شناسایی موتاسیونهای ژن *rpoB* در سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ریفامپین جدا شده از بیماران ایرانی

فرحنوش دوستدار*[1] ، آذر دخت خسروی[1] ، پریسا فرنیا[2] ، احمد رضا بهره مند[3]

۱) گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

۲) مرکز رفرانس سل کشوری ، بیمارستان مسیح دانشوری تهران

۳) انستیتو پاستور ایران

نویسنده رابط: فرحنوش دوستدار، گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

تلفن: ۰۹۱۲۳۷۹۰۷۰ f_doustdar@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۶/۳/۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۶/۳/۲۲

چکیده:

زمینه و اهداف: در این تحقیق ، فراوانی موتاسیونها در ناحیه پر موتاسیون بسیار متغیر ژن rpoB سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد بررسی قرار گرفت. این سویه ها مقاوم یا حساس به ریفامپین بوده و از بیماران مبتلا به سل مراجعه کننده به مرکز رفرانس سل کشوری و مرکز رفرانس سل اهواز، جدا شده بودند. هدف از این تحقیق بررسی چگونگی تاثیر غربالگری مولکولی این ناحیه از ژن rpoB در نمونه های بیماران مبتلا به سل در تشخیص سریع موارد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ریفامپین بود.

روش بررسی: تعداد ۲۵ نمونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ریفامپین و ۵ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس حساس به ریفامپین جدا شده از بیماران بصورت تصادفی برای انجام این تحقیق انتخاب شد. ناحیه RRDR کلیه نمونه های انتخاب شده پس از تکثیر به وسیله PCR ، کاملا سکانس شد تا انواع و فراوانی موتاسیونهای مرتبط با مقاومت به ریفامپین در این ناحیه بررسی شود.

یافته ها: بر اساس نتایج حاصله ، ۹۶٪ از سویه های مقاوم به ریفامپین ، تغییرات ژنتیکی در ناحیه RRDR را نشان دادند و ۷۲ درصد از سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ریفامپین دارای موتاسیونهای missense بودند که منجر به عوض شدن اسید آمینه در کدون ۵۳۱ (۶۰٪)، کدون ۵۲۶ (۱۶٪) و کدون ۵۱۶ (۸٪) در ناحیه مرکزی ژن rpoB گردیده بود. در حالیکه در تحقیق ما مانند سایر نقاط دنیا کدون ۵۳۱ دارای بیشترین نغییر بود ولی فراوانی موتاسیون در دو کدون شایع دیگر یعنی ۵۲۶ و ۵۱۶ متفاوت از فراوانی موتاسیون گزارش شده از سایر نقاط دنیا بود. این نفاوتها ممکن است ناشی از تغییرات ژنی جغرافیایی در نژادهای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ریفامپین و انتقال این نژادها در بیماران در کشورهای مختلف باشد.

نتیجه گیری: میزان بالای موتاسیون در ناحیه RRDR نمونه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ریفامپین جدا شده از بیماران ، تائید کننده این مطلب است که غربالگری لین ناحیه ژنی برای تعیین مقاومت به ریفامپین در نمونه های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از ایران مناسب است.

کلید واژه ها: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، ریفامپین، مقاومت دارویی، موتاسیون

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه:

در مطالعات اپیدمیولوژیک بیماری سل مقاومت دارویی از اهمیت ویژه ای برخوردار است. مقاومت چند دارویی که به صورت مقاومت هم زمان به حد اقل دو داروی ایزونیازید و ریفامپین تعریف می شود، در بسیاری از کشورها به بیش از ده درصد می رسد و به نظر می رسد امروزه خیلی بیشتر از آنچه در گذشته نشان داده شده بود گسترش پیدا کرده است (۱ و ۲).

به تازگی نواحی جدیدی باشیوع بالای سل مقاوم به چند دارو در کشورهای پر جمعیتی مانند چین وایران شناسایی شده است. در ایران در بین موارد جدید ابتلای به سل شیوع مقاومت به حداقل یک دارو به ۵ درصد میرسد و شیوع مقاومت چند دارویی در بین موارد قبلا درمان شده به ۴۸/۲ درصد میرسد(۳).

ریفامپین به عنوان داروی ضد سل در سال ۱۹۷۲ معرفی شد و از آن موقع به عنوان یک جزء کلیدی در درمان چند دارویی ضد سل مطرح است. ریفامپین یک داروی باکتریسیدال است و به ساب یونیت ß آنزیم RNA پلیمراز وابسته به DNA متصل می شود و مانع شروع رونویسی می گردد(۴).

