

ĐẶT VẤN ĐỀ

Cho đến năm 2013-2014, sởi vẫn còn là “*kẻ giết hại trẻ em*”, đặc biệt ở những nước đang phát triển, trong đó có Việt Nam. Vắc xin góp phần quyết định không chế và thanh toán sởi toàn cầu. Kiểm định công hiệu vắc xin bằng các phương pháp thông thường tốn thời gian, công sức, và kết quả đôi khi phụ thuộc chủ quan người đọc trong khi *real-time* có thể khắc phục được những điểm này.

Lịch sử đã ghi nhận 5 đại dịch cúm với hơn 20 triệu người trên thế giới tử vong năm 1918. Việt Nam là một điểm nóng của lưu hành cúm, bao gồm cả A/H1N1pdm09.

Có thể chẩn đoán sởi và cúm cũng như xác định phân típ cúm A bằng RT-PCR. Để có thể kiểm soát chất lượng và định lượng ARN thì cần gam chuẩn ngoài (chứng dương đã biết nồng độ). Phiên mã *in vitro* cho ARN đồng nhất, tinh khiết, định lượng được, an toàn, và có sản lượng cao. Đề tài “*Nghiên cứu sản xuất các gam chuẩn cho RT-PCR, ứng dụng trong chẩn đoán cúm và kiểm định công hiệu vắc xin sởi*” có mục tiêu:

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

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

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

BỐ CỤC LUẬN ÁN

Luận án bao gồm 147 trang, Đặt vấn đề 2 trang, Kết luận 1 trang, Đề xuất 1 trang, Những đóng góp mới của luận án 1 trang. Luận án có 4 chương: Chương 1: Tổng quan 37 trang; Chương 2: Đối tượng, vật liệu và phương pháp nghiên cứu 25 trang; Chương 3: Kết quả nghiên cứu 33 trang;

Chương 4: Bàn luận 44 trang. Luận án có 47 Hình, 22 Bảng và 182 tài liệu tham khảo, bao gồm 17 tài liệu tiếng Việt, 158 tài liệu tiếng Anh, 2 tài liệu tiếng Pháp và 5 trang thông tin.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan một số vấn đề về cúm

1.1.1. Phép gọi tên và hình thái và cấu trúc

Các virus cúm thuộc trên họ *Mononegavirale*, họ *Orthomyxoviridae*, được phân thành các chi A, B, và C. Virus cúm A gồm các phân típ, virus cúm B và cúm C chỉ có một phân típ.

Hạt virus cúm đa hình thái, dạng hình cầu có kích thước 80-120nm. Cấu trúc hạt virus gồm bộ máy di truyền (genome), capsid và vỏ ngoài (envelop). Genome là một sợi ARN phân cực âm, có 8 phân đoạn với cúm A và B, 7 phân đoạn với cúm C.

1.1.2. Kháng nguyên, tính đa dạng chủng virus cúm A và dịch tế học

Chuyển đổi kháng nguyên đột ngột (shift) là thay đổi cấu trúc kháng nguyên bề mặt, thường gây hiện tượng thay thế một loại HA mới, nhìn chung không chịu tác dụng của miễn dịch tồn tại trước đó và đây là nguyên nhân của các vụ đại dịch cúm.

Biến đổi kháng nguyên từ từ (drift) là những thay đổi nhỏ và liên tục các acid amin tại các khu vực kháng nguyên protein vỏ HA và NA. Những chủng này vẫn chịu một phần miễn dịch tồn tại trước đó.

Virus cúm truyền bệnh qua đường không khí. Cúm xảy ra quanh năm và trên toàn thế giới. Cúm A và B có thể đồng thời lưu hành trong cùng một năm nhưng thường mỗi mùa chỉ có một phân típ cúm A nổi lên.

1.1.3. Sự nhân lên của virus cúm

Virus hấp phụ trên bề mặt tế bào vật chủ qua thụ thể acid sialic và xâm nhập vào tế bào qua con đường *endocytosis*. Nhờ pH thấp của khoang nội bào mà HA tạo hiện tượng tiền thay đổi phù hợp để màng virus hòa với màng khoang nội bào. Tại nhân, ARN virus đóng vai trò làm khuôn mẫu tổng hợp ARN bổ trợ chuỗi dương, sau đó đến lượt ARN chuỗi dương này làm khuôn mẫu để tổng hợp ARN chuỗi âm và ARN thông tin. Hạt virus được giải phóng theo cơ chế này chồi.

1.1.4. Chẩn đoán phòng thí nghiệm

Vai trò phòng thí nghiệm là chẩn đoán kịp thời cho lâm sàng và báo cáo thông tin về sự xuất hiện và lưu hành các chủng virus cúm trong cộng đồng. Phương pháp chẩn đoán phòng thí nghiệm cúm gồm i/. **chẩn đoán trực tiếp** phát hiện hình thể virus (phân lập virus cúm), phát hiện kháng nguyên virus (miễn dịch huỳnh quang) xác định cúm A, cúm B hay phân típ cúm A hoặc ELISA xác định cúm A, cúm B, cúm C), phát hiện vật liệu

di truyền của virus (RT-PCR xác định cúm A, cúm B, cúm C hay phân típ cúm A) cho phép chẩn đoán nhanh, đặc hiệu, và có tính sàng lọc cả cúm A và phân típ cúm A ii/. **chẩn đoán gián tiếp** phát hiện kháng thể bằng các phương pháp huyết thanh học.

Chẩn đoán cúm bằng RT-PCR có thể áp dụng kỹ thuật khuếch đại cổ điển hoặc định lượng trực tiếp, có thể sử dụng phản ứng đơn môi hoặc đa môi phát hiện đồng thời hơn 1 phân típ hay chi (A/H3N2, A/H1N1, A/H1N1pdm09, cúm B), và xác định chính xác phân típ (HA và NA), phát hiện đồng thời virus cúm mùa A (A/H3N2 và A/H1N1), virus cúm B cùng các virus khác như virus hợp bào hô hấp ở người (human respiratory syncytial virus - hRSV) hoặc virus gây viêm phổi ở người (human metapneumovirus - hMPV),....

1.1.5. Tình hình nghiên cứu về cúm

Các nghiên cứu về cúm được tiến hành ở mọi khía cạnh và loại hình nghiên cứu. Nghiên cứu về cúm của Việt Nam có thể bao gồm chẩn đoán và nghiên cứu huyết thanh học, sinh học phân tử, miễn dịch học, mô hình toán học, sản xuất vắc xin, tính nhạy cảm với oseltamivir, giám sát trọng điểm hội chứng cúm (Influenza-Like Illness - ILI), viêm phổi nặng do virus (Severe Viral Pneumonia - SVP), thử nghiệm lâm sàng....

Sau 2 tháng xuất hiện, 11/06/2009, WHO đã công bố đại dịch cúm A/H1N1pdm09. Sau một năm, hầu như tất cả các nước đều công bố có cúm A/H1N1pdm09. Hiện tại chủng cúm này đã được coi là một chủng cúm mùa. Tại Việt Nam, tính đến 19/03/2010, trên cả nước có 11.214 trường hợp được chẩn đoán xác định phòng thí nghiệm và 58 ca tử vong.

Tại Trung quốc, cúm lưu hành quanh năm nhưng chủ yếu từ tháng 1-8. Tỷ lệ nhiễm cúm giai đoạn 2009-2012 dao động từ 10-26% các trường hợp ILI (bao gồm cả cúm A/H1N1pdm09). Tại Campuchia, cúm thường lưu hành vào tháng 8-11, tỷ lệ dương tính với cúm A từ năm 2006-2010 tương ứng là 5,8%; 7,7%; 15,3%; 15,2%; và 1,4%. Cúm B lưu hành quanh năm. Tại Lào, cúm lưu hành chủ yếu vào mùa đông-xuân, tỷ lệ dương tính cúm A trung bình là 9,0%. Tại Hoa Kỳ, tỷ lệ nhiễm cúm từ 5-20%. Tại Pháp, cúm cũng thường lưu hành vào mùa đông-xuân với tỷ lệ trung bình 5-15%.

Tại Việt Nam, theo Nguyễn Thu Yên và cộng sự, tỷ lệ dương tính với cúm ở những người ILI bằng RT-PCR là 22% và luôn chỉ có một chủng cúm A nổi trội (A/H1N1 hoặc A/H3N2). Tỷ lệ dương tính khá tương đồng giữa các loại cơ sở y tế (20-23%) và các vùng miền (21-23%). Cúm B lưu hành ở tất cả các năm, quanh năm và không liên quan đến phân típ cúm A. Năm 2009, tỷ lệ dương tính cúm A/H1N1pdm09 là 9,4%, năm 2010 là 2,1%. Định nhiễm cúm thường từ tháng 5-10. Ở các trường hợp viêm phổi nặng (SVP), cúm A/H1N1pdm09 chiếm 6,1%, cúm mùa A/H1N1 và

A/H3N2 là 2,8%, cúm B là 2,2%, cúm A/H5N1 là 2,9%, và hRSV là 0,1%. Tỷ lệ nhiễm cúm A/H1N1pdm09, A/H1N1 và A/H3N2, cúm B, và A/H5N1 ở bệnh nhân SARI năm 2011 lần lượt là 2,9% (1,1-4,4%), 1,5% (0-2,2%), 3,9% (0-5,8%), và 0,1 (0-0,3%).

Trong khuôn khổ dự án *Giám sát và điều tra tình hình dịch ở Đông Nam Á* (Surveillance and Investigation of Endemic Situations in South-East Asia - SISEA) tại Bến Tre, tỷ lệ nhiễm cúm A/H1N1pdm09, cúm mùa A, và cúm B tương ứng là 1,4%, 2,7%, và 1,0%. Cúm thường lưu hành vào mùa hè và có hiện tượng chuyển sang tháng 5-7.

1.2. Tổng quan một số vấn đề về sởi

1.2.1. Phép gọi tên và hình thái, cấu trúc

Virus sởi thuộc trên họ *Mononegavirales*, họ *Paramyxoviridae*, dưới họ *Paramyxovirinae*, chi *Morbilivirus* và tên quốc tế là measles virus.

Hạt virus sởi hoàn chỉnh đa hình thái nhưng chủ yếu hình cầu, kích thước 100-300 nm. Thành phần cấu tạo gồm genome, capsid và vỏ ngoài. Genome là ARN sợi đơn, phân cực âm, không phân đoạn, dài khoảng 16.000 ribonucleotide, có trật tự 3'- N - P - M - F - H - L Polymerase 5'.

1.2.2. Sự nhân lên của virus

Các dòng tế bào thường trực như Vero hay B95a thường được sử dụng để phân lập virus. Toàn bộ quá trình nhân lên của virus sởi xảy ra tại bào tương của tế bào gây nhiễm. Quá trình gắn màng và xâm nhập tế bào của virus xảy ra khi có sự tương tác giữa protein H và F của virus và thụ thể đặc hiệu - phân tử CD46. Sự nhân lên của virus sởi bắt đầu bằng sợi ARN âm ban đầu có vai trò không những làm khuôn mẫu cho quá trình phiên mã thành ARN thông tin để rồi sau đó được dịch mã thành các protein cấu trúc và phi cấu trúc mà còn làm khuôn mẫu để tổng hợp nên ARN sợi âm thế hệ sau thông qua sợi ARN dương trung gian. Sợi ARN âm lắp ráp cùng với các protein cấu trúc. Màng ngoài virus hình thành do quá trình nảy chồi qua màng bào tương và sự giải phóng hạt virus hoàn chỉnh chỉ sau vài giờ.

1.2.3. Các nghiên cứu liên quan đến sởi

Việt Nam đang ở giai đoạn không chế tiến tới thanh toán sởi. Đã có nhiều hợp tác nghiên cứu cơ bản và ứng dụng như xác định một genotype mới (H2), đặc điểm di truyền các chủng virus sởi hoang dại thời kỳ trước và sau chiến dịch tiêm sởi mũi 2, đánh giá công hiệu vắc xin sởi mũi hai tại Hải Phòng....

Vắc xin phòng sởi hiện nay là vắc xin sống, có thể đơn hoặc phối hợp cùng rubella và quai bị. Thông thường, liều gây miễn dịch là 10^3 - 10^4 đơn vị tạo đám hoại tử (Plaque Forming Unit - PFU). Tuổi khuyến cáo tiêm vắc xin sởi từ 6-15 tháng. Trung tâm Nghiên cứu Sản xuất Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (POLYVAC) đã sản xuất thành công vắc xin sởi đơn, sống giảm

độc lực sử dụng chủng AIK-C. Vắc xin có hiệu giá ổn định, luôn đạt yêu cầu của WHO và vắc xin mẫu chuẩn có hiệu giá 4,2-4,7 Log₁₀/liều 0,5ml. Hiệu giá vắc xin sởi được nhà sản xuất kiểm định bằng phương pháp tạo đám hoại tử (Plaque forming assay – PFA).

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

Vai trò của vắc xin ngày càng lớn, đối tượng phục vụ của vắc xin ngày càng được mở rộng, bao gồm cả phụ nữ có thai, người có tuổi hay trẻ sơ sinh. Đi song hành cùng sự phát triển không ngừng về công nghệ thiết kế và sản xuất vắc xin là sự ra đời của nhiều thử nghiệm kiểm định, trong đó có các kỹ thuật sinh học phân tử.

Đã có nhiều nghiên cứu về ứng dụng real-time trong chẩn đoán, nghiên cứu về sởi và nhiều tác nhân khác. Năm 2006, tác giả Hummel và cộng sự đã thẩm định phương pháp để tìm ra các cặp môi và đầu dò nhạy và đặc hiệu nhất trong phát hiện sởi. Năm 2006, tác giả Nguyễn Thị Thường và cộng sự đã định lượng số bản sao ADN bên trong tế bào gây nhiễm khi xác định tính kháng thuốc của herpes simplex virus (HSV) với aciclovir và foscarnet nên không cần đợi sự xuất hiện của hủy hoại tế bào (cytopathic effects – CPE) trong khi hiệu giá ADN tương quan chặt chẽ với PFU. Năm 2005, tác giả Schalk và sau này là Ammour và cộng sự đã xây dựng phương pháp mới kiểm định công hiệu sởi của vắc xin sởi phối hợp với rubella và quai bị bằng định lượng trực tiếp số bản sao ARN ở dịch nổi nuôi cấy tế bào. Tuy nhiên, phương pháp này còn nhiều tồn tại, quy trình phức tạp và thời gian gặt ít nhất 2 ngày.

Để định lượng trực tiếp thì nhất thiết phải có gam chuẩn ngoài. Sản xuất ARN bằng phiên mã *in vitro* giúp tiết kiệm bệnh phẩm, có hiệu giá cao, định lượng được, ổn định, đồng nhất, và tinh khiết. Việt Nam chưa có công bố về sản xuất chứng dương ARN *in vitro*.

CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Sản xuất ARN bằng phiên mã *in vitro*: 1-2,5μl ARN tách chiết từ chủng virus hoặc mẫu bệnh phẩm.

2.1.2. Xác định tỷ lệ nhiễm cúm: tuân thủ định nghĩa ca bệnh *viêm đường hô hấp cấp tính nặng (SARI)* của dự án SISEA. Bệnh phẩm được lấy từ tháng 1/2009 - 6/2011, 8-10 mẫu/tháng, mỗi tuần 2-3 mẫu đầu tiên của loạt bệnh nhân nhập viện tại Bệnh viện đa khoa huyện Cẩm Giàng và Bệnh viện đa khoa Tỉnh Hải Dương.

2.1.3. Xây dựng phương pháp xác định công hiệu vắc xin sởi: vắc xin sởi mẫu chuẩn (M-0107) và 10 loại vắc xin thành phẩm do POLYVAC sản xuất từ 2010-2013.

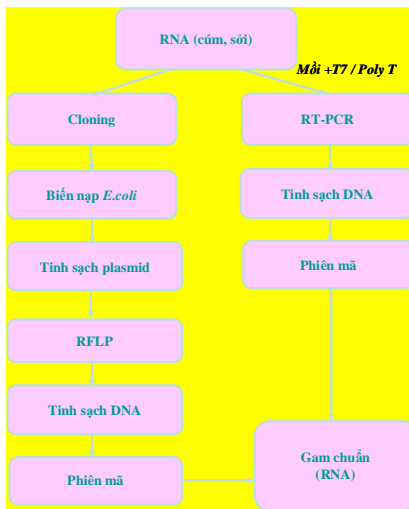
2.2. Vật liệu nghiên cứu

Nguyên vật liệu và trang thiết bị là các các thiết bị khoa học, sinh phẩm, hóa chất, môi trường cơ bản phục vụ các thử nghiệm sinh học phân tử (tách chiết, khuếch đại, tạo dòng, cắt enzyme giới hạn - RFLP, phiên mã...) nuôi cấy tế bào và phân lập virus. Dung dịch đệm ly giải nhanh tế bào (TpLR) là dung dịch tự pha, có thành phần Tris HCL pH=8 chứa 50mM KCL, 50mM MgCL₂, 0,45% Nonidet-P40, và 0,45% Tween 20.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Sản xuất chứng dương ARN *in vitro*

Là nghiên cứu cơ bản phòng thí nghiệm, không tính cỡ mẫu.



