

# ỨNG DỤNG KỸ THUẬT REALTIME PCR PHÁT HIỆN VI KHUẨN LAO KHÁNG THUỐC RIFAMPICIN VÀ ISONIAZID

Ngô Viết Quỳnh Trâm<sup>1</sup>, Nguyễn Thanh Quang<sup>2</sup>,  
Huỳnh Thị Hải Đường<sup>1</sup>, Lê Nữ Xuân Thanh<sup>1</sup>

(1) Đại học Y Dược Huế

(2) Trường Cao đẳng Y tế Quảng Nam

## Tóm tắt

**Đặt vấn đề:** Các phương pháp cấy truyền thông xác định độ nhạy cảm kháng sinh của vi khuẩn lao mất nhiều ngày đến vài tuần. Sử dụng kỹ thuật realtime PCR phát hiện nhanh lao kháng thuốc và đa kháng thuốc giúp cho bệnh nhân được điều trị sớm và đúng, vì vậy ngăn cản sự lây lan. **Mục tiêu:** 1. Xác định tỷ lệ các chủng lao kháng thuốc rifampicin, isoniazid và đa kháng thuốc phân lập từ các bệnh nhân lao tái phát. 2. Xác định tỷ lệ các đột biến kháng rifampicin và isoniazid trong các chủng đề kháng phenotype. **Phương pháp nghiên cứu:** thực hiện kỹ thuật kháng sinh đồ bằng phương pháp MODS cho 50 chủng lao phân lập được từ bệnh nhân lao tái phát, thực hiện realtime PCR với kit *MTB Real-TM Resistance 4* để phát hiện đột biến ở codon 531 trên gen *rpoB* liên quan đến rifampicin và đột biến ở codon 315 trên gen *katG* và codon 209 trên gen *inhA* liên quan đến isoniazid. **Kết quả:** Trong số các chủng lao được phân lập từ bệnh nhân lao tái phát có 8% chủng lao chỉ đề kháng với rifampicin và 60% chủng lao đa kháng thuốc. Kit *Sacace MTB Real-TM resistance 4* phát hiện được 80% chủng lao kháng rifampicine có đột biến gen *rpoB* codon 531 và 86,1% chủng lao kháng có đột biến gen *katG* codon. **Kết luận:** Kit *Sacace MTB Real-TM resistance 4* có thể không phát hiện được các chủng lao kháng thuốc có đột biến tại các codon khác của các gen kể trên.

**Từ khóa:** *M. tuberculosis*, đề kháng rifampicine, đề kháng isoniazid, MODS, realtime PCR.

## Abstract

### APPLICATION OF REALTIME PCR FOR DETECTING M.TUBERCULOSIS RESISTANT TO RIFAMPICIN AND ISONIAZID

Ngô Việt Quỳnh Trâm<sup>1</sup>, Nguyễn Thanh Quang<sup>2</sup>,  
Huỳnh Thị Hải Đường<sup>1</sup>, Lê Nữ Xuân Thanh<sup>1</sup>

(1) Hue University of Medicine and Pharmacy

(2) Quang Nam Medical College

**Introduction:** Conventional culture methods for antibiotic susceptibility testing for *M. tuberculosis* may take days to several weeks. Use of realtime PCR for rapid detection of drug and multidrug resistant tuberculosis could facilitate early initiation of appropriate anti-tubercular treatment regimen thereby interrupting transmission. **Objectives:** 1. Determine prevalence of rifampicin-, isoniazid- and multidrug-resistant tuberculosis strain among the patients with recurrent tuberculosis. Determine proportion of the mutations concern to tuberculosis strains resistant to rifampicin và isoniazid. **Methods:** Doing susceptibility test by MODS assay for 50 tuberculosis strains isolated from patients with

