

ĐẶC ĐIỂM DI TRUYỀN PHÂN TỬ CỦA VI KHUẨN *ORIENTIA TSUTSUGAMUSHI* GÂY BỆNH SỐT MÒ Ở MỘT SỐ TỈNH PHÍA BẮC

NGUYỄN VĂN MINH ⁽¹⁾, NGUYỄN VĂN TÌNH ⁽²⁾, PHẠM THỊ HÀ GIANG ⁽¹⁾,
TRỊNH VĂN TOÀN ⁽³⁾, DƯƠNG TUẤN LINH ⁽⁴⁾, VÕ VIỆT CƯỜNG ⁽¹⁾

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Orientia tsutsugamushi gây bệnh sốt mò (Scrub typhus) là vi khuẩn Gram âm, ký sinh nội bào bắt buộc. Bệnh được truyền từ động vật sang người thông qua vết đốt của ấu trùng mò mang mầm bệnh và lưu hành phổ biến ở châu Á, từ Nhật Bản, Hàn Quốc, Nam Á, Pakistan, Ấn Độ đến các nước Á Rập và Thổ Nhĩ Kỳ [8]. Ở Việt Nam, bệnh sốt mò đã được phát hiện ở Sài Gòn từ năm 1915 bởi Goutron. Bệnh thường xuất hiện ở vùng trung du và miền núi, gần đây, bệnh xuất hiện rải rác ở nhiều khu vực và có xu hướng ngày càng tăng. Năm 2000÷2002, tại bệnh viện Ung Bí (Quảng Ninh) có 449 bệnh nhân sốt mò vào điều trị. Bệnh nhân sốt mò được phát hiện rải rác quanh năm, nhưng có tỷ lệ cao từ tháng 5÷10 [3]. Trong thời gian từ 2001÷2003, có 251 ca sốt mò được xác định bằng chẩn đoán huyết thanh học tại Bệnh viện Bạch Mai [6]. Tại tỉnh Yên Bái, từ tháng 4/2014 đến tháng 9/2014 đã có 78 bệnh nhân bị bệnh sốt mò và 2 trường hợp tử vong [1].

Nguyên nhân gây bệnh và bùng phát dịch sốt mò phụ thuộc rất nhiều vào đặc điểm của chủng lưu hành tại khu vực. Dựa vào sự khác biệt về cấu trúc kháng nguyên bề mặt có trọng lượng phân tử 56-kDa của *O. tsutsugamushi* để phân loại genotypes: Gilliam, Kato, Karp, TA763, Boryong, Kawasaki... [8]. Mục đích của nghiên cứu này nhằm phát hiện *O. tsutsugamushi* trong mẫu máu bệnh nhân nghi ngờ và xác định sự phân bố genotypes của *O. tsutsugamushi* lưu hành ở một số khu vực miền bắc Việt Nam.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Đối tượng và vật liệu

Mẫu máu tổng số của 149 bệnh nhân được chẩn đoán lâm sàng nhiễm *O. tsutsugamushi* với các triệu chứng sau:

- Khởi phát đột ngột, sốt cao 38÷40°C, nhức đầu, đau cơ;
- Có hoặc không có vết loét đặc trưng;
- Có thể nổi hạch sưng đau tại khu vực có vết loét.

Mẫu bệnh phẩm được thu thập tại Bệnh viện Quân y 105, Hà Nội (BVQY 105), Bệnh viện đa khoa Nghĩa Lộ, Yên Bái (BVĐK Nghĩa Lộ), Bệnh viện đa khoa Hà Giang (BVĐK Hà Giang), từ tháng 8 năm 2016 đến tháng 8 năm 2017. Thu thập các thông tin ca bệnh bằng phiếu điều tra, lấy 2÷3 ml máu toàn phần có chống đông bằng EDTA trong vòng 2 tuần kể từ ngày khởi bệnh.

Kit QIAamp DNA mini kit (QIAGEN - 51306), Phusion® Hot Start Flex 2X Master Mix (NEB- M0536S) và các hóa chất khác đạt chuẩn sinh học phân tử.

