

ĐỊNH DANH ĐẾN CẤP ĐỘ LOÀI MỘT SỐ CHỦNG MYCOBACTERIA BẰNG PHƯƠNG PHÁP GIẢI TRÌNH TỰ GEN

Nguyễn Thị Hà^{1,✉}, Nguyễn Văn Hưng²

Trần Minh Châu¹, Phạm Hồng Nhung¹

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Bệnh viện Phổi Trung ương

Mặc dù có liên quan rất gần gũi về mặt di truyền, các loài trong chi *Mycobacterium* lại có sự khác biệt rất lớn về hình thái, tính chất, sự phân bố và khả năng gây bệnh cho người. Thử nghiệm sắc ký miễn dịch định danh vi khuẩn lao (Tbc ID của hãng Becton Dickinson, Sparks, MD) không phát hiện được một số chủng *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC) và không phân biệt được đến loài các chủng non-tuberculous mycobacteria (NTM). Phương pháp phân tích trình tự các đoạn gen đích (16S rRNA, *gyrB*, *rpoB*, *hsp65* và ITS) trên các chủng mycobacteria có thử nghiệm Tbc ID âm tính không những khắc phục được các nhược điểm nêu trên mà còn cho phép định danh đến loài cả các chủng NTM không phổ biến. Trong số 105 chủng có Tbc ID âm tính thì quan sát được 56 chủng (53,3%) là MTBC và 49 chủng (46,7%) là NTM. Trong số 56 chủng MTBC, chiếm đa số là loài *M. tuberculosis*, chỉ có 1 chủng thuộc về loài *M. bovis*. Trong số 49 chủng NTM, chiếm đa số là phức hợp *M. abscessus*/*M. chelonae* tiếp đến là phức hợp *M. avium* và 13 loài NTM khác chiếm tỉ lệ nhỏ.

Từ khóa: Mycobacteria, Tbc ID, giải trình tự.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thử nghiệm sắc ký miễn dịch định danh vi khuẩn lao (Tbc ID của hãng Becton Dickinson, Sparks, MD) phát hiện phức hợp MTBC dựa vào khả năng tiết ra kháng nguyên MPT64 đặc hiệu trong môi trường nuôi cấy. Tbc ID có giá thành rẻ, thời gian thực hiện nhanh chóng, là công cụ hữu hiệu của các phòng xét nghiệm lao, được nhiều nghiên cứu đánh giá có độ nhạy, độ đặc hiệu cao (97,9%; 99,5%).¹ Tuy nhiên, trong bối cảnh Việt Nam vẫn nằm trong nhóm 30 nước có gánh nặng bệnh lao cao nhất thế giới, tỉ lệ nhỏ các chủng MTBC không phát hiện được thông qua thử nghiệm Tbc ID trở thành con số có ý nghĩa đáng kể tại nước ta. Thêm vào đó, thử nghiệm Tbc ID chỉ phát hiện

được 4/12 loài của MTBC là *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* (một số chủng) và *M. microti* cũng như không phân biệt được các loài này với nhau dẫn đến việc khó có thể phân biệt được các trường hợp lao lây truyền từ người sang người và các trường hợp lây truyền từ động vật sang người.

Cùng trong chi *Mycobacterium*, các loài NTM được nhắc đến trong nhiều các nghiên cứu gần đây ở các nước phát triển, giống lên hồi chuông cảnh báo về sự phổ biến của nhóm loài này. Hầu hết các nghiên cứu đều đưa ra báo cáo về sự gia tăng tỉ lệ hiện mắc các bệnh liên quan đến NTM trong vòng 4 thập kỷ qua.² Việc định danh đến loài các chủng NTM không chỉ là yêu cầu bắt buộc đối với chẩn đoán, mà còn cung cấp nhiều thông tin phục vụ quá trình điều trị và tiên lượng cho người bệnh. Tuy nhiên, do phân loại phức tạp của mycobacteria với hơn 200 loài và dưới loài, cùng với đó là sự liên quan chặt chẽ về mặt di truyền giữa các loài, cho đến nay

Tác giả liên hệ: Nguyễn Thị Hà

Trường Đại học Y Hà Nội

Email: nguyenha1994.hmu@gmail.com

Ngày nhận: 21/07/2022

Ngày được chấp nhận: 26/08/2022

phân tích trình tự một đoạn gen đích là không đủ để định danh đến loài NTM và cũng chưa có một chiến lược cụ thể và tối ưu trong việc giải trình tự nhiều gen house-keeping (thường được gọi là gen giữ nhà), phương pháp phân tích đồng thời trình tự các gen 16S rRNA, *gyrB*, *rpoB*, *hsp65*, ITS được áp dụng thường xuyên hơn cả.

