

CHẨN ĐOÁN CÁC CHỦNG VI KHUẨN LAO KHÁNG RIFAMPICIN BẰNG PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH ĐỘT BIẾN TRÊN GEN *rpoB*

Nghiêm Ngọc Minh¹, Nguyễn Văn Bắc¹, Nguyễn Hữu Cường¹, Nguyễn Trung Nam¹, Chu Hoàng Hà¹, Nguyễn Thái Sơn²

¹Viện Công nghệ sinh học

²Học Viện Quân y

TÓM TẮT

Nhiễm vi khuẩn lao (*Mycobacterium tuberculosis*, *MTB*) là một trong những nhiễm trùng phổ biến nhất ở loài người, gây ảnh hưởng nghiêm trọng tới sức khỏe 1/3 dân số thế giới. Tuy vậy, tỷ lệ phát hiện chỉ đạt 37% số bệnh nhân ước tính. Ngày nay, bệnh lao càng trở nên nghiêm trọng hơn do xuất hiện các chủng lao kháng đa thuốc (Multi-drug Resistant, MDR), lao kháng thuốc mờ rộng (Extensively Drug Resistant, XDR) và lao đồng nhiễm HIV/AIDS. Những chủng vi khuẩn lao kháng rifampicin (RIF) đồng thời cũng kháng với nhiều kháng sinh chống lao khác. Phương pháp sinh học phân tử cho phép chẩn đoán nhanh và chính xác các trường hợp bệnh nhân bị nhiễm vi khuẩn lao kháng thuốc. Trong nghiên cứu này, cặp mồi *rpoB*-F và *rpoB*-R đã được thiết kế nhằm nhân vùng quyết định kháng RIF (Rifampicin Resistance Determining Region, RRDR) gồm 27 codon. Sau khi PCR nhân đoạn gen *rpoB* ở 7 chủng vi khuẩn lao nghiên cứu do Bệnh viện Trung ương Huế cung cấp. Phân tích trình tự đoạn gen *rpoB* tách dòng được xuất hiện đột biến sai nghĩa xảy ra tại codon 531 (TCG → TTG) có liên quan kháng rifampicin. Kết quả này rất có ý nghĩa trong việc thay đổi phác đồ điều trị đối với những bệnh nhân này.

Từ khóa: Gen *rpoB*, lao kháng đa thuốc, rifampicin, vi khuẩn lao, xác định đột biến

MỞ ĐẦU

Vi khuẩn lao (*Mycobacterium tuberculosis*, *MTB*) thuộc giống *Mycobacterium*, họ *Mycobacteriaceae* (Nguyễn Đình Bảng, 1992). Đây là vi khuẩn truyền nhiễm và được Tổ chức Y tế thế giới (WHO) khuyến cáo về tình trạng khẩn cấp toàn cầu bởi mức độ lây lan và hậu quả nghiêm trọng của chúng gây ra đối với sức khỏe con người. Hàng năm, trên thế giới ước tính có thêm 9 triệu người mắc bệnh lao và dẫn tới gần 3 triệu người bị chết (Lê Thị Luyến, Bộ Y tế, 2007). Ở Việt Nam mỗi năm có khoảng 100.000 người mắc bệnh lao và 20.000 người chết, đứng thứ 13 trong số 22 quốc gia có số bệnh nhân lao được báo cáo cao nhất (Bộ Y tế, Trung tâm phòng chống lao quốc gia, 2006). Ngày nay bệnh lao càng trở nên nghiêm trọng hơn do xuất hiện các chủng lao kháng đa thuốc (MDR), lao kháng thuốc tuyệt đối (XDR) và lao đồng nhiễm HIV/AIDS. Vì vậy, việc nghiên cứu chẩn đoán vi khuẩn lao kháng thuốc có ý nghĩa hết sức to lớn đối với y học cũng như sức khỏe con người.

