

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Trịnh Hoàng Long

**NGHIÊN CỨU TIẾN HÓA DI TRUYỀN CỦA
SARS-COV-2 ĐƯỢC PHÁT HIỆN Ở KHU VỰC
MIỀN TRUNG VIỆT NAM NĂM 2020**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC THỰC NGHIỆM

Nha Trang – 2023

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Trịnh Hoàng Long

**NGHIÊN CỨU TIẾN HÓA DI TRUYỀN CỦA
SARS-COV-2 ĐƯỢC PHÁT HIỆN Ở KHU VỰC
MIỀN TRUNG VIỆT NAM NĂM 2020**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC THỰC NGHIỆM

Mã số: 8420114

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

1. PGS.TS. Lê Văn Tấn

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'LVT', written over a horizontal line.

2. TS. Nguyễn Xuân Vy

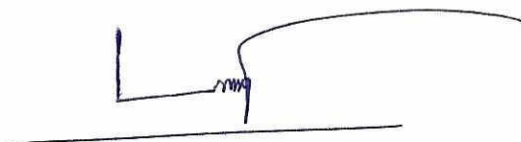
A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'NV', written over a horizontal line.

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Nha Trang, ngày 10 tháng 11 năm 2023

Tác giả luận văn



Trịnh Hoàng Long

LỜI CẢM ƠN

Trước hết, tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc và trân trọng nhất đến PGS.TS. Lê Văn Tấn, Đơn vị Nghiên cứu Lâm sàng - Đại học Oxford tại thành phố Hồ Chí Minh và TS. Nguyễn Xuân Vy, Viện Hải dương học đã dành cho tôi nhiều thời gian, tâm sức hướng dẫn và định hướng nghiên cứu khoa học trong suốt quá trình tôi thực hiện và hoàn thiện luận văn.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn chân thành và sâu sắc đến Ban lãnh đạo Viện Pasteur Nha Trang đã tạo điều kiện cho tôi tham gia và hoàn thành chương trình cao học. Đồng thời, tôi xin trân trọng cảm ơn Trung tâm Dự phòng và Kiểm soát Bệnh tật Hoa Kỳ (U.S CDC) và Đơn vị Nghiên cứu Lâm sàng - Đại học Oxford tại thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ rất lớn nguồn kinh phí cho tôi thực hiện nghiên cứu này.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến Quý Thầy, Cô đã giảng dạy và cung cấp kiến thức mới để tôi hoàn thành các học phần trong chương trình đào tạo


Tôi xin chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo Học viện Khoa học và Công nghệ, Ban lãnh đạo Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang và Quý Thầy, Cô ở Phòng Đào tạo của Học viện Khoa học và Công nghệ; Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang đã tận tình hướng dẫn và tạo điều kiện thuận lợi để tôi hoàn thành các nội dung trong chương trình đào tạo và các thủ tục cần thiết trong quá trình học tập.

Cuối cùng, tôi xin cảm ơn gia đình, người thân và đồng nghiệp đã luôn quan tâm, hỗ trợ và động viên trong thời gian qua để tôi có thể hoàn thành tốt nhiệm vụ học tập và công tác chuyên môn

Tôi xin chân thành cảm ơn

Nha Trang, ngày 10 tháng 11 năm 2023

Tác giả luận văn



Trịnh Hoàng Long

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN

LỜI CẢM ƠN

MỤC LỤC 1

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT 4

DANH MỤC CÁC BẢNG 7

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ 8

MỞ ĐẦU 10

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU 13

1.1. TỔNG QUAN VỀ SARS-CoV-2 13

1.1.1. Hình thái của SARS-CoV-2 13

1.1.2. Đặc điểm di truyền của SARS-CoV-2 14

1.1.3. Sự xâm nhập và nhân lên của SARS-CoV-2 15

1.1.4. Đáp ứng miễn dịch của cơ thể đối với SARS-CoV-2 16

1.1.5. Phương thức lây truyền của SARS-CoV-2 17

1.1.6. Các phương pháp xét nghiệm SARS-CoV-2 17

1.2. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM DI TRUYỀN CỦA SARS-COV-2 19

1.2.1. Các nghiên cứu trên thế giới 19

1.2.2. Các nghiên cứu trong nước 29

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 35

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU 35

2.2. HÓA CHẤT, TRANG THIẾT BỊ VÀ BỘ GENE THAM CHIẾU 36

2.2.1. Hóa chất sử dụng 36

2.2.2. Trang thiết bị 36

2.2.3 Trình tự gene SARS-CoV-2 tham chiếu 37

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	37
2.3.1. Thu thập thông tin ca bệnh dương tính với SARS-CoV-2	37
2.3.2. Thực hiện kỹ thuật real time RT-PCR phát hiện các mẫu dương tính SARS-CoV-2	37
2.3.3. Khuếch đại bộ gene SARS-CoV-2 các mẫu có ct value ≤ 30	38
2.3.4. Tạo thư viện bộ gene SARS-CoV-2	38
2.3.5. Giải trình tự bộ gene SARS-CoV-2 trên máy MiSeq/Mỹ	39
2.3.6. Phân tích tiến hóa di truyền của SARS-CoV-2.....	39
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	41
3.1. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH ĐẶC ĐIỂM NHÂN KHẨU VÀ DỊCH TỄ MẪU NGHIÊN CỨU NĂM 2020	41
3.1.1. Số lượng chủng SARS-CoV-2 năm 2020 tại khu vực miền Trung Việt Nam giải trình tự gene thành công.....	41
3.1.2. Số lượng chủng SARS-CoV-2 thu được theo từng giai đoạn dịch COVID-19 của khu vực miền Trung năm 2020	42
3.1.3. Đặc điểm giới tính đối tượng nghiên cứu	43
3.1.4. Đặc điểm nhóm tuổi đối tượng nghiên cứu	44
3.1.5. Tình trạng sống/chết của đối tượng nghiên cứu	44
3.1.6. Kết quả phân tích đối tượng cộng đồng và nhập cảnh.....	45
3.1.7. Kết quả phân tích ca tiếp xúc	46
3.2. PHÂN TÍCH ĐẶC ĐIỂM DI TRUYỀN SARS-COV-2 KHU VỰC MIỀN TRUNG VIỆT NAM NĂM 2020.....	47
3.2.1. Kết quả định danh các chủng SARS-CoV-2 khu vực miền Trung Việt Nam năm 2020	47
3.2.2. Sự lưu hành các dòng của SARS-CoV-2 trong giai đoạn một của dịch COVID-19 tại khu vực miền Trung	48
3.2.3. Sự lưu hành các dòng của SARS-CoV-2 trong giai đoạn hai của dịch COVID-19 tại khu vực miền Trung	51

3.3. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH ĐỘ BIẾN CÁC DÒNG	53
3.3.1. Kết quả phân tích độ biến chủng thuộc dòng B.....	54
3.3.2. Kết quả phân tích độ biến các chủng thuộc dòng B.1	55
3.3.3. Kết quả phân tích độ biến các chủng thuộc dòng B.1.1	56
3.3.4. Kết quả phân tích độ biến các chủng nhập cảnh.....	57
3.4. PHÂN TÍCH ĐẶC ĐIỂM DI TRUYỀN CỦA VI RÚT TRÊN CÁC ĐỐI TƯỢNG TIẾP XÚC.....	58
3.5. MỞ RỘNG GIÁM SÁT BIẾN CHỨNG SARS-COV-2 NĂM 2021 .	59
3.5.1. Số lượng trình tự gene SARS-CoV-2 thu được năm 2021	59
3.5.2. Kết quả phát hiện biến thể SARS-CoV-2 năm 2021	61
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	64
KẾT LUẬN.....	64
KIẾN NGHỊ	64
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ	65
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	66
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
A	Adenin	
Aa	Acid amin	A xít amin
ACE2	Angiotensin-converting enzyme 2	
Bp	Base pair	Cặp nucleobase
BĐ		Tỉnh Bình Định
BT		Tỉnh Bình Thuận
C	Cytosine	
CDC	Centers for Disease Control and Prevention	Trung tâm Dự phòng và Kiểm soát Bệnh tật
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic acid	DNA bổ sung
COVID-19	Coronavirus disease 2019	Bệnh do vi rút Corona-19 gây ra
CT	Cycle threshold	Ngưỡng chu kỳ
DNA	Deoxyribonucleic acid	
ĐN		Thành phố Đà Nẵng
E	Envelope	Vỏ
G	Guanin	
HE	Hemagglutinin esterase	
HIV	Human Immunodeficiency Virus	virus gây ra hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải ở người
KH		Tỉnh Khánh Hòa
M	Membrane	Màng

MERS-CoV	Middle East Respiratory Syndrome corona virus	Vi rút Corona gây hội chứng viêm đường hô hấp cấp vùng Trung Đông
N	Nucleocapsid	
Nu	Nucleotide	
NT		Tỉnh Ninh Thuận
NTD	N-terminal domain	Miền đầu cuối protein N
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng tổng hợp chuỗi polymerase
QB		Tỉnh Quảng Bình
QNg		Tỉnh Quảng Ngãi
QNa		Tỉnh Quảng Nam
QTr		Tỉnh Quảng Trị
PY		Tỉnh Phú Yên
RBD	Receptor-binding domains	Miền liên kết với thụ thể
RBM	Receptor-binding motif	Mô đun liên kết với thụ thể
RNA	Acid ribonucleic	
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction	Phản ứng tổng hợp chuỗi polymerase sao chép ngược
S	Spike	Gai
SARS-CoV	Severe acute respiratory syndrome corona virus	Vi rút corona gây hội chứng hô hấp cấp tính nặng
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome corona virus - 2	Vi rút corona - 2 gây hội chứng hô hấp cấp tính nặng
T	Timin	

TTH		Tỉnh Thừa Thiên Huế
TTKSBT		Trung tâm Kiểm soát Bệnh tật
TP		Thành phố
UK	United Kingdom	Vương Quốc Anh
VOC	Variant of concern	Biến thể đáng quan ngại
VOI	Variant of interest	Biến thể đáng quan tâm
VOHC	Variant of high consequence	Biến thể gây hậu quả cao
VUM	Variant under monitoring	Biến thể được giám sát
US.CDC	United States Centers for Disease Control and Prevention	Trung tâm Dự phòng và Kiểm soát Bệnh tật Hoa Kỳ
WHO	World Health Organization	Tổ chức Y tế Thế giới

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 3.1. Kết quả phân theo giới tính của đối tượng nghiên cứu	44
Bảng 3.2. Đặc điểm nhóm tuổi nghiên cứu.....	44
Bảng 3.3. Số lượng ca nhập cảnh và cộng đồng qua hai giai đoạn dịch.....	45
Bảng 3.4. Kết quả phát hiện đột biến các chủng thuộc dòng B.1	56
Bảng 3.5. Kết quả phát hiện đột biến các chủng nhập cảnh	58
Bảng 3.6. Kết quả phân bố cộng đồng và nhập cảnh các biến thể SARS-CoV-2 tại khu vực miền Trung năm 2021	62

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1.1. Hình dạng của SARS-CoV-2	14
Hình 1.2. Bộ gene của SARS-CoV-2.....	15
Hình 1.3. Quá trình xâm nhập và nhân lên của SARS-CoV-2	16
Hình 1.4. Phân tích cây phát sinh loài của SARS-CoV-2 với các vi rút đại diện của chi Betacoronavirus	20
Hình 1.5. Các vùng đột biến thay thế aa của 3 biến thể đáng quan ngại P.1, B.1.1.7 và B.1.351	27
Hình 1.6. Sự thay thế của biến thể Omicron B.1.1.529	29
Hình 1.7. Các đột biến đặc thù của biến thể Delta B.1.617.2 trên 38 mẫu thu được ở Bắc Giang từ tháng 5 – 6/2021	33
Hình 2.1. Địa điểm thu thập mẫu nghiên cứu	35
Hình 3.1. Số lượng mẫu dương SARS-CoV-2 lưu tại Viện Pasteur Nha Trang năm 2020	41
Hình 3.2. Số lượng trình tự bộ gene SARS-CoV-2 năm 2020 thu được ở khu vực miền Trung Việt Nam	42
Hình 3.3. Số lượng trình tự bộ gene SARS-CoV-2 khu vực miền Trung thu được trong giai đoạn một và giai đoạn hai dịch COVID-19 năm 2020.....	43
Hình 3.4. Kết quả thu thập thông tin quốc gia xuất cảnh của các ca nhập cảnh	46
Hình 3.5. Kết quả thu thập thông tin dịch tễ của các ca tiếp xúc.....	47
Hình 3.6. Kết quả định danh 58 chủng SARS-CoV-2 thu thập năm 2020 tại khu vực miền Trung Việt Nam	48
Hình 3.7. Kết quả định danh các chủng lưu hành trong giai đoạn một của dịch COVID-19 tại khu vực miền Trung Việt Nam	49
Hình 3.8. Cây phát sinh loài mô tả mối liên hệ di truyền các chủng được lấy trên các đối tượng cộng đồng ở Bình Thuận vào tháng 3/2020.....	50
Hình 3.9. Kết quả định danh các chủng lưu hành trong giai đoạn hai của dịch COVID-19 tại khu vực miền Trung Việt Nam	51

