NGHIÊN CỨU DỊCH TỄ HỌC PHÂN TỬ CÁC CHỦNG VIRUT SỞI LƯU HÀNH TRONG CÁC VỤ DỊCH SỞI NĂM 2006-2013 Ở MIỀN BẮC VIỆT NAM

VŨ THỊ KIM LIÊN; ĐỖ THỊ QUỲNH NGA; TRẦN THỊ HẢI ÂU; NGUYỄN THỊ HỒNG NGỌC*; TRIỆU THỊ THANH VÂN; ĐỖ PHƯƠNG LOAN; NGUYỄN THÁI SƠN*

Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương

**** Học viện Quốn Y 103***

TÓM TẮT

Đoạn ADN 492 bp đặc hiệu genom Nucleoprotein virus sởi của 43 chủng virut sởi phân lập trong các vụ dịch sởi tại Hà Nội, Thanh Hoá; Bắc Giang, Hoà Bình; Nghệ An, Hà Giang; Lai Châu, Lào Cai… được phân tích bằng phương pháp PCR-RFLP và giải trình tự. Kết quả đã xác định được sự lưu hành của genotype H1 virut sởi tại miền Bắc Việt Nam trong giai đoạn 2006-2013, phù hợp với kết quả phương pháp giải trình tự ADN. Do vậy, phương pháp PCR-RFLP có thể được sử dụng trong các nghiên cứu nhằm xác định nhanh đặc điểm dịch tễ học phân tử của các chủng sởi đang lưu hành.

***Từ khoá**: virut sởi; RFLP; giải trình tự ADN*

SUMMARY

MOLERCULAR EPIDEMIOLOGY OF MEASLES IN THE NORTH OF VIETNAM

The nucleoprotein gen N of 46 confirmed measles isolates in Hanoi, Thanh Hoa, Bac giang, Hoa binh, Nghe an, Ha giang, Lai chau, Lao cai between 2006-2013 were analyzed by PCR-RFLP and sequencing. PCR-RFLP analysis revealed the circulating of genotype H1 in collected isolates. The sequence of 660 bp specific DNA of measles virus confirmed the dominant of genotype H1 in Vietnam, 2006-2013. Thus, PCR-RFLP method can be used for molecular epidemiology analysis of measles vivus.

***Keywords**: Measles virus; restriction fragment length polymorphism ; sequencing DNA.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo tổ chức y tế thế giới (WHO), tình trạng tử vong do bệnh sởi đã giảm 78% và vaccine đã cứu sống 4,3 triệu người trong thập kỷ qua. Tuy nhiên theo thống kê của WHO trung bình trên thế giới mỗi ngày có khoảng 380 trẻ em chết vì sởi hiện vẫn là quá lớn đối với một bệnh hoàn toàn có thể phòng ngừa được bằng vaccine [1]. Từ năm 1998, nghiên cứu dịch tễ học phân tử nhằm xác định các genotype chủng virus sởi hoang dại lưu hành tại các vùng địa lý khác nhau được WHO đẩy mạnh. Mục tiêu của chiến lược này nhằm kiểm soát, ngăn chặn sự lây truyền của virus sởi, tiến tới khống chế bệnh sởi trên toàn cầu. Để đạt được điều này, WHO kêu gọi sự hợp tác của tất cả các quốc gia trong việc hoàn thiện bản đồ phân bố genotype của toàn bộ chủng virus sởi hiện đang lưu hành tại các vùng địa lý dân cư trên khắp các Châu lục [2].

Tại Việt Nam, các vụ dịch sởi ở mọi lứa tuổi, xảy ra tại nhiều địa phương trong những năm gần đây là vấn đề nổi cộm trong ngành y tế dự phòng. Chính vì vậy việc xác định các genotype sởi hiện đang lưu hành giúp cho việc hoàn chỉnh bản đồ phân bố chủng virus sởi tại các vùng lãnh thổ quốc gia là vấn đề cần thiết cho công tác giám sát dịch tễ học.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

- Chủng vacxin sởi: chủng virut sởi được phân lập từ ba loại vacxin sống giảm độc lực gồm: W6675/Rouvax Aventis Pasteur (Pháp); AIK-C Vero và MMR (Mỹ). Các chủng này được sử dụng như chủng chuẩn trong nghiên cứu genotyp virut sởi.

- Chủng đối chứng: chủng virus sởi MVi/Hanam.VNM/6.09/9 H1 (Genbank: JF824649) phân lập từ dịch sởi tại Hà Nam tháng 9/2009, được sử dụng làm chủng đối chứng để so sánh và phân tích với các chủng hoang dại trong nghiên cứu.

- Chủng virut sởi hoang dã: 46 chủng virus sởi thu được từ một số vụ dịch do Phòng virut hô hấp, Khoa Virut, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương phân lập từ mẫu dịch hầu họng của bệnh nhân có biểu hiện lâm sàng bệnh sởi từ 2006 đến 2013 tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam: 6 chủng năm 2006 (Thái Nguyên, Hải Dương, Thái Bình, Điện Biên); 15 chủng năm 2008 (Ninh Bình, Hà Nội, Thanh Hoá, Hải Dương); 13 chủng năm 2009 (Ninh Bình, Hải Dương, Bắc Giang, Hà Nội, Lai Châu, Hoà Bình); 3 chủng năm 2010 (Nghệ An, Hà Giang) và 8 chủng 2013 (Lai Châu, Lào Cai). Các mẫu dịch hầu họng này được phân lập trên dòng tế bào Vero/SLAM, nếu xuất hiện sự huỷ hoại tế bào, dùng phương pháp RT-PCR khẳng định virus sởi.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Phương pháp tách chiết ARN của các chủng virus sởi

RNA được tách chiết từ nước nổi tế bào gây nhiễm virus sởi theo hướng dẫn của bộ sinh phẩm QIAamp Viral RNA Mini Kit (Cat. No. 52904_

QIAGEN).

2.2. Phương pháp RT - PCR và Nested - PCR

Genom virus sởi đều là một chuỗi RNA đơn. Phản ứng RT-PCR gồm hai giai đoạn chính là phiên mã RNA virus thành cDNA nhờ enzym phiên mã ngược và tổng hợp DNA dưới tác dụng của DNA polymerase sử dụng bộ sinh phẩm *Tag* RT - PCR Kit (New Englangd BioLab). Một số trình tự cặp mồi đặc hiệu: Cặp mồi cho quy trình PCR: MN5: 5'-GCCATGGGAGTAGGAGTGGAAC - 3' (1113-1134 trên GenBank NC_001498.1); MN6:5'-CTGGCGGCTGTGTGGACCTG - 3' (1773-1754 trên GenBank NC_001498.1).

Cặp mồi cho quy trình Nested - PCR: Nf1: 5'-GATGGTAAGGAGGTCAGCTGG - 3'; Nr7: 5' - TCGGCCTCTCGCACCTA - 3'

2.3. Phương pháp RFLP

Nhóm tác giả tiếp tục nghiên cứu kế thừa và phát triển dựa trên kết quả thu được của đề tài nghiên cứu cấp bộ "Nghiên cứu đặc điểm di truyền một số chủng sởi đang lưu hành ở Việt nam bằng phương pháp RFLP", các chủng virut sởi thu thập từ năm 2002-2005 được thực hiện bởi các cán bộ khoa học phòng Sinh học phân tử, Khoa Miễn dịch và Sinh học phân tử, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương [3].

2.4. Phương pháp giải trình tự ADN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi xác định trình tự ADN theo phương pháp enzyme học của Sanger thông qua việc sử dụng các dideoxynucleotid.

Sản phẩm PCR có độ dài 660 bp được khuếch đại trên genom virut sởi, sử dụng cặp mồi MN5 và MN6. Sau đó sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ sinh phẩm QIAquick PCR purification Kit (Cat. No. 28104_ QIAGEN) và được sử dụng làm khuôn để giải trình tự ADN.

