

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO**

**BỘ Y TẾ**

**VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG**

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

**PHẠM KHÁNH TÙNG**

**THỰC TRẠNG VIÊM NÃO NHẬT BẢN, MỘT SỐ  
ĐẶC ĐIỂM CỦA VÉC TƠ VÀ TÁC NHÂN GÂY  
BỆNH TẠI KHU VỰC TÂY NGUYÊN, 2005 – 2018**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y TẾ CÔNG CỘNG**

**HÀ NỘI – 2020**

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO**

**BỘ Y TẾ**

**VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG**

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

**PHẠM KHÁNH TÙNG**

**THỰC TRẠNG VIÊM NÃO NHẬT BẢN, MỘT SỐ ĐẶC  
ĐIỂM CỦA VÉC TƠ VÀ TÁC NHÂN GÂY BỆNH TẠI  
KHU VỰC TÂY NGUYÊN, 2005 – 2018**

**Chuyên ngành: Y tế công cộng**

**Mã số: 62720301**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y TẾ CÔNG CỘNG**

**Người hướng dẫn khoa học:**

**1. GS.TS Đặng Tuấn Đạt**

**2. GS.TS Phan Thị Ngà**

**HÀ NỘI – 2020**

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi với sự hợp tác của các đồng nghiệp và được sự đồng ý của Thầy, Cô hướng dẫn khoa học thống nhất cho công bố trong Luận án này.

Kết quả nghiên cứu thể hiện trong Luận án này là trung thực và chưa 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**

**NCS. Phạm Khánh Tùng**

## LỜI CẢM ƠN

*Sau hơn 4 năm học tập, giờ đây khi cuốn Luận án tốt nghiệp tiến sĩ y tế công cộng đã và đang được hoàn thành. Tôi chân thành biết ơn đến: Ban lãnh đạo Viện, các thầy cô giáo, Phòng Đào tạo Sau đại học; Phòng thí nghiệm, SHPT– Viện VSDT Trung Ương; Ban lãnh đạo Viện, Khoa Vi rút, Khoa Dịch tễ, Khoa Côn trùng - Viện VSDT Tây Nguyên, đã tạo điều kiện, giúp đỡ cho tôi trong suốt thời gian học tập, nghiên cứu và thực hiện Luận án.*

*Xin được bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến GS.TS Đặng Tuấn Đạt và GS.TS Phan Thị Nga, là thầy cô đã trực tiếp hướng dẫn, động viên khích lệ, tận tình giúp đỡ, hỗ trợ và định hướng cho tôi trong suốt thời gian học tập, thu thập số liệu nghiên cứu để thực hiện và hoàn thành Luận án này.*

*Tôi xin cảm ơn đến tập thể, lãnh đạo Sở Y tế, Trung tâm Y tế Dự phòng tỉnh: Đắk Nông, Đắk Lắk, Gia Lai và Kon Tum; các Trạm y tế xã, thị trấn của 4 tỉnh Tây Nguyên, nơi tiến hành nghiên cứu, đã tạo điều kiện giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện Luận án.*

*Xin được cảm ơn đến lãnh đạo UBND tỉnh Đắk Nông, lãnh đạo Sở Y tế Đắk Nông, lãnh đạo TYTY huyện Đắk R'lấp, lãnh đạo TTYTDP Đắk Nông đã tạo kiện cho phép tôi được tham gia học tập, nghiên cứu sinh.*

*Xin được cảm ơn các anh, chị em, bạn bè thân hữu đã khuyến khích tôi trên con đường học tập. Và sự biết ơn vô bờ bến của cha, mẹ, vợ và các con, người thân trong gia đình đã vất vả, dành mọi tình cảm, thời gian, vật chất và là nguồn động viên lớn để tôi hoàn thành khóa học nghiên cứu sinh.*

*Hà Nội, tháng 8 năm 2020*

**Phạm Khánh Tùng**

## MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ.....	1
Chương 1 .....	2
TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....	2
1.1. Dịch tễ học bệnh viêm não Nhật Bản .....	3
1.2. Đặc điểm muỗi <i>Culex</i> và vai trò truyền vi rút viêm não Nhật Bản .....	17
1.3. Đặc điểm phân tử/dịch tễ sinh học phân tử vi rút viêm não Nhật Bản .....	23
1.4. Vài nét tổng quan khu vực Tây Nguyên.....	32
Chương 2 .....	34
ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	34
2.1. Đối tượng, địa điểm và thời gian nghiên cứu .....	34
2.2. Phương pháp nghiên cứu .....	36
2.3. Nội dung nghiên cứu .....	39
Chương 3 .....	53
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU .....	53
3.1. Thực trạng bệnh viêm não Nhật Bản tại 4 tỉnh khu vực Tây Nguyên, 2005-2018 .....	53
3.2. Thành phần loài, phân bố và tỷ lệ nhiễm vi rút viêm não Nhật Bản của muỗi thuộc giống <i>Culex</i> ở khu vực Tây Nguyên, 2005-2018 .....	67
3.3. Mô tả một số đặc điểm phân tử của vi rút viêm não Nhật Bản phân lập được ở khu vực Tây Nguyên .....	83
Chương 4 .....	91
BÀN LUẬN .....	91
4.1. Thực trạng viêm não Nhật Bản tại 4 tỉnh khu vực Tây Nguyên, 2005-2018.....	91

4.2. Thành phần loài, phân bố và tỷ lệ nhiễm vi rút viêm não Nhật Bản của muỗi thuộc giống <i>Culex</i> ở khu vực Tây Nguyên, 2005-2018 .....	100
4.3. Một số đặc điểm phân tử của vi rút viêm não Nhật Bản phân lập được từ muỗi ở khu vực Tây Nguyên.....	109
KẾT LUẬN .....	118
1. Thực trạng viêm não Nhật Bản tại 4 tỉnh Tây Nguyên, 2005–2018 .....	118
2. Thành phần loài, phân bố và tỷ lệ nhiễm vi rút viêm não Nhật Bản của một số loài muỗi <i>Culex</i> ở khu vực Tây Nguyên, 2005–2018.....	118
3. Một số đặc điểm phân tử của vi rút viêm não Nhật Bản phân lập được ở khu vực Tây Nguyên, 2005-2018 .....	119
KHUYẾN NGHỊ.....	120
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN ĐÃ CÔNG BỐ	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	
Phụ lục 1: Phiếu thu thập thông tin bệnh nhân VNNB (2005- 2018)	
Phụ lục 2: Phiếu thu thập thông tin, mẫu muỗi <i>Culex</i> giai đoạn (2005-2016)	
Phụ lục 3: Phiếu thu thập thông tin, mẫu muỗi <i>Culex</i> giai đoạn (2017-2018)	
Phụ lục 4: Phiếu định loại muỗi <i>Culex</i> giai đoạn, 2017- 2018	

## DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

TỪ VIẾT TẮT	TỪ TIẾNG ANH	TỪ- NGHĨA TIẾNG VIỆT
Arbo	Arthropodborne	Mang bởi côn trùng tiết túc
AND	Deoxyribonucleic acid	Axit Deoxyribonuclêic
ARN	Ribonucleic acid	Axit ribonucleic
cDNA	Complement DNA	ADN bổ sung
<i>Cx</i>	<i>Culex</i>	Muỗi <i>Culex</i>
CS		Cộng sự
CBHD		Cán bộ hướng dẫn
dNTP	Deoxynucleotide triphosphate	
ddNTP	Dideoxynucleotide triphosphate	
DNT	Cerebrospinal fluid (CSF)	Dịch não tủy
ELISA	Enzyme Linked Immunorbent assay	Thử nghiệm miễn dịch gắn enzyme
G	Genotype	Kiểu gen
GI	Genotype I	Kiểu gen I
GIII	Genotype III	Kiểu gen III
GV	Genotype V	Kiểu gen V
HCVNC	AES	Hội chứng viêm não cấp
KN	-	Kháng nguyên
JEV	Japanese Encephalitis Virus	Vi rút Viêm não Nhật Bản
KT	-	Kháng thể
MAC-ELISA	IgM Antibody Capture ELISA	Kỹ thuật ELISA tóm bắt IgM
MEM	Minium Essential Medium	Môi trường thiết yếu
NCS	Postgraduate	Nghiên cứu sinh
NGS	Next Generation Sequencing	Thế hệ thứ hai
NKSS	Asparagin-Lysine-Serine-Serine	
OD	Optical density	Mật độ quang học
PBS	Phosphate Buffer Saline	Đệm muối phốt phát.
P	Probability	Xác suất

<b>TỪ VIẾT TẮT</b>	<b>TỪ TIẾNG ANH</b>	<b>TỪ- NGHĨA TIẾNG VIỆT</b>
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi phiên mã ngược
SKSS	Serine- Lysine- Serine- Serine	
SR-KST-CTTW		Sốt rét- Ký sinh trùng- Côn trùng Trung ương
TMB	Tetramethylbenzidine	
VNNB	Japanese Encephalitis Virus	Viêm não Nhật Bản
VSDTTN		Vệ sinh dịch tễ Tây Nguyên
VSDTTW		Vệ sinh Dịch tễ Trung Ương
WHO	World Health Organization	Tổ chức Y tế Thế giới



## DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 3.1. Tỷ lệ mắc, chết do hội chứng viêm não cấp, viêm não Nhật Bản ở 4 tỉnh Tây Nguyên, 2005- 2018 .....	53
Bảng 3.2. Tỷ lệ chết/ mắc do viêm não Nhật Bản tại 4 tỉnh Tây Nguyên, 2005 – 2018 .....	55
Bảng 3.3. Phân bố theo huyện/thị xã/thành phố số mắc hội chứng viêm não cấp, viêm não Nhật Bản ở khu vực Tây Nguyên, 2005-2018.....	57
Bảng 3.4. Phân bố mắc hội chứng viêm não cấp, viêm não Nhật Bản theo nhóm tuổi ở 4 tỉnh Tây Nguyên, 2005- 2018.....	59
Bảng 3.5. Phân bố mắc hội chứng viêm não cấp, viêm não Nhật Bản theo tuổi tại Gia Lai, 2005- 2018 .....	61
Bảng 3.6. Phân bố mắc hội chứng viêm não cấp, viêm não Nhật Bản theo nhóm tuổi tại Kon Tum, 2005- 2018.....	61
Bảng 3.7. Phân bố mắc hội chứng viêm não cấp, viêm não Nhật Bản theo nhóm tuổi tại Đăk Lăk, 2005- 2018 .....	62
Bảng 3.8. Phân bố mắc hội chứng viêm não cấp, viêm não Nhật Bản theo nhóm tuổi tại Đăk Nông, 2005- 2018 .....	63
Bảng 3.9. Phân bố mắc hội chứng viêm não cấp, viêm não Nhật Bản theo giới tại 4 tỉnh Tây Nguyên, 2005- 2018 .....	64
Bảng 3.10. Phân bố mắc hội chứng viêm não cấp, viêm não Nhật Bản theo nhóm dân tộc tại 4 tỉnh Tây Nguyên, 2005- 2018 .....	66
Bảng 3.11. Thành phần, phân bố một số loài muỗi <i>Culex</i> ở khu vực Tây Nguyên, 2005-2018.....	67
Bảng 3.12. Thành phần, phân bố một số loài muỗi <i>Culex</i> ở 4 tỉnh khu vực Tây Nguyên, 2005-2007 .....	70

Bảng 3.13. Thành phần, phân bố một số loài muỗi <i>Culex</i> ở khu vực Tây Nguyên, 2012-2014.....	73
Bảng 3.14. Thành phần, phân bố một số loài muỗi <i>Culex</i> ở khu vực Tây Nguyên, 2017-2018.....	75
Bảng 3.15. Phân lập vi rút VNNB bằng tế bào C6/36 từ một số loài muỗi <i>Culex</i> thu thập ở khu vực Tây Nguyên, 2005-2018.....	77
Bảng 3.16. Kết quả phân lập vi rút viêm não Nhật Bản bằng tế bào C6/36 từ một số loài muỗi <i>Culex</i> ở khu vực Tây Nguyên, 2005-2018.....	78
Bảng 3.17. Tỷ lệ nhiễm tối thiểu vi rút viêm não Nhật Bản trong một số loài của muỗi <i>Culex</i> thu thập ở khu vực Tây Nguyên, 2005-2018.....	82
Bảng 3.18. Thông tin về các chủng vi rút phân lập từ muỗi <i>Culex</i> ở các tỉnh Gia Lai và Kon Tum thuộc khu vực Tây Nguyên, 2005-2018.....	83
Bảng 3.19. Độ khác biệt ở mức nucleotide giữa các vi rút viêm não Nhật Bản GI ở Tây Nguyên với Việt Nam và khu vực.....	88
Bảng 3.20. Đặc điểm các acid amin thay thế của vi rút viêm não Nhật Bản GI phát hiện ở khu vực Tây Nguyên so với chủng genotype I chuẩn.....	89
Bảng 3.21. Kiểu Haplotype của vi rút viêm não Nhật Bản phân lập ở khu vực Tây Nguyên.....	90

## DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Tình hình bệnh viêm não Nhật Bản ở Nhật Bản.....	4
Hình 1.2. Tình hình bệnh viêm não Nhật Bản ở Hàn Quốc.....	5
Hình 1.3. Phân bố vùng lưu hành vi rút viêm não Nhật Bản trên thế giới .....	6
Hình 1.4. Vi rút viêm não Nhật Bản và cấu trúc genome .....	10
Hình 1.5. Chu trình lây truyền vi rút VNNB trong tự nhiên.....	11
Hình 1.6. Chu trình lây truyền của vi rút viêm não Nhật Bản .....	18
Hình 1.7. Mật độ một số loài muỗi <i>Culex</i> ở Cát Quế, Hoài Đức, Hà Tây (cũ) đã thu thập để phân lập vi rút viêm não Nhật Bản, 2001-2003 .....	20
Hình 1.8. Mật độ muỗi <i>Culex</i> tại tỉnh Sơn La, Điện Biên, Lào Cai, 2018 ....	22
Hình 1.9. Sơ đồ kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ thứ nhất.....	26
Hình 1.10. Mô phỏng từ trình tự peptide đến giải mã genome.....	28
Hình 1.11. Phân bố địa lý và sự lan truyền của các kiểu gen vi rút viêm não Nhật Bản.....	29
Hình 2.2. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu.....	39
Hình 2.3. Sơ đồ kỹ thuật MAC-ELISA chẩn đoán VNNB.....	42
Hình 2.4. Bản đồ vị trí các điểm thu thập muỗi <i>Culex</i> , 2017-2018 .....	45
Hình 2.5. Sơ đồ xây dựng cây di truyền phả hệ vi rút VNNB.....	50
Hình 3.1. Số mắc HCVNC, viêm não Nhật Bản theo tỉnh, 2005-2018 .....	55
Hình 3.2. Phân bố số mắc hội chứng viêm não cấp, viêm não Nhật Bản theo tháng tại 04 tỉnh Tây Nguyên, 2005- 2018 .....	59

Hình 3.3. Phân bố số lượng muỗi <i>Culex</i> thu được theo thời gian (tháng) tại 4 tỉnh Tây Nguyên, 2005- 2018 .....	69
Hình 3.4. Phân bố số cá thể muỗi <i>Culex</i> thu được theo thời gian (tháng) tại 4 tỉnh Tây Nguyên, 2005- 2007 .....	72
Hình 3.5. Phân bố số cá thể muỗi <i>Culex</i> thu được theo thời gian (tháng) tại 4 tỉnh Tây Nguyên, 2012- 2014 .....	74
Hình 3.6. Phân bố số cá thể muỗi <i>Culex</i> thu được theo thời gian (tháng) tại 4 tỉnh Tây Nguyên, 2017- 2018 .....	77
Hình 3.7. Xác định các mẫu vi rút viêm não Nhật Bản phân lập từ muỗi ở khu vực Tây Nguyên, 2007 bằng RT-PCR với cặp mồi đặc hiệu gen E .....	81
Hình 3.8. Xác định các mẫu vi rút viêm não Nhật Bản phân lập từ muỗi ở khu vực Tây Nguyên, 2018 bằng RT-PCR với cặp mồi đặc hiệu gen E .....	81
Hình 3.9. Trình tự nucleotide vùng gen của chủng 18VN139 chạy giải trình tự với cặp mồi JE-Ef và JE-Ev của vi rút viêm não Nhật Bản.....	86
Hình 3.10. Cây phát sinh loài được xây dựng từ trình tự nucleotide vùng gen E của một số chủng vi rút viêm não Nhật Bản phân lập từ muỗi <i>Culex</i> ở khu vực Tây Nguyên .....	87

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngày nay, các bệnh dịch mới nổi và tái bùng phát do vi rút lây truyền từ động vật sang người như sốt xuất huyết Dengue, viêm não Nhật Bản (VNNB), v.v. đặc biệt sự biến đổi cấu trúc di truyền của các vi rút gây nên các dịch nguy hiểm như viêm đường hô hấp cấp (SARS), cúm AH5N1, Mers-CoV, nCoV, v.v. đã và đang là mối lo ngại lớn tới sức khỏe cộng đồng trên qui mô toàn cầu [1;29;90].

Trong các bệnh dịch, vai trò qua trung gian truyền bệnh là các loài muỗi thuộc họ *Culicidae* như vi rút Banna ở Trung Quốc, vi rút West Nile ở Mỹ, vi rút Dengue ở các nước nhiệt đới và cận nhiệt đới (Singapore, Philippines, Việt Nam, Thái Lan, v.v.), vi rút viêm não Nhật Bản, v.v. đã và đang là vấn đề y tế đáng quan ngại, do hậu quả và gánh nặng bệnh tật, cũng như những khó khăn trong phòng, chống, kiểm soát bệnh dịch này tại cộng đồng [1;6;29;32;90].

Một trong số các bệnh dịch do muỗi truyền này, bệnh viêm não Nhật Bản được xem là vấn đề y tế hiện nay, do tỷ lệ tử vong cao, hoặc di chứng bệnh để lại đối với cá nhân người bệnh, gia đình và xã hội. Mặc dù bệnh đã có vắc xin phòng ngừa, nhưng cho đến nay, trên thế giới bệnh viêm não Nhật Bản vẫn ghi nhận số mắc hàng năm trung bình khoảng 67.900 trường hợp, tỷ lệ chung là 1,8/100.000 dân và có nguy cơ bùng phát dịch [68].

Tại Việt Nam, từ năm 1959 đã phát hiện được hội chứng viêm não cấp ở trẻ em, sau đó xảy ra trên địa bàn rộng nhiều năm nay [44;49;52;126]. Tại Tây Nguyên, trong các năm 2000-2001 xác định được 21 trường hợp viêm não Nhật Bản [14;23;39]. Giai đoạn 2002-2005, ghi nhận được 283 trường hợp viêm não, trong đó 50 trường hợp tử vong. Trong 10 năm trở lại đây (2006-2015), báo cáo từ ngành y tế địa phương vẫn ghi nhận các ca mắc viêm não Nhật Bản tại khu vực này [43]. Một số nghiên cứu về véc tơ truyền bệnh, dịch tễ học bệnh viêm

não Nhật Bản ở khu vực Tây Nguyên và Việt Nam đã được công bố như: Điều tra khu hệ côn trùng y học ở Tây Nguyên; Điều tra cơ bản muỗi *Culicinae* ở Việt Nam; Giám sát viêm não Nhật Bản ở Việt Nam [10;23;30] và một vài nghiên cứu xác định type vi rút, trong đó Tây Nguyên cũng như ở Việt Nam mới phát hiện được vi rút viêm não Nhật Bản genotype I [4;64;86;96;110]. Tây Nguyên là khu vực miền núi, địa bàn rộng lớn địa hình và sinh cảnh đa dạng phức tạp, thành phần loài động vật nói chung và côn trùng nói riêng rất phong phú và khả năng truyền bệnh của chúng rất đa dạng. Cho đến nay vẫn chưa có một nghiên cứu tổng thể, đầy đủ về bệnh, véc tơ truyền bệnh, cấu trúc phân tử cũng như có khả năng tiềm tàng đã xuất hiện của vi rút viêm não Nhật Bản genotype V, hoặc các kiểu gen thay thế nhưng chưa được phát hiện.

Để tìm hiểu dịch tễ học, vai trò truyền bệnh của một số loài muỗi *Culex*, đặc điểm phân tử của vi rút viêm não Nhật Bản ở Tây Nguyên, chúng tôi xây dựng và nghiên cứu đề tài "**Thực trạng viêm não Nhật Bản, một số đặc điểm của véc tơ và tác nhân gây bệnh tại khu vực Tây Nguyên, 2005-2018**", với mục tiêu:

1. Mô tả thực trạng viêm não Nhật Bản tại 4 tỉnh khu vực Tây Nguyên, 2005–2018.
2. Xác định thành phần loài, phân bố và tỷ lệ nhiễm vi rút viêm não Nhật Bản của một số loài muỗi thuộc giống *Culex* ở khu vực Tây Nguyên, 2005 - 2018.
3. Mô tả một số đặc điểm phân tử của vi rút viêm não Nhật Bản phân lập được ở khu vực Tây Nguyên, 2005-2018.

## **Chương 1**

### **TỔNG QUAN TÀI LIỆU**

## **1.1. Dịch tễ học bệnh viêm não Nhật Bản**

### **1.1.1. Lịch sử xuất hiện bệnh trên thế giới và Việt Nam**

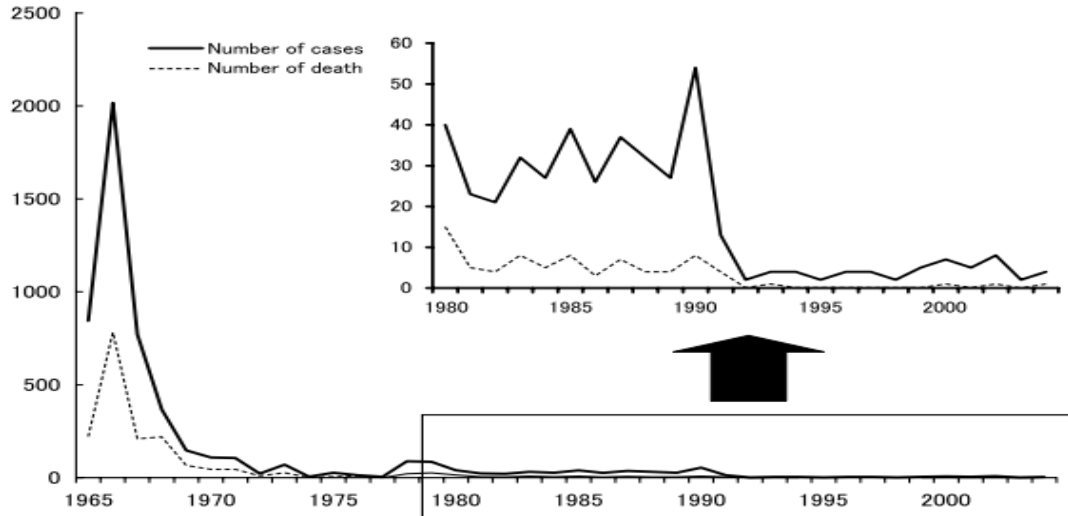
#### ***1.1.1.1. Lịch sử xuất hiện bệnh viêm não Nhật Bản trên thế giới***

Lịch sử nghiên cứu bệnh viêm não Nhật Bản (VNNB) đã được các nhà khoa học Nhật Bản ghi nhận từ năm 1871 với các triệu chứng viêm não ở ngựa và ở người. Bệnh VNNB đã được coi là một thể lâm sàng riêng biệt từ sau vụ dịch lớn năm 1924 với hơn 6.000 người mắc, tử vong khoảng 60% tại Nhật Bản. Futaki (1924) gọi đây là bệnh viêm não mùa hè, là viêm não B để phân biệt với viêm não ngựa Von Economo là loại A đã được phát hiện trước đó ở Nhật bởi Crucher và Von Economo vì có những đặc điểm dịch tễ, lâm sàng khác hẳn bệnh viêm não ngựa lịm của Von Economo [1;17;52;62;118;133].

Từ năm 1932, nghiên cứu để xác định tác nhân gây bệnh thực nghiệm đã được Hayashi và cộng sự thực hiện thành công trong việc lấy chất não của tử thi bệnh nhân bị VNNB và gây bệnh cho 5 thế hệ khỉ *Macacus* theo đường gây nhiễm vào não. Năm 1935, Mitamura, Takagi, Takenouchi và cộng sự đã phân lập được từ não tử thi của một bệnh nhân VNNB. Chủng đầu tiên (Prototype) này được lấy theo tên họ của bệnh nhân, gọi là chủng Nakayama, đây chính là chủng vi rút VNNB được sử dụng để phát triển vắc xin dự phòng và kháng nguyên trong xét nghiệm chẩn đoán bệnh VNNB đầu tiên ở Nhật Bản cũng như hiện nay [1;4;47;66;133].

Theo ước tính, thế giới có khoảng ba tỷ người sống trong vùng lưu hành vi rút VNNB và có nguy cơ nhiễm vi rút do muỗi *Culex* truyền, đặc biệt là *Cx.tritaeniorhynchus* và *Cx.vishnui* do có liên quan đến canh tác trồng lúa nước và nuôi lợn ở Châu Á [49;52;91;105;122;123;128]. Từ năm 1873, nhiều trường hợp bệnh lưu hành và dịch đã được ghi nhận hàng năm ở Nhật Bản. Trong các vụ dịch từ năm 1924-1959 tỷ lệ tử vong dao động từ 24-91,7%. Từ năm 1972

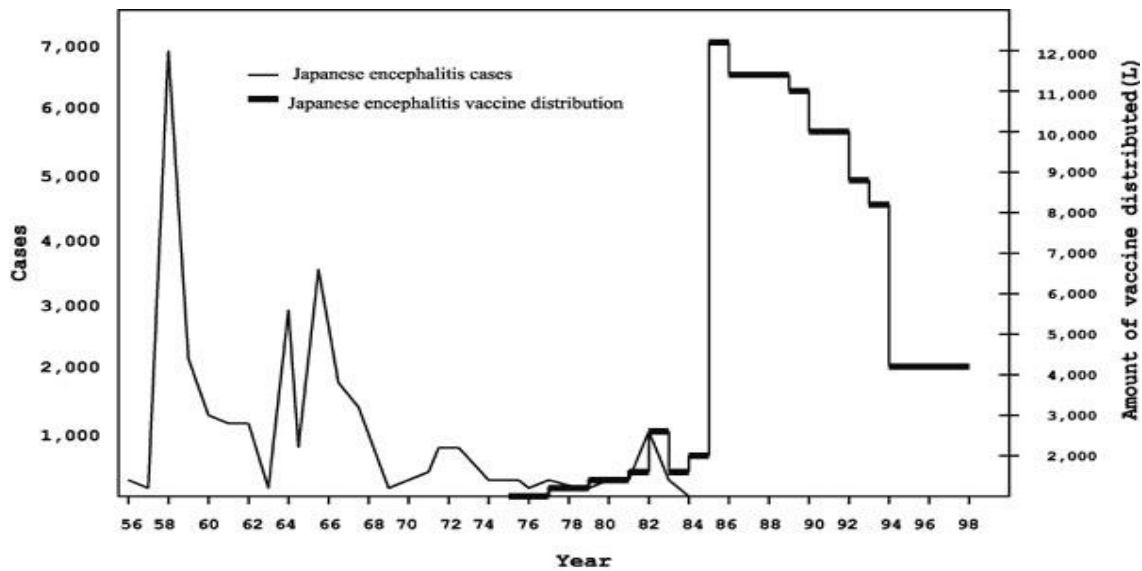
đến nay, theo thống kê của Bộ Y tế và phúc lợi Nhật Bản, mỗi năm chỉ còn dưới 100 trường hợp mắc VNNB do tác động của vắc xin dự phòng bệnh [17;49].



**Hình 1.1. Tình hình bệnh viêm não Nhật Bản ở Nhật Bản**

Ở Triều Tiên trong vụ dịch năm 1949 có 5.616 trường hợp, tỷ lệ mắc trên 100.000 dân là 27,8 và số tử vong là 2.729 trường hợp. Từ năm 1949-1958 các vụ dịch thường xảy ra cách 03 năm một lần với trên 1.000 trường hợp trong 09 năm liền. Riêng trong vụ dịch năm 1958 đã có 6.897 bệnh nhân, tỷ lệ mắc trên 100.000 dân là 29,7 và có 2.117 trường hợp tử vong (khoảng 9,4/100.000 dân). Giai đoạn 1958-1969, hàng năm vẫn thường có khoảng 1.000 trường hợp mắc, nhưng hiện nay đã giảm xuống dưới 100 trường hợp, riêng các năm có số mắc tăng (năm 1973 có 769 trường hợp, 1982 có 1.197 trường hợp) [17;111].





**Hình 1.2. Tình hình bệnh viêm não Nhật Bản ở Hàn Quốc**

Thực tế này cho thấy, do tác động dự phòng của vắc xin VNNB đã không chế được bệnh VNNB ở một số nước Bắc Á như Nhật Bản và Triều Tiên, nhưng ngược lại VNNB vẫn còn là một vấn đề nghiêm trọng ở Trung Quốc cũng như một số nước Nam Á. Cụ thể, tỷ lệ mắc VNNB ở Trung Quốc là từ 15-20/100.000 người và tỷ lệ tử vong khoảng 30% [17;66]. Ở Malaysia trong hàng thập kỷ từ 1997-2006, quốc gia này đều ghi nhận các trường hợp VNNB xảy ra [17;101]. Còn ở Ấn Độ, dịch xảy ra tại nhiều địa phương, trước năm 1970 thường chỉ gặp các trường hợp VNNB ở miền Nam Ấn Độ nhưng từ năm 1973 đã ghi nhận ca bệnh ở miền Tây Bengal và nhiều nơi khác của Ấn Độ. Theo Rustagi R. (2019), tần số mắc bệnh là từ 31 trường hợp vào năm 1983 trong vụ dịch ở Goa tăng lên đến 3.451 trường hợp trong năm 1978 ở Uttar Pradesh với tỷ lệ tử vong từ 25%-45%, cho thấy sự cần thiết một chiến lược khống chế bệnh VNNB ở quốc gia này [17;59;76;105].



**Hình 1.3. Phân bố vùng lưu hành vi rút viêm não Nhật Bản trên thế giới**

Từ năm 1978–1984, ở Nepal đã ghi nhận được 2.508 trường hợp mắc VNNB với 886 trường hợp tử vong, tỷ lệ tử vong là 35,32% được ghi nhận tại các bệnh viện. Đặc biệt đối với trẻ em dưới 14 tuổi, tỷ lệ mắc VNNB là 33% và tỷ lệ tử vong lên tới 28,7%. Trong vụ dịch năm 1985 ở Nepal có 595 trường hợp mắc bệnh trong mọi lứa tuổi và đã có 146 tử vong, năm 1986 có 1.299 trường hợp mắc và 357 đã tử vong [52;80;126].

Tại miền Bắc Thái Lan năm 1969 tỷ lệ mắc bệnh là 20,3 trên 100.000 dân, riêng đối với trẻ em dưới 15 tuổi, tỷ lệ mắc VNNB hàng năm thường vượt mức 100 trên 100.000 dân [17;102;115;123].

Như vậy, vi rút VNNB được xác định ở hầu hết các nước châu Á, bao gồm cả miền Đông châu Á, từ vùng biển Xibêri ở phía Bắc xuống tới các đảo Indonesia ở phía Nam. Khu vực các đảo, quần đảo ở vùng biển châu Á, như Nhật Bản, Triều Tiên, Guam, Đài Loan, Philippines, Myanmar, Singapore, Malaysia, Thái Lan, Indonesia, Bangladesh, Sri Lanka, Pakistan, Ấn Độ, Nepal,

Campuchia và Việt Nam, v.v. [17;55;60;61;74;77]. Cho đến nay, vi rút VNNB mới được ghi nhận lưu hành ở châu Á, miền Bắc nước Úc, còn châu Mỹ, châu Âu và châu Phi chưa ghi nhận có sự lưu hành của vi rút VNNB [71;103;119].

Bệnh VNNB xảy ra chủ yếu về mùa hè ở các nước vùng cận nhiệt đới, các vụ dịch lớn thường được ghi nhận, còn ở những vùng nhiệt đới ca bệnh xảy ra rải rác quanh năm, đối tượng có nguy cơ mắc cao chủ yếu là trẻ em dưới 15 tuổi và những người chưa có miễn dịch tự nhiên hoặc miễn dịch chủ động bằng vắc xin dự phòng bệnh VNNB [17;34;42;99;132].

#### ***1.1.1.2. Lịch sử xuất hiện bệnh viêm não Nhật Bản ở Việt Nam, Tây Nguyên***

Ở Việt Nam, lần đầu tiên bệnh VNNB được ghi nhận vào năm 1953 với báo cáo sơ bộ của hai nhà khoa học người Pháp là Puyuelo H. và Pre'vot M. về 98 trường hợp mắc VNNB được ghi nhận trong quân đội viễn chinh Pháp tại miền Bắc Việt Nam [4;13;36]. Tiếp đó các nhà khoa học Việt Nam đã tiến hành nghiên cứu có về sự lưu hành của vi rút VNNB và tình hình dịch tễ học của bệnh VNNB ở miền Bắc Việt Nam, đặc biệt phần lớn ở các tỉnh vùng đồng bằng gần Hà Nội đã kết luận nguyên nhân gây HCVNC ở miền Bắc Việt Nam là do vi rút VNNB [36;37]. Đồng thời vai trò truyền vi rút VNNB của muỗi *Cx. tritaeniorhynchus* cũng đã được khẳng định bằng kết quả phân lập được vi rút từ loài muỗi này [36]. Các nghiên cứu dịch tễ học, lâm sàng và xét nghiệm đã xác định vai trò của vi rút VNNB trong các vụ dịch xảy ra vào mùa hè ở Việt Nam dưới biểu hiện lâm sàng chung là HCVNC [1;4;36]. Theo dõi tình hình mắc HCVNC dựa trên số liệu thống kê cho thấy, ở miền Bắc, tỷ lệ mắc trên 100.000 dân dao động từ 1,77 (1962) đến 22,07 (1970); tỷ lệ tử vong từ 0,477 (1962) đến 4,982 (1970) và không có xu hướng giảm cho đến những năm gần đây, khi vắc xin VNNB được đưa vào sử dụng trong chương trình tiêm chủng mở rộng cho trẻ em từ 01-05 tuổi với 03 liều cơ bản đã góp phần làm giảm tỷ lệ số mắc trên

100.000 dân ở các tỉnh trung du và đồng bằng Bắc Bộ xuống còn khoảng 02-05 trên 100.000 dân, và tỷ lệ mắc trên toàn quốc là 0,9-1,4 trên 100.000 dân giai đoạn 2011-2013 [4;15;36;47;132].

Ở các tỉnh thành phía Nam, các trường hợp mắc VNNB chỉ được ghi nhận một cách lẻ tẻ, ví dụ như trong mùa hè năm 1968, tại khu vực Long Bình - Sài Gòn, ghi nhận 57 trường hợp VNNB trong quân đội Hoa Kỳ, tử vong 01 trường hợp. Thời gian từ 1978-1997, phân lập được vi rút VNNB từ bệnh nhân tại ngoại thành thành phố (TP) Hồ Chí Minh và các tỉnh Đồng Tháp, Sông Bé, Đồng Nai và phân lập được vi rút VNNB từ muỗi *Culex quiquefasciatus* tại TP. Hồ Chí Minh, tỉnh Long An. Trong các năm 1999-2001 đã ghi nhận các trường hợp VNNB xuất hiện tản phát ở hai tỉnh Đồng Nai và Vĩnh Long [4;11;13;21].

Tại Tây Nguyên, theo tài liệu của Viện VSDTTW (1993), thống kê tình hình "hội chứng viêm não cấp" ở Việt Nam từ 1979-1990, cho thấy, tỷ lệ mắc trên 100.000 dân dao động từ 1,62 (1990) đến 5,96 (1984) và tỷ lệ tử vong dao động từ 0,18 (1990) đến 0,76 (1983). Trong giai đoạn này, chẩn đoán huyết thanh VNNB ở trẻ em xác định dương tính từ 50-70% trong các trường hợp có biểu hiện của "hội chứng viêm não cấp" [7;17]. Trong các năm 2000-2001, xác định được 21 trường hợp VNNB, phân bố tại Gia Lai, Kon Tum và Đắk Lắk. Giai đoạn, năm 2002-2005 tại Tây Nguyên phát hiện được trên 283 trường hợp viêm não, trong đó 50 trường hợp tử vong, riêng tại Gia Lai đã phát hiện được 46 ca VNNB từ 74 bệnh phẩm của bệnh nhân có HCVNC [7;8;14]. Trong giai đoạn 10 năm trở lại đây, từ 2006-2015, số liệu chưa được thống kê đầy đủ, nhưng vẫn ghi nhận được báo cáo từ ngành y tế địa phương có các ca mắc VNNB tại các tỉnh Gia Lai, Kon Tum và rải rác Đắk Lắk, Đắk Nông [4;43].

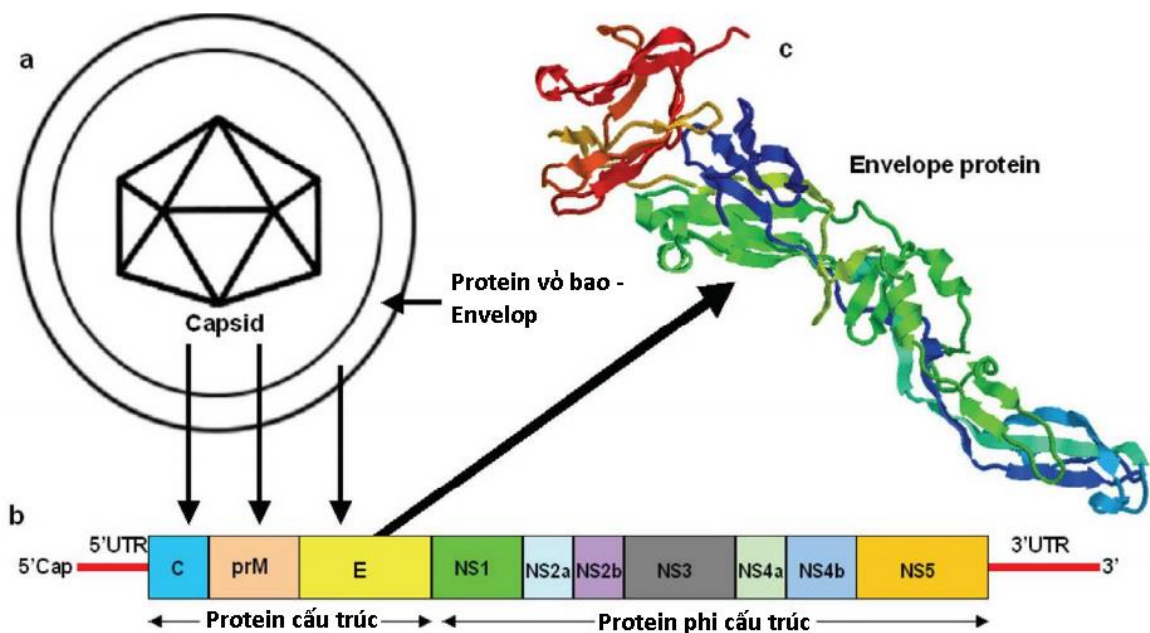
Điều tra huyết thanh học trên quần thể lợn ở tỉnh Đắk Lắk, 2000-2001 xác định 66,1% số lợn kiểm tra có kháng thể kháng vi rút VNNB với hiệu giá trung

binh 01:39,9. Trong giai đoạn 1999-2003, sử dụng kỹ thuật MAC-ELISA trên bệnh nhân có HCVNC tại các tỉnh Đắk Lắk, Gia Lai, Kon Tum, ghi nhận bệnh nhân này có kháng thể IgM kháng vi rút VNNB rải rác ở cả 3 tỉnh [7;14;45].

## 1.1.2. Tác nhân gây bệnh, đường lây, cơ chế bệnh sinh và các thể lâm sàng

### 1.1.2.1. Tác nhân gây bệnh

Tác nhân gây bệnh là vi rút VNNB, một loại vi rút Arbo do muỗi truyền thuộc chi Flavivirus, họ *Flaviviridae*. Vi rút VNNB hình cầu, đường kính khoảng 45-50 nm, vật liệu di truyền là một sợi ARN đơn dương, với kích thước khoảng 11Kb [16;34;62;82;97]. Vi rút VNNB bị bất hoạt ở 56°C trong vòng 30 phút, bị mất hoạt lực gây nhiễm ở nhiệt độ phòng trong khoảng 01-02 giờ, bị Desoxycholat và Focmol 0,2% phá hủy. Vi rút tồn tại được ở -70°C trong khoảng vài năm, hay dưới dạng đông khô bảo quản dài hạn ở -70°C [1;2;40]. Đây là những đặc điểm sinh học của vi rút VNNB cần được quan tâm khi thiết lập một quy trình thu thập mẫu, bảo quản, vận chuyển để phân lập được vi rút thành công và lưu giữ chủng vi rút [1;113;126].

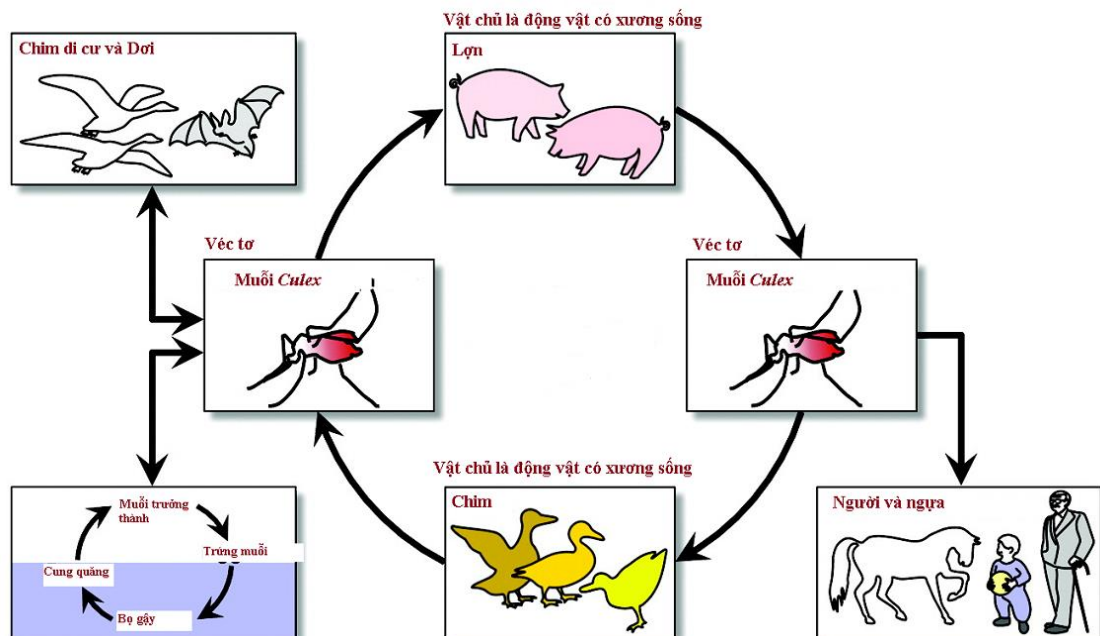


## Hình 1.4. Vi rút viêm não Nhật Bản và cấu trúc genome

### 1.1.2.2. Đường lây truyền

Vi rút VNNB được lây truyền từ ổ chứa vi rút sang người qua véc tơ trung gian truyền bệnh là muỗi *Culex* [1;2;4;24;62]. Nghiên cứu cho thấy, muỗi *Culex* không chỉ là véc tơ truyền bệnh mà còn là ổ chứa vi rút thứ cấp trong tự nhiên với vai trò chính là *Cx. tritaeniorhynchus* [5;17;31;53;56;83;88].

Bệnh VNNB không truyền trực tiếp từ người sang người mà phải lây truyền qua các véc tơ trung gian là các loài muỗi *Culex*. Muỗi cái hút máu súc vật ở các giai đoạn bị nhiễm vi rút huyết sẽ trở thành muỗi bị nhiễm vi rút VNNB để truyền bệnh suốt đời và có thể truyền vi rút VNNB sang thế hệ sau qua trứng [62;93;99]. Thời gian vật chủ có thể lây truyền là thời gian vi rút huyết, cụ thể thời gian bị nhiễm VNNB trong máu ở chim từ 02-05 ngày và ở lợn từ 02-04 ngày với hiệu giá của vi rút đủ cao để gây nhiễm cho muỗi véc tơ. Thời gian ủ bệnh của muỗi véc tơ là 14 ngày sau khi hút máu động vật bị nhiễm vi rút VNNB [52;66;82;92;128].



### **Hình 1.5. Chu trình lây truyền vi rút VNNB trong tự nhiên**

Như vậy ổ chứa thiên nhiên của vi rút VNNB chủ yếu là chim và lợn. Các loại chim hoang dại mang vi rút nhưng không có biểu hiện bệnh lý, nó là nguồn lây nhiễm vi rút cho các loài muỗi sống trong tự nhiên. Các loài chim di trú có thể lây truyền vi rút từ vùng này qua vùng khác. Những loài động vật như trâu bò, ngựa, chó, v.v. cũng bị nhiễm vi rút VNNB nhưng vai trò truyền bệnh của chúng cho người chưa có bằng chứng ghi nhận [1;62;78;95;121].

#### ***1.1.2.3. Cơ chế bệnh sinh***

Cơ chế bệnh sinh của bệnh VNNB phụ thuộc vào các yếu tố là vật chủ cảm nhiễm, sự sẵn có véc tơ truyền bệnh mang vi rút VNNB và ổ chứa vi rút gần người. Vi rút được muỗi truyền vào máu, phát triển ở trong máu và đi khắp cơ thể. Nhờ hướng tính thần kinh, vi rút xâm nhập vào các tế bào thần kinh, sinh sản và phát triển nhanh ở đó. Khi vi rút xâm nhập đến hệ thần kinh trung ương, chúng có khả năng nhân lên ở mô não, gây nên các phản ứng viêm não dẫn đến các triệu chứng thần kinh xuất hiện [1;62;121].

Trẻ em dưới 10 tuổi chưa có miễn dịch tự nhiên, là đối tượng dễ mắc hơn người lớn. Tỷ lệ mắc bệnh VNNB ở vùng đồng bằng cao hơn vùng rừng núi, ở nông thôn cao hơn thành phố. Sau khi mắc bệnh người bệnh thường có miễn dịch suốt đời [2;24;74;80;115;119;133].

#### ***1.1.2.4. Các thể lâm sàng***

Hầu hết các trường hợp nhiễm vi rút VNNB là thể ẩn, có khoảng 250-1.000 trường hợp nhiễm ẩn mới có 01 ca bệnh có biểu hiện lâm sàng tùy theo vùng địa lý [1;52;101;123;128]. Bệnh nặng là đặc điểm khởi phát sốt cao, đau đầu, cứng cổ, mất phương hướng, hôn mê, co giật, liệt, tê liệt và tử vong. Tỷ lệ tử vong/trường hợp có thể lên đến 30% trong số những người có triệu chứng

bệnh. Trong số những người sống sót, 20%-30% có các vấn đề về trí tuệ, hành vi hoặc bị tê liệt thân kinh vận động vĩnh viễn, co giật tái phát hoặc không thể nói được có thể xuất hiện sau thời gian mắc bệnh đến hai năm [36;50;127;133].

Các thể lâm sàng bao gồm: Thể điển hình; Thể màng não; Thể ẩn; Thể liệt hành tuỷ; Thể cắt; Thể liệt mềm giống bại liệt [2;4;24;59;62].

#### ***a) Thể điển hình***

Thời kỳ nung bệnh: Kéo dài từ 05-14 ngày, trung bình là 01 tuần. Thời kỳ khởi phát: Bệnh khởi phát rất đột ngột bằng sốt cao 39-40°C hoặc hơn. Bệnh nhân đau đầu, buồn nôn và nôn. Ngay trong 01-02 ngày đầu của bệnh đã xuất hiện cứng gáy, tăng trương lực cơ, rối loạn vận động nhãn cầu, lú lẫn hoặc mất ý thức, phản xạ gân xương tăng, xung huyết giãn mạch rõ. Ở một số trẻ nhỏ, có thể thấy đi lỏng, đau bụng, nôn giống như nhiễm khuẩn-nhiễm độc ăn uống. Thời kỳ khởi phát của bệnh tương ứng với lúc vi rút vượt qua hàng rào máu-não và gây phù não [1;2;24;85;114;115].

Thời kỳ toàn phát: Từ ngày thứ 03-04 đến ngày thứ 06-07 của bệnh. Triệu chứng nổi bật trong giai đoạn toàn phát là sự xuất hiện các triệu chứng tổn thương hệ thần kinh trung ương và tổn thương thần kinh khu trú, sang ngày thứ 03-04 của bệnh, các triệu chứng của thời kỳ khởi phát tiếp tục tăng lên. Bệnh nhân có thể từ mê sáng kích thích, u ám lúc đầu, dần dần bệnh nhân đi vào hôn mê sâu dần. Có các triệu chứng rối loạn thần kinh thực vật, ảo giác, kích động, tăng trương lực cơ kiểu ngoại tháp làm cho bệnh nhân nằm co quắp và có các cơn xoắn vặn, co giật cứng hoặc giật rung các cơ mặt và cơ chi hoặc có triệu chứng khu trú như liệt chân, tay; các dây thần kinh sọ não bị tổn thương, đặc biệt là các dây vận nhãn và dây VII. Thời kỳ lui bệnh với biểu hiện chủ yếu là các biến chứng và di chứng. Biến chứng thường gặp là viêm phế quản, viêm phổi, loét nhiễm trùng, rối loạn giao cảm, rối loạn chuyển hoá, rối loạn tâm thần, v.v..



Di chứng thường gặp là liệt chi, nói ngọng, nhưng có di chứng xuất hiện sau vài năm, thậm chí hàng chục năm như động kinh, Parkinson [1;2;24;62;77].

Tiên lượng: Bệnh VNNB có tỷ lệ tử vong cao lên đến 25%-50% đặc biệt ở các nước kém phát triển và di chứng thần kinh-tâm thần khoảng 50% [4;133].

Ở nước ta, theo số liệu thống kê và báo cáo của một số cơ sở điều trị, nhờ phát hiện sớm, điều trị và chăm sóc kịp thời, tỷ lệ tử vong do vi rút VNNB gây HCVNC đã giảm còn khoảng 10% so với những năm trước đây. Tử vong thường xảy ra từ ngày thứ ba đến ngày thứ tám của giai đoạn cấp, khi bệnh nhân có hôn mê sâu, co giật và những triệu chứng tổn thương hành não dẫn đến rối loạn hô hấp, tim mạch trầm trọng. Nhìn chung, HCVNC do vi rút VNNB thường nặng hơn hội chứng viêm não cấp do một số vi rút khác ví dụ như vi rút ECHO 30 [2;13;24;40;104;116].

#### ***b) Một số thể không điển hình***

***Thể ẩn:*** Người ta thấy sau các vụ dịch số người không mắc bệnh mà vẫn có đáp ứng miễn dịch chiếm tỷ lệ rất cao có thể gấp đến hàng trăm hoặc đến hàng nghìn lần số người mắc bệnh tùy phân vùng địa lý [4;52;71;101;119].

***Thể cut:*** Chỉ có hội chứng nhiễm khuẩn nhiễm độc (sốt cao, xung huyết, nhức đầu), không có triệu chứng của hội chứng não - màng não [2;24;62].

***Thể viêm màng não:*** Bệnh diễn biến giống như viêm màng não do virút khác. Thể này khởi đầu có sốt và nhức đầu. Thường thấy nổi bật các triệu chứng màng não nhưng không có dấu hiệu thương tổn khu trú của não, tuy nhiên đôi khi ý thức có thể bị rối loạn nhẹ. Phần lớn đối tượng bệnh nhân thuộc nhóm từ 10–30 tuổi. Đối với thể màng não, bệnh không để lại di chứng [1;2;17;24;62;105].

#### **1.1.3. Xét nghiệm cận lâm sàng**

Xét nghiệm huyết học và sinh hóa thường thấy bạch cầu tăng cao và chủ yếu loại đa nhân trung tính. Tốc độ lắng máu nói chung cũng tăng nhưng không

có tính đặc trưng, còn đường máu, urê máu, điện giải đồ trong giới hạn bình thường. Đôi khi có thể gặp protein niệu đơn thuần (0,10–0,40g/l) trên một vài bệnh nhân. Chụp X quang phổi thường gặp hình ảnh rón phổi đậm kèm theo viêm hạch rón phổi [1;4;17;62]. Chụp cắt lớp vi tính và điện não đồ, không có hình ảnh đặc trưng của bệnh VNNB.

#### **1.1.4. Chẩn đoán xác định ca bệnh**

Trên thực tế, có một số tác nhân gây HCVNC dễ nhầm với HCVNC do vi rút VNNB, mặt khác HCVNC do vi rút VNNB cũng rất đa dạng, nên không thể dựa vào triệu chứng lâm sàng để xác định ca bệnh mà phải dựa vào xét nghiệm vi rút đặc hiệu [1;76;85;104;116]. Các xét nghiệm đặc hiệu có thể sử dụng là phân lập vi rút hoặc phát hiện vật liệu di truyền, kháng nguyên NS1 của vi rút từ mẫu bệnh phẩm lâm sàng lấy sau mắc 1-5 ngày đầu của bệnh như mẫu máu, dịch não tủy hoặc từ não tử thi. Phương pháp này có giá trị để xác định ca bệnh, nhưng xét nghiệm thường ít có kết quả dương tính. Nên xét nghiệm đặc hiệu sử dụng phổ biến hiện nay là phát hiện IgM đặc hiệu kháng vi rút VNNB từ mẫu máu hoặc dịch não tủy của bệnh nhân, việc phát hiện được IgM kháng vi rút VNNB từ dịch não tủy của bệnh nhân được coi là “chuẩn vàng”. Ngoài ra, cần kết hợp thêm với các yếu tố về dịch tễ như ca bệnh thường xuất hiện vào mùa hè, ở trẻ nhỏ <15 tuổi, hoặc người lớn chưa có miễn dịch đi vào khu vực lưu hành vi rút VNNB [2;24;79;87;128;133].

#### **1.1.5. Điều trị**

Cho đến nay chưa có thuốc điều trị đặc hiệu bệnh VNNB, việc điều trị chủ yếu là hỗ trợ làm giảm các triệu chứng bằng cách chống phù nề não, điều trị triệu chứng, biến chứng và chống bội nhiễm, v.v. [2;24;62;114;128].

#### **1.1.6. Phòng bệnh, kiểm soát dịch**

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.

**1.1.6.1. Biện pháp đối với ổ chứa vi rút:** Đối với ổ chứa vi rút VNNB là các động vật hoang dại, các loài chim không thể kiểm soát được. Còn đối với các động vật gần người như lợn, trâu, bò, dê, cừu, v.v. cần có quy hoạch chăn nuôi tập trung để phòng tránh sự lây truyền bệnh từ động vật sang người qua muỗi đốt như: Chuồng trại chăn nuôi cần cách xa nhà ở, vệ sinh sạch sẽ, xua đuổi muỗi hoặc diệt trừ muỗi bằng hoá chất [1;62;105].

**1.1.6.2. Phòng chống véc tơ truyền bệnh:** Véc tơ là một trong các mắt xích của dây truyền dịch tế các bệnh truyền nhiễm do côn trùng truyền. Phòng chống muỗi véc tơ về mặt lý thuyết có thể thực hiện bằng một số biện pháp thông dụng như dùng hương trừ muỗi, hoặc dùng màn tránh muỗi, màn che được tẩm hóa chất để trừ muỗi/xua đuổi muỗi. Có một số loại hóa chất diệt côn trùng có tác dụng tốt và an toàn như: Permethrin, ICON, Fendona, v.v.. Muỗi truyền vi rút VNNB thường sống và sinh sản ở vùng ruộng nên kiểm soát véc tơ truyền bệnh là rất khó khăn. Ngoài ra, muỗi có thể truyền vi rút sang thể hệ sau qua trứng nên sự tồn tại của vi rút VNNB trong tự nhiên là liên tục. Véc tơ truyền bệnh là muỗi *Culex* có thói quen hoạt động ở đồng ruộng trồng lúa nước, thích hút máu gia súc như bò, lợn. Muỗi *Culex* nhiễm vi rút VNNB hút máu người là một sự ngẫu nhiên và truyền vi rút sang cho người qua vết đốt [17;31;72;88;93;121].

**1.1.6.3. Biện pháp với đối tượng cảm nhiễm:** Biện pháp phòng bệnh cho người chủ động là sử dụng vắc xin phòng bệnh, đây là biện pháp phòng bệnh có hiệu quả nhất [49;66;97;111;133]. Tổ chức Y tế thế giới khuyến cáo, tiêm vắc xin VNNB không chỉ cho trẻ em mà còn nên tiêm cho những người đi du lịch hay đi công tác vào vùng vi rút lưu hành và vùng đang có dịch VNNB [49;62;133].

### **1.1.7. Sử dụng vắc xin phòng bệnh**

Hiện nay có bốn loại vắc xin VNNB đang được sử dụng trên thế giới, nhưng vắc xin bất hoạt tinh chế từ chủng vi rút Nakayama vẫn là loại vắc xin được sử dụng rộng rãi nhất trên thế giới từ 1960s cho đến nay [1;29;42].

Vắc xin VNNB bất hoạt chế từ não chuột, đây là vắc xin được sản xuất từ não chuột được phép sử dụng ở Nhật Bản từ năm 1954, với hiệu lực bảo vệ của cả hai loại vắc xin đơn giá và nhị giá là 91% [49].

Vắc xin VNNB bất hoạt chế từ nuôi cấy tế bào, đây là vắc xin mới sản xuất trên tế bào Vero nhằm thay thế vắc xin từ não chuột được Viện Biken, Kaketsuken của Nhật Bản và Intercell của Áo nghiên cứu sản xuất, JEBIK V(2009) và ENCEVAC (2011). Vắc xin an toàn và đáp ứng miễn dịch cao đang được quan tâm để phòng bệnh VNNB rộng rãi trên thế giới. Một vắc xin bất hoạt phòng bệnh VNNB khác được sản xuất ở Trung Quốc bằng cách làm giảm độc lực chủng SA14-14-2 trên tế bào Vero là IC 51. Vắc xin này đã được chứng minh là an toàn và có miễn dịch cao với tỷ lệ chuyển đổi huyết thanh từ 99%-100% sau hai liều tiêm, hiệu quả bảo vệ từ 98%-99% [49;97;133].

Vắc xin VNNB sử dụng công nghệ tái tổ hợp biến đổi gen là vắc xin sống, giảm độc lực phòng bệnh VNNB đã được sản xuất dựa trên vi rút Chimeri YF-JE (ChimeriVax-JE). Loại vắc xin ChimeriVax-JE có tên thương mại là IMOJEV, JE-CV, hoặc THAIJEV đã được sử dụng tại Úc và Thái Lan. Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng vắc xin ChimeriVax-JE là an toàn, tạo miễn dịch bảo vệ cao, chuyển đổi huyết thanh đạt 95-99% sau một liều duy nhất [133].

Ở Việt Nam, vắc xin VNNB đang được sử dụng rộng rãi trong chương trình tiêm chủng mở rộng do Việt Nam sản xuất là vắc xin bất hoạt, tinh khiết, sử dụng theo phác đồ của nhà sản xuất với miễn dịch cơ bản 3 liều trong 2 năm đầu,

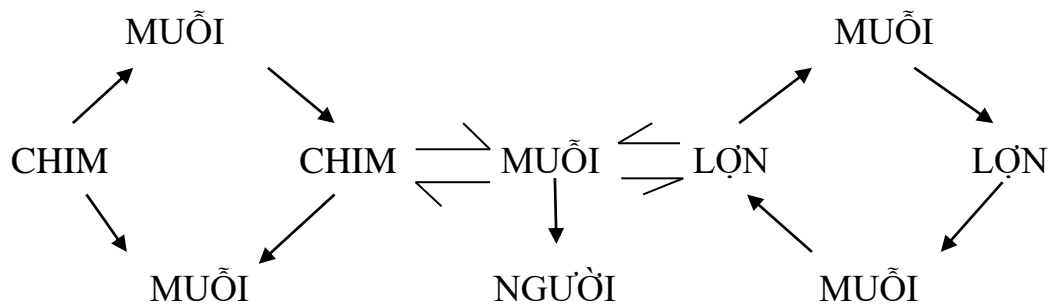
sau 3-4 năm cần tiêm nhắc lại để duy trì đáp ứng miễn dịch, đảm bảo hiệu quả phòng bệnh của vắc xin [2;24;62;97;133].

## **1.2. Đặc điểm muỗi *Culex* và vai trò truyền vi rút viêm não Nhật Bản**

Cho đến nay, đã xác định có trên 30 loài *Culex* có khả năng truyền vi rút VNNB, như *Cx. tritaeniorhynchus*, *Cx. vishnui*, *Cx. gelidus*, v.v. [1;62;133]. Các loài muỗi này thường sinh sản ở đồng ruộng, đôi khi xa nơi ở của người, nhưng chúng có khả năng bay xa. Ví dụ như *Cx. tritaeniorhynchus* có thể bay xa 1,5 km và được phát hiện ở độ cao 13-15m so với mặt đất, là độ cao mà các loài chim thường trú đậu, đó là điều làm vi rút có thể lây truyền từ muỗi sang các loài chim. Muỗi hút máu động vật có nhiễm vi rút, đặc biệt là lợn, chim trong thời kỳ nhiễm vi rút huyết, sau đó muỗi có khả năng truyền bệnh suốt đời và có thể truyền vi rút sang đời sau qua trứng [88;93;110]. Vi rút VNNB phát triển tốt trong cơ thể muỗi ở độ 27-30°C. Nếu dưới 20°C thì sự phát triển của vi rút dừng lại. Đó cũng là lý do bệnh/dịch VNNB thường xảy ra vào mùa hè ở những vùng cận nhiệt đới [1;22;23;62;121].

### **1.2.1. Véc tơ truyền vi rút viêm não Nhật Bản**

Muỗi *Culex* vừa là ổ chứa vi rút vừa là véc tơ truyền vi rút sang người. Tại Việt Nam một số loài *Culex*, trong đó có *Cx. tritaeniorhynchus* được xác định là véc tơ chính truyền bệnh VNNB [5;17;36;72;83]. Dựa trên cơ sở dữ liệu và quan sát thực tế đã xác định, chu kỳ bình thường của vi rút VNNB trong thiên nhiên là chu kỳ "chim-muỗi". Về mùa hè chu kỳ này phát triển thêm ra một chu kỳ khuếch đại vi rút là "muỗi-lợn", từ đó có thể dẫn đến chu kỳ đặc biệt "muỗi-người". Ở chu kỳ "người-muỗi" có thể gọi là chu trình cuối cùng, vì vi rút VNNB không lây truyền từ người sang người qua trung gian muỗi véc tơ. Chu trình sinh thái của vi rút VNNB trong tự nhiên có thể minh họa như sau [1;53]:



**Hình 1.6. Chu trình lây truyền của vi rút viêm não Nhật Bản**

## 1.2.2. Nghiên cứu về muỗi *Culicinae*

### 1.2.2.1. Nghiên cứu về muỗi *Culicinae* trên thế giới

Đã có nhiều công trình nghiên cứu về muỗi *Culicinae* trong đó có nhiều loài muỗi *Culex* được xác định là trung gian truyền bệnh VNNB. Việc điều tra nghiên cứu về khu hệ, sinh thái học, vai trò truyền bệnh và các biện pháp phòng chống những loài muỗi *Culex* là trung gian truyền bệnh VNNB đã được nhiều tác giả, công bố với những nghiên cứu ở một số nước khu vực Đông Nam Á như Thái Lan, Singapore, Indonesia, Philippines, Malaysia, v.v.. [56;61;67;69;120]; hoặc Bắc Á như Trung Quốc [88]; hoặc Nam Á như Ấn Độ [93], v.v.. Những loài muỗi *Culex* đã được nhiều tác giả xác định là véc tơ truyền vi rút VNNB bao gồm:

#### a) *Cx. gelidus*

Đây là loài muỗi thích hút máu gia súc hơn là máu người, nó được phát hiện ở nhiều nước châu Á như Malaysia, Thái Lan, Taipang, Perak, Ấn Độ, v.v. theo công bố trước đây, loài muỗi này còn có tên khác là *Cx. bipunctata* khi được phát hiện ở châu Á Thái Bình Dương từ các nước như: Myanmar, Trung Quốc, Ấn Độ, Indonesia, Nhật Bản, Malaysia, Nepal, New Guinea, Pakistan, Philippines, Đài Loan, Thái Lan, Việt Nam [3;38;39;40;110;120;129].

#### b) *Cx. tritaeniorhynchus*

Đây là véc tơ chính truyền vi rút VNNB ở châu Á, loài muỗi này đã được thu thập ở Bom Bay, Ấn Độ và đặt tên là *Cx. biroii*. Dyar, 1920 đã thu thập loài muỗi này ở Los Banos, Philippines và đặt tên là *Cx. summorosus*. Còn Baraud và Christophers, 1931 đã thu thập loài muỗi này ở Chiang Mai, Thái Lan và đặt tên là *Cx. siamensis*. Loài muỗi này phân bố hầu như khắp thế giới như các nước thuộc châu Phi (Angola, Camerun, Cộng hòa Trung Phi, Ai Cập, v.v.), các nước Nam Á và một số nước châu Âu như Togo, Thổ Nhĩ Kỳ, v.v. châu Á Thái Bình Dương. Loăng quăng và bọ gậy tìm thấy ở mọi nơi như đầm lầy, ao tù, ruộng, rãnh, v.v.. Nghiên cứu xác định, muỗi cái chủ yếu hút máu các loài gia súc và lợn, còn hút máu người chỉ là một sự ngẫu nhiên [3;39;50;72;81;83;129].

c) *Culex vishnui*

Đây cũng là là véc tơ chính truyền vi rút VNNB, loài muỗi này phân bố khá rộng ở hầu khắp các nước Châu Á Thái Bình Dương như Bangladesh, Myanma, Campuchia, Trung Quốc, Ấn Độ, Indonesia, Nhật Bản, Malaysia, Nepal, Philippines, Singapore, Sri Lanka, Đài Loan, Thái Lan, Đông Timo, Việt Nam. Loăng quăng, bọ gậy được tìm thấy trong ao tù, bao gồm chỗ nước bùn, ruộng rãnh, ao, vũng chân gia súc, lốp bánh xe và ở đồng ruộng mới gặt, cày ải cho nước vào và ruộng lúa mới cấy. Muỗi cái chủ yếu hút máu các loài chim và lợn, nhưng cũng hút cả máu người [3;39;50;121;129].

d) *Culex sittiens*

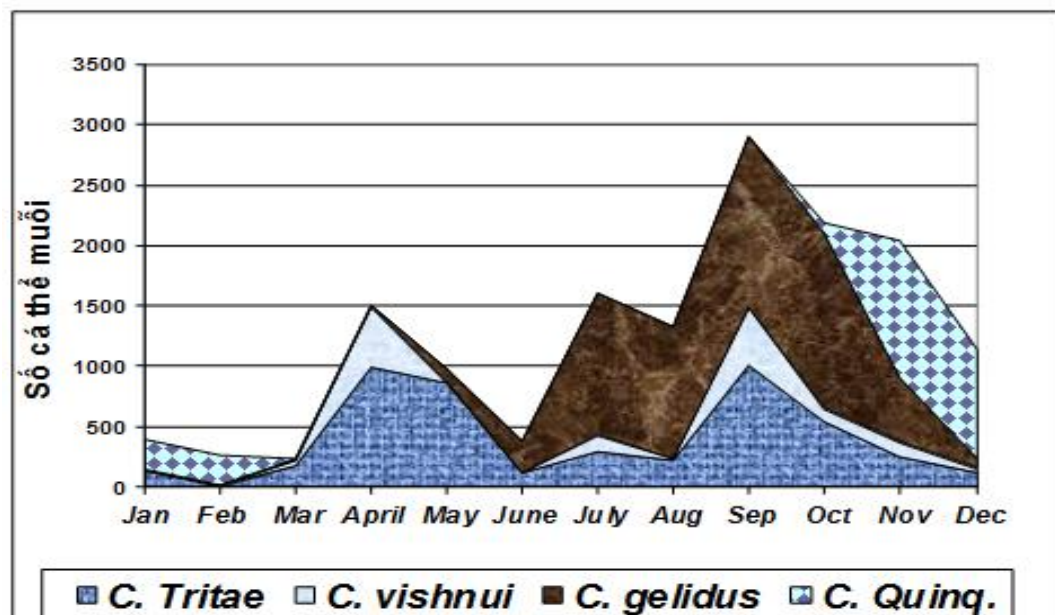
Loài muỗi này có khả năng truyền vi rút VNNB cũng như giun chỉ ở Thái Lan. Loài muỗi này cũng được thu thập ở Makassar, Celebes và đặt tên là *Cx. impellens*, còn ở Úc, loài muỗi này được đặt tên là *Cx. annulirostris*, còn những mẫu muỗi thu thập được ở Malaya được đặt tên là *Cx. somaliensis*, v.v.. Người ta đã tìm thấy loăng quăng, bọ gậy của loài muỗi này trong dụng cụ chứa nước

mặn, nước lợ và nước ngọt đọng ở vùng ven biển. Muỗi cái chủ yếu hút máu các loài chim và lợn, nhưng cũng hút máu người [3;110].

#### 1.2.2.2. Nghiên cứu về muỗi *Culicinae* ở Việt Nam

Trước năm 1954, các công trình nghiên cứu về muỗi *Culicinae* ở Việt Nam chủ yếu do người nước ngoài thực hiện trước các thập niên 1940s, từ thập niên 1950s trở lại đây chủ yếu do người Việt Nam thực hiện liên quan đến véc tơ truyền bệnh sốt rét và bệnh VNNB ở miền Bắc Việt Nam. Những công trình nghiên cứu này được tiến hành kết hợp với công tác điều tra cơ bản khác [23;36].

Kết hợp giữa giám sát véc tơ truyền bệnh và phân lập vi rút từ muỗi trên quy mô lớn ở những vùng lưu hành dịch như Việt Yên Bắc Thái, Đông Anh Hà Nội, Gia Lương Hà Bắc (cũ) đã đưa ra nhận định *Cx. tritaeniorhynchus*, *Cx. vishnui*, *Cx. gelidus* là véc tơ truyền bệnh VNNB ở miền Bắc [31;36;99].

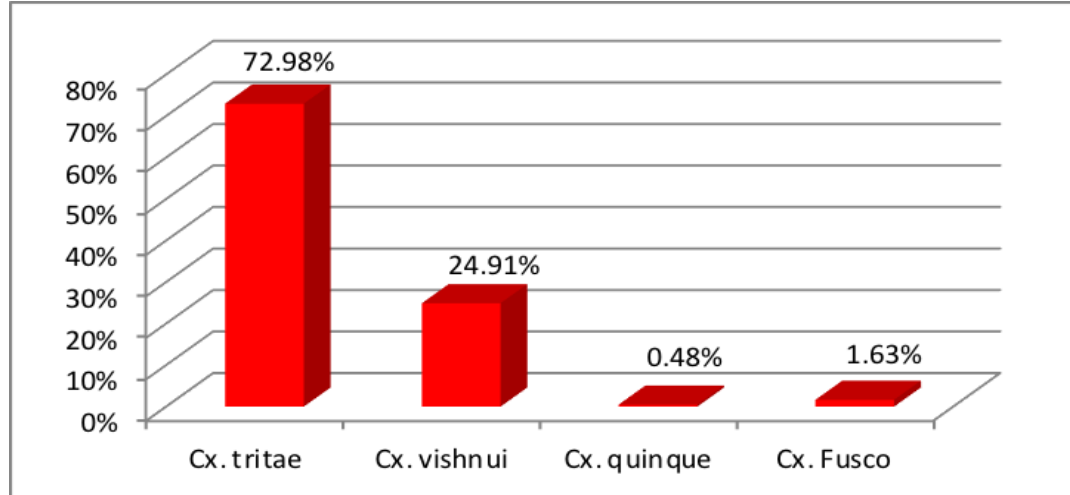


Hình 1.7. Mật độ một số loài muỗi *Culex* ở Cát Quế, Hoài Đức, Hà Tây (cũ) đã thu thập để phân lập vi rút viêm não Nhật Bản, 2001-2003



Tiếp đến một số công trình nghiên cứu đặc điểm phân bố, sinh thái của muỗi truyền bệnh VNNB ở miền Bắc Việt Nam của nhiều tác giả trong nước và hơn thế nữa là công trình nghiên cứu xác định sự phân bố của một số loài muỗi *Culex* ở Cát Quê Hà Tây (cũ), 2001-2003 với sự giám sát mật độ muỗi định kỳ hàng tháng [31]. Kết quả trong nghiên cứu này cho thấy *Cx. tritaeniorhynchus* được thu thập quanh năm, nhưng mật độ cao với hai đỉnh được ghi nhận trong tháng 4 và tháng 9. Còn *Cx. vishnui* xuất hiện trong các tháng 3 tháng 4 và từ tháng 7 đến tháng 11 với đỉnh ghi nhận trùng với *Cx. tritaeniorhynchus*. Với *Cx. gelidus* chỉ được phát hiện từ tháng 5 đến tháng 12 với đỉnh cao trong tháng 10 và *Cx. quinquefasciatus* chỉ được phát hiện trong các tháng 1, 2 và tháng 11 [31]. Cho đến nay, ở miền Bắc, vi rút VNNB mới chỉ được phát hiện chủ yếu từ 3 loài muỗi đó là *Cx. tritaeniorhynchus*, *Cx. vishnui* và *Cx. gelidus* là véc tơ truyền vi rút VNNB. Mật độ muỗi, đặc biệt là *Cx. tritaeniorhynchus*, *Cx. vishnui* cao có liên quan với tần suất ca bệnh VNNB được ghi nhận ở người [26;31;36].

Các công trình nghiên cứu về khu hệ, sinh thái, vai trò dịch tễ học của muỗi *Culicinae*, véc tơ của bệnh VNNB, đồng thời nghiên cứu đánh giá sự nhạy cảm của các véc tơ với hóa chất đang sử dụng ở Việt Nam, góp phần tích cực vào việc phòng chống các bệnh do muỗi truyền trong giai đoạn chưa có vắc xin dự phòng bệnh [36].



**Hình 1.8. Mật độ muỗi *Culex* tại tỉnh Sơn La, Điện Biên, Lào Cai, 2018**

Nghiên cứu trong các năm gần đây ở ba tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam là Sơn La, Điện Biên và Lào Cai, đã phát hiện được 4 loài muỗi *Culex*, trong đó *Cx. tritaeniorhynchus* chiếm tỷ lệ cao nhất 72,98%, tiếp theo là *Cx. vishnui* 24,91%. Trong nghiên cứu này không thực hiện phân lập vi rút VNNB từ muỗi, nhưng hai loài muỗi *Culex* này đã được xác định là véc tơ chính truyền bệnh VNNB ở Việt Nam trong nghiên cứu trước đây [31;36]. Ngoài ra, hai loài *Cx. quinquefasciatus* và *Cx. fuscocephala* cũng được phát hiện ở hai tỉnh này, nhưng chiếm tỷ lệ thấp dao động, 0,48%-1,63%) [38].

### **1.2.2.3. Nghiên cứu về muỗi *Culicinae* ở Tây Nguyên**

Hiện tại Tây Nguyên vẫn là khu vực còn nhiều diện tích rừng tự nhiên của Việt Nam, với thảm sinh vật đa dạng, nhiều khu bảo tồn động vật phong phú, bao gồm cả một số loài động vật mang các mầm bệnh nguy hiểm có thể dẫn đến nguy cơ lây lan trong cộng đồng [7;10]. Đã có một số công trình nghiên cứu về thành phần, phân bố của *Culex* ở khu vực Tây Nguyên trong những năm trước đây: Năm 1993, các tác giả Đặng Tuấn Đạt, Nguyễn Ái Phương, Lý Thị Vi Hương và CS đã xác định được có 41 loài muỗi thuộc phân họ *Culicinae*. Trong

đó giống *Aedes* có 16 loài, *Armigeres* có 08 loài, *Mansonia* 01 loài, *Orthopodomyia* 10 loài, *Malaya* 01 loài, *Toxorhynchites* 3 loài, *Tripterooides* 2 loài, và đặc biệt giống *Culex* có 9 loài [10]. Một số công trình nghiên cứu ở khu vực Tây Nguyên như trên đã phản ánh khái quát về thành phần, phân bố của muỗi *Culex*, tuy nhiên việc cập nhật số liệu thành phần, sự phân bố và vai trò truyền bệnh VNNB của *Culex* ở Tây Nguyên trong những năm gần đây và hiện tại chưa được nghiên cứu một cách hệ thống đầy đủ. Do vậy rất cần có những nghiên cứu hiện tại và tương lai về lĩnh vực này, góp phần vào việc chăm sóc và bảo vệ sức khỏe cho cộng đồng các dân tộc ở Tây Nguyên.

### **1.3. Đặc điểm phân tử/dịch tễ sinh học phân tử vi rút viêm não Nhật Bản**

#### **1.3.1. Khái niệm chung**

Đặc điểm phân tử/dịch tễ sinh học phân tử là những nghiên cứu liên quan đến lĩnh vực di truyền dựa trên việc so sánh trình tự nucleotide/axit amine của một gen đích hoặc toàn bộ genome của các chủng vi sinh vật được phân lập 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 [27;54;70;75;109].

Trong lĩnh vực vi sinh y học, đặc điểm phân tử/dịch tễ sinh học phân tử là phương pháp hiện đại nhất hiện nay để xác định về đặc điểm phân tử của tác nhân gây bệnh, nguồn gốc của tác nhân gây bệnh, sự lan truyền của chúng theo không gian, thời gian ở mức độ phân tử [106;107;118]. Nó đã trở thành một công cụ chính xác và cần thiết trong công tác giám sát dịch tễ học 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 trong tự nhiên (hoang dại).

### **1.3.2. Sự phát triển và ứng dụng kỹ thuật giải trình tự gen**

#### ***1.3.2.1. Giải trình tự nucleotide***

##### ***a) Thế hệ thứ nhất (Phương pháp Sanger)***

Phương pháp Sanger để giải trình tự nucleotide do Sanger F. phát minh vào năm 1977, hiện nay nó vẫn đang được coi là “chuẩn vàng” vì nó 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 [57;75;89;108;117].

Nguyên lý của phương pháp này là dựa vào cơ chế tổng hợp ADN trên cơ sở nguyên lý của việc tổng hợp ADN của vi sinh vật sống khi nó sử dụng dideoxynucleotide (ddNTP) bị mất nhóm –OH ở cả hai vị trí cacbon 2’ và 3’ cho phản ứng hóa học gắn kết. 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 [27].



### **Hình 1.9. Sơ đồ kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ thứ nhất**

Đến những năm cuối thế kỷ XX, trình tự nucleotide được xác định bằng máy đọc tự động (Sequencer) theo nguyên lý sắc ký lỏng, nó có thể đọc trực tiếp kết quả với các trình tự nucleotide dài hơn so với phương pháp trước đây [27]. Đây là phương pháp được sử dụng để xác định trình tự những genotype mới phát hiện trên cơ sở thiết kế các mồi dựa trên trình tự các chủng “consensus” như nghiên cứu để phát hiện genotype I và genotype V của vi rút VNNB trong mấy thập kỷ vừa qua, tương ứng ở các nước châu Á và một số nước Bắc Á [19;20;81;87;102].

