

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**

Chuyên ngành: Vi sinh vật học

Mã số: 9 42 01 07

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2024

**CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU NÀY ĐƯỢC HOÀN THÀNH TẠI
VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG**

Người hướng dẫn khoa học:

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

**Phản biện 1: PGS. TS. Đoàn Mai Phương
Bệnh viện Bạch Mai**

**Phản biện 2: PGS. TS. Đinh Ngọc Sỹ
Hội Phổi Việt Nam**

**Phản biện 3: PGS. TS. Nguyễn Đăng Tôn
Viện Nghiên cứu Hệ gen, Viện
Hàn lâm Khoa học và Công
nghệ Việt Nam**

Luận án được bảo vệ tại Hội đồng đánh giá luận án cấp Viện họp tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

Vào hồi 14 giờ 00, ngày 08 tháng 07 năm 2024.

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Quốc gia
2. Thư viện Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương

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).

Việt Nam nằm trong danh sách 30 quốc gia có gánh nặng bệnh lao và lao kháng thuốc cao nhất thế giới. Ước tính mỗi năm có khoảng 170.000 ca mắc mới, 14.000 người tử vong, 70% người mắc lao ở trong độ tuổi lao động. Trong đó, 64% bệnh nhân lao thường và 98% bệnh nhân lao kháng thuốc phải chịu gánh nặng chi phí chữa bệnh cao. Thống kê của CTCLQG cho thấy 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.

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. Nhằm nghiên cứu tổng thể tình hình bệnh lao và lao kháng thuốc tại Hà Nội, chúng tôi thực hiện 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” với các mục tiêu:

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.

Những điểm mới về khoa học và giá trị thực tiễn của đề tài

Nghiên cứu đã tổng hợp, phân tích các yếu tố của quá trình lây truyền bệnh lao và lao kháng thuốc tại Hà Nội từ năm 2020 – 2022, đưa ra một số nhận định về quần thể nghiên cứu với các thống kê chi tiết về tỷ lệ bệnh lao kháng thuốc, phát hiện các đột biến gen liên quan đến kháng thuốc làm cơ sở để dự báo tình hình dịch bệnh lao và xây dựng kế hoạch phòng chống lao kháng thuốc. Nghiên cứu cung cấp dữ liệu minh chứng về sự lưu hành của các dòng chủng vi khuẩn lao kháng thuốc trên địa bàn thành phố Hà Nội từ năm 2020 – 2022.

Nghiên cứu cũng góp phần triển khai thành công kỹ thuật giải trình tự toàn bộ hệ gen vi khuẩn lao từ mẫu đờm và chủng vi khuẩn lao, nâng cao năng lực chuyên môn và nghiên cứu khoa học cho cán bộ y tế của các đơn vị tham gia tại Bệnh viện Phổi Trung ương và Bệnh viện Phổi Hà Nội.

CẤU TRÚC CỦA LUẬN ÁN

Luận án gồm 150 trang không kể tài liệu tham khảo và phụ lục, có 20 hình, 27 bảng, 13 biểu đồ. Đặt vấn đề, mục tiêu 2 trang. tổng quan 45 trang; đối tượng phương pháp nghiên cứu 27 trang; kết quả nghiên cứu 30 trang; bàn luận 42 trang; kết luận 2 trang và kiến nghị 1 trang.

Chương 1. TỔNG QUAN

1.1 TÌNH HÌNH BỆNH LAO TRÊN THẾ GIỚI VÀ Ở VIỆT NAM

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. Theo báo cáo về kiểm soát bệnh lao toàn cầu của Tổ chức Y tế thế giới năm 2023, số bệnh nhân lao mới được phát hiện và báo cáo năm 2022 trên toàn cầu là 7,5 triệu người. 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. Việt Nam, đứng thứ 10 về số người mắc lao cao và đứng thứ 11 trong 30 nước có gánh nặng lao kháng đa thuốc. 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). 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, 187].

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 . Vi khuẩn lao rất hiếu khí, gây bệnh chủ yếu ở phổi. Hệ gen của vi khuẩn lao được S.T.Cole giải trình tự năm 1998 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 rất ít không thay đổi trên toàn bộ genome.

1.2. TÍNH 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. Nhiều kỹ thuật để chẩn đoán vi khuẩn lao và tính kháng thuốc đã và đang được triển khai tại Việt Nam. Kỹ thuật nhuộm soi trực tiếp tìm AFB, kỹ thuật nuôi cấy phân lập và kháng sinh đồ kiểu hình với các thuốc lao hàng 1, hàng 2, kỹ thuật sinh học phân tử Xpert MTB/RIF và kỹ thuật giải trình tự hệ gen vi khuẩn lao chẩn đoán kháng thuốc kiểu gen.

