

NGHIÊN CỨU TÌNH HÌNH KHÁNG THUỐC VÀ ĐẶC ĐIỂM PHÂN TỬ GEN RPOB CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN LAO KHÁNG ĐA THUỐC.

TỔNG QUAN

1. Tổng quan tình hình nghiên cứu thuốc lĩnh vực của đề tài

Bệnh lao là một trong 4 bệnh truyền nhiễm hàng đầu gây tỷ lệ tử vong cao nhất trên thế giới ngày nay. Bệnh lao cũng đứng hàng thứ 7 trong số các bệnh gây tử vong toàn cầu. Hiện nay, trên thế giới có khoảng 2,2 tỷ người đã nhiễm lao (chiếm 1/3 dân số thế giới). Theo số liệu công bố của WHO, ước tính trong năm 2006 có thêm khoảng 9,3 triệu người mắc lao mới và 2,4 triệu người chết do lao. Khoảng 95% số bệnh nhân lao và 98% số người chết do lao ở các nước có thu nhập vừa và thấp, 75% số bệnh nhân lao cả nam và nữ ở độ tuổi lao động. Trong đó, có khoảng 80% số bệnh nhân lao toàn cầu thuộc 22 nước có gánh nặng bệnh lao cao.

Hiện nay, tỷ lệ điều trị thành công trên toàn cầu đạt 85%, nhưng tỷ lệ phát hiện chỉ đạt 44% số bệnh nhân ước tính. Như vậy, còn rất nhiều bệnh nhân lao không được chữa trị đang tiếp tục lây bệnh cho cộng đồng, và theo ước tính của WHO, mỗi năm có thêm 1% dân số thế giới bị nhiễm lao (65 triệu người). Hơn 33% số bệnh nhân lao toàn cầu tại khu vực Đông-Nam châu Á.

Tình hình lao kháng thuốc, theo thông báo của WHO năm 2007, tỷ lệ lao kháng đa thuốc là 4,8%. Tỷ lệ lao kháng thuốc tiên phát với ít nhất 1 loại thuốc là 17% (từ 0% đến 56,3%), kháng isoniazid là 10,3%, kháng đa thuốc thay đổi từ 0% đến 22,3%. Trường hợp kháng thuốc thứ phát: kháng ít nhất 1 loại thuốc là 35%, kháng isoniazid là 27,7%, tỷ lệ kháng đa thuốc là 15,3%, tỷ lệ kháng đa thuốc mở rộng là 7,0%. Tại Uzbekistan tỷ lệ đa kháng thuốc lên đến 60,0%, Azerbaijan là 55,8%. Trung Quốc, Ấn Độ, Liên bang Nga là những nước có tỷ lệ lao kháng thuốc lớn nhất. Hiện nay 69 nước và vùng lãnh thổ được xác định là xảy ra lao kháng đa thuốc, và 45 nước xuất hiện lao kháng đa thuốc mở rộng. Theo ước tính của WHO, tỷ lệ lao kháng đa thuốc mở rộng tăng từ 1 triệu ca đến 1,5 triệu ca trong khoảng thời gian từ 2-3 năm.

Vi khuẩn lao kháng đa thuốc đang là một thách thức lớn cho toàn cầu. Trong khi thuốc chống lao hàng đầu chỉ có 5 thuốc, thì thuốc chống lao loại hai thường có độc tính cao và giá thành rất đắt. Những người mắc bệnh lao với chủng vi khuẩn kháng đa thuốc mở rộng cần phải điều trị trên 2 năm so với từ 6-8 tháng trước đây và chi phí điều trị cũng tăng lên gấp 100 lần.

Theo WHO, Việt Nam nằm trong số 12 quốc gia có gánh nặng bệnh lao cao nhất thế giới. Trong khu vực Tây - Thái Bình Dương, Việt Nam đứng thứ ba sau Trung quốc và Philipinnes về số lượng bệnh nhân lao lưu hành cũng như bệnh nhân lao mới xuất hiện hàng năm. Theo báo cáo của Chương trình chống lao quốc gia năm 2006, tổng số người mắc lao là 161.000, trong đó số người mắc lao mới khoảng 149.000, số lao thứ phát là 12.000 người.

Theo Chương trình chống lao quốc gia năm 2006, tình hình kháng thuốc của vi khuẩn lao tại Việt Nam đang là một vấn đề đáng lo ngại, tỷ lệ kháng thuốc tiên phát là 30,7% vào loại cao trên thế giới. Tỷ lệ kháng đa thuốc chung là 4%, trong đó tỷ lệ đa kháng thuốc thứ phát là 19,3%, tỷ lệ đa kháng thuốc tiên phát là 2,7%. Ước tính đến 2015, số ca tử vong do lao khoảng 14.000.