Trình tự các cặp mồi được thiết kế trên trình tự gen mã hóa kháng nguyên màng 56-kDa với PCR 2 vòng (1st-2nd), sản phẩm PCR có kích thước 483 bp [5].

2.2. Phương pháp và kỹ thuật

2.2.1. Phương pháp nghiên cứu

Mô tả cắt ngang kết hợp với thực nghiệm trong phòng thí nghiệm.

2.2.2. Kỹ thuật nested PCR phát hiện *O. tsutsugamushi*

ADN tổng số từ mẫu máu toàn phần bệnh nhân nghi ngờ sốt mò được tách bằng bộ kit QIAgen - 51306, tiến hành khuếch đại đoạn gen có kích thước 483 bp mã hóa cho kháng nguyên 56-kDa bằng kỹ thuật nested PCR [5]. 5 µl ADN tổng số được dùng làm khuôn để tiến hành PCR vòng 1 với cặp mồi P34 (5'-ATT GCT AGT GCA ATG TCT GC-3') và P55 (5'-CTG CTG CTG TGC TTG CTG CG-3') cho tổng số 25 µl phản ứng. Phản ứng được biến tính ở 94°C trong 3 phút; tiếp theo là 30 chu kỳ phản ứng của 94°C trong 20 giây, 61°C trong 30 giây, 72°C trong 2 phút, phản ứng được kết thúc với chu kỳ kéo dài chuỗi ở 72°C trong 10 phút. 2,5 µl sản phẩm PCR của vòng 1 được sử dụng làm khuôn cho PCR vòng 2 với cặp mồi P10 (5'-CCT CAG CCT ACT ATA ATG CC-3') và P11 (5'-CGA CAG ATG CAC TAT TAG GC-3') cho tổng số 25 µl phản ứng. Hỗn hợp phản ứng được biến tính ở 94°C trong 3 phút; tiếp theo là 30 chu kỳ phản ứng của 94°C trong 20 giây, 61°C trong 30 giây, 72°C trong 40 giây, phản ứng được kết thúc với chu kỳ kéo dài chuỗi ở 72°C trong 5 phút.

2.2.3. Kỹ thuật giải trình tự gen

20 µl sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit QIAquick PCR Purification Kit (QIAgen, Đức) và sử dụng cặp mồi P10 và P11 để giải trình tự trên máy phân tích phân đoạn DNA tự động 3500 (Applied Biosystems) và kit BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing (Applied Biosystems).

2.2.4. Phân tích trình tự gen

Hiệu chuẩn các trình bằng phần mềm Bioedit, xếp giống cột (align) và dựng cây phát sinh chủng loại bằng phần mềm MEGA7.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Phát hiện *O. tsutsugamushi* bằng kỹ thuật nested PCR

Kết quả nested PCR đã phát hiện 47/149 mẫu máu dương tính với *O. tsutsugamushi*, chiếm 31,5%. Hiện nay, việc chẩn đoán *Rickettsia* nói chung và bệnh sốt mò nói riêng chủ yếu dựa vào đặc điểm lâm sàng. Xét nghiệm cận lâm sàng như phát hiện IgM kháng *O. tsutsugamushi* hoặc PCR được sử dụng trong chẩn đoán xác định bệnh sốt mò ở một số nước [9,17]. Hai loại mẫu bệnh phẩm chủ yếu được sử dụng trong xét nghiệm PCR là vẩy hoặc dịch vết loét và máu toàn phần, kết quả xét nghiệm từ mẫu vẩy vết loét thường có độ nhạy cao hơn so với mẫu máu [14]. Nghiên cứu của Nguyễn Lê Khánh Hằng cho thấy tỷ lệ dương tính với *O. tsutsugamushi* từ mẫu máu bệnh nhân nghi nhiễm sốt mò từ 48,5% đến 67% [2,12].