- Địa chỉ liên hệ: Ngô Viết Quỳnh Trâm, email: qtramnv@gmail.com

DOI: 10.34071/jmp.2015.4+5.15

- Ngày nhận bài: 3/8/2015 \* Ngày đồng ý đăng: 30/8/2015 \* Ngày xuất bản: 12/11/2015

recurrent tuberculosis, realtime PCR was performed by using *MTB Real-TM Resistance 4* kit to detect mutations in codon 531 of the *rpoB* gene related to rifampicine and mutations in codon 315 of the *katG* gene or in codon 209 of the *inhA* gene related to isoniazid. **Results:** Among tuberculosis strains isolated from patients with recurrent tuberculosis, there were 8% strains monoresistant to rifampicin and 60% multidrug-resistant strains. The *Sacace MTB Real-TM resistance 4* kit detected 80% tuberculosis strains resistant to rifampicine with the mutation in *rpoB* gene codon 531 and 86,1% tuberculosis strains resistant to isoniazid with the mutation in *katG* gene codon 315 among the strains determined by MODS assay. **Conclusion:** The *Sacace MTB Real-TM resistance 4* kit can't detect rifampicine-/ isoniazid - resistant tuberculosis strains which have mutations in other codons of the above gene.

**Key words:** *M. tuberculosis*, rifampicine-resistance, isoniazid-resistance, MODS, realtime PCR.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Năm 2011, Tổ chức Y tế thế giới ước tính có khoảng 650000 trường hợp bệnh lao đa kháng thuốc và khoảng 150000 bệnh nhân chết vì lao đa kháng thuốc (kháng đồng thời rifampicin và isoniazid). Nghiên cứu của Hiệp hội Lao và Bệnh phổi Quốc tế TP. Hồ Chí Minh khảo sát trong thời gian 1998-2000 tại khu vực nội thành cho thấy rằng tỷ lệ lao đa kháng thuốc ở bệnh nhân lao tái phát là 67% [1]. Lao đa kháng thuốc làm tăng tỷ lệ mắc bệnh và tỷ lệ tử vong. Phát hiện bệnh lao hoạt động và lao kháng thuốc là cách phòng ngừa sự lây truyền bệnh [4]. Nuôi cấy vi khuẩn lao và thực hiện kỹ thuật kháng sinh đồ thường cho kết quả chậm: phương pháp cấy MODS (Microscopic Observation Drug Susceptibility Assay) là 7 ngày, cấy máy tự động là 22 ngày và cấy trên môi trường Lowenstein-Jensen là 68 ngày [7]. Các phương pháp chẩn đoán cho kết quả nhanh rất cần thiết để ngăn chặn sự lây truyền bệnh lao và lao đề kháng thuốc. Kỹ thuật PCR phát hiện vi khuẩn lao kháng thuốc cho kết quả *đặc hiệu, nhanh và nhạy*.

Nhiều nghiên cứu của các tác giả khác nhau cho thấy có sự liên quan giữa các chủng lao kháng rifampicin (RIF) với đột biến điểm trên gen *rpoB*, cũng như giữa các chủng lao kháng isoniazid (INH) với đột biến điểm trên gen *katG* hoặc gen *inhA* [3],[5],[14].

Với những lý do trên, chúng tôi thực hiện đề tài này nhằm mục tiêu:

- Xác định tỷ lệ chủng vi khuẩn lao kháng RIF, INH và lao đa kháng thuốc được phân lập từ các bệnh nhân bị lao tái phát điều trị tại Bệnh

viện Lao và Bệnh phổi Quảng Nam.

- Xác định tỷ lệ các đột biến kháng rifampicin và isoniazid trong các chủng đề kháng thuốc.

## 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng

50 chủng vi khuẩn lao phân lập được từ các bệnh nhân bị lao tái phát tại Bệnh viện Lao và Bệnh phổi Quảng Nam từ tháng 1 đến tháng 7 năm 2014 và 6 chủng vi khuẩn lao đa kháng thuốc được lưu trữ tại Bộ môn Vi sinh Đại học Y Dược Huế.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp mô tả cắt ngang.

### 2.3. Vật liệu - Phương tiện nghiên cứu

+ Môi trường lỏng Middlebrook 7H9, OADC (oxalic acid, albumin, dextrose, và catalase) và PANTA (polymyxin, amphotericin B, acid nalidixic, trimethoprim, và azlocillin) của công ty Becton Dickinson dùng để nuôi cấy vi khuẩn lao.

+ Isoniazid, Rifampicin của công ty Sigma-Aldrich để phát hiện độ nhạy cảm kháng sinh của vi khuẩn lao.

+ Bộ kit chiết tách DNA theo phương pháp phenol / chloroform của công ty Việt Á, TP Hồ Chí Minh.

+ Bộ kit Realtime PCR định tính phát hiện vi khuẩn lao trên đoạn gen đích là 16S theo phương pháp Taq Man (công ty Việt Á).

