

## PHÁT HIỆN DNA CỦA VI KHUẨN *RICKETTSIA* VÀ *ORIENTIA TSUTSUGAMUSHI* TRÊN ĐỘNG VẬT GẤM NHẮM VÀ NGOẠI KÝ SINH TRÙNG Ở HÀ GIANG

Lê Thị Lan Anh<sup>1</sup>, ✉, Võ Viết Cường<sup>1</sup>, Trịnh Văn Toàn<sup>1</sup>, Hồ Thị Hồng Nhung<sup>3</sup>, Lê Thị Vân Anh<sup>5,6</sup>, Cần Thị Thu Thủy<sup>2</sup>, Phạm Thị Hà Giang<sup>1</sup>, Bùi Thị Thanh Nga<sup>1</sup>, Bùi Thị Lan Anh<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Châu<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga

<sup>2</sup>Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

<sup>3</sup>Học viện Nông nghiệp Việt Nam

<sup>4</sup>Viện Sốt rét, Ký sinh trùng - Côn trùng Trung Ương

<sup>5</sup>Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>6</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: leanhbio@gmail.com

Ngày nhận bài: 24.6.2019

Ngày nhận đăng: 16.9.2019

### TÓM TẮT

Bệnh sốt do *Rickettsia* là bệnh truyền từ động vật sang người, tác nhân gây bệnh là vi khuẩn thuộc chi *Rickettsia*. Vector truyền bệnh là ngoại ký sinh trùng như ve, mò, bọ chét, chấy, rận... thông qua vật chủ trung gian là động vật gặm nhấm và thú nhỏ như chuột, sóc, chồn, cáo... Trong nghiên cứu này, thành phần loài gặm nhấm và ngoại ký sinh trùng đã được khảo sát, đồng thời các kỹ thuật phát hiện *Rickettsia* cũng được thực hiện. Trong năm 2018, 83 mẫu chuột đã được thu thập tại 2 xã Thanh Đức Và Phú Linh của huyện Vị Xuyên, tỉnh Hà Giang trong đó 48,2% là chuột nhà *Rattus flavipectus*, 21,7% là chuột rừng *R. rattus*, 12% là chuột hươu bé *R. fulvescens*, 8,4% là chuột bông *R. nitidus*, còn lại rải rác là các loài chuột puộc *Berylmus bowersi*, chuột nhắt nương *Mus pahari*, *Leopoldamys sabanus*, *Mus musculus* và *R. niviventer* chiếm tỷ lệ từ 1,2% đến 3,6%. Về ngoại ký sinh trùng đã thu thập, xác định được 5 loài mò gồm: *Leptotrombidium (Leptotrombidium) deliense*, *Ascoschoengastia (Laurentella) indica*, *Garhliepia (Walchia) rustica*, *Lorilutum oreophilum* và *Shunsenia sp* và 3 loài mạt ký sinh trên chuột là *Laelaps (Echidninus) sedlaceki*, *Laelaps (Laelaps) nuttali* và *Lenstivalius klossi bispinifomis*. Bằng kỹ thuật real-time PCR cho thấy 19,3% chuột dương tính với *Rickettsia* nhóm sốt nổi mụn (SFG) và 10,8% chuột dương tính với *Rickettsia typhi*. 19,4% cá thể chuột, 10% mẫu mò dương tính với *Orientia tsutsugamushi* bằng nested PCR, trong đó có loài mò *L. (L.) deliense* ký sinh trên chuột nhà *R. flavipectus*.

**Từ khóa:** chuột, mò, nested PCR, *O. tsutsugamushi*, real-time PCR, *Rickettsia* spp.

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh sốt do *Rickettsia* là bệnh truyền từ động vật sang người, tác nhân gây bệnh là vi khuẩn gram (-), ký sinh nội bào bắt buộc thuộc chi *Rickettsia*. Bệnh được lây truyền thông qua vector truyền bệnh là các loài động vật thuộc

ngành chân khớp bao gồm: ve, mò, bọ chét, chấy rận... (Blanda V *et al.*, 2017, Parola *et al.*, 2013). Bệnh sốt do *Rickettsia* được chia thành các nhóm khác nhau dựa vào đặc điểm lâm sàng và tác nhân gây bệnh. Hai nhóm bệnh được nhiều tác giả sử dụng gồm sốt phát ban (Typhus group rickettsia-TG) do các tác nhân:

*Rickettsia typhi*, *Rickettsia prowazekii* và *R. canada* và vector truyền bệnh là bọ chét chuột *Xenopsylla cheopis*; nhóm sốt nổi mụn (Spotted fever group-SFG), có khoảng 20 tác nhân *Rickettsia* khác nhau do bọ chét, chấy rận hoặc mạt truyền (Parola *et al.*, 2013). Bệnh sốt mò (scrub typhus) gây ra bởi vi khuẩn *Orientia tsutsugamushi* thông qua vector truyền bậy là ấu trùng mò. Bệnh sốt do *Rickettsia* và *O. tsutsugamushi* lưu hành và gây dịch ở nhiều nơi trên thế giới. Biểu hiện lâm sàng của bệnh đa dạng, có thể gây nguy hiểm đến tính mạng, phụ thuộc vào từng loài *Rickettsia* bị nhiễm. Hiện nay, có rất nhiều các nghiên cứu về *Rickettsia* tại Việt Nam như nghiên cứu sự lưu hành các kháng thể kháng *Rickettsia* trên người khỏe mạnh ở miền Bắc Việt Nam (Vu *et al.*, 2017), nghiên cứu phát hiện DNA vi khuẩn *Rickettsia* trên thú nhỏ và động vật gặm nhấm tại Hà Nội (Hotta *et al.*, 2014), hay trên ngoại ký sinh trùng như ve, mò, mạt tại Lâm Đồng (Lê Thành Đồng *et al.*, 2017). Tuy nhiên, các nghiên cứu sự lưu hành của *Rickettsia* tại các khu vực có địa hình phức tạp như Hà Giang chưa được chú trọng nhiều. Địa bàn tỉnh Hà Giang có vị trí địa lý phức tạp giáp Biên giới, sự giao thoa giữa các tác nhân dễ xảy ra do đó có nguy cơ lây nhiễm các bệnh lây truyền từ động vật sang người cao. Nghiên cứu của tác giả Nguyễn Văn Minh và đồng tác giả, 2017 cho thấy đã phát hiện thấy DNA của vi khuẩn *O. tsutsugamushi* trong các mẫu máu bệnh nhân sốt không rõ nguyên nhân thu thập được tại Bệnh viện Đa Khoa tỉnh Hà Giang (Nguyễn Văn Minh *et al.*, 2017).

