

NGHIÊN CỨU TỶ LỆ PHÂN BỐ CÁC LOÀI *Nontuberculous mycobacteria* PHÂN LẬP ĐƯỢC TẠI BỆNH VIỆN 74 TRUNG ƯƠNG BẰNG PHƯƠNG PHÁP GIẢI TRÌNH TỰ GEN *hsp65*

VŨ THỊ THƯƠNG⁽¹⁾, PHẠM VIỆT HÙNG⁽¹⁾, PHẠM THỊ HÀ GIANG^(1,2), BÙI THỊ THANH NGÀ⁽¹⁾,
VŨ QUANG DIỄN⁽³⁾, GIANG MẠNH CHIẾN⁽³⁾, LƯU VĂN ĐOÀN⁽³⁾, LÊ THỊ LAN ANH⁽¹⁾

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây bên cạnh gánh nặng bệnh lao và lao kháng thuốc, bệnh do vi khuẩn lao không điển hình (*Nontuberculous mycobacteria* - NTM) gây ra cũng là một trong những vấn đề cấp bách đang được quan tâm. Vi khuẩn lao (*Mycobacterium tuberculosis* - MTB) và vi khuẩn NTM thuộc chi *Mycobacteria*, có thể gây bệnh cho người, vật nuôi và động vật hoang dã [1]. NTM là vi khuẩn hiếu khí, hình que, không di động, tồn tại trong môi trường tự nhiên như đất, nước, cát, sỏi đá, bụi... [2]. Dựa theo tốc độ sinh trưởng trên môi trường thạch Lowenstein-Jensen, NTM được chia thành 2 nhóm: *Mycobacteria* phát triển nhanh (RGM) có thời gian nuôi cấy dưới 7 ngày và *mycobacteria* phát triển chậm (SGM) có thời gian nuôi cấy kéo dài đến vài tuần [2]. Tỷ lệ mắc bệnh do NTM ngày càng gia tăng nhanh chóng trên toàn thế giới, ước tính 4,1-14,1 trường hợp mắc NTM trên 100 000 dân (2013) [2]. Tỷ lệ mắc NTM vào khoảng 10/100 000 dân tại Úc và Bắc Mỹ; 2/100 000 dân ở Châu Âu [3]. Hiện nay việc chẩn đoán phân biệt MTB và NTM vẫn là một thách thức lớn do sự giống nhau giữa MTB và NTM về biểu hiện lâm sàng, chụp X-quang phổi hay nhuộm Ziehl-Neelsen [4]. Tại Mỹ, trong số các bệnh nhân nghi ngờ mắc lao đa kháng thuốc do không đáp ứng điều trị từ 2-3 tháng bằng thuốc chống lao hàng 1, có khoảng 30% bệnh nhân nhiễm NTM chứ không phải là MTB [5]. Đối với MTB, Chương trình Chống lao Quốc gia và Bộ y tế đã có phác đồ điều trị tiêu chuẩn, còn với NTM cần phác đồ điều trị cá thể dựa trên loài NTM mắc phải, mỗi loài có phác đồ điều trị riêng biệt [6]. Vì vậy, việc định danh được loài NTM gây bệnh sẽ giúp bác sĩ lâm sàng lựa chọn phác đồ điều trị hiệu quả và rút ngắn thời gian điều trị cho bệnh nhân.

Dựa theo phương pháp truyền thống, có thể phân loài NTM thông qua quan sát hình thái khuẩn lạc, tốc độ tăng trưởng và sắc tố trên một số môi trường chọn lọc hoặc dựa trên các đặc điểm sinh hóa như thử nghiệm niacin, catalase, khử nitrat, urease, pyrazinamidase hoặc arylsulfatase [7], [8]. Tuy nhiên, các phương pháp này có những hạn chế do tốn thời gian và khó phân biệt chính xác tới cấp độ loài. Các xét nghiệm sinh hóa truyền thống dần được thay thế bằng các phương pháp phân tử để định danh loài NTM như lai đầu dò (LPA), multiplex PCR, realtime PCR,... hay giải trình tự gen đích [9]. Phương pháp LPA chỉ phát hiện được 27 loài NTM, multiplex PCR, realtime PCR chỉ phát hiện phân biệt MTB/NTM hoặc một số loài NTM loài phổ biến trong khi đó có hơn 200 loài NTM đã được phát hiện. Ngoài ra, thông tin về sự đa dạng loài NTM ở Việt Nam còn rất hạn chế. Vì vậy, phương pháp giải trình tự gen được coi là tiêu chuẩn vàng để định danh đến cấp độ loài NTM. Một số gen đích như *16S rRNA* mã hoá cho ribosom 16S RNA, gen *rpoB* mã hoá cho tiểu phần β -subunit RNA polymerase hay gen *hsp65* mã hoá cho protein 65 kDa