استفاده گسترده از ریفامپین و سایر مشتقات ریفامایسین موجب ظهور مقاومت به ریفامپین گردیده است(۵).

در مطالعات متعدد نشان داده شده است که موتاسیون در ژن *rpoB* که کد کننده ساب یونیت ß آنزیم RNA پلیمراز است، بطور مشخص در ارتباط با فنوتایپهای مرتبط با ریفامپین می باشد(۶). بیش از ۷۰ نوع موتاسیون متفاوت در ژن *rpoB* برای نمونه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ریفامپین از سراسر جهان گزارش شده است(۷).

موتاسیونها در ژن *rpoB* بیشتر در یک ناحیه bp ۸۱ به نام ناحیه تعیین کننده مقاومت به ریفامپین (RIF resistance-determining region) یا RRDR صورت می گیرد. از آنجاییکه تا ۹۰ درصد نمونه های مقاوم به ریفامپین دارا ی موتاسیون در کدونهای ۵۳۱ و ۵۲۶ و۵۱۶ ناحیه RRDR هستند این ناحیه برای تشخیص سریع نمونه های مقاوم به ریفامپین استفاده می شود (۸ و ۹). اگرچه نشان داده شده است که آنالیز مولکولی ژن *rpoB* در بیش از ۹۰ درصد نژادهای مقاوم به ریفامپین از نواحی جغرافیایی مختلف برای تشخیص مقاومت به ریفامپین مفید بوده است، اما اطلاعات کمی از ناحیه آسیای خاور میانه در دست است(۱۰).

برای تعیین اینکه آیا غربالگری مولکولی ناحیه RRDR ژن *rpoB* برای تشخیص نمونه های مقاوم به ریفامپین در ایران مفید است، ما فراوانی موتاسیونها را در ناحیه RRDR ژن *rpoB* در ۲۵نمونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ریفامپین و ۵ نمونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس حساس به ریفامپین با روش سکانس مستقیم کل ناحیه RRDR مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روش ها:

انتخاب نمونه و تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی : تعداد ۲۵ نمونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ریفامپین و ۵ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس حساس به ریفامپین جدا شده از بیماران مبتلا به سل مراجعه کننده به مرکز رفرانس سل کشوری و مرکز رفرانس سل اهواز طی سال ۲۰۰۶، بصورت تصادفی برای انجام این تحقیق انتخاب شدند. با استفاده از تستهای معمول شامل میکروسکوپی، کشت و نتایج مثبت در تست نیاسین ونیترات و کاتالاز باکتری ها بعنوان مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شناسایی شدند(۱۱). *M. tuberculosis* strains H37RvT and CDC 1551 نیز به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفت. حساسیت دارویی نمونه های مورد استفاده در این تحقیق با استفاده از روش کشت روی محیط لوون اشتاین جانسن حاوی غلظت معین از دارو بررسی شد. غلظت ریفامپین برابر 1µg در هر 1ml محیط بود. اگر تعداد کلنی های باکتری که روی محیط واجد ریفامپین رشد می کرد کمتر از ۱ درصد کلنی هایی بود که روی محیط فاقد ریفامپین رشد می کرد، بود باکتری به عنوان حساس به ریفامپین و اگر برابر یا بیشتر از ۱ درصد بود، باکتری به عنوان مقاوم به دارو تعیین می گردید(۱۱ و ۱۲).

استخراج DNA : DNA ژنومی با استفاده از روش van Soolingen با تغییرات جزئی استخراج شد(۱۳). باکتری های رشد یافته بر روی محیط لوون اشتاین جانسن برداشت شده و با استفاده از حرارت ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری کشته شدند. سپس باکتری ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با لیزوزیم انکوبه شدند و به دنبال آن عمل تخریب دیواره سلولی با استفاده از 50 µg proteinase K in 10% SDS به مدت ۳۰ دقیقه در ٦٥ درجه سانتیگراد انجام شد. سپس انکوباسیون به مدت ۱۰ دقیقه در ٦٥ درجه با CTAB/NaClانجام شد و عمی رسوب دهی با استفاده از مخلوط کلروفرم/ ایزوآمیل الکل (24: 1, v/v) انجام شد. در

Archive of SID

www.SID.ir

نهایت DNA ژنومی با استفاده از مخلوط فنل/ کلروفرم استخراج شد و با استفاده ازاتانل ۱۰۰ درصد رسوب داده شد(۱۳).

