

# **ĐẶC ĐIỂM DỊCH TỄ VÀ DI TRUYỀN CỦA LIÊN CẦU KHUẨN GÂY TAN MÁU $\beta$ LƯU HÀNH Ở TRẺ EM TỈNH QUẢNG TRỊ**

PHẠM KHẮC LINH, VŨ HOÀNG GIANG, VÕ VIỆT CƯỜNG,  
DMITRIEV A.V., ILYASOV I.U.

## **1. ĐẶT VẤN ĐỀ**

Liên cầu khuẩn gây tan máu  $\beta$  là một trong những tác nhân gây bệnh phổ biến trong các bệnh truyền nhiễm ở người. Trong đó liên cầu khuẩn nhóm A *Streptococcus pyogenes* (GAS) là tác nhân gây bệnh phổ biến nhất ở trẻ em thuộc các nhóm tuổi khác nhau. Những vi sinh vật này xâm nhiễm các màng nhầy họng, amidal, da và các lớp sâu của mô, gây viêm hạch bạch huyết, viêm họng, viêm mô tế bào, sốt nhiễm độc... và có thể gây nên biến chứng thấp tim, viêm cầu thận cấp... ở trẻ em các nước đang phát triển [1, 2, 3, 5, 7]. Trong những năm gần đây, một số chủng của nhóm C (GCS) và nhóm G (GGS) ngày càng được báo cáo là gây nhiễm trùng tương tự giống GAS như viêm họng, nhiễm trùng huyết, viêm da và mô mềm, sốt nhiễm độc, viêm cầu thận [3].

Giám sát tỷ lệ mắc bệnh liên cầu khuẩn trong cộng đồng là một thách thức lớn của ngành y tế. Hạn chế sự lây nhiễm liên cầu khuẩn trong cộng đồng sẽ cải thiện đáng kể sức khỏe, chất lượng cuộc sống và giảm gánh nặng cho nền kinh tế. Bài báo này tổng hợp các kết quả nghiên cứu được thực hiện năm 2012 tại xã Gio Châu, huyện Gio Linh, tỉnh Quảng Trị với mục tiêu xác định một số đặc điểm dịch tễ và di truyền phân tử của các chủng liên cầu gây tan máu  $\beta$  lưu hành ở học sinh tiểu học tỉnh Quảng Trị.

## **2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Đối tượng nghiên cứu**

Gồm 200 học sinh tiểu học (HS) độ tuổi từ 7 ÷ 11, không phân biệt giới tính đang sinh sống tại xã Gio Châu, huyện Gio Linh, Quảng Trị.

### **2.2. Cách tiếp cận: Điều tra cắt ngang**

*Cỡ mẫu nghiên cứu:* Cỡ mẫu trong nghiên cứu được tính theo công thức:

$$n = \frac{Z_{1-\alpha/2}^2 P (1 - P)}{d^2}$$

Trong đó:

$Z_{1-\alpha/2} = 1,96$  (độ tin cậy 95%);

d - sai số cho phép (d = 0,05);

P - tỷ lệ nhiễm liên cầu khuẩn (Lấy P = 0,15) [1, 2];

n - cỡ mẫu tối thiểu cần đạt (Tính được n = 196. Chúng tôi chọn n = 200).

### 2.3. Phương pháp nghiên cứu

\* Phương pháp điều tra dịch tễ học: Phỏng vấn bố mẹ học sinh theo mẫu phiếu.

\* Phương pháp thực hành labo

- Kỹ thuật lấy bệnh phẩm: Tiến hành khám khoang miệng và đường hô hấp trên. Lấy bệnh phẩm ở họng (hai hốc amygdal, thành sau họng) bằng tăm bông vô trùng.

- Kỹ thuật nuôi cấy: Bệnh phẩm được cấy trên môi trường thạch máu cừu 5% và ủ trong tủ ẩm CO<sub>2</sub> 5% trong thời gian 24 giờ.

- Kỹ thuật xác định nhóm liên cầu: Sử dụng bộ kit SlidexStreptoPlus (BIOMERIEUX®, Pháp) để xác định các nhóm liên cầu khuẩn phân lập được.