+ Bộ kit Real time PCR *MTB Real – TM Resistance 4* chẩn đoán lao kháng thuốc isoniazide và rifampicine của hãng Sacace

Biotechnologies, Ý.

Nguyên lý dựa trên kỹ thuật realtime PCR Taq Man và PCR đa mồi cho phép phát hiện các đột biến gen của vi khuẩn lao. Một bộ các primer đặc hiệu được đánh dấu huỳnh quang ở đầu 5' và một đoạn oligonucleotide được đánh dấu quelquer đầu bổ sung 3'. Chứng dương nội tại được cho vào phản ứng. Phương pháp này cho phép phát hiện đến 3 đột biến điểm trong cùng một tube phản ứng. Nếu mẫu bệnh phẩm có chứa DNA đột biến, primer đặc hiệu được đánh dấu huỳnh quang ở đầu 5' sẽ tham gia phản ứng và tín hiệu huỳnh quang tăng ở cả probe chứng và primer đặc hiệu. Nếu mẫu bệnh phẩm không có gen đột biến, chỉ có chứng nội tại dương cho thấy tín hiệu huỳnh quang tăng.

Bộ kit *MTB Real – TM Resistance 4* phát hiện các đột biến gen *rpoB* codon 531 liên quan kháng thuốc RIF, *katG* codon 315 và *inhA* codon 209 liên quan kháng thuốc INH.

Bộ kit Sacace *MTB Real-TM resistance 4* có thể thực hiện cho các mẫu nuôi cấy vi khuẩn lao, đàm hay các bệnh phẩm lâm sàng khác.

Theo quy trình của kỹ thuật này, nếu thực hiện cho mẫu nuôi cấy thì cần phải đo độ đục của dịch treo cấy vi khuẩn, nếu  $\geq 10^5$  VK/ml thì có thể thực hiện trực tiếp kỹ thuật Real time PCR phát hiện lao kháng thuốc; nhưng nếu  $< 10^5$  VK/ml cần có một bước khuếch đại các đoạn gen *rpoB*, *katG* và *inhA* bằng kỹ thuật PCR đa mồi trước khi thực hiện kỹ thuật Realtime PCR phát hiện các đột biến gen trên. Trường hợp thực hiện cho mẫu bệnh phẩm như đàm, bước đầu tiên cần thực hiện là xác định định tính và định lượng vi khuẩn lao bằng kỹ thuật Real time PCR phát hiện đoạn gen IS6110 trong bệnh phẩm (không được cung cấp trong bộ kit): nếu số bản sao của đoạn IS6110  $\leq 5 \times 10^3$ /phản ứng thì cần phải nuôi cấy tăng sinh vi khuẩn; nếu số bản sao của đoạn IS6110  $> 5 \times 10^3$ /phản ứng thì cần có một bước khuếch đại các đoạn gen *rpoB*, *katG* và *inhA* bằng kỹ thuật PCR đa mồi trước khi thực hiện kỹ thuật Realtime PCR phát hiện các đột biến gen trên.

+ Ống nghiệm chứa môi trường, khay 24 giếng,

pipette định mức 2 ml và 5 ml, pipette Pasteur 3 ml, bộ micropipette và các đầu micropipette có lọc với các thể tích khác nhau, lam kính.

+ Kính hiển vi đảo ngược, tủ ấm 37°C.

Máy ly tâm 13000 vòng/phút (Eppendorf), máy ủ nhiệt (Eppendorf), máy real time PCR (Stratagene Mx3000).