Các phương pháp sinh học phân tử cho phép phát hiện DNA của các loài *Rickettsia* như PCR (Tzianabos *et al.*, 1989; Phan *et al.*, 2011; Do Amaral *et al.*, 2018; Bartlett *et al.*, 2004), nested PCR (Prakash *et al.*, 2006; Kamani *et al.*, 2015) hay real-time PCR (Labruna *et al.*, 2009) đã được nghiên cứu. Nguyên lý của các phương pháp này là dựa vào các trình tự gen đặc hiệu cho từng loài hay nhóm *Rickettsia* như *gltA* (citrate synthase protein), 17kDa (17 kDa lipoprotein precursor antigen gene) dùng để phát hiện *Rickettsia*

nhóm sốt phát ban, *OmpA* (outer membrane proteins A) và *OmpB* (outer membrane proteins B) phát hiện *Rickettsia* nhóm sốt nổi mụn (Do Amaral *et al.*, 2018; Kamani *et al.*, 2015; Ishikura M *et al.*, 2004; Prakash *et al.*, 2012), gen 56 kDa (56 kDa type specific antigen) phát hiện sốt mò *O. tsutsugamushi* (Nguyễn Văn Minh *et al.*, 2017). Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng phương pháp nested PCR phát hiện DNA của *O. tsutsugamushi* và phương pháp real-time PCR phát hiện DNA của *Rickettsia* SFG và *Rickettsia typhi*.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu ngoài thực địa: chúng tôi lựa chọn 2 địa bàn xã thuộc huyện Vị Xuyên, tỉnh Hà Giang gồm xã Thanh Đức và xã Phú Linh đặc trưng cho sinh cảnh thuộc vùng biên giới của tỉnh Hà Giang.

Nghiên cứu trong phòng thí nghiệm: (i) Các xét nghiệm sinh học phân tử được tiến hành tại Phòng thí nghiệm Độc học và Các bệnh nhiệt đới, Viện Y sinh nhiệt đới, Trung tâm nhiệt đới Việt – Nga; (ii) Các nghiên cứu về định loại ngoại ký sinh trùng gồm ve, mò, mạt được thực hiện tại phòng thí nghiệm của Viện Sốt rét, Côn trùng và Ký sinh trùng Trung ương và phòng thí nghiệm Độc học và các bệnh nhiệt đới, Viện Y sinh nhiệt đới, Trung tâm nhiệt đới Việt-Nga.

### Thời gian nghiên cứu

Đợt 1 được tiến hành trong tháng 6 năm 2018, đợt 2 được tiến hành trong tháng 10 năm 2018.

### Đối tượng nghiên cứu

Vật chủ của các ngoại ký sinh trùng: Chuột.

Các loại ngoại ký sinh trùng: Ve, mò, mạt, bọ chét trên chuột.

Vi khuẩn gây bệnh: *O. tsutsugamushi*, *Rickettsia* SFG và *Rickettsia typhi*.

### Phương pháp nghiên cứu điều tra thực địa

Thiết kế nghiên cứu: nghiên cứu mô tả cắt ngang, kết hợp với hồi cứu.

Điều tra chuột và mò theo phương pháp cắt ngang, mô tả và phân tích: Định loại gặm nhấm theo Đặng Huy Huỳnh và đồng tác giả, 2008 (các mẫu chuột thu thập được đo kích thước và khối lượng, chuột được định loại dựa vào đặc điểm hình thái gồm màu lông, độ cứng của lông, chiều dài thân và đuôi, đặc điểm bàn chân... Định loại ve, mò mạt theo Nguyễn Văn Châu và đồng tác giả, 2007, 2016. Các mẫu ve mò mạt được xử lý và cố định trên lam kính và soi dưới kính hiển vi. Dựa vào các đặc điểm hình thái để định loại tên loài ve, mò, mạt.

Phương pháp thu thập chuột: sử dụng bẫy lồng kích thước 24 x 14 x 14 cm (theo phương pháp của Nguyễn Văn Châu *et al.*, 2011). Mỗi điểm nghiên cứu đặt bẫy 3 đến 5 đêm, mỗi đêm đặt khoảng 50 bẫy gồm bẫy đặt ở xung quanh hộ dân và đặt trên các nương, rẫy, trên rừng trên địa bàn nghiên cứu. Mỗi bẫy chuột là khoai lang, sắn hoặc bắp ngô tươi.

Phương pháp thu thập mò: thu thập mò trên chuột sau khi đã gây mê lấy huyết thanh. Dùng kim mũi mác gỡ mò ký sinh trên chuột (chủ yếu ở tai) cho vào tuýp chứa cồn 70 độ. Mò thu được ở từng con chuột đựng riêng từng tuýp có nhãn, nút chặt bằng bông không thấm nước rồi cho vào lọ nhựa có nắp bảo quản và đem về phòng thí nghiệm phân tích, định loại. Mò được gắn trên lam kính để định loại dưới kính hiển vi.

Phương pháp thu thập ve, mạt trên chuột tương tự như phương pháp thu thập mò.

