คุณลักษณะทางพันธุศาสตร์ของเชื้อวัณโรคที่ต้านยา RIFAMPIN

นางสาวศิริวรรณ แย้มนิ่มนวล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-332-072-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 19206203

GENETIC CHARACTERIZATION OF RIFAMPIN RESISTANCE IN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Miss Siriwan Yaemnimnual

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 Yaemnimnual
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 Chongthaleong, 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.)

[illegible]

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

ทำการทดสอบหาการกลายพันธุ์ของ *rpoB* gene ซึ่งควบคุมการสร้าง β-subunit ของ RNA polymerase เปรียบเทียบผลกับการหาความไวรับต่อยาด้วยวิธี radiometric โดยใช้เชื้ออ้างอิง 16 สายพันธุ์และเชื้อที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย 108 ตัวอย่าง ผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยา rifampin ด้วยวิธี radiometric method พบเชื้อไวต่อยา 52 ตัวอย่าง และต้านต่อยา 56 ตัวอย่าง ทดสอบการ กลายพันธุ์ของเชื้อโดยเพิ่มปริมาณ DNA ขนาด 305-bps ของ *rpoB* gene โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) และหาลำดับเบสของ PCR product ได้นำเทคนิค heteroduplex formation (HDF) มาทดสอบการกลายพันธุ์ด้วย ผลของการหาลำดับเบสพบว่า 100% ของเชื้อวัณโรคที่ต้านยา rifampin มีการกลายพันธุ์ที่บริเวณนี้ พบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 531 มากที่สุด (50%) รองลงมาคือที่ตำแหน่ง 526 (35.7%) และพบตำแหน่งอื่นๆคือ ตำแหน่ง 513, 516, 519, 522 และ 533 ไม่พบการกลายพันธุ์ในเชื้อวัณโรคที่ไวต่อยา rifampin จากการศึกษาครั้งนี้พบการกลายพันธุ์ของ *rpoB* gene ที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อน 3 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 519 (AAC→AAA), 522 (TCG→CAG) และ 523 (GGG→GAG) ผลการทดสอบความเป็นไปได้ที่จะนำเทคนิค PCR-HDF มาหาการกลายพันธุ์ใน *rpoB* gene ให้เร็วขึ้นไม่ประสบผลสำเร็จยกเว้นในเชื้ออ้างอิง 1 สายพันธุ์ ซึ่งมีการกลายพันธุ์แบบ insertion mutation

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต ศิริวรรณ แย้มนิ่มนวล
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา [illegible]
ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม [illegible]

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

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, 516, 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 สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต สิริวรรณ แย้มนิ่มนวล
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา สมหญิง ธีรสร
ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ACKNOWLEDGEMENTS

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

Associate Professor Dr. Somying Tumwasorn, 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 indepted 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
MACHANISM 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 *M. tuberculosis* strains used in this study	19
4.	Mutation of the *rpoB* gene found in rifampin - resistant *M. tuberculosis* isolated from Thai tuberculosis patients	29

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure Page

1. Amplification products (305 bp) by PCR from *M. tuberculosis* in clinical isolates..... 26
2. Substituted amino acids in codon 513 through 533 of the β- subunit of RNA polymerase in 56 rifampin - resistance *M. tuberculosis* isolates..... 27
3. Mutation identified by direct sequencing of PCR products localization is shown of the two most frequent mutation identified in rifampin - resistant *M. tuberculosis*..... 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.e.	id est
L-J	Lowenstein-Jensen
KCl	potassium chloride
M	molar

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MDR-TB	multidrug-resistant tuberculosis
mg	milligram
$MgCl_2$	magnesium chloride
min	minute(s)
ml	millilitre
mm	millimetre
mM	millimolar
mmol	milimolar
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	micrograme
µl	microliter
µM	micromolar
UV	ultraviolet
V	voltage
WHO	World Health Organization
Z	pyrazinamide

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย