Phân bố kiểu gen của Rotavirut ở bệnh nhân tiêu chảy cấp trẻ em

Nguyễn Lĩnh Toàn*

TÓM TẮT

Rotavirut là một trong những nguyên nhân chủ yếu gây tiêu chảy cấp (TCC) ở trẻ em. Hai nhóm kiểu gen G và P của rotavirut được xác định. Phân tích kiểu gen 78 chủng rotavirut-ARN phân lập từ mẫu phân của 95 bệnh nhân (BN) TCC ở trẻ em bằng kỹ thuật multiplex RT-PCR. Kết quả cho thấy, kiểu gen G của rotavirut chiếm ưu thế (73/78 BN = 93,6%) và kiểu gen P (5/78 BN = 6,4%). Rotavirut G3 là chủ yếu (55/78 BN = 74,3%), tiếp đến là G1 (9/78 BN = 11,5%) và đồng nhiễm G1 và G3 (6/78 BN = 7,7%). Trong khi đó, kiểu gen P chỉ phát hiện được duy nhất là P8: 5/78 BN (6,4%). Hai kiểu gen G và P của rotavirut đã được tìm thấy, trong đó phổ biến là G3 ở khu vực Hà Đông, Hà Nội.

* Từ khóa: Tiêu chảy cấp; Rotavirut; Phân bố kiểu gen.

Distribution of Rotavirus genotypes in pediatric acute diarrhea

SUMMARY

Rotavirus is one of the major causes of pediatric acute diarrhea world-wide. Rotavirus genotypes were devided into two major genotype (G and P). 78 rotavirus-RNA strains isolated from 95 stool samples of acute diarrhea children were genotyped by multiplex RT-PCR. Results showed that rotavirus genotype G was predominanted in 73/78 (93.6%) and genotype P, 5/78 (6.4%). In which the rotavirus G3 was mainly genotype 55/78 (74.3%), following by G1, 9/78 (11.5%) and co-infected G1 and G3, 6/78 (7.7%). Meanwhile, rotavirus P was only found genotype P8, 5/78 (6.4%). In summary, in this study two rotavirus genotypes G and P were found with the predominant genotype G3 in Ha Dong area, Hanoi.

** Key words: Acute diarrhea;Rotavirus; Distribution of genotype.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Rotavirut là một trong những nguyên nhân chính gây bệnh TCC ở trẻ em trên thế giới. Ước tính mỗi năm có khoảng 111 triệu trẻ em mắc TCC, trong đó có tới 25 triệu trường hợp phải can thiệp y tế, 2 triệu trẻ em phải nhập viện và từ 400.000 - 600.000 trường hợp tử vong trên thế giới, hơn 80% xảy ra ở các n□ớc nghèo (Gentsch và CS, 2005). Theo số liệu khảo sát trên 16.173 trẻ TCC nhập viện từ 33 trung tâm y tế khác nhau ở 9 nước châu Á, trong đó có Việt Nam năm 2001 - 2002 cho thấy 45% mẫu phân dương tính với rotavirut. Tỷ lệ TCC do rotavirut khác nhau giữa các nước dao động từ 24 - 67%. Trong đó, Việt Nam có tỷ lệ cao nhất là 59% và thấp nhất ở Hồng Kông (28%) (Gray và CS, 2008).

* *Học viện Quân y*

Phản biện khoa học: TS. Trần Văn Khoa

Ở nước ta, nghiên cứu dịch tễ và phân bố genotýp của rotavirut cho thấy có tới 65,6% trường hợp TCC do rotavirut. Phần lớn là trẻ < 2 tuổi, đặc biệt là ở trẻ 1 - 2 tuổi, tỷ lệ TCC do rotavirut lên tới 75,7% và thường xuất hiện hàng năm theo chu kỳ

mùa; trong đó 99,5% mang kiểu gen G. Theo Doan và CS (2003) tỷ lệ rotavirut ở Việt Nam mang kiểu gen G1 là phổ biến (68,7%), tiếp theo là G4: 15,4%; G2: 12,3%; G3: 0,6% và G9: 0,5%. Trong đó, kiểu gen G1P8 chiếm 58,2%. Các nghiên cứu khác cũng cho thấy, ở Việt Nam, rotavirut mang các kiểu gen chủ yếu là G1, G2, G3, G4 và G9, kết hợp với P8, P4 và P6 (Nguyen Van Man, 2005; Đặng Đức Anh, 2005). Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành xác định phân bố kiểu gen G của rotavirut gây TCC trẻ em khu vực Hà Đông, Hà Nội.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Bệnh nhân và bệnh phẩm.

Phân lập 78 mẫu rotavirut-ARN từ phân của 95 trẻ em TCC < 5 tuổi nhập viện tại Bệnh viện Đa khoa Hà Tây (cũ) và Bệnh viện 103. Chẩn đoán xác định TCC và phân loại mất nước theo Tổ chức Y tế Thế giới (1995).

Tiêu chuẩn lựa chọn BN: trẻ em < 5 tuổi, vào viện được chẩn đoán xác định TCC theo tiêu chuẩn của Tổ chức Y tế Thế giới: số lần đi đại tiện > 3 lần/ngày và tính chất phân thay đổi như loãng, nhiều nước. Phân loại mức độ TCC thành 03 nhóm: mất nước mức độ nhẹ, vừa và nặng. Thu thập mẫu phân theo đúng quy trình riêng rẽ từng BN, tránh nhiễm chéo qua dụng cụ lấy mẫu. Pha loãng phân trong nước khử ion, tỷ lệ 1:9, ly tâm 6.000 vòng/phút ở 4^0C, 30 phút. Dịch nổi phân 10% được bảo quản -80^0C cho đến khi sử dụng.

2. Phương pháp nghiên cứu.

** Tách ARN:* sử dụng bộ kit tách ARN "QIAamp viral RNA" của hãng QIAgen, (Đức) để tách ARN virut. Dùng 140 µl dung dịch dịch nổi phân tách ARN virut. Quy trình tách ARN virut theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm ARN sau khi tách được bảo quản ở -70^0C.

** Bộ mồi:* phân biệt kiểu gen của rotavirut bằng phương pháp multiplex-PCR.

Bảng 1: Trình tự các mồi phân biệt kiểu gen của rotavirut.

Mồi	Trình tự các mồi (5'-3')	Kích thước (bp)	Vị trí
Rota1F	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCC	1.062	21 - 22
Rota1R	GGTCACATCATACAATTCTAATC		1.062 - 1.032
G1F	GCAAGTACTCAAATCAATGATG	749	313 - 334
G2F	CAATGATATTAACACATTTTCTGTG	651	411 - 435
G3F	CGTTTGAAGAAGTTGCAACAG	374	689 - 709
G4F	CGTTTCTGGTGAGGAGTTG	582	480 - 498
G9F	CTAGATGTAACTACAACTAC	305	757 - 776
G5R	CACGTACTCGTTGTTACGTC	778	779 - 760
(1)	(2)	(3)	(4)
G6R	CTAGTTCCTGTGTAGAATC	498	499 - 481

G8R	CGGTTCCGGATTAGACAC	272	273 - 256
G10R	TTCAGCCGTTGCGACTTC	713	714 - 697
G11R	GTCATCAGCAATCTGAGTTGC	335	336 - 316
Con2R	ATTTCGGACCATTTATAACC	876	887 - 868
Con3F	TGGCTTCGCTCATTTATAGACA		11 - 32
P1F	CGAACGCGGGGGTGGTAGTTG	618	269 - 289
P5F	GCCAGGTGTCGCATCAGAG	551	336 - 354
P11F	GGAACGTATTCTAATCCGGTG	293	574 - 594
P6F	GCTTCAACGTCCTTTAACATCAG	422	465 - 487
P7F	CTTTATCGGTGGAGAATACGTCAC	498	389 - 412
P8R	TCTACTTGGATAACGTGC	281	292 - 275
P4R	CTATTGTTAGAGGTTAGAGTC	483	494 - 474
P6R	TGTTGATTAGTTGGATTCAA	267	278 - 259
P9R	TGAGACATGCAATTGGAC	391	402 - 385
P10R	ATCATAGTTAGTAGTCGG	583	594 - 575
P3R	TGATTGAGCTTTTAATGATATCAC	748	759 - 736

- Dùng phản ứng PCR lồng (nested RT-PCR) phân biệt kiểu gen G của rotavirut:

+ Phản ứng RT-PCR thứ nhất: dùng cặp mồi Rota1F và Rota1R, kích thước sản phẩm PCR là 1.062 bp.

+ Phản ứng PCR thứ hai: dùng hai tổ hợp mồi: tổ hợp primer thứ nhất gồm các mồi: RotaR và các mồi G1F, G2F, G3F, G4F và G9F. Tổ hợp thứ hai gồm các mồi Rota1F và G5R, G6R, G8R, G10R và G11R.

- Phân biệt kiểu gen P của rotavirut bằng phản ứng PCR lồng:

+ Phản ứng RT-PCR thứ nhất: dùng cặp mồi Con2R và Con3F, kích thước sản phẩm PCR là 876 bp.

+ Phản ứng PCR thứ hai: dùng hai tổ hợp mồi: tổ hợp primer thứ nhất gồm các mồi: Con2R và các mồi P1F, P5F, P11F, P6F và P7F. Tổ hợp thứ hai gồm các mồi Con3F và các mồi P8R, P4R, P6R, P9R, P10R và P3R.

Hỗn hợp mồi chỉ pha đủ cho một lần chạy đông tan, không dùng lại cho lần sau.

** Phản ứng multiplex RT-PCR:* phát hiện rotavirut-ARN trong mẫu bệnh phẩm bằng kỹ thuật PCR bán lồng (seminested-PCR), sử dụng kít ARN một bước (One step RT-PCR kit, QIAgen). Thực hiện phản ứng PCR lồng để chẩn đoán và phân biệt kiểu gen G của rotavirut. Chu trình nhiệt của các phản ứng PCR như sau: vòng PCR thứ nhất: sau 1 chu kỳ tổng hợp cADN 45^0C x 30 phút và 95^0C x 5 phút, thực hiện 35 chu kỳ 94^0C x 1 phút, 46^0C x 2 phút và 72^0C x 1 phút. Vòng PCR thứ hai: cũng gồm 35 chu kỳ 94^0C x 1 phút, 55^0C x 2 phút và 72^0C x 1 phút.

Sản phẩm cADN của phản ứng PCR thứ 2 điện di trên gel agarose 1,5% với ethidium bromide (0,5 mg%) trong đệm 1 x TBE, 110 V, dòng 80 mA, trong 45 phút, quan sát và

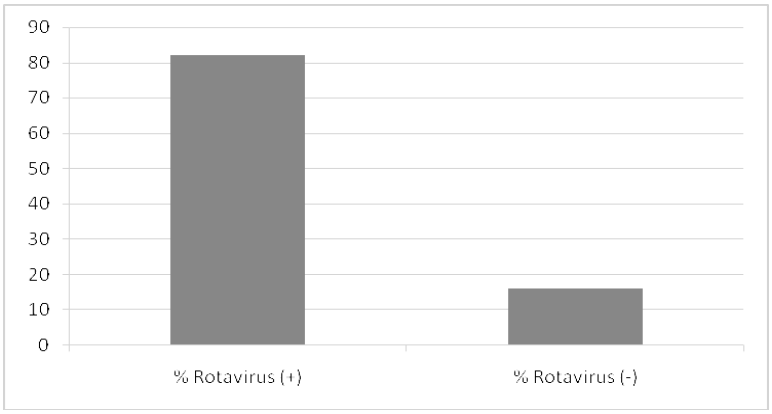
chụp ảnh bằng máy soi Gel-Dolphil.

** Phân tích và xử lý số liệu:* theo phương pháp thống kê sử dụng phần mềm STAT 7.0 (www.stata.com).

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

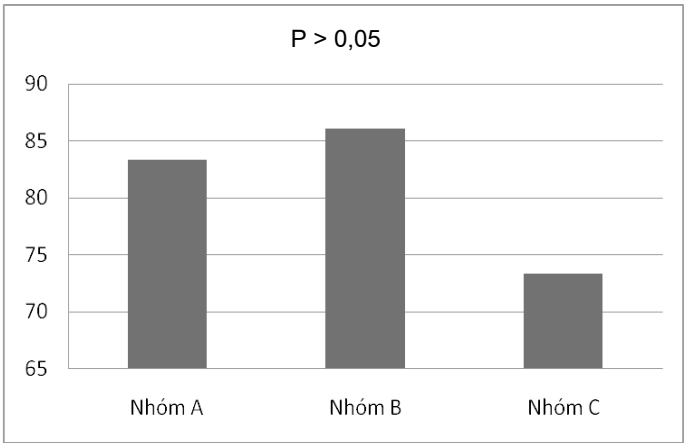
1. Tỷ lệ rotavirut (+) ở trẻ em TCC khu vực Hà Đông, Hà Nội.

Bằng kỹ thuật RT-PCR đa mồi xác định tỷ lệ rotavirut-ARN dương tính trong phân của 78/95 (82%) mẫu bệnh phẩm của trẻ em TCC (*hình 1*).



Hình 1: Biểu đồ tỷ lệ rotavirut-ARN (+) và (-) trong phân bệnh nhi mắc TCC khu vực Hà Đông, Hà Nội.

Phân tích tỷ lệ rotavirut-ARN (+) theo mức độ nước cho thấy: cao nhất ở nhóm B (86,1%), tiếp đến nhóm A (83,3%) và nhóm C (73,3%). Không có sự khác biệt về tỷ lệ rotavirut (+) ở các nhóm BN (p > 0,05) (*hình 2*).



Hình 2: Tỷ lệ rotavirut-ARN (+) ở các nhóm BN TCC theo phân loại theo mức độ mất nước nhóm A, B và C.

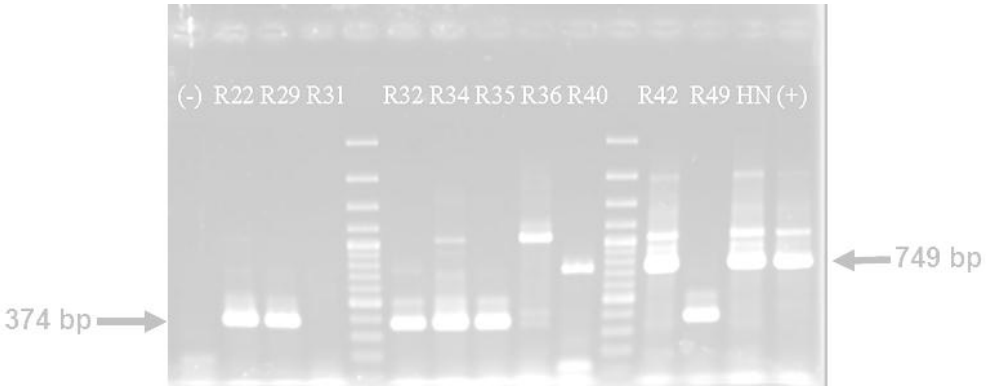
2. Phân bố kiểu gen của rotavirut ở BN TCC trẻ em ở khu vực Hà Đông, Hà Nội.

Bằng kỹ thuật multiplex RT-PCR sử dụng nhiều cặp mồi đặc hiệu, xác định kiểu gen rotavirut trong các mẫu phân BN trẻ em TCC cho thấy: cả hai kiểu gen G và P đều xuất hiện ở trẻ em < 5 tuổi (Hà Đông, Hà Nội). Trong đó, kiểu gen G chiếm đa số (73/78 BN = 93,5%) và kiểu gen P: 5/78 BN (6,5%).

Bảng 2: Phân bố các kiểu gen G và P của rotavirut ở BN TCC trẻ em.

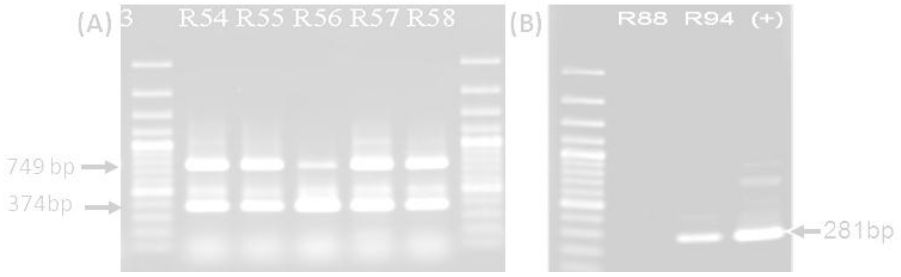
KIỂU GEN ROTAVIRUT	ROTAVIRUT G1 (n, %)	ROTAVIRUT G3 (n, %)	ĐỒNG NHIỄM G1 VA G3 (n, %)	ROTAVIRUT P8 (n, %)	CỘNG (n, %)
Kiểu gen G	9 (11,6)	58 (74,3)	6 (7,7)		73 (93,5)
Kiểu gen P				5 (6,5)	5 (6,5)

Kết quả phân tích dưới kiểu gen G và P cho thấy: tồn tại hai dưới kiểu gen G là G1 và G3 ở BN nghiên cứu, trong đó G3 chiếm đa số (74,3%) và G1 là 11,6% (*hình 3*).



Hình 3: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR đa mồi trên gel agarose 1%. Các mẫu R22, R29, R32, R34, R35, R36 và R49 cho sản phẩm 374 bp là kiểu gen G3; các mẫu R40, R42 và HN cho sản phẩm PCR 749 bp là kiểu gen G1; chứng dương chủng KH0118 (G1P8), mẫu R31 âm tính.

Ngoài ra, xuất hiện 6 trường hợp đồng nhiễm nhiều kiểu gen G1 và G3 (7,7%) (*hình 4A*). Ngoài ra, 05 BN mang kiểu gen P8 (281 bp) (*hình 4B*).



Hình 4: Hình ảnh điện di sản phẩm RT-PCR xác định các mẫu từ R54 đến R58 đồng nhiễm kiểu gen G1 (374 bp) và G3 (749 bp) **(A)** và kiểu gen P8 (281 bp) **(B)**, chứng dương chủng KH0118 (G1P8).

BÀN LUẬN

1. Tỷ lệ TCC trẻ em liên quan nhiễm rotavirut.

Rotavirut là nguyên nhân hàng đầu gây TCC ở trẻ em. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu cho thấy: tỷ lệ nhiễm khác nhau theo khu vực và thời điểm nghiên cứu. Nghiên cứu này tiến hành trên 95 BN trẻ em < 5 tuổi, nhập viện Bệnh viện tỉnh Hà Tây và Bệnh viện 103 từ tháng 12 - 2007 đến 10 - 2008, được chẩn đoán lâm sàng TCC. Kết quả cho thấy: bằng kỹ thuật RT-PCR đa mồi cho phép chẩn đoán nhiễm rotavirut trong phân BN trẻ em TCC. Đồng thời, phân biệt được các genotýp của rotavirut dựa vào kích thước sản phẩm PCR khác nhau, phù hợp với từng genotýp trên gel agarose. Đã phát hiện được 78/95 mẫu phân (82%) dương tính với rotavirut-ARN, cho thấy nguyên nhân chủ yếu gây TCC trẻ em là do rotavirut. Kết quả này phù hợp với một số nghiên cứu đã công bố gần đây: Doan và CS (2003) trên trẻ em mắc TCC ở TP.Hồ Chí Minh cho tỷ lệ rotavirut (+) là 65,6%. Nghiên cứu của Nguyen Van Man và CS (2005) gặp tỷ lệ nhiễm rotavirut ở trẻ em TCC nhập viện là 50 - 70%. Có sự dao động về tỷ lệ mắc giữa các nghiên cứu có thể do nhiều nguyên nhân, như khu vực địa lý, tuổi, phương pháp phát hiện cũng như thời gian lấy mẫu bệnh phẩm.

TCC cấp do virut thường xảy ra theo mùa, chủ yếu là mùa đông và mùa xuân ở miền Bắc. Chúng tôi tiến hành lấy mẫu từ tháng 12 đến tháng 10 năm sau ở khu vực Hà Đông. Thời gian này bao trùm cả mùa đông và xuân thường gây TCC liên quan nhiễm virut. Người ta thấy rằng TCC do rotavirut ở miền Bắc nước ta thường xuất hiện vào thời điểm giao mùa giữa mùa thu và đông, mùa đông và mùa xuân. Thời tiết khô, lạnh là điều kiện thích hợp để bệnh tiêu chảy do rotavirut phát triển. Trong khi đó ở miền Nam, không có mùa đông rõ rệt, nên tiêu chảy do rotavirut xảy ra quanh năm, không bùng phát thành dịch như phía Bắc (Doan và CS, 2003). Chúng tôi lấy mẫu từ tháng 12 đến tháng 10, bao trùm cả mùa đông và xuân, đây là mùa TCC trẻ em thường liên quan đến nguyên nhân do virut gây ra.

