مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره اول، شماره دوم، بهار 1390
Archive of SID

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی موتاسیون های ژن *rpoB* در سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از بیماران شهر تهران

سعید ذاکر بستان آباد*[1]، اسماعیل جبارزاده[2]، شاهین پور آذر[1]، مصطفی قلمی[4]، وحید ملا کاظمی[5]

[1] استادیار، گروه میکروبیولوژی و بیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، تهران- ایران.
[2] استاد، عضو هیئت علمی انستیتوپاستور ایران، تهران-ایران.
[3] کارشناس ارشد، آزمایشگاه تشخیص مولکولی، مجتمع آزمایشگاهی مسعود، تهران- ایران.
[4] کارشناس، آزمایشگاه سل، مجتمع آزمایشگاهی مسعود ، تهران- ایران.
[5] کارشناس، بخش بانک سلولی، انیستستوپاستور ایران، تهران-ایران.

چکیده

سابقه و هدف: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس باکتری عامل بیماری سل است که سالانه حدود 2 میلیون نفر بر اثر ابتلا به این بیماری جان خود را از دست می دهند. وجود باکتری های مقاوم به دارو های ضد سلی از عوامل مهم مرگ افراد مبتلا به سل است. از جمله مهم ترین این داروها، داروی ریفامپیسین است که به نظر می رسد مکانیسم عملکرد این دارو، دخالت در فرایند رونویسی از طریق اتصال به زیرواحد β آنزیم RNA پلیمر از می باشد. مقاومت مایکوباکتریوم ها به این دارو در اثر جهش در ناحیه 81 bp ژن *rpoB* است که این ژن رمز کننده زیر واحد β آنزیم RNA پلیمراز می باشد. این تحقیق با هدف شناسایی نوع و فراوانی جهش های این ناحیه، در نمونه های شهر تهران صورت گرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه 65 بیمار مبتلا به سل که پس از 6 ماه درمان با داروهای ضد سلی به درمان جواب نداده بودند، انتخاب شدند و از آن ها پس از اخذ رضایت، نمونه خلط گرفته شد. پس از کشت نمونه ها در محیط کشت جامد لون اشتاین جانسون و پس از انجام تست های حساسیت، نمونه های مقاوم به ریفامپیسین شناسایی شدند. ژن *rpoB* نمونه های مقاوم به ریفامپیسین تکثیر شد و توالی یابی گردید. نتایج توالی یابی توسط برنامه DNAMAN آنالیز گردید.

یافته ها: در این تحقیق، 35 نمونه مقاوم به ریفامپیسین شناسایی گردید. آنالیز های کامپیوتری نشان داد که 14نمونه (70٪) دارای جهش در ناحیه 81bp ژن *rpoB* مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و 6 نمونه نیز فاقد هرگونه جهش در این ناحیه بودند. فراوان ترین جهش ها در کدون های 531 (40٪) و 515 (20٪) مشاهده گردید. جهش جدیدی نیز در کدون 515 در 5 سوش مشاهده گردید. جهش در کدون های 526 (10٪) و 510 (15٪) نیز مشاهده شد.

نتیجه گیری: فراوان ترین جهش ها در نمونه های شهر تهران در کدون های 531 و 515 واقع شده اند. وجود جهش جدید در کدون 515 نشانگر الگوی متفاوت جهش در تهران می باشد. داده های ما 6 نمونه فاقد جهش در این ناحیه و چند نمونه دارای جهش در خارج از این ناحیه را نشان می دهد. این نتایج ما را به این نظریه می رساند که مقاومت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نسبت به داروی ریفامپیسین می تواند علاوه بر عوامل ژنتیکی دارای عوامل غیر ژنتیکی نیز باشد و یا ممکن است ژن های دیگری نیز در ایجاد مقاومت به ریفامپیسین نقش داشته باشند که با مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی مطابقت دارد.

کلمات کلیدی: ریفامپیسین، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، ژن *rpoB*

مقدمه

بیماری سل یکی از بیماری های شایع و خطرناک در جهان است که در ترتیب جهانی بیماری ها در سال 1990 در رده هفتم قرار داشته و پیش‌بینی می‌شود در سال 2020 هم در رده هفتم جهانی بیماری ها، بر اساس شاخص DAILY، باقی بماند (Bakonyt et al., 2005).

بر اساس آمار های سازمان جهانی بهداشت یک سوم جمعیت جهان به بیماری سل آلوده‌اند و سالانه هشت میلیون و هشتصد هزار مورد جدید نیز به این بیماری مبتلا می‌شوند (Jun et al., 2009; Kim et al., 2004). سالانه حدود 3-2 میلیون نفر بر اثر بیماری سل جان خود را از دست می دهند. عامل این بیماری باسیل مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (MTB) است که در اثر استنشاق هوای آلوده به این باسیل وارد ریه های فرد شده و باعث ایجاد بیماری سل می گردد (Bobadilla et al., 2001; Hirano et al., 1991). طبق ارزیابی سازمان جهانی بهداشت، هر سال تقریباً 490 هزار مورد جدید در سراسر

آدرس نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی ،دانشکده ی علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند
Email: Saeedzaker20@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله: 1389/10/17
تاریخ پذیرش: 1389/12/24
www.SID.ir