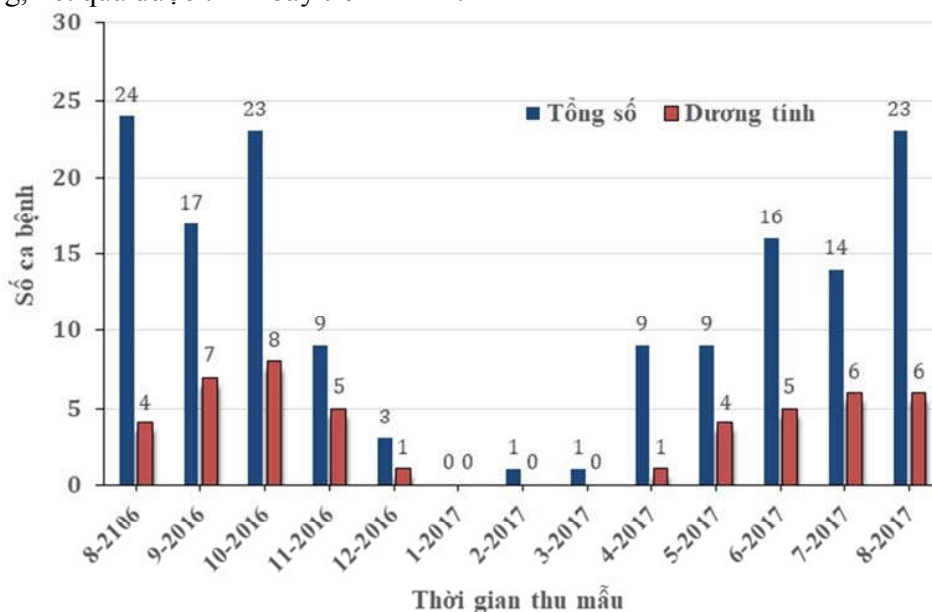
Tỷ lệ dương tính với *O. tsutsugamushi* trong các mẫu vẩy vết loét và mẫu máu thu thập tại Bệnh viện Đa khoa Quảng Nam lần lượt là 85% và 25% [13]. Kết quả nghiên cứu của một số tác giả khác cho thấy độ nhạy của xét nghiệm PCR trên vẩy vết loét cho kết quả dương tính với *O. tsutsugamushi* từ 79,5% đến 95% [9,16].



Hình 1. Sản phẩm nested PCR của đoạn 483 bp trên gen 56-kDa *O. tsutsugamushi*. M: Thang ADN chuẩn (100 bp); NC: Đối chứng âm; 1, 3-5, 7: Các mẫu dương tính với *O. tsutsugamushi*; 2, 6: Các mẫu âm tính.

3.2. Số ca bệnh sốt mò thu dung điều trị

Để xác định sự phân bố bệnh sốt mò trong thời gian từ tháng 8 năm 2016 đến tháng 8 năm 2017 tại các bệnh viện, số ca bệnh sốt mò được thống kê theo từng tháng, kết quả được trình bày trên hình 2.



Hình 2. Số ca bệnh sốt mò thu dung điều trị trong năm

Các ca bệnh sốt mò ở miền Bắc chủ yếu xuất hiện vào tháng 5 đến tháng 11 kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây [3]. Số ca bệnh tăng cao từ tháng 8 đến tháng 10, khoảng 17÷24 ca/tháng. Trong thời gian từ tháng 1 đến tháng 3 số trường

hợp mắc bệnh được ghi nhận ở mức thấp, chỉ xuất hiện 2 ca bệnh. Một số nghiên cứu về sự lưu hành bệnh sốt mò miền Bắc cho thấy bệnh lưu hành quanh năm, tuy nhiên số ca bệnh cao nhất được ghi nhận vào mùa hè và mùa thu [3,11]. Nghiên cứu sự lưu hành bệnh sốt mò ở Quảng Ninh giai đoạn 2000÷2002 cho thấy số ca bệnh cao nhất xuất hiện vào tháng 7 với 20÷47 ca bệnh, từ tháng 1 đến tháng 3 số ca bệnh được ghi nhận ở mức thấp, từ 1÷5 ca [3]. Nghiên cứu của tác giả Nguyễn Lê Khánh Hằng tại BVQY 105, giai đoạn 2016÷2017 cho thấy phần lớn các trường hợp dương tính với *O. tsutsugamushi* được phát hiện từ tháng 8 đến tháng 11 [12].

