XÁC ĐỊNH CA BỆNH NHIỄM KÍ SINH TRÙNG SỐT RÉT *PLASMODIUM OVALE* ĐƠN THUẦN BẰNG HÌNH THÁI HỌC VÀ SINH HỌC PHÂN TỬ TẠI VEN BIỂN MIỀN TRUNG VIỆT NAM

TS. HUỲNH HỒNG QUANG, PGS.TS. HỒ VĂN HOÀNG
ThS. NGUYỄN THỊ MINH TRINH
Viện Sốt rét - Kí sinh trùng - Côn trùng Quy Nhơn
TS. TRẦN THANH SƠN - *Đại học Quy Nhơn*
TS. NGUYỄN THANH THÙY NHIÊN
Đơn vị NCLS Đại học Oxford

Phản biện khoa học: (1) TS. LÊ VĂN NAM
(2) BSCKII. PHẠM XUÂN VINH

TÓM TẮT: *Nghiên cứu xác định ca bệnh nhiễm kí sinh trùng sốt rét P. ovale đơn thuần bằng phân tích hình thái học và sinh học phân tử tại vùng ven biển miền Trung Việt Nam.*

Kết quả: *Cả phân tích hình thái học và di truyền phân tử đều xác nhận 2 bệnh nhân nhiễm P. ovale. Như vậy, tỉnh Ninh Thuận và tỉnh Khánh Hòa được công nhận là nơi có sốt rét lưu hành với sự có mặt của P. ovale. Cần có các nghiên cứu khác, phân tích các biến thể loài P. ovale curtisi hay P. ovale wallikeri của P. ovale tại hai tỉnh này.*

Từ khóa: *Plasmodium ovale,* kĩ thuật phân tử.

ABSTRACTS: *Confirmation study of human P. ovale mono-infection in the Central Coastal area by the morphological and molecular biology analysis.*

Result: *Both morphological and molecular biology techniques confirmed of two patients infected of P. ovale* malaria*. Hence, both Ninh Thuan and Khanh Hoa provinces have malaria endemic zones with* the *P. ovale* presentation*. Needs a further other discriminatory analysis of these P. ovale curtisi or P. ovale wallikeri of P. ovale species in these provinces.*

Keywords: *Plasmodium ovale*, molecular technique.

Chịu trách nhiệm nội dung: TS. Huỳnh Hồng Quang, Email: huynhquangimpe@yahoo.com

Ngày nhận bài: 01/6/2021; mời phản biện khoa học: 6/2021; chấp nhận đăng: 24/7/2021.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ.

Theo Tổ chức Y tế thế giới (WHO), năm 2016, trên toàn cầu có 216 triệu ca mắc sốt rét và 445.000 ca tử vong tại 91 quốc gia. Hơn 100 năm qua, chẩn đoán sốt rét phần lớn dựa vào kính hiển vi (được xem là tiêu chuẩn chuẩn vàng bởi nó vừa định tính - định loài, giai đoạn và thể kí sinh trùng; vừa định lượng - mật độ kí sinh trùng để tiên lượng và theo dõi diễn tiến bệnh). Gần đây, với sự phát triển khoa học công nghệ, nhất là công nghệ sắc kí miễn dịch, test chẩn đoán nhanh ra đời đã bổ sung thêm một phương pháp chẩn đoán bệnh sốt rét (bên cạnh kính hiển vi), giúp phát hiện và chẩn đoán ca bệnh thêm toàn diện, đầy đủ. Tuy nhiên, bất cứ công cụ chẩn đoán nào cũng có điểm giới hạn của nó.

Gần đây, việc nghiên cứu và ứng dụng công nghệ sinh học phân tử chẩn đoán sốt rét đã có độ nhạy, độ đặc hiệu và độ chính xác cao, giúp phát hiện số loài kí sinh trùng tăng từ 4 loài lên đến 6 loài (*Plasmodium falciparum, P. vivax, P. malariae, P. knowlesi, P. ovale curtisi và P. ovale wallikeri*). Theo Stephens (1914), giới chuyên môn đánh giá sự phân bố của loài *P. ovale* chỉ giới hạn tại khu vực cận sa mạc Sahara, châu Phi, Nam và Đông Nam Á, các đảo Indonesia; đặc biệt, rất hiếm báo cáo ở Việt Nam (nếu có, chỉ dừng lại ở kết quả sinh học phân tử mà thiếu các bằng chứng hình thái học của kí sinh trùng).

Chúng tôi thực hiện nghiên cứu ca bệnh được xác định nhiễm kí sinh trùng sốt rét *P. ovale* đơn thuần bằng phân tích hình thái học và sinh học phân tử tại vùng ven biển miền Trung Việt Nam.

2. ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.

2.1. Đối tượng nghiên cứu:

2 bệnh nhân (BN) sốt rét được xác định nhiễm kí sinh trùng *P. ovale* đơn thuần bằng phân tích hình thái học (qua lam máu nhuộm Giemsa với các hình thể điển hình đã từng được mô tả trên y văn) và sinh học phân tử.

- Ca bệnh thứ 1 (mã số VNNT79): BN nữ, 26 tuổi; quê quán xã Ma Nới, huyện Ninh Sơn, tỉnh Ninh Thuận; phát hiện bệnh tháng 4/2015.

- Ca bệnh thứ 1 (mã số VNKH46): BN nam, 41 tuổi, quê quán xã Khánh Lê, huyện Khánh Vĩnh, tỉnh Khánh Hòa; phát hiện bệnh tháng 6/2019.

2.2. Phương pháp nghiên cứu:

- Thiết kế nghiên cứu: mô tả trường hợp bệnh và kĩ thuật xét nghiệm.

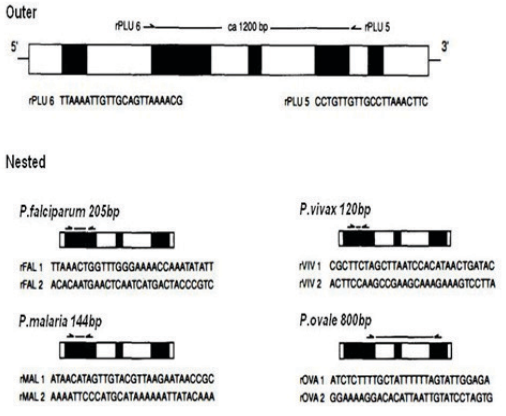
- Các kĩ thuật sử dụng trong nghiên cứu: (1) Kĩ thuật xét nghiệm lam máu nhuộm Giemsa tìm kí sinh trùng sốt rét theo Tổ chức Y tế thế giới (WHO, 2015); (2) Kĩ thuật Nested-PCR xác định 4 loài kí sinh trùng sốt rét theo quy trình Snounou G và cộng sự (1993) tại Khoa Xét nghiệm - Sinh học phân tử, Viện Sốt rét - Kí sinh trùng - Côn trùng Quy Nhơn và Đơn vị NCLS, Đại học Oxford (Vương quốc Anh). Trình tự mồi cho kĩ thuật Nested-PCR theo bảng sau:

Kí hiệu mồi	Trình tự	Kích thước sản phẩm PCR
PL U5 PL U6	CCT GTT GTT GCC TTA AAC TTC TTA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CG	≈ 1,2 kb
FF FR	TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC	205 bp
VF VR	CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC ACT TCC AAG CCG AAG GAA AGA AAG TCC TTA	120 bp
MF MR	ATA ACA TAG TTG TAG GTT AAG AAT AAC CGC AAA ATT CCC ATG CAT AAA AAA TTA TAC AAA	144 bp
OF OR	ATC TCT TTT GCT ATT TTT TAG TAT TGG AGA GGA AAA GGA CAC ATT AAT TGT ATC CTA GTG	786 bp

Phản ứng khuếch đại Nested-PCR được thực hiện qua 2 giai đoạn (kĩ thuật chẩn đoán định loài kí sinh trùng sốt rét đặc hiệu từ mẫu DNA. Phát hiện và phân tích *Plasmodium spp.* được làm theo 2 bước Nested-PCR sử dụng các cặp mồi của Snounou và cộng sự, năm 1993):

+ Bước 1 (PCR1): 1 µl DNA tách chiết khuếch đại sử dụng các cặp mồi đặc hiệu giống (genus specific primers).