Hai phương pháp chẩn đoán lao kháng thuốc được sử dụng rộng rãi hiện nay ở các phòng thí nghiệm trên thế giới là phương pháp xác định kiểu hình và phương pháp xác định kiểu gen. Trong đó phương pháp xác định kiểu hình dựa trên khả năng

phát triển của vi khuẩn lao trong môi trường có kháng sinh phải mất 4 - 8 tuần và đòi hỏi nồng độ của mẫu cao nên độ nhạy của phản ứng thấp. Khắc phục những nhược điểm trên, phương pháp xác định kiểu gen dựa trên cơ sở xác định đột biến ở các gen có liên quan kháng thuốc tương ứng như giải trình tự gen, lai trên pha rắn, real-time PCR... (Juan *et al.*, 2007), trong đó giải trình tự gen vẫn là phương pháp cơ bản, xác định MDR trong các mẫu bệnh phẩm lâm sàng chính xác và rõ ràng nhất.

Genome của *M. tuberculosis* có chiều dài 4411522 cặp base (base pair - bp) bao gồm 90,8% trình tự mã hóa protein và chỉ có 6 gen giả (James, 1995). Gen *rpoB* là một đoạn DNA có kích thước 3519 bp mã hóa enzyme RNA polymerase. Thông qua enzyme này, RIF gây tác dụng lên chức năng sao mã tạo các RNA thông tin (mRNA) ở vi khuẩn lao. Trong hầu hết các nghiên cứu trên thế giới đều cho thấy, khoảng 96% các chủng vi khuẩn lao kháng RIF đều xuất hiện phân đoạn siêu đột biến dài 81 bp (27 codon từ codon 507 - 533) nằm trong vùng giữa của gen *rpoB* (Kristin, Margreta, 1997; Nguyễn Văn Hưng, 2001; Traore, Deun, 2006). Trong đó, các đột biến sai nghĩa làm thay đổi amino acid Ser → Leu, His → Arg và Arg → Val tương ứng với vị trí đột biến tại các codon 531 (TCG → TTG), codon 526

(CAC → GAC) và codon 516 (GAC → GTC) (James, 1995; Telenti *et al.*, 1993; Tracevska *et al.*, 2002).

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu nghiên cứu

Nguồn DNA tổng số của vi khuẩn lao

DNA tổng số của các chủng vi khuẩn nghiên cứu do Học viện Quân Y cung cấp được tách chiết và tinh sạch theo phương pháp phenol/chloroform/isoamyl alcohol (Phạm Hùng Văn, 2007).

Các sinh phẩm hóa chất chính

Hóa chất dùng cho phản ứng PCR (Fermentas), kit thổi gel, kit tách chiết plasmid (Qiagen), vector nhân dòng pBT (Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học), chủng vi khuẩn *E. coli* DH5α được sử dụng cho biến nạp với vector nhân dòng pBT (Fermentas) và một số hóa chất khác đều ở dạng tinh khiết như: cao nấm men, peptone từ ICN (Mỹ), các enzyme *Bam*HI, T4 ligase từ Fermentas.

Chủng *M. tuberculosis* được nuôi cấy trên môi trường Lowenstein-Jensen. Các chủng *E. coli* được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng (10 g/l Bactotryptone; 5 g/l Yeast extract; 10 g/l NaCl; pH 7,2). Chọn chủng mang plasmid tái tổ hợp trên LB đặc (LB lỏng + 20 g/l agar) bổ sung kháng sinh ampicillin 100 mg/l, IPTG 100 mg/l và X-gal 200 mg/l.

Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế môi

Các cặp môi được thiết kế để khuếch đại vùng RRDR gồm 27 codon nằm gần trung tâm của gen *rpoB* dựa vào trình tự gen *rpoB* của chủng đại H37Rv đã được công bố trên ngân hàng dữ liệu gen quốc tế NCBI. Các cặp môi được thiết kế tại những vùng có độ bảo thủ cao nhất và phải chứa vùng RRDR. Trên cơ sở đó, các môi đặc hiệu *rpoB*-F (5'-GCC ACC ATC GAA TAT CTG GT - 3') và *rpoB*-R (5'-ACA CGA TCT CGT CGC TAA CC - 3') được thiết kế để nhân vùng gen 571 nucleotide của gen *rpoB*.

Tách chiết DNA và khuếch đại gen

DNA tổng số của *M. tuberculosis* được tách

chiết theo phương pháp phenol/chloroform/isoamyl alcohol (Phạm Hùng Văn, 2007). Phản ứng PCR nhân đoạn gen *rpoB* đặc hiệu được thực hiện với thể tích 25 µl gồm: 10,25 µl nước; 2,5 đệm PCR 10X; 2,5 µl MgCl₂ 25 mM; 2,5 µl dNTP 2,5 mM; 1 µl mỗi loại mỗi *rpoB*-F và *rpoB*-R 50 pmol/µl; 0,25 µl *Taq* DNA polymerase 5 U/µl; 5 µl mẫu DNA tổng số và theo chu kỳ nhiệt như sau: 01 chu kỳ 95°C/5 phút; 40 chu kỳ (94°C/1 phút, 50°C/45 giây, 72°C/1 phút); 01 chu kỳ 72°C/10 phút; và giữ ở 4°C đến khi phân tích.

Dòng hóa *rpoB* vào vector pBT

Sau khi khuếch đại, tinh sạch bằng bộ kit của Qiagen, đoạn gen *rpoB* tiếp tục được dòng hóa vào vector pBT để tạo vector tái tổ hợp mang gen *rpoB* (ký hiệu: pBrpoB). Hỗn hợp phản ứng nối ghép 20 µl (12 µl sản phẩm PCR; 2 µl đệm 10X T4 ligase; 1 µl vector pBT; 1 µl PEG; 1 µl T4 ligase; 3 µl nước) được ủ ở 22°C trong 2 h. 10 µl sản phẩm nối ghép được ủ với tế bào khả biến *E. coli* DH5α (đã được xử lý bằng CaCl₂ theo phương pháp chuẩn) trong 15 phút và sốc nhiệt 42°C trong 70 giây. Sản phẩm biến nạp được bổ sung 700 µl LB lỏng, lắc 200 vòng/phút trong 1 giờ ở 37°C và trải trên đĩa thạch có bổ sung ampicillin 100 mg/l, IPTG 100 mg/l và X-gal 200 mg/l. Đĩa thạch được ủ qua đêm ở 37°C. Mỗi chủng được chọn 3 dòng khuẩn lạc để tiến hành chạy colony-PCR nhằm kiểm tra gen chèn, hỗn hợp phản ứng colony-PCR 25 µl gồm: 15,25 µl nước; 2,5 đệm PCR 10X; 2,5 µl MgCl₂ 25 mM; 2,5 µl dNTP 2,5 mM; 1 µl mỗi loại mỗi *rpoB*-F và *rpoB*-R 50 pmol/µl; 0,25 µl *Taq* DNA polymerase 5 U/µl; khuẩn lạc lấy trực tiếp từ đĩa thạch và theo chu kỳ nhiệt: 01 chu kỳ 95°C/5 phút; 40 chu kỳ (94°C/1 phút, 50°C/45 giây, 72°C/1 phút); 01 chu kỳ 72°C/10 phút; và giữ ở 4°C. Một trong 3 dòng khuẩn lạc của mỗi chủng cho kết quả dương tính tốt nhất với phản ứng colony-PCR tiếp tục được chọn nuôi qua đêm trong môi trường LB lỏng có bổ sung kháng sinh ampicillin 100 mg/l. Plasmid pBrpoB tách chiết và tinh sạch theo protocol của bộ kit Qiagen một lần nữa được kiểm tra chắc chắn có đoạn gen chèn qua phản ứng cắt bằng enzyme hạn chế *Bam*HI. Plasmid cho kết quả dương tính tiếp tục phục vụ cho quá trình giải trình tự gen.

Đọc trình tự và phân tích gen

Gen *rpoB* được giải trình tự thông qua phản ứng PCR gắn BigDye, sử dụng cặp môi đặc hiệu M13 của pBT. Hỗn hợp phản ứng 20 µl gồm: 3 µl BigDye ready mix; 2 µl khuôn; 1 µl môi; 14 µl

nước. Theo chu kỳ nhiệt: 01 chu kỳ 96°C/5 phút; 20 chu kỳ (96°/30 giây; 50°C/20 giây; 60°C/4 phút); và giữ ở 4°C. Sản phẩm PCR được tủa, tinh sạch bằng 3 M acetate Natri, ethanol, isopropanol và được đọc trình tự trên máy ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer. Phần mềm BioEdit và BLAST được sử dụng để phân tích và so sánh trình tự vùng RRDR (27 codon) với chủng chuẩn wild type H37Rv trên Genbank (Taxonomy ID: 83332, ACCESSION NC_000962), với gen *rpoB* đã được công bố ký hiệu Rv0667 do đó sẽ thu được kết quả các vị trí đột biến có liên quan kháng thuốc của từng chủng nghiên cứu.

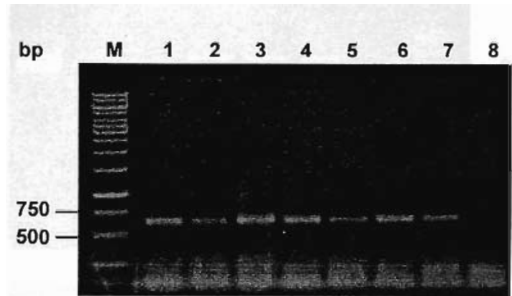
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tách chiết DNA và khuếch đại gen

DNA tách từ các chủng *M. tuberculosis* được chạy điện di kiểm tra trên gel agarose 1% (không biểu diễn kết quả). DNA tinh sạch được dùng làm khuôn để nhân gen *rpoB* bằng phản ứng PCR với cặp mồi *rpoB*-F và *rpoB*-R. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1% (Hình 1) đã thu được một băng DNA rất đặc hiệu, có kích thước 571 bp, tương ứng với kích thước dự đoán khi thiết kế mồi. Do vậy, sản phẩm PCR tiếp tục được dùng để dòng hóa và xác định trình tự.

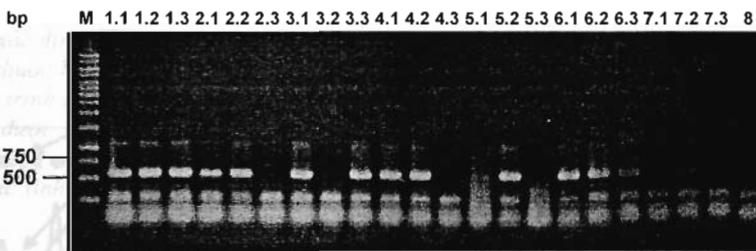
Sản phẩm PCR được chèn vào vector nhân dòng pBT, hình thành vector tái tổ hợp pBrpoB và biến nạp vào *E. coli* DH5 α . Khuẩn lạc trắng (do có phân

đoạn DNA quan tâm chèn vào giữa gen β -galactosidase) mọc trên đĩa thạch và có kết quả dương tính với colony-PCR (Hình 2) được chọn để nuôi cấy và tách plasmid kiểm tra.



Hình 1. Điện di sản phẩm PCR nhân đoạn gen *rpoB* bằng cặp mồi *rpoB*-F và *rpoB*-R. M: thang chuẩn DNA 1 kb; 1 - 7: các chủng tương ứng TB₀₅-03, TB₀₅-11, TB₀₅-21, TB₀₅-27 TB₀₅-33, TB₀₅-40, TB₀₅-50; 8: đối chứng âm.

Để xác định chính xác gen chèn, plasmid được cắt bằng enzyme cắt hạn chế *Bam*HI. Kết quả điện di kiểm tra cho một băng có kích thước tương ứng với gen *rpoB* (~571 bp), các băng còn lại là pBT đã bị cắt (~2,7 kb) và pBrpoB chưa cắt hết hoặc có thể do plasmid bị đứt gãy... (Hình 3). Do vậy, chắc chắn rằng đoạn gen *rpoB* đã được chèn vào vector pBT. Các vector tái tổ hợp này tiếp tục được chọn cho giải trình tự gen.



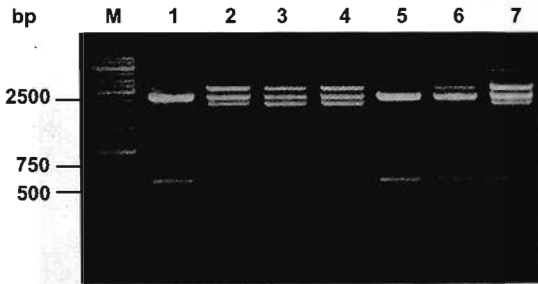
Hình 2. Điện di sản phẩm colony-PCR nhân đoạn gen *rpoB* bằng cặp mồi *rpoB*-F và *rpoB*-R. M: thang chuẩn DNA 1 kb; 1.1 - 7.3: các dòng từ 1 - 3 đối với các chủng tương ứng TB₀₅-03, TB₀₅-11, TB₀₅-21, TB₀₅-27, TB₀₅-33, TB₀₅-40, TB₀₅-50; 8: đối chứng âm.