Trên thế giới, đã có các công trình nghiên cứu về vi khuẩn lao kháng thuốc. 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. Các nghiên cứu chủ yếu thực hiện giải trình tự gen đích, tìm hiểu về một số gen liên quan đến kháng thuốc isoniazid, rifampicin. Cần có thêm các dữ liệu về giải trình tự toàn bộ hệ gen vi khuẩn lao ở bệnh nhân lao kháng rifampicin, cung cấp thông tin đột biến kháng thuốc lao hàng 1, hàng 2 và dịch tễ lây truyền các chủng vi khuẩn lao kháng thuốc tại Hà Nội. Đánh giá tính chính xác, độ tin cậy và tính ứng dụng cao của giải trình tự gen trong chẩn đoán và điều trị hiệu quả bệnh lao kháng thuốc.

Chương 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 ĐỐI TƯỢNG, ĐỊA ĐIỂM, THỜI GIAN 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

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.

2.1.2 Địa điểm nghiên cứu: Thành phố Hà Nội

2.1.3 Thời gian nghiên cứu: Từ tháng 5/2020 đến 12/2023.

2.2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1.2.1 Cỡ mẫu và kỹ thuật chọn mẫu

Nghiên cứu mô tả cắt ngang, thu mẫu toàn bộ. Nghiên cứu thực hiện các 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 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), Amikacin (AMK). Giải trình tự toàn bộ hệ gen để phát hiện đột biến kháng thuốc.

2.2.2 Phân tích và xử lý số liệu.

Số liệu được nhập liệu và quản lý bằng phần mềm excel, phân tích bằng phần mềm tin sinh Mykrobe, Clockwork, Gnomimus. Sử dụng các phương pháp thống kê y sinh học, mã hóa số liệu và trích dẫn theo chủ đề.

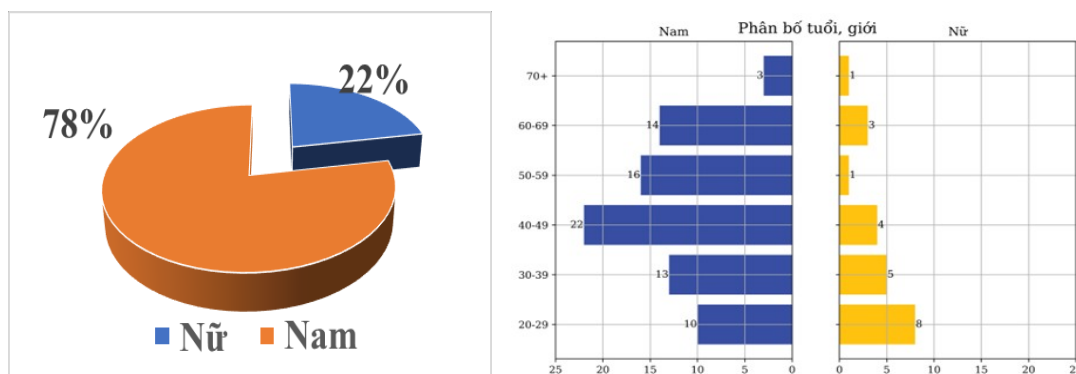
2.2.3 Đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu tuân thủ các yêu cầu, quy định về 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. Các thông tin thu thập chỉ phục vụ cho mục đích nghiên cứu.

Chương 3. KẾT QUẢ

3.1 ĐẶC ĐIỂM DỊCH TỄ CỦA MẪU NGHIÊN CỨU

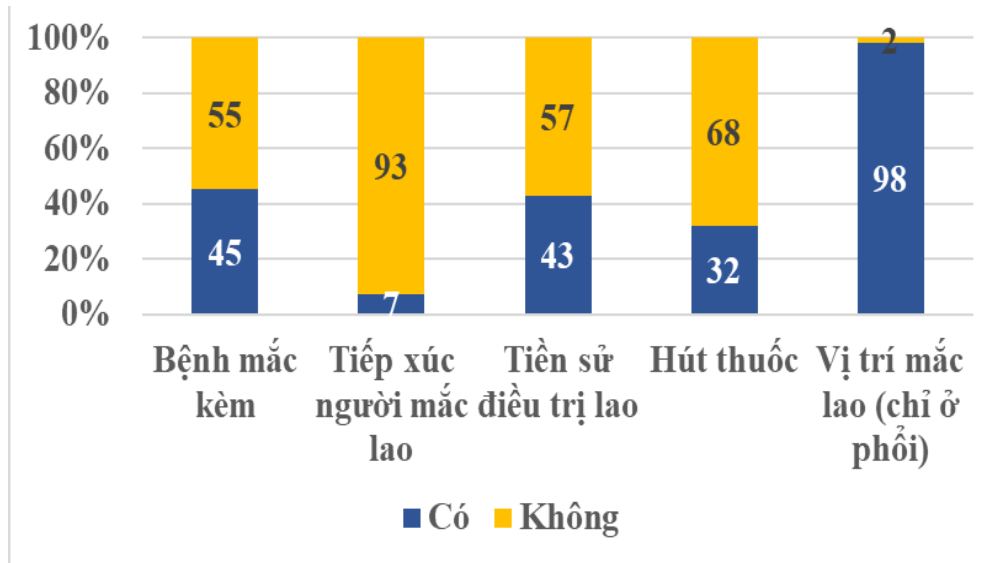
Số lượng bệnh nhân nghiên cứu là nam chiếm đa số (78%), gấp 3,5 lần bệnh nhân nữ (22%) được quản lý điều trị tại BV Phổi Trung ương và BV Phổi Hà Nội.