تکثیر قطعه ژنومی نمونه های مایکوباکتریوم با استفاده از PCR : 10–20 ng از DNA مایکوباکتریایی استخراج شده به واکنش PCR اضافه گردید. قطعه bp ۱۵۷ از ژن rpoB با استفاده از پرایمرهای (5- rpob F , rpobR -3) (5-GGTCGGCATGTCGCGGATGG-3)و (5-GTAGTGCGACGGGTGCACGTC-3) تکثیر شد(۱۴). تکثیر با برنامه زیر انجام شد: یک مرحله Denaturation اولیه در ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۰ سیکل ۹۵ درجه به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۲ درجه به مدت ۱۵ ثانیه، ۷۲ درجه به مدت ۱۵ ثانیه و در آخر Extension نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه. هر µl ۵۰ از مخلوط واکنش حاوی mM ۱ MgCl2، nM ۲۰۰ از هر پرایمر، µM۱۰۰ از هر داکسی نوکلئوتید تری فسفات، ng۱۰ از DNA الگو، (µl of 10XPCR Fermentas) ۱۰ buffer و AmpliTaq Gold (Fermentas) ۱U بود. وجود DNA تکثیر شده bp ۲۵۰ توسط الکتروفورز در ژل آگارز تایید شد.

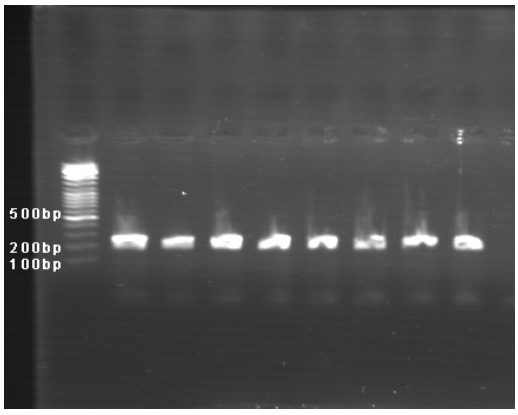
خالص سازی و سکانس محصول PCR : محصولات PCR با استفاده از کیت خالص سازی محصول PCR (Roche) خالص سازی شدند و نوکلئوتیدهای قطعات PCR شده توسط شرکت MWG آلمان سکانس شدند.

بررسی سکانس DNA : DNA سکانس شده با استفاده از برنامه های MEGA و DNAMAN آنالیز شدند و با سکانس نژادهای استاندارد CDC 1551, H37RV مقایسه شدند.

یافته ها:

کلیه سویه ها با استفاده از خصوصیات میکروسکپی و فنوتیپی استاندارد به عنوان مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد تائید قرار گرفتند. در همه این نمونه های کلینیکی ناحیه متغیر ژن rpoB پس از تکثیر سکانس شد. ده موتاسیون missense در کدونهای ۴۹۰، ۵۱۳، ۵۱۶، ۵۲۲،526 ، 531و ۵۳۳ در ۲۲ نمونه مقاوم به ریفامپین (۸۸ درصد) مشاهده شد (جدول) . موتاسیون در کدون ۵۳۱ در ۱۴ (۵۶ درصد) ، در کدون ۵۲۶ در ۴ نمونه (۱۶ درصد) و در کدون ۵۱۶ در ۲ نمونه (۸ درصد) مشاهده شد. شایعترین تغییرات جایگزینی اسید آمینه تریپتوفان به جای اسید آمینه سرین در کدون ۵۳۱ در ۱۲ نمونه (۴۸ درصد) و جایگزینی هیستیدین به جای تیروزین در کدون ۵۲۶ در ۳ نمونه (۱۲ درصد) بود. یک موتاسیون در کدون ۵۱۳ که موجب جایگزینی گلایسین به جای پرولین شده بود در یک نمونه و یک موتاسیون در کدون ۵۲۲ که موجب جایگزینی سرین به جای لوسین شده بود در نمونه دیگر شناسایی شد. دو نمونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ریفامپین (۱۲ درصد) دارای موتاسیونهای missense در کدونهای جداگانه شامل کدون ۴۹۰ (در خارج منطقه متغیر) و کدون ۵۲۶ (۴ درصد) و در دیگری در کدونهای ۴۹۰ و ۵۳۱ (۴ درصد) بودند. یک نمونه دارای موتاسیون خاموش در کدون ۴۹۰ بهمراه موتاسیون missense در کدون ۵۱۳ و یک نمونه دارای یک موتاسیون خاموش در کدون ۵۴۰ بود. یک نمونه مقاوم به ریفامپین دارای چندین موتاسیون خاموش در کدونهای ۵۰۷، ۵۱۳ و ۵۳۴ بود. هیچ تغییر ژنی در ۱ نمونه (۴ درصد) از ۲۵ نمونه مقاوم به ریفامپین مشاهده نشد. ۵ نمونه حساس به ریفامپین که به عنوان کنترل بررسی شده بودند حاوی هیچ موتاسیونی در این ناحیه نبودند.

