Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ
Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học
ISSN 1859-2333 | e-ISSN 2815-5599

DOI:10.22144/ctujos.2024.273

ĐẶC ĐIỂM ĐỘT BIẾN GENE KHÁNG THUỐC RIFAMPICIN VÀ ISONIAZIDE CỦA VI KHUẨN LAO (*Mycobacterium tuberculosis*) Ở TỈNH ĐỒNG THÁP

Dương Thế Long[1], Trần Ngọc Dung[2], Dương Thị Loan[2], Đinh Thị Hương Trúc[2], Trịnh Thị Hồng Của[2], Phạm Đắc Lộc[2], Nguyễn Hữu Thành[3] và Đỗ Tấn Khang[1*]

[1]*Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ*
[2]*Khoa Y, Trường Đại học Y Dược Cần Thơ*
[3]*Bệnh viện Phổi Đồng Tháp*
**Tác giả liên hệ (Corresponding author): dtkhang@ctu.edu.vn*

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 05/09/2023
Sửa bài (Revised): 30/09/2023
Duyệt đăng (Accepted): 09/10/2023

Title: *Characteristics of mutations in rifampicin and isoniazide resistance genes of Mycobacterium tuberculosis in Dong Thap*

Author(s): *Duong The Long[1], Tran Ngoc Dung[2], Duong Thi Loan[2], Dinh Thi Huong Truc[2], Trinh Thi Hong Cua[2], Pham Dac Loc[2], Nguyen Huu Thanh[3] and Do Tan Khang[1*]*

Affiliation(s): *[1]Can Tho University, [2]Can Tho University of Medicine and Pharmacy, [3]Pulmonary Hospital Dong Thap*

TÓM TẮT

Sự xuất hiện của bệnh lao đa kháng thuốc (MDR-TB) đã gây khó khăn trong kiểm soát bệnh lao, và việc chẩn đoán kịp thời MDR-TB là một thách thức đáng chú ý. Mục tiêu nghiên cứu là xác định đặc điểm phân tử của đột biến gen rpoB, katG, inhA liên quan đến khả năng kháng Rifampicin (RIF) và Isoniazid (INH) ở vi khuẩn lao kháng thuốc được phân lập ở tỉnh Đồng Tháp. Tổng cộng có 29 mẫu vi khuẩn lao kháng thuốc (n=29) đã được ly trích DNA bộ gen bằng kỹ thuật NGS từ đó xác định các đột biến trên gen rpoB, katG và inhA. Kết quả cho thấy đột biến Ser450Leu là phổ biến nhất (58,6%) trên gen rpoB. Ngoài ra, một đột biến mới, Ser254Pro, đã được xác định ở 3,4% số mẫu. Nghiên cứu cũng ghi nhận 7 đột biến khác trên gen rpoB: Gln432Lys, Asp435Tyr, Asp435Val, His445Tyr, His445Leu, Ser450Cys và Leu452Pro. Trên gen katG, hai đột biến đã được ghi nhận: Ser315Thr, với tỷ lệ phổ biến là 82,8% và Arg463Leu, được quan sát thấy ở 96,6% các chủng phân lập. Ngoài ra, gen inhA biểu hiện một đột biến đơn lẻ, Ile194Thr (chiếm 3,4%), có liên quan đến khả năng kháng Isoniazid (INH).

Từ khoá: *Giải trình tự thế hệ mới, inhA, katG, kháng thuốc, Mycobacterium tuberculosis, rpoB*

ABSTRACT

The advent of Multidrug-Resistant Tuberculosis (MDR-TB) has significantly complicated the control of tuberculosis, with the prompt diagnosis of MDR-TB presenting a notable challenge. This study aimed to elucidate the molecular characteristics of rpoB, katG, and inhA gene mutations associated with resistance to Rifampicin (RIF) and Isoniazid (INH) in drug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolated from Dong Thap province. A total of twenty-nine drug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates (n=29) underwent genomic DNA extraction followed by Next-Generation Sequencing (NGS) technique. This analysis facilitated the identification of mutational patterns within the rpoB, katG, and inhA genes. The results showed that Ser450Leu mutation was the most prevalent, occurring in 58.6% of the rpoB gene sequences. Additionally, a novel mutation, Ser254Pro, was identified in 3.4% of the samples. The study also documented seven other mutations within the rpoB gene: Gln432Lys, Asp435Tyr, Asp435Val, His445Tyr, His445Leu, Ser450Cys, and Leu452Pro. Within the katG gene, two mutations were documented: Ser315Thr, with a prevalence of 82.8%, and Arg463Leu, observed in 96.6% of the isolates. Additionally, the inhA gene exhibited a singular mutation, Ile194Thr (representing 3.4%), which is implicated in conferring resistance to Isoniazid (INH).

