

NGHIÊN CỨU ĐỘT BIẾN GEN *katG* VÀ *rpoB* CỦA VI KHUẨN LAO KHÁNG THUỐC ISONIAZID VÀ RIFAMPICIN TẠI BỆNH VIỆN TRUNG ƯƠNG HUẾ

Mai Văn Tuấn¹, Phạm Hùng Vân², Hoàng Tiến Mỹ²,
Nguyễn Thị Nam Liên¹, Nguyễn Văn Hòa³

TÓM TẮT

Mục tiêu: Sử dụng kỹ thuật giải trình tự để phân tích các đột biến gen *katG*, *rpoB* ở những chủng vi khuẩn lao kháng INH, RIF phân lập tại Bệnh viện TW Huế.

Phương pháp: Kháng sinh đồ lao của 214 chủng MTB được thực hiện theo phương pháp tỷ lệ kinh điển. Giải trình tự để tìm đột biến ở 81 chủng vi khuẩn lao bao gồm: 12 chủng nhạy và 34 chủng kháng INH, 12 chủng nhạy và 23 chủng kháng RIF.

Kết quả:

- Tỷ lệ kháng thuốc chống lao nói chung là 24,3%. Kết quả kháng sinh đồ cho thấy INH và STM có tỷ lệ kháng cao nhất là 18,2%, tiếp theo là RIF (11,2%) và thấp nhất là EMB (7,9%).

- Không phát hiện đột biến nào trên gen *katG* và *rpoB* của các chủng nhạy cảm với INH và RIF. Tỷ lệ đột biến trên gen *katG* của MTB kháng INH là 61,8%. Hầu hết đột biến được tìm thấy ở codon 315 (90,5%). Tỷ lệ đột biến trên gen *rpoB* của MTB kháng RIF là 86,9%. Phát hiện 15 vị trí codon có đột biến ở gen *rpoB*, và hầu hết nằm ở các codon 531 (32,3%), 516 (16,1%), và 526 (12,9%). Tỷ lệ đột biến ở vùng 81-bp "hot spot" của gen *rpoB* là 67,7%. Hầu hết MTB kháng RIF cũng kháng với INH, vì vậy đột biến ở gen *rpoB* là tiêu chí chỉ ra vi khuẩn lao đa kháng thuốc (MDR-TB).

Kết luận: Phát hiện đột biến ở codon 315 của gen *katG* và vùng 81-bp "hot spot" của gen *rpoB* sẽ hữu ích cho việc phát hiện nhanh vi khuẩn lao kháng INH và RIF.

Từ khóa: Giải trình tự, đột biến; gen *katG*, gen *rpoB*.

SUMMARY

STUDY ON *katG* AND *rpoB* GENE MUTATIONS IN ISONIAZID AND RIFAMPICIN RESISTANT *M. TUBERCULOSIS* STRAINS IN HUE CENTRAL HOSPITAL

Mai Van Tuan¹, Pham Hung Van², Hoang Tien My²,
Nguyen Thi Nam Lien¹, Nguyen Van Hoa³

Objectives: The aims of this study was to use DNA sequencing to analyze the mutations of targeted genes (*katG*, *rpoB*) in INH-, and RIF-resistant *M. tuberculosis* isolated in Hue Central Hospital.

Methods: Drug susceptibility testing (DST) was determined by using standard conventional proportional method for 214 culture isolates. The sequencing was used for detecting mutations of eighty-one *M. tuberculosis* strains including 12 INH-sensitive strains and 34 INH-resistant strains, 12 RIF-sensitive strains and 23 RIF-resistant strains.

1. Khoa Vi sinh, Bệnh viện TW Huế
2. ĐHY Dược Tp HCM
3. ĐHY Dược Huế

- Ngày nhận bài (received): 7/7/2015; Ngày phản biện (revised): 26/7/2015
- Ngày đăng bài (Accepted): 12/8/2015
- Người phản biện: Phạm Như Hiệp
- Người phản hồi (Corresponding author): Mai Văn Tuấn
- Email: maituanbvh@yahoo.com.vn; ĐT: 0905138797

Results:

- The rate of drug resistant antituberculous was 24.3%. DST revealed that INH and STM had the highest resistant rate (18.2%), followed by RIF (11.2%), and the lowest resistant rate was that of EMB (7.9%).

- There were no mutations in the *katG* and *rpoB* genes in *M. tuberculosis* isolates sensitive to INH and RIF. The rate of mutation on *katG* gene of INH-resistant *M. tuberculosis* strains was 61.8%. Most mutations were found in *katG* gene codon 315 (90.5%). The rate of mutation on *rpoB* gene of RIF-resistant *M. tuberculosis* strains was 86.9%. We detected 15 mutation codon positions on *rpoB* gene, and the most prevalent mutations were in codons 531 (32.3%), 516 (16.1%), and 526 (12.9%). Rate of mutations located in 81-bp core region of *rpoB* gene was 67.7%. Most of Rifampicin resistant isolates are also resistant to Isoniazid, mutation in *rpoB* gene became important as a surrogate marker for MDR-TB.