#### ***b) Thế hệ thứ hai (Next Generation Sequencing-NGS)***

Phương pháp sequencing thế hệ thứ hai, có 4 điểm chính tiến bộ hơn so với phương pháp của 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 [27].

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 nghiên cứu về genome và sinh học phân tử với một số công nghệ hiện đại khác nhau được sử dụng [135].

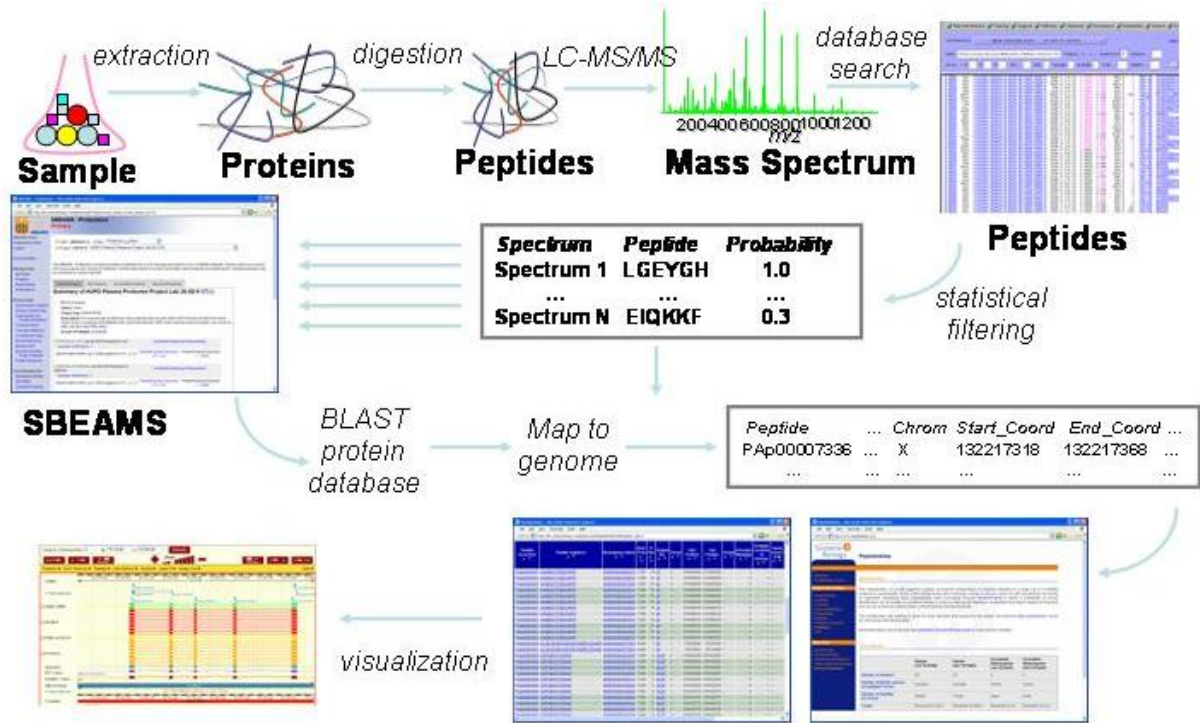
#### ***1.3.2.2. Giải trình tự acid amine***

### ***a) Giới thiệu chung về các phương pháp giải trình tự acid amine***

Giải trình tự protein là kỹ thuật xác định trình tự các acid amine, cấu tạo nên protein có hoạt tính và mức độ tạo phức với phân tử khác. Khám phá cấu trúc và chức năng của protein trong cơ thể sống là công cụ quan trọng để tìm hiểu những chu trình tế bào với mục đích tìm ra con đường chuyển hóa và đích đến cho các loại thuốc.

Có hai phương pháp giải trình tự trực tiếp protein là (1) *phương pháp khối phổ* và (2) *phản ứng Edman sequencing*. Phương pháp này được thay thế bằng phương pháp giải trình tự acid nucleic (là một phương pháp đơn giản, khi xác định được trình tự ADN có thể dự đoán trình tự protein suy biến một cách dễ dàng).

Xác định thành phần acid amine của một protein với mục đích tìm ra trình tự của protein, nhờ đó có thể phát hiện ra sai sót trong quá trình giải trình tự hoặc để phân biệt giữa các kết quả không rõ ràng. Hiểu biết về tần số của các acid amine nhằm chọn protease sử dụng để phân cắt protein [27].



**Hình 1.10. Mô phỏng từ trình tự peptide đến giải mã genome**

(Nguồn ảnh: <http://www.peptideatlas.org/>)

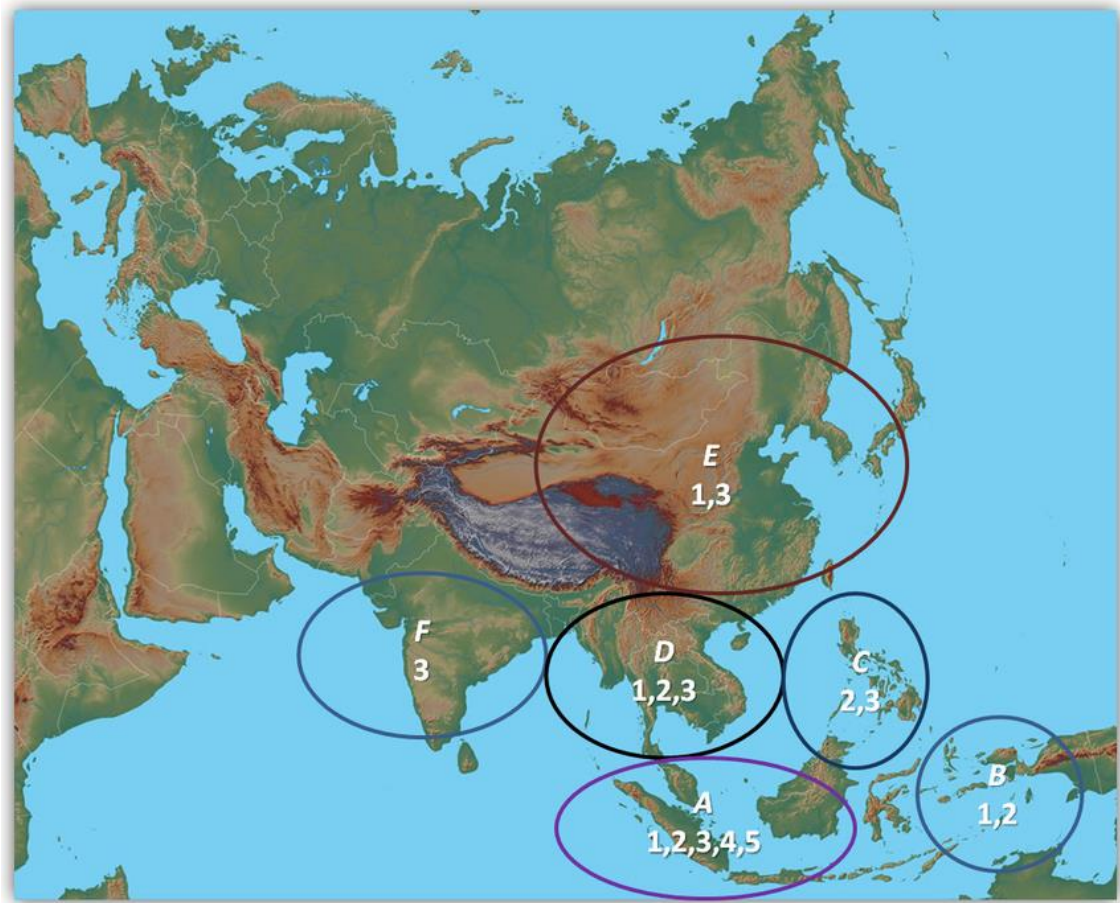
**b) Ứng dụng của các kỹ thuật giải trình tự acid amine**

Xác định mức biểu hiện của các protein tại các thời điểm khác nhau: Các thay đổi trong biểu hiện protein trong các quá trình biệt hoá, tăng sinh và truyền tín hiệu của các tế bào cả về mặt chất lượng và định lượng. Thuật ngữ proteomics đã xuất hiện sau năm 1970, để xây dựng các cơ sở dữ liệu protein. Tuy nhiên, việc xác định protein đã gặp nhiều khó khăn do thiếu những phương pháp phân tích nhanh và nhạy ví dụ như phương pháp PCR. Phương pháp phân tích trình tự ADN tự động với sự ra đời của kỹ thuật khối phổ (1990) đã chứng tỏ nó thật sự là một công cụ phân tích hữu hiệu đối với protein. Thuật ngữ proteomics được dùng để đề cập về việc phân tích chức năng của các sản phẩm gene với sự đồng nhất của các protein cũng như sự tương tác của chúng, vì lý do



đó mà proteomics đóng góp trực tiếp lên việc khám phá và phát triển thuốc do bởi hầu hết các thuốc dùng để điều trị đều tác dụng trực tiếp lên protein [27].

### ***1.3.2.3. Đặc điểm dịch tễ sinh học phân tử của vi rút viêm não Nhật Bản***



**Hình 1.11. Phân bố địa lý và sự lan truyền của các kiểu gen vi rút viêm não Nhật Bản**

Vi rút VNNB chỉ có một type huyết thanh duy nhất, nhưng có 5 genotype. Sự phân bố của các genotype vi rút VNNB cũng khác nhau tùy theo từng vùng địa lý, theo thời gian; về mặt di truyền vi rút VNNB có tần suất tiến hóa với tốc độ rất thấp <3,2% [27;97].

### ***a) Sự liên quan giữa độc lực của vi rút với các genotype***

Phân tích genotype vi rút VNNB dựa trên trình tự nucleotide của toàn bộ genom hoặc vùng gen E của các chủng vi rút VNNB có mã số trên ngân hàng gen quốc tế với ngưỡng để phân biệt các genotype là tỷ lệ khác nhau về trình tự nucleotide là 12% [57;89;124]. Vi rút VNNB có 5 genotype, độc lực và tính chất gây bệnh cũng khác nhau đối với từng genotype. Chủng vi rút VNNB lần đầu tiên được phát hiện trên thế giới vào năm 1935 ở Nhật Bản được đặt tên là chủng Nakayama thuộc genotype III. Các chủng vi rút VNNB phân lập từ bệnh nhân ở nhiều nước trong khu vực châu Á trong các thập kỷ 60-70s phần lớn là các chủng vi rút VNNB thuộc genotype III chính vì vậy, vi rút VNNB genotype III như chủng Nakayama được sử dụng để sản xuất vắc xin bất hoạt sử dụng phòng bệnh cho người trên toàn cầu trong hơn nửa thập kỷ qua [47;49;105;132;133]. Ngoài ra, chủng SA 14-14-2 cũng thuộc genotype III, được giảm độc lực sau nhiều lần cấy truyền sử dụng để phát triển vắc xin sống giảm độc lực dự phòng bệnh cho người ở Trung Quốc [66;128;133]. Ngược lại, vi rút VNNB genotype I trước đây chỉ phát hiện được 5 chủng vi rút từ người trong những năm 1970s, nên vi rút này được cho là thích ứng với muỗi và lợn hơn là người [98;100;107]. Còn đối với vi rút VNNB genotype II, có một số chủng được phân lập từ người, muỗi ở Malaysia, Indonesia và Bắc Úc trong các thập kỷ 1980s và 1990s, nhưng trong những thập kỷ gần đây chưa có công bố về sự tái xuất hiện của genotype này ở bất kỳ quốc gia nào [101;103;108;120]. Với vi rút VNNB genotype II, IV và V vai trò gây bệnh chưa được xác định rõ ràng trên động vật thực nghiệm. Vi rút VNNB genotype IV bao gồm một số chủng vi rút phân lập được từ muỗi ở Indonesia, qua thực nghiệm cho thấy độc lực của vi rút VNNB genotype IV thấp hơn so với độc lực của các chủng vi rút VNNB genotype I và III [60;97;103].

### ***b) Lịch sử xuất hiện những genotype mới của vi rút viêm não Nhật Bản***

Về đặc điểm dịch tễ sinh học phân tử các chủng vi rút VNNB phân lập trên thế giới đã xác định cả 5 genotype vi rút VNNB đã được phát hiện lưu hành ở khu vực Malaysia, Indonesia và New Guinea. Nhưng ở Nhật Bản, nơi phát hiện chủng vi rút VNNB đầu tiên từ người bệnh vào năm 1935 chỉ có vi rút VNNB genotype III lưu hành. Nguồn gốc của vi rút VNNB genotype III phát hiện ở Nhật Bản được cho là chủng vi rút tiến hóa từ vi rút tổ tiên ở châu Phi cách đây vài thế kỷ [28]. Đầu thế kỷ XXI khi nghiên cứu về nguồn gốc và sự tiến hóa của vi rút VNNB đã có giả thiết cho rằng vi rút VNNB xuất hiện đầu tiên ở Malaysia và Indonesia và từ đó lan rộng đến các nước châu Á và dự đoán rằng trong tương lai các chủng vi rút VNNB genotype III sẽ xuất hiện ở Úc và genotype II sẽ xuất hiện và lưu hành ở khu vực Bắc Á như Trung Quốc, Nhật Bản [118].

Nhưng thực tế cho thấy, 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 [71;106;108].

Sau gần 60 năm kể từ khi phát hiện vi rút VNNB genotype III ở Nhật, vi rút VNNB genotype I đã được phát hiện ở Nhật Bản vào năm 1994 từ muỗi [93]. 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 (chủng phân lập từ muỗi), ở Nam Triều Tiên năm 1983 (chủng phân lập từ muỗi) và ở Việt Nam năm 1990 (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 [63;67;89;106;107]. Như vậy, vi rút VNNB genotype I được phát hiện ở các nước vùng Bắc Á và hầu

khắp các nước châu Á từ người bệnh. Hơn thế nữa, vi rút VNNB genotype I mới xuất hiện đã dần dần thay thế cho vi rút VNNB genotype III ở những vùng địa lý trước đây genotype III lưu hành [64;65;70;75;95;102]. Cơ chế của sự thay đổi genotype này đã được mô phỏng và chứng minh qua nghiên cứu thực nghiệm trên một số dòng tế bào có nguồn gốc từ người, muỗi và lợn cũng như một số những nghiên cứu thực nghiệm khác [58;65;69].

Ngoài ra, còn phát hiện có sự mới xuất hiện vi rút VNNB genotype I ở Úc vào năm 2000, cho thấy vi rút VNNB genotype II, mới chỉ phát hiện được ở Úc, Malaysia, Indonesia và Thái Lan từ muỗi, lợn. Sự lưu hành của genotype này cho đến nay vẫn mang tính chất địa phương [28]. Vi rút VNNB genotype V được phát hiện lần đầu tiên vào những năm 1950s ở Malaysia và Singapore, nhưng gần đây genotype này đã được phát hiện ở một số nước Bắc Á như Trung Quốc và Triều Tiên từ muỗi *Culex* [81;86;97;107;109]. Điều này cho thấy, vi rút VNNB genotype V rất có thể đã xuất hiện ở Việt Nam trong quần thể muỗi *Culex* nhưng chưa được phát hiện.

#### **1.4. Vài nét tổng quan khu vực Tây Nguyên**

Tây Nguyên là vùng núi cao rộng lớn của Trung Bộ, thuộc sườn phía Tây của dãy Trường Sơn nằm khoảng 11<sup>0</sup>44' vĩ độ Bắc, 107<sup>0</sup>15' đến 108<sup>0</sup>50' độ kinh Đông. Phía Bắc giáp Quảng Nam, Đà Nẵng; phía Đông giáp các tỉnh Quảng Ngãi, Bình Định, Phú Yên, Khánh Hòa, Bình Thuận, Ninh Thuận; phía Nam giáp các tỉnh Đồng Nai, Bình Dương, Bình Phước; phía Tây giáp Lào, Campuchia. Tây Nguyên hiện nay gồm 5 tỉnh (Kon Tum, Gia Lai, Đắk Lắk, Đắk Nông, Lâm Đồng), gồm 06 thành phố và 56 huyện, thị xã.

Tây Nguyên không phải là một cao nguyên duy nhất, mà là một loạt cao nguyên liền kề. Đó là các cao nguyên Kon Tum cao khoảng 500 m, cao nguyên Kon Plong, cao nguyên Kon Hà Nừng, Pleiku cao khoảng 800 m, cao nguyên

M'Drak cao khoảng 500 m, cao nguyên Buôn Ma Thuột cao khoảng 500 m, cao nguyên Mơ Nông cao khoảng 800-1.000 m, cao nguyên Lâm Viên cao khoảng 1.500 m và cao nguyên Di Linh cao khoảng 900-1.000 m. Tất cả các cao nguyên này đều được bao bọc về phía Đông bởi những dãy núi và khối núi cao (chính là Trường Sơn Nam). Với đặc điểm thổ nhưỡng đất đỏ bazan ở độ cao khoảng 500 m đến 600 m so với mặt nước biển, Tây Nguyên rất phù hợp với những cây công nghiệp như cà phê, ca cao, hồ tiêu, dâu tằm, điều, cây cao su và gần đây các vườn cây ăn quả cũng đang được phát triển. Khí hậu ở Tây Nguyên được chia làm 2 mùa, mùa mưa từ tháng 5 đến tháng 10, mùa khô từ tháng 11 đến tháng 4, trong đó tháng 3 và tháng 4 là 2 tháng nóng và khô nhất.

Tính đến năm 2009, Tây Nguyên có 46 dân tộc khác nhau, chủ yếu là người Kinh. Tính đến cuối năm 2018, dân số Tây Nguyên (gồm 5 tỉnh) ước tính là 5.865.914 người, như thế so với năm 1976 đã tăng hơn 3,17 lần. Thực tế này một phần do gia tăng dân số tự nhiên, và phần lớn do gia tăng cơ học: di dân đến Tây Nguyên theo 2 luồng di dân kế hoạch và di dân tự do. Sự tăng dân số do di dân và nạn chặt phá rừng làm nương rẫy, làm cho môi trường sinh thái thay đổi, dễ làm dịch bệnh có nguy cơ phát triển.

Hiện tại Tây Nguyên vẫn là khu vực còn nhiều diện tích rừng của Việt Nam, với thảm sinh vật đa dạng, nhiều khu bảo tồn động vật. Song nạn phá rừng, săn bắt thú rừng, hủy diệt tài nguyên thiên nhiên và khai thác lâm sản bừa bãi chưa ngăn chặn được, dẫn đến nguy cơ làm nghèo kiệt rừng và thay đổi môi trường sinh thái, khu hệ động thực vật bị ảnh hưởng. Tuy nhiên, đến nay vẫn còn tồn tại với số lượng khá phong phú, trong số đó có một số loài động vật mang các mầm bệnh nguy hiểm có thể dẫn đến nguy cơ lây lan trong cộng đồng [10].

Điều kiện tự nhiên, khí hậu ở Tây Nguyên thuận lợi cho sự phát triển và tồn tại của một số loài động vật hoang dại và các loài côn trùng, trong đó có các

loài muỗi. Đặc biệt việc chăn nuôi gia súc như trâu, bò, lợn, tạo điều kiện cho sự phát triển một số loài thuộc giống muỗi *Culex*, véc tơ chính của bệnh viêm não.

Nghiên cứu xác định thành phần, phân bố vai trò truyền bệnh VNNB của muỗi *Culex* và nghiên cứu định loài vi rút viêm não Nhật Bản ở muỗi *Culex* tại Tây Nguyên, một cách có hệ thống và đầy đủ; từ đó đề xuất những định hướng và giải pháp phòng bệnh phù hợp là điều cần thiết, góp phần vào việc chăm sóc và bảo vệ sức khỏe cho cộng đồng các dân tộc ở Tây Nguyên [7;14;83].

## **Chương 2**

### **ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

#### **2.1. Đối tượng, địa điểm và thời gian nghiên cứu**

##### **2.1.1. Đối tượng nghiên cứu**

#### **2.1.1.1. Đối tượng nghiên cứu cho mục tiêu 1**

Các trường hợp HCVNC nghi ngờ do vi rút và VNNB có phiếu điều tra (Phụ lục 1) ở 4 tỉnh của khu vực Tây Nguyên, 2005-2018.

Tiêu chuẩn lựa chọn:

Định nghĩa ca bệnh HCVNC 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 với các biểu hiện: (1) 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); (2) Dịch não tủy trong, không màu [34;42;132].

Định nghĩa ca bệnh VNNB là các trường hợp HCVNC được xét nghiệm xác định có kháng thể IgM kháng vi rút VNNB từ dịch não tủy hoặc huyết thanh bệnh nhân bằng kỹ thuật MAC-ELISA [4;15;132].

Trong nghiên cứu này ca bệnh VNNB được xác định là những trường hợp có kết quả xét nghiệm IgM kháng vi rút VNNB dương tính bằng kỹ thuật MAC-ELISA tại các phòng xét nghiệm của Trung tâm Y tế dự phòng tỉnh, Viện VSĐT Tây Nguyên [126;132].

#### **2.1.1.2. Đối tượng nghiên cứu cho mục tiêu 2**

Một số loài muỗi *Culex* thu thập ở 4 tỉnh của khu vực Tây Nguyên, 2005-2018;

Vi rút VNNB được phân lập từ muỗi *Culex* ở Tây Nguyên, 2005-2018.

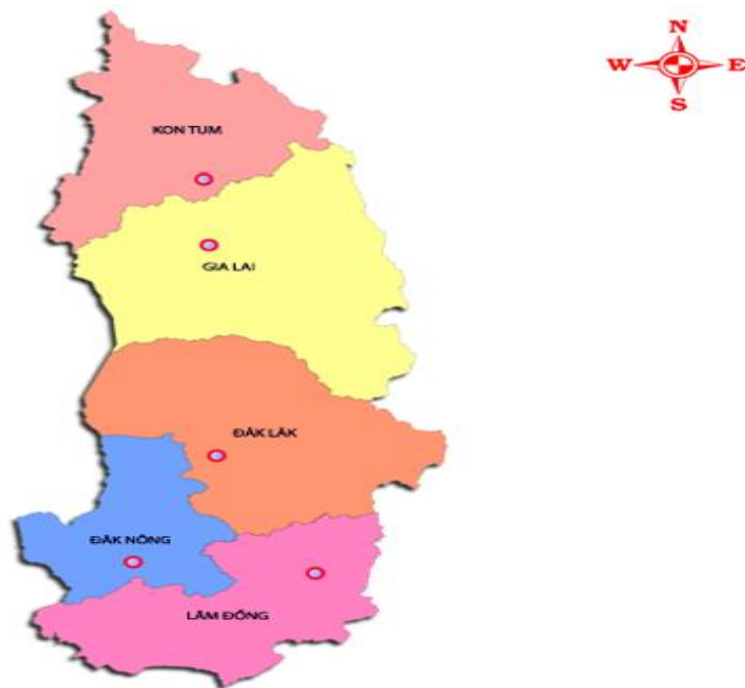
#### **2.1.1.3. Đối tượng nghiên cứu cho mục tiêu 3**

Trình tự nucleotide và acid amin vùng gen E của các chủng vi rút VNNB được phân lập từ muỗi *Culex* ở 4 tỉnh của Tây Nguyên.

### 2.1.2. Địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại 4 tỉnh thuộc khu vực Tây Nguyên: Kon Tum, Gia Lai, Đắk Lắk và Đắk Nông.

Tây Nguyên là vùng núi cao rộng lớn của Trung Bộ, thuộc sườn phía Tây của dãy Trường Sơn nằm khoảng 11°44' vĩ độ Bắc, 107°15' đến 108°50' độ kinh Đông. Khu vực Tây Nguyên gồm 5 tỉnh là Kon Tum, Gia Lai, Đắk Lắk, Đắk Nông và Lâm Đồng với địa hình chủ yếu là cao nguyên.



**Hình 2.1. Bản đồ hành chính khu vực Tây Nguyên**

### 2.1.3. Thời gian nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ năm 2017 đến 2018.

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Thiết kế nghiên cứu



Nghiên cứu mô tả cắt ngang (cross-sectional study).

## **2.2.2. Cỡ mẫu và phương pháp chọn mẫu**

### **2.2.2.1. Cỡ mẫu và phương pháp chọn mẫu cho mục tiêu 1**

Thu thập toàn bộ số liệu, 2005-2018 liên quan đến HCVNC và ca bệnh VNNB được xác định ở 4 tỉnh của khu vực Tây Nguyên.

Trên thực tế đã thực hiện phiếu điều tra 713 bệnh nhân HCVNC do vi rút trong đó có 168 trường hợp VNNB được xác định, 2005-2018 ở 4 tỉnh của khu vực Tây Nguyên.

### **2.2.2.2. Cỡ mẫu và phương pháp chọn mẫu cho mục tiêu 2**

1) Thu thập toàn bộ số mẫu muỗi *Culex* được xét nghiệm xác định khả năng nhiễm vi rút VNNB trong giai đoạn 2005-2016. Trên thực tế, nghiên cứu chỉ thu thập và sử dụng được số mẫu muỗi *Culex* vào 2 giai đoạn 2005-2007 và 2012-2014 để mô tả và phân lập vi rút. Riêng giai đoạn 2008- 2011, nghiên cứu không thu thập được số liệu, vì đây là số liệu hồi cứu nên phụ thuộc vào các địa phương trong giai đoạn này không tiến hành hoạt động giám sát véc tơ VNNB.

Mỗi mẫu có khoảng 5-50 con/mẫu bảo quản ở tủ lạnh âm sâu (-70<sup>0</sup>C) cho đến khi phân lập vi rút, tương ứng số mẫu muỗi *Culex* thu được 138 mẫu với 5.368 cá thể muỗi của giai đoạn 2005-2007 và 236 mẫu với 8.351 cá thể muỗi thu thập giai đoạn 2012-2014 để mô tả và xét nghiệm khả năng nhiễm vi rút VNNB.

2) Mẫu muỗi *Culex* thu thập tại thực địa trong 2 năm (2017-2018): cá thể muỗi/nhà x 15 nhà/điểm x 10 điểm x 2 đợt, như vậy tổng số muỗi thu thập được tối thiểu là 300 cá thể muỗi.

Trên thực tế nghiên cứu đã thu thập được 372 cá thể muỗi, tất cả các cá thể muỗi *Culex* cái trưởng thành được thu thập ở thực địa sau khi đã định loại,

xử lý, bảo quản trong Nitơ lỏng để chuyển đến phòng thí nghiệm của Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương để phân lập vi rút.

Mỗi mẫu phân lập vi rút là 1 cá thể muỗi/mẫu, dự kiến số mẫu muỗi *Culex* sẽ phân lập vi rút là 100 mẫu, thực tế đã phân lập 166 mẫu.

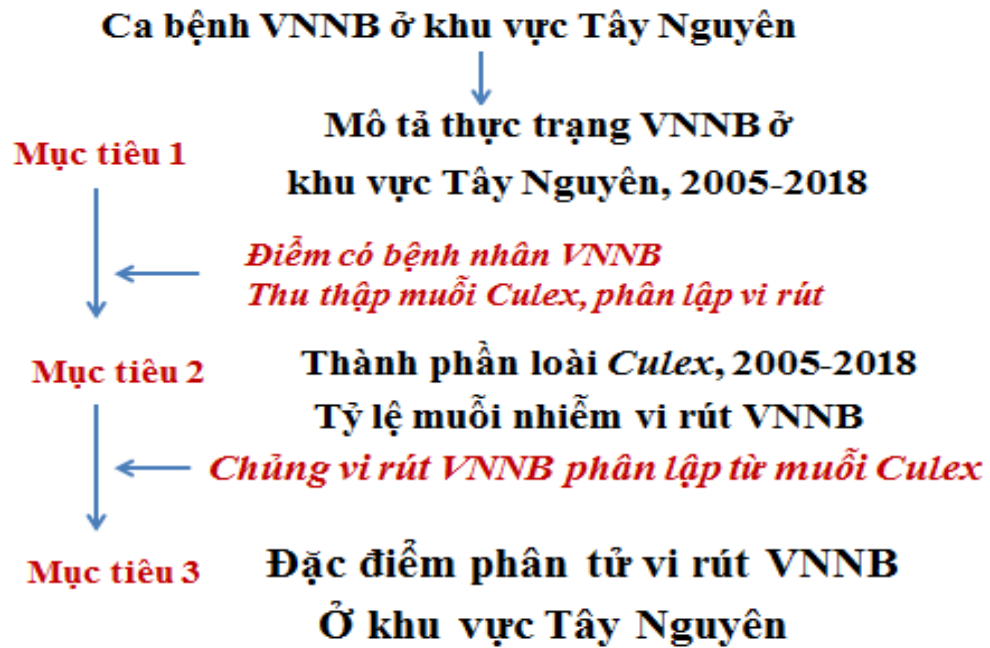
### **2.2.2.3. Cỡ mẫu và phương pháp chọn mẫu cho mục tiêu 3**

Chọn mẫu theo phương pháp thuận tiện, toàn bộ chủng vi rút VNNB phân lập từ muỗi *Culex* ở khu vực Tây Nguyên trong thời gian nghiên cứu từ 2005-2018 được xác định dương tính bằng kỹ thuật RT-PCR. Các chủng vi rút này được bảo quản ở điều kiện tủ lạnh âm sâu 70 độ C ở Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung Ương cho đến khi thực hiện nghiên cứu. Trên thực tế nghiên cứu đã thực hiện:

1) Số liệu hồi cứu: 04 chủng vi rút phân lập từ muỗi *Culex*, 2007 trong giai đoạn thu thập mẫu muỗi *Culex*, 2005-2007.

2) Số liệu thực hiện tại thực địa trong 2 năm (2017-2018): 05 chủng vi rút phân lập từ muỗi *Culex* trong năm 2018.

### **2.2.3. Sơ đồ nghiên cứu**



**Hình 2.2. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu**

### 2.3. Nội dung nghiên cứu

#### 2.3.1. Các biến số, chỉ số nghiên cứu

TT	Các biến số/chỉ số	Loại biến	Phương pháp thu thập thông tin
<b>Mục tiêu 1</b>			
1	Giới	Nhị phân	Hỏi cứu; Cắt ngang
2	Tuổi	Liên tục	Hỏi cứu; Cắt ngang
3	Dân tộc	Phân loại	Hỏi cứu; Cắt ngang
4	Nghề nghiệp	Phân loại	Hỏi cứu;

			Cắt ngang
5	Nơi thường trú	Địa danh	Hồi cứu; Cắt ngang
6	Thời gian mắc bệnh	Liên tục	Hồi cứu; Cắt ngang
7	Nơi mắc bệnh, lấy mẫu xét nghiệm và điều trị	Địa danh	Hồi cứu; Cắt ngang
8	Kết quả xét nghiệm về chẩn đoán VNNB	Phân loại	Hồi cứu; Cắt ngang
9	Ca bệnh	Phân loại	Hồi cứu; Cắt ngang
<b>Mục tiêu 2</b>			
1	Thành phần loài muỗi <i>Culex</i>	Phân loại	Hồi cứu; Cắt ngang
2	Phân bố từng loài muỗi <i>Culex</i>	Phân loại	Hồi cứu; Cắt ngang
3	Tỷ lệ nhiễm tối thiểu của một loài muỗi <i>Culex</i> với vi rút VNNB	Liên tục	Hồi cứu; Cắt ngang
<b>Mục tiêu 3</b>			
1	Vi rút VNNB và xác định genotype	Phân loại	Hồi cứu; Cắt ngang;
2	Cây di truyền phả hệ	Định danh	Hồi cứu; Cắt ngang
3	So sánh về sự tương đồng trình tự nucleotide	Phân loại	Hồi cứu; Cắt ngang
4	Đột biến acid amin	Phân loại	Hồi cứu; Cắt ngang

## **2.3.2. Kỹ thuật và công cụ thu thập thông tin**

### **2.3.2.1. Kỹ thuật và công cụ thu thập thông tin, cách tiến hành, đánh giá kết quả cho mục tiêu 1**

#### 1) Tiêu chí đánh giá

Tỷ lệ mắc HCVNC, VNNB/100.00 dân của từng tỉnh và khu vực theo năm, theo giai đoạn.

Tỷ lệ chết VNNB trên 100.000 dân của từng tỉnh và khu vực theo năm, theo giai đoạn.

Phân bố số mắc HCVNC, VNNB theo huyện của từng tỉnh và khu vực theo năm, theo giai đoạn.

Phân bố số mắc HCVNC, VNNB theo tháng tại của từng tỉnh và khu vực theo năm, theo giai đoạn.

Phân bố số mắc HCVNC, VNNB theo nhóm tuổi tại của từng tỉnh và khu vực theo năm, theo giai đoạn.

#### 2) Phương pháp thu thập

Tiến hành điều tra, thu thập số liệu tại Viện Vệ sinh dịch tễ Tây Nguyên, Trung tâm y tế dự phòng: Kon Tum, Gia Lai, Đăk Lăk, Đăk Nông, trong 02 năm 2017-31/12/2018.

Từ hệ thống báo cáo, thống kê, giám sát tình hình dịch bệnh tại Viện Vệ sinh Dịch tễ Tây Nguyên, Trung tâm Y tế Dự phòng: Gia Lai, Kon Tum, Đăk Lăk, Đăk Nông. Các mẫu xét nghiệm của bệnh nhân HCVNC tại các tỉnh Tây Nguyên là mẫu huyết thanh hoặc dịch não tủy của những bệnh nhân HCVNC được hồi cứu kết quả xét nghiệm VNNB bằng MAC- ELISA tại Phòng thí nghiệm Viện VSDTTN.

Thu thập thông tin bệnh nhân VNNB về tuổi, giới, nghề nghiệp, dân tộc, kết quả được xét nghiệm VNNB, v.v. số liệu thu thập theo hồi cứu số liệu đã

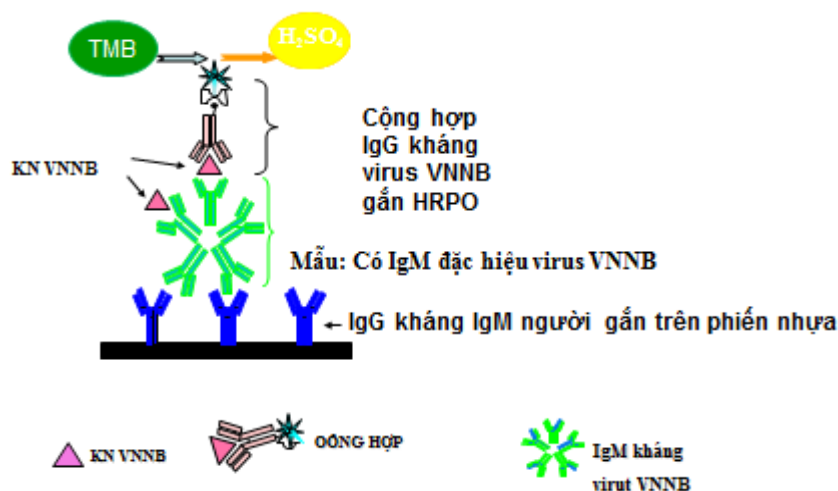
được ghi nhận, bằng phương pháp quan sát, ghi chép các số liệu có sẵn theo phiếu điều tra của phụ lục 1.

### 3) Kỹ thuật xét nghiệm

Các trường HCVNC nghi ngờ do vi rút sẽ được lấy mẫu huyết thanh hoặc dịch não tủy để xác định ca bệnh VNNB bằng kỹ thuật MAC-ELISA phát hiện IgM kháng vi rút dựa theo nguyên lý kỹ thuật ELISA gián tiếp tóm tắt IgM, thực hiện bằng bộ sinh phẩm MAC-ELISA chẩn đoán VNNB [1;4;34].

#### **- Kỹ thuật MAC-ELISA chẩn đoán VNNB từ huyết thanh/DNT**

Sử dụng bộ sinh phẩm MAC-ELISA do Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương cung cấp, thực hiện và nhận định kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất [1;4].



**Hình 2.3. Sơ đồ kỹ thuật MAC-ELISA chẩn đoán VNNB**

*Nguyên lý kỹ thuật:* 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. Khi IgM có trong mẫu xét nghiệm kết hợp với IgG kháng IgM người. Nếu trong mẫu xét nghiệm có IgM đặc hiệu kháng vi rút VNNB nó sẽ kết hợp với kháng nguyên viêm não Nhật Bản khi cho tiếp xúc với kháng nguyên.

Tiếp theo IgG kháng vi rút VNNB 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.

**- 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 (tiêu chuẩn vàng).

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 hiệu giá 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 hiệu giá kháng thể của hai mẫu huyết thanh này): Bị HCVNC do nguyên nhân khác.

2.3.2.2. Kỹ thuật và công cụ thu thập thông tin, cách tiến hành, đánh giá kết quả cho mục tiêu 2

1) Tiêu chí đánh giá

Thành phần loài muỗi *Culex* gồm các cá thể từng loài thuộc giống *Culex* được thu thập, định loại để xét nghiệm xác định khả năng nhiễm vi rút VNNB.

Phân bố từng loài muỗi *Culex* là sự hiện diện số cá thể của từng loài muỗi này phát hiện và thu thập ở các điểm nghiên cứu của các địa phương.

Tỷ lệ nhiễm tối thiểu của một loài muỗi *Culex* với vi rút VNNB được xác định là số lượng mẫu muỗi phân lập dương tính (khẳng định lại bằng kết quả Sequencing)/số lượng các cá thể muỗi trong các mẫu được phân lập x 1000.

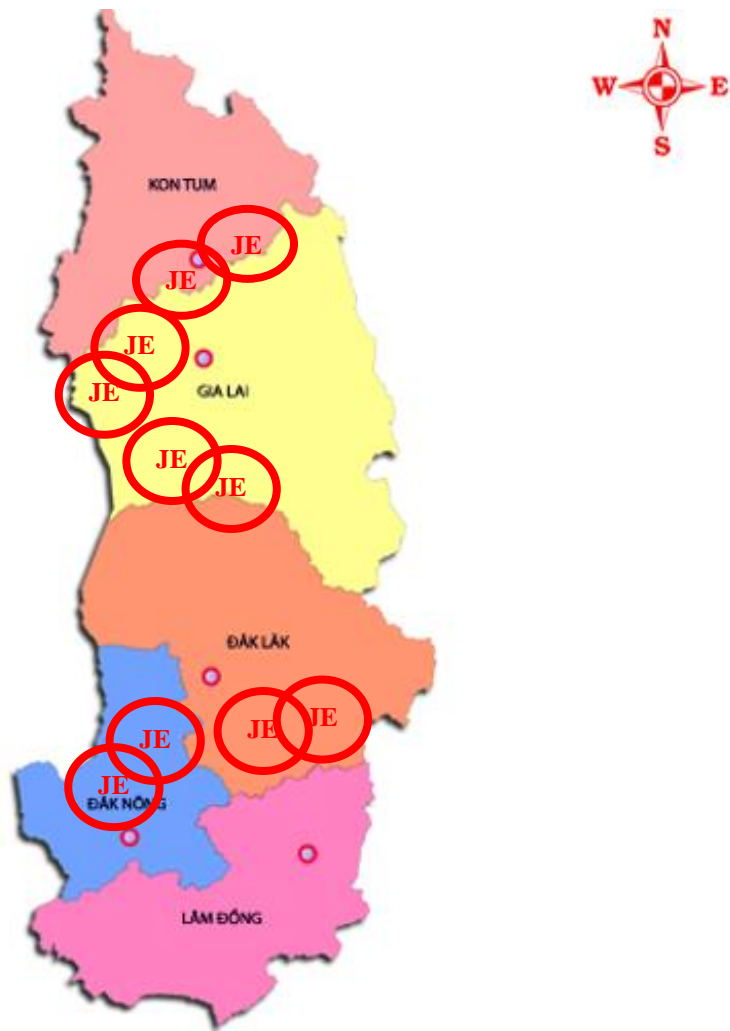
## 2) Phương pháp thu thập

- Thu thập toàn bộ số liệu, khai thác về thành phần, phân bố, vai trò truyền bệnh của muỗi *Culex* giai đoạn 2005-2016 (vi rút VNNB được phân lập từ số mẫu trong giai đoạn này) trong năm 2018, tại Viện Vệ sinh dịch tễ Tây Nguyên và Viện Vệ sinh dịch tễ Trung Ương.