## 2.4. Tiến hành

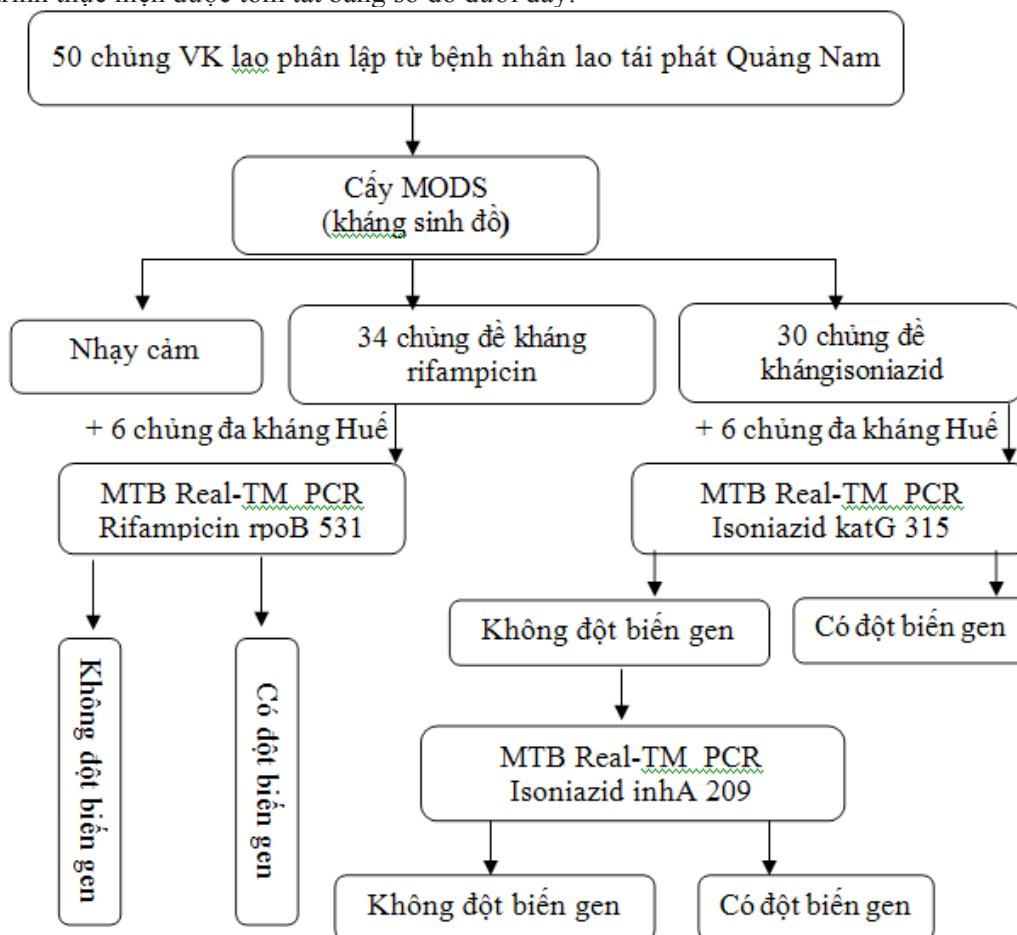
+ Pha môi trường lỏng bằng Middlebrook 7H9 thêm OADC và PANTA theo quy trình đã được mô tả [12], nồng độ kháng sinh cuối cùng trong môi trường nuôi cấy là INH: 0,1 µg/ml, Rifampicin: 1 µg/ml. Với mỗi mẫu đàm, cấy vào 3 giếng của khay 24 giếng, trong đó 1 giếng chứa môi trường không có kháng sinh, 1 giếng chứa môi trường có INH 0,1µg/ml và 1 giếng chứa môi trường có Rifampicin 1µg/ml. Ủ 37°C, xem kết quả mọc hàng ngày dưới kính hiển vi đảo ngược vật kính 20X từ ngày thứ 4 đến ngày thứ 15, cách ngày từ ngày thứ 16 đến 25. Để tránh ngoại nhiễm và an toàn các khay giếng được bọc kín trong bao nylon có khóa.

Đọc kết quả tính nhạy cảm với kháng sinh: Vi khuẩn nhạy cảm với kháng sinh: nếu vi khuẩn mọc tạo dây chỉ ở giếng không có kháng sinh và không mọc ở giếng có kháng sinh. Vi khuẩn đề kháng với kháng sinh: nếu vi khuẩn mọc tạo dây ở cả giếng có kháng sinh chứng tỏ vi khuẩn đề kháng với kháng sinh [10],[12]. Chứng vi khuẩn lao H37Rv dùng để làm chủng vi khuẩn chứng nhạy cảm với RIF và INH. Chủng vi khuẩn lao MTB\_HUE\_20 dùng để làm chủng chứng đề kháng với kháng sinh RIF và INH.

+ Tách chiết DNA từ vi khuẩn lao theo quy trình của công ty Việt Á cho những chủng vi khuẩn lao kháng RIF và/hoặc kháng INH được xác định bằng cấy MODS và 6 chủng vi khuẩn lao đa kháng thuốc được lưu trữ tại Bộ môn Vi sinh, Trường Đại học Y Dược Huế.

