

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



NGUYỄN THỊ THƯỜNG

**NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT
CÁC GAM CHUẨN CHO RT-PCR
ỨNG DỤNG TRONG CHẨN ĐOÁN CÚM
VÀ KIỂM ĐỊNH CÔNG HIỆU VẮC XIN SỞI**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI – NĂM 2014

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

NGUYỄN THỊ THƯỜNG

**NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT
CÁC GAM CHUẨN CHO RT-PCR
ỨNG DỤNG TRONG CHẨN ĐOÁN CÚM
VÀ KIỂM ĐỊNH CÔNG HIỆU VẮC XIN SỞI**

Chuyên ngành: Vi sinh Y học

Mã số: 62720115

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

1. GS.TS. Huỳnh Phương Liên
2. GS.TS. Nguyễn Trần Hiền

HÀ NỘI – NĂM 2014

Lêi cẢm Ơn

Tôi xin phép được gửi những lời cảm ơn sâu sắc tới Ban Giám hiệu, Phòng Đào tạo Sau đại học, Bộ môn vi sinh vật Y học trường Đại học Y Hà Nội, Ban Giám đốc, Khoa Virus - Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương đã tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi hoàn thành Luận án này.

Tôi xin cảm ơn Bộ Y tế đã phê duyệt và cấp kinh phí cho đề tài tuyển chọn “Nghiên cứu sản xuất bộ mẫu chuẩn RNA in vitro và đánh giá kết quả trên thực địa” cho nhóm nghiên cứu của Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương mà một phần kết quả của đề tài được trình bày trong Luận án.

Tôi xin cảm ơn Viện Pasteur Paris, Cộng hòa Pháp đã cho tôi tham gia khóa học về Vắc xin học và Miễn dịch học để giúp tôi hoàn thành Luận án thuận lợi hơn và cung cấp cho tôi nhiều hình ảnh minh họa trình bày trong Luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn GS.TS. Huỳnh Phương Liên, là giáo viên chính, đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo và tạo mọi điều kiện cho tôi hoàn thành Luận án này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn GS.TS. Nguyễn Trần Hiền, là giáo viên hướng dẫn, đã tạo mọi điều kiện và cho phép tôi tham gia Dự án SISEA để nâng cao năng lực nghiên cứu sản xuất chứng dương RNA và nghiên cứu về 18 tác nhân virus đường hô hấp cũng như cung cấp hầu hết kinh phí và toàn bộ trang thiết bị cho nghiên cứu của Luận án này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn PGS.TS. Nguyễn Đăng Hiền, Giám đốc Trung tâm Nghiên cứu và Sản xuất Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (POLYVAC) đã cung cấp cho tôi hơn 700 liều vắc xin sởi đơn sản xuất trong 4 năm (2010-2013) để tôi thực hiện nghiên cứu.

Tôi xin trân trọng cảm ơn PGS.TS. Lê Văn Phùng, trưởng Bộ môn Vi sinh Trường Đại học Y Hà Nội đã tạo điều kiện cho tôi tham gia học một số khóa học liên quan đến mẫu chuẩn, xuất xưởng vắc xin và thẩm định phương pháp do Tổ

chức Y tế Thế giới tổ chức để tôi có thể thực hiện được phân phân tích thẩm định phương pháp của Luận án này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn các thầy, cô giáo của Bộ môn Vi sinh Trường Đại học Y Hà Nội đã hướng dẫn cho tôi các Học phần Tiến sỹ, Chuyên đề Tiến sỹ và Tiểu luận Tổng quan Tiến sỹ cũng như toàn thể cán bộ của Bộ môn đã động viên, tạo mọi điều kiện cho tôi hoàn thành Luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn TS. Phạm Hồng Nhung, giáo vụ Sau Đại học Bộ môn Vi sinh Trường Đại học Y Hà Nội đã hết sức nhiệt tình, có trách nhiệm, động viên, chan hòa, và tạo mọi điều kiện thuận lợi để tôi hoàn thành Luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn TS. Luật sư Victor E. Fitzmaurice đã hiệu đính bản Tóm tắt luận án tiếng Anh.

Tôi xin trân trọng cảm ơn toàn thể cán bộ phòng thí nghiệm các virus herpes mà nay là phòng thí nghiệm virus viêm gan và các cán bộ của Dự án SISEA, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương đã thực hiện nghiêm túc và hợp tác cùng tôi để có được kết quả nghiên cứu của Dự án mà một phần được trình bày trong Luận án này.

Tôi cũng xin chân thành cảm ơn bạn bè, đồng nghiệp đã luôn động viên, dõi theo các bước tiến và chia sẻ với tôi nhiều vui buồn trong cuộc sống và công việc.

Sau cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn vô hạn tới mẹ và gia đình đã cho tôi cuộc sống này, nuôi dưỡng, bao bọc và dạy tôi biết sống tốt, thẳng thắn, và yêu công việc.

Hà Nội, tháng 10 năm 2014

Nghiên cứu sinh

BS. ThS. Nguyễn Thị Thuồng

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là NGUYỄN THỊ THƯỜNG, nghiên cứu sinh khóa 27, Trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Vi sinh Y học, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của GS.TS. Huỳnh Phương Liên và GS.TS. Nguyễn Trần Hiền.
2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.
3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật về những cam kết này.

Hà Nội, ngày tháng năm 2014

Bs. Ths. Nguyễn Thị Thường

CHỮ VIẾT TẮT TRONG LUẬN ÁN

A	Adenin
ACV.....	Aciclovir
ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity (Đáp ứng miễn dịch gây độc qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể)
ARN	Ribonucleic acid (Acid ribonucleic)
ADN	Deoxyribonucleic acid (Acid deoxyribonucleic)
CDC	Centers for disease control and prevention (Trung tâm Phòng và Kiểm soát Bệnh tật)
CEF.....	Chicken embryonic fibroblast (Nguyên bào sợi phôi gà)
CMV	Cytomegalovirus
CoP	Correlate of protection (Yếu tố bảo vệ)
CPE:	Cytopathic effects (Hủy hoại tế bào)
Ct	Threshold cycle (Chu kỳ ngưỡng)
CV	Coefficient of variation (Hệ số biến thiên)
EDTA	Ethylenediamin tetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (Thử nghiệm miễn dịch hấp phụ gắn enzyme)
EQA.....	External quality assessment (Chương trình đánh giá chất lượng từ bên ngoài)
FCS.....	Fetal calf serum (Huyết thanh bê bào thai)
FDA	French development agency (Cơ quan Phát triển Pháp)

HA	Haemagglutination (Ngưng kết hồng cầu)
hAdV	Human adenovirus (Virus adeno gây bệnh ở người)
hCoV.....	Human coronavirus (Virus corona gây bệnh ở người)
HIV	Human immunodeficiency virus (Virus gây suy giảm miễn dịch ở người)
HI.....	Haemagglutination inhibition (Ức chế ngưng kết hồng cầu)
hMPV	Human metapneumovirus (Virus gây viêm phổi ở người)
HPV	Human papillomavirus (Virus gây u nhú ở người)
hRSV	Human respiratory syncytial virus) (Virus hợp bào hô hấp)
HRV.....	Human rhinovirus (Virus rhino gây bệnh ở người)
<i>hSLAM</i>	Human signaling lymphocyte activation marker (Phân tử dấu ấn tín hiệu hoạt hóa tế bào lympho ở người)
HSV	Herpes simplex virus (Virus herpes simplex)
IFA	Immunofluorescence assay (Thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang)
ILI.....	Influenza-like illness (Bệnh tương tự cúm/hội chứng cúm)
IQC	Internal quality control (Chương trình nội kiểm)
ISO	International standard organization (Tổ chức Tiêu chuẩn quốc tế)
Log	Logarit (cơ số 10)

MDCK Madin-Darby canine kidney
(Tế bào thường trực thận chó)

MMR Measles - Mumps - Rubella
(Sởi - Quai bị - Rubella)

NAT: Nucleic acid testing
(Xét nghiệm acid nucleic)

NCBI..... National center for biotechnology information
(Trung tâm quốc gia về thông tin công nghệ sinh học)

NIH..... National institute of health
(Viện Sức khỏe quốc gia)

NK Natural killer
(Tế bào diệt tự nhiên)

OD Optical density
(Mật độ quang)

OMV Outer membrane vesicle
(Túi màng ngoài/vô bào)

OPV Oral polio vaccine
(Vắc xin bại liệt uống)

PCR Polymerase chain reaction
(Phản ứng chuỗi polymerase)

pdm..... Pandemic
(Đại dịch)

PFA..... Foscarnet

PFU..... Plaque forming unit
(Đơn vị tạo đám hoại tử)

QA Quality assurance
(Đảm bảo chất lượng)

QC Quality control
(Kiểm soát chất lượng)

RFLP..... Restriction fragments length polymorphism
(Phản ứng đa dạng chiều dài đoạn cắt enzyme giới hạn)

RNP	Ribonucleoprotein (Phức hợp ribonucleoprotein)
ROR.....	Rougeole - Oreillons - Rubéole (Sởi - Quai bị - Rubella)
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction (Phản ứng chuỗi polymerase phiên mã ngược)
SA.....	Sialic acid (Acid sialic)
SARI.....	Severe acute respiratory infection (Viêm đường hô hấp cấp tính nặng)
SDS.....	Sodium dodecyl sulfate
SISEA.....	Surveillance and investigation of endemic situations in South-East Asia (Giám sát và điều tra tình hình dịch ở Đông Nam Á)
SOP.....	Standard operating procedures (Quy trình thực hành chuẩn)
SVP.....	Severe viral pneumonia (Viêm phổi nặng do virus)
T	Thymine
TCID ₅₀	Tissue culture infectivity dose (Liều gây nhiễm 50% nuôi cấy tế bào)
Vero	Verda reno (Tế bào thận khỉ xanh Châu Phi)
VLP	Viral-like particle (Phần tử tương tự hạt virus)
VZV.....	Varicella-Zoster virus
WHO.....	World Health Organization (Tổ chức Y tế Thế giới)

MỤC LỤC

	Trang
ĐẶT VẤN ĐỀ	1
I. TỔNG QUAN.....	3
1.1. Tổng quan một số vấn đề về cúm.....	3
1.1.1. Phép gọi tên.....	3
1.1.2. Hình thái, cấu trúc	4
1.1.3. Kháng nguyên và tính đa dạng chủng.....	5
1.1.4. Sự nhân lên của virus cúm	7
1.1.5. Dịch tễ học	9
1.1.6. Chẩn đoán phòng thí nghiệm	10
1.1.7. Điều trị	12
1.1.8. Tình hình nghiên cứu về cúm và tỷ lệ nhiễm cúm	13
1.2. Tổng quan một số vấn đề về sởi.....	25
1.2.1. Phép gọi tên.....	25
1.2.2. Hình thái, cấu trúc	26
1.2.3. Sự nhân lên của virus.....	27
1.2.4. Các triển vọng thanh toán sởi.....	29
1.2.6. Các nghiên cứu liên quan đến sởi.....	29
1.3. Sản xuất chứng dương ARN <i>in vitro</i> và kiểm định công hiệu vắc xin.....	32
II. ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	40
2.1. Đối tượng nghiên cứu	40
2.2. Vật liệu nghiên cứu.....	42
2.2.1. Cơ sở vật chất và trang thiết bị, máy móc.....	42
2.2.2. Sinh phẩm hóa chất.....	44
2.2.3. Môi và đầu dò.....	45
2.2.4. Tế bào.....	48
2.2.5. Phần mềm phân tích và nguồn thông tin.....	48
2.3. Phương pháp nghiên cứu	49
2.3.1. Sản xuất chứng dương ARN <i>in vitro</i>	49

2.3.2. Xác định tỷ lệ nhiễm cúm	55
2.3.2. Xây dựng phương pháp kiểm định vắc xin sởi	61
III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	67
3.1. Sản xuất chứng dương ARN	67
3.1.1. Tạo khuôn mẫu cho phương pháp phiên mã cổ điển	67
3.1.2. Tạo khuôn mẫu cho phương pháp phiên mã trực tiếp	74
3.1.3. Phiên mã.....	75
3.2. Xác định tỷ lệ nhiễm cúm bằng RT-PCR	81
3.2.1. Đặc điểm đối tượng nghiên cứu	81
3.2.2. Đặc điểm trường hợp tử vong do cúm.....	81
3.2.3. Ứng dụng chứng dương trong xác định tỷ lệ nhiễm cúm	82
3.2.4. Tỷ lệ đồng nhiễm cúm và các virus khác.....	84
3.2.5. Phân bố nhiễm cúm theo giới tính, nhóm tuổi và thời gian	86
3.3. Kiểm định công hiệu vắc xin sởi.....	91
3.3.1. Công hiệu vắc xin mẫu chuẩn bằng tạo đám hoại tử.....	91
3.3.2. Công hiệu vắc xin mẫu chuẩn bằng real-time RT-PCR.....	91
3.3.3. Sự ổn định của ARN tách chiết bằng TpLR	93
3.3.4. Công hiệu vắc xin sởi thành phẩm	94
3.3.5. Độ lặp lại của phản ứng	98
IV. BÀN LUẬN.....	103
4.1. Kết quả sản xuất các gam chuẩn	103
4.1.1. Tạo dòng plasmid tái tổ hợp và chuyển nạp.....	103
4.1.2. Kiểm tra chuyển nạp.....	105
4.1.3. Tạo mạch thẳng ADN plasmid bằng cắt enzyme giới hạn	110
4.1.4. Kết quả phiên mã <i>in vitro</i>	111
4.2. Tỷ lệ nhiễm cúm tại Hải Dương năm 2009-2011.....	115
4.2.1. Đặc điểm đối tượng nghiên cứu	115
4.2.2. Tỷ lệ tử vong và nhiễm cúm của bệnh nhân SARI.....	115
4.2.3. Phân bố nhiễm cúm theo giới tính, nhóm tuổi và thời gian	122
4.3. Bước đầu xây dựng phương pháp xác định hiệu giá vắc xin sởi đơn bằng real-time RT-PCR	125
4.3.1. Thử nghiệm tối ưu hóa các điều kiện phản ứng	125

4.3.2. Công hiệu vắc xin sợi thành phẩm	133
4.3.3. Thẩm định phương pháp	135
4.4. Bàn luận về các ưu điểm của đề tài	143
4.4.1. Chất lượng của sinh phẩm.....	143
4.4.2. Trang thiết bị máy móc	143
4.4.3. Quy trình thực hiện thử nghiệm	143
4.4.4. Phân tích kết quả và sự phù hợp với mục tiêu nghiên cứu	145
4.4.5. Chứng của phòng thí nghiệm và chứng quốc tế.....	145
4.4.6. Hoạt động độc lập.....	146
4.5. Bàn luận về những hạn chế của đề tài	146
4.5.1. Hạn chế trong sản xuất chứng dương ARN <i>in vitro</i>	146
4.5.2. Hạn chế trong xác định tỷ lệ nhiễm cúm	146
4.5.3. Hạn chế trong nghiên cứu xác định công hiệu vắc xin sợi	147
KẾT LUẬN.....	148
NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN	149
ĐỀ XUẤT	150
TÀI LIỆU THAM KHẢO	

CÁC HÌNH SỬ DỤNG TRONG LUẬN ÁN

	Trang
Hình 1.1. Cấu trúc hạt virus cúm.....	4
Hình 1.2. Nguồn gốc các chủng cúm đại dịch 1918-1977	5
Hình 1.3. Cơ chế phiên mã của virus cúm A	8
Hình 1.4. Sơ đồ chẩn đoán phòng thí nghiệm của cúm.....	11
Hình 1.5. Cấu trúc của oseltamivir (a) và zanamivir (b)	12
Hình 1.6. Nguồn gốc chủng cúm A/H1N1pdm2009.....	16
Hình 1.7. Các ca bệnh và phân típ cúm tại Trung quốc, 2009-2013.....	18
Hình 1.8. Các ca bệnh và phân típ cúm tại Hoa Kỳ, 2009-2013.....	20
Hình 1.9. Lưu hành cúm và phân típ cúm tại Việt Nam, 2006-2012.....	22
Hình 1.10. Tỷ lệ nhiễm cúm và phân típ cúm ở bệnh nhân SARI, 2011-2012.....	23
Hình 1.11. Ảnh chụp dưới kính hiển vi điện tử và sơ đồ virus sởi.....	26
Hình 1.12. Sơ đồ bộ máy di truyền (genome) của virus sởi.	27
Hình 1.13. Sơ đồ nhân lên của virus sởi.....	28
Hình 1.14. Sơ đồ quá trình sản xuất chủng vắc xin sởi.....	30
Hình 2.1. Sơ đồ quá trình phiên mã (cổ điển và trực tiếp).....	49
Hình 2.2. Sơ đồ cơ chế phiên mã cổ điển	53
Hình 2.3. Sơ đồ cơ chế phiên mã trực tiếp	54
Hình 2.4. Sơ đồ xét nghiệm của dự án SISEA.....	57
Hình 2.5. Sơ đồ thử nghiệm tạo đám hoại tử.....	62
Hình 2.6. Xây dựng phương pháp xác định công hiệu vắc xin sởi bằng real-time RT-PCR	64
Hình 3.1. Khuếch đại các đoạn gen cho phản ứng tạo dòng.....	67
Hình 3.2. Chuyển nạp đoạn gen 7 virus cúm mùa A.....	69
Hình 3.3. Kiểm tra chuyển nạp đoạn gen 7 virus cúm mùa A bằng PCR.....	70
Hình 3.4. Kiểm tra chuyển nạp bằng giải trình tự gen.....	71
Hình 3.5. Hình ảnh Blast với ngân hàng gen của virus cúm mùa A.....	72
Hình 3.6. Sơ đồ vị trí khuếch đại virus cúm mùa A.....	72
Hình 3.7. Tạo plasmid mạch thẳng chứa đoạn gen 7 virus cúm mùa A.....	74
Hình 3.8. Khuếch đại với môi cải biên đoạn gen 7 virus cúm A/H1N1pdm09.....	75

Hình 3.9. Chứng dương phiên mã.....	76
Hình 3.10. Kiểm tra độ tinh sạch ARN.....	77
Hình 3.11. Đo nồng độ ARN virus cúm A/H1N1pdm09.....	78
Hình 3.12. Hỗn dịch chứng dương virus cúm mùa A và cúm B.....	80
Hình 3.13. Chuẩn độ chứng dương ARN gen N virus sởi.....	80
Hình 3.14. Tỷ lệ dương tính với virus cúm ở bệnh nhân SARI tại Hải Dương.....	83
Hình 3.15. Tỷ lệ nhiễm cúm trong tổng số các ca SARI dương tính với virus.....	84
Hình 3.16. Đồng nhiễm cúm với các virus khác.....	85
Hình 3.17. Phân bố cúm theo giới tính ở bệnh nhân SARI.....	87
Hình 3.18. Phân bố cúm theo nhóm tuổi ở bệnh nhân SARI tại Hải Dương.....	88
Hình 3.19. Phân bố cúm theo thời gian.....	90
Hình 3.20. Tương quan của 3 phương pháp tách chiết ARN.....	92
Hình 3.21. Tương quan hiệu giá PFU và ARN.....	95
Hình 3.22. Biểu đồ Levey-Jennings hiệu giá PFU và ARN vắc xin sởi.....	97
Hình 3.23. Độ lặp lại trong cùng một lần làm phản ứng.....	98
Hình 3.24. Đường thẳng tuyến tính của phản ứng real-time.....	102
Hình 4.1. Sơ đồ cơ chế phản ứng tạo dòng (cloning).....	104
Hình 4.2. Cơ chế bù α lựa chọn các tế bào cảm biến.....	107
Hình 4.3. Bản đồ genome của véc-tơ pGEM T-Easy.....	108
Hình 4.4. Quá trình thẩm định một phương pháp sinh học.....	136

CÁC BẢNG SỬ DỤNG TRONG LUẬN ÁN

	Trang
<i>Bảng 1.1. Họ Paramyxoviridae</i>	25
<i>Bảng 2.1. Môi và đầu dò đặc hiệu khuếch đại sởi và cúm</i>	46
<i>Bảng 2.2.a. Pha hỗn dịch tạo dòng (TOPO[®]pCR2.1 - Invitrogen).....</i>	51
<i>Bảng 2.2.b. Pha hỗn dịch tạo dòng (pGEM T Easy - Promega)</i>	51
<i>Bảng 2.3. Pha hỗn dịch phiên mã</i>	54
<i>Bảng 2.4. Pha hỗn dịch phản ứng RT-PCR đa môi phát hiện cúm A,hRSV, cúm B và hMPV</i>	58
<i>Bảng 2.5. Khẳng định cúm mùa A và cúm B bằng PCR bán tổ.....</i>	59
<i>Bảng 3.1. Chiều dài các đoạn gen đích và ngưỡng phát hiện thấp</i>	73
<i>Bảng 3.2. Sản lượng phiên mã.....</i>	79
<i>Bảng 3.3. Tỷ lệ nhiễm cúm ở bệnh nhân SARI tại Hải Dương, 2009-2011.....</i>	83
<i>Bảng 3.4. Tỷ lệ đồng nhiễm của cúm</i>	84
<i>Bảng 3.5. Các loại virus và số lượng đồng nhiễm với virus cúm</i>	86
<i>Bảng 3.6. Phân bố cúm theo giới tính.....</i>	87
<i>Bảng 3.7. Phân bố cúm theo nhóm tuổi ở bệnh nhân SARI.....</i>	88
<i>Bảng 3.8 Phân bố cúm mùa A và cúm B theo thời gian trong năm.....</i>	90
<i>Bảng 3.9. Hiệu giá PFU của vắc xin mẫu chuẩn M-0107.....</i>	91
<i>Bảng 3.10. Hiệu giá ARN ở 24, 48, và 72 giờ (M-0107).....</i>	92
<i>Bảng 3.11. Bền vững của ARN ở các điều kiện nhiệt độ và thời gian thực.....</i>	93
<i>Bảng 3.12. Sự khác biệt Ct khi thử nghiệm trên tấm nhựa 24 và 96 giếng.....</i>	94
<i>Bảng 3.13. Hiệu giá ARN vắc xin sởi thành phẩm sản xuất tại Việt Nam</i>	96
<i>Bảng 3.14. Độ lặp lại trong cùng một lần làm phản ứng</i>	99
<i>Bảng 3.15. Độ lặp lại trung gian của gam chuẩn ngoài</i>	100
<i>Bảng 3.16 . Độ lặp lại của 10 loạt vắc xin giữa 2 ngày thử nghiệm</i>	101

ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo Tổ chức Y tế thế giới (World Health Organization - WHO), hàng năm, trên thế giới có khoảng 30 triệu người mắc và 1 triệu người tử vong vì sởi, tập trung nhiều nhất ở những nước đang phát triển và virus sởi vẫn được coi là “*kẻ giết hại trẻ em*”. Theo Trung tâm Phòng và Kiểm soát bệnh tật (Centers for Diseases Control and Prevention - CDC) Hoa Kỳ, giai đoạn 2000-2008, số tử vong sởi đã giảm từ 733.000 xuống 164.000 nhưng ở khu vực Tây Thái Bình Dương, con số này chỉ đạt 4% chỉ tiêu [1-4]. Vắc xin góp phần quyết định thành công của chiến lược khống chế và thanh toán sởi toàn cầu [3]. Việt Nam đã sản xuất thành công vắc xin sởi đơn, sống giảm độc lực nên kiểm định công hiệu là một bước rất quan trọng [3]. Kiểm định công hiệu vắc xin bằng các phương pháp hiện hành tốn thời gian, công sức, và kết quả đôi khi phụ thuộc vào chủ quan người đọc cũng như nhiều yếu tố khách quan khác [2],[5]. Gần đây, kiểm định công hiệu vắc xin bằng *real-time PCR/RT-PCR* có thể khắc phục được những yếu điểm trên [5-8]. Sự phát triển của khoa học vắc xin chính là một nhánh của phát triển khoa học nói chung, trong đó các kỹ thuật mới của chẩn đoán và nghiên cứu đã và đang được áp dụng cho nghiên cứu sản xuất vắc xin, bao gồm cả kiểm định [5-10].

Đại dịch cúm kinh hoàng nhất trong lịch sử xảy ra năm 1918 làm chết hơn 20 triệu người trên thế giới, các đại dịch năm 1957, 1968, và 1977 không trầm trọng như năm 1918 [11-14]. Tại Việt Nam, kể từ khi ca bệnh cúm gia cầm A/H5N1 ở người đầu tiên được xác định tháng 12 năm 2003, đã có bốn đợt dịch ở người xảy ra tại 32 Tỉnh/Thành phố với hơn 100 ca mắc và một nửa trong số đó đã tử vong [14-17]. Trên phạm vi cả nước, từ tháng 9/2009-

03/2010, đại dịch cúm A (A/H1N1pdm09) đã có 11.214 ca mắc và 58 trường hợp tử vong [18].

Có thể chẩn đoán sởi và cúm cũng như xác định phân típ cúm A bằng RT-PCR [19-21]. Để có thể kiểm soát chất lượng và định lượng ARN trong RT-PCR thì cần phải có gam chuẩn ngoài (chứng dương đã biết nồng độ) [5],[22]. Đây là một yêu cầu bắt buộc nhưng hiện tại nhiều phòng thí nghiệm thường tách chiết ARN từ một mẫu bệnh phẩm đã được chẩn đoán trước đó để coi như chứng dương nên không tinh khiết, không định lượng được [5],[23-27]. Ngoài ra, lượng bệnh phẩm có hạn và đôi khi nhân viên xét nghiệm phải đối mặt với nguy hiểm khi tiếp xúc với bệnh phẩm của bệnh nhân nặng [28-31]. Một số phòng thí nghiệm khác lại sử dụng plasmid hay tính theo đơn vị tạo đám hoại tử (Plaque Forming Unit - PFU) để làm chứng dương cho RT-PCR, điều này cũng không tối ưu vì ADN không thể kiểm soát chất lượng của bước phiên mã ngược và PFU chỉ đo lường virus có hoạt tính và lượng ARN chứng sẽ quá nhiều [32-36].

Trong khi đó, sản xuất ARN *in vitro* khắc phục được những hạn chế của sử dụng ARN tách chiết từ bệnh phẩm [33],[37]. Dựa vào những ưu điểm nổi bật trên, đề tài “*Nghiên cứu sản xuất các gam chuẩn cho RT-PCR, ứng dụng trong chẩn đoán cúm và kiểm định công hiệu vắc xin sởi*” được xây dựng nhằm các mục tiêu:

- 1. Sản xuất được các gam chuẩn cho RT-PCR phát hiện đồng thời ARN virus cúm A, B (M); cúm A/H5N1 (M, H5 và N1); và sởi (N);**
- 2. Xác định tỷ lệ nhiễm cúm mùa và phân típ cúm gia cầm A/H5N1 (nếu có) tại Hải Dương năm 2009 bằng RT-PCR;**
- 3. Xác định công hiệu vắc xin sởi đơn sản xuất tại Việt Nam bằng real-time RT-PCR một bước.**

CHƯƠNG 1

TỔNG QUAN

Sởi và cúm là hai bệnh do virus gây ra, được đề cập trong Y văn từ trước Công nguyên, qua thời kỳ Trung cổ, các cuộc chiến tranh và cho đến ngày nay. Những nghiên cứu về mọi khía cạnh của cúm và sởi thực sự lớn, khi vào trang mạng <http://www.google.com>. (xem tháng 2 năm 2014), chỉ mất 0,25 giây là có tới 45.200.000 kết quả liên quan đến cúm và con số tương ứng cho sởi là 0,32 giây với 9.910.000 kết quả.

1.1. Tổng quan một số vấn đề về cúm

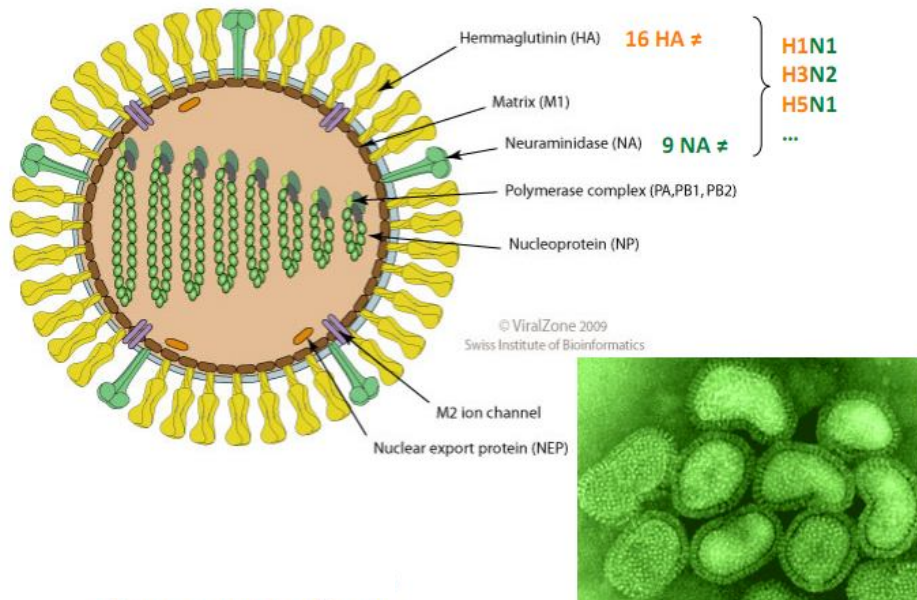
Cúm là một bệnh nhiễm virus đường hô hấp cấp tính, thường để lại dấu ấn dịch qua từng thế kỷ [1]. Hàng năm, thế giới có 3-5 triệu người mắc cúm nặng với 250.000-500.000 trường hợp tử vong. Giữa các đại dịch, virus cúm A và B vẫn gây dịch hàng năm [39],[40]. Đôi khi, người ta phát hiện được các trường hợp cúm C ở người [41]. Cúm gia cầm A/H5N1 ở động vật vẫn chưa được kiểm soát trên phạm vi toàn cầu, lây truyền từ động vật sang người và gây tử vong [15],[16],[42],[43].

1.1.1. Phép gọi tên

Các virus cúm thuộc trên họ *Mononegavirale*, họ *Orthomyxoviridae*, được phân thành các típ (sau năm 2002 đổi thành chi) A, B, và C dựa vào quyết định kháng nguyên nucleoprotein (NP). Họ *Orthomyxoviridae* còn có các chi *Isavirus*, *Quaranjavirus*, và *Thogotovirus* [1],[2],[38]. Virus cúm A gồm các phân típ dựa vào sự thay đổi hoàn toàn quyết định kháng nguyên haemagglutinin (HA) của thử nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu (Haemagglutinin Inhibition - HI), virus cúm B chỉ có duy nhất một phân típ [1],[2],[38].

1.1.2. Hình thái, cấu trúc

Hạt virus cúm A và cúm B đa hình thái, những phân lập mới thường có dạng hình sợi nhưng lại có dạng hình cầu khi được cấy chuyển trên nuôi cấy tế bào hoặc trứng gà ấp dở. Virus hình cầu có kích thước 80-120nm gồm 70-75% protein, 20% lipid, và 1% ARN [1],[2],[38].



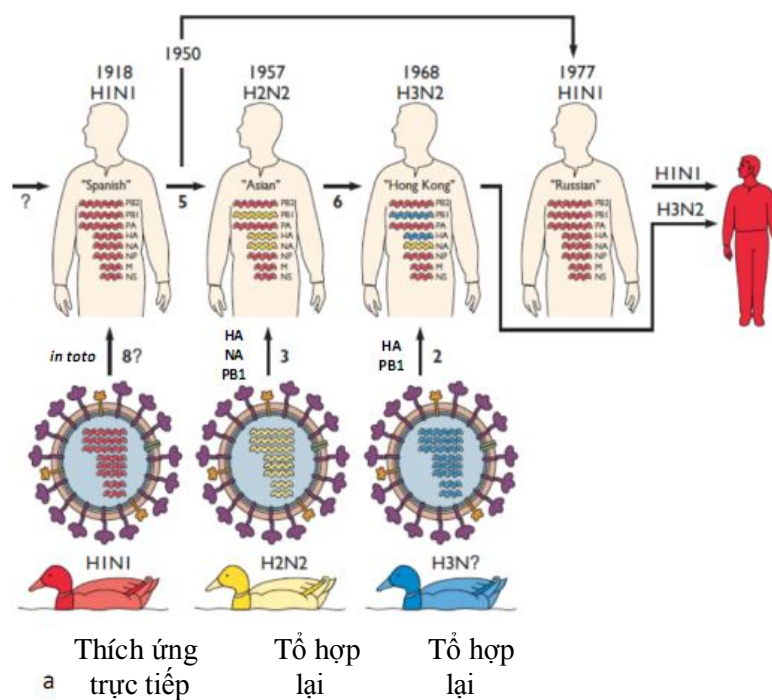
Hình 1.1. Cấu trúc hạt virus cúm.

Nguồn: S. Munier - Viện Pasteur Paris, Cộng hòa Pháp [44].

Thành phần cấu trúc từ trong ra ngoài của hạt virus gồm bộ máy di truyền (genome), capsid và vỏ ngoài (envelop). Genome virus cúm A và cúm B chứa vật liệu di truyền là một sợi ARN phân cực âm, có phân đoạn (Hình 1.1) với tên gọi hoặc là theo đoạn ARN, hoặc dựa vào chức năng tạo nên cấu trúc hạt virus. Đoạn 1 đến 8 tương ứng mã hóa các protein PB2, PB1/N40/PB1F2, PA/PA-X, HA, NP, NA, M1/M2/M42, NS1/NEP [1],[2],[38],[44],[45]. Đề tài nghiên cứu này khuếch đại các khu vực ổn định

của các đoạn gen 7 mã hóa protein M virus cúm mùa A (H3N2 và H1N1), virus cúm B, và các đoạn gen 7, 6, 4 mã hóa tương ứng protein M, HA và NA của virus cúm gia cầm A/H5N1 và đoạn gen 7 của virus cúm đại dịch A/H1N1pdm09.

1.1.3. Kháng nguyên và tính đa dạng chủng



Hình 1.2. Nguồn gốc các chủng cúm đại dịch 1918-1977.

Nguồn: S. Munier. Viện Pasteur Paris, Cộng hòa Pháp [44].

Chuyển đổi kháng nguyên đột ngột (shift) là thay đổi cấu trúc kháng nguyên bề mặt, chủ yếu là HA, do tổ hợp lại vật liệu di truyền của các phân tử khác nhau và thường gây hiện tượng thay thế một loại HA mới, nhìn chung không chịu tác dụng của miễn dịch tồn tại trước đó và đây chính là nguyên nhân của các vụ đại dịch cúm trong thế kỷ XX và XXI [1],[2],[11-13],[38],[46]. Đây là điểm đáng lưu ý trong chẩn đoán cúm và xác định phân tử cúm A bằng RT-PCR vì khi một đoạn gen bị thay thế thì có thể phải thiết

kế lại cặp môi và đầu dò (real-time) đặc hiệu, đồng thời phải sản xuất lại chúng dương ARN.

Nguồn gốc các đại dịch cúm có thể hoặc là do hiện tượng tổ hợp lại các đoạn gen, hoặc là do thích ứng trực tiếp từ loài khác [1],[13],[38],[46]. Chi tiết, cúm đại dịch A/H1N1 năm 1918 có thể do thích ứng trực tiếp từ A/H1N1 thủy cầm hoặc do tổ hợp từ một nguồn khác không rõ (không có số liệu di truyền trước 1918), sau đó đại dịch cúm năm 1957 là do tổ hợp của 5 đoạn gen chủng A/H1N1 năm 1918 và 3 đoạn gen HA, NA, PB1 của chủng A/H2N2 thủy cầm để tạo thành virus A/H2N2 đại dịch 1957. Đại dịch cúm 1968 là do tổ hợp của 6 đoạn gen chủng 1957 và 2 đoạn gen HA và PB1 của A/H3Nx thủy cầm để hình thành chủng A/H3N2 đại dịch 1968 Hong Kong và chủng này hiện lưu hành như một chủng cúm mùa đến tận ngày nay. Chủng cúm mùa A/H1N1 hiện tại là do chủng đại dịch 1977 tiếp tục lưu hành (Hình 1.2).

Biến đổi kháng nguyên từ từ (drift) là những thay đổi nhỏ và liên tục các acid amin hoặc đột biến điểm tại các khu vực kháng nguyên protein vỏ HA và NA do lỗi của ARN polymerase hoặc do hiện tượng áp lực chọn lọc miễn dịch của kháng thể. Những chủng này không chuyển đổi hoàn toàn kháng nguyên do vậy vẫn chịu một phần miễn dịch từ những lần nhiễm cúm trước và chúng mới nổi trội hơn chủng cũ [1],[38]. Đây cũng là một điểm quan trọng cần lưu ý trong thiết kế môi. Mặc dù không có hiện tượng thay thế một đoạn gen hoàn toàn mới nhưng nhiều đột biến điểm có thể làm thiết kế môi thông thường không phát hiện được hết các chủng, chính vì vậy nhiều tác giả đã áp dụng phương pháp thiết kế thoái hóa môi để tăng độ nhạy phát hiện của cặp môi và đầu dò. Điều này đặc biệt quan trọng trong chẩn đoán cúm gia cầm A/H5N1 ở người [47].

1.1.4. Sự nhân lên của virus cúm

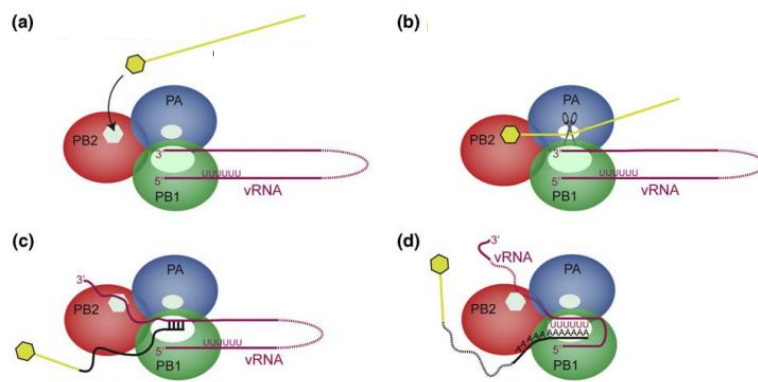
Các hệ thống tế bào phân lập virus cúm là tế bào thận khi tiên phát và tế bào thường trực thận chó (Madin-Darby Canine Kidney - MDCK). Phân lập virus cúm trên nuôi cấy tế bào có thể có hoặc không tạo hủy hoại tế bào (Cytopathic Effects - CPE) [2],[19].

Virus được hấp phụ trên bề mặt tế bào vật chủ qua thụ thể tế bào là acid sialic (SA) và xâm nhập vào tế bào qua con đường *endocytosis*. Acid sialic gắn với galactose qua cầu nối $\alpha 2,3$ hoặc $\alpha 2,6$. Đây chính là yếu tố quyết định độc lực của một số chủng virus và bệnh cảnh lâm sàng vì ở đường hô hấp trên thì $\alpha 2,6$ nhiều hơn hẳn $\alpha 2,3$ và ngược lại với đường hô hấp dưới [1],[44],[45].

Sau hấp phụ, nhờ pH thấp của khoang nội bào mà HA tạo ra hiện tượng *tiền thay đổi phù hợp* về hình thái để peptide hòa màng tiến gần tới màng của nội bào, chèn peptide hòa màng vào màng của nội bào. Sau đó, hiện tượng bán hòa màng xảy ra, màng của virus và màng của tế bào vật chủ được kéo lại gần nhau rồi hình thành nên một lỗ hòa màng, tiếp đó xuất hiện những *thay đổi phù hợp* để bộc lộ peptide hòa màng làm cho kênh ion M2 bơm các proton để giải phóng phức hợp ribonucleoprotein (RNP) của virus và màng virus hòa với màng của khoang nội bào. ARN được vận chuyển vào nhân tế bào qua lỗ màng nhân nhờ RNP gắn với α và β karyopherin [1],[44],[45],[48].

Tại nhân tế bào, ARN virus đóng vai trò làm khuôn mẫu tổng hợp ARN hỗ trợ chuỗi dương, sau đó đến lượt ARN chuỗi dương này làm khuôn mẫu để tổng hợp trở lại ARN virus chuỗi âm và ARN thông tin. Cụ thể, phức hợp RNP gắn với 3 polymerase có vai trò thiết yếu trong quá trình nhân lên của virus cúm. PA có khu vực *endonuclease* và vị trí gắn với PB1, PB1 có vị trí gắn với PA và vị trí gắn với PB2, PB2 có vị trí gắn với PB1 và vị trí gắn với cấu trúc “*đội mũ*” của tiền ARN thông tin (Hình 1.3) [1],[44],[45],[49-51].

ARN virus cúm có cấu trúc “đội mũ” m⁷GpppXm(N10-13) và nó được PB2 sử dụng như đoạn mồi để khởi đầu quá trình phiên mã và sau đó PA của virus sẽ cắt cấu trúc mũ của ARN thông tin. Quá trình tổng hợp chuỗi hỗ trợ được xúc tác nhờ enzyme PB1, chính là *ARN polymerase phụ thuộc ARN* dựa trên khuôn mẫu là ARN virus. Sau cùng, quá trình tổng hợp chuỗi kết thúc khi xuất hiện tín hiệu poly A từ cấu trúc khuôn mẫu poly U (Hình 1.3) [1],[44],[45],[49-51].



Hình 1.3. Cơ chế phiên mã của virus cúm A.

Nguồn: S. Munier, Viện Pasteur Paris, Cộng hòa Pháp [44].

a. PB2 gắn với cấu trúc mũ

b. PA endonuclease cắt ARN thông tin

c. PB1 sử dụng ARN virus làm khuôn mẫu kéo dài chuỗi

d. Tổng hợp poly A

Quá trình dịch mã xảy ra tại bào tương, các protein M1, 3 polymerase, và NP được vận chuyển vào nhân tế bào. Tại nhân, sau khi phức hợp RNP được hình thành thì các protein NEP/NS2 gắn vào phức hợp này rồi từ nhân ra bào tương qua lỗ màng nhân. Ở bào tương, chúng theo khung tế bào để đến

bộ Golgi rời đi từ khu vực *Cis* sang *Trans* của bộ Golgi để tới màng tế bào và lắp ráp thành hạt virus hoàn chỉnh với HA, NA, M2 - là những protein đã trưởng thành ở lưới nội bào có hạt. Quá trình lắp ráp thiên về giả thiết cơ chế lắp ráp lựa chọn hơn là ngẫu nhiên. Hạt virus được giải phóng khỏi tế bào gây nhiễm theo cơ chế nảy chồi. [1],[44],[45].

Hiện tượng cắt môi liên kết giữa SA và galactose nhờ hoạt tính sialidase tạo nên chức năng neuramidase. Điều này cho phép giải phóng hạt virus gây bệnh khỏi tế bào vật chủ nhiễm, làm cho các phần tử virus mới được tổng hợp không ngưng kết với nhau, và cho phép virus đi xuyên qua lớp màng nhày của đường hô hấp. Sau khi hạt virus mới được tổng hợp và giải phóng khỏi tế bào thì có hiện tượng cắt HA0 thành HA1 và HA2 nhờ protease ngoại bào nằm ở đường hô hấp. Đây cũng chính là một trong số các yếu tố quyết định độc lực của cúm ở một số loài (không có độc lực cao nếu tổ chức không có nhiều protease tại chỗ).

1.1.5. Dịch tế học

Virus cúm truyền bệnh từ người sang người qua đường không khí, điều này giải thích hình thái xuất hiện bệnh đột ngột và mức độ lan truyền dịch nhanh trong cộng đồng. Trong cùng vụ dịch, tỷ lệ tấn công trẻ em cao hơn người lớn. Ở giai đoạn trung bình, khoảng 25% dân số bị nhiễm và trong số này, một phần ba phải đi điều trị, tỷ lệ nhập viện cao hơn hẳn ở nhóm tuổi nhỏ và người có tuổi. Các vụ dịch cúm đều tuân theo một hình thái tương tự nhau, nhiễm virus và mắc cúm thường bắt đầu xảy ra từ trẻ em trường học dẫn đến hiện tượng học sinh nghỉ học, số bệnh nhân phải đi khám bác sỹ và nhập viện vì các bệnh phổi tăng. Vào giai đoạn cuối của dịch, thường người lớn phải nghỉ làm, số người đi khám và tử vong vì bệnh phổi tăng lên. Thời gian kéo dài dịch ở địa phương khoảng 2-3 tuần, ở cộng đồng dân cư lớn hơn

có thể đến 6-8 tuần. Virus có mặt trong cộng đồng và gây bệnh với tần số thấp vài tuần trước và sau giai đoạn dịch [1],[38],[45].

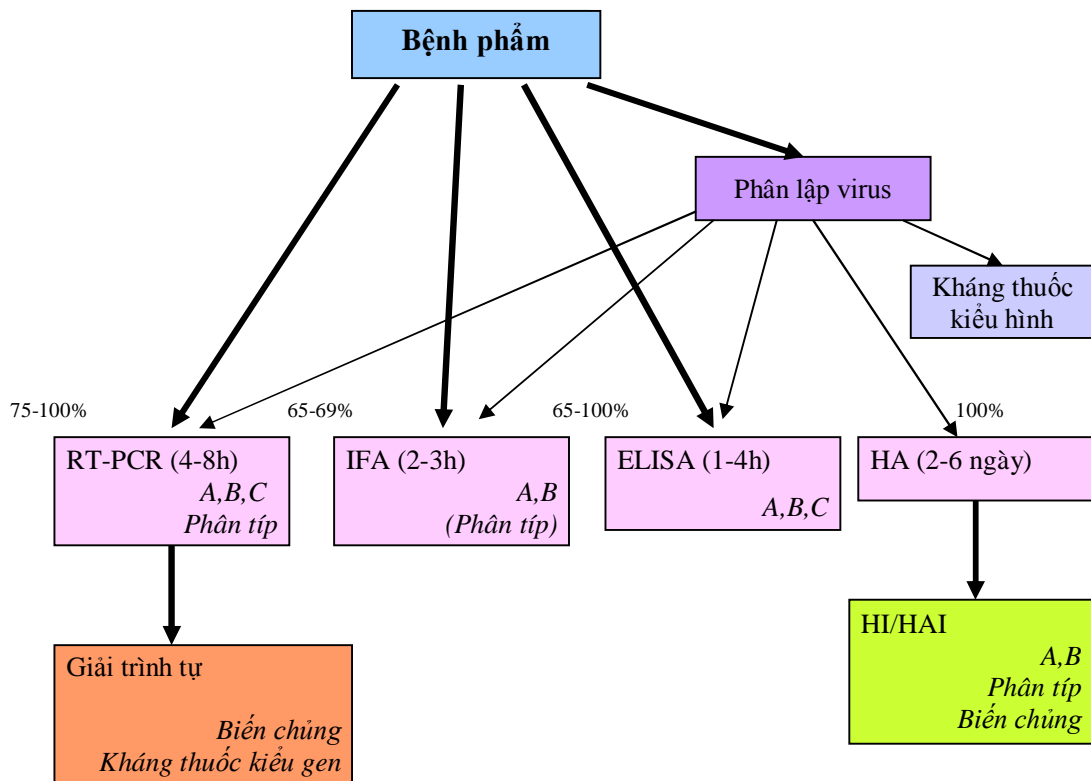
Dịch cúm xảy ra quanh năm và trên toàn thế giới. Cúm A và cúm B có thể đồng thời lưu hành trong cùng một năm nhưng thường mỗi mùa chỉ có một phân típ cúm A nổi lên. Một biến chủng xuất hiện với số lượng trung bình vào cuối mùa dịch có xu hướng trở thành chủng virus lưu hành chính của năm tiếp theo [1],[38],[45].

1.1.6. Chẩn đoán phòng thí nghiệm

Vai trò phòng thí nghiệm là chẩn đoán kịp thời cho lâm sàng và báo cáo thông tin về sự xuất hiện và lưu hành các chủng virus cúm trong cộng đồng. Phương pháp chẩn đoán phòng thí nghiệm cúm gồm i/. **chẩn đoán trực tiếp** phát hiện hình thể virus (phân lập và xác định virus cúm, xác định phân típ cúm A), phát hiện kháng nguyên virus (miễn dịch huỳnh quang (Immunofluorescence Assay - IFA) xác định cúm A, cúm B hay phân típ cúm A hoặc ELISA xác định cúm A, cúm B, cúm C), phát hiện vật liệu di truyền của virus (RT-PCR xác định cúm A, cúm B, cúm C hay phân típ cúm A); ii/. **chẩn đoán gián tiếp** phát hiện kháng thể bằng các phương pháp huyết thanh học (Hình 1.4). Đáng chú ý, RT-PCR cho phép chẩn đoán nhanh, đặc hiệu, và có tính sàng lọc cả cúm A và phân típ cúm A [2],[38],[19].

Trong chẩn đoán cúm, ngoài xác định kiểu gen, các đột biến quyết định tính kháng thuốc đối với các thuốc kháng virus thì chẩn đoán cúm bằng RT-PCR có thể áp dụng kỹ thuật khuếch đại cổ điển hoặc định lượng trực tiếp, có thể sử dụng phản ứng đơn mồi hoặc đa mồi phát hiện đồng thời hơn 1 phân típ hay chi (A/H3N2, A/H1N1, A/H1N1pdm09, cúm B), và xác định chính xác phân típ (H1 cúm mùa (A/H1N1), N1 cúm mùa (A/H1N1), H1 đại dịch (A/H1N1pdm09), N1 đại dịch (A/H1N1pdm09), H3 cúm mùa (A/H3N2), N2 cúm mùa (A/H3N2), H5 cúm gia cầm (A/H5N1), N1 cúm gia cầm (A/H5N1),

phát hiện đồng thời virus cúm mùa A (A/H3N2 và A/H1N1), virus cúm B cùng các virus khác như virus hợp bào hô hấp ở người (human respiratory syncytial virus - hRSV) hoặc virus gây viêm phổi ở người (human metapneumovirus - hMPV).....[19],[20],[38].



Hình 1.4. Sơ đồ chẩn đoán phòng thí nghiệm của cúm.

Nguồn: Dựa theo sơ đồ của Naffakh N., Van der Werf S.,

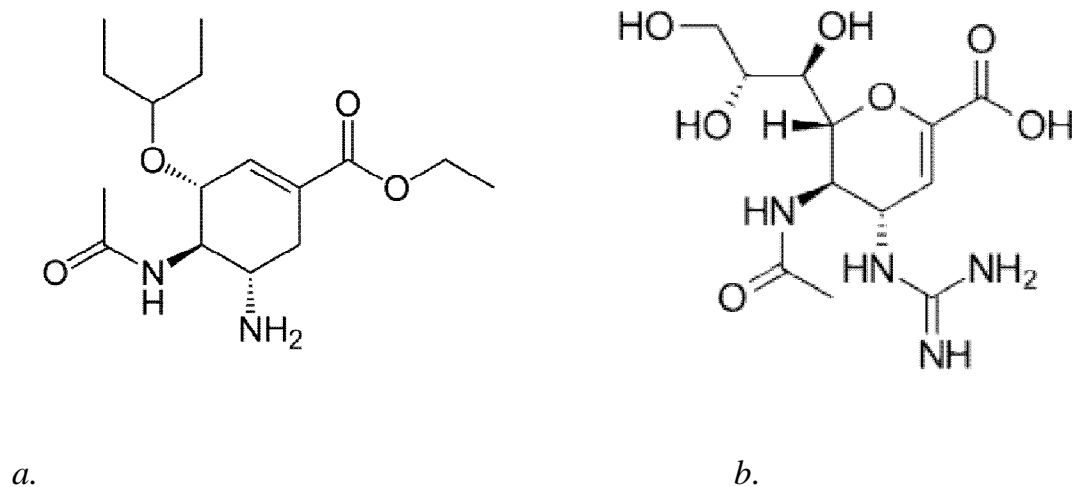
Cộng hòa Pháp [38].

Trên thực tế, mỗi nước và mỗi phòng thí nghiệm có thể tự xây dựng các thường quy chẩn đoán, sử dụng các cặp môi, đầu dò khác nhau và tự tiến hành thẩm định chất lượng môi và tối ưu phản ứng. Điều này rất khó để lựa chọn cặp môi và đầu dò phù hợp cho mỗi phòng thí nghiệm nên hiện nay một số các phòng thí nghiệm lớn đã tiến hành nghiên cứu thẩm định và xác nhận tất cả các cặp môi và đầu dò đã công bố để khuyến cáo cho các phòng thí

nghiệm trên phạm vi toàn cầu. Thông thường, quy trình chẩn đoán cúm (bao gồm cả xác định phân tí) được xây dựng, thẩm định, và xác nhận bởi các tổ chức hay phòng thí nghiệm lớn và được khuyến cáo cho mạng lưới cúm khu vực hay toàn cầu (WHO, CDC - Hoa Kỳ, Viện Pasteur Paris - Cộng hòa Pháp, Trung tâm nghiên cứu Cúm Khu vực Châu Âu - Vương quốc Anh...).

1.1.7. Điều trị

Hiện thuốc điều trị cúm chủ yếu là oseltamivir phosphate (tên thương mại là Tamiflu) (Hình 1.5.a), ngoài ra còn có zanamivir (tên thương mại là Relenza) (Hình 1.5.b). Oseltamivir và zanamivir là chất ức chế neuramidase mới, cạnh tranh hoạt tính với enzyme neuramidase của virus lên acid sialic trên bề mặt tế bào vật chủ [54]. Phần lớn kháng oseltamivir là do đột biến thay thế một acid amin (His274Tyr) của enzyme neuraminidase trong khi vị trí đột biến của kháng zanamivir là Gln136Lys (Q136K), do vậy không có hiện tượng kháng chéo giữa 2 thuốc [43],[52-55].



Hình 1.5. Cấu trúc của oseltamivir (a) và zanamivir (b).

Nguồn: <http://www.medicinescomplete.com/mc/ahfs/current/a399040> [55].

1.1.8. Tình hình nghiên cứu về cúm và tỷ lệ nhiễm cúm

Các nghiên cứu về cúm được tiến hành ở mọi khía cạnh như lâm sàng, điều trị, thuốc kháng virus, dịch tễ học, cấu trúc và sự nhân lên của virus, vắc xin, tá chất và các chiến lược tiêm vắc xin, báo cáo, giám sát... Loại hình nghiên cứu cũng rất đa dạng từ nghiên cứu vĩ mô tầm quốc gia đến mô tả ca bệnh, cắt ngang, bệnh-chứng, thuần tập, can thiệp, hay lồng ghép giữa các phương pháp [15],[16],[42],[43],[56-68].

Vắc xin được nhìn nhận ở 3 khía cạnh là kháng nguyên, tá chất, và phương thức gây miễn dịch [44]. Kháng nguyên cúm được lựa chọn và cập nhật hàng năm [38],[45],[69]. Đáng chú ý, Châu Âu đang nghiên cứu vắc xin gồm kháng nguyên của tất cả phân típ cúm để khắc phục hạn chế này [70]. Công nghệ sản xuất được cải tiến đáng kể với tiến bộ di truyền ngược, tạo kiểu gen để quy định kiểu hình mong muốn. Hiện nay, đã có nhiều phương cách gây nhiễm vắc xin khác nhau như đường tiêm, niêm mạc hay nang lông. Phạm vi và lực nghiên cứu tăng rõ ràng với các nghiên cứu đa trung tâm, cỡ mẫu lớn, quy trình chuẩn hóa và sự tuân thủ nghiêm ngặt các quy định quốc tế về y đức [44],[71-78].

Việt Nam đã có Trung tâm cúm quốc gia điều phối toàn bộ mạng lưới giám sát cúm trên phạm vi cả nước và tham gia mạng lưới cúm toàn cầu <http://www.flu.int.net>. Công tác giám sát cúm được thực hiện với sự kết hợp giữa hệ thống dịch tễ và phòng thí nghiệm [78]. Ở khía cạnh phòng thí nghiệm, trên trang mạng <http://www.google.com> (xem tháng 2 năm 2014), chỉ trong vòng 0,41 giây đã có hàng nghìn thông tin liên quan đến cúm của Việt Nam, có thể bao gồm chẩn đoán và nghiên cứu huyết thanh học, sinh học phân tử, miễn dịch học, đáp ứng tế bào lympho T, mô hình toán học, sản xuất vắc xin, tính nhạy cảm kiểu hình và kiểu gen của virus cúm với oseltamivir, giám sát trọng điểm hội chứng cúm (Influenza-Like Illness - ILI), viêm phổi

nặng do virus (Severe Viral Pneumonia - SVP), đồng nhiễm của virus cúm, phương pháp phòng thí nghiệm, thử nghiệm lâm sàng.... [15],[16],[42],[43],[56-68].

Việt Nam đã giải trình tự toàn bộ genome virus cúm gia cầm A/H5N1, tham gia cung cấp chủng và thông tin để lựa chọn kháng nguyên cho sản xuất vắc xin cúm toàn cầu, có nhiều đơn vị tham gia sản xuất vắc xin cúm gia cầm A/H5N1, đánh giá công hiệu vắc xin cúm trên thực địa Việt Nam [63]. Trong chẩn đoán, ngoài phát hiện cúm thì xác định phân tít cúm A cũng được tiến hành thường xuyên. Ngoài ra, có rất nhiều dự án quốc tế đã và đang được thực hiện để nghiên cứu các bệnh đường hô hấp, trong đó có cúm [61],[62].

Nghiên cứu đặc điểm di truyền các chủng virus cúm A/H5N1 giai đoạn 2003-2013 ở người và 2005-2010 ở động vật tại Việt Nam cho thấy chúng thuộc nhóm gen (Clade) 1 và 2.3.4, trong đó 2.3.4 phân tách thành 3 nhóm phụ là 2.3.4.1, 2.3.4.2, và 2.3.4.3. Có hiện tượng trao đổi và tích hợp giữa các nhóm gen và nhóm phụ nhưng đặc tính kháng nguyên giữa các nhóm phụ của nhóm gen 2.3.4 không thay đổi [15].

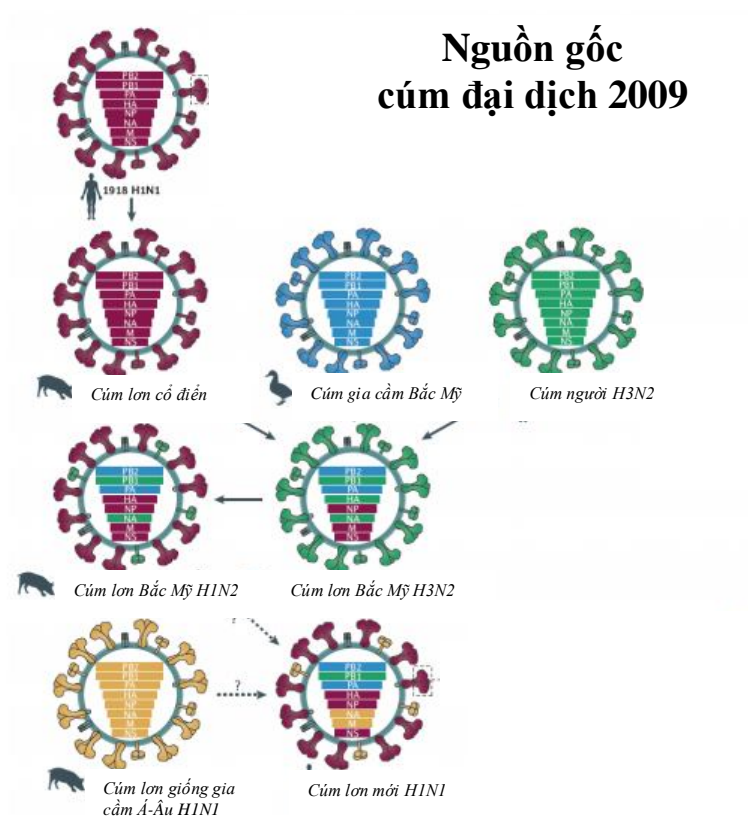
Ảnh hưởng về mặt kinh tế của cúm tại Việt Nam cũng rất lớn, theo ước tính của Nguyễn Hải Tuấn và cộng sự, chi phí trung bình cho mỗi trường hợp bị cúm tại cơ sở y tế tuyến huyện là hơn 1.300.000 đồng [60].

Tại thời điểm năm 2009, Việt nam đã có nhiều nghiên cứu về cúm, trong đó có xác định tỷ lệ nhiễm cúm và phân tít cúm A bằng RT-PCR trong giám sát trọng điểm ILI hay SVP [62]. Tuy nhiên, giám sát trọng điểm không đặt tại Hải Dương và chưa có công bố về tỷ lệ nhiễm cúm ở bệnh nhân viêm đường hô hấp cấp tính nặng (Severe Acute Respiratory Infection - SARI) cũng như tỷ lệ đồng nhiễm virus cúm với hàng loạt tác nhân virus khác (18 tác nhân).

Theo báo cáo của CDC Hoa Kỳ, ca cúm A/H1N1pdm09 đầu tiên được ghi nhận ngày 15/04/2009 ở một bệnh nhi 10 tuổi tại California từ một nghiên cứu lâm sàng. Phòng thí nghiệm cúm của CDC đã khẳng định rằng đây là một virus cúm mới ở người. Chỉ 2 ngày sau đó, ca bệnh thứ hai là một bệnh nhi 8 tuổi sống cách bệnh nhân thứ nhất 240km đã được khẳng định từ một nghiên cứu giám sát cúm và người ta không thấy có mối liên quan nào giữa hai ca bệnh này. Ngày 01/05/2009, CDC đã gửi sinh phẩm đến các phòng thí nghiệm trong nước (120) và quốc tế (140) để chẩn đoán virus cúm mới. Ngày 11/06/2009, WHO đã công bố đại dịch cúm A/H1N1pdm09 - đại dịch đầu tiên của thế kỷ XXI. Tại thời điểm này, 70 nước đã báo cáo có ca bệnh và dịch vẫn tiếp tục lan ra các nước khác trên toàn thế giới. Chỉ từ giữa tháng 6 đến giữa tháng 7 năm 2009, số nước và vùng lãnh thổ công bố có cúm đại dịch đã tăng gấp đôi và đến 01/08/2010 đã có 214 nước và vùng lãnh thổ công bố các ca cúm A/H1N1pdm09 với tổng số 18.499 trường hợp tử vong. Hoa Kỳ là nước có số mắc nhiều nhất mặc dù đa số đều có thể khỏi mà không cần phải nhập viện. Ngày 25/06/2009, khoảng 1 triệu người Mỹ mắc cúm A/H1N1pdm09, đến 29/03/2010, con số này tăng lên khoảng 60 triệu người và 265.000 người phải nhập viện, gần 12.000 ca tử vong, 90% trong số này dưới 65 tuổi, và 275 trường hợp là bệnh nhi. Khoảng 57% số ca bệnh xảy ra ở nhóm 5-24 tuổi. Tỷ lệ phải nhập viện cao nhất là trẻ dưới 5 tuổi, sau đó đến nhóm 5-24 tuổi. Tử vong chủ yếu rơi vào nhóm 22-57 tuổi. Rất ít các ca bệnh và không có ca tử vong nào ở người lớn trên 65 tuổi. Tỷ lệ tử vong ở người trẻ tuổi lớn gấp 5 lần so với cúm mùa. Sau một năm, hầu như tất cả các nước đều công bố có cúm A/H1N1pdm09. Hiện tại chủng cúm này đã được coi là một chủng cúm mùa [46],[81-84]. Nghiên cứu về kháng thể cho thấy trẻ em không có kháng thể chéo với cúm A/H1N1pdm09 trong khi 1/3 người lớn trên 60 tuổi có kháng thể chéo với virus này [81].

Chủng cúm A/H1N1pdm09 do tổ hợp gen của nhiều nguồn khác nhau, bao gồm chủng *A/H1N1* năm 1918 lưu hành ở lợn, chủng này tổ hợp với chủng *A/H3N2* Bắc Mỹ - một chủng tổ hợp từ *A/H3N2* của người và cúm gia cầm Bắc Mỹ - để có chủng *cúm lợn A/H1N2* Bắc Mỹ. Người ta nghi ngờ rằng chủng *cúm lợn A/H1N2* Bắc Mỹ tổ hợp với chủng *A/H1N1* *cúm lợn tương tự gia cầm Á-Âu* để xuất hiện chủng *A/H1N1pdm09* (Hình 1.6) [44],[46].

Tại Việt Nam, ca cúm A/H1N1pdm09 đầu tiên được phát hiện vào tháng 09/2009 tại Thành phố Hồ Chí Minh và tính đến 19/03/2010, trên cả nước đã có 11.214 trường hợp được chẩn đoán xác định phòng thí nghiệm và 58 ca tử vong [18],[82].

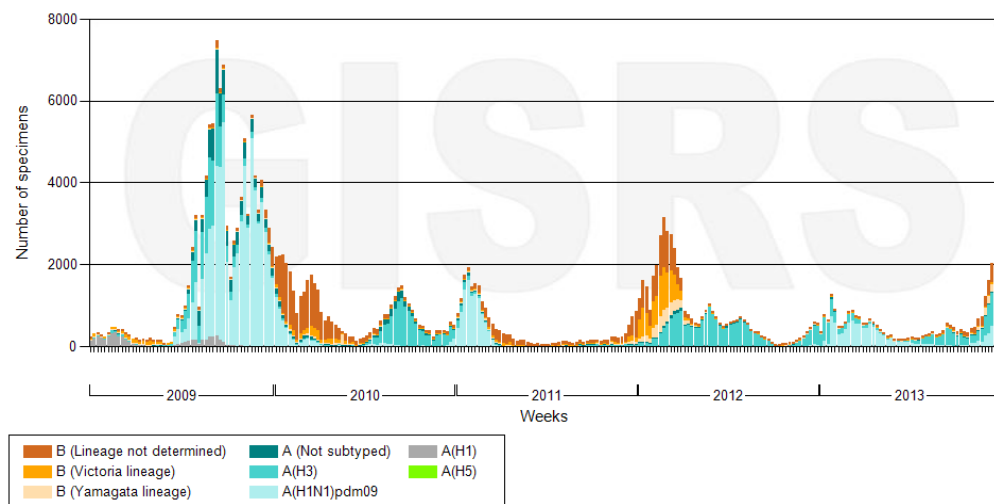


Hình 1.6. Nguồn gốc chủng cúm A/H1N1pdm2009.

Nguồn: S. Munier, Viện Pasteur Paris, Cộng hòa Pháp [44].

Theo báo cáo của CDC Hoa Kỳ, ca nhiễm cúm A/H7N9 được ghi nhận đầu tiên vào tháng 3 năm 2013 tại Trung Quốc. Hầu hết các trường hợp nhiễm cúm A/H7N9 đều nặng, tỷ lệ tử vong lên tới 1/3. Năm 2013, WHO đã ghi nhận 132 ca nhiễm cúm A/H7N9 với 44 ca tử vong. Chưa có bằng chứng cho thấy có sự lây truyền từ người sang người của chủng virus này. Việt Nam chưa ghi nhận trường hợp cúm A/H7N9 nào ở người hay gia cầm [81].

Chi tiết hơn về tỷ lệ nhiễm cúm, theo số liệu chính thức từ trang mạng <http://www.flunet.int.com> (xem tháng 2 năm 2014) thì tại Trung quốc, cúm lưu hành quanh năm nhưng chủ yếu từ tháng 1-8. Tỷ lệ nhiễm cúm giai đoạn 2009-2012 dao động từ 10-26% các trường hợp ILI (bao gồm cả cúm A/H1N1pdm09). Năm 2008, lượng mẫu thu thập dưới 500 mỗi tuần và chủ yếu là cúm mùa A/H3, A/H1, và cúm B. Tuần dịch tễ thứ 24 năm 2009, ca cúm A/H1N1pdm09 đầu tiên xuất hiện và từ đó số lượng mẫu rất lớn, đạt đỉnh từ tuần 36-39 với gần 8000 ca/tuần. Mặc dù cúm A/H1N1pdm09 chiếm ưu thế nhưng vẫn có những ca cúm B, cúm A/H3 và A/H1, đồng thời có cả những trường hợp cúm không xác định phân típ nhưng không có ca cúm A/H5N1 nào. Đầu năm 2010, cúm B chiếm ưu thế và được thay thế dần bởi cúm A/H3. Đầu năm 2011, cúm A/H1N1pdm09 lại nổi trội, sau đó là cúm B lưu hành cho đến hết quý I năm 2012 và được thay thế bởi cúm A/H3. Năm 2013, cúm A/H1N1pdm09 lại chiếm ưu thế những tháng đầu năm và sau đó được thay thế bởi cúm A/H3 và cúm B. Đến cuối năm 2013, A/H1N1pdm09 lại quay trở lại. Từ giữa năm 2009 đến nay, chưa thấy sự tái xuất hiện của cúm A/H1N1 (Hình 1.7) [82].



Hình 1.7. Các ca bệnh và phân típ cúm tại Trung quốc, 2009-2013.

Nguồn: <http://www.flunet.int.com> [82].

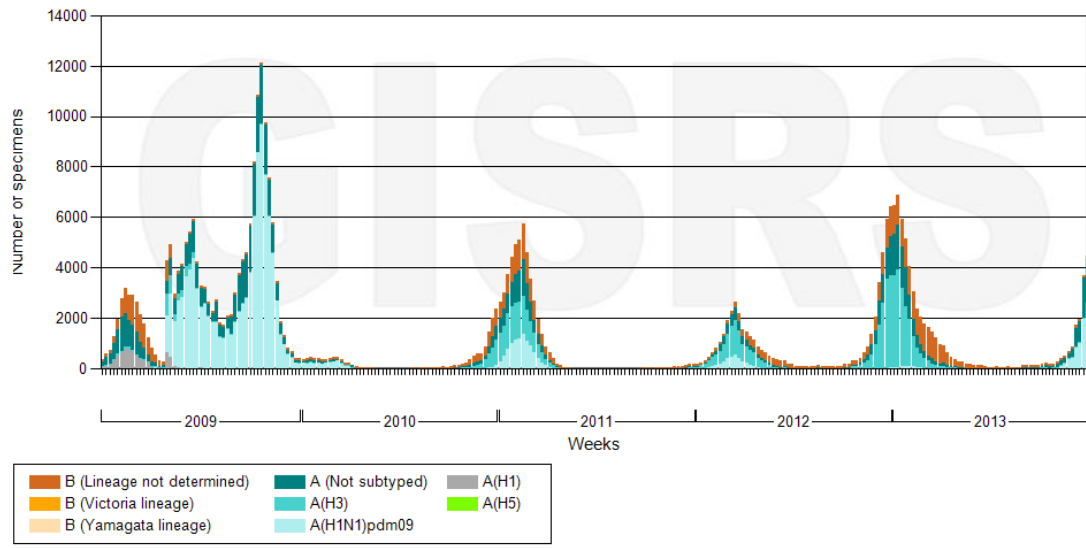
Tại Campuchia, cúm thường lưu hành vào tháng 8-11, tỷ lệ dương tính với cúm A từ năm 2006-2010 tương ứng là 5,8%; 7,7%; 15,3%; 15,2%; và 1,4%. Số mẫu ghi nhận đạt đỉnh khoảng 70 ca/tuần năm 2009 thời điểm có dịch cúm A/H1N1pdm09. Cúm B lưu hành quanh năm và cúm A/H1N1pdm09 cùng lưu hành với cúm B vào những tháng cuối năm. Năm 2012 và 2013, rải rác có những ca cúm A/H5N1 [82].

Tại Lào, số liệu chỉ được ghi nhận từ 9 tuần cuối cùng của năm 2010 đến nay với con số thu thập từ 0-26 ca/tuần, tỷ lệ dương tính với cúm A trung bình là 9,0%. Cúm lưu hành chủ yếu vào quý IV năm trước tới hết quý I năm sau (mùa đông-xuân). Những tuần cuối của năm 2010 có sự lưu hành đồng thời của cả cúm A/H1N1pdm09 và cúm B. Năm 2011, lưu hành chủ yếu là cúm A/H3 và cúm B, tập trung vào những tháng cuối năm. Năm 2012-2013, cúm A/H3 lưu hành, theo đó là cúm A/H1N1pdm09 và cúm B. Cuối năm 2013, số mẫu của cúm A/H1N1pdm09 và A/H3 chiếm ưu thế hơn so với cúm B [82],[85].

Tại Thái Lan, mẫu cúm được thu thập quanh năm. Cúm A/H1N1 lưu hành đến cuối năm 2009 và được thay thế bởi cúm A/H1N1pdm09, chủng cúm này lưu hành liên tục tới hết năm 2010, chiếm ưu thế tuyệt đối so với cúm A/H3 và cúm B. Đầu năm 2011, số lượng mẫu cúm được ghi nhận rất ít (<20 ca/tuần) và đồng thời có sự lưu hành của cả cúm B, cúm A/H1N1pdm09 và A/H3. Từ giữa năm 2011, cúm A/H3 và B nổi trội đến tận giữa năm 2012 và tiếp đó là sự quay trở lại của A/H1N1pdm09 và chủng này lưu hành đồng thời với cúm B đến hết năm. Năm 2013, cúm A/H3 chiếm ưu thế tuyệt đối so với A/H1N1pdm09 và cúm B [82].

Tại Nhật Bản, các ca cúm cũng thường được ghi nhận vào mùa đông-xuân. Riêng năm 2009, số mẫu cúm ghi nhận quanh năm với cúm A/H1N1 lưu hành đầu năm, được thay thế bằng A/H1N1pdm09 vào cuối năm và chủng này lưu hành đến hết quý I năm 2010. Năm sau đó vẫn là sự lưu hành của cúm A/H1N1pdm09 cùng với cúm A/H3 và B. Cúm A/H3 chiếm ưu thế tới hết năm 2013. Cúm B thường xuất hiện sau cúm A/H3 kể từ năm 2011 đến nay [82].

Tại Hoa Kỳ, tỷ lệ nhiễm cúm từ 5-20%. Đầu năm 2009, cả cúm A/H1N1, A không phân típ và cúm B được ghi nhận. Từ tháng 4, cúm A/H1N1pdm09 xuất hiện và chiếm ưu thế đến cuối năm mặc dù có ghi nhận một số rất ít các ca cúm A không phân típ. Cúm cũng thường lưu hành vào mùa đông-xuân, năm 2011 và 2012 là cả cúm A/H1N1pdm09, cúm A/H3, cúm A không phân típ và cúm B. Đầu năm 2013 các ca cúm A/H3, cúm A không phân típ và cúm B được ghi nhận nhưng đến cuối năm 2013 đã xuất hiện trở lại cúm A/H1N1pdm09 (Hình 1.8) [81],[82].



Hình 1.8. Các ca bệnh và phân típ cúm tại Hoa Kỳ, 2009-2013.

Nguồn: <http://www.flunet.int.com> [82].

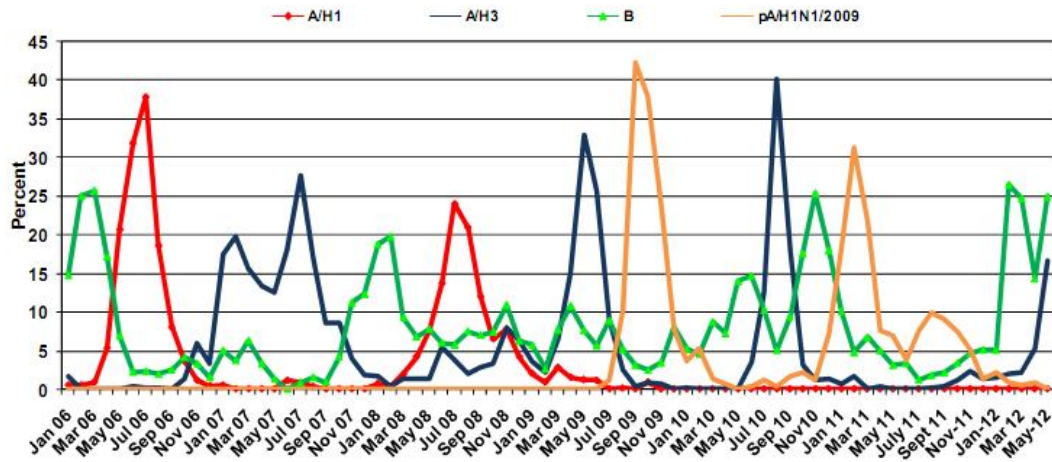
Tại Pháp, cúm cũng thường lưu hành vào mùa đông-xuân với tỷ lệ trung bình là 5-15%. Cúm A/H1N1pdm09 được ghi nhận từ cuối năm 2009 đến đầu 2010. Năm 2010-2011, ngoài cúm A/H1N1pdm09, còn có các ca cúm A không phân típ và cúm B. Năm 2012, các chủng cúm A/H3 và A không phân típ chiếm ưu thế. Năm 2013 lại có sự quay trở lại của cúm A/H1N1pdm09 và cúm B [38],[82].

Tại Anh, thời gian và hình thái dịch cúm tương tự Pháp, sau đại dịch cúm A/H1N1pdm09 năm 2009, virus này vẫn lưu hành giai đoạn 2010-2011, cùng với cúm A không phân típ và cúm B. Năm 2011-2012, cúm A/H3 chiếm ưu thế trong khi cúm B không có nhiều và năm 2013 thì cúm A/H1N1pdm09 quay trở lại cùng lưu hành với cúm A không phân típ và cúm B [82].

Tại Úc, cúm thường lưu hành vào giữa năm. Cúm A/H1N1pdm09 lưu hành mạnh mẽ năm 2009, kéo dài đến hết 2011. Năm 2012, cúm A/H3 chiếm ưu thế, sau đó là cúm A/H1N1pdm09 vào năm 2013 [82].

Tại Brasil, các ca bệnh cúm được ghi nhận quanh năm. Năm 2009, cúm A/H1N1pdm09 thay thế cúm A/H1N1 và lưu hành đến nửa đầu năm 2010. Năm 2011, cúm A/H3 chiếm ưu thế vào nửa đầu năm nhưng từ cuối năm, cúm A/H1N1pdm09 đã quay trở lại lưu hành tới hết 2013 cùng cúm A/H3 năm 2012 hoặc cúm B năm 2013 [82].

Tại Việt Nam, theo Nguyễn Thu Yên và cộng sự, nghiên cứu giám sát trọng điểm về tỷ lệ nhiễm cúm trong số các ca ILI giai đoạn 2006-2012 do Trung tâm cúm Quốc gia tiến hành ở 15 cơ sở y tế gồm tuyến huyện, tuyến tỉnh, bệnh viện trung ương, các phòng khám đa khoa trên một số lượng cỡ mẫu được xét nghiệm rất lớn là 29.804 trường hợp, ở cả hai giới với các nhóm tuổi dao động từ 0-94 tuổi (trung vị là 12 tuổi) cho thấy tỷ lệ dương tính với cúm bằng RT-PCR là 22%. Trong đa số các năm giám sát, luôn chỉ có một chủng cúm A nổi trội (A/H1N1 hoặc A/H3N2). Năm 2006 và 2008, cúm A/H1N1 chiếm ưu thế trong khi cúm A/H3N2 lưu hành ở mức thấp nhưng năm 2007 và 2010 thì ngược lại, A/H3N2 chiếm ưu thế còn A/H1N1 lại ở mức thấp. Riêng năm 2009, cúm A/H3N2 lưu hành trước khi có sự xuất hiện của cúm A/H1N1pdm09, kéo dài tới tận đầu năm 2010. Chủng cúm này tái xuất hiện vào năm 2011 và 2013. Tỷ lệ dương tính cúm khá tương đồng giữa các loại cơ sở y tế (20-23%) và giữa các vùng miền (21-23%). lứa tuổi học đường có tỷ lệ dương tính cao nhất (29%) và nhóm tuổi thấp nhất là < 6 tháng và > 64 tuổi. Cúm B lưu hành ở tất cả các năm, không liên quan đến phân típ cúm A. Năm 2009, xét nghiệm cúm A/H1N1pdm09 bắt đầu từ tháng 5 và tỷ lệ dương tính của năm này là 9,4%. Năm 2010, mặc dù cúm A/H1N1pdm09 tiếp tục lưu hành nhưng ở mức thấp hơn nhiều (2,1%) và cúm B và A/H3N2 cùng chiếm ưu thế. Cúm A/H1N1 không còn được phát hiện kể từ năm 2009 (Hình 1.9) [62],[81],[86].



Hình 1.9. Lưu hành cúm và phân típ cúm tại Việt Nam, 2006-2012.

$N=7344$ ca dương tính.

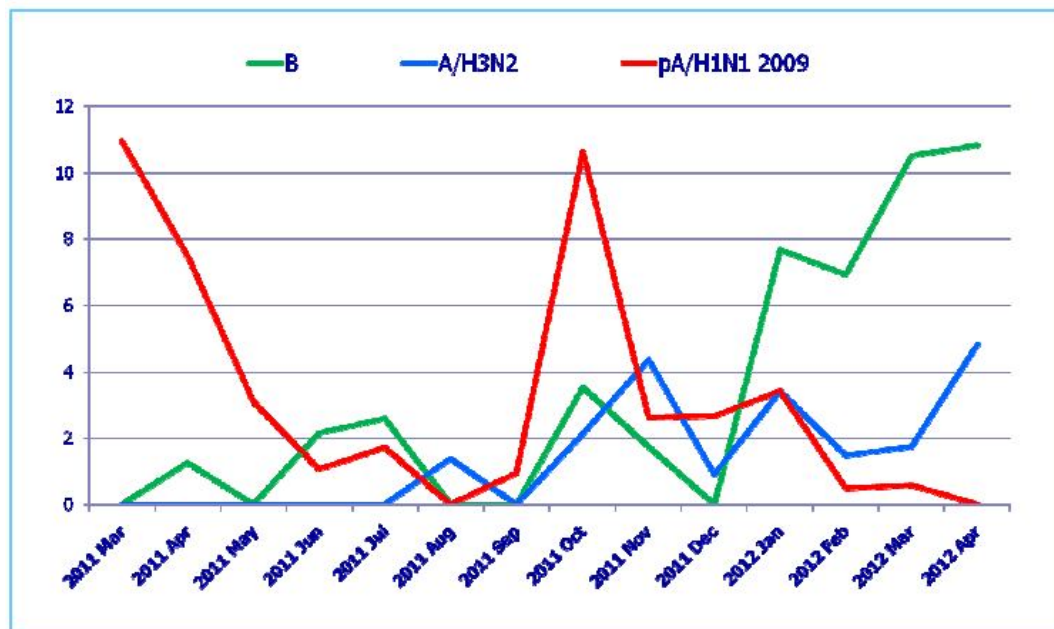
Nguồn: Nguyễn Thị Thu Yến và cộng sự,

Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương [62].

Nghiên cứu này cũng cho thấy virus cúm lưu hành quanh năm, virus cúm A và B thường cùng lưu hành, có thể đạt đỉnh nhiễm và thường ở những thời điểm khác nhau (đạt đỉnh nhiễm nếu tỷ lệ dương tính $>20\%$). Đỉnh nhiễm cúm thường xảy ra trong khoảng từ tháng 5-10 nhưng cũng có thể xảy ra ở các tháng khác trong năm, ví dụ năm 2007, cúm A/H3N2 có 2 đỉnh là tháng 2-3 và tháng 5-10. Cúm B cũng lưu hành quanh năm và nếu có đỉnh thì thường rơi vào khoảng tháng 11-3. Tại Miền Trung, cúm B thường xảy ra ở giai đoạn tháng 11-5. Tại Miền Nam, cúm B thường xảy ra đều ở tất cả các tháng trong năm, chỉ có 56% rơi vào giai đoạn tháng 11-5. Đáng chú ý là cúm A/H1N1pdm09 được phát hiện từ đầu tháng 9-12 năm 2009 và đạt đỉnh vào tuần 20 (tháng 9) với 58% bệnh nhân ILI dương tính [49],[62],[86].

Nghiên cứu về tỷ lệ nhiễm cúm ở các trường hợp SVP tiến hành năm 2006-2012 trên 1034 mẫu bệnh phẩm của Trung tâm cúm Quốc gia cho thấy cúm A/H1N1pdm09 chiếm 6,1%, cúm mùa A/H1N1 và A/H3N2 là 2,8%,

cúm B là 2,2%, cúm A/H5N1 là 2,9%, và hRSV là 0,1% [49]. Đây cũng là một nghiên cứu có cỡ mẫu lớn tập trung vào các bệnh nhân bị viêm phổi nặng để tìm nguyên nhân cúm và có phát hiện thêm một tác nhân ngoài cúm là hRSV. Như vậy vai trò của cúm đã được nghiên cứu trên cả bệnh nhân ILI - một bệnh cảnh lâm sàng gặp nhiều ở cộng đồng và SVP - một bệnh cảnh thường khiến bệnh nhân phải nhập viện. Tuy nhiên, nghiên cứu này mới chỉ dừng ở một tác nhân virus ngoài cúm là hRSV chứ chưa sàng lọc hàng loạt tác nhân virus gây bệnh đường hô hấp nên còn hạn chế về phân tích đồng nhiễm cúm và các virus khác [62],[86].



Hình 1.10. Tỷ lệ nhiễm cúm và phân típ cúm ở bệnh nhân SARI, 2011-2012.

Nguồn: Nguyễn Thu Yến và cộng sự,

Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương [86].

Mặc dù năm 2009 chưa có nghiên cứu nào về SARI, nhưng Nguyễn Thu Yến và cộng sự đã tiến hành nghiên cứu này ở giai đoạn 2011-2012 trên 1578 bệnh nhân tại 5 cơ sở y tế gồm bệnh viện đa khoa DakLak, bệnh viện đa

khoa Khánh hòa, bệnh viện Nhi đồng 1 - Thành phố Hồ Chí Minh, bệnh viện Nhi Trung ương và Viện lâm sàng Các bệnh nhiệt đới. Kết quả cho thấy tỷ lệ nhiễm cúm A/H1N1pdm09, A/H1N1 và A/H3N2, cúm B, và A/H5N1 lần lượt là 2,9% (1,1-4,4%), 1,5% (0-2,2%), 3,9% (0-5,8%), và 0,1 (0-0,3%) [62],[86]. Diễn biến theo tháng của các loại cúm và phân tít của 135 trường hợp dương tính cúm A/H3N2, A/H1N1pdm09 và B cho thấy tỷ lệ nhiễm cúm A/H1N1pdm09 đạt đỉnh trước tháng 3 và 9-11 năm 2011, cúm B từ tháng 1-4 năm 2012 và cúm A/H3N2 tăng nhẹ tháng 11 năm 2011 đến tháng 1 năm 2012 (Hình 1.10) [62].

Một nghiên cứu mô tả cắt ngang đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu của giám sát chủ động và giám sát thường xuyên tại xã Cẩm Sơn, huyện Cẩm Giàng, tỉnh Hải Dương giai đoạn 04/2009-03/2010 do tác giả Thẩm Chí Dũng và cộng sự tiến hành cho thấy trong tổng số 54 mẫu được xét nghiệm, 34 mẫu (69,3%) cho kết quả dương tính, trong đó virus cúm A/H1N1pdm09 chiếm 53,7%, virus cúm B chiếm 1,9%. Nghiên cứu này phát hiện được virus cúm A/H1N1pdm từ tháng 08/2009 và đạt mức cao nhất từ tháng 09, kéo dài đến tận tháng 12 cùng năm [64].

Một nghiên cứu được thực hiện trong khuôn khổ dự án *Giám sát và điều tra tình hình dịch ở Đông Nam Á* (Surveillance and Investigation of Endemic Situations in South-East Asia - SISEA) hợp tác với Cơ quan Phát triển Pháp (French Development Agency - FDA) thông qua Viện Pasteur Paris giai đoạn 2009-2011 tại Bến Tre chỉ ra rằng, tỷ lệ nhiễm cúm A/H1N1pdm09, cúm mùa A, và cúm B tương ứng là 1,4%, 2,7%, và 1,0%. Cúm tại Miền Nam thường lưu hành vào mùa hè và có hiện tượng chuyển sang tháng 5-7 [61].

1.2. Tổng quan một số vấn đề về sởi

Bệnh sởi được mô tả từ thế kỷ thứ VI sau Công nguyên và được công nhận là bệnh của trẻ em năm 1224. Ở những nước đang phát triển, virus sởi vẫn được coi là “kẻ giết hại trẻ em” [1-4].

1.2.1. Phép gọi tên

Virus sởi thuộc trên họ *Mononegavirales*, họ *Paramyxoviridae*, dưới họ *Paramyxovirinae*, chi *Morbilivirus* và tên quốc tế là measles virus (Bảng 1.1). Từ năm 1998, WHO đã quy định phép gọi tên chủng virus sởi để cung cấp những thông tin thiết yếu ở mức độ phân tử [87-89]. Cùng thuộc trên họ *Mononegavirales* còn có hai họ virus ARN sợi đơn, phân cực âm, và không phân đoạn là *Rhabdoviridae* và *Filoviridae* [1],[2],[38].

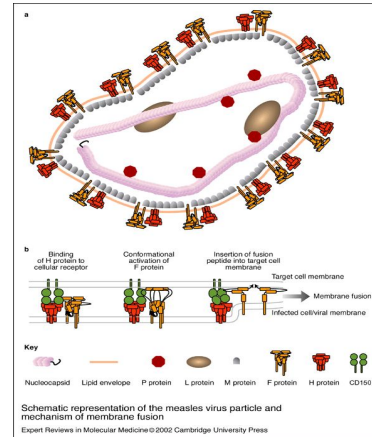
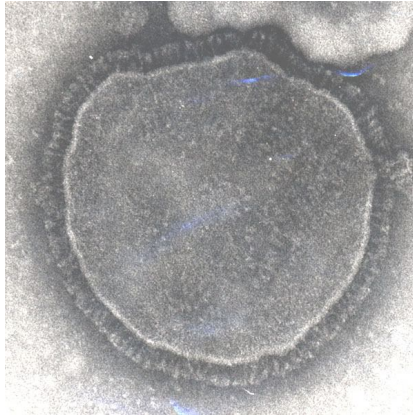
Bảng 1.1. Họ *Paramyxoviridae* - một họ virus quan trọng với con người.

Nguồn: François Freymuth, Cộng hòa Pháp [38].

Dưới họ	Chi	Loài
<i>Paramyxovirinae</i>	<i>Paramyxovirus</i>	human parainfluenza virus 1 (hPIV-1) human parainfluenza virus 3 (hPIV-3)
	<i>Rubulavirus</i>	human parainfluenza virus 2 (hPIV-2) human parainfluenza virus 4 (hPIV-4) mumps virus newcastle virus
	<i>Morbilivirus</i>	<u>measles virus (virus sởi)</u>
<i>Pneumovirinae</i>	<i>Pneumovirus</i>	human respiratory syncytial virus (hRSV A và B)
	<i>Metapneumovirus</i>	human metapneumovirus (hMPV)

1.2.2. Hình thái, cấu trúc

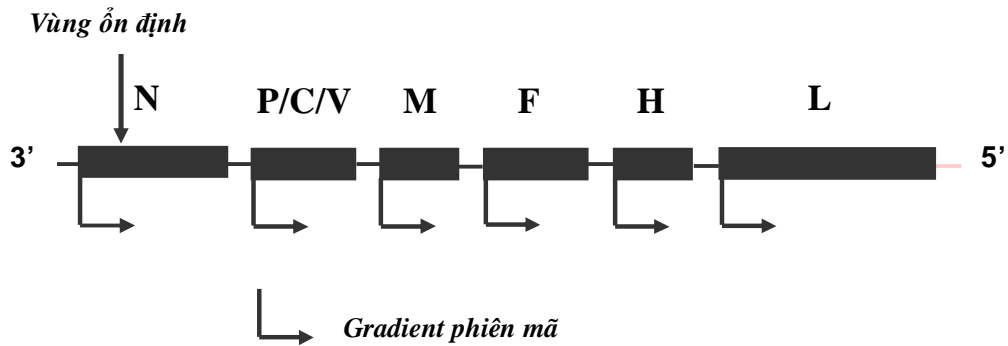
Hạt virus sởi hoàn chỉnh đa hình thái nhưng chủ yếu hình cầu, kích thước 100-300 nm. Thành phần cấu tạo từ trong ra ngoài gồm bộ máy di truyền (genome), capsid và vỏ ngoài (Hình 1.11) [1],[3].



Hình 1.11. Ảnh chụp dưới kính hiển vi điện tử và sơ đồ virus sởi.

Nguồn: Scheider-Schaulies S. và Meulen V [3].

Bộ máy di truyền của virus sởi là ARN sợi đơn, phân cực âm, không phân đoạn, dài khoảng 16.000 ribonucleotide, có trật tự 3'- N - P - M - F - H - L Polymerase 5', mã hóa 6 protein cấu trúc từ 6 gen tương ứng và 2 protein phi cấu trúc từ gen P (protein N - P/C/V - M - F - H - L). Sự nhân lên, phiên mã, dịch mã và lắp ráp tương tự như các *Paramyxovirus* khác. Những *mono* và *bicistron* ARN thông tin được phiên mã với một *gradient* phiên mã từ N đến L nên protein N có hàm lượng cao nhất (Hình 1.12) [1-3].



ARN sợi đơn âm, không phân đoạn, dài 15.892 Ribonucleotide

Hình 1.12. Sơ đồ bộ máy di truyền (genome) của virus sởi.

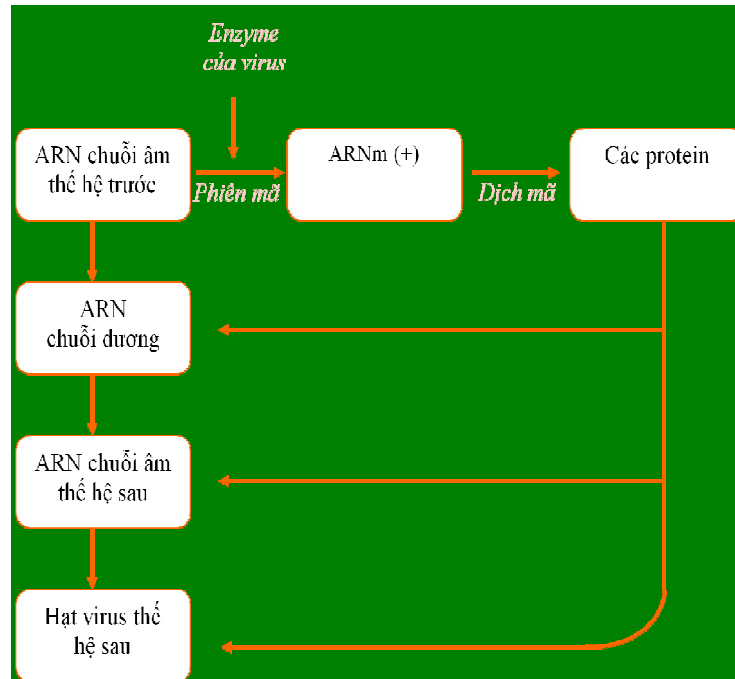
Nguồn: Billeter A.M. và Meulen V.T., Đức [3].

1.2.3. Sự nhân lên của virus

Nhìn chung, khó tìm được mô hình động vật phù hợp để nghiên cứu bệnh học sởi. Các phòng thí nghiệm thường sử dụng các dòng tế bào thường trực như Vero, Vero *hSLAM*, hay B95a để nghiên cứu các thử nghiệm liên quan đến nuôi cấy tế bào [2],[21].

Toàn bộ chu kỳ nhân lên của virus sởi xảy ra tại bào tương của tế bào gây nhiễm (Hình 1.13). Quá trình gắn màng và xâm nhập tế bào của virus xảy ra khi có sự tương tác giữa protein H và F của virus và thụ thể đặc hiệu (receptor) nằm trên bề mặt tế bào vật chủ (người hoặc khỉ) - phân tử glycoprotein CD46. Phân tử ARN thông tin mã hóa cho các protein bao gồm peptide có tín hiệu kết thúc giống nhau, một đoạn trình tự ngắn, lặp lại chung và gắn bổ thể, một khu vực liên màng và một phần có vai trò như một chiếc mỏ neo. Chúng khác nhau về độ dài và thành phần của một khu vực ngoại bào giàu serine/threonin và proline gần đoạn xuyên màng và đoạn nằm trong bào

tương. Có tác giả đã công bố rằng ở *in vivo*, virus sởi không sử dụng CD46 mà sử dụng phân tử phát tín hiệu hoạt hóa tế bào lympho là CDw150 [1],[3].



Hình 1.13. Sơ đồ nhân lên của virus sởi.

Nguồn: Bernard Field. *Virology - Philadelphia, Hoa Kỳ* [1].

Quá trình nhân lên của ARN virus sởi bắt đầu bằng sợi ARN âm ban đầu có vai trò không những làm khuôn mẫu cho quá trình phiên mã thành ARN thông tin để rồi sau đó được dịch mã thành các protein cấu trúc và phi cấu trúc mà còn làm khuôn mẫu để tổng hợp nên ARN sợi âm thể hệ sau thông qua sợi ARN dương trung gian. Sợi ARN âm sẽ lắp ráp cùng với các protein cấu trúc. Màng ngoài virus hình thành do quá trình nảy chồi qua màng bào tương. Sự giải phóng hạt virus hoàn chỉnh ra khỏi tế bào gây nhiễm có thể chỉ sau vài giờ [1-3].

1.2.4. Các triển vọng thanh toán sởi

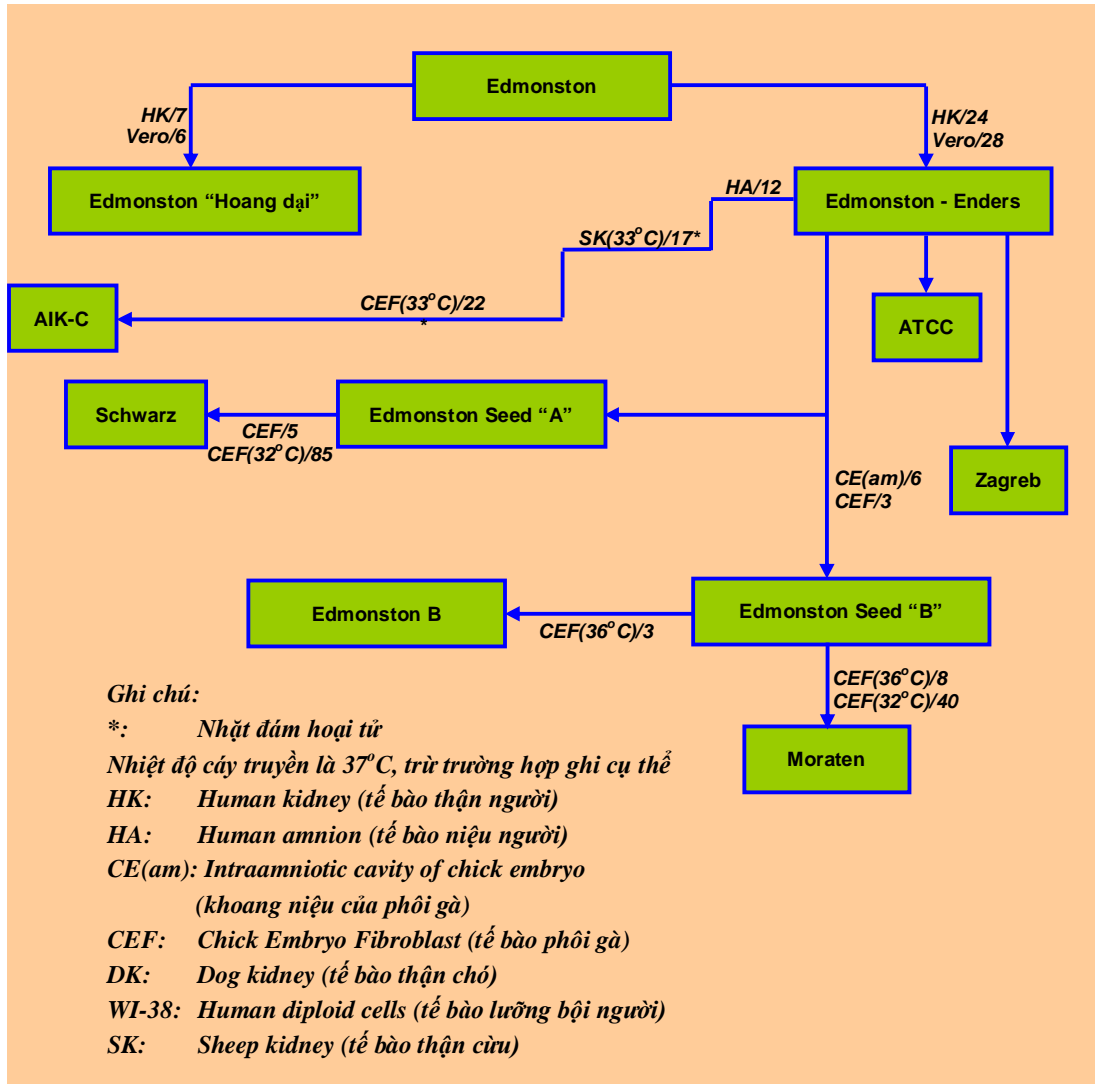
Về mặt lý thuyết, sởi là một bệnh lý tương đễ thanh toán bằng tiêm chủng do virus chỉ có một típ huyết thanh, đa số các trường hợp có thể chẩn đoán lâm sàng, không có ổ chứa động vật và có vắc xin phòng bệnh [3].

1.2.5. Các nghiên cứu liên quan đến sởi

Việt Nam đang ở giai đoạn không chế tiến tới thanh toán sởi, đã có nhiều hợp tác nghiên cứu cơ bản phòng thí nghiệm và ứng dụng như phân lập virus sởi trên tế bào B95a, xác định một genotype mới (H2) và được WHO công nhận năm 2001, xác định genotype sởi hoang dại lưu hành tại miền Bắc, miền Trung và Tây Nguyên, đặc điểm di truyền các chủng virus sởi hoang dại thời kỳ trước và sau chiến dịch tiêm sởi mũi 2. Các trình tự gen N và H của nhiều chủng sởi lưu hành tại Việt Nam đã được đăng nhập vào ngân hàng gen thế giới (Genbank) [90-93].

Nhiều nghiên cứu huyết thanh học đã được tiến hành như giám sát định kỳ sởi, đánh giá công hiệu vắc xin sởi mũi hai tại Hải Phòng, xác định căn nguyên gây sốt phát ban không phải do sởi [94]. Việt Nam cũng sản xuất kháng nguyên sởi sử dụng trong ngưng kết hồng cầu, được CDC Hoa Kỳ chuyển giao công nghệ sản xuất kháng nguyên protein N tái tổ hợp sử dụng trong ELISA [94]. Các kỹ thuật được sử dụng trong chẩn đoán và nghiên cứu sởi rất đa dạng như ngưng kết hồng cầu khí, ELISA (gián tiếp và tóm bắt kháng thể IgM), phân lập virus, trung hòa và trung hòa vi lượng, RT-PCR, real-time RT-PCR và giải trình tự gen (sequencing) [90-94].

Trong lịch sử, đã có vắc xin sởi bất hoạt nhưng hiện nay nó đã được thay thế bằng vắc xin sởi sống, có thể đơn hoặc phối hợp cùng quai bị và rubella (Measles Mumps Rubella - MMR hay Rougeole Oreillons Rubéole - ROR) [3],[95-98].



Hình 1.14. Sơ đồ quá trình sản xuất chủng vắc xin sởi.

Nguồn: Billeter A.M., Meulen V.T., Đức [3].

Vắc xin sởi sống giảm độc lực lần đầu tiên được sản xuất bằng thích nghi chủng Edmonston trên phôi gà và nguyên bào sợi phôi gà (Chicken Embryonic Fibroblast - CEF) sau 24 lần cấy truyền trên tế bào thận người tiên phát và 28 lần trên tế bào Vero, sau đó là 6 lần trên tế bào khoang niệu của phôi gà để có được chủng virus Edmonston B. Vắc xin này rất có hiệu quả và

được cấp phép năm 1963 nhưng hay gây phản ứng sốt và phát ban ở phần lớn trẻ được tiêm phòng nên đôi khi phải chỉ định gamaglobulin đồng thời với vắc xin. Tác giả Schwarz đã cấy truyền thêm trên CEF chủng Edmonston B để có được một chủng giảm độc hơn và được cấp phép năm 1965. Hiện nay, nhiều nơi trên thế giới, vắc xin sản xuất từ chủng Schwarz được xem là một vắc xin sợi chuẩn. Chủng Moraten được cấp phép sử dụng tại Mỹ năm 1968 có liên quan rất gần với chủng Schwarz. Những chủng vắc xin khác có nguồn gốc từ chủng Edmonston B (chủng Zagreb) cũng được sử dụng ở một số khu vực. Những chủng giảm độc lực khác (CAM, AIK-C, Leningrad-16, Shanghai-191) được sản xuất độc lập so với vắc xin có nguồn gốc từ chủng Edmonston bằng cách áp dụng những phương pháp tương tự (Hình 1.14) [3].

Gây miễn dịch liều chuẩn thức vắc xin sợi sống giảm độc lực tạo hiện tượng giảm lympho bào trong thời gian ngắn, ức chế đáp ứng quá mẫn muộn trong da, và thay đổi sản xuất cytokine. Sự ức chế đáp ứng miễn dịch này không có ý nghĩa quan trọng về mặt lâm sàng [1],[3].

Thông thường, liều gây miễn dịch là 10^3 - 10^4 PFU. Khi dùng quá 10-100 lần thì đáp ứng miễn dịch thể tốt hơn ở nhóm trẻ 4-6 tháng tuổi, tuy nhiên, sẽ có một tỷ lệ tử vong cao hơn sau đó 2-3 năm ở những nước có *tỷ lệ tử vong trẻ em* cao do ức chế đáp ứng miễn dịch kéo dài làm tăng hiện tượng mắc các bệnh nhiễm trùng khác [1],[3]. Đáp ứng miễn dịch với vắc xin sợi sống giảm độc lực tương tự nhiễm sợi tự nhiên nhưng biến động hơn. Tỷ lệ thất bại sau tiêm sợi mũi hai xấp xỉ 5,0% sau 10-15 năm. Hiện nay, vắc xin sợi mũi hai đang được áp dụng rộng rãi nhằm tạo cơ hội gây miễn dịch cho những người không được tiêm hoặc không có đáp ứng sau tiêm sợi mũi một [1],[3].

Tuổi khuyến cáo tiêm vắc xin sợi có thể thay đổi từ 6-15 tháng và vẫn còn là một vấn đề đang được bàn luận [95],[97],[98]. Khả năng đáp ứng huyết

thanh phụ thuộc vào mức kháng thể đặc hiệu sởi của mẹ truyền vẫn còn tồn lưu trong cơ thể con, do vậy, tuổi khuyến cáo khi tiêm vắc xin phụ thuộc vào sự cân nhắc giữa lứa tuổi tối ưu để có đáp ứng huyết thanh và khả năng mắc sởi trước lứa tuổi đó. Tại các khu vực còn nhiều sởi, tiêm vắc xin sởi thường xuyên được tiến hành khi trẻ được 9 tháng tuổi, trong khi đó, ở những khu vực sởi ít lưu hành thì tuổi tiêm là 12-15 tháng. Ngoài tuổi của trẻ và sự có mặt kháng thể tồn lưu của mẹ, các bệnh phối hợp cũng có thể ảnh hưởng đến tỷ lệ đáp ứng huyết thanh. Bất kỳ một nguy cơ nào làm giảm đáp ứng huyết thanh đều phải được cân nhắc so với việc mất cơ hội được tiêm phòng và những nguy hiểm sau mắc sởi. Vắc xin sởi hiện nay hoàn toàn có thể tiêm theo phác đồ thông thường cho trẻ em và người lớn dương tính với HIV nhưng tỷ lệ đáp ứng huyết thanh thấp hơn so với bình thường [1],[3].

Việt Nam đã sản xuất thành công vắc xin sởi đơn, sống giảm độc lực từ chuyển giao công nghệ của Viện Kitasato (Nhật Bản) cho Trung tâm Nghiên cứu Sản xuất Vắc xin và Sinh phẩm Y tế - POLYVAC sử dụng chủng AIK-C. Vắc xin này có hiệu giá ổn định, luôn đạt yêu cầu của WHO và mẫu chuẩn có hiệu giá 4,2-4,7 Log₁₀/liều 0,5ml [99]. Hiệu giá vắc xin sởi được nhà sản xuất kiểm định bằng phương pháp tạo đám hoại tử với đơn vị tính là số PFU/liều 0,5ml, được Viện Kiểm định quốc gia kiểm định bằng liều gây nhiễm 50% nuôi cấy tế bào (Tissue Culture Infectivity Dose - TCID₅₀) theo hướng dẫn của WHO [100].

