Archive of SID

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۱، شماره ۱، بهار ۹۰، صفحات ۲۴ تا ۳۱

Original Article

# مطالعه و شناسایی پلی‌مورفیسم ژن rpoB (مارکر مقاومت به داروی ریفامپین) در سوش‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به دارو در نمونه‌های جدا شده از بیماران شهر تهران

فهیمه استادزاده[۱]، مهرداد هاشمی[۲]، سعید ذاکر بستان آباد[۳]، محمد کریم رحیمی[۳]، سجّاد نوری[۱]، مصطفی قلمی[۴]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران
[۲] استادیار، دکترای ژنتیک مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران
[۳] استادیار، دکترای میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران
[۴] کارشناس گروه میکروبیولوژی، آزمایشگاه مسعود

## چکیده

**سابقه و هدف:** *باکتری‌های مقاوم به داروهای ضد سلی از عوامل مهم مرگ مبتلایان به سل است. مقاومت مایکوباکتریوم‌ها به ریفامپین در اثر جهش در ناحیه ۸۱ bp ژن rpoB است. این تحقیق با هدف شناسایی نوع و فراوانی جهش‌های این ناحیه در نمونه‌های شهر تهران صورت گرفت.*

**روش بررسی:** *در این مطالعه تجربی، از ۵۰ بیمار مبتلا به سل که پس از ۶ ماه درمان با داروهای ضد سلی بهبود نیافته بودند، نمونه خلط گرفته شد. پس از کشت نمونه‌ها در محیط کشت لون اشتاین جانسون و انجام تست‌های حساسیت، نمونه‌های مقاوم به ریفامپین شناسایی شدند و ژن rpoB شان تکثیر و توالی یابی گردید. نتایج توالی‌یابی توسط برنامه DNAMAN آنالیز گردید.*

**یافته‌ها:** *۱۴ نمونه (۷۰ درصد) دارای جهش در ناحیه ۸۱ bp ژن rpoB بودند. ۶ نمونه فاقد هرگونه جهش در این ناحیه بودند. فراوان‌ترین جهش‌ها در رمزهای ۵۳۱ (۴۰ درصد) و ۵۱۵ (۲۰ درصد) مشاهده گردید. جهش جدیدی نیز در رمز ۵۱۵ مشاهده گردید.*

**نتیجه‌گیری:** *وجود جهش جدید در رمز ۵۱۵ می‌تواند نشانگر الگوی متفاوت جهش در بیماران شهر تهران باشد. وجود ۶ نمونه فاقد جهش در این ناحیه این نظریه را قوّت می‌بخشد که مقاومت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نسبت به داروی ریفامپین می‌تواند علاوه بر عوامل ژنتیکی دارای عوامل غیرژنتیکی نیز باشد و یا ژن‌های دیگری در خارج از ناحیه ۸۱ bp نیز در ایجاد مقاومت به ریفامپین نقش داشته باشند.*

**واژگان کلیدی:** *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس، مقاومت دارویی، جهش ژن rpoB، ریفامپین.*

## مقدمه

بیماری سل یکی از بیماری‌های مهلک در جهان است که در ترتیب و توالی جهانی بیماری‌ها در سال ۱۹۹۰ در رده هفتم قرار داشته و پیش‌بینی می‌شود در سال ۲۰۲۰ هم، بر اساس شاخص DALY، در رده هفتم جهانی بیماری‌ها باقی بماند. بر اساس برآورد 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. سالانه حدود ۳-۲ میلیون نفر بر اثر بیماری سل جان خود را از دست می‌دهند (۱). عامل این بیماری، باسیل‌مایکوباکتریوم توبرکلوزیس(MT) است که در اثر استنشاق هوای آلوده به این باسیل وارد ریه‌های فرد شده و باعث ایجاد بیماری سل می‌گردد.

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحدعلوم و تحقیقات، فهیمه استادزاده
(email: fahimeh84@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۱۲/۱۸
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۹/٤/۲۳

www.SID.ir

Archive of SID


طبق ارزیابی سازمان جهانی بهداشت، هر سال تقریباً ۴۹۰ هزار مورد جدید در سراسر جهان به سل مقاوم به چند دارو (MDR) مبتلا می‌شوند (۱). سل MDR نوعی از بیماری سل است که در آن مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (MT)های عامل بیماری حداقل به دو داروی ریفامپین و ایزونیازید مقاوم باشند. ریفامپین به همراه ایزونیازید دو دارویی هستند که با هم بیش از ۹۹ درصد باسیل‌های سل را در دو ماه اول درمان از بین می‌برند (۲). بدین ترتیب، درمان سل MDR با مشکلات زیادی همراه است و شناسایی بیماران مبتلا به سل MDR در تسریع روند درمان اهمیت بالایی دارد.

