

STREPTOMİSİNE DİRENÇLİ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS KOMPLEKS İZOLATLARINDA *rpsL* VE *rrs* GEN BÖLGESİ MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI*

INVESTIGATION OF *rpsL* AND *rrs* GENE REGION MUTATIONS IN STREPTOMYCIN RESISTANT MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX ISOLATES

Mahmut ÜLGER¹, Gönül ASLAN¹, Gürol EMEKDAŞ¹, Seda TEZCAN¹, Mehmet Sami SERİN²

¹ Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin. (drgaslan@gmail.com)

² Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

ÖZET

Streptomisin (SM) bakterilerde protein sentezini etkileyerek antimikrobiyal etki gösteren ve tüberküloz (TB) tedavisinde kullanılan majör anti-TB ilaçlardan birisidir. Bu çalışmada fenotipik ilaç duyarlılık testi ile SM direnci belirlenen *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTC) izolatlarında, SM direncinden sorumlu *rpsL* ve *rrs* gen bölgelerindeki mutasyon varlığının DNA dizi analizi ile araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında, 2003-2007 yılları arasında izole edilen SM'ye dirençli ve duyarlı 10'ar olmak üzere toplam 20 MTC izolatı dahil edilmiştir. Suşların tanımlanması ve primer anti-TB ilaçlara duyarlılık testleri BACTEC 460 TB (Becton Dickinson, MD, ABD) sistemi ile yapılmıştır. İzolatlarının SM'ye karşı duyarlılıkları ayrıca agar proporsiyon yöntemi (APY) ile düşük (2 µg/ml) ve yüksek (10 µg/ml) ilaç konsantrasyonlarında tekrar çalışılmıştır. Genotipik analiz için izole edilen DNA'lar, SM'ye karşı direnç ile ilişkili olduğu bilinen *rpsL* ve *rrs* gen bölgelerini hedefleyen özgül primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile amplifiye edilmiştir. Elde edilen ürünlerde nükleotid değişiklikleri gümüş boyama DNA dizi analizi yöntemi (Silver Sequence DNA Sequencing System, Promega) ile araştırılmış ve GenBank veri tabanından elde edilen *rpsL* gen bölgesi için L08011, *rrs* gen bölgesi için ise X52917 kayıt numaralı dizilerle karşılaştırılmıştır. BACTEC 460 TB sisteminde SM'ye dirençli olan 10 izolattan 8'i APY ile her iki SM düzeyine de (2 µg/ml ve 10 µg/ml) dirençli bulunmuş, diğer ikisi ise sadece düşük düzeyde (2 µg/ml) SM direnci göstermiştir. Her iki ilaç konsantrasyonunda dirençli bulunan 8 izolatın hepsinde *rpsL* gen bölgesinin 43. kodonunda AAG→AGG (Lys→Arg) dönüşümü şeklinde nokta mutasyonu belirlenmiştir. Düşük ilaç konsantrasyonuna dirençli iki izolat ile duyarlı 10 izolatta ise mutasyonla ilişkili olabilecek herhangi bir nükleotid değişikliği belirlenememiştir. Sonuç olarak, TB tedavisinin başarısı için MTC izolatlarının moleküler analizinin yapılmasının yararlı olacağı ve bu konuda ülkemizde daha geniş kapsamlı çalışmaların planlanması gerektiği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: *Mycobacterium tuberculosis*, streptomisin, direnç, dizi analizi, *rpsL*, *rrs*.

* Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen BAP-SBE TM (MÜ) 2007-1YL no'lu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

