ỨNG DỤNG KỸ THUẬT GIẢI TRÌNH TỰ GEN PHÁT HIỆN *Rickettsia* GÂY BỆNH SỐT NỔI MỤN (*Rickettsia* SFG) TỪ MẪU NGOẠI KÝ SINH THU THẬP TẠI HÀ GIANG

VŨ THỊ THƯƠNG [(1)], PHẠM VIỆT HÙNG [(1)], BÙI THỊ THANH NGA [(1)], CẤN THỊ THU THỦY [(2)], TRỊNH VĂN TOÀN [(1)], NGUYỄN VĂN CHÂU [(3)], LÊ THỊ LAN ANH [(1)]

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh sốt do *Rickettsia* gây ra là bệnh truyền nhiễm từ động vật sang người, tác nhân gây bệnh là vi khuẩn gram (-), ký sinh nội bào bắt buộc thuộc chi *Rickettsia*. Bệnh được lây truyền thông qua vector truyền bệnh là các loài động vật thuộc ngành chân khớp bao gồm: ve, mò, bọ chét, chấy rận [1, 2]. Bệnh sốt do *Rickettsia* được chia thành ba nhóm gồm sốt phát ban (Typhus group rickettsia-TG); nhóm sốt nổi mụn (Spotted fever group-SFG) và nhóm sốt mò (scrub typhus group-STG). Hiện nay, việc chẩn đoán và điều trị bệnh nhiễm *Rickettsia* gặp nhiều khó khăn do bệnh có biểu hiện lâm sàng giống với bệnh sốt dengue, sốt rét, hay sốt do *Leptospira*. Ngoài ra, các nghiên cứu về *Rickettsia* còn ít, chưa được cập nhật. Vì vậy, các nghiên cứu dịch tễ học về *Rickettsia* đóng vai trò quan trọng trong dự phòng, định hướng chẩn đoán và điều trị bệnh sốt do *Rickettsia*.

Trong các nghiên cứu đã công bố, có rất nhiều các phương pháp, kỹ thuật được sử dụng để phát hiện *Rickettsia* như PCR, nested PCR, real time PCR với các trình tự mồi khác nhau, tuy nhiên đều dựa trên trình tự các gen đích gồm *gltA, OmpA, OmpB* và *17kDa*. Gen *gltA* được sử dụng để xác định chi *Rickettsia*, gen *17kDa, OmpA, OmpB* được sử dụng để xác định *Rickettsia* nhóm sốt phát ban hay nhóm sốt nổi mụn, đặc biệt trong đó gen *OmpA/OmpB* đặc hiệu cho *Rickettsia* SFG. Tại Việt Nam, khu vực biên giới tỉnh Hà Giang có vị trí địa lý phức tạp, giao thoa giữa các tác nhân gây bệnh trong và ngoài nước, dẫn đến tăng nguy cơ lây nhiễm các bệnh truyền từ động vật sang người. Ngoài ra, theo kết quả nghiên cứu trước đây của nhóm nghiên cứu đã phát hiện ADN của *Rickettsia* trên các mẫu động vật gặm nhấm và ngoại ký sinh trùng tại khu vực tỉnh Hà Giang [3]. Tuy nhiên, các nghiên cứu về sự lưu hành của *Rickettsia* trên các động vật chân đốt ký sinh trên vật nuôi như ve, mò, mạt, chấy, rận, bọ chét còn ít và chưa được cập nhật. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành thu thập các mẫu ve, rận trâu tại huyện Vị Xuyên, tỉnh Hà Giang và tiến hành PCR, giải trình tự phát hiện *Rickettsia* SFG [4-7].

2. ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Thu thập 125 cá thể ve trâu (chưa định danh loài) và 140 cá thể rận trâu (*Haematopinus tuberculatus*) tại xã Thanh Đức, huyện Vị Xuyên, tỉnh Hà Giang. Cứ 5 cá thể ve trâu được trộn lại thành 1 mẫu, 10 cá thể rận được trộn lại thành 1 mẫu (tổng 25 mẫu gộp ve trâu và 14 mẫu gộp rận trâu). Các mẫu ve, rận được giữ trong ethanol 70% trong ống có nắp vặn và vận chuyển về phòng thí nghiệm.