heat-shock được sử dụng. So với *16S rRNA* và *rpoB*, trình tự gen *hsp65* đa dạng hơn với tính không đồng nhất di truyền cao và tỷ lệ phần trăm tương đồng giữa các loài thấp hơn từ 89,2% đến 100% [10]. Ngoài ra, theo báo cáo của Si Hyun Kim và Jeong Hwan Shin tỷ lệ xác định loài thành công của gen *16S rRNA*, *rpoB* và *hsp65* lần lượt là 71,30%, 81,55% và 86,79% [9]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thu thập các ống MGIT-BACTEC nghi ngờ NTM, đồng thời mô tả sự đa dạng loài NTM phân lập được tại Bệnh viện 74 Trung ương thông qua giải trình tự gen *hsp65*.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mẫu nghiên cứu

Các chủng nghi ngờ NTM phân lập từ mẫu đờm bằng phương pháp nuôi cấy lỏng trên hệ thống nuôi cấy tự động BACTEC MGIT. Nuôi cấy, sàng lọc mẫu nghi ngờ NTM được thực hiện tại Bệnh viện 74 Trung ương theo quy trình thường quy của Bệnh viện. Tổng cộng 122 mẫu nghi ngờ NTM nhận được từ tháng 11 năm 2021 đến tháng 5 năm 2022 được chuyển đến Phòng thí nghiệm Sinh học phân tử - Viện Y sinh Nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga.

2.2. Thiết bị, hoá chất

- *Thiết bị*: Máy PCR eppendorf Mastercycler X50s, Máy ly tâm eppendorf 5424R, Bộ điện di đứng Cleaver Scientific, Bể ủ nhiệt khô TDB-120 (Biosan), Hệ thống chụp ảnh gel Gel DocTM EZ Imager (Biorad), Tủ an toàn sinh học Yakos 65.

- *Hoá chất, sinh phẩm*: Kit tách chiết ADN QIAamp@ DNA Mini Kit, kit tinh sạch sản phẩm PCR GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific, thuốc nhuộm Redsafe (Intron, Hàn Quốc), Master mix Go Taq Green (Promega), agarose (Serva). Mồi xuôi *hsp65*-F (5' -ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3') và mồi ngược *hsp65*-R (5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT- 3') của hãng IDT, Thang chuẩn GeneRuler 100bp DNA (Thermo).

2.3. Phương pháp

2.3.1. Tách chiết ADN tổng số

Dịch nuôi cấy từ các ống MGIT nghi ngờ NTM được bất hoạt ở 80°C trong 20 phút trước khi thực hiện tách chiết ADN vi khuẩn để làm nguyên liệu cho phản ứng PCR. Quy trình tách chiết được thực hiện theo hướng dẫn của hãng sản xuất.

2.3.2. Kỹ thuật PCR gen *hsp65* và giải trình tự Sanger

Phản ứng PCR nhân gen đích *hsp65* được tiến hành theo Parveen Kumar và cộng sự với một số cải biến [11]. Hỗn hợp phản ứng gồm 20µl Master mix 2X, 0,8µl mồi *hsp65*-F (10µM), 0,8µl mồi *hsp65*-R (10µM), 1,6µl MgCl₂ (25mM), 12,8µl H₂O, 4µl ADN, tổng thể tích phản ứng 40µL. Chu trình nhiệt 95°C trong 2 phút - 1 chu kỳ; (94°C trong 30 giây, 58°C trong 30 giây, 72°C trong 45 giây) x 40 chu kỳ; 72°C trong 5 phút - 1 chu kỳ; giữ 15 °C. Sản phẩm PCR có kích thước 441bp được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,5% nhuộm Redsafe. Sản phẩm PCR được tinh sạch và tiến hành giải trình tự gen theo phương pháp Sanger tại hãng 1st BASE (Singapore), sử dụng mồi *hsp65*-F.

2.3.3. Định danh loài NTM và xây dựng cây phát sinh loài

Các trình tự được biên tập đồng nhất bằng phần mềm Bioedit Sequence Alignment Editor và nhận biết loài tham chiếu từ Ngân hàng gen bằng BLAST-NCBI. Việc căn chỉnh các trình tự, xếp dóng cột được tiến hành bằng phần mềm ClustalX2 và tiến hành xây dựng cây phát sinh loài bằng phần mềm MEGA-X (sử dụng phương pháp Construction/Test Maximum likelihood), iTOL v6. Trình tự gen của loài MTB được sử dụng làm gốc phát sinh loài.