متناظر با شیوع بیماری سل، مقاومت به داروی ریفامپین هم افزایش می‌یابد (۳). شناسایی سریع مقاومت به ریفامپین از اهمیت بالایی برخوردار است، زیرا مقاومت به ریفامپین مارکری برای سل MDR می‌باشد که مانع عظیمی در درمان بیماری سل (TB) است (۴، ۵). امروزه چندین روش سریع فنوتیپی برای تشخیص سل وجود دارد، ولی آزمایش‌های ژنوتیپی که اساس آنها بر شناسایی جهش‌هایی است که باعث مقاومت به داروی ریفامپین می‌شوند، از سریع‌ترین روش‌هایی است که امروزه وجود دارد.

امروزه مطالعات حاصل از توالی یابی DNA ثابت نموده است که در بیش از ۹۵ درصد نمونه‌های مقاوم به ریفامپین ، جهش در ژن رمز کننده زیر واحد β آنزیم RNA پلیمراز (rpoB ) به ویژه جهش‌های واقع شده در یک ناحیه ۸۱bp از ژن rpoB، عامل ایجاد مقاومت نسبت به داروی ریفامپین می‌باشد (۶، ۷). داروی ریفامپین به طور اختصاصی با زیر واحد β آنزیم RNA پلیمراز واکنش داده و رونویسی را مهار می‌کند. وقوع جهش در ژن rpoB باعث ایجاد تغییرات شکلی در زیر واحد β آنزیم RNA پلیمراز می‌شود که حاصل آن اتصال ناقص دارو به این زیر واحد و متعاقباً ایجاد مقاومت نسبت به این دارو می‌باشد.

بررسی‌هایی که در کشورهای مختلف بر روی انواع جهش‌های موجود در ناحیه ۸۱bp ژن rpoB انجام شده نشان داده است که فراوانی جهش‌ها در مناطق جغرافیایی مختلف متفاوت می‌باشد (۴، ۵). تاکنون فراوان‌ترین رمزهای جهش یافته در جهان، رمزهای ۵۳۱، ۵۲۶، ۵۱۶ و۵۱۱ بوده‌اند (۶، ۸، ۹). این تحقیق با هدف بررسی فراوانی جهش‌های موجود در ناحیه ۸۱ bp ژن rpoB در نمونه‌های حاصل از بیماران شهر تهران و مقایسه فراوانی آنها با فراوانی‌های گزارش شده از مناطق جغرافیایی دیگر و شناسایی جهش‌های شایع شهر تهران صورت گرفت.

امید است این تحقیقات راه را جهت پیشرفت سریع‌تر طراحی کیت‌های تشخیص سریع بیماری سل و نیز طراحی داروهای جدید هموارتر نماید.

## مواد و روشها

در این مطالعه تجربی با همکاری آزمایشگاه مسعود، از ۵۰ بیمار مبتلا به سل که پس از ۵-۳ ماه درمان با داروهای ضدسلی بهبودی حاصل ننموده بودند و جهت بررسی مقاومت دارویی به این آزمایشگاه مراجعه نموده بودند، پس از اخذ رضایت، نمونه‌گیری از خلط انجام شد.

پس از دکانتامیناسیون نمونه‌ها به روش پتروف، از هر نمونه دکانتامینه شده لام تهیه گردید و لام‌ها پس از رنگ‌آمیزی به روش زیل‌نلسون با میکروسکوپ نوری بررسی گردیدند. نمونه‌هایی که دارای باسیل‌های قرمز رنگ مقاوم به اسید بودند، مثبت گزارش شده و هر نمونه در دو لوله لون اشتاین جانسون کشت داده شد. پس از ۸-۶ هفته، محیط‌های کشت از لحاظ وجود کلنی‌های کرم رنگ و گل کلمی شکل مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (MT) بررسی شدند و پس از تهیه لام از این کلنی‌ها و رنگ‌آمیزی به روش زیل نلسون، مجدداً لام‌ها از لحاظ وجود باسیل های قرمز رنگ مقاوم به اسید بررسی شدند. نمونه‌های حاوی باسیل جهت انجام تست حساسیت دارویی در محیط‌های کشت لون اشتاین جانسون حاوی دارو کشت داده شدند. پس از ۶-۴ هفته محیط‌ها از لحاظ رشد باکتری‌ها بررسی گردیدند. نمونه‌هایی که در محیط حاوی ریفامپین رشد نموده بودند و تعداد کلنی‌هایشان بیش از ۱ درصد تعداد کلنی‌های لوله‌های شاهد بود، نمونه‌های مقاوم به ریفامپین گزارش شدند. DNA نمونه‌های مقاوم به ریفامپین توسط کیت استخراج DNA مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با مارک DNA Technology، به روش رسوب‌دهی DNA استخراج گردید (۱۰). در این روش، قدری از کلنی‌های گل کلمی شکل MT در ۱۰۰ میکرولیتر بافر حل کننده حل گردید. سپس باسیل‌ها توسط ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده، لیز شده و DNA توسط ۴۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانل رسوب داده شد. رسوب حاصل توسط ۵۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰ درصد (شستشوی اول) و ۳۰۰ میکرولیتر استون (شستشوی دوم) شستشو داده شد. سپس رسوب DNA در ۵۰ میکرولیتر بافر حل کننده، حل شده و برای انجام PCR تأییدی مورد استفاده قرار گرفت (۱۰).