3.3. Đa dạng di truyền gen mã hóa kháng nguyên 56-kDa của *O. tsutsugamushi*

Sự phân bố kiểu gen kháng nguyên 56-kDa theo vùng được thể hiện trên bảng 1 và hình 3. Trong số 14 mẫu được giải trình tự của BVQY 105 thì tỷ lệ nhóm Karp là cao nhất, chiếm 64,3%; nhóm Kato chiếm 21,4%; còn lại nhóm TA763 và Gilliam là 7,1%. Nhóm Karp cũng được phát hiện nhiều nhất ở BVĐK Nghĩa Lộ và BVĐK Hà Giang với tỷ lệ lần lượt là 81,8% và 37,5%. Nhóm Kato phát hiện một chủng ở BVĐK Hà Giang và không thấy xuất hiện ở BVĐK Nghĩa Lộ. Trong khi đó nhóm TA763 cũng xuất hiện một trường hợp ở mỗi bệnh viện.

Bảng 1. Kiểu gen kháng nguyên 56-kDa của *O. tsutsugamushi* ở 3 bệnh viện phía Bắc Việt Nam từ tháng 8 năm 2016 đến tháng 8 năm 2017

Kiểu gen	BVQY 105 (n = 14)	BVĐK Hà Giang (n = 8)	BVĐK Nghĩa Lộ (n = 11)	Tổng số (n = 33)
Karp	9 (64,3%)	3 (37,5%)	9 (81,8%)	21 (63,6%)
Kato	3 (21,4%)	1 (12,5%)	0	4 (12,1%)
TA763	1 (7,1%)	1 (12,5%)	1 (9,1%)	3 (9,1%)
Gilliam	1 (7,1%)	0	1 (9,1%)	2 (6,1%)
Nhóm khác	0	3 (37,5%)	0	3 (9,1%)

Trong số 33/47 mẫu dương tính với *O. tsutsugamushi* cho thấy nhóm Karp chiếm 63,6% (21/33), Kato chiếm 12,1% (4/33), TA763 chiếm 9,1% (3/33), Gilliam chiếm 6,1% (2/33), các nhóm khác chiếm 9,1% (3/33). Nghiên cứu tính đa dạng di truyền của *O. tsutsugamushi* dựa trên gen mã hoá protein 56-kDa ở một số khu vực cho thấy trong số 13 chủng *O. tsutsugamushi* phân lập tại khu vực miền Trung có 77% thuộc nhóm Karp, nhóm TA763 chiếm 15,5% và JG-v chiếm 7,5% [4]. Phân tích gen mã hóa kháng nguyên 56-kDa của 14 chủng *O. tsutsugamushi* thu thập tại Quảng Nam cho thấy nhóm Karp 64,4% (9/14), Gilliam 14,3% (2/14), Kawasaki 14,3% (2/14), và TA716 7,1% (1/14) [13]. Năm 2016, Hotta đã phát hiện 7/519 mẫu thú nhốt đánh bắt ở khu vực Hà Nội dương tính với *O. tsutsugamushi*, phân tích cây phả hệ di truyền cho thấy các chủng phát hiện được có mối quan hệ gần với nhóm Gilliam [7]. Nghiên cứu 42 mẫu bệnh phẩm sốt mò tại BVQY 105 dương tính với *O. tsutsugamushi* cho thấy 55% các chủng thuộc nhóm Karp, nhóm TA763, Gilliam chiếm tỷ lệ tương đương nhau 17% [12]. Tỷ lệ lưu hành các nhóm *O. tsutsugamushi*

[illegible][illegible]

4. KẾT LUẬN

1. Thu thập 149 mẫu máu bệnh nhân chẩn đoán sơ bộ sốt mò tại một số bệnh viện khu vực phía Bắc từ tháng 8/2016 đến tháng 8/2017, phát hiện 47/149 (31,5%) mẫu dương tính với *O. tsutsugamushi* bằng kỹ thuật nested PCR. Các ca bệnh sốt mò chủ yếu xuất hiện vào tháng 5 đến tháng 11.

2. Sự phân bố các nhóm kiểu gen trong số 33 chủng *O. tsutsugamushi* khu vực phía Bắc gồm Karp (63,6%), Kato (12,1%), TA763 (9,1%), Gilliam (6,1%), nhóm khác (9,1%).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Thị Hồng Vân, Hà Minh Thư, Nguyễn Văn Châu, *Tình hình sốt mò tỉnh Yên Bái năm 2014*, Báo cáo khoa học toàn văn Hội nghị toàn quốc Ký sinh trùng. Nhà xuất bản khoa học tự nhiên và công nghệ, 2014, tr.172-179.
2. Nguyễn Lê Khánh Hằng, Nguyễn Văn Tình, *Xác định nhiễm Orient tsutsugamushi ở bệnh nhân nghi nhiễm sốt mò đến điều trị tại một số bệnh viện tại Hà nội*, 2015-2016. Tạp chí Y học dự phòng, 2016, Tập XXVI, Số 8 181:55-60.
3. Nguyễn Văn Châu, Phùng Xuân Bích, Nguyễn Thị Kha, Dương Thị Mùi, Nguyễn Thị Liên, *Tìm hiểu sự phân bố các loài mò (Trombiculidae) liên quan đến sự phân bố sốt mò (tsutsugamushi) ở một số địa phương thuộc tỉnh Quảng Ninh*. Tạp chí Phòng chống sốt rét, 2003, Số 6:53-63.
4. Duong V., Mai T.T., Blasdel K., Lo le V., Morvan C., *Molecular epidemiology of Orientia tsutsugamushi in Cambodia and Central Vietnam reveals a broad region-wide genetic diversity*, Infect Genet Evol, 2013, 15:35-42.
5. Furuya Y., Yoshida Y., Katayama T., Yamamoto S., Kawamura A., *Serotypespecific amplification of Rickettsia tsutsugamushi DNA by nested polymerase chain reaction*, J. Clin. Microbiol. 1993, 31:1637-1640.
6. Hamaguchi S., Cuong N.C., Tra D.T., Doan Y.H., Shimizu K., Tuan N.Q., Yoshida L.M., Mai L.Q., Duc-Anh D., Ando S., Arikawa J., Parry C.M., Ariyoshi K., Thuy P.T., *Clinical and Epidemiological Characteristics of Scrub Typhus and Murine Typhus among Hospitalized Patients with Acute Undifferentiated Fever in Northern Vietnam*, Am J Med Hyg, 2015, 92(5):972-978.
7. Hotta K., Pham H.T., Hoang H.T., Trang T.C., Vu T.N., Ung T.T., Shimizu K., Arikawa J., Yamada A., Nguyen H.T., Nguyen H.L., Le M.T., Hayasaka D., *Prevalence and Phylogenetic Analysis of Orientia tsutsugamushi in Small Mammals in Hanoi, Vietnam*, Vector Borne Zoonotic Dis, 2016, 16(2):96-102.
8. Kelly D.J., Fuerst P.A., Ching W.M., Richards A.L., *Scrub typhus: the geographic distribution of phenotypic and genotypic variants of Orientia tsutsugamushi*, Clin Infect Dis, 2009, 48:S203-30.