+ Bước 2 (PCR2): 1 µl sản phẩm khuếch đại của PCR1 được khuếch đại thêm, sử dụng các mồi đặc hiệu loài. Lấy 10 µl của sản phẩm DNA PCR2 được tách ra, điện di trên gen 2% agarose, nhuộm trong 15 phút với ethidium bromide và xem dưới đèn UV (hình 1).

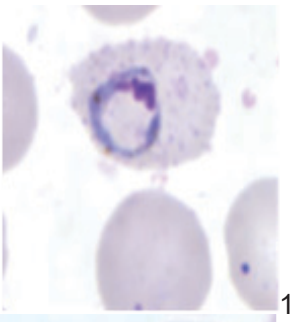


Hình 1. Sơ đồ phản ứng nested PCR gen 18S xác định 4 loài kí sinh trùng sốt rét (nguồn: G Snounou, 1993).

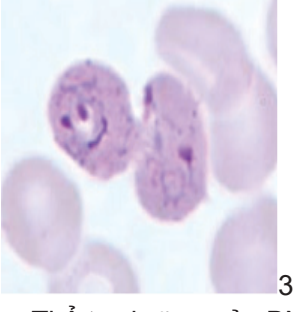
3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.

3.1. Kết quả xác định *P. ovale* bằng kĩ thuật lam máu nhuộm Giemsa:

Phân tích hình thái hồng cầu BN nhiễm đơn thuần loài *P. ovale* cho thấy, các hồng cầu nhiễm có thể có kích thước bình thường, hơi lớn, hình tròn hoặc oval; đôi khi có hình lông ở rìa (fimbriated form). Dưới điều kiện tối ưu, có thể nhìn thấy các chấm Schüffner trên lam nhuộm Giemsa. Thể nhẫn của *P. ovale* trong có bào tương chắc và chấm chromatin lớn (hình 2).


1

2


3

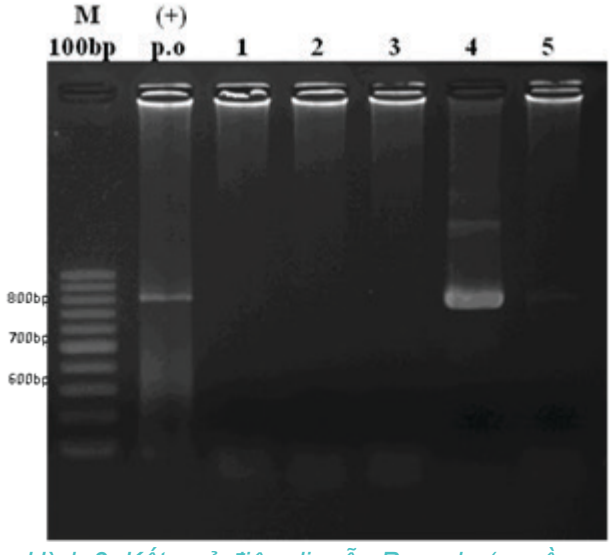
Hình 2. Thể nhẫn và tư dưỡng đang phát triển, kèm theo hình ảnh các chấm Schüffner's trên BN VNNT79 (1) và BN NVKH46 (3) (nguồn: Viện Sốt rét - Kí sinh trùng - Côn trùng Quy Nhơn).

Thể tư dưỡng của BN nhiễm *P. ovale* trong báo cáo này thấy nhân tròn thô, nằm gần rìa hồng cầu,

nguyên sinh chất bắt màu xanh - tím kéo dài thành dải bao quanh nhân. Hạt sắc tố ít và tập trung thành cụm trên nguyên sinh chất, màu nâu đen, hạt Shüffner (không phải chấm James) rõ màu hồng rải rác khắp hồng cầu và đặc biệt hồng cầu bị kí sinh có hình oval, một đầu kia của hồng cầu bị kí sinh có tua răng cưa.

3.2. Kết quả xác định *P. ovale* bằng kĩ thuật Nested-PCR:

Mẫu lam có kí sinh trùng sốt rét dương tính nêu trên được tiến hành tách chiết DNA. Sau khi tách chiết DNA, sản phẩm DNA này được đo OD để xác định nồng độ và độ tinh sạch. Kết quả thu được các sản phẩm DNA với độ tinh sạch lần lượt là 1,7 và 2,1; nồng độ DNA thu được lần lượt là 85 ng/µl và 92 ng/µl. Sau đó, các mẫu này được xác định loài kí sinh trùng sốt rét bằng kĩ thuật Nested-PCR. Kết quả xác định loài kí sinh trùng bằng kĩ thuật Nested-PCR (hình 3) như sau:



Hình 3. Kết quả điện di mẫu P. ovale (nguồn: IMPE Quy Nhơn). Ghi chú: (+) P.O: chứng (+) của P. ovale (~ 800 bp); từ 1-3: mẫu (-) với P. ovale; 4: xác định P. ovale.

Kết quả điện di cho thấy đã xác định được loài của mẫu *Plasmodium spp.* sử dụng trong nghiên cứu với kích thước đúng như mong muốn. Cụ thể, mẫu *P. ovale* cho kích thước vạch điện di khoảng 800 bp.

4. BÀN LUẬN.

P. ovale lần đầu tiên được mô tả trên một người lính trở về từ Đông Phi, năm 1922. Mặc dù, *P. ovale* đã được báo cáo trên khắp các lục địa, song đa số báo cáo thường gặp tại vùng châu Phi nhiệt đới và New Guinea. Tại Tây Phi, tỉ lệ lam máu dương tính với *P. ovale* từ 0,7-10%. Thường các ca nhiễm *P. ovale* có mật độ thấp trên kính hiển vi và dễ chẩn đoán nhầm với *P. vivax*. Do đó, con số thật ước tính cũng chưa đầy đủ.

Tại Việt Nam, *P. ovale* được công bố lần đầu năm 1970 bởi Gleason N.N và cộng sự. Tổng hợp các nghiên cứu từ 1970-1995, ở Việt Nam đã xác nhận có 4 trường hợp nhiễm *P. ovale* trong số lính Mỹ đóng quân ở một vị trí tại phía Nam Việt Nam. Cùng với một số nghiên cứu khác cho thấy bằng chứng rõ ràng sự tồn tại của *P. ovale* ở lục địa Đông Nam Á. Tất cả 4 BN này chưa bao giờ phục vụ ở bất kỳ vùng sốt rét lưu hành và cũng không có du lịch đến các nước khác. Tiền sử bệnh cho thấy, cả 4 ca nhiễm này đều do muỗi sốt rét truyền, chiếm 0,066% trong tổng số 6.036 lính Mỹ trở về trong giai đoạn này và 0,11% trong số lam máu ở 3.686 người được xét nghiệm bởi Trung tâm Bệnh Truyền nhiễm quốc gia Hoa Kỳ (United State - National Communicable Disease Center) cùng thời kì này. Trên kính hiển vi quang học, soi giọt mỏng cho thấy thể tư dưỡng và phân liệt chưa trưởng thành, thể nhẫn và giao bào rất hiếm, không tìm thấy phân liệt trưởng thành. Hình thể của kí sinh trùng là điển hình của *P. ovale*, hơn 50% hồng cầu nhiễm có tua lông, hình oval hoặc cả hai. Sau đó nhiều năm, có báo cáo tại vùng sốt rét lưu hành ở huyện Bắc Bình, tỉnh Bình Thuận với hình thể điển hình [1], trên cả lam giọt máu mỏng và giọt dày. Tuy nhiên, các số liệu về sau dường như rất ít đề cập về xuất hiện loài kí sinh trùng sốt rét này tại các vùng sốt rét, nhất là vùng sốt rét lưu hành nặng, trên các dữ liệu báo cáo hằng năm của Chương trình Quốc gia phòng, chống sốt rét. Ngoại trừ chỉ có một số nghiên cứu báo cáo về áp dụng sinh học phân tử xác định sự có mặt của 4 loài kí sinh trùng sốt rét *Plasmodium spp.* cổ điển tại các vùng sốt rét lưu hành ở miền Trung - Tây Nguyên, như Gia Lai, Khánh Hòa và Đăk Lăk [1], [7], song ít có dữ liệu về mặt hình thái học. Gần đây, Hồ Văn Hoàng và cộng sự (2011) báo cáo 1 ca bệnh nhiễm *P. ovale* về mặt hình thái học, khẳng định nhiễm đơn loài *P. ovale* và sau đó thẩm định bằng sinh học phân tử là *P. ovale* [1]. Một số tác giả khác còn phát hiện loài kí sinh trùng sốt rét thứ 5 gây nhiễm cho người mà vốn dĩ từ lâu gây bệnh cho các loài linh trưởng là *P. knowlesi* [2]. Tất cả dữ liệu trên cho thấy rằng, loài *P. ovale* là tương đối hiếm và chiếm tỉ lệ rất thấp tại các vùng sốt rét của Việt Nam.

Trong nghiên cứu này, ca bệnh có thời gian ủ bệnh khoảng 20 ngày; trước đó cũng đã nhiều lần có mắc sốt rét, sốt không cao (khoảng 38°C) và không có cơn sốt điển hình; đau đầu nhẹ, không rối loạn tiêu hóa; qua cơn sốt, ăn uống bình thường; lách lớn độ II, không thiếu máu trên lâm sàng. Ban đầu, ca bệnh được chẩn đoán sốt rét do *P. vivax* và đưa vào nghiên cứu hiệu lực thuốc

(Xem tiếp trang 110)

9. Bộ Y tế (2015), *Quyết định số 37/QĐ-ATTP ngày 02/2/2015 của Cục An toàn thực phẩm về việc "Ban hành tài liệu tập huấn kiến thức ATTP và Bộ câu hỏi đánh giá kiến thức ATTP của chủ cơ sở và người trực tiếp chế biến, kinh doanh dịch vụ ăn uống và đáp án trả lời"*.

10. Nguyễn Thùy Dương (2014), *Đánh giá điều kiện đảm bảo an toàn thực phẩm và một số yếu tố liên quan tại các cửa hàng phở trên địa bàn quận Đống Đa, Hà Nội năm 2014*, Luận văn thạc sĩ y tế công cộng, Trường Đại học Y tế công cộng.

11. Phạm Thị Lan Anh (2014), *Thực trạng điều kiện an toàn thực phẩm và một số yếu tố liên quan của các cửa hàng ăn tại khu du lịch chùa Hương mùa lễ hội năm 2014,* Luận văn thạc sĩ y tế công cộng, Trường Đại học y tế công cộng.

12. Lagasse L.P Greiner A.L, Neff R.A, et al (2013), "Reassuring or risky: the presentation of seafood safety on the angiate of the British Petroleum Deepwater Hoziron Oil Spill", *Am I Public Health*, 103(7), 1198-1206.

13. Veras J.E Martins M.C, Uchoa J.L et al (2013), "Food safety and tthe use of regional foods, the validation of serial album", *Rev Esc Enferm USP*, 46(6), 1354-1361. ❑

****

XÁC ĐỊNH CA BỆNH NHIỄM KÍ SINH TRÙNG SỐT RÉT *PLASMODIUM OVALE*...

(Tiếp theo trang 71)

chloroquin. Tuy nhiên, do hình thái học có một số điểm đặc biệt và nghi ngờ như hình nahr trương phồng của hồng cầu nhiễm, có hình ngọn đuốc, có ria lông, hình ảnh bào tương đặc chắc hơn so với bình thường.

Do vậy, một loạt lam máu giọt đặc, giọt đàn và giấy thấm được lấy trên BN để xác định lại do 2 kĩ thuật viên kính hiển vi cấp độ 1 của WHO soi đối chiếu và đều khẳng định là *P. ovale*. Nhằm xác định chính xác ca bệnh này có nhiễm loài *P. ovale* đơn thuần bên cạnh kết quả hình thái học hay không, các mẫu giấy thấm được phân tích sinh học phân tử PCR và Nested-PCR để khẳng định. Kết quả trùng hợp là nhiễm đơn thuần loài *P. ovale*.

Về phân tích phả hệ di truyền, trong số các loài gây nhiễm cho khỉ, hình thái học *Plasmodium schwetzi* dường như có liên quan chặt chẽ với *P. ovale*. Năm 2013, các nghiên cứu DNA phân tích thành *Plasmodium ovale curtisi* và *Plasmodium ovale wallikeri*. Cả 2 loài này đã được xác định tại Ghana, Myanmar, Nigeria, Sierra Leone, São Tomé và Uganda. Việc phân tách các dòng (lineages) ước tính xảy ra khoảng 1-3,5 triệu năm trước và các loài này dường như liên quan chặt chẽ với *Plasmodium malariae* hơn là *Plasmodium vivax*. Đặc biệt, hai loài này có sự khác nhau về mặt sinh học mà trong đó *P. ovale wallikeri* có giai đoạn ngủ ngắn hơn *P. ovale curtisi*. Do đó, việc phân tích ca bệnh này thuộc loài nào là cần thiết để góp phần bổ sung dữ liệu di truyền của kí sinh trùng sốt rét *P. ovale* tại Việt Nam.

5. KẾT LUẬN.

Nghiên cứu ca bệnh xác định loài kí sinh trùng sốt rét bằng phương phân tích hình thái học và sinh học phân tử đều xác định 2 BN nhiễm *P. ovale*. Hai phương pháp trên đều là tiêu chuẩn vàng chẩn đoán bệnh và rất hiếm khi được sử dụng đồng thời trên cùng một BN. Như vậy, Ninh Thuận và Khánh Hòa được công nhận là nơi có sốt rét lưu hành với sự có mặt của *P. ovale*.

Cần có các nghiên cứu khác, phân tích các biến thể loài *P. ovale curtisi* hay *P. ovale wallikeri* của *P. ovale* tại hai tỉnh này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Hồ Văn Hoàng, Nguyễn Thị Lệ Huyền (2011), "Báo cáo trường hợp nhiễm *Plasmodium ovale* tại Bình Thuận, miền Trung Việt Nam", *Tạp chí Y học thực hành*, số 11 (791), tr. 27-32.

2. Peter Van den Eede, Hong Nguyen Van, Chantal Van Overmeir et al (2009), "Human Plasmodium knowlesi infections in young children in Central Vietnam", *Malar J*, 2009 Oct 30, 8:249, doi: 10.1186/1475-2875-8-249.

3. Snounou G Viriyakosol S, Jarra W, Thai Thong S, and Brown K.N. (1993), "Identification of the four human malaria species in field samples by the polymerase chain reaction of high prevalence if mixed infection", *Mol. Biochem. Parasitol*, 58, 283-292.

4. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu X.P et al (1993), *"High sensitivity detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction"*, *Mol. Biochem. Parasitol*. 61, 315-320.

5. Gleason N.N, Fisher G.U, Blumhardt R, Roth A.E, Gaffney G.W (1970), "*Plasmodium ovale* malaria acquired in Viet-Nam", *Bull. World Health Organ*. 42 (3): 399-403.

6. Sutherland C.J, Tanomsing N, Nolder D, Oguike M, Jennison C et al, (2010), "Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite *Plasmodium ovale* occur globally", *J Infect Dis.* 201 (10): 1544-50.

7. Kawamoto F, Miyake H, Maneko O, Kimura M, Le Duc Dao (1996), "Sequence variation in the 18S rRNA gene: A target for PCR-based malaria diagnosis, in *Plasmodium ovale* from Southern Vietnam", *Journal Of Clinical Microbiology*, *American Society for Microbiology*, Vol. 34, No. 9:2287-2289. ❑