ABSTRACT

Streptomycin (SM) displays antimicrobial activity via inhibition of protein synthesis in bacteria and it is one of the major antituberculous drugs used in chemotherapy of tuberculosis (TB). The aim of this study was to investigate the presence of mutations in *rpsL* and *rrs* gene regions responsible for SM resistance using DNA sequencing system in SM resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) isolates detected by a phenotypic drug susceptibility test. Ten SM resistant and 10 SM sensitive MTC strains isolated between 2003-2007, in Mersin University Medical Faculty Department of Medical Microbiology Laboratory, were included to this study. The identification of the strains and their susceptibility to primary antituberculous drugs were performed by BACTEC 460 TB system (Becton Dickinson, USA). The SM susceptibility was retested by agar proportion method at low (2 µg/ml) and high (10 µg/ml) concentrations of SM. For genotypic analysis, isolated DNA samples were amplified with polymerase chain reaction (PCR) using primers specific for *rpsL* and *rrs* gene regions associated with SM resistance. PCR products were analyzed for the presence of nucleotide changes by silver stained DNA sequence analysis (Silver Sequence DNA Sequencing System, Promega) and the data were compared to sequences encoded as L08011 for *rpsL* gene region and X52917 for *rrs* gene region in GeneBank database. Of the 10 SM resistant isolates 8 were resistant to SM at both low and high drug concentrations (2 µg/ml and 10 µg/ml) while two were resistant to SM at low drug concentration (2 µg/ml) using agar proportion method. A point mutation as AAG→AGG (Lys→Arg) was detected at codon 43 of *rpsL* gene region in eight isolates resistant to SM at both low and high drug concentrations. Nucleotide changes associated with mutation were not detected in 10 sensitive isolates and two low drug concentration resistant isolates. It was concluded that molecular analysis of MTC isolates might aid to the success of TB treatment and larger scale nationwide studies should be conducted to enlighten the molecular basis of drug resistance in MTC isolates.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, streptomycin, resistance, sequence analysis, *rpsL*, *rrs*.

GİRİŞ

Mycobacterium tuberculosis'ın neden olduğu tüberküloz (TB) hastalığı, gelişen ilaç direnci nedeniyle halen dünyada en yaygın ve ölümcül bulaşıcı hastalıklardan biri olmaya devam etmektedir¹. TB tedavisinde kullanılan streptomisin (SM), izoniazid (INH), rifampisin (RIF), etambutol (EMB) ve pirazinamid (PZA) birinci seçenek anti-TB ilaçlardır². *M.tuberculosis* suşlarındaki ilaç direncinden sorumlu genlerdeki rastgele mutasyonlar sonucu ilaç direnci gelişmektedir³. 1944 yılından beri TB tedavisinde kullanılan SM, ribozomun 30S alt ünitesine bağlanarak translasyonu inhibe edip polipeptid sentezini engelleyerek etki göstermektedir. Ribozomal protein S12'yi kodlayan *rpsL* gen bölgesindeki ve 16S ribozomal RNA'yı kodlayan *rrs* gen bölgesindeki mutasyonlar SM direncinden sorumlu tutulmaktadır^{4,5}. *rpsL* gen bölgesinde en sık rastlanan mutasyon 43. kodondaki AAG→AGG (Lys→Arg) değişimi, daha az rastlanılan ise AAG→ACG (Lys→Thr) değişimi ile sonuçlanan mutasyonlardır⁶⁻⁸. *rrs* gen nokta mutasyonları ise 530. ve 915. nükleotidlerin çevresinde kümelenmiştir^{4,6,8,9}.

Bu çalışmada, fenotipik ilaç duyarlılık testi ile SM direnci belirlenen *M.tuberculosis* izolatlarında *rpsL* ve *rrs* hedef gen bölgelerindeki mutasyonların varlığı ve direnç ile ilgili mutasyon paternlerinin DNA dizi analizi yöntemiyle araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Örnekler

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarında 2003-2007 yılları arasında BACTEC 460 TB (Becton Dickinson, MD, ABD) sistemi ile izolasyonu ve tanımlaması yapılarak, aynı sistemle primer anti-TB ilaç duyarlılıkları saptanan izolatlardan SM'ye dirençli ve duyarlı 10'ar suş çalışmaya alındı. Yöntemde kullanılan ilaç konsantrasyonları; SM 2.0 µg/ml, INH 0.1 µg/ml, RIF 2.0 µg/ml ve EMB 2.5 µg/ml şeklinde idi. Tüm izolatların SM'ye karşı in vitro duyarlılıkları, agar proporsiyon yöntemi ile farklı konsantrasyonlarda SM (2 µg/ml ve 10 µg/ml) kullanılarak yeniden test edildi.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR için kullanılacak DNA örnekleri, Löwenstein-Jensen besiyerinde üreyen *M.tuberculosis* kolonilerine hızlı DNA izolasyon yöntemi uygulanarak elde edildi¹⁰. Direncin araştırılacağı hedef bölgeler ve ilgili primer dizileri Tracevska ve arkadaşlarının⁴ çalışmasından seçildi. *rpsL* gen bölgesi SM1 (5'-CCAACCATCCAGCAGCTGGT-3') ve SM2 (5'-ATC-CAGCGAACCGCGGATGA-3') primerleri ile, *rrs* geninin 530. ilmeği (*rrs-1*) SM3 (5'-GAT-GACGGCCTTCGGGTGT-3') ve SM4 (5'-TCTAGTCTGCCCCGTATCGCC-3') primerleri ile ve *rrs* geninin 915. bölgesi (*rrs-2*) SM5 (5'-GTAGTCCACGCCGTAAACGG-3') ve SM6 (5'-AGGCCACAAGGAACGCCTA-3') primerleri ile çoğaltıldı. PCR ürünlerine dizi reaksiyonundan önce saflaştırma işlemi uygulandı ve bu amaçla Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega, A21180) kullanıldı.