9. Kim D.M., Kim H.L., Park C.Y., Yang T.Y., Lee J.H., Yang J.T., Shim S.K., Lee S.H., *Clinical usefulness of eschar polymerase chain reaction for the diagnosis of scrub typhus: a prospective study*. Clin Infect Dis. 2006; **43**(10):1296-1300.
10. Kim D.M., Yun N.R., Neupane G.P., Shin S.H., Ryu S.Y., Yoon H.J., *Differences in clinical features according to Boryoung and Karp genotypes of Orientia tsutsugamushi*, PloS one, 2011, **6** (8):e22731. doi: 10.1371/journal.pone.0022731.
11. Nadjm B., Thuy P.T., Trang V.D., Ha le D., Kinh N.V., Wertheim H.F., *Scrub typhus in the northern provinces of Vietnam: an observational study of admissions to a national referral hospital*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2014, **108**(11):739-740.
12. Nguyen H.L.K., Pham H.T.T., Nguyen T.V., Hoang P.V., Le M.T.Q., Takemura T., Hasebe F., Hayasaka D., Yamada A., Hotta K., *The genotypes of Orientia tsutsugamushi, identified in scrub typhus patients in northern Vietnam*, Trans R Soc Trop Med Hyg, 2017, **111**(3):137-139.
13. Nhiem L.V., Maureen L., Hoa L.T.P., Nho L.V., Oleg M., Didier R., Philippe P., *Use of eschar swabbing for the molecular diagnosis and genotyping of Orientia tsutsugamushi causing scrub typhus in Quang Nam province, Vietnam*, PLoS Negl Trop Dis, 2017, **11**(2):e0005397. doi:10.1371/journal.pntd.0005397.
14. Ono A., Nakamura K., Hihuchi S., Miwa Y., Nakamura K., Tsunoda T., *Successful diagnosis using eschar for PCR specimen in tsutsugamushi disease*. Intern Med. 2002, **41**:408-411.
15. Sonthayanon P., Chierakul W., Wuthiekanun V., Blacksell S.D., Pimda K., Suputtamongkol Y., *Rapid diagnosis of scrub typhus in rural Thailand using polymerase chain reaction*, The American journal of tropical medicine and hygiene, 2006, **75**(6):1099-1102.
16. Varghese G.M., Janardhanan J., Mahajan S.K., Tariang D., Trowbridge P., Prakash J.A., David T., Sathendra S., Abraham O.C., *Molecular epidemiology and genetic diversity of Orientia tsutsugamushi from patients with scrubtyphus in 3 regions of India*, Emerg Infect Dis, 2015 Jan; **21**(1):64-69.
17. Wei Y., Ma Y., Luo L., Wu X., Huang Y., Li X., *Differences in Clinical and Laboratory Features for Different Genotypes of Orientia tsutsugamushi in Guangzhou, Southern China*, Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, NY), 2017, doi:10.1089/vbz.2016.2045.
18. Wongprompitak P., Anukool W., Wongsawat E., Silpasakorn S., Duong V., Buchy P., Morand S., Frutos R., Ekpo P., Suputtamongkol Y., *Broad-coverage molecular epidemiology of Orientia tsutsugamushi in Thailand*, Infect Genet Evol., 2013, **15**:53-8.

SUMMARY

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *ORIENTIA TSUTSUGAMUSHI* CAUSING SCRUB TYPHUS IN SOME NORTHERN PROVINCES

Orientia tsutsugamushi, a scrub typhus pathogen, an acute, mite-borne, febrile illness that occurs in the Asia-Pacific region. They were diversified by the 56-kDa surface antigen gene (TSA) which was rapidly detected by nested PCR. To investigate the genotypes of clinical variants of *O. tsutsugamushi*, 149 blood samples were collected from patients with suspected scrub typhus in period August 2016 to August 2017. The results indicated that 47 (31.5%) samples showed positive result for *O. tsutsugamushi*. Analyzing the collected samples in a time manual showed that cases were almost occurred from May to November. The nucleotide sequences of 56-kDa TSA gene were determined and assessed the relationship among them. The phylogenetic analyses of partial 56-kDa TSA gene sequences demonstrated wide diversity of *O. tsutsugamushi* genotypes. The sequencing result of 33 samples indicated that the most common genotype was identified to be Karp (63.6%). Other genotypes including Kato, TA763, Gilliam, and other types were also determined as 12.1%, 9.1%, 6.1% and 9.1%, respectively.

Từ khóa: Sốt mò, PCR lồng, kháng nguyên 56-kDa; Scrub typhus, *Orientia tsutsugamushi*, Nested PCR, 56-kDa antigen.

Nhận bài ngày 01 tháng 9 năm 2017

Hoàn thiện ngày 20 tháng 10 năm 2017

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

⁽²⁾ Khoa Truyền nhiễm, Bệnh viện Quân y 105

⁽³⁾ Trường ĐH Khoa học Tự nhiên, ĐHQG Hà Nội

⁽⁴⁾ Khoa Vi sinh, Viện Y học Dự phòng Quân đội