

## PHÁT HIỆN CÁC ĐA HÌNH TRÊN GEN *katG* CÓ KHẢ NĂNG LIÊN QUAN ĐẾN TÍNH KHÁNG ISONIAZID TRÊN MỘT SỐ CHỦNG LAO (*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*) KHÁNG THUỐC PHÂN LẬP Ở MIỀN TRUNG VIỆT NAM

Lã Duy Anh<sup>1</sup>, Nguyễn Hữu Cường<sup>2</sup>, Nguyễn Văn Bắc<sup>3</sup>, Nghiêm Ngọc Minh<sup>2</sup>, Nguyễn Thái Sơn<sup>1</sup>, Lê Văn Sơn<sup>1</sup>, Chu Hoàng Hà<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Đại học Thái Nguyên

<sup>2</sup>Viện Công nghệ sinh học

<sup>3</sup>Bệnh viện 103, Học Viện Quản lý

### TÓM TẮT

Nhiễm vi khuẩn lao (*Mycobacterium tuberculosis*) là một trong những nhiễm trùng phổ biến nhất ở loài người từ ước tính tỷ lệ nhiễm vi khuẩn lao được xác định là chiếm 1/3 dân số thế giới. Hiện nay, bệnh lao đang trở nên nghiêm trọng hơn với đặc trưng là kháng đa thuốc đối với hai loại thuốc phổ biến là isoniazid (INH) và rifampicin (RIF). Bệnh lao kháng đa thuốc gây ra những khó khăn không chỉ trong công tác điều trị mà bên cạnh đó là việc kiểm soát sự lan truyền nhanh chóng các chủng lao kháng thuốc này trong cộng đồng. Đột biến gen là một trong những nguyên nhân chính dẫn đến tính kháng thuốc của vi khuẩn lao. Mặc dù Việt Nam là một trong những quốc gia có số người nhiễm lao và lao kháng thuốc cao trên thế giới, tuy nhiên những nghiên cứu về đột biến gen liên quan đến tính kháng thuốc khá ít. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phân tích tính đa hình gen *katG* (mã hóa catalase-peroxidase) của các chủng vi khuẩn lao kháng INH phân lập từ các bệnh nhân ở Bệnh viện Trung ương Huế. Phân đoạn có chiều dài 684bp của gen *katG* từ các chủng vi khuẩn này đã được tách dòng và đọc trình tự. Kết quả phân tích cho thấy trong 14 chủng vi khuẩn lao nghiên cứu đã phát hiện 13 chủng có đột biến gen, trong đó 11 chủng mang đột biến thay đổi amino acid từ serine thành threonine/asparagine tại codon 315. Đột biến này đã được chứng minh là quy định tính kháng INH của vi khuẩn lao. Những kết quả này là cơ sở tốt để phát triển thành bộ sinh phẩm chẩn đoán lao kháng thuốc INH ở giai đoạn sớm nhằm giúp cho công tác điều trị trở nên hiệu quả hơn đối với các bệnh nhân nhiễm lao

**Từ khóa:** đột biến gen, gen *katG*, isoniazid, *Mycobacterium tuberculosis*, vi khuẩn lao kháng thuốc

### MỞ ĐẦU

Bệnh lao gắn liền với sự phát triển xã hội loài người từ hàng ngàn năm nay, trên thế giới chưa bao giờ và không có một quốc gia nào, một khu vực nào, một dân tộc nào không có người mắc bệnh lao và chết do lao. Ngày nay, bệnh lao đang xuất hiện trở lại và cùng với đại dịch HIV/AIDS trở thành một trong những căn nguyên gây mắc bệnh và tử vong chủ yếu, đặc biệt tại các nước đang phát triển. Hiện nay, trên thế giới có khoảng 2,2 tỷ người đã nhiễm lao. Trong đó, có khoảng 80% số bệnh nhân lao toàn cầu thuộc 22 nước có gánh nặng bệnh lao cao (Palomio *et al.*, 2007).

