

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

NGUYỄN MẠNH KIÊN

**NGHIÊN CỨU SỰ BIẾN ĐỔI DI TRUYỀN
CÁC GEN PB2, PB1 VÀ PA POLYMERASE
CỦA VIRUS CÚM A/H5N1 ĐƯƠNG NHIỄM
TẠI VIỆT NAM**

Chuyên ngành: Hóa sinh Y học

Mã số : 62 72 01 12

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI – 2014

Công trình được hoàn thành tại: TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI.

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS.TS. Lê Thanh Hòa.
2. PGS.TS. Đặng Thị Ngọc Dung.

Phản biện 1: PGS.TS. Bạch Vọng Hải

Học viện Quân Y.

Phản biện 2: GS.TS. Đặng Đức Anh

Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

Phản biện 3: PGS.TS. Đinh Duy Kháng

Viện Công nghệ sinh học.

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Trường

Họp tại: Hội trường bảo vệ luận án - Trường Đại học Y Hà Nội.

Số 1, Tôn Thất Tùng – Đống Đa – Hà Nội.

Vào hồigiờ ... ngày ... tháng... năm 2014.

Có thể tìm hiểu luận án tại các thư viện:

- Thư viện Quốc Gia.
- Thư viện Trường Đại học Y Hà Nội.
- Thư viện thông tin Y học Trung ương.

CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU

ĐÃ CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Nguyễn Mạnh Kiên**, Nguyễn Thị Bích Nga, Lê Thanh Hòa (2008), “Đặc điểm gen H5 của virus cúm A/H5N1 thuộc dưới dòng Phúc Kiến (Fujian) gây bệnh trên gia cầm và người phân lập tại Việt Nam năm 2007”, *Tạp chí Y – Dược học quân sự*, 33(8), tr 29-36.
2. **Nguyễn Mạnh Kiên**, Nguyễn Thị Bích Nga, Đoàn Thanh Hương, Đặng Thị Ngọc Dung, Lê Thanh Hòa (2011), “Đặc điểm cấu trúc phân tử gen polymerase PB1 chủng DkNA72 và DkNA114 thuộc phân dòng Phúc Kiến của virus cúm A/H5N1 phân lập tại Việt Nam”, *Tạp chí Y – Dược học quân sự*, 36(1), tr 36-41.
3. **Nguyễn Mạnh Kiên**, Đặng Thị Ngọc Dung, Lê Thanh Hòa (2012), “Đặc điểm phân tử tổ hợp gen polymerase liên quan bệnh học ở virus cúm A/H5N1 clade 2.3.2.1 phân lập từ vịt bệnh tại Quảng Trị năm 2011”, *Tạp chí Y học Việt Nam*, 396(1), tr 50-56.

DANH MỤC CÁC CHỮ, KÍ HIỆU VIẾT TẮT

Ký hiệu	Tên đầy đủ
bp	base pair
Da	dalton
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxy Nucleotide Triphosphate
ddNTP	dideoxy Nucleotide Triphosphate
FAO	Food and Agricultural Organization
HA	Hemagglutinin
kb	Kilo base
M	Matrix protein
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
NA	Neuraminidase
NEP	Nuclear Export Protein
NP	Nucleoprotein
NS	Non-structural protein
OIE	Office International des Epizooties
PA	Polymerase acidic protein
PB1	Polymerase basic protein 1
PB2	Polymerase basic protein 2

RT-PCR	Revertranscription Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleic acid
RNP	Ribonucleoprotein
(-) ssRNA	Negative single-strand Ribonucleic Acid
WHO	World Health Organization

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết và thực tiễn của đề tài

Virus cúm A thuộc họ *Orthomyxoviridae*, gồm nhiều phân type virus lưu hành ở chim hoang dã, có khả năng biến đổi xâm nhiễm, lây truyền sang người và nhiều loài động vật, nguyên nhân gây ra các đại dịch cúm A ở người trong lịch sử.

Các gen PB2, PB1 và PA mã hóa tổng hợp 03 protein PB2, PB1 và PA polymerase, dưới đơn vị cấu tạo phức hợp enzym polymerase, có vai trò quan trọng quyết định khả năng thích nghi nhân lên của virus ở cơ thể các loài vật chủ. Ngoài ra, gen PB1 còn chứa 02 khung đọc mở gen PB1-F2 và PB1-N40 mã hóa tổng hợp các protein tương ứng, tham gia biểu hiện độc lực của virus cúm A ở cơ thể nhiễm.

Từ năm 2003 đến nay, virus cúm A/H5N1 thể độc lực cao nguyên nhân gây ra dịch cúm A/H5N1 nguy hại ở gia cầm và xâm nhiễm gây bệnh cúm nặng có tỉ lệ tử vong cao ở người (khoảng 60%). Trong đó, Việt Nam là quốc gia có dịch cúm gia cầm A/H5N1 bùng phát vào năm 2003 và liên tục tái bùng phát nhiều đợt dịch ở gia cầm hàng năm tại các địa phương, với 63 người tử vong trong tổng số 125 người được xác định nhiễm virus cúm A/H5N1 cho đến nay. Các chủng virus cúm A/H5N1 clade 1, 2 và 7 thuộc 03 genotypic Z, V và G, là các nhóm virus lưu hành phổ biến gây dịch cúm A/H5N1 ở gia cầm và xâm nhiễm gây bệnh trên người, tại Việt Nam và nhiều quốc gia trên thế giới từ năm 2003 đến nay. Gần đây, nhóm virus clade 1.1 và đặc biệt là nhóm virus clade 2.3.2.1 hình thành năm 2009, có sự thay đổi lớn về kháng nguyên H5, độc lực cao ở gia cầm so với các

virus lưu hành trước đó, làm cho vấn đề phòng chống dịch cúm A/H5N1 trở nên phức tạp hơn.

Sự biến đổi của các gen PB2, PB1 và PA polymerase là cơ sở giúp virus cúm A/H5N1 thích nghi nhân lên trong tế bào cảm thụ, yếu tố quyết định sự lây truyền dễ dàng giữa người với người và gia tăng độc lực của virus ở cơ thể người. Đây là một trong các vấn đề được quan tâm nghiên cứu giám sát ở virus cúm A/H5N1 gây bệnh dịch ở gia cầm và xâm nhiễm gây bệnh trên người hiện nay. Dữ liệu di truyền của các gen PB2, PB1 và PA là cơ sở khoa học góp phần dự báo sớm dịch tễ học ở mức độ phân tử, nghiên cứu phát triển vaccine tái tổ hợp và sử dụng vaccine phòng chống cúm A/H5N1 cho người và gia cầm.

2. Mục tiêu nghiên cứu của đề tài

- Nghiên cứu sự biến đổi đặc tính di truyền các gen PB2, PB1 và PA polymerase, của một số biến chủng virus cúm A/H5N1 đang nhiễm tại Việt Nam, so sánh sự tương đồng về nucleotide và amino acid với các chủng virus A/H5N1 trên thế giới.

- Tìm hiểu nguồn gốc phả hệ các gen nói trên của các biến chủng virus cúm A/H5N1 trong nghiên cứu với các chủng A/H5N1 thế giới.

3. Phạm vi nghiên cứu của đề tài

Các gen PB2, PB1 và PA polymerase trong hệ gen của 6 biến chủng virus cúm A/H5N1 thuộc 3 clade 1.1, 2.3.2.1 và 2.3.4.3, thu nhận từ 6 mẫu bệnh phẩm tương ứng lấy ở gia cầm bệnh tại Việt Nam các năm 2007 – 2011.

4. Bố cục của luận án

Luận án gồm 116 trang. Đặt vấn đề: 2 trang, Chương 1 - Tổng quan tài liệu: 30 trang, Chương 2 - Đối tượng và phương pháp: 20 trang, Chương 3 - Kết quả nghiên cứu: 35 trang, Chương 4 - Bàn luận: 26 trang, Kết luận: 2 trang, Kiến nghị: 1 trang. Danh mục các công trình đã công bố 1 trang, tài liệu tham khảo 13 trang và phụ lục 39 trang. Luận án có 29 bảng, 26 hình, sử dụng 118 tài liệu (14 tài liệu tiếng Việt, 104 tài liệu tiếng Anh) và 8 trang web tham khảo.

Chương 1. TỔNG QUAN

1.1. ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA VIRUS CÚM A

1.1.1. Cấu tạo chung của virus cúm A

1.1.2. Đặc điểm cấu tạo hệ gen của virus cúm A

1.1.3. Cấu tạo và chức năng của các phân đoạn RNA hệ gen virus cúm A

1.1.4. Đặc điểm cấu tạo và chức năng của các gen PB2, PB1 và PA

1.1.5. Phức hợp enzym polymerase của virus cúm A

1.1.6. Đặc tính biến đổi di truyền các gen và hệ gen virus cúm A

1.2. ĐẠI DỊCH CÚM A VÀ ĐẶC ĐIỂM BIẾN ĐỔI CÁC GEN PB2, PB1 VÀ PA CỦA VIRUS CÚM A GÂY ĐẠI DỊCH CÚM Ở NGƯỜI

1.2.1. Các đại dịch cúm A ở người trong lịch sử

1.2.2. Đặc điểm biến đổi các gen PB2, PB1 và PA của virus cúm A gây đại dịch cúm ở người

1.3. ĐẶC ĐIỂM DỊCH TỄ VÀ SINH HỌC VIRUS CÚM A/H5N1

1.3.1. Đặc điểm dịch tễ virus cúm A/H5N1

1.3.2. Đặc điểm sinh học của virus cúm A/H5N1

1.4. NGHIÊN CỨU BIẾN ĐỔI CÁC GEN PB2, PB1, PA LIÊN

QUAN ĐỘC LỰC VÀ LÂY TRUYỀN Ở NGƯỜI CỦA VIRUS CÚM A/H5N1

1.4.1. Trên thế giới

1.4.2. Tại Việt Nam

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ TRANG THIẾT BỊ

2.1.1. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu

* *Đối tượng nghiên cứu:* gồm các gen PB2, PB1 và PA trong hệ gen của 06 biến chủng virus cúm A/H5N1, đại diện cho 03 clade gen H5 2.3.4.3, 2.3.2.1 và 1.1, lưu hành gây bệnh dịch phổ biến ở tại Việt Nam từ năm 2007 – 2011.

* *Vật liệu nghiên cứu:*

+ Trong nghiên cứu sử dụng 6 mẫu bệnh phẩm lấy từ gia cầm chết bệnh (gà, vịt) trong các vụ dịch cúm A/H5N1, xảy ra ở một số địa phương tại Việt Nam các năm 2007- 2011.

- Sáu mẫu bệnh phẩm trên đều có chứa các chủng virus cúm A/H5N1 tương ứng, dựa trên kết quả giải trình tự, xác định clade gen H5 và N1, được công bố trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Bích Nga và Lê Thanh Hòa (2012).

- Các mẫu bệnh phẩm và chủng virus cúm A/H5N1 có trong bệnh phẩm, được kí hiệu tên viết tắt sử dụng trong nghiên cứu và theo qui định danh pháp quốc tế (Bảng 2.1).

Bảng 2.1. Danh sách 6 biến chủng virus cúm A/H5N1 trong nghiên cứu

SỐ TT	KÍ HIỆU MẪU/CHŨNG VIRUS	TÊN CHŨNG VIRUS THEO DANH PHÁP QUỐC TẾ	NĂM PHÂN LẬP	CLADE H5
----------	----------------------------	-------------------------------------------	--------------------	-------------

01.	DkQT801-2011	A/Duck/VietNam/QT801/2011(H5N1)	2011	2.3.2.1
02.	DkQT802-2011	A/Duck/VietNam/QT801/2011(H5N1)	2011	2.3.2.1
03.	DkTG926-2009	A/Duck/VietNam/TG926/2009(H5N1)	2009	1.1
04.	CkDT382-2008	A/Chicken/VietNam/DT382/2008(H5N1)	2008	1.1
05.	DkNA72-2007	A/Duck/VietNam/NA72/2007(H5N1)	2007	2.3.4.3
06.	DkNA114-2007	A/Duck/VietNam/NA114/2007(H5N1)	2007	2.3.4.3

Ghi chú: Dk (Duck): Vịt, Ck (Chicken): Gà, QT: Quảng Trị, TG: Tiền Giang, DT: Đồng Tháp, NA: Nghệ An, Clade H5: phân loại virus theo clade gen kháng nguyên H5.

+ Các gen PB2, PB1 và PA của 06 biến chủng virus cúm A/H5N1 nghiên cứu, sau thu nhận được so sánh phân tích biến đổi đặc tính di truyền với các gen tương ứng của 25 chủng tham chiếu đại diện 04 nhóm virus cúm A/H5N1 clade 1, 1.1, 2.3.4.3 và 2.3.2.1 của Việt Nam và một số quốc gia trên thế giới từ 2007 – 2012.

+ Trình tự các gen PB2, PB1 và PA của các chủng virus đại diện tham chiếu, được thu thập từ cơ sở dữ liệu của Ngân hàng gen, có clade H5 và genotype xác định theo kết quả nghiên cứu trước đây từ các tài liệu tham khảo đã công bố.

2.1.2. Dụng cụ, trang thiết bị

2.1.3. Các bộ kit sinh phẩm sử dụng trong nghiên cứu

Trong nghiên cứu sử dụng các bộ kit sinh phẩm sử dụng trong kỹ thuật sinh học phân tử, của các hãng: QIAGEN (Mỹ), Fermentas (Mỹ), Bioneer (Hàn Quốc), Invitrogen (Nhật Bản), có uy tín trên thế giới.

2.1.4. Môi trường sử dụng trong dòng hóa

2.1.5. Các hóa chất sử dụng trong điện di trên thạch agarose

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Quy trình nghiên cứu các gen PB2, PB1 và PA polymerase của virus cúm A/H5N1 được trình bày ở hình 2.1.

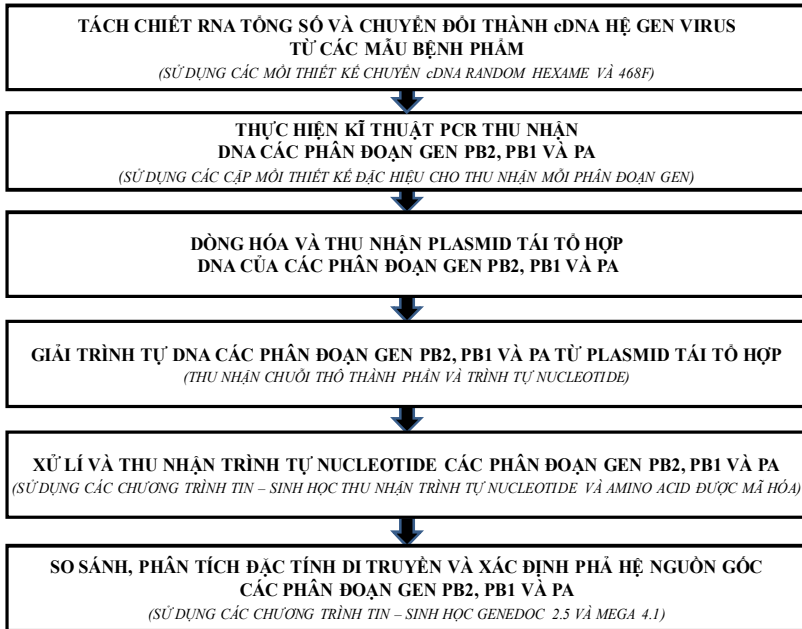
2.2.1. Kỹ thuật tách chiết ribonucleic acid tổng số

Sử dụng bộ kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN).

2.2.2. Thiết kế các trình tự mỗi nucleotide sử dụng trong nghiên cứu

- Trình tự nucleotide các môi trong nghiên cứu được thu nhận bằng chương trình thiết kế môi MacVector8.2, và đối chiếu với chương trình “Primer design” có trong Ngân hàng gen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Primer.cgi>).

- Các trình tự môi sử dụng trong nghiên cứu sau thiết kế, được tổng hợp bởi Phòng thí nghiệm của Công ty Bioneer (Hàn Quốc).



Hình 2.1. Sơ đồ qui trình tổng quát nghiên cứu các gen PB2, PB1 và PA polymerase của virus cúm A/H5N1

2.2.3. Kỹ thuật RT-PCR

- Chuyển RNA hệ gen virus thành cDNA bằng môi 468F và môi hexamer, sử dụng bộ kit Maxima™ Universal First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas),

- PCR thu nhận DNA các gen PB2, PB1 và PA từ khuôn cDNA với các cặp môi đặc hiệu, bằng bộ kit PCR Master Mix 2X (Fermentas).

2.2.4. Tinh sạch DNA sản phẩm của RT-PCR/PCR

Tinh sạch DNA sản phẩm RT-PCR/PCR bằng bộ kit AccuPrep® Gel purification Kit (Bioneer).

2.2.5. Kỹ thuật điện di nucleic acid trên gel

2.2.6. Kỹ thuật dòng hóa DNA

DNA các gen PB2, PB1 và PA sau khi tinh sạch được dòng hóa vào vector PCR2.1-TOPO, bằng bộ kit TA cloning[®] Kit (Invitrogen).

2.2.7. Giải trình tự DNA của gen và hệ gen

DNA trong plasmid tái tổ hợp được giải trình tự trên máy tự động, sử dụng bộ kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)

2.2.8. Xử lý, thu nhận trình tự nucleotide và amino acid của các gen nghiên cứu

Các trình tự nucleotide thu nhận sau giải trình tự, được xử lý bằng chương trình SeqEd v1.03 và hệ chương trình MacVector 8.2 (Accelrys Inc.) trên máy tính Macintosh.

Phân tích, so sánh về thành phần nucleotide và amino acid bằng chương trình GENEDOC 2.5, phân tích mối quan hệ phả hệ bằng chương trình MEGA4.1 trên máy tính cá nhân (Personal computer).

2.3. VẤN ĐỀ ĐẠO ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU

Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả thu nhận trình tự nucleotide các gen PB2, PB1 và PA polymerase, của 6 biến chủng virus cúm A/H5N1 trong nghiên cứu

Sau các bước tách chiết RNA tổng số, chuyển đổi RNA thành cDNA, PCR, giải trình tự, xử lý và đối chiếu các trình tự nucleotide lưu trữ trong Ngân hàng gen, chúng tôi đã thu nhận được trình tự nucleotide của các gen cần nghiên cứu.

Kết quả cho thấy:

- Các gen PB2, PB1 và PA polymerase của 6 biến chủng virus cúm A/H5N1 trong nghiên cứu, đều có chứa số lượng nucleotide lần lượt là: 2.280, 2.274 và 2.151 nucleotide. Các gen trên lần lượt mã hóa cho các protein tương ứng chứa: 759, 757 và 716 amino acid theo thứ tự.

- Gen PB1 của 6 biến chủng virus cúm A/H5N1 trong nghiên cứu, đều có chứa khung đọc mở PB1-F2 (gồm 273 nucleotide, mã hóa 90 amino acid) và khung đọc mở gen PB1-N40 (gồm 757 nucleotide, mã hóa 718 amino acid).

- Trình tự nucleotide các gen PB2, PB1 và PA thu nhận sau giải trình tự, đều có tỷ lệ tương đồng từ 97% - 99% với mức độ so sánh 96% - 100%, so với trình tự các gen tương ứng của virus cúm A/H5N1 lưu trữ trong Ngân hàng gen.

3.2. Kết quả so sánh thành phần nucleotide và amino acid các gen PB2, PB1 và PA của 6 biến chủng virus cúm A/H5N1 nghiên cứu với các chủng của thế giới

Trình tự nucleotide và amino acid các gen PB2, PB1 và PA của 6 biến chủng virus cúm A/H5N1 nghiên cứu, được so sánh với trình tự tương ứng của 19 chủng virus đại diện 4 nhóm virus clade 2.3.2.1, 2.3.4.3, 1 và 1.1.

3.2.1. Kết quả so sánh thành phần nucleotide và amino acid gen PB2

3.2.1.1. Kết quả so sánh thành phần nucleotide và amino acid

- Trình tự gen PB2 của 6 biến chủng virus cúm A/H5N1 nghiên cứu, có số lượng nucleotide và amino acid được mã hóa đúng bằng trình tự gen này, của 19 chủng đại diện trong 4 nhóm virus so sánh, lần lượt là 2.280 nucleotide và 759 amino acid.

- Bên cạnh nhiều vị trí sai khác đơn lẻ, có tới 110 vị trí sai khác về nucleotide trong trình tự gen PB2 của 6 biến chủng virus nghiên cứu và 19 chủng đại diện, tương đối tập trung theo 4 nhóm virus lựa chọn so sánh. Tuy nhiên, chỉ có 18/110 vị trí sai khác nucleotide kể trên dẫn đến thay đổi amino acid trong protein PB2 suy diễn.

- Sáu biến chủng virus cúm A/H5N1 nghiên cứu cùng với các chủng phân lập từ gia cầm bệnh ở cả 4 nhóm virus so sánh, đều có protein PB2 bảo tồn glutamic acid tại vị trí 627 (E627) và aspartic acid vị trí 701 (D701).

- Đặc biệt, trình tự gen PB2 của 7 chủng virus phân lập từ người bệnh trong 2 nhóm virus clade 1 và 2.3.4.3, có sai khác nucleotide tại vị trí 1897 (A↔C) dẫn đến thay đổi amino acid từ glutamic acid thành lysin ở vị trí 627 (E627K) trong protein PB2, so với trình tự tương ứng của virus A/H5N1 phân lập từ gia cầm bệnh.

3.2.1.2. Kết quả so sánh tỷ lệ tương đồng (%) về thành phần nucleotide và amino acid

- Tỷ lệ tương đồng (%) về thành phần nucleotide và amino acid gen PB2 giữa 25 chủng virus cúm A/H5N1 so sánh, đạt lần lượt là 92% – 99% và 96% – 100% (Bảng 3.1).

- Tỷ lệ này của gen PB2 giữa 6 biến chủng virus nghiên cứu và các chủng phân lập tại Việt Nam, so với các chủng phân lập ở Trung Quốc, Campuchia, Lào và Thái Lan trong cùng nhóm clade, lần lượt đạt 96% – 99% và 98% – 100% (Bảng 3.1).

Bảng 3.1. Tỷ lệ tương đồng (%) thành phần nucleotide và amino acid gen PB2

SỐ THỨ TỰ	CLADE 2.3.2.1							CLADE 2.3.4.3							CLADE 1						CLADE 1.1				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
CLADE 2.3.2.1	1	99	98	98	98	96	96	96	96	96	96	95	96	95	95	95	94	94	94	93	93	93	93	92	
	2	99		98	98	98	96	96	95	95	95	95	95	95	95	94	94	94	94	93	93	93	93	92	
	3	99	99		98	99	96	97	96	96	96	96	96	96	95	95	95	94	94	94	93	93	93	93	93
	4	99	98	99		98	96	96	96	96	96	96	95	96	95	95	94	94	94	94	93	93	93	93	92
	5	99	99	99	99		97	97	96	96	96	96	96	96	95	95	95	95	95	95	93	94	93	93	93
	6	98	98	98	98	98		99	96	96	96	96	96	96	95	95	95	95	95	95	93	93	93	93	93
	7	98	98	99	98	99	98		97	97	97	97	97	97	95	95	95	95	95	95	94	94	93	94	93
CLADE 2.3.4.3	8	98	98	98	98	98	98		99	99	99	99	98	99	96	96	96	96	96	96	95	95	95	95	95
	9	98	98	98	98	98	98	100		99	99	99	98	99	96	96	96	96	96	96	95	95	95	95	95
	10	98	97	98	98	98	97	98	99	99		99	99	99	96	96	96	96	96	96	95	95	95	95	94
	11	98	98	98	98	98	98	98	99	99	99		99	98	96	96	96	96	96	96	95	95	95	95	94
	12	98	97	98	98	98	97	98	99	99	98	99		98	96	96	96	96	96	96	95	95	94	95	94
	13	98	98	98	98	98	98	98	99	99	99	99	98	98	96	96	96	96	96	96	95	95	94	95	94

	14	98	98	98	98	98	98	98	98	99	99	99	99	99	99	99	96	96	96	96	96	96	95	95	95	95	94	
CLADE I	15	97	97	98	97	98	97	98	98	98	98	98	98	98	98	98	99	98	98	98	98	98	97	97	97	97	97	
	16	97	97	98	98	98	97	98	98	98	98	98	98	98	98	98	99	99	98	99	98	97	97	97	97	96	96	
	17	97	97	98	97	98	97	98	98	98	98	98	98	98	98	98	99	99	99	98	98	96	97	96	97	96	96	
	18	97	97	98	97	98	97	98	98	98	98	98	98	98	98	98	99	99	100	98	98	96	97	96	96	96	96	96
	19	97	97	97	97	97	97	97	97	98	98	98	98	97	98	98	99	99	99	99	98	96	97	96	97	96	96	
	20	97	97	97	97	97	97	97	97	98	98	98	98	97	98	98	99	99	99	99	98	96	97	96	96	96	96	96
CLADE I.1	21	96	96	96	96	96	96	96	97	97	96	96	96	97	97	98	98	98	98	97	97	98	98	98	98	98	98	
	22	96	96	96	96	96	96	96	97	97	96	96	96	97	97	98	98	98	98	97	97	98	98	98	98	98	98	
	23	96	96	97	97	97	96	97	97	97	97	97	97	97	97	98	98	98	98	98	98	99	99	98	99	98	99	
	24	96	96	96	96	97	96	97	97	97	96	97	96	97	97	98	98	98	98	97	97	98	98	99	98	98	98	
	25	96	96	96	96	97	96	97	97	97	96	97	96	97	97	98	98	98	98	97	97	98	98	99	99	98	98	

Ghi chú: Số liệu trên trên đường chéo là tỷ lệ tương đồng (%) thành phần nucleotide và dưới đường chéo là tỷ lệ tương đồng (%) thành phần amino acid. Số thứ tự từ 1 đến 25 kí hiệu các chủng virus so sánh trong nghiên cứu. **1: DkQT802-2011; 2: DkQT801-2011; 3: A/Dk/VN/LBM140/2012; 4: A/MDk/VN/LBM113/2012;**

5: A/Hubei/1/2010; 6: A/GCG/QH/1/2009; 7: A/BHG/MN/X53/2009; **8: DkNA72-2007; 9: DkNA114-2007;** 10: A/VN/UT31203A/2007;

11: A/VN/UT31244II/2007; 12: A/VN/UT31394II/2008; 13: A/VN/UT31413II/2008; 14: A/MDk/VN/56/2007; 15: A/Ck/VN/NCVD10/2007;

16: A/VN/UT3028/2003; 17: A/VN/1203/2004; 18: A/VN/UT3040/2004; 19: A/TH/2(SP-3)/2005; 20: A/TH/676/2005; **21: CkDT382-2008; 22: DkTG926-2009;**

23: A/MDk/VN/OIE/559/2011; 24: A/KH/U0417030/2010; 25: A/KH/V0417301/2011. Số thứ tự của 06 chủng virus cúm A/H5N1 trong nghiên cứu được in đậm.

3.2.2. Kết quả so sánh thành phần nucleotide và amino acid gen PB1

3.2.2.1. Kết quả so sánh thành phần nucleotide và amino acid

- Trình tự gen PB1 của 6 biến chủng virus cúm A/H5N1 nghiên cứu, có số lượng nucleotide và amino acid được mã hóa đúng bằng trình tự gen này, của 19 chủng đại diện trong 4 nhóm virus so sánh, lần lượt là 2.274 nucleotide và 757 amino acid.

- Bên cạnh nhiều vị trí sai khác đơn lẻ, có 98 vị trí sai khác về nucleotide trong trình tự gen PB1 của 6 biến chủng virus nghiên cứu và 19 chủng đại diện, tương đối tập trung theo 4 nhóm virus lựa chọn so sánh. Tuy nhiên, chỉ có 6/110 vị trí sai khác nucleotide kể trên dẫn đến thay đổi amino acid trong protein PB1 suy diễn.

3.2.2.2. Kết quả so sánh tỷ lệ tương đồng nucleotide và amino acid

- Tỷ lệ tương đồng về thành phần nucleotide và amino acid gen PB1 giữa 25 chủng virus cúm A/H5N1 so sánh, đạt lần lượt là 94% – 99% và 98% – 100%.

- Tỷ lệ này của gen PB1 giữa 6 biến chủng virus cúm A/H5N1 nghiên cứu và các chủng phân lập tại Việt Nam, so với các chủng virus cúm A/H5N1 phân lập ở Trung Quốc, Campuchia, Lào và Thái Lan trong cùng nhóm clade, lần lượt đạt 96% – 99% và 98% – 100%.

3.2.2.2. Kết quả so sánh thành phần nucleotide và amino acid gen PB1-F2

- Trình tự gen PB1-F2 của 6 biến chủng virus cúm A/H5N1 nghiên cứu, đều chứa 273 nucleotide bằng với trình tự tương ứng của 19 chủng đại diện 4 nhóm virus so sánh.

- Có 12 vị trí sai khác nucleotide trong trình tự gen PB1-F2, dẫn đến thay đổi amino acid trong protein PB1-F2, mang tính chất tập trung giữa 4 nhóm virus ([Hình 3.1](#)).

	*	20	*	40	*	60	*	80	*													
DkQT802-2011	:	MEQGQGT	PWTQ	STEHTNI	QKRGSG	QQTOR	PEHPN	STRML	DHYLKIT	SPVGMHK	QIVYWK	QWLSL	KSP	TQGS	LKTHV	LKR	WKL	FNK	QEW	TN	-	: 90
DkQT801-2011	:	MEQGQGT	PWTQ	STEHTNI	QKRGSG	QQTOR	PEHPN	STRML	DHYLKIT	SPVGMHK	QIVYWK	QWLSL	KSP	TQGS	LKTHV	LKR	WKL	FNK	QEW	TN	-	: 89
A-Dk-VN-LBM14	:	MEQGQGT	PWTQ	STEHTNI	QKRGSG	QQTOR	PEHPN	STRML	DHYLKIT	SPVGMHK	QIVYWK	QWLSL	KSP	TQGS	LKTHV	LKR	WKL	FNK	QEW	TN	-	: 90
A-MDk-VN-LBM1	:	MEQGQGT	PWTQ	STEHTNI	QKRGSG	QQTOR	PEHPN	STRML	DHYLKIT	SPVGMHK	QIVYWK	QWLSL	KSP	TQGS	LKTHV	LKR	WKL	FNK	QEW	TN	-	: 90
A-Hubei-1-201	:	MEQGQGT	PWTQ	STEHTNI	QKRGSG	QQTOR	PEHPN	STRML	DHYLKIT	SPVGMHK	QIVYWK	QWLSL	KSP	TQGS	LKTHV	LKR	WKL	FNK	QEW	TN	-	: 90
A-GCG-QH-1-20	:	MEQGQGT	PWTQ	STEHTNI	QKRGSG	QQTOR	PEHPN	STRML	DHYLKIT	SPVGMHK	QIVYWK	QWLSL	KSP	TQGS	LKTHV	LKR	WKL	FNK	QEW	TN	-	: 90
A-BHG-MN-X53-	:	MEQGQGT	PWTQ	STEHTNI	QKRGSG	QQTOR	PEHPN	STRML	DHYLKIT	SPVGMHK	QIVYWK	QWLSL	KSP	TQGS	LKTHV	LKR	WKL	FNK	QEW	TN	-	: 90
DkNA72-2007	:	MEQGQGT	PWTQ	STEHTNI	QKRGSG	QQTOR	PEHPN	STRML	DHYLKIT	SPVGMHK	QIVYWK	QWLSL	KSP	TQGS	LKTHV	LKR	WKL	FNK	QEW	TN	-	: 90
DkNA114-2007	:	MEQGQGT	PWTQ	STEHTNI	QKRGSG	QQTOR	PEHPN	STRML	DHYLKIT	SPVGMHK	QIVYWK	QWLSL	KSP	TQGS	LKTHV	LKR	WKL	FNK	QEW	TN	-	: 90
A-VN-UT31203A	:	MEQGQGT	PWTQ	STEHTNI	QKRGSG	QQTOR	PEHPN	STRML	DHYLKIT	SPVGMHK	QIVYWK	QWLSL	KSP	TQGS	LKTHV	LKR	WKL	FNK	QEW	TN	-	: 90
A-VN-UT31244I	:	MEQGQGT	PWTQ	STEHTNI	QKRGSG	QQTOR	PEHPN	STRML	DHYLKIT	SPVGMHK	QIVYWK	QWLSL	KSP	TQGS	LKTHV	LKR	WKL	FNK	QEW	TN	-	: 89
A-VN-UT31394I	:	MEQGQGT	PWTQ	STEHTNI	QKRGSG	QQTOR	PEHPN	STRML	DHYLKIT	SPVGMHK	QIVYWK	QWLSL	KSP	TQGS	LKTHV	LKR	WKL	FNK	QEW	TN	-	: 90
A-VN-UT31413I	:	MEQGQGT	PWTQ	STEHTNI	QKRGSG	QQTOR	PEHPN	STRML	DHYLKIT	SPVGMHK	QIVYWK	QWLSL	KSP	TQGS	LKTHV	LKR	WKL	FNK	QEW	TN	-	: 90
A-MDk-VN-56-2	:	MEQGQGT	PWTQ	STEHTNI	QKRGSG	QQTOR	PEHPN	STRML	DHYLKIT	SPVGMHK	QIVYWK	QWLSL	KSP	TQGS	LKTHV	LKR	WKL	FNK	QEW	TN	-	: 90
A-Ck-VN-NCVD-	:	MEQGQGT	PWTQ	STEHTNI	QKRGSG	QQTOR	PEHPN	STRML	DHYLKIT	SPVGMHK	QIVYWK	QWLSL	KSP	TQGS	LKTHV	LKR	WKL	FNK	QEW	TN	-	: 90
A-VN-UT3028-2	:	MEQGQGT	PWTQ	STEHTNI	QKRGSG	QQTOR	PEHPN	STRML	DHYLKIT	SPVGMHK	QIVYWK	QWLSL	KSP	TQGS	LKTHV	LKR	WKL	FNK	QEW	TN	-	: 90
A-VN-1203-200	:	MEQGQGT	PWTQ	STEHTNI	QKRGSG	QQTOR	PEHPN	STRML	DHYLKIT	SPVGMHK	QIVYWK	QWLSL	KSP	TQGS	LKTHV	LKR	WKL	FNK	QEW	TN	-	: 90
A-VN-UT3040-2	:	MEQGQGT	PWTQ	STEHTNI	QKRGSG	QQTOR	PEHPN	STRML	DHYLKIT	SPVGMHK	QIVYWK	QWLSL	KSP	TQGS	LKTHV	LKR	WKL	FNK	QEW	TN	-	: 90
A-TH-2(SP-33)	:	MEQGQGT	PWTQ	STEHTNI	QKRGSG	QQTOR	PEHPN	STRML	DHYLKIT	SPVGMHK	QIVYWK	QWLSL	KSP	TQGS	LKTHV	LKR	WKL	FNK	QEW	TN	-	: 90
A-TH-676-2005	:	MEQGQGT	PWTQ	STEHTNI	QKRGSG	QQTOR	PEHPN	STRML	DHYLKIT	SPVGMHK	QIVYWK	QWLSL	KSP	TQGS	LKTHV	LKR	WKL	FNK	QEW	TN	-	: 90
CkdT382-2008	:	MEQGQGT	PWTQ	STEHTNI	QKRGSG	QQTOR	PEHPN	STRML	DHYLKIT	SPVGMHK	QIVYWK	QWLSL	KSP	TQGS	LKTHV	LKR	WKL	FNK	QEW	TN	-	: 90
DkTG928-2009	:	MEQGQGT	PWTQ	STEHTNI	QKRGSG	QQTOR	PEHPN	STRML	DHYLKIT	SPVGMHK	QIVYWK	QWLSL	KSP	TQGS	LKTHV	LKR	WKL	FNK	QEW	TN	-	: 90
A-MDk-VN-OIE-	:	MEQGQGT	PWTQ	STEHTNI	QKRGSG	QQTOR	PEHPN	STRML	DHYLKIT	SPVGMHK	QIVYWK	QWLSL	KSP	TQGS	LKTHV	LKR	WKL	FNK	QEW	TN	-	: 89
A-KH-U0417030	:	MEQGQGT	PWTQ	STEHTNI	QKRGSG	QQTOR	PEHPN	STRML	DHYLKIT	SPVGMHK	QIVYWK	QWLSL	KSP	TQGS	LKTHV	LKR	WKL	FNK	QEW	TN	-	: 90
A-KH-V0417301	:	MEQGQGT	PWTQ	STEHTNI	QKRGSG	QQTOR	PEHPN	STRML	DHYLKIT	SPVGMHK	QIVYWK	QWLSL	KSP	TQGS	LKTHV	LKR	WKL	FNK	QEW	TN	-	: 90

Hình 3.1. Các vị trí thay đổi amino acid trong protein PB1-F2 của 25 chủng virus cúm A/H5N1 so sánh

Ghi chú: Ký hiệu 6 biến chủng virus cúm A/H5N1 nghiên cứu được in đậm trên nền sẫm màu; Các chữ cái trong trình tự đích so sánh là ký hiệu amino acid theo qui định quốc tế; Vị trí xuất hiện mã kết thúc “STOP” trong trình tự protein PB1-F2 được khoanh tròn; Vị trí thay đổi amino acid N66S trong trình tự protein PB1-F2 được đóng khung dọc.

- Trình tự protein PB1-F2 của biến chủng virus A/H5N1 nghiên cứu DkQT801-2011 clade 2.3.2.1, xuất hiện đột biến hình thành mã “STOP” tại vị trí codon thứ 10, do đó chỉ có chứa 9 amino acid. Tương tự, 2 chủng virus A/VN/UT31244II/2007 clade 2.3.4.3 và A/MDk/VN/OIE/559/2011 clade 1.1, cũng chỉ chứa 79 và 25 amino acid lần lượt theo thứ tự (Hình 3.1).

- Đặc biệt, có sự thay đổi amino acid từ arginin (N) thành serin (S) tại vị trí 66 (N66S) trong protein PB1-F2, của biến chủng virus DkQT802-2011 clade 2.3.2.1 và 2 biến chủng virus CkDT382-2008 và DkTG926-2009 clade 1.1 trong nghiên cứu, so với các chủng virus so sánh (Hình 3.1).

- Trình tự protein PB1-F2 của 2 biến chủng virus DkNA72-2007 và DkNA114-2007 clade 2.3.4.3, chứa đầy đủ 90 amino acid và bảo tồn arginin tại vị trí 66 (N66) (Hình 3.1).

3.2.2.2. Kết quả xác định khung đọc mở gen PB1-N40

Sáu biến chủng virus cúm A/H5N1 nghiên cứu và 19 chủng đại diện trong 4 nhóm virus so sánh, đều có chứa khung đọc mở gen PB1-N40 lồng trong khung đọc của gen PB1.

Khung đọc mở gen PB1-N40 được giới hạn từ mã khởi đầu ATG tại vị trí nucleotide 118 – 120 và mã kết thúc kTAG ở cuối trình tự khung đọc mở của gen PB1. Như vậy, gen PB1-N40 chứa 2.157 nucleotide mã hóa cho protein PB1-N40 gồm 718 amino acid, thiếu hụt 39 amino acid vùng đầu N-tận so với protein PB1.

3.2.2. Kết quả so sánh thành phần nucleotide và amino acid gen PA

3.2.2.1. Kết quả so sánh thành phần nucleotide và amino acid

- Trình tự gen PA của 6 biến chủng virus cúm A/H5N1 nghiên cứu, có số lượng nucleotide và amino acid được mã hóa đúng bằng trình tự gen này của 19 chủng đại diện trong 4 nhóm virus so sánh, lần lượt là 2.251 nucleotide và 716 amino acid.

- Bên cạnh nhiều vị trí sai khác đơn lẻ, có tới 166 vị trí sai khác về nucleotide trong trình tự gen PA của 6 biến chủng virus nghiên cứu và 19 chủng đại diện, tương đối tập trung theo 4 nhóm virus lựa chọn so sánh. Tuy nhiên, chỉ có 21/166 vị trí sai khác nucleotide kể trên dẫn đến thay đổi amino acid trong protein PA suy diễn.

3.2.2.2. Kết quả so sánh tỷ lệ tương đồng nucleotide và amino acid

- Tỷ lệ tương đồng về thành phần nucleotide và amino acid gen PA giữa 25 chủng virus cúm A/H5N1 so sánh, đạt lần lượt là 90% – 99% và 95% – 100%.

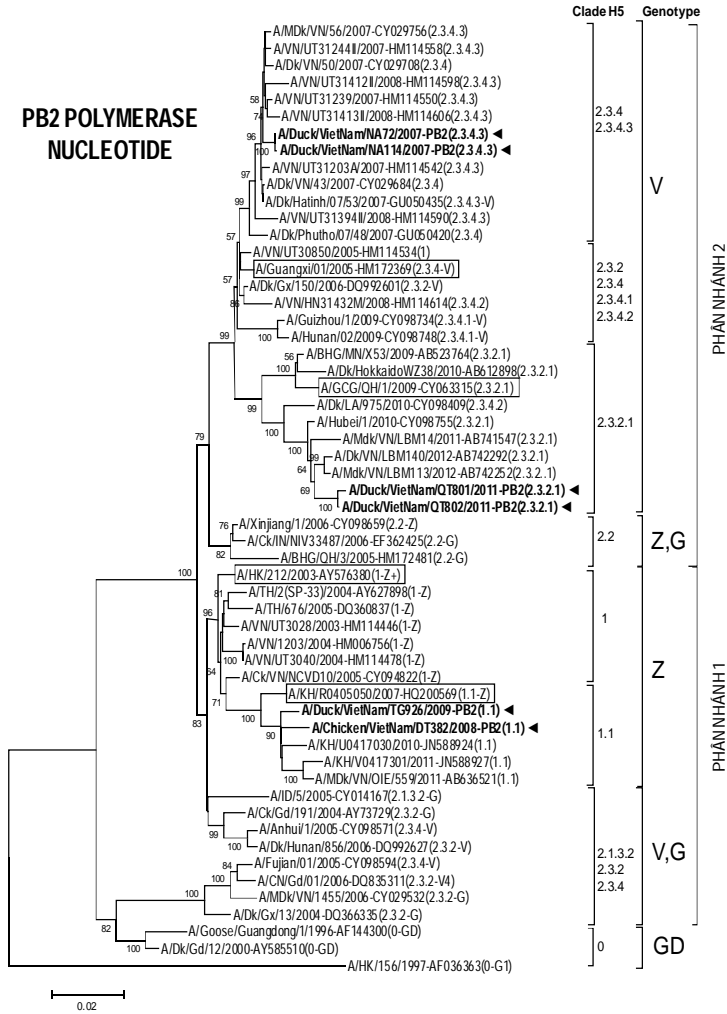
- Tỷ lệ này của gen PA giữa 6 biến chủng virus cúm A/H5N1 nghiên cứu và các chủng phân lập tại Việt Nam, so với các chủng A/H5N1 phân lập ở Trung Quốc, Campuchia, Lào và Thái Lan trong cùng nhóm clade, lần lượt đạt 93% – 99% về nucleotide và 96% – 100% về amino acid.

3.3. Kết quả xác định nguồn gốc các gen PB2, PB1 và PA của 6 biến chủng virus cúm A/H5N1 nghiên cứu

Trình tự các gen PB2, PB1 và PA của 6 biến chủng virus cúm A/H5N1 nghiên cứu, được tiến hành xác định mối quan hệ nguồn gốc với trình tự các gen tương ứng, của 50 chủng virus tham chiếu phân lập trên nhiều loài vật chủ từ 1996 đến nay, đã được xác định clade và/hoặc genotype.

3.3.1. Kết quả phân tích xác định phả hệ nguồn gốc gen PB2

- Gen PB2 của 6 biến chủng virus cúm A/H5N1 nghiên cứu cùng với các chủng virus phân lập các năm từ 2003 - 2012, tập hợp thành 1 nhánh tiến hóa có quan hệ gần gũi với nhánh tiến hóa gen tương ứng, của nhóm virus cúm A/H5N1 clade 0 thuộc genotype GD, bao gồm cả chủng virus cúm A/H5N1 nguyên thủy ban đầu A/Goose/Guangdong/1/1996 (Hình 3.2).



Hình 3.2. Cây phả hệ nguồn gốc 56 chủng virus cúm A/H5N1 dựa trên trình tự nucleotide vùng PB2 polymerase

Ghi chú: Cây phả hệ được xây dựng bằng chương trình MEGA4.1 sử dụng phương pháp liên kết cận kề (Neighbour – Joining, NJ) với hệ số bootstrap = 1000 replicates. Sáu chủng virus cúm A/H5N1 nghiên cứu được in chữ đậm và kí hiệu (◄); Kí hiệu loài vật chủ: Dk(Duck); Vịt, BHG(Bar headed - goose); Kí hiệu số và chữ cái trong ngoặc đơn sau danh pháp chủng: (clade H5-genotype) của chủng virus. Các chữ

cái Z, G, V và GD: tên genotype (kiểu gen) virus cúm A/H5N1; Tên chủng virus đại diện nguồn gốc genotype được đóng khung.

- Gen PB2 của 4 biến chủng virus A/H5N1 nghiên cứu: DkQT801-2011, DkQT802-2011, DkNA72-2007 và DkNA114-2007, tập hợp thành 1 phân nhánh tiến hóa cùng với nhóm các chủng virus clade 2.3.2.1 và 2.3.4, phân lập tại Việt Nam, Trung Quốc và Mông Cổ từ năm 2005 – 2012. Phân nhánh tiến hóa này chứa gen PB2 của chủng A/Guangxi/1/2005 clade 2.3.4 thuộc genotype V, và có sự chia tách thành 2 dưới phân nhánh (Hình 3.2). Trong đó: gen PB2 của 2 biến chủng DkQT801-2011 và DkQT802-2011, cùng với nhóm virus clade 2.3.2.1 tập hợp thành 1 dưới phân nhánh tiến hóa xa hơn, so với dưới phân nhánh gồm gen PB2 của 2 biến chủng DkNA72-2007 và DkNA114-2007 cùng với nhóm virus clade 2.3.4(2.3.4.3).

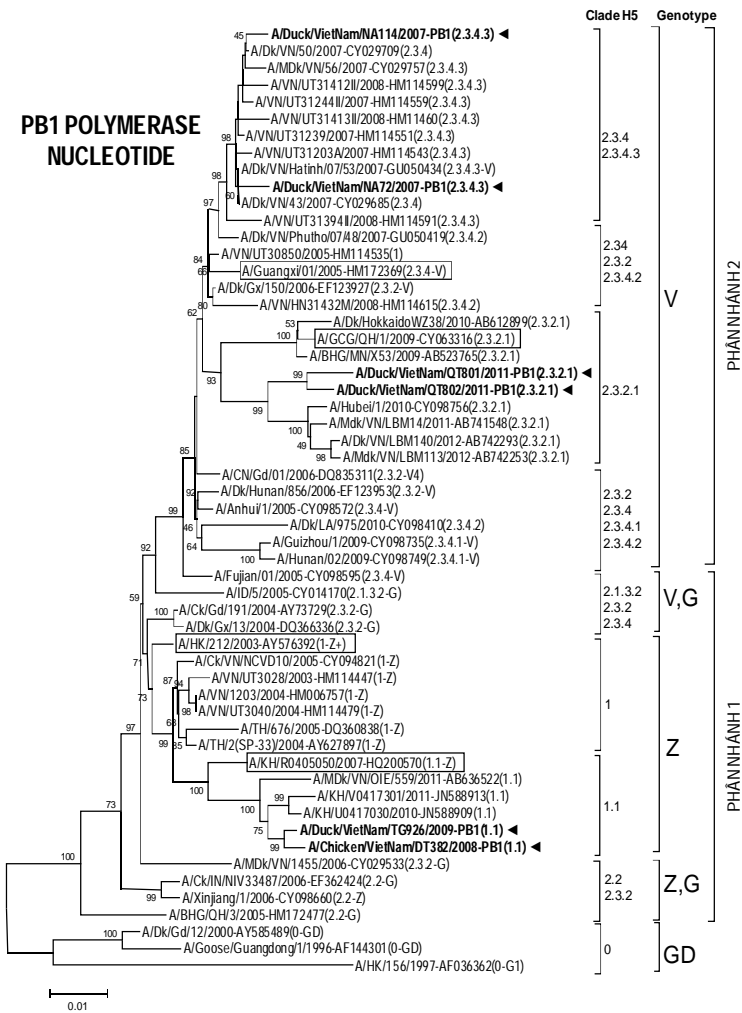
- Tương tự, gen PB2 của 2 biến chủng virus nghiên cứu: CkDT382-2008 và DKTG926-2009, tập hợp thành 1 phân nhánh tiến hóa cùng với nhóm các chủng virus clade 1 và 1.1, phân lập tại Việt Nam, Trung Quốc, Campuchia và Thái Lan từ 2003 – 2011 (Hình 3.2). Phân nhánh này gồm gen PB2 của các chủng virus đại diện: A/HK/212/2003 clade 1 thuộc genotype Z+ và A/KH/R405050/2007 clade 1.1 thuộc genotype Z.

3.3.2. Kết quả phân tích xác định phả hệ nguồn gốc gen PB1

- Tương tự gen PB2, gen PB1 của 6 biến chủng virus nghiên cứu, cùng với các chủng phân lập các năm từ 2003 - 2012 tập hợp thành 1 nhánh tiến hóa, quan hệ gần gũi với nhánh tiến hóa của nhóm virus clade 0 thuộc genotype GD (Hình 3.3).

- Gen PB1 của 4 biến chủng virus nghiên cứu: DkQT801-2011, DkQT802-2011, DkNA72-2007 và DkNA114-2007, tập hợp thành 1 phân nhánh tiến hóa cùng với nhóm các chủng virus clade 2.3.2.1 và 2.3.4, phân

lập tại Việt Nam, Trung Quốc và Mông Cổ từ năm 2005 – 2012. Phân nhánh tiến hóa này bao gồm gen PB1 của chủng virus đại diện A/Guangxi/1/2005 clade 2.3.4 thuộc genotype V (Hình 3.3).



Hình 3.3. Cây phả hệ nguồn gốc 56 chủng virus cúm A/H5N1 dựa trên trình tự nucleotide gen PB1 polymerase

Ghi chú: Cây phả hệ được xây dựng bằng chương trình MEGA4.1 sử dụng phương pháp liên kết cận kề (Neighbour – Joining, NJ) với hệ số bootstrap = 1000 replicates. Sáu chủng virus cúm A/H5N1 nghiên cứu được in chữ đậm và kí hiệu (◀); Kí hiệu loài vật chủ: Dk(Duck): Vịt, BHG(Bar headed - goose): Kí hiệu số và chữ cái trong ngoặc đơn sau danh pháp chủng: (clade H5-genotype) của chủng virus. Các chữ cái Z, G, V và GD: tên genotype (kiểu gen) virus cúm A/H5N1; Tên chủng virus đại diện nguồn gốc genotype được đóng khung.

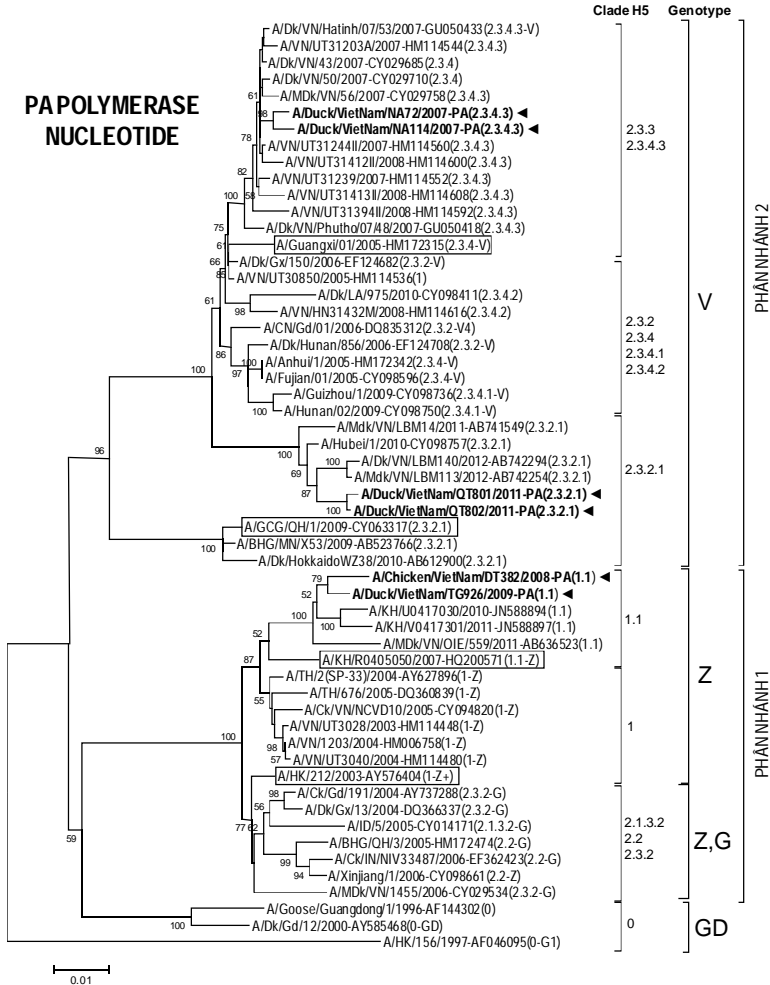
- Gen PB1 của 2 biến chủng virus nghiên cứu CkDT382-2008 và DkTG926-2009, tập hợp thành 1 phân nhánh tiến hóa cùng với nhóm các chủng virus clade 1 và 1.1, phân lập tại Việt Nam, Trung Quốc, Campuchia và Thái Lan từ 2003 - 2011. Phân nhánh này bao gồm gen PB1 của các chủng virus cúm A/H5N1 đại diện: A/HK/212/2003 clade 1 thuộc genotype Z+ và A/KH/R405050/2007 clade 1.1 thuộc genotype Z (Hình 3.3).

3.3.2. Kết quả phân tích xác định phả hệ nguồn gốc gen PA

- Tương tự gen PB2 và PB1, gen PA của 6 biến chủng virus nghiên cứu, cùng với các chủng phân lập các năm từ 2003 - 2012 tập hợp thành 1 nhánh tiến hóa, quan hệ gần gũi với nhánh tiến hóa của nhóm virus clade 0 thuộc genotype GD (Hình 3.4).

- Gen PA của 4 biến chủng virus nghiên cứu: DkQT801-2011, DkQT802-2011, DkNA72-2007 và DkNA114-2007, tập hợp thành 1 phân nhánh tiến hóa cùng với nhóm các chủng virus clade 2.3.2.1 và 2.3.4, phân lập tại Việt Nam, Trung Quốc và Mông Cổ từ năm 2005 – 2012. Phân nhánh này bao gồm gen PA của chủng virus đại diện A/Guangxi/1/2005 clade 2.3.4 thuộc genotype V, và có sự chia tách thành 2 dưới phân nhánh (Hình 3.4). Trong đó: gen PA của 2 biến chủng DkQT801-2011 và DkQT802-2011, cùng với nhóm virus clade 2.3.2.1 tập hợp thành 1 dưới phân nhánh tiến hóa xa hơn, so với dưới phân nhánh tiến hóa gồm gen PA của 2 biến chủng DkNA72-2007 và DkNA114-2007 cùng với nhóm virus clade 2.3.4(2.3.4.3).

- Gen PA của 2 biến chủng virus nghiên cứu: CkDT382-2008 và DkTG926-2009, tập hợp thành 1 phân nhánh tiến hóa cùng với nhóm các chủng virus clade 1 và 1.1, phân lập tại Việt Nam, Trung Quốc, Campuchia và Thái Lan từ 2003 - 2011. Phân nhánh này bao gồm gen PA của các chủng virus cúm A/H5N1 đại diện: A/HK/212/2003 clade 1 thuộc genotype Z⁺ và A/KH/R405050/2007 clade 1.1 thuộc genotype Z (Hình 3.4).



Hình 3.4. Cây phả hệ nguồn gốc 56 chủng virus cúm A/H5N1 dựa trên trình tự nucleotide gen PA polymerase

Ghi chú: Cây phả hệ được xây dựng bằng chương trình MEGA4.1 sử dụng phương pháp liên kết cận kề (Neighbour – Joining, NJ) với hệ số bootstrap = 1000 replicates. Sáu chủng virus cúm A/H5N1 nghiên cứu được in chữ đậm và kí hiệu (◀); Kí hiệu loài vật chủ: Dk(Duck); Vịt, BHG(Bar headed - goose); Kí hiệu số và chữ cái trong ngoặc đơn sau danh pháp chủng: (clade H5-genotype) của chủng virus. Các chữ

cái Z, G, V và GD: tên genotype (kiểu gen) virus cúm A/H5N1; Tên chủng virus đại diện nguồn gốc genotype được đóng khung.

Chương 4. BÀN LUẬN

4.1. Về kết quả thu nhận các gen PB2, PB1 và PA của 6 biến chủng virus cúm A/H5N1 nghiên cứu

Sáu biến chủng virus cúm A/H5N1 nghiên cứu, gồm: DkNA72-2007, DkNA114-2007, CkDT382-2008, DkTG926-2009, DkQT801-2011 và DkQT802-2011, chứa các gen PB2, PB1 và PA thu nhận sau giải trình tự, có kích thước lần lượt là 2.280, 2.274 và 2.151 nucleotide theo thứ tự, với mã khởi đầu là ATG và mã kết thúc là TAG. Đây cũng là tổng số nucleotide trong trình tự vốn có của các gen PB2, PB1 và PA trong hệ gen virus cúm A/H5N1 được phân lập, nghiên cứu và công bố từ năm 1996 đến nay. Điều này chứng tỏ không có đột biến làm thay đổi độ dài các gen kể trên của 6 biến chủng virus nghiên cứu, so với gen tương ứng của virus cúm A/H5N1 kể từ khi phát sinh hình thành cho đến nay.

4.2. Về kết quả so sánh thành phần nucleotide và amino acid các gen PB2, PB1 và PA của 6 biến chủng virus cúm A/H5N1 nghiên cứu với các chủng của thế giới

- Trình tự gen PB2 của 6 biến chủng virus cúm A/H5N1 trong nghiên cứu, đều có sự bảo tồn amino acid tại các vị trí E627 và D701. Kết quả này chứng tỏ rằng, gen PB2 của 6 biến chủng virus nghiên cứu chưa có đột biến, giúp virus thích nghi nhân lên trong tế bào cảm thụ ở cơ thể người.

- Protein PB1-F2 của biến chủng virus DkQT801-2011, chỉ chứa 9 amino acid. Bên cạnh đó, protein này của các biến chủng virus DkQT802-2011, CkDT382-2008 và DkTG926-2009, có đột biến thay đổi amino acid N66S.

Điều này cho thấy, các biến chủng virus nói trên có sự xuất hiện các đột biến trong trình tự protein PB1-F2, liên quan đến thay đổi độc lực gây bệnh của virus ở cơ thể vật chủ, làm cho dịch tễ và bệnh học của virus cúm A/H5N1 trở nên phức tạp và khó dự đoán.

- Trình tự các gen PB2, PB1 và PA của 6 biến chủng virus cúm A/H5N1 nghiên cứu, cùng với các chủng virus phân lập tại Việt Nam, có tỷ lệ tương đồng cao (92%-99%) về nucleotide và (96 – 100%) về amino acid, so với trình tự gen tương ứng của các chủng virus cùng phân nhóm clade, phân lập tại Trung Quốc, Campuchia, Lào và Thái Lan. Kết quả này cho thấy, các gen PB2, PB1 và PA của 6 biến chủng virus nghiên cứu, cũng như các chủng virus phân lập tại Việt Nam, có cùng nguồn gốc với các chủng virus lưu hành và gây bệnh dịch cúm A/H5N1 ở các quốc gia nói trên.

4.3. Về kết quả so sánh phức hợp enzym polymerase của 6 biến chủng virus A/H5N1 nghiên cứu với các chủng của thế giới

Phức hợp enzym polymerase của 6 biến chủng virus cúm A/H5N1 nghiên cứu, có sự thay đổi 12 amino acid gồm: 4 vị trí (I504V, Q508R, I675L và A683T) trong protein PB2, 4 vị trí (L13P, V171M, R198K và H436Y) trong protein PB1 và 4 vị trí (P224S, S515T, I550L và N615K) trong protein PA, tương tự nhóm virus cúm A/H5N1 độc lực cao. Kết quả này cho thấy, phức hợp enzym polymerase của 6 chủng virus cúm A/H5N1 trong nghiên cứu, đang có sự bảo tồn đặc tính của nhóm virus cúm A/H5N1 độc lực cao.

4.4. Về kết quả xác định phả hệ nguồn gốc các gen PB2, PB1 và PA của 6 biến chủng virus cúm A/H5N1 nghiên cứu với các chủng của thế giới

Kết quả phân tích xác định phả hệ nguồn gốc cho thấy: Các gen PB2, PB1 và PA của 6 biến chủng virus cúm A/H5N1 nghiên cứu, cũng như của các chủng virus phân lập tại Việt Nam, đều có quan hệ nguồn gốc từ nguồn gen tương ứng của virus cúm A/H5N1, được hình thành tại Trung Quốc và lưu hành ở Campuchia, Lào, Thái Lan.

- Các gen PB2, PB1 và PA của 4 chủng virus DkQT801-2011, DkQT802-2011, DkNA72 và DkNA114, cùng với 2 nhóm virus clade 2.3.2.1 và 2.3.4.3 phân lập tại Việt Nam, có nguồn gốc từ nguồn gen virus A/H5N1 thuộc genotype V, hình thành và lưu hành tại Trung Quốc từ năm 2005. Trong khi các gen trên của 2 chủng virus CkDT382-2008 và DkTG926-2009, cùng với 2 nhóm virus clade 1 và 1.1 phân lập tại Việt Nam, lại có nguồn gốc từ nguồn gen virus A/H5N1 thuộc genotype Z, hình thành trước đây tại Trung Quốc từ năm 2003.

Các kết quả trên cũng phù hợp với các nghiên cứu đã được công bố trước đây của nhiều tác giả, về nguồn gốc các gen H5, N1 hoặc cả hệ gen của virus cúm A/H5N1, lưu hành gây bệnh dịch tại Việt Nam và các quốc gia trên thế giới.

KẾT LUẬN

1. Sáu biến chủng virus cúm A/H5N1 trong nghiên cứu, thuộc 3 nhóm clade 2.3.2.1, 2.3.4.3 và 1.1, phân lập ở gia cầm chết bệnh tại Việt Nam từ năm 2007 - 2011, chứa các gen PB2, PB1 và PA:

- Có độ dài lần lượt là: 2.280, 2.274 và 2.151 nucleotide, mã hóa cho 759, 757 và 716 amino acid theo thứ tự, không có đột biến thay đổi số lượng nucleotide và amino acid được mã hóa, so với các gen tương ứng của virus cúm A/H5N1 phân lập từ 2003 đến nay.

- Protein PB2 của 6 biến chủng virus nghiên cứu, có sự bảo tồn glutamic acid tại vị trí 627 (E627) và aspartic acid tại vị trí 701 (D701).

- Protein PB1-F2 của biến chủng A/Duck/VietNam/QT801/2011(H5N1) clade 2.3.2.1 chỉ chứa 9 amino acid. Protein PB1-F2 của biến chủng virus A/Duck/VietNam/QT802/2011(H5N1) clade 2.3.2.1, và 2 biến chủng clade 1.1: A/Chicken/VietNam/DT382/2008(H5N1), A/Duck/VietNam/TG926/2009(H5N1), chứa đầy đủ 90 amino acid và có đột biến thay đổi arginin thành serin tại vị trí 66 (N66S). Protein PB1-F2 của 2 biến chủng virus: A/Duck/VietNam/NA72/2007(H5N1) và A/Duck/VietNam/NA114/2007(H5N1) clade 2.3.4.3, chứa đầy đủ 90 amino acid không có đột biến N66S.

- Phức hợp enzym polymerase của 6 biến chủng virus cúm A/H5N1 nghiên cứu, có sự thay đổi 12 amino acid gồm: 4 vị trí (I504V, Q508R, I675L và A683T) trong protein PB2, 4 vị trí (L13P, V171M, R198K và H436Y) trong protein PB1 và 4 vị trí (P224S, S515T, I550L và N615K) trong protein PA, tương tự nhóm virus cúm A/H5N1 độc lực cao.

2. Các gen PB2, PB1 và PA polymerase của 6 biến chủng virus: A/Duck/VietNam/QT801/2011(H5N1) và A/Duck/VietNam/QT802/2011(H5N1) clade 2.3.2.1, A/Duck/VietNam/NA72/2007(H5N1) và A/Duck/VietNam/NA114/202007(H5N1) clade 2.3.4.3, A/Chicken/VietNam/DT382/2008(H5N1) và A/Duck/VietNam/TG926/2009(H5N1) clade 1.1, lần lượt theo thứ tự đều có sự tương đồng 96% - 99% về nucleotide và 98% - 99% về amino acid, so với gen tương ứng của các nhóm virus clade 2.3.2.1, 2.3.4.3 và 1.1 phân lập từ 2007 đến nay.

3. Các gen PB2, PB1 và PA polymerase của 2 biến chủng virus A/Duck/VietNam/QT801/2011(H5N1) và A/Duck/VietNam/QT802/2011(H5N1) clade 2.3.2.1, cùng với 2 biến chủng A/Duck/VietNam/NA72/2007(H5N1) và

A/Duck/VietNam/NA114/202007(H5N1) clade 2.3.4.3, đều có nguồn gốc từ nguồn gen virus A/H5N1 genotype V hình thành ở Trung Quốc giai đoạn 2004 - 2006. Các gen trên của 2 biến chủng virus A/Chicken/VietNam/DT382/2008(H5N1) và A/Duck/VietNam/TG926/2009(H5N1) thuộc clade 1.1, có nguồn gốc từ nguồn gen virus A/H5N1 thuộc genotype Z hình thành ở Trung Quốc giai đoạn 2002 - 2003.

KIẾN NGHỊ

Giải trình tự các gen M, NP và NS của một số chủng virus cúm A/H5N1 clade 2.3.2.1 phân lập từ 2011 đến nay, nhằm có thêm đầy đủ cơ sở dữ liệu xác định chính xác genotype, đánh giá toàn diện đặc tính biến đổi di truyền liên quan bệnh học và lây truyền trên người của nhóm virus này.

BACKGROUND

One of the most important phase of the procedure of IVF is the stimulation of the ovary. Under the activity of the stimulation on the ovary, about 80% of cycles display the suitable responses activities, but 10-20% is deficit or less responses, 9-24% is the rate of less responses of ovarian stimulation. Therefore, the number of collected, transferred fetuses, the rate of success are decreased and the cost of treatment increased.

Experimental and clinical evidences demonstrate the role of the LH in the optimum development and the perfect growth of the ova and the induce of ovulation. Studies demonstrate that the complement of LH for the groups of less responsiveness to ovarian stimulation increase the successful rate of the cycles of IVF. However, diverse studies gave the different results because of the choice of the subjects of study and the designs and the diverse dimensions of studying samples, thus confirm the effective methods.

The Department of the Reproduction Assistance at the Central Hospital of Obstetrics and Gynecology is the biggest center of IVF in North Vietnam. With the long procedure the patients of less responsiveness possessed by 21%. The short procedure of agonist combining with FSH or FSH+LH is the first choice in the patients with less responsiveness. LH maybe recombinant LH or human Menopausal Gonadotropin. There is no simple preparation of recombinant LH on

market, there is only high price FSH preparations- in combining with recombinant LH in the rate of 2:1. Thus, LH in hMG is the preparation of choice for complementing of LH. However, this is a preparation of controversial needing the physician's experience. What is the effect of LH on the patients with less responsiveness group? What is the relation between the complementing of LH and the cause of the risk of early luteinizing. What is its influence on the mucous membrane of the uterus and the rate of fecundation. Responding such those questions for discovering the effective procedure to stimulate the less responsiveness cases in IVF, we perform the studies on the effective procedures of treating the cases focusing these objectives:

- 1. To evaluate the effect of the short protocol/hMG and the short protocol/rFSH for treating ovary responds poorly in in vitro infertilization at in the National Hospital of Obstetrics and Gynecology.***
- 2. To analyse some factors involving in the results of ovarian stimulation in IVF.***

Practical meaning and new contributions of the thesis

1. The effect of short protocol/HMG and the short protocol/rFSH on the poor responder in IVF was evaluated. The short protocol/HMG gave the higher result in comparing with the short protocol/rFSH concerning the average of ova, the quality of fetus of 3rd grade, the amount of freeze fetuses, the cycles processing freeze fetuses. The results increase the chances of with the own ovule for the group of patients with the less responsiveness ovarian stimulation. The short protocol/HMG is the procedure manifest the noble humanist, safe, effective and economical.
2. Dose 75 IU LH in HMG does not manifest the negative effect on the quality of the ovule, the thickness and the form of the uterus does not induce the early luteinizing.
3. Study demonstrated the use of a short regimen LH supplementation in a dose hMG 75IU per day not affect oocyte quality, thickness and shape of the uterine lining, causing no royal phenomenon som 4 materialize.

Structure of the thesis

A part from the foreword and conclusion, structure of this thesis consist of 4 part: Part 1: Review, 36 pages; Part 2: Subject and method, 17 pages; Part 3: Requests, 16 pages; Part 4: Discussion, 34 pages; 12 images, 26 tables, 8 graphs, 3 schemes, 133 preference (28 English and 105 Vietnamese).

Part 1: Review

1.1. Scientific notion of Ovarian stimulation

Ovarian stimulation is an approach making the premature follicles develop to mature follicles growing a large number of strong follicles, then collect them for IVF. The mechanism of this development of the follicles and the growth of estradiol level in this process is explained through the notion of FSH threshold, LH ceiling and the system of 2 cells, 2 gonadotropins.

1.1.1. FSH threshold

FSH manifests an important role in process of choice selecting and make the follicle surpassed. Certain quantity of excreted FSH is needed to make the developed follicle defined as FSH threshold. For diverse follicle, FSH is not identical, thus for numerous follicles, FSH must be surpassed over the less sensitive follicles. Therefore, the growing of FSH in the beginning phase of the cycle is a key factor for selecting the necessary follicles. Maintaining FSH surpassed level to the mature period of follicle is the important factor of controlled ovarian stimulation.

1.1.2. LH Ceiling

LH receptor exists on the cells of the peel and appears on the cells of the seed once a stimulation has a complete effect on the seed cells, marking the seed cell ripened in the follicle before the ovulation appeared immediately to LH. Experimental and clinical trials express that the development of the follicle does not need LH but LH possess the role of completing the growth of the follicle, inducing the ovulation.

LH is needed in the synthesis of estradiol and maintaining the surpassed of the follicles. The clinical trial demonstrate that the ovarian stimulation in surplus doses of LH give the negative influences on the normal development of the follicles. In diverse stages of development, surpassing the ceiling level will inhibit the seed cell, inducing the degeneration of the premature follicle and make early luteinizing before ovulation of follicles.

1.1.3. Two cells, two gonadotropins system

The system composes of seed cells and peel cells. The system of 2 gonadotropins composes of FSH and LH. FSH combining with their receptor on seed cell, stimulating their development of the follicles and inducing the activity of aromatase enzyme. LH link with its receptor in the peel, stimulation its production of androgene. Under the effect of aromactasa enzyme androgene transformer to estradiol. Estrogen induce the link with LH, making the maturation of follicles inducing the ovulation and the development of lutein.

1.2. “LH window” in the ovarian stimulation

1.2.1. The role of LH in a cycle of natural development of the follicle

LH was synthesized by the genitotrophic cells in the anterior lobe of the hydrothalamus gland. Normal secretion of LH depends on the biological secretion of GmRH, balanced by the positive and negative feedback. High level of estrogene in the ovum phase make the positive feedback and high level of progesterone in the lutein phase making negative phase. Thus, the LH low level under the minimum need level, the synthesized estrogen level will be not enough for the development of the follicles and the mucus of the uterus.

Ovulation: Top induces a series of events forward the ovulation. Top LH stimulates the consecutive meiosis dividing of the ovum, the luteinizing og the seed cells, the synthsin of progesterone ad prostaglandin in the follicles.

Progesteron increases the action of the lysto-enzym and with prostaglandin maker the follicle broken. Top FSH appeared in the mid-cycle liberates the follicl, transforming plasminogene to proteolytic enzyme, plasmin.

LH stimulates the synthesis of androgene in the peel cells, transported through the seed cell. It is the precursor for the synthesizing estrogen in the seed cell, make the ovary more sensitive to FSH, making the follicle matured, making ovulation in

meeting hCG it increase the luteinizing. LH receptor also exist in the mucous the membrane of the uterus. Therefore, LH exprimes the role in ovulation.

1.2.2. The notion of LH window in the stimulation of the ovary

All scheme of ovarian stimulation in IVF inhibit the production of LH, therefore, theoretically, in some cases, its supplement is necessary. Practically in 10-20% of patients, the responsiveness to current schemes of ovarian stimulation is in appropriate.

LH is not enough, but the completing is in controversy

Studies show that

- LH < 1.2 mIU/ml: follicles is under developed steroid hormone is less symthetized the growth of follicle is in perfect, with a low rate of fecundation.
- LH > 5 mIU/ml: LH receptor decreased inhibit the growth of seed cell, less fecundation in IVF.
- $1,2 \text{ mIU} \leq \text{LH} < 5 \text{ mIU/ml}$ optimum development of follicle, perfect growth.

1.2.3. The case needed a completing of LH

Degeneration of the control ovary (group I following WHO classification)

- Previously, less responsiveness to ovarian stimulation (4 follicles with ovarian stimulation following the standard scheme, minimum dose of FSH of 300 IU/day)
- Non optima ovarian responsiveness in the treatment cycle: 6 FSH a day (no follicle > 10 mm, $E_2 < 200 \text{ pg/ml}$, uterus mucous membrane < 6 mm)
- Age ≥ 35 .

1.3. The scheme of ovarian stimulation in IVF

Ovarian stimulation agent used to reach the maximum mature follicles in each cycle of ovarian stimulation. Then stimulation the last phase of follicle development, in this moment, planing the moment od removing the follicles.

1.3.1. The scheme of simple gonadotropin

hMG or simple FSH to ovarian stimulation in IVF began to early 8th decade of this century. The scheme is using scarcely because of the scarce of the early controlled appearance of top LH, making bad consequense of ovarian stimulation and the rate of success. Therefore, currently the schemes of ovarian stimulation in IVF must be combining with FSH and GnRH or GnRH antagonist.

1.3.2. The scheme of GnRH against and gonadotropins

FSH stimulates the development of the follicle, while GnRH agonist hinders the appearance of early LH top, entirely limit the ovulation and early LH top, entirely

limit the ovulation and early luteinization, increase the sum of collected ovum in each cycle and mature follicles. There are 2 schemes of ovarian stimulation:

- The short and the long protocols.

- Long protocol (down regulation protocol subcutaneous injection of 0.1mg diphereline in continuous 14 days, beginning at the 21th day or the first day of menstrual cycle and then diphereline doses decreases by 1/2 part (to 0.05 mg). This combining prolong 10-12 days up to get at 1 follicle of diameter of $\geq 18\text{mm}$ (in the ultrasound image), then use hCG to stimulate the growing of the follicle. After 36 hours of gathering of follicles transfer the fetus at the 2nd or 3rd day. This is the standard protocol for the patients of prognosis with the normal responsiveness to ovarian stimulation, the must using protocol in the centers of reproduction aid. In the year of 2003, at the central Hospital of Gynecology and Obstetrics, this protocol was applied at 85.7% of the cycles of IVF and rate of clinical fecundation got 34.8%.

- Short protocol (flare up protocol)

Dipherelin is given in the 2nd day of this cycle, from the 3rd day, it decreases to 0.05 mg combining with FSH. Follow the development of follicle, get it and transfer the fetus as in the long protocol. This protocol used to applied at the () of the risk of less responsiveness to ovarian stimulation.

1.3.3. The scheme of GnRH antagonist gonadotropin

Recently, GnRH antagonist used for ovarian to limit top LH. The time of stimulation is shorter with less quantity of the medicine. In comparing with GnRH agonist 2 schemes do not show the statistic significant difference in limiting the top LH. GnRH antagonist give a less rate of severe surpass stimulation than GnRH agonist protocol but the rate of clinical fecundation is less than in the GnRH antagonist.

Currently, the most common scheme of ovarian stimulation is the of GnRH agonist in combining with gonadotropin and the protocol of GnRH antagonist in combining with gonadotropin.

1.4. Poor response to ovarian stimulation

1.4.1. Definition

Poor response to ovarian stimulation for in vitro fertilization is the condition where the number of superior follicles on day of hCG injection and retrieved oocytes is low. Currently there is no consensus in the medical documents about the criterion to diagnose poor response (low responder, poor responder). However, many authors have used a number of thresholds to evaluate a poor response to ovarian stimulation as the following:

- There are < 4 follicles on the day of hCG injection.
- Content of E2 <500 pg/ml on the day of hCG injection.
- Number of retrieved oocytes < 4.

Poor response to ovarian stimulation usually occurs in older women (over 35 years), high levels of basic FSH and low antral follicle count (AFC), those with surgery to remove ovarian tumor tissues causing reduction of volume of healthy tissues of ovary, those have severe pelvic or endometriosis.

1.4.2. Causes

All causes of reduction of ovarian reserve such as: age, history of ovarian or pelvic surgery, endometriosis, uterine fibroids ... is those leading to poor response to ovarian stimulation. However, there is a group of patients with normal ovarian reserve but still poor ovarian response.

1.4.3. Standard for diagnosis

Diagnosis of poor response to ovarian stimulation is based on the presence of 1 of 2 signs:

- The number of follicles on ultrasound scan on the day of hCG injection or number of retrieved oocytes less than 4.
- E2 concentration on the 6th day of ovarian stimulation <200pg/ml or E2 concentration on the day of hCG injection <500pg/ml.

1.4.4. Classification of poor response: Poor responders are commonly in one of three groups:

- Patients with a history of poor ovarian response but the basic FSH concentration is in the normal range
- Younger patients but have basic FSH concentration last long
- Older patients with abnormal endocrine

In three groups above, only the first two groups when changing treatment regimens are capable of improving the success rate. With the 3rd group, the most effective treatment options for these cases is the technique of in vitro fertilized with donated ovule.

CHAPTER 2 SUBJECT AND METHODOLOGY

2.1. Subject of study

Including patients of in vitro fertilization in the Assisted Reproduction Center, National Hospital of Obstetrics and Gynecology from January 2012 to June 2013.

* Standards of selection:

- Patients with a history of poor ovarian response in in vitro fertilization (Number of follicles on ultrasound scan on the day of hCG injection \leq 4, retrieved oocyte \leq 4)
- Groups at risk of poor response when there is one of the following signs:
 - Age \geq 35

- AFC (Antral Follicle Count) <5 follicles
- Basic FSH > 10mIU/ml
- Husband's semen analysis is normal
- The number of times to do IVF ≤ 3

* **Exclusion criteria:**

- Age > 40
- With a history of ovarian surgery
- Endometriosis in the uterus and ovary
- There are abnormalities in the uterus: uterus fibroids, fibred uterus, uterine stick
- Husband's semen analysis is abnormal
- The number of times to do IVF ≥ 3

2.2. Methodology

2.2.1. *Design of study:* Random clinic test with control group

2.2.2. *Sample size:* according to formula to calculate sample size for interference study of WHO [92]

$$N = \frac{\left\{ Z_{1-\alpha/2} \sqrt{2P(1-P)} + z_{1-\beta} \sqrt{P_1(1-P_1) + P_2(1-P_2)} \right\}^2}{(P_1 - P_2)^2}$$

- N = number of subjects for each group
- Significance weight: $\alpha = 5\%$, $Z_{1-\alpha/2} = 1,96$

- Strength: $1-\beta=80\%$, $Z_{1-\beta} = 0,84$
- $P_1 = 42,3\%$: clinic rate in short-course/ hMG under the study of Kolibianakis (2007 in Bilbao- Spain) [93].
- $P_2 = 30\%$ clinic pregnancy rate in short-course/rFSH under study of Marr R, Scholcraft (2004 in Colorado – USA) [94].
- $P = (P_1 + P_2)^2/2 = (0,42 + 0,3)^2/2 \sim 0,26$

Replace with number, we have $N = 93$

Expected treatment canceling rate is 15%.

Therefore, the study will take sample size of 110 patients for each course.

2.2.3. Steps of study

2.2.3.1. Clinic examination and testing

Before starting the implementation of in-vitro fertilization, each couple has clinical examination and basic laboratory tests

• For the wife:

- general gynecological examination.
- Tests: HBsAg, TPHA, HIV, Chlamydia, blood counts, blood chemistry, basic endocrine tests FSH, LH, E2 on the 2nd day or the 3rd day of the menstrual cycle.
- Ultrasound scan of the uterus and two ovaries.

• For the husband:

- Male general medical examination.
- Tests: HBsAg, TPHA, HIV and semen.

2.2.3.2. Steps of study

After completing records of infertility treatment, the study subjects are eligible for selection criteria and exclusion criteria will be treated according to the following steps:

1. Grouping study group by layered sample random selection:
 - HMG group: with short course with hMG supplementation
 - rFSH group (control group): with short-course combining use of rFSH
2. Monitoring the development of follicles in ultrasound scan and hormone testing.
3. Mature ovule with hCG.
4. Oocyte aspiration and flush out sperm.
5. Oocyte quality assessment
6. Perform fertilization techniques by Intra-cytoplasmic Sperm (ICSI).
7. Assessing the quality of embryos
8. Transfer embryos into the uterus: 3rd day embryo transfer.
9. Luteal phase support.
10. β hCG test to determine pregnancy and ultrasound to monitor the fetal development.
11. Assessing the results of ovarian stimulation of two courses:
 - The response of the ovaries, number of follicles ≥ 14 mm on the day of hCG injection
 - The number of retrieved ovules, embryos
 - The number of good embryos (embryo grade 3).
 - The number of embryos to be frozen.
 - The rate of biochemical pregnancy, rate of clinical pregnancy.
 - Factors related to the outcome of in vitro fertilization.

2.3. Data analysis

- Compare the difference of mean values between the two groups by T-test and Mann-Whitney test for normally distributed variables and **abnormally distributed variables.**
- Compare the difference of the mean values of the 3 groups by Anova test.
- The mean values are expressed as Mean \pm SD.
 - Compare the difference between the ratios by Chi-square test.
 - Multivariate regression analysis to evaluate factors related to the response of the ovaries, number of retrieved ovules, implantation rate and clinical pregnancy rate.
 - $p < 0.05$ indicates significant difference statistically.

2.4. Ethics of study

Use of short course with LP supplementation is one of the measures to tackle poor response to ovarian stimulation for in vitro fertilization. The study is to find effective measures with poor responder group aiming to bring opportunities of pregnancy with her own ovule for infertile patients before having to take oocyte IVF with **donored ovule**. This is greatly humanitarian.

The study outline has been adopted and approved by the scientific council of the Hanoi Medical University to be conducted at the Assisted Reproduction Center, the National Hospital of Obstetrics and Gynecology. The patient was fully consulted on the use of ovarian stimulation drugs, procedures of in vitro fertilization, the risk of ovarian hyperstimulation, poor ovarian response, fertilization ability, clinical pregnancy possibility the pregnancy outcome of in vitro fertilization. The patient agreed to participate in the study and signed a commitment agreement to take in vitro fertilization.

The patient information is kept confidential, used only for study purposes but not used for any other purpose.

Chapter 3. STUDY OUTCOME

3.1. The homogeneity of two protocols

Table 3.1. The homogeneity of two protocols on research object feature

General features	hMG group	rFSH group	p
	X ± SD	X ± SD	
Average age (year)	34,2 ± 4,3	35,1 ± 5,7	0,9
Basic FSH (IU/L)	8,3 ± 4,9	8,0 ± 2,7	0,4
BMI	20,6 ± 2,1	20,1 ± 1,9	0,9
AFC (follicle)	6,4 ± 2,0	5,8 ± 1,9	0,7

3.2. Assess the effectiveness of the two protocols

3.2.1. Assess the result of ovarian stimulation of the two protocols

Table 3.2. Assess the result of ovarian stimulation

Cycle feature KTBT-TTON	hMG group		rFSH group		p
	n	(%)	n	(%)	
Rate of clinical pregnancy	23	22,1	18	17,1	0,5
Rate of cycle delimitation	6	5,4	5	4,5	0,9
Poor response rate	40	36,4	46	41,8	0,5

	<i>Average</i>		
Number of FSH (IU/L) injection days	9,4 ± 0,7	9,1 ± 0,9	0,9
Total dose FSH (IU/L)	3082,3 ± 387,0	3586,6 ± 462,0	0,05
Average NMTC (mm)	10,8 ± 2,2	11,5 ± 3,3	0,2
Average number of ovuls	6,0 ± 2,5	4,9 ± 3,3	0,002
Average number of IVF ovuls	4,5 ± 2,5	3,9 ± 2,1	0,08

3.2.2. Assess the hormonal changes during ovarian stimulation

- *Assess the E2 concentration changes*

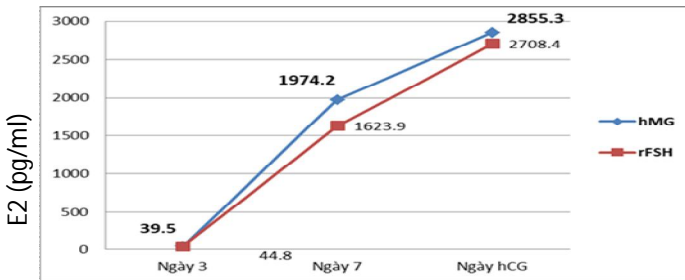


Diagram 3.1. Concentration changes E2

- *Assessment LH concentration changes*

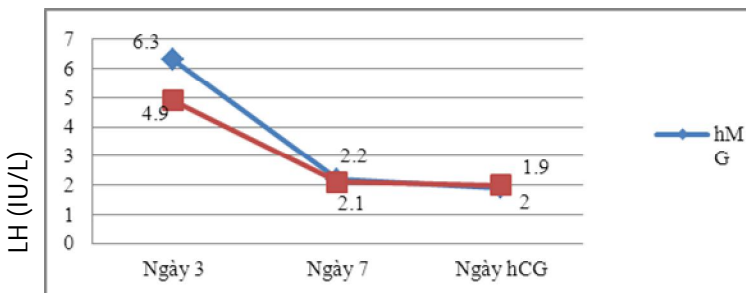


Diagram 3.2. Concentration changes LH

- *Assess the P4 concentration changes*

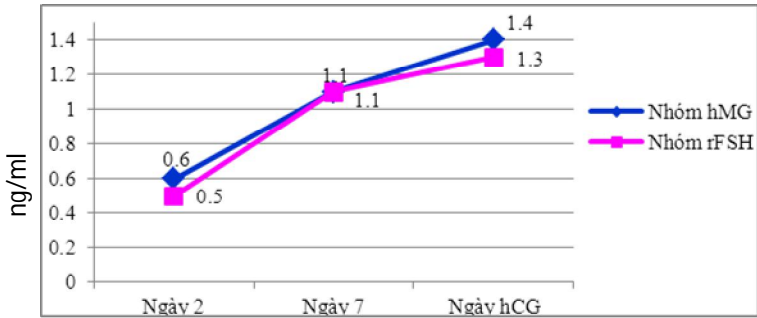


Diagram 3.3. Assessment of concentration changes P4

3.2.3 Assessment of ovul quality of the two protocols

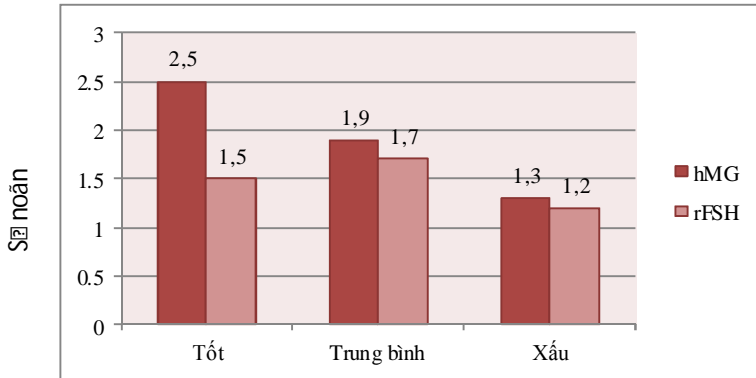


Diagram 3.4. Assessment of ovuls quality of the two protocols

3.2.4. Assessing the quality of embryos of the two protocols

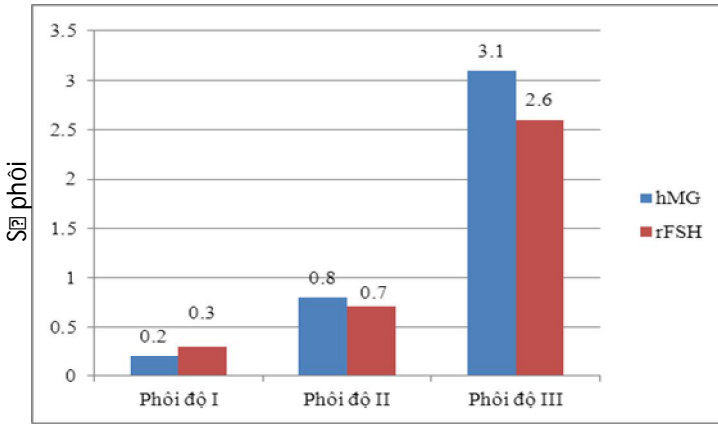


Diagram 3.5. Quality of embryos of the two groups

3.2.5. Assess the clinical pregnancy rate of the two protocols

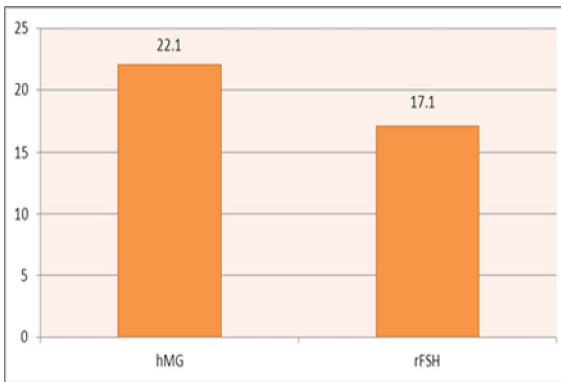


Diagram 3.6. Clinical pregnancy rate /Embryo transfer

3.3. Factors related to the outcome of in vitro fertilization of the two protocols

3.3.1. Factors related to poor response to ovarian stimulation

Table 3.4. Multivariate regression model related to poor response to ovarian stimulation

Related factors (independent difference)		PaAoor response (dependent difference)	
		OR	Reliable range 95% (CI)
Age	≥ 35	2,23	1.1 – 4.8 (*)
	< 35		

Related factors (independent difference)		PaAoor response (dependent difference)	
		OR	Reliable range 95% (CI)
BMI	≥ 23	1,39	0,5 – 4,1
	< 23		
BasicFSH (IU/l)	≥ 10	2,31	1,1 – 4,7 (*)
	< 10		
AFC (follicle)	≤ 5	2,9	1.1 – 8,3 (*)
	< 5		
E2 day 7 (pg/ml)	≤ 300	12,9	5.6 – 67,8 (*)
	> 300		
E2 day hCG (pg/ml)	≤ 1000	1,2	0,7 – 2,2
	> 1000		
LH day 7 (IU/l)	$\leq 1,2$	2,55	1,1 – 5,68 (*)
	$> 1,2$		
LH day hCG (IU/l)	$\leq 1,2$	0,77	0.3 - 1.8
	$> 1,2$		
P4 day 7 (nmol/l)	> 1	0,34	0.3 - 1.5
	≤ 1		
P4 day hCG (nmol/l)	$> 1,5$	1,75	0.9 – 3,9
	$\leq 1,5$		

(*): Statistical difference with $p < 0,05$

When the age is above 35, the risk of a poor response to ovarian stimulation is 2.23 times higher than the age group under 35. Group with number of antral follicle count (AFC) under 5 has risk of poor response 2.9 times higher than the group has the number of antral follicle count (AFC) above 5. Patients with E2 concentration on the 7th day ≤ 300 pg 7 day/ml at risk of poor response 12.9 times higher than those with E2 concentration on the 7th day > 300 pg / ml.

3.3.2. Factors related to number of ovules

Table 3.5. Multivariate regression model of age, FSH day 3, Number of follicles ≥ 14 mm and concentration E2 day hCG to number of ovules

Số nởn (Y)	Coefficient	Std Err	p	95% CI
Tuổi	-0,062	0,021	0,004	-0,104 ; -0,020
FSH ngày 3	-0,047	0,038	0,002	-0.121 ; 0,027
Số nang ≥ 14	0,891	0,049	$< 0,001$	0,795 ; 0,987
E2 ngày hCG	0,00008	0,00007	0,0001	-0,00006 ; 0,0002

Constant	2.511			
----------	-------	--	--	--

Constant, Coefficient, Std Err, $R^2 = 60\%$

Multivariate regression equation of the community impact of the independent variables such as age, 3rd day FSH, number of follicles ≥ 14 mm, and E2 on day of hCG over dependent variable (number of ovules):

$$Y(\text{number of ovules}) = a + b(\text{age}) + c(\text{3}^{\text{rd}} \text{ day FSH}) + d(\text{number of follicle} \geq 14 \text{ mm}) + e(\text{E2 on hCG day})$$

With a = 2,511; b = - 0,062; c = - 0,047; d = 0,891; e = 0,00008

The equation Y (number of ovules) correlated negatively with age, 2nd day FSH concentration and correlated positively with the number of ovules ≥ 14 mm and E2 concentrations on the day of hCG injection. Therefore, the older you are, the higher the 3rd day FSH, then less the number of aspirated ovules. The number of follicles ≥ 14 mm, the higher E2 concentrations on hCG is, the more number of retrieved ovules.

$p < 0,05$ and $R^2 = 60\%$ shows this equation is of very high significance to evaluate the number of ovules according to the above mentioned factors.

3.3.3. Relation between E2 concentration ovules

Table 3.6. Relation between E2 concentration ovules

E2 day hCG (pg/ml)	Số noãn của nhóm hMG		Số noãn của nhóm rFSH		P
	n	$\bar{X} \pm SD$	n	$\bar{X} \pm SD$	
≤ 1000	3	$6,00 \pm 3,61$	9	$1,56 \pm 0,88$	0,01
$1001 - \leq 2500$	29	$4,69 \pm 1,95$	35	$3,66 \pm 1,98$	0,72
$2501 - \leq 3500$	41	$5,61 \pm 2,51$	26	$5,15 \pm 1,41$	0,56
$3501 - \leq 4500$	21	$6,71 \pm 2,47$	18	$6,17 \pm 2,26$	0,23
> 4500	16	$8,13 \pm 1,89$	22	$6,64 \pm 2,65$	0,18
Tổng số	110	P=0,001	110	P=0,001	

For both hMG

3.3.4. Factors related to the nesting ratio

Table 3.7. Factors related to the nesting ratio

Các yếu tố	OR	95% CI
------------	----	--------

Niêm mạc tử cung (mm)	> 8	1,39	0,4 – 5,1
	≤ 8		
P4 ngày hCG (nmol/l)	≤ 1,5	1,47	0,6 -3,5
	> 1,5		
Số phôi độ 3	≥ 1	7,66	1,1-15,6 (*)
	<1		
	<5		

(*): Statistical difference with $p < 0,05$

The considered factors related to nesting ratio are uterine lining, P4 concentration, the number of grade 3 embryos. Nesting ratio in group of at least grade 3 embryos is 7.66 higher than the group without grade 3 embryos, the difference is statistically significant with $p < 0.05$.

3.3.5. Factors related to clinic pregnancy rate

Table 3.8. Multivariate regression model related to clinic pregnancy rate

Related factors Independence difference		Clinic pregnancy rate	
		OR	Reliable range 95% CI
Age	< 35	2,48	1,2 – 5,3
	≥ 35		
BMI (kg/m ²)	< 23	4,8	0.6 – 99,3
	≥ 23		
Basic FSH (IU/l)	< 10	2,6	1,1 – 5,8
	≥ 10		
Thickness of uterus mucus (mm)	> 8	3,0	1.1 - 8.7 (*)
	≤ 8		
Number of ovuls	> 4	1,1	0.3 - 4
	≤ 4		
E2 day hCG (pg/ml)	> 1000	0,4	0.1 - 1.2
	≤ 1000		
LH day hCG (IU/l)	> 1,2	1,3	0.5 – 3,3
	≤ 1,2		
P4 day hCG (nmol/l)	< 1,5	1,8	1.1 - 3.2 (*)
	≥ 1,5		
Number of transferred embryos	> 3	3,1	0.9 - 10.1
	≤ 3		

Number of embryos grade 3	≥ 1	3,2	1.5 - 7.2 (*)
	<1		

(*): Statistical difference with $p < 0,05$

Possibility of pregnancy among patients with uterine lining thickness > 8 mm is 3 times higher than those with uterine lining ≤ 8 mm.

Possibility of pregnancy among patients with P4 on hCG day ≤ 1.5 ng/ml is 1.8 times higher than those with P4 on the hCG day > 1.5 ng / ml

Possibility of pregnancy among patients with at least 1 grade 3 embryo is 3.2 times higher than those without any grade 3 embryos.

Chapter 4: DISCUSS

4.1. Discuss the results of ovarian stimulation of two courses

Results of ovarian stimulation of two courses are evaluated and discussed include: ovarian response, number of retrieved ovules after aspiration, cycle cancellation rate.

4.1.1. Discuss the ovarian response

Standard poor response to ovarian stimulation in research when there are less than 4 retrieved follicles after oocyte aspiration. The response rate is low in hMG group which is 36.4%, at rFSH group its is 41.8%. This rate is higher than other studies in Vietnam. Author Vuong Thi Ngoc Lan (2002), poor response rate is 22.7%. Author Vu Minh Ngoc (2006) poor response rate of long course is 22.6%. This difference is because that the research subject of the group has history or risk of poor response, not group anticipated normal ovarian response. Also due to this characteristic that both research groups do not have cases of ovarian hyperstimulation.

However, when selecting objects in the study, number of patients with a history of poor response from previous IVF cycles accounts for 69.1% in the HMG group and 70% in the rFSH group. After using these two courses, the poor response rate drops to 36.4% in the HMG group and 41.8% in the rFSH group. This is the most valuable results of two studies using this course in general and using hMG in ovarian stimulation in particular. In addition, this result is also greatly humanitarian, which helps increase the chances of pregnancy with their own ovules for infertilization women before going to the final solution is in vitro fertilization with donated ovule.

4.1.2 . Discuss the number of ova obtained of the two courses

One of the purposes of ovarian stimulation is to increase the number of ova obtained. Only the hCG injections cause mature ovum when at least one follicle size ≥ 2 follicles ≥ 18 mm or 17mm. The study results show that although the number of follicles ≥ 14 mm stimulating day of hCG injection did not differ between the two groups but the average number of ova obtained by HMG group higher than rFSH

group (6.0 ± 2.5 versus 4.7 ± 2.4), differences were statistically significant with $p = 0:02$. Results of the study were lower than the study of Vu Ngoc Minh City (2006) with ovule number obtained is 8.3 ± 4.7 . The reason for this result may be due to the choice of different research subjects. But this is also a positive result of the use of HMG research in ovarian stimulation with poor response group.

4.1.3 . Discuss the cycle cancellation rate of two courses

In hMG group, there were 4 cases of no embryo transfer for the reason of not fertilized ovum , 2 cases of no oocyte upon aspiration. In rFSH group, 5 cases with oocyte upon aspiration but ovum was not fertilized so there's no embryo for transfer. Thus the hMG group has only 104 patients and rFSH group has 105 patients receive embryo transfer embryos . The rate of cycle cancellation of two groups is respectively 5.4 % and 4.5 % , with no statistical significance ($p > 0.5$). Cycle cancellation rate in our study is 1.4% higher than the study of Nguyen Xuan Hoi (2011) , 2.6% higher than study of Vu Ngoc Minh. Tsai's study compares leuprolide acetate rFSH 0.5mg/day and hMG 1.88mg, cycle cancellation rate was 3.8 % in the hMG group, 5.0% in the rFSH group, the cause of cycle cancellation is due to no development of follicle. This difference is due to the choice of research subjects vary between studies.

4.1.4. Discuss the hormonal changes in the course of ovarian stimulation of two courses

* Discuss the changes in E2 concentration

Tests to evaluate E2 concentration in blood are the routine laboratory tests and are essential in the process of monitoring the development of follicles to stimulate the ovaries, valuable in assessing the rate of follicle development and the maturation of the oocyte.

Basic E2 concentration of the cycle was equivalent between the two groups then increased during ovarian stimulation. E2 concentration on the 7th day of FSH increased rapidly, the difference was statistically significant between the two groups with $p < 0.05$. But on the day of hCG injection of the two studies, E2 concentrations will correspond to the number of ovules and oocyte quality. These results will be discussed in section of relevant factors.

* **Discuss the changes in concentrations of LH**

Use of LH present in hMG always raises questions related to the phenomenon of peak LH and early luteal phase to clinicians. However, chart 3.2 shows, LH concentrations of both groups significantly reduced after use of GnRH agonist and continued to decline to 7th day of FSH and maintained to day of hCG injections. Basic LH concentrations on the 3rd day of the cycle was higher in the hMG group (6.3 ± 0.6) compared with rFSH group (4.9 ± 2.2), the differences were statistically significant with $p > 0.05$. On the day of hCG injection, LH concentrations were similar for the two groups.

High LH on the first day of ovarian stimulation will increase ovarian sensitivity to FSH, increase ability to recruit follicles, increase the number of ovules. This

explains the study's results, the increase of the number of ova obtained in hMG group versus rFSH group. Low LH and FSH on the 7th day of hCG has demonstrated the role of GnRH agonists in inhibiting LH. The results of this study reinforce the belief of clinicians to use hMG in ovarian stimulation.

*** Discuss the changes in P4 concentrations**

Assessing changes in P4 concentrations showed that: P4 increases gradually from 2nd day of the cycle to 7th day of FSH on day of hCG injection. However, P4 concentrations on the day of hCG injection between hMG group and rFSH group were respectively 1.4 ± 0.7 and 1.3 ± 0.4 . The difference was not statistically significant with $p > 0.05$ level. This proves the use of LH present in hMG and GnRH agonists does not increase serum P4 concentrations on the day of hCG injection.

Study result of Daya S (2002) comparing hMG and rFSH in ovarian stimulation shows P4 concentrations on the day of hCG injection were similar between two groups.

In summary, analysis of changes in concentrations of E2, LH and P4 proved agonist short-course combined with hMG and rFSH does not increase peak LH during ovarian stimulation. These results contribute further evidence and experience on the use of hMG in ovarian stimulation courses for in vitro fertilization.

4.1.5. Discuss oocyte quality between the two courses

Insemination is used in ICSI study, this method was only performed on mature oocyte (MII oocyte). Thus, the mature oocyte obtain is the ultimate goal of ovarian stimulation. The study results mean number of mature ova for all 3 types: good, average and bad in the hMG group are respectively (2.5, 1.9, 1.3) tend to be higher compared with the rFSH group (1.5, 1.7, 1.2), however the difference is not statistically significant with $p > 0.05$. The collection of more mature ovum in hMG group helps to increase number of frozen embryos and increase the chances of success of a cycle of in vitro fertilization.

4.1.6. Discuss the number of fertilized ovules and average fertilization rate

The number of fertilized ovules and fertilization rates are aggregate results of oocyte quality, sperm quality and fertilization methods. The number of fertilized ovules and average fertility of the study tend to be higher in hMG group versus rFSH group, a difference not statistically significant with $p > 0.05$. Research done by Safdarian 100 % ICSI gave the fertilization rate of 97.7 % in the hMG group, equivalent to rFSH group, which was 98.9 %, higher than our study (79.4 % and 67.6 %). Because sperm quality and fertilization techniques are the same, fertilization rates will depend on oocyte quality. Group has a history of poor response and risk of poor response often have poorer quality and quantity of oocyte than group of normal response, which explains fertility rate of the research group was lower than other studies. However, the number of ovules obtained after aspiration of of hMG group was higher, which is statistically significant compared

with the rFSH group, so it should be able to explain fertilization rates tend to be higher in group HMG versus rFSH group .

4.1.7. Discuss the number of embryos and embryo quality of two courses

With low average number of embryos, less than 5 embryos, it is often enough for fresh embryo transfer, no stored embryo. However, differences between the two groups is the quality of embryos, number of grade 3 embryos in hMG group was higher, which is statistically significant compared with the rFSH group with $p < 0.05$ (3.1 ± 1.9 versus $2, 6 \pm 1.6$) and also higher compared to grade 2 and grade 1 embryos. Number of grade 3 embryos, which are the best quality embryos, including uniform embryos and without debris. This is significant to reduce the number of embryos transferred, increase number of frozen embryo, increase chance of frozen embryos, ensure the success rate of the cycle in vitro fertilization and reduce the incidence of multiple pregnancies.

4.1.8. Discuss the number of transferred embryos of two courses

How many embryos to be transferred in one cycle for being reasonable, indeed it is a problem without a consensus among in vitro fertilization centers, because it depends on many factors such as patient age, uterine lining quality, quantity and quality of embryos, technical proficiency, religion, the law of each country.

The optimal number of embryos to be transferred is the one increasing pregnancy rate and reducing the rate of multiple pregnancies because multiple pregnancies in IVF will cause complications such as increase of ovarian hyperstimulation in those at risk, increase the likelihood of miscarriage, premature birth, preeclampsia ... According to the recommendations of the American Society of Reproductive, if under the age of 35, the number of embryos to transfer is ≤ 3 . If aged 35-40, the number of embryos to transfer embryos ≤ 4 . If you are aged over 40, the number of embryos to transfer ≤ 5 . If good quality embryos, should reduce the number of embryos to transfer to avoid multiple pregnancies.

The percentage of 3 embryos transferred into the uterus takes the highest proportion in both groups, 46.2% in the hMG group and 37.1% in the rFSH group, the average number of embryos transferred in 2 groups are respectively 2.5 ± 1.2 and 2.7 ± 1.2 , but the difference is not statistically significant with $p > 0.05$. The number of embryos transferred in this study was lower than the study of Vuong Thi Ngoc Lan (3.4 ± 1.4) and equivalent of Dal Prato study with number of embryos transferred in the hMG group was $2.2 \pm 0,6$ and in the rFSH group was 2.2 ± 0.5 .

The reason for this difference is due to the number of grade 3 embryos in hMG group was higher, which is statistically significant compared with the rFSH group ($p < 0.05$), and also explains for the average number of embryos transferred of the hMG group was lower than rFSH. In group of poor response, number of ova obtained is often low, having more number of grade 3 embryos to reduce the number embryo to be transferred will increase the chances of frozen embryos, increasing cumulative pregnancy rate for IVF cycles.

4.1.9. Discuss the rate of frozen embryos and rate of cycle with frozen embryos of two courses

In hMG group, there were 41 cases of frozen embryos, in rFSH group there were 28 cases of frozen embryos. The rate of frozen embryo in hMG group was 39.4% and of the rFSH group was 26.7%. The difference in the rate of frozen embryos between two groups is statistically significant with $p = 0.05$ ($p < 0.05$).

The increase in the number of frozen embryos and increase the rate of cycles with frozen embryos can help increase the cumulative pregnancy rate of one cycle of ovarian stimulation, in-vitro fertilization. This economic benefit of hMG group compared with rFSH group recorded in the study will reduce treatment costs for poor response group in in vitro fertilization.

4.1.10. Discuss the rate of nesting of two courses

Embryo implantation is a process in which the embryo attaches to the uterine wall and the first to penetrate the lining of the uterus then the circulatory system of the mother to form the placenta. Nesting ratio is calculated as the ratio between the gestational sac and embryo transfer into the uterus. Nesting ratio reflects both the quality of embryos and fetuses have the ability to grow well into the gestational sac, and a reflection of the quality of the lining of the uterus to receive the embryo development.

Nesting ratio of hMG group was 23.2, higher than rFSH group, which was 16% with $p > 0.05$ (Table 3.9). This rate is lower than the study of Nguyen Xuan Hoi (2008) which was 41.3% and 39.9% when comparing the two courses [109]. This is explained by different study subjects.

Thus, the study of hormonal levels change during ovarian stimulation, oocyte quality, thickness and pictures of the lining the uterus, implantation rate showed effectiveness when used LH present in hMG in ovarian stimulation with group at risk of poor response.

4.1.11. Discuss the clinical application values of two courses

*** Discuss the rate of FSH dose increase and decrease**

During ovarian stimulation, increase the FSH dose when the ovarian at risk of poor response. Indicate to increase FSH dose increase when there is less than 5 follicles ≤ 12 mm in size on ultrasound scan and E₂ concentration < 300 pg/ml on 7th day of FSH. Indicate to reduce FSH dose once there are 10 follicles each side of ovary with the dimension of ≥ 14 mm and E₂ level ≥ 2500 pg/ml at the 7th day of FSH.

In all 2 group there is not any case of decreasing of the dose. FSH dose rate in the hMG of FSH has the decrease trend (2.7% and 6.4%) the difference in 2 group has not statistic difference. Pepovic to dorovic also give the increased or decreased doses at the 8th FSH day [110], the rate of rFSH in 31% higher than that of the group of our study. Thus, the decision of beginning FSH dose at the subject is appropriate.

In the hCG group, 3 subjects receive 2 days of increasing doses, with 50 IU of FSH each day.

In the rFSH group, 4 subjects receive 2 days of increasing doses with 50 IU of FSH each day.

The rate of patients receive increasing dose of FSH, the prolonged day of increasing, the total increased doses of 2 group have not statistic significant with $p=0.05$.

Studies show that, we can need of increase too much the daily dose FSH, we can reach the purpose of ovarian stimulation once we have the precis beginning dose. The results were appropriate with the studies of Miton Leong (Hong Kong) and Pasquale Patrizic (USA) on 124,700 cycles of ovarian stimulation at 196 center of IVF from 45 nations, much of these center performed an average of 400 cycles/year, 2 centers 4000 cycles/year. Results show that the beginning doses at the group with less responsiveness ovarian stimulation are > 300 IU/day but < 450 IU/day.

***About the economical value of 2 protocols**

The cost of IVF can reach some million VND composing of the price of the stimulator substance, the media of culture and the equipments for ovary punctuation and collection of ova, ICSI and transferring the fetuses. The reduce of the treatment cost has important significant () decrease the cost and hinder the interruption of treatment, specially the decrease of the cost for the medicaments in ovarian stimulation.

The group of hMG has no great difference with the group of rFSH in the technique and result and in the result of the cycle of ovarian stimulation; however total doses of FSH hMG are difference with rFSH group with statistic significant. On the market, the price of hMG is lower than that of rFSH. In addition, the collected follicles, the 3rd grade fetuses and freeze fetuses and the cycles with freeze fetuses of hMG group are increased statistically make the higher cases of success and the higher accumulated number of fetuses in each cycle of ovarian stimulation. Therefore, total cost of each time of ovarian stimulation reduces.

4.2. About the factors involving in the result of IVF

4.2.1. About the factors involving in less responsiveness

The prognosis factors of less responsibility before the beginning of ovarian stimulation were reported such as at the age > 35 , 3rd day FSH the increasing > 10 IU at antral follicles < 4 , inhibin B < 45 pg/m, AMH < 25 pg. However, clinically, less responsiveness state occurred even while those factors are at the normal limit, this shows that there are any factors show its affect to the ovarian stimulation.

The multi variant regress analyses of the factors of age, AFC, BMI, basal FSH, 7th day E₂ level LH, P₄ at hCG day, with the rate of less responsiveness show that:

At the age > 35 , the group of risk of less responsibility is 2.23 folds higher than that of the age < 35 . The patients with the sum of antral follicles < 5 have the risk of less responsiveness 2.9 folds higher than that of AFC > 5 . The patients of basal FSH level ≥ 10 IU/l have the risk of less responsiveness 2,3,1 folds than that of the group of basal FSH ≤ 10 IU/l with 95% CI (1.1-4.7).

Almost studies approve that age is 1 of most influencing factors of the reproduction of woman, the more older age, the less ovary reserve, the less responsibility of the ovary and thus the less possibility of pregnancy. Bostros Risk studies show the successful rate of 24.4% at women of 30-34 years old age and decreasing to 14,7% at women higher 41 years old ago. Vivien MacLaclan in Australia and New Zealand also report that the rate of pregnancy at the age 35-39 is 27.2% but that of the group of more 40 is only 5.1%. I 12th June, 2009 in USA Saswali Sunderam reported that in ≤ 35 years onld age woman, the rate of getting pregnancy 45%, while at the age > 42 , the rate of getting pregnancy only 7%.

E_2 examination at 7th day is the first normal examination after FSH injection. Thus, that is an early examination of value to prognose the risk of less responsiveness of the ovary, and this moment is physician regulate to increase FSH doses to get optima effect of ovarian simulation.

In the group of E_2 at 7th day ≤ 300 pg/ml, the risk of less responsiveness, the risk of less responsiveness is higher than that of the group at 7th day $E_2 > 300$ pg/ml 12,9 folds

Thus, the age, AFC, FSH at 3rd day. E_2 level at 7th day the prognosis of less responsiveness, $p < 0.75$.

4.2.2. About the factors involving in the sum number of follicles

In table 3.2.2 multi variant regress analysis give an evaluation of total effects of the age, FSH at 3rd day, the sum of ≥ 14 nm follicles, E_2 at hCG day to the collected sum of follicles.

This relation is exported by the equation:

$$Y(\text{sum of follicles}) = a + b(\text{age}) + c (\text{FSH at } 3^{\text{rd}} \text{ day}) + d (\text{sum of follicles}) + e (E_2 \text{ level at hCG day})$$

$a = 2.511$; $b = -0.062$; $c = -0.047$; $d = 0.891$; $e = 0.00008$

The equation Y has a reverse relation with the age, basal FSH level, and a positive relation with the sum of ≥ 14 mm follicles and E_2 at the injected day hCG. Thus, the elder age, the basal FSH level the less number of collected follicles.

The sum of ≥ 14 mm, E_2 level at hCG day higher, the collected follicle sum larger, $p < 0.05$ and $R=60\%$. Thus equation has great signification to evaluate the sum member of follicle.

The sum member of follicles is not related only to the age and basal FSH but related positively to AFC. Much studies also evaluate the antral follicle count by ultrasound at the beginning menstrual cycle to prognoses the responsibility of ovary and follicles count.

4.3.3. About the relation of E_2 and the sum of follicles

Higher level of E_2 higher follicle count, the difference has statistic significant with $p < 0.05$. The relation was exposed by the Equation:

$$Y(\text{follicle count}) = 0.000867 \times E_2 \text{ at hCG} + 2.988$$

For all 2 group hCG and rFSH, average sum of follicles increases following E₂ level at hCG day. The higher E₂ at hCG day, the larger number of follicles count. The difference has statistic significant, $p = 0.001$

The equation on follicle count:

$$Y = 0.000867 \times E_2 \text{ (at hCG day)} + 2.988$$

$$a = 0.000867; b = 2.988 \text{ relation coefficient } R = 0.619$$

The higher E₂ level, the higher sum of collected follicles.

4.3.4. About the factors involving in the rate of implantation

Studies show that the thickness of uterus mucous membrane do not influence on the rate of implantation.

However practically, many other factors influence on the rate of implantation. Following us, these factors compose of uterus mucous membrane, P₄ level at hCG day, the sum number of 3rd grade fetuses. The freer of liberated fetuses from the membrane the mark of transferring fetuses. Table 3.2.4 shows that only the number of 3rd grade fetuses has relation with the rate of implantation. The group of at least 1 fetus of 3rd grade has the group of 3rd grade fetuses has the rate of 7.66 folds higher than the none 3rd grade fetuses with statistic difference with $p < 0.05$ (95% CI, 1.1-15.6)

Recently studies show also the relation of P₄ level at the hCG injection day and the rate of implantation. In the year 2010, studies performing on 1045 cycles of IVF/ICSI with GnRH agonist, comparing the patients with an increase of P₄ >1.1 pg/ml with the patients with P₄ ≤ 1.1 pg/ml show that the patients group with the increased P₄, has a lower rate of implantation (18.1% comparing with 24.4% $p=0.008$) and the rate of the lower of survival (27.6% in comparing with 24.4%, $p=0.004$) [114]. Our study also a higher in comparing with the cases with higher P₄ ≥ 1.5 but there is not statistic difference (OR = 1.47; 95% CI = 0.6-3.5). Thus LH in hMG does not influence on the rate of implantation.

The reproduction help center of control Hospital of Gynecology and Obstetrics, has evaluated the mark of fetuses transferring to prog the possibility of implantation and getting pregnancy in IVF. The mark of fetuses transferring composes of 3 factors the mark fetuses (quality and quantity of transferred fetuses), the mark of uterus mucous membrane (thickness and form) the technique of transferring (easy or difficult) the highest mark reaches 2 for each factor. The results of studies show that the rate of the group of > 5 of the transferring fetuses is higher than that of the group of mark < 5. The difference has not statistic significant with $p > 0.005$. In the year of 2003, at the Central G&O, there is not any case of difficult transferring fetuses get pregnancy.

Following us, excluding objective causes, the evaluation as easy or difficult is subjectively, depending on the skill of the physician and on the technique and equipments. However, the cleanness of catheter has influence significantly the for getting pregnancy. In the group of transferring the fetuses with the cleanest catheter the

rate of getting pregnancy is 50.5% higher than 10% in the case of dirty catheter ($p=0.013$ OR 0.09, $0<OR<0.09$) Almost studies have reported that the dirty catheter decrease the number of getting pregnancy. The technique of fetuses transferring also has great influence. The fetuses placed in the very center of the uterus with a distance of 1.5-2 cm from the uterus bottom give best result. Catheters with polluted substance such as blood, mucous substance increase the possibility of infection, induce and the constraction of uterus, reducing the possibility of getting pregnancy.

4.3.5. About the factors involving in the rate of clinical pregnancy

Multi variant regress analysis on the factors as age, BMI, basal FSH, the thickness of uterus mucous membrane, the sum of follicles, E_2 , LH, P_4 level at hCG day, the sum of transferred fetuses and pregnancy. But only 3 factors – uterus mucous membrane, P_4 level at hCG day and quality of the fetuses, expose the relation with the rate of clinical pregnancy.

Two factors play the most influence on the result of cycle of IVF are the quality of the transferred fetuses and the possibility of receiving of the uterus membrane. Prognosis value of the thickness of the uterus mucous membrane can be evalprated in ultrasound and at any day of the treatment period but the hCG injection day is the most influenced factor, beacause at that moment, the follicles was matured confirm many studies are performed at that moment such as by Vuong Thi Ngoc Lan, Bruffi RLR, Oliveria JBA.

At the Reproduction Help Center of the Central Hospital of G & O, the thickness of the uterus mucous membrane at hCG Day. Determining the relation of the rate of getting pregnancy and the value threshold of uterus mucous membrane thickness, Kovacs study has showed that the rate of getting pregnancy in the group of ≥ 10 mm higher thickness significant statistically than that of the group of < 10 mm of thickness (OR=1.3; CI=1.0-1.7; $p<0.05$) Vuong Thi Ngoc Lan (1012) also reported the > 10 mm thickness of uterus gave the higher rate of clinical pregnancy.

Up to now, the prognosis value P_4 to the possibility of getting pregnancy is a topic of controversial. Some authors reported that there is no relation between the rate of getting pregnancy with P_4 level at hCG day (Abuzeid 1956, Urman, 1999, Martinezsa 2004) Bosch study has concluded that progesterol level ≤ 1.5 ng/ml give a statistic significant higher rate of progressive getting pregnancy with the P_4 level > 1.5 ng/ml. Our study shows that at the patients of P_4 at hCG day ≤ 1.5 mmol/ml a 1.8 folds higher than that of the subjects of P_4 at hCG day > 1.5 mmol/ml, (OR = 1.8; 95 CI = 1.1 – 3.2)

In the patient of at least 1 fetuses of 3rd grade the rate of getting pregnancy is 3.2 folds higher than the subjects of none of 3rd grade fetuses (OR = 3.2; 95% CL = 1.5 – 7.2)

Logistic agress analysis in 2003 of Shen (USA) shows that the factors of prognosis value to the possibility of getting pregnancy in the patients whose submitted ICSI compose of the age of patient, E_2 level at hCG day, the count of transferred fetuses

and the quality of fetuses. But Shen 's study is a retrospective which do not show the threshold of prognosis value.

In sum, studies show that the thickness of the uterus mucous membrane, P₄ level at hCG day and the quality of the fetuses are the related factors involving in the rate of implantation and the rate of clinical pregnancy.

Conclusion

Short protocol/HMG and short protocol/rFSH *for treating ovary responds poorly in in vitro fertilization* at the National Hospital of Obstetrics and Gynecology demonstrates that:

1- The short protocol/HMG gives an analogue result is with the short protocol/rFSH concerning.

- The responsiveness of the ovary, the thickness of mucous membrane the uterus, the sum number of ≥ 14 mm follicles at the hCG inject day.
- The average sum of follicles: 4.2 ± 2.5 in comparing with 3.6 ± 2.0
- The rate of fecundation 79.4% in comparing with 67.6%.
- The rate of implantation 23.3% in comparing with 16.07%.
- The rate of clinical fetus/cycle 20.1% in comparing with 16.4%.
- The rate of clinical fetus/the transfer of fetus 22.1% in comparing with 17.1%.

2- The protocol/HMG gives the better result in comparing with the protocol/rFSH concerning.

- Average sum of follicle 6.0 ± 2.5 in comparing with 4.9 ± 2.5
- Quality of fetuses (the sum number of fetuses 3rd grade): 3.1 ± 1.9 and 2.2 ± 1.6 .
- The sum number of freeze fetuses 2.5 ± 1.2 in comparing with 1.6 ± 1.3
- The number of cycles with freeze fetuses 39.4% in comparing with 26.7%
- Total doses Of FSH: 3082.3 ± 40.7 in comparing with 3563.6 ± 48.0
- Decrease the cost of treatment.

3- Factors involving in results of IVF.

- Age FSH at 3rd day, AFC, E₂ at 7th day, LH at 7th day.
- The sum number of obtained follicles has an increase ratio with the age, base FSH and a direct ratio with the sum number of ≥ 14 mm follicle and E₂ level at the hCG day.

- The quality of 3rd grade fetuses involving in the rate of implantation (7.66 fetuses higher in the group of at least 1 fetuses of 3rd grade fetuses in comparing with the none)
- The thickness of lining of the uterus $> 8\text{mm}$ or P_4 at the hCG inject $\leq 1.5\text{mmol/l}$ or in the case of at less 1 fetuses of 3rd grade, the ratio fecundation is higher than of the group of $< 8\text{mm}$ thickness of mucous membrane, P_4 at the day of hCG $> 1.5\text{ mmol/ml}$ none 3rd grade fetuses reach 3 folds 1.8 and 3.2 folds consecutively.
- The lining ò uterus, P_4 on hCG day, the quality of embryo get the influence to the ratio of implantation and the ratio of clinical fetuses.

Recommendation

1. Short protocol/hMG is the choice ovarian stimulation at the group of previous poor responder or at the risk of less responsiveness in IVF.
2. hMG studies must be promoted.
3. E_2 level at the 7th day is a prognosis factor to detect the risk of less responsiveness of ovarian stimulation if $E_2 \leq 300\text{ pg/ml}$. In this case, physician must increase the dose of FSH properly.