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

1. RT-PCR khuếch đại đoạn gen N đặc hiệu virut sởi

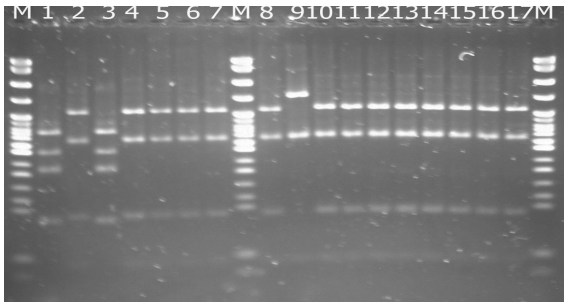
ARN sởi được phiên mã bằng Reverse transcriptase và khuếch đại bằng Taq polymerase. Sản phẩm quy trình PCR có độ dài là 660 bp, quy trình Nested-PCR sử dụng ADN khuôn là sản phẩm của quy trình PCR và sản phẩm này có độ dài là 492 bp. Sản phẩm của quy trình Nest-PCR khẳng định rằng vạch 660 bp đầu tiên đúng là một đoạn của virus sởi được nhân lên (Kết quả không được đưa ra).

2. Mô hình dịch tễ học phân tử của các chủng virut sởi sử dụng phương pháp RFLP

Nhóm nghiên cứu sử dụng enzym giới hạn MboI chế tạo là sản phẩm của đề tài KHCN cấp thành phố (mã số: 01C-08/15-2012-2), được lựa chọn cho phân tích genotype của 46 chủng virut sởi phân lập từ các vụ dịch trong năm 2006-2013 tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam.

Theo tính toán lý thuyết khi MboI cắt chủng chuẩn A_Edmonston-wt/54 (Genbank: U01987) cho các vạch DNA với kích thước 183, 142, 115 và 52 bp; chủng H1_Hunan.CHN/93/7 (Genbank: AF045212) cho vạch: 167, 136, 106, 55 và 28 bp, chủng đối chứng H1_ Genbank: JF824649 cho vạch: 242, 155, 55, 29 và 11 bp.

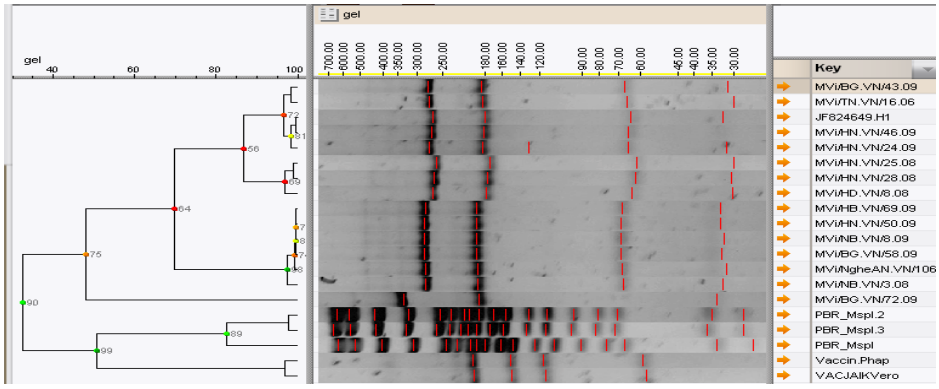
Kết quả điện di thực nghiệm của chủng chuẩn, chủng đối chứng và một số chủng virus sởi hoang dại phân lập tại một số tỉnh Miền Bắc Việt Nam trong giai đoạn 2006 – 2013 khi cắt với enzyme *Mbo*I cho thấy: chủng vacxin có hình vạch tương tự chủng chuẩn A_Edmonston-wt/54, chủng virut sởi hoang dại có các hình vạch giống nhau và tương tự với chủng đối chứng H1_Genbank: JF824649 (MVi/Hanam.VNM/6.09/9 H1) (Hình 1), nhưng kích thước các vạch này có sự thay đổi so với chủng chuẩn nhóm H1 là Hunan.CHN/93/7 (theo tính toán lý thuyết). Từ đó có thể nhận thấy có sự thay đổi về vị trí nhận biết của các enzyme này trên trình tự gen giữa các chủng Việt Nam so với chủng chuẩn Hunan.CHN/93/7 H1 (AF045212), xác định được sự sai khác trong trình tự giữa các chủng Việt Nam so với chủng chuẩn.