Do vậy, nhằm phân biệt MTBC và NTM trong nhóm các chủng mycobacteria âm tính với thử nghiệm TBc ID, cùng với đó xác định tỉ lệ các loài thuộc MTBC (lây truyền từ người sang người, từ động vật sang người) cũng như tỷ lệ của các loài NTM tại Việt Nam, chúng tôi tiến hành nghiên cứu "Định danh đến loài một số chủng mycobacteria bằng phương pháp giải trình tự gen" với 2 mục tiêu: 1. Định danh đến loài các chủng *Mycobacterium* nuôi cấy MGIT dương tính có TBc ID âm nghi ngờ MTBC; 2. Định danh đến loài các chủng *Mycobacterium* nuôi cấy MGIT dương tính nghi ngờ NTM.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng: 105 chủng *Mycobacterium* nuôi cấy MGIT dương tính và có TBc ID âm tính phân lập được tại Bệnh viện Phổi Trung ương từ tháng 8/2019 đến tháng 8/2020.

2. Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu mô tả cắt ngang.

Tiêu chuẩn lựa chọn: Các chủng *Mycobacterium* có nuôi cấy MGIT dương tính, nhuộm soi cặn có AFB và làm thử nghiệm TBc ID âm tính.

Tiêu chuẩn loại trừ: Các chủng phân lập từ cùng một bệnh nhân, các chủng từ bệnh nhân nghi NTM cấy ít hơn 2 mẫu bệnh phẩm đờm.

Kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu: Quy trình tách chiết DNA sử dụng bộ kit Lytestar™ TB/NTM PCR kit 3.0. (CE-IVD). Phản ứng PCR được thực hiện bằng bộ kit BioFACT™ H-Star Taq DNA Polymerase (BioFACT).

Bảng 1. Các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu

Gen đích	Trình tự mồi	Kích thước	Ta
16S rRNA	5'GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG	~ 1000bp ³	68
16S rRNA	5'TGC ACA CAG GCC ACA AGG GA		
ITS 1	5'GAT TGG GAC GAA GTC GTA AC	~ 400bp ⁴	57
ITS 1	5'AGC CTC CCA CGT CCT TCA TC		
<i>hsp65</i>	5'ACCAACGATGGTGTGTCCAT	441bp ⁵	60
<i>hsp65</i>	5'CTCGTCGAACCGCATACCCT		
<i>gyrB</i>	5'TCG GAC GCG TAT GCG ATA TC	1020bp ⁶	72
<i>gyrB</i>	5'ACA TAC AGT TCG GAC TTG CG		
<i>rpoB</i>	5'GGCAAGGTCACCCCGAAGGG	723bp ⁷	64
<i>rpoB</i>	5'AGCGGCTGCTGGGTGATCATC		

Giải trình tự bằng phương pháp Sanger với kit BigDye® Terminatorv3.1 trên máy ABI 3500 Genetic Analyzer. Quy trình giải trình tự được thực hiện tại Viện Công nghệ Sinh học trực

thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Sử dụng phần mềm BioEdit và so sánh với cơ sở dữ liệu của GenBank.