Biểu đồ 3. 1. Phân bố mẫu nghiên cứu theo giới tính và nhóm tuổi

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.

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.



Biểu đồ 3.3. Phân bố mẫu theo tiền sử bệnh

Các mẫu sau khi thu thập sẽ 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 các kết quả XN

	Mẫu XN(n)	Tỷ lệ (%)
Điểm nghiên cứu		
BV Phổi Trung ương	52	52,0
BV 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		

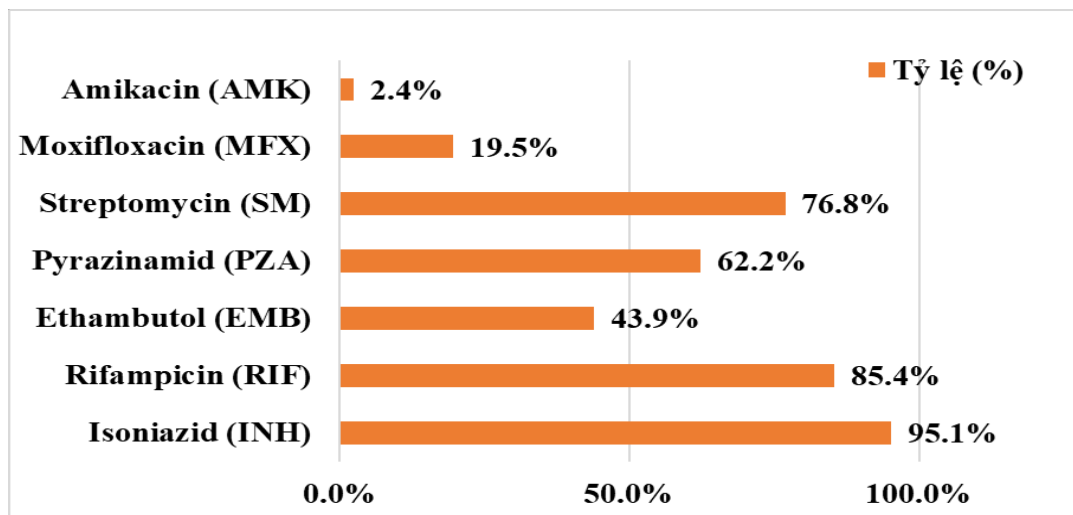
	Mẫu XN(n)	Tỷ lệ (%)
MTB	95	95,0
NTM	3	3,0
Chủng nhiễm	2	2,0

Mẫu cấy MTB có kết quả kháng thuốc kiểu hình và kiểu gen

Có kết quả kháng thuốc	82	82,0
Không có KQ kháng thuốc	18	18,0

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 đèn dương tính từ 1+ trở lên chiếm 73,0% và 23,0% dương tính loại AFB ít dưới 10 vi khuẩn trong một dòng 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.

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 (95.1%), 70 mẫu kháng RIF (85.4%), 36 mẫu có kháng EMB (43.9%), 51 mẫu kháng PZA (62,2%), 63 mẫu kháng với SM (76.8%), 16 mẫu kháng MFX (19.5%), 2 mẫu kháng AMK (2.4%).



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

Mẫu nghiên cứu được phân thành 3 nhóm, trong đó kháng đơn 12/82 mẫu (14,6%), kháng đa thuốc có 57/82 mẫu (69,5%) và tiền siêu kháng thuốc 13/82 mẫu (15,9%).

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 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.

- Đột biến gen liên quan đến kháng thuốc INH

Bảng 3.3. Đột biến gen ở các chủng kháng INH

Gen	Vị trí đột biến	Mức độ	Tần suất	Tỷ lệ
<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 %

Tổng số 78/82 mẫu kháng INH, xuất hiện đột biến ở 3 gen: *katG* 78,3%, *fabG1* 16,3% và *inhA* 5,4%. Hầu hết đột biến trên gen *katG* đều xảy ra ở codon Ser315SerThr chiếm tỷ lệ cao nhất là 75,0%. đột biến tại codon 315SerGly chiếm tỷ lệ 3,3 % và các đột biến trên gen *fabG1*(16,3%) và *inhA* (5,4%).

Phát hiện 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 Arg463Leu.

- Đột biến gen liên quan đến kháng thuốc RIF

Bảng 3.4. Đột biến gen ở các chủng kháng RIF

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

Đa số đột biến trên gen *rpoB* xảy ra ở codon Ser531Leu (58,1%) và codon His526Tyr (10,8%), liên quan đến kháng thuốc mức độ 1. Một số đột biến tại các codon 144, 172, 516, 522 và mất đoạn tại codon 1299 cũng gây ra kháng thuốc kiểu hình.