Phân tích trình tự gen *rpoB* của từng chủng nghiên cứu

Để xác định trình tự gen *rpoB* của mỗi chủng *M.*

tuberculosis nghiên cứu, vector tái tổ hợp pBrpoB được sử dụng làm khuôn chạy PCR cho đọc trình tự. Trình tự gen *rpoB* của mỗi chủng được đọc 2 chiều xuôi và ngược sử dụng cặp mồi đặc hiệu M13-F và

M13-R của vector pBT. Kết quả được trình bày ở hình 4.

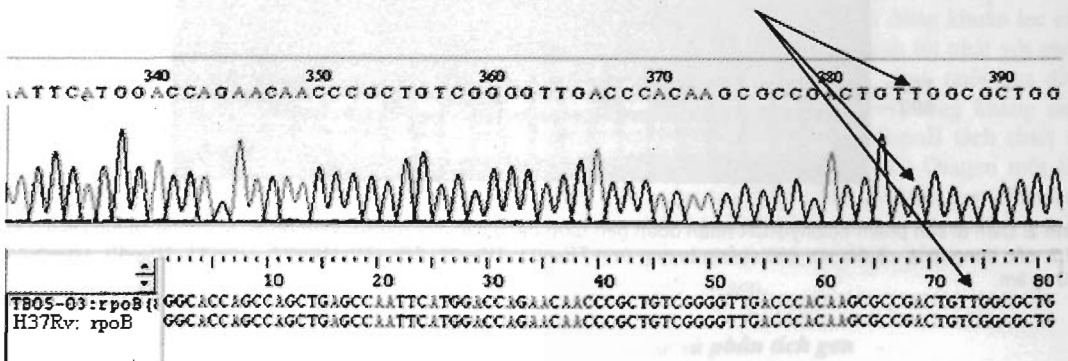


Hình 3. Điện di sản phẩm cắt plasmid tái tổ hợp pBrpOB bằng enzyme cắt hạn chế *Bam*HI. M: thang chuẩn DNA 1 kb; 1-7 các chủng tương ứng TB₀₅-03, TB₀₅-11, TB₀₅-21, TB₀₅-27 TB₀₅-33, TB₀₅-40, TB₀₅-50.

Trình tự phân đoạn 571 nucleotide của gen *rpoB* và trình tự amino acid suy diễn được thu nhận bằng chương trình BioEdit. Phân tích bằng chương trình BLAST và so sánh với chủng wild type H37Rv cho thấy chủng nghiên cứu TB₀₅-03 phát hiện đột biến thay thế nucleotide tại codon 531 (TCG → TTG) làm thay đổi amino acid Ser → Leu (Hình 4 và 5). Theo những kết quả mà các tác giả trong và ngoài nước đã công bố, khoảng 96% các chủng lao kháng RIF có đột biến ở vùng RRDR của gen *rpoB*. Tần