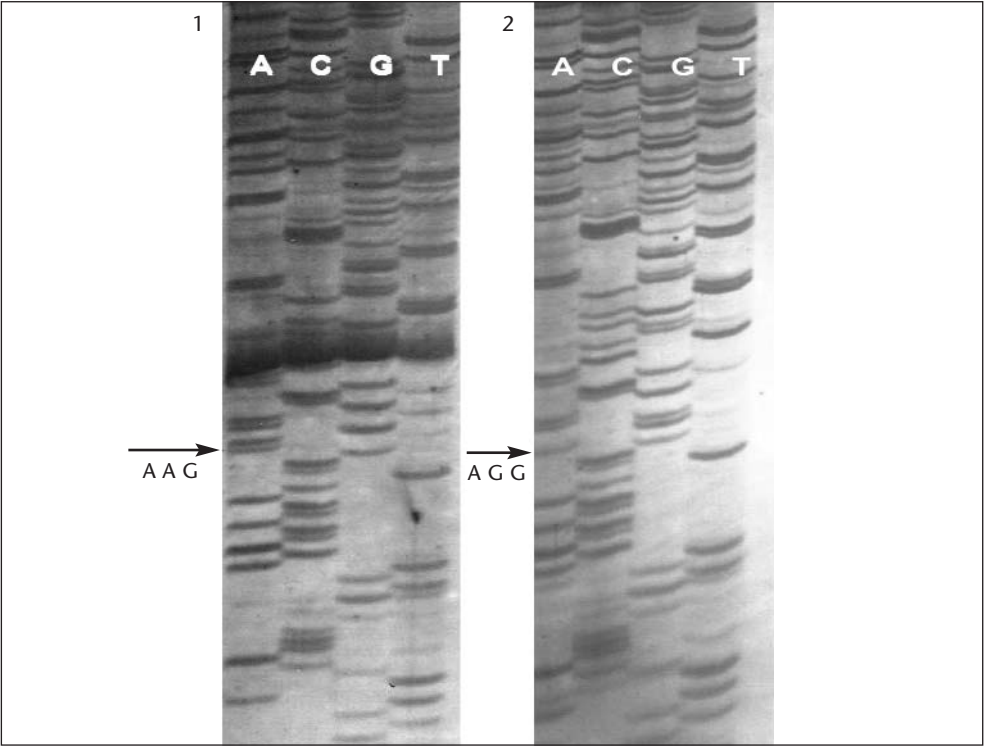
Gümüş Boyama DNA Dizi Analizi Yöntemi

Sekans reaksiyonu, ısı döngü sistemi ile gümüş boyama protokolünün birleşiminden oluşan ve sekans jeline DNA bantlarını belirlemeye yarayan Silver Sequence DNA Sequencing System (Promega, Q4130) ile gerçekleştirildi. Sekans reaksiyonu tamamlandıktan sonra oluşan ürünlerin elektroforezi, TBE tamponu ile hazırlanmış 7 M üre içeren, 0.4 mm kalınlığında, %4-6'lık poliakrilamid jelde (19:1 akrilamid-bisakrilamid) uygulandı. Elektroforez işleminden sonra jelin gümüş ile boyanması ise üretici firmanın (Promega Technical Manual, Q4130, Q4131 ve Q4132) önerdiği şekilde uygulandı.