Keywords: *Drug resistance, inhA, katG, Mycobacterium tuberculosis, next generation sequencing, rpoB*

1. GIỚI THIỆU

Bệnh lao (*Tuberculosis* - TB) là một bệnh truyền nhiễm đường hô hấp do *Mycobacterium tuberculosis* gây ra. Theo Tổ chức Y tế thế giới (WHO) cho biết, trong năm 2020 có khoảng 9,9 triệu ca và 1,28 triệu trường hợp tử vong liên quan đến bệnh lao (WHO, 2021b).

Thêm vào đó, sự xuất hiện của vi khuẩn lao đa kháng thuốc (multidrug-resistant – MDR-TB) làm việc kiểm soát bệnh lao trở nên khó khăn. Việt Nam hiện vẫn là nước có gánh nặng bệnh lao cao, đứng thứ 10 trong 30 nước có số người bệnh lao cao nhất toàn cầu, đứng thứ 11 trong số 30 nước có gánh nặng bệnh lao kháng đa thuốc cao nhất thế giới (Zhang et al., 2016; WHO, 2021b). Tỉnh Đồng Tháp có số bệnh nhân mắc lao đứng thứ hai trong các tỉnh ở đồng bằng sông Cửu Long (Ủy ban nhân dân tỉnh Đồng Tháp, 2021). Các chủng *Mycobacterium tuberculosis* kháng thuốc là mối quan tâm lớn đối với sức khỏe cộng đồng trên toàn thế giới, vì chúng có thể khó điều trị và có thể dẫn đến tăng tỷ lệ mắc bệnh và tử vong, trong đó kháng Rifampicin (RIF) và Isoniazid (INH) được quan tâm chủ yếu vì đây là hai loại thuốc chủ lực trong phác đồ điều trị lao theo khuyến nghị của WHO. Việc chẩn đoán vi khẩn lao đa kháng thuốc hiện nay vẫn là một thách thức do khả năng tiếp cận cơ sở chẩn đoán hạn chế, độ nhạy thấp của một số phương pháp chẩn đoán, độ phức tạp của xét nghiệm và sự xuất hiện của các chủng kháng thuốc mới. Giải quyết các vấn đề này và phát triển các kỹ thuật chẩn đoán nhạy cảm và đơn giản hơn là cần thiết để cải thiện chẩn đoán và điều trị lao đa kháng thuốc, đặc biệt là trong các môi trường giới hạn tài nguyên (Paul et al., 2016; Comas, 2017). Với sự phát triển của công nghệ giải trình tự thế hệ mới (Next Generation Sequencing – NGS), việc giải trình tự toàn bộ bộ gen cho phép sàng lọc các locus liên quan đến tính kháng thuốc đã biết đồng thời dự đoán khả năng kháng thuốc của các locus khác hỗ trợ trong điều trị và phòng ngừa các chủng lao đa kháng thuốc (Walker et al., 2015). Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu khảo sát đặc điểm các nhóm gen liên quan đến thuốc kháng lao hàng 1 và hàng 2 của các chủng vi khuẩn lao kháng thuốc ở tỉnh Đồng Tháp.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Các mẫu bệnh phẩm lao được thu nhận từ người dân tỉnh Đồng Tháp đủ 15 tuổi trở lên có dấu hiệu lâm sàng nghi ngờ mắc lao chưa được điều trị bằng thuốc chống lao nào, được nuôi cấy và xác định tình trạng kháng thuốc tại bệnh viện Phổi Đồng Tháp. Các mẫu vi khuẩn lao kháng thuốc (n=29) được ly trích và giải trình tự bằng kỹ thuật NGS, phân tích bằng các công cụ tin sinh học, qui trình cụ thể như sau.

2.1. Qui trình kỹ thuật NGS

Ly trích DNA bộ gen vi khuẩn lao: Các chủng vi khuẩn lao được tách chiết DNA bằng bộ Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit (Zymo Research, Mỹ), chuẩn nồng độ DNA đạt theo yêu cầu của kỹ thuật.

Tạo thư viện DNA: Quá trình bao gồm cắt bộ gen thành các đoạn nhỏ (gọi là read). Tập hợp các read được tạo ra sau quá trình cắt tạo thành thư viện (library). Các kỹ thuật cắt bộ gen (Tagment Genomic DNA), khuếch đại các đoạn DNA trong thư viện (Amplifies library), tinh sạch DNA trong thư viện (Clean up library) và giải trình tự (Sequencing) sử dụng bộ kit Nextera XT v3 (Illumina, Mỹ) dựa trên quy trình kỹ thuật được công ty Illumina cung cấp kèm theo.

Giải trình tự: Các mẫu được giải trình tự bằng máy giải trình tự thế hệ thứ hai (Short read) Miseq (Illumina, Mỹ) bằng bộ kit Nextera XT v3, theo hướng dẫn đi kèm.