Conclusions: Detection of mutations in the *katG* codon 315 and the hot-spot region of *rpoB* would be useful for rapid detection of INH and RIF resistance.

Keywords: Sequencing, mutation; *katG* gene; *rpoB* gene.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh lao là một bệnh nhiễm khuẩn do *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) gây ra, cho đến nay vẫn thu hút sự quan tâm rất lớn của các nhà chuyên môn trên thế giới vì tỷ lệ mắc bệnh, tỷ lệ tử vong, di chứng và hậu quả về mặt kinh tế và xã hội kèm theo.

Vấn đề vi khuẩn lao kháng thuốc là một nội dung cần quan tâm rất lớn trong các chương trình kiểm soát bệnh lao. Vi khuẩn lao đa kháng thuốc, được định nghĩa là kháng ít nhất hai loại thuốc Rifampicin (RIF) và Isoniazid (INH), ngày càng gia tăng [1], [15]. Theo WHO, năm 2013 đã có 480.000 ca bệnh lao đa kháng thuốc (Multidrug-resistant Tuberculosis, MDR-TB) và trong số đó, 210.000 người đã tử vong. Tỷ lệ MDR-TB trong tổng số ca nhiễm lao mới toàn cầu là 3,5% và trong tổng số ca đã qua điều trị là 20,5% [15].

Đặc điểm chính để phát hiện kháng thuốc RIF là sự đột biến trên đoạn gen *rpoB* trong nhiễm sắc thể của vi khuẩn lao. Bằng phát hiện kháng RIF cũng có thể xác định được tính kháng đa thuốc bởi vì các chủng kháng RIF phần lớn là đa kháng thuốc. Đối với INH, sự kháng thuốc thường được gây ra bởi đa dạng đột biến trong 4 gen (*katG*, *inhA*, *kasA* và *ahpC*), trong đó phần lớn (60-70%) các đột biến nằm trên gen *katG* [12].

Việc tìm hiểu để có thể áp dụng, phát triển được những kỹ thuật sinh học phân tử, nhất là kỹ thuật giải trình tự (sequencing) sẽ giúp xác định nhanh

và chính xác vi khuẩn lao kháng RIF và INH, đồng thời xác định được đặc điểm đột biến kháng RIF và INH của các chủng *M. tuberculosis* sẽ mang lại hiệu quả rất lớn trong kiểm soát bệnh lao và cũng giúp ích cho nghiên cứu tạo ra các thuốc chống lao mới, hiệu quả hơn. Vì vậy, chúng tôi thực hiện đề tài này với các mục tiêu:

- Xác định tỷ lệ kháng thuốc Isoniazid và Rifampicin của các chủng *M. tuberculosis* phân lập được tại Bệnh viện TW Huế bằng phương pháp nuôi cấy và kháng sinh đồ kinh điển.

- Xác định đột biến trên gen *katG* và *rpoB* từ những chủng *M. tuberculosis* kháng Isoniazid và Rifampicin bằng phương pháp giải trình tự.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Các chủng vi khuẩn lao được nuôi cấy tại khoa Vi sinh, Bệnh viện Trung ương Huế trong khoảng thời gian từ 2008 đến 2010. Không lấy chủng vi khuẩn phân lập được lần thứ hai của một bệnh nhân. Thực hiện kháng sinh đồ với 4 loại thuốc kháng lao: Rifampicin (RIF), Isoniazid (INH), Ethambutol (EMB) và Streptomycin (STM). Giải trình tự tại Bộ môn Vi sinh, Học viện Quân y.

- Chủng vi khuẩn lao chuẩn *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv nhạy cảm với tất cả các thuốc kháng sinh chống lao làm đối chứng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Các chủng vi khuẩn lao được nuôi cấy trên môi trường Ogawa và làm kháng sinh đồ theo phương pháp kháng sinh đồ tỷ lệ.

- Để nghiên cứu đặc điểm phân tử gen *rpoB* và *katG*, ADN vi khuẩn lao được tách chiết bằng quy trình sử dụng lysis buffer, lysozym, proteinase K, Phenol/Chloroform/ Isoamyl alcohol (25:24:1) và tủa ADN bằng alcohol 100%.

- Sử dụng kỹ thuật PCR nhân trình tự gen đích *rpoB* có độ dài 528 bp với cặp mồi *rpoB*-F: 5'-GCCACCATCGAATATCTGGT-3' / *rpoB*-R: 5'-ACACGATCTCGTCGCTAACC-3'; chu kỳ luân nhiệt: 95°C: 5 phút; (94°C: 1 phút, 50°C: 45 giây, 72°C: 1 phút) x 32 chu kỳ; 72°C: 10 phút và giữ ở 4°C. Nhân trình tự gen đích *katG* có độ dài 684 bp với cặp mồi *katG*-F: 5'-GAGCCCGATGAGGTCTATTG-3' / *katG*-R: 5'-GTCTCGGTGGATCAGCTTGT-3'; chu kỳ luân nhiệt: 95°C: 5 phút; (94°C: 1 phút, 56°C: 45 giây, 72°C: 1 phút) x 32 chu kỳ; 72°C: 10 phút và giữ ở 4°C.