2. Phân bố kiểu gen của rotavirut gây bệnh TCC ở Hà Đông, Hà Nội.

Hệ gen của rotavirut bao gồm 11 đoạn ARN sợi kép mã hóa cho protein cấu trúc (VP) hoặc không cấu trúc (NVP). Cấu trúc vỏ capsid của rotavirut gồm 3 lớp: lớp lõi chứa các protein cấu trúc VP1, VP2, VP3 được mã hóa nhờ các gen số 1, 2 và 3; lớp trong là VP6 - một loại kháng nguyên đặc hiệu nhóm do gen số 6 mã hóa; lớp ngoài cùng là VP4 và VP7, trong đó, VP7 có bản chất glycoprotein (G protein) được mã hóa do gen số 9 của rotavirut, còn VP4 là protein nhạy cảm với protease (P protein) được mã hóa bởi gen số 4. Hai gen này gây đáp ứng miễn dịch tạo kháng thể trung hòa và có liên quan đến miễn dịch bảo vệ, xác định tính đặc hiệu kiểu gen của virut. Vì vậy, nó được sử dụng để đặt tên cho các chủng rotavirut. Các nghiên cứu gần đây cho thấy, hiện có tới 19 kiểu gen G, 27 kiểu gen P và 11 VP6 được phát hiện cả ở người và động vật. Tuy nhiên, gây bệnh cho người chủ yếu là kiểu gen G1, G2, G3, G4, G9 và phối hợp với P8, P4 và P6 (Matthijnssens J và CS, 2008). Kết quả nghiên cứu này cho thấy chỉ xuất hiện hai kiểu gen G và P của rotavirut gây TCC trẻ em khu vực Hà Đông, Hà Nội (*bảng 2*). Trong đó rotavirut G chiếm ưu thế và dưới kiểu gen G3 chiếm đa số (74,3%), kiểu gen G1 11,6% và đồng nhiễm G1 với G3 là 7,7%, kiểu gen P chỉ thấy duy nhất P8 chiếm 6,5%. Một số nghiên cứu gần đây cho thấy rotavirut ở Việt Nam thường mang kiểu gen G1P8, ngoài ra có một tỷ lệ nhỏ các chủng G2P4, G1P4, G4P8, G4P6, G3P8 (Nguyen Van Man và CS, 2006; Đặng Đức Anh và CS, 2005). Có sự khác biệt

trong nghiên cứu của chúng tôi và các tác giả khác: có thể trong một thời gian dùng vắcxin chống lại virut có kiểu gen G1, làm tỷ lệ lưu hành nhóm G1 giảm xuống hoặc do sự khác biệt về khu vực địa lý cũng như cỡ mẫu nghiên cứu.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu trên 95 bệnh nhi TCC ở khu vực Hà Đông, Hà Nội cho thấy, nguyên nhân chủ yếu gây TCC là rotavirut với tỷ lệ 82%. Phân tích phân bố kiểu gen chứng minh tồn tại hai kiểu gen G và P trong các chủng rotavirut ở khu vực này. Trong đó, kiểu gen G gặp chủ yếu (93,5%) và P là 6,5%. Trong kiểu gen G, chủ yếu là G3 (74,3%) và G1 (11,6%), đồng nhiễm G1 với G3 là 7,7%. Kiểu gen P duy nhất tìm thấy là P8 (6,5%).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đặng Đức Anh. Bệnh TCC do virut Rota ở Việt Nam 1998 - 2003. Tạp chí Y học dự phòng. 2005, tập XV, số 1, tr.5-7.

2. Nguyen Van Man, Luan LT and D.D. Trach et al. Epidemiological profile and burden of rotavirus diarrhea in Vietnam: 5 years of sentinel hospital surveillance, 1998 - 2003. J Infect Dis. 2005, 192, S127-S132.

3. Doan LT, Okitsu S, Nishio O, Pham DT, Nguyen DH, Ushijima H. Epidemiological features of Rotavirus infection among hospitalized children with gastroenteristis in Hochiminh City, Vietnam. J Med Virol. 2003, Apr, 69 (4), pp.588-594.

4. Estes M. Rotaviruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Holey PM, editors. Fields Virology, 3rd edition, Vol 2. Philadelphia: Lippincott-Raven Press. 1996, pp.1625-1655.

5. Gentsch JR, Glass RI, WoodsP, Gouvea V, Gorzilia M, Flores J, Das BK, Bhan MK. Identification of group A Rotavirus gene 4 types by PCR. J Clin Microbiol. 1992, 30, pp.1365-1373.

6. Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, Fang ZY. Polymerase chain reaction amplification and typing of Rotavirus nucleic acid from stool specimens. J Clin Microbiol. 1990, 28, pp.276-82. Iturriza-Gómara M, Kang G, Gray J. Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human Rotaviruses. J Clin Virol. 2004, Dec, 31 (4), pp.259-265.

7. Gray J, Timo Vesikari, Pierre Van Damme, Carlo Giaquinto, Jacek Mrukowicz, Alfredo Guarino, Ron Dagan, Hania Szajewska, and Vytautas Usonis. Rotavirus. JPGN. 2008, 46, S24-S31.

8. Matthijnssens J, Ciarlet M, Rahman M, Attoui H, Bányai K, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gómara M, et al. Recommendations for the classification of group A Rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. Arch Virol. 2008, 153 (8), pp.1621-169.

9. World Health Organization. The treatment of diarrhoea: a manual for physicians and other senior health workers. Geneva. World Health Organization. 1995.