

# ỨNG DỤNG KỸ THUẬT PCR LỒNG (NESTED PCR) XÁC ĐỊNH KÍ SINH TRÙNG GÂY BỆNH SỐT RÉT Ở NGƯỜI

KHUẤT HỮU THANH, LÊ ĐỨC ĐÀO, NGUYỄN THỊ HÀN LY

## 1. MỞ ĐẦU

Hàng năm bệnh sốt rét gây tử vong khoảng 1 triệu người trên toàn thế giới. Nhiều nghiên cứu đã khẳng định bệnh sốt rét ở người chủ yếu do 4 loài kí sinh trùng gây nên: *Plasmodium falciparum* (P.f), *Plasmodium malariae* (P.m.), *Plasmodium ovale* (P.o.) và *Plasmodium vivax* (P.v). Người bị bệnh sốt rét do bị nhiễm 1 loài hoặc nhiều loài kí sinh trùng sốt rét khác nhau. Xác định chính xác loài kí sinh trùng sốt rét (KSTSR) ở người bệnh bị nhiễm có ý nghĩa quan trọng, giúp lựa chọn loại thuốc điều trị và phương pháp điều trị có hiệu quả.

Sử dụng kỹ thuật PCR có thể phát hiện nhanh, chính xác người bị nhiễm kí sinh trùng sốt rét khi chưa biểu hiện bệnh, mặt khác có thể phát hiện chính xác người bệnh bị nhiễm đơn một loài KSTRS hay bị nhiễm phối hợp nhiều loài. Hiện nay kỹ thuật PCR ngày càng được sử dụng rộng rãi ở các bệnh viện, viện nghiên cứu và các trung tâm y tế cộng đồng ... góp phần phòng chống và điều trị bệnh sốt rét có hiệu quả.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Mẫu máu những người nghi bị nhiễm KSTSR được thu thập từ Nông trường 11, thuộc Công ti cao su Phú Riềng, huyện Phước Long tỉnh Bình Phước. Mẫu máu của 30 người được lấy từ đầu ngón tay, thấm trên giấy thấm Whatman 3MM, để khô trong điều kiện môi trường, bảo quản trong túi nilon chuyên dụng (mẫu máu do Viện Sốt rét - Kí sinh trùng - Côn trùng Trung ương cung cấp).

Tách chiết và tinh sạch ADN của KSTSR trong máu người theo phương pháp Plowe C. V., Djimde S. và cộng sự, 1995.

+ Sử dụng kỹ thuật PCR lồng (Nested PCR) theo Snounou G. và cộng sự, 1993.

Phản ứng PCR lần 1 (Nested 1 PCR) để nhân gen đặc hiệu của kí sinh trùng sốt rét sử dụng 2 cặp mồi Plu5 và Plu6 có trình tự oligonucleotid:

Plu5: 5'-CCT GTT GTT GCC TTA AAT TTC- 3'

Plu6: 5'-TTA AAA TTG TTG TTG CAG TTA AAA GC- 3'

Xác định các loài KSTSR đặc hiệu có trong máu người bằng kỹ thuật nhân gen đặc hiệu loài bằng phản ứng PCR lần 2 (Nested 2 PCR) với 4 cặp mồi đặc hiệu, có trình tự:

Cặp mồi FAL1 và FAL 2 để nhân các gen đặc hiệu của KSTSR thuộc loài *Plasmodium falciparum*

FAL1: 5'-TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT- 3'

FAL2: 5'-ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC- 3'

Cặp mồi VIV1 và VIV 2 nhân các gen đặc hiệu *Plasmodium vivax*

VIVI: 5' -CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC- 3'

VIV2: 5' -ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCCC TTA- 3'

Cặp mồi MAL1 và MAL 2 nhân các gen đặc hiệu *Plasmodium malariae*

MAL1: 5' -ATA ACA TAG TTG TAC GTT AAG AAT AAC CGC- 3'

MAL2: 5' -AAA ATT CCC ATG CAT AAA AAA TTA TAC AAA- 3'

Cặp mồi OVA1 và OVA 2 nhân các gen đặc hiệu *Plasmodium ovale*

OVA1: 5' -ATC TCT TTT GTC ATT TTT TAG TAT TGG AGA- 3'

OVA2: 5' -GGA AAA GGA CAC ATT AAT TGT ATC CTA GTG- 3'

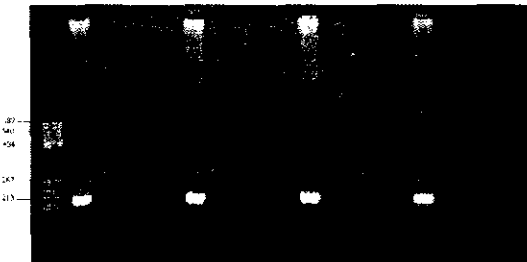
+ Chu trình nhiệt của phản ứng Nested 1 PCR: biến tính chung 95°C - 5 phút, thực hiện 25 chu kỳ PCR với: 94°C - 1 phút, 58°C - 2 phút, 72°C - 2 phút và 72°C 8 phút. Phản ứng Nested 2 PCR sử dụng AND khuôn từ Nested 1 PCR, thực hiện trong 30 chu kỳ với chu trình nhiệt như ở phản ứng Nested 1 PCR.

+ Sản phẩm PCR được chạy điện di trên bản gel nồng độ 2% agarose, có chứa 50 µg/ml ethidium bromide. Hình ảnh điện di phân tích trên phần mềm Labworks 4.0.

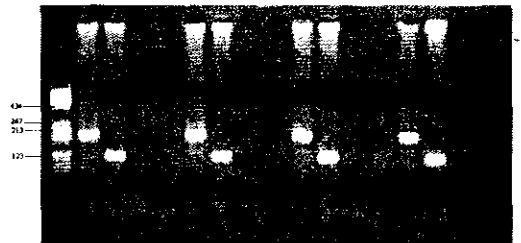
+ Thí nghiệm được thực hiện tại Phòng nghiên cứu enzym, Protein và Kỹ thuật gen thuộc Viện CNSH & CNTP, Trường ĐHBK Hà Nội và Phòng thí nghiệm sinh học phân tử, thuộc Viện Sốt rét - Kí sinh trùng - Côn trùng Trung ương.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả phân tích tình hình nhiễm kí sinh trùng sốt rét của các mẫu nghiên cứu cho thấy, người dân thuộc nông trường 11, công ty cao su Phú Riềng, huyện Phước Long, tỉnh Bình Phước bị nhiễm kí sinh trùng sốt rét rất đa dạng, bao gồm chủ yếu nhiễm đơn một loài KSTSR (hình 1), nhiễm phối hợp 2 loài KSTSR (hình 2), nhiễm phối hợp 3 loài KSTSR (hình 3) và nhiễm phối hợp cả 4 loài KSTSR (hình 4).

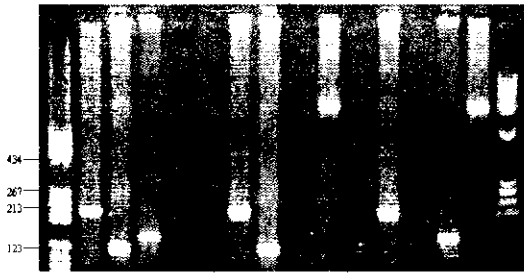


Hình 1. Ảnh điện di bệnh nhân nhiễm đơn *Plasmodium falciparum*

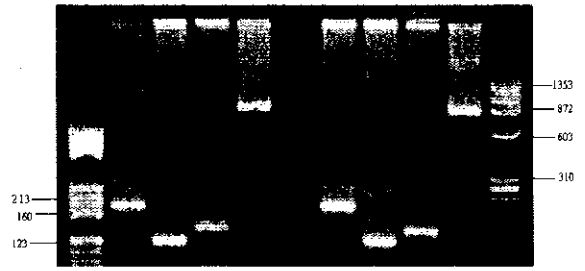


Hình 2. Ảnh điện di bệnh nhân nhiễm phối hợp 2 loài KSTSR, *Plasmodium falciparum* + *Plasmodium vivax*

Bảng 1 cho thấy người lao động bị nhiễm đơn loài *Plasmodium falciparum* chiếm 63,27%, số người bị nhiễm đơn loài *Plasmodium vivax* chiếm 3,3%. Kết quả phân tích PCR còn phát hiện các trường hợp một người bệnh bị nhiễm phối hợp đồng thời nhiều loài KSTSR. Trường hợp nhiễm phối hợp 2 loài chiếm 19,98%, nhiễm phối hợp 3 loài chiếm 9,99% và nhiễm phối hợp cả 4 loài KSTSR chiếm 3,33%.



Hình 3.



Hình 4.

Hình 3 ảnh điện di bệnh nhân nhiễm phối hợp 4 loài KSTRS, *Plasmodium falciparum* + *Plasmodium vivax* + *Plasmodium malariae*.

Hình 4 ảnh điện di bệnh nhân nhiễm phối hợp 4 loài KSTRS, *Plasmodium falciparum* + *Plasmodium vivax* + *Plasmodium malariae* + *Plasmodium ovale*.

