

NGHIÊN CỨU SỰ LƯU HÀNH CỦA CÁC TYP VIRUT DENGUE Ở CÁC TỈNH PHÍA NAM VIỆT NAM GIAI ĐOẠN 2005 - 2009

Lê Hải Yến*; Nguyễn Xuân Thành*

John Aaskov**, Wenjun Liu*** và CS

TÓM TẮT

Phân lập virus Dengue từ 233 mẫu huyết thanh bệnh nhân (BN) được chẩn đoán là sốt dengue trong 5 năm (2005 - 2009) tại các bệnh viện quân đội bằng kỹ thuật nuôi cấy tế bào và miễn dịch huỳnh quang gián tiếp cho thấy phát hiện được 117 ca dương tính (50,12%). Trong đó Dengue typ 1 là chủ đạo (84 BN = 71,80%), Dengue 2: 7 BN (5,98%), Dengue 3: 5 BN (4,28%). Chưa phát hiện thấy Dengue 4. Đặc biệt, 11 BN (9,4%) đồng nhiễm Dengue 1 và 2. 10 BN (8,54%) đồng nhiễm Dengue 1 và 3. Tỷ lệ lưu hành Dengue 1 tăng liên tục trong 5 năm. Dengue 2 chỉ xuất hiện gián đoạn trong 2 năm 2005 và 2009. Trong khi đó, Dengue 3 xuất hiện liên tục trong 3 năm (2006 - 2008).

* Từ khóa: Typ virus Dengue; Lưu hành.

STUDY OF CIRCULATION OF TYPES OF DENGUE VIRUS IN NORTH PROVINCES OF VIETNAM (2005 - 2009)

SUMMARY

Dengue virus isolation of 233 dengue patient sera were collected from army hospitals during 5-year period (2005 - 2009) by using of cell culture method and Indirect immunofluorescence assay, revealed 117 positive cases (50.12%). The maximum number of positive cases (84 out of 117) fell into Dengue 1 (71.80%). Dengue 2 occupied 7 cases (5.98%) and Dengue 3 was 5 cases (4.28%). Dengue 4 had not been detected yet. Particularly, simultaneous infection with Dengue 1 and Dengue 2 was recovered in 11 cases (9.4%); 10 cases (8.54%) of simultaneous infection with Dengue 1 and Dengue 3. Circulating rate of Dengue 1 increased continuously during 5 years. Dengue 2 just occurred in 2005 and 2009 while Dengue 3 circulated continuously during the years 2006, 2007, 2008.

* Key words: Dengue virus; Circulating rate.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Tình hình dịch sốt do virus Dengue trong thời gian gần đây, đặc biệt là ở các tỉnh phía Nam đang diễn biến theo chiều hướng phức tạp với mức độ tăng cao cả về số

trường hợp mắc lẫn tình trạng nặng của bệnh. Một trong những nguyên nhân có thể được nghĩ tới đó là vai trò quan trọng của virus Dengue, trong đó xuất hiện sự mất đi của một typ virus hay thay thế của các typ virus lưu hành trong các vụ dịch. Điều này cũng đã

* Viện Vệ sinh Phòng dịch Quân đội

** Trường Đại học Kỹ thuật Queensland, Australia

*** Viện Sốt rét Lục quân Australia

Phản biện khoa học: GS. TS. Lê Bách Quang

được chứng minh qua một số vụ dịch sốt dengue/sốt xuất huyết dengue (SD/SXHD)

bùng phát ở khu vực châu Á như Myanmar [4] và Thái Lan [3]. Để góp phần tìm hiểu rõ

hơn về tình trạng lưu hành các týp virut Dengue ở một số tỉnh phía Nam, chúng tôi tiến hành *ngiên cứu phân lập xác định týp virut Dengue từ huyết thanh BN được chẩn đoán lâm sàng nhiễm Dengue, thu thập tại các bệnh viện quân đội ở một số tỉnh phía Nam thời gian từ 2005 - 2009.*

ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng, vật liệu nghiên cứu.

- Huyết thanh BN được chẩn đoán lâm sàng và xác chẩn mắc Dengue bằng kỹ thuật sắc ký miễn dịch (Immuno-chromatography).

- Các chủng virut Dengue phân lập từ huyết thanh BN tại các bệnh viện quân đội từ 2005 đến 2009.

- Kit chẩn đoán nhanh (rapid test).

- Tế bào muỗi C6-36. Môi trường nuôi cấy tế bào RPMI-1640.

- Bộ kháng thể đơn dòng đặc hiệu 4 týp virut Dengue (Trường ĐH Kỹ thuật Queensland, Australia). Bộ kháng thể huỳnh quang của hãng Invitrogen.

- Các trang thiết bị khác.

- Phân lập vi rút: tiến hành tại phòng thí nghiệm virut Viện Vệ sinh Phòng dịch Quân đội và Viện Sốt rét Lục quân Australia.

2. Phương pháp nghiên cứu.

Thực nghiệm, tiến cứu.

* *Thu thập huyết thanh*: mẫu huyết thanh đôi của BN được chẩn đoán nhiễm virut Dengue theo thường quy của Tổ chức Y tế

Thế giới (2004), sàng lọc bằng kỹ thuật sắc ký miễn dịch theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Panbio, Australia).

* *Nhận định kết quả*:

KẾT QUẢ XÉT NGHIỆM KHÁNG THỂ IgM, IgG	CHẨN ĐOÁN	DIỄN GIẢI
IgM (+), IgG (-)	Sơ nhiễm Dengue	Dương tính
IgM (+), IgG (+) hoặc IgG (+), IgM (-)	Tái nhiễm Dengue	Dương tính
IgM (-), IgG (-)	Không nhiễm Dengue	Âm tính

+ Chọn huyết thanh cho phân lập virut: huyết thanh lần 1 có kết quả âm tính với thử nghiệm nhanh của BN được xác chẩn là đang nhiễm Dengue ở thử nghiệm lần 2.

* *Định týp (serotyping) virut*:

Tế bào ngực muỗi trưởng thành *Aedes albopictus* dòng C6-36 sử dụng cho gây nhiễm virut Dengue, nuôi trong các bình nuôi cấy tế bào chuyên biệt có diện tích đáy 25 cm² ở môi trường RPMI/1640, bổ sung 10% huyết thanh bê bào thai FCS, 5% chất kháng sinh chống khuẩn và nấm PSG. Đặt các bình nuôi tế bào trong tủ ẩm ở nhiệt độ 30 - 32⁰C, 2,5% khí trường CO₂. Chọn bình tế bào đạt mật độ tế bào sống từ 90 - 95%, dàn đều trên đáy bình, không nhiễm khuẩn để gây nhiễm virut.

Cấy 100 µl huyết thanh vào bình tế bào C6-36 đủ tiêu chuẩn trên sau khi đã loại bỏ hết môi trường cũ. Thêm 10 ml môi trường

RPMI 1640/2% FCS, 5% PSG/ủ 7 ngày ở 30 - 32°C, 2,5% CO₂. Thu phần nước nổi chứa virut, bảo quản trong môi trường chứa 20% FCS ở -25°C cho đến khi sử dụng.

Xác định serotíp: sử dụng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang gián tiếp (IFA).

- Chuẩn bị tiêu bản: nhỏ 40 µl huyền dịch tế bào lên lam kính. Để tế bào lắng tự nhiên, hút đi phần nước nổi. Để khô tự

nhiên. Cố định 2 phút trong acetone lạnh. Để khô tự nhiên.

- Phản ứng miễn dịch huỳnh quang: nhỏ 30 µl kháng thể đơn dòng (4G₂, 2H₂, M17, 3H₅, 5D₄, 1H₁₀) lên giếng tế bào trên lam kính. Ủ 30 phút. Rửa 3 lần/5 phút trong PBS pH 7,2. Nhỏ 30 µl kháng thể đa dòng FITC lên các giếng. Ủ 30 phút trong buồng tối. Rửa 3 lần/5 phút trong PBS pH 7,2. Soi vật kính dầu dưới kính hiển vi huỳnh quang.

- Nhận định kết quả:

4G ₂	2H ₂	M17	3H ₅	5D ₄	1H ₁₀	Kết quả
(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	Den-1
(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	Den-2
(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	Den-3
(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	Den-4

4G₂: xác định họ Flaviviridae.

3H₅: xác định virut Dengue týp 2.

2H₂: xác định virut Dengue.

5D₄: xác định virut Dengue týp 3.

M17: xác định virut Dengue týp 1.

1H₁₀: xác định virut Dengue týp 4.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Kết quả phân lập virut Dengue giai đoạn 2005 - 2009.

Tổng số 233 mẫu huyết thanh thu thập tại 4 điểm nghiên cứu trong giai đoạn 5 năm cho thấy: 117 trường hợp dương tính (50,21%). Trong đó, các týp Dengue lưu hành trên

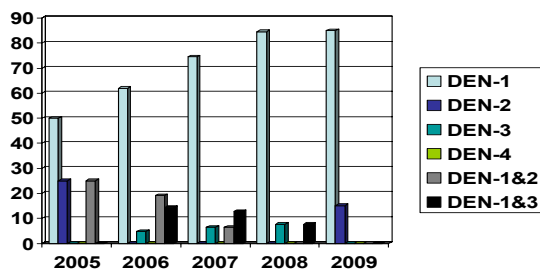
khu vực này bao gồm Den-1 (71,80%), Den-2 (5,98%) và Den-3 (4,28%). Chưa thấy xuất hiện lưu hành của týp Den-4. Đặc biệt, có nhiễm 2 týp Dengue trên 1 BN: Den-1 và Den 2 (9,40%); Den-1 và Den-3 (8,54%) ở các điểm Nha Trang (Bệnh viện 87), Qui Nhơn (Bệnh viện C13) và Cần Thơ (Bệnh viện 121) (bảng 1).

Bảng 1: Các týp virut lưu hành giai đoạn 2005 - 2009 ở một số tỉnh phía Nam.

ĐIỂM NGHIÊN CỨU	TỔNG SỐ PHÂN LẬP	DƯƠNG TÍNH (%)	TYP VIRUT LƯU HÀNH (tổng số/%)					
			Den-1	Den-2	Den-3	Den-4	Den 1 & 2	Den 1 & 3
Bệnh viện 121	38	16 (42,1)	14 (87,5)	0	1 (6,25)	0	0	1 (6,25)
Bệnh viện 87	58	26 (44,82)	17 (65,38)	4 (15,39)	0	0	5 (19,23)	0
Bệnh viện 13	125	69 (55,2)	50 (72,46)	0	4 (5,79)	0	6 (8,69)	9 (13,04)
Bệnh viện 17	12	6 (50)	3 (50)	3 (50)	0	0	0	0
Tổng	233	117 (50,21)	84 (71,80)	7 (5,98)	5 (4,28)	0	11 (9,40)	10 (8,54)

Tỷ lệ lưu hành của Dengue týp 1 tăng đều theo từng năm. Trong đó, sự lưu hành của Dengue 2 bị gián đoạn trong 3 năm (2006, 2007 và 2008). Năm 2005, Dengue 2 xuất hiện ở Nha Trang và năm 2009 đã quay trở lại Đà Nẵng, tuy nhiên tại Đà Nẵng không gây nên sự thay đổi nào đáng kể về quy mô dịch ở khu vực này. Hiện tượng đồng nhiễm Dengue 1 và 2 trên 1 BN năm 2005 và đồng nhiễm Dengue 1 và 3 các năm 2006, 2007, 2008 là những năm đều có sự lưu hành của cả 2 týp Dengue 1 và 2 hoặc 1 và 3. Tuy nhiên, vấn đề đặt ra ở đây là tại sao trong 2 năm 2006 và 2007 không có sự lưu hành của Dengue 2, nhưng vẫn xảy ra hiện tượng đồng nhiễm của Dengue 1 và 2 ở cả hai khu vực Nha Trang và Qui Nhơn? Điều này có thể giải thích: do ở đây vẫn lưu hành một tỷ lệ nhất định muỗi bị nhiễm cả hai týp virut cùng một lúc từ năm trước đó (biểu đồ 1).

Theo các kết quả nghiên cứu trước đây, Việt Nam đã phân lập được cả 4 týp virut Dengue. Các týp lưu hành chủ yếu theo thứ tự là Den-2, Den-1, Den-3 và đôi khi cả Den-4 [7]. Năm 1987, ở miền Nam đã phân lập được týp virut Dengue lưu hành chủ yếu là Den-2 (90,56%) [6].



Biểu đồ 1: Phân bố tỷ lệ týp Dengue từng năm.

Một nghiên cứu khác cho thấy, kết quả phân lập virut Dengue ở miền Bắc (2000 - 2004) có mặt cả 4 týp, chủ yếu là týp 2 (58,9%), týp 1 (25,2%), týp 3 (1,49%) và týp 4 (14,5%) [8].

Việc thay đổi về các týp virut lưu hành trên một vùng lưu hành dịch và đồng nhiễm 2 týp virut trên cùng một BN đều được ghi nhận trong những nghiên cứu được công bố trước đây của các tác giả ở Myanmar và một số tác giả khác ở Thái Lan và Somalia [1, 2, 4]. Đồng thời, những hiện tượng này cũng đều dẫn đến biến đổi sâu sắc về phạm vi ảnh hưởng, cũng như mức độ nặng của bệnh [4, 5].

Nguyên nhân chính của hiện tượng này còn chưa được biết rõ, tuy nhiên có thể giải thích trên cơ sở khoa học bởi hai yếu tố: (a) thay đổi khả năng thích hợp ký chủ mà nguyên nhân sâu xa có thể do quá trình biến đổi gen của virut đến mức chúng không còn thích hợp với ký chủ hoặc bản thân các đột biến có hại đối với khả năng sống sót của virut. (b) sự biến đổi hoặc giảm mật độ vector gây nên hiện tượng “tắc nghẽn di truyền” do thay đổi khí hậu hay tốc độ đô thị hóa nhanh chóng dẫn đến thay đổi đặc điểm sinh học trong quần thể muỗi lưu hành ở khu vực này.

Như vậy, hiện tượng nổi lên của týp Dengue 1 và dần biến mất týp Dengue 4 ở miền Nam Việt Nam trong thời gian qua không phải là ngoại lệ. Có thể nghĩ rằng đây là thủ phạm chính dẫn đến những biến đổi phức tạp của dịch bệnh Dengue tại các tỉnh phía Nam nói riêng và trên cả nước nói chung trong những năm gần đây.

KẾT LUẬN

- Típ virus Dengue lưu hành chủ yếu trong giai đoạn hiện nay tại một số tỉnh phía Nam là Dengue típ 1 (71,80%), sau đó là Dengue típ 2 (5,98%), Dengue típ 3 (4,28%).

- Chưa phát hiện Dengue típ 4.

- Đã phát hiện hiện tượng đồng nhiễm hai típ virus trên cùng một BN: Dengue típ 1 và 2 (9,40%), Dengue típ 1 và 3 (8,54%).

- Tỷ lệ lưu hành Dengue 1 tăng đều trong 5 năm, Dengue 2 chỉ gián đoạn trong 2 năm 2005 và 2009 và Dengue 3 xuất hiện trong 3 năm liên tiếp (2006, 2007 và 2008).

Cần mở rộng phạm vi nghiên cứu tiếp ở các tỉnh phía Bắc và nghiên cứu đột biến của virus có liên quan đến các vụ dịch và khả năng gây bệnh của chủng đột biến để có thêm thông tin về vai trò của virus trong những vụ dịch.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Đỗ Quang Hà*. Tình hình Dengue xuất huyết ở miền Nam Việt Nam từ 1975 - 1990. Luận án Phó Tiến sỹ Y học. Trường Đại học Y Dược TP.Hồ Chí Minh. 1991.

2. *Trương Uyên Ninh*. Virus Arbor. NXB Y học. Hà Nội. 2003.

3. *Nguyễn Thị Thu Thủy*. Dịch tễ học phân tử vùng vỏ glycoprotein E của virus Dengue típ 1 và 2 tại một số tỉnh miền Bắc và miền Trung Việt Nam giai đoạn 2000 - 2004. Luận văn Thạc sỹ Khoa học. Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội. 2006.

4. *Kanesa-Thanan*. Dengue serotype 2 and 3 in US forces in Somalia. Lancet. 1994, 343, p.678.

5. *Maneeakarn N*. Applications of polymerase chain reaction for identification of Dengue virus isolated from patient sera. Microbiol Immunol. 1993, 37, pp.41-47.

6. *Sittisombut, N*. Possible occurrence of a genetic bottleneck in Dengue serotype 2 viruses between the 1980 and 1987 epidemic season in Bangkok, Thailand. Am J Trop Med Hyg. 1997, 57, pp.100-108.

7. *Thu H.M*. Myanmar Dengue outbreak associated with displacement of serotype 2, 3, 4 by Dengue 1. 2004, Vol 10 No 4, pp.593-597.

8. *Wittke*. Extinction and rapid emergence of strains of Dengue 3 virus during an interepidemic period. Virology. 2002, 301, p.148.