### Tách chiết DNA từ các mẫu chuột và ngoại ký sinh trùng

Nội tạng chuột gồm hỗn hợp gan và thận trong đệm PBS 1x, pH7,4 được xử lý tạo dung dịch đồng nhất bằng máy nghiền mẫu Tissue lyzer, tần số - 50 Hz/s; thời gian đồng nhất là 10 phút (Qiagen, Đức). Dịch đồng nhất được tiến hành tách chiết DNA tổng số sử dụng bộ kit G-spin total DNA extraction (Intron, Hàn Quốc).

Quy trình tách chiết DNA được tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

### Phương pháp real-time PCR phát hiện *Rickettsia* SFG và *Rickettsia typhi*

Bộ kit *Rickettsia* SFG và *Rickettsia typhi* real-time PCR (Amplisens, LB Nga) được sử dụng cho phát hiện DNA của *Rickettsia* nhóm sốt nổi mụn và *Rickettsia typhi*. Đây là bộ kit do Viện Dịch tễ Trung Ương Liên Bang Nga sản xuất và chỉ dùng trong xét nghiệm phát hiện *Rickettsia* SFG và *Rickettsia typhi* nội bộ, không thương mại hoá. Thành phần phản ứng trong 25 µL tổng thể tích có 10 µL hỗn hợp PCR 1; 4,5 µL hỗn hợp PCR 2; 0,5 µL 0,02 mM DNA Taq F polymerase; 10 µL DNA. Chương trình PCR được tiến hành như sau: 95°C trong 15 phút (1 chu kỳ), (95°C trong 10 giây, 60°C trong 20 giây) x 45 chu kỳ. Kênh phát huỳnh quang (FAM/Green, JOE/Yellow) được sử dụng trong bộ kit *Rickettsia* SFG real-time PCR và (FAM/Green, ROX/Orange) được sử dụng trong bộ kit *Rickettsia typhi* real-time PCR.

### Phương pháp nested PCR phát hiện DNA của *O. tsutsugamushi*

Phương pháp nested PCR phát hiện DNA của *O. tsutsugamushi* trong các mẫu nội tạng chuột được thực hiện theo phương pháp của Nguyễn Văn Minh và cộng sự, 2017. Mỗi sử dụng cho phản ứng nested PCR được thiết kế dựa vào gen đặc hiệu 56 kDa của *O. tsutsugamushi*. Phản ứng Nested PCR phát hiện nhóm sốt mò do *O. tsutsugamushi* được tiến hành sử dụng 2 cặp mồi p34: 5' ATTGCTAGTGCAATGTCTGC 3' và P55: 5' CTGCTGTGCTTGCTGCG 3'; P10: 5' CCTCAGCCTACTATAATGCC 3' và P11: 5' CGACAGATGCACTATTAGGC 3'. Phản ứng Nested PCR được tiến hành như sau: 5 µL ADN tổng số được dùng làm khuôn để tiến hành PCR với vòng 1 với cặp mồi P34 và P55 cho tổng số 25 µl phản ứng. Phản ứng được biến tính ở 94°C trong 3 phút; tiếp theo là 30 chu kỳ phản ứng của 94°C trong 20 giây, 61°C trong 30 giây, 72°C trong 2 phút, phản ứng được kết thúc với chu kỳ kéo dài chuỗi ở 72°C trong 5 phút. 2,5 µL sản phẩm PCR của vòng 1 được sử dụng làm khuôn cho PCR vòng 2 với cặp mồi P10 và P11

cho tổng số 25  $\mu$ L phản ứng. Hỗn hợp phản ứng được biến tính ở 94°C trong 3 phút; tiếp theo là 30 chu kỳ phản ứng của 94°C trong 20 giây, 61°C trong 30 giây, 72°C trong 40 giây, phản ứng được kết thúc với chu kỳ kéo dài chuỗi ở 72°C trong 5 phút sản phẩm PCR có kích thước 483 – 507 bp.

### Đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu của đề tài đã được Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu y sinh học của Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga thông qua. Ngoài ra, nghiên cứu được tiến hành trên các loài động vật gặm nhấm và ngoại ký sinh trùng, không tác động đến con người nên không gây hại cho người.

### KẾT QUẢ

#### Thu thập và định loài chuột và ngoại ký sinh trùng

Trong đợt 1 tiến hành vào tháng 6 năm 2018, chúng tôi đã thu thập được 29 mẫu chuột và ngoại ký sinh trùng gồm ve, mò mạt ký sinh trên chuột tại xã Thanh Đức. Đợt 2 được tiến hành vào tháng 10 năm 2018, kết quả thu thập

được 54 mẫu chuột và ngoại ký sinh trùng tại xã Thanh Đức và xã Phú Linh, huyện Vị Xuyên, tỉnh Hà Giang. Tổng số 83 mẫu chuột thu thập được định loại theo Bộ gặm nhấm - Động vật chí Việt Nam (Nguyễn Văn Châu *et al.*, 2016). Ngoại ký sinh trùng trên chuột gồm ve, mò, mạt, bọ chét được định loại theo tài liệu của Viện Sốt rét - Côn trùng - Ký sinh trùng Trung ương (Nguyễn Văn Châu *et al.*, 2007, 2016).

Kết quả thu thập và định loại 83 mẫu chuột và ngoại ký sinh trùng trên chuột trong bảng 1 cho thấy thành phần loài chuột thu thập tại địa bàn huyện Vị Xuyên, tỉnh Hà Giang khá đa dạng. Trong số 83 mẫu chuột có 9 loài chuột khác nhau đã được tìm thấy (bảng 1), chủ yếu là chuột nhà *R. flavipectus* (40/83 con, chiếm 48,2%), tiếp theo là chuột rừng *R. rattus* (18/83 con, chiếm 21,7%), chuột hươu bé *R. fulvescens* (10/83 con, chiếm 12%), chuột bóng *R. nitidus* (7/83 con, chiếm 8,4%), còn lại rải rác là các loài chuột puộc *B. bowersi* (3 con), chuột nhắt nương *Mus pahari* (1 con), *Leopoldamys sabanus* (2 con), *Mus musculus* (1 con) và *R. niviventer* (1 con).

**Bảng 1.** Kết quả điều tra định loại chuột và ngoại ký sinh trùng.

STT	Tên loài chuột	Địa điểm lấy mẫu		Tổng (con)	Ngoại ký sinh trùng (số chuột có (NKS))				
		Xã Thanh Đức	Xã Phú Linh		Ve	Rận	Mò	Mạt	Bọ chét
1	<i>R. flavipectus</i>	37	3	40	1	0	11	7	1
2	<i>R. rattus</i>	10	8	18	1	1	10	3	0
3	<i>R. fulvescens</i>	6	4	10	1	0	5	2	0
4	<i>R. nitidus</i>	6	1	7	0	0	3	0	0
5	<i>B. bowersi</i>	3	0	3	0	0	2	1	0
6	<i>Mus pahari</i>	1	0	1	0	0	0	0	0
7	<i>L. sabanus</i>	1	1	2	0	0	1	0	0
8	<i>Mus musculus</i>	1	0	1	0	0	1	0	0
9	<i>R. niviventer</i>	0	1	1	0	0	1	0	0
<b>Tổng</b>		<b>65</b>	<b>18</b>	<b>83</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>33</b>	<b>13</b>	<b>1</b>

Điều tra ngoại ký sinh trùng trên các mẫu chuột cho thấy trên 40% chuột thu thập có mò. Trong 9 loài chuột thu thập được, nhóm chuột thuộc loài *R. flavipectus* có số ngoại ký sinh nhiều nhất gồm cả ve, mò, mạt, và bọ chét. Cụ thể, trong số 40 cá thể chuột thuộc loài *R. flavipectus*, có 11 cá thể có mò, 7 cá thể có mạt, 1 cá thể có ve và 1 cá thể có bọ chét trong đó có 3 cá thể có cả mò và mạt. Tiếp đến là loài chuột *R. rattus*, trong số 18 cá thể có tới 10 cá thể có mò, 3 cá thể có mạt, 1 cá thể có ve và 1 cá thể có rận. Thứ ba là loài chuột *R. fulvescens*, trong 10 cá thể thuộc loài này thì có 5 cá thể có mò, 2 cá thể có mạt và 1 cá thể có ve. Các loài chuột còn lại do số lượng cá thể ít nên số lượng ngoại ký sinh trùng thu thập được không đáng kể.

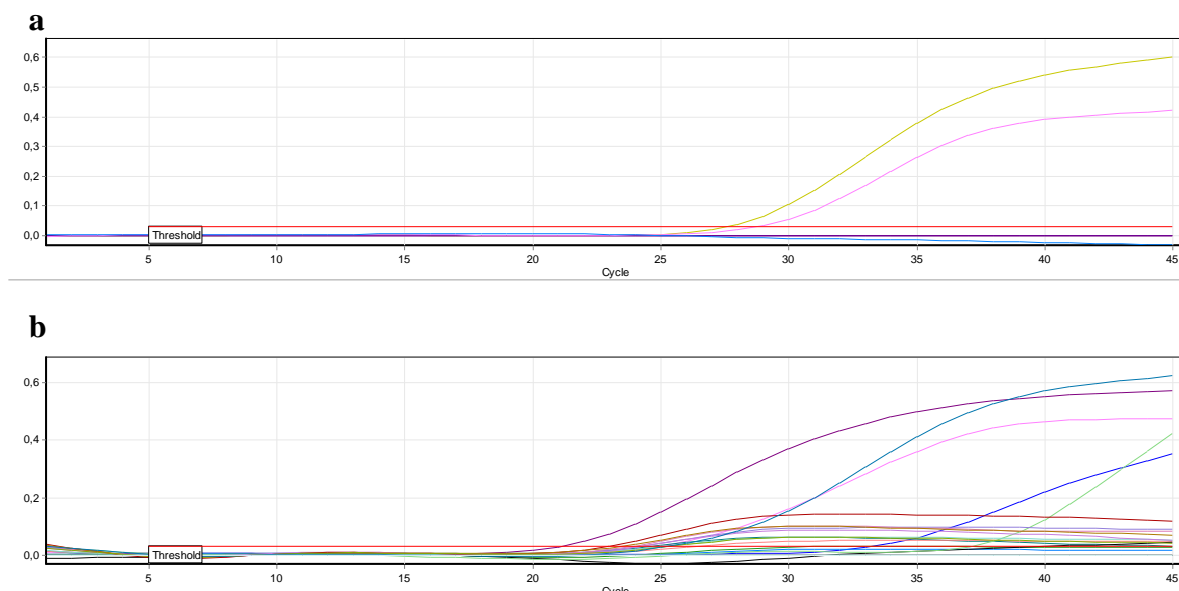
Các mẫu ngoại ký sinh trùng được xử lý và định loại. Kết quả cho thấy đã phát hiện thấy 5 loài mò gồm *L. (L.) deliense*, *As (L.) indicase*, *G. (W.) rustica*, *Lorilutum oreophilum* và *Shunsenia sp* trong đó loài mò *L. (L.) deliense* chiếm tỷ lệ nhiều nhất, tiếp đến là loài mò *A. (L.) indica* và *G. (W.) rustica*. Kết quả định loại mạt cho thấy phát hiện có 3 loài mạt ký sinh trên chuột là *Lac. (E.) sedlaceki*, *Laelaps (Laelaps) nuttali* và *Lenstivalius klossi bispiniformis*. Trong đó chủ yếu là loài mạt *Lac. (E.) sedlaceki*. Trong số ngoại ký

sinh trùng, chỉ có 1 mẫu chuột *R. rattus* có rận ăn lông Mallophaga (chưa định loại tên loài).

Kết quả điều tra cho thấy, không chỉ các loài chuột trên địa bàn huyện Vị Xuyên tỉnh Hà Giang đa dạng về thành phần loài, mà cơ cấu và thành phần loài ngoại ký sinh trùng cũng tương đối đa dạng. Mặc dù, mẫu vật ngoại ký sinh trùng chỉ phân loại một phần ba tổng số mẫu thu thập, còn lại dùng để phân tích PCR phát hiện *O. tsutsugamushi*.