2.2. Phân tích kết quả giải trình tự

Sau khi kết thúc giải trình tự, máy giải trình tự cho ra 2 file nén có phần mở rộng là *.fastq.gz* cho mỗi mẫu. File thứ nhất chứa trình tự theo chiều xuôi của các đoạn read, tên file chứa ký hiệu R1. File còn lại chứa trình tự theo chiều ngược của các đoạn read, tên file chứa ký hiệu R2. Các file được tải lên hệ thống Galaxy (www.usegalaxy.org) để tiến hành xử lý và phân tích. Sau khi được tải lên nền tảng Galaxy, các file trình tự xuôi *R1.fastq.gz* và trình tự ngược *R2.fastq.gz* của một mẫu được nhóm lại thành một bộ sưu tập (collection). Các đột biến xuất hiện được phát hiện bằng công cụ *Snippy* (Seemann, 2015).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phát hiện đột biến tại các vùng gen rpoB, inhA, katG trên bộ gen vi khuẩn lao có liên quan đến tính kháng thuốc hàng 1.

Các mẫu vi khuẩn lao được tách chiết bộ gen đã được kiểm tra độ nhạy cảm với thuốc chống lao (Drug sensitive testing). Kết quả cho thấy tất cả các vi khuẩn lao được đưa vào tách chiết DNA đều là MDR-TB.

3.1. Số lượng các đột biến phát hiện

Các đột biến được phân thành 2 nhóm gồm (1) Nhóm đột biến làm thay đổi acid amin, dẫn đến thay

đổi kiểu hình và chức năng của protein, gọi là nhóm đột biến sai nghĩa (missense variant); và (2) Nhóm đột biến không làm thay đổi acid amin, không làm thay đổi kiểu hình và chức năng của protein, gọi là nhóm đột biến đồng nghĩa (synonymous variant). Các đột biến sai nghĩa làm ảnh hưởng đến chức năng của protein, có khả năng liên quan đến tính kháng thuốc, do đó trong nghiên cứu này không đề cập đến các đột biến đồng nghĩa và chỉ quan tâm đến các đột biến sai nghĩa trên các gen chủ yếu liên quan đến tính kháng RIF và INH (rpoB, katG, inhA, ahpC), và kể từ đây, khi đề cập đến thuật ngữ "đột biến" được hiểu là đột biến sai nghĩa.

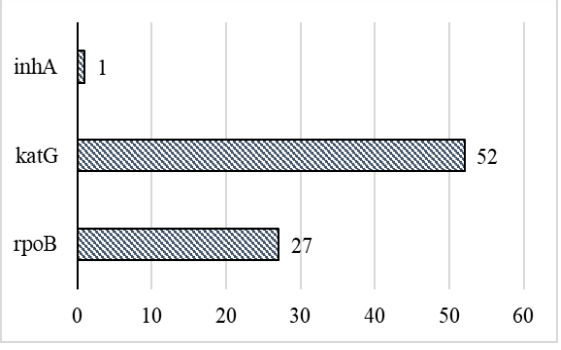
Kết quả nghiên cứu cho thấy 100% các mẫu đều xuất hiện ít nhất 1 đột biến trên 1 trong các gen được khảo sát. Kết quả ghi nhận được tổng số 80 đột biến trên 3 gen rpoB, katG. Trong đó, gen katG có số lượng đột biến cao nhất là 52 đột biến, kế đến là gen rpoB với 27 đột biến, gen inhA chỉ ghi nhận 1 đột biến (Hình 1). Nghiên cứu trái ngược với báo cáo của Matsui et al. (2020), theo đó Matsui và cộng sự đã phân tích 156 mẫu lao kháng thuốc hàng 1 và hàng 2 ở Brazil và xác định các đột biến gen liên quan, cho thấy 152 mẫu có đột biến vùng gen rpoB, và 106 mẫu có đột biến gen katG.

Hiện tại, các phương pháp phát hiện đột biến kháng thuốc trong vi khuẩn lao tập trung vào hai gen chính là katG và rpoB. Tuy nhiên, gen rpoB là phổ biến nhất và được phát hiện bằng kỹ thuật GenXpert MTB RIF. Xét nghiệm kháng sinh đồ bằng kỹ thuật LPA (phát hiện đột biến trên gen gyrA, gyrB, eis,...) chỉ được sử dụng cho một số bệnh nhân. Hiện chưa có nhiều nghiên cứu về đột biến trên gen gyrA được thực hiện ở Việt Nam để so sánh. Kết quả cho thấy tính ưu việt và vượt trội của kỹ thuật NGS trong việc phát hiện các đột biến gen kháng thuốc của vi khuẩn lao. Đồng thời, kết quả này cũng gợi ý rằng kỹ thuật GenXpert và kỹ thuật giải trình tự đoạn gen (Sanger sequencing) không còn phù hợp cho việc xác định tính kháng thuốc của vi khuẩn lao vì có thể bỏ sót nhiều đột biến trên gen, dẫn đến đánh giá không chính xác về mức độ, phạm vi kháng thuốc của các chủng vi khuẩn lao đang lưu hành tại địa phương.