www.SID.ir

Archive of SID


جهت اطمینان از توبرکلوزیس بودن مایکوباکتریوم‌های مورد نظر، PCR تأییدی انجام شد. این PCR توسط کیت PCR تأییدی شرکت DNA Technology صورت گرفت. طبق پروتکل، پس از افزودن ۵ میکرولیتر ازDNA نمونه مورد نظر به میکروتیوب‌های آماده کیت، PCR تأییدی طبق برنامه زمانی زیرانجام شد: الف) دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱دقیقه و ۳۰ ثانیه، ب) دما ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه، پ) دمای ۶۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ت) دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ث) تکرار مراحل ب و پ به میزان ۵ سیکل، ج) دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، چ) دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، ح) دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، خ) تکرار مراحل ج- ح به میزان ۴۰ سیکل. پس از الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز۱/۵ درصد، باندهای bp ۳۳۰ و ۹۰۰bp مشاهده گردید. طبق پروتکل این کیت، باندهای ۳۳۰bp نمایانگر مثبت بودن نمونه‌ها ($MT^+$) و باندهای ۹۰۰bp نمایانگر منفی بودن نمونه‌ها ($MT^-$) بود. نمونه‌های مثبت جهت تکثیر ناحیه ۸۱bp ژن rpoB، PCR گردیدند. توالی پرایمربه کار رفته (۱۱) که یک ناحیه bp ۴۱۱ از ژن rpoB را تکثیر می‌نماید، در جدول ۱ نشان داده شده است.

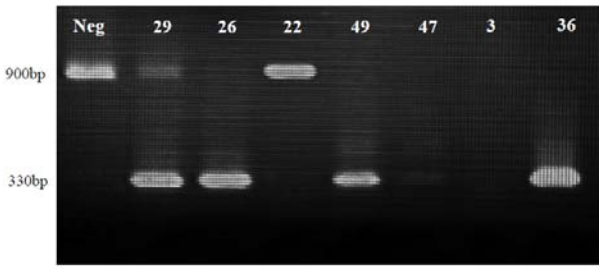
**جدول ۱**- توالی پرایمر به کار رفته جهت تکثیر ناحیه ۸۱bp ژن rpoB

| توالی پرایمر | نوع پرایمر |
|---|---|
| 5'- TACGGTCGGCGAGCTGATCC-3' | Fw |
| 5'- TACGGCG TTTCGA TGAACC-3' | Rv |

از غلظت۲۵ پیکومول/ میکرولیتر این پرایمر جهت انجام PCR استفاده گردید. محتویات هر میکروتیوب از این قرار بود: ۳۶/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۱ میکرولیتر از مخلوط ۱۰ میلی‌مولار dNTP، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمراز، از هر پرایمر ۲۵ پیکومولی ۱ میکرولیتر، ۱۰ میکرولیتر DNA استخراج شده نمونه. برنامه زمانی این PCR به صورت زیر است: الف) دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۵ دقیقه، ب) دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱دقیقه، پ) دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد، ۱دقیقه، ت) دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۱دقیقه، ث) تکرار مراحل ب- ت به میزان ۴۲ سیکل، ج) دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۱دقیقه. پس از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، نمونه هایی که باند قوی داشتند، جهت توالی‌یابی به شرکت MACROGEN کره فرستاده شدند. نتایج توالی یابی توسط برنامه DNAMAN آنالیز گردیدند.

## یافته‌ها

پس از رنگ‌آمیزی لام‌های ۵۰ نمونه اولیه‌ای که از بیماران مبتلا به سل گرفته شده بود (به ۵-۳ 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 آنها با میکروسکوپ نوری مشاهده شد که از میان ۵۰ نمونه، ۳ نمونه فاقد باسیل‌های قرمزرنگ مایکوباکتریوم بودند. پس از انجام تست آنتی‌بیوگرام، ۲۵ نمونه (۵۰ درصد) مقاومت به داروی ریفامپین و ۲۵ نمونه (۵۰ درصد) حساسیت به داروی ریفامپین نشان دادند. از میان ۲۵ نمونه مقاوم به ریفامپین، ۱۳ نمونه به ایزونیازید هم مقاوم بودند که به عنوان MDR گزارش شدند و فراوانی آنها در میان ۵۰ بیمار مبتلا به سلی که تحت مطالعه قرار داشتند، حدود ۲۶ درصد گزارش شد. در ۲۵ نمونه‌ای که به داروی ریفامپین مقاوم بودند، جهت اطمینان از MT بودنشان با PCR تأییدی تکثیر شدند. از این میان، ۴ نمونه پس از الکتروفورز روی ژل آگارز باند bp ۳۳۰ را (که نشانگر $MT^+$ نمونه‌ها است) نشان ندادند، بلکه یا باند bp ۹۰۰ را نشان دادند و یا هیچ یک از این دو باند را نشان ندادند. در نتیجه PCR شان منفی گزارش شد که در شکل ۱ نشان داده شده است. در این شکل، نمونه‌های ۳۶، ۴۹، ۲۶ و ۲۹ دارای باند ۳۳۰bp ($MT^+$) و نمونه‌های ۳ و ۴۷ فاقد باند و نمونه ۲۲ دارای باند ۹۰۰bp بودند. ($MT^-$)Neg، کنترل منفی می‌باشد. نتایج منفی نشانگر آن است که این سویه‌ها ($MT^-$) از مایکوباکتریوم‌های آتیپیک بوده‌اند. مایکوباکتریوم‌های آتیپیک توسط این PCR اختصاصی تکثیر نمی‌یابند.



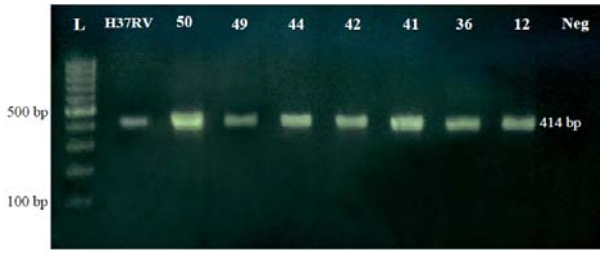

**شکل ۱**- نتایج الکتروفورز PCR تائیدی. Neg: کنترل منفی

۲۱نمونه‌ای که به داروی ریفامپین مقاوم بودند، با پرایمرهای اختصاصی ژن rpoB تکثیرشدند. از H37RV که سوش استاندارد مایکوباکتریوم است به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

www.SID.ir

Archive of SID






**شکل ۲**- نتایج PCR نمونه‌های مقاوم به ریفامپین با پرایمر اختصاصی. Neg: کنترل منفی؛ L: نردبان bp ۱۰۰.

پس از انجام PCR و الکتروفورز روی ژل آگارز، نمونه‌ها برای توالی‌یابی فرستاده شدند. پس از آن، نتایج حاصل از توالی یابی با برنامه DNAMAN آنالیز گردید. از میان ۲۱ نمونه مقاوم به ریفامپین که توالی‌یابی شدند، یک نمونه به علت توالی یابی نامطلوب و نبود زمان لازم برای توالی یابی مجدد آن از بررسی‌ها حذف گردید. بنابراین ۲۰ نمونه آنالیز گردید.از این ۲۰ نمونه، ۶ نمونه (۳۰ درصد) فاقد هرگونه جهش در ناحیه ۸۱bp ژن rpoB بودند. ۱۴ نمونه (۷۰ درصد) نیز دارای ۲۰ جهش در این ناحیه بودند (جدول ۲).

**جدول ۲**- فراوانی تغییرات نوکلئوتیدی و اسیدهای آمینه تغییر یافته در ژن rpoB نمونه‌های ۲۰ بیمار

| فراوانی جهش مربوطه | نوکلئوتید تغییر یافته | رمز و اسیدآمینه جهش یافته |
|---|---|---|
| ۷(۳۵)* | TCG→ TTG | 531 Ser→ Leu |
| ۱(۵) | TCG→ TGG | 531 Ser→ Trp |
| ۲(۱۰) | CAC→ GAC | 526 His→ Asp |
| ۴(۲۰) | ATG→ATA | 515 Met→ Ile |
| ۳(۱۵) | CAG→ GAG | 510 Gln→ Glu |
| ۱(۵) | GGG→ GGC | 566 Gly→ Arg |
| ۱(۵) | CAG→CAT | 490 Gln→ His |
| ۱(۵) | CGG→GGG | 476 Arg→ Gly |

* اعداد داخل پرانتز معرف درصد هستند.