Archive of SID

جهان به سل مقاوم به دارو (Multi Drug Resistance - MDR) مبتلا می‌شوند. سل MDR نوعی از بیماری سل است که در آن مایکوباکتریوم توبرکلوزیس های عامل بیماری حداقل به دو داروی ریفامپیسین و ایزونیازید مقاوم می گردند (Cummings et al., 2004; Zakerbostanabad et al., 2008). ریفامپین به همراه ایزونیازید دو دارویی هستند که با هم بیش از 99% باسیل‌های سل را در دو ماه اول درمان از بین می‌برند، بدین ترتیب، درمان سل MDR با مشکلات زیادی همراه است و شناسایی بیماران مبتلا به سل MDR در تسریع روند درمان اهمیت بالایی دارد. همزمان با شیوع بیماری سل، مقاومت به داروی ریفامپیسین هم افزایش می یابد (Fan et al., 2003). شناسایی سریع مقاومت به ریفامپیسین از اهمیت بالایی برخوردار می باشد، زیرا مقاومت به ریفامپیسین مارکری برای مقاومت چند دارویی (MDR) می باشد که مانع عظیمی در درمان TB است (Miknailovich et al., 2001; Zakerbostanabad et al., 2008a). امروزه چندین روش سریع فنوتیپی برای تشخیص سل وجود دارد، ولی آزمایش های ژنوتیپی که اساس آن ها بر شناسایی جهش هایی است که باعث مقاومت به داروی ریفامپیسین می شوند، از سریع ترین روش هایی مرسومی است که امروزه وجود دارد. امروزه مطالعات حاصل از توالی یابی DNA ثابت نموده است که در بیش از 90٪ نمونه های مقاوم به ریفامپیسین، جهش در ژن *rpoB* به ویژه جهش های واقع شده در یک ناحیه 81 bp از ژن *rpoB*، عامل ایجاد مقاومت نسبت به داروی ریفامپیسین می باشد (Huany et al., 2000). این ژن رمز کننده زیر واحد β آنزیم RNA پلی مراز می باشد. ریفامپیسین به طور اختصاصی با زیر واحد β آنزیم RNA پلیمر از واکنش داده و رونویسی را مهار می کند. وقوع جهش در ژن *rpoB* باعث ایجاد تغییرات شکلی در زیر واحد β آنزیم RNA پلی مراز می‌شود که حاصل آن اتصال ناقص دارو به این زیر واحد و متعاقباً ایجاد مقاومت نسبت به این دارو می‌باشد. بررسی های مختلف انجام شده بر روی انواع جهش های موجود در ناحیه 81 bp ژن *rpoB* نشان داده است که فراوانی جهش ها در مناطق جغرافیایی مختلف متفاوت می باشد (Telenti et al., 1997; Titov et al., 2006). فراوان ترین کدون های جهش یافته در جهان، کدون های 531، ۵۱۶، ۵۲۶ و511 گزارش شده اند (Shin et al., 2005; Titov et al., 2006) تحقیق حاضر به بررسی نوع و فراوانی جهش های موجود در نمونه های مقاوم به ریفامپیسین در نمونه های بیماران شهر تهران پرداخته و فراوانی جهش ها در نمونه ها مورد ارزیابی قرار گرفته است تا از نتایج بدست آمده وضعیت اپیدمیولوژی مولکولی بیماری در منطقه شهر تهران بدست آید.

www.SID.ir

مواد و روش ها

جداسازی نمونه ها

در این مطالعه تجربی با همکاری مجتمع آزمایشگاهی مسعود و آزمایشگاه دکتر ظریفی، از 65 بیمار مبتلا به سل که پس از 5-3 ماه درمان با داروهای ضد سلی بهبود نیافته بودند و جهت بررسی مقاومت دارویی که در سال 89- 1388 به این آزمایشگاه ها مراجعه نموده بودند، پس از اخذ رضایت، نمونه گیری از خلط انجام شد. پس از دکانتامیناسیون نمونه ها به روش پتروف، از هر نمونه دکانتامینه شده لام تهیه گردید و لام ها پس از رنگ آمیزی به روش زیل نلسون با میکروسکوپ نوری بررسی گردیدند. نمونه هایی که دارای باسیل های قرمز رنگ مقاوم به اسید بودند، مثبت گزارش شده و از هر نمونه در دو لوله لون اشتاین جانسون کشت داده شد. پس از 56 روز، محیط های کشت از لحاظ وجود کلنی های کرم رنگ و گل کلمی شکل مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بررسی شدند و پس از تهیه لام از این کلنی ها و رنگ آمیزی به روش زیل نلسون، مجدداً لام ها از لحاظ وجود باسیل های قرمز رنگ مقاوم به اسید بررسی گردیدند. نمونه های حاوی باسیل جهت انجام تست حساسیت دارویی در محیط های کشت لون اشتاین جانسون حاوی دارو های استاندارد کشت داده شدند.