Bệnh lao ở Việt Nam còn gặp nhiều khó khăn trong chẩn đoán và điều trị, do trình độ dân trí thấp, việc phát hiện vi khuẩn vẫn hầu hết dựa vào xét nghiệm tìm vi khuẩn trực tiếp, tỷ lệ phát hiện chỉ đạt 44% số bệnh nhân ước tính. Nhiễm vi khuẩn lao kháng thuốc là nguyên nhân dẫn đến thất bại trong điều trị và tử vong. Vì vậy việc phát hiện và ngăn chặn sự lây lan của các chủng vi khuẩn lao kháng thuốc là vấn đề quan trọng nhất trong chiến lược phòng chống bệnh lao hiện nay.

Phát hiện sớm các chủng vi khuẩn lao kháng thuốc có ý nghĩa rất lớn trong liệu pháp điều trị, làm

giảm lan truyền sự đề kháng và tác động điều trị có hiệu quả. Trong các loại kháng thuốc của vi khuẩn lao thì kháng rifampicin và isoniazid - những kháng sinh chủ lực trong điều trị lao - được quan tâm nhất vì thường dẫn đến thất bại trong điều trị và tử vong. Sự đề kháng với 2 thuốc chống lao dòng 1 này được cho là do có sự đột biến các gen *rpoB* và *KatG*.

Với các chủng lao kháng rifampicin hiện nay đã xác định được là do có đột biến ở gen *rpoB*, nhất là đoạn "mutation hot spot region". Mỗi một nucleotid trên đoạn gen này có thể mất đi, bị thay thế, hoán đổi vị trí, thêm vào, tạo ra các đột biến là nguyên nhân của kháng rifampicin.

Các nghiên cứu cụ thể hơn được tiến hành từ các vùng khác nhau trên thế giới đã chỉ ra rằng tần số của các đột biến đặc biệt thay đổi đáng kể giữa các cộng đồng dân tộc và các vùng địa lý.

Còn với các chủng lao kháng isoniazid thì thường do đột biến ở vị trí codon 315 trên gen *KatG*.

Để xác định đột biến ở gen *rpoB* và gen *KatG* hiện có thể sử dụng phương pháp Sequencing cho phép phát hiện nhanh và chính xác các đột biến. Giải trình tự gen sản phẩm sau PCR đã trở thành kỹ thuật được sử dụng rộng rãi nhất để phát hiện lao kháng thuốc.

Các nghiên cứu về tính kháng thuốc của vi khuẩn lao cho thấy, rất hiếm các chủng kháng rifampicin đơn thuần mà thường có ít nhất 90% các chủng lao lâm sàng kháng rifampicin thì đồng thời cũng kháng INH. Như vậy việc phát hiện các chủng lao kháng rifampicin cũng có nghĩa là xác định được lao kháng đa thuốc. Hơn 95% các chủng lao kháng rifampicin phát hiện có đột biến tại gen *rpoB*. Và hầu hết các chủng lao kháng rifampicin (các chủng này kháng đa thuốc) đều có đột biến ở vùng lõi 81 bp. Nếu gắn các gen này vào genom của chủng *M. smegmatis* nhạy cảm rifampicin thì các chủng này cũng trở nên kháng rifampicin. Vì vậy có thể áp dụng công nghệ sinh học phân tử để phát hiện khả năng kháng đa thuốc của vi khuẩn lao.

Các phương pháp sinh học phân tử thường được sử dụng nhiều hơn cả là nghiên cứu về gen có lợi thế là thời gian xác định ngắn hơn rất nhiều, không phải nuôi cấy, nguy cơ nhiễm sinh học thấp và có thể tự động hóa. Phương pháp gồm hai bước cơ bản: sử dụng kỹ thuật PCR để khuếch đại các đoạn gen của genom ở các chủng đề kháng sau đó đánh giá sản phẩm khuếch đại để xác định các đột biến đặc hiệu liên quan đến tính kháng thuốc.

Kỹ thuật sequencing đã trở thành một kỹ thuật để phát hiện sự đề kháng ở *M. tuberculosis*. Nó được sử dụng để xác định nhanh và chính xác các đột biến ở gen *rpoB*, nhất là đoạn "mutation hot spot region" (đặc hiệu cho sự kháng rifampicin) và gen *KatG*. Amina Abdelaal và cộng sự sử dụng kỹ thuật sequencing phát hiện 92,3% số trường hợp có đột biến điểm tại vị trí codon 315 trên gen *KatG* liên quan kháng INH, 86,9% đột biến trên gen *rpoB* (trong đó gặp nhiều nhất ở vị trí codon 516) liên quan kháng rifampicin.

2. Danh mục các công trình đã công bố thuộc lĩnh vực của đề tài của chủ nhiệm và những thành viên tham gia nghiên cứu (họ và tên tác giả; bài báo; ấn phẩm; các yếu tố về xuất bản)

- Nguyễn Thái Sơn, Hoàng Văn Tổng, Bùi Tiến Sỹ (2007) "Hoàn thiện quy trình PCR đối với hai gen mới IS 1081 và 23S rDNA trong nâng cao hiệu quả chẩn đoán lao", Tạp chí y dược học quân sự, Volume 32, No 2. p 31-37.

- Nguyễn Thái Sơn, Hoàng Ngọc Hiền, Lê Thu Hồng, Nguyễn Văn Hưng (2005), "Phát hiện gen rpoB Ở những chủng vi khuẩn lao kháng rifampicin ", Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống, Bộ khoa học công nghệ và môi trường, p 1228-1230
- Nguyễn Thị Thu Thái (2009), " Lao kháng đa thuốc và kháng đa thuốc mở rộng: thách thức, mối đe dọa và biện pháp trong kiểm soát", Tạp chí y học thực hành, số 8 (670) tháng 08/2009.

MỤC TIÊU

1. Xác định các đặc điểm phân tử gen rpoB liên quan kháng đa thuốc của các chủng vi khuẩn lao.
2. So sánh mức độ phù hợp giữa kết quả kháng sinh đồ với tỷ lệ đột biến trên gen rpoB.

NỘI DUNG

- Thu thập chủng vi khuẩn lao và lao kháng thuốc ở các viện Lao và bệnh phổi Trung Ương, Bệnh viện Đa khoa Trung ương Huế, Bệnh viện Phạm Ngọc Thạch ở TP HCM và một số bệnh viện khu vực khác.
- Tách ADN từ các chủng vi khuẩn lao theo 3 nhóm: nhạy, kháng đơn và kháng đa thuốc; trong mỗi nhóm lại bao gồm các chủng lao của 3 miền theo tỷ lệ tương ứng.
- PCR, multiplex PCR xác định vi khuẩn lao và nhân đoạn gen đích tương ứng với tính kháng các kháng sinh chống lao.
- Giải trình tự gen, phân tích xác định vị trí đột biến, điểm đột biến, loại đột biến liên quan kháng thuốc trong những chủng vi khuẩn lao ở Việt Nam.
- Phân tích, xử lý số liệu rút ra những đặc trưng về đặc điểm phân tử của các chủng lao kháng đa thuốc.
- * Xác định các đặc điểm phân tử gen rpoB liên quan kháng đa thuốc của các chủng vi khuẩn lao.
- Các vị trí đột biến trên gen rpoB, tỷ lệ từng vị trí.
- Các hình thái đột biến trên gen rpoB, tỷ lệ từng loại
- Mức độ liên quan của vị trí đột biến trên gen rpoB đến kháng rifampicin
- Mức độ liên quan của hình thái, kiểu đột biến trên gen rpoB đến kháng rifampicin.
- Các thay đổi cấu trúc phân tử trên gen rpoB liên quan đến kháng đa thuốc.
- * So sánh mức độ phù hợp giữa kết quả kháng sinh đồ với tỷ lệ đột biến trên gen rpoB.
- Tỷ lệ vi khuẩn lao kháng thuốc (kháng đơn, kháng đa thuốc, kháng đa thuốc mở rộng).
- So sánh độ phù hợp của các phương pháp sinh học phân tử so với phương pháp kháng sinh đồ trong chẩn đoán lao kháng thuốc.
- Tỷ lệ vi khuẩn lao kháng thuốc đối với kháng sinh chống lao dòng 1 và 2.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

- Thu thập các chủng vi khuẩn lao từ các loại bệnh phẩm đờm, dịch màng phổi, dịch rửa phế quản, dịch màng bụng, dịch màng phổi...
- Tất cả các chủng vi khuẩn này đều được nuôi cấy và làm kháng sinh đồ xác định tính kháng thuốc trước khi nghiên cứu tìm đặc điểm phân tử gen rpoB liên quan kháng đa thuốc (lấy 75 chủng vi khuẩn lao theo 3 nhóm: nhạy, kháng đơn và kháng đa thuốc).
- Tách chiết ADN từ vi khuẩn lao bằng phương pháp DNAPRE-BOOM.
 - Phương pháp PCR: ADN đã tách chiết được dùng làm khuôn cho phản ứng PCR có chiều dài 528 bp, khuếch đại trên vùng kháng rifampicin của gen rpoB cùng với cặp primers đặc hiệu:

VSF1: 5'-ACCGACGACATCGACCACTT-3'

VSR1: 5'- GGC GGT CAG GTA CAC GAT CT-3'

- Phương pháp tách dòng gen rpoB:

Vùng ADN đặc hiệu quyết định đến kháng Rifampin được khuếch đại trên gen rpoB. Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch được tạo vector tái tổ hợp bằng kit A1360- Promega.

Khẳng định kết quả quá trình tách dòng bằng cách kiểm tra plasmid tái tổ hợp theo hai phương pháp: phương pháp PCR và phương pháp thủy phân sử dụng enzym giới hạn EcoRI.

- Phương pháp giải trình tự ADN

Các chủng đa kháng, đa kháng mở rộng tách dòng thành công và sản phẩm PCR của chủng đơn kháng, chủng nhạy thuốc được giải trình tự ADN, trên hệ thống ABI Prism® 3130XL Genetic analyzer (Applied Biosystems, USA), cùng với các bộ sinh phẩm BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems; DyeEx™ 2.0 Spin kit; QIAGEN

- Phân tích kết quả giải trình tự, xác định được đột biến liên quan kháng RIF của các chủng vi khuẩn lao kháng thuốc.

HIỆU QUẢ KTXH

ĐƠN VỊ SỬ DỤNG