Ở nước ta, bệnh lao còn phổ biến và ở mức độ trung bình cao. Việt Nam đứng thứ 13 trong 22 nước có số bệnh nhân lao cao trên toàn cầu (WHO, 2004). Hiện nay nguy cơ nhiễm lao hàng năm ở nước ta ước tính là 1,5% (ở các tỉnh phía nam là 2%, ở các tỉnh phía bắc là 1%). Theo báo cáo dựa trên thăm dò lớn về lao kháng thuốc toàn cầu của WHO công bố ngày

26/2/2008, tỷ lệ nhiễm lao kháng nhiều thuốc hiện nay ở mức cao chưa từng có. Mỗi năm có khoảng nửa triệu ca lao kháng đa thuốc, theo ước tính của WHO, khoảng 5% trong số 9 triệu ca nhiễm lao hàng năm. Theo WHO, hiện nay bệnh lao kháng thuốc là một vấn đề toàn cầu, đặc biệt nghiêm trọng là tình hình kháng đa thuốc. Qua các nghiên cứu đã cho thấy Việt Nam là một trong những quốc gia có tỷ lệ bệnh lao kháng thuốc cao trên thế giới (Caws *et al.*, 2007).

Kết quả điều trị với bệnh nhân kháng thuốc thường không cao, nhất là đối với bệnh nhân kháng đa thuốc. Chi phí điều trị bệnh nhân lao kháng đa thuốc tăng lên 100 lần so với bệnh nhân lao không kháng thuốc và thậm chí không điều trị được ở một số trường hợp. Cho đến nay INH là một trong những thuốc điều trị lao hiệu quả nhất và nếu chủng vi khuẩn lao kháng INH là dấu hiệu nhận biết đối với các chủng kháng đa thuốc (Vilchèze *et al.*, 2007; Caws *et al.*, 2007). Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng tính kháng INH của vi khuẩn lao phân lập trên các

mẫu bệnh phẩm đều có liên quan đến những đột biến gen *katG*, gen mã hóa cho enzyme catalase-peroxidase hoạt hóa INH trong tế bào vi khuẩn lao.

Ở trạng thái hoạt động bình thường catalase-peroxidase xúc tác cho phản ứng hoạt hóa thuốc INH tiêu thụ NAD. Sau đó phức chất INH-NAD sẽ ức chế hoạt động của enoyl-ACP (acyl carrier protein) reductase (*InhA*) trong chu trình sinh tổng hợp acid béo kiểu II (FASII). Kết quả là ức chế sự tạo thành mycolic acid, một trong những acid béo cấu trúc thành tế bào vi khuẩn lao, và do đó tế bào vi khuẩn lao không thể hình thành. Khi đột biến xảy ra trên gen *katG* sẽ làm mất hoặc giảm hoạt tính của catalase-peroxidase (Heym et al., 1992; Heym et al., 1995; Zhang et al., 1992; Vilchèze et al., 2007). Những đột biến thường thấy có thể là nhầm/vô nghĩa, thêm/mất đoạn hoặc có thể đột biến mất toàn bộ gen (Ramaswamy et al., 2003; Zhang et al., 2005). Tuy nhiên, đột biến được phát hiện nhiều nhất là đột biến thay thế amino acid serine thành threonine tại codon 315, và ở các chủng vi khuẩn lao mang đột biến này phức hệ INH-NAD giảm đi rõ rệt.

Chính vì vậy đột biến này được dùng như là một chỉ thị để xác định chủng vi khuẩn lao kháng INH (Ghiladi et al., 2004). Trong bài báo này, các chủng vi khuẩn lao phân lập từ các bệnh nhân nhiễm lao tại Bệnh viện Trung ương Huế đã được xác định là kháng INH thông qua các phép thử kháng sinh đồ được dùng làm nguyên liệu để xác định đột biến trên gen *katG*. Những số liệu từ nghiên cứu này là tiền đề để xây dựng quy trình chẩn đoán lao kháng thuốc INH ở giai đoạn sớm công tác điều trị, bên cạnh đó nhằm cung cấp thông tin về tình trạng vi khuẩn lao kháng thuốc INH ở Việt Nam.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

Các chủng vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis* (ký hiệu 1...14) được phân lập từ các bệnh nhân tại Bệnh viện Trung ương Huế. Các chủng vi khuẩn lao đã được kháng định tính kháng INH bằng nuôi cấy và xác định kháng sinh đồ. DNA tổng số từ các chủng vi khuẩn lao này được tách chiết tại Học viện Quân y và được dùng để cho phản ứng nhân bản và tách dòng gen *katG*.