1.3. Sản xuất chứng dương ARN *in vitro* và kiểm định công hiệu vắc xin

Vai trò của vắc xin ngày càng lớn cùng với sự phát triển của khoa học công nghệ, trong đó có sự ra đời của vắc xin điều trị và vắc xin phòng các bệnh dị ứng, tự miễn, chuyển hóa, thậm chí trong tương lai có thể phòng nghiện như nicotine hoặc cocaine. Đối tượng phục vụ của vắc xin cũng ngày

càng được mở rộng, bao gồm cả phụ nữ có thai, người có tuổi hay trẻ sơ sinh [44], [101-109].

Công nghệ nghiên cứu và sản xuất vắc xin không ngừng phát triển, có thể là vắc xin đơn (sởi, viêm não Nhật Bản B) hay phối hợp (sởi, quai bị và rubella), vắc xin chết (viêm não Nhật bản B trên não chuột), sống giảm độc lực (Oral Polio Vaccine - OPV), vắc xin là thành phần của tế bào (ho gà), giải độc tố (uốn ván), tái tổ hợp giữa thành phần tế bào và giải độc tố (ly), vắc xin không bào hay vô bào (Outer Membrane Vesicle - OMV) (viêm màng não do não mô cầu), vắc xin ADN (viêm gan B), vắc xin tương tự phần tử hạt virus (Viral-Like Particle - VLP) (Human papillomavirus - HPV), vắc xin tái tổ hợp (viêm gan B), vắc xin bao phủ toàn bộ các phân tử cúm đang lưu hành toàn cầu (universal - đang nghiên cứu) [101-109]. Đi song hành cùng sự phát triển về công nghệ thiết kế và sản xuất vắc xin là sự ra đời của nhiều thử nghiệm kiểm định, trong đó có các kỹ thuật sinh học phân tử.

Mục đích của tiêm vắc xin là để hệ thống miễn dịch có được đáp ứng miễn dịch lâu dài, bảo vệ cơ thể khỏi bị bệnh hoặc để giúp cơ thể kiểm soát được bệnh [102],[105],[110],[111]. Tuy nhiên, sẽ không được phép sử dụng vắc xin nếu nó chưa được kiểm định về *an toàn* và *công hiệu* [44].

Công hiệu (Potency) là đo lường hoạt tính sinh học, sử dụng một thử nghiệm sinh học định lượng phù hợp, dựa trên thuộc tính của sản phẩm kết hợp với các đặc tính sinh học phù hợp tương ứng [110],[111].

Kiểm định công hiệu vắc xin là xác định được yếu tố bảo vệ (Correlate of Protection - CoP). *CoP là một đáp ứng miễn dịch có liên quan một cách có ý nghĩa thống kê đến bảo vệ* [110-117].

CoP có thể tuyệt đối, có thể tương đối, và có thể có đồng CoP [49]. CoP cũng có thể được chia theo i./ CoP cơ học (mechanistic - mCoP) là một đáp ứng miễn dịch chịu trách nhiệm bảo vệ; ii./ CoP không cơ học (non-

mechanistic - nCoP), trước đây còn được gọi là chất thay thế (surrogate), là một đáp ứng miễn dịch thay thế cho mCoP khi không thể biết hoặc không dễ dàng đo lường được mCoP [110-117]. Xác định công hiệu vắc xin bằng real-time là một nCoP.

Rất nhiều loại vắc xin hiện đang được nghiên cứu, thậm chí, một vắc xin nhưng nhiều nhà sản xuất cùng nghiên cứu, nghiên cứu vắc xin mới để thay thế những vắc xin hiện đang tồn tại mà chưa phải là tối ưu. Từ sự phát triển của công nghệ vắc xin mà ra đời những thử nghiệm kiểm định vắc xin. Mặt khác, từ những số liệu hiện có cho thấy tỷ lệ thành công ở giai đoạn 3 của thử nghiệm lâm sàng là rất hiếm, rất nhiều các bài học kinh nghiệm đã được rút ra từ những thử nghiệm này, và một trong những hành động khắc phục chính là nghiên cứu những phương pháp kiểm định vắc xin mới thay thế cho những thử nghiệm được cho rằng chưa tối ưu [44],[102-104],[111]. Như vậy, phát triển các thử nghiệm vắc xin mới, trong đó có kiểm định chính là một nhánh của sự phát triển khoa học.

Ngày càng nhiều kỹ thuật tiên tiến sử dụng trong chẩn đoán phòng thí nghiệm, nghiên cứu và sản xuất đã và đang được áp dụng cho kiểm định với khả năng đo lường ngày càng cao, từ đáp ứng miễn dịch dịch thể đến đáp ứng miễn dịch tế bào, thậm chí loại tiểu quần thể tế bào lympho T đáp ứng đặc hiệu và định lượng từng tiểu quần thể tế bào, sản phẩm của tế bào lympho ở mức độ từng tế bào, định lượng các phân tử đích dựa vào số lần phân bào.... Các nghiên cứu về sinh học phân tử cũng đã và đang được áp dụng không những cho nghiên cứu thiết kế vắc xin mà còn cho cả những nghiên cứu về kiểm định [6-10],[118-120].

Phát hiện ARN bằng RT-PCR nhạy hơn phân lập virus, ngoài ra, các yêu cầu về chất lượng bệnh phẩm, thời gian và điều kiện vận chuyển mẫu cũng không nghiêm ngặt như trong phân lập và xác định trực tiếp kháng

nguyên virus [2],[47],[121]. Để khắc phục những hạn chế của phản ứng khuếch đại cổ điển, tác giả Higuchi và cộng sự đã phân tích tính động học của PCR bằng một hệ thống phát hiện những sản phẩm khuếch đại khi chúng tích tụ lại [22]. Trên thế giới, đã có nhiều nghiên cứu về ứng dụng real-time trong chẩn đoán, nghiên cứu về sốt và nhiều tác nhân khác.

Năm 2004, tác giả Stranska và cộng sự đã nghiên cứu về tính nhạy cảm của Herpes Simplex Virus (HSV) với thuốc kháng virus aciclovir (ACV) và foscarnet (PFA) trong dịch nổi nuôi cấy tế bào gây nhiễm (Vero). Nghiên cứu này cho kết quả chính xác, tự động hóa nhưng vẫn phải chờ đợi CPE và không có sự tương quan giữa PFU và ADN ở dịch nổi nuôi cấy tế bào [32].

Năm 2006, tác giả Nguyễn Thị Thường, Henry Agut và cộng sự đã phát triển nghiên cứu của Stranska bằng cách định lượng số bản sao ADN bên trong tế bào gây nhiễm thay vì định lượng ở dịch nổi. Sự thay đổi này cho phép định lượng nhanh chóng ADN trong vòng 24 giờ sau cấy mà không cần đợi sự xuất hiện của CPE trong khi hiệu giá ADN tương quan chặt chẽ với PFU [5]. Đây chính là mô hình thử nghiệm để xây dựng kỹ thuật kiểm định công hiệu vắc xin virus ARN áp dụng cho sốt.

Đáng chú ý, năm 2005, tác giả Schalk và sau này là tác giả Ammour và cộng sự đã xây dựng một phương pháp mới để kiểm định công hiệu sốt của vắc xin sốt phối hợp với quai bị và rubella (MMR) bằng cách định lượng trực tiếp số bản sao ARN. Đây thực sự là một phương pháp mới có tính đột phá do có thể đơn giản hóa và tự động hóa quá trình xét nghiệm, kết quả nhanh và chính xác. Tuy nhiên, hạn chế của phương pháp này là quy trình phức tạp, virus quai bị có thể ảnh hưởng đến sự nhân lên của virus sốt, và hiệu giá ARN được xác định từ dịch nổi nuôi cấy tế bào hoặc không đề cập rõ ràng phương pháp gặt ARN, thời gian gặt vẫn ít nhất 2 ngày. Ngoài ra, gam chuẩn ngoài được sản xuất còn nhiều ADN gốc (7%), điều này có ảnh hưởng đến kết quả

định lượng ARN [6],[7]. Mặc dù còn một số tồn tại, hiện phương pháp xác định công hiệu vắc xin sợi bằng real-time RT-PCR của Schalk đang dần được đưa vào khuyến cáo của WHO [118].

Năm 2006, tác giả Hummel và cộng sự đã tiến hành một nghiên cứu thẩm định/xác nhận phương pháp để tìm ra các cặp môi và đầu dò nhạy và đặc hiệu nhất trong chẩn đoán sợi là khuếch đại vị trí 1131-1293 của gen N [121].

Đề tài nghiên cứu này kế thừa hiệu quả của nghiên cứu dựa trên mô hình HSV, thẩm định cặp môi và đầu dò phát hiện sợi để khắc phục những điểm còn tồn tại của phương pháp Schalk và Ammour.

Để có thể kiểm soát được hiệu quả khuếch đại, không chế khả năng âm tính giả của phản ứng, hoặc để định lượng trực tiếp thì nhất thiết phải có chứng dương hay gam chuẩn ngoài [5],[22],[24],[32],[122]. Sản xuất ARN *in vitro* khắc phục được những hạn chế của sử dụng ARN tách chiết trực tiếp từ bệnh phẩm như không phải tiếp xúc thường xuyên với bệnh phẩm, tiết kiệm bệnh phẩm cho những nghiên cứu khác, chứng dương định lượng được, hiệu giá cao (10^{11} - $10E^{19}$ bản sao/phản ứng 20 μ l), ổn định, đồng nhất, tinh khiết, không bị nhiễm ARN/ADN từ vật chủ và từ những tác nhân khác (như đồng nhiễm virus hay vi khuẩn) nên tránh được hiện tượng cạnh tranh giữa các tác nhân [37],[123].

Sản xuất chứng dương đã được nghiên cứu từ lâu, ngày càng có nhiều cải tiến đáng kể trong thiết kế quá trình sản xuất. Có thể sản xuất ARN bằng phương pháp phiên mã cổ điển hoặc bằng phương pháp phiên mã trực tiếp với kỹ thuật cải biên môi đặc hiệu nhờ gắn môi với trình tự phiên mã và một chuỗi poly T. Nhiều tác giả đã có thể sản xuất được ARN chuỗi kép. Tuy nhiên, quá trình sản xuất chứng dương gồm nhiều bước nên quy trình sản xuất

luôn chỉ được nêu một cách vắn tắt và rất không đầy đủ, một số nghiên cứu có giới thiệu những bước thực hiện nhưng không rõ ràng, kể cả đó là hướng dẫn của các nhà sản xuất [5-7],[32],[37],[124],[125].

Nhìn chung, trừ một số trường hợp thật đặc biệt, mỗi phòng thí nghiệm sử dụng trình tự mỗi cho chẩn đoán và nghiên cứu khác nhau hoặc chỉ một số phòng thí nghiệm có trình tự mỗi giống nhau nên không có gam chuẩn ngoài chung cho tất cả các phòng thí nghiệm, do vậy nó thường không được thương mại hóa [5],[6],[123],[125].

Tại thời điểm nghiên cứu, nhiều phòng thí nghiệm tại Việt Nam thường tách chiết một mẫu bệnh phẩm đã được chẩn đoán trước đó để coi như chứng dương mà không biết trong một thể tích khuôn mẫu đưa vào phản ứng có bao nhiêu bản sao và độ tinh khiết của mẫu, số bản sao cũng khác nhau giữa các lần chuẩn bị mẫu (tách chiết), như vậy sẽ không thể tránh được hiện tượng âm tính giả nếu sử dụng một mẫu bệnh phẩm dương tính quá mạnh mà hiệu quả khuếch đại không đạt yêu cầu. Sử dụng plasmid như một chứng dương cho RT-PCR cũng không tối ưu vì ADN không thể kiểm soát chất lượng của bước phiên mã ngược và một bản sao ARN không tương ứng với một bản sao ADN. Một số tác giả sử dụng chứng dương ARN quy từ hiệu giá PFU cũng chưa phù hợp vì PFU chỉ đo lường virus có hoạt tính, trên thực tế còn có thể có những phân tử không có tính gây nhiễm và hiệu giá ARN thường cao hơn ít nhất 10^3 lần so với PFU nên không thể kiểm soát được hiện tượng âm tính giả ở những mẫu có một lượng khuôn mẫu thấp [1],[36].

Việt Nam cũng tham gia các chương trình đánh giá chất lượng từ bên ngoài (External Quality Assessment - EQA) về xét nghiệm acid nucleic (Nucleic Acid Testing - NAT) với tư cách là một cơ quan thành viên chứ không phải đơn vị tổ chức cung cấp dịch vụ. Cho đến thời điểm hiện tại, chưa có những công bố trong nước về nghiên cứu sản xuất hàng loạt chứng dương

ARN hoặc tính được chi tiết từng bản sao acid nucleic cụ thể, trừ một đề tài Nghiên cứu tuyển chọn cấp Bộ Y tế về sản xuất chứng dương ARN *in vitro* do nghiên cứu sinh làm chủ nhiệm đề tài [82],[125],[126].

Theo yêu cầu kỹ thuật của Tổ chức Tiêu chuẩn Quốc tế (International Standard Organization - ISO), quá trình xét nghiệm được tính từ khi lấy mẫu bệnh phẩm đến khi kết quả được trả về cho khách hàng (thầy thuốc lâm sàng, bệnh nhân, phòng thí nghiệm gửi mẫu...) và được chia làm 3 giai đoạn là *Trước xét nghiệm*, *Xét nghiệm* và *Sau xét nghiệm*. Mỗi giai đoạn đều có vai trò hết sức quan trọng để đảm bảo kết quả của phòng thí nghiệm phải đúng, được trả cho đúng khách hàng và đúng thời gian (kịp thời). Để đảm bảo được điều này, toàn bộ 3 giai đoạn của quá trình xét nghiệm phải được kiểm soát bởi hệ thống *Đảm bảo chất lượng* (Quality Assurance - QA), còn giai đoạn *Xét nghiệm* phải được đảm bảo bởi *Kiểm soát chất lượng* (Quality Control - QC), trong đó chứng dương chính là mẫu nội bộ sử dụng cho QC [127].

Phát triển sau chương trình nội kiểm (Internal Quality Control - IQC) và EQA huyết thanh học nhưng hiện nay các gam chuẩn ngoài ADN và ARN đã và đang được ứng dụng cho các phòng thí nghiệm y học và chương trình quản lý chất lượng trên phạm vi toàn cầu. Tại khu vực châu Á có Viện Sức khỏe Quốc gia (National Institute of Health - NIH) thuộc Bộ Y tế công cộng Thái lan chịu trách nhiệm sản xuất các bộ mẫu chuẩn (panel) sinh học phân tử cho khu vực Châu Á, Úc chịu trách nhiệm sản xuất các bộ mẫu chuẩn cho toàn cầu, nhất là khu vực của Nam bán cầu, WHO chịu trách nhiệm phân phối các bộ mẫu chuẩn cho EQA NAT toàn cầu, Viện Pasteur Paris chịu trách nhiệm về EQA NAT cho các phòng thí nghiệm thuộc mạng lưới Quốc tế các Viện Pasteur, Trung tâm nghiên cứu và đánh giá sinh phẩm miễn dịch của Italia (Center for Immunobiologicals Research and Evaluation - CRIVIB)

chịu trách nhiệm về chương trình EQA các bệnh lây truyền theo đường máu của Châu Âu.... [24],[82],[128-130].

Bộ Y tế Việt Nam đã và đang xây dựng hệ thống quản lý chất lượng phòng thí nghiệm y học, bao gồm cả QC và QA. Chứng dương ARN là một trong số những yếu tố góp phần triển khai chương trình quản lý chất lượng theo ISO [127],[131].

CHƯƠNG 2

ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

▪ Đối tượng nghiên cứu trong sản xuất chứng dương ARN *in vitro*: Mười (10) μ l ARN tách chiết từ chủng virus cúm gia cầm A/H5N1 phân lập tháng 12 năm 2007 tại Việt Nam do Trung tâm Cúm Quốc gia, Khoa Virus, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương cung cấp. ARN của virus cúm mùa A, cúm B, và cúm A/H1N1pdm09 được tách chiết từ mẫu bệnh phẩm đã được chẩn đoán khẳng định bằng RT-PCR;

▪ Đối tượng và thời gian nghiên cứu trong xác định tỷ lệ nhiễm cúm: Lựa chọn đối tượng tham gia nghiên cứu tuân thủ định nghĩa ca bệnh SARI của dự án SISEA thực hiện tại Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương. Bệnh nhân nhập viện tại Bệnh viện đa khoa Tỉnh Hải Dương và Bệnh viện đa khoa huyện Cẩm Giàng ở mọi lứa tuổi, cả hai giới, được chẩn đoán lâm sàng SARI với các dấu hiệu:

Trẻ < 5 tuổi:

- Ho HOẶC khó thở HOẶC thở ngắn khi nhập viện
- VÀ, ít nhất có một trong các triệu chứng sau:
 - o Thở nhanh
 - o Co rút lồng ngực
 - o Các triệu chứng nguy hiểm nói chung
- VÀ triệu chứng xuất hiện trong vòng 7 ngày

Trẻ > 5 tuổi và người lớn:

- Ho HOẶC viêm họng HOẶC khó thở (hoặc thở ngắn)

- VÀ sốt khi nhập viện (hoặc tiền sử sốt trong vòng 3 ngày)
- VÀ, có ít nhất một trong các triệu chứng sau:
- Thở nhanh
- X-quang có hình ảnh thâm nhiễm mới
- Nói khó
- Phải sử dụng cơ hỗ trợ hô hấp (co rút cơ liên sườn)
- Giảm oxy máu (mức bão hòa oxy < 92 %)
- VÀ các triệu chứng xuất hiện trong vòng 7 ngày

Ghi chú: Thở nhanh

<i>Trẻ < 2 tháng:</i>	<i>nhịp thở > 60 lần/phút.</i>
<i>Trẻ 2 tháng - 1 tuổi:</i>	<i>nhịp thở > 50 lần/phút.</i>
<i>Trẻ 1 - 4 tuổi:</i>	<i>nhịp thở > 40 lần/phút.</i>
<i>Trẻ >4 tuổi và người lớn:</i>	<i>nhịp thở > 30 lần/phút.</i>

Tiêu chí loại trừ:

Đề tài nghiên cứu này không lấy mẫu của những bệnh nhân bị tâm thần hoặc phụ nữ có thai nếu không được yêu cầu.

Để đảm bảo tính đại diện theo thời gian, bệnh phẩm được lấy liên tục trong suốt 2,5 năm từ tháng 1/2009 - 6/2011, 8-10 mẫu/tháng, mỗi tuần 2-3 mẫu đầu tiên của loạt bệnh nhân vào khám bệnh tại Bệnh viện đa khoa tỉnh Hải Dương và Bệnh viện đa khoa huyện Cẩm Giàng, thuộc tỉnh Hải Dương. Khi có ca bệnh nghi ngờ, hệ thống giám sát của dự án SISEA tiến hành điều tra và điền vào *phiếu điều tra* trước khi lấy mẫu. Bệnh phẩm là tăm bông ngoáy mũi và họng, được bảo quản trong dung dịch *môi trường bảo quản và vận chuyển virus* vô trùng. Các thầy thuốc lâm sàng được tập huấn về định nghĩa ca bệnh, kỹ thuật lấy mẫu, bảo quản và vận chuyển mẫu an toàn từ thực địa nghiên cứu về phòng thí nghiệm. Các thông tin bệnh nhân được lưu trữ tại

các tủ hồ sơ và hệ thống phần mềm máy tính riêng biệt của Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương để kiểm soát và đảm bảo chất lượng nghiên cứu.

- Đối tượng nghiên cứu trong xác định hiệu giá ARN vắc xin sởi: Vắc xin mẫu chuẩn, ký hiệu M-0107 và 10 loạt vắc xin thành phẩm sản xuất trong 4 năm liên tục 2010-2013 do POLYVAC cung cấp (tổng số 710 liều).

2.2. Vật liệu nghiên cứu

Nguyên vật liệu và trang thiết bị là các các thiết bị khoa học, sinh phẩm, hóa chất, vật liệu tiêu hao, môi trường cơ bản phục vụ các thử nghiệm sinh học phân tử, nuôi cấy tế bào và phân lập virus.

2.2.1. Cơ sở vật chất và trang thiết bị, máy móc

- Phòng thí nghiệm an toàn sinh học cấp độ 2, có đầy đủ các khu vực nuôi cấy tế bào, xử lý bệnh phẩm, trước PCR, PCR, và sau PCR;
- Tủ âm CO₂ (Thermo) với các ngăn riêng biệt cho tế bào sạch và các nuôi cấy đã gây nhiễm;
- Máy ly tâm để bàn tốc độ cao (18.000 vòng/phút) và nhiệt độ lạnh (4°C) (Hettich): là thiết bị có thể sử dụng với cả ống 0,2ml và 1,8-2,0ml, phù hợp cho cả tách chiết acid nucleic và plasmid;
- Máy ly tâm tế bào (Hettich): là thiết bị có thể ly tâm lạnh tới 0°C, tốc độ tối đa 4000 vòng/phút, và sử dụng cho tấm nhựa, ống ly tâm 15ml hoặc 50ml;
- Buồng điện di (Biorad): buồng điện di sử dụng cho phiên mã và chạy điện di chẩn đoán riêng biệt;
- Tủ an toàn sinh học (Jouan): là tủ an toàn sinh học cấp độ 2, hàng năm được kiểm tra, bảo dưỡng và cấp chứng nhận bởi Khoa An toàn sinh học và Quản lý chất lượng của Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương;

- Tủ sinh học phân tử (Esco): hàng năm được kiểm tra, bảo dưỡng và cấp chứng nhận bởi Khoa An toàn sinh học và Quản lý chất lượng của Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương;
- Máy khuếch đại gen cổ điển (MJ Research và Biorad C1000); sử dụng cho loại ống nghiệm 0,2ml, 1 khối (96 ống phản ứng) và 2 khối (48 ống phản ứng), có chế độ cài đặt dải nhiệt độ (*gradient* nhiệt độ);
- Máy real-time 7500 FAST (Applied Biosystems): đọc được tất cả các hệ thống màu hiện có trên thị trường, trong đó có FAM. Là thiết bị mới, trong suốt thời gian sử dụng, thiết bị luôn được chạy hiệu chuẩn theo đúng quy định của nhà sản xuất (6 tháng/lần);
- Máy giải trình tự gen (Applied Biosystems 3130): là thiết bị được bảo trì bảo dưỡng theo đúng quy định của nhà sản xuất;
- Máy soi gel, máy chụp gel (Syngene);
- Máy đo nồng độ acid nucleic (Thermo);
- Máy cất nước khử ion (Millipore): đảm bảo chất lượng nước đạt 18M Ω ;
- Tủ -80°C (Sanyo và Nuair);
- Tủ -20°C, -30°C (Sanyo);
- Tủ lạnh 4°C (Toshiba và Medika);
- Máy làm đá vẩy (Fiocchetti);
- Máy ủ nhiệt có lắc (Eppendorf);
- Nồi cách thủy (Mettler): nhiệt độ dao động trong khoảng 20-95°C và có chế độ lắc ngang tự động;
- PipetteMan các loại (P2-P5000): mới hoặc luôn trong thời hạn hiệu chuẩn. PipetteMan được hiệu chuẩn bởi Khoa An toàn sinh học và Quản lý chất lượng của Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương;
- Một số thiết bị nhỏ khác.

2.2.2. Sinh phẩm hóa chất

- Bộ sinh phẩm tách chiết ARN (Qiagen);
- Dung dịch đệm ly giải nhanh tế bào (TpLR): là dung dịch Tris HCL pH=8 chứa 50mM KCL, 50mM MgCL₂, 0,45% Nonidet-P40, và 0,45% Tween 20.
- Bộ sinh phẩm tinh sạch ADN (Qiagen);
- Bộ sinh phẩm tách chiết plasmid (Qiagen);
- Bộ sinh phẩm RT-PCR one-step (Qiagen);
- Bộ sinh phẩm RT-PCR one-step (Invitrogen);
- Bộ sinh phẩm giải trình tự gen;
- Thạch điện di (Promega);
- Thuốc nhuộm ADN SYBR (Promega);
- Thang ADN chuẩn 2log, 100bp, 1Kpb (Promega);
- Thang ARN chuẩn 0,1-2,0Kbp (Invitrogen);
- Tế bào cảm biến *E.coli* chủng *DH5α lacZAM15* (Invitrogen);
- Sinh phẩm tạo dòng (Invitrogen và Promega);
- Chỉ thị màu X-gal (Promega);
- Kháng sinh ampicilline (Sigma);
- Thạch nuôi vi khuẩn (Gibco);
- Methylcellulose (Sigma);
- Canh thang LB (Invitrogen);
- Phức hợp phản ứng PCR (green master mix) (Promega);
- Enzyme giới hạn Sall (Promega);
- Bộ sinh phẩm phiên mã T7RiboMax (Promega);
- Phenol : Chloroform : Isoamylalcohol 25 : 24 :1 (Fluka);
- Chloroform : Isoamylalcohol 24 : 1 (Sigma);
- Diethylpyrocarbonate (DEPC) (Sigma);

- Loading dye (Promega);
- 3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid (MOPS) (Sigma);
- Đệm điện di TAE_x10 và TBE_x10 (Invitrogen);
- Nước cất không có nuclease (Invitrogen);
- Một số hóa chất cơ bản phòng thí nghiệm khác.

2.2.3. Môi và đầu dò

Các cặp môi và đầu dò đặc hiệu khuếch đại virus sởi, virus cúm, xác định phân típ cúm gia cầm A/H5N1 và A/H1N1pdm09, và các môi chức năng (T7)... được tổng hợp bởi Integrated ADN Technologies (IDT) theo trình tự khuyến cáo của dự án SISEA, nhà sản xuất hoặc đã được thẩm định và công bố quốc tế (Bảng 2.1) [37],[121].

- Cặp môi đặc hiệu sử dụng trong RT-PCR đa môi phát hiện đoạn gen 7 mã hóa protein M virus cúm mùa A (A/H3N2 và A/H1N1) và cúm B tương ứng là A1/A2 và B1/B2B. Cặp môi đặc hiệu sử dụng trong PCR đơn môi bán tổ khẳng định virus cúm mùa A và B là A1/MIA và B1/MIB3;
- Cặp môi và đầu dò phát hiện đoạn gen 7 mã hóa protein M virus cúm gia cầm A/H5N1 bằng real-time RT-PCR là MP-39-67/MP-183-153/MP96-75. Cặp môi phát hiện đoạn gen 7 virus cúm gia cầm A/H5N1 bằng RT-PCR cổ điển là M+52/M-253;
- Cặp môi và đầu dò xác định phân típ H5 (đoạn gen 4 mã hóa protein HA) virus cúm gia cầm A/H5N1 bằng real-time là H5HA-205-227/H5HA-326-303/H5HA-239-RV_a/H5HA-239RV_b. Cặp môi xác định phân típ H5 virus cúm gia cầm A/H5N1 bằng RT-PCR cổ điển là HA+/HA-;
- Cặp môi và đầu dò xác định phân típ NA (đoạn gen 6 mã hóa protein NA) virus cúm gia cầm A/H5N1 bằng real-time là N1-For-474-502/N1-Rev-603-631/N1-501-525;

- Cặp mồi và đầu dò phát hiện đoạn gen 7 virus cúm A/H1N1pdm09 bằng real-time RT-PCR và cổ điển (không sử dụng đầu dò) là GRAM-7Fw/GRAM-161Rv/GRAM51P;
- Cặp mồi và đầu dò xác định phân típ H1 (đoạn gen 4 mã hóa protein HA) virus cúm A/H1N1pdm09 bằng real-time là GRswH1-349/GRswH1-601/GRswH1-538P;
- Cặp mồi và đầu dò phát hiện gen N virus sởi là Ms1131-1160F/Ms1213-1190R/Ms1136-1187P.

Bảng 2.1. Mồi và đầu dò đặc hiệu khuếch đại sởi và cúm [121],[150].

Tên mồi	Trình tự	Sản phẩm (bp)
A1	GAG AGACTT GAA GAT GTC TTT GCT G	212
A2	TCC TGTCAC CTC TGA CTA AGG GGA TTT TG	
MIA	CTC TGA CTA AGG GGA TTT TG	130+/-212
B1	GAA AAA TTA CAC TGT TGG TTC GGT G	365
B2B	AGC GTT CCT AGT TTT ACT TGC ATT GA	
MIB3	CAT GAA ARC TCA CAC ATC T	260+/-365
GRAM/7Fw	CTT CTA ACC GAG GTC GAA ACG TA	154
GRAM/161Rv	GGT GAC AGG ATT GGT CTT GTC TTT A	
GRAM51P	TCA GGC CCC CTC AA GCC GAG	
GRswH1-349	GAG CTA AGA GAG CAA TTG A	252
GRswH1-601	GTA GAT GGA TGG TGA ATG	
GRswH1-538P	TTG CTG AGC TTT GGG TAT GA	
M+52	CTT CTA ACC GAG GTC GAA ACG	245

M-253	AGG GCA GAG GTC GAA ACG	
MP-39-67	CCM AGG TCG AAA CGT AYG TTC TCT CTA TC	144
MP-183-153	TGA CAG RAT YGG TCT TGT CTT TAG CCA YTC CA	
MP-96-75	ATY TCG GCT TTG AGG GGG CCT G	
Primer H5-1	GCC ATT CCA CAA CAT ACA CCC	358
Primer H5-2	TAA ATT CTC TAT CCT CCT TTC CAA	
H5HA-205-227	CGA TCT AGA YGG GGT GAA RCC TC	126
H5HA-326-303	CCT TCT CCA CTA TGT ANG ACC ATT C	
H5-Probe-239-RVa	AGC CAY CCA GCT ACR CTA CA	
H5-Probe-239-RVa	AGC CAT CCC GCA ACA CTA CA	
N1-For-474-502	TAY AAC TCA AGG TTT GAG TCT GTY GCT TG	157
N1-Rev-603-631	ATG TTR TTC CTC CAA CTC TTG ATR GTG TC	
N1-Probe-501-525	TCA GCR AGT GCY TGC CAT GAT GGC A	
Ms-1131-1160F	TGG CAT CTG AAC TCG GTA TCA C	82
Ms-1213-1190R	TGT CCT CAG TAG TAT GCA TTG CAA	
Ms-1163-1187P	CCG AGG ATG CAA GGC TTG TTT CAG A	
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	Sản phẩm
M13R	AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA	đích + 200

Ghi chú:

M: aMino (A hoặc C);

N: aNy (A hoặc C hoặc G hoặc T/U);

R: puRine (A hoặc G);

Y: pYrimidine (C hoặc T/U).

2.2.4. Tế bào

- Dòng tế bào thường trực Vero (Eurobio, Cộng hòa Pháp): là tế bào thận khỉ xanh Châu Phi, phát triển trên môi trường MEM 3% huyết thanh bê bào thai (Fetal Calf Serum - FCS), ở điều kiện khí trường 5% CO₂ và 37°C. Thời gian nhân đôi là 24 giờ, tách tế bào 3-4 ngày một lần theo tỷ lệ 1:5 và cần có enzyme trypsin 0,25%. Khi lấy tế bào từ điều kiện bảo quản âm sâu, tế bào được tách chuyển ổn định ít nhất 3 lần trước khi làm thử nghiệm. Nồng độ tế bào sử dụng cho thử nghiệm khi tách là $1,3 \times 10^4$ tế bào/ml;

- Môi trường nuôi cấy tế bào (MEM được bổ sung kháng sinh, glutamine, FCS, trypsin, HEPES, NaHCO₃, đỏ phenol). Môi trường MEM ở dạng bột, đóng gói theo từng lít, được pha trong nước cất 3 lần hoặc nước khử ion và hấp ước trước 121°Cx 30 phút trước khi thêm các thành phần bổ sung, nồng độ cuối cùng là MEMx1. Hóa chất NaHCO₃ ở dạng bột, pha 7,5% (w/v) trong nước khử ion và hấp ước 121°Cx 30 phút, nồng độ cuối cùng là 0,26% (w/v). Đỏ phenol ở dạng bột, pha 5% (w/v) trong nước khử ion và hấp ước ở 121°Cx 30 phút, nồng độ cuối cùng là 0,1% (w/v). Glutamin và HEPES ở dạng bột, được hòa tan trong nước cất 3 lần và lọc 0,22µm, nồng độ cuối cùng tương ứng là 0,02 và 0,1M. Huyết thanh bê bào thai, trypsin với nồng độ hoạt động 0,25%, được cấp giấy chứng nhận chất lượng (certified) và là sản phẩm thương mại, sẵn dùng.

2.2.5. Phần mềm phân tích và nguồn thông tin

- Phần mềm phân tích trình tự gen, vẽ cây di truyền, và so sánh từng cặp: Genetyx 7.0, Biodit, Mega 5.0;

- Thông tin về vật liệu di truyền: Trang thông tin của Trung tâm Quốc gia về Thông tin Công nghệ sinh học (National Center for Biotechnology

Information - NCBI) Hoa Kỳ (<http://www.ncbi.com>) và trang thông tin mạng lưới cúm toàn cầu (<http://www.flunet.int.com>).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Sản xuất chứng dương ARN *in vitro*

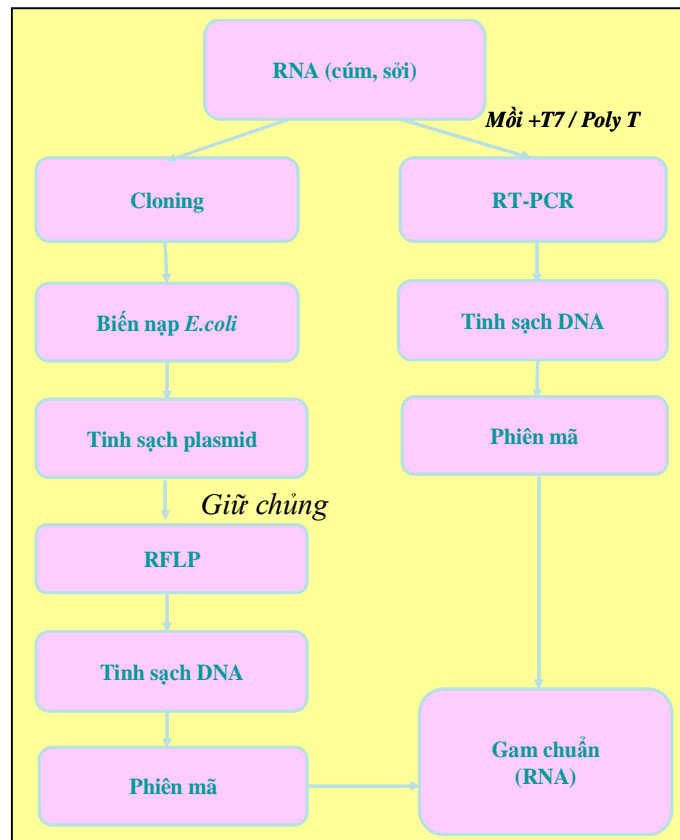
2.3.1.1. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu cơ bản phòng thí nghiệm.

2.3.1.2. Cỡ mẫu nghiên cứu

Không áp dụng công thức tính cỡ mẫu. Mẫu nguồn là 1-2,5 μ l ARN cho mỗi loại được tách chiết từ chủng virus hoặc bệnh phẩm.

2.3.1.3. Kỹ thuật



Hình 2.1. Sơ đồ quá trình phiên mã (cổ điển và trực tiếp)

Áp dụng 2 kỹ thuật i./ **phiên mã cổ điển** (virus cúm mùa A và cúm B (đoạn gen 7 mã hóa protein M) và cúm A/H5N1 (đoạn gen 7, 4, 6 mã hóa tương ứng protein M, HA, NA cho real-time RT-PCR và đoạn gen 7, 4 cho RT-PCR cổ điển) và ii./ **phiên mã trực tiếp** (gen N virus sởi và đoạn gen 7 virus cúm A/H1N1pdm09).

Phiên mã là một quá trình gồm nhiều bước (Hình 2.1), sản phẩm của mỗi bước trung gian sẽ là khuôn mẫu cho bước tiếp theo và luôn phải đảm bảo tinh khiết, không có mặt nuclease.

- Phiên mã cổ điển:

Trước tiên, ARN được tách chiết bằng bộ sinh phẩm tách chiết ARN (Qiagen) theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất (trừ ARN virus cúm A/H5N1 do Trung tâm cúm quốc gia cung cấp, sẵn dùng), có thể sử dụng ngay hoặc được bảo quản ở -80°C cho đến khi sử dụng. Sau đó, ARN được khuếch đại bằng RT-PCR với đoạn môi đặc hiệu để có được sản phẩm đích ADN.

Sản phẩm sau tinh sạch được nối với vec-tơ *pGEM T Easy* hoặc *TOPO[®]pCR2.1* để tạo plasmid tái tổ hợp, rồi được đưa vào tế bào cảm biến *E.coli* (Invitrogen) với sự có mặt của kháng sinh ampicilline và X-gal. Khuẩn lạc chuyển nạp sẽ được kiểm tra qua đánh giá màu sắc (trắng và xanh nhạt hay xanh đậm), bằng PCR cổ điển, giải trình tự gen với cả đoạn môi đặc hiệu và môi của vec-tơ để khẳng định chắc chắn sản phẩm đã được cài vào vec-tơ trước khi vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường canh thang LB và plasmid tái tổ hợp được tinh sạch.

Bảng 2.2.a. Pha hỗn dịch tạo dòng (TOPO[®]pCR2.1 - Invitrogen)[132].

Sinh phẩm	Số lượng	Ghi chú
Sản phẩm PCR	0,5 - 4 μ l	
Dung dịch muối	1 μ l	1,2M NaCL và 0,06M MgCL ₂
Nước cất vô trùng	Vừa đủ 5 μ l	
Vec-tơ TOPO	1 μ l	
Tổng số	6μl	

Trộn nhẹ hỗn dịch và để 5 phút ở nhiệt độ phòng và đặt lên đá vảy.

Bảng 2.2.b. Pha hỗn dịch tạo dòng (pGEM[®] T Easy – Promega) [133].

Sinh phẩm	Số lượng	Ghi chú
Đệm x2	5 μ l	
Vec-tơ pGEM T Easy	1 μ l	
Sản phẩm PCR	X* μ l	
Enzyme T4 DNA ligase	1 μ l	
Nước cất vô trùng	10-(X+7) μ l	
Tổng số	10μl	

Ghi chú: *: Tỷ lệ so với trọng lượng vec-tơ khoảng (1:3) đến (3:1).

Trộn nhẹ hỗn dịch, ủ 1 giờ ở nhiệt độ phòng và đặt lên đá vảy.

Các bước của quy trình chuyển nạp:

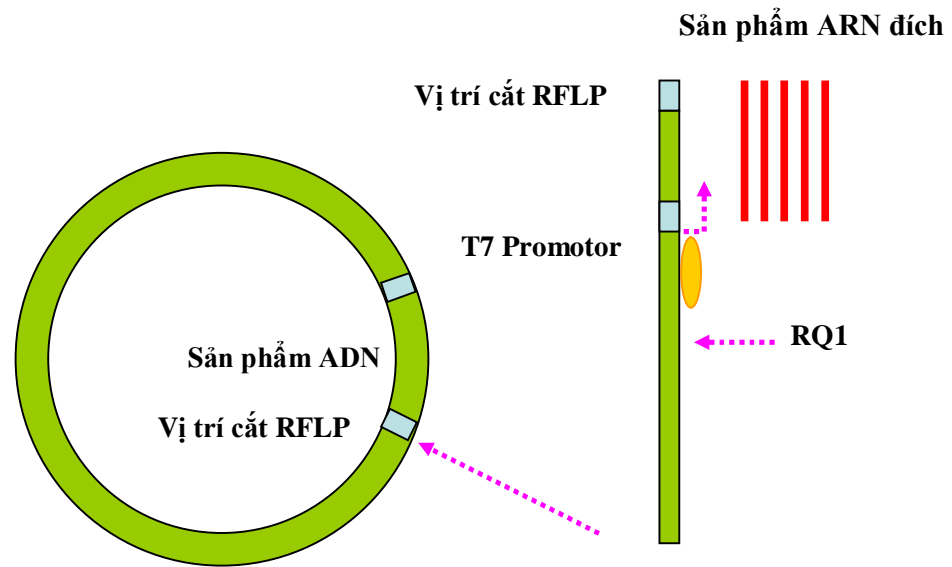
Bước 1: Thêm vào ống tế bào cảm biến (DH5 α) 2 μ l sản phẩm tạo dòng và ủ trên đá vảy 5-30 phút;

Bước 2: Sốc nhiệt ở 42°C trong 30 giây, sau đó thêm 250 μ l môi trường SOC (2% tryptone, 0,5% chiết xuất nấm men, 10mM NaCl, 2,5mM KCL, 10mM MgCL₂, 10mM MgSO₄, và 20mM Glucose) rồi lắc 200 vòng/phút ở 37°Cx1 giờ;

Bước 3: Tráng đều 10-50 μ l hỗn dịch chuyển nạp này lên đĩa thạch LB với nồng độ kháng sinh ampicilline 50-100 μ g/ml mà trước đó đã được tráng khô cơ chất X-Gal nồng độ 60 μ g/ml;

Bước 4: Lật ngược hộp lồng và ủ ở 37°C qua đêm. Sau 24 giờ có thể gạt khuẩn lạc trắng và xanh nhạt.

Sau khi đã có đủ một lượng plasmid tái tổ hợp, tiến hành tạo mạch thẳng plasmid bằng cắt enzyme giới hạn sử dụng Sall cho *pGEM T Easy* và HindIII cho *TOPO[®]pCR2.1* để có một vị trí cắt duy nhất và đặc hiệu, gần vị trí sản phẩm và đầu cắt tận cùng nằm phía đối diện với trình tự phiên mã T7 (Hình 2.2). Sau bước cắt plasmid tạo mạch thẳng, sản phẩm được tinh sạch trong điều kiện không có nuclease trước khi đưa vào làm khuôn mẫu cho thử nghiệm phiên mã *in vitro*.



Hình 2.2. Sơ đồ cơ chế phiên mã *in vitro*.

Phiên mã được thực hiện nhờ enzyme phiên mã T7 và luôn kèm theo chúng phiên mã của nhà sản xuất (pGEM). Sau phiên mã, dùng enzyme RQ1 phá hủy hoàn toàn khuôn mẫu ADN và chỉ giữ lại ARN. Sau cùng, sản phẩm ARN được tinh sạch bằng hóa chất theo phương pháp *phenol:chloroform*. Mật độ quang học (Optical Density - OD), hệ số chuyển đổi Avogadro, kích thước sản phẩm đích và cấu trúc ARN sẽ là những thông số cơ sở để tính sản lượng và nồng độ sản phẩm ARN đích. Sản phẩm ARN mới được tổng hợp được pha loãng trong nước khử ion đã xử lý diethylpyrocarbonate (DEPC) và không có nuclease thành các hỗn dịch chứng ARN có nồng độ mong muốn trong một đơn vị thể tích phản ứng, được kiểm tra bằng RT-PCR có bước RT (RT+) và không có bước RT (RT-).

Bảng 2.3. Pha hỗn dịch phiên mã [37].

Sinh phẩm	Số lượng/phản ứng	Chứng dương (pGEM)
Đệm phiên mã T7x2	10 μ l	10 μ l
ADN mạch thẳng 1 μ g	1-8 μ l	0 μ l
Chứng dương pGEM	0 μ l	1 μ l
Nước không có nuclease	0-7 μ l*	7 μ l
Enzyme phiên mã	2 μ l	2 μ l
Tổng số	20μl	20μl

Ghi chú: *: Cho vừa đủ tổng thể tích phản ứng là 20 μ l.

- Phiên mã trực tiếp:

Đoạn môi cổ điển đặc hiệu được cải biên bằng cách cài thêm tương ứng ở đầu 5' của môi xuôi và môi ngược một trình tự kích thích phiên mã T7 và poly T. Trước tiên, khuếch đại ARN nguồn bằng RT-PCR cổ điển với môi cải biên. Sau khi kiểm tra sản phẩm với kích thước mong muốn là tổng kích thước của sản phẩm đích khi sử dụng môi đặc hiệu và kích thước của 2 đoạn môi xuôi và ngược thì khẳng định bằng giải trình tự gen (Hình 2.3). Sau cùng, tinh sạch sản phẩm ADN và tiến hành bước phiên mã *in vitro* mà không cần qua các bước tạo dòng và chuyển nạp vào *E.coli*. Phá hủy ADN khuôn mẫu và tính toán số bản sao ARN giống như phiên mã cổ điển.



Hình 2.3. Sơ đồ cơ chế phiên mã trực tiếp.

2.3.1.4. Phân tích và tính toán số liệu

Nồng độ ARN được tính toán dựa vào kích thước, OD, cấu trúc phân tử ARN (ARN sợi đơn) và hệ số chuyển đổi Avogadro.

2.3.2. Xác định tỷ lệ nhiễm cúm

2.3.2.1. Phương pháp nghiên cứu

Quan sát mô tả cắt ngang sử dụng kỹ thuật RT-PCR đơn môi, đa môi và PCR bán tổ với biến số có tính chất định tính và là biến nhị phân (nhận giá trị dương tính hoặc âm tính). Các biến số sẽ được phân tích theo giới tính (nam, nữ), nhóm tuổi (<1 tuổi, 1-5 tuổi, 6-18 tuổi, 19-64 tuổi, và >64 tuổi), và thời gian (tháng, mùa, năm).

2.3.2.2. Cỡ mẫu nghiên cứu

Tính theo công thức tính cỡ mẫu cho nghiên cứu mô tả cắt ngang, sử dụng tỷ lệ mắc cúm trung bình toàn cầu không phải đại dịch (5 - 20%) [27];

$$n = \frac{Z_{(1-\alpha/2)}^2 \times p \times q}{d^2}$$

Trong đó:

n: cỡ mẫu nghiên cứu;

Z = 1,96 với độ tin cậy 95%;

p: tỷ lệ nhiễm ước lượng = 15%;

q = 1-p;

d: độ chính xác tuyệt đối của p = 1,5% = 0,015.

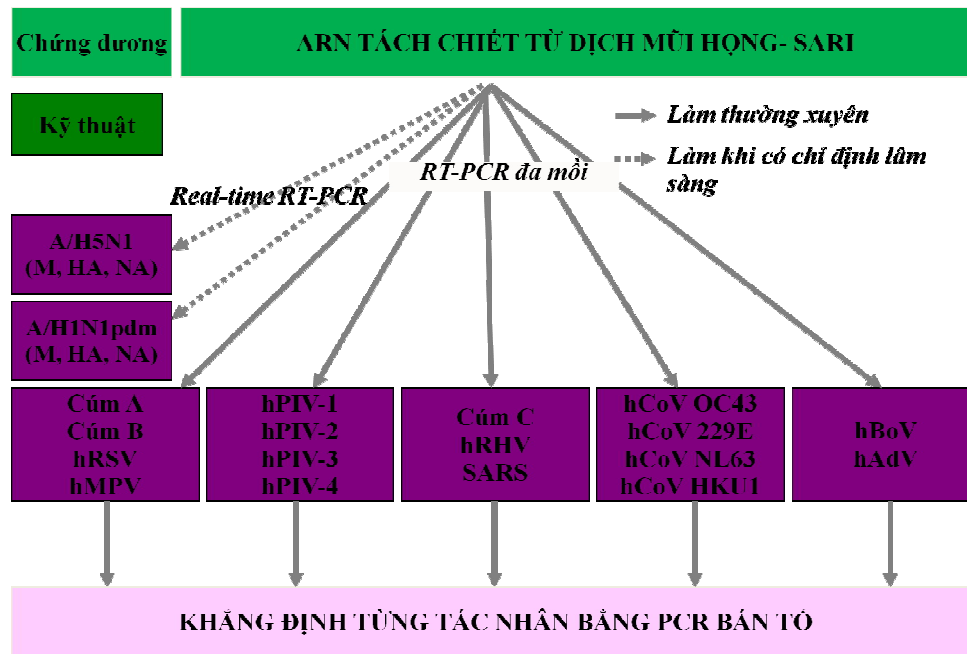
Thay vào công thức trên ta có:

$$n = \frac{1,96 \times 0,15 \times 0,85}{(0,015)^2} = 1110$$

Số mẫu nghiên cứu tối thiểu là 1110 mẫu. Trên thực tế, 1273 bệnh phẩm đã được thu thập liên tục trong 2,5 năm cho đề tài nghiên cứu này.

2.3.2.3. Kỹ thuật xét nghiệm

- Lấy bệnh phẩm dịch mũi họng: Mỗi bệnh nhân SARI được lấy bệnh phẩm bằng 2 tấm bông sợi polyester vô trùng, một tấm bông lấy bệnh phẩm ở mũi, một tấm bông lấy bệnh phẩm ở hai bên niêm mạc miệng và thành sau họng. Đưa tấm bông vào lỗ mũi (cả hai lỗ mũi) theo chiều song song với vòm họng, giữ vài giây, sau đó rút nhẹ nhàng, vừa rút vừa xoay. Với bệnh phẩm họng, bệnh nhân há miệng, thầy thuốc dùng dụng cụ chuyên dụng đè lưỡi bệnh nhân, dùng tấm bông sát và xoay nhẹ nơi tổn thương 2 bên niêm mạc má và thành sau họng. Xác định chất lượng lấy bệnh phẩm bằng cách quan sát sẽ thấy có một ít bệnh phẩm dính vào tấm bông là được. Cho cả 2 tấm bông vào ống nhựa vô trùng đựng sẵn dung dịch *môi trường bảo quản và vận chuyển virus* và vận chuyển ở điều kiện 4°C về Trung tâm Y tế dự phòng Tỉnh Hải Dương cùng ngày để giữ lâu dài ở -80°C trước khi chuyển về Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương để xử lý mẫu, tách chiết ARN và tiến hành phản ứng khuếch đại.



Hình 2.4. Sơ đồ xét nghiệm của dự án SISEA

▪ Quá trình xử lý, tách chiết bệnh phẩm và xét nghiệm được thực hiện tại Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương (Hình 2.4). ARN được tách chiết từ 140 μ l hỗn dịch bệnh phẩm bằng bộ sinh phẩm tách chiết ARN (Qiagen) theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất. Virus cúm mùa A (A/H3N2 và A/H1N1) và cúm B được phát hiện bằng khuếch đại ARN đoạn gen 7 mã hóa protein M bằng RT-PCR một bước, đa môi (phát hiện đồng thời cúm A, hRSV, cúm B, và hMPV) sử dụng bộ sinh phẩm RT-PCR một bước (Qiagen) và các cặp môi đặc hiệu (Bảng 2.1) theo đúng quy trình của Dự án SISEA - Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương (Bảng 2.4). Chứng dương được pha thành một hỗn hợp 2,5 μ l chứa ARN của 4 virus gồm 10^4 bản sao ARN cho mỗi loại virus cúm mùa A, hRSV, hMPV và 10^5 bản sao cho virus cúm B. Chứng dương chính là mẫu nội kiểm cho mỗi phản ứng khuếch đại. Kích thước tương ứng của sản phẩm vòng một là 212, 278, 365, và 537bp. Chu kỳ nhiệt của RT-PCR cổ điển một bước là 50°C x 30 phút, 94°C x 3 phút, tiếp theo là 40 chu kỳ 94°C x

30 giây, 55°C x 30 giây, 72°C x 1 phút, sau cùng là 72°C x 10 phút và sản phẩm được giữ ở 10°C.

Bảng 2.4. Pha hỗn dịch phản ứng RT-PCR đa mồi phát hiện cúm A, hRSV, cúm B, và hMPV.

Thành phần	n = 1 (µl)	n = ... (µl)	Ống phản ứng	Khuôn mẫu
H ₂ O	6,0		M1R1(-) 1
Buffer x 5	5,0		M1R1(-) 2
dNTP	1,0		M1R1 (+)
Cane p1 (RSV)	1,2		M1R1	ARN
Cane p2 (RSV)	1,2		M1R1	ARN
A1	1,2		M1R1	ARN
A2	1,2		M1R1	ARN
B1	1,2		M1R1	ARN
B2B	1,2		M1R1	ARN
M1a (MPV)	1,2		M1R1	ARN
M2 (MPV)	1,2		M1R1	ARN
Enzyme mix	1,0		M1R1	ARN
Khuôn mẫu	2,5		M1R1	ARN
Tổng số	25,0		M1R1	ARN

Sản phẩm vòng một của cúm mùa A và cúm B được khẳng định bằng PCR bán tổ, đơn môi (vòng 2) (Bảng 2.5). Kích thước sản phẩm đích vòng 2 của virus cúm A là 130bp (± 212 bp) và của virus cúm B là 260bp (± 365 bp). Mỗi phản ứng đều kèm theo 2 chứng âm (nước cho vòng hai, và chứng âm của vòng một). Chu trình nhiệt của phản ứng bán tổ khẳng định cúm mùa A và cúm B gồm $94^{\circ}\text{C} \times 5$ phút, tiếp theo là 40 chu kỳ $94^{\circ}\text{C} \times 10$ giây, $55^{\circ}\text{C} \times 30$ giây, $72^{\circ}\text{C} \times 30$ giây, sau cùng là $72^{\circ}\text{C} \times 10$ phút, và sản phẩm được giữ ở 10°C .

Bảng 2.5. Khẳng định cúm mùa A và cúm B bằng PCR bán tổ.

PCR bán tổ cúm mùa A			PCR bán tổ cúm B		
Thành phần	n=1	n=.....	Thành phần	n=1	n=.....
Master mix x 2	12,5		Master mix x 2	12,5	
MIA3	1,0		B1	1,0	
A2	0,5		MIB3	0,5	
H ₂ O	10,5		H ₂ O	10,5	
Khuôn mẫu	0,5		Khuôn mẫu	0,5	
Tổng số	25,0		Tổng số	25,0	

Nghiên cứu này không xác định phân típ của virus cúm mùa A. Chỉ đọc kết quả khi trên thạch điện di có mặt thuốc nhuộm SYBR cho hình ảnh thang ADN chuẩn rõ nét, các chứng âm tính không có dải ADN nào, chứng dương tính có các dải ADN với kích thước như mong đợi.