Hình 1: Kết quả RFLP chủng virus sởi cắt với enzym MboI
M: Thang ADN chuẩn PBR-MspI; **1; 3**: Chủng vaccine; **2**: Chủng virut sởi nhóm H1_Genbank: JF8246491; **4 -17**: các chủng virus sởi Thanh Hóa, Ninh Bình, Hà Nội, Bắc Giang

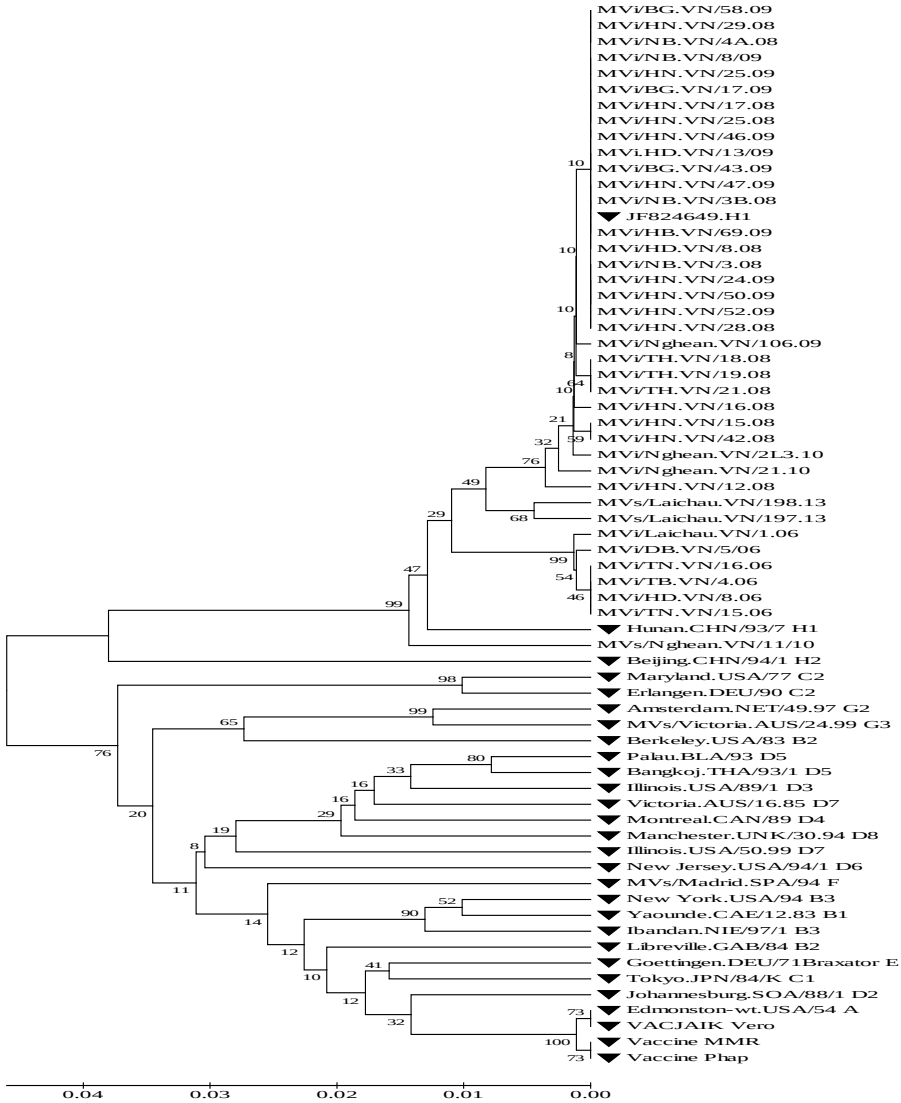
Khi phân tích chủng H1_Genbank: JF824649 và các chủng virus phân lập tại một số tỉnh miền Bắc cho thấy sự giống nhau về kích thước và số lượng các đoạn DNA giới hạn, do đó cho phép nhận định 46 chủng virus hoang dại từ năm 2006 đến 2013 trong nghiên cứu đều thuộc genotype H1, kết quả phù hợp với nghiên cứu trước đây [5]