### Hóa chất và thiết bị

Các loại hóa chất dùng cho các kỹ thuật sinh học phân tử được mua từ các hãng Fermentas, Sigma-

Aldrich. Vector tách dòng pBT, chủng tế bào khả biến *E. coli* DH5a được cung cấp bởi Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học. Các bộ kit để tinh sạch plasmid, tinh sạch sản phẩm PCR, *Taq* polymerase của hãng Bioneer. Các thí nghiệm sinh học phân tử được tiến hành trên các hệ thống máy móc của Phòng Công nghệ tế bào thực vật và Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học.

### Thiết kế môi khuếch đại phân đoạn gen *katG*

Dựa vào trình tự gen *katG* của chủng vi khuẩn lao chuẩn (Genbank: accession number U06262), cặp môi đặc hiệu được thiết kế nhằm mục đích khuếch đại một phân đoạn gen *katG* dài 684bp. Phân đoạn gen được nhân bản này có mang cả codon 315. Cặp môi thiết kế có trình tự như sau:

katG F: 5'-GAG CCC GAT GAG GTC TAT TG-3'

katG R: 5'-ACA AGC TGA TCC ACC GAG AC-3'

### Khuếch đại phân đoạn gen *katG* bằng phản ứng PCR

DNA của 14 chủng vi khuẩn lao nghiên cứu được tách chiết và sử dụng làm khuôn để nhân bản phân đoạn gen *katG* với cặp môi đặc hiệu đã được thiết kế. Thành phần phản ứng PCR bao gồm: 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,5 μM môi, 1 đơn vị *Taq* polymerase và 10 ng DNA tổng số. Phản ứng PCR được tiến hành với 30 chu kỳ với chu trình nhiệt bao gồm: 94°C/1 phút, 56°C/50 giây, 72°C/1 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel 1% agarose.

### Tách dòng phân đoạn gen *katG*

Sau khi điện di sản phẩm PCR trên gel 1% agarose, băng vạch DNA có kích thước quan tâm được tinh sạch sử dụng bộ kit Gel Extraction (Bioneer). Các phân đoạn DNA tinh sạch được sử dụng cho phản ứng kết nối với vector tách dòng pBT ở 22°C trong 60 phút. Vector tái tổ hợp mang các phân đoạn DNA quan tâm được biến nạp vào chủng tế bào khả biến *E. coli* DH5a bằng phương pháp sốc nhiệt ở 42°C. Chọn lọc các dòng tế bào vi khuẩn *E. coli* DH5a mang vector tái tổ hợp theo phương pháp chọn lọc khuẩn lạc xanh/trắng, phương pháp PCR từ khuẩn lạc và xử lý plasmid với enzyme giới hạn *Bam*HI.

### Đọc trình tự và phân tích đột biến trên gen *katG*

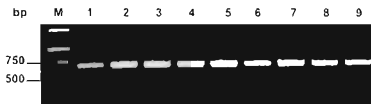
Plasmid từ các dòng vi khuẩn *E. coli* DH5a mang vector tái tổ hợp đã chọn lọc được tách chiết

và đọc trình tự bằng hệ thống đọc trình tự tự động của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học. Trình tự các phân đoạn DNA của các chủng lao nghiên cứu được so sánh với trình tự gen *katG* của chủng vi khuẩn lao chuẩn H37Rv (GenBank: accession number U06262) bằng phần mềm DNASTar.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Khuếch đại phân đoạn gen *katG*

Sử dụng cặp mồi *katG F* và *katG R* nhân bản đoạn gen *katG* bằng kỹ thuật PCR. Sau khi, sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel 1% agarose (Hình 1).



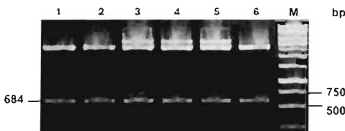
Hình 1. Sản phẩm PCR khuếch đại phân đoạn gen *katG*. M: DNA marker 1 kb; 1-9: DNA tổng số từ các chủng vi khuẩn lao nghiên cứu.

### Tách dòng các phân đoạn gen *katG*

Các khuẩn lạc mang plasmid tái tổ hợp chứa đoạn gen *katG* quan tâm được sàng lọc bằng kỹ thuật PCR khuẩn lạc. Các dòng khuẩn lạc trắng được chọn ngẫu nhiên để thực hiện phản ứng PCR khuẩn lạc sử dụng cặp mồi *katG F* và *katG R*. Sản phẩm colony-PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel 1% agarose. Nếu khuẩn lạc có plasmid mang gen *katG* thì sản phẩm PCR sẽ xuất hiện một băng có

kích thước mong muốn khoảng 684 bp. Đồng thời, để khẳng định chắc chắn rằng plasmid mới tách chiết có mang đoạn gen *katG* quan tâm, plasmid được tách chiết từ các dòng khuẩn lạc này và cắt kiểm tra. Sản phẩm cắt plasmid được kiểm tra bằng điện di trên gel 1% agarose (Hình 2).

Như vậy, DNA plasmid mang đoạn gen *katG* đã được nhân lên với số lượng lớn trong tế bào vi khuẩn *E. coli* DH5 $\alpha$  và có đủ điều kiện về độ tinh sạch cũng như nồng độ để giải trình tự gen



Hình 2. Sản phẩm cắt plasmid tái tổ hợp mang phân đoạn gen *katG*. M: DNA marker 1 kb; 1 - 6: Các mẫu plasmid mang phân đoạn gen *katG* từ các chủng vi khuẩn lao.

### Phân tích trình tự các phân đoạn gen *katG* của các chủng vi khuẩn lao nghiên cứu

Các phân đoạn DNA của gen *katG* tách dòng từ các chủng vi khuẩn lao sau khi đọc trình tự được xử lý bằng phần mềm BioEdit. So sánh trình tự nucleotide và amino acid từ các mẫu bệnh phẩm với trình tự nucleotide và amino acid của chủng đại H37Rv chúng tôi thu được các đột biến ở các chủng lao kháng thuốc (Bảng 1 và 2).

Đột biến xảy ra ở 13 trên tổng số 14 mẫu bệnh phẩm. Đột biến xảy ra ở một điểm hoặc nhiều điểm trên đoạn gen *katG*. Tuy nhiên không phải tất cả các đột biến đều dẫn đến sự thay thế amino acid. Ở

chủng số 1, tại điểm 768 có đột biến thay đổi 1 nucleotide C thành T làm biến đổi bộ ba GCC thành GCT, tại điểm 1107 có đột biến thay đổi nucleotide C thành T làm biến đổi bộ ba GGC thành GGT; Ở chủng số 4, tại điểm 708 có đột biến thay đổi 1 nucleotide C thành T làm biến đổi bộ ba AAC thành AAT; Ở chủng số 9, tại điểm 723 có đột biến thay đổi nucleotide C thành G làm biến đổi bộ ba CCC thành CCG; Ở chủng số 12, tại điểm 1203 có đột biến thay đổi nucleotide C thành A làm biến đổi bộ ba CCC thành CCA. Đối chiếu với bảng codon, các đột biến này không làm xuất hiện các amino acid mới. Do đó, các đột biến này không liên quan tới tính kháng thuốc INH.

**Bảng 1.** Các vị trí nucleotide bị đột biến trên trình tự các phân đoạn gen *katG*

TT	612	628	673	708*	723*	742	761	768*	925	944	980	1060	1070	1107*	1123	1129	1163	1203*	1205	1211	
1	TGG- CGG									AGC- ACC				GGC- GGT							
2										AGC- ACC					CCG- TCG						
3										AGC- ACC		ACC- GCC									TTG- TCG
4				AAC- AAT		ATT- TTT				AGC- ACC											
5										AGC- ACC											
6		ATG- GTG									AAA- ATA										
7										AGC- ACG						ATG- X GTG					
8										AGC- ACC											
9					CCC- CCG					AGC- ACC											GAG- GGG
10																					
11							CGC- CAC			AGC- ACC											
12										AGC- ACC											CCC- CCA
13		x							GGT- TGT	AGC- ACC											
14										AGC- ACC											

Ghi chú: X: Đột biến mất nucleotide; \*: Các điểm đột biến nucleotide nhưng không thay đổi amino acid; Cột thứ nhất: thứ tự các chủng lao nghiên cứu; Hàng ngang thứ nhất: vị trí nucleotide có đột biến trên phân đoạn gen *katG*.

Đột biến xảy ra ít nhất trên 1 codon và nhiều nhất là trên 3 codon như ở các chủng số 3, 7, 13. Trong số 13 chủng có mang đột biến thì có tới 11 chủng xuất hiện đột biến tại codon 315, chiếm 84,6%. Đột biến tại codon 315 này là đột biến thay thế 1 nucleotide G thành C. Đột biến tại codon 315 cũng có thể là sự thay

thế cùng lúc 2 nucleotide, như ở chủng số 7. Sự thay đổi bộ ba mã hóa các amino acid kéo theo là sự thay đổi các amino acid do bộ ba đó quy định. Vì vậy, amino acid tại codon 315 được biến đổi từ serine (S) thành threonine (T), dạng đột biến này chiếm tỷ lệ rất cao (84,6%). Những đột biến phát hiện trong nghiên

cứu này khá thống nhất với các số liệu đã công bố. Afanasev và cộng sự nghiên cứu 412 trường hợp nhiễm lao ở Cộng hòa liên bang Nga đã phát hiện 79,9% mang đột biến S315T (Afanasev *et al.*, 2007). Công bố gần đây ở tỉnh Tứ Xuyên (Sichuan) của Trung Quốc cho thấy trên 60% ca nhiễm lao mang đột biến này và con số ở tỉnh Quảng Đông (Guangdong) là 68,6% (Gou *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009).

Ngoài ra, ở chủng số 13 và chủng số 7 xuất hiện đột biến mất nucleotide làm dịch khung đọc tại các vị trí nucleotide tương ứng 628 và 1163. Dạng đột biến này cũng đã ghi nhận ở các nghiên cứu khác, tuy nhiên tần số rất thấp (Bostanabad *et al.*, 2008; Aslan *et al.*, 2008). Bên cạnh đột biến tại codon 315, chúng tôi phát hiện ra một số điểm đột biến mới mà các đột biến này chưa từng được công bố trước đây. Ví dụ ở chủng số 1, đột biến tại codon 204 (W/R), ở chủng số 2, đột biến tại codon 375 (P/S), ở chủng số 3, tại codon 354 (T/A), tại

codon 404 (L/S), ở chủng số 4, tại codon 248 (I/F), ở chủng số 6, tại codon 225 (M/V) và tại codon 327 (K/V), ở chủng số 7, tại codon 377 là (M/V), ở chủng số 9, tại codon 402 (E/G), ở chủng số 11, tại codon 254 (R/H). Để khẳng định liệu những đột biến mới này có liên quan tới tính kháng INH đối với những nghiên cứu sâu hơn về protein và với số lượng mẫu lớn hơn.

