

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG

KHIẾU THỊ THÚY NGỌC

**NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM
HỆ GEN CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN LAO
KHÁNG THUỐC PHÂN LẬP TỪ BỆNH NHÂN LAO
KHÁNG RIFAMPICIN TẠI HÀ NỘI NĂM 2020-2022**

LUẬN ÁN TIẾN SỸ SINH HỌC

HÀ NỘI - 2024

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG

KHIẾU THỊ THÚY NGỌC

**NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM
HỆ GEN CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN LAO
KHÁNG THUỐC PHÂN LẬP TỪ BỆNH NHÂN LAO
KHÁNG RIFAMPICIN TẠI HÀ NỘI NĂM 2020 - 2022**

Ngành: Vi sinh vật học

Mã số: 9 42 01 07

LUẬN ÁN TIẾN SỸ SINH HỌC

Cán bộ hướng dẫn:

- 1. PGS.TS. BS. Nguyễn Văn Hưng**
- 2. TS. Nguyễn Thị Vân Anh**

HÀ NỘI - 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Khiếu Thị Thúy Ngọc, nghiên cứu sinh khoá 38 thuộc Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương, chuyên ngành Vi sinh vật học, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của PGS. TS. BS. Nguyễn Văn Hưng và TS. Nguyễn Thị Vân Anh.

2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.

3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật về những cam kết này.

Hà Nội, ngày 20 tháng 10 năm 2024

Tác giả luận án



Khiếu Thị Thúy Ngọc

LỜI CẢM ƠN

Trong thời gian học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án, tôi đã nhận được nhiều sự giúp đỡ, tạo điều kiện của các cá nhân, tập thể, các thầy cô, gia đình, bạn bè và đồng nghiệp. Với lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc, tôi xin gửi lời cảm ơn trân trọng nhất tới PGS. TS. Nguyễn Văn Hưng và TS. Nguyễn Thị Vân Anh là những người thầy đã trực tiếp hướng dẫn, tạo mọi điều kiện tốt nhất, giúp đỡ tôi trong quá trình nghiên cứu, học tập và hoàn thành luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn PGS. TS. Nguyễn Việt Nhung đã động viên và tạo điều kiện cho tôi được tham gia tiến hành đề tài này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn PGS. TS. Nguyễn Thụy Thương Thương, PGS. TS. Timothy M Walker, GS Guy Thwaites, ThS. Vũ Thị Ngọc Hà – Đơn vị Nghiên cứu Lâm sàng Đại học Oxford (OUCRU), Tp Hồ Chí Minh đã dành sự giúp đỡ đặc biệt cho tôi trong những bước khởi đầu triển khai đề tài.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến Ban giám hiệu, Phòng Đào tạo Sau đại học - Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương đã tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và hoàn thành luận án. Tôi xin trân trọng cảm ơn các Thầy, Cô của hội đồng đánh giá luận án đã chỉ giáo cho tôi để hoàn thành tốt khóa luận.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đặc biệt tới Ban Lãnh đạo Bệnh viện Phổi Trung ương TS. BSCC Đinh Văn Lượng – Giám đốc Bệnh viện và phòng Tổ chức Cán bộ đã tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo, tập thể Bác sỹ, nhân viên khoa Khám bệnh, khoa Lao Hô hấp – Bệnh viện Phổi Trung ương, khoa Khám bệnh và điều trị bệnh nhân lao kháng thuốc – Bệnh viện Phổi Hà Nội đã giúp đỡ, tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình thu thập mẫu và dữ liệu nghiên cứu.

Tôi xin trân trọng cảm ơn tập thể Ban lãnh đạo, cán bộ nhân viên khoa Vi sinh và Labo Lao chuẩn Quốc gia - BV Phổi Trung ương, các nhóm chuyên môn nhận mẫu, nuôi cấy kháng sinh đồ vi khuẩn lao, sinh học phân tử... đã phối hợp, hỗ trợ tạo điều kiện giúp đỡ tôi trong quá trình triển khai kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới nhiều vất vả và khó khăn nhất.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ tình cảm thân thương và lòng biết ơn đặc biệt đối với gia đình, người thân, bạn bè và đồng nghiệp đã luôn bên tôi, giúp đỡ động viên, chia sẻ những khó khăn vất vả để tôi có được điều kiện tốt nhất trong suốt quá trình học tập và thực hiện luận án.

Trân trọng cảm ơn !

Hà Nội, ngày 20 tháng 10 năm 2024



Khiếu Thị Thúy Ngọc

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU	3
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN	4
1.1. Tình hình bệnh lao trên thế giới và Việt Nam	4
1.1.1. Bệnh lao trên thế giới	4
1.1.2. Bệnh lao tại Việt Nam	7
1.2. Vi khuẩn lao	9
1.2.1. Một số đặc điểm hình thái, cấu trúc của vi khuẩn lao	9
1.2.2. Đặc điểm nuôi cấy	13
1.2.3. Đặc điểm hệ gen của vi khuẩn lao	14
1.3. Vi khuẩn lao kháng thuốc.....	17
1.3.1. Tần suất đột biến gen của vi khuẩn lao	17
1.3.2. Cơ chế kháng thuốc của vi khuẩn lao	22
1.3.3. Phân loại kháng thuốc của vi khuẩn lao	28
1.3.4. Một số nghiên cứu về lao kháng thuốc tại Việt Nam.....	29
1.4. Xét nghiệm chẩn đoán vi khuẩn học bệnh lao	32
1.4.1. Xét nghiệm AFB trực tiếp nhuộm huỳnh quang	33
1.4.2. Xét nghiệm nuôi cấy vi khuẩn lao trên môi trường đặc Lowenstein-Jensen và môi trường lỏng MGIT	34
1.4.3. Xét nghiệm kháng sinh đồ vi khuẩn lao trên môi trường lỏng MGIT	38
1.4.4. Xét nghiệm Xpert MTB/RIF	39
1.4.5. Giải trình tự gen	40
1.5. Điều trị bệnh lao	43
1.5.1. Nguyên tắc điều trị	43
1.5.2. Thuốc kháng lao:	44

1.5.3. Phác đồ điều trị lao	45
CHƯƠNG II: ĐỐI TƯỢNG, THỜI GIAN, ĐỊA ĐIỂM VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	49
2.1. Đối tượng, thời gian và địa điểm nghiên cứu	49
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu	49
2.1.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu	50
2.2. Phương pháp nghiên cứu	50
2.2.1. Thiết kế nghiên cứu	50
2.2.2. Cỡ mẫu nghiên cứu	51
2.2.2. Biến số của nghiên cứu	51
2.2.3. Các kỹ thuật được sử dụng trong nghiên cứu	52
2.2.4. Xử lý và phân tích số liệu	72
2.2.5. Không chế sai số và đạo đức trong nghiên cứu	73
CHƯƠNG III: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	76
3.1. Đặc điểm dịch tễ của mẫu nghiên cứu	76
3.1.2. Phân bố theo giới	76
3.1.2. Phân bố theo nhóm tuổi và giới	76
3.1.3. Phân bố theo tiền sử bệnh	77
3.1.4. Phân bố theo một số kết quả xét nghiệm	78
3.1.5. Đặc điểm kháng thuốc kiểu hình của mẫu nghiên cứu	79
3.2. Xác định các gen liên quan đến tính kháng thuốc của vi khuẩn lao phân lập từ bệnh nhân lao kháng Rifampicin tại Bệnh viện Phổi Trung ương và Bệnh viện Phổi Hà Nội năm 2020 – 2022.	80
3.2.1. Kết quả giải trình tự gen phát hiện đột biến kháng thuốc Isoniazid	80
3.2.2. Kết quả giải trình tự gen phát hiện đột biến kháng thuốc Rifampicin	82
3.2.3. Kết quả giải trình tự gen phát hiện đột biến kháng thuốc Ethambutol	85

3.2.4. Kết quả giải trình tự gen phát hiện đột biến kháng thuốc Pyrazinamide .	87
3.2.5. Kết quả giải trình tự gen phát hiện đột biến kháng thuốc Streptomycin .	89
3.2.6. Kết quả giải trình tự gen phát hiện đột biến kháng thuốc Moxifloxacin .	92
3.2.7. Kết quả giải trình tự gen phát hiện đột biến kháng thuốc Amikacin	93
3.2.8. Kết quả độ nhạy, độ đặc hiệu của xét nghiệm giải trình tự gen vi khuẩn lao từ mẫu đờm	95
3.2.9. Kết quả độ nhạy, độ đặc hiệu của xét nghiệm giải trình tự gen vi khuẩn lao từ mẫu chủng	98
3.3. Mối liên hệ kiểu gen của các chủng vi khuẩn lao phân lập từ bệnh nhân lao kháng Rifampicin bằng kỹ thuật giải trình tự toàn bộ hệ gen.	101
3.3.1. Phân loại kháng thuốc kiểu hình theo dòng vi khuẩn	101
3.3.2. Cây phát sinh chủng loại của quần thể vi khuẩn lao kháng thuốc tại Hà Nội năm 2020 – 2022	104
CHƯƠNG IV: BÀN LUẬN	106
4.1. Đặc điểm dịch tễ của mẫu nghiên cứu	106
4.1.1. Phân bố tuổi, giới và tiền sử bệnh của mẫu nghiên cứu	106
4.1.2. Đặc điểm kháng thuốc kiểu hình của mẫu nghiên cứu	112
4.2. Xác định các gen và vị trí đột biến gen liên quan đến tính kháng thuốc của vi khuẩn lao phân lập từ mẫu nghiên cứu	115
4.2.1. Gen và các đột biến gen liên quan đến kháng thuốc lao hàng một (Isoniazid, Rifampicin, Ethambutol, Pyrazinamide, Streptomycin).	115
4.2.2. Giải trình tự gen phát hiện đột biến kháng thuốc lao hàng hai (Moxifloxacin, Amikacin)	132
4.2.3. Độ nhạy, độ đặc hiệu của xét nghiệm giải trình tự gen MTB từ mẫu đờm.	134

4.2.4. Độ nhạy, độ đặc hiệu của xét nghiệm giải trình tự gen vi khuẩn lao từ mẫu chúng.....	137
4.3. Mối liên hệ kiểu gen của các chủng vi khuẩn lao phân lập từ bệnh nhân lao kháng Rifampicin bằng kỹ thuật giải trình tự toàn bộ hệ gen.	140
4.3.1. Phân loại kháng thuốc kiểu hình theo dòng vi khuẩn	140
4.3.2. Cây phát sinh chủng loại của quần thể vi khuẩn lao kháng thuốc tại Hà Nội năm 2020 – 2022	143
CHƯƠNG V. KẾT LUẬN	148
KHUYẾN NGHỊ	149
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	
.....	150
0	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Thuật ngữ tiếng anh	Thuật ngữ tiếng việt
ADN	Axit Deoxyribonucleic	Vật chất di truyền
AFB	Axit Fast Bacilli	Trực khuẩn kháng axit
AMK	Amikacin	
CAP	Capreomycin	
DST	Drug susceptibility tests	Thử độ nhạy cảm với thuốc
EMB	Ethambutol	
FLQ	Fluoroquinolon	
INH	Isoniazid	
KM	Kanamycin	
KSD		Kháng sinh đồ
MDR -TB	Multidrug Drug Resistance Tuberculosis	Lao đa kháng thuốc
MXF	Moxifloxacin	
MGIT	Mycobacteria Growth Indicator Tube	Nuôi cấy vi khuẩn lao trong môi trường lỏng
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Vi khuẩn lao
NPV	Negative predictive values	Giá trị dự báo âm tính
NTM	Nontuberculous Mycobacteria	Vi khuẩn Mycobacteria ngoài lao
PPV	Positive predictive values	Giá trị dự báo dương tính
Pre XDR - TB	Pre - Extensively Drug Resistant	Lao tiền siêu kháng thuốc
PZA	Pyrazinamid	
RIF	Rifampicin	
ROC	Receiver operating characteristic	Chỉ số đánh giá sự hữu hiệu của xét nghiệm
RR-TB	Rifampicin Resistance Tuberculosis	Lao kháng rifampicin
SM	Streptomycin	
SP3		Phần mềm phân tích dữ liệu tin sinh
WGS	Whole genome sequencing	Giải trình tự toàn bộ hệ gen
WHO	World Health Organization	Tổ chức Y tế thế giới
XDR-TB	Extensively drug resistance tuberculosis	Lao siêu kháng thuốc

DANH MỤC HÌNH

Hình 1. 1. Tỷ lệ bệnh nhân MDR / RR-TB trên thế giới năm 2022	7
Hình 1. 2. Vi khuẩn lao dưới kính hiển vi điện tử	9
Hình 1. 3. Cấu trúc thành tế bào của Vi khuẩn lao	11
Hình 1.4. Vi khuẩn lao khi nhuộm Ziehl – Nielsen	13
Hình 1.5. Khuẩn lạc của vi khuẩn lao trên môi trường nuôi cấy đặc	13
Hình 1.6. Sơ đồ hệ gen của vi khuẩn lao (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>) ...	15
Hình 1.7. Quá trình hình thành bệnh lao kháng thuốc	26
Hình 1.8. AFB trực tiếp nhuộm huỳnh quang	33
Hình 1.9. Ống cấy MGIT dương và nhuộm soi cận cấy trên tiêu bản nhuộm ZN từ ống MGIT(+)	36
Hình 1.10. Kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới	41
Hình 2.1. Các bước thực hiện xét nghiệm Xpert MTB/RIF	53
Hình 2.2. Vùng xác định tính kháng RIF 81bp trên gen <i>rpoB</i>	54
Hình 2.3. Phân tích kết quả Xpert MTB/RIF Ultra	55
Hình 2.4. Các bước thực hiện xét nghiệm AFB trực tiếp nhuộm huỳnh quang	56
Hình 2.5. Xét nghiệm nuôi cấy, kháng sinh đồ vi khuẩn lao	58
Hình 2. 6. Quy trình phân tích dữ liệu tin sinh	73
Hình 2. 7. Sơ đồ nghiên cứu	75
Hình 3.1. Cây phát sinh chủng loại của quần thể vi khuẩn lao kháng thuốc .	105
Hình 4.1. Cấu trúc hệ gen của chủng <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	116
Hình 4.2: Cây phát sinh chủng loại của <i>M.tuberculosis</i> trên thế giới	141

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Ước tính gánh nặng của bệnh lao tại Việt Nam - năm 2022	8
Bảng 1.2. Một số gen liên quan đến kháng thuốc lao	23
Bảng 1.3: Quy định ghi kết quả xét nghiệm AFB nhuộm huỳnh quang	34
Bảng 1.4: Ghi kết quả xét nghiệm nuôi cấy vi khuẩn lao trên môi trường lỏng MGIT.....	36
Bảng 1.5. Phân loại mức độ liên quan đến kháng thuốc lao	43
Bảng 2.1. Nồng độ thuốc trong ống MGIT (thuốc dạng đông khô)	61
Bảng 2.2. Thể tích các thuốc trong ống cấy MGIT	63
Bảng 2.3. Thể tích thuốc PZA trong ống cấy MGIT	65
Bảng 2.4. Quy định báo cáo kết quả kháng sinh đồ thuốc lao hàng 1, 2	66
Bảng 3.1. Phân bố mẫu nghiên cứu theo một số kết quả xét nghiệm	78
Bảng 3.2. Phân loại kiểu hình kháng thuốc của mẫu nghiên cứu	80
Bảng 3.3. Vị trí đột biến gen và mức độ liên quan đến kháng thuốc INH ở các chủng kháng	81
Bảng 3.4. Vị trí đột biến gen và mức độ liên quan đến kháng thuốc INH ở các chủng nhạy	82
Bảng 3.5. Vị trí đột biến gen và mức độ liên quan đến kháng thuốc RIF ở các chủng kháng	83
Bảng 3.6. Vị trí đột biến gen và mức độ liên quan đến kháng thuốc RIF ở các chủng nhạy	84
Bảng 3.7. Vị trí đột biến gen và mức độ liên quan đến kháng thuốc EMB ở các chủng kháng	85
Bảng 3.8. Vị trí đột biến gen và mức độ liên quan đến kháng thuốc PZA ở các chủng nhạy	89

Bảng 3. 9. Vị trí đột biến gen và mức độ liên quan đến kháng thuốc SM ở các chủng kháng	89
Bảng 3.10. Vị trí đột biến gen và mức độ liên quan đến kháng thuốc MFX ở các chủng kháng	92
Bảng 3.11. Vị trí đột biến gen và mức độ liên quan đến kháng thuốc AMK ở các chủng kháng	94
Bảng 3.12. Vị trí đột biến gen và mức độ liên quan đến kháng thuốc AMK ở các chủng nhạy	94
Bảng 3.13. Số lượng, tỷ lệ kháng thuốc kiểu hình và kiểu gen từ mẫu đờm	96
Bảng 3.14. Giá trị độ nhạy, độ đặc hiệu của xét nghiệm giải trình tự gen trực tiếp từ mẫu đờm trong chẩn đoán lao kháng thuốc.	97
Bảng 3.15. Số lượng, tỷ lệ kháng thuốc kiểu hình và kiểu gen của mẫu chủng	99
Bảng 3.16. Giá trị độ nhạy, độ đặc hiệu của xét nghiệm giải trình tự gen từ mẫu chủng trong chẩn đoán lao kháng thuốc..	99
Bảng 3.17. Phân loại kháng thuốc kiểu hình của <i>M. tuberculosis</i> theo dòng vi khuẩn.....	101
Bảng 4.1. So sánh tỷ lệ đột biến trên gen rpoB của các chủng vi khuẩn lao kháng rifampicin ở các khu vực trên thế giới	125

DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 3.1. Phân bố mẫu nghiên cứu theo giới tính.	76
Biểu đồ 3.2. Phân bố mẫu nghiên cứu theo nhóm tuổi.	77
Biểu đồ 3.3. Phân bố mẫu theo tiền sử bệnh.	77
Biểu đồ 3.4. Kết quả kháng từng loại thuốc của mẫu nghiên cứu.	79
Biểu đồ 3.5. Biểu đồ vị trí đột biến gen và mức độ liên quan đến kháng thuốc RIF ở các chủng kháng.	84
Biểu đồ 3.6. Vị trí đột biến gen và mức độ liên quan đến kháng thuốc EMB ở các chủng nhạy.	86
Biểu đồ 3.7. Vị trí đột biến gen và mức độ liên quan đến kháng thuốc PZA ở các chủng kháng.	88
Biểu đồ 3.8. Vị trí đột biến gen và mức độ liên quan đến kháng thuốc SM ở các chủng kháng	90
Biểu đồ 3.9. Vị trí đột biến gen và mức độ liên quan đến kháng thuốc SM ở các chủng nhạy..	91
Biểu đồ 3.10. Vị trí đột biến gen và mức độ liên quan đến kháng thuốc MFX ở các chủng nhạy..	93
Biểu đồ 3.11. Giá trị AUC của xét nghiệm giải trình tự gen trực tiếp từ mẫu đàm trong chẩn đoán lao kháng thuốc.	97
Biểu đồ 3.12. Giá trị AUC của xét nghiệm giải trình tự gen từ mẫu chủng trong chẩn đoán lao kháng thuốc.	100
Biểu đồ 3.13. Phân loại kháng thuốc kiểu hình của <i>M. tuberculosis</i> theo dòng vi khuẩn.	102
Biểu đồ 3.14. <i>M. tuberculosis</i> kháng đơn thuốc theo dòng vi khuẩn	103

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh lao (TB) là một bệnh truyền nhiễm gây bởi vi khuẩn *Mycobacterium tuberculosis* và hiện đang là một trong những nguyên nhân chính gây tử vong do các bệnh truyền nhiễm trên khắp thế giới. Vi khuẩn lao có tên khoa học là *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) chính thức được xác định và mô tả vào năm 1882. Đây là công trình nghiên cứu của Robert Koch (1843-1910), và để ghi nhận công lao của ông, người ta còn gọi trực khuẩn lao gây bệnh trên người là trực khuẩn Koch (Robert Koch) [35]. Theo báo cáo về kiểm soát bệnh lao toàn cầu của Tổ chức Y tế thế giới năm 2023 (WHO Report 2022 Global Tuberculosis Control) khoảng 1/3 dân số thế giới nhiễm lao. Mỗi năm, có thêm gần 10 triệu người mắc lao mới và khoảng 1,4 triệu người tử vong do lao trên toàn cầu. Trong đó, 81% số bệnh nhân thuộc về 22 nước có gánh nặng bệnh lao cao [28]. Tuy nhiên, với rất nhiều nỗ lực của các tổ chức y tế, tỷ lệ phát hiện mặc dù liên tục được cải thiện nhưng chỉ đạt 66 % số bệnh nhân ước tính [196], do có những hạn chế về công tác chẩn đoán, đặc biệt là lao kháng thuốc. Như vậy, còn rất nhiều bệnh nhân lao không được phát hiện và chữa trị đang tiếp tục lây lan cho cộng đồng.

Từ năm 1943, streptomycin là thuốc chống lao đầu tiên được phát hiện và sử dụng hiệu quả. Sau đó, hàng loạt thuốc chống lao khác ra đời đã mở ra một kỷ nguyên mới trong điều trị bệnh lao, cũng như đã cứu chữa cho hàng triệu bệnh nhân lao khỏi căn bệnh nguy hiểm này. Cùng với sự phát triển của đại dịch HIV/AIDS, dịch tễ lao toàn cầu đã gây ra những thách thức rất lớn cho cuộc chiến chống lao của loài người, đó là sự tương tác giữa lao và đại dịch HIV/AIDS và sự phát triển của các chủng vi khuẩn lao kháng thuốc.

Từ khi WHO công bố COVID-19 là “Đại dịch toàn cầu” vào tháng 1/2020, do ảnh hưởng nặng nề của đại dịch COVID-19, tỷ lệ phát hiện bệnh nhân lao trên thế giới năm 2020 đã giảm khoảng 20%. Ở 3 nước có gánh nặng bệnh lao cao (Ấn độ, Indonesia và Philippine), số bệnh nhân lao phát hiện giảm khoảng 25-30% so với năm 2019. Tại Việt Nam, tỷ lệ này đã giảm 3,1%. Cũng theo báo cáo này, Việt Nam là một trong 30 nước có gánh nặng bệnh lao và lao kháng thuốc cao nhất thế giới. Ước tính tại mỗi năm có khoảng 170.000 ca mắc mới, 14.000 người tử vong, 70% người mắc lao ở trong độ tuổi lao động [186].

Lao kháng thuốc và lao siêu kháng thuốc là tình trạng hết sức nguy hiểm đối với cộng đồng, nguy hại đến sức khỏe, mất nhiều thời gian và chi phí điều trị cực kỳ tốn kém. Nguyên nhân dẫn đến lao kháng thuốc là do chậm trễ trong việc chẩn đoán lao kháng thuốc để đưa người bệnh vào điều trị kịp thời với phác đồ phù hợp. Đồng thời, bệnh nhân không tuân thủ quy trình điều trị, tự ý giảm liều hoặc ngừng thuốc khi chưa đủ thời gian điều trị. Quá trình điều trị dở dang, bệnh không khỏi mà còn nhanh tái phát, trở thành bệnh lao kháng thuốc. Thách thức lớn trong chẩn đoán và điều trị lao kháng thuốc là sự khó khăn trong việc xác định sớm và chính xác tính nhạy cảm với thuốc kháng sinh của vi khuẩn *M. tuberculosis*.

Do vậy, vấn đề đặt ra là làm thế nào để xác định được nhanh và chính xác loại vi khuẩn *M. tuberculosis* và dự báo tính kháng thuốc của chủng vi khuẩn gây bệnh để từ đó có hướng dẫn điều trị hiệu quả ngay từ sớm.

Xuất phát từ tình hình thực tế này, chúng tôi tiến hành đề tài “**Nghiên cứu một số đặc điểm hệ gen của các chủng vi khuẩn lao kháng thuốc phân lập từ bệnh nhân lao kháng Rifampicine tại Hà Nội năm 2020-2022**” nhằm đưa ra một phương pháp mới chẩn đoán lao kháng thuốc nhanh và chính xác. Nghiên

cứu được thực hiện tại Bệnh viện Phổi Trung ương và Bệnh viện Phổi Hà Nội trong thời gian từ năm 2020 – 2022.

MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU

- 1.** Xác định các gen liên quan đến tính kháng thuốc của vi khuẩn lao phân lập từ bệnh nhân lao kháng Rifampicin tại Bệnh viện Phổi Trung ương và Bệnh viện Phổi Hà Nội năm 2020 – 2022.
- 2.** Tìm hiểu mối liên hệ kiểu gen của các chủng vi khuẩn lao phân lập từ bệnh nhân lao kháng Rifampicin bằng kỹ thuật giải trình tự toàn bộ hệ gen.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

1.1. Tình hình bệnh lao trên thế giới và Việt Nam

1.1.1. Bệnh lao trên thế giới

Lao là căn bệnh truyền nhiễm xuất hiện từ rất lâu và là một trong những nguyên nhân gây tử vong hàng đầu trên thế giới do một tác nhân gây bệnh, xếp hạng trên cả HIV/AIDS. Trong những năm 1990, tỷ lệ mắc bệnh lao toàn cầu tăng chủ yếu do sự lan rộng của HIV ở vùng Sub-Sahara ở châu Phi. Năm 2005, tỷ lệ lao giảm chậm trong 6 vùng theo phân loại của WHO, bao gồm cả châu Phi. Với con số ước tính 1.400 trường hợp mắc lao/1 triệu người mỗi năm, bệnh lao được xếp vào hàng đầu trong 10 bệnh gây tử vong cao nhất trên thế giới.

Theo báo cáo của Tổ chức Y tế thế giới năm 2023 (WHO Global Tuberculosis Report 2023), hoạt động chẩn đoán và điều trị bệnh lao đã có sự phục hồi mạnh mẽ trên toàn cầu trong năm 2022, sau 2 năm gián đoạn liên quan đến COVID. Điều này đã giúp cải thiện những tác động tiêu cực của đại dịch đối với số người chết và mắc lao trên toàn cầu. Tuy nhiên, bệnh lao vẫn là nguyên nhân gây tử vong đứng thứ hai trên thế giới trong số các bệnh truyền nhiễm, chỉ sau COVID, và các mục tiêu toàn cầu trong công tác chống lao hiện nay vẫn đang hoàn toàn bị chậm tiến độ [186].

Số bệnh nhân lao mới được phát hiện và báo cáo năm 2022 trên toàn cầu là 7,5 triệu người. Đây là con số cao nhất kể từ khi WHO bắt đầu theo dõi bệnh lao toàn cầu vào năm 1995, cao hơn mức trước COVID (và mức đỉnh lịch sử trước đó) là 7,1 triệu vào năm 2019 và cao hơn từ 5,8 triệu vào năm 2020 và 6,4 triệu vào năm 2021. Con số được ước tính trong năm 2022 có thể bao gồm một lượng lớn những ca bệnh đã tồn đọng trong những năm trước nhưng việc chẩn đoán và

điều trị bị trì hoãn, do những tác động của COVID đã ảnh hưởng đến việc tiếp cận và cung cấp các dịch vụ y tế.

Trên toàn cầu trong năm 2022, bệnh lao đã gây ra khoảng 1,3 triệu ca tử vong. Con số này đã giảm so với ước tính trước đó của TCYTTG là 1,4 triệu trong năm 2020 và 2021, và gần như quay trở lại mức số ca tử vong của năm 2019. Sự gián đoạn của việc tiếp cận và cung cấp các dịch vụ y tế liên quan đến COVID được ước tính đã dẫn đến thêm gần nửa triệu ca tử vong trong ba năm 2020–2022. Việc quay về xu hướng giảm giống như thời điểm trước đại dịch có khả năng bắt đầu xảy ra vào năm 2023 hoặc 2024. Tuy nhiên, bên cạnh đó, khoảng cách giữa số người ước tính mắc lao và số ca được báo cáo đã được thu hẹp xuống là 3,1 triệu vào năm 2022, giảm từ khoảng 4 triệu trong cả năm 2020 và 2021, và trở lại mức trước đại dịch COVID trong năm 2019. Mức giảm về số ca tử vong do lao trên toàn cầu từ năm 2015 đến năm 2022 là 19%, còn cách rất xa với cột mốc trong Chiến lược chấm dứt bệnh lao của WHO là giảm 75% vào năm 2025.

Theo báo cáo về kiểm soát bệnh lao toàn cầu của Tổ chức Y tế thế giới năm 2023 (WHO-Global tuberculosis report 2022), dân số Thế giới năm 2022 là 7,88 tỷ người, trong đó ước tính có khoảng 10,4 triệu trường hợp mắc bệnh lao: khoảng 6,3 triệu ca mắc mới (61%), 90% là người trưởng thành, 65% là nam giới, 10% người mắc lao đồng nhiễm HIV (74% ở Châu Phi). Hầu hết các trường hợp được đánh giá trong năm 2023 tập trung ở châu Á (56%) và châu Phi (29%); tỷ lệ thấp hơn được ghi nhận ở Trung Đông (8%), châu Âu (4%) và châu Mỹ (3%). 22 quốc gia bị ảnh hưởng nặng nề bởi bệnh lao được cho là có tỷ lệ cao nhất toàn cầu kể từ năm 2000, chiếm đến 82% số trường hợp mắc bệnh lao của cả thế giới. Trong số 9 triệu trường hợp đó, khoảng 550.000 là trẻ em và 3,3 triệu là phụ nữ., đa số (56%) tập trung ở 5 nước gồm Ấn Độ, Indonesia, Trung Quốc, Philippines và Pakistan. 6 quốc gia có số lượng mắc bệnh nhiều nhất trong năm 2013 là Ấn Độ

(2.100.000), Trung Quốc (980.000), Nigeria (590.000), Pakistan (500.000), Indonesia (460.000) và Nam Phi (450.000). Chỉ riêng Ấn Độ và Trung Quốc đã chiếm đến 24% và 11% số trường hợp mắc bệnh lao toàn cầu.

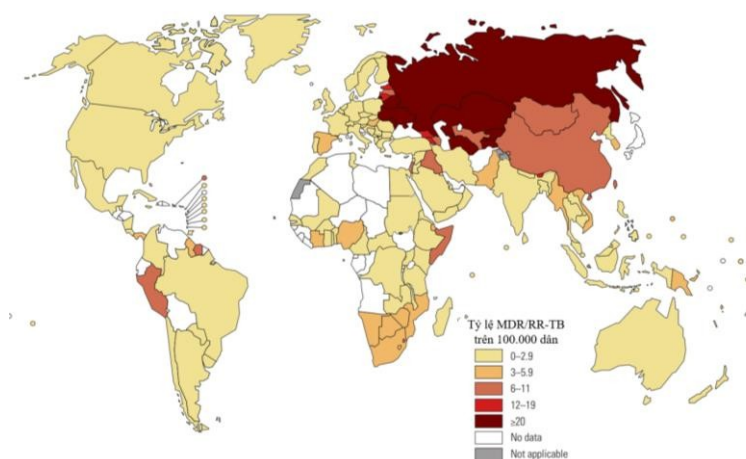
Bệnh lao không còn nằm trong top 10 toàn cầu (từ vị trí thứ 7 vào năm 2000 xuống thứ 13 vào năm 2019), trong đó tỷ lệ tử vong toàn cầu giảm 30%. Tuy nhiên, bệnh lao vẫn nằm trong số 10 nguyên nhân gây tử vong hàng đầu ở các khu vực châu Phi và Đông Nam Á [190].

Sáu quốc gia có số lượng mắc bệnh nhiều nhất trong năm 2023 là Ấn Độ (2.100.000), Trung Quốc (980.000), Nigeria (590.000), Pakistan (500.000), Indonesia (460.000) và Nam Phi (450.000). Chỉ riêng Ấn Độ và Trung Quốc đã chiếm đến 24% và 11% số trường hợp mắc bệnh lao toàn cầu [28].

Tỷ lệ mắc bệnh lao có liên quan đến kích thước quần thể và khác nhau rất nhiều giữa các quốc gia, từ dưới 10/100.000 dân ở các nước có thu nhập cao đến 150-300/100.000 dân ở 30 nước có gánh nặng bệnh lao cao và trên 500/100.000 dân ở một vài nước như Triều Tiên, Lesotho, Mozambique, Philipin và Nam Phi. Tỷ lệ mắc lao đang giảm khoảng 2% mỗi năm. Vùng giảm nhanh nhất là châu Âu (4,5% mỗi năm), và chậm nhất là vùng Trung Đông (giảm dưới 1% mỗi năm) và Đông Nam Á (1,5% mỗi năm). Chỉ số này cần phải được cải thiện với khoảng 4-5% mỗi năm để đạt được cột mốc đầu tiên (2020) của Chiến lược kết thúc bệnh lao [28]. Năm 2016, ước tính có khoảng 1,3 triệu ca tử vong do lao trong số người âm tính HIV (giảm từ 1,7 triệu người năm 2000) và cộng thêm 374.000 người chết do lao trong số người dương tính HIV. Trên toàn cầu, tỷ lệ tử vong do lao giảm khoảng 3% mỗi năm.

Trên toàn cầu trong năm 2022, ước tính có khoảng 1,13 triệu ca tử vong do lao trong số người âm tính HIV và cộng thêm 167.000 người chết do lao trong số người dương tính HIV. Như vậy con số chung là khoảng 1,3 triệu người tử vong

do bệnh lao trong năm 2022, trong đó 55% là nam giới, 33% là phụ nữ, 12% là trẻ em. Có khoảng 490.000 ca tử vong do mắc phải lao kháng Rifampicin và đa kháng thuốc (MDR/RR-TB) [192].



Hình 1. 1 Tỷ lệ bệnh nhân MDR/RR-TB trên thế giới năm 2022 [100, 186]

Nhìn chung, tỷ lệ tử vong trên toàn cầu do bệnh lao đã giảm đến 45% so với năm 2020; và các dự đoán hiện nay cho thấy rằng mục tiêu Thiên niên kỷ của Tổ chức Y tế Thế giới vào năm 2035 là giảm 75% số người tử vong do bệnh lao so với năm 2015; giảm 50% số người mắc lao mới so với năm 2015; không có bệnh nhân lao và gia đình họ phải đối mặt với chi phí thảm họa do bệnh lao gây ra [186].

Công cuộc thanh toán bệnh lao toàn cầu vẫn còn rất nhiều trở ngại và cần nhiều hơn nỗ lực từ các quốc gia, đặc biệt là phải biến các cam kết được đưa ra tại cuộc họp cấp cao của Liên hợp quốc về bệnh lao năm 2023 thành hành động cụ thể trong việc ứng dụng công nghệ hiện đại nhằm chẩn đoán nhanh và chính xác bệnh lao và lao kháng thuốc để thu dụng điều trị kịp thời bệnh nhân lao.

1.1.2. Bệnh lao tại Việt Nam

Ở nước ta, bệnh lao còn phổ biến và ở mức độ trung bình cao. Hiện nay, Việt Nam vẫn nằm trong top 30 quốc gia có gánh nặng bệnh lao cao nhất thế giới,

đứng thứ 10 về số người mắc lao cao và đứng thứ 11 trong 30 nước có gánh nặng lao kháng đa thuốc. Trong đó, 64% bệnh nhân lao thường và 98% bệnh nhân lao kháng thuốc phải chịu gánh nặng chi phí chữa bệnh cao. Được biết, 70% người mắc lao ở trong độ tuổi lao động. Vì vậy, căn bệnh này thực sự là một vấn đề ảnh hưởng đến kinh tế từng gia đình nói riêng và đất nước nói chung. Mặc dù Việt Nam được đánh giá có nhiều nỗ lực và hiệu quả hàng đầu về công tác phòng chống lao, nhưng hàng năm vẫn có khoảng 169.000 người nhiễm lao mới, 12.000 người chết vì bệnh lao (gấp 1,5 số người chết vì tai nạn giao thông). Tỷ lệ phát hiện lao các thể là 58%. Việc phát hiện sớm bệnh lao là vô cùng quan trọng và có tính quyết định với tỷ lệ chữa khỏi khoảng 25% trên thế giới và 75% ở Việt Nam. Thậm chí, ở Việt Nam, nếu người mắc lao lần đầu được phát hiện thì tỷ lệ chữa khỏi hoàn toàn trong vòng 4 - 6 tháng lên tới 90%.

Bảng 1.1. Ước tính gánh nặng của bệnh lao tại Việt Nam - năm 2022 [186]

<i>Ước tính gánh nặng bệnh lao – 2022</i>	<i>Số lượng (nghìn người)</i>	<i>Tỷ lệ (trên 100.000 dân)</i>
Tử vong do lao (loại trừ HIV)	11 (7,6-15)	11 (7,7-15)
Lao mới mắc các thể (bao gồm cả HIV +)	172 (119-247)	176 (121-251)
Lao /HIV dương tính mới mắc	4,3 (2,9-6,1)	4 (2,9-6,2)
Tỷ lệ phát hiện lao các thể (%)	59 (42-86)	
Tỷ lệ kháng đa thuốc trong BN mới (%)	4,5 (4,4 – 4,6)	
Tỷ lệ kháng đa thuốc trong BN điều trị lại (%)	15 (14 – 16)	
% bệnh nhân lao được xét nghiệm HIV	86%	
% HIV dương tính trong số người xét nghiệm HIV	2,5%	

* Nguồn: Vietnam Country Profile 2023, WHO Global TB Report 2023 [4, 186]

Năm 2023, ước tính có khoảng 5.224 trường hợp lao kháng thuốc MDR/RR-TB đã được thông báo, trong đó có khoảng 4,5% trường hợp mắc lao mới và 15% trường hợp lao đã được điều trị trước đó [4, 186].

1.2. Vi khuẩn lao

1.2.1. Một số đặc điểm hình thái, cấu trúc của vi khuẩn lao

Vi khuẩn lao - *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) do nhà khoa học người Đức Robert Koch phát hiện năm 1882.

Giới (domain): Bacteria

Ngành (phylum): Actinobacteria

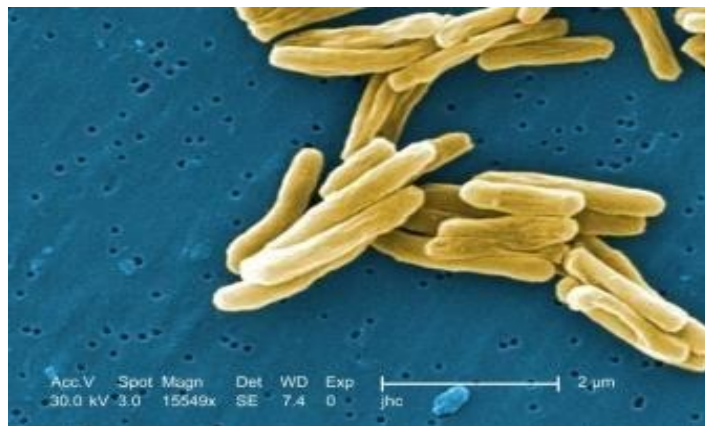
Bộ (ordo): Actinomycetales

Bộ phụ (subordo): Corynebacteriaceae

Họ (familia): Mycobacteriaceae

Giống (genus): *Mycobacterium*

Loài (species) : *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)



Hình 1.2. Vi khuẩn lao dưới kính hiển vi điện tử

* Nguồn: theo Palomino J. C.(2007) [143]

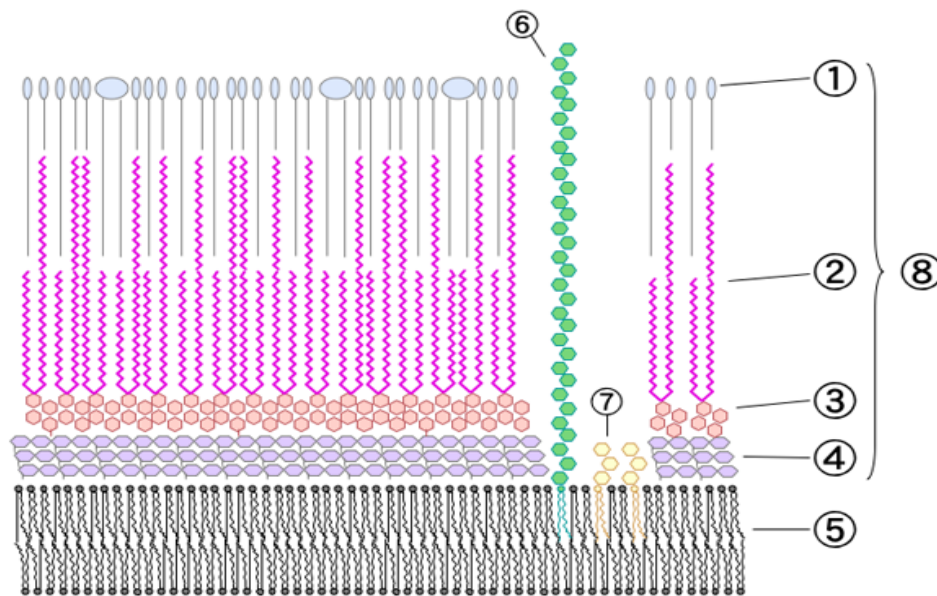
Mycobacterium tuberculosis (MTB) là vi khuẩn hiếu khí, thường có dạng hình que mảnh hơi cong, không di động, có chiều dài 2-4 μm . Chúng không có vỏ, không có lông và không sinh bào tử. Ở điều kiện tự nhiên, MTB có thể tồn tại 3-4 tháng. Trong phòng thí nghiệm người ta có thể bảo quản MTB nhiều năm.

Dưới ánh nắng mặt trời, MTB bị chết sau 1,5 giờ. Ở 420 C, MTB ngừng phát triển và chết sau 10 phút ở 800C, trong cồn 900 vi khuẩn tồn tại được ba phút, trong axid phenic 5% chỉ sống được một phút. Vi khuẩn lao phát triển rất chậm trong môi trường nuôi cấy, trung bình mỗi lần phân chia từ 48-72h, thường 1-2 tháng mới tạo được khuẩn lạc trên môi trường đặc Lowenstein- Jensen (gồm chủ yếu khoai tây, huyết thanh và asparagin), vi khuẩn lao mọc thành khuẩn lạc dạng R. Trong môi trường lỏng Sauton (là môi trường tổng hợp), vi khuẩn lao mọc thành vầng và lắng cặn. Vi khuẩn lao có thể xếp vào nhóm vi khuẩn Gram dương mặc dù không bắt màu một cách rõ ràng, catalase (+), sinh axid từ đường, có hoạt tính oxydase. Ngoại trừ 2 chủng gây bệnh bắt buộc là *M. tuberculosis* complex và *M. leprae*, các loài *Mycobacterium* sống tự do trong môi trường và được gọi là các *Mycobacteria* tự nhiên, những loài này cũng có thể gây bệnh cơ hội ở trên người và động vật [5, 7]

Chi *Mycobacterium* với hơn 190 loài khác nhau bao gồm các tác nhân gây bệnh ở người, đáng chú ý như *Mycobacterium tuberculosis* và *Mycobacterium leprae* và một nhóm lớn của *Mycobacteria* không lao (NTM). Bệnh lao có thể do một tổ hợp các chủng *M. tuberculosis* gây ra, bao gồm các loài *M.tuberculosis*, *M.canetti*, *M.microti*, *M.africanum*, *M. canetti* và *M.bovis* (còn được gọi là phức hợp *M.tuberculosis* complex), trong đó phức hợp *M.tuberculosis* complex là tác nhân gây ra bệnh lao trong khi đó nhóm vi khuẩn *Mycobacteria* không lao (Nontuberculous *Mycobacteria* – NTM) là tác nhân gây ra các bệnh nhiễm trùng phổi [93].

Vi khuẩn lao có thành tế bào chứa peptidoglycan được cấu tạo từ axit N-glycolylmuramic chứ không phải axit N-acetylmuramic như các vi khuẩn Gram dương khác. Liên kết với peptidoglycan là vô số các polysaccharide chuỗi phân nhánh, protein và lipid. Thành tế bào giàu lipid trong đó đặc biệt quan trọng là axit

mycolic (axit béo chuỗi dài) và các thành phần lipit khác gồm mycoside, sulfolipit và lipoarabinomanna (LAM, có cấu trúc và chức năng tương tự như lipopolysaccharide của vi khuẩn gram âm), đề kháng với nhiều chất khử trùng và kháng sinh [40, 113].



Hình 1. 3. Cấu trúc vách tế bào của vi khuẩn lao [40]

(1) – Lipit ngoài, (2) – Mycolic axit, (3) – Polysaccharide (arabinogalactan), (4) – Peptidoglycan, (5) – Màng plasma, (6) – Lipoarabinomanna (LAM), (7) – Phosphatidylinositol mannoside, (8) – Khung xương tế bào

M. tuberculosis có cấu trúc vách tế bào phức tạp, hoàn hảo mà ít vi sinh vật có được. Nó không những đảm bảo cho sự tồn tại của vi khuẩn mà còn làm cho vi khuẩn bền vững đối với hiện tượng thực bào, khi xâm nhập vào cơ thể vi khuẩn lao rất khó bị tiêu diệt. Vách tế bào có vai trò quan trọng đối với khả năng gây bệnh và tính kháng thuốc của vi khuẩn lao. Thành tế bào vi khuẩn lao có tỷ lệ lipit cao, chiếm tới hơn 60% trọng lượng khô của thành tế bào, trong đó axit mycolic là thành phần lipit chủ yếu. Thành tế bào cũng được đặc trưng bởi sự liên kết giữa các axit mycolic và các chất lipit phức tạp, tạo nên độc tính của vi khuẩn lao, làm

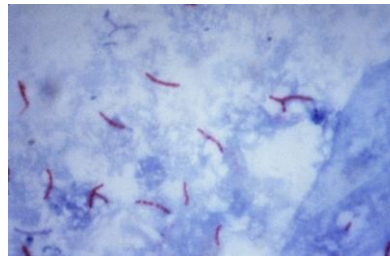
tăng khả năng chống thấm nước của thành vi khuẩn giúp vi khuẩn tồn tại lâu với môi trường bên ngoài, chống lại khả năng bị huỷ diệt của đại thực bào và các tế bào miễn dịch. Axit mycolic là các chất béo nhánh anpha duy nhất tìm thấy trong vách tế bào của *Mycobacterium* và *Corynebacterium*. Chúng chiếm 50% trọng lượng khô của vỏ tế bào *Mycobacteria* [122]

Đối với các vi khuẩn phát triển bên trong tế bào, ngoài 3 lớp nêu trên còn có lớp peptidoglycolipit phủ ngoài cùng vi khuẩn. Nó có tác dụng như chiếc áo giáp tăng cường thêm khả năng tự bảo vệ của vi khuẩn, giúp vi khuẩn chống lại được các enzym huỷ diệt tiết ra từ các tiêu thể (lysosome) của tế bào.

Cấu trúc khá hoàn hảo trên đây của lớp vỏ giúp cho vi khuẩn lao chống lại được mọi yếu tố tác động của môi trường bên ngoài, chống lại được tác động của axit và các chất kiềm ở một nồng độ nhất định. Trong điều kiện tự nhiên vi khuẩn lao có thể tồn tại 3 - 4 tháng. Trong phòng thí nghiệm người ta có thể lưu giữ và bảo quản chúng trong nhiều năm .

Vách tế bào MTB giàu lipit khiến cho bề mặt của tế bào trở nên kỵ nước làm cho nó trở nên khó nhuộm vì nó kháng lại với hầu hết các thuốc nhuộm cơ bản trừ khi chúng được xử lý bởi nhiệt hoặc các chất diệt khuẩn hoặc nhuộm trong thời gian dài. Một khi đã bắt màu thuốc nhuộm, *Mycobacterium* rất khó bị tẩy màu bằng hỗn hợp chứa hydrochloric axit và cồn ethanol, do đó được gọi là vi khuẩn kháng cồn, kháng axit (axit-fast bacillus hay AFB). Đặc tính này cho phép phân biệt nhanh chóng *Mycobacterium* với các vi khuẩn khác bằng cách kiểm tra dưới kính hiển vi. *Mycobacterium* nói chung có thể nhuộm bằng Carbofuchsin đun nóng (phương pháp Ziehl-Neelsen) hoặc để cho thuốc nhuộm tiếp xúc trực tiếp với vi khuẩn trong 5-10 phút (phương pháp nhuộm lạnh Kinyoun. *Mycobacterium* cũng có thể nhuộm được với thuốc nhuộm huỳnh quang (Auramine O, Rhodamine, Fluorochrome).

Vi khuẩn lao khó bắt màu các thuốc nhuộm thông thường. Thường nhuộm theo phương pháp Ziehl - Neelsen, trực khuẩn lao không bị cồn và axit làm mất màu của carbonfuchsin. Khi soi kính hiển vi, vi khuẩn lao bắt màu đỏ trên nền xanhmetylen [122].



Hình 1.4. Vi khuẩn lao khi nhuộm Ziehl – Nielsen

** Nguồn: theo Palomino J. C.(2007) [143, 144]*

1.2.2. Đặc điểm nuôi cấy

Vi khuẩn lao ưa khí bắt buộc, không mọc được ở điều kiện kỵ khí. Vì vậy, các trường hợp lao phổi thông thường tổn thương hay gặp ở thùy trên của phổi. Tuy nhiên, trong điều kiện thiếu oxy như trong các nốt vôi hoá, cục xơ hoá, cục bã đậu rắn chắc vi khuẩn lao vẫn tồn tại ở trạng thái không hoạt động trong khá nhiều năm [8].



Hình 1.5. Khuẩn lạc của vi khuẩn lao trên môi trường nuôi cấy đặc

** Nguồn: theo Lê Văn Phụng (2009)*

Vi khuẩn lao phát triển thuận lợi trên môi trường giàu chất dinh dưỡng (như môi trường Löwenstein – Jensen). Vi khuẩn này phát triển tốt nhất ở pH 6,2 – 7,2, chúng cũng có thể phát triển trên môi trường có pH axit (5,5) hay pH kiềm (8,0). Vi khuẩn lao có thể phát triển ở nhiệt độ 29 0C – 42 0C, nhưng phát triển tốt nhất

ở 37°C – 38 °C. Trên môi trường đặc Löwenstein (gồm chủ yếu khoai tây, huyết thanh và asparagin), vi khuẩn lao mọc thành khuẩn lạc dạng R. Trong môi trường lỏng Sauton (là môi trường tổng hợp), vi khuẩn lao mọc thành vầng và lắng cặn. Có thể nuôi cấy vi khuẩn lao trong môi trường lỏng Middlebrook 7H12, môi trường thạch bán tổng hợp Middlebrook 7H10 và 7H11 [8].

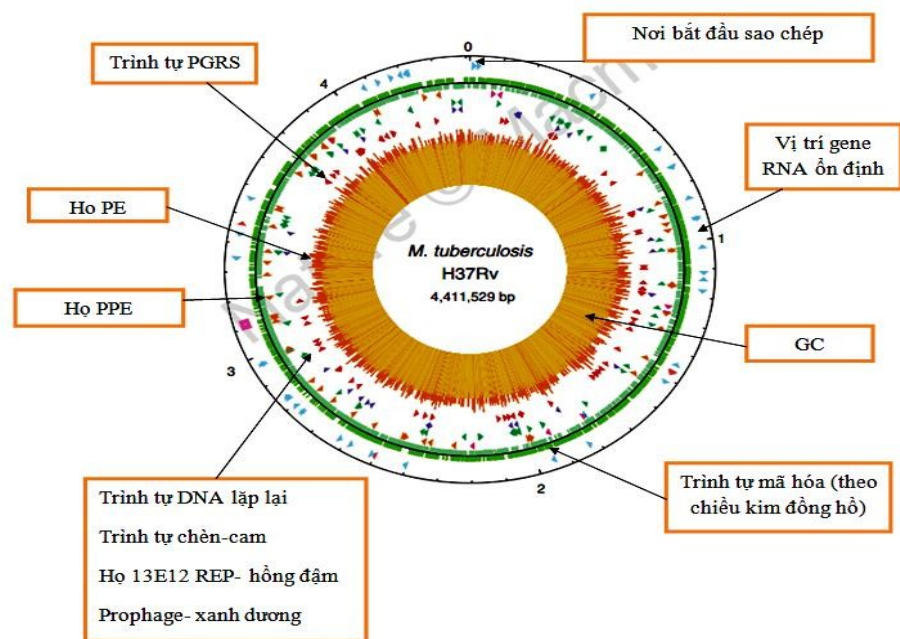
Hình thái khuẩn lạc: Vi khuẩn lao là vi khuẩn mọc chậm, thời gian một thế hệ của *Mycobacterium tuberculosis* khoảng 18 - 20 giờ, phải 4-6 tuần sau mới hình thành khuẩn lạc điển hình, dạng R. Khuẩn lạc tròn, nhẵn, sau đó sần sùi như hoa súp lơ (đường kính 5 – 10mm), màu kem. Các khuẩn lạc dễ lấy ra khỏi môi trường nuôi cấy nhưng khó tan trong nước [143]. Vi khuẩn nuôi cấy dương tính trên môi trường lỏng MGIT được định danh bằng thử nghiệm sắc ký miễn dịch phát hiện kháng nguyên MPT 64 đặc trưng của *M. tuberculosis* complex.

Vi khuẩn lao rất hiếu khí, phát triển tốt nhất khi áp suất O₂ là 100mmHg và áp suất CO₂ là 40mmHg trong các tổ chức. Đỉnh phổi và vùng phổi dưới xương đòn hay mắc lao nhất vì có áp suất O₂ từ 120-130mmHg, rồi đến thân xương và đầu xương có áp suất O₂ là 100 mmHg. Gan, lách, dạ dày, thực quản có áp suất O₂ thấp nên ít mắc lao hơn. Một hang lao nhỏ đường kính 2cm đã có thể có 10⁷ vi khuẩn (10 triệu), nơi tổn thương thiếu O₂ như các nốt vôi hóa, cục xơ hóa thì vi khuẩn ở trạng thái không hoạt động trong rất nhiều năm, gọi là trạng thái ngủ yên của vi khuẩn. Vi khuẩn lao sinh sản chậm, 20 giờ phân chia tế bào một lần, thường 1-2 tháng mới tạo được khuẩn lạc trên môi trường nuôi cấy. Tiến triển bệnh lao mang tính bán cấp hoặc mạn tính nhiều hơn là cấp tính [8].