شکل : ژل آگارز حاوی قطعه bp ۲۵۰ تکثیر شده شامل منطقه متغیر ژن rpoB



Archive of SID

www.SID.ir

جدول: تغییرات ژنتیکی ژن rpoB در ۲۵ نمونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ریفامپین از بیماران ایرانی

Codon(s)	Amino acid substitution(s)	Mutation(s)	No. of isolates (%)
490,526	Gln3 His ; His3Tyr	CAG3CAT; CAC3TAC	1(4.0) [a]
490,531	Gln3His; Ser3Leu	CAG3CAT;TCG3TTG	1(4.0) [a]
490,531	Gln3Gln; Ser3Leu	CAG3CAT;TCG3TTG	1(4.0) [b]
507, 513, 534	Gly3Gly; Glu3Glu; Gly3Gly	GGC3GGA;CAA3CAG GGG3GGC	1(4.0) [c]
513	Gln3Pro	CAA3CCA	1 (4.0)
516	Asp3Val	GAC3GTC	1 (4.0)
516	Asp3Tyr	GAC3TAC	1 (4.0)
522	Ser3Leu	TCG3TTG	1 (4.0)
526	His3Tyr	CAC3TAC	2 (8.0)
526	His3Asp	CAC3GAC	1 (4.0)
531	Ser3Leu	TCG3TTG	10(44.0)
531	Ser3Trp	TCG3TGG	2 (8.0)
533	Leu3Pro	CTG3CCG	1(4.0)
540	Arg3Arg	CGT3CGG	1(4.0)
No mutation			1 (4.0)
			Total 25 (100)

a موتاسیون همزمان در دو کدون ۴۹۰ و ۵۲۶ در یک نمونه و موتاسیون همزمان در در دو کدون ۴۹۰ و ۵۳۱ نیز در یک نمونه مشاهده شد.

b. موتاسیون Silent در کدون ۴۹۰ همراه با موتاسیون missens در کدون ۵۳۱ مشاهده شد.

c. سه موتاسیون Silent در یک نمونه مشاهده شد.

بحث:

ریفامپین یک داروی کلیدی در درمان سل است و ایجاد مقاومت بر علیه آن معمولا شاخصی برای سل مقاوم به درمان است(۱۵). بیشتر نژادهای مقاوم به ریفامپین در نتیجه بروز مقاومت در ناحیه ۸۱ bp ناحیه بسیار متغیر ژن rpoB که کد کننده ساب یونیت ß آنزیم RNA پلیمراز است، ایجاد می شوند(۱۶). تغییرات ژنتیکی در این ناحیه با فراوانی بالای ۹۶ درصد در نمونه های ایرانی مورد بررسی ما مشاهده شد. در این تحقیق مشاهده شد که ۷۲ درصد نمونه های مقاوم به ریفامپین دارای موتاسیون missense بودند که منجر به جایگزینی اسید آمینه های سرین در کدون ۵۳۱ (۶۰٪)، هیستیدین در کدون ۵۲۶ (۱۶٪) یا آسپارژین در کدون ۵۱۶ (۸٪) در ناحیه مرکزی ژن rpoB بودند. در حالیکه در تحقیق ما مانند نتایج گزارش شده از سایر نقاط جهان کدون ۵۳۱ رایج ترین محل بروز موتاسیون بود، موتاسیون در دو کدون رایج دیگر یعنی کدونهای ۵۲۶ و ۵۱۶ در نژادهای ما با فراوانی متفاوت از نواحی جغرافیایی دیگر بود(۱۷ و ۱۸). حدود ۸ درصد از نمونه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ریفامپین دارای موتاسیون در کدون ۵۳۳ بودند. این موتاسیون با فراوانی کم (۳/۳٪) یا بندرت در نواحی جغرافیایی دیگر گزارش شده است (۱۹ و ۲۰). این تفاوتها ممکن است مربوط به تفاوتهای ژنتیکی جغرافیایی در نژادهای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ریفامپین و انتقال این نژادها در بین بیماران در کشورهای مختلف باشد. دو موتاسیون همزمان در ۳ نمونه (۱۲٪) شناسایی شد که این نمونه ها دارای موتاسیون ثانویه ای در خارج از ناحیه بسیار متغیر بودند. تحقیقات قبلی(۲۱ و ۲۲)