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

Phiên mã cổ điển: Sản phẩm khuếch đại được nối với vec-tơ để tạo plasmid tái tổ hợp, rồi được đưa vào tế bào cảm biến *E.coli* với sự có mặt của X-gal. Khuẩn lạc chuyển nạp sẽ được kiểm tra theo màu sắc (trắng/xanh nhạt hay xanh đậm) bằng PCR cổ điển và giải trình tự gen. Tạo mạch thẳng plasmid bằng RFLP. Phiên mã được thực hiện nhờ enzyme phiên mã T7. Mật độ quang học, kích thước sản phẩm, cấu trúc ARN và hệ

số Avogadro sẽ được sử dụng để tính sản lượng ARN. Sản phẩm ARN mới tổng hợp được kiểm tra bằng RT-PCR với (RT+) và (RT-).

Phiên mã trực tiếp: đoạn mỗi đặc hiệu được cải biên bằng cài thêm ở đầu 5' của mỗi xuôi và mỗi ngược một trình tự kích thích phiên mã T7 và poly T. Sản phẩm được sử dụng trực tiếp cho phiên mã *in vitro*.

2.3.2. Xác định tỷ lệ nhiễm cúm

- Là nghiên cứu quan sát mô tả cắt ngang, cỡ mẫu nghiên cứu được tính dựa vào tỷ lệ mắc cúm trung bình toàn cầu không phải đại dịch (5 - 15%) với độ chính xác của $p = 1,5\%$. Trên thực tế, 1273 bệnh phẩm đã được thu thập cho nghiên cứu.

- ARN của virus cúm mùa A và B được phát hiện bằng RT-PCR đa mục cùng hRSV và hMPV, được khẳng định bằng PCR bán tổ. Chứng dương là hỗn hợp 2,5 μ l khuôn mẫu ARN gồm 10^4 bản sao ARN cho mỗi loại virus cúm mùa A, hRSV, hMPV và 10^5 bản sao cho virus cúm B.

- Cúm A/H1N1pdm09 và cúm gia cầm A/H5N1 (nếu nghi ngờ) được phát hiện và xác định phân tít bằng real-time RT-PCR đơn mục. Tỷ lệ phân bố cúm được phân tích theo giới tính, nhóm tuổi, và thời gian. Sự khác biệt của các biến rời rạc được tính bằng thuật toán *Khi bình phương* (χ^2). Giá trị $p < 0.05$ được coi là có ý nghĩa thống kê.

- Y đức: Số liệu của đề tài nghiên cứu này là một phần của Dự án SISEA, đã được thông qua Hội đồng Y đức cơ sở và là dự án phi lợi nhuận. Đề tài này có phân tích biến số giới tính nhưng chỉ với mục đích nghiên cứu dịch tễ học, không nhằm mục đích phân biệt giới.

2.3.3. Xây dựng phương pháp kiểm định vắc xin sởi

- Là nghiên cứu cơ bản phòng thí nghiệm.

- Cỡ mẫu nghiên cứu: không tính cỡ mẫu, chọn mẫu tiện lợi, ngẫu nhiên.

Kỹ thuật xét nghiệm: Hiệu giá PFU được xác định bằng PFA trên tấm nhựa 24 giếng. Cây 200 μ l hỗn dịch virus đặc và pha loãng bậc 10 từ 10^{-1} - 10^{-4} lên tế bào Vero, mỗi nồng độ 2 giếng. Sau ủ 1 giờ ở 37°C x 5% CO_2 , hút dịch cấy rồi rửa sạch tế bào bằng MEM 0% FBS và thêm môi trường phủ methylcellulose 1% có 3% huyết thanh bê bào thai (Fetal Calf Serum – FCS). Sau 9 ngày ủ, cố định tế bào bằng 10% formaldehyde (38%) trong PBS 1/75M và nhuộm tế bào bằng dung dịch tím crystian 0,25% trong formaldehyde 38%. Thử nghiệm được làm 6 lần với mẫu chuẩn.

Hiệu giá PFU/0,5ml = (Trung bình đám hoại tử x 5 x độ pha loãng)/2

- Hiệu giá ARN được xác định tương tự như PFA. Sau khi cấy 24, 48, và 72 giờ, tách chiết ARN bên trong tế bào bằng 3 phương pháp: i./ sử dụng trypsin tách tế bào, sau đó rửa sạch tế bào bằng PBS 1/75M và ly tâm (2500 vòng/phút x 15 phút x 4°C) rồi trả lại 300 μ l PBS và tách chiết ARN sử dụng bộ sinh phẩm tách chiết ARN (Qiagen). ii./ sử dụng dung dịch ly

giải nhanh tế bào (TpLR) 300 μ l/giếng và ủ ở 37°C x 4 phút, sau đó ARN được tách chiết bằng bộ sinh phẩm tách chiết ARN (Qiagen). iii./ chỉ ly giải tế bào bằng TpLR 300 μ l/giếng và ủ ở 37°C x 4 phút. ARN của cả 3 phương pháp được định lượng trong cùng thử nghiệm.

Số bản sao ARN/0,5ml

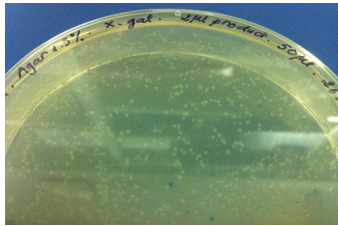
$$= (\text{Trung bình số bản sao ARN}/5\mu\text{l} \times 15 \times 5 \times \text{độ pha loãng})/2$$

- So sánh sự khác biệt tuyệt đối và tương quan hiệu giá hai phương pháp để xác định nồng độ pha loãng virus, thời gian gặt và phương pháp tách chiết ARN tối ưu.
- Phương pháp mới được thẩm định với 10 loạt vắc xin thành phẩm, bao gồm các tiêu chí i./ *Độ đúng*. ii./ *Độ chính xác*. iii./ *Độ tương quan tuyến tính* và *Hệ số tương quan*. iv./ *Giới hạn phát hiện* và *Giới hạn định lượng*. v./ *Tính đặc hiệu* và *Tính lựa chọn*. và vi./ *Độ mạnh*.

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Sản xuất chứng dương ARN

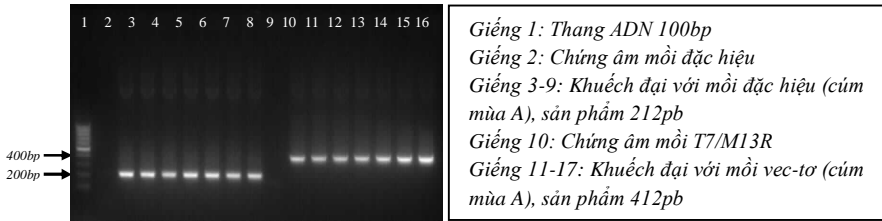
3.1.1. Tạo khuôn mẫu và chuyển nạp



Hình 3.1. Chuyển nạp đoạn gen 7 virus cúm mùa A.

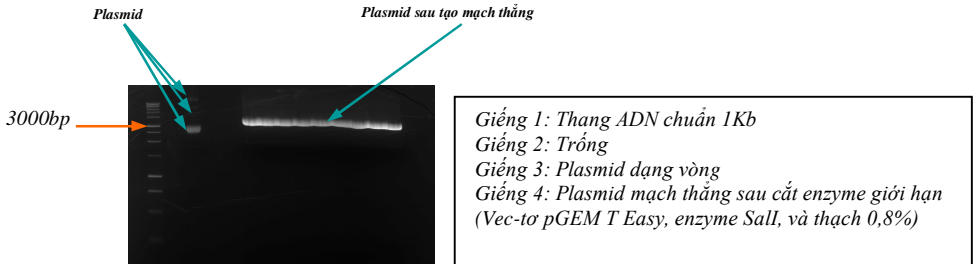
Hầu hết trong số hàng trăm khuẩn lạc *E.coli* chuyển nạp đều có màu trắng hoặc xanh nhạt, chỉ một vài hoặc không có khuẩn lạc nào màu xanh đậm (Hình 3.1). Kết quả thu được là 7 plasmid tái tổ hợp chứa đoạn gen 7 virus cúm mùa A, cúm B, các đoạn gen 7, 4, 6 virus cúm gia cầm A/H5N1 dùng cho RT-PCR real-time, các đoạn gen 7, 4 virus cúm gia cầm A/H5N1 dùng cho RT-PCR cổ điển. Các chủng vi khuẩn sau đó được nuôi cấy ở môi trường canh thang LB và giữ ở -80°C trong môi trường glycerol 50%.

Chuyển nạp được kiểm tra bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu và cặp mồi của vec-tơ (T7/M13R). Hình 3.2 là kết quả khuếch đại plasmid tái tổ hợp chứa đoạn gen 7 mã hóa protein M virus cúm mùa A sử dụng mồi đặc hiệu và mồi vec-tơ với sản phẩm tương ứng khoảng 210bp và 410bp. Sau cùng, kết quả chuyển nạp được khẳng định bằng giải trình tự gen.



Hình 3.2. Kiểm tra chuyển nạp đoạn gen 7 virus cúm mùa A bằng PCR.

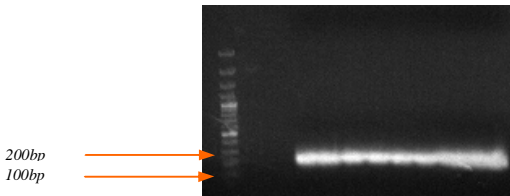
Plasmid tái tổ hợp được tạo mạch thẳng bằng RFLP (SalI cho pGEM T Easy và HindIII cho TOPO[®] pCR2.1) (Hình 3.3).



Hình 3.3. Tạo plasmid mạch thẳng chứa đoạn gen 7 virus cúm mùa A.

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

Phiên mã trực tiếp không qua tạo đồng mà chỉ khuếch đại ARN nguồn với cặp mỗi cái biên. Hình 3.4 là kết quả khuếch đại với mỗi cái biên virus cúm A/H1N1pdm09 và kích thước sản phẩm khoảng 200bp. Đề tài đã sản xuất được 2 gam chuẩn là đoạn gen 7 virus cúm A/H1N1pdm09 và gen N virus sởi.

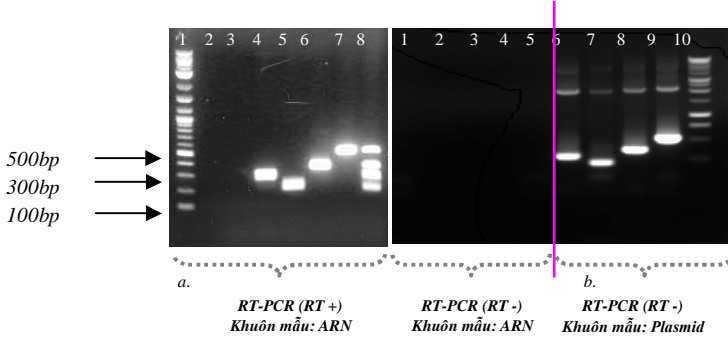


Hình 3.4. Khuếch đại đoạn gen 7 virus cúm A/H1N1pdm09 (mỗi cái biên).

3.1.3. Phiên mã

Hình 3.5 là kết quả kiểm tra độ tinh khiết của ARN sau phá hủy ADN khuôn mẫu của virus cúm mùa A, hRSV, cúm B, hMPV. Hình 3.5.a là kết quả khuếch đại ARN mới được tổng hợp và có bước phiên mã ngược (RT+), Hình 3.5.b là kết quả khuếch đại ARN mới được tổng hợp nhưng

không có bước RT (RT-), Hình 3.5.c là kết quả khuếch đại không có bước RT nhưng sử dụng khuôn mẫu là plasmid.



Hình 3.5. Kiểm tra độ tinh sạch ARN bằng RT-PCR

a. Chứng dương sau phiên mã: PCR, RT+

Giếng 1: Thang ADN 100bp (Promega)

Giếng 2: Chứng âm

Giếng 3: Trống

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

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

b. Chứng dương sau phiên mã: PCR, RT-

Giếng 1: Chứng âm

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

c. Plasmid: PCR, RT-

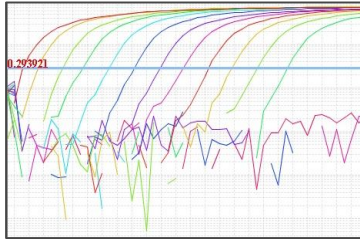
Giếng 6,7,8,9: Tương ứng cúm mùa A, hRSV, cúm B, hMPV

Giếng 10: Thang ADN 1Kb (Promega).

Bảng 3.1. Sản lượng phiên mã.

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

Sau tinh sạch, đo OD để tính nồng độ ARN trong một đơn vị thể tích (1 μ l). Bảng 3.1 trình bày sản lượng ARN thu được của 9 gam chuẩn sau phiên mã của đề tài nghiên cứu. Sau cùng, pha loãng dung dịch để có gam chuẩn 10^1 - 10^6 sử dụng cho mỗi phản ứng.



Trục tung: ΔRn
Trục hoành: Chu kỳ

Hình 3.6. Chuẩn độ chứng dương ARN gen N virus sởi 10^1 - 10^{12} .

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

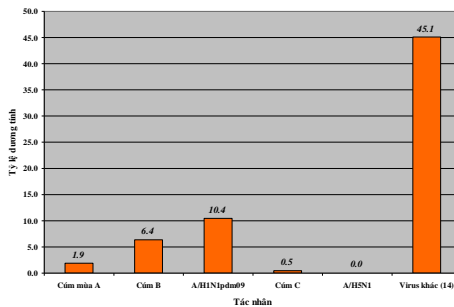
3.2.1. Đặc điểm đối tượng nghiên cứu

Từ 1/2009-6/2011, đề tài đã thu thập liên tục được 336; 452; và 485 mẫu bệnh phẩm theo đúng định nghĩa ca bệnh SARI (tổng số 1273 mẫu). Tỷ lệ nam/nữ = 1,3; tuổi từ 2 tháng-84 tuổi, trung vị là 2 tuổi và trẻ <5 tuổi chiếm 63,3%.

3.2.2. Tỷ lệ tử vong do cúm

Có một trường hợp nam, 70 tuổi tử vong năm 2011 do virus cúm A/H1N1pdm09 (chiếm 0,08% các trường hợp dương tính). Ca tử vong âm tính với cúm A/H5N1 và không đồng nhiễm với 18 tác nhân virus khác.

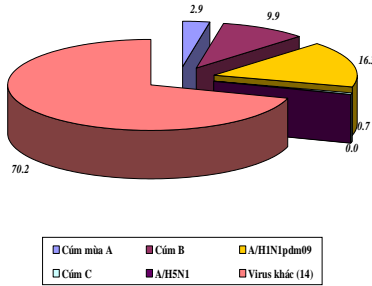
3.2.3. Tỷ lệ nhiễm cúm



Hình 3.7. Tỷ lệ dương tính với virus cúm ở bệnh nhân SARI, Hải Dương.

Tỷ lệ dương tính trung bình tương ứng của virus cúm mùa A (A/H3N2, A/H1N1), cúm B, và cúm A/H1N1pdm09 là 1,9%; 6,4%; và 10,4% trong

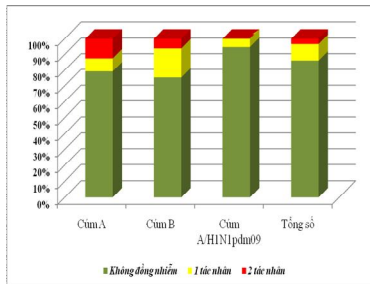
suốt 2,5 năm nghiên cứu (Hình 3.7). Nghiên cứu này không phát hiện được trường hợp nào dương tính với cúm gia cầm A/H5N1. Trong số 818 mẫu dương tính với virus nói chung (63,4%), có 244 mẫu dương tính với virus cúm (cúm mùa A, cúm B, cúm C, cúm A/H1N1pdm09), chiếm 29,8% (Hình 3.8).



Hình 3.8. Phân bố cúm ở các trường hợp SARI dương tính với virus.

