

NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG MULTIPLEX-PCR XÁC ĐỊNH PHÂN TYP HIV-1 TRÊN ĐỐI TƯỢNG NGHIỆN CHÍCH MA TUÝ VÀ MẠI DÂM KHU VỰC VIÊNG CHĂN - LÀO

*Sa Ngouane TaVanh**; *Trần Hải Âu***; *Vũ Thị Kim Liên***
*Nguyễn Thái Sơn****; *Lê Bách Quang*****

TÓM TẮT

Nghiên cứu sự phân bố các phân typ của HIV-1 góp phần giám sát dịch tễ học, lựa chọn liệu pháp kháng virut, phát triển vắc xin. Nghiên cứu này nhằm xác định phân typ HIV-1 trên các đối tượng có xét nghiệm HIV dương tính ở khu vực Viêng Chăn, gồm 3 nhóm: nghiện chích ma túy (NCMT), gái mại dâm (GMD) và các đối tượng khác. Kết quả: NCMT gặp phân typ tái tổ hợp CRF01-AE = 39/50 người (78%), phân typ A = 1/50 người (2%), phân typ B = 1/50 người (2%) và chưa xác định 9/50 người (18%); GMD gặp phân typ tái tổ hợp CRF01-AE = 39/50 người (78%), phân typ C = 3/50 người (6%) và chưa xác định 8/50 người (16%); nhóm đối tượng khác gặp phân typ tái tổ hợp CRF01-AE = 40/40 người (100%).

* Từ khoá: Phân typ HIV-1; Tiêm chích ma túy; Gái mại dâm; Multiplex PCR; Viêng Chăn; Lào.

APPLYING MULTIPLEX-PCR IN IDENTIFICATION OF HIV-1 SUBTYPE IN DRUG USERS AND COMMERCIAL SEX WORKERS AT VIENTIANE, LAOS

SUMMARY

Study of distribution of subtypes of HIV-1 can contribute in epidemiological surveillance, options for antiviral therapy, vaccine development. This study aims to identify HIV-1 subtype on the subjects positive for HIV in the Vientiane area, including three groups: injecting drug users (IDUs), commercial sex workers (CSWs) and other subjects. Results identified the subtypes encountered in the study groups: IDUs having subtype recombinant CRF01-AE = 39/50 (78%), subtype A = 1/50 (2%), subtype B = 1/50 (2%) and unknown 9/50 (18%); CSWs met subtype recombinant CRF01-AE = 39/50 (78%), subtype C = 3/50 (6%), and unknown 8/50 (16%), the other target groups met subtype recombinant CRF01-AE = 40/40 (100%).

** Key words: HIV-1 subtype; Drug users; Commercial sex workers; Multiplex-PCR, Vientiane; Laos.*

* Trung tâm Phòng chống HIV/AIDS Viêng Chăn, Lào

** Viện Vệ sinh Dịch tễ TW

*** Bệnh viện 103

**** Học viện Quân y

Phản biện khoa học: TS. Trần Văn Khoa

ĐẶT VẤN ĐỀ

HIV có 2 týp là HIV-1 và HIV-2, cả hai týp này đều lây truyền qua đường tình dục, đường máu và từ mẹ sang con. HIV-1 có tính đa dạng di truyền cao và dễ dàng lây lan nhanh trong cộng đồng. Các chủng của HIV-1 được phân thành 4 nhóm: M, N, O, P, trong đó nhóm M chiếm tuyệt đại đa số, lại được chia thành 10 phân týp bao gồm các phân týp A, B, C, D, E, F, G, H, J và K [7], 49 dạng tái tổ hợp (CRFs) [8] của các phân týp trên. Các phân týp phân bố mang tính trội cho từng vùng địa lý khác nhau, mỗi phân týp lại có tính trội theo những đường lây truyền nhất định. Ví dụ, ở Thái Lan, phân týp B trội ở những đối tượng TCMT, phân týp E trội ở những trường hợp lây nhiễm qua đường tình dục [7]. Nghiên cứu sự phân bố các phân týp và dạng tái tổ hợp của HIV-1 có giá trị giám sát dịch tễ học ở tầm quốc gia và khu vực; liên quan đến chiến lược dự phòng, phát triển vắc xin thích hợp cho từng khu vực, đối tượng, chế tạo các kit chẩn đoán và lựa chọn liệu pháp kháng virus đặc hiệu (hiệu quả của thuốc kháng virus khác nhau với từng phân týp) [3, 6].

Có nhiều phương pháp xác định phân týp HIV-1: giải trình tự gen, phát hiện kháng thể peptide đặc hiệu, heteroduplex mobility assay (HMA)... Trong đó, phương pháp multiplex PCR sử dụng phối hợp các ADN mỗi đặc hiệu xác định phân týp trên một phản ứng, thao tác đơn giản, hiệu quả cao, cho kết quả nhanh, giá thành hợp lý. Trong nghiên cứu này chúng tôi *áp dụng kỹ thuật multiplex PCR (mPCR) để chẩn đoán phân týp HIV-1 khu vực Viêng Chăn trên đối tượng tiêm chích ma túy, GMD và các đối tượng khác.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

140 bệnh nhân (BN) có xét nghiệm HIV dương tính ở khu vực Viêng Chăn, gồm 3 nhóm: 50 người NCMT, 50 GMD và 40 đối tượng khác.

2. Phương pháp nghiên cứu.

Sử dụng phương pháp nghiên cứu dịch tễ học cắt ngang và phân tích labo để tìm hiểu phân týp HIV-1 trên các đối tượng nghiên cứu.

Mẫu máu của đối tượng HIV dương tính sau thu thập được tách khối bạch cầu, tách và tinh sạch ADN bằng bộ kit QIAamp ADN Mini Kit, (QIAGEN).

Các ADN mẫu cho phản ứng mPCR xác định phân týp HIV, tham khảo từ nghiên cứu Fumihiko Y [4], gồm:

+ BECO5 (7938-7960 bp): 5' GGCATCAA CAGCTCCAGGCAAG 3'

+ BECO3 (8766-8791 bp): 5'AGCAAAG CCCTTTCTAAGCCCTGTCT3'

+ BE-ANCH (7963-7985 bp): 5'TCCTGGC TGTGGAAAGATACCTA3'

+ B-SPEC (8384-8403 bp): 5'GTCCCC TCGGGGCTGGGAGG 3'.

+ E- SPEC (8585 bp) 5' GTCTCAGTCCC TTGAGACTGCTG 3'.

+ C-SPEC (8615-8638 bp): 5' AGACCCC

AATACTGCACAAGACTT 3'.

+ F-SPEC (8720-8744 bp): 5'AACAGCTC

TACCAGCTCTTTGCAAA 3'.

+ 5'A (8094-8112 bp):5' GANAACATGACC TGGCTGC 3'.

3'A (8693-8716 bp): 5'TCTATAACCCTA TCTGTCCAGCCA 3'.

+ 5'E (8181-8207 bp): 5'CAGGAAAGG AATGAAAAGGATTTGTTA 3'.

3'E (8693-8713 bp): 5'ATAACCCTATCTG TCCACCCC 3'.

+ 5'G (8131-8757 bp): 5'ACAATTACACA

CCACATATACAGCC 3'.

3'G (8694-8716 bp): 5'TCTATAACCCTA

TCTGTCCAGTT 3'.

+ 5'D (8037-8058 bp): 5'ACCACTAATG TGCCCTGGAACT 3'.

3'D (8356-8386 bp): 5' AGGAGGGTCTG AAATGACAGA 3'.

* Phương pháp mPCR xác định phân týp HIV-1 với ADN mỗi khuếch đại vùng gen env (gp120 và gp41), tiến hành theo trình tự sau:

PCR1 với ADN mỗi BECO3 và BECO5 khuếch đại gp120 và gp41.

PCR2 xác định phân týp A, E, G với ADN mỗi (5'A-3'A), (5'E-3'E), (5'G-3'G). PCR2.1 xác định phân týp A, E, G, B, D, C, F với ADN mỗi BE-ANCH là mỗi xuôi, 4 cặp mỗi B-SPEC, C-SPEC, E-SPEC và F-SPEC là mỗi ngược khuếch đại đoạn gen đặc hiệu cho HIV-1 phân týp A B, C, D, E, F và G. PCR2.2 phân biệt phân týp B, D với các ADN mỗi 5'D-3'D.

- Hỗn hợp mix cho 1 phản ứng PCR gồm: 200 μ M của mỗi loại dNTP; 5 mM MgCl₂; 0,2 pmol của mỗi loại ADN mỗi; 1 U Taq ADN polymerase (Invitrogen) và 1x đệm PCR (20 mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl), bổ sung nước tới thể tích 25 μ l. Phản ứng PCR thực hiện trên hệ thống luân nhiệt, với chu trình nhiệt: 5 phút biến tính ở 95^oC, 35 chu kỳ (95^oC/45giây - 64^oC/1 phút - 72^oC/1,5 phút), cuối cùng chu kỳ tổng hợp 10 phút ở 72^oC. Hiệu quả của quá trình khuếch đại và kích thước sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1% nhuộm bằng ethidium.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ

BÀN LUẬN

Bảng 1: Kết quả xác định phân týp HIV-1 bằng mPCR trên đối tượng nhiễm ở khu vực Viêng Chăn.

PHÂN TÝP HIV-1	TỔNG SỐ MẪU NGHIÊN CỨU (n = 140)	
	n	n %
Tỷ lệ phát hiện	123	87,86
Phân týp E CRF01-AE)*	118	84,30
Phân týp A	1	0,71
Phân týp B	1	0,71
Phân týp C	3	2,14
Chưa xác định	17	12,14
Tổng số	140	100%

(* Hiện nay phân týp E hầu như không còn thấy đơn độc, các mẫu dương tính với phân týp E khi phân tích trình tự đều là CRF01-AE).

