

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG

-----*-----

HOÀNG VŨ MAI PHƯƠNG

**TÍNH KHÁNG THUỐC OSELTAMIVIR
CỦA VIRUT CÚM A LƯU HÀNH
TẠI MIỀN BẮC VIỆT NAM, 2001 – 2012**

LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

HÀ NỘI – 2014

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG

-----*-----

HOÀNG VŨ MAI PHƯƠNG

**TÍNH KHÁNG THUỐC OSELTAMIVIR
CỦA VIRUT CÚM A LƯU HÀNH
TẠI MIỀN BẮC VIỆT NAM, 2001 – 2012**

Chuyên ngành: Vi sinh Y học

Mã số : 62.72.01.15

LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

- 1. GS.TS. Đặng Đức Anh**
- 2. PGS.TS. Lê Thị Quỳnh Mai**

HÀ NỘI – 2014

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi.

Các số liệu, kết quả trong luận văn là trung thực và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

NGHIÊN CỨU SINH

Hoàng Vũ Mai Phương

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận văn này, tôi xin trân trọng cảm ơn:

- **Khoa Đào tạo và Quản lý khoa học, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung Ương.**
- **Ban Giám đốc, Ban Chủ nhiệm Khoa Virút, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung Ương.**

Đã tạo điều kiện tốt nhất, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

*Tôi xin gửi lời cảm ơn đặc biệt đến **GS.TS Đặng Đức Anh**, người đã tạo điều kiện cho tôi đến với chuyên ngành vi rút, cho tôi những lời khuyên hữu ích, sự động viên và lòng nhiệt tình trong suốt quá trình nghiên cứu và hoàn thành luận văn. Tôi xin gửi lòng biết ơn sâu sắc tới **PGS.TS. Lê Thị Quỳnh Mai**, người đã tận tình dìu dắt giúp đỡ tôi từ những ngày đầu tiên bước chân vào lĩnh vực vi rút học, truyền đạt những kinh nghiệm quý báu và luôn khuyến khích tôi bước về phía trước, tiếp cận với những kiến thức nâng cao và mở rộng để tôi có thể hoàn thành luận văn này.*

*Tôi xin trân trọng cảm ơn **TS. Nguyễn Lê Khánh Hằng, Ths Nguyễn Cơ Thạch, Ths Lê Thị Thanh, CN Phạm Thị Hiền** cùng các bạn đồng nghiệp công tác tại **Phòng thí nghiệm Cúm - Khoa Vi rút - Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung Ương** đã nhiệt tình giúp đỡ và ủng hộ tôi trong suốt quá trình hoàn thành luận văn.*

*Tôi xin chân thành cảm ơn sự tài trợ của **Trung tâm Cúm thuộc Viện sức khỏe Hàn Quốc (KNIH)** trong suốt quá trình nghiên cứu.*

*Tôi xin chân thành cảm ơn **TS Mendi Jamsran, TS Aeron Hurt**, chuyên viên của **Tổ chức Y tế Thế giới**, cho những hỗ trợ kỹ thuật ban đầu của nghiên cứu.*

*Tôi xin gửi tặng **Gia đình, bạn bè và những người thân trong gia đình** đã hết lòng giúp đỡ, động viên tôi trên con đường sự nghiệp khoa học để tôi đạt được thành quả ngày hôm nay.*

Hà nội, ngày 22 tháng 10 năm 2013

HOÀNG VŨ MAI PHƯƠNG

v
MỤC LỤC

Trang phụ bì	i
Lời cam đoan	ii
Lời cảm ơn	iii
Mục lục	iv
Chữ viết tắt	vii
Danh mục bảng	viii
Danh mục hình, biểu đồ, sơ đồ	ix
ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG I – TỔNG QUAN	4
1.1. Vi rút cúm A	4
1.1.1. Cấu tạo chung và hệ gen của vi rút cúm A.....	4
1.1.2. Cơ chế nhân lên của vi rút cúm A.....	11
1.1.3. Thay đổi nhỏ và thay đổi lớn trong hệ gen của vi rút cúm A.....	13
1.1.4. Sự trao đổi và tích hợp trong hệ gen của vi rút cúm A.....	15
1.1.5. Khả năng gây bệnh của vi rút cúm.....	16
1.1.6. Tiến hóa của vi rút cúm A	17
1.2. Phòng và điều trị cúm A	18
1.2.1. Vắc xin phòng cúm	18
1.2.2. Thuốc điều trị vi rút cúm A	20
1.2.3. Các thuốc kháng vi rút mới	23
1.3. Tình hình kháng thuốc của vi rút cúm A với thuốc kháng vi rút	25
1.3.1. Tình hình kháng thuốc của vi rút cúm với thuốc amantadine	25
1.3.2. Tình hình kháng thuốc của vi rút cúm với thuốc oseltamivir.....	26
1.4. Kỹ thuật áp dụng trong quá trình xác định tính kháng thuốc của vi rút cúm A	27

1.4.1. Nguyên nhân của hiện tượng kháng thuốc	27
1.4.2. Các kỹ thuật được áp dụng trong giám sát sự kháng thuốc thông qua sự thay đổi vật liệu di truyền của vi rút cúm	28
1.4.3. Kỹ thuật xác định mức độ kháng oseltamivir dựa trên hoạt động của neuraminidase.....	32
1.4.4. Giám sát sự kháng thuốc vi rút cúm.....	34
CHƯƠNG II - ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU	
VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	37
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	37
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	37
2.3. Vật liệu và kỹ thuật xét nghiệm.....	38
2.3.1. Vật liệu	38
2.3.2. Kỹ thuật xét nghiệm	42
2.4. Phân tích số liệu.....	51
CHƯƠNG III – KẾT QUẢ.....	
53	
3.1. Các vi rút cúm A thu thập trong giai đoạn từ 2001 – 2012.....	53
3.2. Xác định giá trị IC ₅₀ ngưỡng của các phân típ vi rút cúm A	54
3.3. Sự tương tác của oseltamivir với các vi rút cúm A	60
3.4. Vị trí đột biến trên protein NA của các chủng cúm A liên quan đến kháng thuốc oseltamivir	65
3.5. Tỷ lệ các chủng vi rút cúm A kháng oseltamivir tại miền Bắc Việt Nam, 2001-2012	69
3.6. Sự tương đồng về gen HA và NA giữa các vi rút cúm A có biểu hiện giảm độ nhạy oseltamivir với các vi rút cùng phân típ lưu hành trong giai đoạn nghiên cứu	72

CHƯƠNG IV – BÀN LUẬN.....	86
4.1. Sự lưu hành của các vi rút cúm A trong khoảng thời gian nghiên cứu	86
4.2. Mức độ và tỉ lệ các vi rút cúm A giảm độ nhạy cảm với oseltamivir thông qua giá trị ức chế 50% (IC ₅₀).....	88
4.3. Sự liên quan của các đột biến trên gen NA với quá trình kháng thuốc oseltamivir của các chủng cúm A lưu hành tại miền Bắc Việt Nam.....	94
4.4. Sự liên quan về mặt di truyền học của các chủng vi rút A mang gen đột biến và các vi rút cúm A lưu hành cùng thời gian.	98
KẾT LUẬN	101
KIẾN NGHỊ	103
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ ĐÃ CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	

TÀI LIỆU THAM KHẢO

PHỤ LỤC

CHỮ VIẾT TẮT

ABI	Applied Biosystems
APHL	<i>Association of Public Health Laboratories</i> (<i>Tổ chức của các PTN trong hệ thống Y tế Cộng đồng</i>)
ATSH	An Toàn Sinh Học
DNA	Deoxiribonucleic Acid
GISRS	Global Influenza Surveillance and Response System (Hệ thống phản ứng và giám sát cúm toàn cầu)
IC ₅₀	Inhibition Concentration 50% (Nồng độ ức chế 50% vi rút)
IQR	<i>Interquartile Range (Khoảng liên tứ phân vị)</i>
ISIRV-AVG	International Society for Influenza and other Respiratory Virus Diseases – Antiviral Group (Hiệp hội quốc tế về cúm và các vi rút gây bệnh đường hô hấp khác – Nhóm nghiên cứu thuốc kháng vi rút)
Kb	Kilobase
NAI	Neuraminidase Inhibition (Ức chế neuraminidase)
NIID	National Institute of Infectious Diseases - Japan (Viện các bệnh truyền nhiễm quốc gia – Nhật Bản)
PCR	Polymerase Chain Reaction
pdm	Pandemic
PTN	Phòng Thí Nghiệm
RNA	Ribonucleic Acid
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction
SOP	<i>Standard Operating Procedure (Quy trình chuẩn)</i>
TCYTTG	Tổ chức Y tế Thế giới
US-CDC	United States- <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> (Trung tâm kiểm soát bệnh dịch Hoa Kỳ)
WHO	World Health Organization (Tổ chức Y tế Thế giới)