Archive of SID

www.SID.ir

نیز موتاسیونهای خارج از ناحیه متغیر را در کدونهای ۵۳۴، ۵۳۵، ۵۰۴، ۵۴۱، ۵۵۳ و ۵۷۲ گزارش کرده اند. هیچ موتاسیونی در یکی از نمونه های مقاوم به ریفامپین (۴٪) مشاهده نشد که این نتیجه مشابه نتایج بدست آمده از تحقیقات قبلی است(۲۳). مطالعات قبلی نشان داده است که در این نمونه موتاسیون ممکن است در خارج از ناحیه مورد بررسی ما انجام گرفته باشد(۲۴). احتمالات دیگر اینست که در این نژادهای مقاوم سایر موتاسیونهای نادر ژن rpoB صورت گیرد یا مخلوطی از نژادهای مقاوم همراه با نژادهای حساس وجود داشته باشند یا به احتمال کمتر مکانیسمهای دیگر مقاومت وجود داشته باشند(۲۵).

نتیجه گیری:

در نتیجه گیری می توان گفت که الگوی کلی موتاسیونها در ناحیه ۸۱ bp ژن rpoB در نمونه های ما مشابه نتایج به دست آمده از نمونه های اکثر نقاط دنیا بوده است. اطلاعات بیشتر در مورد این موتاسیونها برای توسعه تکنیکهای مولکولی تشخیصی جدید مناسب هستند و این میزان بالای موتاسیون در ناحیه متغیر ژن rpoB در نمونه های ایرانی بیانگر آنست که غربالگری این ناحیه برای تعیین مقاومت به ریفامپین در نمونه های کلینیکی به دست آمده از بیماران ایرانی مناسب است.

تقدیر و تشکر:

این تحقیق بااستفاده از بودجه طرح های تحقیقاتی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور انجام گرفته که مولفین مراتب سپاس خود را اعلام می دارند. با تشکر فراوان از خانم اسکندری و آقای کمائی از مرکز رفرانس سل اهواز که در تهیه نمونه مارا یاری دادند.

فهرست مراجع:

1. McCammon MT, Gillette JS , Thomas DP , Ramaswamy SV , Graviss EA , Kreiswirth BN *et al*. Detection of rpoB Mutations Associated with Rifampin Resistance in Mycobacterium tuberculosis Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**(6): 2200–2209.

2. World Health Organization**.** Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. W.H.O. report 2004.331, World Health Organization, Geneva, Switzerland.

3. Espinal MA, Laszlo A, Simonsen L, Boulahbal F, Kim SJ, Reniero A, *et al.* Global Trends in Resistance to Antituberculosis Druges *the N Engl J Med* 2001; **344(17):**1294-1303.

4. Espinal, M. A. The global situation of MDR-TB, *Tuberculosis* 2003; 83:44–51.

5. Chaisson, R. E. Treatment of chronic infections with rifamycins: is resistance likely to follow? *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**:3037–3039.

6. Van Der Zanden, A. G. M., E. M. Te Koppele-Vije, N. Vijaya Bhanu, D. Van Soolingen, and L. M. Schouls. Use of DNA extracts from Ziehl-Neelsen stained slides for molecular detection of rifampin resistance and spoligotyping of Mycobacterium tuberculosis. *J. Clin. Microbiol* 2003; **41**:1101–1108.

7. Tang, X., S. L. Morris, J. J. Langone, and L. E. Bockstahler. Microarray and allele specific PCR detection of point mutations in *Mycobacterium tuberculosis* genes associated with drug resistance *J Microbiol Methods* 2005; **63:**318–330.

8. Kocagoz, T., Z. Saribas, and A. Alp. Rapid determination of rifampin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by real-time PCR *J Clin Microbiol* 2005; **43:**6015–6019.