2.3.4. Phân tích dữ liệu thống kê

Các số liệu nghiên cứu được xử lý bằng máy vi tính trên phần mềm Excel 2013, phần mềm STATA phiên bản 14 (Statacorp LLC, Texas, Hoa Kỳ) theo phương pháp thống kê y sinh học. Phương pháp kiểm định χ^2 được sử dụng để so sánh các nhóm giá trị, khoảng tin cậy (CI) 95%, giá trị khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

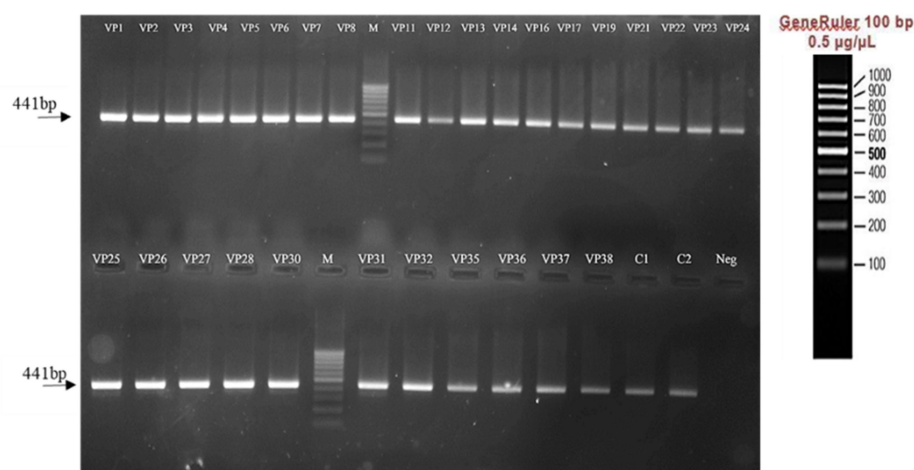
2.3.5. Đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu của đề tài đã được Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu y sinh học của Trung tâm nhiệt đới Việt - Nga thông qua với mã số 38/2021/VREC.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả PCR

Nhóm nghiên cứu tiến hành phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu cho vùng gen *hsp65* đối với 122 mẫu ADN tách chiết từ các ống MGIT nghi ngờ NTM và ADN tách chiết từ 2 chủng chuẩn *Mycobacterium avium* (ATCC 700898TM), *Mycobacterium abscessus* (ATCC 700869TM). Kết quả PCR đại diện cho một số mẫu nghiên cứu kèm theo đối chứng được trình bày trong hình 1.



Hình 1. Kết quả PCR một số mẫu nghi ngờ NTM

Chú thích: M: Thang chuẩn GeneRuler 100bp DNA, đối chứng dương C1: *M. avium*, C2: *M. abscessus*, Neg: Đối chứng âm (nước được sử dụng thay cho ADN khuôn).

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% cho thấy băng ADN đặc hiệu có kích thước 441 bp như dự kiến. Kết quả chung ghi nhận toàn bộ 122 mẫu nghi ngờ NTM và 2 chủng chuẩn ATCC *M. avium* và *M. abscessus* đều được nhân thành công gen *hsp65* bằng phương pháp PCR.

3.2. Kết quả định danh NTM

Để định danh loài NTM, sản phẩm PCR của 122 mẫu nghi ngờ NTM và 2 chủng ATCC được giải trình tự theo phương pháp Sanger sử dụng môi xuôi *hsp65*-F. Phân tích trình tự gen *hsp65* cho thấy NTM chiếm 94,3% (115/122 trường hợp), có 3 loài khác nhau không thuộc NTM được xác định bao gồm *Gordonia* spp., *Rothia* spp., và *Streptomyces* spp.

Phân chia loài NTM theo nhóm tốc độ sinh trưởng cho thấy SGM chiếm đa số với 71/115 trường hợp (61,7%) trong khi RGM là 44/115 trường hợp (38,3%) ($p=0,0003$). Kết quả định danh loài NTM phân lập được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Phân bố các loài thuộc NTM đã phát hiện trên 115 mẫu