+Thực hiện kỹ thuật realtime PCR theo quy trình của bộ kit *MTB Real – TM Resistance 4* của hãng Sacace Biotechnologies, Ý [9] cho các chủng lao kháng thuốc phân lập được theo phương pháp cấy MODS và 6 chủng lao đa kháng lưu trữ ở Huế.

Quá trình thực hiện được tóm tắt bằng sơ đồ dưới đây:



### 3. KẾT QUẢ

#### 3.1. Tỷ lệ chủng lao kháng RIF, INH và đa kháng thuốc được xác định bằng cây MODS

Thực hiện cây MODS xác định các chủng vi

khuẩn lao kháng thuốc rifampicin và thuốc isoniazid cho 50 chủng vi khuẩn lao phân lập được từ các bệnh nhân bị lao tái phát tại Bệnh viện Lao và Bệnh phổi Quảng Nam chúng tôi thu được kết quả sau:

**Bảng 1.** Tỷ lệ các chủng vi khuẩn lao kháng thuốc xác định bằng phương pháp cây MODS

| MODS     | RIF |      | INH |      | RIF + INH |      |
|----------|-----|------|-----|------|-----------|------|
|          | n   | %    | n   | %    | n         | %    |
| Nhạy cảm | 16  | 32,0 | 20  | 40,0 | -         | -    |
| Đề kháng | 34  | 68,0 | 30  | 60,0 | 30        | 60,0 |
| Tổng     | 50  | 100  | 50  | 100  |           |      |

Trong số 50 chủng vi khuẩn lao có 34 (68%) chủng vi khuẩn lao kháng rifampicin, trong đó có 4 (8%) chủng chỉ kháng rifampicin và 30 (60%) chủng phối hợp kháng INH). Có 30 (60%) chủng kháng INH, đây cũng chính là 30 chủng lao đa kháng thuốc.

Thực hiện kỹ thuật nuôi cấy MODS cho 6 chủng vi khuẩn lao đa kháng được lưu trữ tại Bộ môn Vi sinh, Trường Đại học Y Dược Huế để xác định lại tính đa kháng thuốc của các chủng

vi khuẩn lao này và kết quả cho thấy 6 chủng vi khuẩn lao này là đa kháng thuốc.

#### 3.2. Tỷ lệ các đột biến kháng RIF và INH ở các chủng lao kháng thuốc

Thực hiện kỹ thuật realtime PCR phát hiện đột biến rpoB codon 531 kháng RIF đối với 34 chủng vi khuẩn lao đề kháng thuốc RIF được xác định kỹ thuật cây MODS và 6 chủng vi khuẩn lao đa kháng được lưu trữ tại Bộ môn Vi sinh chúng tôi có được kết quả ở bảng 2.

**Bảng 2.** Kết quả phát hiện đột biến gen *rpoB* codon 531

| <b>Realtime PCR<br/><i>rpoB</i> 531<br/>(kiểu đột biến<br/>Alm)</b> | <b>Có đột biến</b> |          | <b>Không đột biến</b> |          |
|---------------------------------------------------------------------|--------------------|----------|-----------------------|----------|
|                                                                     | <b>n</b>           | <b>%</b> | <b>n</b>              | <b>%</b> |
| Alm 1                                                               | 04                 | 10,0     | 8                     | 20,0     |
| Alm 2                                                               | 28                 | 70,0     |                       |          |
| Tổng cộng<br>(N = 40)                                               | 32                 | 80,0     | 8                     | 20,0     |

Trong số 40 chủng vi khuẩn lao kháng thuốc rifampicin được phát hiện bằng phương pháp MODS có 32 chủng (80%) có đột biến gen *rpoB* codon 531, trong đó kiểu Alm1 có 04 chủng (10%) và kiểu Alm2 có 28 chủng (70%). Có 8 chủng được xác định là đề kháng thuốc rifampicin nhưng không có đột biến gen *rpoB* codon 531.