1.2.3. Đặc điểm hệ gen của vi khuẩn lao

Hệ gen của vi khuẩn lao (*Mycobacterium tuberculosis*) được giải mã lần đầu tiên bởi nhóm nghiên cứu S.T.Cole đăng trên tạp chí Nature năm 1998. Theo báo

cáo này, hệ gen của *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) chủng H37 Rv là phân tử DNA trần, mạch vòng, dài 4.411.529 bp với khoảng 4.000 gen, trong đó có 3924 gen mã hóa cho protein và 50 gen mã hóa cho các RNA chức năng. Đây là genome có kích thước rất lớn, chứa nhiều Guanine và Cytosine (G + C khoảng 65%) và không thay đổi hầu như trên toàn bộ genome [52] [202] (hình 1.6).



Hình 1.6. Sơ đồ hệ gen của vi khuẩn lao (*M. tuberculosis*) [52]

*Nguồn: Nature Macmillan Publishers Ltd 1998 [52] [150]

Mặc dù, bộ gen MTB nhỏ hơn E.coli nhưng nó rất đa năng, các bộ ba mã hóa cho hầu hết các enzym đặc trưng cho con đường đồng hóa và dị hóa, cũng như những enzym cho tổng hợp và phân giải amino axit. Tuy nhiên, một nét đặc trưng thể hiện sự khác biệt của MTB so với các vi khuẩn khác là sự hiện diện với xấp xỉ 4.000 gen mã hóa hầu hết cho các enzym liên quan đến thủy phân lipid (giúp cho chúng tồn tại bên trong tế bào chủ) và tổng hợp lipid (giúp cho việc tổng hợp lớp vỏ cellular). Những vi khuẩn này thường được bao quanh bởi 250 enzym liên quan đến tổng hợp các axit béo [52].

Nghiên cứu của S.T.Cole cũng cho thấy bộ gen của MTB rất nhiều các vùng lặp DNA và các trình tự chèn. Một trong những đặc tính được quan tâm của *Mycobacterium tuberculosis* là sự có mặt và phân bố của các trình tự chèn (insertion sequence - IS), như IS6110 và IS1081, trong đó đặc biệt là đoạn IS6110. Tuy nhiên, một số lượng đáng kể các chủng khuyết gen IS6110 đã được tìm thấy ở châu Á, Ấn Độ và Việt Nam [127] [167]. Gen 23S rDNA là đoạn gen mã hóa cho tiểu phần 23S của ribosome và có mặt ở tất cả các chủng lao gây bệnh. MTB khác hẳn với các vi khuẩn khác ở chỗ phần lớn gen mã hóa của nó là dành cho việc mã hóa sản xuất các enzyme có liên quan đến quá trình tổng hợp axit béo (lipogenesis) và quá trình phân huỷ mỡ (lipolysis) và 2 loại protein giàu glycine có cấu trúc lặp lại có thể là nguồn tạo ra sự biến đổi kháng nguyên gây bệnh. Bộ gen có nhiều vùng ADN lặp lại, đặc biệt là các trình tự chèn, được chèn vào trong gen hoặc vào vùng không mã hóa, thường dẫn đến làm mất gen ARN vận chuyển. Việc chèn này cũng có thể làm xuất hiện những gen bị bất hoạt.

Khi so sánh trình tự mã hóa protein của MTB với toàn bộ các trình tự của các vi sinh vật khác cho thấy các axit amin alanine, glycine, proline, arginine và tryptophan được mã hóa bởi những codon giàu GC. Trong khi đó, những axit amin khác như asparagine, isoleucine, lysine, phenylalanine và tyrosine được mã hóa bởi những codon giàu AT. Ngoài chức năng tổng hợp lipid, các enzym cho các con đường tổng hợp glycolysis, pentose phosphate cho chúng ta thấy các chu trình tricarboxylic và glycoxylate cũng hiện diện trong MTB.

Trong số những protein tiết được nhận diện trong bộ gen của vi khuẩn thì có những protein có thể hoạt động như một nhân tố gây độc. Đó là phospholipases C, lipases và esterases, chúng có thể tấn công vách và màng không bào giống như một vài protease. Một trong số những phospholipid này liên quan đến sự tồn tại dai dẳng của vi khuẩn trong môi trường dinh dưỡng giới hạn.

Ở vi khuẩn lao, việc thông tin di truyền ngoài vai trò của nhiễm sắc thể còn có plasmid nằm ngoài nhiễm sắc thể. Có thể, nhiễm sắc thể của vi khuẩn đã truyền một số thông tin di truyền nào đó cho plasmid vì plasmid có phân tử nhỏ hơn nên nó dễ truyền thông tin từ tế bào này sang tế bào khác. Như vậy, trong cơ chế kháng thuốc của vi khuẩn lao ngoài nhiễm sắc thể, plasmid cũng đóng vai trò quan trọng.

1.3. Vi khuẩn lao kháng thuốc

1.3.1. Tần suất đột biến gen của vi khuẩn lao

Các nghiên cứu được thực hiện trước đó đã cho thấy kháng thuốc có mối liên quan mật thiết với những đột biến gen. Nhưng trong nhiều trường hợp, cơ chế và vai trò của các gen liên quan đến kháng thuốc chưa hoàn toàn được hiểu biết. Sự phức tạp của các quá trình này bùng phát và phổ biến lao kháng thuốc, gây khó khăn trong kiểm soát và đấu tranh chống lại các bệnh truyền nhiễm. Sự kháng thuốc của vi khuẩn lao được cho là sự đột biến ngẫu nhiên nhiễm sắc thể vi khuẩn lao được chọn lọc trong quá trình điều trị do không sử dụng đầy đủ liều lượng và hoặc không kết hợp các loại thuốc với nhau. Tần suất đột biến trong quá trình phân chia tế bào ở vi khuẩn lao đối với từng loại thuốc kháng sinh khác nhau lần lượt là Rifampicin (RIF) $3,32 \times 10^{-9}$, Isoniazid (INH) $2,56 \times 10^{-8}$, Ethambutol (EMB) $1,0 \times 10^{-7}$, Pyrazinamid (PZA) $1,9 \times 10^{-8}$ và Streptomycin (SM) $2,29 \times 10^{-8}$. Các phác đồ kết hợp thuốc cho bệnh nhân lao cũng có thể dẫn đến làm tăng nguy cơ mắc lao đa kháng thuốc [25, 53, 65, 69].

Hiện nay, năm loại kháng sinh vẫn đang được sử dụng thuộc nhóm thuốc chống lao thiết yếu hàng 1 gồm có INH, RIF, EMB, PZA và SM. Kháng các thuốc chống lao hàng 1 đã được chứng minh có liên quan đến những đột biến ở tối thiểu 7 gen gồm *katG*, *inhA* đối với kháng INH; *rpoB* đối với kháng RIF, đột biến trên

gen *embB* liên quan đến kháng EMB, *pncA* đối với kháng PZA và *rrs*, *gid*, *rpsL* liên quan tới kháng SM. Kháng thuốc lao hàng 2 như MFX (FQs thế hệ 4) có liên quan đến đột biến gen *gyrA* và đột biến gen *rrs* liên quan đến kháng thuốc nhóm aminoglycosides và polypeptides như AMK, CAP, KM [19, 69, 125, 157, 166].

Isoniazid (INH) hay còn gọi là isonicotinic hydrazide axit được tổng hợp rất sớm từ những năm đầu thế kỷ 20 nhưng chỉ được đưa vào sử dụng trong điều trị lao lần đầu tiên năm 1951 [27, 61, 200]. INH đi vào tế bào dưới dạng tiền thuốc, sau đó dạng tiền thuốc này sẽ được hoạt hóa bởi enzyme peroxidase mã hóa bởi gen *katG*. Hoạt tính peroxidase của enzyme cần thiết để hoạt hóa INH trở thành chất độc đối với tế bào vi khuẩn. Cơ chất độc này sau đó tác động tới các đích bên trong tế bào chẳng hạn như quá trình tổng hợp sinh học axit mycolic, chất này là một thành phần quan trọng của vách tế bào. Việc thiếu hụt axit mycolic dẫn đến kết quả cuối cùng là mất tính toàn vẹn của tế bào và làm cho vi khuẩn chết [124, 172]. Những nghiên cứu về gen đã chứng minh rằng các đột biến hoặc mất đoạn, thậm chí mất toàn bộ gen *katG* đã làm tăng mức độ kháng INH [83, 150].

Một trong những mục tiêu tác động của INH thể hoạt động là protein được mã hóa bởi gen *inhA*, đây là một enzyme khử enoyl–acyl carrier protein (ACP) [19, 124]. INH thể hoạt động bám vào phức hệ INHA-NADH để hình thành một phức hệ bậc 3, phức hệ này ức chế quá trình tổng hợp sinh học axit mycolic. Những đột biến điểm liên quan đến kháng INH bên trong cấu trúc gen *inhA* đã được xác định. Khoảng 70 – 80% các phân lập lâm sàng *M. tuberculosis* kháng INH có thể là do mang những đột biến trên các gen *katG* và *inhA* [124, 130, 150].

Rifampicin (RIF) đã được sử dụng lần đầu vào năm 1972 như một loại thuốc chống lao và cho thấy hoạt tính khử khuẩn tuyệt vời. Hoạt động của RIF kết hợp với PZA cho phép rút ngắn thời gian điều trị lao từ 1 năm xuống còn 6 tháng. RIF

còn kết hợp với INH hình thành bộ khung liệu pháp hóa trị liệu ngắn hạn. Một điều rất đáng chú ý rằng kháng đơn đối với INH thì khá phổ biến nhưng kháng đơn đối với RIF thì rất hiếm gặp. Nhiều giả thuyết đã đề xuất kháng RIF có thể được sử dụng như marker đại diện cho lao đa kháng thuốc bởi vì gần 90% các chủng kháng RIF cũng kháng luôn INH [145, 150, 195]. RIF gây nhiễu quá trình phiên mã RNA polymerase phụ thuộc DNA. RNA polymerase được hợp thành từ 4 tiểu phần gồm α , β , β' và σ được mã hóa bởi lần lượt các gen *rpoA*, *rpoB*, *rpoC* và *rpoD*. RIF gắn với tiểu phần β và cản trở quá trình phiên mã do đó làm chết vi khuẩn. Những nghiên cứu mở rộng trên gen *rpoB* ở những phân lập *M. tuberculosis* kháng RIF đã phát hiện rất nhiều đột biến và mất đoạn trên gen này. Trên 95% trong số các đột biến mất nghĩa nằm trong khu vực “hot spot” (còn gọi là khu vực xác định kháng RIF hay RRDR) gồm 81bp từ codon 507-533 [21, 37, 48, 68].

Pyrazinamid (PZA), tương tự nicotinamide, đã được khám phá lần đầu và thể hiện hoạt tính kháng lao vào năm 1952. PZA nhắm tới enzyme liên quan đến tổng hợp axit béo và chịu trách nhiệm tiêu diệt vi khuẩn lao kháng thuốc trong giai đoạn tấn công ban đầu của liệu pháp hóa trị [125, 157, 206]. Tuy nhiên, trong suốt 2 ngày đầu điều trị, PZA không có hoạt tính diệt khuẩn chống lại các loài vi khuẩn phát triển nhanh [157]. PZA là một tiền chất, chất này bị chuyển hóa thành dạng hoạt động là axit pyrazinoic (POA) nhờ enzyme pyrazinamidase (PZase) được mã hóa bởi gen *pncA*. Hoạt tính của PZA có độ đặc hiệu cao đối với *M. tuberculosis*, vì vậy nó không có tác động tới các vi khuẩn khác thuộc chi *Mycobacteria*. PZA duy nhất hoạt động chống *M. tuberculosis* ở pH axit bên trong tế bào chất nơi mà thuốc bị tích tụ lại do bơm thải hoạt động không hiệu quả. Sự tích tụ POA dẫn đến giảm pH nội bào tới mức độ bất hoạt quá trình tổng hợp axit béo quan trọng. Việc chọn dòng và nghiên cứu đặc tính của gen *pncA* ở *M.*

tuberculosis bởi Scorpio và cộng sự đã cho thấy những đột biến trên *pncA* dẫn tới kháng PZA [206]. Trên 70% các phân lập lâm sàng *M. tuberculosis* kháng PZA mang những đột biến rải rác khắp gen *pncA*. Trong một nghiên cứu từ Peru đã tìm thấy 59% các bệnh nhân lao đa kháng thuốc đã mang những chủng *M. tuberculosis* kháng PZA [183, 184]. Việc xác định tính nhạy cảm PZA đã không được thực hiện thường xuyên ở rất nhiều quốc gia do kỹ thuật phức tạp, tỷ lệ lặp lại thấp và dẫn tới các kết quả thiếu độ tin cậy. Thực vậy, mức độ kháng PZA trên toàn cầu gần như không biết. Kháng PZA đã chỉ ra mối liên hệ mật thiết với lao đa kháng thuốc và do đó nó đã được đề xuất rằng không nên dựa vào PZA để điều trị các bệnh nhân lao đa kháng thuốc [170, 183, 204]. Những đột biến trên gen *pncA* có mối liên hệ cao với kiểu hình kháng PZA. Tuy nhiên, các phân lập kháng PZA mà không tìm thấy đột biến trên gen *pncA* cũng đã được phát hiện, từ đó đưa ra giả thuyết rằng đã có cơ chế kháng khác có thể liên quan đến kháng PZA ở những phân lập này. Thêm vào đó, không phải tất cả các đột biến (ví dụ Thr114Met) đều liên quan đến kháng PZA. Thực vậy, sự phức tạp trong kháng PZA làm cho việc phát triển các phương pháp phân tử để chẩn đoán nhanh gặp khó khăn.

Ethambutol (EMB), thuộc nhóm thuốc kháng lao dòng 1, được sử dụng kết hợp với các thuốc khác và rất đặc hiệu với *Mycobacteria*. EMB ức chế enzyme arabinosyl transferase (mã hóa bởi gen *embB*) tham gia vào quá trình tổng hợp sinh học thành tế bào [83, 150, 194]. Rất nhiều nghiên cứu đã phát hiện các đột biến ở codon 306 có liên hệ với 70–90% tất cả phân lập kháng EMB [59, 150]. Những đột biến mất nghĩa khác ngoài đột biến tại codon 306 ở các phân lập kháng EMB cũng được phát hiện trong khu vực xác định tính kháng EMB (hay còn gọi là vùng ERDR). Trong một nghiên cứu mới thực hiện gần đây bởi Johnson và cộng sự [89, 126], cho thấy khi phân tích kiểu gen đã phát hiện những đột biến

tại codon 306 trên gen *embB* chứng minh cho tính kháng EMB ở *M. tuberculosis*. Tuy nhiên, việc phân tích kiểu hình thường xuyên thất bại tới 91,4% ở các phân lập kháng EMB và rất khó khăn trong việc xác định kiểu hình nhạy cảm EMB. Việc không có khả năng phát hiện chính xác các phân lập thực sự kháng EMB bằng nuôi cấy đã ảnh hưởng tiêu cực đến các chương trình chống lao. Những phương pháp dựa vào kỹ thuật phân tử cung cấp chẩn đoán nhanh kháng EMB và có thể bằng cách này sẽ đem đến lợi ích từ việc quản lý bệnh nhân lao trong ngày. Tuy nhiên những phân lập có kiểu hình kháng EMB (khoảng 30%) vẫn thiếu đột biến liên quan đến kháng thuốc đã được biết đến trên gen *embB*. Chính vì vậy, cần thiết phải có sự nghiên cứu sâu hơn và hiểu biết đầy đủ hơn về cơ chế kháng EMB ở các phân lập lâm sàng.

Cooksey (1996), Telenti (1993) đã nghiên cứu về thuốc Streptomycin (SM). Đây là aminocyclitol glycoside, thuộc nhóm thuốc chống lao dòng 1 được khuyến cáo trong điều trị lao bởi WHO. Hiệu quả của SM trên nhóm vi khuẩn đã được chứng minh diễn ra ở mức độ ribosom. SM tương tác với tiểu phần 16S rRNA và protein ribosom S12 (được mã hóa bởi lần lượt các gen *rrs* và *rpsL*), gây ra các thay đổi ribosom - là nguyên nhân chính gây đọc sai của RNA thông tin (mRNA) và ức chế tổng hợp protein. Mặc dù SM là thuốc chống lao được đề xuất sử dụng trong chương trình chống lao tuy nhiên nó có hiệu quả kém đối với *M. tuberculosis* hơn là INH và RIF [53, 55], Trong tổng số 65–67% các phân lập kháng SM đã mang các đột biến điểm trên gen *rrs* và *rpsL*. Những đột biến điểm thường thấy nhất ở vòng lặp 530 có mức độ bảo thủ cao trên gen *rrs* đã được xác định. Khu vực vòng lặp 530 là một phần của vị trí liên kết aminoacyl-tRNA và tham gia vào quá trình dịch mã. Sự chuyển C-T tại nucleotide 491 không đáp ứng kháng STR vì nó xảy ra ở cả những phân lập nhạy cảm và kháng SM nhưng nó lại có mối liên hệ mật thiết với quá trình lây lan toàn cầu của kiểu gen Western

Cape F11 ở *M. tuberculosis*. Ngoài ra, những đột biến tại vòng lặp 915 và khu vực 1400 trên gen *rrs* cũng được xác định có liên quan đến kháng SM. Đối với gen *rpsL*, các đột biến điểm cũng rất phổ biến và tác động đến tính kháng STR ở vi khuẩn lao. Phân tích MIC của các chủng kháng STR cho thấy sự thay thế axit amin ở gen *rpsL* liên quan đến kháng SM ở mức độ cao, trong khi đó những đột biến trên gen *rrs* dẫn đến kháng SM mức độ thấp. Thêm vào đó, đã có giả thuyết rằng kháng SM ở mức độ thấp là do tính thấm của tế bào bị thay đổi hoặc do những đột biến hiếm gặp khác nằm ngoài các gen *rrs* and *rpsL*.

1.3.2. Cơ chế kháng thuốc của vi khuẩn lao

Tính kháng thuốc của vi khuẩn lao liên quan đến sự phát sinh các đột biến một cách ngẫu nhiên ở các gen nằm trong vùng nhân của tế bào vi khuẩn. Các chủng vi khuẩn lao hoang dại không tiếp xúc với các thuốc chống lao sẽ không bao giờ xuất hiện tính kháng thuốc ngoại trừ kháng thuốc tự nhiên của các loài vi khuẩn với một số thuốc như *M. bovis* kháng pyrazinamid, *M. tuberculosis* kháng penicilli... [124, 146, 205].

Lao kháng thuốc là tình trạng vi khuẩn lao kháng lại với các thuốc kháng lao, hoặc do đột biến gen mắc phải hoặc do lây truyền gen kháng thuốc từ người này sang người khác. Gen kháng thuốc nằm trên nhiễm sắc thể của vi khuẩn và di truyền cho thế hệ sau. Hiện nay người ta đã xác định được bản đồ gen và nhiều mã gen kháng thuốc của vi khuẩn lao. Gen kháng thuốc mã hoá thông tin từ đó vi sinh vật sử dụng để chống lại hiệu lực ức chế đặc hiệu của kháng sinh theo các cơ chế sau đây:

- Làm giảm tính thấm của màng nguyên tương.
- Làm thay đổi đích tác động.

- Tạo ra các isoenzym không có ái lực với kháng sinh nên bỏ qua tác động của kháng sinh.
- Tạo ra enzym: Các enzym do gen đề kháng tạo ra có thể biến đổi hoặc phá huỷ cấu trúc hoá học của phân tử kháng sinh.

Bảng 1.2. Một số gen liên quan đến kháng thuốc lao [184, 187]

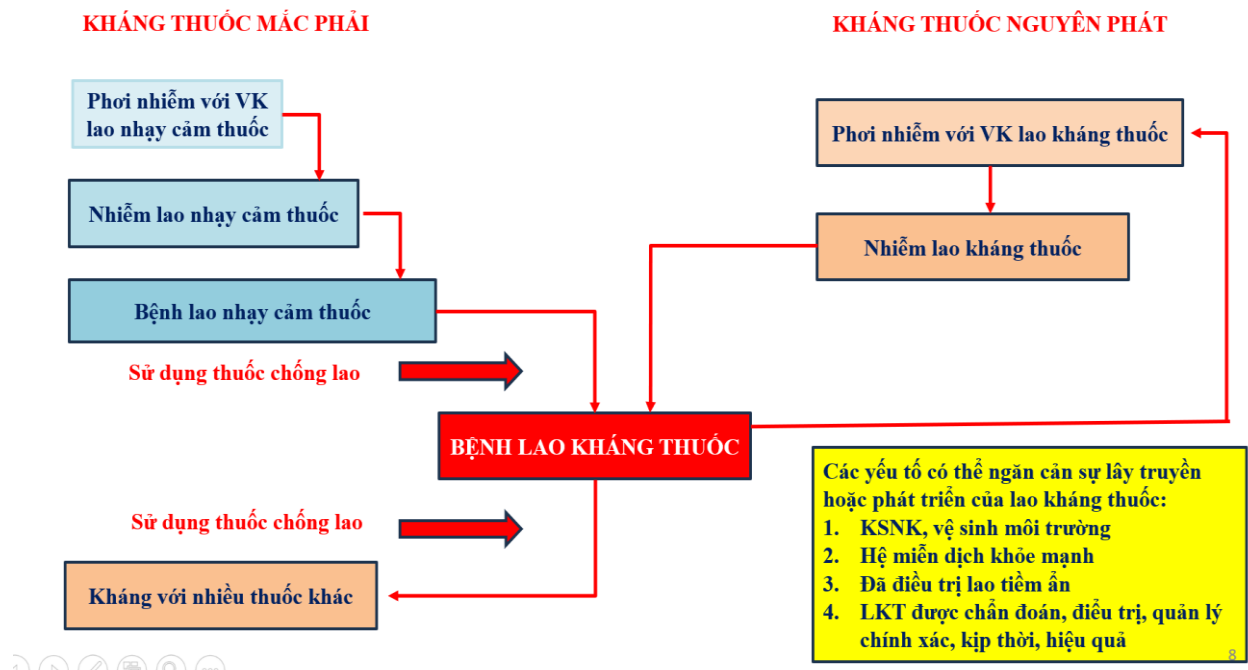
	Thuốc (năm phát hiện)	Gen kháng thuốc	Cơ chế tác động
Thuốc lao hàng 1	Isoniazid (1952)	<i>katG</i>	Ức chế sinh tổng hợp axit mycolic và nhiều tác dụng khác
		<i>inhA</i>	
	Rifampicin (1966)	<i>rpoB</i>	Ức chế tổng hợp RNA
	Pyrazinamide (1952)	<i>pcnA</i>	Giảm tính thấm của màng tế bào
	Ethambutol (1961)	<i>embB</i>	Ức chế tổng hợp arabinogalactan
	Streptomycin (1944)	<i>rpsL</i>	Ức chế tổng hợp Protein
		<i>rrs</i>	
		<i>gidB</i>	
Thuốc lao hàng 2	Amikacin/ Kanamycin (1957)	<i>rrs</i>	Ức chế tổng hợp Protein
	Capreomycin (1960)	<i>tlyA</i>	
	Quinolones (1963)	<i>gyrA</i>	Ức chế tổng hợp DNA <i>gyrAse</i>
		<i>gyrB</i>	
	Ethionamide (1956)	<i>etaA / ethA</i>	Ức chế tổng hợp mycolic axit
		<i>inhA</i>	
	PAS (1946)	<i>thyA</i>	Ức chế tổng hợp folic axit

- Vi khuẩn kháng Rifampicin đột biến ở gen *rpo B* mã hoá tổng hợp ARN - polymerase.
- Vi khuẩn kháng Isoniazid đột biến ở gen *kat G*, *inh A*, *fabG*
- Vi khuẩn kháng Streptomycin và các Aminoglycosid: đột biến ở gen *rrs*, *gid*, *rpsL*.
- Vi khuẩn kháng Pyrazinamid: đột biến ở gen *pncA*.
- Vi khuẩn kháng Ethambutol: đột biến ở gen *embB*.
- Vi khuẩn kháng Moxifloxacin: đột biến ở gen *gyrA*.
- Vi khuẩn kháng Amikacin: đột biến ở gen *rrs*.

Trong quá trình nhân lên của vi khuẩn lao, tính kháng thuốc được phát triển theo những trật tự xác định. Tính kháng thuốc do sự phát sinh ngẫu nhiên các đột biến liên quan này được gọi là tính kháng di truyền. Khi không có mặt của thuốc kháng sinh, các chủng vi khuẩn lao miễn cảm thuốc phát triển lẫn át các chủng kháng thuốc. Sự có mặt của thuốc kháng sinh trong điều trị đã cung cấp một áp lực chọn lọc cho các chủng vi khuẩn lao. Các chủng miễn cảm bị ức chế sinh trưởng, thậm chí bị tiêu diệt, các chủng kháng thuốc trở thành ưu thế hình thành tính kháng thuốc thu được, đặc biệt là trong các bệnh nhân có chứa một lượng lớn trực khuẩn lao. Sự lây lan của các chủng kháng thuốc này sang những người khác làm cho những người này bị nhiễm vi khuẩn lao kháng thuốc ngay từ đầu (tính kháng thuốc nguyên phát). Tính kháng nhiều loại thuốc khác nhau của vi khuẩn liên quan đến sự có mặt đồng thời các đột biến ở các gen đặc hiệu. Ví dụ, tính kháng isoniazid của vi khuẩn lao có tần suất là 10^6 , sự xuất hiện các đột biến liên quan đến tính kháng rifampicin có tần suất khoảng 10^{-8} , và sự xuất hiện đồng thời các đột biến liên quan đến tính kháng cả 2 loại thuốc này là kết quả của hai đột biến độc lập nên sẽ có tần số rất thấp. Tuy nhiên, trong một quần thể vi khuẩn chỉ kháng isoniazid, các đột biến ngẫu nhiên phát sinh có thể dẫn đến tính kháng

rifampicin ở một vài cá thể. Khi bệnh nhân được điều trị bằng tổ hợp isoniazid và rifampicin, các chủng kháng cả 2 loại thuốc này được chọn lọc phát triển ưu thế. Tương tự như vậy, sự xuất hiện của các đột biến có thể dẫn đến tính kháng tổ hợp các loại thuốc kháng sinh khác ở vi khuẩn lao. Nguyên nhân dẫn đến xuất hiện các chủng vi khuẩn lao kháng thuốc có thể do việc điều trị không thích hợp hoặc không đầy đủ (sử dụng liệu pháp đơn trị liệu đầy đủ, chỉ định phác đồ điều trị không đúng - liều quá thấp, thời gian điều trị ngắn, không phối hợp thuốc hoặc phối hợp quá ít, có thời gian không dùng thuốc - và quan trọng nhất là bệnh nhân chưa được tiếp cận đầy đủ trong điều trị). Sự lan truyền các chủng lao kháng thuốc từ bệnh nhân sang những người khác càng làm cho vấn đề trở nên nghiêm trọng. Các kiểu hình kháng đa thuốc (MDR-TB) và siêu kháng thuốc (XDR-TB) được gây ra bởi sự tích tụ liên tiếp các đột biến trong các gen khác nhau liên quan đến sự đề kháng của từng thuốc riêng biệt [184].

Các nhà nghiên cứu cho rằng cơ chế kháng thuốc của vi khuẩn lao là do di truyền ở mức nhiễm sắc thể thông qua đột biến sinh ra chủng kháng thuốc. Hiện tượng này xảy ra ở những chủng vi khuẩn lao chưa một lần tiếp xúc với thuốc kháng lao nhưng ngay từ khi tiếp xúc lần đầu tiên chúng đã kháng lại thuốc đó.



Hình 1.7: Quá trình hình thành bệnh lao kháng thuốc

*Nguồn: *Companion Handbook to the WHO Guidelines for the Programmatic Management of Drug-Resistant Tuberculosis. 2014* [193]

Vi khuẩn lao kháng thuốc có thể là tiên phát hoặc thứ phát. Kháng thuốc tiên phát là hiện tượng lây nhiễm chủng vi khuẩn đã kháng thuốc tự nhiên. Kháng thuốc thứ phát thường xảy ra sau khoảng 3 tháng dùng thuốc, là do dùng thuốc kháng lao không đúng quy cách. Nếu xuất hiện kháng đa thuốc thì việc điều trị khó khăn hơn rất nhiều, đặc biệt ở những bệnh nhân vừa bị lao vừa mắc bệnh AIDS. .

Có 2 con đường hình thành lao kháng thuốc: (i) kháng thuốc mắc phải (thứ phát) và (ii) kháng thuốc nguyên phát. Các con đường này được kết nối với nhau và có nhiều yếu tố hình thành [6].

Kháng thuốc mắc phải (acquired resistance): là những chủng *M. tuberculosis* kháng thuốc xuất hiện ở bệnh nhân có tiền sử đã điều trị thuốc lao với thời gian từ một tháng hoặc hơn. Không giống như các vi khuẩn khác có thể kháng thuốc

qua việc tiếp nhận theo đường ngang (horizontal transfer) từ các yếu tố như plasmid, transposon hoặc integron, vi khuẩn lao có thể kháng thuốc chủ yếu nhờ vào đột biến tự phát trong các gen của nhiễm sắc thể, dẫn đến sự chọn lọc các chủng đề kháng trong quá trình điều trị [23, 99].

Kháng thuốc mắc phải là kết quả của việc điều trị không chính xác, không đầy đủ, chất lượng điều trị kém khiến cho vi khuẩn lao xuất hiện đột biến kháng thuốc. Việc sử dụng phác đồ đơn trị liệu với một thuốc kháng lao ở bệnh nhân lao phổi nhạy cảm thuốc là yếu tố nguy cơ xuất hiện các đột biến kháng thuốc một cách chọn lọc, các đột biến này nhân lên trong quá trình điều trị và hình thành chủng kháng thuốc. Nếu một cá nhân có kháng thuốc nguyên phát với một thuốc chống lao bất kỳ nhưng vẫn được điều trị bằng phác đồ chống lao có thuốc đó thì vi khuẩn lao sẽ phát triển thành chủng kháng thuốc với các thuốc khác trong phác đồ (ngoài thuốc đã bị kháng).

Các đột biến đa kháng thuốc tự nhiên là rất hiếm. Vì vậy phác đồ điều trị kết hợp các thuốc chống lao giúp ngăn chặn việc hình thành các chủng lao kháng thuốc. Đây là cơ sở lý luận trong việc tuân thủ điều trị cũng như sử dụng phối hợp thuốc trong quản lý bệnh lao.

Kháng thuốc nguyên phát (primary resistance): là tính kháng thuốc của các chủng kiểu hoang dại với các thuốc đặc hiệu. Ví dụ: tất cả các chủng *M. bovis* kiểu hoang dại đều có tính kháng thuốc tự nhiên với Pyrazinamid, *Mycobacterium tuberculosis* có tính kháng tự nhiên với Penicillin. Kháng thuốc tự nhiên thường do sự bất thường trong cấu trúc vách tế bào có chứa axit mycolic của vi khuẩn, từ đó các kháng sinh và các chất hóa trị liệu giảm thấm vào bên trong vi khuẩn. Gần đây, vai trò của cơ chế bơm đẩy (efflux) cũng được ghi nhận như một yếu tố quan trọng trong đề kháng tự nhiên của MTB với các kháng sinh như Tetracycline, Fluoroquinolone và Aminoglycosid [23, 99, 123].

Kháng thuốc nguyên phát xảy ra ở bệnh nhân mới được chẩn đoán lao, trước đó chưa sử dụng một liệu pháp điều trị chống lao nào hoặc đã điều trị với thời gian dưới 1 tháng. Người bệnh nhiễm vi khuẩn lao kháng thuốc ngay từ đầu. Con đường lây truyền lao kháng thuốc tương tự như trong bệnh lao nhạy cảm thuốc. Tỷ lệ người bệnh lao kháng thuốc trong cộng đồng cao làm gia tăng khả năng nhiễm lao kháng thuốc nguyên phát. Lao kháng thuốc không được chẩn đoán và điều trị kịp thời làm gia tăng tỷ lệ lưu hành lao kháng thuốc trong cộng đồng [4-7].

1.3.3. Phân loại kháng thuốc của vi khuẩn lao

Tính kháng thuốc của vi khuẩn lao được định nghĩa là “sự giảm mức mẫn cảm của *Mycobacterium tuberculosis* trong ống nghiệm làm cho chúng có sự khác biệt với các chủng đại chưa bao giờ tiếp xúc với thuốc kháng sinh” [193]

Theo hướng dẫn điều trị và chẩn đoán bệnh lao kháng thuốc của chương trình Chống Lao Quốc Gia, quyết định 162/QĐ-BYT 2024 tài liệu Hướng dẫn Chẩn đoán, điều trị và dự phòng bệnh Lao [3], căn cứ vào kết quả kháng sinh đồ hoặc các xét nghiệm chẩn đoán nhanh được WHO chứng thực (Hain test, Xpert MTB/RIF...), tiêu chuẩn chẩn đoán cho các thể bệnh lao kháng thuốc được xác định như sau:

- **Lao kháng đơn thuốc**(monoresistant TB): là những trường hợp vi khuẩn lao chỉ kháng với một thuốc chống lao hàng 1: isoniazid, rifampicin, pyrazinamide, ethambutol hoặc streptomycin.
- **Lao kháng nhiều thuốc** (polydrug resistant TB): là những trường hợp vi khuẩn lao kháng với nhiều hơn một thuốc chống lao dòng thứ nhất (nhưng không phải kháng đồng thời cả isoniazid và rifampicin).
- **Lao kháng đa thuốc (MDR-TB)**: là vi khuẩn lao kháng ít nhất với cả 2 loại thuốc là isoniazid và rifampicin.

- **Lao tiền siêu kháng (preXDR-TB):** Vi khuẩn lao đa kháng thuốc hoặc kháng Rifampicin và có kháng thêm với bất cứ thuốc nào thuộc nhóm Fluoroquinolone (FQs) (bao gồm Levofloxacin hoặc Moxifloxacin sử dụng trong phác đồ ngắn hạn hoặc dài hạn theo khuyến cáo hiện hành).
- **Lao siêu kháng thuốc (XDR-TB):** Vi khuẩn lao đa kháng hoặc lao kháng Rifampicin có kháng thêm với bất cứ thuốc nào thuộc nhóm FQs và bất cứ thuốc nào trong ba thuốc tiêm hàng hai (Capreomycin, Kanamycin, Amikacin).

1.3.4. Một số nghiên cứu về lao kháng thuốc tại Việt Nam

+ Rất ít các nghiên cứu cơ bản về cơ chế phân tử và gen kháng thuốc ở *M. tuberculosis* được thực hiện tại Việt Nam. Trong một nghiên cứu gần đây Nguyen Quang Huy (2017) đã phát hiện ra những kiểu gen đặc trưng liên quan tới kháng thuốc ở 50 chủng *M. tuberculosis* tại Việt Nam kháng đồng thời với 4 loại thuốc chống lao hàng 1 gồm RIF, INH, STR và EMB (còn gọi là chủng Quinidine Drug Resistance - QDR) [127]. Nghiên cứu đã tìm thấy những đột biến trên gen *rpoB* liên quan đến kháng RIF ở tất cả các chủng QDR, đặc biệt là 98% các đột biến này được phát hiện ở khu vực “hot spot”. Đột biến thường thấy nhất xuất hiện tại codon 531 (56%). Tất cả các chủng QDR cũng có đột biến trên gen *katG* trong đó 92% mang những đột biến tại codon 315. Các đột biến trên gen *inhA* được xác định là 12% trong số các chủng QDR được nghiên cứu. Do đó, những đột biến gen liên quan đến kháng INH đã được tìm thấy ở tất cả các chủng QDR. Đối với kháng STR, 98% chủng QDR mang các đột biến tại codon 43 hoặc 88 của gen *rpsL* (72%) hoặc tại vòng lặp 530 và khu vực 1400 trên gen *rrs* (38%). Trong khi đó 88% các chủng QDR có các đột biến trên gen *embB* liên quan tới kháng EMB, trong đó những đột biến tại codon 306 được xác định là 62% và không một đột

biến nào liên quan đến kháng thuốc được tìm thấy ở 15 chủng nhạy cảm cũng được thực hiện trong nghiên cứu này [2, 127, 128].

Đột biến kháng thuốc chống lao hàng 1 ở vi khuẩn lao tại Việt Nam cho thấy các kiểu đột biến kháng thuốc ở những chủng QDR rất đa dạng, quá trình tiến hóa kháng thuốc ở *M. tuberculosis* không theo thứ bậc, các đột biến khác nhau đa phần xuất hiện đồng thời trong quần thể. Nghiên cứu của Nguyễn Quang Huy và cộng sự năm 2017 đã xác định các điểm đột biến liên quan đến kháng 4 thuốc này và tần suất xuất hiện của chúng trong vi khuẩn lao phân lập tại Việt Nam. Đây là những thông tin khoa học quan trọng góp phần phát triển công cụ chẩn đoán lao kháng thuốc ở Việt Nam [127].

Nghiên cứu của Nguyễn Thị Vân Anh và cộng sự về lao kháng thuốc tiên phát tại Hà Nội, Việt Nam: tình hình hiện tại và các yếu tố nguy cơ là nghiên cứu được tiến hành với 506 bệnh nhân Lao mới (2007-2009) ở Hà Nội. Nghiên cứu đã cho thấy trong số 489 chủng phân lập được, có 298 (60,9%) là nhạy cảm với tất cả các loại thuốc thử nghiệm. Kháng với isoniazid (INH), rifampicin (RIF), streptomycin (SM), ethambutol (EMB) và MDR-TB chiếm tỷ lệ tương ứng 28,2%; 4,9%; 28,2%; 2,9% và 4,5% [73, 127, 175].

Mai Huyền và cộng sự đã nghiên cứu nhiễm lao đa chủng ở nông thôn miền Nam. Nghiên cứu 1.248 mẫu trực khuẩn lao được phân lập từ 1.248 bệnh nhân được phân tích bằng RFLP typing, spoligotyping và VNTR typing [78, 79]. Tỷ lệ nhiễm đa chủng ở nông thôn miền Nam vào khoảng 3,1%. Nhiễm đa chủng thường gặp hơn ở người mới điều trị lần đầu, tổn thương Xquang nhẹ và độ dương tính mẫu đờm thấp.

Tỷ lệ cao chủng Bắc Kinh và EAI4-VNM phân lập ở miền Bắc - Nguyễn Thị Vân Anh (2012) đã thử 221 mẫu trực khuẩn lao được lấy từ bệnh viện và cộng

đồng được phân tích bằng spoligotyping, 12, 15 và 21 MIRU VNTR typing. Chiếm đa số là chủng Bắc Kinh chiếm 38,5% và liên quan đến đối tượng trẻ tuổi ở thành thị. Chủng EAI cũng chiếm 38,5% trong đó EIA4-VNM chiếm 67% và liên quan đến đối tượng nhiều tuổi [2, 128].

Trần Ngọc Bửu (2012) nghiên cứu tăng lây truyền bệnh lao kiểu gen Bắc Kinh liên quan với kháng Streptomycin: nghiên cứu trên cộng đồng - Kết quả phân tích 2.531 bệnh nhân lao trong 4 năm (2003 - 2006) cho thấy có sự liên quan chặt chẽ giữa MDR-TB và chủng lao mang kiểu gen Bắc Kinh trong quần thể phụ thuộc vào sự đề kháng với streptomycin. Kháng streptomycin có thể tạo ra lợi thế cho các chủng Bắc Kinh so với các kiểu gen khác và dẫn đến việc kháng thuốc ở bệnh nhân nhiễm chủng Bắc Kinh [42].

Việc ứng dụng các phương pháp phân tử cuối thập niên 20 đã thay đổi rất nhiều sự hiểu biết của chúng ta về sự lan truyền của bệnh lao và kháng thuốc ở bệnh lao và bằng cách nào các chủng kháng thuốc lại phát triển và lây lan trong quần thể. Các phương pháp dịch tễ học phân tử là công cụ mô tả về sự bùng phát lao kháng thuốc. Sự hiểu biết này giúp chúng ta ngăn ngừa xảy ra kháng thuốc cũng như nhận biết các gen liên quan tới kháng thuốc ở các thuốc mới. Tại Việt Nam cũng đã có một số nghiên cứu về gen kháng thuốc ở *M. tuberculosis*. Tuy nhiên, nghiên cứu chuyên sâu về các đặc điểm phân tử của vi khuẩn kháng thuốc chống lao hàng 1 và hàng 2 còn rất hạn chế một phần do thiếu sự đầu tư về công nghệ và nhân lực. Phần lớn các nghiên cứu tập trung khảo sát tình hình và tỉ lệ xuất hiện các đột biến trên các gen liên quan đến từng loại thuốc chống lao của các chủng vi khuẩn phân lập, chưa có nghiên cứu phân tích trực tiếp từ mẫu bệnh phẩm đờm của người nghi lao và đưa vào điều trị. Điều này đặt ra thách thức cho việc tiếp cận xử lý mẫu trực tiếp từ bệnh phẩm đờm để thực hiện việc tách chiết DNA và giải trình tự toàn bộ hệ gen *M. tuberculosis* xác định các gen liên quan

đến tính kháng đa thuốc của vi khuẩn lao, dự đoán khả năng kháng thuốc lao hàng hai của vi khuẩn lao dựa trên kết quả của kỹ thuật giải trình gen.

Thông qua sự hợp tác chặt chẽ giữa Việt Nam và Anh, đã có một số đề tài sử dụng công nghệ giải trình tự gen để nghiên cứu về vấn đề kháng thuốc ở Việt Nam. Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương đã hợp tác với Đại học Cambridge, Vương Quốc Anh sử dụng công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới để định danh vi khuẩn kháng thuốc trong nhiễm khuẩn bệnh viện. Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương đã hợp tác cùng Đại học Cardiff, Vương Quốc Anh để đánh giá cấu trúc gen của những vi khuẩn thông thường gây kháng thuốc ở Việt Nam. Tuy nhiên, vẫn chưa có nghiên cứu về giải trình tự gen nào ở Việt Nam tập trung vào lao kháng đa thuốc và cụ thể là ứng dụng để chẩn đoán và điều trị lao kháng đa thuốc.

1.4. Xét nghiệm chẩn đoán vi khuẩn học bệnh lao

Các phương pháp truyền thống được sử dụng để xác định Mycobacteria là xét nghiệm AFB trực tiếp và nuôi cấy vi khuẩn lao. Hiện nay, nuôi cấy vẫn được coi là tiêu chuẩn vàng để xác định Mycobacteria. Tuy nhiên, Mycobacteria có đặc tính sinh trưởng khá chậm, thường mất khoảng 3-8 tuần trên môi trường rắn và ít nhất 2 tuần trên hệ thống nuôi cấy lỏng (BATEC) dẫn đến việc chẩn đoán lao bị chậm trễ. Còn xét nghiệm AFB được sử dụng để định danh nhanh Mycobacteria trong mẫu bệnh phẩm tuy nhiên phương pháp này có độ nhạy thấp, thường phải lặp lại vài lần để khẳng định kết quả dương tính là chính xác và phương pháp này cũng chỉ xác định được là Mycobacteria mà không phân biệt được MTB hay NTM.

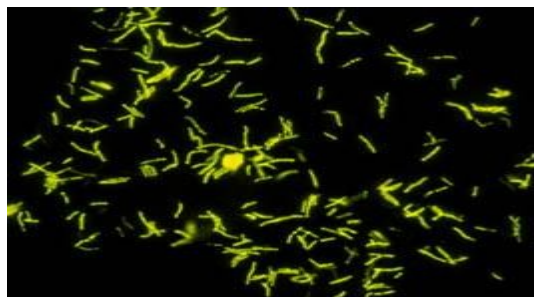
Do những hạn chế của các phương pháp truyền thống thì nhiều phương pháp chẩn đoán phân tử như PCR, real-time PCR, phương pháp lai với trình tự đã biết LPA, Xpert MTB/RIF, Xpert MTB XDR, giải trình tự gen, đã được phát triển để xác định nhanh sự có mặt của MTB và tính kháng thuốc trong mẫu bệnh phẩm

lâm sàng hoặc mẫu nuôi cấy. Các phương pháp này dựa trên sự khác biệt về trình tự gen IS6110, 16S-rRNA, hsp65, *rpoB*, *inhA*... để xác định MTB.

Một số xét nghiệm chẩn đoán vi khuẩn học bệnh lao đang được áp dụng:

1.4.1. Xét nghiệm AFB trực tiếp nhuộm huỳnh quang

Mycobacteria có lớp vách sáp dày chứa axit Mycolic, khi nhuộm Auramine thấm vào vi khuẩn do có phenol trong dung dịch nhuộm, khi tẩy màu AFB vẫn giữ được màu vàng của auramine do có tính kháng axit. Sau đó nhuộm nền bằng xanh methylene để tạo màu nền tối, thuận nhất cho ánh sáng phát quang. Khi soi bằng ánh sáng huỳnh quang AFB phát quang màu vàng sáng tương phản rõ ràng trên nền tối [5, 168] (hình 1.8). Kính hiển vi huỳnh quang có ưu điểm là soi nhanh hơn KHV quang học với nhuộm Ziehl – Neelsen và đặc biệt có giá trị ở những phòng xét nghiệm có khối lượng công việc lớn. Kỹ thuật này cũng có độ nhạy cao hơn ở những mẫu bệnh phẩm ít vi khuẩn vì diện tích vi trường được quan sát nhiều hơn [168]. Xét nghiệm nhằm phát hiện AFB giúp chẩn đoán, theo dõi, đánh giá kết quả điều trị. Các bước thực hiện xét nghiệm AFB trực tiếp nhuộm huỳnh quang theo quy trình thực hành chuẩn xét nghiệm Vi sinh lao [5].



Hình 1.8. AFB trực tiếp nhuộm huỳnh quang [5]

Nhận định kết quả: Đếm số lượng AFB và phân loại kết quả như bảng sau:

Bảng 1.3: Quy định ghi kết quả xét nghiệm AFB nhuộm huỳnh quang [5]

Số lượng AFB quan sát bằng vật kính x 20	Kết quả	Phân loại
0 AFB/ 1 dòng	Âm tính	Âm tính
1–29 AFB/ 1 dòng (scanty)	Dương tính	Ghi số lượng AFB cụ thể
30–299 AFB/ 1 dòng	Dương tính	1+
10–100 AFB/ 1 VT (soi ít nhất 10 VT)	Dương tính	2+
>100 AFB/ 1 VT (soi ít nhất 4 VT)	Dương tính	3+

Ghi chú: 1 dòng tương đương 30 vi trường, VT: vi trường

Xét nghiệm AFB trực tiếp nhuộm huỳnh quang có ưu điểm là kỹ thuật đơn giản, cho kết quả nhanh, giá thành thấp. Đây là xét nghiệm sàng lọc sớm giúp phát hiện nhanh nguồn lây chính trong cộng đồng. Tuy nhiên, xét nghiệm này cũng có những hạn chế về độ nhạy và độ đặc hiệu thấp, cần từ 5.000-10.000 vi khuẩn/1ml đờm mới có khả năng phát hiện. Đặc biệt với lao ngoài phổi, lao ở người có HIV lấy khó lấy bệnh phẩm thì khả năng phát hiện càng khó hơn. Đồng thời, xét nghiệm này không phân biệt được MTB với NTM, không phân biệt được vi khuẩn sống với vi khuẩn chết vì chỉ phát hiện dựa trên hình thái nhuộm soi kính hiển vi cũng như không phân biệt được vi khuẩn kháng với vi khuẩn nhạy cảm thuốc.

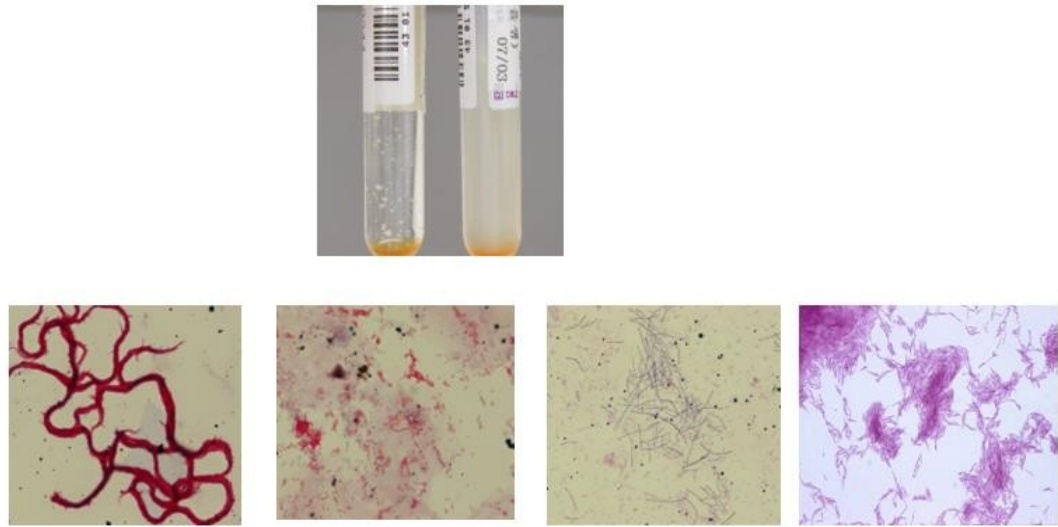
1.4.2. Xét nghiệm nuôi cấy vi khuẩn lao trên môi trường đặc Lowenstein-Jensen và môi trường lỏng MGIT

Cấy đờm có thể phát hiện từ 10-100 vi khuẩn/ml đờm, so với soi kính trực tiếp cần 5.000-10.000 vi khuẩn/1ml đờm. Xét nghiệm nuôi cấy được coi là tiêu

chuẩn vàng để chẩn đoán lao phổi. Ở những trường hợp lao phổi soi đờm trực tiếp âm tính, ví dụ ở những người nhiễm HIV, nuôi cấy giúp khẳng định chẩn đoán khoảng 49% bệnh nhân điều trị lao có soi trực tiếp âm tính nhiều lần. Nuôi cấy đờm ở bệnh nhân nhiễm HIV cần nhiều thời gian hơn bệnh nhân HIV âm tính vì những bệnh nhân lao nhiễm HIV có số lượng vi khuẩn trong đờm ít, nuôi cấy lỏng có thể rút ngắn khoảng 15 ngày so với môi trường Loweinstein Jensen.

Môi trường MGIT cung cấp dinh dưỡng cho sự phát triển của *Mycobacteria*. Hợp chất huỳnh quang gắn dưới đáy ống nhạy cảm với oxy hòa tan trong môi trường. Số lượng lớn oxy hòa tan trong môi trường ức chế sự phát quang của hợp chất huỳnh quang. Khi vi khuẩn sinh trưởng sẽ tiêu thụ oxy, hợp chất huỳnh quang thoát ức chế sẽ phát quang, mức độ phát quang tương ứng với mật độ vi khuẩn có trong môi trường, máy báo dương khi đơn vị tăng trưởng vượt 75 đơn vị, mật độ vi khuẩn trong ống cấy thường vào khoảng 105 đến 106/ml. Tuy nhiên có trường hợp ống báo dương khi lượng vi khuẩn trong ống MGIT thấp tới mức không quan sát thấy hình ảnh vi khuẩn trên lam nhuộm Zielh (hình 1.9). Do đó, không có mối liên quan trực tiếp giữa sinh khối và đơn vị tăng trưởng tại thời điểm máy báo dương tính. Thời gian cho kết quả dương tính tùy thuộc số lượng vi khuẩn có trong mẫu bệnh phẩm, thời gian cho kết quả âm tính sau 42 ngày [5].

Trường hợp ống MGIT báo ống dương tính và ghi lại chỉ số GU bằng 0 hoặc lớn hơn trong vòng 5 giờ kể từ lúc nhập máy, sự phát triển diễn ra rất nhanh vượt qua giới hạn 75 đơn vị. Cùng với đó, đồ thị đường cong tăng trưởng này rất dốc so với đường cong tiêu chuẩn, trong các trường hợp này, kết quả in từ máy sẽ ghi chữ T vào cột đơn vị tăng trưởng.



AFB cuộn thành đám

AFB vụn

Ngoại nhiễm

AFB kết thành đám

Hình 1.9. Ống cấy MGIT dương và nhuộm soi cận cây trên tiêu bản nhuộm ZN từ ống MGIT(+)

Máy BATEC báo kết quả tự động 60 phút /lần bằng tín hiệu đèn sáng và âm thanh. MGIT Growth Supplement cung cấp các chất thiết yếu giúp cho Mycobacteria phát triển, axit Oleic đóng vai trò quan trọng trong việc trao đổi chất, dextrose cung cấp năng lượng, albumin gắn vào các axit béo tự do, catalase tiêu hủy peroxide độc hại.

Hỗn hợp kháng sinh PANTA bổ sung vào môi trường cấy nhằm ức chế sự phát triển của nấm và vi khuẩn không phải Mycobacteria, giảm tỉ lệ ngoại nhiễm.

Nhận định kết quả cấy MGIT: Theo dõi các ống cấy MGIT hàng ngày và ghi nhận kết quả theo bảng 1.4.

Bảng 1.4: Ghi kết quả xét nghiệm nuôi cấy vi khuẩn lao trên môi trường lỏng MGIT.

Máy báo	Soi ZN	Định danh MTB	Trả kết quả
Dương	Không thấy AFB, có vi khuẩn khác, nấm,	Không thực hiện	Ngoại nhiễm

Máy báo	Soi ZN	Định danh MTB	Trả kết quả
	AFB điển hình	Dương tính	<i>M. tuberculosis</i>
		Âm tính	Trả kết quả dựa vào định danh phương pháp khác Niacin, LPA...
	AFB không điển hình	Âm tính	Trả kết quả NTM, Tư vấn lâm sàng cấy thêm mẫu khác
	AFB lẫn vi khuẩn khác	Dương tính	<i>M. tuberculosis</i> Phân lập MTB (nếu cần)
	Không thấy AFB, vi khuẩn, nấm (hiếm gặp)	Làm lại tiêu bản, lưu ý lấy được phần cặn và kỹ thuật cố định, nhuộm tiêu bản: + Nếu âm ủ âm theo dõi tiếp đến hết 42 ngày + Nếu có vi khuẩn, trả lời theo tình huống trên	
Âm tính	Quan sát: không thấy cặn vụn, GU=0	Âm tính	
	Có các tình huống hiếm gặp sau: + Có cặn nghi lao: vẫn cặn ở đáy ống hoặc bám vào thành ống, hoặc trên bề mặt môi trường. Khi lắc ống, môi trường trong. + GU >0. + Soi huyền dịch bệnh phẩm AFB dương.	Xử lý như ống máy báo dương	

Xét nghiệm nuôi cấy và định danh vi khuẩn lao trên môi trường lỏng MGIT có ưu điểm là chẩn đoán xác định *M. tuberculosis* với độ nhạy và đặc hiệu cao trên 85%, giúp chẩn đoán người bệnh ở giai đoạn sớm (trước khi thành nguồn lây chính), tăng số bệnh nhân phát hiện lên (30%-50%) , đồng thời giúp phân lập được chủng vi khuẩn để làm kháng sinh đồ hoặc cho các mục đích nghiên cứu. Tuy nhiên, xét nghiệm này cũng có một vài hạn chế về kỹ thuật phức tạp, giá thành cao và thời gian thực hiện xét nghiệm, theo dõi đến khi có kết quả kéo dài tối đa 42 ngày với các mẫu âm tính. Yêu cầu về trang Trang thiết bị đặc biệt như hệ thống máy li tâm, máy cấy BACTEC MGIT, tủ an toàn sinh học và điều kiện an toàn sinh học cấp độ II, nhân viên xét nghiệm phải được đào tạo bài bản có kỹ năng chuyên môn tốt.

1.4.3. Xét nghiệm kháng sinh đồ vi khuẩn lao trên môi trường lỏng MGIT

Đây là xét nghiệm nhằm xác định vi khuẩn lao và tính kháng thuốc lao hàng 1, 2. Hệ thống máy BACTEC MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube – Vi khuẩn Mycobacteria mọc trong ống nghiệm) là hệ thống máy nuôi cấy và phát hiện tự động sự phát triển của vi khuẩn Mycobacteria khi cấy vào môi trường MGIT. Sau khi định danh vi khuẩn lao và thực hiện kỹ thuật kháng sinh đồ, các ống môi trường xếp theo thứ tự vào các loại giá AST, nhập vào hệ thống BACTEC MGIT. Hệ thống tự động so sánh lượng vi khuẩn mọc ở ống chứa thuốc với ống chứng không chứa thuốc, phân tích kết quả và trả lời kết quả nhạy hoặc kháng trong khoảng thời gian 4-13 ngày với SIRE kit, thuốc hàng 2 và 4-21 ngày với PZA kit [5, 7].

Xét nghiệm này yêu cầu điều kiện cơ sở vật chất ở mức độ an toàn sinh học cấp độ 2 cho thực hiện kháng sinh đồ với chủng lây nhiễm. Đầy đủ trang thiết bị máy móc cho vận hành đạt tiêu chuẩn, được bảo dưỡng định kỳ hàng năm theo quy định của Bộ Y tế.

Xét nghiệm nuôi cấy, kháng sinh đồ vi khuẩn Lao trên môi trường lỏng MGIT được đánh giá là “tiêu chuẩn vàng” trong xác định vi khuẩn lao kháng thuốc. Xét nghiệm này có thể thực hiện từ chủng cấy MTB dương tính với độ nhạy và độ đặc hiệu cao tùy thuộc loại kháng sinh sử dụng. Tuy nhiên xét nghiệm này đòi hỏi yêu cầu cao về cơ sở vật chất, trang thiết bị, điều kiện an toàn sinh học và nhân sự cần được đào tạo chuẩn, và thời gian thực hiện cho kết quả xét nghiệm kéo dài nên chỉ áp dụng được ở các phòng xét nghiệm tuyến trên như tuyến vùng hoặc tuyến trung ương.

1.4.4. Xét nghiệm Xpert MTB/RIF

Xét nghiệm Xpert MTB/RIF là xét nghiệm sinh học phân tử nhanh nhằm phát hiện *Mycobacterium tuberculosis* và tính kháng Rifampicin trên hệ thống GenXpert tự động khép kín.

Sinh phẩm xét nghiệm Xpert MTB/RIF bao gồm cartridge và hóa chất xử lý mẫu. Trong cartridge chứa các hóa chất cần thiết cho việc phát hiện vi khuẩn lao và tính kháng Rif. Đồng thời, cartridge có các quy trình đối chứng: Đối chứng xử lý mẫu (Sample processing control-SPC) và Đối chứng kiểm tra mẫu dò (Probe check control-PCC). SPC bao gồm bào tử *Bacillus globigii* dạng đông khô không lây nhiễm có vai trò đảm bảo gen đích được nhân lên trong điều kiện thích hợp và không có các chất ức chế phản ứng PCR. PCC được hệ thống thực hiện trước khi bắt đầu quá trình nhân gen. Hệ thống đo lường tín hiệu huỳnh quang của các mẫu dò để kiểm tra sự hòa tan các hóa chất đông khô, quá trình làm đầy ống PCR, sự toàn vẹn của các mẫu dò và sự ổn định của chất nhuộm huỳnh quang. Hai quá trình này làm tăng độ tin cậy của kết quả [136, 139, 188].

Việc phát triển thử nghiệm GenXpert MTB/RIF trên nền tảng chung của hệ thống GenXpert đã được hoàn thiện năm 2009 và được xem là một bước đột phá

quan trọng trong cuộc chiến chống lại bệnh lao. Lần đầu tiên, một xét nghiệm sinh học phân tử được làm đơn giản, giảm thiểu các nguy cơ lây nhiễm, yêu cầu an toàn sinh học cũng như đào tạo nhân lực ban đầu, nhưng đủ mạnh để triển khai tại các phòng xét nghiệm thông thường. GenXpert MTB/RIF phát hiện được sự có mặt của vi khuẩn lao cũng như đột biến kháng bằng cách sử dụng 3 môi đặc hiệu và 5 đầu dò (probe) phân tử riêng biệt để đảm bảo độ đặc hiệu cao. Thử nghiệm này cho kết quả trực tiếp với bệnh phẩm đờm trong vòng 100 phút [12, 139].

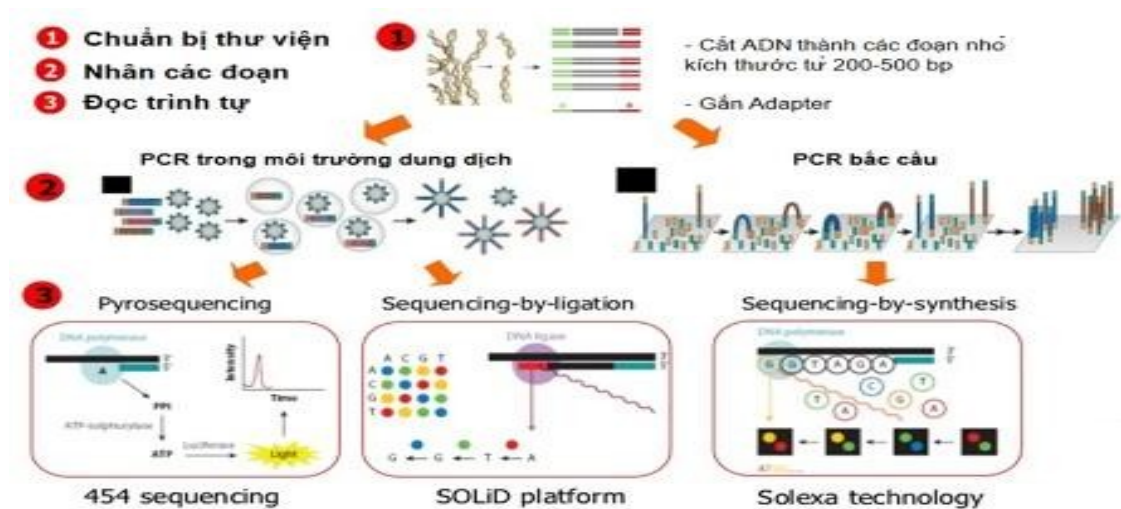
TCYTTG năm 2010 đã ra khuyến cáo về việc triển khai kỹ thuật Xpert MTB/RIF như một xét nghiệm ban đầu cho những trường hợp nghi lao kháng thuốc và lao ở người nhiễm HIV. Năm 2011, CTCL đã triển khai từng bước và ở từng cấp độ kỹ thuật này. GenXpert giúp trả lời câu hỏi có vi khuẩn lao hay không và vi khuẩn lao có kháng với RIF không, qua đó giúp chẩn đoán nhanh ca bệnh lao và lao kháng đa thuốc. GenXpert đã được Bộ y tế, CTCL ban hành quy trình triển khai kỹ thuật nhằm mục đích “Nhằm chẩn đoán nhanh bệnh lao, bệnh lao do vi khuẩn kháng RIF và bệnh lao ở người nhiễm HIV ” [139, 140].

Mặc dù có những ưu điểm như trên, GenXpert cũng có những hạn chế xuất phát từ bản chất của kỹ thuật, như rất phụ thuộc vào chất lượng của bệnh phẩm, hoặc cơ sở hạ tầng yêu cầu triển khai kỹ thuật như nguồn điện, máy vi tính, chuẩn hóa, và giá thành hiện nay của một xét nghiệm vẫn còn cao xấp xỉ 20 USD khi đã được trợ giá. Chính vì vậy mà những câu hỏi các CTCL ở từng quốc gia cần đặt ra đó là thời điểm nào triển khai (When), triển khai cho nhóm đối tượng nào và ở đâu (Where) và triển khai như thế nào (How).

1.4.5. Giải trình tự gen

Kỹ thuật giải trình tự hệ gen trên hệ thống MiniSeq dựa trên nguyên lý tổng hợp chuỗi (synthesis-based) bổ sung với gen đích; trong đó mỗi loại nucleotit sử

dụng trong phản ứng giải trình tự được đánh dấu với một chất huỳnh quang khác nhau và được phát hiện bằng hệ thống quang học. Từ đó cho phép xác định chính xác trình tự sắp xếp các nucleotit trên chuỗi DNA. Giải trình tự gen bằng kỹ thuật Sanger là phương pháp cổ điển, có khả năng đọc chính xác đoạn gen có độ dài khoảng 500-800bp.



Hình 1.10. Kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới

Hệ thống máy giải trình tự DNA thế hệ mới sử dụng công nghệ đọc trình tự theo nguyên lý tổng hợp (Sequencing by Synthesis – SBS). Đây là hệ thống giải trình tự gen thế hệ mới (Next Generation Sequencing), quy trình hoàn toàn tự động trên một máy duy nhất bao gồm quá trình tạo cluster, khuếch đại, chạy giải trình tự, rửa và phân tích kết quả (hình 1.10).

Giải trình tự gen thế hệ mới (NGS) đang được tiếp cận để chẩn đoán lao kháng thuốc cũng như theo dõi biến đổi di truyền của các chủng trên quần thể. Phương pháp này có khả năng phân tích toàn bộ DNA có mặt trong mẫu bệnh phẩm. Do vậy, nó có thể phát hiện các chủng MTB có mặt trong mẫu bệnh phẩm. Một số công nghệ khác nhau như Illumina, pyrosequencing hay ion torrent đã được phát triển cho NGS. Trong đó, giải trình tự Illumina là thế hệ thứ hai, sử

dụng 4 nucleotit đánh dấu huỳnh quang. Trong mỗi chu kỳ, một deoxynucleotit đánh dấu huỳnh quang được thêm vào chuỗi axit nucleic và kết thúc phản ứng tổng hợp.

Hệ thống máy NGS MiniSeq Illumina có công suất chạy phân tích 8 mẫu chủng hoặc 3 mẫu đờm trong một lần giải trình tự. Đọc giải mã 2 chiều cho gen có chiều dài 250bp tối đa là 7.5-8.5 Gb trong gần 39 tiếng khi sử dụng MiniSeq Reagent Kit v2; Công suất đọc 2 chiều đạt tới 13.2-15 Gb với chiều dài gen là 300bp trong vòng 56 tiếng khi dùng MiniSeq Reagent Kit v3 do dự án cung cấp. Chất lượng dữ liệu (Quality Score) > Q30 (độ chính xác 99.9%). Phần trăm dữ liệu có chất lượng > 85% > Q30 (giải 1 chiều được 25 triệu đoạn đọc, 2 chiều được 50 triệu đoạn đọc). Hệ thống quang học sử dụng đèn LED kích thích (515 nm, 650 nm). Tín hiệu huỳnh quang phát ra được ghi nhận và các base lần lượt được xác định, kết quả cho ra trình tự ADN phân tích [165].

Từ năm 1998, nhà khoa học Cole và cộng sự đã thực hiện giải trình tự toàn bộ hệ gen của chủng *M. tuberculosis* H37Rv. Quá trình giải mã, phân tích đã cung cấp những kiến thức về sinh bệnh học vi khuẩn lao, mở ra những khái niệm mới trong can thiệp phòng và điều trị bệnh. Toàn bộ hệ gen gồm 4.411.529 bp (base pairs- cặp base) chứa khoảng 4000 gen, với tỷ lệ GC (guanine + cytosine) cao khoảng 65%. Điểm khác cơ bản trong hệ gen giữa *M. tuberculosis* với những vi sinh vật khác là phần lớn các gen mã hoá những enzyme có liên quan đến việc tổng hợp và phân giải lipid, có 2 họ protein mới (PE và PPE) giàu glycine với cấu trúc lặp lại [52, 150]. Kể từ đó, giải trình tự toàn bộ bộ gen (WGS) đã được áp dụng cho một loạt các tình huống lâm sàng, với tiềm năng cách mạng hóa việc chẩn đoán bệnh lao (TB), điều tra ổ dịch, phát triển thuốc và vắc-xin, đồng thời hỗ trợ tìm hiểu sự tiến hóa và khả năng gây bệnh của vi khuẩn lao.

Trên cơ sở tổng hợp các kết quả giải trình tự gen từ các nghiên cứu trên thế giới, Tổ chức Y tế thế giới năm 2023 đã cập nhật phân loại mức độ tin cậy liên quan đến kháng thuốc kiểu gen thành 5 mức [187] (bảng 1.5).

Bảng 1.5: Phân loại mức độ liên quan đến kháng thuốc lao

Mức độ	Liên quan đến kháng thuốc
Mức độ 1	Liên quan đến kháng thuốc (<i>Associated with Resistance</i>)
Mức độ 2	Liên quan đến kháng thuốc - mức độ tạm thời (<i>Associated with Resistance – Interim</i>)
Mức độ 3	Ý nghĩa không chắc chắn (<i>Uncertain significance</i>)
Mức độ 4	Không liên quan đến kháng thuốc - mức độ tạm thời (<i>Not associated with Resistance – Interim</i>)
Mức độ 5	Không liên quan đến kháng thuốc (<i>Not associated with Resistance</i>)

Tuy nhiên phương pháp NGS có nhược điểm là giá thành khá cao so với phương pháp phổ biến khác như realtime-PCR và cần có chuyên gia có chuyên môn để phân tích kết quả trình tự gen cũng như so sánh với các dữ liệu trên ngân hàng gen để đưa ra kết luận cuối cùng.

1.5. Điều trị bệnh lao

1.5.1. Nguyên tắc điều trị

Nguyên tắc chung điều trị lao được áp dụng cho tất cả các thể lao, trên cơ sở phối hợp các thuốc lao [31, 133], bao gồm:

- ✓ Phối hợp các thuốc chống lao

Phối hợp ít nhất 3 loại thuốc trong giai đoạn tấn công và 2 loại ở giai đoạn duy trì. Sự phối hợp này có tác dụng nâng cao hiệu quả diệt vi khuẩn lao và hạn chế sự kháng thuốc.

✓ Phải dùng thuốc đúng liều

Các thuốc chống lao tác dụng hợp đồng, mỗi loại thuốc có một nồng độ nhất định. Nếu dùng liều thấp sẽ không hiệu quả và tạo ra các chủng kháng thuốc, dùng liều cao dễ gây tai biến.

✓ Phải dùng thuốc đủ thời gian và theo 2 giai đoạn tấn công và duy trì

+ Giai đoạn tấn công: Kéo dài 2 - 3 tháng nhằm tiêu diệt nhanh số lượng lớn vi khuẩn lao có trong các vùng tổn thương để ngăn chặn các đợt biến kháng thuốc.

+ Giai đoạn duy trì: Kéo dài từ 4 - 6 tháng nhằm tiêu diệt hết vi khuẩn lao nằm trong các tổn thương để tránh tái phát.

Đối với bệnh lao kháng thuốc: thành phần và thời gian sử dụng các thuốc theo từng giai đoạn tùy thuộc vào từng phác đồ.

✓ Phải dùng thuốc đều đặn

Các thuốc chống lao phải tiêm và uống cùng một lúc, cùng một giờ trong ngày, xa bữa ăn để thuốc hấp thụ tốt và đạt được nồng độ cao trong huyết thanh.

✓ Thời gian điều trị phải đủ và liên tục để tránh tái phát

Điều trị có kiểm soát nhằm mục đích

Theo dõi việc dùng thuốc của bệnh nhân.

Xử trí kịp thời các biến chứng của bệnh và tác dụng phụ của thuốc.

1.5.2. Thuốc kháng lao:

Các thuốc kháng lao dòng thứ nhất bao gồm Isoniazid (INH hay H), Rifampicin (RIF hay R), Pyrazinamid (PZA hay Z), Ethambutol (EMB hay E) và Streptomycin (STM hay S), Rifabutin (RFB). Các thuốc này đều đã qua các đánh

giá trên lâm sàng và là các loại thuốc được sử dụng trong phác đồ điều trị lao phổ biến nhất hiện nay (2HRZE/4HR).

Có 6 nhóm thuốc kháng lao dòng thứ hai được WHO công nhận là: (1) aminoglycosid (ví dụ như Amikacin, Kanamycin), (2) polypeptide (ví dụ như Capreomycin, Viomycin, Enviomycin), (3) fluoroquinolone (ví dụ như Ciprofloxacin, Levofloxacin, Moxifloxacin), (4) thioamide (ví dụ như Ethionamide, Prothionamide), (5) cycloserine và (6) para-aminosalicylic axit.

1.5.3. Phác đồ điều trị lao

Việc chỉ định điều trị và phác đồ điều trị bệnh nhân lao hiện nay tuân theo “Hướng dẫn Chẩn đoán, điều trị và dự phòng bệnh Lao” theo Quyết định số 162/QĐ-BYT ngày 19/01/2024 trên cơ sở tham khảo tài liệu của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) với chiến lược DOTS (Directly Observed Treatment Short - Điều trị có kiểm soát trực tiếp bằng phác đồ ngắn hạn) [3, 133]

Phác đồ A1: 2HRZE/4RHE (phác đồ 06 tháng – điều trị lao cho người lớn). Phác đồ điều trị lao chuẩn theo CTCLQG Việt Nam hiện nay là 2 tháng đầu với 4 loại thuốc kháng lao dòng thứ nhất (Isoniazid, Rifampicin, Pyrazinamid, Ethambutol (hoặc Streptomycin) và 4 tháng với Isoniazid, Rifampicin và Ethambutol dùng hàng ngày. Đối tượng chỉ định là lao người lớn, không có bằng chứng kháng thuốc hoặc nghi ngờ kháng thuốc trên lâm sàng bao gồm cả người nhiễm HIV và phụ nữ mang thai. Không chỉ định phác đồ này với lao hệ thần kinh trung ương, lao xương khớp.

Phác đồ A2: 2HRZE/4RH (phác đồ 06 tháng – điều trị lao cho trẻ em). Giai đoạn tấn công: kéo dài 02 tháng, với 04 loại thuốc: H, R, Z, E dùng hàng ngày; Giai đoạn duy trì kéo dài 04 tháng với 02 loại thuốc: R, H; dùng hàng ngày. Đối tượng chỉ định là lao trẻ em không có bằng chứng kháng thuốc hoặc không nghi

ngờ kháng thuốc trên lâm sàng. Có thể sử dụng cho trẻ nhiễm HIV. Không chỉ định phác đồ này với lao hệ thần kinh trung ương, lao xương khớp.

Cả hai phác đồ này được xếp là phác đồ I, chỉ định cho tất cả các trường hợp người bệnh lao mới. Nếu sau 2 tháng tấn công xét nghiệm đờm AFB vẫn dương tính thì kéo dài thời gian tấn công thêm 1 tháng bằng H, R, Z sau đó chuyển điều trị duy trì. Nếu tháng thứ 5 xét nghiệm đờm AFB âm tính thì tiếp tục điều trị duy trì, nếu dương tính coi là thất bại phải chuyển sang công thức tái trị.

Phác đồ B1: 2HRZE/10RHE (phác đồ 12 tháng - điều trị lao cho người lớn).
Giai đoạn tấn công: kéo dài 02 tháng, với 04 loại thuốc: H, R, Z, E; dùng hàng ngày. Giai đoạn duy trì: kéo dài 10 tháng, với 3 loại thuốc: R, H, E; dùng hàng ngày. Lưu ý: Đối với lao màng não sử dụng Corticosteroid (Dexamethasone hoặc Prednisolone) liều giảm dần trong 6-8 tuần đầu tiên và có thể sử dụng thêm Streptomycin trong giai đoạn tấn công với lao màng não nặng khi cân nhắc giữa lợi ích và nguy cơ. Chỉ định cho các trường hợp lao hệ thần kinh trung ương, lao xương khớp ở người lớn và không có bằng chứng kháng thuốc hoặc nghi ngờ kháng thuốc trên lâm sàng.

Phác đồ B2: 2HRZE/10RH (phác đồ 12 tháng – điều trị lao cho trẻ em).
Giai đoạn tấn công: kéo dài 02 tháng, với 4 loại thuốc: H, R, Z, E; dùng hàng ngày. Giai đoạn duy trì: kéo dài 10 tháng, với 02 loại thuốc: R, H; dùng hàng ngày. Lưu ý: Đối với lao màng não sử dụng Corticosteroid (dexamethasone hoặc prednisolone) liều giảm dần trong 6-8 tuần đầu tiên, và sử dụng thêm Streptomycine trong giai đoạn tấn công. Chỉ định cho các trường hợp lao hệ thần kinh trung ương, lao xương khớp ở trẻ em và không có bằng chứng kháng thuốc và không nghi ngờ kháng thuốc trên lâm sàng.

Phác đồ cá thể. Những trường hợp đang điều trị lao nhạy cảm thuốc (không có bằng chứng vi khuẩn hoặc lâm sàng nghi ngờ kháng thuốc) nhưng không đáp ứng, đáp ứng kém, không dung nạp với phác đồ chuẩn, không dung nạp, có biến cố bất lợi với thuốc chống lao. Hội chẩn xây dựng phác đồ phù hợp với từng ca bệnh, sử dụng tối ưu các thuốc có tác dụng đối với vi khuẩn lao.

Phác đồ C: Hiện tại, để điều trị lao đa kháng thuốc (MDR-TB), chương trình chống lao sử dụng phác đồ C cho các đối tượng khác nhau:

- **Phác đồ C1a:** 4-6Bdq[6]-Lfx-Pto-E-Z-Hh-Cfz /5 Lfx-Cfz-Z-E
- **Phác đồ C2a:** 4-6 Bdq[6]- Lfx- Lzd [2]- E -Z-Hh- Cfz/5 Lfx/Mfx-Cfz-Z-E thay thế Pto bằng Lzd (4 tháng Pto bằng 2 tháng Lzd)

Trường hợp không sử dụng được phác đồ C1, C2: khi không dung nạp các thuốc H, E, Z trong phác đồ C1, C2 hoặc kháng một trong các thuốc này (kháng H khi đột biến đồng thời *inhA* và Kat G, kháng E, Z), các phác đồ sau được sử dụng:

- **Phác đồ C3 :** 9-11 Bdq [6] Lfx Lzd Cfz (Z), hoặc Phác đồ BPaL

Lưu ý: việc sử dụng phác đồ C1a hay C2a tùy thuộc vào khả năng dung nạp của người bệnh, khả năng quản lý biến cố bất lợi (liên quan đến Lzd) của đơn vị và nguồn thuốc sẵn có tại mỗi thời điểm. Phụ nữ có thai sử dụng phác đồ C2a thay cho C1a. Trong trường hợp có đủ điều kiện và nguồn lực, ưu tiên sử dụng phác đồ C2a

- Thời gian dùng Bdq là 06 tháng, không kéo dài (trừ khi có chỉ định chuyển phác đồ dài hạn và cần thông qua hội chẩn hội đồng điều trị lao kháng thuốc và theo dõi an toàn thuốc chặt chẽ).
- Thời gian sử dụng 07 thuốc có thể kéo dài tới 06 tháng nếu xét nghiệm nhuộm soi đờm trực tiếp và nuôi cấy vẫn dương tính sau 04 tháng điều trị).

- Nếu xét nghiệm nhuộm soi trực tiếp không âm hóa ở tháng thứ 6, lâm sàng không cải thiện cần xem xét việc chuyển sang phác đồ dài hạn.
- Thời gian điều trị các phác đồ C1a, C1b và C2a phụ thuộc tình trạng âm hóa đờm thông qua XN soi đờm trực tiếp và nuôi cấy.

Tuy nhiên, việc áp dụng phác đồ điều trị bệnh nhân lao kháng thuốc MDR-TB còn nhiều phức tạp nên việc điều trị cần hội chẩn với hội đồng điều trị lao kháng thuốc (khu vực hoặc theo miền Bắc, Trung, Nam).

CHƯƠNG II: ĐỐI TƯỢNG, THỜI GIAN, ĐỊA ĐIỂM VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, thời gian và địa điểm nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Các mẫu đờm (và phiếu thu thập thông tin) của bệnh nhân lao đã có kết quả xét nghiệm Xpert MTB dương tính và kháng RIF đến khám tại BV Phổi Trung ương và BV Phổi Hà Nội trong thời gian từ năm 2020 – 2022.

- Tiêu chuẩn chọn mẫu

- + Các mẫu đờm được thu thập từ bệnh nhân/người nghi lao phổi mới từ 18 tuổi trở lên chưa điều trị với thuốc lao hoặc điều trị lao dưới hoặc bằng 30 ngày.
- + Mẫu đờm đạt chất lượng và có thông tin đầy đủ đi kèm bao gồm: họ và tên bệnh nhân, tuổi, giới, khoa, tiền sử bệnh, tình trạng điều trị với thuốc lao tại thời điểm thu mẫu.
- + Các mẫu đờm sau khi thu thập được kiểm tra chất lượng với thể tích từ 4-6ml đờm nhày mủ, làm xét nghiệm soi kính trực tiếp có kết quả dương tính. Các mẫu này sau đó được xử lý đồng nhất mẫu, khử tạp để tiến hành nuôi cấy phân lập vi khuẩn lao và làm kháng sinh đồ xác định tính kháng thuốc với các thuốc chống lao hàng 1 và hàng 2.

- Tiêu chuẩn loại trừ

- + Người nghi lao có tiền sử điều trị lao trên 30 ngày hoặc nghi lao dưới 18 tuổi.
- + Mẫu đờm không đạt chất lượng, không có thông tin đầy đủ thông tin bao gồm: họ và tên bệnh nhân, tuổi, giới, khoa, tình trạng điều trị với thuốc lao tại thời điểm thu mẫu, tiền sử bệnh.

- + Nảy sinh bất kỳ tình huống nào khi tham gia nghiên cứu, mà theo ý kiến của cán bộ nghiên cứu là có thể vi phạm thoả thuận tham gia điều tra, khiến việc tiếp tục tham gia nghiên cứu của đối tượng không an toàn, gây khó khăn cho việc diễn giải kết quả nghiên cứu hoặc gây trở ngại cho việc thực hiện các mục tiêu nghiên cứu.
- + Người nghi lao không đồng ý tham gia nghiên cứu
- + Không lấy chủng vi khuẩn phân lập được lần thứ hai của một bệnh nhân.
- + Các chủng bị tạp nhiễm.

Các tiêu chuẩn chọn chủng vi khuẩn được thực hiện theo quy trình của nhánh đề tài cấp Nhà nước “Nghiên cứu giải trình tự gen vi khuẩn lao nhằm dự báo tính nhạy cảm với thuốc kháng lao ở bệnh nhân lao kháng đa thuốc tại Việt Nam”, mã số đề tài NĐT.81.GB/20.

2.1.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- Thời gian nghiên cứu: Từ tháng 5/2020 đến hết tháng 12/2023
- Thời gian thu mẫu: Từ tháng 11/2020 đến hết tháng 12/2022
- Địa điểm nghiên cứu: Bệnh viện Phổi Trung ương và Bệnh viện Phổi Hà Nội

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả cắt ngang (cross sectional study), thu mẫu toàn bộ. Nghiên cứu được tiến hành bằng cách thực hiện xét nghiệm Xpert MTB/RIF, nhuộm Ziehl Neelsen, nuôi cấy và định danh vi khuẩn lao, làm kháng sinh đồ bằng phương pháp tỷ lệ (proportion method) trên môi trường lỏng MGIT với các thuốc kháng lao hàng 1: Rifampicin (RIF), Isoniazid (INH), Ethambutol (EMB), Pyrazinamid (PZA), Streptomycin (SM) và thuốc lao hàng 2: Moxifloxacin

(MFX), thực hiện phương pháp giải trình tự toàn bộ hệ gen (whole genome sequencing - WGS) để phát hiện đột biến kháng thuốc.

2.2.2. Cỡ mẫu nghiên cứu

Tổng số 100 mẫu đờm của bệnh nhân lao đủ điều kiện có kết quả xét nghiệm Xpert MTB dương tính và kháng RIF đến khám tại Bệnh viện Phổi Trung Ương và Bệnh viện Phổi Hà Nội trong giai đoạn từ năm 2020 – 2022.

+ Các mẫu được xử lý đồng nhất, khử tạp và chia làm 2 phần. Một phần được bảo quản bảo quản ở -80°C để thực hiện giải trình tự toàn bộ hệ gen trên hệ thống Miniseq Illumina. Một phần mẫu đờm được nuôi cấy phân lập và thực hiện kháng sinh đồ thuốc lao hàng 1,2, đồng thời thực hiện giải trình tự toàn bộ hệ gen từ chủng cấy dương tính với *M. tuberculosis*. Kết quả có 82 chủng vi khuẩn *M. tuberculosis* có đủ thông tin kháng thuốc kiểu hình và kháng thuốc kiểu gen từ chủng cấy dương tính với MTB được đưa vào phân tích.

+ Các mẫu đờm đạt chất lượng bảo quản ở -80°C được tách DNA và chạy giải trình tự toàn bộ hệ gen trên hệ thống Miniseq Illumina. Kết quả có 38 mẫu giải trình tự đạt chất lượng (kiểm soát chất lượng QC đạt trên 80 %) và các thông tin kháng thuốc kiểu hình và kiểu gen đầy đủ để phân tích giá trị chẩn đoán của xét nghiệm giải trình tự toàn bộ hệ gen vi khuẩn lao trực tiếp từ mẫu đờm.

2.2.2. Biến số của nghiên cứu

- ✓ Tuổi: Là số nguyên từ 1 trở lên. Nhóm tuổi người lớn từ 18 tuổi trở lên
- ✓ Giới: Nam hoặc Nữ
- ✓ Nơi cư trú: Tên huyện hoặc thành phố, tỉnh.
- ✓ Loại bệnh phẩm: mẫu đờm của người nghi lao
- ✓ Kết quả nhuộm soi: Dương tính: Scanty (số lượng AFB), 1+, 2+, 3+.

- ✓ Kết quả Xpert MTB/RIF: Dương tính theo các mức độ (Vết, rất thấp, thấp, trung bình, cao).
- ✓ Kết quả nuôi cấy lao và kháng sinh đồ: MTB, NTM.
- ✓ Mức độ kháng thuốc: Kháng (R) hoặc nhạy (S) với kháng sinh được thử nghiệm.

2.2.3. Các kỹ thuật được sử dụng trong nghiên cứu

2.2.3.1. Thu thập, bảo quản mẫu xét nghiệm

- Mẫu đờm được lấy vào buổi sáng sớm sau khi bệnh nhân ngủ dậy, súc miệng cho sạch nước bọt, vỗ ngực và lưng 2-3 phút cho long đờm khỏi vách phế quản, khạc đờm với số lượng từ 4-6 ml đờm đặc, nhày mủ vào tuýp falcon 50 ml có nắp vặn. Vận chuyển mẫu đờm bằng hộp có nắp đậy, sắp xếp các mẫu xét nghiệm để tránh làm đổ lọ đờm khi di chuyển của các bệnh nhân có kết quả xét nghiệm Xpert MTB/RIF dương tính và kháng RIF được thu thập. Các mẫu được xử lý mẫu theo quy trình nuôi cấy vi khuẩn lao trên môi trường lỏng MGIT. Cận bệnh phẩm sau li tâm được chia làm 4 phần. Một phần làm xét nghiệm AFB trực tiếp, 1 phần làm xét nghiệm Xpert MTB/RIF, 1 phần làm cấy MGIT và 1 phần bảo quản – 80 0C để thực hiện tách DNA làm giải trình tự NGS trực tiếp từ đờm:

2.2.3.2 Xét nghiệm Xpert MTB/RIF

Cận đờm sau khi xử lý khử tạp, đồng nhất và li tâm được phân chia để thực hiện các xét nghiệm Xpert MTB/RIF, nuôi cấy kháng sinh đồ vi khuẩn lao.

Hệ thống máy GenXpert Dx là hệ thống tự động có chức năng tách chiết mẫu, khuếch đại axit nucleic và phát hiện trình tự đích dựa trên phản ứng real-time PCR. Bộ sinh phẩm Xpert MTB/RIF là kit chẩn đoán in vitro trên hệ thống GenXpert giúp xác định vi khuẩn lao và tính kháng RIF từ bệnh phẩm.

Xét nghiệm Xpert MTB/RIF được thiết kế để nhận đoạn trình tự 192bp của gen *rpoB* ở vi khuẩn lao bằng phản ứng PCR. Trình tự các đoạn mồi và 5 mẫu dò được thiết kế đặc biệt để có khả năng phát hiện đột biến cao nhất và đảm bảo xác định được vùng thường xuyên xảy ra đột biến chứa 81bp. Mẫu dò huỳnh quang chứa trình tự có thể cặp đôi với DNA của chủng vi khuẩn lao trong tự nhiên. Xác định có đột biến kháng RIF dựa trên việc có ít nhất một mẫu dò không bắt cặp.

Các bước thực hiện xét nghiệm Xpert MTB/RIF:

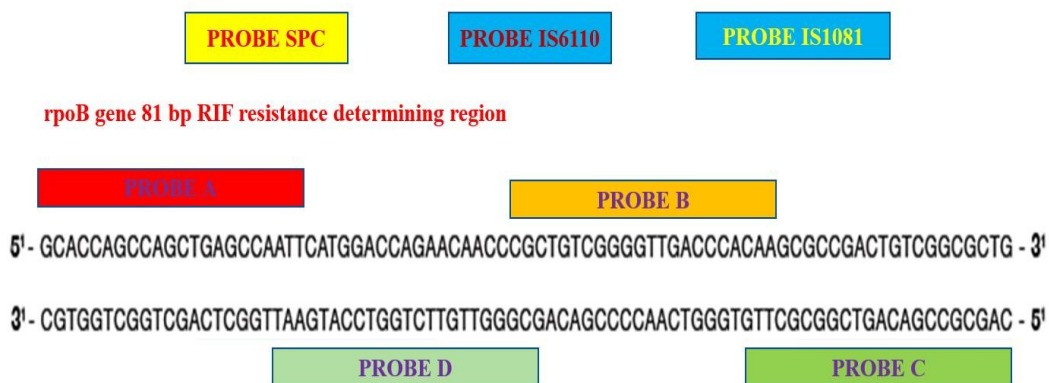


Hình 2.1. Các bước thực hiện xét nghiệm Xpert MTB/RIF [46, 633]

Kết quả từ các nghiên cứu phân tích cho thấy: việc phát hiện vi khuẩn lao bằng xét nghiệm Xpert MTB/RIF có độ nhạy 96,7% và độ đặc hiệu trên 98,3 %, giới hạn phát hiện vi khuẩn lao trong mẫu đờm là 131 cfu/ml đờm (đơn vị khuẩn lạc lao trong một ml đờm) [74]. Chỉ thị phân tử nhắm vào gen *rpoB* đã bao trùm được tất cả những đột biến tìm thấy trong hơn 99,5% các chủng kháng RIF. Không có phản ứng chéo với các vi khuẩn Mycobacteria không phải trực khuẩn lao. Vi khuẩn lao và tính kháng RIF được phát hiện chính xác cả khi có mặt DNA không phải của vi khuẩn lao hoặc trộn lẫn các chủng nhạy cảm và chủng đề kháng. Quy

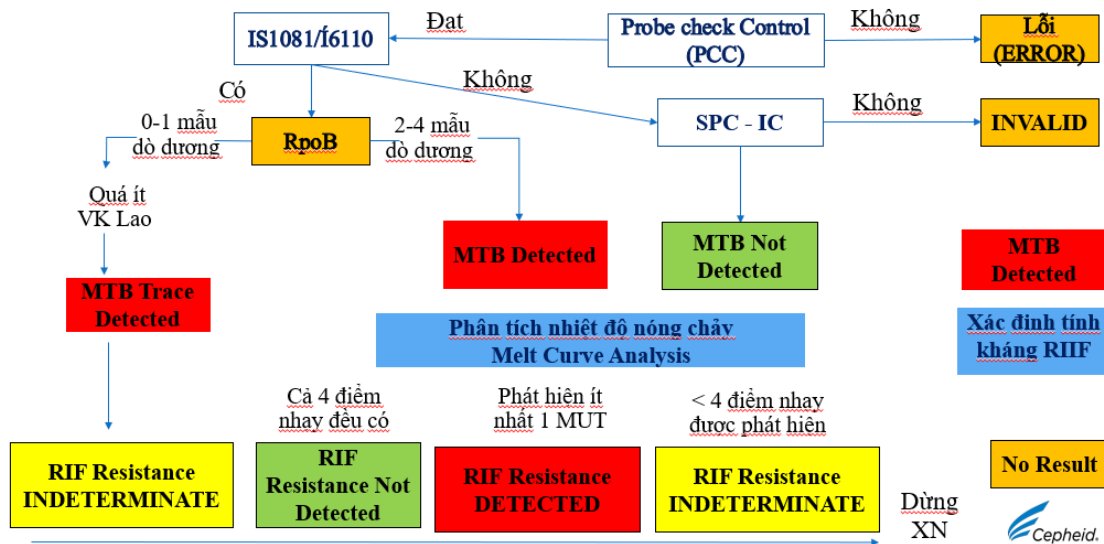
trình xử lý bệnh phẩm trong quá chuẩn bị bệnh phẩm và chạy máy GenXpert không tạo ra các hạt chứa vi khuẩn sống có khả năng lây nhiễm ở mức có thể phát hiện được so với các kỹ thuật như soi kính trực tiếp hay nuôi cấy [22, 48]. Đồng thời, hệ thống này có hai đối chứng nội tại bao gồm: SPC (đối chứng của quá trình xử lý mẫu) có thành phần là bào tử của vi khuẩn *Bacillus globigii*. SPC nhằm đảm bảo quá trình xử lý mẫu trong hộp chứa mẫu xét nghiệm (cartridges). Một đối chứng khác là PCC (Đối chứng kiểm tra mẫu dò) xác định các chất đã được hydrat hoá, ống PCR trong cartridge, mẫu dò toàn vẹn và thuốc nhuộm ổn định. Hai đối chứng này giúp làm tăng độ tin cậy của kết quả xét nghiệm.

Xét nghiệm Xpert MTB/RIF là xét nghiệm sinh học phân tử áp dụng hoàn toàn tự động với các bước như: tách gen, nhân gen và xác định gen.



Hình 2.2. Vùng xác định tính kháng RIF 81bp trên gen *rpoB* [15, 46]

Kỹ thuật sử dụng nhiều primer và probe để nhận biết tính kháng thuốc RIF. Phần mềm máy tính xác định tổ hợp các probe xuất hiện và đưa ra kết luận (hình 2.3).



Hình 2.3. Phân tích kết quả Xpert MTB/RIF Ultra [46, 57, 82, 138]

- Tách DNA:

Vi khuẩn bị tiêu hủy bởi sóng siêu âm mạnh, DNA của vi khuẩn được chiết tách và có hệ thống tự kiểm định chất lượng quá trình chiết tách.

- Nhân gen

Phản ứng nhân gen gọi là realtime hemi nested PCR là yếu tố quan trọng tạo nên độ nhạy đặc biệt của kỹ thuật.

- Xác định gen:

Các đoạn gen đặc hiệu của vi khuẩn lao và tính kháng RIF được phát hiện và đánh giá dựa trên việc sử dụng 5 primer đặc hiệu và 5 probe phân tử duy nhất để nhận biết sự hiện diện của vi khuẩn lao và tính kháng RIF của nó.

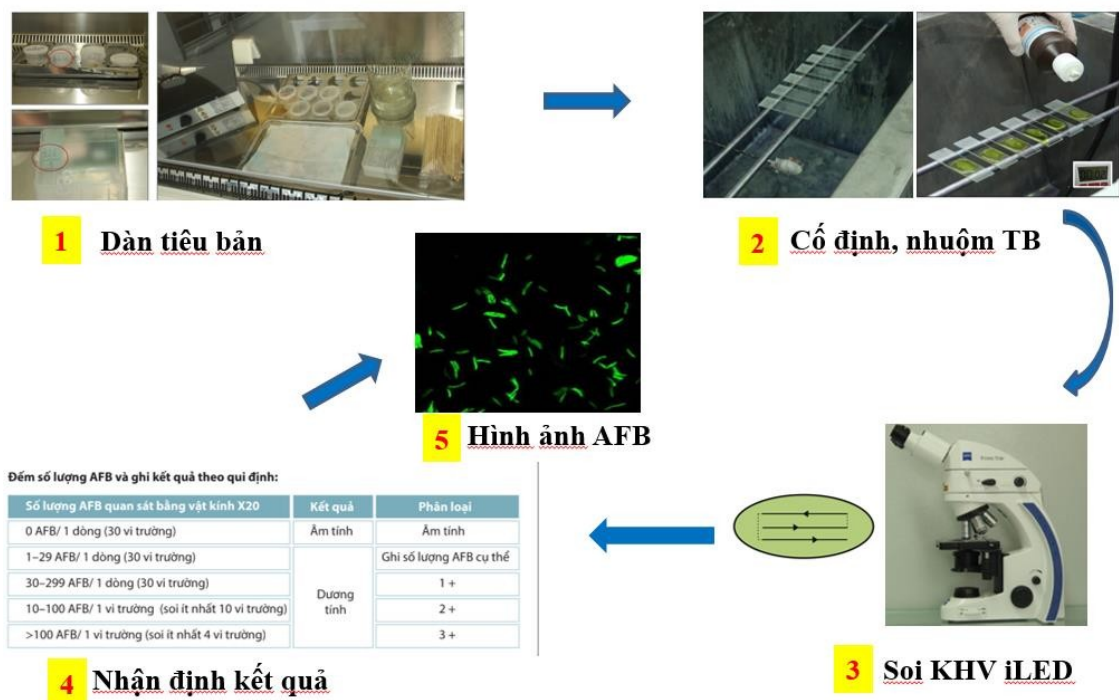
Xét nghiệm Xpert MTB/RIF dựa trên phản ứng PCR với đích là đoạn trình tự 192bp của gen *ropB*. 5 mẫu dò dạng beacon phân tử (molecular beacon) được thiết kế để bao phủ vùng điểm nóng về đột biến liên quan đến tính kháng RIF

(81bp) giúp xác định vi khuẩn lao và tính kháng RIF. 5 mẫu dò được gắn với một chất nhuộm huỳnh quang có màu khác nhau, ký hiệu A, B, C, D, E.

2.2.3.3. Xét nghiệm AFB trực tiếp nhuộm huỳnh quang

Nghiên cứu thực hiện xét nghiệm AFB trực tiếp nhuộm huỳnh quang với tất cả các mẫu đờm thu được (hình 2.4). Chỉ các mẫu đờm có kết quả soi kính dương tính mức độ số lượng từ 3 vi khuẩn (AFB) trở lên đến 1+, 2+, 3+ mới được thu nhận vào nghiên cứu.

Kết quả xét nghiệm soi kính trực tiếp được ghi nhận vào sổ xét nghiệm để so sánh đối chiếu với kết quả tách DNA mẫu đờm trước khi tiếp hành tiếp các bước giải trình tự gen.



Hình 2.4. Các bước thực hiện xét nghiệm AFB trực tiếp nhuộm huỳnh quang

2.2.3.4.. Xét nghiệm nuôi cấy MGIT và kháng sinh đồ thuốc lao hàng 1, 2

Các trang thiết bị cần thiết:

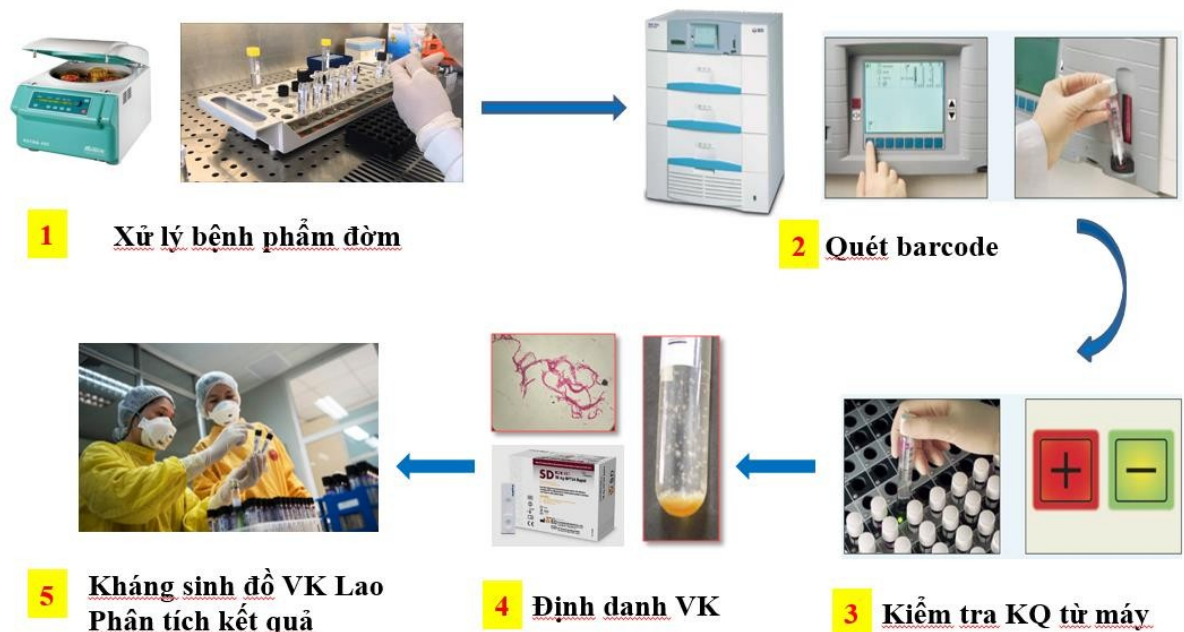
- Tủ an toàn sinh học dùng để thao tác nuôi cấy và thực hiện kháng sinh đồ lao (Biological Safety Cabinet).
- Máy cấy BACTEC 960
- Nồi hấp, tủ sấy
- Tủ -20 0C và tủ mát 2-8 0C.
- Máy ly tâm lạnh, máy ly tâm thường, máy vortex (VELP-Vortex mixer ZX3), máy lắc, kính hiển vi, cân phân tích.
- Falcon, pipetman, đầu tip có lọc và ống Eppendorf các loại, ống thủy tinh có nắp vặn, que cấy.

Các sinh phẩm, hóa chất cần thiết:

- NaOH, Na-citrate, N-acetyl-L-cysteine, đệm phosphate (KH_2PO_4 , Na_2HPO_4).
- Các vật liệu dùng cho nuôi cấy vi khuẩn lao: Môi trường MGIT
- Các loại thuốc kháng sinh để làm kháng sinh đồ (BD-Mỹ): Rifampicin (RIF), Isoniazid (INH), Ethambutol (EMB), Streptomycin (SM), Pyrazinamide (PZA), Moxifloxacin (MFX), Amikacin (AMK), Kanamycin (KM), Capreomycin (CAP).

Các mẫu đờm có kết quả cấy MGIT dương tính được tiếp tục làm định danh vi khuẩn và kháng sinh đồ để xác định tính kháng thuốc hàng 1, 2 của vi khuẩn phân lập được. Các chủng *M. tuberculosis* được bảo quản ở - 20 °C để tiếp tục tách DNA và thực hiện giải trình tự gen xác định tính kháng thuốc.

Các bước thực hiện xét nghiệm MTB kháng thuốc hàng 1, 2 môi trường lỏng (hình 2.5).



Hệ thống tự động phát hiện sự phát triển của Mycobacteria và kháng sinh đồ vi khuẩn lao

Hình 2.5. Xét nghiệm nuôi cấy, kháng sinh đồ vi khuẩn lao

Xét nghiệm kháng sinh đồ (cung cấp thông tin kháng thuốc kiểu hình) là tiêu chuẩn vàng để chẩn đoán bệnh lao kháng thuốc. Xét nghiệm dựa trên nguyên tắc so sánh sự tăng trưởng của vi khuẩn trên môi trường chứa thuốc kháng sinh với sự tăng trưởng vi khuẩn trên môi trường đối chứng. Có thể sử dụng môi trường nuôi cấy đặc hoặc lỏng. Nuôi cấy lỏng cho thấy thời gian vi khuẩn mọc nhanh hơn nuôi cấy đặc. Tuy nhiên, môi trường lỏng có tỷ lệ tạp nhiễm cao hơn môi trường đặc. Vi khuẩn Mycobacteria ngoài lao (Non-Tuberculous Mycobacteria - NTM) thường được phân lập nhiều hơn ở môi trường lỏng so với môi trường đặc. Do đó, cần thiết phải làm thêm xét nghiệm định danh phân biệt giữa *M. tuberculosis* và các NTM. Kháng sinh đồ trên môi trường lỏng MGIT cần ít nhất 9-14 ngày và môi trường đặc mất ít nhất 1 tháng.

Hệ thống BACTEC MGIT là hệ thống máy nuôi cấy và phát hiện tự động sự phát triển của vi khuẩn lao khi cấy vào môi trường MGIT. Sau khi thực hiện kỹ thuật kháng sinh đồ, các ống môi trường xếp theo thứ tự vào các loại giá AST, nhập vào hệ thống BACTEC MGIT, hệ thống tự động so sánh lượng vi khuẩn mọc ở ống chứa thuốc với ống chứng không chứa thuốc, phân tích kết quả và trả lời kết quả nhạy hoặc kháng trong khoảng thời gian 4-13 ngày với SIRE kit, thuốc hàng 2 và 4-21 ngày với PZA kit.

Môi trường MGIT cung cấp dinh dưỡng cho sự phát triển của *Mycobacteria*. Hợp chất huỳnh quang gắn dưới đáy ống nhạy cảm với oxy hòa tan trong môi trường, khi có vi khuẩn mọc tiêu thụ oxy, hợp chất sẽ phát quang. Cho thêm kháng sinh vào môi trường để phát hiện tính kháng thuốc của vi khuẩn. Chủng vi khuẩn lao pha theo tỷ lệ qui định, cấy vào môi trường lỏng MGIT có và không có thuốc chống lao, nhập vào máy BACTEC MGIT.

Hệ thống máy BACTEC MGIT giám sát liên tục sự phát quang của ống cấy dựa vào đơn vị sinh trưởng (Grow unit - GU). Kết quả kháng thuốc được máy tự động phân tích và báo tín hiệu hiển thị trên màn hình, dựa trên so sánh sự phát triển của *M. tuberculosis* trong ống chứng và các ống có thuốc khi ống chứng đạt GU 400, ngưỡng kháng thuốc GU 100.

+ Ống có thuốc GU < 100 là nhạy cảm

+ Ống có thuốc GU ≥ 100 là kháng thuốc

- Kết quả thể hiện dưới 3 hình thức: nhạy (Sensitivity -S); kháng (Resistant -R) và không xác định (KXĐ)

- Kết quả kháng sinh đồ được máy báo tại thời điểm ống chứng (Grow Control - GC) đủ 400 đơn vị sinh trưởng trong vòng 4-13 ngày. Ngưỡng kháng

thuốc là 100. Kết quả nhạy khi ống có thuốc có GU <100, kết quả kháng khi ống có thuốc có GU ≥ 100. Kết quả không kết luận được (KXĐ) có thể do:

- + GU > 400 thời gian máy báo < 4 ngày, có thể do pha huyền dịch vi khuẩn đặc hoặc chủng nhiễm trùng.
- + Một số chủng kháng thuốc đặc hiệu mọc chậm hoặc huyền dịch vi khuẩn loãng
- + Môi trường và sinh phẩm dạng thương mại SIRE kit, thuốc hàng 2 và PZA kit tương thích với hệ thống máy [137].
- Chuẩn bị chủng làm KSD
 - Chủng *M. tuberculosis* thuần từ ống MGIT dương không quá 5 ngày tuổi hoặc chủng trên môi trường đặc không quá 14 ngày tuổi.
 - Kiểm tra chủng thuần từ ống MGIT bằng cách cấy vài giọt canh khuẩn vào thạch máu ủ ấm 35 - 37° C/ 48 giờ không thấy vi khuẩn mọc là đạt.
 - Kiểm tra đối chiếu thông tin trên ống chủng và thông tin trên phiếu chỉ định xét nghiệm, ghi đầy đủ thông tin vào nhật kí KSD.
- Chuẩn bị huyền dịch vi khuẩn từ ống MGIT (+)
 - Ống MGIT (+) phải xác định được chủng thuần và định danh là *M. tuberculosis*
 - Ngày máy báo (+) là ngày 0. Sử dụng ống MGIT (+) từ 1- 5 ngày sau khi máy báo để làm KSD. Ống cấy (+) sau 5 ngày phải cấy truyền sang ống MGIT mới
 - Ống MGIT (+) từ 1-2 ngày sử dụng ngay huyền dịch trong ống MGIT để làm KSD (tương đương nồng độ 1:5 để cấy vào ống môi trường có thuốc)
 - Ống MGIT (+) từ 3-5 ngày trộn đều pha loãng với nước cất vô trùng theo tỉ lệ

1:5 (1ml huyền dịch với 4ml nước cất) dùng huyền dịch này làm KSD (cấy vào ống môi trường có thuốc)

Lưu ý: huyền dịch vi khuẩn từ ống MGIT (+) phải chuyển vào ống có bi thủy tinh vô trùng, vortex tan, để lắng 15 phút hút phần trên làm KSD.

- Chuẩn bị huyền dịch vi khuẩn cho ống chứng (GC)
- Huyền dịch vi khuẩn 1:100 (số 1) cho KSD SIRE, hàng 2 và thuốc mới: Pha tiếp 0.1ml huyền dịch vi khuẩn đã chuẩn bị ở trên (tỉ lệ 1:5 hoặc tương đương) với 9.9 ml nước cất vô trùng.
- Huyền dịch vi khuẩn 1:10 (số 2) cho KSD PZA: Pha tiếp 1ml huyền dịch vi khuẩn đã chuẩn bị ở trên (tỉ lệ 1:5 hoặc tương đương) với 9 ml nước cất vô trùng.
- Sử dụng huyền dịch số 1 và số 2 để cấy vào các ống GC

Bảng 2.1. Nồng độ thuốc trong ống MGIT (thuốc dạng đông khô)

Tên thuốc	Nồng độ đông khô µg	Thể tích dung môi ml	Nồng độ sau pha µg/ml	Thể tích thêm vào ống MGIT µl	Nồng độ trong ống MGIT µg/ml
SIRE Kit					
STR	332,0	4	83,0	100	1.0
INH	33.2	4	8,3	100	0.1
RIF	332,0	8	41.5	100	0.5
		4	83,0	100	1.0
EMB	1660,0	4	415,0	100	5.0
PZA Kit					
PZA	20000	2.5	8000	100	100

Tên thuốc	Nồng độ đồng khô μg	Thể tích dung môi ml	Nồng độ sau pha $\mu\text{g/ml}$	Thể tích thêm vào ống MGIT μl	Nồng độ trong ống MGIT $\mu\text{g/ml}$
INH nồng độ cao					
INH	66.4	2	33.2	100	0.4
Kháng sinh hàng hai					
MOX	498	6	83,0	100	1.0
		24	20.75	100	0.25
AMK	332	4	83,0	100	1,0
KM	830	4	207.5	100	2.5
CAP	830	4	207.5	100	2.5
Thuốc mới					
BDQ	170	2	83,0	100	1,0
LFX	249	3	83,0	100	1,0

- Chuẩn bị dung dịch thuốc có nồng độ 10.000 $\mu\text{g/ml}$ (dung dịch gốc) bằng cách pha 100mg thuốc tinh khiết vào 10 ml dung môi. Độ tinh khiết của thuốc tùy thuộc vào hãng sản xuất và lô thuốc. Chia nhỏ, bảo quản dung dịch gốc -30 tới -70°C trong vòng 6 tháng hoặc đến khi hết hạn thuốc.

2.2.3.5.. Xét nghiệm nuôi cấy MGIT và kháng sinh đồ thuốc lao hàng 1, 2

- KSD hàng 1: dán nhãn 4 ống MGIT 7 ml cho mỗi xét nghiệm theo thứ tự: GC, STR, INH, RIF, EMB
- KSD hàng 2 và thuốc khác: dán nhãn 5 ống MGIT 7 ml theo thứ tự: GC, MOX, AMK, KM, CAP,
- Dán nhãn ống PNB
- Thêm 0,8 ml BACTEC MGIT 960 SIRE Supplement/ OADC Cat 245116

cho mỗi ống.

- Thêm 100µl dung dịch thuốc vào các ống theo nhãn thuốc tương ứng, không cho thuốc vào ống GC.
- Cấy 0,5ml huyền dịch vi khuẩn tỉ lệ 1:100 (số 1 mục 9.1.2.3) vào ống GC.
- Cấy 0,5ml huyền dịch vi khuẩn tỉ lệ 1:5 hoặc tương đương vào mỗi ống có thuốc và ống PNB.
- Vặn chặt nắp và đảo ngược ống 3-4 lần.
- KSD hàng 1 xếp 5 ống vào giá AST loại 5 giếng theo đúng thứ tự: GC, STR, INH, RIF, EMB
- KSD hàng 2 xếp 5 ống vào giá AST loại 5 giếng theo đúng thứ tự: GC, MOX, AMK, KM, CAP
- Nhập giá AST vào máy BACTEC MGIT
- Ống PNB nhập máy riêng như 1 ống cấy thông thường

Bảng 2.2. Thẻ tích các thuốc trong ống cấy MGIT

KSD hàng 1	Ống 7 ml MGIT				
	GC	STR	INH	RIF	EMB
		1.0 µg/ml	0.1 µg/ml	0.5 µg/ml	5.0 µg/ml
Supplement	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml
Thuốc đã pha	-	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
Huyền dịch vi khuẩn 1:5	-	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Huyền dịch vi khuẩn 1:100	0.5 ml				
KSD hàng 2	Ống 7 ml MGIT				

	GC	MOX 0.25 µg/ml	AMK 1.0 µg/ml	KM 2.5 µg/ml	CAP 2.5 µg/ml
Supplement	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml	0.8 ml
Thuốc đã pha	-	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
Huyền dịch vi khuẩn 1:5	-	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Huyền dịch vi khuẩn 1:100	0.5 ml				

PZA kit

- Dán nhãn 2 ống MGIT 960 PZA cho mỗi xét nghiệm KSD theo thứ tự: GC, PZA.
- Thêm 0,8 ml BACTEC MGIT 960 PZA Supplement cho mỗi ống.
- Thêm 100µl dung dịch thuốc PZA vào ống có nhãn PZA, không cho thuốc vào ống GC.
- Cấy 0,5 ml huyền dịch vi khuẩn tỉ lệ 1:10 (số 2 mục 9.1.2.3) vào ống GC.
- Cấy 0,5ml huyền dịch vi khuẩn tỉ lệ 1:5 hoặc tương đương vào ống PZA
- Vặn chặt nắp và đảo ngược ống 3-4 lần.
- Xếp 2 ống vào giá AST loại 2 giếng theo đúng thứ tự: GC, PZA
- Nhập giá AST vào máy BACTEC MGIT

Bảng 2.3. Thể tích thuốc PZA trong ống cấy MGIT

Bộ PZA kit	GC	PZA 100 µg/ml
BACTEC MGIT 960 PZA Supplement	0.8 ml	0.8 ml
Thuốc đã pha	-	0.1 ml
Huyền dịch vi khuẩn 1:5 hoặc tương đương	-	0.5 ml
Huyền dịch vi khuẩn 1:10	0.5 ml	

Diễn giải và báo cáo kết quả

- Máy tự động đọc kết quả. Khi có tín hiệu máy báo, lấy bộ AST ra khỏi máy, quét mã vạch, in kết quả KSD
- Kết quả KSD: Nhạy (S); kháng (R), và lỗi (X).
 - + Kết quả nhạy khi ống có thuốc GU dưới 100
 - + Kết quả kháng khi ống có thuốc GU ≥ 100
 - + Lỗi (E92): X400 hoặc X200 có thể do pha huyền dịch vi khuẩn đặc hoặc vi khuẩn tạo cụm, hoặc chủng ngoại nhiễm, chủng mix Mycobacteria hoặc chủng kháng thuốc mọc chậm hoặc huyền dịch vi khuẩn loãng.

Sai sót

- Máy báo lỗi X400 có thể do chủng nhiễm, vi khuẩn tạo thành cụm trong huyền dịch, pha huyền dịch đặc; lỗi E 200 do pha huyền dịch loãng hoặc chủng kháng thuốc mọc chậm.
- Ống PNB dương tính chủng làm KSD không phải *M. TUBERCULOSIS* hoặc chủng lẫn
- Chất lượng kháng sinh: pha không chuẩn, bảo quản sai...

- Nhiễm chéo trong quá trình thao tác kỹ thuật.
- Thực hành không an toàn.

Quy định báo cáo kết quả kháng sinh đồ kiểu hình vi khuẩn lao với từng loại thuốc tại bảng 2.4.

Bảng 2.4. Quy định báo cáo kết quả kháng sinh đồ thuốc lao hàng 1, 2

Thuốc/nồng độ	KQ máy báo	Báo cáo kết quả	Xử lý
STR 1.0 µg/ml INH 0.1 µg/ml RIF 0.5 µg/ml EMB 5.0 µg/ml	Nhạy với SIRE	Nhạy	Không
	Kháng với STR, INH, RIF	Kháng STR, INH, RIF	Không
	Kháng EMB (E)	Kháng E khi có kết hợp kháng với thuốc khác. Ví dụ HE, HSE	Không
		Kháng đơn E: không kết hợp với thuốc khác. Làm lại để khẳng định.	
INH 0.4µg/ml	Lỗi (X)	Không trả KQ	Làm lại
	Nhạy	Nhạy	Không
	Kháng	Kháng H 0.4	Không
PZA 100 µg/ml	Lỗi (X)	Không trả KQ	Làm lại
	Nhạy	Nhạy	Không
	Kháng	Kháng	Kiểm tra độ thuần chủng
AMK 1 µg/ml KM 2.5µg/ml CAP 2.5µg/ml	Lỗi (X)	Không trả KQ	Làm lại
	Nhạy	Nhạy	Không
	Kháng	Kháng	Không

Thuốc/nồng độ	KQ máy báo	Báo cáo kết quả	Xử lý
MFX 0.25 µg/ml	Nhạy	Nhạy	Không
	Kháng	Kháng	Làm thêm nồng độ MFX 1 µg/ml (<i>nếu có chỉ định</i>)
	Lỗi (X)	Không trả KQ	Làm lại

2.2.3.6. Giải trình tự hệ gen vi khuẩn lao

Trang thiết bị dùng cho giải trình tự gen DNA vi khuẩn lao

Thiết bị	Hãng sản xuất
Máy Giải trình tự gen MiniSeq	Illumina SY-420-1001
Mini hot dry bath (for 2 ml tube)	Benchmark
Vortex mixer	BioShake iQ
Microcentrifuge	Eppendorf
Nanodrop spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific
Sonicator (ultrasonic bath)	Infitek, USC-D series
Tissue homogeniser	Bertin Technology Precellys 24
Qubit™ 4 NGS Starter Kit	Invitrogen Q33240
Super Magnetic Plate Agencourt SPRIP 96 ring	Beckman Coulter Cat No: A32782

Hoá chất dùng tách chiết DNA vi khuẩn lao

Tên hóa chất / sinh phẩm	Hãng sản xuất
Qubit Assay Tube	Life Technologies, Cat No: Q32856
Qubit dsDNA HS Assay Kit 500rxn	Life Technologies, Cat No: Q32854
Tris – Base	Applied BioSiciences (Mỹ)
Proteinase K	Sigma (Mỹ)
Các dung môi hữu cơ	Gibco BRL Life technology
Lysozyme	Fermentas
Tên hóa chất / sinh phẩm	Hãng sản xuất
Ethanol	Wako (Japan)
NaAC	Wako (Japan)
Phenol/Chloroform/Isomyl	Wako (Japan)
Sterile phosphate buffered saline (PBS)	Rectopur (CE- EMB)
Nuclease-free water	Sigma water
GTC	ThermoFisher
AMPure XP bead	Beckman Coulter
MiniSeq (Hybridization + Flow Cell)	Illumina Cat No: FC-420- 1004
Nextera XT DNA sample preparation kit	Illumina Cat No: FC-131- 1096

Nextera XT Index Kit	Illumina Cat No: FC-131-1001
Lib Quant Kit (Illumina/LC480)	Roche, 7960298001

Các chủng *M.tuberculosis* sau khi cấy MGIT dương tính được bảo quản ở -20°C để tiếp tục tách DNA và giải trình tự hệ gen xác định tính kháng thuốc.

M. tuberculosis trong mẫu đờm hoặc chủng cấy MGIT dương tính bị bất hoạt bởi sự kết hợp giữa nhiệt và lysozyme. Thành tế bào vi khuẩn sau đó bị phá vỡ bằng phương pháp cơ học. DNA được làm tinh sạch bằng hạt AMPure XP. Hệ thống tinh sạch Agencourt AMPure XP PCR* sử dụng công nghệ hạt thuận từ đảo ngược pha rắn (SPRI) của Beckman Coulter để tinh sạch DNA chất lượng cao. Agencourt AMPure XP sử dụng một chất đệm được tối ưu hóa để liên kết có chọn lọc ra các đoạn DNA có chiều dài lớn hơn 100 bp. Sau đó loại bỏ môi, nucleotide, muối, và các enzyme dư thừa bằng một quy trình rửa đơn giản với ethanol. DNA cuối cùng được thu nhận trong nước deion hoặc đệm TE.

Tách DNA từ mẫu đờm hoặc chủng cấy MGIT dương tính được thực hiện theo quy trình xử lý tách DNA từ mẫu xét nghiệm bao gồm các bước sau:

- Khử tạp mẫu đờm bằng NaLC - NaOH
- Bất hoạt MTB từ mẫu đờm hoặc chủng cấy MGIT ở 80 – 90 °C trong 30 phút.
- Rửa loại bỏ các thành phần khác
- Phá màng tế bào bằng hạt thủy tinh, đập ống trong máy đồng nhất mô 2 lần trong 40 giây ở vận tốc 6.0 m/s và ủ trong khay đá 5 phút giữa các bước.
- Tinh sạch DNA bằng hạt từ AMPure XP (A63881 Beckman Coulter)
- Kiểm tra chất lượng, tính toàn vẹn và nồng độ DNA

DNA được định lượng bằng độ hấp thụ ở bước sóng 260nm sử dụng máy quang phổ Nanodrop. Chất lượng DNA được xác định bằng tỷ lệ độ hấp thụ ở bước sóng 260nm và bước sóng 280nm (A260/280), và tỷ lệ độ hấp thụ ở bước sóng 260nm và bước sóng 230nm (A260/230).

DNA tinh khiết có tỷ lệ A260/280 là 1.8 – 2.0 và A260/230 từ 2.0 -2.2.

Thực hiện giải trình tự bộ gen vi khuẩn lao bằng hệ thống Illumina MiniSeq được thực hiện theo các bước sau:

- **Bước 1:** Chuẩn bị thư viện bằng kit Nextera XT với mục đích tạo ra các trình tự DNA được cắt ở độ dài từ 300 – 500bp và gắn adaptor ở hai đầu của đoạn gen. Các adaptor này giúp DNA bám trên flow cell trong quá trình đọc, đồng thời cũng là đoạn môi trong phản ứng và chỉ thị phân biệt trình tự từ các mẫu khác nhau.
 - + Pha loãng DNA mẫu đạt cùng nồng độ 0.2ng/ul
 - + Cắt ngẫu nhiên DNA thành các đoạn ngắn
 - + Trung hòa phản ứng cắt DNA
 - + Chạy phản ứng PCR gắn đoạn chỉ thị (Index)
 - + Tinh sạch thư viện chạy giải trình tự bằng kit AMPure XP.
 - + Định lượng thư viện bằng phản ứng tổng hợp chuỗi định lượng (real-time) RT-PCR Kapa.
 - + Pha loãng thư viện đạt cùng nồng độ 4nM
 - + Tập hợp các thư viện của mỗi mẫu thành 1 thư viện chung và pha loãng thành thư viện chung 1nM.

+ Biến tính thư viện chung để chạy giải trình tự. Nồng độ cuối của thư viện chung được tối ưu hóa trong khoảng từ 1.0 pM – 1.2 pM

+ Chuẩn bị thư viện PhiX chuẩn

Trình tự index Nextera XT (FC-131-1024, FC-131-1096)

Index 1	Sequence	Index 2	Sequence
N701	TAAGGCGA	S501	TAGATCGC
N702	CGTACTAG	S502	CTCTCTAT
N703	AGGCAGAA	S503	TATCCTCT
N704	TCCTGAGC	S504	AGAGTAGA
N705	GGACTCCT	S505	GTAAGGAG
N706	TAGGCATG	S506	ACTGCATA
N707	CTCTCTAC	S507	AAGGAGTA
N708	CAGAGAGG	S508	CTAAGCCT

- **Bước 2:** Chạy chương trình giải trình tự trên máy. Các đoạn DNA được đưa vào và gắn trên bề mặt flow cell. Sau đó, các đoạn DNA được khuếch đại tạo thành các cụm (cluster).
- **Bước 3:** Hệ thống giải trình tự dựa trên “kỹ thuật giải trình tự tổng hợp” và sử dụng các dNTP có gắn các tín hiệu huỳnh quang tương ứng với 4 loại nucleotide. Trong mỗi chu kỳ giải trình tự, từng nucleotide có gắn tín hiệu huỳnh quang được gắn vào chuỗi axit nucleic theo nguyên tắc bổ sung trên sợi DNA khuôn. Vì nucleotide được gắn vào như là một chất chấm dứt kéo dài chuỗi, nên phản ứng tạm dừng lại. Sau khi gắn từng nucleotide, tín hiệu huỳnh quang được ghi lại để xác định các trình tự của loại nucleotide được gắn vào DNA.

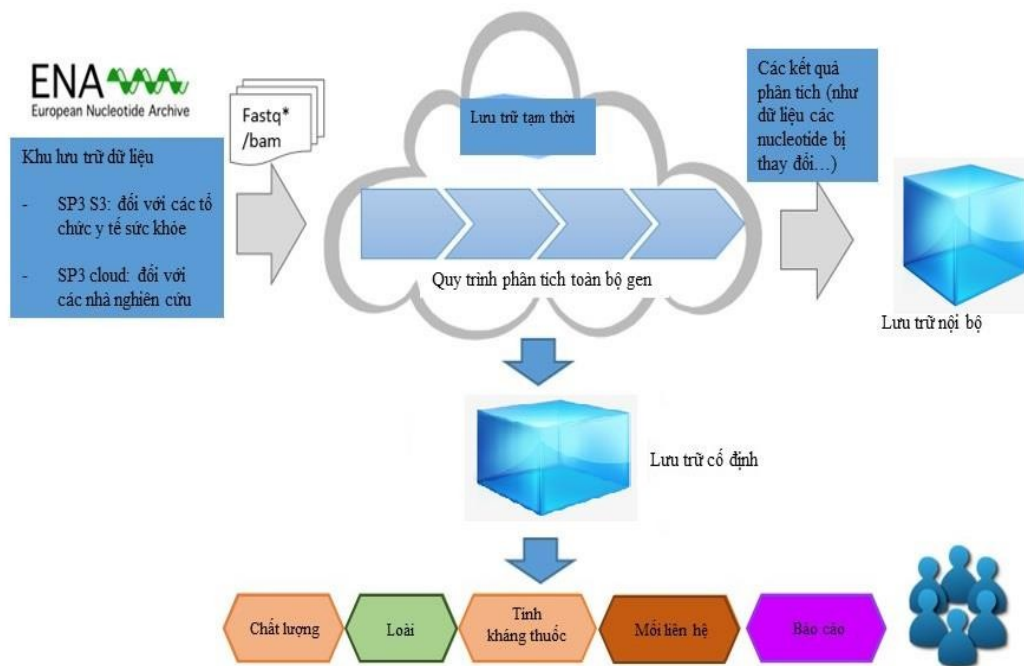
- **Bước 4:** Quá trình giải trình tự kết thúc, xuất các trình tự (read) trong file với định dạng fastq.gz và có thể bắt đầu thực hiện phân tích dữ liệu.

Lưu file fastq về ổ lưu trữ nội bộ, ghi nhận ngày chạy, các thông số để đánh giá kết quả chất lượng chạy giải trình tự (thông số hiển thị trên máy MiniSeq khi kết thúc quá trình giải trình tự như cluster density, estimate output, passing filter).

Kết quả giải trình tự cho biết định danh tên loài vi khuẩn và dự báo tính kháng thuốc dựa trên các trình tự gen bằng cách phân tích theo quy trình được phê duyệt, sử dụng phần mềm sinh tin MyKrobe.

2.2.4. Xử lý và phân tích số liệu

- Nhập các kết quả xét nghiệm vào file excel.
- Phân tích số liệu tin sinh bằng phần mềm tin sinh Mykrobe, Clockwork, Gnominius
- Phân tích số liệu thống kê bằng phần mềm SPSS 20
- Cỡ mẫu cho mục tiêu 1 là 38 mẫu đờm và 82 mẫu chủng vi khuẩn lao được làm giải trình tự toàn bộ hệ gen để chẩn đoán kháng thuốc lao
- Cỡ mẫu cho mục tiêu 2 là 82 mẫu chủng vi khuẩn lao được làm giải trình tự gen để xác định dòng vi khuẩn và mối liên quan đến kháng thuốc lao của từng dòng chủng.



Hình 2. 6. Quy trình phân tích dữ liệu tin sinh

2.2.5. Không chế sai số và đạo đức trong nghiên cứu

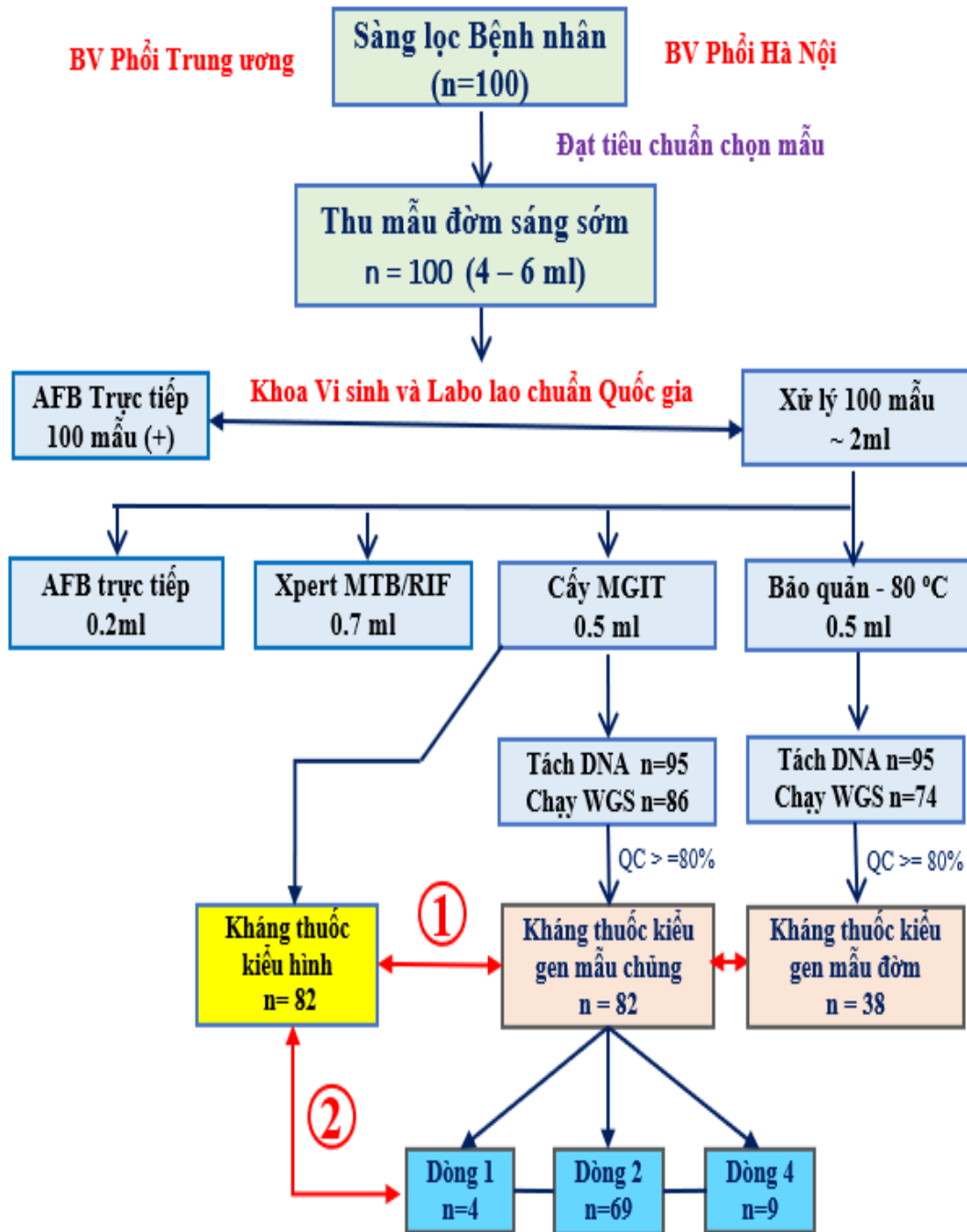
Các thông số kỹ thuật đo lường về kết quả xét nghiệm được phê duyệt, xem xét định kỳ tại khoa Vi sinh và Labo Lao chuẩn Quốc gia – Bệnh viện Phổi Trung Ương. Đồng thời, các thông số này cũng nằm trong phần đánh giá lâm sàng của các hương pháp xét nghiệm do Bệnh viện thực hiện hàng năm.

Nghiên cứu đã được Hội đồng đạo đức trong Nghiên cứu Y sinh học của Bệnh viện Phổi Trung ương cho phép thực hiện theo quyết định số 21/CT-HDDD ngày 25/5/2020. Việc tiến hành nghiên cứu có sự đồng ý của Ban Giám đốc Bệnh viện Phổi Trung ương, sự chấp nhận của Hội đồng Khoa học BV Phổi Trung ương, Hội đồng chăm đề cương nghiên cứu sinh tại Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương.

Việc nuôi cấy và phân lập chủng vi khuẩn lao tại khoa Vi sinh và Labo Lao chuẩn Quốc gia, Bệnh viện Phổi Trung ương là nghiên cứu thuộc đề tài nhánh cấp Nhà nước (Mã số NĐT.81.GB/20) đã được Bộ Khoa học và Công nghệ phê duyệt.

Nguy cơ: đối với bệnh nhân gần như không có vì các xét nghiệm lao là thường quy trong thực hành lâm sàng và các thử nghiệm nghiên cứu không liên quan trực tiếp đến bệnh nhân. Ngoài ra dữ liệu của từng bệnh nhân nghiên cứu được mã hóa và tuyệt đối giữ bí mật các thông tin cá nhân về họ.

Lợi ích: Kết quả nghiên cứu cung cấp thông tin hữu ích về mức độ đề kháng kháng sinh của vi khuẩn lao phân lập tại Hà Nội, từ đó giúp cho các bác sĩ lâm sàng có hướng điều trị tốt hơn. Đồng thời các dữ liệu về đặc điểm phân tử của vi khuẩn lao kháng thuốc là cơ sở để tiếp tục nghiên cứu và phát triển các bộ sinh phẩm chẩn đoán nhanh vi khuẩn lao kháng thuốc tại Việt Nam.



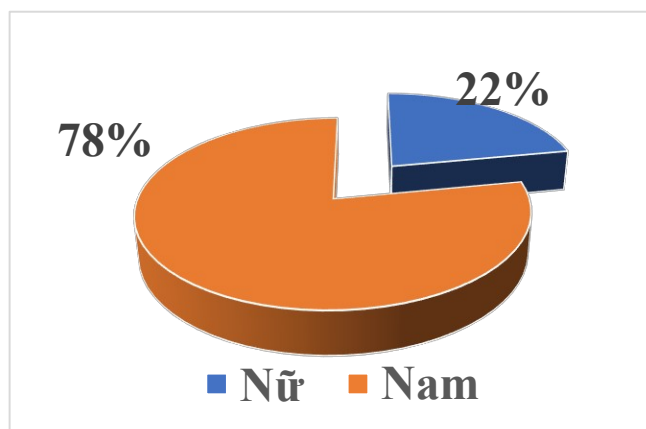
Hình 2. 7. Sơ đồ nghiên cứu

CHƯƠNG III: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm dịch tễ của mẫu nghiên cứu

Tổng số 100 bệnh nhân lao có kết quả xét nghiệm Xpert MTB dương tính và kháng RIF đến khám tại Bệnh viện Phổi Trung Ương và Bệnh viện Phổi Hà Nội trong giai đoạn từ năm 2020 – 2022. Các mẫu đờm được nuôi cấy phân lập và thực hiện kháng sinh đồ thuốc lao hàng 1,2 từ các mẫu cấy dương tính với *M.tuberculosis* , đồng thời thực hiện giải trình tự toàn bộ hệ gen từ chủng cấy dương tính. Kết quả có 82 chủng vi khuẩn *M. tuberculosis* có đủ thông tin kháng thuốc kiểu hình và kháng thuốc kiểu gen bằng kỹ thuật giải trình tự toàn bộ hệ gen (WGS) được đưa vào phân tích.

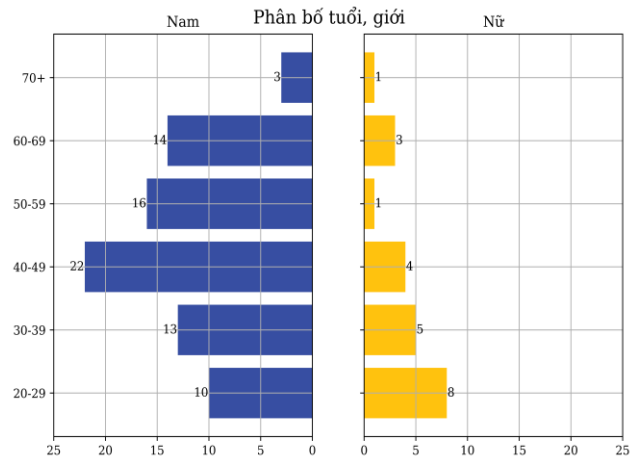
3.1.2. Phân bố theo giới



Biểu đồ 3.1. Phân bố mẫu nghiên cứu theo giới tính

Nhận xét: Số lượng bệnh nhân nghiên cứu là nam chiếm đa số (78%), gấp 3,5 lần bệnh nhân nữ (22%) được quản lý điều trị tại BV Phổi Trung ương và BV Phổi Hà Nội.

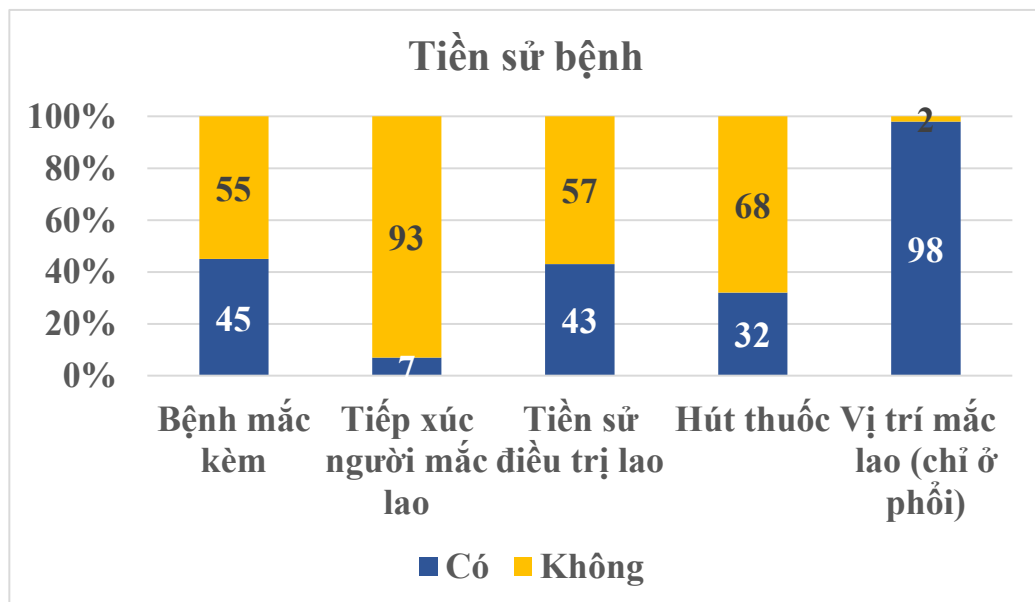
3.1.2. Phân bố theo nhóm tuổi và giới



Biểu đồ 3.2. Phân bố mẫu nghiên cứu theo nhóm tuổi

Nhận xét: Tất cả bệnh nhân nghiên cứu đều là người lớn trên 18 tuổi. Tuổi trung bình của mẫu là 44,7 với độ lệch chuẩn là 14,3 tuổi. Độ tuổi 40-49 tuổi chiếm tỷ lệ cao nhất (26,0%). Số lượng mẫu phân lập được ở người trên 60 tuổi cũng chiếm số lượng đáng kể (21,0%). Đa số bệnh nhân đang ở trong độ tuổi lao động.

3.1.3. Phân bố theo tiền sử bệnh



Biểu đồ 3.3. Phân bố mẫu theo tiền sử bệnh

Nhận xét: Qua khai thác tiền sử bệnh, 45% người bệnh lao kháng thuốc có tiền sử bệnh mắc kèm, 7% có tiếp xúc với người bệnh lao, 43% có tiền sử điều trị lao và đa số là bệnh lao phổi kháng thuốc (98%) nguy cơ lây nhiễm ra cộng đồng rất cao.

3.1.4. Phân bố theo một số kết quả xét nghiệm

Các mẫu sau khi thu thập được đánh giá chất lượng bằng cách thực hiện xét nghiệm soi kính trực tiếp tìm AFB. Chỉ những mẫu có kết quả xét nghiệm trực tiếp dương tính mới được tiếp tục thu nhận vào nghiên cứu và tiếp hành tiếp các xét nghiệm Xpert MTB/RIF, nuôi cấy, kháng sinh đồ và giải trình tự gen.

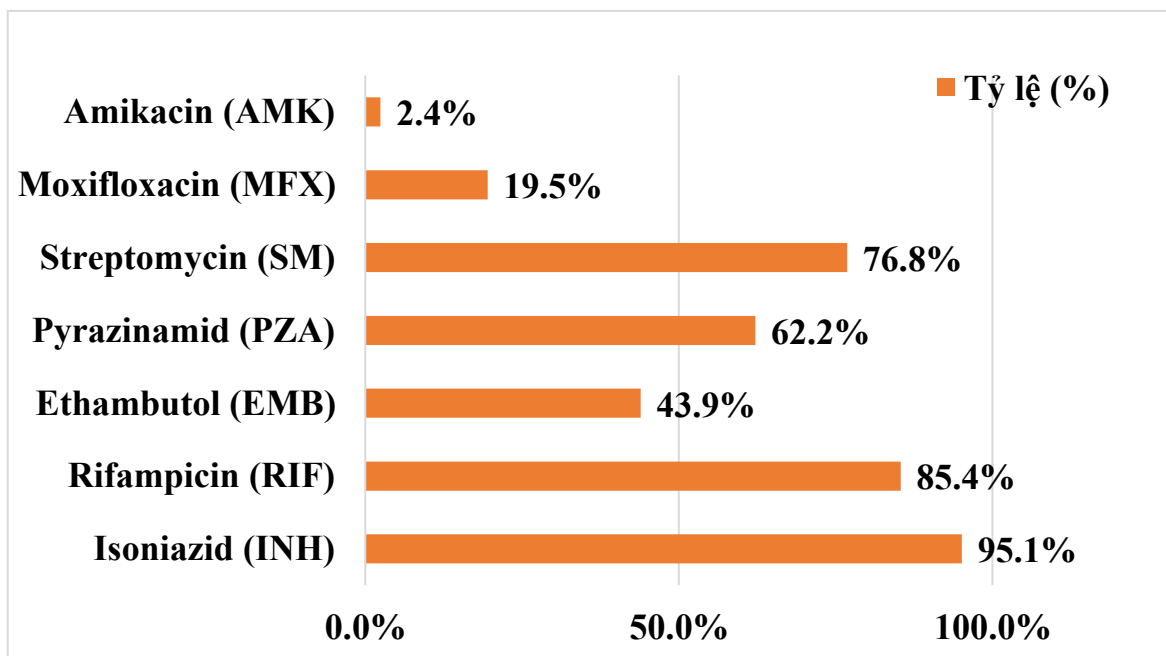
Bảng 3.1. Phân bố mẫu nghiên cứu theo một số kết quả xét nghiệm

	Mẫu xét nghiệm (n)	Tỷ lệ (%)
Điểm nghiên cứu		
Bệnh viện Phổi Trung ương	52	52,0
Bệnh viện Phổi Hà Nội	48	48,0
Kết quả soi đờm		
AFB ít	23	23,0
1+	35	28,0
2+	14	14,0
3+	28	28,0
Kết quả Xpert MTB/RIF		
MTB (+) / RIF (+)	98	98,0
MTB (+) / RIF không xác định	2	2,0
Kết quả nuôi cấy		
MTB	95	95,0
NTM	3	3,0
Chủng nhiễm	2	2,0
Mẫu cấy MTB có kết quả kháng thuốc kiểu hình và kiểu gen		
Có kết quả kháng thuốc	82	82,0
Không có kết quả kháng thuốc	18	18,0

Nhận xét:. Tổng số 52 bệnh nhân được quản lý điều trị tại BV Phổi Trung ương và 48 bệnh nhân tại BV Phổi Hà Nội. Đa số mẫu có kết quả soi đờm dương tính từ 1+ trở lên chiếm 73,0% và 23,0% dương tính loại AFB ít dưới 10 vi khuẩn trong một vi trường soi kính hiển vi. Các mẫu có kết quả Xpert MTB dương tính kháng RIF chiếm 98,0 % và 2 mẫu có kết quả Xpert MTB dương tính không xác định tính kháng thuốc RIF.

3.1.5. Đặc điểm kháng thuốc kiểu hình của mẫu nghiên cứu

Nghiên cứu trên 82 mẫu cấy dương tính với MTB có đầy đủ kết quả kháng thuốc kiểu hình và kháng thuốc kiểu gen được đưa vào phân tích. Đa số mẫu kháng với thuốc lao hàng 1, trong đó có 78 mẫu kháng với INH (chiếm 95.1%), 70 mẫu kháng RIF (chiếm 85.4%), 36 mẫu có kháng EMB (chiếm 43.9%), 51 mẫu kháng PZA (chiếm 62,2%), 63 mẫu kháng với SM (chiếm 76.8%). Rất ít các mẫu kháng với MFX là 16 mẫu (19.5%), AMK là 2 mẫu (2.4%), (biểu đồ 3.4).



Biểu đồ 3.4. Kết quả kháng từng loại thuốc của mẫu nghiên cứu

Theo hướng dẫn chẩn đoán, điều trị và dự phòng bệnh Lao của Bộ Y tế, Chương trình Chống Lao Quốc Gia, quyết định số 162/QĐ-BYT ngày 19 tháng 01 năm 2024 trên cơ sở cập nhật định nghĩa mới của Tổ chức Y tế Thế giới về phân loại kháng thuốc lao [3, 135], căn cứ vào kết quả kháng sinh đồ kiểu hình của 82 mẫu nghiên cứu, có thể chia các mẫu nghiên cứu thành 3 nhóm, trong đó kháng đơn hoặc kháng nhiều thuốc có 12/82 mẫu (chiếm 14,6%), kháng đa thuốc có 57/82 mẫu (69,5%) và tiền siêu kháng thuốc 13/82 mẫu (15,9%). (bảng 3.2).

Bảng 3.2. Phân loại kiểu hình kháng thuốc của mẫu nghiên cứu

Kiểu hình kháng thuốc	Tổng số	Tỷ lệ (%)
Kháng đơn/nhiều thuốc (DR-TB)	12	14,6
Kháng đa thuốc (MDR-TB)	57	69,5
Tiền siêu kháng thuốc (Pre-XDR TB)	13	15,9
Tổng số	82	100,0

3.2. Xác định các gen liên quan đến tính kháng thuốc của vi khuẩn lao phân lập từ bệnh nhân lao kháng Rifampicin tại Bệnh viện Phổi Trung ương và Bệnh viện Phổi Hà Nội năm 2020 – 2022.

3.2.1. Kết quả giải trình tự gen phát hiện đột biến kháng thuốc Isoniazid

- Đột biến gen ở các mẫu có kiểu hình kháng thuốc Isoniazid (INH)**

Tổng số 78/82 mẫu kháng INH, kết quả giải trình tự hệ gen các mẫu này cho thấy có các đột biến liên quan đến kháng thuốc INH xuất hiện ở 3 gen với các tần suất và tỷ lệ đột biến khác nhau. Trong đó 14 mẫu có hơn 1 vị trí đột biến trên cả 3

gen. Đột biến tại gen *katG* (chiếm tỷ lệ 78,3%), *fabG1* (chiếm tỷ lệ 16,3%) và *inhA* liên quan ít nhất đến kháng thuốc INH (chiếm tỷ lệ 5,4%) (bảng 3.3).

Bảng 3.3. Vị trí đột biến gen và mức độ liên quan đến kháng thuốc INH ở các chủng kháng

gen	Vị trí đột biến	Mức độ liên quan đến kháng thuốc	Tần suất đột biến trong mẫu NC	Tỷ lệ đột biến trong mẫu NC
<i>katG</i> 78.3%	Ser315Thr	Mức độ 1	69	75.0%
	Ser315Gly	Mức độ 3	3	3.3%
<i>fabG1</i> 16.3%	c15t	Mức độ 2	3	3.3%
	a18c	Mức độ 2	3	3.3%
	C	Mức độ 2	3	3.3%
	CTG607CTA	Mức độ 2	2	2.2%
	Ile6Ile	Mức độ 2	2	2.2%
	Ser141Phe	Mức độ 2	1	1.1%
	Ile194Thr	Mức độ 3	1	1.1%
<i>inhA</i> 5,4%	Ser94Ala	Mức độ 2	2	2.2%
	Ile194Thr	Mức độ 2	1	1.1%
	G	Mức độ 3	2	2.2%
TỔNG SỐ			92	100 %

Nhận xét: Hầu hết đột biến trên gen *katG* đều xảy ra ở codon 315, đột biến làm thay đổi axit amin Serine (Ser) thành Threonine (Thr) chiếm tỷ lệ cao nhất là 75,0% và có liên quan đến kháng thuốc - mức độ 1. Bên cạnh đó, đột biến tại codon 315 làm thay đổi axit amin Serine (Ser) thành Glycine (Gly) chiếm tỷ lệ 3,3 % và có liên quan đến kháng thuốc – mức độ 3. Tiếp theo là các đột biến trên

gen *fabG1* và *inhA*, trong đó có các vị trí đột biến thay thế hay mất đoạn, đột biến đồng nghĩa tại codon 6 axit amin Isoleucine (Ile) với bộ ba mã hóa AUU thành Isoleucine (Ile) với bộ ba mã hóa AUC chiếm 2,2%. Đột biến tại codon 194 axit amin Isoleucine (Ile) thành Threonine (Thr) chiếm 1,1%, Đột biến tại codon 94 axit amin Serine (Ser) thành Alanin (Ala) chiếm 2,2% và codon 194 axit amin Isoleucine (Ile) thành Threonine (Thr) chiếm 1,1% (Bảng 3.3).

- **Đột biến gen ở các mẫu có kiểu hình không kháng thuốc INH**

Kết quả kháng thuốc kiểu hình có 4/82 mẫu không kháng thuốc INH, giải trình tự hệ gen của 4 mẫu này cho thấy có 3 mẫu xuất hiện đột biến tại gen *katG* vị trí codon 463, đột biến làm thay đổi axit amin Arginine (Arg) thành Leucine (Leu) và không liên quan đến kháng thuốc - mức độ 5 (bảng 3.4).

Bảng 3.4. Vị trí đột biến gen và mức độ liên quan đến kháng thuốc INH ở các chủng nhạy.

gen	Vị trí đột biến	Mức độ liên quan đến kháng thuốc	Tần suất đột biến trong mẫu NC	Tỷ lệ đột biến trong mẫu NC
<i>katG</i>	Arg463Leu	Mức độ 5	3	100%
TỔNG SỐ			3	100 %

3.2.2 . Kết quả giải trình tự gen phát hiện đột biến kháng thuốc Rifampicin

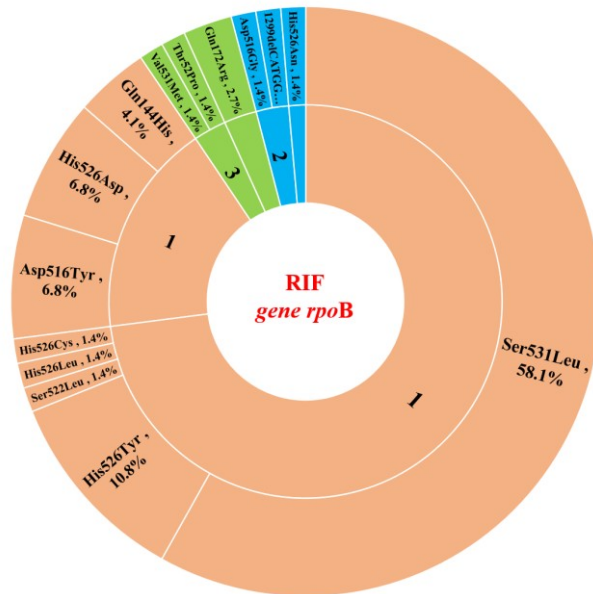
- **Đột biến gen ở các mẫu có kiểu hình kháng thuốc Rifampicin (RIF)**

Kết quả kháng thuốc kiểu hình có 70/82 mẫu kháng RIF, giải trình tự hệ gen các mẫu này phát hiện các đột biến ở gen *rpoB* liên quan đến kháng thuốc RIF. Trong đó 4 mẫu có hơn 1 vị trí đột biến trên gen *rpoB* (bảng 3.5).

Bảng 3.5. Vị trí đột biến gen và mức độ liên quan đến kháng thuốc RIF ở các chủng kháng.

gen	Vị trí đột biến	Mức độ liên quan đến kháng thuốc	Tần suất đột biến trong mẫu NC	Tỷ lệ đột biến trong mẫu NC
<i>rpoB</i> 100%	1299delCATGGA	Mức độ 2	1.4%	1
	Asp516Gly	Mức độ 2	1.4%	1
	His526Asp	Mức độ 1	6.8%	5
	Asp516Tyr	Mức độ 1	6.8%	5
	Gln144His	Mức độ 1	4.1%	3
	Gln172Arg	Mức độ 3	2.7%	2
	His526Asn	Mức độ 2	1.4%	1
	His526Cys	Mức độ 1	1.4%	1
	His526Leu	Mức độ 1	1.4%	1
	His526Tyr	Mức độ 1	10.8%	8
	Ser522Leu	Mức độ 1	1.4%	1
	Ser531Leu	Mức độ 1	58.1%	43
	Thr52Pro	Mức độ 3	1.4%	1
	Val531Met	Mức độ 3	1.4%	1
	TỔNG SỐ		100%	74

Nhận xét: Đa số đột biến trên gen *rpoB* xảy ra ở codon 531, đột biến thay thế axit amin Serine thành Leucine chiếm 58,1% và codon 526 thay thế Histidine thành Tyrosine chiếm 10,8%, có liên quan đến kháng thuốc - mức độ 1. Bên cạnh đó một số đột biến tại các codon 144, 172, 516, 522 và đột biến mất đoạn tại codon 1299 cũng gây ra kháng thuốc kiểu hình (Bảng 3.5).



Biểu đồ 3.5. Biểu đồ vị trí đột biến gen và mức độ liên quan đến kháng thuốc RIF ở các chủng kháng

- Đột biến gen ở các mẫu có kiểu hình không kháng thuốc RIF**

Kết quả kháng thuốc kiểu hình có 12/82 mẫu không kháng RIF (chủng nhạy). Giải trình tự hệ gen các mẫu này cho thấy có các đột biến ở gen *rpoB* liên quan đến kháng thuốc RIF với các mức độ khác nhau (bảng 3.6).

Bảng 3.6. Vị trí đột biến gen và mức độ liên quan đến kháng thuốc RIF ở các chủng nhạy.

gen	Vị trí đột biến	Mức độ liên quan đến kháng thuốc	Tần suất đột biến trong mẫu NC	Tỷ lệ đột biến trong mẫu NC
<i>rpoB</i> 100%	Ser531Leu	Mức độ 1	1	4.2%
	Leu533Pro	Mức độ 1	5	20.8%
	His526Asn	Mức độ 2	2	8.3%
	Asp516Tyr	Mức độ 1	3	12.5%
	1309delAAC	Mức độ 2	1	4.2%
	3225T>C	Mức độ 5	12	50.0%
	TỔNG SỐ		24	100%

Nhận xét: Kết quả kháng thuốc kiểu hình có 12 mẫu không kháng RIF, tuy nhiên kháng thuốc kiểu gen cho thấy 12 mẫu này đều có các đột biến gen ở các codon 533 (20,8%), 516 (12,5%), 526 (8,3%), 531 (4,2%), 1309 (4,2%), các đột biến này có liên quan đến kháng thuốc - mức độ 1 và 2. Các mẫu này cũng có đột biến tại vị trí codon 3225 thay thế nucleotit Thymine (T) thành Cytosine (C) chiếm tỷ lệ 50%, tuy nhiên đây là đột biến câm, không biểu hiện kiểu hình kháng thuốc RIF, không liên quan đến kháng thuốc - mức độ 5 (bảng 3.6).

3.2.3. Kết quả giải trình tự gen phát hiện đột biến kháng thuốc Ethambutol

- Đột biến gen ở các mẫu có kiểu hình kháng thuốc Ethambutol (EMB)**

Tổng số 36/82 mẫu kháng EMB, kết quả giải trình tự hệ gen các mẫu này có các đột biến trên gen *embB* với tỷ lệ xuất hiện các đột biến trong mẫu nghiên cứu khác nhau.

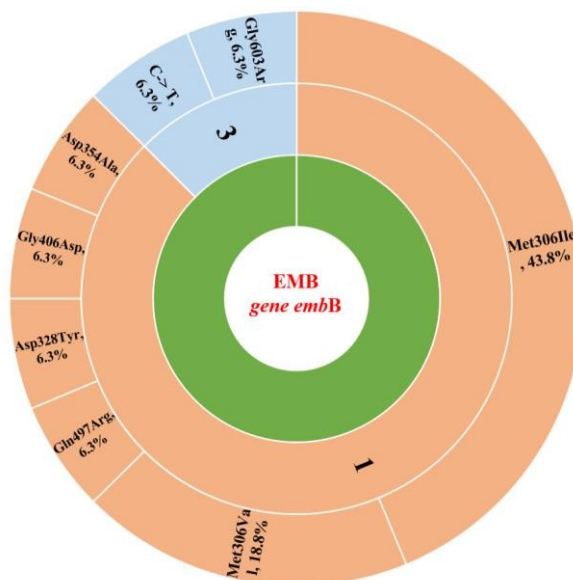
Bảng 3.7. Vị trí đột biến gen và mức độ liên quan đến kháng thuốc EMB ở các chủng kháng

gen	Vị trí đột biến	Mức độ liên quan đến kháng thuốc	Tần suất đột biến trong mẫu NC	Tỷ lệ đột biến trong mẫu NC
<i>embB</i> 100%	Asp354Ala	Mức độ 1	1	2.8%
	Gly406Ser	Mức độ 1	1	2.8%
	Gln497Lys	Mức độ 1	1	2.8%
	Val492Gly	Mức độ 1	2	5.6%
	Met306Ile	Mức độ 1	14	38.9%
	Met306Val	Mức độ 1	14	38.9%
	Gln497Arg	Mức độ 1	3	8.3%
	TỔNG SỐ		36	100 %

Nhận xét: Đa số đột biến trên gen *embB* xảy ra ở codon 306, thay thế axit amin Methionine (Met) thành Isoleucine (Ile) chiếm 14/36 mẫu (38,9%) và Methionine (Met) thành Valine (Val) chiếm 38,9%. Các đột biến này trên gen *embB* đều liên quan đến kháng thuốc – mức độ 1 (Bảng 3.7).

• **Đột biến gen ở các mẫu có kiểu hình không kháng thuốc EMB**

Kết quả kháng thuốc kiểu hình cho thấy có 46/82 mẫu không kháng thuốc EMB, tuy nhiên khi giải trình tự gen cho thấy 16/46 mẫu có đột biến tại các vị trí khác nhau trên gen *embB* (biểu đồ 3.6).



Biểu đồ 3.6. Vị trí đột biến gen và mức độ liên quan đến kháng thuốc EMB ở các chủng nhạy.

Nhận xét: Đa số đột biến trên gen *embB* xảy ra ở codon 306, thay thế axit amin Methionine thành Isoleucine chiếm 7/16 mẫu (43,8%) và Methionine (Met) thành Valine (Val) chiếm 18,8%; Ngoài ra có các đột biến Asp354Ala (6,3%); Gly406Asp (6,3%); Asp328Tyr (6,3%); Gln497Arg (6,3%). Các đột biến này trên gen *embB* đều liên quan đến kháng thuốc – mức độ 1. Hai mẫu có hai đột biến

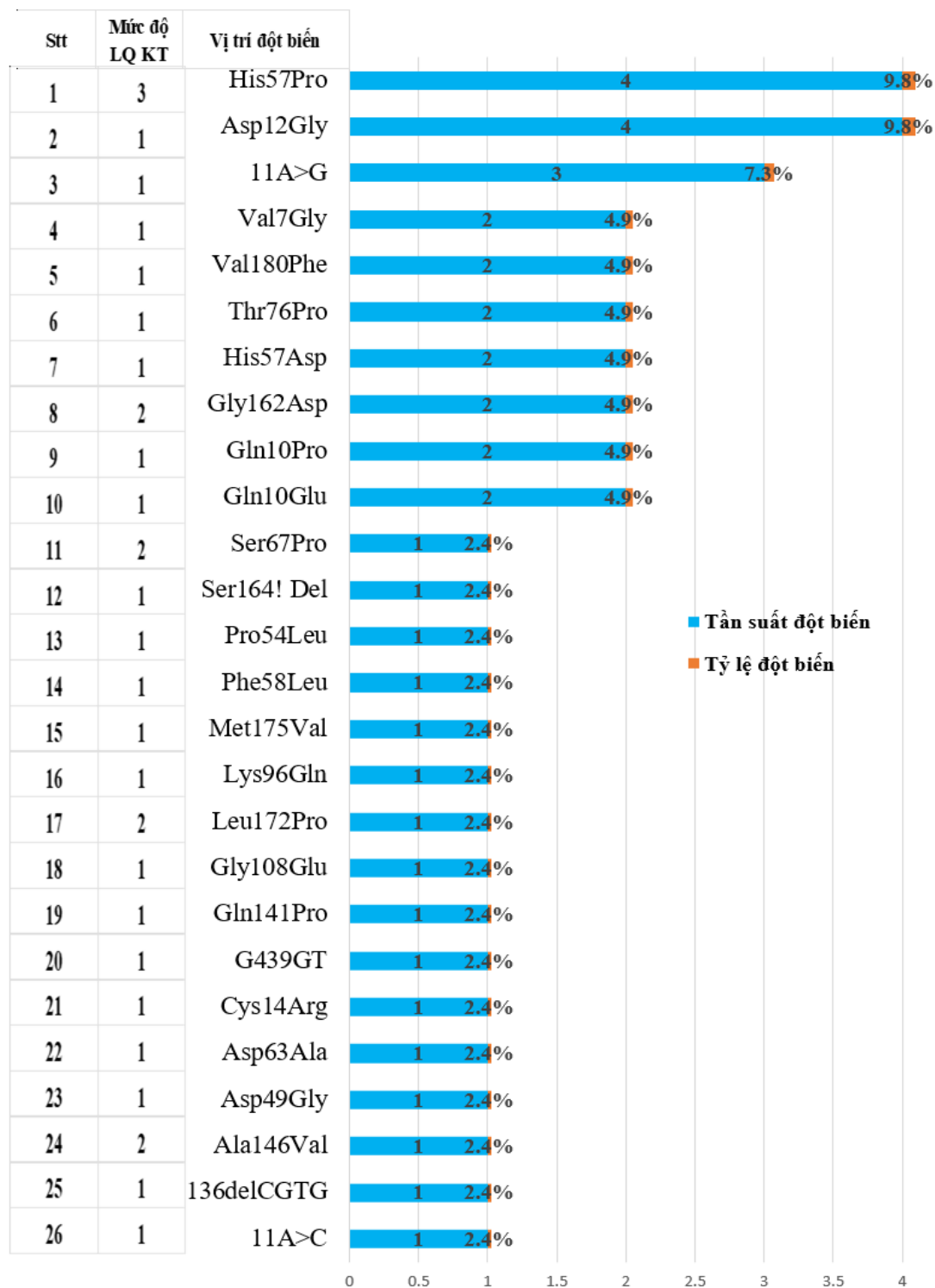
thay thế Gly603Arg và nucleotit 15 C-> T có mức độ liên quan đến kháng thuốc không chắc chắn – mức độ 3. Các đột biến này không biểu hiện kiểu hình kháng thuốc EMB (Biểu đồ 3.6).

3.2.4. Kết quả giải trình tự gen phát hiện đột biến kháng thuốc Pyrazinamide

- **Đột biến gen ở các mẫu có kiểu hình kháng thuốc Pyrazinamide (PZA)**

Tổng số 51/82 mẫu có kiểu hình kháng PZA, trong đó có 41 mẫu kết quả giải trình tự hệ gen kháng thuốc PZA.

Nhận xét: Kháng thuốc PZA liên quan đến các đột biến trên gen *pncA*. Từ 41 mẫu kháng thuốc kiểu gen, cho thấy xuất hiện 26 loại đột biến khác nhau có liên quan đến kháng thuốc PZA ở các mức độ 1,2 và 3. Trong đó đột biến tại vị trí His57Pro chiếm tỷ lệ 9,8% (4 mẫu), đột biến Asp12Gly chiếm tỷ lệ 9,8% (4 mẫu), thay thế 11A>G chiếm tỷ lệ 7,3% (3 mẫu). Tiếp theo là các vị trí đột biến Gln10Glu, Gly162Asp, Gln10Pro, His57Asp, Thr76Pro, Val180Phe, Val7Gly đều lần lượt chiếm tỷ lệ 4,9%. Các đột biến còn lại (16 loại) lần lượt chiếm tỷ lệ 2,4 % (biểu đồ 3.7).



Biểu đồ 3.7. Vị trí đột biến gen và mức độ liên quan đến kháng thuốc PZA ở các chủng kháng

- **Đột biến gen ở các mẫu có kiểu hình không kháng thuốc PZA**

Kết quả kháng thuốc kiểu hình cho thấy có 31/82 mẫu nhạy cảm với thuốc PZA. Tuy nhiên khi giải trình tự hệ gen có 1 mẫu xuất hiện đột biến trên gen *pncA* vị trí His57Tyr, liên quan đến kháng thuốc - mức độ 1 (bảng 3.8).

Bảng 3.8. Vị trí đột biến gen và mức độ liên quan đến kháng thuốc PZA ở các chủng nhạy.

gen	Vị trí đột biến	Mức độ liên quan đến kháng thuốc	Tần suất đột biến trong mẫu NC	Tỷ lệ đột biến trong mẫu NC
<i>pncA</i>	His57Tyr	Mức độ 1	1	100%
TỔNG SỐ			1	100 %

3.2.5. Kết quả giải trình tự gen phát hiện đột biến kháng thuốc Streptomycin

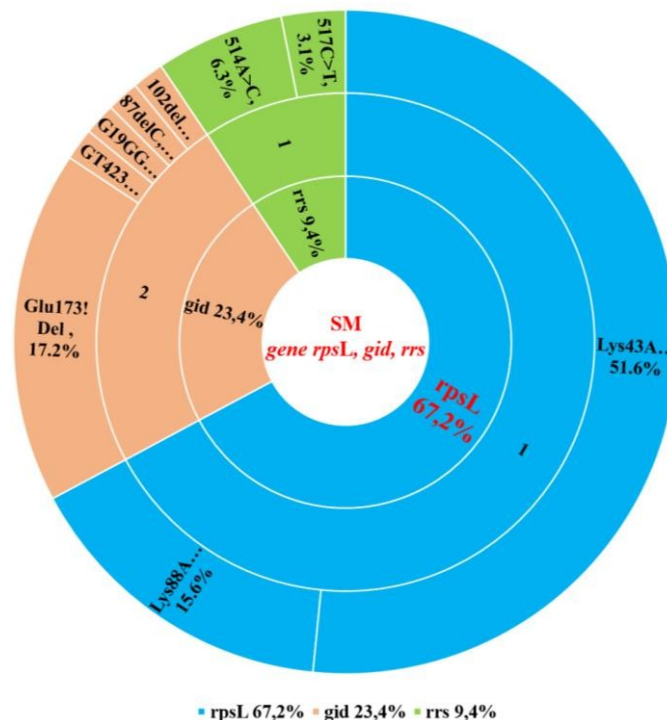
- **Đột biến gen ở các mẫu có kiểu hình kháng thuốc Streptomycin (SM)**

Tổng số 63/82 mẫu có kiểu hình kháng SM, kết quả giải trình tự hệ gen các mẫu này cho thấy có 3 gen quy định tính kháng thuốc SM ở các mức độ khác nhau. Trong đó đột biến trên gen *rpsL* chiếm tỷ lệ cao nhất (67,2%), gen *gid* chiếm tỷ lệ 23,3% và gen *rrs* chiếm tỷ lệ thấp nhất là 9,4%.

Bảng 3.9. Vị trí đột biến gen và mức độ liên quan đến kháng thuốc SM ở các chủng kháng.

#	gen	Vị trí đột biến	Phân loại mức độ liên quan	Tỷ lệ đột biến trong mẫu	Tần suất đột biến trong mẫu
1	<i>rpsL</i> 67,2%	Lys43Arg	Mức độ 1	51.6%	33
		Lys88Arg*	Mức độ 1	15.6%	10
1	<i>gid</i> 23,4%	102delG	Mức độ 2	1.6%	1
		87delC	Mức độ 2	1.6%	1

#	gen	Vị trí đột biến	Phân loại mức độ liên quan	Tỷ lệ đột biến trong mẫu	Tần suất đột biến trong mẫu
		G19GG/C17CC/C16CC/G15GC/G15GC/C18CG	Mức độ 2	1.6%	1
		Glu173! Del *	Mức độ 2	17.2%	11
		GT423G/TT424T	Mức độ 2	1.6%	1
3	<i>rrs</i> 9,4%	514A>C	Mức độ 1	6.3%	4
		517C>T	Mức độ 1	3.1%	2
		TỔNG SỐ		100.0%	64



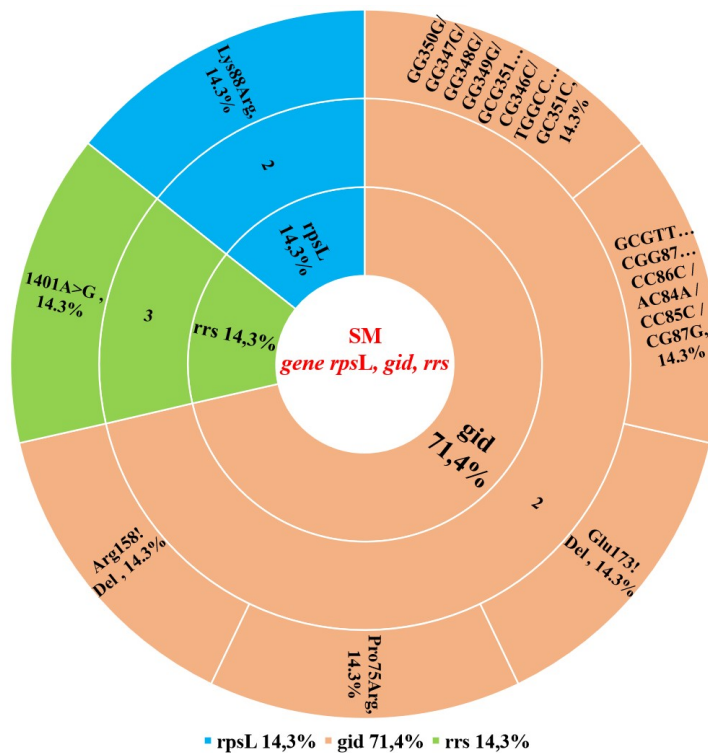
Biểu đồ 3.8. Vị trí đột biến gen và mức độ liên quan đến kháng thuốc SM ở các chủng kháng

Nhận xét: Đột biến kháng thuốc SM xảy ra ở cả 3 gen *rpsL*, *gid* và *rrs*, trong đó đột biến gen *rpsL* tại codon 43 thay thế Lys thành Arg chiếm tỷ lệ cao nhất (51,6%). Tiếp theo là đột biến Lys88Arg chiếm tỷ lệ 15,6% và đột biến mất đoạn tại codon 173 Glutamic axit chiếm 17,2%. Các đột biến còn lại chiếm từ 1,6 đến 6,3%. Đây là các đột biến sai nghĩa, liên quan đến kháng thuốc SM ở các mức

độ 1 và 2. *Một mẫu số VS125 xuất hiện đột biến ở hai gen *rpsL* vị trí Lys88Arg và gen *gid* vị trí codon 173 mất đoạn GAG.

- **Đột biến gen ở các mẫu có kiểu hình không kháng thuốc SM**

Nghiên cứu có 19/82 mẫu có kiểu hình không kháng SM, trong đó 7 mẫu có kết quả giải trình tự hệ gen phát hiện đột biến ở cả 3 gen với tỷ lệ xuất hiện lần lượt là *gid* 71,4% , *rrs* 14,3% và *rpsL* 14,4% (biểu đồ 3.9).



Biểu đồ 3.9. Vị trí đột biến gen và mức độ liên quan đến kháng thuốc SM ở các chủng nhậy.

Nhận xét: Đột biến xảy ra ở 7 vị trí codon khác nhau thuộc 7 mẫu không có biểu hiện kiểu hình kháng thuốc. Trong đó 5 vị trí đột biến trên gen *gid* tại các codon 158 gây mất đoạn CGU (Arginine); codon 75 thay thế Pro thành Arg; codon 173 gây mất đoạn GAA (Glutamic axit); đột biến mất bazơ nitơ tại nhiều vị trí trên gen *gid* như CCG87GG / CC86C / AC84A / CC85C / CG87G và

GG350G/ GG347G/ GG348G/ 349G/ GCG351CG/ CG346C. Ngoài ra còn có một đột biến trên gen *rpsL* tại codon 88 thay thế Lys thành Arg và một đột biến trên gen *rrs* tại codon 1401 thay thế bazơ nitơ Adenin (A) thành Guanin (G).

3.2.6. Kết quả giải trình tự gen phát hiện đột biến kháng thuốc Moxifloxacin

- Đột biến gen ở các mẫu có kiểu hình kháng thuốc Moxifloxacin (MFX)**

Kết quả nghiên cứu cho thấy 16/82 mẫu có kiểu hình kháng thuốc MFX trong đó có 6 mẫu xảy ra đột biến trên gen *gyrA*.

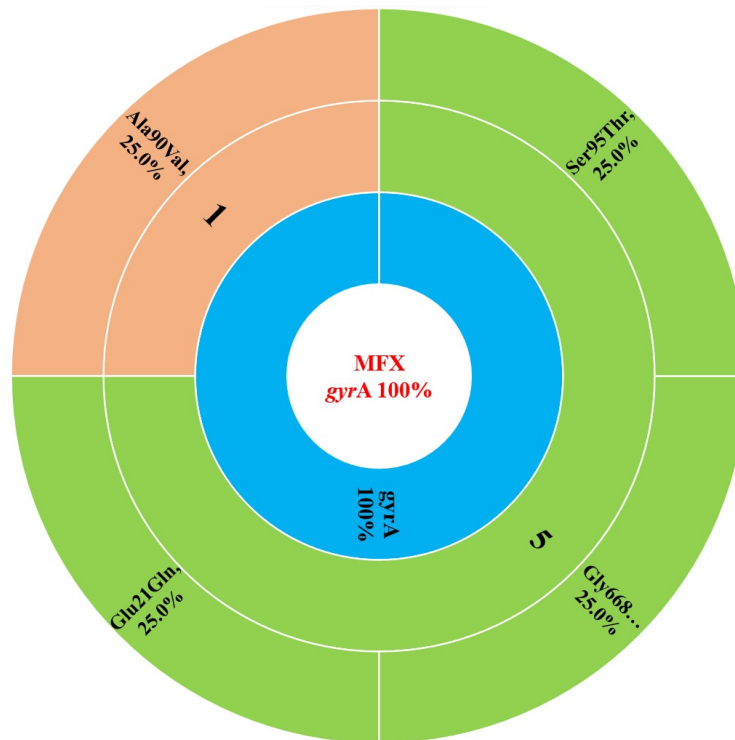
Bảng 3.10. Vị trí đột biến gen và mức độ liên quan đến kháng thuốc MFX ở các chủng kháng.

gen	Vị trí đột biến	Mức độ liên quan đến kháng thuốc	Tần suất đột biến trong mẫu NC	Tỷ lệ đột biến trong mẫu NC
<i>gyrA</i> 100%	Ala90Val	Mức độ 2	1	16,7%
	Asp94Gly	Mức độ 1	4	66,7%
	Asp94Asn	Mức độ 1	1	16,7%
TỔNG SỐ			6	100 %

Nhận xét: Tính kháng thuốc của MFX liên quan đến các đột biến trên gen *gyrA*. Đột biến ở codon 94 thay thế Asp thành Gly chiếm 66,7%%, hai đột biến còn lại tại codon 90 thay thế Ala thành Val chiếm 16,7% và Asp thành Asn chiếm 16,7%. Các đột biến này đều liên quan đến kháng thuốc ở mức độ 1 và 2 (Bảng 3.10).

- Đột biến gen ở các mẫu có kiểu hình không kháng thuốc MFX.**

Kết quả giải trình tự gen của 66/82 mẫu có kiểu hình không kháng thuốc MFX, có 01 mẫu xuất hiện đột biến ở cả 4 vị trí trên *gyrA*.



Biểu đồ 3.10. Vị trí đột biến gen và mức độ liên quan đến kháng thuốc MFX ở các chủng nhạy.

Nhận xét: Trong 66 mẫu có kiểu hình không kháng MFX, có duy nhất một mẫu VS130 xuất hiện cả 4 đột biến trên gen *gyrA* tại các vị trí codon 90 thay thế Ala thành Val – liên quan đến kháng thuốc mức độ 1; ba vị trí đột biến còn lại là Glu21Gln, Gly668Asp, Ser95Thr – liên quan đến kháng thuốc mức độ 5 (Biểu đồ 3.10).

3.2.7. Kết quả giải trình tự gen phát hiện đột biến kháng thuốc Amikacin

- Đột biến gen ở các mẫu có kiểu hình kháng thuốc Amikacin (AMK)**

Nghiên cứu có 2/82 mẫu có kiểu hình kháng thuốc AMK. Kết quả giải trình tự hệ gen của 2 mẫu này cho thấy có đột biến xuất hiện tại 2 mẫu VS202 và VS224 (Bảng 3.11)

Bảng 3.11. Vị trí đột biến gen và mức độ liên quan đến kháng thuốc AMK ở các chủng kháng.

gen	Vị trí đột biến	Mức độ liên quan đến kháng thuốc	Tần suất đột biến trong mẫu NC	Tỷ lệ đột biến trong mẫu NC
<i>rrs</i> 100%	1401A>G	Mức độ 1	2	100.0%
TỔNG SỐ			2	100 %

Nhận xét: Kháng thuốc AMK liên quan đến đột biến tại gen *rrs*. Hai mẫu có đột biến tại codon 1401 thay thế Adenine (A) thành Guanine (G). Đây là đột biến sai nghĩa, biểu hiện kiểu hình kháng thuốc và liên quan đến kháng thuốc AMK – mức độ 1.

• **Đột biến gen ở các mẫu có kiểu hình không kháng thuốc AMK**

Quản thể nghiên cứu có 80/82 mẫu có kiểu hình không kháng thuốc AMK. Kết quả giải trình tự hệ gen của 80 mẫu này cho thấy có đột biến xuất hiện tại 1 mẫu VS262 (bảng 3.12).

Bảng 3.12. Vị trí đột biến gen và mức độ liên quan đến kháng thuốc AMK ở các chủng nhạy

gen	Vị trí đột biến	Mức độ liên quan đến kháng thuốc	Tần suất đột biến trong mẫu NC	Tỷ lệ đột biến trong mẫu NC
<i>rrs</i> 100%	64 C>T	Mức độ 4	1	100.0%
TỔNG SỐ			1	100 %

Nhận xét: Trong số 80 mẫu không kháng AMK, có một mẫu VS262 xuất hiện đột biến tại codon 64 thay thế Cytosine (C) thành Thymine (T). Đột biến này liên quan đến kháng thuốc AMK ở mức độ 4 và không biểu hiện kiểu hình kháng thuốc.

3.2.8. Độ nhạy, độ đặc hiệu của xét nghiệm giải trình tự gen vi khuẩn lao từ mẫu đờm

Nghiên cứu thu thập 100 mẫu đờm của bệnh nhân lao đạt tiêu chuẩn chọn mẫu đến khám tại Bệnh viện Phổi Trung Ương và Bệnh viện Phổi Hà Nội trong giai đoạn từ năm 2020 – 2022. Các mẫu được xử lý đồng nhất, khử tạp và chia làm 2 phần. Một phần được bảo quản bảo quản ở -80°C để thực hiện giải trình tự toàn bộ hệ gen trên hệ thống Miniseq Illumina. Một phần mẫu đờm được nuôi cấy phân lập và thực hiện kháng sinh đồ thuốc lao hàng 1,2 từ các mẫu cấy dương tính với MTB.

Kết quả nuôi cấy có 95 mẫu dương tính với MTB và được tiếp tục làm kháng sinh đồ chẩn đoán kháng thuốc lao hàng 1, hàng 2. Các mẫu đờm tương ứng với 95 mẫu cấy dương tính với MTB được tách DNA và chạy giải trình tự gen. Trong quá trình tách DNA, nhóm nghiên cứu đã sử dụng 2 loại sinh phẩm tách DNA: (1) Sinh phẩm, trang thiết bị tách DNA của hãng Truenat Molbio. Đây là sinh phẩm tách chiết DNA tự động, trong quy trình thực hiện không có bước khử DNA người, sản phẩm thu được có chất lượng kém, không tinh sạch và bị lẫn nhiều DNA người. Kết quả 18 mẫu đờm có nồng độ DNA khi đo bằng Qubit dưới 2.0 (ng/ul), không phù hợp cho thực hiện các bước tiếp theo của quy trình giải trình tự gen; (2) Tách DNA bằng sinh phẩm của hãng Qiagen trong đó 3 mẫu có nồng độ DNA thấp dưới 2.0 (ng/ul); 74 mẫu có nồng độ DNA trên 2.0 (ng/ul), độ tinh sạch trong giới hạn đo bằng Nanodrop bước sóng A260/280 từ 1.8 – 2.0 và A260/230 trong khoảng 2.0 – 2.2 được tiếp tục thực hiện giải trình tự gen.

Kết quả giải trình tự của 74 mẫu đờm có 6 mẫu nhiễm (contaminate) không có dữ liệu về loài và tính kháng thuốc, 30 mẫu có kết quả kiểm soát chất lượng (QC) dưới 80 % và không có dữ liệu về loài và tính kháng thuốc, 38 mẫu có QC đạt trên 80 % và các thông tin kháng thuốc kiểu gen đầy đủ để phân tích so sánh

với kết quả kháng thuốc kiểu hình. Kết quả phân tích độ nhạy (Se) và độ đặc hiệu (Sp) của xét nghiệm giải trình tự toàn bộ hệ gen vi khuẩn lao trực tiếp từ mẫu đờm so với xét nghiệm kháng sinh đồ vi khuẩn lao trên môi trường lỏng được thể hiện ở bảng 3.13, bảng 3.14 và biểu đồ 3.11.

Bảng 3.13. Số lượng, tỷ lệ kháng thuốc kiểu hình và kiểu gen từ mẫu đờm

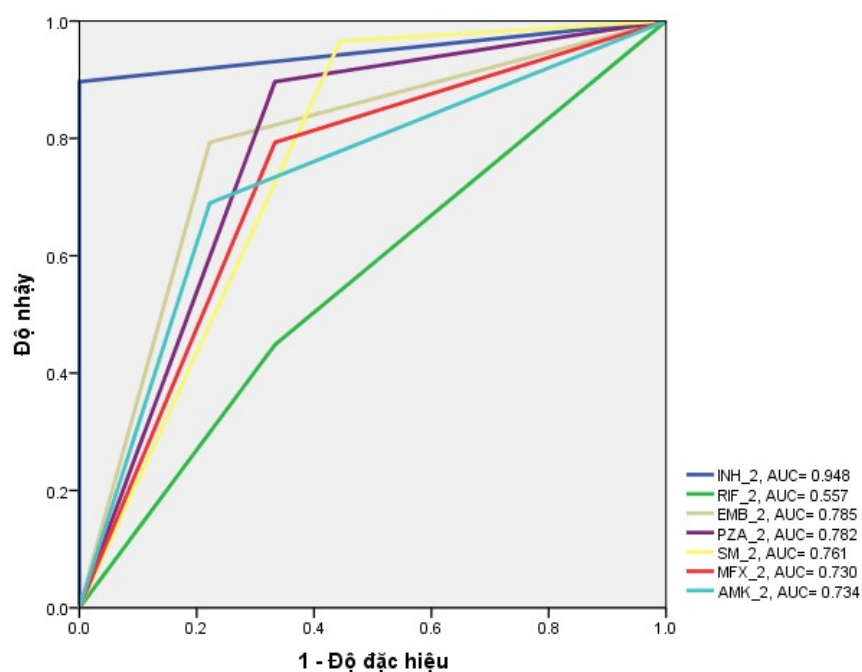
	Kháng thuốc kiểu hình				Tổng số	
	R		S			
	n	%	n	%		
Kháng thuốc kiểu gen	Isoniazid					
	R	33	91.7	0	0	33
	S	3	8.3	2	100	5
	Tổng số	36		2		38
	Rifampicin					
	R	26	86.7	6	75	32
	S	4	13.3	2	25	6
	Tổng số	30		8		38
	Ethambutol					
	R	17	89.5	6	32	23
	S	2	10.5	13	68	15
	Tổng số	19		19		38
	Pyrazinamide					
	R	13	56.5	0	0	13
	S	10	43.5	15	100	25
	Tổng số	23		15		38
	Streptomycin					
	R	21	67.7	1	14	22
	S	10	32.3	6	86	16
	Tổng số	31		7		38
	Moxifloxacin					
	R	5	50.0	1	4	6
	S	5	50.0	27	96	32
	Tổng số	10		28		38
	Amikacin					
	R	0	2.0	2	5	2
	S	0	36.0	36	95	36
	Tổng số	0	38.0	38		38

*R: Resistant – Kháng thuốc

S: Sensitive – Nhạy cảm

Bảng 3.14. Giá trị độ nhạy, độ đặc hiệu của xét nghiệm giải trình tự gen trực tiếp từ mẫu đờm trong chẩn đoán lao kháng thuốc.

Tên thuốc	Se (%)	Sp (%)	PPV (%)	NPV (%)	P
Isoniazid (INH)	91,7	100,0	100,0	40,0	0,035
Rifampicin (RIF)	86,7	25,0	81,3	33,3	0,109
Ethambutol (EMB)	89,5	68,4	73,9	86,7	0,092
Pyrazinamide (PZA)	67,7	85,7	95,5	37,5	0,094
Streptomycin (SM)	56,5	100,0	100,0	60,0	0,089
Moxifloxacin (MFX)	50,0	96,4	83,3	84,4	0,107
Amikacin (AMK)	0	94,7	0	100,0	1,107



Biểu đồ 3.11. Giá trị AUC của xét nghiệm giải trình tự gen trực tiếp từ mẫu đờm trong chẩn đoán lao kháng thuốc.

Nhận xét: Kết quả ở bảng 3.14 cho thấy độ nhạy (Se), độ đặc hiệu (Sp) của xét nghiệm giải trình tự gen từ mẫu đờm khi so sánh với kháng sinh đồ kiểu hình của các thuốc lần lượt là: thuốc Isoniazid độ nhạy (Se) 91,7% và độ đặc hiệu (Sp) 100%. Độ nhạy của xét nghiệm giải trình tự trong chẩn đoán kháng Rifampicin là Se 86,79% và Sp 25,0%. Ethambutol có Se 89,5%, Sp 68,4%. Pyrazinamide có Se 56,5%, Sp 100%. Streptomycin có Se 67,7%, Sp 85,7%. Moxifloxacin (MFX) có Se 50,0%, Sp 96,4%. Không có mẫu kháng Amikacin (AMK) trong số 38 mẫu giải trình tự từ mẫu đờm nên AMK có Se 0,0%, Sp 94,7%.

Khi so sánh giá trị AUC (Area Under The Curve - Khu vực dưới đường cong) cho thấy kỹ thuật giải trình tự gen có ý nghĩa chẩn đoán rất cao với thuốc Isoniazid (0,948); Các thuốc có giá trị AUC ở mức trên trung bình là Ethambutol (0,785), Pyrazinamide (0,782), Streptomycin (0,761), Moxifloxacin (0,730) và Amikacin (0,734). Thuốc có giá trị AUC ở mức trung bình là Rifampicin (0,557) (biểu đồ 3.11).

3.2.9. Độ nhạy, độ đặc hiệu của xét nghiệm giải trình tự gen vi khuẩn lao từ mẫu đờm

Từ 100 mẫu đờm thu được, nghiên cứu đã thực hiện nuôi cấy trên môi trường lỏng MGIT 960, trong đó có 95 mẫu cấy có kết quả dương tính MTB, 3 mẫu cấy dương tính NTM và 2 mẫu cấy chủng nhiễm. Các mẫu cấy dương tính MTB được làm xét nghiệm kháng sinh đồ với thuốc lao hàng 1,2 và tách DNA để làm giải trình tự gen. Kết quả có 82 mẫu có đầy đủ thông tin kháng thuốc kiểu hình và kháng thuốc kiểu gen để đưa vào phân tích. Kết quả độ nhạy và độ đặc hiệu của xét nghiệm giải trình tự toàn bộ hệ gen vi khuẩn lao từ mẫu đờm so với xét nghiệm kháng sinh đồ vi khuẩn lao trên môi trường lỏng được thể hiện ở bảng 3.15, bảng 3.16 và biểu đồ 3.12.

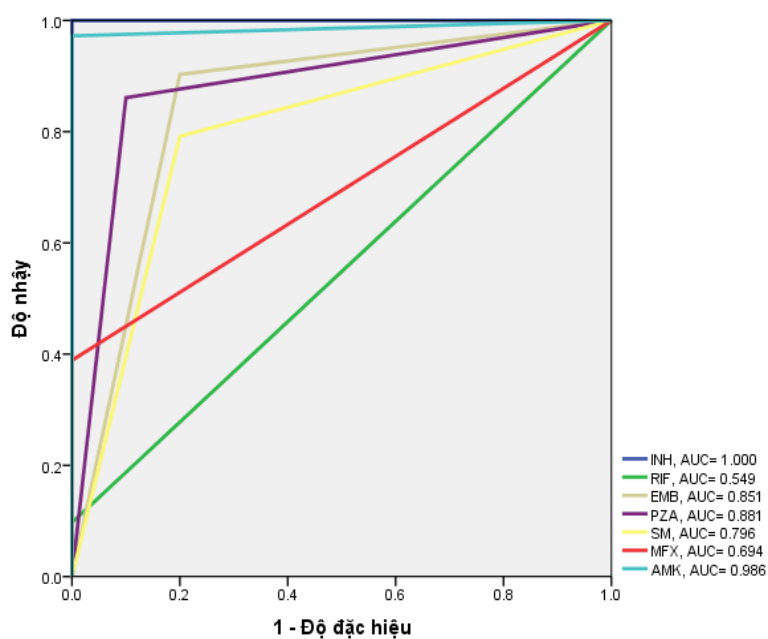
Bảng 3.15. Số lượng, tỷ lệ kháng thuốc kiểu hình và kiểu gen của mẫu chủng

	Kháng thuốc kiểu hình				Tổng số	
	R		S			
	n	%	n	%		
Kháng thuốc kiểu gen	Isoniazid					
	R	78	100%	0	0	78
	S	0	0	4	100%	4
	Tổng số	78		4		82
	Rifampicin					
	R	69	88.%	12	100	82
	S	1	1%	0	0	0
	Tổng số	70		12		82
	Ethambutol					
	R	35	45%	15	33%	50
	S	1	1%	31	67%	32
	Tổng số	36		46		82
	Pyrazinamide					
	R	40	51%	1	3%	41
	S	11	14%	30	97%	41
	Tổng số	51		31		82
	Streptomycin					
	R	60	77%	7	37%	67
	S	3	4%	12	63%	15
	Tổng số	63		19		82
	Moxifloxacin					
	R	6	8%	1	2%	7
	S	10	13%	65	98%	75
	Tổng số	16		66		82
	Amikacin					
	R	2	3%	1	1%	3
	S	0	0%	79	99%	79
	Tổng số	2		80		82

***R:** Resistant – Kháng thuốc**S:** Sensitive – Nhạy cảm

Bảng 3.16. Giá trị độ nhạy, độ đặc hiệu của xét nghiệm giải trình tự gen từ mẫu chủng trong chẩn đoán lao kháng thuốc..

Tên thuốc	Se (%)	Sp (%)	PPV (%)	NPV (%)	P
Isoniazid (INH)	100.0	100,0	100,0	100,0	0,001
Rifampicin (RIF)	98,6	0,0	85,2	0.0	0,091
Ethambutol (EMB)	97,2	67,4	70,0	96,9	0,077
Pyrazinamide (PZA)	78,4	96,8	97,6	73,2	0,060
Streptomycin (SM)	95,2	63,2	89,6	80,0	0,079
Moxifloxacin (MFX)	37,5	98,5	85,7	86,7	0,069
Amikacin (AMK)	100,0	98,8	66,7	100,0	0.012



Biểu đồ 3.12. Giá trị AUC của xét nghiệm giải trình tự gen từ mẫu chủng trong chẩn đoán lao kháng thuốc.

Nhận xét: Kết quả ở bảng 3.16 cho thấy độ nhạy (Se), độ đặc hiệu (Sp) của xét nghiệm giải trình tự gen từ mẫu chủng khi so sánh với xét nghiệm kháng sinh

đồ kiểu hình của các thuốc lần lượt là: thuốc Isoniazid Se 100,0% và Sp 100%. Rifampicin có Se 98,6% và Sp bằng 0 do không có chủng nhạy RIF. Ethambutol có Se 97,2%, Sp 67,4%. Pyrazinamide có Se 78,4%, độ Sp 96,8%. Streptomycin có Se 95,2%, độ Sp 63,2%. Moxifloxacin có Se 37,5%, Sp 98,5%. Amikacin (AMK) có Se 100%%, Sp 98,8%.

Giá trị AUC cho thấy kỹ thuật giải trình tự gen có ý nghĩa chẩn đoán rất cao với thuốc Isoniazid (1,000, Amikacin (0,986)); Các thuốc có giá trị AUC ở mức khá cao là Ethambutol (0,851), Pyrazinamide (0,881), Streptomycin (0,796), Moxifloxacin (0,694). Thuốc có giá trị AUC ở mức trung bình là Rifampicin (0,549) .

3.3. Mối liên hệ kiểu gen của các chủng vi khuẩn lao phân lập từ bệnh nhân lao kháng Rifampicin bằng kỹ thuật giải trình tự toàn bộ hệ gen.

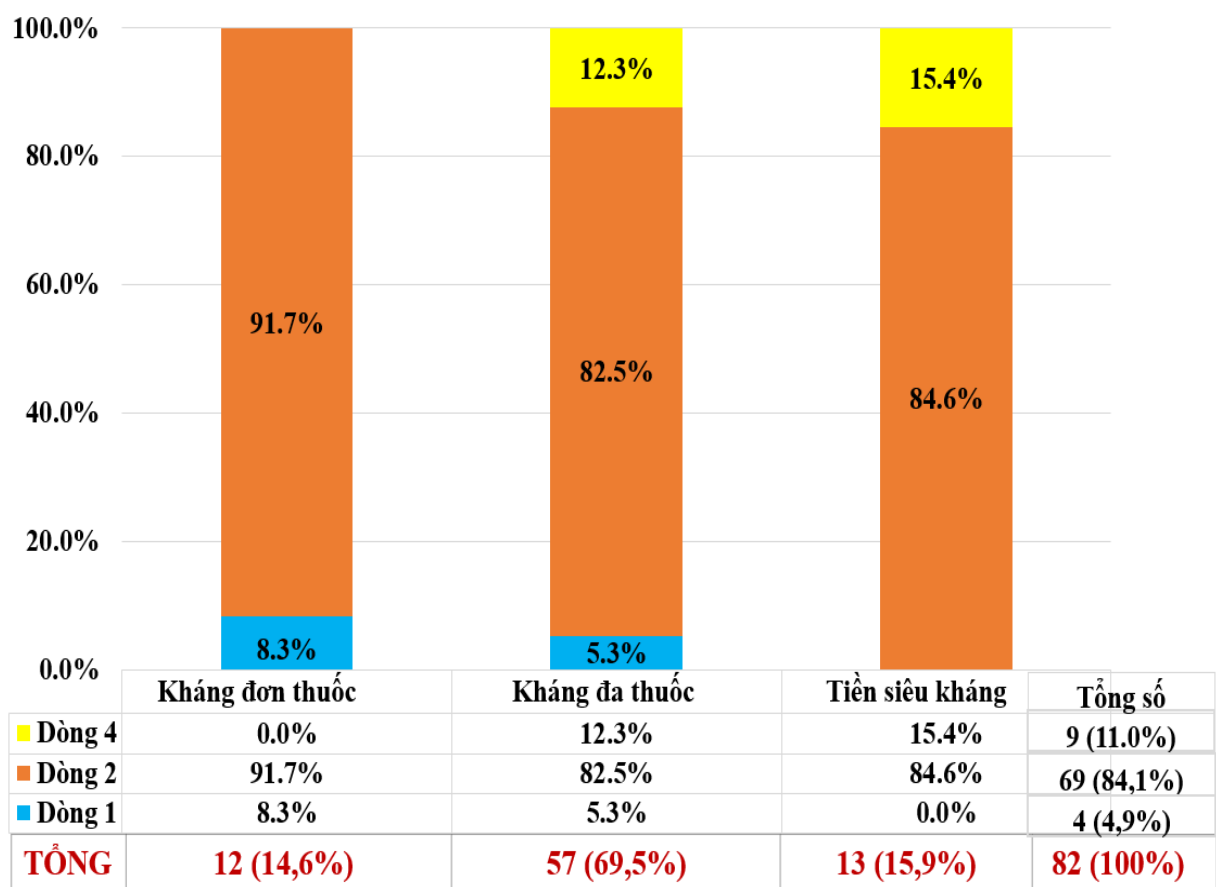
3.3.1. Phân bố các dòng vi khuẩn lao theo các nhóm kháng thuốc kiểu hình

Phân tích kết quả kháng thuốc kiểu hình và giải trình tự gen của 82 mẫu cho thấy quần thể vi khuẩn lao trong nghiên cứu thuộc ba dòng (lineage) số 1, 2, 4 và đa số các chủng vi khuẩn lao kháng thuốc thuộc dòng 2 (bảng 3.17 và biểu đồ 3.12; 3.13).

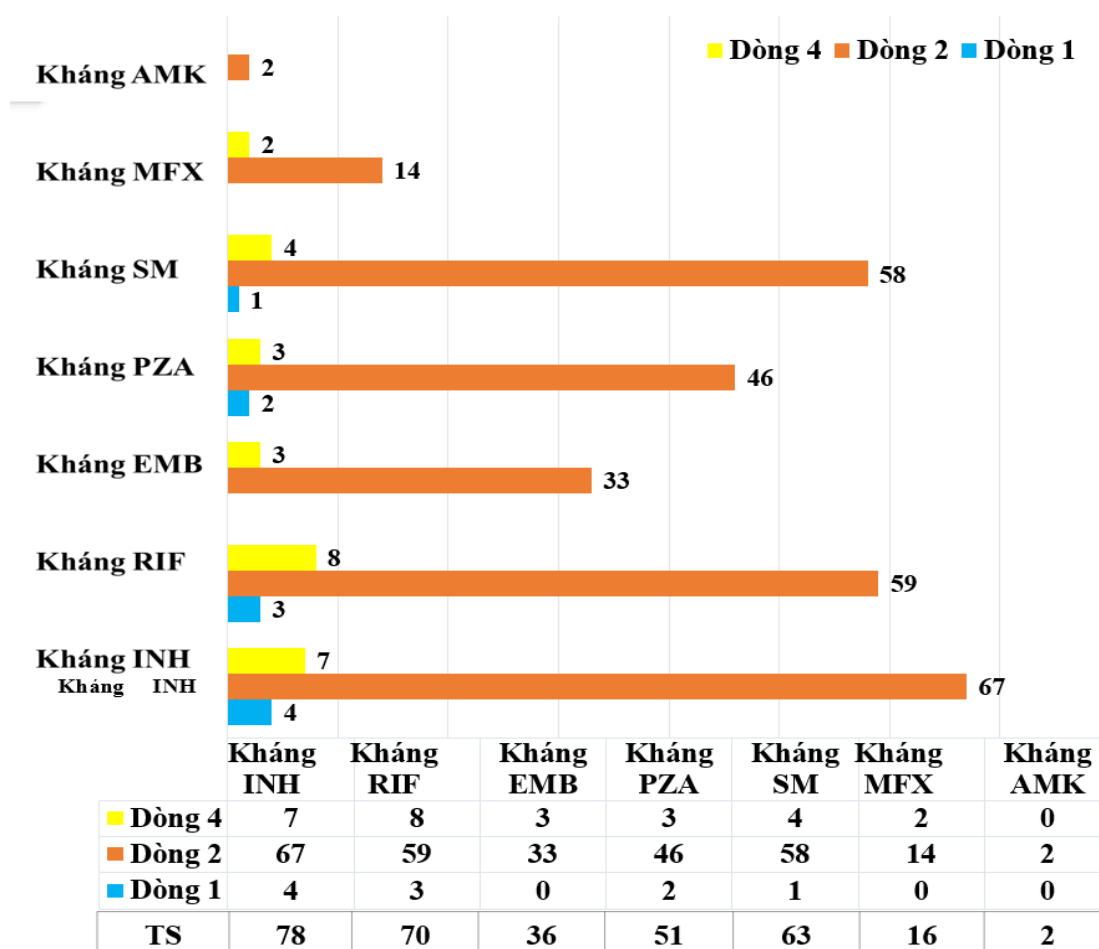
Bảng 3.17. Phân loại kháng thuốc kiểu hình của *M. tuberculosis* theo dòng vi khuẩn

Kiểu hình kháng thuốc	Dòng <i>M. tuberculosis</i>			Tổng	Tỷ lệ
	Dòng 1	Dòng 2	Dòng 4		
Kháng đơn (DR-TB)	1	11	0	12	14.6%
Kháng đa thuốc (MDR-TB)	3	47	7	57	69.5%
Tiền siêu kháng (Pre-XDR TB)	0	11	2	13	15.9%
Tổng số mẫu theo dòng vi khuẩn	4 (4.9 %)	69 (84.1%)	9 (11.0%)	82	100.0%

Kiểu hình kháng thuốc	Dòng <i>M. tuberculosis</i>			Tổng	Tỷ lệ
	Dòng 1	Dòng 2	Dòng 4		
Kháng INH	4	67	7	78	95.1%
Kháng RIF	3	59	8	70	85.4%
Kháng EMB	0	33	3	36	43.9%
Kháng PZA	2	46	3	51	62.2%
Kháng SM	1	58	4	63	76.8%
Kháng MFX	0	14	2	16	19.5%
Kháng AMK	0	2	0	2	2.4%



Biểu đồ 3.13. Phân loại kháng thuốc kiểu hình của *M. tuberculosis* theo dòng vi khuẩn



Biểu đồ 3.14. *M. tuberculosis* kháng đơn thuốc theo dòng vi khuẩn

Nhận xét: Kết quả giải trình tự gen của 82 mẫu nghiên cứu cho thấy đa số các mẫu thuộc dòng 2 chiếm 84,1% (69/82), dòng 4 chiếm 11,0% (9/82) và dòng 1 chiếm ít nhất là 4,9% (4/82). Trong 69 mẫu dòng 2 có 15,9% (11/69) chủng kháng đơn thuốc; 68,1% (47/69) chủng kháng đa thuốc và 15,9% (11/69) chủng tiền siêu kháng thuốc (bảng 3.17 và biểu đồ 3.12).

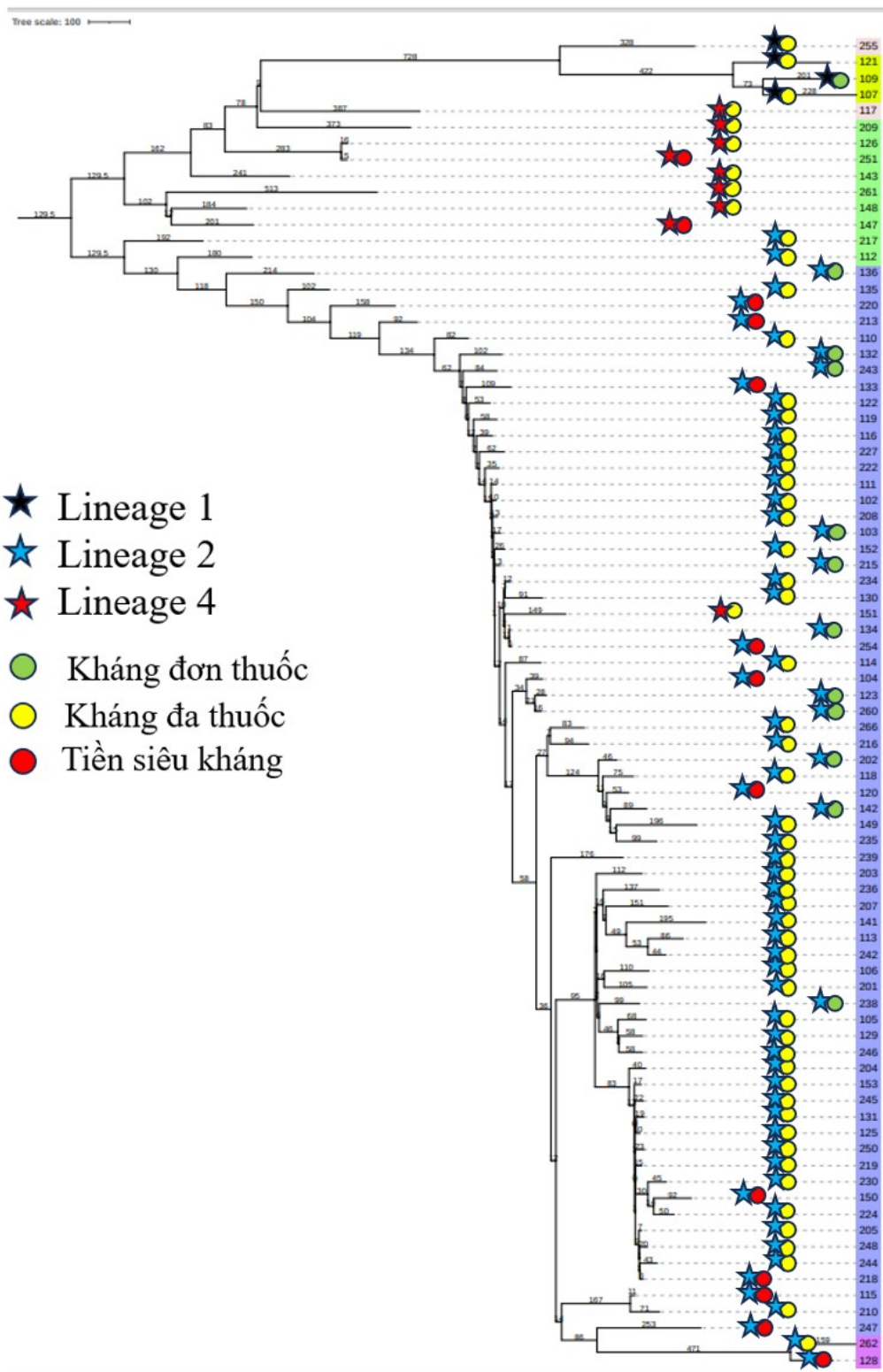
Phân tích kháng thuốc kiểu hình và dòng vi khuẩn cho thấy số mẫu kháng đơn thuốc (DR-TB) là 12/82 mẫu (14,6%) trong đó 11/12 mẫu (91,7%) thuộc dòng 2. Kháng thuốc xảy ra ở tất cả các mẫu thuộc dòng 2, tuy nhiên các mẫu dòng 1 không kháng EMB, MFX và AMK, mẫu dòng 4 không kháng AMK (biểu

đồ 3.13). Số mẫu đa kháng thuốc (MDR-TB) là 57/82 (69,5%) chiếm tỷ lệ cao trong quần thể và đa số gặp ở các mẫu dòng 2 có 47/57 (82,5%). Nghiên cứu có 13/82 mẫu (15,9%) là Tiền siêu kháng thuốc (Pre-XDR TB) có trong đó dòng 2 có 11/13 mẫu (84,6%) (biểu đồ 3.13).

3.3.2. Cây phát sinh chủng loại của quần thể vi khuẩn lao kháng thuốc tại Hà Nội năm 2020 – 2022

Dữ liệu trình tự DNA có thể được sử dụng để đo khoảng cách phát sinh gen và từ đó định lượng mức độ đa dạng di truyền trong và giữa các nhóm chủng. So sánh typ phân tử của 82 mẫu nghiên cứu cho thấy các mẫu được phân loại thành 3 nhánh tương ứng với ba dòng (lineage). Nhánh đầu tiên là dòng 1 (Indo-Oceanic) gồm các chủng dòng EAI (East Africa and Southeast Asia). Nhánh tiếp theo là dòng 4 (Euro-American) gồm các chủng dòng Haarlem, LAM, T và nhánh cuối cùng là dòng 2 (East-Asian) gồm các chủng dòng Beijing (hình 3.1).

Nhận xét: Kết quả WGS cho phép phân loại các chủng hoặc nhóm chủng cụ thể, liên quan đến kháng thuốc kiểu hình. Quần thể nghiên cứu phân chia theo 3 dòng: dòng 1 có 4/82 chủng (4,9%) trong đó có 3 chủng đa kháng thuốc và 1 chủng kháng đơn thuốc. Dòng 4 có 9/82 chủng (11,0%) trong đó có 2 chủng tiền siêu kháng thuốc và 7 chủng kháng đa thuốc. Dòng 2 có 69/82 chủng (84,1%) trong đó 11 chủng tiền siêu kháng thuốc, 47 chủng kháng đa thuốc và 11 chủng kháng đơn thuốc. Các chủng dòng 2 có sự đa dạng về tính kháng thuốc và khả năng lây lan rộng ở khu vực Đông Á.



Hình 3.1. Cây phát sinh chủng loại của quần thể vi khuẩn lao kháng thuốc

CHƯƠNG IV: BÀN LUẬN

4.1. Đặc điểm dịch tễ của mẫu nghiên cứu

4.1.1. Phân bố tuổi, giới và tiền sử bệnh của mẫu nghiên cứu

Phân bố theo giới

Trong nghiên cứu của chúng tôi, số lượng bệnh nhân là nam chiếm đa số (78%), gần gấp hơn ba lần so với nữ (22%) (Biểu đồ 3.1). Tỷ lệ này phù hợp với hầu hết nhiều nghiên cứu trong nước và trên thế giới đã ghi nhận: Số lượng nam mắc bệnh lao luôn cao hơn so với nữ.

Ở trong nước, Phan Thượng Đạt (2008) nghiên cứu trong thời gian 3 năm (2005-2008), 200 bệnh nhân được chẩn đoán lao phổi đa kháng thuốc, nam có 135 trường hợp chiếm 67,5%, nữ có 65 trường hợp chiếm 32,5%. Tỷ lệ nam/nữ là 2,08 (135/65) [9].

Các tác giả Nguyễn Thiên Hương (2007) nghiên cứu 2093 bệnh nhân và Nguyễn Bình Hòa (2010) nghiên cứu trên 105.000 người dân (từ 15 tuổi trở lên) tại các vùng dân cư ở thành thị, nông thôn, miền núi của Việt Nam đều ghi nhận tỷ lệ xét nghiệm Ziehl-Neelsen dương tính ở nam cao hơn nữ [72, 77].

Tác giả Nguyễn Huy Điện (2010), nghiên cứu tính kháng thuốc của MTB phân lập được ở 218 bệnh nhân tràn dịch màng phổi (TDMP) do lao tại bệnh viện Lao và Bệnh phổi Hải Phòng. Trong số đó, nam chiếm ưu thế với tỷ lệ 81,7%. Tính riêng những bệnh nhân TDMP/HIV (+) thì tỷ lệ nam cũng cao (84/96 trường hợp, tỷ lệ 87,5%) [10]. Nghiên cứu trên những bệnh nhân lao phổi tái phát tại bệnh viện Phổi Trung ương và bệnh viện 74 Trung ương, Nguyễn Thu Hà (năm 2011 và 2012) đã ghi nhận sự phân bố tỷ lệ bệnh nhân nam lao phổi tái phát cao gấp từ 3 – 5 lần so với bệnh nhân nữ [11]. Nguyễn Thị Thu Thái (2012) nghiên cứu trên 103 bệnh nhân lao phổi mới và lao phổi tái phát ở Bệnh viện Phổi Trung

ương cũng ghi nhận bệnh nhân nam chiếm 76,7%, bệnh nhân nữ chiếm 23,3% [13, 15].

Trên thế giới, nhiều nghiên cứu cũng ghi nhận tỷ lệ bệnh nhân nam mắc bệnh lao cao hơn nữ: nghiên cứu ở Ai Cập (2009) với tỷ lệ nam là 54,3%, nữ 45,7%; ở Uganda (2010) tỷ lệ nam là 59,4%; ở Bồ Đào Nha (2005) là 73,8% và ở Lào (2013) là 57,3% [17, 68, 81, 182].

Theo báo cáo của WHO về kiểm soát bệnh lao toàn cầu (2023), kết quả nhận được từ báo cáo của 192 quốc gia trên thế giới, bao phủ gần 99% các trường hợp bệnh lao trên thế giới, bệnh lao thường gặp ở nam hơn ở nữ. Tính chung toàn cầu, tỷ lệ nam: nữ là 1,67. Nhưng tính riêng trong số những quốc gia có tỷ lệ bệnh lao cao thì tỷ lệ này thay đổi từ 0,7 ở Afghanistan đến 2,9 ở Việt Nam [186].

Có sự chênh lệch về tỷ lệ giới giữa nam và nữ này, một số giải thích đưa ra: vì nam giới là trụ cột trong gia đình, tham gia lao động chính, thường gánh vác công việc nặng nhọc, chịu nhiều áp lực trong cuộc sống. Do thói quen sống tự do, nghiện rượu, nghiện thuốc lá... khiến cho sức đề kháng yếu nên dễ phát bệnh lại hơn nữ. Bên cạnh đó còn có một số lý do khác như sự bất bình đẳng nam nữ trong các hoạt động xã hội, vị thế của phụ nữ chưa được nâng cao, ý thức về tôn giáo tín ngưỡng lạc hậu trọng nam khinh nữ... đã tạo ra rào cản trong việc phát hiện bệnh lao ở nữ. Ngoài ra có giả thuyết còn cho rằng có vai trò của nội tiết giới tính ảnh hưởng tới nguy cơ mắc lao ở nam và nữ [11].

Phân bố theo nhóm tuổi

Tất cả bệnh nhân trong nghiên cứu của chúng tôi đều là người lớn từ 18 tuổi trở lên. (biểu đồ 3.2). Đa số bệnh nhân đang ở trong độ tuổi lao động từ 20 đến 59 tuổi chiếm tỷ lệ cao (79%), người cao tuổi (trên 60 tuổi) chiếm tỷ lệ 21,0%

Nhiều nghiên cứu trong nước và thế giới thực hiện ở mức trên 15 tuổi [9, 11, 17, 182].

Nghiên cứu của Phan Thượng Đạt (2008) trên bệnh nhân lao phổi đa kháng thuốc, lứa tuổi chiếm tỷ lệ cao nhất là 25-34 tuổi (32%), trường hợp nhỏ tuổi nhất là 15 tuổi và lớn tuổi nhất là 76 [9]. Trần Ngọc Bửu (2009) nghiên cứu sự kết hợp giữa kiểu gen Bắc Kinh và vi khuẩn lao đa kháng thuốc (MDR-TB) tại vùng nông thôn Việt Nam. Kết quả cho thấy, nhìn chung thì nhóm tuổi 35-44 và lớn hơn hoặc bằng 65 tuổi chiếm ưu thế. Nhưng tỷ lệ kiểu gen Bắc Kinh tăng lên theo mức độ giảm của tuổi [42].

Tác giả Nguyễn Huy Điện (2010), nghiên cứu MTB phân lập được ở 218 bệnh nhân tràn dịch màng phổi do lao tại Hải Phòng, nhóm tuổi có tỷ lệ TDMP do lao cao nhất là 25-29 tuổi và lớn hơn hoặc bằng 50 tuổi (tỷ lệ 21,6%). Tuy nhiên nhóm tuổi có tỷ lệ HIV (+) cao nhất là 25-29 tuổi (27/96 trường hợp, tỷ lệ 28,1 %). Trong khi đó nhóm tuổi có tỷ lệ HIV (-) cao nhất là ≥ 50 tuổi (43/122 trường hợp, tỷ lệ 35,2 %) [10]. Tác giả Nguyễn Thị Thu Thái (2012) nghiên cứu 103 bệnh nhân lao phổi mới và lao phổi tái phát ở Bệnh viện Phổi Trung ương thì 11,6% ở độ tuổi trên 60 tuổi, số còn lại (88,4%) đều ở trong độ tuổi lao động [15].

Dù ít nghiên cứu đề cập đến, nhưng phụ nữ và trẻ em là những người đặc biệt có nguy cơ tử vong cao do bệnh lao. Hàng năm, số phụ nữ tử vong do bệnh lao còn cao hơn số lượng tử vong do sinh sản. Năm 2008, ước tính khoảng 3,6 triệu phụ nữ được chẩn đoán nhiễm lao, với số lượng cao nhất nằm trong độ tuổi sinh sản - cũng là nhóm tuổi có tỷ lệ nhiễm HIV cao nhất [14, 47].

Theo báo cáo của WHO (2023), kết quả ghi nhận được từ báo cáo của 192 quốc gia trên thế giới, bao phủ gần 99% các trường hợp bệnh lao toàn cầu, thì ở

châu Á, có sự gia tăng không ngừng trong tỷ lệ độ tuổi mắc bệnh lao. Mức độ nhiễm lao ở các nhóm tuổi trẻ hơn có giảm và gánh nặng bệnh lao lại chuyển qua nhóm tuổi lớn hơn. Tỷ lệ trẻ em < 15 tuổi mắc lao chiếm 12% trong năm 2022 [186].

Trong khi bệnh lao ở người lớn dễ nhận biết hơn, do các triệu chứng điển hình (như hình ảnh trên phim X quang và kết quả xét nghiệm soi đờm trực tiếp dương tính), bệnh lao ở trẻ em khó chẩn đoán hơn vì hình ảnh trên phim X quang thường không điển hình và trẻ em khó khạc đờm để lấy mẫu. Bệnh lao ở trẻ em thường gặp thể lao ngoài phổi, nhất là trẻ em dưới 3 tuổi. Việc sử dụng kỹ thuật Ziehl-Neelsen để phát hiện bệnh lao ở trẻ em thường có kết quả thấp (10% -15%) vì khó lấy mẫu đờm ở lứa tuổi trẻ em, và số lượng vi khuẩn trong bệnh phẩm thường thấp. Đôi khi phải lấy dịch hút từ dạ dày để xét nghiệm trong những trường hợp khó lấy mẫu đờm ở trẻ em [72, 102, 129].

Phân bố theo các yếu tố khác

Trong nghiên cứu của chúng tôi, có 45% người bệnh lao kháng thuốc có tiền sử bệnh mắc kèm, 7% có tiếp xúc với người bệnh lao, 43% có tiền sử điều trị lao và đa số bệnh nhân mắc bệnh lao phổi (98%), lao kháng thuốc nguy cơ lây nhiễm ra cộng đồng rất cao (biểu đồ 3.3). Kết quả của chúng tôi cũng tương tự một số nghiên cứu khác như của Miguel Viveiros (2005), Yang Song (2011) [182, 199].

Trong nhiều nghiên cứu về bệnh lao, tỷ lệ bệnh nhân lao mới khá cao như nghiên cứu của Trần Ngọc Bửu (2009) tỷ lệ bệnh nhân lao mới là 90,2% so với bệnh nhân lao đã điều trị 9,8% [42], của Abdelaal Amina (2009), thực hiện tại Ai Cập (lao mới: 68,6%; lao cũ: 31,4%) [17], của Vibol Iem (2013) tại Lào (lao mới: 85,1%; lao cũ: 14,9%) [81].

Số lượng bệnh nhân đồng nhiễm lao/HIV trong nghiên cứu không nhiều (chỉ có 2/100 trường hợp, tỷ lệ 2%). Vấn đề xét nghiệm để phát hiện đồng nhiễm lao/HIV rất cần được quan tâm. Đối với bệnh nhân nhiễm HIV, xét nghiệm đờm hoặc các loại bệnh phẩm khác để chẩn đoán bệnh lao thường dễ thực hiện hơn. Trong khi đó, việc thực hiện xét nghiệm HIV cho tất cả những bệnh nhân mắc bệnh lao lại khó thực hiện hơn. Trong nghiên cứu đa trung tâm tại Lào của Vibol Iem (2013), chỉ có 5/87 bệnh nhân lao được thử HIV [81].

Các yếu tố và bệnh đồng nhiễm làm tăng nguy cơ mắc lao và lao kháng thuốc như: suy dinh dưỡng, nhiễm HIV, sử dụng rượu, hút thuốc (đặc biệt ở nam giới) và bệnh tiểu đường. Số bệnh nhân lao có liên quan đến 5 yếu tố nguy cơ được WHO tổng kết trong báo cáo năm 2023 là 2,3 triệu người suy dinh dưỡng, 0,89 triệu người có HIV, 0,73 triệu người nghiện rượu, 0,70 triệu người hút thuốc là và 0,37 triệu người mắc bệnh tiểu đường. Trong bối cảnh đại dịch COVID-19 và hậu quả của nó, cũng như chiến tranh ở Ukraine, đang diễn ra xung đột ở các nơi khác trên thế giới và những thách thức toàn cầu về an ninh năng lượng và lương thực, cần thiết có những hành động đa ngành để giải quyết những vấn đề này và các yếu tố quyết định bệnh lao khác [186].

Nghiên cứu của chúng tôi thu thập 100 mẫu đờm nhuộm Ziehl-Neelsen dương tính, phần lớn là kết quả từ 1+ đến 3+ chiếm tỷ lệ 77,0%, còn lại 23% là soi dương tính với số lượng AFB ít, kết quả Xpert MTB/RIF dương tính kháng RIF là 98%, nuôi cấy dương tính MTB là 95% và số mẫu cấy dương tính có đầy đủ kết quả kháng sinh đồ kiểu hình và kiểu gen là 82 mẫu (bảng 3.1).

Helb Danica (2010) nghiên cứu trên 107 mẫu đờm của bệnh nhân lao tại Việt Nam phát hiện 82 mẫu nuôi cấy lao dương tính MTB và 64 mẫu đờm của bệnh nhân lao tại Uganda có 54 mẫu nuôi cấy dương tính MTB. Trong số các mẫu nhuộm Ziehl-Neelsen dương tính của Việt Nam, kết quả phần lớn là 1+ và 2+

chiếm 65%. Với các mẫu từ Uganda, 78,1% có kết quả nhuộm 3+, chỉ có 3,1% kết quả dương tính 1+. Điểm khác biệt là tất cả bệnh nhân tại Uganda đã dùng thuốc kháng lao trước đó [68].

Naga Suresh (2007) khi thực hiện kháng sinh đồ của 56 chủng MTB với 4 loại kháng sinh RIF, INH, SM và EMB và giải trình tự gen *rpoB* tìm đột biến kháng thuốc, đã đề cập đến sự liên quan giữa kết quả nhuộm Ziehl-Neelsen và khuếch đại gen *rpoB*. Với những mẫu có kết quả nhuộm 2+ và 3+, kết quả khuếch đại ADN là 98%. Với mẫu kết quả 1+, tỷ lệ này là 93% và với những mẫu kết quả từ 1 – 9 AFB/ 100 vi trường thì tỷ lệ khuếch đại ADN chỉ là 62,5% [171].

Khadka JB (2013) nghiên cứu phát hiện sớm MDR-TB bằng phương pháp phân tử và phương pháp cổ điển. Trong số 56 mẫu đờm có kết quả Ziehl-Neelsen dương tính, có 94,6% (53/56 mẫu) có kết quả Ziehl-Neelsen từ 2+ đến 3+ [95].

Nhuộm Ziehl-Neelsen vẫn là phương pháp được sử dụng rộng rãi để phát hiện bệnh lao. Tuy nhiên, trong khi tỷ lệ phát hiện toàn cầu hiện nay của kỹ thuật Ziehl-Neelsen là 60% thì ở bệnh nhân nhiễm HIV, tỷ lệ này còn thấp hơn (20- 40%). Các bệnh nhân bị tổn thương miễn dịch thường có số lượng trực khuẩn lao thấp hơn, từ đó dễ dàng bị bỏ sót vì ngưỡng phát hiện của kỹ thuật Ziehl-Neelsen khoảng 104 vi khuẩn/ml bệnh phẩm. Những bệnh nhân đồng nhiễm lao/HIV thường có kết quả nhuộm soi đờm âm tính, và/hoặc bệnh lao ngoài phổi, và vi khuẩn lao kháng thuốc là những yếu tố ảnh hưởng nhiều đến kết quả nhuộm soi phát hiện vi khuẩn lao.

Ngoài ra, các bệnh nhân HIV thường nhiễm Mycobacterium không phải lao (nontuberculous mycobacteria - NTM), do đó dễ đưa đến các kết quả dương tính giả khi sử dụng kỹ thuật Ziehl-Neelsen. Thêm vào đó, trên 30% bệnh nhân không thể lấy được mẫu đờm (nhất là ở trẻ em). Vì vậy, mặc dù kỹ thuật Ziehl-Neelsen

được xem là phương tiện chẩn đoán nhanh, thích hợp (trong điều kiện hạn chế), vẫn không nên chỉ căn cứ vào kỹ thuật này để loại bỏ khả năng mắc bệnh lao. Những cải tiến gần đây được đưa ra nhằm tăng độ nhạy của kỹ thuật như xét nghiệm đờm trực tiếp nhuộm huỳnh quang Auramine và kính hiển vi đèn LED (light-emitting diode microscopy). Trong nhiều nghiên cứu gần đây, việc chẩn đoán lao bên cạnh xét nghiệm soi kính trực tiếp còn có các xét nghiệm sinh học phân tử như Xpert MTB/RIF, Truenat MTB/RIF để chẩn đoán bệnh lao kháng RIF [10, 47, 185, 188].

4.1.2. Đặc điểm kháng thuốc kiểu hình của mẫu nghiên cứu

Theo bảng 3.2, tỷ lệ đề kháng thuốc kháng sinh của các chủng vi khuẩn lao chúng tôi phân lập được phân theo 3 loại. Kháng đơn thuốc chiếm tỷ lệ 14,6% (12/82 chủng), kháng đa thuốc là 69,5% (57/82 chủng) và tiền siêu kháng thuốc là 15,9% (13/82 chủng).

Tỷ lệ này cao hơn so với nhiều nghiên cứu khác trong nước do đối tượng thu nhận của chúng tôi là bệnh nhân lao kháng RIF tại Hà Nội. Nghiên cứu của Trần Ngọc Bửu (2009) với các vi khuẩn lao phân lập tại vùng nông thôn Việt Nam, tỷ lệ MTB kháng với một thuốc kháng lao bất kỳ là 33% (577/1744 chủng) [42]. Nguyễn Thị Mai Huyền (2010) ghi nhận tỷ lệ lao kháng thuốc là 53,1% [79].

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. Như nghiên cứu của Miguel Viveiros (2005) về mức độ kháng thuốc của 342 chủng MTB từ bệnh nhân ở vùng Greater Lisbon (Bồ Đào Nha). Kết quả đề kháng với một loại thuốc bất kỳ là 24% (82/342 chủng) [182]. Sau đó Perdigão J. (2010) đã nghiên cứu trên 3025 chủng MTB phân lập được trong vòng 6 năm ở Bồ Đào Nha, tỷ lệ vi khuẩn lao kháng ít nhất 1 thuốc kháng lao là 22,3% đến 26% [147].

Ở châu Á, tỷ lệ kháng thuốc cao hơn. Jun-ichiro Sekiguchi (2007) nghiên cứu các chủng vi khuẩn lao phân lập tại Nhật Bản (105 chủng) và Ba Lan (33 chủng). Trong 138 chủng, có 55 chủng (39,9%) kháng với ít nhất một loại kháng sinh [156]. Guo Jian-Hua (2008) thực hiện kháng sinh đồ của 191 chủng MTB phân lập tại tỉnh Sichuan, Trung Quốc. Kết quả có 39,8% chủng kháng với ít nhất một loại thuốc kháng lao [64].

Sự đề kháng của MTB với các thuốc kháng 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 (point mutations) 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 (MDR-TB) [92, 110]

Với các chủng lao của chúng tôi, tỷ lệ kháng INH là 95,1% (78/82 chủng), cao hơn tỷ lệ kháng RIF (85,4%, 70/82 chủng). Với EMB, tỷ lệ kháng là 43,9% (36/82 chủng), kháng PZA chiếm tỷ lệ 62,2% (51/82 chủng), kháng SM chiếm tỷ lệ 76,8% (63/82 chủng), kháng với MFX là 16/82 chủng (19,5%), và chỉ có 2/82 chủng kháng AMK (2,4%) (Biểu đồ 3.4).

Kết quả kháng thuốc INH và STM của chúng tôi cao hơn nhiều so với với kết quả của Nguyễn Thiên Hương vào năm 2006 với tỷ lệ kháng INH là 17,3% (154/888 chủng), kháng STM là 19,5% (173/888 chủng) [77].

So với kết quả của Nguyễn Thị Thu Thái (2012) nghiên cứu trên 103 bệnh nhân lao phổi (trong đó có 53 lao phổi tái phát) ở Bệnh viện Phổi Trung ương cho thấy tỷ lệ kháng Streptomycin là cao nhất (94,3%), tiếp đến là Isoniazid (68,2%), Rifampicin (62,5%) và Ethambutol (38,6%) [15].

Trong khi đó ở châu Phi, nghiên cứu ở Ai Cập của Abdelaal Amina (2009), tỷ lệ kháng RIF, EMB thấp hơn kết quả của chúng tôi (lần lượt là 15% và 14,4%). Đồng thời, tỷ lệ kháng INH và SM cũng thấp hơn của chúng tôi (lần lượt là 17% và 11,8%) [16]. Marinus Barnard [34](2008), nghiên cứu ở bệnh nhân lao tại Nam Phi, kết quả có 122 chủng kháng INH (26,6%), 97 chủng kháng RIF (21,2%) và EMB (28,6%) .

Ở một số quốc gia châu Á, tỷ lệ kháng thuốc thường từ 15-30%. Jun-ichiro Sekiguchi (2007) nghiên cứu các chủng vi khuẩn lao phân lập tại Nhật Bản (105 chủng) và Ba Lan (33 chủng). Kết quả kháng INH (27,5%), kháng STM (21,7%), kháng với RIF (20,3%), và kháng EMB (13%) [156]. Tại Ấn Độ, nghiên cứu của Naga Suresh (2007) có 25% kháng INH, 14,3% kháng với RIF [171]. Đặc biệt, tại Trung Quốc và Nepal, có những chủng MTB đề kháng rất cao các thuốc kháng lao. Guo Jian-Hua (2008) với 191 chủng MTB phân lập tại tỉnh Sichuan, Trung Quốc, có 78,9% chủng kháng với RIF, 65,8% kháng INH, và 60,5% kháng EMB [64]. Poudel Ajay (2012) thực hiện kháng sinh đồ của 158 chủng MTB phân lập ở Nepal, ghi nhận tỷ lệ kháng INH là 71,5% (113/158 chủng) và kháng RIF là 69% (109/158 chủng) [148].

Tỷ lệ lao kháng thuốc tùy thuộc vào tỷ lệ đột biến kháng thuốc (kháng thuốc mắc phải) và tỷ lệ lan truyền các chủng lao kháng thuốc (kháng thuốc tiên phát) [43, 123]. Đối với *Mycobacterium tuberculosis*, sự kháng thuốc mắc phải xảy ra thông qua đột biến nhiễm sắc thể. Với những bệnh nhân lao mới, một trong những điều kiện để xuất hiện tượng đột biến trong gen kháng lại thuốc kháng lao là số lượng vi khuẩn. Số lượng vi khuẩn lao sinh sản đến một số lượng nhất định sẽ có một số vi khuẩn đột biến kháng lại thuốc chống lao (ví dụ tại ổ tổn thương lao ở phổi khi số lượng vi khuẩn lao đến 10^{-7} vi khuẩn sẽ có 1 vi khuẩn kháng lại

Rifampicin). Như vậy chẩn đoán sớm thì tổn thương còn nhỏ, số lượng vi khuẩn chưa nhiều đến mức gây đột biến kháng thuốc [43].

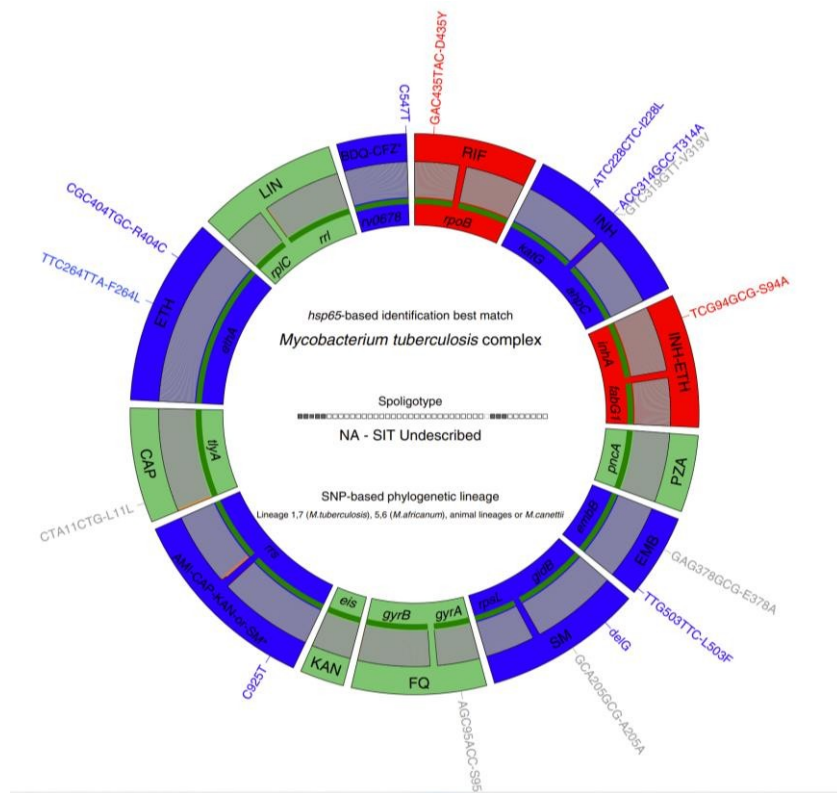
Một số yếu tố được cho là liên quan đến sự gia tăng tỷ lệ bệnh lao kháng thuốc trên toàn cầu, đó là sự không tuân thủ điều trị của bệnh nhân, sự thay đổi dược động học và chất lượng thuốc không đạt yêu cầu (kể cả thuốc giả). Không phối hợp các thuốc điều trị lao (điều trị đơn lẻ), liều lượng thuốc không đủ, dùng thuốc kháng lao không tuân thủ theo phác đồ, uống thuốc không đều đặn, không đúng giờ, bệnh nhân tự bỏ điều trị, điều trị không đủ thời gian quy định... đều dễ dẫn đến sự kháng thuốc của vi khuẩn lao. Ngoài ra, đồng nhiễm lao/HIV cũng là yếu tố góp phần trong việc gia tăng vi khuẩn lao kháng thuốc [58].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, việc phân loại bệnh nhân lao mới (new TB case) và phân loại kháng thuốc được căn cứ theo định nghĩa của WHO năm 2021 và Chương trình Chống lao quốc gia năm 2023 [3, 135]. Trong đó, những bệnh nhân được ghi nhận lao mới là những người chưa bao giờ được điều trị bằng các thuốc kháng lao, hoặc đã điều trị nhưng thời gian dưới 4 tuần.

Tỷ lệ đề kháng chung của chúng tôi cao hơn so với nhiều nghiên cứu khác tại Việt Nam, có thể do số lượng bệnh nhân có tiền sử điều trị lao trên 1 tháng là 43 người trong số 100 bệnh nhân nghiên cứu. Đồng thời chúng tôi lựa chọn ngay từ ban đầu là bệnh nhân có kết quả xét nghiệm Xpert MTB/RIF dương tính kháng RIF nên tỷ lệ kháng INH và RIF khá cao.

4.2. Xác định các gen và vị trí đột biến gen liên quan đến tính kháng thuốc của vi khuẩn lao phân lập từ mẫu nghiên cứu

4.2.1. Gen và các đột biến gen liên quan đến kháng thuốc lao hàng một (Isoniazid, Rifampicin, Ethambutol, Pyrazinamide, Streptomycin).



Hình 4.1 Cấu trúc hệ gen của chủng *M. tuberculosis* H37Rv

**Nguồn: Jean Claude et al, 2020 Nature Communications 11(1):2917*

Năm 1998, Cole và cộng sự [54] đã công bố trình tự gen của *M.tuberculosis* bao gồm hơn 4 triệu nucleotit và khoảng 4000 gen với nhiều chức năng đa dạng. Đã có nhiều nghiên cứu phân tích tác dụng của các gen cấu trúc và các đột biến trên các đoạn gen liên quan đến tính kháng thuốc của vi khuẩn lao (hình 4.1).

- Gen và vị trí đột biến liên quan kháng thuốc Isoniazid**

Nghiên cứu này sử dụng thư viện cập nhật của WHO năm 2023 để phân tích. Các vị trí đột biến được phân loại theo 5 mức độ để đưa ra kết luận kháng thuốc kiểu gen khi so sánh với kết quả kháng thuốc kiểu hình [187].

Isoniazid (INH) là thuốc chống lao dòng hàng một được sử dụng rộng rãi nhất, đây là thuốc cơ bản thiết yếu trong điều trị lao và các trường hợp nhiễm lao

tiềm ẩn. Việc gia tăng gần đây của các trường hợp bệnh lao kháng INH và kháng đa thuốc đang làm mất đi các ưu điểm của thuốc này trong điều trị lao. Isoniazid là một tiền chất cần được hoạt hóa bởi enzyme catalase-peroxidase mã hóa bởi gen *katG* [69]. Cơ sở phân tử của tính kháng với isoniazid khá phức tạp và gây ra bởi đa dạng đột biến trong 3 gen khác nhau của *M. tuberculosis*: *katG*, *inhA*, *fabG1*. Trong đó cơ chế chủ yếu gây ra đề kháng với INH là các đột biến trên gen *katG* [204].

Nghiên cứu của chúng tôi có 78/82 (95,1%) chủng kháng INH, 70/82 (85,4%) chủng kháng RIF, trong đó có 68/70 (97%) chủng đều là các chủng MDR-TB (kháng đồng thời RIF và INH). Điều này phù hợp với rất nhiều nghiên cứu trong nước và thế giới đã ghi nhận rằng kháng RIF/nhạy INH thường rất hiếm gặp [15, 44, 147]. Trong nghiên cứu này, đột biến gen ở các mẫu có kiểu hình kháng INH xảy ra ở cả 3 gen với các tần suất và tỷ lệ đột biến khác nhau (bảng 3.3). Giải trình tự của 78 chủng kháng thuốc kiểu hình INH, phát hiện 92 vị trí đột biến trên các gen *katG*, *fabG1* và *inhA* đều liên quan đến kháng thuốc ở các mức độ 1, 2 và 3. Các đột biến này có biểu hiện kiểu hình kháng INH, trong đó 14 mẫu có hơn 1 vị trí đột biến trên cả 3 gen. Hầu hết đột biến tại gen *katG* đều xảy ra ở codon 315, đột biến làm thay đổi axit amin Serine thành Threonine chiếm tỷ lệ cao nhất là 75,0% và có liên quan đến kháng thuốc - mức độ 1. Bên cạnh đó, đột biến tại codon 315 làm thay đổi axit amin Serine thành Glycine chiếm tỷ lệ 3,3 % và có liên quan đến kháng thuốc – mức độ 3. Tiếp theo là các đột biến trên gen *fabG1* và *inhA*, trong đó có các vị trí đột biến thay thế hay mất đoạn, đột biến đồng nghĩa tại codon 6 axit amin Isoleucine thành Isoleucine với bộ ba mã hóa AUU -> AUC chiếm 2,2%. Đột biến tại codon 194 axit amin Isoleucine thành Threonine chiếm 1,1%, Đột biến tại codon 94 axit amin Serine thành Alanin chiếm 2,2% và codon 194 axit amin Isoleucine thành Threonine chiếm tỷ lệ 1,1%

Kết quả này cũng tương tự như nghiên cứu của Hillemann năm 2005 tại Đức với 91/103 chủng (88,4%) phát hiện đột biến trên gen *katG* [71]; nghiên cứu của Moaddab tại Iran năm 2011 với 19/25 chủng (76%) phát hiện đột biến trên gen *katG* [120]; tại Pakistan năm 2013, 30/30 chủng nhạy cảm INH không phát hiện được đột biến và 19/24 (79%) chủng kháng INH có xuất hiện đột biến trên gen *katG* [97].

So với kết quả nghiên cứu trong nước, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng hoàn toàn phù hợp về tỷ lệ đột biến trên gen *katG* ở các chủng kháng INH [44]. Như vậy đột biến trên gen *katG* có liên quan đến tính kháng INH ở các chủng vi khuẩn lao. Ở 72 chủng vi khuẩn lao kháng INH xuất hiện đột biến trên gen *katG* tại codon Ser315Thr (69 chủng – 75%), và Ser315Gly (3 chủng – 3,3%), trong đó có 9 chủng kháng đơn với INH, 63 chủng kháng đa thuốc. Kết quả này củng cố giả thuyết có sự liên quan giữa đột biến trên gen *katG* với sự phát triển đề kháng INH ở các chủng vi khuẩn lao.

Theo nhiều nghiên cứu khác nhau, đột biến trên gen *katG* xảy ra ở khoảng 50-95% số chủng kháng INH. Đột biến trên gen này cũng chính là cơ chế đề kháng chính đối với INH ở vi khuẩn lao [86, 97]. Mặc dù có sự đa dạng về đột biến trên gen *katG* ở các chủng kháng INH nhưng đột biến ở vị trí codon 315 vẫn phổ biến nhất. Tỷ lệ đột biến tại codon 315 khác nhau ở khu vực địa lý khác nhau và chiếm tỷ lệ cao trong khu vực có tỷ lệ mắc bệnh lao cao [151, 164]. Đột biến ở codon này được tìm thấy ở 92,3% số chủng kháng isoniazid phân lập ở Ai Cập [16], 86-98,4% số chủng phân lập ở Kazakhstan, Lithuania và Latvia [29, 101, 174], 70% ở Nam Phi [62], 75,3% ở Braxin [164], khoảng 62-65% ở Trung Quốc, Myanmar, Thái Lan, Australia và Kuwait [20, 94, 103, 177, 208] khoảng 56% ở Hàn Quốc [50, 164] và 37,8% ở Italia [153]. Một tỷ lệ tương đối thấp đột biến ở codon 315 đã được ghi nhận ở Nhật Bản [18] và Uruguay [179].

Một số nghiên cứu xác định đặc điểm phân tử trên các gen chịu trách nhiệm kháng INH ở vi khuẩn lao tại Việt Nam. Nghiên cứu của Caw và cộng sự tại Bệnh viện Phạm Ngọc Thạch cho thấy có 77 trong số 100 chủng (77%) vi khuẩn lao kháng INH có đột biến ở codon 315 với 4 kiểu thay thế nucleotide. Trong đó, 71/77 chủng lao kháng INH có kiểu thay thế nucleotide thường gặp nhất AGC → ACC [45]. Nghiên cứu của Nguyễn Văn Duy tại Hà Nội trên 76 chủng lao kháng INH, tỷ lệ đột biến ở codon 315 là 77,6%, trong đó cũng chiếm đa số là kiểu thay thế AGC → ACC. Nghiên cứu của Nguyễn Thị Thu Thái tại Hà Nội [15] cho thấy đột biến ở codon 315 trong gen *katG* ở 41/59 (69,5%) chủng kháng INH. Trong đó có đến 35/41 chủng là kháng đa thuốc. Như vậy kết quả của chúng tôi cũng nằm trong tỷ lệ phân bố chung của đột biến gen *katG* codon Ser315Thr ở các vùng có tỷ lệ lưu hành bệnh lao cao trên thế giới cũng như trong các nghiên cứu tại Việt Nam trước đây. Để giải thích cho sự phổ biến của đột biến 315*katG*, các tác giả cho rằng đột biến này làm cho hoạt động của catalase-peroxidase đủ để làm giảm khả năng chuyển hóa isoniazid. Do đó, sự thay thế axit amin ở vị trí 315 xuất hiện để cân bằng giữa sự cần thiết phải duy trì hoạt động catalase-peroxidase nhằm giải độc gốc tự do chống lại vi khuẩn, và làm giảm sự biến đổi từ dạng tiền chất sang dạng hoạt động của INH, một quá trình mà thông thường sẽ giết chết vi khuẩn [151].

Khi xem xét các kiểu đột biến ở codon 315 trên gen *katG* ở các nghiên cứu khác thì 80% các chủng ở Belarus có đột biến ở vị trí 315 là kiểu đột biến thay thế AGC → ACC (Ser → Thr) [39], ở Lithuania là 83,9% [29]. Ở Balan 90% đột biến ở codon 315 với 5 kiểu đột biến (ACC, ACT, ACA, AAC, ATC) [154]. Kiểu đột biến chiếm ưu thế trên gen *katG* ở các chủng vi khuẩn lao kháng INH là đột biến thay thế Ser315Thr (AGC → ACC, Serine → Threonine), có mặt ở khoảng 30-90% số chủng kháng INH và có liên quan đến kháng INH ở mức độ cao

(MIC $\geq$ 4 μ g/ml) [164, 176, 178, 203, 205]. Nhiều nghiên cứu cho thấy tỷ lệ đột biến Ser315Thr trên gen *katG* ở các chủng lao kháng INH (đặc biệt là kháng đa thuốc) trên thế giới rất thay đổi tùy thuộc vào từng vị trí địa lý trên thế giới; thấp trong khu vực có tỷ lệ mắc bệnh lao thấp [105, 153, 179] và cao trong khu vực có tỷ lệ mắc bệnh lao cao [101, 121]. Một số nơi như Singapore [105] và Italia [153] có tỷ lệ hiện mắc bệnh lao trung bình và thấp, đột biến Ser315Thr là 22,5% và 37,8%. Ngược lại đột biến Ser315Thr chiếm 90,3% trong số chủng kháng isoniazid ở Kazakhstan [101], Pakistan là 79% [96], ở Ba Lan là 69% [87], ở Myanmar là 57,3% [177], Thái Lan là 62,1% [94], ở Khu vực trung Đông là 60% [20], Braxin là 55,7% [164]. Trong nghiên cứu của các tác giả trong nước như nghiên cứu của Caw và cộng sự trên các chủng vi khuẩn lao phân lập tại bệnh viện Phạm Ngọc Thạch (TP Hồ Chí Minh), chỉ phát hiện một loại và tỷ lệ đột biến Ser315Thr là 71% trong số các chủng lao kháng Isoniazid [45].

Nghiên cứu của Nguyễn Thị Thu Thái và cộng sự năm 2014 [15] được thực hiện nhằm phát hiện đột biến trên gen *katG* ở 59 chủng vi khuẩn lao kháng isoniazid (INH) và 10 chủng nhạy cảm với thuốc chống lao. Kỹ thuật giải trình tự được sử dụng để xác định đột biến trên vùng 684bp có chứa codon 315 gen *katG* của vi khuẩn lao. Kết quả cho thấy đột biến trên gen *katG* không tìm thấy ở các chủng nhạy cảm thuốc, trong khi đó 81,4% chủng kháng INH phát hiện thấy có đột biến trên gen *katG*. Vị trí đột biến thường gặp nhất là codon 315 (69,5% - 41/59 chủng), với duy nhất 1 kiểu đột biến thay thế Ser315Thr (AGC $\rightarrow$ ACC, Serin $\rightarrow$ Threonine). Tần suất xuất hiện đột biến Ser315Thr trên gen *katG* ở các chủng vi khuẩn lao kháng đa thuốc cao hơn so với các chủng kháng đơn với INH.

Đa số các nghiên cứu trong và ngoài nước đề cập đến đột biến thay thế Ser315Thr (AGC $\rightarrow$ ACC, Serine $\rightarrow$ Threonine). Nghiên cứu của chúng tôi phát

hiện thêm một vị trí đột biến trên gen *katG* thay thế Ser315Gly (AGC → GGC, Serine → Glycine). Đây là đột biến đã được ghi nhận trong tài liệu của WHO cập nhật năm 2023 [187], có liên quan đến kháng thuốc ở mức độ 3. Trong quần thể nghiên cứu này, tần suất đột biến Ser315Gly là 3,3% và có biểu hiện kiểu hình kháng thuốc INH.

Ngoài đột biến chiếm ưu thế ở codon 315 trên gen *katG*, trong nghiên cứu của chúng tôi, còn có vị trí đột biến khác đã được phát hiện ở chủng vi khuẩn lao kháng INH. Trong 78 chủng kháng INH, số chủng phát hiện đột biến trên gen *katG* là 72 chủng. Có 6/78 (7,7%) chủng không phát hiện thấy đột biến trên vùng gen *katG*, nhưng đều có kiểu hình kháng INH. Trong 6 chủng này đều xuất hiện đột biến tại gen *fabG1* với tần suất đột biến tại 7 vị trí khác nhau (16,3%) và đột biến tại gen *inhA* với tần suất đột biến tại 3 vị trí là 5,4% (bảng 3.3). Kết quả nghiên cứu này của chúng tôi cũng tương tự như kết quả nghiên cứu của Amina Abdelaal [17] tại Ai Cập (92,3% chủng kháng INH có xuất hiện đột biến và 7,7% số chủng không có đột biến tại gen *katG*), của Siqueira [163] tại Braxin (92,8% chủng kháng isoniazid có xuất hiện đột biến và 7,2% số chủng không xuất hiện đột biến gen *katG*), của Jagielski [86] tại Ba Lan (93% chủng kháng isoniazid có xuất hiện đột biến và 7% số chủng không xuất hiện đột biến), của Khan tại Pakistan tỷ lệ tương ứng là 79% và 21% [97]. Có thể các đột biến dẫn đến kháng INH còn xảy ra bên ngoài vùng gen *katG* hoặc xảy ra trên các gen có liên quan kháng INH khác như gen *inhA*, *fabG1*.

Các đột biến gen ở các chủng vi khuẩn lao kháng INH được biết đến là các đột biến liên quan đến kháng thuốc ở mức độ 1,2 và 3. Bên cạnh đó, còn có các chủng vi khuẩn lao không kháng thuốc INH nhưng khi giải trình tự gen phát hiện đột biến tại các gen kháng thuốc như *katG* ở các vị trí khác nhau. Nghiên cứu này chúng tôi phát hiện 4/82 chủng không kháng thuốc INH trong đó có 3 chủng xuất

hiện đột biến tại gen *katG* vị trí codon 463, đột biến làm thay đổi axit amin Arginine thành Leucine và liên quan đến kháng thuốc ở mức độ 5 (bảng 3.4). Đột biến này được nhận biết trong nghiên cứu nhưng không biểu hiện kiểu hình kháng thuốc.

Các nghiên cứu của các tác giả đã chứng minh rằng phần lớn các chủng kháng INH với đột biến 315*katG* giữ lại hoạt động catalase [151, 152]. Sự thiếu khả năng chuyển hóa INH là do đột biến Ser315Thr làm thay đổi cấu trúc hóa học của protein nên làm giảm ái lực với thuốc [207]. Đột biến ở gen *katG* với tần số cao gấp 100 so với đột biến trên gen *rpoB* và được coi là bước đầu tiên trong quá trình tiến hóa để dẫn tới kháng đa thuốc [75, 173] đồng thời cũng tạo ra nhiều khả năng hơn xuất hiện các đột biến thu được ở các gen khác. Sự kết hợp kháng INH và duy trì độc lực có thể làm cho một vài chủng kháng INH, đặc biệt là các chủng mang đột biến Ser315Thr ở gen *katG*, bị kháng thuốc bổ sung mắc phải và trở thành kháng đa thuốc [75].

• Gen và vị trí đột biến liên quan kháng thuốc Rifampicin

Tình hình bệnh lao đang ngày một đáng lo ngại hơn bởi sự gia tăng của các chủng lao kháng thuốc, đặc biệt là lao kháng đa thuốc (MDR-TB). Việc điều trị MDR-TB thường khó khăn hơn, liên quan đến tỷ lệ mắc và tỷ lệ chết cao, kéo dài thời gian điều trị và làm tăng nguy cơ lan truyền các chủng kháng thuốc trong cộng đồng [143, 197]. Theo báo cáo của WHO về vi khuẩn lao kháng thuốc 2023 [186], ước tính trên toàn cầu có 410.000 người mắc lao kháng đa thuốc hoặc lao kháng RIF (MDR/RR-TB) trong năm 2022. Sự đề kháng Rifampicin (RIF) là một điều quan trọng cần quan tâm để chẩn đoán MDR/RR-TB.

Cơ chế tác dụng của RIF là ngăn cản quá trình phiên mã bằng cách gắn lên ARN polymerase. Enzym này có 4 tiểu đơn vị khác nhau (α và các tiểu đơn vị β ,

β' , ω). Các tiểu đơn vị này được mã hóa bởi các gen *rpoA*, *rpoB*, *rpoC* và *rpoD*. RIF gắn lên tiểu đơn vị α của ARN polymerase, ức chế quá trình phiên mã và bằng cách này RIF giết chết vi khuẩn.

Trong nghiên cứu in vitro cho thấy các đột biến tự nhiên có liên quan đến kháng thuốc trong khi đó áp lực chọn lọc của kháng sinh dẫn đến sự tích lũy tăng cường các đột biến kháng thuốc. Cơ chế phân tử của tính kháng RIF ở vi khuẩn lao đã được xác định là chủ yếu liên quan đến sự phát sinh các đột biến xảy ra trong vùng "hot spot mutation" (vùng lõi 81bp) của gen *rpoB*. Sự phát sinh các đột biến này làm thay đổi cấu trúc của tiểu phần β dẫn đến RIF không có khả năng liên kết với enzym RNA polymerase và ức chế hoạt động của enzym này trong quá trình phiên mã [91, 205].

Phân tích tính kháng RIF ở các chủng vi khuẩn lao trong nghiên cứu này, chúng tôi thu được 70/82 (85,4%) chủng kháng RIF, giải trình tự hệ gen các chủng này phát hiện các đột biến ở gen *rpoB* liên quan đến kháng thuốc RIF. Trong đó 4 mẫu có hơn 1 vị trí đột biến trên gen *rpoB* (bảng 3.5). Kết quả của chúng tôi phù hợp với nhiều nghiên cứu khác trên thế giới, cho biết đột biến chỉ xảy ra ở các chủng vi khuẩn lao kháng thuốc, đây chính là cơ sở cho việc áp dụng kỹ thuật sinh học phân tử chẩn đoán lao kháng thuốc. Như Kozhamkulov và cộng sự nghiên cứu phát hiện đột biến ở 272 chủng MTB kháng RIF tại Kazakhtan thì có 255 chủng có đột biến (93,7%) [101], Abdelaal phát hiện được 20/23 chủng lao (86,9%) kháng RIF tại Ai Cập có xuất hiện đột biến [16]; tác giả Bostanabad tại Iran phát hiện 85% số chủng kháng RIF có đột biến [38]; Hillemann xác định được 102/103 (99%) chủng vi khuẩn lao kháng đa thuốc tại Đức có đột biến trên gen *rpoB* [71]. Các tác giả này không phát hiện được đột biến trên gen *rpoB* ở các chủng nhạy cảm với RIF.

Kháng đơn với INH thường gặp còn kháng RIF đơn thuần rất hiếm gặp, thường trên 90% số chủng lao kháng với RIF kết hợp với kháng INH, nghĩa là kháng đa thuốc [1, 16, 162]. Sự đề kháng với RIF là một dấu hiệu chỉ điểm có giá trị cho kháng đa thuốc và là kết quả của đột biến trên gen *rpoB*, gen mã hoá cho tiểu đơn vị β của RNA polymerase [1, 91, 205]. Kết quả của chúng tôi cũng khẳng định điều đó, rằng các chủng xuất hiện đột biến trên gen *rpoB* chỉ xảy ra ở các chủng kháng với RIF và đa số là các chủng kháng đa thuốc, với 70/82 (85,4%) chủng vi khuẩn lao kháng RIF là kháng đa thuốc.

Khác với đề kháng với INH, đề kháng với RIF có liên quan chủ yếu với các đột biến điểm trong vùng “hot-spot mutation” hay còn gọi là vùng lõi 81bp - RIF-resistance determining region (RRDR) của gen *rpoB*, vùng này kéo dài từ codon 507 – 533 được gọi là vùng quyết định đề kháng với INH [91, 111, 143, 159, 162, 205]. Cũng giống như các vi khuẩn khác, đột biến trong vùng RRDR của gen *rpoB* được tìm thấy ở khoảng 96% chủng MTB kháng rifampicin phân lập được trong đó các đột biến ở các vị trí 531, 526 và 516 là thường gặp nhất và thường gắn liền với các chủng kháng đa thuốc [111, 159, 162, 205]. Trong nghiên cứu này chúng tôi phát hiện được 67/70 chủng vi khuẩn lao kháng RIF (chiếm tỷ lệ 95,7%) có đột biến trong vùng RRDR của gen *rpoB*. Đa số đột biến trên gen *rpoB* xảy ra ở codon 531, đột biến thay thế axit amin Serine thành Leucine chiếm 58,1% và codon 526 thay thế Histidine thành Tyrosine chiếm 10,8%, có liên quan đến kháng thuốc - mức độ 1. Bên cạnh đó một số đột biến tại các codon 516, 522, 144, 172 và đột biến mất đoạn tại codon 1299 cũng gây ra kháng thuốc kiểu hình (Bảng 3.5). Như vậy kết quả của chúng tôi cũng nằm trong kết quả chung trên thế giới. Đa số các chủng có đột biến trong vùng này là chủng kháng đa thuốc. Điều này càng khẳng định rằng đột biến trong vùng RRDR trên gen *rpoB* của các chủng vi khuẩn lao có liên quan mật thiết với tính kháng đa thuốc.

Đột biến tại vị trí codon 531/526/516 là thường gặp nhất trên gen *rpoB* mặc dù những sự thay đổi liên quan đến tần suất đột biến trên những codon này được mô tả đối với chủng vi khuẩn lao từ những vị trí địa lý khác nhau [16, 67, 71, 98, 160, 205]. Đột biến tại vị trí các codon 516/526/531 trong vùng RRDR thường gặp nhất ở các chủng vi khuẩn lao kháng đa thuốc. Như vậy, số liệu của nghiên cứu của chúng tôi và các nghiên cứu khác cho thấy rằng khi nghiên cứu kiểu gen trên các chủng kháng RIF, đặc biệt là các trường hợp nghi ngờ lao kháng đa thuốc, cần quan tâm nhiều hơn đến các codon mã hóa cho tiểu phần Ser531, His526 và Asp516 thường gặp nhất, bất kể các chủng MTB phân lập được từ vùng địa lý nào.

Các nghiên cứu tại Kazakhtan cho thấy, trong 8 năm (2001 - 2009) đã có sự thay đổi đáng kể về tần suất xuất hiện các codon đột biến trên gen *rpoB* ở các chủng MTB [101]. Tại Việt Nam, các nghiên cứu xác định tỷ lệ đột biến tại các codon thường gặp trên gen *rpoB* ở các chủng vi khuẩn lao kháng RIF chưa thấy có sự thay đổi nhiều [15, 45, 80] (bảng 4.1).

Bảng 4.1. So sánh tỷ lệ đột biến trên gen *rpoB* của các chủng vi khuẩn lao kháng rifampicin ở các khu vực trên thế giới

Vùng địa lý (số chủng)	Tỷ lệ % đột biến			Tài liệu tham khảo
	531	526	516	
Pakistan (n=27)	52,0	7,0	1,05	[96]
Kazakhstan (n=272)	82,7	8,4	1,1	[101]
Ấn Độ (n=30)	47,0	17,0	13,0	[108]
Trung Quốc (n=56)	3,6	73,2	1,8	[160]
Ba Lan (n=64)	41,0	9,0	16,0	[154]
Việt Nam (n=104)	43,0	31,0	15,0	[45]
Việt Nam (n=54)	50,0	29,6	9,26	[15]
Nghiên cứu này (n=54)	59,5	21,6	8,1	

Nhiều nghiên cứu về gen *rpoB* ở các chủng *M. tuberculosis* kháng RIF cho thấy có nhiều đột biến khác nhau và đột biến khuyết trên gen này. Tổng cộng có 69 đột biến đơn; 3 đột biến chèn; 16 đột biến khuyết và có sự thay đổi ở nhiều nucleotide [38]. Hơn 90% đột biến sai nghĩa ở vùng 81bp - vùng lõi gen *rpoB* (vùng xác định kháng RIF) từ codon 507 đến codon 533 với sự thay đổi phổ biến nhất là ở codon 531, codon 526 và codon 516. Hơn 70% sự thay đổi này xảy ra ở các chủng kháng RIF. Hơn nữa, nồng độ ức chế tối thiểu (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) cho thấy sự kháng RIF liên kết với đột biến ở codon 526 và 531 ở nồng độ cao, ngược lại sự thay đổi ở codon 511, 516, 518 và 522 thường kháng RIF ở nồng độ thấp hơn [96] [101] [108] [154] [45] [15]

Số chủng kháng đơn với RIF là rất hiếm, trong nghiên cứu này chúng tôi chỉ gặp 2/82 (2,4%) chủng kháng đơn với RIF. Như vậy đột biến trên gen *rpoB* là đặc trưng của kháng đa thuốc. 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 kháng RIF mà 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) [141]. Tuy nhiên, vào những năm sau đó, nhiều nghiên cứu ghi nhận tỷ lệ trên 3% như nghiên cứu của Cho Eun Hae (2009) trên các chủng MTB kháng INH và RIF phân lập được tại Hàn Quốc. Có 15/141 chủng nhạy INH/kháng RIF (tỷ lệ 10,6%). Tác giả Abdelaal Amina (2009), nghiên cứu trên 153 chủng MTB tại Ai Cập, có 6 chủng kháng RIF riêng lẻ, tỷ lệ 3,9%. Nghiên cứu của Yang Song (2011) đã thực hiện kháng sinh đồ 168 chủng MTB, có 10 chủng kháng đơn RIF (5,9%)

và Feuerriegel Silke (2012) trên 97 chủng MTB của các bệnh nhân đã điều trị chống lao trước đó, có 1 chủng kháng RIF riêng lẻ [17, 51, 183, 199].

Tuy nhiên chúng tôi cũng thấy có 1/82 chủng (chiếm tỷ lệ 1,2%) không phát hiện được đột biến trên gen *rpoB* mặc dù chủng này có kiểu hình kháng RIF. Một số nghiên cứu trên thế giới cũng cho kết quả tương tự, như nghiên cứu của Amina Abdelaal tại Ai Cập năm 2009 với 3/23 chủng (13,1%) kháng RIF không xuất hiện đột biến trên gen *rpoB* [16]; nghiên cứu của Kozhamkulov tại Kazakhtan năm 2011 với 17/272 chủng (6,2%) [101]; nghiên cứu của Isfahani tại Iran năm 2006 [85] với 3/21 chủng (14,3%); nghiên cứu của Hillemann tại Đức năm 2005 với 1/103 chủng (1%) [71]. Sự khác nhau giữa kết quả phân tích kiểu hình và kiểu gen có thể là do các đột biến khác nằm ngoài gen *rpoB* liên quan đến kháng RIF của MTB mà chưa được biết đến. Một giải thích khác được gọi là “heteroresistance”, có nghĩa là có sự hiện diện của hỗn hợp quần thể vi khuẩn nhạy cảm và đề kháng trong nuôi cấy mà có thể ảnh hưởng tới độ nhạy của phương pháp kiểu gen, dẫn tới không phát hiện được các đột biến. Tuy nhiên khi nuôi cấy các chủng vi khuẩn này trong môi trường chứa RIF thì lại phát hiện được các đột biến trên các chủng này [67]. Các cơ chế như rào cản tính thấm hoặc các protein màng đóng vai trò như bơm đẩy thuốc cũng có thể dẫn tới kháng RIF do làm giảm nồng độ thuốc trong tế bào [201].

Nghiên cứu của chúng tôi cũng phát hiện 12/82 (14,6%) chủng vi khuẩn lao không kháng RIF (chủng nhạy). Giải trình tự hệ gen các mẫu này phát hiện các đột biến ở gen *rpoB* liên quan đến kháng thuốc RIF với các mức độ khác nhau (bảng 3.6). Có 11 chủng xuất hiện 5 vị trí đột biến trong vùng RRDR trên gen *rpoB* trong đó Leu533Pro chiếm tỷ lệ 20,8%, Asp516Tyr 12,5%, Ser531Leu 4,2% và đột biến mất đoạn codon 1309ACC chiếm tỷ lệ 4,2%. Đồng thời cả 12 chủng này đều xuất hiện đột biến ở codon 3225 thay thế Thymine thành Cytosine (T-

>C) nằm ngoài vùng RRDR. Các đột biến im lặng này không dẫn tới thay đổi axit amin nên không dẫn đến kiểu hình kháng rifampicin.

Ngoài hai thuốc chống lao chủ đạo hàng một là INH và RIF, nghiên cứu phát hiện đột biến gen liên quan đến kháng các thuốc Ethambutol (EMB), Pyrazinamide (PZA) và Streptomycin (SM) với tỷ lệ đột biến trên các gen khác nhau.

- **Gen và vị trí đột biến liên quan kháng thuốc Ethambutol**

Ethambutol (EMB), một chất tương tự arabinose, là một loại thuốc kháng khuẩn, được sử dụng để điều trị bệnh lao từ giữa những năm 1960. Thuốc được khuyến dùng thường xuyên cho giai đoạn điều trị lao tích cực, như một phần của phác đồ bốn loại thuốc, bao gồm isoniazid (INH), rifampicin (RMP) và pyrazinamide (PZA) [1]. Điều đáng lo ngại là gần 4% trong số tất cả các chủng phân lập lâm sàng của bệnh lao đã được chứng minh là có khả năng kháng EMB [30].

Nghiên cứu thực hiện giải trình tự 36/82 chủng kháng EMB, kết quả cho thấy có các đột biến trên gen *embB* với tỷ lệ xuất hiện các đột biến khác nhau. Đa số đột biến trên gen *embB* xảy ra ở codon 306, thay thế axit amin Methionine thành Isoleucine chiếm tỷ lệ 38,9% (14/36 chủng) và Methionine thành Valine chiếm tỷ lệ 38,9% (14/36 chủng). Bên cạnh đó, nghiên cứu cũng phát hiện các đột biến Gln497Arg (8,3%), Val492Gly (5,6%) và Asp354Ala (2,8%), Gly406Ser (2,8%), Gln497Lys (2,8%). Các đột biến này trên gen *embB* đều liên quan đến kháng thuốc – mức độ 1 (Bảng 3.7). Theo tài liệu cập nhật về danh sách các đột biến ở gen *embB*, có 15 đột biến được ghi nhận liên quan đến kháng thuốc EMB mức độ 1 và 2 [187]. Nghiên cứu này phát hiện 7 vị trí đột biến xuất hiện ở 36 chủng liên quan chặt chẽ đến kháng thuốc EMB - mức độ 1.

Nghiên cứu của Zofia Bakuba năm 2013 đã phát hiện 17/50 (34%) chủng kháng EMB. Trong đó đột biến Met306Ile là phổ biến nhất chiếm tỷ lệ 29,4%, tiếp theo là Met306Val (23,5%), Gly406Ala (23,5%). Còn lại là các đột biến khác trên gen *embB* như Leu413Pro 10,0%, Gln497Arg 7,5%, Glu504Gln 6% [30]. Mặc dù EMB đã được sử dụng để điều trị bệnh lao trong hơn 40 năm, nhưng cơ chế phân tử của tình trạng kháng EMB vẫn chưa được hiểu rõ. Các nghiên cứu trước đây đã liên hệ giữa kiểu hình kháng EMB với đột biến gen của operon *embCAB*, đáng chú ý nhất là ở gen *embB*. Đột biến ở vị trí codon 306 của gen *embB* được phát hiện xảy ra thường xuyên phổ biến nhất. Tỷ lệ phát hiện đột biến cao ở codon *embB*306 trong số các chủng MTB kháng EMB phân lập được báo cáo từ Hàn Quốc là 47% [106], Trung Quốc là 55% [161].

Mặc dù có những hạn chế của nghiên cứu về quy mô và khung thời gian của mẫu, kết quả của chúng tôi xác nhận những quan sát trước đây rằng trình tự đột biến trong gen *embB* là không đủ để phát hiện nhanh tình trạng kháng EMB và đột biến codon 306 không phải là dấu hiệu tốt để dự đoán khả năng kháng EMB. Cần phân tích các locus di truyền khác để xác định các đột biến cụ thể hơn liên quan đến tính kháng EMB.

- **Gen và vị trí đột biến liên quan kháng thuốc Pyrazinamide**

Pyrazinamide (PZA) là một loại kháng sinh phổ rộng được phát hiện và đưa vào sử dụng để điều trị bệnh lao (TB) ở cả người lớn lẫn trẻ em từ giữa những năm 1952. Thuốc được khuyến dùng thường xuyên cho giai đoạn điều trị lao tích cực, như một phần của phác đồ điều trị lao nhạy cảm, bao gồm Isoniazid (INH), Rifampicin (RMP) và Ethambutol (EMB) [206].

Do có số lượng lớn các đột biến kháng thuốc tiềm tàng ở gen *pncA* và gen khởi đầu của nó, các đột biến được phát hiện có liên quan đến kháng PZA kiểu

hình (liên quan đến kháng thuốc mức độ 1). Các đột biến vô nghĩa và đột biến indel trong vùng mã hóa của *pncA* đều phải được coi là tạo ra kiểu hình kháng thuốc và do đó gây ra tính kháng PZA ở mức độ 2 theo phân loại của WHO năm 2023 [112, 187].

Modlin và cộng sự (2021) [47] nêu ra khả năng rằng *clpC1* V63A, dường như là điểm đánh dấu cho dòng 1 của MTBC, chịu trách nhiệm làm tăng nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của PZA thuộc dòng này so với các kiểu gen MTBC khác (ngoại trừ *M. bovis* và *M. canettii*) và rằng hiện tại nồng độ tới hạn (Critical concentra – CC) là 100 mg/L có thể phân chia giới hạn trên của phân bố MIC của dòng 1, dẫn đến tỷ lệ kháng đơn PZA cao hơn ở dòng này. Giả thuyết này không bị mâu thuẫn bởi thực tế là, trong phân tích này, *clpC1* V63A được phát hiện là đột biến trung tính nhóm 5 do PPV 4,6% (KTC 95%, 3,2–6,3%).

Chủng *M. canettii* hiếm khi được tìm thấy bên ngoài khu vực Châu Phi, về bản chất có khả năng kháng PZA [206]. Cơ sở di truyền của kiểu hình này chưa rõ ràng (có thể liên quan đến nhiều cơ chế) và hầu hết các chủng phân lập được mô tả cho đến nay không có đột biến không đồng nghĩa hoặc indel trong *pncA* [125]. Do đó, tính kháng nội tại này phải được chẩn đoán gián tiếp thông qua một chất thay thế thông tin phát sinh gen (ví dụ: *M. canettii* có đột biến đồng nghĩa ở codon 46 của *pncA* [125, 157].

Mặc dù số lượng đột biến được phân loại thành nhóm 1, 2, 4 thể hiện sự tiến bộ đáng kể so với các phân loại trước đây của WHO, nhưng người ta thừa nhận rằng chúng chỉ bao gồm một tỷ lệ nhỏ các đột biến không đồng nghĩa có thể xảy ra ở *pncA* [125]. Do đó, một quy tắc chuyên môn bổ sung cho *pncA* được đề xuất, quy tắc này không được áp dụng trực tiếp vào các bảng nhưng được đề xuất cho thực hành thường quy để bổ sung cho việc phân loại độ tin cậy cuối cùng. Cụ thể, bất kỳ đột biến mới, không đồng nghĩa nào (tức là chưa được phân loại vào nhóm

1, 2, 4 hoặc 5) và tất cả các đột biến không đồng nghĩa trong nhóm 3 phải được coi là gây ra tính kháng PZA nếu chúng xảy ra ở chủng phân lập kháng với RIF, vì xác suất kháng PZA trước xét nghiệm là cao trong những trường hợp này [125, 157].

- **Gen và vị trí đột biến liên quan kháng thuốc Streptomycin**

Streptomycin (SM) là một loại kháng sinh có nguồn gốc từ *Streptomyces griseus*, là aminoglycoside đầu tiên được phát hiện và sử dụng trong điều trị lâm sàng từ những năm 1940. Mặc dù SM là kháng sinh đầu tiên được xác định là có hiệu quả chống lại vi khuẩn lao, nhưng nó đã không còn được ưa chuộng do kháng thuốc và hiện nay chủ yếu được sử dụng để điều trị hỗ trợ trong các trường hợp lao kháng đa thuốc. Streptomycin được sử dụng với các loại thuốc khác để điều trị bệnh lao hoạt động nếu bạn không thể dùng các loại thuốc khác cho bệnh lao hoặc mắc một loại bệnh lao không thể điều trị bằng các loại thuốc khác (lao kháng đa thuốc). Thuốc này cũng có thể được sử dụng để điều trị các bệnh nhiễm trùng nghiêm trọng khác (ví dụ như *Mycobacterium avium complex*-MAC, bệnh sốt mò, viêm nội tâm mạc, bệnh dịch hạch).

Nghiên cứu của chúng tôi phát hiện 58/82 mẫu chủng có đột biến liên quan đến kháng thuốc SM tại 7 gen bao gồm: *Rv1258c*, *Rv2477c*, *bacA*, *gid*, *glpK*, *rpsL*, *rrs*. Trong đó tỷ lệ đột biến ở vị trí *Rv1258c_p.581delC* trên gen *Rv1258c* là 21.1%; *gid_c.615A>G* và *gid_p.Glu92Asp* trên gen *gid* lần lượt là 22.3% và 21.9%. Bên cạnh đó, 9/82 mẫu chủng cấy MGIT dương tính có xuất hiện đột biến tại 7 gen không liên quan đến kháng thuốc SM: *Rv1258c*, *Rv2477c*, *bacA*, *gid*, *glpK*, *rpsL*, *rrs*. Trong đó tỷ lệ đột biến ở vị trí *gid_c.615A>G* và *gid_p.Glu92Asp* trên gen *gid* lần lượt là 20.0 % và 14.6%.

Nghiên cứu của Gregory ST (2009) và Demirci H (2014) đã phát hiện 12 đột biến, được xác định có độ nhạy 75,2% (KTC 95%, 73,9–76,4%) và độ đặc hiệu 98,0% (KTC 95%, 97,6–98,2%). Hầu hết các đột biến đó (tức là sáu đột biến *gid*, *rpsL* K43R, K88M và K88R, *rrs* a514c và c517t) đều được hiểu rõ về mặt chức năng và được ghi nhận là có liên quan đến kháng thuốc [56, 132].

4.2.2. Giải trình tự gen phát hiện đột biến kháng thuốc lao hàng hai (Moxifloxacin, Amikacin)

- **Gen và vị trí đột biến liên quan kháng thuốc Moxifloxacin**

Moxifloxacin (MFX) là một kháng sinh tổng hợp thuộc nhóm fluoroquinolon với hoạt tính và tác dụng tương tự ciprofloxacin. MFX có tác dụng diệt khuẩn với cả vi khuẩn gram dương và gram âm bằng cách ức chế topoisomerase II (ADN *gyrA*se) hoặc enzym topoisomerase IV. Đây là thành phần cần thiết cho sự sao chép, phiên mã và sửa chữa ADN vi khuẩn.

Kháng thuốc MFX liên quan đến các đột biến trên gen *gyrA*. Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy có 16/82 chủng (19,5%) kháng thuốc MFX kiểu hình, trong đó có 10 chủng không có đột biến trên gen *gyrA* và 6 chủng có các đột biến trên gen *gyrA*, (4/6) chủng kháng MFX mang ít nhất 1 đột biến kháng MFX và chỉ có 1,5% (1/66) chủng nhạy mang đột biến kháng. Đột biến thường gặp nhất được phát hiện là trên gen *gyrA* tại codon 94 thay thế Asp94Gly (67%). Đột biến ở các codon khác trên gen *gyrA* được phát hiện ở 1 chủng tại 4 vị trí khác nhau trên gen *gyrA* là Ala90Val, Glu21Gln, Gly668Asp, Ser95Thr, trong đó có 1 vị trí liên quan đến kháng thuốc theo công bố của WHO là Ala90Val [187].

Nghiên cứu của Viksna Anda và cộng sự tại Latvia năm 2023 [180] trên 63 chủng MDR-TB cho thấy tỷ lệ kháng thuốc MFX là 16,7% , trong đó đột biến Ala90Val cũng được phát hiện và liên quan đến kháng thuốc MFX ở mức độ 1.

- Gen và vị trí đột biến liên quan kháng thuốc Amikacin

Amikacin (AMK) là thuốc kháng sinh bán tổng hợp thuộc nhóm Aminoglycosid bán tổng hợp từ kanamycin A. Amikacin có hiệu lực trên các enzym, làm mất hoạt tính của các aminoglycoside khác và do đó ngăn chặn sự phát triển của vi khuẩn.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, phát hiện 2/82 (2,4%) chủng có đột biến liên quan đến kháng thuốc AMK tại gen *rrs*. Trong đó tỷ lệ vị trí đột biến ở vị trí codon 1401A>G trên gen *rrs* là 100% trên cả 2 chủng. Đồng thời, nghiên cứu cũng phát hiện 1 chủng VS262 nhạy cảm AMK có đột biến tại codon 64 thay thế Cytosine (C) thành Thymine (T). Đột biến này liên quan đến kháng thuốc AMK ở mức độ 4 và không biểu hiện kiểu hình kháng thuốc (bảng 3.11 và 3.12).

Trước đây, chỉ có *rrs* a1401t và *rrs* g1484t được công nhận là đột biến kháng AMK. Tuy nhiên, đánh giá hệ thống năm 2018 của WHO về nồng độ tới hạn (critical concentrations- CC) đối với AMK đã cho thấy *rrs* c1402t và *eis* c-14t cũng tăng MIC một cách khiêm tốn gần với CC mới được xác nhận là 2 mg/L trong 7H10, mặc dù chúng không được chính thức công nhận là dấu hiệu cho AMK kháng thuốc. Trong phân tích này, *eis* c-14t được phân loại là dấu hiệu chính xác về khả năng kháng thuốc (nhóm 1), phù hợp với cách giải thích về đột biến này trong xét nghiệm Cepheid Xpert MTB/XDR [169].

Tuy nhiên, cần lưu ý rằng hiện tượng epistark làm phức tạp việc giải thích *eis* c-14t để dự đoán kiểu gen kháng AMK, vì nó chỉ có thể dẫn đến sự biểu hiện quá mức của *eis* và dẫn đến kháng thuốc. Do đó, việc giải thích đột biến gen khởi động này mà không xem xét đến đột biến LoF có thể dẫn đến đánh giá quá cao khả năng kháng AMK. Trên cơ sở kết quả kháng thuốc kiểu hình, *rrs* c1402t được phân loại liên quan đến kháng thuốc mức độ 3 - có ý nghĩa không chắc chắn. Tuy

nhiên, dựa trên đánh giá hệ thống đã nói ở trên, thực tế là đột biến này được hiểu là đột biến kháng AMK và để thận trọng, người ta đã quyết định công nhận *rrs* c1402t là nhóm liên quan đến kháng thuốc - mức độ 2 trong phân loại cập nhật của WHO 2023 [187].

Hiện tại, Kanamycin (KAN) và capreomycin (CAP) không còn được WHO khuyến cáo để điều trị bệnh lao nên tài liệu cập nhật của CTCLQG cũng hạn chế sử dụng hai loại thuốc này [189, 191].. Vị trí và tỷ lệ đột biến gen liên quan đến kháng thuốc Kanamicin (KAN) và Capreomicin (CAP) hoàn toàn giống với kháng thuốc AMK nên chúng tôi không đưa vào phân tích trong nghiên cứu này.

4.2.3. Độ nhạy, độ đặc hiệu của xét nghiệm giải trình tự gen MTB từ mẫu đờm.

Hệ gen hoàn chỉnh của *M. tuberculosis* là phân tử DNA mạch vòng có kích thước 4.400.000 bp với 4.329 gen [155]. Tuy nhiên, có tới 50% các gen này vẫn được coi là chưa biết, không được xác định hoặc có chức năng giả định. Gần đây, một chương trình gọi SNP kết hợp với WGS đã cho phép tạo ra một danh mục các gen độc lực và các dòng phụ mới có khả năng gây độc. Một bài báo gần đây khám phá sự biến đổi di truyền của một cụm phụ của đột biến phát lao INH-R ở London [26], WGS cũng có thể chứng minh các SNP ảnh hưởng đến các gen khác nhau đặc biệt đối với các chủng lâm sàng và có khả năng giải thích sự tồn tại của đột biến phát trong nhiều năm. WGS có tiềm năng cách mạng hóa quá trình xác định các gen đích [107]. Kỹ thuật truyền thống, kháng sinh đồ kiểu hình dựa trên nuôi cấy được sử dụng để xác định tình trạng kháng thuốc nhưng khi thay thế bằng các xét nghiệm sinh học phân tử nhanh để phát hiện khả năng kháng thuốc cụ thể thông qua các đột biến. Giải trình tự toàn bộ bộ gen thế hệ tiếp theo (NGS) của chủng *M. tuberculosis* ngày càng được sử dụng nhiều hơn trong nghiên cứu và các cơ sở lâm sàng để xác định toàn diện tất cả các loại đột biến liên quan

đến kháng thuốc. *M. tuberculosis* có một bộ gen được bảo tồn với ít đa dạng di truyền giữa các chủng và không có bằng chứng về chuyển gen ngang [36]. Sự đa dạng trong việc kháng thuốc của bệnh nhân có thể xảy ra do nhiễm trùng hỗn hợp với các chủng khác biệt về mặt di truyền hoặc sự tiến hóa bên trong vật chủ của một chủng lây nhiễm đơn lẻ. Các quần thể vi khuẩn có thể được phát hiện trong các mẫu lâm sàng sau khi đọc trình tự ánh xạ tới một bộ gen tham chiếu trong đó nhiều lệnh gọi cơ sở được phát hiện tại một bộ gen duy nhất [198].

Việc triển khai WGS trong môi trường lâm sàng bị cản trở bởi một số hạn chế đáng kể. Điều quan trọng nhất trong số này là yêu cầu đối với mẫu nuôi cấy trước khi phân lập và giải trình tự DNA. Gần đây, WGS trực tiếp từ các mẫu lâm sàng đã được chứng minh thành công [117, 130, 145, 155, 183], mặc dù tất cả các quy trình hiện tại cho thực hành lâm sàng vẫn yêu cầu một bước nuôi cấy. Ngoài ra, trước khi chuyển hoàn toàn sang thử nghiệm WGS, cần một thời gian chuyển tiếp dài với cả WGS và phương pháp nuôi cấy thông thường được sử dụng song song để làm rõ sự khác biệt hiện tại giữa kiểu gen và kiểu hình. Cần thiết có một bộ dữ liệu lớn cho phép phân tích rõ hơn vai trò của các cơ chế đề kháng hiếm gặp và mức độ đề kháng do các đột biến khác nhau quy định.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã ứng dụng thành công kỹ thuật giải trình tự gen chẩn đoán kháng thuốc từ mẫu đờm và từ chủng nghiên cứu. Kết quả thực hiện từ mẫu đờm cho thấy chẩn đoán kháng Isoniazid (INH) có độ nhạy 91,7 % và độ đặc hiệu 100% . Kết quả này rất có ý nghĩa và thống nhất với các công bố của Papaventis và cộng sự [142] khi phân tích về tỷ lệ kháng INH trong nhóm bệnh nhân có kháng RIF thì độ nhạy và độ đặc hiệu lần lượt là 95,4 % và 98,5%. Kết quả này cũng phù hợp với công bố của WHO khi đưa ra khuyến cáo về giá

trị của chẩn đoán của kỹ thuật giải trình tự gen so với kháng sinh đồ kiểu hình truyền thống [21, 136, 149, 189].

Nghiên cứu của chúng tôi thực hiện giải trình tự gen thành công với 38/95 (40,0%) mẫu đờm được giải trình tự toàn bộ hệ gen thành công và có đủ kết quả kháng thuốc kiểu hình và kiểu gen để phân tích. Độ nhạy của xét nghiệm giải trình tự gen trực tiếp từ mẫu đờm trong chẩn đoán kháng Rifampicin (RIF) là 86,7% và độ đặc hiệu là 25%. Đối chiếu với tài liệu của WHO 2021 công bố về độ nhạy và độ đặc hiệu của xét nghiệm giải trình tự so với kháng sinh đồ kiểu hình có giá trị tương ứng là 93,8 % và 98,2 % [184] [21, 134, 184, 189]. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng kháng sinh đồ kiểu hình với RIF nồng độ 0.5 ug/ml, thấp hơn nồng độ RIF 1.0 ug/ml nêu trong tài liệu của WHO 2018 [137] và phù hợp với công bố cập nhật của WHO 2021[184, 187] Điều này cần xem xét đến nồng độ kháng sinh trong việc xét nghiệm kháng sinh đồ kiểu hình khi thực hiện cho các mẫu lâm sàng thì sự phù hợp giữa kết quả kháng sinh đồ kiểu hình và kiểu gen có sự sai khác cần xem xét kỹ trước khi đưa ra phác đồ điều trị phù hợp [183, 184, 187].

Trong chẩn đoán lao kháng Ethambutol (EMB), kết quả cho thấy độ nhạy của xét nghiệm giải trình tự gen là 89.5%. Tuy nhiên, độ đặc hiệu của xét nghiệm chỉ đạt 68,4% so với kháng thuốc kiểu hình. Đột biến trong các trường hợp này được xác định trên gen *embB* trong đó đa số tại codon Met306Ile và Met306Val, đã được Tổ chức y tế thế giới công bố năm 203 [187]. Có 63/82 chủng kháng thuốc kiểu hình với Streptomycin. Độ nhạy và độ đặc hiệu của chẩn đoán kháng SM là 56.5% và 100 %.

Chẩn đoán kháng Pyrazinamide và Moxifloxacin có những hạn chế nhất định khi so sánh với kháng sinh đồ kiểu hình. PZA có độ nhạy 67,7 % , độ đặc hiệu 85,7%, MFX có độ nhạy 50,0 % và độ đặc hiệu 96,4%. Công bố của WHO

2021 đối với hai thuốc này thì độ nhạy và độ đặc hiệu cũng thấp hơn so với các thuốc lao hàng 1 . Các trình tự và vị trí đột biến gen liên quan đến tính kháng thuốc FQs vẫn đang được WHO xem xét bổ sung và chưa đưa vào danh mục khuyến cáo bổ sung [184, 187].

Để lý giải cho những sai khác khá lớn giữa kháng thuốc kiểu hình và kháng thuốc kiểu gen, đối với các đột biến hiếm gặp dẫn đến MIC gần với nồng độ ngưỡng, do đó kết quả kháng thuốc kiểu hình được phân loại không nhất quán với kháng thuốc kiểu gen [184].

4.2.4. Độ nhạy, độ đặc hiệu của xét nghiệm giải trình tự gen vi khuẩn lao từ mẫu chủng.

Việc sử dụng các thuốc kháng sinh trong điều trị bệnh lao đã cứu chữa cho hàng triệu bệnh nhân khỏi căn bệnh nguy hiểm này. Tuy nhiên điều đó cũng đã tạo ra một áp lực chọn lọc cho sự hình thành và phát triển các chủng vi khuẩn lao kháng thuốc. Tình hình bệnh lao đang ngày một đáng lo ngại hơn bởi sự gia tăng của các chủng lao kháng thuốc. Từ đầu những năm 90 của thế kỷ trước, một xu hướng đáng báo động là xuất hiện lao kháng đa thuốc. Điều trị lao kháng đa thuốc thường khó khăn hơn, liên quan đến tỷ lệ mắc và tỷ lệ chết cao, kéo dài thời gian điều trị và làm tăng nguy cơ lan truyền các chủng kháng thuốc trong cộng đồng [90, 104, 144]. Trong nghiên cứu in vitro cho thấy các đột biến tự nhiên có liên quan đến kháng thuốc trong khi đó áp lực chọn lọc của kháng sinh dẫn đến sự tích lũy tăng cường các đột biến kháng thuốc [63].

WGS có thể xác định đa hình nucleotide đơn (SNP) giữa các chủng khác nhau đặc biệt hữu ích khi cố gắng phân biệt tái phát lâm sàng với tái nhiễm. Nghiên cứu của Jindani Amina năm 2014 phân tích dữ liệu từ thử nghiệm RIFAQUIN gần đây [88], 36 bệnh nhân có nuôi cấy dương tính trước và sau khi

điều trị đã được định loại chủng của họ bằng cách sử dụng 24-locus MIRU-VNTR, trong silico spoligotyping và WGS. Trong khi WGS và MIRU-VNTR phân biệt tái phát và tái nhiễm với mức độ phân biệt tương tự, WGS cung cấp thêm thông tin quan trọng. Một cặp có số lượng khác biệt SNP trung bình (nhiều hơn 5), có khả năng là kết quả của sự nhiễm hỗn hợp với kiểu gen phụ trước điều trị có liên quan nhiều đến kiểu gen sau điều trị. WGS đã phân loại lại điều này là sự tái phát, trong khi kiểu gô MIRU-VNTR không thể thực hiện được điều này. Từ quan điểm toàn cầu, WGS đã cho phép phát hiện sự đa dạng di truyền trong *M. tuberculosis* với độ phân giải chưa từng có. Nó đã được sử dụng để hiểu sự tiến hóa của nó, bao gồm cả việc khám phá ra nguồn gốc của nó từ *Mycobacterium* (được mô tả lần đầu tiên vào năm 1969 và hiện được coi là loài tổ tiên mà từ đó *M. tuberculosis* xuất hiện) và cả dòng họ, biến thể ở cấp độ toàn cầu, địa phương và cá thể [32].

Trong 82/95 (86,3%) chủng giải trình tự cho thấy, độ nhạy (Se), độ đặc hiệu (Sp) của xét nghiệm giải trình tự gen từ mẫu chủng khi so sánh với kháng sinh đồ kiểu hình của các thuốc rất khác nhau. Isoniazid có độ nhạy 100,0 % và độ đặc hiệu 100% . Độ nhạy của xét nghiệm giải trình tự trong chẩn đoán kháng Rifampicin là 98.6%. Ethambutol có độ nhạy 97,2%, độ đặc hiệu 67.4%. Streptomycin có độ nhạy 95,2%, độ đặc hiệu 63,2%. Pyrazinamide có độ nhạy 78,4%, độ đặc hiệu 96.8%. Moxifloxacin có độ nhạy 37,5%, độ đặc hiệu 98.5%. Amikacin có độ nhạy 100% và độ đặc hiệu 98,8%.

Nghiên cứu của chúng tôi có sự khác biệt về kết quả độ đặc hiệu trong chẩn đoán kháng RIF do không có mẫu nào nhạy với cả hai loại kháng thuốc kiểu gen và kiểu hình. Đồng thời, có 12 chủng kết quả kiểu gen kháng RIF nhưng kiểu hình nhạy. Điều này đã được mô tả trong tài liệu của WHO năm 2021 về một số đột

biến dẫn đến MIC gần với nồng độ ngưỡng, do đó kết quả DST kiểu hình được phân loại không nhất quán với kiểu gen [184, 189].

Walker Timothy và cộng sự năm 2022 [184] đã phát hiện có 14 đột biến không đồng nghĩa ở *embB* và một đột biến liên gen ở phần đầu của *embA* đáp ứng tiêu chí cho nhóm 1 hoặc 2. Kết quả thu được độ nhạy của EMB là 86,7% (95% CI, 85,7–87,6% và độ đặc hiệu 93,3% (95% CI, 93,0–93,6%) và PPV là 71,1% (95% CI, 69,9–72,2%), vì nhiều đột biến *embB* tạo ra nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) gần với CC, dẫn đến sự phù hợp về mặt phân loại kém với DST kiểu hình. Hơn nữa, không rõ liệu các CC hiện đang được sử dụng có tương ứng tốt với các giá trị giới hạn dịch tễ học hay không. Điểm dừng cao không phù hợp có thể làm trầm trọng thêm tỷ lệ phân loại sai các đột biến *embB*, tương tự như trường hợp đột biến kháng RIF ở ranh giới.

Theo Ando (2011), các đột biến không đồng nghĩa khác ở gen *katG* có thể gây ra tình trạng kháng INH nhưng rất hiếm trong bộ dữ liệu này [24]. Các đột biến trình khởi động *ahpC* quá hiếm trong tập dữ liệu này để đáp ứng các tiêu chí về dấu hiệu kháng thuốc hoặc có giá trị dự báo dương tính (PPV) thấp. Điều này có thể là do các đột biến này chủ yếu hoặc chỉ hoạt động như các đột biến bù (tức là chúng thường trùng với các đột biến *katG* gây ra tình trạng kháng INH [21]. Các codon hoặc indel dừng sớm trong vùng mã hóa của *katG* cũng được phân loại là liên quan đến kháng thuốc mức độ 1 và 2 dựa trên phân loại của WHO 2023 [187].

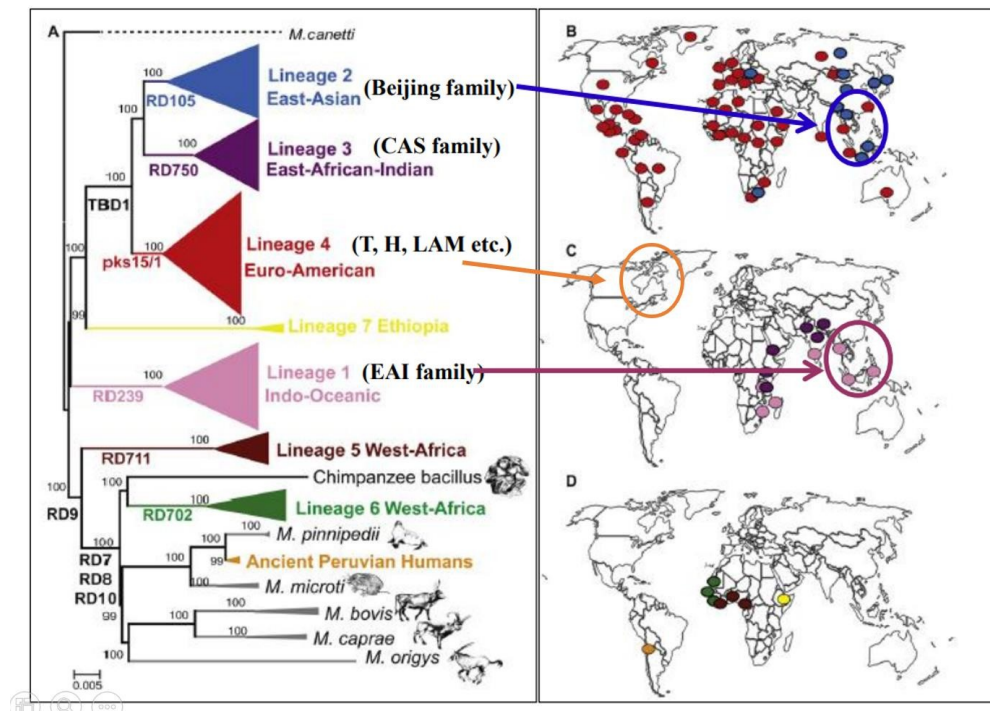
Do có số lượng lớn các đột biến kháng thuốc tiềm tàng ở gen *pncA* và gen khởi đầu của nó, các đột biến được phát hiện có liên quan đến kháng PZA kiểu hình (theo tiêu chí được áp dụng cho nhóm 1) có độ nhạy chỉ 56,8% (95% CI, 54,8–58,8%). Độ nhạy tăng lên 72,3% (95% CI, 70,5–74,2%) khi bao gồm các đột biến liên quan đến kháng thuốc mức độ 2.

Gygli SM và cộng sự (2019) [66] đã phát hiện 166 đột biến, trong đó 162 đột biến được phân loại dựa trên giả định rằng bất kỳ đột biến vô nghĩa hoặc indel nào trong *gid* gây ra tình trạng kháng SM, đã tăng độ nhạy lên 82,4% (KTC 95%, 81,3–83,5%) nhưng giảm độ đặc hiệu xuống 95,4% (KTC 95%, 95,0–95,8%). PPV tương đối thấp đối với đột biến nhóm 2 là 60,5% (KTC 95%, 56,4–64,4%) có lẽ là do ngay cả đột biến LoF trong gen *gid* cũng chỉ làm tăng MIC nhỏ. Giống như EMB, cũng không rõ liệu các CC hiện đang được sử dụng có tương ứng tốt với các giá trị giới hạn dịch tễ học hay không và điều này có thể làm trầm trọng thêm tỷ lệ lỗi kháng thuốc kiểu hình rất lớn đối với cơ chế kháng thuốc này. Ba đột biến (*rrs* c492t và *gid* L16R và E92D) được biết là xảy ra thường xuyên vì chúng có nguồn gốc sâu xa trong hệ gen MTBC đã được phân loại vào nhóm 5 là hoàn toàn trung tính, qua đó xác nhận những phát hiện trước đó [116, 119, 181].

4.3. Môi liên hệ kiểu gen của các chủng vi khuẩn lao phân lập từ bệnh nhân lao kháng Rifampicin bằng kỹ thuật giải trình tự toàn bộ hệ gen.

4.3.1. Phân loại kháng thuốc kiểu hình theo dòng vi khuẩn

Đã có nhiều nghiên cứu về các loài *M. tuberculosis*, căn nguyên gây bệnh lao trên thế giới. Kết quả cho thấy tại mỗi khu vực địa lý, mỗi quần thể người, đặc biệt là các khu vực và quần thể người có tỷ lệ mắc lao cao, luôn có một số dòng, typ vi khuẩn lao lưu hành nổi trội hơn những dòng hay typ phân tử khác. Các dòng hay typ phân tử nổi trội ở mỗi khu vực hay quần thể mang tính đặc trưng cho khu vực hay quần thể đó [41, 60, 123, 131].



Hình 4.2: Cây phát sinh chủng loại của *M.tuberculosis* trên thế giới

Nguồn: Mireia Coscolla và cộng sự, (2014) *SciencDirect* [54].

Nghiên cứu của Coscolla và cộng sự năm 2014 về các dòng lineage của *M. tuberculosis* đã phân nhánh thành 7 nhóm chính [54]. Trong đó dòng (lineage) 1 bao gồm EAI nổi trội ở khu vực Ấn Độ Dương (Indo- Oceanic); dòng 2 gồm Beijing nổi trội ở khu vực Đông Á (East- Asian); dòng 3 chủ yếu ở khu vực Đông Phi và Ấn Độ; dòng 4 gồm các nhóm Haarlem, LAM, T nổi trội ở Châu Âu và châu Mỹ ((Euro-American); dòng 5 và dòng 6 thường lưu hành ở Tây Phi.

Chủng vi khuẩn MTBC trong nhiều năm đã được coi là một “bản sao”, chứa đựng quá ít sự đa dạng di truyền nên cần được xem xét. Mô hình này hiện đã thay đổi và nhiều nghiên cứu thực nghiệm cũng như dịch tễ học đã chứng minh tác động kiểu hình của sự đa dạng chủng MTBC. Chỉ trong bốn năm qua, ít nhất 52 nghiên cứu mới đã thực hiện và phân tích sự khác biệt về kiểu hình giữa các chủng và dòng MTBC [70, 118, 158]. Mặc dù các nghiên cứu lâm sàng đã

báo cáo những kết quả trái ngược nhau về xu hướng của các dòng MTBC gây bệnh phổi khác biệt với bệnh ngoài phổi. Các nghiên cứu tập trung vào các biến thể khác của “độc tính” và đã phát hiện ra các mô hình chung cho thấy các dòng “hiện đại” nói chung có độc lực cao hơn và mang tính toàn cầu hơn, thành công so với các dòng khác có giới hạn về mặt địa lý (Hình 4...). Sự khác biệt về khả năng sinh miễn dịch, mức độ nghiêm trọng của bệnh và khả năng lây truyền nhất quán chỉ ra rằng Dòng 2 và Dòng 4 độc hại hơn Dòng 1 và dòng 6. Cần tìm hiểu, nghiên cứu thêm đối với Dòng 3, 5 và 7, nhưng do sự phân bố địa lý hạn chế của những dòng sau này, do đó Dòng 5 và Dòng 7 cho thấy các biến thể ở dòng này có độc lực thấp [115, 158].

Các báo cáo nghiên cứu đã nhận thấy sự xuất hiện của dòng 2 – Beijing theo thời gian. Sự gia tăng dòng 2 - Beijing này có thể được thúc đẩy một phần bởi các yếu tố môi trường như điều trị bằng kháng sinh và chọn lọc tự nhiên làm gia tăng số lượng dòng 2 trên thế giới. Ngoài ra, hiệu ứng này cũng có thể được thúc đẩy bởi những thay đổi về nhân khẩu học của các nước. Sự mở rộng dân số của con người trong các cuộc cách mạng thời kỳ đồ đá mới và công nghiệp được cho là có liên quan đến sự gia tăng độc lực của một số MTBC [118].

Quần thể 82 mẫu nghiên cứu này của chúng tôi được phân loại kiểu gen theo 3 dòng 1,2 và 4. Trong đó dòng 1 (EAI) có 4 chủng (4.9%), dòng 2 (Beijing) có 69/82 chủng (84.1%) và dòng 4 (T, H, LAM) có 9/82 chủng (11.0%). Số lượng chủng kháng đơn thuốc (DR-TB) chiếm 14,6% trong đó dòng 2 Beijing chiếm tỷ lệ 91,7% (11/12 chủng). Số lượng chủng đa kháng (MDR-TB) chiếm tỷ lệ cao trong quần thể (69,5%), đa số gặp ở các chủng dòng 2 Beijing chiếm tỷ lệ 82,5% (47/57 chủng). Số lượng chủng tiền siêu kháng thuốc (XDR-TB) có 13 chủng trong đó dòng 2 Beijing chiếm tỷ lệ là 84.6% (11/13 chủng). Kháng đơn RIF (RR-TB) là 85.4%,

đa số gặp ở chủng dòng 2 Beijing chiếm tỷ lệ 84.0% (59/70 chủng). Kháng MFX có 16 chủng trong đó dòng 2 Beijing là 87.5% (14/16 chủng) (bảng 3.17).

Theo thời gian, tỷ lệ các chủng vi khuẩn lao dòng 2 (Beijing) ngày càng gia tăng tại Việt Nam và liên quan nhiều tới tính kháng thuốc, đặc biệt là kháng đa thuốc MDR – TB và kháng Rifampicin (RR-TB). Nghiên cứu của Nguyễn Thị Vân Anh (2016) về dịch tễ học phân tử chủng vi khuẩn lao tại Việt Nam cũng cho thấy dòng phổ biến nhất là Beijing (55,4%), tiếp theo là EAI (27,5%), T (6,4%), LAM (1,3%), Haarlem (1%) và loại Zero (0,3%). Tỷ lệ chủng Beijing phân lập ở miền Bắc (70,4 %) và miền Nam (68 %) cao hơn ở miền Trung (28 %), trong khi tỷ lệ phân lập EAI ở miền Bắc (7,1 %) và miền Nam (17 %) thấp hơn nhiều so với miền Trung (59 %). Nhìn chung, các chủng dòng 2 Beijing phổ biến và có khả năng kháng thuốc cao nhất, các chủng dòng 1 EAI có khả năng kháng thuốc ít nhất, ngoại trừ ở miền Nam Việt Nam, nơi EAI cũng có khả năng kháng thuốc khá cao [127, 128].

Trần Ngọc Bửu (2012) và Mai Nguyệt Thu Huyền (2013) đã báo cáo sự phân cụm kiểu gen của dòng 2 cao hơn so với dòng 1 ở Việt Nam [42, 78]. Tương tự, một nghiên cứu ở Thượng Hải cho thấy dòng 2 có khả năng phân cụm cao hơn và tuổi trẻ hơn so với các dòng chủng khác [109]. Nhiều nghiên cứu khác ở nhiều môi trường khác nhau đã báo cáo mức độ phù hợp cao hơn của các chủng dòng 2 Beijing được phản ánh bằng việc tăng tần suất của chúng theo thời gian [33, 78, 114] .

4.3.2. Cây phát sinh chủng loại của quần thể vi khuẩn lao kháng thuốc tại Hà Nội năm 2020 – 2022

Cây phát sinh chủng loại của quần thể vi khuẩn lao tại Hà Nội năm 2020 – 2022 (hình 3.1) cho thấy các chủng vi khuẩn lao trong nghiên cứu được chia vào 3 dòng. Trong đó chủng thuộc dòng 2 Beijing chiếm tỷ lệ rất cao 69/82 (84,1%)

và nguy cơ mắc lao kháng đa thuốc, tiền siêu kháng thuốc rất nhất. Đặc biệt trong các chủng dòng 2 Beijing, kháng đơn thuốc có 11/69 (15,9%) chủng, kháng đa thuốc có 47/69 (68,1%) chủng và tiền siêu kháng thuốc có 11/69 (15,9%) chủng. Dòng 1 không có chủng tiền siêu kháng thuốc và dòng 4 không có chủng kháng đơn. Tỷ lệ kháng đa thuốc ở dòng 4 là 7/9 (77,8%) và tiền siêu kháng thuốc là 2/9 (22,2%). Như vậy, xu hướng lây lan kháng đa thuốc và tiền siêu kháng thuốc chủ yếu tập chung vào những chủng dòng 2 và dòng 4. Đây là những chủng có khả năng gây bệnh và lây truyền cao hơn, không bị hạn chế bởi các giới hạn về địa lý [54].

Nghiên cứu của Nguyễn Văn Hưng và cộng sự năm 2011 trên quần thể 1802 chủng *M.tuberculosis* thu được từ điều tra kháng thuốc toàn quốc lần thứ 3 năm 2005, số liệu phân tích cho thấy chủng *M. tuberculosis* dòng 2 Beijing chiếm tỷ lệ 35.1%. Nhóm bệnh nhân lao mới, dòng 2 Beijing kháng thuốc bất kỳ là 43.4% và kháng đa thuốc là 5%. Nhóm bệnh nhân lao đã điều trị, dòng 2 Beijing kháng thuốc bất kỳ là 74% và kháng đa thuốc là 26% [12].

Một trong những lý do là mẫu nghiên cứu thu thập từ các bệnh viện tại thành phố Hà Nội khiến tỷ lệ chủng dòng 2 Beijing khá cao. Chủng này cũng đang được phát hiện nổi lên, chiếm tỷ trọng lớn ở Việt Nam và các nước Châu Á. Đây là nguyên nhân chủ yếu lây nhiễm các chủng lao kháng thuốc tại khu vực này. Nguyễn Thị Vân Anh (2016) cho thấy dòng 2 Beijing phổ biến nhất (55,4%), tiếp theo là dòng 1 EAI (27,6%) và dòng 4 LAM, H, T (9,0%). Tỷ lệ chủng Beijing phân lập ở miền Bắc (70,4 %) và miền Nam (68 %) cao hơn ở miền Trung (28 %) [2].

MTB được lan truyền bởi các làn sóng dân tộc khác nhau trong nhiều thế kỷ. Huang, Shiang-Fen (2012) và Chen, Yih-Yuan (2014) đã nghiên cứu về dịch tễ và đường lây truyền của các dòng *M. tuberculosis* tại Đài Loan, trong đó phổ biến nhất là dòng 2 Beijing (58%), dòng 1 EAI (20%) và dòng 4 Haarlem, LAM, T

(22%). Các nghiên cứu trước đây sử dụng đại thực bào có nguồn gốc từ tế bào đơn nhân của con người đã chứng minh rằng các dòng MTB hiện đại gây ra phản ứng viêm nhẹ trong khi các dòng cổ xưa tạo ra phản ứng mạnh mẽ hơn. Các kết quả này cho thấy rằng phản ứng miễn dịch giảm đối với các dòng Beijing hiện đại, do đó góp phần làm cho bệnh lao mà chúng gây ra tiến triển nhanh hơn cũng như tốc độ lây truyền cao hơn. Nghiên cứu này đã chứng minh rằng các chủng MTB biểu hiện các cấu hình cytokine gây viêm khác nhau, với các chủng dòng 2 Beijing hiện đại có vùng RD150 và RD142 nguyên vẹn tạo ra hàm lượng cytokine gây viêm rất thấp khi so sánh với các dòng Beijing và EAI cổ đại [49, 76] .

Phân bố chủng vi khuẩn lao có mức độ kháng thuốc khác nhau trên cây phát sinh chủng loại. Các chủng kháng thuốc đặc biệt là đa kháng và tiền siêu kháng thuốc có xu hướng tập trung hơn so với chủng nhạy cảm. Có nghĩa là typ phân tử của các chủng này có tính tương đồng cao hơn so với typ phân tử của chủng nhạy cảm. Các phát hiện trên cho thấy vi khuẩn lao đã tiến hóa theo hướng thích nghi với áp lực của thuốc chống lao. Do thuốc chống lao hàng một đã được sử dụng từ rất lâu nên vi khuẩn đã có quá trình chọn lọc lâu dài khiến cho cấu trúc quần thể của vi khuẩn thể hiện sự liên quan mật thiết với khả năng kháng thuốc lao hàng một. Thuốc lao dòng hai mới chỉ được WHO khuyến cáo đưa vào áp dụng từ năm 1998 [84], do vậy ảnh hưởng của thuốc hàng hai tới cấu trúc quần thể vi khuẩn lao nghiên cứu vẫn chưa được thể hiện.

Các chủng có mức độ kháng thuốc càng thấp mức độ đa dạng phân tử càng cao thể hiện ở độ phân tán cao trên cây phân loại. Phân bố phân tử của nhóm kháng đơn thuốc thường ở ở giữa các nhánh trên cây phân loại và phân tán ở một nhánh thuộc dòng 1 (hình 3.1). Phân bố của chủng nhạy cảm là phân bố thể hiện cấu trúc quần thể vi khuẩn lao hoang dại, trong nghiên cứu này chúng tôi không có chủng nhạy cảm nên chỉ xem xét đến sự đa dạng phân tử của nhóm kháng đơn

thuốc so với nhóm đa kháng thuốc và tiền siêu kháng thuốc. Cây phân loại cho thấy độ phân hóa cao của quần thể vi khuẩn lao trong quá trình tiến hóa, dưới tác dụng của thuốc chống lao cấu trúc quần thể ngày càng thay đổi theo xu hướng chọn lọc các chủng lao có khả năng kháng với thuốc chống lao tạo ra quần thể mới kém đa dạng về di truyền nhưng lại vượt trội về khả năng kháng thuốc.

Cấu trúc quần thể vi khuẩn lao thay đổi dưới tác dụng chọn lọc của thuốc chống lao. Vi khuẩn lao tiến hóa không ngừng theo hướng khó đối phó hơn do phát triển tính kháng thuốc dưới áp lực chọn lọc của thuốc. Nếu không có sự thay thế các thuốc chống lao thế hệ cũ bằng các thuốc chống lao mới, thanh toán bệnh lao sẽ rất khó thực hiện được. Do vậy việc liên tục nghiên cứu phát triển các thuốc lao mới để thay thế các thuốc đang sử dụng đóng vai trò quyết định trong kiểm soát bệnh lao.

Những điểm mới và hạn chế của nghiên cứu

Nghiên cứu một số đặc điểm hệ gen của các chủng vi khuẩn lao đa kháng thuốc tại Hà Nội năm 2020 – 2022 với các kết quả cho thấy tỷ lệ bệnh nhân nam mắc lao kháng đa thuốc chiếm 78.0 %, cao hơn nhiều so với nữ là 22.0%. Đồng thời, nhóm bệnh nhân trong độ tuổi lao động từ 18 đến dưới 60 tuổi chiếm 79.0 %. Điều này thể hiện gánh nặng chi phí thảm họa đối với các gia đình khi nhân lực lao động chính mắc lao và điều trị bệnh kéo dài.

Nghiên cứu này cũng đã góp phần triển khai thành công kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới trực tiếp từ mẫu đờm và chủng cây MTB dương tính tại Bệnh viện Phổi Trung ương, đánh dấu bước tiến quan trọng trong việc ứng dụng thành công kỹ thuật chẩn đoán mới chẩn đoán nhanh bệnh nhân lao kháng thuốc trong cộng đồng, giúp đưa ra phác đồ điều trị cá thể một cách hiệu quả.

Các dữ liệu về dịch tễ học phân tử kiểu gen và các đột biến kháng thuốc trong nghiên cứu này góp phần cung cấp thông tin đa dạng di truyền và dịch tễ lây truyền của các chủng vi khuẩn lao lưu hành tại Việt Nam từ năm 2020 – 2022.

Tuy nhiên, hạn chế của nghiên cứu là mới tiến hành với đối tượng được thu thập tại Hà Nội, mà chưa đại diện cho cả nước. Các số liệu thống kê chưa đủ lớn để có ý nghĩa cao hơn. Việc thực hiện nhiều loại xét nghiệm trên một mẫu thu thập ban đầu bị hạn chế về mặt thể tích 4-6 ml nên không đủ lượng mẫu nếu cần làm lại việc tách chiết DNA. Các xét nghiệm giải trình tự gen trong điều kiện hạn chế về sinh phẩm cận hạn sử dụng nên không thể làm lại với các mẫu không đạt chất lượng.

CHƯƠNG V. KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu một số đặc điểm hệ gen của 82 chủng vi khuẩn lao kháng thuốc Rifampicin tại Hà Nội, chúng tôi rút ra một số kết luận như sau:

1. Xác định các gen liên quan đến tính kháng thuốc của vi khuẩn lao phân lập từ bệnh nhân lao kháng Rifampicin tại Bệnh viện Phổi Trung ương và Bệnh viện Phổi Hà Nội từ năm 2020 – 2022.

Tỷ lệ kháng thuốc của các chủng vi khuẩn lao phân lập được cao hơn so với nhiều nghiên cứu khác. Tỷ lệ kháng đơn thuốc là 14,6%, kháng đa thuốc (MDR/RR-TB) là 69,5% trong đó có 2 chủng kháng đơn RR-TB, tiền siêu kháng thuốc là 15,9%.

Phát hiện các đột biến kháng thuốc lao hàng 1 đối với các thuốc INH, RIF, EMB, PZA và SM. Kháng INH do đột biến gen *katG* chiếm tỷ lệ cao nhất là 78,3%, vị trí đột biến tại codon Ser315Thr là 75,0%, gen *fabG1* là 16,3% và *inhA* thấp nhất là 5,4%; Kháng RIF do đột biến trên gen *rpoB* tại vùng hot-spot 81bp chiếm 90,5%; đột biến tại codon Ser531Leu chiếm tỷ lệ cao nhất là 58,1%, codon His526Tyr là 10,8%; Kháng EMB do đột biến gen *embB* vị trí codon Met306Ile chiếm tỷ lệ cao nhất là 38,9%, codon Met306Val là 38,9%; Kháng PZA do đột biến rải rác ở 41 vị trí khác nhau trên gen *pncA*. Kháng SM do đột biến gen *rpsL* chiếm tỷ lệ cao nhất là 67,2% trong đó đột biến tại codon Lys43Arg là 51,6%, gen *gid* là 23,4% và *rrs* thấp nhất là 9,4%; Kháng thuốc MFX do đột biến gen *gyrA* codon Asp94Gly chiếm tỷ lệ cao nhất là 66,7%, codon Ala90Val là 16,7% và codon Asp94Asn là 16,7%. Kháng AMK do đột biến gen *rrs* vị trí codon 1401 thay thế Adenine (A) thành Guanine (G).

2. Mối liên hệ kiểu gen của các chủng vi khuẩn lao phân lập từ bệnh nhân lao kháng Rifampicin bằng kỹ thuật giải trình tự gen.

Vi khuẩn lao phân lập trong giai đoạn 2020 – 2022 tại Hà Nội được chia làm 3 dòng chính. Chiếm tỷ lệ cao nhất là dòng 2 Beijing 84,1%, tiếp theo là dòng 4 LAM, H, T 11,0% và thấp nhất là dòng 1 EAI 4,9% ($p < 0.5$).

Dòng 2 Beijing có tỷ lệ kháng đa thuốc và tiền siêu kháng thuốc cao hơn rõ rệt so với dòng 1 và dòng 4 ($p < 0.5$).

Kháng đơn thuốc ở dòng 1 là 8,3%, dòng 2 là 91,7% và dòng 4 là 0%. Kháng đa thuốc ở dòng 1 là 5,3%, dòng 2 là 82,5% và dòng 4 là 12,3%. Tiền siêu kháng thuốc ở dòng 1 là 0%, dòng 2 là 84,6% và dòng 4 là 15,4%.

KHUYẾN NGHỊ

Từ kết quả nghiên cứu của đề tài, chúng tôi có một số kiến nghị như sau:

1. Kỹ thuật giải trình tự toàn bộ hệ gen phát hiện vi khuẩn lao kháng thuốc nhanh hơn với độ nhạy và độ đặc hiệu cao so với phương pháp truyền thống. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này vẫn còn một số chủng vi khuẩn lao kháng thuốc PZA nhưng không phát hiện đột biến trên gen *pncA* và một số chủng nhạy INH, RIF, MFX nhưng có phát hiện đột biến gen. Vì vậy, cần có thêm những nghiên cứu giải trình tự gen trên cỡ mẫu lớn hơn, đại diện cho toàn quốc để có thể xác định đầy đủ hơn bản chất di truyền của các chủng vi khuẩn lao tại Việt Nam, từ đó đáp ứng được vấn đề quan trọng nhất trong điều trị lao hiện nay là phát hiện nhanh, không bỏ sót để ngăn chặn sự lan truyền các chủng vi khuẩn lao kháng thuốc.
2. Cần tối ưu hóa quy trình giải trình tự gen thế hệ mới trực tiếp từ mẫu đờm và mẫu chủng để nhanh chóng ứng dụng, triển khai kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới tại các phòng xét nghiệm tuyến trung ương, khu vực và tuyến tỉnh nơi có nguy cơ lao kháng thuốc cao. Hỗ trợ chẩn đoán và đưa ra phác đồ điều trị cá thể một cách hiệu quả, giúp CTCLQG đạt được mục tiêu thanh toán bệnh lao vào năm 2035.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Khiếu Thị Thúy Ngọc, Nguyễn Văn Hưng, Đinh Thị Hương, Lê Thị Nam, Vũ Ngọc Trung, Đoàn Thu Hà, Nguyễn Văn Khiêm, Nguyễn Kim Cương, Nguyễn Bình Hòa, Đinh Văn Lượng, Nguyễn Thụy Thương Thương, Timothy M Walker, Guy Thwaites (2023), “Xác định đột biến gen liên quan đến tính kháng thuốc Moxifloxacin của chủng vi khuẩn *Mycobacterium tuberculosis* tại Hà Nội năm 2020 – 2022”, *Tạp chí Y học Dự phòng* – Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương, ISSN: 0868 - 2836, Số 7, tr. 86-94.**
2. **Khiếu Thị Thúy Ngọc, Nguyễn Văn Hưng, Trần Huyền Trang, Đinh Thị Hương, Lê Thị Nam, Vũ Ngọc Trung, Đoàn Thu Hà, Nguyễn Văn Khiêm, Nguyễn Kim Cương, Nguyễn Bình Hòa, Đinh Văn Lượng, Nguyễn Thụy Thương Thương, Timothy M Walker, Guy Thwaites (2023), “Ứng dụng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới trong chẩn đoán lao kháng thuốc trực tiếp từ mẫu đờm tại Bệnh viện Phổi trung ương năm 2020 – 2022”, *Tạp chí Y học Dự phòng* – Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương, ISSN: 0868 - 2836, Số 7, tr. 138-146.**

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tham khảo tiếng Việt

1. Đặng Đức Anh (2001), *Nghiên cứu sự đáp ứng miễn dịch trong một số thể bệnh lao*, Luận án tiến sĩ sinh học, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.
2. Nguyễn Thị Vân Anh (2012), *Dịch tễ học phân tử Lao tại Việt Nam (2003-2009)*, Luận án tiến sĩ sinh học, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.
3. Bộ Y tế (2024), *Quyết định 162/QĐ-BYT 2024 tài liệu Hướng dẫn Chẩn đoán, điều trị và dự phòng bệnh Lao*, Bộ Y Tế, Hà Nội.
4. Bộ Y tế (2023), *Báo cáo tổng kết Chương trình Chống lao Quốc gia năm 2023 và phương hướng hoạt động năm 2024*, Hà Nội.
5. Bộ Y tế (2019), *Hướng dẫn quy trình chuẩn Vi sinh lao*, Hà Nội.
6. Bộ Y tế (2018), *Bệnh lao kháng thuốc gây nguy hại sức khỏe thế nào?*, Hà Nội.
7. Bộ Y tế (2013), *Chuyên ngành kỹ thuật Vi sinh Y Học*, Hà Nội.
8. Lê Huy Chính (2001), "Họ Mycobacteriaceae", *Vi sinh Y học*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
9. Phan Thượng Đạt (2008), "Kết quả điều trị lao phổi đa kháng thuốc bằng phác đồ với các thuốc kháng lao hàng thứ hai tại bệnh viện Phạm Ngọc Thạch", *Tạp chí Y học thành phố Hồ Chí Minh* tập 12 (3), pp. 149-152.
10. Nguyễn Huy Điện (2009), *Nghiên cứu lâm sàng, cận lâm sàng tràn dịch màng phổi do lao có xét nghiệm HIV(+) và kháng thuốc của Mycobacterium tuberculosis*, Luận án tiến sĩ Y học, Đại học Y Hà Nội.
11. 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.
12. Nguyễn Văn Hưng, Khiếu Thị Thúy Ngọc, Đinh Ngọc Sỹ, Nguyễn Thị Ngọc Lan, E.W. Tiemersma, F.G.J. Cobelens, D.van Soolingen (2011), "Sự phân bố của *Mycobacterium tuberculosis* kiểu gen Bắc Kinh và mối liên quan đến tính kháng thuốc lao tại Việt Nam", *Tạp chí Hồ hấp Pháp-Việt* 2, pp. 61-65.
13. Nghiêm Ngọc Minh, Nguyễn Văn Bắc, Vũ Thị Mai, Cung Thị Ngọc Mai, Vũ Thị Thanh, Nguyễn Thái Sơn (2011), "Xác định các đột biến trên gen rpoB

liên quan đến tính kháng Rifampicin của một số chủng vi khuẩn lao thu thập tại miền Bắc Việt Nam", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, pp. 97-102.

14. Mai Văn Tuấn, Phạm Hùng Vân, Hoàng Tiến Mỹ, Nguyễn Thị Nam Liên, Nguyễn Văn Hòa (2015), "Nghiên cứu đột biến gen katG và rpoB của vi khuẩn lao kháng thuốc Isoniazid và Rifampicin tại Bệnh viện TW Huế", *Tạp chí Y học lâm sàng*, pp. 74-82.
15. Nguyễn Thị Thu Thái, Nguyễn Thái Sơn, Đinh Ngọc Sỹ (2014), "Xác định đột biến katG trên chủng vi khuẩn lao kháng Isoniazid", *Tạp chí Y học dự phòng*, (24), pp. 17-21.

Tài liệu tham khảo tiếng Anh

16. Abdelaal, Amina, El-Ghaffar, Hassan Abd, Zaghloul, Mohammad Hosam Eldeen, 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*. 8(4), pp. doi: 10.1186/1476-0711-8-4.
17. Abdelaal, Amina, El-Ghaffar, Hassan Abd, Zaghloul, Mohammad Hosam Eldeen, 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*. 8, pp. 1-8.
18. Abe C., Kobayashi I., Mitarai S., et al. (2008), "Biological and molecular characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates with low-level resistance to isoniazid in Japan. ", *J. Clin. Microbiol.* . 46, pp. 2263-2268.
19. Advanced Biological Laboratories Deepchek-TB RpoB/InhA genotyping assay, accessed, from <https://www.ablsa.com/laboratory-applications/deepchek-hbv-rt-genotyping-dr-assay-2-2/>.
20. Ahmad S. and Mokaddas E. (2004), "Contribution of AGC to ACC and other mutations at codon 315 of the katG gen in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Middle East", *International Journal of Antimicrobial Agents*. 23(5), pp. 473-479.
21. Ajbani, Kanchan, Comas, Iñaki, Coulter, Chris, et al. (2021), "Technical Report on critical concentrations for drug susceptibility testing of isoniazid and the rifamycins (rifampicin, rifabutin and rifapentine)".
22. Al-Darraj, Haider Abdulrazzaq Abed, Razak, Humaira Abd, Ng, Kee Peng, et al. (2013), "The diagnostic performance of a single GeneXpert MTB/RIF

assay in an intensified tuberculosis case finding survey among HIV-infected prisoners in Malaysia", *PLoS One*. 8(9), p. e73717.

23. Almeida Da Silva, Pedro Eduardo and Palomino, Juan Carlos (2011), "Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs", *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 66(7), pp. 1417-1430.
24. Ando, Hiroki, Kondo, Yuji, Suetake, Toshinori, et al. (2010), "Identification of katG mutations associated with high-level isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 54(5), pp. 1793-1799.
25. Ando, Hiroki, Miyoshi, Akiyama, Tohru, Watanabe, Shinya, et al. (2014), "A silent mutation in mabA confers isoniazid resistance on *Mycobacterium tuberculosis*", *Molecular microbiology*. 91(3), pp. 538-547.
26. Andrews, Jason R, Lawn, Stephen D, Rusu, Corina, et al. (2012), "The cost-effectiveness of routine tuberculosis screening with Xpert MTB/RIF prior to initiation of antiretroviral therapy in South Africa: a model-based analysis", *AIDS*. 26(8), p. 987.
27. Andries, Koen, Verhasselt, Peter, Guillemont, Jerome, et al. (2005), "A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*", *Science*. 307(5707), pp. 223-227.
28. Bagcchi, Sanjeet (2023), "WHO's global tuberculosis report 2022", *The Lancet Microbe*. 4(1), p. e20.
29. Bakonyte D., Baranauskaite A., Cicenaitis J., et al. (2003), "Molecular Characterization of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates in Lithuania. ", *Antimicrob Agents Chemother*. 4, pp. 2009-2011
30. Baku, Zofia, Napiorkowska, Agnieszka, Bielecki, Jacek, et al. (2013), "Mutations in the embB gene and their association with ethambutol resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Poland", *BioMed research international*. 2013.
31. Balasingham, Seetha V, Davidsen, Tonje, Szpinda, Irena, et al. (2009), "Molecular diagnostics in tuberculosis: basis and implications for therapy", *Molecular diagnosis & therapy*. 13, pp. 137-151.
32. Barberis, Ilaria, Bragazzi, Nicola Luigi, Galluzzo, Lucia, et al. (2017), "The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus", *Journal of preventive medicine and hygiene*. 58(1), p. E9.
33. Barbier, Maxime and Wirth, Thierry (2016), "The evolutionary history, demography, and spread of the *Mycobacterium tuberculosis* complex", *Microbiology spectrum*. 4(4), pp. 10.1128/microbiolspec.tb2-0008-2016.

34. Barnard, Marinus, Albert, Heidi, Coetzee, Gerrit, et al. (2008), "Rapid molecular screening for multidrug-resistant tuberculosis in a high-volume public health laboratory in South Africa", *American journal of respiratory and critical care medicine*. 177(7), pp. 787-792.
35. Basso, Luiz A and Blanchard, John S (1998), *Resistance to antitubercular drugs*, Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol. 456, 115-144.
36. Bitar, Ibrahim, Papagiannitsis, Costas C, and Antonelli, Alberto (2023), *The use of next-generation sequencing in fighting antimicrobial resistant pathogens*, Vol. 16648714, Frontiers Media SA.
37. Black, PA, De Vos, M, Louw, GE, et al. (2015), "Whole genome sequencing reveals genomic heterogeneity and antibiotic purification in *Mycobacterium tuberculosis* isolates", *BMC genomics*. 16(1), pp. 1-14.
38. Bostanabad, Saeed Zaker, Fatch, Abolfazl, Seyedi, Khaled, et al. (2007), "Frequency and molecular characterization of rifampicin resistance in rpoB region of multiple drug resistance (MDR) isolates from tuberculosis patients in southern endemic region of Iran", *IRANIAN JOURNAL of BIOTECHNOLOGY*. 5(4), pp. 212-218.
39. Bostanabad, Saeed Zaker, Molla Kazemi V., Rahimi M.K., et al. (2009), "Multiple- mutations in the katG gen of *Mycobacterium tuberculosis* isolates correlate with high- level of resistance to isoniazid in patients with active pulmonary tuberculosis from Belarus", *Iranian Journal of Microbiology*. Volume 1 (Number 1 (Spring 2009)), pp. 13- 21.
40. Brennan, Patrick J (2003), "Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*", *Tuberculosis*. 83(1-3), pp. 91-97.
41. Brudey, Karine, Driscoll, Jeffrey R, Rigouts, Leen, et al. (2006), "*Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology", *BMC microbiology*. 6, pp. 1-17.
42. Buu, Tran N, van Soolingen, Dick, Huyen, Mai NT, et al. (2012), "Increased transmission of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains associated with resistance to streptomycin: a population-based study", *PLoS One*.
43. Casali, Nicola, Nikolayevskyy, Vladyslav, Balabanova, Yanina, et al. (2014), "Evolution and transmission of drug-resistant tuberculosis in a Russian population", *Nature genetics*. 46(3), pp. 279-286.
44. Caws, M, Duy, Phan Minh, Tho, Dau Quang, et al. (2006), "Mutations prevalent among rifampin-and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a hospital in Vietnam", *Journal of clinical microbiology*. 44(7), pp. 2333-2337.

45. Caws M., Duy P.M., Tho D.Q., et al. (2006), "Mutations prevalent among rifampin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a hospital in Vietnam. ", *J Clin Microbiol* 44, pp. 2333-2337.
46. Chakravorty, Soumitesh, Simmons, Ann Marie, Rowneki, Mazhgan, et al. (2017), "The new Xpert MTB/RIF Ultra: improving detection of *Mycobacterium tuberculosis* and resistance to rifampin in an assay suitable for point-of-care testing". 8(4), pp. e00812-17.
47. Chegou, Novel N, Hoek, Kim GP, Kriel, Magdalena, et al. (2011), "Tuberculosis assays: past, present and future", *Expert review of anti-infective therapy*. 9(4), pp. 457-469.
48. Chen, Peixin, Sun, Wenwen, and He, Yayi %J Journal of Thoracic Disease (2020), "Comparison of metagenomic next-generation sequencing technology, culture and GeneXpert MTB/RIF assay in the diagnosis of tuberculosis". 12(8), p. 4014.
49. Chen, Yih-Yuan, Chang, Jia-Ru, Huang, Wei-Feng, et al. (2014), "The pattern of cytokine production in vitro induced by ancient and modern Beijing *Mycobacterium tuberculosis* strains", *PLoS One*. 9(4), p. e94296.
50. Cho, Eun Hae, Bae, Hye Kyung, Kang, Seong Ki, et al. (2009), "Detection of Isoniazid and Rifampicin Resistance by Sequencing of katG, inhA, and rpoB Genes in Korea", *Korean J Lab Med* 29, pp. 455-460.
51. Cho, Eun Hae, Bae, Hye Kyung, Kang, Seong Ki, et al. (2009), "Detection of isoniazid and rifampicin resistance by sequencing of katG, inhA, and rpoB gens in Korea", *The Korean journal of laboratory medicine*. 29(5), pp. 455-460.
52. Cole, STea, Brosch, R, Parkhill, J, et al. (1998), "Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence", *Nature*. 393(6707), pp. 537-544.
53. Coll, Francesc, McNERney, Ruth, Preston, Mark D, et al. (2015), "Rapid determination of anti-tuberculosis drug resistance from whole-genome sequences", *Genome Med*. 7(1), pp. 1-10.
54. Coscolla, Mireia and Gagneux, Sebastien (2014), Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*, *Seminars in immunology*, Elsevier, pp. 431-444.
55. Dalton, Tracy, Cegielski, Peter, Akksilp, Somsak, et al. (2012), "Prevalence of and risk factors for resistance to second-line drugs in people with multidrug-resistant tuberculosis in eight countries: a prospective cohort study". 380(9851), pp. 1406-1417.
56. Demirci, Hasan, Murphy IV, Frank V, Murphy, Eileen L, et al. (2014), "Structural analysis of base substitutions in *Thermus thermophilus* 16S rRNA

conferring streptomycin resistance", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 58(8), pp. 4308-4317.

57. Dorman, Susan E, Schumacher, Samuel G, Alland, David, et al. (2018), "Xpert MTB/RIF Ultra for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampicin resistance: a prospective multicentre diagnostic accuracy study". 18(1), pp. 76-84.
58. Eldholm, Vegard, Monteserin, Johana, Rieux, Adrien, et al. (2015), "Four decades of transmission of a multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* outbreak strain", *Nature communications*. 6(1), p. 7119.
59. Gardy, Jennifer L, Johnston, James C, Sui, Shannan J Ho, et al. (2011), "Whole-genome sequencing and social-network analysis of a tuberculosis outbreak", *N Engl J Med*. 364(8), pp. 730-739.
60. Glynn, Judith R, Whiteley, Jennifer, Bifani, Pablo J, et al. (2002), "Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review", *Emerging infectious diseases*. 8(8), p. 843.
61. Gonzalo, Ximena, Casali, Nicola, Broda, Agnieszka, et al. (2015), "Combination of amikacin and doxycycline against multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis", *Int J Antimicrob Agents*. 45(4), pp. 406-412.
62. Green E., Obi L. C., Nchabeleng M., et al. (2008), "Molecular characterisation of resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Dr George Mukhari Hospital, Pretoria, South Africa", *South Afr J Epidemiol Infect* 23(3), pp. 11-14.
63. Guo, Hongling, Seet, Qihui, Denkin, Steven, et al. (2006), "Molecular characterization of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from the USA", *Journal of medical microbiology*. 55(11), pp. 1527-1531.
64. Guo, Jian-Hua, Xiang, Wen-Liang, Zhao, Qing-Rong, et al. (2008), "Molecular characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Sichuan Province in China", *Japanese journal of infectious diseases*. 61(4), pp. 264-268.
65. Guo, Qinglong, Bi, Jing, Lin, Qiao, et al. (2022), "Whole genome sequencing identifies novel mutations associated with bedaquiline resistance in *Mycobacterium tuberculosis*", *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 12, p. 807095.
66. Gygli, Sebastian M, Keller, Peter M, Ballif, Marie, et al. (2019), "Whole-genome sequencing for drug resistance profile prediction in *Mycobacterium tuberculosis*", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 63(4), pp. 10.1128/aac.02175-18.

67. Heep M., Brandstatter B., Rieger U., et al. (2001), "Frequency of *rpoB* mutations Inside and Outside the Cluster I Region in Rifampin-Resistant Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates", *J Clin Microbiol.* 39(1), pp. 107-110.
68. Helb, Danica, Jones, Martin, Story, Elizabeth, et al. (2010), "Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology". 48(1), pp. 229-237.
69. Heym, Beate, Alzari, Pedro M, Honore, Nadine, et al. (1995), "Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, *katG*, are associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*", *Mol. Microbiol.* 15(2), pp. 235-245.
70. Hijikata, Minako, Keicho, Naoto, Duc, Le Van, et al. (2017), "Spoligotyping and whole-genome sequencing analysis of lineage 1 strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Da Nang, Vietnam", *PLoS One.* 12(10), p. e0186800.
71. Hillemann D., Weizenegger M., Kubica T., et al. (2005), "Use of the genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates ", *J Clin Microbiol.* 43(8), pp. 3699-3703.
72. Hoa, Nguyen Binh, Sy, Dinh Ngoc, Nhung, Nguyen Viet, et al. (2010), "National survey of tuberculosis prevalence in Viet Nam", *Bulletin of the World Health Organization.* 88, pp. 273-280.
73. Hoang, H. T., Ishizaki, A., Nguyen, C. H., et al. (2013), "Infection with high-risk HPV types among female sex workers in northern Vietnam", *J Med Virol.* 85(2), pp. 288-94.
74. Horne, David J, Kohli, Mikashmi, Zifodya, Jerry S, et al. (2019), "Xpert MTB/RIF and Xpert MTB/RIF Ultra for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults", *The Cochrane database of systematic reviews.* 2019(6).
75. Hu, Yi, Hoffner, Sven, Jiang, Weili, et al. (2010), "Extensive transmission of isoniazid-resistant *M. tuberculosis* and its association with increased multidrug-resistant TB in two rural counties of eastern China: a molecular epidemiological study", *BMC Infectious Diseases.* 10, pp. 1-8.
76. Huang, Shiang-Fen, Su, Wei-Juin, Dou, Horng-Yunn, et al. (2012), "Association of *Mycobacterium tuberculosis* genotypes and clinical and epidemiological features" – a multi-center study in Taiwan", *Infection, Genetics and Evolution.* 12(1), pp. 28-37.
77. Huong, Nguyen T, Lan, Nguyen TN, Cobelens, Frank GJ, et al. (2006), "Antituberculosis drug resistance in the south of Vietnam: prevalence and trends", *The Journal of infectious diseases.* 194(9), pp. 1226-1232.

78. Huyen, Mai NT, Buu, Tran N, Tiemersma, Edine, et al. (2013), "Tuberculosis relapse in Vietnam is significantly associated with *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype infections", *The Journal of Infectious Diseases*. 207(10), pp. 1516-1524.
79. Huyen, Mai NT, Kremer, Kristin, Lan, Nguyen TN, et al. (2012), "Mixed tuberculosis infections in rural South Vietnam". 50(5), pp. 1586-1592.
80. Huyen, Mai NT, Tiemersma, Edine W, Lan, Nguyen TN, et al. (2010), "Validation of the GenoType® MTBDRplus assay for diagnosis of multidrug resistant tuberculosis in South Vietnam", *BMC Infectious Diseases* 2010, . 10:149.
81. Iem, Vibol, Somphavong, Silaphet, Buisson, Yves, et al. (2013), "Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to antibiotics in Lao PDR: first multicentric study conducted in 3 hospitals", *BMC Infectious Diseases*. 13, pp. 1-7.
82. Initiative, Global Laboratory (2017), Planning for country transition to Xpert MTB/RIF Ultra cartridges, Editor^Editors, Geneva.
83. Ioerger, Thomas R, O'Malley, Theresa, Liao, Reiling, et al. (2013), "Identification of new drug targets and resistance mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*", *PLoS One*. 8(9), p. e75245.
84. Iseman, Michael D (1998), "MDR-TB and the developing worldâ€”a problem no longer to be ignored: the WHO announces â€˜DOTS Plusâ€™™ strategy", *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2(11), pp. 867-867.
85. Isfahani B.N., Tavakoli A., Salehi M., et al. (2006), "Detection of rifampin resistance patterns in *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Iran by polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism and direct sequencing methods", *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 101(6), pp. 597-602.
86. Jagielski, Tomasz, Grzeszczuk, Magdalena, Kamiński, Michał, et al. (2013), "Identification and analysis of mutations in the katG gene in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates", *Advances in Respiratory Medicine*. 81(4), pp. 298-307.
87. Jagielski, Tomasz, Grzeszczuk, Magdalena, Kamiński, Michał, et al. (2013), "Identification and analysis of mutations in the katG gene in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates", *Pneumonol. Alergol. Pol.* . 81, pp. 298-307
88. Jindani, Amina, Harrison, Thomas S, Nunn, Andrew J, et al. (2014), "High-dose rifapentine with moxifloxacin for pulmonary tuberculosis", *New England Journal of Medicine*. 371(17), pp. 1599-1608.

89. Johnson, Justin, Alahi, Alexandre, and Fei-Fei, Li (2016), Perceptual losses for real-time style transfer and super-resolution, *European conference on computer vision*, Springer, pp. 694-711.
90. Johnson, Rabia, Streicher, Elizabeth M, Louw, Gail E, et al. (2006), "Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*", *Current issues in molecular biology*. 8(2), pp. 97-112.
91. Johnson, Rabia, Streicher, Elizabeth M., Louw, Gail E., et al. (2006), "Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*", *Curr. Issues Mol. Biol.* . 8, pp. 97–112.
92. Kadura, Suha, King, Nicholas, Nakhoul, Maria, et al. (2020), "Systematic review of mutations associated with resistance to the new and repurposed *Mycobacterium tuberculosis* drugs bedaquiline, clofazimine, linezolid, delamanid and pretomanid", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 75(8), pp. 2031-2043.
93. Katoch, VM (2004), "Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM)", *Indian Journal of Medical Research*. 120, pp. 290-304.
94. Khadka D.K., Eampokalap B., Panitchakorn J., et al. (2007), "Multiple mutations in *katG* and *inhA* identified in Thai isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates.", *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. . 38(2), pp. 376-382.
95. Khadka, JB, Maharjan, B, and Ghimire, P (2013), "Early diagnosis of MDR-TB cases directly on sputum specimens by rapid molecular method", *Int J Microbiol Res Rev*. 1, pp. 92-96.
96. Khan, Sadiq Noor, Niemann, Stefan, Gulfraz, Muhammad, et al. (2013), "Molecular Characterization of Multidrug-Resistant Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Patients in Punjab, Pakistan", *Pakistan J. Zool*. 45(1), pp. 93-100.
97. Khan, Sadiq Noor, Niemann, Stefan, Gulfraz, Muhammad, et al. (2013), "Molecular characterization of multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from patients in Punjab, Pakistan", *Pakistan journal of zoology*. 45(1).
98. Kim B. J., Lee K. H., Park B. N., et al. (2001), "Detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in sputa by nested PCR-linked single-strand conformation polymorphism and DNA sequencing. ", *J Clin Microbiol*. 39, pp. 2610-2617.
99. Kolyva, Anastasia S and Karakousis, PC (2012), *Old and new TB drugs: mechanisms of action and resistance.* , Vol. ISBN: 978-953-307-948-6, InTech Understanding tuberculosis-new approaches to fighting against drug resistance

100. Kombe Kombe, A. J., Li, B., Zahid, A., et al. (2020), "Epidemiology and Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases, Molecular Pathogenesis, and Vaccine Evaluation", *Front Public Health*. 8, p. 552028.
101. Kozhamkulov, Ulan, Akhmetova, Ainur, Rakhimova, Saule, et al. (2011), "Molecular Characterization of Rifampicin- and Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated in Kazakhstan", *Jpn. J. Infect. Dis.* 64, pp. 253-255
102. LÃ³pez Ã•valos, Gladys Guadalupe and Prado Montes de Oca, Ernesto (2012), "Classic and new diagnostic approaches to childhood tuberculosis", *Journal of Tropical Medicine*. 2012.
103. Lavender, Caroline, Globan, Maria, Sievers, Aina, et al. (2005), "Molecular Characterization of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Collected in Australia", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49(10), pp. 4068-4074.
104. Leão, Sylvia Cardoso, Ritacco, Viviana, and Palomino, Juan Carlos (2007), *Tuberculosis 2007: From basic science to patient care*, Vol. 1st edition, Bernd Sebastian Kamps.
105. Lee A. S. G., Lim I. H. K., Tang L. L. H., et al. (1999), "Contribution of kasA analysis to detection of isoniazid resistant M.tuberculosis in Singapore. ", *Antimicrob Agents Chemother* 43, p. 2087.
106. Lee, Hye Young, Myoung, Han Jung, Bang, Hye Eun, et al. (2002), "Mutations in the embB locus among Korean clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to ethambutol", *Yonsei medical journal*. 43(1), pp. 59-64.
107. Leung, Kenneth Siu-Sing, Tam, Kingsley King-Gee, Ng, Timothy Ting-Leung, et al. (2022), "Clinical utility of target amplicon sequencing test for rapid diagnosis of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* from respiratory specimens", *Frontiers in Microbiology*. 13, p. 974428.
108. Lingala M. A. L., Srikantam P., Suman J., et al. (2010), "Clinical and geographical profiles of rpoB gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Hyderabad and Koraput in India", *Journal of Microbiology and Antimicrobials*. 2(2), pp. 13-18.
109. Liu, Yi, Zhang, Xuxia, Zhang, Yuqing, et al. (2018), "Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains in Beijing, China: drug susceptibility phenotypes and Beijing genotype family transmission", *BMC infectious diseases*. 18, pp. 1-10.
110. Lorena Cristina, Santos (2012), "the molecular basis of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*", *Open Journal of Medical Microbiology*. 2012.

111. Luo, Tao, Zhao, Ming, Li, Xia, et al. (2010), "Selection of Mutations To Detect Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains in Shanghai, China", antimicrobial agents and chemotherapy . 54(3), pp. 1075-1081.
112. MacLean, Emily Lai-Ho, Miotto, Paolo, González Angulo, Lice, et al. (2023), "Updating the WHO target product profile for next-generation *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility testing at peripheral centres", *PLOS Global Public Health*. 3(3), p. e0001754.
113. Maitra, Arundhati, Munshi, Tulika, Healy, Jess, et al. (2019), "Cell wall peptidoglycan in *Mycobacterium tuberculosis*: An Achilles' heel for the TB-causing pathogen", *FEMS Microbiology Reviews*. 43(5), pp. 548-575.
114. Merker, Matthias, Blin, Camille, Mona, Stefano, et al. (2015), "Evolutionary history and global spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage", *Nature genetics*. 47(3), pp. 242-249.
115. Merker, Matthias, Blin, Camille, Mona, Stefano, et al. (2015), "Evolutionary history and global spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage", *Nature genetics*. 47(3), pp. 242-249.
116. Merker, Matthias, Kohl, Thomas A, Barilar, Ivan, et al. (2020), "Phylogenetically informative mutations in genes implicated in antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex", *Genome Medicine*. 12(1), pp. 1-8.
117. Merker, Matthias, Kohl, Thomas A, Roetzer, Andreas, et al. (2013), "Whole genome sequencing reveals complex evolution patterns of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains in patients", *PLOS One*. 8(12), p. e82551.
118. Mikhecheva, Natalya E, Zaychikova, Marina V, Melerzanov, Alexander V, et al. (2017), "A nonsynonymous SNP catalog of *Mycobacterium tuberculosis* virulence genes and its use for detecting new potentially virulent sublineages", *Genome Bio Evol*. 9(4), pp. 887-899.
119. Miotto, Paolo, Tessema, Belay, Tagliani, Elisa, et al. (2017), "A standardised method for interpreting the association between mutations and phenotypic drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*", *European Respiratory Journal*. 50(6).
120. Moaddab, Seed Reza, Farajnia, Safar, Kardan, Davood, et al. (2011), "Isoniazid MIC and KatG gene mutations among *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Northwest of Iran", *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 14(6), p. 540.
121. Mokrousov I., Narvskaya O., Otten T., et al. (2002), "High prevalence of KatG Ser315Thr substitution among isoniazid-resistant *Mycobacterium*

tuberculosis clinical isolates from northwestern Russia, 1996 to 2001.", *Antimicrob. Agents Chemother.* . 46, pp. 1417-1424.

122. Monkongdee, Patama, McCarthy, Kimberly D, Cain, Kevin P, et al. (2009), "Yield of acid-fast smear and mycobacterial culture for tuberculosis diagnosis in people with human immunodeficiency virus", *Am J Respir Crit Care Med.* 180(9), pp. 903-908.
123. Muller, Borna, Borrell, Sonia, Rose, Graham, et al. (2013), "The heterogeneous evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*", *Trends in Genetics.* 29(3), pp. 160-169.
124. Musser, James M (1995), "Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights", *Clin Microbiol* 8(4), pp. 496-514.
125. Mvelase, Nomonde Ritta, Singh, Ravesh, Swe Swe-Han, Khine, et al. (2022), "Pyrazinamide resistance in rifampicin discordant tuberculosis", *Plos one.* 17(9), p. e0274688.
126. Ned-Sykes, Renée, Johnson, Catherine, Ridderhof, John C, et al. (2015), "Competency guidelines for public health laboratory professionals: CDC and the Association of Public Health Laboratories".
127. Nguyen, Huy Quang, Nguyen, Nhung Viet, Contamin, Lucie, et al. (2017), "Quadruple-first line drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Vietnam: What can we learn from genes?", *J Infection, Genetics Evolution.* 50, pp. 55-61.
128. Nguyen, Van Anh Thi, Bañuls, Anne-Laure, Tran, Thanh Hoa Thi, et al. (2016), "*Mycobacterium tuberculosis* lineages and anti-tuberculosis drug resistance in reference hospitals across Viet Nam". 16, pp. 1-9.
129. Nhu, Nguyen Thi Quynh, Ha, Dang Thi Minh, Anh, Nguyen Duc, et al. (2013), "Evaluation of Xpert MTB/RIF and MODS assay for the diagnosis of pediatric tuberculosis", *BMC infectious diseases.* 13, pp. 1-9.
130. Nimmo, Camus, Doyle, Ronan, Burgess, Carrie, et al. (2017), "Rapid identification of a *Mycobacterium tuberculosis* full genetic drug resistance profile through whole genome sequencing directly from sputum", *Int J Infect Dis.* 62, pp. 44-46.
131. Niobe-Eyangoh, Sara Ngo, Kuaban, Christopher, Sorlin, Philippe, et al. (2003), "Genetic biodiversity of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains from patients with pulmonary tuberculosis in Cameroon", *Journal of clinical microbiology.* 41(6), pp. 2547-2553.
132. Okamoto, Susumu, Tamaru, Aki, Nakajima, Chie, et al. (2007), "Loss of a conserved 7- ϵ -methylguanosine modification in 16S rRNA confers low- ϵ -level streptomycin resistance in bacteria", *Molecular microbiology.* 63(4), pp. 1096-1106.

133. Organization, World Health (2022), *WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 4: treatment-drug-resistant tuberculosis treatment, 2022 update*, World Health Organization.
134. Organization, World Health (2021), "Target product profile for next-generation drug-susceptibility testing at peripheral centres", *Target product profile for next-generation drug-susceptibility testing at peripheral centres*.
135. Organization, World Health (2021), "WHO announces updated definitions of extensively drug-resistant tuberculosis", *WHO: Geneva, Switzerland*.
136. Organization, World Health (2021), *WHO consolidated guidelines on tuberculosis: module 2: screening: systematic screening for tuberculosis disease*, World Health Organization.
137. Organization, World Health (2018), "Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis".
138. Organization, World Health (2017), *WHO meeting report of a technical expert consultation: non-inferiority analysis of Xpert MTB/RIF Ultra compared to Xpert MTB/RIF*, World Health Organization.
139. Organization, World Health (2014), *Xpert MTB/RIF implementation manual: technical and operational 'how-to'; practical considerations*, World Health Organization.
140. Organization, World Health (2011), *Rapid implementation of the Xpert MTB/RIF diagnostic test: technical and operational 'How-to'; practical considerations*.
141. Organization, World Health (2008), *Anti-tuberculosis drug resistance in the world: fourth global report: the world health organization/international union against tuberculosis and lung disease (who/union) global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance, 2002-2007*, World Health Organization.
142. Pai, Madhukar and Schito, Marco %J The Journal of infectious diseases (2015), "Tuberculosis diagnostics in 2015: landscape, priorities, needs, and prospects". 211(suppl_2), pp. S21-S28.
143. Palomino J. C., Leão S.C., and Ritacco V. (2007), *Tuberculosis 2007: From basic science to patient care*, Vol. First Edition, WWW.TuberculosisTextbook.com
144. Palomino, Juan Carlos and Ritacco, Tuberculosis (2007), "From basic science to patient care", *Tuberculosis textbook. com, Brasil*.
145. Papaventsis, D, Casali, N, Kontsevaya, I, et al. (2017), "Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* for detection of drug resistance: a systematic review", *Clinical Microbiology Infection*. 23(2), pp. 61-68.

146. Parsons, Linda M., Somoskoš, A' kos, Gutierrez, Cristina, et al. (2011), "Laboratory Diagnosis of Tuberculosis in Resource-Poor Countries: Challenges and Opportunities", *clinical microbiology review* . 24(2), pp. 314–350
147. Perdigão, J, Macedo, R, Silva, C, et al. (2011), "Tuberculosis drug-resistance in Lisbon, Portugal: a 6-year overview", *Clinical microbiology and infection*. 17(9), pp. 1397-1402.
148. Poudel, Ajay, Nakajima, Chie, Fukushima, Yukari, et al. (2012), "Molecular characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Nepal", *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 56(6), pp. 2831-2836.
149. Quagliaro, Pauline, Dziri, Samira, El Alaoui, Fatma Magdoud, et al. (2023), "Performances of bioinformatics tools for the analysis of sequencing data of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains", *Tuberculosis*. 139, p. 102324.
150. Ramaswamy, S and Musser, James M (1998), "Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update", *Tubercle and Lung Disease: The Official Journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*. 79(1), pp. 3-29.
151. Ramaswamy S. and Musser J. M. (1998), "Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update", *Tubercle and Lung Disease* 79(1), pp. 3-29.
152. Ramaswamy S.V., Reich R., Dou S.J., et al. (2003), "Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. ", *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, pp. 1241-1250.
153. Rindi L., Bianchi L., Tortoli E., et al. (2005), "Mutations responsible for *Mycobacterium tuberculosis* isoniazid resistance in Italy", *int j tuberc lung dis* 9(1), pp. 94-97.
154. Sajduda A., Brzostek A., awska M., et al. (2004), "Molecular characterisation of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Poland", *J Clin Microbiol* 42, pp. 2425-2431.
155. Satta, Giovanni, Lipman, M, Smith, GP, et al. (2018), "*Mycobacterium tuberculosis* and whole-genome sequencing: how close are we to unleashing its full potential?", *Clin Microbiol Infect*. 24(6), pp. 604-609.
156. Sekiguchi, Jun-ichiro, Miyoshi-Akiyama, Tohru, Augustynowicz-Kopec, Ewa, et al. (2007), "Detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*", *Journal of clinical microbiology*. 45(1), pp. 179-192.
157. Sengstake S and Rigouts L (2020), *A multicenter evaluation of the Genoscholar PZA-TB II line probe assay to detect pyrazinamide resistance in*

Mycobacterium tuberculosis isolates: study report, Institute of Tropical Medicine, Antwerp.

158. Shanmugam, Siva Kumar, Kumar, Narender, Sembulingam, Tamilzhalagan, et al. (2022), "*Mycobacterium tuberculosis* lineages associated with mutations and drug resistance in isolates from India", *Microbiology Spectrum*. 10(3), pp. e01594-21.
159. Sharma, Soniya and Madan, Molly (2014), "Detection of Mutations in rpoB Gene of Clinically Isolated M. tuberculosis by DNA Sequencing", *J Mycobac Dis* 4: 156. doi:10.4172/2161-1068.1000156.
160. Sheng J., Li J., Sheng G., et al. (2008), "Characterization of rpoB mutations associated with rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* from eastern China ", *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03815.x, pp. 904-911.
161. Shi, Dawei, Li, Liang, Zhao, Yuling, et al. (2011), "Characteristics of embB mutations in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Henan, China", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 66(10), pp. 2240-2247.
162. Silva, Pedro Eduardo Almeida Da and Palomino, Juan Carlos (2011), "Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs", *J Antimicrob Chemother*. doi:10.1093/jac/dkr173.
163. Siqueira, Helio Ribeiro de, Freitas, Flávia Alvim Dutra de, Oliveira, Denise Neves de, et al. (2009), "Isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains arising from mutations in two different regions of the katG gene", *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 35, pp. 773-779.
164. Siqueira, Helio Ribeiro de, Freitas, Flávia Alvim Dutra de, Oliveira, Denise Neves de, et al. (2009), "Isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains arising from mutations in two different regions of the katG gene", *J Bras Pneumol*. . 35(8), pp. 773-779.
165. Slatko, B. E., Gardner, A. F., and Ausubel, F. M. (2018), "Overview of Next-Generation Sequencing Technologies", *Curr Protoc Mol Biol*. 122(1), p. e59.
166. Slayden, Richard A and Barry III, Clifton E (2000), "The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*", *Microbes. Infect*. 2(6), pp. 659-669.
167. Sreevatsan, Srinand, Pan, XI, Stockbauer, Kathryn E, et al. (1997), "Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94(18), pp. 9869-9874.

168. Steingart, Karen R, Ng, Vivienne, Henry, Megan, et al. (2006), "Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review", *The Lancet infectious diseases*. 6(10), pp. 664-674.
169. Stephen, Stephen, Muzhizhizhi, Donhodzo, Dhibi, Nicholas, et al. (2019), "Validation of the GenoType® MTBDRplus Ver 2.0 assay for detection of rifampicin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates at UZCHS-CTRC TB research laboratory", *The International Journal of Mycobacteriology*. 8(1), pp. 83-88.
170. Sun, Wenwen, Gui, Xuwei, Wu, Zheyuan, et al. (2022), "Prediction of drug resistance profile of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-MTB) isolates from newly diagnosed case by whole genome sequencing (WGS): a study from a high tuberculosis burden country", *BMC Infectious Diseases*. 22(1), pp. 1-10.
171. Suresh, Naga, Singh, Urvashi Balbir, Gupta, Chhavi, et al. (2007), "Rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* directly from stained sputum smears using single-tube nested polymerase chain reaction deoxyribonucleic acid sequencing", *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 58(2), pp. 217-222.
172. Takayama, Kuni and Kilburn, James O (1989), "Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 33(9), pp. 1493-1499.
173. Tracevska, T, Jansone, I, Broka, L, et al. (2002), "Mutations in the rpoB and katG genes leading to drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Latvia", *Journal of clinical microbiology*. 40(10), pp. 3789-3792.
174. TracevskaT., Jansone I., Broka L., et al. (2002), "Mutations in the rpoB and katG Genes Leading to Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Latvia.", *Journal of Clinical Microbiology*. 40(10), pp. 3789-3792.
175. Tran, L. T., Tran, L. T., Bui, T. C., et al. (2015), "Risk factors for high-risk and multi-type Human Papillomavirus infections among women in Ho Chi Minh City, Vietnam: a cross-sectional study", *BMC Womens Health*. 15, p. 16.
176. Unissa A. N., Selvakumar N., Narayanan S., et al. (2015), "Investigation of Ser315 Substitutions within katG Gene in Isoniazid-Resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from South India", *BioMed Research International*. Volume 2015, Article ID 257983, 5 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/257983>.
177. Valvatne, Ha°vard, Syre, Heidi, Kross, Martijn, et al. (2009), "Isoniazid and rifampicin resistance-associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Yangon, Myanmar: implications for rapid molecular testing", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 64, pp. 694-701.

178. Van Soolingen D., de Hass P.E., van Doorn H.R., et al. (2000), "Mutations at amino acid position 315 of the *katG* Gene are Associated with High-level Resistance to isoniazid, Other Drug resistance, and successful transmission *Mycobacterium tuberculosis* in the Netherlands. ", *J Infect Dis* 182, pp. 1788-1790.
179. Varela G., Gonzalez S., Gadea P., et al. (2008), "Prevalance and dissemination of the Ser315Thr substitution within the *katG* enzyme in isoniazid- resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Uruguay. ", *Journal of Medical Microbiology* 57, pp. 1518-1522.
180. Viksna, Anda, Sadovska, Darja, Berge, Iveta, et al. (2023), "Genotypic and phenotypic comparison of drug resistance profiles of clinical multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates using whole genome sequencing in Latvia", *BMC Infectious Diseases*. 23(1), p. 638.
181. Vilch  ze, Catherine and Jacobs Jr, William R (2014), "Resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*: genes, mutations, and causalities", *Molecular genetics of Mycobacteria*, pp. 431-453.
182. Viveiros, Miguel, Leandro, Clara, Rodrigues, Liliana, et al. (2005), "Direct application of the INNO-LiPA Rif. TB line-probe assay for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains and detection of rifampin resistance in 360 smear-positive respiratory specimens from an area of high incidence of multidrug-resistant tuberculosis", *Journal of Clinical Microbiology*. 43(9), pp. 4880-4884.
183. Walker, Timothy M, Kohl, Thomas A, Omar, Shaheed V, et al. (2015), "Whole-genome sequencing for prediction of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility and resistance: a retrospective cohort study", *Lancet Infect Dis*. . 15(10), pp. 1193-1202.
184. Walker, Timothy M, Miotto, Paolo, K  ser, Claudio U, et al. (2022), "The 2021 WHO catalogue of *Mycobacterium tuberculosis* complex mutations associated with drug resistance: a genotypic analysis", *The Lancet Microbe*. 3(4), pp. e265-e273.
185. Weyer, Karin, Mirzayev, Fuad, Migliori, Giovanni Battista, et al. (2013), "Rapid molecular TB diagnosis: evidence, policy making and global implementation of Xpert MTB/RIF", *European Respiratory Journal*. 42(1), pp. 252-271.
186. World Health Organization (2023), *WHO's global tuberculosis report 2023*, Geneva.
187. World Health Organization (2023), *Catalogue of mutations in Mycobacterium tuberculosis complex and their association with drug resistance, second edition*, Geneva.

188. World Health Organization (2021), *WHO consolidated guidelines on tuberculosis Module 3: diagnosis – rapid diagnostics for tuberculosis detection*, Geneva.
189. World Health Organization (2021), *Catalogue of mutations in Mycobacterium tuberculosis complex and their association with drug resistance*, Geneva.
190. World Health Organization (2021), *Public announcement to TB in vitro diagnostics manufacturers*, World Health Organization, Geneva.
191. World Health Organization (2020), *WHO consolidated guidelines on tuberculosis Module 4: treatment – drug-resistant tuberculosis treatment*, Geneva.
192. World Health Organization (2016), *Report of the 16th meeting of the Strategic and Technical Advisory Group for Tuberculosis*, Geneva.
193. World Health Organization (2014), *Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis*, Geneva.
194. World Health Organization (2013), *Definitions and reporting framework for tuberculosis – 2013 revision (updated December 2014)* (WHO/HTM/TB/2013.2), Editor^Editors, Geneva.
195. World Health Organization (2013), *Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB*, Geneva.
196. World, World Health Organization (2013), *Global Tuberculosis Report 2013*, WHO report 2013.
197. World, World Health Organization (2010), *Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response*, Editor^Editors, WHO/HTM/TB/2010.3.
198. Wu, Sheng-Han, Xiao, Yu-Xin, Hsiao, Hseuh-Chien, et al. (2022), "Development and Assessment of a Novel Whole-Gene-Based Targeted Next-Generation Sequencing Assay for Detecting the Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to 14 Drugs", *Microbiology Spectrum*. 10(6), pp. e02605-22.
199. Yang, Song, Zhong, Min, Zhang, Yaoting, et al. (2011), "Rapid detection of rpoB and katG genes from the sputum of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction (PCR)-direct sequencing analysis", *Afr J Microbiol Res*. 5(26), pp. 4519-4523.
200. Yang, Zhenhua, Durmaz, Riza, Yang, Dong, et al. (2005), "Simultaneous detection of isoniazid, rifampin, and ethambutol resistance of *Mycobacterium*

tuberculosis by a single multiplex allele-specific polymerase chain reaction (PCR) assay", *Diagn Microbiol Infect Dis.* 53(3), pp. 201-208.

201. Zaczek, Anna, Brzostek, Anna, Augustynowicz-Kopec, Ewa, et al. (2009), "Genetic evaluation of relationship between mutations in *rpoB* and resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampin.", *BMC Microbiology* 9:10 doi:10.1186/1471-2180-9-10.
202. Zeineldin, Mohamed, Camp, Patrick, Farrell, David, et al. (2023), "Whole genome sequencing of *Mycobacterium bovis* directly from clinical tissue samples without culture", *Frontiers in Microbiology.* 14, p. 1141651.
203. Zhang, Min, Yue, Jun, Yang, Yan-ping, et al. (2005), "Detection of Mutations Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from China", *Journal of Clinical Microbiology.* 43(11), pp. 5477-5482.
204. Zhang, Y and Yew, WW (2015), "Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: update 2015", *Int J Tuberc Lung Dis.* 19(11), pp. 1276-1289.
205. Zhang Y. and Yew W. W. (2009), "Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*", *Int J Tuberc Lung Dis* 13(11), pp. 1320–1330.
206. Zhang, Ying and Mitchison, D (2003), "The curious characteristics of pyrazinamide: a review", *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease.* 7(1), pp. 6-21.
207. Zhao X., Yu H., Yu S., et al. (2006), "Hydrogen peroxide-mediated isoniazid activation catalyzed by *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG) and its S315T mutant. ", *Biochemistry.* 45, pp. 4131-4140.
208. Zhou, Aiping, Nawaz, Muhammad, Duan, Yan, et al. (2011), "Molecular Characterization of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Xi'an, China", *Microb Drug Resist.* . 17(2), pp. 275-281. DOI: 10.1089/mdr.2010.0135

PHỤ LỤC

PHỤ LỤC 1: PHIẾU THU THẬP THÔNG TIN NGƯỜI BỆNH

I. THÔNG TIN HÀNH CHÍNH

1. Họ và tên:.....
2. Mã nghiên cứu:
3. Mã bệnh nhân:
4. Ngày tháng năm sinh: Số điện thoại
5. Giới tính:
 - Nam ☐
 - Nữ ☐
 - Khác ☐
 - Không biết ☐
6. Dân tộc: Kinh ☐
Khác ☐
7. Quốc tịch:
8. Nghề nghiệp:
 - Cán bộ nhân viên ☐
 - Giáo viên ☐
 - Bán hàng tại chợ ☐
 - Công nhân nhà máy ☐
 - Nông dân ☐
 - Ngư dân ☐
 - Xe ôm ☐
 - Bộ đội ☐
 - Cảnh sát ☐
 - Ngành khách sạn (quán bar, khách sạn, nhà hàng) ☐
 - Ngành y tế (bác sỹ, y tá) ☐
 - Học sinh/Sinh viên ☐
 - Nội trợ ☐
 - Nghỉ hưu ☐
 - Lái xe oto ☐

- Lau dọn ☐
- Thất nghiệp ☐
- Tàn tật không có việc làm ☐
- Tự làm chủ (doanh nghiệp tư nhân) ☐
- Khác (Ghi rõ):.....
- Địa chỉ nơi làm việc

9. Địa chỉ nơi bạn thường ở nhất trong cả ngày

- Địa chỉ 1:
Giờ/tuần:...../.....
- Địa chỉ 2:
Giờ/tuần:...../.....
- Địa chỉ 3:
Giờ/tuần:...../.....

10. Địa chỉ:

Nơi sinh của bố:

Nơi sinh của mẹ:

Ngày/tháng/năm bố mẹ bạn chuyển sang Thành phố Hồ Chí Minh:

11. Trình độ học vấn

- Mù chữ ☐
- Tiểu học ☐
- Trung học cơ sở ☐
- Trung học phổ thông ☐
- Trung cấp/ học nghề ☐
- Cao đẳng/Đại học ☐
- Sau đại học ☐

12. Tình trạng hôn nhân

- Độc thân ☐
- Ly hôn/ly thân ☐
- Kết hôn/Sống thử ☐
- Khác:.....(ghi rõ)

13. Sử dụng BHYT:

- Có ☐

- Không ☐

Số người tiếp xúc gần:

Gia đình bạn có bao nhiêu người >18t: Và trẻ em /tổng số thành viên trong gia đình.....

Số tuổi của từng trẻ em: Số con:

Bao nhiêu người ngủ cùng giường với BN:người lớn,trẻ em

II. THÔNG TIN SỨC KHỎE

1. Lý do vào viện:

.....

Quá trình bệnh lý:

.....

Tình trạng mang thai: Có ☐ Không ☐ Không rõ ☐

2. Tiền sử bệnh

2.1. Bệnh lao

Đã từng điều trị lao: Có ☐ Không ☐ → Chuyển sang câu 3.4

Số lần điều trị lao:.....

2.2. Phác đồ đã điều trị đợt gần đây nhất:

Lao nhạy cảm ☐ Lao kháng thuốc ☐ Lao đa kháng thuốc ☐

Ghi rõ phác đồ điều trị:.....

Sử dụng thuốc tiêm Có ☐ Không ☐

Ngày bắt đầu điều trị:...../...../.....

Ngày kết thúc điều trị:/.../.....

2.3. Kết quả điều trị lao đợt gần đây nhất:

Khỏi ☐ HTĐT ☐ Thất bại ☐ Bỏ trị ☐ Không theo dõi ☐

Lao nhạy cảm ☐ Lao kháng thuốc ☐ Lao đa kháng thuốc ☐

2.4. Bệnh đồng mắc kèm theo Có mắc bệnh khác ngoài lao:

Có ☐ Không ☐ → Chuyển sang 3.11

2.5. Loại bệnh mắc phải:

Hô hấp (COPD, hen)

Tiểu đường

Đau xương khớp mạn tính

Khác: Ghi rõ.....

2.6. Điều trị bệnh: Có ☐ Không ☐ – Chuyển sang câu 3.11

2.7. Phác đồ điều trị: ghi rõ.....

2.8. Thời gian điều trị:

3. Yếu tố liên quan bệnh

3.1. Hút thuốc lá thuốc Lào: Có ☐ Đã từng ☐ → bỏ trong vòng bao lâu:..... Không ☐ → Chuyển sang câu 3.11

3.2. Số lượng hút:điều/ngày

3.3. Tình trạng nghiện rượu:

<14 đơn vị mỗi tuần ☐

<14 đơn vị mỗi tuần ☐

Không ☐ → Chuyển sang câu 3.13

Cách tính: 1 đơn vị = 25ml rượu mạnh hoặc 100ml rượu vang hoặc 50 ml rượu thường, 1 chai bia 333ml = 1.5 đơn vị

3.4. Tình trạng sử dụng chất gây nghiện, chất kích thích: Có ☐ Không ☐ → Chuyển sang câu 3.15

3.5. Mức độ sử dụng:

Thường xuyên ☐

Thỉnh thoảng ☐

Hiếm khi ☐

3.6. Dị ứng: Có ☐ Không ☐ → Chuyển sang câu 3.17

3.7. Loại dị ứng:

Phấn hoa ☐ Thuốc ☐ Thời tiết ☐ Thực phẩm ☐ (ghi rõ).....

Khác:

3.8. Tình trạng HIV: Có ☐ Không ☐

3.9. Có tiếp xúc bệnh nhân lao: Có ☐ Không ☐ → Chuyển câu 3.20

3.10. Loại lao người thân/người tiếp xúc mắc :

Lao nhạy cảm ☐ Lao kháng thuốc ☐ Lao đa kháng thuốc ☐

Thời gian tiếp xúc với người mắc bệnh lao?

Ít hơn 1 năm trước ☐ <2 năm trước ☐ <3 năm ☐ > 3 năm ☐

Bệnh nhân tiếp xúc là người nhà, tiếp xúc hộ gia đình: Có ☐ Không ☐

BN tiếp xúc là đồng nghiệp: Có ☐ Không ☐

BN tiếp xúc là người hàng xóm: Có ☐ Không ☐

BN tiếp xúc có đeo khẩu trang trước khi bắt đầu điều trị: Có ☐ Không ☐

NTX2: Loại lao người thân/người tiếp xúc mắc :

Lao nhạy cảm ☐ Lao kháng thuốc ☐ Lao đa kháng thuốc ☐

Thời gian tiếp xúc với người mắc bệnh lao?

Ít hơn 1 năm trước ☐ <2 năm trước ☐ <3 năm ☐ > 3 năm ☐

BN tiếp xúc là người nhà, tiếp xúc hộ gia đình: Có ☐ Không ☐

Bệnh nhân tiếp xúc là đồng nghiệp: Có ☐ Không ☐

Bệnh nhân tiếp xúc là người hàng xóm: Có ☐ Không ☐

BN tiếp xúc có đeo khẩu trang trước khi bắt đầu điều trị: Có ☐ Không ☐

1.1. Người vô gia cư Có ☐ Không ☐

1.2. Tù nhân: Có ☐ Không ☐

1.3. Xuất khẩu lao động Có ☐ Không ☐

1.4. Cán bộ y tế làm việc liên quan đến Bệnh lao: Có ☐ Không ☐

III. THÔNG TIN LÂM SÀNG

1. Cân nặng: 2. Chiều cao 3. BMI

2. Toàn thân:

.....

3. Mạch 4. Huyết áp 5. Tỷ lệ hô hấp:

5. Triệu chứng hô hấp:

Bạn có ho? Có ☐ Không ☐

Nếu có ho, Ho trong bao lâu:ngày

6. Các triệu chứng tâm thần kinh ngoại biên
(đau rát tê mất cảm giác).....

4. Triệu chứng tiêu hóa:

.....

5. Vấn đề tinh thần (có tỉnh táo và minh mẫn)

.....

6. Vấn đề da liễu (vàng da mẩn ngứa....)

.....

7. Vấn đề liên quan đến thị giác (mờ, vàng mắt)

.....

8. Vấn đề liên quan đến thính giác (nghe khó)

.....

IV. THÔNG TIN CẬN LÂM SÀNG

1. Xét nghiệm soi đờm: Có ☐ Không ☐ → chuyển câu 4
2. Cách thức nhuộm:
Ziehl – Neelsen ☐ Flourescence ☐ Không rõ ☐
3. Kết quả soi:
-0.09 ☐ 1+ ☐ 2+ ☐ 3+ ☐ 4+ ☐
4. Xét nghiệm nuôi cấy: Có ☐ Không ☐ → chuyển sang câu 7
5. Hình thức
-Lowenstein-Jensen ☐ -MGIT (Ghi lượng cụm khuẩn) ☐
-Middlebrook 7H11S ☐ -TLA ☐ -Khác:
6. Kết quả nuôi cấy:
- 1-19 khuẩn lạc ☐ - 1+ ☐ - 2+ ☐ - 3+ ☐
- Dương tính ☐ Âm tính ☐ Không rõ ☐ Chưa có KQ ☐
-Tạp nhiễm ☐ - NTM ☐
7. Xét nghiệm Kháng thuốc Có ☐ Không ☐
Loại xét nghiệm:
DST ☐ HAIN MTB DR ☐ Xpert ☐
8. Kết quả:

Xpert MTB/RIF:

Vi khuẩn lao			Tính kháng RIF			Lỗi
Không có MTB	MTB (*)	Không xác định	Không kháng	Kháng	Không xác định	

LPA

Loại XN	RIF	INH*	FLQ	KM**	AMK	CAP	VMC	ETH
Đa kháng LPA								
Siêu kháng LPA								

DST

- ☐ Lowenstein-Jensen
- ☐ MGIT 960/320
- ☐ Middlebrook 7H11S
- ☐ TLA

☐Khác: _____

Kháng thuốc (ghi rõ).....

9. Chụp CT

Sử dụng chất cản quang OMNIPAQUE 350 Có ☐ Không ☐

i. Accumulation Of Contrast

10. Phim chụp Xquang

i. Modality:

ii. Người đọc kết quả

1. Bác sĩ lâm sàng

2. Bác sĩ chuyên khoa CDHA

iii. Chất lượng phim Xquang (tốt/trung bình/kém)

iv. Thùy phổi tổn thương:

Trên		Giữa & dưới	
Giữa		Trên & dưới	
Dưới		Toàn bộ phổi	
Trên & giữa			

v. Phân thùy tổn thương (segment):

S1		S4+5	
S1+2		S5	
S1-3		S1-5	
S2		S6	
S2+3		S1-6	
S3		S7-10	
S4		Tất cả các phân thùy	

vi. Tổn thương hang

3. Số lượng: (0/1/2/3 trở lên)

4. Kích thước:

a. <10mm

b. 10-25mm

c. >25mm

11. Xét nghiệm HIV Có ☐ Không ☐ → chuyển câu 13

12. Kết quả XN Âm tính ☐ Dương tính ☐ → chỉ số CD4:.....

13. Xét nghiệm viêm gan: Viêm gan B ☐ Viêm gan C ☐

Không ☐ Không rõ ☐

Tiểu đường (Loại I, Loại II): Có ☐ Không ☐

13. Chỉ số hóa sinh

a.	Ka-li	l.	TSH
b.	Na-tri	m.	Lipase
c.	Clo-rua	n.	Albumin huyết thanh
d.	Bicarbonate	o.	AST/SGOT
e.	Ma-giê	p.	ALT/SGPT
f.	Canxi ion hóa	q.	Tổng bilirubin
g.	U-rê	r.	Phosphatase kiềm
h.	Creatinine	s.	GGT
i.	Glucose (nhịn ăn)	t.	A-xít uric
j.	Glucose (khôngnhịn ăn)		Total Protein
k.	HbA1c		ADA dịch màng phổi
	T3		
	T4		

14 Chỉ số huyết học

WBC	RBC
NEU#	HGB
NEU%	HCT
LYMP#	MCV
LUMP%	MCH
MONO#	MCHC
MONO%	RDW-SD
EOS#	PLT
EOS%	MPV
BASO#	PCT
BASO%	PDW

15. Xét nghiệm đông máu

- ii. APTT (giây)
- iii. TT (giây)
- iv. PT (%)
- v. INR

16. Xét nghiệm vi sinh:

- vi. HBsAg
- vii. HCV

17. Kết quả đo thính lực:

Tai trái

tai phải

18. Kết quả đo thị lực:

Mắt trái

Mắt phải

19. Kết quả đo điện tâm đồ

Nhịp (đánh dấu một loại)

-Nhịp xoang:1 -Rung tâm nhĩ:2 -Phức hợp thất sớm:3 -Khác: 4 (ghi rõ)

Nhịp tim mỗi phút (bpm):

Khoảng QT (ms):

Khoảng QTcF (ms)

Lưu ý: $QT_cF = QT / \sqrt[3]{RR}$

Hà Nội, ngày tháng năm 20

Người thu thập