TT	Nhóm mycobacteria		Loài	Mã chủng	Tỷ lệ theo loài
1	SGM 71/115 (61,7%)	MAC 43 (37,4%)	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	VP11, VP13, VP14, VP35, VP39, VP45, VP51, VP52, VP57, VP66, VP71, VP76, VP79, VP88, VP90, VP93, VP96, VP97, VP100, VP108, VP111, VP113, VP121, VP126, VP152, VP163, VP186, VP193, VP195, VP201, VP210, VP211, VP212	33 (28,7%)
			<i>Mycobacterium timosen</i>	VP1, VP12, VP101, VP189, VP209	5 (4,4%)
			<i>Mycobacterium avium</i>	VP31, VP94, VP208	3 (2,6%)
			<i>Mycobacterium colombiense</i>	VP70, VP125	2 (1,7%)
			<i>Mycobacterium lentiflavum</i>	VP2, VP3, VP7, VP23, VP67, VP78, VP127, VP207	8 (7,0%)
			<i>Mycobacterium simiae</i>	VP26, VP27, VP32, VP60, VP83, VP130,	8 (7,0%)

TT	Nhóm mycobacteria	Loài	Mã chủng	Tỷ lệ theo loài
			VP133, VP159	
		GOR 6 (5,2%)	<i>Mycobacterium paragordoniae</i>	4 (3,5%)
			<i>Mycobacterium gordonae</i>	2 (1,7%)
			<i>Mycobacterium mantenii</i>	2 (1,7%)
			<i>Mycobacterium gastri</i>	2 (1,7%)
			<i>Mycobacterium europaeum</i>	1 (0,9%)
			<i>Mycobacterium senense</i>	1 (0,9%)
2	RGM 44/115 (38,3%)	ABS 36 (31,3%)	<i>Mycobacterium massiliense</i>	19 (16,5%)
			<i>Mycobacterium abscessus</i>	16 (13,9%)
			<i>Mycobacterium bolletii</i>	1 (0,9%)
		FOR 8 (7,0 %)	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	6 (5,2%)
			<i>Mycobacterium brisbanense</i>	1 (0,9%)
			<i>Mycobacterium peregrinum</i>	1 (0,9%)

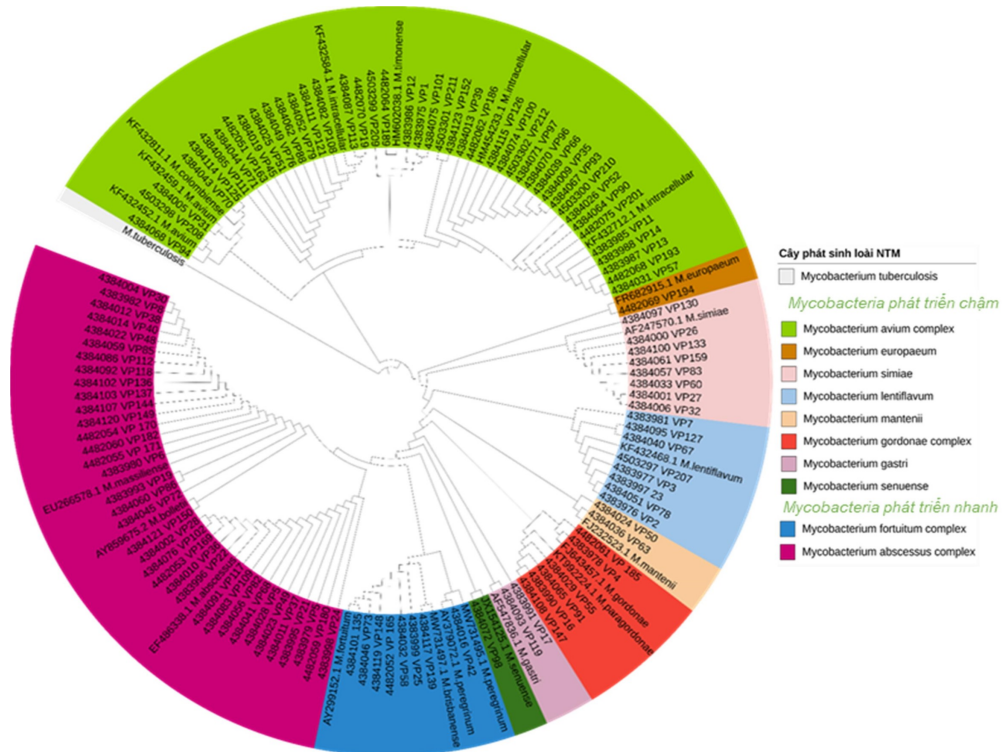
Ghi chú: SGM - *Mycobacteria* phát triển chậm, RGM - *Mycobacteria* phát triển nhanh, MAC - nhóm *Mycobacterium avium*, ABS - nhóm *Mycobacterium abscessus*, GOR - nhóm *Mycobacterium gordonae*, FOR - nhóm *Mycobacterium fortuitum*.

Đối với SGM, các loài NTM thuộc MAC chiếm đa số 37,4% ($p=0,0001$) trong đó loài *M. intracellulare* (28,7%), *M. timonense* (4,4%), *M. avium* (2,6%), và *M. colombiense* (1,7%). MAC là loài phổ biến nhất trong số các loài NTM phân lập. Tỷ lệ phát hiện các loài khác thuộc SGM là *M. lentiflavum* (7,0%), *M. simiae* (7,0%), nhóm *M. gordonae* (5,2%) và *M. mantenii*, *M. gastri*, *M. europaeum* và *M. sensuense* dưới 2,0%. Các nghiên cứu trước đây cho thấy điều kiện môi trường và khí hậu ảnh hưởng đến sự phân bố của các loài NTM, một số loài NTM cụ thể chiếm ưu thế ở các vùng địa lý khác nhau [4, 10, 12]. MAC chiếm ưu thế ở nhiều vùng địa lý khác nhau như Châu Phi, Đông Nam Á, Đông Á, Trung Quốc, Nga, Mỹ. Theo ước tính toàn cầu MAC là NTM phổ biến chiếm từ 34,0% đến 61,0% tùy theo lục địa khác nhau [10]. Tỷ lệ lây nhiễm cao của các loài MAC có thể là do sự phân bố rộng rãi của các loài này trong môi trường tự nhiên khác nhau như nước và đất, vì vậy làm tăng khả năng lây lan và lây nhiễm sang người [13].

Đối với RGM, chúng tôi phát hiện được 2 nhóm mọc nhanh là nhóm *M. abscessus* và nhóm *M. fortuitum*. Nhóm *M. abscessus* là loài NTM phổ biến nhất (31,3%) và đứng thứ 2 sau MAC về tỷ lệ phân lập trong đó *M. massiliense* (16,5%), *M. abscessus* (13,9%) và *M. bolletii* dưới 1,0%. Tỷ lệ phát hiện nhóm *M. fortuitum* là 7,0% trong đó *M. fortuitum* (5,2%) và *M. brisbanense* và *M. peregrinum* dưới 1,0%. RGM là các chủng phân lập phổ biến ở Đông Nam Á, chiếm 27,0% tổng số chủng NTM phân lập so với tần suất phân lập là 17,9%, 16,0% và 14,0% ở Bắc Mỹ, Nam Mỹ và Châu Âu. Tuy nhiên, có sự khác biệt về tần suất phát hiện RGM giữa các quốc gia trong khu vực Châu Á. Ở Tokyo (Nhật Bản), RGM chỉ chiếm 6,6% tổng số các chủng phân lập, ngược lại ở Hàn Quốc là 28,7% và Đài Loan là 50,0% [14]. *M. abscessus* và *M. fortuitum* là 2 loài NTM phân lập nhiều nhất trên toàn thế giới. Tại Đài Loan, *M. fortuitum* và *M. abscessus* là loài NTM phổ biến thứ hai và thứ ba sau MAC, tại Hàn Quốc *M. abscessus* là loài NTM phổ biến thứ hai sau MAC [14].

Dựa theo cây phát sinh loài được kết hợp giữa trình tự tham chiếu và 115 trình tự phân tích, hình ảnh cho thấy có 10 cụm NTM riêng biệt (hình 2). Tính từ nốt với MTB, các cụm trình tự thể hiện lần lượt: nhóm *M. avium* (4 phân nhóm - 43 trình tự), *M. europaeum* (1 trình tự), *M. simiae* (8 trình tự), *M. lentiflavum* (8 trình tự), *M. mantenii* (2 trình tự), nhóm *M. gordonae* (2 phân nhóm - 6 trình tự), *M. gastri* (2 trình tự) và *M. sensuense* (1 trình tự). Tám cụm trình tự này cho thấy các loài NTM gần gũi với nhau về mặt di truyền và thuộc mycobacteria mọc chậm. Xa nhất với nốt MTB là các trình tự thuộc mycobacteria mọc nhanh gồm nhóm *M. fortuitum* (3 phân nhóm - 8 trình tự) và nhóm *M. abscessus* (3 phân nhóm - 36 trình tự). Chiếm ưu thế về số lượng trình tự là nhóm *M. avium* và nhóm *M. abscessus* với tỷ lệ 68,7% (79/115 trình tự).