- Kỹ thuật sinh học phân tử:

+ Phương pháp tách chiết ADN: Cấy chuyển khuẩn lạc liên cầu khuẩn vào 10ml môi trường THB ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, nuôi qua đêm. Sau đó tế bào được thu lại bằng ly tâm 4000 vòng/phút trong 10 phút. Hòa tế bào vi khuẩn vào 250 µl đệm TE; bổ sung 2,5 µl lysozyme (100 mg/ml); ủ trong 1 giờ ở 37°C. Bổ sung 3 µl protease K (20 mg/ml); 30 µl SDS 10%; ủ ở 37°C trong 30 phút. Bổ sung 140 µl TE; 180 µl NaCl 5M lắc nhẹ và ủ tiếp ở 65°C trong 10 phút. Ly tâm 13000 vòng/phút trong 10 phút để thu dịch nổi. Protein của tế bào được loại bỏ bằng hỗn hợp phenol chloroform (1:1). ADN hệ gen nằm ở pha trên được tủa lại bằng cồn tuyệt đối và được hòa tan trong 40 µl TE [4].

+ Phương pháp PCR phân loại các chủng liên cầu khuẩn nhóm C và G: Các cặp mồi đặc hiệu được thiết kế dựa trên trình tự gen *cpn60* trên ngân hàng gen (Genbank). Các cặp mồi:

Ang1: TGCAGCCGTATCATCACGCAG và

Ang2: GTTGGCAATAGCTTCGGCATCA để xác định chủng *S. anginosus*;

Const1: TTGAAAGTGCTACATCTGAATTTGACAAA và

Const2: CTGCATTGATAGCGAT-TTGTCGAAT để xác định chủng *S. constellatus*;

Dysg1: TGGCTTGATTAAGTCACAACCTAGAAACCA và

Dysg2: GCTCAAGAGCAGCTACTTTTTTCGATCA để xác định chủng *S. dysgalactiae subsp. equisimilis*.

Phản ứng PCR được tiến hành theo các bước sau: biến tính 95°C - 60 giây, tiếp đến 25 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 3 bước: biến tính ở 95°C - 30 giây, gắn mồi ở 55°C - 30 giây, kéo dài ở 72°C - 60 giây. Kết thúc phản ứng ở 72°C - 10 phút [3, 4, 5].

+ Phương pháp điện di trong trường xung điện được tiến hành theo Dmitriev A.V. và cộng sự [4] để phân tích các chủng *S. pyogenes* phân lập được.

\* Các số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS 22.0.

### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

#### 3.1. Tỷ lệ nhiễm liên cầu khuẩn ở học sinh Trường tiểu học Gio Châu

**Bảng 1.** Cơ cấu giới tính và tuổi của học sinh trường tiểu học Gio Châu

|           | Lứa tuổi: 6 ÷ 8 | Lứa tuổi: 9 ÷ 11 | Tổng số  |         |
|-----------|-----------------|------------------|----------|---------|
|           |                 |                  | Số lượng | Tỷ lệ % |
| Nam       | 40              | 63               | 103      | 51,50   |
| Nữ        | 38              | 59               | 97       | 48,50   |
| Tổng cộng | 78              | 122              | 200      | 100     |

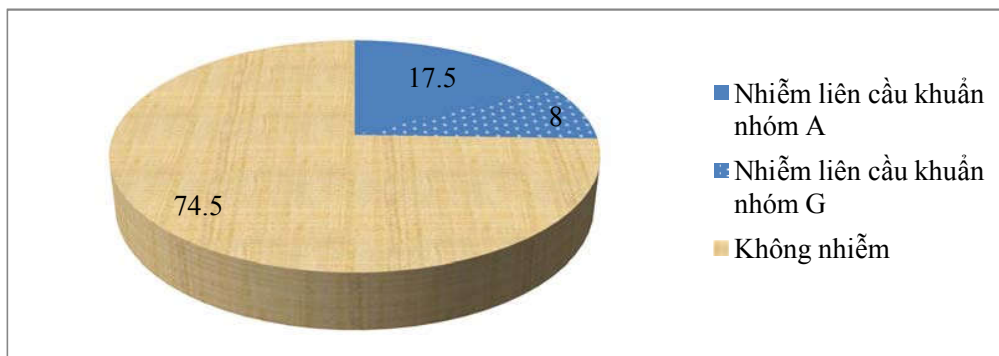
Kết quả ở bảng 1 cho thấy: Lứa tuổi của học sinh Trường tiểu học Gio Châu trong nghiên cứu này từ 6 ÷ 8 tuổi là 78 HS, từ 9 ÷ 11 tuổi là 122 HS; về giới: ở các nhóm lứa tuổi, nam đều nhiều hơn nữ (tổng số nam 103 HS chiếm 51,50%; nữ 97 HS chiếm 48,50%).

