

CHẨN ĐOÁN NHANH VI KHUẨN LAO KHÁNG RIFAMPICIN BẰNG KỸ THUẬT KHUẾCH ĐẠI GEN ĐA MỖI ĐẶC HIỆU ALEN

*Hoàng Quốc Trường**; *Nguyễn Trọng Chính**; *Trần Thị Thanh Huyền***
*Trần Thị Huyền Trang**; *Nguyễn Văn Hưng***; *Vũ Thị Kim Liên****; *Lê Hữu Song**

TÓM TẮT

Nuôi cấy vi khuẩn (VK) làm kháng sinh đồ để đánh giá kháng thuốc. Sử dụng kỹ thuật khuếch đại gen đa mỗi đặc hiệu alen (MAS-PCR) và so sánh kết quả với giải trình tự gen để tìm đột biến gen kháng thuốc. Kết quả: 15 chủng VK lao được nuôi cấy thành công, trong đó 3 chủng đa kháng. Kết quả MAS-PCR đã phát hiện đột biến tại các vị trí rpoB516, rpoB526 và rpoB531 trong 1 ngày. Giải trình tự đoạn gen *rpoB* đã khẳng định kết quả đột biến trên. So với giải trình tự gen và nuôi cấy VK, kỹ thuật MAS-PCR thực hiện trong thời gian ngắn hơn (1 ngày so với 3 và 30 ngày).

* Từ khóa: Lao; MAS-PCR; Đột biến; Kháng thuốc*.

RAPID DETECTION OF RIFAMPICIN RESISTANCE MUTATIONS IN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* USING MULTIPLEX ALLELE SPECIFIC POLYMERASE CHAIN REACTION ASSAY

SUMMARY

Bacteria culture was used to assess antibiotic resistance. To detect tuberculosis (TB) resistant to rifampicin (RIF), we used multiplex allele specific polymerase chain reaction assay (MAS-PCR) and compared the results with DNA sequencing. Results: 15 strains of TB were cultured successfully, among those, three strains were multidrug-resistant. The results showed that point mutation in the specific position rpoB516, rpoB526 and rpoB531 was detected through MAS-PCR assay within a day. The results of MAS-PCR were confirmed by rpoB gene sequencing. Compared with sequencing and bacterial culture techniques, the MAS-PCR was performed in a shorter time (1 day compared with 3 and 30 days).

* *Key words: Tuberculosis; MAS-PCR; Mutation; Drug resistance.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), Việt Nam xếp thứ 12 trong tổng số 22 quốc gia có số bệnh nhân (BN) lao cao nhất toàn cầu

với tỷ lệ lao đa kháng nguyên phát 2,3%. Theo thống kê của Chương trình Phòng chống Lao Quốc gia hàng năm, cả nước có thêm 120.000 BN lao các thể, trong đó 55.000 - 60.000 BN ho khạc ra VK. Mỗi ngày có

** Bệnh viện TWQĐ 108

** Bệnh viện Phổi TW

*** Viện Vệ sinh Dịch tễ TW

Phản biện khoa học: PGS. TS. Nguyễn Thái Sơn
khoảng 50 người chết vì bệnh lao. Mỗi lo ngại hàng đầu chính là tình trạng kháng đa thuốc của VK lao do kiểm soát và phát hiện

khống chế lao đa kháng thuốc trong cộng đồng rất khó khăn. Bên cạnh đó, chi phí để điều trị lao kháng đa thuốc cao hơn hàng

chục lần so với kinh phí để điều trị lao thông thường.

Rifampicin (RIF) là kháng sinh chủ lực trong điều trị lao. Theo WHO, lao đa kháng là VK lao kháng đồng thời RIF và INH. Do đó, các xét nghiệm phát hiện kháng RIF là bắt buộc trong chẩn đoán lao kháng đa thuốc [3]. VK lao kháng RIF là do chúng có khả năng tự biến đổi gen *rpoB*, gen mã hóa cho tiểu đơn vị β -ARN polymerase, trong hệ gen của chúng. Đến nay, chẩn đoán VK lao kháng RIF dựa trên việc phát hiện đột biến trong đoạn gen chứa 81 nucleotide. Các kỹ thuật sinh học phân tử được sử dụng để phát hiện đột biến gen *rpoB* bao gồm: giải trình tự gen [1], polymerase chain reaction single-stranded conformation polymorphism (PCR-SSCP) [2], PCR-ELISA và allele-specific PCR assay [6]. Tuy nhiên, phương pháp có một số ưu, nhược điểm riêng nên chưa được sử dụng rộng rãi trong thực hành.

Kỹ thuật khuếch đại gen đa mồi (Multiplex PCR) là một trong những kỹ thuật sinh học phân tử sử dụng hơn một cặp mồi (primer) trong cùng một phản ứng khuếch đại gen (PCR). Với kỹ thuật này, nhiều đoạn gen khác nhau trong cùng một hệ gen (genome) của đối tượng nghiên cứu sẽ nhân lên. Kỹ thuật này giúp giảm bớt thời gian làm xét nghiệm bằng phản ứng PCR đơn lẻ, tiết kiệm công sức và chi phí. Multiplex PCR được ứng dụng rộng rãi tại nhiều phòng thí nghiệm sinh học phân tử trên thế giới để chẩn đoán nhanh, chính xác các mầm bệnh vi sinh vật, đặc biệt trong chẩn đoán lao [8]. Kỹ thuật nhân đặc hiệu alen (allele - specific amplification - ASA) là một kỹ thuật khác trong chẩn đoán sinh học phân tử được ứng dụng để xác định các đột biến điểm đặc hiệu trên trình tự gen cần nghiên cứu.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi ứng dụng công nghệ kết hợp lợi thế của hai kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại. Nhân gen đa mồi

(multiplex PCR); khuếch đại đặc hiệu alen trong chẩn đoán phát hiện VK lao kháng RIF.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

VK lao và chủng VK lao đa kháng thuốc: các chủng VK lao MTB-103, N21, A11, N1, N11, N12, S40, N66, N2, S48 và S11 được phân lập tại Khoa Miễn dịch Phân tử, Viện Vệ sinh Dịch tễ TW theo quy trình chuẩn hiện hành. 4 chủng lao đa kháng HRSE: MTB-182HN, MTB-215HN, MTB-230HN và MTB-224HN, được nuôi cấy và làm kháng sinh đồ tại Bệnh viện Phổi TW theo quy trình chuẩn.

2. Phương pháp nghiên cứu.

Chủng VK lao đa kháng thuốc được hòa trong đệm Tris-HCl (pH 7,5) và biến tính 30 phút ở 100°C. Sau biến tính, 200 μ l dung dịch bất hoạt VK lao hòa trong 400 μ l dung dịch đệm B và 64 μ l dung dịch C. Các dung dịch B, C được pha chế tại Khoa Sinh học Phân tử, Bệnh viện TWQĐ 108. ADN được tách chiết với phenol-chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) và tủa bởi 0,6 thể tích isopropanol. Các bước xử lý mẫu và tách chiết ADN tiến hành riêng biệt trong tủ cấy an toàn sinh học cấp II.

3. Khuếch đại gen đa mồi đặc hiệu alen và giải trình tự gen.

Tiến hành phản ứng khuếch đại gen đa mồi đặc hiệu alen (MAS-PCR) để xác định điểm đột biến tương ứng tại các codon 516, 526 và 531 của gen *rpoB*. Tiến hành phản ứng với thể tích 50 μ l cho mỗi mẫu, tỷ lệ như sau: 10X Taq buffer, 25 mM MgCl₂, 2,5 mM dNTP, primer-516F: 5-CAGCTGAGCCAATTCATGGA-3 (5pM), primer-526F: 5-CTGTCGGGGTTGACCCA-3 (10pM), primer-531F: 5-CACAAGCGCCGACTGTC-3 (45pM) và *rpoBR*: 5-TTGACCC GCGCGTA-CAC-3 (60pM), 0,5 μ l Taq DNA polymerase

(Fermentas). 50 ng ADN và 13,5 µl nước cho phản ứng PCR. Phản ứng khuếch đại gen thực hiện trên máy PCR tự động GeneAmp PCR System 9700 với chu kỳ nhiệt như sau: 96°C/3 phút; 25 chu kỳ (95°C/50 giây, 68°C/40 giây, 72°C/1 phút); 72°C trong 7 phút.

Để khẳng định kết quả, tiến hành kỹ thuật giải trình tự gen. Gen *rpoB* chứa các điểm đột biến tại codon 516, 526 và 531 nhân bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi: TuberLabF: 5-TACGGTCGGCGAGCTGATCC-3 và TuberLabR: 5-TACGGCGTTTCGATG AAC-3. Sản phẩm của phản ứng PCR sau đó được làm sạch và đọc trình tự trên máy giải trình tự CEQ8800 (Becman Coulter, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

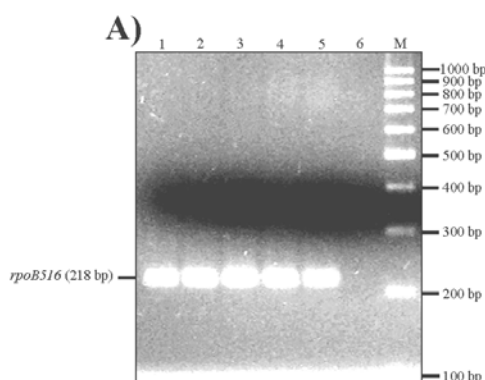
4. Phân tích kết quả khuếch đại gen đa mồi đặc hiệu alen và giải trình tự gen.

Phân tích 20 µl sản phẩm PCR của mỗi mẫu thí nghiệm bằng phương pháp điện di trên gel agarose 2,5% với điện thế không đổi (100 V). Để đánh giá các điểm đột biến gen *rpoB* bằng MAS-PCR, sử dụng thang chuẩn ADN 100 bp. Nhuộm agarose gel với ethidium bromide (0,5 µg/ml, Sigma) và chụp ảnh trên máy đọc gel UVP (Mỹ) tiến hành song song với 1 chứng âm và 1 chứng dương. Các băng ADN có kích thước 218 bp (*rpoB516*), 185 bp (*rpoB526*) và 170 bp (*rpoB531*) không xuất hiện trên điện di được coi là phản ứng PCR dương tính đối với lao kháng RIF. Phân tích kết quả giải trình tự gen *rpoB* xác định đột biến bằng phần mềm BioEdit.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Kết quả xác định đột biến gen *rpoB* bằng kỹ thuật khuếch đại đặc hiệu alen (allele specific amplification).

* *Xác định đột biến điểm 516:*

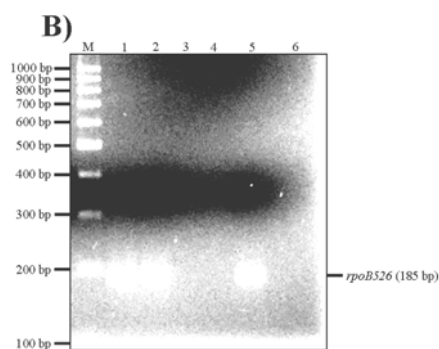


Hình 1A: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR phát hiện đột biến điểm 516.

Tất cả các mẫu nghiên cứu không phát hiện thấy đột biến tại vị trí 516.

(Ghi chú: giếng 1 và 5 là các chủng hoang dại, giếng 2, 3, 4 là 3 mẫu đã biết có đa kháng thuốc bằng nuôi cấy. Giếng 6: mẫu đối chứng âm. Do thiết kế mồi đặc hiệu nên khi có đột biến sẽ không có sản phẩm PCR, M, thang ADN chuẩn).

* *Xác định đột biến điểm 526:*

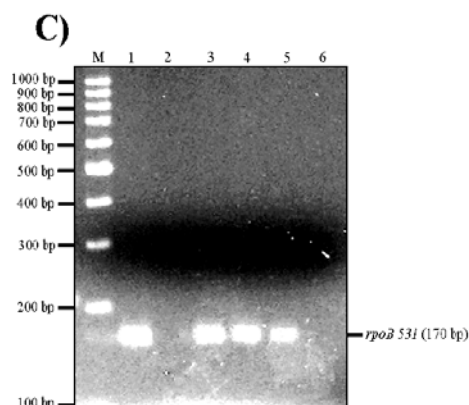


Hình 1B: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR phát hiện đột biến điểm 526.

Có 2 mẫu đột biến là MTB-215HN (giếng 3) và MTB-230HN (giếng 4).

(Ghi chú: giếng 1 và 5 là các chủng hoang dại, giếng 2, 3, 4 là 3 mẫu đã biết có đa kháng thuốc bằng nuôi cấy. Giếng 6: mẫu đối chứng âm. Do thiết kế mồi đặc hiệu nên khi có đột biến sẽ không có băng PCR, M, thang ADN chuẩn).

* Xác định đột biến điểm 531:



Hình 1C: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR phát hiện đột biến điểm 531.

Có 1 mẫu đột biến là MTB-182HN (giếng 2).

(Ghi chú: giếng 1 và 5 là các chủng hoang dại, giếng 2, 3, 4 là 3 mẫu đã biết có đa kháng thuốc bằng nuôi cấy. Giếng 6: mẫu đối chứng âm. Do thiết kế mỗi đặc hiệu nên khi có đột biến sẽ không có băng PCR, M, thang ADN chuẩn).

Như vậy, bằng kỹ thuật PCR đặc hiệu alen, đã xác định 3 mẫu kháng thuốc tại 2 vị trí khác nhau 526 (2 mẫu) và 531 (1 mẫu).

2. Kết quả giải trình tự vùng quyết định đột biến kháng RIF.

Vùng quyết định đột biến kháng rifampicin
(81-bp RIF resistance determining region)

	Gly	Thr	Ser	Gln	Leu	Ser	Gln	Phe	Met	Asp	Gln	Asn	Asn	Pro	Leu	Ser	Gly	Leu	Thr	His	Lys	Arg	Arg	Leu	Ser	Ala	Leu	Gly
	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534
MTB-H37Ra (CP000611)	GGC	ACC	AGCC	AGCT	GG	CCAA	TTC	ATG	GAC	CCAGA	ACA	ACC	CGCT	GTC	GGGG	TG	ACCC	ACA	AGC	CGAC	TGT	CGGC	CTGGGG					
MTB-224HN / Control
MTB-182HN / HRSE
MTB-215HN / HRSE
MTB-230HN / HRSE

primer-516F: CAGCTGACGCAA TTC ATC GA

primer-526F: CTGTCGGGGTTG ACC CA

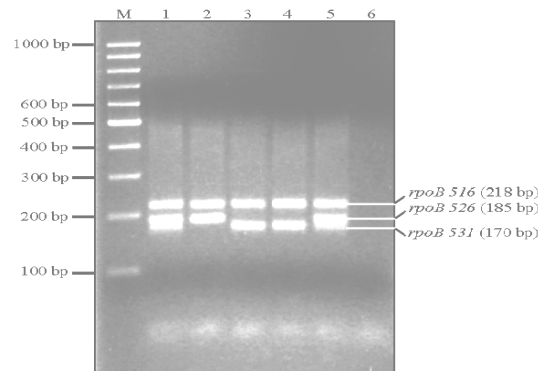
primer-531F: CACAAGCGCCGA CTG TC

Hình 2: Trình tự đoạn gen *rpoB* trên các mẫu nghiên cứu.

So với mẫu hoang dại và mẫu chuẩn lấy từ ngân hàng gen đã xác định mẫu MTB-182HN đột biến tại vị trí 531 và 2 mẫu (MTB-215HN và MTB-230HN) đột biến tại vị trí 526. Kết quả này phù hợp với kỹ thuật PCR đặc hiệu alen.

3. Kết quả xác định đột biến gen *rpoB* bằng kỹ thuật khuếch đại gen đa môi đặc hiệu alen (MAS-PCR).

Từ kết quả thu được ở trên và nhằm phát triển kỹ thuật sinh học phân tử trong chẩn đoán nhanh VK lao đa kháng thuốc, đặc biệt đối với RIF và INH, chúng tôi ứng dụng kỹ thuật khuếch đại gen đa môi đặc hiệu alen (MAS-PCR), tổ hợp của kỹ thuật nhân gen đa môi (multiplex PCR) và khuếch đại đặc hiệu alen nhằm phát hiện cùng lúc các đột biến kháng RIF tại 3 codon 516, 526, 531 của gen *rpoB* trong cùng một phản ứng.

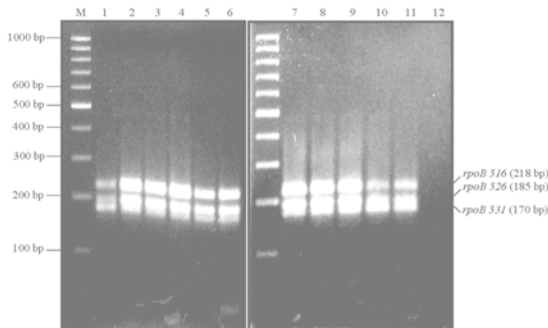


Hình 3: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR đa môi đặc hiệu alen xác định đột biến gen *rpoB*.

3 mẫu đột biến tại các vị trí khác nhau. Giếng 1 và 5: mẫu chứng dương không đột biến có sản phẩm là 3 băng. Mẫu 2 có 2 băng, mất băng thứ 3 tương ứng với điểm đột biến 531, mẫu 3 và 4 không có băng thứ 2 tương ứng với đột biến tại vị trí 526. Giếng 6: mẫu đối chứng âm, M, thang ADN chuẩn.

4. Kết quả nghiên cứu trên mẫu bệnh phẩm.

Sau khi hoàn thiện kỹ thuật PCR đa môi đặc hiệu alen, chúng tôi tiến hành thử nghiệm trên 11 mẫu do Viện Vệ sinh Dịch tễ TW cung cấp.



Hình 4: Kết quả điện di sản phẩm PCR đa môi đặc hiệu alen trên mẫu bệnh phẩm.

Không có đột biến gen nào được tìm thấy trên 11 mẫu nghiên cứu. Tất cả đều có 3 băng. Giếng 12: mẫu đối chứng âm, M, thang ADN chuẩn.

BÀN LUẬN

RIF tác động trực tiếp lên quá trình trao đổi chất của VK lao hoạt động ở giai đoạn sớm, đồng thời duy trì hoạt tính kháng khuẩn sau đó. Với đặc tính dược học này, khi RIF kết hợp với pyrazinamide sẽ rút ngắn phác đồ điều trị bệnh lao phổi từ 1 năm xuống 6 tháng [4]. Tuy nhiên, theo thời gian, tình trạng VK lao kháng RIF càng trở nên nghiêm trọng dẫn đến tỷ lệ thất bại trong điều trị ngày càng tăng [5]. Theo các nghiên cứu trước đây, lao đơn kháng INH phổ biến còn đơn kháng RIF rất hiếm gặp. Ngược lại, kháng RIF thường gặp ở các chủng VK lao đã kháng INH. Do vậy, kháng RIF được coi là một "dấu ấn" trong chẩn đoán bệnh lao đa kháng thuốc MDR-TB (Multi Drug Resistance - Tuberculosis) [10].

RIF ức chế quá trình phiên mã của VK bằng tác động trực tiếp lên enzyme ARN polymerase phụ thuộc ADN. VK lao phát triển cơ chế kháng RIF qua thay đổi cấu trúc gen *rpoB*. Đây là gen mã hóa cho tiểu phần β -ARN polymerase có trong hệ gen của chúng. Nghiên cứu công bố trên thế giới cho thấy vùng quyết định đột biến kháng RIF của VK lao có kích thước 81 nucleotid (27 codon), đột biến ở vùng này thấy ở 96% chủng VK lao kháng RIF. Do đó, vùng gen này được coi là một dấu ấn quan trọng trong chẩn đoán nhanh lao kháng RIF/MDR [7].

Phần lớn các đột biến (65 - 86%) phát hiện ở vị trí codon 526 hoặc codon 531 của gen *rpoB* với mức độ kháng RIF tương đối cao, nồng độ ức chế tối thiểu (minimal inhibitory concentration [MIC] > 32 mg/ml). Trong vùng quyết định đột biến kháng RIF tìm thấy những biến đổi khác tại vị trí codon 511, 516, 518 và 522 với mức độ kháng RIF thấp hơn. Dựa trên trình tự nucleotid vùng quyết định đột biến kháng RIF của chủng VK lao, chúng tôi sử dụng 3 cặp mồi (primer-516F, *rpoBR*); (primer-526F, *rpoBR*) và (primer-531F, *rpoBR*) tương ứng để phát hiện các alen bị biến đổi của 3 codon này. Khi không có đột biến tại các codon kể trên, những đoạn gen đặc hiệu alen với kích thước 218-, 185-, và 170 nucleotid sẽ nhân lên. Ngược lại, các chủng VK lao kháng RIF sẽ không khuếch đại đoạn gen đặc hiệu alen này.

Kết quả cho thấy: bằng phương pháp này, đã thành công trong việc phát hiện đột biến điểm tại vị trí cần xác định. Đây là kết quả rất đáng quan tâm vì chi phí của phương pháp này chỉ bằng 1/10 so với kỹ thuật giải trình tự gen.

Để khẳng định lại kết quả xác định đột biến kháng RIF bằng kỹ thuật khuếch đại đặc hiệu alen, chúng tôi tiến hành giải trình tự đoạn gen *rpoB* chứa vùng quyết định đột biến kháng RIF. Kết quả của giải trình tự gen phù hợp với kết quả của kỹ thuật khuếch đại đặc hiệu alen. Như vậy, tính chính xác của kỹ thuật khuếch đại đặc hiệu alen được khẳng định.

Từ kết quả thu được và với mục đích phát triển kỹ thuật sinh học phân tử trong chẩn đoán nhanh VK lao đa kháng thuốc, đặc biệt đối với RIF và INH. Chúng tôi ứng dụng kỹ thuật khuếch đại gene đa mồi đặc hiệu alen, tổ hợp của kỹ thuật nhân gen đa mồi (multiplex PCR) và khuếch đại đặc hiệu alen với mục tiêu phát hiện các đột biến kháng RIF tại 3 codon 516, 526, 531 của gen *rpoB* trong cùng một phản ứng. Kết quả: đã thành công không chỉ với kỹ thuật đơn mồi mà ngay cả kỹ thuật đa mồi cũng cho kết quả tương tự.

Hiện nay, để phát hiện VK lao và lao kháng đa thuốc theo phương pháp soi, phân lập nuôi cấy và làm kháng sinh đồ cần ít nhất từ 1 tuần đến 1 tháng. Do đó, việc điều trị sẽ chậm trễ, hiệu quả kém, nguy cơ lây nhiễm những chủng lao kháng thuốc cho cộng đồng tăng cao. Vì vậy, việc phát triển các kỹ thuật chẩn đoán nhanh có ý nghĩa hết sức to lớn không chỉ trong theo dõi, điều trị mà còn khống chế, kiểm soát bệnh lao phổi. Mặc dù kỹ thuật khuếch đại gen đa mồi đặc hiệu alen cũng như các kỹ thuật chẩn đoán sinh học phân tử

khác không thể thay thế hoàn toàn kỹ thuật nuôi cấy, nhưng kỹ thuật này có thể sử dụng để sàng lọc, xác định nhanh VK lao nói chung và VK lao kháng thuốc nói riêng. Bên cạnh đó, MAS-PCR là tổ hợp của các xét nghiệm chẩn đoán lao đơn kháng thuốc riêng biệt, do đó sẽ giúp người làm xét nghiệm rút ngắn được thời gian và thao tác chẩn đoán cũng như giảm chi phí xét nghiệm.

KẾT LUẬN

MAS-PCR là phương pháp chẩn đoán nhanh, ít tốn kém nên được đưa vào ứng dụng trong thực hành lâm sàng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bartfai Z, Somoskovi A, Kodmon C, Szabo N, Puskas E, Kosztolanyi L, Farago E, Mester J, Parsons LM and Salfinger M. Molecular characterization of rifampicin resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Hungary by DNA sequencing and the line probe assay. J Clin Microbiol. 2001, 39, pp.3736-3739.
2. Bobadilla-del-Valle M, Ponce-de-Leon A, Arenas HC, Vargas AG, Kato MM, Small PM, Couary P, Ruiz Palacios GM and Sifuentes OJ. rpoB gene mutations in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* identified by polymerase chain reaction single stranded conformational polymorphism. Emerg Infect Dis. 2001, 7, pp.1010-1013.
3. Grange JM. Drug resistance and tuberculosis elimination. Bull Int Union Against Tuber Lung Dis. 1990, 65, pp.57-62.
4. Mitchison DA. The Garrod Lecture. Understanding the chemotherapy of tuberculosis: current problems. J Antimicrob Chemother. 1992, 29, pp.477-493.
5. Moghazeh SL, Pan X, Arain T, Stover CK, Musser JM and Kreiswirth BN. Comparative antimycobacterial activities of rifampin, rifapentine, and KRM-1648 against a collection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates with known rpoB mutations. Antimicrob Agents Chemother. 1996, 40, pp.2655-2657.
6. Mokrousov I, Otten T, Vyshnevskiy B and Narvskaya O. Allele-specific rpoB PCR assays for detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in sputum smears. Antimicrob Agents Chemother. 2003, 47, pp.2231-2235.
7. Ramaswamy S and Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. Tuberc Lung Dis. 1998, 79, pp.3-29.
8. Shah DH, Verma R, Bakshi CS and Singh RK. A multiplex-PCR for the differentiation of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Microbiol Letters. 2002, 214, pp. 39-43.
9. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, Matter L, Schopfer K and Bodmer T. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet. 1993, 341, pp.647-650.
10. Zhang Y and Telenti A. Genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Washington, DC7 ASM Press, 2000.