بررسی مقاومت دارویی

برای بررسی مقاومت و حساسیت دارویی باسیل مایکوباکتریوم جداشده، آن را به روی محیط های دارویی که دارو در محیط لون اشتاین حل شده است با روش های استاندارد کشت داده شد (ریفامپیسین با 40 میکروگرم در میلی لیتر، ایزونیازید 2 میکروگرم در میلی لیتر، اتامبوتول 2 میکروگرم در میلی لیتر، اتیونامید 20 میکروگرم در میلی لیتر، استرپتومایسین 4 میکروگرم در میلی لیتر و کانامایسین20 میکروگرم در میلی لیتر مورد استفاده قرار گرفت). پس از 8-6 هفته محیط ها از لحاظ رشد باکتری ها بررسی گردیدند. نمونه هایی که در محیط حاوی ریفامپیسین رشد نموده بودند و تعداد کلنی های آن ها بیش از 1٪ تعداد کلنی های لوله های شاهد بود، نمونه های مقاوم به ریفامپیسین گزارش شدند. با استفاده از آزمون های بیوشیمیایی و افتراقی: نیاسین –احیاء نیترات –آریل سولفاتاز (3و14روزه) پیرازین آمیداز- احیاء تلوریت- کاتالاز (68-22 درجه) - جذب آهن – تحمل نمک، اوره آز، تولید رنگدانه و منبع کربن مورد افتراق و شناسایی قرار گرفت.

جدا سازی DNA

DNA نمونه های مقاوم به ریفامپیسین توسط کیت استخراج DNA مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با مارک *DNA Technology*، به روش رسوب دهی DNA استخراج گردید. در این روش قدری از کلنی های گل کلمی شکل مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در µl 100 بافر حل کننده

Archive of SID

حل گردید. سپس باسیل ها توسط 300µl بافر لیزکننده، لیز شده و DNA توسط µl 400 ایزوپروپانل رسوب داده شد. رسوب حاصل توسط 500µl الکل 70٪ (شستشوی اول) و 300µl استون (شستشوی دوم) شستشو داده شد. سپس رسوب DNA در 50µl بافر حل کننده، حل شده و برای انجام (Polymerase Chain Reaction) PCR تأییدی مورد استفاده قرار گرفت. جهت اطمینان از توبرکلوزیس بودن مایکوباکتریوم های مورد نظر، PCR تأییدی انجام شد. این PCR توسط کیت PCR تأییدی شرکت Technology DNA صورت گرفت.

PCR: طبق پروتکل، پس از افزودن 50µl از DNA نمونه مورد نظر به میکروتیوب های آماده کیت، PCR تأییدی طبق برنامه زمانی زیر انجام شد:

الف) دمای 94°c به مدت 1دقیقه و 30 ثانیه

ب) دمای 94°c به مدت 50 ثانیه

پ) دمای 67°c به مدت45 ثانیه

ج) دمای 72°c به مدت30 ثانیه

د) تکرار مراحل ب- ج به میزان 5 سیکل

ذ) دمای 95°c به مدت20 ثانیه

ه) دمای 65°c به مدت20 ثانیه

و) دمای 72 °c به مدت20 ثانیه

ی) تکرار مراحل ذ- ی به میزان 40 سیکل

پس از الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز 1/5٪، باندهای 330 bp و 900bp مشاهده گردید. باند های 330bp نمایانگر مثبت بودن نمونه ها (MT+) و باندهای 900 bp نمایانگر منفی بودن نمونه ها جهت تکثیر ناحیه 81bp ژن *rpoB* به مورد بهره برداری جهت PCR قرار گرفت (جدول 1) پرایمر به کار رفته به صورت زیر می باشد که یک ناحیه

جدول 1- توالی پرایمر به کار رفته جهت تکثیر ناحیه 81bp ژن rpoB.

توالی پرایمر	نوع پرایمر
5´- TACGGTCGGCGAGCTGATCC-3´	F
5´- TACGGCG TTTCGA TGAACC-3´	R

411 bp از ژن *rpoB* را تکثیر می نماید. از غلظت 25 پیکومول/میکرولیتر این پرایمر جهت انجام PCR استفاده گردید. محتویات هر میکروتیوب: 36/5 µl بافر PCR، یک میکرو لیتر از مخلوط 10 میلی مولا dNTP، 0/5میلی مولار آنزیم Taq پلیمر از، از هر پرایمر 25 پیکو مولی ، 1µl DNA, 10µl استخراج شده نمونه بود. برنامه زمانی این PCR به صورت زیر است:

الف) دمای 94°c، 5 دقیقه

ب) دمای 94 °c، 1دقیقه

ج) دمای 57°c، 1دقیقه

د) دمای 72°c، 1دقیقه

ه) تکرار مراحل ب- د به میزان 42 سیکل

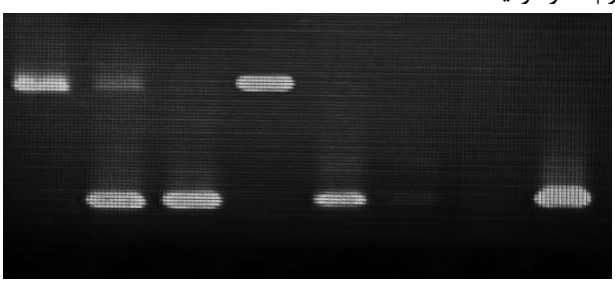
و) دمای 72°c، 1دقیقه

پس از الکتروفورز روی ژل آگارز 1/5٪ نمونه هایی که باند قوی داشتند، جهت توالی یابی به شرکت MACROGEN کره فرستاده شدند. نتایج توالی یابی توسط برنامه DNAMAN آنالیز گردید.