Theo lý thuyết về cơ chế phát triển tính kháng thuốc của vi khuẩn lao, trong quá trình nhân lên, tính kháng thuốc của vi khuẩn lao được phát triển theo nhiều cách khác nhau. Tính kháng thuốc di truyền do phát sinh ngẫu nhiên các đột biến gen liên quan. Khi bệnh nhân được điều trị, sự có mặt của thuốc kháng sinh tạo nên một áp lực chọn lọc cho các chủng vi khuẩn *M. tuberculosis*. Các chủng kháng thuốc trở nên chiếm ưu thế, hình thành tính kháng thuốc thu được, đặc biệt là ở những bệnh nhân có chứa một lượng lớn vi khuẩn lao. Sự lây lan của các chủng kháng thuốc này sang người khác làm cho những người này bị nhiễm vi khuẩn lao kháng thuốc ngay từ đầu (kháng thuốc tiên phát). Điều này là một vấn đề nghiêm trọng (Hà, 2012; Thái, 2014).

Vi khuẩn lao kháng thuốc có thể đa dạng hóa kháng nhiều loại thuốc chống lao khác nhau thông qua các đột biến gen đặc hiệu. Chẳng hạn, đột biến gen độc lập có thể dẫn đến tính kháng Rifampicin ở một vài cá thể trong một quần thể vi khuẩn lao kháng thuốc ban đầu chỉ có kháng Isoniazide. Việc sử dụng phác đồ thuốc kết hợp Isoniazide và Rifampicin để điều trị bệnh nhân lao kháng thuốc cũng có thể dẫn đến tính kháng phối hợp của nhiều loại thuốc kháng lao ở một chủng vi khuẩn lao, và sự lan truyền các chủng lao đa kháng, siêu kháng thuốc trong cộng đồng. Các kiểu hình MDR/XDR-TB được tạo nên bởi sự tích tụ liên tiếp các đột biến ở các gen khác nhau liên quan đến sự đề kháng của từng thuốc chống lao riêng biệt.

Theo Zenteno-Cuevas et al. (2019), 85-90% các chủng phân lập có khả năng kháng rifampicin có đột biến ở vùng 81 bp của rpoB, gen này có phần mở rộng là 3543 bp và mã hóa thành tiểu đơn vị β của RNA polymerase. Trong khi đó, 30-70% chủng kháng Isoniazid có đột biến ở gen katG và inhA. katG có chiều dài 2223 bp và tổng hợp enzyme catalase-peroxidase liên quan đến quá trình tổng hợp acid mycolic trong khi inhA và chất điều hòa của nó tạo ra protein inhA, tham gia vào quá trình tổng hợp acid béo.



Hình 1. Số lượng đột biến ở các gen

3.2. Đặc điểm về dạng đột biến theo nhóm gen

3.2.1. Đặc điểm đột biến ở nhóm gen kháng RIF

Các gen rpoB, rpoC, rpoA là 3 gen mã hóa cho các tiểu phần của protein DNA-directed RNA polymerase. Trong đó, đột biến ở gen rpoB được báo

cáo là chịu trách nhiệm chính trong tính kháng RIF của *Mycobacterium tuberculosis*.

Gen rpoB có chiều dài 3.519 nucleotide mã hóa cho 1.172 acid amin. Kết quả nghiên cứu ghi nhận 9 vị trí đột biến trên gen rpoB. Các đột biến xuất hiện ở 27 trong số 29 mẫu và làm ảnh hưởng đến 6 codon (Bảng 1).

Bảng 1. Đặc điểm đột biến gen rpoB

Thay đổi nucleotide	Thay đổi acid amin	Số lần xuất hiện	Tỷ lệ
760T>C	Ser254Pro	1/29	3,4%
1294C>A	Gln432Lys	1/29	3,4%
1303G>T	Asp435Tyr	2/29	6,8%
1304_1305delACinsTT	Asp435Val	1/29	3,4%
1333C>T	His445Tyr	2/29	6,8%
1334A>T	His445Leu	1/29	3,4%
1349C>T	Ser450Leu	17/29	58,6%
1349_1350delCGinsGT	Ser450Cys	1/29	3,4%
1355T>C	Leu452Pro	1/29	3,4%

Đa số các đột biến xuất hiện ở vùng 81 bp, được gọi là vùng xác định kháng RIF (RIF resistance-determining region - RRDR). Bảng 1 cho thấy, đột biến điểm chiếm tỷ lệ cao nhất, và đột biến ở codon 450 là phổ biến nhất (chiếm 62,96%). Tuy nhiên, các đột biến phức tạp (complex) cũng được ghi nhận như đột biến CG>GT làm thay đổi Ser>Cys ở codon 450 (3,7%), và đột biến AC>TT làm thay đổi Asp>Val ở codon 435 (3,7%).