Thực hiện kỹ thuật realtime PCR phát hiện đột biến gen *katG* codon 315 kháng INH đối với 30 chủng vi khuẩn lao đề kháng thuốc Isoniazid (Bằng kỹ thuật cấy MODS) trong 50 chủng vi khuẩn lao phân lập được từ các bệnh nhân bị lao tái phát tại Bệnh viện Lao và Bệnh phổi Quảng Nam và 6 chủng vi khuẩn lao đa kháng thuốc (MODS) được lưu trữ tại Khoa Vi sinh Trường Đại học Y Dược Huế, chúng tôi có được kết quả ở bảng 3.

**Bảng 3.** Kết quả phát hiện đột biến gen *katG* codon 315

| <b>Realtime PCR<br/><i>katG</i> 315<br/>(kiểu đột biến<br/>Alm)</b> | <b>Có đột biến</b> |          | <b>Không đột biến</b> |          |
|---------------------------------------------------------------------|--------------------|----------|-----------------------|----------|
|                                                                     | <b>n</b>           | <b>%</b> | <b>n</b>              | <b>%</b> |
| Alm 12                                                              | 01                 | 2,8      | 5                     | 13,9     |
| Alm 13                                                              | 30                 | 83,3     |                       |          |
| Alm 14                                                              | 0                  |          |                       |          |
| Tổng cộng (N = 36)                                                  | 31                 | 86,1     | 5                     | 13,9     |

Trong số 36 chủng vi khuẩn lao kháng thuốc INH được phát hiện bằng phương pháp MODS có 31 chủng có đột biến gen *katG* codon 315 (86,1%) gồm hai kiểu Alm 12 và Alm 13, trong đó kiểu Alm 13 chiếm đa số 83,3%. Không có đột biến gen *katG* codon 315 theo kiểu Alm 14 nào trong mẫu nghiên cứu của chúng tôi.

Tiếp tục thực hiện kỹ thuật realtime PCR phát hiện đột biến gen *inhA* codon 209 kháng thuốc

INH cho 5 chủng lao kháng thuốc isoniazid được xác định bằng phương pháp cấy MODS nhưng không có đột biến gen *katG* codon 315, chúng tôi không thu được kết quả dương tính nào.

#### 4. BÀN LUẬN

Nghiên cứu của Ngô Viết Quỳnh Trâm (2011) trên các đối tượng là bệnh nhân nghi mắc lao đến khám tại Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế cho kết quả 5,7% chủng lao đề kháng với INH, 31% đề kháng với RIF và 8,5% chủng vi khuẩn lao đa kháng thuốc [2]. Nghiên cứu của Hiệp hội Lao và Bệnh phổi Quốc tế TP. Hồ Chí Minh khảo sát trong thời gian 1998-2000 tại khu vực nội thành cho thấy rằng tỷ lệ lao đa kháng thuốc ở bệnh nhân lao tái phát là 67% [1]. Kết quả của chúng tôi có 68% chủng kháng rifampicin và 60% chủng kháng INH, đây cũng chính là các chủng lao đa kháng thuốc. Tỷ lệ kháng thuốc cao là do các chủng vi khuẩn lao được phân lập từ mẫu nghiệm đàm của các bệnh nhân được chẩn đoán lao tái phát, phù hợp với nghiên cứu trên.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi có 32 chủng (80%) trong số 40 chủng vi khuẩn lao kháng thuốc rifampicin có đột biến gen *rpoB* codon 531. Theo các kết quả của các nghiên cứu khác, các chủng vi khuẩn lao kháng thuốc rifampicin có đột biến điểm trên gen *rpoB* codon 531 là thường gặp nhất (70% -73%), ngoài ra còn có một số chủng kháng thuốc rifampicin có đột biến trên gen này nhưng tại các vị trí codon khác như codon 513 (27%) và codon 526 (7%) [11], [14].

Nghiên cứu của Moon và cộng sự (2014), cho kết quả độ nhạy trong chẩn đoán lao kháng thuốc Rifampicin của bộ kit Sacace MTB Real-TM resistance là 91,8% và độ đặc hiệu là 100%. Sacace MTB Real-TM resistance là bộ kit realtime PCR có thể phát hiện các đột biến đặc hiệu trên gen *rpoB* các tại các codon khác nhau như *rpoB* codon 531 (hai kiểu đột biến: Ser-Leu and Ser-Trp), *rpoB* codon 526-1 (3 kiểu đột biến: His-Tyr, His-Asp, and His-Arg), *rpoB* codon 526-2 (ba kiểu đột biến: His-Leu, His-Asn, and His-Pro), *rpoB* codon 516 (một kiểu đột biến: Asp-Val), *rpoB* codon 533 (một kiểu đột biến: Leu-Pro) [6]. Trong khi đó bộ