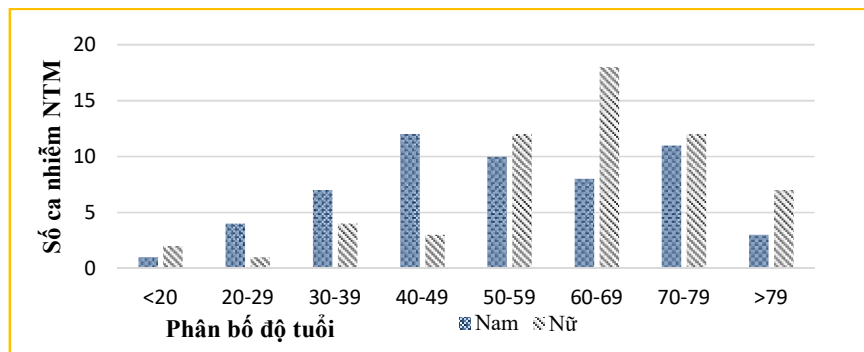
Kết quả của chúng tôi phù hợp với kết quả đã công bố của Đặng Thị Nguyên và cộng sự, 2018, trên 473 chủng NTM tại Bệnh viện Phổi Trung ương Việt Nam nhóm *M. avium* và nhóm *M. abscessus* chiếm 52,2% trong tổng số các loài NTM phân lập được [15].



Hình 2. Cây phát sinh loài NTM

3.3. Đặc điểm tuổi, giới tính các trường hợp NTM

Trong nghiên cứu này, độ tuổi của bệnh nhân dao động từ 17 đến 90 tuổi. Đối với nam giới độ tuổi nhiễm NTM cao nhất ở 40-49 tuổi còn đối với nữ giới là 60-69 tuổi (hình 3).

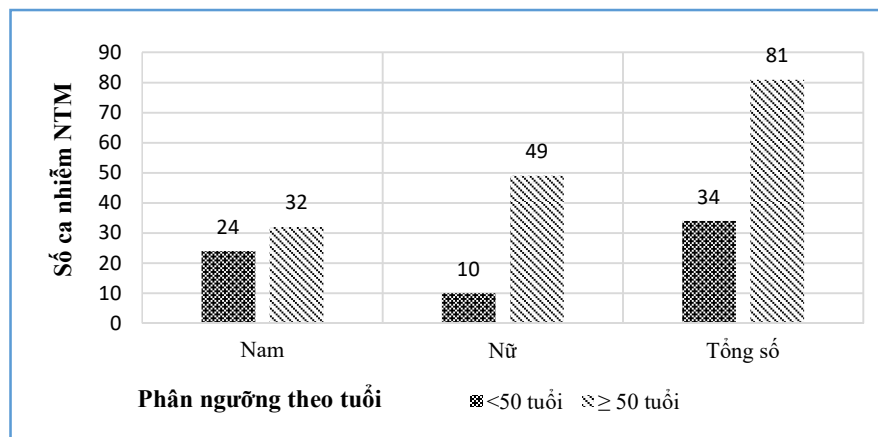


Hình 3. Biểu đồ tỷ lệ nhiễm NTM theo giới tính và tuổi

Có sự khác biệt về tỷ lệ nhiễm NTM ($p < 0,00001$) đối với các bệnh nhân ở ngưỡng 50 tuổi (hình 4). Số ca nhiễm NTM ở các bệnh nhân ≥ 50 (81/115) cao gấp 2,3 lần đối với các bệnh nhân < 50 tuổi (34/115). Không có sự khác biệt về mặt thống kê giữa nam giới và nữ giới mắc bệnh ($p = 0,396$), tỷ lệ khá tương đồng trong

đó nữ chiếm 51% (59/115) và nam chiếm 49% (56/115). Tuy nhiên, phân chia theo ngưỡng 50 tuổi, giới tính có ảnh hưởng đến tỷ lệ mắc bệnh ($p=0,0021$). Ở nữ giới tỷ lệ mắc bệnh ở bệnh nhân ≥ 50 tuổi (49/59 trường hợp) cao gấp 5 lần so người <50 (10/59 trường hợp).

Đặc điểm lâm sàng như tuổi tác, giới tính, khả năng miễn dịch, bệnh lý nền kèm theo đã được báo cáo có liên quan tới khả năng lây nhiễm NTM [6],[16]. Nghiên cứu dịch tễ học về bệnh phổi do NTM cho thấy bệnh phổ biến ở nữ giới và đặc biệt ở phụ nữ lớn tuổi so với nam giới trẻ [4]. Tại US, theo báo cáo của Prevots và cộng sự, tỷ lệ mắc bệnh hàng năm ở đối tượng ≥ 60 tuổi tăng từ 19,6 lên 26,7/100.000 trường hợp trong giai đoạn 1999-2006 [16]. Như vậy, kết quả của chúng tôi phù hợp với những nghiên cứu trước đây.