3.2.4. Tỷ lệ đồng nhiễm cúm và các virus khác

Trong 238 mẫu dương tính với cúm A và B, có 33 ca đồng nhiễm, cụ thể đồng nhiễm cúm A là 8,3%, cúm B là 19,8%, cúm A/H1N1pdm09 là 5,3%. Có 8 ca (3,4%) đồng nhiễm 2 tác nhân, trong đó cúm mùa A chiếm 12,5%, cúm B là 6,2% và không có trường hợp cúm A/H1N1pdm09 nào đồng nhiễm 2 tác nhân virus.

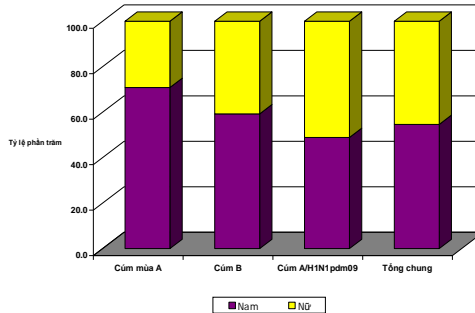


Hình 3.9. Đồng nhiễm cúm với các virus khác.

Ba mươi ba (33) mẫu virus cúm đồng nhiễm với 13 trong số 18 virus hô hấp nghiên cứu trong khuôn khổ dự án SISEA (virus cúm mùa A, cúm B, cúm C, cúm A/H1N1pdm09, hRSV, hMPV, parainfluenza 3 (hPIV-3), parainfluenza 4 (hPIV-4), rhinovirus (HRV), coronavirus chủng OC43 (CoV OC43), coronavirus chủng 229E (CoV 229E), adenovirus (hAdV), và bocavirus (hBoV)).

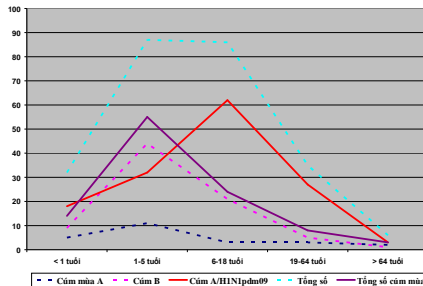
3.2.5. Phân bố nhiễm cúm theo giới tính, nhóm tuổi và thời gian

Tỷ lệ nhiễm cúm nam/nữ = 1,2 lần, trong đó nam/nữ của cúm mùa A, cúm B, và cúm A/H1N1pdm09 lần lượt là 2,4; 1,5; và 1,1%.



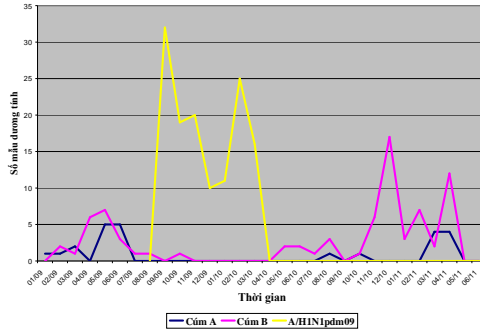
Hình 3.10. Phân bố cúm theo giới tính của bệnh nhân SARI.

Tỷ lệ nhiễm cúm mùa A và cúm B chủ yếu rơi vào nhóm 1-5 tuổi (52,4%), sau đó đến nhóm 6-18 tuổi (22,8%) trong khi tỷ lệ này ở nhóm dưới 1 tuổi chiếm 13,3% nhưng lại chiếm 43,5% các bệnh nhân dưới 1 tuổi. Tỷ lệ nhiễm cúm A/H1N1pdm09 cao nhất ở nhóm 6-18 tuổi (46,6%), tiếp đến là nhóm 1-5 tuổi (17,2%). Nhóm người có tuổi (>64 tuổi) có tỷ lệ nhiễm cúm nói chung thấp (2,5%) đối với cả cúm mùa A, cúm B và cúm A/H1N1pdm09.



Hình 3.11. Phân bố cúm theo nhóm tuổi ở bệnh nhân SARI tại Hải Dương.

Kết quả phân bố của cúm theo tháng được trình bày ở Hình 3.12. Virus cúm A/H1N1pdm09 được phát hiện từ tháng 09/2009 và ngay lập tức đạt đỉnh và kéo dài đến đầu năm 2010, sau đó không phát hiện thêm trường hợp nào cho đến tận 2011. Không giống với giai đoạn đầu và cuối của đại dịch là cúm B và cúm A đồng lưu hành, trong giai đoạn đại dịch, chủng cúm A/H1N1pdm09 chiếm ưu thế tuyệt đối, không phát hiện được trường hợp cúm mùa A nào. Nghiên cứu này không xác định phânтип cúm mùa A.



Hình 3.12. Mắc cúm ở bệnh nhân SARI theo tháng.

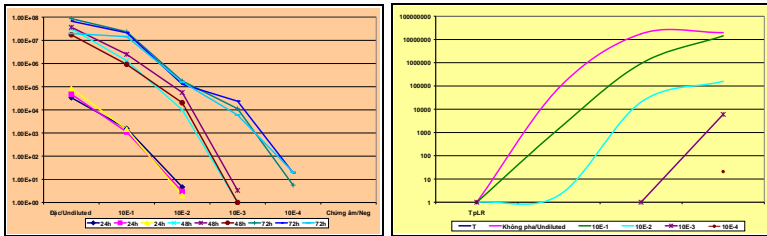
3.3. Kiểm định công hiệu vắc xin sởi

3.3.1. Kết quả xác định hiệu giá chuẩn bằng PRA

Hiệu giá PFU/liều 0,5ml dao động trong khoảng 4,00-4,06 log₁₀.

3.3.2. Hiệu giá chuẩn bằng real-time

Cả 3 phương pháp tách chiết ARN có hệ số tương quan (R) từng cặp dao động trong khoảng 0,96 - 0,99 và không có sự khác biệt tuyệt đối ($p > 0,5$). Hình 3.13 là kết quả định lượng ARN ở 24, 48, và 72 giờ.



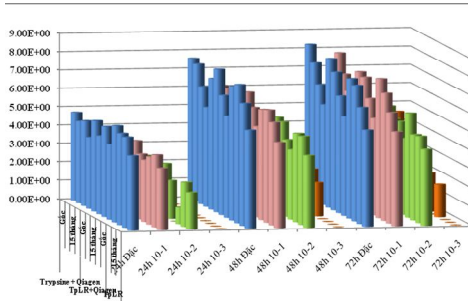
a.

b.

Hình 3.13. Tương quan của 3 phương pháp tách chiết ARN (a) và hiệu giá sau gây nhiễm (b).

3.3.3. Sự ổn định của ARN tách chiết bằng TpLR

Chất lượng của ARN tách chiết bằng TpLR còn được đánh giá thông qua hệ số tương quan (R) và giá trị khác biệt tuyệt đối khi ARN của cả ba phương pháp tách chiết được kiểm tra sau khi được bảo quản 12 tháng (-80°C), 15 tháng (-80°C), và tiếp đó 2 tháng (-30°C).

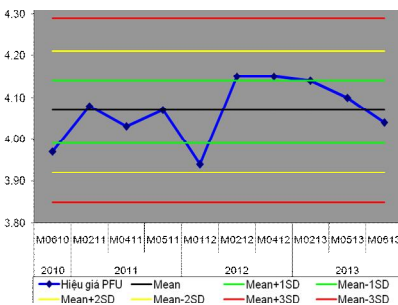


Hình 3.14. Bền vững của ARN ở nhiệt độ và thời gian thực (Log10).

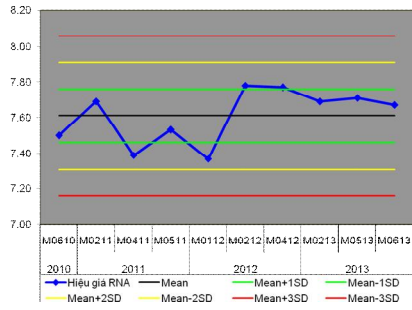
3.3.4. Hiệu giá ARN vắc xin sởi thành phẩm

Hệ số tương quan hiệu giá PFU so với hiệu giá ARN của 10 loạt vắc xin thành phẩm khi cấy vắc xin đặc, pha loãng 10^{-1} , và 10^{-2} tương ứng là 0,67, 0,90, và 0,88. Hệ số tương quan chung là 0,80. Hệ số tương quan của ARN tách chiết trực tiếp từ vắc xin so với hiệu giá PFU <0,4. Hiệu giá ARN của 10 loạt vắc xin dao động trong khoảng [7,67-8,08log10] và trung bình cao hơn hiệu giá PFU $3,1 \times 10^3$ lần. Hiệu giá ARN thành phẩm trung bình cao hơn hiệu giá PFU $1,4 \times 10^2$ lần.

Hình 4.23 là biểu đồ theo dõi xu hướng (biểu đồ Levey-Jennings) hiệu giá PFU (a) và số bản sao ARN (b) (Log10) của 10 loạt vắc xin. Hiệu giá vắc xin (đường màu xanh nước biển) luôn nằm trong khoảng $M \pm 2SD$ (đường màu vàng) và hai phương pháp có đường biểu diễn tương đồng nhau.



a.



b.

Hình 3.15. Biểu đồ Levey-Jennings hiệu giá PFU (a) và ARN (b).

3.3.5. Độ lặp lại của phản ứng

Hệ số biến thiên (CV) trung bình của độ lặp lại trong cùng một lần thử nghiệm (repeatability) và độ lặp lại trung gian (intermediate precision)

tương ứng là 0,8% và 3,3%. Trung bình CV của 2 ngày thử nghiệm 10 loạt vắc xin ở các nồng độ cấy vắc xin đặc, 10^{-1} , và 10^{-2} là 2,7%.

CHƯƠNG 4 : BÀN LUẬN

4.1. Kết quả sản xuất các gam chuẩn

4.1.1. Tạo dòng plasmid tái tổ hợp và chuyển nạp

Tạo dòng là kỹ thuật cài trực tiếp một đoạn ADN vào véc-tơ mạch thẳng biết trước tạo plasmid tái tổ hợp. Đầu 3' của véc-tơ *TOPO[®]pCR2.1* (Invitrogen) gắn sẵn Thymine (T) và topoisomerase. Do Taq polymerase có hoạt tính vận chuyển đầu tận cùng không phụ thuộc khuôn mẫu nên nó sẽ thêm một deoxyadenosine (A) vào đầu 3' của sản phẩm PCR. Điều này cho phép sản phẩm PCR chèn và nối được với véc-tơ một cách hiệu quả (cầu nối A-T). Khi sử dụng *pGEM T Easy* (Promega), cần thực hiện thêm bước gắn sản phẩm vào véc-tơ.

4.1.2. Kiểm tra chuyển nạp

Phản ứng chuyển nạp cho phép lựa chọn các tế bào cảm biến *E.coli* chứa plasmid tái tổ hợp dựa vào cơ chế bù α của gen β -galactosidase. Khuẩn lạc màu trắng hoặc xanh nhạt là do enzyme β -galactosidase hoạt tính không được hình thành vì trình tự đích đã chèn vào *lacZa* của plasmid (chuyển nạp thành công).

Chuyển nạp được kiểm tra bằng PCR sử dụng mỗi đặc hiệu và mỗi của véc-tơ (T7/M13R). Hình 3.2. là kết quả khuếch đại đoạn gen 7 virus cúm mùa A, trọng lượng đích khi khuếch đại với mỗi đặc hiệu khoảng 210bp (giếng 3-9), trong khi sản phẩm khuếch đại với T7/M13R khoảng 410bp (giếng 11-17). Chiều dài của sản phẩm là tổng chiều dài của 2 đoạn mỗi và chiều dài khoảng cách giữa 2 đoạn mỗi của khuôn mẫu. Dựa vào bản đồ genome của véc-tơ *pGEM T Easy*, xét về mặt kích thước, sản phẩm đích đã cài được vào véc-tơ. Kết quả giải trình tự gen với cặp mỗi của véc-tơ đã khẳng định chuyển nạp ở mức nucleotide.

4.1.3. Tạo mạch thẳng ADN plasmid

ADN phải ở dạng mạch thẳng để sản phẩm ARN tổng hợp có chiều dài đồng nhất. Hình 3.3 cho thấy plasmid tái tổ hợp chứa một đoạn gen mã hóa protein M của virus cúm mùa A (*pGEM T Easy*) được tạo mạch thẳng với kích thước đích mong muốn. Sản phẩm RFLP chỉ có một dải ADN duy nhất, không có các dải phụ, điều này cho thấy phản ứng RFLP đã cắt hoàn toàn plasmid mạch vòng.

Với phiên mã trực tiếp, sản phẩm luôn là ADN mạch thẳng với kích thước bằng tổng chiều dài trình tự đích và chiều dài trình tự chức năng được cài vào mỗi. Hình 3.4 cho thấy sản phẩm khuếch đại có kích thước xấp xỉ 200bp, chính là tổng chiều dài (191bp) đoạn gen 7 mã hóa protein M

của cúm A/H1N1pdm09 (154bp) và chiều dài của 2 cặp mỗi cái biên (37bp).

4.1.4. Kết quả phiên mã *in vitro*

Phiên mã *in vitro* (T7RiboMAX™) có thể sản xuất đến mức *mg* ARN/phản ứng 20 μ l. Cơ chế của phiên mã *in vitro* cổ điển là sử dụng trình tự chức năng phiên mã T7 vốn có của véc-tơ. Đầu phiên mã là trình tự chức năng phiên mã T7, đầu còn lại tự do, là vị trí của RFLP. Điều này làm cho sản phẩm đích ARN luôn có chiều dài bằng nhau (đồng nhất).

Một trong số các ứng dụng của thiết kế cặp mỗi là đánh dấu mỗi. Đề tài này đã áp dụng cái biên mỗi bằng cách cài thêm vào cặp mỗi đặc hiệu trình tự phiên mã T7 và poly T ở mỗi xuôi và mỗi ngược (cái biên 2 mỗi) để chèn được các trình tự chức năng này vào 2 đầu của sản phẩm đích.

Hình 3.5 cho thấy ARN mới được tổng hợp bằng phiên mã *in vitro* đều cho các sản phẩm đích như mong muốn. Sau phiên mã, khuôn mẫu ADN bị phá hủy để đảm bảo quá trình khuếch đại không bị ảnh hưởng vì nếu ADN còn sót lại thì cho dù không có bước RT nhưng vẫn thu được sản phẩm đích nên ngoài việc kiểm tra sản phẩm bằng RT-PCR như quy trình cổ điển, cần phải kiểm tra sự phá hủy khuôn mẫu ADN bằng RT-PCR nhưng không có bước RT (chu kỳ nhiệt không có bước RT). Khi không có bước RT, tất cả các giếng đều âm tính hoàn toàn, điều này chứng minh ADN khuôn mẫu của quá trình phiên mã đã được phá hủy hết. Ngược lại, plasmid là khuôn mẫu ADN vẫn cho sản phẩm đích như mong muốn mặc dù không có bước RT. Khi ADN đã bị phá hủy hoàn toàn thì kết quả khuếch đại là từ khuôn mẫu ARN vừa được tổng hợp. Đây cũng là cách một số tác giả sử dụng khi sản xuất chứng dương.

Sản lượng phiên mã của đề tài rất cao, ổn định, dao động từ $1,59 \times 10^{11}$ - $1,2 \times 10^{19}$ bản sao, đảm bảo sử dụng trong một thời gian dài (bền vững ít nhất 4 năm, số liệu không được chỉ ra ở nghiên cứu này) và ở phạm vi rộng. ARN tổng hợp bằng phiên mã *in vitro* không những được dùng cho chẩn đoán mà còn có thể sản xuất các bộ mẫu chuẩn (panel) sử dụng cho chương trình ngoại kiểm sinh học phân tử (External quality assessment for nucleic acid testing - EQA NAT).

Gam chuẩn ngoài của nghiên cứu đã được sử dụng như các mẫu nội kiểm trong chẩn đoán cúm (mục tiêu 2) và định lượng sợi (mục tiêu 3) cho chính đề tài này. Phiên mã có thể áp dụng cho các trình tự phiên mã T3 hay SP6. Phiên mã cổ điển có thể giữ được chủng *E.coli* tái tổ hợp vĩnh viễn. Phiên mã trực tiếp có thể áp dụng cho mọi trình tự mỗi, kể cả sản xuất ARN sợi kép.

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

4.2.1. Đặc điểm đối tượng nghiên cứu

Cỡ mẫu nghiên cứu lớn và khá đồng đều giữa các năm bảo đảm lực nghiên cứu trong một số tính toán thống kê cũng như độ tin cậy khi phân tích theo thời gian. Tuy nhiên, sự phân bố không đều theo giới tính (nam/nữ = 1,3 lần) và nhóm tuổi (63,3% là trẻ <5 tuổi) có ảnh hưởng đến việc phân tích và biện luận kết quả.

