

KHẢO SÁT TỶ LỆ NHIỄM *Rickettsia* VÀ *Orientia tsutsugamushi* TRÊN BỆNH NHÂN SỐT KHÔNG RÕ NGUYÊN NHÂN TẠI HÀ GIANG

LÊ THỊ LAN ANH ⁽¹⁾, BÙI THỊ THANH NGÀ ⁽¹⁾, TRỊNH VĂN TOÀN ⁽¹⁾, LÊ THỊ VÂN ANH ^(2, 3)

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh sốt do *Rickettsia* là bệnh truyền từ động vật sang người gây ra bởi vi khuẩn gram âm ký sinh nội bào bắt buộc thuộc bộ *Rickettsiales*, họ *Rickettsiaceae* thông qua vector truyền bệnh là các loài động vật thuộc ngành chân khớp, bao gồm: ve, mò, bọ chét, chấy rận... [1, 2]. Bệnh sốt *Rickettsia* được cho là nguyên nhân gây bệnh sốt phổ biến thứ hai trong khu vực Đông Nam Á sau sốt xuất huyết [3]. Họ *Rickettsiaceae* gồm 2 chi là *Rickettsia* và *Orientia* được chia thành 3 nhóm chính gồm nhóm sốt nổi mụn (*Rickettsia* spotted fever group), nhóm sốt phát ban (typhus group) và nhóm sốt mò (scrub typhus) [4]. Nhóm sốt phát ban và sốt mò phân bố phổ biến ở khu vực Đông Nam Á. Ở Châu Á, *Rickettsia typhi* là nguyên nhân chính gây bệnh sốt thuộc nhóm phát ban và *Orientia tsutsugamushi* là nguyên nhân phổ biến gây bệnh sốt mò [5, 6]. *Rickettsia* nhóm sốt nổi mụn gồm ít nhất 30 loài, tuy nhiên hiện nay mới chỉ phân lập được khoảng 20 loài gây bệnh gồm *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. africae*, *R. massiliae*, *R. philipii*, *R. conorii*, *R. sibirica*, *R. slovaca*, *R. raoultii*, *R. monacensis*, *R. aeschlimannii*, *R. helvetica*, *R. heilongjiangensis*, *R. japonica*, *R. honei*, *R. tamurae*, *Candidatus Rickettsia kellyi*, *R. australis*, *R. mongolotimonae*, *R. felis* và *R. akari*,... trong đó *R. rickettsii* là loài gây bệnh *Rickettsia* nhóm sốt núi đá phổ biến nhất ở Mỹ [7] và *R. conorii* là loài *Rickettsia* phổ biến ở khu vực châu Âu, châu Phi và châu Á [8, 9, 10].

Hiện nay, có nhiều phương pháp xét nghiệm phát hiện *Rickettsia* và *O. tsutsugamushi* được ứng dụng trong các bệnh viện như phương pháp nested PCR hoặc real-time PCR cho phát hiện sớm DNA của tác nhân gây bệnh và phương pháp ELISA phát hiện kháng thể trong mẫu máu và huyết thanh bệnh nhân. Nghiên cứu của tác giả N. V. Minh và cs, 2017 cho thấy đã phát hiện thấy DNA của vi khuẩn *O. tsutsugamushi* trong các mẫu máu bệnh nhân sốt không rõ nguyên nhân thu thập được tại Bệnh viện Đa Khoa tỉnh Hà Giang [11]. Nghiên cứu sự lưu hành kháng thể của nhóm sốt mò, sốt phát ban và sốt nổi mụn trên quần thể người khỏe mạnh tại khu vực miền Bắc Việt Nam cho thấy sự có mặt của các kháng thể kháng *Rickettsia* nhóm sốt mò, sốt nổi mụn và sốt phát ban lần lượt là 1,1%; 1,7% và 6,5% [12].