Tóm lại, qua nghiên cứu 14 mẫu bệnh phẩm mang đột biến có khả năng liên quan tới tính kháng thuốc ở các chủng vi khuẩn lao kháng INH chúng tôi thấy rằng tỷ lệ đột biến trên gen *katG* là gần 93%. Quy trình chẩn đoán vi khuẩn lao kháng thuốc bằng phương pháp giải trình tự gen sẽ rút ngắn thời gian xuống còn khoảng 4 - 7 ngày thay vì từ 2 - 4 tháng như phương pháp cổ điển trước đây. Do vậy, nghiên cứu này có ý nghĩa rất lớn với công tác điều trị và kiểm soát bệnh lao ở một nước có mức độ bệnh nhân nhiễm lao cao như nước ta

**Bảng 2.** Các đột biến thay thế amino acid trên phân đoạn *KatG* của các chủng vi khuẩn lao nghiên cứu.

TT	204	210	225	248	254	309	315	327	354	356	375	377	388	402	404
1	W/R						S/T								
2							S/T				P/S				
3							S/T			T/A					L/S
4				I/F			S/T								
5							S/T								
6			M/V					K/I							
7							S/T								
8							S/T					M/V	X		
9							S/T								E/G
10															
11					N/H		S/T								
12							S/T								
13		X				G/C	S/T		D/G						
14							S/T								

Ghi chú: X: Vị trí tương ứng đột biến mất 1 nucleotide làm dịch khung đọc; Cột thứ nhất: thứ tự các chủng lao nghiên cứu; Hàng ngang thứ nhất: vị trí amino acid có đột biến trên protein *katG*.

## KẾT LUẬN

Thực hiện phản ứng PCR nhân bản thành công đoạn gen *katG* ở 14 chủng vi khuẩn lao nghiên cứu. Các phân đoạn DNA của gen *katG* được tách dòng vào vector pBT. Phân tích trình tự nucleotide và

amino acid cho thấy tỷ lệ đột biến gen *katG* ở 14 chủng vi khuẩn lao kháng INH là gần 93%. Trong số 13 chủng vi khuẩn lao có mang đột biến thì dạng đột biến thay thế 1 nucleotide tại codon 315, làm sai nghĩa dịch mã dẫn tới thay đổi amino acid serine thành threonine chiếm tỷ lệ rất cao (84,6%). Đối với

14 chủng vi khuẩn lao nghiên cứu có 1 chủng mang đột biến vừa dịch khung vừa thay thế nucleotide. Ngoài dạng đột biến S315T tại codon 315 phổ biến đã phát hiện, các đột biến khác chưa từng được công bố trước đây trên thế giới cũng như ở Việt Nam.

**Lời cảm ơn:** Công trình này được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài nghiên cứu "Nghiên cứu tối ưu hóa quy trình xác định nhanh các chủng vi khuẩn lao và lao kháng thuốc bằng kỹ thuật sinh học phân tử" thuộc Chương trình KC10/06-10. Nghiên cứu được thực hiện có sự dụng các thiết bị của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Afanasev MV, Ikryannikova LN, Ilina EN, Sidorenko SV, Kuzmin AV, Larionova EE, Smirnova TG, Chemousova LN, Kamaev EY, Skomiakov SN, Kinsht VN, Cherednichenko AG, Govorun VM (2007) Molecular characteristics of rifampicin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Russian Federation. *J Antimicrob Chem* 59: 1057-1064.
- Aslan G, Tezcan S, Senn MS, Emekdas G (2008). Genotypic analysis of isoniazid and rifampin resistance in drug-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in Southern Turkey. *Jpn J Infect Dis* 61: 255-260
- Bostanabad SZ, Titov LP, Bahrmand A, Nojourni SA (2008) Detection of mutation in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from tuberculosis patients in Belarus. *Indian J Med Microbiol* 26(2) 143-147.
- Caws M, Dau QT, Phan MD, Nguyen TNL, Dai VH, Torok ME, Tran THC, Nguyen VMC, Nguyen TC, Farrar J (2007) PCR-restriction fragment length polymorphism for rapid, low-cost identification of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 45(6): 1789-1793.
- Ghiladi RA, Cabelli DE, Ortiz de Montellano PR (2004) Superoxide reactivity of *katG*: insights into isoniazid resistance pathways in TB. *J Am Chem Soc* 126, 4772-4773.
- Gou JH, Xiang WL, Zhao QR, Lou T, Huang M, Zhang J, Zhao J, Yang ZR, Sun Q (2008) Molecular characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Sichuan province in China. *Jpn J Infect Dis* 61: 264-268.
- Heym B, Alzari PM, Horone N, Cole ST (1995) Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, *katG*, are associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 15: 235-245.
- Heym B, Cole ST (1992) Isolation and characterization of isoniazid-resistant mutants of *Mycobacterium smegmatis* and *M. aurum*. *Res Microbiol* 143: 721-730.
- Nguyễn VH (2001) Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của *Mycobacterium tuberculosis* phân lập tại viện Lao và Bệnh phổi. Luận án Tiến sĩ Y học
- Palomio JC, Leão SC, Ritacco V (2007) Tuberculosis: From basic science to patient care. [www.TuberculosisTextbook.com](http://www.TuberculosisTextbook.com).
- Ramaswamy SV, Reich R, Dou SJ, Jasperse L, Pan X (2003) Single nucleotide polymorphism in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 1241-1250.
- Vilchèze C, Jacobs WR (2007) The mechanism of isoniazid killing: Clarity through the scope of genetics. *Annu Rev Microbiol* 61: 35-50.
- Wang YC, Zhu RY, Xu YY, Zhao MQ, Liu YH, Li B, Chen JD (2009) Molecular characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Guangdong, China. *Jpn J Infect Dis* 62: 270-274.
- Zhang M, Yue J, Yang YP, Zhang HM, Lei JQ (2005) Detection of mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *J Clin Microbiol* 43: 5477-5482.
- Zhang Y, Garbe T, Young D (1993) Transformation with *katG* restores isoniazid-sensitivity in *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to a range of drug concentrations. *Mol Microbiol* 8, 521-524.
- Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole ST (1992) The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* 358: 591-593.

