

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG

-----\*

DƯƠNG THỊ HIỀN

**MỘT SỐ CĂN NGUYÊN VI RÚT  
GÂY HỘI CHỨNG VIÊM NÃO CẤP TẠI TỈNH  
BẮC GIANG, 2004 - 2017**

**LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC**

**HÀ NỘI - 2020**

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG

-----\*-----

**DƯƠNG THỊ HIỂN**

**MỘT SỐ CĂN NGUYÊN VI RÚT  
GÂY HỘI CHỨNG VIÊM NÃO CẤP TẠI TỈNH  
BẮC GIANG, 2004 - 2017**

**Chuyên ngành: Vi sinh y học**

**Mã số: 62 72 01 15**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC**

*Người hướng dẫn khoa học :*

- 1. GS.TS. PHAN THỊ NGÀ**
- 2. TS. VIÊN QUANG MAI**

**HÀ NỘI - 2020**

## LỜI CẢM ƠN

Với lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành tới: GS.TS. Phan Thị Ngà, Nguyên trưởng Khoa Đào tạo và Quản lý Khoa học Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương và TS. Viên Quang Mai, nguyên Viện trưởng Viện Pasteur Nha Trang, là những người thầy đã tận tình hướng dẫn, giúp đỡ, động viên, khuyến khích tôi trong suốt quá trình xây dựng đề cương, thu thập số liệu, viết báo cáo và hoàn thiện luận án.

Tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới Ban lãnh đạo Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương; Khoa Vi rút, Trung tâm Đào tạo và Quản lý khoa học Viện Vệ sinh Dịch Tễ Trung ương; Phòng thí nghiệm Nagasaki-NIHE friendship; TS. Đỗ Phương Loan, các thầy cô trong chương trình đào tạo Nghiên cứu sinh đã tạo mọi điều kiện thuận lợi, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và hoàn thiện luận án.

Tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc Ban lãnh đạo Sở Y tế Bắc Giang; Bác sỹ CKII. Đặng Thanh Minh, Ban lãnh đạo Trung tâm Kiểm soát bệnh tật tỉnh Bắc Giang; Tập thể cán bộ Khoa Xét nghiệm, Khoa Kiểm soát bệnh truyền nhiễm Trung tâm Kiểm soát bệnh tật tỉnh Bắc Giang đã hỗ trợ, giúp đỡ tôi trong quá trình thu thập số liệu, luôn tạo điều kiện tốt nhất trong suốt quá trình nghiên cứu, hoàn thiện luận án.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành tới Bệnh Viện Đa khoa tỉnh Bắc Giang, Bệnh viện Đa khoa Khu vực Lục Ngạn, Bệnh viện Sản Nhi Bắc Giang đã hỗ trợ tôi trong quá trình nghiên cứu, thu thập số liệu cho luận án.

Tôi xin được cảm tạ những tình cảm vô bờ của bố mẹ, người thân trong gia đình, bạn bè, đồng nghiệp đã giúp đỡ và động viên tôi trong những ngày tháng học tập và nghiên cứu.

Hà Nội, ngày tháng năm 2020

**Dương Thị Hiền**

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi với sự hợp tác của đồng nghiệp và đã được sự đồng ý cho công bố luận án này.

Kết quả nghiên cứu trong luận án là trung thực và chưa từng công bố trong bất kỳ một công trình nào khác.

Tôi xin chịu hoàn toàn trách nhiệm về những lời cam đoan này.

**Tác giả luận án**

**Dương Thị Hiền**

## MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN	3
1.1. MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM CHUNG VỀ HỘI CHỨNG VIÊM NÃO CẤP	3
1.1.1. Một số khái niệm	3
1.1.2. Tình hình hội chứng viêm não cấp	3
1.1.3. Căn nguyên gây hội chứng viêm não cấp	7
1.1.4. Căn nguyên vi rút gây hội chứng viêm não cấp	7
1.2. ĐẶC ĐIỂM MỘT SỐ VI RÚT GÂY HỘI CHỨNG VIÊM NÃO CẤP	
1.2.1. Vi rút viêm não Nhật Bản	9
1.2.1.1. Đặc điểm cấu trúc	9
1.2.1.2. Đặc điểm ổ chứa, đường truyền	10
1.2.1.3. Đặc điểm dịch tễ	11
1.2.1.4. Đặc điểm lâm sàng	12
1.2.1.5. Đặc điểm phân tử	13
1.2.1.6. Chẩn đoán	15
1.2.1.7. Phòng và điều trị	15
1.2.2. Vi rút Banna	16
1.2.2.1. Đặc điểm cấu trúc	16
1.2.2.2. Đặc điểm ổ chứa, đường truyền	17
1.2.2.3. Đặc điểm dịch tễ	18
1.2.2.4. Đặc điểm lâm sàng	18
1.2.2.5. Đặc điểm phân tử	19
1.2.2.6. Chẩn đoán	20

1.2.2.7. Phòng và điều trị	20
1.2.3. Vi rút Nam Định	21
1.2.3.1. Đặc điểm cấu trúc	21
1.2.3.2. Đặc điểm ổ chứa, đường truyền	22
1.2.3.3. Đặc điểm dịch tễ	22
1.2.3.4. Đặc điểm lâm sàng	22
1.2.3.5. Đặc điểm phân tử	22
1.2.3.6. Chẩn đoán	23
1.2.3.7. Phòng và điều trị	23
1.2.4. Vi rút đường ruột	24
1.2.4.1. Đặc điểm cấu trúc	24
1.2.4.2. Đặc điểm ổ chứa, đường truyền	25
1.2.4.3. Đặc điểm dịch tễ	25
1.2.4.4. Đặc điểm lâm sàng	25
1.2.4.5. Đặc điểm phân tử	25
1.2.4.6. Chẩn đoán	28
1.2.4.7. Phòng và điều trị	28
1.2.5. Vi rút Herpes	29
1.2.5.1. Đặc điểm cấu trúc	29
1.2.5.2. Đặc điểm ổ chứa, đường truyền	29
1.2.5.3. Đặc điểm dịch tễ	30
1.2.5.4. Đặc điểm lâm sàng	31
1.2.5.5. Đặc điểm phân tử	31
1.2.5.6. Chẩn đoán	33
1.2.5.7. Phòng và điều trị	34

1.3. PHƯƠNG PHÁP CHẨN ĐOÁN VÀ NGHIÊN CỨU PHÂN TỬ VI RÚT	34
1.3.1. Phương pháp chẩn đoán	34
1.3.1.1. Phương pháp phân lập vi rút	35
1.3.1.2. Phương pháp miễn dịch Enzyme phát hiện IgM	36
1.3.1.3. Phương pháp PCr/Rt-PCR	37
1.3.2. Phương pháp nghiên cứu phân tử vi rút	38
1.3.2.1. Giải trình tự nucleotid thế hệ thứ nhất (Phương pháp Sanger)	39
1.3.2.2. Phương pháp giải trình tự gen thế hệ thứ hai (NGS)	39
1.3.2.3. Những ứng dụng của kỹ thuật giải trình tự nucleotid	40
1.3.3. Phần mềm tin y sinh học	40
CHƯƠNG 2: PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	42
2.1. Đối tượng nghiên cứu	42
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu mục tiêu 1	42
2.1.2. Đối tượng nghiên cứu mục tiêu 2	42
2.1.3. Tiêu chuẩn lựa chọn hoặc loại trừ đối tượng nghiên cứu	42
2.1.3.1. Tiêu chuẩn lựa chọn	42
2.1.3.2. Tiêu chuẩn loại trừ	43
2.2. Thời gian, địa điểm nghiên cứu	43
2.3. Phương pháp nghiên cứu	44
2.4. Phương pháp nghiên cứu mục tiêu 1	45
2.4.1. Thiết kế nghiên cứu	45
2.4.2. Biến số nghiên cứu	45
2.4.3. Phương pháp thu thập số liệu	46
2.4.3.1. Lựa chọn bệnh nhân có chẩn đoán lâm sàng HCVNC nghi do vi rút	46

2.4.3.2. Lấy mẫu xét nghiệm	46
2.4.3.3. Tiêu chuẩn xác định ca bệnh do vi rút	46
2.4.3.4. Vật liệu, trang thiết bị, hóa chất sử dụng cho nghiên cứu	47
2.4.3.5. Kỹ thuật xét nghiệm	48
2.5. Phương pháp nghiên cứu mục tiêu 2	51
2.5.1. Thiết kế nghiên cứu	51
2.5.2. Các biến số nghiên cứu	53
2.5.3. Phương pháp thu thập số liệu	53
2.5.3.1. Vật liệu, trang thiết bị, hóa chất sử dụng cho nghiên cứu	53
2.5.3.2. Kỹ thuật ELISA-NS1 VNNB	54
2.5.3.3. Kỹ thuật nuôi cấy phân lập vi rút VNNB	55
2.5.3.4. Kỹ thuật nuôi cấy phân lập vi rút đường ruột	58
2.6. Các biện pháp hạn chế sai số	59
2.7. Phương pháp xử lý số liệu	60
2.8. Đạo đức trong nghiên cứu	60
<b>CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU</b>	
3.1. Xác định một số căn nguyên vi rút Arbo, vi rút đường ruột, vi rút Herpes gây hội chứng viêm não cấp tại Bắc Giang, 2004-2017	61
3.1.1. Chẩn đoán xác định căn nguyên vi rút gây HCVNC	61
3.1.2. Một số đặc điểm HCVNC do vi rút	65
3.1.2.1. Một số đặc điểm HCVNC do vi rút đường ruột	65
3.1.2.2. Một số đặc điểm HCVNC do vi rút viêm não Nhật Bản	70
3.1.2.3. Một số đặc điểm HCVNC do vi rút Banna	77
3.1.2.4. Một số đặc điểm HCVNC do vi rút Nam Định	82
3.1.2.5. Một số đặc điểm HCVNC do vi rút xác định	86



3.2. Một số đặc điểm phân tử vi rút VNNB, VRĐR gây HCVNC tại Bắc Giang, 2004-2017	88
3.2.1. Một số đặc điểm phân tử của vi rút VNNB	88
3.2.2. Một số đặc điểm sinh học phân tử của vi rút đường ruột	95
CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN	
4.1. Xác định một số căn nguyên vi rút Arbo, vi rút đường ruột, vi rút Herpes gây hội chứng viêm não cấp tại Bắc Giang, 2004-2017	99
4.1.1. Chẩn đoán xác định căn nguyên vi rút gây HCVNC	99
4.1.1.1. Một số đặc điểm HCVNC	99
4.1.1.2. Chẩn đoán xác định căn nguyên vi rút gây HCVNC	101
4.1.2. Một số đặc điểm HCVNC do vi rút	103
4.1.2.1. Một số đặc điểm HCVNC do vi rút đường ruột	103
4.1.2.2. Một số đặc điểm HCVNC do vi rút viêm não Nhật Bản	107
4.1.2.3. Một số đặc điểm HCVNC do vi rút Banna	114
4.1.2.4. Một số đặc điểm HCVNC do vi rút Nam Định	117
4.1.2.5. Một số đặc điểm HCVNC do vi rút xác định	119
4.2. Một số đặc điểm phân tử vi rút VNNB, VRĐR gây HCVNC tại Bắc Giang, 2004-2017	122
4.2.1. Một số đặc điểm sinh học phân tử của vi rút VNNB	122
4.2.2. Đặc điểm sinh học phân tử của vi rút đường ruột	129
4.3. Ưu điểm và hạn chế của nghiên cứu	132
KẾT LUẬN	134
KIẾN NGHỊ	136
CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

## CÁC CHỮ VIẾT TẮT

TỪ VIẾT TẮT	TỪ TIẾNG ANH	TỪ- NGHĨA TIẾNG VIỆT
Arbo	Arthropodborne	Mang bởi côn trùng tiết túc
ADN	Deoxyribonucleic acid	Axit Deoxyribonuclêic
ARN	Ribonucleic acid	Axit ribonucleic
BAV	Banna virus	Vi rút Banna
cDNA	Complement DNA	ADN bổ sung
dNTP	Deoxynucleotide triphosphate	
ddNTP	Dideoxynucleotide triphosphate	
DNT	Cerebrospinal fluid	Dịch não tủy
ELISA	Enzyme Linked Immunorbent assay	Thử nghiệm miễn dịch gắn enzyme
G	Genotype	Kiểu gen
HCVNC	AES	Hội chứng viêm não cấp
HSV	Herpes simplex virus	Vi rút Hec-pec
HT	-	Huyết thanh
KN	-	Kháng nguyên
KT	-	Kháng thể
MAC-ELISA	IgM Antibody Capture ELISA	Kỹ thuật ELISA tóm bắt IgM
MEM	Minium Essential Medium	Môi trường thiết yếu
NDiV	Nidovirus	Vi rút Nam Định
OD	Opital density	Mật độ quang học
PBS	Phosphate Buffer Saline	Đệm muối phốt phát.
P	Probability	Xác suất
RT-PCR	Reverse transcriptaze polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi phiên mã ngược
TAE	Tris- Acetate – EDTA	
VNNB	Japanese Encephalitis Virus	Viêm não Nhật Bản
VRĐR	Enterovirus	Vi rút đường ruột
WHO	World Health Organization	Tổ chức Y tế Thế giới

## DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1.	Vi rút viêm não Nhật bản. Cấu trúc vi rút viêm não Nhật Bản (a) tổ chức bộ gen (b) cấu trúc bao ngoài (c)	9
Hình 1.2.	Chu trình lây truyền vi rút VNNB trong tự nhiên	11
Hình 1.3.	Phân bố địa lý viêm não vi rút thuộc họ <i>Flaviviridae</i>	11
Hình 1.4.	Phân bố địa lý vùng có nguy cơ viêm não Nhật Bản	11
Hình 1.5.	Phân bố địa lý và sự lan truyền của các kiểu gen vi rút viêm não Nhật Bản	13
Hình 1.6.	Cấu trúc vi rút Banna	16
Hình 1.7.	Phân bố khu vực phát hiện được vi rút Banna	18
Hình 1.8.	Phân tích sự tiến hóa BAV trên thế giới 1980-2012	20
Hình 1.9.	Đặc điểm hình thái, cấu trúc phân tử của vi rút Nam Định	21
Hình 1.10	Cây phát sinh loài của một số vi rút họ <i>Misoniviridae</i>	23
Hình 1.11.	Cấu trúc vi rút đường ruột	24
Hình 1.12.	Cây phát sinh loài của vi rút đường ruột gây viêm não tại Hàng Châu, Trung Quốc dựa trên trình tự gen VP1, 5'UTR	27
Hình 1.13.	Cấu trúc vi rút Herpes	29
Hình 1.14.	Cấu trúc phân tử vi rút Herpes	31
Hình 1.15.	Phân tích di truyền dựa trên trình tự toàn bộ genome của 50 chủng HSV-1	32
Hình 1.16.	Hệ thống PCR ELISA phát hiện ADN của hãng Roche	34
Hình 2.1.	Thiết kế nghiên cứu	44
Hình 2.2.	Thiết kế nghiên cứu mục tiêu 1	45
Hình 2.3.	Sơ đồ kỹ thuật MAC-ELISA chẩn đoán VNNB	48
Hình 2.4.	Thiết kế nghiên cứu mục tiêu 2	52
Hình 2.5.	Quy trình xây dựng cây phát sinh loài các chủng vi rút	57
Hình 3.1.	Phân bố ca mắc HCVNC Bắc Giang, 2004-2017	61
Hình 3. 2.	Kết quả đại diện Realtime RT-PCR chẩn đoán EV từ	63

	bệnh nhân HCVNC, 2004-2017	
Hình 3. 3.	Kết quả đại diện Realtime PCR chẩn đoán HSV từ bệnh nhân HCVNC, 2004-2017	64
Hình 3. 4.	Phân bố ca bệnh HCVNC do vi rút đường ruột theo năm, 2004-2017	66
Hình 3. 5.	Phân bố ca bệnh HCVNC do vi rút đường ruột theo tháng, 2004-2017	66
Hình 3.6.	Phân bố ca bệnh HCVNC do vi rút đường ruột theo huyện, 2004-2017	68
Hình 3.7.	Phân bố ca bệnh HCVNC do vi rút đường ruột trên 100.000 dân theo khu vực, 2004-2017	69
Hình 3.8.	Phân bố ca mắc viêm não Nhật Bản theo năm, 2004-2017	70
Hình 3.9.	Phân bố ca bệnh viêm não Nhật Bản theo tháng, 2004-2017	71
Hình 3.10.	Phân bố viêm não Nhật Bản trên 100.000 theo nhóm tuổi, 2004-2017	73
Hình 3.11.	Phân bố mắc viêm não Nhật Bản trên 100.000 theo nhóm tuổi và giai đoạn, 2004-2017	73
Hình 3.12.	Phân bố ca bệnh viêm não Nhật Bản theo giới, 2004-2017	75
Hình 3.13.	Phân bố ca bệnh viêm não Nhật Bản theo huyện, 2004-2017	75
Hình 3.14.	Phân bố ca bệnh viêm não Nhật Bản trên 100.000 theo khu vực, 2004-2017	76
Hình 3.15.	Phân bố HCVNC do vi rút Banna theo giai đoạn, 2004-2017	77
Hình 3.16.	Phân bố HCVNC do vi rút Banna theo năm, 2004-2017	78
Hình 3.17.	Phân bố HCVNC do vi rút Banna theo tháng, 2004-2017	78
Hình 3.18.	Phân bố HCVNC do vi rút Banna theo nhóm tuổi, 2004-2017	80
Hình 3.19.	Phân bố HCVNC do vi rút Banna theo nhóm tuổi theo các giai đoạn, 2004-2017	80
Hình 3.20.	Phân bố HCVNC do vi rút Banna theo giới, 2004-2017	81

Hình 3.21.	Phân bố HCVNC do vi rút Banna theo huyện, 2004-2017	81
Hình 3.22	Phân bố HCVNC do vi rút Banna theo khu vực, 2004-2017	82
Hình 3.23.	Phân bố HCVNC do vi rút Nam Định theo năm, 2004-2017	83
Hình 3.24.	Phân bố ca mắc HCVNC do vi rút Nam Định theo tháng, 2004-2017	83
Hình 3.25.	Phân bố ca mắc HCVNC do vi rút Nam Định theo nhóm tuổi, 2004-2017	84
Hình 3.26.	Phân bố ca mắc HCVNC do vi rút Nam Định theo giới, 2004-2017	84
Hình 3.27.	Phân bố ca mắc HCVNC do vi rút Nam Định theo huyện, 2004-2017	85
Hình 3.28.	Phân bố ca mắc HCVNC do vi rút Nam Định theo khu vực, 2004-2017	85
Hình 3.29.	Tuổi trung bình mắc viêm não vi rút ở Bắc Giang, 2004-2017	87
Hình 3.30.	Cây phát sinh loài được xây dựng từ trình tự vùng gen E của vi rút VNNB GI và GIII tại Bắc Giang, 2004-2017	91
Hình 3.31.	Cây phát sinh loài được xây dựng từ trình tự vùng gen E của vi rút VNNB GI tại Bắc Giang, 2004-2017	92
Hình 3.32.	Cây phát sinh loài vùng gen VP1 của vi rút đường ruột tại Bắc Giang, 2004-2017	97
Hình 4.1.	Phân bố tỷ lệ mắc HCVNC trên 100.000 dân, 1995-2017	100
Hình 4.2	Phân bố theo mùa viêm não vi rút tại Trung Quốc	106
Hình 4.3	Phân bố theo mùa viêm não vi rút tại Bắc Giang	106
Hình 4.4.	Tỷ lệ mắc VNNB/HCVNC trên 100.000 dân, Bắc Giang, 1995-2017	107
Hình 4.5.	Tuổi trung bình mắc VNNB, Bắc giang, 1995-2017	113
Hình 4.6.	So sánh sự phân bố theo tháng HCVNC do vi rút do một số căn nguyên xác định tại Bắc Giang và Miền Nam	121

Hình 4.7.	Sự lan truyền và phân bố của vi rút VNNB genotype Ib ở châu Á	127
-----------	---	-----

### DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1	Trình tự môi sử dụng cho phản ứng RT-PCR và giải trình tự gen E vi rút VNNB	56
Bảng 3.1.	Xác định tác nhân vi rút Arbo gây hội chứng viêm não cấp bằng kỹ thuật ELISA tại Bắc Giang, 2004-2017	62
Bảng 3.2.	Xác định tác nhân vi rút Arbo gây hội chứng viêm não cấp bằng kỹ thuật sinh học phân tử tại Bắc Giang, 2004-2017	63
Bảng 3.3.	Tỷ lệ dương tính với ít nhất một tác nhân và sự phân bố đồng nhiễm các trường hợp HCVNC do vi rút tại Bắc Giang, 2004-2017	64
Bảng 3.4.	Phân bố ca mắc HCVNC do vi rút đường ruột theo giai đoạn, 2004-2017	65
Bảng 3.5.	Phân bố ca mắc HCVNC do vi rút đường ruột theo nhóm tuổi, 2004-2017	67
Bảng 3.6.	Phân bố ca mắc HCVNC do vi rút đường ruột theo giới, 2004-2017	68
Bảng 3.7.	Phân bố ca bệnh viêm não Nhật Bản theo giai đoạn, 2004-2017	70
Bảng 3.8.	Phân bố ca VNNB theo tuổi trung bình mắc VNNB, 2004-2017	71
Bảng 3.9.	Phân bố ca bệnh viêm não Nhật Bản theo nhóm tuổi, 2004-2017	72
Bảng 3.10.	Tiền sử tiêm phòng viêm não Nhật Bản, 2004-2017	74
Bảng 3.11.	Phân bố ca bệnh viêm não Nhật Bản theo khu vực, 2004-2017	76
Bảng 3.12.	Phân bố ca bệnh viêm não Banna theo giai đoạn, 2004-2017	77
Bảng 3.13.	Phân bố ca bệnh viêm não Banna theo nhóm tuổi, 2004-2017	79

Bảng 3.14.	Phân bố ca bệnh viêm não Nam Định theo giai đoạn, 2004-2017	82
Bảng 3.15.	Một số đặc điểm HCVNC do vi rút xác định, 2004-2017	86
Bảng 3.16.	Kết quả phân lập/phát hiện kháng nguyên của một số vi rút gây HCVNC ở Bắc Giang, 2004-2017	88
Bảng 3.17.	Thông tin về dịch não tủy của bệnh nhân được lựa chọn để phát hiện kháng nguyên VNNB NS1 và phân lập vi rút, 2004-2017	89
Bảng 3.18.	Độ khác biệt ở mức nucleotide giữa các vi rút VNNB GI và GIII ở Bắc Giang với các chủng vi rút VNNB khác ở Việt Nam và trong khu vực	93
Bảng 3.19.	Đặc điểm các acid amin thay thế của vi rút VNNB phát hiện ở Bắc Giang so với chủng genotype I chung (chủng Consensus <sup>*</sup> )	94
Bảng 3.20.	Phân bố theo năm của các typ huyết thanh VRĐR gây HCVNC, 2004-2017*	95
Bảng 3.21.	Độ tương đồng ở mức độ nucleotide giữa các VRĐR ở Bắc Giang và với các chủng khác trong cùng một typ huyết thanh	96
Bảng 4.1.	Căn nguyên vi rút chính gây HCVNC tại Bắc Giang với khu vực địa lý khác trên thế giới	120
Bảng 4.2	Sự xuất hiện mới các genotype vi rút VNNB ở một số nước châu Á, Thái Bình Dương và miền bắc Úc trong thập kỷ gần đây	125

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Hội chứng viêm não cấp (HCVNC) do vi rút là vấn đề y tế công cộng trên toàn thế giới do bệnh có tỷ lệ tử vong cao (10-20%), hoặc để lại một trong số các di chứng thần kinh nặng nề như động kinh, giảm vận động, liệt các chi, rối loạn ngôn ngữ, giảm trí tuệ... Các di chứng thần kinh chiếm tỷ lệ 10-30% người mắc bệnh, để lại gánh nặng cho gia đình và xã hội [1], [28], [111].

Trên thế giới, tỷ lệ hiện mắc của HCVNC do vi rút từ 3,5-7,4/100.000 dân, bệnh gặp ở mọi lứa tuổi nhưng cao hơn ở trẻ em [50]. Theo số liệu đã công bố, ở các nước phương tây và các nước nhiệt đới, tỷ lệ mắc HCVNC ở trẻ em trong những năm gần đây là 10,5-13,8/100.000; tỷ lệ này trên người trưởng thành 2,2/100.000 [62]. Các căn nguyên gây HCVNC bao gồm vi khuẩn, vi rút, ký sinh trùng và có thể là một số hợp chất hóa học... [35], [43], [57], nhưng vi rút vẫn là tác nhân chủ yếu gây HCVNC. Các vi rút gây HCVNC gồm nhiều nhóm khác nhau, như nhóm lây truyền trực tiếp qua đường hô hấp, đường tiêu hóa như vi rút đường ruột, vi rút Nipah...; Nhóm lây truyền do động vật hoặc côn trùng truyền như vi rút viêm não Nhật Bản (VNNB), vi rút Tây sông Nil... Nhóm vi rút tiềm ẩn như vi rút Herpes. Trong số các nhóm tác nhân gây HCVNC, có những tác nhân gây bệnh mang tính toàn cầu như các vi rút nhóm herpes, nhưng cũng có những căn nguyên mang tính khu vực như vi rút VNNB. Trong số các tác nhân vi rút gây HCVNC, mới có vắc xin dự phòng bệnh VNNB [2], [51], [60], [68], [124].

Tại Việt Nam, tỷ lệ mắc HCVNC được ghi nhận cao ở các tỉnh phía Bắc trên 6,0/100.000 dân, có xu hướng giảm dần trong 10 năm chỉ còn 1,4-3,0/100.000 dân, giai đoạn 1998-2007 [135]. HCVNC do vi rút VNNB được ghi nhận ở hầu khắp các vùng nông thôn đồng bằng hoặc miền núi, là tác nhân hàng đầu gây HCVNC cho trẻ em Việt Nam. Nhờ hiệu quả của chương trình tiêm chủng mở rộng, bệnh VNNB đã từng bước được khống chế. Trước năm 2000, hằng năm có khoảng 2000-3000 trường hợp mắc HCVNC do vi rút, trong đó căn nguyên do vi rút VNNB được xác định trung bình trên 50%, nhưng những năm gần đây các trường hợp HCVNC chỉ còn được ghi nhận 1200-1500 trường hợp, căn nguyên do vi rút VNNB được xác



định đã giảm xuống còn 5-35% tùy từng địa phương, tùy theo thời gian, liên quan đến tỷ lệ bao phủ vắc xin VNNB [4], [6], [16], [25], [27]. Ngoài căn nguyên VNNB gây HCVNC, một số tác nhân vi rút khác gây HCVNC cũng đã được phát hiện ở Việt Nam như vi rút đường ruột ECHO 30, vi rút Banna (BAV), vi rút Nam Định (NDiV), vi rút Herpes [5], [12], [14], [24], [122].

Bắc Giang là một tỉnh miền núi phía Bắc, tiếp giáp với nhiều tỉnh lân cận như Hải Dương, Lạng Sơn, Thái Nguyên, Hà Nội, Bắc Ninh, Quảng Ninh. Bắc Giang là nơi giao lưu, trung chuyển giữa các vùng miền, tiềm ẩn bùng phát các bệnh truyền nhiễm gây dịch. Năm 1999, vụ dịch viêm não lớn xảy ra với số mắc là 203 trường hợp, tử vong trên 30%, căn nguyên do vi rút VNNB được xác định là 33,3%, số còn lại chưa rõ nguyên nhân. Từ năm 2000, vắc xin phòng bệnh VNNB cho trẻ em ở tỉnh Bắc Giang đã được tăng cường sử dụng và đến năm 2007 đạt độ bao phủ vắc xin cho nhóm trẻ 1-5 tuổi là trên 90% [8], [16], [19]. Nhưng giám sát HCVNC cho thấy số các trường hợp mắc không có chiều hướng giảm. Nghiên cứu phát hiện vi rút từ quần thể muỗi tại Bắc Giang trong các năm 2006-2012 đã xác định có sự lưu hành của vi rút VNNB, vi rút Banna, vi rút Nam Định trong quần thể muỗi *Culex*. Trong số các vi rút mới phát hiện ở Bắc Giang từ muỗi, vi rút Banna đã được chứng minh là vi rút gây HCVNC [9], [83], [88]. Như vậy, số các trường hợp HCVNC không có chiều hướng giảm ở Bắc Giang có thể do những tác nhân vi rút nào? Vi rút gây HCVNC có những đặc điểm gì? Đây là những vấn đề cần được quan tâm nghiên cứu, định hướng cho dự phòng bệnh được hiệu quả. Xuất phát từ thực tế trên chúng tôi tiến hành đề tài nghiên cứu: "**Một số căn nguyên vi rút gây hội chứng viêm não cấp tại Bắc Giang, 2004-2017**" với hai mục tiêu sau:

1. *Xác định một số căn nguyên vi rút Arbo, vi rút đường ruột và vi rút Herpes gây hội chứng viêm não cấp tại Bắc Giang, 2004-2017.*
2. *Mô tả một số đặc điểm sinh học phân tử vi rút viêm não Nhật Bản, vi rút đường ruột gây hội chứng viêm não cấp tại Bắc Giang, 2004-2017.*

## Chương 1

### TỔNG QUAN

#### 1.1. MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM CHUNG VỀ HỘI CHỨNG VIÊM NÃO CẤP

##### 1.1.1. Một số khái niệm

*Hội chứng viêm não cấp (HCVNC)* là một tình trạng tổn thương não cấp tính biểu hiện trên lâm sàng bằng rối loạn tri giác, co giật, có thể kèm theo dấu hiệu thần kinh khu trú hoặc lan tỏa, tăng bạch cầu đơn nhân trong dịch não tủy, kết quả chẩn đoán hình ảnh sọ não và điện não đồ bất thường [1], [117].

*Viêm não* là tình trạng bệnh lý do viêm xảy ra ở một phần, nhiều phần hoặc toàn bộ tổ chức não, có thể bao gồm cả tủy sống, màng não và các rễ thần kinh [1].

*Viêm não màng não* là tình trạng viêm xảy ra cả ở tổ chức não và màng não, đây là thể bệnh lâm sàng thường gặp nhất của các viêm não cấp tính với biểu hiện lâm sàng, cận lâm sàng, tổ chức học ở cả não và màng não [1].

*Viêm não tủy* là tình trạng viêm cả tổ chức não và tủy sống. Lâm sàng ngoài triệu chứng của tổn thương não còn có các dấu hiệu của tổn thương tủy sống như rối loạn cảm giác, dấu hiệu liệt tủy, rối loạn cơ tròn [1].

##### 1.1.2. Tình hình hội chứng viêm não cấp

###### 1.1.2.1. Tình hình hội chứng viêm não cấp trên thế giới

HCVNC thường gây ra tình trạng bệnh cảnh lâm sàng nặng nề, thời gian nằm viện dài, sử dụng nhiều kỹ thuật chẩn đoán và biện pháp điều trị tốn kém nhưng lại để lại nhiều di chứng nặng nề, thậm chí tử vong. Hầu hết các ca bệnh HCVNC không xác định được căn nguyên trực tiếp từ tổ chức não mà phải xác định tác nhân gây bệnh thông qua xét nghiệm huyết thanh, miễn dịch, sinh học phân tử... từ dịch não tủy, máu hoặc các bệnh phẩm lấy từ các vị trí ngoài hệ thống thần kinh trung ương. Trong số tác nhân gây HCVNC, chỉ có khoảng 10% căn nguyên có thuốc điều trị đặc hiệu cho các tác nhân như vi khuẩn, nấm, ký sinh trùng (sốt rét thể não) và một số loại vi rút gây viêm não như Herpes simplex, Varicella zoster; còn phần lớn các trường hợp HCVNC (90%) không có điều trị đặc hiệu [108], [133].

Trong một nghiên cứu phân tích của Jmor và cộng sự năm 2008 tập hợp từ 87 nghiên cứu về HCVNC trên toàn thế giới cho thấy tỷ lệ ở các nước phương Tây những năm gần đây là 7,4/100.000 dân, trong đó ở trẻ em là 10,5 đến 13,8/100.000 trẻ; tỷ lệ này trên người trưởng thành là khoảng 2,2/100.000. Điều đáng lưu ý là tỷ lệ mắc HCVNC ở các nước phương tây và các nước vùng nhiệt đới khác nhau không đáng kể, thậm chí ở các nước phương tây này còn cao hơn. Tỷ lệ mắc HCVNC ở các nước vùng nhiệt đới là 6,34/100.000 dân [62]. Nghiên cứu tại Anh giai đoạn 1989-1998 cho thấy tỷ lệ mắc HCVNC là 1,5 /100000, trong đó 40% là xác định được nguyên nhân, còn lại 60% là viêm não vi rút không xác định. Những năm gần đây việc tăng cường sử dụng phương pháp chẩn đoán bằng sinh học phân tử, căn nguyên gây HCVNC xác định bởi phòng xét nghiệm đã tăng lên 7 lần [66].

Mặc dù là căn nguyên chính gây HCVNC nhưng những hiểu biết và nghiên cứu về các tác nhân vi rút gây HCNVC còn chưa được đầy đủ. Vai trò gây bệnh của các căn nguyên vi rút gây HCVNC rất khác nhau tùy theo lứa tuổi, mùa cũng như vị trí địa lý. Có căn nguyên mang tính toàn cầu như viêm não cấp do vi rút nhóm herpes; nhưng cũng có những căn nguyên mang tính khu vực, điển hình là viêm não cấp do các vi rút nhóm Arbo [32], [60], [108], [115], [131].

Tại các nước châu Âu và Mỹ, nhờ sự phát triển của các kỹ thuật chẩn đoán, tỷ lệ xác định được căn nguyên vi rút lên tới 50%. Tại Anh, số lượng ca bệnh viêm não cấp do vi rút tăng trên tất cả các nhóm tuổi từ tỷ lệ mắc 0,6/100.000 (năm 2004) tăng lên 3,9/100.000 (năm 2013). Độ tuổi trung bình là 30,6, với 1/3 trường hợp là trẻ em. Vi rút đường ruột (VRĐR) là căn nguyên chính chiếm 52%, sau đó là vi rút herpes simplex (HSV) 29% và varicella zoster 13% [66]. Tại Phần Lan căn nguyên chính gây HCVNC ở người lớn là VRĐR (26%), HSV týp 2 (17%) và 9% là vi rút Arbo [75]. Tại Thụy Điển, tỷ lệ HCVNC do HSV tip 1 là 0,22/100.000 dân, tỷ lệ tử vong 14%, di chứng thần kinh tâm thần là 22% [29]. Tại Mỹ, giai đoạn 1950-1981, tỷ lệ mắc HCVNC hàng năm là 7,4/100.000 dân, tỷ lệ mắc giảm dần theo thời gian. Trong nghiên cứu của Trevio cho thấy tỷ lệ mắc trên 100.000 dân từ năm 1988 - 1997 là 4,3, căn nguyên chính là vi rút Arbo [55]. Trong nghiên cứu dịch tễ học

HCVNC giai đoạn 2011-2014, tỷ lệ căn nguyên viêm não ở người lớn có sự thay đổi, tỷ lệ do vi rút Arbo chỉ chiếm 1,1%, trong khi đó căn nguyên chính là do VRDR chiếm 51,6% và HSV là 8,3% [54].

Ở châu Á, HCVNC khá phổ biến, trong đó căn nguyên do vi rút VNNB được xác định là tác nhân hàng đầu gây HCVNC cho trẻ em trong khu vực Châu Á Thái bình Dương bao gồm Trung Quốc, Nhật Bản, Triều Tiên, phần viễn đông nước Nga, Đài Loan, Ấn Độ, Pakistan, Nepal, Papua New Guinea, Bangladesh, Australia ... và toàn bộ các nước Đông Nam Á với dân số khoảng 2,7 tỷ người, trong đó trẻ em dưới 15 tuổi có nguy cơ mắc bệnh cao hơn là hơn 1 tỷ [36], [59], [70], [125], [132]. Tại Ấn Độ, HCVNC có tỷ lệ mắc và tử vong rất cao, nguyên nhân được xác định chủ yếu là vi rút và vi khuẩn. Trong đó vi rút VNNB là một trong những nguyên nhân chính gây HCVNC [59], [60]. Nghiên cứu tại Malaysia giai đoạn 1997-2006 cho thấy trong số ca mắc bệnh VNNB, 92% là trẻ em từ 12 tuổi trở xuống, 8% bệnh nhân là trẻ lớn và người lớn. Nhưng trong những năm 1998-1999, vi rút Nipah, một loại vi rút lây truyền trực tiếp qua đường hô hấp được xác định là tác nhân vi rút mới gây HCVNC chủ yếu cho người lớn ở nước này [36], [93]. Tại Philippine, vi rút VNNB được xác định là một nguyên nhân hàng đầu gây bệnh viêm não ở người, chiếm 15% số ca mắc HCVNC. Tuy chưa có công bố về nguyên nhân các tác nhân vi rút khác gây HCVNC ở Philippine, nhưng với minh chứng về sự lưu hành của vi rút Banna trong quần thể muỗi ở quốc đảo, cho thấy vi rút Banna có thể cũng là nguyên nhân gây HCVNC ở Philippine [64], [129].

#### **1.1.2.2. Tình hình hội chứng viêm não cấp ở Việt Nam**

Tại Việt Nam, HCVNC được nghiên cứu đến từ thế kỷ trước, trong đó VNNB được biết từ năm 1952 theo công bố của hai tác giả người Pháp là Puyuelo H và Prévot M. Năm 1953 hai tác giả người Pháp này đã có một báo cáo về 98 trường hợp VNNB trong quân đội viễn chinh Pháp tại miền Bắc Việt Nam. Giám sát HCVNC nghi ngờ do vi rút là cơ sở để chẩn đoán/giám sát bệnh nhân VNNB, giám sát trong nhiều năm cho thấy trong các khoảng thời gian khác nhau, tỷ lệ mắc VNNB có sự thay đổi do tác động của vắc xin phòng bệnh. Cụ thể, tỷ lệ mắc VNNB

hàng năm dao động trong khoảng 4,16-4,78/100.000 dân (1994-1996); 2,57-4,16/100.000 dân (1996-2000) và 2,75-2,82/100.000 dân (2001-2004) [3], [4],[135].

### **1.1.2.3. Tình hình hội chứng viêm não cấp ở Bắc Giang**

Bắc Giang là một tỉnh miền núi phía Bắc, có địa hình trung du xen lẫn với vùng đồi, núi, có canh tác nông nghiệp nuôi lợn và trồng lúa nước. Bắc Giang có diện tích 3848,9 km<sup>2</sup>, dân số trung bình là 1588,5 nghìn người. Tình hình bệnh truyền nhiễm trên địa bàn tỉnh Bắc Giang diễn biến tương đối phức tạp, theo hệ thống giám sát bệnh, hằng năm trên địa bàn tỉnh ghi nhận trung bình khoảng 16 - 20 loại bệnh truyền nhiễm trong 42 bệnh thuộc danh mục phải báo cáo theo quy định của Bộ Y tế. HCVNC do vi rút luôn là vấn đề sức khỏe nổi trội của tỉnh Bắc Giang trong nhóm các bệnh truyền nhiễm được ghi nhận trong nhiều năm qua. Tại Bắc Giang tỷ lệ mắc HCVNC giai đoạn 1995-1999 là 12,5/100.000 dân, năm 2000-2004 là 7,44/100.000 dân [8]. Những nghiên cứu liên quan đến việc phát hiện các tác nhân gây HCVNC ở Bắc Giang được đề cập sau vụ dịch viêm não cấp năm 1999 có 203 trường hợp mắc và 66 tử vong (căn nguyên vi rút VNNB được xác định là 33,3%, số còn lại không rõ căn nguyên) với đặc điểm lâm sàng xuất hiện đột ngột và diễn biến rất nhanh. Để khống chế số mắc và số tử vong do HCVNC ở Bắc Giang, vắc xin VNNB đã được tăng cường sử dụng để phòng bệnh cho trẻ em từ 1-5 tuổi trong toàn tỉnh (năm 2000 có 63,9% trẻ em được tiêm phòng vắc xin, năm 2004 có trên 90% trẻ em được tiêm phòng vắc xin) nhưng số các trường hợp HCVNC nghi ngờ do vi rút không giảm nhiều, các vụ dịch vẫn xảy ra mang tính chất chu kỳ 2 - 3 năm (1999, 2001, 2004). Đặc biệt năm 2007 và 2008 là hai năm liên tiếp và năm 2011 có số trường hợp HCVNC ở Bắc Giang được ghi nhận cao. Ngoài một số ca bệnh có biểu hiện lâm sàng xuất hiện đột ngột và diễn biến nhanh đã được xác định có thể do hoạt chất hạ đường huyết trong trái cây vải [90], những tác nhân khác chưa được nghiên cứu một cách hệ thống, nên rất cần có một nghiên cứu tổng thể trong một khoảng thời gian nhất định để xác định các tác nhân gây bệnh để định hướng cho việc phòng bệnh được hiệu quả.

### 1.1.3. Căn nguyên gây hội chứng viêm não cấp

Các căn nguyên gây HCVNC rất đa dạng như vi khuẩn, vi rút, nấm, ký sinh trùng, hóa chất, độc chất, rối loạn chuyển hóa, phản ứng tự miễn sau tiêm vắc xin... [1], [57], [90], [98]. Tuy nhiên, hơn 60% các trường hợp HCVNC không xác định được căn nguyên gây bệnh [34], [55], [59], [69]. Tại Ấn Độ, chỉ có khoảng 20 - 30% số trường hợp HCVNC xác định được căn nguyên [63]. Trong các căn nguyên gây HCVNC, phần lớn được xác định là do vi rút và số loại tác nhân vi rút được phát hiện có liên quan đến HCVNC càng ngày càng tăng [70], [77], [108], [122].

### 1.1.4. Căn nguyên vi rút gây hội chứng viêm não cấp

Hiện nay đã phát hiện hơn 100 loại vi rút có khả năng gây nên HCVNC. Có hai cách thường dùng trên thực tế để phân loại căn nguyên vi rút gây HCVNC, cụ thể:

#### \* Phân loại căn nguyên vi rút theo đường lây truyền

(1) *Nhóm vi rút lây truyền theo đường tiêu hóa hô hấp* như một số vi rút đường ruột (VRĐR) nhóm Entero-Picorna: Vi rút Nipah, Coxsackie nhóm B týp 1, 2, 3, 4, 5, 6; vi rút ECHO các týp 2, 5, 6, 7, 9, 14, 16, 30; vi rút Entero các týp 70,71 [21], [54], [65], [102], [124].

(2) *Nhóm vi rút lây truyền bởi các côn trùng chôn đốt, tiết túc như:* muỗi, ve...: vi rút viêm não Nhật Bản (VNNB), vi rút Tây sông Nile, vi rút viêm não ngựa Venezuela, vi rút viêm não ngựa miền Đông, vi rút viêm não ngựa miền Tây, vi rút Banna (BAV)... [2], [4], [5].

(3) *Nhóm vi rút có thể gây viêm não - màng não cơ hội:* Vi rút Epstein Barr, vi rút *Herpes simplex* (HSV) type 1 và type 2, vi rút Varicella Zoster, vi rút Cytomegalo [29], [37], [127].

#### \* Phân loại căn nguyên vi rút theo lâm sàng bệnh học

(1) *Các vi rút gây viêm não tiên phát:* Vi rút gây viêm não tiên phát là các vi rút có tế bào đích là các tế bào thần kinh trung ương, gây tổn thương trực tiếp cho các tế bào này [1], [113].

- *Vi rút thuộc họ Togaviridae:* Viêm não tủy ngựa miền Đông, viêm não tủy ngựa miền Tây, viêm não tủy ngựa Venezuela [113].

- *Vi rút thuộc họ Flaviviridae*: Viêm não St.Louis, viêm não Thung lũng Murray, viêm não tây sông Nile, vi rút VNNB, vi rút Dengue, các vi rút do ve truyền (Tick-bone encephalitis) [111], [113], [114].

- *Vi rút thuộc họ Bunyaviridae*: Viêm não California, viêm não La Crosse, viêm não Thung lũng Rift, Toscana [113].

- *Vi rút thuộc họ Paramyxoviridae*: Vi rút sởi, vi rút Quai bị, vi rút Hendra, vi rút Nipah [113].

- *Vi rút thuộc họ Arenaviridae*: Lymphocytic chorio- meningitis, Machupo, Lassa, Junin [113].

- *Vi rút thuộc họ Piconaviridae*: Bại liệt, Coxsackie, Echo, Viêm gan A [21], [63], [113].

- *Vi rút thuộc họ Reoviridae*: Lyssa, Đại [111], [113].

- *Vi rút thuộc họ Filoviridae*: Ebola, Marburg [113]

- *Vi rút thuộc họ Retroviridae*: HIV [111].

- *Vi rút thuộc họ Herpesviridae*: Vi rút Herpes simplex tít 1 và 2, Vi rút Varicella-zoster (VZV), Vi rút Epstein-Barr (EBV), Vi rút Cytomegalovirus (CMV) [113], [130].

- *Vi rút thuộc họ Adenoviridae*: Vi rút Adeno [111].

(2) *Các vi rút gây viêm não thứ phát*: Các vi rút viêm não thứ phát gây tổn thương tế bào thần kinh đệm [1].

- *Vi rút thuộc họ Togaviridae*: Vi rút Rubella [113].

- *Vi rút thuộc họ Orthomyxoviridae*: Vi rút Cúm [1].

- *Vi rút thuộc họ Paramyxoviridae*: Vi rút Sởi, vi rút Quai bị [113].

- *Vi rút thuộc họ Poxviridae*: Vi rút Đậu bò (Cowpox-Vaccinia virus) [1].

- *Vi rút thuộc họ Herpesviridae*: Vi rút Varicella-zoster (VZV), vi rút Epstein-Barr (EBV), vi rút Cytomegalovirus (CMV) [113], [127].

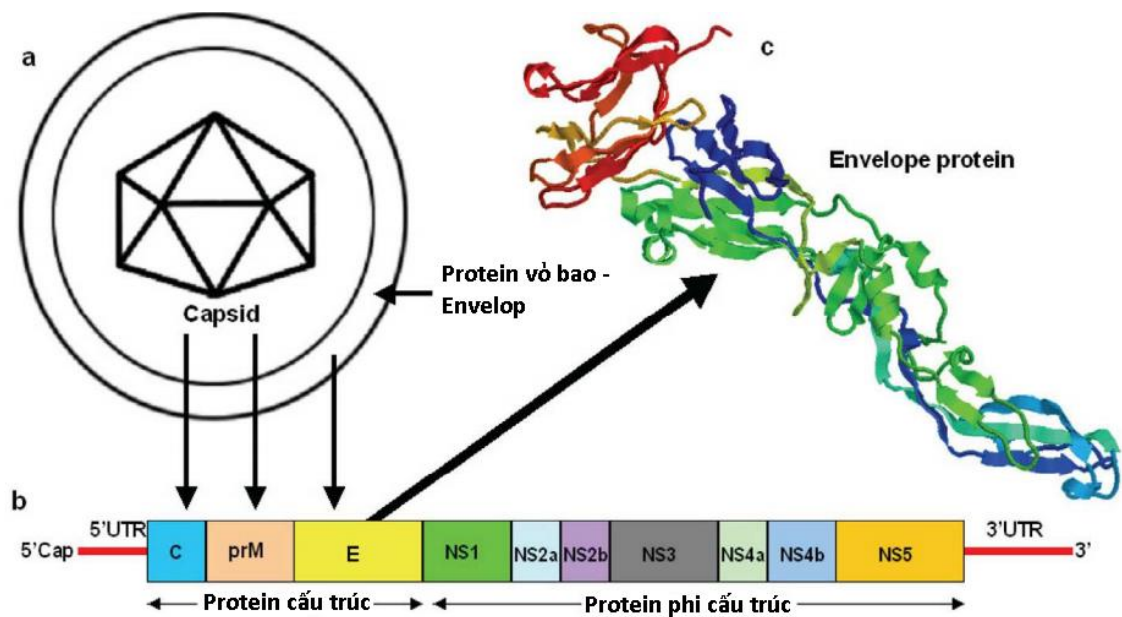
Ngày nay với sự phát triển của công nghệ gen, việc phân loại vi rút theo cấu trúc vật liệu di truyền là ADN hay ARN được thực hiện khá phổ biến: (1) vi rút có cấu trúc phân tử là ADN (2) vi rút có cấu trúc phân tử là ARN [111].

Nhiễm trùng hệ thống thần kinh trung ương do vi rút không có thuốc điều trị đặc hiệu (trừ vi rút Herpes), thường để lại di chứng thần kinh ở các mức độ khác nhau, là gánh nặng bệnh tật cho gia đình và xã hội. Trong số các tác nhân vi rút gây HCVNC, cho đến nay mới có vắc xin để dự phòng bệnh VNNB, cho thấy HCVNC là những thách thức lớn về sức khỏe cộng đồng [35], [36], [45].

## 1.2. ĐẶC ĐIỂM MỘT SỐ VI RÚT GÂY HỘI CHỨNG VIÊM NÃO CẤP

### 1.2.1. Vi rút viêm não Nhật Bản

#### 1.2.1.1. Đặc điểm cấu trúc vi rút



**Hình 1.1. Vi rút viêm não Nhật Bản. Cấu trúc vi rút viêm não Nhật Bản (a), tổ chức bộ gen (b) cấu trúc bao ngoài (c)[112]**

Vi rút VNNB thuộc họ *Flaviviridae*, chi *Flavivirus*, cấu trúc phân tử của vi rút VNNB có dạng hình cầu, capsid đối xứng hình khối, đường kính hạt vi rút 40-50nm, có vỏ bọc là màng lipid kép. Vật liệu di truyền là ARN sợi đơn dương, chứa toàn bộ thông tin di truyền của vi rút, chiều dài sợi ARN xấp xỉ 11kb, mã hóa cho 10 loại protein gồm 3 loại protein cấu trúc và 7 loại protein phi cấu trúc.

Protein cấu trúc gồm: Protein C (lõi) còn gọi là V2, là một polipeptid, có trọng lượng phân tử là 13,5kD gồm 136 acid amin. Protein M (màng) hay còn gọi là V1, là một polypeptid, có trọng lượng phân tử 8,7kD, gồm 75 acid amin. Protein E (bao ngoài) còn hay gọi là V3, là glycoprotein, có trọng lượng phân tử 53 kD, gồm



500 acid amin. V3 đóng vai trò quan trọng cho sự xâm nhiễm của vi rút VNNB và sự khác nhau về động lực của vi rút VNNB trong tự nhiên. Protein bao ngoài còn giúp vi rút nhận ra những thụ thể đặc hiệu trên bề mặt tế bào cảm thụ, kích thích cơ thể sinh kháng thể trung hòa, đáp ứng miễn dịch tế bào và là kháng nguyên ngưng kết hồng cầu.

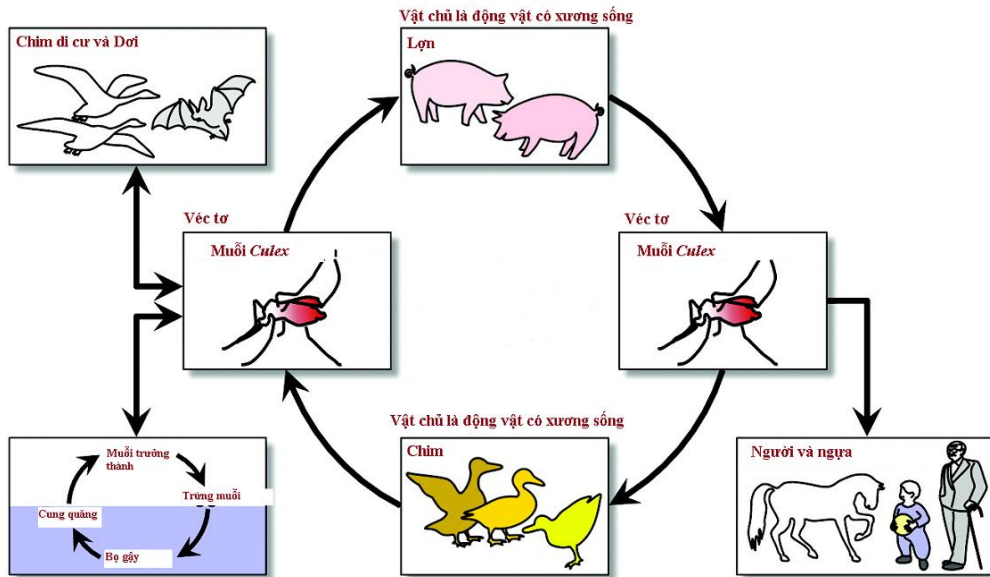
Protein không cấu trúc NS (non-structural protein): Protein không cấu trúc gồm 7 loại protein có ký hiệu là NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5. Protein NS1 là glycoprotein rất kỵ nước, có trọng lượng phân tử xấp xỉ 46kD, trong giai đoạn nhiễm vi rút, sự đáp ứng miễn dịch thể mạnh mẽ được hình thành để kháng lại protein này. Protein NS2a và NS2b kỵ nước, NS2a có trọng lượng phân tử rất nhỏ xấp xỉ 22kD, NS2b xấp xỉ 14kD. Protein NS3 là protein đa chức năng giúp cho sự xâm nhiễm và nhân lên của ARN trong tế bào nhiễm vi rút. NS3 có trọng lượng phân tử rất lớn xấp xỉ 70kD. Protein NS4a và NS4b rất nhỏ, có trọng lượng phân tử tương ứng là 16kD và 27kD, là protein kỵ nước. Protein NS5 rất lớn, có trọng lượng phân tử 103kD, rất bền vững, là protein có nhiều chức năng với enzym methyltransferase (MTase) và hoạt tính RdRP (RNA dependent RNA polymerase-ARN polymease phụ thuộc ARN) [7], [15], [38], [41], [44].

### **1.2.1.2. Đặc điểm ổ chứa, đường truyền**

Vi rút VNNB tồn tại trong tự nhiên ở các loài chim nước và một số loài chim ăn quả, các loài động vật/gia súc lớn như lợn, ngựa, bò, dê. Mức độ cảm nhiễm của các loài đối với vi rút VNNB khác nhau. Chim và lợn là những vật chủ quan trọng nhất cho sự nhân lên và lan rộng vi rút VNNB. Lợn được coi là nguồn nhiễm vi rút huyết quan trọng truyền cho muỗi. Người chủ yếu bị nhiễm vi rút VNNB từ muỗi hút máu lợn trong giai đoạn nhiễm vi rút huyết của quần thể lợn.

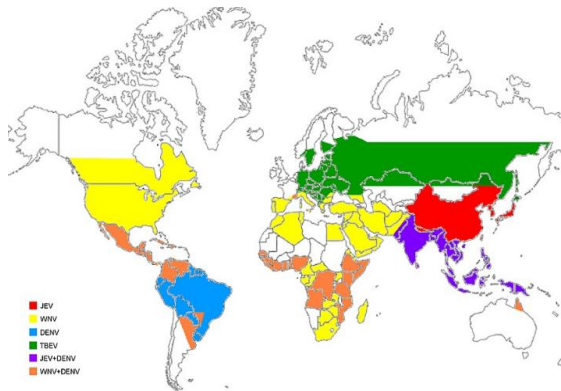
Giám sát về mật độ của muỗi truyền bệnh VNNB ở miền Bắc Việt Nam cho thấy mật độ các loài muỗi này phát triển cao trong các tháng 4, 5, 6 là nguyên nhân bùng phát các vụ dịch VNNB vào mùa hè với đỉnh cao của dịch thường là tháng 6 [2], [11], [112]. Có nhiều loài muỗi được xác định là véc tơ có khả năng truyền vi rút VNNB, trong đó chỉ có một số ít loài là véc tơ quan trọng. *Culex (Cx)*

*tritaeniorhynchus* được xác định là véc tơ chủ yếu truyền vi rút VNNB cho người ở khu vực châu Á. Ngoài ra loài muỗi này còn truyền vi rút VNNB sang thể hệ sau qua trứng [4], [11], [93].

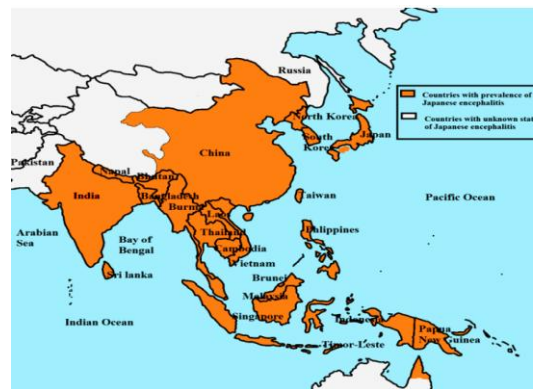


Hình 1.2. Chu trình lây truyền vi rút VNNB trong tự nhiên [105]

1.2.1.3. Đặc điểm dịch tễ



Hình 1.3. Phân bố địa lý viêm não do vi rút thuộc họ Flaviviridae [114]



Hình 1.4. Phân bố địa lý vùng có nguy cơ viêm não Nhật Bản [67]

Vi rút VNNB là nguyên nhân hàng đầu gây HCVNC ở châu Á, ước tính hàng năm có khoảng 67.900 trường hợp mắc, tỷ lệ tử vong từ 10%-30% và tỷ lệ di chứng thần kinh hay tâm thần có thể lên đến 30%-50% [4], [36], [132].

Tất cả mọi lứa tuổi nếu chưa có miễn dịch đều có thể bị VNNB khi bị muỗi nhiễm vi rút VNNB đốt. Ở những vùng có vi rút VNNB lưu hành, trẻ em bị mắc bệnh là chủ yếu. Nhưng không phải tất cả những người bị muỗi nhiễm vi rút đốt đều phát bệnh, sự phát bệnh phụ thuộc vào nhiều yếu tố: Số lượng vi rút và độc lực của chúng khi vào cơ thể và sức đề kháng của cơ thể đối với vi rút VNNB.

#### ***1.2.1.4. Đặc điểm lâm sàng***

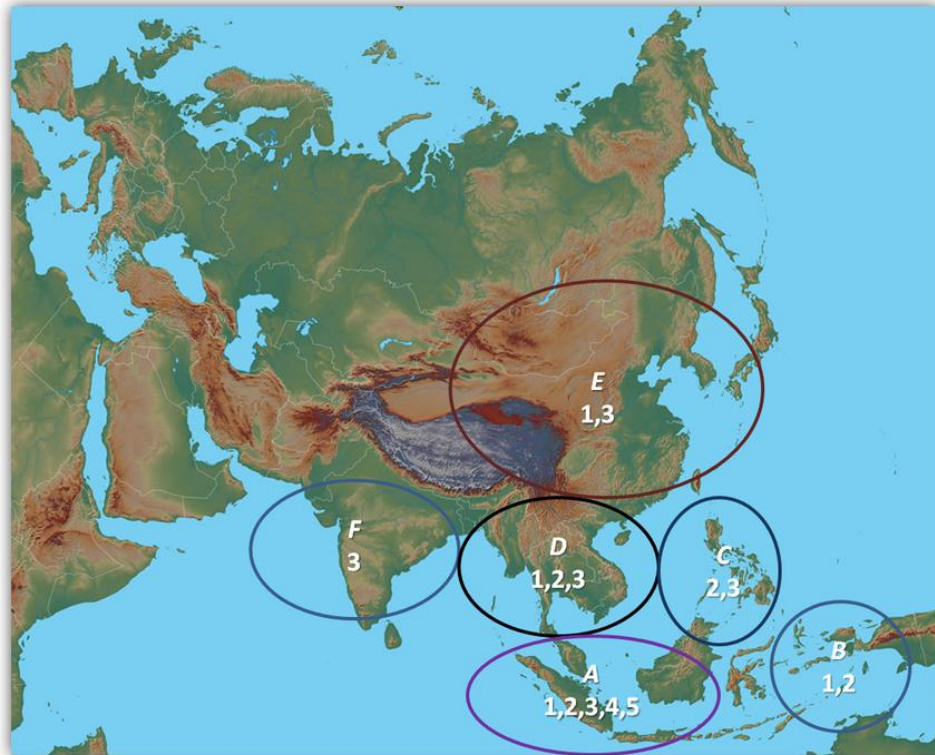
Thông thường chỉ có một số ít người khi bị nhiễm vi rút là có biểu hiện triệu chứng, đa số là không có biểu hiện triệu chứng gọi là thể ẩn. Biểu hiện lâm sàng của các trường hợp mắc VNNB có thể chỉ có sốt đơn thuần, nhưc đầu; Thể viêm màng não vô khuẩn đến thể viêm não điển hình sau khi khỏi bệnh đều có miễn dịch đặc hiệu với vi rút VNNB. Ở thể ẩn, cơ thể có đủ khả năng tự bảo vệ thông qua hệ thống miễn dịch, tiêu diệt hết vi rút VNNB, nên vi rút không đến được thần kinh trung ương và cơ thể không có biểu hiện bệnh lý gì. Sự nhiễm ẩn được ghi nhận bằng sự có mặt của kháng thể đặc hiệu kháng vi rút VNNB trong huyết thanh [2], [44], [132].

Với thể bệnh có triệu chứng lâm sàng điển hình, diễn biến của bệnh thường theo 4 giai đoạn: Giai đoạn khởi phát 1-2 ngày đầu với triệu chứng sốt cao, đau đầu, hội chứng thần kinh chưa rõ nét. Giai đoạn toàn phát kéo dài 3-6 ngày, bệnh nhân sốt rất cao, có rối loạn thần kinh thực vật, vã mồ hôi, diễn biến về bệnh thay đổi từ nhẹ đến nặng và có thể hôn mê, phản xạ gân xương tăng, dấu hiệu màng não rõ, có co giật trên 80%, tiếp theo liệt khu trú, có thể có cử động bất thường như múa vờn, múa giật và các phản xạ bệnh lý. Co giật thường gặp ở trẻ em hơn là người lớn. Đa số bệnh nhân tử vong vào giai đoạn này của bệnh. Giai đoạn tiền triển bán cấp kéo dài 7-9 ngày, hội chứng màng não giảm, đỡ sốt, mạch ổn định. Ở giai đoạn này có thể có biến chứng do nằm lâu. Giai đoạn hồi phục: Bệnh nhân chỉ còn sốt nhẹ, tùy tổn thương, bệnh nhân có thể bị di chứng hoặc không. Di chứng sớm thường xuất

hiện như liệt nhẹ toàn thân hoặc nửa người. Di chứng muộn như động kinh, Parkinson, có trường hợp sau 2 năm mới xuất hiện di chứng [1], [4].

#### 1.2.1.5. Đặc điểm phân tử

Vi rút VNNB có 5 genotype (5 kiểu gen) được ký hiệu từ I đến V dựa trên trình tự nucleotide của gen E và C/PrM [79], [89], [107], [110].



**Hình 1.5. Phân bố địa lý và sự lan truyền của các kiểu gen vi rút VNNB [116]**

Các chủng vi rút có kiểu gen I (GI) được phân lập từ Ấn Độ, Trung Quốc, Campuchia, Nhật Bản, Malaysia, Hàn Quốc, Đài Loan, miền Bắc Thái Lan, Việt Nam và miền bắc Australia [47], [52], [53], [108], [109]. Kiểu gen II (GII) đã được báo cáo rải rác ở Indonesia, Malaysia, Bắc Úc, Papua New Guinea và miền Nam Thái Lan. Kiểu gen III (GIII) là kiểu gen được phân bố phổ biến ở các vùng ôn đới, cận nhiệt đới như Ấn Độ, Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật Bản, Myanmar, Philippines, Nepal, Đài Loan, Việt Nam và Sri Lanka. Kiểu gen IV (GIV) chỉ được phân lập từ muỗi ở Indonesia [38], [92], [108]. Ngoài ra, kiểu gen V (GV), được phát hiện từ những năm 1950s ở Malaysia và Singapore tương ứng từ muỗi, chim.

Trong những năm gần đây, sự xuất hiện của vi rút VNNB GV đã được ghi nhận ở một số nước châu Á với các chủng vi rút được phát hiện từ muỗi *Culex* như Hàn Quốc, Trung Quốc. Như vậy rất có thể vi rút VNNB GV cũng xuất hiện ở Việt Nam nhưng chưa được phát hiện [71], [79].

Trong số tất cả các kiểu gen được phân lập từ năm 1935, có 98% các chủng thuộc về kiểu gen GI, GII và GIII [39]. Kiểu gen GI và GIII thường xảy ra ở dạng bùng phát ở vùng ôn đới, nhưng kiểu gen GII là nguyên nhân gây bệnh phổ biến ở các vùng nhiệt đới [67]. Trước đây kiểu gen GIII là kiểu gen phân bố rộng rãi ở các nước châu Á bao gồm cả Ấn Độ; Trong những năm gần đây kiểu gen GI xuất hiện, thay thế kiểu gen GIII [41], [48], [52], [109].

Tại Việt Nam, nghiên cứu dịch tễ học phân tử vi rút VNNB ở Việt Nam chưa được quan tâm trước những năm 1990, nhưng sau những năm 1990, nghiên cứu dịch tễ học phân tử vi rút VNNB được thực hiện với sự xác định trình tự vùng gen C, vùng gen M của các chủng vi rút phân lập ở miền Bắc và miền Nam trong các năm 1964-1988. Kết quả đã xác định các chủng vi rút VNNB phân lập trong khoảng thời gian này từ bệnh nhân, muỗi, chim, lợn đều thuộc nhóm genotype III, chúng có họ hàng với chủng Nakayama của Nhật Bản và Beijing-1 của Trung Quốc [15], [41], [92]. Nghiên cứu dịch tễ phân tử vi rút VNNB ở một số vùng của Việt Nam dựa trên kết quả giải trình tự và phân tích vùng gen E của 34 chủng vi rút VNNB phân lập trong các năm 1988-2007 đã khẳng định: vi rút VNNB genotyp I lưu hành ở cả bốn miền Bắc, Trung, Nam và Tây Nguyên từ các mẫu phân lập vi rút có nguồn gốc là muỗi, lợn trong các năm 2001-2007. Xác định có sự lưu hành đồng thời cả vi rút VNNB genotyp I và genotyp III ở Việt Nam trong các năm 1990-2007. Chủng vi rút VNNB genotyp 1 gây bệnh cho người chiếm tỷ lệ thấp 3,7%, genotyp 3 gây bệnh cho người chiếm 96,3% [15]. Nghiên cứu dịch tễ học phân tử của vi rút VNNB ở miền Bắc Việt Nam, 1964-2011, cho thấy có sự tiến hóa của vi rút VNNB ở Việt Nam tương quan với sự tiến hóa chung, các chủng vi rút VNNB GIII của Việt Nam đã được thay thế bởi các chủng vi rút VNNB GI [41], [42]. Trong khoảng 5 năm gần đây, thông tin về đặc điểm phân tử của vi rút VNNB lưu

hành ở Việt Nam chưa được cập nhật. Hơn thế nữa nghiên cứu về đặc điểm phân tử của vi rút VNNB gây HCVNC ở Bắc Giang vẫn còn là một vấn đề cần được quan tâm, nhưng chưa được thực hiện khi vắc xin VNNB được sản xuất từ chủng vi rút genotype III đang được sử dụng rộng rãi trong một thời gian dài.

#### **1.2.1.6. Chẩn đoán**

Chẩn đoán hướng tới bệnh VNNB dựa vào các biểu hiện lâm sàng, cận lâm sàng và yếu tố dịch tễ. Ca bệnh nghi ngờ khi có các biểu hiện sốt cấp tính, có một trong các biểu hiện thay đổi tâm thần, thần kinh, có thể co giật, rối loạn tri giác, sống ở vùng dịch VNNB hay mới đến vùng có dịch. Ca bệnh khẳng định khi có kết quả xét nghiệm bằng phân lập được vi rút VNNB từ dịch não tủy hoặc tổ chức não; Phát hiện vật liệu di truyền của vi rút VNNB trong dịch não tủy; xét nghiệm ELISA xác định được kháng thể đặc hiệu IgM kháng vi rút VNNB trong dịch não tủy hay trong huyết thanh [2], [4], [44].

Sau khi nhiễm vi rút có ít nhất 3 loại kháng thể được tạo ra đó là kháng thể ức chế ngưng kết hồng cầu, kháng thể kết hợp bổ thể và kháng thể trung hòa. Các kháng thể gồm 5 lớp: IgA, IgD, IgE, IgG, IgM. Trong đó IgG và IgM là các kháng thể chiếm tỷ lệ chủ yếu trong dịch thể. Phân tử IgM có trọng lượng phân tử 90kD, hằng số lắng 19S, không qua được hàng rào rau thai, IgM xuất hiện sớm sau nhiễm vi rút và tồn tại khoảng 30-90 ngày tùy theo miễn dịch tiên phát hay thứ phát. Sự phát hiện được IgM trong máu là bằng chứng nhiễm mới của vi rút. Bình thường trong dịch não tủy không có IgM, nó chỉ qua hàng rào máu não để thực hiện chức năng bảo vệ. Do vậy, sự phát hiện IgM trong dịch não tủy là tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán VNNB. IgM xuất hiện ở trẻ dưới 1 tuổi là bằng chứng phản ứng bảo vệ của cơ thể, không phải là kháng thể do mẹ truyền [4].