Địa bàn tỉnh Hà Giang có vị trí địa lý phức tạp giáp biên giới, sự giao thoa giữa các tác nhân dễ xảy ra, do đó nguy cơ lây nhiễm các bệnh lây truyền từ động vật sang người cao. Các nghiên cứu về sự lưu hành của *Rickettsia* tại khu vực biên giới như tỉnh Hà Giang hiện nay chưa có. Kết quả nghiên cứu sự lưu hành của *Rickettsia* trên các động vật gặm nhấm và ngoại ký sinh trùng tại Hà Giang của chúng tôi cho thấy đã có sự lưu hành của *Rickettsia* nhóm sốt nổi mụn và *Rickettsia typhi* bằng nested PCR (dữ liệu chưa công bố). Tuy nhiên, số liệu về sự lưu hành kháng thể các nhóm *Rickettsia* khác như nhóm sốt phát ban và sốt nổi mụn trong các bệnh nhân tại khu vực tỉnh Hà Giang chưa được cập nhật. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát sự lưu hành các kháng thể IgM của *O. tsutsugamushi*,

2 nhóm *Rickettsia* gồm nhóm sốt phát ban (*Rickettsia typhi*), nhóm sốt nổi mụn (*Rickettsia rickettsii*) và kháng thể IgG kháng *Rickettsia* nhóm sốt nổi mụn trong các mẫu bệnh nhân thu thập tại bệnh viện đa khoa tỉnh Hà Giang.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu máu tổng số của 162 bệnh nhân sốt nghi ngờ nhiễm *O. tsutsugamushi* được thu thập tại bệnh viện đa khoa tỉnh Hà Giang với các triệu chứng như: sốt cao trên 38°C kèm nhức đầu, đau cơ, có hoặc không có vết loét đặc trưng, có thể nổi hạch sưng đau tại khu vực có vết loét.

Mẫu máu tổng số (khoảng 2-3ml) được lấy vào ống đựng máu chống đông có chứa EDTA và bảo quản ở -80°C.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tách chiết DNA các mẫu nghiên cứu

Các mẫu máu bệnh nhân sốt không rõ nguyên nhân thu thập được tiến hành tách chiết DNA tổng số sử dụng bộ kit G-spin total DNA extraction (Intron, Hàn Quốc). Quy trình tách chiết DNA được tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.2.2. Phương pháp real-time PCR phát hiện *O. tsutsugamushi*, *Rickettsia typhi* và *Rickettsia* nhóm sốt nổi mụn

Bộ kit *O. tsutsugamushi*, *Rickettsia typhi* và *Rickettsia SFG* real-time PCR (Amplisens, LB Nga) được sử dụng cho phát hiện DNA của *O. tsutsugamushi*, *Rickettsia* nhóm sốt phát ban và sốt nổi mụn. Thành phần phản ứng trong 25 µl tổng thể tích có 10 µl hỗn hợp PCR 1; 4,5 µl hỗn hợp PCR 2; 0,5 µl DNA taq F polymerase; 10 µl DNA. Chương trình PCR được tiến hành như sau: 95°C trong 15 phút (1 chu kỳ), (95°C trong 10 giây, 60°C trong 20 giây) x 45 chu kỳ. Kênh phát huỳnh quang (FAM/Green, JOE/Yellow với bộ kit *Rickettsia SFG* và *O. tsutsugamushi* real-time PCR; FAM/Green, ROX/Orange với bộ kit *Rickettsia typhi* real-time PCR).

2.3. Đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu của đề tài đã được Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học của Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga thông qua.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả phát hiện *O. tsutsugamushi*, *Rickettsia typhi* và *Rickettsia* nhóm sốt nổi mụn

Hai loại mẫu bệnh phẩm chủ yếu được sử dụng trong xét nghiệm PCR là vẩy hoặc dịch vết loét và máu toàn phần. Một số nghiên cứu cho thấy xét nghiệm từ mẫu vẩy hay vết loét có độ nhạy cao hơn nhiều so với mẫu máu [13], tuy nhiên rất ít các bệnh nhân có vết loét điển hình vì vậy trong nghiên cứu này, mẫu máu của bệnh nhân đã được thu thập. Tiến hành real-time PCR trên 162 mẫu máu bệnh nhân thu

thập tại Bệnh viện đa khoa tỉnh Hà Giang cho thấy có 40/162 trường hợp dương tính với *O. tsutsugamushi*, chiếm tỷ lệ 24,69%. Các mẫu âm tính với *O. tsutsugamushi* (142 mẫu) được tiến hành real-time PCR phát hiện *Rickettsia typhi* và *Rickettsia* nhóm sốt nổi mẩn. Kết quả cho thấy có 2/142 mẫu dương tính với *Rickettsia* nhóm sốt nổi mẩn, chiếm tỷ lệ 1,41% và 8/142 trường hợp dương tính với *Rickettsia typhi*, chiếm tỷ lệ 5,63% (bảng 1).

Bảng 1. Tỷ lệ phát hiện *O. tsutsugamushi* và *Rickettsia* bằng real-time PCR

Tác nhân gây bệnh	<i>O. tsutsugamushi</i>	<i>Rickettsia typhi</i>	<i>Rickettsia</i> nhóm sốt nổi mẩn
Số mẫu dương tính (n)	40	8	2
Tỷ lệ dương tính (%)	24,69	5,63	1,41
Tổng số mẫu nghiên cứu	162	142	142

Nghiên cứu của tác giả Nguyễn Văn Minh và cộng sự, 2017 cho thấy trong 149 mẫu máu bệnh nhân chẩn đoán sơ bộ sốt mò tại một số bệnh viện khu vực phía Bắc trong đó có bệnh viện đa khoa tỉnh Hà Giang cho thấy có 31,5% mẫu dương tính với *O. tsutsugamushi* bằng kỹ thuật nested PCR [11]. Như vậy đã có sự lưu hành của *O. tsutsugamushi* tại địa bàn tỉnh Hà Giang. Tuy nhiên, hiện nay chưa có công bố nào về tỷ lệ nhiễm *Rickettsia* nhóm sốt nổi mẩn và *Rickettsia typhi* trên các bệnh nhân tại Việt Nam.

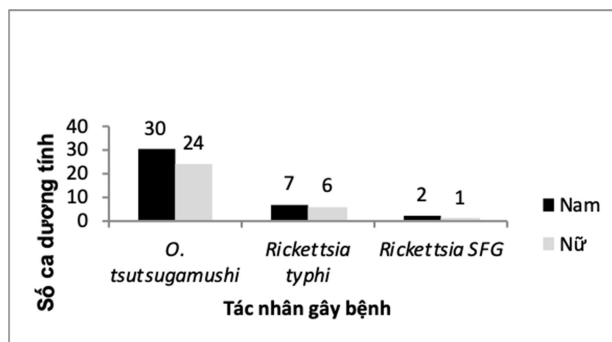
3.2. Kết quả ELISA phát hiện kháng thể IgM kháng *O. tsutsugamushi*, *Rickettsia typhi* và *Rickettsia* nhóm sốt nổi mẩn

Để xác định tỷ lệ lưu hành kháng thể kháng *O. tsutsugamushi*, *Rickettsia typhi* và *Rickettsia* nhóm sốt nổi mẩn trong các mẫu bệnh nhân thu thập tại bệnh viện đa khoa tỉnh Hà Giang, 162 mẫu huyết thanh bệnh nhân đã được thực hiện. Kết quả cho thấy có 54/162 mẫu dương tính với IgM kháng *O. tsutsugamushi*, chiếm tỷ lệ 33,33%, 13/162 mẫu dương tính với *Rickettsia typhi*, chiếm tỷ lệ 8,02%, 3/162 mẫu dương tính với *Rickettsia* nhóm sốt nổi mẩn, chiếm tỷ lệ 1,85% (bảng 2). Kết quả này khá tương đồng với kết quả Real-time PCR. Trong số 162 bệnh nhân sốt không rõ nguyên nhân thì số bệnh nhân nhiễm *O. tsutsugamushi* có tỷ lệ cao nhất, tiếp đến là *Rickettsia typhi* và thấp nhất là *Rickettsia* nhóm sốt nổi mẩn.

Bảng 2. Kết quả ELISA phát hiện kháng thể IgM kháng *O. tsutsugamushi*, *Rickettsia typhi* và *Rickettsia* nhóm sốt nổi mẩn

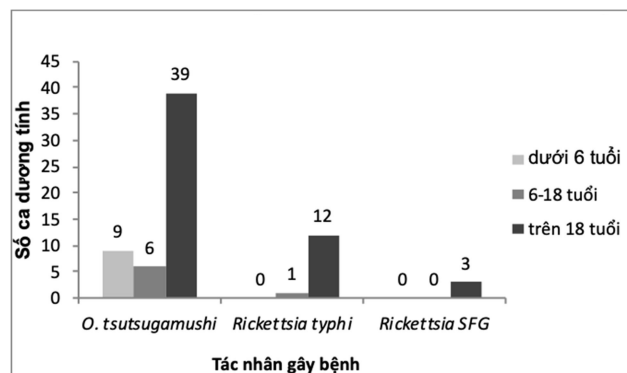
Tác nhân gây bệnh	<i>O. tsutsugamushi</i>	<i>Rickettsia typhi</i>	<i>Rickettsia</i> nhóm sốt nổi mẩn
Số mẫu dương tính (n)	54	13	3
Tỷ lệ dương tính (%)	33,33	8,02	1,85
Tổng số mẫu nghiên cứu	162	162	162

Trong nghiên cứu này, 162 mẫu bệnh cũng được tiến hành ELISA phát hiện kháng thể IgG kháng *Rickettsia* nhóm sốt nổi mụn. Kết quả cho thấy có 3/162 trường hợp dương tính, chiếm tỷ lệ 1,85%. Nghiên cứu sự lưu hành kháng thể IgG kháng *Rickettsia* của nhóm tác giả Nguyễn Vũ Trung và cộng sự năm 2017 trên đối tượng người khỏe mạnh tại khu vực miền Bắc Việt Nam cho thấy nhóm sốt phát ban chiếm tỷ lệ cao nhất 6,5%, tiếp đến là nhóm sốt nổi mụn chiếm 1,7% và cuối cùng là nhóm sốt mò chiếm 1,1% [12]. Như vậy, cả người bệnh và người khỏe mạnh đều có sự lưu hành của *Rickettsia* nhóm sốt nổi mụn. Kết quả này đóng vai trò quan trọng trong giám sát dự phòng bệnh sốt do *Rickettsia* tại Hà Giang nói riêng và các khu vực miền Bắc Việt Nam nói chung.



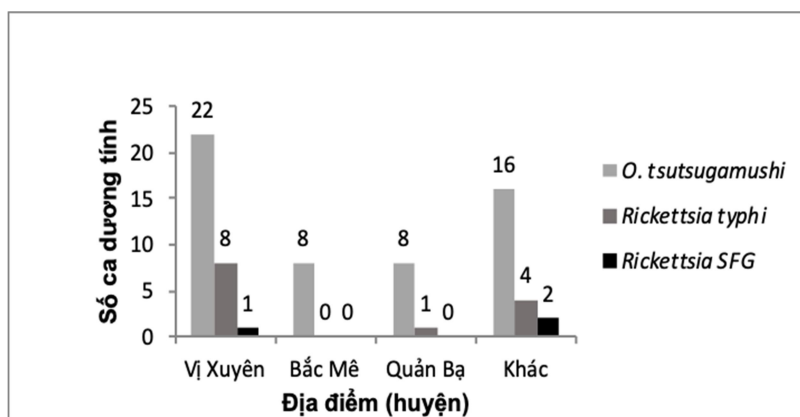
Hình 1. Sự phân bố tác nhân gây bệnh theo giới tính

Phân tích sự phân bố của 3 tác nhân gây bệnh gồm *O. tsutsugamushi*, *Rickettsia typhi* và *Rickettsia* nhóm sốt nổi mụn theo giới tính cho thấy, số các bệnh nhân nam dương tính với tác nhân *O. tsutsugamushi* gây bệnh sốt mò cao hơn nữ. Cụ thể trong 54 trường hợp dương tính với *O. tsutsugamushi* có 30 trường hợp là nam và 24 trường hợp là nữ. Có thể giải thích rằng, tại Hà Giang, nam giới hàng ngày phải tiếp xúc với rừng núi, động vật gặm nhấm và ngoại ký sinh trùng của chúng đã làm tăng nguy cơ nhiễm sốt mò so với nữ giới. Không có sự khác nhau nhiều về giới tính trong số các bệnh nhân dương tính với *Rickettsia typhi* và *Rickettsia* nhóm sốt nổi mụn. Trong 13 trường hợp dương tính với *Rickettsia typhi* có 7 trường hợp là nam và 6 trường hợp là nữ. Tương tự, trong 3 trường hợp dương tính với *Rickettsia* nhóm sốt nổi mụn có 2 mẫu là nam, 1 mẫu là nữ (hình 1).



Hình 2. Sự phân bố tác nhân gây bệnh theo độ tuổi

Kết quả phân tích sự phân bố tác nhân gây bệnh theo độ tuổi cho thấy, trong 3 độ tuổi phân tích gồm dưới 6 tuổi, từ 6 đến 18 tuổi và trên 18 tuổi cho thấy số ca dương tính với cả 3 tác nhân trên đều thuộc độ tuổi trên 18 tuổi. Cụ thể, trong các mẫu dương tính với *O. tsutsugamushi*, 72% trường hợp ở độ tuổi trên 18 tuổi. trong khi 92% mẫu dương tính với *Rickettsia typhi* nằm ở độ tuổi này (hình 2).



Hình 3. Sự phân bố tác nhân gây bệnh theo địa điểm

Phân tích sự phân bố của 3 tác nhân *O. tsutsugamushi*, *Rickettsia typhi* và *Rickettsia* nhóm sốt nổi mụn theo vùng địa lý. Phần lớn các mẫu bệnh thu thập tại bệnh viện đa khoa tỉnh Hà Giang là mẫu của những người sống trên địa bàn tỉnh Hà Giang gồm huyện Vị Xuyên, Quản Bạ, Bắc Mê, thành phố Hà Giang, Yên Minh, Quang Bình,... ngoại trừ có 2 trường hợp ở Cao Bằng, 1 trường hợp ở Đắc Lắc. Kết quả phân bố theo địa điểm cho thấy có một tỷ lệ cao các trường hợp dương tính với 3 tác nhân trên thuộc huyện Vị Xuyên, tỉnh Hà Giang (hình 3). Động vật gặm nhấm và ngoại ký sinh trùng là hai nguồn lây nhiễm các tác nhân *Rickettsia* chính. Vì vậy, cần có thêm các nghiên cứu khảo sát về sự lưu hành các tác nhân *Rickettsia* trên đối tượng động vật gặm nhấm, đặc biệt trên địa bàn huyện Vị Xuyên, tỉnh Hà Giang. Nghiên cứu này sẽ đóng vai trò quan trọng trong dự phòng bệnh sốt do *Rickettsia*.

4. KẾT LUẬN

- Xét nghiệm real-time PCR cho thấy, tỷ lệ dương tính với *O. tsutsugamushi*, *R. typhi*, *Rickettsia SFG* trong 162 bệnh nhân sốt không rõ nguyên nhân lần lượt là 24,69%, 5,63%, và 1,41%. Các ca dương tính không có sự khác nhau nhiều về giới tính, tập trung chủ yếu ở lứa tuổi trên 18 và phân bố chủ yếu trên địa bàn huyện Vị Xuyên, tỉnh Hà Giang.

- Tỷ lệ lưu hành các kháng thể IgM kháng *O. tsutsugamushi*, *R. typhi*, *Rickettsia SFG* trong 162 bệnh nhân xét nghiệm bằng ELISA lần lượt là 33,33%, 8,02%, và 1,85%. Tỷ lệ lưu hành kháng thể IgG kháng *Rickettsia SFG* là 1,85%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Blanda V., Torina A., La Russa F., D'Agostino R., Randazzo K., Scimeca S., Giudice E., Caracappa S., Cascio A., de la Fuente J., *A retrospective study of the characterization of Rickettsia species in ticks collected from humans*, Ticks Tick Borne Dis., 2017, Jun, **8**(4):610-614.
2. Parola P., Paddock C.D., Socolovschi C., Labruna M.B., Mediannikov O., Kernif T., Abdad M.Y., Stenos J., Bitam I., Fournier P.E., Raoult D., *Update on tick-borne rickettsioses around the world: A geographic approach*, Clin. Microbiol. Rev., 2013, **26**(4):657-702.
3. Acestor N., Cooksey R., Newton P.N. et al., *Mapping the aetiology of non-malarial febrile illness in Southeast Asia through a systematic review-terra incognita impairing treatment policies*, PLoS ONE 2012, 2016, **7**(9):e44269.
4. Bhengsri S., Baggett H.C., Edouard S. et al., *Sennetsu neorickettsiosis, spotted fever group, and typhus group rickettsioses in three provinces in Thailand*, Am J. Trop Med Hyg., 2016, **95**(1):43-49.
5. Chikeka I., Dumler J.S., *Neglected bacterial zoonoses*, Clin. Microbiol. Infect., 2015, **21**(5):404-415.
6. Izzard L., Fuller A., Blacksell S.D. et al., *Isolation of a novel Orientia species (O. chuto sp. nov.) from a patient infected in Dubai*, J. Clin. Microbiol., 2010, **8**(12):4404-4409.
7. Kato C.Y., Chung I.H., Robinson L.K., Austin A.L., Dasch G.A., Massung R.F., *Assessment of real-time PCR assay for detection of Rickettsia spp. and Rickettsia rickettsii in banked clinical samples*, J. Clin. Microbiol., 2013, **51**(1):314-317.
8. Nanayakkara D.M., Rajapakse R.P., Wickramasinghe S., Kularatne S.A., *Serological evidence for exposure of dogs to Rickettsia conorii, Rickettsia typhi, and Orientia tsutsugamushi in Sri Lanka*, Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 2013, **13**(8):545-549.
9. Niang M., Parola P., Tissot-Dupont H., Baidi L., Brouqui P., Raoult D., *Prevalence of antibodies to Rickettsia conorii, Rickettsia africae, Rickettsia typhi and Coxiella burnetii in Mauritania*, Eur J Epidemiol., 1998, **14**(8):817-818.
10. Parola P., *Tick-borne rickettsial diseases: emerging risks in Europe. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious J.*, 2004, **27**(5):297-304.
11. Nguyễn Văn Minh, Nguyễn Văn Tình, Phạm Thị Hà Giang, Trịnh Văn Toàn, Dương Tuấn Linh, Võ Viết Cường, *Đặc điểm di truyền phân tử của vi khuẩn Orientia tsutsugamushi gây bệnh sốt mò ở một số tỉnh phía Bắc, Tạp chí KH&CN Nhiệt đới*, 2017, **13**(11):59-66.
12. Trung N.V., Hoi L.T., Thuong N.T.H., Toan T.K., Huong T.T.K., Hoa T.M., Fox A., Kinh N.V., Van Doorn H.R., Wertheim H.F.L., Bryant J.E., Nadjm B., *Seroprevalence of scrub typhus, typhus, and spotted fever among rural and urban populations of northern Vietnam*, Am J. Trop Med Hyg., 2017, **96**(5):1084-1087.

13. Ono A., Nakamura K., Hihuchi S., Miwa Y., Nakamura K., Tsunoda T., *Successful diagnosis using eschar for PCR specimen in tsutsugamushi disease.* Intern Med., 2002, **41**:408-411.

SUMMARY

SURVEY OF *RICKETTSIA* AND *ORIENTIA TSUTSUGAMUSHI* INFECTION RATE IN UNKNOWN ORIGIN FEVER PEOPLE IN HA GIANG PROVINCE

Rickettsial fever is one of a zoonotic disease which is caused by bacteria genus *Rickettsia*. The ectoparasites such as ticks, mites, fleas, lice... were demonstrated as the main transmitted vectors through host reservoirs are rodents and small animals including mice, squirrels, mink... These is the main cause of *Rickettsia* infection in human. The prevalence of *Rickettsia* and *Orientia tsutsugamushi* in rodents and ectoparasites and patients in Vietnam were reported. However, the data still was not clearly and fully understanding. Ha Giang is one of the important provinces with complex mountainous terrain where there is a high risk of zoonotic diseases. The *O. tsutsugamushi* was detected in patients collected in Ha Giang province. In current paper, we describe the result for investigating the *Rickettsia* infection rate as well as the seroprevalence of scrub typhus, *Rickettsia typhi* and *Rickettsia* spotted fever group in fever of unknown origin patient collecting in Ha Giang province general Hospital. The ELISA result in 162 patients indicates that seroprevalence of *Orientia tsutsugamushi*, *Rickettsia typhi*, and *Rickettsia* spotted fever group are 33.33%, 8.02%, và 1.85%, respectively. The real-time PCR result shows that the positive rates of *Orientia tsutsugamushi*, *Rickettsia typhi* and *Rickettsia* spotted fever group are 24.69%, 5.63%, và 1.41%, respectively.

Keywords: *Rickettsia typhi*, *rickettsia* spotted fever group, *orientia tsutsugamushi*, scrub typhus, spotted fever group, typhus group, non-caused fever, sốt mò, sốt nổi mụn, sốt không rõ nguyên nhân.

Nhận bài ngày 30 tháng 10 năm 2019

Phản biện xong ngày 31 tháng 12 năm 2019

Hoàn thiện ngày 08 tháng 01 năm 2020

⁽¹⁾ Viện Y sinh Nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga

⁽²⁾ Học Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

⁽³⁾ Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam