

PHÁT HIỆN CÁC ĐỘT BIẾN TRÊN GEN *KatG* LIÊN QUAN ĐẾN TÍNH KHÁNG THUỐC ISONIAZID CỦA MỘT SỐ VI KHUẨN LAO THU THẬP Ở MIỀN TRUNG VÀ MIỀN NAM VIỆT NAM

Nghiêm Ngọc Minh^{1,2,✉}, Nguyễn Thị Hoài Thu¹

¹Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: nghieminh@igr.ac.vn

Ngày nhận bài: 23.01.2017

Ngày nhận đăng: 02.4.2018

TÓM TẮT

Nhiễm vi khuẩn lao (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) là một trong những nhiễm trùng phổ biến nhất ở người. Tuy nhiên, tỷ lệ phát hiện chỉ đạt 37% số bệnh nhân ước tính. Hiện nay, bệnh lao đang trở nên nghiêm trọng hơn với sự xuất hiện của nhiều chủng vi khuẩn lao với đặc trưng là kháng đa thuốc, lao kháng thuốc phổ rộng và lao đồng nhiễm HIV/AIDS. Những chủng vi khuẩn lao kháng isoniazid (INH) đồng thời cũng kháng với nhiều kháng sinh chống lao khác. Phương pháp sinh học phân tử cho phép chẩn đoán nhanh và chính xác các trường hợp bệnh nhân bị nhiễm vi khuẩn lao kháng thuốc. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng cặp mồi *katG*-F và *katG*-R đã được thiết kế nhằm khuếch đại đoạn gen *katG* có kích thước 684 bp ở 7 chủng vi khuẩn lao thu thập tại bệnh viện Phạm Ngọc Thạch -Thành phố Hồ Chí Minh và bệnh viện Trung ương Huế. Phân tích trình tự đoạn gen *katG* cho thấy xuất hiện đột biến tại codon 315 ở 5 mẫu, đó là đột biến thay thế 1 nucleotide (G thành C), dẫn đến amino acid tại codon 315 được biến đổi từ Serine thành Threonine (S315T). Ở mẫu DA5 đã xuất hiện thêm một đột biến mới tại codon 324, với amino acid là D324G. Mẫu DA1 không thấy xuất hiện đột biến trên codon nào của đoạn gen *katG* nghiên cứu. Kết quả này có ý nghĩa rất lớn trong việc thay đổi phác đồ điều trị và kiểm soát bệnh lao ở một nước có mức độ bệnh nhân lao cao như tại Việt Nam.

Từ khóa: Gen *katG*, isoniazid, kháng đa thuốc, vi khuẩn lao

MỞ ĐẦU

Vi khuẩn lao (*Mycobacterium tuberculosis* - MTB) thuộc giống *Mycobacterium*, họ *Mycobacteriaceae* (Nguyễn Đình Bảng, 1992). Đây là vi khuẩn truyền nhiễm được Tổ chức Y tế thế giới (WHO) khuyến cáo về tình trạng khẩn cấp toàn cầu bởi mức độ lây lan và hậu quả nghiêm trọng của chúng gây ra đối với sức khỏe con người. Theo ước tính của WHO trên thế giới có khoảng 42 vạn người mắc lao đa kháng thuốc, chiếm số lượng lớn nhất là ở khu vực Tây Thái Bình Dương có 15 vạn trường hợp, kế đến là khu vực Đông Nam Á và sau đó là khu vực Châu Phi và Đông Âu. Ở Việt Nam mỗi năm có khoảng 100.000 người mắc bệnh lao và 20.000 người chết, đứng thứ 12 trong tổng số 22 quốc gia có số bệnh nhân lao cao (Bộ Y tế, 2006). Ngày nay, bệnh lao càng trở nên nghiêm trọng hơn khi xuất hiện các chủng lao kháng đa thuốc (Multi-Drugs Resistant -

MDR), lao kháng thuốc phổ rộng (Extensively Drug Resistance - EDR) và lao đồng nhiễm HIV/AIDS. Vì vậy, việc nghiên cứu chẩn đoán vi khuẩn lao kháng thuốc có ý nghĩa hết sức to lớn đối với y học cũng như sức khỏe con người.

Hai phương pháp chẩn đoán lao kháng thuốc được sử dụng rộng rãi hiện nay là phương pháp xác định kiểu hình và phương pháp xác định kiểu gen. Trong đó phương pháp xác định kiểu hình dựa trên khả năng phát triển của vi khuẩn lao trong môi trường nuôi cấy có kháng sinh phải mất 4 – 8 tuần và đòi hỏi nồng độ của mẫu cao nên độ nhạy của phản ứng thấp. Khắc phục những nhược điểm trên, phương pháp xác định kiểu gen dựa trên cơ sở xác định đột biến ở các gen có liên quan kháng thuốc tương ứng như giải trình tự gen, lai trên pha rắn, real-time PCR ... (Trần Văn Sáng, 1999). Trong đó giải trình tự gen vẫn là phương pháp cơ bản, xác định MDR trong các mẫu bệnh phẩm lâm sàng chính xác và rõ ràng nhất.

Genome của *M. tuberculosis* được giải trình tự, phân tích và công bố năm 1998 gồm 4.411.529 bp, chứa 65% guanine và cystosine. Trên 90% trình tự được dự đoán là có mã hóa cho protein và chỉ có 6 gen giả (pseudogene) (Palomino *et al.*, 2007). Gen *katG* là một đoạn DNA có kích thước 2.223 bp, chịu trách nhiệm mã hóa cho *catalase peroxidase*. Enzyme này làm hoạt hóa INH bằng cách kết hợp axyl isonicotinic với NADH để tạo thành phức hệ axyl isonicotinic-NADH. Phức hệ này liên kết chặt chẽ với enzyme ketoenoylreductase (mã hóa bởi gene *InhA*), theo đó làm ngăn cản cơ chất enoyl-AcpM. Quá trình này làm ức chế sự tổng hợp acid mycolic cần cho thành tế bào vi khuẩn lao. Cơ chế phân tử của tính kháng INH chủ yếu có liên quan tới đột biến thêm đoạn/mất đoạn hoặc các đột biến nhằm nghĩa/vô nghĩa, trong đó chủ yếu diễn ra tại codon 315 và 463 (Ser → Thr) của gen *katG* mã hóa *catalase peroxidase* (Campbell *et al.*, 2001). Nếu có sự biến dạng hay đột biến ở base thứ 2 của *katG* (AGC biến thành ACC hay ACA) sẽ dẫn đến làm giảm hoặc mất hoàn toàn hoạt tính của *catalase peroxidase*, do đó *M. tuberculosis* sẽ trở thành kháng thuốc INH (Elis *et al.*, 2001). Do đó phát hiện sự thay đổi di truyền này trong gen *katG* có thể cung cấp một phương pháp sàng lọc nhanh và chính xác cho việc phát hiện các chủng *M. tuberculosis* kháng isoniazid.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguồn vi khuẩn lao

Các chủng vi khuẩn lao *M. tuberculosis* được phân lập từ bệnh viện Phạm Ngọc Thạch, Thành phố Hồ Chí Minh và bệnh viện Trung ương Huế do Học viện Quân y cung cấp đã được ký hiệu theo quy định của Học viện Quân y (Bảng 1).

Bảng 1. Các mẫu vi khuẩn lao *M. Tuberculosis*.

Số thứ tự	Mã DNA	Mã Chủng
1	H37Rv	NC_000962
2	S1	TB06-24
3	S2	TB06-25
4	N1	TB06-140
5	DA1	TB05 - 1
6	DA3	TB05 - 97
7	DA4	TB05 - 108
8	DA5	TB05 - 117

Chủng chuẩn quốc tế *M. tuberculosis* H37Rv có nguồn gốc từ Phòng xét nghiệm Trung tâm về Vi khuẩn và Virus, Cộng hòa Pháp.

Các sinh phẩm, hóa chất chính

Hóa chất dùng cho phản ứng PCR (Fermentas Inc.), kit tách chiết plasmid (Qiagen Inc.), vector nhân dòng pBT, chủng vi khuẩn *E. coli* DH5α và một hóa chất khác như: cao nấm men, peptone từ ICN (Mỹ), các enzyme *Bam*HI, T4 ligase (Fermentas Inc.),

Chủng *M. tuberculosis* được nuôi cấy trên môi trường Lowenstein-Jensen. Các chủng *E. coli* được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng (10 g/l Bactotryptone; 5 g/l Yeast extract; 10 g/l NaCl; pH 7,2).

Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế môi

Các cặp môi được thiết kế tại những vùng có tính bảo thủ cao nhất, nằm gần trung tâm của gen *katG* ở chủng đại chuẩn H37Rv. Trên cơ sở đó, các cặp môi đặc hiệu *katG-F* (5'-GAGCCCGATGAGGTCTATTG-3') và *katG-R* (5'-GTCTCG GTGGATCAGCTTGT-3') được thiết kế để nhân vùng gen 684 bp của gen *katG*.

Tách chiết DNA và khuếch đại gen

DNA tổng số của *M. tuberculosis* được tách chiết theo phương pháp phenol/chloroform/isoamyl alcohol (Phạm Hùng Văn, 2007). Phản ứng PCR nhân đoạn gen *katG* đặc hiệu với thể tích 25 µl gồm: 2,5 µl đệm PCR 10X; 2 µl MgCl₂ 25 mM; 2,5 µl dNTP 2,5 mM; 1 µl mỗi loại môi *katG-F* và *katG-R* (10 pmoles/µl); 0,25 µl Taq DNA polymerase 5 U/µl; 3 µl mẫu DNA tổng số, 12,75 µl nước tinh khiết đã loại trừ ion. PCR thực hiện theo chu trình nhiệt như sau: 01 chu kỳ ở 95°C/5 phút; 32 chu kỳ ở (94°C /1 phút; 56°C /45 giây; 72°C /1 phút); 01 chu kỳ ở 72°C /10 phút; và giữ ở 4°C đến khi phân tích.

Xác định trình tự DNA và phân tích kết quả

Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch được xác định trình tự nucleotide trên máy đọc trình tự tự động ABI PRISM 3100 Avant Data Collection v.1.0.

Sử dụng phần mềm BioEdit để phân tích trình tự của gen *katG* có kích thước khoảng 0,7 kb, so sánh, đối chiếu với các dữ liệu trên Ngân hàng gen để xác

định các vị trí đột biến của từng chủng nghiên cứu, đồng thời xác định các mối liên quan kháng thuốc.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tách chiết DNA và khuếch đại gen

DNA tách từ các chủng *M. tuberculosis* được kiểm tra đủ chất lượng dùng làm khuôn để nhân gen *katG* bằng phản ứng PCR với cặp mồi *katG*-F và *katG*-R. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1% (Hình 1) đã thu được một băng DNA đặc hiệu từ tất cả các chủng nghiên cứu, có kích thước khoảng 0,7 kb, (trùng khớp với kích thước 684 bp dự đoán khi thiết kế mồi).

Kết quả điện di kiểm tra sau khi PCR nhân gen *katG* cho thấy, cả 7 mẫu bệnh phẩm có chứa vi khuẩn lao đều cho kết quả đoạn DNA của gen *katG* có chiều dài khoảng 0,7 kb. Các vạch DNA rõ ràng, đặc hiệu, không có vạch phụ kèm theo và có kích thước đúng theo dự tính. Do vậy, sản phẩm PCR của 7 chủng vi khuẩn lao này được chúng tôi sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Xác định các vị trí đột biến trên gen *katG* liên quan đến tính kháng thuốc isoniazid ở các chủng

Đoạn gen *katG* của các chủng vi khuẩn lao trong nghiên cứu này, sau khi đọc trình tự và xử lý kết quả đã xuất hiện các đột biến khác nhau trên các chủng lao kháng thuốc. Kết quả được thể hiện trong hình 2.

Để kiểm tra liệu sự thay đổi nucleotide trên gen của các chủng có làm thay đổi các amino acid trong chuỗi polypeptide hay không, chúng tôi đã tiến hành phân tích trình tự amino acid, so sánh các mẫu nghiên cứu với nhau và với chủng H37Rv. Kết quả được trình bày trên hình 3.

Kết quả từ hình 2 và 3 cho thấy, đột biến đã xuất hiện ở 5 mẫu trên tổng số 7 mẫu nghiên cứu. Đột biến có thể xảy ra ở một điểm hoặc nhiều điểm trên đoạn gen *katG*.

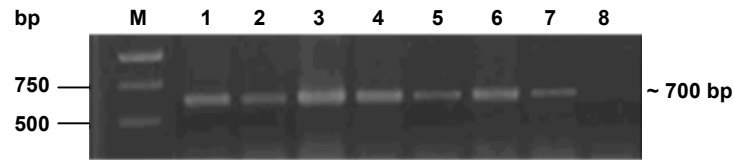
Trong số 5 mẫu nghiên cứu có mang đột biến ở gen *katG* thì cả 5 mẫu đều bị đột biến tại codon 315. Đột biến tại codon 315 này là đột biến thay thế 1 nucleotide loại G thành loại C, sự thay thế này làm bộ mã AGC trở thành ACC. Sự thay đổi nucleotide này đã làm thay đổi amino acid tại codon S315T (Serine thành Threonine).

Abete và đồng tác giả (2001) khi giải trình tự gen *katG* của 68 chủng vi khuẩn lao kháng INH phân lập ở châu Âu đã thu được 62 mẫu (91%) có đột biến tại codon 315 AGC→ACC (S315T), 4 mẫu (6%) có đột biến AGC→ACC (S315T) và 2 mẫu (3%) có đột biến AGC→ACA (S315T). Các đột biến hiếm xảy ra khác như (AGC→ATC [S315I] và AGC→CGC [S315R]) cũng đã được tìm thấy trong các nghiên cứu đối với các chủng vi khuẩn lao được phân lập từ châu Phi (<http://vi.wikipedia/wiki/cochedoclucuvikhuon>).

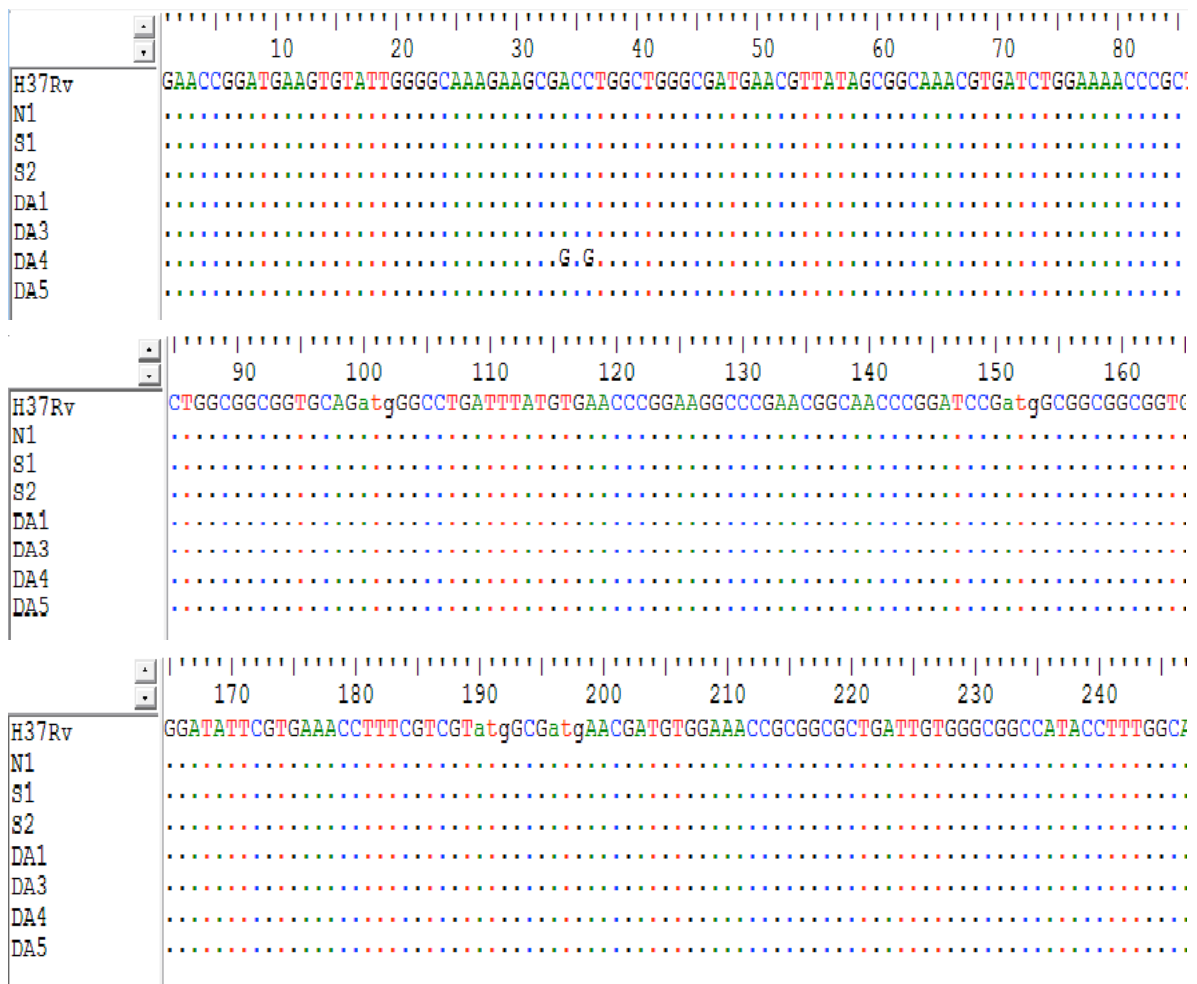
Năm 2008, Aslan và đồng tác giả đã tiến hành thu thập mẫu bệnh phẩm tại nhiều vùng khác nhau ở Châu Á để xác định các đột biến liên quan đến tính kháng thuốc trên các gen *katG*, *inhA*, *rpoB*. Kết quả cho thấy có 25 mẫu được chẩn đoán có liên quan đến tính kháng isoniazid trong số 30 mẫu nghiên cứu đã phát hiện có 4 điểm đột biến trên gen *katG*. Tại codon 315, có các dạng đột biến S315T, S315N và S315I, trong đó dạng đột biến S315T chiếm tỷ lệ lớn nhất (72%) (Aslan *et al.* 2008). Trong nghiên cứu này, chúng tôi chỉ gặp một dạng đột biến ở codon S315T, không gặp dạng đột biến S315I và S315N, có thể là do số lượng mẫu còn hạn chế, hoặc đây có thể là dạng đột biến đặc trưng cho từng vùng địa lý. Như vậy, các mẫu lao kháng thuốc được thu thập từ nhiều nơi trên thế giới có đặc điểm chung là xảy ra đột biến tại codon 315 với dạng biến đổi amino acid điển hình là S315T, với tần suất rất cao. Bên cạnh đó, đột biến S315I, S315N và S315R xảy ra với tần suất nhỏ hơn. Như vậy, nghiên cứu của chúng tôi hoàn toàn thống nhất với các công bố trong và ngoài nước khác.

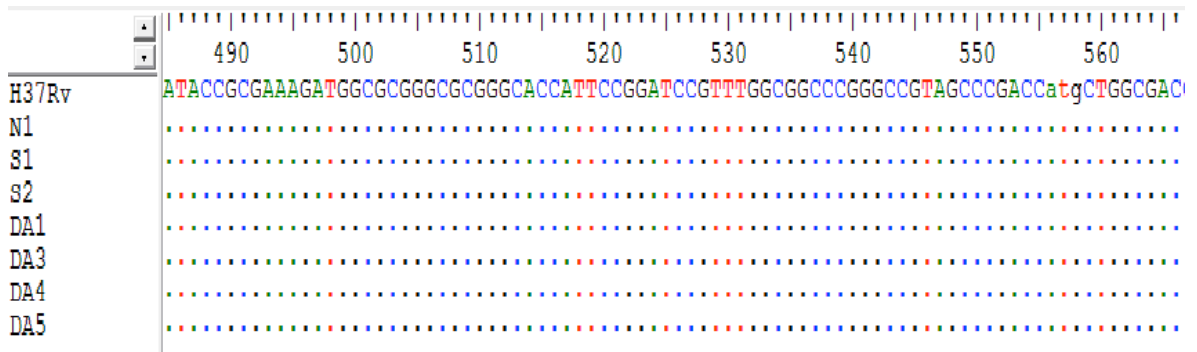
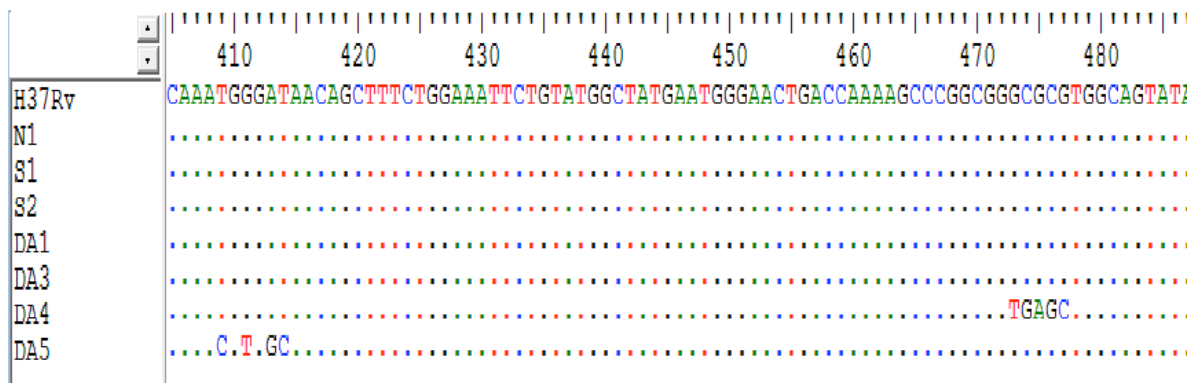
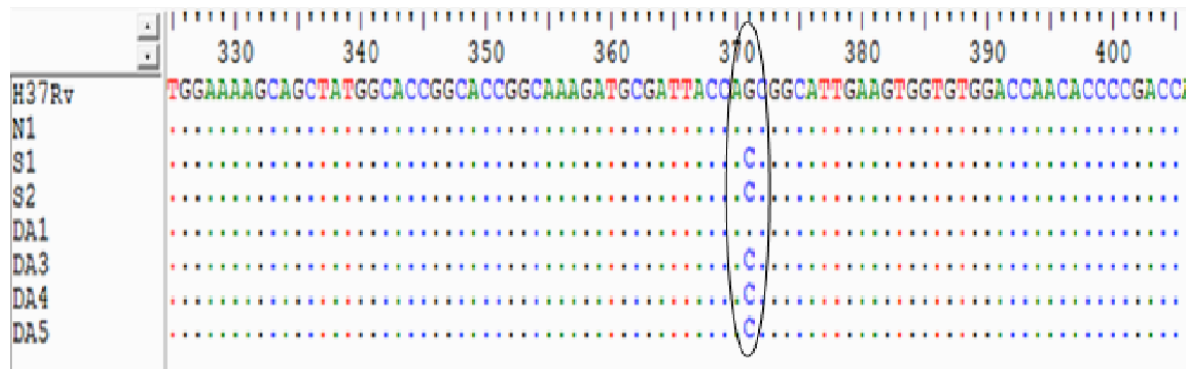
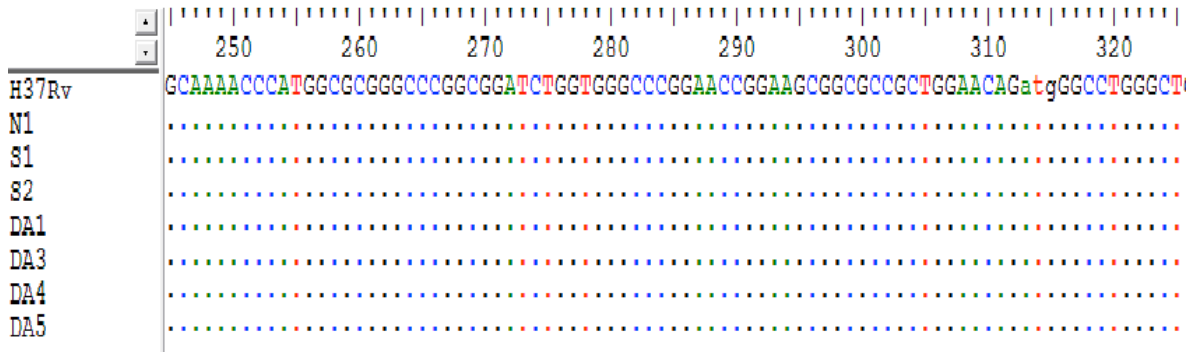
Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phát hiện ra một đột biến mới ở mẫu DA5, xuất hiện tại codon 324, biến đổi amino acid ở dạng D324G. Với số lượng hạn chế và chưa có điều kiện phân tích sâu về polypeptide nên chúng tôi chưa khẳng định được đột biến này có liên quan tới tính kháng thuốc isoniazid hay không. Để có thể đưa ra một kết luận chính xác về tính kháng thuốc của các mẫu bệnh phẩm này, cần số lượng mẫu lớn hơn và được thu thập ở nhiều nơi khác nhau để tiến hành nghiên cứu.

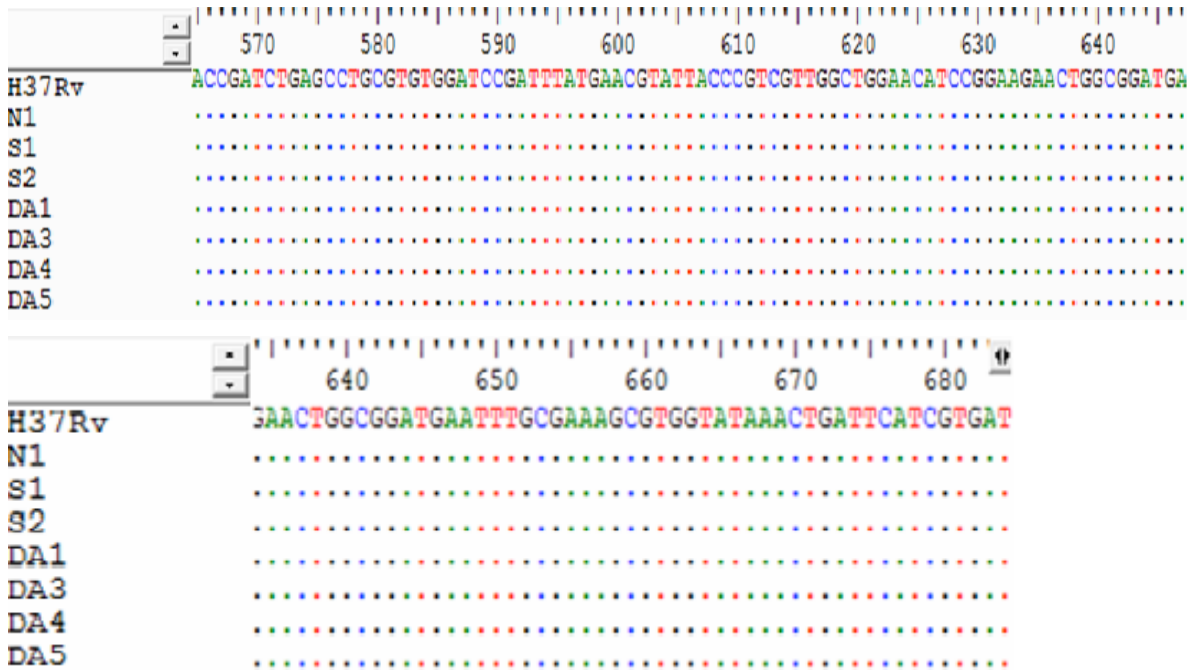
Riêng ở mẫu DA1 không thấy có sự đột biến trên codon nào của đoạn gen *katG*, nhưng theo chẩn đoán kháng sinh đồ thì mẫu DA1 kháng 2 loại thuốc là (Isoniazid và Streptomycin (Số liệu không trình bày ở đây)). Như vậy, gen *katG* của mẫu DA1 có thể mang đột biến tại codon ngoài vùng gen mà chúng tôi nghiên cứu.



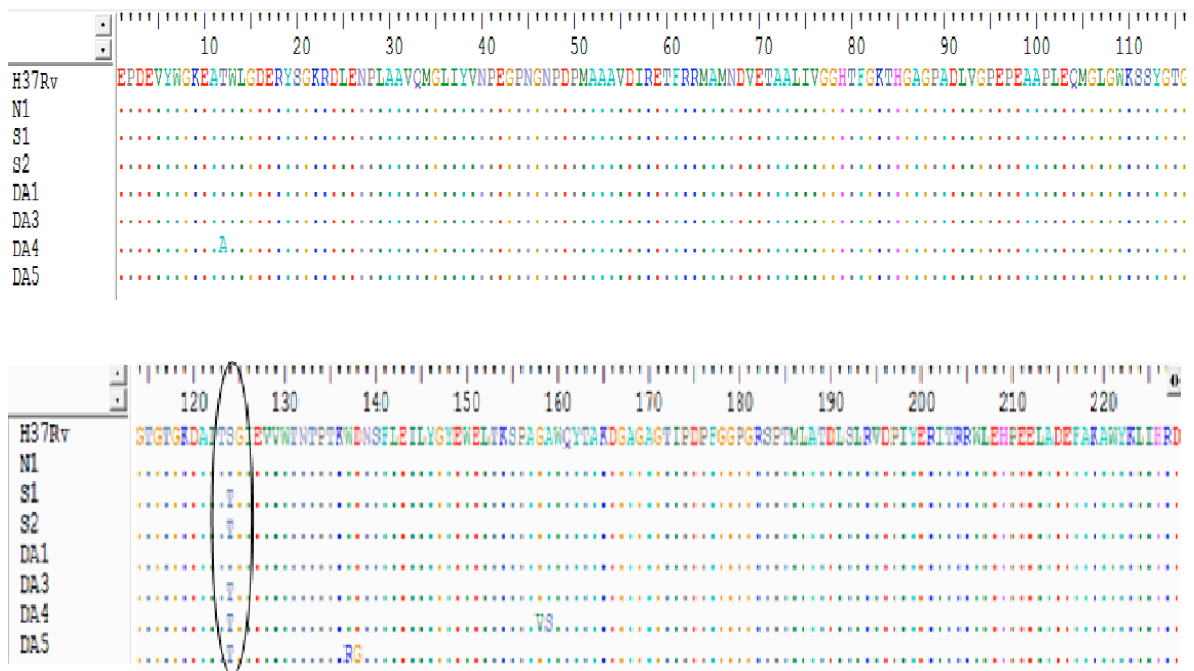
Hình 1. Điện di đồ sản phẩm PCR nhân đoạn gen *katG* từ DNA các chủng vi khuẩn lao. M: Maker 1kb. Giếng 1-7: Thứ tự các mẫu nghiên cứu S1, S2, DA1, DA3, DA4, DA5, N; Giếng 8: Đối chứng âm.







Hình 2. So sánh trình tự nucleotide các mẫu nghiên cứu với trình tự nucleotide của chủng đại chuẩn H37Rv.



Hình 3. So sánh trình tự acid amin của các mẫu nghiên cứu với chủng chuẩn H37Rv.

KẾT LUẬN

Trong 7 mẫu vi khuẩn lao xác định trình tự đoạn gen *katG* trong nghiên cứu này, có 5 mẫu xuất hiện đột biến tại codon 315. Đó là đột biến thay thế 1 nucleotide loại G thành loại C, làm bộ mã AGC trở thành ACC, đã làm amino acid biến đổi từ Serine thành Threonine (S315T).

Ở mẫu DA5 đã xuất hiện thêm một đột biến mới tại codon 324, trong đó amino acid Aspartic (D) được Glycine (G) (D324G). Mẫu DA1 không thấy xuất hiện đột biến trên codon nào của đoạn gen *katG* nghiên cứu.

Lời cảm ơn: Công trình này được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài nhánh “Nghiên cứu tối ưu hóa quy trình xác định nhanh các chủng vi khuẩn lao và lao kháng thuốc bằng kỹ thuật sinh học phân tử” thuộc chương trình KC10/06-10. Cảm ơn Học viện Quân y đã cung cấp mẫu vi khuẩn lao cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Abate G, Hoffner SE, Thomsen VO, Miorner H (2001) Characterization of isoniazid-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* on the basis of phenotypic properties and mutations in *katG*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20: 329–333.

Aslan G, Tezcan S, Serin MS, Emekdas G (2008) Genotypic analysis of isoniazid and rifampicin resistance in drug-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis*

complex isolates in southern tukey. *Jpn Infect Dis* 61(4): 255–260.

Bộ Y tế, Trung tâm phòng chống lao quốc gia (2006) *Báo cáo tổng kết Chương trình chống lao quốc gia 2005*. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.

Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, Darst SA (2001) Structure Mechanism for Rifampicin Inhibition of bacteria RNA polymerase. *Cell* 104: 901–912.

Dalla Costa ER, Ribeiro MO, Silva MS, Arnold LS, Rostirolla DC, Cafrune PI, Espinoza RC, Palaci M, Telles MA, Ritacco V, Suffys PN, Lopes ML, Campelo CL, Miranda SS, Kremer K, da Silva PE, Fonseca Lde S, Ho JL, Kritski AL, Rossetti MLElis RDC, Marta OR, Márcia SNS, Liane SA, Diana CR, Patricia IC, Roger CE, Moises P, Maria AT, Viviana R, Philip NS, Maria LL (2009) Correlations of mutations in *katG*, *oxyR-ahpC* and *inhA* genes and in vitro susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains segregated by spoligotype families from tuberculosis prevalent countries in South America. *BMC Microbiol* 9: 39.

Nguyễn Đình Bảng (1992) *Vi sinh vật Y học*. Nhà Xuất bản Học viện Quân Y, Hà Nội.

Palomino JC, Leao SC, Ritacco V (2007) *Tuberculosis 2007 – from basic science to patient care* (www.tuberculosis textbook.com).

Phạm Hùng Vân (2007) Các quy trình kỹ thuật sinh học phân tử thường được sử dụng trong chẩn đoán và nghiên cứu y (<http://www.nk-biotek.com.vn>).

Trần Văn Sáng (1999) *Vi khuẩn lao kháng thuốc, cách phòng và điều trị*. Nhà xuất bản Giáo dục, Hà Nội.

DETECTION OF MUTATIONS IN THE *KatG* GENE RELATED TO ISONIAZID RESISTANCE OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COLLECTED IN CENTRAL AND SOUTH VIETNAM

Nghiêm Ngọc Minh^{1,2}, Nguyễn Thị Hoài Thu¹

¹Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology

²Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Infection of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) is one of the most common infections in humans. However, the detection rate is only 37% of estimated patients. Currently, Tuberculous bacteria (TB) are becoming more serious with many TB strains developing multi-drug resistance, and particularly, in case of co-infection with TB and HIV/AIDS. The isoniazid resistant TB strains (INH) also resistant to the other anti-TB antibiotics. The molecular biology methods have allowed rapid and accurate diagnosis of patients infected with drug-resistant TB bacteria. In this study, we used primers *katG-F* and *katG-R* designed for amplification of a fragment of 684 bp in *katG* gene in 7 strains of TB bacteria collected in Pham Ngoc Thach - Ho Chi Minh city

and Hue Central hospitals. Sequence analysis of the *katG* gene fragments showed that 5 samples had substitution mutations at codon 315 (point mutation G to C), leading to the change of amino acid from Serine to Threonine (S315T). In the 5th sample there appeared another mutation at codon 324, changing amino acid Aspartic (D) to Glycine (G) (D324G). In the sample DA1, no mutation has been found in any codon in the *katG* gene fragment studied. The results obtained in this study may have important implications in changing the treatment regimen and control of tuberculosis in a country with high number of TB patients as in Vietnam.

Keywords: *isoniazid, katG gene, multi-drug resistant, Mycobacterium tuberculosis.*