## بحث

جهش در رمزهای ۵۳۱، ۵۲۶، ۵۱۶ و ۵۱۱ به عنوان فراوان‌ترین جهش‌های ژن rpoB در سراسر جهان گزارش شده‌اند (۶، ۸). در تحقیق حاضر فراوان‌ترین رمزهای جهش یافته رمزهای ۵۳۱ (۴۰ درصد) و ۵۱۵ (۲۰ درصد) بودند. این امر به دلیل تفاوت جغرافیایی بین نمونه های مورد بررسی است (۶، ۸، ۹، ۱۲).از ۸ جهش مشاهده شده در رمز ۵۳۱ ، ۷ جهش در اثر تغییر TCG→TTG (Ser→Leu) و یک جهش در نتیجه تغییر TCG→TGG (Ser→Trp) حاصل شده است. در این تحقیق فراوانی جهش در رمز ۵۳۱، ۴۰ درصد بود. مقایسه این فراوانی با یافته‌های محققین دیگر نشان می‌دهد که فراوانی این رمز در مطالعات انجام شده در کشورهای مختلف متفاوت است. فراوانی جهش در رمز ۵۳۱ در چندین کشور به این صورت گزارش شده است: هند ۵۳ درصد (۱۳)، پرو ۶۸/۱ درصد (۱۴)، ایتالیا ۶۳/۳ درصد (۱۵)، فرانسه و برزیل ۳۱/۲ درصد (۱۶)، بلاروس ۲۹/۵ درصد (۱۷)، چین ۴۶/۱ درصد (۱۸)، ۵۳/۸ درصد (۱۹)، ۶۰ درصد (۲۰) و ۵۱/۶ درصد (۲۱)، در کشورهای آسیایی ۵۳/۳ درصد (۲۲) و ژاپن ۳۵ درصد (۲۳). در مطالعه‌ای نیز که پیش از این روی نمون های کشور ایران انجام شده، فراوانی جهش در این رمز ۴۷/۶ درصد و در مطالعه دیگری که روی نمونه‌های شهر زابل انجام گرفته، فراوانی ۲۶ درصد گزارش شده است (۲۴). در این تحقیق نوع جهش‌های مشاهده شده در رمز ۵۳۱ به صورت TCG→TTG, TGG می‌باشد.در مطالعات انجام شده درسایر کشورها جهش‌های این رمزها به صورت زیر گزارش شده‌اند: در هند TCG→TTG, TGG، در روسیه TCG→TTG, CAG, TGT، و در چین ، کره، ژاپن و تایوان TCG→TTG (۵). در مطالعاتی که پیش از این روی نمونه‌های کشورمان صورت گرفته جهش‌های زیر در این رمز گزارش شده است: TCG→TTG, TTC که دارای جهش دوبل در این رمز می‌باشد (۵، ۲۴) و TCG→TTG (۲۵). لازم به ذکر است که در تحقیق حاضر هیچ جهش دوبلی در یک رمز مشاهده نشد. در گزارشات متعددی جهش در رمزهای ۵۳۱ و ۵۲۶ را با دوز بالای مقاومت به ریفامپین مرتبط دانسته‌اند (۱۴، ۱۸، ۲۳، ۲۴، ۲۶، ۲۷).

در سال ۲۰۰۴، مطالعه‌ای روی موقعیت چند اسید آمینه در ژن rpoB و ارتباط آنها با مقاومت به دوز بالای داروی ریفامپین انجام گرفت. توالی اسیدآمینه های رمزهای ۵۲۳-۵۱۱ ژنrpoB و رابطه آن با MICهای ریفامپین برای نمونه های مختلف MT از کشور ژاپن وشهر نیویورک مورد بررسی قرار گرفت. این مطالعه نقش رمزهای ۵۳۱ و ۵۲۶ در ایجاد مقاومت بالا به داروی ریفامپین را مشخص نمود. نمونه‌هایی که دارای جهش در رمز۵۳۱ بودند، دارای مقاومت بیشتر تا MIC ۱۰۰ برابر داروی ریفامپین و نمونه‌هایی که دارای جهش در رمز ۵۲۶ بودند، دارای مقاومت تا MIC ۳۴۵ برابر داروی