- Sản phẩm PCR gen *rpoB* và *katG* được tinh sạch bằng AccuPrep® PCR Purification Kit; Bioneer, sau đó được chèn vào vector tách dòng pBT (pGEM®T-Vector system; Cat. A1360; Promega) và biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5α theo phương pháp sốc nhiệt. Sau khi chọn dòng, tách plasmid và kiểm tra sự có mặt của đoạn gen *rpoB*, *katG*, thu được sản phẩm plasmid tái tổ hợp có chứa đoạn gen *rpoB* 528 bp và *katG* 684 bp. Mỗi chủng vi khuẩn lao được chọn 3 dòng để giải trình tự.

- Toàn bộ các chủng vi khuẩn tách dòng thành công được giải trình tự ADN, trên hệ thống ABI Prism® 3130XL Genetic analyzer (Applied Biosystems, USA), cùng với các bộ sinh phẩm BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems; DyeEx™ 2.0 Spin kit; QIAGEN. Phân tích các trình tự đoạn gen *rpoB* 528 bp và *katG* 684 bp của vi khuẩn lao thu được bằng chương trình phân tích chuỗi BioEdit v7.0. Thống kê xử lý số liệu với chương trình SPSS 16.0.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Các kiểu hình kháng thuốc:

Bảng 1. Tỷ lệ các kiểu hình kháng thuốc

Kiểu kháng thuốc	Số lượng	Tỷ lệ %
1. Nhạy cảm	162	75,7
2. Kháng thuốc (một loại trở lên)	52	24,3
TỔNG CỘNG (1 + 2)	214	100
3. Kháng Isoniazid (H)	39	18,2
4. Kháng Rifampicin (R)	24	11,2
Kiểu hình kháng thuốc	Số lượng	Tỷ lệ %
Kháng đơn thuốc	18	8,4
- Kháng H	5	
- Kháng S (Streptomycin)	10	
- Kháng E (Ethambutol)	3	
Kháng đa thuốc (MDR-TB)	24	11,2

- Kháng HRSE	11	
- Kháng HRS	9	
- Kháng HRE	2	
- Kháng HR	2	
Kháng nhiều thuốc (không phải MDR-TB)	10	4,7
- Kháng HS	9	
- Kháng HE	1	

Nhận xét: Tỷ lệ đề kháng thuốc kháng sinh nói chung của các chủng vi khuẩn lao phân lập được là 24,3%. Tỷ lệ kháng INH là 18,2%, cao hơn tỷ lệ đề kháng RIF (11,2%). Tỷ lệ đa kháng MDR-TB là 11,2%.

3.2. Kết quả giải trình tự phát hiện đột biến trên gen *katG*:

Trong số 46 chủng giải trình tự đoạn 684 bp trên gen *katG*, kết quả thu được như sau:

*Bảng 2. Kết quả giải trình tự và phát hiện đột biến trên gen *katG**

Chủng vi khuẩn lao		Xác định đột biến	
Đặc tính	Số lượng chủng	Đột biến	Không đột biến
Nhạy thuốc INH	12	0	12 (100%)
Kháng đơn INH	5	3 (60,0%)	2 (40,0%)
Kháng đa MDR-TB	19	14 (73,7%)	5 (26,3%)
Kháng INH+STM/EMB	10	4 (40,0%)	6 (60,0%)
Tổng số	46	21 (45,7 %)	25 (54,3 %)

Tỷ lệ % đột biến/kháng thuốc là 61,8 % (21/34 chủng kháng thuốc)

Nhận xét: Trong 34 chủng kháng thuốc INH, tỷ lệ đột biến là 61,8 %, trong đó tỷ lệ đột biến trong kháng đơn INH là 60%; tỷ lệ đột biến trong kháng đa thuốc (MDR-TB) là cao nhất đạt 73,7%. Không có chủng nhạy cảm INH nào có đột biến trên gen *katG*.