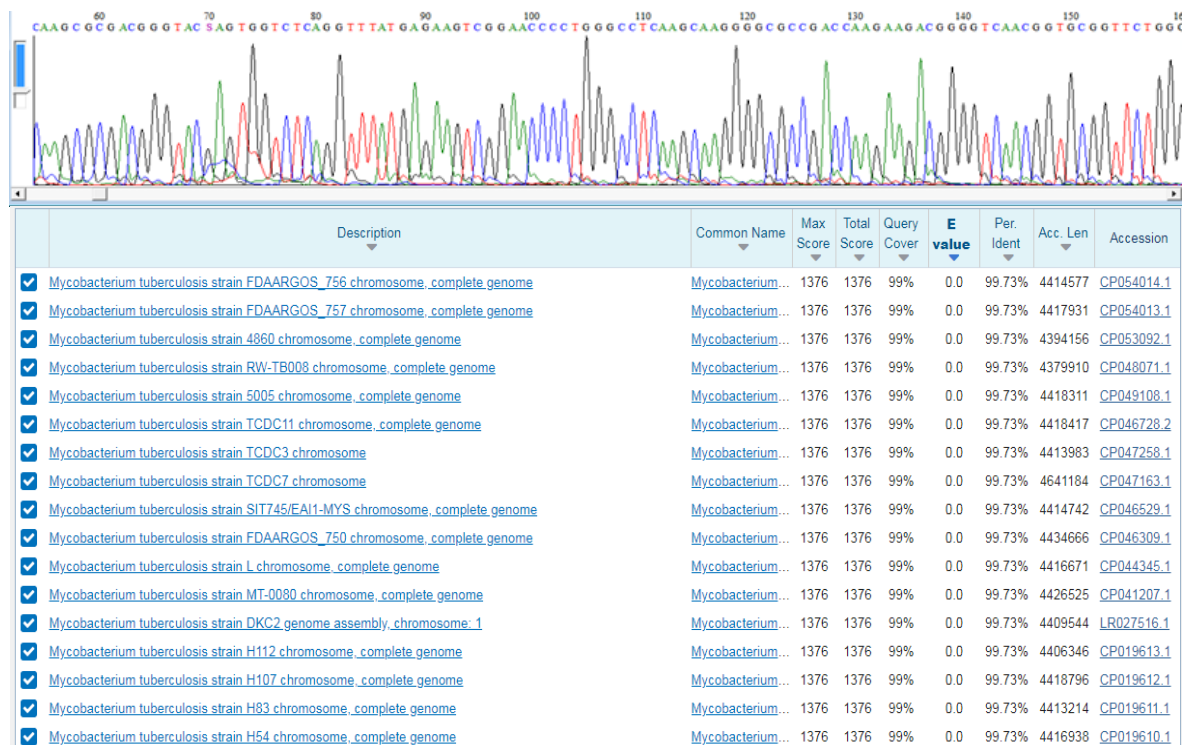
Xử lý và phân tích số liệu bằng phần mềm

SPSS 20, các thuật toán tính và so sánh 2 tỉ lệ.

3. Đạo đức nghiên cứu: Nghiên cứu được sự cho phép của Ban lãnh đạo Bệnh viện Phổi Trung ương. Nghiên cứu được tiến hành trên các chủng vi khuẩn phân lập được từ bệnh

phẩm của bệnh nhân, không can thiệp hay tác động đến người bệnh. Đảm bảo mọi thông tin cá nhân của bệnh nhân được giữ bí mật, các thông tin trong hồ sơ chỉ phục vụ mục đích nghiên cứu.

III. KẾT QUẢ



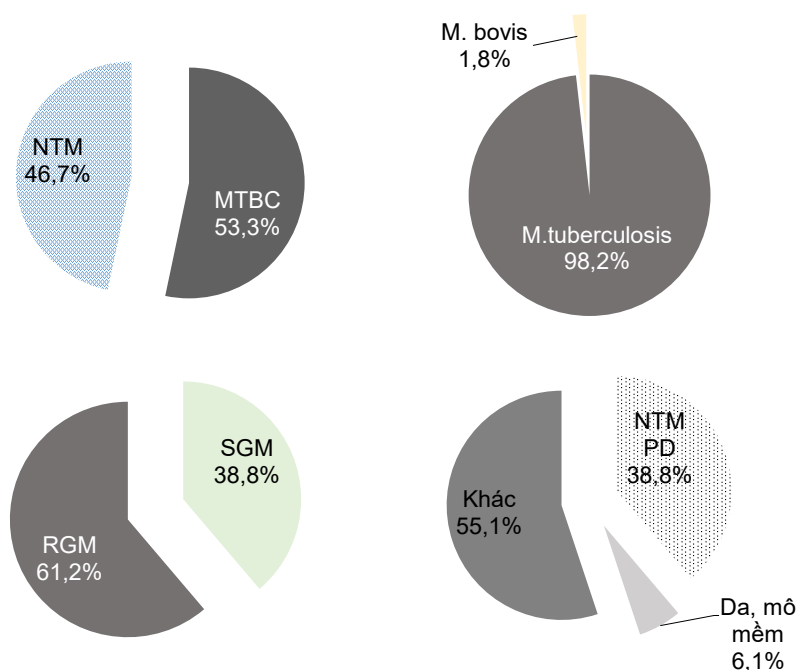
Hình 1. Ví dụ về một đoạn trình tự và kết quả BLAST trên GenBank