یافته ها

پس از رنگ آمیزی لام های 65 نمونه اولیه ای که از بیماران مبتلا به سل گرفته شده بود (که به 3-5 ماه درمان یا بیشتر با داروهای ضد سلی پاسخ مطلوبی نداده بودند و روند بهبودی را طی ننموده بودند) با روش زیل نلسون و مشاهده آن ها با میکروسکوپ نوری، مشاهده شد که از میان 65 نمونه، 6 نمونه فاقد باسیل های قرمزرنگ مایکوباکتریوم بودند. پس از انجام تست آنتی بیوگرام، 35 نمونه مقاومت به داروی ریفامپیسین و 30 نمونه حساسیت به داروی ریفامپیسین نشان دادند. از میان 35 نمونه مقاوم به ریفامپیسین 13 نمونه به ایزونیازید هم مقاوم بودند که MDR گزارش شدند و فراوانی آن ها در میان 65 بیمار مبتلا به سلی که تحت مطالعه قرار داشتند حدود 20% می باشد. 35 نمونه ای را که به داروی ریفامپیسین مقاوم بودند جهت اطمینان از این که مایکوباکتریوم توبرکلوزیس باشند، PCR تأییدی انجام شد.

از میان کل نمونه های مستخرج شده n =65 نمونه پس از الکتروفورز روی ژل آگارز باند 330bpرا نشان ندادند بلکه باند ۹۰۰ bp را نشان دادند و یا هیچ یک از این دو باند را نشان ندادند، در نتیجه PCR شان منفی گزارش شد. (شکل 1). این نشانگر آن است که این سویه ها از مایکوباکتریوم های آتیپیک بوده اند. مایکوباکتریوم های آتیپیک توسط این PCR اختصاصی تکثیر نمی یابند. که از میان 7 نمونه، 5 نمونه مرتبط با مقاومت به ریفامپیسین بود که از آمار 35 نمونه مختص به نمونه های ریفامپیسین مقاوم کسر گردید.

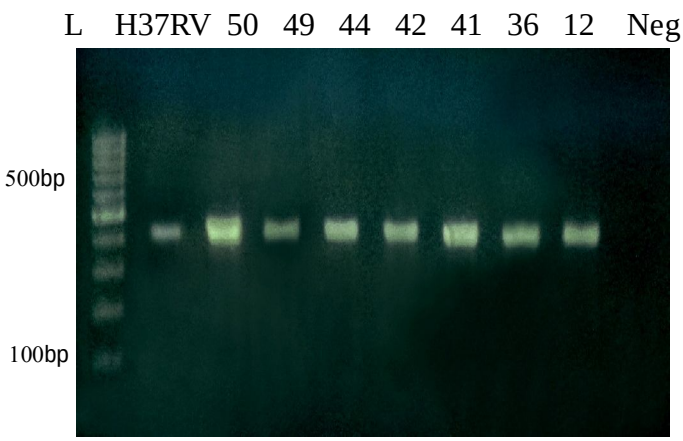


شکل1- نتایج الکتروفورز PCR تائیدی.

www.SID.ir

Archive of SID

35 نمونه که به داروی ریفامپیسین مقاوم بودند، با پرایمر های اختصاصی ژن *rpoB* تکثیرشدند. از H37RV که سوش استاندارد مایکوباکتریوم است به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید (شکل2).



شکل2- نتایج PCR نمونه های مقاوم به ریفامپیسین که قطعه 414 بازی بدست آمد.

پس از انجام PCR و الکتروفورز روی ژل آگارز، برای توالی یابی فرستاده شدند. پس از آن، نتایج حاصل از توالی یابی با برنامه DNAMAN آنالیز شدند. از میان 35 نمونه مقاوم به ریفامپیسین که توالی یابی شدند، 3 نمونه به علت توالی یابی نامطلوب از بررسی ها حذف گردید. بنابر این با احتساب کسر 5 نمونه آتیپیک و 3 نمونه نامطلوب، 27 نمونه آنالیز گردید.

از این 27 نمونه 6 نمونه (30٪) فاقد هرگونه جهش در ناحیه 81bp ژن *rpoB* بودند. 14 نمونه (70٪) نیز در مجموع دارای 38 جهش در این ناحیه بودند (جدول 2).

بحث

جهش در کدون های531 ($TCG \rightarrow TTG$)، 526 ($CAC \rightarrow TAC$) 516 و 511 به عنوان فراوان ترین جهش های ژن *rpoB* در سراسر جهان گزارش شده اند. در تحقیق حاضر فراوان ترین کدون های جهش یافته کدون های 531 (47%)، کدون 515 (15.7%) و510 (13%) می باشند. این امر به دلیل تفاوت جغرافیایی بین نمونه های مورد بررسی است. (Shin et al., 2005; Titov et al., 2006) از بین 18 جهش مشاهده شده در کدون 531، 15 جهش در اثر تغییر $TCG \rightarrow TTG (Ser \rightarrow Leu)$ و 3 جهش در نتیجه تغییر $TCG \rightarrow TGG (Ser \rightarrow Trp)$ حاصل شده است. در این تحقیق فراوانی جهش در کدون 531 (47%) می باشد. در مقایسه این فراوانی با اطلاعات داده شده توسط محققین دیگر مشاهده می گردد که فراوانی این کدون در مطالعات انجام شده در کشورهای مختلف متفاوت است. فراوانی کدون 531 در چندین کشور به این صورت گزارش شده است: هند - 53 ٪ (marin et al., 2004)، پرو - 68/1٪ (spindola et al., 2001)، ایتالیا - 63/3٪ (Quan et al., 2002)،