3.3. Kết quả của vị trí đột biến trên gen *katG* liên quan đến kháng INH:

*Bảng 3. Liên quan của vị trí đột biến trên gen *katG* đến kháng INH*

Vị trí các codon đột biến	Thay đổi acid amin	Kháng đơn INH	Kháng đa MDR-TB	Kháng INH+S/E	Tần số đột biến
200 (AAA→CAA)	Lys→Gln			1	1/31
203 (ACC→GCG)	Thr→Ala			1	1/31
215 (GAT→GTT)	Asp→Val			1	1/31
309 (GGT→TGT)	Gly→Cys		1		1/31
315 (AGC→ACC)	Ser→Thr	3	13	3	19/31
315 (AGC→AGT)	Ser→Ser		1		1/31
317 (ATT→GTT)	Ile→Val			1	1/31
317 (ATT→ACT)	Ile → Thr		1		1/31
328 (TGG→CGT)	Trp→Arg			1	1/31
329 (GAT→GGC)	Asp→Gly			1	1/31
349 (GGC→GTG)	Gly→Val			1	1/31
350 (GCG→AGC)	Ala→Ser			1	1/31
356 (GAT→GGT)	Asp→Gly			1	1/31
Số đột biến		3	16	12	31
Số chủng có đột biến		3	14	4	

Nhận xét: Đột biến liên quan kháng thuốc xảy ra ở nhiều vị trí trên gen *katG* từ codon 200 đến codon 356, đặc biệt tập trung cao nhất tại codon 315 (Ser→Thr) có tới 19/21 chủng đột biến kháng thuốc chiếm 90,5%, trong đó kháng đa thuốc là chủ yếu (13 chủng).

3.4. Kết quả giải trình tự phát hiện đột biến trên gen *rpoB*:

Trong số 35 chủng giải trình tự đoạn 528 bp trên gen *rpoB*, kết quả thu được như sau:

Bảng 4. Kết quả giải trình tự và phát hiện đột biến trên gen *rpoB*

Chủng vi khuẩn lao		Xác định đột biến	
Đặc tính	Số lượng chủng	Đột biến	Không đột biến
Nhạy với RIF	12	0	12 (100%)
Kháng đa MDR-TB	23	20 (86,9%)	3 (13,1%)
Tổng số	35	20 (57,1 %)	15 (42,9 %)

Nhận xét: Kết quả giải trình tự cho thấy đột biến gen *rpoB* chỉ xảy ra ở các chủng vi khuẩn kháng thuốc RIF. Trong 23 chủng đa kháng thuốc (MDR-TB), tỷ lệ đột biến là 86,9%.

3.5. Kết quả của vị trí đột biến trên gen *rpoB* liên quan đến kháng RIF:

Bảng 5. Liên quan của vị trí đột biến trên gen *rpoB* đến kháng RIF

Vị trí các codon đột biến	Thay đổi acid amin	Tần số đột biến
460 (ATC→GTC)	Ile→Val	1/31
462 (AAC→AGC)	Asn→Ser	1/31
481 (ACC→ACT)	Thr →Thr	1/31
481 (ACC→GCT)	Thr →Ala	1/31
504 (GAG→AAG)	Glu→Lys	1/31
516 (GAC→GTC)	Asp→Val	5/31
526 (CAC→CGC)	His→Arg	2/31
526 (CAC→GAC)	His→Asp	2/31
531 (TCG→TTG)	Ser→Leu	10/31
533 (CTG→CCG)	Leu→Pro	1/31
542 (CGT→TGT)	Arg→Cys	2/31
544 (GGG→GGT)	Gly→Gly	1/31
570 (GGT→AGT)	Gly→Ser	1/31
572 (ATC→TTC)	Ile→Phe	1/31
588 (GAA→GGA)	Glu→Gly	1/31
Số đột biến		31
Số chủng có đột biến		20

Nhận xét: Đột biến liên quan kháng thuốc xảy ra ở nhiều vị trí trên gen *rpoB* từ codon 460 đến codon 588. Có 20 chủng có đột biến tại 15 vị trí của gen *rpoB*, đặc biệt tập trung cao nhất tại codon 531 (Ser→Leu) có tới 10/31 số đột biến

kháng thuốc (32,3%). Tiếp theo là vị trí codon 516 (Asp→Val) với 5/31 số đột biến (16,1%), codon 526 với 4/31 số đột biến (12,9 %) (2 đột biến thay đổi acid amin His→Asp và 2 đột biến thay đổi His→Asp).

IV. BÀN LUẬN

4.1. Các kiểu hình kháng thuốc:

Theo bảng 1, tỷ lệ đề kháng thuốc nói chung của các chủng vi khuẩn lao chúng tôi phân lập được là 24,3%. Tỷ lệ này thấp so với nhiều nghiên cứu khác trong nước: Nguyễn Duy Hưng (2009) nghiên cứu trên 67 chủng lao phân lập tại tỉnh Hưng Yên cho thấy 40,3 % kháng với ít nhất một loại thuốc; Nguyễn Thị Mai Huyền (2010) thực hiện kháng sinh đồ 111 chủng MTB tại miền Nam, Việt Nam, tỷ lệ kháng 1 loại thuốc bất kỳ là 53,1% [7].