Tuy nhiên sự khác nhau này không có ý nghĩa thống kê.

**Bảng 2.** Kết quả phân lập liên cầu khuẩn

|                             | Kết quả nuôi cấy dương tính với liên cầu khuẩn |    |      | Kết quả nuôi cấy âm tính với liên cầu khuẩn |    |      | Tổng cộng |
|-----------------------------|------------------------------------------------|----|------|---------------------------------------------|----|------|-----------|
|                             | Nam                                            | Nữ | Tổng | Nam                                         | Nữ | Tổng |           |
| Nhiễm liên cầu khuẩn nhóm A | 18                                             | 17 | 35   | 77                                          | 72 | 149  | 200       |
| Nhiễm liên cầu khuẩn nhóm G | 8                                              | 8  | 16   |                                             |    |      |           |
| Tổng cộng                   | 26                                             | 25 | 51   | 77                                          | 72 | 149  | 200       |

Kết quả trong bảng 2 cho thấy: Trong số 200 mẫu nhầy họng, đã phân lập được 51 chủng liên cầu khuẩn, trong đó có 35 chủng nhóm A và 16 chủng nhóm G. Tỷ lệ nhiễm liên cầu nhóm A và G ở cả nam và nữ là tương đương nhau.



**Hình 1.** Tỷ lệ trẻ em nhiễm liên cầu ở Trường Tiểu học Gio Châu

Hình 1 cho thấy tỷ lệ nhiễm liên cầu gây tan máu  $\beta$  ở trẻ em trường tiểu học Gio Châu là 25,5%; trong đó 17,5% thuộc liên cầu nhóm A; 8% thuộc nhóm G.

Ở Việt Nam, một số nghiên cứu cho thấy tỷ lệ nhiễm liên cầu khuẩn nhóm A tương đối khác nhau, tùy thuộc vào độ tuổi, khu vực địa lý và điều kiện kinh tế xã hội. Tỷ lệ nhiễm liên cầu nhóm A học sinh 5 ÷ 16 tuổi khu vực Hà Nội là 15,3%; học sinh, sinh viên 16 ÷ 25 tuổi là 3,8%, trẻ em dưới 5 tuổi 2,8% [2]. Tỷ lệ cấy dương tính liên cầu khuẩn nhóm A từ phết họng ở học sinh 6 ÷ 15 tuổi tại Dương Minh Châu, tỉnh Tây Ninh chiếm 11,67%. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ nhiễm liên cầu nhóm A ở học sinh tiểu học 7 ÷ 11 tuổi xã Gio Châu là 17,5% cao hơn so với nghiên cứu của tác giả Nguyễn Thanh Phước. Tỷ lệ nhiễm liên cầu khuẩn nhóm A ở học sinh nam và nữ tương đương nhau. Tuy nhiên, phân phối tần suất nuôi cấy GAS (+) theo giới tính khi phết nhầy họng thì tương đương với tác giả này [1].

### 3.2. Một số đặc điểm dịch tễ nhiễm liên cầu khuẩn

Để tìm hiểu một số yếu tố dịch tễ ảnh hưởng tới tình trạng nhiễm liên cầu khuẩn, đã tiến hành khảo sát tình trạng tổn thương mũi, họng và khoang miệng cũng như trình độ văn hóa và nghề nghiệp của bố mẹ học sinh.

**Bảng 3.** Tỷ lệ tổn thương mũi, họng và khoang miệng ở các nhóm nuôi cấy dương tính và nhóm nuôi cấy âm tính với liên cầu khuẩn

| Tình trạng viêm<br>họng, mũi, amydal   | Kết quả nuôi cấy (+)<br>(n = 51) |         | Kết quả nuôi cấy (-)<br>(n = 149) |         | Thống kê |
|----------------------------------------|----------------------------------|---------|-----------------------------------|---------|----------|
|                                        | Số lượng                         | Tỷ lệ % | Số lượng                          | Tỷ lệ % |          |
| Viêm họng                              | 18                               | 35,29   | 46                                | 30,87   | p > 0,05 |
| Viêm amydal                            | 17                               | 33,33   | 54                                | 36,24   | p > 0,05 |
| Viêm mũi xuất tiết                     | 13                               | 25,49   | 31                                | 20,80   | p > 0,05 |
| Viêm các tổ chức<br>trong khoang miệng | 11                               | 21,57   | 35                                | 23,49   | p > 0,05 |

Các số liệu trong bảng 3 cho thấy tình trạng viêm họng, viêm amydal, viêm mũi và viêm các tổ chức trong khoang miệng ở nhóm kết quả nuôi cấy dương tính với liên cầu gây bệnh và nhóm nuôi cấy âm tính khác nhau không rõ rệt.