### Phát hiện DNA *Rickettsia SFG* và *Rickettsia typhi* trên chuột

Bằng phương pháp real-time PCR, DNA của *Rickettsia* được phát hiện trong các mẫu nội tạng chuột. Các mẫu dương và âm được đánh giá dựa vào chu kỳ ngưỡng (giá trị Ct) của mẫu nghiên cứu với kênh phát huỳnh quang là yellow với bộ kit *Rickettsia SFG* Real-time PCR, kênh huỳnh quang là orange với bộ kit *Rickettsia typhi* Real-time PCR. Theo hướng dẫn của nhà sản xuất, các mẫu có giá trị Ct dưới 40 được kết luận là dương tính với *Rickettsia* và các mẫu có giá trị Ct  $\geq 40$  được kết luận là âm tính với *Rickettsia*. Giá trị Ct của các mẫu khảo sát được trình bày trong hình 1, kết quả real-time PCR được tổng hợp trong Bảng 2.



Hình 1. Biểu đồ chu kỳ ngưỡng phát hiện *Rickettsia SFG* (a) và *Rickettsia typhi* (b).

**Bảng 2.** Kết quả phát hiện *Rickettsia* và *O. tsutsugamushi* trên chuột.

Tác nhân gây bệnh	<i>Rickettsia</i> SFG		<i>Rickettsia typhi</i>		<i>O. tsutsugamushi</i>	
Phương pháp phát hiện	Real-time PCR (n=83)		Real-time PCR (n=83)		Nested PCR (n=67)	
Kết quả (n)	Dương tính	Âm tính	Dương tính	Âm tính	Dương tính	Âm tính
Tỷ lệ (%)	16	67	9	74	13	54
	19,3	80,7	10,8	89,2	19,4	80,6

Ghi chú: n là số mẫu nội tạng chuột được xét nghiệm.

Kết quả real-time PCR trên Bảng 2 cho thấy, trong 83 mẫu chuột có 16 mẫu dương tính với *Rickettsia* SFG, chiếm tỷ lệ 19,3 % và 9 mẫu dương tính với *Rickettsia typhi*, chiếm tỷ lệ 10,8%, trong đó có 22 mẫu chuột được thu thập tại xã Thanh Đức và 3 mẫu chuột thu thập tại xã Phú Linh. Các mẫu chuột dương tính với *Rickettsia* chủ yếu là chuột nhà *R. flavipectus* (17 mẫu), còn lại 3 mẫu trên chuột lương bé *R. funvescens*, 4 mẫu trên chuột rừng *R. rattus* và 1 mẫu trên chuột *B. bowersi*.

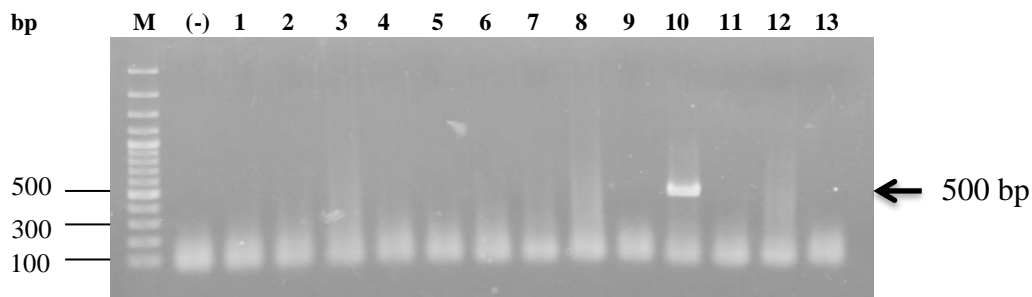
#### Phát hiện DNA *O. tsutsugamushi* trên chuột và ngoại ký sinh trùng

Để xét nghiệm phát hiện *O. tsutsugamushi* trên các mẫu chuột thu thập được, 67 mẫu nội tạng chuột đã được sử dụng. Bên cạnh đó, các mẫu mò ký sinh trên chuột cũng được tiến hành nested PCR. Tuy nhiên, do số lượng mò trên các cá thể chuột là khác nhau, có những mẫu chuột chứa rất ít mò và chỉ đủ cho thí nghiệm định loại mò. Do vậy, mặc dù có nhiều cá thể chuột có mò nhưng chỉ có 10 mẫu chuột chứa nhiều mò được sử dụng để tiến hành tách chiết DNA và

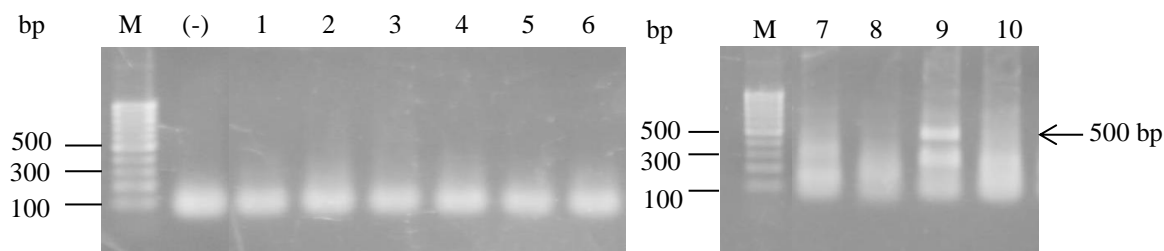
nested PCR phát hiện *O. tsutsugamushi*. Bằng kỹ thuật nested PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu cho gen 56 kDa của *O. tsutsugamushi*, 67 mẫu nội tạng chuột và 10 mẫu mò đã được xét nghiệm. Theo tính toán, các mẫu dương tính với *O. tsutsugamushi* sẽ tạo sản phẩm PCR có kích thước khoảng 483-507 bp. Kết quả được minh họa trong Hình 2, số liệu được tổng hợp trong Bảng 2.