Trong 105 chủng (Hình 2) có 56 chủng (53,3%) là MTBC và 49 chủng là NTM (46,7%). Định danh đến loài phát hiện 2/12 loài nằm trong nhóm MTBC và 15/ >200 loài nằm trong nhóm NTM.

Đối với MTBC, trong số 56 chủng có 55 chủng (98,2%) là *M. tuberculosis* thuộc nhóm lây truyền từ người sang người, và 1 chủng (1,8%) là *M. bovis* thuộc nhóm lây truyền từ động vật sang người. Đối với NTM, trong số 49 chủng phân lập được có 30 chủng (61,2%) thuộc về nhóm mycobacteria phát triển nhanh (RGM) và 19 chủng (38,8%) thuộc về nhóm mycobacteria phát triển chậm (SGM). Định

danh đến loài cho thấy phức hợp *M. abscessus*/*M. chelonae* có tần suất xuất hiện cao nhất với 27 chủng (55,1%), tiếp đến là phức hợp MAC với 8 chủng (16,3%). Các loài khác phân lập được với tỉ lệ nhỏ.

Khi xem xét mối liên quan với các bệnh gây ra bởi NTM trên 49 chủng phân lập được trên 49 bệnh nhân khác nhau. Trong số các bệnh nhân này có 19 người (38,8%) được chẩn đoán mắc bệnh phổi do NTM (NTM PD) theo tiêu chuẩn của ATS 2007 và 3 người (6,1%) mắc các bệnh da, niêm mạc do NTM, 27 người còn lại (55,1%) không có bệnh liên quan đến NTM.



Hình 2. Tỷ lệ các nhóm loài phân lập được

Bảng 3. Các loài NTM phân lập được

Tên loài/ phức hợp	Gây bệnh	Tổng
<i>M. abscessus/ M. chelonae</i>	10 (46,0%)	27 (55,2%)
MAC	5 (22,5%)	8 (16,4%)
<i>M. angelicum</i>	0 (0%)	1 (2,0%)
<i>M. farcinogenes</i>	0 (0%)	1 (2,0%)
<i>M. fortuitum</i>	0 (0%)	2 (4,1%)
<i>M. interjectum</i>	1 (4,5%)	2 (4,1%)
<i>M. kansasii</i>	3 (13,5%)	3 (6,1%)
<i>M. marinum</i>	1 (4,5%)	1 (2,0%)
<i>M. mucogenicum</i>	0 (0%)	1 (2,0%)
<i>M. scrofulaceum</i>	1 (4,5%)	2 (4,1%)
<i>M. stomatopiae</i>	1 (4,5%)	1 (2,0%)
Tổng	22 (100%)	49 (100%)

Định danh đến loài cho thấy phức hợp *M. abscessus/ M. chelonae* có tần suất xuất hiện cao nhất với 27 chủng (55,1%), tiếp đến là phức hợp MAC với 8 chủng (16,3%). Các loài khác phân lập được với tỷ lệ nhỏ.

Trong số 22 bệnh nhân mắc các bệnh liên quan đến NTM, số người nhiễm phức hợp *M. abscessus*/*M. chelonae* chiếm tỉ lệ cao nhất với 10 bệnh nhân (46%), đứng thứ hai là 5

người (22,5%) nhiễm phức hợp MAC, đứng thứ ba là *M. kansasii* với 3 người (13,5%), các loài khác chiếm tỉ lệ nhỏ.