2.2. Vật liệu nghiên cứu

Thiết bị: Máy PCR Eppendorf Mastercycler X50s, máy nghiền mẫu Tissuelyzer (QIAgen), máy ly tâm Eppendorf 5424R, tủ an toàn sinh học Yakos 65, bộ điện di đứng Cleaver Scientific, hệ thống chụp gel Gel Doc EZ Imager.

Hóa chất, sinh phẩm: Kit tách chiết G-spin total DNA extraction (iNtRON), ethanol 96% (Merck), PBS (Merck), PCR master mix (2X Promega), QIAquick PCR Purification Kit (QIAgen, Đức).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Tách chiết ADN các mẫu nghiên cứu

Các mẫu ve, rận trong ethanol 70% được rửa 2 lần với nước cất và giữ trong đệm PBS 1x, pH=7,4. Sử dụng máy nghiền mẫu để xử lý và tạo dung dịch đồng nhất ở tần số 50 Hz/s trong 10 phút. Tiến hành tách chiết ADN tổng số của dịch đã đồng nhất bằng bộ kit tách chiết. Quy trình tách chiết ADN được tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.3.2. Phương pháp PCR

Phản ứng PCR nhắm gen mục tiêu *OmpA* và *gltA*, quy trình được tham khảo với một số cải biến [5, 6]. Hỗn hợp phản ứng gồm 20µl PCR Master mix 2X; 2 µl (10 µM) mồi xuôi Rr190k.71p hoặc gltA_Fc; 2 µl (10 µM) mồi ngược Rr190k.602n hoặc gltA_Rc; 10 µl nước và 6 µl ADN tổng số. Tổng thể tích phản ứng là 40 µl. Trình tự mồi và chu trình phản ứng PCR được trình bày ở bảng 1 và 2.

Bảng 1. Trình tự mồi sử dụng trong nghiên cứu

Gene	Mồi	Trình tự mồi (5'- 3')	Kích thước sản phẩm (bp)
OmpA [5]	Rr190k.71p	5'-TGGCCAATATTTCTCCAAAA-3'	542
	Rr190k.602n	5'-AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT-3'	
gltA [6]	gltA_Fc	5'-CGAACTTACCGCTATTAGAATG-3'	580
	gltA_Rc	5'-CTTTAAGAGCGATAGCTTCAAG-3'	

Bảng 2. Chu trình PCR phát hiện *Rickettsia* spp.

Gene	Biến tính (ºC/phút) - 1 chu kỳ	Chương trình PCR (45 chu kỳ)			Kết thúc (ºC/phút) - 1 chu kỳ
		(ºC/giây)	(ºC/giây)	(ºC/giây)	
OmpA	95/5	95/30	48/15	72/40	72/5
gltA	95/5	95/30	55/15	72/40	72/5

2.3.3. Giải trình tự gen, phân tích và xây dựng cây phát sinh loài

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% nhuộm Redsafe và quan sát trong hệ thống chụp gel. Sản phẩm PCR gen *OmpA* được tinh sạch và tiến hành giải trình tự gen theo phương pháp Sanger tại hãng 1st BASE với cặp mồi Rr190k.71p và Rr190k.602n.

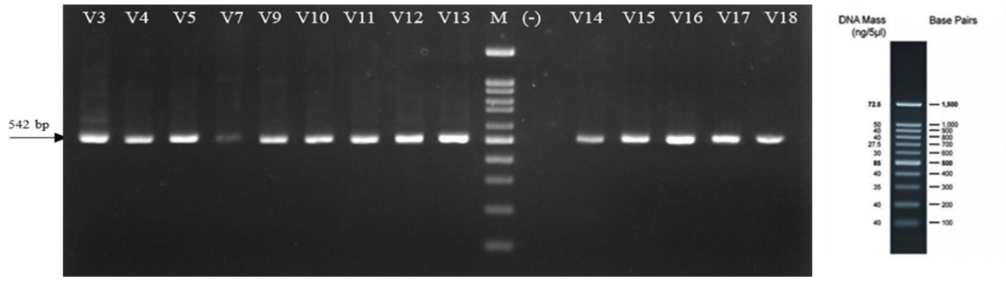
Kiểm tra chất lượng trình tự gốc (AB1 file) và biên tập đồng nhất bằng phần mềm Bioedit Sequence Alignment Editor. Các trình tự sau khi chỉnh sửa được so sánh và nhận biết loài tham chiếu từ Ngân hàng gen bằng BLAST-NCBI (Trung tâm Quốc gia về Thông tin Công nghệ Sinh học). Việc căn chỉnh các trình tự, xếp dóng cột (align) được tiến hành bằng phần mềm ClustalX2 và tiến hành xây dựng cây phát sinh loài bằng phần mềm MEGA-X, thuật toán Maximum-likelihood, Bootstrap value 1000. Trình tự gen *OmpA* của loài *Orientia tsutsugamushi* được sử dụng làm gốc phát sinh loài.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