Nghiên cứu phát hiện 12 mẫu không kháng RIF, tuy nhiên kháng thuốc kiểu gen cho thấy 12 mẫu này đều có các đột biến ở gen *rpoB* tại codon Leu533Pro (20,8%), Asp516Tyr (12,5%), His526Asn (8,3%), Ser531Leu (4,2%), 1309delAAC (4,2%). Các mẫu này cũng có đột biến tại vị trí codon 3225T>C (50%), đây là đột biến câm, không biểu hiện kiểu hình kháng thuốc RIF.

- Đột biến gen liên quan đến kháng thuốc EMB

Tổng số 36/82 mẫu kháng EMB có đột biến trên gen *embB* với tỷ lệ xảy ra ở codon Met306Ile là 38,9% và Met306Val là 38,9%. Các đột biến này trên gen *embB* đều liên quan đến kháng thuốc - mức độ 1.

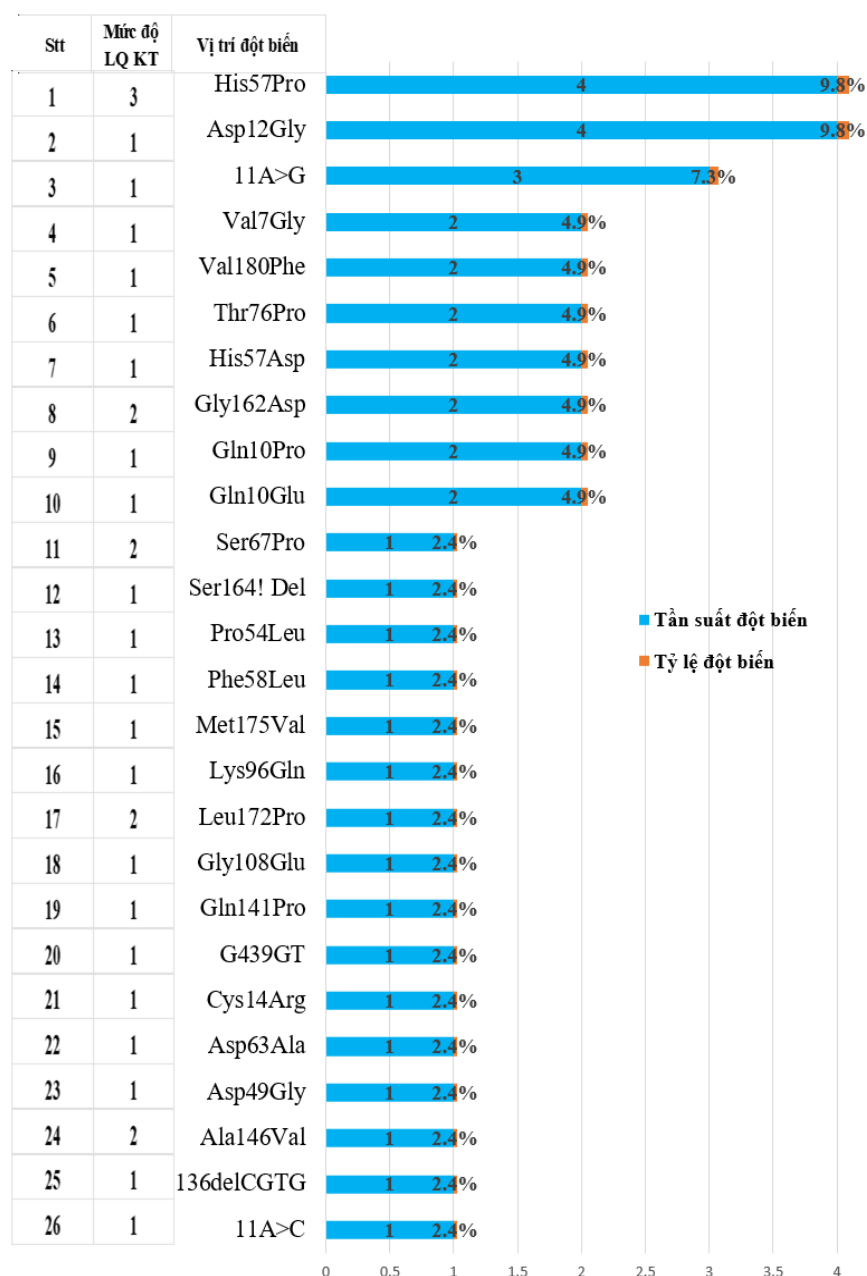
Bảng 3.7. Đột biến gen ở các chủng kháng EMB

Gen	Vị trí đột biến	Mức độ	Tần suất	Tỷ lệ
<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%

Trong 46/82 mẫu không kháng thuốc EMB, kết quả giải trình tự gen phát hiện 16 mẫu có đột biến tại các vị trí khác nhau trên gen *embB*. Đột biến ở codon Met306Ile là 43,8% và codon Met206Val là 18,8%; Các đột biến khác trên gen *embB* codon 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 đột biến codon Gly603Arg và thay thế nucleotit 15 C-> T có liên quan đến kháng thuốc không chắc chắn – mức độ 3. Các đột biến này không biểu hiện kiểu hình kháng thuốc EMB.