Theo Hà (2012), đột biến liên quan đến kháng RIF xảy ra ở nhiều vị trí trên gen rpoB, làm ảnh hưởng đến nhiều codon, đặc biệt tập trung cao nhất ở các vị trí thuộc codon 435 đến 450. Trong đó, đột biến ở các codon 435, 445 và 450 thường liên quan đến tính kháng RIF ở mức độ cao. Kết quả này khá phù hợp với các nghiên cứu trước đây. Như nghiên cứu của Caws et al. (2006) trên 104 chủng vi khuẩn lao kháng RIF lấy từ Việt Nam, cho thấy có 43% số chủng có các kiểu đột biến tại codon 450, 31% số chủng vi khuẩn có đột biến tại codon 445 và 15% có đột biến tại codon 435. Minh et al. (2012) phân lập 74 chủng vi khuẩn lao kháng rifampicin từ các vùng khác nhau đã ghi nhận các đột biến của vi khuẩn tại các codon sau: 435 (9,46%), 441 (1,35%), 445 (23%), 449 (1,35%), 450 (37,8%) và 452 (1,35%). Nghiên cứu của Thái (2014) phát hiện các đột biến trên gen rpoB ở các vị trí codon 375, 379, 398, 399, 400, 409, 423, 424, 435, 441, 445, 449, 450, 452, 463, 482, 491, 496, 507, trong đó codon 450 có tỷ lệ đột biến cao nhất (50%). So với Thái (2014), kết quả nghiên cứu này chỉ ghi nhận đột biến tại vị trí 435, 441, 445 và 450, các vị trí khác không ghi nhận được. Sự khác biệt này có lẽ là do khác biệt về kỹ thuật phát hiện cũng như các đặc tính kháng thuốc của chủng vi khuẩn lao nghiên cứu. Các nghiên cứu trên thế giới sử dụng công nghệ NGS cũng có phát hiện tương tự như kết quả của báo cáo này. Shea et al. (2021) khảo sát trên 139 chủng vi khuẩn lao xuất hiện đột biến gen rpoB bằng công nghệ NGS đã ghi nhận đột biến tại 11 codon trong đó cũng bao gồm đột biến tại các codon 432, 435, 445, 450, 452 và đột biến Ser450Leu có tỷ lệ xuất hiện cao nhất (58,6%).

Bên cạnh đó, bằng kỹ thuật NGS còn phát hiện đột biến ở codon 254 (T>C → Ser>Pro) mà chưa được WHO ghi nhận (tính đến năm 2021). Có 1 mẫu xuất hiện đột biến Ser254Pro và cũng là mẫu duy nhất xuất hiện 2 đột biến trên gen rpoB (Ser254Pro và Ser450Leu). Đột biến này là đột biến duy nhất trong số 9 vị trí đột biến được phát hiện trong nghiên cứu này nằm ngoài vùng RRDR và là đột biến mới, chưa ghi nhận trong dữ liệu đột biến của WHO (WHO, 2021a). Những đột biến ngoài vùng RRDR cũng có ảnh hưởng đến khả năng kháng RIF của vi khuẩn lao (Siu et al., 2011). Heep et al. (2001) ghi nhận 5 dòng MDR-TB không mang bất kỳ đột biến nào trong vùng RRDR của gen rpoB, mặc dù 5 chủng đó đã được khẳng định là mang kiểu hình kháng RIF. Lý do có thể là do các biến thể kiểu gen xảy ra hoặc sự hiện diện của các đột biến bên ngoài vùng 81 bp. Do đó, cần có những nghiên cứu sâu hơn để xác định xem đột biến Ser254Pro này có ảnh hưởng đến việc kháng RIF hay không.

3.2.2. Đặc điểm đột biến trên nhóm gen kháng INH

Các gen katG, inhA, ahpC là những gen chịu trách nhiệm trong sự kháng INH. Trong đó, đột biến trên gen katG đóng vai trò quan trọng và chiếm tỷ lệ cao trong các mẫu vi khuẩn lao kháng INH. Gen katG có 2.224 nucleotide, mã hóa cho 740 acid amin cấu tạo nên protein Catalase-peroxidase. Kết quả xác định đột biến trên gen katG cho thấy, phát hiện

được 52 đột biến trong tổng số 29 mẫu tại 2 vị trí trên gen: đột biến G>C làm thay đổi codon 315 (Ser>Thr) và đột biến G>T làm thay đổi codon 463 (Arg>Leu).

Bảng 2. Đặc điểm đột biến gen *katG* và *inhA*

Thay đổi nucleotide	Thay đổi acid amin	Số lần xuất hiện	Tỷ lệ
Gen katG			
944G>C	Ser315Thr	24/29	82,8%
1388G>T	Arg463Leu	28/29	96,6%
Gen inhA			
581T>C	Ile194Thr	1/29	3,4%

Đa số các mẫu đều xuất hiện đồng thời cả hai đột biến. Cụ thể, có 5 mẫu chỉ xuất hiện riêng lẻ một đột biến Arg463Leu và 1 mẫu chỉ xuất hiện riêng lẻ một đột biến Ser315Thr.

Nghiên cứu của Thái (2014) về bệnh nhân lao kháng thuốc đã phát hiện tổng cộng 25 vị trí codon đột biến trên gen katG. Trong số này, tỷ lệ đột biến tại vị trí codon 315 chiếm tỷ lệ cao nhất (69,5%), trong khi tỷ lệ tại các vị trí codon khác thấp hơn từ 0,7% đến 5,1%. Một nghiên cứu khác của Chaidir et al. (2018) với vi khuẩn lao kháng INH cũng tìm thấy đột biến tại codon 315 trên gen katG chiếm tỷ lệ cao nhất (48,27%). Tuy nhiên, nghiên cứu này cũng không ghi nhận đột biến tại vị trí codon 463. Trong khi đó, nghiên cứu này cho thấy đột biến tại codon 463 chiếm tỷ lệ cao nhất (96,6%). Có thể vì nghiên cứu sử dụng công nghệ NGS giúp khảo sát toàn bộ gen giúp ghi nhận những đột biến tốt hơn, nhiều hơn so với những nghiên cứu trước đây không sử dụng NGS.

Kết quả nghiên cứu tương thích với báo cáo của Ko et al. (2019). Ko và cộng sự sử dụng công nghệ NGS để xác định đột biến trên vi khuẩn lao kháng thuốc, trong đó đột biến Arg463Leu trên gen katG được xác định là biến thể phổ biến nhất và không gây kháng thuốc INH.

Nghiên cứu của Ko et al. (2019) cũng chỉ ra rằng trong số các biến thể liên quan đến kiểu hình kháng thuốc, đột biến katG Ser315Thr thường được tìm thấy nhất, điều này phù hợp với các báo cáo trước đó.

Nghiên cứu của Doorn et al. (2001) cũng đã tìm hiểu mối liên hệ giữa tính nhạy cảm của *Mycobacterium tuberculosis* đối với Isoniazid và đột biến Arg>Leu tại codon 463 của gen katG. Từ nghiên cứu này, Doorn et al. (2001) đã kết luận rằng sự hiện diện của đột biến Arg463Leu trong gen katG của *M. tuberculosis* không có mối liên hệ sinh học hay dịch tễ học với kháng thuốc INH, không có tính nhạy cảm cao đối với INH hoặc kháng đa thuốc ở *M. tuberculosis.* Tuy nhiên, các mẫu vi khuẩn lao được khảo sát trong nghiên cứu này đều là các mẫu vi khuẩn lao kháng thuốc và tần suất xuất hiện đột biến Arg463Leu nhiều hơn hẳn đột biến Ser315Thr. Như vậy, cần phải có nghiên cứu thêm về đột biến Arg463Leu đến khả năng kháng thuốc của vi khuẩn lao và trong mối tương quan với những đột biến khác.

Nghiên cứu cũng phát hiện 7 mẫu vi khuẩn xuất hiện đột biến ở ít nhất 1 trong các gen inhA, ahpC. Tuy nhiên, chỉ có duy nhất 1 mẫu xuất hiện đột biến sai nghĩa ở gen inhA, còn lại đều là các đột biến đồng nghĩa. Gen inhA có 810 nucleotide mã hóa cho 269 acid amin cấu tạo nên protein NADH-dependent enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase (NADH-dependent enoyl-ACP reductase). Đột biến tại acid amin thứ 194, biến đổi Isoleucine (Ile) thành Threonine (Thr).

Hai gen katG và inhA chịu trách nhiệm chính trong sự kháng INH. Ngoài đột biến trên gen katG, sự kháng INH phát sinh từ các đột biến ở vùng promoter của gen inhA. Đột biến phổ biến nhất trên promoter của gen inhA là -15C>T (đột biến ở vị trí nucleotide thứ 15 của promoter biến C>T), chiếm 19% trong số các dòng vi khuẩn lao kháng thuốc được phân lập (Lempens et al., 2018). Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu không phát hiện thấy kiểu đột biến -15C>T ở bất kì mẫu nào. Ko et al. (2019) cũng có ghi nhận tương tự như vậy. Một nghiên cứu của Callum et al. (2022) khảo sát về mức độ lưu hành và cơ sở di truyền của vi khuẩn lao kháng thuốc hàng 1 ở Cà Mau ghi nhận 4 vị trí đột biến trên gen inhA, trong đó có 3 đột biến ở promoter inhA: -15C>T (15/265 mẫu), -17G>T (2/265 mẫu), -8T>C (3/265 mẫu), và 1 đột biến ở codon thứ 21: Ile21Val (2/265 mẫu) tuy nhiên đột biến này không thể hiện kiểu hình kháng thuốc. Lempens et al. (2018) nghiên cứu về các mức độ kháng isoniazide của vi khuẩn lao ghi nhận được 3 đột biến: -15C>T, Ser94Ala, Ile194Thr. Theo Lempens et al. (2018), kiểu đột biến -15C>T tại vùng promoter inhA xuất hiện đơn lẻ thường có biểu hiện kháng INH ở mức độ thấp, trong khi sự xuất hiện đồng thời 2 đột biến -15C>T và Ile194Thr tạo nên sự kháng INH ở mức trung bình. Ile194Thr ảnh hưởng đến sự liên kết của NADH với enzyme và làm giảm tốc độ phản ứng do isoleucine 194 nằm trong khe liên kết của enzyme và gần với nguyên tử oxy của NADH. Rất có thể việc thay thế chuỗi isoleucine alkyl bằng nhóm hydroxyl của threonine làm phá vỡ kiểu liên kết hydro xung quanh NADH và làm giảm ái lực của