www.SID.ir

Archive of SID


ریفامپین بودند (۲۸).در میان نمونه‌های این تحقیق، ۴ نمونه دارای مقاومت بالا به داروی ریفامپین بودندکه عبارت بودند از: نمونه شماره ۶ با مقاومت ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، نمونه ۳۶ با مقاومت ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، نمونه ۴۴ با مقاومت ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و نمونه ۴۹ با مقاومت ۳۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر. از میان این ۴ نمونه ،۳ نمونه دارای جهش در رمز ۵۳۱ بودند. این نتیجه ممکن است تائیدی بر گزارشات موجود مبنی بر ارتباط مقاومت بالا به داروی ریفامپین با جهش در رمز ۵۳۱ باشد.

در مقالات بسیار معدودی جهش در رمز ۵۱۵ ژن rpoB گزارش شده است. از جمله این مقالات گزارشی است که جهشی در رمز ۵۱۵ را با فراوانی ۱/۸ درصد گزارش نموده است (۲۰). در تحقیق دیگری در ژاپن، جهش در این رمز را ATG→GTG با فراوانی ۵ درصد گزارش نمودند (۲۳). در ۴ نمونه (۲۰ درصد) از نمونه‌های مقاوم به ریفامپین مطالعه حاضر، جهش ATG→ATA در رمز ۵۱۵ که موجب جایگزینی اسید آمینه ایزولوسین با متیونین (Met→Ile) می‌شود، مشاهده گردید. این جهش تاکنون در تحقیقات مشابه گزارش نشده بود. در عین حال این جهش پس از رمز ۵۳۱ (۴۰ درصد) دارای بالاترین فراوانی جهش در نمونه‌های این تحقیق می‌باشد. این جهش در دو نمونه از ۴ نمونه دارای مقاومت بالا به ریفامپین (نمونه‌های ۴۹ و ۳۶) نیز دیده شد.

در ۱۵ درصد نمونه‌ها جهش در رمز ۵۱۰ (CAG→GAG) مشاهده گردید که این جهش منجر به تغییر Gln→Glu می‌گردد. به طور کلی وقوع جهش در رمز ۵۱۰ بسیار نادر گزارش شده است و در بسیاری از کشورها نیز چنین جهشی رویت نشده است (۲۹، ۳۰). از جمله کشورهایی که این جهش را گزارش نموده‌اند می‌توان به موارد زیر اشاره نمود. در بلاروس جهش در این رمز با فراوانی ۱۲/۵ درصد گزارش شده است که دارای سه نوع جهش می‌باشد ( CAG→GAG, TAG, AAG) که موجب تغییر اسید آمینه‌ها به صورت (Gln→Glu, Stop, Lys) می‌گردند (۱۷). در هند و روسیه (۱۷) جهش (CAG→CAT)، Gln→His ودر لیتوانی و هلند (۲۴،۵) جهش (CAG→GAG) در کدون ۵۱۰ گزارش شده است. در تحقیقی که روی نمونه‌های زابل (۲۴) انجام گرفته، فراوانی ۲۴ درصد برای وقوع حذف در کدون ۵۱۰ گزارش شده است (CAG→-AG). در نمونه‌های ما در این ناحیه حذفی مشاهده نگردید. فراوانی نسبتاً بالایی که برای جهش در این رمز در نمونه‌های ایرانی (۵، ۲۴، ۲۵، ۳۰) گزارش شده است، ممکن است تائیدی بر فراوانی این الل در ایران نسبت به سایر کشورها باشد.

در مطالعات انجام شده در سایر نقاط جهان رمز ۵۲۶ را یکی از فراوان‌ترین رمزهای جهش یافته در این ژن گزارش نموده‌اند که از آن جمله می‌توان به فراوانی‌های گزارش شده زیر اشاره نمود: چین ۱۷/۶ درصد (۱۸)، ۲۳/۱ درصد (۱۹)، ۳۲/۲۶ درصد (۲۱)، فرانسه ۱۸/۷ درصد، برزیل ۱۱/۱ درصد (۱۶)، روسیه ۷/۷ درصد (۱۱)، ایتالیا ۲۹/۷ درصد (۱۵)، ژاپن ۳۵ درصد (۲۳) و پرو ۲۳/۴ درصد (۱۴). ۱۰ درصد از نمونه‌های مقاوم به ریفامپین این تحقیق حاضر دارای جهش در رمز ۵۲۶ (CAC→GAC) بودند. در مطالعه دیگری که پیش از این روی نمونه‌های ایرانی انجام شده است، فراوانی این جهش ۱۶/۶ درصد (۵) و در نمونه‌های شهر زابل ۴۸درصد (۲۴) گزارش شده است. نوع جهش‌هایی که در کشورهای دیگر در رمز ۵۲۶ گزارش شده است، به شرح زیر می‌باشد: کره ، چین و ژاپن (۱۸، ۱۹، ۲۳، ۳۲) CAC→TAC، در روسیه (۱۱) CAC→CTC, GAC, CAA, CAG, TGG, AAC, CGC, CCC و در تایوان CAC→TAC, CGC (۲۵). در نمونه‌های شهر زابل جهش‌ها به صورت CAC→ACC, CGC, CAA, TTC, TAC گزارش شده‌اند. جهشی را که در این تحقیق در این رمز مشاهده شده است (CAC→GAC)، در نمونه‌های شهر زابل گزارش نشده است (۲۴). فراوانی جهش (CAC→GAC) در نمونه‌های ایتالیایی، ۴۰/۱ درصد (۳۱) و در نمونه‌های یونان ۱۷/۶درصد (۹) گزارش شده است. در کل، جهش در رمز ۵۲۶ از فراوان‌ترین جهش‌های گزارش شده در جهان است، ولی در نمونه‌های شهر تهران این جهش با فراوانی بسیار پایینی دیده شده است.

در تحقیق حاضر هیچ جهشی در رمز ۵۱۱ که یکی از فراوان‌ترین جهش ها در سطح جهان است، مشاهده نگردید. در حالی که در نمونه‌های ما در رمزهای ۵۶۶ (GGG→GGC) (Gly→Arg)، ۴۷۶ (CGG→GGG) (Arg→Gly) و ۴۹۰ (CAG→CAT) (Gln→His) جهش هایی مشاهده گردید که خارج از منطقه ۸۱bp ژن rpoB است.

در مطالعه‌ای که در تایلند صورت گرفت، ۳۴ درصد نمونه‌ها دارای جهش در دو جایگاه، ۱۳ درصد در ۳ جایگاه، ۳ درصد در ۵ جایگاه و ۱ درصد نمونه‌ها دارای جهش در ۶ جایگاه بودند (۲۲). در میان ۱۴ نمونه این تحقیق، ۶ نمونه دارای جهش‌های دوبل بودند که بر این اساس فراوانی جهش‌های دوبل در میان نمونه‌های این تحقیق ۴۶/۱۵ درصد می‌باشد. در حالی که در تحقیقات قبلی در ایران، فراوانی جهش‌های دوبل

www.SID.ir

Archive of SID


۳۲ درصد گزارش شده است (۵). در سایر کشورها جهش‌های دوبل با فراوانی پایینی گزارش شده‌اند (۲۷، ۲۹، ۳۰، ۳۳).

در اکثر مطالعاتی که روی ژن rpoB، جهت بررسی جهش‌های عامل مقاومت به داروی ریفامپین صورت گرفته، جهش‌های مختلف و نسبتاً فراوانی در رمزهای مختلف ناحیه ۸۱ bp این ژن دیده شده است. ولی در موارد معدودی نیز نمونه‌هایی گزارش شده‌اند که فاقد هرگونه جهش در این ناحیه از ژن می‌باشند. از جمله این گزارشات می‌توان به مطالعاتی در هند (۲۹) وژاپن (۲۳) اشاره نمود که در تعدادی از نمونه‌های مقاوم به داروی خود هیچ جهشی گزارش ننمودند. وجود چنین نمونه‌هایی بیانگر آن است که علاوه بر وقوع جهش، مکانیسم‌های دیگری نیز در ایجاد مقاومت به دارو نقش دارند. در عین حال این فرضیه را تقویت می‌نماید که علاوه بر ژن rpoB یک یا چند ژن دیگردر خارج از ناحیه ۸۱ bp این ژن نیز در ایجاد مقاومت نسبت به داروی ریفامپین دخیل می‌باشند. زیرا احتمال دارد که وقوع چند جهش در ژن‌های مختلف دارای اثر ترکیبی در ایجاد مقاومت به این دارو باشند. بدین جهت پیشنهاد می‌گردد تا در چنین نمونه‌هایی به بررسی جهش‌های موجود در دیگر ژن‌ها پرداخته شود و نتایج حاصل با جهش‌های موجود در خارج از ناحیه ۸۱bp ژن rpoB در نمونه‌های مقاوم دارای جهش، مقایسه گردد.