Kết quả nested PCR cho thấy đã phát hiện 13/67 mẫu nội tạng chuột dương tính với *O. tsutsugamushi* chiếm tỷ lệ 19,4% (Bảng 2), trong đó có 7 mẫu là chuột nhà *R. flavipectus*, 4 mẫu là *R. rattus*, 1 mẫu là *B. bowersi* và 1 mẫu *Mus pahari*. Trong 13 mẫu dương tính với *O. tsutsugamushi*, có 10 mẫu được thu thập tại xã Thanh Đức và 3 mẫu thu thập tại xã Phú Linh.

Xét nghiệm nested PCR trên 10 mẫu mò ký sinh trên chuột cho thấy có 1 mẫu dương tính với *O. tsutsugamushi*, chiếm tỷ lệ 10%. Kết quả định loại mò cho thấy mẫu mò dương tính với *O. tsutsugamushi* thuộc loài mò *L. (L.) deliense* ký sinh trên chuột nhà *R. flavipectus*.



**Hình 2.** Kết quả phát hiện DNA *O. tsutsugamushi* trong các mẫu nội tạng chuột. M: Thang DNA chuẩn 100 bp (Thermo), giếng (-): đối chứng âm (nước được sử dụng thay cho DNA khuôn), giếng 1 - 13: các mẫu DNA tách chiết từ nội tạng chuột.



**Hình 3.** Kết quả phát hiện DNA *O. tsutsugamushi* trong các mẫu mò. M: Thang DNA chuẩn 100 bp (Thermo), giếng (-): đối chứng âm (nước được sử dụng thay cho DNA khuôn), giếng 1 - 10: các mẫu DNA tách chiết từ mẫu mò.

### THẢO LUẬN

Kết quả điều tra thành phần loài động vật gặm nhấm và ngoại ký sinh trùng tại huyện Vị Xuyên, tỉnh Hà Giang cho thấy có sự đa dạng cao về thành phần loài. Trong 83 cá thể chuột đã phát hiện thấy 9 loài chuột khác nhau, chủ yếu là chuột nhà *R. flavipectus* (40 con, chiếm tỷ lệ 48,2%), tiếp theo là chuột rừng *R. rattus* (18 con, chiếm 21,7%), chuột hươu bé *R. fulvescens* (10 con, chiếm 12%), còn lại là các loài chuột bóng *R. nitidus* (8,4%), chuột puộc *B. bowersi*, chuột nhắt nướng *Mus pahari*, *Leopoldamys sabanus*, *Mus musculus* và *R. niviventer* chiếm tỷ lệ thấp từ 1,2% đến 3,6%. Tuy nhiên, hiện nay chưa có công bố nào về thành phần loài động vật gặm nhấm đặc biệt là chuột tại địa bàn tỉnh Hà Giang. Điều tra ngoại ký sinh trùng đã phát hiện thấy 5 loài mò gồm *L. (L.) deliense*, *As (L.) indicase*, *G. (W.) rustica*, *Lorilutum oreophilum* và *Shunsenia sp* và 3 loài mạt ký sinh trên chuột là *Lac. (E.) sedlaceki*, *Laelaps (Laelaps) nuttali* và *Lenstivalius klossi bispiniformis*. Đây là những loài mò, mạt đã được công bố tại Việt Nam cũng như trên thế giới, trong đó có loài mò *L. (L.) deliense*, *As (L.) indicase* đã được chứng minh là nguyên nhân gây bệnh sốt mò (Frances *et al.*, 2000) và loài mạt *Lac. (E.) sedlaceki* là nguyên nhân gây bệnh sốt phát ban ở một số nước. Kết quả điều tra sự hiện diện của *Rickettsia SFG*, *Rickettsia typhi* và *O. tsutsugamushi* trên quần thể động vật gặm nhấm thu thập tại Hà Giang cho thấy 19,3% cá thể chuột dương tính với *Rickettsia SFG*, 10,8% dương tính với *Rickettsia typhi*. 19,4% (13/67) cá thể chuột dương tính với *O. tsutsugamushi* (Bảng 2). Kết quả nghiên cứu

sự lưu hành của vi khuẩn *O. tsutsugamushi* và vi khuẩn thuộc chi *Rickettsia* trên quần thể 519 con chuột thu thập tại khu vực Hà Nội cho thấy không tìm thấy cả thể chuột dương tính với chi *Rickettsia* và 1 tỷ lệ rất thấp 1,3% cá thể chuột dương tính với *O. tsutsugamushi* (Hotta *et al.*, 2016). Kết quả nghiên cứu gợi ý rằng huyện Vị Xuyên, tỉnh Hà Giang là khu vực có sự lưu hành *Rickettsia SFG*, *Rickettsia typhi* và *O. tsutsugamushi* cao hơn so với khu vực thành phố.

Kết quả nested PCR phát hiện *O. tsutsugamushi* trên các mẫu mò, mạt ký sinh trên chuột cho thấy 1/10 mẫu mò (10%) dương tính với *O. tsutsugamushi*. Đây là mò *L. (L.) deliense*, ký sinh trên chuột nhà *R. flavipectus* thu thập tại xã Phú Linh, huyện Vị Xuyên, tỉnh Hà Giang, không có mẫu mạt dương tính với *O. tsutsugamushi*. Nghiên cứu sự hiện diện của các động vật chân đốt gồm mò, mạt ký sinh trên chuột tại Lâm Đồng cho thấy không có mẫu mò nào dương tính với chi *Rickettsia*, 1,4% mẫu mò dương tính với *O. tsutsugamushi* và không có mẫu mạt nào dương tính với hai tác nhân trên (Lê Thành Đồng *et al.*, 2017). Kết quả này gợi ý rằng tỷ lệ nhiễm *O. tsutsugamushi* trên mò tại Hà Giang cao hơn nghiên cứu tại Lâm Đồng.

Trong 19 mẫu chuột dương tính với *Rickettsia SFG* và *Rickettsia typhi* có 15 mẫu được thu thập tại xã Thanh Đức và trong 13 mẫu dương tính với *O. tsutsugamushi* thì có 10 mẫu thu thập tại xã Thanh Đức. Như vậy, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy huyện Vị Xuyên, tỉnh Hà Giang, đặc biệt là 2 xã Thanh Đức và Phú Linh là địa bàn có nguy cơ lây nhiễm *Rickettsia spp.* và *O. tsutsugamushi* cao. Bên cạnh *Rickettsia*

*spp.* hay *O. tsutsugamushi*, các nghiên cứu trên thế giới cho thấy động vật gặm nhấm và ngoại ký sinh trùng còn là nguồn lây nhiễm nhiều loại tác nhân khác cho con người như *Leptospira*, *Bartonella*, *Borrelia*, *Coxiella*... (Leulmi *et al.*, 2016, Cortez *et al.*, 2018).

## KẾT LUẬN

Nghiên cứu cho thấy, trong 83 mẫu chuột thu thập được trong đó chủ yếu là chuột nhà *Rattus flavipectus*, tiếp theo là chuột rừng *R. rattus*, chuột hươu bé *R. fulvescens*, chuột bóng *R. nitidus*, còn lại rải rác là các loài chuột puộc *B. bowersi*, chuột nhắt nương *Mus pahari*, *Leopoldamys sabanus*, *Mus musculus* và *R. niviventer*. Kết quả điều tra ngoại ký sinh trùng đã phát hiện thấy 5 loài mò gồm *L. (L.) deliense*, *As. (L.) indica*, *G. (W.) rustica*, *Lorilutum oreophilum* và *Shunsenia sp* và 3 loài mạt ký sinh trên chuột là *Lac. (E.) sedlaceki*, *Laelaps (Laelaps) nuttali* và *Lenstivalius klossi bispiniformis*.

Bằng phương pháp real-time PCR và nested PCR cho thấy 19,3% cá thể chuột dương tính với *Rickettsia SFG*, 10,8% dương tính với *Rickettsia typhi*, 19,4% cá thể chuột, 10% mẫu mò dương tính với *O. tsutsugamushi*.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này sử dụng kinh phí của đề tài UBPH nghiên cứu hỗn hợp Việt-Nga nhiệm vụ M1.1-2, Viện Y sinh nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt-Nga.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Blanda V, Torina A, La Russa F, D'Agostino R, Randazzo K, Scimeca S, Giudice E, Caracappa S, Cascio A, de la Fuente J (2017) A retrospective study of the characterization of *Rickettsia* species in ticks collected from humans. *Ticks Tick Borne Dis* 8(4): 610-614.

Parola P, Paddock CD, Socolovschi C, Labruna MB, Mediannikov O, Kernif T, Abdad MY, Stenos J, Bitam I, Fournier PE, Raoult D (2013) Update on tick-borne rickettsioses around the world: A geographic approach. *Clin Microbiol Rev* 26(4): 657-702.

Trung NV, Hoi LT, Thuong NTH, Toan TK, Huong TTK, Hoa TM, Fox A, Kinh NV, van Doorn HR, Wertheim HFL, Bryant JE, Nadjm B (2017) Seroprevalence of scrub typhus, typhus, and spotted fever among rural and urban populations of northern Vietnam. *Am J Trop Med Hyg* 96(5): 1084-1087.

Hotta K, Pham HT, Hoang HT, Trang TC, Vu TN, Ung TT, Shimizu K, Arikawa J, Yamada A, Nguyen HT, Nguyen HL, Le MT, Hayasaka D (2016) Prevalence and phylogenetic analysis of *Orientia tsutsugamushi* in small mammals in Hanoi, Vietnam. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 16(2): 96-102.

Lê Thành Đồng, Đoàn Bình Minh, Phạm Nguyễn Thúy Vy (2017) Xác định sự hiện diện các vi khuẩn gây bệnh trên ve, mò, mạt. *Tạp chí Y học dự phòng* 157-165.

Nguyễn Văn Minh, Nguyễn Văn Tinh, Phạm Thị Hà Giang, Trịnh Văn Toàn, Dương Tuấn Linh, Võ Viết Cường (2017) Đặc điểm di truyền phân tử của vi khuẩn *Orientia tsutsugamushi* gây bệnh sốt mò ở một số tỉnh phía bắc. *Tạp chí KH&CN nhiệt đới* 13(11): 59-66.

Tzianabos T, Anderson BE, McDade JE (1989) Detection of *Rickettsia rickettsii* DNA in clinical specimens by using polymerase chain reaction technology. *J Clin Microbiol* 27(12): 2866-2868.

Phan JN, Lu CR, Bender WG, Smoak RM, Zhong J (2011) Molecular Detection and Identification of *Rickettsia* Species in *Ixodes pacificus* in California. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 11(7): 957-961.

Do Amaral RB, Lourenço EC, Famadas KM, Garcia AB, Machado RZ, André MR (2018) Molecular detection of *Bartonella* spp. and *Rickettsia* spp. in bat ectoparasites in Brazil. *PLoS One* 13(6): e0198629.

Bartlett JG (2004) *Rickettsia parkeri*: A newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the united states. *Infect Dis Clin Pract* 15; 38(6): 805-811.

Prakash J a J, Abraham OC, Mathai E (2006) Evaluation of tests for serological diagnosis of scrub typhus. *Trop Doct [Internet]* 36(4): 212-3.

Kamani J, Baneth G, Apanaskevich DA, Mumcuoglu KY, Harrus S (2015) Molecular detection of *Rickettsia aeschlimannii* in *Hyalomma* spp. ticks from camels (*Camelus dromedarius*) in Nigeria, West Africa. *Med Vet Entomol*. 29(2):205-209.