Trên thế giới, tỷ lệ kháng thuốc nói chung có khác nhau. Ở các nước Tây Âu, mức độ kháng thuốc của vi khuẩn lao thường thấp. Nghiên cứu của Miguel Viveiros (2005) trên 342 chủng MTB (từ các mẫu đàm, dịch phế quản, dịch súc rửa phế nang) được lấy từ bệnh nhân ở vùng Greater Lisbon (Bồ Đào Nha). Kết quả đề kháng với 1 loại thuốc bất kỳ là 24% (82/342 chủng) [9]. Perdigão J. (2010) đã nghiên cứu trên 3025 chủng MTB phân lập ở Bồ Đào Nha, kết quả tỷ lệ vi khuẩn lao kháng ít nhất 1 thuốc chống lao là 22,3% đến 26% [11].

Ở châu Á, tỷ lệ kháng thuốc cao hơn. Guo Jian-Hua (2008) nghiên cứu trên các chủng MTB phân lập tại tỉnh Sichuan, Trung Quốc: Có 39,8% chủng kháng với ít nhất một loại thuốc chống lao [6]. Jun-ichiro Sekiguchi (2007) với các chủng MTB phân lập tại Nhật Bản (105 chủng) và Ba Lan (33 chủng), kết quả: có 39,9% chủng kháng với ít nhất một loại kháng sinh [8]. Với Yang Song (2011) có 56% chủng đề kháng với ít nhất 1 loại thuốc chống lao dòng thứ nhất [16].

Sự đề kháng của MTB với các thuốc chống lao thường là do đột biến ngẫu nhiên các gen của vi khuẩn và, tệ hơn nữa, là “sự khuếch đại một hiện tượng tự nhiên do con người tạo ra” (man-made amplification of the natural phenomenon). Các đột biến thường xảy ra với một tần suất tương đối thấp, 10^{-6} đến 10^{-8} số lần sao chép của vi khuẩn lao. Các đột biến điểm riêng lẻ thường liên quan đến kháng thuốc đơn độc và sự tích tụ liên tục của những đột biến này trên nhiều gen khác nhau thường liên quan đến lao đa kháng thuốc (MDR-TB) [13].

Với các chủng lao của chúng tôi, tỷ lệ kháng

INH là 18,2% (39/214 chủng), cao hơn tỷ lệ đề kháng RIF (11,2%, 24/214 chủng). Với STM, tỷ lệ kháng là 18,2% (39/214 chủng) và tỷ lệ kháng EMB là thấp nhất 7,9% (17/214 chủng).

Đối với các kiểu hình kháng thuốc, đơn kháng chiếm 8,4%, đa kháng MDR-TB có tỷ lệ 11,2% và kháng đôi (INH+STM hoặc INH+EMB) là 4,7%. Tất cả các chủng lao kháng RIF đều là các chủng MDR-TB (đồng kháng INH). Điều này phù hợp với nhiều nghiên cứu trong nước và thế giới đã ghi nhận rằng kháng RIF/nhạy INH thường hiếm gặp. Theo Perdigão J. (2010) ở Bồ Đào Nha, tỷ lệ kháng đơn RIF là dưới 0,4% [11]. Caws M. (2006) tại Bệnh viện Phạm Ngọc Thạch (TPHCM), có 2 chủng kháng RIF không phải là đa kháng MDR-TB: 1 chủng đơn kháng RIF và 1 chủng kháng RIF và STM, tỷ lệ 1,5% [5].

Theo báo cáo của WHO về vi khuẩn lao kháng thuốc (2008), sự đề kháng RIF/nhạy INH là một điều quan trọng cần quan tâm nếu tầm soát MDR-TB chỉ dựa chủ yếu vào mỗi xét nghiệm kháng RIF riêng lẻ. Kháng RIF không kèm với kháng INH thường hiếm gặp, và như vậy cũng có thể là một chỉ điểm tốt của phòng xét nghiệm. Nếu đề kháng RIF không phải MDR-TB có tỷ lệ lớn hơn 3%, điều này cần được xem như bất thường - gợi ý đến sai sót ở xét nghiệm tính nhạy cảm RIF hoặc INH. Trong số 39 quốc gia báo cáo tính đến năm 2008, 80% ghi nhận tỷ lệ kháng RIF không phải MDR-TB dưới 1%, chỉ có 2 quốc gia ghi nhận tỷ lệ này là trên 3% (Trung Quốc và Jordani) [14].

Tỷ lệ vi khuẩn lao đa kháng MDR-TB của chúng tôi là 11,2%. Các nghiên cứu trên thế giới cũng đưa ra tỷ lệ MDR-TB khác nhau tùy theo vùng địa lý, quốc gia. Jun-ichiro Sekiguchi (2007) với các chủng MTB phân lập tại Nhật Bản (105 chủng) và Ba Lan (33 chủng), tỷ lệ MDR-TB là 16,7% [8]. Tại châu Âu, với các mẫu MTB được phân lập từ vùng Greater Lisbon (Bồ Đào Nha), Miguel Viveiros (2005) ghi nhận kết quả MDR-TB là 11,7% [9]. Nghiên cứu của Perdigão J. (2010), tỷ lệ MDR-TB là 9,9% đến 15,2% [11]. Ở trong nước, theo Nguyễn Thị Mai Huyền (2010) kết quả tỷ lệ MDR-TB là 49,5% [7].