- Đột biến gen liên quan đến kháng thuốc PZA

Tổng số 51/82 mẫu có kiểu hình kháng PZA, trong đó 41 mẫu có kết quả kháng thuốc kiểu gen với 26 vị trí đột biến tại gen *pncA*. Trong đó đột biến tại codon His57Pro chiếm tỷ lệ 9,8%, đột biến codon Asp12Gly chiếm tỷ lệ 9,8%, thay thế 11A>G chiếm tỷ lệ 7,3%. Tiếp theo là các vị trí đột biến codon 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 %. Đối với 31/82 mẫu nhạy cảm với thuốc PZA, giải trình tự có 1 mẫu xuất hiện đột biến trên gen *pncA* codon His57Tyr, liên quan đến kháng thuốc lao - mức độ 1.



Biểu đồ 3.7. Đột biến gen ở các chủng kháng thuốc PZA

- Đột biến gen liên quan đến kháng thuốc SM

Bảng 3. 9. Đột biến gen ở các chủng kháng thuốc SM

Gen	Vị trí đột biến	Mức độ	Tần suất	Tỷ lệ
<i>rpsL</i> 67,2%	Lys43Arg	Mức độ 1	33	51.6%
	Lys88Arg*	Mức độ 1	10	15.6%
<i>gid</i> 23,4%	102delG	Mức độ 2	1	1.6%
	87delC	Mức độ 2	1	1.6%
	G19GG/C17CC/C16CC/	Mức độ 2	1	1.6%

Gen	Vị trí đột biến	Mức độ	Tần suất	Tỷ lệ
	G15GC/G15GC/C18CG			
	Glu173! Del *	Mức độ 2	11	17.2%
	GT423G/TT424T	Mức độ 2	1	1.6%
rrs 9,4%	514A>C	Mức độ 1	4	6.3%
	517C>T	Mức độ 1	2	3.1%
	TỔNG SỐ		64	100%

Đột biến kháng thuốc SM xảy ra ở cả 3 gen rpsL, gid và rrs, trong đó đột biến gen rpsL codon Lys43Arg chiếm tỷ lệ cao nhất là 51,6%, codon Lys88Arg chiếm tỷ lệ 15,6% và đột biến mất đoạn tại codon 173 Glutamic 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 codon Lys88Arg và gen gid codon 173 mất đoạn GAG. 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% .

- Đột biến gen liên quan đến kháng thuốc MFX

Bảng 3. 10. Đột biến gen ở các chủng kháng thuốc MFX

Gen	Vị trí đột biến	Mức độ	Tần suất	Tỷ lệ
gyrA 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%

Tính kháng thuốc của MFX liên quan đến các đột biến trên gen gyrA. Có 16/82 mẫu xuất hiện đột biến ở codon Asp94Gly chiếm tỷ lệ 66,7% , codon Ala90Val là 16,7% và Asp94Asn là 16,7%. Các đột biến này đều liên quan đến kháng thuốc ở mức độ 1 và 2. 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.

- Đột biến gen liên quan đến kháng thuốc AMK

Bảng 3.11. Đột biến gen ở các chủng kháng thuốc AMK

Gen	Vị trí đột biến	Mức độ	Tần suất	Tỷ lệ
<i>rrs</i> 100%	1401A>G	Mức độ 1	2	100%
	TỔNG SỐ		2	100%

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. 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.

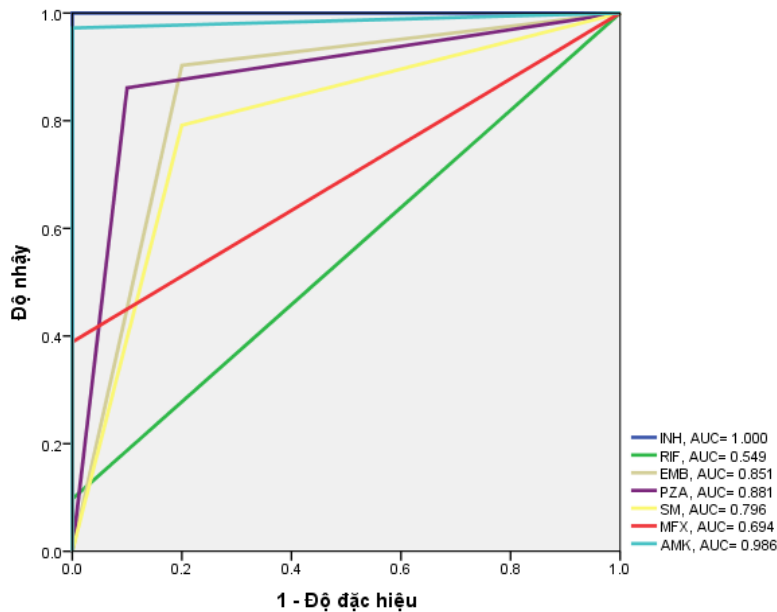
- Độ nhạy, độ đặc hiệu của giải trình tự gen MTB từ mẫu chủng.