Kết quả nghiên cứu cho thấy: phân týp CRF01-AE là phân týp chủ yếu của HIV-1 tại khu vực Viêng Chăn, các phân týp khác hiếm gặp, 12,14% chưa xác định được phân týp, đây có thể là dạng tái tổ hợp mới nên chưa xác định được bằng bộ mỗi hiện tại đang sử dụng cho phản ứng mPCR với 3 lần chạy [5]. Theo Nguyễn Thị Bích Yến (2003) [1], Fumihiro Yagyu (2005) [4], Đặng Thị Hồng Thắng (2009) [2]: phương pháp mPCR có nhiều ưu điểm, trong hỗn hợp có nhiều thành phần khác nhau cùng tham gia phản ứng và nhân lên đồng thời nhiều gen đích, quy trình sẽ tiết kiệm công sức, rút ngắn thời gian thu kết quả, giảm giá thành chẩn đoán. Thực tế cho thấy, phương pháp này cho hiệu quả tốt, tỷ lệ phát hiện trong nghiên cứu này đạt 87,86%. Những trường hợp chưa xác định được phân týp thường là dạng tái tổ hợp mới, chiếm 7,3% trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Bích Yến (2003) [1]; 15,2% trong nghiên cứu của Fumihiro Yagyu (2005) [4].

Bảng 2: Tỷ lệ phân týp của HIV-1 theo các nhóm đối tượng.

ĐỐI TƯỢNG	n	PHÂN TÝP CỦA HIV-1				
		CRF01AE	A	B	C	Chưa xác định

NCMT	50	39 (78%)	1 (2%)	1 (2%)	0	9 (18%)
GMD	50	39 (78%)	0	0	3 (6%)	8 (16%)
Khác	40	40 (100%)	0	0	0	0
Tổng số	140	118 (84,3%)	1 (0,71%)	1 (0,71%)	3 (2,14%)	17 (12,14%)

Trong các nhóm đối tượng nghiên cứu, NCMT và GMD có tỷ lệ phân týp phức tạp, ngoài phân týp CRF01-AE là chủ yếu, nhưng xuất hiện cả các phân týp khác (A, B, C). Một vấn đề lưu ý nữa là những trường hợp chưa xác định được phân týp cũng thuộc 2 nhóm đối tượng NCMT và GMD, trong khi các đối tượng còn lại đều là phân týp CRF01-AE, cho thấy tính phức tạp về phân týp và các dạng tái tổ hợp của HIV-1 chủ yếu ở đối tượng NCMT và GMD.

Kết quả này có ý nghĩa quan trọng trong giám sát, theo dõi sự lan truyền các phân týp và góp phần thiết kế bản đồ dịch tễ học phân týp HIV-1 tại Lào và trong khu vực, là tiền đề cho những nghiên cứu dịch tễ học phân tử HIV sau này.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu xác định phân týp HIV-1 trên 140 đối tượng nhiễm HIV thuộc 3 nhóm NCMT, GMD và các đối tượng khác tại khu vực Viêng Chăn, Lào cho thấy: phân týp CRF01-AE là phân týp chủ yếu của HIV-1 (84,30%); các phân týp khác chiếm tỷ lệ ít là phân týp C (2,14%), phân týp A (0,71%) và B (0,71%). 12,14% trường hợp không xác định được phân týp bằng kỹ thuật mPCR. Các phân týp khác nhau và trường hợp không xác định được phân týp HIV-1 đều thuộc nhóm NCMT và GMD.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Bích Yến, Phan Thị Thu Anh, Nguyễn Việt Cồ. Đặc điểm lâm sàng, miễn dịch và kiểu gen HIV-1 trên BN lao nhiễm HIV tại Thành phố Hồ Chí Minh. Luận án Tiến sỹ Y học. Trường Đại học Y Hà Nội. 2003.
2. Đặng Thị Hồng Thắng, Vũ Thị Kim Liên, Nguyễn Thái Sơn. Nghiên cứu ứng dụng multiplex PCR xác định phân týp HIV-1 trên đối tượng NCMT và mại dâm khu vực Hà Nội. Tạp chí Y học dự phòng. 2009, tập XIX, số 4 (112), tr.112-117.
3. Ariyoshi, Koyo; Matsuda, Masakazu et al. Patterns of point mutations associated with antiretroviral drug treatment failure in CRF01-AE (subtype E) infection differ from subtype B infection. JAIDS. 2003, 33 (3), pp.336-342.
4. Fumihiko Yagyu a, Shoko Okitsu et al. Determination of HIV-1 subtypes by PCR in the transmembrane region with novel primers. Journal of Medical Virology. 2005, 76, pp.16-23.
5. Gkikas Magiorkinis, Dimitris Paraskevis, Emmanouil et al. Reanalysis of the HIV-1 circulating recombinant form A/E (CRF01-AE): Evidence of A/E/G recombination. JAIDS. 2002, 30 (1), pp.124-129.
6. Shalom Spira, Mark A. Wainberg, Hugues Loomba et al. Impact of clade diversity on HIV-1 virulence, antiretroviral drug sensitivity and drug resistance, Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2003, 51, pp.229-240.
7. www.Avert.org/hiv/types. Htm. Introduction to HIV types, groups and subtypes. 2008, March 3.
8. <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>.