suất đột biến ở các chủng lao kháng thuốc chủ yếu xảy ra ở một codon, và chủ yếu là đột biến sai nghĩa do thay thế một nucleotide (Cavusoglu *et al.*, 2002; Ramaswamy, 1998). Theo Matsiota Bernard và đồng tác giả (1998), Pozzi và đồng tác giả (1999) nghiên cứu trên các chủng lao kháng RIF được phân lập từ Hy Lạp và các chủng lao kháng đa thuốc từ Italy cho thấy, tỷ lệ đột biến trên gen *rpoB* có liên quan kháng RIF chiếm tần số cao nhất tại codon 531 (TCG → TTG) lần lượt ở các nghiên cứu là 56% và 59%. Elif và đồng tác giả (2005) cũng nghiên cứu các đặc tính phân tử ở 21 chủng lao kháng RIF được phân lập từ Malatya, Thổ Nhĩ Kỳ cho kết quả phát hiện đột biến trên gen *rpoB* tại các vị codon 531, 516, 526, và 513 với tỷ lệ tương ứng 47,6%, 23,8%, 14,3%, and 14,3%, trong đó đột biến tại codon 531 (TCG → TTG) là thường thấy nhất (47,6%). Elif và đồng tác giả cũng so sánh tỷ lệ này với các nghiên cứu khác trên thế giới đối với 3000 chủng lao kháng thuốc được phân lập từ 44 nước khác nhau và nhận thấy tỷ lệ đột biến tại codon 516, 526 và 531 ở các chủng phân lập từ châu Á, châu Úc và Nga thường cao hơn các vùng khác, trong đó đột biến tại codon 531 có tần số cao hơn cả. Do đó, kết quả này của chúng tôi cũng phù hợp với đặc điểm chung và thường thấy nhất trong các nghiên cứu trên thế giới. Sáu chủng nghiên cứu còn lại, sau khi giải trình tự chúng tôi không nhận thấy đột biến nào xảy ra trên vùng RRDR của gen *rpoB*, điều đó chứng tỏ các chủng *M. tuberculosis* này không liên quan tới tính kháng RIF.

Clone TB₀₅-03 codon 531: C → T



Hình 4. Phân tích, so sánh trình tự nucleotide và phát hiện đột biến tại phân đoạn 81 bp của gen *rpoB* đối với chủng TB₀₅-03.

501 Ala Ile Lys Glu Phe Phe Gly Thr Ser Gln Leu Ser Gln Phe Met Asp Gln Asn 518

GCG	ATC	AAG	GAG	TTC	TTC	GGC	ACC	AGC	CAG	CTG	AGC	CAA	TTC	ATG	GAC	CAG	AAC
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

519 Asn Pro Leu Ser Gly Leu Thr His Lys Arg Arg Leu Ser Ala Leu Gly Pro Gly 538

AAC	CCG	CTG	TCG	GGG	TTG	ACC	CAC	AAG	CGC	CGA	CTG	TCG	GCG	CTG	GGG	CCC	GGC
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

↓
TTG (Leu)

Hình 5. Kết quả xác định trình tự và phát hiện đột biến trên chủng nghiên cứu TB₀₅₋₀₃. **Phân in đậm:** Vùng siêu đột biến liên quan kháng RIF trên gen *rpoB* (codon 507 – 531). **Phân in đậm nghiêng:** Đột biến tại codon 531 (Ser → Leu).

KẾT LUẬN

Đoạn gen *rpoB* của 7 chủng *M. tuberculosis* nghiên cứu thu nhận từ các bệnh nhân ở Bệnh viện Trung ương Huế đã được nhân lên thông qua phản ứng PCR. Tách dòng, tạo vector tái tổ hợp, tách chiết DNA plasmid có chứa đoạn gen *rpoB* và xác định trình tự đã được thực hiện thành công. Kết quả cho thấy 1 chủng mang đột biến tại codon 531 của gen *rpoB* có liên quan đến tính kháng RIF đã phát hiện. Điều này cũng phù hợp với những công bố thường gặp nhất về đột biến sai nghĩa tại codon 531 (Ser → Leu) của các tác giả trên thế giới.

Lời cảm ơn: Công trình này được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài nhánh "Nghiên cứu tối ưu hóa quy trình xác định nhanh các chủng vi khuẩn lao và lao kháng thuốc bằng kỹ thuật sinh học phân tử" thuộc Chương trình KC10/06-10. Một số kết quả xác định trình tự được thực hiện trên các thiết bị của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen thuộc Viện Công nghệ sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bộ Y tế, Trung tâm phòng chống lao quốc gia (2006) Báo cáo tổng kết Chương trình chống lao quốc gia 2005. Hà Nội.

Cavusoglu C, Hilmioğlu S, Guneri S, Bilgic A (2002) Characterization of *rpoB* mutations in rifampicin-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Turkey by DNA sequencing and line probe assay. *J Clin Microbiol* 40: 4435-4438.

Elif A, Riza D, Dong Y, Zhenhua Y (2005) Molecular Characterization of Isoniazid and Rifampicin Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates from Malatya, Turkey. *Microbial Drug Resistance* 11(2): 94-99.