Bảng 3.16. 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

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%, Sp 96,8%. Streptomycin có Se 95,2%, 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) .

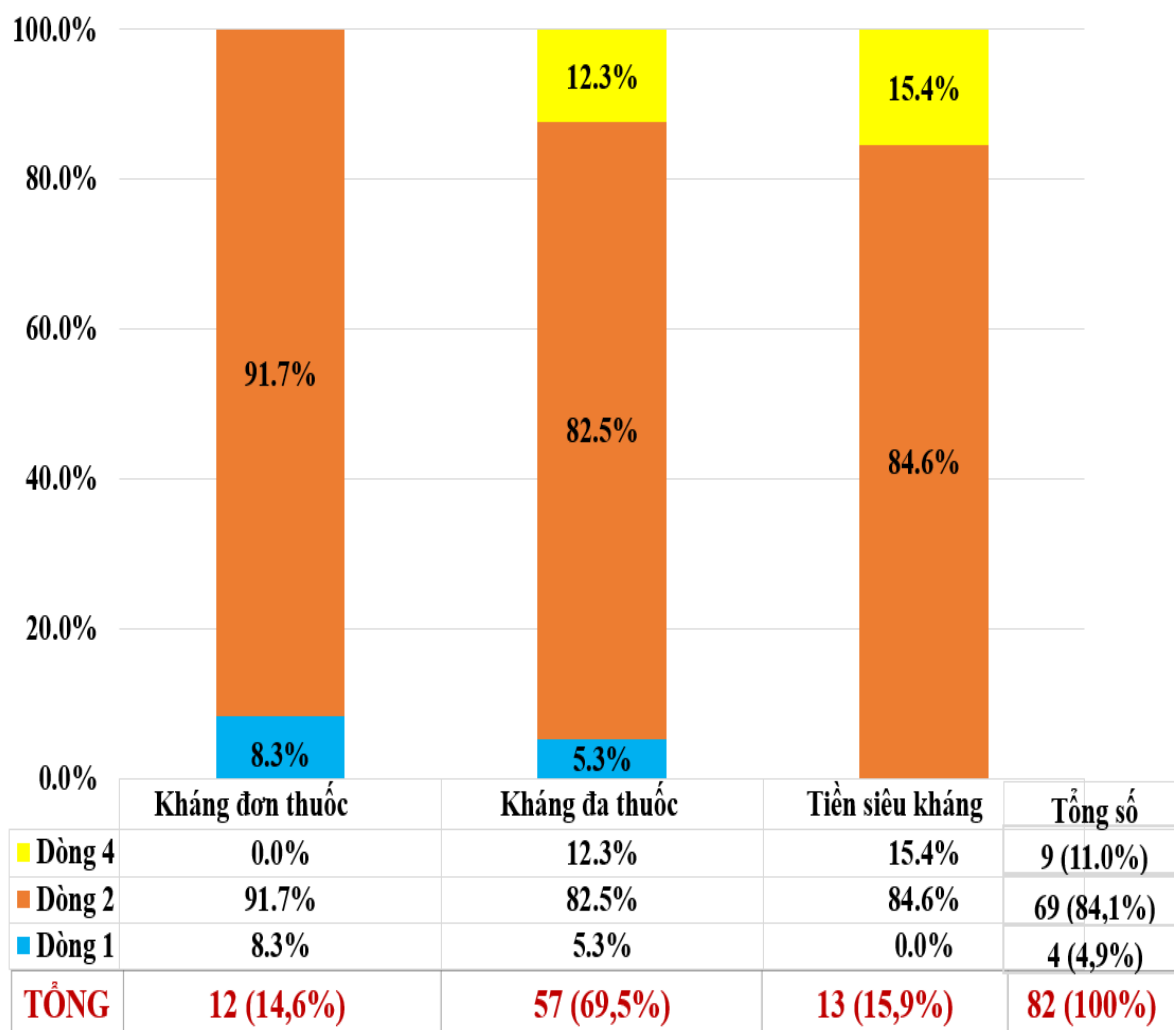


Biểu đồ 3.12. Giá trị AUC của xét nghiệm giải trình tự gen từ mẫu chủng trong chẩn đoán lao kháng thuốc