## تشکر و قدردانی

بدین وسیله از هیئت رئیسه آزمایشگاه مسعود که امکان انجام این تحقیق را فراهم نمودند و کادر بخش میکروب‌شناسی و ژنتیک آن که دلسوزانه با دانش خود این تحقیق را همراهی نمودند، تشکر به عمل می‌آید.

## *REFERENCES*

1. World Health Organization. Global tuberculosis control, surveillance, planning and financing. Geneva: WHO; 2008.
2. Rattan A, Kalia A, Ahmad N. Multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis: molecular perspectives. Emerg Infect Dis 1998; 4: 195–209.
3. Doustdar F, Khosravi AD, Farnia P, Bahrmand AR, Masjedi MR, Velayati AA. Mutations in rpoB gene and genotypes of rifampin resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in Iran. Tanaffos 2008; 7: 11-17.
4. McCammon M, John T, Gillette S, Derek P, Srinvas T, Ramaswamy V, et al. Detection of rpoB mutation associated with rifampicin resistance in Mycobacterium tuberculosis using denaturing gradient gel electrophoresis. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 2200-209.
5. 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: 370-77.
6. Sajduda A, Anna A, Popławska M, Augustynowicz-Kopec E, Zwolska Z, Niemann S, et al. Molecular characterization of rifampicin- and isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis strains isolated in Poland. J Clin Microbiol 2004; 42: 2425-31.
7. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis 2009; 13: 1320-30.
8. 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: 936-38.
9. 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.
10. Kent PT, Kubica GP. Public health Mycobacteriology, a guide for the level III laboratory. Atlanta: CDC, U S. Department of Health and Human service publication no.(CDC) 86-216546; 1985. p.21-30.
11. Zakerbostanabad S, Titov LP, Bahrmand AR. Genetic mechanism of Mycobacterium tuberculosis resistance to antituberculsis drugs, isoniazid and rifampicine. Journal Daklady of National Akademia Science Belarus 2006; 50: 92-98.
12. Kapur V, Li LL, Iordanescu S. Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (rpoB) encoding the RNA polymerase beta subunit in rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis strains from New York city and Texas. J Clin Microbiol 1994; 32: 1095–98.
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.

www.SID.ir

Archive of SID


*14.* Shin SS, Naroditskaya V, Sloutsky A, Werner B, Timperi R, Bayona J, et al. rpoB Gene mutations in clinical isolates of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in northern Lima, Peru. Microb Drug Resist 2005; 11: 26-30.

15. Pozzi G, Meloni M, Iona E, Orro G, Thorensen OF, Ricci A, et al. rpoB mutations in multi drug resistant strains of Mycobacterium tuberculosis isolated in Italy. J Clin Microbiol 1999; 37: 1197-99.

16. 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 Brazil and France. Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janerio 2001; 96: 247-50.

17. 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.

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

19. 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: 993-97.

20. Ma X, Wang H, Deng Y, Liu Z, Xu Y, Pan X, et al. rpoB gene mutations and molecular characterization of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Shandong province, China. J Clin Microbiol 2006; 44: 3409-12.

21. 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. Journal of Medical Colledge of PLA 2009; 24: 223-27.

22. Hirano K, Abe C, Takahashi M .Mutations in the rpoB gene of rifampicin- resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated mostly in Asian countries and their rapid detection by line probe assay. J Clin Microbiol 1999; 37: 2663-66.

23. 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: 1053-56.

24. Zakerbostanabad S, Noghanian M, Graviss AE, Bahrmand AR, 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. Afr J Microbiol Res 2008; 2: 95-102.

25. 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.

26. Deepa P, Therese KL, Madhavan HN. Detection and characterization of mutations in rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates by DNA sequencing. Indian J Tuberc 2005; 52: 132-36.

27. Qian L, Abe C, Lin TP, Yu M, Cho S, Wang S, et al. rpoB genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family isolates from east Asian countries. J Clin Microbiol 2002; 40: 1091-93.

28. 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.

29. Bobadilla-del-Valle M, Arenas-Huertero C, Vargas Alarcon G, Kato-Maeda M, Small PM, Couary P, et al. rpoB gene mutations in rifampin resistant *Mycobacterium tuberculosis* identified by polymerase chain reaction single-stranded conformational polymorphism. J Emerg Infect Dis 2001; 7: 1010-13.

30. 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.

31. 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: 4204-208.

32. 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. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2003; 37: 136-47.

www.SID.ir

Archive of SID


33. Marin M, Viedma DG, Ruiz-Serrano MJ, Bouza E. Rapid direct detection of multiple rifampicin and isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory samples by real-time PCR. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 4293-300.

www.SID.ir