#### **1.2.1.7. Phòng và điều trị**

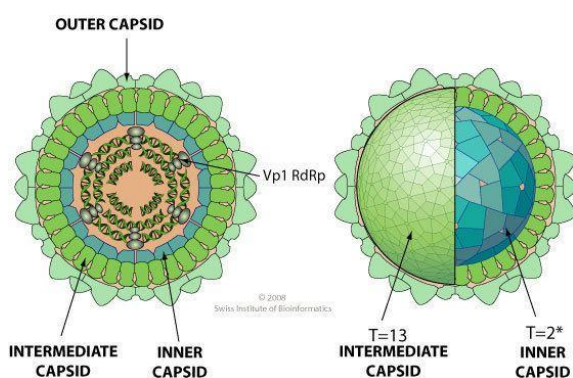
Cho đến nay VNNB vẫn chưa có thuốc điều trị đặc hiệu bệnh VNNB. Điều trị triệu chứng là chủ yếu trong đó công tác hộ lý là quan trọng nhất, chế độ dinh dưỡng đảm bảo, tránh ứ đọng đờm dãi, thông thoáng đường hô hấp, chống suy hô hấp. Điều trị các biến chứng nhiễm khuẩn, loét, di chứng. Việc phòng chống bệnh

VNNB về nguyên tắc có thể phối hợp các biện pháp để cắt đứt một trong ba mắt xích của quá trình dịch là: Ổ chứa vi rút, véc tơ truyền bệnh và khối cảm thụ bệnh. Đối với ổ chứa tự nhiên là các động vật hoang dại, các loài chim không thể kiểm soát được VNNB. Còn đối với các động vật gần người như lợn, trâu, bò, dê, cừu,... cần có quy hoạch chăn nuôi tập trung để phòng tránh sự lây truyền bệnh từ động vật sang người qua muỗi đốt như làm chuồng trại chăn nuôi cần cách xa nhà ở, vệ sinh sạch sẽ, xua đuổi muỗi hoặc diệt trừ muỗi bằng hoá chất. Đối với lợn là ổ chứa vi rút gần người quan trọng nhất, có thể tiêm vắc xin VNNB để ngăn chặn sự lây truyền vi rút VNNB trong tự nhiên, nhưng tính hiệu quả rất thấp [4], [34], [132].

Do vậy, chủ động sử dụng vắc xin là biện pháp phòng bệnh có hiệu quả nhất cho người. Thực tế cho thấy ở các nước như Nhật Bản, Hàn Quốc, Trung Quốc, Đài Loan...việc sử dụng vắc xin phòng bệnh đã góp phần không chế được bệnh VNNB [30], [49], [56], [115], [129]. Tương tự như vậy, ở Việt Nam, kết quả giám sát bệnh VNNB sau sử dụng vắc xin phòng bệnh ở một số tỉnh thành trọng điểm dịch của miền Bắc Việt Nam đã góp phần làm giảm căn nguyên vi rút VNNB gây HCVNC từ khoảng 80% trong năm 2003 xuống còn khoảng 10% trong những năm gần đây [4], [16], [19], [25]. Tổ chức Y tế thế giới, Trung tâm Kiểm soát và dự phòng bệnh (CDC) Hoa Kỳ đã khuyến cáo tiêm vắc xin VNNB không chỉ riêng cho trẻ em mà những người đi du lịch hay đi công tác vào vùng lưu hành vi rút VNNB cũng cần được tiêm vắc xin để dự phòng [132].

## 1.2.2. Vi rút Banna

### 1.2.2.1. Đặc điểm cấu trúc



Hình 1.6. Cấu trúc vi rút Banna [83]

Vi rút Banna thuộc chi Seadornavirus, họ *Reoviridae*, vi rút có vật liệu di truyền là ARN sợi kép gồm có 12 phân đoạn. Vi rút Banna có dạng hình cầu, đường kính virion khoảng 60-70 nm với các gai rất ngắn trên bề mặt, đây là loại vi rút không có vỏ. Quan sát hình thái vi rút Banna bằng kính hiển vi điện tử cho thấy trong tế bào chất của tế bào muỗi C6/36 sau khi nhiễm vi rút Banna (chúng có ký hiệu BAV-Ch) xuất hiện các đám thể vùi (virus inclusion body - VIB). Đây chính là nơi thực hiện quá trình nhân lên và lắp ráp các thành phần của vi rút trong bào tương tế bào [23], [44], [58].

Vi rút Banna có 7 protein cấu trúc, 2 trong số này (VP4 và VP9) tạo thành capsid bên ngoài; Còn ở bên trong lõi có 5 loại protein (VP1, VP2, VP3, VP8 và VP10). Điều khác biệt so với vi rút Rota là vi rút Banna chỉ có một lớp capsid bên ngoài và lõi bên trong, protein VP9 của vi rút Banna có vai trò giúp vi rút gắn kết với màng tế bào chủ trong giai đoạn đầu của quá trình nhiễm trùng. VP2 là protein ‘T=2’ hình thành trong cùng lớp gần nhân. Trong khi đó VP8 là protein ‘T=13’ được hình thành ở lớp bề mặt nhân. Ngoài ra VP9 còn được cho là có liên quan đến đáp ứng miễn dịch và sự xâm nhập của vi rút vào bề mặt tế bào vật chủ [83], [86].

#### **1.2.2.2. Đặc điểm ổ chứa, đường truyền**

Một số nghiên cứu ở Việt Nam và trên thế giới cho thấy BAV tồn tại ở muỗi. Véc tơ truyền BAV đã được khẳng định ở một số nước châu Á bằng kết quả phân lập được vi rút từ một số loài muỗi *Cx.tritaeniorhynchus*, *Cx.vishnui*, *Cx.fuscocephalus*, *Anopheles vagus*, *Aedes albopictus* và *Aedes dorsalis* [9]. Ngoài ra, cũng có bằng chứng về sự lưu hành của BAV trong vật nuôi (lợn) bằng kết quả phân lập vi rút BAV, cho thấy BAV có thể tồn tại ở một số loài chim di cư, đây chính là điều kiện cho sự phát tán vi rút sang các khu vực khác theo thời gian [88].

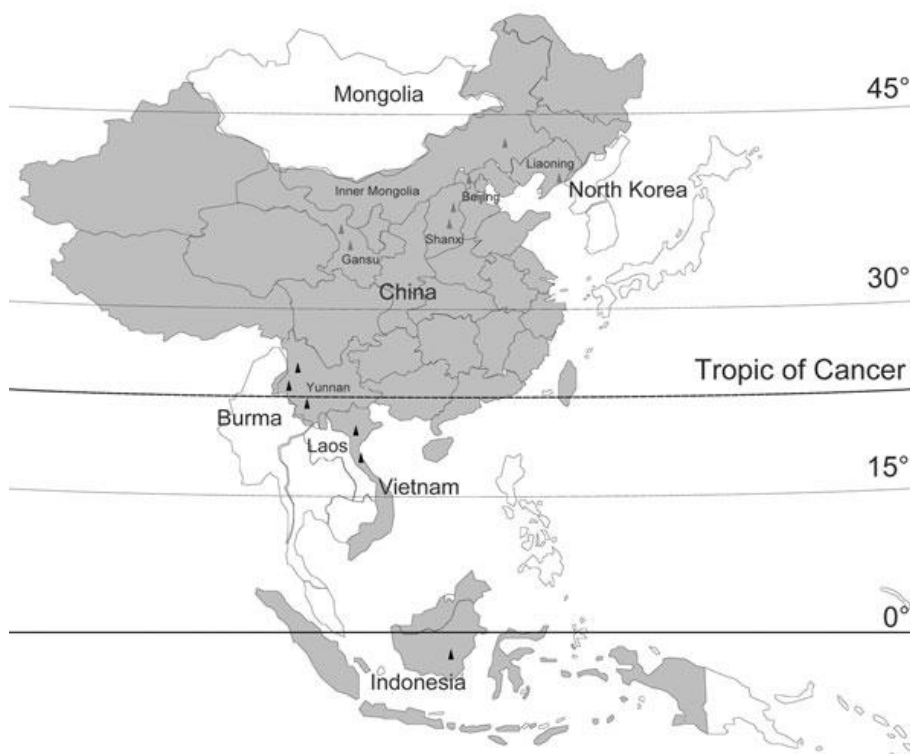
Đối tượng cảm nhiễm của BAV là người, nghiên cứu về BAV ở Trung Quốc, 1987-2007 cho thấy BAV xuất hiện ở những khu vực có dịch VNNB và nơi phát hiện có muỗi *Culex*, đây là loài muỗi đóng vai trò là véc tơ truyền bệnh chính, đồng thời cũng là véc tơ chung của nhiều loại vi rút khác như vi rút VNNB, vi rút Nam



Định. BAV thuộc họ *Reoviridae* nhưng được truyền bởi côn trùng tiết tức nên được xếp là vi rút Arbo [9], [11], [88], [93], [138].

### 1.2.2.3. Đặc điểm dịch tễ

Vi rút Banna được phân lập được từ dịch não tủy của bệnh nhân có HCVNC và từ máu bệnh nhân sốt không rõ nguyên nhân viêm não ở tỉnh Yunnan, Trung Quốc sau đó cũng phân lập được ở các vùng khác nhau từ bệnh nhân, từ muỗi ở Trung Quốc, Indonesia và Việt Nam [14], [83], [88].



**Hình 1.7. Phân bố khu vực phát hiện được vi rút Banna [83]**

### 1.2.2.4. Đặc điểm lâm sàng

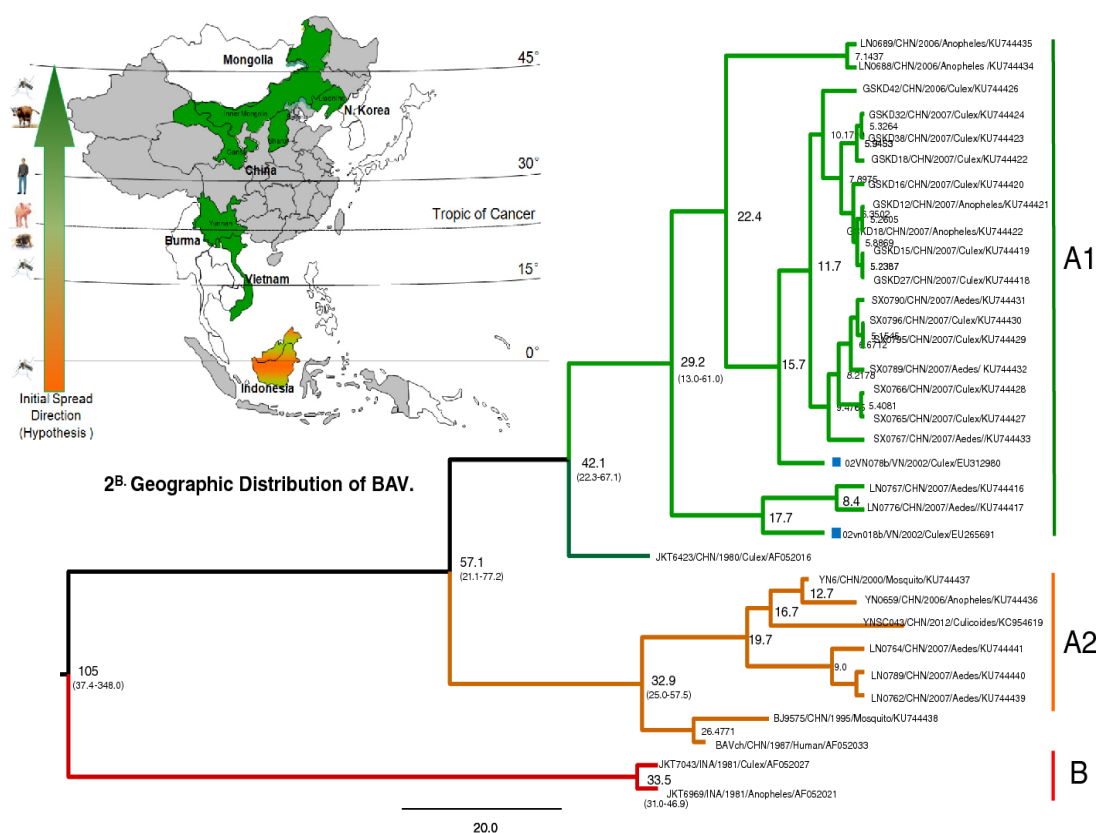
Theo y văn ghi nhận, BAV gây bệnh cấp tính có tổn thương hệ thần kinh trung ương hoặc sốt không rõ nguyên nhân. Thời kỳ khởi phát thường kéo dài 1-2 ngày, nhưng cũng khó xác định khi bệnh nhân không nhớ được chính xác thời điểm xuất hiện triệu chứng sốt cao đột ngột, ớn lạnh, đau đầu, đau cơ khớp, chán ăn. Thời kỳ toàn phát thường kéo dài sau 3-6 ngày, bệnh nhân sốt cao có mê sảng, rối loạn thần kinh thực vật, cứng gáy, thờ ơ với ngoại cảnh có thể hôn mê, khó thở, sợ ánh sáng, chán ăn, buồn nôn. Các triệu chứng tổn thương thần kinh ngoại vi như liệt,

múa vờn, múa giật... Giai đoạn này nếu không cấp cứu và chữa trị kịp thời bệnh nhân dễ tử vong nhất. Những bệnh nhân HCVNC do BAV thường có triệu chứng điển hình như đau cơ, khớp, sốt và viêm não. Tuy nhiên, cũng rất khó chẩn đoán HCVNC do BAV nếu chỉ dựa vào triệu chứng lâm sàng vì có rất nhiều tác nhân vi rút gây HCVNC khác cũng đã được ghi nhận [5], [44], [83]. Thời kỳ tiến triển bán cấp là từ ngày thứ 7- 9 của bệnh, các triệu chứng giảm đi như đỡ sốt, mạch nhiệt ổn định, hội chứng thần kinh trung ương và ngoại vi giảm. Tuy nhiên, thời kỳ này chú ý các biến chứng như viêm phổi, táo bón, có thể bị loét da... do nằm lâu ngày. Trong thời kỳ hồi phục, bệnh nhân chỉ còn sốt nhẹ, tinh táo dần, có cảm giác thèm ăn, chỉ còn lại các di chứng tùy thuộc vào mức độ nặng nhẹ của bệnh như liệt, xuất huyết, viêm cơ tim, viêm màng ngoài tim, trí nhớ kém [5].

#### **1.2.2.5. Đặc điểm phân tử**

Đặc điểm phân tử của BAV cũng như các vi rút khác trong họ *Reoviridae* là ARN sợi kép gồm nhiều phân đoạn. Tùy từng chi vi rút khác nhau số các phân đoạn cũng khác nhau ví dụ như chi *Orthoreovirus* (*Reovirus*), *Orbivirus*, *Rotavirus* là những chi vi rút có 10 hoặc 11 phân đoạn (không có phân đoạn thứ 12), còn chi *Coltivirus* và *Seadornavirus* có 12 phân đoạn. Độ dài các phân đoạn của BAV cũng rất khác nhau dao động trong khoảng 862bp - 3747bp, riêng phân đoạn 12 là ngắn nhất chỉ có 862bp, trong đó có 612bp mã hóa protein VP12, còn lại 250bp là vùng không mã hóa [17], [18], [32].

Trình tự vùng gen số 12 của các chủng BAV thường được lựa chọn để phân tích genotype các chủng BAV phân lập ở Việt Nam và một số vùng địa lý ở châu Á. Kết quả nghiên cứu đã xác định các chủng BAV được chia thành hai genotype khác nhau, các chủng ở Trung Quốc và Việt Nam thuộc genotype A, còn các chủng phân lập từ Indonesia thuộc genotype B. Genotype A được chia thành hai phân nhóm genotype A1 và A2; Trong phân nhóm genotype A1 được chia ra 4 clade độc lập với nhau bao gồm các chủng BAV phân lập tại ở miền Bắc Trung Quốc, Liaoning và Việt Nam; Phân nhóm genotype A2 bao gồm các chủng BAV phân lập ở Miền Trung Việt Nam, Trung Quốc [17], [18], [80].



2A Evolution analysis of BAV isolated worldwide from 1980 to 2012.

**Hình 1.8. Phân tích sự tiến hóa BAV trên thế giới 1980-2012 [80]**

BAV mới được phát hiện vào cuối thế kỷ 20, nghiên cứu thực nghiệm đã khẳng định đây là tác nhân vi rút Arbo gây bệnh cho người mới được phát hiện theo tiêu chuẩn của R.Koch. Giám sát vi rút học cho thấy sự phân bố của BAV ngày càng lan rộng, cùng với các kiểu gen mới phát hiện, cho thấy đây là một tác nhân tiềm tàng đe dọa sức khỏe cộng đồng, cần tăng cường giám sát để định hướng dự phòng bệnh kịp thời [83].

**1.2.2.6. Chẩn đoán**

Chẩn đoán bệnh thường dựa vào biểu hiện lâm sàng, yếu tố dịch tễ và xét nghiệm phát hiện vật liệu di truyền của vi rút hoặc kháng thể đặc hiệu kháng BAV trong dịch não tủy bệnh nhân [5], [26], [83].

**1.2.2.7. Phòng và điều trị**

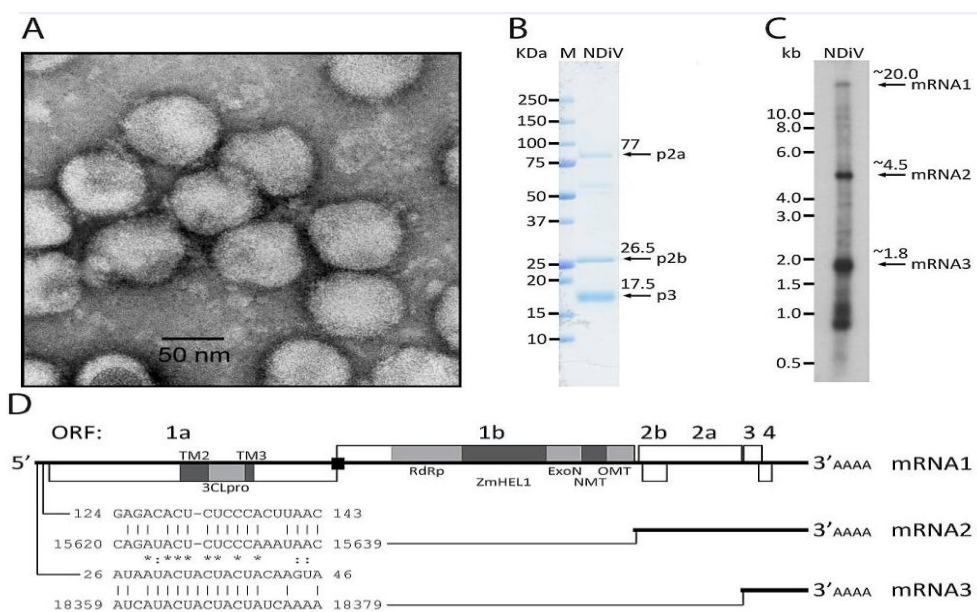
Hiện nay chưa có thuốc điều trị đặc hiệu cho các trường hợp bị HCVNC do BAV, chủ yếu là điều trị triệu chứng hoặc điều trị các biến chứng của bệnh. BAV là một loại vi rút do muỗi truyền mới được phát hiện trong vài thập kỷ vừa qua chủ yếu ở khu vực châu Á, những nghiên cứu về gánh nặng bệnh tật do loại vi rút này chưa được đề cập đến, cho đến nay chưa có vắc xin để phòng bệnh, biện pháp phòng chống hiệu quả nhất hiện nay là phòng chống véc tơ muỗi truyền bệnh.

### 1.2.3. Vi rút Nam Định

#### 1.2.3.1. Đặc điểm cấu trúc

NDiV là thành viên của họ *Mesoniviridea*, vi rút có hình cầu, với đường kính 60-80nm, vật liệu di truyền là sợi đơn dương ARN với kích thước bộ gen 20,192kb [91], [139], [140].

Trình tự vật liệu di truyền của vi rút Nam Định không giống trình tự của các chủng vi rút đã công bố trong ngân hàng gen quốc tế, nó là một loại vi rút hoàn toàn mới lần đầu tiên phát hiện ở Việt Nam có tên khoa học là Nidovirus, cùng với chủng vi rút Cavally phân lập được ở Bồ biển Nga năm 2004, chính thức được công nhận và xếp thành một họ vi rút mới, họ *Mesoniviridae* [91].



**Hình 1.9 Đặc điểm hình thái, cấu trúc vi rút Nam Định [91]**

Cho đến nay, ngoài vi rút Nam Định, một chủng được đặt tên là vi rút Đắc Nông, là vi rút phân lập được từ muỗi, 2013 ở khu vực Tây Nguyên có trình tự nucleotid tương đồng khoảng 75,8-89,5% với vi rút Nam định, được xếp là một nhánh mới thuộc họ vi rút này. Gần đây, vi rút tương tự như vi rút Nam Định cũng được phát hiện ở Trung Quốc, Thái Lan, Indonesia, Mỹ cho thấy, họ *Mesoniviridae* vi rút rất phong phú, có thể có nhiều thành viên, chi nhánh nhưng chưa được phát hiện [76], [84], [128].

### **1.2.3.2. Đặc điểm ổ chứa, đường truyền**

NDiV là một loại vi rút Arbo mới do muỗi truyền, được phân lập từ muỗi *Culex quinquefasciatus* [138], *Culex vishnui* và *Culex tritaeniorhynchus* [91], muỗi *Culex quinquefasciatus* và muỗi *Aedes albopictus* [128]. NDiV thường được phát hiện ở muỗi *Culex*, đặc biệt là *Culex pipiens quinquefasciatus*, chỉ ra rằng muỗi *Culex* là vật chủ chính của NDiV trong tự nhiên. Không có bằng chứng nhiễm trùng động vật có xương sống do loại vi rút này được phát hiện.

### **1.2.3.3. Đặc điểm dịch tễ**

Vi rút Nam Định (NDiV), sau khi được phân lập lần đầu tiên từ bệnh phẩm bệnh nhi 20 tháng tuổi thuộc tỉnh Nam Định năm 2002. Năm 2003, tiếp tục phân lập được trên bệnh nhân tại Hà Nội và Hà Tây cũ [12], [13]. Các nghiên cứu về tỷ lệ mắc, đặc điểm phân bố theo lứa tuổi, địa dư, giới, thời gian...tại Việt Nam và trên thế giới còn nghèo nàn. Trong nghiên cứu phát triển sinh phẩm chẩn đoán NDiV trong HCVNC giai đoạn 1998-2004, tỷ lệ xác định HCVNC do NDiV là 12% trong số các trường hợp HCVNC nghi ngờ do vi rút đã loại trừ căn nguyên VNNB [13].

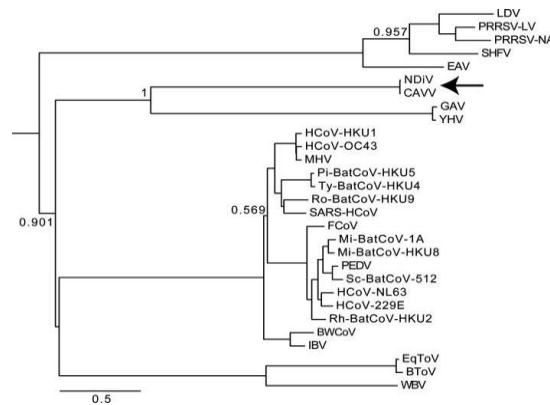
### **1.2.3.4. Đặc điểm lâm sàng**

Triệu chứng lâm sàng mang đặc điểm chung của HCVNC, sốt chưa rõ nguyên nhân.

### **1.2.3.5. Đặc điểm phân tử**

Đặc điểm phân tử của NDiV cũng như các vi rút khác trong họ *Mesoniviridae* là ARN sợi đơn dương (ssRNA +), mang đặc điểm cấu trúc bộ gen với nhiều khung

đọc mở (ORF<sub>s</sub>), kích thước bộ gen ~20kb, là trung gian phạm vi kích thước giữa các bộ gen của nidovirus kích thước nhỏ và kích thước lớn. Sự tương đồng về tổng thể giữa bộ gen CAVV và NDiV được tìm thấy rất cao: kích thước gần giống nhau (lần lượt là 20,187 và 20,192bp), vùng bảo tồn ORF với các đặc điểm nhận dạng trình tự từ 87,8% - 96,1% ở mức axit amin và từ 88,3% đến 93,7% ở mức nucleotide [91].



**Hình 1.10. Cây phát sinh loài của một số vi rút họ *Misoniviridae* [76]**

Trong một nghiên cứu tại Trung Quốc, giải trình tự gen vi rút NDiV, so sánh trình tự acid amin của sáu ORF chính của NDiV-SZ1106Z và NDiV-02VN178 cho thấy sự khác biệt chủ yếu là do đột biến thay thế; không chèn cũng không xóa đột biến, còn sự tương đồng thấp nhất được xác định trong ORF3b. Mặc dù Zirkel suy đoán rằng ORF3b có liên quan đến quá trình tổng hợp mRNA3 và protein mã hóa (M) và màng bao (E), vai trò cụ thể của nó vẫn chưa được xác định [138]. Cần có nghiên cứu thêm để làm sáng tỏ quá trình tổng hợp protein và cấu trúc của sự khác biệt trình tự aa được mã hóa bởi ORF3b của các vi rút được phân lập ở các khu vực.

#### **1.2.3.6. Chẩn đoán**

Chẩn đoán dựa vào biểu hiện lâm sàng, yếu tố dịch tễ và xét nghiệm phát hiện vật liệu di truyền của vi rút hoặc kháng thể kháng vi rút trong dịch não tủy [13]. Cho đến nay, nghiên cứu để xác định NDiV là tác nhân gây bệnh ở người theo tiêu chuẩn của R. Koch đang được tiếp tục thực hiện [2].

#### **1.2.3.7. Phòng và điều trị**

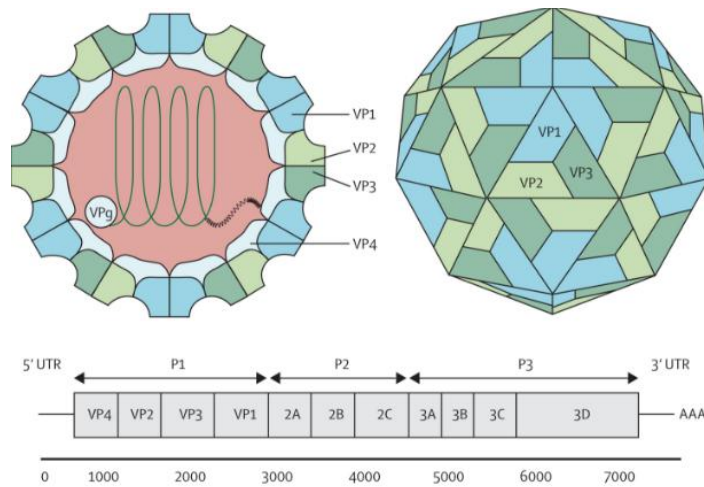
Hiện nay chưa có thuốc điều trị đặc hiệu cho các trường hợp bị HCVNC do NDiV, chủ yếu là điều trị triệu chứng hoặc điều trị các biến chứng của bệnh. NDiV

là một loại vi rút do muỗi truyền mới được phát hiện trong những năm đầu thế kỷ XXI, những nghiên cứu về đặc điểm lâm sàng, dịch tễ, cơ chế bệnh sinh, miễn dịch, đặc điểm vi rút, gánh nặng bệnh tật chưa được đề cập đến, biện pháp phòng chống hiệu quả nhất hiện nay là phòng chống véc tơ muỗi truyền bệnh.

## 1.2.4. Vi rút đường ruột

### 1.2.4.1. Đặc điểm cấu trúc

VRĐR là vi rút thuộc chi *Enterovirus* trong họ *Picornaviridae*. Có bảy loài *Enterovirus* gây bệnh cho người: *Enterovirus A-D* và *Rhinovirus A-C*. Trong khi rhinoviruses thường gây ra bệnh hô hấp nhẹ, enteroviruses A-D (EVs) là nguyên nhân quan trọng gây bệnh và tử vong trên toàn thế giới [44], [74]. Trước khi được phân loại lại là VRĐR A-D, VRĐR ban đầu được phân loại là polioviruses (PV) 1-3, coxsackieviruses (CV) A1-24 và B1-6, echovirus (ECV) 1-33 và các VRĐR khác (68-121) [2].



**Hình 1.11. Cấu trúc vi rút đường ruột [114]**

Cấu trúc hạt vi rút hình khối cầu (20 mặt đối xứng), đường kính 30nm; không có vỏ bao. Vỏ capsid gồm 60 đơn vị (protomers) hợp thành, mỗi đơn vị cấu trúc bởi 4 polypeptid VP1, VP2, VP3, VP4. VP4 nằm ở mặt trong vỏ capsid. Cấu trúc bộ gen của vi rút đường ruột gồm: một chuỗi đơn dương RNA, mạch thẳng, không phân đoạn, dài khoảng 7,4 kb. Có protein VPg gắn ở đầu 5' thay vì cấu trúc nucleotide được methyl hóa. Vùng không dịch mã (UTR) ở đầu 5' chứa vị trí gắn

của ribosom type I (IRES). Vùng P1 mã hóa cho các polypeptides cấu trúc. Vùng P2 và P3 mã hóa cho các protein không cấu trúc liên quan đến quá trình nhân lên của vi rút. Có đuôi polyA gắn ở đầu 3'. Vùng 3' không dịch mã có vai trò quan trọng trong việc tổng hợp sợi âm ARN [118].

#### **1.2.4.2. Đặc điểm ổ chứa, đường truyền**

Nguồn truyền bệnh là người bệnh và người mang vi rút. Đường truyền bệnh chủ yếu lây truyền qua đường tiêu hóa, thứ yếu qua đường hô hấp, qua những giọt nhỏ trong giai đoạn đầu của bệnh đối với người tiếp xúc gần [1].

#### **1.2.4.3. Đặc điểm dịch tễ**

Từ báo cáo đầu tiên trong những năm 1950-1960 về những bệnh nhân viêm não do VRĐR, đến nay đã có nhiều báo cáo về các vụ dịch viêm não do VRĐR trên thế giới [28], [46], [54], [73], [101]. Tỷ lệ HCVNC do VRĐR khác nhau tùy theo vùng địa lý, khí hậu và mùa. Bệnh xảy ra nhiều hơn tại vùng nhiệt đới và ôn đới, vào mùa hè và mùa thu, nhưng cao quanh năm ở các nước nhiệt đới và cận nhiệt đới. Tỷ lệ HCVNC do VRĐR chiếm khoảng 21-22% các trường hợp được xác định ở các vùng địa lý khác nhau. Mọi lứa tuổi, cao nhất là trẻ em dưới 5 tuổi và sau đó giảm dần ở lứa tuổi lớn hơn, số mắc ở trẻ khoảng 75%, nam cao hơn nữ [21], [40], [78], [103], [111].

#### **1.2.4.4. Đặc điểm lâm sàng**

Bệnh cảnh lâm sàng của HCVNC do VRĐR rất đa dạng bao gồm các hội chứng như viêm não, màng não, hiếm gặp hơn là thể liệt mềm giống bại liệt, hội chứng run giật cơ, tăng áp lực nội sọ. Dấu hiệu khởi phát thường là sốt, 97% có rối loạn tri giác, 72% rối loạn trương lực cơ, 52% hội chứng màng não, 36% co giật toàn thân [35], [61], [75], [77], [137].

#### **1.2.4.5. Đặc điểm phân tử**

Các VRĐR có bộ gen là ARN sợi đơn, là một chi lớn thuộc họ *Picornaviridae*. Theo nghiên cứu trước đây, VRĐR gây bệnh ở người có hơn 100 týp huyết thanh được chia thành bốn dưới nhóm: Polio (3 týp huyết thanh); Coxsackie A (23 týp huyết thanh); Coxsackie B (6 týp huyết thanh); Echo (28 týp

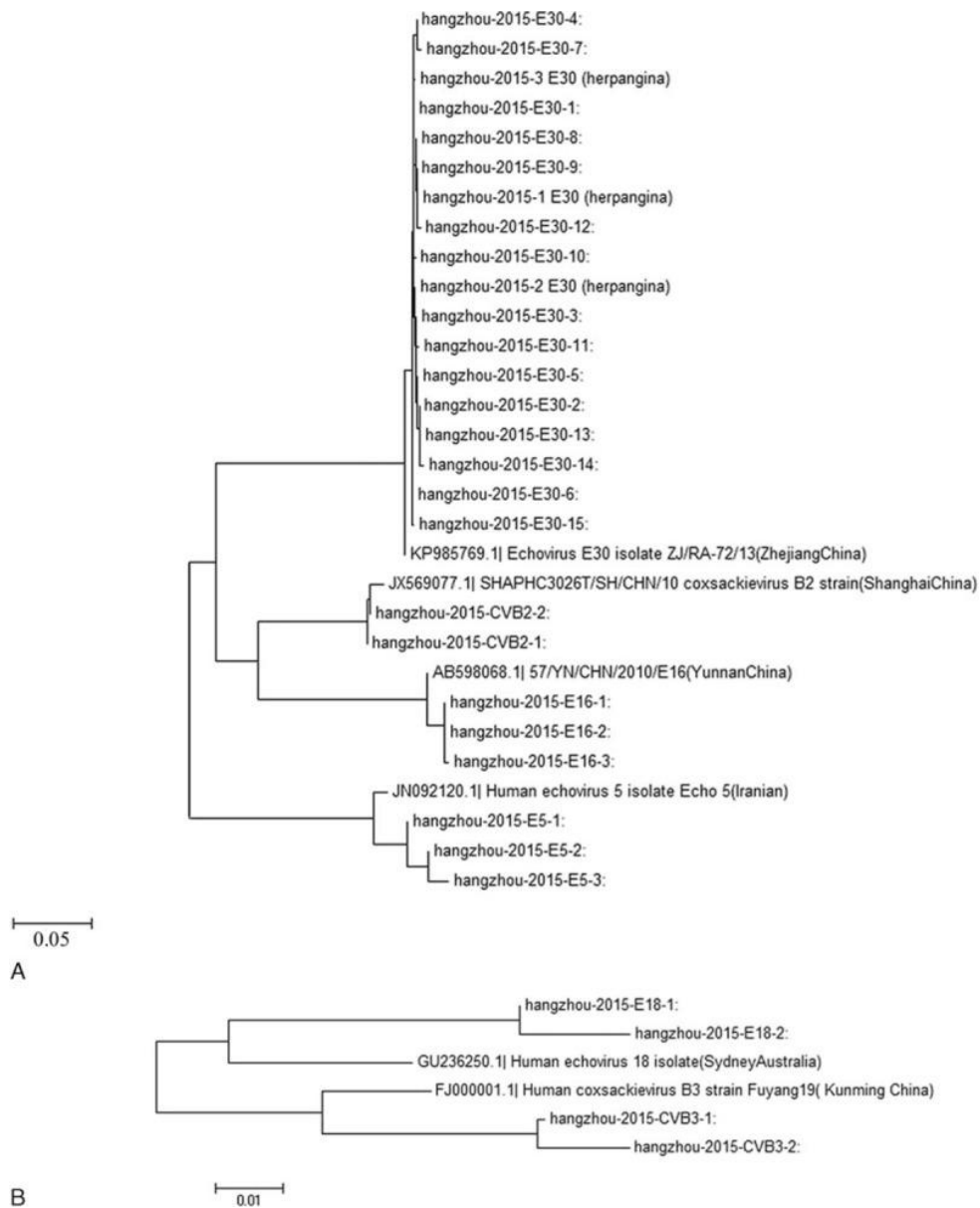


huyết thanh) và các vi rút đường ruột khác [74]. Hiện nay các chủng VRĐR gây bệnh ở người chia thành 4 nhóm từ A đến D và đánh số để chỉ týp huyết thanh.

Trong nghiên cứu về đặc điểm phân tử của VRĐR thường sử dụng các gen đích khác nhau của vùng không dịch mã 5'(5'UTR), gen VP1, VP4/VP2, VP3. Lợi ích của RT-PCR và giải trình tự gen là khả năng phát hiện rộng và khuếch đại các gen đích của VRĐR, không kể nhóm gen và týp huyết thanh của VRĐR, có thể bao gồm cả những chủng mới xuất hiện và các týp huyết thanh mới của VRĐR [61].

Trên thế giới, nghiên cứu tại Hungary trong vụ dịch năm 1978 đã xác định EV71 trong số 323 ca viêm màng não vô khuẩn, gồm cả vi rút được phân lập từ hệ thần kinh trung ương và từ mẫu phân. Các báo cáo về dịch tế học tại châu Mỹ đã cho thấy EV71 có độc lực hướng thần kinh và liên quan tới mức độ nặng của bệnh như một nghiên cứu tại Brazil trong 3 năm (1988-1990) xác định EV71 là căn nguyên của phần lớn các trường hợp bệnh lý thần kinh. Trong giai đoạn 2000-2001, Vương quốc Anh, các quốc gia châu Âu khác, Úc và Mỹ đã trải qua một đợt bùng phát nhiễm trùng echovirus, với echovirus 13 chiếm ưu thế vào năm 2000 và echovirus 30 vào năm 2001. Echovirus 30 là một trong những kiểu gen phổ biến nhất của VRĐR, là tác nhân gây ra dịch bệnh và là nguyên nhân chủ yếu là viêm não-màng não ở trẻ em và người lớn. Trong những năm gần đây, nghiên cứu tại Mỹ và Anh cho thấy tỷ lệ viêm não do VRĐR chiếm 51,6%-52% gặp chủ yếu Echovirus, Coxsackie A, Coxsackie B và Enterovirus [54], [61], [65].

Một nghiên cứu giám sát dài hạn trong khoảng thời gian 11 năm (2002–2012) ở miền đông Trung Quốc đã xác định các Coxsackia A9, B1, B2, B3, B4 và B5 và các vi rút Echo 3, 4, 6, 9, 14, 25 và 30 từ các ca bệnh viêm não chưa xác định nguyên nhân, đặc biệt Coxsackia B4 đã được xác định lần đầu tiên trong khu vực này. Ngoài ra, trong giai đoạn 2002-2004 và 2010-2012, ECV 30 được phát hiện là týp huyết thanh chiếm ưu thế định kỳ ở những bệnh nhân viêm não do VRĐR [61].



**Hình 1.12. Phân tích phát sinh loài của vi rút đường ruột gây viêm não tại Hàng Châu, Trung Quốc dựa trên trình tự gen VP1 (A), 5'UTR (B) [81].**

Tại Việt Nam, các nghiên cứu đã chỉ ra một số VRĐR gây viêm não màng não như Coxackievirus A, B. Cụ thể là các týp A9, A10, B5, các vi rút Echo týp 4, 5, 9, 11, 19, 30 và các týp EV71, 75, 76, 89 [94], [102], [124].

Trong những năm gần đây vai trò của EV71 đang được chú ý vì tỷ lệ viêm não-màng não trong các vụ dịch Tay Chân Miệng ở khu vực Châu Á-Thái Bình dương và Đông Nam Á chủ yếu do EV 71 [61], [118]. VRĐR đã nổi lên như một

trong những tác nhân gây bệnh quan trọng gây HCVNC ở cả trẻ em và người lớn. Cần có những giám sát, nghiên cứu về sự phân bố, về đặc điểm lâm sàng, đặc điểm sinh học phân tử để có biện pháp dự phòng phù hợp. Nghiên cứu về đặc điểm phân tử của VRĐR ở Việt Nam chủ yếu mới đề cập đến EV71, Coxsackia, còn đối với các Echo còn rất nghèo nàn.

#### **1.2.4.6. Chẩn đoán**

Chẩn đoán HCVNC do VRĐR dựa vào dấu hiệu lâm sàng và các xét nghiệm xác định căn nguyên VRĐR. Chẩn đoán xác định dựa vào phân lập được VRĐR, PCR VRĐR (+) hoặc kỹ thuật ELISA phát hiện kháng thể IgM kháng VRĐR trong dịch não tủy. Tiêu chuẩn vàng để xác định nhiễm VRĐR là phân lập được vi rút, nhưng nhược điểm của phương pháp này là độ nhạy còn thấp. Kỹ thuật sinh học phân tử ra đời là một bước tiến lớn trong chẩn đoán vi sinh, kỹ thuật semi nested RT-PCR phát hiện EV cho kết quả xét nghiệm nhanh, độ nhạy và độ đặc hiệu cao (85,7% và 93,9%). Kỹ thuật semi nested RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) và giải trình tự gen (sequencing) để xác định tít vi rút gây bệnh [65], [87], [94], [96], [104].

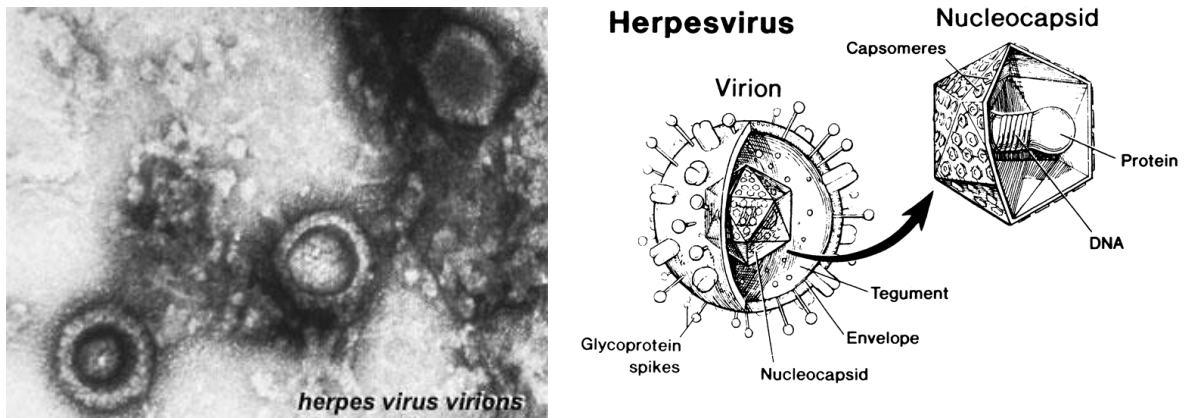
#### **1.2.4.7. Phòng và điều trị**

Trước đây không có thuốc điều trị đặc hiệu HCVNC do VRĐR, điều trị triệu chứng bệnh là chủ yếu, nâng cao thể trạng và điều trị di chứng nếu có. Nhưng gần đây đã sử dụng một số thuốc kháng vi rút để điều trị và đặc biệt sử dụng globulin miễn dịch truyền theo đường tĩnh mạch [61]. Tỷ lệ tử vong của HCVNC do VRĐR là 15,2%-19,3%; tỷ lệ di chứng 15%; tỷ lệ khỏi hoàn toàn là 69,7% [1], [111]. Hiện nay mới có vắc xin phòng bệnh bại liệt, vắc xin phòng EV 71 đang trong quá trình nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng. Do vậy để dự phòng HCVNC do VRĐR chủ yếu là phòng bệnh không đặc hiệu với các biện pháp chẩn đoán, phát hiện kịp thời, cách ly bệnh nhân và tẩy uế, khử trùng những chất thải, đồ dùng có liên quan tới bệnh nhân bằng chất khử trùng; Đối với đường truyền nhiễm, thực hiện ăn chín, uống sôi, đảm bảo các chỉ tiêu về an toàn thực phẩm, về sinh cá nhân, vệ sinh nguồn nước [59], [60].

## 1.2.5. Vi rút Herpes

### 1.2.5.1. Đặc điểm cấu trúc

Vi rút thuộc họ *Herpesviridae* có dạng hình cầu, đường kính 120-200nm. Đặc điểm cấu trúc hạt vi rút gồm 4 thành phần: Vật liệu di truyền là sợi ADN kép, vỏ capsid (nucleocapsid) đối xứng xoắn hình trụ, kích thước khoảng 100nm và có 162 mặt (capsomer); có vỏ bao ngoài (envelop) do vi rút đã lấy từ màng nhân tế bào vật chủ và mang những glycoprotein có nguồn gốc vi rút; lớp tegument - là lớp protein sợi nằm giữa vỏ ngoài và capsid [44].



**Hình 1.13. Cấu trúc vi rút Herpes [44]**

ADN vi rút được các protein kiềm bao bọc để tạo nên cấu trúc lõi hạt vi rút, kích thước biến động từ 123Kbp (VZV) đến 230Kbp (HCMV) và mã hóa 70-200 protein. ADN có trình tự lặp lại đảo ngược ở hai đầu hoặc ở giữa và dựa vào đặc điểm này các vi rút herpes gây bệnh ở người được chia làm 6 nhóm. Tỷ lệ GC dao động từ 42% (HCMV) đến 69% (HSV2), có khoảng 40 gen đồng nhất nằm trên 7 khu vực ổn định, chủ yếu là các gen mã hóa protein capsid, protein điều hòa quá trình nhân lên của ADN, glycoprotein và protein vỏ bao, genôm có ít khu vực không mã hóa và ARN được phiên mã từ cả 2 chuỗi ADN [24], [44].

### 1.2.5.2. Đặc điểm ổ chứa, đường truyền

HSV lây trực tiếp từ người sang người, chủ yếu qua nước bọt, qua tiếp xúc với da và niêm mạc tổn thương do HSV.

Do rất dễ lây truyền nên hầu hết mọi người đều bị nhiễm ở tuổi thiếu niên. Biểu hiện đầu tiên của nhiễm HSV thường là viêm miệng, sau đó HSV xâm nhập vào vào hạch dây thần kinh giao thoa và tồn tại ở đó dưới dạng thể vùi. Từ đây HSV có thể tái hoạt động, gây các bệnh lý ở môi, da, niêm mạc và có thể theo dây thần kinh giao thoa xâm nhập vào não - màng não, gây tổn thương chủ yếu ở vùng hố não trước và não giữa [1].

### **1.2.5.3. Đặc điểm dịch tễ**

Từ thập niên 1920, ủy ban Mathewson đã đưa ra báo cáo sớm nhất về HSV gây viêm não ở người, một loại vi rút tiềm ẩn. Theo ước tính, trên thế giới có tới 90% người đã từng bị nhiễm HSV, gần như tất cả mọi người đều bị nhiễm HSV sau tuổi 40. HSV lây truyền qua tiếp xúc trực tiếp với vùng da hoặc niêm mạc bị tổn thương nhưng cũng có thể lây khi tiếp xúc với người mang vi rút không có triệu chứng qua dịch tiết (nước mũi, nước bọt, dịch tiết đường sinh dục...), vào máu và đến khu trú ở các hạch thần kinh. Hiện nay, có 8 loại HSV gây bệnh cho người đã được xác định như: Vi rút Herpes simplex type 1 (HSV-1); Vi rút Herpes simplex type 2 (HSV-2); Vi rút varicella-zoster (VZV-HSV-3); Vi rút Epstein barr (EBV-HSV-4) Cytomegalovirus (CMV- type 5); Vi rút Human Herpes type 6 (HHV-6); Vi rút Human Herpes type 7 (HHV-7)... trong đó có type 1 dễ gây viêm não nhất chiếm 90%. Viêm não do HSV-1 có bệnh lý nặng và tỷ lệ tử vong rất cao. Việc chẩn đoán xác định còn nhiều khó khăn nên tỷ lệ phát hiện bệnh rất thấp, nhiều ca bị bỏ sót. Bệnh xảy ra rải rác, không thành dịch, thường diễn biến nặng, gây tử vong hoặc để lại di chứng khiến trẻ khó thích nghi với cuộc sống sau này [44], [127], [130], [131], [133].

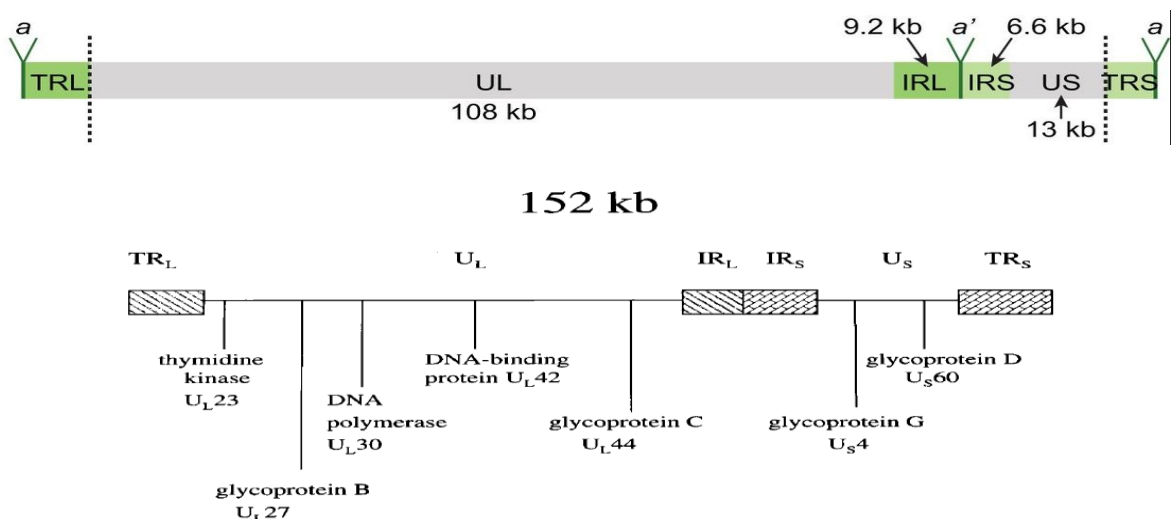
Viêm não do HSV xảy ra rải rác quanh năm, thường gặp vào mùa hè và đầu thu. HSV-1 là vi rút thường gặp nhất trong viêm não vi rút cấp lẻ tẻ ở các nước châu Âu và trên toàn thế giới. Tần suất mắc 1/250.000-1/500.000 dân/năm tại các nước công nghiệp, ở Hoa Kỳ mỗi năm có khoảng 2000 trường hợp mắc bệnh [31], [131], [133]. Tại Việt Nam các số liệu báo cáo về viêm não do HSV còn nghèo nàn. Trước đây, viêm não do HSV thường chỉ được chẩn đoán theo kinh nghiệm lâm sàng,

thiếu các xét nghiệm khẳng định, khó khăn trong kỹ thuật chẩn đoán, kỹ thuật nuôi cấy phân lập vi rút hoặc phát hiện vật liệu di truyền của vi rút (PCR) chưa được phổ cập rộng rãi, chỉ có rất ít phòng xét nghiệm trong nước có khả năng thực hiện chẩn đoán HSV. Những năm gần đây, nhờ sự hỗ trợ của kỹ thuật sinh học phân tử và chẩn đoán hình ảnh, một số công bố về phát hiện các ca bệnh ở Hà Nội và thành phố Hồ Chí Minh [10], [24], [102], [124]. Theo Phạm Nhật An viêm não cấp do HSV ở trẻ em đang có xu hướng gia tăng, chỉ đứng sau VNNB, gặp chủ yếu ở nhóm trẻ dưới 5 tuổi [1].

#### 1.2.5.4. Đặc điểm lâm sàng

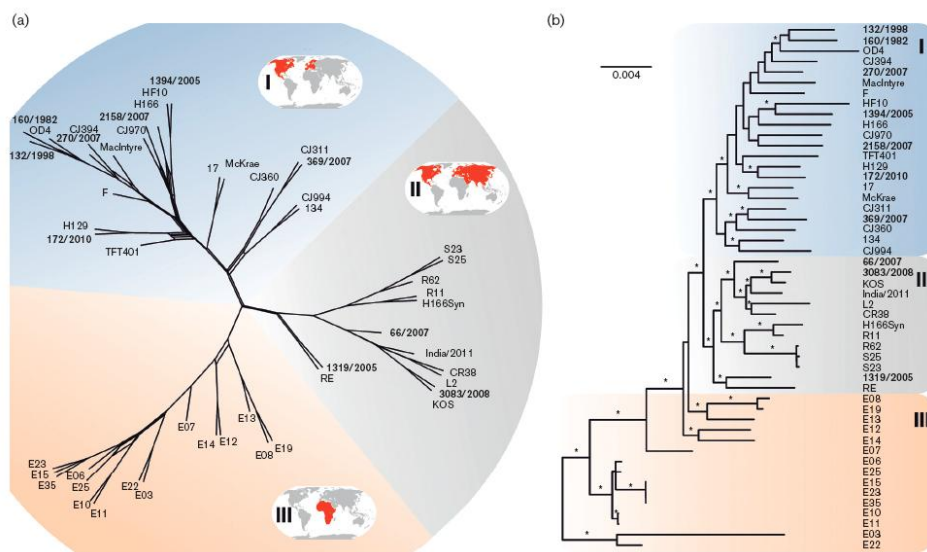
Triệu chứng lâm sàng của HCVNC do HSV1 rất đa dạng bao gồm rối loạn tri giác, sốt và co giật là những dấu hiệu đầu tiên thường được ghi nhận; Trẻ lớn thường có thêm các triệu chứng như đau đầu, thay đổi tính tình, ngoài ra những biểu hiện khác có thể gặp là nôn ói, hay quên. Tỷ lệ gặp các triệu chứng trên lâm sàng như sốt (92,3%), co giật (32% - 84,6%), tăng trương lực cơ (23%-74,4%), rối loạn tri giác (13%-58,9%) [1], [33], [44], [133]. Trên 70% bệnh nhân không điều trị sẽ diễn tiến đến tử vong, chỉ có 2,5%-3% trong số bệnh nhân sống sót phục hồi chức năng thần kinh bình thường [33], [127], [131].

#### 1.2.5.5. Đặc điểm phân tử



Hình 1.14. Cấu trúc phân tử HSV - 1 [44]

Vi rút Herpes thuộc họ *Herpesviridae*, nhóm *Anpha herpesviridae*, giống *simplexvirus*. Bộ gen của HSV là ADN sợi kép, dài khoảng 152 kb với tỷ lệ CG chiếm khoảng 68% [85]. Bộ gen của HSV chứa đoạn trình tự đặc trưng “U<sub>L</sub> (unique long) và U<sub>S</sub> (unique short). Ở đầu và cuối các đoạn gen này có chứa các đoạn lặp lại: đoạn lặp đầu-cuối (TR<sub>L</sub> và TR<sub>S</sub>: Terminal repeat long, terminal repeat short) cũng như các đoạn lặp bên trong (IR<sub>L</sub> và IR<sub>S</sub>: internal repeat long, internal repeat short) tùy thuộc vào vị trí của các đoạn lặp này trên vùng U<sub>L</sub> hay U<sub>S</sub>. Ngoài ra, bộ gen của HSV-1 còn chứa các đoạn lặp ngắn (<100bp) (short tandem repeats: STRs) và các đoạn lặp trung bình (variable number of tandem repeats: VNTRs) với chiều dài khoảng >500bp. Bộ gen của HSV-1 chứa rất nhiều các đoạn đọc mã mở (ORFs: open reading frames) có thể mã hóa cho khoảng 74 protein. Trong các loại HSV, HSV2 hay gây viêm não ở trẻ sơ sinh và thường gây nhiễm mạn tính. HSV1 là typ gây viêm não phổ biến nhất, chiếm tới 90% nhưng thường gây ra bệnh cảnh lâm sàng nặng nề và tỷ lệ tử vong rất cao. Hiện nay, các nghiên cứu về sinh học phân tử của HSV gây viêm não rất hạn chế, các kết quả nghiên cứu thường không phân tách HSV gây viêm não và gây các tổn thương khác. Nghiên cứu về sinh học phân tử của HSV gây HCVNC còn nghèo nàn, các nghiên cứu chủ yếu đề cập đến việc phân tít HSV1, HSV2 và các tít khác [24], [33], [37].



**Hình 1.15. Phân tích di truyền dựa trên trình tự toàn bộ genome của 50 chủng HSV-1[45].**

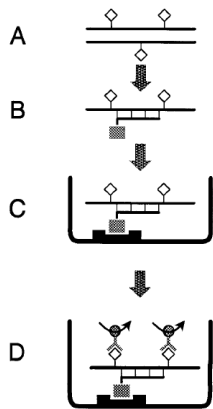
Một nghiên cứu gần đây phân tích đặc điểm sinh học phân tử của HSV-1 dựa trên toàn bộ bộ gen cho thấy HSV-1 là vi rút có tốc độ tiến hóa nhanh nhất trong nhóm *Alphaherpesvirus* trên người (p-distance khi so sánh theo cặp là 75,6%). Tốc độ tiến hóa của HSV-1 chủ yếu hiện tượng tái tổ hợp. Nghiên cứu đặc điểm sinh học phân tử cho thấy có thể phân chia HSV-1 thành ba nhóm chính, phù hợp với đặc điểm phân bố địa dư: (1) chủng Tây bán cầu gồm Châu Âu và Bắc Mỹ, (2) chủng Châu Á và (3) chủng châu Phi [45].

#### **1.2.5.6. Chẩn đoán**

Chẩn đoán HCVNC do HSV dựa vào các triệu chứng lâm sàng, cận lâm sàng (hình ảnh CT hay MRI thấy tổn thương não hay gặp ở thùy thái dương và thùy trán). Chẩn đoán đặc hiệu HCVNC do HSV dựa vào xét nghiệm PCR với cặp mồi đặc hiệu HSV để phát hiện vật liệu di truyền của HSV trong dịch não tủy hoặc mô bị thương tổn của bệnh nhân [1], [33]. Việc chẩn đoán sớm căn nguyên HSV ở bệnh nhân HCVNC có ý nghĩa vô cùng quan trọng để sử dụng thuốc điều trị đặc hiệu kịp thời. Kết quả phân lập HSV từ mẫu dịch não tủy dương tính chỉ có 4%, nên kỹ thuật PCR phát hiện ADN của HSV được coi là phương tiện chẩn đoán đầu tay tại các phòng xét nghiệm. Tuy nhiên, việc ứng dụng kỹ thuật PCR để phát hiện ADN của HSV cũng vẫn còn gặp nhiều thách thức, việc phân tít cũng chưa có quy định thống nhất. Để phát hiện HSV, thường dựa vào 7 vùng mã hóa chính phân bố dọc theo vùng  $U_L$  và  $U_S$  (unique long, unique short) của bộ gen HSV.

Ngoài ra, các kỹ thuật kết hợp khác cũng đang được phát triển và áp dụng nhằm nâng cao độ nhạy của phương pháp phát hiện HSV từ mẫu dịch não tủy. Một trong số những kỹ thuật này là PCR-ELISA. Sản phẩm PCR sẽ được gắn biotin tóm bắt DNA đặc hiệu cho HSV. Sau đó, phức hợp này sẽ kết hợp với streptavidin phủ bản trong giếng nhựa ELISA. Phản ứng này được phát hiện nhờ hệ thống cơ chất giống như kỹ thuật ELISA kinh điển và kết quả biểu thị bằng mật độ quang học (OD) đọc được bằng máy đọc ELISA.





**Hình 1.16. Kỹ thuật PCR ELISA phát hiện vi rút Herpes simplex trong dịch não tủy.** (A): quá trình khuếch đại: enzyme Taq polymerase gắn digoxigenin-11-dUTP vào đoạn ADN đích; (B): đầu dò gắn biotin tóm bắt phần digoxigenin; (C): Phức hợp bị tóm bắt bởi streptavidin gắn trên đáy của giếng nhựa; (D): phức hợp được phát hiện bởi hệ thống cộng hợp (kháng thể peroxidase- conjugated anti-digoxigenin và cơ chất (ABTS)).

#### 1.2.5.7. Phòng và điều trị

HCVNC do HSV-1 là bệnh vi rút có thuốc đặc trị, đó là Acyclovir. Thuốc giúp giảm tỷ lệ tử vong từ 70% xuống còn 19% và tăng tỷ lệ hồi phục hoàn toàn chức năng thần kinh lên 38%. Sử dụng thuốc càng sớm thì khả năng hồi phục càng cao, do vậy chẩn đoán phát hiện HCVNC do HSV rất quan trọng để định hướng cho điều trị bệnh kịp thời [1], [33].

Hiện chưa có vắc-xin phòng bệnh do HSV, việc phòng bệnh chủ yếu là cách ly với nguồn lây, đặc biệt với đối tượng có tổn thương hệ miễn dịch.

### 1.3. PHƯƠNG PHÁP CHẨN ĐOÁN VÀ NGHIÊN CỨU PHÂN TỬ VI RÚT

#### 1.3.1. Phương pháp chẩn đoán

- Phương pháp chẩn đoán trực tiếp: Chẩn đoán hình ảnh đại thể (quan sát bằng kính hiển vi điện tử, quan sát bằng kính hiển vi điện tử phối hợp miễn dịch hiển vi điện tử, phương pháp hóa mô miễn dịch); Phát hiện kháng nguyên (phương pháp miễn dịch gắn Enzyme, phương pháp sắc ký miễn dịch); Phát hiện vật liệu di truyền (phương pháp lai ghép, PCR/RT-PCR, LAMP/RT-LAMP, Realtime PCR/RT-PCR, PCR/sequencing) và nuôi cấy phân lập vi rút [2].

- Phương pháp chẩn đoán gián tiếp: Phương pháp ức chế ngưng kết hồng cầu, phương pháp kết hợp bổ thể, phương pháp trung hòa (trên động vật hoặc tế bào), phương pháp miễn dịch gắn enzyme (phương pháp capture, phương pháp

sandwich), phương pháp Dot blot, phương pháp sắc ký miễn dịch và miễn dịch huỳnh quang [2].

Tùy mục đích chẩn đoán, tùy loại vi rút, tùy loại bệnh phẩm, thời điểm lấy bệnh phẩm, tùy vào độ nhạy, độ đặc hiệu của từng phương pháp mà có lựa chọn khác nhau. Trong nghiên cứu căn nguyên vi rút gây HCVNC, phụ thuộc vào các tác nhân đích mà một số phương pháp xét nghiệm huyết thanh học, phân lập vi rút bằng nuôi cấy tế bào và phản ứng chuỗi polymerase (PCR) thường được sử dụng một số phương pháp kinh điển hoặc hiện đại, hoặc kết hợp giữa kinh điển và hiện đại.

#### **1.3.1.1. Phương pháp phân lập vi rút**

- Nguyên lý: Vi rút là ký sinh nội bào bắt buộc phải có tế bào sống để nhân lên. Phân lập vi rút bằng tế bào một lớp hay bằng động vật phòng thí nghiệm. Động vật thí nghiệm dùng để phân lập vi rút thường có 3 loại chính là khí, thỏ và chuột (chuột ỏ, chuột trường thành thuộc các dòng hanster, swiss trắng...), gây nhiễm bằng cách tiêm truyền qua não, bụng, dưới da hay tiêm bắp. Các dòng tế bào tiên phát và tế bào thường trực, tùy theo tính cảm nhiễm của tế bào với từng loại vi rút mà chọn dòng tế bào thích hợp. Tế bào tiên phát là tế bào trực tiếp được tách ra từ mô của sinh vật sống như tế bào thận khí tiên phát, là dòng tế bào nhạy cảm với nhiều loại vi rút khác nhau, nhưng dòng tế bào này khó chủ động trong công việc và chi phí cao lên ít được sử dụng trong phân lập vi rút mà chủ yếu được sử dụng trong phát triển vắc xin dự phòng. Tế bào thường trực là dòng tế bào đã được thuần chủng và có khả năng giữ được trong phòng thí nghiệm trong thời gian dài ở điều kiện lạnh sâu  $-196^{\circ}\text{C}$ . Có nhiều các dòng tế bào thường trực khác nhau, mỗi dòng có khả năng nhạy cảm với từng nhóm vi rút, đây là dòng tế bào được sử dụng phổ biến trong phân lập vi rút. Trong phân lập vi rút Arbo gây HCVNC thường sử dụng chuột ỏ và tế bào muỗi *Aedes albopictus* dòng C6/36, VRDR thường dùng tế bào vero, RDa [2], [4], [44].

- Khả năng áp dụng với mẫu: Chủ yếu áp dụng cho nghiên cứu, ít áp dụng cho chẩn đoán lâm sàng vì thời gian phân lập thường kéo dài.

- Độ nhạy, độ đặc hiệu: Độ nhạy thấp (1-25%), độ đặc hiệu cao (100%) [44].

- Ưu điểm: Đây là tiêu chuẩn vàng, để chẩn đoán chính xác nguyên nhân vi rút gây bệnh, sử dụng tế bào để phân lập vi rút có ưu điểm là không cần diện tích rộng rãi như khi sử dụng động vật thí nghiệm để phân lập. Vi rút sau khi phân lập sẽ được định loại nhanh bằng kỹ thuật PCR/RT-PCR.

- Hạn chế: Là phương pháp rất khó đạt kết quả, do bị ảnh hưởng của quá nhiều yếu tố như điều kiện lấy và bảo quản mẫu, thời kỳ phát bệnh, lựa chọn dòng tế bào để phân lập, kinh nghiệm kỹ năng thực hiện... Mặt khác, sự nhân lên của vi rút trên tế bào có thể xuất hiện hiện tượng gây bệnh lý tế bào (Cytophathic effect - CPE), hoặc không có hiện tượng CPE.

### **1.3.1.2. Phương pháp miễn dịch Enzyme phát hiện IgM**

- Nguyên lý: Phương pháp ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay- xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzyme) dựa trên sự kết hợp đặc hiệu giữa kháng nguyên và kháng thể, trong đó kháng thể được gắn với một loại enzyme; Khi cho cơ chất thích hợp với enzyme vào phản ứng nhờ Hydrogenperoxide ( $H_2O_2$ ) xúc tác, enzyme sẽ kết hợp với cơ chất tạo thành một chất có màu, là bằng chứng về phản ứng đặc hiệu giữa kháng thể - kháng nguyên và thông qua mật độ màu mà biết được sự có mặt, hàm lượng (hiệu giá) kháng nguyên/kháng thể cần phát hiện.

Kháng thể IgM thường được tạo ra sớm sau nhiễm vi rút và tồn tại khoảng từ 1-3 tháng có khi lâu hơn tùy thuộc vào nhiễm tiên phát hay nhiễm thứ phát. Sự phát hiện được IgM trong nhiều trường hợp đồng nghĩa là có sự nhân lên hoặc hiện diện của vi rút trong thời gian gần đây. Do vậy, phát hiện được IgM là một bằng chứng hữu hiệu trong chẩn đoán mới nhiễm vi rút.

- Khả năng áp dụng với mẫu: Sử dụng cho cả chẩn đoán lâm sàng và nghiên cứu vì thời gian trả thực hiện xét nghiệm nhanh, ngay trong ngày nhận mẫu.

- Độ nhạy, độ đặc hiệu: Kỹ thuật này có độ nhạy cao, cho phép xác định kháng nguyên hoặc kháng thể ở một hàm lượng thấp (khoảng 0,1 ng/ml) [4]. Tuy nhiên, độ đặc hiệu thấp hơn so với kỹ thuật phân lập và khuếch đại gen [2].

Đánh giá hiệu quả chẩn đoán xác định VNNB được thực hiện với 225 mẫu dịch não tủy lấy trong vòng 5 ngày đầu của bệnh ở bệnh nhân có HCVNC nghi do

vi rút bằng kỹ thuật MAC-ELISA và kỹ thuật Real-time RT-PCR. Kết quả cho thấy, hiệu quả xét nghiệm chẩn đoán VNNB đối với mẫu dịch não tủy lấy trong giai đoạn sớm của bệnh bằng kỹ thuật MAC-ELISA đạt cao là 89,5%, trong khi kỹ thuật Real-time RT-PCR có hiệu quả xác định bệnh là 15,5% [4].

- Ưu điểm: Nhanh, đơn giản, tiện lợi, kinh tế hơn, thích hợp cho lô mẫu lớn.

- Nhược điểm: Độ đặc hiệu thường dưới 100%, tùy loại tác nhân, có thể do tính đặc hiệu của kháng nguyên sử dụng để phát hiện kháng thể.

### **1.3.1.3. Phương pháp PCR/RT-PCR**

- Nguyên lý: Kỹ thuật PCR (polymerase chain reaction) là một phương pháp tổng hợp ADN dựa trên mạch khuôn là một trình tự đích ADN ban đầu, khuếch đại, nhân số lượng bản sao của khuôn này thành hàng triệu bản sao nhờ hoạt động của enzyme polymerase và một cặp mồi (primer) đặc hiệu cho đoạn ADN này. Primer (mồi) là những đoạn ADN ngắn, có khả năng bắt cặp bổ sung với một mạch của đoạn ADN khuôn và nhờ hoạt động của ADN polymerase đoạn primer này được kéo dài để hình thành mạch mới. Kỹ thuật PCR được hình thành dựa trên đặc tính này của ADN polymerase, đoạn ADN nằm giữa hai primer sẽ được khuếch đại thành số lượng lớn bản sao, sản phẩm này được xác định sau khi nhuộm bằng ethidium bromide hoặc SYB<sup>®</sup> Safe DNA gel Stain, đoạn ADN có thể được tách ra này cho các mục đích khác nhau bằng các thao tác trên gel. Như vậy, để khuếch đại một trình tự ADN xác định, cần phải có những thông tin tối thiểu về trình tự của ADN, đặc biệt là trình tự nucleotid trên những đoạn ADN dài để tạo các primer bổ sung chuyên biệt (inner primer), để giải trình tự những ADN dài.

- Khả năng áp dụng với mẫu: Cho cả mẫu lâm sàng và mẫu phân lập.

- Độ nhạy, độ đặc hiệu: Độ nhạy, độ đặc hiệu cao. PCR được thiết kế để khuếch đại về mặt hoá học trong ống nghiệm một đoạn ADN, đây là chu trình được lặp lại rất nhiều lần theo cấp số nhân. Do vậy, số sản phẩm PCR được tăng lên theo công thức:  $Y=2^n$  Như vậy từ một gen đích ban đầu, không thể phát hiện được bằng bất cứ một kỹ thuật nào hiện có nhưng có thể phát hiện được gen đích bằng kỹ thuật PCR/RT-PCR.

- Ưu điểm: Cần một lượng mẫu nhỏ, không bắt buộc phải tinh khiết, kỹ thuật rất đặc hiệu, vì mỗi có nguồn gốc từ trình tự rất đặc hiệu phù hợp với gen đích, có kết quả nhanh. Có thể phát hiện vật liệu di truyền ít có khả năng gây nhiễm dù trình tự acid nucleic vẫn còn nguyên vẹn.

- Hạn chế: Đòi hỏi một kỹ năng thực hiện đặc biệt và nhiều biện pháp để phòng kết quả âm tính giả hoặc dương tính giả. Giá thành xét nghiệm cao, sự đa dạng về vật liệu di truyền trong số các chủng vi sinh có thể dẫn đến kết quả âm tính giả do khác nhau vài nucleotide giữa các chủng. Tuy nhiên, kỹ thuật này không thay thế được kỹ thuật phân lập vì không thể phát hiện được toàn bộ đặc điểm vi sinh của tác nhân gây bệnh mà nó chỉ có tính chất phát hiện, vật liệu di truyền của tác nhân gây bệnh.