4.2. Kết quả giải trình tự phát hiện đột biến trên gen *katG*:

Chúng tôi thực hiện giải trình tự gen *katG* của 46 chủng MTB (gồm 34 chủng kháng INH và 12 chủng nhạy INH). Theo bảng 2, với 34 chủng kháng thuốc INH, tỷ lệ phát hiện có đột biến là 61,8%, trong đó tỷ lệ đột biến trong kháng đơn INH là 60% (3/5 chủng); tỷ lệ đột biến trong kháng đa thuốc (MDR) là cao nhất đạt 73,7% (14/19 chủng). Không có chủng nhạy cảm INH nào có đột biến trên gen *katG*.

Ngoài các đột biến điểm, còn có 1 đột biến đồng nghĩa (Ser→Ser ở codon 315) và 2 chủng có đột biến đôi. Với kiểu hình kháng đôi INH+STM/EMB, có 4/10 chủng đột biến (40%) trong đó 3 chủng có đột biến ở codon 315 (Ser→Thr) (Bảng 3).

Đột biến liên quan kháng thuốc xảy ra ở nhiều vị trí trên gen *katG* từ codon 200 đến codon 356, đặc biệt tập trung cao nhất tại codon 315 (Ser→Thr) có tới 19/21 chủng đột biến kháng thuốc chiếm 90,5%, trong đó kháng đa thuốc (MDR-TB) là chủ yếu (13 chủng). Các chủng kháng đôi INH+STM/EMB, ngoài 3 chủng có đột biến tại codon 315, còn có 9 đột biến ngoài codon 315 (Bảng 3). Kết quả này của chúng tôi phù hợp với ghi nhận của nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước về sự ưu thế trong đột biến ở codon 315 của gen *katG*.

Caws M. (2006) thực hiện giải trình tự gen *katG* của 100 chủng kháng INH tại bệnh viện Phạm Ngọc Thạch (TPHCM). Phần lớn các chủng (71%) mang đột biến Ser→Thr (AGC→ACC) [5]. Nghiêm Ngọc Minh (2012) giải trình tự gen *katG* của 82 chủng MTB kháng INH ở Việt Nam, có 63/82 chủng mang đột biến tại codon 315 của gen *katG* (tỷ lệ 76,8%). Trong đó có 60 chủng thay đổi acid amin Ser→Thr (AGC→ACC) [10]. Nguyễn Thu Hà (2012) nghiên cứu ở bệnh nhân lao phổi tái phát cũng nhận thấy rằng những đột biến ở gen *katG* của các chủng lao kháng INH là phổ biến nhất (76,9%) [2].

Một số tác giả ghi nhận rằng: Đột biến S315T trên gen *katG* xảy ra thường xuyên ở các chủng MDR-TB hơn là các chủng đơn kháng INH và hầu hết đều kết hợp với đề kháng INH mức

độ cao. Ngoài ra, các đột biến tại các codon V33Stop, D65E, D94A, G99E, H108E, N138S/H, S140A/N, D142A, L150A, S160L, A172T, T180C, V200Stop, F252L, T262R, P275T, Q294Stop, W299G, W328G, I335T, A350S ở trên gen *katG* cũng thường đi kèm với mức độ đề kháng cao INH. Đối với những chủng đề kháng INH nồng độ thấp, các đột biến thường được tìm thấy ở vùng khởi động của gen *inhA*, gen *acpM* và gen *kasA* [4], [6], [13]. Hầu hết các đột biến liên quan kháng INH trên gen *katG* của chúng tôi đều là đột biến sai nghĩa (20/21 chủng). Đa số các chủng kháng đơn INH và đa kháng (MDR-TB) chỉ có 1 đột biến ở codon 315 (14/17 chủng), trong khi đó các chủng kháng đôi INH+STM/EMB đều có đột biến từ 2 codon trở lên (Bảng 3).