kít *Sacace MTB Real-TM resistance 4* được sử dụng trong nghiên cứu của chúng tôi chỉ có thể phát hiện được đột biến của gen *rpoB* codon 531, điều này phù hợp với kết quả của chúng tôi phát hiện được 80% trường hợp có đột biến gen *rpoB* trong số 40 chủng lao kháng thuốc Rifampicin được chẩn đoán bằng phương pháp cấy MODS, khả năng những chủng còn lại có thể có đột biến gen *rpoB* nhưng tại các vị trí codon khác. Chủng vi khuẩn lao MTB\_Hue\_20 - một trong 6 chủng lao đa kháng thuốc được phân lập từ bệnh nhân ở Huế được đưa vào đối tượng nghiên cứu - theo Ngô Viết Quỳnh Trâm (2012), đề kháng thuốc Rifampicin nhưng được xác định là không có đột biến trên gen *rpoB* bằng kỹ thuật giải trình tự gen (sequencing) [8], cũng cho thấy kết quả âm tính với kỹ thuật realtime với bộ kít *Sacace MTB Real-TM resistance 4*.

Nghiên cứu của Yao (2010) trên 50 chủng vi khuẩn lao phân lập được xác định kháng INH có 82% có đột biến gen *katG* codon 315 và 18% đột biến gen *inhA*-15, còn các chủng nhạy cảm với thuốc Rifampicin và thuốc Isoniazid đều không tìm thấy đột biến gen *rpoB*, *katG* và *inhA* [14]. Nghiên cứu của Tessema (2012) bằng sử dụng kỹ thuật MTBDRplus cho kết quả sau: trong số 35 chủng kháng thuốc INH có 33 (94%) trường hợp có đột biến trong gen *katG* codon 315, 6% chủng có đột biến trong gen *inhA* codon C15T [11].

Kết quả của chúng tôi cho thấy trong số 36 chủng vi khuẩn lao kháng thuốc INH được phát hiện bằng phương pháp MODS, có 31 chủng có đột biến gen *katG* codon 315 (86,1%). Bằng kỹ thuật realtime PCR với bộ kít *Sacace MTB Real-TM resistance 4* chúng tôi có 5 chủng (13,9%) vi khuẩn lao kháng thuốc INH không được phát hiện đột biến trên gen *katG* 315 cũng như gen *inhA* codon 209, có thể giải thích là do hiện tượng đột biến xảy ra tại các vị trí codon khác. Cũng theo Ngô Viết Quỳnh Trâm, chủng vi khuẩn lao MTB\_Hue\_20 đa kháng thuốc được xác định có đột biến

gen *katG* nhưng tại codon 463 [8], vì vậy kết quả realtime PCR âm tính với kháng thuốc INH khi sử dụng bộ kít trong đề tài này là phù hợp.

Với quy trình và các điều kiện của bộ kít *Sacace MTB Real-TM resistance 4* để thực hiện và chẩn đoán vi khuẩn lao đề kháng thuốc Rifampicin và thuốc Isoniazid như đã mô tả ở trên, chúng tôi nhận thấy rằng nếu sử dụng bộ kít này cho các mẫu bệnh phẩm lâm sàng của bệnh nhân cần phải thực hiện nhiều giai đoạn như đầu tiên dùng kỹ thuật Realtime PCR IS6110 (không bao gồm trong bộ kít) để xác định và định lượng vi khuẩn lao trong mẫu, nếu số bản sao của đoạn IS6110  $\leq 5 \times 10^3$ /phản ứng thì cần phải nuôi cấy tăng sinh vi khuẩn, rồi sau đó đo độ đục của dịch treo cấy vi khuẩn để thực hiện tiếp các bước tiếp theo. Như vậy, đối với những phòng xét nghiệm không có xét nghiệm nuôi cấy vi khuẩn lao thường quy thì khó có thể áp dụng kỹ thuật này. Bộ kít *Sacace MTB Real-TM resistance 4* phát hiện đột biến gen thường gặp của vi khuẩn lao là gen *rpoB* codon 531 kháng thuốc RIF và gen *katG* codon 315 hay *inhA* codon 209 kháng INH. Bộ kít này không phát hiện được các đột biến khác. Vì vậy, khi sử dụng bộ kít này sẽ có thể bỏ sót chẩn đoán một số trường hợp kháng thuốc mặc dù trên lâm sàng có triệu chứng.