**Bảng 4.** Mối liên quan giữa trình độ học vấn và nghề nghiệp của bố mẹ với tình trạng nhiễm liên cầu khuẩn của trẻ em

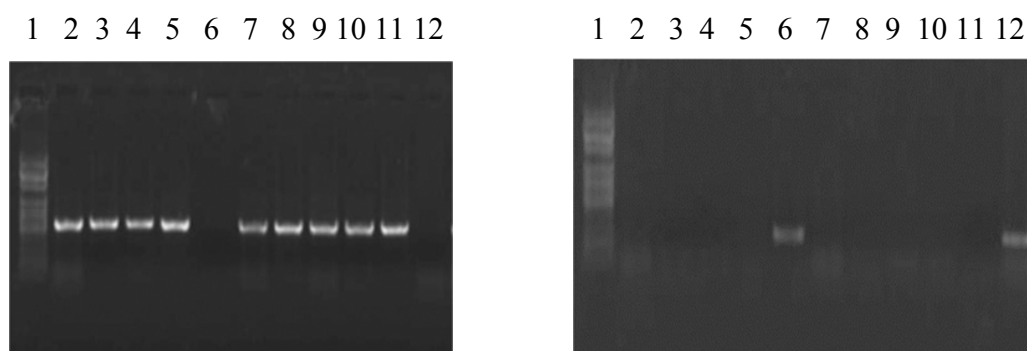
| Trình độ học<br>vấn và nghề<br>nghiệp của<br>bố mẹ | Kết quả nuôi cấy (+) với<br>liên cầu khuẩn (n = 51) |       |        |       | Kết quả nuôi cấy (-) với<br>liên cầu khuẩn (n = 149) |       |        |       | Thống kê                             |
|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------|--------|-------|------------------------------------------------------|-------|--------|-------|--------------------------------------|
|                                                    | Bố (1)                                              |       | Mẹ (2) |       | Bố (3)                                               |       | Mẹ (4) |       |                                      |
|                                                    | SL                                                  | %     | SL     | %     | SL                                                   | %     | SL     | %     |                                      |
| <b>Học vấn:</b>                                    |                                                     |       |        |       |                                                      |       |        |       |                                      |
| Đại học                                            | 4                                                   | 7,84  | 2      | 3,92  | 11                                                   | 7,38  | 2      | 1,34  | $P_{1-3} > 0,05$<br>$P_{2-4} > 0,05$ |
| Phổ thông                                          | 47                                                  | 92,16 | 49     | 96,08 | 138                                                  | 92,62 | 147    | 98,66 | $P_{1-3} > 0,05$<br>$P_{2-4} > 0,05$ |
| <b>Nghề nghiệp:</b>                                |                                                     |       |        |       |                                                      |       |        |       |                                      |
| CNVC                                               | 5                                                   | 9,80  | 4      | 7,84  | 26                                                   | 17,45 | 21     | 14,19 | $P_{1-3} < 0,05$<br>$P_{2-4} < 0,05$ |
| Làm ruộng                                          | 33                                                  | 64,71 | 36     | 70,59 | 102                                                  | 68,46 | 98     | 65,77 | $P_{1-3} > 0,05$<br>$P_{2-4} > 0,05$ |
| Buôn bán                                           | 2                                                   | 3,92  | 3      | 5,88  | 1                                                    | 0,67  | 8      | 5,37  | $P_{1-3} > 0,05$<br>$P_{2-4} > 0,05$ |
| Làm thuê,<br>tự do                                 | 11                                                  | 21,57 | 8      | 15,69 | 20                                                   | 13,42 | 22     | 14,77 | $P_{1-3} < 0,05$<br>$P_{2-4} > 0,05$ |

Các số liệu ở bảng 4 cho thấy học vấn của bố mẹ trong các nhóm học sinh có kết quả nuôi cấy (+) với liên cầu khuẩn và nhóm có kết quả nuôi cấy (-) khác nhau không đáng kể. Về nghề nghiệp, tỷ lệ bố mẹ làm CNVC ở nhóm có kết quả nuôi cấy (+) thấp hơn so với nhóm có kết quả nuôi cấy (-) (9,80% so với 15,44% và 7,84% so với 12,08%;  $p < 0,05$ ). Ngược lại, nhóm có kết quả nuôi cấy (+) có tỷ lệ người bố đi làm thuê, tự do cao hơn so với nhóm có kết quả nuôi cấy (-) (21,57% so với 14,77%;  $P < 0,05$ ). Tỷ lệ bố, mẹ làm ruộng, buôn bán ở hai nhóm tương đương.