4.3. Kết quả giải trình tự phát hiện đột biến trên gen *rpoB*:

Giải trình tự 12 chủng vi khuẩn lao nhạy với RIF, chúng tôi không phát hiện đột biến ở vùng gen *rpoB* nghiên cứu. Còn ở 23 chủng vi khuẩn lao kháng RIF (cũng là 23 chủng đa kháng thuốc-MDR-TB, tìm thấy 20 trong số 23 chủng (86,9%) có đột biến ở gen *rpoB*, có 3 chủng (13,1%) không thấy có đột biến nào (bảng 4). Không có trường hợp nào kháng đơn với RIF, **phát hiện kháng RIF là tiêu chí chỉ ra kháng đa thuốc của vi khuẩn lao.**

Trong số 20 chủng có đột biến trên gen *rpoB*, có 10 chủng có đột biến trên codon 531 (Ser→Leu) (50%), 5 chủng đột biến trên codon 516 (Asp→Val) (25%). Ngoài ra có 9 chủng có đột biến trên 9 codon khác. Đột biến liên quan kháng thuốc xảy ra ở nhiều vị trí trên gen *rpoB* từ codon 460 đến codon 588. Các đột biến xảy ra tại 15 vị trí của gen *rpoB*, đặc biệt tập trung cao nhất tại codon 531 (Ser→Leu) chiếm 32,3%. Tiếp theo là vị trí codon 516 (Asp→Val) với tỷ lệ 16,1%, codon 526 với tỷ lệ 12,9% (Bảng 5).

Trong 20 chủng vi khuẩn lao kháng thuốc có đột biến, số chủng chỉ có đột biến ở 1 codon chiếm tỷ lệ cao nhất 60%, có 8/20 chủng có từ 2 vị trí đột biến trở lên. Tất cả các đột biến liên quan kháng RIF trên gen *rpoB* của chúng tôi đều là đột biến sai nghĩa do thay thế một nucleotide. Đột biến mất hoặc chèn nucleotide không phát hiện thấy trong nghiên cứu

của chúng tôi. Tỷ lệ phát hiện đột biến trên gen *rpoB* của các chủng lao kháng RIF (cũng là chủng MDR-TB) là 86,9% (20/23 chủng).

Kết quả của chúng tôi cao hơn kết quả của Aslan Gonul (2008), với 14/19 chủng kháng RIF có đột biến tại gen *rpoB* (73%) [4] và tương tự kết quả của Abdelaal Amina (2009), thực hiện tại Ai Cập với 20/23 (86,9%) chủng kháng RIF có đột biến [3]. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu khác ghi nhận tỷ lệ đột biến gen *rpoB* rất cao (>90%). Nhiều tác giả ghi nhận tỷ lệ 100% chủng lao kháng RIF có đột biến trên gen *rpoB* [8], [9], [16].

Theo kết quả ở bảng 5, số lượng đột biến trên vùng 81-bp của gen *rpoB* “Hot spot region mutation” (từ codon 503 đến 533), được biết như là vùng để xác định kháng RIF, chiếm tỷ lệ 67,7% (21/31 số đột biến). Số lượng đột biến trên codon 531 là 10/31 đột biến (32,3%), codon 516 là 5/31 đột biến (16,1%) và ở codon 526 là 4/31 đột biến (12,9%). Kết quả này tương đồng với rất nhiều kết quả nghiên cứu trong nước và thế giới. Hầu hết các tác giả đều ghi nhận các đột biến trên gen *rpoB* của các chủng kháng RIF xảy ra nhiều nhất ở codon 531 (Ser→Leu; TCG→TTG), tiếp đến là ở codon 526 (His→Asp; CAC→GAC hoặc (His→Tyr; CAC→TAC) hoặc (His→Ala; CAC→GCC), và thứ ba là codon 516 (Asp→Val; GAC→GTC) [2], [3], [5], [6], [9], [10], [16].

V. KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu mức độ kháng thuốc chống lao của 214 chủng vi khuẩn lao được phân lập, giải trình tự gen *katG* của 46 chủng (kháng và nhạy Isoniazid) và gen *rpoB* của 35 chủng (kháng và nhạy Rifampicin), chúng tôi rút ra một số kết luận như sau:

1. Bộ Y tế (2009), *Tài liệu hướng dẫn chẩn đoán, điều trị và phòng lao*, Hà Nội.
2. Nguyễn Thu Hà (2012), *Nghiên cứu lâm sàng, cận lâm sàng, đột biến gen *rpoB*, *katG* và *inhA* của vi khuẩn trong lao phổi tái phát*, Luận án tiến sĩ chuyên ngành Lao, Đại học Y Hà Nội.
3. Abdelaal Amina et al. (2009), “Genotypic

* Mức độ kháng thuốc của các chủng vi khuẩn lao phân lập được

- Tỷ lệ đề kháng thuốc chống lao nói chung của các chủng vi khuẩn phân lập được là 24,3%. - Tỷ lệ kháng INH là 18,2%, kháng STM là 18,2%, kháng RIF là 11,2% và kháng EMB là thấp nhất 7,9%. Tỷ lệ đơn kháng là 8,4%, đa kháng MDR-TB có tỷ lệ 11,2%.

* Kết quả giải trình tự phát hiện đột biến trên gen *katG*

- Tỷ lệ đột biến ở các chủng kháng INH là 61,8%, đột biến trong kháng đa thuốc (MDR-TB) là cao nhất 73,7%. Không có chủng nhạy cảm INH nào có đột biến trên gen *katG*.

- Đột biến liên quan kháng thuốc xảy ra ở nhiều vị trí trên gen *katG* từ codon 200 đến codon 356, tập trung cao nhất tại codon 315 (Ser→Thr) với 90,5% chủng đột biến kháng thuốc.

* Kết quả giải trình tự phát hiện đột biến trên gen *rpoB*

- Tỷ lệ đột biến của các chủng lao kháng RIF (cũng là chủng MDR-TB) là 86,9%. Không tìm thấy đột biến nào ở 12 chủng nhạy với RIF.

- Đột biến liên quan kháng thuốc xảy ra ở nhiều vị trí trên gen *rpoB* từ codon 460 đến codon 588. Tập trung cao nhất tại codon 531 (Ser→Leu), tỷ lệ 32,3%, codon 516 (Asp→Val) tỷ lệ 16,1%, codon 526 tỷ lệ 12,9%. Đột biến trong vùng “hot-spot” 81-bp chiếm tỷ lệ 67,7%.

* Các chữ viết tắt:

- **Codon:** Bộ ba nucleotid mã hóa acid amin;
EMB: Ethambutol; **STM:** Streptomycin; **INH:** Isoniazid, **RIF:** Rifampicin; **MTB:** *Mycobacterium tuberculosis* (Vi khuẩn lao); **PCR:** Polymerase Chain Reaction (Phản ứng chuỗi polymerase).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế (2009), *Tài liệu hướng dẫn chẩn đoán, điều trị và phòng lao*, Hà Nội.
2. Nguyễn Thu Hà (2012), *Nghiên cứu lâm sàng, cận lâm sàng, đột biến gen *rpoB*, *katG* và *inhA* của vi khuẩn trong lao phổi tái phát*, Luận án tiến sĩ chuyên ngành Lao, Đại học Y Hà Nội.
3. Abdelaal Amina et al. (2009), “Genotypic Detection of Rifampicin and Isoniazid Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains by DNA Sequencing: a Randomized Trial”, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, Vol. 8, No. 4, pp. 1-8.
4. Aslan Gonul, Tezcan Seda et al. (2008), “Genotypic Analysis of Isoniazid and Rifampin

- Resistance in Drug-Resistant Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates in Southern Turkey”, *Japanese journal of infectious diseases*, Vol. 61, pp. 255-260.
5. Caws M., Duy Phan M., Tho Dau Q. et al. (2006), “Mutations Prevalent among Rifampin- and Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from a Hospital in Vietnam”, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 44, No. 7, pp. 2333-2337.
 6. Guo Jian-Hua et al. (2008), “Molecular Characterization of Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Sichuan Province in China”, *Japanese Journal of Infectious Diseases*, Vol. 61, pp. 264-268.
 7. Huyen NT Mai et al (2010), “Validation of the GenoType® MTBDRplus assay for diagnosis of multidrug resistant tuberculosis in South Vietnam”, *BioMed Central Infectious Diseases*, Vol. 10, pp. 1-8.
 8. Jun-ichiro Sekiguchi et al. (2007), “Detection of Multidrug Resistance in *M. tuberculosis*”, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 45, No. 1, pp. 179-192.
 9. Miguel Viveiros et al. (2005), “Direct Application of the INNO-LiPA Rif.TB Line-Probe Assay for Rapid Identification of *M. tuberculosis* Complex Strains and Detection of Rifampin Resistance in 360 Smear-Positive Respiratory Specimens from an Area of High Incidence of Multidrug-Resistant Tuberculosis”, *Jour. of Clin. Microbio.*, Vol. 43, No. 9, pp. 4880-4884.
 10. Minh N. N., Nguyen Van Bac, Nguyen Thai Son et al. (2012), “Molecular Characteristics of Rifampin- and Isoniazid-Resistant *M. tuberculosis* Strains Isolated in Vietnam”, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 50, No. 3, pp. 598-601.
 11. Perdigão J., Macedo R. et al. (2010), “Tuberculosis drug-resistance in Lisbon, Portugal: a 6-year overview”, *Clinical Microbiology and Infection*, Vol. 17, No. 9, pp. 1397-1402.
 12. Rabia Johnson et al. (2006), “Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*”, *Current Issues in Molecular Biology*, Vol. 8, pp. 97-112.
 13. Santos Lorena Cristina (2012), “Review: The Molecular Basis of Resistance in *M. tuberculosis*”, *Open Journal of Medical Microbiology*, Vol. 2, pp. 24-36.
 14. WHO (2008), *Anti-Tuberculosis drug resistance in the world*, Fourth Global Report. The WHO/ IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance 2002-2007.
 15. WHO (2014), *Global tuberculosis report 2014*.
 16. Yang Song et al. (2011), “Rapid detection of *rpoB* and *katG* genes from the sputum of multidrug-resistant *M. tuberculosis* by polymerase chain reaction (PCR)-direct sequencing analysis”, *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 5, No. 26, pp. 4519-4523.