

مقدمه

سل یک بیماری مسری است و بیماران مبتلا به سل ریوی مهم‌ترین منبع عفونت هستند. این افراد در هنگام سرفه سبب ایجاد ذرات کوچک عفونی می‌شوند که حاوی باسیل‌های سل است و تنفس آن‌ها مهم‌ترین راه ابتلا و گسترش بیماری سل است (۱ و ۲).

در سال‌های اخیر، بروز و گسترش سل مقاوم به دارو نگرانی‌های زیادی در برنامه‌ی جهانی کنترل سل ایجاد کرده است. شکست برخی از برنامه‌های کنترل سل به این دلیل است که فقط یک سوم یا نیمی از موارد اسمیر مثبت بیماری تشخیص داده می‌شوند (۳). پیشرفت در تشخیص و درمان بیماری، کلید کنترل مؤثر بیماری سل می‌باشد، در نتیجه لازم است که ژنتیک و فیزیولوژی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و نحوه غلبه باکتری‌ها بر سیستم دفاعی میزبان و ایجاد بیماری، مورد مطالعه دقیق قرار گیرد (۴ و ۵).

درمان سه دارویی، اساس درمان سل می‌باشد. اتیونامید یکی از داروهای رده دوم در درمان مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌باشد که در درمان سل مقاوم به دارو مورد استفاده قرار می‌گیرد و یک آنالوگ ساختاری از ایزونیازید است (۶). اتیونامید یک پیش داروست که توسط یک آنزیم منواکسیژناز (RV۳۸۵۴C) به نام *EthA* یا *EtaA* فعال می‌شود و سپس پروتئین *inhA* درگیر در سنتز مایکولیک اسید را مهار می‌کند (۷). ژن *ethA* آنزیم فلاوین منواکسیژناز را کد می‌کند، این آنزیم در جایگاه فعال خود حاوی گروه فلاوپروتئینی (FAD) می‌باشد که توسط این گروه واکنش‌های آنزیمی خود را کاتالیز می‌کند. از جمله این واکنش‌ها تبدیل داروی اتیونامید به آنالوگ‌هایی از جمله S-oxid می‌باشد، این آنالوگ‌ها روی دیواره سلولی باکتری اثر می‌گذارند و با جلوگیری از سنتز اسیدهای

مایکولیک و با ایجاد واکنش‌های اکسید و احیا منجر به مرگ سلول می‌شوند (۸).

در سویه‌های مقاوم به اتیونامید هرگونه موتاسیون در ژن *ethA* باعث عدم تولید آنزیم فلاوین آدنین دی نوکلئوتید (FAD) شده و در نتیجه اتیونامید فعال نشده و باکتری نمی‌میرد. بیان ژن *ethA* تحت کنترل تنظیمی منفی پروتئین رپرسور *EthR* می‌باشد. افزایش در بیان *EthR* میزان فعالیت ژن *ethA* را کاهش می‌دهد. در نتیجه منجر به کاهش فعالیت دارو و افزایش مقاومت به اتیونامید می‌شود (۹).

تعیین رخداد جهش که می‌تواند جایگزین روش بسیار وقت‌گیر کشت باشد، از اولویت‌های اصلی در علم مایکوباکتریولوژی محسوب می‌شود. هدف از این مطالعه ارائه روشی کاربردی برای شناسایی موتاسیون‌های مرتبط با مقاومت به اتیونامید در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است.

مواد و روش‌ها

۲۷ نمونه کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از بانک DNA مرکز تحقیقات سل و عفونی کودکان دانشگاه علوم پزشکی اراک بر اساس نتایج تست تعیین مقاومت دارویی انتخاب گردید.

PCR

با توجه به طول بسیار بلند ژن *ethA* (۱۴۷۰ bp) به‌منظور تکثیر، توالی این ژن با کمک پرایمرهای طراحی شده به سه قسمت تقسیم گردید. به همین دلیل سه جفت پرایمر مورد استفاده قرار گرفت.

پرایمرهای *ethA* ۱-F و *ethA* ۱-R یک قطعه ۶۶۷ bp به نام *ETH* ۱، پرایمرهای *ethA* ۲-F و *ethA* ۲-R یک قطعه ۶۹۲ bp به نام *ethA* ۲ و پرایمرهای

۴۵ ثانیه و تکثیر نهائی 72°C به مدت ۱۰ دقیقه بود. جدول ۲ توالی پرایمرهای استفاده شده برای انجام PCR و تعیین توالی را نشان می‌دهد.