Hình 3. So sánh trình tự đoạn gyrB của 2 loài *M. tuberculosis* và *M. bovis*

(Dòng trên là trình tự của *M. tuberculosis*, dòng dưới là trình tự của *M. bovis*, dấu "." thể hiện các Nu giống nhau. Trình tự đoạn gyrB của 2 loài có sự khác biệt rất nhỏ, ví dụ: ở vị trí 142 ở *M. bovis* thay G bằng A)

bộ nhiễm. Đối với các chủng này cần tiến hành định danh thêm bằng các phương pháp khác như thử nghiệm niacin hoặc GeneXpert. Việc phát hiện các chủng MTBC (*M. bovis*) gây bệnh lao lây truyền từ động vật sang người có ý nghĩa trong điều trị và phòng bệnh vì *M. bovis* đề kháng tự nhiên với pyrazinamide và việc quản lý đàn gia súc và các sản phẩm từ gia súc là biện pháp có ý nghĩa hơn so với cách ly bệnh nhân. Như vậy, việc sử dụng đơn độc phương pháp định danh bằng TBc ID có thể dẫn đến khả năng bỏ sót một số chủng MTBC, cần có một chiến lược định danh phối hợp với các phương pháp khác đối với các chủng có TBc ID âm tính. Các phương pháp sinh học phân tử nên được ưu tiên hơn các phương pháp xác định tính chất sinh vật hóa học cổ điển nhờ ưu thế vào thời gian quay vòng nhanh và độ nhạy, độ đặc hiệu cao.

Đối với NTM, trong 49 chủng NTM có 30 chủng (61,2%) là RGM và 19 chủng (38,8%) là SGM. Tỷ lệ các loài SGM và RGM có sự khác biệt đáng kể với khu vực châu Âu và châu Mỹ khi mà nghiên cứu tại khu vực này cho thấy tỷ lệ RGM tương đối thấp. Các nghiên cứu ở khu vực Đông Á cũng quan sát thấy tỷ lệ RGM cao hơn tuy nhiên lại có sự khác biệt lớn giữa các quốc gia khác nhau, do vậy việc so sánh tỷ lệ RGM là rất khó khăn. Nguyên nhân dẫn đến việc gia tăng tỷ lệ các loài RGM gia tăng ở khu vực châu Á nói chung và ở Việt Nam nói riêng vẫn chưa được làm sáng tỏ, tuy nhiên một số nghiên cứu gợi ý sự khác biệt về khí hậu, vật chủ (con người) và năng lực phòng xét nghiệm của từng khu vực.

Định danh đến loài các chủng NTM cho thấy tỷ lệ của phức hợp *M. abscessus/ M. chelonae* thuộc nhóm RGM đứng hàng đầu với 27 chủng (55,2%). Tỷ lệ này cao hơn nhiều so với dữ liệu thu được từ các nghiên cứu ở khu vực Đông Á, nơi được coi là phổ biến phân lập được

nhóm loài này, cũng cao hơn dữ liệu của Đặng Thị Nguyên (2018) khi tỷ lệ *M. abscessus/ M. chelonae* là 36,6%.⁸ Khi so sánh tỷ lệ của phức hợp *M. abscessus/ M. chelonae* ở các khu vực khác nhau, chúng tôi thấy có sự tương tự với các khu vực lưu hành phổ biến của lao như khu vực miền nam Đài Loan hay khu vực bang Para của Bra-xin. Nghiên cứu của Simons năm 2011 cũng gợi ý về mối liên quan giữa NTM PD với tiền sử lao phổi cũ tuy nhiên cần thêm nhiều bằng chứng để có thể kết luận.⁹ Cũng thuộc RGM, nhóm *M. fortuitum* thường có độ phổ biến cao ở nhiều quốc gia và khu vực lại chiếm tỷ lệ tương đối thấp trong nghiên cứu này (4,1%), có thể lý giải là do nhóm *M. fortuitum* thường gây bệnh trên da, mô mềm là chủ yếu trong khi đối tượng đưa vào chủ yếu là trên nhóm bệnh nhân có triệu chứng đường hô hấp. Nhóm *M. mucogenicum* cũng chiếm tỷ lệ rất nhỏ và các thành viên của 3 nhóm RGM quan trọng là nhóm *M. smegmatis*, nhóm RGM sinh sắc tố sớm và nhóm *M. megeritense/ M. wolinskyi* thì không quan sát thấy chủng nào. Có lẽ do cỡ mẫu nghiên cứu còn nhỏ nên các nhóm ít phổ biến hơn trong các loài RGM không thấy xuất hiện.