Xây dựng cây phả hệ phát sinh chủng loại của kết quả phân tích RFLP, 46 chủng virut sởi bằng phần mềm *BioNumerics Fingerprint types*_version 6.0 (phần mềm tin học bản quyền của Hãng Applied Maths _ Bỉ) (Hình 2)



Hình 2: Cây phả hệ phát sinh chủng loại virut sởi bằng phương pháp RFLP

3. Mô hình dịch tễ học phân tử của các chủng virut sởi sử dụng phương pháp giải trình tự ADN



Hình 3: Cây phát sinh chủng loại virus sởi miền Bắc Việt Nam giai đoạn 2006-2013

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành giải trình tự 44 trên tổng số 50 chủng virus sởi. Trong số 44 chủng giải trình tự gồm có: 3 chủng vaccine, chủng đối chứng H1_Genbank JF824649 và 40 chủng virus hoang dại thu thập tại Việt Nam. Các chủng giải trình tự có số thứ tự từ 1 – 44 trong danh sách chủng nghiên cứu.

Xây dựng cây phả hệ phát sinh chủng loại virut sởi lưu hành tại Miền Bắc Việt Nam năm 2006-2013, dựa trên kết quả giải trình tự của 44 chủng virut sởi bằng phần mềm *BioNumerics Sequence types* và *BioNumerics Tree and Netword Inference* (version 6.0 _ Applied Maths, Bỉ). Kết quả cho thấy toàn bộ 44 trình tự phân tích đều được phân nhánh genotyp H1, tương tự với chủng đối chứng MVi/Hanam.VNM/6.09/9 H1 (Hình 3). Kết quả giải trình tự ADN, phù hợp với kết quả dịch tễ học phân tử các chủng virus sởi bằng phương pháp RFLP. Do vậy, phương pháp PCR-RFLP có thể được sử dụng trong các nghiên cứu nhằm xác định nhanh đặc điểm dịch tễ học phân tử của các chủng sởi lưu hành tại Việt nam

KẾT LUẬN

- Xây dựng thành công cây phả hệ phát sinh chủng loại virut sởi, mối quan hệ di truyền với chủng chuẩn và các chủng virut hoang dại khác nhau, sử dụng phần mềm *BioNumerics Sequence types* và *BioNumerics Tree and Netword Inference* (version 6.0 _ Applied Maths, Bỉ)

- Xác định được genotype của 46 chủng virus sởi lưu hành trong một số vụ dịch sởi tại Miền Bắc Việt Nam, giai đoạn năm 2006-2013 thuộc nhóm H1, sử dụng phương pháp PCR-RFLP. Kết quả này được khẳng định lại và hoàn toàn phù hợp với kết quả giải trình tự ADN.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. World Health Organization (2012) *"Global measles and rubella strategic plan: 2012-2020"*

2. World Health Organization (1998) "Weekly epidemiological record" No. 35, 28 August 1998, 73, pp 265-272.

3. Lê Thị Kim Tuyến và CS (2005) "Nghiên cứu đặc điểm di truyền một số chủng sởi đang lưu hành ở Việt Nam bằng phương pháp RFLP (Đa dạng độ dài đoạn cắt giới hạn)", Đề tài cấp bộ năm Y tế, nghiệm thu 2005.

4. Trần Như Dương, Nguyễn Thị Thu Yến, Phạm Quang Thái, Nguyễn Thị Thu Hương "Một số đặc điểm dịch sởi tại miền Bắc VIệt Nam, 2006 - 2008" Tạp chí Y học dự phòng, Tập XXI, số 5 (123) 2011, tr 37-45.

5. Nguyễn Hạnh Phúc, Nguyễn Hiền Thanh, Nguyễn Thị Thu Thủy và CS (2009) *"Genotyp H1 virus sởi lưu hành trong các vụ dịch sởi năm 2006 – 2008 ở miền Bắc Việt Nam"*, Tạp chí y học dự phòng 2009, số 5 (104), tr 50 - 56.