- Cúm A/H1N1pdm09 và cúm gia cầm A/H5N1 (nếu nghi ngờ trên lâm sàng) được phát hiện bằng khuếch đại ARN đoạn gen 7 mã hóa protein M bằng real-time RT-PCR một bước, đơn môi sử dụng bộ sinh phẩm RT-PCR (Invitrogen) và các cặp môi, đầu dò đặc hiệu (Bảng 2.1). Sau khi có kết quả khuếch đại đoạn gen 7 dương tính, khẳng định phân típ HA và NA. Mỗi phản ứng có nồng độ ion Mg là 3mM, môi và đầu dò đặc hiệu tương ứng là 0,8 μ M và 0,2 μ M, đều kèm theo 2 chứng âm tính (khuôn mẫu là nước cất và hỗn dịch phản ứng). Chu kỳ nhiệt của real-time khuếch đại cúm gia cầm A/H5N1 và A/H1N1pdm09 (các đoạn gen) đều là 50°C x 15 phút, 95°C x 2 phút, tiếp theo là 50 chu kỳ gồm 95°C x 15 giây, 60°C x 40 giây.

2.3.2.4. Phân tích kết quả

Kết quả được phân tích tại phòng thí nghiệm của dự án SISEA, nghiên cứu sinh thực hiện sản xuất chứng dương, chịu trách nhiệm và tham gia hầu hết các thử nghiệm khuếch đại phát hiện cúm, và phân tích kết quả. Tỷ lệ nhiễm cúm mùa A, cúm B, và cúm A/H1N1pdm09 được tính chung cho 2,5 năm nghiên cứu và theo từng năm. Phân tích tỷ lệ nhiễm cúm theo giới tính, nhóm tuổi và tháng trong năm. Sự khác biệt của các biến rời rạc được tính bằng thuật toán *Khi bình phương* (χ^2). Giá trị $p < 0,05$ được coi là có ý nghĩa thống kê.

2.3.2.5. Ý đức

Số liệu về tỷ lệ nhiễm cúm của đề tài nghiên cứu này là một phần của Dự án SISEA, đã được thông qua Hội đồng Ý đức của Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương. Bệnh nhân hoặc/và người nhà bệnh nhân được giải thích rõ ràng về mục đích nghiên cứu, được ký vào bản thỏa thuận tham gia nghiên cứu tình nguyện và không phải trả kinh phí xét nghiệm. Các trường hợp bệnh nhân không đưa vào nghiên cứu tuân theo các tiêu chí loại trừ của dự án

SISEA. Đề tài này có phân tích biến số giới tính nhưng chỉ với mục đích nghiên cứu dịch tễ học, không nhằm mục đích phân biệt giới. SISEA là dự án hợp tác quốc tế khoa học giữa Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương và FDA thông qua Viện Pasteur Paris, Cộng hòa Pháp và là dự án phi lợi nhuận. Giám đốc Dự án đồng ý cho Nghiên cứu sinh sử dụng và công bố số liệu trong đề tài nghiên cứu. Đề tài này không có xung đột về quyền lợi.

2.3.3. Xây dựng phương pháp kiểm định vắc xin sởi

2.3.3.1. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu cơ bản phòng thí nghiệm với biến số của hiệu giá các loại vắc xin có tính chất định lượng và là biến liên tục (nhận giá trị số PFU hoặc Log10 của PFU và số bản sao ARN hoặc Log10 của số bản sao ARN trong một đơn vị thể tích mẫu nghiên cứu (liều/0,5ml)).

2.3.3.2. Cỡ mẫu nghiên cứu

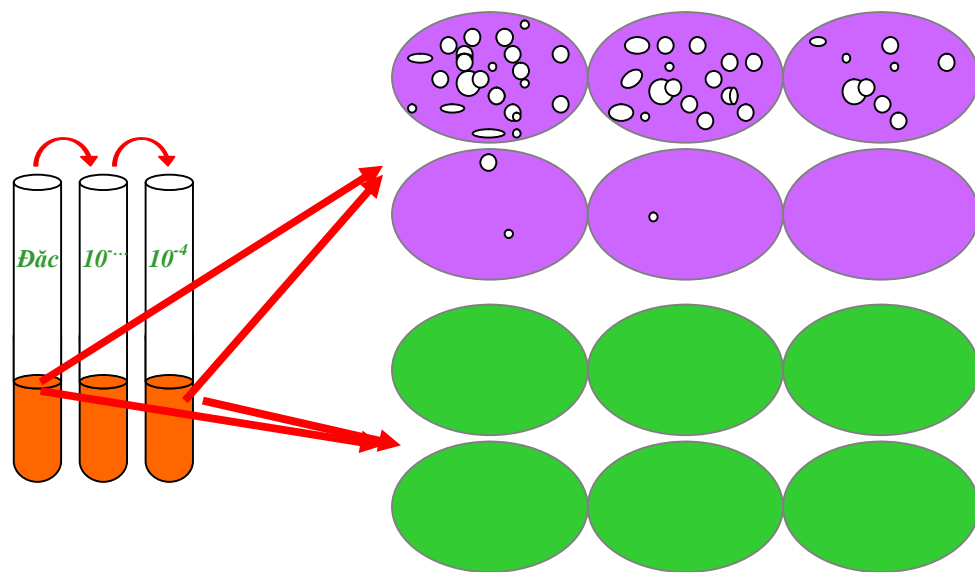
Phương pháp chọn mẫu tiện lợi và ngẫu nhiên với 10 loại vắc xin sởi thành phẩm được sản xuất trong giai đoạn 2010-2013. Không áp dụng công thức tính cỡ mẫu. Trong tổng số 20 loại vắc xin thành phẩm sản xuất 2010-2013 hiện có của POLYVAC, một cán bộ không làm việc cho POLYVAC, không biết rõ mục đích nghiên cứu lựa chọn ngẫu nhiên 10 loại cho nghiên cứu này.

2.3.3.3. Kỹ thuật xét nghiệm

- Xác định hiệu giá đơn vị tạo đám hoại tử: Hiệu giá gây nhiễm virus được xác định bằng phương pháp tạo đám hoại tử trên tế bào Vero ở các tấm nhựa 24 giếng. Cây 200µl hỗn dịch virus đặc và pha loãng bậc 10 từ 10^{-1} đến 10^{-4} lên tế bào Vero kín 95%, mỗi nồng độ cấy 2 giếng. Sau ủ 1 giờ ở 37°C x 5% CO_2 và lắng đều dịch cấy 15 phút/lần, hút dịch cấy rồi rửa sạch tế bào

bằng MEM 0% FCS và thêm môi trường phủ là 1% methylcellulose với 3% FCS. Sau 9 ngày ủ ở cùng điều kiện như trên, cố định tế bào bằng 10% formaldehyde (38%) trong PBS 1/75M và nhuộm tế bào bằng dung dịch tím crystian 0,25% trong formaldehyde 38% và tính số đám hoại tử trung bình của mỗi nồng độ pha loãng virus. Đơn vị tính là số PFU/0,5ml vắc xin mẫu chuẩn hoặc vắc xin thành phẩm (Hình 2.5). Thử nghiệm này được làm 6 lần với mẫu chuẩn, hiệu giá được so với khoảng giới hạn công bố của nhà sản xuất (POLYVAC).

$$\text{Hiệu giá PFU/0,5ml} = \frac{\text{Trung bình số đám hoại tử} \times 5 \times \text{đ pha loãng}}{2}$$



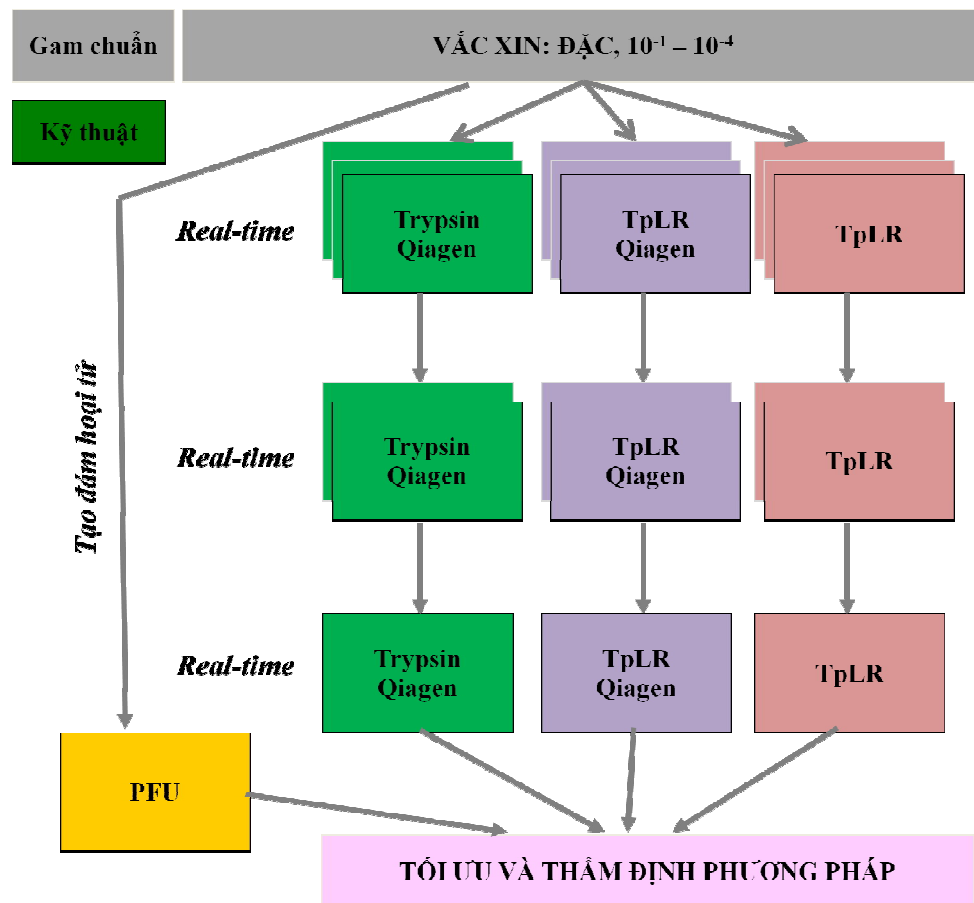
Hình 2.5. Sơ đồ thử nghiệm tạo đám hoại tử.

- Xác định hiệu giá ARN bên trong tế bào bằng real-time RT-PCR TaqMan và tối ưu điều kiện phản ứng: Thử nghiệm thăm dò được tiến hành trên tế bào Vero nuôi cấy ở tám nhựa 24 giếng tương tự như thử nghiệm tạo đám hoại tử (Hình 2.6). Dựa vào kết quả chuẩn độ virus, cấy vắc xin mẫu

chuẩn M-0107 do POPYVAC cung cấp ở các nồng độ đặc và pha loãng bậc 10 từ 10^{-1} đến 10^{-4} sau khi đã trải đông khô theo đúng quy định của nhà sản xuất (5,5ml nước cất/lọ 10 liều), mỗi nồng độ cấy 2 giếng, mỗi tấm nhựa đều có kèm 01 hàng chứng âm là tế bào không gây nhiễm virus. Chính xác sau khi cấy tại các thời điểm 24, 48, và 72 giờ, tách chiết ARN toàn phần trong tế bào bằng 3 phương pháp: i./ sử dụng trypsin tách tế bào như quy trình tách tế bào thông thường để làm bong rời tế bào khỏi bề mặt bám, sau đó rửa sạch tế bào bằng PBS 1/75M và ly tâm (2500 vòng/phút x 15 phút x 4°C) rồi trả lại 300 μl PBS và tách chiết ARN sử dụng bộ sinh phẩm tách chiết ARN (Qiagen), sau cùng, định lượng ARN virus sợi bằng real-time RT-PCR một bước sử dụng các đoạn mồi và đầu dò đặc hiệu sợi là Ms1131-1160F/Ms1213-1190R/Ms1136-1187P (Bảng 2.1); ii./ sử dụng dung dịch ly giải nhanh tế bào (TpLR) 300 μl /giếng và ủ ở 37°C x 4 phút để ly giải toàn bộ tế bào, sau đó ARN được tách chiết bằng bộ sinh phẩm tách chiết ARN (Qiagen) và được định lượng bằng real-time RT-PCR như mục (i.) đã trình bày ở trên. iii./ chỉ ly giải tế bào bằng TpLR 300 μl /giếng và ủ ở 37°C x 4 phút, hỗn dịch này được sử dụng trực tiếp làm khuôn mẫu của phản ứng real-time RT-PCR một bước như mục (i.) đã trình bày ở trên. Sản phẩm ARN của cả 3 phương pháp tách chiết tại các thời điểm 24, 48, và 72 giờ được giữ ở -80°C , không làm đông-tan băng ARN quá 5 chu kỳ và được làm xét nghiệm đồng thời. Thành phần và điều kiện phản ứng giống với phản ứng real-time phát hiện cúm A/H5N1 hoặc A/H1N1pdm09 nhưng khác về cặp mồi và đầu dò đặc hiệu. Kết quả âm tính khi giá trị Ct xuất hiện sau chu kỳ 40, kết quả dương tính được định lượng trực tiếp nhờ gam chuẩn ngoài 10^1 - 10^6 bản sao/5 μl khuôn mẫu:

$$\text{Hiệu giá RNA/0,5ml} = \frac{\text{Số bản sao RNA/5}\mu\text{l} \times 15 \times 5 \times \text{độ pha loãng}}{2}$$

- So sánh sự khác biệt tuyệt đối và tương quan hiệu giá hai phương pháp qua hệ số tương quan từng cặp ở các thời điểm 24, 48, và 72 giờ để xác định điều kiện tối ưu của kỹ thuật về nồng độ pha loãng virus, thời gian và phương pháp tách chiết ARN.
- Sau khi tối ưu độ pha loãng vắc xin khi gây nhiễm và thời gian gặt ARN, thử nghiệm được thích ứng từ tám nhựa 24 giếng sang 96 giếng với lượng hóa chất, sinh phẩm và thể tích virus gây nhiễm (vắc xin mẫu chuẩn M-0107) giảm còn $\frac{1}{4}$.



Hình 2.6. Xây dựng phương pháp xác định công hiệu vắc xin sởi bằng real-time RT-PCR.

- Xác định công hiệu vắc xin sởi thành phẩm: Sau khi đã xác định mối tương quan hiệu giá của hai phương pháp và tối ưu hóa được độ pha loãng virus, thời gian gặt ARN, phương pháp gặt ARN thì tiến hành xác định hiệu giá 10 loạt vắc xin thành phẩm sản xuất tại POLYVAC bằng định lượng ARN virus sởi bên trong tế bào gây nhiễm bằng real-time RT-PCR TaqMan. Đồng thời, vẫn tiến hành xác định hiệu giá PFU để bước đầu thẩm định phương pháp.

2.3.3.4. Phương pháp phân tích

Độ tuyến tính của phương pháp sinh học được tính toán và vẽ hình bằng phần mềm BioAssist của WHO, hệ số tương quan (R) và công thức đường thẳng tuyến tính $y=ax+b$ của real-time được tính toán tự động dựa vào phần mềm của hệ thống thiết bị Applied Biosystems 7500 FAST. Độ chính xác trong phản ứng xác định công hiệu dựa vào giá trị ngưỡng của phản ứng (Ct), kết quả định lượng dựa vào gam chuẩn ngoài 10^1-10^6 bản sao/5 μ l khuôn mẫu và chỉ nhận giá trị nguyên dương. So sánh trung bình từng cặp của biến liên tục sử dụng test t và giữa các cặp dựa vào phân tích INOVA một chiều. Giá trị $p<0,05$ được coi là có ý nghĩa thống kê. Các số liệu thống kê khác được tính toán dựa trên phần mềm Excel hoặc SPSS.

2.3.3.5. Thẩm định phương pháp kiểm định công hiệu vắc xin sởi

Phương pháp kiểm định công hiệu vắc xin sởi đơn, sống giảm độc lực sản xuất tại Việt Nam bằng định lượng ARN bên trong tế bào gây nhiễm sử dụng kỹ thuật real-time RT-PCR một bước được thẩm định theo hướng dẫn của WHO về thẩm định các phương pháp sinh học có tính chất định lượng bao gồm các tiêu chí i./ *Độ đúng*. ii./ *Độ chính xác* (bao gồm độ lặp lại trong cùng một lần làm phản ứng và độ lặp lại trung gian). iii./ *Độ tương quan tuyến tính* và *Hệ số tương quan* của hai phương pháp cũng như của gam

chuẩn ngoài (10^1 - 10^6). iv./ *Giới hạn phát hiện* và *Giới hạn định lượng*. v./ *Tính đặc hiệu* và *Tính lựa chọn*. vi./ *Độ mạnh*. Tiêu chí chấp nhận của phương pháp dựa theo khuyến cáo của Phòng thí nghiệm Kiểm định Quốc gia, Viện Sức khỏe Quốc gia (National Institute of Health - NIH), Bộ Y tế Thái Lan là độ đúng PFU so với khoảng giới hạn công hiệu công bố của nhà sản xuất (4,2-4,7 Log₁₀/liều 0,5ml), độ chính xác phải nằm trong khoảng giới hạn 3 độ lệch chuẩn ($\pm 3SD$), tuân theo Dược điển Châu Âu (không khác biệt quá $\pm 0,3\text{Log}_{10}$) và khuyến cáo của NIH Thái Lan (không khác biệt quá $\pm 0,5\text{Log}_{10}$), hệ số biến thiên (Coefficient of Variation - CV) phải dưới 10% (áp dụng tiêu chí của thử nghiệm enzyme). Hệ số tương quan (R) của phản ứng real-time phải $>0,97$. Giới hạn định lượng phải nằm trong khoảng tuyến tính của gam chuẩn ngoài, độ mạnh phải có CV $<10\%$, kết quả tương quan của hai phương pháp xác định công hiệu bằng PFU và định lượng ARN dựa theo thang phân loại 4 mức độ tương quan (0-0,25 là không tương quan; 0,26-0,5 là tương quan lỏng lẻo; 0,51-0,75 là có tương quan; và 0,76-1,0 là tương quan chặt chẽ). Giá trị trong khoảng [0;1] là tương quan thuận và [-1;0] là tương quan nghịch.

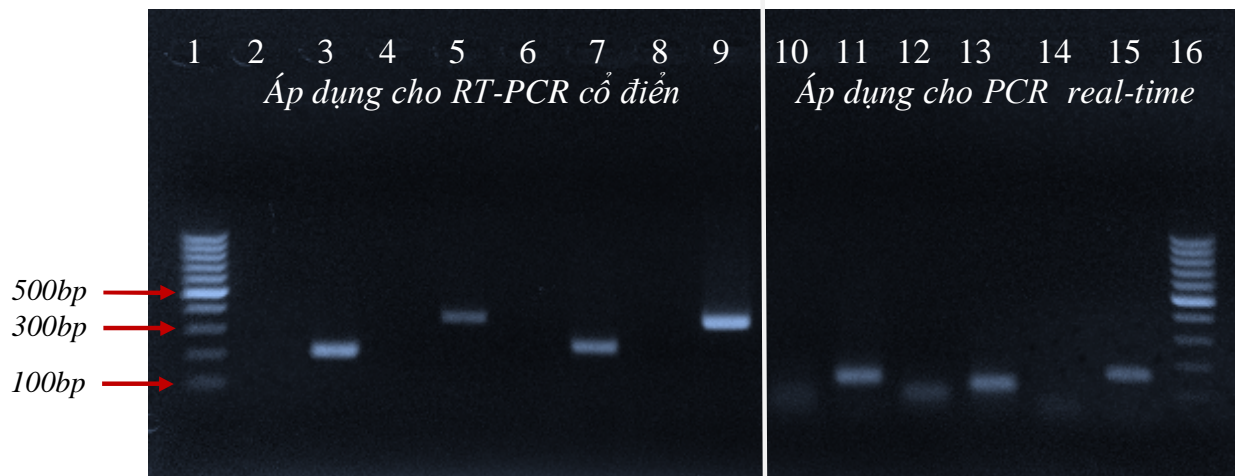
CHƯƠNG 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Sản xuất chứng dương ARN

3.1.1. Tạo khuôn mẫu cho phương pháp phiên mã cổ điển

3.1.1.1. Khuếch đại ARN



Hình 3.1. Khuếch đại các đoạn gen cho phản ứng tạo dòng.

Giếng 1, 16: thang ADN chuẩn 100bp (Promega)

Giếng 2,4,6,8,10,12,14: Chứng âm

Giếng 3: đoạn gen 7 mã hóa protein M virus cúm mùa A (212bp)

Giếng 5: đoạn gen 7 mã hóa protein M virus cúm mùa B (365bp)

Giếng 7: đoạn gen 7 mã hóa protein M virus cúm gia cầm A/H5N1 (245bp)

Giếng 9: đoạn gen 4 mã hóa protein HA virus cúm gia cầm A/H5N1 (361bp)

Giếng 11: đoạn gen 7 mã hóa protein M virus cúm gia cầm A/H5N1 (144bp)

Giếng 13: đoạn gen 4 mã hóa protein HA virus cúm gia cầm A/H5N1 (140bp)

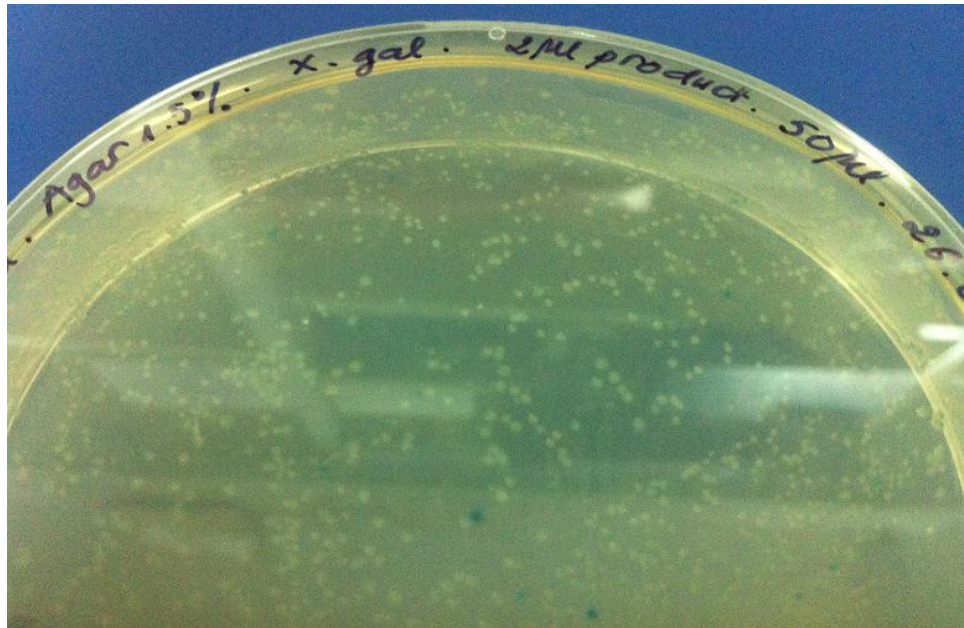
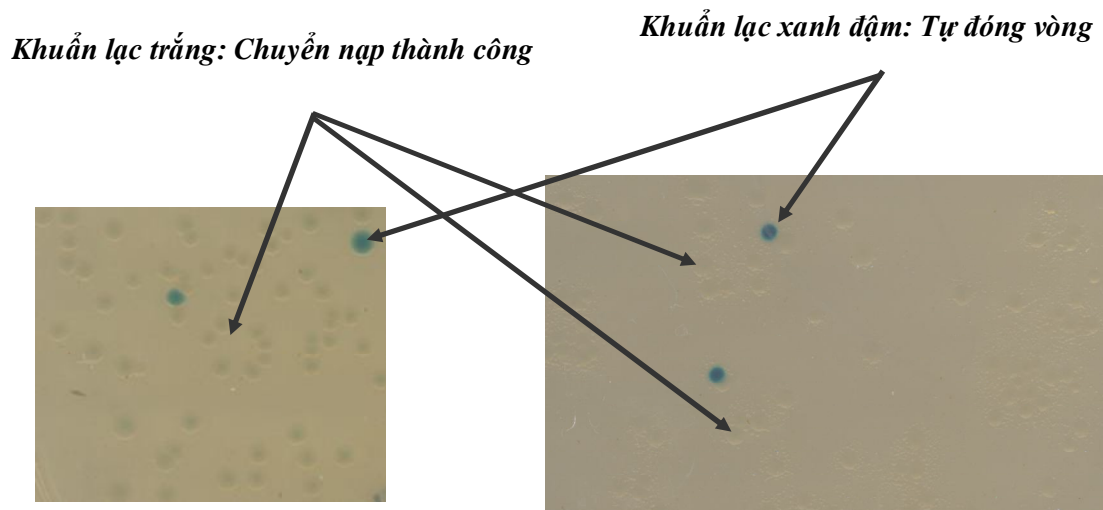
Giếng 15: đoạn gen 6 mã hóa protein NA virus cúm gia cầm A/H5N1 (157bp)

ARN các mẫu dương tính với các tác nhân nghiên cứu là virus cúm mùa A, cúm B, virus cúm gia cầm A/H5N1 được khuếch đại để có sản phẩm ADN làm khuôn mẫu cho tạo dòng. Cụ thể, đoạn gen 7 mã hóa protein M virus cúm mùa A, virus cúm B, các đoạn gen 7, 4, 6 mã hóa tương ứng các protein M, HA, NA của virus cúm gia cầm A/H5N1 (áp dụng cho RT-PCR cổ điển và real-time) đã được khuếch đại (Hình 3.1).

Sản phẩm ADN được chèn vào vec-tơ *pGEM T Easy* nhờ enzyme nối T4 ADN ligase để tạo plasmid tái tổ hợp hoặc được chèn trực tiếp vào vec-tơ *TOPO[®]pCR2.1* mà không cần bước nối sản phẩm vào vec-tơ. Plasmid tái tổ hợp được chuyển nạp vào *E. coli*.

3.1.1.2. Kiểm tra chuyển nạp qua màu sắc khuẩn lạc

Kết quả chuyển nạp trước tiên được đánh giá sơ bộ qua màu sắc khuẩn lạc. Hầu hết trong số hàng trăm khuẩn lạc thu được từ hộp lồng 9 cm sau 24 giờ đều có màu trắng hoặc xanh nhạt, chỉ một vài khuẩn lạc có màu xanh đậm (Hình 3.2). Đôi khi, có những trường hợp chuyển nạp không có khuẩn lạc nào màu xanh đậm. Kết quả thu được của đề tài này là 7 plasmid tái tổ hợp chứa các đoạn gen đích. Cụ thể, plasmid chứa đoạn gen 7 virus cúm mùa A, cúm mùa B, các đoạn gen 7, 4 virus cúm gia cầm A/H5N1 dùng cho phản ứng khuếch đại cổ điển và các đoạn gen 7, 4, 6 virus cúm gia cầm A/H5N1 dùng cho phản ứng real-time. Các chủng vi khuẩn sau đó được nuôi cấy ở môi trường canh thang LB với nồng độ ampicilline 100µg/ml và được giữ ở -80°C tại phòng thí nghiệm trong môi trường LB có glycerol 50% theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

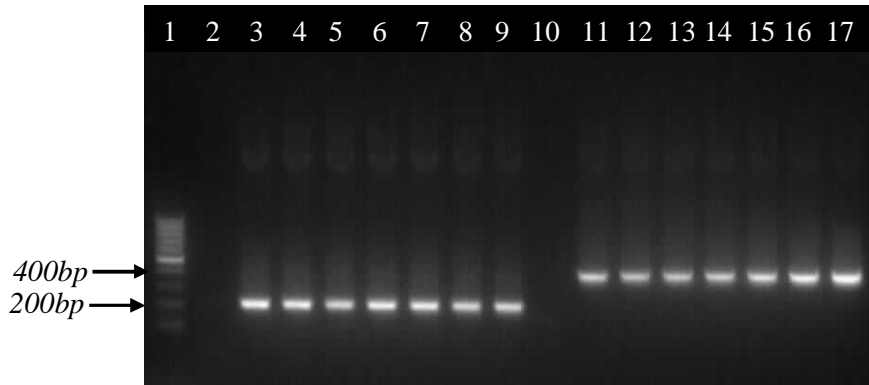


Hình 3.2. Chuyển nạp đoạn gen 7 virus cúm mùa A.
(cơ chất X-gal, vec-tơ pGEM T Easy)

3.1.1.3. Kiểm tra chuyển nạp bằng PCR

Khoảng 10% số khuẩn lạc trắng và xanh nhạt sẽ được gặt để kiểm tra bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu và cặp mồi của vec-tơ (T7/M13R). Hình 3.3 là kết quả khuếch đại plasmid tái tổ hợp chứa đoạn gen 7 mã hóa protein M

virus cúm mùa A sử dụng môi đặc hiệu A1/A2 và môi T7/M13R với sản phẩm tương ứng khoảng 210bp và 410bp.



Hình 3.3. Kiểm tra chuyển nạp đoạn gen 7 virus cúm mùa A bằng PCR.

Giếng 1: Thang ADN 100bp (Promega)

Giếng 2: Chứng âm môi đặc hiệu

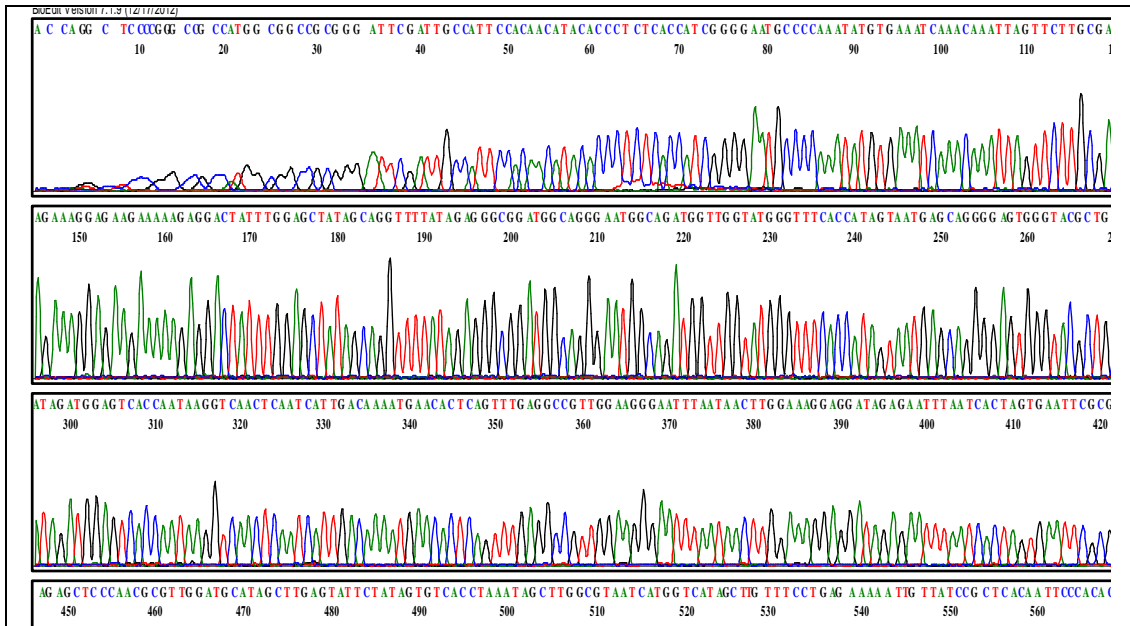
Giếng 3-9: Khuếch đại với môi đặc hiệu (cúm mùa A), sản phẩm 212bp

Giếng 10: Chứng âm môi T7/M13R

Giếng 11-17: Khuếch đại với môi vec-tơ (cúm mùa A), sản phẩm 412bp

3.1.1.4. Kiểm tra chuyển nạp bằng giải trình tự gen

Kết quả chuyển nạp được khẳng định bằng giải trình tự gen với môi đặc hiệu và môi của vec-tơ cho tất cả các sản phẩm. Hình 3.4 là kết quả giải trình tự gen đoạn gen 4 mã hóa protein HA của virus cúm gia cầm A/H5N1 với môi T7 và M13R.



a.

		T7		Vec-to		
H5N1. H5-1 H5-2. M13R.gnu	1	TATACGACTC	ATAGCG	AATTGGGCCCGACGT	CGCATGCTCCGGCCGCATGGC	60
H5N1. H5-1 H5-2. T7.gnu	1	-----	-----	-----	GGCCGCATGGC	12
			H5N1			
H5N1. H5-1 H5-2. M13R.gnu	61	GGCCCGGGAATT	GATTGCCATT	CCACACATACACCCT	CTCACCATCGGGGAATGCC	120
H5N1. H5-1 H5-2. T7.gnu	13	GGCCCGGGAATT	GATTGCCATT	CCACACATACACCCT	CTCACCATCGGGGAATGCC	72
H5N1. H5-1 H5-2. M13R.gnu	121	CAAATATGTGAAAT	CAAA	CAAAATAGTTC	TCTTGGCGACTGGGCTCAGAAATAGTCCTCTAAG	180
H5N1. H5-1 H5-2. T7.gnu	73	CAAATATGTGAAAT	CAAA	CAAAATAGTTC	TCTTGGCGACTGGGCTCAGAAATAGTCCTCTAAG	132
H5N1. H5-1 H5-2. M13R.gnu	181	AGAAAGGAGAGAAAA	GAGGACTATTT	TGGAGCTATAGCAGGTT	TTATAGAGGGCGGATG	240
H5N1. H5-1 H5-2. T7.gnu	133	AGAAAGGAGAGAAAA	GAGGACTATTT	TGGAGCTATAGCAGGTT	TTATAGAGGGCGGATG	192
H5N1. H5-1 H5-2. M13R.gnu	241	GCAGGGAAATGGCAGAT	GTTGGTATGGGTTT	CACCATAGTAAT	GAGCAGGGGAGTGGGTA	300
H5N1. H5-1 H5-2. T7.gnu	193	GCAGGGAAATGGCAGAT	GTTGGTATGGGTTT	CACCATAGTAAT	GAGCAGGGGAGTGGGTA	252
H5N1. H5-1 H5-2. M13R.gnu	301	CGCTGCAGACAAGAAT	CCACTCAAAAGGC	AATAGATGGAGT	CACCAATAAGGTCAACTC	360
H5N1. H5-1 H5-2. T7.gnu	253	CGCTGCAGACAAGAAT	CCACTCAAAAGGC	AATAGATGGAGT	CACCAATAAGGTCAACTC	312
H5N1. H5-1 H5-2. M13R.gnu	361	AATCATTGACAAAAT	GAACACTCAGTTT	GAGGCCGTTGGAAGGG	AATTTAATAACTTGGAA	420
H5N1. H5-1 H5-2. T7.gnu	313	AATCATTGACAAAAT	GAACACTCAGTTT	GAGGCCGTTGGAAGGG	AATTTAATAACTTGGAA	372
H5N1. H5-1 H5-2. M13R.gnu	421	AAGGAGGATAGAGAA	TTAATCACTAGTGA	ATTGCGCGCCGCT	GCAGGTGCACCATATG	480
H5N1. H5-1 H5-2. T7.gnu	373	AAGGAGGATAGAGAA	TTAATCACTAGTGA	ATTGCGCGCCGCT	GCAGGTGCACCATATG	432
H5N1. H5-1 H5-2. M13R.gnu	481	GGAGAGCT	-----	-----	-----	488
H5N1. H5-1 H5-2. T7.gnu	433	GGAGAGCT	CCCAACGCGTTG	GATGCATAGCTT	GAGTATCTATAGTGCACCTAAAT	489

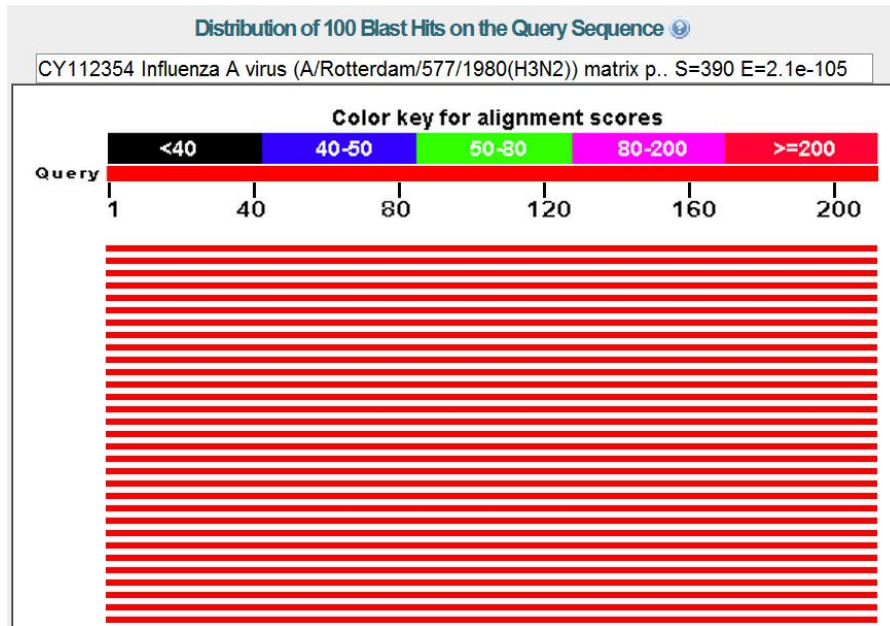
b.

Hình 3.4. Kiểm tra chuyển nạp bằng giải trình tự gen.

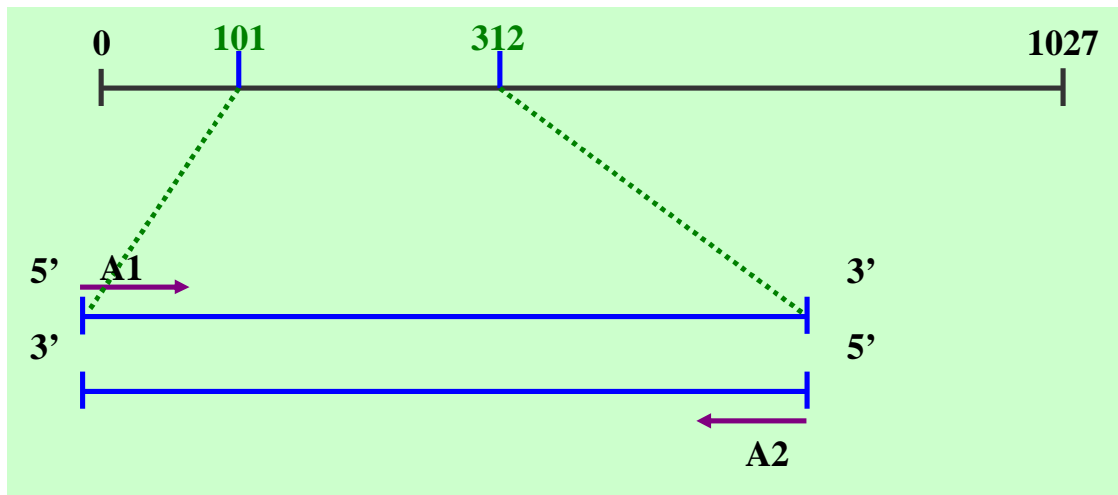
(Đoạn gen 4 mã hóa protein HA của virus cúm gia cầm A/H5N1

a. Dạng tập tin giải trình tự (megafiler). b. Dạng trình tự ghép 2 chiều).

3.1.1.5. So sánh trình tự ở Ngân hàng gen thế giới (GenBank)



Hình 3.5. Hình ảnh Blast với ngân hàng gen của virus cúm mùa A.
 Mỗi vạch đỏ là một trình tự, mức độ tương đồng giảm dần từ trên xuống.



Hình 3.6. Sơ đồ vị trí khuếch đại virus cúm mùa A (H3N2 và H1N1).
 Dựa theo sơ đồ của J.C. Donofrio và cộng sự, Italia [150].

Sau khi có kết quả giải trình tự gen, các trình tự này được so sánh với các trình tự chuẩn của NCBI (*Blast*) qua trang mạng <http://www.ncbi.com> để có được chủng gần nhất của loài virus đó. Hình 3.5 và Hình 3.6 là kết quả so sánh trình tự gen virus cúm A/H3N2 tại trang thông tin này, chủng gần nhất có số đăng nhập CY112354 và vị trí khuếch đại là 101-312.

Kết quả *Blast* của tất cả các đoạn gen của sởi và cúm trong nghiên cứu này được trình bày chi tiết ở Bảng 3.1.

Bảng 3.1. Chiều dài các đoạn gen đích và ngưỡng phát hiện thấp.

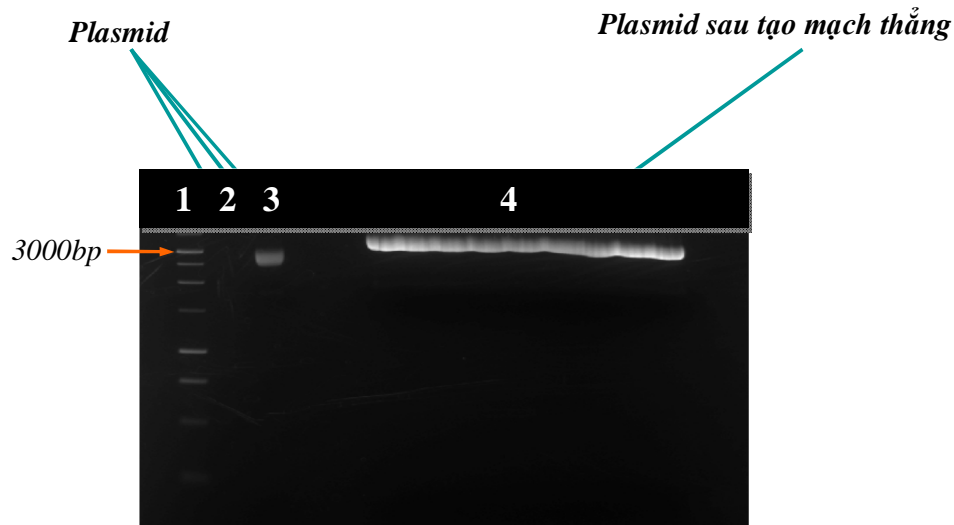
Virus	Chiều dài (bp) và gen đích	Vị trí khuếch đại
Virus cúm mùa A (M)	212/Seg7 (M)	101-312
Virus cúm mùa B (M)	365/Seg7 (M)	100-464
A/H5N1 (M) cổ điển	245/Seg7 (M)	31-276
A/H5N1 (HA) cổ điển	361/Seg4 (HA)	943-1303
A/H5N1 (M) real-time	144/Seg7 (M)	39-183
A/H5N1(HA) real-time	140/Seg4 (HA)	205-326
A/H5N1 (NA) real-time	157/Seg6 (NA)	474-631
A/H1N1pdm09(M) real-time, cổ điển	154/Seg7 (M)	7-161
Virus sởi (N) real-time	74 (N)	1131-1213

Ghi chú: Seg: đoạn gen ARN

3.1.1.6. Tạo plasmid mạch thẳng

Sau khi nuôi cấy qua đêm ở môi trường canh thang LB với nồng độ kháng sinh ampicillin 100µg/ml, tiến hành tách chiết plasmid tái tổ hợp và tạo

mạch thẳng bằng cắt enzyme giới hạn đặc hiệu (SalI cho *pGEM T Easy* và HindIII cho *TOPO[®]pCR2.1*) theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất. Hình 3.7 là kết quả tạo mạch thẳng từ plasmid tái tổ hợp virus cúm A/H3N2 có kích thước khoảng 3200bp.



Hình 3.7. Tạo plasmid mạch thẳng chứa đoạn gen 7 virus cúm mùa A.
(Vec-tơ *pGEM T Easy*, enzyme *SalI*, và thạch 0,8%)

Giếng 1: Thang ADN chuẩn 1Kb (*Promega*)

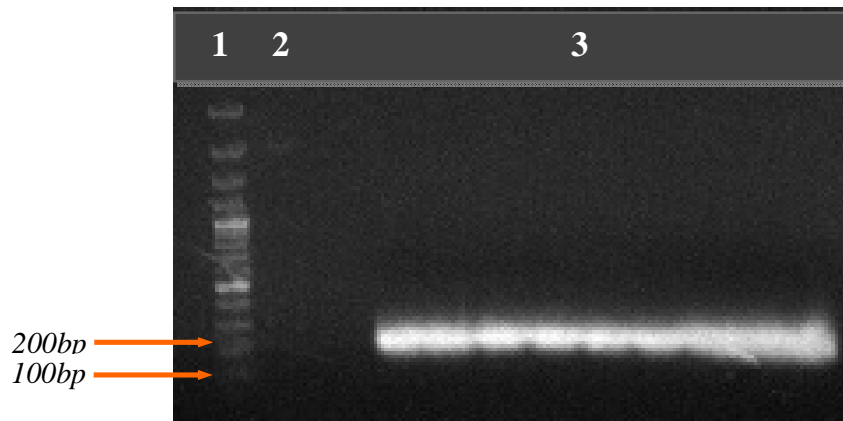
Giếng 2: Trống

Giếng 3: Plasmid dạng vòng

Giếng 4: Plasmid mạch thẳng sau cắt enzyme giới hạn

3.1.2. Tạo khuôn mẫu cho phương pháp phiên mã trực tiếp

Khác với phiên mã cổ điển, phương pháp phiên mã trực tiếp không qua bước tạo dòng để tạo plasmid tái tổ hợp mà chỉ khuếch đại ARN nguồn với cặp mồi cải biên. Hình 3.8 là kết quả khuếch đại với mồi cải biên virus cúm A/H1N1pdm09 và kích thước sản phẩm khoảng 200bp.



Hình 3.8. Khuếch đại với mỗi cái biên đoạn gen 7 virus cúm A/H1N1pdm09.

Giếng 1: Thang ADN chuẩn 100bb (Promega)

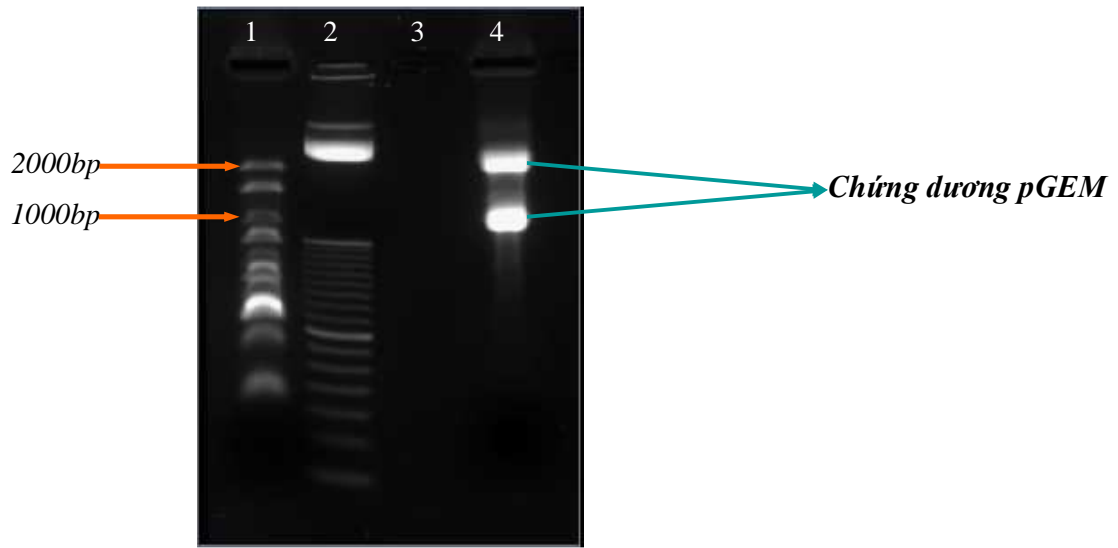
Giếng 2: Trống

Giếng 3: DNA H1N1 cúm A/H1N1 (2009) khuếch đại bằng cặp mồi đặc hiệu cài trình tự T7 và Poly T

3.1.3. Phiên mã

3.1.3.1. Kiểm tra chất lượng phản ứng phiên mã

Mỗi phản ứng phiên mã đều phải có chứng kèm theo (pGEM) do nhà sản xuất cung cấp. Hình 3.9 là kết quả điện di chứng của phản ứng phiên mã với 2 dải ARN khoảng 1,1Kbp và 2,3Kbp.



Hình 3.9. Chứng dương phiên mã (2 dải ARN 1,1Kbp và 2,3Kbp).

Giếng 1: Thang ARN chuẩn 0,1-2,0Kbp (Invitrogen)

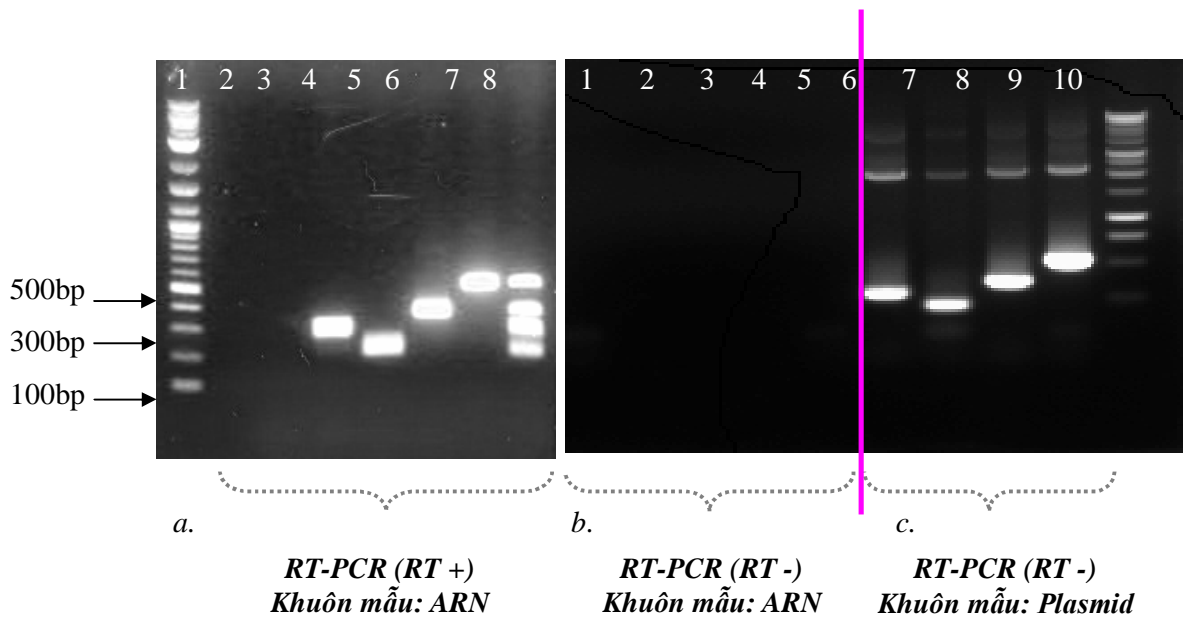
Giếng 2: Thang ADN chuẩn 1Kbp (Promega)

Giếng 3: Trống

Giếng 4: Chứng dương phiên mã

3.1.3.2. Kiểm tra độ tinh khiết của ARN

Hình 3.10 là kết quả kiểm tra độ tinh khiết của ARN sau phá hủy ADN khuôn mẫu của virus cúm mùa A, hRSV, cúm B, hMPV. Hình 3.10.a là kết quả khuếch đại ARN mới được tổng hợp và có bước phiên mã ngược (RT+) sử dụng các cặp mồi đặc hiệu, Hình 3.10.b là kết quả khuếch đại ARN mới được tổng hợp nhưng không có bước RT (RT-), Hình 3.10.c là kết quả khuếch đại không có bước RT nhưng sử dụng khuôn mẫu là plasmid.



Hình 3.10. Kiểm tra độ tinh sạch ARN (a-c). RT-PCR đa môi

a. Chứng dương sau phiên mã: PCR, RT+

Giếng 1: Thang ADN 100bp (Promega)

Giếng 2: Chứng âm

Giếng 3: Trống

Giếng 4,5,6,7: Tương ứng cúm mùa A, hRSV, cúm B, hMPV

Giếng 8: Hỗn hợp ARN của cúm mùa A, hRSV, cúm B, hMPV

b. Chứng dương sau phiên mã: PCR, RT-

Giếng 1: Chứng âm

Giếng 2,3,4,5: Tương ứng cúm mùa A, hRSV, cúm B, hMPV

c. Plasmid: PCR, RT-

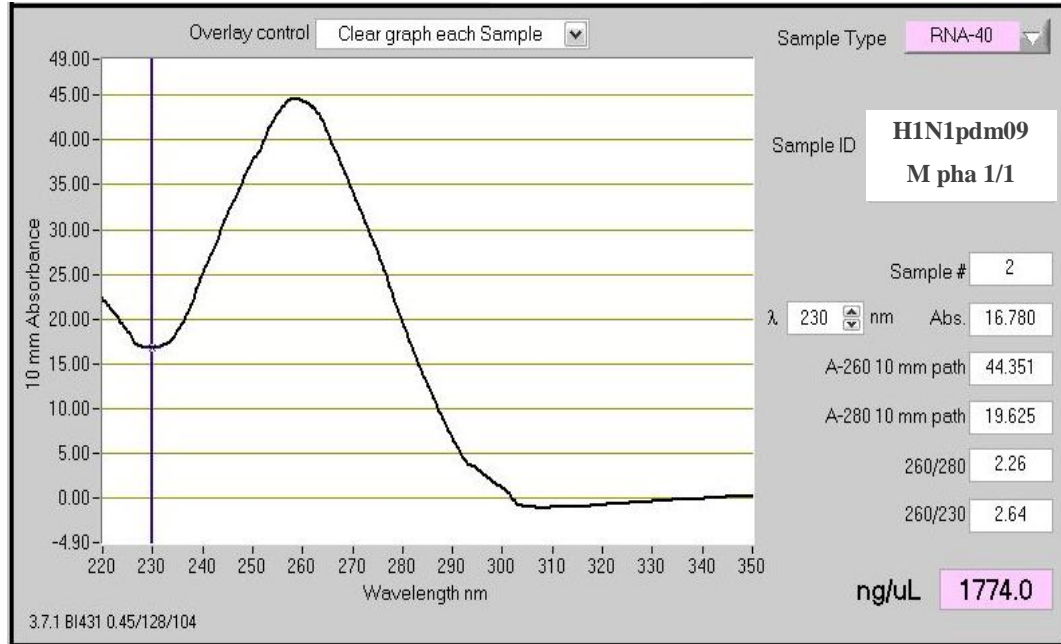
Giếng 6,7,8,9: Tương ứng cúm mùa A, hRSV, cúm B, hMPV

Giếng 10: Thang ADN 1Kb (Promega).

3.1.3.3. Đo mật độ quang học của hỗn dịch ARN

Sau khi có được sản phẩm ARN tinh khiết, tiến hành đo OD các mẫu để tính nồng độ ARN trong một đơn vị thể tích (1 μ l). Hình 3.11 cho thấy nồng độ ARN đoạn gen 7 mã hóa protein M virus cúm A/H1N1pdm09 là

1774ng/μl. Bảng 3.2 trình bày nồng độ ARN thu được sau phiên mã của 9 gam ARN chuẩn của đề tài nghiên cứu này.



Hình 3.11. Đo nồng độ ARN virus cúm A/H1N1pdm09.

3.1.3.4. Tính sản lượng và nồng độ ARN

Sau khi đo nồng độ ARN, tính sản lượng cho từng mẫu chứng dựa vào kích thước của sản phẩm đích, bản chất cấu trúc ARN đích và hệ số chuyển đổi Avogadro ($6,022 \times 10^{-23}$).

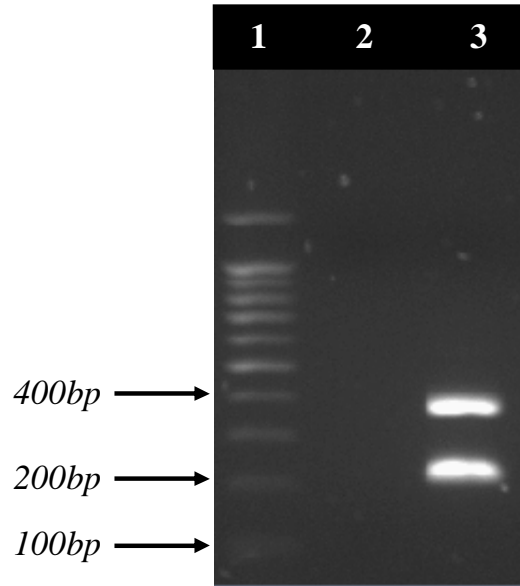
Bảng 3.2. Sản lượng phiên mã.

Virus	Chiều dài (bp)	Nồng độ (ng/ μ l)	Sản lượng (bản sao)	Độ nhạy (bản sao)
Virus cúm mùa A (M) cổ điển	212	50,16	$5,8 \times 10^{12}$	10^{4*}
Virus cúm B (M)) cổ điển	364	54,00	$4,15 \times 10^{12}$	10^{5*}
H5N1 (M) cổ điển	245	36,12	$1,59 \times 10^{11}$	10^1
H5N1 (HA) cổ điển	361	22,57	$1,1 \times 10^{14}$	10^1
H5N1 (M) real-time	144	33,07	$4,0 \times 10^{14}$	10^1
H5N1 (HA) real-time	140	24,61	$1,1 \times 10^{14}$	10^1
H5N1 (NA) real-time	157	21,58	$2,4 \times 10^{14}$	10^1
H1N1pdm09 (M) real-time	154	3548,00	$3,08 \times 10^{16}$	10^1
Virus sởi (N) real-time	74	978,16	$1,2 \times 10^{19}$	10^1

Ghi chú:

*: Áp dụng cho phản ứng RT-PCR đa môi.

Tùy thuộc vào số bản sao ARN trong một đơn vị thể tích nhất định và tùy thuộc vào từng thể tích khuôn mẫu được sử dụng cho mỗi phản ứng RT-PCR mà pha loãng dung dịch để có số bản sao được sử dụng làm khuôn mẫu cho mỗi phản ứng là 10^1 - 10^6 /đơn vị thể tích. Bảng 3.2 là sản lượng phiên mã của 9 gam ARN chuẩn và độ nhạy phát hiện. Độ nhạy được xác định qua ít nhất 5 lần làm thử nghiệm theo đúng quy trình và đều cho kết quả như nhau. Ngoài ra, độ nhạy còn có thể được kiểm tra bằng real-time RT-PCR (Hình 3.13).

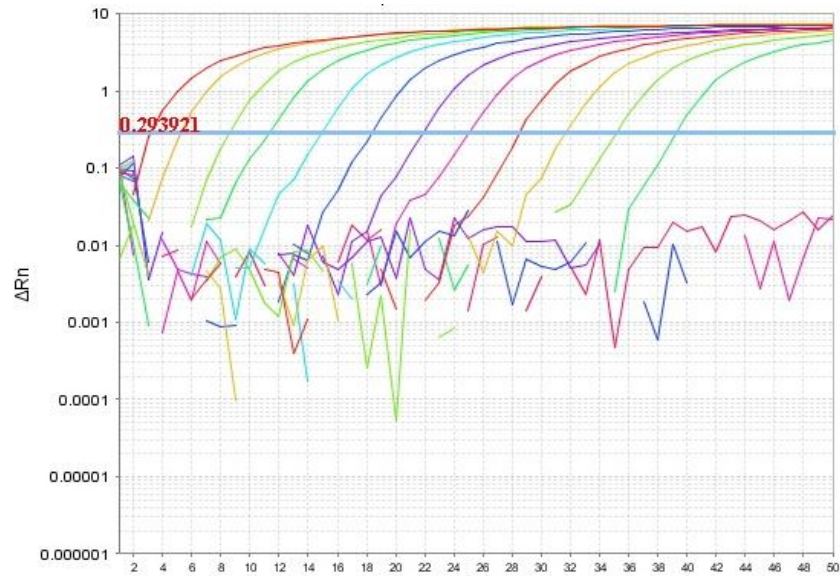


Hình 3.12. Hỗn dịch chứng dương virus cúm mùa A (10^4) và cúm B (10^5).

Giếng 1: Thang ADN chuẩn 100bp (Promega)

Giếng 2: Chứng âm tính

Giếng 3: Chứng dương tính cúm mùa A và cúm B



Hình 3.13. Chuẩn độ chứng dương ARN gen N virus sởi 10^1 - 10^{12} bản sao/ $5\mu\text{l}$.

Ghi chú: Trục tung: ΔRn ; Trục hoành: chu kỳ khuếch đại.

Sau sản xuất, gam chuẩn được tinh sạch và giữ ở -80°C ở các ống ly tâm 50ml (gốc) và 1,8ml, có nắp xoáy và không có nuclease. Chúng dương hoạt động được pha loãng hàng loạt ở các ống Eppendorf và giữ ở -30°C , được đánh giá tính ổn định trong suốt thời gian nghiên cứu tại phòng thí nghiệm (03/2011 - 04/2014 với 41 lần xét nghiệm phức hợp ARN 10^4 bản sao cho mỗi virus cúm mùa A, hRSV, hMPV và 10^5 bản sao cho virus cúm B; 18 lần xét nghiệm cho mỗi gam chuẩn của thử nghiệm real-time phát hiện cúm) và tại khoa virus, Viện Pasteur Nha Trang (năm 2012 với 18 lần xét nghiệm phức hợp ARN 10^4 bản sao cho mỗi virus cúm mùa A, hRSV, hMPV và 10^5 bản sao cho virus cúm B) (số liệu cụ thể không được chỉ ra trong đề tài nghiên cứu này). Chúng dương sau đó được sử dụng làm i./ **mẫu nội kiểm** ở dạng phức hợp ARN của 4 tác nhân là virus cúm mùa A, virus cúm B, hRSV và hMPV cho mục tiêu 2; ii./ **gam chuẩn ngoài** sợi 10^1 - 10^6 bản sao/ $5\mu\text{l}$ thể tích khuôn mẫu để định lượng cho mục tiêu 3 của đề tài.

3.2. Xác định tỷ lệ nhiễm cúm bằng RT-PCR

3.2.1. Đặc điểm đối tượng nghiên cứu

Trong nghiên cứu này, 336; 452; và 485 mẫu bệnh phẩm là tăm bông ngoáy mũi và họng của bệnh nhân SARI đã được thu thập liên tục theo đúng định nghĩa ca bệnh từ 1/2009 đến hết 6/2011 (tổng số 1273 mẫu). Tỷ lệ nam/nữ = 1,3; tuổi dao động từ 2 tháng đến 84 tuổi, trung vị là 2 tuổi và trẻ <5 tuổi chiếm 63,3%.

3.2.2. Đặc điểm trường hợp tử vong do cúm

Trong tổng số 1273 bệnh nhân SARI, có một trường hợp nam, 70 tuổi tử vong năm 2011 (chiếm 0,08% các trường hợp dương tính) và chẩn đoán lâm sàng là nhiễm cúm nhưng không xác định là cúm A/H1N1pdm09 hay cúm gia cầm A/H5N1. Bệnh phẩm của trường hợp này đã được xét nghiệm

đồng thời để phát hiện gen M và HA virus cúm A/H1N1pdm09 và cúm gia cầm A/H5N1. Kết quả dương tính với cúm A/H1N1pdm09. Ca bệnh tử vong không đồng nhiễm với 18 tác nhân virus khác và kết quả khuếch đại gen nội chuẩn (*house keeping gene*) dương tính.

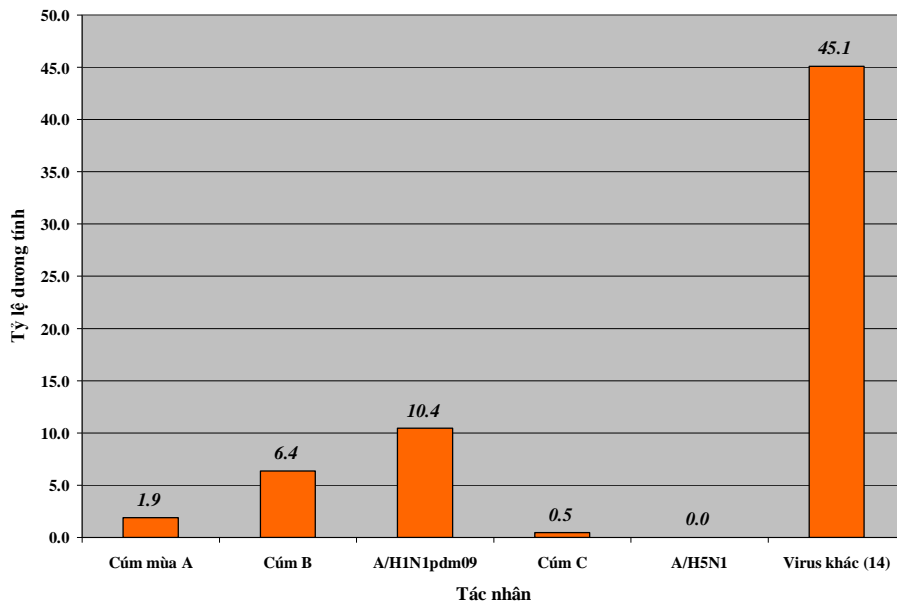
3.2.3. Ứng dụng chứng dương trong xác định tỷ lệ nhiễm cúm

Các chứng dương, trong đó có chứng dương của nghiên cứu này được sử dụng làm mẫu nội kiểm cho các thử nghiệm RT-PCR đa môi phát hiện ARN của 18 tác nhân virus gây bệnh đường hô hấp của dự án SISEA qua 5 phản ứng: phản ứng 1 phát hiện virus cúm mùa A (A/H3N2 và A/H1N1), hRSV, cúm B, và hMPV; phản ứng 2 phát hiện 4 parainfluenza (hPIV 1-4); phản ứng 3 phát hiện các virus rhino (HRV), cúm C và SARS; phản ứng 4 phát hiện các virus corona (hCoV) gồm các chủng OC43, 229E, HKU1, và NL63; và phản ứng 5 phát hiện virus adeno (hAdV) và virus boca (hBoV). Ngoài ra các phản ứng RT-PCR đơn môi phát hiện virus cúm A/H1N1pdm09). Trong số 1273 mẫu bệnh phẩm, có 818 mẫu dương tính với bất cứ loại virus nào trong số này và chiếm 64,3%. Nghiên cứu này chỉ đề cập đến số liệu của cúm (nhưng không bao gồm chi tiết số liệu cúm C).

Tỷ lệ nhiễm cúm chung và nhiễm cúm từng năm được trình bày ở Bảng 3.3. Tỷ lệ dương tính trung bình của virus cúm mùa A (A/H3N2, A/H1N1), cúm B, và cúm A/H1N1pdm09 tương ứng là 1,9%; 6,4%; và 10,4% trong suốt 2,5 năm nghiên cứu. Nghiên cứu này có tỷ lệ dương tính với cúm C là 0,5%, không phát hiện được trường hợp nào dương tính với cúm gia cầm A/H5N1 (Hình 3.14).

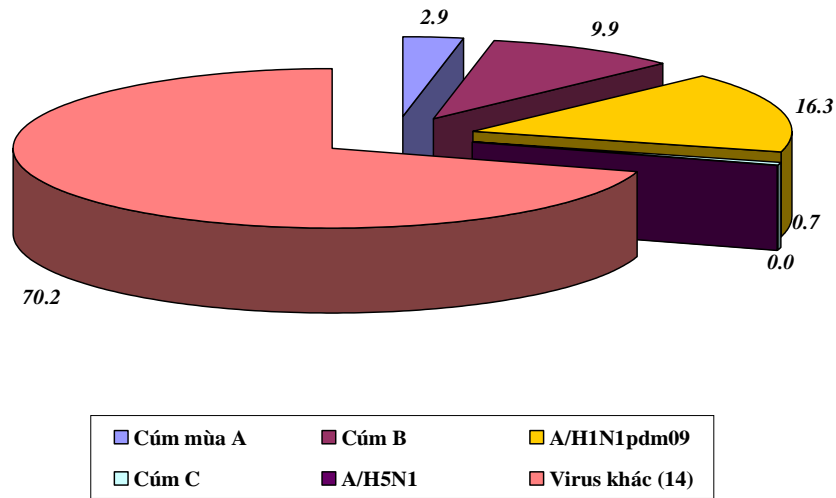
Bảng 3.3. Tỷ lệ nhiễm cúm ở bệnh nhân SARI tại Hải Dương, 2009-2011

Tác nhân	2009	2010	2011	2009-2011
Cúm mùa A	14 (4,2%)	2 (0,4%)	8 (1,6%)	24 (1,9%)
Cúm B	23 (6,8%)	30 (6,6%)	28 (5,8%)	81 (6,4%)
A/H1N1pdm09	81 (24,1%)	1 (0,2%)	51 (10,5%)	133 (10,4%)
Virus khác	6 mẫu (0,5%) là virus cúm C			580 (45,6%)
Âm tính				455 (35,7%)
Tổng số	336	452	485	1273 (100%)



Hình 3.14. Tỷ lệ dương tính với virus cúm ở bệnh nhân SARI tại Hải Dương.

Trong số 818 mẫu dương tính với virus nói chung, có 244 mẫu dương tính với virus cúm (cúm mùa A, cúm B, cúm C, cúm A/H1N1pdm09), chiếm 29,8% (Hình 3.15).



Hình 3.15. Tỷ lệ nhiễm cúm trong tổng số các ca SARI dương tính với virus.

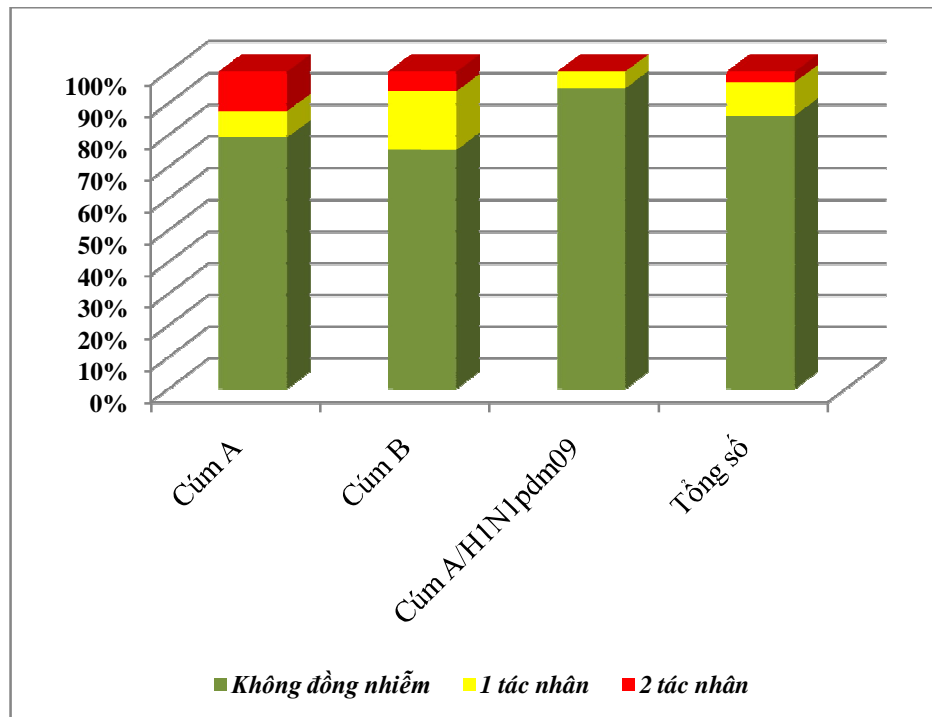
3.2.4. Tỷ lệ đồng nhiễm cúm và các virus khác

Bảng 3.4. Tỷ lệ đồng nhiễm của cúm.

1 tác nhân		2 tác nhân	
Số lượng	%	Số lượng	%
2	8,3	3	12,5
16	18,5	5	6,2
7	5,3	0	0
25	10,5	8	3,4

Trong tổng số 238 mẫu dương tính với cúm (không tính 6 mẫu dương tính với virus cúm C), có 33 ca cúm đồng nhiễm, trong đó 25 ca đồng nhiễm với 1 tác nhân virus khác (10,5%), cụ thể đồng nhiễm cúm A là 8,3%, cúm B

là 19,8%, cúm A/H1N1pdm09 là 5,3%. Đồng nhiễm 2 tác nhân virus trong nghiên cứu này có 8 ca (3,4%), trong đó cúm mùa A chiếm 12,5%, cúm B là 6,2% và không có trường hợp cúm A/H1N1pdm09 nào đồng nhiễm 2 tác nhân virus. Tỷ lệ đồng nhiễm virus được trình bày ở Bảng 3.4. và Hình 3.16.



Hình 3.16. Đồng nhiễm cúm với các virus khác.

Ba mươi ba (33) mẫu virus cúm đồng nhiễm với 13 trong số 18 virus gây bệnh đường hô hấp được nghiên cứu trong khuôn khổ dự án SISEA. Loại virus và số lượng mẫu đồng nhiễm được trình bày ở Bảng 3.5.

Bảng 3.5. Các loại virus và số lượng đồng nhiễm với virus cúm (N= 33).

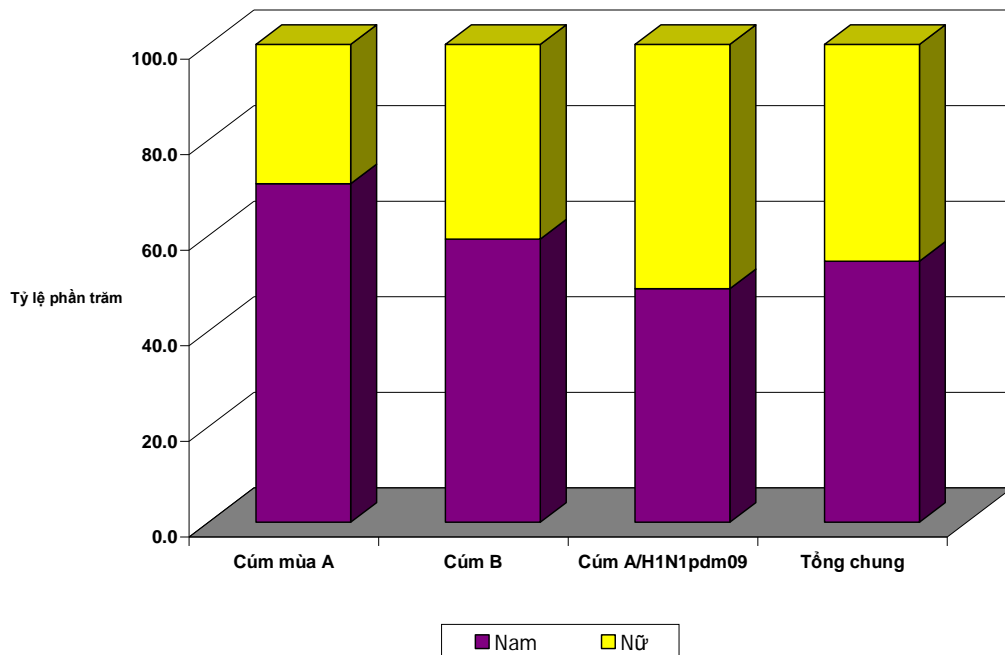
Đồng nhiễm	Cúm mùa A	Cúm B	A/H1N1pdm09
Cúm mùa A		3	
Cúm B	3		
A/H1N1pdm09		1	
Cúm C			1
hRSV		1	
hMPV		4	2
hPIV-3	2	1	
hPIV-4		1	
HRV	2	11	3
hCoV OC43			1
hCoV 229E		1	
hAdV	1	1	
hBoV	1	2	

3.2.5. Phân bố nhiễm cúm theo giới tính, nhóm tuổi và thời gian

Tỷ lệ nhiễm cúm theo giới tính là 54,6% với nam và 45,4% với nữ, hay nam/nữ = 1,2 lần. Phân tích cụ thể theo từng loại cúm, tỷ lệ nam/nữ nhiễm cúm mùa A, cúm B, và cúm A/H1N1pdm09 lần lượt là 2,4; 1,5; và 1,1%. Bảng 3.6 và Hình 3.17 mô tả tỷ lệ nhiễm cúm theo giới tính.

Bảng 3.6. Phân bố cúm theo giới tính ở bệnh nhân SARI.

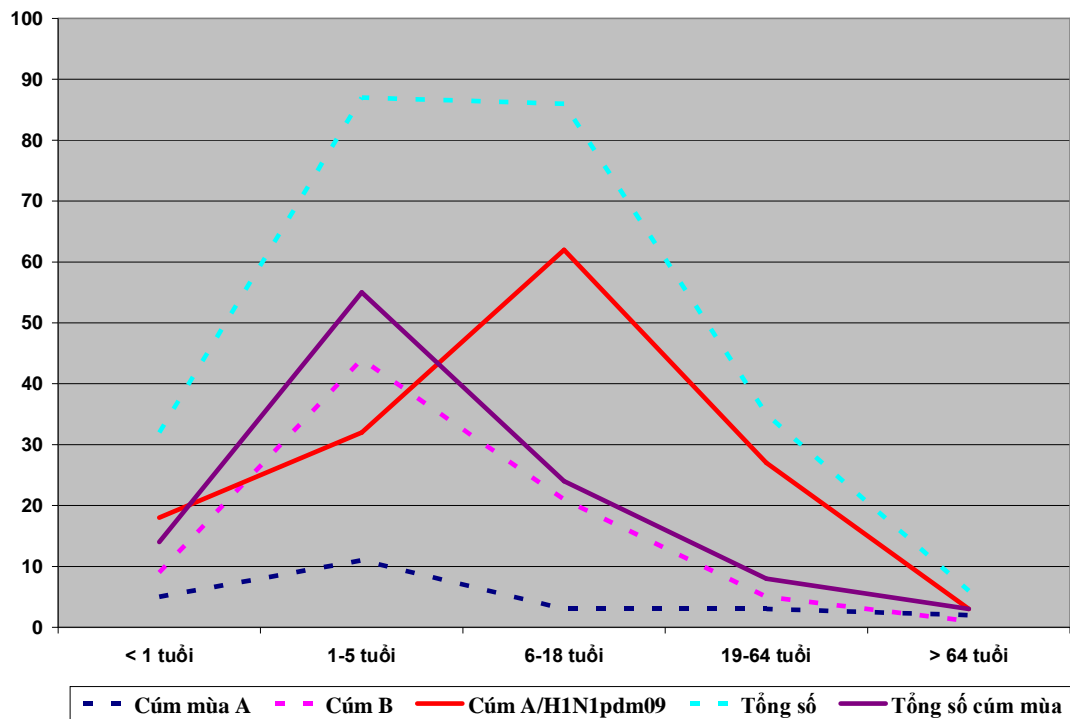
Loại virus	Nam		Nữ		Tổng số	
	Số mẫu	%	Số mẫu	%	Số mẫu	%
Cúm mùa A	17	70,8	7	29,2	24	100,0
Cúm B	48	59,3	33	40,7	81	100,0
Cúm A/H1N1pdm09	65	48,9	68	51,1	133	100,0
Tổng	130	54,6	108	45,4	238	100,0



Hình 3.17. Phân bố cúm theo giới tính ở bệnh nhân SARI.

Bảng 3.7. Phân bố cúm theo nhóm tuổi ở bệnh nhân SARI (N=1273).

Nhóm tuổi	< 1 tuổi	1-5 tuổi	6-18 tuổi	19-64 tuổi	> 64 tuổi	Không có thông tin	Tổng số
Cúm mùa A ⁽¹⁾	5	11	3	3	2	0	24
Cúm B ⁽²⁾	9	44	21	5	1	1	81
Tổng cúm ⁽¹⁺²⁾	14	55	24	8	3	1	105
A/H1N1pdm09 ⁽³⁾	18	32	62	27	3	1	143
Tổng ⁽¹⁺²⁺³⁾	32	87	86	35	6	2	248



Hình 3.18. Phân bố cúm theo nhóm tuổi ở bệnh nhân SARI tại Hải Dương.

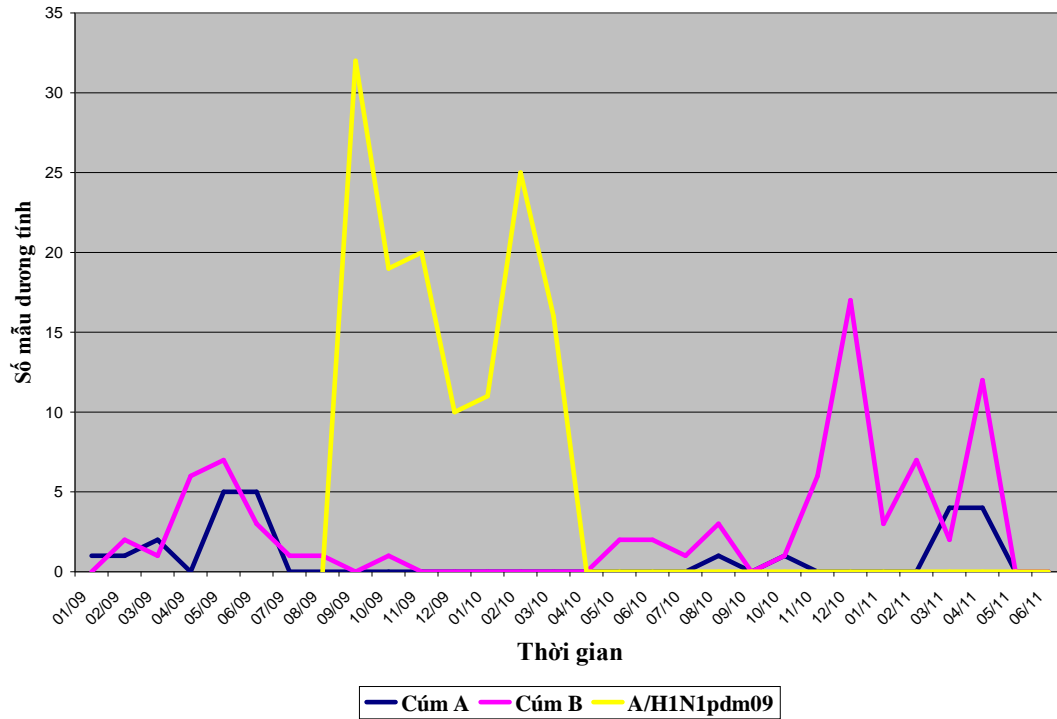
Bảng 3.7 và Hình 3.18 cho thấy bệnh nhân nhiễm cúm mùa A và cúm B chủ yếu rơi vào nhóm 1-5 tuổi với 55 trong tổng số 105 trường hợp của tất cả các nhóm tuổi (52,4%), tiếp đó đến nhóm 6-18 tuổi với 24 trường hợp

(22,8%) trong khi con số này ở nhóm dưới 1 tuổi chỉ là 14 trường hợp (13,3%) nhưng lại chiếm tới 43,8% trong tổng số 32 trường hợp nhiễm cúm các loại của nhóm tuổi này. Số bệnh nhân nhiễm cúm A và B của nhóm 19-64 tuổi và >64 tuổi ở nghiên cứu này tương ứng là 8 và 3 trường hợp hay 7,6% và 2,9%.

Tỷ lệ nhiễm cúm A/H1N1pdm09 cao nhất (72,1%) ở nhóm 6-18 tuổi với 62 trường hợp trong tổng số 86 trường hợp dương tính với các loại cúm của nhóm tuổi này và 43,4% trong tổng số 143 trường hợp nhiễm cúm A/H1N1pdm09. Đứng sau nhóm 6-18 tuổi là nhóm 1-5 tuổi với 32 trường hợp (22,4%).

Trong nghiên cứu này, nhóm người có tuổi (>64 tuổi) có tỷ lệ nhiễm cúm nói chung thấp với 6 trường hợp nhiễm cúm các loại trong tổng số 248 trường hợp dương tính (2,4%). Riêng với cúm A/H1N1pdm09, con số 3 trong tổng số 143 trường hợp dương tính chỉ chiếm 2,1%.

Tổng số 238 mẫu dương tính với cúm mùa A, cúm B và cúm A/H1N1pdm09 được phân tích theo thời gian (tháng). Kết quả phân bố của cúm được trình bày ở Hình 3.19. Trước khi đại dịch cúm xảy ra vào tháng 09/2009 tại Hải Dương, cả virus cúm mùa A và virus cúm B cùng lưu hành. Virus cúm A/H1N1pdm09 được phát hiện từ tháng 09/2009 và ngay lập tức đạt đỉnh và kéo dài đến đầu năm 2010, sau đó không phát hiện trường hợp nào nữa cho đến tận 2011. Thời kỳ đầu của đỉnh dịch, từ tháng 09/2009 đến 10/2010, vẫn còn một số trường hợp cúm B lưu hành. Trong thời gian lưu hành cúm A/H1N1pdm09, đề tài nghiên cứu không phát hiện được trường hợp cúm mùa A nào. Sau dịch cúm A/H1N1pdm09, cúm B chiếm ưu thế nhưng vẫn có những trường hợp cúm mùa A lưu hành đồng thời với cúm B. Nghiên cứu này không xác định phân típ cúm mùa A.



Hình 3.19. Phân bố cúm theo thời gian.

Bảng 3.8 là tỷ lệ nhiễm cúm theo quý trong năm. Chi quý III có số mắc thấp nhất, chiếm 6,7%, còn lại các quý I, II, IV có tỷ lệ nhiễm tương ứng là 21,9%; 45,7%; và 25,7%.

Bảng 3.8 Phân bố của cúm mùa A và cúm B theo thời gian trong năm.

Tác nhân	Quý I	Quý II	Quý III	Quý IV	Tổng số
Cúm mùa A	8	14	1	1	24
Cúm B	15	34	6	26	81
Tổng số (%)	23 (21,9)	48 (45,7)	7 (6,7)	27 (25,7)	105

3.3. Kiểm định công hiệu vắc xin sởi

3.3.1. Công hiệu vắc xin mẫu chuẩn bằng tạo đám hoại tử

Xác định công hiệu được tiến hành 6 lần độc lập với vắc xin mẫu chuẩn M-0107. Kết quả ở Bảng 3.9 cho thấy số đám hoại tử trung bình của mỗi giếng cấy 200 μ l hỗn dịch vắc xin pha loãng 10^{-2} , luôn nằm trong khoảng 40-46, công hiệu mỗi liều vắc xin (0,5ml) của cả 6 lần thử nghiệm dao động trong khoảng $[1,00 \times 10^4 - 1,15 \times 10^4]$ PFU hay luôn đạt giá trị 4,00-4,06Log10.

Bảng 3.9. Hiệu giá PFU/0,5ml của vắc xin mẫu chuẩn M-0107.

Số thứ tự	Số đám hoại tử	PFU (số mũ)	PFU (Log10)
1	42	$1,05 \times 10^4$	4,02Log10
2	41	$1,03 \times 10^4$	4,01Log10
3	40	$1,00 \times 10^4$	4,00Log10
4	41	$1,03 \times 10^4$	4,01Log10
5	44	$1,10 \times 10^4$	4,04Log10
6	46	$1,15 \times 10^4$	4,06Log10

3.3.2. Công hiệu vắc xin mẫu chuẩn bằng real-time RT-PCR

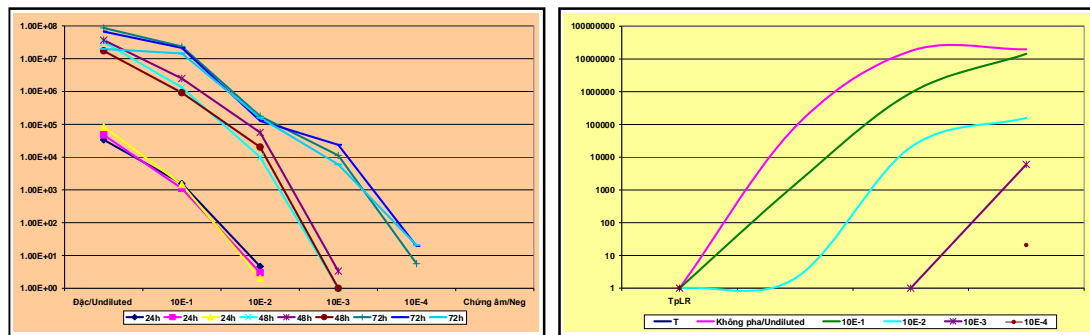
Sau khi cấy vắc xin mẫu chuẩn, gặt tế bào chính xác ở 24, 48, và 72 giờ, sau đó tách chiết ARN toàn phần trong tế bào bằng 3 phương pháp: i./ trypsin hóa tế bào rồi tách chiết ARN bằng bộ sinh phẩm thương mại (Qiagen); ii./ ly giải tế bào bằng dung dịch ly giải nhanh (TpLR) 300 μ l/giếng và ủ ở 37°C x 4 phút, sau đó tách chiết ARN bằng bộ sinh phẩm thương mại

(Qiagen); iii./ ly giải tế bào bằng TpLR, sử dụng trực tiếp hỗn dịch này làm real-time mà không dùng bộ sinh phẩm tách chiết thương mại.

Bảng 3.10. Hiệu giá ARN (số bản sao/5 μ l) ở 24, 48, và 72 giờ (M-0107).

Phương pháp	Trypsine + Qiagen			TpLR+Qiagen			TpLR		
	24 giờ	48 giờ	72 giờ	24 giờ	48 giờ	72 giờ	24 giờ	48 giờ	72 giờ
Đặc	3,37E4	3,23E7	8,65E7	4,74E4	3,70E7	6,67E7	8,35E4	1,74E7	1,98E7
10 ⁻¹	1,56E3	1,32E6	2,33E7	1,10E3	2,48E6	2,13E7	1,47E3	9,13E5	1,44E7
10 ⁻²	4,67E0	9,97E3	1,76E5	3,00E0	5,60E4	1,27E5	2,00E0	2,00E4	1,59E5
10 ⁻³	0,00E0	1,00E0	1,12E4	0,00E0	3,33E0	2,37E4	0,00E0	3,33E0	5,97E3
10 ⁻⁴	0,00E0	0,00E0	5,67E0	0,00E0	0,00E0	1,93E1	0,00E0	0,00E0	2,07E1
Neg	0,00E0	0,00E0	0,00E0	0,00E0	0,00E0	0,00E0	0,00E0	0,00E0	0,00E0

Ghi chú: E: Số mũ của 10, ví dụ 3,37E4 = 3,37x10⁴



a.

b.

Hình 3.20. Tương quan của 3 phương pháp tách chiết ARN (a) và hiệu giá sau gây nhiễm (b).

Cả 3 phương pháp tách chiết ARN đều cho kết quả tương đương nhau, với hệ số tương quan (R) từng cặp dao động trong khoảng 0,96-0,99 và không có sự khác biệt tuyệt đối ($p > 0,5$). Bảng 3.10 và Hình 3.20 là kết quả định lượng ARN ở các thời điểm 24, 48, và 72 giờ của cả 3 phương pháp tách chiết.

3.3.3. Sự ổn định của ARN tách chiết bằng TpLR

Chất lượng của ARN tách chiết bằng TpLR còn được đánh giá thông qua hệ số tương quan (R) và giá trị khác biệt tuyệt đối khi ARN của cả ba phương pháp tách chiết được kiểm tra sau khi được bảo quản 12 tháng (-80°C), 15 tháng (-80°C), và tiếp đó 2 tháng (-30°C). Bảng 3.11 là kết quả định lượng ARN của cả 3 phương pháp tách chiết sau khi bảo quản ở các điều kiện nhiệt độ và thời gian thực.

*Bảng 3.11. Bền vững của ARN (số bản sao/5µl)
ở các điều kiện nhiệt độ và thời gian thực (M-0107).*

Thời gian	Trypsine + Qiagen				TpLR+Qiagen				TpLR			
	Gốc (-80°C)	12 tháng (-80°C)	15 tháng (-80°C)	2 tháng (-30°C)	Gốc (-80°C)	12 tháng (-80°C)	15 tháng (-80°C)	2 tháng (-30°C)	Gốc (-80°C)	12 tháng (-80°C)	15 tháng (-80°C)	2 tháng (-30°C)
24 giờ	5,70E4	2,63E4	3,90E4	6,87E3	7,81E4	1,65E4	7,49E4	1,10E4	1,61E5	8,69E4	7,65E4	1,05E4
	3,34E3	1,71E3	7,07E3	1,44E3	1,08E3	5,63E2	1,18E4	3,10E3	2,08E3	4,40E3	7,80E3	2,08E3
	1,00E0	1,90E1	4,51E2	1,74E2	1,00E0	7,00E0	6,36E2	1,10E2	1,00E0	8,00E0	2,44E2	1,01E2
	0,00E0	0,00E0	0,00E0	3,90E1	0,00E0	0,00E0	1,43E2	0,00E0	0,00E0	0,00E0	0,00E0	0,00E0
48 giờ	4,00E7	2,77E7	2,28E6	2,39E5	1,22E7	5,57E7	2,91E6	3,04E5	1,81E7	3,09E7	4,15E6	2,03E5
	1,26E6	1,18E6	3,47E5	4,55E4	1,16E6	2,94E6	6,03E5	7,78E4	9,18E5	1,22E6	3,60E5	4,14E4
	3,98E2	1,00E3	8,13E3	1,70E3	6,65E3	1,17E5	9,25E4	1,38E4	5,60E3	6,03E4	5,96E4	7,57E3
	8,90E1	2,00E0	1,75E2	4,10E1	0,00E0	3,00E0	2,39E2	6,30E1	0,00E0	0,00E0	0,00E0	0,00E0
72 giờ	1,82E8	2,53E7	2,31E6	2,63E5	1,17E8	3,04E7	2,15E6	2,27E5	3,67E7	2,21E7	1,98E6	1,62E5
	5,96E7	5,68E6	9,58E5	1,16E5	2,14E7	1,51E7	1,47E6	1,71E5	3,43E7	7,85E6	9,77E5	1,22E5
	1,82E5	1,41E5	1,06E5	1,58E5	2,77E5	7,63E4	7,68E4	1,27E4	4,33E5	4,09E4	4,68E4	1,27E4
	3,35E4	1,00E0	1,62E2	0,00E0	5,70E1	1,00E0	1,14E2	0,00E0	5,60E1	0,00E0	0,00E0	0,00E0

Ghi chú: E: Số mũ của 10, ví dụ 5,70E4 = 5,70x10⁴

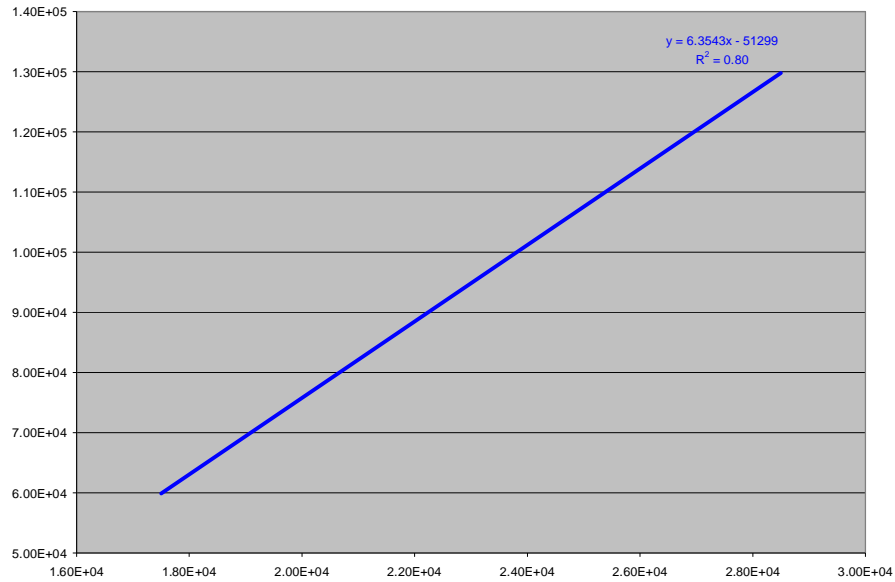
Hiệu giá ARN vắc xin sởi khi chuyển từ tám nhựa 24 giếng sang tám nhựa 96 giếng được trình bày ở Bảng 3.12. Kết quả cho thấy $R \approx 1$ và sự khác biệt tuyệt đối theo chu kỳ phát hiện (Ct) dao động từ 1,0-1,1 lần.

Bảng 3.12. Sự khác biệt Ct khi thử nghiệm trên tám nhựa 24 và 96 giếng (M-0107).

M-0107	24 giếng (Ct)	96 giếng (Ct)	Khác biệt tuyệt đối
Đặc	23,7	23,9	1,0
10^{-1}	27,9	28,9	1,0
10^{-2}	38,8	35,3	1,1
10^{-3}	Âm tính	Âm tính	Khó
10^{-4}	Âm tính	Âm tính	Khó
Tế bào	Âm tính	Âm tính	Khó
R	$\approx 1,0$		

3.3.4. Công hiệu vắc xin sởi thành phẩm

Hiệu giá ARN của 10 loại vắc xin thành phẩm sản xuất giai đoạn 2010-2013 được xác định bằng real-time RT-PCR một bước ở nồng độ cấy vắc xin đặc, pha loãng 10^{-1} và 10^{-2} . Hiệu giá ARN của vắc xin mẫu chuẩn và của chính vắc xin thành phẩm của 10 loại này cũng được xác định trực tiếp mà không qua nuôi cấy chủng virus vắc xin trên tế bào Vero. Ngoài ra, công hiệu PFU vẫn được xác định bằng thử nghiệm tạo đám hoại tử.



Hình 3.21. Tương quan hiệu giá PFU và ARN

Hình 3.21 và Bảng 3.13 trình bày tương quan hiệu giá PFU so với hiệu giá ARN khi cấy vắc xin đặc ($R=0,67$), vắc xin pha loãng 10^{-1} ($R=0,90$), và vắc xin pha loãng 10^{-2} ($R=0,88$). Hệ số tương quan của hiệu giá PFU và hiệu giá ARN chung là 0,80. Hệ số tương quan của ARN tách chiết trực tiếp từ vắc xin so với hiệu giá PFU $<0,4$. Hiệu giá ARN của 10 loạt vắc xin dao động trong khoảng $[4,71 \times 10^7 - 1,20 \times 10^8]$ trong khi hiệu giá PFU dao động trong khoảng $[1,75 \times 10^4 - 2,85 \times 10^4]$. Hiệu giá ARN trung bình cao hơn hiệu giá PFU $3,1 \times 10^3$ lần và hiệu giá ARN thành phẩm trung bình cao hơn hiệu giá PFU $1,4 \times 10^2$ lần.

Bảng 3.13. Hiệu giá ARN vắc xin sởi thành phẩm sản xuất tại Việt Nam

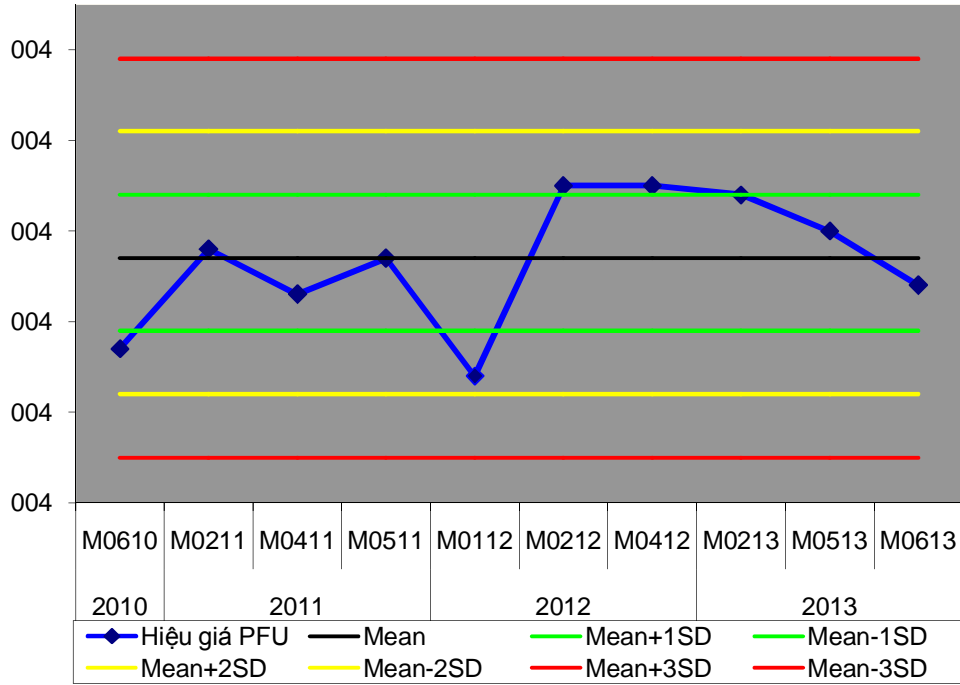
Loại	Hiệu giá PFU/0,5ml	Hiệu giá ARN (số bản sao ARN/0,5ml)				
		ARN đặc	ARN 10 ⁻¹	ARN 10 ⁻²	ARN chung	Thành phẩm
M-0610	9,40E3	2,48E7	3,19E7	3,86E7	3,18E7	1,63E6
M-0211	1,20E4	3,88E7	3,71E7	7,15E7	4,91E7	1,58E6
M-0411	1,07E4	2,31E7	2,67E7	2,34E7	2,44E7	2,05E6
M-0511	1,17E4	2,21E7	2,88E7	5,10E7	3,39E7	1,72E6
M-0112	8,75E3	2,13E7	2,19E7	2,75E7	2,36E7	1,32E6
M-0212	1,43E4	3,77E7	4,58E7	9,70E7	6,00E7	1,62E6
M-0412	1,40E4	3,89E7	4,67E7	9,05E7	5,90E7	1,78E6
M-0213	1,39E4	3,07E7	5,40E7	6,10E7	4,86E7	1,87E6
M-0513	1,27E4	4,16E7	4,38E7	6,95E7	5,15E7	1,76E6
M-0613	1,10E4	3,69E7	3,42E7	6,95E7	4,69E7	1,30E6
M-0107	1,14E4	4,43E7	4,73E7	3,94E7	4,36E7	ND
M	1,18E4	3,16E7	3,71E7	5,99E7	4,29E7	1,66E6
SD	1,92E3	8,08E6	1,02E7	2,48E7	1,35E7	2,31E5
M-2SD	7,99E3	1,54E7	1,66E7	1,03E7	1,59E7	1,20E6
M+2SD	1,57E4	4,77E7	5,75E7	1,10E8	6,98E7	2,12E6
M-3SD	6,08E3	7,34E6	6,38E6	0,00E0	2,42E6	9,68E5
M+3SD	1,76E4	5,58E7	6,78E7	1,34E8	8,33E7	2,35E6

Ghi chú: E: Số mũ của 10, ví dụ 9,40E3 = 9,40x10³.

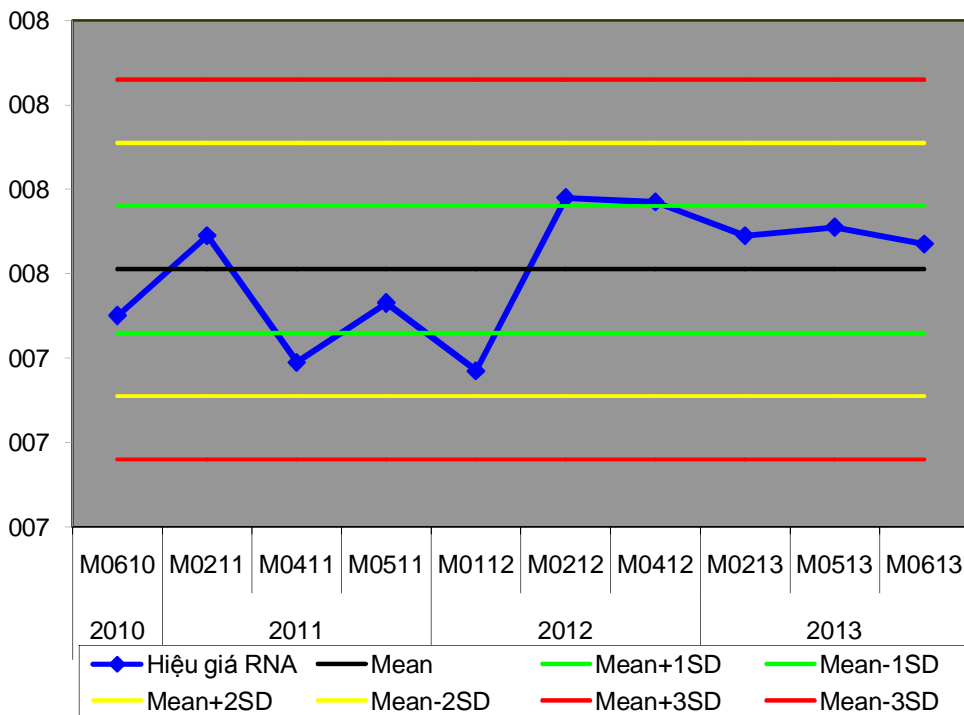
M: Trung bình;

SD: Độ lệch chuẩn;

ND: Không làm



a.



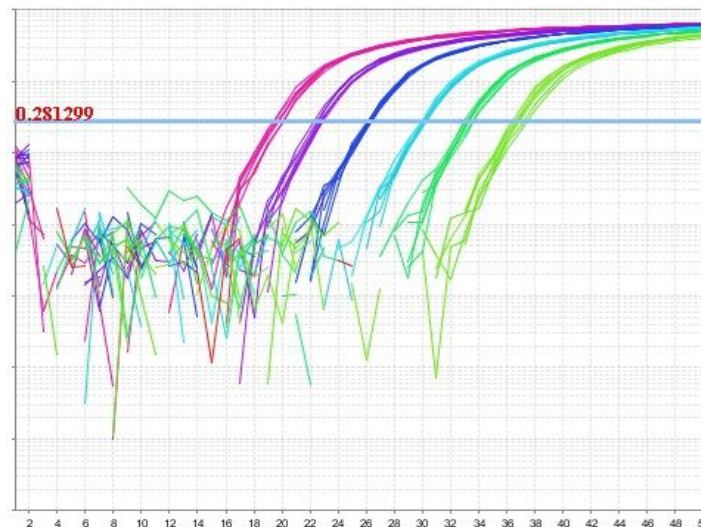
b.

Hình 3.22. Biểu đồ Levey-Jennings hiệu giá PFU (a) và ARN (b) vắc xin sởi.

Hình 3.22 là biểu đồ theo dõi xu hướng (biểu đồ Levey-Jennings) hiệu giá PFU (a) và số bản sao ARN (b) được chuyển từ đơn vị số mũ sang đơn vị Log10 của 10 loạt vắc xin sợi sản xuất tại Việt Nam 2010-2013. Đường màu đen là giá trị hiệu giá trung bình nhân (Geomean), hai đường màu xanh là khoảng $M \pm 1SD$, hai đường màu vàng là khoảng $M \pm 2SD$, và hai đường màu đỏ là khoảng $M \pm 3SD$. Đường màu xanh nước biển là giá trị hiệu giá của từng loạt vắc xin thành phẩm. Kết quả cho thấy đường biểu diễn hai loại hiệu giá rất tương đồng, luôn nằm trong khoảng $M \pm 2SD$. Sự khác biệt giữa các loạt đều $< 0,5 \text{ Log}_{10}$, trong đó khác biệt PFU $< 0,21 \text{ Log}_{10}$ và ARN $< 0,41 \text{ Log}_{10}$.

3.3.5. Độ lặp lại của phản ứng

Độ chính xác của phản ứng được đánh giá qua độ lặp lại trong cùng một thực hiện phản ứng (repeatability) của gam chuẩn ngoài 10^1 - 10^6 bản sao ARN/5 μ l khuôn mẫu (7 lần). Kết quả Hình 3.23 và Bảng 3.14 cho thấy CV trung bình của 7 gam chuẩn ngoài của nghiên cứu này là 0,8% [0,4-1,3%].



Hình 3.23. Độ lặp lại trong cùng một lần làm phản ứng (gam chuẩn 10^1 - 10^6).

Ghi chú: Trục tung: ΔRn ; Trục hoành: chu kỳ khuếch đại.

Bảng 3.14. Độ lặp lại trong cùng một lần làm phản ứng (Ct).

Lần thử nghiệm	Gam chuẩn					
	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6
1	37,5	33,7	30,5	26,7	22,9	20,2
2	37,0	33,6	30,5	26,8	23,1	20,1
3	36,9	33,8	30,7	26,8	23,1	20,3
4	37,2	33,9	30,9	26,9	23,4	19,9
5	37,3	34,2	30,7	26,9	23,4	20,6
6	38,1	33,7	30,9	27,0	23,5	20,3
7	37,9	34,1	30,8	26,8	23,3	20,6
SD	0,42	0,24	0,16	0,11	0,21	0,26
M	37,4	33,9	30,7	26,9	23,2	20,3
CV(%)	1,1	0,7	0,5	0,4	0,9	1,3
CVTB	0,8 [0,4 - 1,3]					

Ghi chú:

M: Trung bình; *SD*: Độ lệch chuẩn; *CVTB*: CV trung bình.

Độ lặp lại trung gian (intermediate precision) của gam chuẩn ngoài 10^2 - 10^6 bản sao ARN/5 μ l khuôn mẫu của 7 lần thử nghiệm khác biệt được trình bày ở Bảng 3.15. Hệ số biến thiên trung bình là 3,3% [2,3-4,6%].

Bảng 3.15. Độ lặp lại trung gian của gam chuẩn ngoài (Ct).

Lần thử nghiệm	Gam chuẩn				
	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6
1	33,0	29,3	25,8	22,4	19,4
2	33,7	30,5	26,7	22,9	20,2
3	33,7	30,4	26,9	23,7	19,9
4	32,0	29,4	26,0	22,2	20,2
5	33,1	30,5	27,1	23,7	20,2
6	34,7	31,0	29,2	24,2	20,2
7	34,8	31,7	28,4	25,1	21,0
SD	0,99	0,84	1,24	1,01	0,47
M	33,6	30,4	27,2	23,5	20,2
CV(%)	2,9	2,8	4,6	4,3	2,3
CVTB	3,3 [2,3 - 4,6]				

Ghi chú:

M: Trung bình;

SD: Độ lệch chuẩn;

CVTB: CV trung bình.

Bảng 3.16 . Độ lặp lại của 10 loạt vắc xin giữa 2 ngày thử nghiệm (Ct).

Loạt	Đặc		10 ⁻¹		10 ⁻²	
	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 1	Ngày 2
M-0112	21,66	21,62	26,52	26,34	30,95	30,59
M-0211	20,38	20,47	25,40	25,56	28,92	29,32
M-0212	20,44	20,44	24,94	24,87	28,26	28,40
M-0513	20,23	20,55	25,04	25,06	28,97	29,21
M-0610	21,34	21,12	25,72	26,45	30,23	30,25
M-0613	20,48	20,38	25,57	25,97	28,97	29,26
M-0412	20,37	20,67	24,90	25,14	28,40	28,59
M-0411	21,48	21,38	26,10	26,08	31,30	31,11
M-0213	20,88	20,26	24,60	24,74	29,24	30,32
M-0511	21,58	21,09	25,93	25,53	29,64	29,40
M-0107	20,10	19,95	24,87	24,40	30,18	30,36
CV	2,7%	2,3%	2,4%	2,4%	3,5%	3,0%
CV TB	2,7% [2,3-3,5%]					

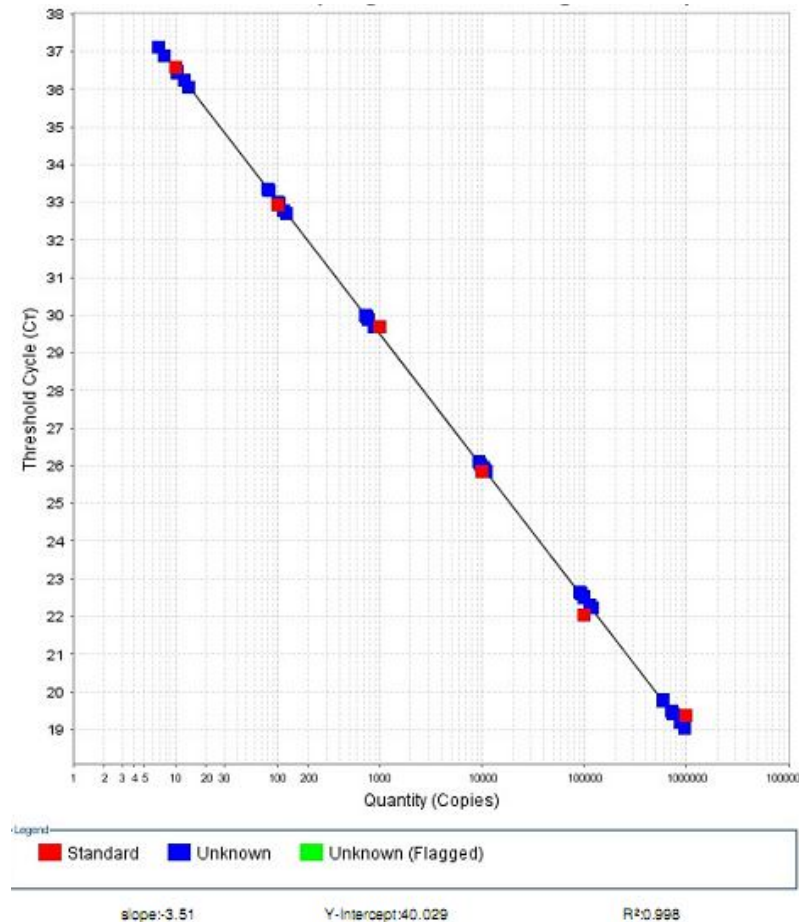
Ghi chú:

CVTB: CV trung bình.

M-0107 là vắc xin chuẩn.

Để đánh giá độ mạnh của phương pháp, hiệu giá ARN ở các nồng độ cấy vắc xin đặc, pha loãng 10^{-1} và 10^{-2} của 10 loạt vắc xin được thử nghiệm hai ngày khác nhau (ARN được bảo quản 5 tuần ở -80°C). Kết quả Bảng 3.16 cho thấy số chu kỳ khác biệt giữa hai lần thử nghiệm là 0-1,08 chu kỳ và trung vị là 0,19 chu kỳ. Giá trị CV của 2 ngày thử nghiệm ở các nồng độ cấy vắc xin đặc, 10^{-1} , và 10^{-2} là 2,7% [2,3-3,5%].

Đường thẳng tuyến tính $y = ax + b$ của phản ứng real-time và R được tính tự động bởi hệ thống Applied Biosystems mỗi lần chạy phản ứng và luôn $>0,97$ (Hình 3.24).



Hình 3.24. Đường thẳng tuyến tính của phản ứng real-time.

$$y = -3,51x + 40,029 \text{ và } R^2 = 0,998.$$

CHƯƠNG 4

BÀN LUẬN

4.1. Kết quả sản xuất các gam chuẩn

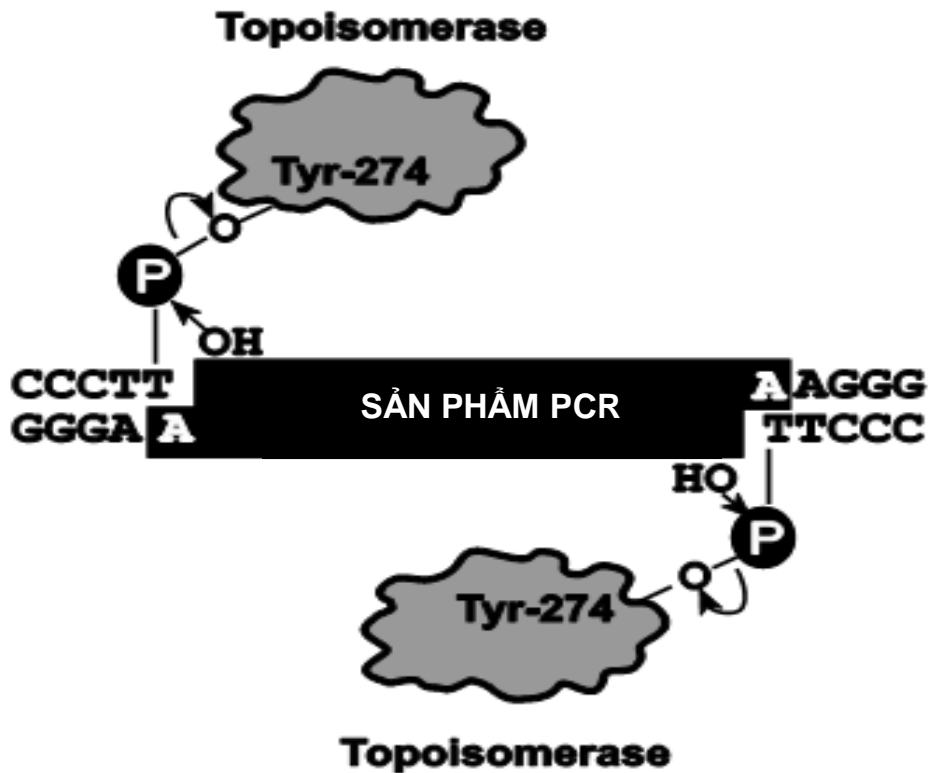
4.1.1. Tạo dòng plasmid tái tổ hợp và chuyển nạp

Trước tiên, để thực hiện phản ứng tạo dòng thì cần một sản phẩm PCR [132-134]. ARN/ADN tách chiết từ chủng virus, chủng vắc xin hoặc từ bệnh phẩm xác định được sử dụng làm khuôn mẫu cho RT-PCR/PCR [28-30]. Sản phẩm được kiểm tra bằng chạy điện di trên thạch agarose có nồng độ phù hợp với trọng lượng đích của sản phẩm và có mặt thuốc nhuộm dải ADN (SYBR) [135]. Kích thước của sản phẩm được kiểm tra và khẳng định dựa vào thang ADN chuẩn phù hợp. Hình 3.1 là kết quả phản ứng khuếch đại 7 đoạn gen mã hóa protein M, HA, và NA virus cúm mùa và A/H5N1. Mỗi sản phẩm chỉ có một dải ADN duy nhất, nhìn rõ ràng và sắc nét, có kích thước phù hợp với vị trí khuếch đại (Bảng 3.1). Đây là một trong số các yếu tố đảm bảo sản phẩm chuyển nạp không bị tạp nhiễm bởi các sản phẩm không đặc hiệu.

Với cúm, mặc dù khu vực khuếch đại đều là những đoạn gen ổn định nhất nhưng ARN nguồn sử dụng để sản xuất chứng dương đều được tách chiết từ chủng virus (cúm gia cầm A/H5N1 gây bệnh ở người) hoặc mẫu bệnh phẩm (A/H3N2, A/H1N1pdm09) được thu thập từ những bệnh nhân Việt Nam để đảm bảo không có sự khác biệt quá lớn về di truyền vì sản phẩm ARN được sử dụng trong chẩn đoán tại khu vực nghiên cứu của Việt Nam.

Tạo dòng là một kỹ thuật đơn giản, chỉ mất 5 phút thực hiện, tùy thường quy mà có một bước (*TOPO[®]pCR2.1* - Invitrogen) hoặc hai bước thực hiện (*pGEM-T Easy* - Promega) để cài trực tiếp một đoạn ADN vào một véc-tơ mạch thẳng biết trước tạo plasmid tái tổ hợp. Véc-tơ *TOPO[®]pCR2.1*

(Invitrogen) ở dạng mạch thẳng với đầu 3' gắn sẵn Thymine (T) và topoisomerase bằng phương pháp đồng hóa trị (véc-tơ hoạt hóa). Do Taq polymerase có hoạt tính vận chuyển (transferase) đầu tận cùng không phụ thuộc khuôn mẫu nên nó sẽ thêm một deoxyadenosine (A) vào đầu 3' của sản phẩm PCR. Véc-tơ mạch thẳng của bộ sinh phẩm có một đầu treo 1 deoxythymidine. Điều này cho phép sản phẩm PCR chèn và nối được với véc-tơ một cách hiệu quả (cầu nối A-T) (Hình 4.1) [132],[134].



Hình 4.1. Sơ đồ cơ chế phản ứng tạo dòng (cloning).

Nguồn: www.Invitrogen.com [132].

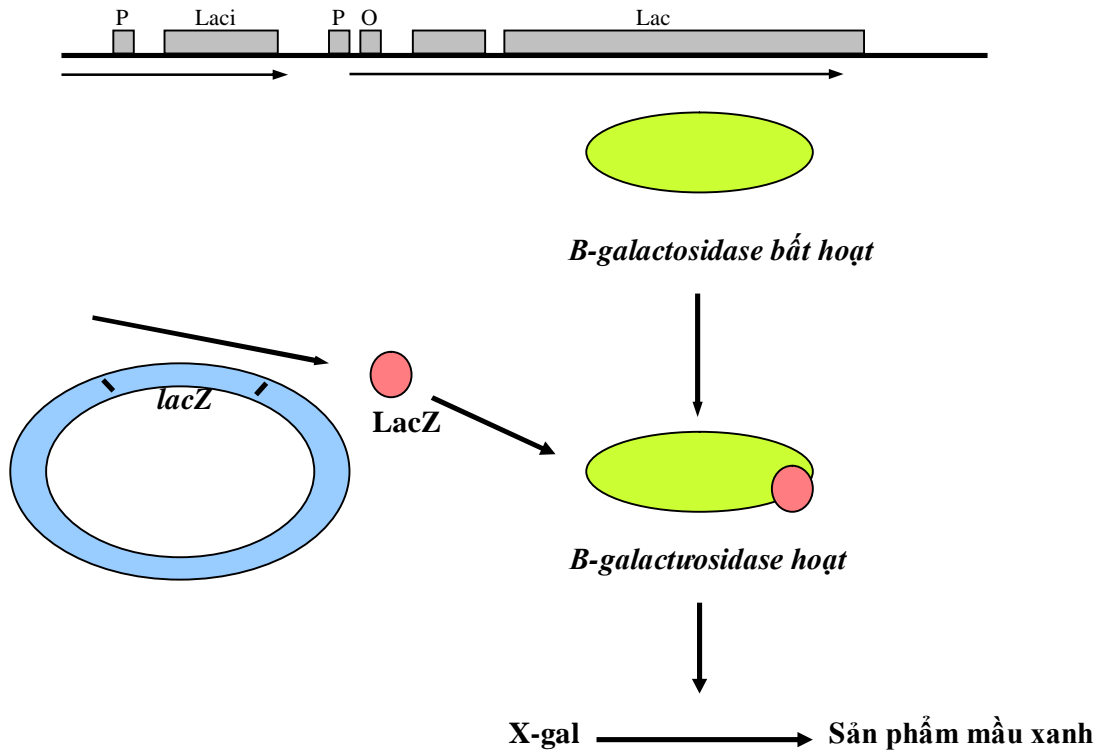
Theo Shuman và cộng sự, topoisomerase I của virus đậu gấn vào ADN kép ở một vị trí đặc hiệu và cắt các khung phosphodiester sau 5'-CCCTT của một chuỗi. Năng lượng từ khung phosphodiester sau khi bị cắt được bảo toàn bằng cách hình thành một cầu nối đồng hóa trị giữa 3' phosphate của chuỗi bị cắt và một tyrosyl (Tyr-274) của topoisomerase I. Cầu nối phospho-tyrosyl giữa ADN và enzyme sau đó bị tấn công bởi 5' của chuỗi bị cắt ban đầu, làm đảo chiều phản ứng và giải phóng topoisomerase. TOPO[®] Cloning khai thác phản ứng này để tạo dòng sản phẩm PCR một cách có hiệu quả (Hình 4.1). Với trường hợp sử dụng vec-tơ *pGEM T Easy*, do không có sẵn topoisomerase nên cần thực hiện thêm bước gấn sản phẩm vào vec-tơ nhờ enzyme T4 ligase (Bảng 2.2.b), các bước tiếp theo thực hiện tương tự như với vec-tơ TOPO [132],[133].

4.1.2. Kiểm tra chuyển nạp

Phản ứng chuyển nạp cho phép lựa chọn các tế bào cảm biến chứa plasmid tái tổ hợp để sau đó có thể nhân dòng. Có thể chuyển nạp bằng phương pháp sốc điện hoặc sốc nhiệt tế bào, nhưng nhiều phòng thí nghiệm y học thường dùng phương pháp sốc nhiệt tế bào. Với những phương tiện có sẵn, đề tài nghiên cứu này cũng áp dụng quy trình sốc nhiệt cho cả 2 loại vec-tơ theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất và sử dụng tế bào cảm biến là *E.coli* chủng *lacZADH5 α* , lựa chọn chuyển nạp bằng cơ chế bù α của gen β -galactosidase (Hình 4.2).

Enzyme β -galactosidase là một protein được mã hóa bởi nhóm gen *lac* (*operon*) và tồn tại ở dạng cấu trúc bậc 4 đồng nhất (homotetramer) có hoạt tính. Tuy nhiên, đột biến β -galactosidase của chủng *E.coli* M15 làm tổng hợp peptide ω và ở dạng bất hoạt do tetramer không được hình thành. Dạng hoạt tính tetramer sẽ được hồi phục khi có mặt peptide α . Sự hồi phục chức năng của β -galactosidase đột biến nhờ peptide α gọi là sự bù α . *E.coli lacZADH5 α*

là tế bào cảm biến mang gen đột biến *lacZ* (*lacZ Δ M15*) nên tổng hợp peptide ω còn plasmid có trình tự *lacZ α* nên tổng hợp được peptide α . Cả 2 dạng peptide ω và α đều không có hoạt tính chức năng nhưng khi chúng cùng có mặt thì tạo ra được một enzyme β -galactosidase có hoạt tính chức năng giống như khi trình tự *lacZ α* được chuyển nạp vào tế bào cảm biến mà không có *lacZ Δ M15*. Enzyme β -galactosidase có cơ chất là X-gal - một đồng phân không màu của lactose - enzyme này thủy phân X-gal để tạo thành 5-bromo-4-chloro-indoxyl, chất này ngay lập tức tạo thành cấu trúc bậc 2 (dimer hóa) và được oxy hóa để tạo thành một sắc tố không hòa tan có màu xanh nhạt là 5,5-dibromo-4,4-dichloro-indigo. Như vậy, những tế bào có chứa enzyme β -galactosidase có hoạt tính sẽ có màu xanh đậm, hay nói cách khác, khuẩn lạc màu xanh đậm có nghĩa là tế bào cảm biến chứa véc-tơ mang *lacZ α* không bị phá hủy (không có hiện tượng chèn trình tự đích vào hay chuyển nạp không thành công). Phương pháp sàng lọc bằng chọn khuẩn lạc màu trắng/xanh dựa vào việc phá hủy quá trình bù α . Khi ADN được chèn vào véc-tơ giữa gen *lacZ α* thì gen này bị phá hủy và do vậy không tổng hợp được peptide α nên không tạo thành được enzyme β -galactosidase có hoạt tính dẫn đến X-gal không bị thủy phân để chuyển thành dạng sắc tố màu xanh, hay nói cách khác, khuẩn lạc màu trắng là những khuẩn lạc không tạo được enzyme β -galactosidase có hoạt tính do plasmid chứa trình tự đích đã chèn vào *lacZ α* (chuyển nạp thành công). Hình 3.2 cho thấy trong số hàng trăm khuẩn lạc *E.coli* mọc trên các đĩa thạch LB đường kính 9cm, không có hoặc chỉ có vài khuẩn lạc màu xanh đậm, còn lại toàn bộ đều có màu trắng hoặc xanh nhạt. Điều này cho thấy phản ứng chuyển nạp của đề tài này đã thành công [136].

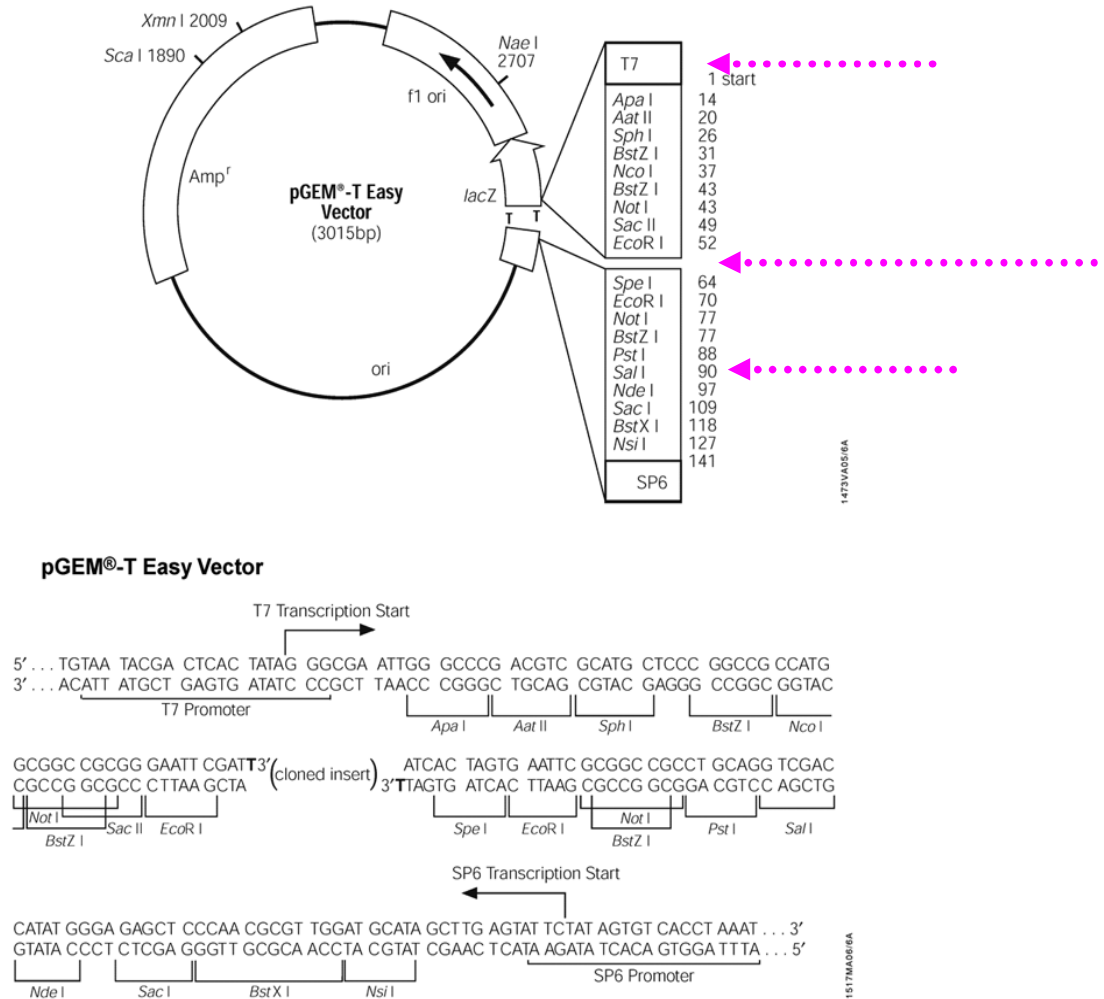


Hình 4.2. Cơ chế bù a lựa chọn các tế bào cảm biến. Véc-tơ TOPO pCR2.1.

Mặc dù có thể lựa chọn chuyển nạp bằng cách dựa vào màu sắc khuẩn lạc nhưng kháng sinh ampicillin với nồng độ cao 50-100 μ g/ml được thêm vào môi trường để đảm bảo những vi khuẩn tạp nhiễm không thể mọc được còn những vi khuẩn chứa plasmid tái tổ hợp vẫn có thể phát triển bình thường do véc-tơ có chứa các gen đề kháng kháng sinh này [132],[133].

Sau khi đã có những khuẩn lạc trắng hoặc xanh nhạt (chuyển nạp thành công), sản phẩm chuyển nạp được kiểm tra bằng khuếch đại sử dụng môi đặc hiệu và môi của véc-tơ (cặp môi T7/M13R) để khẳng định về mặt kích thước sản phẩm ADN đích đã chèn được vào véc-tơ. Nếu chỉ sử dụng cặp môi đặc hiệu mà không phải môi của véc-tơ thì vẫn có thể có trường hợp dương tính giả do ADN khuôn mẫu của phản ứng chuyển nạp vẫn tồn tại trong môi

trường và được khuếch đại chứ chưa thực sự được chèn vào vec-tơ. [132],[133].



Hình 4.3. Bản đồ genome của vec-tơ pGEM T-Easy.

Nguồn: www.promega.com [133].

Hình 3.3. là kết quả khuếch đại đoạn gen 7 mã hóa protein M virus cúm mùa A, trọng lượng đích khi khuếch đại với môi đặc hiệu A1/A2 là 212bp (giống 3-9) còn trọng lượng đích khi khuếch đại với môi vec-tơ T7/M13R là

khoảng 410bp (giếng 11-17). Về lý thuyết, PCR là một quá trình nhắc lại của 3 phản ứng liên tục: **biến tính** ADN sợi kép thành ADN sợi đơn; **gắn môi** đặc hiệu vào chuỗi ADN sợi đơn tại đầu 5'-3'; và **kéo dài chuỗi** nhờ hoạt tính enzyme từ đầu 3' theo hướng 3'-5' để tổng hợp chuỗi ADN bổ trợ mới. Chiều dài của sản phẩm là tổng chiều dài của 2 đoạn môi và chiều dài khoảng cách giữa 2 đoạn môi của khuôn mẫu [2],[47]. Dựa vào cấu trúc của bản đồ genome của vec-tơ *pGEM T Easy* ta có chiều dài môi T7 và M13R tương ứng là 20bp và 17bp, trình tự chức năng giữa 2 môi là 163bp, và sản phẩm đích là 212bp. Tổng kích thước sản phẩm đích khi khuếch đại với cặp môi T7/M13R phải là $212\text{bp} + 37\text{bp} + 163\text{bp} = 412\text{bp}$. Như vậy, xét về mặt kích thước, sản phẩm đích đã cài được vào vec-tơ [133].

Trên thực tế, vẫn có những trường hợp sản phẩm khuếch đại có kích thước như mong muốn nhưng đó lại là sản phẩm không đặc hiệu, một điều rất hay xảy ra ở những người mới làm thử nghiệm tạo dòng và chuyển nạp. Giải trình tự gen với cặp môi của vec-tơ, ví dụ T7 và M13 R, và tốt nhất là giải trình tự 2 chiều để khẳng định chuyển nạp ở mức nucleotide. Hình 3.4.b cho thấy, sau trình tự T7 “*TAATACGACTCACTATAGGG*” là các trình tự chức năng khác của vec-tơ “*GGGCGAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCATGGCCGC GGGATT*” và trình tự này được nối liền với trình tự của đoạn gen 4 mã hóa protein HA của virus cúm A/H5N1 (“*CGATT.....*”), điều này có thể khẳng định ở mức độ nucleotide rằng trình tự đích đoạn gen 4 mã hóa protein HA của virus cúm A/H5N1 đã được cài vào vec-tơ [132],[133],[137],[138].

Sau khi có kết quả giải trình tự gen, so sánh với trình tự của NCBI tại <http://www.ncbi.com> để xác định chính xác vị trí của đoạn gen đích, tên chủng, các chủng gần nhất, tỷ lệ đồng nhất và vị trí khác biệt ở mức nucleotide của các chủng gần nhất do đây là một trong những trang mạng

chứa nhiều thông tin di truyền của virus nhất. Hình 3.5 và Hình 3.6 cho thấy chủng virus cúm mùa sử dụng trong đề tài nghiên cứu này được khẳng định bằng *Blast* và gần với chủng virus cúm mùa H3N2 A/Rotterdam/577/1980 với số đăng nhập là CY112354 và vị trí khuếch đại là 101-312, đúng với thông tin về vị trí và trình tự môi mà tác giả Donofrio và cộng sự thiết kế cặp môi đặc hiệu A1/A2 đã công bố. Bảng 3.1 là tổng hợp các thông tin về chiều dài và gen đích của các tác nhân nghiên cứu trong đề tài này. Khu vực khuếch đại đều là những vùng ổn định nhất nên hoàn toàn phù hợp cho chẩn đoán [139].

4.1.3. Tạo mạch thẳng ADN plasmid bằng cắt enzyme giới hạn (RFLP)

ADN phải ở dạng mạch thẳng để sản phẩm ARN tổng hợp có chiều dài đồng nhất (Hình 2.2). Hiệu giá ARN tối ưu phụ thuộc vào khuôn mẫu phản ứng phiên mã, tức là ADN mạch thẳng của giai đoạn cắt ADN mạch vòng bằng phản ứng cắt enzyme giới hạn (restriction fragment length polymorphism - RFLP) [37],[134].

Mỗi véc-tơ thường có một hoặc một vài enzyme tạo mạch thẳng mà vị trí cắt enzyme tạo ra một khoảng tối ưu tính từ trình tự chức năng phiên mã. Với véc-tơ *TOPO[®]pCR 2.1*, enzyme tạo mạch thẳng là Hind III và kích thước ADN của mạch thẳng là 3890bp, trong khi enzyme tạo mạch thẳng của *pGEM-T Easy* là Sall với kích thước 3015bp [132],[133]. Sau khi tạo mạch thẳng, điện di kiểm tra sản phẩm để bảo đảm plasmid đã được cắt hoàn toàn, có kích thước đích như mong muốn (kích thước đích bằng tổng kích thước của véc-tơ và sản phẩm đích), luôn điện di cùng với chứng dương là plasmid mạch vòng (không cắt enzyme giới hạn). Hình 3.7 cho thấy plasmid tái tổ hợp chứa một đoạn gen mã hóa protein M của virus cúm mùa A được tạo mạch thẳng từ plasmid mạch vòng sử dụng véc-tơ *pGEM T Easy* nên kích thước đích mong muốn là 3015bp + 212bp = 3227bp. Cùng phân tử nhưng mạch vòng luôn có kích thước khác mạch thẳng với 3 dải ADN đại diện cho cấu

trúc vòng, xoắn và siêu xoắn. Sản phẩm RFLP chỉ có một dải ADN duy nhất, không có các dải phụ, điều này cho thấy phản ứng RFLP đã cắt hoàn toàn plasmid mạch vòng, đảm bảo sản phẩm của phản ứng phiên mã là đồng nhất. Ngoài ra mạch thẳng luôn nằm giữa trọng lượng mạch vòng và mạch xoắn của plasmid mạch vòng cho thấy đây chính là kích thước mong muốn.

Với phiên mã trực tiếp, do trình tự chức năng được gắn vào môi nên sản phẩm luôn là ADN mạch thẳng với kích thước bằng tổng chiều dài trình tự đích, chiều dài của cặp môi, và chiều dài trình tự chức năng được cài vào môi. Hình 3.8 cho thấy sản phẩm khuếch đại với môi cải biên khoảng gần 200bp, chính là tổng chiều dài (191bp) đoạn gen 7 mã hóa protein M của cúm A/H1N1pdm09 (154bp) và chiều dài của 2 cặp môi cải biên (37bp). Sản phẩm sáng, rõ nét, không có dải ADN phụ. Điều này khẳng định sản phẩm đích đã được khuếch đại với cặp môi cải biên và không có các sản phẩm không đặc hiệu [140-142].

4.1.4. Kết quả phiên mã *in vitro*

Phiên mã *in vitro* có thể sản xuất đến mức *mg* ARN/phản ứng 20 μ l trong khoảng 30 phút [37],[143]. Đề tài nghiên cứu này sử dụng bộ sinh phẩm phiên mã với hiệu giá cao (T7RiboMAXTM) [37].

Cơ chế của phản ứng phiên mã *in vitro* cổ điển là sử dụng trình tự chức năng phiên mã T7 vốn có của véc-tơ. Sau khi cắt bằng enzyme giới hạn tạo ADN mạch thẳng, đầu phiên mã của sản phẩm đích là trình tự chức năng phiên mã T7, cách trình tự đích một khoảng tối ưu, đầu còn lại tự do, thường là vị trí cắt enzyme giới hạn (Hình 4.3), điều này làm cho sản phẩm đích ARN luôn có chiều dài bằng nhau (đồng nhất) [37],[143].

Theo tác giả Innis và cộng sự, một trong số các ứng dụng của thiết kế cặp môi sử dụng trong PCR là đánh dấu môi. Có thể gắn một số trình tự chức năng hoặc chất đánh dấu vào đầu 5' của một hoặc cả hai môi để chèn vào sản

phẩm PCR trong quá trình khuếch đại biotin hay dig, chất huỳnh quang, enzyme, vị trí cắt enzyme giới hạn, các trình tự hoạt hóa ARN polymerase... để phục vụ cho bước tóm bắt, phát hiện sản phẩm PCR, và các mục đích khác. Đề tài nghiên cứu này đã cải biên môi bằng cách cài thêm vào cặp môi đặc hiệu trình tự phiên mã T7 ở một đầu của môi xuôi và poly T ở đầu còn lại của môi ngược (cải biên cả 2 môi) để chèn được các trình tự chức năng này vào sản phẩm khuếch đại nhằm mục đích phiên mã trực tiếp. Cơ chế của phản ứng phiên mã *in vitro* trực tiếp là cặp môi cải biên cũng chứa trình tự chức năng phiên mã T7, cách trình tự đích khoảng 20 nucleotide và đầu tự do là đuôi poly T nên sản phẩm phiên mã luôn có đuôi poly A, một tín hiệu kết thúc chuỗi. Như vậy, sản phẩm vẫn chứa một trình tự chức năng phiên mã mà không cần qua bước tạo dòng và tạo mạch thẳng [47],[134].

Phản ứng phiên mã luôn phải có chứng dương đi kèm bộ sinh phẩm (pGEM) đóng vai trò kiểm soát chất lượng phản ứng. Hình 3.9 cho thấy sản phẩm phiên mã có 2 dải ARN khi điện di là 1,1Kbp và 2,3Kbp, đúng với khuyến cáo của nhà sản xuất. Điều này khẳng định phản ứng phiên mã chạy tốt [37].

Hình 3.10.a cho thấy khuếch đại khuôn mẫu ARN vừa được tổng hợp bằng phiên mã *in vitro* với các cặp môi đặc hiệu đều cho các sản phẩm đích như mong muốn của 4 tác nhân virus cúm mùa A, hRSV, cúm B, hMPV tương ứng là 212bp, 278bp, 365bp, và 537bp. Sau phiên mã *in vitro*, khuôn mẫu ADN bị phá hủy bằng enzyme RQ1 để đảm bảo quá trình khuếch đại không bị ảnh hưởng vì nếu ADN còn sót lại thì cho dù phản ứng RT không chạy nhưng vẫn thu được sản phẩm đích như mong muốn nên ngoài việc kiểm tra sản phẩm bằng RT-PCR như quy trình cổ điển, cần phải kiểm tra khuôn mẫu ADN đã được phá hủy hết hay chưa bằng cách tiến hành RT-PCR như thông thường nhưng không có bước RT (sinh phẩm RT-PCR nhưng chu

kỳ nhiệt không có bước RT). Hình 3.10.b cho thấy khi không có bước RT, tất cả các giếng đều âm tính hoàn toàn, như vậy kết quả này chứng minh rằng ADN khuôn mẫu của quá trình phiên mã đã được phá hủy hết. Ngược lại, plasmid là khuôn mẫu ADN vẫn cho sản phẩm đích như mong muốn mặc dù không có bước RT (Hình 3.10.c). Kết quả nghiên cứu chứng minh được rằng khi ADN đã bị phá hủy hoàn toàn thì kết quả khuếch đại là từ khuôn mẫu ARN vừa được tổng hợp. Đây cũng là cách kiểm tra sản phẩm mà một số tác giả sử dụng khi sản xuất chứng dương ARN bằng phiên mã *in vitro* [6],[121].

Hình 3.11 là dạng đường cong điển hình khi đo nồng độ ARN [144],[145]. Từ kết quả này và kích thước đích của sản phẩm sau phiên mã (Bảng 3.1 và Hình 4.3) có thể tính toán sản lượng phiên mã cho từng sản phẩm. Bảng 3.2 và Hình 3.13 cho thấy sản lượng phiên mã của đề tài rất cao, ổn định, dao động từ $1,59 \times 10^{11}$ - $1,2 \times 10^{19}$ bản sao. Như vậy, sản lượng ARN này là đủ để sử dụng trong một thời gian lâu dài. Trong vòng 30 phút, từ một lượng khuôn mẫu là 1-2,5 μ l, chỉ bằng một phản ứng phiên mã 20 μ l, sản lượng ARN thu được đạt thấp nhất là 10^{11} bản sao cho phương pháp phiên mã cổ điển và 10^{19} bản sao cho phương pháp phiên mã trực tiếp. Mỗi phản ứng RT-PCR cổ điển sử dụng 10^2 - 10^3 bản sao thì lượng ARN mới được tổng hợp có thể sử dụng cho khoảng 10^{10} phản ứng. Nếu áp dụng cho real-time với gam chuẩn ngoài 10^1 - 10^6 bản sao/phản ứng thì sản lượng $1,2 \times 10^{19}$ bản sao cũng có thể sử dụng cho 10^{13} phản ứng. Đây không những là phương pháp sản xuất chứng dương ổn định, có hiệu giá cao dùng cho chẩn đoán, nghiên cứu, mà còn có thể làm cơ sở cho sản xuất các bộ mẫu chuẩn ARN sử dụng trong chương trình EQA NAT với một phạm vi rộng.

Một hỗn dịch ARN tinh khiết và có trình tự đích đồng nhất, ngắn hơn so với ARN toàn bộ genome virus, có chứa vị trí gắn cho cặp mồi đặc hiệu đã được tổng hợp *in vitro*. Kết quả đánh giá độ nhạy phát hiện của chứng dương

của nghiên cứu này (Bảng 3.2) trùng với số liệu khuyến cáo của dự án SISEA, kết quả của các đơn vị thành viên tham gia dự án [123]. Dựa vào kết quả đánh giá tính ổn định của ARN này trong suốt thời gian nghiên cứu tại phòng thí nghiệm (03/2011 - 04/2014 với 41 lần xét nghiệm phức hợp ARN 10^4 bản sao cho mỗi virus cúm mùa A, hRSV, hMPV và 10^5 bản sao cho virus cúm B; 18 lần xét nghiệm cho mỗi gam chuẩn của thử nghiệm real-time) và tại khoa virus, Viện Pasteur Nha Trang (năm 2012 với 18 lần xét nghiệm phức hợp ARN 10^4 bản sao cho mỗi virus cúm mùa A, hRSV, hMPV và 10^5 bản sao cho virus cúm B) (số liệu cụ thể không được chỉ ra trong đề tài nghiên cứu này), ARN tổng hợp bằng phiên mã *in vitro* này vẫn có thể sử dụng được ít nhất sau 3 năm (số liệu của đề tài nghiên cứu tuyển chọn cấp Bộ Y tế đã nghiệm thu 06/2014 và không được chỉ ra trong đề tài nghiên cứu này) [126]. Như vậy, ARN được sản xuất theo phương pháp phiên mã *in vitro* thật sự đã tránh được một số nhược điểm của ARN tự nhiên mà chúng ta vẫn sử dụng cho các phản ứng sinh học phân tử. Các gam chuẩn này thực sự hữu ích cho khâu kiểm soát chất lượng của quá trình đảm bảo chất lượng phòng thí nghiệm, áp dụng cho cả chẩn đoán và nghiên cứu. Gam chuẩn ngoài cúm của nghiên cứu đã được sử dụng như các mẫu nội kiểm cho chính đề tài này để đảm bảo phản ứng chạy tốt và hạn chế âm tính giả do nồng độ chứng dương sử dụng làm khuôn mẫu không cao (mục tiêu 2) và trong xét nghiệm hàng loạt virus đường hô hấp của một số nghiên cứu khác và trong đào tạo tại Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương cho các tuyến cơ sở [64],[124],[146],[147]. Gam chuẩn ngoài sởi của nghiên cứu 10^1 - 10^6 bản sao/5 μ l khuôn mẫu được sử dụng để định lượng số bản sao ARN virus sởi cho mục tiêu nghiên cứu 3 của chính đề tài này. Ngoài ra, các gam chuẩn ngoài này cũng được sử dụng để sản xuất bộ mẫu chuẩn (panel) sinh học phân tử trong đánh giá năng lực xét nghiệm (số liệu không được chỉ ra ở đề tài nghiên cứu này).

Mặc dù phiên mã cổ điển gồm nhiều bước và sản lượng thấp hơn phiên mã trực tiếp nhưng có thể giữ được chủng *E.coli* tái tổ hợp vĩnh viễn và những chu kỳ phiên mã sau không cần bước tạo dòng và kiểm tra chuyển nạp nữa (Hình 2.1). Sử dụng phương pháp phiên mã cổ điển hoặc trực tiếp đều có thể áp dụng cho cả các trình tự chức năng phiên mã T3 hay SP6 [37],[132],[133]. Phiên mã trực tiếp có thể áp dụng cho bất cứ một đoạn môi nào, áp dụng cho cả virus ARN sợi kép như các Alphavirus hoặc cho những trình tự rất nhỏ, hoặc cho trường hợp chèn cả genome vào vec-tơ và vị trí phiên mã đích nằm quá xa trình tự chức năng phiên mã [140-142].

4.2. Tỷ lệ nhiễm cúm tại Hải Dương năm 2009-2011

4.2.1. Đặc điểm đối tượng nghiên cứu

Trong nghiên cứu này, 336; 452; và 485 mẫu bệnh phẩm SARI đã được thu thập liên tục theo đúng định nghĩa ca bệnh từ 1/2009 đến 6/2011, cỡ mẫu lớn và khá đồng đều giữa các năm bảo đảm lực nghiên cứu trong một số tính toán thống kê cũng như độ tin cậy khi phân tích theo thời gian. Tuy nhiên, sự phân bố không đều theo giới tính (nam/nữ = 1,3 lần) và nhóm tuổi (63,3% đối tượng nghiên cứu là trẻ <5 tuổi) có ảnh hưởng đến việc phân tích và biện luận kết quả.

4.2.2. Tỷ lệ tử vong và nhiễm cúm của bệnh nhân SARI

Trong nghiên cứu này, có 1 trường hợp tử vong (bệnh nhân nam, 70 tuổi) do cúm A/H1N1pdm09, chiếm 0,08% các trường hợp dương tính với cúm. Với trường hợp này, trước tiên, bệnh phẩm được tách chiết để khuếch đại gen nội chuẩn. Đây là một gen luôn có mặt ở mọi tế bào người, kết quả khuếch đại gen này dương tính khẳng định chất lượng tách chiết ARN được đảm bảo [148],[149]. Kết quả khuếch đại với virus cúm A/H1N1pdm09 (đoạn gen 7 mã hóa protein M, đoạn gen 6 mã hóa protein HA, và đoạn gen 4 mã

hóa protein NA) dương tính và kết quả khuếch đại với virus cúm A/H5N1 âm tính khẳng định trường hợp này nhập viện vì cúm A/H1N1pdm09 chứ không phải vì cúm A/H5N1. Kết quả phát hiện vật liệu di truyền của 18 tác nhân virus khác của dự án SISEA đều âm tính (số liệu không được nêu ra ở nghiên cứu này) có thể hướng tới khẳng định nguyên nhân tử vong của bệnh nhân này là cúm A/H1N1pdm09. Theo phân tích của tác giả Field và cộng sự, quá trình làm sạch virus cúm ở đường hô hấp nhờ interferon và đáp ứng miễn dịch gây độc qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity - ADCC), tế bào diệt tự nhiên (Natural Killer - NK) và tế bào lympho T [1]. Đáp ứng miễn dịch ở người có tuổi bị hạn chế, đây có thể là một trong số các lý do gây tử vong của bệnh nhân này. Do không có thông tin khác nên chúng tôi không phân tích được nguyên nhân tử vong liên quan đến các bệnh lý kèm theo.

Bảng 3.3 và Hình 3.14 cho thấy, tỷ lệ nhiễm virus cúm B là 6,4%, khá ổn định giữa các năm (6,8%; 6,6%; và 5,8%) ($p > 0,05$) trong khi virus cúm A chiếm 1,9%, lại dao động (4,2; 0,4; và 1,6%) ($p < 0,01$), điều này có thể do năm 2009, số lượng mắc cúm A được phát hiện rơi vào thời điểm trước khi đại dịch cúm A/H1N1pdm09 xảy ra. Tỷ lệ nhiễm cúm A/H1N1pdm09 là 10,4%, tỷ lệ phát hiện khác biệt có ý nghĩa giữa các năm ($p < 0,0005$). Đại dịch xảy ra năm 2009, số lượng bệnh nhân mắc nhiều nên tỷ lệ nhiễm cao nhất (24,1%), năm 2010, tỷ lệ dương tính chỉ còn 0,2% do đây là giai đoạn cuối của đại dịch và trong quần thể có thể đã có miễn dịch với chủng virus mới này. Năm 2011, tỷ lệ nhiễm là 10,5%, như vậy đây là vụ dịch mới. Do bệnh phẩm chỉ được thu thập đến tháng 6 năm 2011 nên có thể đây chưa phải là con số thống kê cuối cùng. Con số mắc cúm A/H1N1pdm09 của từng năm tương đồng với các công bố của nhiều tác giả Việt Nam và quốc tế [61],[62],[64],[85],[86],[123],[150].

Có thể có một tỷ lệ bảo vệ chéo giữa cúm A/H1N1pdm09 và cúm mùa A/H1N1 nên tỷ lệ nhiễm cúm mùa A giảm đi rõ rệt vào năm 2010 và 2011 ($p < 0,0005$) hoặc cũng có thể do đặc điểm sinh học của virus cúm, khi có một chủng virus cúm mới xuất hiện thì nó thường chiếm ưu thế hơn những chủng đã tồn tại trước đó [1],[38],[45]. Nghiên cứu này không xác định phân típ cúm mùa A nên không thể phân tích được phân típ của chủng lưu hành trước và sau khi xuất hiện đại dịch. Nguyên nhân chính làm dịch cúm xảy ra hàng năm là do sự đa dạng kháng nguyên làm xuất hiện liên tục các biến chủng mà có thể không chịu tác dụng của miễn dịch từ những lần nhiễm cúm trước và gây tái nhiễm [1],[38]. Hiện tượng thay đổi đột ngột kháng nguyên chính là nguyên nhân của các vụ đại dịch cúm, trong đó có đại dịch cúm A/H1N1pdm09 [83]. Điều này giải thích tại sao tỷ lệ nhiễm cúm A/H1N1pdm09 rất cao vào năm 2009 và giảm xuống một cách rõ rệt còn 0,2% ở năm tiếp theo.

Cũng theo tác giả Field và cộng sự, virus cúm truyền bệnh từ người sang người qua đường không khí, điều này giải thích hình thái xuất hiện bệnh đột ngột và mức độ lan truyền dịch nhanh trong cộng đồng [1]. Virus cúm truyền bệnh từ người sang người do dịch tiết được đào thải qua các hạt không khí 1-5 μ m, chủ yếu do ho. Vị trí xâm nhập là lớp màng nhầy chứa thụ thể bao phủ niêm mạc đường hô hấp và cây khí phế quản. Lượng virus trong dịch tiết và mức độ trầm trọng của bệnh tương quan tuyến tính với nhau. Virus có mặt trong dịch tiết khoảng 3-5 ngày ở người lớn và lâu hơn ở trẻ nhỏ hoặc người lớn có lâm sàng thể nặng, hiếm khi phát hiện được virus trong máu [1],[38],[44],[45]. Cơ sở lý thuyết này cùng với hiện tượng thay đổi đột ngột kháng nguyên giải thích tại sao đại dịch cúm A/H1N1pdm09 lại có tỷ lệ nhiễm rất cao năm 2009, hình thái dịch hình chữ ‘V’ và ‘W’ của cúm mùa và cúm đại dịch, và thời gian kéo dài dịch cúm tại địa phương [44].

Nghiên cứu này không phát hiện được trường hợp nào nhiễm cúm gia cầm A/H5N1 ở người. Kết quả nghiên cứu phù hợp với một số công bố của các nước thuộc cùng dự án và trong khu vực [62],[82],[86]. Mặc dù vậy, có tử vong và con số 18,7% dương tính với cúm (chưa tính 0,5% dương tính với cúm C) và chiếm 29,3% trong tổng số các mẫu dương tính với virus cho thấy vai trò quan trọng của virus cúm gây SARI ở trẻ em tại tỉnh Hải Dương (Hình 3.14 và Hình 3.15). Một tỷ lệ nhiễm cúm cao cũng phù hợp với một số nghiên cứu trong cùng khuôn khổ dự án [85],[123],[150].

Do nghiên cứu không thu thập bệnh phẩm của tất cả các bệnh nhân đáp ứng định nghĩa ca bệnh nên chúng tôi không thể tính và phân tích theo tỷ lệ nhiễm mới (incidence) hay tỷ lệ hiện nhiễm (prevalence).

Hình 3.16 cho thấy tỷ lệ đồng nhiễm của cúm với một tác nhân virus khác trong 2,5 năm nghiên cứu liên tục là 10,5%, một con số khá cao và tương đồng với các nghiên cứu khác [123],[150]. Trong số này, đồng nhiễm cúm B cao nhất, chiếm tới 18,5%, tiếp đó là đồng nhiễm cúm mùa A chiếm 8,3% và đồng nhiễm cúm A/H1N1pdm09 thấp nhất với 5,3%. Tỷ lệ đồng nhiễm cúm với 2 tác nhân virus khác chiếm 3,4% và không có trường hợp nào cùng lúc nhiễm 4 virus. Tỷ lệ đồng nhiễm cao và mức độ đồng nhiễm nhiều với cùng lúc có thể nhiễm tới 3 tác nhân virus (Bảng 3.5) cũng là một khó khăn khi xác định tác nhân gây bệnh chính, nhất là khi phản ứng định lượng trực tiếp không được áp dụng cho từng tác nhân và đây là một nghiên cứu mô tả chứ không phải là một nghiên cứu bệnh-chứng. Trong số các tác nhân đồng nhiễm, HRV và hMPV chiếm cao nhất, bao gồm cả đồng nhiễm với 1 và 2 tác nhân virus. Điều này có thể giải thích là do hiện tượng cùng lưu hành của virus cúm và các virus khác, trong đó HRV và hMPV là 2 trong số các virus có tỷ lệ nhiễm cao nhất, tương ứng là 17,4% và 5,0% [123],[150-152]. Ngoài ra, HRV là virus đường ruột, không có vỏ ngoài nên khá bền vững, lưu hành

quanh năm, thời gian đào thải tới vài tuần, và theo một số nghiên cứu thì virus này còn được phát hiện ở cả người lành nên tỷ lệ nhiễm và đồng nhiễm với HRV có thể cao hơn các tác nhân khác [153]. Một nghiên cứu khác trong cùng khuôn khổ dự án, Nguyễn Thị Thường và cộng sự đã chứng minh được sự tương quan chặt chẽ ($R=0,95$) giữa tỷ lệ nhiễm và tỷ lệ đồng nhiễm của hMPV với các tác nhân virus khác [154]. Nhiễm và đồng nhiễm các virus cúm có thể cũng tương tự. Kết quả này cho thấy việc giám sát virus học, dịch tễ học hàng loạt tác nhân và định lượng từng virus trong chẩn đoán có thể đóng một vai trò quan trọng góp phần xác định nguyên nhân gây bệnh thực sự. Một điểm đáng lưu ý trong nghiên cứu này là có hiện tượng đồng nhiễm giữa các virus cúm với nhau như cúm mùa A và cúm B, cúm B và cúm A/H1N1pdm09, cúm A/H1N1pdm09 và cúm C. Bằng chứng này cho thấy vai trò quan trọng trong nghiên cứu bệnh học cúm do hiện tượng tái tổ hợp giữa các chi cúm có thể làm biến đổi về độc lực và khả năng lây bệnh ở người [1],[44],[45]. Kết quả của nghiên cứu này cũng phù hợp với những công bố trước đây rằng cúm A và B có thể đồng thời lưu hành trong cùng một năm và sự lưu hành của virus này không ảnh hưởng đến sự lưu hành của virus khác và ngược lại. Theo nhiều tác giả, trong cùng một năm thường chỉ có một phân típ cúm A nổi lên, do đề tài nghiên cứu này không xác định phân típ cúm A nên chúng tôi không phân tích sự lưu hành của các phân típ và đồng nhiễm giữa các phân típ [1],[38],[44].

So sánh với số liệu của Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh thực hiện tại Bến Tre trong cùng khuôn khổ hợp tác nghiên cứu, tỷ lệ nhiễm cúm A/H1N1pdm09, cúm mùa A, và cúm B tương ứng là 1,4%, 2,7%, và 1,0%. Cúm tại Miền Nam thường lưu hành vào mùa hè và có hiện tượng chuyển sang tháng 5-7. Điều kiện thời tiết có thể là một trong số các lý do làm kết quả khác biệt giữa 2 đơn vị nghiên cứu [61],[150].

So với nghiên cứu của Thẩm Chí Dũng và cộng sự tại một xã của huyện Cẩm Sơn, cũng thuộc tỉnh Hải Dương, nghiên cứu này cũng có một số điểm tương đồng là đỉnh nhiễm cúm A/H1N1pdm09 đều rơi vào tháng 9 và tháng 10 năm 2009. Chúng tôi không so sánh được tỷ lệ và sự lưu hành của cúm mùa A và cúm B vì nghiên cứu của Thẩm Chí Dũng có cỡ mẫu được xét nghiệm nhỏ (54 mẫu) [64].

So với các con số của Trung tâm cúm quốc gia và Khoa Dịch tễ Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương tổng hợp số liệu cúm toàn quốc bằng xét nghiệm RT-PCR, kết quả của đề tài này có tỷ lệ nhiễm cúm nhìn chung thấp hơn so với số liệu của nghiên cứu giám sát trọng điểm ILI (22%), điều này có thể giải thích do trong công bố của Nguyễn Thu Yên và cộng sự, đối tượng nghiên cứu được giám sát ở cộng đồng, chỉ có triệu chứng cúm, không phải bệnh nhân SARI nhập viện nên định nghĩa ca bệnh rộng hơn nhiều so với SARI. Khi so sánh với số liệu của bệnh nhân phải nhập viện, tỷ lệ dương tính của nghiên cứu này vẫn thấp hơn so với con số nghiên cứu của Nguyễn Thu Yên và cộng sự (19%) do nhóm bệnh nhân ILI mặc dù phải nhập viện nhưng định nghĩa ca bệnh vẫn rộng hơn SARI [62],[86].

So với nghiên cứu về SVP giai đoạn 2006-2012 trên 888 bệnh nhân viêm phổi nặng của Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương (Nguyễn Thu Yên và cộng sự), tỷ lệ dương tính với cúm nói chung (A/H1N1, A/H3N2, A/H5N1, A/H1N1pdm2009, và cúm B) là 145 ca chiếm 14,0%, trong khi kết quả của đề tài này lại cao hơn (18,7%), rõ ràng có tiệm cận hơn nhưng vì nghiên cứu của Nguyễn Thu Yên và cộng sự chỉ nhằm vào các bệnh nhân viêm phổi nặng nên có thể định nghĩa ca bệnh lại chặt chẽ hơn so với nghiên cứu của dự án SISEA là SARI mà không cần phải chẩn đoán xác định SVP. Cả hai số liệu đều đáng tin cậy do cỡ mẫu rất lớn (1273 và 1034 mẫu) [62],[86].

Trong nghiên cứu này, tỷ lệ dương tính ở bệnh nhân SARI từ cao đến thấp là A/H1N1pdm09 (10,4%), cúm B (6,4%) và A/H1N1 và A/H3N2 (1,9%), tương đương với nghiên cứu SVP của Nguyễn Thu Yên và cộng sự, trong đó A/H1N1pdm09 chiếm tỷ lệ cao nhất là 7,1%, cao hơn so với các loại cúm khác [62],[86].

So sánh với nghiên cứu trên bệnh nhân SARI năm 2011-2012 của Nguyễn Thu Yên và cộng sự tiến hành trên 1578 bệnh nhân ở 5 cơ sở y tế, tỷ lệ nhiễm cúm A/H1N1pdm09, A/H1N1 và A/H3N2, cúm B, và A/H5N1 lần lượt là 2,9% (1,1-4,4%), 1,5% (0-2,2%), 3,9% (0-5,8%), và 0,1 (0-0,3%). Như vậy mặc dù vẫn có sự khác biệt trong định nghĩa ca bệnh, quy trình xét nghiệm nhưng số liệu của đề tài này về cúm mùa A và cúm B rất gần với số liệu của nghiên cứu của Nguyễn Thu Yên và cộng sự, trừ trường hợp cúm A/H1N1pdm09 do năm 2011-2013, phân típ cúm A này vẫn còn lưu hành nhưng không chiếm ưu thế nữa mà chỉ ở một mức thấp. Một số cơ sở nghiên cứu của Nguyễn Thu Yên và cộng sự không phát hiện được trường hợp nào nhiễm cúm B hoặc cúm A nên có thể ảnh hưởng đến số liệu trung bình (tác giả không sử dụng con số trung vị). Tỷ lệ nhiễm cúm có thể khác biệt tùy thuộc vào định nghĩa ca bệnh (triệu chứng lâm sàng và thời gian bệnh nhân được lấy mẫu), chuẩn hóa theo cơ cấu dân số của khu vực và những yếu tố khác. Ngoài ra, một số yếu tố có thể ảnh hưởng đến sự khác biệt của kết quả là quy trình xét nghiệm, bao gồm cả trình tự cặp môi và đầu dò, thời gian lấy mẫu làm xét nghiệm, loại phản ứng áp dụng (đơn môi hay đa môi)... Mặc dù vậy, rõ ràng kết quả của đề tài có nhiều điểm tương đồng so với nghiên cứu của Nguyễn Thu Yên và cộng sự khi cùng nghiên cứu trên các bệnh nhân SARI [62],[86].

So với nghiên cứu cùng khuôn khổ tại Campuchia, tỷ lệ dương tính với cúm A từ năm 2006-2010 tương ứng là 5,8%; 7,7%; 15,3%; 15,2%; và

1,4%. Con số nhiễm cúm 2009-2010 có tương quan với nghiên cứu này nhưng tác giả không tách biệt tỷ lệ nhiễm cúm mùa A và cúm A/H1N1pdm09 [150]. Tại Lào, số liệu chỉ được ghi nhận từ 9 tuần cuối cùng của năm 2010 đến nay với con số thu thập từ 0-26 ca/tuần, tỷ lệ dương tính với cúm A trung bình là 9,0% (bao gồm cả cúm A/H1N1pdm09), rất gần với con số 10,4% của nghiên cứu này [85]. Tỷ lệ nhiễm cúm của nghiên cứu này cũng nằm trong khoảng 5-20%, là con số thống kê mắc cúm của Hoa Kỳ và Pháp [38],[82].

Như vậy tỷ lệ nhiễm cúm của nghiên cứu này cũng tương đồng với nhiều nghiên cứu khác.

4.2.3. Phân bố nhiễm cúm theo giới tính, nhóm tuổi và thời gian

Phân tích theo giới tính, Bảng 3.6 và Hình 3.17 cho thấy nghiên cứu này luôn có tỷ lệ nam lớn hơn nữ, cụ thể với cúm mùa A là 2,4 lần ($p < 0,05$), cúm B là 1,5 lần ($p > 0,05$) và cúm A/H1N1pdm09 là 1,1 lần ($p > 0,1$) và tỷ lệ chung là 1,2 lần ($p > 0,1$). Sự khác biệt theo giới của cúm A có ý nghĩa thống kê, tuy nhiên, con số này có thể chưa chính xác do số mẫu dương tính của cúm A quá nhỏ, chỉ là 24 trường hợp nên chưa có tính đại diện. Với cúm B, tỷ lệ nam và nữ giảm xuống còn 1,5 khi tổng số ca dương tính tăng lên 81 trường hợp. Ngoài ra, một yếu tố có thể làm ảnh hưởng đến tỷ lệ dương tính giữa nam và nữ là tỷ lệ đối tượng tham gia nghiên cứu cũng không đồng đều, nam/nữ = 1,3 và số liệu không được chuẩn hóa theo cơ cấu dân số của thực địa nghiên cứu. Điều này có thể gây ảnh hưởng đến kết quả phân tích tỷ lệ nhiễm cúm theo giới tính. Với cúm A/H1N1pdm09, tỷ lệ nam/nữ là 1,1 và sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,1$). Số liệu này có lẽ chính xác hơn số liệu của cúm mùa A do số mẫu dương tính lớn hơn (133 mẫu), có tính đại diện hơn. Sự không khác biệt về giới tính cũng tương đồng với một số nghiên cứu khác của Việt Nam [62],[86].

Phân tích theo nhóm tuổi, nhóm trẻ dưới 12 tháng tuổi nhiễm cúm mùa A và B là 5,9%, tỷ lệ này của nhóm 1-5 tuổi là 23,1%. Như vậy, có tới 29,0% số trẻ em dưới 5 tuổi được chẩn đoán SARI phải nhập viện tại Hải Dương, nhiều hơn một cách có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$) so với các nhóm còn lại là 5-18 tuổi (10,1%), 19-64 tuổi (3,4%), và >64 tuổi (1,3%) (Bảng 3.7). Đây là một trong số các bằng chứng cho thấy gánh nặng bệnh tật của cúm gây SARI ở trẻ em và phải nhập viện. Đề tài này không phân tích gánh nặng bệnh tật theo thời gian nằm viện của từng nhóm tuổi.

Hình 3.18 cho thấy cúm mùa chủ yếu gây bệnh ở trẻ nhỏ, đây có thể phù hợp với biểu đồ diễn biến của cúm, đó là hình chữ “V”, nghĩa là 2 nhóm tuổi bị tấn công nhiều nhất là trẻ nhỏ và người có tuổi [1],[44],[45]. Tuy nhiên, do đặc điểm đối tượng tham gia của nghiên cứu này có tới 63,3% là trẻ em, nhóm >64 tuổi rất ít (4,1%) nên chỉ có thể nhìn thấy nhánh trẻ em mà không thể nhìn thấy nhánh còn lại của hình chữ “V”. Đây là một trong số những hạn chế của nghiên cứu.

Ngược lại, cúm A/H1N1pdm09 lại có số mắc chủ yếu rơi vào nhóm 6-18 tuổi, tiếp theo là các nhóm 1-5 tuổi và 19-64 tuổi. Do số mẫu dương tính không nhiều nên chúng tôi không chia nhỏ hơn nhóm tuổi mắc cúm.

Một điểm lý thú của nghiên cứu là cúm A/H1N1pdm09 có lẽ cũng tuân theo biểu đồ diễn biến của một virus cúm đại dịch, đó là hình chữ “W” với 3 đỉnh là trẻ nhỏ, nhóm tuổi thanh niên và người trẻ tuổi; và nhóm người có tuổi [44]. Trong nghiên cứu này, chỉ trong vòng 2 tháng diễn ra đại dịch cúm, có tới 46,6% số ca bệnh rơi vào nhóm tuổi trẻ lớn và thanh niên (6-18 tuổi) và chiếm tới 72,1% các ca dương tính của nhóm tuổi này. Hai đỉnh nhóm tuổi mắc cúm mùa và cúm đại dịch khác biệt rõ rệt (Hình 3.18). Tuy nhiên, cũng giống với kết quả phân tích cúm mùa, virus cúm đại dịch có số đối tượng

nghiên cứu ở nhóm >64 tuổi thấp nên không nhìn được nhánh người có tuổi. Ngoài ra, chúng tôi cũng đồng ý với phân tích của CDC Hoa Kỳ rằng có thể do đặc điểm tích hợp của virus cúm A/H1N1pdm có gen HA khởi nguồn từ chủng A/H1N1pdm1918 nên có thể có hiện tượng bảo vệ chéo cho nhóm đối tượng >64 tuổi, vì vậy với trường hợp cúm đại dịch, nhánh còn lại của hình “W” không xuất hiện rõ ràng [81].

Phân tích nhiễm cúm theo thời gian, cũng giống với nhiều số liệu tại trang mạng <http://www.flunet.int.com>, trước khi đại dịch cúm A/H1N1pdm09 xuất hiện, tại tỉnh Hải Dương vẫn đồng thời có sự lưu hành của cả cúm A và cúm B. Khi cúm đại dịch xuất hiện, vẫn còn một số trường hợp nhiễm cúm B và sau khi kết thúc đại dịch, cúm B lại tiếp tục chiếm ưu thế và đồng thời vẫn có sự lưu hành của cúm mùa A. Như vậy, sự lưu hành cúm B không chịu sự tác động của lưu hành cúm mùa A và ngược lại và dường như khi chủng cúm đại dịch xuất hiện, nó chiếm ưu thế hơn so với các chủng cúm khác. Hình 3.19 cho thấy sự lưu hành đồng thời của cả cúm mùa A và cúm B vào năm 2009 và 2011, một nguy cơ gây tái tổ hợp các virus cúm tại tỉnh Hải Dương. Năm 2009, đỉnh nhiễm cúm mùa A và cúm B xảy ra từ tháng 4-6. Đại dịch xảy ra vào tháng 9/2009 - 3/2010. Đỉnh cúm B kéo dài ở giai đoạn tháng 10-01 và tháng 4-5 của năm 2011. Diễn tiến của cúm tại tỉnh Hải Dương cũng giống với mô hình chung của Việt Nam và nhiều nước khác (Hình 1.9 và Hình 3.19) [62],[64],[86].

Tại Campuchia, cúm A thường lưu hành vào tháng 8-11. Cúm B lưu hành quanh năm và cúm A/H1N1pdm09 cùng lưu hành với cúm B vào những tháng cuối năm 2009 [82],[150]. Số liệu không giống hoàn toàn với lưu hành cúm ở nghiên cứu này mà khá tương đồng với kết quả của Thái Lan hoặc Thành phố Hồ Chí Minh, lý do có thể do điều kiện khí hậu của Campuchia

giống với miền Nam Việt Nam và Thái Lan hơn là miền Bắc Việt Nam [61],[82].

Tại Lào, cúm lưu hành chủ yếu vào quý IV năm trước tới hết quý I năm sau (mùa đông-xuân). Những tuần cuối của 2010 có sự lưu hành đồng thời của cả cúm A/H1N1pdm09 và cúm B. Năm 2011, chủ yếu là cúm A/H3 và cúm B, tập trung vào những tháng cuối năm. Như vậy, kết quả nghiên cứu của Lào cũng có một số điểm tương đồng với nghiên cứu này [82],[85].

Lưu hành cúm tại nghiên cứu này khác với công bố của Úc là giữa năm, có thể do Úc ở bán cầu khác Việt Nam nên tuân thủ mô hình cúm của khu vực nam bán cầu [82].

Tỷ lệ nhiễm virus cúm ở một số nghiên cứu khác của cùng khuôn khổ dự án cao rõ ràng ở quý IV và I khi so với quý II và III [123]. Tuy nhiên, ở nghiên cứu này, tỷ lệ nhiễm cúm mùa A và B cao nhất ở quý II (34 mẫu, chiếm 45,7%), sau đó là quý IV (27 mẫu, chiếm 25,7%), quý I (23 mẫu, chiếm 21,9%) và sự khác biệt giữa các quý I, II, IV không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$. Riêng quý III, tỷ lệ nhiễm virus cúm thấp hơn hẳn với 7 mẫu, chiếm 6,7% ($p < 0,01$) (Bảng 3.8). Kết quả này gợi ý rằng tại Hải Dương, các virus cúm thường gây gánh nặng bệnh tật và nhập viện cho trẻ em gần như quanh năm, chỉ trừ những tháng hè-thu.

Chúng tôi cũng tin rằng đây là một trong số các số liệu đầu tiên của Hải Dương về một số đặc điểm dịch tễ học của cúm ở bệnh nhân SARI trong suốt 2,5 năm nghiên cứu.

4.3. Bước đầu xây dựng phương pháp xác định hiệu giá vắc xin sởi đơn bằng real-time RT-PCR

4.3.1. Thử nghiệm tối ưu hóa các điều kiện phản ứng

4.3.1.1. Bàn luận về thời gian gặt ARN và độ pha loãng vắc xin

Các tài liệu kinh điển về đặc điểm sinh học virus sởi đã thừa nhận chu kỳ nhân lên của sởi rất nhanh, chỉ mất vài giờ nên số bản sao ARN bên trong tế bào gây nhiễm sau 24 giờ rất cao và nhờ những ứng dụng rộng rãi của real-time mà phương pháp định lượng số bản sao ARN bên trong tế bào gây nhiễm cho phép đọc kết quả chỉ sau 24 giờ cấy mà không cần theo dõi CPE hay TCID₅₀, đây là cơ sở để xây dựng một phương pháp cho kết quả nhanh và có tính tự động hóa cao [1],[3]. Real-time PCR/RT-PCR đã được áp dụng để phát hiện ADN và ARN trong các mẫu bệnh phẩm cũng như vắc xin nên việc thực hiện rất thuận lợi, chỉ cần các thiết bị và đào tạo cơ bản [5-8],[22],[32],[34-36],[121],[124],[155].

Hiệu giá của vắc xin sởi đơn, sống giảm độc lực tại Việt Nam (cả vắc xin mẫu chuẩn và vắc xin thành phẩm) ổn định và luôn đạt 10^3 - 10^4 PFU/liều 0,5ml [99]. Cùng với thử nghiệm thăm dò xác định hiệu giá với các độ pha loãng khi gây nhiễm vắc xin là đặc đến 10^{-7} (số liệu không được chỉ ra trong nghiên cứu này), chúng tôi xác định được chỉ cần sử dụng 5 độ pha loãng bậc 10 là đặc đến 10^{-4} và chứng tế bào là đủ vì khi pha loãng $>10^{-4}$ thì không có CPE nữa. Ngoài ra, các tài liệu cũng chứng minh rằng pha loãng virus bậc 10 là đủ để đánh giá sự khác biệt trong đáp ứng sinh học [2],[156].

Bảng 3.10 cho thấy có thể đo lường được hiệu giá ARN 24 giờ sau cấy ở nồng độ đặc và 10^{-1} , dao động trong khoảng $[1,10 \times 10^3 - 8,35 \times 10^4]$ bản sao/5µl khuôn mẫu ($[3,37 \times 10^4 - 8,35 \times 10^4]$ với đặc và $[1,10 \times 10^3 - 1,56 \times 10^3]$ với 10^{-1}), như vậy kết quả đều rơi vào khoảng tuyến tính của gam chuẩn ngoài (10^1 - 10^6 bản sao) nên đảm bảo được độ tin cậy. Mặc dù có thể phát hiện được ARN ở độ pha loãng vắc xin 10^{-2} nhưng hiệu giá rất thấp, dao động trong khoảng $[2,00 \times 10^0 - 4,67 \times 10^0]$, nằm ngoài khoảng tuyến tính của gam chuẩn (<10 bản sao) nên không đảm bảo độ tin cậy của kết quả. Không phát hiện

được ARN ở nồng độ pha loãng 10^{-3} và 10^{-4} . Hiệu giá ARN trong thử nghiệm thăm dò cao hơn hiệu giá PFU khoảng $1,83 \times 10^3$ lần.

Ở 48 và 72 giờ, có thể đo lường được ARN ở các nồng độ từ 10^{-1} đến 10^{-3} , thậm chí 10^{-4} nhưng 10^{-1} và 10^{-2} có hiệu giá ARN rơi ra ngoài khoảng tuyến tính của gam chuẩn ngoài ($>10^7$ bản sao - cực đối nghịch) nên cũng không đảm bảo độ tin cậy của kết quả (Bảng 3.10 và Hình 3.20). Kết quả này chứng minh được thời gian tối ưu để gặt ARN là 24 giờ và nồng độ pha loãng vắc xin là đặc và 10^{-1} . Khi so sánh với thời gian đọc công hiệu thông thường là 9 ngày, rõ ràng 24 giờ có một ưu điểm rõ ràng, điều này thật sự hữu ích khi thị trường có nhu cầu vắc xin gấp.

4.3.1.2. Bàn luận về phương pháp gặt ARN

Sử dụng TpLR xử lý ARN bên trong tế bào phức tạp hơn ở dịch nổi nhưng lại cho phép đọc kết quả sớm hơn và pha loãng vắc xin 10^{-1} thì các chất ức chế trong vắc xin có thể không ảnh hưởng đến quá trình nhân lên của virus [7]. Trên thực tế, khi so sánh với các phương pháp tách chiết sử dụng bộ sinh phẩm thương mại thì cả 3 phương pháp tách chiết ARN đều cho kết quả như nhau, với hệ số R từng cặp dao động trong khoảng 0,96-0,99 ở cả 24, 48, và 72 giờ và không có sự khác biệt tuyệt đối về số lượng bản sao ARN ($p > 0,05$).

Acid nucleic có thể được tách chiết từ virus, vi khuẩn, nấm, thực vật, môi trường, plasmid, và bệnh phẩm từ động vật hay người (máu, dịch não tủy, đờm, phân, nước tiểu, tiêu bản, mô sinh thiết tươi hay đúc trong nền paraffin...) tùy theo mục đích áp dụng trong chẩn đoán phòng thí nghiệm hay trong nghiên cứu và sản xuất [28-30],[157-162]. Trong trường hợp này, ARN không được gặt từ dịch nổi (ngoài tế bào) mà được gặt từ bên trong tế bào Vero gây nhiễm virus sởi và nhằm mục đích nghiên cứu.

Tách chiết acid nucleic là bước vô cùng quan trọng trước khi tiến hành PCR/RT-PCR [47]. Mặc dù có rất nhiều phương pháp song về mặt nguyên lý, một thường quy cụ thể cần phù hợp với từng loại tác nhân, tổ chức mà ta cần tách chiết vì cấu trúc và thành phần của các tổ chức rất khác nhau [28-30],[157-164]. Một đặc điểm chung của các phương pháp tách chiết là ***trước tiên tế bào hoặc virus được phá hủy để giải phóng acid nucleic, sau đó acid nucleic được tách rời ra khỏi các thành phần khác như protein, lipid và carbohydrate*** [47]. Quá trình tách chiết ARN phức tạp và khó hơn nhiều so với ADN do enzyme phá hủy ARN là ribonuclease có mặt ở khắp mọi nơi trong tế bào và tổ chức. Điều quan trọng là tại thời điểm phá hủy tế bào hay tổ chức - là thời điểm tính toàn vẹn của ARN bị đe dọa - thì ***các chất làm biến tính nuclease phải tiếp xúc được với các thành phần trong tế bào***. Để thành công, các thường quy tách chiết ARN thường phải sử dụng các chất gây biến tính mạnh như GITC, LiCL, SDS, phenol. Sự có mặt của EDTA là rất quan trọng để ức chế các nuclease có trong mẫu. Để giữ ARN trong thời gian ngắn, có thể dùng đệm EDTA 0,1mM hay đệm TE và điều kiện nhiệt độ -20°C , để giữ ARN trong thời gian dài thì bảo quản ở -80°C . Ion Mg^{2+} và các ion kim loại khác thủy phân không đặc hiệu các vị trí cắt trong ARN do vậy cần thêm EDTA trong môi trường bảo quản nếu cần giữ ARN nguyên vẹn [47],[28-30],[157-164]. ARN của nghiên cứu này được bảo quản ở -80°C và dung dịch TpLR là đệm Tris HCL pH=8 chứa 50mM KCL, 50mM MgCl_2 , 0,45% Nonidet-P40, và 0,45% Tween 20 đáp ứng được đầy đủ yêu cầu của nguyên lý tách chiết và bảo quản ARN.

Đặc biệt, Bảng 3.11 cho thấy hiệu giá ARN của cả 3 phương pháp vẫn không khác biệt tuyệt đối sau 1 năm bảo quản ở -80°C ($p>0,05$), như vậy chỉ cần sử dụng TpLR, vừa giảm đáng kể khối lượng công việc, tiết kiệm thời gian (trung bình chỉ 1-2 phút/mẫu), và tiết kiệm kinh phí tách chiết (kinh phí

sinh phẩm trung bình giảm từ 180.000 đồng/mẫu xuống 5.000 đồng/mẫu), lượng mẫu thu được nhiều (300 μ l thay vì 60 μ l). Đây là một ưu điểm đáng kể của nghiên cứu này, đặc biệt khi có một lượng mẫu lớn. Thêm vào đó, chu kỳ nhân lên của virus sởi rất nhanh, chỉ mất vài giờ nên ARN trong tế bào rất cao, đây là một trong số những đặc điểm sinh học để có thể định lượng ARN trong vòng 24 giờ sau gây nhiễm. Như vậy, xét đến quá trình nhân lên của acid nucleic thì gặt ARN trong tế bào rất thuận lợi.

ARN của cả 3 phương pháp sau khi được cất giữ ở -80°C sau 12 tháng vẫn ổn định, tương quan chặt chẽ với R từng cặp dao động trong khoảng 0,8-1,0 và không có sự khác biệt ($p>0,05$). Cụ thể, sau 12 tháng, lượng ARN gặt ở 24 giờ ổn định, giữ nguyên được hiệu giá 10^4 - $10^5/5\mu\text{l}$ với vắc xin đặc và 10^3 khi pha loãng 10^{-1} . ARN ở 48 giờ giữ nguyên được hiệu giá 10^7 với vắc xin đặc và 10^5 - 10^6 khi pha loãng 10^{-1} , hiệu giá giảm khoảng 1 Log10 ở độ pha loãng 10^{-2} . ARN ở 72 giờ giữ nguyên được hiệu giá 10^7 - 10^8 với vắc xin đặc và 10^6 - 10^7 khi pha loãng 10^{-1} , hiệu giá cũng giảm khoảng 1Log10 ở độ pha loãng 10^{-2} . Sau 15 tháng, hiệu giá ARN của cả 3 phương pháp tách chiết vẫn không bị giảm ở 24 giờ nhưng có giảm đi khoảng 1Log10 ở 48 và 72 giờ và sự giảm hiệu giá rõ ràng hơn ở những mẫu $>10^6$. Hiệu giá ARN sau khi giữ tiếp ở -30°C vẫn ổn định ở 24 giờ nhưng giảm tiếp khoảng 1Log10, tức là khoảng 2Log10 so với hiệu giá tại thời điểm ban đầu và hiệu giá cũng giảm rõ hơn ở mẫu $>10^6$. Nguyên nhân của hiện tượng giảm hiệu giá của những mẫu có ARN $>10^6$ có thể do trong một thể tích dung dịch đệm bảo quản, lượng ARN quá nhiều sẽ bị biến tính nhanh hơn hoặc khi đông-tan băng nhiều chu kỳ thì dung dịch có nhiều ARN bị biến tính nhiều hơn, hoặc do lượng ARN nằm ngoài khoảng tuyến tính của gam chuẩn làm giảm độ tin cậy của kết quả. Đây là một cơ sở nữa để lựa chọn gặt ARN sau 24 giờ cấy vì lượng ARN khoảng 10^3 - $10^4/5\mu\text{l}$, nằm giữa khoảng tuyến tính nên đảm bảo được độ tin cậy

của kết quả và hạn chế ảnh hưởng của sai số ngẫu nhiên và sai số hệ thống nếu có. Với số liệu đánh giá tính bền vững của ARN theo điều kiện thời gian thực và nhiệt độ thực, kết quả này chứng minh rằng có thể gặt ARN bằng TpLR và giữ được ARN ổn định ở -80°C ít nhất sau 12 tháng, tương tự như khi tách chiết sử dụng sinh phẩm thương mại Qiagen.

4.3.1.3. Bàn luận chung về phương pháp

Kỹ thuật PCR được Tiến sỹ Kary Mullis nghiên cứu và đã được nhận giải thưởng Nobel hóa học vì những ứng dụng to lớn của nó [165]. Tuy nhiên, phương pháp này cần hệ thống phát hiện sản phẩm PCR gồm nhiều bước, nhiều thiết bị và muối ethidium bromide hoặc SYBR để nhuộm sản phẩm ADN [47]. Ngoài ra, phương pháp cổ điển này có độ nhạy phát hiện sản phẩm thấp (ngưỡng tối thiểu khoảng 10^2 - 10^3 bản sao/5-10 μl khuôn mẫu), khả năng tự động hóa không hoàn toàn, sản phẩm được phân tích chủ yếu dựa vào kích thước số cặp ba-zơ nitơ, có thể có nhận định nhầm, không định lượng được chính xác số bản sao acid nucleic và phụ thuộc vào số lượng chu kỳ khuếch đại của phản ứng [47].

Tác giả Higuchi và cộng sự đã phân tích tính động học của PCR bằng một hệ thống phát hiện những sản phẩm PCR khi chúng tích tụ lại. Hệ thống "real-time" này cho ta một đường cong khuếch đại tương tự đường cong phát triển vi khuẩn gồm 3 giai đoạn: **tích lũy** đến khi dấu hiệu của sản phẩm PCR lớn hơn dấu hiệu nền của hệ thống, **lũy thừa**, và **bình nguyên**. Do vậy, một bức tranh hoàn thiện của cả quá trình PCR được thể hiện rõ hơn chứ không phải chỉ là một sản phẩm cuối cùng của phản ứng sau một số chu kỳ nhất định [22]. Với real-time PCR, kết quả được phân tích nhanh hơn, ngay trong lúc phản ứng đang chạy nên không bị nhiễm sản phẩm từ ngoài vào nhưng lại được kiểm soát tốt hơn, tự động hoàn toàn. Gam ARN chuẩn ngoài được sử

dụng để định lượng một cách chính xác [22]. Độ nhạy thông thường của real-time RT-PCR TaqMan là 10^1 - 10^5 bản sao acid nucleic trong 5-10 μ l khuôn mẫu. Với TaqMan trong nghiên cứu này, sau bước phiên mã ngược, đầu dò đánh dấu FAM-BHQ gắn vào khu vực ADN giữa 2 đoạn mồi, bị phân cắt khỏi chuỗi ADN khi ADN polymerase hoạt động nên làm chất huỳnh quang ở dạng tự do và phát sáng, vì vậy có thể định lượng kết quả bằng đo tín hiệu huỳnh quang sau mỗi chu kỳ. TaqMan là phổ biến nhất trong các kỹ thuật real-time PCR do có độ tích lũy tín hiệu huỳnh quang lớn nhất [22], [166]. Như vậy, nếu áp dụng phương pháp định lượng trực tiếp, real-time RT-PCR vừa có vai trò chẩn đoán, tiên lượng và vừa có vai trò đánh giá đáp ứng sinh học.

Real-time PCR đã được áp dụng để phát hiện ADN và ARN trong các mẫu bệnh phẩm của người cũng như các mẫu vắc xin nên việc thực hiện rất thuận lợi và chỉ cần các thiết bị cơ bản của một phòng thí nghiệm sinh học phân tử và cán bộ thực hiện được đào tạo [5-8],[22],[32],[34-36],[121],[124],[155]. Trong nghiên cứu, nhiều tác giả đã ứng dụng real-time PCR/RT-PCR để xây dựng phương pháp xác định tính nhạy cảm của virus với thuốc kháng virus, xác định công hiệu vắc xin trên mô hình động vật hoặc tế bào [5-8]. Hiện tại, xác định công hiệu vắc xin bằng real-time RT-PCR đang dần được đưa vào khuyến cáo của WHO với sởi và Rota [6],[118],[167]. Nghiên cứu này là sự phát triển tiếp theo của những mô hình đã được thử nghiệm trước đó và phù hợp với xu thế phát triển chung.

Một số tác giả nghiên cứu về công hiệu sởi sử dụng vắc xin sống giảm độc lực phối hợp (sởi, quai bị, và rubella) nên phải loại bỏ hoàn toàn virus rubella và quai bị. Mặc dù bước loại bỏ này có độ tin cậy cao nhưng vẫn cần thẩm định [6],[7]. Trong nghiên cứu này, vắc xin sởi của POLYVAC là loại đơn, sống giảm độc lực nên không cần bước loại bỏ các virus khác.

Phương pháp xác định công hiệu vắc xin sởi sống, giảm độc lực bằng real-time RT-PCR được xây dựng trên cơ sở mô hình nghiên cứu sử dụng HSV, đã chứng minh được mối tương quan giữa số bản sao ADN bên trong tế bào gây nhiễm và PFU [5]. So với phương pháp tạo đám hoại tử, 2 phương pháp có cùng bản chất do đều đo lường các hạt virus có hoạt tính (hạt virus có khả năng gây nhiễm tế bào), đều dựa trên thử nghiệm nuôi cấy tế bào, đều cấy chuyển 1 lần trên nuôi cấy tế bào. Tuy nhiên, tín hiệu phát hiện của 2 phương pháp khác nhau. Phương pháp tạo đám hoại tử đo lường số hạt virus có hoạt tính ở mức độ tế bào (thông thường mỗi hạt virus tạo một đám hoại tử) nên thời gian đọc kết quả lâu hơn (9 ngày). Phương pháp mới cũng đo lường số hạt virus có hoạt tính nhưng ở mức độ phân tử qua định lượng ARN bên trong tế bào gây nhiễm (ARN của những hạt virus đã xâm nhập vào tế bào), không đo lường ARN ở dịch nổi, là ARN bên ngoài tế bào gây nhiễm (ARN của phần tử không hoàn chỉnh hoặc hạt virus có thể không có hoạt tính) nên thời gian đọc kết quả chỉ mất 24 giờ. Thêm vào đó, virus sởi không có dạng nhiễm chậm như một số virus khác như họ *Herpesviridae* nên không cần phải khuếch đại polymerase mới minh chứng là hạt virus đang nhân lên.

Phương pháp này tránh được nhược điểm của các phương pháp sử dụng huyết thanh là đáp ứng kháng thể bị giảm đi ở các đối tượng là trẻ em, người có tuổi, suy dinh dưỡng, suy nhược, những người suy giảm hoặc ức chế miễn dịch sau ghép, hóa trị liệu, nhiễm virus gây suy giảm miễn dịch, những nhiễm trùng bề mặt, nhiễm trùng hô hấp, nhiễm trùng đã thoái lui và có kháng thể thụ động như truyền máu hoặc nhiễm trùng bẩm sinh làm kháng thể từ mẹ truyền sang con. Ngoài ra, bản thân xét nghiệm cũng có thể gây ra những kết quả âm tính giả (ví dụ cạnh tranh của IgG với IgM) [2].

Sau cùng, hiện tại chúng ta có ELISA để kiểm soát sản phẩm trong quá trình sản xuất (*in process control*) đối với vắc xin chết nhưng chưa có kỹ

thuật tương ứng để kiểm soát sản phẩm trong quá trình sản xuất đối với vắc xin sống nên có thể áp dụng kỹ thuật mới cho mục đích này. Ngoài ra, có thể nghiên cứu áp dụng kỹ thuật này cho những vắc xin virus sống giảm độc lực bài xuất virus ra khỏi tế bào rất thấp và cần rất nhiều thời gian như virus varicella-zoster (VZV) và cytomegalovirus (CMV) hoặc nghiên cứu để áp dụng cho những vắc xin virus không tạo CPE.

4.3.2. Công hiệu vắc xin sợi thành phẩm

Bảng 3.13 là kết quả hiệu giá PFU, hiệu giá ARN của 10 loạt vắc xin thành phẩm khi cấy vắc xin ở 3 nồng độ là đặc, pha loãng 10^{-1} và 10^{-2} , và hiệu giá ARN định lượng trực tiếp từ vắc xin thành phẩm mà không qua cấy virus trên tế bào Vero. Kết quả cho thấy hiệu giá PFU tương quan với hiệu giá ARN cấy vắc xin đặc ($R=0,67$), tương quan chặt chẽ với vắc xin pha loãng 10^{-1} ($R=0,90$), và vắc xin pha loãng 10^{-2} ($R=0,88$). Hiệu giá PFU tương quan chặt chẽ với hiệu giá ARN chung ($R=0,80$). Hiệu giá PFU không tương quan với hiệu giá ARN tách chiết trực tiếp từ vắc xin thành phẩm ($R < 0,4$), lý do có thể do quá trình sản xuất vắc xin là từ dịch nổi nuôi cấy tế bào. Như vậy hai phương pháp xác định công hiệu vắc xin sợi bằng PFU và ARN bên trong tế bào gây nhiễm tương quan chặt chẽ với nhau theo thang phân loại R gồm 4 cấp độ và hệ số tương quan chặt chẽ nhất ở nồng độ pha loãng vắc xin 10^{-1} . Điều này có thể do khi cấy vắc xin đặc, một số thành phần có trong vắc xin có thể ức chế quá trình nhân lên của virus hoặc do lượng virus quá nhiều có thể tạo ra một tỷ lệ thấp hơn những phần tử có tính gây nhiễm. Kết quả này cũng trùng khớp với kết quả thăm dò trên vắc xin mẫu chuẩn M-0107 và một lần nữa khẳng định có thể xác định hiệu giá vắc xin ở 2 nồng độ cấy là đặc và pha loãng 10^{-1} nhưng độ pha loãng vắc xin tối ưu là 10^{-1} .

Hiệu giá ARN của 10 loạt vắc xin đều rất ổn định, dao động trong khoảng $[2,36 \times 10^7 - 6,00 \times 10^7]$ trong khi hiệu giá PFU dao động trong khoảng

[$8,75 \times 10^3 - 1,43 \times 10^4$]. Hiệu giá ARN trung bình cao hơn hiệu giá PFU $3,1 \times 10^3$ lần và hiệu giá ARN thành phẩm trung bình cao hơn hiệu giá PFU $1,4 \times 10^2$ lần.

Kết quả này khẳng định tính ổn định hiệu giá ARN của vắc xin sởi sản xuất tại Việt Nam. Hay nói cách khác, có thể xác định hiệu giá vắc xin sởi ở mức độ phân tử rất sớm trong vòng 24 giờ, hiệu giá này rất ổn định và cao hơn hiệu giá kiểu hình khoảng 3000 lần.

Hình 3.22 cho thấy kết quả theo dõi xu hướng hiệu giá PFU (a) và ARN (b) của 10 loạt vắc xin thành phẩm qua 4 năm sản xuất liên tục từ 2010 đến 2013. Sự khác biệt hiệu giá PFU giữa các loạt là $0,21 \text{Log}_{10}$ và các kết quả luôn ổn định trong khoảng $\pm 2SD$, đáp ứng được yêu cầu của Dược điển Châu Âu và WHO cho các thử nghiệm sinh học làm trên nuôi cấy tế bào (tương ứng $0,3 \text{Log}_{10}$ và $0,5 \text{Log}_{10}$ và khoảng $\pm 3SD$) [156],[168-170]. Biểu đồ theo dõi xu hướng hiệu giá ARN và PFU rất tương đồng với nhau. Sự khác biệt hiệu giá ARN là $0,41 \text{Log}_{10}$ và luôn thuộc khoảng $\pm 2SD$. Hiệu giá ARN khác biệt giữa các loạt nhiều hơn PFU có thể vì khả năng đo lường ARN nhạy hơn đám hoại tử nhưng cũng luôn $< 0,5 \text{Log}_{10}$. Với một thử nghiệm sinh học, kết quả theo dõi xu hướng nằm trong khoảng $\pm 2SD$ cho phép khẳng định ở mức độ phân tử tính ổn định cao của vắc xin sởi sản xuất tại Việt Nam, giai đoạn 2010-2013 [171-173].

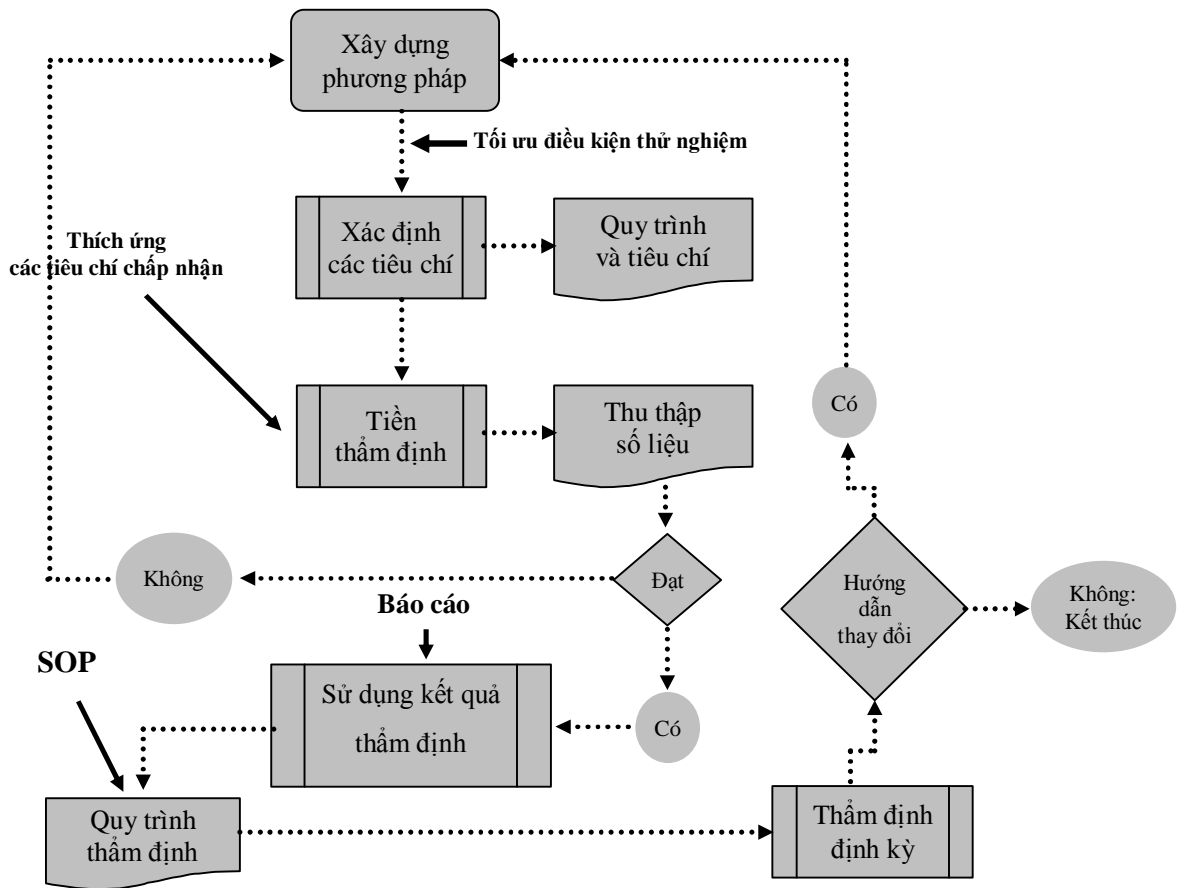
Sản xuất vắc xin sởi là từ dịch nổi của nuôi cấy chủng virus trên nuôi cấy tế bào và ARN tách chiết trực tiếp từ vắc xin thành phẩm không tương quan với hiệu giá PFU cho thấy kết quả này có tính logic do PFU đo lường hạt virus có hoạt tính gây nhiễm nên không tương quan với ARN trong dịch nổi (ARN ngoài tế bào), là ARN của các phần tử không hoàn chỉnh và của hạt virus không có tính gây nhiễm [1],[99]. Kết quả này trái ngược hẳn với hệ số tương quan giữa PFU và ARN nằm bên trong tế bào gây nhiễm. Mặc dù vậy,

rõ ràng lượng ARN được tách chiết từ vắc xin thành phẩm nằm trong khoảng tuyến tính của gam chuẩn, việc định lượng cực kỳ dễ dàng, đơn giản. Các thử nghiệm sinh học đôi khi không cần phải tương quan với nhau mà điểm rất quan trọng là phải ổn định. Số liệu ban đầu của nghiên cứu này cho thấy, hiệu giá ARN của vắc xin thành phẩm rất ổn định, luôn nằm trong khoảng tuyến tính, chính xác trong khoảng $\pm 2SD$ và cao hơn hiệu giá PFU khoảng $1,4 \times 10^2$ lần nên có thể đây cũng là cơ sở để xây dựng phương pháp kiểm định hiệu giá ARN trực tiếp từ vắc xin thành phẩm [156].

4.3.3. Thẩm định phương pháp

Theo khuyến cáo của WHO, quá trình thẩm định thực sự phức tạp và chỉ được thực hiện sau khi phương pháp đã được xây dựng và tối ưu [156]. Sau khi đã tối ưu hóa điều kiện phản ứng, cần xác định các tiêu chí chấp nhận, viết quy trình thực hành chuẩn (Standard Operating Procedure - SOP) cho thẩm định và tiến hành bước tiền thẩm định (pre-validation) với ít nhất 6 mẫu thử nghiệm. Sau khi kết quả thẩm định đạt theo các tiêu chí đặt ra, có thể áp dụng quy trình như các thử nghiệm thường quy. Nếu kết quả thẩm định chưa đạt thì phải xây dựng và tối ưu hóa lại điều kiện phản ứng cũng như các tiêu chí chấp nhận của nghiên cứu thẩm định. Như vậy nghiên cứu này tuân thủ đúng quá trình thẩm định và đang ở giai đoạn tiền thẩm định (Hình 4.4).

Nghiên cứu này xây dựng một phương pháp mới nên phải tiến hành thẩm định hoàn toàn, không phải thẩm định bán phần hay xác nhận phương pháp. Riêng chất lượng cặp môi và đầu dò được tiến hành xác nhận phương pháp theo kết quả thẩm định phương pháp của phòng thí nghiệm virus sởi, CDC Hoa Kỳ [121]. Các tiêu chí thẩm định bao gồm *độ đúng*, *độ chính xác*, *ngưỡng phát hiện* và *ngưỡng định lượng*, *độ tuyến tính*, *độ đặc hiệu* và *tính chọn lọc*, và *độ mạnh* [156].



Hình 4.4. Quá trình thẩm định một phương pháp sinh học.

Nguồn: Phumiamorn, NIH, Thái Lan

4.3.3.1. Độ đúng của phương pháp

Độ đúng của phương pháp (accuracy) được đánh giá thông qua 6 lần thử nghiệm xác định hiệu giá PFU. Kết quả đều nằm trong một khoảng hẹp là $[1,00 \times 10^4 - 1,15 \times 10^4]$, tức là luôn luôn đạt 4,00-4,06Log10/0,5ml. Tính theo đơn vị Log10, hiệu giá vắc xin của cả 6 lần thử nghiệm đều không khác biệt ($CV=8,2\% \lll 330\% = 0,5\text{Log}10$). Tuy nhiên, hiệu giá này thấp hơn hiệu giá của nhà sản xuất là 4,2-4,7Log10/0,5ml.

Mặc dù vắc xin đầu tiên được Edward Jenner sử dụng năm 1796 nhưng mãi đến đầu những năm 1960 mới có những nghiên cứu về thuốc kháng virus

[1],[38],[174]. Thuốc kháng virus có các cơ chế hoạt động khác nhau nhưng một trong số các cách phân loại là dựa vào tác dụng của thuốc theo chu kỳ nhân lên của virus [38]. Ở bước gắn màng tế bào vật chủ, ta có các thuốc cạnh tranh với đồng thụ thể như với HIV là thuốc cạnh tranh với CXCR4 hoặc CCR5 - các đồng thụ thể của phân tử CD4. Các thuốc T20 hoặc T1249 ức chế giai đoạn hòa màng của HIV. Trước đây, amantadine hoặc rimantadine được chỉ định để ức chế giai đoạn cởi bỏ capsid của virus cúm hay arildone có tác dụng tương tự với các picornavirus. Ở giai đoạn nhân lên của virus ta có ACV ức chế thymidine kinase và PFA ức chế ADN polymerase của HSV, NRTI (Nucleoside reverse transcriptase inhibitor) ức chế enzyme phiên mã ngược và nelfinavir ức chế protease của HIV. Với giai đoạn lắp ráp, trưởng thành và giải phóng hạt virus, ta có oseltamivir hay zanamivir ức chế sự giải phóng hạt virus cúm qua tác động vào neuramidase..... Tuy nhiên, interferon có tác dụng tổng hợp ở tất cả các giai đoạn của chu kỳ nhân lên của virus [38],[175]. Đây chính là một trong số các cơ sở có thể giải thích hiệu giá PFU của đề tài thấp hơn của nhà sản xuất mặc dù sự khác biệt tối đa giữa các lần thử nghiệm chỉ là $0,41\text{Log}_{10} < 0,5\text{Log}_{10}$. Nhà sản xuất sử dụng dòng tế bào Vero sản xuất không bài xuất interferon và sau khi cấy thì không sử dụng FCS, là chất cũng cản trở quá trình nhân lên của virus và được chứng minh rất rõ ràng trong một nghiên cứu của Ấn Độ về công hiệu của OPV [176]. Trong khi đó, mặc dù đều đọc kết quả sau 9 ngày như quy trình của nhà sản xuất song tế bào của đề tài này là dòng Vero sử dụng trong nghiên cứu, vẫn bài xuất interferon và nhu cầu FCS là 3%. Ngoài ra, một số yếu tố khác cũng có thể làm kết quả hiệu giá PFU của nghiên cứu thấp hơn của nhà sản xuất là điều kiện phản ứng (tám nhựa 24 giếng thay vì 6 giếng, môi trường phủ...) hoặc do sai số hệ thống giữa các phòng thí nghiệm [177]. Đây là một vấn đề đặt ra giữa cơ sở kiểm

định và nhà sản xuất để làm hài hòa thử nghiệm kiểm định công hiệu vắc xin sởi sản xuất tại Việt Nam.

Xác định công hiệu vắc xin bằng thử nghiệm định lượng trực tiếp phát hiện ARN nên trong trường hợp này không áp dụng xác định tỷ lệ thu hồi ARN (spike recovery study) do ARN rất dễ bị phá hủy trong các môi trường thông thường [158],[178]. Tuy nhiên, có thể coi chính TpLR là dung môi để nghiên cứu về thu hồi ARN khi so sánh hiệu giá ARN tách chiết bằng TpLR và 2 phương pháp sử dụng bộ sinh phẩm thương mại Qiagen ở nồng độ đặc và 10^{-1} sau 17 tháng bảo quản ở -80°C và -30°C , tỷ lệ thu hồi theo đơn vị Log10 dao động trong khoảng [85%-132%] với giá trị trung vị là 100%. Kết quả này cho thấy độ đúng của tách chiết ARN bằng TpLR so với bộ sinh phẩm tách chiết ARN thương mại.

Bảng 3.12 cho thấy sự tương quan chặt chẽ và không khác biệt số lượng tuyệt đối hiệu giá ARN của vắc xin mẫu chuẩn M-0107 khi thích nghi thử nghiệm từ tấm nhựa 24 giếng sang tấm nhựa 96 giếng. Kết quả này chứng minh rằng việc thích ứng này đảm bảo độ đúng của phương pháp. Việc thích ứng từ tấm nhựa 24 giếng sang 96 giếng không những tiết kiệm tới 75% sinh phẩm mà còn làm thuận lợi hơn quá trình thực hiện thử nghiệm và làm tăng năng suất công việc phòng thí nghiệm nhiều lần (sử dụng pipette đa kênh pha loãng, cấy, phủ, rửa hàng loạt trên tấm nhựa 96 giếng và gặt ARN rồi chuyển trực tiếp khuôn mẫu sang tấm nhựa phản ứng real-time 96 giếng). Ngoài ra, đây cũng là cơ sở khoa học để so sánh hiệu giá ARN và TCID_{50} - một thử nghiệm thường được áp dụng tại các phòng kiểm định công hiệu vắc xin sởi [100].

Do đây là lần đầu tiên hiệu giá vắc xin sởi được xác định bằng định lượng ARN bên trong tế bào gây nhiễm, nhà sản xuất chưa thực hiện thử

nghiệm này nên chúng tôi không thể so sánh độ đúng hiệu giá ARN của nghiên cứu với hiệu giá ARN của nhà sản xuất. Tác giả Ammour có xác định hiệu giá ARN của vắc xin sởi nhưng ở dịch nổi nuôi cấy tế bào nên chúng tôi cũng không thể đánh giá độ đúng của nghiên cứu này với kết quả nghiên cứu đó [7]. Chứng dương ARN trong nghiên cứu của tác giả Schalk còn 7% khuôn mẫu ADN, rõ ràng có làm ảnh hưởng kết quả định lượng [6].

4.3.3.2. Độ chính xác của phương pháp

Độ chính xác (precision) của thử nghiệm mới được đánh giá ở một số khía cạnh. Trong nghiên cứu này, CV của độ lặp lại trung bình trong cùng một lần làm phản ứng (repeatability) của 7 gam chuẩn là 0,8% với giới hạn dưới và trên tương ứng là 0,4% và 1,3% (Bảng 3.14). Giá trị trung bình thấp hơn nhiều so với con số cho phép của một thử nghiệm sử dụng enzyme là 10% (theo khuyến cáo của Phòng thí nghiệm kiểm định quốc gia, NIH, Thái Lan) và một số công bố khác [5],[32],[156]. Đây là một trong số các số liệu minh chứng về độ chính xác của nghiên cứu này.

Độ lặp lại trung gian (intermediate precision) trung bình của 7 lần thử nghiệm cho gam chuẩn 10^2 - 10^6 là 3,3% với giới hạn dưới và trên tương ứng là 2,3 và 4,6% (Bảng 3.15). Hệ số biến thiên của độ lặp lại trung gian cao hơn so với độ lặp lại trong cùng một lần thử nghiệm là hợp lý do những thay đổi điều kiện phản ứng giữa các lần thử nghiệm khác nhau nhiều hơn so với cùng một lần thử nghiệm. Tuy nhiên, con số 3,3% cũng thấp hơn nhiều so với con số cho phép của một thử nghiệm sử dụng enzyme là 10% và thấp hơn con số 5,0% của hai nghiên cứu lớn về độ lặp lại trung gian của các phòng thí nghiệm đánh giá công hiệu vắc xin sởi [5],[32],[156],[179],[180]. Đây cũng là một trong số các số liệu minh chứng về độ chính xác của nghiên cứu này.

Hiện kỹ thuật này chưa được chuyển giao cho phòng thí nghiệm khác nên không áp dụng tính độ lặp lại giữa các phòng thí nghiệm (reproducibility).

4.3.3.3. Độ đặc hiệu và tính chọn lọc của phương pháp

Theo WHO, độ đặc hiệu của một phương pháp (specificity) là khả năng đo lường chất phân tích (cụ thể trường hợp này là ARN) mà không đo lường các thành phần khác, hay nói cách khác đó là khả năng của phương pháp chỉ phát hiện duy nhất ARN [156]. Trong nghiên cứu này, mỗi phản ứng đều có hai chứng âm tính, trong đó một chứng âm có khuôn mẫu là nước. Các kết quả âm tính của chứng nước này cho thấy phương pháp có độ đặc hiệu cao.

Cũng theo WHO, tính chọn lọc của phương pháp (selectivity) là khả năng một phương pháp xác định được chất phân tích (ARN) trong một phức hợp phản ứng mà không bị ảnh hưởng bởi bất cứ một thành phần nào của phức hợp phản ứng đó [156]. Chứng âm tính thứ hai của nghiên cứu này là chứng âm sử dụng khuôn mẫu là chính hỗn dịch phản ứng. Đồng thời với mỗi loạt vắc xin đều có chứng tế bào, là chứng không cấy virus. Kết quả âm tính của các chứng âm này và chứng tế bào cho thấy phương pháp này có tính chọn lọc cao.

4.3.3.4. Độ tuyến tính của phương pháp

Độ tuyến tính (linearity) của gam chuẩn trong thử nghiệm định lượng trực tiếp và phương trình đường thẳng tuyến tính $y = ax + b$ được xác định tự động bởi hệ thống máy real-time với y là ký hiệu hàm số, hệ số a là *độ dốc (slope)* của phản ứng, hằng số b là giá trị *y-intercept*. Hệ số tương quan R của gam chuẩn ngoài cũng được xác định tự động và luôn $>0,97$, điều này cũng khẳng định độ tin cậy của phản ứng (Hình 3.24).

Mức độ tương quan của hiệu giá PFU và ARN được đánh giá qua hệ số tương quan. Hình 3.21 cho thấy đường thẳng tuyến tính $y = ax + b$ của hai phương pháp là $y = 6,35x - 5,1 \times 10^4$ và $R = 0,80$. Trong nghiên cứu này, chúng tôi vận dụng thang phân loại 4 mức độ để phân tích hệ số tương quan, nghĩa là 0-0,25 là không tương quan; 0,25-0,5 là tương quan rất lỏng lẻo; 0,5-0,75 là có tương quan; và 0,75-1,0 là có tương quan chặt chẽ. Giá trị của $R > 0$ là tương quan thuận và $R < 0$ là tương quan nghịch [181],[182]. Rõ ràng hai phương pháp tương quan chặt chẽ với nhau ($R = 0,8 > 0,75$) và là tương quan thuận. Cụ thể, R của độ pha loãng 10^{-1} là cao nhất còn đặc là thấp nhất. Khi pha loãng vắc xin 10^{-1} thì có thể hiện tượng ức chế sự nhân lên của virus bởi các chất ức chế có trong vắc xin không còn nữa. Hệ số tương quan của độ pha loãng 10^{-2} và 10^{-3} thấp hơn 10^{-1} có thể do ở hai độ pha loãng này, hiệu giá ARN còn thấp sau 24 giờ cấy, mới chỉ bắt đầu vào giai đoạn tăng gia tốc mà thôi (Hình 3.20).

4.3.3.5. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp

Giới hạn phát hiện (limit of detection - LOD) và giới hạn định lượng (limit of quantification - LOQ) được xác định rõ ràng trong nghiên cứu này do theo kết quả thẩm định của CDC Hoa Kỳ trong nghiên cứu thẩm định các cặp môi và đầu dò đặc hiệu, những đường cong xuất hiện sau chu kỳ 40 được coi là âm tính và dựa vào gam chuẩn ngoài của phản ứng là 10^1 - 10^6 bản sao/5 μ l khuôn mẫu [121]. Hình 3.13 cho thấy, phản ứng có thể phát hiện ARN trong khoảng 10^1 - 10^{12} bản sao/5 μ l khuôn mẫu. Tuy nhiên, giới hạn định lượng nằm trong khoảng tuyến tính của gam chuẩn ngoài là 10^1 - 10^6 bản sao/5 μ l khuôn mẫu. Những giá trị nằm ngoài khoảng tuyến tính này có thể không chính xác.

4.3.3.6. Độ mạnh của phương pháp

Do đây là nghiên cứu đánh giá phương pháp mới nên mọi điều kiện phản ứng đều được chú ý làm ổn định đến mức có thể [156]. Chính vì vậy, nghiên cứu này không đánh giá độ mạnh của phương pháp theo khía cạnh làm *thay đổi có chủ ý* (robustness). Một số khía cạnh không thể thay đổi được như thời gian ủ, chu kỳ nhiệt, loạt huyết thanh, nguồn gốc sinh phẩm, loại tế bào, nguồn gốc tế bào, tuổi tế bào khi tách chiết.... Chính vì vậy, để đánh giá độ mạnh của phương pháp, đề tài ước tính độ lặp lại của thử nghiệm khi có những *thay đổi không thể tránh khỏi* (ruggedness) [156]. Trong số những thay đổi loại này, đa số các điều kiện phản ứng đã được cố định để tối ưu hóa quy trình thử nghiệm như đều được thực hiện trong cùng một phòng thí nghiệm, sử dụng cùng một thiết bị, cùng một người làm, cùng một loại sinh phẩm, thậm chí cùng một loạt sinh phẩm nên đề tài đánh giá độ mạnh qua CV ở các ngày làm thử nghiệm khác nhau. Độ lặp lại trung gian một lần nữa cũng được sử dụng để đánh giá độ mạnh của phương pháp.

Bảng 3.16 là kết quả đo hiệu giá ARN của 10 loạt vắc xin thành phẩm với 3 độ pha loãng là đặc, 10^{-1} và 10^{-2} , ở hai ngày làm thử nghiệm khác nhau (cách nhau 5 tuần và ARN được bảo quản ở -80°C). Kết quả cho thấy Ct dao động từ 0-1,08 chu kỳ và giá trị trung vị là 0,19 chu kỳ, một khoảng rất nhỏ với cỡ mẫu $n=60$. Giá trị CV trung bình của 2 ngày làm thử nghiệm ở cả 3 nồng độ cấy vắc xin là 2,7% với giới hạn dưới là 2,3% và giới hạn trên là 3,5%, nhỏ hơn thực sự đáng kể so với con số cho phép 10% của các thử nghiệm sinh học mà nhiều nghiên cứu sử dụng [5],[32],[156]. Ngoài ra, chính số liệu về độ lặp lại trung gian là 3,3% cũng minh chứng được độ mạnh của phương pháp này.

4.4. Bàn luận về các ưu điểm của đề tài

4.4.1. Chất lượng của sinh phẩm

Sinh phẩm được sử dụng trong nghiên cứu này đã được thương mại hóa. Sinh phẩm được đặt mua từ những nhà cung cấp có uy tín trên thế giới, với tách chiết ARN, tinh sạch ADN và plasmid là Qiagen, với khuếch đại gen là Qiagen cho RT-PCR cổ điển và Invitrogen cho real-time, với PCR bán tổ là hỗn hợp có sẵn enzyme Tap Gold Polymerase, với RFLP và phiên mã là Promega. Vật liệu tiêu hao như đầu côn lọc, tấm nhựa real-time là AB gene, tấm nhựa nuôi tế bào là Nunc.... đều đạt tiêu chuẩn Quốc tế. Như vậy, tất cả các sinh phẩm và hóa chất sử dụng đều được chuẩn hóa, đã được thẩm định và xác nhận tại nhiều phòng thí nghiệm cũng như tại Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương, hạn chế tối đa những sai số có thể do sinh phẩm và vật liệu tiêu hao gây ra.

4.4.2. Trang thiết bị máy móc

Chúng tôi sử dụng những trang thiết bị máy móc (bao gồm cả các dụng cụ nhỏ) của những nhà cung cấp có uy tín như máy ly tâm tốc độ cao của Hettich, máy khuếch đại gen AB Applied Biosystems 7500 FAST. Tất cả các thiết bị đều mới (dự án SISEA cung cấp từ 2009-2010) và đều trong thời gian chạy hiệu chuẩn hoặc được chạy hiệu chuẩn khi hết hạn. Điều này hạn chế những sai số hệ thống có thể có do thiết bị gây ra, đảm bảo đến mức nhiều nhất có thể độ chính xác của thử nghiệm.

4.4.3. Quy trình thực hiện thử nghiệm

Toàn bộ quy trình thực hiện trong đề tài này là một phần công việc của dự án SISEA, một dự án có sự tham gia của nhiều đơn vị bao gồm Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương, Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh, Viện Pasteur Nha Trang, Viện Pasteur Campuchia, Viện Pasteur Lào, Viện Pasteur

Thượng Hải và đều được thẩm định và xác nhận của từng viện khu vực. Các quy trình chẩn đoán cúm do Viện Pasteur Paris, Cộng hòa Pháp xây dựng, được thẩm định và sử dụng ngay tại Viện Pasteur Paris, được xác nhận và sử dụng bởi tất cả các Viện thành viên [61],[85],[123],[150]. Những quy trình này cũng đã được chuẩn hóa và được công bố trên các tạp chí khoa học uy tín quốc tế [123],[150]. Một ưu điểm khác của các quy trình real-time chẩn đoán và xác định phân tít cúm A/H1N1pdm09 và A/H5N1 là các phản ứng đơn mỗi đều có cùng chu kỳ nhiệt nên có thể xác định cúm và phân tít cúm A trong cùng một lần thử nghiệm, trên cùng một tấm nhựa phản ứng, vẫn đảm bảo độ nhạy mà lại thuận tiện và rất tiết kiệm thời gian. Ngoài ra, một số môi và đầu dò sử dụng trong chẩn đoán cúm được thiết kế bằng kỹ thuật thoái hóa môi để phát hiện tối đa các chủng cúm do virus này có hiện tượng thay đổi kháng nguyên từ từ mà nguyên nhân của nó là do hiện tượng đột biến [47]. Riêng với sởi, có rất nhiều quy trình trên thế giới phát hiện khu vực ổn định nhất gen N và đều công bố độ nhạy và độ đặc hiệu rất cao. Phòng thí nghiệm virus sởi của CDC tại Atlanta, Hoa Kỳ đã tiến hành một nghiên cứu thẩm định và xác nhận đồng thời độ nhạy và độ đặc hiệu của tất cả các cặp môi và đầu dò đã được công bố trên toàn thế giới để tìm ra cặp môi và đầu dò tốt nhất [121]. Cặp môi và đầu dò của nghiên cứu này được lựa chọn theo kết quả nghiên cứu thẩm định và xác nhận của CDC Hoa Kỳ. Đây là một trong số các bằng chứng chứng minh tính tin cậy của tất cả các cặp môi và đầu dò đặc hiệu sử dụng trong nghiên cứu. Độ đặc hiệu của phản ứng được đánh giá bằng các nghiên cứu trước đây, độ nhạy của phản ứng được đánh giá qua gam chuẩn ngoài và các công bố của Viện Pasteur Paris và các Viện nghiên cứu thành viên tham gia dự án SISEA [61],[85],[121],[123],[150]. Năng lực của đội ngũ tham gia nghiên cứu một phần được khẳng định thông qua kết quả EQA NAT phát hiện đồng thời 18 tác nhân gây bệnh đường hô hấp, phòng thí nghiệm

thực hiện đề tài nghiên cứu này là đơn vị duy nhất đạt 100% kết quả đúng trong quá trình tham gia nghiên cứu (02 vòng EQA) (kết quả không được chỉ ra ở nghiên cứu này).

4.4.4. Phân tích kết quả và sự phù hợp với mục tiêu nghiên cứu

Nghiên cứu sinh trực tiếp thực hiện đề tài nghiên cứu và làm việc trong lĩnh vực sinh học phân tử, virus học và quản lý chất lượng phòng thí nghiệm y học, đặc biệt các kỹ thuật như RT-PCR, real-time PCR, tạo dòng, giải trình tự gen, phiên mã, nuôi cấy tế bào và phân lập virus... và đã ứng dụng kỹ thuật real-time không những để chẩn đoán mà còn xây dựng phương pháp xác định tính nhạy cảm của HSV với thuốc kháng virus, được đào tạo dài hạn về khía cạnh phân tích kết quả phòng thí nghiệm phục vụ lâm sàng trong chẩn đoán xác định, điều trị, và nghiên cứu. Nghiên cứu sinh có 17 năm học tập và làm việc với công tác kiểm định vắc xin, nghiên cứu về sởi, và chẩn đoán các virus đường hô hấp.

4.4.5. Chứng của phòng thí nghiệm và chứng quốc tế

Trong các thử nghiệm, chứng là một phần rất quan trọng, ở đây chứng âm được sử dụng là nước cất (Promega) và hỗn dịch phản ứng (cho vào đầu tiên và sau cùng) để kiểm soát hiện tượng nhiễm giữa chứng dương và các mẫu, đồng thời giảm tối đa hiện tượng dương tính giả, làm ảnh hưởng đến việc phân tích tỷ lệ dương tính sau cùng. Mỗi phản ứng đều có chứng dương do nhà sản xuất cung cấp hoặc được sản xuất theo quy trình chuẩn. Trong xây dựng phương pháp xác định công hiệu vắc xin sởi bằng real-time RT-PCR, mỗi thử nghiệm luôn kèm theo chứng tế bào (không gây nhiễm virus) và vắc xin mẫu chuẩn của nhà sản xuất.

4.4.6. Hoạt động độc lập

Khi có kết quả trong tay, bước phân tích kết quả mới được thực hiện dựa vào thông tin do khoa Dịch tễ cung cấp để đảm bảo tính vô tư trong nghiên cứu, kết quả xét nghiệm hoàn toàn không bị chi phối bởi những thông tin lâm sàng trước khi tiến hành xét nghiệm.

4.5. Bàn luận về những hạn chế của đề tài

4.5.1. Hạn chế trong sản xuất chứng dương ARN *in vitro*

Mặc dù có nhiều ưu điểm nhưng chứng dương của nghiên cứu này chỉ là những đoạn gen được phiên mã, không phải toàn bộ genome của virus nên chỉ áp dụng được cho nghiên cứu này mà có thể không áp dụng được cho những nghiên cứu khác nếu sử dụng cặp mồi nằm ngoài khu vực khuếch đại của đề tài này. Thêm vào đó, các đoạn ARN virus cúm có hiện tượng tích hợp lại, nếu điều này xảy ra thì phải sản xuất lại gam chuẩn ngoài đặc hiệu cho đoạn gen mới. Phiên mã trực tiếp cho hiệu giá cao hơn hẳn phiên mã cổ điển nhưng không giữ được chủng vi khuẩn chứa plasmid tái tổ hợp. Điều này sẽ không thích hợp nếu phòng thí nghiệm không có chủng virus.

4.5.2. Hạn chế trong xác định tỷ lệ nhiễm cúm

Nghiên cứu này chỉ có số liệu về virus mà không có số liệu về vi khuẩn nên hạn chế phân phân tích đồng nhiễm virus cúm và các vi khuẩn. Ngoài ra, do sàng lọc cúm đồng thời với nhiều tác nhân virus khác bằng RT-PCR đa mồi cổ điển nên độ nhạy của phản ứng có thể bị ảnh hưởng [2],[47]. Việc không định lượng được ARN khi làm RT-PCR đa mồi cổ điển đã làm hạn chế một phần phân tích nguyên nhân gây bệnh thực sự của các trường hợp đồng nhiễm [38]. Nghiên cứu này cũng không tiến hành xác định phân típ cúm mùa A nên hạn chế phân tích về sự lưu hành của phân típ cúm mùa A cũng như đồng nhiễm giữa các phân típ cúm A. Ngoài ra, các số liệu của nghiên cứu chỉ

là tỷ lệ dương tính trong xét nghiệm, không phải tỷ lệ nhiễm mới hay tỷ lệ hiện nhiễm và không được chuẩn hóa theo cơ cấu dân số của tỉnh Hải Dương.

4.5.3. Hạn chế trong nghiên cứu xác định công hiệu vắc xin sởi

Nghiên cứu này xác định hiệu giá vắc xin sởi trên tế bào Vero nhưng là tế bào Vero bài xuất interferon và có nhu cầu bắt buộc sử dụng FCS 3%.

KẾT LUẬN

1. Đề tài nghiên cứu đã sản xuất được 9 gam chuẩn dùng làm mẫu nội kiểm cho phản ứng RT-PCR cổ điển (cúm) hoặc định lượng trực tiếp (sởi). ARN sản xuất bằng phiên mã *in vitro* có sản lượng cao (10^{11} - 10^{19} bản sao/phản ứng 20 μ l), tinh khiết, và ổn định;

2. Tỷ lệ phát hiện ARN virus cúm mùa A (A/H3N2 và A/H1N1), cúm B, và cúm A/H1N1pdm09 ở bệnh nhân SARI tại Hải Dương giai đoạn 2009-2011 tương ứng là 1,9%, 6,4%, và 10,4%. Tỷ lệ đồng nhiễm virus của cúm là 11,3%, gồm đồng nhiễm một và hai tác nhân virus khác, có cả đồng nhiễm các virus cúm với nhau. Bệnh nhân nhiễm virus cúm mùa A và cúm B chủ yếu ở nhóm 1-5 tuổi, trong khi bệnh nhân nhiễm virus cúm A/H1N1pdm09 chủ yếu ở nhóm 6-18 tuổi. Dường như không có sự khác biệt về giới tính;

3. Đề tài nghiên cứu đã xây dựng và bước đầu thẩm định được kỹ thuật mới xác định công hiệu vắc xin sởi đơn bằng định lượng trực tiếp ARN bên trong tế bào gây nhiễm bằng cấy vắc xin pha loãng 10^{-1} và gặt ARN bằng TpLR sau 24 giờ cấy. Kỹ thuật này nhanh, chính xác, tự động hóa và tương quan chặt chẽ với hiệu giá PFU. Hiệu giá ARN vắc xin sởi ổn định theo thời gian, cao hơn hiệu giá PFU khoảng 3×10^3 lần. Ngoài ra, kỹ thuật này khắc phục được những điểm còn tồn tại của các phương pháp mới tương tự do các nước khác xây dựng.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

1. Nghiên cứu đã sản xuất hàng loạt chứng dương ARN với sản lượng cao (10^{11} - 10^{19} bản sao/phản ứng $20\mu\text{l}$) bằng cả hai kỹ thuật phiên mã cổ điển và trực tiếp;
2. Nghiên cứu đã đưa ra được tỷ lệ phát hiện cúm mùa và cúm A/H1N1pdm09 ở bệnh nhân viêm đường hô hấp cấp tính nặng, nhập viện tại Hải Dương 2009-2011;
3. Nghiên cứu đã xây dựng và tiền thẩm định phương pháp mới xác định nhanh công hiệu vắc xin sởi đơn, sống giảm độc lực bằng định lượng trực tiếp ARN bên trong tế bào gây nhiễm bằng real-time RT-PCR.

ĐỀ XUẤT

1. Tiếp tục sản xuất chứng dương ARN cho các tác nhân khác để kiểm soát chất lượng RT-PCR, sản xuất bộ mẫu chuẩn ARN cho IQC và EQA NAT, tiến tới sản xuất các bộ sinh phẩm chẩn đoán sinh học phân tử thương mại hóa. Sản xuất lại chứng dương cúm nếu các đoạn gen nghiên cứu tích hợp lại;

2. Tiếp tục tiến hành đánh giá thẩm định phương pháp xác định công hiệu vắc xin sởi sản xuất tại Việt Nam với cỡ mẫu lớn hơn. Tiếp tục nghiên cứu để áp dụng cho kiểm định công hiệu các vắc xin không tạo CPE hoặc tạo CPE chậm (*in process control* và vắc xin thành phẩm).

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH LIÊN QUAN ĐÃ CÔNG BỐ

1. Nguyễn Thị Thường, Henri Agut et al (2006). Rapid determination of antiviral drug susceptibility of herpes simplex virus types 1 and 2 by real-time PCR. *Antiviral Research*, 69, 152-157.
2. Nguyễn Thị Thường, Thẩm Chí Dũng, Trần Thị Mai Hưng, Nguyễn Trần Hiền, Taniguchi K (2010). Tác nhân vi rút gây hội chứng cúm trong cộng đồng tại xã Cẩm Sơn, huyện Cẩm Giàng, tỉnh Hải Dương, 2009-2010. *Tạp chí Y học dự phòng*, 10 (118), 67-74.
3. Nguyễn Trần Hiền, Nguyễn Thị Thường và cộng sự (2011). Epidemiology and viral etiologies of Severe Acute Respiratory Infections (SARI) in Northern Vietnam . *BMC Proc*, 5(S1) 118.
4. Lương Minh Tân, Phan Thị Ngà, Thẩm Chí Dũng, Nguyễn Thị Thường, Đỗ Phương Loan, Holly S., MacIntyre C.R (2011). Tác nhân vi sinh vật gây bệnh đường hô hấp ở nhân viên y tế và ở khẩu trang đã qua sử dụng ở các bệnh viện Hà Nội. *Tạp chí Y học và thông tin Dược (JMPI)*, 12, ISSN 0868-3891, 26-30.
5. Nguyễn Thị Thường, Trần Như Dương, Huỳnh Phương Liên và cộng sự (2012). Sản xuất chứng dương ARN *in vitro*. *Tạp chí Y học Dự phòng*, 5(132), 103-111.
6. Nguyễn Thị Thường, Nguyễn Đăng Hiền, Huỳnh Phương Liên, Phạm Thị Bích Ngọc, Trần Thị Hiền, Nguyễn Trần Hiền (2013). Xây dựng kỹ thuật xác định hiệu giá ARN vắc xin sởi bằng real-time RT-PCR. *Tạp chí Y học Dự phòng*, 11(147), 10-16.

7. Nguyễn Thị Thường và cộng sự (2014). *Nghiên cứu phát triển bộ mẫu chuẩn RNA cho kỹ thuật RT-PCR và thử nghiệm đánh giá hiệu quả sản phẩm trên thực địa*. Đề tài tuyển chọn cấp Bộ. Bộ Y tế. Nghiệm thu cấp Bộ tháng 04/2014.

8. Thâm Chí Dũng, Nguyễn Trần Hiền, Nguyễn Thị Thường et al (2014). Sensitivity and specificity of routine epidemiological influenza-like illness surveillance system at district level in Northern Vietnam. *Vietnamese Prev. Med. J.* 1e(1), 56-65.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Fields B.N (2000). *Virology*, fourth edition, Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia.
2. Lennette E.H., Lennette D.A., Lennette E.T (1995). *Diagnostic Procedures for Virals, Rickettsial and Chlamydial infection*, seventh edition. American Public Health Association, Washington.
3. Billeter A.M., Meulen V.T (1995). *Measles Virus*. Springer Produktions – Gesellschaft. Berlin. 1-300.
4. Centers for Disease Control and Prevention (2009). Global Measles Mortality, 2000-2008. *MMWR*, 58(47), 1321-1326.
5. Nguyễn Thị Thường, Henri Agut et al (2006). Rapid determination of antiviral drug susceptibility of herpes simplex virus types 1 and 2 by real-time PCR. *Antiviral Research*, 69, 152-157.
6. Schalk J.A., De Vries C.G., Jongen P.M (2005). Potency estimation of measles, mumps and rubella trivalent vaccines with quantitative PCR infectivity assay. *Biologicals*, 2(33), 71-79.
7. Ammour Y., Faizuloev E., Borisova T et al (2013). Quantification of measles, mumps and rubella viruses using real-time quantitative TaqMan-based RT-PCR assay. *J Virol Methods*, 187(1), 57-64.
8. Prabhu M., Siva Sankar M.S., Bhanuprakash V., Venkatesan G., Bora D.P., Yogisharadhya R., Balamurugan V (2012). Real time PCR: a rapid tool for potency estimation of live attenuated camelpox and buffalopox vaccines. *Biologicals*, 40(1), 92-95.
9. Guy B., Saville M., Lang J (2010). Development of Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Human vaccines*, 6(9), 696-705.

10. Bougeon M.L (2013). Measurement of immune response during vaccine trials. *Training course on immunology and vaccinology*. <http://www.ip.bio-med.ch/cms/Default.aspx>.
11. Morens D.M., Fauci A.S (2007). The 1918 influenza pandemic: insights for the 21st century. *J Infect Dis*, 195, 1018-1028.
12. Pandemic flu history. <http://www.flu.gov/pandemic/history/>
13. Edwin D. K. (2006). Influenza Pandemics of the 20th Century. *Emerging Infectious Diseases*, 12(1), 9-14.
14. Taubenberger J.K., Morens D.M (2006). 1918 influenza: the mother of all pandemics. *Emerging Infectious Diseases*, 12, 15-22.
15. Nguyễn Lê Khánh Hằng, Nguyễn Ngọc Linh, Hoàng Vũ Mai Phương, Nguyễn Tùng, Jile J., Patridge J., Nguyễn Trần Hiễn, Lê Quỳnh Mai (2013). Sự tiến hóa và phân tách của vi rút cúm gia cầm độc lực cao A/H5N1 clade 2.3.4 tại Việt Nam 2005-2010. *Tạp chí Y học dự phòng*, 11(147), 3-5.
16. Lê Quỳnh Mai et al (2005). Avian flu: isolation of drug-resistant H5N1 virus, *Nature*, (437), 1108.
17. Nguyễn Trần Hiễn (2007). Avian influenza in Vietnam: Epidemiology, lessons learned in prevention and control. 4th Pasteur virology training course in Hong Kong.
18. Cục Y tế dự phòng và Môi trường - Bộ Y tế (2010). Đại dịch cúm giai đoạn 2007-2010.
19. World Health Organization (2011). Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. *Global Influenza Surveillance Network*.
20. World Health Organization/USCDC (2009). CDC protocol of realtime RTPCR for influenza A(H1N1). http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCRealtimeRTPCR_SwineH1Assay-2009_20090430.pdf.

21. World Health Organization (2007). Manual for the laboratory diagnosis of measles viral infection, second edition, *Department of vaccines and biologicals*. <http://www.cdc.gov/measles/lab-tools/WHO-lab-manual.html>.
22. Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R (1993). Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 11, 1026-1030.
23. Kwok S., Higuchi R (1989). Avoiding false positives with PCR. *Nature*, 339, 237-238.
24. Cross N.C., Lin F., Goldman J (1994). Appropriate controls for reverse transcription polymerase-chain reaction (RT-PCR). *British Journal of Haematology*, (87), 218.
25. Kidd V.J (1997). Problematic controls for reverse transcription polymerase chain reactions (RT-PCR): an issue revisited. *Leukemia*, 11, 873-874.
26. Đỗ Phương Loan, Bùi Minh Trang, Phan Thị Ngà. (2013). Phát triển kỹ thuật real-time RT-PCR phát hiện và xác định kiểu gen GI và GIII của virus viêm não Nhật Bản. *Tạp chí Y học dự phòng*, 11(147), 31-35.
27. Nguyễn Thị Kiều Anh, Ngô Châu Giang, Nguyễn Vĩnh Đông (2008). Phát hiện nhanh vật liệu di truyền của virus dại bằng kỹ thuật RT-PCR trực tiếp. *Tạp chí Y Dược học quân sự*, 33, 114-118.
28. Qiagen (2007). *QIAamp^R DNA mini kit and QIAamp DNA blood mini kit handbook*, second edition. www.qiagen.com. 1-66.
29. Qiagen (2010). *QIAamp^R viral RNA mini kit handbook*, second edition. www.qiagen.com. 1-43.
30. Promega (2013). *SV total RNA isolation systems. Technical manual*. 1-29. Madison.
31. World Health Organization (2004). *Laboratory biosafety manual*, third edition. Geneva. 1-178.

32. Stranska R., van Loon A.M., Polman M., Schuurman R (2002). Application of real-time PCR for determination of antiviral drug susceptibility of herpes simplex virus. *Antimicrob Agents Chemother*, 46, 2943-2947.
33. Fronhoffs S., Totzke G., Stier S et al (2002). Method for the rapid construction of cRNA standard curves in quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes*, (16), 99-110.
34. Yasmon A., Bela B., Ibrahim F., Syahrudin E (2011). In vitro transcription of HIV-1 RNA for standard RNA. *Med J Indones*, 20, 185-189.
35. European association for the study of the liver (2012). EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *Clinical Practice Guidelines. Journal of Hepatology*, 57, 167-185.
36. Namikawa M., Kakizaki S., Yata Y et al (2012). Optimal follow-up time to determine the sustained virological response in patients with chronic hepatitis C receiving pegylated-interferon and ribavirin. *J Gastroenterol Hepatol*, 27(1), 69-75.
37. Promega (2008). *T7 Ribo MAXTM Express Large Scale RNA Production System. Instruction for use of Product P1320*. Madison <http://www.promega.com/product/P1320>.
38. Huraux J.M., Agut H et al (2004). *Traité de Virologie Médicale*, Estem, Paris.
39. World Health Organization (2011). Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) Geneva. . http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/en/
40. Russell C., Jones T., Barr I.G et al (2008). The global circulation of seasonal influenza A (H3N2) viruses. *Science*, 320, 340-346.

41. Matsuzaki Y., Abiko C., Mizuta K. et al (2007). A Nation wide epidemic of influenza C virus infection in Japan in 2004. *Journal of clinical microbiology*, 45(3), 783-788.
42. Lê Quỳnh Mai, Ito M., Muramoto Y., Hoàng Vũ Mai Phương et al (2010). Pathogenicity of highly pathogenic avian H5N1 influenza A viruses isolated from human between 2003-2008 in northern Vietnam. *Journal of General virology*, 91(10), 2485-2490.
43. Hoàng Vũ Mai Phương, Nguyễn Cơ Thạch, Nguyễn Lê Khánh Hằng và cộng sự (2013). Oseltamivir resistance among influenza viruses: surveillance in northern Viet Nam, 2009-2012. *WPSAR*, 4(2), 1-10.
44. Basics of vaccinology. *Training course on Vaccinology. Pasteur Institute in Paris, Paris, France.* <http://www.ip.bio-med.ch/cms/Default.aspx>.
45. Manuguerra J.C (2002). Grippe, *Maladies infectieuses*, Editions scientifiques et médicales Elsevier SAS, Paris, 8-069-A-10, 1-22. *Virologie systématique*. L'Institut Pasteur à Paris. Paris.
46. Zhu H., Webby R., Lam T.T et al (2013). History of Swine influenza viruses in Asia. *Curr Top Microbiol Immunol*, 370, 57-68.
47. Innis M.A., Gelfand D.H (1990). *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego.
48. Paterson D., Fodor E (2012). Emerging roles for the influenza A virus nuclear export protein (NEP). *PLoS Pathog*, 8(12), e1003019.
49. Honda A, Ishihama A (1997). Transcription and replication of influenza virus genome. *Nihon Rinsho*, 55 (10), 2555-2561.
50. Matsuoka Y., Matsumae H., Katoh M et al (2013). A comprehensive map of the influenza A virus replication cycle. *BMC Syst Biol*, 7, 97.

51. Tsai P.L., Chiou N.T., Kuss S., García-Sastre A., Lynch K.W., Fontoura B.M 2013. Cellular RNA binding proteins NS1-BP and hnRNP K regulate influenza A virus RNA splicing. *PLoS Pathog*, 9(6), e1003460.
52. Rossi S (2006). *Australian Medicines Handbook 2006*, <http://www.rocheusa.com/products/tamiflu>.
53. Hurt A.C., Holden J.K., Parker M. et al (2009). Zanamivir-resistant influenza viruses with a novel neuraminidase mutation. *J Virol*, 83(20), 10366-10373.
54. De Jong D., Tran T., Truong K et al (2005). Oseltamivir resistance during treatment of influenza A (H5N1) infection. *The New England Journal of Medicine*, 353(25), 2667-2672.
55. World Health Organization (2010). Update on oseltamivir resistance to influenza H1N1 (2009) viruses. <http://www.cdc.gov/flu/about/qa/antiviralresistance.htm#antiviral-drugs>.
56. Powell T.J., Fox A., Peng Y., Quỳnh-Mai Lê et al (2012). Identification of H5N1-specific T-cell responses in a high-risk cohort in vietnam indicates the existence of potential asymptomatic infections. *J Infect Dis*, 205(1), 20-27. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/index.html.
57. Shin M., Taisuke H., Lê Quỳnh Mai et al (2008). Growth Determinants for H5N1 Influenza Vaccine Seed Viruses in MDCK Cells. *J Virol*, 82(21), 10502-10507.
58. An V (2013). Molecular characterization of influenza A(H1N1) pdm09 virus circulating during the 2009 outbreak in Thua Thien Hue, Vietnam. *Journal of Infection in Developing Countries*, 7, 235-242.
59. Hatta M., Hatta Y., Kim J.H. et al (2007). Growth of H5N1 influenza A viruses in the upper respiratory tracts of mice. *PLoS Pathog*, 3, 1374-1379.

60. Nguyễn Hải Tuấn, Nguyễn Thị Thu Yến, Trần Như Dương và cộng sự (2012). Kết quả ban đầu đánh giá gánh nặng của bệnh cúm tại một số bệnh viện huyện ở Việt Nam. *Tạp chí Y học dự phòng*, 8(135), 23-30.
61. Nguyễn Trần Hiền, Trần Ngọc Hữu, Vũ Thị Quế Hương, Nguyễn Thị Thường và cộng sự (2011). Epidemiology and viral etiologies of Severe Acute Respiratory Infections (SARI) in the Northern Vietnam. *BMC Proc*, 5(S1) 116, 118.
62. Nguyễn Thị Thu Yến và cộng sự (2012). National influenza sentinel surveillance, Vietnam 2006-2012. http://www.wpro.who.int/emerging_diseases/meetings/docs/CPVietnam.pdf.
63. Cao Thị Bảo Vân (2007). Nghiên cứu giải mã bộ gen virus cúm gà A/H5N1 lưu hành ở Việt Nam trên mẫu bệnh phẩm người và gia cầm năm 2004-2005. *Giải thưởng WIPO Việt Nam 2007*.
64. Thẩm Chí Dũng, Nguyễn Trần Hiền, Nguyễn Thị Thường et al (2014). Sensitivity and specificity of routine epidemiological influenza-like illness surveillance system at district level in Northern Vietnam. *Vietnamese Prev. Med. J.* In press.
65. Phạm Quang Thái, Lê Quỳnh Mai, Matthijs R.W. et al (2014). Pandemic H1N1 virus transmission and shedding dynamics in index case households of a prospective Vietnamese cohort. *The journal of infection*. In press.
66. Phạm Quang Thái, Lê Quỳnh Mai, Matthijs R.W et al (2014). Pandemic H1N1 virus transmission and shedding dynamics in index case households of a prospective Vietnamese cohort. *The journal of infection*. In press.
67. Birrell P.J., Ketszis G., Gay N.J. et al (2011). Bayesian modelling to unmask and predict the influenza A/H1N1pdm dynamics in London. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 108, 1-6.

68. Horby P., Fox A., Lê Quỳnh Mai et al (2012). Influenza Infection Rates, Measurement Errors and the Interpretation of Paired Serology. *PLoS Pathog*, 12, e1003061.
69. World Health Organization. Recommendations for Influenza Vaccine Composition.
<http://www.who.int/influenza/vaccines/vaccinerecommendations1/en/>
70. European Vaccine Initiatives (2013). The quest for a universal vaccine against influenza”. European Commission supports EDUFLUVAC project to develop an innovative vaccine against influenza.
<http://www.euvaccine.eu/>.
71. Lewis J., Podda A (2013). Phase I/II and III. Vaccine trials. Methodology and implementation. *Training course on Vaccinology. Pasteur Institute in Paris, Paris, France.* <http://www.ip.bio-med.ch/cms/Default.aspx>.
72. Plotkin S.A (1999). Vaccination against the major infectious diseases. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 322, 943-951.
73. Bjarnarson S.P., Adarna B.C., Benonisson H. et al (2012). The adjuvant LT-K63 can restore delayed maturation of follicular dendritic cells and poor persistence of both protein- and polysaccharide-specific antibody-secreting cells in neonatal mice. *J Immunol*, 189(3), 1265-1273.
74. Della C.G., Nicolay U., Lindert K. Et al (2012). Superior immunogenicity of seasonal influenza vaccines containing full dose of MF59 (®) adjuvant: results from a dose-finding clinical trial in older adults. *Hum Vaccin Immunother*, 8(2), 216-227.
75. Subbarao K., Katz J.M (2004). Influenza vaccines generated by reverse genetics. *Curr Top Microbiol Immunol*, 283, 313-342.

76. Steel J., Lowen A.C., Pena L. et al (2009). Live attenuated influenza viruses containing NS1 truncations as vaccine candidates against H5N1 highly pathogenic avian influenza. *J Virol*, 83(4),1742-1753.
77. Shi H., Liu X.F., Zhang X. et al (2007). Generation of an attenuated H5N1 avian influenza virus vaccine with all eight genes from avian viruses. *J Vaccin*, 25(42),7379-7384.
78. Schickli J.H., Flandorfer A., Nakaya T. et al (2001). Plasmid-only rescue of influenza A virus vaccine candidates. *Biol Sci*, 356(1416),1965-1973.
79. Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương. <http://www.nihe.org.vn/>
80. Horby P., Fox A., Lê Quỳnh Mai et al (2012). Influenza Infection Rates, Measurement Errors and the Interpretation of Paired Serology. *PLoS Pathog*, 12, e1003061.
81. <http://cdc.com.gov/flu>
82. <http://www.flunet.int.com>
83. World Health Organization (2010). Pandemic influenza H1N1 update. *Report*, 112.
84. Christman M.C., Kedwaii A., Xu J. et al (2011). Pandemic (H1N1) 2009 Virus Revisited: an Evolutionary Retrospective. *Infect Genet Evol*, 11(5), 803-811.
85. Vongphrachanh P., Simmerman J.M., Phonekeo D. et al (2010). An early report from newly established laboratory-based influenza surveillance in Lao PDR. *Influenza other respiratory viruses*, 2, 47-52.
86. Nguyễn Thị Thu Yên et al (2013). National surveillance for influenza and influenza-like illness in Vietnam, 2006-2010. *Vaccine*. In press.
87. World Health Organization (1998). Standardization of the nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles virus. *Wkly Epidemiol Rec*, 73, 265-273.

88. World Health Organization (2001). Nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles viruses (update). Part I. *Wkly Epidemiol Rec*, 76, 242-247.
89. World Health Organization (2003). Update of the nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles viruses: new genotypes and reference strains. *Wkly Epidemiol Rec*, 78, 229-232.
90. Liffick L.S., Thuong N.T., Xu W.B., Yequiang L., Lien H.P., Bellini W.J., Rota P.A (2001). Genetic characterization of contemporary wild-type measles viruses from Vietnam and the Peoples' Republic of China: Identification of two genotypes within Clade H. *Int. J. Mol. Cel. Viro*, 77(1), 81-87.
91. Nguyễn Thị Thường, Huỳnh Phương Liên, Nguyễn Thị Út và cộng sự (2005). Đặc điểm di truyền của các chủng virus sởi phân lập tại miền Bắc, miền Trung, và Tây Nguyên Việt Nam. *Tạp chí Y học Dự phòng*, 5(76), 80-86.
92. Nguyễn Thị Thường, Nguyễn Trần Hiền, Huỳnh Phương Liên, Trịnh Thị Minh Liên, Nguyễn Vũ Trung, Nguyễn Thị Út, Nguyễn Hồng Hạnh, Trần Như Dương, Phạm Ngọc Đính (2010). Theo dõi đặc điểm di truyền virus sởi hoang dại lưu hành tại Việt Nam giai đoạn 1998-2009. *Tạp chí Y học Dự phòng*, 10 (118), 32-41.
93. Huỳnh Phương Liên, Rota P.A., Nguyễn Thị Thắng, Nguyễn Thị Thường, Nguyễn Thị Út, Hoàng Văn Tân, Nguyễn Thị Quý (2000). Chẩn đoán xác định dịch sởi 1998, phân tích đặc điểm di truyền của virus sởi lưu hành tại miền Bắc Việt Nam. *Tuyển tập công trình 1997-2000 viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương. Nhà xuất bản Y học*, 49-53.
94. Huỳnh Phương Liên, Nguyễn Thị Thắng, Nguyễn Thị Thường, Nguyễn Thị Út, Nguyễn Thị Quý, Nguyễn Kim Thanh, Nguyễn Thị Nụ, Nguyễn Hồng

Mai (2003). *Nghiên cứu sự tồn lưu kháng thể sởi ở trẻ 9 tháng – 15 tuổi và đánh giá đáp ứng kháng thể ở trẻ em 1-10 tuổi tại Tiên Lãng, Hải Phòng*. Đề tài nghiên cứu cấp Bộ. Bộ Y tế.

95. Centers for Disease Control and Prevention (2013). Advisory committee on immunization practices (ACIP) recommended immunization schedules for persons aged 0 through 18 years and adults aged 19 years and older - United States. *MMWR*, 62(S1), 1-19.
96. Centers for Disease Control and Prevention (2013). Vaccine safety and adverse events. <http://www.cdc.gov/vaccines/vac-gen/safety/default.htm>.
97. Fukumi H (1975). *Vaccination*, International medical foundation of Japan. Tokyo. 1-176.
98. World Health Organization (2009). Measles vaccine: WHO position paper. *MMWR*, 35(84), 349-360.
99. Nguyễn Văn Mẫn và cộng sự (2002). *Bước đầu nghiên cứu công nghệ sản xuất Vắc xin sởi tại Việt Nam qui mô phòng thí nghiệm*. Đề tài độc lập cấp Nhà nước. Bộ Khoa học và Công nghệ.
100. World Health Organization (1994). Manual of laboratory methods for testing of vaccine used in the WHO expanded programme on immunization. VSQ/97.04.
101. Riedel S (2005). Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Baylor University Medical Centers (BUMC) Proceedings*, 18, 21-25.
102. Ada G (2005). Overview of vaccines and vaccination. *Mol Biotechnol*, 29(3), 255-272.
103. Hebert C.J., Hall C.M., Odoms L.N (2012). Lessons learned and applied: what the 20th century vaccine experience can teach us about vaccines in the 21st century. *Hum Vaccin Immunother*, 8(5), 560-568.

104. The 21st century global vaccine revolution.
<http://www.idri.org/documents/IDRIVaccineGallery.pdf>
105. Nieburg P., McLaren N.M (2011). Role(s) of vaccines and immunization programs in global disease control. *A report of the CSIS Global Health Policy Center*, 1-18.
106. Rappuoli R., Mandl C.W., Black S., De Gregorio E (2012). Vaccines for the twenty-first century society. *Nat Rev Immunol*, 11(12), 865-872.
107. Centers for Disease Control and Prevention (2011). Ten great public health achievements--worldwide, 2001-2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 60, 814-818.
108. Shakib J.H., Korgenski K., Sheng X. et al (2013). Tetanus, diphtheria, acellular pertussis vaccine during pregnancy: pregnancy and infant health outcomes. *J Pediatr*, 5(163), 1422-1426.
109. Demirjian A., Levy O. (2009). Safety and efficacy of neonatal vaccination. *Eur J Immunol*, 39(1), 36-46.
110. Plotkin S.A (2010). Immunologic correlates of protection induced by vaccination. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(7), 1055-1065.
111. Ada G (2007). The importance of vaccination. *Front Biosci*, 1(12),1278-1290.
112. Hope J.C., Thom M.L., McAulay M. et al (2001). Identification of surrogates and correlates of protection in protective immunity against *Mycobacterium bovis* infection induced in neonatal calves by vaccination with *M. bovis* BCG Pasteur and *M. bovis* BCG Danish. *Clin Vacc Immunol*, 18(3), 373-379.
113. Omit S.E (2011). Influenza hemagglutination-inhibition antibody titer as a correlate of vaccine-induced protection. *Journal of Infectious Diseases*, 204, 1879-1885.

114. Panchanathan V., Chaudhri G., Karupiah G (2010). Antiviral protection following immunization correlates with humoral but not cell-mediated immunity. *Immunol Cell Biol*, 88(4), 461-467.
115. Plotkin S.A (2008). Vaccines: correlates of vaccine-induced immunity. *Clin. Inf. Dis*, 47, 401-409.
116. Plotkin S.A., Gilbert P.B (2012). Nomenclature for immune correlates of protection after vaccination. *CID*, 54(11), 1615-1617.
117. Qin L (2007). A framework for assessing immunological correlates of protection in vaccine trials. *J Inf Dis*, (196), 1279-1281.
118. World Health Organization (2005). Informal consultation on the application of molecular methods to assure the quality, safety and efficacy of vaccines. *WHO, Geneva, Switzerland*.
119. World Health Organization (2011). Regulation and licensing of biological products in countries with newly developing regulatory authorities. *Adopted at ECBS 1994*, 858.
120. Combadiere B., Liard C (2011). Transcutaneous and intradermal vaccination. *Human vaccines*, 7(8), 811-827.
121. Hummel B.K., Lowe L., Bellini J.W., Rota. P.A (2006). Development of quantitative gene-specific real-time RT-PCR assays for the detection of measles virus in clinical specimens. *Journal of Virological Methods*, 132, 166-173.
122. Chen J.M, Guo L.X. et al (2006). A stable and differentiable RNA positive control for reverse transcription - polymerase chain reaction. *Biotechnology Letters*, 28, 1787-1792.
123. Wang W., .Cavailler P., Ren P et al (2010). Molecular monitoring of causative viruses in child acute respiratory infection in endemo-epidemic situations in Shanghai. *Journal of Clinical Virology*, 49, 211-218.

124. Nguyễn Thị Thường, Nguyễn Đăng Hiền, Huỳnh Phương Liên, Phạm Thị Bích Ngọc, Trần Thị Hiền, Nguyễn Trần Hiền (2013). Xây dựng kỹ thuật xác định hiệu giá ARN vắc xin sởi bằng real-time RT-PCR. *Tạp chí Y học Dự phòng*, 11(147), 10-16.
125. Nguyễn Thị Thường, Trần Như Dương, Huỳnh Phương Liên và cộng sự (2012). Sản xuất chứng dương ARN *in vitro*. *Tạp chí Y học Dự phòng*, 5(132), 103-111.
126. Nguyễn Thị Thường và cộng sự (2014). *Nghiên cứu phát triển bộ mẫu chuẩn RNA cho kỹ thuật RT-PCR và thử nghiệm đánh giá hiệu quả sản phẩm trên thực địa*. Đề tài tuyển chọn cấp Bộ. Bộ Y tế. Nghiệm thu cấp cơ sở 12/2013.
127. ISO 15189 (2012). *Medical laboratories-particular requirements for quality and competence*.
128. Prijavudhi A., Kotivongsa K., Cotivongsa P., Pavaro U (2002). Thailand intensive external quality assessment schemes as dynamic tools for improving laboratory quality and standard. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 33(2), 14-17.
129. Taqi R.S. Cabuang L.M., Vincini G.A (2012). HIV-1, HBV and HCV viral load nucleic acid testing external quality assessment schemes, 2012. [http://www.nrl.gov.au/CA25782200833499/All/B6B1467B023EF562CA257A63000084BB/\\$file/Roseena_Taqi.pdf](http://www.nrl.gov.au/CA25782200833499/All/B6B1467B023EF562CA257A63000084BB/$file/Roseena_Taqi.pdf).
130. Candido A., Chionne P., Milazzo L., Dettori S et al (2008). Nucleic acid testing (NAT) for HCV RNA in Italian transfusion centres: an external quality assessment. *Journal of Clinical Virology*, 41(4), 277-282.
131. Bộ Y tế. *Hướng dẫn thực hiện quản lý chất lượng xét nghiệm tại cơ sở khám bệnh, chữa bệnh*. Thông tư 01/2013/TT-BYT.
132. Invitrogen™. (2009). “*TOPO TA cloning*”. *User manual*. 1-27.

133. Promega™. (2009). “*pGEM®-T and pGEM-T Easy Vector Systems. Instruction for use of product A1360, A1380, A3600 and A3610*”. *User manual*. Madison.
134. Irwin N (2012). *Molecular cloning*, third edition, Cold spring harbor laboratory press. New York.
135. Life Technology. SYBR® Safe DNA Gel Stain. <http://www.lifetechnologies.com/vn/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/nucleic-acid-gel-electrophoresis/dna-stains/sybr-safe.html>.
136. Langley K.E., Villarejo M.R., Fowler A.V. et al (1975). Molecular basis of beta-galactosidase alpha-complementation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72 (4), 1254-1257.
137. Hall B.G (2008). *Phylogenetic trees made easy*. Sinauer associates publishers. Massachusetts. 1-233.
138. BioEdit Sequence Alignment Editor Software. <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>.
139. <http://www.ncbi.com/blast>
140. Schurer H., Lang K., Schuster J., Morl M (2002). A universal method to produce in vitro transcripts with homogeneous 3' ends. *Nucleic Acids Res*, 30, 1-5.
141. Roche (2014). RNA labeling using in vitro transcription. https://www.roche-applied-science.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Articles/RNA_Labeling.
142. Timothy W., Rio N.C., Rio D.C (2012). *In vitro transcription of labeled RNA: synthesis, capping, and substitution*. Adapted from *RNA: A laboratory manual*, by Donald C.R., Manuel A.J., Gregory J.H., Timothy W.N. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.

143. Beckert B., Masquida B (2011). Synthesis of RNA by in vitro transcription. *Methods Mol Biol*, 703, 29-41.
144. Desjardins P., Conklin D. (2010). NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *Journal of Visualized Experiments and Thermo Fisher Scientific, Inc*, 45, 1-5. <http://www.jove.com/video/2565/>.
145. Armbrecht M., Gloe J., Goemann W (2013). Determination of nucleic acid concentrations using fluorescent dyes in the Eppendorf BioSpectrometer® fluorescence. *Eppendorf Application note*, 271.
146. Nguyễn Thị Thường, Trần Như Dương, Nguyễn Quang Minh, Phạm Thị Cẩm Hà, Huỳnh Thị Phương Liên, Bùi Huy Nhanh, Phạm Thị Bích Ngọc, Trần Thị Hiền, Nguyễn Trần Hiền (2012). Một số đặc điểm di truyền của vi rút gây viêm phổi cho người (hMPV) ở bệnh nhân viêm đường hô hấp cấp tính nặng tại tỉnh Hải Dương từ 2009 đến 2011. *Tạp chí Y học Dự phòng*, 7(134), 5-11.
147. Lương Minh Tân, Phan Thị Ngà, Thẩm Chí Dũng, Nguyễn Thị Thường, Đỗ Phương Loan, Holly S., MacIntyre C.R (2011). Tác nhân vi sinh vật gây bệnh đường hô hấp ở nhân viên y tế và ở khẩu trang đã qua sử dụng ở các bệnh viện Hà Nội. *Tạp chí Y học và thông tin Dược (JMPI)*, 12, ISSN 0868-3891, 26-30.
148. Eisenberg E., Levanon E.Y (2003). Human housekeeping genes are compact. *Trends in genetics*, 19(7), 362-365.
149. Tan S.C., Carr C.A., Yeoh K.K. et al (2011). Identification of valid housekeeping genes for quantitative RT-PCR analysis of cardiosphere-derived cells preconditioned under hypoxia or with prolyl-4-hydroxylase inhibitor". *Mol Biol Rep*, 39(4), 4857-4867.
150. Buecher C., Mardy S., Wang W., Duong V., Vong S., Naughtin M., Vabret A., Freymuth F., Deubel V., Buchy P (2010). Use of multiplex

- PCR/RT-PCR approach to assess the viral causes of influenza-like illnesses in Cambodia during three consecutive dry seasons. *Journal of medical virology*, 82, 1762-1772.
151. Jin Y., Yuan X.H., Xie Z.P. et al (2009). Prevalence and Clinical Characterization of a Newly Identified Human Rhinovirus C Species in Children with Acute Respiratory Tract Infections. *Journal of clinical microbiology*, 47(9), 2895-2900.
152. Boivin G., De Serres G., Côté S. et al (2003). Human Metapneumovirus Infections in Hospitalized Children. *Emerging Infectious Diseases*, 9(6), 634-640.
153. Arden K.E., Mackay I.M (2010). Newly identified human rhinoviruses: molecular methods heat up the cold viruses. *Rev Med Virol*, 20(3),156-176.
154. Nguyễn Thị Thường, Trần Như Dương, Nguyễn Quang Minh et al. A distribution of the epidemiological and genetic characteristics of human metapneumovirus (hMPV) among hospitalized severe acute respiratory infection (SARI) patients- Hai Duong, Vietnam, 2009-2011. *Seventh international Tephinet bioregional scientific conference*. Đà Nẵng, Việt Nam, Bộ Y tế, Tổ chức Y tế Thế giới, 178.
155. Bustin S.A., Mueller R (2005). Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical science*, 109, 365-379.
156. Thailand National Institute of Health (2014). Lot release, reference standards, and method validation. *Training courses*. National Institute for Quality Control of Vaccines and Biologicals, Hanoi, Vietnam and World Health Organization in Vietnam.
157. Peirson S.N., Butler J.N (2007). RNA extraction from mammalian tissues. *Methods Mol Biol*, 362, 315-327.

158. Blake R.D., Delcourt S.G (1998). Nucleic acids: Thermal stability and denaturation. *Nucleic Acids Res*, 26(14), 3323-3332.
159. Boom R., Sol C.J.A., Salimans M.M. et al (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbio*, 28, 495-503.
160. Chomczynski P., Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid Guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162, 156-159.
161. Higuchi R (1989). Rapid, efficient DNA extraction for PCR from cells or blood. *Amplifications*, 2, 1-3.
162. Bird I.M (2005). Extraction of RNA from cells and tissue. *Methods Mol Med*, 108, 139-148.
163. De Lamballerie X., Zandotti C., Vignoli C. et al (1992). A one-step microbial DNA extraction method using chelex 100, suitable for gene amplification. *Res Microbiol*, 8(143), 785-790.
164. Roche (2007). MagNA pure compact nucleic acid isolation kit I - large volume. 1-24. www.roche-applied-science.com.
165. Shampo M.A., Kyle R.A (2002). Kary B. Mullis - Nobel Laureate for procedure to replicate DNA. *Mayo Clinic Proceedings*, 77 (7), 606.
166. Mackay I.M (2004). Real-Time PCR in Microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(3), 190-212.
167. World Health Organization (2007). Guidelines to assure the quality, safety and efficacy of live attenuated rotavirus vaccines (oral). *WHO Technical Report No 941*.
168. Validation of compendia methods. USP 36 (1225) USPC. Rockville Maryland. 1994.
<https://hmc.usp.org/sites/default/files/documents/HMC/GCs-Pdfs/c1225%20USP36.pdf>.

169. Ludwig H (2010). Validation of analytical methods. *Agilent technology*, 1-74.
170. Schofield T.L (2003). Assay development, *Encyclopedia of biopharmaceutical statistics*, second edition, Marcel Dekker, New York.
171. Brooks Z (2007). Quality control in theory and practice – a gap analysis. <http://www.bloodagar.org/F276FAB5-A3B2-4030-8176-F3A5A8DC1BE0.W5doc?frames=n...,1-6>. (xem 07/2013).
172. Brooks Z (2007). I found the gap... it's in the basement! <http://www.bloodagar.org/27AA61F0-FFBD-4CB5-A07D-17A7547A549D.W5doc?frames=n...,1-8>. (xem 07/2013).
173. Centers for Diseases Control and Prevention (2012). The Strengthening Laboratory Management Towards Accreditation. Toolkit for teachers. Module 6: Quality Control. 1-44.
174. Immunization Action Coalition (2013). Historic dates and events related to vaccines and immunization. <http://www.immunize.org/timeline/>.
175. Volker F. Ganes C (2009). Interferons and viral infections. *Biofactors*, 35(1), 14-20.
176. Robins T., Dhivya R., Kumar R.S.R. et al (2009). Studies on the potency of oral polio vaccine using RD cell line and evaluation of growth using different serum concentration and volume of media. *African Journal of Biotechnology*, 8 (22), 6408-6415.
177. Joint Committee for Guides in Metrology - JCGM (2009). Evaluation of measurement data - An introduction to the “Guide to the expression of uncertainty in measurement” and related documents, second edition, 100:2009.
178. Alberts B., Johnson A., Lewis J. et al (2002). *Molecular biology of the cell*, fourth edition. Garland science. New York.

179. Forsey T., Health A.B, Minor P.D (1992). A collaborative study to assess the proficiency of laboratory estimates of potency of live measles vaccines. *Biologicals*, 20, 233-234.
180. Forsey T., Health A.B, Minor P.D (1993). A European collaborative study to assess the proficiency of laboratory estimates of potency of live measles , mumps and rubella tri-valent vaccines. *Biologicals*, 21, 239-249.
181. Moore D.S., McCabe G.P., Craig B.A (2009). *Introduction to the practice of statistics*, sixth Edition. Texas Instrument Incorporated. New York.
182. Armitage P., Berry G., Matthews J.N.S (2005). Regression and correlation, *Statistical methods in medical research*, fourth edition. Blackwell. Massachusetts, Chapter 7, 187-208.