Đối với nhóm SGM, phức hợp MAC (16,4%) là loài phổ biến nhất, tương đương với kết quả thu được ở nghiên cứu của Đặng Thị Nguyên (15,9%).⁸ Ở các quốc gia và khu vực khác, độ phổ biến của MAC rộng rãi hơn nhiều so với kết quả này. Xét riêng trong nhóm SGM, phức hợp MAC vẫn đóng vai trò quan trọng nhất. Các nghiên cứu về phức hợp MAC thường có liên quan đến các bệnh về suy giảm miễn dịch (HIV/AIDS) mà không phải là đối tượng chính trong nghiên cứu này, cũng có thể là nguyên nhân dẫn đến sự khác biệt này. Ngoài ra, *M. kansasii* đứng thứ sáu về tần suất phân lập được trên thế giới, đặc trưng bởi khả năng gây bệnh cao cũng có tỷ lệ 6,1% trong nghiên cứu này. Đặc

biệt chúng tôi quan sát được một trường hợp phân lập được *M. marinum* trên bệnh nhân có nhiễm trùng khớp. *M. marinum* thường được biết đến là nguyên nhân gây các nhiễm trùng trên da do các vết xây xước tiếp xúc với nguồn nước mặn, có thể là căn nguyên phổ biến ở nước ta với đường bờ biển dài. Các loài NTM hiếm gặp như *M. angelicum*, *M. farciogenes*, *M. interjectrum*, *M. scrofulacum*, *M. stomatopiae* cũng chiếm những tỉ lệ nhỏ. Các loài SGM có mức độ phổ biến cao trên thế giới như *M. malmoense*, *M. xenopi* và *M. simiae* lại không được tìm thấy trong nghiên cứu này. Nguyên nhân được cho là *M. xenopi* (ưa sống ở 42°C) thường liên quan đến hệ thống cung cấp nước nóng phát triển ở các nước châu Âu và châu Mỹ hơn là Việt Nam. Nhiều nghiên cứu tại châu Á cũng cho thấy sự vắng mặt của *M. simiae* ở khu vực này. Đối với *M. malmoense* không được tìm thấy có thể thật sự do *M. malmoense* không phân bố tại Việt Nam, một nguyên nhân khác có thể nghĩ đến là do giảm khả năng phát hiện do thời gian nuôi cấy cần kéo dài 8 - 12 tuần thay vì 6 tuần như quy trình thường thấy ở nước ta.

Không giống như chẩn đoán của lao, đối với chẩn đoán bệnh do NTM cần kết hợp nhiều yếu tố để có thể đưa đến chẩn đoán xác định, trong đó bộ tiêu chuẩn do ATS/IDSA đưa ra năm 2007 vẫn được sử dụng rộng rãi. Trên 49 bệnh nhân có NTM phân lập được từ bệnh phẩm, có 19 bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh phổi do NTM, 3 bệnh nhân có các bệnh về da, niêm mạc, mô mềm liên quan đến NTM và 27 bệnh nhân có các bệnh không liên quan đến NTM hoặc chưa đủ tiêu chuẩn chẩn đoán bệnh do NTM. Hầu hết các nghiên cứu đều chỉ ra mối liên quan giữa các bệnh lý mãn tính về cấu trúc của phổi như bệnh hen, bệnh phổi tắc nghẽn mãn tính, giãn phế quản, bệnh thiếu alpha-1 antitrypsin, bệnh bụi phổi, bệnh xơ nang phổi với NTM PD. Tuy nhiên, do hạn chế trong việc

thu thập thông tin dẫn đến số liệu về tiền sử bệnh tật của các bệnh nhân không đầy đủ nên không thể đưa ra kết luận. Việc định danh đến loài NTM và tính đề kháng kháng sinh của chúng đóng vai trò quan trọng trong việc điều trị và quản lý bệnh nhân NTM PD.