- Labruna MB, McBride JW, Bouyer DH, Camargo LMA, Camargo EP, Walker DH (2009) Molecular evidence for a spotted fever group *Rickettsia* species in the tick *Amblyomma longirostre* in Brazil. *J Med Entomol* 41(3): 533-7.
- Ishikura M, Ando S, Shinagawa Y, Matsuura K, Hasegawa S, Nakayama T, Fujita H, Watanabe M (2003) Phylogenetic analysis of spotted fever group *rickettsiae* based on *gltA*, *17-kDa*, and *rOmpA* genes amplified by nested PCR from ticks in Japan. *Microbiol Immunol* 2003.
- Prakash JA, Sohan Lal T, Rosemol V, Verghese VP, Pulimood SA, Reller M, Dumler JS (2012) Molecular detection and analysis of spotted fever group *Rickettsia* in patients with fever and rash at a tertiary care centre in Tamil Nadu, India. *Pathog Glob Health* 106(1): 40-45.
- Đặng Huy Huỳnh, Cao Văn Sung, Lê Xuân Cảnh, Phạm Trọng Anh, Lê Xuân Đăng, Hoàng Minh Khiên, Nguyễn Minh Tâm (2008) Động vật chí Việt Nam - Fauna of Vietnam, 25. Lớp thú (Mammalia: Primates, Carnivora, Artiodactyla, Perissodactyla, Rodentia). Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- Nguyễn Văn Châu, Đỗ Sĩ Hiên, Nguyễn Thu Vân (2007) Động vật chí Việt Nam – Fauna of Vietnam, 16. Họ mò đỏ *Trombiculidae*, Bộ bọ chét *Siphonaptera*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật: 306 trang.
- Nguyễn Văn Châu, Trần Thanh Dương (2016) Tài liệu định loại Ve (Ixodida: Ixodoidea), Mò (Prostigmata: Trombiculidae), Mạt (Mesostigmata: Gamasoidea) thường gặp ở Việt Nam. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
- Nguyễn Văn Châu, Nguyễn Mạnh Hùng, Hồ Đình Trung (2011) Thực hành kỹ thuật chân đốt y học. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
- Frances SP, P Watcharapichat, D Phulsuksombati, P. Tanskul (2000) Transmission of *Orientia tsutsugamushi*, the aetiological agent for scrub typhus, to co-feeding mites. *Parasitology* 120: 601–607.
- Leulmi H, Aouadi A, Bitam I, Bessas A, Benakhla A, Raoult D, Parola P (2016) Detection of *Bartonella tamiae*, *Coxiella burnetii* and *Rickettsiae* in arthropods and tissues from wild and domestic animals in northeastern Algeria. *Parasit Vectors* 20: 9:27.
- Valerie Cortez , Enrique Canal, J. Catherine Dupont-Turkowsky, Tatiana Quevedo, Christian Albuja, Ti-Cheng Chang, Gabriela Salmon-Mulanovich, Maria C. Guezala-Villavicencio, Mark P Simons, Elisa Margolis, Stacey Schultz-Cherry, Víctor Pacheco, Daniel G Bausch (2018) Identification of *Leptospira* and *Bartonella* among rodents collected across a habitat disturbance gradient along the Inter- Oceanic Highway in the southern Amazon Basin of Peru. *PLoS One* 13(10): e0205068.

## DETECTION OF DNA OF *RICKETTSIA* AND *ORIENTIA TSUTSUGAMUSHI* IN RODENTS AND ECTOPARASITES IN HA GIANG PROVINCE

Le Thi Lan Anh<sup>1</sup>, Vo Viet Cuong<sup>1</sup>, Trinh Van Toan<sup>1</sup>, Ho Thi Hong Nhung<sup>3</sup>, Le Thi Van Anh<sup>5,6</sup>, Can Thi Thu Thuy<sup>2</sup>, Pham Thi Ha Giang<sup>1</sup>, Bui Thi Thanh Nga<sup>1</sup>, Bui Thi Lan Anh<sup>1</sup>, Nguyen Van Chau<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Vietnam - Russia Tropical Center, Ministry of National Defence

<sup>2</sup>University of Science, Vietnam National University Hanoi

<sup>3</sup>Vietnam National University of Agriculture

<sup>4</sup>National Institute of Malaria Parasitology and Entomology

<sup>5</sup>Publishing House for Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology

<sup>6</sup>Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology

### SUMMARY

Rickettsial fever is one of a zoonotic disease which is caused by bacteria genus *Rickettsia*. The ectoparasites such as ticks, mites, fleas, lice... were demonstrated as the main transmitted vectors through host reservoirs are rodents and small animals including mice, squirrels, mink... In this study, the rodents and ectoparasites species were identified. The molecular detection of *Rickettsia*

was also performed. In 2018, 83 rats were trapped in 2 villages Thanh Duc and Phu Linh, Vi Xuyen district, Ha Giang province, in which 48.2% mice were found as house mice *Rattus flavipectus*, 21.7% was forest mice *R. rattus*, 12% was *R. fulvescens*, 8.4% was *R. nitidus*, the remaining rates were *R. bowersi*, *Mus pahari*, *Leopoldamys sabanus*, *Mus musculus* and *R. niviventer*, accounting for 1.2% - 3.6%. The ectoparasites survey found 5 chigger mite species including *Leptotrombidium (Leptotrombidium) deliense*, *Ascoschoengastia (Laurentella) indica*, *Garhliepia (Walchia) rustica*, *Lorilutum oreophilum* and *Shunsenia sp* as well as 3 gamasid mite species such as *Laelaps (Echidninus) sedlaceki*, *Laelaps (Laelaps) nuttali* and *Lenstivalius klossi bispiniiformis*. The result indicated that 19.3% and 10.8% mice were positive with *Rickettsia* spotted fever group (SFG) and *Rickettsia typhi*, respectively by real-time PCR. The nested PCR result showed that 19.4% *R. flavipectus* mice and 10% *L. (L.) deliense* chigger mites were positive with *Orientia tsutsugamushi*.

**Keywords:** mice, chigger mites, nested PCR, *O. tsutsugamushi*, Real-time PCR, *Rickettsia* spp.