### **1.3.2. Phương pháp nghiên cứu phân tử vi rút**

Sinh học phân tử tập trung khai thác về khía cạnh di truyền, là sự so sánh trình tự nucleotide/axit amin của một gen đích hoặc toàn bộ genome của các chủng vi sinh vật được phát hiện từ nhiều nguồn khác nhau, trong các khoảng thời gian khác nhau ở những phân vùng địa lý khác nhau để nghiên cứu quá trình lan truyền của một tác nhân gây bệnh, hoặc để xác định có bao nhiêu loại type huyết thanh/nhóm genotype/genotype/phân nhóm genotype (clade)/tiểu phân nhóm genotype (cluster) đang lưu hành tại một vùng địa lý nhất định, trong những khoảng thời gian nhất định [44]. Trong lĩnh vực vi sinh y học, sinh học phân tử là phương pháp hiện đại nhất để xác định về đặc điểm phân tử của tác nhân gây bệnh trên cơ sở đó xác định được nguồn gốc của căn nguyên gây bệnh, sự lan truyền của tác nhân gây bệnh theo không gian, thời gian ở mức độ phân tử do vậy, dịch tễ sinh học phân tử hiện nay đã trở thành một công cụ chính xác và cần thiết trong công tác giám sát một loại tác nhân gây bệnh cụ thể vì nó có thể: Xác định được nguồn gốc, sự mới xuất hiện và sự lan rộng của tác nhân gây bệnh; Theo dõi được sự thay đổi các chủng gây bệnh ở mức phân tử theo thời gian và phân vùng địa lý; Theo dõi sự tiến hóa của các chủng vi sinh gây bệnh; Xác định được xu hướng của bệnh dịch liên quan đối với những tác nhân gây bệnh mang gene độc lực ở mức độ cao hoặc

thấp; Trong một số trường hợp là cơ sở để phân biệt chủng phân lập có nguồn gốc từ vắc xin hay từ trong tự nhiên (hoang dại) [2], [44], [109].

### **1.3.2.1. Giải trình tự nucleotide thế hệ thứ nhất (Phương pháp Sanger)**

Phương pháp giải trình tự gen được sử dụng phổ biến nhất được gọi là phương pháp Sanger kết thúc chuỗi bằng dideoxy do Sanger F. phát minh vào năm 1977, cho phép xác định chính xác trình tự ADN của các mẫu phân tích khi so sánh sự tương đồng về trình tự nucleotide của chúng với nhau [44]. Nguyên lý của phương pháp này là dựa trên cơ chế tổng hợp ADN trong cơ thể sinh vật nhưng có sử dụng dideoxynucleotide (ddNTP) bị mất nhóm –OH ở cả hai vị trí cacbon 2' và 3'; Trong phản ứng tổng hợp ADN, khi ADN polymerase gắn ngẫu nhiên một ddNTP vào sợi ADN đang tổng hợp nó sẽ làm ngừng quá trình này lại, do nhóm –OH bị mất ở vị trí 3' là nơi để nucleotide tiếp theo gắn vào hình thành nên cầu nối phosphodiester trong quá trình kéo dài chuỗi. Trình tự nucleotide đã được xác định trên bằng máy đọc tự động (Sequenser) dựa trên nguyên lý của phương pháp sắc ký, đọc trực tiếp kết quả từ mẫu, giảm các thao tác, tiết kiệm hóa chất, thời gian và có thể đọc được trình tự nucleotide dài >500bp. Giải trình tự gen bằng phương pháp Sanger cho đến nay vẫn được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu khoa học để xác định, định loại tác nhân gây bệnh [32], [39], [44], [72], [116].

Nhưng phương pháp Sanger có một số hạn chế khi sử dụng như thời gian thực hiện phản ứng dài, thông lượng của một lần giải trình tự thấp (1 trình tự/1 phản ứng), để giải trình tự những genome có kích thước lớn rất khó có tính khả thi.

### **1.3.2.2. Phương pháp giải trình tự gen Thế hệ thứ hai (Next Generation Sequencing-NGS)**

Phương pháp giải trình tự mới được phát triển có thông lượng cao, cho phép thực hiện giải trình tự của nhiều mẫu cùng một lúc, là phương pháp giải trình tự thế hệ mới (Next Generation Sequencing-NGS). Với 4 ưu điểm chính vượt trội hơn so với phương pháp sequencing Sanger đó là: Nhanh hơn, giá thành thấp hơn, có thể thực hiện với nhiều mẫu hơn trong cùng một thời gian và chính xác hơn khi với lượng ADN không nhiều [32], [90], [138]. Đối với kỹ thuật sequencing của Sanger,

cần một lượng lớn ADN để đọc ví dụ cho một trình tự 100bp, lượng ADN cần trên vài trăm bản sao... Nhưng đối với NGS, một trình tự có thể thu nhận được từ một bản sao (sợi đơn) nên nó có thể áp dụng trực tiếp để phát hiện trình tự của một vi sinh từ mẫu bệnh phẩm lâm sàng. NGS cho kết quả nhanh hơn kỹ thuật sequencing Sanger nhờ hai cách: (1) Phản ứng hóa học có thể kết hợp với sự phát hiện tín hiệu trong một vài chuyển đổi đối với kỹ thuật NGS, ngược lại Sanger sequencing là hai quá trình tách biệt. (2) Một điều có ý nghĩa hơn nữa là với một lần đọc tối đa khoảng 1Kb có thể mất một khoảng thời gian khi sử dụng Sanger sequencing. Ngược lại với NGS thì có thể đọc ADN đồ sộ tương đương tới 300Gb trong một lần chạy trên một chip với phương pháp để đọc trình tự nucleotide dài được kiến tạo từ rất nhiều phần đọc ngắn kế tiếp nhau kết hợp lại bằng phần mềm được thiết kế. Về lý thuyết, giá thành của NGS thấp hơn rất nhiều so với Sanger khi thực hiện với số lượng mẫu lớn. NGS cũng được biết như là công cụ để giải trình tự với sản lượng cao (high-throughput sequencing), những công nghệ gần đây cho phép chúng ta giải trình tự ADN và ARN nhanh hơn và rẻ hơn so với khi sử dụng kỹ thuật sequencing của Sanger, nó thực sự là một cuộc cách mạng hóa nghiên cứu về genome và sinh học phân tử với một số công nghệ hiện đại khác nhau bao gồm: (1) Illumina (Solexa) sequencing; (2) Roche 454 sequencing; (3) Ion torrent: Proton / PGM sequencing; (4) SOLID sequencing [44].

### **1.3.2.3. Những ứng dụng của kỹ thuật giải trình tự nucleotide**

Xác định đặc điểm phân tử của vi sinh, nghiên cứu về dịch tễ sinh học phân tử của vi sinh, phát hiện tác nhân gây bệnh mới.

### **1.3.3. Phần mềm tin y sinh học.**

Nghiên cứu trình tự ADN, nguồn gốc, sự lan truyền của vi rút có thể được thực hiện với phần mềm tin y sinh học Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) [138]. Nguyên lý: Phần mềm BLAST sẽ lắp ghép trình tự của vi rút với hàng triệu chuỗi được lưu trữ trong các cơ sở dữ liệu genomic và nucleotide. Công cụ này cho kết quả là các trình tự tương tự nhất với trình tự của vi rút nghiên cứu. Phần mềm này cung cấp những

hiểu biết chuyên sâu để có thể nhận dạng của các chuỗi đó; Kết quả bao gồm sự tương đồng giữa các loài và các trình tự nucleotide tương tự nhau, do vậy phần mềm BLAST rất quan trọng để xác định các trình tự được so sánh về sự tương đồng và không phải là liên kết ngẫu nhiên.

**BLASTN:** So sánh trình tự nucleotide của vi rút với các trình tự nucleotide trong GenBank, kho cơ sở dữ liệu của NCBI sẽ cung cấp các trình tự nucleotide.

**BLASTX:** So sánh sáu khung dịch mã khác nhau (mở khung đọc) của trình tự nucleotide của vi rút tới chuỗi amino axit trong cơ sở dữ liệu Protein của NCBI. Nhằm tìm ra các sản phẩm và chức năng có thể có của chuỗi amino axit đích.

**MegaBLAST:** So sánh trình tự nucleotide của vi rút nghiên cứu với các trình tự nucleotide khác, tối ưu hóa để tìm các chuỗi tương tự nhau của các loài liên quan, điều này làm nên một mạng lưới chặt chẽ hơn.

Sự tương đồng về nucleotid sẽ được xác định qua phần mềm BLAST có thể được liên kết bằng cách sử dụng các thuật toán như ClustalW hoặc Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation (MUSCLE); Còn ClustalW sử dụng một thuật toán tiến bộ cho sự liên kết, nó sắp xếp hai dãy tại mỗi bước, sau đó sắp xếp liên kết với một dãy khác. MUSCLE đạt được kết quả tốt hơn ClustalW qua các thông số quan trọng, các thông số này bao gồm độ chính xác của liên kết cũng như sự phức tạp về thời gian và không gian thấp hơn bằng cách sử dụng các liên kết tịnh tiến chứ không phải lặp đi lặp lại. Có nhiều cách lựa chọn để xây dựng cây phát sinh với phần mềm MEGA.6, bao gồm cây UPGMA, Maximum Parsimony, Neighbor-Joining và Maximum Likelihood; Cách tiếp cận khác nhau để xây dựng cây phát sinh, dựa vào ưu và nhược điểm riêng của từng phần mềm cũng như phù hợp với mục đích cụ thể. Đối với một phương pháp đã chọn, MEGA sẽ giúp tìm ra mô hình tốt nhất cho tỷ lệ thay thế trình tự ADN hoặc protein của vi rút.

BLAST và MEGA sẽ giúp phân tích bộ/đoạn gen và hiểu được trình tự dữ liệu, độ tin cậy của cây có thể được ước lượng bằng cách sử dụng phương pháp bootstrap. Trong nghiên cứu đặc điểm phân tử của vi rút, thường sử dụng bootstrap với độ lặp 1000 lần tạo độ tin cậy cao [123].



## Chương 2

### ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

##### 2.1.1. Đối tượng của mục tiêu 1

- Các bệnh nhân mắc HCVNC nghi ngờ do vi rút trên địa bàn tỉnh Bắc Giang, giai đoạn 2004-2017, được lấy máu, dịch não tủy (DNT) để xác định căn nguyên.

##### 2.1.2. Đối tượng của mục tiêu 2

- Một số chủng vi rút hoặc vật liệu di truyền của vi rút được phân lập hoặc phát hiện từ DNT của bệnh nhân HCVNC trên địa bàn tỉnh Bắc Giang, giai đoạn 2004-2017.

##### 2.1.3. Tiêu chuẩn lựa chọn hoặc loại trừ đối tượng nghiên cứu

###### 2.1.3.1. Tiêu chuẩn lựa chọn

- *Tiêu chuẩn bệnh nhân được chẩn đoán lâm sàng HCVNC nghi ngờ do vi rút theo tiêu chuẩn của Bộ Y tế (Quyết định 4283/QĐ-BYT ngày 08 tháng 8 năm 2016) và tiêu chuẩn của WHO (2006).*

Bệnh nhân sốt đột ngột (nhiệt độ  $\geq 37,8^{\circ}\text{C}$ ) kèm theo đau đầu, buồn nôn, nôn, có thể có rối loạn ý thức từ nhẹ đến nặng (Ngủ gà, trạng thái sững sờ, lú lẫn, mất phương hướng, li bì, lơ mơ, hôn mê), có dấu hiệu thần kinh khác như dấu hiệu màng não (co cứng cơ, cổ cứng), các dấu hiệu thần kinh khu trú (co giật, liệt nửa người hoặc tứ chi), tăng hoặc giảm trương lực cơ, cử động bất thường (run giật, múa vờn).

+ Dịch não tủy trong, không màu.

+ Bệnh nhân điều trị tại Bệnh viện đa khoa khu vực Lục Ngạn, Bệnh viện Đa khoa tỉnh và Bệnh viện Sản Nhi của tỉnh Bắc Giang.

+ Có phiếu điều tra ca bệnh và được lấy mẫu huyết thanh kép, dịch não tủy trong ngày nhập viện để làm xét nghiệm.

+ Người bệnh hoặc gia đình người bệnh (với bệnh nhi) đồng ý tham gia nghiên cứu.

+ Nhập viện trong thời gian 2004-2017.

- **Tiêu chuẩn bệnh nhân được chẩn đoán xác định mắc HCVNC do vi rút VNNB, BAV, NDiV, VRĐR, HSV theo tiêu chuẩn của Bộ Y tế (Quyết định 2322/QĐ/BYT ngày 30 tháng 6 năm 2006 và Quyết định 4283/QĐ-BYT ngày 08 tháng 8 năm 2016).**

+ Theo tiêu chuẩn của bệnh nhân được chẩn đoán lâm sàng HCVNC nghi ngờ do vi rút.

+ Trong bệnh phẩm DNT hoặc huyết thanh kép có phát hiện ít nhất một dấu ấn (kháng thể hoặc kháng nguyên đặc hiệu) của vi rút VNNB, BAV, NDiV, VRĐR, HSV [4], [13], [26].

- **Chủng vi rút, vật liệu di truyền của vi rút gây HCVNC**

+ Chủng vi rút VNNB, VRĐR phân lập được từ dịch não tủy của bệnh nhân HCVNC tại Bắc Giang giai đoạn 2004-2017.

+ Vùng gen E của vi rút VNNB, vùng gen VP1 của VRĐR được phát hiện từ DNT của bệnh nhân HCVNC do vi rút VNNB và VRĐR giai đoạn 2004-2017.

+ Có thông tin rõ ràng về nguồn gốc mẫu phân lập vi rút/phát hiện vật liệu di truyền của vi rút.

### **2.1.3.2. Tiêu chuẩn loại trừ**

- **Bệnh nhân mắc HCVNC**

+ Không đáp ứng được tiêu chuẩn lựa chọn.

+ Các ca bệnh được xét nghiệm máu hoặc DNT xác định căn nguyên không phải do vi rút.

+ Bệnh nhân/người bảo trợ của bệnh nhân không đồng ý tham gia nghiên cứu.

- **Chủng vi rút gây HCVNC**

+ Không có thông tin lý lịch rõ ràng về nguồn gốc phân lập chủng vi rút.

+ Không khuếch đại được vùng gen E (vi rút VNNB), vùng gen VP1 (VRĐR) từ dịch não tủy bệnh nhân HCVNC do vi rút VNNB và VRĐR tại tỉnh Bắc Giang, 2004-2017.

## **2.2. Thời gian, địa điểm nghiên cứu:**

- Thời gian thực hiện nghiên cứu: 2015-2018

- Lấy mẫu bệnh phẩm, điều tra thông tin bệnh nhân: HCVNC là bệnh nặng, hầu hết các ca bệnh được điều trị tại bệnh viện khu vực, bệnh viện chuyên khoa nhi và bệnh viện đa khoa tuyến tỉnh, vì vậy lấy mẫu bệnh phẩm, điều tra thông tin bệnh nhân HCVNC được thu thập tại Bệnh viện đa khoa Khu vực Lục Ngạn, Bệnh viện Đa khoa tỉnh và Bệnh viện Sản Nhi của tỉnh Bắc Giang.

- Nghiên cứu vi rút học, xác định tác nhân gây bệnh được thực hiện tại Khoa Xét nghiệm Trung tâm Kiểm soát bệnh tật tỉnh Bắc Giang; Nuôi cấy, phân lập và giải trình tự gene thực hiện tại Phòng Vi rút Trung tâm đào tạo và Quản lý Khoa học, Phòng thí nghiệm Nagasaki-NIHE Friendship tại Viện Vệ sinh dịch Tễ Trung ương.

### 2.3. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp nghiên cứu mô tả, thiết kế dọc hồi cứu giai đoạn 2004-2014 và tiến cứu giai đoạn 2015-2017.

#### **Ca bệnh có chẩn đoán lâm sàng HCVNC nghi ngờ do vi rút**

- Giai đoạn 2004-2014: Hồi cứu phiếu điều tra, lấy toàn bộ bệnh nhân đủ mẫu bệnh phẩm huyết thanh kép và DNT.
- Giai đoạn 2015-2017: Tiến cứu, tất cả bệnh nhân được lấy mẫu huyết thanh kép, DNT làm xét nghiệm.

#### **Mục tiêu 1: Xác định một số căn nguyên vi rút Arbo, VRĐR, HSV**

- Sử dụng kỹ thuật ELISA-IgM gián tiếp, MAC-ELISA, Realtime RT-PCR, Realtime PCR chẩn đoán xác định vi rút VNNB, BAV, NDiV, VRĐR, HSV.

#### **Mục tiêu 2: Đặc điểm sinh học phân tử vi rút VNNB, VRĐR gây bệnh**

- Nuôi cấy phân lập vi rút từ mẫu dương tính vật liệu di truyền của vi rút (VRĐR), nuôi cấy phân lập hoặc/và NS1-ELISA từ mẫu dương tính kháng thể đặc hiệu (VNNB).
- Giải trình tự gene từ chủng vi rút phân lập và từ mẫu kháng nguyên dương tính, xây dựng cây phát sinh loài.

**Hình 2.1. Thiết kế nghiên cứu**

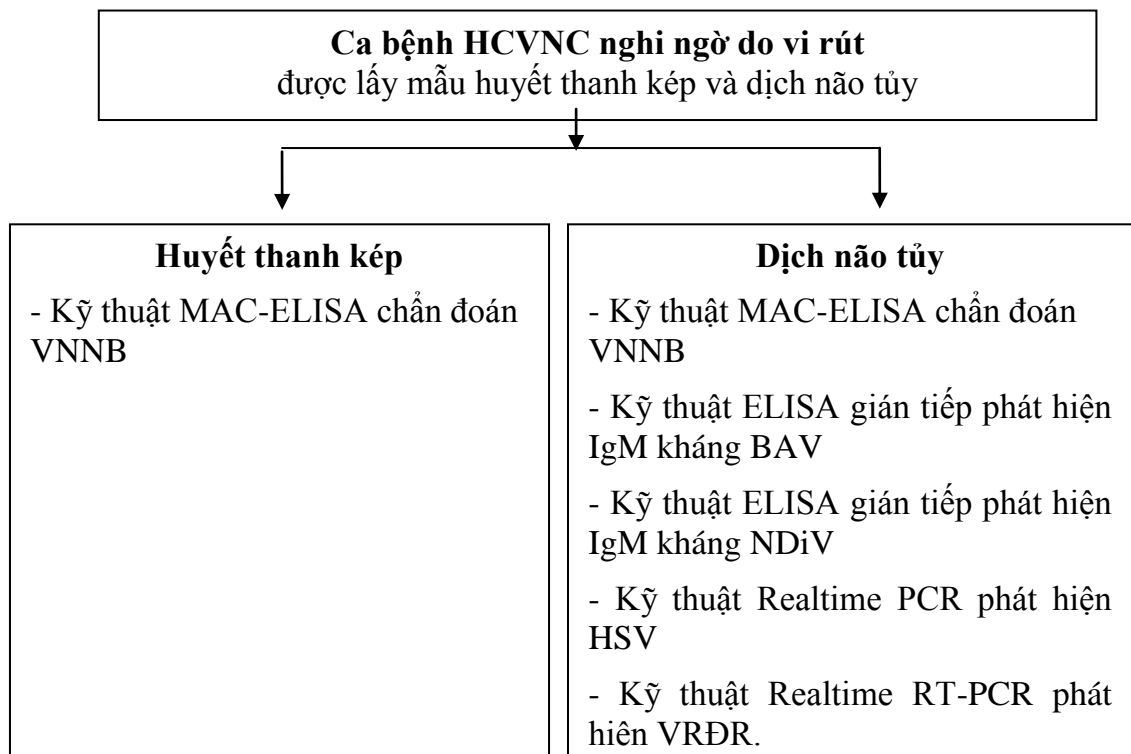
## 2.4. Phương pháp nghiên cứu mục tiêu 1

### 2.4.1. Thiết kế nghiên cứu

Mô tả căn nguyên vi rút gây HCVNC tại Bắc Giang, 2004-2017 và một số đặc điểm của HCVNC do vi rút.

- Bệnh nhân có chẩn đoán lâm sàng HCVNC nghi ngờ do vi rút tại bệnh viện Đa khoa tỉnh, bệnh viện Đa khoa khu vực Lục Ngạn, bệnh viện Sản Nhi Bắc Giang.

- Cỡ mẫu nghiên cứu: Toàn bộ các ca bệnh HCVNC nghi ngờ do vi rút. Trong nghiên cứu này có 594 ca bệnh được chẩn đoán lâm sàng HCVNC nghi ngờ do vi rút, được lấy mẫu huyết thanh kép, dịch não tủy để chẩn đoán xác định.



**Hình 2.2. Thiết kế nghiên cứu mục tiêu 1**

### 2.4.2. Biến số nghiên cứu

- Tỷ lệ xác định được căn nguyên vi rút gây HCVNC
- Đặc điểm phân bố HCVNC do vi rút theo năm
- Đặc điểm phân bố HCVNC do vi rút theo giai đoạn (theo hệ số 5 năm)
- Đặc điểm phân bố HCVNC theo giới
- Đặc điểm phân bố HCVNC theo lứa tuổi

- Đặc điểm phân bố HCVNC theo địa dư, khu vực
- Đặc điểm phân bố HCVNC theo mùa (tháng)
- Tiền sử tiêm phòng vắc xin phòng VNNB

### **2.4.3. Phương pháp thu thập số liệu**

#### **2.4.3.1. Lựa chọn bệnh nhân có chẩn đoán lâm sàng HCVNC nghi do vi rút**

- Giai đoạn 2004-2014: Bệnh nhân mọi lứa tuổi trên địa bàn tỉnh Bắc Giang được chẩn đoán là HCVNC nghi ngờ do vi rút được hệ thống giám sát Trung tâm Y tế dự phòng tỉnh Bắc Giang điều tra, lấy mẫu lưu tại Trung tâm YTDP tỉnh Bắc Giang (lấy toàn bộ mẫu theo phương thức thuận tiện).

- Giai đoạn 2015-2017: Bệnh nhân mọi lứa tuổi trên địa bàn tỉnh Bắc Giang được chẩn đoán là HCVNC nghi ngờ do vi rút tại Bệnh viện Đa khoa tỉnh Bắc Giang, Bệnh viện sản Nhi Bắc Giang và Bệnh viện đa khoa Khu vực Lục Ngạn.

- Thu thập số liệu liên quan đến tất cả các ca bệnh HCVNC nghi ngờ do vi rút đưa vào nghiên cứu (*Phụ lục 1: Phiếu điều tra ca bệnh*).

#### **2.4.3.2. Lấy mẫu xét nghiệm**

- Mẫu dịch não tủy: 2ml với bệnh nhân trên 1 tuổi và 1ml với bệnh nhân dưới 1 tuổi tại thời điểm nhập viện hoặc trong vòng 5 ngày đầu nhập viện;

- Mẫu huyết thanh: 5ml máu tĩnh mạch với bệnh nhân trên 1 tuổi và 3ml máu tĩnh mạch với bệnh nhân dưới 1 tuổi. Mẫu huyết thanh I lấy trong ngày đầu nhập viện, mẫu huyết thanh II lấy sau 7-10 ngày nhập viện hoặc trước khi ra viện.

- Các mẫu DNT, mẫu máu sau khi tách huyết thanh được mã hóa mẫu theo số theo dõi lấy mẫu, được lưu giữ ở -70°C cho đến khi thực hiện các kỹ thuật xét nghiệm (*Phụ lục 2: Kỹ thuật lấy mẫu, bảo quản và vận chuyển bệnh phẩm*).

#### **2.4.3.3. Tiêu chuẩn ca bệnh xác định do vi rút**

- Tất cả các trường hợp bệnh nhân có đủ tiêu chuẩn đưa vào nghiên cứu được tiến hành xét nghiệm huyết thanh và dịch não tủy với ít nhất một trong các kỹ thuật ELISA, MAC-ELISA, Realtime PCR, Realtime RT-PCR, phát hiện vật liệu di truyền của vi rút VNNB, BAV, NDiV, VRĐR, HSV gây HCVNC tại Bắc Giang, giai đoạn 2004-2017.

- Ca bệnh xác định gây HCVNC do vi rút theo tiêu chuẩn của Bộ Y tế (Quyết định 2322/QĐ/BYT ngày 30 tháng 6 năm 2006 và Quyết định 4283/QĐ-BYT ngày 08 tháng 8 năm 2016):

(1) Do vi rút VNNB khi xét nghiệm xác định có kháng thể IgM kháng vi rút VNNB dương tính đối với DNT hoặc chênh lệch giá trị OD phát hiện kháng thể IgM của huyết thanh II hơn huyết thanh I bệnh nhân từ 2-4 lần trở lên trong cùng một lần chạy;

(2) Do BAV khi xét nghiệm xác định có kháng thể IgM kháng BAV dương tính trong mẫu DNT bệnh nhân;

(3) Do NDIV khi xét nghiệm xác định có kháng thể IgM kháng NDIV dương tính trong mẫu DNT bệnh nhân;

(4) Do VRĐR khi xét nghiệm xác định có vật liệu di truyền của VRĐR trong mẫu DNT bằng kỹ thuật Realtime RT-PCR;

(5) Do HSV khi xét nghiệm xác định có vật liệu di truyền của HSV trong mẫu DNT bằng kỹ thuật Realtime PCR.

#### **2.4.3.4. Vật liệu, trang thiết bị hóa chất sử dụng cho nghiên cứu**

##### *a) Dụng cụ, trang thiết bị*

- Sử dụng Pipet nhựa 5ml, 10ml, Pipet bán tự động một kênh loại 10-100 $\mu$ l; 2-20 $\mu$ l; 100-1000 $\mu$ l; Pipet bán tự động đa kênh loại 300  $\mu$ l; Tuýp eppendofit các loại 0,2ml, 0,5ml, 2,0ml; Các loại đầu pipet tip có lọc vô trùng tương ứng; Nước cất hoặc nước trao đổi ion, pH trung tính; Giấy thấm nước; Các ống nghiệm và giá đựng ống nghiệm tương ứng; Bút lông, nhãn, găng tay dùng 1 lần.

- Sử dụng một số thiết bị như tủ an toàn sinh học cấp II, hệ thống máy rửa, máy ủ, máy đọc ELISA, máy ly tâm lạnh, máy Vontex, máy PCR, máy Real-time PCR của hãng QIAGEN model Rotorgen Q, máy lắc, tủ lạnh 4°C, tủ lạnh -20°C và tủ lạnh -70°C.

##### *b) Hóa chất, sinh phẩm*

*Sinh phẩm MAC-ELISA chẩn đoán VNNB*, sử dụng bộ sinh phẩm thương mại MAC-ELISA do Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương cung cấp.

*Sinh phẩm ELISA phát hiện IgM kháng NDiV:* Bản nhựa đáy bằng 2x48 giếng gắn kháng nguyên vi rút NDiV tinh chế, được cung cấp bởi Viện Y học Nhiệt đới, trường Đại học Nagasaki. Chứng dương: Huyết thanh người có IgM kháng vi rút NDiV. Chứng âm: Huyết thanh người không có IgM và kháng vi rút NDiV. Cộng hợp: IgG kháng IgM người gắn enzyme peroxydaza của hãng SIGMA. Cơ chất hiện màu: Ortho - Phenylendiamin (OPD) tinh thể. Dung dịch đệm pha cơ chất: Photphat - Citrat có chứa 0,03% Hydrogenperoxide. PBS-T (x 10). Dung dịch pha loãng: PBS, pH 7,2 có BSA, đỏ phenol. Dung dịch dừng phản ứng:  $H_2SO_4.4N$

*Sinh phẩm ELISA phát hiện IgM kháng BAV:* Bản nhựa đáy bằng 2x48 giếng gắn kháng nguyên vi rút BAV tinh chế, được cung cấp bởi Viện Y học Nhiệt đới, trường Đại học Nagasaki. Chứng dương: Huyết thanh người có IgM kháng vi rút BAV. Chứng âm: Huyết thanh người không có IgM và kháng vi rút BAV. Cộng hợp: IgG kháng IgM người gắn enzyme peroxydaza của hãng SIGMA. Cơ chất hiện màu: Ortho-Phenylendiamin (OPD) tinh thể. Dung dịch đệm pha cơ chất: Photphat - Citrat có chứa 0,03% Hydrogenperoxide. PBS-T (x 10). Dung dịch pha loãng: PBS, pH 7,2 có đỏ phenol. Dung dịch dừng phản ứng:  $H_2SO_4.4N$

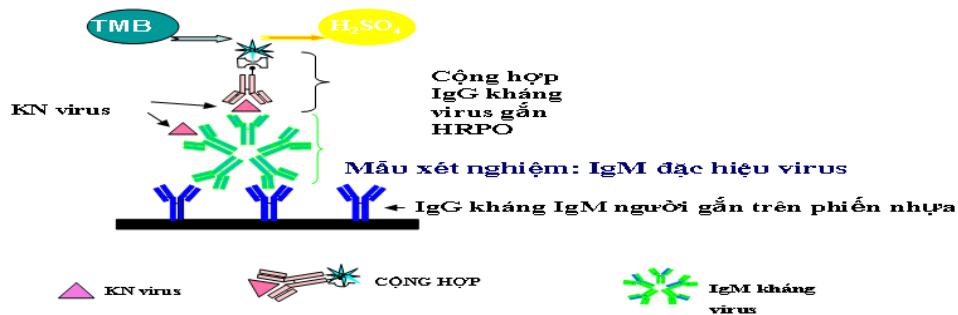
*Sinh phẩm tách chiết vật liệu di truyền của vi rút:* Sử dụng sinh phẩm thương mại QIAamp viral RNA, QIAamp DNA.

*Sinh phẩm chẩn đoán VRDR và HSV:* Sử dụng sinh phẩm thương mại Sacace Enterovirus Real-TM, QIAgen Artus HSV-1/2 QS-RGQ kit.

#### 2.4.3.5. Kỹ thuật xét nghiệm

##### a) Kỹ thuật MAC-ELISA chẩn đoán VNNB từ huyết thanh/DNT (theo phụ lục 3)

Sử dụng bộ sinh phẩm MAC-ELISA thương mại do Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương cung cấp, thực hiện, nhận định kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất [4].



Hình 2.3. Sơ đồ kỹ thuật MAC-ELISA chẩn đoán VNNB [4]

- Tiêu chuẩn nhận định một trường hợp bị VNNB:

Phát hiện được IgM trong dịch não tủy, nhưng không phát hiện được IgM trong mẫu máu lấy cùng ngày: Bị HCVNC do vi rút VNNB.

Không phát hiện được IgM trong dịch não tủy và mẫu huyết thanh lấy cùng ngày trong giai đoạn cấp, phát hiện được IgM trong mẫu huyết thanh lấy lần thứ hai: Bị HCVNC do vi rút VNNB (có chênh lệch giá trị OD kháng thể).

Không phát hiện được IgM trong mẫu dịch não tủy, nhưng phát hiện được IgM trong mẫu huyết thanh lấy cùng ngày và mẫu huyết thanh lấy lần thứ hai (nhưng không có chênh lệch giá trị OD kháng thể của hai mẫu huyết thanh này): Bị HCVNC do nguyên nhân khác.

*b) Kỹ thuật ELISA gián tiếp phát hiện IgM kháng NDiV (theo phụ lục 4).*

Sử dụng kháng nguyên vi rút Nam Định tinh chế để gắn bản do Viện Y học Nhiệt đới, trường đại học Nagasaki cung cấp; Cộng hợp kháng IgM người gắn enzyme Peroxidase của hãng Sigma.

- Nguyên lý kỹ thuật ELISA IgM gián tiếp dựa trên nguyên lý sử dụng kháng nguyên NDiV tinh chế được gắn trên bản nhựa với hàm lượng kháng nguyên là 50ng/giếng. Cho tiếp xúc với dịch não tủy của bệnh nhân (pha loãng 1/10), nếu trong mẫu dịch não tủy có kháng thể kháng NDiV, nó sẽ kết hợp với kháng nguyên NDiV. Tiếp theo sử dụng cộng hợp IgG kháng IgM người gắn enzyme peroxydase, nó sẽ kết hợp đặc hiệu với kháng thể IgM người nếu có trong mẫu xét nghiệm. Cho một phức hợp cơ chất không màu Ortho-Phenylenediamin (OPD)/Hydrogen Peroxide. Dưới sự xúc tác của Hydrogen Peroxide, cơ chất không màu phản ứng với enzyme peroxydase để chuyển thành màu vàng. Dừng phản ứng bằng axit sulfuric, màu vàng chuyển thành màu nâu. Sự có mặt của IgM đặc hiệu kháng NDiV trong mẫu được xác định qua sự chuyển màu. Mẫu chứng âm và các mẫu thử không có IgM đặc hiệu kháng NDiV không xuất hiện màu. Kết quả xét nghiệm được ghi nhận bằng mật độ quang học (OD).



- Nhận định kết quả theo tiêu chuẩn OD chứng dương/OD chứng âm 2, các mẫu xét nghiệm có giá trị OD mẫu xét nghiệm/OD chứng âm >2 được xác định là dương tính [13].

*c) Kỹ thuật ELISA gián tiếp phát hiện IgM kháng BAV (theo phụ lục 5)*

Sử dụng kháng nguyên vi rút Banna tinh chế để gắn bản do Viện Y học Nhiệt đới, trường đại học Nagasaki cung cấp; Cộng hợp của hãng Sigma.

- Nguyên lý kỹ thuật ELISA IgM gián tiếp: Sử dụng kháng nguyên BAV tinh chế được gắn trên bản nhựa với hàm lượng kháng nguyên là 50ng/giếng. Cho tiếp xúc với dịch não tủy của bệnh nhân (pha loãng 1/10), nếu trong mẫu dịch não tủy có kháng thể kháng BAV, nó sẽ kết hợp với kháng nguyên BAV. Sử dụng cộng hợp IgG kháng IgM người gắn enzyme peroxydaze, nó sẽ kết hợp đặc hiệu với kháng thể IgM người nếu có trong mẫu xét nghiệm. Cho một phức hợp cơ chất không màu Ortho-Phenylenediamin (OPD)/Hydrogen Peroxide. Dưới sự xúc tác của Hydrogen Peroxide, cơ chất không màu phản ứng với enzyme peroxydaze để chuyển thành màu vàng. Dừng phản ứng bằng axit sulfuric, màu vàng chuyển thành màu nâu. Sự có mặt của IgM đặc hiệu kháng BAV trong mẫu được xác định qua sự chuyển màu. Mẫu chứng âm và các mẫu thử không có IgM đặc hiệu kháng BAV không xuất hiện màu. Kết quả xét nghiệm được ghi nhận bằng mật độ quang học (OD).

- Nhận định kết quả theo tiêu chuẩn OD chứng dương/OD chứng âm > 2, các mẫu xét nghiệm có giá trị OD mẫu xét nghiệm/OD chứng âm >2 được xác định là dương tính [5], [26].

*d) Kỹ thuật Realtime RT-PCR phát hiện vật liệu di truyền của vi rút đường ruột từ dịch não tủy (theo phụ lục 6)*

- Sử dụng các cặp mồi đặc hiệu vùng gen 5'UTR vi rút đường ruột, sử dụng bộ sinh phẩm thương mại: QIAamp viral RNA Mini, Cat No./ID:52904, Sacace Enterovirus Real-TM, Lot 01B17J579, REF V16-50FRT, thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Thiết bị Realtime sử dụng là Qiagen Rotor-Gene Q.

e) *Kỹ thuật Realtime PCR phát hiện vật liệu di truyền của vi rút Herpes simplex 1/2 từ dịch não tủy (theo phụ lục 7)*

- Sử dụng các cặp mồi đặc hiệu vùng gen UL5 (154bp) vi rút Herpes simplex 1/2 có trong bộ sinh phẩm thương mại QIAamp DNA Mini, QIAgen Artus HSV-1/2 QS-RGQ kit, Cat No./ID: 4500368 thực hiện kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Thiết bị Realtime sử dụng là Qiagen Rotor-Gene Q.

## **2.5. Phương pháp nghiên cứu mục tiêu 2**

### **2.5.1. Thiết kế nghiên cứu**

- *Nghiên cứu mô tả* để xác định một số đặc điểm sinh học phân tử vi rút VNNB, VRĐR gây HCVNC tại Bắc Giang, 2004-2017.

- *Cỡ mẫu nghiên cứu*: Giải trình tự toàn bộ số mẫu dương tính từ chủng phân lập (VRĐR), toàn bộ số mẫu dương tính từ phân lập hoặc/và NS1-ELISA (VNNB).

*Chọn mẫu phân lập vi rút VNNB và phát hiện kháng nguyên VNNB NS1-ELISA*: Các mẫu dịch não tủy từ bệnh nhân VNNB sẽ được lựa chọn để xét nghiệm phát hiện NS1 bằng kỹ thuật ELISA-NS1 với sinh phẩm do Viện Pasteur Paris cung cấp [82] và đồng thời phân lập trên dòng tế bào C6/36. Tiêu chuẩn lựa chọn mẫu dịch não tủy là các ca bệnh đã xác định VNNB có mẫu dịch não tủy lấy trong 5 ngày kể từ khi khởi phát, mẫu máu 1 (lấy mẫu trong 5 ngày đầu khởi bệnh) có kết quả phát hiện IgM âm tính, mẫu máu 2 (lấy sau mẫu máu 1 từ 7-10 ngày) có kết quả phát hiện IgM dương tính, mẫu dịch não tủy có kết quả IgM đặc hiệu âm tính hoặc dương tính thấp.

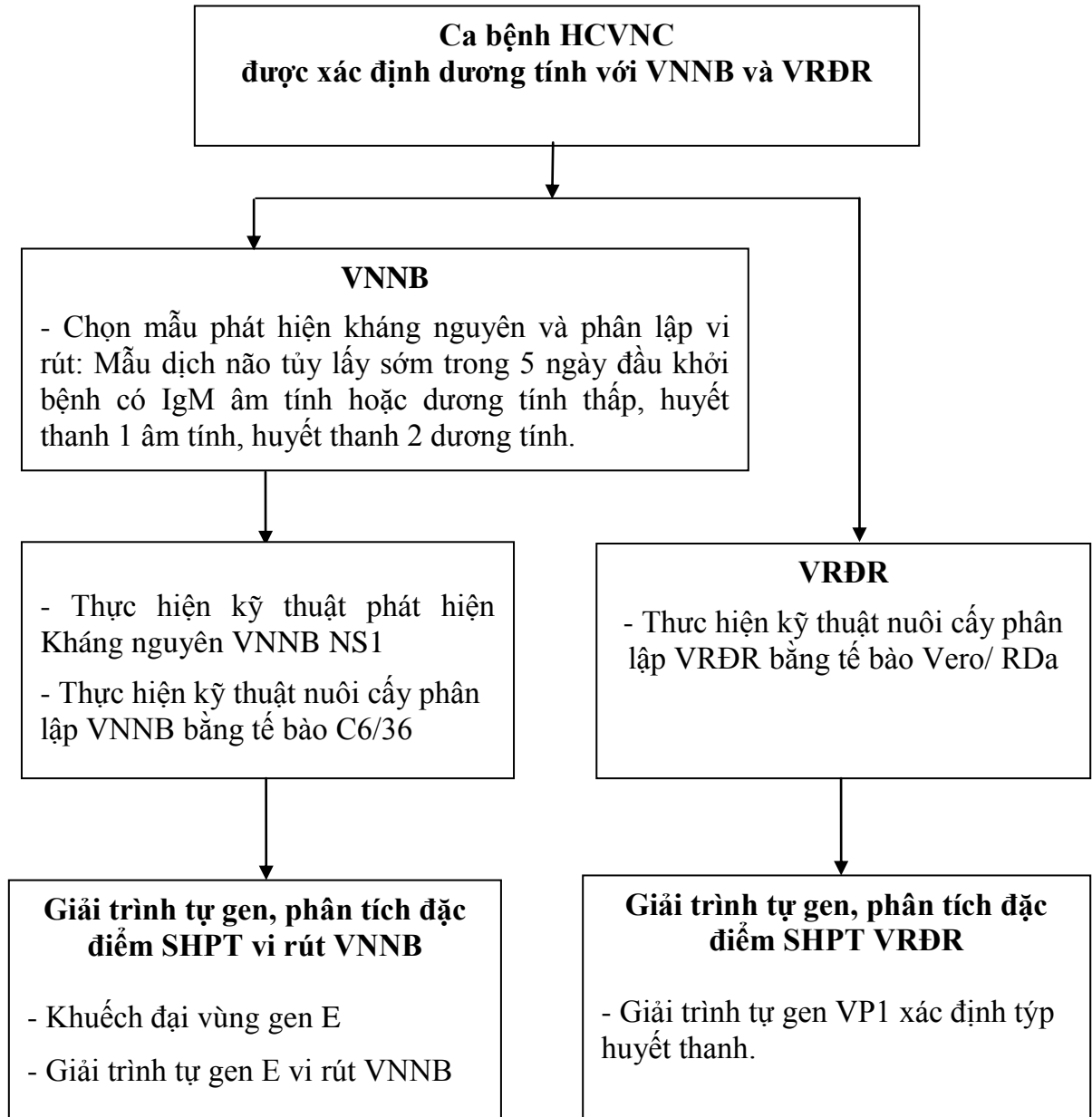
*Chọn mẫu phân lập VRĐR*: Chọn mẫu dịch não tủy có kết quả dương tính với VRĐR bằng kỹ thuật realtime RT-PCR, các mẫu này sẽ được nuôi cấy trên dòng tế bào Vero/RDa để phân lập được VRĐR.

- *Đối tượng nghiên cứu*:

+ Vùng gen E từ mẫu lâm sàng/chủng VNNB và vật liệu di truyền của vi rút VNNB được khuếch đại từ những mẫu dương tính với kháng nguyên VNNB NS1 và chủng vi rút phân lập được từ dịch não tủy.

+ Vùng gen VP1 của mẫu/chủng và vật liệu di truyền VRĐR được tách chiết từ những mẫu dịch não tủy phân lập dương tính.

+ Các chủng được chọn làm chủng tham chiếu về trình tự gen là các chủng VNNB, VRĐR thu thập tại Việt Nam và các nước trong khu vực châu Á đã được công bố trên ngân hàng gen GenBank.



**Hình 2.4. Thiết kế nghiên cứu mục tiêu 2**

## **2.5.2. Các biến số nghiên cứu**

### **2.5.2.1 Vi rút VNNB**

- Genotyp của chủng vi rút VNNB phân lập được và các mẫu phát hiện NS1 dương tính từ bệnh nhân VNNB ở Bắc Giang bằng kỹ thuật khuếch đại vùng gen E của vi rút.

- Cây phát sinh loài vùng gen E của vi rút VNNB tại Bắc Giang với các chủng vi rút VNNB khác của Việt Nam và một số nước trong khu vực.

- Đặc điểm trình tự nucleotid vùng gen E của vi rút VNNB tại Bắc Giang với các chủng vi rút VNNB khác của Việt Nam và một số nước trong khu vực.

- Đặc điểm các acid amin vùng gen E của vi rút VNNB phát hiện tại Bắc Giang với chủng Consensus.

### **2.5.2.2. Vi rút đường ruột**

- Xác định genotyp/kiểu huyết thanh của chủng VRĐR phân lập từ bệnh nhân gây HCVNC ở Bắc Giang giai đoạn 2004-2017 dựa trên vùng gene VP1 của VRĐR.

- Cây phát sinh loài vùng gen VP1 của các chủng VRĐR tại Bắc Giang so sánh với vùng gen VP1 có độ tương đồng cao nhất trong Genbank.

- Đặc điểm trình tự nucleotid vùng gen VP1 của các chủng VRĐR tại Bắc Giang với các chủng VRĐR khác của Việt Nam và một số nước trong khu vực.

## **2.5.3. Phương pháp thu thập số liệu**

### **2.5.3.1. Vật liệu, trang thiết bị, hóa chất sử dụng cho nghiên cứu**

#### **a) Dụng cụ, trang thiết bị**

- Sử dụng pipet nhựa 10ml, 5ml vô trùng, trợ pipet, pipet bán tự động một kênh, pipet tip có lọc vô trùng các loại, chai nuôi cấy tế bào 25cm<sup>2</sup>.

- Sử dụng một số thiết bị như tủ an toàn sinh học cấp II, tủ nuôi cấy 28°C, máy PCR của eppendorf, máy Sequencing ABI Avant 3100, máy giải trình tự gen thế hệ mới (Next generation sequence Miseq), máy ly tâm lạnh eppendorf, tủ -70°C.

*b) Hóa chất, sinh phẩm*

- Tế bào *Aedes albopictus* dòng C6/36, tế bào Vero/RDa (Human rhabdomyosarcoma) do Viện Y học Nhiệt đới Trường đại học Nagasaki cung cấp, môi trường DMEM, MEM của hãng Sigma, huyết thanh bào thai bê của hãng Gibco.

- Các sinh phẩm và hóa chất cần thiết cho kỹ thuật ELISA-NS1 do Viện Pasteur Paris cung cấp.

- Bộ sinh phẩm tách chiết ARN (QIAamp viral ARN extraction kit của hãng QIAGEN); Bộ sinh phẩm tinh sạch ADN của ExoSAP IT (Affymetrix); Bộ sinh phẩm giải trình tự BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem), bộ sinh phẩm tổng hợp cDNA SuperScript® III First-Strand Synthesis System (Invitrogen), bộ sinh phẩm chuẩn bị thư viện Illumina XT (Illumina).

**2.5.3.2. Kỹ thuật ELISA-NS1 VNNB**

- Kháng nguyên VNNB NS1 là một dấu ấn sinh học (biomarker) cho chẩn đoán sớm nhiễm vi rút VNNB. Kháng nguyên VNNB- NS1 là một glycoprotein phi cấu trúc, được tổng hợp ở cả dạng màng tế bào và dạng được bài tiết, xuất hiện trong huyết thanh bệnh nhân nhiễm vi rút VNNB giai đoạn sớm, nó xuất hiện sớm trước khi có sự xuất hiện các kháng thể VNNB IgM và IgG. Kháng nguyên VNNB NS1 có thể phát hiện trong máu, dịch não tủy từ ngày đầu tiên cho đến ngày thứ 7 sau khi xuất hiện sốt [82].

- Nguyên lý kỹ thuật xét nghiệm miễn dịch kháng nguyên dựa trên kháng thể đơn dòng ái lực cao, đặc hiệu để phát hiện protein không cấu trúc VNNB-NS1 [4].

- Nhận định kết quả theo tiêu chuẩn OD chứng dương/OD chứng âm >2, các mẫu xét nghiệm có giá trị OD mẫu xét nghiệm/OD chứng âm >2 được xác định là dương tính [4], [82] (theo phụ lục 8).

### 2.5.3.3. Kỹ thuật nuôi cấy phân lập vi rút VNNB

#### a) Phân lập vi rút VNNB:

- Tế bào dùng để phân lập vi rút VNNB là *Aedes albopictus* dòng C6/36
- Chuẩn bị tế bào: Quan sát tế bào dưới kính hiển vi đảo ngược, tạo hỗn dịch tế bào đạt nồng độ  $10^5$ /ml trong môi trường phát triển (đếm tế bào bằng buồng đếm); Cho 2ml hỗn dịch tế bào vào tube nuôi tế bào (hoặc 5ml vào chai nuôi tế bào). Ủ ở nhiệt độ thích hợp, với tế bào *Aedes albopictus* dòng C6/36 là 28°C để tạo tế bào một lớp, quan sát sự phát triển của tế bào bằng kính hiển vi đảo pha để xác định sự phát triển của tế bào trước gây nhiễm.
- Xử lý bệnh phẩm: mẫu DNT được làm tan băng, gây nhiễm mẫu trực tiếp.
- Gây nhiễm mẫu cho tế bào: Loại bỏ môi trường cũ, thể tích mẫu gây nhiễm được tính tương đương bằng 1/10–1/20 thể tích nuôi cấy tế bào. Hấp thụ ở nhiệt độ nuôi tế bào/2 giờ, sau đó cho môi trường duy trì.
- Theo dõi sau gây nhiễm: Tế bào được để ở nhiệt độ nuôi tế bào trong khoảng 3-5 ngày. Quan sát sự thay đổi bệnh lý của tế bào dưới kính hiển vi đảo ngược hàng ngày. Gặt nước nổi tế bào để xác định vật liệu di truyền của vi rút bằng kỹ thuật RT-PCR với cặp mồi đặc hiệu với vi rút [4].

#### b) Xác định kiểu gen và xây dựng cây phát sinh loài của vi rút VNNB

- Các mẫu phân lập và/hoặc các mẫu NS1 dương tính sẽ được tách chiết ARN bằng bộ sinh phẩm QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- ARN được sử dụng làm khuôn mẫu để thực hiện phản ứng RT-PCR khuếch đại vùng gen E với cặp mồi đặc hiệu JE-EF và JE-ER và bộ sinh phẩm Qiagen OneStep RT-PCR (Qiagen, Đức) bằng cặp mồi khuếch đại vùng gen E của vi rút VNNB. Toàn bộ vùng gen E được khuếch đại bằng cặp mồi này cho sản phẩm PCR có chiều dài 1917bp trong đó có 1500bp của gen E. Các mồi khác được thiết kế bên trong đoạn gen E để giải trình tự gồm có 939F, 1273F, 1769F, 1986R, 2122R.

Thông tin cụ thể về tên cặp mồi, trình tự cặp mồi trong bảng sau [41]:

**Bảng 2.1. Trình tự mồi sử dụng cho phản ứng RT-PCR  
và giải trình tự gen E**

Tên mồi	Trình tự nucleotide (5' – 3')	Vị trí
JE- EF	TGYTGGTCGCTCCGGCTTA	955-973
JE- ER	AAGATGCCACTTCCACAYCTC	2516-2536
390 F	GGCAGAAAGCAAAACAAAAG	390-410
939F	CGCGATCAGTAAAGCCTTGT	939 -959
1273F	AACGCTTCAGTGTTTCAGTCC	1273-1293
1769F	TGGCCTGATGTAACTTCAC	1769-1789
1986R	TAGCGCTGCTAGTCTCTGAG	1966-1986
2122R	TGAAGACCCCTCCAATAGAG	2102-2122
2426R	TCACAAACCACCACGGAAGT	2406-2426

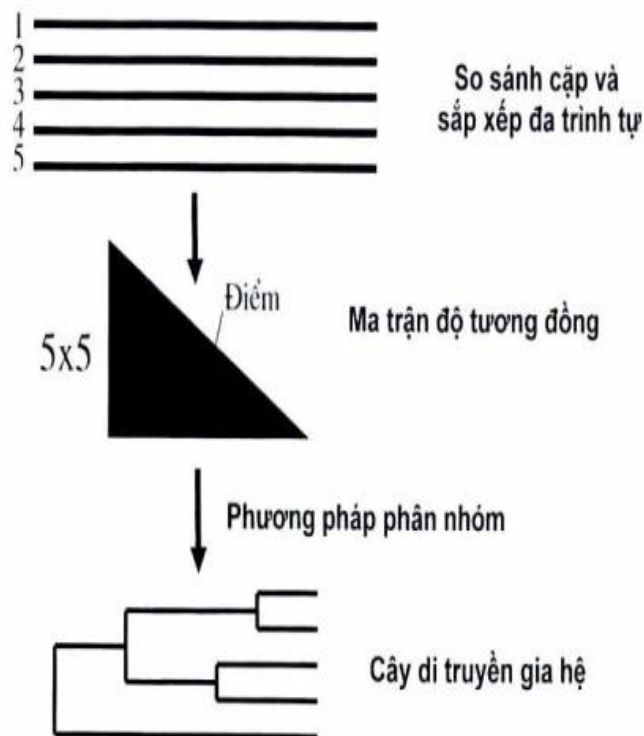
- Sản phẩm của phản ứng RT-PCR được tinh sạch bằng bộ sinh phẩm ExoSAP IT (Affymetrix) để làm khuôn mẫu cho phản ứng giải trình tự gen bằng bộ sinh phẩm BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem). Sau khi được tinh sạch, toàn bộ sản phẩm được đọc trên máy giải trình tự ABI Avant 3100 (Applied Biosystems) (*theo phụ lục 9*).

- Trình tự nucleotide được nối với nhau bằng phần mềm DNA Star (Lasogene) để tạo ra trình tự một trình tự nucleotid duy nhất. Các trình tự này sẽ được so sánh với trình tự chuẩn đại diện cho các kiểu gen để xác định kiểu gen. Sắp xếp thẳng hàng trình tự nucleotid của gen E được thực hiện bằng phần mềm MUSCLE tích hợp trong gói phần mềm MEGA6.06.

- Kiểu gen của vi rút VNNB được xác định bằng cách so sánh trình tự nucleotid vùng gen E của chúng cần xác định kiểu gen với chủng chuẩn công bố

trên ngân hàng gen GenBank. Sử dụng các chủng chuẩn đại diện tiêu biểu cho mỗi genotyp để xác định, dựa trên giá trị 12% khác nhau về số lượng nucleotid làm giá trị ngưỡng để phân chia các genotyp vi rút VNNB, trong mỗi genotyp có thể chia ra các (sub-genotyp) nhóm dưới genotyp.

- Cây phát sinh loài được xây dựng bằng phương pháp Maximum Likelihood với độ lặp 1.000 lần, mô hình Tamura- Nei, phân bố Gamma (TN93+G) được chọn là mô hình thích hợp nhất với bộ số liệu. Các chủng được chọn làm chủng tham chiếu là tất cả các chủng GI thu thập tại Việt Nam và các nước trong khu vực châu Á đã được công bố trên ngân hàng gen GenBank [4], [41].



### Hình 2.5 Quy trình xây dựng cây phát sinh loài các chủng vi rút

- Sử dụng trình tự nucleotid vùng gen E của 60 chủng vi rút đã được xác định trình tự nucleotid vùng gen E, có mã số trong ngân hàng gen quốc tế, trong đó có 32 chủng vi rút VNNB phân lập tại Việt Nam để so sánh trình tự vùng gen E và xây dựng cây phát sinh loài (*phụ lục 10*).



- So sánh độ tương đồng nucleotid và acid amin của các vi rút VNNB cần so sánh bằng gói phần mềm MEGA6.

#### **2.5.3.4. Kỹ thuật nuôi cấy phân lập vi rút đường ruột**

##### **a) Phân lập VRDR:**

- Chuẩn bị tế bào: Sử dụng dòng tế bào RDa (tế bào ung thư tim người/human rhabdomyosarcoma).

- Xử lý bệnh phẩm: DNT pha loãng trong môi trường duy trì có 2% huyết thanh bê bào thai, xử lý mẫu ở nhiệt độ 56°C/30 phút

- Chuẩn bị tế bào một lớp: Mỗi loại tế bào phải chuẩn bị riêng biệt để tránh bị nhiễm chéo giữa các dòng tế bào. Chai tế bào một lớp phát triển tốt, không bị nhiễm trùng. Gạn bỏ môi trường phát triển và rửa tế bào 2 lần bằng PBS. Thêm 0,5ml dung dịch Trypsin 0,25% vào chai tế bào, ủ 37°C cho tới khi tế bào tách khỏi thành chai (khoảng 2-3 phút), đập mạnh vào thành chai cho tế bào bong ra hết. Pha loãng tế bào ở nồng độ  $1 \times 10^5$  TB/1ml trong môi trường phát triển. Cho tế bào vào tube (1ml/1tube) để tạo tế bào 1 lớp (sau 2 ngày sẽ tạo được tube tế bào 1 lớp).

- Gây nhiễm mẫu bệnh phẩm cho tế bào: Chọn những tube tế bào tốt, thay môi trường phát triển bằng môi trường duy trì. Đánh dấu tube tế bào theo thứ tự số mẫu, năm, loại tế bào và số lần cấy chuyển. Cấy 0,2ml bệnh phẩm vào mỗi tube tế bào, ủ ở 37°C. Dùng 2 tube tế bào không gây nhiễm để làm tế bào chứng.

- Theo dõi sau gây nhiễm: Kiểm tra tế bào hàng ngày dưới kính hiển vi chuẩn để theo dõi tình trạng bệnh lý của tế bào. Sau 10-14 ngày nếu tế bào bình thường thì phân lập là âm tính. Tế bào bị có sự thay đổi như co tròn lại, tách khỏi thành chai nuôi cấy. Nếu tế bào bị thoái hóa nhanh trong vòng 1 ngày sau gây nhiễm thì có khả năng do độc tố của bệnh phẩm, cần xem xét pha loãng mẫu để loại trừ. Những tube này được cất ở -70°C, làm tan băng và cấy tiếp trong các lần sau. Nếu hiện tượng tế bào bị nhiễm độc tiếp tục xảy ra thì pha loãng bệnh phẩm gốc 1/10 trong PBS và gây nhiễm lại tế bào. Những tube tế bào hủy hoại >50% được cất ở -70°C để định tít huyết thanh và xác định đặc điểm phân tử của VRDR.

*b) Xác định tít huyét thanh của VRĐR*

- Kỹ thuật NGS giải trình tự toàn bộ vùng gen VP1 Illumina: chuẩn bị thư viện bằng bộ sinh phẩm Nextera XT (Illumina), giải trình tự gen trên máy Illumina Miseq với phương pháp "paired-end". Các đoạn đọc thuộc về vùng gen VP1 của VRĐR sẽ chọn bằng công cụ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) bằng cách so sánh với các chủng VRĐR trên ngân hàng gen (GenBank) sau đó được nối bằng phần mềm CLC Main Workbench (CLCbio) theo phương pháp de novo. Tít huyét thanh được xác định dựa trên toàn bộ vùng gen VP1 (866 nucleotide) trên trang web <https://www.rivm.nl/mpf/typingtool/enterovirus/>[73]

*c) Xác định đặc điểm phân tử và xây dựng cây phát sinh loài của VRĐR*

- Phân tích đặc điểm sinh học phân tử: Cây phát sinh loài của các tít huyét thanh xác định được trong nghiên cứu này bao gồm các chủng thu được trong nghiên cứu này và các trình tự chuẩn, trình tự tham khảo đã công bố trên ngân hàng gen GenBank (*phụ lục 11*). Cây phát sinh loài được xây dựng bằng phần mềm MEGA6.0 theo phương pháp Maximum Likelihood với độ lặp 1.000 lần, mô hình thích hợp nhất (General Time Reversible + G + I) với giá trị BIC nhỏ nhất [123]. Độ tương đồng = 1- p-distance trong đó p-distance là độ khác biệt ở mức độ nucleotide và tính toán bằng phần mềm MEGA6.0.

**2.6. Các biện pháp hạn chế sai số**

Để loại trừ các sai số ngẫu nhiên có thể xảy ra, trong nghiên cứu này đã thực hiện các biện pháp:

- Thiết kế nghiên cứu chặt chẽ, các công cụ thu thập số liệu theo biến số và chỉ số nghiên cứu. Sinh phẩm xét nghiệm được kiểm soát chất lượng, kỹ thuật xét nghiệm đều được thực hiện theo đúng quy trình chuẩn và tại các phòng thí nghiệm Trung tâm Kiểm soát bệnh tật tỉnh Bắc Giang (tên cũ là Trung tâm Y tế dự phòng) và Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

- Các thuật toán thống kê thường dùng trong y học cũng đã được sử dụng để loại trừ các sai số ngẫu nhiên.

- Sử dụng các phần mềm tin sinh học để so sánh phân tích về trình tự nucleotid của các chủng vi rút/mẫu vật liệu di truyền của vi rút được phát hiện từ bệnh nhân HCVNC tại Bắc Giang với các chủng trong nước và quốc tế.

- Chọn đội ngũ điều tra viên là các cán bộ chuyên môn sâu và có kinh nghiệm về lĩnh vực bệnh truyền nhiễm, đồng thời đã tổ chức tập huấn thống nhất về phương pháp giám sát trường hợp bệnh; việc điều tra, giám sát được thực hiện thường xuyên, đầy đủ. Trong chẩn đoán HCVNC luôn tuân thủ nghiêm ngặt tiêu chuẩn chẩn đoán của Bộ Y tế/WHO. Các biện pháp này đã đảm bảo tránh chẩn đoán nhầm và tránh bỏ sót trường hợp bệnh.

- Tính đại diện của kết quả nghiên cứu được đảm bảo dựa trên cỡ mẫu toàn bộ, có sự kết hợp cả hồi cứu và tiền cứu để có kết quả chính xác.

### **2.7. Phương pháp xử lý số liệu**

- Số liệu được làm sạch và nhập vào máy tính và quản lý bằng phần mềm Epidata 3.1. Bộ nhập liệu được thiết kế với tập check để khống chế các sai số. Số liệu được xử lý bằng phần mềm Stata 14. Thống kê mô tả được thực hiện thông qua tính toán giá trị trung bình, trung vị, độ lệch, tần số, tỷ lệ phần trăm. Thống kê suy luận được thực hiện qua ước tính 95% CI và kiểm định giả thuyết. Trắc nghiệm thống kê khi bình phương được thực hiện để so sánh tỷ lệ mắc bệnh giữa các nhóm. Tỷ suất chênh (OR) được tính toán trong phân tích mối tương quan. Mức ý nghĩa thống kê  $p < 0,05$  được sử dụng.

- Sử dụng phần mềm MEGA 6.06 để tạo cây phát sinh loài, xác định nguồn gốc của một số tác nhân vi rút gây HCVNC tại Bắc Giang.

### **2.8. Đạo đức trong nghiên cứu**

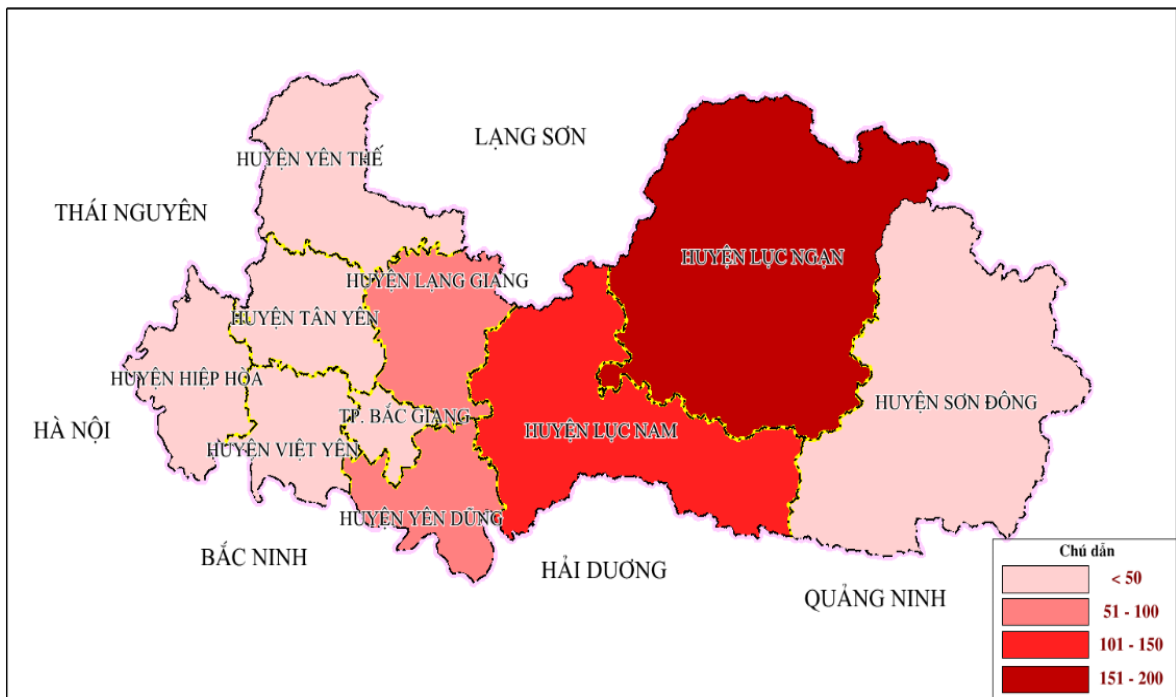
- Việc thực hiện nghiên cứu này được sự chấp thuận của Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu Y sinh của Viện vệ sinh dịch tễ Trung ương với mã số chấp thuận IRB-VN01057-14/2016.

### Chương 3

## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 3.1. Xác định một số căn nguyên vi rút Arbo, vi rút đường ruột, vi rút herpes gây hội chứng viêm não cấp tại Bắc Giang, 2004-2017

#### 3.1.1. Chẩn đoán xác định căn nguyên vi rút gây HCVNC



**Hình 3.1. Phân bố ca mắc HCVNC tại Bắc Giang, 2004-2017**

Trong giai đoạn 2004-2017, HCVNC xuất hiện ở 10/10 huyện, thành phố của tỉnh Bắc Giang với tổng số ca mắc là 594. Huyện có số ca mắc cao trên 100 ca là hai huyện Lục Nam (103 ca) và Lục Ngạn (161 ca). Huyện có số ca mắc trung bình trên 50 ca là huyện Lạng Giang (77 ca) và Yên Dũng (59 ca). Những huyện còn lại có số ca mắc thấp hơn, trong khoảng từ 19 đến 48 ca. Tỷ lệ mắc trên 100.000 dân cao nhất ở huyện Lục Ngạn (5,49/100.000), sau đó là huyện Lục Nam (3,63/100.000) và Yên Dũng (2,93/100.000). Các huyện có số ca mắc thấp là Hiệp Hòa, Việt Yên, Yên Thế, tỷ lệ mắc trên 100.000 giao động trong khoảng từ 1,22/100.000-1,41/100.000.

Trong giai đoạn từ tháng 01 năm 2004 đến tháng 12 năm 2017, có tổng số 594 ca bệnh HCVNC nghi ngờ do vi rút được lấy mẫu dịch não tủy, huyết thanh I và huyết thanh II để thực hiện các kỹ thuật xét nghiệm MAC-ELISA/ELISA IgM gián tiếp để phát hiện IgM kháng vi rút VNNB, BAV và NDiV. Sử dụng kỹ thuật Realtime RT-PCR và Realtime PCR phát hiện vật liệu di truyền của vi rút đường ruột và vi rút herpes.

**Bảng 3.1. Xác định tác nhân vi rút Arbo gây HCVNC bằng kỹ thuật ELISA tại Bắc Giang, 2004-2017**

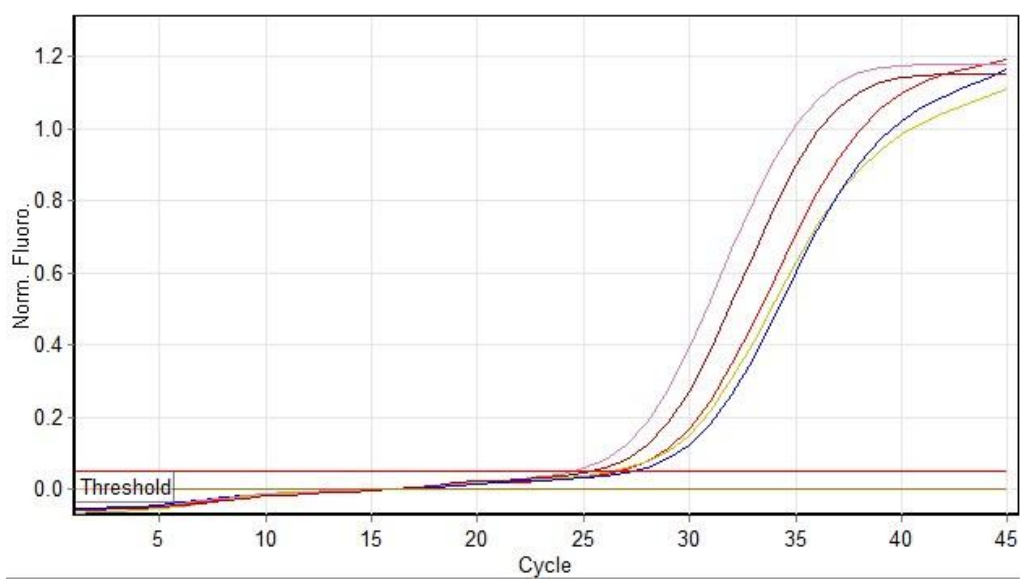
Loại mẫu		VNNB	BAV	NDiV
Dịch não tủy (n=594)	Tổng số mẫu	594	594	594
	Dương tính	97	112	28
	<b>Tỉ lệ dương tính (%)</b>	<b>16,33</b>	<b>18,86</b>	<b>4,71</b>
Huyết thanh I (n=594)	Tổng mẫu	594	0	0
	Dương tính	97	0	0
	<b>Tỉ lệ dương tính (%)</b>	<b>16,33</b>	0	0
Huyết thanh II (n=594)	Tổng mẫu	594	0	0
	Dương tính	120	0	0
	<b>Tỉ lệ dương tính (%)</b>	<b>20,2</b>	0	0

Trong tổng số 594 trường hợp HCVNC, bằng kỹ thuật MAC-ELISA xác định VNNB có 97 trường hợp xác định dương tính, có IgM kháng vi rút VNNB trong mẫu DNT, 23 trường hợp xác định dương tính, có IgM kháng vi rút VNNB bằng chênh lệch hiệu giá kháng thể huyết thanh kép, tỷ lệ xác định dương tính với VNNB là 20,2%. Bằng kỹ thuật ELISA IgM gián tiếp để phát hiện IgM kháng vi rút Banna hoặc vi rút Nam Định, kết quả đã xác định có 112 mẫu DNT được xác định dương tính với kháng nguyên vi rút Banna, tỷ lệ xác định dương tính với kháng nguyên vi rút Banna là 18,86%. Trong khi đó chỉ phát hiện được 28 mẫu DNT dương tính với kháng nguyên vi rút Nam Định, tỷ lệ xác định dương tính với kháng nguyên vi rút Nam Định chỉ có 4,71%.

