

คุณลักษณะทางพันธุศาสตร์ของเชื้อวัณโอลที่ต้านยา RIFAMPIN

นางสาวศิริวรรณ แย้มนิมนาล



สถาบันวิทยบริการ
อุปถัมภ์หน่วยงาน
วิทยานิพนธ์เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2541
ISBN 974-332-072-5
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**GENETIC CHARACTERIZATION OF RIFAMPIN RESISTANCE IN
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

Miss Siriwan Yaemnimmual

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Microbiology

Inter-Department of Medical Microbiology

Graduate School

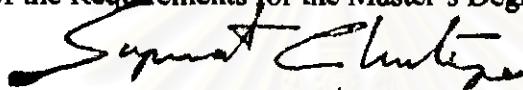
Chulalongkorn University

Academic Year 1998

ISBN 974-332-072-5

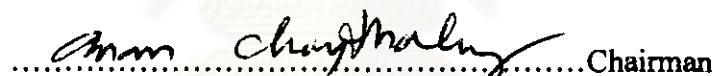
Thesis Title Genetic characterization of rifampin resistance in
Mycobacterium tuberculosis
By Miss Siriwan Yaemnimmual
Inter-Department Medical Microbiology
Thesis Advisor Associate Professor Somying Tumwasorn, Ph.D.
Thesis Co-advisor Instructor Nibondh Udomsantisuk, M.Sc.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.



..... Dean of Graduate School
(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

Thesis committee:



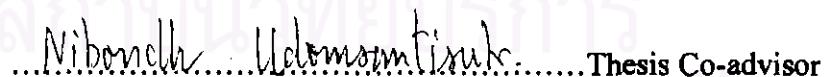
..... Chairman

(Anan Chonthaleong, M.D.)



..... Thesis Advisor

(Associate Professor Somying Tumwasorn, Ph.D.)



..... Thesis Co-advisor

(Instructor Nibondh Udomsantisuk, M.Sc.)



..... Member

(Associate Professor Somjai Reinprayoon, M.D.)



..... Member

(Assistant Professor Prasit Palittapongarnpim , M.D.)

ศิริวรรณ แย้มนิ่นวล : คุณลักษณะทางพันธุศาสตร์ของเชื้อวัณโรคที่ต้านยา RIFAMPIN
(GENETIC CHARACTERIZATION OF RIFAMPIN RESISTANCE IN
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. สมหญิง ชัมวาสาร,
อ. ที่ปรึกษาร่วม : อาจารย์นิพนธ์ อุดมสันติสุข, 52 หน้า. ISBN 974-332-072-5.

ทำการทดสอบทางการกล่ายพันธุ์ของ *rpoB* gene ซึ่งควบคุมการสร้าง β-subunit ของ RNA polymerase เปรียบเทียบผลกับการหาความไวรับต่อยาด้วยวิธี radiometric โดยใช้เชื้ออั่งอิง 16 สายพันธุ์และเชื้อที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย 108 ตัวอย่าง ผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยา rifampin ด้วยวิธี radiometric method พบเชื้อไวต่อยา 52 ตัวอย่าง และต้านต่อยา 56 ตัวอย่าง ทดสอบการกล่ายพันธุ์ของเชื้อโดยเพิ่มปริมาณ DNA ขนาด 305-bps ของ *rpoB* gene โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) และหาลำดับเบสของ PCR product ได้ naïve เทคนิค heteroduplex formation (HDF) มาทดสอบการกล่ายพันธุ์ด้วย ผลของการหาลำดับเบสพบว่า 100% ของเชื้อวัณโรคที่ต้านยา rifampin มีการกล่ายพันธุ์ที่บริเวณนี้ พบการกล่ายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 531 มากที่สุด (50%) รองลงมา คือที่ตำแหน่ง 526 (35.7%) และพบตำแหน่งอื่นๆ คือ ตำแหน่ง 513, 516, 519, 522 และ 533 ไม่พบการกล่ายพันธุ์ในเชื้อวัณโรคที่ไวต่อยา rifampin จากการศึกษาครั้นนี้พบการกล่ายพันธุ์ของ *rpoB* gene ที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อน 3 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 519 (AAC→AAA), 522 (TCG→CAG) และ 523 (GGG→GAG) ผลการทดสอบความเป็นไปได้ที่จะ naïve เทคนิค PCR-HDF มาทำการกล่ายพันธุ์ใน *rpoB* gene ให้เร็วขึ้นไม่ประสบผลลัพธ์เจิงจังในเชื้ออั่งอิง 1 สายพันธุ์ ซึ่งมีการกล่ายพันธุ์แบบ insertion mutation