## 5. KẾT LUẬN

- Thực hiện phương pháp cấy MODS cho 50 chủng vi khuẩn lao được phân lập từ bệnh nhân lao tái phát, tỷ lệ chủng lao chỉ kháng rifampicin là 8% và đa kháng thuốc là 60%, không có chủng lao chỉ kháng INH.

- Khả năng phát hiện vi khuẩn lao kháng rifampin do đột biến gen *rpoB* codon 531 và kháng isoniazid do đột biến gen *katG* codon 315 của bộ kít *Sacace MTB Real-TM resistance 4* trong số các chủng đã được xác định kháng thuốc bằng phương pháp cấy MODS là 80% và 86,1% theo thứ tự và không có chủng vi khuẩn lao kháng isoniazid do đột biến gen *inhA* codon 209.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phan Thượng Đạt (2013), “Chương 1: Dịch tễ bệnh lao kháng thuốc”, Lao kháng thuốc, Nhà xuất bản Y học, tr 11-25.
2. Ngô Viết Quỳnh Trâm, Nguyễn Thị Châu Anh, và cs (2011). “Nuôi cấy vi khuẩn lao và phát hiện lao đa kháng thuốc bằng phương pháp MODS”.

- Tạp chí Thông tin Y Dược học, Bộ Y tế, Số 9, tr. 13-16.
3. Jagielski T, Grzeszczuk Metal. (2013), "Identification and analysis of mutations in the *katG* gene in multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates", *Pneumonol. Alergol. Pol.*, 81, pp 298–307.
  4. Mark F Brady, J Coronel, RH Gilman, DAJ Moore (2008), "The MODS method for diagnosis of TB and multidrug resistant TB", A companion to the user guide at modsperu.org (mods video.flv).
  5. Moaddab SR, Farajnia Setal. (2011), "Isoniazid MIC and *KatG* Gene Mutations among *Mycobacterium tuberculosis* is Isolates in Northwest of Iran", *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 14(6), pp 540-545.
  6. Moon H-W, Hur M, Kim J-Y, Yun Y-M (2014), "Comparison of Three Molecular Assays for the Detection of Rifampicin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*", *Journal of clinical laboratory analysis*, 00, pp 1-4.
  7. Moore D, Evans C et al. (2006), "Microscopic-Observation Drug-Susceptibility Assay for the Diagnosis of TB", *The New England Journal of Medicine*, 355 (15), 1539-1550.
  8. Ngo Viet Quynh Tram (2011), *Molecular epidemiology and phenotypic and genetic characterization of Mycobacteria isolated in Central Vietnam*, Tesi di dottorato, XXIV Ciclo, Università degli studi di Sassari.
  9. Sacace Biotechnologies (2010), *MTB Real-TM Resistance 4 Handbook*, 44 Scalabrini, str 22100 Como, Italy.
  10. Singh S, Kumar P, Sharma S, et al (2012), "Rapid Identification and Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*: Standard Operating Procedure for Non Commercial Assays. Part 1: Microscopic Observation Drug Susceptibility Assay", *Journal of Laboratory Physicians*, 4(2), pp 101-111.
  11. Tessema B, Beer J, Emmrich F, et al (2012), "Analysis of gene mutations associated with isoniazid, rifampicin and ethambutol resistance among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Ethiopia", *BMC Infectious Diseases*, 12(37).
  12. Universidad Peruana Cayetano Heredia (2008), *A user guide Microscopic observation drug susceptibility assay*, [http://www.mods-peru.org/MODS\\_user\\_guide.pdf](http://www.mods-peru.org/MODS_user_guide.pdf).
  13. WHO: Treatment of drug-resistant tuberculosis. Treatment of tuberculosis Guidelines, 2009, 4th ed, pp.83-92.
  14. Yao C, Zhu T, Li Y, et al "Detection of *rpoB*, *katG* and *inhA* gen mutations in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Chongqing as determined by microarray", *Clin Microbiol Infect*, 16, pp 1639–1643.