**Bảng 3.2. Xác định tác nhân vi rút gây HCVNC bằng kỹ thuật sinh học phân tử tại Bắc Giang, 2004-2017**

Tác nhân vi rút	Realtime PCR (DNT)		Realtime RT-PCR (DNT)		Tỷ lệ dương tính / tổng số (%)
	Số mẫu xét nghiệm	Dương tính	Số mẫu xét nghiệm	Dương tính	
<b>HSV</b>	594	0	-	-	0/594 (0,00)
<b>EV</b>	-	-	594	78	78/594 (13,13)

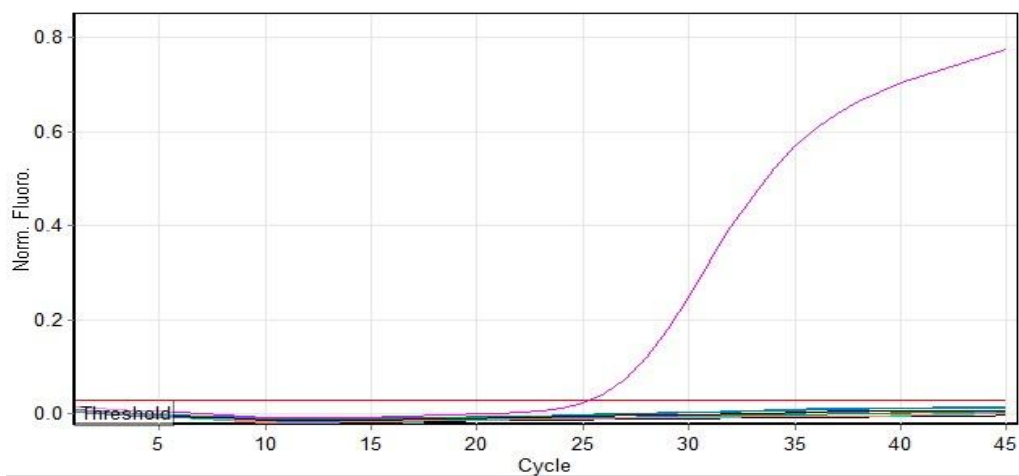
Trong 594 ca bệnh mắc HCVNC, bằng kỹ thuật RT-PCR, Realtime RT-PCR xác định có 78 trường hợp dương tính với cặp mồi đặc hiệu vi rút đường ruột, tỷ lệ xác định dương tính là 13,13%. Trong nghiên cứu này, không phát hiện được trường hợp nào dương tính với cặp mồi đặc hiệu các vi rút herpes.



**Hình 3.2. Kết quả đại diện Realtime RT-PCR chẩn đoán EV từ bệnh nhân HCVNC, 2004-2017**

- Chủng dương (Dương tính)
- Ng. X. Q. (Dương tính)
- Chủng âm (Âm tính)
- T. V. B. (Dương tính)
- D. V. S. (Dương tính)
- P. A. T. (Dương tính)

(threshold: Giá trị ngưỡng)



**Hình 3.3. Kết quả đại diện Realtime PCR chẩn đoán HSV từ bệnh nhân HCVNC, 2004-2017**

■ Chứng dương (Dương tính)      ■ Ng. V. K (Âm tính)  
■ Chứng âm (Âm tính)              ■ Ng. Q. B (Âm tính)

**Bảng 3.3. Tỷ lệ dương tính với ít nhất một tác nhân và sự phân bố đồng nhiễm các trường hợp HCVNC do vi rút tại Bắc Giang, 2004-2017**

Tác nhân vi rút	Số mẫu DNT được xét nghiệm	Số mẫu HT kép được xét nghiệm	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ %
<b>Tỷ lệ dương tính với ít nhất một vi rút xác định</b>	<b>594</b>	<b>594</b>	<b>302</b>	<b>50,84</b>
VNNB	594	594	120	20,2
BAV	594	-	112	18,86
NDiV	594	-	28	4,71
EV	594	-	78	13,13
HSV	594	-	0	0,0
<b>Đồng nhiễm</b>	<b>594</b>	<b>-</b>	<b>32</b>	<b>5,39</b>
BAV - VNNB - NDiV	594	-	4	0,67
BAV – VNNB	594	-	8	1,35
BAV-NDiV	594	-	9	1,52
BAV - VRĐR	594	-	8	1,35
VNNB - NDiV	594	-	1	0,17
VNNB - VRĐR	594	-	2	0,34

Trong tổng số 594 ca bệnh HCVNC xác định được căn nguyên là 302/594 (50,84%). Trong đó có 32 (5,39%) bệnh nhân có xét nghiệm dương tính với nhiều hơn một tác nhân vi rút. Trong phần lớn số ca đồng nhiễm này (29/32; 90,6%) có DNT dương tính với IgM kháng BAV cộng với một tác nhân khác. Ở những trường hợp xác định HCVNC do VRĐR (dương tính) có 2 trường hợp cũng được xác định dương tính với vi rút VNNB.

Phân tích số ca đồng nhiễm trong tổng số ca xác định được căn nguyên vi rút gây HCVNC, tỷ lệ đồng nhiễm trên số ca xác định được nguyên nhân là (32/302; 10,6%). Trong số ca đồng nhiễm, phần lớn là đồng nhiễm 2 tác nhân (28/32; 87,5%), đồng nhiễm 3 tác nhân ( 4/32; 12,5%). Trong 4 ca đồng nhiễm 3 tác nhân đều là đồng nhiễm trong nhóm vi rút Arbo: VNNB, BAV và NDiV.

### 3.1.2. Một số đặc điểm HCVNC do vi rút

#### 3.1.2.1. Một số đặc điểm HCVNC do vi rút đường ruột

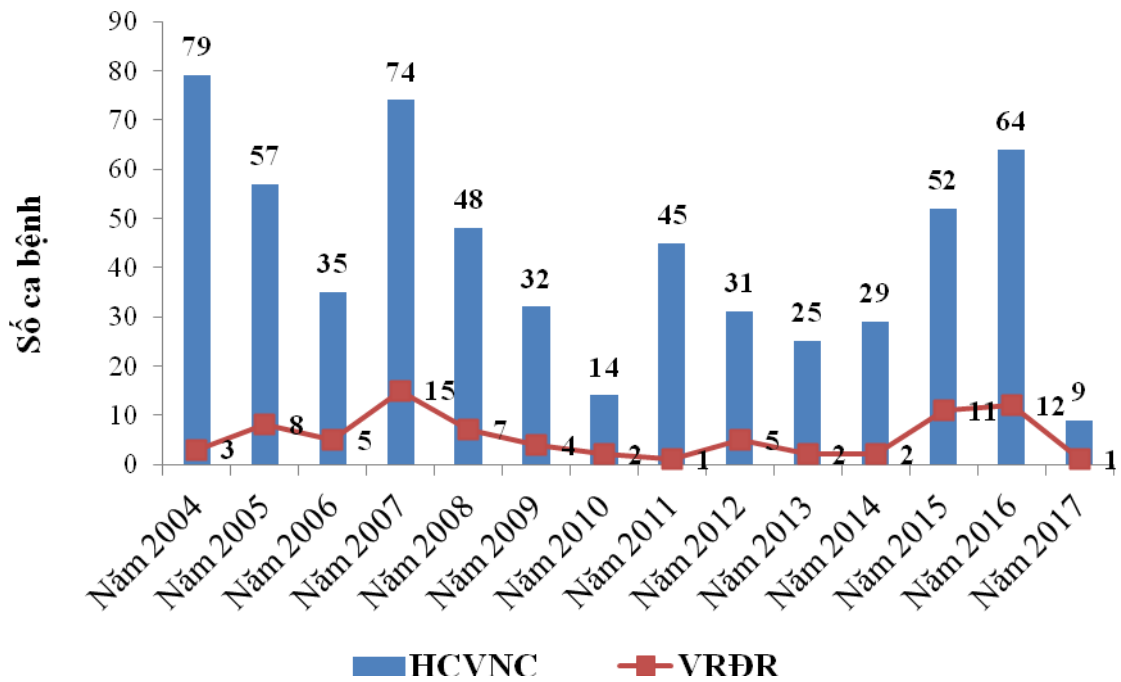
**Bảng 3. 4. Phân bố ca mắc HCVNC do VRĐR theo giai đoạn, 2004-2017**

Giai đoạn	HCVNC					VRĐR				
	Mắc (M)		Chết (C)		C/M (%)	Mắc		Chết		C/M (%)
	n	%	n	%		n	%	n	%	
2004-2008	293	49,33	34	75,56	11,60	38	48,72	1	100	2,63
2009-2013	147	24,75	9	20,00	6,12	14	17,95	0	0,00	0,00
2014-2017	154	25,93	2	4,44	1,30	26	33,33	0	0,00	0,00
<b>Tổng</b>	<b>594</b>	<b>100</b>	<b>45</b>	<b>100</b>	<b>7,58</b>	<b>78</b>	<b>100</b>	<b>1</b>	<b>100</b>	<b>1,28</b>

Trong 14 năm từ 2004-2017, số ca mắc HCVNC là 594, số ca tử vong là 45, tỷ lệ chết /mắc là 7,58%. Tỷ lệ mắc HCVNC cao hơn trong giai đoạn 2004-2008 (49,33%), giảm dần trong giai đoạn 2009-2013 (24,75%) và 2014-2017 (25,93%).

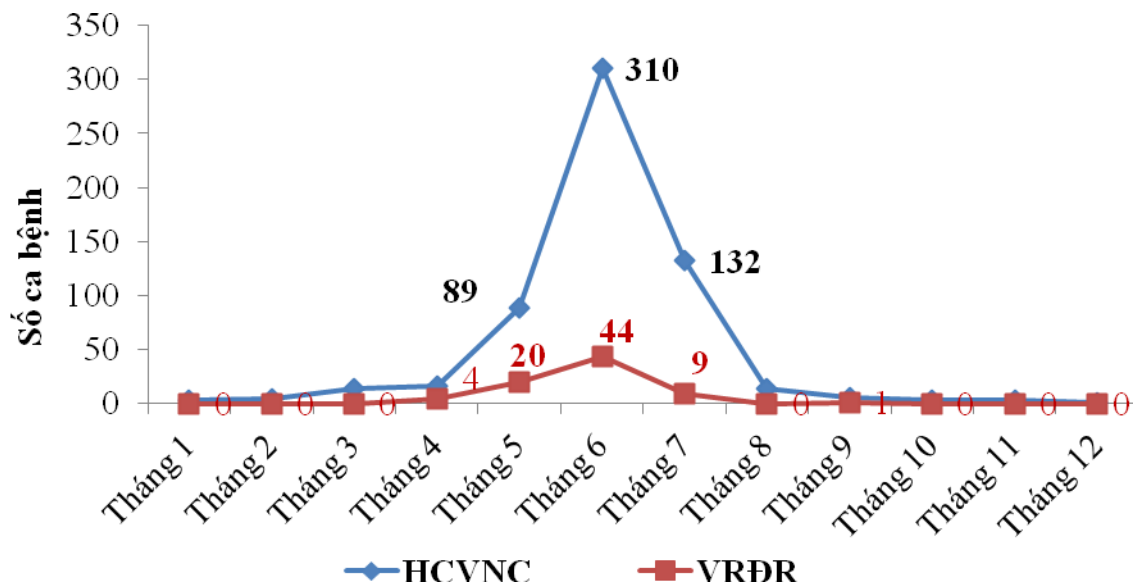
Số ca mắc HCVNC do VRĐR cao trong giai đoạn 2004-2008 (48,72%) và giai đoạn 2014-2017 (33,33%), thấp hơn ở giai đoạn 2009-2013 (17,95%). Tỷ lệ chết/ mắc HCVNC do VRĐR là 1,28%.





**Hình 3. 4. Phân bố ca bệnh HCVNC do VRĐR theo năm, 2004-2017**

Phân tích theo năm cho thấy số ca mắc HCVNC cao ở các năm 2004, 2007-2008, 2011, 2015-2016; Trong 78 ca HCVNC do VRĐR, số ca mắc ở tất cả các năm, trong đó số năm có ca mắc cao hơn là năm 2007 (15 ca), năm 2015 (11 ca) và năm 2016 (12 ca).



**Hình 3. 5. Phân bố ca bệnh HCVNC do VRĐR theo tháng, 2004-2017**

HCVNC xuất hiện ở tất cả các tháng từ tháng 1 đến tháng 12 trong năm, số ca mắc tăng dần từ tháng 3 đến tháng 8, cao trong ba tháng hè (tháng 5, tháng 6, tháng 7). Số ca mắc trong ba tháng hè là 531/594 chiếm 89,39%; Tháng có số ca mắc HCVNC cao nhất trong năm là tháng 6 với số ca mắc là 310/594 chiếm 52,19% tổng số ca mắc trong năm.

Trong số 78 trường hợp mắc HCVNC do VRĐR, số ca mắc xuất hiện từ tháng 4 đến tháng 7 trong năm, cao trong ba tháng hè (73/78; 93,59%), số mắc cao tập trung vào tháng 6 trong năm (44/78; 56,41%).

**Bảng 3.5. Phân bố ca mắc HCVNC do vi rút đường ruột theo nhóm tuổi, 2004-2017**

Nhóm tuổi		HCVNC			HCVNC do VRĐR		
		n	%	Mắc/ 100.000	n	%	Mắc/ 100.000
Theo 5 nhóm tuổi	<1	39	6,57	<b>10,54</b>	4	5,13	<b>1,08</b>
	1-4	176	29,63	<b>12,50</b>	26	33,33	<b>1,85</b>
	5-9	152	25,59	8,98	21	26,92	1,24
	10-14	97	16,33	5,05	10	12,82	0,52
	≥ 15	130	21,89	0,77	17	21,79	0,10
	Tổng	594	100	2,67	78	100	0,35
Theo 2 nhóm tuổi	<15	464	78,11	8,60	61	78,21	1,13
	≥ 15	130	21,89	0,77	17	21,79	0,10
	Tổng	594	100	2,67	78	100	0,35

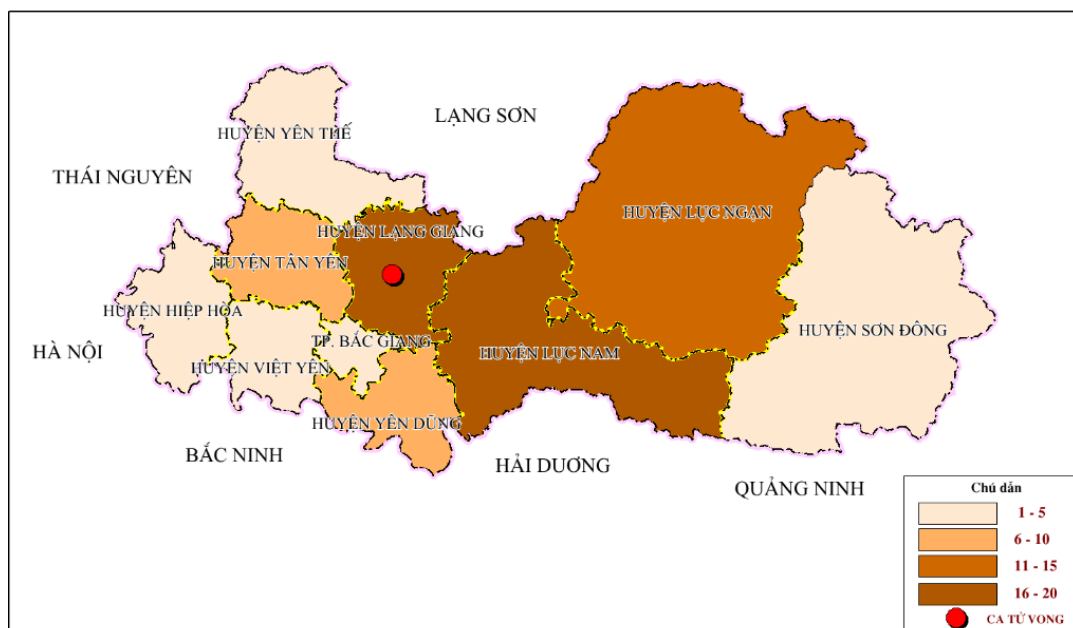
Phân bố ca mắc HCVNC theo nhóm tuổi cho thấy, tỷ lệ mắc tập chung ở nhóm dưới 15 tuổi (0,77/100.000) cao gấp 11 lần so với nhóm tuổi trên 15 (8,6/100.000), trong đó tỷ lệ mắc cao ở nhóm dưới 5 tuổi (10,54/100.000 – 12,5/100.000).

Tương tự như vậy, phân bố các trường hợp mắc HCVNC do VRĐR gặp ở tất cả các nhóm tuổi, nhưng tập trung mắc ở nhóm dưới 15 tuổi (1,13/100.000) cao gấp 11 lần so với nhóm tuổi trên 15 (0,1/100.000), trong đó tập trung cao ở nhóm dưới 10 tuổi, trong khoảng 1,08/100.000-1,85/100.000. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .

**Bảng 3.6. Phân bố ca mắc HCVNC do vi rút đường ruột theo giới, 2004-2017**

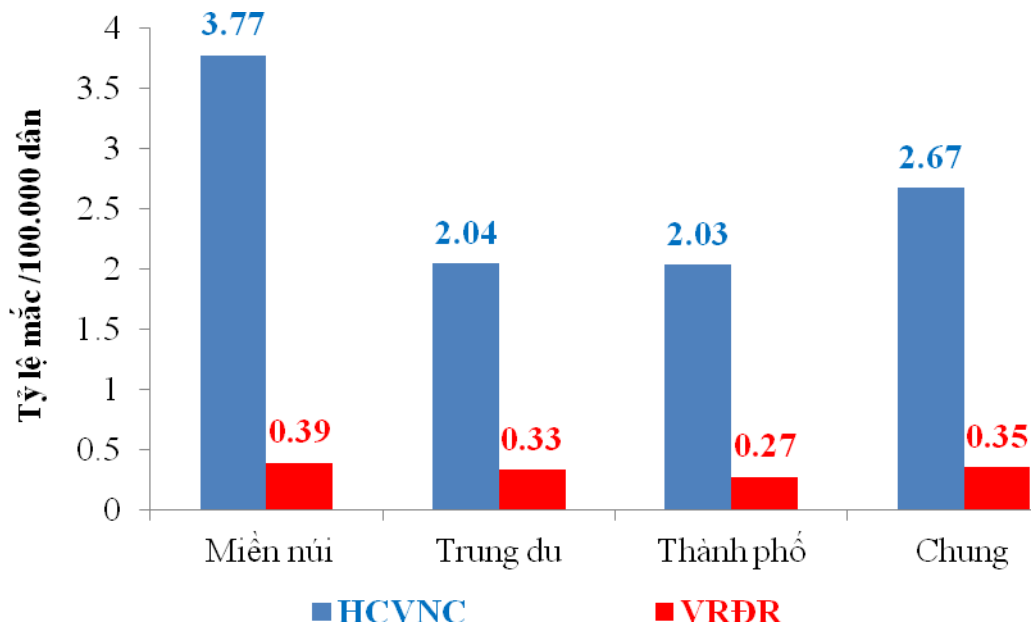
Giai đoạn	Nam			Nữ			p
	n	%	Mắc/ 100.000	n	%	Mắc/ 100.000	
2004-2008	23	60,53	0,60	15	39,47	0,38	0,002
2009-2013	10	71,43	0,26	4	28,57	0,10	
2014-2017	20	76,92	0,61	6	23,08	0,18	
<b>Tổng</b>	<b>53</b>	<b>67,95</b>	<b>0,48</b>	<b>25</b>	<b>32,05</b>	<b>0,22</b>	

Trong số các trường hợp HCVNC do vi rút đường ruột, tỷ lệ số mắc ở nam (67,95%) cao hơn nữ (32,05%). Tỷ lệ mắc trên 100.000 dân ở nam giới (0,48/100.000) cao hơn 2 lần so với nữ giới (0,22/100.000), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .



**Hình 3.6. Phân bố ca bệnh HCVNC do VRĐR theo huyện, 2004-2017**

Trong giai đoạn 2004-2017, các trường hợp mắc HCVNC do vi rút đường ruột gặp ở cả 10/10 huyện, thành phố của tỉnh Bắc Giang. Số ca mắc HCVNC do VRĐR tập trung ở các huyện Lục Nam (17 ca) và huyện Lạng Giang (17 ca), huyện Lục Ngạn (12 ca). Những huyện có số ca mắc thấp dưới 5 ca là các huyện Sơn Động, huyện Yên Thế, huyện Hiệp Hòa, huyện Việt Yên và thành phố Bắc Giang.



**Hình 3.7. Phân bố ca bệnh HCVNC do VRĐR trên 100.000 dân theo khu vực, 2004-2017**

Tỷ lệ mắc HCVNC trên 100.000 dân trong giai đoạn 2004-2017 là 2,67/100.000; Trong đó tỷ lệ mắc cao ở khu vực miền núi là 3,77/100.000, Khu vực Trung du và thành phố lần lượt là 2,04/100.000 và 2,03/100.000.

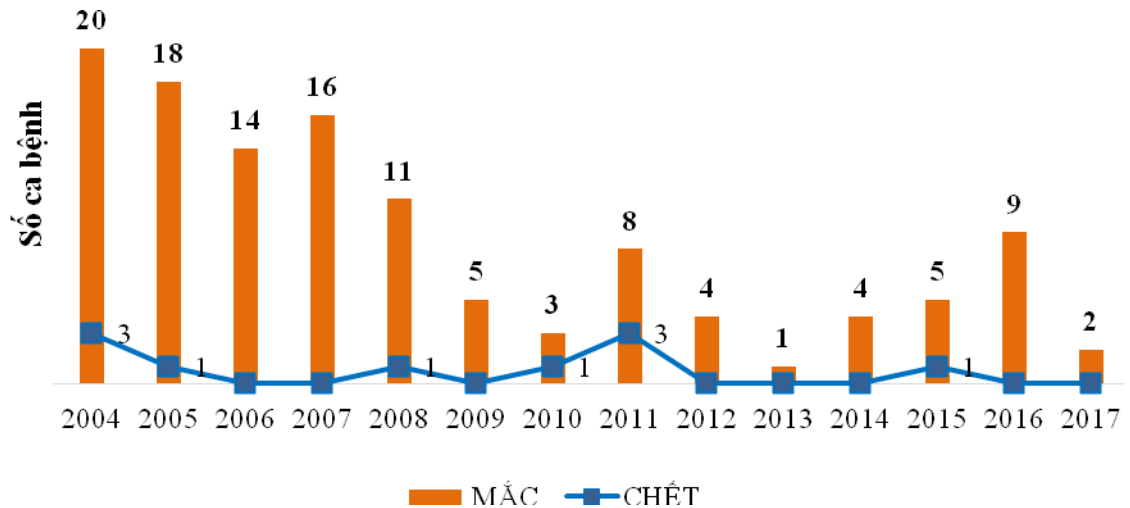
Trong 78 ca mắc HCVNC do VRĐR, số ca ở khu vực miền núi là 32/78 ca chiếm 41,03%, khu vực trung du là 41/78 ca chiếm 52,56%, khu vực thành phố là 5/78 ca chiếm 6,41%. Tỷ lệ mắc HCVNC do VRĐR trên 100.000 dân là 0,35/100.000 dân, phân theo khu vực cho thấy, tỷ lệ mắc ở khu vực miền núi là 0,39/100.000; khu vực trung du là 0,33/100.000 và khu vực thành phố là 0,27/100.000. Tỷ lệ mắc ở khu vực miền núi cao hơn khu vực trung du và thành phố có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .

### 3.1.2.2. Một số đặc điểm HCVNC do vi rút viêm não Nhật Bản

**Bảng 3.7. Phân bố ca bệnh viêm não Nhật Bản theo giai đoạn, 2004-2017**

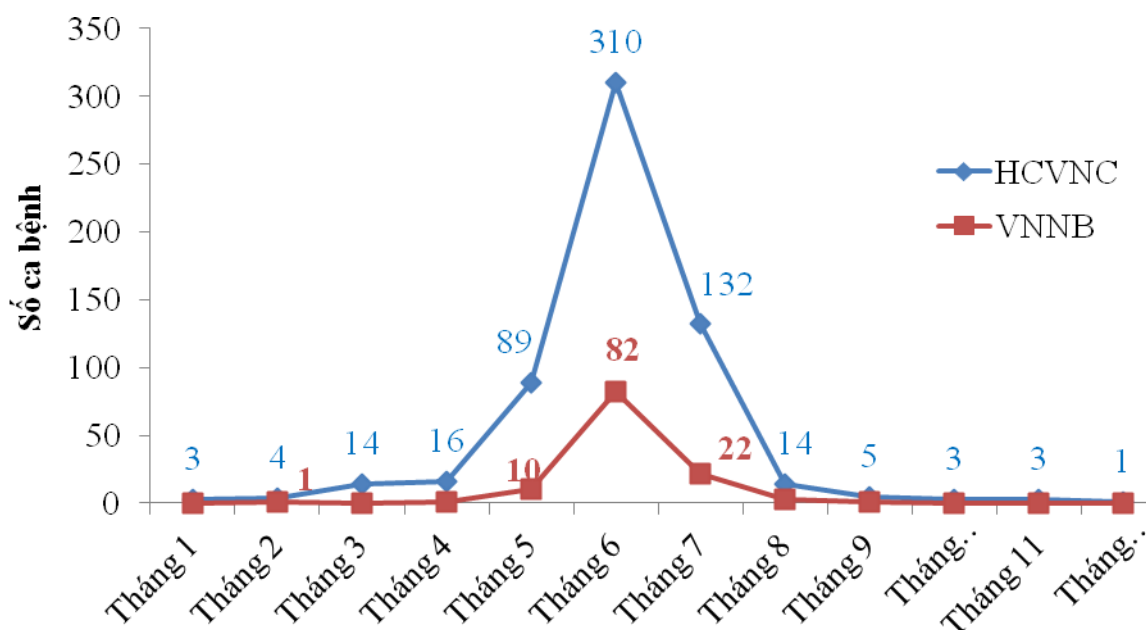
Giai đoạn	Mắc			Chết		
	Mắc	%	Mắc /100.000	Chết	%	Chết /100.000
2004-2008	79	65,83	<b>1,03</b>	5	50,00	0,07
2009-2013	21	17,50	0,27	4	40,00	0,05
2014-2017	20	16,67	0,30	1	10,00	0,02
<b>Tổng</b>	<b>120</b>	100	<b>0,54</b>	<b>10</b>	<b>100</b>	<b>0,05</b>

Trong 14 năm, có 120 ca VNNB được phát hiện, trong đó giai đoạn 2004-2008 có 79 ca chiếm 65,83%, tỉ lệ mắc trên 100.000 dân ở giai đoạn này là 1,03/100.000 dân cao gấp 3,4-3,8 lần so với giai đoạn 2009-2013 và giai đoạn 2014-2017.



**Hình 3.8. Phân bố ca mắc viêm não Nhật Bản theo năm, 2004-2017**

Trong số 120 trường hợp mắc VNNB phân bố ở tất cả các năm trong giai đoạn 2004-2017, trong đó tập trung cao từ 2004-2008 và các năm 2011, năm 2016.



**Hình 3.9. Phân bố ca bệnh viêm não Nhật Bản theo tháng, 2004-2017**

Số ca mắc VNNB xuất hiện từ tháng 2 đến tháng 9 trong năm, trong đó số ca mắc cao tập trung vào các tháng 5, tháng 6, tháng 7 chiếm 95% (114/120) tổng số ca mắc trong năm. Riêng tháng 6 số ca mắc cao nhất chiếm 68,33% (82/120).

Trong 10 ca tử vong do VNNB, tập trung ở tháng 5 (2 ca), tháng 6 (5 ca), tháng 7 (2 ca) trong năm, 90% (9/10 ca) ca tử vong trong khoảng thời gian này.

**Bảng 3.8. Phân bố ca bệnh VNNB theo tuổi trung bình mắc VNNB, 2004-2017**

Giai đoạn	Tuổi trung bình mắc viêm não Nhật Bản			
	Số ca bệnh	Tuổi trung bình	Trung vị	95%CI
2004-2008	79	7,27	6	6 – 9
2009-2013	21	9,76	9	7 – 13
2014-2017	20	10,2	12	7 – 13
<b>Tổng</b>	<b>120</b>	<b>8,20</b>	<b>7,00</b>	<b>7 – 9</b>

Tuổi trung bình ca bệnh VNNB dựa trên 120 ca bệnh là 8,2 tuổi, tuổi trung bình nằm trong khoảng 7-9 tuổi với độ tin cậy 95%. Giai đoạn 2004-2008 tuổi trung bình mắc bệnh là 7,27 tuổi thấp hơn giai đoạn 2009-2013 là 9,76 tuổi và giai đoạn 2014-2017 là 10,2 tuổi, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

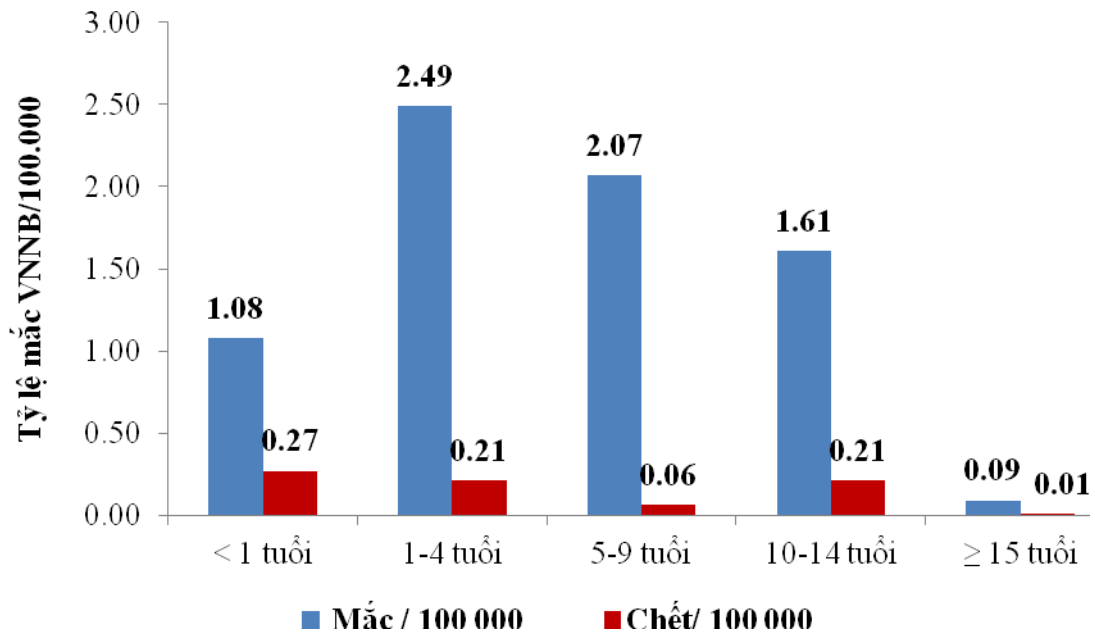
**Bảng 3.9. Phân bố ca bệnh viêm não Nhật Bản theo nhóm tuổi, 2004-2017**

Nhóm tuổi		Mắc		Chết		Tỉ lệ Chết /Mắc (%)
		n	%	n	%	
Phân theo 5 nhóm	<1	4	3,33	1	10,00	25,00
	1-4	35	<b>29,17</b>	<b>3</b>	30,00	8,57
	5-9	35	<b>29,17</b>	1	10,00	2,86
	10-14	31	<b>25,83</b>	<b>4</b>	40,00	12,90
	≥ 15	15	12,50	1	10,00	6,67
	Tổng	120	100	10	100	8,33
Phân theo 2 nhóm	<15	105	87,50	9	90,00	8,57
	≥ 15	15	12,50	1	10,00	6,67
	Tổng	120	100	10	100	8,33

VNNB gặp ở các nhóm tuổi, nhưng tập trung cao là nhóm <15 tuổi với tỷ lệ số mắc ở nhóm tuổi <15 chiếm tới 87,50% còn ở nhóm ≥15 chỉ chiếm 12,50%. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .

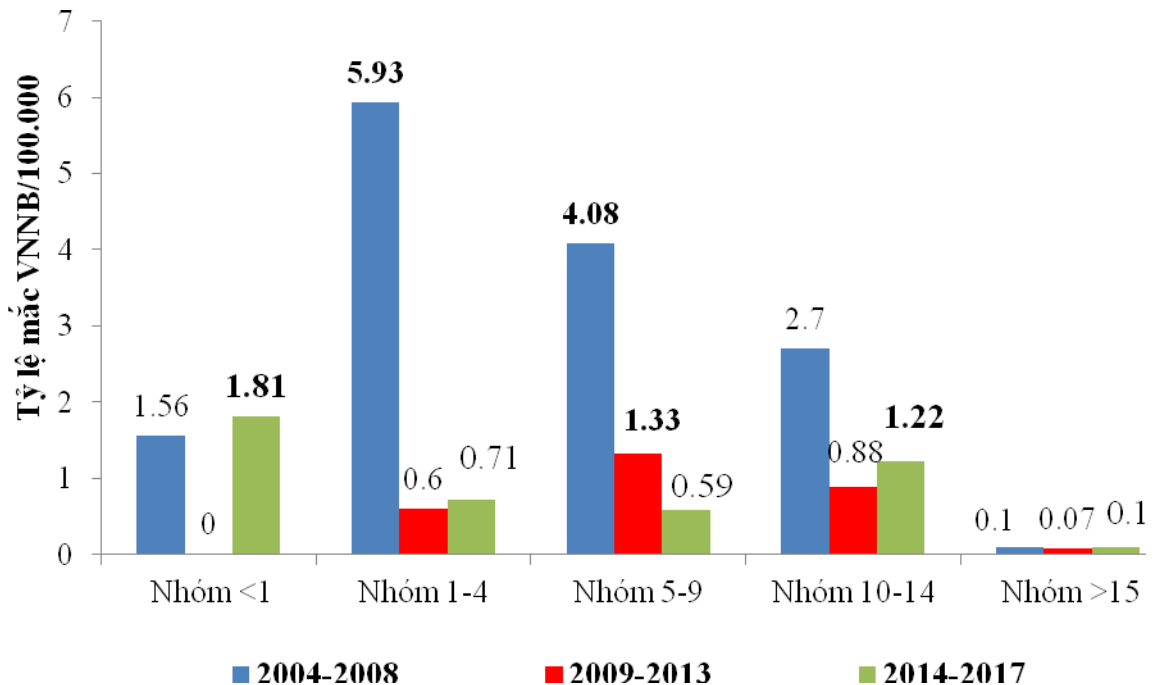
Trong nhóm dưới 15 tuổi, số ca mắc cao ở nhóm tuổi 1-4 và nhóm tuổi 5-9 chiếm 29,17%, số ca mắc ở nhóm tuổi 10-14 chiếm 25,83%. Số ca mắc thấp nhất ở nhóm <1 tuổi chiếm 3,33%.

Số ca tử vong gặp ở các nhóm tuổi, riêng nhóm 1-4 tuổi có 3 ca tử vong, nhóm 10-14 tuổi có 4 ca tử vong. Tỷ lệ chết/mắc là 8,33%, cao ở nhóm tuổi nhỏ.



**Hình 3.10. Phân bố viêm não Nhật Bản trên 100.000 dân theo nhóm tuổi, 2004-2017**

Tỷ lệ mắc trên 100.000 dân theo nhóm tuổi cao ở nhóm 1-4 tuổi giảm dần ở các nhóm lớn hơn, thấp nhất là nhóm  $\geq 15$  tuổi.



**Hình 3.11. Phân bố mắc viêm não Nhật Bản trên 100.000 dân theo nhóm tuổi và giai đoạn, 2004-2017**



Trong giai đoạn 2004-2008 tỷ lệ mắc cao nhất ở nhóm tuổi 1-4 (5,93/100.000), sau đó đến nhóm 5-9 tuổi (4,08/100.000). Đến giai đoạn 2009-2013 tỷ lệ mắc cao ở nhóm tuổi 5-9 (1,33/100.000). Sang giai đoạn 2014-2017 tỷ lệ mắc cao ở nhóm dưới 1 tuổi (1,81/100.000) và nhóm 10-14 tuổi (1,22/100.000).

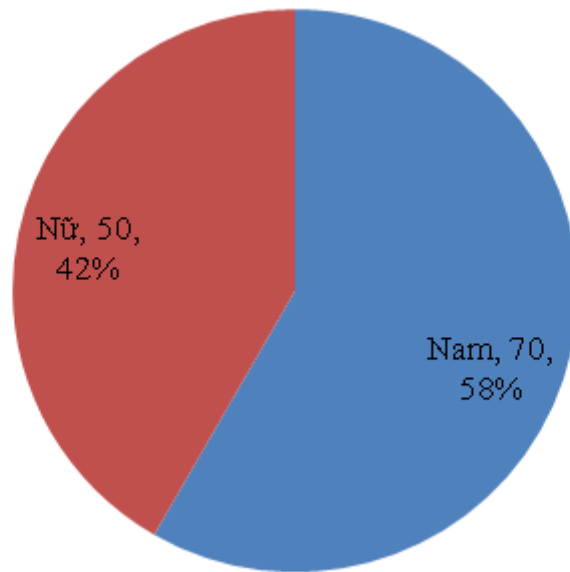
**Bảng 3.10. Tiền sử tiêm phòng vắc xin viêm não Nhật Bản, 2004-2017**

Nhóm tuổi	Không tiêm		Có tiêm					
	n	%	1 liều	2 liều	3 liều	4 liều	n	%
<1	4	100,00	0	0	0	0	0	0,00
1-4	23	65,71	3	7	2	0	12	34,29
5-9	14	40,00	3	8	10	0	21	60,00
10-14	21	67,74	0	1	9	0	10	32,26
≥ 15	15	100,00	0	0	0	0	0	0,00
<b>Tổng</b>	<b>77</b>	<b>64,17</b>	<b>6</b>	<b>16</b>	<b>21</b>	<b>0</b>	<b>43</b>	<b>35,83</b>

Pearson chi2 (12) = 29,8106 Pr = 0,003

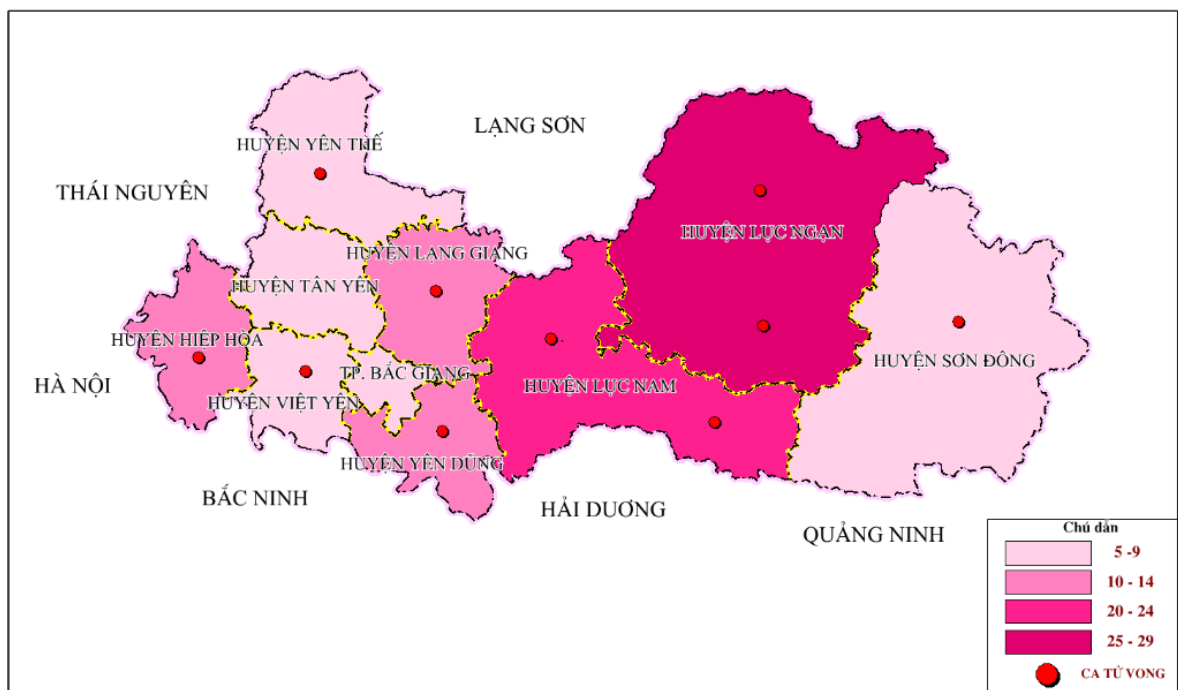
Trong số 120 ca VNNB được xác định, 2004-2017 có 77 ca chiếm 64,17% là những trường hợp chưa được tiêm vắc-xin VNNB để phòng bệnh.

Trong số 43 ca có tiêm phòng từ 1-3 liều, có 6 trường hợp tiêm 1 liều, 16 trường hợp tiêm 2 liều, 21 trường hợp tiêm đủ 3 liều nhưng không có trường hợp nào tiêm liều nhắc lại để duy trì miễn dịch sau 3-4 năm kể từ mũi thứ 3. Trong số ca mắc VNNB đã được tiêm đủ 3 liều cơ bản, nhưng không tiêm nhắc lại, nhóm tuổi có tỷ lệ mắc cao là nhóm 5-9 (10 ca) và nhóm 10-14 (9 ca) chiếm 90% tổng số ca mắc VNNB.



**Hình 3.12. Phân bố ca mắc viêm não Nhật Bản theo giới, 2004-2017**

Số ca mắc VNNB ở nam là 70/120 (58%) cao hơn nữ 50/120 (42%).



**Hình 3.13. Phân bố ca mắc viêm não Nhật Bản theo huyện, 2004-2017**

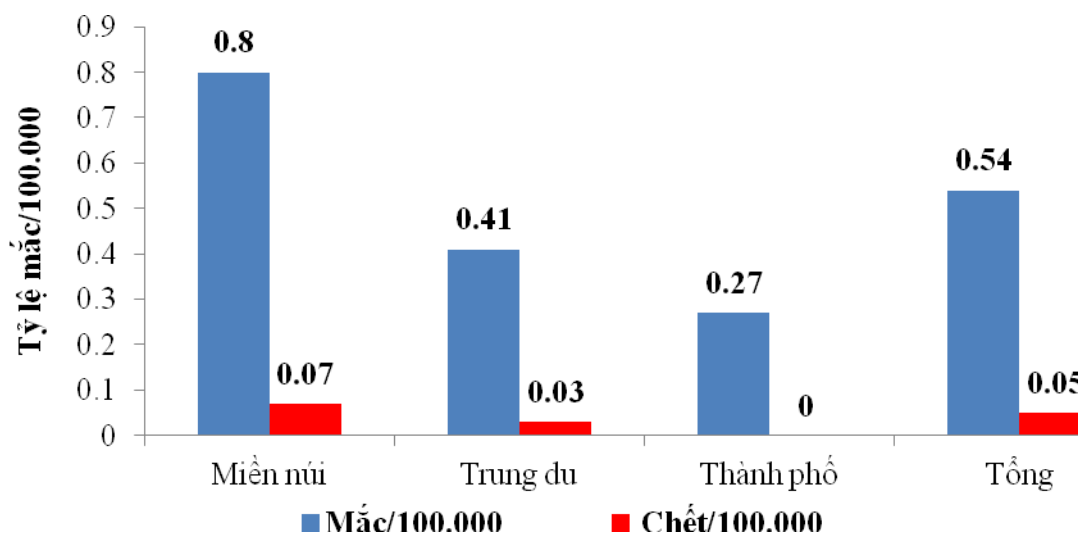
Các trường hợp VNNB xác định có ở 10/10 huyện thành phố trên địa bàn tỉnh Bắc Giang, trong đó huyện có tỷ lệ mắc cao là Lục Ngạn, Lục Nam, Hiệp Hòa,

Lạng Giang, Yên Dũng với lần lượt số ca mắc là 28, 24, 14, 13, 11. Số ca tử vong do VNNB trong giai đoạn 2004-2017 gặp ở 8/10 huyện thuộc tỉnh Bắc Giang. Huyện Tân Yên và thành phố Bắc Giang trong 14 năm không có ca tử vong do VNNB.

**Bảng 3.11. Phân bố ca bệnh viêm não Nhật Bản theo khu vực, 2004-2017**

Giai đoạn	Mắc		Chết		Chết/Mắc (%)
	N	%	n	%	
Miền núi	65	54,17	6	60,00	9,23
Trung du	50	41,67	4	40,00	8,00
Thành phố	5	4,17	0	0,00	0,00
<b>Tổng</b>	<b>120</b>	<b>100</b>	<b>10</b>	<b>100</b>	<b>8,33</b>

Số ca mắc VNNB xác định được ghi nhận tập trung ở khu vực trung du và miền núi chiếm 95% tổng số ca mắc VNNB trong giai đoạn 2004-2017.



**Hình 3.14. Phân bố ca bệnh viêm não Nhật Bản trên 100.000 dân theo khu vực, 2004-2017**

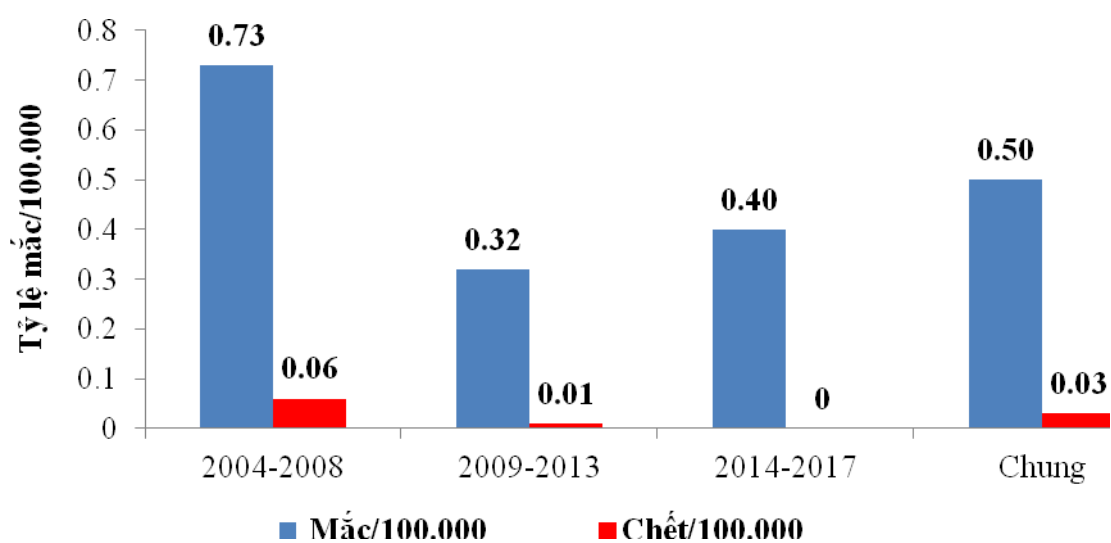
Phân tích cho thấy, trong giai đoạn 2004-2017 tỷ lệ mắc VNNB trên 100.000 dân ở khu vực miền núi ở tỉnh Bắc Giang cao hơn 2-4 lần so với khu vực trung du và thành phố, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .

### 3.1.2.3. Một số đặc điểm HCVNC do vi rút Banna

**Bảng 3.12. Phân bố ca bệnh viêm não Banna theo giai đoạn, 2004-2017**

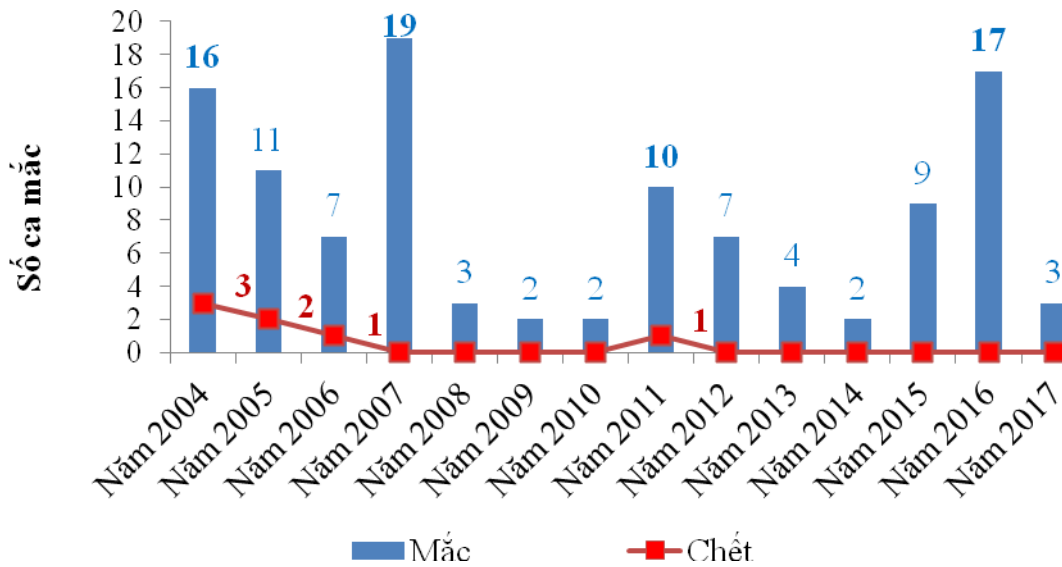
Giai đoạn	Mắc		Chết		Chết/ Mắc (%)
	N	%	n	%	
2004-2008	56	50,00	6	85,71	10,71
2009-2013	25	22,32	1	14,29	4,00
2014-2017	31	27,68	0	0,00	0,00
<b>Tổng</b>	<b>112</b>	<b>100</b>	<b>7</b>	<b>100</b>	<b>6,25</b>

Trong 14 năm có 112 ca xác định HCVNC do vi rút Banna, số ca mắc cao trong giai đoạn 2004-2008 (56/112; 50%), số ca mắc thấp hơn ở giai đoạn sau.



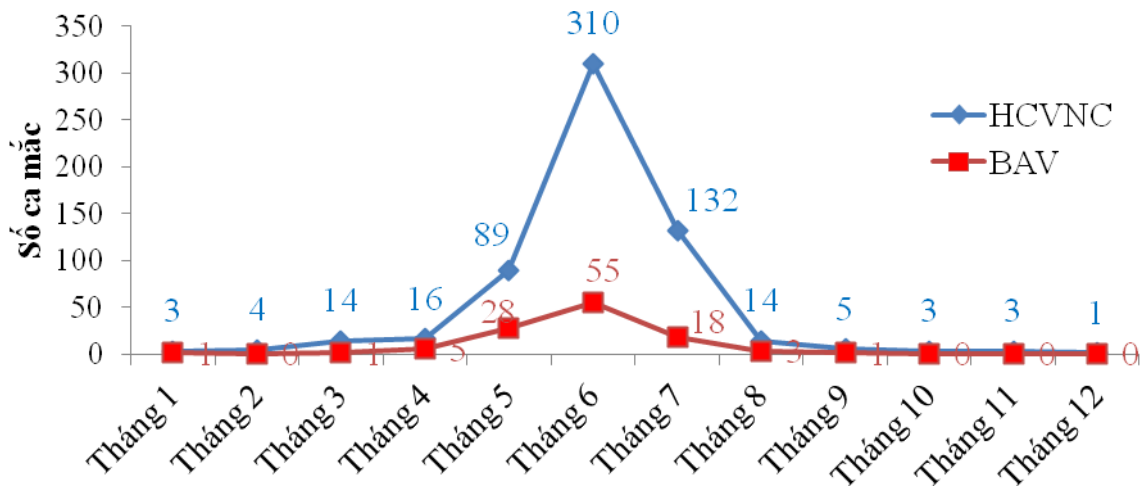
**Hình 3.15. Phân bố HCVNC do vi rút Banna trên 100.000 dân theo giai đoạn, 2004-2017**

Phân bố tỷ lệ mắc HCVNC do vi rút Banna trên 100.000 theo giai đoạn cho thấy cao nhất là giai đoạn 2004-2008 với tỷ lệ mắc 0,73/100.000, có xu hướng giảm dần ở giai đoạn 2009-2013 và 2014-2017.



**Hình 3.16. Phân bố HCVNC do vi rút Banna theo năm, 2004-2017**

HCVNC do vi rút Banna gặp ở tất cả các năm, trong số 112 ca xác định trong giai đoạn 2004-2017 ở tỉnh Bắc Giang, số ca mắc cao tập trung ở các năm 2004, 2007, 2011 và 2016.



**Hình 3.17. Phân bố HCVNC do vi rút Banna theo tháng, 2004-2017**

HCVNC do vi rút Banna xuất hiện từ tháng 1 đến tháng 9 trong năm. Số ca mắc tăng dần từ tháng 4 đến tháng 8 với số mắc cao trong ba tháng hè, tháng 5, tháng 6, tháng 7. Tổng số ca mắc trong ba tháng hè là 101/112 (90,18%), đỉnh cao nhất là tháng 6 với gần 50% ca mắc trong cả năm (55/112; 49,11%).

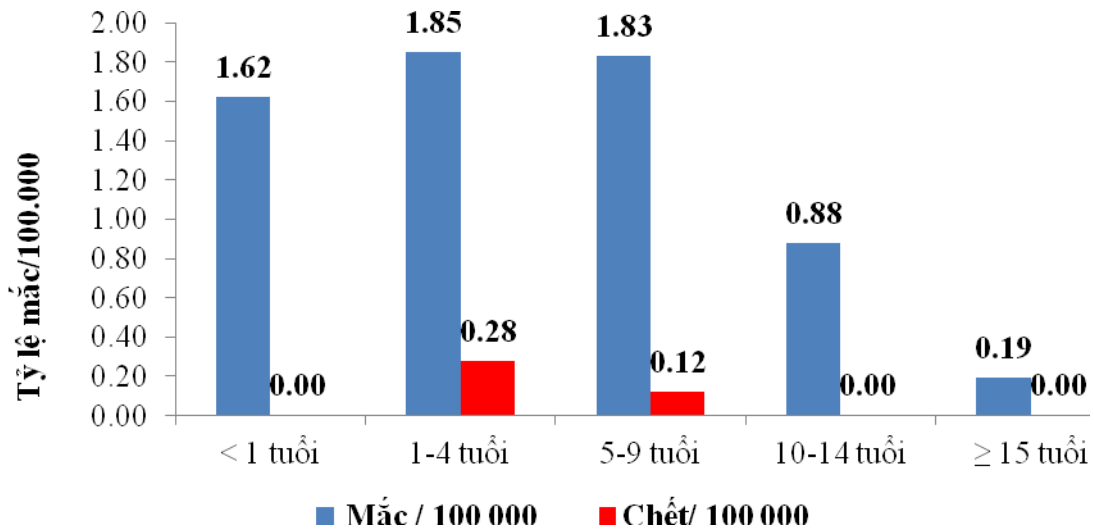
**Bảng 3.13. Phân bố ca mắc viêm não Banna theo nhóm tuổi, 2004-2017**

Nhóm tuổi		Mắc		Chết		Tỉ lệ Chết /Mắc (%)
		n	%	n	%	
Phân theo 5 nhóm tuổi	<1	6	5,36	0	0,00	0,00
	1-4	27	<b>24,11</b>	5	71,43	<b>18,52</b>
	5-9	32	<b>28,57</b>	2	28,57	<b>6,25</b>
	10-14	16	14,29	0	0,00	0,00
	≥ 15	31	<b>27,68</b>	0	0,00	0,00
	Tổng	112	100	7	100	6,25
Phân theo 2 nhóm tuổi	<15	81	72,32	7	100	8,64
	≥ 15	31	27,68	0	0,00	0,00
	Tổng	112	100	7	100	6,25

HCVNC do vi rút Banna gặp ở các nhóm tuổi, nhưng tập trung cao là nhóm <15 tuổi. Tỷ lệ mắc ở nhóm tuổi <15 chiếm tới 72,32%. Nhóm ≥15 chiếm 27,68%. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .

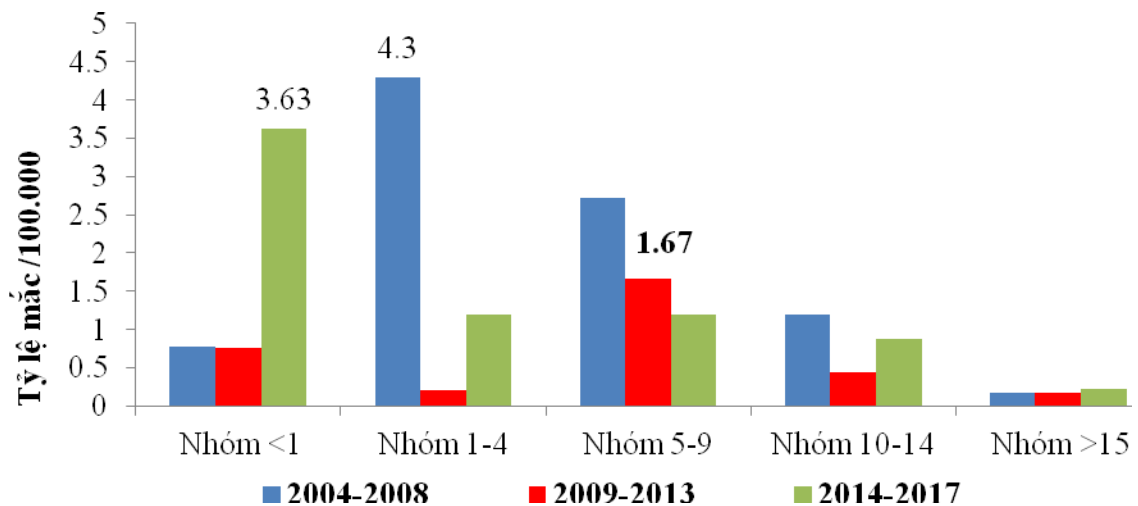
Trong nhóm dưới 15 tuổi, số ca mắc cao nhất ở nhóm tuổi 5-9 chiếm 28,57%, số ca mắc thấp nhất ở nhóm <1 tuổi chiếm 5,36%.

Số ca tử vong gặp ở cả hai nhóm tuổi 1-4 và 5-9, riêng nhóm 1-4 tuổi có 5/7 ca tử vong được ghi nhận ở tỉnh Bắc Giang, 2004-2017.



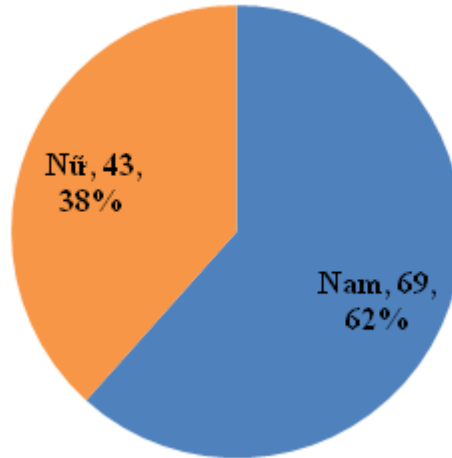
**Hình 3.18. Phân bố HCVNC do vi rút Banna trên 100.000 dân theo nhóm tuổi, 2004-2017**

Số ca HCVNC do vi rút Banna gặp ở tất cả các nhóm tuổi, trong đó tỷ lệ mắc trên 100.000 dân ở nhóm tuổi 1-4 là 1,85/100.000 tương đương với nhóm tuổi 5-9 là 1,83/100.000. Thấp nhất là nhóm tuổi  $\geq 15$ . Tỷ lệ mắc HCVNC do vi rút Banna trên 100.000 dân theo nhóm tuổi cho thấy ở nhóm dưới 10 tuổi (1,62-1,85/100.000) cao hơn 1,8-2,1 lần nhóm 10-14 tuổi (0,88/100.000) và cao hơn 8,5-9,7 lần so với nhóm  $\geq 15$  tuổi (0,19/100.000). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .



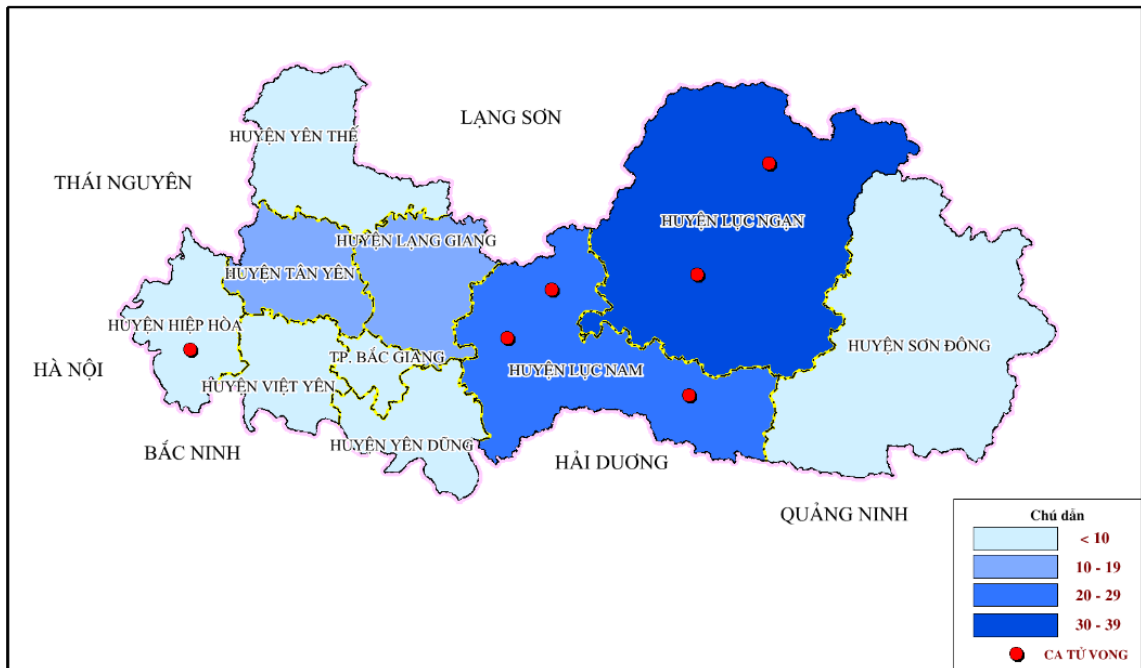
**Hình 3.19. Phân bố HCVNC do vi rút Banna theo nhóm tuổi theo các giai đoạn, 2004-2017**

Trong giai đoạn 2004-2008, số ca mắc HCVNC do vi rút Banna gặp chủ yếu ở nhóm 1-4 tuổi (4,3/100.000). Giai đoạn 2009-2013, số ca mắc HCVNC do vi rút Banna lại gặp chủ yếu ở nhóm 5-9 tuổi (1,67/100.000). Còn trong giai đoạn 2014-2017, số ca mắc HCVNC do vi rút Banna chủ yếu ở nhóm <1 tuổi (3,63/100.000).



**Hình 3.20. Phân bố HCVNC do vi rút Banna theo giới, 2004-2017**

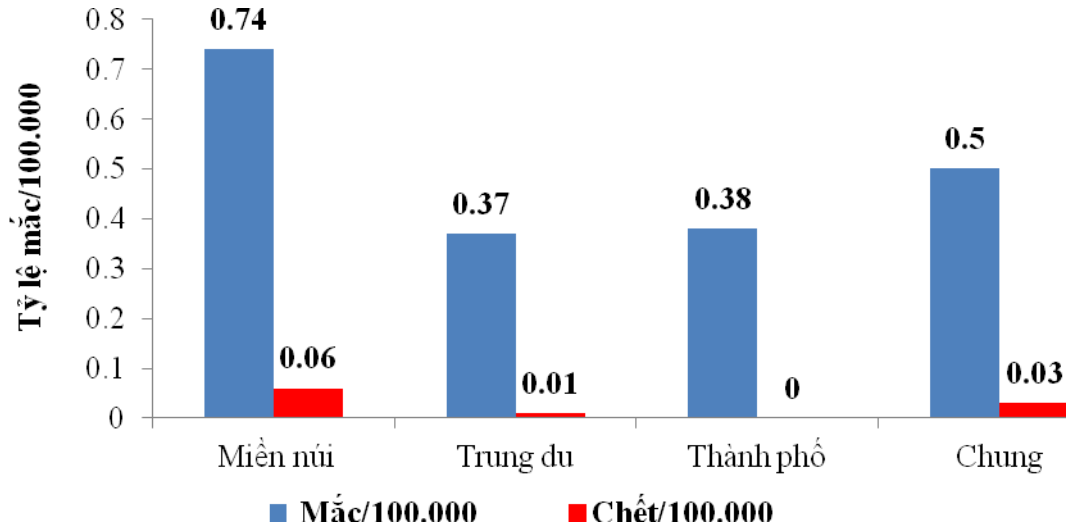
Phân tích trong số những trường hợp xác định HCVNC do vi rút Banna, xác định tỷ lệ mắc HCVNC do vi rút Banna ở nam (69/112; 62,0%) cao hơn ở nữ giới (43/112; 38,0%) 1,6 lần.



**Hình 3.21. Phân bố HCVNC do vi rút Banna theo huyện, 2004-2017**



Viêm não do vi rút Banna gặp ở 10/10 huyện thành phố, số ca mắc cao ở huyện Lục Ngạn, Lục Nam, Lạng Giang và Tân Yên.



**Hình 3.22. Phân bố HCVNC do vi rút Banna theo khu vực, 2004-2017**

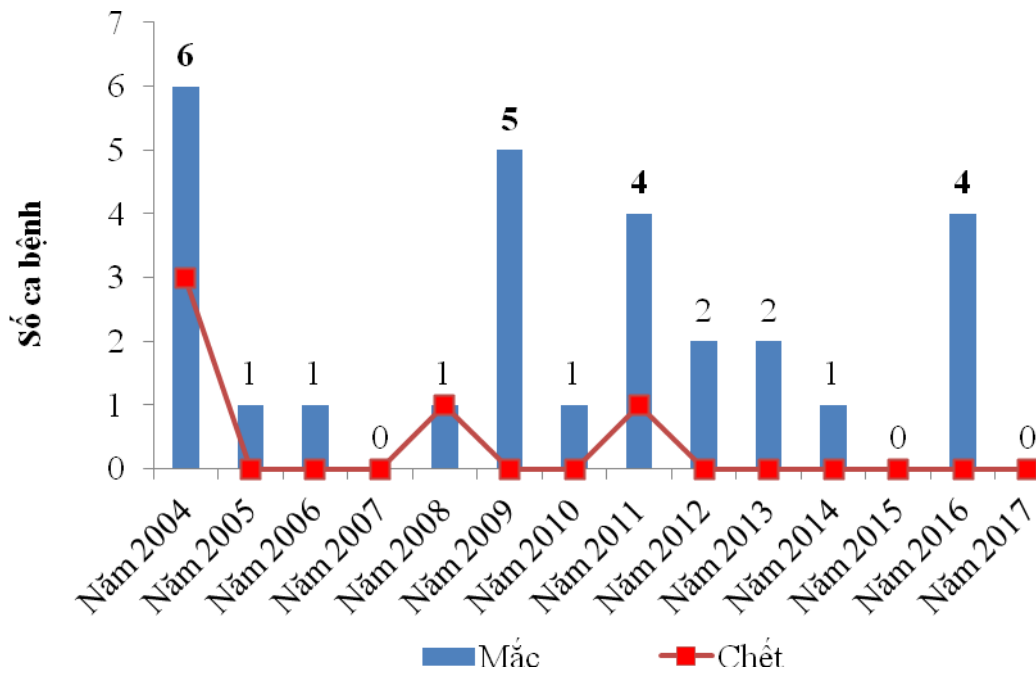
Tỷ lệ mắc của HCVNC do vi rút Banna trên 100.000 dân ở khu vực miền núi cao gấp 2 lần so với khu vực trung du và thành phố.

#### 3.1.2.4. Một số đặc điểm HCVNC do vi rút Nam Định

**Bảng 3.14. Phân bố HCVNC do vi rút Nam Định theo giai đoạn, 2004-2017**

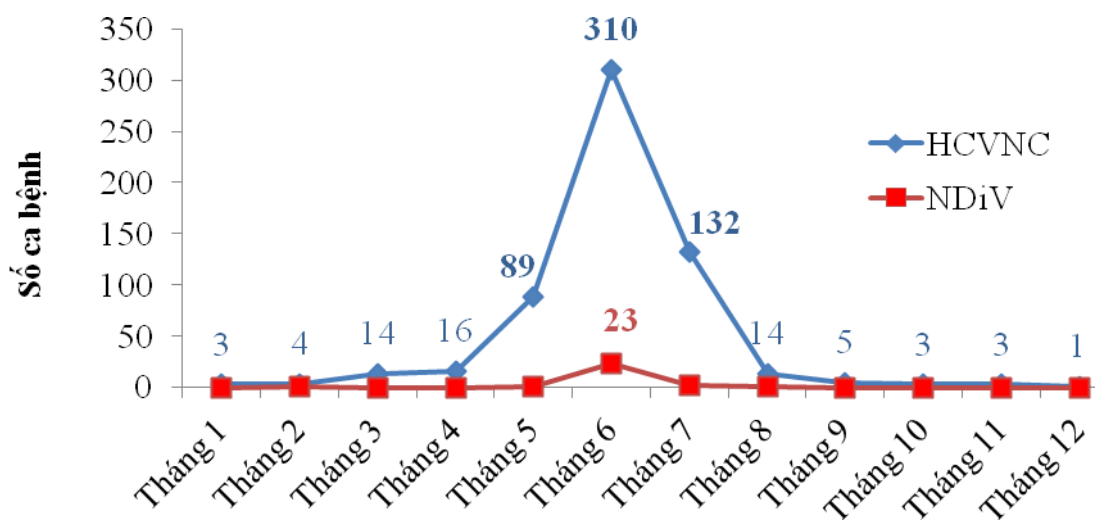
Giai đoạn	Mắc	
	n	%
2004-2008	9	32,14
2009-2013	14	50,00
2014-2017	5	17,86
<b>Tổng</b>	<b>28</b>	<b>100.00</b>

Trong 14 năm có 28 ca HCVNC do vi rút Nam Định, số ca mắc cao trong giai đoạn 2009-2013 (14/28; 50%).



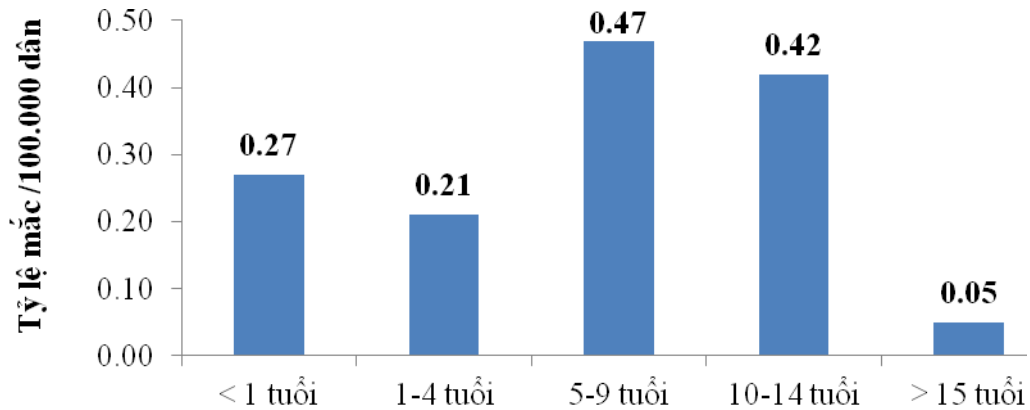
**Hình 3.23. Phân bố HCVNC do vi rút Nam Định theo năm, 2004-2017**

Trong giai đoạn 2004-2017, trong tổng số 594 ca mắc HCVNC có 28 ca HCVNC được xác định do vi rút Nam Định chiếm 4,71%. Số ca mắc rải rác ở các năm 2004-2006, 2008-2014 và năm 2016, tỷ lệ mắc trên 100.000 dân của HCVNC do vi rút Nam Định rất thấp chỉ có 0,13/100.000.



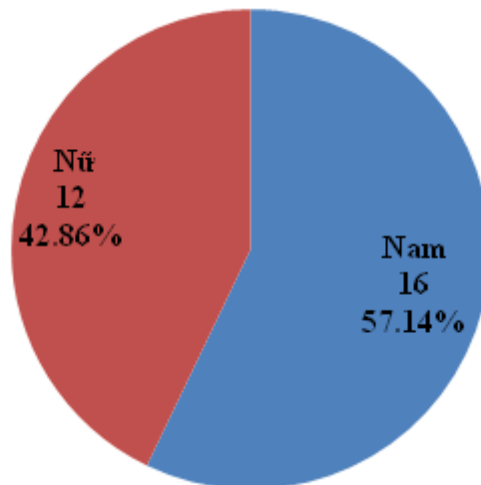
**Hình 3.24. Phân bố HCVNC do vi rút Nam Định theo tháng, 2004-2017**

Trong số 28/594 trường hợp xác định dương tính, số ca mắc tập trung ở tháng 4 đến tháng 8 trong năm và cao nhất là tháng 6 chiếm 82,14% (23/28) số ca mắc trong năm.



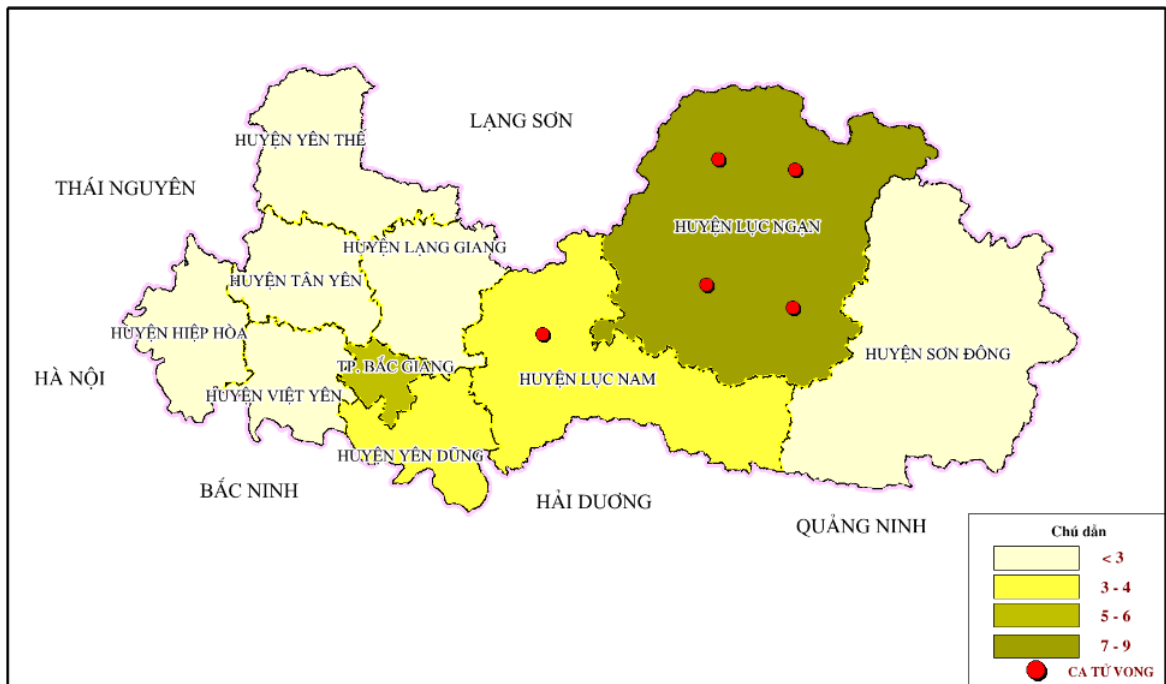
**Hình 3.25. Phân bố số mắc HCVNC do vi rút Nam Định theo nhóm tuổi, 2004-2017**

Số ca mắc HCVNC do vi rút Nam Định cao ở nhóm tuổi 5-9 là 0,47/100.000 dân, nhóm tuổi 10-14 là 0,42/100.000 dân, các nhóm tuổi còn lại có số mắc thấp hơn.



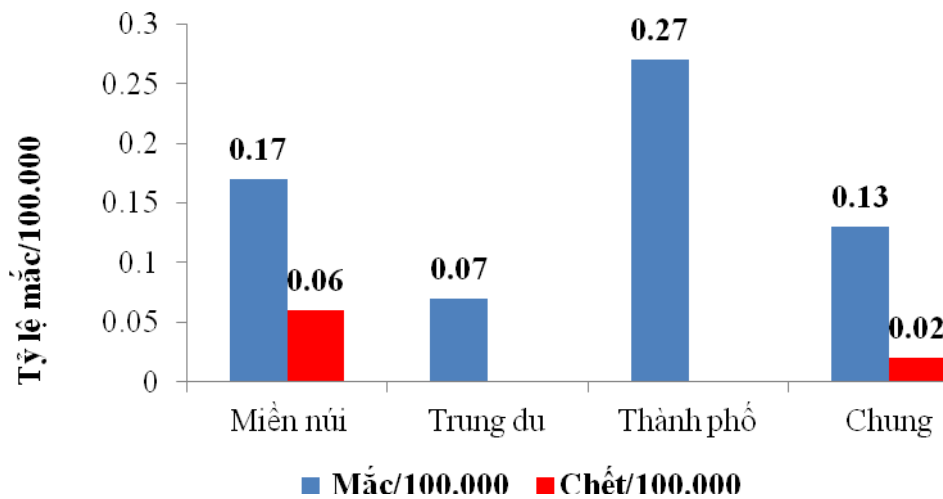
**Hình 3.26. Phân bố HCVNC do vi rút Nam Định theo giới, 2004-2017**

Tỷ lệ mắc ở nam là 57,14% cao hơn ở nữ. Tỷ lệ mắc trên 100.000 ở nam là 0,15 /100.000, tỷ lệ này ở nữ là 0,11/100.000.



**Hình 3.27. Phân bố HCVNC do vi rút Nam Định theo huyện, 2004-2017**

Viêm não do vi rút Nam Định gặp ở 10/10 huyện, thành phố của tỉnh Bắc Giang, số ca mắc ở huyện Lục Ngạn cao hơn so với các huyện còn lại trong tỉnh.



**Hình 3.28. Phân bố HCVNC do vi rút Nam Định theo khu vực, 2004-2017**

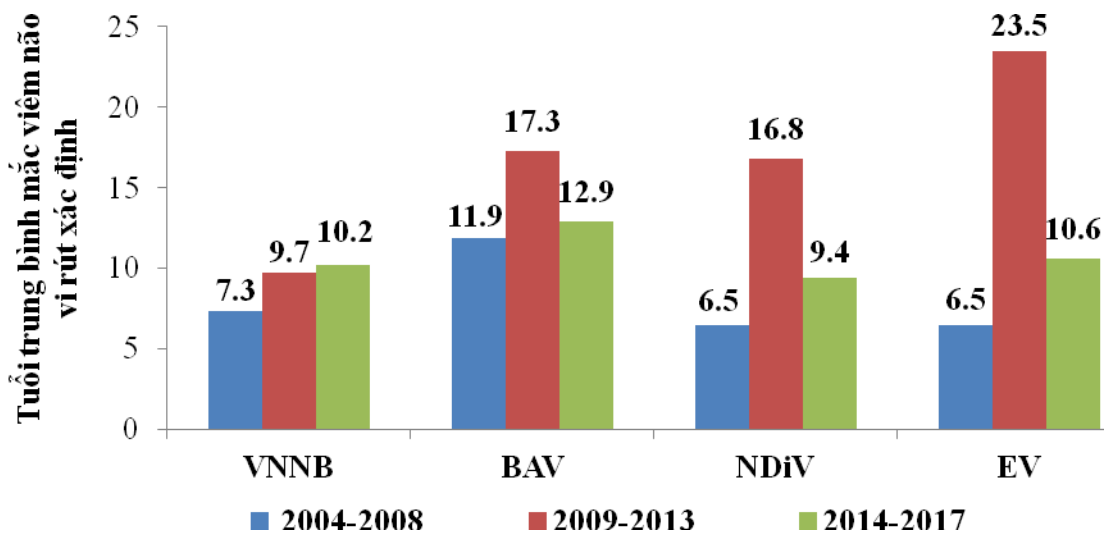
Tỷ lệ mắc cao ở khu vực miền núi và thành phố, thấp hơn ở khu vực trung du. Tỷ lệ tử vong chỉ gặp ở khu vực miền núi.

### 3.1.2.5. Một số đặc điểm HCVNC do một số tác nhân vi rút xác định

**Bảng 3.15. Một số đặc điểm HCVNC do vi rút xác định được tác nhân, 2004-2017**

Đặc điểm phân bố		Số ca VNVR xác định (n=302)	Tỷ lệ (%)	Tỷ lệ mắc /100.000
Phân bố viêm não do vi rút xác định theo giai đoạn	2004-2008	164	54,30	2,13
	2009-2013	72	23,84	0,91
	2014-2017	66	21,85	1,00
Phân bố viêm não vi rút xác định theo mùa	Xuân	10	3,31	0,05
	Hạ	283	93,71	1,27
	Thu	9	2,98	0,04
	Đông	0	0,00	0,00
Phân bố Viêm não vi rút xác định theo khu vực	Thành phố	21	6,95	1,15
	Trung du	130	43,05	1,06
	Miền Núi	151	50,00	1,86
Phân bố viêm não vi rút xác định theo giới tính.	Nam	181	59,93	1,65
	Nữ	121	40,07	1,08
Phân bố Viêm não vi rút xác định theo nhóm tuổi	<1 tuổi	14	4,64	3,78
	1-4 tuổi	84	27,81	5,97
	5-9 tuổi	82	27,15	4,84
	10-14 tuổi	57	18,87	2,97
	< 15 tuổi	237	78,48	4,39
	≥ 15 tuổi	65	21,52	0,39

Những trường hợp HCVNC do vi rút được xác định cho thấy tỷ lệ mắc trong giai đoạn 2004-2008 là 2,13/100.000 dân cao hơn giai đoạn 2009-2013 và giai đoạn 2014-2017, tương ứng là 0,91 và 1,00 ( $p < 0,001$ ). Số ca mắc HCVNC do vi rút trong mùa hè chiếm 93,71% so với các thời điểm khác trong năm ( $p < 0,001$ ). Tỷ lệ mắc HCVNC do vi rút ở khu vực miền núi là 1,86/100.000 cao hơn 1,6-1,8 lần so với khu vực trung du và thành phố ( $p < 0,001$ ). Số ca mắc ở nam là 1,65/100.000 cao hơn so với nữ là 1,08/100.000 ( $p = 0,001$ ). Số ca mắc gặp ở tất cả các nhóm tuổi, trong đó tỷ lệ mắc ở nhóm dưới 15 tuổi là 4,39/100.000 cao gấp 11,26 lần so với nhóm trên 15 tuổi có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$ .



**Hình 3.29. Tuổi trung bình mắc HCVNC do vi rút ở Bắc Giang, 2004-2017**

Trong số các trường hợp HCVNC do vi rút được xác định ở Bắc Giang, 2004-2017, tuổi trung bình của HCVNC do vi rút theo từng loại tác nhân được xác định với độ tuổi trung bình thường gặp ở nhóm VNNB (8,29 tuổi) thấp hơn so với độ tuổi trung bình do BAV (13,4 tuổi), do NDiV (12,2 tuổi) và vi rút đường ruột (10,9 tuổi), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ . Tuổi trung bình mắc VNNB có xu hướng tăng lên theo thời gian, giai đoạn 2009-2013 và 2014-2017 có tuổi trung bình cao hơn giai đoạn 2004-2008, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ . Riêng tuổi trung bình mắc viêm não do BAV, NDiV và vi rút đường ruột không theo quy luật nào.

### 3.2. Một số đặc điểm phân tử vi rút VNNB, vi rút đường ruột gây HCVNC tại Bắc Giang, 2004-2017

**Bảng 3.16. Kết quả số mẫu phân lập, phát hiện kháng nguyên của một số vi rút gây HCVNC ở Bắc Giang, 2004-2017**

Tác nhân gây bệnh	Mẫu phát hiện NS1		Mẫu phân lập vi rút		Số mẫu giải trình tự
	Số mẫu	Dương tính	Số mẫu	Dương tính	
Vi rút VNNB	23	4	23	1	4
Vi rút đường ruột			78	15	15

Trong giai đoạn 2004-2017, có 594 trường hợp HCVNC được lấy mẫu dịch não tủy trong 5 ngày đầu của bệnh, bảo quản ở  $-70^{\circ}\text{C}$  cho đến khi thực hiện kỹ thuật phân lập và phát hiện vật liệu di truyền/kháng nguyên của vi rút. Kết quả cho thấy đối với vi rút VNNB phân lập được 01 chủng vi rút từ bệnh nhân, bằng kỹ thuật ELISA-NS1 xác định mẫu dương tính để sử dụng kỹ thuật RT-PCR khuếch đại vùng gen E để giải trình tự gen, kết quả đã xác định có 04 mẫu dương tính (trong đó có 1 mẫu dương tính với cả kỹ thuật ELISA-NS1 và kỹ thuật phân lập). Riêng với VRDR, đã phân lập được 15 chủng vi rút trong số 78 mẫu xác định dương tính bằng kỹ thuật Realtime RT-PCR. Trong nghiên cứu này, phân tích đặc điểm phân tử của vi rút gây HCVNC ở Bắc Giang được thực hiện với vùng gen E của vi rút VNNB và vùng gen VP1 của VRDR.

### 3.2.1. Một số đặc điểm sinh học phân tử của vi rút VNNB

**Bảng 3.17. Thông tin về dịch não tủy của bệnh nhân được lựa chọn để phát hiện kháng nguyên VNNB NS1 và phân lập vi rút, 2004-2017**

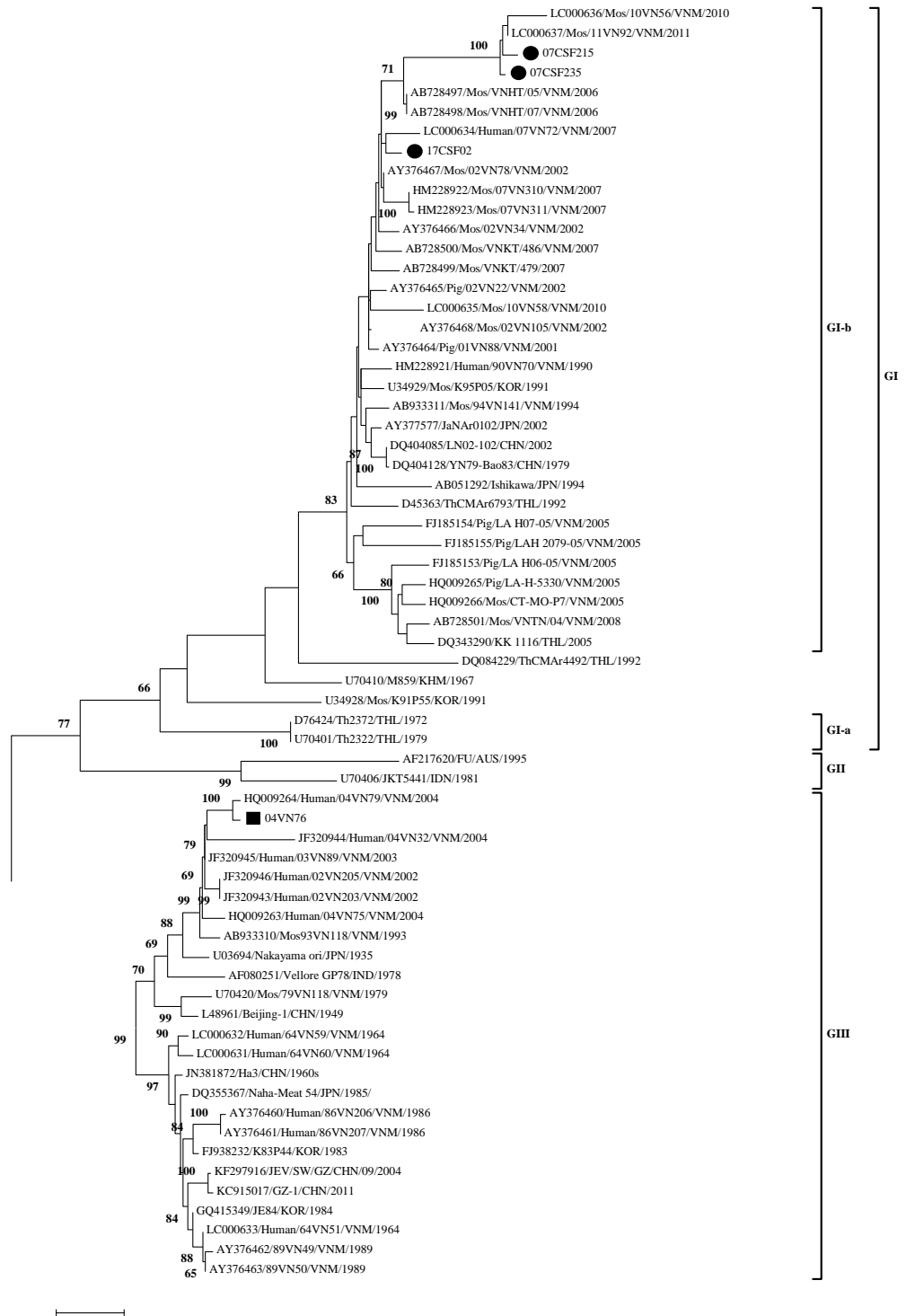
STT	Mã số mẫu	Tuổi bệnh nhân	Thời gian mắc VNNB (tháng/Năm)	NS1-ELISA/ phân lập*
1	04VN76	2 tuổi	06/2004	Dương tính*
2	04CSF390	13	06/2004	Âm tính
3	04CSF455	9	06/2004	Âm tính
4	05CSF210	4	06/2005	Âm tính
5	05CSF233	12	06/2005	Âm tính
6	06CSF223	15	06/2006	Âm tính
7	06CSF233	7	06/2006	Âm tính
8	07CSF215	33	06/2007	Dương tính
9	07CSF220	14	06/2007	Âm tính
10	07CSF235	01	06/2007	Dương tính
11	07CSF242	07	06/2007	Âm tính
12	07CSF302	01	05/2007	Âm tính
13	10CSF203	06	06/2010	Âm tính
14	10CSF206	04	06/2010	Âm tính
15	15CSF21	14	06/2015	Âm tính
16	15CSF24	22	06/2015	Âm tính
17	16CSF25	18	05/2016	Âm tính
18	16CSF34	16	06/2016	Âm tính
19	16CSF36	13	06/2016	Âm tính
20	16CSF48	13	06/2016	Âm tính
21	16CSF53	16	06/2016	Âm tính
22	16CSF63	11	07/2016	Âm tính
23	17CSF02	02	07/2017	Dương tính

\*Phân lập dương tính song song với kết quả phát hiện kháng nguyên NS1



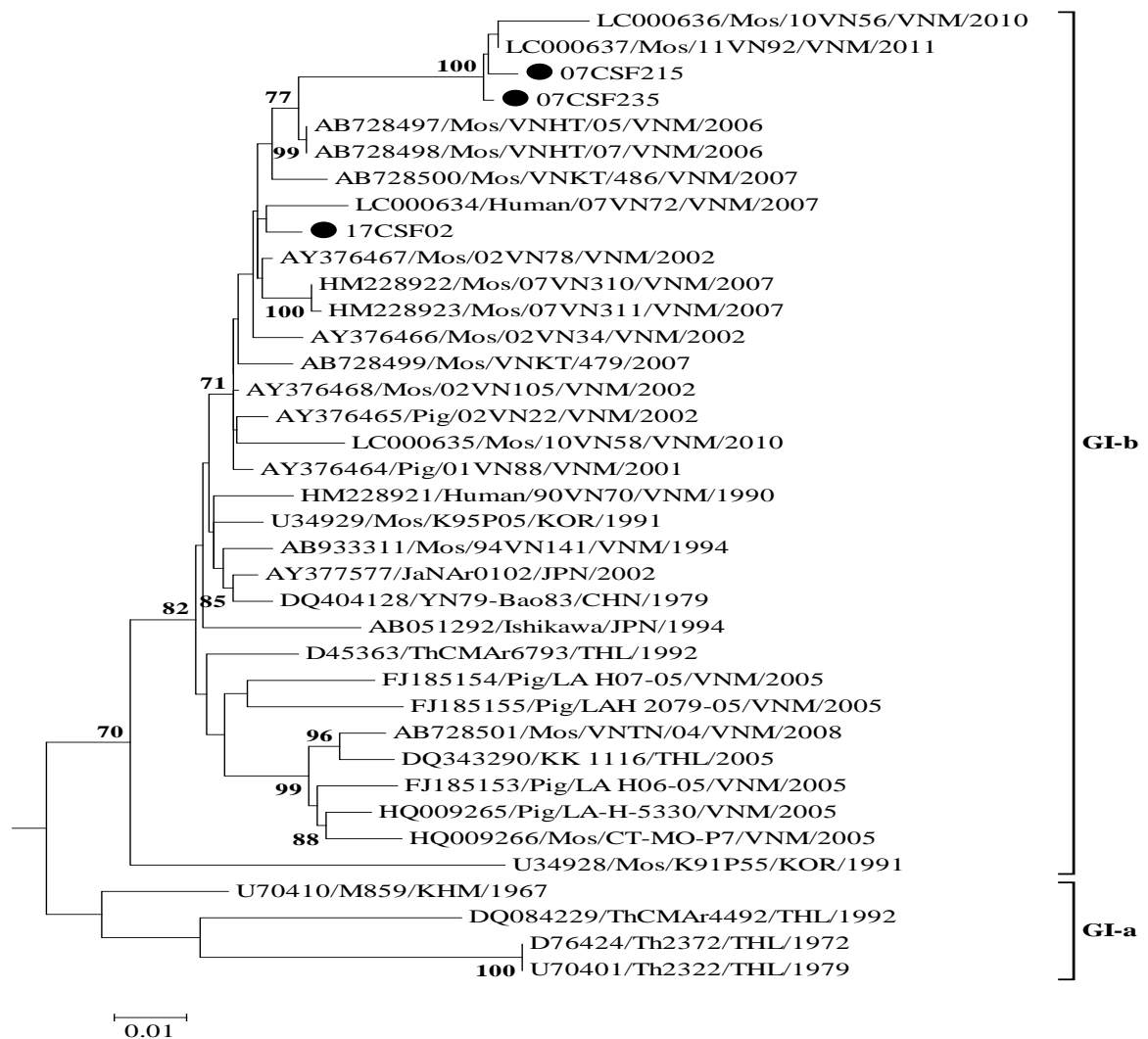
Dựa trên thông tin bệnh nhân, hiệu giá kháng thể phát hiện khi so sánh giữa mẫu máu lấy trong giai đoạn cấp và giai đoạn lui bệnh, có 23 bệnh nhân VNNB được chọn mẫu dịch não tủy để phân lập vi rút VNNB bằng tế bào C3/36 và phát hiện kháng nguyên VNNB NS1 bằng kỹ thuật ELISA-NS1. Kết quả cho thấy có 04 mẫu dương tính gồm 01 mẫu của bệnh nhân VNNB năm 2004, 02 mẫu của bệnh nhân VNNB năm 2007 và 01 mẫu của bệnh nhân VNNB năm 2017. Tỷ lệ phát hiện được kháng nguyên NS1 trong số các ca VNNB của kỹ thuật ELISA-NS1 là 17,39% (4/23). Sử dụng tế bào C6/36 để phân lập vi rút từ 23 mẫu dịch não tủy chọn lọc từ bệnh nhân VNNB, kết quả chỉ phân lập được 01 chủng vi rút VNNB có ký hiệu 04VN76. Tỷ lệ phân lập được vi rút là 4,34% (1/23). Mẫu lưu tương ứng với 3 mẫu dịch não tủy phát hiện được kháng nguyên VNNB NS1 và 1 chủng vi rút phân lập được tách chiết vật liệu di truyền của vi rút để khuếch đại vùng gen E bằng cặp mồi đặc hiệu vi rút VNNB để phân tích kiểu gen.

Sản phẩm PCR vùng gen E được khuếch đại từ vật liệu di truyền của vi rút VNNB từ 03 mẫu dịch não tủy có ký hiệu 07CSF215, 07CSF235, 17CSF02 và 01 chủng vi rút phân lập có ký hiệu 04VN76 được tinh sạch cho kỹ thuật giải trình tự gen để xác định genotype của vi rút. Cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên trình tự vùng gen E đã xác định có 2 kiểu genotype của vi rút VNNB gây HCVNC ở Bắc Giang lưu hành, 2004-2017 bao gồm: GIII được xác định từ chủng vi rút có ký hiệu 04VN76 được phân lập từ dịch não tủy của bệnh nhân VNNB năm 2004; GI được xác định từ vật liệu di truyền của vi rút trong mẫu dịch não tủy của bệnh nhân VNNB.



**Hình 3.30. Cây phát sinh loài được xây dựng từ trình tự toàn bộ vùng gen E (1917bp) của vi rút VNNB GI và GIII tại Bắc Giang, 2004-2017**  
 (Phương pháp Maximun Likelihood, so sánh với các chủng vi rút VNNB khác của Việt Nam và một số nước trong khu vực từ 1964 đến 2017: chấm tròn đen là vi rút VNNB GI, Hình vuông đen là vi rút VNNB GIII ở Bắc Giang)

Trên cây phát sinh loài, xác định 01 chủng vi rút VNNB có ký hiệu 04VN76 phân lập từ bệnh nhân VNNB năm 2004 là GIII, cùng nhóm với các chủng VNNB GIII phân lập ở Việt Nam trước 2004. Các mẫu vi rút VNNB phát hiện từ dịch não tủy (03 mẫu), trong đó 02 mẫu phát hiện năm 2007 có ký hiệu 07CSF215, 07CSF235 và 01 mẫu phát hiện năm 2017 có ký hiệu 17CSF02 đều thuộc GI phân nhóm GI-b.



**Hình 3.31. Cây phát sinh loài được xây dựng từ trình tự toàn bộ vùng gen E của vi rút VNNB GI tại Bắc Giang, 2004-2017**  
(Phương pháp *Maximun Likelihood*, so sánh với với các chủng GI của Việt Nam và một số nước trong khu vực, 1964-2017: Chấm tròn đen là vi rút VNNB GI ở Bắc Giang)

Trên cây phả hệ xây dựng dựa trên trình tự nucleotide vùng gen E của vi rút VNNB, cả 3 mẫu vi rút VNNB phát hiện từ dịch não tủy của bệnh nhân HCVNC ở Bắc Giang đều thuộc kiểu gen GI, phân nhóm GI-b tương tự như chủng vi rút VNNB phân lập từ bệnh nhân ở Việt Nam năm 1990 và những năm đầu thế kỷ 21.

**Bảng 3.18. Độ khác biệt ở mức nucleotide giữa các vi rút VNNB GI và GIII ở Bắc Giang với các chủng vi rút VNNB khác ở Việt Nam và trong khu vực**

Genotype	Tiêu chí so sánh	p-distance	Khoảng giá trị
Genotype I	Giữa các vi rút VNNB GI ở Bắc Giang	2,6%	0,6%-3,7%
	Giữa các vi rút VNNB GI ở Bắc Giang và các chủng GI ở Việt Nam	3,5%	0,3%-6,8%
	Giữa các vi rút VNNB GI ở Bắc Giang và các chủng khác trong khu vực	6,1%	1,7%-9,9%
Genotype III	Giữa chủng GIII ở Bắc Giang và các chủng GIII ở Việt Nam	2,5%	0,4%-5,6%

Phân tích, so sánh trình tự vùng gen E của vi rút VNNB GI ở Bắc Giang với các chủng vi rút VNNB GI ở Việt Nam và khu vực cho thấy, sự khác biệt về mặt nucleotide giữa các vi rút GI ở Bắc Giang là 2,6% (0,6%-3,7%). Phân nhóm này cũng bao gồm các chủng vi rút VNNB phát hiện được tại Việt Nam trong giai đoạn từ 1994 đến 2010. Sự khác biệt về mặt nucleotide giữa các vi rút VNNB GI tại Bắc Giang và các chủng GI khác tại Việt Nam là 3,5% (0,3%-6,8%). Kết quả so sánh độ khác biệt ở mức nucleotide giữa các vi rút VNNB GI ở Bắc Giang và các chủng GI-b khác trong khu vực như Thái Lan, Nhật Bản, Cam Pu Chia, Hàn Quốc, Trung Quốc là 6,1% (1,7%-9,9%).

Trong nghiên cứu này, phân lập được 01 chủng vi rút VNNB GIII có ký hiệu 04VN76 từ bệnh nhân VNNB năm 2004, khi phân tích, so sánh sự khác biệt về mặt

nucleotide giữa chúng này với các chủng GIII khác của Việt Nam giao động trong khoảng là 2,5% (0,4%-5,6%).

**Bảng 3.19. Đặc điểm các acid amin thay thế của vi rút VNNB phát hiện ở Bắc Giang so với chủng genotype I chung (chủng Consensus\*)**

STT	Vị trí amino acid	Amino acid thay thế		Kiểu thay thế
		Chủng chuẩn	Vi rút VNNB ở Bắc Giang	
1	316	Tyr	Asp	Không bảo tồn
2	328	Ser	Met	Không bảo tồn
3	410	Arg	Cys	Không bảo tồn
4	414	Leu	Ser	Không bảo tồn
5	421	Glu	Gly	Không bảo tồn
6	424	Thr	Ile	Không bảo tồn
7	427	Lys	Ser	Không bảo tồn
8	603	Arg	Ser	Không bảo tồn

\* *Consensus là chủng có trình tự nucleotid của genome tương đồng nhất cho tất cả các chủng vi rút VNNB genotype I đã đăng ký trong ngân hàng gen.*

Từ kết quả giải trình tự vùng gen E của vi rút VNNB GI ở Bắc Giang, so sánh trình tự acid amin của 3 mẫu vi rút VNNB GI này với nhau xác định có 8 vị trí thay đổi acid amin khi so sánh với Consensus của các chủng vi rút VNNB genotyp I phân lập từ muỗi, lợn. Phân tích cho thấy trong vùng gen E có 8 vị trí thay thế với kiểu thay thế không bảo tồn.

Ngoài ra, kết quả phân tích haloptype của các vi rút VNNB GI tại 4 vị trí acid amin tương ứng là 123, 209, 227 và 408 được dự đoán là nơi chịu áp lực của chọn lọc dương tính, các vi rút VNNB GI phát hiện ở Bắc Giang, 2007, 2017 tại Bắc Giang đều có haloptype là NKSS (Asparagine-Lysine-Serine-Serine).

### 3.2.2. Một số đặc điểm sinh học phân tử của vi rút đường ruột

**Bảng 3.20. Phân bố theo năm của các tít huyết thanh VRĐR gây HCVNC, 2004-2017\***

Năm	Tít huyết thanh				Tổng
	E4	E6	E30	E33	
2006		1	1		2
2009	1				1
2010			1		1
2012		4	1	2	7
2013			2		2
2014			1		1
2015			1		1
<b>Tổng</b>	<b>1</b> <b>(6,7%)</b>	<b>5</b> <b>(33,3%)</b>	<b>7</b> <b>(46,7%)</b>	<b>2</b> <b>(13,3%)</b>	<b>15</b> <b>(100%)</b>

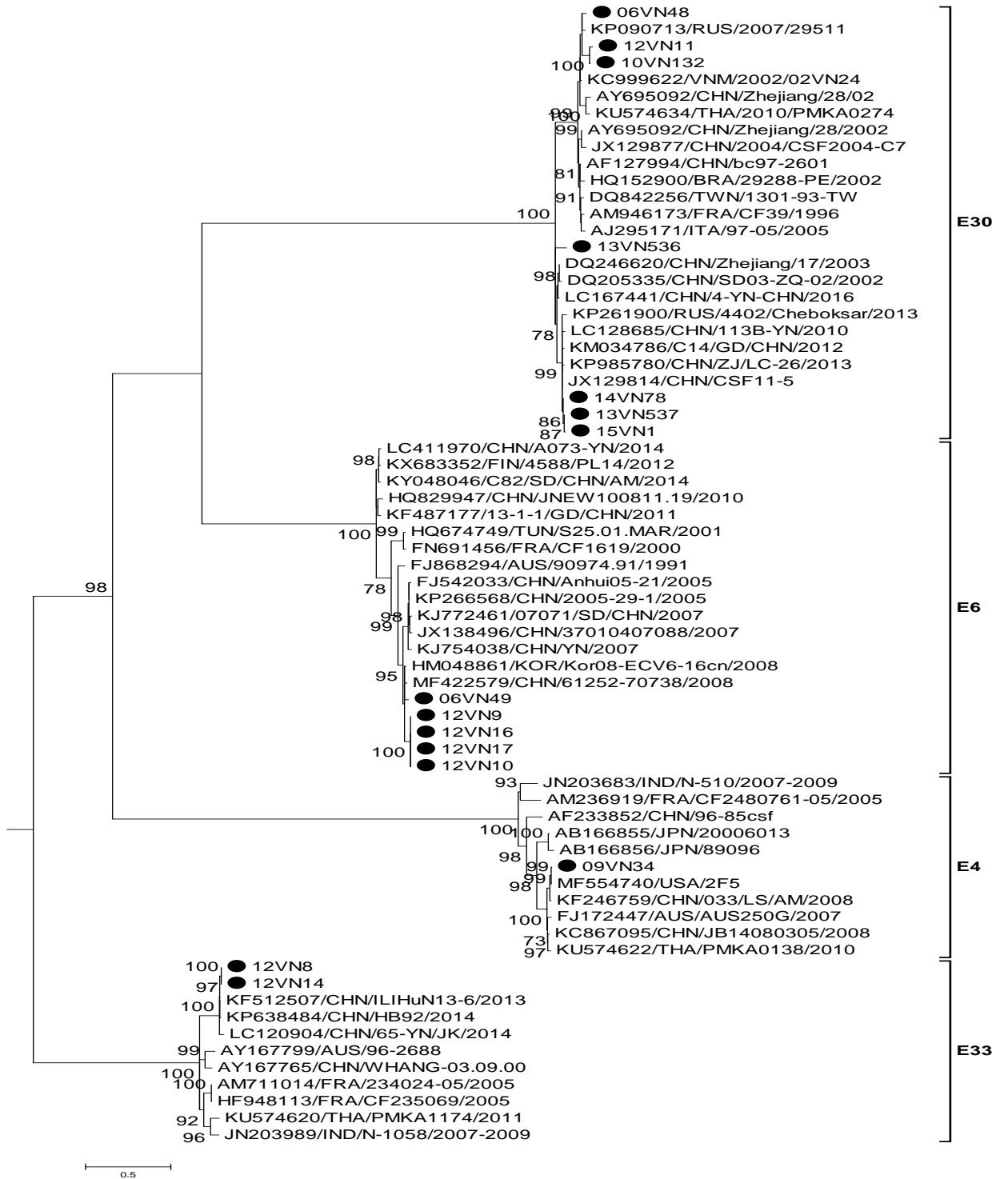
\* Bảng trên chỉ phân tích các năm phát hiện được tít huyết thanh

Trong số 78 mẫu dương tính với VRĐR phát hiện được trong nghiên cứu này, chỉ có 15 mẫu dương tính khi phân lập trên tế bào RDa (19,2%) và xác định được tít huyết thanh. Các tít huyết thanh phát hiện được là E4, E6, E30 và E33 trong đó E30 chiếm tỷ lệ cao nhất (46,7%), sau đó là E6 (33,3%), E33 chiếm tỷ lệ 13,3% và E4 (6,7%). Trong năm 2012 có nhiều chủng VRĐR được phát hiện và giải trình tự gen nhất (7/15 chủng), bao gồm cả 3 tít huyết thanh (E6, E30 và E33), còn chủng VRĐR E30 phát hiện được rải rác trong các năm từ 2006–2015, riêng như hai chủng VRĐR E33 đều phát hiện được vào năm 2012. Chủng E6 chỉ phát hiện được trong hai năm 2006 và 2012 trong đó năm 2012 phát hiện được 4/5 chủng, đây cũng là năm mà tít E6 chiếm ưu thế nhất so với các tít khác. Trong nghiên cứu này, lần đầu tiên phát hiện được 1 tít E4 vào năm 2009 từ bệnh nhân HCVNC do VRĐR ở Bắc Giang.

**Bảng 3.21. Độ tương đồng ở mức độ nucleotide giữa các vi rút đường ruột ở Bắc Giang và với các chủng khác trong cùng một typ huyết thanh**

<b>Kiểu gen</b>	<b>Chủng</b>	<b>Độ tương đồng ở mức nucleotide (%)</b>	<b>Khoảng dao động (%-%)</b>
E30	Nhóm 1 Bắc Giang	94,1	92,8- 97,9
	Phân nhóm 1 – nước khác	91,6	89,0-95,8
	Phân nhóm 2 Bắc Giang	94,7	89,8-99,4
	Phân nhóm 2 – nước khác	95,0	88,8-99,2
	Các chủng tại Bắc Giang	86,1	83,2- 99,4
E6	Các chủng tại Bắc Giang	97,6	94,0-100,0
	Bắc Giang – nước khác	89,9	85,5-97,0
E33	Các chủng tại Bắc Giang	100	-
	Bắc Giang – nước khác	85,3	83,3-98,7
E4	Bắc Giang – nước khác	87,2	79,7-98,3

Trên cây phả hệ, các chủng E30 phát hiện tại Bắc Giang trong nghiên cứu này chia thành hai phân nhóm với độ tương đồng giữa hai nhóm là 86,1%. Nhóm 1 gồm các chủng lưu hành trong các năm 2006, 2010 và 2011 với độ tương đồng ở mức độ nucleotide là 94,1%; nhóm 2 gồm các chủng lưu hành trong các năm từ 2013 đến 2015 với độ tương đồng là 94,7%. Trong nhóm 1, các chủng có độ tương đồng cao nhất trong ngân hàng gen với các chủng của Bắc Giang là các chủng đã phát hiện trước đó tại Việt Nam cũng như các chủng phát hiện được ở nhiều quốc gia trên thế giới như Trung Quốc, Thái Lan, Đài Loan, Brazil, Italia, Pháp, Nga với độ tương đồng trong nhóm 1 là 91,6%. Còn đối với nhóm 2, các chủng VRĐR có độ tương đồng cao với các chủng của Trung Quốc và Nga, độ tương đồng về nucleotide của các VRĐR trong nhóm 2 này là 95%.



**Hình 3.32. Cây phát sinh loài vùng gen VP1 (866bp) vi rút đường ruột tại Bắc Giang, 2004 - 2017.**

(Phương pháp Maximun Likelihood, các chủng được đánh dấu tròn đen (●) là các chủng phát hiện tại Bắc Giang trong giai đoạn 2004 – 2017)



Các chủng E6 phát hiện trong nghiên cứu này có độ tương đồng ở mức nucleotide là 97,6%. Bằng công cụ BLAST, các chủng E6 có độ tương đồng cao nhất với các chủng của Việt Nam là các chủng tìm thấy tại Trung Quốc cũng như nhiều nước khác trên thế giới như Hàn Quốc, một số nước châu Âu (Pháp, Phần Lan), Úc với độ tương đồng ở mức nucleotide là 89,9%.

Cả hai chủng E33 của Bắc Giang cùng phát hiện được năm 2012 có độ tương đồng tuyệt đối ở vùng gen VP1 (100%). Khi so sánh trên Genbank, chúng có độ tương đồng cao nhất với các chủng tại Trung Quốc, Thái Lan với độ tương đồng là 85,3%.

Trong cơ sở dữ liệu của ngân hàng gen, các chủng có tít huyết thanh E4 được công bố, chủ yếu từ Trung Quốc, Thái Lan, Úc, Mỹ, Pháp và Nhật Bản. Độ tương đồng ở mức nucleotide với chủng tại Bắc Giang là 87,2%. Kết quả nghiên cứu này cho thấy, chủng vi rút đường ruột có tít huyết thanh E4 là chủng vi rút lần đầu tiên được phát hiện ở Việt Nam.

## Chương 4

### BÀN LUẬN

#### **4.1. Xác định một số căn nguyên vi rút Arbo, vi rút đường ruột, vi rút Herpes gây hội chứng viêm não cấp tại Bắc Giang, 2004-2017**

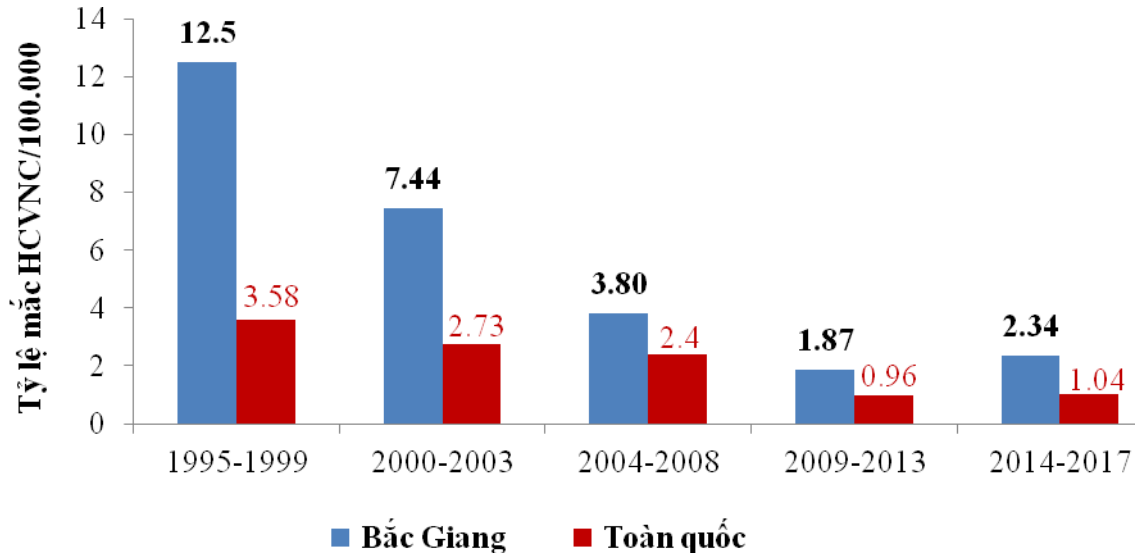
##### **4.1.1 Chẩn đoán xác định căn nguyên vi rút gây HCVNC**

###### **4.1.1.1. Một số đặc điểm HCVNC**

HCVNC do vi rút là mối quan tâm cho sức khỏe cộng đồng trên toàn thế giới vì tỷ lệ tử vong cao và di chứng thần kinh nặng nề. Về biểu hiện lâm sàng, có nhiều tác nhân gây HCVNC với những triệu chứng khó có thể xác định được do tác nhân vi rút nào. Thậm chí HCVNC do vi rút VNNB cũng có các thể lâm sàng rất đa dạng, dễ nhầm lẫn với HCVNC do tác nhân vi rút khác [77], [113], [114]. Ngoài tác nhân vi rút, một số loại hợp chất tự nhiên như Hypoglycin A và Methylenecyclopropylglycine có trong vỏ, niềng trắng của hạt vải cũng có thể là một yếu tố góp phần gia tăng thể viêm não tối cấp ở trẻ em do tình trạng hạ đường huyết tối cấp, dễ nhầm với thể HCVNC thể tối cấp. Những ca bệnh này có thể kết hợp thêm với tác nhân vi rút làm cho tình trạng bệnh nặng nề hơn ở những vùng nông thôn miền núi trồng vải trong mùa thu hoạch vải quả, vì vậy chẩn đoán xác định bệnh cần được xác định bằng các kỹ thuật xét nghiệm phù hợp [57], [90]. Ước tính tỷ lệ HCVNC do vi rút là 1,4/100.000 dân, điều kiện về sinh thái, địa lý là yếu tố quyết định chính của HCVNC do những vi rút gây bệnh lây truyền qua véc tơ. Chẩn đoán HCVNC do vi rút vẫn là thách thức đối với y học, vì gần 40%-70% trường hợp HCVNC nghi ngờ do vi rút chưa xác định được nguyên nhân [113].

Bắc Giang là một tỉnh có địa hình đồng bằng xen lẫn với vùng đồi, núi có kinh tế nông nghiệp là nuôi lợn và trồng lúa nước, là điều kiện sinh thái thích hợp cho lưu hành vi rút VNNB. Mặc dù vắc xin VNNB đã được sử dụng với độ bao phủ cao để phòng bệnh, nhưng Bắc Giang vẫn là một trong số các tỉnh có tỷ lệ HCVNC nghi ngờ do vi rút cao trong cả nước [3], [22]. HCVNC do vi rút luôn là vấn đề sức khỏe nổi trội của tỉnh Bắc Giang trong nhóm các bệnh truyền nhiễm được ghi nhận

hiều năm qua. Hằng năm số ca mắc bệnh khá cao, thể hiện sự lưu hành một số loại vi rút gây HCVNC trên địa bàn tỉnh Bắc Giang, nhưng cho đến nay ngoài tác nhân vi rút VNNB gây HCVNC, còn có tác nhân vi rút khác vẫn chưa được đề cập đến trong những nghiên cứu trước đây [16], [20].



**Hình 4.1. Phân bố tỷ lệ mắc HCVNC trên 100.000 dân, 1995-2017 [3]**

Tại Bắc Giang tỷ lệ mắc HCVNC giai đoạn 1995-1999 là 12,5/100.000 dân [8], năm 2000-2003 là 7,44/100.000 dân và đến nay giai đoạn 2004-2017 tỷ lệ mắc HCVNC là 2,67/100.000 dân. Theo niên giám thống kê của Bộ Y tế, tại Việt Nam, các trường hợp HCVNC trước năm 2005 khoảng 2,3-3,5 ca mắc HCVNC/100.000 dân, đến nay còn khoảng 1,1-1,7 ca mắc HCVNC/100.000 dân [3]. Khi so sánh với toàn quốc, Bắc Giang là tỉnh có tỷ lệ mắc HCVNC cao gấp 2 lần so với tỷ lệ mắc trung bình cả nước (hình 4.1); Các trường hợp HCVNC được ghi nhận ở tất cả 10/10 huyện, thành phố của tỉnh Bắc Giang, 2004-2017 (hình 3.1).

Nghiên cứu của thập niên đầu thế kỷ 21 cho thấy, mặc dù HCVNC đã xác định được một số tác nhân gây bệnh với những ca bệnh xuất hiện ở khắp nơi trên thế giới, tỷ lệ mắc bệnh dao động từ 3,5 đến 7,4/100.000 dân tùy từng khu vực, ca bệnh được ghi nhận chủ yếu ở trẻ em và nam giới [50].

Trong một nghiên cứu phân tích của Jmor và cộng sự năm 2008 tập hợp từ 87 nghiên cứu về HCVNC trên toàn thế giới cho thấy tỷ lệ mắc bệnh ở các nước

phương Tây gần đây từ 10,5 đến 13,8/100.000 trẻ em còn trên người trưởng thành là khoảng 2,2/100.000. Điều đáng lưu ý là tỷ lệ HCVNC ở các nước phương tây và các nước vùng nhiệt đới khác nhau không đáng kể, thậm chí còn cao hơn ở các nước phương tây, tỷ lệ HCVNC ở các nước vùng nhiệt đới là 6,34/100.000 dân, trong khi tỷ lệ này ở các nước phương tây là 7,40/100.000 dân [50], [62].

Nghiên cứu tại Anh trong giai đoạn 2004-2013 tỷ lệ mắc HCVNC là 1,5-3,9/100,000 [66]. Tại Mỹ, giai đoạn 1950-1981 tỷ lệ mắc HCVNC hàng năm là 7,4/100.000 dân, tỷ lệ mắc giảm dần theo thời gian. Trong nghiên cứu của Holman cho thấy tỷ lệ mắc trên 100.000 dân từ năm 1988-1997 là 4,3 [55]. Giai đoạn 2011-2014 tỷ lệ mắc HCVNC trên 100.000 dân là 2,8 [54].

Trong kết quả nghiên cứu tại Bắc Giang giai đoạn 2004-2017, HCVNC mắc cao nhất ở nhóm dưới 5 tuổi, tỷ lệ mắc trên 100.000 dân là 10,54-12,50. Trong khi đó tỷ lệ mắc ở người lớn, trên 15 tuổi là 0,77/100.000 dân thấp hơn 11 lần so với nhóm dưới 15 tuổi (bảng 3.5). Kết quả nghiên cứu tại Bắc Giang cũng phù hợp với nghiên cứu phân tích của Jmor về HCVNC trên thế giới, tỷ lệ mắc HCVNC ở trẻ em cao hơn 5-15 lần so với người lớn [50], [62].

#### **4.1.1.2. Chẩn đoán xác định căn nguyên vi rút gây HCVNC**

Căn nguyên gây HCVNC liên quan nhiều nhất đến vi rút gây bệnh, nhưng cũng có thể gặp các căn nguyên vi sinh khác như vi khuẩn, ký sinh trùng, nấm... và cả những trường hợp viêm não vô khuẩn cũng được ghi nhận. Những năm gần đây, nhờ sự hỗ trợ của các kỹ thuật y sinh học hiện đại như kỹ thuật nuôi cấy phân lập, kỹ thuật khuếch đại chuỗi PCR để xác nhận sự hiện diện của các vi sinh vật đã giúp rất nhiều cho việc chẩn đoán căn nguyên gây HCVNC. Tại Anh và xứ Wales trong giai đoạn 2004-2013 đã xác định tỷ lệ mắc HCVNC tăng lên từ 0,6/100.000 dân trong năm 2004 lên đến 3,9/100.000 dân trong năm 2013, việc tăng cường sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử để xét nghiệm đã góp phần làm tăng 7 lần số ca bệnh HCVNC được xác định nguyên nhân [66].

Trong tổng số 594 ca bệnh HCVNC tại Bắc Giang giai đoạn 2004-2017 đã xác định được 4 tác nhân vi rút gây HCVNC đó là vi rút đường ruột, vi rút VNNB, vi rút Banna và vi rút Nam Định. Trong nghiên cứu này, không phát hiện được trường hợp nào bị HCVNC do các vi rút Herpes (bảng 3.1 và bảng 3.2), HSV là tác nhân chủ yếu gây bệnh ở da và niêm mạc, thường chỉ gây HCVNC thứ phát trên bệnh nhân suy giảm miễn dịch nên tỷ lệ HCVNC do HSV thường thấp hoặc không phát hiện ở trẻ em. Tại Bắc Giang, căn nguyên chủ yếu gây HCVNC là nhóm vi rút Arbo và VRĐR. Số ca phát hiện được ít nhất một nguyên nhân trên tổng số ca mắc HCVNC là 302/594 (50,84%) (bảng 3.3). Tỷ lệ phát hiện được căn nguyên vi rút gây HCVNC trong kết quả nghiên cứu của chúng tôi có sự tương đồng với nghiên cứu của một số tác giả trên thế giới và tại miền Nam Việt Nam, tỷ lệ phát hiện được tác nhân trong khoảng 30-60% [43], [54], [59], [102], [124].

Tại Ấn Độ, một nghiên cứu dịch tễ học và nguyên nhân gây HCVNC ở miền Bắc Ấn Độ đã phát hiện các tác nhân vi rút VNNB, vi rút dengue, vi rút herpes, vi rút sởi, vi rút quai bị, vi rút hợp bào đường hô hấp. Tỷ lệ phát hiện được căn nguyên vi rút gây HCVNC là 58,3%, trong số đó VNNB được phát hiện phổ biến nhất, sau đó là vi rút dengue, herpes, sởi, quai bị và vi rút hợp bào đường hô hấp, nhưng không có ca bệnh HCVNC nào do vi rút đường ruột. Tỷ lệ tử vong cao nhất là do vi rút VNNB, còn những bệnh nhân bị HCVNC do vi rút herpes có tỷ lệ di chứng thần kinh cao. Sự phân bố ca bệnh liên quan đến tuổi, giới, thay đổi theo địa lý và theo mùa. Vi rút VNNB và vi rút dengue là tác nhân gây bệnh chính của HCVNC ở miền Bắc Ấn Độ [59].

Tại miền Nam Việt Nam, trong một nghiên cứu 12 năm xác định căn nguyên gây HCVNC người lớn, cho thấy tỷ lệ phát hiện được nguyên nhân là 38,2%, tỷ lệ tử vong là 10%, tỷ lệ di chứng thần kinh là 27%. Trong đó vi-rút VNNB, vi rút dengue, vi rút herpes và vi rút đường ruột là nguyên nhân hàng đầu được xác định gây HCVNC [124]. Nghiên cứu trên đối tượng trẻ em mắc HCVNC, cho thấy 41% phát hiện được nguyên nhân vi rút gây HCVNC, tỷ lệ tử vong 27%. Tác nhân vi rút chính gây HCVNC ở trẻ em là vi rút VNNB, tiếp theo là vi rút đường ruột, vi rút

dengue, vi rút herpes, vi rút cytomegalo và vi rút cúm A đã được ghi nhận ở miền Nam Việt Nam [102]. Nghiên cứu tại Sơn La, một trong các tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam năm 2015, tỷ lệ xác định được căn nguyên vi rút gây HCVNC là 54,5%, trong đó VNNB là 49,4%, vi rút herpes là 2,8% và vi rút đường ruột rất thấp chỉ có là 2,3% [6]. Tại Bắc Giang chưa phát hiện được trường hợp nào HCVNC do vi rút herpes, có lẽ đây là căn nguyên gây viêm não lẻ tẻ, thường gặp ở những đối tượng suy giảm miễn dịch, ghép tạng, suy thận hay nhiễm HIV, do vậy tỷ lệ phát hiện HCVNC do herpes thường thấp so với tác nhân gây HCVNC nguyên phát.

Trong kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng có hiện tượng đồng nhiễm tác nhân gây bệnh, trong tổng số 594 ca HCVNC, xác định được nguyên nhân là 302/594 (50,84%), trong đó có 32/594 (5,39%) ca dương tính với hơn một tác nhân gây bệnh (bảng 3.3). Trong phần lớn số ca đồng nhiễm này là phát hiện có IgM kháng BAV, VNNB và NDiV, hiện tượng đồng nhiễm cũng đã được công bố trong các nghiên cứu trên thế giới cũng như ở Việt Nam và ở Bắc Giang được ghi nhận trong nghiên cứu này. Tại Bihar Ấn Độ, trong nghiên cứu phát hiện tác nhân vi rút gây HCVNC cho thấy hiện tượng dương tính với hơn một tác nhân gây bệnh là 23,3% [60]. Tại miền Nam Việt Nam, tỷ lệ đồng nhiễm được xác định là 8% trong nghiên cứu 12 năm xác định căn nguyên gây HCVNC [124]. Hiện tượng đồng nhiễm có thể do các tác nhân vi rút có cùng vec tơ truyền bệnh như muỗi Culex được xác định là vec tơ chung của vi rút VNNB, BAV và NDiV [5], [9], [88]. Ngoài ra, điều kiện vệ sinh môi trường không đảm bảo dẫn đến hiện tượng đồng nhiễm trong HCVNC do vi rút đường ruột [2].

#### **4.1.2. Một số đặc điểm HCVNC do vi rút**

##### **4.1.2.1. Một số đặc điểm HCVNC do vi rút đường ruột**

Hầu hết các vi rút đường ruột (VRĐR) lây nhiễm từ người sang người qua đường tiêu hóa và gây ra các triệu chứng nhẹ. Nhưng một số VRĐR có thể xâm nhập vào hệ thống thần kinh trung ương và dẫn đến các triệu chứng thần kinh khác nhau có liên quan đến tỷ lệ tử vong do nhiễm vi rút đường ruột. Từ những báo cáo đầu tiên những năm 1950 về những bệnh nhân HCVNC do VRĐR, cho đến những

năm gần đây, các ổ dịch do VRĐR lớn đã xảy ra trên toàn thế giới [61], [103], [118], [122], [137]. Vi rút đường ruột xâm nhập vào người qua đường tiêu hóa, có thể không biểu hiện bệnh, nhưng cũng có thể gây ra bệnh cảnh lâm sàng khá đa dạng như viêm cơ tim, viêm tụy và viêm cơ mãn tính. Không phải tất cả các VRĐR đều gây HCVNC ở người, chỉ có Coxsackie A, vi rút Coxsackie B, các vi rút ECHO (Enteric Cytopathic Human Orphan) và một số type vi rút đường ruột EV-71, EV-75, EV-76, EV-89 được ghi nhận là tác nhân gây HCVNC cho người [78], [103], [106]. Trong số các VRĐR gây HCVNC, EV-71 là tác nhân có liên quan đến sự bùng phát lan rộng của bệnh tay chân miệng trên toàn khu vực Châu Á Thái Bình Dương từ năm 1997 cho đến nay bao gồm có cả những báo cáo rải rác về bệnh nhân HCVNC. Sốc thần kinh với phù phổi là một biến chứng gây tử vong do nhiễm EV-71. Nhiều trẻ em và trẻ sơ sinh đã chết do biến chứng thần kinh nghiêm trọng trong các dịch bệnh này, nhiễm EV-71 đã trở thành một vấn đề sức khỏe cộng đồng nghiêm trọng ở khu vực [61], [103], [118]. Các bệnh cảnh thần kinh do VRĐR rất đa dạng như viêm màng não, viêm não, viêm não-màng não, hiếm gặp hơn là liệt mềm giống bại liệt, hội chứng run giật cơ-thất điều, viêm thân não và tăng áp lực nội sọ lành tính [28], [35].

Các ca bệnh HCVNC do VRĐR được báo cáo rải rác, tại bệnh viện Nhi Trung ương HCVNC do vi rút đường ruột là căn nguyên gây viêm não cho trẻ em đứng hàng thứ 3 sau VNNB và vi rút herpes [1]. Trong nghiên cứu của chúng tôi tại Bắc Giang, trong tổng số 594 ca mắc HCVNC giai đoạn 2004-2017 có 78 ca do VRĐR ruột chiếm 13,13% (bảng 3.2). Số ca mắc do vi rút đường ruột ở tất cả các năm, tỷ lệ xác định căn nguyên HCVNC do vi rút đường ruột theo năm dao động trong khoảng từ 2,22% đến 21,15% (hình 3.4). Số năm có ca mắc HCVNC do vi rút đường ruột trên 15% là các năm 2007, 2012, 2015, 2016. Như vậy cứ sau 3-5 năm lại có chu kỳ mắc với tỷ lệ cao hơn (hình 3.4).

Tỷ lệ xác định HCVNC do vi rút đường ruột khác nhau tùy theo vùng địa lý, kết quả nghiên cứu xác định căn nguyên HCVNC do vi rút đường ruột tại miền Trung giai đoạn 2015- 2017 là 11,2%, miền Nam Việt Nam giai đoạn 1996 - 2008

là 9,3% [124], tại Sơn La năm 2015 là 2,3% [6]. Tuy nhiên, tại Sơn La, nghiên cứu chỉ tiến hành trong 1 năm nên tỷ lệ phát hiện VRĐR thấp có thể bị nhiễu do thời gian nghiên cứu. Vì vậy, đối với việc xác định vai trò gây HCVNC của VRĐR, các nghiên cứu cần được tiến hành trong nhiều năm để tránh bị nhiễu do tỷ lệ lưu hành khác nhau giữa các năm. Mặc dù có sự khác biệt về tỷ lệ phát hiện căn nguyên VRĐR gây HCVNC ở các khu vực địa lý nhưng các nghiên cứu đều chỉ ra rằng VRĐR là một trong số căn nguyên gây HCVNC cần được quan tâm để dự phòng bằng các biện pháp thông dụng như vệ sinh tay trước khi ăn... vì chưa có vắc xin.

Phân bố ca mắc HCVNC do VRĐR tại Bắc Giang gặp cả 10/10 huyện, thành phố của tỉnh Bắc Giang (hình 3.6) với số ca mắc cao ở khu vực miền núi, khu vực trung du; khu vực thành phố tỷ lệ mắc thấp hơn (hình 3.7). Có thể ở khu vực miền núi điều kiện vệ sinh và trình độ dân trí thấp hơn so với khu vực thành phố nên tỷ lệ mắc bệnh truyền nhiễm nói chung và bệnh HCVNC do VRĐR nói riêng cao hơn.

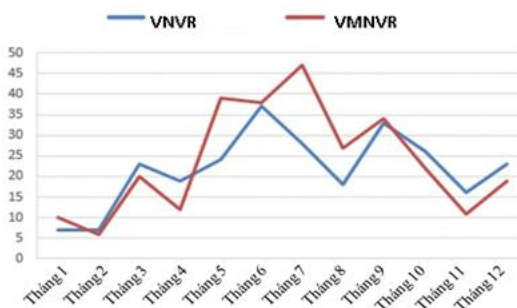
VRĐR lưu hành rộng rãi ở vùng khí hậu nhiệt đới hoặc cận nhiệt đới (ôn đới). Ở những vùng khí hậu ôn đới, với tác động rất hiệu quả của vắc xin phòng bệnh bại liệt cùng tình trạng vệ sinh được cải thiện, thêm vào đó trẻ sơ sinh được chăm sóc tại nhà, nguy cơ tiếp xúc tác nhân vi sinh gây bệnh nói chung và VRĐR nói riêng thấp, do vậy bệnh lý trẻ sơ sinh bị HCVNC do VRĐR ít được ghi nhận. Nhưng khi trẻ lớn hơn, môi trường nhà trẻ, xã hội là nguyên nhân làm cho HCVNC do VRĐR có xu hướng xảy ra phổ biến hơn, đặc biệt là sự bùng phát của bệnh Tay-Chân-Miệng, các biểu hiện HCVNC do EV-71 cũng đã được ghi nhận [75]. Các dấu hiệu chẩn đoán dựa vào yếu tố dịch tễ, biểu hiện lâm sàng, các dấu hiệu cận lâm sàng và các chỉ số hóa sinh trong dịch não tủy. Tuy nhiên, chẩn đoán xác định phụ thuộc vào phương pháp chẩn đoán phòng thí nghiệm, chủ yếu là khuếch đại vật liệu di truyền của vi rút đường ruột trong dịch não tủy bệnh nhân HCVNC [74]. Sự khác nhau về tỷ lệ HCVNC do VRĐR theo vùng địa lý cũng đã được khẳng định trong kết quả nghiên cứu tại một số quốc gia trên thế giới. Như tại Hoa Kỳ, trong một nghiên cứu dịch tễ học HCVNC giai đoạn 2011-2014 cho thấy VRĐR là căn nguyên phổ biến nhất gây HCVNC, tỷ lệ xác định HCVNC do VRĐR



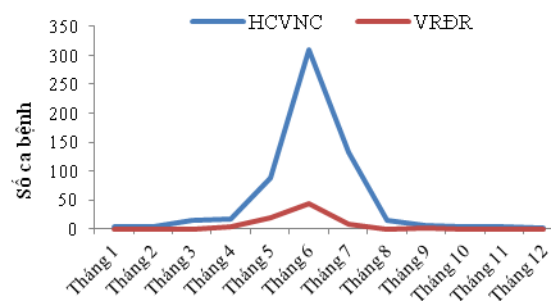
chiếm 51,6% [54]. Còn tại Anh, tỷ lệ xác định HCVNC do VRĐR là 33%, với số mắc được ghi nhận chủ yếu vào mùa hè và thời gian giao mùa giữa mùa hè và mùa đông, số mắc cao là trẻ em <15 tuổi chiếm 58%. Tỷ lệ số mắc HCVNC do VRĐR ở trẻ em cao gấp 2 lần so với người lớn. Đặc biệt, trẻ nhỏ <3 tháng tuổi chiếm 23% trong số các bệnh nhiễm trùng do VRĐR và 37% các ca nhiễm VRĐR ở trẻ em; Sau tuổi này, tỷ lệ số mắc HCVNC do VRĐR giảm nhanh chóng, với một đỉnh thấp hơn ở những người tuổi từ 25 đến 44 [65].

Tại Trung Quốc, căn nguyên gây HCVNC đã được xác nhận ở 42,8%-52,5% tổng số ca bệnh. Tác nhân do VRĐR là 27,7%-37,7% trong tổng số ca HCVNC do vi rút. VRĐR là nguyên nhân hàng đầu gây HCVNC ở trẻ em. Tỷ lệ xác định di chứng và tỷ lệ tử vong trong số các trường hợp HCVNC do VRĐR tương ứng là 7,5% và 0,8%. Như vậy, HCVNC do VRĐR chiếm khoảng trên 20% ở các vùng dịch tễ của Trung Quốc [28].

Phân bố ca mắc HCVNC do VRĐR theo mùa khá rõ rệt, trong nghiên cứu tại Bắc Giang, số ca mắc HCVNC do VRĐR xuất hiện từ tháng 4 đến tháng 9 trong năm (hình 3.5). Kết quả nghiên cứu cũng phù hợp với một số tác giả nghiên cứu trong nước và quốc tế [28],[53], HCVNC do VRĐR thường tăng cao vào mùa hè, do điều kiện khí hậu thuận lợi cho sự nhân lên của vi sinh gây bệnh, đặc biệt ở những quốc gia có điều kiện vệ sinh môi trường chưa tốt, thực hành vệ sinh cá nhân chưa đảm bảo, làm tăng cường bệnh truyền nhiễm nói chung, bệnh lây theo đường phân miệng nói riêng.



**Hình 4.2** Phân bố theo mùa viêm não vi rút tại Trung Quốc [28]



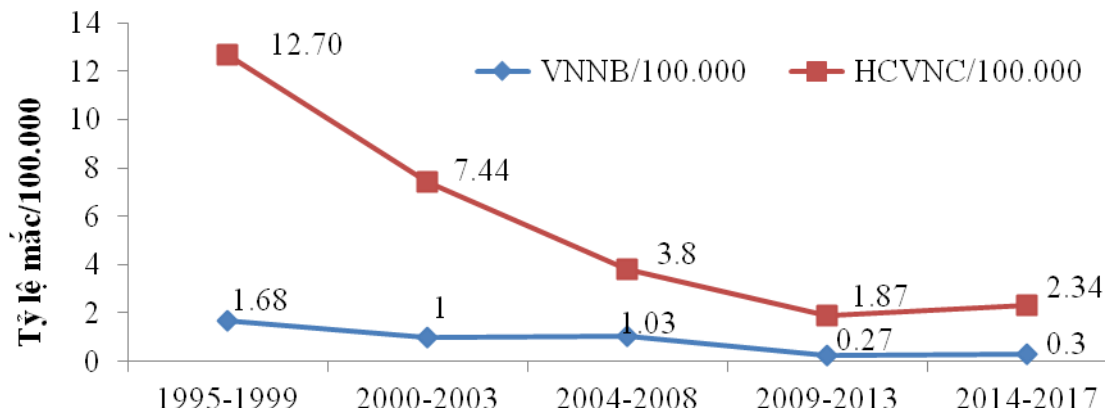
**Hình 4.3** Phân bố theo mùa viêm não vi rút tại Bắc Giang

Trong nghiên cứu của chúng tôi, phân bố ca mắc HCVNC do VRĐR gặp ở tất cả các nhóm tuổi, tập trung mắc cao ở nhóm dưới 10 tuổi, nam mắc cao hơn 2 lần so với nữ giới (bảng 3.5 và 3.6). Kết quả nghiên cứu cũng phù hợp với nghiên cứu đặc điểm HCVNC do vi rút đường ruột tại bệnh viện Nhi Trung ương, tuổi mắc bệnh trung bình là 5,7 tuổi, số mắc ở nam cao hơn nữ, ca bệnh rải rác quang năm nhưng số mắc cao thường được ghi nhận từ tháng 4 đến tháng 6 trong năm [1]. Kết quả của chúng tôi cũng không khác biệt với kết quả nghiên cứu tại Trung Quốc, tuổi trung bình của HCVNC do vi rút là 5,88-6,39 ± 3,6. Tỷ lệ nam cao hơn tỷ lệ mắc ở nữ từ 1,97 - 2,24 lần [28].

Như vậy, VRĐR là một trong số những nguyên nhân hàng đầu gây HCVNC ở trẻ em, tùy theo vùng địa lý mà có tỷ lệ mắc khác nhau, tại Bắc Giang VRĐR là một trong 3 căn nguyên chính gây HCVNC sau vi rút VNNB và vi rút Banna nên cần có những biện pháp can thiệp và dự phòng đối với tác nhân gây bệnh trực tiếp qua đường tiêu hóa để bảo vệ sức khỏe cộng đồng một cách hiệu quả nhất.

#### 4.1.2.2. Một số đặc điểm HCVNC do vi rút viêm não Nhật Bản

VNNB là bệnh lưu hành tại Bắc Giang, trước năm 2000 tỷ lệ xác định căn nguyên vi rút VNNB trong số các trường hợp HCVNC là trên 30%. So sánh tỷ lệ mắc VNNB tại Bắc Giang giai đoạn 2004-2017 với giai đoạn trước có sự thay đổi theo xu hướng giảm dần.



**Hình 4.4. Tỷ lệ mắc VNNB, HCVNC trên 100.000 dân, Bắc Giang, 1995-2017**

Trong giai đoạn 1995-1999 tỷ lệ VNNB trong các ca bệnh HCNC là 30,32%, tỷ lệ mắc VNNB là 1,68/100.000 dân. Sau năm 2000, tỷ lệ mắc VNNB giảm dần, trong giai đoạn 2000-2003, tỷ lệ xác định căn nguyên vi rút VNNB trong số các trường hợp HCVNC là 15,24%, tỷ lệ mắc là 1,00/100 000 dân [8]. Giai đoạn 2004-2017 có 120 ca VNNB được phát hiện, trong đó giai đoạn 2004-2008 có 79 ca chiếm 65,8%, tỉ lệ mắc trong giai đoạn này là 1,03/100.000 dân cao gấp 3,4-3,8 lần so với giai đoạn 2009-2013 và giai đoạn 2014-2017 (bảng 3.7; hình 3.6). Như vậy, tỷ lệ mắc VNNB giai đoạn 2004-2017 giảm 3 lần so với tỷ lệ mắc VNNB giai đoạn 1995-1999 tại Bắc Giang, khi so sánh giai đoạn 2014-2017 với giai đoạn trước năm 2000 tỷ lệ mắc VNNB tại Bắc Giang giảm 5,6 lần [8].