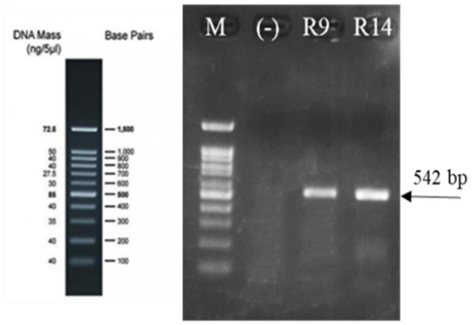
3.1. Kết quả PCR

Trong nghiên cứu này, dựa trên các công bố trên thế giới, chúng tôi sử dụng cả 2 cặp mồi đặc hiệu nhân vùng gen *gltA*, *OmpA* để phát hiện *Rickettsia* spp. Kết quả PCR sử dụng cặp mồi nhân đặc hiệu nhân gen *gltA* cho thấy 14/25 mẫu ve trâu và 2/14 mẫu rận trâu cho sản phẩm PCR có kích thước khoảng 580 bp theo như tính toán (dữ liệu không trình bày). Với gen *OmpA,* sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% cho thấy băng ADN đặc hiệu như thiết kế có kích thước 542 bp ở 14/25 mẫu ve trâu và 2/14 mẫu rận trâu. Kết quả đại diện cho các mẫu có băng kích thước theo dự kiến được thể hiện ở hình 1 và 2.

Mặc dù số lượng mẫu ve, rận khảo sát còn ít, nhưng kết quả bước đầu cho thấy có sự lưu hành của *Rickettsia* SFG tại xã Thanh Đức, huyện Vị Xuyên, tỉnh Hà Giang. Ngoài ra, bằng kỹ Real-time PCR, nhóm nghiên cứu đã phát hiện được 19,3% mẫu chuột dương tính với *Rickettsia* SFG và 10,8% chuột dương tính với *Rickettsia typhi* trong nghiên cứu trước đây [3]. Như vậy, ngoài động vật gặm nhấm thì ngoại ký sinh trùng như ve, rận trên trâu nuôi tại Hà Giang cũng mang tác nhân *Rickettsia* SFG.



Hình 1. Kết quả PCR mẫu ve ký sinh trên trâu sử dụng cặp mồi đặc hiệu gen OmpA. M: Thang chuẩn ADN 100bp (Cleaver Scientific), V3, V4, V5, V7, V9, V10, V11, V12, V14, V15, V16, V17 và V18 là các mẫu ve ký sinh trên trâu, (-): đối chứng âm



Hình 2. Kết quả PCR mẫu rận ký sinh trên trâu sử dụng cặp mồi đặc hiệu gen. M: Thang chuẩn ADN 100bp (Cleaver Scientific), R9, R14: mẫu rận ký sinh trên trâu, (-): đối chứng âm *OmpA*

3.2. Kết quả giải trình tự gen các mẫu dương tính với *Rickettsia* SFG

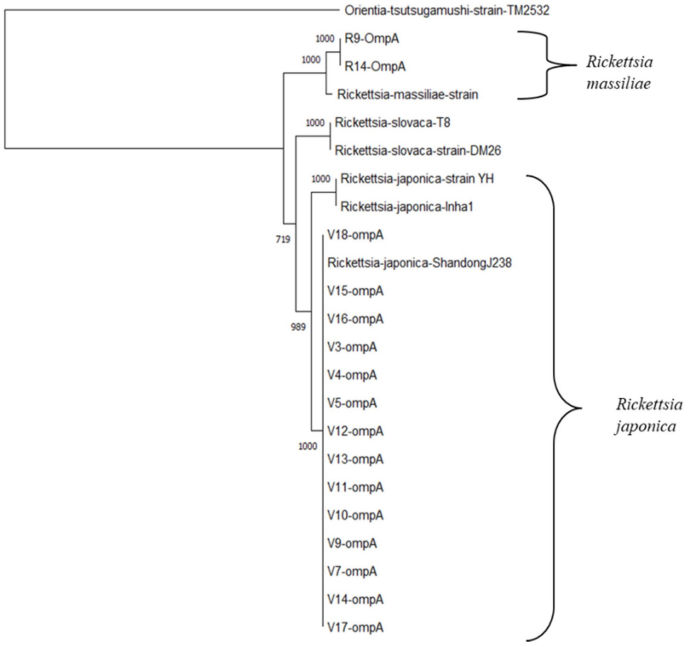
Các nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra rằng ve là vector chính truyền bệnh *Rickettsia* nhóm sốt nổi mụn (*Rickettsia* SFG) cho người. Nghiên cứu sự đa dạng *Rickettsia* trong các mẫu ve thu thập tại các vùng biên giới Đông Nam - Trung Quốc đã phát hiện thấy 7 loài *Rickettsia* trong các mẫu ve gồm *R. aeschlimannii*, *R. conorii*, *R. raoultii*, *R. sibirica*, *R. slovaca*, *R. massiliae* và *R. barbariae* [8]. Tại Nhật Bản, nghiên cứu trên 827 mẫu ve thu thập từ năm 2007-2011, bằng phương pháp PCR đã phát hiện 181 mẫu ve (21,9%) dương tính với *Rickettsia* SFG [9]. Phân tích 40 mẫu ve ký sinh trên dê thu thập tại Hàn Quốc từ 2016 đến 2019, có 45% dương tính với *Candidatus Rickettsia longicornii* [10].

Trong nghiên cứu này, để xác định được loài *Rickettsia* SFG trên các mẫu ve, rận thu thập được, sản phẩm PCR của 14 mẫu ve và 2 mẫu rận có băng đặc hiệu *Rickettsia* SFG bằng PCR được tiến hành khuếch đại, tinh sạch. Sản phẩm PCR giải trình tự theo phương pháp Sanger với mồi đặc hiệu cho gen *OmpA* (Rr190k.71p) (hình 3).

Phân tích cây phát sinh loài (hình 3) cho thấy tất cả các chủng thu được từ mẫu ve, rận đều phân cụm vào loài *Rickettsia* mà không thuộc loài *O. tsutsugamushi.* Các chủng *Rickettsia* phân lập được chia thành 2 cụm là *R. japonica* và *R. massiliae.* Đối với 14 chủng *Rickettsia* phân lập được từ ve trâu có sự tương đồng cao với *R. japonica* (cụ thể chủng *R. japonica* strain Shandong J238 - MK102719) [11]. Với 2 chủng *Rickettsia* phân lập được từ rận trâu có sự tương đồng cao với *R. massiliae* (cụ thể là chủng *R. massiliae* isolate - MG521363) [12]. Như vậy, kết quả nghiên cứu cho thấy đã có sự lưu hành của *Rickettsia* SFG trong các mẫu ve, rận trâu thu thập tại Hà Giang.

R. japonica lần đầu tiên được phát hiện tại tỉnh Tokushima ở Nhật Bản vào năm 1984 [11]. Sau đó *R. japonica* đã phát hiện ở nhiều quốc gia khác ở Châu Á như Hàn Quốc, Philippines và Thái Lan [11]. Từ năm 2013, *R. japonica* được phát hiện trên bệnh nhân cũng như các mẫu ve thu thập ở Trung Quốc [13]. Đến nay, đã có nhiều công bố về sự lưu hành của loài *Rickettsia* này tại Trung Quốc. Trong

nghiên cứu này, trình tự của 14 mẫu ve cho thấy tỷ lệ trình tự tương đồng lên tới 100% với chủng *R. japonica* Shandong J238 đã được phát hiện tại tỉnh Shandong, Trung Quốc năm 2019. Như vậy, nghiên cứu phần nào cho thấy mối quan hệ gần gũi về sự lưu hành của các chủng *R. japonica* Shandong J238 ở Trung Quốc và tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam - Hà Giang. *R. massilia* được phân lập lần đầu tiên trên ve thu thập tại khu vực gần Marseille, Pháp năm 1990 [14]. Kể từ đó mầm bệnh tiếp tục được phát hiện khu vực Châu Âu, Bắc Phi, Trung Phi, và Hoa Kỳ. Đặc biệt một số trường hợp cho thấy mầm bệnh có thể gây nhiễm trùng cho con người [14]. Theo số liệu thống kê về sự phân bố của các loài *Rickettsia* SFG tại các nước khu vực Châu Á của Jaruwan Satjanadumrong và cộng sự, 2019 cho thấy cả 2 loài *Rickettsia* SFG gồm *R. japonica* và *R. massiliae* đều được phát hiện ở Trung Quốc [15].



Hình 3. Cây phân loài *Rickettsia* spp dựa vào trình tự gen *OmpA*

4. KẾT LUẬN

- Đã phát hiện được ADN của *Rickettsia* SFG trong các mẫu ve, rận trâu thu thập tại huyện Vị Xuyên, tỉnh Hà Giang.

- Phân tích trình tự gen dựa trên đoạn gen *OmpA* cho thấy *Rickettsia* SFG trên các mẫu ve thu thập có trình tự tương đồng từ 98% đến 100% với *R. japonica* và *Rickettsia* SFG trên các mẫu rận tương đồng về trình tự là 99% với *R. massiliae*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Blanda V., Torina A., La Russa F., D'Agostino R., Randazzo K., Scimeca S., Giudice E., Caracappa S., Cascio A., de la Fuente J., *A retrospective study of the characterization of Rickettsia species in ticks collected from humans*, Ticks. Tick. Borne. Dis., 2017, **8**(4):610-614.

2. Parola P., Paddock C. D., Socolovschi C., Labruna M. B., Mediannikov O., Kernif T., Abdad M. Y., Stenos J., Bitam I., Fournier P. E., Raoult D., *Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach*, Clin. Microbiol. Rev., 2013, **26**(4):657-702.

3. Lê Thị Lan Anh, Võ Viết Cường, Trịnh Văn Toàn, Hồ Thị Hồng Nhung, Lê Thị Vân Anh, Cấn ThịThu Thủy, Phạm Thị Hà Giang, Bùi Thị Thanh Nga, Bùi Thị Lan Anh, Nguyễn Văn Châu, *Phát hiện DNA của vi khuẩn Rickettsia và Orientia Tsutsugamushi trên động vật gặm nhấm và ngoại kí sinh trùng ở Hà Giang*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2020, **18(**3):543-552.

4. Regnery R. L., Spruill C. L., Plikaytis B. D., *Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes*, J. Bacteriol., 1991, **173**(5):1576-89.

5. Noh Y., Lee Y. S., Kim H. C., Chong S. T., Klein T. A., Jiang J., Richards A. L., Lee H. K., Kim S. Y., *Molecular detection of Rickettsia species in ticks collected from the southwestern provinces of the Republic of Korea*, Parasites & Vectors., 2017, **10**(1):20-30.

6. Thu M. J., Qiu Y., Matsuno K., Kajihara M., Mori-Kajihara A., Omori R., Monma N., Chiba K., Seto J., Gokuden M., Andoh M., Oosako H., Katakura K., Takada A., Sugimoto C., Isoda N., Nakao R., *Diversity of spotted fever group rickettsiae and their association with host ticks in Japan*, Sci. Rep., 2019, **9**(1):1500.

7. Schötta A. M., Wijnveld M., Höss D., Stanek G., Stockinger H., Markowicz M., *Identification and characterization of "Candidatus Rickettsia thierseensis", a novel spotted fever group Rickettsia species detected in Austria*, Microorganisms, 2020, **8**(11):1670.

8. Song S., Chen C., Yang M., Zhao S., Wang B., Hornok S., Makhatov B., Rizabek K., Wang Y., *Diversity of Rickettsia species in border regions of northwestern China*, Parasites & Vectors, 2018, **11**(1):634.