DANH MỤC BẢNG

Bảng	Tên bảng	Trang
1.1.	Các phân đoạn gen của vi rút cúm A	6
3.1.	Phân bố theo năm các phân típ virut cúm A sử dụng trong nghiên cứu ..	53
3.2.	Giá trị trung bình của các phân típ cúm A thực hiện trong nghiên cứu và giá trị IC ₅₀ của các vi rút trong bộ chứng chuẩn	56
3.3.	Giá trị IC ₅₀ của các chủng A/H1N1 kháng oseltamivir năm 2008 và 2009	60
3.4.	Giá trị IC ₅₀ của các chủng A/H1N1pdm09 kháng oseltamivir năm 2009 và 2011	61
3.5.	Giá trị IC ₅₀ của các chủng A/H3N2 từ năm 2003 đến 2012.....	62
3.6.	Giá trị IC ₅₀ của các chủng A/H5N1 năm 2005 và 2008.....	62
3.7.	Kết quả phân loại mức độ giảm độ nhạy của vi rút cúm A với oseltamivir.....	64
3.8.	Mức độ giảm nhạy cảm của vi rút cúm với oseltamivir và các điểm đột biến	70
3.9.	Tỉ lệ kháng oseltamivir của các chủng vi rút cúm A trong nghiên cứu dựa trên hai phương pháp (ức chế neuraminidase và giải trình tự gen)...	71

DANH MỤC HÌNH VẼ, SƠ ĐỒ, BIỂU ĐỒ

Hình	Tên hình	Trang
1.1.	Cấu trúc vi rút cúm	4
1.2.	Hình ảnh vi rút cúm	4
1.3.	Sự tham gia của các polymerase vào quá trình sao mã của vi rút cúm	10
1.4.	Cấu trúc ribonucleoprotein của vi rút cúm	10
1.5.	Cơ chế nhân lên của vi rút và cơ chế tác dụng của thuốc kháng vi rút	12
1.6.	Cấu trúc và cơ chế tác dụng của amantadine và rimantadine	21
1.7.	Cấu trúc của oseltamivir và zanamivir	22
1.8.	Cơ chế hoạt động của neuraminidase và chất ức chế neuraminidase trong quá trình giải phóng vi-rút ra khỏi tế bào	23
2.1.	Thang chỉ thị phân tử chuẩn 1 kb Invitrogen	50
3.1.	Đột biến tại vị trí 275 trên protein NA của các chủng cúm A/H1N1.....	66
3.2.	Đột biến tại vị trí 275 trên protein NA của các chủng cúm A/H1N1pdm09	67
3.3.	Đột biến tại vị trí 117 trên protein NA của các chủng cúm A/H5N1.....	68
3.4.	Đột biến tại vị trí 275 trên protein NA của các chủng cúm A/H5N1.....	69
3.5.	Cây gia hệ gen HA các chủng cúm A/H1N1, 2001-2009	74
3.6.	Cây gia hệ phân đoạn gen mã hóa HA các chủng cúm A/H1N1 – nhóm 2, 2001-2009.....	75
3.7.	Cây gia hệ gen NA các chủng cúm A/H1N1, 2001-2009	76
3.8.	Cây gia hệ phân đoạn gen mã hóa NA các chủng cúm A/H1N1- nhóm 2, 2001-2009.....	77
3.9.	Cây gia hệ gen HA các chủng cúm A/H1N1pdm09	79
3.10.	Cây gia hệ gen NA các chủng cúm A/H1N1pdm09	80
3.11.	Cây gia hệ gen HA các chủng cúm A/H5N1	83