BULGULAR

Çalışmada, BACTEC 460 TB ile SM'ye dirençli bulunan 10 izolatın 8'i agar proporsiyon yöntemi (APY) ile de SM'nin düşük (2 µg/ml) ve yüksek (10 µg/ml) konsantrasyonlarına dirençli bulunmuş, 2 izolat ise düşük konsantrasyonda dirençli iken yüksek konsantrasyonda duyarlı olarak tespit edilmiştir. SM'ye duyarlı izolatlar ise her iki konsantrasyonda da yine duyarlı olarak belirlenmiştir.

GenBank veri tabanından elde edilen *rpsL* gen bölgesi için L08011, *rrs* gen bölgesi için ise X52917 kayıt numaralı dizi ile çalışılan izolatların ilgili dizileri, 5' ucundan 3' ucuna doğru karşılaştırılmış, bu şekilde saptanan nükleotid değişiklikleri ilaç direncinden sorumlu mutasyon olarak kabul edilmiştir (Resim 1).



Resim 1. *rpsL* gen bölgesinin gümüş boyama DNA dizi analizi jel görüntüsü. Kolon 1; mutasyonun gözlenmediği wild-tip izolat, kolon 2; mutasyon tespit edilen izolat (43. kodonda görünen AAG→AGG nükleotid değişimi).

BACTEC 460 TB ve APY ile SM'ye dirençli bulunan 8 izolatın hepsinde *rpsL* gen bölgesinin 43. kodonunda AAG'den AGG'ye dönüşüm (Lys→Arg) şeklinde nokta mutasyonu tespit edilmiştir. Bu izolatların *rrs-1* ve *rrs-2* gen bölgelerinde dirençle ilişkili olabilecek herhangi bir nükleotid değişikliğine rastlanmamıştır. APY ile sadece düşük SM konsantrasyonunda dirençli olan 2 izolatta ise hedef gen bölgelerinde herhangi bir nükleotid değişikliği saptanmamıştır. Her iki fenotipik ilaç duyarlılık testi ile SM'ye duyarlı olan 10 klinik izolatta da çalışılan hedef gen bölgelerinde herhangi bir nükleotid değişikliği belirlenmemiştir.

TARTIŞMA

SM, *M.tuberculosis*'e karşı etkinliği gösterilen ilk antibiyotik olup, 1960'lı yıllarda bazı ülkelerde kullanımı azaltılmakla birlikte bakterinin çoklu ilaç direnci sorunu nedeniyle son yıllarda TB kontrol programlarında yeniden kullanılmaya başlanmıştır⁵. Bu çalışmada, SM'ye dirençli *M.tuberculosis* klinik izolatlarında dirençten sorumlu olabilecek *rpsL* ve *rrs* gen bölgelerindeki mutasyonların varlığı araştırılmış ve yüksek düzey (10 µg/ml) SM direnci gösteren suşlarda *rpsL* gen bölgesinin 43. kodonunda AAG→AGG (Lys→Arg) dönüşümü şeklinde nokta mutasyonu saptanmıştır. Ülkemizde SM direncinden sorumlu ola-

bilecek DNA mutasyonları ile ilgili yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. Öztürk ve arkadaşları¹¹, Düzce ilinde SM'ye dirençli 5 izolatın 4'ünde *rpsL* gen bölgesinin 43. kodonunda Lys→Arg dönüşümü şeklinde mutasyon bildirmiştir. Adana'da Yaşar ve arkadaşları¹² *rpsL* ve *rrs* gen bölgelerine ait mutasyonların, Ankara'da ise Erdem ve arkadaşları¹³ *rpsL* gen bölgesinin 43. kodonunda Lys→Arg dönüşümü şeklindeki mutasyonun tespit edildiğini rapor etmişlerdir. Değişik ülke ve bölgelerde yapılan çalışmalarda, SM'ye dirençli izolatlarda en sık rastlanan mutasyonların *rpsL* gen bölgesinde olduğu (%24, %30.7, %61), *rrs* gen bölgesindeki mutasyonlara ise daha düşük oranda (%2.2, %12, %24) rastlandığı bildirilmiştir^{4,14,15}. Çalışmamızda, yüksek konsantrasyonda (10 µg/ml) SM'ye dirençli izolatların tümünde (n= 8) saptanan mutasyon *rpsL* gen bölgesinde olup, *rrs* gen bölgesinde dirençle ilgili herhangi bir nükleotid değişikliğine rastlanmamıştır. Bu durumun, örnek sayısının az olmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Düşük ilaç konsantrasyonunda (2 µg/ml) dirençli olduğu halde, yüksek konsantrasyonda duyarlı bulunan iki izolatın dizi analizinde, SM direnci ile ilişkili olabilecek herhangi bir nükleotid değişikliğine rastlanmamıştır. Bununla birlikte yapılan bir çalışmada, yüksek düzey ilaç direnci (MIK > 500 µg/ml) saptanan 24 izolatın hepsinde *rpsL* gen bölgesinde 43. kodonda Lys→Arg dönüşümü şeklinde mutasyon tespit edilirken, düşük düzey SM dirençli (MIK, 10 µg/ml) 20 izolatın sadece birinde *rrs* gen bölgesinin 915. ilmeğinin 903. pozisyonunda C→G değişimi saptanmıştır. Araştırmacılar mutasyon tespit edilmeyen bu düşük düzey SM'ye dirençli izolatlarda, hücre geçirgenliğinde değişiklik, aminoglikozid modifiye eden enzimlerin üretimi veya diğer ribozomal moleküllerdeki değişiklikler gibi SM direncinden sorumlu alternatif mekanizmaların olabileceğini belirtmişlerdir^{7,8}.