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา สนศาสตร์ชีววิทยาทางการแพทย์
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์
สาขาวิชา 2541
ปีการศึกษา

ลายมือชื่อนิสิต สิริกรรณ ใจดีนิล
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา พลเอก ไชยวัฒน์ พิรุณ
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ท.พ. พ.
.....

พิมพ์ด้วยน้ำเงินทั้งหมดโดยวิทยากรที่ระบุไว้ในกรอบคือชื่อวันที่พิมพ์เมื่อเดือน

** C845632 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: RIFAMPIN RESISTANCE/MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

SIRIWAN YAEMNIMNUAL : GENETIC CHARACTERIZATION OF

RIFAMPIN RESISTANCE IN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS.

THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. SOMYING TUMWASORN, Ph.D.,

CO-ADVISOR: INSTRUCTOR NIBONDH UDOMSANTISUK, M.Sc.

52 pp. ISBN 974-332-072-5.

Mutation in the gene encoding β -subunit of RNA polymerase (*rpoB* gene) was determined for detecting resistance to rifampin and compared the results with radiometric method for susceptibility testing. Sixteen reference *Mycobacterium tuberculosis* strains and 108 clinical isolates were used in this study. Radiometric method detected 52 rifampin-susceptible isolates and 56 rifampin-resistant isolates. Mutation was detected by amplification of a 305-bp fragment in *rpoB* gene by polymerase chain reaction (PCR) and direct sequencing of the PCR product. Heteroduplex formation (HDF) analysis was also performed for detecting the mutation. The sequencing result showed that 100% of resistant isolates had mutations in this DNA region. Substitution in codon 531 showed the highest frequency (50%) followed by mutation in codon 526 (35.7%). Additional mutations were found in positions 513, 518, 519, 522, 523, and 533. No mutations were observed in rifampin-susceptible isolates. This study revealed three new types of mutation (AAC to AAA at codon 519, TCG to CAG at codon 522, and GGG to GAG at codon 523). The use of PCR-HDF technique for rapid identification of mutations in the *rpoB* gene was unsuccessful in testing resistant *M. tuberculosis* isolates, except one reference strain with insertion mutation.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา សหสាផ្តិវិទ្យាពាណិជ្ជកម្ម¹
สาขาวิชา ឧត្តម៌វិទ្យាពាណិជ្ជកម្ម²
ปีการศึกษา 2541

ลายมือชื่อนิสิต จิริธรรม ไก่เขนแก้ว
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ดร.กานต์ ชัยชนะ
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ท.ดร. [ไม่รู้]



ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude to the following individuals who helped in making this thesis possible:

Associate Professor Dr. Somying Turnwasorn, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University my advisor for her excellent instruction, advice, in dispensable help, encouragement and criticism throughout the period of this study.

Instructor Nibondh Udomsantisuk, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, my co-advisor, for his kindness, advice, suggestion and assistance.

Dr. Anan Chongthaleong, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, the chairman of thesis committee, Associate Professor **Dr. Somjai Reinprayoon**, and Assistant Professor **Dr. Prasit Palittapongarnpim**, the member of thesis committee for their constructive criticisms.

The committee of Molecular biology research unit, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for the research grant to support this study. The staffs of the Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for their friendship and also special thank to Miss Saowanee Kwanlertjit for her kind helps.