جدول ۲) توالی پرایمرهای استفاده شده جهت

تکثیر ژن *ethA*

اندازه	نام پرایمر	ترادف (۳-۵)	محصول
PCR			
۶۶۷bp	<i>ethA1-F</i>	ATC ATC GTC GTC TGA CTA TGG	ACT ACA ACC CCT GGG ACC
	<i>ethA1-R</i>	CCT CGA CCT TCC CGT GA	
۶۹۲bp	<i>ethA2-F</i>	CCT CGA GTA CGT CAA GAG CAC	
	<i>ethA2-R</i>	GGT GGA ACC GGA TAT GCC TG	
۳۴۲bp	<i>ethA3-F</i>	CGT TGA CGG CCT CGA CAT TAC	
	<i>ethA3-R</i>		

الکتروفورز

بررسی وجود قطعات تکثیر شده با انجام الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد انجام گرفت و نتیجه با کمک دستگاه ترانس لومیناتور بررسی گردید.

تعیین توالی (Sequencing)

محصول PCR جهت تعیین توالی به شرکت Source BioScience انگلستان ارسال گردیده و با کمک دو پرایمر رفت و برگشت با دستگاه Applied Biosystem تعیین توالی شدند. سپس نتیجه تعیین توالی با کمک نرم‌افزار Mega4 و Chromas بررسی گردید.

یافته‌ها

سویه‌های مورد بررسی

در این تحقیق جمعاً از ۲۷ سویه کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس استفاده شد. که از این تعداد ۲۳ نمونه (۸۵/۲ درصد) مقاوم به اتیونامید و ۴ نمونه (۱۴/۸ درصد) حساس به اتیونامید بودند (جدول ۳).

ethA^۳-F و *ethA*^۳-R یک قطعه ۳۴۲ bp به نام *ethA*^۳ را تکثیر می‌کنند. این سه قطعه تولید شده در برخی ترادف‌ها با هم دیگر هم‌پوشانی دارند (۹). واکنش PCR در حجم نهائی ۲۵ میکرولیتر مطابق جدول ۱ انجام شد.

جدول ۱) حجم و غلظت مواد استفاده شده

در واکنش PCR

ردیف	نام ماده	غلظت	حجم (میکرولیتر)
۱	DNA	۴۰ng	۲
۲	Buffer	۱۰X	۲/۵
۳	MgCL2	۵۰mM	۰/۵
۴	dNTPs	۱۰ mM	۱
۵	Primer F	۱۰pmol	۲
۶	Primer R	۱۰pmol	۲
۷	taq	۱unit	۰/۵
۸	H2O	Up to ۲۵	

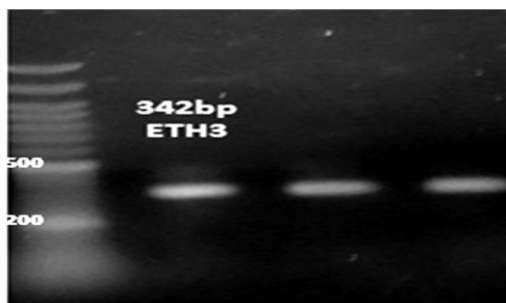
دمای اتصال پرایمرها در واکنش PCR بر مبنای دمای ذوب آن‌ها تعیین می‌شود. پرایمرهای قطعات ۱ و ۲ دمای اتصال و T_m مشابهی داشتند به این لحاظ از یک برنامه برای هر دو استفاده شد اما برای تکثیر قطعه ۳ به دلیل اختلاف در دمای اتصال، از برنامه PCR متفاوتی استفاده شد.

سیکل حرارتی برای تکثیر قطعات (*eth*^۱) و (*eth*^۲) از ژن *ethA* شامل دمای دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۴ دقیقه، ۳۵ سیکل به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۵ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه و دمای پایانی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه استفاده گردید.

سیکل حرارتی برای PCR ژن *ethA* برای قطعه‌ی (*eth*^۳) نیز به این ترتیب بود: دناتوراسیون اولیه 95°C به مدت ۴ دقیقه، سیکل اصلی با ۳۵ بار تکرار شامل دناتوراسیون 95°C به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها 68°C به مدت ۱ دقیقه، تکثیر 72°C به مدت

نتایج PCR

محصولات PCR ۲۷ نمونه مورد مطالعه که با استفاده از پرایمرهای ژن *ethA* تکثیر شده بودند، روی ژل الکتروفورز باندهای مطلوب ایجاد کردند که نشانگر صحت انتخاب پرایمرها و تعیین برنامه مناسب PCR بود (اشکال ۱-۳). در شکل‌های ۱، ۲ و ۳، ۳ قطعه ۶۶۷bp، ۶۹۲bp و ۳۴۲bp که با پرایمرهای به ترتیب *ethA1* و *ethA2* و *ethA3* تولید شده اند، قابل مشاهده می‌باشند.

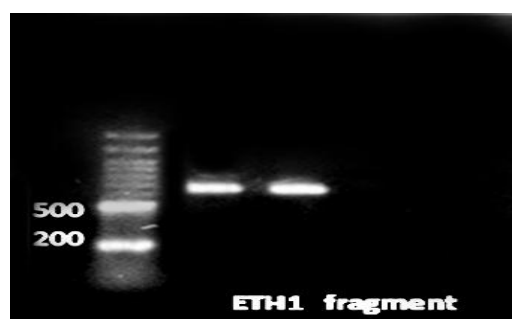


شکل ۳) محصول حاصل از تکثیر قطعه‌ی *ethA3* ستون سمت چپ مارکر و سایر ستون‌ها محصول ۳۴۲ جفت بازی *ethA3* را نشان می‌دهند

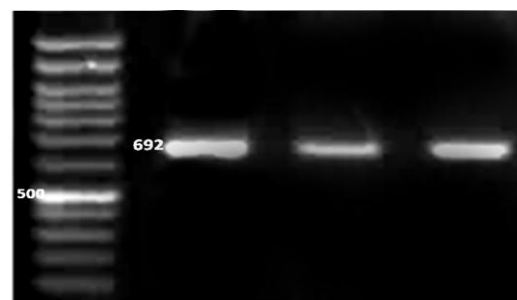
نتایج تعیین توالی

نتایج تعیین توالی برای هر نمونه شامل توالی سه قطعه بود که با کمک برنامه Mega4 هم‌پوشان شدند. سپس توالی به دست آمده با توالی استاندارد ژن، با استفاده از Blast-NCBI در برنامه Mega4 با یکدیگر منطبق شدند (شکل ۴).

رخداد موتاسیون در هر سویه با انطباق توالی استاندارد و توالی به دست آمده از سویه‌ها بررسی شد (شکل ۴). دقت در انطباق، توجه به احتمال رخداد خطا در تعیین توالی، استفاده از پرایمرهای رفت و برگشت هم‌پوشان و تکرار آزمایش در صورت نیاز، دقت کار را افزایش داد. شماره نوکلئوتیدهای به دست آمده حاصل از تفسیر نتایج برخی از نمونه‌های مورد بررسی را در جدول ۳ مشاهده می‌کنید. سویه‌های مقاوم به اتیونامید مانند سویه ۱۲۴X، ۹۹X و ۱۱۵X به ترتیب در نوکلئوتیدهای ۳۰۵، ۳۱۲ و ۶۲۸ دارای موتاسیون بودند. سویه ۱۹N نیز دارای موتاسیون در کدون ۳۳۱ بود.



شکل ۱) محصول حاصل از تکثیر قطعه *ethA1* ستون سمت چپ مارکر و سایر ستون‌ها محصول ۶۶۷ جفت بازی *ethA1* را نشان می‌دهند



شکل ۲) محصول حاصل از تکثیر قطعه‌ی *ethA2* ستون سمت چپ مارکر و سایر ستون‌ها محصول ۶۹۲ جفت بازی *ethA2* را نشان می‌دهند

DNA Sequences	Translated Protein Sequences
<i>ethA</i>	ATGACCGAGCACCTCGACGTTGTTCATCGTGGGCG
408324101_99R_ <i>ethA</i> sequence	ATGACCGAGCACCTCGACGTTGTTCATCGTGGGCG
408324101_99R_ <i>ethB</i> sequence	CGGCCTGGCACCCTGCAGGACCGTTGCCCGACCAA
408324201_99R_ <i>ethC</i> sequence	AAGAGCTACGCCATCCTGGGAAAAGCGGGAATCCA

شکل ۴) نتایج حاصل از توالی‌یابی نمونه ۹۹R بررسی شده با نرم‌افزار MEGA4

از طرف دیگر تمامی سویه‌های حساس به اتیونامید از جمله نمونه ۷۲۵ فاقد هرگونه موتاسیون بود. این مسئله انطباق کامل فنوتیپی و ژنوتیپی را نشان می‌دهد. سویه استاندارد H3۷RV به عنوان کنترل منفی فاقد موتاسیون بود. ولی سویه‌های ۵۲۵، ۵۳۵ و ۷۲۵ از انواع بسیار مقاوم به سایر داروها ولی حساس به اتیونامید بودند. به طور کلی سویه‌های حساس به تمامی داروها و یا تنها حساس به اتیونامید فاقد هر گونه موتاسیون در این ژن بودند و درصد انطباق فنوتیپی و ژنوتیپی در آن‌ها ۱۰۰ درصد بود.

جدول ۳) نوکلئوتید تغییر یافته در برخی از نمونه‌های مورد بررسی. R، سویه مقاوم و S سویه حساس از نظر فنوتیپی را نشان می‌دهد

نام نمونه	فنوتیپ	نوکلئوتید تغییر یافته
۹۹R	R	۳۰۵
۱۲۴X	R	۳۱۲
۱۹N	R	۳۳۱
۱۱۵X	R	۶۲۸
۷۲۵	S	—

بحث

موتاسیون در ژن *ethA* با مقاومت به اتیونامید مرتبط است. در این پژوهش بررسی مقاومت به آنتی‌بیوتیک اتیونامید در سویه‌های کلینیکی MTB مورد ارزیابی ملکولی گرفت. بدین منظور سویه‌های مقاوم و حساس به اتیونامید که تعیین مقاومت در آن‌ها به روش فنوتیپی کشت صورت پذیرفته است مورد استفاده قرار گرفته و از روش‌های PCR و تعیین توالی برای تعیین موتاسیون در این ژن استفاده به عمل آمد. از نظر میکروبی‌شناسی، مقاومت دارویی به دلیل جهش ژنتیکی در ژنوم باسیل در حضور دارو اتفاق می‌افتد. درمان ناقص یا اشتباه اجازه می‌دهد که باسیل‌های

جهش یافته‌ای که به داروها مقاوم شده‌اند به سوش غالب در بدن فرد مبتلا تبدیل شوند. به این ترتیب باسیل‌های حساس به دارو در اثر داروهای ضد سل مصرفی از بین می‌روند، اما موتانت‌های مقاوم در حضور آنتی‌بیوتیک، تکثیر یافته و به سوش غالب در بدن بیمار مبدل می‌شوند (۹ و ۱۲).

مورلاک (Morlock) در سال ۲۰۰۳ ژن *ethA* را در ۴۱ سویه مقاوم به اتیونامید تعیین توالی کرد. نتایج به دست آمده در مطالعه مذکور در ۱۵ سویه، موتاسیون در ژن *ethA* را نشان داد که در تمامی آن‌ها MIC اتیونامید بیشتر از ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. بر اساس این نتایج، موتاسیون‌های ژن *ethA* کاملاً متنوع و در سراسر ژن پراکنده بودند (۹) این مسئله با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت.

در تحقیق مورلاک، موتاسیون در *ethA* و *inhA* با مقاومت سطح بالا به اتیونامید مرتبط بود. حدود ۷۶ درصد از سویه‌های مقاوم با MIC بیش از ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مقاوم به اتیونامید موتاسیون داشتند. در ۸ سویه مقاوم، موتاسیون حذفی در ژن *inhA* کشف شد (۹). در تحقیق حاضر موتاسیون حذفی در سویه‌های مورد مطالعه مشاهده نشد.

بروزیر (Brossier) در سال ۲۰۰۹ نیز با استفاده از تعیین توالی ژن *ethA*، ۸۷ سویه را مورد بررسی قرار داد که از این تعداد ۴۷ نمونه مقاوم به اتیونامید و ۲۴ نمونه حساس و ۱۶ نمونه مقاومت نسبی داشتند. در ۸۱ درصد از سویه‌های مقاوم، موتاسیون‌هایی در *ethA*، *ethR* یا *inhA* یا پروموتور آن یافت شد. از ۱۶ سویه که مقاومت نسبی داشتند، در ۷ سویه یک موتاسیون در *ethA* و در ۸ سویه هیچ موتاسیونی کشف نشد و یکی از نمونه‌ها نیز موتاسیون در *mshA* داشت. از ۲۴ سویه حساس به اتیونامید در مطالعه

بر اساس نتایج این تحقیق، رخداد هرگونه موتاسیون در هر نقطه از ژن باعث ایجاد مقاومت به اتیونامید در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌گردد. بدین ترتیب انجام تعیین توالی و اثبات هر میزان موتاسیون، اثبات کننده مقاومت به اتیونامید در سویه‌ها می‌باشد.

بروزیر، در ۲۳ نمونه هیچ موتاسیونی در ژن *ethA* نشان داده نشد و در یکی از نمونه‌ها یک موتاسیون جدید در پروموتور *inhA* نشان داده شد (۱۰). نتایج این محقق، با نتایج تحقیق حاضر مبنی بر رخداد یک و یا چند موتاسیون عامل مقاومت در سویه‌ها مطابقت دارد. سویه‌های کاملاً حساس و یا تنها حساس به اتیونامید نیز فاقد هرگونه موتاسیون در این ژن بودند.

References:

1. Nasr Esfahani B. Genetics and detection. In: Narimani T, editor. Tuberculosis, Managing, detection, treatment and drug resistance. 1th edition. Isfahan: Isfahan University of Medical Sciences, 2010, 75-102.
2. Donnelly R. Cardinal Manifestations and Presentation of Diseases. In: Loscalzo J, editor. Harrison principles of internal medicin. 14th edition. Wiley-vch verlag gmbh and co. kga, 1998, 300-17.
3. Jawetz E, levinson W. Sources of infection, In: Doerr B, Fleischer VAJ, Kemp F, editors. medical microbiology and immunology, Ottawa Health Research Institute, 2008, 121-3.
4. Palomino JC, Leao SC, Ritacco V. Tuberculosis, Pulmonary. Tuberculosis From basic science to patient care. Amedeo Challenge, 2007, 234-255.
5. Nasehi M, Mirhaghani L. Mycobacterium Tuberculosis. National Tuberculosis Control Guide. Sanandaj: Andishmand Co, 2009, 12-14.
6. Velayati AA, Farnia P, Masjedi MR, et al. Totally drug-resistant tuberculosis strains: evidence of adaptation at the cellular level. Eur Respir J, 2009; 34: 1202-3.
7. Palomino JC, Martin A, Portaels F. Rapid drug resistance detection in Mycobacterium tuberculosis: a review of colourimetric methods. Clin Microbiol Infect 2007; 13: 754-62.
8. Vannelli TA, Dykman A, De Montellano PRO. The antituberculosis drug ethionamide is activated by a flavoprotein monooxygenase. J Biol Chem, 2002; 277: 12824-9.
9. Morlock GP, Metchock B, Sikes D, et al. *ethA*, *inhA*, and *katG* loci of ethionamide-resistant clinical Mycobacterium tuberculosis isolates. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 3799-805
10. Brossier F, Veziris N, Aubry A, et al. Detection by GenoType MTBDRsl test of complex mechanisms of resistance to second-line drugs and ethambutol in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis complex isolates. J Clin Microbiol 2010; 48: 1683-9.
11. Shojaei H. Mycobacterium infectious. Guideline for Tuberculosis Conventional and Molecular Diagnosis, Isfahan: Isfahan university of medical sciences, 2011, 130-149. (Persian)

Original Article

Study of ethA gene sequence in Ethionamide resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*

S. Moazemi.¹, M. Arjomandzadegan^{2*}, A. Ahmadi³,
M. Tayebun¹, M. Shojapor⁴

¹ Microbiology Department, Faculty of Science, Islamic Azad University of Arak

² Department of microbiology, Tuberculosis and Pediatric Infectious Disease Research Center , Arak University of Medical Sciences

³ Tuberculosis and Pediatric Infectious Disease Research Center, Arak, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran

⁴ Research Center of Molecular Medicine, University of Medical Sciences, Arak

(Received 20 Apr, 2013 Accepted 3 Sep, 2013)

Abstract

Background: Ethionamide (ETH) is a structural analog of isoniazid and secondary line anti-tuberculosis drugs. Both of Ethionamide and isoniazid target INHA protein in mycobacterium tuberculosis. This protein involved in mycolic acid biosynthesis. The purpose of this study is evaluation of sequence of ethA gene in order to detect mutations related to resistance to isoniazide in clinical mycobacterium tuberculosis isolates.

Material and Methods: In this study were evaluated 27 resistance and sensitive isolates to ethionamide. Because of length of this fragment (1470bp) were performed three reactions for each sample with ethA-10, ethA-8, ethA-9, ethA-4, ethA-5 and ethA-1 specific primers in PCR reaction.

Results: From 27 used clinical isolates, 23 strains were resistant and 4 isolates were susceptible to ETH. Results of electrophoresis were proved proper selection of primers and PCR conditions. DNA sequencing results were determined mutations at some points of the gene in the resistant isolates to ETH, but none of susceptible strains harbored mutations.

Conclusion: According to the results it was proved that any mutations in each point of ethA gene could cause resistance to Ethionamid. Rapid molecular detection of the resistance is possible only via complete sequencing of total length of this gene.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, Drug resistant, Ethionamide, sequencing

*Address for correspondence: Department of microbiology, Tuberculosis and Pediatric Infectious Disease Research Center, Arak University of Medical Sciences. Email: arjomandzadegan@arakmu.ac.ir