Bảng 1. Tỷ lệ nhiễm đơn và nhiễm phối hợp các loài KSTRS

Loài kí sinh trùng sốt rét		Kết quả		
Nhiễm đơn	<i>P. falciparum</i>	19	63,27 %	
	<i>P. vivax</i>	1	3,33 %	
	<i>P. malariae</i>	0	0	
	<i>p. ovale</i>	0	0	
Nhiễm phối hợp	2 loài	<i>P.f</i> + <i>P.v</i>	4	13,32 %
		<i>P.f</i> + <i>P.m</i>	2	6,66 %
	3 loài	<i>P.f</i> + <i>P.v</i> + <i>P.m</i>	3	9,99%
		<i>P.f</i> + <i>P.v</i> + <i>P.o</i>	0	0
		<i>P.f</i> + <i>P.m</i> + <i>P.o</i>	0	0
	4 loài	<i>P.f</i> + <i>P.v</i> + <i>P.m</i> + <i>P.o</i>	1	3,3 %
Tổng số		30	100 %	

So sánh với số liệu thu được bằng phương pháp nhuộm giêmsa do Viện Sốt rét - Kí sinh trùng - Côn trùng Trung ương cung cấp, trong tổng số 30 mẫu máu trên phát hiện 29 mẫu nhiễm đơn và một mẫu máu nhiễm phối hợp 2 loài. Như vậy, kĩ thuật PCR lồng (Nested PCR) là kĩ thuật có độ chính xác cao, thời gian phân tích nhanh cho phép chẩn đoán chính xác mức độ nhiễm KSTRS đến loài, từ đó có thể đưa ra phác đồ điều trị có hiệu quả.

#### IV. KẾT LUẬN

Kí sinh trùng sốt rét gây bệnh cho người ở huyện Phước Long, tỉnh Bình Phước rất đa dạng, bao gồm đầy đủ các loài KSTRS gây bệnh chủ yếu ở người gồm *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* và *Plasmodium ovale*.

Tỉ lệ nhiễm đơn kí sinh trùng sốt rét loài *Plasmodium falciparum* 63,27%, loài *Plasmodium vivax* bằng 3,33%.

Tỉ lệ nhiễm phối hợp nhiều loài rất cao: nhiễm phối hợp 2 loài từ 6,66% - 13,32%, Nhiễm phối hợp 3 loài 9,99%. Đã phát hiện có trường hợp bệnh nhân nhiễm cả 4 loài kí sinh trùng sốt rét (3,3%).

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Barkers R. H. J. - DNA probe diagnosis parasitic infection, *Exp. Parasitol*, **70** (1990) 494-499.
2. Lê Đức Đào, Nguyễn Văn Tuấn, Bùi Quang Phúc - Nghiên cứu cơ cấu kí sinh trùng sốt rét tại 3 tỉnh Lâm Đồng, Bình Phước, Đắk Lắk bằng kĩ thuật PCR, Kĩ yếu công trình nghiên cứu khoa học 1996-2000, Nxb Y học, 2001, pp. 195-200.
3. Plowe C.V., Djimde A., Bouare M., Doumbo O., and Wellems T.E. - Pyrimethamine and proguanil resistance-conferring mutation in *Plasmodium faciarum* dihydrofolate reductase: polymerase chain reaction methods for surveillance in Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg* **52** (1995) 565-568.
4. Snounou G., Viriyakosol S., Zhu X. P., Jara W., Pinheiro L., Rosario V.E.D., Thai Thong S., and Brown K. N. - High sensitivity of detection of Human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction, *Mol. Biochem. Parasitol* **61** (1993) 315-320.

## SUMARY

### APPLICATION OF NESTED PCR FOR DETECTION OF HUMAN MALARIA PARASITIC DISEASE

Five specific primer pairs and computer soft ware Labworks 4.0 were used to detect of Human malaria parasites in blood samples by the used nested polymerase chain reaction. The second PCR using of the first PCR product as template with second primer pair: FAL1, FAL2; VIV1, VIV2; MAL1, MAL2, OVA1, OVA2.

In 30 blood samples collected from patients of the Phu Rieng Caoutchouc Ltd. of Phuoc Long, Binh Phuoc were determined 4 species of malaria parasites: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* in patients. *Plasmodium falciparum* is high frequency infected (63,27%), and *Plasmodium vivax* low frequency infected (3.33%). Coordination infected of malaria parasites of 2 species is 6.66% - 13.32%, of 3 species is 9.99% and coordination infected of 4 species is 3.3%.

Địa chỉ:

Nhận bài ngày 12 tháng 3 năm 2007

Trường Đại học Bách khoa Hà Nội.