9. Hirano, K., C. Abe, M. Takahashi. Mutations in the rpoB gene of rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis strains isolated mostly in Asian countries and their rapid detection by line probe assay *J Clin Microbiol 1999*; **37**:2663–2666.

10. Lee AS.G, Lim IH.K , Tang LL.H, Wong S.Y, High Frequency of Mutations in the rpoB Gene in Rifampin-Resistant Clinical Isolates of Mycobacterium tuberculosis from Singapore. *J Clin Microbiol* 2005; **43**(4): 2026-2027.

11. Kent, P. T. & Kubica, G. P, Public Health Mycobacteriology, a Guide for the Level III Laboratory. Atlanta: US Department of Health

Archive of SID

www.SID.ir

and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. 1985.
12. Inderlied, C. B. & Nash, K. A. Antimycobacterial agents: in vitro susceptibility testing, spectra of activity, mechanisms of action and resistance, and assays for activity in biologic fluids, In Antibiotics in Laboratory Medicine, 4th edn, Edited by V. Lorain. Baltimore: Williams & Wilkins; 1996. pp. 127–175.
13. van Soolingen, D., de Haas, P. E., Hermans, P. W. & van Embden, J. D, DNA fingerprinting of Mycobacterium tuberculosis, *Methods Enzymol* 1994; **235**:196–205.
14. Nikolayevsky, V., Brown, T., Balabanova, Y., Ruddy, M., Fedorin, I., and Drobniewski, F., Detection of Mutations Associated with Isoniazid and Rifampin Resistance in Mycobacterium tuberculosis Isolates from Samara Region, Russian Federation, *J Clin Microbiol* 2004; **42**(10): 4498–4502.
15. Kapur, V., Li, L.-L., Iordanescu, S., Hamrick, M. R., Wanger, A., Kreisworth, B. N., & Musser, J. M, Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (rpoB) encoding the RNA polymerase b subunit in rifamipin resistant Mycobacterium tuberculosis strains from New York City and Texas. *J Clin Microbiol*1994; **32**: 1095–1098.
16. Ramaswamy, S., & Musser, J. M, Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in Mycobacterium tuberculosis 1998 update. *Tubercle Lung Dis*1998; **79**: 3–29.
17. Qian, L., Abe, C., Lin, T. P., Yu, M. C., Cho, S. N., Wang, S. & Douglas, J. T, rpoB genotypes of Mycobacterium tuberculosis Beijing family isolates from East Asian countries. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 1091–1094.
18. Pozzi, G., Meloni, M., Iona, E., Orru, G., Thoresen, O. F., Ricci, M. L., *et al.* rpoB mutations in multidrug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis isolated in Italy *J Clin Microbiol* 1999; **37**: 1197–1199.
19. Mani, C., Selvakumar, N., Narayanan, S. & Narayanan, P. R., Mutations in the rpoB gene of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from India. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 2987–2990.
20. Bartfai, Z., Somoskovi, A., Kodmon, C., Molecular characterization of rifampin-resistant isolates of Mycobacterium tuberculosis from Hungary by DNA sequencing and the line probe assay. *J Clin Microbiol* 2001; **39**:3736–3739.
21. Mani, C., Selvakumar, N., S. Narayanan, S. and Narayanan, P. R., Mutations in the rpoB gene of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from India *J Clin Microbiol* 2001; **39**:2987–2990.
22. Schilke, K., Weyer, K., Bretzel, G., Amthor, B., Brandt, J., Sticht-Grohn, V., *et al.* Universal pattern of rpoB gene mutations among multidrug-resistant isolates of Mycobacterium tuberculosis complex from Africa. *Int J Tuber Lung Dis*1999; **3**: 620–626.
23. Mokrousov, I., Bhanu, N. V., Suffys, P. N., Kadival, G. V., Yap, S. F., Cho, S. N., *et al.* Multicenter evaluation of reverse line blot assay for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates. *J Microbiol Methods* 2004; **57**:323–335.
24. Heep, M., Rieger, U., Beck, D. and Lehn, N., Mutations in the beginning of the rpoB gene can induce resistance to rifamycins both in Helicobacter pylori and Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 1075–1077.
25. Heep, M., Brandtsta¨tter, B., Rieger, U., Lehn, N., Richter, E.,¨sch-Gerdes, S. Ru. And Niemann, S., Frequency of rpoB mutations inside and outside the cluster I region in rifampin resistant clinical Mycobacterium tuberculosis isolates *J Clin Microbiol* 2001; **39**:107–110.

Archive of SID

www.SID.ir