جدول 2- فراوانی تغییرات کدونی و اسیدهای آمینه تغییر یافته در ژن *rpoB* نمونه های

Codon	Frequency	Chang of amino acid	Chang of nucleotide	Isolates
Mutations 1				
531	9	Ser→Leu	TCG→TTG	8, 21, 23, 29, 44, 49, 55, 86, 103
531	3	Ser→Trp	TCG→TGG	6, 51, 111
515	2	Met→Ile	ATG→ATA	36, 43
490	1	Gln→His	CAG→CAT	12
476	1	Arg→Gly	CGG→GGG	41
Mutations 2				
531, 566	3	Ser→Leu, Gly→Arg	TCG→TTG, GGG→GGC	15, 24, 97
510, 526	4	Gln→ Glu, His→Asp	CAG→GAG, CAC→GAC	16, 32, 99, 118
510, 515	1	Gln→ Glu, Met→Ile	CAG→GAG, ATG→ATA	26
515, 531	3	Met→Ile, Ser→Leu	ATG→ATA, TCG→TTG	29, 49, 133
Non Mutation				
-	6	-	-	1, 5, 34, 39, 42, 50

www.SID.ir

Archive of SID

فرانسه و برزیل -31/2٪ (Telenti et al., 1997)، بلاروس- 29/5٪ (Zakerbostanabad et al., 2008)، چین و کشور های آسیایی- 53/3٪، ژاپن - 35٪ (pozzi et al., 1999)، در مطالعه ای نیز که روی نمونه های کشور ایران انجام شده بود فراوانی جهش در این کدون 47/6٪ گزارش شد و در مطالعه دیگری که روی نمونه های شهر زابل انجام گرفت، فراوانی 26٪ گزارش گردید (Zakerbostanabad et al., 2008b). در این تحقیق نوع جهش های مشاهده شده در کدون 531 به صورت TCG →TTG,TGG می باشد. در مطالعات انجام شده در سایر کشورها جهش های این کدون ها متفاوت بوده، که گزارش نشده است. و در مطالعاتی که روی نمونه های کشورمان صورت گرفت جهش های زیر در این کدون دیده شده است: TCG→TTG ,TTC و TCG →TTG که دارای جهش دوبل در این کدون می باشد (Zakerbostanabad et al., 2008a-b). لازم به ذکر است که در تحقیق حاضر هیچ جهش دوبلی در یک کدون مشاهده نشد. در گزارشات متعددی جهش در کدون های 531 و 526 را با دوز بالای مقاومت به ریفامپیسین مرتبط دانسته اند [1] (MIC > 64 ? gml) (Doustar et al., 2008; Pozzi et al., 1999;Ramasoota et al ., 2003; Zaker bostanabad et al., 2008b) *rpoB* در سال 2004، مطالعه ای روی موقعیت چند اسید آمینه در ژن و ارتباط آن ها با مقاومت به دوز بالای داروی ریفامپیسین انجام گرفت. و رابطه آن با *rpoB* توالی اسیدآمینه های کدون های 511-523 ژن از کشورهای MT های ریفامپیسین برای نمونه های مختلف MIC ژاپن و نیویورک مورد بررسی قرار گرفت. این مطالعه نقش کدون های 531 و 526 در ایجاد مقاومت بالا به داروی ریفامپیسین را مشخص نمود نمونه هایی که دارای جهش در کدون 531 بودند دارای مقاومت بیشتر تا MIC 100 برابر داروی ریفامپیسین و نمونه هایی که دارای جهش در کدون 526 بودند، دارای مقاومت تا MIC ی 345 برابر داروی ریفامپیسین بودند (Deepa et al., 2005). در میان نمونه های تحت مطالعه ما 4 نمونه دارای مقاومت بالا به داروی ریفامپیسین بودندکه عبارتند از: نمونه شماره 6 با مقاومت gml ? 400، نمونه 36 با مقاومت gml ? 80، نمونه 44 با مقاومت gml ? 400 و نمونه 49 با مقاومت gml ? 320 که مقاومت بالابوده است. از میان این 4 نمونه، 3 نمونه دارای جهش در کدون 531 بودند. این نتیجه تائیدی بر گزارشات موجود مبنی بر ارتباط مقاومت بالا به داروی ریفامپیسین با جهش در کدون 531 می باشد. در مقالات بسیار محدودی جهش در کدون 515 ژن rpoB گزارش شده است. از جمله این مقالات، گزارشی است که جهشی در کدون 515 را با فراوانی 1/8٪ گزارش نموده است (mani et al., 2001). در تحقیق دیگری که در ژاپن صورت گرفته است جهش در این کدون ATG →GTG را با فراوانی 5٪ گزارش نموده اند شده است (Pozzi et al., 1999). در 4 نمونه (15/7٪) از نمونه های مقاوم به ریفامپیسین مورد مطالعه در تحقیق حاضر، جهش ATA → GTA در کدون 515 که موجب جایگزینی اسید آمینه ایزولوسین با متیونین MET → IIE می شود، مشاهده گردید. این جهش تا کنون در تحقیقات مشابه گزارش نشده بود. در عین حال این جهش پس از کدون 531 (47٪) دارای بالاترین فراوانی جهش در نمونه های این تحقیق می باشد. در این میان نکته حائز اهمیت وجود این جهش در دو نمونه از 4 نمونه دارای مقاومت بالا به ریفامپیسین (نمونه های 49و 36) می باشد. احتمالاً وقوع جهش در این کدون نیز می تواند در ایجاد مقاومت بالا نسبت به داروی ریفامپیسین موثر باشد. در 13٪ نمونه ها جهش در کدون GLN →GLU 510 مشاهده گردید که این جهش منجر به تغییر می گردد. به طور کلی وقوع جهش در کدون GLN → GLU 510 بسیار نادر گزارش شده است و در بسیاری از کشورها نیز چنین جهشی رویت نشده است (cummings et al., 2004; Dhno et al.,1996). از جمله کشور هایی که این جهش را گزارش نموده اند می توان به موارد زیر اشاره نمود: در بلاروس جهش در این کدون با فراوانی 12/5٪ گزارش شده است که دارای سه نوع جهش می باشد CAG → GAG ,TAG AAG, که موجب تغییر اسید آمینه ها GH→GLU, STOP,LYS به صورت می گردند (Zakerbostanabad et al., 2008a). در هند و روسیه جهش (CAG → CAT)، GLN→HIS و در لیتوانی و هلند جهش (CAG → GAG) در کدون 510 گزارش شده است. در تحقیقی که روی نمونه های زابل انجام گرفته است فراوانی 24٪ برای وقوع حذف در کدون 510 گزارش شد (CAG → -AG). در نمونه های ما در این ناحیه حذفی مشاهده نگردید. فراوانی نسبتاً بالایی که برای جهش در این کدون در نمونه های ایرانی گزارش شده است می تواند تائیدی بر فراوانی این الل در ایران نسبت به سایر کشور ها باشد (Cummings et al., 2004; Dhno et al.,1996 Zakerbostanabad et al., 2008b; Mikhailovich et al., 2001). درمطالعات انجام شده در سایر نقاط جهان کدون 526 را یکی از فراوان ترین کدون های جهش یافته در این ژن گزارش نموده اندکه از آن جمله می توان به فراوانی های گزارش شده زیر اشاره نمود:

1- Minimum Inhibitor Concentration

www.SID.ir

Archive of SID

چین ۱۷/۶٪ (Kim et al., 2006)، فرانسه -۱۸/۷٪ و برزیل -۱۱/۱٪ (Telenti et al., 1997)، در روسیه -۷/۷٪ (mikhailovich et al., 2001)، ایتالیا -29/7٪ (Qian et al.,2002)، ژاپن -۳۵٪ (Pozzi et al., 1999) و پرو- ۲۳/۴٪ (Spindola et al., 2001). ۱۰٪ از نمونه های مقاوم به ریفامپیسین در این تحقیق دارای جهش در کدون 526 بودند. در مطالعه دیگری که در این زمینه روی نمونه های ایرانی انجام شده است، فراوانی این جهش 16/6٪ و در نمونه های شهر زابل 48٪ گزارش شده است (Zakerbostanabad et al., 2008). نوع جهش هایی که در کشورهای دیگر در کدون 526 گزارش شده است به شرح زیر می باشد: در هند، در کره، چین و ژاپن و در روسیه و در تایوان. در نمونه ها شهر زابل جهش ها به صورت گزارش شده اند. جهشی را که در این تحقیق در این کدون مشاهده شده است، در نمونه های شهر زابل گزارش نشده است (Mccammon et al ., 2005; Mohammad et al ., 2006; Shin et al., 2005). فراوانی جهش در نمونه های ایتالیایی، 40/1٪ و در نمونه های یونان 17/6٪ گزارش شده است. در کل جهش در کدون 526 از فراوان ترین جهش های گزارش شده در جهان است ولی در نمونه های شهر تهران این فراوانی بسیار پایین تر از سایر نقاط دیده شده است. در این میان هیچ جهشی در کدون 511 که یکی از فراوان ترین جهش ها در سطح جهان است، مشاهده نگردید. در حالی که در نمونه های ما در کدون های 566 ، 476 و 490 جهش هایی مشاهده گردید، که خارج از منطقه 81bp ژن *rpoB* است. در مطالعه ای که در تایلند صورت گرفت 34٪ نمونه ها دارای جهش در دو جایگاه، ۱۳٪ در 3 جایگاه، 3٪ در 5 جایگاه و1٪ نمونه ها دارای جهش در 6 جایگاه بودند (Ratan et al., 1998). در میان 14 نمونه مورد مطالعه ما ، 6 نمونه دارای جهش های دوبل بودند که بر این اساس فراوانی جهش های دوبل در میان نمونه های این تحقیق 46/15٪ می باشد. در حالی که در گزارشات قبلی انجام شده در ایران فراوانی جهش های دوبل 32٪ گزارش شده است (Zakerbostanabad et al., 2008). این فراوانی های گزارش شده از ایران می تواند نشانگر بالا بودن فراوانی جهش های دوبل در سویه های ایرانی باشد که در مقایسه با سایر مطالعات دارای فراوانی بسیار بالاتری است (Huny et al., 2000; Mccamman et al., 2005 Ramasoota et al., 2003; cummings et al., 2004) در اکثر مطالعاتی که روی ژن *rpoB*، جهت بررسی جهش های عامل مقاومت به داروی ریفامپیسین، صورت می گیرد جهش های مختلف و نسبتاً فراوانی در کدون های مختلف ناحیه 81bp این ژن دیده می شود، ولی در موارد معدودی نیز نمونه هایی گزارش شده اند که فاقد هر گونه جهش در این ناحیه از ژن می باشند. از جمله این گزارشات می توان به مطالعات Bobadilla-del-Valle M در سال 2001 اشاره نمودکه در 11 نمونه خود هیچ جهشی مشاهده ننمود.

