

XÁC ĐỊNH PHÂN TYP HIV-1 TRÊN ĐỐI T- ỢNG NGHIỆN CHÍCH MA TÚY VÀ MẠI DÂM KHU VỰC HÀ NỘI (VIỆT NAM) VÀ VIÊNG CHĂN (LÀO)

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

TÓM TẮT

Nghiên cứu sự phân bố phân typ HIV-1 ở 280 bệnh nhân (BN) có xét nghiệm HIV (+), trong đó 140 BN ở khu vực Hà Nội (KVHN) và 140 BN ở Viêng Chăn (KVVC). Kết quả cho thấy: phân typ CRF01-AE chiếm chủ yếu ở hai khu vực với 138/140 BN (98,57%); 2/140 BN (1,43%) chưa xác định được ở KVHN và 118/140 BN (84,30%) ở KVVC; phân typ A: 1/140 BN (0,71%), phân typ B: 1/140 BN (0,71%), phân typ C: 3/140 BN (2,14%); có tới 17/140 BN (12,14%) chưa xác định được phân typ ở KVVC. Tuy nhiên, phân typ HIV ở KVVC đa dạng hơn KVHN.

* Từ khoá: Phân typ HIV-1; Nghiện chích ma túy; Gái mại dâm; Hà Nội; Viêng Chăn.

DETERMINATION OF HIV-1 SUBTYPE IN DRUG-ADDICTS AND PROSTITUTORS IN HANOI (VIETNAM) AND VIENTIANE (LAOS)

SUMMARY

A study on the distribution of HIV-1 subtypes was conducted on 280 patients with positive HIV. Among them, 140 patients lived in Hanoi (Vietnam) and the other 140 lived in Vientiane (Laos). The results showed that subtype CRF01-AE was predominant in both areas but the HIV subtypes in Vientiane were more diverse. In Hanoi, subtype CRF01-AE accounted for 98.57%, subtypes in 1.43% of patients were not identified. The same subtype in Vientiane area was 84.30%, subtype A: 1/140 (0.71%), subtype B: 1/140 (0.71%), subtype C: 3/140 (2.14%) and subtypes in 17/140 of patients (12.14%) were not identified.

* Key words: HIV-1 subtypes; Drug-addicts; Prostitutors; Hanoi; Vientiane.

ĐẶT VẤN ĐỀ

HIV có 2 typ là HIV-1 và HIV-2, cả hai typ này đều lây truyền qua đường tình dục, đường máu và từ mẹ sang con. Riêng 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 đa số, được chia thành 10 phân typ, bao gồm: phân typ A, B,

* Lưu học sinh Lào

** Viện Vệ sinh Dịch tễ TW

*** Học viện Quân y

**** Bệnh viện 103

Phản biện khoa học: PGS. TS. Đoàn Huy Hậu

PGS. TS. Trịnh Thị Xuân Hòa

C, D, E, F, G, H, J và K và 49 dạng tái tổ hợp (CRFs) [7] của các phân týp trên. Phân týp phân bố mang tính trội cho từng vùng địa lý khác nhau, mỗi phân týp lại có tính trội theo đường lây truyền nhất định. Ví dụ, ở Thái Lan, phân týp B trội ở những đối tượng tiêm chích ma túy, phân týp E trội ở 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 trong giám sát dịch tễ học ở tầm quốc gia và khu vực, góp phần xây dựng 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 virút đặc hiệu (hiệu quả của thuốc kháng virut khác nhau với từng phân týp) [1, 3, 6]. Vì vậy, để dự phòng và kiểm soát HIV lây truyền, cần nghiên cứu phối hợp giữa các khu vực quốc gia láng giềng.

Hà Nội và Viêng Chăn là thủ đô của hai nước Việt Nam và Lào, không những gần nhau về địa lý mà còn có mối quan hệ đặc biệt thân thiết. Rất nhiều công dân của Lào sang học tập, làm việc tại Hà Nội và ngược lại, nhiều tổ chức, cá nhân của Việt Nam sang làm việc, kinh doanh và học tập tại Viêng Chăn. Giao thông giữa Hà Nội và Viêng Chăn cũng rất thuận tiện. Nghiên cứu này nhằm: *Xác định và so sánh phân týp HIV-1 trên các đối tượng có xét nghiệm HIV dương tính ở KVHN và KVVC; tìm hiểu sự tương đồng của các phân týp HIV, làm tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo, góp phần thiết kế bản đồ dịch tễ học phân týp HIV-1 tại Việt Nam, Lào và trong khu vực, giúp các nhà khoa học và cơ quan chuyên*

ngành của hai nước có thêm số liệu tham khảo nhằm kiểm soát tình hình nhiễm HIV trong nước và khu vực.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

280 BN có HIV (+), trong đó, 140 BN ở KVHN và 140 BN ở KVVC. Mỗi khu vực nghiên cứu trên 3 nhóm: 50 người nghiện chích ma túy (NCMT), 50 gái mại dâm (GMD) và 40 người thuộc các đối tượng khác (ĐTK).

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu.

* *Phương pháp nghiên cứu:* dịch tể học cắt ngang và phân tích labo để tìm hiểu phân týp HIV-1. Xác định cỡ mẫu bằng phương pháp dịch tể học nghiên cứu tỷ lệ trong quần thể.

Mẫu máu từ KVVC được chống đông, ly tâm tách huyết tương, bảo quản lạnh, vận chuyển về Trung tâm Nghiên cứu Sinh - Y - Dược học quân sự (Học viện Quân y) và thực hiện nghiên cứu đồng thời với các mẫu nghiên cứu của KVHN. Tách khối bạch cầu, tách và tinh sạch ADN bằng bộ kit QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Đức).

Sử dụng kỹ thuật mPCR xác định phân týp HIV [1, 2, 4]; kiểm chứng phân týp bằng kỹ thuật giải trình tự, đối chiếu với Genbank [8]. Kỹ thuật nghiên cứu được tiến hành tại Trung tâm Nghiên cứu Sinh - Y - Dược học quân sự (Học viện Quân y) và Viện Vệ sinh Dịch tể TW (Hà Nội) với các sinh phẩm cho sinh học phân tử đặt mua từ Công ty Invitrogen (Singapore).

Thu thập mẫu máu của đối tượng HIV (+) sau đó, tách khối bạch cầu, tách và tinh sạch ADN bằng bộ kit QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN).

Các ADN mẫu cho phản ứng mPCR để xác định phân týp HIV (Fumihiro Y [4]), gồm:

+ BECO5 (7938-7960 bp): 5' GGCATCA-AACAGCTCCAGGCAAG 3'

+ BECO3 (8766-8791 bp): 5'AGCAAA-GCCCTTTCTAAGCCCTGTCT3'

+ BE-ANCH (7963-7985 bp): 5'TCCTGG-CTGTGGAAAGATACCTA3'

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

+ E-SPEC (8585 bp) 5' GTCTCAG-TCCCTTGAGACTGCTG 3'.

+ C-SPEC (8615-8638 bp): 5' AGACCCC-AATACTGCACAAGACTT 3'.

+ F-SPEC (8720-8744 bp): 5'AACAGC-TCTACCAGCTCTTTGCAAA 3'.

+ 5'A (8094-8112 bp):5' GANAACATGA-CCTGGCTGC 3'.

3'A (8693-8716 bp): 5'TCTATAACCC-TATCTGTCCAGCCA 3'.

+ 5'E (8181-8207 bp): 5'CAGGAAAGGAA-TGAAAAGGATTTGTTA 3'.

3'E (8693-8713 bp): 5'ATAACCCTATCT-GTCCACCCC 3'.

+ 5'G (8131-8757 bp): 5'ACAATTACAC-ATACCACATATACAGCC 3'.

3'G (8694-8716 bp): 5'TCTATAACCC-TATCTGTCCAGTT 3'.

+ 5'D (8037-8058 bp): 5'ACCACTAAT-GTGCCCTGGAAGT 3'.

3'D (8356-8386 bp): 5' AGGAGGGTCT-GAAATGACAGA 3'.

* *Phương pháp mPCR xác định phân týp HIV-1 với ADN mẫu khuếch đại vùng gen env (gp120 và gp41) tiến hành theo trình tự sau (cải tiến từ nghiên cứu của Fumihiro [2, 4]):*

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

PCR2 xác định phân týp A, E, G với các ADN mẫu (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 mẫu BE-ANCH là mẫu xuôi, 4 cặp primer B-SPEC, C-SPEC, E-SPEC và F-SPEC là mẫu 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 ADN mẫu 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 mẫu; 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 95⁰C, 35 chu kỳ (95⁰C/45 giây - 64⁰C/phút - 72⁰C/1,5 phút), cuối cùng chu kỳ tổng hợp 10 phút ở 72⁰C. Kiểm tra hiệu quả quá

trình khuếch đại và kích thước sản phẩm PCR trên gel agarose 1% nhuộm bằng ethidium.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

Bảng 1: Kết quả xác định phân tít HIV-1 trên đối tượng nhiễm HIV ở 2 khu vực.