V. KẾT LUẬN

Trong 105 chủng mycobacteria không phát hiện thấy kháng nguyên MPT64 trong môi trường nuôi cấy, có 53,3% chủng thuộc về MTBC và 46,7% thuộc về NTM. Trong các chủng MTBC phát hiện 2/12 loài, chiếm 98,2% là loài *M. tuberculosis* và 1,8% là loài *M. bovis*. Trong các chủng NTM, có 15/ > 200 loài xuất hiện, phức hợp *M. abscessus/ M.chelonae* chiếm đa số với 55,2%, đứng thứ hai là phức hợp MAC với 16,4%, các loài và phức hợp khác chiếm các tỷ lệ nhỏ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Brent AJ, Mugo D, Musyimi R, et al. Performance of the MGIT TBc identification test and meta-analysis of MPT64 assays for identification of the Mycobacterium tuberculosis Complex in liquid culture. *J Clin Microbiol.* 2011;49(12):4343-4346. doi: 10.1128/JCM.05995-11.
2. British Thoracic Society guidelines for the management of Non-Tuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease (NTM-PD). Published online 2017.
3. Kirschner P, Springer B, Vogel U, et al. Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: Report of a 2-year experience in a clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 1993;31(11):2882-2889. doi: 10.1128/JCM.31.11.2882-2889.1993.
4. Richter E, Niemann S, Rüscher-Gerdes S, Hoffner S. Identification of Mycobacterium kansasii by using a DNA probe (AccuProbe) and molecular techniques. *J Clin Microbiol.*

1999;37(4):964-970. doi: 10.1128/JCM.37.4.964-970.1999.

5. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.* 1993;31(2):175-178. doi: 10.1128/JCM.31.2.175-178.1993.

6. Kasai H, Ezaki T, Harayama S. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their *gyrB* sequences. *J Clin Microbiol.* 2000;38(1):301-308.

7. Adékambi T, Colson P, Drancourt M. *rpoB*-based identification of nonpigmented and

late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 2003;41(12):5699-5708. doi: 10.1128/jcm.41.12.5699-5708.2003.

8. Đặng Thị Nguyên, Nguyễn Thị Hằng, Đặng Thị Ngọc Hà, Trần Duy Hưng, Nguyễn Văn Khiêm, Nguyễn Văn Hưng. Định danh và xác định tần số của các chủng mycobacteria không lao (Non-Tuberculous Mycobacteria - NTM) thu thập tại Bệnh viện Phổi Trung ương, Việt Nam. Published online 2018.

9. Simons S, van Ingen J, Hsueh PR, et al. Nontuberculous mycobacteria in respiratory tract infections, Eastern Asia. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(3):343-349. doi: 10.3201/eid1703.100604.

Summary

IDENTIFICATION VARIOUS MYCOBACTERIA STRAINS TO THE SPECIES LEVEL BY GENE SEQUENCING

Despite the close genetic relatedness, members of the genus *Mycobacterium* differ significantly in morphology, biochemistry, host range and pathogenicity. TBc ID (Becton Dickinson, Sparks, MD) is a rapid and reliable method for MTBC identification in liquid culture assay, however a small minority of MTBC isolates are not detected by TBc ID assay due to none to low concentration of MPT64 in liquid culture; moreover, TBc ID cannot distinguish mycobacteria to species. Identification of mycobacteria isolates to the species level by analysis of several target genes (including 16S rRNA, *gyrB*, *rpoB*, *hsp65* and ITS) could overcome these disadvantages and accurately differentiate some less common NTM. Overall, there are 105 TBc ID negative strains, including 56 MTBC strains (53.3%) and 49 NTM strains (46.7%). Looking closely to species level identification of all 56 MTBC strains, *M. tuberculosis* took an important part and solely *M. bovis* strain was detected. Within 49 NTM strains, the predominant is *M. abscessus*/*M. chelonae* complex, the second in common is MAC and the other 13 NTM species are in smaller portions.

Keywords: Mycobacteria, TBc ID, sequencing.