Sonuç olarak çalışmamızda, SM'ye dirençli klinik izolatlarda dirençle ilişkili yaygın mutasyonlardan biri olan *rpsL* gen bölgesindeki tek bir mutasyon paterni ortaya konmuştur. Çalışmada kullandığımız sekans analiz tekniği radyoaktif olmadığından, uygulaması diğer geleneksel radyoaktif yöntemlerden daha güvenlidir. Ayrıca, sonuçların bir gün içerisinde elde edilebilmesi ve laboratuvar şartları bir kez standardize edildikten sonra oldukça ekonomik olması önemli avantaj sağlamaktadır.

KAYNAKLAR

1. Mukherjee JS, Rich ML, Sacci AR, et al. Programmes and principles in treatment of multidrug-resistant tuberculosis. Lancet 2004; 363: 474-81.
2. Telenti A. Genetics of drug resistant tuberculosis. Thorax 1998; 53: 793-7.
3. Hillemann D, Weizenegger M, Kubica T, Richter E, Niemann S. Use of the genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. J Clin Microbiol 2005; 43: 3699-703.
4. Tracevska T, Jansone I, Nodieva A, Marga O, Skenders G, Baumanis V. Characterisation of *rpsL*, *rrs* and *embB* mutations associated with streptomycin and ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Res Microbiol 2004; 155: 830-4.
5. Honore N, Cole ST. Streptomycin resistance in mycobacteria. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38: 238-42.

6. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Williams DL, Kreiswirth BN, Musser JM. Characterization of *rpsL* and *rrs* mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse geographic localities. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 1024-6.
7. Cooksey RC, Morlock GP, McQueen A, Glickman SE, Crawford JT. Characterization of streptomycin resistance mechanisms among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in New York City. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 1186-8.
8. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis* 1998; 79: 3-29.
9. Lipin MY, Stepanshina VN, Shemyakin IG, Shinnick TM. Association of specific mutations in *katG*, *rpoB*, *rpsL* and *rrs* genes with spoligotypes of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Russia. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 620-6.
10. Sajduda A, Brzostek A, Poplawska M, et al. Molecular characterization of rifampin and isoniazide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Poland. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2425-31.
11. Ozturk CE, Sanic A, Kaya D, Ceyhan I. Molecular analysis of isoniazid, rifampin and streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with tuberculosis in Düzce, Turkey. *Jpn J Infect Dis* 2005; 58: 309-12.
12. Yaşar M. Tüberkülozda streptomisin ve rifampisin direncinin moleküler yöntemlerle saptanması. Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları AD. 2000, Adana.
13. Erdem EN. *Mycobacterium tuberculosis* suşlarında *rpsL* 43. kodon mutasyonu ile oluşan streptomisin direncinin polimeraz zincirleme reaksiyonu ve floresans rezonans enerji transferi kullanılarak hızlı şekilde saptanması. Doktora Tezi. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji AD. 2001, Ankara.
14. Brzostek A, Sajduda A, Sliwinski T, et al. Molecular characterization of streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Poland. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; 8: 1032-5.
15. Ramaswamy SV, Dou SJ, Rendon A, et al. Genotypic analysis of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Monterrey, Mexico. *J Med Microbiol* 2004; 53: 107-13.