PHÂN TÍT HIV-1	KVHN	KVVC	p
	n = 140 (%)	n = 140 (%)	
Phân tít CRF01-AE	138 (98,57)	118 (84,30)	p < 0,01
Phân tít A	0	1 (0,71)	p > 0,05
Phân tít B	0	1 (0,71)	
Phân tít C	0	3 (2,14)	
Chưa xác định	2 (1,43)	17 (12,14)	p < 0,01
Tổng số	140 (100)	140 (100)	

Ở cả hai khu vực nghiên cứu, phân tít chủ yếu là dạng tái tổ hợp CRF01-AE, đặc biệt, KVHN chiếm tỷ lệ cao (98,57). Hai phân tít không xác định được ban đầu bằng kỹ thuật mPCR, sau khi phân tích bằng giải trình tự cho kết quả vẫn là CRF01-AE. KVVC có tỷ lệ phân tít HIV phức tạp và đa dạng hơn, ngoài dạng CRF01-AE, còn phát hiện phân tít A, B, C với tỷ lệ thấp. Ở KVVC, tỷ lệ phân tít chưa xác định được bằng mPCR cao hơn KVHN và trong nghiên cứu này cũng

chưa xác định được bằng kỹ thuật giải trình tự. Đây có thể là dạng tái tổ hợp mới nên chưa xác định được bằng bộ primer hiện đang sử dụng cho phản ứng mPCR với 3 lần chạy. Trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Bích Yến (2003) [1], các dạng tái tổ hợp mới là 7,3%; của Fumihiko Yagyu (2005) [4] là 15,2%. Kết quả này cho thấy nghiên cứu phân tít HIV ở KVVC gặp khó khăn hơn, do tính phức tạp và đa dạng của các phân tít HIV so với KVHN.

Bảng 2: So sánh tỷ lệ phân bố phân tít HIV-1 ở 2 khu vực.

KHU VỰC NGHIÊN CỨU	ĐỐI TƯỢNG	n	TỶ LỆ PHÂN BỐ PHÂN TÍT HIV-1				
			CRF01-AE	A	B	C	Chưa xác định
KVHN	NCMT	50	49 (98%)	0	0	0	1 (2%)
	GMD	50	49 (98%)	0	0	0	1 (2%)
	ĐTK	40	40 (100%)	0	0	0	0
	Cộng	140	138 (98,57%)	0	0	0	2 (1,43%)
KVVC	NCMT	50	39 (78 %)	1 (2%)	1 (2%)	0	9 (18%)

TẬP CHÍ Y - D- ỢC HỌC QUÂN SỰ SỐ 1-2012

	GMD	50	39 (78 %)	0	0	3 (6%)	8 (16%)
	ĐTK	40	40 (100%)	0	0	0	0
	Cộng	140	123 (87,86%)	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 tít phức tạp, ngoài phân tít CRF01-AE chủ yếu, có cả các phân tít khác (A, B, C). Một vấn đề lưu ý nữa là những trường hợp chưa xác định được phân tít cũng thuộc 2 nhóm đối tượng NCMT và GMD, trong khi các đối tượng còn lại đều là phân tít CRF01-AE. Những trường hợp khó, phức tạp, chưa xác định được phân tít HIV đều thuộc 2 nhóm đối tượng trên. Điều này cho biết tính phức tạp về phân tít và các dạng tái tổ hợp của HIV-1 chủ yếu ở đối tượng NCMT và GMD. Phân tít HIV-1 ở KVVC đa dạng và phức tạp hơn KVHN.

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

KẾT LUẬN

Phân tít dạng tái tổ hợp CRF01-AE của HIV-1 là phân tít chủ yếu ở cả KVHN (98,57%) và KVVC (84,30%). KVVC có tỷ lệ phân tít HIV phức tạp và đa dạng hơn KVHN. Ngoài dạng CRF01-AE, phát hiện cả phân tít A, B, C với tỷ lệ thấp. Trong các nhóm đối tượng nghiên cứu, NCMT và GMD có tỷ lệ phân tít phức tạp hơn các ĐTK.

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 TP. Hồ Chí Minh. Luận án Tiến sĩ 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 tít HIV-1 trên đối tượng NCMT và GMD 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. <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>.
8. Lwembe R, Ochieng W, Panikulam A, et al. Anti-retroviral drug resistance-associated mutations among non-subtype B HIV-1-infected Kenyan children with treatment failure. J Med Virol. 2007, 79 (7), pp.865-872.