- Tiến hành điều tra bắt muỗi tại thực địa, định loại loài muỗi để thống kê mô tả thành phần, phân bố các loài muỗi *Culex* thu được, phân loại mẫu bảo quản vận chuyển về Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương để xét nghiệm xác định khả năng nhiễm vi rút VNNB của các loài muỗi này.

Đại điểm điều tra: Nơi có sinh địa cảnh thuận lợi phù hợp với sự phát triển của muỗi *Culex* như gần ruộng lúa, có vườn cây ăn quả, có chăn nuôi gia súc. Là các địa phương có bệnh nhân VNNB được ghi nhận trong các năm 2015-2018. Đây là tiêu chí quan trọng cho việc quyết định lựa chọn điểm điều tra, thu thập muỗi. Ngoài ra tham khảo thêm một số tiêu chí khác, đó là: (1) Theo vùng địa lý, theo phân khu hành chính (huyện); (2) Phù hợp với nhân lực, vật lực.





**Hình 2.4. Bản đồ vị trí các điểm thu thập muỗi *Culex*, 2017-2018**

Dựa trên số liệu về ca bệnh VNNB được xác định ở khu vực Tây Nguyên, 2015- 2018 với các tiêu chí như trên. Nghiên cứu đã chủ đích chọn 10 điểm điều tra: (1) Tỉnh Gia lai: 6 điểm (xã Ia Ka - huyện Chư Păh; TT Phú Thiện, xã Ia Peng, xã Ia Ke – huyện Phú Thiện, xã Ia Khai – huyện Ia Grai, xã Ia Kly - huyện Chư Prông; (2) Tỉnh Đắk Lắk: 2 điểm (xã Cư Dăm – huyện Krông Bông, xã Ea Yiêng – huyện Krông Păk); (3) Tỉnh Đắk Nông: 2 điểm (xã Đắk Rông – huyện Cư Jut; xã Đức Mạnh – huyện Đắk Mil); (4) Tỉnh Kon Tum: 2 điểm (xã Chư Hreng - Tp. Kon Tum; xã Đắk Tờ Re - H. Kon Rẫy).

Cách chọn hộ gia đình để điều tra: Tại mỗi điểm, nghiên cứu chọn hộ gia đình đang có hoặc đã từng mắc bệnh VNNB để điều tra làm trung tâm, sau đó điều tra theo phương pháp nhà liền kề ra xung quanh cho đến khi mỗi điểm đủ 15 hộ thì dừng lại. Trường hợp đã đủ 15 hộ nhưng chưa đủ cỡ mẫu, thì tiếp tục điều tra các hộ gia đình tiếp theo cho đến khi đủ cỡ mẫu thì dừng lại. Hộ gia đình được chọn điều tra là những hộ đáp ứng sinh địa cảnh của muỗi *Culex*, điều tra trong nhà, ngoài sân vườn, đặc biệt hộ gia đình có chuồng gia súc như chuồng nuôi lợn, chuồng nuôi bò, v.v..

### 3) Kỹ thuật thực hiện

a) *Kỹ thuật thu thập muỗi*: Điều tra, thu thập muỗi truyền bệnh VNNB, gồm các bước sau: (1) Bắt muỗi trú đậu trong nhà ban đêm từ 18 giờ đến 20 giờ; (2) Bắt muỗi trú đậu ban đêm tại chuồng gia súc quanh nhà (trâu, bò, lợn) từ 18-20 giờ [23].

Bắt muỗi bằng đèn pin ở nơi tối từ quần áo treo trên móc, lọ cắm hoa, chần màn, tường vách, v.v.. Tay trái (tay không thuận) cầm đèn pin soi từng chỗ, thật nhẹ nhàng. Khi thấy muỗi, tay phải (tay thuận) cầm ống nghiệm (ống tube 18, mở nút bằng bông không thấm nước) nhẹ nhàng úp thẳng góc lên con muỗi đang đậu. Muỗi sẽ tự động bay lên đáy ống, lấy ngón tay trở bịt miệng ống rồi dùng ít bông không thấm nước đậy miệng ống lại, dùng que đẩy bông và con muỗi về phía dưới khoảng 1/3 ống, rồi tiến hành bắt tiếp, mỗi ống bắt 2-3 con muỗi [23]. Sau khi thu thập, muỗi được chuyển sang hộp giấy và được giữ trong điều kiện đủ độ ẩm và dinh dưỡng trong quá trình vận chuyển đến nơi định loại muỗi.

b) *Kỹ thuật định loại muỗi Culex*: Định loại muỗi trưởng thành được tiến hành chủ yếu ở thực địa, phân loại muỗi *Culex* dựa vào đặc điểm hình thái bên ngoài, theo tài liệu hướng dẫn Bảng định loại muỗi họ *Culicidae* của Vũ Đức Hương,

năm 1997 [22]. Ngoài ra, có tham khảo thêm tài liệu của các tác giả khác [46;92] với các bước sau: (1) Dùng kính lúp cầm tay soi trực tiếp lên ống nghiệm chứa muối, quan sát các đặc điểm hình thái bên ngoài của con muối như: Vòi, lưng ngực, mặt bên lưng ngực, bụng, đuôi sau, cánh, v.v. để xác định tên loài muối. (2) Sau khi định loại xong muối được ghi tên lên trên ống nghiệm đựng muối riêng rẽ theo từng loài đã xác định, sau đó cho vào tủ  $-70^{\circ}\text{C}/30$  phút để bất động muối, lấy muối khỏi ống nghiệm, dùng kẹp nhỏ nhặt muối, chia ra theo từng loài rồi cho vào Cryotube, dán nhãn mẫu muối có ghi tên loài, địa điểm, số lượng và thời gian (đã được mã hóa).

*c) Kỹ thuật bảo quản, vận chuyển mẫu muối sau định loại từ thực địa:* Mẫu muối thu thập và định loại được bảo quản ở âm 196 độ C bằng bình ni tơ, vận chuyển về Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương để phân lập vi rút.

*d) Xử lý mẫu muối để phân lập:*

Trong nghiên cứu hồi cứu, có 374 mẫu muối (138 và 236 mẫu thu thập tương ứng các giai đoạn 2005-2007 và 2012-2014), mỗi mẫu khoảng 5-50 con/mẫu. Rửa muối bằng dung dịch nước muối sinh lý lạnh có kháng sinh 3 lần, nghiền muối bằng cối sứ trong 2ml muối trường MEM có 10% huyết thanh bê bào thai.

Trong nghiên cứu tiến cứu: Tách từng cá thể muối riêng biệt cho vào tube Ependorf, rửa muối bằng dung dịch nước muối sinh lý có kháng sinh 3 lần, cho cát thủy tinh vào tube nghiền muối trong 0,5ml môi trường MEM có 10% huyết thanh bê bào thai bằng máy nghiền muối Mixer Mill (Model MM 300 Resta GmbH Hanna, Germany ở  $4^{\circ}\text{C}/5$  phút.

*e) Phân lập vi rút VNNB bằng tế bào muối C6/36:* Mẫu muối sau nghiền bằng cối sứ/bằng máy, ly tâm  $10.000\text{v}/\text{p}/10$  phút ở  $4^{\circ}\text{C}$ , lấy nước nổi lọc qua lọc  $0,45\mu\text{m}$  (Ultrafre MC, Millipor Bedford, MA) lấy dịch lọc gậy nhiễm vào tế bào

muỗi *Aedes albopictus*, để dịch lọc hấp phụ vào tế bào trong khoảng 90 phút, bổ sung môi trường MEM 2% huyết thanh bê bào thai. Theo dõi hiện tượng bệnh lý của tế bào sau gây nhiễm bằng kính hiển vi đảo ngược trong khoảng 7 ngày sau gây nhiễm. Những mẫu tế bào sau gây nhiễm bệnh phẩm, theo dõi, được bảo quản ở âm 70 độ C để định loại [1;83].

f) *Định loại vi rút VNNB*: Các mẫu phân lập từ muỗi *Culex* 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) để khuếch đại vùng gen E của vi rút VNNB, thông tin về cặp mồi đặc hiệu vùng gen E [16;57;98].

Tên mồi	Trình tự nucleotide (5' – 3')	Vị trí
JE- EF	GGCAGAAAGCAAAACAAAAG	390-410
JE- ER	TCACAAACCACCACGGAAGT	2306-2426

Điều kiện phản ứng: 50°C trong 30 phút; 95°C trong 15 phút; lặp 35 vòng gồm ba bước: 95°C trong 1 phút, 57°C trong 1 phút, 72°C trong 2 phút; 72°C trong 10 phút, giữ mẫu ở 4°C. Sản phẩm của phản ứng RT-PCR được quan sát bằng phương pháp điện di trên gel agarose 2%, có kích thước khoảng 1500bp tương tự như mẫu chứng dương.

Các mẫu dương tính bằng kỹ thuật RT-PCR được khẳng định lại bằng kỹ thuật giải trình tự gen là cơ sở để tính tỷ lệ nhiễm vi rút VNNB ở một số loài muỗi theo công thức đối với các trường hợp mẫu phân lập được trộn nhiều cá thể muỗi trong một mẫu: Tỷ lệ nhiễm tối thiểu của một loài muỗi với vi rút VNNB

được xác định là số lượng mẫu muỗi phân lập dương tính/số lượng các cá thể muỗi xét nghiệm x 1000 [83].

2.3.2.3. Kỹ thuật và công cụ thu thập thông tin, cách tiến hành, đánh giá kết quả cho mục tiêu 3

1) Tiêu chí đánh giá

Khẳng định vi rút VNNB và xác định genotype của vi rút VNNB phân lập từ muỗi *Culex* ở Tây Nguyên, bằng kỹ thuật giải trình tự gen.

Xây dựng cây di truyền phá hệ để mô tả mối liên quan của các genotype vi rút VNNB phân lập từ muỗi *Culex* ở Tây Nguyên.

So sánh về sự tương đồng trình tự nucleotide vùng gen E của vi rút VNNB phân lập từ muỗi *Culex* ở Tây Nguyên với một số chủng vi rút VNNB trong nước, một số nước khác trong khu vực để xác định hoặc giả định về nguồn gốc sự xuất hiện của các genotype vi rút VNNB ở Tây Nguyên.

Xác định các đột biến acid amin, loại đột biến trên vùng gen E của các chủng vi rút VNNB phân lập được ở khu vực Tây Nguyên, 2005-2018.

2) Phương pháp thu thập

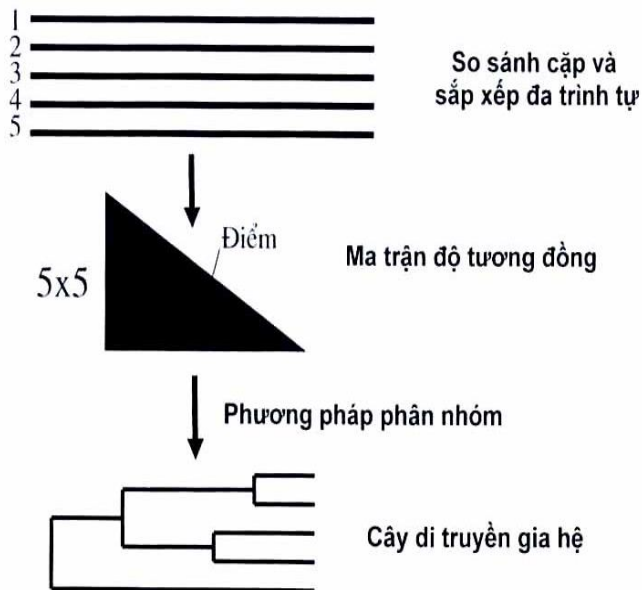
Thực hiện các kỹ thuật xét nghiệm, giải trình tự gen vào năm 2018 tại phòng thí nghiệm Viện Vệ sinh dịch tễ Trung Ương.

3) Kỹ thuật thực hiện

a) *Kỹ thuật tinh sạch sản phẩm RT-PCR để giải trình tự bằng phương pháp Sanger:*

Sản phẩm của phản ứng RT-PCR được tinh sạch bằng bộ kit QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN), sản phẩm PCR được chuẩn bị bằng bộ sinh phẩm BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), đọc kết quả giải trình tự trên máy ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

b) *Xây dựng cây phát sinh loài*



**Hình 2.5. Sơ đồ xây dựng cây di truyền phả hệ vi rút VNNB**

Trình tự nucleotide vùng gen E của các mẫu được phân tích, hiệu chỉnh và lắp ráp tạo contig bằng phần mềm DNA Star (Lasergene).

Các contigs được sắp xếp, so sánh bằng Clustal W v.1.83. Cây gia hệ toàn bộ vùng gen E được dựng bằng phần mềm MEGA v.7.0 theo phương pháp Maximum Likelihood với độ lặp lại 1.000 lần [116].

Trình tự nucleotide được nối với nhau bằng phần mềm DNA Star (Lasergene) để tạo ra trình tự một trình tự nucleotide 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 nucleotide của gen E được thực hiện bằng phần mềm MUSCLE tích hợp trong phần mềm MEGA v.7.0.

Các chủng được chọn làm chủng tham chiếu là tất cả đại diện các genotype vi rút VNNB ở Việt Nam và các nước trong khu vực châu Á đã được công bố trên ngân hàng gen GenBank.

Cây gia hệ được xây dựng bằng phương pháp Maximum Likelihood với độ lặp lại là 1000 lần với mô hình thích hợp nhất (Tamura-Nei, phân bố Gamma (TN83+G) được chọn là mô hình thích hợp bằng phần mềm tích hợp trong MEGA v.7.0.

Phân tích đặc điểm phân tử của các chủng vi rút VNNB phân lập từ muỗi *Culex* ở khu vực Tây nguyên dựa trên trình tự acid amin của vùng gen E [89].

## **2.4. Phương pháp xử lý số liệu**

### **2.4.1. Đối với mục tiêu 1 và 2**

Nhập và xử lý làm sạch số liệu bằng phần mềm EpiData 3.1, phần mềm Exel: Số liệu được làm sạch bằng cách kiểm tra đối chiếu bằng phương pháp quan sát thông thường sau đó sẽ được nhập vào phần mềm để quản lý.

Thống kê số liệu thông thường bằng phần mềm Exel, phân tích số liệu bằng phần mềm Stata 13.

### **2.4.2. Đối với mục tiêu 3**

Sử dụng phần mềm Meggas, Bioedit, v.v. [116] để tạo cây di truyền phá hệ, xác định nguồn gốc giả định của vi rút VNNB ở khu vực Tây Nguyên.

## **2.5. Sai số và cách hạn chế sai số**

Nghiên cứu thu thập thông tin hồi cứu và tiến cứu về ca bệnh VNNB từ 2005-2018. Các số liệu hồi cứu về các loài muỗi *Culex* được lưu từ trước cần có sự so sánh, đối chiếu để tránh nhầm lẫn. Các mẫu muỗi thu thập từ thực địa trong nghiên cứu tiến cứu phụ thuộc rất nhiều vào kỹ thuật thu thập định loại muỗi để có số liệu chính xác. Để khắc phục vấn đề này, việc tập huấn đầy đủ và cụ thể về phương pháp bắt muỗi, định loại muỗi, bảo quản, vận chuyển mẫu,... cho các cộng tác viên tham gia điều tra thu thập muỗi *Culex* được thực hiện đầy đủ.

Các kỹ thuật xét nghiệm ca bệnh VNNB được thực hiện tại các phòng xét nghiệm tuyến tỉnh và khu vực với sinh phẩm và kỹ thuật MAC-ELISA theo tiêu chuẩn của WHO [12].

Thực hiện kỹ thuật phân lập vi rút VNNB, định loại và giải trình tự vùng gen E của vi rút VNNB được thực hiện tại một số phòng thí nghiệm của Viện Vệ sinh dịch tễ Trung Ương với sinh phẩm hóa chất đúng chủng loại, trang thiết bị hiện đại, được hiệu chuẩn định kỳ.

## **2.6. Đạo đức trong nghiên cứu**

Đây là nghiên cứu mô tả tiến cứu, hồi cứu số liệu kết hợp với nghiên cứu phân tích, không can thiệp, ít có nguy cơ cho người bệnh khi sử dụng số liệu điều tra ẩn danh. Ngoài ra, việc sử dụng số liệu về bệnh nhân HCVNC và VNNB của hệ thống cũng như số liệu điều tra về muỗi *Culex*, v.v. phân lập vi rút VNNB từ muỗi lưu giữ tại phòng thí nghiệm đều được sự đồng ý của các đơn vị, cơ quan có thẩm quyền.

- Việc lấy mẫu bệnh phẩm để chẩn đoán xác định căn nguyên vi rút VNNB gây HCVNC được thực hiện theo hệ thống giám sát thường xuyên của các Trung tâm Y tế dự phòng các tỉnh ở khu vực và Viện Vệ sinh Dịch tễ Tây Nguyên.
- Việc thực hiện nghiên cứu của đề tài được sự chấp thuận của Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu Y sinh của Viện Vệ sinh dịch tễ Trung Ương có mã số IRB-VN01057-23/2017; Ngoài ra, nghiên cứu được thực hiện với sự hợp tác và giúp đỡ của Viện Vệ sinh dịch tễ Tây Nguyên, Trung tâm y tế dự phòng 4 tỉnh thuộc khu vực Tây Nguyên và Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung Ương.



### **Chương 3**

## **KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU**

### **3.1. Thực trạng bệnh viêm não Nhật Bản tại 4 tỉnh khu vực Tây Nguyên, 2005-2018**

#### **3.1.1. Tình hình HCVNC, VNNB tại 4 tỉnh Tây Nguyên, 2005-2018**

**Bảng 3.1. Tỷ lệ mắc, chết do hội chứng viêm não cấp, viêm não Nhật Bản ở 4 tỉnh Tây Nguyên, 2005- 2018**

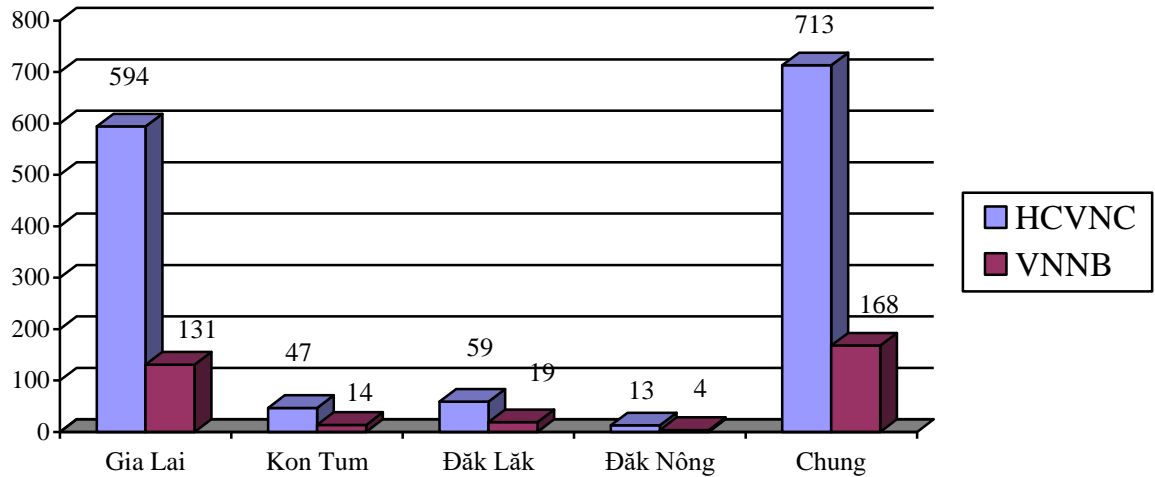
Năm	Mắc HCVNC	Chết	Mắc HCVNC/ 100.000 dân	Mắc VNNB	Chết	Mắc VNNB/ 100.000 dân	Chết VNNB/ 100.000 dân
2005	40	4	1,11	10	4	0,28	0,11

Năm	Mắc HCVNC	Chết	Mắc HCVNC/ 100.000 dân	Mắc VNNB	Chết	Mắc VNNB/ 100.000 dân	Chết VNNB/ 100.000 dân
2006	46	3	1,24	11	3	0,30	0,08
2007	16	0	0,32	2	0	0,04	0,00
2008	20	2	0,53	7	2	0,18	0,05
2009	28	2	0,72	11	2	0,28	0,05
2010	21	2	0,52	4	2	0,10	0,05
2011	40	0	0,99	13	0	0,32	0,00
2012	11	0	0,27	2	0	0,05	0,00
2013	46	0	1,10	8	0	0,19	0,00
2014	63	3	1,43	7	3	0,16	0,07
2015	107	9	2,48	33	9	0,76	0,21
2016	90	0	2,02	20	0	0,45	0,00
2017	113	7	2,45	28	7	0,61	0,15
2018	72	2	1,56	12	2	0,26	0,04
Chung	713	34	1,21	168	34	0,29	0,06

Điều tra 713 trường hợp HCVNC do vi rút trong khoảng thời gian từ 2005-2018, cho thấy ca bệnh được ghi nhận hàng năm trên địa bàn 4 tỉnh Gia Lai, Kon Tum, Đắk Lắk, Đắk Nông với tỷ lệ mắc chung là 1,21/100.000 dân. Các năm có tỷ lệ mắc cao vào năm 2015 là 2,48/100.000 dân, năm 2017 là 2,45/100.000 dân, và thấp nhất vào năm 2012 là 0,27/100.000 dân.

Trong số 713 trường hợp HCVNC, qua xét nghiệm bằng kỹ thuật MAC-ELISA đã xác định có 168/713 trường hợp bị VNNB, tỷ lệ là 23,56%. Tỷ lệ mắc VNNB chung là 0,29/100.000 dân. Các năm có tỷ lệ mắc cao đối với VNNB vào năm 2015 là 0,76/100.000 dân, tiếp đến năm 2017 là 0,61/100.000 dân, thấp nhất năm 2007 là 0,04/100.000 dân.

Trong giai đoạn này ghi nhận số tử vong do HCVNC thực chất là số tử vong được xác định VNNB với 34 ca, tỷ lệ tử vong chung là 0,06/100.000 dân. Năm 2015 có tỷ lệ tử vong cao nhất với 9 ca (0,21/100.000 dân), các năm 2007, 2011, 2012, 2013 và 2016 đều không ghi nhận tử vong do VNNB.



**Hình 3.1. Số mắc HCVNC, viêm não Nhật Bản theo tỉnh, 2005-2018**

Trong số những trường hợp HCVNC và VNNB được ghi nhận 04 tỉnh Tây Nguyên, thì tập trung chủ yếu tại Gia Lai với số mắc HCVNC và VNNB chiếm tỷ lệ cao 594/713 (83,31%) HCVNC, 131/168 (77,98%) VNNB. Các tỉnh còn lại HCVNC và bệnh VNNB xuất hiện rải rác: Đắk Lắk 59/713 (8,27%) HCVNC và VNNB có 19/168 (11,31%); Kon Tum có 47/713 (6,59) và 14/168 (8,33%); Đắk Nông 13/713 (1,82%) HCVNC và 4/168 (2,38%) VNNB.

**Bảng 3.2. Tỷ lệ chết/ mắc do viêm não Nhật Bản tại 4 tỉnh Tây Nguyên, 2005 – 2018**

Tỉnh	Gia Lai	Kon Tum	Đắk Lắk	Đắk Nông

Năm	M/ 10 <sup>5</sup> dân	C/M%	M/ 10 <sup>5</sup> dân	C/M%	M/ 10 <sup>5</sup> dân	C/M%	M/ 10 <sup>5</sup> dân	C/M %
2005	0,89	40,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2006	0,67	37,50	0,79	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2007	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2008	0,58	28,57	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2009	0,88	18,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2010	0,30	50,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2011	0,97	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2012	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2013	0,57	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2014	0,46	42,86	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2015	1,00	35,71	0,21	0,00	0,75	21,43	0,70	25,00
2016	0,96	0,00	0,99	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00
2017	1,41	14,29	0,56	100,00	0,20	25,00	0,00	0,00
2018	0,67	10,00	0,37	50,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Chung	0,70	19,10	0,23	28,57	0,07	21,05	0,05	25,00

Tỷ lệ mắc VNNB/100.000 dân tại 04 tỉnh Tây Nguyên, ghi ở nhận Gia Lai là tỉnh có tỷ lệ mắc VNNB cao nhất 0,7/100.000 dân, tiếp đến Kon Tum

0,23/100.000 dân, Đắk Lắk 0,07/100.000 dân, thấp nhất ghi nhận tại Đắk Nông 0,05/100.000 dân.

Tỷ lệ chết/mắc trong giai đoạn này ở Kon Tum cũng cao hơn cả (28,57%), trong đó riêng năm 2017 tỷ lệ này là 100%, tiếp đến ở Đắk Nông 25%, Đắk Lắk 21,05% và thấp nhất là Gia Lai 19,1%.

### **3.1.2. Một số đặc điểm dịch tễ học những trường hợp hội chứng viêm não cấp, viêm não Nhật Bản tại 4 tỉnh Tây Nguyên, 2005-2018**

#### **3.1.2.1. Sự phân bố hội chứng viêm não cấp, viêm não Nhật Bản theo địa phương tại 4 tỉnh Tây Nguyên, 2005-2018**

**Bảng 3.3. Phân bố theo huyện/thị xã/thành phố số mắc hội chứng viêm não cấp, viêm não Nhật Bản ở khu vực Tây Nguyên, 2005-2018**

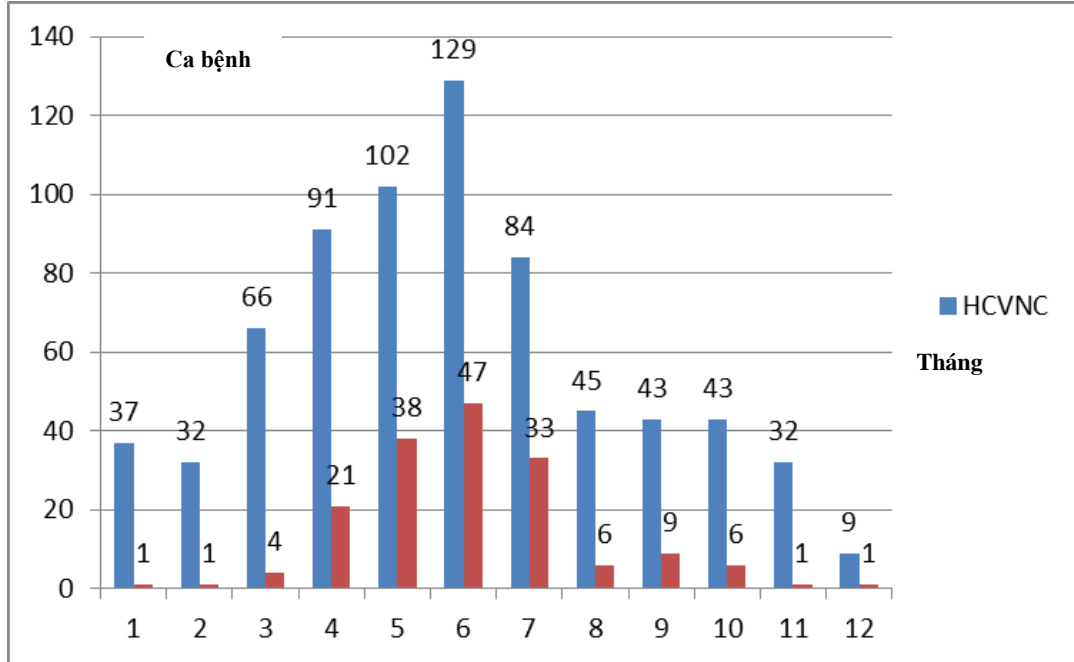
Tỉnh	Số huyện	Ca bệnh	Số huyện mắc	Tỷ lệ (%)
Gia Lai	17	HCVNC	16	94,12
		VNNB	15	88,24
Kon Tum	10	HCVNC	9	90,00
		VNNB	7	70,00
Đắk Lắk	15	HCVNC	15	100,00
		VNNB	8	53,33
Đắk Nông	8	HCVNC	5	62,50
		VNNB	3	37,50
Chung	50	HCVNC	45	90,00

Tỉnh	Số huyện	Ca bệnh	Số huyện mắc	Tỷ lệ (%)
		VNNB	33	66,00

Trong giai đoạn 2005-2018, HCVNC do vi rút được ghi nhận ở 45/50 (90%) huyện/thành phố/thị xã của 4 tỉnh, Gia Lai, Kon Tum, Đắk Lắk, Đắk Nông. Trong đó, riêng Đắk Lắk số mắc HCVNC ghi nhận ở cả 15/15 huyện (100%) của tỉnh, Gia Lai 16/17 (94,12%), Kon Tum 9/10 (90%) và Đắk Nông 5/8 (62,5%).

Ca bệnh VNNB chỉ được xác định ở 33/50 (66%) huyện/thành phố/thị xã, và xuất hiện rải rác, trong đó Gia Lai có số huyện mắc VNNB nhiều hơn cả 15/17 huyện (88,24%), Kon Tum 7/10 (70%), Đắk Lắk 8/15 (53,33%), và Đắk Nông 3/8 (37,5%).

***3.1.2.2. Sự phân bố hội chứng viêm não cấp, viêm não Nhật Bản theo thời gian (tháng) tại 4 tỉnh Tây Nguyên, 2005-2018***



**Hình 3.2. Phân bố số mắc hội chứng viêm não cấp, viêm não Nhật Bản theo tháng tại 04 tỉnh Tây Nguyên, 2005- 2018**

Nhìn chung HCVNC do vi rút và VNNB xuất hiện quanh năm, bệnh thường mắc rải rác vào những tháng đầu năm (tháng 1,2) và tăng dần vào những tháng cuối mùa khô, đầu mùa mưa (tháng mùa hè), đạt đỉnh vào tháng 6 với 129 ca HCVNC và 47 ca VNNB, sau đó giảm dần và xuất hiện lẻ tẻ vào các tháng cuối năm (tháng 11,12) thuộc cuối mùa mưa, đầu mùa khô.

**3.1.2.3. Sự phân bố hội chứng viêm não cấp, viêm não Nhật Bản theo nhóm tuổi tại 4 tỉnh Tây Nguyên, 2005-2018**

**Bảng 3.4. Phân bố mắc hội chứng viêm não cấp, viêm não Nhật Bản theo nhóm tuổi ở 4 tỉnh Tây Nguyên, 2005- 2018**

Tuổi	HCVNC		VNNB	
	Số ca	(%)	Số ca	(%)

Tuổi	HCVNC			VNNB		
	Số ca	(%)		Số ca	(%)	
<1	70	9,82	59,61	4	2,38	69,64
1-4	131	18,37		40	23,80	
5-9	134	18,80		51	30,36	
10-14	90	12,62		22	13,10	
≥15-70	288	40,39		51	30,36	
Tổng	713	100,00		168	100,00	

Phân tích số mắc theo nhóm tuổi, qua 713 trường hợp HCVNC do vi rút và 168 VNNB được xác định ở 4 tỉnh thuộc khu vực Tây Nguyên trong giai đoạn 2005-2018, cho thấy bệnh ghi nhận ở mọi lứa tuổi, từ ở trẻ dưới 1 cho tới 70 tuổi. Có sự sai khác giữa các nhóm tuổi, trong đó HCVNC ở nhóm 1-4 tuổi và 5-9 tuổi có tỷ lệ mắc không chênh lệch nhiều, lần lượt là 18,37% và 18,80%, nhóm <1 tuổi có tỷ lệ mắc thấp 9,82% tiếp đến nhóm 10-14 tuổi chiếm 12,62%. Nhìn chung ở nhóm < 15 tuổi chiếm tỷ lệ tới 59,61%, trong khi đó nhóm tuổi còn lại ≥15-70 là 40,39%.

Đối với những trường hợp mắc VNNB, số mắc ở các nhóm tuổi có sự khác nhau. Trong đó nhóm 5-9 tuổi có tỷ lệ mắc tới 30,36%, tiếp đến là nhóm từ 1-4 tuổi và nhóm 10-14 tuổi, với số mắc tương ứng là 23,80% và 13,10%, nhóm trẻ <1 tuổi mắc thấp nhất có 2,38%. Nhìn chung nhóm <15 tuổi có số mắc cao 69,64% so với nhóm ≥15 tuổi có 30,36% tổng số ca mắc.



**Bảng 3.5. Phân bố mắc hội chứng viêm não cấp, viêm não Nhật Bản theo tuổi tại Gia Lai, 2005- 2018**

Tuổi	HCVNC		VNNB			
	Số ca	(%)	Số ca	(%)		
<1	67	11,28	56,56	4	3,05	67,94
1-4	95	15,99		28	21,38	
5-9	97	16,33		39	29,77	
10-14	77	12,96		18	13,74	
≥15	258	43,44		42	32,06	
Tổng	594	100,00		131	100,00	

Tại Gia Lai, giai đoạn 2005-2018 ghi nhận 594 ca HCVNC, nhóm < 15 tuổi chiếm tỷ lệ 56,56%, nhóm ≥15 chiếm 43,44%. Trong nhóm < 15 tuổi, thì ở nhóm 5-9 tuổi có tỷ lệ cao nhất (16,33%), nhóm < 1 tuổi có tỷ lệ mắc thấp hơn cả 11,28%.

Trong số 131 ca VNNB có sự khác nhau giữa các nhóm tuổi, nhóm < 15 tuổi chiếm đa số (67,94%), nhóm ≥15 là 32,06%. Trong nhóm < 15 tuổi thì nhóm 5-9 tuổi có tỷ lệ cao nhất (29,77%), nhóm < 1 tuổi chiếm tỷ lệ mắc thấp nhất 3,05%.

**Bảng 3.6. Phân bố mắc hội chứng viêm não cấp, viêm não Nhật Bản theo nhóm tuổi tại Kon Tum, 2005- 2018**

Tuổi	HCVNC		VNNB	
	Số ca	%	Số ca	%

<1	3	6,38	74,47	0	0,00	92,86
1-4	15	31,92		4	28,57	
5-9	13	27,66		6	42,86	
10-14	4	8,51		3	21,43	
≥15	12	25,53		1	7,14	
Tổng	47	100,00		14	100,00	

Tại Kon Tum, giai đoạn 2005-2018 ghi nhận 47 ca HCVNC, tập trung nhóm < 15 tuổi chiếm đa số (74,47%), còn lại là ở nhóm ≥15 (25,53%). Trong nhóm < 15 tuổi, ghi nhận nhóm 1-4 tuổi là nhiều nhất (31,92%), nhóm < 1 tuổi có tỷ lệ mắc thấp nhất (6,38%).

Trong số 14 ca VNNB phân bố theo nhóm tuổi, cho thấy có sự khác biệt giữa các nhóm này, trong đó hầu hết số mắc ở nhóm < 15 tuổi chiếm tỷ lệ 92,86%, nhóm ≥15 chỉ có 7,14%. Trong nhóm < 15 tuổi, tỷ lệ mắc cao ở nhóm 5-9 tuổi (42,86%), không ghi nhận trường hợp nào ở nhóm < 1 tuổi.

**Bảng 3.7. Phân bố mắc hội chứng viêm não cấp, viêm não Nhật Bản theo nhóm tuổi tại Đắk Lắk, 2005- 2018**

Tuổi	HCVNC			VNNB		
	Số ca	(%)		Số ca	(%)	
<1	0	0,00	77,97	0	0,00	63,16

Tuổi	HCVNC			VNNB		
	Số ca	(%)		Số ca	(%)	
1-4	16	27,12		6	31,58	
5-9	21	35,60		5	26,32	
10-14	9	15,25		1	5,26	
≥15	13	22,03		7	36,84	
Tổng	59	100,00		19	100,00	

Tại Đắk Lắk, giai đoạn 2005-2018 ghi nhận 59 ca HCVNC, nhóm <15 tuổi chiếm đa số (77,97%), nhóm ≥15 là 22,03%. Trong nhóm <15 tuổi, thì ở nhóm 5-9 tuổi chiếm tỷ lệ cao hơn cả (35,60%), không ghi nhận ca mắc ở nhóm <1 tuổi.

Trong số 19 ca VNNB, ở nhóm <15 tuổi chiếm đa số (63,16%), nhóm ≥15 chiếm tỷ lệ thấp (36,84%). Trong nhóm <15 tuổi, ghi nhận tỷ lệ mắc cao ở nhóm 1-4 tuổi (31,58%), không ghi nhận số mắc ở nhóm < 1 tuổi.

**Bảng 3.8. Phân bố mắc hội chứng viêm não cấp, viêm não Nhật Bản theo nhóm tuổi tại Đắk Nông, 2005- 2018**

Tuổi	HCVNC			VNNB		
	Số ca	(%)		Số ca	(%)	
<1	0	0,00	61,54	0	0,00	75,00

Tuổi	HCVNC			VNNB		
	Số ca	(%)		Số ca	(%)	
1-4	5	38,46		2	50,00	
5-9	3	23,08		1	25,00	
10-14	0	0,00		0	0,00	
≥15	5	38,46		1	25,00	
Tổng	13	100,00		4	100,00	

Tại Đắk Nông, giai đoạn 2005-2018 ghi nhận 13 ca HCVNC, mắc nhiều hơn cả ở nhóm <15 tuổi (61,54%), nhóm ≥15 là 38,46%. Trong nhóm <15 tuổi, gặp chủ yếu ở nhóm 1-4 tuổi (38,46%), không ghi nhận ca mắc ở nhóm <1 tuổi và nhóm 10-14 tuổi.

Trong số 04 ca VNNB, nhóm 1-4 tuổi có 02 ca, nhóm 5-9 tuổi là 01 ca, và nhóm ≥15 tuổi chỉ ghi nhận 01 trường hợp, các nhóm tuổi khác không ghi nhận.

#### ***3.1.2.4. Sự phân bố hội chứng viêm não cấp, viêm não Nhật Bản theo giới tính tại 4 tỉnh Tây Nguyên, 2005-2018***

**Bảng 3.9. Phân bố mắc hội chứng viêm não cấp, viêm não Nhật Bản theo giới tính tại 4 tỉnh Tây Nguyên, 2005- 2018**

Tỉnh	Ca bệnh	Nam		Nữ		Tổng	
		Số ca	(%)	Số ca	(%)	Số ca	(%)
Gia Lai	HCVNC	372	62,63	222	37,37	594	100,00

Tỉnh	Ca bệnh	Nam		Nữ		Tổng	
		Số ca	(%)	Số ca	(%)	Số ca	(%)
	VNNB	79	60,31	52	39,69	131	100,00
Kon Tum	HCVNC	29	61,70	18	38,30	47	100,00
	VNNB	10	71,43	4	28,57	14	100,00
Đắk Lắk	HCVNC	33	55,93	26	44,07	59	100,00
	VNNB	9	47,37	10	52,63	19	100,00
Đắk Nông	HCVNC	3	23,08	10	76,92	13	100,00
	VNNB	2	50,00	2	50,00	4	100,00
Chung	HCVNC	437	61,29	276	38,71	713	100,00
	VNNB	100	59,52	68	40,48	168	100,00

Tổng số 713 trường hợp HCVNC, ghi nhận nam mắc 437 ca chiếm 61,29%, nữ mắc 276 ca (38,71%). Trong số 168 ca VNNB, phân tích tỷ lệ số mắc theo giới tính cho thấy, tỷ lệ mắc VNNB ở nam giới là 59,52 % cao hơn ở nữ giới (40,48%). Nhìn chung có sự sai khác tỷ lệ này giữa nam và nữ, tại các tỉnh Đắk Lắk, Đắk Nông sự chênh lệch này không nhiều.

### ***3.1.2.5. Sự phân bố HCVNC, VNNB theo dân tộc tại 4 tỉnh Tây Nguyên, 2005-2018***

**Bảng 3.10. Phân bố mắc hội chứng viêm não cấp, viêm não Nhật Bản theo nhóm dân tộc tại 4 tỉnh Tây Nguyên, 2005- 2018**

Tỉnh	Ca bệnh	Kinh		Gia Rai		Khác (Xơ Đăng <sup>(1)</sup> , Ê Đê <sup>(2)</sup> , M'Nông <sup>(3)</sup> , v.v..)		Tổng	
		Số ca	%	Số ca	%	Số ca	%	Số ca	%
Gia Lai	HCVNC	144	24,24	445	74,92	5	0,84	594	100,00
	VNNB	12	9,16	119	90,84	0	0,00	131	100,00
Kon Tum	HCVNC	5	10,64	0	0,00	42	89,36	47	100,00
	VNNB	0	0,00	0	0,00	14 <sup>(1)</sup>	100,00	14	100,00
Đắk Lắk	HCVNC	30	50,85	0	0,00	29	49,15	59	100,00
	VNNB	7	36,84	0	0,00	12 <sup>(2)</sup>	63,16	19	100,00
Đắk Nông	HCVNC	8	61,54	0	0,00	5	38,46	13	100,00
	VNNB	3	75,00	0	0,00	1 <sup>(3)</sup>	25,00	4	100,00
Chung	HCVNC	187	26,23	445	62,41	81	11,36	713	100,00
	VNNB	22	13,10	119	70,83	27	16,07	168	100,00

Trong tổng số 168 trường hợp VNNB của 713 ca HCVNC ở 04 tỉnh Tây Nguyên, giai đoạn 2005-2018, ở người Kinh có 22 ca, chiếm 13,10%, số còn lại tập trung nhiều ở một số dân tộc khác như Gia Rai ở Gia Lai, Xơ Đăng gặp nhiều ở Kon Tum, Ê Đê tại Đắk Lắk. Đáng chú ý, có tới 119 ca VNNB là người Gia

Rai chiếm tới 70,83% trong tổng số, còn lại 27 ca chiếm 16,07% mắc rải rác ở các tộc người (Xơ Đăng, Ê Đê, Ba Na, v.v..).

Tại Gia Lai, trong số 131 ca VNNB, người Kinh chỉ ghi nhận 12 ca chiếm 9,16%, trong khi người Gia Rai mắc 119 ca, chiếm tới 90,84%, không ghi nhận số mắc ở nhóm tộc người khác. Tại các tỉnh Kon Tum, Đắk Lắk, Đắk Nông ghi nhận tỷ lệ mắc ở người Kinh lần lượt 0%; 36,84%; 75%, trong khi đó ở Kon Tum có 14 ca thì người Xơ Đăng chiếm 100%, tại Đắk Lắk có 19 ca VNNB có tới 12 ca là người Ê Đê chiếm 63,16% và tại Đắk Nông trong tổng số 04 ca mắc VNNB ghi nhận 01 ca (25%) là người M'Nông. Nhìn chung tỷ lệ mắc tại các tỉnh này có sự khác biệt giữa người Kinh và các dân tộc khác.

### **3.2. Thành phần loài, phân bố và tỷ lệ nhiễm vi rút viêm não Nhật Bản của muỗi thuộc giống *Culex* ở khu vực Tây Nguyên, 2005-2018**

#### **3.2.1. Thành phần, phân bố của một số loài muỗi giống *Culex* được xét nghiệm viêm não Nhật Bản tại 4 tỉnh Tây Nguyên, 2005-2018**

**Bảng 3.11. Thành phần, phân bố một số loài muỗi *Culex* ở khu vực Tây Nguyên, 2005-2018**

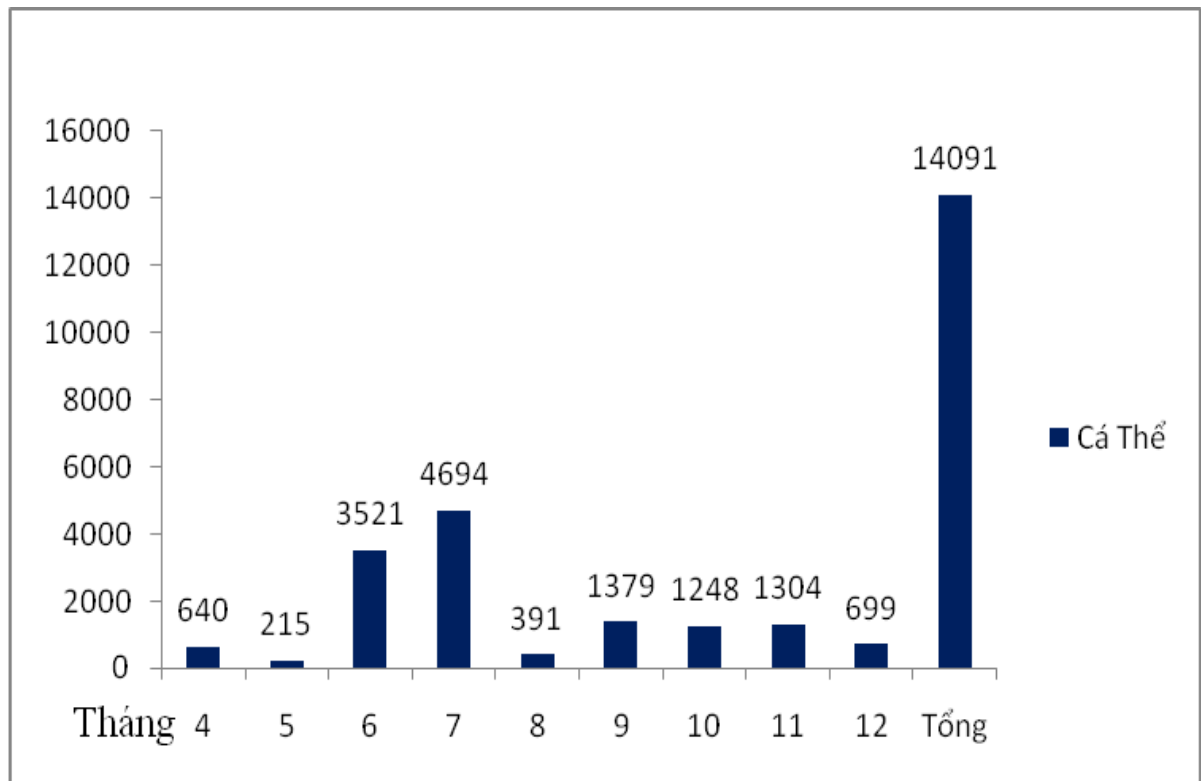
<b>Tên loài</b>	<b>Gia Lai</b>	<b>Kon Tum</b>	<b>Đắk Lắk</b>	<b>Đắk Nông</b>	<b>Tổng số cá thể (Tỷ lệ%)</b>
<i>I.Cx. tritaeniorhynchus</i>	2.043	1.039	2.075	911	6.068 (43,06%)

Tên loài	Gia Lai	Kon Tum	Đắk Lắk	Đắk Nông	Tổng số cá thể (Tỷ lệ%)
2. <i>Cx. vishnui</i>	1.649	2.199	823	426	5.097 (36,17%)
3. <i>Cx. fuscocephala</i>	212	451	63	201	927 (6,58%)
4. <i>Cx. gelidus</i>	132	208	337	119	796 (5,65%)
5. <i>Cx. malayi</i>	118	112	156	67	453 (3,22%)
6. <i>Cx. quinquefasciatus</i>	180	143	77	41	441 (3,13%)
7. <i>Cx. khazani</i>	33	88	32	32	185 (1,31%)
8. <i>Cx. whitmorei</i>	66	0	0	0	66 (0,47%)
9. <i>Cx. pseudovishnui</i>	58	0	0	0	58 (0,41%)
Tổng số cá thể muỗi	4.491 31.87(%)	4.240 30.09(%)	3.563 25.29(%)	1.797 (12.75%)	14.091 (100%)

Tổng hợp kết quả thu thập muỗi ở 04 tỉnh thuộc khu vực Tây Nguyên là các tỉnh: Gia Lai, Kon Tum, Đắk Lắk và Đắk Nông từ 2005-2018 đã thu được 14.091 cá thể muỗi và đã xác định có 09 loài muỗi được thu thập, chiếm số lượng nhiều hơn cả là *Cx. tritaeniorhynchus* với tỷ lệ 43,06%, tiếp đến là *Cx. vishnui* chiếm tỷ lệ 36,17%, còn 7 loài khác tỷ lệ thu thập được muỗi thấp dao



động trong khoảng 0,41%–6,58%. Có 07 loài muỗi phát hiện ở hầu khắp các địa phương, đáng chú ý chỉ có tại tỉnh Gia Lai thu thập được 02 loài muỗi là *Cx. pseudovishnui* (58 cá thể) và *Cx. whitmorei* (66 cá thể).



**Hình 3.3. Phân bố số lượng muỗi *Culex* thu được theo thời gian (tháng) tại 4 tỉnh Tây Nguyên, 2005- 2018**

Từ năm 2005-2018 thu thập muỗi được thực hiện trong 03 giai đoạn, đó là các năm 2005-2007; 2012-2014 và 2017-2018, tại một số địa phương thuộc 04 tỉnh Đắk Lắk, Đắk Nông, Gia Lai và Kon Tum của khu vực Tây Nguyên. Trong các giai đoạn này, muỗi thu được ở các thời điểm từ tháng 04 đến tháng 12. Trong tổng số 14.091 cá thể muỗi thu được thì thời điểm tháng 07 là nhiều nhất có 4.694 cá thể chiếm 33,31%, tiếp đến các tháng 06, 09; 11 và tháng 10 tương

ứng số cá thể thu được là: 3.521 (24,99%); 1.379 (9,79%); 1.304 (9,25%) và 1.248 (8,86%). Các tháng còn lại thu được số cá thể dao động từ 215 (tháng 05); 391 (tháng 08); 640 (tháng 04) đến 699 (tháng 12) trong giai đoạn này.

**3.2.1.1. Thành phần, phân bố của một số loài muỗi giống *Culex* được xét nghiệm viêm não Nhật Bản tại 4 tỉnh Tây Nguyên, 2005-2007**

**Bảng 3.12. Thành phần, phân bố một số loài muỗi *Culex* ở 4 tỉnh khu vực Tây Nguyên, 2005-2007**

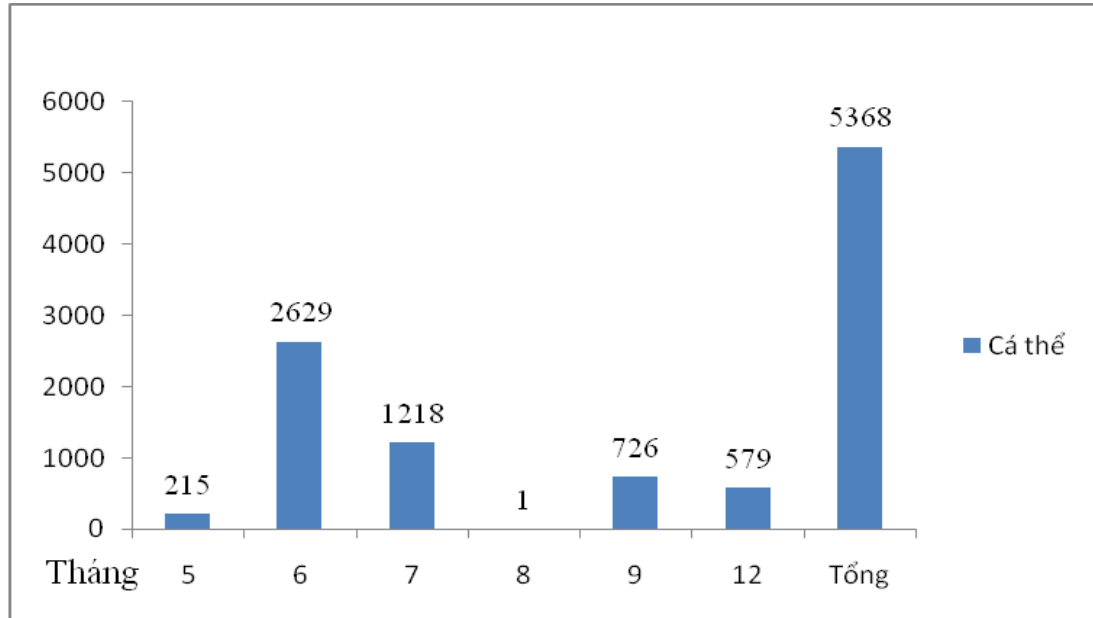
Loài	Các tỉnh của khu vực Tây Nguyên				Tổng số cá thể (Tỷ lệ)
	Gia Lai	Kon Tum	Đắk Lắk	Đắk Nông	
1. <i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	426	387	1.273	689	2.775 (51,69%)
2. <i>Cx. vishnui</i>	178	880	130	345	1.533 (28,59%)
3. <i>Cx. gelidus</i>	10	42	327	96	475 (8,85%)
4. <i>Cx. fuscocephala</i>	55	202	10	109	376 (7,00%)
5. <i>Cx. whitmorei</i>	66	0	0	0	66 (1,23%)
6. <i>Cx. pseudovishnui</i>	53	0	0	0	53 (0,98%)

Loài	Các tỉnh của khu vực Tây Nguyên				Tổng số cá thể (Tỷ lệ)
	Gia Lai	Kon Tum	Đắk Lắk	Đắk Nông	
7. <i>Cx. malayi</i>	0	1	10	23	34 (0,63%)
8. <i>Cx. quinquefasciatus</i>	6	10	3	13	32 (0,59)
9. <i>Cx. khazani</i>	0	9	5	10	24 (0,45%)
<b>Tổng cộng</b>	794 (14,79%)	1.531 (28,52%)	1.758 (32,75%)	1.285 (23,93%)	5.368 (100%)

Với 5.368 cá thể muỗi thu được để xét nghiệm, phân lập nhằm xác định khả năng nhiễm vi rút VNNB trong giai đoạn 2005-2007 thuộc 04 tỉnh của khu vực Tây Nguyên, đã xác định gồm 09 loài muỗi, trong đó *Cx. tritaeniorhynchus* chiếm ưu thế với 2.775 cá thể muỗi, chiếm 51,69%. Tiếp theo là *Cx. vishnui* có 1.533 cá thể muỗi, chiếm 28,59%. Các loài chiếm tỷ lệ thấp hơn bao gồm: *Cx. gelidus* là 8,85%, *Cx. fuscocephala* là 7,00%. Số còn lại chiếm tỷ lệ rất thấp chỉ có từ 0,45%-1,23% như loài: *Cx. khazani* (0,45%), *Cx. quinquefasciatus* (0,59%), *Cx. malayi* (0,63%), *Cx. pseudovishnui* (0,98%), *Cx. whitmorei* (1,23%).

Trong số cá thể và thành phần loài muỗi thu được vào thời điểm này, nhiều hơn cả là tại Đắk Lắk với 1.758 cá thể chiếm 32,75%, đã xác định có 07 loài muỗi *Culex*, tại Kon Tum thu được 1.531 cá thể chiếm 28,52%, Đắk Nông là 1.285 cá thể chiếm 23,93%. Đáng chú ý tại 03 địa phương này đều không thu được 02 loài muỗi *Cx. whitmorei* và *Cx. pseudovishnui*. Thấp nhất tại Gia Lai

thu thập 794 cá thể chiếm 14,79%, cũng đã xác định được 07 loài *Culex*, trong đó không thu được 02 loài *Cx. malayi*, và *Cx. khazani*.



**Hình 3.4. Phân bố số cá thể muỗi *Culex* thu được theo thời gian (tháng) tại 4 tỉnh Tây Nguyên, 2005- 2007**

Trong giai đoạn 2005–2007, thu thập muỗi được thực hiện tại một số địa phương thuộc 04 tỉnh của khu vực Tây Nguyên, thời điểm thu thập muỗi được tiến hành trong các tháng 5, 6, 7, 8, 9 và 12. Với 5.368 cá thể thu được tập trung vào 03 thời điểm: (1) tháng 5, 6 và tháng 7; (2) tháng 9; (3) là tháng 12. Trong đó thời điểm tháng 5 đến tháng 7 thu được số cá thể muỗi nhiều hơn cả, nhất là tháng 6 với tổng số cá thể muỗi thu được 2.629 chiếm 48,98% trong tổng số.

### **3.2.1.2. Thành phần, phân bố của một số loài muỗi giống *Culex* được xét nghiệm viêm não Nhật Bản tại 4 tỉnh Tây Nguyên, 2012-2014**

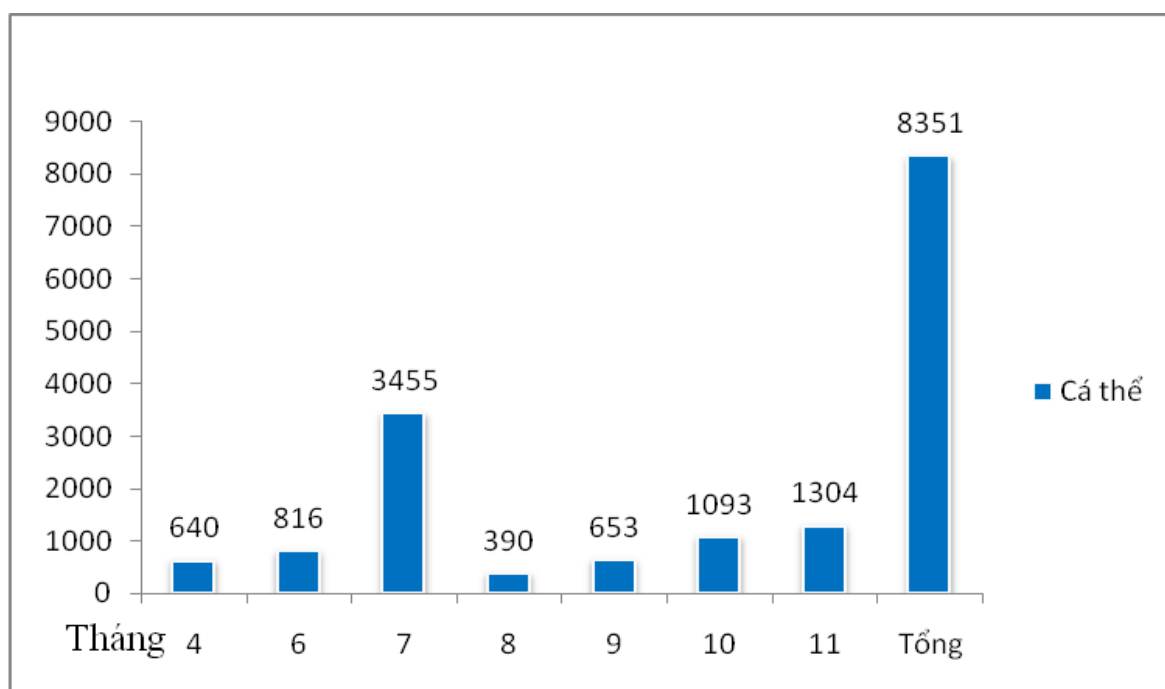
**Bảng 3.13. Thành phần, phân bố một số loài muỗi *Culex* ở khu vực Tây Nguyên, 2012-2014**

Loài	Các tỉnh của khu vực Tây Nguyên				Tổng số (Tỷ lệ %)
	Gia Lai	Kon Tum	Đắk Lắk	Đắk Nông	
1. <i>Cx. vishnui</i>	1.456	1316	670	49	3.491 (41,80%)
2. <i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	1.575	644	783	171	3.173 (38,00%)
3. <i>Cx. fuscocephala</i>	149	236	47	77	509 (6,09%)
4. <i>Cx. malayi</i>	98	109	146	28	381 (4,56%)
5. <i>Cx. quinquefasciatus</i>	150	105	67	10	332 (3,98%)
6. <i>Cx. gelidus</i>	119	166	10	10	305 (3,65%)
7. <i>Cx. khazani</i>	30	79	27	19	155 (1,86%)
8. <i>Cx. pseudovishnui</i>	5	0	0	0	5 (0,06%)
<b>Tổng cộng</b>	3.582 (42,89%)	2.655 (31,79%)	1.750 (20,96%)	364 (4,36%)	8.351 (100%)

Trong các năm 2012-2014, muỗi *Culex* được thu thập tại một số địa phương thuộc 04 tỉnh: Đắk Lắk, Đắk Nông, Gia Lai và Kon Tum của khu vực Tây Nguyên là 8.351 cá thể muỗi, đã xác định được 08 loài, trong đó loài *Cx. vishnui* có số lượng nhiều hơn cả với 3.491 cá thể (41,80%), tiếp đến loài *Cx.*

*tritaeniorhynchus* với 3.173 cá thể, chiếm 38%. Các loài khác có tỷ lệ thấp, gồm *Cx. fuscocephala* là 6,09%, *Cx. malayi* là 4,56%, *Cx. quinquefasciatus* là 3,98%, *Cx. gelidus* là 3,65%, đáng chú ý loài *Cx. pseudovishnui* chỉ thu được 05 cá thể và tỷ lệ rất thấp là 0,06%.

Trong số cá thể muỗi thu được thì tại Gia Lai có 3.582 cá thể chiếm 42,89% và xác định có đủ 08 loài muỗi. Các tỉnh còn lại, Kon Tum 2.655 cá thể chiếm 31,79%, Đắk Lắk 1.750 cá thể chiếm 20,96%, thấp nhất Đắk Nông thu thập 364 cá thể chiếm 4,36%, cả 03 tỉnh đều xác định có 07 loài muỗi và không thu thập được loài *Cx. pseudovishnui* trong giai đoạn này.



**Hình 3.5. Phân bố số cá thể muỗi *Culex* thu được theo thời gian (tháng) tại 4 tỉnh Tây Nguyên, 2012- 2014**

Trong các năm 2012-2014, muỗi *Culex* được thu thập tại một số địa phương thuộc 04 tỉnh Đắk Lắk, Đắk Nông, Gia Lai và Kon Tum của khu vực Tây Nguyên được thực hiện ở các thời điểm tháng 04, và từ tháng 06 đến tháng

11. Trong số cá thể muỗi thu được thì thời điểm tháng 07 là nhiều nhất có 3.455 cá thể chiếm 41,37%, tiếp đến các tháng 11, 10 và tháng 06 tương ứng số cá thể thu được là: 1.304 (15,61%); 1.093 (13,09%); 816 (9,77%). Các tháng còn lại thu được số cá thể dao động từ 390 (tháng 6); 640 (tháng 04) đến 653 (tháng 09) trong giai đoạn này.

**3.2.1.3. Thành phần, phân bố của một số loài muỗi giống *Culex* được xét nghiệm viem não Nhật Bản tại 4 tỉnh Tây Nguyên, 2017-2018**

**Bảng 3.14. Thành phần, phân bố một số loài muỗi *Culex* ở khu vực Tây Nguyên, 2017-2018**

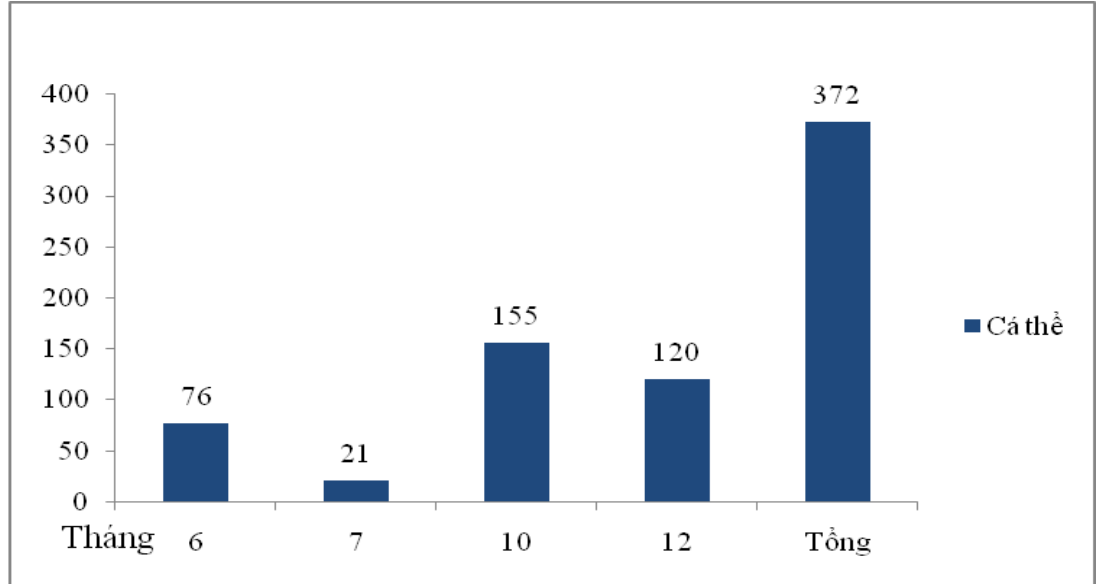
TT	Tên loài	Kon Tum	Gia Lai	Đắk Lắk	Đắk Nông	Tổng số cá thể (Tỷ lệ %)
1	<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	8	42	19	51	120 (32,26%)
2	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	28	24	7	18	77 (20,70%)
3	<i>Cx. vishnui</i>	3	15	23	32	73 (19,62%)
4	<i>Cx. fuscocephala</i>	13	8	6	15	42 (11,30%)
5	<i>Cx. malayi</i>	2	20	0	16	38 (10,21)
6	<i>Cx. gelidus</i>	0	3	0	13	16

TT	Tên loài	Kon Tum	Gia Lai	Đắk Lắk	Đắk Nông	Tổng số cá thể (Tỷ lệ %)
						(4,30%)
7	<i>Cx. khazani</i>	0	3	0	3	6 (1,61%)
Tổng số cá thể muỗi		54 (14,52%)	115 (30,91%)	55 (14,78%)	148 (39,79%)	372 (100%)

Có 372 cá thể muỗi đã xác định 07 loài muỗi giống *Culex* thu thập được tại các địa phương 04 tỉnh, Gia Lai, Kon Tum, Đắk Lắk và Đắk Nông của khu vực Tây Nguyên. Trong đó loài *Cx. tritaeniorhynchus* chiếm tỷ lệ cao nhất là 32,26%, tiếp đến là *Cx. quinquefasciatus* là 20,70%, *Cx. vishnui* là 19,62%, *Cx. fuscocephala* là 11,30%. Còn 03 loài muỗi *Culex* khác có số lượng cá thể thu thập được không cao, dao động trong khoảng 1,61%-10,21%.

Ghi nhận số cá thể thu thập được nhiều hơn cả là tại Đắk Nông với 148 cá thể chiếm 39,79%, tại Gia Lai 115 cá thể chiếm 30,91%, cả 02 địa phương này đều xác định có 07 loài được thu thập. Đắk Lắk chỉ thu 55 cá thể chiếm 14,78%, với 4/7 loài được thu thập, Kon Tum thu thập 54 cá thể chiếm 14,52%, và 5/7 loài được xác định.





**Hình 3.6. Phân bố số cá thể muỗi *Culex* thu được theo thời gian (tháng) tại 4 tỉnh Tây Nguyên, 2017- 2018**

Trong giai đoạn 2017-2018, muỗi *Culex* được thu thập tại một số địa phương thuộc 04 tỉnh Đắk Lắk, Đắk Nông, Gia Lai và Kon Tum của khu vực Tây Nguyên được thực hiện ở 02 giai đoạn tháng 06, 07 và tháng 10, 12. Trong đó thời điểm tháng 10 và 12 là nhiều hơn cả, đáng chú ý là tháng 10 thu được 155 cá thể chiếm 41,67%, tháng 12 là 120 (32,26%). Thời điểm tháng 06 thu được 76 (20,4%) và tháng 07 là 21 (5,6%) cá thể.

### **3.2.2. Khả năng nhiễm vi rút viêm não Nhật Bản của một số loài muỗi giống *Culex* thu được tại 4 tỉnh Tây Nguyên, 2005-2018**

**Bảng 3.15. Phân lập vi rút VNNB bằng tế bào C6/36 từ một số loài muỗi *Culex* thu thập ở khu vực Tây Nguyên, 2005-2018**

Thời gian thu thập muỗi	Số mẫu phân lập	Số mẫu gây hiện tượng hủy hoại trên tế bào	Số mẫu xác định vi rút VNNB bằng RT-PCR

2005-2007	138	17	04
2012-2014	236	26	0
2017-2018	166	51	05
<b>Tổng số</b>	<b>540</b>	<b>94</b>	<b>09</b>

Sử dụng tế bào muỗi *Aedes albopictus* dòng C6/36 để phân lập vi rút VNNB từ 540 mẫu muỗi *Culex* thu thập ở khu vực Tây Nguyên trong giai đoạn 2005-2018. Mẫu muỗi *Culex* thu thập để phân lập trong giai đoạn 2005-2007 và 2008-2014 là những mẫu muỗi được trộn từ những cá thể cùng loài từ  $\geq 05$ -100 con. Trong giai đoạn 2017-2018 mỗi mẫu muỗi phân lập là từng cá thể muỗi. Kết quả phân lập cho thấy, có 94 mẫu gây hiện tượng hủy hoại trên tế bào muỗi C6/36, bằng kỹ thuật RT-PCR với cặp mồi đặc hiệu vùng gen E để xác định vi rút VNNB, đã xác định có 09 mẫu dương tính. Các mẫu được xác định là vi rút VNNB bao gồm 04 mẫu từ muỗi thu thập từ muỗi *Culex* trong năm 2007 (giai đoạn 2005-2007) và 05 mẫu trong năm 2018 (giai đoạn 2017-2018), còn trong các năm 2008–2014 không phân lập được chủng vi rút VNNB nào. Các mẫu gây hiện tượng hủy hoại tế bào C6/36 được xác định là những vi rút khác, nằm ngoài khả năng của mục tiêu nghiên cứu này thực hiện.

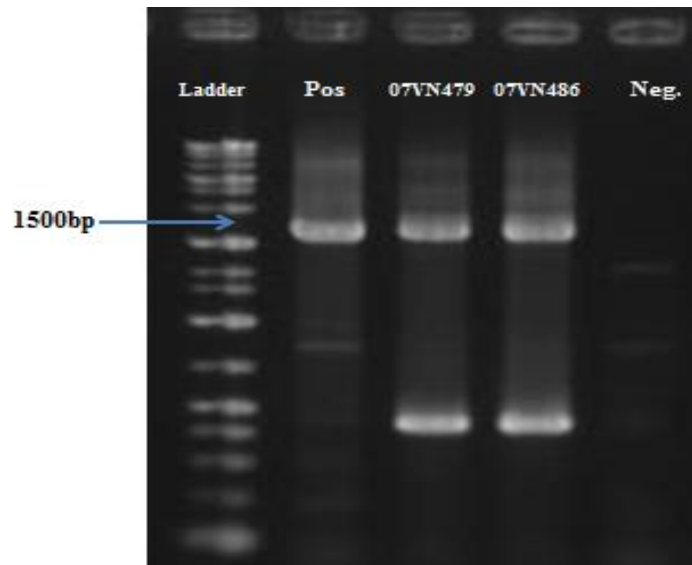
**Bảng 3.16. Kết quả phân lập vi rút viêm não Nhật Bản bằng tế bào C6/36 từ một số loài muỗi *Culex* ở khu vực Tây Nguyên, 2005-2018**

TT	Tên loài	Số mẫu phân lập	Số mẫu gây hiện tượng hủy hoại trên tế bào	Số mẫu dương tính
----	----------	-----------------	--	-------------------

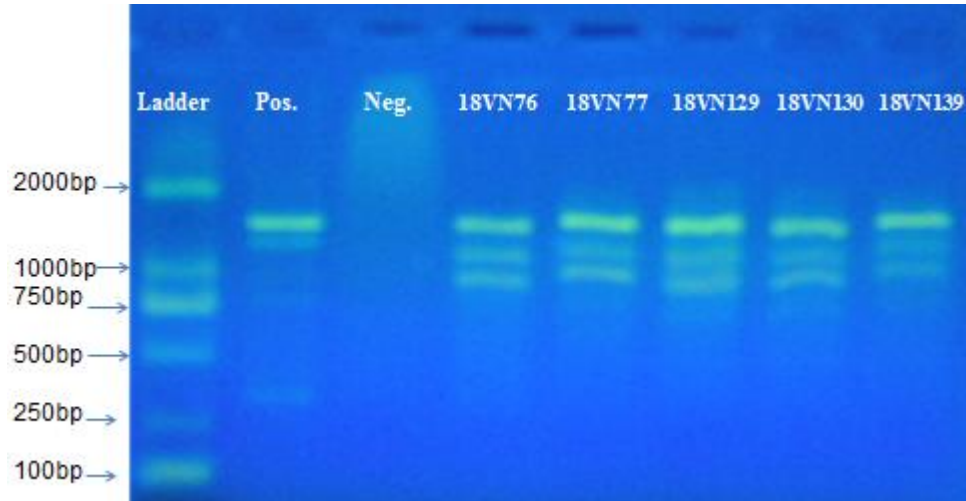
TT	Tên loài	Số mẫu phân lập	Số mẫu gây hiện tượng hủy hoại trên tế bào	Số mẫu dương tính
1	<i>Cx. fuscocephala</i>	45	7	1
2	<i>Cx. gelidus</i>	74	9	0
3	<i>Cx. khazani</i>	7	0	0
4	<i>Cx. malayi</i>	31	0	0
5	<i>Cx. pseudovishnui</i>	2	0	0
6	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	62	6	0
7	<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	176	49	4
8	<i>Cx. vishnui</i>	140	23	4
9	<i>Cx. whitmorei</i>	3	0	0
Tổng số mẫu muỗi		540	94	09

Trong số mẫu thuộc 09 loài muỗi thu thập được để phân lập vi rút VNNB ở các tỉnh thuộc khu vực Tây Nguyên, các mẫu dương tính với cặp mồi của vi rút VNNB được xác định có 03 loài muỗi, đó là: *Cx. fuscocephalus*, *Cx. tritaeniorhynchus* và *Cx. vishnui*. Còn 06 loài muỗi còn lại chưa xác định có mẫu nào dương tính với cặp mồi của vi rút VNNB trong nghiên cứu này. Như vậy, mới có 09/94 mẫu đã xác định là vi rút VNNB bằng kỹ thuật RT-PCR, còn 85 mẫu phân lập gây hiện tượng bệnh lý trên tế bào C6/36, không nằm trong mục tiêu của nghiên cứu này, sẽ được đề cập đến trong nghiên cứu khác. Dựa trên kết quả xác định dương tính bằng kỹ thuật RT-PCR, tỷ lệ trung bình phân lập được (tỷ lệ nhiễm) vi rút VNNB trong quần thể muỗi *Culex* thu thập ở một số tỉnh của

Tây Nguyên, 2005-2018 được tính trên tổng số mẫu muỗi thu thập là 09/540 mẫu (1,67%). Do kết quả RT-PCR không phải là chuẩn vàng, nên tỷ lệ nhiễm vi rút VNNB trong quần thể muỗi *Culex* cần được xác định lại bằng kỹ thuật giải trình tự nucleotide vùng gen E để khẳng định cũng như xác định genotype của vi rút VNNB. Các chủng vi rút phân lập 2007 đã được định loại bằng giải trình tự gen, nên sử dụng 02 chủng này cùng với 05 chủng vi rút phân lập 2018 để thực hiện kỹ thuật giải trình tự gen bằng phương pháp Sanger.



**Hình 3.7. Xác định các mẫu vi rút viêm não Nhật Bản phân lập từ muỗi ở khu vực Tây Nguyên, 2007 bằng RT-PCR với cặp mồi đặc hiệu gen E**



**Hình 3.8. Xác định các mẫu vi rút viêm não Nhật Bản phân lập từ muỗi ở khu vực Tây Nguyên, 2018 bằng RT-PCR với cặp mồi đặc hiệu gen E**

Sử dụng cặp mồi đặc hiệu với vi rút VNNB đặc hiệu vùng gen E, cho sản phẩm 1581bp để xác định vi rút VNNB trong số 94 mẫu phân lập gây hiện tượng bệnh lý trên tế bào muỗi C6/36 bằng kỹ thuật RT-PCR.

Muỗi thu thập trong các giai đoạn 2005-2007, 2012-2014 được trộn nhiều cá thể muỗi cùng loài để phân lập vi rút, trong hai giai đoạn này chỉ có 04 chủng vi rút VNNB được phân lập từ 138 mẫu muỗi thu thập trong năm 2007 của giai đoạn 2005-2007 từ tỉnh Kon Tum. Cụ thể là có 02 chủng vi rút VNNB phân lập từ *Cx. tritaeniorhynchus* ở Kon Tum tháng 06/2007 có ký hiệu là 07VN310, 07VN311 và 02 chủng vi rút VNNB từ *Cx. vishnui* ở Kon Tum tháng 07/2007 có ký hiệu là 07VN479 và 07VN486. Không phân lập được chủng vi rút VNNB từ muỗi thu được ở 03 tỉnh còn lại. Giai đoạn 2012-2014 không phân lập được chủng vi rút VNNB nào trong số 236 mẫu muỗi thu thập từ 04 tỉnh của khu vực Tây Nguyên.

Trong giai đoạn 2017-2018, có 5 mẫu phân lập từ muỗi *Culex* thu thập ở hai tỉnh là Gia Lai và Kon Tum được xác định dương tính với cặp môi đặc hiệu vùng gen E. Đây là những mẫu vi rút VNNB mới được xác định dương tính bằng kỹ thuật RT-PCR, cần được giải trình tự vùng gen E để khẳng định lại cũng như xác định genotype vi rút VNNB ở Tây Nguyên để xác định tỷ lệ nhiễm vi rút VNNB trong một số loài muỗi *Culex* ở khu vực Tây Nguyên, 2005-2018.

**Bảng 3.17. Tỷ lệ nhiễm tối thiểu vi rút viêm não Nhật Bản trong một số loài của muỗi *Culex* thu thập ở khu vực Tây Nguyên, 2005-2018**

Tên loài	Số mẫu phân lập/Số cá thể muỗi phân lập	Số mẫu (+)	% nhiễm tối thiểu với vi rút VNNB
<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	176 (6.068)	02	0,33
<i>Cx. vishnui</i>	140 (5.097)	02	0,39

Trong số 9 chủng vi rút phân lập được xác định dương tính bằng kỹ thuật RT-PCR với cặp môi vùng gen E của vi rút VNNB, chỉ có 4 chủng vi rút phân lập từ muỗi thu thập 2007 được giải mã toàn bộ vùng gen E để xác định là vi rút VNNB bằng kỹ thuật giải trình tự gen. Còn 05 chủng vi rút phân lập từ muỗi thu thập 2018 không phải là vi rút VNNB mà là một loại vi rút khác được phát hiện ở khu vực Tây Nguyên. Nên tỷ lệ nhiễm tối thiểu vi rút VNNB trong quần thể muỗi phân lập được tính trên số mẫu phân lập dương tính bằng kỹ thuật giải trình tự gen chia cho số cá thể phân lập và nhân với 1000. Kết quả đã xác định tỷ lệ nhiễm vi rút VNNB ở *Cx. tritaeniorhynchus* là 0,33%, còn *Cx. vishnui* là 0,39% ở khu vực Tây Nguyên, 2005-2018.

**3.3. Mô tả một số đặc điểm phân tử của vi rút viêm não Nhật Bản phân lập được ở khu vực Tây Nguyên**

**Bảng 3.18. Thông tin về các chủng vi rút phân lập từ muỗi *Culex* ở các tỉnh Gia Lai và Kon Tum thuộc khu vực Tây Nguyên, 2005-2018**

Ký hiệu chủng	Loài muỗi	Thời gian thu thập	Tỉnh	Định loại VNNB bằng RT-PCR
07VN310	<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	6/2007	Kon Tum	Dương tính
07VN311	<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	6/2007	Gia Lai	Dương tính
07VN479	<i>Cx. vishnui</i>	7/2007	Kon Tum	Dương tính
07VN486	<i>Cx. vishnui</i>	7/2007	Kon Tum	Dương tính
18VN76	<i>Cx. fuscocephalus</i>	6/2018	Kon Tum	Dương tính
18VN77	<i>Cx. vishnui</i>	6/2018	Kon Tum	Dương tính
18VN129	<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	6/2018	Gia Lai	Dương tính
18VN130	<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	6/2018	Gia Lai	Dương tính
18VN139	<i>Cx. vishnui</i>	6/2018	Gia Lai	Dương tính

Có 9 chủng vi rút được phân lập từ muỗi *Culex* ở khu vực Tây Nguyên năm 2007 và 2018 trong số mẫu muỗi thu thập, 2005-2018 (giai đoạn 2012-2014 không có mẫu nào được xác định dương tính bằng kỹ thuật RT-PCR). Các chủng vi rút này xác định dương tính bằng cặp mồi được thiết kế từ vùng gen E của vi rút VNNB gồm 4 chủng phân lập 2007 và 5 chủng vi rút được phân lập trong năm 2018. Trong số 9 chủng vi rút này, 4 chủng vi rút đã được giải trình tự vùng gen E trong nghiên cứu trước đây, xác định chúng là vi rút VNNB, nhưng còn 5 chủng vi rút phân lập 2018, mới được xác định dương tính bằng kỹ thuật RT-PCR cần được giải trình tự để xác định lại. Để kiểm soát chất lượng trong nghiên cứu này, sản phẩm PCR khuếch đại bằng cặp mồi đặc hiệu vùng gen E của 5 chủng vi rút phân lập trong 2018 và của 2 chủng vi rút VNNB phân lập 2007 được thu hồi và tinh sạch cho phản ứng giải trình tự gen. Sau tinh sạch sản phẩm PCR được kiểm tra lại trên thạch agarose 2% cho thấy hiện các band đã tinh sạch tương ứng như mẫu chứng dương, các mẫu tinh sạch này được thực hiện phản ứng giải trình tự gen trực tiếp bằng phương pháp Sanger.

Kết quả cho thấy các chủng cần phân tích đều có kết quả của phản ứng giải trình tự gen với cặp mồi vùng gen E có ký hiệu JE-Ef và JE-Er. Trong đó 2 chủng vi rút phân lập 2007 có ký hiệu 07BN479 và 07VN486, kết quả của phản ứng giải trình tự thu nhận được độ dài trình tự đọc mẫu của một loại mồi khoảng 850bp-1100bp, đủ dữ liệu để phân tích trình tự vùng gen E đối với các chủng VNNB phân lập 2007, nhưng với các chủng phân lập 2018 thì có khác.



LOCUS 18VN139Q-EF\_C08.ab1 394 bp DNA linear UNA 20-DEC-2019  
 DEFINITION .  
 ACCESSION urn.local...1sv-bn90me0  
 VERSION urn.local...1sv-bn90me0  
 KEYWORDS .  
 SOURCE  
 ORGANISM .  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 ORIGIN  
 1 cgtcgtacgt tttccagaat atctacagtt agtccaggaa ttctcttga gattcatcca  
 61 ggatttcctc taggtgttct tgcaggaata tgtttcggta tagctcccgg aattccctt  
 121 gcatttcttg gaaattcttc tgaaatgcat gcttgaatct atcaagacgt ttttactggg  
 181 aatccatgaa ttgctccaga taatcccca caactttcat ctggaattcc ttcgtggatt  
 241 tctccaggaa atttcatcaa aaatcctagc agggatttct tccggagatt tcaatagata  
 301 ttctccaat ggattaattt ttggaaatcg aggttttct tcttagggat accttttaag  
 361 gaatttcccc attggaaaaa aaaatccctt tcaa

//

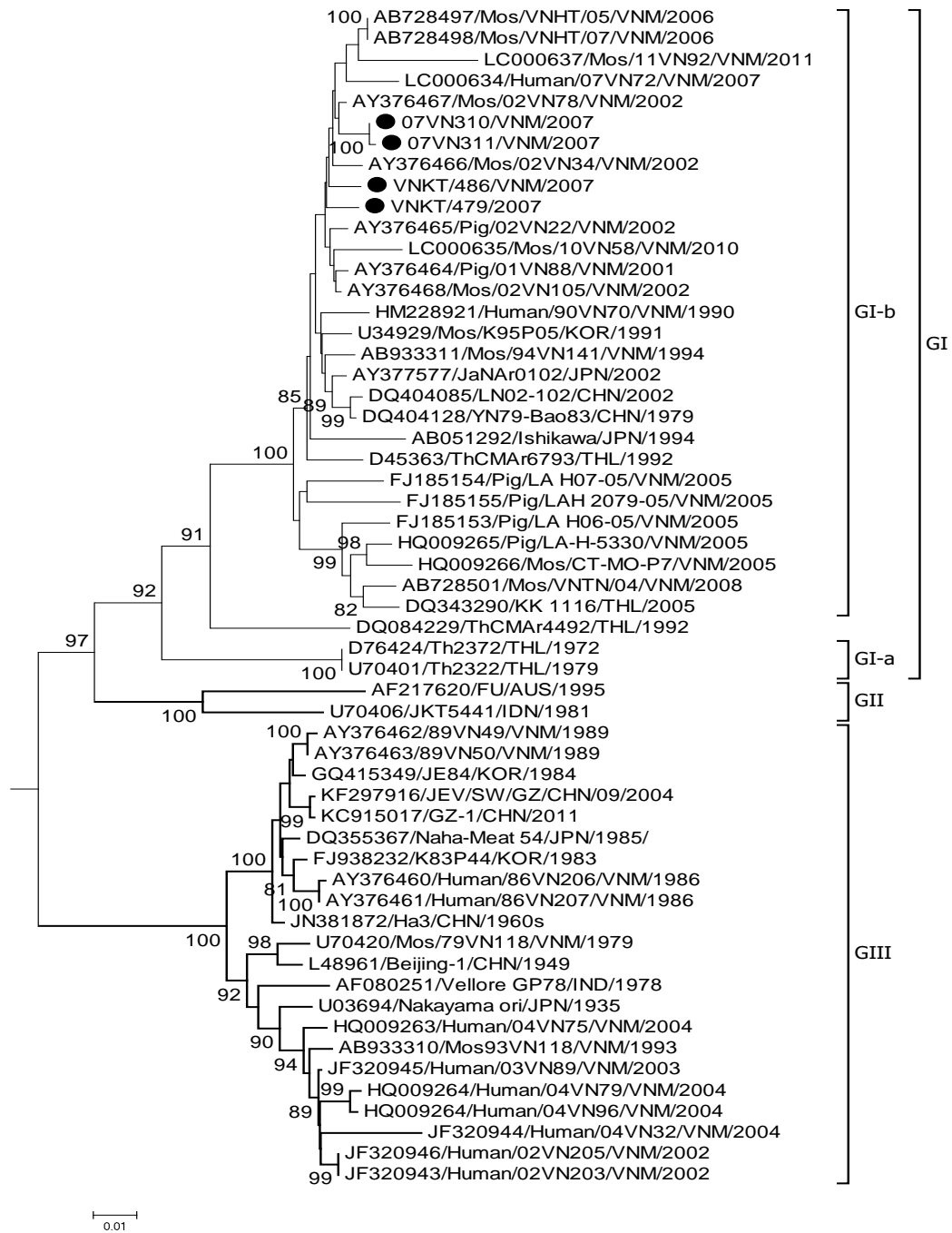
LOCUS 18VN139Q-ER\_D08.ab1 421 bp DNA linear UNA 20-DEC-2019  
 DEFINITION .  
 ACCESSION urn.local...1t1-bn90muq  
 VERSION urn.local...1t1-bn90muq  
 KEYWORDS .  
 SOURCE  
 ORGANISM .  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 ORIGIN  
 1 agtttgaggt aggtttcagc agacttctct gaccgcacca ttagttagttagt ttgtcgccac  
 61 atgtacgcca tacaactgca ttgctggatcc ggaagagca gttcacacag tacagttagt  
 121 gtacgtacac ttaggagcag aaggtagggt tactaaaaag gaaactgaaa cccaattgcc  
 181 ccagccgcag tcgcccactcc gtccagctcg gcctcgatcc ggccactctg gggcccggcc  
 241 gtcgtcggtc agtcagtggc cgacaaaat gggcatgcac gcgcgcaaac cacttctctc  
 301 tttctctgct gctgctgcca ctttctctcg atgtgaacaa cgagcgacga cgcgccacc  
 361 caagcaagca agggcccaa aaggtaggaaa ttaaataatt tacgcattgt ttgcctgatg  
 421 t

//

### **Hình 3.9. Trình tự nucleotide vùng gen của chủng 18VN139 chạy giải trình tự với cặp môi JE-Ef và JE-Ev của vi rút viêm não Nhật Bản**

Kết quả giải trình tự của 5 chủng vi rút phân lập 2018 có ký hiệu 18VN76, 18VN77, 18VN129, 18VN130 và 18VN139 cho thấy độ dài trình tự đọc mẫu chỉ thu được khoảng 390bp–420bp với mỗi loại môi đối với cả 5 chủng này được minh họa bằng độ dài trình tự đoạn đọc mẫu của chủng vi rút có ký hiệu 18VN139 chạy với môi xuôi và môi ngược, tương ứng là 394bp và 421bp. Cả hai trình tự này đều không định dạng được bằng BLAST trên cơ sở dữ liệu NCBI.

Để định loại, 5 chủng vi rút này được giải trình tự bằng phương pháp NGS, chủng có kết quả tương đồng cao (99%) với chủng vi rút Manglie (MH807827.1), nhưng là 0% với chủng vi rút Nakayama (EF571853.1). Việc nghiên cứu liên quan đến đặc điểm phân tử về chủng vi rút mới này ở Tây Nguyên sẽ được tiếp nối trong thời gian tiếp theo.



**Hình 3.10. Cây phát sinh loài được xây dựng từ trình tự nucleotide vùng gen E của một số chủng vi rút viêm não Nhật Bản phân lập từ muỗi *Culex* ở khu vực Tây Nguyên**

Cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên trình tự nucleotide toàn bộ vùng gen E gồm 1500bp của các chủng vi rút VNNB phân lập từ muỗi *Culex* ở một số tỉnh ở khu vực Tây Nguyên, 2007. Phân tích trên cây phát sinh loài, xác định cả 4 chủng vi rút có ký hiệu 07VN310, 07VN311, 07VN479 và 07VN486 là những chủng vi rút phân lập từ muỗi *Culex* thu thập ở tỉnh Gia Lai và Kon Tum ở khu vực Tây Nguyên là vi rút VNNB genotype I (GI). Nghiên cứu này, không phát hiện được chủng vi rút VNNB genotype III và genotype V ở một số tỉnh của khu vực Tây Nguyên từ các mẫu muỗi *Culex* thu thập, 2005-2018.

Trong nghiên cứu này, có 4 chủng vi rút VNNB bao gồm 2 chủng vi rút VNNB phân lập từ *Cx.tritaeniorhynchus* và 2 chủng vi rút VNNB phân lập từ *Cx. vishnui* có trình tự nucleotide vùng gen E đã đăng ký và được cấp mã số trong ngân hàng gen để có cơ sở dữ liệu chia sẻ trong cộng đồng các nhà khoa học cũng như cần phân tích đặc điểm phân tử của 4 chủng vi rút VNNB phân lập ở khu vực Tây Nguyên với các mã số HM228922, HM2289923, AB728500 và AB728499.

**Bảng 3.19. Độ khác biệt ở mức nucleotide giữa các vi rút viêm não Nhật Bản GI ở Tây Nguyên với Việt Nam và khu vực**

<b>Genotype</b>	<b>Tiêu chí so sánh</b>	<b>p-distance</b>	<b>Khoảng giá trị</b>
Genotype I	Giữa các vi rút VNNB GI ở một số tỉnh của khu vực Tây Nguyên	1,4%	0,1%–1,8%
	Giữa các vi rút VNNB GI ở Tây Nguyên và các GI ở Việt Nam	2,7%	1,1%–4,9%
	Giữa các vi rút VNNB GI ở Tây Nguyên và các GI trong khu vực	4,8%	1,6%–9,1%

Phân tích, so sánh trình tự vùng gen E của các chủng vi rút VNNB GI ở Tây Nguyên với các chủng vi rút VNNB GI ở Việt Nam và khu vực cho thấy, sự khác biệt về mặt nucleotide giữa bốn chủng vi rút VNNB phân lập từ muỗi *Culex* ở khu vực Tây Nguyên trung bình là 1,4% (0,1%–1,8%). Còn sự khác biệt giữa các chủng vi rút VNNB GI ở khu vực Tây Nguyên với các chủng vi rút VNNB phát hiện được tại Việt Nam trong giai đoạn từ 1994 đến 2017 trung bình là 2,7% (1,1%–4,9%). Kết quả so sánh sự khác biệt ở mức nucleotide giữa các chủng vi rút VNNB ở khu vực Tây Nguyên với các chủng GI khác trong khu vực như Thái Lan, Nhật Bản, Cam Pu Chia, Hàn Quốc, Trung Quốc, v.v. (gọi chung là Châu Á Thái Bình Dương) trung bình là 4,8% (1,6%–9,1%).

**Bảng 3.20. Đặc điểm các acid amin thay thế của vi rút viêm não Nhật Bản GI phát hiện ở khu vực Tây Nguyên so với chủng genotype I chuẩn**

STT	Vị trí amino acid	Amino acid thay thế		Kiểu thay thế
		Chủng chuẩn	Vi rút VNNB ở Tây Nguyên	
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

Trình tự acid amin vùng gen E của 4 chủng vi rút VNNB phân lập ở một số tỉnh của khu vực Tây Nguyên được phân tích bằng phần mềm Mega v7.0. Kết quả so sánh trình tự acid amin của 4 chủng vi rút VNNB này với chủng chuẩn phát hiện có 8 vị trí thay đổi acid amin vùng gen E, với kiểu thay thế không bảo tồn. Trong đó, có tới 3 vị trí biến đổi acid amin thành Ser, cụ thể ở vị trí acid amin E414: Leu chuyển thành Ser, E427: Lys chuyển thành Ser và E603: Arg chuyển thành Ser.

**Bảng 3.21. Kiểu Haplotype của vi rút viêm não Nhật Bản phân lập ở khu vực Tây Nguyên**

Ký hiệu chủng	Vị trí acid amin trên gen E								Haplotype
	10	34	36	65	123	209	227	408	
07VN310	D	M	N	V	A	L	S	S	NKSS
07VN311	D	M	N	V	A	L	S	S	NKSS
07VN479	D	M	N	V	S	L	S	S	SKSS
07VN486	N	S	N	V	S	L	S	S	SKSS

Kết quả phân tích haloptype của 4 chủng vi rút VNNB phân lập ở 4 vị trí acid amin tương ứng là 123, 209, 227 và 408 được dự đoán là nơi chịu áp lực của chọn lọc lần lượt là NKSS (Asparagine-Lysine-Serine-Serine) với hai chủng vi rút VNNB có ký hiệu 07VN310 và 07VN311; SKSS (Serin-Lysine-Serine-Serine) với hai chủng vi rút VNNB có ký hiệu là 07VN479 và 07VN486.

## **Chương 4**

### **BÀN LUẬN**

#### **4.1. Thực trạng viêm não Nhật Bản tại 4 tỉnh khu vực Tây Nguyên, 2005-2018**

Có nhiều nguyên nhân gây HCVNC trong đó nguyên nhân hàng đầu gây bệnh cho trẻ em ở khu vực châu Á Thái Bình Dương là vi rút VNNB do muỗi truyền, với số mắc hàng năm gần 68.000 trường hợp, tử vong 20.400 trường hợp, tỷ lệ di chứng thần kinh vĩnh viễn hoặc di chứng tâm thần chiếm 30%-50%, biện pháp hiệu quả nhất để phòng bệnh cho người là sử dụng vắc xin [49;52;132].

Ngay sau khi vi rút VNNB được phát hiện ở Nhật Bản 1935, phát triển vắc xin dự phòng bệnh đã được thực hiện từ năm 1945 và đến những năm 1960 vắc xin VNNB đã được sử dụng để phòng bệnh cho người ở Nhật Bản bằng công nghệ vắc xin tinh chế sản xuất từ não chuột, đã góp phần khống chế bệnh VNNB ở Nhật Bản cũng như một số nước Bắc Á từ sau thập kỷ 80 cho đến nay [49]. Do vậy, theo chiến lược phòng bệnh VNNB, được sự hỗ trợ của WHO, công nghệ sản xuất vắc xin này đã chuyển giao cho Việt Nam từ những năm 1990 để sản xuất vắc xin phòng VNNB theo phương pháp hóa lý của Takaku là một phương pháp sản xuất vắc xin tiên tiến, ứng dụng các kỹ thuật hiện đại về vi rút học, sinh hóa học và miễn dịch học. Vắc xin của Việt Nam có chất lượng phù hợp với tiêu chuẩn của Tổ chức y tế thế giới và của Viện Biken, Nhật Bản. Hiệu lực sử dụng vắc xin này trên thực địa khi so sánh với vắc xin VNNB của Viện Biken cho 203 trẻ em từ 02-04 tuổi ở huyện Gia Lương, Hà Bắc đã xác định 100% trẻ em được tiêm phòng vắc xin có đáp ứng kháng thể đối với cả hai loại vắc xin này [47].

Trên thực tế, việc triển khai tiêm vắc xin phòng VNNB được cho là hữu hiệu nhất để dự phòng mắc bệnh, nhưng giải pháp này cũng gặp một số khó khăn như: quy mô tổ chức triển khai, sự chấp nhận của cộng đồng, đặc biệt sự hiểu biết về bệnh VNNB, nguồn lực, v.v.. Ở Việt Nam, vắc xin VNNB được đưa vào chương trình tiêm chủng mở rộng từ 1997 để dự phòng bệnh cho nhóm trẻ từ 1-5 tuổi cho các tỉnh trọng điểm dịch ở miền Bắc [33;34;42;47;93]. Cho đến nay, vắc xin VNNB đã được tăng cường sử dụng trên cả 63 tỉnh, thành ở Việt Nam để phòng bệnh cho trẻ em, nhằm góp phần làm giảm tỷ lệ mắc VNNB. Để đánh giá hiệu quả dự phòng vắc xin VNNB cần có giám sát/chẩn đoán huyết thanh học để khẳng định, vì nếu dựa vào triệu chứng lâm sàng rất khó phân biệt HCVNC do vi rút VNNB hay do một số tác nhân vi rút khác như vi rút đường ruột, vi rút herpes, v.v. [76;104;116]. Có một số kỹ thuật thường được sử dụng trong chẩn đoán xác định VNNB, nhưng kỹ thuật được sử dụng phổ biến hiện nay là kỹ thuật MAC-ELISA để phát hiện kháng thể IgM kháng vi rút VNNB [15;30;126].

Trong nghiên cứu này, tỷ lệ mắc HCVNC do vi rút ở 4 tỉnh thuộc khu vực Tây Nguyên trong giai đoạn 2005-2018 được xác định là 1,21/100.000 dân thấp hơn so với năm 1984 là 5,96 [7;14]. Trong số 713 trường hợp HCVNC do vi rút được xét nghiệm xác định VNNB bằng kỹ thuật MAC-ELISA đã xác định có 168 trường hợp bị VNNB tỷ lệ xác định VNNB dương tính là 23,56% và tỷ lệ mắc VNNB trên 100.000 dân trung bình là 0,29 (0,04-0,76) trong giai đoạn 2005- 2018 (Bảng 3.1). Kết quả nghiên cứu này cao hơn so với kết quả nghiên cứu của Dương Thị Hiền & CS tại Bắc Giang giai đoạn 2006-2015 [15], tỷ lệ mắc VNNB trên 100.000 dân trung bình là 0,25 (0,06-0,65), nhưng thấp hơn nhiều so với kết quả nghiên cứu Phan Thị Ngà, Nguyễn Thị Kiều Anh và cộng sự, nghiên cứu giai đoạn 1979-1990 ở miền Bắc Việt Nam, tỷ lệ mắc VNNB trên 100.000 dân dao động từ 1,62 (1990) đến 5,96 (1984), và tỷ lệ xét nghiệm



VNNB dương tính ở trẻ <15 tuổi dao động 50-70 trong số các trường hợp HCVNC.

Tỷ lệ tử vong do VNNB giai đoạn 2005-2018 là 0,06/100.000 dân, thấp hơn so với năm 1990 là 0,18/100.000 dân; năm 1983 là 0,76/100.000 dân [7;30] Kết quả nghiên cứu cũng phù hợp với tình hình chung của bệnh viêm não Nhật Bản hiện nay trong khu vực và thế giới. Viêm não Nhật Bản được ghi nhận mắc cao trong những thập niên 70 của thế kỷ 19 cho đến những thập niên 80 của thế kỷ 20, sau đó giảm dần vào những thập niên tiếp theo của thế kỷ 20. Hiện tại vẫn ghi nhận số mắc tại các ổ dịch rải rác, tuy nhiên không bùng phát thành dịch. Kết quả này đã được khẳng định vai trò của vắc xin phòng viêm não Nhật Bản: ở Nhật Bản, ngay từ năm 1945 đã nghiên cứu tiêm phòng cho người và súc vật. Các tài liệu thống kê cũng đã chứng minh rõ ràng hiệu lực của biện pháp này [17;112]. Tại Trung Quốc, đã dùng vắc xin tiêm phòng hàng năm cho khoảng 70 triệu trẻ em. Ấn Độ, đã sản xuất được 2 triệu liều vắc xin vào năm 1986 (Umenai T và cộng sự, 1985) [17;112]. Ở Việt Nam, Viện Vệ sinh dịch tễ học đã điều chế sản xuất được một loại vắc xin từ năm 1974 (Đỗ Quang Hà và cộng sự, 1974). Từ năm 1971 – 74 đã tổ chức tiêm thí điểm vắc xin phòng viêm não Nhật Bản này cho 109.047 trẻ em từ 1 – 10 tuổi ở nhiều địa phương thuộc các tỉnh Hà Bắc, Bắc Thái, Hà Nội và Hải Phòng. Sau 4 năm nhận thấy tỷ lệ bảo vệ của vắc xin này là 72,3% (Đỗ Quang Hà và cộng sự, 1975) [17;112].

Tại các tỉnh trong khu vực Tây Nguyên, giám sát VNNB được thực hiện trong các năm 2000-2001, xác định được 21 trường hợp VNNB, phân bố tại Gia Lai, Kon Tum và Đắk Lắk [23]. Trong những năm 2002-2005, phát hiện được trên 283 trường hợp viêm não, trong đó 50 trường hợp tử vong. Riêng tại Gia Lai đã ghi nhận được 46 ca VNNB từ 74 bệnh phẩm của bệnh nhân có hội chứng não cấp (HCVNC) [7;43]. Trong giai đoạn 2005-2018, các trường hợp HCVNC do vi

rút và VNNB được ghi nhận ở tất cả 4 tỉnh của khu vực Tây Nguyên, nhưng tập trung nhiều nhất tại tỉnh Gia Lai với số mắc HCVNC được ghi nhận cao nhất 594/713 trường hợp, chiếm 83,31% tổng số ca HCVNC của khu vực Tây Nguyên. Tương tự như vậy có 131/168 trường hợp VNNB, chiếm 77,98% tổng số ca VNNB của khu vực Tây Nguyên (Hình 3.1). Tỷ lệ mắc VNNB trên 100.000 dân trong giai đoạn này tại Gia Lai rất cao 0,7 (0,15-1,41) so với kết quả nghiên cứu của Dương Thị Hiền & CS tại Bắc Giang giai đoạn 2006-2015 [15], tỷ lệ mắc VNNB trên 100.000 dân trung bình là 0,25 (0,06-0,65). Các tỉnh còn lại, Kon Tum, Đắk Lắk, Đắk Nông, có tỷ lệ mắc VNNB trên 100.000 dân lần lượt là 0,23; 0,07; 0,05 (Bảng 3.2) đều thấp hơn kết quả nghiên cứu tại Bắc Giang giai đoạn 2006-2015 [15].

Mặc dù VNNB đã được phát hiện ghi nhận ở nước ta từ những năm đầu thập niên 50 của thế kỷ trước, tuy nhiên những ca VNNB này chỉ tập trung phát hiện tại khu vực các tỉnh miền Bắc và Miền Nam, khu vực Tây Nguyên được triển khai hệ thống giám sát phát hiện kể từ năm 2000 cho đến nay. Do vậy dẫn liệu về VNNB khu vực Tây Nguyên những năm 2000 trở về trước rất hạn chế để nghiên cứu có thể sử dụng, phân tích. Việc tiêm vắc xin VNNB được triển khai theo quy mô chiến dịch lần đầu tiên tại Gia Lai từ tháng 6/2004 cho tới nay, và phải chăng đó cũng là lý do tại Gia Lai ghi nhận số ca mắc viêm não Nhật Bản cao vào những năm trước thời điểm tiêm vắc xin. Còn tại Gia Lai có số mắc VNNB cao hơn các tỉnh còn lại của khu vực Tây Nguyên, có thể do điều kiện môi trường tự nhiên và thói quen canh tác của người địa phương, cũng như tỷ lệ bao phủ, tiếp cận vắc xin còn hạn chế là những yếu tố liên quan đến số mắc VNNB gia tăng, và rất cần có những phát triển nghiên cứu chuyên ngành sâu hơn để làm rõ điều này.

Ở Việt Nam, từ năm 1953, hai tác giả người Pháp là Puyuelo H. và Pre'vot M. đã công bố về 98 trường hợp VNNB trong quân đội viễn chinh Pháp được phát hiện tại miền Bắc Việt Nam. Tiếp đến vụ dịch VNNB được xác định lần đầu tiên ở Việt Nam từ những năm 1960s, do tính đặc thù của điều kiện địa lý, dịch VNNB thường xảy ra về mùa hè ở miền Bắc còn ở miền Nam các ca bệnh VNNB xảy ra có tính rải rác quanh năm [15;30;132]. Trong nghiên cứu này, 713 trường hợp HCVNC do vi rút được ghi nhận quanh năm, trong đó có 168 trường hợp VNNB, được phân bố theo thời gian trong năm, những tháng đầu năm số ca mắc thấp, tăng dần vào những tháng mùa hè và đạt đỉnh số mắc cao vào tháng 6, sau đó giảm dần tới những tháng cuối năm (Hình 3.2). Số mắc VNNB ở người liên quan đến chu kỳ phát triển của véc tơ truyền bệnh muỗi *Culex* vào những tháng nóng, có mưa, thời điểm muỗi sinh sản phát triển ở vùng trồng lúa nước và còn tùy thuộc vào hoạt động canh tác của người địa phương. Hình 3.3, trong nghiên cứu cho thấy trong giai đoạn 2005- 2018, tại khu vực Tây Nguyên, muỗi *Culex* thu thập được nhiều vào thời điểm tháng 6 (3.521 cá thể) và đỉnh cao tháng 7 (4.694 cá thể). Điều này có thể đưa ra nhận định, có sự liên quan về chu kỳ của muỗi *Culex* tại khu vực Tây Nguyên là phát triển mạnh vào những tháng (hè) đầu mùa mưa (tháng 6, 7), thì số ca mắc VNNB vào những tháng này tại khu vực Tây Nguyên cũng ghi nhận nhiều nhất và đạt đỉnh vào tháng 6 (Hình 3.2). Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với số liệu nghiên cứu của một số tác giả trong và ngoài nước cho rằng VNNB được ghi nhận chủ yếu trong các tháng mùa hè [4;13;119;131].

Đối chiếu với nghiên cứu của một số tác giả tại các tỉnh/thành khác ở Việt Nam, như sự 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 cao vào những tháng mùa hè, số mắc vào mùa hè từ tháng 5 đến tháng 9 chiếm 73%

tổng số các trường hợp mắc trong năm, nhưng đối với 3 khu vực còn lại của Việt Nam như miền Trung, miền Nam và Tây Nguyên, các trường hợp HCVNC được ghi nhận có tính chất rải rác quanh năm và ít trầm trọng hơn khu vực miền Bắc [132].

Bệnh VNNB do muỗi *Culex* mang vi rút truyền, bệnh không truyền trực tiếp từ người sang người, mà qua véc tơ truyền bệnh, nên người được coi là vật chủ cuối cùng của chu trình lưu hành vi rút VNNB trong tự nhiên [99]. Ở miền Bắc 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 [31]. Đây là điều kiện để dịch VNNB thường xảy ra vào mùa hè ở những vùng cận nhiệt đới ở khu vực châu Á, với đỉnh cao của dịch thường ghi nhận trong các tháng hè chiếm khoảng 70% số ca bệnh trong năm [4;52].

Trong nghiên cứu này, các trường hợp HCVNC do vi rút và VNNB được ghi nhận ở tất cả 4 tỉnh, Gia Lai, Đắk Lắk, Kon Tum, Đắk Nông, trong đó có tới 90% (45/50) huyện ghi nhận có HCVNC, đáng chú ý có tới 66% (33 huyện) trên tổng số huyện (50) trong giai đoạn này tại 04 tỉnh Tây Nguyên được ghi nhận mắc VNNB (Bảng 3.3), trong đó Gia Lai có số huyện mắc VNNB cao nhất khu vực với tỷ lệ 88,24% (15/17) huyện mắc VNNB cao nhất khu vực. Số liệu cho thấy, các ca bệnh VNNB mắc rải rác, có sự lưu hành, phủ khắp các huyện, không tập trung một địa điểm cố định.

Điều tra một số đặc điểm về dịch tễ huyết thanh học của 168 trường hợp VNNB được xác định ở 4 tỉnh của khu vực Tây Nguyên trong các năm 2005-2018, cho thấy bệnh được ghi nhận ở mọi lứa tuổi từ trẻ dưới 1 tuổi đến người

lớn 70 tuổi. Tuy nhiên, tỷ lệ số mắc tập trung cao nhất ở nhóm dưới 15 tuổi chiếm 69,64%, trong đó nhóm 5-9 tuổi là 30,36%, tiếp đến là nhóm từ 1-4 tuổi và nhóm 10-14 tuổi với tỷ lệ tương ứng là 23,80 và 13,10%, nhóm trẻ <1 tuổi tỷ lệ số mắc rất thấp chỉ có 2,38%, nhóm  $\geq 15$  tuổi tỷ lệ số mắc VNNB chiếm 30,36% (Bảng 3.4). Kết quả này tương đối phù hợp với kết quả nghiên cứu của Phan Thị Nga, Nguyễn Thị Kiều Anh và cộng sự (2000-2001), cho thấy bệnh VNNB xảy ra chủ yếu ở trẻ em dưới 15 tuổi chiếm tỷ lệ 83,18% tổng số ca mắc. Số mắc VNNB ở nhóm >15 là 30,36% có xu hướng cao hơn so với những năm trước đây khi tỷ lệ số mắc VNNB ở nhóm này chiếm khoảng 10% [14;30]. Đáng chú ý, mặc dù VNNB xảy ra chủ yếu ở nhóm trẻ <15 tuổi ở khu vực Tây Nguyên, nhưng tỷ lệ số mắc VNNB ở nhóm trẻ 1-4 tuổi chỉ có 2,38% (Bảng 3.4), thấp hơn so với một số nghiên cứu trước đây đây thường ghi nhận khoảng 12-15%, điều này cho thấy có thể do tác động của việc sử dụng vắc xin dự phòng cho nhóm trẻ 1-5 tuổi [7;15;33;132].

Theo kết quả nghiên cứu của nhiều tác giả trong và ngoài nước cho thấy, sự phân bố bệnh VNNB theo nhóm tuổi có thể thay đổi giữa các miền vùng sau khi tăng cường sử dụng vắc xin dự phòng bệnh. Nhìn chung, ở những vùng lưu hành vi rút VNNB, ca bệnh VNNB chủ yếu gặp ở trẻ em <15 tuổi. Còn những vùng không có vi rút VNNB lưu hành, các nhóm tuổi đều có thể mắc bệnh do chưa có miễn dịch với vi rút, nếu chưa sử dụng vắc xin dự phòng [49;52;123].

Ở một số nước khác như 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, trong năm 2006 có 73% số ca bệnh VNNB <17 tuổi trong số 72 ca mắc VNNB tại Metro Manila, Luzon và Visayas. Tương tự như vậy,

năm 2013, theo kết quả giám sát tại 5 bệnh viện của Philippines khoảng 64% trường hợp mắc VNNB ở nhóm trẻ 2-9 tuổi [123].

Theo số liệu thống kê của Tổ chức Y tế Thế giới, ở các nước Nam Á, hiện đang là khu vực trọng điểm ghi nhận bệnh VNNB, hầu hết số mắc VNNB là <10 tuổi do tỷ lệ bao phủ vắc xin VNNB dự phòng bệnh còn thấp. Còn 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 [128].

Nghiên cứu về sự phân bố ca bệnh VNNB theo nhóm tuổi ở Trung Quốc đại lục giai đoạn 2004–2014, cho thấy tỷ lệ số mắc VNNB ở trẻ em đã được giảm đáng kể do việc tăng cường sử dụng vắc xin phòng bệnh. Tuy nhiên, tỷ lệ số mắc VNNB ở người lớn đã tăng ở một số vùng của Trung Quốc. Trong nhóm người trưởng thành, đặc biệt là đối với những người trên 40 tuổi, các trường hợp VNNB tập trung chủ yếu ở khu vực phía bắc sông Dương Tử. Tỷ lệ mắc VNNB ở nhóm người lớn thường được ghi nhận vào tháng 09 và tháng 10 cao hơn đáng kể so với các nhóm khác do vắc xin được sử dụng dự phòng chủ yếu cho trẻ em, đây là một vấn đề sức khỏe cộng đồng cần được quan tâm khi các trường hợp VNNB gia tăng đối với người lớn cao hơn so với trẻ em. Do đó, các nghiên cứu về sự cần thiết và tính khả thi của việc sử dụng vắc xin VNNB dự phòng cho người lớn sống ở các vùng lưu hành vi rút VNNB trở thành trọng tâm mới để khống chế bệnh VNNB trong tương lai [1;66;133].

Tỷ lệ mắc VNNB theo giới tại 4 tỉnh Tây Nguyên, 2005- 2018, cho thấy nam giới mắc VNNB (59,52%), cao hơn nữ giới (40,48%), trong đó tại tỉnh Gia Lai, nam 60,31% (79/131) cao hơn nữ 39,69% (52/131). Các tỉnh khác, Đắk Lắk,

Đắk Nông tỷ lệ mắc ở 2 giới không có chênh lệch nhiều, riêng tại Kon Tum tỷ lệ nam mắc 71,43 (10/14 ca), nữ 28,57% (4/14 ca), (Bảng 3.9). Mặc dù không có sự khác biệt rõ ràng về tỷ lệ mắc giữa nam và nữ trong nghiên cứu này, nhưng số liệu cũng cho thấy nam có xu hướng mắc nhiều hơn nữ và tương tự nhận xét ở một số nghiên cứu khác trên địa bàn cả nước. Theo Lê Đức Hình khảo sát tại Bệnh viện Bạch Mai, phân tích 116 bệnh án trong thời gian 1978 -1980, thấy có 68 nam và 48 nữ [18], tác giả Đoàn Thị Ngọc Diệp nghiên cứu tại Bệnh viện Nhi đồng I - Thành phố Hồ Chí Minh, giai đoạn 1997-2000 với 114 bệnh nhân, nam là 64,04% [11].

Trong số 168 ca mắc VNNB tại 4 tỉnh Tây Nguyên tại nghiên cứu này, tỷ lệ mắc ở người Gia Rai chiếm cao nhất 70,83% (119/168), tiếp đến các dân tộc khác như Xơ Đăng, Ê Đê, M'Nông, v.v. chiếm 16,07% (27/168), người Kinh chiếm 13,10 (22/168), (Bảng 3.10). Và tại Gia Lai có tới 131 ca chiếm đa phần số mắc VNNB trong 4 tỉnh của khu vực Tây Nguyên. Riêng ở tỉnh Gia Lai thì người Gia Rai chiếm tỷ lệ nhiều nhất 90,84% (119/131) sau đó ở người Kinh (Bảng 3.10), kết quả này cao hơn nghiên cứu trước đây của Đặng Tuấn Đạt &Cs tại Gia Lai, 2003- 2007, tỷ lệ VNNB người dân tộc Gia Rai chiếm 59,7% [9]. Đáng chú ý không ghi nhận ca mắc VNNB ở nhóm người Ba Na, Xơ Đăng, v.v. tại Gia Lai, cũng như tỷ lệ mắc ở người Kinh tại tỉnh này 9,16% (12/131), thấp hơn nghiên cứu của Đặng Tuấn Đạt tại Gia Lai, 2003- 2007, tỷ lệ người Ba Na mắc chiếm 17,1%; dân tộc Kinh chiếm 23,2% [9;7]. Tại Kon Tum số mắc VNNB chỉ ghi nhận ở dân tộc tại chỗ người Xơ Đăng là 100%; tại Đắk Lắk, người Ê Đê là 63,16%, nhưng tại Đắk Nông chỉ ghi nhận 1 ca (25%) người M'Nông (Bảng 3.10). Như vậy, có thể lý giải tỷ lệ mắc VNNB chủ yếu ở người Gia Rai do liên quan đến điều kiện môi trường sống theo phong tục của người bản địa, có chuồng heo, bò nuôi xung quanh, sát nhà hoặc dưới sàn nhà sàn, và

sống tại những nơi trũng thấp để canh tác trồng lúa, hoa màu, là điều thuận lợi để véc tơ là muỗi *Culex* phát triển mạnh vào mùa mưa. Do vậy, tại những khu vực có bệnh nhân VNNB, điều tra thu thập muỗi cần được thực hiện để làm sáng tỏ mối liên quan giữa véc tơ và bệnh VNNB ở người như một số nghiên cứu khác đã đề cập [7]. Bên cạnh đó việc sử dụng vắc xin để phòng bệnh VNNB là rất quan trọng, do vậy việc thu thập mô tả đầy đủ thông tin về tình hình tiêm vắc xin tại các tỉnh trong khu vực Tây Nguyên về tỷ lệ tiêm đầy đủ, đúng liều, đúng lịch, có vùng nào chưa được tiêm chủng, trong đó cần lưu ý các vùng sâu, vùng xa, vùng đồng bào dân tộc thiểu số đã được tiêm đầy đủ theo dự án tiêm chủng mở rộng Quốc gia? Đặc biệt đánh giá so sánh tỷ lệ tiêm vắc xin VNNB tại những nơi ghi nhận mắc VNNB với các vùng khác? Rất cần có những đề tài khảo sát đầy đủ chi tiết về hiệu quả tiêm vắc xin VNNB tại những vùng này.

#### **4.2. Thành phần loài, phân bố và tỷ lệ nhiễm vi rút viêm não Nhật Bản của muỗi thuộc giống *Culex* ở khu vực Tây Nguyên, 2005-2018**

Vi rút VNNB là một loại vi rút do muỗi *Culex* truyền, đây là loài muỗi thích hút máu lợn, gia súc hơn là máu gà và người vào lúc tối, khác với loài muỗi *Aedes* thường thích hút máu người vào ban ngày đặc biệt vào buổi sáng và trước lúc hoàng hôn [67;72;93]. Đây là cơ sở để xây dựng kế hoạch thu thập muỗi *Culex* cho mục đích xác định thành phần loài và tỷ lệ nhiễm vi rút VNNB trên quần thể muỗi. Để xác định các loài muỗi mang vi rút/véc tơ truyền vi rút phải dựa trên kết quả phân lập và định loại được vi rút từ muỗi. Vi rút VNNB rất thích ứng trên tế bào C6/36 đây là dòng tế bào được sử dụng rộng rãi để phân lập vi rút VNNB [12;41;51].

Trong nghiên cứu này, để xác định thành phần loài và tỷ lệ nhiễm tối thiểu vi rút VNNB trên muỗi *Culex* ở 4 tỉnh của khu vực Tây Nguyên được thực hiện với các lần thu thập muỗi ở những điểm có bệnh nhân VNNB được xác định



trong giai đoạn, 2005-2018. Trong số các loài muỗi *Culex* thu thập, còn sống được lưu giữ để phân lập vi rút VNNB trong các năm 2005- 2018 ở 4 tỉnh thuộc khu vực Tây nguyên đó là các tỉnh Gia Lai, Kon Tum, Đắk Lắk và Đắk Nông. Có 9 loài muỗi *Culex* được thu thập gồm 14.091 cá thể để phân lập VNNB, chiếm ưu thế nhất là *Cx. tritaeniorhynchus* chúng có mặt ở hầu khắp các điểm điều tra, với tỷ lệ 43,06%, tiếp đến là *Cx. vishnui* chiếm tỷ lệ 36,17%, *Cx. fuscocephala* chiếm tỷ lệ 6,58%, còn 06 loài khác thu thập được tỷ lệ thấp dao động trong khoảng 0,41%–5,65%. Riêng tại tỉnh Gia Lai thu thập được 2 loài muỗi là *Cx. pseudovishnui* (58 cá thể) và *Cx. whitmorei* (66 cá thể) trong giai đoạn 2005-2007 (Bảng 3.11).

Trong từng khoảng thời gian khác nhau, thành phần loài và sự phân bố của loài *Culex* ở khu vực Tây Nguyên cũng có sự thay đổi, ví dụ như trong giai đoạn 2005-2007, loài *Cx. tritaeniorhynchus* chiếm tỷ lệ cao là 51,69% (Bảng 3.12) nhưng trong giai đoạn 2012-2014, loài *Cx. vishnui* chiếm tỷ lệ cao là 41,80% (Bảng 3.13) và giai đoạn 2017-2018 loài *Cx. tritaeniorhynchus* lại chiếm tỷ lệ ưu thế là 32,26% (Bảng 3.14). Riêng các loài *Cx. whitmorei* và *Cx. pseudovishnui* chỉ có ở Gia Lai mặc dù số lượng ít, nhưng cho thấy có sự khác biệt rất rõ ràng về phân bố, số lượng các loài muỗi ở các tỉnh khác nhau giữa các tỉnh của khu vực Tây Nguyên (Bảng 3.11), sự khác biệt này có thể do điều kiện địa lý, đặc điểm sinh thái khác nhau. Kết quả nghiên cứu này cũng tương tự như một số nghiên cứu khác trước đây trong giám sát véc tơ truyền vi rút VNNB tại Việt Nam của nhóm nghiên cứu CDC Fort Collins Hoa Kỳ kết hợp với Viện Vệ sinh dịch tễ Trung Ương đã thu thập muỗi ở 4 tỉnh gần Hà Nội trong tháng 6 năm 2002, tháng 7 và tháng 8 năm 2004 để phân lập vi rút VNNB. Trong tổng số 20.165 cá thể muỗi thu thập gồm có 19 loài muỗi được trộn thành 1.122 mẫu muỗi để phân lập vi rút. Trong tháng 6/2002, mặc dù cùng điều kiện sinh thái

tương tự nhau ở 4 điểm thu thập mẫu, thành phần loài cũng khác nhau rất rõ rệt giữa các điểm thu thập. Cụ thể ở Cát Quế Hà Tây, loài chiếm ưu thế là *Cx. gelidus* chiếm 37%; ở Mễ Trì Hà Nội và Hồng Thái Bắc Giang, loài chiếm ưu thế lại là *Cx. tritaeniorhynchus*. Trong năm 2004, loài muỗi chiếm ưu thế là *Cx. tritaeniorhynchus* chiếm 51-81%, tiếp theo là *Cx. vishnui* (9-38%), còn các loài *Culex* khác chiếm một tỷ lệ rất thấp và hiếm ở tất cả các điểm nghiên cứu [51].

Trong nghiên cứu giám sát muỗi *Culex* truyền vi rút VNNB của nhóm nghiên cứu Nhật Bản kết hợp với nhóm nghiên cứu của Viện Vệ sinh dịch tễ Trung Ương, 2006-2008, tại 08 điểm nghiên cứu ở Việt Nam bao gồm các tỉnh ở miền Bắc (Hải Phòng, Hà Tây), miền Trung (Quảng Bình), miền Nam (Tây Ninh) và Tây Nguyên (Gia Lai, Kon Tum, Đắk Lắk, Đắk Nông). Kết quả giám sát về muỗi *Culex* trong giai đoạn này đã thu thập được 25 loài muỗi cái gồm có 10.407 cá thể để phân lập vi rút VNNB, có 3 loài cũng chỉ thu thập được 1 cá thể/loài, có những loài chỉ thu thập được dưới 10 cá thể. Nhưng loài muỗi chiếm tỷ lệ cao nhất vẫn là *Cx. tritaeniorhynchus* (34,4%), tiếp đến là *Cx. quinquefasciatus* (28,2%) và *Cx. vishnui* (11,0%), v.v. trong tổng số cá thể muỗi thu thập ở 8 tỉnh thành ở Việt Nam, 2006-2008 [83].

Trên thực tế, tùy theo từng vùng địa lý, sự phân bố những loài muỗi *Culex* được xác định là véc tơ truyền vi rút VNNB cũng khác nhau như các nghiên cứu đã được công bố. Tại Tây Nguyên, khi nghiên cứu về sự phân bố của các loài muỗi, các tác giả Đặng Tuấn Đạt, Nguyễn Ái Phương đã xác định có 41 loài muỗi thuộc phân họ *Culicinae* với rất nhiều loài khác nhau, cho thấy thành phần loài muỗi ở Tây Nguyên rất phong phú [7;23].

Số lượng cá thể muỗi thu được trong giai đoạn này cũng khác nhau giữa các thời điểm thu thập, số cá thể thu được nhiều nhất vào tháng 7 và tháng 6, tương ứng 4.694 cá thể chiếm 33,31%, và 3.521 chiếm 24,99%, (Hình 3.3). Đây

cũng là thời điểm ghi nhận số ca bệnh HCVNC và VNNB nhiều nhất trong năm, như tháng 6 với 129 ca HCVNC và 47 ca VNNB (Hình 3.2). Nhận định này, phản ánh sự phát triển mạnh của véc tơ VNNB và ghi nhận nhiều ca mắc VNNB tại khu vực Tây Nguyên: Muỗi *Culex* có quanh năm nhưng bắt đầu phát triển mạnh vào những tháng cuối mùa khô, đầu mùa mưa (tháng mùa hè) do điều kiện môi trường rất thuận lợi cho sự sinh trưởng, phát triển của véc tơ truyền bệnh VNNB. Kết quả này cũng tương tự như một số nghiên cứu khác của Đặng Tuấn Đạt & CS tại khu vực Tây Nguyên; Dương Thị Hiền, Phan Thị Nga & CS tại Bắc Giang [6;7;8;9;15]. Từ năm 1964 - 1968, Viện Sốt Rét- Ký Sinh Trùng- Côn Trùng Trung Ương và Viện Vệ sinh Dịch Tễ Trung Ương đã phối hợp điều tra, phân lập vi rút từ muỗi trên quy mô lớn, và đi tới nhận định là nhóm *Culex tritaeniorhynchus*, *Culex vishnui* có liên quan mật thiết đến mùa dịch VNNB. Song tất cả các phân lập vi rút từ muỗi đều không thành công. Năm 1971, tiếp tục tìm hiểu vai trò truyền bệnh của VNNB của muỗi ở nước ta. Nhằm xác định sự liên quan giữa các loài muỗi và dịch tễ bệnh viêm não ở thực địa (tại xã M.T, huyện Từ Liêm, Hà Nội và xã H.T, huyện Việt Yên, tỉnh Hà Bắc) cũng như sự cảm thụ của chúng trong thực nghiệm. Kết quả nghiên cứu đã rút ra nhận xét: Muỗi *Culex tritaeniorhynchus* có mật độ cao từ tháng 5-9; số bệnh nhân có hội chứng viêm não cấp phát hiện vào tháng 6-7. Trong thời gian từ tháng 5-9 đã phân lập được 3 chủng viêm não Nhật Bản từ muỗi *Culex tritaeniorhynchus*. Đồng thời tham khảo kết quả nghiên cứu trước đó, các tác giả đã khẳng định: *Culex tritaeniorhynchus* là một loài muỗi truyền bệnh viêm não Nhật Bản ở Việt Nam [46].

Trong nghiên cứu này cũng cho thấy loài *Cx. tritaeniorhynchus*; *Cx. vishnui* chiếm ưu thế trong giai đoạn 2005-2018 (Bảng 3.11), và trong từng thời

điểm cũng như địa điểm nơi có ca VNNB đều xác định có sự hiện diện của loài muỗi này, khẳng định vai trò véc tơ truyền bệnh chính của các loài muỗi này.

Tỷ lệ nhiễm tối thiểu vi rút VNNB trong quần thể muỗi *Culex*, sẽ được tính đối với loài muỗi phân lập được vi rút đã được khẳng định bằng kỹ thuật giải trình tự gen. Các mẫu muỗi thu thập từ thực địa được lưu giữ trong điều kiện âm sâu ở bình ni tơ lỏng để phân lập vi rút VNNB bằng dòng tế bào C6/36 làm minh chứng để khẳng định loài muỗi *Culex* nào trong nghiên cứu này là véc tơ hoặc có thể là véc tơ hay bị nhiễm vi rút VNNB. Cho đến nay đã xác định có khoảng 30 loài *Culex* là véc tơ truyền vi rút VNNB. Nhưng ở Việt Nam vi rút VNNB mới được phát hiện từ *Cx. tritaeniorhynchus*, *Cx. vishnui* *Cx. gelidus*, *Cx. quinquefaiatus* và *Cx. fuscocephala*, riêng ở Tây Nguyên trong nghiên cứu trước đây mới phát hiện được vi rút VNNB từ *Cx. tritaeniorhynchus* và *Cx.vishnui* [12;41].

Trong nghiên cứu này có 14.091 cá thể muỗi thuộc 9 loài muỗi được thu thập từ các điểm trên địa bàn 4 tỉnh Gia Lai, Kon Tum, Đắk Lắk và Đắk Nông của khu vực Tây Nguyên (Bảng 3.11). Có tổng số 540 mẫu muỗi *Culex* phân lập được thực hiện bao gồm các mẫu muỗi thu thập trong 2005-2007, 2012-2014 và 2017-2018 tương ứng với 138, 236 và 166 mẫu muỗi. Kết quả có 94 mẫu gây hiện tượng bệnh lý trên tế bào, nhưng chỉ có 9 mẫu được sàng lọc bằng kỹ thuật RT-PCR xác định có thể là vi rút VNNB, bao gồm 4 mẫu phân lập từ muỗi *Culex* 2007 và 5 mẫu phân lập từ muỗi *Culex* 2018 (Bảng 3.15). Tuy nhiên, để khẳng định kết quả phân lập vi rút cần dựa trên tiêu chuẩn vàng là giải trình tự vật liệu di truyền của vi rút, bằng kỹ thuật này, chỉ có 4 chủng vi rút phân lập 2007 được xác định là vi rút VNNB, còn 5 chủng vi rút được xác định không phải là vi rút VNNB mặc dù có kết quả đọc trình tự của mỗi đầu mỗi khoảng 390-420bp (Hình 3.7).

Đối chiếu với nghiên cứu trước đây của CDC Fort Collins Colorado Hoa Kỳ, kết hợp với Viện Vệ sinh dịch tễ Trung Ương để phát hiện các vi rút Arbo từ muỗi ở miền Bắc Việt Nam, phân lập vi rút được thực hiện với 1.122 mẫu muỗi được trộn từ 20.165 cá thể muỗi thu thập trong tháng 6/2002, tháng 7 và tháng 8/2004 bằng tế bào Vero, đã xác định có 44 mẫu gây hiện tượng bệnh lý trên tế bào, kết quả định loại xác định bằng giải trình tự đã xác định chúng là các chủng vi rút Sagiyama (14 chủng), vi rút Getah (15 chủng), vi rút Oya (13 chủng) và vi rút Akabane (4 chủng), nhưng rất ngạc nhiên là không phân lập được vi rút VNNB từ muỗi *Culex* thu thập, 2002-2004 ở miền Bắc Việt Nam [51]. Việc không phân lập được vi rút VNNB từ muỗi *Culex* thu thập ở những vùng lưu hành vi rút VNNB ở miền Bắc Việt Nam, có thể liên quan đến hệ thống tế bào phân lập vi rút là tế bào Vero, mặc dù đây là dòng tế bào cũng thích ứng với vi rút VNNB, nhưng dòng tế bào nhạy cảm và dùng rộng rãi để phân lập vi rút VNNB vẫn là tế bào muỗi dòng C6/36 [25;83;84].

Trong nghiên cứu này, có 94 mẫu phân lập gây hiện tượng bệnh lý trên tế bào C6/36, với những mẫu phân lập 2005-2007 và 2012-2014 đã xác định có một số chủng là vi rút Nam Định, vi rút Banna, số còn lại chưa xác định [41;84]. Trong số 51 mẫu phân lập 2017-2018, xác định có 05 mẫu có kết quả RT-PCR dương tính với cặp mồi thiết kế từ vùng gen E của vi rút VNNB, nhưng kết quả giải trình tự gen đã xác định chúng không phải là vi rút VNNB. Các chủng vi rút này được giải trình tự bằng phương pháp NGS, chúng có kết quả tương đồng cao (99%) với chủng vi rút Manglie (MH807827.1), là chủng vi rút mới được phát hiện gần đây ở một số nước trong khu vực châu Á như Trung Quốc, Philippines [94;113]. Điều này cho thấy, khu vực Tây Nguyên có thể là nơi tiềm tàng rất nhiều loại vi rút do muỗi truyền nhưng chưa được phát hiện, cần có những

nghiên cứu tiếp theo để xác định góp phần bổ sung vào dữ liệu nghiên cứu của quốc tế.

Như vậy, trong giai đoạn 2005-2018 với tổng số 14.091 cá thể muỗi *Culex* của 9 loài muỗi *Culex* thu thập ở 4 tỉnh của khu vực Tây Nguyên để phân lập vi rút VNNB, kết quả có 4 chủng vi rút VNNB phân lập được xác định bằng kỹ thuật giải trình tự gen vùng gen E bao gồm 2 chủng vi rút VNNB phân lập từ muỗi *Cx. tritaeniorhynchus* và 2 chủng vi rút VNNB phân lập từ *Cx. vishnui* (Bảng 3.17). Xác định tỷ lệ nhiễm tối thiểu vi rút VNNB trong quần thể muỗi được tính theo công thức quy chuẩn quốc tế theo công thức sau: Số mẫu phân lập dương tính của loài muỗi chia cho tổng số cá thể của loài muỗi đó và nhân với 1.000 để tính ra tỷ lệ nhiễm tối thiểu cho một loài muỗi có kết quả phân lập vi rút dương tính [53;83]. Do vậy, trong nghiên cứu này, tỷ lệ nhiễm tối thiểu vi rút VNNB trong quần thể *Cx. tritaeniorhynchus* và *Cx. vishnui* giai đoạn 2005-2018 ở khu vực Tây Nguyên tương ứng là 0,33 và 0,39 (Bảng 3.17). So sánh với một nghiên cứu khác ở Việt Nam giai đoạn 2006-2008, tỷ lệ nhiễm tối thiểu vi rút VNNB trong quần thể *Cx. tritaeniorhynchus* và *Cx. vishnui* tương ứng là 0,71 (3 mẫu dương tính/4.199 cá thể muỗi phân lập) và 1,30 (92 mẫu dương tính/1.542 cá thể muỗi phân lập) cao hơn trong nghiên cứu này [53;83]. Nhưng với nghiên cứu khác ở Việt Nam giai đoạn 2002-2004 lại không xác định được vì không có chủng vi rút VNNB nào được phân lập trong tổng số 1.122 mẫu muỗi được trộn từ 20.165 cá thể muỗi *Culex* với thành phần loài muỗi chiếm ưu thế là *Cx. tritaeniorhynchus* và *Cx. vishnui* [51].

Vi rút VNNB tồn tại trong tự nhiên ở ổ chứa vi rút gần người như lợn hoặc chim hoang dại, với những kết quả phân lập được vi rút VNNB từ muỗi *Cx. tritaeniorhynchus* thế hệ F1 nuôi trong phòng thí nghiệm đã xác định, nó không chỉ là véc tơ truyền bệnh mà còn là ổ chứa vi rút thứ cấp. Ngoài ra, một số

nghiên cứu của các tác giả trong và ngoài nước đã chứng minh được vi rút VNNB tồn tại qua mùa đông ở muỗi [12;93]. Cho thấy khó có thể không chế được sự tồn tại của vi rút VNNB trong tự nhiên, nên biện pháp tốt nhất phòng bệnh cho người là sử dụng vắc xin VNNB. Trong nghiên cứu này, vi rút VNNB chủ yếu được phân lập từ muỗi thu thập trong tháng 6 và tháng 7, 2005-2007; tháng 6/2018 (Bảng 3.15). Trên cơ sở kết quả nghiên cứu của đề tài này, chúng tôi cho rằng việc lựa chọn thời điểm để thu thập muỗi phân lập vi rút VNNB là một vấn đề cần quan tâm để có thể đạt kết quả phân lập được vi rút VNNB từ muỗi. Mặt khác, cũng cần phải coi trọng sự biến đổi khí hậu, để chọn thời điểm thu thập muỗi vì nó cũng có thể ảnh hưởng đến kết quả xác định tỷ lệ nhiễm vi rút VNNB trong quần thể muỗi *Culex* [88]. Tương tự như nghiên cứu của CDC Hoa Kỳ trước đây tại miền Bắc Việt Nam, thu thập muỗi *Culex* để phân lập vi rút VNNB với khoảng 3.000 mẫu muỗi thu thập trong tháng 8/2007 nhưng không phân lập được chủng vi rút VNNB nào mà chủ yếu phân lập được vi rút Arbo khác (Porcine virus) [51].

Vi rút VNNB chỉ có 1 type huyết thanh nhưng có 5 genotype, sự xuất hiện và lan chuyển của các genotype cũng khác nhau tùy theo từng khoảng thời gian và phân vùng địa lý, như sự mới xuất hiện và lan rộng của vi rút VNNB genotype I trong vài thập kỷ gần đây đã lấn át và thay thế vi rút VNNB genotype III ở hầu hết các nước châu Á [57].

Trong số những bệnh do muỗi truyền, bệnh VNNB đã có vắc xin để dự phòng cho người rất hiệu quả từ những năm 1960s ở Nhật Bản đó là vắc xin được sản xuất từ chủng vi rút VNNB genotype III [49]. Vắc xin phòng viêm não Nhật Bản thường được sản xuất từ 5 chủng: Nakayama – NIH, Nakayama Yokken, Ja Gar – OI, Yokoshiba (YS) và T8. Hai chủng Nakayama – NIH và Nakayama Yokken đều được phân lập năm 1935 từ não người. Nhật Bản đã sử

dùng chủng Nakayama – NIH để sản xuất vắc xin dùng cho người và chủng Yokken để sản xuất vắc xin dùng cho động vật. Sau Đại chiến thế giới lần thứ II, chủng Nakayama – NIH được sử dụng rộng rãi để sản xuất vắc xin vì đạt 4 tiêu chuẩn là: thuần khiết về mặt di truyền, thuần dòng làm ổn định đường chuẩn bất hoạt, không gây độc tế bào thần kinh, đảm bảo an toàn, có khả năng gây đáp ứng miễn dịch cao trong quần thể dân cư [17;112].

Từ năm 1954, ở Nhật Bản thường dùng chủng Nakayama – NIH và cho rằng tính kháng nguyên của các chủng viêm não Nhật Bản đều giống nhau. Năm 1968, Okuno và cộng sự phát hiện thấy đối với vi rút viêm não Nhật Bản ít nhất có 3 type miễn dịch là Nakayama – NIH, Ja Gar – OI và type trung gian. Năm 1983, một nhóm nghiên cứu ở Handai Biken nhận thấy loại vắc xin điều chế với chủng Beijing – I có hiệu lực cao nhất đối với chủng vi rút viêm não Nhật Bản có các type miễn dịch khác nhau, cho nên từ năm 1986, Bộ Y tế và phúc lợi Nhật Bản đã quyết định sử dụng chủng Beijing – I thay thế cho chủng Nakayama – NIH. Để xác định hàm lượng protein chứa trong vắc xin phòng viêm não Nhật Bản, người ta cũng đã thay thế phương pháp vi lượng Kiedahl bằng phương pháp Lowry chính xác hơn và quyết định hàm lượng của protein trong sản phẩm cuối cùng của vắc xin phòng viêm não Nhật Bản không được quá 80 microgam trong 1ml (Oya A, 1987). Hiện nay ở Nhật Bản cũng đang tiếp tục nghiên cứu điều chế vắc xin thế hệ thứ hai bằng các kỹ thuật hiện đại của sinh học phân tử [17;112].

Ở Việt Nam, Viện vệ sinh dịch tễ học cũng đã thành công trong sản xuất vắc xin phòng viêm não Nhật Bản có hiệu lực cao, tinh chế theo phương pháp hóa lý của Takaku là một phương pháp hiện nay được coi là tiên tiến nhất, ứng dụng các kỹ thuật hiện đại về vi rút học, sinh hóa học và miễn dịch học. Vắc xin của Việt Nam có chất lượng phù hợp với tiêu chuẩn của Tổ chức y tế thế giới



và của Viện Biken, Nhật Bản qua sử dụng vắc xin này trên thực địa song song với vắc xin Biken cho 203 trẻ em từ 2 - 4 tuổi đã thấy 100% trẻ em được tiêm đều có đáp ứng kháng thể đối với cả hai loại vắc xin (Viện Vệ sinh dịch tễ học, 1994) [17;112].

Đến nay, việc triển khai tiêm vắc xin phòng VNNB được cho là hữu hiệu nhất để dự phòng mắc bệnh. Tuy nhiên giải pháp này cũng gặp một số khó khăn như: quy mô tổ chức triển khai, sự chấp nhận của cộng đồng do nhiều yếu tố, đặc biệt sự hiểu biết về bệnh VNNB, nguồn lực, v.v.. Cần có nhiều giải pháp đồng bộ dự phòng vắc xin, phòng chống và kiểm soát véc tơ, môi trường sống, v.v. để có thể ngăn chặn nguy cơ mắc bệnh và kiểm soát dịch bùng phát hiệu quả.

Gần đây, có sự tái xuất hiện của vi rút VNNB genotype V từ muỗi ở một số nước sau gần 50 năm không phát hiện được, đây là genotype vi rút có độc lực thấp nên có những hướng nghiên cứu về hiệu quả của vắc xin dựa trên những hạt vi rút tiêu thành phần có nguồn gốc từ genotype này để tạo miễn dịch. Thực tế cho thấy, mặc dù có sự xuất hiện mới và thay đổi genotype vi rút gây bệnh, nhưng vắc xin sản xuất từ các chủng vi rút VNNB genotype III vẫn có hiệu quả bảo vệ rất tốt [73;96;97]. Nên nghiên cứu về đặc điểm phân tử của vi rút VNNB ở những vùng vi rút lưu hành là một trong những vấn đề cần được quan tâm.

#### **4.3. Một số đặc điểm phân tử của vi rút viêm não Nhật Bản phân lập được từ muỗi ở khu vực Tây Nguyên**

Sinh học phân tử/dịch tễ sinh học phân tử là thuật ngữ liên quan đến những nghiên cứu về khía cạnh di truyền, là sự so sánh trình tự nucleotide/acid amine của một gen đích hoặc toàn bộ genome của các chủng vi sinh vật được phân lập 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 [27].

Do vậy, khi nghiên cứu nguồn gốc và sự tiến triển của vi rút VNNB ở Đông Nam Á, Tom Solomon (2003) đã có giả thiết cho rằng vi rút VNNB dường như có nguồn gốc từ một vi rút tổ tiên từ những năm 1.500 và xuất hiện đầu tiên ở vùng Indonesia-Malaysia, tiếp đó tiến triển thành 5 genotyp khác nhau và sau đó lan rộng khắp châu Á. Tỷ lệ tiến hóa trung bình ước tính là  $4.35 \times 10^{-4}$  (khoảng  $3.4906 \times 10^{-4}$  đến  $5.303 \times 10^{-4}$ ) cấu phần nucleotide tại mỗi nơi mỗi năm và quần đảo Mã Lai được biết đến có một điều kiện môi trường/địa lý độc nhất cho phép tiến hóa khác nhau của thực vật và động vật. Khí hậu nhiệt đới và tính đa dạng của sinh vật côn trùng và động vật có xương sống cũng có thể tạo điều kiện cho sự xuất hiện và sự tiến hóa nhanh chóng của vi rút [118].

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 type huyết thanh duy nhất. Trước những năm 1990 ở Việt Nam chỉ có vi rút VNNB GIII lưu hành, từ năm 1990 đến nay đã phát hiện sự xuất hiện của vi rút VNNB GI ở Việt Nam từ người bệnh, muỗi, lợn. Trong những năm gần đây có sự xuất hiện của vi rút VNNB genotype V (GV) từ muỗi *Culex* ở Trung Quốc (2009) và Triều Tiên (2010), nhưng vi rút VNNB GV chưa được phát hiện ở Việt Nam [81;86], nên cần có nghiên cứu để xác định genotype vi rút VNNB đang lưu hành ở Việt Nam nhằm cung cấp cơ sở dữ liệu để chia sẻ với cộng đồng các nhà khoa học.

Để giải trình tự gen, có hai phương pháp giải trình tự nucleotide là: (1) Kỹ thuật Sanger (trực tiếp hoặc gián tiếp); (2) Kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ thứ hai (NGS). Phương pháp Sanger để giải trình tự nucleotide do Sanger F. phát

minh vào năm 1977, [57;75;89;108;117]. Nguyên lý của phương pháp này là dựa vào cơ chế tổng hợp ADN trên cơ sở nguyên lý của việc tổng hợp ADN của vi sinh vật sống khi nó sử dụng dideoxynucleotide (ddNTP) bị mất nhóm –OH ở cả hai vị trí cacbon 2' và 3' cho phản ứng hóa học gắn kết. 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 [27]. Kỹ thuật Sanger cho đến nay vẫn được coi là “chuẩn vàng” vì nó 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 [57;75;89;108;117]. Phương pháp này thường được áp dụng để giải trình tự gen với những vi rút đã biết, còn NGS lại có ưu điểm rất thích hợp để phát hiện và giải mã trình tự di truyền của các tác nhân vi rút mới [27;84;86;125].

**Phương pháp sequencing thế hệ thứ hai (NGS) được phát triển từ những năm cuối thế kỷ XX, trình tự nucleotide được xác định bằng máy đọc tự động (Sequenser) theo nguyên lý sắc ký lỏng, nó có thể đọc trực tiếp kết quả với các trình tự nucleotide dài hơn so với phương pháp trước đây [27]. Đây là phương pháp được sử dụng để xác định trình tự những genotype mới phát hiện trên cơ sở thiết kế các mồi dựa trên trình tự các chủng “consensus” như nghiên cứu để phát hiện genotype I và genotype V của vi rút VNNB trong mấy thập kỷ vừa qua, tương ứng ở các nước châu Á và một số nước Bắc Á [19;20;81;86;102]. Có 4 điểm chính của phương pháp NGS tiến bộ hơn so với phương pháp của Senger 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 [27]. 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 nghiên cứu về genome và sinh học phân tử với một số công nghệ hiện đại khác nhau được sử dụng [135].

Tuy nhiên, để phát hiện những type/genotype mới phương pháp NGS ít có hiệu quả hơn phương pháp Sanger. Do vậy, trong nghiên cứu này để phát hiện genotype mới của vi rút VNNB xuất hiện ở Tây Nguyên chúng tôi sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen theo phương pháp của Sanger.

Vật liệu di truyền của vi rút VNNB khoảng 11.000bp mã hóa cho 3 protein cấu trúc và 7 protein phi cấu trúc và hai đầu là vùng không mã hóa với kích thước các vùng gen khác nhau, trong đó vùng gen E là có chiều dài nhất 1.500bp. Để xác định genotype vi rút VNNB, một số vùng gen của vi rút VNNB thường được sử dụng, trong số này vùng gen E với chiều dài 1.500bp, là vùng gen có liên quan đến độc tính của vi rút, có chiều dài lý tưởng thường được sử dụng để xác định genotype và đặc điểm phân tử của vi rút VNNB [57;69;83]. Trước đây, do chưa có điều kiện về thiết bị giải trình tự cũng như enzyme tổng hợp, việc giải trình tự chỉ có thể thực hiện với những vùng gen có kích thước nhỏ khoảng 300bp-500bp, để giải trình tự những vùng gen lớn hơn cần phải thiết kế rất nhiều mồi trong để tiếp nối giữa các đoạn giải trình tự [12;57]. Nhưng hiện nay với sự phát triển những thiết bị mới hiện đại cũng như có những enzyme cho phản ứng PCR có trong bộ sinh phẩm BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) sử dụng trong nghiên cứu này, cho phép tạo phản ứng và đọc trình tự với mỗi một đầu mồi lên đến 800bp-1000bp bằng phương pháp Sanger với các chủng 2007.

Trong giai đoạn 2005-2018, có 9 loài muỗi *Culex* được thu thập với tổng số 14.091 cá thể được trộn thành 540 mẫu muỗi để phân lập vi rút VNNB bao

gồm 138 mẫu, 236 mẫu và 166 mẫu tương ứng với các giai đoạn thu thập là 2005-2007, 2012-2014 và 2017-2018, (Bảng 3.15).

Có 9 chủng vi rút đã được xác định dương tính bằng cặp mồi JE-Ef và JE-Er để khuếch đại vùng gen của vi rút VNNB bằng kỹ thuật RT-PCR bao gồm các chủng vi rút phân lập từ muỗi thu thập 2005-2007 và 2017-2018, nhưng không có mẫu nào được phát hiện dương tính bằng kỹ thuật RT-PCR trong số các mẫu phân lập từ muỗi thu thập ở khu vực Tây Nguyên 2012-2014 (Bảng 3.18). Kết quả phân lập vi rút VNNB trong giai đoạn 2012-2014 của nghiên cứu cũng tương tự như nghiên cứu trước đây về phân lập vi rút từ muỗi tại Việt Nam của nhóm nghiên cứu CDC Fort Collins Hoa Kỳ kết hợp với Viện Vệ sinh dịch tễ Trung Ương, trong tổng số 20.165 cá thể muỗi thu thập gồm có 19 loài muỗi được trộn thành 1.122 mẫu muỗi để phân lập vi rút nhưng không phân lập được vi rút VNNB nào trong tổng số 20.165 cá thể muỗi thu thập 2002-2004 ở một số tỉnh gần Hà Nội [51].

Theo tiêu chuẩn quốc tế, kết quả xác định dương tính bằng kỹ thuật RT-PCR chỉ là kết quả sàng lọc, cần được thực hiện kỹ thuật giải trình tự gen để khẳng định [83]. Do vậy, 9 chủng vi rút được xác định dương tính bằng kỹ thuật RT-PCR, khi giải trình tự chỉ xác định có 4 chủng vi rút phân lập từ muỗi thu thập 2007 là vi rút VNNB bao gồm các chủng có ký hiệu là 07VN310, 07VN311, 07VN479 và 07VN486. Các chủng vi rút này được xác định là vi rút VNNB GI, sự khác biệt về nucleotide với các GI khác tại các tỉnh thuộc Tây Nguyên, Việt Nam và trong khu vực (Châu Á Thái Bình Dương) với tỷ lệ lần lượt là 1,4%-2,7%-4,8% (Hình 3.10, Bảng 3.19). Trình tự vùng gen E của 4 chủng vi rút này đã có mã số trong ngân hàng gen tương ứng là HM228922, HM228923, AB728500 và AB728499.

Còn 5 chủng vi rút phân lập từ muỗi *Culex* ở một số tỉnh của Tây Nguyên năm 2018 được xác định dương tính bằng cặp mồi được thiết kế từ vùng gen E của vi rút VNNB, sản phẩm PCR tinh sạch được sử dụng để thực hiện phản ứng giải trình tự gen, nhưng với mỗi loại primer (ngược hoặc xuôi) chỉ có khoảng 300bp-400bp được xác định trình tự, nhưng khi Blast trên ngân hàng gen, trình tự này không xác định được, nên khả năng đây là genotype mới của vi rút VNNB là rất thấp. Nhóm nghiên cứu đã sử dụng vật liệu di truyền của 5 chủng vi rút này để giải trình tự toàn bộ genome các chủng vi rút bằng phương pháp NGS, kết quả đã xác định chúng là chủng vi rút mới lần đầu tiên được phát hiện ở Việt Nam với kết quả tương đồng về toàn bộ genome đến 99% với chủng vi rút Manglie có mã số trong ngân hàng gen là MH807827.1, là chủng vi rút đã phân lập ở Trung Quốc 2011 (Hình 3.9) [125]. Việc công bố về việc phát hiện các chủng vi rút mới này và nghiên cứu thêm về vi rút học sẽ cần phải có những nghiên cứu tiếp theo tương tự như các công bố trước đây về việc phát hiện được vi rút Nam Định, vi rút Đák Nông từ muỗi *Culex* ở khu vực Tây Nguyên, Việt Nam [1;15;84].

Phân tích genotype các chủng vi rút VNNB phân lập trong các năm 1964-2011 dựa trên trình tự 1.500 nucleotide vùng gen E đã xác định trong khoảng thời gian trước 1990 các chủng vi rút VNNB phân lập ở Việt Nam, Nhật Bản, Hàn Quốc chỉ có duy nhất là genotype III. Chủng vi rút VNNB genotype I đầu tiên được phát hiện ở Việt Nam là chủng vi rút có ký hiệu 90VN70 được phân lập từ máu của người bệnh VNNB. Tiếp đó chủng vi rút VNNB genotype I được phân lập từ muỗi vào năm 1994 có ký hiệu 94VN141. Điều này cho thấy vi rút VNNB genotype I có thể đã xuất hiện trước 1990 trong tự nhiên ở véc tơ truyền bệnh cũng như ổ chứa vi rút và từ đó truyền cho người qua muỗi đốt [28;35;57].

Sự chuyển đổi genotype vi rút VNNB ở châu Á đã được xác định qua giám sát về dịch tễ sinh học phân tử vi rút VNNB ở một số nước như Việt Nam, các chủng vi rút VNNB genotype I và III cùng lưu hành trong khoảng thời gian 1990–2004, nhưng sau 2004 chỉ có các chủng vi rút VNNB genotype I được phát hiện và là genotype duy nhất lưu hành ở Việt Nam [57]. 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 cho đến nay [100;108;109;134].

Dựa trên cơ sở dữ liệu ngân hàng gen quốc tế cũng như 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 và cụ thể về sự thay đổi genotype vi rút VNNB trong những thập kỷ gần đây. 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 [98]. 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, Nhật Bản, Trung Quốc, Ấn Độ, v.v.. [57;60;63;64;65].

Khi so sánh kết quả của hai phương pháp giải trình tự gen cho thấy, cặp mồi JE-Ef và JE-Er không đặc hiệu cho riêng các mẫu VNNB, cặp mồi này có khả năng chạy chéo với vi rút khác, mặc dù đây là cặp mồi đã được sử dụng để

nghiên cứu vi rút VNNB khoảng 2 thập kỷ gần đây vì cặp môi có thể phát hiện được cả 5 genotype vi rút VNNB [98]. Việc cặp môi này chạy chéo với một loại vi rút khác là một hiện tượng rất hiếm gặp khi có sự trùng lặp hai đoạn nucleotide của hai loại vi rút khác nhau, chính sự tình cờ này đã giúp phát hiện ra được những loại vi rút mới lưu hành ở Tây Nguyên (Hình 3.9). Nghiên cứu về cơ sở dữ liệu của ngân hàng gen trước đây đã chỉ ra hầu hết các vi rút đã biết trên thế giới đều có khoảng 26 nucleotide tương tự như một vùng gen của vi rút đậu mùa với trình tự nucleotide như sau:

“GCCGGAGCTCTGCAGATATCNNNNNN”, đây là cơ sở để các nhà khoa học thiết kế cặp môi cho chiến lược phát hiện vi rút mới [48].

Đối với các genotype vi rút VNNB, trong khoảng thời gian trước năm 1990, các chủng vi rút VNNB phân lập ở Việt Nam, Nhật Bản, Hàn Quốc chỉ thuộc GIII. Chủng vi rút VNNB GI được phát hiện từ người và muối từ năm 1990 và trong giai đoạn chuyển giao từ năm 1990 đến năm 2004 có cả hai kiểu gen GI và GIII đồng lưu hành và sau đó chỉ còn xuất hiện duy nhất kiểu gen GI. Kết quả của nghiên cứu này càng khẳng định sự “im lặng” của kiểu gen GIII và sự lưu hành chiếm ưu thế của kiểu gen GI tại Việt Nam hiện nay (Hình 3.10). Hiện tượng này không chỉ xảy ra tại Việt Nam mà còn xuất hiện ở Hàn Quốc, Ấn Độ, Đài Loan và Nhật Bản mặc dù các nghiên cứu này chỉ mới thực hiện giám sát vi rút VNNB trên quần thể muối [57;69].

Phân tích một số biến đổi về acid amin của các vi rút VNNB GI ở khu vực Tây Nguyên xác định có 8 vị trí thay đổi acid amin nhưng chúng đều là sự thay thế không bảo tồn (Bảng 3.20). Phân tích về đặc điểm haplotype của vi rút VNNB tại một số tỉnh ở khu vực Tây Nguyên đã phát hiện có hai kiểu haplotype NKSS và SKSS, là hai kiểu haplotype phổ biến nhất của VNNB trên muối và lợn tại Việt Nam (Bảng 3.21). Trong đó kiểu haplotype đặc trưng cho kiểu gen GI là



NKSS với điểm đặc biệt của kiểu haplotype NKSS là có chứa asparagine (N) ở vị trí acid amin 123, đây là vị trí acid amin quyết định khả năng nhân lên cũng như khả năng gây bệnh của các chủng vi rút VNNB. Vị trí acid amin 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 [130]. Theo y văn, cho đến nay trên thế giới mới chỉ phát hiện được 4 chủng vi rút VNNB trên người có chứa asparagine ở vị trí 123 bao gồm một chủng phát hiện được tại Thái Lan năm 1985, hai chủng tại Trung Quốc và một chủng phát hiện được tại Việt Nam năm 2007 (Human/07VN72/VNM/2007: Mã số GenBank LC000634) [60]. Trong nghiên cứu này, khi phân tích đặc điểm phân tử của 04 chủng vi rút VNNB phân lập từ muỗi *Culex* ở khu vực Tây Nguyên đã phát hiện được 2 chủng vi rút VNNB có ký hiệu 07VN310 và 07VN311 có chứa asparagine (N) ở vị trí acid amin 123 được xác định là haplotype NKSS (Asparagine-Lysine-Serine-Serine), còn với 2 chủng vi rút có ký hiệu là 07VN479 và 07VN486 được xác định là haplotype SKSS (Serin-Lysine-Serine-Serine) do vị trí acid amino 123 là Serine (Bảng 3.21).

Với xu hướng nổi trội của kiểu gen GI hiện nay trên toàn thế giới, việc giám sát dịch tễ sinh học phân tử của vi rút VNNB cần được tiếp tục thực hiện 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.

## KẾT LUẬN

### 1. Thực trạng viêm não Nhật Bản tại 4 tỉnh Tây Nguyên, 2005–2018

Trong số 713 trường hợp HCVNC nghi ngờ do vi rút ở 4 tỉnh của khu vực Tây Nguyên, 2005-2018 đã xác định có 168 trường hợp VNNB bằng kỹ thuật MAC-ELISA, tỷ lệ xác định dương tính là 23,56%.

Tỷ lệ mắc VNNB là 0,29/100000 dân, ghi nhận ở 33/50 (66%) huyện/thị xã/thành phố, tại Gia Lai có số huyện mắc nhiều hơn cả 15/17 (88,24%).

Bệnh VNNB mắc rải rác quanh năm, tăng dần vào những tháng cuối mùa khô, đầu mùa mưa (tháng mùa hè), đạt đỉnh vào tháng 06. Bệnh gặp ở mọi lứa tuổi, nhóm trẻ <15 tuổi có số mắc cao hơn nhóm  $\geq 15$  tuổi (69,64% & 30,36%). Nam giới mắc nhiều hơn nữ giới (59,52% & 40,48%). Dân tộc Gia Rai có số mắc cao hơn (70,83%) so với nhóm dân tộc khác Xơ Đăng, Ê Đê, M' Nông, v.v. (16,07%) và người Kinh (13,10%).

### 2. Thành phần loài, phân bố và tỷ lệ nhiễm vi rút viêm não Nhật Bản của một số loài muỗi *Culex* ở khu vực Tây Nguyên, 2005–2018

Xác định được 9 loài muỗi thuộc giống *Culex* phân bố hầu khắp các địa điểm, trong đó loài *Cx. tritaeniorhynchus* chiếm tỷ lệ cao nhất là 43,06%, tiếp đến là *Cx. vishnui* là 36,17%; 07 loài còn lại có tỷ lệ dao động trong khoảng 0,41%–6,56%.

Phân lập được 9 chủng vi rút và được xác định dương tính với cặp môi vùng gen E bằng kỹ thuật RT-PCR, từ muỗi *Culex*, năm 2007 và 2018. Chỉ có 4

chủng vi rút phân lập từ muỗi *Culex* 2007 là vi rút VNNB, còn 5 chủng vi rút phân lập từ muỗi *Culex* 2018 là những chủng vi rút mới lần đầu phát hiện ở Việt Nam có 99% trình tự genome tương tự như vi rút Manglie (MH807827.1).

Đã xác định có 2 chủng vi rút VNNB phân lập được từ *Cx. tritaeniorhynchus* và 2 chủng vi rút VNNB phân lập được từ *Cx. vishnui*, tỷ lệ nhiễm vi rút VNNB tối thiểu trong quần thể *Cx. tritaeniorhynchus* là 0,33% và *Cx. vishnui* là 0,39%.

### **3. Một số đặc điểm phân tử của vi rút viêm não Nhật Bản phân lập được ở khu vực Tây Nguyên, 2005-2018**

Có 4 chủng vi rút VNNB phân lập từ muỗi *Culex* vào năm 2007, được xác định là vi rút VNNB genotype I. Còn 5 chủng vi rút phân lập từ muỗi *Culex* thu thập năm 2018 không phải là vi rút VNNB mà là vi rút mới được phát hiện ở Tây Nguyên.

Có sự khác biệt về trình tự nucleotide vùng gen E của 4 chủng vi rút VNNB GI ở khu vực Tây Nguyên với chủng vi rút VNNB GI ở địa phương khác tại các tỉnh thuộc Tây Nguyên, Việt Nam và khu vực (Châu Á Thái Bình Dương) với tỷ lệ khác biệt lần lượt là 1,4% - 2,7% - 4,8%. Các chủng vi rút này có 8 vị trí thay đổi acid amin, nhưng là kiểu thay thế không bảo tồn với hai kiểu haplotype là NKSS và SKSS, trong đó haplotype NKSS là kiểu hiếm gặp.

## **KHUYẾN NGHỊ**

Trên cơ sở kết quả và kết luận nghiên cứu của đề tài có một số khuyến nghị đề xuất sau:

1) Cần tiếp tục theo dõi giám sát dịch tễ học hội chứng viêm não cấp tính, viêm não Nhật Bản và giám sát điều tra véc tơ truyền bệnh viêm não Nhật Bản hàng năm, làm cơ sở đánh giá dịch tễ học, đề xuất các biện pháp phòng chống bệnh này được tích cực, kịp thời và hiệu quả hơn.

2) Tiếp tục có những nghiên cứu, giám sát dịch tễ học phân tử vi rút viêm não Nhật Bản trên người và véc tơ truyền bệnh; nghiên cứu đánh giá về hiệu quả của dự phòng vắc xin viêm não Nhật Bản tại khu vực Tây Nguyên; nghiên cứu yếu tố điều kiện xã hội, phong tục tập quán, v.v. của một số dân tộc thiểu số với tình hình mắc viêm não Nhật Bản ở khu vực Tây Nguyên.

**DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH LIÊN QUAN ĐẾN  
LUẬN ÁN ĐÃ CÔNG BỐ**

1. **Phạm Khánh Tùng**, Ngô Thị Tú Thủy, Trương Xuân Toàn, Võ Gia Bắc, Đặng Tuấn Đạt, Phan Thị Nga (2019), “Một số đặc điểm dịch tễ học của viêm não Nhật Bản ở Tây Nguyên, 2005–2018”, *Tạp chí Y học dự phòng*, tập 29, số 12- 2019, tr. 94-101.
2. **Phạm Khánh Tùng**, Bùi Minh Trang, Nguyễn Việt Hoàng, Đặng Tuấn Đạt, Nguyễn Văn Sinh, Trương Xuân Toàn, Phan Thị Tuyết Nga, Nguyễn Hồng Đan, Đỗ Phương Loan, Bùi Mạnh Tuấn, Nguyễn Thị Hồng Yến, Phan Thị Nga (2019), “Xác định thành phần loài muỗi *Culex* và tỷ lệ nhiễm vi rút viêm não Nhật Bản của một số loài *Culex* ở khu vực Tây Nguyên, 2005–2018”, *Tạp chí Y học dự phòng*, tập 29, số 12- 2019, tr. 118-127.
3. **Phạm Khánh Tùng**, Phạm Hồng Quỳnh Anh, Đỗ Phương Loan, Đặng Tuấn Đạt, Bùi Minh Trang, Nguyễn Vĩnh Đông, Phan Thị Nga (2020), “Một số đặc điểm phân tử của vi rút viêm não Nhật Bản phân lập được từ muỗi ở khu vực Tây Nguyên”, *Tạp chí Y học dự phòng*, tập 30, số 1 – 2020, tr. 9-18

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### TIẾNG VIỆT

1. **Đặng Đức Anh, N. T. H., Phan Thị Ngà**, (2010), *Vi rút y học*, NXB Y học, Hà Nội.
2. **Bộ môn Truyền nhiễm- Học viện Quân Y** (2002), *Bệnh học truyền nhiễm*, Nhà xuất bản Quân đội nhân dân, Hà Nội.
3. **Các khu vực Đông Nam Á Tạp chí Y học Nhiệt đới và Y tế công cộng** (2005), Illustrated keys to the Mosquito of Thailand II Genera Culex and Lutzia, vol. 36 (II). Trang web [http://translate.googleusercontent.com/translate\\_c?depth=1&hl=vi&prev=search&rurl=translate.google.com&sl=en&u=http://www.tm.mahidol.ac.th/seameo/journal\\_36\\_2\\_2005\\_spp.html&usg=ALkJrhiYM309yfVKtVh4jNpc453AXQXwNg](http://translate.googleusercontent.com/translate_c?depth=1&hl=vi&prev=search&rurl=translate.google.com&sl=en&u=http://www.tm.mahidol.ac.th/seameo/journal_36_2_2005_spp.html&usg=ALkJrhiYM309yfVKtVh4jNpc453AXQXwNg), ngày truy cập 28/6/2015.
4. **Cục Y tế Dự phòng- Bộ Y tế** (2010), *Bệnh viêm não Nhật Bản*, Nhà xuất bản Văn hóa Thông tin.
5. **Cục Y tế Dự phòng- Bộ Y tế** (2009), *Cẩm nang phòng chống bệnh truyền nhiễm*, trang 300, Hà Nội.
6. **Đặng Tuấn Đạt & CS** (2008), "Nghiên cứu thành phần loài, đặc điểm sinh thái, tỷ lệ nhiễm virus của các loài muỗi Culicinae và vai trò truyền bệnh viêm não Nhật Bản ở tây Nguyên", *Đề tài cấp Bộ - Viện Vệ sinh Dịch tễ Tây Nguyên*.
7. **Đặng Tuấn Đạt & CS** (2004), "Tình hình bệnh viêm não khu vực Tây Nguyên năm 2003 và 6 tháng đầu năm 2004", *Tạp san Y học dự phòng Tây Nguyên*, số 2 pp. 4-7.

8. **Đặng Tuấn Đạt & CS** (2005), "Tìm hiểu tình hình bệnh viêm não Nhật Bản ở tỉnh Gia lai, 1/2003 - 5/2005", *Tạp san Y học dự phòng Tây Nguyên*.
9. **Đặng Tuấn Đạt & CS** (2007), "Tìm hiểu đặc điểm dịch tễ học và biện pháp phòng chống dịch viêm não ở tỉnh Gia Lai", *Đề tài khoa học cấp cơ sở - Viện Vệ sinh Dịch tễ Tây Nguyên*.
10. **Đặng Tuấn Đạt, Nguyễn Ái Phương & Lý Thị Vi Hương** (1993), "Khu hệ NKS và khu hệ côn trùng y học ở Tây Nguyên - Vai trò truyền bệnh của chúng", *Hội nghị côn trùng học toàn quốc (lần thứ 4)*, pp. 137-145.
11. **Đoàn Thị Ngọc Diệp** (2002), "Đặc điểm lâm sàng bệnh viêm não Nhật Bản ở trẻ em tại Bệnh viện Nhi Đồng I", *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh*, Tập 6, Số 1 pp. 45-48.
12. **Trần Như Dương, D. T. H., 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.
13. **Đỗ Quang Hà, V. T. Q. H., Huỳnh Thị Kim Loan, Đinh Quốc Thắng**, (1994), *Tình hình bệnh viêm não Nhật Bản ở các tỉnh phía Nam 1976-1992*, Báo cáo khoa học toàn văn tại Hội nghị khoa học Viện Pasteur thành phố Hồ Chí Minh tháng 1 năm 1994.
14. **Nguyễn Thị Minh Hằng & CS** (2004), "Sự lưu hành của vi rút viêm não Nhật Bản ở Tây Nguyên, 1999-2000", *Tạp chí Y học dự phòng*, Tập 14, Số 6 (71)pp. 68-71.
15. **Dương Thị Hiền & CS** (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 26, Số 8 (181): 121-128.
16. **Dương Thị Hiền, Đ. P. L., 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.

17. **Lê Đức Hình** (2003), *Bách khoa thư bệnh học- Viêm Não Nhật Bản*, NXB Y học, Hà Nội, tập 3, trang 512-514.
18. **Lê Đức Hình & CS** (2001), "Viêm não Nhật Bản Ở Việt Nam", *Tạp san Nội khoa*, Số 1 pp. 29-33.
19. **Nguyễn Việt Hoàng & CS** (2010), "Đặc điểm di truyền học của chủng vi rút viêm não Nhật Bản genotype 1 phân lập lần đầu tiên từ bệnh nhân Việt Nam", *Tạp chí Y học dự phòng*, Tập 20, số 6 (114)pp. 129-139.
20. **Nguyễn Việt Hoàng & cộng sự** (2008), "Phát hiện sự xuất hiện của vi rút viêm não Nhật Bản genotype I ở miền Trung, miền Nam, Tây Nguyên, Việt Nam", *Tạp chí Y học dự phòng*, tập 18, số 5(97): 38-45.
21. **Trần Kim Hoàng & Phạm Hoài Danh** (2002), "Tình hình viêm não cấp và viêm não Nhật Bản tại Bệnh viện Vĩnh Long năm 2001", *Tạp chí Thời sự Y dược học*, Số 10 pp. 264- 266.
22. **Vũ Đức Hương** (1997), *Bảng định loại muỗi Culicidae ở Việt Nam đến giống và bảng định loại muỗi Aedes thường gặp ở Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, trang 36, Hà Nội.
23. **Vũ Đức Hương & CS** (1995), "Điều tra cơ bản muỗi *Culicinae* ở Việt Nam (1992- 1995)", *Kỷ yếu công trình nghiên cứu khoa học (1991-1996)*, Viện Sốt rét-KST-CT TŨ, Tập II pp. 117-128.
24. **Nguyễn Lê – Bộ môn Truyền nhiễm HVQY** (2015), Viêm não Nhật Bản. Trang web <http://www.benhvien103.vn/vietnamese/bai-giang-chuyen-nganh/truyen-nhiem/viem-nao-nhat-ban/753/>, ngày truy cập 26/12/2016.
25. **Đỗ Phương Loan, B. M. T., Phan Thị Nga** (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 (1350 pp. 261-268.



26. **Nguyễn Đức Mạnh & CS** (1988), *Khu hệ muỗi Anophelles Meigen và vai trò truyền bệnh sốt rét của chúng ở Tây Nguyên ở Miền Bắc Việt Nam*, Luận án Phó tiến sĩ khoa học Sinh học, Trường Đại học Tổng hợp Hà Nội, trang 175.
27. **Phan Thị Nga** (2014), *Dịch tễ sinh học phân tử vi rút viêm não Nhật Bản*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
28. **Phan Thị Nga** (2015), "Biến động về các genotype vi rút viêm não Nhật Bản: Sự trái ngược giữa dự đoán và thực tế trong những thập kỷ gần đây", *Tạp chí Y học dự phòng*, Tập 25, số 3 (163): 24–30.
29. **Phan Thị Nga & Đặng Tuấn Đạt & cộng sự** (2007), "Phát hiện một số thành viên virus thuộc họ reoviridae gây hội chứng não cấp ở tỉnh Gia Lai, 2005", *Tạp chí Y học dự phòng*, tập XVI, số 2(87), pp. 87-93.
30. **Phan Thị Nga & Nguyễn Thị Kiều Anh và CS** (2002), "Giám sát chẩn đoán viêm não Nhật Bản ở Việt Nam", *Tạp chí Y học dự phòng*, tập XII. số 4 (55 ), pp. 5-11.
31. **Phan Thị Nga & Vũ Sinh Nam và Kouichi Morita** (2004), "Nghiên cứu sự tồn tại của virus viêm não Nhật Bản trong tự nhiên", *Tạp chí Y học dự phòng*, tập XIV, số 1(64 ), pp. 21-26.
32. **Phan Thị Nga & cộng sự** (1996), "Phân lập virus viêm não Nhật Bản (VNNB) từ bệnh nhân ở miền Bắc Việt Nam trong các năm 1984-1993 bằng chuột ỏ", *Tạp chí Vệ sinh Phòng dịch*, tập VI, số 1(26), pp. 25-29
33. **Phan Thị Nga & CS** (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.", *Tạp chí Y học dự phòng*, Tập 20 số 5 (113) pp. 29-35

34. **Phan Thị Ngà & CS** (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.
35. **Phan Thị Ngà, Đ. P. L., Nguyễn Việt Hoàng, Bùi Minh Trang, Lê Thị Hiền Thu, Tống Thị Hà &CS**, (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 )pp. 5-10.
36. **Hoàng Thủy Nguyên, T. V. T. v. c. s.** (1994), *Phát hiện sự phân bố sốt xuất dengue và viêm não Nhật Bản theo phân vùng địa lý đặc trưng trên cơ sở điều tra các biến động số lượng của véc tơ truyền bệnh này*, Đề tài cấp Nhà nước 64B-04-01.
37. **Lê Hồng Phong, T. V. T., Hoàng Thủy Nguyên, Phan Thị Ngà và Vũ Sinh Nam**, (1996), "Bệnh viêm não Nhật Bản ở miền Bắc Việt Nam 1988-1992", *Tạp chí Vệ sinh Phòng dịch*, 6(2): 11-15.
38. **Vũ Vi Quốc, V. T. D. C.** (2018), "Véc tơ truyền bệnh viêm não Nhật Bản tại một số điểm thuộc khu vực Tây Bắc, 2018 ", *Tạp chí Y học dự phòng*, Tập 28, số 7: 179-185.
39. **Tạp chí Y học Nhiệt đới và Y tế công cộng khu vực Đông Nam Á** (2005), Illustrated keys to the Mosquito of Thailand II Genera Culex and Lutzia, vol. 36 (II). Trang web [http://translate.googleusercontent.com/translate\\_c?depth=1&hl=vi&prev=search&rurl=translate.google.com&sl=en&u=http://www.tm.mahidol.ac.th/sea/meo/journal\\_36\\_2\\_2005\\_spp.html&usg=ALkJrhiYM309yfVKtVh4jNpc453AXQXwNg](http://translate.googleusercontent.com/translate_c?depth=1&hl=vi&prev=search&rurl=translate.google.com&sl=en&u=http://www.tm.mahidol.ac.th/sea/meo/journal_36_2_2005_spp.html&usg=ALkJrhiYM309yfVKtVh4jNpc453AXQXwNg), ngày truy cập 28/6/2015.
40. **Phạm Quang Thái** (2015), "Một số đặc điểm dịch viêm não Nhật Bản tại Sơn La năm 2014", *Tạp chí Y học dự phòng*, tập 25, số 8 (168): 179-185.

41. **Bùi Minh Trang & CS** (2010), "Phát hiện virus VNNB genotype 1 và một số virus arbo khác từ muỗi ở Tây nguyên 2006–2007", *Tạp chí Y học dự phòng*, Tập 20, số 6 (114) pp. 154-162.
42. **Đặng Thị Trang & CS** (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) pp. 78 -83.
43. **Viện Vệ sinh Dịch tễ Tây Nguyên** (2013-2015), *Danh sách trường hợp "hội chứng não cấp" được xét nghiệm xác định viêm não Nhật Bản tại tổ Tiêm chủng Mở rộng- Khoa Dịch tễ, Buôn Ma Thuột.*
44. **Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung Ương** (1996), *Hội thảo về bệnh viêm não Nhật Bản ở Việt Nam, Hà Nội.*
45. **Hoàng Anh Vương & CS** (2003), "Sự lưu hành của vi rút viêm não Nhật Bản ở Tây Nguyên", *Tạp chí Y học dự phòng Tây Nguyên*, Số 1, pp. 1-5.
46. **Lê Xuân Xanh & CS** (1999), "Công tác phòng chống viêm não Nhật Bản tại Kiên Giang", *Tạp chí Y học dự phòng*, tập X số 2 (44), pp. 76-77.
47. **Nguyễn Thu Yến, T. V. T., Huỳnh Phương Liên & CS**, (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**

48. **Allander T., T. M. T., Eriksson M. et al**, (2005), "Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples", *PNAS, USA*, 102 (36): 12891-12896.

49. **Arai S., M. Y., Takasaki T.** (2008), "Japanese encephalitis: surveillance and elimination effort in Japan from 1982 to 2004", *Jpn J Infect Dis*, 61(5):333-8.
50. **Bradley S. Hollidge** (2010), "Arboviral Encephalitides: Transmission, Emergence, and Pathogenesis", *J. Neuroimmune Pharmacol* 5(3): 428–442.
51. **Bryant J., C. M. B., Nam V. S., Yen N. T., Duc H. M. and Miller B. R.**, (2005), "Short report: Isolation of Arboviruses from mosquitoes collected in northern VietNam", *Am.J. Trop. Med. Hyg.* 2005, 73 (2) pp. 470 – 473.
52. **Campbell G.L., H. S. L., Fischer M., Jacobson J.A., Hoke C.H., Hombach J.M., Marfin A.A., Solomon T.**, (2011), "Estimated global incidence of Japanese encephalitis: A systematic review", *Bulletin of the World Health Organization*, 89 (10) pp. 766-774.
53. **Chen C., Z. T., Jiang Y., Li C., Wang G., Gao J., Dong Y., Xing D., Guo X., Zhao T.**, (2019), "Vector Mosquito Ecology and Japanese Encephalitis Virus Genotype III Strain Detection from *Culex tritaeniorhynchus* and Pig in Huaihua, China", *Vector Borne Zoonotic Dis*, doi: 10.1089/vbz.2019.2453.
54. **Chen N., Y. 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.
55. **Chen Y.Y., F. Y. C., Tu W.C. et al.**, (2011), "Japanese encephalitis virus genotype replacement, Taiwan, 2009-2010", *Emerging Infectious Disease Journal*, 17(12): 2354-2356.
56. **Chu H1, Wu Z2, Chen H2, Li C1, Guo X1, Liu R1, Wang G3, Zhou M2, Zhao T1**, (2017), "Japanese Encephalitis Virus Infection Rate and Detection of Genotype I From *Culex tritaeniorhynchus* Collected From Jiangsu, China", *Vector Borne Zoonotic Dis*, 17 (7) :503-509. doi: 10.1089/vbz.2016.2086.

57. **Do PL, B. M. H. F. M. K. P. T.** (2015), "Molecular epidemiology of Japanese encephalitis in northern Vietnam, 1964-2011: Genotype replacement", *Virology Journal*, DOI 10.1186/s12985-015-0278-4.
58. **Do P.L., B. 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.
59. **Elizabeth T. Rogawski Manish Kakkar, S. S. A., Sanjay Chaturvedi, Tapan N. Dhole, Shaikh Shah Hossain, and Sampath K. Krishnan**, (2013), "Acute Encephalitis Syndrome Surveillance, Kushinagar District, Uttar Pradesh, India, 2011–2012", *Emerging Infectious Disease Journal*, 9(9): 1361-1367.
60. **Fan Y.C., L. J. W., Liao S.Y., Chen J.M., Chen Y.Y., Chiu H.C., et al**, (2017), "Virulence of Japanese encephalitis virus genotypes I and III, Taiwan", *Emerg Infect Dis*, 23:1883–1886. doi: 10.3201/eid2311.161443.
61. **Fang Y., Z. Y., Zhou Z.B., Xia S., Shi W.Q., Xue J.B., Li Y.Y., Wu J.T.**, (2019), "New strains of Japanese encephalitis virus circulating in Shanghai, China after a ten-year hiatus in local mosquito surveillance", *Parasit Vectors*, 12 (1): 22. doi: 10.1186/s13071-018-3267-9.
62. **Field N.B., e. a.** (2007), "Fields Virology", *Fifth Edition Volume*, Volume I: 795-839, 1101-1131.
63. **Fulmali P.V., S. 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.
64. **Gao X., L. H., Li X., Fu S., Cao L., Shao N., Zhang W., Wang Q., Lu Z., Lei W., He Y., Cao Y., Wang H., Liang G.**, (2019), "Changing Geographic

- Distribution of Japanese Encephalitis Virus Genotypes, 1935-2017", *Vector Borne Zoonotic Dis*, 19(1) pp. 35-44. doi: 10.1089/vbz.2018.2291.
65. **Gao X., L. 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.
66. **Gao X., L. 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.
67. **Garjito T.A., P. M. T., Susanti L., Prastowo D., Sa'adah S.R., Taviv Y., Satoto T.B.T., Waluyo J., Manguin S., Frutos R.**, (2019), "First evidence of the presence of genotype-1 of Japanese encephalitis virus in *Culex gelidus* in Indonesia ", *Parasit Vectors*. 2019 Jan 8, 12(1):19. doi: 10.1186/s13071-018-3285-7.
68. **Grant L Campbell, a. S. L. H., b Marc Fischer, b Julie A Jacobson, c Charles H Hoke, d Joachim M Hombach, e Anthony A Marfin, f Tom Solomon, g Theodore F Tsai, h Vivien D Tsu, i and Amy S Ginsburg** corresponding author, (2011), Estimated global incidence of Japanese encephalitis: a systematic review. Trang web <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3209971/>, ngày truy cập 28/2/2017.
69. **Han N., J. A. P., Chen Z. Y., Guo X. F., Zhong W., Fang N., Li L., Wen X. Y., Tao Z., Yuan M. and Rayner S.**, (2014), "Comparison of genotypes I and III in Japanese encephalitis virus reveals distinct differences in their genetic and host diversity", *Journal Virol*, 88(19): 11469-11479.

70. **Han N, A. J., Fang W, Liu SQ, Rayner S.,** (2015), "Investigation of the genotype III to genotype I shift in Japanese encephalitis virus and the impact on human cases", *Virol Sin*, 30: 277–289. doi: 10.1007/s12250-015-3621-4.
71. **Hanna J.N., R. 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.
72. **Hasegawa M., T. N., Yen N.T., Nam V.S., and Takagi M.,** (2008), "Influence of the Distribution of Host Species on Adult Abundance of Japanese Encephalitis Vectors—*Culex vishnui* Subgroup and *Culex gelidus*—in a Rice-Cultivating Village in Northern Vietnam", *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 78(1), 2008 pp. 159–168.
73. **Honjo S., M. M., Ishikawa T.,** (2019), "Effects of the Japanese Encephalitis Virus Genotype V-Derived Sub-Viral Particles on the Immunogenicity of the Vaccine Characterized by a Novel Virus-Like Particle-Based Assay ", *Vaccines (Basel) pii: E81. doi: 10.3390/vaccines7030081*, .
74. **Hsu L.C., C. Y. J., Hsu F.K. et al,** (2014), "The Incidence of Japanese Encephalitis in Taiwan-A Population-Base Study", *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8 (7): e 3030.
75. **Jan L, Y. Y., Wu YC, Horng CB, Wang GR.,** (2000), "Genetic Variation of Japanese Encephalitis virus in Taiwan", *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 62(4): 446-452.
76. **Jitendra Kumar Tiwari, B. M., Aradhana Chauhan, Hemant Malhotra, Pratibha Sharma, Farah Deeba, Khushbu Trivedi, Anjenya M Swamy,** (2017), "Etiological study of viruses causing acute encephalitis syndrome in North West India", *In J Med Micro*, Vol 35 (4), 529-534.

77. **Josephine G., A. A. L. L., Vito G. Roque, Jr., Amado O. Tandoc, III, Ava Kristy Sy., Fe Esperanza Espino, Maricel DeQuiroz-Castro, Youngmee Jee, Maria Joyce Ducusin, and Kimberley K. Fox,** (2015), "Epidemiology of Japanese Encephalitis in the Philippines: A Systematic Review", *PLoS Negl Trop Dis*, 9(3) : e 0003630.
78. **Karna AK, B. R.** (2019), "Experimental Evaluation of the Role of Ecologically-Relevant Hosts and Vectors in Japanese Encephalitis Virus Genotype Displacement", *Viruses* 11(1). pii: E32. doi: 10.3390/v11010032.
79. **Karthikeyan A., S. 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.
80. **Khinchi YR., K. A., and Yadav S.,** (2010), "Study of acute encephalitis syndrome in children", *J College of Med SciNepal*, 6: 7-13.
81. **Kim H., C. G. W., Jeong Y.E., Lee W.G., Chang K.S., Roh J.Y.,** (2015), "Detection of Japanese Encephalitis Virus Genotype V in *Culex orientalis* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in Korea", *PLoS ONE*, 10: pp. e0116547.
82. **Kolaskar AS 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.
83. **Kuwata R, N. P., Yen NT, Hoshino K, Isawa H, Higa Y, Hoang NV, Trang BM, Loan DP, Phong TV, Sasaki T, Tsuda Y, Kobayashi M, Sawabe K, Takagi M.,** (2013), "Surveillance of Japanese encephalitis virus infection in mosquitoes in Vietnam from 2006 to 2008", *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88 (4): 681 – 688.



84. **Kuwata R, S. T., Isawa H, Yen NT, Phong TV, Nga PT, Kurashige T, Hiramatsu Y, Fukumitsu Y, Hoshino K, Sasaki T, Kobayashi M, Sawabe,** (2013), "Characterization of DakNong virus, an insect nidovirus isolated from *Culex* mosquitoes in Vietnam", *Arch Virol*, 2273-2283.
85. **Kyaw AK1, Ngwe Tun MM2, Nabeshima T2, Buerano CC3,2, Ando T2, Inoue S2, Hayasaka D2, Lim CK4, Saijo M4, Thu HM1, Thant KZ1, Morita K,** (2019), "Japanese Encephalitis- and Dengue-Associated Acute Encephalitis Syndrome Cases in Myanmar", *Am J Trop Med Hyg*, 100 (3): 643-646. doi: 10.4269/ajtmh.18-0530.
86. **Li M.H., F. 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.
87. **Li Z., C. D., Lu P., Liang G. D., Vu Thi Que Huong, Phan Thi Nga, Huynh Thi Kim Loan, Sun G.,** (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.
88. **Liu B., G. X., Ma J., Jiao Z., Xiao J., Wang H.,** (2018), "Influence of Host and Environmental Factors on the Distribution of the Japanese Encephalitis Vector *Culex tritaeniorhynchus* in China", *Int J Environ Res Public Health*.
89. **Ma SP, Y. Y., Makino Y, Tadano M, Ono T, Ogawa MA,** (2003), "Major genotype of Japanese encephalitis virus currently circulating in Japan", *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 69(2): 151-154.
90. **Mackenzie J.S., C. K. B., Daniels P.W., Eaton B.T., Field H.E., Hall R.A., Halpin K., Johansen C.A., Kirkland P.D., Lam S.K., McMinn P., Nisbet D.J., Paru R., Pyke A.T., Ritchie S.A., Siba P., Smith D.W., Smith G.A., Hurk A.F., Wang L.F., Williams D.T.,** (2001), " Emerging viral

Diseases of Southeast Asia and the Western Pacific", *Emerging Infectious Disease*, Vol. 7, No. 3, pp. 497 - 504.

91. **Mackenzie JS, B. A., Deubel V**, (2002), "Japanese Encephalitis and West Nile Viruses-The Japanese encephalitis serological group of flaviviruses: a brief introduction to the group", *Springer; New York, NY, USA. [ PubMed ]*.
92. **Matting PF** (1970), "Contribution to the Mosquitoes fauna of Southeast Asia- VI. The genus Heizmannia Ludlow in Southeast Asia", *Contribution of the American Entomological Institute*, Vol 5 (7 ), pp. 104.
93. **Mourya DT, M. A., Soman RS**, (1991), "Transmission of Japanese encephalitis virus in *Culex pseudovishnui* & *Culex tritaeniorhynchus* mosquitoes", *Indian J Med Res*, Vol 93 pp. 250-252.
94. **Nabeshima T, I. S., Okamoto K, Posadas-Herrera G, Yu F,Uchida L, Ichinose A, Sakaguchi M, Sunahara T, Buerano CC,Tadena FP, Orbita IB, Natividad FF, Morita K**, (2014), "Tanay virus, a new species of virus isolated from mosquitoes in the Philippines", *J Gen Virol*, 95(Pt 6):1390–1395.
95. **Nabeshima T., L. 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(Pt 4): 827-832.
96. **Nerome K., Y. R., Fuke N., Izzati U.Z., Maegawa K., Sugita S., Kawasaki K., Kuroda K., Nerome R. (2018)**, (2018), "Development of a Japanese encephalitis virus genotype V virus-like particle vaccine in silkworms", *J Gen Virol*, 99 (7) pp. 897-907. doi: 10.1099/jgv.0.001081.

97. **Nga P.T., L. D. P., Thiem V.D.,** (2018), *Japanese Encephalitis Virus: Displacing of Virus Genotype and Efficacy of Vaccination*, E-Book ISBN: 978-93-87500-28-0
98. **Nga P.T., d. C. 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.
99. **Nga P.T., P. 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.
100. **Nitatpattana N., D.-P. A., Gouilh M.A. , et al.,** (2008), "Change in Japanese encephalitis virus distribution, Thailand", *Emerg Infect Dis*, 14: 1762-1765.
101. **Ooi M.H., W. 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., 13: 52-55.
102. **Pan XL., L. 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.
103. **Pyke A.T., e. I.** (2001), "The appearance of a second genotype of Japanese encephalities virus in the Australasian region", *Am J Tropmed Hyg*, 65.
104. **Qui P.T., T. 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.

105. **Rustagi R., B. S., Garg S.**, (2019), "Japanese encephalitis: Strategies for prevention and control in India", *Indian Journal of Medical Specialities*, Volume 10, Issue 1: 12-17.
106. **Schuh A.J., G. 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.
107. **Schuh A.J., W. 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 AJ, L. L., Tesh RB, Innis BL, Barrett AD**, (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.
109. **Schuh AJ, W. M., Brown AJ, Barrett AD**, (2013), " Phylogeography of Japanese encephalitis virus: Genotype is associated with climate ", *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(8): e2411.
110. **Service MW** (1993), *Mosquito Ecology*, London, UK, Elsevier Applied Science.
111. **Sohn Y.M.** (2000), "Japanese Encephalitis Immunization in South Korea: Past, Present, and Future", *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 6
112. **Tom Solomon** (2006), Control of Japanese Encephalitis — Within Our Grasp? *New England Journal of Medicine*. 355 (9): 869-71. Trang web

<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMp058263>, ngày truy cập 23/2/2016.

113. **Tom Solomon & cs** (2008), A cohort study to assess new WHO Japanese encephalitis surveillance standards. Trang web <https://www.who.int/bulletin/volumes/86/3/07-043307/en/>, ngày truy cập 23/2/2016.
114. **Su C.L., Y. C. F., Teng H.J., Lu L.C., Lin C., Tsai K.H., Chen Y.Y., Chen L.Y., Chang S.F. and Shu P.Y.**, (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.
115. **Supawat K. Sonja J. Olsen, A. P. C., Surapee Anantapreecha, Sahas Liamsuwan, Supoch Tunlayadechanont, Anannit Visudtibhan, Somsak Lupthikulthum, Kanlaya Dhiravibulya, Akravudh Viriyavejakul, Kiatsak Rajborirug, Veerachai Watanaveeradej**, (2010), "Japanese encephalitis virus remains an important cause of encephalitis in Thailand", *International Journal of Infectious Diseases*, 14(10): e 888–e892.
116. **Takamatsu Y., U. L., Nga P.T., Okamoto K., Nabeshima T., Thao D.T., Hai do T., Tuyet N.T., Duc H.M., Luat le X., 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", *Virology*, 10: 280.
117. **Tamura, K. e. a.** (2013), "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0", *Molecular biology and evolution*, 30 (12): 2725-2729.

118. **Tom Solomon, N. 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) pp. 3091-3098.
119. **Touch S., H. 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.
120. **Tsuchie H., O. K., Vythilingam I., Thayan R., Vijayamalar B., Sinniah M., Singh J., Wada T., Tanaka H., Kurimura T., Igarashi A.**, (1997), "Genotypes of Japanese encephalitis virus isolated in three states in Malaysia", *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 56(2): 153-158.
121. **Tuno N, T. Y., Takagi M.**, (2017), "How zoophilic Japanese encephalitis vector mosquitoes feed on humans", *J Med Entomol*, 2017;54:8-13.
122. **Van den Hurk AF, R. S., Mackenzie JS**, (2009), "Ecology and geographical expansion of Japanese encephalitis virus", *Ann. Rev. Entomol.* 2009; 54 :17–35. doi: 10.1146/annurev.ento.54.110807.090510.[ PubMed ].
123. **Wang H. and Liang G.** (2015), "Epidemiology of Japanese encephalitis: past, present, and future prospects", *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 11: 435-448.
124. **Wang H. Y., T. T., Fu S. H., Sun X. H., Zhang H. L., Wang Z. X., Hao Z. Y., Liang X. F., Yang W. Z., Kurane I. and Liang G. D.**, (2007), "Molecular epidemiological of Japanese encephalitis virus in China", *Journal of General Virology*, 88: 855 – 894.
125. **Wang Y.; Guo X., P. H., LuY., Zeng X., Dai K., Zuo S., Zho H., Zhang J., TongY.**, (2019), Complete genome sequence of a novel negevirus

- isolated from *Culex tritaeniorhynchus* in China. Trang web <https://doi.org/10.1007/s00705-018-04133-5>, ngày truy cập 28/12/2019.
126. **WHO**, Recommended Surveillance Standards. 2nd ed. WHO/CDS/CSR/ISR/99.2. Trang web [http://www.data.unaids.org/publications/irc-pub04/surveillancestandards\\_en.pdf](http://www.data.unaids.org/publications/irc-pub04/surveillancestandards_en.pdf)., ngày truy cập 18/2/2018.
127. **WHO Media centre** (2015), Japanese encephalitis. Trang web <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs386/en/>, ngày truy cập 25/2/2017.
128. **World Health Organization** (2014), "Japanese encephalitis", *Mediacentre Fact sheet*, No 386, March 2014.
129. **WRBU** (2013), WRBU - Traditional Mosquitoes Classification, July 2013. Trang web [http://www.wrbu.org/docs/mq\\_ClassificationTraditional201307.pdf](http://www.wrbu.org/docs/mq_ClassificationTraditional201307.pdf), ngày truy cập 28/6/2015.
130. **Yamaguchi Y, N. 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.
131. **Yan-Jang S. Huang , 2Stephen Higgs , 1,2Kate McElroy Horne , 2 và Dana L. Vanlandingham1**, (2014), Interaction Flavivirus-Mosquito, *Viruses*. 2014 Nov; 6(11): 4703–4730. Trang web <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4246245/>, ngày truy cập 08/2/2016.
132. **Yen NT, D. M., Hong NM., Hien NT, Fischer M, and Susan LH**, (2010), "Surveillance for Japanese Encephalitis in Vietnam, 1998–2007", *Am J Trop Med Hyg*, Vol 83(4): 816-819.

133. **Yun SI. and Young-Min Lee YM** (2014), "Japanese encephalitis: The virus and vaccines ", *Human Vaccin Immunother*, 10(2): 263–279.
134. **Zhang JS, Z. Q., Guo XF et al**, (2011), "Isolation and genetic characteristics of human genotype 1 Japanese encephalitis virus, China, 2009", *PLoS One* 2011, 6 (1) : e16418.
135. **Zhou Y., W. R., Feng Y., Zhao Q., Wen X., Huang X., Wen Y., Yan Q., Huang Y., Ma X., Han X., Cao S.**, (2018), "Genomic changes in an attenuated genotype I Japanese encephalitis virus and comparison with virulent parental strain", *Virus Genes*, 54(3): 424-431. doi: 10.1007/s11262-018-1559-y.



**Phụ lục 1: Phiếu thu thập thông tin bệnh nhân VNNB (2005- 2018)**

*(Điều tra hồi cứu tại Viện VSDTTN; TTYTDP tỉnh 04 tỉnh Tây Nguyên)*

**Tỉnh:**.....**Năm:**.....

T	T	S	tt	Họ tên	Tuổi	Giới	Dân tộc	Nghề nghiệp	Địa chỉ			Ngày, tháng mắc		Ngày, tháng lấy mẫu		Năm	Phương pháp XN	Kết quả XN	Tình trạng hiện tại		
									Thôn	Huyện	Tỉnh	Ngày	Tháng	Ngày	Tháng		(ME;P)	(+;-)	Sống	Tử vong	

- Phương pháp xét nghiệm: Mac Elisa (M); Phân lập (P);

- Kết quả xét nghiệm: Dương tính (+); Âm tính (-).

NGƯỜI CUNG CẤP SỐ LIỆU

*(Ký, ghi rõ họ tên)*

NGƯỜI ĐIỀU TRA

*(Ký, ghi rõ họ tên)*

ĐẠI DIỆN CƠ SỞ CUNG CẤP SỐ LIỆU

*(Ký, đóng dấu, ghi rõ họ tên)*

**Phụ lục 2: Phiếu thu thập thông tin, mẫu muỗi *Culex* giai đoạn (2005- 2016).**

*(Điều tra hồi cứu tại Viện VSDTTN; Viện VSDTTW, Viện SR-KST-CTTW; TTYTDP tỉnh 04 tỉnh TN)*

Mã số phiếu: .....

Ngày tháng năm hồi cứu: [...../...../.....]

Địa điểm hồi cứu (tên đơn vị, Đ/chỉ): .....

.....

TT	Mã Lab-	Mã Lab/ Số-	Tên loài	Địa chỉ	Ngày bắt muỗi	Số cá thể (muỗi/mẫu)	Ghi chú

**CHỦ NHIỆM ĐỀ TÀI/  
NGƯỜI ĐIỀU TRA**  
*(Ký, ghi rõ họ tên)*

**XÁC NHẬN CƠ QUAN CHỦ QUẢN**  
*(Ký, đóng dấu, ghi rõ họ tên)*

**NGƯỜI CUNG CẤP THÔNG TIN/  
CHỦ NHIỆM ĐỀ TÀI CHO PHÉP  
SỬ DỤNG SỐ LIỆU**





