



## Đặc điểm kiểu gen của BK polyomavirus trên bệnh nhân sau ghép thận ở miền Bắc Việt Nam

Đinh Thị Thu Hằng\*, Hoàng Xuân Sử

*Viện Nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y, Số 222 Phùng Hưng, Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam*

Nhận ngày 20 tháng 3 năm 2018

Chỉnh sửa ngày 16 tháng 4 năm 2018; Chấp nhận đăng ngày 12 tháng 6 năm 2018

**Tóm tắt:** BK polyomavirus (BKV) là virus cơ hội khá phổ biến ở người và được xem là nguyên nhân quan trọng của bệnh thận do BKV (BKV associated nephropathy, BKVN) ở bệnh nhân sau ghép thận. BKV có 4 kiểu gen khác nhau là I, II, III và IV. Công trình này đã phân tích kiểu gen của 6 chủng BKV từ 20 mẫu bệnh phẩm là huyết tương, nước tiểu của bệnh nhân sau ghép thận ở miền Bắc Việt Nam dựa trên trình tự gen *VP1*. Đoạn gen *VP1* (580 bp) được phân tích bằng BLAST (NCBI), Bioedit, đồng thời phần mềm MEGA7.0 được sử dụng để xây dựng và phân tích cây phát sinh loài. Một số đột biến điểm đã được xác định trên 6 chủng BKV so với chủng chuẩn BKV Dunlop, trong đó mẫu BKV1 có kiểu gen IVc1 xuất hiện nhiều đột biến nhất 39/580 nucleotide, cũng chính là mẫu từ bệnh nhân BKVN, các chủng BKV còn lại có kiểu gen I. Đây là nghiên cứu bước đầu về đặc điểm kiểu gen BKV, cung cấp cơ sở dữ liệu phân tử có giá trị góp phần giám sát BKV ở bệnh nhân ghép thận.

**Từ khóa:** BK polyomavirus, bệnh thận do BKV (BKVN), ghép thận, kiểu gen.

### 1. Mở đầu

BKV lần đầu tiên được phân lập từ nước tiểu của một bệnh nhân ghép thận bị hẹp niệu quản vào năm 1970 [1]. Nhưng phải đến 20 năm sau, BKV mới được công nhận là nguyên nhân chính của bệnh thận ở bệnh nhân sau ghép thận, bao gồm viêm bàng quang xuất huyết và không xuất huyết, hẹp niệu quản, viêm thận kẽ và thải ghép (gọi là bệnh thận do BKV - BKV associated nephropathy, BKVN) [2-4]. BKV là thành viên thuộc chi *Polyomavirus*, họ Polyomaviridae, bao gồm cả JC và Simian 40

virus (SV-40), là một loại virus khá phổ biến với tỷ lệ huyết thanh dương tính ở trẻ em trung bình là 80%, kháng thể xuất hiện sớm và miễn dịch bền vững [2]. Nhiễm BKV thường không có triệu chứng lâm sàng, tuy nhiên một số triệu chứng không đặc hiệu cũng đã được ghi nhận là sốt và viêm đường hô hấp trên thể nhẹ [4]. Trước thời kỳ sử dụng thuốc ức chế miễn dịch chống thải ghép là cyclosporine trong ghép thận, hẹp niệu quản là biến chứng thường gặp hơn BKVN. Sự tổn thương thận mạn tính do BKV dẫn đến xơ hóa mô kẽ của thận không thể hồi phục và teo ống thận. Hiện tượng mất mô thận ghép được ghi nhận ở 45% bệnh nhân BKVN [5]. Do đó, việc chẩn đoán sớm và ức chế hoàn toàn sự nhân lên của BKV ở bệnh nhân sau ghép thận bằng điều chỉnh thuốc ức

\* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-904194391.

Email: [hangdinhbio@gmail.com](mailto:hangdinhbio@gmail.com)

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4104>

chế miễn dịch là đích điều trị chính nhằm hồi phục cả về chức năng và hình thái thận ghép.

BKV là virus không có bao ngoài với hệ gen là DNA mạch kép dạng vòng, kích thước khoảng 5,1 kb, được chia thành 3 vùng chức năng: vùng kiểm soát sớm, vùng kiểm soát muộn và vùng kiểm soát phiên mã. Trong đó, vùng kiểm soát muộn được tập trung nhiều trong nghiên cứu phân tử BKV, đây là vùng mã hóa cho 3 protein cấu trúc là capsid VP1 (viral protein 1), VP2, VP3 và agnoprotein [6]. VP1 là protein cấu trúc chính của BKV, chiếm xấp xỉ 80% toàn bộ protein vỏ capsid, và vùng gen mã hóa VP1 cũng là căn cứ để phân loại BKV thành 4 kiểu gen từ I đến IV (genotype). Trên thế giới, trong 4 kiểu gen BKV, kiểu gen I (chủng chuẩn BKV Dunlop) chiếm tỷ lệ cao nhất (80%), tiếp theo là kiểu gen IV (15%) lưu hành chủ yếu ở châu Á và một số quốc gia châu Âu [7]. Đặc điểm kiểu gen BKV không những có giá trị về truy xuất nguồn gốc phát sinh, chẩn đoán phân tử mà còn có giá trị trong định hướng tiên lượng và điều trị BKVN ở bệnh nhân ghép thận [4, 6, 8-10]. Ở Việt Nam, các công trình nghiên cứu về BKV còn đang hạn chế, cho đến nay mới chỉ có một vài công bố về ca lâm sàng nhiễm BKV ở bệnh nhân ghép thận và chưa có nghiên cứu về kiểu gen [11-12]. Do đó, công trình này được thực hiện nhằm bước đầu phân tích đặc điểm kiểu gen của BKV trên những bệnh nhân sau ghép thận ở miền Bắc Việt Nam, làm cơ sở cho các nghiên cứu về dịch tễ học và chẩn đoán phân tử BKV.

## 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Mẫu bệnh phẩm

Mẫu huyết tương, nước tiểu được thu thập từ 20 bệnh nhân sau ghép thận có các triệu chứng bất thường về chức năng thận điều trị tại bệnh viện Quân y 103 và bệnh viện Việt Đức, trong đó có 1 bệnh nhân bị BKVN đã được khẳng định bằng sinh thiết mô bệnh học (mẫu ký hiệu BKV1). Các mẫu bệnh phẩm gồm 12 mẫu máu (ký hiệu BKV1-BKV5, BKV19-

BKV25) và 08 mẫu nước tiểu (ký hiệu BKV6-BKV13) được cung cấp nhờ hợp tác nghiên cứu giữa Viện Nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y và Khoa Thận, lọc máu - Bệnh viện Quân y 103, Học viện Quân y và Bệnh viện Việt Đức.

### 2.2. Tách chiết BKV DNA, PCR và tạo dòng gen *VPI*

200 µl mẫu huyết tương, nước tiểu (sau khi ly tâm 3.200 vòng/ phút trong 30 phút, thu cạn) được sử dụng để tách chiết BKV DNA theo quy trình bộ GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific, Mỹ). Cặp môi tạo dòng phục vụ để nhân gen *VPI* được thiết kế sử dụng phần mềm Primer3plus và Bioedit dựa trên các trình tự tham chiếu gen *VPI* BKV đã được công bố trên Genbank (Mã số AB263912, AB269868, AB269869, DQ989812, DQ989807, DQ989804, V01108), được đặt tổng hợp bởi hãng IDT (Mỹ) có trình tự BKVF: CTCACAGGACTGCTCCTCGAA và BKVR: GCACTCCCTGCATATCCTACCG. Phản ứng PCR khuếch đại gen *VPI* có thành phần như sau: Phusion HF buffer 5X (Thermo Scientific, Mỹ); 0,4 µM mỗi xuôi, mỗi ngược mỗi loại, 5 µl DNA khuôn, điều chỉnh H<sub>2</sub>O đủ thể tích 20 µl. Quá trình khuếch đại được thực hiện trên máy PCR Eppendorf Mastercycler proS (Đức) với chu trình: Biến tính 98°C/ 30 giây, tiếp theo là 35 chu kỳ (98°C/ 10 giây; 58°C/ 10 giây; 72°C/ 20 giây), sau đó hoàn thành kéo dài chuỗi ở 72° trong 7 phút. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1,2% TBE 0,5X, nhuộm ethidium bromide, chụp ảnh và lưu kết quả trên máy UVP Eppendorf. Sản phẩm PCR tinh sạch gen *VPI* được nối ghép trực tiếp với vector pGEMT-easy nhờ T4-ligase. Sản phẩm nối ghép được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5α (One Shot Max Efficiency DH5α, Invitrogen). Toàn bộ quy trình tạo dòng gen *VPI* được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Promega). Plasmid tái tổ hợp được tách chiết bằng kit Plasmid extraction (Bioneer, Hàn Quốc) và cắt kiểm tra bằng enzyme giới hạn *AvaII* và *EcoRI* (Thermo Scientific, Mỹ).

### 2.3. Giải trình tự và phân tích kiểu gen BKV

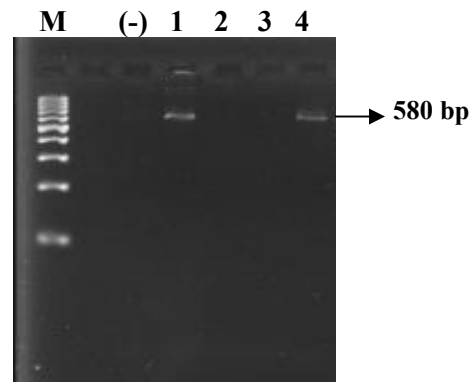
Các plasmid pGEMT-easy tái tổ hợp mang gen *VPI* được giải trình tự theo nguyên lý Sanger (máy ABI 3730XL) trên cả 2 chiều sử dụng môi của vector. Kết quả giải trình tự các chủng BKV phân lập ở Việt Nam được phân tích, so sánh với trình tự gen *VPI* của BKV trên Genbank bằng phần mềm BLAST (NCBI), Bioedit. Đồng thời, chúng tôi sử dụng phần mềm MEGA7.0 để xây dựng và phân tích cây phát sinh loài các chủng BKV phân lập ở Việt Nam theo phương pháp Maximum Likelihood (ML) với hệ số bootstrap lặp lại 1000 lần.

## 3. Kết quả

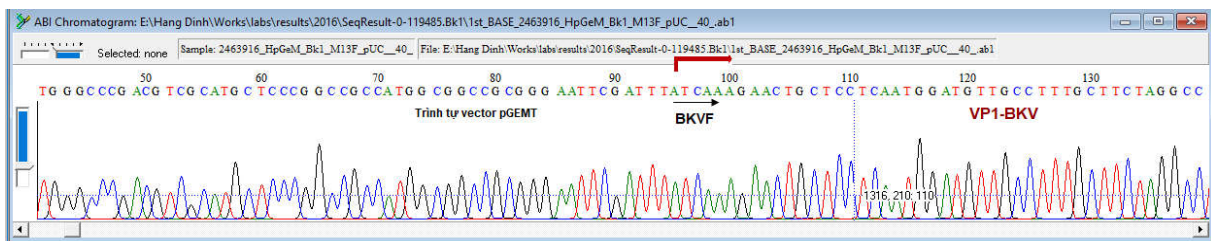
### 3.1. Phân lập gen *VPI* của BKV và phân tích trình tự

Sử dụng cặp môi được thiết kế đặc hiệu BKVF/BKVR đã phân lập thành công đoạn gen *VPI* BKV của 6/20 mẫu bệnh phẩm từ bệnh nhân sau ghép thận, trong đó có 4 mẫu bệnh

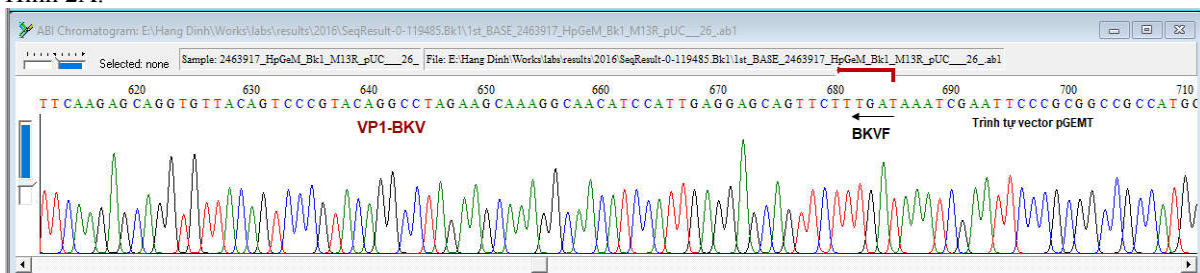
phẩm huyết tương (có ký hiệu là BKV1, 4, 5, 22), 2 mẫu bệnh phẩm nước tiểu (BKV6 và BKV10). Sản phẩm khuếch đại là một băng duy nhất rõ nét, có kích thước khoảng 580 bp đúng theo tính toán lý thuyết và không xuất hiện băng phụ (Hình 1).



Hình 1. Sản phẩm tổng hợp gen đích *VPI* BKV bằng Phusion DNA Polymerase trên gel agarose 1,2%. M: Thang DNA chuẩn 100 bp (Thermo Scientific, Mỹ); (-): Đối chứng âm là nước khử ion; 1- 4: Mẫu bệnh phẩm huyết tương ký hiệu BKV1-BKV4.



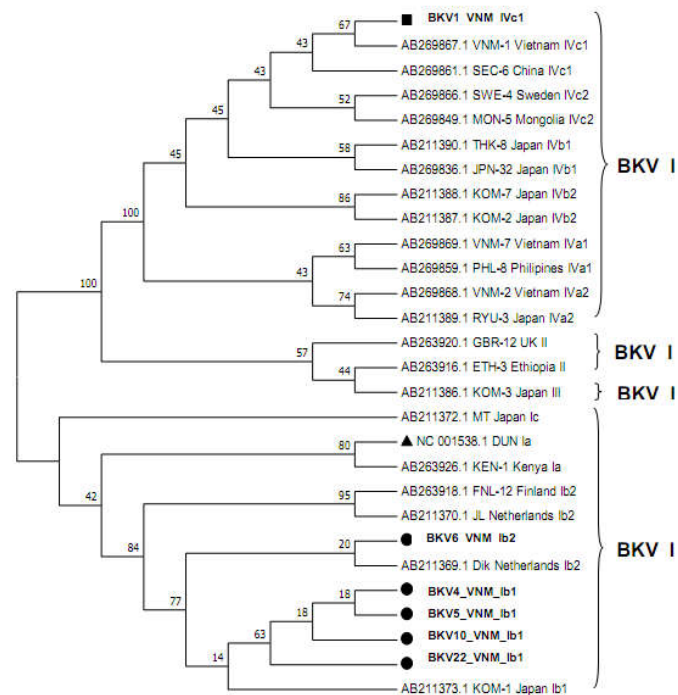
Hình 2A.



Hình 2B.

Hình 2. Một phần biểu đồ trình tự plasmid tái tổ hợp pGEMT chứa gen *VPI*-của mẫu BKV1 được đọc lần lượt với môi M13F\_pUC\_40 (Hình 2A) và M13R\_pUC\_26 (Hình 2B).





Hình 4. Cây phát sinh loài của trình tự gen *VPI* các chủng BKV phân lập ở miền Bắc Việt Nam với các chủng tham chiếu sử dụng phần mềm MEGA7 theo phương pháp Maximum Likelihood với hệ số bootstrap lặp lại 1000 lần, các chủng BKV trong nghiên cứu này được đánh dấu ■ và ●, chủng chuẩn Dunlop được đánh dấu ▲.

#### 4. Thảo luận

Bệnh thận do BKV là một vấn đề thách thức lâm sàng ở bệnh nhân sau ghép thận khi mà các lựa chọn trong điều trị còn hạn chế, phụ thuộc nhiều vào kinh nghiệm của bác sĩ. Việc theo dõi điều trị bệnh nhân sau ghép thận đóng vai trò rất quan trọng trong duy trì chức năng thận ghép, giảm thiểu tối đa nguy cơ mất mô ghép hay suy chức năng thận ghép [13-14].

Trong công trình này, chúng tôi đã phân tích đặc điểm kiểu gen của 6 chủng BKV trên bệnh nhân sau ghép thận ở Việt Nam để bước đầu có cơ sở dữ liệu cho nghiên cứu dịch tễ học phân tử cũng như phát triển kỹ thuật phân tử chẩn đoán BKV. Kết quả đã xác định được 6/20 mẫu bệnh nhân sau ghép thận dương tính với BKV bằng PCR khi sử dụng cặp mồi BKVF/R, trong đó có 2 kiểu gen là I và IV, với kiểu gen I chiếm tỷ lệ 83,3% (5/6). Hiện nay, có 4 kiểu gen của BKV đã được xác định là I-IV, trong

đó, phân tích phát sinh loài đã xác định thêm 4 phân nhóm của kiểu gen I (I/a, I/b-1, I/b-2 và I/c) và 6 phân nhóm của kiểu gen IV (IV/a-1, IV/a-2, IV/b-1, IV/b-2, IV/c-1 và IV/c-2) [15]. Sự phân bố của các phân nhóm này phụ thuộc vào các vùng địa lý khác nhau [4, 6]. Các nghiên cứu gần đây chỉ ra rằng, BKV kiểu gen I chiếm tỷ lệ khoảng 70% ở bệnh nhân ghép thận có BKV dương tính trong nước tiểu [8, 9, 16]. Nghiên cứu của Pastrana và cs. (2013) lại chỉ ra BKV kiểu gen IV chiếm tỷ lệ cao hơn ở bệnh nhân bị BKVN sau ghép thận so với bệnh nhân sau ghép chỉ có BKV dương tính trong máu và nước tiểu [17]. Theo đó, đặc điểm kiểu gen của BKV có thể có ý nghĩa trong tiên lượng BKVN ở bệnh nhân sau ghép thận. Nghiên cứu này cũng đã xác định được 1/6 chủng BKV có kiểu gen IV (mẫu BKV1), đây cũng chính là mẫu từ bệnh nhân bị BKVN. Cho đến trước nghiên cứu này, chưa có công trình nào về phân tích trình tự của gen *VPI* chủng BKV trên bệnh nhân sau

ghép thận ở Việt Nam. Đến nay, mới chỉ có 3 trình tự chủng BKV kiểu gen IV của Việt Nam đã được công bố trên Genbank (Mã số AB269867, AB269868, AB269869) nhưng được nghiên cứu ở Nhật Bản [18]. Kết quả phân tích trình tự gen *VPI* của các chủng BKV trong nghiên cứu này đã chứng minh có độ tương đồng cao trên 92%), là cơ sở di truyền phân tử rất có giá trị trong nghiên cứu thiết kế kỹ thuật real-time PCR phù hợp với các chủng BKV ở Việt Nam cũng như trên thế giới.

Trên thực tế, để xác định kiểu gen của BKV, gen *VPI* hoặc gen *LTA* (large T antigen, kháng nguyên T lớn) đã được nhiều công trình lựa chọn. Gen *VPI* mã hóa protein VP1 cùng với VP2, VP3 là những protein cấu trúc cần thiết cho sự lắp ráp tạo các virion hoàn chỉnh. Trong khi đó, gen *LTA* kích hoạt sự sao chép của virus thông qua sự gắn với các protein là Rb (retinoblastoma) ức chế khối u và p53, đồng thời kích thích tế bào chủ đi vào chu trình tế bào [19]. Tuy nhiên, gen *VPI* vẫn được ưu tiên sử dụng hơn bởi ngoài khả năng xác định được 4 kiểu gen chính còn có thể phân loại ra các phân nhóm của kiểu gen (4 và 6 phân nhóm tương ứng cho kiểu gen I và IV). Đồng thời, dựa trên sự đa dạng di truyền gen *VPI* còn cho phép phân biệt giữa BKV và JCV cũng như SV40 - là các virus cùng chi *Polyomavirus* [7, 20]. Chính vì vậy, gen *VPI* đã được lựa chọn trong nghiên cứu kiểu gen của BKV trong công trình này. Hai kiểu gen I và IV đã được xác định trong 6/20 mẫu dương tính với BKV của bệnh nhân sau ghép thận, đây cũng là 2 kiểu gen phổ biến ở trên thế giới. Tỷ lệ 6/20 mẫu BKV dương tính trên bệnh nhân sau ghép thận gợi ý rằng, Việt Nam cũng có thể là vùng dịch tễ lưu hành khá cao của BKV, tuy nhiên, để khẳng định điều này cần có những nghiên cứu trên quy mô lớn hơn.

## 5. Kết luận

Đã xác định được 2 kiểu gen là I và IV trên 6 chủng BKV phân lập được từ 20 mẫu huyết tương, nước tiểu bệnh nhân sau ghép thận ở

miền Bắc Việt Nam. Đây là cơ sở bước đầu nghiên cứu về đặc điểm dịch tễ học phân tử BKV, cung cấp cơ sở dữ liệu phân tử có giá trị góp phần giám sát BKV ở bệnh nhân sau ghép thận ở Việt Nam.

## Lời cảm ơn

Công trình này được hoàn thành nhờ sự hợp tác nghiên cứu giữa Viện Nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y và Khoa Thận, lọc máu - Bệnh viện Quân y 103, Học viện Quân y; Bệnh viện Việt Đức.

## Tài liệu tham khảo

- [1] Gardner, S.D., et al., *New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation*. Lancet, 1971. 1(7712): p. 1253-7.
- [2] Repleog, M.D., G.A. Storch, and D.B. Clifford, *Bk virus: a clinical review*. Clin Infect Dis, 2001. 33(2): p. 191-202.
- [3] Randhawa, P.S., et al., *Human polyoma virus-associated interstitial nephritis in the allograft kidney*. Transplantation, 1999. 67(1): p. 103-9.
- [4] Sawinski, D. and S. Goral, *BK virus infection: an update on diagnosis and treatment*. Nephrol Dial Transplant, 2015. 30(2): p. 209-17.
- [5] Hirsch, H.H., et al., *Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: critical issues of screening and management*. Adv Exp Med Biol, 2006. 577: p. 160-73.
- [6] Bechert, C.J., et al., *Monitoring of BK viral load in renal allograft recipients by real-time PCR assays*. Am J Clin Pathol, 2010. 133(2): p. 242-50.
- [7] Takasaka, T., et al., *Subtypes of BK virus prevalent in Japan and variation in their transcriptional control region*. J Gen Virol, 2004. 85(Pt 10): p. 2821-7.
- [8] Boukoum, H., et al., *Distribution of BK polyomavirus genotypes in Tunisian renal transplant recipients*. J Med Virol, 2011. 83(4): p. 725-30.
- [9] Ledesma, J., et al., *BK polyomavirus genotyping at inter- and intra-patient level in Spain*. J Med Virol, 2013. 85(8): p. 1402-8.
- [10] Schwarz, A., et al., *Viral Origin, Clinical Course, and Renal Outcomes in Patients With BK Virus*