## POLYMORPHIC ANALYSIS OF *katG* ASSOCIATED WITH ISONIAZID RESISTANCE IN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* STRAINS ISOLATED FROM CLINICAL PATIENTS IN THE CENTRAL VIETNAM

La Duy Anh<sup>1</sup>, Nguyen Huu Cuong<sup>2</sup>, Nguyen Van Bac<sup>2</sup>, Nghiem Ngoc Minh<sup>2</sup>, Nguyen Thai Son<sup>3</sup>, Le Van Son<sup>1</sup>, Chu Hoang Ha<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Thai Nguyen University

<sup>2</sup>Institute of Biotechnology

<sup>3</sup>Hospital 103, Army Academy of Medicine

### SUMMARY

Tuberculosis (TB) is a common and often deadly infectious disease caused by mycobacteria. Approximately one-third of the world's population has been infected with *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis becomes more serious due to the emergence of drug-resistant, especially multiple-drug resistant (MDR), strains of *M. tuberculosis* with typical phenotype being resistant to two most powerful anti-TB drugs isoniazid (INH) and rifampicin (RIF) against tuberculosis. MDR-TB affects not only treatment approaches for patients but also programs to control the transmission of MDR strains in public health. It has been demonstrated that the drug resistance in *M. tuberculosis* is associated with gene mutations. Although Vietnam is ranked 13th among the WHO list of 22 high-burden countries threatened by TB, studies of gene mutations associated to drug resistance in *M. tuberculosis* is limited. In this work, we analyzed polymorphism of the gene encoding KatG from 14 *M. tuberculosis* strains isolated from 14 clinical patients in Hue Central Hospital. 684-nucleotide DNA fragments of *katG* of these strains were cloned and sequenced. Sequence analysis revealed that 13 studied *M. tuberculosis* strains carried point mutations. Among these, 11 *M. tuberculosis* strains contained mutation at codon 315 (serine replaced by threonine). This mutation has been proved as a marker to detect *M. tuberculosis* strains resisted to INH. Results of this study can be used in order to develop a kit to detect MDR strains in early stages of TB treatment.

**Keywords:** drug resistance, gene mutation, isoniazid, *katG*, *Mycobacterium tuberculosis*

---

\* Author for correspondence: Tel: 84-4-37562368; Fax: 84-4-38363144; E-mail: [chuhongha@ibt.ac.vn](mailto:chuhongha@ibt.ac.vn)