در مطالعه دیگری که توسط Edwards KJ در سال 2001 صورت گرفت نیز یک نمونه فاقد جهش مشاهده گردید. در مطالعات Ohno H نیز تعدادی نمونه فاقد جهش گزارش شده است .در تحقیقی در تایلند 7٪ نمونه ها فاقد جهش بودند. در مطالعات Mani C و همکارانش در هند نیز یک نمونه فاقد جهش گزارش گردید. (Marin et al., 2004)، وجود چنین نمونه هایی بیانگر آن است که علاوه بر وقوع جهش، مکانیسم های دیگری نیز در ایجاد مقاومت به دارو نقش دارند.در عین حال این فرضیه را تقویت می نماید که علاوه بر ژن rpoB یک یا چند ژن دیگر نیز در ایجاد مقاومت نسبت به داروی ریفامپیسین دخیل می باشند و ممکن است وقوع چند جهش در ژن های مختلف دارای اثر ترکیبی در ایجاد مقاومت به این دارو باشند.

تشکر و قدردانی

از تمامی همکاران آزمایشگاه مسعود تهران، آزمایشگاه ضیا ظریفی و کارشناسان دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران پزشکی تشکر می نمائیم.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1- Bakonyte DA, Baranauskaite Cicenaite J, Sosnovskaja A, Stakenas P. Mutations in the *rpoB* gene of rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from Lithuania. Int Tuber lung dis, 2005; 9: 936-8.

2- Bobadilla-del-Valle M, Arenas-Huertero C, Vargas Alarcon G, Kato-Maeda M, Small PM, Couary P, Ruiz -Palacios GM, Sifuentes -Osornio. rpoB Gene Mutations in Rifampin Resistant Mycobacterium tuberculosis Identified by Polymerase Chain Reaction Single-Stranded Conformational Polymorphism. J Emerging Infect Dis, 2001; 7: 1010 -13.

3- Cummings MP, Segal MR. Few amino acid positions in rpoB are associated with most of the rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis. BMC Bioinformatics, 2004; 5: 137.

4- Deepa P, Therese KL, Madhavan HND etection and Characterization of mutations in rifampicin resistant mycobacterium tuberculosis clinical isolates by DNA sequencing. Indian J Tuberc, 2005; 52: 132-6

5- Doustdar F, Khosravi AD, Farnia P, Bahrmand AR, Masjedi MR ,Velayati AA. Mutations in rpoB Gene and Genotypes of Rifampin Resistant Mycobacterium Tuberculosis solates in Iran. Tanaffos, 2008; 7(2): 11-17

6- Fan XY, Hu ZY ,Xu FH , Yan ZQ, Guo SQ , Li ZM .Rapid detection of rpoB gene mutations in rifampin -resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in Shanghai by using the amplification refractory mutation system. J Clin Microbiol, 2003; 41: 993 -7

7- Hirano K, Abe C, Takahashi M .Mutations in the rpoB gene of rifampicin- resistant Mycobacterium tuberculosis strains isolated mostly in Asian countries and theirrapid detection by line probe assay. J ClinMicrobial, 1999; 37: 2663 -6

8- Huang H, Jin QW, Ma Y, Chen X, Zhuangz.Y. Characterization of *rpoB* mutations inrifampicin-resistant 9- Mycobacterium tuberculosis isolated in China. Tuberculosis, 2000; 82: 79 -83

9- Isfahani BN, Tavakoli A,Salehi M, Tazhibi M .Detection of rifampicin resistance patterns in Mycobacterium tuberculosis strains isolated in Iran by polymerase chain reaction -single-strand conformation polymorphism and direct sequencing methods. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2006; 101: 597 -602

10- Jun L,Shan J, Song Y, Zongchang H .Sequence analysis on drug resistant *rpoB* gene of Mycobacterium tuberculosis L -form of isolated from pneumoconiosis workers. J Med Collrge PLA, 2009; 24: 223 -227

11- Kim BJ, Hong SK, Lee KH, Yun YJ. Differential identification of Mycobacterium tuberculosis complex and nontuberculous mycobacteria by duplex PCR assay using the RNA polymerase gene(*rpoB*). J Clin Microbiol, 2004; 42: 4204 -4208

12- Ma X, Wang H, Deng Y, Liu Z, Xu Y, Pan X, James M. *rpoB* Gene Mutations and Molecular Characterization of Rifampin-Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolates from Shandong Province, China J Clin Microbiol , 2006; 44: 0095 -1137

13- Mani C, Selvakumar N, Narayanan S, Narayanan PR. Mutations in the *rpoB* gene of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from India. J Clin Microbiol, 2001; 39: 2987 –90