- Infection After Living-Donor Renal Transplantation. *Transplantation*, 2016. 100(4): p. 844-53.
- [11] An, H.P.H., et al., *Cả lâm sàng nhiễm virus BK ở bệnh nhân sau ghép thận*. Tạp chí Nghiên cứu Y học, 2015. 93(1): p. 142-148.
- [12] Hùng, T. <http://benhvien198.vn/thong-bao-hai-truong-hop-nhiem-virus-bk-tren-benh-nhan-sau-ghiep-than-tai-benh-vien-19-8>. 2016.
- [13] Sharma, R., et al., BK Virus in Kidney Transplant: Current Concepts, Recent Advances, and Future Directions. *Exp Clin Transplant*, 2016. 14(4): p. 377-84.
- [14] Hayden, R.T., et al., Factors contributing to variability of quantitative viral PCR results in proficiency testing samples: a multivariate analysis. *J Clin Microbiol*, 2012. 50(2): p. 337-45.
- [15] Zhong, S., et al., Distribution patterns of BK polyomavirus (BKV) subtypes and subgroups in American, European and Asian populations suggest co-migration of BKV and the human race. *J Gen Virol*, 2009. 90(Pt 1): p. 144-52.
- [16] Matsuda, Y., Y. Qazi, and Y. Iwaki, A rapid and efficient method BK polyomavirus genotyping by high-resolution melting analysis. *J Med Virol*, 2011. 83(12): p. 2128-34.
- [17] Pastrana, D.V., et al., BK polyomavirus genotypes represent distinct serotypes with distinct entry tropism. *Journal of virology*, 2013. 87(18): p. 10105-10113.
- [18] Nishimoto, Y., et al., An Asian origin for subtype IV BK virus based on phylogenetic analysis. *J Mol Evol*, 2007. 65(1): p. 103-11.
- [19] Luo, C., et al., Genotyping schemes for polyomavirus BK, using gene-specific phylogenetic trees and single nucleotide polymorphism analysis. *J Virol*, 2009. 83(5): p. 2285-97.
- [20] Jin, L. and P.E. Gibson, *Genomic Function and Variation of Human Polyomavirus BK (BKV)*. *Rev Med Virol*, 1996. 6(4): p. 201-214.

## BK Polyomavirus Genotypes in Renal Transplant Recipients in Northern Vietnam

Dinh Thi Thu Hang, Hoang Xuan Su

*Institute of Biomedicine and Pharmacy, Vietnam Military Medical University,  
222 Phung Hung, Ha Dong, Hanoi, Vietnam*

**Abstract:** BK polyomavirus (BKV), a ubiquitous opportunistic infection among humans, causes BKV-associated nephropathy (BKVN) after renal transplantation. BKV strains worldwide are classified into 4 genotypes (I-IV), among which genotype I and IV are subdivided into 4 and 6 subtypes, respectively. Based on 580 bp-long *VPI* sequences, this study analyzed the genotypes of 6 BKV strains from 20 specimens including plasma and urine from renal allograft recipients in Northern Vietnam. The *VPI* genes of the BKV strains were analyzed by BLAST (NCBI), Bioedit, combined with MEGA7.0 software to construct and analyze the phylogenetic tree. Several mutations (8-39/ 580 nucleotides) were identified in all the 6 BKV strains compared to reference Dunlop BKV strain, among which BKV1 strain's subtype IVc1 (isolated from the BKVN patients) had the most mutation nucleotides (39/ 580). The remaining 5 strains of BKV belonged to genotype I. The study provides a valuable fundamental molecular database contributing to monitoring as well as screening strategies and treatment options for BKV in kidney allograft recipients in Vietnam.

**Keywords:** BK polyomavirus, BKV-associated nephropathy (BKVN), renal transplantation, genotype.