NADH với protein InhA. Sau đó, một tỷ lệ lớn hơn các phân tử InhA của tế bào sẽ được giữ lại ở dạng không gắn NADH do ái lực giảm. Theo Rozwarski et al. (1998), protein InhA ở dạng gắn NADH dễ bị tấn công bởi INH hoạt hóa hơn ở dạng phân tử tự do. Do đó ái lực của NADH thấp hơn sẽ bảo vệ hầu hết các phân tử InhA khỏi INH.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã khảo sát trên 29 mẫu vi khuẩn lao kháng thuốc tại tỉnh Đồng Tháp, ghi nhận 12 đột biến sai nghĩa trên 3 gen rpoB (9 đột biến), katG (2 đột biến), inhA (1 đột biến).

Trên gen rpoB ghi nhận đột biến Ser450Leu xuất hiện ở 17/29 mẫu (58,6%) và 7 đột biến khác xuất hiện với tỷ lệ 3,4%-6,8% (Gln432Lys, Asp435Tyr, Asp435Val, His445Tyr, His445Leu, Ser450Cys và Leu452Pro). Cả 8 đột biến này đều nằm trong vùng RRDR. Bên cạnh đó, nghiên cứu ghi nhận 1 đột biến mới chưa được báo cáo trong tài liệu của WHO (Ser254Pro) và đột biến này nằm ngoài vùng RRDR (WHO, 2021a), cần có thêm nghiên cứu về đột biến mới này trong mối tương quan với tính kháng thuốc RIF.

Gen katG ghi nhận 2 đột biến Ser315Thr (82,8%) và Arg463Leu (96,6%) và có 25 mẫu xuất hiện đồng thời 2 đột biến này trong bộ gen. Trong đó, đột biến Arg463Leu xuất hiện nhiều nhất trong nghiên cứu này nhưng chưa thấy ghi nhận trong các nghiên cứu trước đây. Do đó, mối liên hệ giữa hai đột biến này cần được xem xét cũng như sự ảnh hưởng của đột biến Arg463Leu đến tính kháng thuốc INH trong những nghiên cứu tiếp theo.

Nghiên cứu còn ghi nhận duy nhất 1 mẫu có đột biến trên gen inhA (Ile194Thr) được cho là có ảnh hưởng đến sự kháng INH.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Callum, J., Nguyen, P. T. B., Martinez, E., Nguyen, V. T., Garden, F., Nguyen, N. V., Nguyen, T. A., Nguyen, H. B., Nguyen, S. V., Luu, K. B., Ho, J., Linh, N. N., Britton, W. J., Sintchenko, V., Fox, G. J., & Marks, G. B. (2022). Prevalence and genetic basis of first-line drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Ca Mau, Vietnam. *ERJ open research*, *8*(4), 00122-2022. https://doi.org/10.1183/23120541.00122-2022

Caws, M., Thwaites, G., Stepniewska, K., Lan, N. T. N., Duyen, N. T. H., Phuong, N. T., Huyen, M. N. T., Duy, P. M., Loc, T. H., Chau, T. T. H., Van Soolingen, D., Kremer, K., Chau, N. V. V., Chinh, N. T., & Farrar, J. (2006). Beijing genotype of Mycobacterium tuberculosis is significantly associated with human immunodeficiency virus infection and multidrug resistance in cases of tuberculous meningitis. *Journal of Clinical Microbiology*, *44*(11), 3934-3939.

Chaidir, L., Ruesen, C., Dutilh, B. E., Ganiem, A. R., Andryani, A., Apriani, L., Huynen, A. M., Ruslami, R., Hill, C. P., Crevel R., & Alisjahbana, B. (2018). Use of whole genome sequencing to predict *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance in Indonesia. *Journal of Global Antimicrobial Resistance.* doi:10.1016/j.jgar.2018.08.018

Comas, I. (2017). Genomic Epidemiology of *Tuberculosis*. Advances in experimental medicine and biology, 1019, 79–93.

Doorn, H. R., Kuijper, E. J., Van Der Ende, A., Welten, A. G., Van Soolingen, D., de Haas, P. E., & Dankert, J. (2001). The susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and the Arg>Leu mutation at codon 463 of *katG* are not associated. *Journal of clinical microbiology*, *39*(4), 1591–1594. https://doi.org/10.1128/JCM.39.4.1591-1594.2001

Hà, N. T. (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 Y học).* Trường Đại học Y Hà Nội.

Heep, M., Brandstätter, B., Rieger, U., Lehn, N., Richter, E., Rüsch-Gerdes, S., & Niemann, S. (2001). Frequency of rpoB mutations inside and outside the cluster I region in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Journal of clinical microbiology*, *39*(1), 107–110. https://doi.org/10.1128/JCM.39.1.107-110.2001

Ko, D. H., Lee, E. J., Lee, S. K., Kim, H. S., Shin, S. Y., Hyun, J., Kim, J. S., Song, W., & Kim, H. S. (2019). Application of next-generation sequencing to detect variants of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: genotype–phenotype correlation. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, *18*(1), 1-8.

Lempens, P., Meehan, C. J., Vandelannoote, K., Fissette, K., de Rijk, P., Van Deun, A., Rigouts, L., & De Jong, B. C. (2018). Isoniazid resistance levels of *Mycobacterium tuberculosis* can largely be predicted by high-confidence resistance-conferring mutations. *Scientific reports*, *8*(1), 3246. https://doi.org/10.1038/s41598-018-21378-x

Matsui, T., Pinhata, J. M. W., Rabello, M. C. D. S., Brandão, A. P., Ferrazoli, L., Leão, S. C., Viana-Niero, C., & Oliveira, R. S. (2020). Frequency of first and second-line drug resistance-associated

mutations among resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from São Paulo, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, *115*, e200055. https://doi.org/10.1590/0074-02760200055

Minh, N. N., Bac, N. V., Son, N. T., Lien, V. T., Ha, C. H., Cuong, N. H., Mai, C. T., & Le, T. H. (2012). Molecular characteristics of rifampin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Vietnam. *Journal of clinical microbiology*, *50*(3), 598–601. https://doi.org/10.1128/JCM.05171-11

Paul, B., Gupta, H., Thokur, M. S., G, V. T., & Kapaettu, S. (2016). Repeat sequence analysis of *Mycobacterium Tuberculosis*. *Journal of Computational Methods in Sciences and Engineering*, *16*(1), 157–164. https://doi.org/DOI: 10.3233/JCM-160597

Rozwarski, D. A., G. A. Grant, D. H. R. Barton, W. R. Jacobs, Jr., & Sacchettini, J.C.. (1998). Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Science, 279*, 98-102.

Seemann, T. (2015). Snippy: rapid haploid variant calling and core SNP phylogeny. *GitHub. Available at: github. com/tseemann/snippy*.

Shea, J., Halse, T. A., Kohlerschmidt, D., Lapierre, P., Modestil, H. A., Kearns, C. H., Dworkin, F. F., Rakeman, J. L., Escuyer, V., & Musser, K. A. (2021). Low-Level Rifampin Resistance and *rpoB* Mutations in *Mycobacterium tuberculosis*: an Analysis of Whole-Genome Sequencing and Drug Susceptibility Test Data in New York. *Journal of clinical microbiology, 59*(4), e01885-20. https://doi.org/10.1128/JCM.01885-20

Siu, G. K. H., Zhang, Y., Lau, T. C., Lau, R. W., Ho, P., Yew, W. W., Lau, C. B., Cheng, V. C., Yuen, K., & Yam, W. (2011). Mutations outside the rifampicin resistance-determining region associated with rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *66*(4), 730–733. https://doi.org/10.1093/jac/dkq519

Thái, N. T. T. (2014). Nghiên cứu đặc điểm phân tử gen rpoB, katG của vi khuẩn lao đa kháng thuốc ở Việt Nam (luận án tiến sĩ Y học). Trường Đại học Y Hà Nội.

Ủy ban nhân dân tỉnh Đồng Tháp. (2021). *Báo cáo tổng kết công tác phòng, chống lao* (số 523/BC-UBND).

Walker, T. M., Kohl, T. A., Omar, S. V., Hedge, J., Del Ojo Elias, C., Bradley, P., Iqbal, Z., Feuerriegel, S., Niehaus, K. E., Wilson, D. J., Clifton, D. A., Kapatai, G., Ip, C. L. C., Bowden, R., Drobniewski, F. A., Allix-Béguec, C., Gaudin, C., Parkhill, J., Diel, R., Supply, P., & Modernizing Medical Microbiology (MMM) Informatics Group. (2015). Whole-genome sequencing for prediction of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility and resistance: a retrospective cohort study. *The Lancet. Infectious diseases*, *15*(10), 1193–1202.

WHO. (2021a). Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex and their association with drug resistance.

WHO. (2021b). Global *tuberculosis* report 2021.

Zenteno-Cuevas, R., Cuevas-Córdoba, B., & Parissi-Crivelli, A. (2019). rpoB, katG and inhA mutations in multi-drug resistant strains of Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from southeast Mexico. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *37*(5), 307-313.

Zhang, D., Gomez, J. E., Chien, J. Y., Haseley, N., Desjardins, C. A., Earl, A. M., Hsueh, P. R., & Hung, D. T. (2016). Genomic Analysis of the Evolution of Fluoroquinolone Resistance in Mycobacterium tuberculosis Prior to Tuberculosis Diagnosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *60*(11), 6600–6608. https://doi.org/10.1128/AAC.00664-16