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

Kết quả dương tính với virus cúm A/H1N1pdm09 và âm tính với cúm A/H5N1 cũng như không có hiện tượng đồng nhiễm virus dường như có thể khẳng định trường hợp tử vong duy nhất vì cúm A/H1N1pdm09. Quá trình làm sạch virus cúm ở đường hô hấp nhờ interferon, đáp ứng miễn dịch gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity - ADCC), tế bào diệt tự nhiên (Natural Killer - NK) và tế bào lympho T. Đáp ứng miễn dịch ở người có tuổi bị hạn chế, đây có thể là một trong số các lý do gây tử vong của bệnh nhân này.

Trong khi tỷ lệ phân bố cúm B ổn định thì con số tương ứng của virus cúm mùa A là 1,9%, biến động ($p < 0,01$), điều này có thể do năm 2009, số lượng mắc cúm A được phát hiện rơi vào thời điểm trước đại dịch cúm A/H1N1pdm09. Tỷ lệ nhiễm cúm A/H1N1pdm09 là 10,4%, khác biệt có ý nghĩa giữa các năm ($p < 0,0005$). Đại dịch xảy ra năm 2009, số lượng bệnh nhân mắc nhiều nên tỷ lệ nhiễm cao nhất (24,1%), năm 2010, tỷ lệ dương tính chỉ còn 0,2% do đây là giai đoạn cuối của đại dịch và trong quần thể có thể đã có miễn dịch với chủng virus mới. Có thể có một tỷ lệ bảo vệ chéo giữa cúm A/H1N1pdm09 và cúm mùa A/H1N1 nên tỷ lệ nhiễm cúm mùa A giảm đi rõ rệt vào năm 2010 và 2011 ($p < 0,0005$) hoặc cũng có thể do đặc điểm sinh học của virus cúm là khi có một chủng virus cúm mới xuất hiện thì nó thường chiếm ưu thế hơn những chủng đã tồn tại trước đó. Hiện tượng thay đổi đột ngột kháng nguyên chính là nguyên nhân của các vụ đại dịch cúm, trong đó có đại dịch cúm A/H1N1pdm09. Năm 2011, tỷ lệ nhiễm là 10,5%, như vậy đây là vụ dịch mới. Con số mắc cúm A/H1N1pdm09 của từng năm tương đồng với nhiều tác giả Việt Nam và quốc tế.

Có tử vong và con số 18,7% dương tính với cúm và chiếm 29,3% trong tổng số các mẫu dương tính với virus cho thấy vai trò quan trọng của virus cúm gây SARI, đặc biệt ở trẻ em tại tỉnh Hải Dương.

Tỷ lệ đồng nhiễm cao, đồng nhiễm giữa các virus cúm, đồng nhiễm nhiều loại tác nhân và cùng lúc với nhiều tác nhân virus cũng là một khó khăn khi xác định tác nhân gây bệnh chính, nhất là khi phản ứng định

lượng trực tiếp không được áp dụng và đây là một nghiên cứu mô tả chứ không phải là một nghiên cứu bệnh-chứng. Trong số các tác nhân đồng nhiễm, HRV và hMPV chiếm cao nhất, có thể do hiện tượng cùng lưu hành của virus cúm và 2 virus này, thêm vào đó, đây cũng là 2 trong số các virus có tỷ lệ nhiễm cao nhất. Ngoài ra, HRV là virus đường ruột, không có vỏ ngoài nên khá bền vững, lưu hành quanh năm, thời gian đào thải tới vài tuần, được phát hiện ở cả người lành nên tỷ lệ nhiễm và đồng nhiễm với HRV có thể cao hơn các tác nhân khác. Kết quả này cho thấy việc giám sát virus học, dịch tễ học hàng loạt tác nhân và định lượng từng virus trong chẩn đoán có thể đóng một vai trò quan trọng góp phần xác định nguyên nhân gây bệnh thực sự. Đồng nhiễm giữa các virus cúm với nhau cho thấy vai trò quan trọng trong nghiên cứu bệnh học cúm do hiện tượng tái tổ hợp giữa các chi cúm có thể làm biến đổi về độc lực và khả năng lây bệnh ở người. Kết quả nghiên cứu cũng phù hợp với công bố trước đây rằng cúm A và B có thể đồng thời lưu hành trong cùng một năm và sự lưu hành của virus này không ảnh hưởng đến sự lưu hành của virus khác và ngược lại.

So với nghiên cứu của Nguyễn Thu Yên và cộng sự, kết quả của đề tài này có tỷ lệ nhiễm cúm nhìn chung thấp hơn nhiều so với số liệu của nghiên cứu giám sát trọng điểm ILI (22%), điều này có thể do định nghĩa ca bệnh ILI, mặc dù phải nhập viện, luôn rộng hơn SARI. So với SVP, kết quả của đề tài này cao hơn (18,7% so với 14%) do SVP chỉ nhằm vào bệnh nhân viêm phổi nặng nên có thể định nghĩa ca bệnh lại chặt chẽ hơn SARI. So sánh với nghiên cứu trên bệnh nhân SARI của cùng tác giả, mặc dù vẫn có sự khác biệt trong định nghĩa ca bệnh, quy trình xét nghiệm nhưng số liệu của 2 nghiên cứu này rất tương đồng, trừ trường hợp cúm A/H1N1pdm09 do năm 2011-2013, phân típ cúm A này vẫn còn lưu hành nhưng không chiếm ưu thế nữa và nghiên cứu này chỉ thu thập bệnh phẩm đến tháng 6/2011. Tỷ lệ nhiễm cúm có thể khác biệt tùy thuộc vào định nghĩa ca bệnh, chuẩn hóa theo cơ cấu dân số của khu vực, quy trình xét nghiệm, bao gồm cả trình tự cập mỗi và đầu dò, thời gian lấy mẫu làm xét nghiệm, loại phản ứng (đơn mỗi hay đa mỗi)....

So với số liệu của Campuchia, tỷ lệ nhiễm cúm 2009-2010 có tương quan với nghiên cứu này nhưng tác giả không tách biệt tỷ lệ nhiễm cúm mùa A và cúm A/H1N1pdm09. Tại Lào, tỷ lệ dương tính với cúm A trung bình là 9,0% (bao gồm cả cúm A/H1N1pdm09), cũng rất gần với con số 10,4% của nghiên cứu này. Tỷ lệ nhiễm cúm của nghiên cứu này cũng nằm trong khoảng 5-20%, là con số thống kê mắc cúm của Hoa Kỳ và Pháp.

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

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

Phân bố cúm không có sự khác biệt theo giới tính, trừ cúm A, nguyên nhân có thể do số mẫu quá nhỏ ($n=24$) nên không có tính đại diện. Số liệu này cũng tương đồng với một số nghiên cứu khác.

Có tới 29,0% trẻ em dưới 5 tuổi mắc SARI phải nhập viện tại Hải Dương, nhiều hơn ($p<0,001$) so với các nhóm còn lại là 5-18 tuổi (10,1%), 19-64 tuổi (3,4%), và >64 tuổi (1,3%). Đây cũng là một trong số các bằng chứng về gánh nặng bệnh tật của cúm.

Trong nghiên cứu này, cúm mùa chủ yếu gây bệnh ở trẻ nhỏ, đây có thể phù hợp với biểu đồ diễn biến hình chữ “V” (trẻ nhỏ và người có tuổi mắc nhiều nhất). Tuy nhiên, do chỉ 4,1% đối tượng nghiên cứu thuộc nhóm >64 tuổi nên nhánh này không rõ ràng như nhánh trẻ nhỏ.

Dường như cúm A/H1N1pdm09 có biểu đồ diễn biến hình chữ “W” của một virus cúm đại dịch (trẻ nhỏ, thanh niên, và người có tuổi mắc nhiều nhất). Hai đỉnh nhóm tuổi mắc cúm mùa và cúm đại dịch khác biệt rõ rệt (Hình 3.11). Nhánh người có tuổi trong nghiên cứu này không rõ có thể do số đối tượng nghiên cứu >64 tuổi thấp hoặc theo CDC Hoa Kỳ thì có thể do đặc điểm tích hợp của virus cúm A/H1N1pdm có gen HA khởi nguồn từ chủng A/H1N1pdm1918 nên có hiện tượng bảo vệ chéo cho nhóm đối tượng >64 tuổi.

Chúng tôi tin rằng đây là một trong số các số liệu đầu tiên của Hải Dương về một số đặc điểm dịch tễ học của virus cúm gây SARI trong suốt 2,5 năm nghiên cứu giai đoạn 2009-2011.

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

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

Các tài liệu kinh điển đã thừa nhận chu kỳ nhân lên của sởi chỉ mất vài giờ nên số bản sao ARN bên trong tế bào gây nhiễm sau 24 giờ rất cao và nhờ những ứng dụng rộng rãi của real-time mà phương pháp định lượng số bản sao ARN bên trong tế bào gây nhiễm cho phép đọc kết quả chỉ sau 24 giờ cấy mà không cần theo dõi CPE hay TCID₅₀, đây là cơ sở để xây dựng một phương pháp cho kết quả nhanh và có tính tự động hóa cao.

Hiệu giá của vắc xin sởi đơn, sống giảm độc lực ổn định và luôn đạt 10^3 - 10^4 PFU/liều 0,5ml nên chỉ cần pha loãng bậc 10 là đặc đến 10^{-4} và chứng tế bào là đủ. Các tài liệu cũng chứng minh rằng pha loãng virus bậc 10 là đủ để đánh giá sự khác biệt trong đáp ứng sinh học.

Có thể đo lường được hiệu giá ARN 24 giờ sau cấy ở nồng độ đặc và 10^{-1} , kết quả đều rơi vào khoảng tuyến tính của gam chuẩn ngoài nên đảm bảo được độ tin cậy. Hiệu giá ARN ở độ pha loãng vắc xin 10^{-2} rất thấp,

nằm ngoài khoảng tuyến tính nên không đảm bảo độ tin cậy. Không phát hiện được ARN ở nồng độ pha loãng 10^{-3} và 10^{-4} .

Ở 48 và 72 giờ, có thể đo lường được ARN ở các nồng độ từ đặc đến 10^{-3} , thậm chí 10^{-4} nhưng 10^{-1} và 10^{-2} có hiệu giá ARN rơi ra ngoài khoảng tuyến tính của gam chuẩn ngoài nên cũng không đảm bảo độ tin cậy của kết quả.

Như vậy, thời gian tối ưu để gặt ARN là 24 giờ và nồng độ pha loãng vắt xin là đặc và 10^{-1} . Khi so sánh với thời gian đọc công hiệu thông thường là 9 ngày, rõ ràng 24 giờ có một ưu điểm rõ ràng, điều này thật sự hữu ích khi thị trường có nhu cầu vắt xin gấp.

Sử dụng TpLR xử lý ARN bên trong tế bào phức tạp hơn ở dịch nổi nhưng lại cho phép đọc kết quả sớm hơn và pha loãng vắt xin 10^{-1} thì các chất ức chế trong vắt xin có thể không ảnh hưởng đến quá trình nhân lên của virus. Khi so sánh với phương pháp tách chiết sử dụng bộ sinh phẩm thương mại thì cả 3 phương pháp tách chiết ARN đều tương quan chặt chẽ và không khác biệt tuyệt đối ở các thời điểm 24, 48, và 72 giờ ($p > 0,05$).

Một đặc điểm chung của các phương pháp tách chiết là ***trước tiên tế bào hoặc virus được phá hủy để giải phóng acid nucleic, sau đó acid nucleic được tách rời ra khỏi các thành phần khác như protein, lipid và carbohydrate***. Tại thời điểm phá hủy tế bào hay tổ chức - là thời điểm tính toàn vẹn của ARN bị đe dọa - thì ***các chất làm biến tính nuclease phải tiếp xúc được với các thành phần trong tế bào***. Để thành công, các thường quy tách chiết ARN thường phải sử dụng các chất gây biến tính mạnh. Sự có mặt của EDTA là cần thiết để giữ ARN nguyên vẹn. ARN của nghiên cứu này được bảo quản ở -80°C và dung dịch TpLR là đệm Tris HCL pH=8 chứa 50mM KCL, 50mM MgCL₂, 0,45% Nonidet-P40, và 0,45% Tween 20 đáp ứng được đầy đủ yêu cầu của nguyên lý tách chiết và bảo quản ARN.

Hiệu giá ARN của cả 3 phương pháp tách chiết vẫn không khác biệt tuyệt đối sau 1 năm bảo quản ở -80°C ($p > 0,05$). Gặt ARN bằng TpLR vừa giảm đáng kể khối lượng công việc, tiết kiệm thời gian và tiết kiệm kinh phí, lượng mẫu thu được nhiều (300 μl thay vì 60 μl). Đây là một ưu điểm đáng kể của nghiên cứu này, đặc biệt khi có một lượng mẫu lớn. Như vậy, có thể gặt ARN bằng TpLR và sử dụng được ít nhất trong vòng 12 tháng bảo quản ở -80°C .

Khi khuếch đại bằng real-time, hệ thống này cho ta một đường cong khuếch đại gồm 3 giai đoạn: ***kéo dài*** đến khi dấu hiệu của sản phẩm PCR lớn hơn dấu hiệu nền của hệ thống, ***tăng gia tốc*** kéo dài, và ***tạo hình phẳng***. Do vậy, một bức tranh hoàn thiện của cả quá trình PCR được thể hiện rõ hơn, kết quả được phân tích ngay trong lúc phản ứng đang chạy nên

không bị nhiễm sản phẩm từ ngoài vào nhưng lại được kiểm soát tốt hơn, tự động hoàn toàn. Gam ARN chuẩn ngoài được sử dụng để định lượng một cách chính xác với độ nhạy thông thường của TaqMan là 10^1 - 10^5 bản sao acid nucleic trong 5-10 μ l khuôn mẫu. TaqMan là phổ biến nhất trong các kỹ thuật real-time PCR do có độ tích lũy tín hiệu huỳnh quang lớn nhất. Như vậy, định lượng trực tiếp vừa có vai trò chẩn đoán, tiên lượng và vừa có vai trò đánh giá đáp ứng sinh học.

Trong nghiên cứu, nhiều tác giả đã ứng dụng real-time để xây dựng phương pháp xác định tính nhạy cảm của virus với thuốc kháng virus và xác định công hiệu vắc xin. Nghiên cứu này là sự phát triển tiếp theo của những mô hình đã được thử nghiệm trước đó. So với PFA, 2 phương pháp có cùng bản chất do đều đo lường các hạt virus có hoạt tính (có khả năng gây nhiễm tế bào). Tuy nhiên, tín hiệu phát hiện của 2 phương pháp khác nhau, PFA đo lường số hạt virus có hoạt tính ở mức độ tế bào qua số đám hoại tử (9 ngày) còn phương pháp mới cũng đo lường số hạt virus có hoạt tính nhưng ở mức độ phân tử qua định lượng ARN bên trong tế bào gây nhiễm nên chỉ mất 24 giờ. Phương pháp này tránh được nhược điểm của thử nghiệm huyết thanh học và có thể được áp dụng để kiểm soát sản phẩm trong quá trình sản xuất (*in process control*) - một vấn đề hiện chưa có giải pháp cho các vắc xin sống. Có thể mở rộng nghiên cứu đối với những vắc xin virus sống giảm độc lực bài xuất virus ra khỏi tế bào thấp và cần rất nhiều thời gian hoặc áp dụng cho những vắc xin virus không tạo CPE.

4.3.2. Hiệu giá ARN vắc xin sởi thành phẩm

Hai phương pháp xác định công hiệu vắc xin sởi bằng PFU và ARN bên trong tế bào gây nhiễm tương quan chặt chẽ và R cao nhất khi pha loãng vắc xin 10^{-1} . Điều này có thể do khi cấy vắc xin đặc, một số thành phần có trong vắc xin có thể ức chế quá trình nhân lên của virus hoặc do lượng virus quá nhiều có thể tạo ra một tỷ lệ thấp hơn những phần tử có tính gây nhiễm. Kết quả này cũng trùng với kết quả thăm dò trên chủng chuẩn M-0107. Kết quả *theo dõi xu hướng* hiệu giá PFU và ARN của 10 loạt vắc xin thành phẩm cho thấy đường biểu diễn xu hướng rất tương đồng, sự khác biệt hiệu giá giữa các loạt $< 0,41\text{Log}10$ và luôn ổn định trong khoảng $\pm 2\text{SD}$, đáp ứng được yêu cầu của WHO cho các thử nghiệm sinh học làm trên nuôi cấy tế bào. Điều này cho thấy có thể xác định nhanh trong vòng 24 giờ hiệu giá vắc xin sởi ở mức độ phân tử, hiệu giá này rất ổn định và cao hơn hiệu giá kiểu hình khoảng 3000 lần.

Hiệu giá PFU không tương quan với hiệu giá ARN tách chiết trực tiếp từ vắc xin thành phẩm ($R < 0,4$), lý do có thể do sản xuất vắc xin là từ dịch nổi nuôi cấy tế bào nên có cả ARN của hạt virus không gây nhiễm.

4.3.3. Thẩm định phương pháp

Nghiên cứu này xây dựng một phương pháp mới nên yêu cầu tiến hành thẩm định hoàn toàn. Riêng chất lượng cặp môi và đầu dò được tiến hành xác nhận theo kết quả thẩm định của CDC Hoa Kỳ.

4.3.3.1. Độ đúng của phương pháp

Kết quả PFU của 6 lần thử nghiệm luôn đạt 4,00-4,06 Log₁₀/liều 0,5ml với CV=8,2% <<<330% = 0,5Log₁₀. Tuy nhiên, hiệu giá này thấp hơn số liệu của nhà sản xuất (4,2-4,7Log₁₀/0,5ml). Nguyên nhân khác biệt có thể do nghiên cứu này sử dụng dòng tế bào Vero có sản xuất interferon và môi trường phát triển và duy trì đều cần FCS, hay sai số hệ thống giữa các phòng thí nghiệm. Đây là cơ sở để làm hài hòa thử nghiệm kiểm định công hiệu vắc xin sản xuất tại Việt Nam giữa nhà sản xuất và cơ quan kiểm định.

4.3.3.2. Độ chính xác

CV trung bình của độ lặp lại trong cùng một lần thử nghiệm (0,8%) và độ lặp lại trung gian (3,3%) thấp hơn nhiều so với con số cho phép 10% của một thử nghiệm enzyme.

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

Kết quả âm tính của các chứng âm (nước và sinh phẩm) và của chứng tế bào cho thấy phương pháp có độ đặc hiệu cao tính chọn lọc cao.

4.3.3.4. Độ tuyến tính

Hai phương pháp (hiệu giá PFU và ARN) tương quan chặt chẽ với nhau ($R=0,8 > 0,75$) và là tương quan thuận với R của độ pha loãng 10^{-1} là cao nhất. Hệ số tương quan của độ pha loãng 10^{-2} và 10^{-3} thấp hơn có thể do hiệu giá ARN còn thấp, mới chỉ bắt đầu vào giai đoạn tăng gia tốc. Sự khác biệt tuyệt đối của hiệu giá ARN so với PFU khoảng hơn 3000 lần.

4.3.3.5. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Những đường cong xuất hiện sau chu kỳ 40 được coi là âm tính. Hình 3.6 cho thấy phản ứng có thể phát hiện ARN trong khoảng 10^1 - 10^{12} bản sao/5μl khuôn mẫu. Tuy nhiên, giới hạn định lượng nằm trong khoảng tuyến tính của gam chuẩn ngoài là 10^1 - 10^6 .

4.3.3.6. Độ mạnh của phương pháp

Độ mạnh của phương pháp qua ước tính CV trung bình của 10 loạt vắc xin khi có những *thay đổi không thể tránh khỏi* (ruggedness) với 2 ngày thử nghiệm. Con số 2,7% nhỏ hơn đáng kể so với 10% của các thử nghiệm sinh học. Ngoài ra, chính số liệu về độ lặp lại trung gian là 3,3% cũng minh chứng được độ mạnh của phương pháp này.

4.4. Bàn luận về những hạn chế của đề tài

4.4.1. Sản xuất chứng dương ARN *in vitro*

Chứng dương của nghiên cứu chỉ là những đoạn ARN. Phiên mã trực tiếp cho hiệu giá cao hơn nhưng không có được chủng vi khuẩn tái tổ hợp.

4.4.2. Xác định tỷ lệ nhiễm cúm ở bệnh nhân SARI tại Hải Dương

Nghiên cứu không phân tích đồng nhiễm vi khuẩn. RT-PCR đa môi có thể ảnh hưởng đến độ nhạy của phản ứng và hạn chế một phần phân tích nguyên nhân gây bệnh thực sự của các trường hợp đồng nhiễm. Nghiên cứu này không xác định phân típ cúm mùa A.

4.4.3. Xây dựng phương pháp mới xác định công hiệu vắc xin sởi

Hiệu giá vắc xin sởi được xác định trên tế bào Vero cần FCS và có bài xuất interferon.

KẾT LUẬN

- Đề tài đã sản xuất được 9 gam ARN chuẩn bằng phiên mã *in vitro* có sản lượng cao (10^{11} - 10^{19} bản sao/phản ứng 20 μ l), tinh khiết và ổn định;
- Tỷ lệ phát hiện ARN virus cúm mùa A (A/H3N2 và A/H1N1) là 1,9%, cúm B là 6,4%, cúm A/H1N1pdm09 là 10,4%. Tỷ lệ đồng nhiễm virus (1 hoặc 2 tác nhân) chiếm 11,3%, có cả đồng nhiễm các virus cúm với nhau. Nhóm tuổi nhiễm virus cúm mùa A và cúm B chủ yếu là 1-5 tuổi, trong khi nhóm tuổi nhiễm virus cúm A/H1N1pdm09 là 6-18 tuổi. Đường như không có sự khác biệt về giới tính;
- Đề tài đã xây dựng được kỹ thuật mới xác định hiệu giá vắc xin sởi đơn bằng định lượng trực tiếp ARN bên trong tế bào gây nhiễm sau 24 giờ cấy 1 nồng độ pha loãng vắc xin 10^{-1} . Kỹ thuật này chính xác, nhanh, tự động hóa và tương quan chặt chẽ với hiệu giá PFU. Hiệu giá ARN vắc xin sởi ổn định theo thời gian, cao hơn hiệu giá PFU khoảng 3×10^3 lần.

ĐỀ XUẤT

- Tiếp tục sản xuất chứng dương ARN cho các tác nhân khác để kiểm soát chất lượng RT-PCR, sản xuất bộ mẫu chuẩn ARN cho IQC và EQA NAT, tiến tới sản xuất các bộ sinh phẩm chẩn đoán sinh học phân tử thương mại hóa. Sản xuất lại chứng dương cúm nếu các đoạn gen tích hợp lại;
- Tiếp tục tiến hành đánh giá thẩm định phương pháp xác định công hiệu vắc xin sởi sản xuất tại Việt Nam với cỡ mẫu lớn hơn. Tiếp tục nghiên cứu để áp dụng cho kiểm định công hiệu các vắc xin không tạo CPE hoặc tạo CPE chậm (in process control và vắc xin thành phẩm)/.

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



NGUYỄN THỊ THƯỜNG

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

Chuyên ngành: Vi sinh Y học

Mã số: 62720115

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI, 2014

Công trình được hoàn thành tại:

VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG

Người hướng dẫn khoa học:

1. **GS.TS. Huỳnh Phương Liên**
2. **GS.TS. Nguyễn Trần Hiến**

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Trường
Tổ chức tại Trường Đại học Y Hà Nội

Vào hồi.....giờ.....phút, ngày.....tháng.....năm 201....

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện quốc gia;
2. Thư viện Thông tin Y học Trung ương;
3. Thư viện Trường Đại học Y Hà Nội.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Nguyễn Thị Thường, Henri Agut et al (2006). Rapid determination of antiviral drug susceptibility of herpes simplex virus types 1 and 2 by real-time PCR. *Antiviral Research*, 69, 152-157.
2. Nguyễn Thị Thường, Thẩm Chí Dũng, Trần Thị Mai Hưng, Nguyễn Trần Hiền, Taniguchi K (2010). Tác nhân vi rút gây hội chứng cúm trong cộng đồng tại xã Cẩm Sơn, huyện Cẩm Giàng, tỉnh Hải Dương, 2009-2010. *Tạp chí Y học dự phòng*, 10 (118), 67-74.
3. Nguyễn Trần Hiền, Nguyễn Thị Thường và cộng sự (2011). Epidemiology and viral etiologies of Severe Acute Respiratory Infections (SARI) in Northern Vietnam. *BMC Proc*, 5(S1) 118.
4. Lương Minh Tân, Phan Thị Ngà, Thẩm Chí Dũng, Nguyễn Thị Thường, Đỗ Phương Loan, Holly S., MacIntyre C.R (2011). Tác nhân vi sinh vật gây bệnh đường hô hấp ở nhân viên y tế và ở khẩu trang đã qua sử dụng ở các bệnh viện Hà Nội. *Tạp chí Y học và thông tin Dược (JMPI)*, 12, ISSN 0868-3891, 26-30.
5. Nguyễn Thị Thường, Trần Như Dương, Huỳnh Phương Liên và cộng sự (2012). Sản xuất chứng dương ARN *in vitro*. *Tạp chí Y học Dự phòng*, 5(132), 103-111.
6. Nguyễn Thị Thường, Nguyễn Đăng Hiền, Huỳnh Phương Liên, Phạm Thị Bích Ngọc, Trần Thị Hiền, Nguyễn Trần Hiền (2013). Xây dựng kỹ thuật xác định hiệu giá ARN vắc xin sởi bằng real-time RT-PCR. *Tạp chí Y học Dự phòng*, 11(147), 10-16.
7. Nguyễn Thị Thường và cộng sự (2014). *Nghiên cứu phát triển bộ mẫu chuẩn RNA cho kỹ thuật RT-PCR và thử nghiệm đánh giá hiệu quả sản phẩm trên thực địa*. Đề tài tuyển chọn cấp Bộ. Bộ Y tế. Nghiệm thu cấp Bộ tháng 04/2014.
8. Thẩm Chí Dũng, Nguyễn Trần Hiền, Nguyễn Thị Thường et al (2014). Sensitivity and specificity of routine epidemiological influenza-like illness surveillance system at district level in Northern Vietnam. *Vietnamese Prev. Med. J.* 1e(1), 63-65.

INTRODUCTION

In 2013-2014, measles remains a "child killer", especially in developing countries, including Vietnam. Although vaccines contribute to global measles control and elimination, vaccine potency testing using conventional methods takes time, effort, and occasionally produces results open to subjective interpretation.

The most severe of five recorded influenza pandemics occurred in 1918 and resulted in more than 20 million deaths. Vietnam is a hot spot of influenza circulation, including the 2009 pandemic (A/H1N1pdm09).

Measles and influenza detection as well as influenza A subtyping can be performed by RT-PCR. RNA quantified positive controls are required for internal quality control (IQC) or quantification. *In vitro* transcription produces homogeneous, purified, quantified, and high yield RNA. Therefore, research reported in the thesis "***Preparation of RNA positive controls for RT-PCR, application in influenza diagnostics and measles vaccine potency testing***" was conducted with the following 3 objectives:

4. Preparation of RNA positive controls as IQC samples for a multiplex RT-PCR to detect influenza A, influenza B (segment 7 encoding protein M); avian influenza A/H5N1 (segments 7, 4, 6 encoding proteins M, HA and NA, respectively) and as a standard curve for real-time to quantify measles virus (N gene);
5. Detection of influenza and subtyping by RT-PCR the avian influenza A/H5N1 (if any) in Hai Duong from 2009-2011;
6. Setting-up a new assay to determine the potency of single and live-attenuated measles vaccine produced in Vietnam by real-time RT-PCR.

NEW FINDINGS OF THE THESIS

1. High yield of RNA (10^{11} - 10^{19} copies/20 μ l reaction) has been prepared in Vietnam by both conventional and direct *in vitro* transcription;
2. Detection of seasonal influenza and influenza A/H1N1pdm09 among hospitalized severe acute respiratory infection (SARI) patients in Hai Duong during 2009-2011 has been conducted;
3. A new assay testing rapidly the potency of single and live-attenuated measles vaccine by quantification of RNA within infected cells by real-time RT-PCR has been set up and pre-validated.

STRUCTURE OF THE THESIS

The thesis consists of 147 pages, including the Introduction (2 pages), Conclusion (1 page), New findings of the thesis (1 page), and Recommendation (1 page). It is divided into 4 chapters: Chapter 1: Literature review (37 pages); Chapter 2: Subjects, materials and methodology (25 pages); Chapter 3: Results (33 pages); Chapter 4: Discussion (44 pages). The thesis includes 47 Figures, 22 Tables and 182 references, including 17 in Vietnamese, 158 in English, 2 in French, and 5 websites.

CHAPTER 1: LITERATURE REVIEW

1.4. Review of influenza

1.4.1. Nomenclature and structure

Influenza viruses belong to the *Orthomyxoviridae* family, classified into genus A, B, and C. Influenza A has different subtypes, whereas influenza B and C has only one subtype.

Influenza virion is polymorphic, the spherical form measuring 80-120nm in diameter. The structure includes envelop, capsid and genome – a negative, single-stranded and segmented RNA (8 segments for influenza A and B, 7 segments for influenza C).

1.4.2. Antigenic diversity and epidemiology

Antigenic shift - the cause of a pandemic - is a change of influenza A surface antigen, often occurring when HA is replaced. In general, pre-existing immunity is not effective protection from the new strain.

Antigenic drift is the minor and continuous changes of amino acids in antigenic regions of influenza A surface proteins - HA and NA. Pre-existing immunity still partially protects against these strains.

Influenza viruses are transmitted through the air and infection occurs throughout the year and around the world. Influenza A and B may simultaneously circulate in the same season, but each year usually only one influenza A subtype dominates.

1.4.3. Replication of influenza A and B

Influenza virus is adsorbed on the surface of host cells through the sialic acid receptor and enters the cell by *endocytosis*. The low pH of intracellular compartments contributes to the phenomenon of pre-conformational changes to make the fusion between the viral membrane and that of intracellular compartments occur. In nucleus, viral RNA is the template for the synthesis of message and negative RNA through the intermediate positive strand. The virions are released from the infected cells by budding.

1.4.4. Laboratory diagnostics

The roles of a laboratory are to diagnose in time for clinicians and to report the appearance and circulation of influenza strains in the community. Laboratory strategies for influenza diagnosis include *i*/. **Direct methods** to detect the virus (virus isolation), detect viral antigens by immunofluorescence (identification of influenza A, influenza B and subtyping influenza A) or by ELISA (identification of influenza A, influenza B, influenza C), detect the genetic materials by RT-PCR (identification of influenza A, influenza B, influenza C and subtyping influenza A). This reaction permits a rapid and specific diagnosis and can be applied for both screening influenza viruses or subtyping influenza A *ii*/. **Indirect methods** to detect specific antibodies by serological techniques.

RT-PCR applied in influenza diagnostics can be conventional or real-time. The types may be mono- or multiplex to detect simultaneously multi genus or subtypes (A/H3N2, A/H1N1, A/H1N1pdm09, influenza B), and identify influenza A subtypes (HA and NA), or detect influenza A (A/H3N2 and A/H1N1), influenza B and other viruses such as human respiratory syncytial virus - hRSV or human metapneumovirus - hMPV, etc.

1.4.5. Overview of studies on influenza

Influenza studies continue to be conducted in many types of research and in their several aspects. Publications on influenza in Vietnam have covered diagnosis and serological studies, molecular biology, immunology, mathematical modeling, vaccine production, susceptibility to antivirals, sentinel surveillance on influenza-like illness (ILI) or severe viral pneumonia (SVP), and clinical trials, etc.

Two months after detection, on 11 June, WHO declared the 2009 influenza a pandemic. One year later, almost (214) countries and territories have reported A/H1N1pdm09 cases. Currently, A/H1N1pdm09 is considered a seasonal strain. In Vietnam, as of 19 March 2010, over 11,214 cases were laboratory confirmed and 58 deaths were reported nation-wide.

In China, influenza circulates throughout the year, but mainly January-August. Influenza detection among ILI subjects during 2009-2012 ranged from 10% to 26% (including A/H1N1pdm09). In Cambodia, influenza circulates August-November. Influenza A infection during the years 2006-2010 was 5.8%; 7.7%; 15.3%; 15.2%; and 1.4%, respectively. Influenza B circulates around the year. In Laos, influenza is detected principally in winter-spring, with influenza A accounting for 9.0%. In the United States, influenza prevalence is 5-20% and for France it is 5-15%.

In Vietnam, according to Nguyen Thu Yen and colleagues, influenza infection detected by RT-PCR among ILI subjects was 22% and consistently only one influenza A subtype dominated in the year (A/H1N1 versus A/H3N2). The figures were similar between types of health care facilities (20-23%) and regions (21-23%). Influenza B circulated around the year and was unrelated to the circulation of influenza A subtypes. From 2009-2010, A/H1N1pdm09 detection was 9.4% and 2.1%, respectively. Influenza normally peaks from May-October. Among SVP patients, A/H1N1pdm09, seasonal influenza A/H1N1 and A/H3N2, influenza B, avian influenza A/H5N1, and hRSV accounted for 6.1%; 2.8%; 2.2%, 2.9%; and 0.1%, respectively. Influenza infection among SARI patients in 2011 was 2.9% (1.1-4.4%); 1.5 % (0-2.2%); 3.9% (0-to 5.8%); and 0.1 (0-0.3%), respectively.

The project of *Surveillance and Investigation of Endemic Situations in South-East Asia* (SISEA) conducted in Ben Tre province indicated that A/H1N1pdm09, seasonal influenza A, and influenza B accounted for 1.4%; 2.7%; and 1.0%, respectively. Influenza commonly circulates in the summer and tends to peak in May-July.

1.5. Review of measles

1.5.1. Nomenclature and structure

The measles virus belongs to the *Paramyxoviridae* family, the virion is polymorphic but usually spherical, 100-300 nm in diameter, and its structure includes the envelop, capsid, and genome - a negative, single-stranded and non-segmented RNA of approximately 16,000 ribonucleotide in length with gene order of 3'-N - P - M - F - H - L polymerase 5'.

1.5.2. Replication

Continuous cell lines such as Vero or B95a are commonly used for virus isolation. The whole replication cycle takes just a few hours and occurs in the cytoplasm of infected cells. The attachment to the cell membrane and entering process occur when there is an interaction between viral H and F proteins and the specific receptor - CD46 molecules. The negative strand RNA plays the role of template not only for transcription to messenger RNA to synthesize the structural and non-structural proteins, but also for the synthesis of next generation negative RNA mediated through a complementary positive strand. The virions are released from the infected cells by budding through the plasma membrane.

1.5.3. Studies on measles

Vietnam, at present, is in the phase of measles control and moving toward elimination. There have been collaborative studies on measles such as identification of a new genotype (H2), genetic characteristics of wild-

type measles strains before and after second vaccination campaign, and efficacy of second vaccination in Hai Phong, etc.

Recent measles vaccines are live-attenuated, single or combined with rubella and mumps. Typically, the immunogenic dose is 10^3 - 10^4 plaque forming unit (PFU). Age recommended for vaccination is 6-15 months. The Centre for Research and Production of Vaccines and Biologicals (POLYVAC) in Vietnam has successfully produced a single, live-attenuated vaccine using the AIK-C strain. The potency of POLYVAC vaccine tested by plaque forming assay (PFA) is stable and meets the WHO requirements. The potency of manufacturer's reference is from 4.2-4.7 \log_{10} per 0.5-ml dose.

1.6. Preparation of RNA positive control and testing vaccine potency

It is undeniable that the importance of vaccines is increasing, and that vaccination scope is remarkably expanding, now including pregnant women, elderly, and infants. The continuous advances in laboratory technology, vaccine design and production have led to a parallel development of quality control assays, including molecular biology techniques.

Real-time is being applied in diagnostics and research. In fact, in 2006, Hummel and colleagues performed a study to validate the best primers and probe in terms of sensitivity and specificity for measles detection. In 2006, Nguyen Thi Thuong and colleagues quantified DNA within the infected cells to determine the susceptibility of herpes simplex virus (HSV) to antivirals of acyclovir and foscarnet and so to negate waiting for the cytopathic effects (CPE) while DNA titer strongly correlated with PFU. In 2005, Schalk and later Ammour and colleagues developed a new method to test the potency of measles in the combined measles-rubella-mumps vaccine by quantification of RNA copies in supernatant of the cell cultures. These methods still had some limitations, such as complicated procedures or an at least 2-day read out.

A standard curve is required for the quantification. Preparation of RNA by *in vitro* transcription saves clinical specimens while producing a high yield of quantifiable, stable, homogeneous, and pure RNA. Vietnam has not yet published an account of this study.

CHAPTER 2: SUBJECTS, MATERIALS AND METHODOLOGY

2.4. Study subjects

2.4.1. Preparation of RNA by *in vitro* transcription: 1-2.5 μ l of RNA extracted from virus strains or clinical specimens.

2.4.2. Determination of influenza infection: the case definition of SARI was developed by the SISEA project. Nasopharyngeal specimens of the first 2 or 3 qualified patients admitted to and hospitalized at Cam Giang General District Hospital and Hai Duong General Provincial Hospital from January 2009 to June 2011 were collected, making it 8-10 samples/month.

2.1.1. Setting-up a new assay to determine the potency of measles vaccine: the manufacturer's reference (M-0107) and 10 POLYVAC measles vaccine lots produced from 2010-2013.

2.5. Materials

Materials and equipment were scientific devices, reagents, chemicals, basic media for molecular biology tests (extraction, amplification, cloning, transformation, restriction fragment length polymorphism (RFLP), *in vitro* transcription, etc), cell cultures and virus isolation. Rapid lysis buffer (TpLR) is the *in-house* solution with the composition of Tris HCl pH=8 containing 50mm KCl, 50mm MgCl₂, 0.45% Nonidet-P40, and 0.45% Tween 20.

2.6. Methodology

2.6.1. Preparation of RNA by *in vitro* transcription

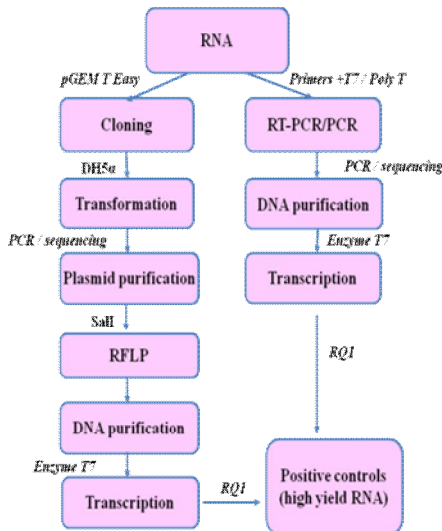


Figure 2.1. Process of conventional and direct *in vitro* transcription.

Basic laboratory study. The sample size was not applied. Conventional transcription: An amplified product was inserted into a vector to produce

the recombinant plasmid, which was then transformed into the competent cells of *E. coli* with the presence of X-gal. Transformed colonies were analyzed by color (white/light blue or dark blue), PCR and sequencing. The recombinant plasmid was linearized by RFLP to be submitted as the template for transcription. The optical density (OD), product size, RNA structure and Avogadro constant were used to calculate the RNA yield. Newly synthesized RNA products were analyzed by RT-PCR with (RT +) and (RT-). Direct transcription: specific primers were modified by the attachment at the 5' end of the forward and reverse primers with the T7 transcription sequence and a poly T, respectively. The product was then used directly as a template for the *in vitro* transcription.

2.6.2. Determination of influenza infection

- Observational cross-sectional study. The sample size was calculated based on the average prevalence of global non-pandemic influenza (5-15%) with the accuracy for $p = 1.5\%$. In this study, 1273 specimens were collected.
- RNA of the seasonal influenza A and influenza B was detected together with that of hRSV and hMPV by a multiplex RT-PCR. The suspected positive results from the first round were confirmed by a semi-nested monoplex PCR (second round). The IQC is 2.5 μ l RNA mixture of 10⁴ copies for influenza A, hRSV, hMPV each and 10⁵ copies for influenza B.
- Influenza A/H1N1pdm09 and avian influenza A/H5N1 (if suspected) were detected and subtyped by monoplex real-time RT-PCR.
- Influenza infection was analyzed by gender, age group, and time. The difference of discrete variables was calculated by *Chi-square* algorithm (χ^2). P values <0.05 was considered statistically significant.
- Ethics: Data of this study were a part of the non-profit SISEA project, which was approved by the local ethics council. The data were stratified by gender just for epidemiological analysis, not for the purpose of gender discrimination.

2.6.3. Setting-up a new assay to determine the potency of measles vaccine

- Basic laboratory study. The sample size was not applied, however, samples were taken by convenience and at random.
- Techniques: PFU titer was determined by PFA on 24-well cell culture plates. Two hundreds microliter (200 μ l) vaccine of undiluted and 10-fold serial dilutions from 10⁻¹-10⁻⁴ was inoculated in duplicates on confluent Vero cells. After incubation for 1 hour at 37°C x 5% CO₂, the inoculum was aspirated. Then, the cells were washed with MEM 0% fetal calf serum (FCS) and finally overlaid with the solutions of MEM with 1%

methylcellulose and 3% FCS. After 9 days of incubation, cells were fixed with 10% formaldehyde (38%) in PBS 1/75M and stained with 0.25% crystal violet in formaldehyde. The test was performed 6 times and controlled by the manufacturer's reference.

$$\mathbf{PFU/0.5ml} = \frac{\mathbf{Average\ plaques\ x\ 5\ x\ dilution\ factor}}{\mathbf{2}}$$

- RNA titer was determined similarly to the PFU. At 24, 48, and 72 hours post inoculation (pi), RNA inside the infected cells was extracted by 3 methods: i./ The cells were trypsinized, washed and diluted in 300µl PBS. Then, RNA was extracted using commercial kit (Qiagen). ii./ The infected cells in each well were lysed with 300µl of TpLR and inoculated at 37°C x 4 minutes. Then, RNA was extracted using commercial kit (Qiagen). iii./ The infected cells in each well were just lysed with 300µl of TpLR and inoculated at 37°C x 4 minutes. RNA of 3 extraction methods was quantified at the same run.

RNA copies/0.5ml

$$= \frac{\mathbf{Average\ RNA/5\mu l\ x\ 15\ x\ 5x\ dilution\ factor}}{\mathbf{2}}$$

- Correlation between 2 methods was calculated and the absolute difference between them was compared to determine the optimal conditions of vaccine dilution, RNA harvest time and extraction technique.
- New method was fully validated based on 10 vaccine lots following criteria of i./ *Accuracy*. ii./ *Precision*. iii./ *Linearity* and *Correlation coefficient*. iv./ *Limit of detection (LOD)* and *Limit of quantification (LOQ)* v./ *Specificity* and *Selectivity*. and vi./ *Robustness*.

CHAPTER 3: RESULTS

3.1. Preparation of RNA by *in vitro* transcription

3.3.6. Preparation of templates and transformation

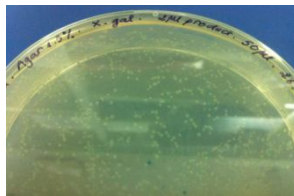


Figure 3.1. Segment 7 - seasonal influenza A transformation.

Most transformed *E. coli* colonies were white or light blue, few or even no colony were dark blue (Figure 3.1). Seven (7) recombinant plasmids containing gene segment 7 of the seasonal influenza A, influenza B,

segments 7, 4, 6 of avian influenza A/H5N1 amplified by real-time RT-PCR, and 7, 4 of avian influenza A/H5N1 amplified by conventional RT-PCR has been produced. The bacterial strains were cultured in LB broth and kept at -80°C in 50% glycerol solution.

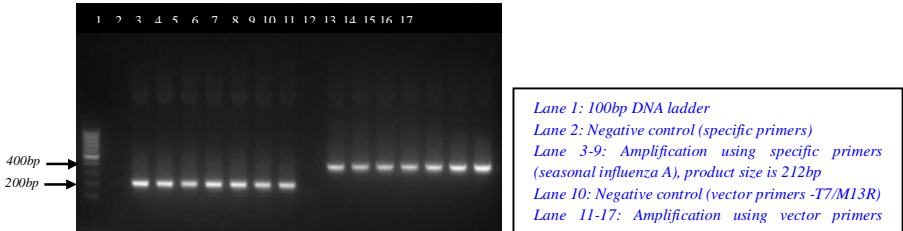


Figure 3.2. Analysis of transformants by PCR (Segment 7 of seasonal influenza A).

Transformants were analyzed by PCR. Figure 3.2 illustrates the segment 7 amplification products of influenza A using specific and vector primers (T7/M13R) were approximately 210bp and 410bp, respectively. Finally, the transformants were confirmed at nucleotide level by sequencing.

Recombinant plasmid were linearized by RFLP (Sall for *pGEM T Easy* and HindIII for *pCR2.1@TOPO*) (Figure 3.3).

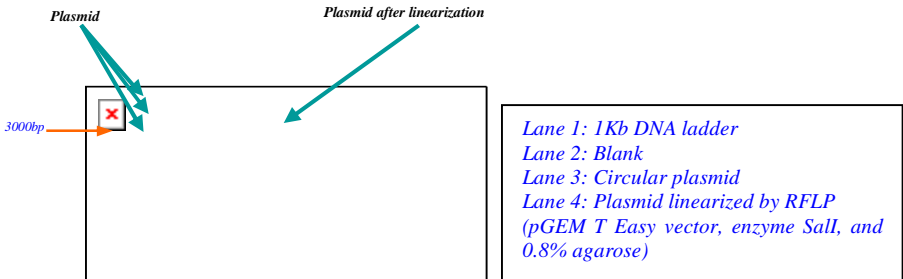


Figure 3.3. Linearization of recombinant plasmid containing segment 7 of seasonal Influenza A.

3.3.7. Preparation of DNA template for direct *in vitro* transcription

This is not a required cloning step for direct *in vitro* transcription, but was done in connection with amplification of the template with modified primers. Figure 3.4 is the segment 7 amplification product of approximately 200bp of influenza A/H1N1pdm09. In this study, 2 standard curves of segment 7 of A/H1N1pdm09 and N gene of measles virus were prepared by this technique.

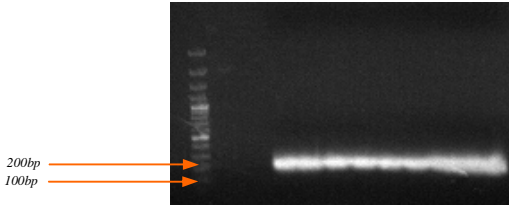


Figure 3.4. Amplification of segment 7 of A/H1N1pdm09 with modified primers.

3.3.8. *In vitro* transcription

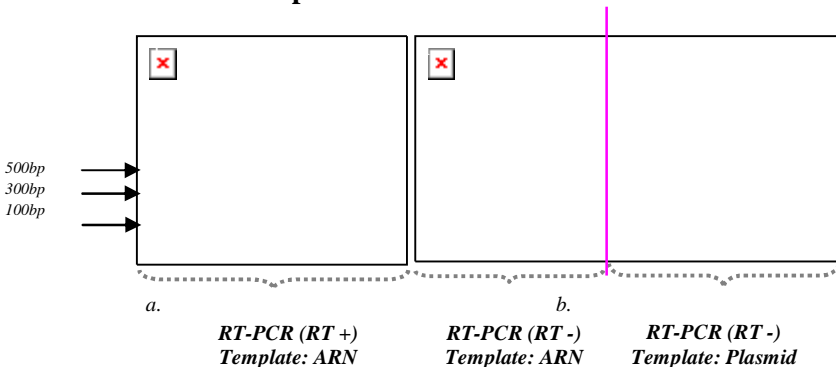


Figure 3.5. Analysis RNApurity by RT-PCR.

b. RNA prepared by *in vitro* transcription: PCR, RT+
 Lane 1: 100bp DNA ladder (Promega)
 Lane 2: Negative control
 Lane 3: Blank
 Lane 4,5,6,7: Seasonal influenza A, hRSV, influenza B, hMPV, respectively
 Lane 8: ARN mixture of seasonal influenza A, hRSV, influenza B, hMPV

c. RNA prepared by *in vitro* transcription: PCR, RT-
 Lane 1: Negative control
 Lane 2,3,4,5: Seasonal influenza A, hRSV, influenza B, hMPV, respectively

d. Plasmid: PCR, RT-
 Lane 6,7,8,9: Seasonal influenza A, hRSV, influenza B, hMPV, respectively
 Lane 10: 1Kbp DNA ladder (Promega).

zed RNA of seasonal influenza A, hRSV, influenza B, and hMPV after the destruction of DNA template. Figure 3.5.a depicts the RT-PCR results (RT+) using newly synthesized RNA as template, as does Figure 3.5.b but (RT-), and

Figure 3.5.c evidences the RT-PCR results (RT-), but using plasmid as template.

Table3.1. In vitro transcription yield.

Virus	Length (bp)	Concentration (ng/μl)	Yield (copies)
Influenza A (M) - conventional	212	50,16	$5,8 \times 10^{12}$
Influenza B (M) - conventional	364	54,00	$4,15 \times 10^{12}$
A/H5N1 (M) - conventional	245	36,12	$1,59 \times 10^{11}$
A/H5N1 (HA) - conventional	361	22,57	$1,1 \times 10^{14}$
A/H5N1 (M) - real-time	144	33,07	$4,0 \times 10^{14}$
A/H5N1 (HA) - real-time	140	24,61	$1,1 \times 10^{14}$
A/H5N1 (NA) - real-time	157	21,58	$2,4 \times 10^{14}$
A/H1N1pdm09 (M) - conventional and real-time	154	3548,00	$3,08 \times 10^{16}$
Measles (N) - real-time	74	978,16	$1,2 \times 10^{19}$

RNA was used as internal QC samples in RT-PCR or as standard curves for quantification. Table 3.1 presents the RNA yield of 9 positive controls.

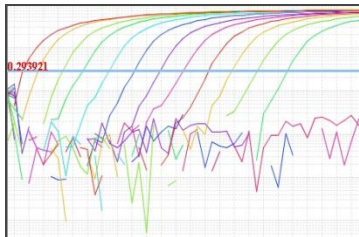


Figure 3.6. Titration of measles positive control (N gene, 10^1 - 10^{12} copies).

3.4. Determination of influenza infection by RT-PCR

3.4.1. Characteristics of participants

From January 2009 to June 2011, 336; 452; and 485 SARI specimens were continuously collected (1273 in total). The ratio of male/female = 1.3, age ranged from 2 months to 84 years, with an age median of 2 years. Children aged <5 years accounted for 63.3%.

3.4.2. Mortality due to influenza

The sole death (accounting for 0.08% of total positive cases) in this study was a 70-year-old male, positive with A/H1N1pdm09 2011, negative for A/H5N1 and not co-infected with any of other 18 viruses.

3.4.3. Influenza infection

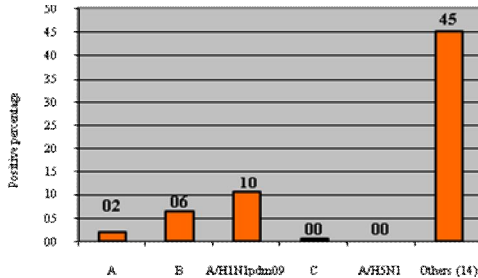


Figure 3.7. Influenza infection among SARI patients in Hai Duong.

Seasonal influenza A (A/H3N2, H1N1), influenza B, and A/H1N1pdm09 infection during 2.5 consecutive years was 1.9%; 6.4%; and 10.4%, respectively. No case of A/H5N1 was detected (Figure 3.7). Of 818 samples which tested positive for any virus (63.4%), 244 were positive for influenza (seasonal influenza A, influenza B, influenza C, and influenza A/H1N1pdm09), accounting for 29.8% (Figure 3.8).

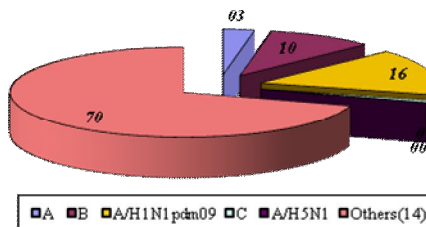


Figure 3.8. Influenza distribution among SARI patients positive with any virus.

3.4.4. Co-infection between influenza and other viruses

Of 238 samples positive for influenza A and influenza B, 33 were co-infected. Specifically, co-infection of influenza A, influenza B, and influenza A/H1N1pdm09 was 8.3%, 19.8%, and 5.3%, respectively. Eight (8) cases (3.4%) of influenza A and influenza B were co-infected with two other viruses.

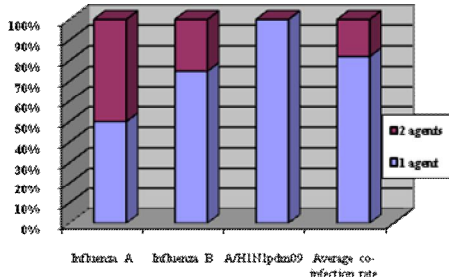


Figure 3.9. Viral co-infection of influenza.

Influenza was co-infected with 13 out of 18 viruses tested by the SISEA project (seasonal influenza A, influenza B, influenza C, influenza A/H1N1pdm09, hRSV, hMPV, parainfluenza 3 (hPIV-3), parainfluenza 4 (hPIV-4), rhinovirus (HRV), coronavirus strain OC43 (OC43 CoV), coronavirus strain 229E (CoV 229E), human adenovirus (hAdV), and human bocavirus (hBoV)).

3.4.5. Distribution of influenza infection by gender, age group and time

The distribution by gender (male/female) of influenza was 1.2. The specific ratios for the seasonal influenza A, influenza B, and influenza A/H1N1pdm09 were 2.4%; 1.5%; and 1.1%, respectively.

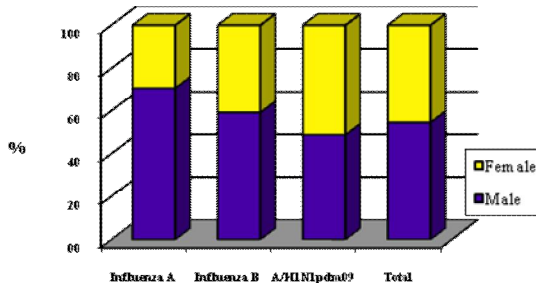


Figure 3.10. Distribution of influenza by gender among SARI patients.

Seasonal influenza A and influenza B occurred primarily in the 1-5 years age group (52.4%), followed by 6-18 years old (22.8%). This figure among <1 year of age accounted for 13.3%, but up to 43.5% among total patients of this age. Most of A/H1N1pdm09 cases (46.6%) occurred among 6-18 years old group, followed by the 1-5 years old (17.2%). In general, influenza infection in elderly (>64 years old) was low (2.5%).

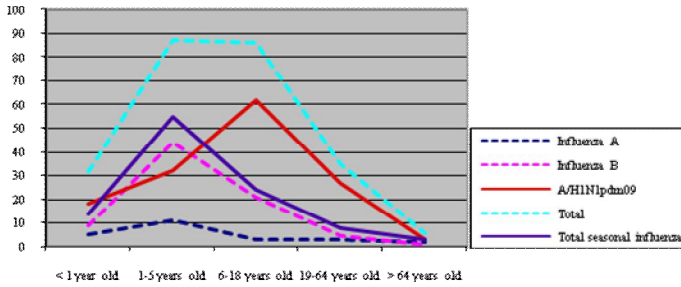


Figure 3.11. Distribution of influenza by age group among SARI patients.

Influenza distribution by month is shown in Figure 3.12. A/H1N1pdm09 was detected from 09/2009, peaked immediately and lasted until early 2010, and then returned in 2011. Unlike the beginning and contraction phase of the pandemic in which influenza B and seasonal influenza A were co-circulated during the pandemic, A/H1N1pdm09 absolutely dominated with no case of seasonal influenza detected. Subtyping seasonal influenza A was not performed.

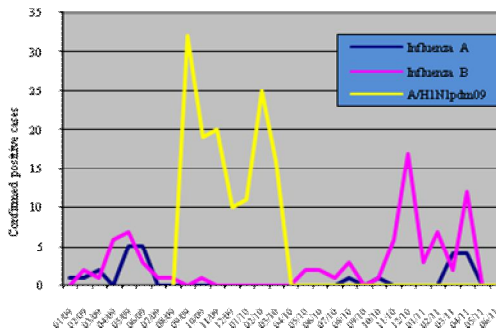


Figure 3.12. Influenza infection by month among SARI patients.

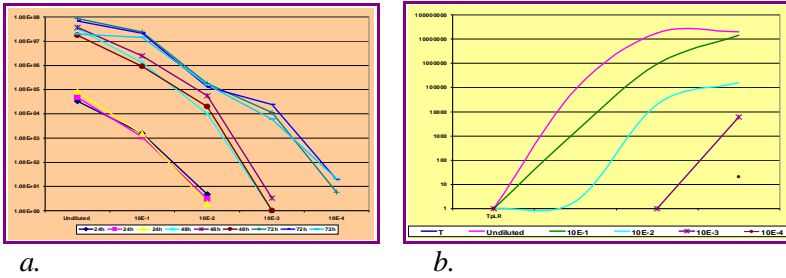
3.5. Setting-up a new assay to determine the potency of measles vaccine

3.5.1. PFU titer of the reference by PRA

The titer of PFU per 0.5-ml dose was from 4.00-4.06 log₁₀.

3.5.2. RNA titer of the reference by real-time

The correlation coefficient (R) of 3 methods of RNA extraction ranged from 0.96 to 0.99 with no absolute difference ($p > 0.5$). Figure 3.13 was the RNA quantification at 24, 48, and 72 hours pi.



a. *Figure 3.13. Correlation of 3 methods of RNA extraction (a) and RNA titer post inoculation (b).*

3.5.3. The stability of RNA extracted by TpLR

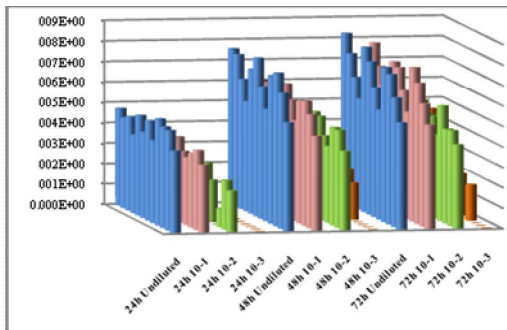


Figure 3.14. Stability of RNA at real temperature and time (log10).

The stability of RNA extracted by TpLR was also evaluated through R values and the absolute difference among 3 extraction methods after 12 and 15 months storage at -80°C , and then 2 months at -30°C .

3.5.4. RNA titer of measles vaccine panel

The R between PFU and RNA titers of 10-lot panel of measles vaccine inoculated at undiluted, 10^{-1} , and 10^{-2} were 0.67, 0.90, and 0.88, respectively and the common R was 0.80. RNA titer of 10 lots was in the range of [7.67-8.08 log₁₀] and averaged 3.1×10^3 times higher than that of PFU. The figure of RNA extracted directly from the vaccine was 1.4×10^2 times with the R value <0.4 .

Figure 3.15 was based on the Levey-Jennings charts for PFU (a) and RNA titers (b) (log₁₀) of 10 vaccine lots. The vaccine titers (blue lines) had similar graphs and were consistently in the range of $M \pm 2SD$ (yellow lines).

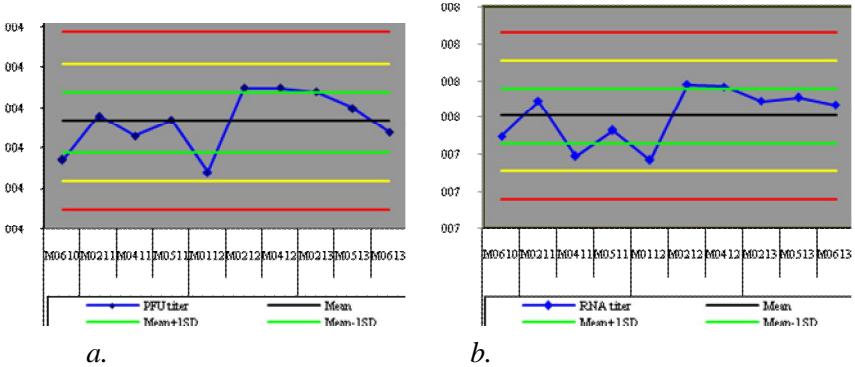


Figure 3.15. Levey-Jennings charts for PFU (a) and RNA (b) titers.

3.5.5. Repeatability and intermediate precision

The coefficient of variation (CV) of the repeatability and intermediate precision was 0.8% and 3.3%, respectively, CV of 2 days of performance for 10 vaccine lots at undiluted, 10^{-1} , and 10^{-2} was 2.7%.

CHAPTER 4: DISCUSSION

4.5. Preparation of RNA by *in vitro* transcription

4.5.1. Cloning for recombinant plasmid and transformation

Cloning is the technique to insert a DNA fragment into a known linear vector to produce a recombinant plasmid. The 3' end of the vector *pCR2.1*[®]*TOPO* (Invitrogen) is overhung with a Thymine (T) and topoisomerase. Taq polymerase has a nontemplate-dependent terminal transferase activity that adds a single deoxyadenosine (A) to the 3' ends of PCR products. This allows PCR inserts to ligate efficiently with the vector (A-T). When the vector of *pGEMT Easy* (Promega) is used, the ligase step is required.

4.5.2. Analysis of transformants

The transformation allows a selection of *E. Coli* cells containing recombinant plasmid based on the α compensation of β -galactosidase gene. The activated β -galactosidase enzyme was not synthesized due to the insertion of DNA fragment into the *lacZ α* operon of the plasmid and as a consequence, the colonies were white or light blue (successful transformation).

Transformants were analyzed by PCR. Figure 3.2 illustrates that the amplification products of segment 7 of influenza A using specific and vector primers (T7/M13R) were approximately 210bp (lane 3-9) and 410bp (lane 11-17), respectively. The length of the PCR product is the total length of 2 primers and the one between two primers. Based on *pGEM T Easy*

genome map, in terms of size, the DNA product was inserted into the vector. Sequencing with T7 and M13R confirmed the transformants at nucleotide level.

4.5.3. Linearization of DNA plasmid

DNA templates are usually linearized prior to *in vitro* transcription to produce RNA transcripts of defined length. Figure 3.3 is the linearized recombinant plasmid with desired target size of about 3200 bp containing a gene segment 7 of seasonal influenza A. The RFLP product had only a single band suggesting the circular recombinant was completely linearized.

For direct transcription, DNA product was in linear and its size was the total length of target and function sequences attached to primers. Figure 3.4 is the product of approximately 200bp - the total length of segment 7 of A/H1N1pdm09 (154bp) and modified primers (37bp).

4.5.4. Results of *in vitro* transcription

In vitro transcription (T7RiboMAX™) can produce RNA up to mg per 20µl reaction. The mechanism of conventional transcription was based on the T7 promoter of the vector. The free end was the RFLP sequence, making target RNA products equal in length.

One of the applications in primer design is labeling them. The study applied this to modify specific primers by attaching the T7 promoter into the forward primer and a poly T into the reverse one (both primers were modified) to insert these functional sequences at 2 ends of target products.

Figure 3.5 indicates that the RT-PCR products using newly synthesized RNA as templates has defined sizes (a). After transcription, the DNA template must be destroyed, otherwise even the defined products can be seen (RT-). This explains why some authors analyze the RNA by RT-PCR with (RT+) in parallel with RT-PCR, but (RT-) (that is, without the RT step in the cycle). Omitting the RT step, all lanes were well negative, suggesting the DNA template had been completely destroyed (b). In contrast, although without RT step, RT-PCR using DNA plasmid as template had defined products (c). Once DNA had been completely destroyed, the products were due to newly synthesized RNA templates.

The transcription yield was high and stable, ranging from [1.59×10^{11} - 2×10^{19} copies], guaranteeing for long-term availability (RNA was stable enough at least for 4 years, data not shown in this study) and to a large scope application. Transcription can be applied to the T3 or SP6 promoters. Conventional transcription produces recombinant *E. coli* strains for permanent storage. Direct transcription can be applied for all primers, including double-stranded RNA preparation. RNA synthesized by *in vitro* transcription was used not only in research but also for laboratory quality

management. In fact, RNA positive controls were used as the IQC samples for RT-PCR to detect influenza (objective 2), as the standard curve to quantify measles (objective 3) and preparation of RNA panels for the external quality assessment (EQA) for nucleic acid testing (NAT).

4.6. Determination of influenza infection in Hai Duong, 2009-2011

4.6.1. Characteristics of the participants

Large and relatively even distribution by years of the sample size enhanced the study power, reliability of statistics and analysis over time. However, the ratio of male/female = 1.3 and age group <5 years accounting for 63.3% affected the data analysis and result validation.

4.6.2. Mortality and infection due to influenza among SARI patients

Positive for A/H1N1pdm09, negative for A/H5N1 and no viral co-infection suggesting A/H1N1pdm09 was the etiology of death. The clearance of virus at the respiratory route is due to interferon, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), natural killer cells (NK) and T lymphocyte. The immune response in the elderly is limited and this may be one of the factors causing death.

While the influenza B infection was stable by year, the influenza A detection was 1.9% and variable ($p < 0.01$). The explanation for this may be that in 2009 seasonal influenza A was detected before the A/H1N1pdm09 pandemic. On average, the A/H1N1pdm09 detection period of 2.5 years was 10.4%, significantly different between years ($p < 0.0005$). The pandemic occurred in 2009, the detection rate was the highest (24.1%), in 2010, the figure was just 0.2% as this was during the contraction phase and immunity against the new virus had already appeared in the community. There may be a partial cross-protection between A/H1N1pdm09 and seasonal influenza A/H1N1 which resulted in significantly decreased infections in 2010 and 2011 ($p < 0.0005$), or perhaps this change was caused by biological characteristics of the influenza viruses promoting a new strain to dominate previously existing ones. Antigenic shift is a cause of influenza pandemics, including the A/H1N1pdm09. In 2011, the detection rate was 10.5%, suggesting a new epidemic. The influenza infection by year was consistent with that published nationally and internationally.

Reported death and 18.7% of samples testing positive for influenza, accounting for 29.3% of viral positive samples suggest the important role of influenza viruses causing SARI, particularly among children in Hai Duong province.

A high rate of co-infection and the co-infection phenomenon occurred among influenza virus, with many viruses and multi viral co-infection

making the etiology difficult. Further complicating matters, real-time was not applied and this was a descriptive cross-sectional study, not a case-control design. Among 18 viruses tested, HRV and hMPV co-infected the largest number with influenza, perhaps because of co-circulation of influenza viruses with HRV and hMPV-two of those with highest detection rate. Another cause may be that HRV is a non-envelop enteric virus, resistant, detected also in healthy people, and circulates all around the year with an excretion time of up to several weeks. The results suggest that the virological and epidemiological surveillance of serial viruses and quantification for each agent may play a key role for the etiology. Co-infection among influenza viruses suggests the importance of influenza pathology studies as the virulence and dissemination in humans may be changed by recombination between influenza genus/subtypes. The results were also consistent with previous reports that influenza A and B simultaneously circulate in the same year and that the circulation of one virus does not affect that of the other.

The influenza infection finding of this study was less than that reported by Nguyen Thu Yen and colleagues in a sentinel surveillance among ILI subjects, but higher than that of SVP (10.4% versus 22%, and 18.7% versus 14%, respectively), this may be because the case definition for ILI subjects, even hospitalized, is broader than SARI and in contrast, case definition of SVP that focused only on severe viral pneumonia - was more strict. Compared with the SARI patients investigation published by the same author, although there were differences in case definitions and testing procedures, the results were rather consistent, except for A/H1N1pdm09. The reason for this difference may be that in 2011-2013, the A/H1N1pdm09 strain was still circulating but no longer dominant and specimens of this study have been collected by June 2011. The influenza prevalence may differ depending on the case definition, standardization by population demographics of the region, testing procedures, including sequences of primers and probes, time of specimen collection, amplification reaction (mono- or multiplex), etc.

Findings from an investigation of Cambodia influenza infection in 2009-2010 were similar to those found in this study, however, seasonal influenza A and A/H1N1pdm09 was not separated. In Laos, the average positive rate for influenza A, including influenza A/H1N1pdm09, was 9.0%, very close to our figure of 10.4%. The influenza infection findings of this study also fell in the influenza prevalence range of 5%-20% of the United States and France.

4.6.3. Distribution of influenza by gender, age group, and time

Distribution of influenza did not differ by gender, except for seasonal influenza A and that may not be representative due to a small sample size ($n = 24$). The finding was also consistent with other studies.

As many as 29.0% of children under 5 years old acquired SARI and were hospitalized in Hai Duong, significant ($p < 0.001$) when compared with the other age groups of 5-18 years (10.1%), 19-64 years (3.4%), and >64 years (1.3%). This also evidences the influenza burden in young children.

In this study, seasonal influenza attacked mainly young children, consistent with the "V" shape graph depicting young children and the elderly as the most frequently infected. However, because only 4.1% of participants were >64 years old, the second peak was not clearly seen.

The A/H1N1pdm09 pandemic in Hai Duong seemed consistent with the "W" shape of an influenza pandemic (children, youth and elderly are infected most). In fact, Figure 3.11 illustrates 2 distinct peaks of seasonal and pandemic influenza by age group. The elderly A/H1N1pdm09 peak in this study was not clear either, perhaps also a consequence of small numbers of elderly participants, or because of a partial cross-protection of this age group, as indicated by a US CDC finding that the HA gene of A/H1N1pdm strain originated from A/H1N1pdm1918.

In summary, the influenza infection findings of this study are consistent with many others. We believe that this is the first publication on influenza infection among SARI patients in Hai Duong during the 2.5 consecutive years, 2009-2011.

4.7. Setting-up a new assay to determine the potency of measles vaccine

4.7.1. Experimental optimization

Classical literature clearly recognizes that the measles replication cycle is complete in just a few hours, therefore, the RNA copies within the infected cells 24 hours pi was sufficiently high to permit detection. Due to the wide application of real-time, the method of quantification of RNA within the infected cells 24 hours pi is feasible and does not require a wait for and follow-up of the CPE or TCID₅₀. This is the significance of setting-up a new rapid assay with high automation.

As titers of single and live-attenuated measles vaccine were consistently in the range of [10^3 - 10^4 PFU] per 0.5-ml dose, 10-fold serial dilutions of vaccine from undiluted to 10^{-4} and cell controls were required. The literature also agrees that 10-fold dilution was enough to evaluate the differences in biological response.

RNA titer was measured at 24 hours pi at undiluted and 10^{-1} , the results fell into the linearity of the standard curve. RNA titer at 10^{-2} dilution was lower than the linearity range, affecting its reliability. RNA of 10^{-3} and 10^{-4} dilutions was undetectable.

At 48 and 72 hours pi, RNA can be measured from undiluted to 10^{-3} , even 10^{-4} but the results of undiluted, 10^{-1} and 10^{-2} fell over the linearity range of the standard curve, making the results unreliable.

Based on these findings, the optimal time to harvest RNA is 24 hours pi and the best vaccine dilutions are undiluted and 10^{-1} . The new assay requiring 24 hours instead of 9-day conventional one is particularly important in urgent vaccine demand.

Use of TpLR to treat RNA inside the infected cells undoubtedly adds a level of complexity to the assay when compared to the collection of culture supernatant. However, this permits an earlier read-out and use of 10^{-1} of vaccine dilution without any need for RNA purification, is rather simple, and the inhibitors in vaccines may not affect the viral replication. All three RNA extraction methods were strongly correlated with no absolute difference at 24, 48, and 72 hours pi ($p > 0.05$).

The common feature of extraction methods is that *first of all, cells or viruses are destroyed to free nucleic acid. The nucleic acid is then separated from the other components, such as proteins, lipids and carbohydrates.* When cells are destroyed - the moment RNA integrity is threatened - *the nuclease denaturant must expose to the elements of cells.* To be successful, strong denaturing substances are often used in the routine RNA extraction procedures. EDTA is necessary to keep RNA intact. RNA of this study was stored at -80°C and TpLR solution was the Tris HCl pH 8 buffer containing 50mm KCl, 50mm MgCl_2 , 0.45% Nonidet-P40, and 0.45% Tween 20, satisfying the requirements in RNA extraction and storage.

There was no absolute difference in RNA titers extracted by 3 methods after storage for 1 year at -80°C ($p > 0.05$). Use of TpLR to treat RNA yielded more RNA solution (300 μl versus 60 μl), significantly reduced workload, and saved time and money. This was one of significant advantages of this study, particularly in instances of large sample volumes. Thus, RNA can be collected by TpLR and used for at least 12 months if stored at -80°C .

The amplification curve of real-time consists of three stages: *extension* until the amplification signal is higher than the threshold, prolonged *exponential acceleration*, and *plateaux*. Thus, a complete picture of PCR process is displayed more clearly. The results are analyzed during the

amplification process, avoiding any external contamination but better controlled and fully automated. Standard curve is used for the accurate quantification and the detection sensitivity of the TaqMan is typically 10^1 - 10^5 nucleic acid copies in 5-10 μ l of template. TaqMan is most common among real-time PCR techniques due to the cumulative maximum of fluorescence signals. Thus, quantification plays the role not only in diagnosis and prognosis but also in evaluation of biological response.

In research, real-time has been applied to develop new methods to determine the susceptibility of viruses to the antivirals and vaccine potency. This study was a further development of the previously published models. Compared with PFA, both methods have the same objective of measuring the infectious viral particles (capable to infect cells); however, their detection signals are different. In fact, the read-out signal of PFA is at cellular level through the CPE (9 days) while that of the new method is at molecular level through RNA copies inside the infected cells (24 hours). In terms of potency testing, although this method detects a non-mechanistic correlate of protection (nCoP), it avoids the drawbacks of serological tests and can be applied for *in process control* - a current unsolved issue for live vaccines. The study can be extended to the viral live-attenuated vaccines with poor release from the culture cells or spread out over time or even for those with no CPE cultures.

3.5.6. RNA titer of measles vaccine panel

PFU and RNA inside the infected cells were well correlated, of which R of 10^{-1} dilution ranked the highest. This may be because inhibitors in the vaccine limited the viral replication or because higher multiplicity of infection (MOI) produces less infectious viral particles. The results were consistent with that performed on the reference. The trend analysis charts (Levey-Jennings) illustrates that PFU and RNA titers of 10 vaccine lots were very similar, the difference between lots was $<0.41 \log_{10}$ and the precision was within $\pm 2SD$, well within the $\pm 3SD$ range recommended by the WHO requirements for cell culture-based biological experiments. The results suggest that the potency of measles live-attenuated vaccine at molecular level could be rapidly determined within 24 hours, is stable, and approximately 3000 times higher than that of PFU.

PFU titer did not correlate with that of RNA extracted directly from the vaccines ($R < 0.4$), perhaps because vaccines are produced from culture supernatant containing RNA of both infectious and non-infectious viral particles.

4.7.2. Method validation

A new assay requiring a full method validation was implemented. Quality of primers and probes was verified according to a validation study of the US CDC.

4.7.2.1. Accuracy

PFU from 6 performance was consistently within the range of [4.00-4.06 log₁₀] per 0.5-ml dose with the CV = 8.2% <<< 330% = 0.5 log₁₀. However, the figure was lower than the manufacturer's data [4.20-4.70 log₁₀]. The lower results may be because Vero cells used for this study produce interferon and need FCS for growing and maintenance, or they may be due to systematic errors between laboratories. This difference suggested the need for a harmonization of measles potency testing between the manufacturer and quality control facilities.

4.7.2.2. Precision

CV of repeatability was 0.8% and that of intermediate precision was 3.3%, remarkably lower than 10% recommended for an enzyme experiment.

4.7.2.3. Specificity and selectivity

Negative results for the negative controls (water and reaction mix) and cell controls were evidence of a high specific and selective method.

4.7.2.4. Linearity

PFU and RNA titers were strongly and positively correlated ($R = 0.8 > 0.75$) and the strongest R was for 10^{-1} dilution. The R of 10^{-2} and 10^{-3} was lower, which may be because the RNA titer was still low, just at the beginning of acceleration phase. The absolute difference between them was about a multiple of 3000.

4.7.2.5. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ)

The curves appearing after cycle 40 were considered negative. Figure 3.6 evidences that real-time can detect approximately 10^1 - 10^{12} copies/5 μ l template. However, the linearity of the standard curve was 10^1 - 10^6 copies.

4.7.2.6. Robustness

The robustness of method was evaluated through the CV of 10 vaccine lots under the *unavoidable changes* (ruggedness) between 2 days of performance. The figure of 2.7% was considerably less than 10% recommended for an enzyme experiment. In addition, CV of intermediate precision of 3.3% also demonstrated the robust character of this method.

4.8. Discussion on limitations of the study

4.8.1. Preparation of ARN by *in vitro* transcription

RNA produced by *in vitro* transcription in this study was fragments, not whole genome. Higher yield was obtained by the direct transcription but no recombinant bacterial strain was produced.

4.8.2. Determination of influenza infection among SARI patients

Bacterial co-infection was not analyzed. The detection sensitivity could be affected by the RT-PCR multiplex and conventional amplification limited the identification of etiology in co-infected cases. Subtyping influenza A was not performed.

4.1.1. Setting-up a new assay to determine the potency of measles vaccine

The potency of measles vaccine was performed on Vero cells excreting interferon and needing FCS.

CONCLUSION

4. Nine (9) pure, stable, and high yield (10^{11} - 10^{19} copies per 20 μ l reaction) RNA positive controls were produced by *in vitro* transcription to be used as the IQC samples for conventional RT-PCR to detect influenza and as the standard curve for measles quantification;

5. RNA detection rate of seasonal influenza A (A/H3N2 and A/H1N1), influenza B, and A/H1N1pdm09 among SARI patients in Hai Duong, 2009-2011 was 1.9%, 6.4% and 10.4%, respectively. The viral co-infection (1 or 2 viruses, including co-infection among influenza viruses) accounted for 11.3%. The age group most infected with seasonal influenza A and influenza B was 1-5 years, while the one infected most with A/H1N1pdm09 was 6-18 years. There was no apparent gender distribution difference;

6. A new assay to determine the potency of single and live-attenuated measles vaccine by quantification of RNA within the infected cells 24 hours pi at 10^{-1} vaccine dilution was set-up and pre-validated. This technique was precise, rapid, automated and strongly correlated with the gold method of PFA. RNA titer of measles vaccine was stable over time and approximately 3×10^3 times higher than that of PFU.

RECOMMENDATIONS

3. Continue to produce the RNA positive controls for other agents, prepare the RNA panels for EQA NAT, and for the production of commercial RT-PCR test kits. Re-prepare the positive controls for influenza A in cases of genetic recombination.

4. Continue to validate the methods to determine the potency of measles vaccine using a larger sample size. Extend this study to the viral live-attenuated vaccines with poor release from the culture cells, or spread out over time, or even for those with no CPE cultures (*in process control* and final vaccine products)/.

MINISTRY OF EDUCATION AND FORMATION MINISTRY OF HEALTH

HANOI MEDICAL UNIVERSITY



NGUYỄN THỊ THƯỜNG

**PREPARATION OF STANDARD GAMS FOR RT-PCR
APPLICATION IN INFLUENZA DIAGNOSTICS
AND MEASLES VACCINE POTENCY TESTING**

Speciality: Microbiology

Speciality code: 62720115

SUMMARY OF MEDICAL PHYLOSOPHY DOCTOR THESIS

HANOI, 2014

This Thesis has been conducted at:

NATIONAL INSTITUTE OF HYGIENE AND EPIDEMIOLOGY

Supervisors:

- 3. **Dr. Huỳnh Phương Liên, Professor in Virology**
- 4. **Dr. Nguyễn Trần Hiền, Professor in Epidemiology**

Reviewer 1:

Reviewer 2:

Reviewer 3:

The Thesis will be defended in front of the National Scientific Jury
 To be organized at Hanoi Medical University
 At.....h.....,/...../201...

This Thesis will be submitted to:

- 4. Vietnamese National Library;
- 5. Vietnamese National Medical Information Library;
- 6. Library of Hanoi Medical University.

LIST OF PUBLICATIONS RELATED TO THE THESIS

9. Nguyễn Thị Thường, Henri Agut et al (2006). Rapid determination of antiviral drug susceptibility of herpes simplex virus types 1 and 2 by real-time PCR. *Antiviral Research*, 69, 152-157.
10. Nguyễn Thị Thường, Thẩm Chí Dũng, Trần Thị Mai Hưng, Nguyễn Trần Hiền, Taniguchi K (2010). Tác nhân vi rút gây hội chứng cúm trong cộng đồng tại xã Cẩm Sơn, huyện Cẩm Giàng, tỉnh Hải Dương, 2009-2010. *Tạp chí Y học dự phòng*, 10 (118), 67-74.
11. Nguyễn Trần Hiền, Nguyễn Thị Thường và cộng sự (2011). Epidemiology and viral etiologies of Severe Acute Respiratory Infections (SARI) in Northern Vietnam . *BMC Proc*, 5(S1) 118.
12. Lương Minh Tân, Phan Thị Ngà, Thẩm Chí Dũng, Nguyễn Thị Thường, Đỗ Phương Loan, Holly S., MacIntyre C.R (2011). Tác nhân vi sinh vật gây bệnh đường hô hấp ở nhân viên y tế và ở khẩu trang đã qua sử dụng ở các bệnh viện Hà Nội. *Tạp chí Y học và thông tin Dược (JMPI)*, 12, ISSN 0868-3891, 26-30.
13. Nguyễn Thị Thường, Trần Như Dương, Huỳnh Phương Liên và cộng sự (2012). Sản xuất chứng dương ARN *in vitro*. *Tạp chí Y học Dự phòng*, 5(132), 103-111.
14. Nguyễn Thị Thường, Nguyễn Đăng Hiền, Huỳnh Phương Liên, Phạm Thị Bích Ngọc, Trần Thị Hiền, Nguyễn Trần Hiền (2013). Xây dựng kỹ thuật xác định hiệu giá ARN vắc xin sởi bằng real-time RT-PCR. *Tạp chí Y học Dự phòng*, 11(147), 10-16.
15. Nguyễn Thị Thường và cộng sự (2014). *Nghiên cứu phát triển bộ mẫu chuẩn RNA cho kỹ thuật RT-PCR và thử nghiệm đánh giá hiệu quả sản phẩm trên thực địa*. Đề tài tuyển chọn cấp Bộ. Bộ Y tế. Nghiệm thu cấp Bộ tháng 04/2014.
16. Thẩm Chí Dũng, Nguyễn Trần Hiền, Nguyễn Thị Thường et al (2014). Sensitivity and specificity of routine epidemiological influenza-like illness surveillance system at district level in Northern Vietnam. *Vietnamese Prev. Med. J.* 1e(1), 56-65.

17.