Hình 4. Biểu đồ tỷ lệ nhiễm NTM phân theo ngưỡng 50 tuổi

Những phát hiện trong nghiên cứu này còn nhiều hạn chế do số lượng mẫu phân tích nhỏ và tại 1 địa điểm, vì vậy cần có các nghiên cứu lớn, có hệ thống hơn nhằm thu thập thông tin trên mẫu lâm sàng và mẫu môi trường để có hiểu biết toàn diện hơn về đặc điểm phân bố các loài NTM tại Bệnh viện 74 Trung ương nói riêng và Việt Nam nói chung.

4. KẾT LUẬN

- Trong tổng số 122 mẫu nghi ngờ NTM thu thập tại Bệnh viện 74 Trung ương, đã định danh được 115 chủng là NTM. SGM chiếm tỷ lệ 61,7%, trong đó nhóm *Mycobacterium avium* (37,4%), *Mycobacterium lentiflavum* (7,0%), *Mycobacterium simiae* (7,0%), nhóm *Mycobacterium gordonae* (5,2%) và một số loài dưới 2,0%. RGM chiếm tỷ lệ 38,3%, trong đó nhóm *Mycobacterium abscessus* (31,3%) và nhóm *Mycobacterium fortuitum* (7,0%). Các loài NTM phổ biến nhất phân lập tại Bệnh viện 74 Trung ương thuộc 02 nhóm *Mycobacterium avium* và nhóm *Mycobacterium abscessus* (68,7%).

- Tỷ lệ nhiễm NTM ở các bệnh nhân trên 50 tuổi cao gấp 2,3 lần so với các bệnh nhân dưới 50 tuổi. Ở nữ giới tỷ lệ này cao gấp 5 lần, tuy nhiên, ở nam giới không có sự khác biệt về mặt thống kê.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lars-Olof Larsson, Eva Polverino, Wouter Hoefsloot, Luigi R. Codecasa, Roland Diel, Stephen G. Jenkins, Michael R. Loebinger, *Pulmonary disease by non-tuberculous mycobacteria - clinical management, unmet needs and future perspectives*, Expert Review of Respiratory Medicine, 2017, **11**(12):977-989.
2. Saloni Saxena, Herman P. Spaink, and Gabriel Forn-Cuní, *Drug resistance in nontuberculous mycobacteria: Mechanisms and models*, Biology (Basel), 2021, **10**(2):1-22.
3. Jan-Willem Alffenaar, Anne-Grete Märtsen, Scott K. Heysell, Jin-Gun Cho, Asad Patanwala, Gina Burch, Hannah Y. Kim, Marieke G. G. Sturkenboom, Anthony Byrne, Debbie Marriott, Indy Sandaradura, Simon Tiberi, Vitali Sintchenko, Shashikant Srivastava, Charles A. Peloquin, *Therapeutic drug monitoring in non-tuberculosis mycobacteria infections*, Clinical Pharmacokinetics, 2021, **60**(6):711-725.
4. Radha Gopalaswamy, Sivakumar Shanmugam, Rajesh Mondal, Selvakumar Subbian, *Of tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial infections - A comparative analysis of epidemiology, diagnosis and treatment*, Journal of Biomedical Science, 2020, **27**(1):1-17.
5. Lei Zhou, Da Xu, Hancan Liu, Kanglin Wan, Ruibai Wang, Zaichang Yang, *Trends in the prevalence and antibiotic resistance of non-tuberculous mycobacteria in Mainland China, 2000-2019: Systematic review and meta-analysis*, Frontiers Public Health, 2020, **8** (7): 1-9.
6. Sara E. Strollo, Jennifer Adjemian, Michael K. Adjemian, D. Rebecca Prevots, *The burden of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease in the United States*, Annals of the American Thoracic Society, 2015, **12**(10):1458-1464.
7. David E. Griffith, Timothy Aksamit, Barbara A. Brown Elliott, Antonino Catanzaro, Charles Daley, Fred Gordin, Steven M. Holland, Robert Horsburgh, Gwen Huitt, Michael F. Iademarco, Michael Iseman, Kenneth Olivier, Stephen Ruoss, C. Fordham von Reyn, Richard J. Wallace Jr., Kevin Winthrop, *An official ATS/IDSA statement: Diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases*, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2007, **175**:367-416.
8. Wellman Ribón, *Biochemical isolation and identification of mycobacteria*, Biochemical Testing, 2012, p. 21-52.
9. Si Hyun Kim, Jeong Hwan Shin, *Identification of nontuberculous mycobacteria using multilocus sequence analysis of 16S rRNA, hsp65, and rpoB*, Journal of Clinical Laboratory Analysis, 2018, **32**(1):1-6.

10. Zakayo Maingi Mwangi, Nellie Njambi Mukiri, Frank Gekara Onyambu, Bulimo Dimbuson Wallace, *Genetic diversity of nontuberculous mycobacteria among symptomatic tuberculosis negative patients in Kenya*, International Journal of Mycobacteriology, 2022, **11**(1):60-69.
11. Parveen Kumar, Prit Benny, Manisha Jain, Sarman Singh, *Comparison of an in-house multiplex PCR with two commercial immuno-chromatographic tests for rapid identification and differentiation of MTB from NTM isolates*, International Journal of Mycobacteriology, 2014, **3**(1):50-56.
12. Kamal Singh, Richa Kumari, Rajneesh Tripathi, Smita Gupta, Shampa Anupurba, *Detection of clinically important non tuberculous mycobacteria (NTM) from pulmonary samples through one-step multiplex PCR assay*, BMC Microbiology, 2020, **20**(1):1-6.
13. Nyasha Chin'ombe, Boniface Muzividzi, Ellen Munemo, and Pasipanodya Nziramasanga, *Molecular identification of nontuberculous mycobacteria in humans in Zimbabwe using 16S ribosequencing*, The Open Microbiology Journal, 2016, **10**(1):113-123.
14. Nontuberculous mycobacteria network european trials group (NTM-NET), *The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study*, European Respiratory Journal, 2013, **42**(6):1604-1613.
15. Đặng Thị Nguyên, Nguyễn Thị Hằng, *Định danh và xác định tần số của các chủng mycobacteria không lao thu thập tại Bệnh viện Phổi Trung ương Việt Nam*, Tạp chí Y học Việt Nam, 2018, **472**(2):158-162.
16. Kevin L. Winthrop, Erin McNelley, Brian Kendall, Allison Marshall-Olson, Christy Morris, Maureen Cassidy, Ashlen Saulson, Katrina Hedberg, *Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease prevalence and clinical features*, American journal of respiratory and critical care medicine, 2010, **182**(7):977-982.

SUMMARY

INVESTIGATING THE DISTRIBUTION RATE OF *Nontuberculous mycobacteria* COLLECTED AT NATIONAL HOSPITAL 74 BY *hsp65* SEQUENCING

In recent years, the burden of nontuberculous mycobacteria pulmonary disease has increased worldwide. *Nontuberculous mycobacteria* - NTM infection is often misdiagnosed with *Mycobacterium tuberculosis* - MTB because of their similar clinical manifestations and preclinical manifestations. For MTB, the National Tuberculosis Program and the Ministry of Health (Vietnam) have a standard treatment regimen, while for NTM, an individualized treatment regimen based on infectious NTM species. Therefore, accurate identification of the causative NTM species can help clinicians choosing an effective treatment regimen. Among 122

suspected NTM samples collected at National Hospital 74, we successfully identified 115 strains belonging to NTM. Analytical DNA sequences, building phylogenetic trees were analyzed by Bioedit, ClustalX2, and MEGA-X software; comparing and identifying reference species from gene bank were used BLAST-NCBI. Slow-growing mycobacteria accounted for 61.7%, consists of *Mycobacterium avium complex* (37.4%), *Mycobacterium lentiflavum* (7.0%), *Mycobacterium simiae* (7.0%), *Mycobacterium gordonae complex* (5.2%) and other species less than 2.0%. The detection rate of rapid-growing mycobacteria was 38.3% including *Mycobacterium abscessus complex* (31.3%), and *Mycobacterium fortuitum* (7.0%). The most prevalent NTM species belonged to *Mycobacterium avium complex* and *Mycobacterium abscessus complex* (68.7%). The proportion of NTM infection in patients 50 years and older is 2.3 times higher than in patients under 50 years. This proportion is 5 times higher in females while there is no significant difference in males.

Keywords: *Nontuberculous mycobacteria, hsp65, Slow-growing mycobacteria, Rapid-growing mycobacteria, Mycobacterium avium complex and Mycobacterium abscessus complex.*

Nhận bài ngày 05 tháng 8 năm 2022

Phản biện xong ngày 19 tháng 10 năm 2022

Hoàn thiện ngày 09 tháng 11 năm 2022

⁽¹⁾ Viện Y sinh Nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga

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

⁽³⁾ Bệnh viện 74 Trung ương, Bộ Y tế

Liên hệ: **Vũ Thị Thương**

Viện Y sinh Nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga

Số 63, Nguyễn Văn Huyền - Nghĩa Đô - Cầu Giấy - Hà Nội

Điện thoại: 0989062369; Email: thuongvt.cnsh@gmail.com