9. Gaowa, Ohashi N., Aochi M., Wuritu D., Wu, Yoshikawa Y., Kawamori F., Honda T., Fujita H., Takada N., Oikawa Y., Kawabata H., Ando S., Kishimoto T., *Rickettsiae in ticks, Japan, 2007-2011*, Emerg. Infect. Dis., 2013, **19**(2):338-40.

10. Seo M. G., Kwon O. D., Kwak D., *Molecular and phylogenetic analysis of tick-borne pathogens in ticks parasitizing native Korean goats (Capra hircus coreanae) in South Korea*, Pathogens, 2020, **9**(2):71.

11. Qin X. R., Han H. J., Han F. J., Zhao F. M., Zhang Z. T., Xue Z. F., Ma D. Q., Qi R., Zhao M., Wang L. J., Zhao L., Yu H., Liu J. W., Yu X. J., *Rickettsia japonica and novel Rickettsia species in ticks, China*, Emerg. Infect. Dis., 2019, **25**(5):992-995.

12. Olivieri E., Wijnveld M., Bonga M., Berger L., Manfredi M. T., Veronesi F., Jongejan F., *Transmission of Rickettsia raoultii and Rickettsia massiliae DNA by Dermacentor reticulatus and Rhipicephalus sanguineus (s.l.) ticks during artificial feeding*, Parasites & Vectors, 2018, **11**(1):494.

13. Lu Q., Yu J., Yu L., Zhang Y., Chen Y., Lin M., Fang X., *Rickettsia japonica infections in humans, Zhejiang Province, China, 2015*, Emerg. Infect. Dis., 2018, **24**(11):2077-2079.
14. Wei Q. Q., Guo L. P., Wang A. D., Mu L. M., Zhang K., Chen C. F., Zhang W. J., Wang Y. Z., *The first detection of Rickettsia aeschlimannii and Rickettsia massiliae in Rhipicephalus turanicus ticks, in northwest China*, Parasites & Vectors, 2015, **10(**8):631.
15. Satjanadumrong J., Robinson M. T., Hughes T., Blacksell S. D., *Distribution and ecological drivers of spotted fever group Rickettsia in Asia*, Ecohealth., 2019, **16**(4):611-626.

SUMMARY

APPLICATION OF GENE SEQUENCING METHOD TO DETECT *Rickettsia* SPOTTED FEVER GROUP FROM ECTOPARASITES COLLECTED IN HA GIANG

Rickettsiosis is a zoonotic disease caused by *Rickettsiae* which are gram negative bacteria, obligate intracellular. These pathogens are transmitted to human through infected ticks, mites, fleas, lice, louse… In this study, The *17kDa* and *OmpA* partial genes of *Rickettsia* were amplified to detect *Rickettsial* DNA in buffalo ticks and louse (*Haematopinus tuberculatus*) collected in Ha Giang province. The PCR products were sequenced, analyzed and build phylogenetic tree by Bioedit, Mega-X softwares; were compared and identified the reference strain sequences by BLAST-NCBI, USA. The results indicated that 14/25 tick samples and 2/14 louse samples were positive for *Rickettsia* SFG by PCR. Sequence analysis of *OmpA* gen showed that 14 clone isolated from the tick samples exhibites a 98% - 100% similarity to *Rickettsia japonica,* whereas 2 clone isolated from the louse samples were 98% similar to *Rickettsia massiliae*. Thus, our research showed that *Rickettsia* SFG including *Rickettsia japonica* and *Rickettsia massiliae* were detected in ticks and louse, respectively collected in Ha Giang province, Vietnam.

Keywords: *Spotted fever, Rickettsia, Rickettsia japonica, Rickettsia massiliae, buffalo louse, tick; sốt nổi mụn, rận trâu, ve trâu.*

Nhận bài ngày 07 tháng 8 năm 2022
Phản biện xong ngày 19 tháng 10 năm 2022
Hoàn thiện ngày 09 tháng 11 năm 2022

(1) Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga
(2) Trường Đại học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội
(3) Viện Sốt rét, Ký sinh trùng và Côn trùng Trung ương

Liên hệ: ***Lê Thị Lan Anh***

Viện Y sinh Nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga
Số 63 Nguyễn Văn Huyên, Nghĩa Đô, Cầu Giấy, Hà Nội
Điện thoại: 0963.122.607; Email: leanhbio@gmail.com