14- Marin M, Viedma DG, Ruiz-Serrano MJ, Bouza E. Rapid Direct Detection of Multiple Rifampicin and

www.SID.ir

Archive of SID

Isoniazid Resistance Mutations in Mycobacterium tuberculosis in Respiratory Samples by Real -Time PCR. Antimicrobiol Agents and Chemotherapy, 2004; 48: 4293 -300

15-McCammon M, John T, Gillette S, Derek P, Srinvas T, Ramaswamy V,Graviss EA, Kreiswirth BN, Vijg J, Quitugua TN. Detection of *rpoB* Mutation Associated with rifampicin Resistance in Mycobacterium tuberculosis Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. Antimicrobiol Agents and Chemothrapy, 2005; 49: 2200 -9

16- Mikhailovich V, Lapa S, Gryadunov D, Sobolev A, Strizhkov B, Chernyh N et al. Identification of Rifampicin-Resistant Mycobacterium tuberculosis Strains by Hybridization, PCR and Ligase Detection Reaction on Oligonucleotide Microchips. J Clin Microbiol, 2001; 39: 2531 - 40

17- Mohammad HN, Sadeghian A, Naderinasab M, Ziaee M . Prevalence of primary drug resistant Mycobacterium tuberculosis in Mashhad, Iran. Indian J Med Res, 2006; 124: 77 -80

18- Ohno H, Koga H, Kohno S, Tashiro T, Hara K. Relationship between rifampin MICs for and *rpoB* mutations of Mycobacterium tuberculosis strains isolated in Japan. Antimicrobiol. Agents Chemother, 1996; 40: 1053 -6

19- Pozzi G, Meloni M, Iona E, Orro G, Thorensen OF, Ricci, ML Oggioni, MR FL, Orefici G. *rpoB* mutations in multi drug resistant strains of Mycobacterium tuberculosis isolated in Italy. J Clin Microbiol, 1999; 37: 1197 -9

20- Qian L, Abe C, Lin TP, Yu M, Cho S, Wang S, Douglas JT. *rpoB* Genotypes of Mycobacterium tuberculosis Beijing Family Isolates from East Asian Countries. J Clin Microbiol, 2002; 40: 1091 -3

21- Ramasoota P, Phatihattakorn W, Pransujarit V, Boonyasopun J. Mutations in the *rpoB* gene of rifampicin resistant mycobacterium tuberculosis strains from Thiland and its evolutionary implications. South-east aslan J trop med public health, 2003; 37

22- Rattan A, Kalia A, Ahmad N. Multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis: molecular perspectives. Emerg Inf Dis, 1998; 4: 195 –209

23- Sajduda A, Anna A, Popławska M, Augustynowicz-Kopec E, Zwolska Z, Niemann S, Dziadek J, Hillemann D. Molecular Characterization of Rifampicin and Isoniazid-Resistant Mycobacterium tuberculosis Strains Isolated in Poland. J Clin Microbiol, 2004; 42: 2425 -31

24- Shin SS, Naroditskaya V, Sloutsky A, Werner B, Timperi R, Bayona J, Farmer PE, Becerra MC. *rpoB* Gene Mutations in Clinical Isolates of Multidrug -Resistant Mycobacterium tuberculosis in Northern Lima, Peru. Microbial drug resistance, 2005; 11

25- Spindola de Miranda S, Kritski AL, Filliol I, Mabilat C, Panteix DE. Mutation in the *rpoB* gene of Rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis Strains Isolated in Brezil and France. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janerio, 2001; 96: 247 -50

www.SID.ir

Archive of SID

26- Telenti A, Honore N, Brenasconi C, March J, Takiff HE, Cole ST. Genotyping assessment of isoniazid and rifampicin resistance in Mycobacterium tuberculosis: a blind study at reference laboratory level. J. Clin. Microbiol, 1997; 35: 719-23

27- Titov LP, Zaker Bostanabad S, Slizen V ,Surkova LK, Taghikhani M, Bahrmand R. Molecular characterization of *rpoB* gene mutations in rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from tuberculosis patients in Belarus. Biotechnol J, 2006; 24: 1447–52

28- Zakerbostanabad S, Bahrmand AR , Titov LP, Tagikhani M. Identification of mutations in the *rpoB* encoding the RNA polymerase beta subunit in rifampicine-resistant Mycobacterium tuberculosis strains from Iran. Tüberküloz ve Toraks Dergisi, 2007; 55(4): 370-377

29- Zakerbostanabad S, Noghanian M, Graviss AE,Bahrmand AR, PLT, Nojoumi A. Multiple mutations in the *rpoB* gene of Mycobacterium tuberculosis isolates correlate with high level of resistance to rifampicin in patients with active pulmonary tuberculosis in Afghanistan border of Iran. African Journal of Microbiology Research, 2008; 2: 095-102

30- Zakerbostanabad S, Titov LP, Bahrmand AR .Frequency and Molecular Characterization of Isoniazid Resistance in katG Region of M.D.R isolates from tuberculosis patients in southern endemic border of Iran Infection Genetics and Evolution, 2008; 1: 11 -9

31- Zakerbostanabad S, Titov LP, Bahrmand AR, Tagikhani M. Mutability of stability genes to isoniazid and rifampicin in M. tuberculosis of patients. Doklady of the national academy of sciences of Belarus, 2006; 50: 84-9

www.SID.ir