James M (1995) Antimicrobial agent resistance in Mycobacteria: Molecular Genetic Insights. *Clinical Microbiol Rev* 8: 496-514.

Juan CP, Sylvia CL, Viviana R (2007) Tuberculosis 2007, from basic science to patient care. (<http://www.TuberculosisTextbook.com>).

Kristin K, Margreta VZ (1997) PCR and Reverse Line Blot Hybridization (PHL) to Detect Rifampicin Resistance. *Laboratory manual*, Mycobacterium Department, National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands.

Lê Thị Luyến, Bộ Y tế (2007) Tình hình dịch tễ, điều trị, dự phòng và nghiên cứu Lao tại Việt Nam. *Hội thảo về sinh học phân tử về bệnh lao*. Đại học Quốc gia Hà Nội.

Matsiota B, Vrioni PG, Marinis E (1998) Characterization of *rpoB* mutations in rifampicin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Greece. *J Clin Microbiol* 36: 20-23.

Nguyễn Đình Bảng (1992) *Vi sinh y học*. Học Viện Quân y.

Nguyễn Văn Hưng (2001) Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của *Mycobacterium Tuberculosis* phân lập tại Viện lao và Bệnh phổi. *Luận án Tiến sỹ Y học*. Học Viện Quân y.

Phạm Hùng Vân (2007) Các qui trình kỹ thuật sinh học phân tử thường được sử dụng trong chẩn đoán và nghiên cứu y sinh học. (<http://www.nk-biotek.com.vn>).

Pozzi G, Meloni M, Iona E, Orru' G, Thoresen OF, Ricci ML, Oggioni MR, Fattorini L, Orefici G (1999) *rpoB* mutations in

multidrugresistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Italy. *J Clin Microbiol* 37: 1197-1199.

Ramaswamy S, Musser J (1998) Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Di* 79: 3-29.

Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston J, Matter L, Schopfer K, Bodmer T (1993) Detection of rifampicin-resistant mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 341: 647-650.

Tracevska T, Jansone I, Broka L, Marga O, Baumanis V (2002) Mutations in the *rpoB* and *katG* genes leading to drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Latvia. *J Clin Microbiol* 40: 3789-3792.

Traore H, Deun V (2006) Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex DNA and Rifampicin Resistance in Clinical Specimens from Tuberculosis Patients by Line Probe Assay *J Clin Microbiol* 44: 4384-4388.

IDENTIFICATION OF RIFAMPICILIN-RESISTANT MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS STRAINS BY POINT MUTATION ANALYSIS OF *RPOB* GENE

Nghiêm Ngọc Minh^{1,*}, Nguyen Van Bac¹, Nguyen Huu Cuong¹, Nguyen Trung Nam¹, Chu Hoang Ha¹, Nguyen Thai Son²

¹Institute of Biotechnology

²Vietnam Military Medical University

SUMMARY

Mycobacterium tuberculosis (MTB) is a pathogenic bacterial species in the genus of *Mycobacterium* causing most cases of tuberculosis. As reported by WHO tuberculosis threatens the health of one third of the world's population. The most facing problem which makes tuberculosis become more seriously is the appearance of antibiotic-resistant TB strains classified as Multi-drug Resistant TB (MDR-TB), Extensively Drug Resistant (XDR) and TB co-infected with HIV/AIDS. Screening and detection drug-resistant strains would help the treatment and diagnosis for tuberculosis more effective in patients. Advantages in molecular biological techniques such as PCR, real-time PCR allow researchers rapidly, exactly identify the drug-resistant *M.tuberculosis* strains isolated from patients. In this study, primer pairs *rpoB*-F and *rpoB*-R were designed to amplify the rifampicin resistance determining region (RRDR) including 27 codon of the *rpoB* gene. After amplified sequences of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from 7 patients of the central hospital in Hue, they were forwarded for sequencing. The Results of sequence analysis showed that a mutation at the codon 531 (TCG → TTG) was detected. And this result was useful method to change the treatment for these patients.

Keywords: Detect mutations, multi-drug resistant, *Mycobacterium tuberculosis*, rifampicin, *rpoB* gene

* Author for correspondence: Tel./Fax: 84-4-39947243; E-mail: nghieminh@ibt.ac.vn