Tại Việt Nam, tỷ lệ xác định căn nguyên VNNB trong số các trường hợp HCVNC là 26%-49% [6], [19], [20], [102], [124]. Trong nghiên cứu của chúng tôi tỷ lệ xác định căn nguyên vi rút VNNB gây HCVNC là 20,20% (bảng 3.1). Tỷ lệ mắc VNNB tại Bắc Giang thấp hơn tỷ lệ mắc VNNB ở miền Bắc cũng như giai đoạn trước do sự bao phủ vắc xin trên 99% ở trẻ 1-5 tuổi trong chương trình tiêm chủng mở rộng. Bên cạnh đó, từ năm 2011 Bắc Giang đã chủ động tiêm vắc xin phòng bệnh VNNB vào tháng 3, tháng 4 hằng năm cùng với việc thực hiện phun thuốc diệt véc tơ truyền bệnh VNNB chủ động trước mùa dịch vào các tháng 3, 4, 5 tại các vùng trọng điểm trên địa bàn toàn tỉnh cũng góp phần dự phòng bệnh do muỗi truyền nói chung trong đó có phòng bệnh VNNB [7], [27], [30], [120].

Bệnh VNNB lưu hành rộng rãi ở châu Á bao gồm Nhật Bản, Trung Quốc, Đài Loan, Hàn Quốc, Philippin, vùng viễn đông nước Nga, tất cả các nước Đông nam Á và Ấn Độ. Với số mắc hàng năm gần 68.000 trường hợp mắc, tử vong 20.400 trường hợp, tỷ lệ di chứng thần kinh vĩnh viễn hoặc di chứng tâm thần chiếm 30%-50% [30], [36], [132]. Tại Trung Quốc tỷ lệ mắc HCVNC giao động 9,2-14,2/100.000 dân, trong đó VNNB trong khoảng 0,08-1,5/100.000 dân. Tỷ lệ mắc VNNB trong số các ca bệnh lâm sàng có chẩn đoán HCVNC là 9,3% [129]. Tại Campuchia, VNNB là bệnh lưu hành, ca bệnh đầu tiên tại Campuchia năm 1965, trong những năm 90 của thế kỷ XX, tỷ lệ xác định VNNB ở trẻ có HCVNC là 18-

30%. VNNB là bệnh do muỗi truyền liên quan đến vùng trồng lúa, Campuchia là quốc gia thuần nông, khoảng 80% dân số sống ở vùng nông thôn và 90% trong số này sản xuất nông nghiệp là lúa nước. Trong thập niên đầu tiên của thế kỷ XXI tỷ lệ xác định căn nguyên vi rút VNNB trong số các trường hợp HCVNC là 19%, dao động từ 13% đến 35% [125]. Tại nhiều quốc gia Châu Á, vi rút VNNB vẫn là căn nguyên hàng đầu gây HCVNC như Ấn Độ, Philippine, Malaysia, Thái Lan, Đài Loan... [47], [56], [64], [95], [97].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, các trường hợp VNNB được ghi nhận ở 9/10 huyện, thành phố trên địa bàn tỉnh Bắc Giang (hình 3.13), số ca mắc VNNB tập trung ở khu vực trung du và miền núi chiếm 95% trong tổng số trường hợp mắc VNNB trong giai đoạn 2004-2017 (bảng 3.13). Tỷ lệ mắc trên 100.000 dân ở khu vực miền núi cao gấp 2-4 lần so với khu vực trung du và thành phố, sự khác nhau về tỷ lệ mắc VNNB giữa các vùng sinh thái có lẽ liên quan đến ổ chứa vi rút và muỗi véc tơ cũng như kết quả tiêm phòng vắc xin. Theo số liệu thống kê của Cục thống kê tỉnh Bắc Giang giai đoạn 2000-2010 cho thấy, huyện Lục Nam là huyện có diện tích, sản lượng và năng suất lúa cao nhất trong toàn tỉnh, cũng là huyện miền núi trong tỉnh, với đặc điểm chung là diện tích và sản lượng cây ăn quả chiếm trên 80% diện tích và sản lượng cây ăn quả trong toàn tỉnh. Trong những năm trở lại đây, các huyện miền núi cũng phát triển mạnh về chăn nuôi gia súc, gia cầm, chiếm 52%-60% số lượng gia cầm trong toàn tỉnh; Các huyện miền núi cũng là nơi có sinh thái thích hợp cho sự phát triển của muỗi truyền bệnh với mật độ cao. Trong nghiên cứu phân lập vi rút tại thực địa trên địa bàn tỉnh Bắc Giang từ 2006-2012, kết quả đã phân lập và định loại được 4 chủng vi rút VNNB từ muỗi [9]. Như vậy có thể nhận định nguyên nhân làm cho số lượng bệnh nhân VNNB ở khu vực miền núi cao hơn khu vực trung du và thành phố là do sự phát triển của cây ăn quả, phát triển của chăn nuôi gia súc gia cầm và sự lưu hành của vec tơ truyền bệnh với mật độ cao và người dân chưa được phòng bệnh đầy đủ bằng vắc xin (bảng 3.11 hình 3.14)

Các vụ dịch VNNB ở Bắc Giang có tính chất mùa và chu kỳ khá rõ rệt. Trong vòng 14 năm từ 2004 đến 2017, các trường hợp VNNB xác định được ghi

nhận hằng năm (hình 3.9). Nhưng trên phạm vi toàn tỉnh, giai đoạn/năm 2004-2008, 2011, 2016 là những năm có hệ số năm dịch lớn hơn 1. Như vậy chu kỳ dịch VNNB thường xuất hiện khá rõ, khoảng thời gian cho một chu kỳ là từ 2 đến 4 năm.

Bệnh VNNB không truyền trực tiếp từ người sang người mà phải lây truyền qua véc tơ trung gian là muỗi *Culex* [93]. Ở Việt Nam, muỗi *Culex* phát triển quanh năm, nhưng có mật độ cao từ tháng 4-9, với đỉnh cao nhất vào thời điểm tháng 5 và tháng 9. Diễn biến này gắn liền với sự có mặt của các vũng nước trên đồng ruộng sau mùa gặt và với nhiệt độ, thời tiết phù hợp với sự phát triển của vi rút VNNB trong muỗi có hiệu giá cao cùng với ổ chứa khuếch đại vi rút gần người là lợn. Đây là điều kiện để dịch VNNB thường xảy ra vào mùa hè, với đỉnh cao của dịch thường ghi nhận trong tháng 6 chiếm khoảng 70% số ca bệnh trong năm [4], [34], [105]. Trong nghiên cứu của tác giả Phạm Quang Thái về đặc điểm dịch VNNB tại Sơn La năm 2014 cho thấy số ca mắc rải rác từ tuần thứ 20 đến tuần thứ 41 trong năm, trong đó số ca VNNB được ghi nhận nhiều nhất là từ tuần thứ 24 đến tuần thứ 32 tương ứng từ tháng 6 đến tháng 8 trong năm [22].

Tại Bắc Giang, ca mắc VNNB được ghi nhận từ tháng 2 đến tháng 9 trong năm, trong đó số ca mắc cao tập trung vào các tháng 5, tháng 6, tháng 7 chiếm 95% tổng số ca mắc trong năm. Riêng tháng 6 số ca mắc cao nhất chiếm 68,33%. Tỷ lệ tử vong do VNNB tập trung ở tháng 5, tháng 6, tháng 7 trong năm, 90% ca tử vong trong khoảng thời gian này. Muỗi truyền bệnh VNNB có đặc điểm sinh thái phổ biến ở vùng nông thôn cấy lúa nước và trồng nhiều cây ăn quả, lượng muỗi thường phát triển vào mùa mưa, có nhiệt độ, độ ẩm cao thuận lợi cho muỗi sinh sôi. Theo số liệu của Cục thống kê tỉnh Bắc Giang, so sánh lượng mưa trung bình các tháng và độ ẩm trên địa bàn tỉnh Bắc Giang trong giai đoạn 2000-2015 cho thấy độ ẩm trung bình từ tháng 2 đến tháng 8 là 83,8% cao hơn độ ẩm trung bình từ tháng 9-12 là 78,5%. Nhiệt độ trung bình từ tháng 2 đến tháng 8 là 25,6°C, cao hơn nhiệt độ trung bình các tháng còn lại, nhiệt độ trung bình từ tháng 9 đến tháng 12 và tháng 1 là 21,9°C. Mùa hè có điều kiện tự nhiên phù hợp với đặc điểm sinh thái của loài muỗi truyền bệnh là thời điểm ghi nhận bệnh VNNB tăng cao trong năm.

Đặc điểm phân bố VNNB theo tháng tại Bắc Giang cũng tương đồng với các địa phương lưu hành VNNB tại miền Bắc. Các trường hợp HCVNC thường có đỉnh cao của dịch trong các tháng mùa hè ở các tỉnh/thành trong khu vực phía bắc, số ca mắc vào mùa hè từ tháng 5 đến tháng 9 chiếm 73% tổng số ca mắc trong năm, nhưng đối với 3 khu vực còn lại của Việt Nam, các trường hợp HCVNC được ghi nhận có tính chất rải rác quanh năm và ít trầm trọng hơn khu vực miền Bắc [135].

Trong các nghiên cứu về VNNB được công bố, hầu hết đều ghi nhận tỷ lệ số mắc VNNB ở nam cao hơn nữ, ví dụ như nghiên cứu tại Campuchia, xác định tỷ lệ số mắc VNNB ở nam giới là 56% [125]. Trong nghiên cứu tại Philippine năm 2013 trong tổng số 251 trường hợp HCVNC có 18% (44 trường hợp) là VNNB được xác định bằng kỹ thuật ELISA, tỷ lệ số mắc nam/nữ là 1,5 [64]. Kết quả nghiên cứu về VNNB của chúng tôi ở Bắc Giang cũng phù hợp kết quả nghiên cứu của một số tác giả khác trên thế giới, trong giai đoạn 2004-2017, tỷ lệ số mắc VNNB ở nam giới là 58,33% (70/120), tỷ lệ số mắc VNNB ở nữ giới là 41,67% (hình 3.12).

Theo kết quả nghiên cứu của nhiều tác giả trong và ngoài nước đã xác định sự phân bố bệnh VNNB theo nhóm tuổi có sự thay đổi giữa các vùng sau khi tăng cường sử dụng vắc xin dự phòng bệnh. Ở những nơi vi rút lưu hành, vắc xin dự phòng chưa được sử dụng, ca bệnh VNNB chủ yếu gặp ở trẻ em <15 tuổi. Còn những vùng không có vi rút VNNB lưu hành thì khả năng mắc bệnh xảy ra ở tất cả các nhóm tuổi [16], [19], [25].

Tại Ấn Độ, tỷ lệ số mắc VNNB được ghi nhận ở tất cả các nhóm tuổi, nhưng cao hơn ở nhóm <20 tuổi; Còn tại Thái Lan tỷ lệ số mắc VNNB ở các nhóm tuổi khác nhau được ghi nhận từ trẻ 6 tháng tuổi đến người lớn 57 tuổi, có 68% ca bệnh ở nhóm <20 tuổi, trong đó 46% là gặp ở trẻ <15 tuổi. Tại Philippines, năm 2006 trong số 72 ca mắc VNNB tại Metro Manila, Luzon và Visayas có 73% số ca bệnh VNNB <17 tuổi. Năm 2013, kết quả giám sát tại 5 bệnh viện tại Philippines cho thấy 64% ca mắc VNNB ở nhóm trẻ 2-9 tuổi [129].

Theo số liệu của Tổ chức Y tế Thế giới, ở những nước trọng điểm lưu hành vi rút VNNB, hầu hết số mắc là <10 tuổi. Ở các quốc gia Nhật Bản, Hàn Quốc, một

số vùng Trung Quốc, Ấn Độ số mắc VNNB đã giảm đi rất nhiều do tăng cường sử dụng vắc xin phòng bệnh, việc cải thiện điều kiện kinh tế xã hội, việc thay đổi điều kiện sản xuất trong nông nghiệp, kiểm soát tốt véc tơ, giáo dục phòng bệnh ở những khu vực này, những trường hợp VNNB chủ yếu gặp ở trẻ lớn và người lớn [132].

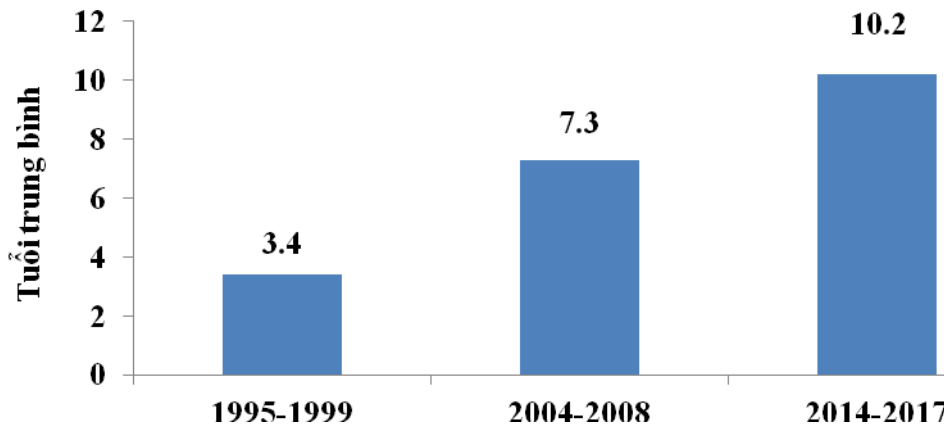
Các kết quả nghiên cứu về sự phân bố bệnh VNNB ở Việt Nam theo nhóm tuổi cho thấy sự khác biệt qua các giai đoạn. Theo số liệu nghiên cứu ghi nhận, từ 1985-1992 nhóm trẻ 1-4 tuổi mắc cao nhất chiếm 36,9%, sau đó là nhóm trẻ 5-9 tuổi chiếm 34,6% [20]. Trong nghiên cứu tại Gia Lương-Bắc Ninh năm 1993-1997 cho thấy 97,2% VNNB xảy ra ở trẻ <15 tuổi, trong đó cao nhất là nhóm trẻ 1-5 tuổi chiếm 54,3%. Trong giai đoạn 1998-1999, tỷ lệ mắc VNNB ở nhóm tuổi 1-4 trong toàn miền Bắc là 27,14%, nhóm 5-9 tuổi chiếm 45,12%, nhóm 10-14 tuổi chiếm 18,9%. Còn trong giai đoạn 2000-2001 ở cả ba miền cho kết quả tương tự, ở nhóm tuổi 5-9 chiếm 43,61%, nhóm 10-14 là 23,67%, nhóm 1-4 là 14,14%. Tại Hà Tây, giai đoạn 1998-2005, giai đoạn chưa sử dụng vắc xin phòng bệnh cho thấy tỉ lệ mắc ở nhóm trẻ 1-4 là 21,6%, nhóm trẻ 5-9 là 43,2%, nhóm trẻ 10-14 là 27,3% và nhóm trên 15 tuổi là 7,9%. Tại Thanh Hóa, được sử dụng vắc xin từ 1997 đến 2006 có 93% trẻ từ 1-5 tuổi được tiêm phòng vắc xin VNNB, trong nghiên cứu giai đoạn 2006-2007 cho thấy tỷ lệ mắc VNNB của trẻ 1-4 là 13,9%, nhóm trẻ 5-9 là 36,1%, nhóm trẻ 10-14 là 36,1% và nhóm trên 15 tuổi là 13,9% [16],[27].

Kết quả nghiên cứu tại Bắc Giang giai đoạn 2004-2017 cũng tương tự kết quả nghiên cứu của một số tác giả khác trong nước về VNNB ở miền Bắc Việt Nam, tỷ lệ mắc trên 100.000 trẻ tương ứng ở nhóm trẻ <15 tuổi là 1,95/100.000 trẻ, tỷ lệ mắc ở nhóm >15 tuổi là 0,09/100.000 người. Tỷ lệ mắc VNNB/100.000 trẻ tương ứng ở nhóm tuổi <15 cao hơn 21 lần so với tỷ lệ mắc ở nhóm >15 tuổi, cao gấp 3,6 lần tỷ lệ mắc trung bình của cả cộng đồng, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$  (bảng 3.9, hình 3.10).

Trong số 120 trường hợp VNNB, tuổi trung bình ca bệnh VNNB là 8,2 tuổi với độ tin cậy 95% (bảng 3.8). Giai đoạn 2004-2008 tuổi trung bình mắc bệnh là 7,27 thấp hơn giai đoạn 2009-2013 (9,76 tuổi) và giai đoạn 2014-2017 (10,2 tuổi),

sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p$  của  $t$  test  $<0,05$ ). Như vậy, có sự dịch chuyển nhóm tuổi mắc VNNB tại Bắc Giang, trong giai đoạn 1995-1999 và giai đoạn 2000-2004 VNNB tập trung cao ở nhóm dưới 5 tuổi, cao nhất là trẻ 3 tuổi [8], [19], [27]. Giai đoạn 2004-2008 tuổi trung bình mắc VNNB là 7,3 tuổi và đến giai đoạn 2014-2017 tuổi trung bình mắc VNNB là 10,2 tuổi.

Có sự thay đổi về tỷ lệ số mắc VNNB giữa các nhóm tuổi và đặc biệt có sự dịch chuyển nhóm tuổi theo chiều hướng tăng lên trong VNNB tại Bắc Giang là do sự tác động của hiệu quả phòng bệnh VNNB bằng vắc xin.



**Hình 4.5. Tuổi trung bình mắc VNNB, Bắc Giang, 1995-2017**

Sự thay đổi phân bố bệnh VNNB theo nhóm tuổi theo thời gian khi có sự can thiệp của tiêm phòng vắc xin VNNB cho trẻ 1-5 tuổi trong chương trình TCMR tới các vùng trọng điểm dịch thường giảm dần ở nhóm tuổi 1-4, cao hơn ở nhóm tuổi 5-9 tuổi. Tại Bắc Giang, vắc xin VNNB được sử dụng để phòng bệnh từ năm 2000 giai đoạn đầu tập trung ở các vùng trọng điểm của huyện Lục Ngạn, sau đó mở rộng trên địa bàn toàn tỉnh từ 2001 cho các đối tượng trẻ 1-5 tuổi, thực hiện duy trì cho đến nay. Phân tích nguy cơ mắc bệnh ở nhóm trẻ, cho thấy trẻ  $<1$  tuổi là lứa tuổi còn kháng thể mẹ truyền và được chăm sóc nên nguy cơ mắc bệnh thấp hơn các nhóm tuổi khác, còn ở nhóm trẻ 1-4 tuổi là lứa tuổi miễn dịch từ mẹ truyền đã hết nếu chưa được tiêm phòng, khả năng bị bệnh sẽ là cao nhất, các lứa tuổi lớn hơn do đã bị nhiễm vi rút thể ẩn từ khi còn nhỏ nên đã có miễn dịch và nguy cơ bị bệnh ít hơn. Nhưng khi sử dụng vắc xin VNNB phòng bệnh cho trẻ 1-5 tuổi đạt trên 90%,



tỷ lệ số mắc VNNB tăng lên ở nhóm 5-9 tuổi, đến những năm gần đây là nhóm trên 10 tuổi có tỷ lệ số mắc VNNB cao. Tại Bắc Giang, trong giai đoạn 2004-2017, xuất hiện ca bệnh VNNB ở nhóm trẻ <1 tuổi với tỷ lệ số mắc chiếm 3,33% (bảng 3.9, hình 3.10). Trong số 4 trẻ <1 tuổi mắc bệnh VNNB, có 2 trẻ là 11 tháng tuổi, 1 trẻ 9 tháng tuổi và 1 trẻ 3 tháng tuổi (tương ứng 1,08/100.000 trẻ cùng nhóm tuổi), đây là vấn đề cần được quan tâm trong chiến lược dự phòng VNNB cho trẻ <1 tuổi.

Hầu hết các ca bệnh VNNB do không tiêm vắc-xin phòng bệnh (64,17%), hoặc tiêm không đầy đủ (35,83%). Tỷ lệ mắc VNNB dù đã tiêm 3 liều cơ bản nhưng không tiêm liều củng cố với số mắc cao ở nhóm 5-9 tuổi (10 ca) và nhóm 10-14 tuổi (9 ca) chiếm 90% (19/21 ca) tổng số ca mắc VNNB (bảng 3.10). Cho thấy, cần tăng cường công tác truyền thông về việc thực hiện sử dụng vắc xin phòng bệnh VNNB đầy đủ và tuân thủ tiêm nhắc lại theo hướng dẫn của nhà sản xuất để củng cố miễn dịch đảm bảo hiệu quả phòng bệnh tốt nhất.

#### **4.1.2.3. Một số đặc điểm hội chứng viêm não cấp do vi rút Banna**

Vi rút Banna là một tác nhân gây bệnh mới xuất hiện được phân lập từ dịch não tủy của bệnh nhân HCVNC và sốt không rõ nguyên nhân ở tỉnh Vân Nam của Trung Quốc vào năm 1987 [83]. Kể từ đó, các chủng vi rút Banna phân lập được từ lợn, bò và một số loại muỗi ở Trung Quốc, Indonesia và Việt Nam, nằm ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới. Năm 2013, vi rút thuộc chi seadornavirus đã được công bố phân lập ở Hungary, cho thấy các loại vi rút này đã lan rộng từ các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới của Đông Nam Á đến các vùng ôn đới Bắc Âu [14], [32], [58], [83], [88].

Nghiên cứu sự lưu hành của vi rút Banna trong ổ chứa vi rút gần người và trong tự nhiên vẫn còn rất hạn chế, hiện chưa có sinh phẩm để chẩn đoán, giám sát vi rút Banna thương mại trên thị trường. Những nghiên cứu về dịch tễ huyết thanh học HCVNC do vi rút Banna trên thế giới cũng như tại Việt Nam còn nghèo nàn, chưa có nghiên cứu về tỷ lệ mắc của một quần thể xác định mà chỉ có những nghiên cứu về tỷ lệ xác định dương tính với kháng nguyên vi rút Banna trong dịch não tủy của bệnh nhân có HCVNC nghi ngờ do vi rút [5], [83].

Trong nghiên cứu căn nguyên vi rút gây HCVNC tại Bắc Giang giai đoạn 2004-2017 cho thấy, HCVNC do vi rút Banna được ghi nhận hàng năm, trong tổng số 112 ca mắc trong giai đoạn 2004-2017, số ca mắc cao tập trung ở các năm 2004, 2007, 2011 và 2016 (hình 3.16). Tỷ lệ xác định dương tính do vi rút Banna trong số các trường hợp HCVNC là 18,86% (bảng 3.1), là căn nguyên thứ hai sau VNNB gây HCVNC tại Bắc Giang. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cao hơn so với kết quả nghiên cứu của Hoàng Minh Đức năm 2012, tỷ lệ căn nguyên vi rút Banna gây HCVNC tại 9 tỉnh thành phố của Việt Nam là 14,32% [5], tương đồng với kết quả nghiên cứu xác định căn nguyên vi rút Banna gây HCVNC trong số các trường hợp có chẩn đoán lâm sàng nghi ngờ VNNB ở Trung Quốc, tỷ lệ huyết thanh bệnh nhân dương tính với kháng nguyên vi rút Banna tái tổ hợp từ vùng gen VP9, bằng kỹ thuật ELISA phát hiện IgM là khoảng 8,2%-24,3% [120].

Vi rút Banna lưu hành ở những khu vực mà vi rút VNNB lưu hành và ở đó *Culex tritaeniorhynchus*, là vec tơ chính [129] đồng thời nó cũng là vec tơ chung của vi rút Banna [9]. Các triệu chứng lâm sàng của HCVNC do hai loại vi rút này rất khó phân biệt nên các trường hợp HCVNC do vi rút Banna có thể không phát hiện được trong đợt bùng phát dịch VNNB. Đã có nghiên cứu chỉ ra khoảng 14% các trường hợp VNNB lâm sàng được xét nghiệm có IgM kháng vi rút Banna có thể do chúng cùng một loại vec tơ chung [83]. Trong nghiên cứu này tỷ lệ tử vong do vi rút Banna là 5,40% thấp hơn so với tỷ lệ tử vong do vi rút VNNB là 8,33% nhưng cao hơn tỷ lệ tử vong do vi rút đường ruột là 1,28%. Vi rút Banna vẫn là một trong những nguyên nhân gây HCVNC cao cho trẻ em trong khu vực châu Á khi chưa có vắc xin phòng bệnh. Chính vì vậy, vi rút Banna được cho là tác nhân tiềm tàng gây ảnh hưởng đến sức khỏe cộng đồng. Tại Bắc Giang, HCVNC do vi rút Banna gặp ở 10/10 huyện thành phố, tỷ lệ mắc trên 100.000 dân ở khu vực miền núi cao gấp 2 lần so với khu vực trung du và thành phố (hình 3.21 và 3.22). Tại khu vực miền núi, do điều kiện vệ sinh môi trường, trình độ dân trí, sự có mặt của vec tơ truyền bệnh có thể là nguyên nhân gây tỷ lệ mắc HCVNC do vi rút Banna cao hơn các khu vực còn lại. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với nghiên cứu của Hoàng

Minh Đức tại 9 tỉnh/thành ở Việt Nam xác định cho thấy ở các phân vùng địa lý khác nhau, tỷ lệ mắc do một loại tác nhân gây bệnh cũng có thể khác nhau [5]. Sự phân bố rộng của vi rút Banna, sự biến đổi di truyền của vi rút giữa các vùng, khả năng gây bệnh nghiêm trọng là nguyên nhân cho sự cần thiết phải cải thiện, cụ thể hóa hơn nữa các hệ thống giám sát, chuẩn hóa kỹ thuật chẩn đoán trên toàn thế giới.

Cũng tương tự các tác nhân vi rút đường ruột, vi rút VNNB gây HCVNC, tỷ lệ số mắc HCVNC do vi rút Banna ở nam cao hơn ở nữ giới 1,6 lần (hình 3.20). Kết quả nghiên cứu cũng phù hợp với công bố quốc tế về viêm não vi rút, tỷ lệ số mắc ở nam cao hơn nữ [125], [129]. Có lẽ do trẻ nam thường hiếu động hơn trẻ nữ, hay chơi ở những nơi có nguy cơ phơi nhiễm với vec tơ truyền bệnh nhiều hơn nên tỷ lệ số mắc thường cao hơn.

HCVNC do vi rút Banna xuất hiện từ tháng 2 đến tháng 9 trong năm, tỷ lệ số mắc cao vào tháng 5, 6 và tháng 7 (hình 3.17). Theo tác giả Hoàng Minh Đức các trường hợp HCVNC do vi rút Banna được ghi nhận quanh năm, nhưng tập trung chủ yếu trong các tháng hè 5, 6 và 7 với đỉnh cao của dịch là tháng 6, trùng với mùa dịch VNNB ở miền Bắc Việt Nam. Đây là một trong những đặc điểm HCVNC của vi rút do muỗi truyền thường xảy ra chủ yếu trong mùa hè ở vùng cận nhiệt đới [5], [19], [34]. Như vậy, sau giai đoạn tăng cường sử dụng vắc xin VNNB để phòng bệnh, các trường hợp HCVNC nghi ngờ do vi rút vẫn chủ yếu được ghi nhận về mùa hè và vi rút Banna được cho là một trong những tác nhân vi rút gây HCVNC về mùa hè.

Trong số các trường hợp xác định dương tính, nhóm có tỷ lệ số mắc cao là nhóm >15 tuổi. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của tác giả Hoàng Minh Đức về sự phân bố theo nhóm tuổi trong HCVNC do vi rút Banna [5]. Tuy nhiên, khi phân tích tỷ lệ mắc trên 100.000 dân theo nhóm tuổi, cho thấy tỷ lệ mắc cao gặp ở nhóm <10 tuổi, cụ thể tỷ lệ mắc cao nhất là nhóm 1-4 tuổi, sau đó đến nhóm 5-9 tuổi, thứ ba là nhóm dưới 1 tuổi, tỷ lệ mắc thấp nhất ở nhóm trên 15 tuổi (bảng 3.13, hình 3.18 và hình 3.19). Kết quả này phù hợp với đặc điểm chung HCVNC do vi rút arbo, gặp chủ yếu ở trẻ em nhóm <15 tuổi [34]. Vi rút Banna đã được phân lập từ

nhều loài muỗi, người bị HCVNC, lợn và gia súc [58], [83],[88]. Đã có bằng chứng về loài *Seadornavirus* ở Bắc Mỹ, Châu Âu và Châu Á, do vậy tỷ lệ mắc HCVNC do Banna có thể tăng lên do chưa có vắc xin phòng bệnh. Vi rút Banna là tác nhân tiềm tàng gây ảnh hưởng đến sức khỏe cộng đồng, có đặc điểm chung của vi rút Arbo gặp chủ yếu vào mùa hè, phân bố khác nhau theo khu vực địa lý, trẻ em là đối tượng có nguy cơ mắc cao nên cần có những biện pháp truyền thông, dự phòng phù hợp đối với vùng lưu hành và những vùng có nguy cơ.

#### **4.1.2.4. Một số đặc điểm hội chứng viêm não cấp do vi rút Nam Định**

Nguyên tắc để chẩn đoán những vi rút Arbo (tính hướng thần kinh) có biểu hiện lâm sàng HCVNC là phát hiện vi rút bằng các phương pháp như phân lập, phát hiện nhanh vi rút bằng kỹ thuật sinh học phân tử, phát hiện kháng thể IgM đặc hiệu kháng vi rút trong DNT hoặc xác định có sự chênh lệch hiệu giá kháng thể của cặp mẫu huyết thanh kép. Trong ba nguyên tắc này, kết quả phân lập được vi rút từ người có ý nghĩa rất quan trọng để xác định nguyên nhân gây bệnh. Tuy nhiên, việc phân lập vi rút từ người bệnh thường ít đạt kết quả đối với vi rút Arbo có tính hướng thần kinh vì hiệu giá của vi rút thường rất thấp khi xuất hiện triệu chứng của bệnh, nên việc phát hiện được IgM kháng vi rút trong dịch não tủy cũng được coi là “tiêu chuẩn vàng” để chẩn đoán. Bình thường dịch não tủy không có kháng thể IgM kháng vi rút, kháng thể chỉ qua hàng rào “máu-não” vào hệ thống thần kinh trung ương để diệt tác nhân gây bệnh, nên khi phát hiện được kháng thể IgM kháng vi rút trong dịch não tủy đồng nghĩa với việc xác định được tác nhân gây bệnh tương ứng với kháng nguyên dùng để phát hiện kháng thể [10],[13].

Vi rút Nam Định là vi rút Arbo, thuộc chi *Alphamesonivirus*1 họ *Mesoniviridae*, đây là vi rút được phân lập trên bệnh nhân đầu tiên vào năm 2002 tại Nam Định, Việt Nam [12]. Trong nghiên cứu này, việc phát hiện IgM kháng vi rút Nam Định được thực hiện bằng kỹ thuật ELISA IgM gián tiếp với kháng nguyên sử dụng cho kỹ thuật được cung cấp từ Viện Y học Nhiệt đới trường đại học Nagasaki Nhật Bản [13].

Kết quả nghiên cứu cho thấy, trong tổng số 594 ca mắc HCVNC, giai đoạn 2004-2017, đã xác định có 28 ca HCVNC do vi rút Nam Định, tỷ lệ xác định dương tính là 4,71% (bảng 3.14), số ca mắc rải rác ở các năm 2004-2006, 2008-2014 và năm 2016 (hình 3.23). Tỷ lệ phát hiện thấp hơn khi so sánh với kết quả nghiên cứu tại miền Bắc Việt Nam giai đoạn 1998-2004, tỷ lệ mắc HCVNC do vi rút Nam Định là 12% các trường hợp HCVNC [13].

Vi rút Nam Định đã được phân lập từ muỗi ở một số nước như Việt Nam, Trung Quốc, Indonexia, Mỹ [9], [128], [138]. Tại Trung Quốc, vi rút Nam Định (NDiV) được phân lập từ *Culex quinquefasciatus* tại Thâm Quyển lần đầu tiên vào năm 2011. So sánh bộ gen của vi rút về trình tự nucleotide và acid amin xác định sự tương đồng giữa vi rút Nam Định phân lập ở Trung Quốc và Việt Nam là trên 94,0% và 89,0% (GenBank KF522691) [138].

Các chủng vi rút Nam Định thuộc loài *Alphamesonivirus-1* có sự phân bố rộng về phạm vi địa lý, vật chủ ở miền Bắc và miền Trung Việt Nam từ *Culex vishnui* và *Culex tritaeniorhynchus*, được thu thập trong quá trình giám sát vi rút VNNB [91]. Tại Indonesia, cũng phân lập được vi rút từ muỗi *Culex vishnui*. Tại Mỹ, bốn chủng vi rút Nam Định cũng được phân lập từ muỗi *Cx. quinquefasciatus* và muỗi *Aedes albopictus* khu vực đô thị Houston trong giám sát vi rút Tây Nile (WNV) năm 2004 và 2010 từ muỗi thu thập trong nhà hoặc gần khu dân cư [128]. Trong nghiên cứu của chúng tôi bước đầu cho thấy HCVNC do vi rút Nam Định cũng có đặc điểm của bệnh do vi rút Arbo, đó là phân bố theo mùa (hình 3.22), tập trung ở đối tượng trẻ em (hình 3.23), tỷ lệ tử vong ở khu vực miền núi cao hơn các khu vực còn lại (hình 3.26).

Vi rút Nam Định gây HCVNC là vi rút mới được phát hiện. Trên thế giới và Việt Nam, các nghiên cứu về đặc điểm dịch tễ, huyết thanh học, lâm sàng và chẩn đoán về HCVNC do vi rút Nam Định còn nghèo nàn do vậy, cần có các nghiên cứu tiếp tục về vi rút học, cơ chế bệnh sinh, nguồn lây, véc tơ truyền bệnh,... để có các biện pháp phòng bệnh đặc hiệu và không đặc hiệu để kiểm soát, bảo vệ sức khỏe cộng đồng.

#### 4.1.2.5. Một số đặc điểm của HCVNC xác định được vi rút gây bệnh

Trong nghiên cứu này, có 302/594 (50,84%) ca bệnh dương tính với ít nhất một trong số tác nhân VNNB, vi rút Banna, vi rút Nam Định và VRĐR. Tỷ lệ phát hiện do vi rút Arbo là 38,89%. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu phân lập và định loại một số loại vi rút Arbo trên muỗi ở tỉnh Bắc Giang 2006-2012 đã phân lập và định loại được 33 chủng vi rút. Trong số các chủng vi rút phân lập được có 4 chủng vi rút VNNB, 4 chủng vi rút Banna và 25 chủng vi rút Nam Định [9].

Vi rút Arbo phân bố trên toàn thế giới, chiếm gần 30% tất cả các bệnh truyền nhiễm mới nổi trong hai thập kỷ qua, nhiều tác nhân mới nổi và tái phát. Ngoài các yếu tố độc lực của vi rút, véc tơ truyền bệnh, vật chủ, khối cảm thụ, khí hậu, địa lý và tình trạng miễn dịch của quần thể vật chủ đóng một vai trò quan trọng trong vòng đời của vi rút Arbo.

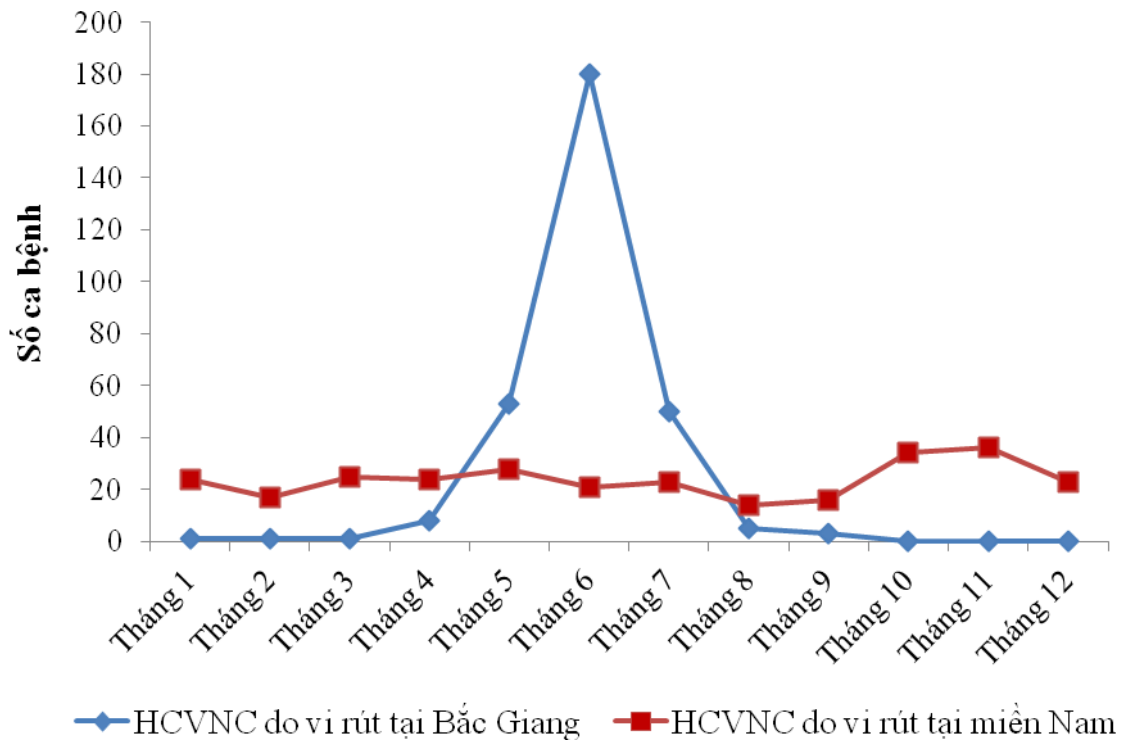
Có hai mô hình truyền bệnh phụ thuộc vào khí hậu đối với vi rút Arbo, ở các khu vực nhiệt đới, vi rút lưu hành quanh năm, thường có đỉnh cao vào mùa hè; ở những vùng khí hậu ôn đới, vi rút được lây truyền giữa các loài vật chủ là động vật có xương sống qua véc-tơ, bệnh chỉ xuất hiện trong những tháng ấm và không có trong những tháng lạnh.

Ngoài yếu tố vi rút, các yếu tố kinh tế xã hội, môi trường và sinh thái góp phần vào sự xuất hiện của các bệnh do vi rút Arbo. Mặt khác, hành vi của con người cũng đóng một vai trò quan trọng trong sự xuất hiện và tái xuất hiện của các bệnh này, du lịch và thương mại hiện đại đã tạo điều kiện thuận lợi cho sự lây lan của bệnh. Biến đổi khí hậu cũng đóng một vai trò quan trọng trong sự xuất hiện và tái xuất hiện của các bệnh do vi rút Arbo. Thời tiết ấm áp đã tạo điều kiện thuận lợi cho sự gia tăng số lượng véc-tơ truyền bệnh, lượng mưa tăng có chu kỳ có liên quan đến chu kỳ bùng phát dịch [34].

**Bảng 4.1. Căn nguyên vi rút gây HCVNC tại Bắc Giang và một số khu vực địa lý khác trên thế giới**

Nghiên cứu	Cỡ mẫu	Phạm vi	Căn nguyên chính		Không rõ nguyên nhân (%)
			Tác nhân	Tỷ lệ (%)	
<i>Bắc Giang</i> (2004-2017)	594	Trẻ em	Arbovirus	38,89	49,16
		Người lớn	Enterovirus	13,13	
			Herpes simplex	0,00	
Son La [6] (2015)	161	Trẻ em	Arbovirus	49,40	50,60
		Người lớn	Herpes simplex	2,80	
			Enterovirus	2,30	
Miền Nam [102] (2004)	194	Trẻ em	Arbovirus	30,60	59,00
			Enterovirus	9,30	
			Herpes simplex	1,03	
Miền Nam [124] (1996-2008)	291	Người lớn	Arbovirus	18,5	68,00
			Herpes simplex	6,50	
			Enterovirus	2,70	
Ấn Độ [59] (2011-2012)	1578	Trẻ em	Arbovirus	27,00	41,60
		Người lớn	Herpes simplex	9,30	
			Enterovirus	0,00	
Mỹ [54] (2011-2014)	26429	Người lớn	Enterovirus	51,60	21,40
			Herpes simplex	8,30	
			Arbovirus	1,10	
Anh [66] (2004-2013)	9941	Trẻ em	Enterovirus	52,00	6,00
		Người lớn	Herpes simplex	29,00	
			Arbovirus	0,00	

Ca bệnh HCVNC do vi rút ghi nhận tăng nhanh vào mùa hè trong các tháng 4-8 và đạt đỉnh cao vào tháng 6. Riêng ba tháng 5-7 số ca mắc chiếm 93,71% số mắc trong năm, đây là những tháng mùa hè, quần thể muỗi vec tơ truyền bệnh phát triển mạnh có thể là điều kiện thuận lợi cho sự gia tăng của bệnh. Như vậy, kết quả nghiên cứu ở Bắc Giang, 2004-2017 của chúng tôi cũng phù hợp với nghiên cứu khác tại miền Bắc Việt Nam về mùa xuất hiện ca bệnh [1], [5], [6]; Nhưng khi so sánh với HCVNC do vi rút tại miền Nam Việt Nam, tỷ lệ mắc ở tất cả các tháng trong năm, cao hơn một chút vào tháng 10 và tháng 11 [124].



**Hình 4.6. So sánh sự phân bố theo tháng HCVNC do một số căn nguyên vi rút xác định tại Bắc Giang (Miền Bắc) và Miền Nam [124]**

Tỷ lệ mắc HCVNC do vi rút gặp ở tất cả các nhóm tuổi. Trong đó tập trung cao ở nhóm dưới 15 tuổi, tỷ lệ mắc trên 100.000 theo nhóm tuổi cao gấp 11,26 lần so với nhóm từ 15 tuổi trở lên, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$  (bảng 3.15). Ca mắc HCVNC do vi rút phân bố ở cả hai giới nam và nữ, nhưng tỷ lệ mắc ở nam (1,65/100.000 nam) cao hơn 1,5 lần so với nữ giới là 1,08/100.000 nữ (bảng



3.15). Kết quả nghiên cứu cũng phù hợp với các nghiên cứu trong và ngoài nước, với tỷ lệ số mắc ở nam cao hơn nữ 1,5-1,9 lần [119], [125], [129]. Phân bố ca bệnh HCVNC do vi rút ở khu vực miền núi là 1,86/100.000 cao hơn 1,6 -1,8 lần so với khu vực thành phố là 1,15/100.000 và khu vực trung du là 1,06/100.000 (bảng 3.15). Có sự chênh lệch này có lẽ do nhận thức và biện pháp phòng bệnh được quan tâm ở những mức độ khác nhau về vệ sinh, môi trường và phòng bệnh chủ động.

#### **4.2. Đặc điểm sinh học phân tử của vi rút viêm não Nhật Bản, vi rút đường ruột gây hội chứng viêm não cấp tại Bắc Giang, 2004-2017**

Trong lĩnh vực vi sinh y học, sinh học phân tử là phương pháp hiện đại nhất để xác định về đặc điểm sinh học phân tử của tác nhân gây bệnh trên cơ sở đó xác định được nguồn gốc của căn nguyên gây bệnh, sự lan truyền của tác nhân gây bệnh theo không gian, thời gian ở mức độ phân tử.

Trong nghiên cứu này phân lập được vi rút VNNB và vi rút đường ruột trong mẫu DNT của bệnh nhân HCVNC, trong giai đoạn 2004-2017 ở Bắc Giang. Do vậy, nguồn mẫu này đã được sử dụng để nghiên cứu về đặc điểm phân tử của vi rút VNNB và vi rút đường ruột gây HCVNC tại Bắc Giang.

##### **4.2.1. Một số đặc điểm sinh học phân tử của vi rút VNNB**

Vi rút VNNB được phân lập đầu tiên từ não tử thi của bệnh nhân tại Nhật Bản năm 1935 là vi rút VNNB GIII, cho đến nay đã xác định vi rút VNNB có 5 genotype nhưng chỉ có 1 typ huyết thanh duy nhất [41], [89], [100]. Trong chẩn đoán VNNB, phân lập vi rút từ mẫu máu và dịch não tủy thường ít đạt được kết quả vì hiệu giá vi rút VNNB trong dịch não tủy và trong mẫu máu thấp do kháng thể xuất hiện sớm sau nhiễm vi rút nhưng kỹ thuật ELISA phát hiện kháng nguyên NS1 (ELISA-NS1) được sử dụng trong chẩn đoán sớm nhiễm một số loại vi rút thuộc chi Flavivirus như vi rút dengue và vi rút VNNB [82]. Đây là loại kháng nguyên liên quan đến quá trình sao chép RNA của vi rút, khi phát hiện có kháng nguyên NS1 là sự chỉ điểm có sự nhân lên của vi rút. Trên thực tế kỹ thuật ELISA-NS1 không được ứng dụng trong chẩn đoán sớm VNNB, nhưng nó rất có ý nghĩa trong việc

phát hiện kháng nguyên vi rút, chỉ điểm cho sự còn hiện diện của vi rút VNNB trong mẫu lâm sàng [4], [82]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng kỹ thuật ELISA-NS1 để phát hiện kháng nguyên vi rút VNNB từ mẫu dịch não tủy của 23 trường hợp VNNB được lựa chọn trong số 120 bệnh nhân VNNB, 2004-2017. Kết quả đã xác định có 04 mẫu dương tính, tỷ lệ xác định dương tính là 17,39% bao gồm 01 mẫu năm 2004, 02 mẫu năm 2007 và 1 mẫu năm 2017 (kết quả bảng 3.16). Nhưng khi sử dụng tế bào C6/36 để phân lập vi rút VNNB, chỉ phân lập được 01/23 chủng vi rút (4,34%). Điều này cho thấy, sử dụng kỹ thuật ELISA-NS1 để sàng lọc mẫu cho kỹ thuật sinh học phân tử phát hiện vật liệu di truyền của vi rút hoặc phân lập vi rút có hiệu quả hơn rất nhiều so với phương pháp phân lập vi rút. Vì phân lập được vi rút VNNB từ mẫu bệnh phẩm lâm sàng của bệnh nhân là rất khó có tính khả thi và không kinh tế. Tương tự như vậy, trong nghiên cứu này, sử dụng kỹ thuật ELISA-NS1 để sàng lọc mẫu cho kỹ thuật phát hiện vật liệu di truyền của vi rút đã đạt được kết quả cao hơn 17,39% so với việc không sàng lọc mẫu chỉ đạt 4,34% [10], cho thấy đây là một chiến lược nên áp dụng trong sàng lọc mẫu để xác định genotype của vi rút VNNB gây bệnh để đạt hiệu quả cao (bảng 3.17).

Phân tích genotype vi rút VNNB dựa trên trình tự nucleotide của toàn bộ gen E của các chủng vi rút VNNB có mã số trên ngân hàng gen quốc tế, đã xác định chủng vi rút VNNB lần đầu tiên được phát hiện trên thế giới vào năm 1935 ở Nhật Bản thuộc genotype III. Sau gần 60 năm, genotype I của vi rút VNNB đã được phát hiện ở Nhật Bản vào năm 1994 từ muỗi. Kết quả nghiên cứu về dịch tễ sinh học phân tử đã xác định sự mới xuất hiện của genotype I ở một số nước vùng Bắc Á và Việt Nam. Cụ thể vi rút VNNB genotype I xuất hiện ở Trung Quốc từ 1979 được xác định với chủng phân lập từ muỗi, ở Nam Triều Tiên năm 1983 với chủng phân lập từ muỗi, còn ở Việt Nam năm 1990 với chủng phân lập từ người bệnh. Ngoài ra, cũng đã phát hiện có sự lưu hành của vi rút VNNB genotype I ở Ấn Độ năm 2009 từ người bệnh [47], [48], [107]. Ngược lại, không phát hiện có sự mới xuất hiện của vi rút VNNB genotype II ở bất cứ nước nào thuộc khu vực bắc Á cũng như không có sự mới xuất hiện của vi rút VNNB genotype III ở Úc trong những thập kỷ vừa

qua kể từ khi chủng vi rút VNNB genotype II đầu tiên được phát hiện ở Úc năm 1995 [110]. Vào năm 2000, đã phát hiện có sự mới xuất hiện vi rút VNNB genotype I ở Úc [100]. Ngoài ra, vi rút VNNB genotype V được phát hiện từ những năm 1950s ở Malaysia và Singapore tương ứng từ muỗi, chim. Trong những năm gần đây, sự xuất hiện của vi rút VNNB genotype V đã được ghi nhận ở một số nước châu Á với các chủng vi rút được phát hiện từ muỗi *Culex* như Hàn Quốc và Trung Quốc [71], [79].

Trước những năm 1990, vi rút VNNB genotype II, IV mới chỉ phát hiện được ở Úc, Malaysia, Indonesia và Thái Lan từ muỗi, lợn. Sự lưu hành của các genotype II và IV cho đến nay vẫn mang tính chất địa phương. Ngược lại, vi rút VNNB genotype III có sự lưu hành rộng rãi ở rất nhiều nước thuộc khu vực châu Á Thái Bình Dương [95], [97], [107], [126], [129]. Tuy nhiên, trong những thập kỷ gần đây, khi vi rút VNNB genotype I xuất hiện ở những vùng trước đây chưa có sự lưu hành của genotype này đã dẫn đến những sự biến động về genotype vi rút VNNB. Đó là sự nổi trội của vi rút VNNB genotype I là tác nhân gây HCVNC được xác định theo phân vùng địa lý và thời gian trong thập kỷ gần đây, cụ thể là tác nhân gây bệnh được ghi nhận ở Đài Loan [38], Trung Quốc [39], [136], Việt Nam [41], Ấn Độ [47], Thái Lan [95], Malaysia [126] và hầu hết các nước ở châu Á [48], [99], [116].

Dựa trên cơ sở dữ liệu ngân hàng gen quốc tế liên quan đến những công trình nghiên cứu về dịch tễ sinh học phân tử của một số nước trong khu vực châu Á Thái Bình Dương và Úc, đã đưa ra những bằng chứng rất sinh động về sự xuất hiện vi rút VNNB genotype I trong tự nhiên, thay thế vi rút VNNB genotype III ở những khu vực trước đây genotype này lưu hành trong những thập kỷ gần đây [41], [99], [107]. Cơ chế cho sự thay đổi này đã được chứng minh trên mô hình thực nghiệm *In-vitro* với một số dòng tế bào, chỉ ra sự cạnh tranh giữa vi rút VNNB genotype I và III trên dòng tế bào muỗi C6/36 dẫn đến sự nổi trội và lấn át của vi rút VNNB genotype I đối với genotype III trên nuôi cấy tế bào [42]. Nếu trước thập kỷ 90, các chủng vi rút VNNB được phân lập từ người bệnh chủ yếu là các vi rút VNNB genotype III,

chỉ có 5 chủng vi rút VNNB genotype I được phân lập ở Thái Lan (đây cũng chính là lý do để chọn các chủng genotype III phát triển vắc xin). Nhưng sau thập kỷ 90, vi rút VNNB genotype I được phát hiện ở nhiều nước châu Á chủ yếu từ muối và lợn nên có giả thiết rằng các chủng vi rút VNNB genotype I thích ứng với muối và lợn hơn là người. Nhưng những nghiên cứu hồi cứu và tiến cứu trong thời gian gần đây đã phát hiện vi rút VNNB genotype I là tác nhân gây bệnh VNNB ở một số nước như Việt Nam [41], Trung Quốc [39], Ấn Độ [47].

**Bảng 4.2. Sự xuất hiện mới các genotype vi rút VNNB ở một số nước châu Á, Thái Bình Dương và miền bắc Úc trong thập kỷ gần đây**

Nước	Thời gian genotype VNNB xuất hiện hoặc được ghi nhận				
	GI	GII	GIII	GIV	GV
Nhật Bản	1994	CPHĐ	1935	CPHĐ	CPHĐ
Trung Quốc	1979	CPHĐ	1948	CPHĐ	2009
Triều Tiên	1983	CPHĐ	1987	CPHĐ	2009
Thái Lan	1963	1983	1964	CPHĐ	CPHĐ
Úc	2000	1995	CPHĐ	CPHĐ	CPHĐ
Malaysia	CPHĐ	1970	1965	1965	1952
Indonesia	CPHĐ	1981	1979	1981	CPHĐ
Ấn Độ	2009	CPHĐ	1956	CPHĐ	CPHĐ
Việt Nam	1990	CPHĐ	1964	CPHĐ	2018*
<b>Bắc Giang (Việt Nam)</b>	<b>2007</b>	<b>CPHĐ</b>	<b>2004</b>	<b>CPHĐ</b>	<b>CPHĐ</b>

Ghi chú: CPHĐ: Chưa phát hiện được; \* Dữ liệu chưa công bố

Trong nghiên cứu về đặc điểm sinh học phân tử vi rút VNNB tại Bắc Giang, vật liệu di truyền của vi rút VNNB được tách chiết từ chủng vi rút phân lập được và

từ mẫu dịch não tủy xác định có kháng nguyên VNNB NS1 để khuếch đại vùng gen E cho kỹ thuật giải trình tự gen. Kết quả phân tích trên cây phát sinh loài xác định chủng vi rút phân lập 2004 có ký hiệu 04VN76 là vi rút VNNB genotype III, còn 03 mẫu vật liệu di truyền của vi rút VNNB 2007 và 2017 đều thuộc genotyp I (hình 3.30, hình 3.31). Khi tiến hành phân tích đặc điểm di truyền của các vi rút VNNB genotype I ở Bắc Giang, cho thấy chúng đều có mối liên hệ gần gũi với các chủng genotype I khác lưu hành tại Việt Nam với độ khác biệt ở mức nucleotide giao động từ 0,3% đến 6,8%, trung bình 3,5%. Còn chủng vi rút VNNB genotype III ở Bắc Giang có mối liên hệ gần gũi với các chủng genotype III khác lưu hành ở Việt Nam ở mức nucleotide giao động từ 0,4% đến 5,6% trung bình là 2,5% (bảng 3.18). Kết quả này cũng phù hợp với nhận định trong những nghiên cứu trước đây xác định sau năm 2004 tại Việt Nam chỉ phát hiện được các chủng VNNB genotype I [41], [92]. Trong khoảng thời gian trước năm 1990, các chủng vi rút VNNB phân lập ở Việt Nam, Nhật Bản, Hàn Quốc chỉ có genotype III. Chủng vi rút VNNB genotype I được phát hiện từ người và muối từ năm 1990 và trong giai đoạn chuyển giao từ năm 1990 đến năm 2004 cả hai kiểu gen genotype I và III đồng lưu hành [41], [52], [89]. Kết quả của nghiên cứu này cũng khẳng định sự lưu hành chiếm ưu thế của kiểu gen genotype I tại Việt Nam hiện nay. Hiện tượng này không chỉ xảy ra tại Việt Nam mà còn xuất hiện ở Hàn Quốc, Ấn Độ, Đài Loan và Nhật Bản [89], [92], [107]. Việc chưa phát hiện được genotype I của vi rút VNNB trên người trước đây được cho rằng vi rút VNNB kiểu gen này thích nghi trên quần thể muối và lợn hơn quần thể người và ít có khả năng gây bệnh cho người như genotype III.

Bằng mô hình toán tin học, các nhà khoa học Trung Quốc đã tính toán và xác định genotype Ib xuất hiện đầu tiên ở Việt Nam có thể vào những năm 1953 và từ đó lan rộng ra các nước khác trong khu vực châu Á như Trung Quốc, Nhật Bản, Nam Triều Tiên, Thái Lan,.. và trở thành genotype nổi trội lưu hành ở châu Á (hình 4.7) [107].



**Hình 4.7. Sự lan truyền và phân bố của vi rút VNNB genotype Ib ở châu Á [107]**

Trong nghiên cứu này, chúng tôi phát hiện được vi rút VNNB genotype I trực tiếp từ 3 mẫu dịch não tủy của bệnh nhân VNNB (bảng 3.17). Kết quả này khẳng định vi rút VNNB genotype I là tác nhân gây HCVNC trên người tương tự như vi rút VNNB genotype III. Trên thực tế, khi gây nhiễm chủng vi rút VNNB genotype I trên chuột ỏ, thời gian chuột bị ốm, liệt sau gây nhiễm vi rút là 3-4 ngày tương tự như các chủng vi rút VNNB genotype III [15].

Vi rút VNNB genotype I có hai phân nhóm a và b. Phân nhóm genotype Ia bao gồm các chủng vi rút VNNB phát hiện ở Thái Lan trước 1970 và ở Úc năm 2000. Còn phân nhóm genotype Ib bao gồm các chủng vi rút VNNB phát hiện ở Việt Nam, Nhật Bản, Triều Tiên, Trung Quốc và Thái Lan từ năm 1979 đến nay [52], [89], [107].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, các vi rút VNNB gây HCVNC ở Bắc Giang được xác định thuộc về phân nhóm genotype Ib, phù hợp với công bố về genotype vi rút VNNB tại Việt Nam [7], [15], [41], [92].

Phân tích một số biến đổi về acid amin của các vi rút VNNB GI ở Bắc Giang xác định có 8 vị trí thay đổi acid amin nhưng chúng đều là sự thay thế không bảo tồn (bảng 3.19). Kết quả phân tích haplotype của vi rút VNNB tại Bắc Giang đều cho kết quả là NKSS. Đây là kiểu haplotype đặc trưng cho kiểu gen GI với điểm đặc biệt của kiểu haplotype này là có chứa asparagine (N) ở vị trí acid amin 123. Vị trí acid amin 123 quyết định khả năng nhân lên cũng như khả năng gây bệnh của vi rút VNNB [121], [134]. Vị trí 123 nằm trên domain II, có vai trò quan trọng trong việc hình thành cấu trúc bậc 2 của protein E, đồng thời, việc thay đổi acid amin trên domain II cũng ảnh hưởng đến độc lực của vi rút do ảnh hưởng đến cấu trúc không gian của vi rút [72]. Theo y văn, cho đến nay mới chỉ phát hiện được 04 chủng VNNB có chứa asparagine ở vị trí 123 trên quần thể người bao gồm 01 chủng phát hiện được tại Thái Lan năm 1985, 02 chủng tại Trung Quốc và 01 chủng phát hiện được tại Việt Nam năm 2007 (Human/07VN72/VNM/2007: mã số GenBank LC000634) [134], [136]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tìm được thêm 3 mẫu vi rút VNNB nữa có chứa asparagine (N) ở vị trí acid amin 123, nâng tổng số vi rút/chủng VNNB GI tìm được trên quần thể người có acid amin. Mặc dù sự thay đổi acid amin tại vị trí 123 từ serine (S) sang asparagine (N) được chứng minh là không làm thay đổi nhiều khả năng nhân lên của vi rút VNNB trên tế bào động vật có vú cũng như độc tính của chúng trên chuột [121]. Tuy nhiên, việc thay đổi acid amin từ serin (acid amin trung tính) sang asparagine (acid amin có tính acid) có thể làm thay đổi pH tối ưu cho quá trình thay đổi cấu trúc không gian của vi rút trước khi hòa màng [134]. Với xu thế nổi trội của kiểu gen GI hiện nay trên toàn thế giới, đặc biệt là trên người, việc giám sát dịch tễ sinh học phân tử của vi rút VNNB cần được tiến hành chặt chẽ để có thể dự đoán được xu hướng thay đổi độc tính cũng như khả năng nhân lên của vi rút VNNB trên vật chủ.

#### 4.2.2. Một số đặc điểm sinh học phân tử của vi rút đường ruột

Vi rút đường ruột là tác nhân gây bệnh phổ biến nhất ở người, là một trong số căn nguyên gây bệnh và tử vong trên toàn thế giới với một số loại VRĐR gây ra bệnh cảnh lâm sàng nặng đã được ghi nhận như EV-71, 68..., là tác nhân gây bệnh mới nổi cần được quan tâm giám sát vi rút học [74], [78], [101], [103], [106].

Ngoài hệ thống giám sát cho bệnh bại liệt, một số quốc gia đã thiết lập các chương trình giám sát toàn diện về sự lưu hành của VRĐR không phải là vi rút bại liệt để đáp ứng với sự xuất hiện của bệnh tay, chân, miệng (HFMD) do một số typ VRĐR gây ra ở khu vực Châu Á-Thái Bình Dương. Mặc dù bại liệt đã được loại bỏ ở hầu hết các quốc gia, gánh nặng của tình trạng liệt cấp tính vẫn còn cao, với nhiều trường hợp liên quan đến VRĐR không thuộc nhóm vi rút Polio [101].

Nhiễm VRĐR thường là thể ẩn không có triệu chứng, nhưng cũng có thể biểu hiện bệnh cảnh lâm sàng từ mức độ nhẹ chỉ có sốt đơn thuần đến những trường hợp có triệu chứng lâm sàng nặng, nghiêm trọng có thể gây tử vong khi có hiện tượng nhiễm trùng hệ thống thần kinh trung ương gây viêm não, màng não, liệt [101]. Vi rút đường ruột nhóm A có liên quan đến bệnh HFMD, nhóm B có liên quan đến viêm não-màng não, nhóm C có liên quan đến bại liệt và nhóm D có liên quan đến với nhiễm trùng đường hô hấp [54], [65], [78]. Ở Việt Nam, VRĐR nhóm A với các typ vi rút được ghi nhận phổ biến nhất là EV-71, Coxsackievirus A16 (CV-A16), CV-A10 và CV-A6, đây là những chủng có liên quan đến sự bùng phát của các vụ dịch HFMD ở trẻ em. Ngoài ra VRĐR cũng đã được phát hiện trong các nghiên cứu bệnh lý về HCVNC do nhiễm vi rút hô hấp [90].

Mặc dù VRĐR có mặt khắp mọi nơi nhưng một số kiểu huyết thanh có thể chiếm ưu thế ở một khu vực cụ thể và một số khác gây bệnh mang tính chu kỳ. Giám sát dịch tễ học liên tục là điều cần thiết để xác định các tít huyết thanh mới hoặc các biến thể liên quan đến một ổ dịch và mô hình bệnh tật của chúng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi chỉ xác định được tít huyết thanh của 19,2% số mẫu dương tính với VRĐR gây HCVNC. Tải lượng của vi rút trong dịch



não tủy của bệnh nhân HCVNC thường rất thấp, thời gian tồn tại ngắn, do đó việc định tít vi rút trực tiếp từ mẫu lâm sàng thường không có hiệu quả. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập các mẫu dương tính với VRĐR bằng kết quả realtime RT-PCR nhằm khuếch đại vật liệu di truyền của vi rút trong mẫu nuôi cấy, tăng khả năng thành công cho việc giải trình tự toàn bộ vùng gen VP1 của chủng VRĐR.

Dựa trên phân tích đặc điểm phân tử của VRĐR trong nghiên cứu này cho thấy các chủng VRĐR phân lập tại Bắc Giang thuộc về VRĐR nhóm B. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với các công trình nghiên cứu và giám sát dịch tễ học phân tử các VRĐR trên thế giới với nhóm B là nhóm chiếm ưu thế gây HCVNC [73], [74], [137]. Các tít huyết thanh phát hiện được là E6, E30, E33 và E4 trong đó E30 chiếm ưu thế nhất với tỷ lệ là 46,7%, tiếp đến là E6 với tỷ lệ 33,3%. Chủng VRĐR E30 phát hiện được trong các năm từ 2006-2014. So với kết quả nghiên cứu năm 2003 phát hiện VRĐR từ dịch não tủy bệnh nhân HCVNC, E30 chiếm tỷ lệ ưu thế gần như tuyệt đối (96,6%), còn lại là E6 như vậy kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy có sự gia tăng của E6 [21]. E33 cũng được xác nhận là nguyên nhân gây HCVNC tại Bắc Giang trong nghiên cứu này, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu độc lập của Viện Pasteur Paris [90]. Ngoài ra, nghiên cứu này còn phát hiện thêm cả sự lưu hành của E4 trên các bệnh nhân HCVNC. Đây là lần đầu tiên tại Việt Nam phát hiện được E4 là tác nhân gây HCVNC, bổ sung thêm vào dữ liệu của ngân hàng Genbank vì cho đến nay mới chỉ có 10 chủng E4 được công bố trên Genbank. Kết quả của nghiên cứu cũng tương đồng với các nghiên cứu trên thế giới cho thấy E30 và E6 là tít gây HCVNC phổ biến nhất trên toàn cầu, bao gồm cả các nước ở khu vực châu Âu, châu Mỹ, châu Á và châu Phi.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi không tìm thấy chủng VRĐR EV-71 nào trong các ca HCVNC mặc dù vi rút EV-71 thường xuyên gây dịch tay chân miệng tại Việt Nam. Có rất nhiều giả thuyết đã được đưa ra liên quan đến việc khó phát hiện được VRĐR EV-71 trong mẫu dịch não tủy của bệnh nhân HCVNC liên quan

đến đặc điểm chủng EV-71, đặc điểm lâm sàng, kỹ thuật chẩn đoán. Trong khi độ nhạy của kỹ thuật PCR phát hiện các VRĐR khác không phải EV-71 trong dịch não tủy thường rất cao (76-100%) thì độ nhạy của kỹ thuật PCR phát hiện EV-71 trong dịch não tủy thường không cao, tỷ lệ phân lập thành công EV-71 trong dịch não tủy chỉ ở mức 0-3%. Nguyên nhân của hiện tượng này chưa được giải thích rõ ràng nhưng giả thuyết được đưa ra là do tải lượng vi rút EV-71 trong dịch não tủy rất thấp, thời gian xuất hiện của EV-71 trong dịch não tủy rất ngắn hoặc chỉ thoáng qua, bệnh cảnh lâm sàng của HCVNC do EV-71 thường khác biệt so với HCVNC do các VRĐR cũng như các vi rút khác nên các ca bệnh do EV-71 không được lựa chọn vào nghiên cứu này.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân tích đặc điểm phân tử của toàn bộ vùng gen VP1 của VRĐR, vùng gen có vai trò quan trọng trong cơ chế sinh miễn dịch với VRĐR. Kết quả nghiên cứu cho thấy các chủng VRĐR E30 tại Bắc Giang từ 2004-2017 có mức độ tương đồng về mặt di truyền của chúng là 94,1%-94,5%. Sự khác biệt về mặt di truyền này cũng không khác biệt quá nhiều với các nước khác trên thế giới, tương ứng với hai phân nhóm là 91,6% và 95%. Điều này cho thấy, các chủng VRĐR lưu hành tại Bắc Giang nói riêng và Việt Nam nói chung không có sự khác biệt so với các chủng trên thế giới, chúng chưa tiến hóa thành một phân nhóm độc lập đặc trưng cho Việt Nam mà có mối quan hệ di truyền gần gũi với thế giới.

Độ tương đồng của các chủng E6 tại Bắc Giang khá cao (97,6%), chúng bao gồm các chủng VRĐR lưu hành được trong hai năm 2006 và 2012 trong đó các chủng 2012 có độ tương đồng là 100% và độ tương đồng với chủng năm 2006 là 94%. Mặc dù trên cây phát sinh loài cũng như xét về độ tương đồng thì dường như các chủng tại Bắc Giang tạo thành phân nhóm riêng biệt nhưng do số lượng chủng không nhiều, độ tương đồng giữa các chủng Bắc Giang với các chủng khác trên thế giới cũng là 89,9% nên chưa có thể đưa ra giả thuyết là các chủng E6 tại Bắc Giang là các chủng nội địa. Đối với các chủng E33 cũng tương tự như vậy do cả hai chủng E33 đều phát hiện được vào năm 2012.

Các nghiên cứu về VRĐR hiện nay tại Việt Nam tập trung chủ yếu vào các căn nguyên gây bệnh tay–chân–miệng và đặc điểm sinh học phân tử của EV-71. Nghiên cứu này tuy chỉ tập trung vào các trường hợp HCVNC ở tại một địa phương nhưng nó là một trong số ít những nghiên cứu phân tích đặc điểm phân tử của các týp huyết thanh gây HCVNC. Kết quả nghiên cứu này sẽ đóng góp lớn vào việc kiểm soát HCVNC và dự đoán về týp huyết thanh VRĐR đối với HCVNC trong tương lai tại Bắc Giang nói riêng và toàn quốc nói chung. Đặc biệt với kết quả lần đầu tiên phát hiện có sự lưu hành của E4 là tác nhân gây HCVNC ở Việt Nam, điều này cho thấy có thể còn các týp VRĐR khác lưu hành và gây HCVNC ở Việt Nam nhưng chưa được phát hiện ví dụ như E18 đã được phát hiện ở Trung Quốc cũng là tác nhân gây HCVNC trong những năm gần đây [118].

Với sự đa dạng của các týp VRĐR thuộc các nhóm A-D được xác định từ mẫu bệnh phẩm lâm sàng của bệnh nhân bị HCVNC cho thấy cần có nghiên cứu tiếp theo về cơ chế bệnh sinh, độc lực, đường truyền cũng như cần nghiên cứu về các yếu tố liên quan đến những thay đổi cấu trúc của vi rút như tính kháng nguyên, độc lực, ái tính, và yếu tố liên quan đến con người như tình trạng vệ sinh cá nhân, khả năng miễn dịch. Mặt khác, những cải tiến trong giám sát, điều tra dịch tễ học, đặc tính di truyền và đặc điểm kháng nguyên của quần thể các vi rút thuộc các nhóm týp huyết thanh VRĐR sẽ giúp làm sáng tỏ cơ chế gây bệnh và phát triển dịch, trên cơ sở này có thể tiến tới kiểm soát dịch bệnh và chiến lược phát triển vắc-xin phòng bệnh chủ động đối với VRĐR.

#### **4.3. Ưu điểm và hạn chế của nghiên cứu**

*Nghiên cứu có các ưu điểm sau:*

- Nghiên cứu có được số liệu toàn tỉnh Bắc Giang một cách có hệ thống trong khoảng thời gian 14 năm, 2004-2017.
- Số liệu được thu thập theo qui trình giám sát chuẩn của Bộ Y tế và Tổ chức Y tế thế giới.

- Kết quả xét nghiệm đáng tin cậy do sử dụng các kỹ thuật hiện đại, được thực hiện tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, tại phòng thí nghiệm đạt chuẩn quốc gia về Trung tâm y tế dự phòng tuyến tỉnh.

*Tuy nhiên, nghiên cứu vẫn còn một số hạn chế sau:*

- Nghiên cứu chưa xác định được tất cả các nguyên nhân gây HCVNC tiềm ẩn ở Bắc Giang, hoặc các nguyên nhân không nhiễm trùng (mới loại trừ dựa vào mẫu dịch não tủy trong, không màu).

- Các trường hợp không được chẩn đoán xác định phòng xét nghiệm có thể do các tác nhân gây bệnh mới xuất hiện mà không bị phát hiện.

Mặc dù có các hạn chế nêu trên, nhưng nghiên cứu vẫn cung cấp các bằng chứng khoa học đáng tin cậy về các nguyên nhân vi rút gây HCVNC ở Bắc Giang, với tỷ lệ chẩn đoán xác định là 50,84% là nghiên cứu có ý nghĩa quan trọng trong việc kiểm soát HCVNC bảo vệ sức khỏe cộng đồng.

## KẾT LUẬN

### **1. Xác định một số căn nguyên vi rút Arbo, vi rút đường ruột, vi rút Herpes gây hội chứng viêm não cấp tại Bắc Giang, 2004-2017**

- Trong giai đoạn 2004-2017, tỷ lệ mắc HCVNC tại Bắc Giang là 2,67/100.000 dân.

- Có 50,84% (302/594) các trường hợp HCVNC xác định được nguyên nhân gồm có 4 tác nhân đó là vi rút VNNB là 20,20%; vi rút Banna là 18,86%; VRĐR là 13,13%; vi rút Nam Định là 4,71%; Trong nghiên cứu này chưa phát hiện được vi rút Herpes gây HCVNC.

- Một số đặc điểm của HCVNC do 4 tác nhân vi rút đã được xác định, chủ yếu tập trung ở nhóm tuổi dưới 15, tỷ lệ số mắc ở nam cao hơn nữ, chủ yếu xảy ra trong mùa hè từ tháng 4 đến tháng 8, đỉnh cao vào tháng 6 và xuất hiện ở 10/10 huyện, thành phố của tỉnh Bắc Giang.

- Các trường hợp bị VNNB có 64,17% là không tiêm phòng vắc xin phòng bệnh; 35,83% là tiêm vắc xin không đầy đủ, hoặc không tiêm nhắc lại để củng cố miễn dịch. Nghiên cứu xác định có sự dịch chuyển nhóm tuổi mắc viêm não Nhật Bản theo chiều hướng ở nhóm tuổi cao hơn.

### **2. Một số đặc điểm phân tử vi rút viêm não Nhật Bản, vi rút đường ruột gây hội chứng viêm não cấp tại Bắc Giang, 2004-2017**

- Đặc điểm phân tử của vi rút VNNB: Trong giai đoạn 2004-2017 đã xác định có vi rút VNNB GI và GIII lưu hành ở Bắc Giang gây HCVNC. Chúng vi rút VNNB phân lập 2004 thuộc genotype III và 3 mẫu vi rút VNNB phát hiện từ dịch não tủy bệnh nhân VNNB, 2007 và 2017 đều thuộc genotype I, phân nhóm GI-b.

+ Sự khác biệt về trình tự nucleotide giữa các chủng vi rút VNNB genotype III ở Bắc Giang và các khu vực khác của Việt Nam là 2,5%.

+ Sự khác biệt về trình tự nucleotide giữa các mẫu vi rút VNNB GI tại Bắc Giang với các chủng vi rút VNNB GI khác tại Việt Nam và các chủng GI-b trong khu vực là 3,5%-6,1% với 8 vị trí thay đổi acid amin với kiểu thay thế không bảo

tồn. Phân tích haloptype của ba mẫu vi rút tại 4 vị trí acid amin tương ứng là 123, 209, 227 và 408, cả ba chủng đều có haloptype là NKSS.

- Đặc điểm phân tử của vi rút đường ruột: Vi rút đường ruột gây HCVNC được phát hiện ở Bắc Giang, 2004-2017 thuộc về nhóm B.

+ Phát hiện được 4 týp VRĐR gây HCVNC đó là E6, E30, E33 và E4; E6 và E30 chiếm ưu thế nhất với tỷ lệ lần lượt là 46,7% và 33,3%. Týp E33 chiếm tỷ lệ 13,3% và lần đầu tiên phát hiện được chủng E4 ở Việt Nam với tỷ lệ là 6,7%.

+ Týp E30 phát hiện rải rác trong nhiều năm và có độ tương đồng cao với các chủng lưu hành trên thế giới (91,6%- 95%). Týp E30 thuộc về hai phân nhóm khác nhau với độ khác biệt ở mức nucleotide là 8,3%.

+ Týp E6 phát hiện trong hai năm 2006 và 2012 có độ tương đồng 97,6%. E33 phát hiện năm 2012 và E4 phát hiện năm 2009.

+ Độ tương đồng của các chủng E6, E33 và E4 so với các chủng cùng týp huyết thanh trên thế giới tương ứng là 89,9%; 85,3% và 87,2%.

## KIẾN NGHỊ

1. Trong nghiên cứu này mới phát hiện được 4 tác nhân gây HCVNC, còn khoảng 50% số trường hợp HCVNC chưa được xác định căn nguyên, cho thấy cần có nghiên cứu tiếp theo để xác định thêm căn nguyên vi rút gây HCVNC ở Bắc Giang. Trong số các tác nhân phát hiện gây HCVNC ở Bắc Giang, có tác nhân vi rút VNNB đã có vắc xin dự phòng, nhưng có trên 60% số trường hợp bị bệnh do chưa được sử dụng vắc xin đúng/đầy đủ theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Cần tiếp tục tăng cường sử dụng vắc xin VNNB để chủ động phòng bệnh có hiệu quả và một số biện pháp dự phòng khác với VRĐR và vi rút Banna.
2. Nghiên cứu về đặc điểm phân tử của một số vi rút gây HCVNC cho thấy các vi rút đường ruột phát hiện ở Bắc Giang có độ tương đồng cao với các vi rút trong khu vực và các nước láng giềng, cho thấy cần tăng cường dự phòng bệnh với những tác nhân lây truyền trực tiếp khi chưa có vắc xin dự phòng. Ngoài ra, việc phát hiện typ E4 gây HCVNC cho thấy có thể còn tiềm tàng các typ VRĐR khác gây HCVNC, cần tiếp tục có những nghiên cứu về vi rút học để xác định.

## CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Dương Thị Hiền, Đặng Thanh Minh, Đỗ Phương Loan, Bùi Minh Trang, Nguyễn Thành Luân, Phan Thị Ngà, Viên Quang Mai, (2018), “*Xác định một số căn nguyên vi rút Arbo, vi rút đường ruột và vi rút herpes gây hội chứng viêm não cấp tại Bắc Giang, 2004-2017*”, *Tạp chí Y học dự phòng*, tập 28(6): 9-17.
2. Dương Thị Hiền, Đỗ Phương Loan, Nguyễn Thành Luân, Bùi Minh Trang, Phan Thị Ngà, (2018), “*Một số đặc điểm phân tử của vi rút viêm não Nhật Bản tại tỉnh Bắc Giang, 2004-2017*”, *Tạp chí Y học dự phòng*, tập 28(7): 105-114.
3. Dương Thị Hiền, Đỗ Phương Loan, Phạm Hồng Quỳnh Anh, Bùi Minh Trang, Phan Thị Ngà, (2019), “*Một số đặc điểm dịch tễ và phân tử của vi rút đường ruột gây hội chứng viêm não cấp tại tỉnh Bắc Giang, 2004-2017*”, *Tạp chí Y học dự phòng*, tập 29 (3): 9-17.



## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### TIẾNG VIỆT

1. Phạm Nhật An (2016), *Bệnh viêm não trẻ em*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
2. Đặng Đức Anh, Nguyễn Thị Hồng Hạnh và Phan Thị Ngà (2010), *Vi rút Y học*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
3. Bộ Y tế, Niên giám thống kê Bệnh truyền nhiễm 1995-2017 - Bệnh viêm não Vi rút.
4. Trần Như Dương, Dương Thị Hồng, Phan Thị Ngà (2016), *Vi rút viêm não Nhật Bản, giám sát và các kỹ thuật xét nghiệm*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội
5. Hoàng Minh Đức, Trần Văn Ban, Đỗ Thiện Hải và các cộng sự (2012), "Một số đặc điểm lâm sàng, dịch tễ hội chứng não cấp do vi rút Banna ở Việt Nam", *Tạp chí Y học dự phòng*, Tập 22 số 8 (135): 198-207.
6. Phạm Thị Cẩm Hà, Ngũ Duy Nghĩa, Nguyễn Thu Thủy, Nguyễn Thị Hiền Thanh, Nguyễn Thị Thường, Nguyễn Tiến Dũng, Trần Như Dương (2016), "Một số đặc điểm dịch tễ học và căn nguyên của viêm não vi rút tại Sơn La năm 2015", *Tạp chí Y học dự phòng*, Tập 26, số 10 (183): 65-73.
7. Dương Thị Hiền, Đặng Thanh Minh, Bùi Minh Trang, Nguyễn Thành Luân, Phan Thị Ngà (2016), "Một số đặc điểm dịch tễ học bệnh viêm não Nhật Bản và hiệu quả phòng bệnh bằng vắc xin tại ở Bắc Giang, 2006-2015", *Tạp chí Y học dự phòng*, tập XXVI, số 10 (183): 50-59.
8. Phùng Tiến Hội, Hà Tấn Dũng và cộng sự (2000), "Tình hình bệnh viêm não Nhật Bản/Hội chứng não cấp tại Bắc Giang từ 1995-1999", *Tạp chí Y học dự phòng*, tập X, số 3 (46): 39-45.
9. Đỗ Phương Loan, Bùi Minh Trang và Phan Thị Ngà (2012), "Phân lập định loại vi rút Arbo trên muỗi ở tỉnh Bắc Giang, 2006-2012", *Tạp chí y học dự phòng*, Tập 22 số 8 (135): 261-268.

10. Phan Thị Ngà và Mary B.Crabtree (2004), "Ứng dụng kỹ thuật RT-PCR phát hiện vật liệu di truyền của một số virus gây hội chứng não cấp ở Việt Nam", *Tạp chí y học dự phòng*, Tập 16 số 6 (70): 5-10.
11. Phan Thị Ngà, Vũ Sinh Nam và Masahiro Takagi (2004), "Nghiên cứu sự tồn tại của vi rút viêm não Nhật Bản trong tự nhiên", *Tạp chí Y học dự phòng*, Tập 14, số 1 (64): 21-26.
12. Phan Thị Ngà và K. Morita (2004), "Phát hiện vi rút viêm não mới từ dịch não tủy của bệnh nhân có hội chứng não cấp ở miền Bắc Việt Nam", *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, Số 29 (3): 13-17.
13. Phan Thị Ngà và Đoàn Hải Yến (2005), "Chế tạo kháng nguyên vi rút Nam Định góp phần chẩn đoán căn nguyên vi rút gây hội chứng não cấp", *Tạp chí Vệ sinh phòng dịch*, Tập 15, số 5 (70): 62-67.
14. Phan Thị Ngà, Nguyễn Thanh Thủy, Bùi Minh Trang và các cộng sự (2007), "Phát hiện một thành viên vi rút thuộc họ *Reoviridae* gây hội chứng não cấp ở tỉnh Gia Lai", *Tạp chí Y học dự phòng*, Tập 17 số 2 (87): 5-10.
15. Phan Thị Ngà, Đỗ Phương Loan, Nguyễn Việt Hoàng, Bùi Minh Trang, Lê Thị Hiền Thu, Tống Thị Hà và cộng sự (2008), "Nghiên cứu dịch tễ học phân tử vi rút viêm não Nhật Bản và xác định vai trò gây bệnh của vi rút viêm não Nhật Bản genotyp 1", *Tạp chí Y học dự phòng*, Tập 18 số 3 (95): 5-10.
16. Phan Thị Ngà, Đỗ Phương Loan, Nguyễn Việt Hoàng và các cộng sự. (2010), "Hiệu quả phòng bệnh viêm não Nhật Bản bằng vắc xin ở một số tỉnh, miền Bắc Việt Nam, 1998 – 2007", *Tạp chí Y học dự phòng*, Tập 20 số 5 (113): 29- 35.
17. Phan Thị Ngà, Đỗ Phương Loan, Bùi Minh Trang, Đoàn Hữu Thiển, Hoàng Minh Đức, Vũ Sinh Nam (2012), "Xác định một số đặc điểm phân tử các chủng vi rút Banna phân lập từ bệnh nhân hội chứng não cấp ở Việt Nam", *Tạp chí Y học dự phòng*, Tập 22 số 8 (135): 179-187.
18. Phan Thị Ngà, Đỗ Phương Loan, Hoàng Minh Đức, Vũ Sinh Nam (2012), "Nghiên cứu dịch tễ học phân tử vi rút Banna ở Việt Nam", *Tạp chí Y học dự phòng*, Tập 22 số 8 (135): 188-197.

19. Phan Thị Nga, Đỗ Phương Loan, Nguyễn Hải Tuấn, Bùi Minh Trang, Nguyễn Viết Hoàng, Đặng Thị Thu Hằng, Đặng Thị Trang, Nguyễn Văn Thơm, Lâm Văn Tuấn, Dương Thị Hiền, Đặng Thanh Minh, Nguyễn Trần Hiền (2013), "Tác động của vắc xin phòng viêm não Nhật Bản đến đặc điểm dịch tễ huyết thanh học của viêm não Nhật Bản ở Việt Nam", *Tạp chí Y học dự phòng*, Tập 23 số 11 (147): 63–70.
20. Lê Hồng Phong, Trần Văn Tiến, Hoàng Thủy Nguyên, Phan Thị Nga và Vũ Sinh Nam (1996), "Bệnh viêm não Nhật Bản ở miền Bắc Việt Nam 1988-1992", *Vệ sinh Phòng dịch*, 6 (2): 11-15.
21. Nguyễn Thị Hiền Thanh (2003), "Bước đầu tìm hiểu căn nguyên gây viêm màng não ở trẻ em do một số vi rút đường ruột", *Tạp chí Y học dự phòng*, Tập 8 số 4 (6): 5-12.
22. Phạm Quang Thái (2015), Một số đặc điểm dịch viêm não Nhật Bản tại Sơn La năm 2014, *Tạp chí Y học dự phòng*, ISSN 0868-2836, Tập XXV, số 8 (168): 179-185.
23. Nguyễn Thanh Thủy, Bùi Minh Trang, Nguyễn Thị Tuấn và các cộng sự (2008), "Đặc điểm hình thái và sự nhân lên của vi rút Banna trên tế bào muỗi *Aedes albopictus* dòng C6/36", *Tạp chí Y học dự phòng*, tập số 18, số 5(91): 35-40.
24. Nguyễn Thị Thường (2006), "Một số đặc điểm họ Herpesviridae gây bệnh ở người", *Tạp chí y học dự phòng*, Tập 16 số 3,4 (83): 54-58.
25. Đặng Thị Trang, Nguyễn Văn Thơm, Phan Thị Nga (2012), "Hiệu quả phòng bệnh bằng vắc xin viêm não Nhật Bản bất hoạt để phòng bệnh cho trẻ 1-5 tuổi, ở tỉnh Thái Bình, 2004-2010", *Tạp chí Y học dự phòng*, Tập 22 số 4 (131): 78-83.
26. Nguyễn Thị Tuấn, Đỗ Phương Loan, Bùi Minh Trang, Nguyễn Viết Hoàng, Lê Thị Hiền Thu, Phan Thị Nga (2009), "Xác định sự lưu hành của vi rút Banna ở Việt Nam và thử nghiệm chế tạo kháng thể kháng vi rút", *Tạp chí Y học dự phòng*, Tập 19 số 8 (107): 15-18.

27. Nguyễn Thu Yên, Trần Văn Tiến, Huỳnh Phương Liên và các cộng sự (2000), "Hiệu quả phòng bệnh VNNB ở huyện Gia Lương, Bắc Ninh sau 5 năm gây miễn dịch bằng vắc xin VNNB do Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương sản xuất", *Tuyển tập công trình 1997 - 2000 Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.

## TIẾNG ANH

28. Ai J., Xie Z., Liu G., Chen Z., Yong Y., Li Y., Chen J., Zheng G. and Shen K., (2017), "Etiology and prognosis of acute viral encephalitis and meningitis in Chinese children: a multicentre prospective study", *BMC Infectious Diseases*, 17:494
29. Anders H., Paul B. and Birgit S. (2007), "Herpes Simplex Encephalitis in Sweden, 1990–2001: Incidence, Morbidity, and Mortality", *Clin Infect Dis*, 45 (7): 875-80.
30. Arai S., Matsunaga Y., Takasaki T. (2008), "Japanese encephalitis: surveillance and elimination effort in Japan from 1982 to 2004", *Jpn J Infect Dis*, 61(5): 333-8.
31. Arvin A., Gabriella C., Edward M. et al. (2007), Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis, *Cambridge University Press*, Cambridge.
32. Attoui H., Billoir F., Biagini P. et al. (2000), "Complete sequence determination and genetic analysis of Banna virus and Kadipiro virus: proposal for assignment to a new genus (seadornavirus) within the family Reoviridae", *J. Gen Virol*, 81: 1507-1515.
33. Bradshaw M.J., Venkatesan A.(2016), "Herpes Simplex Virus-1 Encephalitis in Adults: Pathophysiology, Diagnosis, and Management", *Neurotherapeutics*,13(3):493-508.
34. Bradley S.H. (2010), "Arboviral Encephalitides: Transmission, Emergence, and Pathogenesis", *J. Neuroimmune Pharmacol*, 5(3): 428–442.

35. Brunel D., Leveque N., Jacques J. et al. (2008), "Clinical and virological features of an aseptic meningitis outbreak in North-Eastern France, 2005", *J. Clin Virol*, 42: 225-228.
36. Campbell G.L., Hills S.L., Fischer M. et al., (2011), "Estimated global incidence of Japanese encephalitis: A systematic review", *Bulletin of the World Health Organization*, 89(10): 766-774.
37. Chayavichitsilp P., Buckwalter J.V., Krakowski A.C. et al. (2009), "Herpes simplex", *Pediatr Rev.*, 30(4): 119-129.
38. Chen Y.Y., Fan Y.C., Tu W.C. et al. (2011), "Japanese encephalitis virus genotype replacement, Taiwan, 2009-2010", *Emerging Infectious Disease Journal*, 17(12): 2354-2356.
39. Chen N., Yu Y.X. (2013), "Progress in the research of phenotype and genotype of Japanese encephalitis virus in China", *Chinese Journal of Virology*, 29(4): 457-464
40. Dalwai A., Ahmad S., Pacsa A., Al-Nakib W.(2009), "Echovirus type 9 is an important cause of viral encephalitis among infants and young children in Kuwait", *J Clin Virol*, 44:48–51.
41. Do P.L., Bui M.T., Hasebe F., Morita K., Phan T.N. (2015), "Molecular epidemiology of Japanese encephalitis in northern Vietnam, 1964-2011: Genotype replacement", *Virology Journal*, DOI 10.1186/s12985-015-0278-4.
42. Do P.L., Bui M.T., Phan T.N. (2016), "Mechanism of Japanese encephalitis virus genotypes replacement based on human, porcine and mosquito-originated cell lines model", *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(4): 333-336.
43. Elizabeth T., Rogawski M. K., Syed S.A., Sanjay C., Tapan N. D., Shaikh S. H, and Sampath K.K. (2013), "Acute Encephalitis Syndrome Surveillance, Kushinagar District, Uttar Pradesh, India, 2011–2012", *Emerging Infectious Disease Journal*, 9(9): 1361-1367.

44. Field N.B., et al (2007), *Fields Virology*, Fifth Edition Volume I&II: 795-839, 1101-113, 1853-1909, 2479-2609, 2701-2778.
45. Florian P., Marco G., Andreas S., Roland Z. (2016). Genotyping of herpes simplex virus type 1 by whole-genome sequencing. . *J Virol* 97, 2732-2741.
46. Fowlkes A.L., Honarmand S., Glaser C., Yagi S., Schnurr D. et al. (2008), “Enterovirus-associated encephalitis in the California encephalitis project, 1998-2005”, *J Infect Dis* 198: 1685-1691.
47. Fulmali P.V., Sapkal G.N., Athawale S., Gore M.M., Mishra A.C., Bondre V.P. (2011), “Introduction of Japanese encephalitis virus genotype I, India”, *Emerging Infectious Diseases Journal*, 17(2): 319-321.
48. Gao X., Liu H., Wang H., Fu S., Guo Z., Liang G. (2013), “ Southernmost Asia is the source of Japanese encephalitis virus (genotype 1) diversity from which the viruses disperse and evolve throughout Asia”, *PLoS neglected tropical diseases*, 7: e2459.
49. Gao X., Li X., Li M., Fu S., Wang H., Lu Z., Cao Y., He Y., Zhu W., Zhang T., Gould E.A., and Liang G. (2014), “ Vaccine Strategies for the Control and Prevention of Japanese Encephalitis in Mainland China, 1951–2011”, *PLoS neglected tropical diseases*, 8(8): e3015.
50. Granerod J., Crowcroft N.S. (2007), “The epidemiology of acute encephalitis”, *Neuropsychol Rehabil*, 17(4-5): 406-28.
51. Granerod J., Ambrose H.E., Davies N.W., Clewley J.P., Walsh A.L., Morgan D., Cunningham R., Zuckerman M., Mutton K.J., Solomon T., Ward K.N., Lunn M.P., Irani S.R., Vincent A., Brown D.W., Crowcroft N.S.(2010), “Causes of encephalitis and differences in their clinical presentations in England: a multicentre, population-based prospective study”, *Lancet Infect Dis*, 10(12):835-44.
52. Han N., Adams J., Chen P., et al (2014), “ Comparison of Genotypes I and III in Japanese Encephalitis Virus Reveals Distinct Differences in Their Genetic and Host Diversity”, *Journal of Virology*, 88(19):11469-11479.

53. Hanna J.N., Ritchie S.A., Phillips D.A., Shield J., Bailey M.C., Mackenzie J.S., Poidinger M., McCall B.J., Mills P.J.(1996), "An outbreak of Japanese encephalitis in the Torres Strait, Australia", *The Medical Journal of Australia*, 165(5): 256-260.
54. Hasbun R., Rosenthal N., Balada-Llasat J.M., Chung J., Duff S., Bozzette S., Zimmer L., Ginocchio C.(2017), "Epidemiology of meningitis and encephalitis in the United States from 2011-2014", *Clin Infect Dis*, 65(3): 359-363.
55. Holman R.C., Khetsuriani N., Anderson L.J. (2002), "Burden of encephalitis-associated hospitalizations in the United States, 1988-1997", *Clin Infect Dis*, 35: 175-182.
56. Hsu L.C., Chen Y.J., Hsu F.K. et al (2014), "The Incidence of Japanese Encephalitis in Taiwan-A Population-Based Study", *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8 (7): e3030.
57. Islam M.S., Sharif A.R., Hossain M.S., Sazzad, AKM, Dawlat Khan D., Hasan M., Akter S., Rahman M., Luby S.P., Heffelfinger J.D., and Gurley E.S. (2017), "Outbreak of Sudden Death with Acute Encephalitis Syndrome Among Children Associated with Exposure to Lychee Orchards in Northern Bangladesh, 2012", *Am J Trop Med Hyg*, 97(3): 949–957
58. Jaafar F. M., Attoui H., Mertens P. et al. (2005), "Structural organization of an encephalitis human isolate of Banna virus", *Journal of General Virology*, 86(4): 1147-1157.
59. Jain P., Jain A., Kumar A. et al. (2014), "Epidemiology and etiology of acute encephalitis syndrome in North India", *Japanese Journal Infect Dis.*, 67(3): 197-203.
60. Jain P, Prakash S., Tripathi P.K., Chauhan A., Gupta S., Sharma U., Jaiswal A.K., Sharma D., Jain A. (2018), "Emergence of *Orientia tsutsugamushi* as an important cause of Acute Encephalitis Syndrome in India", *PLoS Negl Trop Dis*, 12(3): e0006346.

61. Jain S., Patel B. and Bhatt G.C. (2014), "Enteroviral encephalitis in children: clinical features, pathophysiology, and treatment advances", *Pathog Glob Health*, 108(5): 216-222.
62. Jimor F., Hedley C., Fischer M. et al. (2008), "The incidence of acute encephalitis syndrome in Western industrialised and tropical countries", *Virology Journal*, 5(134): 1-13.
63. Jitendra K., Bharti M., Aradhana C., et al, (2017), "Aetiological study of viruses causing acute encephalitis syndrome in North West India". *In J Med Micro*, Vol 35 (4), 529-534
64. Josephine G., Aldaba A., Vito G. R., Jr., Amado O. T., et al. (2015), "Epidemiology of Japanese Encephalitis in the Philippines: A Systematic Review", *PLoS Negl Trop Dis.*, 9(3) : e0003630.
65. Kadambari S., Bukasa A., Okike I., Pebody R., Brown D., Gallimore C., Xerry J., Sharland M., Ladhani S. (2014), "Enterovirus infections in England and Wales, 2000-2011: the impact of increased molecular diagnostics", *Clin Microbiol Infect*, 20(12): 1289–1296.
66. Kadambari S., Okike I., Ribeiro S., Ramsay M.E., Heath P.T., Sharland M., Ladhani S.N.(2014), "Seven-fold increase in viral meningo-encephalitis reports in England and Wales during 2004-2013", *J Infect.* , 69(4): 326-332.
67. Karthikeyan A., Shanmuganathan S., Pavulraj S., Prabakar G., Pavithra S., Porteen K., Elaiyaraja G., Malik Y.S. (2017), "Japanese encephalitis, recent perspectives on virus genome, transmission, epidemiology, diagnosis and prophylactic interventions", *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 5(6): 730-748.
68. Karuppanasamy K., Saminathan M., Pavulraj S., Gopalakrishnan A. and Rai RB. (2013), "Acute Encephalitis Syndrome-A Complex Zoonotic Disease", *International Journal of Livestock Research*, 3(2): 174-177.



69. Kennedy P.G., Quan P.L., Lipkin W.I. (2017), "Viral Encephalitis of Unknown Cause: Current Perspective and Recent Advances", *Viruses*, 9(6) pii: e138.
70. Khinchi YR., Kumar A., and Yadav S. (2010), "Study of acute encephalitis syndrome in children", *J College of Med SciNepal*, 6: 7-13.
71. Kim H., Cha G.W., Jeong Y.E., Lee W.G., Chang K.S., Roh J.Y. (2015), "Detection of Japanese Encephalitis Virus Genotype V in *Culexorientalis* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in Korea", *PLoS ONE*, 10: e0116547.
72. Kolaskar A.S. and Kulkarni-Kale U.(1999), "Prediction of three-dimensional structure and mapping of conformational epitopes of envelope glycoprotein of Japanese encephalitis virus", *Virology* 1999, 261 (1): 31-42.
73. Kroneman A., Vennema H., Deforche K., Avoort H.V., Penaranda S., Oberste M.S., Vinje J.(2011), "An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses", *J Clin Virol*, 51(2): 121-5.
74. Kumar A., Shukla D., Kumar R., Idris M.Z., Misra U.K. et al. (2012), "Molecular epidemiological study of enteroviruses associated with encephalitis in children from India", *J Clin Microbiol*, 50 (11): 3509-3512.
75. Kupila L., Vuorinen T., Vainionpaa R. et al. (2006), "Etiology of aseptic meningitis and encephalitis in an adult population", *Neurology*, 66(1): 75-80.
76. Kuwata R., Satho T., Isawa H., Yen N.T., Phong T.V., Nga P.T., Kurashige T., Hiramatsu Y., Fukumitsu Y., Hoshino K., Sasaki T., Kobayashi M., Kyoko Sawabe K. (2013), "Characterization of Dak Nong virus, an insect nidovirus isolated from *Culex* mosquitoes in Vietnam". *Arch Virol*: 2273-2283
77. Lekhjung J. T., et al. (2013), "Clinical profile and outcome of acute encephalitis syndrome (AES) patients treated in College of Medical Sciences-Teaching Hospital", *Journal of College of Medical Sciences-Nepal*, 9(2): 31-37.
78. Lewthwaite P., Perera D., Ooi M.H., et al,(2010), "Enterovirus 75 encephalitis in children, southern India", *Emerg Infect Dis.*, 16:780–782.
79. Li M.H., Fu S.H., Chen W.X., Wang H.Y., Guo Y.H., Liu Q.Y., et al. (2011), "Genotype V Japanese Encephalitis Virus Is Emerging", *PLoS Negl Trop Dis*, 5(7): e1231.

80. Liu H., Gao X.Y., Fu .SH., et al. (2016), "Molecular evolution of emerging Banna virus", *Infection, Genetics and Evolution*, Volume 45: 250-255.
81. Li W., Zhang Q., Shen X., Liu Y., et al. (2016), "Molecular epidemiological study of enteroviruses associated with encephalitis in children from Hangzhou, China", *Medicine (Baltimore)*. 95(40): e4870
82. Li Z., Counor D., Lu P., Liang G. D., Huong V. T.Q., Nga P.T, Huynh T. K. L., Sun G., Grandadam M., Butrapet S., Lavergne J. P., Flamand M., Yu Y. X., Solomon T., Buchy P., Deube V. (2012), "A specific and sensitive antigen capture assay for NS1 protein quantitation in Japanese encephalitis virus infection", *Journal of Virological Methods*, Volume 179, Issue 1: 8-16.
83. Liu H. et al (2010), "Banna virus in China, 1987-2007", *Emerging Infectious Diseases*, 16(3), pp. 514-517.
84. Liu Q., Lin L., Zhou ZM. et al. (2013), "Identification of Nam Dinh virus in China", *Bing Du Xue Bao*, 29(1), pp. 1-6.
85. McGeoch D. J., Dalrymple M. A., Davison A. J., et al. (1988). The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* 69, 1531–1574.
86. Mohd F.J., Attoui H., Bahar M.W. , et al. (2005), "The structure and function of the outer coat protein VP9 of Banna virus", *Structure*, 13, pp. 17-28.
87. Muir P., Kämmerer U., Korn K., Mulders M.N., Pöyry T. et al. (1998), "Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements. The European Union Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis", *Clin Microbiol Rev* 11: 202-227.
88. Nabeshima T., Nga P. T., Guillermo P. , et al. (2008), "Isolation and molecular characterization of Banna virus derived from mosquitoes in Northern and Central Vietnam", *Emerging Infectious Disease Journal*, 14(8): 1276-1279.
89. Nabeshima T., Loan H.T., Inoue S., Sumiyoshi M., Haruta Y., Nga P.T., Huong V.T., Partquet M.C., Hasebe F., Morita K. (2009), "Evidence of frequent

- introductions of Japanese encephalitis virus from south-east Asia and continental east Asia to Japan”, *Journal of General Virology*, 90(4): 827-832.
90. Nga P.T., Gouilh M.A., Paireau J., Loan D.P., Cheval J., Nghia N.D., Hesbert C., Tuan N.H., Lortholary O., Tondeur L., Manuguerra J.C., Barouki R., Sander J., Janzen N., Hien N.T., Brey P.T., Fontanet A., Eloit M. (2018), “Hypoglycemic Toxins and Enteroviruses AS Causes of Outbreaks of Acute Encephalitis-Like Syndrome in Children, Bac Giang Province, Northern Vietnam, *Emerg Infect Dis*, 24 (8): 1436-1443.
  91. Nga P.T., Parquet C.M., Lauber C., Parida M., Nabeshima T., Yu F., Thuy N.T., Inoue S., Ito T., Okamoto K., Ichinose A., Snijder E.J., Morita K., Gorbalenya A. E. (2011), "Discovery of the first insect nidovirus, a missing evolutionary link in the emergence of the largest RNA virus genomes" *PLoS Pathog*, 7(9).
  92. Nga P.T., Carmen P.M., Cuong V.D. et al. (2004), "Shift in Japanese encephalitis virus (JEV) genotype circulating in northern Vietnam: implications for frequent introductions of JEV from Southeast Asia to East Asia", *J Gen Virol*, 85: 1625–1631.
  93. Nga P.T., Phuong N.K., Yen N.T., Nam V.S., Lien H.P., Tien T.V.(1996), “ Transmission of Japanese encephalitis (JE) virus in Gia Luong district, Ha Bac province, Vietnam, after JE vaccination, 1993 – 1994”, *Tropical Medicine*, 37(4): 129-134.
  94. Nguyen T.T.C. B’K., Minh N.N.Q., Qui P.T., Chau T.T.H., Nghia H.D.T., Do L.A.H., Nhung N.N., Chau N.V.V., Thwaites G., Tan L.V., van Doorn H.R. and Thanh T.T. (2018), “ Enterovirus serotypes in patients with central nervous system and respiratory infections in Viet Nam 1997–2010”, *Virology Journal*, 15(1): 69-77.
  95. Nitatpattana N., Dubot-Pérès A, Gouilh M.A. , et al. (2008), "Change in Japanese encephalitis virus distribution, Thailand", *Emerg Infect Dis.*, 14: 1762-1765.

96. Nix W. Allan et al.(2006), "Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens", *Journal of clinical microbiology*, vol. 44,8 (2006): 2698-704.
97. Ooi M.H., Wong S.C., Abdullah A.R., Wong S.Y., Krishnan S., Tio P.H. et al (2008), "A decade of Japanese encephalitis surveillance in Sarawak, Malaysia: 1997–2006", *Trop Med Int Health*, 13: 52-55.
98. Paireau J., Tuan N. H., Lefrancois R., et al. (2012), "Litchi-associated acute encephalitis in children, Northern Vietnam, 2004-2009", *Emerg Infect Dis*, 18 (11): 1817-24.
99. Pan XL., Liu H., Wang HY., et al. (2011), "Emergence of genotype I of Japanese encephalitis virus as the dominant genotype in Asia", *J Virol*, 85: 9847–9853.
100. Pyke A.T., e. l. (2001), "The appearance of a second genotype of Japanese encephalities virus in the Australasian region", *Am J Tropmed Hyg*, 65.
101. Pons-Salort M., Parker E.P., Grassly NC., (2015), "The epidemiology of non-polio enteroviruses: recent advances and outstanding questions", *Current Opinion in Infectious Diseases*, 28(5): 479-487.
102. Qui P.T., Tan L.V, Ha D.Q., Hieu N.B, Bao L.Q., Cam B.V., Khanh T.H, Hien T.T., Chau N.V.V., Tam T.T, Hien V.M., Nga T.V.T, Schultsz C., Farra J.(2010), "Viral Etiology of Encephalitis in Children in Southern Vietnam: Results of a One-Year Prospective Descriptive Study", *PLoS Negl Trop*, 4(10): e854.
103. Ross E. R., Jenna M. T., Ginger T., and Ralph F. (2011), Enterovirus Infections of the Central Nervous System Review, *Virology*, 411(2): 288–305.
104. Roberta L., Kenneth L. T. (2004), "Molecular Methods for Diagnosis of Viral Encephalitis", *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4): 903-925.
105. Sang-Im Yun and Young-Min Lee (2014), "Japanese encephalitis: The virus and vaccines", *Human Vaccin Immunother*, 10(2): 263–279.

106. Sapkal G.N., Bondre V.P., Fulmali P.V., Patil P., Gopalkrishna V., Dadhania V., et al. (2009), "Enteroviruses in patients with acute encephalitis, Uttar Pradesh, India.", *Emerg Infect Dis.* 15: 295-298.
107. Schuh A.J., Ward M.J., Leigh Brown A.J., Barrett A.D. (2014), "Dynamics of the emergence and establishment of a newly dominant genotype of Japanese encephalitis virus throughout Asia", *Journal Virology*, 88(8): 4522-4532.
108. Schuh A.J., Guzman H., Tesh R.B., Barrett A.D.(2013), "Genetic Diversity of Japanese Encephalitis Virus Isolates Obtained from the Indonesian Archipelago Between 1974 and 1987", *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 13: 479-488.
109. Schuh A.J., Ward M.J., Leigh Brown A.J., Barrett A.D. (2013), "Phylogeography of Japanese Encephalitis Virus: Genotype Is Associated with Climate", *PLoS Negl Trop Dis*, 7(8): e2411.
110. Schuh A.J., Li L., Tesh R.B., Innis B.L., Barrett A.D.(2010), "Genetic characterization of early isolates of Japanese encephalitis virus: genotype II has been circulating since at least 1951", *Journal of General Virology*, 91(Pt1): 95-102.
111. Sergio Ferrari, Antonio Toniolo, Salvatore Monaco , et al. (2009), "Viral Encephalitis: Etiology, Clinical Features, Diagnosis and Management", *The Open Infectious Diseases Journal*, 3: 1-12.
112. Shailendra K., Sneham T., Rakhi S., Asha M. and Madhavan P.N. (2011), Japanese Encephalitis: An Emerging and Spreading Arbovirosis, *Flavivirus Encephalitis*, Chapter: 15: 295-316.
113. Silva M. T. T. (2013), "Viral encephalitis", *Arq. Neuro-Psiquiatr*, vol.71 no.9B,703-709.
114. Sips G.J., Wilschut J. and Smit J.M. (2012), "Neuroinvasive flavivirus infections", *Rev Med Virol.*, 22, 69-87.
115. Sohn Y.M. (2000), "Japanese Encephalitis Immunization in South Korea: Past, Present, and Future", *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 6.

116. Solomon T., Ni H., Beasley D.W., Ekkelenkamp M., Cardoso M.J. and Barrett A.D. (2003), “Origin and evolution of Japanese encephalitis virus in southeast Asia”, *J Virol*, 77(5): 3091-3098.
117. Solomon T., Thao T.T., Lewthwaite P., Ooi M.H., Kneen R., Dung N.M., et al (2008), “A cohort study to assess the new WHO Japanese encephalitis surveillance standards”, *Bull World Health Organ*, 86(3): 178-186.
118. Sun Y., Miao Z., Yan J., Gong L., Chen Y., Mao H., Zhang Y. (2019), “Sero-molecular epidemiology of enterovirus-associated encephalitis in Zhejiang Province, China, from 2014 to 2017”, *Int J Infect Dis*, 79:58-64
119. Supawat K. Sonja J. Olsen, Angela P. Campbell, et al. (2010), "Japanese encephalitis virus remains an important cause of encephalitis in Thailand", *International Journal of Infectious Diseases*, 14(10): e888–e892.
120. Su C.L., Yang C.F., Teng H.J., et al. (2014), “Japanese encephalitis epidemic season in humans and MLE of the JEV infection rates in mosquitoes by month during 2005–2012”, *PLoS Negl Trop Dis*, 8(10): e3122.
121. Tajima S., Nerome R., Nukui Y. et al (2010), “A single mutation in the Japanese encephalitis virus E protein (S123R) increases its growth rate in mouse neuroblastoma cells and its pathogenicity in mice”, *Virology* 2010, 396 (2): 298-304.
122. Takamatsu Y., Uchida L., Nga P.T., et al (2013), “An approach for differentiating echovirus 30 and Japanese encephalitis virus infections in acute meningitis/encephalitis: a retrospective study of 103 cases in Vietnam”, *Virol J*, 10:280.
123. Tamura, Koichiro et al (2013). “MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0”. *Molecular biology and evolution* 2013; 30 (12): 2725-2729.
124. Tan le V., Thai le H., Phu NH. et al. (2014), "Viral aetiology of central nervous system infections in adults admitted to a tertiary referral hospital in southern Vietnam over 12 years", *PLoS Negl Trop Dis*, 8(8): e3127.

125. Touch S., Hills S, Sokhal B, et al. (2009), "Epidemiology and burden of disease from Japanese encephalitis in Cambodia: Results from two years of sentinel surveillance", *Trop Med Int Health*, 14: 1365-1373.
126. Tsuchie H., Oda K., Vythilingam I., et al. (1997), "Genotypes of Japanese encephalitis virus isolated in three states in Malaysia", *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 56(2): 153-158.
127. Tyler K.L. (2004), "Herpes simplex virus infections of the central nervous system: encephalitis and meningitis, including Mollaret's", *Herpes*, 11(2): 57A-64A.
128. Vasilakis N., Guzman H., Firth C. et al. (2014), "Mesoniviruses are mosquito-specific viruses with extensive geographic distribution and host range", *Virology*, 11(97): 11-97.
129. Wang H. and Liang G. (2015), "Epidemiology of Japanese encephalitis: past, present, and future prospects", *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 11: 435-448.
130. Ward KN., Ohrling A., Bryant NJ. et al. (2012), "Herpes simplex serious neurological disease in young children: incidence and long-term outcome", *Arch Dis Child*, 97(2): 162-165.
131. Whitley RJ. (2006), "Herpes simplex encephalitis: adolescents and adults", *Antiviral Res.*, 71(2-3): 141-148.
132. World Health Organization (2014), "Japanese encephalitis", Mediacentre Fact sheet No 386, March 2014.
133. World Health Organization (2016), Herpes simplex virus, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs400/en/>.
134. Yamaguchi Y., Nukui Y., Kotaki A. et al (2013), "Characterization of a serine-to-asparagine substitution at position 123 in the Japanese encephalitis virus E protein", *J Gen Virol* 2013, 94 (Pt 1): 90-96.

135. Yen N.T., Duffy M.R., Hong N.M., Hien N.T., Fischer M., and Susan L.H. (2010), "Surveillance for Japanese Encephalitis in Vietnam, 1998–2007", *Am J Trop Med Hyg*, 83(4): 816–819.
136. Zhang J.S., Zhao Q.M., Guo X.F. et al (2011), "Isolation and genetic characteristics of human genotype 1 Japanese encephalitis virus, China, 2009", *PLoS One* 2011, 6 (1): e16418.
137. Zhang L. et al, (2013), "Novel and predominant pathogen responsible for the enterovirus-associated encephalitis in eastern China", *PloS one*, vol. 8,12 e85023.
138. Zhou J., Jin Y., Chen Y., Li J., Zhang Q., Xie X., Liu Q. (2017), "Complete Genomic and Ultrastructural Analysis of a Nam Dinh Virus Isolated from *Culex pipiens quinquefasciatus* in China", *Scientific Reports*, 7, 271.
139. Ziebuhr J., Lauber C., Junglen S., Drosten C., Zirkel F., Nga P. T., Morita K., Snijder E. J., and Gorbalenya A. E (2012), "*Mesoniviridae*: A new family in the order Nidovirales formed 4 by a single species of mosquito-borne viruses", *Archives of Virology*, 157: 1623-1628.
140. Zirkel F., Roth H., Kurth A. et al. (2013), "Identification and characterization of genetically divergent members of the newly established family *Mesoniviridae*", *J Virol.*, 87(11): 6346-6358.



## Phụ lục 1

### PHIẾU ĐIỀU TRA BỆNH NHÂN NGHI VIÊM NÃO NHẬT BẢN

Mã số ca bệnh

Số bệnh án


#### I. Thông tin cá nhân:

- Họ và tên bệnh nhân: .....
- Giới: Nam/ nữ.....
- Ngày tháng năm sinh: / \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ / Tuổi: .... năm tuổi hoặc .....tháng tuổi
- Họ và tên mẹ (hoặc bố).....
- Địa chỉ (nơi ở hiện tại):.....  
Xã:..... Huyện..... Tỉnh.....
- Địa chỉ (hoặc số điện thoại) liên hệ: .....

#### II. Thông tin nhập viện:

- Tên bệnh viện.....
- Tỉnh/ Thành phố.....
- Ngày nhập viện: / \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ /

#### III. Tiền sử tiêm vắc xin viêm não Nhật Bản:

- Có tiêm phòng không? (khoanh tròn): C/ K/ KR

Số mũi vắc xin được tiêm..... (nếu có)

Theo (khoanh tròn): Phiếu/Sổ/Hỏi

- Thời gian tiêm vắc xin (ngày/tháng/năm):

Mũi 1: / \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ / Mũi 2: / \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ /

Mũi 3: / \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ / Mũi 4: / \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ /

Mũi 5: / \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ / Mũi 6: / \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ /

#### IV. Triệu chứng lâm sàng

- Sốt (khoanh tròn): C/ K/ KR
- Ngày bắt đầu sốt: / \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ /
- Thay đổi tình trạng tinh thần (khoanh tròn): C/ K/ KR

15. Dấu hiệu thay đổi tình trạng tinh thần (*khoanh tròn*):

nhầm lẫn/mất phương hướng/lơ mơ/hôn mê

16. Rối loạn ngôn ngữ (*khoanh tròn*): C/ K/ KR

17. Rối loạn vận động (*khoanh tròn*): C/ K/ KR

18. Dấu hiệu rối loạn vận động(*khoanh tròn*):

co giật/co cứng/rung giật/cử động/bất thường/liệt

19. Nôn (*khoanh tròn*): C/ K/ KR

#### V. Xét nghiệm MAC-ELISA

20. Xét nghiệm huyết thanh (*khoanh tròn*): C/K

21. Ngày lấy mẫu máu 1: / \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_/

22. Ngày có kết quả huyết thanh 1: / \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_/

23. Kết quả xét nghiệm huyết thanh 1 (*khoanh tròn*): dương tính/âm tính/không rõ

24. Ngày lấy mẫu máu 2: / \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_/

25. Ngày có kết quả huyết thanh 2: / \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_/

26. Kết quả xét nghiệm huyết thanh 2 (*khoanh tròn*): dương tính/âm tính/không rõ

27. Xét nghiệm dịch não tủy (*khoanh tròn*): C/K

28. Ngày lấy dịch não tủy: / \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_/

29. Ngày có kết quả xét nghiệm dịch não tủy / \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_/

30. Kết quả xét nghiệm dịch não tủy (*khoanh tròn*): dương tính/âm tính/không rõ

31. Nơi làm xét nghiệm (*khoanh tròn*): 1. Viện khu vực 2. TTYTDP 3. Bệnh viện

#### VI. Thông tin khi ra viện

32. Ngày ra viện (hoặc chuyển viện): / \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_/

Bệnh viện chuyển đến:.....

33. Tình trạng lúc ra viện (*khoanh tròn*):

1. Sống, sức khoẻ tốt 2. Sống, còn di chứng 3. Nặng, xin về 4. Tử vong

#### VII Chẩn đoán cuối cùng (đánh dấu X vào ô thích hợp)

a. Loại bỏ không phải là VNNB:

b. Chẩn đoán VNNB xác định :

c. Không rõ:

Ngày tháng năm

Người điều tra

Thủ trưởng đơn vị

## **Phụ lục 2**

### **Kỹ thuật lấy mẫu, bảo quản và vận chuyển bệnh phẩm**

#### **1. Tiêu chuẩn ca bệnh**

Sốt đột ngột ( $\geq 37,8^{\circ}\text{C}$ ) và có một trong những triệu chứng sau:

(1) Thay đổi tình trạng tinh thần: Nhầm lẫn, mất phương hướng, lơ mơ, hôn mê.

(2) Rối loạn vận động: Co giật, cử động bất thường, liệt. Dịch não tủy trong.

#### **2. Loại bệnh phẩm: Mẫu dịch não tủy, mẫu huyết thanh.**

#### **3. Dụng cụ lấy mẫu**

- Ống nghiệm nhựa có nắp;
- Bơm tiêm 5ml, dây garo;
- Phiếu thu thập mẫu bao gồm thông tin chung về bệnh nhân, loại bệnh phẩm, ngày thu thập và một số thông tin về dịch tễ.
- Trang bị phòng hộ cá nhân cho cán bộ lấy mẫu: Sử dụng khẩu trang y tế, găng tay.
- Hộp bảo ôn: Phích đá.

#### **4. Thời gian lấy mẫu**

- Mẫu dịch não tủy và mẫu huyết thanh thứ nhất (HT1) được lấy trong ngày đầu nhập viện.
- Mẫu huyết thanh thứ 2 (HT2) được lấy sau 7- 10 ngày nhập viện hoặc trước khi bệnh nhân ra viện/ tử vong.

#### **4.1. Lượng mẫu**

- Dịch não tủy: Lấy 1-1,5ml
- Máu tĩnh mạch: 2-3ml

#### **4.2. Cách lấy mẫu máu để tách huyết thanh**

Thắt dây bên trên chỗ lấy máu.

Khử khuẩn vùng da lấy máu bằng bông cồn, xoay tròn từ tâm ra ngoài, đợi vùng da khử khuẩn bằng bông cồn khô.

Dùng bơm kim tiêm rút 3ml máu từ tĩnh mạch

Rút kim, bơm nhẹ máu vào thành ống nghiệm, đậy nút kín.

#### **4.3. Tách huyết thanh theo các bước sau**

- Đóng nắp tube chứa máu, để đông máu ở nhiệt độ phòng.

- Ly tâm ở tốc độ thấp 2000 vòng/phút trong 8 phút để tránh vỡ hồng cầu.

(Không làm đông lạnh mẫu máu khi chưa tách huyết thanh).

Dùng pipet vô trùng, nhẹ nhàng hút huyết thanh ở phần trên của tube, chia vào các ống nghiệm có nắp.

#### **4.4. Mã hóa mẫu bệnh phẩm**

Mẫu bệnh phẩm được mã hóa như sau:

aa. bb/ VNVR/ cc

Trong đó: aa: Số thứ tự của bệnh nhân

bb: Mã loại bệnh phẩm (0: DNT, 1: HT 1, 2: HT 2)

VNVR: Viêm não vi rút

cc: Năm lấy mẫu bệnh phẩm

#### **4.5. Bảo quản và vận chuyển mẫu**

Bệnh phẩm sau khi lấy cần cất ngay vào tủ lạnh 4-8°C hoặc để vào bình bảo ôn có 4 bình tích lạnh xung quanh, bệnh phẩm để ở giữa.

Chuyển ngay đến phòng thí nghiệm trong vòng 72 giờ sau khi lấy.

Nếu không chuyển ngay được đến phòng xét nghiệm, bệnh phẩm phải được giữ ở nhiệt độ -20°C hoặc <-70°C cho đến khi chuyển đến phòng xét nghiệm (tránh làm đông tan băng nhiều lần).

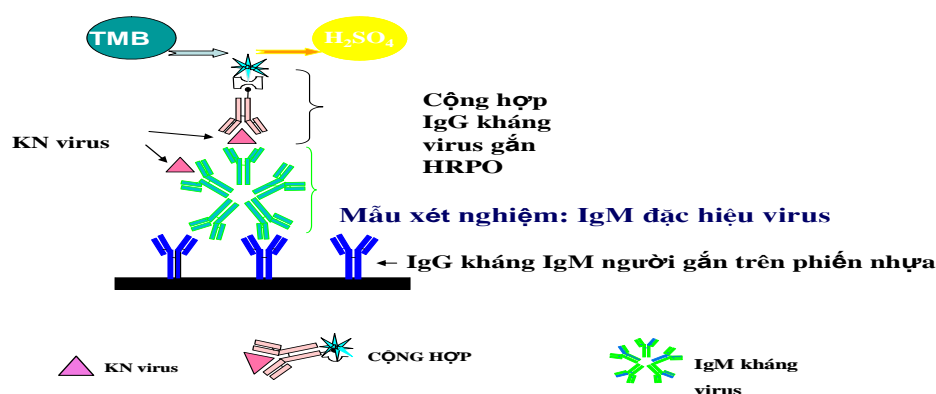
Tại phòng xét nghiệm, mẫu được bảo quản ở tủ lạnh âm sâu <- 70°C.

### Phụ lục 3

## Kỹ thuật MAC-ELISA chẩn đoán viêm não Nhật Bản

### 1. Nguyên lý

Kỹ thuật MAC-ELISA dựa trên nguyên lý sử dụng một IgG kháng IgM người đặc hiệu chuỗi  $\mu$  gắn trên bản nhựa 96 giếng/ thanh nhựa 2 x 8 giếng. IgM có trong mẫu xét nghiệm kết hợp với IgG kháng IgM người. Nếu trong mẫu xét nghiệm có IgM đặc hiệu kháng virus viêm não Nhật Bản nó sẽ kết hợp với kháng nguyên viêm não Nhật Bản khi cho tiếp xúc với kháng nguyên. Tiếp theo IgG kháng virus viêm não Nhật Bản gắn enzyme sẽ kết hợp với kháng nguyên này. Cho một phức hợp cơ chất không màu Tetramethylbenzidine (TMB)/Hydrogen Peroxide. Dưới sự xúc tác của Hydrogen Peroxide, cơ chất không màu sẽ chuyển thành màu xanh. Dùng phản ứng bằng axit, màu xanh chuyển thành màu vàng. Sự có mặt của IgM đặc hiệu kháng vi rút VNNB trong mẫu được xác định qua sự chuyển màu. Mẫu chứng âm và các mẫu thử không có IgM đặc hiệu kháng vi rút VNNB không xuất hiện màu.



### Sơ đồ kỹ thuật MAC-ELISA chẩn đoán VNNB

### 2. Lấy mẫu bệnh phẩm và bảo quản

IgM kháng vi rút VNNB có thể phát hiện ngay ngày đầu của bệnh, thông thường tồn tại khoảng 30 đến 90 ngày sau khi mắc. Để xác định sự nhiễm gần đây của vi rút VNNB, chỉ cần lấy một mẫu đơn máu hoặc dịch não tủy (những trường

hợp lấy máu trong 7 ngày đầu của bệnh, nếu kết quả âm tính nên lấy máu lần 2 kiểm tra lại tránh bỏ sót). Huyết thanh nên tách sớm và để trong điều kiện đông băng, nếu để ở 4° C thì không nên để quá 7 ngày.

### **3. Trang thiết bị, sinh phẩm, hóa chất**

#### **3.1. Trang thiết bị**

- Nước cất hoặc nước trao đổi ion, pH trung tính.
- Pipet bán tự động một kênh loại 1000 µl, 200 µl, 10 µl
- Pipet bán tự động đa kênh loại 300 µl
- Các loại đầu pipet tip tương ứng
- Hệ thống máy rửa, máy ủ, máy đọc ELISA
- Giấy thấm nước
- Các ống nghiệm và giá đựng ống nghiệm tương ứng
- Găng tay

#### **3.2. Hóa chất, sinh phẩm**

- Bản nhựa gắn IgG kháng IgM người đặc hiệu chuỗi µ.
- Kháng nguyên vi rút VNNB sản xuất từ chủng Nakayama (Nak) bất hoạt.
- Chứng dương đông khô: Huyết thanh người có IgM kháng vi rút VNNB.
- Chứng âm: Huyết thanh người không có IgM và IgG kháng vi rút VNNB.
- Cộng hợp: IgG kháng vi rút VNNB gắn enzym Peroxydase.
- Cơ chất hiện màu: TMB.
- Đệm pha cơ chất: Có chứa 0,03 % Hydrogenperoxide.
- Dung dịch đệm PBS-T
- Dung dịch pha loãng PBS pH 7,2 có BSA, đỏ phenol và 0,1 % Tween 20.
- Dung dịch dừng phản ứng: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>4N
- Các vật liệu cần thiết khác

### **4. Kỹ thuật tiến hành**

#### **4.1. Lấy mẫu bệnh phẩm**

IgM kháng vi rút VNNB có thể phát hiện sớm ngay ngày đầu của bệnh, thông thường tồn tại khoảng 30 đến 90 ngày sau khi mắc. Để xác định sự nhiễm gần đây của vi rút VNNB, chỉ cần lấy một mẫu đơn máu hoặc dịch não tủy (những trường hợp lấy mẫu trong 7 ngày đầu của bệnh, nếu kết quả âm tính nên lấy máu lần thứ

hai kiểm tra lại tránh bỏ sót). Huyết thanh nên tách sớm và để trong điều kiện đông băng, nếu để ở 4°C thì không nên để quá 7 ngày.

#### **4.2. Chuẩn bị dung dịch và hoá chất**

Nếu sử dụng bộ sinh phẩm để xét nghiệm, cần tuân thủ theo hướng dẫn của nhà sản xuất; Thông thường trong các bộ sinh phẩm, bản nhựa đều đã được gắn IgG kháng IgM, các bước thực hiện tiếp theo từ giai đoạn cho mẫu. Để thực hiện, tất cả các hoá chất và sinh phẩm phải được chuẩn bị trước khi sử dụng 10 phút. Sau khi đã pha loãng, tất cả sinh phẩm nên được sử dụng trong vòng 24 tiếng.

- Pha loãng dung dịch rửa PBS – T x 10: Dung dịch PBS -T đặc 10 lần, cho nước cất vừa đủ để có dung dịch rửa bản nhựa ở dạng làm việc.

- Pha loãng chứng âm và chứng dương được cho dung dịch pha loãng để có độ pha loãng là 1/100; Lắc đều, giữ ở 4°C hoặc trên khay đá lạnh.

- Pha loãng mẫu xét nghiệm:

+ Huyết thanh (HT) bệnh nhân pha loãng với tỷ lệ 1/ 100:

10 µl HT + 990 µl dung dịch pha loãng

+ Dịch não tủy (DNT) bệnh nhân pha loãng với tỷ lệ 1/10:

100 µl DNT + 900 µl dung dịch pha loãng

#### **4.3. Thực hiện kỹ thuật**

##### **4.3.1. Cho mẫu bệnh phẩm**

- Cho vào mỗi giếng 100 µl lần lượt mẫu chứng dương, chứng âm, dung dịch pha loãng (blank), mẫu xét nghiệm theo như sơ đồ:

A	B	C	D	E	F	G	H
Chứng dương	Chứng âm	Dung dịch pha loãng	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Mẫu 4	Mẫu 5
Chứng dương	Chứng âm	Dung dịch pha loãng	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Mẫu 4	Mẫu 5

- Ủ mẫu ở nhiệt độ phòng trong vòng 1 giờ.

- Rửa thanh nhựa: Có thể tiến hành rửa bằng máy rửa tự động hoặc bằng tay.

+ Loại bỏ phần mẫu có trong các giếng vào một bình chứa chất thải.

+ Rửa thanh nhựa bằng dung dịch PBT- T: Cho dung dịch rửa (PBS -T) vào đầy các giếng (  $\geq 300 \mu\text{l}$  ) để khoảng 1 phút, đổ dung dịch rửa.

+ Làm nhắc lại 3 lần.

#### 4.3.2. Cho kháng nguyên

- Pha kháng nguyên trong dung dịch pha loãng theo hiệu giá đã xác định.

- Lắc đều, giữ lạnh trên khay đá.

- Cho 100  $\mu\text{l}$  kháng nguyên đã pha loãng vào mỗi giếng (có thể cho 50  $\mu\text{l}$ ).

Lưu ý: Có thể ủ nhiệt độ phòng trong 1 giờ hoặc ủ ở 4°C qua đêm.

- Rửa thanh nhựa bằng dung dịch PBT- T: như trên 3 lần.

#### 4.3.3. Cho cộng hợp

- Pha cộng hợp bằng dung dịch pha loãng theo hiệu giá đã xác định.

- Lắc đều, giữ lạnh trên khay đá.

- Cho 100  $\mu\text{l}$  cộng hợp đã pha loãng vào các giếng (có thể cho 50  $\mu\text{l}$ )

- Ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ.

- Rửa bản nhựa bằng dung dịch PBT- T: làm nhắc lại 5 lần (bước rửa sau khi cho ủ cộng hợp phải lặp lại ít nhất 5 lần).

#### 4.3.4. Cho cơ chất

- Pha dung dịch cơ chất: Chỉ chuẩn bị trước khi cho vào phản ứng khoảng 5 phút theo hướng dẫn cho 1 ml dung dịch pha cơ chất vào 1 ml dung dịch TMB lắc kỹ (chú ý tránh ánh sáng).

- Cho vào mỗi giếng 100  $\mu\text{l}$  dung dịch cơ chất.

- Ủ ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng.

- Sau 7-10 phút kiểm tra sự chuyển màu của các giếng.

+ Mẫu chứng dương và các mẫu thử có IgM kháng vi rút VNNB sẽ có sự chuyển màu sang màu xanh.

+ Mẫu chứng âm và các mẫu thử không có IgM kháng vi rút VNNB không xuất hiện màu.

#### 4.3.5. Dừng phản ứng

- Cho vào mỗi giếng 100  $\mu\text{l}$  dung dịch  $\text{H}_2\text{SO}_4$  4N .

#### 4.4. Đọc kết quả

Đọc phản ứng bằng máy đọc ELISA bằng bước sóng kép 450nm/620nm.



## **5. Phân tích kết quả**

### **5.1. Tiêu chuẩn đọc kết quả**

Giá trị ngưỡng là 2, với điều kiện các chứng:

OD blank, OD chứng âm  $\leq 0,200$ .

OD chứng dương  $\geq 0,400$ .

OD chứng dương / OD chứng âm  $\geq 2$ .

### **5.2. Các mẫu xét nghiệm dương tính khi:**

OD mẫu xét nghiệm / OD chứng âm  $\geq 2$

### **5.3. Chú ý**

*5.3.1. Trong những trường hợp OD blank, OD chứng âm  $\leq 0,050$*

Kết quả dương tính được tính theo giá trị ngưỡng trên:

OD mẫu xét nghiệm  $\geq 5 \times$  OD chứng âm

Kết quả âm tính được tính theo giá trị ngưỡng dưới:

OD mẫu xét nghiệm  $\leq 3 \times$  OD chứng âm

Những mẫu nghi ngờ cần kiểm tra lại:

$3 \times$  OD chứng âm  $<$  OD mẫu xét nghiệm  $< 5 \times$  OD chứng âm

*5.3.2. Trên cùng một bệnh nhân xét nghiệm dịch não tủy và huyết thanh được lấy cùng ngày, nếu kết quả xét nghiệm huyết thanh dương tính kết quả xét nghiệm dịch não tủy âm tính thì kết luận bệnh nhân không bị VNNB.*

## **6. Đề phòng**

- Đi găng tay khi tiếp xúc với huyết thanh hoặc dịch não tủy.
- Rửa tay sau từng bước thực hiện phản ứng và sau khi kết thúc.
- Dung dịch dừng phản ứng:  $H_2SO_4$  4N là chất gây bỏng nặng. Nếu bị bắn vào mắt, dùng nước dội rửa ngay. Không được cho nước vào dung dịch này.
- Ortho - Phenylendiamin (OPD) là chất gây ung thư tiềm tàng. Tránh làm đổ hoặc bắn vào da hoặc quần áo. Trong trường hợp bị dính OPD, dùng nước dội rửa mạnh.

## **Phụ lục 4**

### **Kỹ thuật ELISA gián tiếp phát hiện IgM kháng vi rút Nam Định (NDiV)**

#### **1. Nguyên lý**

Kỹ thuật ELISA IgM gián tiếp dựa trên nguyên lý sử dụng kháng nguyên virus NDiV tinh chế được gắn trên bản nhựa với hàm lượng kháng nguyên là 50ng/giếng. Cho tiếp xúc với dịch não tủy của bệnh nhân (pha loãng 1/10), nếu trong mẫu dịch não tủy có kháng thể kháng vi rút NDiV, nó sẽ kết hợp với kháng nguyên vi rút NDiV. Tiếp theo sử dụng cộng hợp IgG kháng IgM người gắn enzyme peroxydaze, nó sẽ kết hợp đặc hiệu với kháng thể IgM người nếu có trong mẫu xét nghiệm. Cho một phức hợp cơ chất không màu Ortho- Phenylendiamin (OPD)/ Hydrogen Peroxide. Dưới sự xúc tác của Hydrogen Peroxide, cơ chất không màu phản ứng với enzyme peroxydaze để chuyển thành màu vàng. Dừng phản ứng bằng axit sulfuric, màu vàng chuyển thành màu nâu. Sự có mặt của IgM đặc hiệu kháng virus NDiV trong mẫu được xác định qua sự chuyển màu. Mẫu chứng âm và các mẫu thử không có IgM đặc hiệu kháng virus NDiV không xuất hiện màu. Kết quả xét nghiệm được ghi nhận bằng mật độ quang học (OD).

#### **2. Bệnh phẩm**

Dịch não tủy bệnh nhân HCNC do vi rút chưa xác định được nguyên nhân.

#### **3. Sinh phẩm ELISA phát hiện IgM kháng NDiV**

- Bản nhựa đáy bằng 2x48 giếng gắn kháng nguyên vi rút NDiV tinh chế, được cung cấp bởi Viện Y học Nhiệt đới, trường Đại học Nagasaki.
- Chứng dương: Huyết thanh người có IgM kháng vi rút NDiV. Bảo quản - 20°C.
- Chứng âm: Huyết thanh người không có IgM và kháng vi rút NDiV. Bảo quản -20°C.
- Cộng hợp: IgG kháng IgM người gắn enzyme peroxydaza của hãng SIGMA. Bảo quản ở 2-8°C.
- Cơ chất hiện màu: Ortho – Phenylendiamin (OPD) tinh thể.

-Dung dịch đệm pha cơ chất: Photphat – Citrat có chứa 0,03% Hydrogenperoxide.

- PBS-T (x 10)

- Dung dịch pha loãng: PBS, pH 7,2 có BSA, đỏ phenol.

- Dung dịch dừng phản ứng:  $H_2SO_4$  4N

#### **4. Dụng cụ, trang thiết bị**

- Pipet tự động hoặc bán tự động có thể điều chỉnh 10 $\mu$ l, 100 $\mu$ l, 1000 $\mu$ l

- Ống đong 500ml hoặc 1000ml.

- Bình rửa, máy ủ, máy đọc ELISA.

- Giấy thấm nước.

- Các ống nghiệm và giá đựng ống nghiệm.

- Găng tay.

#### **5. Các bước thực hiện**

##### **5.1. Phủ bản**

Kháng nguyên NDiV 10 $\mu$ l/bản + 5 ml dung dịch phủ bản.

Để dung dịch phủ bản đồng nhất trong 30 phút/4°C

Cho 50 $\mu$ l/giếng.

Ủ bản nhựa 4°C qua đêm.

##### **5.2. Block:**

Dung dịch PBS (-) 2% BSA.

Cho 100 $\mu$ l dung dịch block/giếng.

Ủ bản nhựa 4°C qua đêm.

##### **5.3. Chuẩn bị dung dịch rửa:**

100ml PBS-T (x10) + nước cất vừa đủ 1000ml.

##### **5.4. Tiếp xúc mẫu:**

Cho 100 $\mu$ l /giếng x 2 giếng một mẫu

Ủ bản nhựa ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ

Rửa bản nhựa 3 lần bằng PBS-T: Có thể tiến hành bằng máy rửa tự động hoặc bằng tay. Loại bỏ phần mẫu có trong các giếng vào một bình chứa chất thải.

Rửa bản nhựa bằng dung dịch PBS-T: Cho dung dịch rửa (PBS-T) vào đầy các giếng ( $\geq 300 \mu\text{l}$ ) để khoảng 1 phút, đổ dung dịch rửa. Làm nhắc lại 3 lần.

#### 5.5. Tiếp xúc với cộng hợp

- Cộng hợp:  $10\mu\text{l}$  IgG kháng IgM người gắn HRPO + 5ml dung dịch pha loãng.

- Cho  $50\mu\text{l}$  cộng hợp/giếng.

- Ủ bản nhựa ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ

Rửa bản nhựa 5 lần bằng PBS-T: Cho dung dịch PBS- T vào đầy các giếng ( $\geq 300 \mu\text{l}$ ) để khoảng 1 phút/rửa. Làm nhắc lại 5 lần (sau khi cho bước cộng hợp phải rửa ít nhất 5 lần).

#### 5.6. Tiếp xúc với cơ chất

- Pha dung dịch cơ chất: Chỉ chuẩn bị trước khi cho vào phản ứng khoảng 5 phút. Cho 10ml dung dịch đệm pha cơ chất vào 5mg OPD, lắc kỹ cho tan (Chú ý: Tránh ánh sáng).

- Cho vào mỗi giếng  $100\mu\text{l}$  dung dịch cơ chất.

- Ủ bản nhựa ở nhiệt độ phòng thí nghiệm ( $20 - 30^{\circ}\text{C}$ ), tránh ánh sáng.

- Sau 15 – 20 phút kiểm tra sự chuyển màu của các giếng

+ Mẫu chứng dương và các mẫu thử có IgM kháng vi rút NDiV sẽ có sự chuyển màu sang màu vàng.

+ Mẫu chứng âm và các mẫu thử không có IgM kháng vi rút NDiV không xuất hiện màu.

#### 5.7. Dừng phản ứng

- Cho dung dịch dừng phản ứng  $\text{H}_2\text{SO}_4$  4N  $75\mu\text{l}$ /giếng

#### 5.8. Đọc kết quả

- Đọc phản ứng bằng máy đọc ELISA ở bước sóng kép 492nm/ 620nm.

### 6. Cách phân tích kết quả

#### 6.1. Tiêu chuẩn đọc kết quả:

Giá trị ngưỡng là 2, với điều kiện các chứng:

OD blank, OD chứng âm  $\leq 0,200$ ;

OD chứng dương  $\geq 0,400$

OD chứng dương/OD chứng âm  $\geq 2$

6.2. Các mẫu xét nghiệm dương tính khi: OD mẫu xét nghiệm/OD chứng âm  $\geq 3$

### **7. Điều kiện an toàn**

- Đi găng tay khi tiếp xúc với huyết thanh hoặc dịch não tủy. Rửa tay sau từng bước thực hiện phản ứng và ngay sau khi kết thúc.

- Dung dịch dùng phản ứng:  $H_2SO_4$  4N là chất gây bỏng nặng. Nếu bị bắn vào mắt, dùng nước dội rửa ngay. Không được cho nước vào dung dịch này.

- Ortho - Phenyldiamin (OPD) là chất gây ung thư tiềm tàng. Tránh làm đổ hoặc bắn vào da hoặc quần áo. Trong trường hợp bị dính OPD, dùng nước dội rửa mạnh.

## **Phụ lục 5**

### **Kỹ thuật ELISA gián tiếp phát hiện IgM kháng vi rút Banna**

#### **1. Nguyên lý**

Kỹ thuật ELISA IgM gián tiếp dựa trên nguyên lý sử dụng kháng nguyên virus Banna tinh chế được gắn trên bản nhựa với hàm lượng kháng nguyên là 50ng/giếng. Cho tiếp xúc với dịch não tủy của bệnh nhân (pha loãng 1/10), nếu trong mẫu dịch não tủy có kháng thể kháng vi rút Banna, nó sẽ kết hợp với kháng nguyên vi rút Banna. Tiếp theo sử dụng cộng hợp IgG kháng IgM người gắn enzyme peroxydaze, nó sẽ kết hợp đặc hiệu với kháng thể IgM người nếu có trong mẫu xét nghiệm. Cho một phức hợp cơ chất không màu Ortho-Phenylenediamin (OPD)/Hydrogen Peroxide. Dưới sự xúc tác của Hydrogen Peroxide, cơ chất không màu phản ứng với enzyme peroxydaze để chuyển thành màu vàng. Dừng phản ứng bằng axit sulfuric, màu vàng chuyển thành màu nâu. Sự có mặt của IgM đặc hiệu kháng virus Banna trong mẫu được xác định qua sự chuyển màu. Mẫu chứng âm và các mẫu thử không có IgM đặc hiệu kháng virus Banna không xuất hiện màu. Kết quả xét nghiệm được ghi nhận bằng mật độ quang học (OD).

#### **2. Lấy mẫu bệnh phẩm và bảo quản**

IgM kháng vi rút Banna có thể phát hiện ngay ngày đầu của bệnh, thông thường tồn tại khoảng 30 đến 90 ngày sau khi mắc. Để xác định sự nhiễm gần đây của vi rút Banna, chỉ cần lấy một mẫu dịch não tủy để trong điều kiện đông băng, nếu để ở 4° C thì không nên để quá 7 ngày.

#### **3. Sinh phẩm ELISA xét nghiệm vi rút Banna**

- Bản nhựa đáy bằng 2x48 giếng
- Kháng nguyên vi rút Banna tinh chế được cung cấp bởi Viện Y học Nhiệt đới, trường Đại học Nagasaki, bảo quản - 20°C.
- Chứng dương: Huyết thanh người có IgM kháng vi rút Banna. Bảo quản - 20°C.

- Chứng âm: Huyết thanh người không có IgM và kháng vi rút Banna. Bảo quản  
- 20°C.

- Cộng hợp: IgG kháng IgM người gắn enzyme peroxydaza của hãng SIGMA.  
Bảo quản ở 2-8°C.

- Cơ chất hiện màu: Ortho - Phenylendiamin (OPD) tinh thể.

- Dung dịch đệm pha cơ chất Photphat-Citrat có chứa 0,03% Hydrogenperoxide.

- PBS-T (x 10)

- Dung dịch pha loãng: PBS, pH 7,2 , BSA, đỏ phenol, 0,1% Tween.

- Dung dịch dừng phản ứng: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N

#### **4. Dụng cụ, trang thiết bị**

- Pipet tự động hoặc bán tự động có thể điều chỉnh 10µl, 100µl, 1000µl

- Ống đong 500ml hoặc 1000ml.

- Bình rửa, máy ủ, máy đọc ELISA.

- Giấy thấm nước.

- Các ống nghiệm và giá đựng ống nghiệm.

- Găng tay.

- Nước cất hoặc nước trao đổi ion, pH trung tính

#### **5. Các bước thực hiện**

##### **5.1. Phủ bản:**

- Kháng nguyên BAV 10µl/bản + 5 ml dung dịch phủ bản.

- Để dung dịch phủ bản đồng nhất trong 30 phút/4°C

- Cho 50µl/giếng.

- Ủ bản nhựa 4°C qua đêm.

##### **5.2. Block:**

Dung dịch PBS (-) có 2% BSA.

- Cho 100µl dung dịch block/giếng.

- Ủ bản nhựa 4°C qua đêm.

##### **5.3. Chuẩn bị dung dịch rửa:**

100 ml PBS-T (x10) + nước cất vừa đủ 1000ml.

#### **5.4. Tiếp xúc mẫu:**

- Cho 100µl mẫu/giếng x 2 giếng cho 1 mẫu theo như sơ đồ:
- Ủ bản nhựa ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ.

Rửa bản nhựa 3 lần bằng PBS-T: Có thể tiến hành bằng máy rửa tự động hoặc bằng tay.

- Loại bỏ phần mẫu có trong các giếng vào một bình chứa chất thải
- Rửa bản nhựa bằng dung dịch PBS-T: Cho dung dịch rửa (PBS-T) vào các giếng ( $\geq 300 \mu\text{l}$ ) để khoảng 1 phút, đổ dung dịch rửa.
- Làm nhắc lại 3 lần.

#### **5.5. Tiếp xúc với cộng hợp**

- Cộng hợp: IgG kháng IgM người gắn HRPO + 5ml dung dịch pha loãng.
- Cho 50µl cộng hợp/giếng. Thời gian:

.....

- Ủ bản nhựa ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ

Rửa bản nhựa 5 lần bằng PBS-T như trên.

#### **5.6. Tiếp xúc với cơ chất**

- Pha dung dịch cơ chất: Chỉ chuẩn bị trước khi cho vào phản ứng khoảng 5 phút. Cho 10ml dung dịch đệm pha cơ chất vào 5mg OPD, lắc kỹ cho đồng nhất (Chú ý: Tránh ánh sáng).

- Cho vào mỗi giếng 100µl dung dịch cơ chất.
- Ủ bản nhựa ở nhiệt độ phòng xét nghiệm (20-30°C), tránh ánh sáng.
- Sau 15 – 20 phút kiểm tra sự chuyển màu của các giếng
- + Mẫu chứng dương và các mẫu thử có IgM kháng vi rút Banna sẽ có sự chuyển màu sang màu vàng.

+ Mẫu chứng âm và các mẫu thử không có IgM kháng vi rút Banna không xuất hiện màu.

#### **5.7. Dừng phản ứng**

- Cho dung dịch dừng phản ứng  $\text{H}_2\text{SO}_4.4\text{N}$  75µl/giếng

#### **5.8. Đọc kết quả**



Đọc phản ứng bằng máy đọc ELISA ở bước sóng kép 492nm/620nm.

## **6. Cách phân tích kết quả**

### **6.1. Tiêu chuẩn đọc kết quả:**

Giá trị ngưỡng là 2, với điều kiện các chứng:

OD blank, OD chứng âm  $\leq 0,200$ ;

OD chứng dương  $\geq 0,400$

OD chứng dương/OD chứng âm  $\geq 2$

### **6.2. Các mẫu xét nghiệm dương tính khi :**

OD mẫu xét nghiệm / OD chứng âm  $\geq 3$

### **6.3. Chú ý:**

Trong trường hợp OD blank, OD chứng âm  $\leq 0,050$

Mẫu dương tính: OD mẫu xét nghiệm  $\geq 5 \times$  OD chứng âm

Mẫu âm tính: OD mẫu xét nghiệm  $\leq 3 \times$  OD chứng âm

Mẫu nghi ngờ: OD chứng âm  $\times 3 \leq$  OD mẫu xét nghiệm  $\leq 5 \times$  OD chứng âm

## **7. Điều kiện an toàn**

- Đi găng tay khi tiếp xúc với huyết thanh hoặc dịch não tủy.
- Rửa tay sau từng bước thực hiện phản ứng và ngay sau khi kết thúc.
- Dung dịch dừng phản ứng: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N là chất gây bỏng nặng. Nếu bị bắn vào mắt, dùng nước dội rửa ngay. Không được cho nước vào dung dịch này.
- Ortho-Phenylendiamin (OPD) là chất gây ung thư tiềm tàng. Tránh làm đổ hoặc bắn vào da hoặc quần áo. Trong trường hợp bị dính OPD, dùng nước dội rửa mạnh.

## **Phụ lục 6**

### **Kỹ thuật Realtime RT-PCR chẩn đoán vi rút đường ruột**

#### **1. Nguyên lý**

Quy trình xét nghiệm phát hiện Enterovirus (EV) dựa trên xét nghiệm phát hiện vật liệu di truyền bằng phương pháp sinh học phân tử, phương pháp này là phản ứng chuỗi polymerase thời gian thực (Realtime RT-PCR). Vùng gen được dùng để thực hiện phản ứng là vùng 5'UTR. EV được xác định nhờ các đầu dò phát huỳnh quang đặc hiệu cho vùng gen 5'UTR của EV và nội chứng (Internal Control). Bộ kit này dựa trên 3 bước: tách ARN từ mẫu bệnh phẩm, thực hiện sao chép ngược và thực hiện nhân bản vùng gen 5'UTR dựa vào kỹ thuật Realtime RT-PCR.

#### **2. Bệnh phẩm**

Dịch não tủy bệnh nhân HCNC do vi rút chưa xác định được nguyên nhân.

#### **3. Trang thiết bị, sinh phẩm, hóa chất**

##### **3.1. Trang thiết bị**

- Tủ an toàn sinh học cấp II.
- Máy ly tâm lạnh, Máy ủ nhiệt, Máy Vontex
- Máy Real-time PCR: Qiagen Rotor-Gene Q
- Máy lắc tuýp 50 ml
- Tủ lạnh 4<sup>0</sup>C, tủ lạnh – 20<sup>0</sup>C
- Đầu côn các loại tương ứng với Pipet bán tự động
- Pipet bán tự động loại 10- 100 µl; 2- 20 µl; 100 - 1000µl
- Bút, nhãn, găng tay dùng 1 lần.
- Tuýp Eppendofit các loại 0.2 ml, 0.5 ml, 2.0 ml

##### **3.2. Sinh phẩm- Hóa chất**

- Sinh phẩm tách chiết ARN của QIAGEN; Sacace Enterovirus Real- TM, Lot 01B17J579, REF V16-50FRT của hãng Sacace: PCR-mix-1 Enterovirus, PCR-mix-2-FRT, TaqF Polymerase, Reverse transcriptase (M-MLV), RT-G-mix-2,

Positive Control Enterovirus cDNA C+, DNA-buffer, Negative Control, Internal Control RNA (IC RNA).

#### **4. Kỹ thuật tiến hành**

##### **4.1. Xử lý bệnh phẩm**

- Loại bệnh phẩm: Dịch não tủy.
- Điều kiện bảo quản: Bệnh phẩm sau khi lấy được bảo quản trong môi trường bảo quản virus ở điều kiện – 80<sup>0</sup>C. Mẫu bệnh phẩm sau khi được làm tan băng, lắc trộn đều trước khi tiến hành tách chiết ARN.

##### **4.2. Quy trình tách chiết ARN từ mẫu bệnh phẩm (sinh phẩm QIAGEN)**

###### **4.2.1. Chuẩn bị sinh phẩm**

###### **- Đệm AVL**

- + Kiểm tra đệm AVL, đảm bảo dung dịch đệm đồng nhất.
- + Thêm 310 µl đệm AVE vào 1 tube đông khô chứa chất mang ARN (Carrier ARN). Hòa tan chất mang ARN bằng máy trộn, sau đó chuyển lượng hòa tan có chứa chất mang ARN sang chai đệm AVL, trộn đều trước khi sử dụng đệm AVL.
- + Chuyển 560 µl đệm AVL có chứa chất mang RNA vào mỗi tube 1,5ml vô trùng.
- + Bảo quản ở nhiệt độ -15<sup>0</sup>C đến -30<sup>0</sup>C và theo hạn sử dụng của kit tách chiết.

###### **- Đệm AW1**

- + Thêm 125 ml Ethanol (96-100%) vào chai đệm AW1 chứa 95ml AW1.
- + Đánh dấu trên nắp chai đã thêm ethanol và ghi ngày tháng năm chuẩn bị đệm AW1 trên chai. Bảo quản ở nhiệt độ phòng theo hạn sử dụng của kit tách chiết.

###### **- Đệm AW2**

- + Thêm 160 ml ethanol (96-100%) vào chai AW2 chứa 66ml AW2.
- + Đánh dấu trên nắp chai đã thêm ethanol và ghi ngày tháng năm chuẩn bị đệm AW2 trên chai. Bảo quản ở nhiệt độ phòng theo hạn sử dụng của kit tách chiết.

###### **4.2.2. Tách chiết mẫu**

**Bước 1:** Kiểm tra độ đồng nhất 560 µl đệm AVL chứa chất mang ARN trong tube 2ml.

**Bước 2:** Thêm 140 µl mẫu, 10µl IC ( Internal Control) vào 560 µl dung dịch ly giải virus AVL có chất mang ARN

**Bước 3:** Trộn bằng máy trộn khoảng 15 giây, để tạo một hỗn dịch đồng nhất giữa mẫu và đệm AVL, ủ ở nhiệt độ phòng 10 phút đảm bảo các hạt virus bị ly giải hoàn toàn, ARN của virus bị ly giải được gắn vào chất mang ARN.

**Bước 4:** Ly tâm nhanh tube hỗn hợp khoảng 10 giây bằng máy ly tâm MICROFUGE để tất cả các dung dịch không dính trên nắp tube. Thêm 560µl Ethanol (96-100%) vào mỗi tube, trộn đều bằng máy trộn trong 15 giây, Ethanol sẽ tủa các sợi ARN.

**Bước 5:** Ly tâm nhanh khoảng 10 giây.

**Bước 6:** Cho 630 µl hỗn dịch trên vào cột QIAamp, ly tâm 8.000 vòng trong 1 phút. Tất cả ARN sẽ được gắn trên bề mặt màng Silicagel với sự có mặt của chất mang ARN. Chuyển cột sang tube 2ml mới.

**Bước 7:** Mở nắp cột QIAamp, lặp lại bước 6.

**Bước 8:** Mở nắp cột QIAamp, thêm 500µl đệm AW1. Đóng nắp và ly tâm 8.000 vòng trong 1 phút. Chuyển cột spin sang tube 2ml sạch và loại bỏ tube có chứa dịch lọc. AW1 có tác dụng loại bỏ các thành phần không phải là ARN có trên mặt màng Silicagel.

**Bước 9:** Mở nắp cột QIAamp, thêm 500µl đệm AW2. Đóng nắp và ly tâm trong khoảng từ 12.000 vòng đến 14.000 vòng trong 3 phút. Chuyển cột QIAamp sang tube 2ml sạch và loại bỏ tube có chứa dịch lọc. Và ly tâm thêm 1 phút ở tốc độ từ 12.000 vòng đến 14.000 vòng để loại bỏ hoàn toàn đệm AW2.

**Bước 10:** Chuyển cột spin QIAamp vào tube ly tâm sạch 1,5ml và loại bỏ tube chứa dịch lọc cũ.

**Bước 11:** Mở nắp cột spin QIAamp, thêm 60µl đệm AVE và ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 phút. Ly tâm 8.000 vòng trong 1 phút để toàn bộ ARN tách khỏi màng Silicagel. Sau khi ly tâm toàn bộ ARN của mẫu sẽ được thu hồi trong dịch lọc.

**Bước 12:** Lưu giữ ở -20°C hoặc -80°C trong thời gian 6 - 12 tháng.

### 4.3. Tiến hành phản ứng

#### 4.3.1. Thành phần phản ứng:

Tổng thể tích cho mỗi ống phản ứng là 25  $\mu$ l

Thành phần phản ứng	Thể tích ( $\mu$ l)
PCR-mix-1	10,0
PCR-mix-2-FRT	5,0
RT-G-mix-2	0,25
TaqF polymerase	0,5
M-MLV	0,25
<i>Trộn đều và đặt hỗn dịch phản ứng lên đá lạnh</i>	
Thể tích hỗn hợp/ phản ứng	15 ( $\mu$ l)
Thể tích ARN	10 ( $\mu$ l)
Tổng thể tích/ phản ứng	25 ( $\mu$ l)

#### 4.3.2. Chạy PCR trên máy Real- time PCR Rotor- Gene Q

❖ Chu trình nhiệt

Bước	Nhiệt độ ( $^{\circ}$ C)	Thời gian (phút: giây)	Chu kỳ lặp
1	50	15:00	x 1
2	95	15:00	x 1
3	95	0:10	} x 45
	60	0:20 <i>Thu tín hiệu huỳnh quang(Green, Yellow)</i>	

❖ Tra mẫu

\* Mẫu chứng:

- Chứng âm khuếch đại (NCA): Cho 10 $\mu$ l dung dịch DNA- buffer vào tube chứa hỗn hợp phản ứng realtime PCR, giữ trong giá tích lạnh.

- Chứng dương: Cho 10 $\mu$ l dung dịch chứng dương (Positive Control Enterovirus cDNA C+) vào tube chứa hỗn hợp phản ứng realtime PCR, giữ trong giá tích lạnh.

- Chứng âm tách chiết (NCE): Cho 10µl dung dịch chứng âm tách chiết vào tube chứa hỗn hợp phản ứng realtime PCR, giữ trong giá tích lạnh.

\* Mẫu bệnh phẩm:

- Cho 10µl mẫu ARN bệnh phẩm vào tube chứa hỗn hợp phản ứng realtime PCR, giữ trong giá tích lạnh.

- Khi tra mẫu phải tra theo đúng sơ đồ mẫu và nhập mã số mẫu vào vị trí mẫu trên khay của máy vào biểu mẫu.

**Chú ý:** Nếu chưa chạy ngay thì nên giữ tube ở điều kiện 4°C.

❖ Chạy máy

- Đặt các tuýp vào máy, khởi động chương trình theo yêu cầu xét nghiệm.

- Tạo tên tệp và lưu giữ dữ liệu

- Nhập tên bệnh nhân, vị trí đặt bệnh phẩm trên khay theo biểu mẫu. Tại mục unit chọn “**coppies/ reaction**”.

❖ Cài đặt máy

Trước khi tiến hành phân tích kết quả cần tiến hành cài đặt các thông số sau đây:

Kênh màu	Gain Optimisation	Threshold	Outlier Removal	Slope Correct
FAM/ Green	5-10	0.05	10%	On
JOE/ Yellow	5-10	0.05	10%	On

## 5. Phân tích kết quả

### 5.1. Tiêu chuẩn của phản ứng

- Kết quả chỉ đọc được khi:

Chứng	Giai đoạn kiểm soát	Ct kênh Green (IC)	Ct kênh Yellow (EV)	Kết luận
NCE	Tách chiết ARN	Dương ( Ct < 38)	Âm hoặc (Ct > 38)	Chấp nhận
NCA	Sao chép ngược và khuếch đại	Âm hoặc (Ct > 38)	Âm hoặc (Ct > 38)	Chấp nhận
C+	Sao chép ngược và khuếch đại	Dương ( Ct < 38)	Dương ( Ct < 38)	Chấp nhận

+ Chứng âm: không có tín hiệu huỳnh quang ở kênh màu ( Yellow)

+ Chứng dương: tín hiệu huỳnh quang được thu nhận ở tất cả các kênh màu (Green, Yellow)

### **5.2. Đọc kết quả:**

- Mẫu âm tính khi có tín hiệu IC (kênh màu Green) với  $Ct < 38$  và kênh màu Yellow không có tín hiệu hoặc  $Ct > 38$

- Mẫu dương tính khi kênh màu Green có hoặc không có tín hiệu và kênh màu Yellow có tín hiệu với  $Ct < 38$

### **5.3. Chú ý**

- Ở kênh màu Green (IC) của mẫu có  $Ct > 38$ : cần kiểm tra lại mẫu

+ Phản ứng PCR bị ức chế: kiểm tra lại quá trình tách chiết mẫu bệnh phẩm có đúng quy trình được khuyến cáo không.

+ Kiểm tra lại tình trạng bảo quản của sinh phẩm

+ Kiểm tra lại chu trình nhiệt và quá trình thực hiện phản ứng PCR

+ Kiểm tra lại IC có được bổ xung theo đúng quy trình tách chiết không.

- Ở kênh màu Yellow (EV) của mẫu có  $Ct > 40$ : cần kiểm tra lại mẫu.

- Có tín hiệu ở kênh Yellow (EV) của chứng âm tách chiết. Bị nhiễm mẫu trong quá trình tách chiết ARN. Tất cả các mẫu đều không được chấp nhận kết quả. Cần thực hiện các biện pháp khử trùng bề mặt và dụng cụ bằng giaven và cồn. Sử dụng đầu côn lọc trong quá trình tách chiết và thay đầu côn cho mỗi mẫu. Tách chiết lại mẫu bệnh phẩm bằng bộ sinh phẩm khác.

- Có tín hiệu ở kênh Yellow (EV) của chứng âm PCR. Bị nhiễm mẫu trong quá trình chuẩn bị PCR. Tất cả các mẫu đều không được chấp nhận kết quả. Cần thực hiện các biện pháp khử trùng bề mặt và dụng cụ bằng giaven và cồn. Sử dụng đầu côn lọc trong quá trình tách chiết và thay đầu côn cho mỗi mẫu. Thực hiện lại PCR mẫu bệnh phẩm bằng bộ sinh phẩm khác.

### **5.4. Báo cáo kết quả:**

Báo cáo kết quả: Âm tính/ Dương tính.

## **Phụ lục 7**

### **Kỹ thuật Realtime PCR chẩn đoán vi rút Herpes**

#### **2. Nguyên lý**

Quy trình xét nghiệm phát hiện Herpes Simplex virus (HSV) dựa trên xét nghiệm phát hiện vật liệu di truyền bằng phương pháp sinh học phân tử, phương pháp này là phản ứng chuỗi polymerase thời gian thực (realtime PCR).

#### **2. Bệnh phẩm**

Dịch não tủy bệnh nhân HCNC do vi rút chưa xác định được nguyên nhân.

#### **3. Trang thiết bị, sinh phẩm, hóa chất**

##### **3.1. Trang thiết bị**

- Tủ an toàn sinh học cấp II.
- Máy ly tâm lạnh, Máy ủ nhiệt, Máy Vontex
- Máy Real- time PCR: Qiagen Rotor-Gene Q
- Máy lắc tuýp 50 ml
- Tủ lạnh 4<sup>0</sup>C, tủ lạnh – 20<sup>0</sup>C
- Đầu côn các loại tương ứng với Pipet bán tự động
- Pipet bán tự động loại 10- 100 µl; 2- 20 µl; 100 - 1000µl
- Bút lông, nhãn, găng tay dùng 1 lần.
- Tuýp Eppendofit các loại 0.2 ml, 0.5 ml, 2.0 ml

##### **3.2. Sinh phẩm-Hóa chất**

- Sinh phẩm tách chiết ADN của QIAGEN; Sinh phẩm: QIAGEN Artus HSV 1/2 QS-RGQ Kit (CE-IVD), Cat No./ID: 4500368 của hãng Qiagen. Bao gồm: HSV-1/2 RG Master, HSV-1/2 Magnesium solution, HSV-1 RG Positive control, HSV-2 RG Positive control, HSV-1/2 RG Internal control, Negative control.

#### **4. Kỹ thuật tiến hành**

##### **4.1. Xử lý bệnh phẩm**



- Loại bệnh phẩm: Dịch não tủy. Điều kiện bảo quản: Bệnh phẩm sau khi lấy được bảo quản trong môi trường bảo quản virus ở điều kiện  $-80^{\circ}\text{C}$ . Mẫu bệnh phẩm sau khi được làm tan băng, lắc trộn đều trước khi tiến hành tách chiết ADN.

#### **4.2. Tách chiết ADN từ mẫu bệnh phẩm (sinh phẩm QIAGEN)**

Chuẩn bị dung dịch đệm theo hướng dẫn bộ sinh phẩm

**Bước 1.** Bổ sung 20 uL Protease (hoặc proteinase K) vào mỗi ống epp 1.5 mL

**Bước 2.** Bổ sung 200 uL mẫu (máu tổng số, huyết thanh, dịch chiết, buffy coat...) vào ống ở bước (1) và vortex

**Bước 3.** Bổ sung 200 uL Buffer AL và 5 ul Carrier RNA. Vortex 15s (Lưu ý không cho Protease/Proteinase K trực tiếp vào AL). Cho thêm 6 ul Internal control (IC)

**Bước 4.** Ủ  $56^{\circ}\text{C}/10$  phút, lắc đều dung dịch trong quá trình ủ. Spin down cho dung dịch lắng hết xuống đáy, không dính trên nắp

**Bước 5.** Bổ sung 200 uL cồn 100% vào mẫu. Invert 15s. Spin down

**Bước 6.** Lên cột. Ly tâm 8000 rpm/phút trong 1 phút. Loại dịch chảy qua cột, chuyển cột sang 1 ống thu mới (được cấp bởi kit)

**Bước 7.** Cho 500 uL Buffer AW1. Ly tâm 8000 rpm/phút trong 1 phút. Loại dịch chảy qua cột, thay ống thu (được cấp bởi kit)

**Bước 8.** Cho 500 uL Buffer AW2. Ly tâm 14000 rpm/ phút trong 3 phút

**Bước 9.** Chuyển cột ly tâm sang ống thu mới. Ly tâm khan tốc độ tối đa (14.000 rpm) trong 1 phút

**Bước 10.** Chuyển cột sang ống 1.5ml sạch. Thêm 60 uL Buffer AE. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Ly tâm 8000 rpm/phút trong 2 phút.

**Bước 11.** Lưu giữ ở  $-20^{\circ}\text{C}$  hoặc  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.3. Tiến hành phản ứng Realtime PCR HSV**

- **Thành phần phản ứng:** Tổng thể tích cho mỗi ống phản ứng là 50  $\mu\text{l}$

<b>Thành phần phản ứng</b>	<b>Thể tích (µl)</b>
HSV RG Master	25
HSV Mg- Sol	5
<b>Tổng</b>	30 (µl)
Trộn đều và đặt hỗn dịch phản ứng lên đá lạnh	
Thể tích ADN	20 (µl)
Tổng thể tích/ phản ứng	50 (µl)

**- Chu trình nhiệt:**

<b>Bước</b>	<b>Nhiệt độ (°C)</b>	<b>Thời gian (phút: giây)</b>	<b>Chu kỳ lặp</b>
1	95	10:00	x 1
2	<b>95</b>	<b>0:15</b>	} x 45
	<b>65</b>	<b>0:30</b> <i>Thu tín hiệu huỳnh quang (Green, Yellow, Orange)</i>	
	<b>72</b>	<b>0:20</b>	

**Chọn touchdown PCR 10 CK, 1°C/CK.**

**- Tra mẫu**

\* Mẫu chứng:

- Chứng âm: Cho 20µl dung dịch nước ( PC Grade) vào tube chứa hỗn hợp phản ứng realtime PCR, giữ trong giá tích lạnh.

- Chứng dương HSV-1: Cho 20µl dung dịch chứng dương HSV-1 ( HSV-1 RG PC) vào tube chứa hỗn hợp phản ứng realtime PCR, giữ trong giá tích lạnh.

- Chứng dương HSV-2: Cho 20µl dung dịch chứng dương HSV-2 ( HSV-2 RG PC) vào tube chứa hỗn hợp phản ứng realtime PCR, giữ trong giá tích lạnh.

\* Mẫu bệnh phẩm:

- Cho 20µl mẫu ADN bệnh phẩm vào tube chứa hỗn hợp phản ứng realtime PCR, giữ trong giá tích lạnh.

- Khi tra mẫu phải tra theo đúng sơ đồ mẫu và nhập mã số mẫu vào vị trí mẫu trên khay của máy vào biểu mẫu.

**Chú ý:** Nếu chưa chạy ngay thì nên giữ tube ở điều kiện 4°C.

### **- Chạy máy**

- Đặt các tuýp vào máy, khởi động chương trình theo yêu cầu xét nghiệm.

- Tạo tên tệp và lưu giữ dữ liệu (**vào thư mục năm/ HSV/ tên file-theo ngày tháng làm xét nghiệm**).

- Nhập tên bệnh nhân, vị trí đặt bệnh phẩm trên khay theo biểu mẫu. Tại mục unit chọn “**coppies/  $\mu$ l**,”

- Ghi chép nhật ký sử dụng thiết bị.

### **- Cài đặt máy**

Trước khi tiến hành phân tích kết quả cần tiến hành cài đặt các thông số sau đây:

<b>Kênh màu</b>	<b>Gain Optimisation</b>	<b>Threshold</b>	<b>Outlier Removal</b>	<b>Slope Correct</b>
FAM/ Green	5-10	0.03- 0.05	10%	On
JOE/ Yellow	5-10	0.03- 0.05	10%	On
ROX/ Orange	5-10	0.03- 0.05	10%	On

## **5. Phân tích kết quả**

### **5.1. Tiêu chuẩn của phản ứng**

- Kết quả chỉ đọc được khi:

+ Chứng âm: không có tín hiệu huỳnh quang ở 2 kênh màu (Green và Orange)

+ Chứng dương: tín hiệu huỳnh quang được thu nhận ở tất cả các kênh màu (Green, Yellow, Orange)

### **5.2. Đọc kết quả**

- Mẫu âm tính khi ở kênh màu Yellow có tín hiệu và cắt đường threshold IC và các kênh màu còn lại không có tín hiệu

- Mẫu dương tính HSV-1 khi kênh màu Green có tín hiệu cắt đường threshold, kênh màu Yellow có hoặc không có tín hiệu cắt đường threshold, kênh màu Orange không có tín hiệu cắt đường threshold.

- Mẫu dương tính HSV-2 khi kênh màu Orange có tín hiệu cắt đường threshold, kênh màu Yellow có hoặc không có tín hiệu cắt đường threshold, kênh màu Green không có tín hiệu cắt đường threshold.

- Mẫu dương tính HSV-1 và HSV-2 khi có tín hiệu cắt đường threshold ở cả 2 kênh màu Green và Orange cùng lúc, có hoặc không có tín hiệu cắt đường threshold ở kênh màu Yellow.

- Không có tín hiệu ở kênh Green, Orange hoặc Yellow. Kết quả không được chấp nhận.

### **5.3. Chú ý**

- Ở kênh màu Yellow của mẫu không có tín hiệu: cần kiểm tra lại mẫu  
+ Phản ứng PCR bị ức chế: kiểm tra lại quá trình tách chiết mẫu bệnh phẩm có đúng quy trình được khuyến cáo không.

+ Kiểm tra lại tình trạng bảo quản của sinh phẩm

+ Kiểm tra lại chu trình nhiệt và quá trình thực hiện phản ứng PCR

+ Kiểm tra lại IC có được bổ xung theo đúng quy trình tách chiết không.

- Ở kênh màu Green, Orange của mẫu không có tín hiệu: cần kiểm tra lại mẫu.

- Có tín hiệu ở kênh Green hoặc Orange của chứng âm PCR. Bị nhiễm mẫu trong quá trình chuẩn bị PCR. Tất cả các mẫu đều không được chấp nhận kết quả. Cần thực hiện các biện pháp khử trùng bề mặt và dụng cụ bằng giaven và cồn. Sử dụng đầu côn lọc trong quá trình tách chiết và thay đầu côn cho mỗi mẫu. Thực hiện lại PCR mẫu bệnh phẩm bằng bộ sinh phẩm khác.

- Mẫu chứng dương không có tín hiệu ở kênh Green hoặc Orange. Cần kiểm tra lại việc bảo quản sinh phẩm, chu trình nhiệt và quá trình thực hiện phản ứng PCR, quy trình phân tích kết quả.

### **5.4. Báo cáo kết quả**

Báo cáo kết quả: Âm tính/ Dương tính.

## **Phụ lục 8**

### **Kỹ thuật ELISA phát hiện Kháng nguyên NS1-Viêm não Nhật Bản**

#### **1. Nguyên lý kỹ thuật**

Đây là phản ứng ELISA sandwich trực tiếp sử dụng thể đơn dòng kháng kháng nguyên NS1 của vi rút VNNB được gắn vào bản nhựa; đồng thời kháng thể này cũng được sử dụng để gắn với enzyme. Cho huyết thanh hoặc dịch não tủy của bệnh nhân cùng với cộng hợp vào giếng đã gắn kháng thể kháng kháng nguyên NS1/VNNB. Nếu bệnh phẩm có kháng nguyên NS1 thì sẽ tạo phức hợp miễn dịch không màu. Phát hiện phức hợp miễn dịch này bằng cơ chất tạo màu TMB và đo ở bước sóng kép 450nm/620nm. Sau đó tính kết quả dựa vào giá trị OD đo được để xác định trong mẫu xét nghiệm có sự hiện diện của kháng nguyên NS1 hay không.

#### **2. Mục đích**

Sử dụng kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên NS1 để phát hiện kháng nguyên NS1 của vi rút VNNB có trong huyết thanh hoặc dịch não tủy của bệnh nhân hội chứng não cấp có chuẩn đoán nghi ngờ do vi rút VNNB.

#### **3. Trang thiết bị, hóa chất, sinh phẩm**

##### **3.1. Dụng cụ, trang thiết bị**

- Nước cất hoặc nước trao đổi ion, pH trung tính.
- Bảng nhựa 96 giếng.
- Pipet bán tự động một kênh loại 10 µl, 200 µl, 1000 µl.
- Pipet bán tự động đa kênh loại 300 µl.
- Các loại pipet tip tương ứng.
- Hệ thống máy rửa, máy ủ, máy đọc ELISA.
- Tủ ấm 37<sup>0</sup>C.
- Tủ lạnh +4<sup>0</sup>C.
- Tủ âm -20<sup>0</sup>C.
- Giấy thấm nước.
- Các ống nghiệm và giá đựng ống nghiệm tương ứng; Găng tay.

### **3.2. Hóa chất, sinh phẩm**

- Biotinylated Mab (anti-NS1 3E10).
- Streptavidin, Peroxidase conjugated (Sigma Lot No S2438).
- Dung dịch phủ bản pH 9,6.
- Dung dịch đệm PBS.
- Dung dịch BSA 3% để block.
- Dung dịch rửa bản nhựa có 0,05% Tween 20.
- Đệm cơ chất TMB.
- Dung dịch dừng phản ứng  $H_2SO_4.4N$ .
- Các sinh phẩm hóa chất cần thiết...

## **4. Thực hiện kỹ thuật**

### **4.1. Gắn bản**

- Pha kháng thể đơn dòng trong dung dịch phủ bản để với hàm lượng  $2,5\mu g/ml$ , cho vào mỗi giếng của bản nhựa  $100\mu l$ , để qua đêm ở  $4^{\circ}C$ .
- Loại bỏ dung dịch phủ bản 2 lần bằng dung dịch PBS.
- Block các giếng nhựa bằng BSA 3%, cho  $100\mu l/gi\ddot{e}ng$ .
- Loại bỏ dung dịch block 2 lần bằng dung dịch PBS.

### **4.2. Cho mẫu kiểm tra và mẫu chứng**

- Cho mẫu kháng nguyên chuẩn NS1 pha ở hiệu giá xác định trong đệm PBS có BSA 1%.
- Các mẫu xét nghiệm pha theo công thức sau: Huyết thanh pha loãng 1/10, dịch não tủy pha  $\frac{1}{2}$ .
- Ủ ở  $37^{\circ}C/1$  giờ.
- Loại bỏ mẫu kháng nguyên chuẩn và mẫu xét nghiệm bằng dung dịch PBS-T 8 lần.

### **4.3. Cho biotinylated 3E 10**

- Pha biotinylated 3E 10 trong dung dịch đệm PBS có BSA 1% để có hàm lượng  $0,4\mu g/ml$ .
- Cho  $100\mu l/gi\ddot{e}ng$ , ủ ở  $37^{\circ}C/1$  giờ.

- Loại bỏ biotinylated 3E 10 rửa 8 lần bằng dung dịch PBS-T.

#### **4.4. Cho tiếp xúc với cộng hợp**

- Pha cộng hợp Streptavidin ở nồng độ 0,2µg/ml; Cho 100µl/giếng, ủ ở 37<sup>0</sup>C/1 giờ.

- Loại bỏ cộng hợp Streptavidin rửa 8 lần bằng dung dịch PBS-T.

#### **4.5. Cho cơ chất**

Cho vào mỗi giếng 100µl dung dịch cơ chất TMB.

Để tránh ánh sáng ở nhiệt độ phòng 30 phút.

#### **4.6. Dừng phản ứng**

Cho 100µl dung dịch dừng phản ứng H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.4N và tắt cả các giếng.

Đọc ở bước sóng kép 450nm/630nm.

### **5. Nhận định kết quả**

#### **5.1. Tính giá trị OD trung bình của cut-off (CO)**

Giá trị CO = giá trị trung bình của 2 giếng mẫu chứng dương.

#### **5.2. Tính tỷ số của mẫu**

Giá trị tỷ số của mẫu = OD mẫu/CO

<b>Tỷ số của mẫu</b>	<b>Kết quả</b>	<b>Giải thích</b>
Tỷ số < 0,5	Âm tính	Không có kháng nguyên NS1
0,5 < Tỷ số < 1	Nghi ngờ	Nghi ngờ có kháng nguyên NS1
Tỷ số ≥ 1	Dương tính	Có kháng nguyên NS1

*Ghi chú:* Có thể có những mẫu dương tính có giá trị OD rất cao, vượt qua ngưỡng đọc của máy ELISA.

### **6. Đề phòng**

- Đi găng tay khi tiếp xúc với huyết thanh hoặc dịch não tủy.
- Rửa tay sau từng bước thực hiện phản ứng và sau khi kết thúc.
- Dung dịch dừng phản ứng: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.4N là chất gây bỏng nặng. Nếu bị bắn vào mắt, dùng nước dội rửa ngay. Không được cho nước vào dung dịch này.

## **Phụ lục 9**

### **Quy trình xác định kiểu gen của vi rút viêm não Nhật Bản bằng kỹ thuật giải trình tự**

#### **1. Nguyên lý**

Kỹ thuật giải trình tự gen theo phương pháp Sanger dựa trên việc sử dụng dideoxynucleotides (ddNTP) bên cạnh các nucleotide bình thường. Dideoxynucleotides về mặt cấu tạo giống như nucleotide ngoại trừ nó có chứa nhóm hydrogen ở đầu Carbon 3' thay vì nhóm hydroxyl (OH). Khi ddNTPs được gắn vào đoạn gen, nó không cho các nucleotide gắn vào tiếp sau đó do cầu nối phosphodiester không thể hình thành giữa ddNTP và dNTP. Do đó chuỗi DNA không kéo dài được nữa. Kết quả của phản ứng PCR giải trình tự gen là các đoạn DNA khuếch đại có chiều dài khác nhau. Sau khi chạy điện di, các đoạn DNA có chiều dài khác nhau sẽ được phân tách và được nhận diện bởi máy giải trình tự. Với mục đích xác định kiểu gen của vi rút Viêm não Nhật Bản, toàn bộ vùng gen E sẽ được chọn để giải trình tự.

#### **2. Nguyên vật liệu, trang thiết bị**

##### **2.1. Dụng cụ tiêu hao**

- Tấm 96 giếng 0.2ml dùng cho máy giải trình tự
- Pipet: 5; 10; 20; 100; 200 và 1000  $\mu$ l
- Đầu côn lọc: 10; 30; 100; 200 và 1000  $\mu$ l
- Tuýp tiệt trùng: 0.2; 0.5 và 1.7 ml
- Giá tích lạnh
- Găng tay

##### **2.2. Trang thiết bị**

- Pipet, Máy lắc, Máy luân nhiệt, Máy ly tâm, Tủ an toàn, Tủ lạnh
- Máy giải trình tự gen ABI

##### **2.3. Sinh phẩm**

- Nước khử ion không có nuclease



- ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent: sinh phẩm dùng tinh sạch sản phẩm PCR

- BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit: Sinh phẩm cho phản ứng PCR giải trình tự gen

+ BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix

+ 5X Sequencing Buffer

- BigDye XTerminator® Purification Kit: sinh phẩm dùng tinh sạch sản phẩm của phản ứng Cycle Sequence

+ Dung dịch XTerminator™

+ Dung dịch SAM™

- Bộ môi cho phản ứng PCR giải trình tự gen vi rút

Tên môi	Trình tự nucleotide (5' – 3')	Vị trí
JE- EF	TGYTGGTCGCTCCGGCTTA	955-973
JE- ER	AAGATGCCACTTCCACAYCTC	2516-2536
390 F	GGCAGAAAGCAAAACAAAAG	390-410
939F	CGCGATCAGTAAAGCCTTGT	939 -959
1273F	AACGCTTCAGTGTTTCAGTCC	1273-1293
1769F	TGGCCTGATGTAACTTCAC	1769-1789
1986R	TAGCGCTGCTAGTCTCTGAG	1966-1986
2122R	TGAAGACCCCTCCAATAGAG	2102-2122
2426R	TCACAAACCACCACGGAAGT	2406-2426

### 3. Các bước tiến hành

#### 3.1. Quy trình pha dung dịch/hóa chất/sinh phẩm

##### 3.1.1. Chuẩn bị sinh phẩm cho phản ứng tinh sạch sản phẩm PCR

- ExoSAP-IT™ được pha loãng với nước tinh sạch theo tỉ lệ 1:7 cho đủ với 1 lần sử dụng. Không dùng lại hoặc pha loãng nhiều hơn mức cần sử dụng do enzyme có trong ExoSAP-IT™ dễ bị bất hoạt.

### Thành phần pha sinh phẩm

STT	Thành phần	Thể tích (ul)/ phản ứng
1	ExoSAP-IT™	2.0
2	DNA mẫu	5.0
	<b>Tổng</b>	<b>7.0</b>

#### 3.1.2. Pha sinh phẩm cho phản ứng Cycle Sequence

- Chuẩn bị sinh phẩm được thực hiện theo hướng dẫn của bộ sinh phẩm BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit

Hỗn hợp phản ứng Cycle Sequence

STT	Thành phần	Nồng độ gốc	Thể tích (ul)
1	NF water		6.3
2	5x Buffer	5x	2.0
3	Big Dye v3.1		0.5
4	Môi xuôi hoặc ngược	10 uM	0.2
5	<b>Tổng</b>		<b>9.0</b>

#### 3.1.3. Pha sinh phẩm cho phản ứng tinh sạch sản phẩm Cycle Sequence

- Chuẩn bị sinh phẩm được thực hiện theo hướng dẫn của bộ sinh phẩm BigDye XTerminator® Purification Kit

Hỗn hợp phản ứng tinh sạch sản phẩm Cycle Sequence

Thành phần	Thể tích(ul)/1 pư
Dung dịch SAM™	23.0
Dung dịch XTerminator™	5.0
<b>Tổng</b>	<b>28.0</b>

### 3.2. Quy trình tinh sạch sản phẩm PCR

### 3.2.1. Cài đặt thiết bị

Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Chu kỳ lặp	Tên chương trình
37	30:00	1	ExoSap
80	15:00	1	
4	∞		

### 3.2.2. Tra mẫu và chạy máy

- Cho 5 µl sản phẩm DNA mẫu (đã được khuếch đại bằng bộ môi JE-ER và JE-EF vào hỗn hợp sinh phẩm đã chuẩn bị cho phản ứng tinh sạch PCR.

- Đặt các tuýp vào máy, khởi động và kiểm tra chương trình trước khi chạy máy luân nhiệt cổ điển theo yêu cầu xét nghiệm.

## 3.3. Quy trình chạy phản ứng Cycle Sequence

### 3.3.1. Cài đặt thiết bị

Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Chu kỳ lặp	Tên chương trình
96	5:00	x 1	Cycle Sequence
96	0:10	} x 35	
50	0:10		
60	4:00		
4	∞		

### 3.3.2. Tra mẫu và chạy máy

- Cho 1µl mẫu DNA đã được tinh sạch vào tube chứa hỗn hợp phản ứng Cycle Sequence, ly tâm nhanh và giữ trong giá tích lạnh. Một mẫu sẽ có 9 tuýp tương ứng với 9 môi.

- Đặt các tuýp vào máy, khởi động và kiểm tra chương trình trước khi chạy máy luân nhiệt cổ điển theo yêu cầu xét nghiệm.

## 3.4. Quy trình tinh sạch sản phẩm Cycle Sequence

- Cho 10 µl sản phẩm DNA mẫu vào hỗn hợp sinh phẩm đã chuẩn bị cho phản ứng tinh sạch sản phẩm Cycle Sequence

- Đặt các tuýp vào máy lắc, lắc đều 30 phút

- Ly tâm 2000 vòng trong vòng 2 phút.

### ***3.5. Quy trình chạy máy giải trình tự gen***

- Sản phẩm Cycle Sequence sau khi được tinh sạch sẽ được nhỏ vào tấm 96 giếng sử dụng cho máy giải trình tự

- Khi tra mẫu phải nhập mã số mẫu vào sơ đồ vị trí khung 96 giếng

Chú ý: Nếu chưa chạy ngay thì nên giữ tấm ở điều kiện 4°C và tránh ánh sáng

- Đặt tấm vào máy, khởi động chương trình theo yêu cầu xét nghiệm. Tạo tên tệp và lưu giữ dữ liệu.

**Phụ lục 10**  
**Thông tin về các chủng vi rút VNNB được sử dụng để so sánh trình tự**  
**vùng gen E và xây dựng cây phát sinh loài**

<b>STT</b>	<b>Chủng</b>	<b>Năm</b>	<b>Quốc Gia</b>	<b>Genotype</b>	<b>Nguồn gốc</b>	<b>Số đăng ký Genbank</b>
1.	10VN56	2010	Việt Nam	GI-b	Muối	LC000636
2.	11VN92	2011	Việt Nam	GI-b	Muối	LC000637
3.	VNHT	2006	Việt Nam	GI-b	Muối	AB728497
4.	VNHT	2006	Việt Nam	GI-b	Muối	AB728498
5.	07VN72	2007	Việt Nam	GI-b	Người	LC000634
6.	02VN78	2002	Việt Nam	GI-b	Muối	AY376467
7.	07VN310	2007	Việt Nam	GI-b	Muối	HM228922
8.	07VN311	2007	Việt Nam	GI-b	Muối	HM228923
9.	02VN34	2002	Việt Nam	GI-b	Muối	AY376466
10	VNKT	2007	Việt Nam	GI-b	Muối	AB728500
11	VNKT	2007	Việt Nam	GI-b	Muối	AB728499
12	02VN22	2002	Việt Nam	GI-b	Lợn	AY376465
13	10VN58	2010	Việt Nam	GI-b	Muối	LC000635
14	02VN105	2002	Việt Nam	GI-b	Muối	AY376468
15	01VN88	2001	Việt Nam	GI-b	Lợn	AY376464
16	90VN70	1990	Việt Nam	GI-b	Người	HM228921
17	K95P05	1991	Hàn Quốc	GI-b	Muối	U34929
18	94VN141	1994	Việt Nam	GI-b	Muối	AB933311
19	JaNAr0102	2002	Nhật Bản	GI-b	Người	AY377577
20	LN02-102	2002	Trung Quốc	GI-b	Người	DQ404085
21	YN79-Bao83	1979	Trung Quốc	GI-b	Muối	DQ404128
22	Ishikawa	1994	Nhật Bản	GI-b	Muối	AB051292
23	ThCMAr6793	1992	Thái Lan	GI-b	Người	D45363
24	LA H07-05	2005	Việt Nam	GI-b	Lợn	FJ185154
25	LAH 2079-05	2005	Việt Nam	GI-b	Lợn	FJ185155
26	LA H06-05	2005	Việt Nam	GI-b	Lợn	FJ185153
27	LA-H-5330	2005	Việt Nam	GI-b	Lợn	HQ009265
28	CT-MO-P7	2005	Việt Nam	GI-b	Muối	HQ009266
29	VNTN	2008	Việt Nam	GI-b	Muối	AB728501

30	KK 1116	2005	Thái Lan	GI-b	Người	DQ343290
31	ThCMAR4492	1992	Thái Lan	GI	Người	DQ084229
32	M859	1967	Campuchia	GI-a	Muối	U70410
33	K91P55	1991	Hàn Quốc	GI-a	Người	U34928
34	Th2372	1972	Thái Lan	GI-a	Người	D76424
35	Th2322	1979	Thái Lan	GI-a	Người	U70401
36	FU	1995	AUS	GII	Người	AF217620
37	JKT5441	1981	Ấn Độ	GII	Muối	U70406
38	04VN79	2004	Việt Nam	GIII	Người	HQ009264
39	04VN32	2004	Việt Nam	GIII	Người	JF320944
40	03VN89	2003	Việt Nam	GIII	Người	JF320945
41	02VN205	2002	Việt Nam	GIII	Người	JF320946
42	02VN203	2002	Việt Nam	GIII	Người	JF320943
43	04VN75	2004	Việt Nam	GIII	Người	HQ009263
44	93VN118	1993	Việt Nam	GIII	Muối	AB933310
45	Nakayama ori	1935	Nhật Bản	GIII	Người	U03694
46	Vellore GP78	1978	Ấn Độ	GIII	Người	AF080251
47	79VN118	1979	Việt Nam	GIII	Muối	U70420
48	Beijing-1	1949	Trung Quốc	GIII	Người	L48961
49	64VN59	1964	Việt Nam	GIII	Người	LC000632
50	64VN60	1964	Việt Nam	GIII	Người	LC000631
51	Ha3	1960s	Trung Quốc	GIII	Người	JN381872
52	Naha-Meat54	1985	Nhật Bản	GIII	Người	DQ355367
53	86VN206	1986	Việt Nam	GIII	Người	AY376460
54	86VN207	1986	Việt Nam	GIII	Người	AY376461
55	K83P44	1983	Hàn Quốc	GIII	Người	FJ938232
56	SW GZ	2004	Trung Quốc	GIII	Người	KF297916
57	GZ-1	2011	Trung Quốc	GIII	Người	KC915017
58	JE84	1984	Hàn Quốc	GIII	Người	GQ415349
59	64VN51	1964	Việt Nam	GIII	Người	LC000633
60	89VN49	1989	Việt Nam	GIII	Người	AY376462
61	89VN50	1989	Việt Nam	GIII	Người	AY376463

**Phụ lục 11**  
**Thông tin về các chủng vi rút đường ruột được sử dụng để so sánh trình tự vùng gen VP1 và xây dựng cây phát sinh loài**

STT	Chủng	Năm	Quốc Gia	Nguồn gốc	Số đăng ký Genbank
1	29511	2007	Nga	Người	KC090713
2	02VN24	2002	Việt Nam	Viêm màng não	KC999622
3	Zhejiang/28/02	2002	Trung Quốc	Người	AY695092
4	PMKA0274	2010	Thái Lan	Người	KU574634
5	Zhejiang/28/02	2002	Trung Quốc	Người	AY695092
6	CSF2004-C7	2004	Trung Quốc	Dịch Não tủy	JX129877
7	Bc97-2601	1997	Trung Quốc	Người	AF127994
8	29288-PE	2002	BRA	Người	HQ152900
9	1301-93-TW	1993	TWN	Người	DQ842256
10	CF39/1996	1996	FRA	CF	AM946173
11	97-05	2005	ITA	Người	AJ295171
12	Zhejiang/17/2003	2003	Trung Quốc	Người	DQ246620
13	DS03-ZQ-02	2002	Trung Quốc	Người	DQ205335
14	4-YN-CHN	2016	Trung Quốc	Người	LC167441
15	4402/Cheboksar	2013	RUS	Người	KP261900
16	113B-YN	2010	Trung Quốc	Người	LC128685
17	C14-GD	2012	Trung Quốc	Người	KM034786
18	ZJ/LC-26	2013	Trung Quốc	Người	KP985780
19	CSF11-5	2005	Trung Quốc	Người	JX129814
20	A073-YN	2014	Trung Quốc	Người	LC411970
21	4588/PL14	2012	FIN	Người	KX683352
22	C82/SD	2014	Trung Quốc	Người	KY048046
23	JNEW100811.19	2010	Trung Quốc	Người	HQ82994
24	13-1-1/GD	2011	Trung Quốc	Người	KF487177
25	S25.01.MAR	2001	TUN	Người	HQ674749

26	CF1619	2000	FRA	CF	FN691456
27	90974.91	1991	AUS	Người	FJ868294
28	Anhui05-21	2005	Trung Quốc	Người	FJ542033
29	2005-29-1	2005	Trung Quốc	Người	KP266568
30	07071/SD	2007	Trung Quốc	Người	KJ772461
31	37010407088	2007	Trung Quốc	Người	JX138496
32	YN	2007	Trung Quốc	Người	KJ754038
33	Kor08-ecv6-16cn	2008	KOR	Người	HM048861
34	61252-70738	2008	Trung Quốc	Người	MF422579
35	N-510	2009	Ấn Độ	Người	JN203683
36	CF2480761-05	2005	Pháp	CF	AM236919
37	96-85CSF	1996	Trung Quốc	Người	AF233852
38	20006013	2000	Nhật Bản	Người	AB166855
39	89096	1996	Nhật Bản	Người	AB166856
40	2F5		Mỹ	Người	MF554740
41	033/LS/AM	2008	Trung Quốc	Người	KF246759
42	AUS250G	2007	AUS	Người	FJ172447
43	JB14080305	2008	Trung Quốc	Người	KC867095
44	PMKA0138	2010	Thái Lan	Người	KU574622
45	ILIHUN13-6	2013	Trung Quốc	Người	KF512507
46	HB92	2014	Trung Quốc	Người	KP638484
47	65-YN/JK	2014	Trung Quốc	Người	LC120904
48	96-2688	1996	AUS	Người	AY167799
49	WHANG- 03.09.00	2000	Trung Quốc	Người	AY167765
50	234024-05	2005	Pháp	Người	AM711014
51	CF235069	2005	Pháp	Người	HF948113
52	PMKA1174	2011	Thái Lan	Người	KU574620
53	N-1058	2009	Ấn Độ	Người	JN203989



**Phụ lục 12.**  
**Danh sách bệnh nhân Viêm não vi rút 2004-2017**

TT	HỌ VÀ TÊN	NĂM	HUYỆN	TT	HỌ VÀ TÊN	NĂM	HUYỆN
1	NGUYEN DUC TH.	2004	YEN THE	36	TRUONG THI NGH.	2005	LUC NAM
2	NGUYEN VAN TH.	2004	TAN YEN	37	HOANG THI THANH H.	2005	LUC NAM
3	TRAN VAN L.	2004	SON DONG	38	NGUYEN THI H.	2005	LUC NAM
4	PHAM THU TR.	2004	LUC NAM	39	HOANG THI Y.	2005	LUC NGAN
5	DUONG THI T.	2004	LANG GIANG	40	HOANG THI V.	2005	LUC NAM
6	TRAN MINH TH.	2004	LANG GIANG	41	NGUYEN THI D.	2005	HIEP HOA
7	TA VAN H.	2004	LUC NAM	42	DANG THI B.	2005	LANG GIANG
8	NGUYEN VAN NH.	2004	LUC NAM	43	NINH VAN H.	2005	LUC NAM
9	TO VAN L.	2004	LUC NGAN	44	LE THI L.	2005	TAN YEN
10	VI VAN T.	2004	LUC NGAN	45	VUONG VAN CH.	2005	LUC NGAN
11	NGUYEN THI L.	2004	LUC NAM	46	TAC THI M.	2005	LUC NGAN
12	TRAN VAN M.	2004	LANG GIANG	47	NGUYEN THI Y.	2005	LUC NAM
13	LUONG THI L.	2004	LUC NGAN	48	NONG THI TH.	2005	SON DONG
14	LE VAN D.	2004	HIEP HOA	49	NGUYEN TRONG C.	2005	YEN DUNG
15	THAN VAN S.	2004	VIET YEN	50	NGUYEN THI SAU NG.	2005	HIEP HOA
16	NGO VAN T.	2004	HIEP HOA	51	DANG THI TH.	2005	LANG GIANG
17	LE VAN S.	2004	LUC NAM	52	DO NGOC H.	2005	TAN YEN
18	NGUYEN VAN K.	2004	LANG GIANG	53	PHAM VAN D.	2005	LUC NAM
19	DO THI TR.	2004	LUC NAM	54	NGUYEN VAN D.	2005	LUC NAM
20	PHUNG VAN Q.	2004	LUC NAM	55	PHAM THI H.	2005	YEN DUNG
21	HOANG VAN T.	2004	SON DONG	56	TRAN THI H.	2005	YEN THE
22	LUONG NGOC V.	2004	LANG GIANG	57	NGUYEN HUU V.	2005	LUC NAM
23	TRAN THI Q.	2004	HIEP HOA	58	DANG THI M.	2005	SON DONG
24	DO THI TR.	2004	LUC NAM	59	CHU BA K.	2005	SON DONG
25	NGO THANH V.	2004	LUC NAM	60	NGUYEN VAN CH.	2005	LUC NAM
26	NGUYEN THI TH.	2004	YEN DUNG	61	PHAM TIEN D.	2005	LUC NAM
27	NGUYEN VAN L.	2004	YEN DUNG	62	VI VAN D.	2005	SON DONG
28	NGUYEN THI TH.	2004	HIEP HOA	63	TO VAN TH.	2005	SON DONG
29	HOANG TRUNG D.	2004	SON DONG	64	DUONG THI TH.	2005	LANG GIANG
30	TRAN DUC TH.	2004	TAN YEN	65	LY VAN H.	2005	LUC NGAN
31	HOANG THI TH.	2004	LANG GIANG	66	LUU DUC CH.	2005	LUC NAM
32	PHAM VAN H.	2004	LUC NGAN	67	NGO QUANG TR.	2005	HIEP HOA
33	DUONG HONG TH.	2005	YEN DUNG	68	NGUYEN XUAN B.	2005	LUC NGAN
34	NGUYEN T THANH TH.	2005	YEN THE	69	NGUYEN VAN D.	2005	LUC NAM
35	NGUYEN THI TH.	2005	LANG GIANG	70	VU VAN T.	2006	YEN DUNG
71	NGUYEN VAN C.	2006	LANG GIANG	110	DAM VAN H.	2007	LUC NGAN

72	TA THI Y.	2006	LUC NAM	111	LOAN VAN D.	2007	SON DONG
73	DUONG KHAC TH.	2006	LANG GIANG	112	PHAM XUAN D.	2007	VIET YEN
74	NGUYEN THI H.	2006	TAN YEN	113	NGUYEN THUY H.	2007	LANG GIANG
75	NGUYEN THI HONG Q.	2006	LUC NAM	114	VU THI KIM T.	2007	TP BAC GIANG
76	LUONG THI TH.	2006	LUC NGAN	115	LE MINH C.	2007	LANG GIANG
77	NGUYEN VAN CH.	2006	TAN YEN	116	LAM THI K.	2007	LUC NGAN
78	DUONG VAN TR.	2006	LUC NAM	117	PHAM THI L.	2007	LUC NAM
79	HUA VAN H.	2006	LUC NGAN	118	TO THI M.	2007	LUC NAM
80	CHU THI PH.	2006	LUC NGAN	119	BANG VAN D.	2007	SON DONG
81	PHAM VAN H.	2006	TP BAC GIANG	120	TRAN THI NG.	2007	SON DONG
82	NGUYEN VAN B.	2006	LANG GIANG	121	TRAN VAN H.	2007	LANG GIANG
83	DUONG GIA H.	2006	LUC NGAN	122	MAI THI TH.	2007	SON DONG
84	TONG VAN H.	2006	LUC NGAN	123	DUONG THI Y.	2007	LUC NGAN
85	TRUONG THI Q.	2006	LUC NAM	124	LA THI H.	2007	LUC NGAN
86	DAO QUANG TH.	2006	HIEP HOA	125	NGUYEN HOANG L.	2007	VIET YEN
87	ONG THI H.	2006	YEN DUNG	126	THANG TIEN D.	2007	LUC NGAN
88	NGUYEN VAN H.	2006	TP BAC GIANG	127	NGUYEN TRUNG K.	2007	VIET YEN
89	DO THUY TR.	2006	TAN YEN	128	DUONG THI TR.	2007	LUC NGAN
90	TA NGOC HOAI A.	2006	HIEP HOA	129	NINH THI NG.	2007	LUC NGAN
91	DUONG VAN TH.	2006	LUC NAM	130	MA THI H.	2007	LUC NGAN
92	HOANG VAN N.	2006	LUC NGAN	131	LY HONG H.	2007	LUC NGAN
93	TRAN VAN TR.	2006	LUC NGAN	132	NGUYEN VAN TH.	2007	LUC NGAN
94	BUI VAN H.	2007	LUC NGAN	133	LUONG VAN H.	2007	LUC NGAN
95	HOANG THI TH.	2007	LANG GIANG	134	PHAM THI O.	2007	LUC NGAN
96	NGUYEN VAN S.	2007	HIEP HOA	135	VI VAN D.	2007	LUC NGAN
97	DOAN THE D.	2007	VIET YEN	136	NGO VAN V.	2007	LUC NGAN
98	NGUYEN THUY TR.	2007	LUC NAM	137	VI THI T.	2007	LUC NGAN
99	NGUYEN THI TH.	2007	LANG GIANG	138	LANG VAN H.	2007	LUC NGAN
100	HA VAN S.	2007	LANG GIANG	139	TRUONG THI L.	2007	LUC NGAN
101	DO TUAN A.	2007	LUC NAM	140	LAI THI D.	2007	LUC NGAN
102	NGUYEN THI HONG NG.	2007	TAN YEN	141	THAN QUANG D.	2007	VIET YEN
103	NGUYEN THI M.	2007	TAN YEN	142	VU TRI C.	2007	LANG GIANG
104	NGUYEN NGOC C.	2007	LUC NGAN	143	NGUYEN VAN D.	2008	LUC NAM
105	NGUYEN VAN TH.	2007	LUC NAM	144	NGUYEN VAN TR.	2008	YEN DUNG
106	NGUYEN VAN C.	2007	LUC NAM	145	TRAN BINH D.	2008	HIEP HOA
107	NGO THI S.	2007	LANG GIANG	146	LE THI H.	2008	LUC NAM
108	DIEP VAN B.	2007	LUC NGAN	147	LY THI TH.	2008	LANG GIANG
109	VI THI H.	2007	LUC NGAN	148	VU DUC A.	2008	TAN YEN
149	PHAN VAN L.	2008	LUC NGAN	187	NGUYEN HOAI TH.	2010	HIEP HOA

150	CHU THUY H.	2008	LUC NAM	188	PHUNG MINH D.	2010	VIET YEN
151	HA THI H.	2008	LANG GIANG	189	GIAP THI NH.	2011	LANG GIANG
152	PHAM VAN D.	2008	LANG GIANG	190	NGUYEN THANH X.	2011	LANG GIANG
153	NGUYEN DANG XUAN H.	2008	TP BAC GIANG	191	PHAM DUY KH.	2011	LANG GIANG
154	NGUYEN HONG S.	2008	LUC NGAN	192	CHU XUAN C.	2011	YEN THE
155	TRAC THI H.	2008	LUC NAM	193	THAN VAN D.	2011	TAN YEN
156	NGUYEN CANH H.	2008	LANG GIANG	194	THAN VAN H.	2011	LUC NAM
157	TRAN VAN TR.	2008	HIEP HOA	195	LE NGOC CH.	2011	YEN THE
158	DINH THI KHANH H.	2008	LUC NGAN	196	NGUYEN GIANG S.	2011	YEN DUNG
159	DANG THU TR.	2008	LUC NGAN	197	NGUYEN DUY H.	2011	LUC NAM
160	DAO ANH KH.	2008	YEN DUNG	198	NGUYEN VAN TR.	2011	HIEP HOA
161	TRAN LE QUANG A.	2008	TP BAC GIANG	199	TRAN THI H.	2011	LUC NGAN
162	NGUYEN THI TH.	2008	YEN DUNG	200	NGO THI H.	2011	YEN DUNG
163	DANG THI NG.	2008	LANG GIANG	201	NGUYEN NGOC A.	2011	HIEP HOA
164	HOANG CAM L.	2008	VIET YEN	202	TRAN VAN KH.	2011	TAN YEN
165	PHAM THI V.	2009	TP BAC GIANG	203	NGO QUANG V.	2011	HIEP HOA
166	TA VAN NGH.	2009	HIEP HOA	204	TRIEU THI M.	2011	YEN DUNG
167	HOANG VAN T.	2009	LANG GIANG	205	DUONG VAN B.	2011	LUC NGAN
168	NGUYEN NGOC KH.	2009	TP BAC GIANG	206	TO THI L.	2011	LUC NGAN
169	NGUYEN VAN TH.	2009	TAN YEN	207	DUONG KIM L.	2011	LUC NGAN
170	NINH THI H.	2009	LUC NAM	208	LUC VAN L.	2011	LUC NGAN
171	NGUYEN VIET D.	2009	TP BAC GIANG	209	VI THI LAN A.	2011	LUC NGAN
172	TRINH VAN T.	2009	YEN DUNG	210	DANG DINH TR.	2012	LANG GIANG
173	PHAM NGOC M.	2009	TP BAC GIANG	211	NGUYEN BAO NG.	2012	VIET YEN
174	THAN VAN T.	2009	VIET YEN	212	TRAN VAN H.	2012	YEN DUNG
175	NGUYEN VAN N.	2009	TP BAC GIANG	213	NGUYEN VAN H.	2012	LANG GIANG
176	HA NGOC K.	2009	YEN DUNG	214	NGUYEN NGOC V.	2012	LUC NAM
177	DO THI T.	2009	YEN DUNG	215	HAO VAN T.	2012	TAN YEN
178	NGUYEN THI TH.	2009	HIEP HOA	216	NGUYEN VAN C.	2012	TP BG
179	NGUYEN THI NH.	2009	YEN THE	217	TRUONG THI NH.	2012	LANG GIANG
180	TRAN THI MY D.	2009	LUC NGAN	218	NGUYEN QUANG T.	2012	TAN YEN
181	CHU THI H.	2010	VIET YEN	219	TRAN THI LAN A.	2012	TP BG
182	PHAM TRI H.	2010	YEN DUNG	220	NGUYEN THI V.	2012	LANG GIANG
183	NGO VAN D.	2010	TAN YEN	221	NGUYEN DANH NH.	2012	TP BG
184	HOANG THI TH.	2010	YEN DUNG	222	NGUYEN MINH T.	2012	LANG GIANG
185	NGUYEN HOANG THUY T.	2010	YEN THE	223	DUONG KIM Q.	2012	LUC NGAN
186	PHAM THU TR.	2010	YEN DUNG	224	DONG VAN Q.	2012	YEN DUNG
225	CHU VAN D.	2012	LUC NGAN	264	DO THI NGOC TH.	2015	VIET YEN
226	LUONG VAN Q.	2012	LUC NGAN	265	NGUYEN DUC A.	2015	LUC NGAN

227	NGUYEN VAN L.	2012	LUC NGAN	266	VU VAN A.	2016	LANG GIANG
228	BUI TIEN L.	2013	TP BG	267	NGUYEN DINH TUNG N.	2016	LUC NAM
229	NGUYEN TUNG D.	2013	TP BG	268	CHU VAN DUC NG.	2016	YEN DUNG
230	PHAM VAN TH.	2013	LUC NAM	269	HA THI THUY NH.	2016	LUC NGAN
231	DUONG DUC NGH.	2013	VIET YEN	270	LUONG DINH V.	2016	TP BG
232	HOANG THI TH.	2013	TP BG	271	NGUYEN VAN S.	2016	YEN DUNG
233	TA VAN TH.	2013	LUC NGAN	272	LUONG NGOC H.	2016	LUC NAM
234	NGOC MINH NG.	2013	SON DONG	273	NGYEN VAN C.	2016	TAN YEN
235	LAM VAN H.	2013	LUC NGAN	274	PHAM ANH T.	2016	LANG GIANG
236	PHAM THI L.	2013	LUC NGAN	275	PHUNG THE V.	2016	YEN DUNG
237	NGUYEN VAN L.	2014	YEN DUNG	276	DONG KHAC CH.	2016	LANG GIANG
238	NGUYEN HOAI N.	2014	LUC NGAN	277	DUONG VAN S.	2016	YEN THE
239	NINH TRUNG K.	2014	LUC NGAN	278	NGO QUANG H.	2016	LANG GIANG
240	TRIEU VAN H.	2014	LUC NGAN	279	NGUYEN VU N.	2016	TP BG
241	NGUYEN THI THU H.	2014	LUC NGAN	280	NGUYEN XUAN Q.	2016	VIET YEN
242	DAM THI NHU Y	2014	LUC NGAN	281	TO VAN B.	2016	LUC NAM
243	TRINH VAN T.	2014	LUC NAM	282	HA MANH H.	2016	TAN YEN
244	DOAN DUC GI.	2014	LUC NAM	283	PHUNG THE KH.	2016	LUC NAM
245	NGUYEN TRUNG KH.	2014	YEN DUNG	284	PHAM HUU D.	2016	TP BG
246	BUI QUOC H.	2015	TAN YEN	285	NGUYEN DAC NGH.	2016	LUC NAM
247	NGUYEN MANH C.	2015	LUC NAM	286	NGUYEN MANH TH.	2016	YEN THE
248	NGUYEN HAI N.	2015	TAN YEN	287	NGUYEN QUOC B.	2016	TP BG
249	TRAN MINH KH.	2015	LUC NAM	288	NGUYEN VAN K.	2016	LUC NAM
250	VI HA L.	2015	LUC NGAN	289	NGUYEN THI ANH NG.	2016	HIEP HOA
251	NGUYEN QUANG TH.	2015	YEN DUNG	290	TRAN VAN T.	2016	LANG GIANG
252	LE HOANG THANH C.	2015	LUC NAM	291	LUU THI C.	2016	LUC NGAN
253	NGO MINH T.	2015	HIEP HOA	292	NONG THI L.	2016	YEN THE
254	HOANG NGOC H.	2015	SON DONG	293	NGO THI HONG A.	2016	YEN DUNG
255	NGO THI V.	2015	LUC NAM	294	NGUYEN HAI A.	2016	LUC NAM
256	VI VAN T.	2015	SON DONG	295	NGUYEN MANH D.	2016	LUC NAM
257	NGUYEN VAN T.	2015	LANG GIANG	296	NGUYEN VAN TH.	2016	HIEP HOA
258	LUONG HUU H.	2015	TPBG	297	NGUYEN VAN K.	2017	LUC NAM
259	TRAN THI H.	2015	HIEP HOA	298	LE QUOC TR.	2017	TAN YEN
260	NGUYEN THI LAN A.	2015	HIEP HOA	299	NGUYEN TRAN XUAN M.	2017	LUC NAM
261	NGUYEN VAN H.	2015	VIET YEN	300	TRAN MINH D.	2017	LUC NAM
262	NGUYEN TRAC A.	2015	LANG GIANG	301	DUONG THI THANH TH.	2017	LUC NGAN
263	BANG THI BICH H.	2015	LUC NGAN	302	TRINH THUY L.	2017	LANG GIANG

XÁC NHẬN CỦA TRUNG TÂM KIỂM SOÁT BỆNH TẬT BẮC GIANG