

**MUTATIONS IN THE GYRA AND GYRB GENES OF
FLUOROQUINOLONE-RESISTANT *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
FROM TB PATIENTS IN THAILAND**

PANNAMTHIP PITAKSAJJAKUL

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (TROPICAL MEDICINE)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2004**

**ISBN 974-04-4686-8
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การผ่าเหล่าบนยีนไจเรสเอ และไจเรสบีของเชื้อวัณโรคที่คือยากลุ่มฟลูออโรควิโนโลนจากผู้ป่วยวัณโรคในประเทศไทย (MUTATIONS IN THE GYRA AND GYRB GENES OF FLUOROQUINOLONE-RESISTANT *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* FROM TB PATIENTS IN THAILAND)

ปานน้ำทิพย์ พิทักษ์สัจจะกุล 4437549 TMTM/M

วท.ม. (อายุรศาสตร์เขตร้อน)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: พงศ์ราม รามสูต D. V. M., Ph.D. (Microbiology), วรรณญา ว่องวิทย์, B.Sc., M.S., Ph.D. (Biochemistry), วันทนี พันธุ์ประสิทธิ์, B.Sc., M.P.H., Dr.P.H., (Industrial Hygiene), บุญช่วย เอี่ยม โภคลาภ, B.Sc. (Med. Tech.), M.Sc. (Trop.Med.), SHARON PEACOCK, B.M., B.A., M.Sc., D.T.M. & H., M.R.C. (PATH), F.R.C.P., Ph.D.

บทคัดย่อ

จากรายงานการศึกษาเชื้อวัณโรคที่คือยากลุ่มฟลูออโรควิโนโลนที่ผ่านมาพบว่า เกิดจากการผ่าเหล่าที่ตำแหน่ง 90, 91, และ 94 บนยีน *gyrA* และที่ตำแหน่ง 495, 516, และ 533 บนยีน *gyrB* ในการศึกษาครั้งนี้สายพันธุ์เชื้อวัณโรคที่คือยากลุ่มฟลูออโรควิโนโลนทั้งหมด 22 ตัวอย่าง ได้ถูกรวบรวมจากโรงพยาบาลศิริราชและสถาบันโรคทรวงอก แล้วจึงใช้เทคนิคที่ชื่อว่า polymerase chain reaction (PCR) ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนของยีน *gyrA* และ *gyrB* จากนั้นจึงทำการศึกษการจัดเรียงลำดับเบสของผลผลิตพีซีอาร์โดยวิธีดีเอ็นเอ ซีแควนซิ่ง ซึ่งพบว่า 10 ตัวอย่าง (45.5%) มีการผ่าเหล่าที่ตำแหน่งที่กล่าวมาแล้ว ซึ่งพบว่า 9 ตัวอย่าง (40.9%) มีการผ่าเหล่าที่ตำแหน่ง Ala90Val, Ser91Pro, และ Asp94(Gly/Ala) บนยีน *gyrA* และ 1 ตัวอย่าง (4.6%) มีการผ่าเหล่าที่ตำแหน่ง Asp495Asn บนยีน *gyrB* อย่างเดียวโดยไม่มีการผ่าเหล่าบนยีน *gyrA* ร่วมด้วย ซึ่งรูปแบบการผ่าเหล่าที่เกิดขึ้นบนยีน *gyrB* อย่างเดียวนี้มีความแตกต่างกับผลการศึกษาที่ผ่านมา ซึ่งพบว่าการผ่าเหล่าบนยีน *gyrB* มักจะเกิดร่วมกับการผ่าเหล่าบนยีน *gyrA* สำหรับ 12 ตัวอย่างที่เหลือ (54.5%) พบว่าไม่มีการผ่าเหล่าเกิดขึ้น จากการใช้เทคนิค single strand conformation polymorphism พบว่ารูปแบบ SSCP ของตัวอย่างเชื้อวัณโรคที่คือยาที่มีการผ่าเหล่ามีความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดจากรูปแบบ SSCP ของตัวอย่างเชื้อวัณโรคที่ไม่คือยา

72 หน้า ISBN 974-04-4686-8

MUTATIONS IN THE *GYRA* AND *GYRB* GENES OF FLUOROQUINOLONE-RESISTANT *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* FROM TB PATIENTS IN THAILAND

PANNAMTHIP PITAKSAJJAKUL 4437549 TMTM/M

M.Sc. (TROPICAL MEDICINE)

THESIS ADVISORS: PONGRAMA RAMASOOTA, D.V.M., Ph.D. (Microbiology), WARANYA WONGWIT, B.Sc., M.S., Ph.D., (Biochemistry), WANTANEE PUNPRASIT, B.Sc., M.P.H., Dr.P.H. (Industrial Hygiene), BOONCHUAY EAMPOKALAP, B.Sc. (Med. Tech.), M.Sc. (Trop. Med.), SHARON PEACOCK, B.M., B.A., M.Sc., D.T.M. & H., M.R.C. (PATH), F.R.C.P., Ph.D.

ABSTRACT

Among fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (FQ^r-MTB) isolates, mutation at positions 90, 91, and 94 in *gyrA* gene and at positions 495, 516, and 533 in *gyrB* gene have been frequently reported. In this study, 22 isolates of FQ^r-MTB were collected from Siriraj Hospital and the Chest Disease Institute. The quinolone resistance-determining regions (QRDR) of *gyrA* and *gyrB* genes in all 22 FQ^r-MTB isolates and from the H37Ra MTB strain were amplified using polymerase chain reaction (PCR). DNA-sequencing and single strand conformation polymorphism (SSCP) were further utilized for characterization of the mutation in the QRDR of *gyrA* and *gyrB* genes and mutation screening, respectively. From DNA-sequencing, 10 of 22 (45.5%) exhibited single-point mutation at different positions, at Ala90Val, Ser91Pro, and Asp94(Gly / Ala) in the *gyrA* gene and Asp495Asn in the *gyrB* gene. These positions were previously frequently reported to be responsible for FQ^r-MTB. The other 12 FQ^r-MTB isolates (54.5%) had no mutation. This study is the first report of mutation occurring only in the QRDR of the *gyrB* gene, without prior mutation in the QRDR of the *gyrA* gene, among FQ^r-MTB isolates. By SSCP analysis, the SSCP patterns of mutated FQ^r-MTB isolates were differentiated from the SSCP patterns of FQ^s-MTB.

KEY WORDS : MUTATION / *GYRASE A* / *GYRASE B* / FLUOROQUINOLONE RESISTANCE / *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* / THAILAND

72 pp. ISBN 974-04-4686-8