Điều này có thể do con của các công nhân viên chức có tình trạng vệ sinh môi trường tốt hơn.

### 3.3. Đặc điểm di truyền liên cầu khuẩn

Liên cầu khuẩn tan huyết  $\beta$  gây bệnh ở đường hấp người chủ yếu thuộc nhóm A. Việc phân loại liên cầu khuẩn nhóm A tương đối đơn giản do trong nhóm này chỉ có một loài *S. pyogenes*. Tuy nhiên, một số chủng liên cầu như *S. dysgalactiae subsp. Equisimilis* và *S. anginosus* đều có ở nhóm C và nhóm G có thể gây nên những triệu chứng nhiễm bệnh giống với liên cầu nhóm A. Để định danh các chủng liên cầu khuẩn nhóm G phân lập được đã sử dụng phương pháp PCR để nhân đoạn gen *cpn60* mã hóa cho protein Cpn60. Trình tự các cặp mồi được mô tả ở phần phương pháp nghiên cứu.



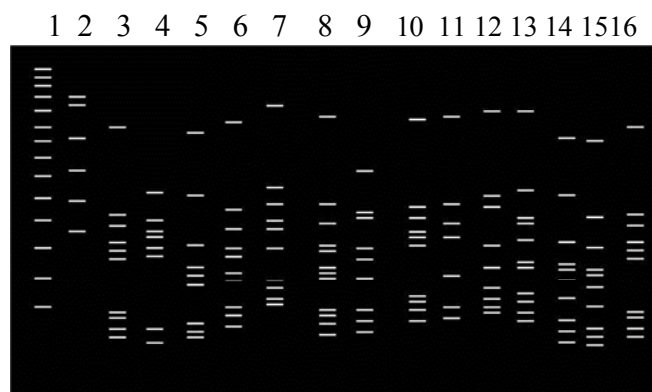
**Hình 2.** Kết quả điện di sản phẩm PCR phân loại các chủng liên cầu nhóm G

Đường chạy 1: Thang mốc chuẩn; Đường chạy 2 ÷ 5, 7 ÷ 11: *S. dysgalactiae subsp. Equisimilis*; Đường chạy 6, 12: *S. anginosus*.

Cặp mồi Ang1, Ang2 dùng để xác định chủng *S. anginosus* cho sản phẩm PCR có kích thước 589 bp; cặp mồi Const1, Const2 để xác định chủng *S. constellatus* cho sản phẩm PCR có kích thước 315 bp; cặp mồi Dysg1, Dysg2 để xác định chủng *S. dysgalactiae subsp. Equisimilis* cho sản phẩm PCR có kích thước 254 bp.

Kết quả là trong 16 chủng liên cầu khuẩn nhóm G phân lập được đã xác định được 12 chủng *S. anginosus* và 2 chủng *S. dysgalactiae subsp. Equisimilis*, 2 chủng không xác định được loài.

Đối với 30 chủng *S. pyogenes* được phân tích bằng phương pháp điện di trong trường xung điện đã phát hiện được 14 đoạn cắt khác nhau *SmaI*. Đã phát hiện được các kiểu gen *emm* 4.0, *emm* 12.0, *emm* 44.0, *emm* 58.0, *emm* 104.0 và *emm* 109.1



**Hình 3.** Các đoạn cắt sử dụng enzyme *SmaI* của *S. pyogenes*.

Đường chạy 1: Nhiễm sắc thể *Saccharomyces cerevisiae*; Đường chạy 2: DNA phage lambda; Đường chạy 3 ÷ 16: Các chủng *S. pyogenes*.

Luca Agostino Vitali và cộng sự đã nghiên cứu 218 mẫu GAS gặp thường xuyên nhất các kiểu gen *emm* là *emm* 4.0, *emm* 1.0, *emm* 12.0, *emm* 89.0, *emm* 6.0, *emm* 44.0, *emm* 18.0, *emm* 29.0, *emm* 5.0, *emm* 28.0 [6].

Hiện nay ở trong nước, chưa có công trình nghiên cứu nào công bố về sự phân bố kiểu gen *emm* của *S. pyogenes* lưu hành ở Việt Nam. Vì vậy các số liệu trên đây chỉ mang tính thông báo về sự có mặt các kiểu gen *emm* của liên cầu khuẩn nhóm A lưu hành ở học sinh Trường tiểu học Gio Châu.

#### 4. KẾT LUẬN

- Tỷ lệ nhiễm liên cầu gây tan máu  $\beta$  ở trẻ em học sinh Trường tiểu học Gio Châu, huyện Gio Linh, Quảng Trị là 25,5%, trong đó nhóm A chiếm 17,5%, nhóm G chiếm 8%.

- Tình trạng nhiễm liên cầu không liên quan đến tuổi và giới tính của trẻ em học sinh, nhưng có liên quan đến nghề nghiệp của bố, mẹ.

- Trong 30/35 chủng *S. pyogenes*, đã phát hiện được các kiểu gen *emm* 4.0, *emm* 12.0, *emm* 44.0, *emm* 58.0, *emm* 104.0 và *emm* 109.1. Đối với 14/16 chủng liên cầu khuẩn nhóm G đã phân loại được 12 chủng *S. anginosus* và 2 chủng *S. dysgalactiae subsp. Equisimilis*.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thanh Phước và cs., *Tình hình mang liên cầu khuẩn tan máu  $\beta$  nhóm A của học sinh từ 6 -15 tuổi tại Huyện Dương Minh Châu, Tây Ninh*, 2010.
2. Nguyễn Thị Tuyền, *Nghiên cứu tình hình nhiễm liên cầu khuẩn nhóm A ở trẻ em lứa tuổi học đường 6-15 tuổi tại Hà Nội và độ nhạy cảm của liên cầu khuẩn nhóm A*, Tạp chí Tim mạch học, số 16, 1998.
3. Dmitriev A.V, Nosik A.G., Linh P.K., Loang V.T., Giang V.H., Il'yasov Yu., *Molecular analysis of group A, C and G streptococci, isolated in Vietnam*, Lancefield conference, Argentina, November 2014.
4. Dmitriev A., Hu Y.Y., Shen A.D., Suvorov A., Yang Y.H., *Chromosomal analysis of group B streptococcal clinical strains; bac gene-positive strains are genetically homogenous* FEMS MicrobiolLett, 2002, **208**(1):8-93.
5. Носик А.Г., Полякова Е.М., Линь Ф.К., Дмитриев А.В., *Новый транспозон Streptococcus pyogenes, содержащий ген устойчивости к тетрациклину, и его распространенность на Северо-Западе России и странах Юго-Восточной Азии* постерный доклад на III Экологическом форуме «здоровье и окружающая среда», сентябрь 2014 г., Санкт-Петербург.
6. Luca Agostino Vitali, Giovanni Gherardi, Maria Chiara Di Luca, *Changing patterns in Macrolide resistance and emm - types in Streptococcus pyogenes isolated in Italy during 2012*, International Scientific Conference: Current diagnostic and therapeutic dilemmas in the clinical management of Group A Streptococcal infections, 2012, (21-23 march 2013, Rom, Italy).

7. Yuri Il'yasov, Pham Xuan Ninh, Pham Khac Linh, Alexander Dmitriev, *Characterization of streptococcal speies in Quang Tri province, Vietnam. International Scientific Conference: Current diagnostic and therapeutic dilemmas in the clinical management of Group A Streptococcal infections*, 2013, (21-23 march 2013, Rom, Italy).

## SUMMARY

### EPIDEMIOLOGICAL AND GENETIC PROPERTIES OF THE $\beta$ HAEMOLYTIC STREPTOCOCCUS IN CHILDREN IN QUANG TRI

This study was carried out in 200 children aged 7 ÷ 11 in Gio Chau Primary School, Gio Linh District, Quang Tri Province. The results showed that the rate of  $\beta$  - hemolytic streptococcal infection was 25.5%, including strains of group A (17,5%) and group G (8,0%). The streptococcal infection in children is not related to their sex but to their parents' occupation. The types of emm 4.0, emm 12.0, emm 44.0, emm 58.0, emm 104.0 and emm 109.1 were found among 30/35 *S. Pyogenes* strains. For group G streptococcus 12 *S. anginosus* and 2 *S. dysgalactiae subsp. Equisimilis* strains were classified.

*Từ khóa:  $\beta$ - hemolytic streptococcus, group A streptococcus.*

*Nhận bài ngày 28 tháng 9 năm 2015*

*Hoàn thiện ngày 21 tháng 10 năm 2015*

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