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

- Phân loại kháng thuốc kiểu hình của MTB theo dòng vi khuẩn

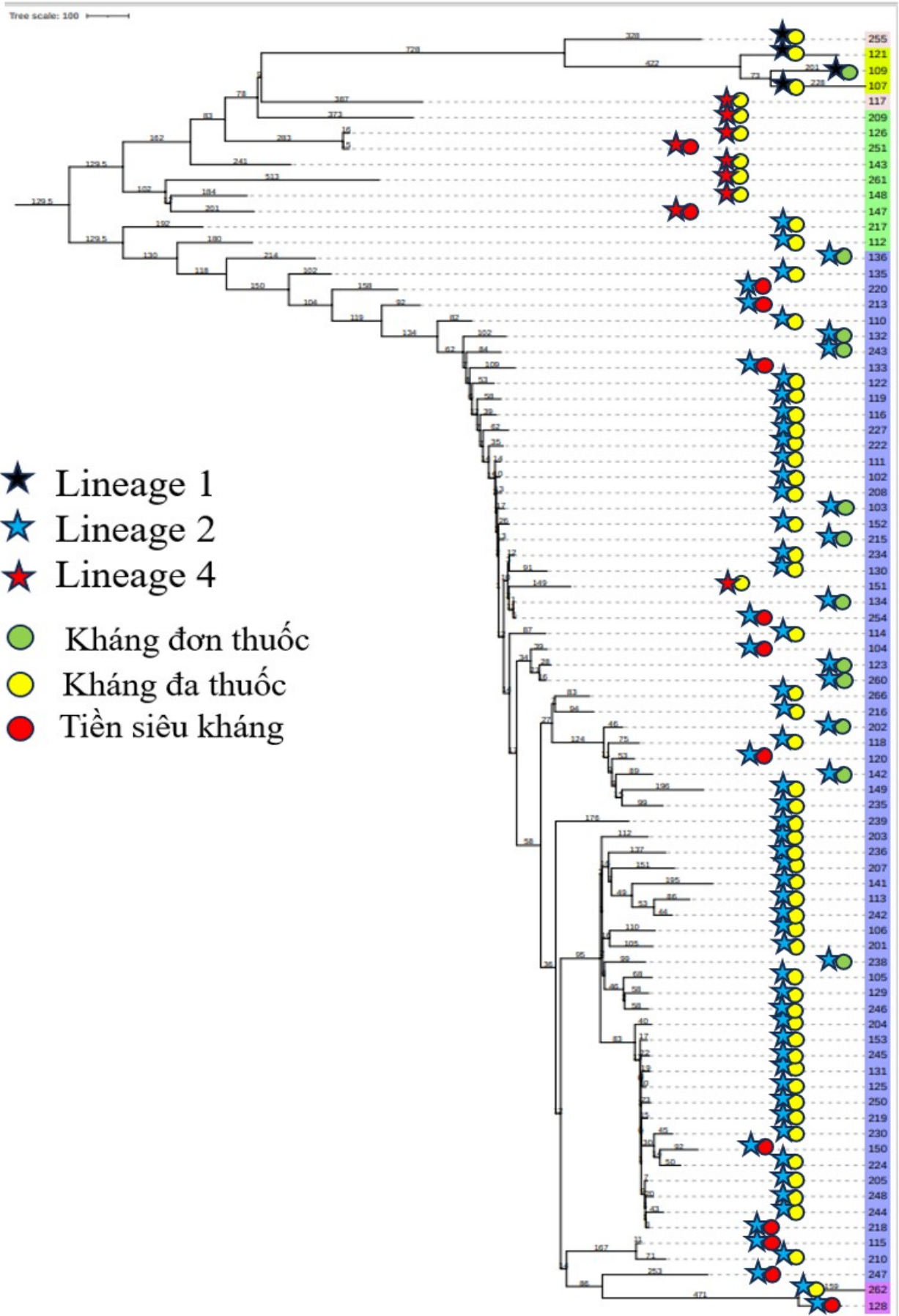
Kết quả giải trình tự gen của 82 mẫu nghiên cứu cho thấy đa số các mẫu thuộc dòng 2 chiếm 84,1% (69/82), dòng 4 chiếm 11,0% (9/82) và dòng 1 chiếm ít nhất là 4,9% (4/82). Trong 69 mẫu dòng 2 có 15,9% (11/69) chủng kháng đơn thuốc; 68,1% (47/69) chủng kháng đa thuốc và 15,9% (11/69) chủng tiền siêu kháng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



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

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

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 tại Hà Nội năm 2020-2022

Chương 4. BÀN LUẬN

4.1 ĐẶC ĐIỂM DỊCH TỄ CỦA MẪU NGHIÊN CỨU

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

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.

Tất cả bệnh nhân trong nghiên cứu của chúng tôi đều là người lớn từ 18 tuổi trở lên. 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%. 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.

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). Tính riêng kháng đơn INH là 95,1%, cao hơn tỷ lệ kháng RIF 85,4%, kháng EMB là 43,9%, kháng PZA là 62,2%, kháng SM là 76,8%, kháng MFX là 19,5% và kháng AMK là 2,4%. 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%.

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). 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% . 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. 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.

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). Đối với *M. tuberculosis*, sự kháng thuốc mắc phải xảy ra thông qua đột biến nhiễm sắc thể. Với những bệnh nhân lao mới, một trong những nguyên nhân gây ra hiện tượng đột biến trong gen khiến vi khuẩn kháng lại thuốc chống 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 thì sẽ có 1 vi khuẩn kháng thuốc Rifampicin). Như vậy chẩn đoán sớm thì tổn thương còn nhỏ, số lượng vi khuẩn chưa nhiều đến mức gây đột biến kháng thuốc. Bên cạnh đó, 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 chống 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.

4.2 XÁC ĐỊNH CÁC GEN VÀ VỊ TRÍ ĐỘT BIẾN 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 tính kháng thuốc lao hàng một : Isoniazid, Rifampicin, Ethambutol, Pyrazinamide, Streptomycin.

Tại Hà Nội, việc chẩn đoán và điều trị bệnh lao kháng thuốc trong giai đoạn tấn công được thực hiện ở bệnh viện Phổi trung ương và bệnh viện Phổi Hà Nội.

Kết quả giải trình tự gen của quần thể mẫu nghiên cứu thu thập từ hai đơn vị này cho thấy (95,1%) chủng kháng INH, 85,4% chủng kháng RIF, trong đó 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 và nhạy INH thường rất hiếm gặp.

Trong nghiên cứu này, đột biến gen ở 78/82 chủng có kiểu hình kháng INH xảy ra ở cả 3 gen *katG*, *fabG1* và *inhA*. 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 Ser315Thr chiếm tỷ lệ cao nhất là 75,0% và có liên quan đến kháng thuốc ở mức độ 1. Bên cạnh đó, đột biến tại codon Ser315Gly chiếm tỷ lệ 3,3 %. 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 bộ ba mã hóa AUU -> AUC chiếm 2,2%. Đột biến tại codon Iso194Thr 1,1%, Đột biến tại codon Ser94Ala 2,2% và codon Iso194Thr 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*; nghiên cứu của Moaddab tại Iran năm 2011 với 19/25 chủng (76%) phát hiện đột biến trên gen *katG*; 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*.

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 sẽ 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. 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*. 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

Kazakhstan thì có 255 chủng có đột biến (93,7%), Abdelaal phát hiện được 20/23 chủng lao (86,9%) kháng RIF tại Ai Cập có xuất hiện đột biến.

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. 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 loại đột biến được ghi nhận liên quan đến kháng thuốc EMB mức độ 1 và 2 [188]. 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.

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). 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

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).

4.2.2. Gen và các đột biến gen liên quan đến tính kháng thuốc lao hàng hai : Moxifloxacin, Amikacin.

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 gyrase) 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.

Amikacin (AMK) là thuốc kháng sinh bán tổng hợp thuộc nhóm Aminoglycosid bán tổng hợp từ kanamycin A. Amikacin có hiệu lực đối với 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.

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

Trong 82/95 (86,3%) chủng giải trình tự cho thấy, độ nhạy (Se), độ đặc hiệu (Sp) của xét nghiệm giải trình tự gene 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 gene và kiểu hình. Đồng thời, có 12 chủng kết quả kiểu gene 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. Walker Timothy và cộng sự năm 2022 đã phát hiện có 14 đột biến không đồng nghĩa ở gen *embB* và một đột biến ở phần đầu của gen *embA* đáp ứng tiêu chí cho nhóm 1 hoặc 2. Kết quả thu được độ nhạy của EMB là 86,7% và độ đặc hiệu 93,3% và PPV là 71,1%. Vì nhiều đột biến gen *embB* tạo ra nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) gần với ngưỡng CC, dẫn đến sự phù hợp về mặt phân loại kém với kháng thuốc 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 của các đột biến gen *embB*, tương tự như trường hợp đột biến kháng RIF ở ranh giới (borderline).

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..

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].

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

đôi 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, 159]. 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.

Cây phát sinh chủng loại của quần thể vi khuẩn lao tại Hà Nội năm 2020 – 2022 cho thấy các chủng vi khuẩn lao trong nghiên cứu được chia vào 3 dòng số 1, 2 và 4. Trong đó dòng 1 (EAI) có 4 chủng (4.9%). Dòng 2 (Beijing) có 69/82 chủng (84.1%) và nguy cơ mắc lao kháng đa thuốc, tiền siêu kháng thuốc cao 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 4 (T, H, LAM) có 9/82 chủng (11.0%), tỷ lệ kháng đa thuốc ở dòng 4 là 7/9 (77,8%) và tiền siêu kháng thuốc là 2/9 (22,2%). 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). Dòng 1 không có chủng tiền siêu kháng thuốc và dòng 4 không có chủng kháng đơn.

Nhu 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.

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. 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.

KẾT LUẬN

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 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. 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 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%.

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.

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%.

KIẾN NGHỊ

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 Chương trình chống Lao Quốc gia đạt được mục tiêu thanh toán bệnh lao vào năm 2035.

DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ XUẤT BẢN
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* 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* ISSN: 0868 - 2836, Số 7, tr. 138-146.