All the staffs of the laboratory of Tuberculosis Division for their kind help in collecting the clinical isolates.

Finally, I am deeply indebted to my parents for their love, help, encouragement, understanding and support during of this study.

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	viii
LIST OF FIGURES.....	ix
ABBREVIATIONS.....	x
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
II LITERATURE REVIEW	
TUBERCULOSIS.....	4
TB INCIDENCE AND MORTALITY.....	4
CHEMOTHERAPY FOR TUBERCULOSIS.....	5
MECHANISM OF DRUG RESISTANCE.....	6
RIFAMPIN RESISTANCE.....	8
EPIDEMIOLOGY OF DRUG RESISTANCE	9
LABORATORY DIAGNOSIS.....	11
III MATERIALS AND METHODS.....	19
IV RESULTS.....	26
V DISCUSSION.....	34
VI CONCLUSION.....	37
REFERENCES.....	38
APPENDIX I	46
APPENDIX II	48
APPENDIX III.....	49
BIOGRAPHY.....	52

LIST OF TABLES

Table	Page
1. Treatment regimens.....	6
2. Gene target for anti - tuberculosis drugs and mutations associated with drugs resistance.....	7
3. Reference <i>M. tuberculosis</i> strains used in this study.....	19
4. Mutation of the <i>rpoB</i> gene found in rifampin - resistant <i>M. tuberculosis</i> isolated from Thai tuberculosis patients.....	29

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Amplification products (305 bp) by PCR from <i>M. tuberculosis</i> in clinical isolates.....	26
2. Substituted amino acids in codon 513 through 533 of the β- subunit of RNA polymerase in 56 rifampin - resistance <i>M. tuberculosis</i> isolates.....	27
3. Mutation identified by direct sequencing of PCR products localization is shown of the two most frequent mutation identified in rifampin - resistant <i>M. tuberculosis</i>	28
4. Mutations identified by direct sequencing of PCR products demonstrated three new types of mutation.....	30
5. Mutations identified by direct sequencing of PCR products demonstrated that 1 isolate had point mutation in two codons.....	31
6. Mutations identified by direct sequencing of PCR products demonstrated that 1 isolate had double point mutation in two adjacent bases of one codon.....	32
7. Mutations identified by PCR-HDF analysis	33

ABBREVIATIONS

bp	base pair
°C	degree celsius
cm	centimetre
dATP	deoxyadenosine 5'-triphosphate
dCTP	deoxycytidine 5'-triphosphate
ddATP	dideoxyadenosine 5'-triphosphate
ddCTP	dideoxycytidine 5'-triphosphate
ddGTP	dideoxyguanosine 5'-triphosphate
ddTTP	dideoxythymidine 5'-triphosphate
DDW	double distilled water
dGTP	deoxyguanosine 5'-triphosphate
DNA	deoxynucleic acid
DTT	dithiothreitol
dTTP	deoxythymidine 5'-triphosphate
E	ethambutol
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
et al.	et alii
g	gram
GI	growth index
H	isoniazid
HCl	hydrochloric acid
HDF	heteroduplex formation
HIV	human immunodeficiency virus
hr	hour
i.c.	id est
L-J	Lowenstein-Jensen
KCl	potassium chloride
M	molar

MDR-TB	multidrug-resistant tuberculosis
mg	milligram
MgCl ₂	magnesium chloride
min	minute(s)
ml	millilitre
mm	millimetre
mM	millimolar
mmol	millimolar
NaCl	sodium chloride
PCR	polymerase chain reaction
pmol	picomol
R	rifampin
RNA	ribonucleic acid
S	streptomycin
sec	second
TAE	Tris-acetate-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TB	tuberculosis
TBE	Tris-Borate-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethane
U	unit
μg	microgramme
μl	microliter
μM	micromolar
UV	ultraviolet
V	voltage
WHO	World Health Organization
Z	pyrazinamide