Hình 3.10. Cây phát sinh loài mô tả mối liên hệ di truyền các chủng được lấy trên các đối tượng cộng đồng liên quan tâm dịch Đà Nẵng vào tháng 7/2020.....	53
Hình 3.11. Đột biến tìm thấy trên chủng thuộc dòng B.....	54
Hình 3.12. Cây phát sinh loài mô tả mối liên hệ di truyền chủng phát hiện đầu tiên tại khu vực miền trung Việt Nam.....	55
Hình 3.13. Các đột biến tìm thấy trên chủng thuộc dòng B.1.1	57
Hình 3.14. Số lượng chủng thu được tại khu vực miền Trung năm 2021	60
Hình 3.15. Thời gian thu thập chủng SARS-CoV-2 năm 2021	60
Hình 3.16. Đối tượng thu thập chủng SARS-CoV-2 năm 2021	60
Hình 3.17. Cây tiến hóa di truyền 203 chủng SARS-CoV-2 tại khu vực miền Trung năm 2021	61
Hình 3.18. Kết quả phát hiện biến thể SARS-CoV-2 năm 2021 tại khu vực miền Trung.....	62
Hình 3.19. Cây tiến hóa di truyền của biến thể Delta B.1.617.2 năm 2021 tại khu vực miền Trung Việt Nam	63
Hình 3.20. Kết quả phân tích các dòng của biến thể Delta B.1.617.2.....	63

MỞ ĐẦU

Đại dịch viêm đường hô hấp cấp tính nặng COVID-19 (*Coronavirus disease 2019*) bắt đầu vào cuối tháng 12/2019 tại thành phố Vũ Hán, thuộc tỉnh Hồ Bắc, Trung Quốc đến nay vẫn còn tiếp tục diễn biến phức tạp. Khi ấy, Trung Quốc thông báo về 27 trường hợp viêm phổi nặng không rõ nguyên nhân có liên quan đến chợ hải sản Huanan - Vũ Hán, nơi có buôn bán hải sản và một số động vật hoang dã như gia cầm, dơi, rắn, ... Hơn một tháng sau, nguyên nhân gây bệnh được công bố là do một chủng mới của Coronavirus gây ra. Ban đầu vi rút mới này được gọi là nCoV (novel Coronavirus), về sau được đặt tên thành SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2) và tên bệnh do SARS-CoV-2 gây ra cũng được đổi lại thành COVID-19 [1]. SARS-CoV-2 thuộc chi *Betacoronavirus* là một chủng mới của họ *Coronaviridae*, cùng chi với SARS-CoV-1 gây Hội chứng suy hô hấp cấp tính nặng vào năm 2002 - 2003 và MERS-CoV gây Hội chứng hô hấp vùng Trung Đông vào năm 2012 - 2015. Tuy tỷ lệ tử vong do SARS-CoV-2 (2-6%) thấp hơn so với SARS-CoV-1 (10%) và MERS-CoV (35%) nhưng với khả năng lây lan nhanh đã dẫn đến tổng số ca mắc nhiều do đó số ca tử vong cao hơn rất nhiều so với số ca tử vong do SARS-CoV-1 và MERS-CoV gây ra trong những đợt dịch trước đây.

Từ khi được phát hiện cho đến nay, COVID-19 đã lây lan nhanh chóng và có mặt ở khắp nơi trên thế giới. Thời gian đầu, Trung Quốc là nước chịu ảnh hưởng nặng nề nhất với 81.000 ca mắc và 3.400 ca tử vong chỉ trong vòng chưa đầy 3 tháng. Ngày 31/01/2020, Tổ chức Y tế Thế giới tuyên bố dịch bệnh COVID-19 là “Tình trạng Y tế công cộng khẩn cấp gây quan ngại toàn cầu” sau khi đã lây lan sang 30 quốc gia trên thế giới. Đến tháng 3/2020, dịch bệnh bùng phát mạnh mẽ ở các nước châu Âu, Hoa Kỳ, và nhanh chóng lây sang hơn 200 quốc gia ở các châu lục với hơn 6 triệu người mắc và hơn 370.000 người tử vong. Ngày 11/3/2020 WHO quyết định công bố “COVID-19 chính thức trở thành đại dịch” có ảnh hưởng nặng nề đến y tế, kinh tế xã hội của thế giới. Vài tháng sau đó số ca mắc lại tiếp tục tăng nhanh ở một số nước châu Mỹ (như Brazil, Mexico, Colombia...), Nam Phi và Ấn Độ. Tính đến 10/11/2023, thế giới đã ghi nhận hơn 771 triệu người mắc với gần bảy triệu người tử vong, trong đó ba nước có số ca nhiễm cao nhất là Mỹ (hơn

103 triệu ca); Trung Quốc (hơn 99 triệu ca); Ấn Độ (hơn 45 triệu ca) với số ca tử vong lần lượt là hơn 1,138 triệu ca; 121.790; 533.294 ca và Việt Nam cũng ghi nhận hơn 11,624 triệu trường hợp mắc và 43.206 trường hợp tử vong [2].

Ngoài việc lây lan rộng khắp, SARS-CoV-2 được biết đến như là một loài siêu vi có khả năng đột biến nhanh với nhiều biến chủng xuất hiện. Biến chủng Alpha B.1.1.7 với khả năng lây lan nhanh được ghi nhận lần đầu tiên ở Vương Quốc Anh vào khoảng tháng 10 năm 2020, biến chủng Beta B.1.351 có mang một số đột biến trên protein gai (S) bao gồm đột biến E484K, biến thể Delta B.1.617.2 xuất hiện vào cuối năm 2020, biến thể Omicron xuất hiện vào cuối năm 2021 đặc biệt là thời gian gần đây xuất hiện biến chủng BA.2.86 chứa 30 đột biến mới trên protein gai so với biến chủng BA.2 của biến thể Omicron được cho là có khả năng trốn thoát khỏi hàng rào miễn dịch được tạo ra bởi các vắc xin hiện hành [2]. Đây là những thách thức mới của dịch COVID-19. Qua đó nêu cao tầm quan trọng của việc tiến hành giải mã gene nhằm tìm hiểu sự tiến hoá của SARS-CoV-2 và đánh giá mức độ ảnh hưởng tiềm tàng của các đột biến mới.

Năm 2020 ở Việt Nam các nghiên cứu về tiến hóa di truyền của SARS-CoV-2 vẫn còn hạn chế đặc biệt là chưa có một nghiên cứu nào tại khu vực miền Trung Việt Nam được công bố. Vì vậy, nghiên cứu về kiểu gene và phân tích tiến hóa di truyền của SARS-CoV-2 đang được chú trọng nhằm cung cấp dữ liệu về kiểu gene và sự tiến hóa di truyền của SARS-CoV-2 từ đó có thể hỗ trợ cho việc sản xuất vắc xin cũng như thuốc điều trị bệnh COVID-19 và cung cấp thông tin quan trọng cho chương trình phòng chống dịch bệnh của quốc gia. Chính vì vậy, chúng tôi thực hiện đề tài “**Nghiên cứu tiến hóa di truyền của SARS-CoV-2 được phát hiện ở khu vực miền Trung Việt Nam năm 2020**” nhằm cung cấp một phần dữ liệu về đặc điểm di truyền và sự tiến hóa của SARS-CoV-2 tại khu vực miền Trung Việt Nam năm 2020 phục vụ cho hoạt động phòng chống dịch COVID-19 của khu vực miền Trung nói riêng và Quốc gia nói chung.

Mục tiêu, nội dung nghiên cứu và ý nghĩa khoa học của đề tài:

Mục tiêu nghiên cứu:

Nghiên cứu mô tả được đặc điểm nhân khẩu và dịch tễ cũng như phân tích và so sánh được đặc điểm di truyền (kiểu gene, dòng) và tiến hóa của SARS-CoV-2 thu được trên các bệnh nhân COVID-19 ở trên các đối tượng cộng đồng cũng như nhập cảnh tại khu vực miền Trung Việt Nam năm 2020

Nội dung nghiên cứu

- Thu nhận thông tin đặc điểm nhân khẩu, dịch tễ của các ca bệnh cộng đồng và nhập cảnh đã được khẳng định dương tính bằng kỹ thuật real time RT-PCR.
- Giải trình tự gene của SARS-CoV-2 được phát hiện tại khu vực miền Trung Việt Nam năm 2020.
- Phân tích đặc điểm di truyền SARS-CoV-2 được phát hiện tại khu vực miền Trung Việt Nam năm 2020
- So sánh về đặc điểm di truyền của vi rút được phát hiện trên những ca bệnh nhập cảnh và các ca bệnh phát hiện ở cộng đồng tại khu vực miền Trung Việt Nam năm 2020.
- Phân tích các đột biến ghi nhận trên bộ gene của các chủng SARS-CoV-2 thu nhận được năm 2020.

Ý nghĩa khoa học của nghiên cứu

Cung cấp một phần dữ liệu về đặc điểm di truyền và sự tiến hóa của SARS-CoV-2 tại khu vực miền Trung Việt Nam năm 2020 phục vụ cho hoạt động phòng chống dịch COVID-19 tại khu vực.

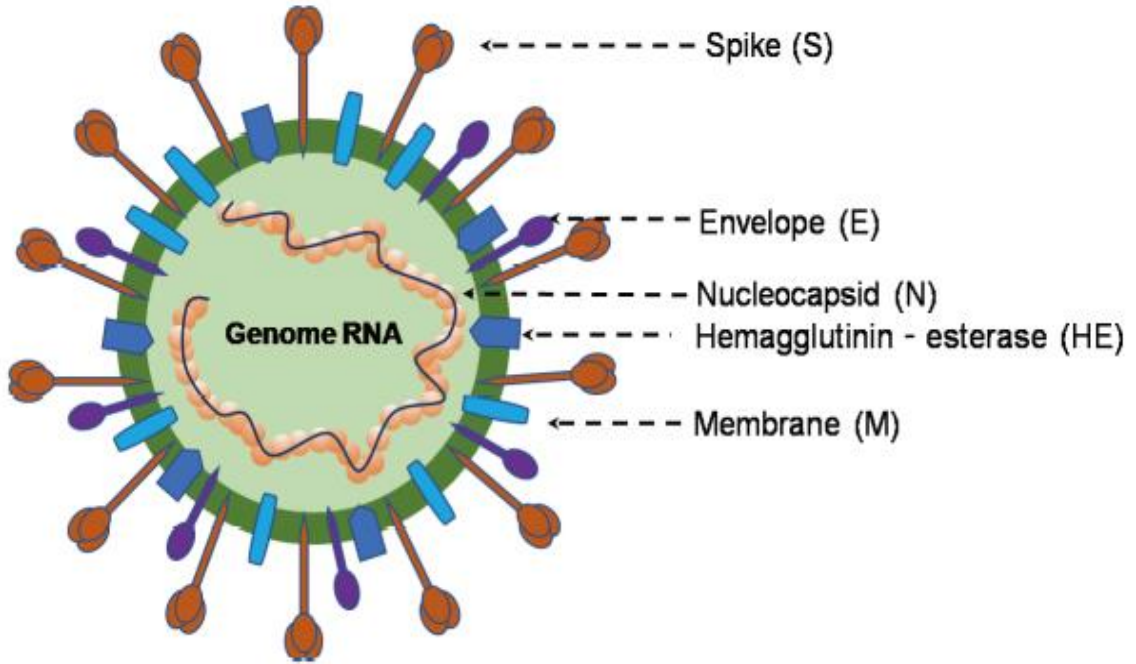
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. TỔNG QUAN VỀ SARS-CoV-2

1.1.1. Hình thái của SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 được phân lập đầu tiên từ dịch rửa phế quản của 3 bệnh nhân COVID-19 tại bệnh viện Jinyinta ở thành phố Vũ Hán vào ngày 30 tháng 12 năm 2019. Bằng kỹ thuật giải trình tự gene và phân tích cây tiến hóa di truyền, SARS-CoV-2 được xác định cùng nhóm với các vi rút thuộc họ *Coronaviridae* [3]. Họ *Coronaviridae* được chia thành 4 phân nhóm dựa trên kiểu di truyền và huyết thanh học gồm: Alpha, Beta, Gamma và Delta gây bệnh cho người và động vật và thường gây ra các bệnh về đường hô hấp, đường ruột, gan và hệ thần kinh. SARS-CoV-2 thuộc nhóm Beta-coronavirus. Trong nhóm này có hai chủng vi rút đã từng gây dịch viêm đường hô hấp cấp tính nghiêm trọng đó là dịch SARS-CoV ở Trung Quốc năm 2002-2003 và Hội chứng viêm đường hô hấp cấp vùng Trung Đông do coronavirus gây ra (MERS-CoV) bắt nguồn từ Ả Rập Xê Út năm 2012 và lây lan mạnh tại Hàn Quốc năm 2015. So sánh về bộ gene, SARS-CoV-2 có độ tương đồng 79,5% với SARS-CoV và 50% so với MERS-CoV.

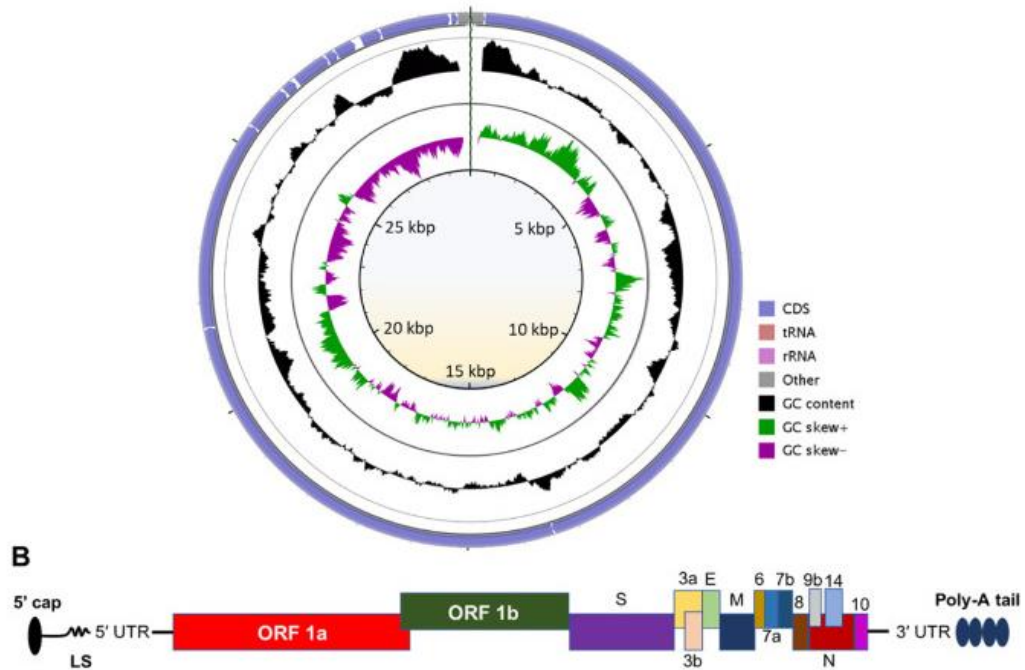
SARS-CoV-2 có dạng hình cầu với đường kính khoảng 120-160nm. Lớp vỏ bên ngoài của chúng có các protein đặc trưng như protein vỏ E (Envelope), protein Hemagglutinin esterase (HE) và đặc biệt là protein hình gai S (spike S) tạo các gai đặc trưng như “vương miện” (do đó được đặt tên là Corona, chữ Corona trong tiếng La tinh có nghĩa là “vương miện”) (hình 1.1). Cũng giống như các chủng vi rút thông thường khác, SARS-CoV-2 nhạy cảm khi bị chiếu tia UV và không chịu được nhiệt độ cao, vi rút cũng bị tiêu diệt bởi các chất khử trùng như ethanol 75%, chlorine, chloroform, ...[3]



Hình 1.1. Hình dạng của SARS-CoV.2 [3]

1.1.2. Đặc điểm di truyền của SARS-CoV-2

Vật liệu di truyền của SARS-CoV-2 là sợi RNA đơn dương (ssRNA+) có kích thước 29,9kb bao gồm các vùng: vùng 5'UTR, khung đọc mở, vùng 3'UTR và cuối cùng là đuôi poly A. Các vùng UTR là vùng không mã hoá protein. Toàn bộ bộ gene của SARS-CoV-2 mã hóa khoảng 7.096 polyprotein bao gồm nhiều protein cấu trúc và không cấu trúc. Hai phần ba đầu tiên của bộ gene mã hóa cho các protein phi cấu trúc từ 2 khung đọc mở là ORF1a và ORF1b, một phần ba cuối của bộ gene mã hóa cho các protein cấu trúc. Có 4 protein cấu trúc được bảo tồn bao gồm: protein gai (S) chịu trách nhiệm liên kết với tế bào vật chủ; protein màng (M), protein vỏ (E) và nucleocapsid (N) protein. Đặc biệt, trong vùng gene mã hóa protein gai của SARS-CoV-2 có chèn 4 đoạn trình tự có độ tương đồng đáng kể với vùng gene mã hóa gp 120 nhận dạng thụ thể tế bào và vùng Gag của HIV-1, đây là một đột biến đáng lo ngại của SARS-CoV-2 (hình 1.2) [4]



Hình 1.2. Bộ gene của SARS-CoV-2 [4]

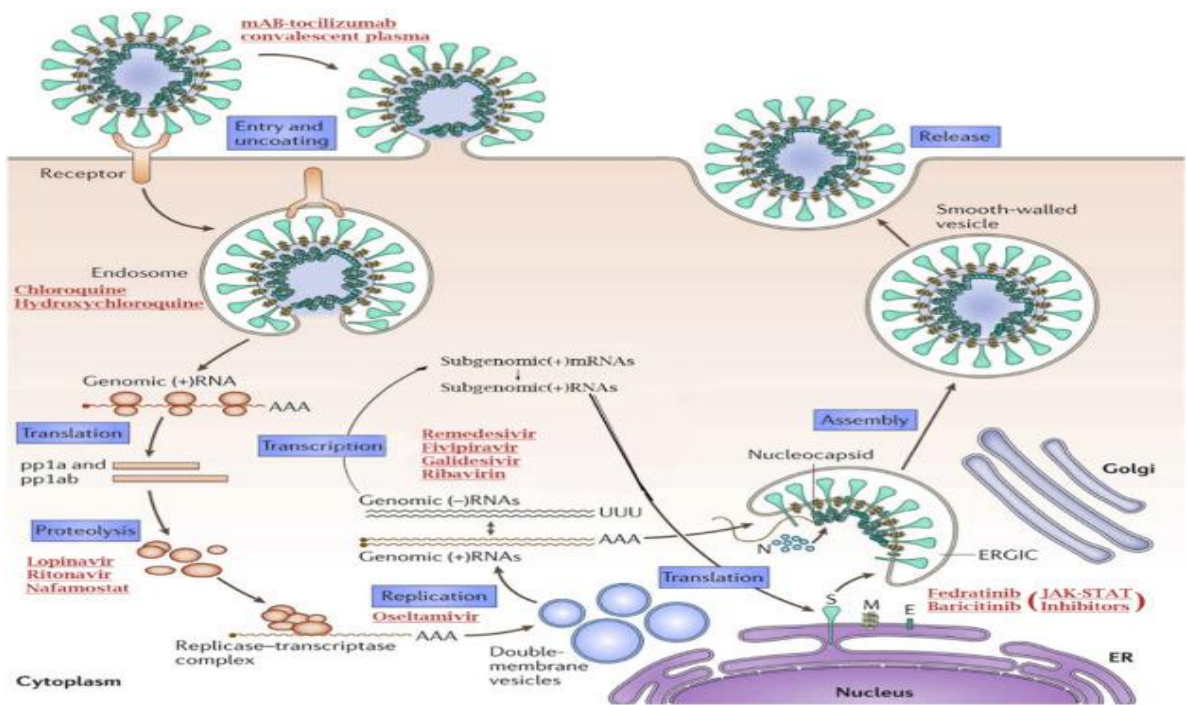
Phân tích tiến hóa di truyền của SARS-CoV cho thấy, trình tự gene của vi rút có độ tương đồng tới 88% với trình tự gene của các chủng coronavirus có nguồn gốc từ dơi được thu thập tại miền Đông Trung Quốc năm 2018 và tương đồng 79,5% với SARS-CoV-1, 50% với MERS-CoV [5].

1.1.3. Sự xâm nhập và nhân lên của SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 có thể xâm nhập tế bào bằng hai cách gồm: thực bào và hòa màng. Các protein gai (S1, S2) của SARS-CoV-2 làm trung gian gắn vào màng của tế bào chủ và gắn kết với ACE2 làm thụ thể xâm nhập. Khi hạt vi rút đã xâm nhập vào tế bào, enzyme cathepsin L hoặc enzyme protease serine của tế bào TMPRSS2 ở gần thụ thể ACE2 phá vỡ màng của vi rút để phóng thích vật liệu di truyền vào tế bào chất của vật chủ. Sự xâm nhập bằng cách hòa màng sinh chất ít có khả năng kích hoạt miễn dịch kháng vi rút của tế bào chủ nên sự nhân lên của vi rút sẽ hiệu quả [4].

Sau khi RNA của vi rút được phóng thích vào tế bào chủ, các polyprotein sẽ được dịch mã. RNA bộ gene của vi rút mã hóa các protein không cấu trúc (NSP) có vai trò quan trọng trong quá trình tổng hợp RNA của vi rút và mã hóa các protein cấu trúc quan trọng đối với quá trình lắp ráp vi rút. Đầu tiên, các polyprotein pp1a và pp1ab được dịch mã và được phân cắt bởi protease để tạo thành các NSP có chức năng như Helicase hoặc enzyme kéo dài chuỗi phụ thuộc RNA (RdRp: RNA-dependent RNA polymerase).

RdRp chịu trách nhiệm sao chép RNA protein cấu trúc. Các protein cấu trúc S1, S2, Envelope (E), Membrane (M) được dịch mã bởi các ribosome trong mạng lưới nội chất (ER - Endoplasmic Reticulum) để chuẩn bị cho quá trình lắp ráp hạt vi rút. Các nucleocapsid (N) được tổng hợp trong tế bào chất và lắp ráp với RNA bộ gene của vi rút. Các thành phần này hợp nhất với tiền chất của hạt vi rút sau đó được vận chuyển từ ER qua bộ máy Golgi đến bề mặt tế bào thông qua các túi nhỏ. Sau đó các hạt vi rút được giải phóng khỏi tế bào bị nhiễm thông qua quá trình xuất bào và tìm kiếm một tế bào chủ khác (hình 1.3) [4].



Hình 1.3. Quá trình xâm nhập và nhân lên của SARS-CoV-2 [4]

1.1.4. Đáp ứng miễn dịch của cơ thể đối với SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 ủ bệnh trong khoảng thời gian từ 2 - 14 ngày trước khi khởi phát với các triệu chứng như sốt, ho, khó thở, ... tương tự như triệu chứng khởi phát của SARS-CoV-1 và MERS-CoV. Tuy nhiên, thời gian khởi phát của SARS-CoV-2 được báo cáo là lâu hơn thời gian khởi phát của SARS-CoV-1 (2002 - 2003) với 2 - 7 ngày. Mức độ bệnh do SARS-CoV-2 gây ra cũng rất đa dạng. Có 5 biểu hiện bệnh được ghi nhận: bệnh không có triệu chứng (chiếm 1,2%), bệnh ở mức nhẹ và vừa (80,9%), bệnh nặng (13,8%), bệnh đặc biệt nghiêm trọng (4,7%) và tử vong (2,3%) [6]. Một số

nghiên cứu gần đây cho thấy tỷ lệ không có triệu chứng ở bệnh nhân COVID-19 ngày càng cao (15,8% - 40%) [7, 8]. Khi bị nhiễm vi rút, cơ thể sẽ đáp ứng miễn dịch để chống lại bệnh. Các cytokines như Interferon-alpha, beta, và các kháng thể IgM, IgG, kháng thể trung hòa sẽ được tạo ra để giúp cơ thể tiêu diệt vi rút. Thời gian xuất hiện kháng thể cũng như thời gian tồn tại của vi rút trong cơ thể khác nhau tùy vào thể trạng của từng người bệnh và sự đáp ứng trong quá trình điều trị.

1.1.5. Phương thức lây truyền của SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 có thể lây truyền từ người sang người qua các con đường sau:

Lây truyền từ người sang người qua tiếp xúc gần như: ôm hôn, hít phải những giọt bắn từ mũi hoặc miệng của người bị COVID-19 phát tán khi ho, hắt hơi hoặc thở ra. Nếu hít hoặc nuốt phải những giọt bắn này từ người bị nhiễm SARS-CoV-2 thì sẽ có nguy cơ bị nhiễm bệnh. Đây là lý do tại sao phải cách xa người bệnh hơn 2 mét. Đến thời điểm này, hình thức này được coi là đường lây lan chính của bệnh.

Do tiếp xúc với các bề mặt nhiễm SARS-CoV-2. Những giọt bắn văng xa tới 2 mét do người bệnh phát tán khi ho, hắt hơi, thở ra, rơi xuống các vật thể và các bề mặt xung quanh người hoặc phải đeo khẩu trang để hạn chế giọt bắn văng ra xa. Bàn tay che chắn khi ho hoặc tiếp xúc với những vật thể hoặc bề mặt nhiễm SARS-CoV-2 sau đó sờ vào mắt, mũi hoặc miệng của họ cũng sẽ có nguy cơ bị lây nhiễm. Do đó, rửa tay thường xuyên bằng xà phòng hoặc sát khuẩn tay là một trong những biện pháp dự phòng có hiệu quả.

1.1.6. Các phương pháp xét nghiệm SARS-CoV-2

** Phân lập SARS-CoV-2*

Bệnh phẩm tốt nhất để phân lập SARS-CoV-2 là dịch ty hầu, dịch ngoáy họng, đôi khi là dịch nội khí quản. Những bệnh phẩm này cần được cho vào môi trường vận chuyển vi rút và bảo quản ở nhiệt độ tiêu chuẩn khi vận chuyển về phòng xét nghiệm làm phân lập vi rút. Mẫu bệnh phẩm được cấy vào tế bào thận khỉ Vero E6 và theo dõi quá trình hủy hoại tế bào theo thời gian và thu thập dịch nuôi cấy.

** Xét nghiệm tìm kháng thể*

Xét nghiệm tìm kháng thể là tìm vi rút gián tiếp thông qua xác định kháng thể trong máu. Kháng thể là các protein đặc biệt (IgM, IgG) mà cơ thể sản sinh ra để chống lại các bệnh nhiễm trùng. Thông thường, sau khi nhiễm bệnh phải mất một thời gian để cơ thể sản sinh ra các kháng thể và có thể phát hiện được trong máu. Hiện nay thường sử dụng 2 kỹ thuật gồm ELISA và miễn dịch sắc ký để tìm kháng thể kháng protein N (đối tượng nhiễm tự nhiên) và kháng thể kháng protein S của SARS-CoV-2 (đối tượng vừa tiêm vắc xin và nhiễm tự nhiên). Xét nghiệm tìm kháng thể kháng protein N và protein S của SARS-CoV-2 có ý nghĩa rất quan trọng trong việc đánh giá sự phát tán của vi rút trong cộng đồng và phát hiện những người có kháng thể vừa tự nhiên hoặc nhờ vắc xin để qua đó có thể đánh giá được khả năng bảo vệ trước SARS-CoV-2 trong cộng đồng. Xét nghiệm này quan trọng với cộng đồng nhưng không dùng để chẩn đoán một người có đang nhiễm SARS-CoV-2 hay không.

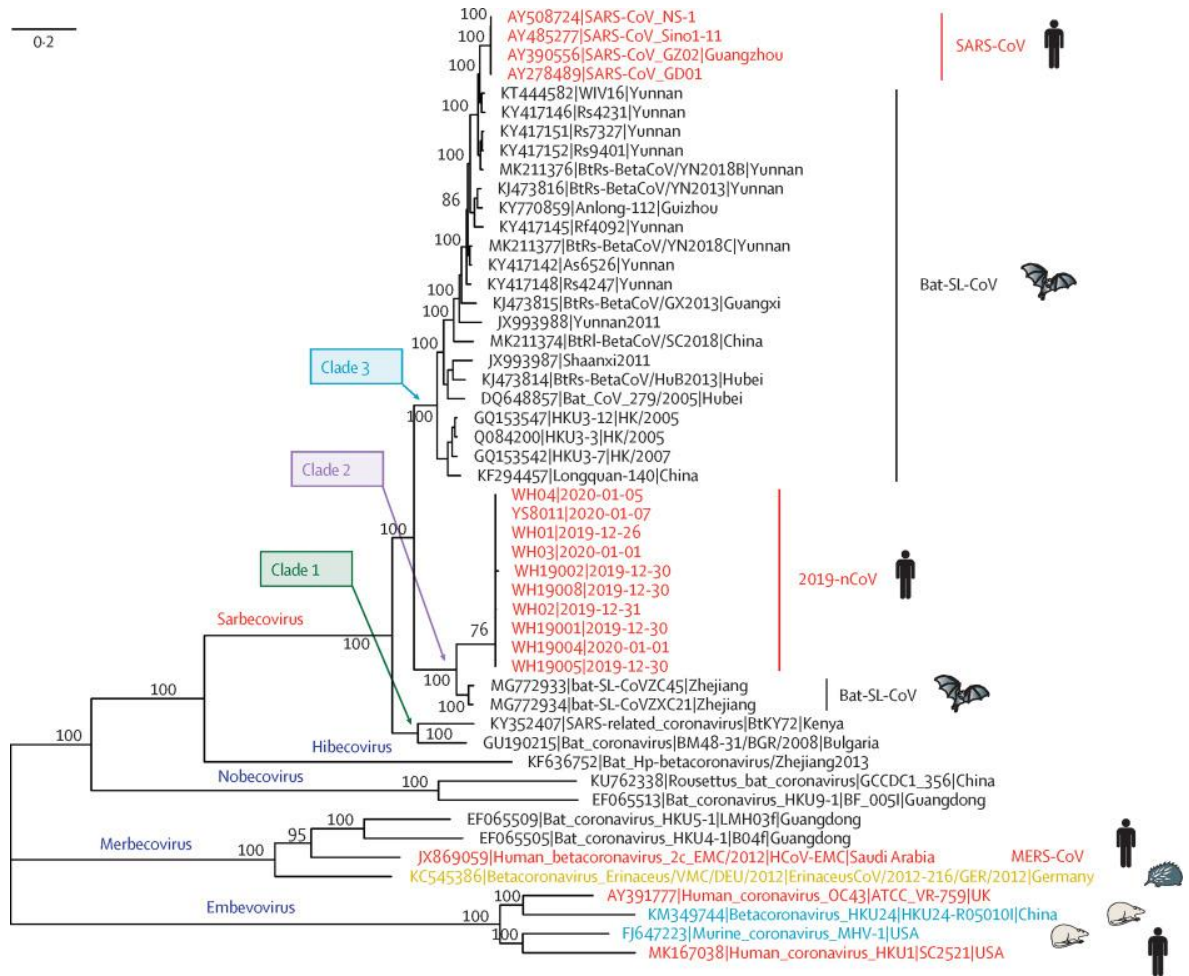
** Phương pháp sinh học phân tử*

Theo khuyến cáo của WHO, xét nghiệm chẩn đoán bằng phương pháp sinh học phân tử phát hiện vật liệu di truyền của SARS-CoV-2 được sử dụng là tiêu chuẩn vàng để chẩn đoán nhiễm bệnh. Lúc đầu, nhằm xác định tác nhân gây bệnh viêm phổi chưa rõ nguyên nhân ở thành phố Vũ Hán, Trung Quốc vào cuối tháng 12/2019, các nhà khoa học đã tiến hành giải trình tự gene và sau đó dựa vào trình tự bộ gene SARS-CoV-2 thu được ở thành phố Vũ Hán, Trung Quốc nhóm nghiên cứu ở Berlin, Đức đã tiến hành thiết kế ra các bộ mồi, mẫu dò (phụ lục 1) đặc hiệu để chẩn đoán bằng kỹ thuật real time RT-PCR với thời gian xét nghiệm nhanh, giá thành thấp và dễ thực hiện ở nhiều phòng xét nghiệm hơn. Khi dịch COVID-19 bắt đầu bùng phát diện rộng trên toàn thế giới, nhằm có dữ liệu gene của vi rút phục vụ cho việc sản xuất vắc xin và hoạt động phòng chống dịch, các phòng xét nghiệm trên thế giới nhanh chóng giải trình tự gene và qua đó đã cho thấy sự tiến hóa nhanh chóng của SARS-CoV-2.

1.2. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM DI TRUYỀN CỦA SARS-COV-2

1.2.1. Các nghiên cứu trên thế giới

Ca bệnh COVID-19 được ghi nhận đầu tiên tại thành phố Vũ Hán, thuộc tỉnh Hồ Bắc, Trung Quốc vào ngày 03/12/2019 liên quan đến chợ hải sản Huanan, đến ngày 26 tháng 1 năm 2020 đã phát hiện hơn 2.000 trường hợp nhiễm COVID-19 và hầu hết liên quan đến những người sống hoặc đến thăm thành phố Vũ Hán và sự lây truyền từ người sang người đã được xác nhận. Đứng trước tình hình đó, Lu và cộng sự [5] đã tiến hành phân tích trình tự gene của chủng vi rút được phân lập từ 9 bệnh nhân đang được điều trị trong đó có 8 bệnh nhân liên quan đến chợ hải sản Huanan ở thành phố Vũ Hán. Kết quả thu được trình tự gene của vi rút có độ tương đồng 88% với trình tự gene của các chủng coronavirus gây hội chứng viêm đường hô hấp cấp tính (SARS) có nguồn gốc từ dơi được thu thập ở Zhoushan thuộc miền Đông Trung Quốc năm 2018 và có độ tương đồng 79,5% với SARS-CoV-1 phát hiện năm 2003, 50% với MERS-CoV. Đặc biệt, vi rút 2019-nCoV có thể liên kết với thụ thể angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) ở người như SARS-CoV-1 gây dịch năm 2003. Khi tiến hành phân tích cây tiến hóa di truyền cho thấy, SARS-CoV-2 khác nhánh với SARS-CoV-1 nhưng cùng nhánh với hai chủng phân lập từ dơi ở Zhoshan thuộc miền Đông Trung Quốc (chủng bat-SL-CoVZC45 và bat-SL-CoVZXC2), điều đó có thể đưa ra giả thuyết dơi là vật chủ ban đầu của SARS-CoV-2 nhưng một vật chủ trung gian khác được bán tại chợ hải sản Huanan, Vũ Hán là nguồn gây bệnh cho người (hình 1.4).



Hình 1.4. Phân tích cây phát sinh loài của SARS-CoV-2 với các vi rút đại diện của chi Betacoronavirus [5]

COVID-19 đã lây lan nhanh chóng sau đó. Thời gian đầu, Trung Quốc là nước chịu ảnh hưởng nặng nề nhất với 81.000 ca mắc và 3.400 ca tử vong chỉ trong vòng chưa đầy 3 tháng. Bệnh đã lây lan sang 30 quốc gia trên thế giới. Ngày 31/01/2020, Tổ chức Y tế Thế giới tuyên bố dịch bệnh COVID-19 là “Sự kiện Y tế công cộng khẩn cấp gây quan ngại toàn cầu”. Đến tháng 3/2020, dịch bệnh bùng phát mạnh mẽ ở các nước châu Âu, Hoa Kỳ và nhanh chóng lây sang hơn 200 quốc gia ở các châu lục với hơn 6 triệu người mắc và hơn 370.000 người tử vong. Ngày 11/3/2020 WHO công bố “COVID-19 chính thức trở thành đại dịch”. Vài tháng sau đó số ca mắc lại tăng nhanh ở một số nước châu Mỹ (như Brazil, Mexico, Colombia...), Nam Phi và Ấn Độ. Đến ngày 26/07/2023, các quốc gia trên thế giới đều ghi nhận có ca mắc với hơn 768 triệu người mắc và hơn 6,9 triệu người tử vong, đứng đầu là các nước Hoa Kỳ (> 103 triệu ca), Trung Quốc (>99 triệu ca), Ấn Độ (> 44 triệu ca), Pháp (>38 triệu ca), ...[2]. Đứng trước tình hình tăng nhanh của đại dịch

COVID-19, các nhà khoa học trên thế giới gấp rút đi sâu vào nghiên cứu di truyền tiến hóa của SARS-CoV-2 để qua đó có thể cung cấp đầy đủ cơ sở dữ liệu di truyền của vi rút phục vụ cho hoạt động ứng phó đại dịch thông qua việc sản xuất vắc xin cũng như điều chế được thuốc điều trị.

Một công bố ngày 21/02/2020 về phân tích sự đa dạng di truyền và tiến hóa của SARS-CoV-2 trên 86 bộ gene hoàn chỉnh hoặc gần hoàn chỉnh đã được công bố ở các nước gồm Trung Quốc (50 gene) Hoa Kỳ (11 gene), Úc (5), Nhật Bản (5), Pháp (4), Singapore (3), Vương Quốc Anh (2), Đài Loan (2), Hàn Quốc (1), Bỉ (1), Đức (1), Việt Nam (1) của các nhà khoa học thuộc Đại học Pittsburgh Hoa Kỳ thực hiện đã phát hiện ra các đột biến gồm: đột biến mất 3 và 24 nucleotide trong polyprotein ORF1ab và mất 10 nucleotide ở phần cuối chiều 3' của bộ gene SARS-CoV-2 từ Nhật Bản, Hoa Kỳ và Úc. Nghiên cứu cũng đã phát hiện được 93 đột biến trên toàn bộ bộ gene của SARS-CoV-2 và 42 đột biến sai khác đã được xác định trong tất cả các protein cấu trúc và không cấu trúc ngoại trừ protein vỏ. Trong đó, 29 đột biến sai khác nằm trong polyprotein ORF1ab, 8 đột biến trong glycoprotein bề mặt gai, 1 trong protein nền và 4 trong protein nucleocapsid. Đặc biệt với 3 đột biến (D³⁵⁴, Y³⁶⁴ và F³⁶⁷) nằm trong vùng liên kết thụ thể glycoprotein bề mặt gai là thành phần đóng vai trò thiết yếu trong việc liên kết với các thụ thể trên tế bào vật chủ, các đột biến này có thể gây ra những thay đổi về hình dạng bề mặt gai của glycoprotein có thể làm thay đổi đặc tính kháng nguyên của vi rút [9].

Tại Mexico, khi phân tích tiến hóa di truyền của SARS-CoV-2 giữa 178 trình tự gene đã được công bố ở 22 quốc gia với trình tự của vi rút được phát hiện đầu tiên vào ngày 27/02/2020 trên bệnh nhân sống tại thành phố Mexico và có tiền sử đi về từ Bergamo, Ý. Kết quả nghiên cứu đã phát hiện, chủng vi rút đầu tiên ở Mexico cùng phân nhóm A2 được phân lập từ Phần Lan, Ý và Đức cũng như chủng phân lập đầu tiên ở Brazil với sự thay thế nucleotide C > T ở vị trí 14.408 đặc trưng. So sánh trình tự gene với các chủng ở thành phố Vũ Hán, Trung Quốc, đã phát hiện được 7 đột biến thay thế nucleotide gồm: T thay thế C ở vị trí 241; C > T (3.037); C > T (14.408); A > G (23.403); A thay thế G ở các vị trí 28.881, 28.882, 28.883 và ở vị trí 14.408 C bị thay thế bởi T [10].

Ngày 4/5/2020, Rehman và cộng sự [11] đã phân tích các đột biến gene và protein của SARS-CoV-2 trên 80 chủng được phân lập tại Thổ Nhĩ Kỳ đã phát hiện được 59 chủng có đột biến thay thế nucleotide A bằng G ở vị trí 23.403 trên gene S và đây là những đột biến đặc trưng cho các chủng phát hiện ở châu Âu; 23 chủng có đột biến thay thế nucleotide G bằng T ở vị trí 25.563 trên gene S cùng với đột biến thay thế G bằng A (28.881), G thay thế bằng A (28.882) và C thay thế G (28.883) là những đột biến thường phát hiện ở các chủng phân lập ở Hoa Kỳ; 8 chủng có đột biến thay thế nucleotid giống như các chủng được phát hiện ở Tây Ban Nha, Ý, Iran, Nhật Bản, Hà Lan và Úc là các đột biến thay thế nucleotide C bằng T (vị trí 241 và 307), G bằng T (11.083) dẫn đến thay thế acid amin leucine bằng phenylalanin trong protein không cấu trúc nsp6. Đặc biệt, nghiên cứu đã phát hiện 11 chủng có đột biến trên protein S và các protein không cấu trúc là nsp2, nsp3, nsp4 và nsp12 do gene RdRP mã hóa là những đột biến mới lần đầu được phát hiện, trong đó đột biến thay thế acid amin isoleucine bằng acid amin valine ở vị trí 468 là đột biến có thể làm ảnh hưởng đến sự liên kết của protein S với thụ thể ACE2 làm tăng khả năng cảm nhiễm SARS-CoV-2 đối với cơ thể.

Xu hướng đột biến mạnh mẽ phát sinh trong quá trình lây từ người sang người của SARS-CoV-2 có thể cản trở sự phát triển của các biện pháp chăm sóc can thiệp đối với người bệnh cũng như sản xuất vắc xin, đây là một thách thức cho toàn thế giới. Nhằm tìm hiểu các đột biến gene dẫn đến sự tiến hóa di truyền của vi rút, các nhà khoa học đã tiến hành một nghiên cứu so sánh 257 trình tự gene của SARS-CoV-2 đã được công bố trên thế giới vào ngày 11/03/2020 với trình tự gốc được phát hiện ở thành phố Vũ Hán, Trung Quốc đã phát hiện hai nhóm chính của vi rút đang lưu hành là nhóm châu Âu và nhóm Bắc Mỹ + châu Á. Sự phân nhóm bộ gene này là sự tiến hóa của SARS-CoV-2 thông qua các đột biến cụ thể trong gene ORF khi vi rút lây lan trên toàn cầu từ tháng 12 năm 2019 đến tháng 3 năm 2020. Nghiên cứu cũng đã phát hiện, đầu cuối 5' của bộ gene dễ bị đột biến hơn so với đầu cuối 3', các đột biến trên gene ORF1ab, spike, ORF3a và E là nguyên nhân chính tạo nên sự đa dạng giữa các chủng của vi rút. Phân tích phát sinh loài, nhóm tác giả đã cho thấy ít nhất 5 phân nhóm khác nhau của vi rút đang lưu hành và dự kiến sẽ có nhiều sự phân nhóm hơn trong thời gian tới [12].

Để đánh giá sự tiến hóa di truyền của SARS-CoV-2 của hai đợt dịch ở Brescia, Ý (tháng 3/2020 và tháng 5/2020), các nhà khoa học đã tiến hành phân lập và giải trình tự gene của 2 chủng là AP66 được phát hiện vào ngày 09/03/2020 và chủng GZ69 thu được ở nhân viên y tế không có triệu chứng (8/5/2020). Kết quả cho thấy, chủng GZ69 thuộc nhóm biến thể phụ B.1.1 với xuất hiện 9 đột biến thay thế nucleotide so với chủng AP66 gồm C>T (2.939); C>T (3.828); G>T (21.784); T>C (21.846); T>C (24.631); G>A(28.881); G>A (28.882); G>C (28.883); G>T (29.810) dẫn đến 6 thay thế acid amin trên các protein gồm ORF1ab: P>S (892); S>L (1.188); S: K>N (74), I>T (95) và N: R>K (203), G>R (204). Khi so sánh với trình tự của chủng gốc Wuhan-Hu-1 cũng đã phát hiện 6 đột biến thay thế nucleotide ở chủng AP66 gồm C>T (241); C>T (3.037); C>T (14.408); T>G (21.784); C>T (21.846); A>G (23.403) dẫn đến 4 thay đổi acid amin ở protein ORF1ab: P>L (4.715L); S: N>K (74), T>I (95), D>G (614G) và 11 đột biến thay thế nucleotide ở chủng GZ69 gồm C>T (241); C>T (2.939); C>T (3.037); C>T (3.828); C>T (14.408); A>G (23.403); T>C (24.631); G>A (28.881); G>A (28.882); G>C (28.883); G>T (29.810) dẫn đến thay thế 6 acid amin ở ORF1ab gồm P>S (892), S>L (1.188), P>L (4.715); S: D>G (614G); N: R>K (203), G>R (204) [13].

Với sự bùng phát mạnh mẽ của dịch COVID-19 những tháng đầu năm 2020 trên toàn thế giới, các nước đã tiến hành đóng cửa biên giới để hạn chế đi lại nhằm giảm thiểu sự bùng phát dịch. Tuy nhiên, khi mở cửa du lịch trở lại ở châu Âu vào mùa hè năm 2020 đã tạo điều kiện cho dịch COVID-19 bùng phát trở lại cùng với sự xuất hiện nhiều biến thể mới. Hodcroft và cộng sự [14] đã phát hiện được một biến thể mới tại Tây Ban Nha thuộc nhánh 20E (B.1.177) sau đó lan rộng khắp Châu Âu được gọi là biến thể Châu Âu 1 (EU1) với mang đột biến thay thế nucleotide C>T (2.222); C>T (28.932); G>T (29.645) dẫn đến thay thế aa trên S: A>V (222); trên ORF10: V>L (30) và N: A>V(220) và song song với nó là biến thể Châu Âu II (EU2) thuộc nhánh 20A (B.1.160) với đột biến thay thế aa protein S: S>N (477) được phổ biến ở châu Âu vào mùa thu năm 2020.

Tại Bắc Kinh, Trung Quốc sau 56 ngày không ghi nhận thêm ca nhiễm SARS-CoV-2 đến ngày 11/06/2020 đã ghi nhận ca nhiễm tái phát tại chợ

Xinfadi, Bắc Kinh. Nhóm tác giả đã tiến hành phân tích đặc điểm di truyền của 4 mẫu dương tính SARS-CoV-2 lấy ở người và 2 mẫu dương tính lấy trên môi trường của chợ Xinfadi, Bắc Kinh. Kết quả cho thấy, độ tương đồng của 6 bộ gene SARS-CoV-2 thu thập được là nằm trong khoảng từ 99,98% đến 99,99% và đều có chung đột biến thay thế nucleotide ở vị trí 6.026 (C>T). Khi so sánh với bộ gene tham chiếu SARS-CoV-2 của Wuhan, kết quả 6 chủng đều có đột biến thay thế nucleotide đặc trưng cho dòng L ở nhánh Châu Âu 1 là ở các vị trí 241 (C>T); 3.037 (C>T); 14.408 (C>T); 23.403 (A>G); 28.881 (G > A); 28.882 (G>A) và 28.883 (G>C). Với thay đổi nucleotide ở vị trí 23.403 (A>G) đã dẫn đến thay đổi aa ở vị trí 614 (D>G) đã làm tăng khả năng lây nhiễm của SARS-CoV-2 ở người và giúp nó trở thành chủng vi rút hàng đầu lây lan khắp thế giới [15].

Với sự phát triển mạnh mẽ hoạt động giải trình tự bộ gene SARS-CoV-2 ở các phòng xét nghiệm trên thế giới đã tạo ra được hàng ngàn trình tự bộ gene vi rút nhưng không có sự thống nhất trong việc đặt tên cho sự đa dạng phát sinh loài của SARS-CoV-2 khi càng ngày càng xuất hiện nhiều biến thể khác của SARS-CoV-2. Vì vậy, các nhà khoa học đã đề xuất danh pháp cho SARS-CoV-2 thành hai nhóm gene (dòng) chính có tên gọi là dòng A và dòng B nhằm đưa ra các giá trị được chấp nhận rộng rãi để đáp ứng được sự đa dạng của vi rút mới khi nó được tạo ra. So với dòng A, vi rút của dòng B có sự phân bố rộng hơn về mặt địa lý và có những đột biến có tính chất quan ngại đối với mục tiêu kiểm soát dịch bệnh COVID-19 trên toàn cầu cũng như việc sản xuất vắc xin [16].

Khi đánh giá các biến thể gây ảnh hưởng đến con người và cộng đồng, WHO và US.CDC tiến hành xếp các biến thể vào các nhóm gồm: Biến thể đáng quan tâm (VOI) là những biến thể mang những thay đổi di truyền được dự đoán hoặc biết là có ảnh hưởng đến các đặc điểm của vi rút như khả năng lây truyền, mức độ nghiêm trọng bệnh, vượt hàng rào miễn dịch, vượt khỏi chẩn đoán hoặc điều trị và các biến chủng này phải được xác định là nguyên nhân gây ra lây truyền cộng đồng đáng kể hoặc nhiều ổ dịch COVID-19, ở nhiều quốc gia với tỷ lệ lưu hành tương đối ngày càng tăng cùng với số trường hợp gia tăng theo thời gian hoặc các tác động dịch tễ học rõ ràng khác cho thấy một nguy cơ mới đối với sức khỏe cộng đồng trên toàn cầu; biến thể

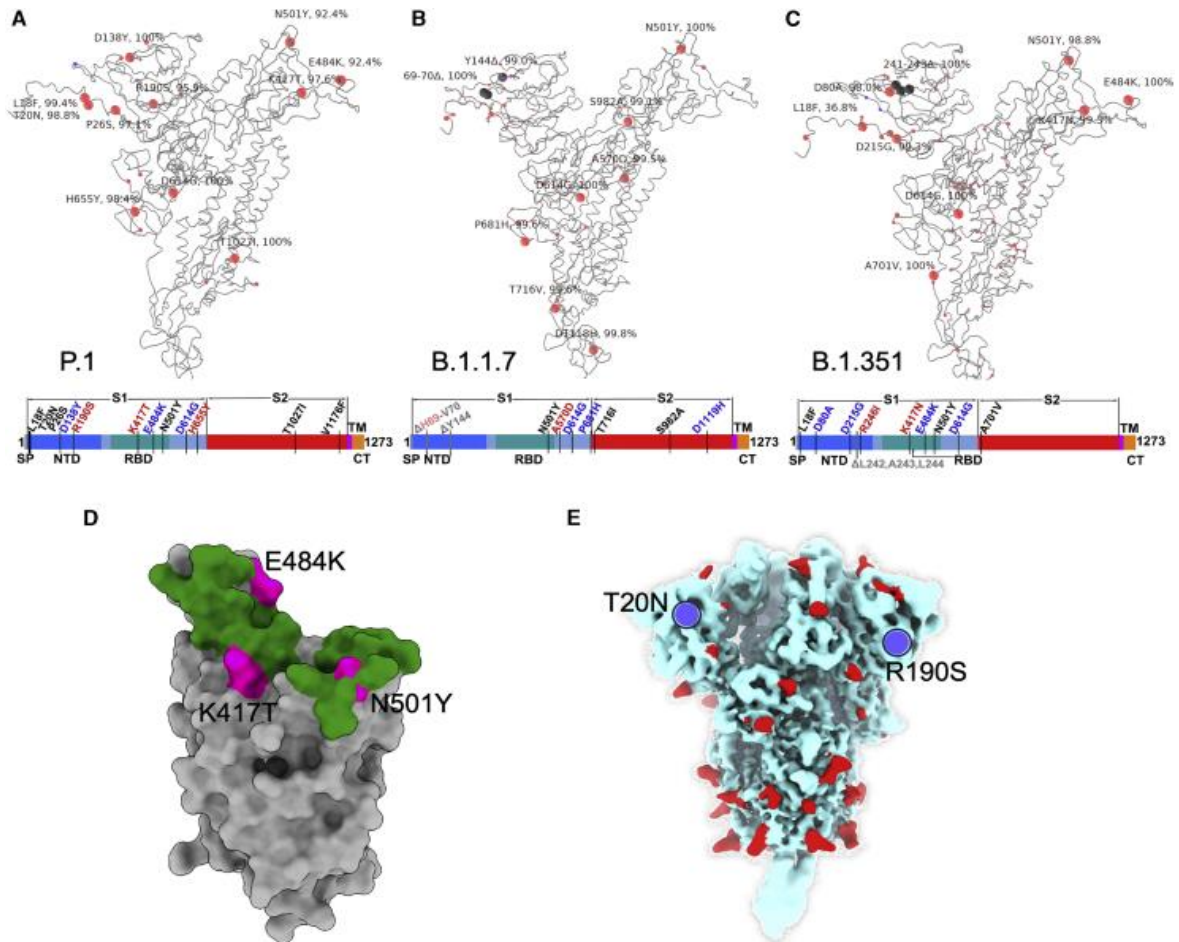
đáng quan ngại (VOC) là các biến thể làm tăng khả năng lây truyền hoặc thay đổi bất lợi trong dịch tễ học COVID-19 hoặc tăng độc lực, thay đổi biểu hiện bệnh lâm sàng hoặc giảm hiệu quả của các biện pháp cộng đồng, chẩn đoán, vắc xin và phương pháp điều trị có sẵn; biến thể đang được theo dõi (VUM) là các biến thể mới có những biến dị di truyền có tác động tiềm ẩn hoặc rõ ràng đối với các biện pháp y tế hiện có hoặc những biến thể đã được lưu hành cao trước đó nhưng hiện tại đang lưu hành ở mức độ rất thấp; biến thể gây hậu quả cao (VOCH) là nhóm các biến thể gây ra các phương pháp xét nghiệm chẩn đoán hiện có bị thất bại, có bằng chứng giảm hiệu quả bảo vệ của vắc xin, gây ra các bệnh lâm sàng nặng hơn và nhập viện nhiều hơn cũng như các phương pháp điều trị hiện hành bị giảm hiệu quả [2, 17].

Với sự mở cửa du lịch trở lại đã tạo điều kiện cho SARS-CoV-2 hình thành ra nhiều biến thể mới mang nhiều biến dị di truyền gây quan ngại y tế công cộng cho thế giới. Ngày 14/12/2020 các nhà khoa học ở Vương quốc Anh đã báo cáo 1 biến thể VOC dòng B.1.1.7 của SARS-CoV-2 có khả năng lây truyền cao hơn các biến thể trước đó cũng như làm tăng nguy cơ nhập viện và tử vong. Biến thể B.1.1.7 (hình 1.5B) được ước tính xuất hiện vào tháng 9/2020 mang 13 đột biến đáng quan ngại như: mất đoạn 69/70 và đột biến thay thế aa N>Y (501) trong miền liên kết với thụ thể của protein S qua đó làm tăng ái lực liên kết của SARS-CoV-2 đối với ACE2 của thụ thể tế bào đã làm tăng khả năng lây truyền của SARS-CoV-2 cũng như giảm hiệu quả xét nghiệm phát hiện đối với các quy trình chẩn đoán trên gene S. Sau khi xuất hiện vào tháng 9/2020, biến thể B.1.1.7 đã nhanh chóng trở thành biến thể lưu hành chủ yếu ở Vương Quốc Anh và lây lan ra 30 nước kể cả Hoa Kỳ là nước có biện pháp cách ly y tế công cộng tốt nhằm giảm lây nhiễm vào thời điểm đó. Tuy nhiên, biến thể B.1.1.7 vẫn chưa phát hiện sự gia tăng các trường hợp tái nhiễm nên hiệu quả vắc xin vẫn còn tác dụng với biến thể này [17, 18, 19].

Sau khi biến thể Vương Quốc Anh B.1.1.7 phát hiện từ tháng 9/2020 và mấy tháng sau đó đã lưu hành trên 30 quốc gia trên thế giới. Sau mấy tháng, tại Nam Phi vào tháng 12/2020 cũng ghi nhận 1 biến thể VOC mới là kết quả của quá trình tiến hóa của SARS-CoV-2 ở bên trong vật chủ bằng cách thoát khỏi sự trung hòa của vật chủ nhờ vào các đột biến ở miền đầu cuối N (NTD)

và miền liên kết với thụ thể (RBD) của protein S. Biến thể mới ở Nam Phi được định danh là 501Y.V2 hay còn được gọi là B.1.351 (thuộc nhánh 20H) (hình 1.5C) với 8 đột biến thay thế aa đặt trung trong protein S (chiếm 77%) và các protein ORF1a, E và N gồm các đột biến: K>N (vị trí 417); E>K (484); N>Y (501); D>A (80); D>G (215); A>V (701); L>F (18); R>I (246) và 2 đột biến mất đoạn ở vị trí 242 và 244. Với các đột biến quan trọng như: thay thế aa N>Y (501) nằm trong RBD của protein S đã làm tăng tốc độ lây truyền của B.1.351 do làm tăng ái lực gắn kết với thụ thể ACE2 của vật chủ; thay thế aa K>N (417); E>K (484) trong miền RBP đã làm cho vi rút tăng khả năng lây nhiễm và trốn được miễn dịch của vật chủ do làm tăng ái lực liên kết với thụ thể của vật chủ. Không những vậy, với sự kết hợp của ba đột biến thay thế aa N>Y (501), K>N (417) và E>K (484) đã gây ra thay đổi hình dạng ở mức cao nhất của RBD trên protein S khi liên kết với ACE2 của vật chủ dẫn đến vi rút thoát khỏi miễn dịch trung hòa của vật chủ [20, 21].

Sau gần 1 năm đại dịch COVID-19 xảy ra, những tháng cuối năm 2020 thế giới đã ghi nhận nhiều biến thể VOC mang những đột biến làm tăng khả năng lây nhiễm đã làm cho dịch COVID-19 lây lan trên toàn thế giới. Cùng với các biến thể như B.1.177, B.1.1.7, B.1.351..., thế giới lại tiếp tục ghi nhận thêm 1 biến thể VOC là biến thể P.1 (hình 1.5A) mang nhiều đột biến có khả năng trốn tránh được miễn dịch của cơ thể người được hình thành từ vắc xin hoặc tự nhiên dẫn đến việc làm bất lợi cho công cuộc phòng chống dịch COVID-19 trên toàn cầu. Biến thể P.1 xuất hiện lần đầu tiên ở Manaus, Braxin vào tháng 12/2020 mang các đột biến thay thế aa trong các vùng protein khác nhau như: NTD với các đột biến thay thế L>F (18), T>20 (N), P>S (26), D>Y (138), R>S (190); K>T (417), E>K (484) và N>Y (501) trong RBD và D>G (614), H>Y (655) tại điểm cuối C của S1 và trong S2 là thay thế aa T>I (1.027) và V>F (1.176) [22].

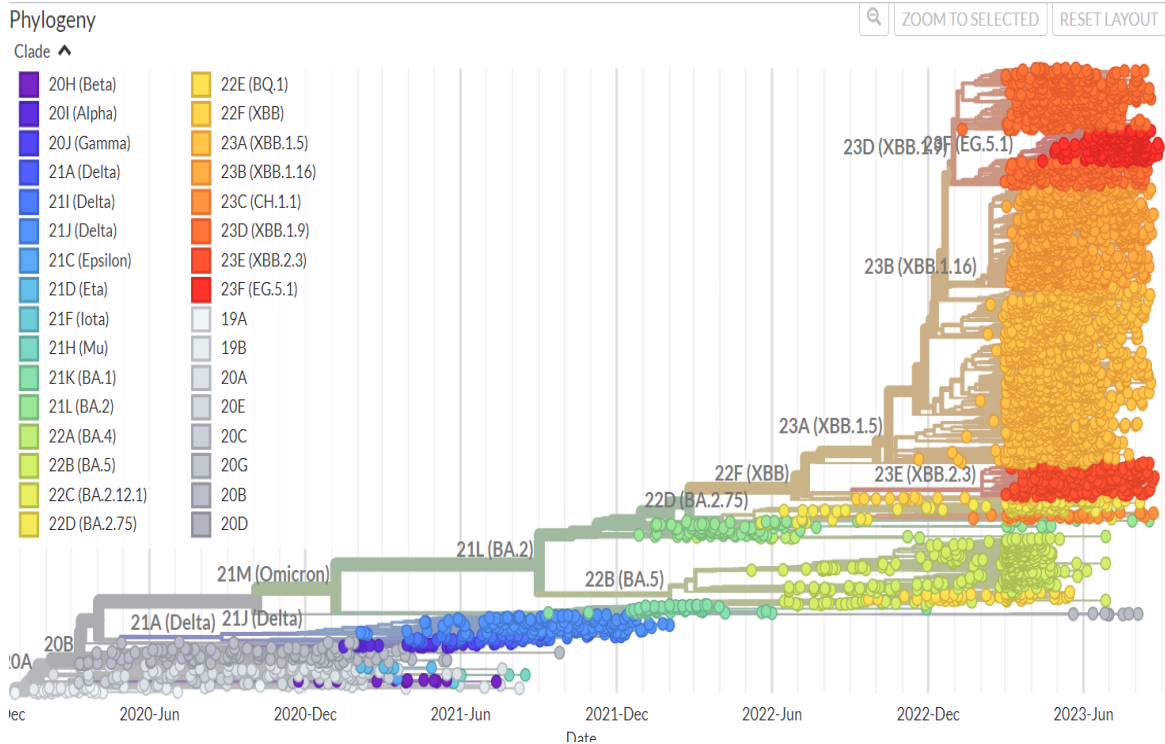


Hình 1.5. Các vùng đột biến thay thế aa của 3 biến thể đáng quan ngại P.1 (A), B.1.1.7 (B) và B.1.351 (C) [22]

Công cuộc phòng chống dịch COVID-19 trên toàn cầu lại tiếp tục đứng trước thách thức mới khi những tháng cuối năm 2020 thế giới tiếp tục ghi nhận thêm 1 biến thể VOC của SARS-CoV-2 ở Ấn Độ được đặt tên là biến thể Delta B.1.617.2 với nhiều đột biến làm tăng khả năng lây nhiễm (gấp đôi chủng đầu tiên và 40% - 60% so với biến thể Alpha B.1.1.7) cũng như tăng độc lực của vi rút dẫn đến số ca tử vong cao. Biến thể Delta B.1.617.2 được ghi nhận đầu tiên tại bang Maharashtra thuộc miền Tây của Ấn Độ vào tháng 10/2020 sau đó nhanh chóng lan rộng khắp Ấn Độ và thay thế các biến thể B.1.617.1, B.1.1.7 đang lưu hành tại Ấn độ lúc bấy giờ. Hai tháng sau bắt đầu lan rộng ra thế giới và trở thành biến thể lưu hành chính từ tháng 12/2020 đến tháng 10/2021 (chiếm 70% các trường hợp nhiễm). Biến thể Delta B.1.617.2 mang các đột biến thay thế aa trên các protein gồm: P>L (2.046), V>L (2.930) trên protein ORF1a; P>L (314), G>S (662), P>L (1.000), A>V (1.918) của ORF1b; ORF3a: S>L (26); ORF7a: V>A (82), T>I (120); ORF8: D>I (119),

xóa 120/121; S: T>R (19), E>G (156), L>R (452), T>K (478), D>G (614), P>R (681), D>N (950); M: I>T (82) và protein N mang các đột biến D>G (63), R>M (203), G>C (215), D>Y (377) [23, 24, 25].

Sau gần 1 năm với với sự chiếm ưu thế trên toàn cầu của biến thể Delta B.1.617.2 thì đến giữa tháng 11/2021 thế giới tiếp tục ghi nhận sự xuất hiện một biến thể VOC mới tại tỉnh Gauteng, Nam Phi được đặt tên là biến thể Omicron B.1.1.529 và được đánh giá là một biến thể có tốc độ lây lan nhanh nhất so với các biến thể trước đó. Sau khi được phát hiện vào giữa tháng 11/2021 thì đến ngày 15/12/2021 biến thể Omicron đã lây lan ra 77 quốc gia trên thế giới và lây lan ra 171 quốc gia vào ngày 20/01/2022 sau đó trở thành biến thể lưu hành chính trên thế giới thay thế cho biến thể Delta B.1.617.2 (hình 1.6). Sự lây lan nhanh chóng của biến thể Omicron B.1.1.529 là do chúng mang nhiều đột biến (khoảng 50 đột biến) trong đó có 15 đột biến nằm trong RBD làm tăng tương tác trước khi xâm nhập vào tế bào vật chủ dẫn đến khả năng lây lan nhanh. Sau khi phân tích đặt điểm di truyền của Omicron B.1.1.529, các nhà khoa học đánh giá đây là biến thể có nhiều đột biến trên các protein nhất so với các biến thể trước đó gồm: Protein S mang đột biến không đồng nghĩa ở các vị trí aa H69-, V70-, G142-, V143, Y144-, N211-; đột biến mất đoạn ở vị trí 69 hoặc 70; đột biến thay thế aa ở các vị trí A>V (67), T>I (95), Y>D (145), G>D (339), S>L (371), S>P (373), S>F (375), K>N (417), N>K (440), G>S (446), S>N (477), T>K (478), E>A (484), Q>R (493), G>S (496), Q>R (498), N>Y (501), Y>H (505), T>K (547), D>G (614), H>Y (655), N>K (679), P>H (681), N>K (764), D>Y (796), N>K (856), Q>H (954), N>K (969), L>F (981) trong đó với 3 đột biến H>Y (655), N>K (679), P>H (681) ở vị trí phân cắt furin và hai đột biến Q>R (498), N>Y (501) đã làm tăng ái lực liên kết với ACE2 của vật chủ dẫn đến làm tăng khả năng lây truyền của chúng. Trên protein ORF1a mang các đột biến thay thế aa gồm: K>R (856), L>I (2084), A>T (2710), T>I (3255), P>H (3395), I>V (3758) và đột biến không đồng nghĩa ở S2083, L3674, S3675, G3676. Protein ORF1b gồm P>L (314) và I>V (1.566). ORF9b là P>S (10), ... [26, 27].



Hình 1.6. Sự thay thế của biến thể Omicron B.1.1.529
 [Nguồn: <https://nextstrain.org/ncov/gisaid/global>]

1.2.2. Các nghiên cứu trong nước

Tại Việt Nam, ca bệnh dương tính với SARS-CoV-2 được phát hiện đầu tiên vào ngày 22 tháng 01 năm 2020 ở thành phố Hồ Chí Minh trên bệnh nhân người Trung Quốc 65 tuổi có yếu tố dịch tễ đi từ thành phố Vũ Hán, Trung Quốc và ca bệnh thứ 2 là con trai của bệnh nhân dương tính có tiền sử tiếp xúc với ca bệnh thứ nhất trong thời gian chăm sóc cha bệnh. Để tìm hiểu các mối liên quan và đặc điểm di truyền của SARS-CoV-2, nhóm nghiên cứu của Viện Pasteur thành phố Hồ Chí Minh đã tiến hành phân lập vi rút từ mẫu bệnh phẩm dịch hầu họng của hai bệnh nhân sau đó tiến hành giải trình tự và phân tích trình tự gene của vi rút với độ dài hoàn chỉnh lần lượt là 29.891 và 29.890 bp. Kết quả phân tích phát sinh loài cho thấy 2 chủng phân lập ở Việt Nam thuộc nhóm Betacoronavirus týp B và có độ tương đồng trình tự nucleotide 99,98% với các chủng được phân lập ở Vũ Hán, tương đồng 96,11% và 90,56% với SARS-CoV-1 được phân lập từ dơi và tê tê. Đặc biệt, kết quả cũng đã phát hiện trình tự của hai chủng vi rút được phân lập ở 2 bệnh nhân giống hệt nhau đây là bằng chứng về mặt di truyền cho thấy sự lây truyền SARS-CoV-2 từ người sang người. Kết quả so với trình tự tham

chiều thu được từ Vũ Hán cũng đã phát hiện được 4 đột biến thay thế nucleotide trên gene ORF1ab. Trong đó có 3 đột biến làm thay đổi acid amin gồm A thay thế G ở vị trí 8.388 dẫn đến acid amin serine bị thay thế bởi asparagin; A > T vị trí 8.987 (isoleucine thành phenylalanine) và C>T (10.232) (arginine thành cysteine) [28].

Những tháng đầu năm 2020 dịch COVID-19 bắt đầu lan rộng nhiều nơi trên thế giới với những đột biến đáng lo ngại đặc biệt là đột biến thay thế nucleotide A>G (23.403) dẫn đến thay thế aa D>G (614) trên protein S đã làm tăng khả năng lây nhiễm của SARS-CoV-2. Để đánh giá khả năng bùng phát dịch COVID-19 ở Việt Nam, nhóm nghiên cứu ở Viện Pasteur TP Hồ Chí Minh đã tiến hành phân tích đặc điểm di truyền của 27 chủng SARS-CoV-2 phân lập được từ tháng 01/2020 đến tháng 4/2020 thu được trên các bệnh nhân nhập cảnh vào Việt Nam. Kết quả đã phát hiện được 54 đột biến gồm 30 đột biến làm thay đổi aa, 19 đột biến không làm thay đổi aa và 5 đột biến ở vùng không mã hóa trên các vùng gene khác nhau ở 27 chủng thu được. Kết quả phân thành các nhánh theo Nextstrain cho thấy, 9/27 chủng thu được trước ngày 14/3/2020 thuộc nhánh 19A, 19B; 18/27 chủng thu được từ ngày 14/3/2020 thuộc nhánh 20A, 20B, 20C và 20D đều mang đột biến thay thế aa D>G (614) với đặc điểm giá trị chu kỳ ngưỡng của real time PCR < 25 điều đó đã chứng tỏ tải lượng vi rút cao dẫn đến tăng khả năng lây nhiễm [29].

Một nghiên cứu phân tích tiến hóa di truyền của SARS-CoV-2 khác được thực hiện trên 44 bệnh nhân dương tính từ đầu tháng 3 năm 2020 đang được điều trị tại Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương Hà Nội với tiền sử đi về từ Vương Quốc Anh (15 người), các nước Châu Âu khác (14), Nga (6) và các nước ở Châu Á (3). Toàn bộ bộ gene SARS-CoV-2 của những bệnh nhân này được giải trình tự sau đó tiến hành phân tích các đột biến di truyền phổ biến. Kết quả cho thấy, tất cả các bộ gene SARS-CoV-2 trên 44 bệnh nhân nghiên cứu đều có độ tương đồng trình tự nucleotide từ 92-100% với trình tự các chủng được phân lập ở Vũ Hán, Trung Quốc (32/44 chủng phân nhóm B.1.1). Nghiên cứu cũng đã phát hiện được ba đột biến thay thế nucleotide phổ biến thường xuất hiện ở các chủng có nguồn gốc từ châu Âu gồm: T

thay thế C ở vị trí 3.037; C > T (14.408) và A > G (23.403) và nhóm đột biến này thường đi kèm với đột biến C > T (241) [30].

Hoạt động phòng chống dịch COVID-19 của Việt Nam đang trên đà thu được những thành quả to lớn khi sau 99 ngày không phát hiện trường hợp lây nhiễm trong cộng đồng cũng như không ghi nhận trường hợp tử vong do SARS-CoV-2. Ngày 23/7/2020 Việt Nam bắt đầu bước vào làn sóng dịch COVID-19 thứ 2 khi phát hiện trường hợp nhiễm SARS-CoV-2 đầu tiên tại thành phố Đà Nẵng chưa xác định được nguồn lây. Từ khi phát hiện ca nhiễm đầu tiên dịch đã nhanh chóng lan rộng ra một số tỉnh miền Trung như Quảng Nam, Quảng Ngãi sau đó lan ra một số tỉnh ở miền Bắc và miền Nam với tổng số ca mắc trong đợt dịch là 1.073 ca cộng đồng, 35 trường hợp tử vong trên nền tảng người già hoặc có bệnh nền nặng [31]. Để xác định và đánh giá sự lưu hành của chủng SARS-CoV-2 của đợt dịch thứ 2, nhóm nghiên cứu của Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương đã giải trình tự gene của 26 mẫu bệnh phẩm gồm 18 mẫu được lấy ở Đà Nẵng, 8 mẫu ở các tỉnh đều có yếu tố dịch tễ liên quan đến Đà Nẵng gồm: 1 mẫu ở Hà Nam, Quảng Nam (1), Thanh Hóa (1), Hà Nội (2), Lạng Sơn (2), Hải Dương (1). Kết quả, 26 chủng thu được đều thuộc dòng B.1.1 và đều mang đột biến mới chưa được ghi nhận trong các trình tự khác trên toàn cầu là đột biến thay thế nucleotide A>C ở vị trí 12.772 dẫn đến sự thay đổi aa L>P ở vị trí 4.169 trong khung đọc mở ORF8 [32].

Trước sự lưu hành mạnh mẽ của biến thể Alpha B.1.1.7 vào những tháng cuối năm 2020 trên thế giới, ngày 25/12/2020 Việt Nam phát hiện ca nhiễm SARS-CoV-2 trên bệnh nhân nhập cảnh có tiền sử đi về từ Vương Quốc Anh. Để đánh giá khả năng du nhập biến thể Alpha B.1.1.7 vào Việt Nam, nhóm nghiên cứu của Viện Pasteur TP Hồ Chí Minh tiến hành giải trình tự gene của chủng thu được trên bệnh nhân trên và kết quả thu được là biến thể Alpha B.1.1.7 với nhiều đột biến đặc trưng ở các protein như xóa đoạn 69-70 và 144, thay thế aa N>Y (501), A>D (570), D>G (614), P>H (681), T>I (716), S>A (982) và D>H (1.118) trên protein S; Q27 dừng, R>I (52) và Y>C (73) trên ORF8 và protein N mang các đột biến D>L (3), R>K (203), G>R (204) và S>F (235) [33].

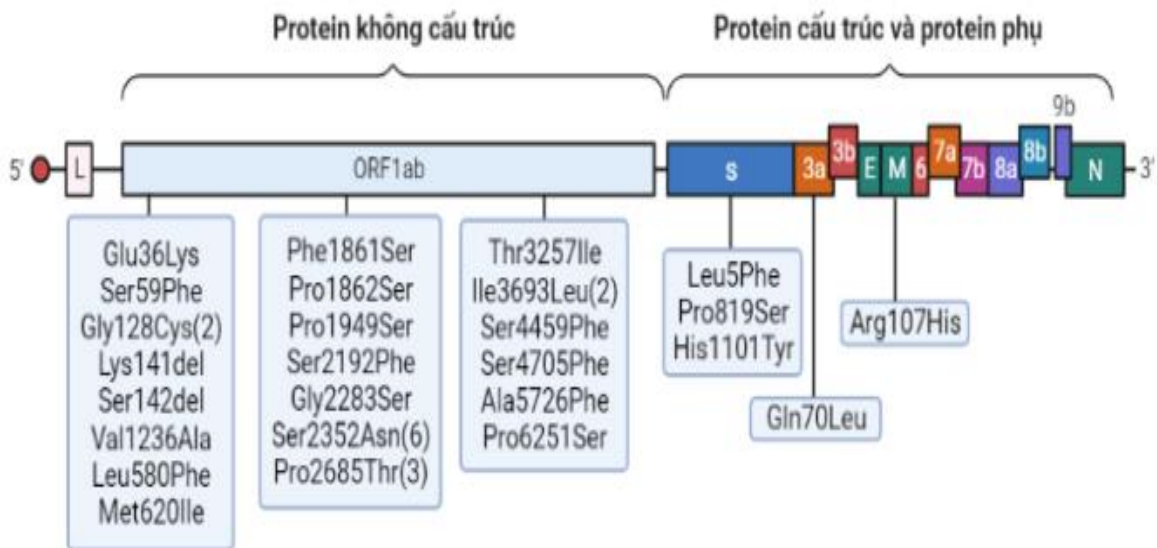
Nhằm đánh giá sự lưu hành của các biến thể ở miền Bắc và miền Trung qua 3 giai đoạn dịch COVID-19 tại Việt Nam từ tháng 01/2020 đến tháng 4/2021, Nguyễn Vũ Sơn và cộng sự [34] đã tiến hành nghiên cứu đặc điểm di truyền của 339 mẫu bệnh phẩm dương tính với SARS-CoV-2 được thu thập từ Trung tâm Kiểm soát bệnh tật và bệnh viện một số tỉnh ở miền Bắc và miền Trung. Kết quả giải trình tự gene trên hệ thống máy iSeq 100 của Illumina thu được 267 trình tự hoàn chỉnh (211 cộng đồng, 56 nhập cảnh) trong đó biến thể Alpha B.1.1.7 chiếm tỷ lệ cao nhất (44,19%) chủ yếu là phát hiện ở giai đoạn 3 của dịch tại Việt Nam (66,95%).

Với những thành công trong kiểm soát dịch COVID-19 năm 2020, năm 2021 Việt Nam tiếp tục trải qua một đợt bùng phát dịch diện rộng trên toàn quốc với TP Hồ Chí Minh và các tỉnh phía Nam là chịu tổn thất nặng nề nhất và được chia thành 2 giai đoạn rõ rệt: giai đoạn 1 từ tháng 1 đến tháng 4 (0 tử vong/1.632 ca nhiễm); giai đoạn 2 từ tháng 6 đến tháng 12 (32.359 tử vong/1.727.398 ca nhiễm). Để đánh giá sự lưu hành các biến thể của SARS-CoV-2 trong năm 2021, nhóm nghiên cứu của Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương ở Hà Nội và Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới ở thành phố Hồ Chí Minh đã tiến hành giải trình tự 1.365 mẫu bệnh phẩm dương tính và đã thu được 1.303 trình tự bộ gene hoàn chỉnh của SARS-CoV-2. Trong đó biến thể Delta B.1.617.2 chiếm tỷ lệ cao nhất (93,8%) và là biến thể duy nhất từ tháng 6/2021 trở đi. Trong 1.222 mẫu thuộc biến thể Delta B.1.617.2 thu được chủ yếu là dòng AY.57 (99,2%) tiếp đến dòng AY.23 và AY.79 đều phát hiện được 3 mẫu và ghi nhận được 1 mẫu ở các dòng AY.6, AY.38, AY.85 [35].

Một nghiên cứu xác định biến thể SARS-CoV-2 khác trên 179 bệnh nhân nằm viện điều trị COVID-19 tại Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương từ tháng 4/2020 đến tháng 4/2021 của nhóm nghiên cứu thuộc Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương đã phát hiện được 121 mẫu biến thể Delta bao gồm 116 thuộc nhánh 21I dòng AY.57, 2 mẫu thuộc nhánh 21A và 3 mẫu thuộc nhánh 21J; 54 biến thể Alpha B.1.1.7 và 4 mẫu thuộc nhánh 20B dòng B.1.1 [36]. Nghiên cứu cũng phát hiện nhóm biến thể Alpha B.1.1.7 mang 6 đột biến mất điểm và 24 đột biến thay thế; nhóm biến thể Delta B.1.617.2 mang 5 đột biến mất điểm và 24 đột biến thay thế và dòng B.1.1 mang hai

đột biến thay thế. Khi so sánh các đột biến của hai biến thể Alpha và Delta cũng phát hiện có 4 đột biến thay thế nucleotide chung ở các gene G>A/T (vị trí 28.881) trên gene N; C>T (14.408) trên gene ORF1b và A>G (23.403) và C>A (23.604) trên gene S [36].

Tỉnh Bắc Giang là tâm dịch xuất hiện sớm trong làn sóng thứ 4 của dịch COVID-19 tại Việt Nam với ca nhiễm cũng như tử vong tăng cao. Để xác định các biến thể SARS-CoV-2 lưu hành tại Bắc Giang, nhóm nghiên cứu của Trường Đại học Khoa học Tự nhiên thuộc Đại học Quốc gia Hà Nội đã tiến hành giải trình tự gene trên 38 mẫu bệnh phẩm thu được tại khu công nghiệp Tây Sơn, tỉnh Bắc Giang từ tháng 5-6/2021. Kết quả thu được 38 mẫu bệnh phẩm đều thuộc biến thể Delta B.1.617.2 với 37 mẫu mang 16 đột biến đặc trưng và 1 mẫu mang 15 đột biến đặc trưng của biến thể Delta trên khung đọc mở 5'URT, 3' UTR và các protein ORF1ab, ORF3a, ORF7a, ORF8, ORF9b, S và RdRp và nghiên cứu cũng phát hiện được 27 đột biến đặc thù mới xuất hiện trên 38 mẫu phát hiện ở Bắc Giang (hình 1.7) [37].



Hình 1.7. Các đột biến đặc thù của biến thể Delta B.1.617.2 trên 38 mẫu thu được ở Bắc Giang từ tháng 5 – 6/2021 [37]

Qua các nghiên cứu trong nước, nhận thấy tình hình dịch COVID-19 tại Việt Nam từ sau khi phát hiện ca nhiễm đầu tiên trên 2 bệnh nhân người Trung Quốc du lịch tới TP Hồ Chí Minh, Việt Nam đã trải qua 4 giai đoạn bùng phát dịch với quy mô, địa bàn, mức độ lây lan và hậu quả của giai đoạn sau đều phức tạp hơn giai đoạn trước [31]. Bốn giai đoạn dịch bao gồm:

- Giai đoạn 1 từ ngày 22/01/2020 đến 22/7/2020: ghi nhận 415 ca mắc (309 ca cộng đồng, 106 ca nhập cảnh), giai đoạn này chỉ phát hiện các ổ dịch nhỏ và rải rác trong nước và không có ca tử vong.

- Giai đoạn 2 từ ngày 23/7/2020 đến ngày 27/01/2021 ghi nhận 1.136 ca nhiễm với 1.073 ca cộng đồng và 35 ca tử vong trên nền tảng có bệnh nền nặng hoặc người già lớn tuổi. Giai đoạn này được bắt đầu khi phát hiện trường hợp 1 bệnh nhân dương tính không rõ nguồn lây ở thành phố Đà Nẵng vào ngày 23/07/2020, sau đó lan rộng khắp thành phố và chỉ mấy ngày sau đã lan ra một số tỉnh trong nước đều có yếu tố dịch tễ liên quan đến thành phố Đà Nẵng như Quảng Nam, Quảng Ngãi, Hà Nội,

- Giai đoạn 3 từ ngày 28/01/2021 đến ngày 26/4/2021 với phát hiện 1.301 ca nhiễm (910 ca cộng đồng, 391 ca nhập cảnh) tại 13 tỉnh, thành phố.

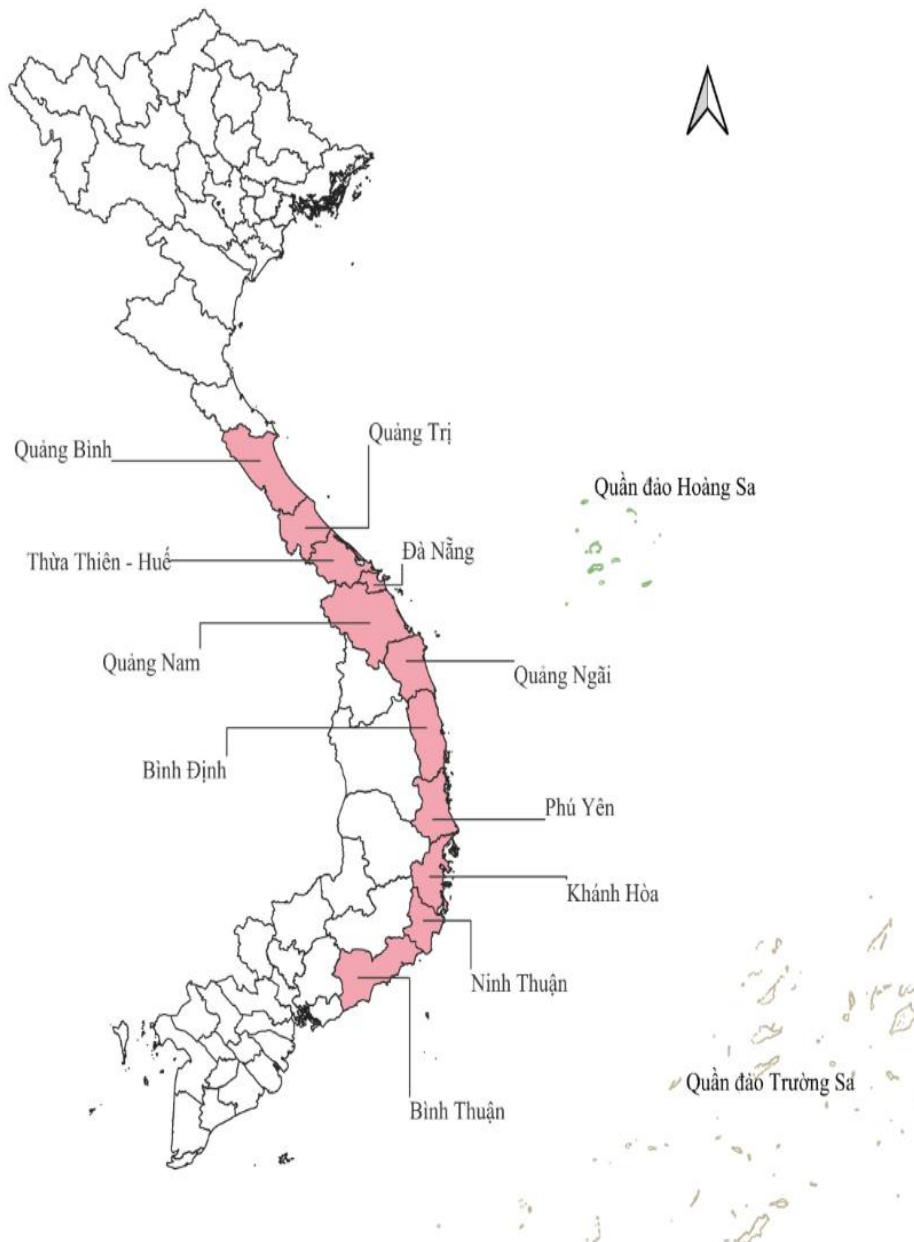
- Giai đoạn 4 từ 27/4/2021 đến nay và được chia thành 2 thời kỳ với sự lưu hành chính của 2 biến thể là Delta B.1.617.2 và Omicron B.1.1.529. Thời kỳ từ 27/4/2021 đến 10/11/2021 với 43.160/998.054 ca tử vong và tập trung chủ yếu các tỉnh miền Nam, miền Trung và một số địa phương của Hà Nội, Nghệ An, Hà Giang, giai đoạn này biến thể Delta B.1.617.2 là biến thể lưu hành chính. Thời kỳ từ 12/10/2021 đến nay dịch đã lan rộng ra cả nước với 10.694.967 ca mắc (10.691.666 ca cộng đồng, 3.301 ca nhập cảnh) và 22.516 ca tử vong với biến Omicron B.1.1.529 chiếm ưu thế.

Cùng với tình hình dịch COVID-19 trong cả nước, khu vực miền Trung từ Quảng Bình đến Bình Thuận tình hình dịch cũng diễn biến phức tạp với tâm dịch ở Đà Nẵng vào giai đoạn 2 và sự bùng phát dịch khắp miền Trung ở giai đoạn 4 nhưng đến thời điểm này vẫn chưa có nghiên cứu nào về đặc điểm di truyền và tiến hóa của SARS-CoV-2 tại khu vực miền Trung nên chưa cung cấp được cơ sở dữ liệu khoa học về đặc điểm di truyền của vi rút tại khu vực này. Vì vậy, việc nghiên cứu đặc điểm tiến hóa di truyền của SARS-CoV-2 tại khu vực miền Trung Việt Nam có ý nghĩa khoa học rất lớn trong việc cung cấp thông tin về di truyền của vi rút qua đó phục vụ tốt cho hoạt động phòng chống dịch COVID-19 trong khu vực cũng như trên toàn quốc.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Các mẫu bệnh phẩm dịch hầu họng của các bệnh nhân COVID-19 tại khu vực miền Trung Việt Nam được khẳng định dương tính SARS-CoV-2 bằng kỹ thuật real time RT-PCR tại Khoa Vi sinh miễn dịch, Viện Pasteur Nha Trang năm 2020.



Hình 2.1. Địa điểm thu thập mẫu nghiên cứu

2.2. HÓA CHẤT, TRANG THIẾT BỊ VÀ BỘ GENE THAM CHIẾU

2.2.1. Hóa chất sử dụng

- QiAamp Viral RNA Mini Kit	QiAgen/ Đức
- Ethanol 99,9%	Merck/ Đức
- Super Script III Platinum One step qRT-PCR	Invitron/ Đức
- Môi xuôi gene E SARS-CoV-2	IDT
- Môi ngược gene E SARS-CoV-2	IDT
- Mẫu dò gene E SARS-CoV-2	IDT
- ARTIC primer V3	IDT
- Nextera XT DNA library Prep kit	Illumina/ Mỹ
- Nextera XT Index Kit v2 Set A	Illumina/ Mỹ
- MiSeq Reagent Micro Kit v2 (300-cycles)	Illumina/ Mỹ
- AMPure XP	Beckman Coulter/ Mỹ
- PhiX Control v3	Illumina/ Mỹ
- Qubit dsDNA HS Assay Kit	Thermo/Mỹ
- Tween 20	Sigma/ Mỹ
- Nước sinh học phân tử	Promega

2.2.2. Trang thiết bị

- Máy lắc trộn	Biorad/Mỹ
- Máy ly tâm lạnh	Eppendorf/ Đức
- Máy ly tâm thường	Hermal/ Đức

- Tủ An toàn sinh học cấp II	Esco/ Singapore
- Tủ thao tác PCR	Telstar/ Tây Ban Nha
- Máy luân nhiệt PCR	ABI/ Singapore
- Máy real time PCR	ABI/ Singapore
- Máy Qubit 4 Fluorometer	Thermo/Mỹ
- Máy giải trình tự gene MiSeq	Illumina, Mỹ

2.2.3 Trình tự gene SARS-CoV-2 tham chiếu

Các trình tự của các chủng tham chiếu trên thế giới và trong nước như trình tự của chủng phát hiện đầu tiên tại thành phố Vũ Hán và trình tự một số biến thể được tham khảo trên GISAID [39].

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.3.1. Thu thập thông tin ca bệnh dương tính với SARS-CoV-2

Thu thập thông tin các ca bệnh dương tính SARS-CoV-2 năm 2020 được lưu mẫu tại Viện Pasteur Nha Trang (đối với các ca dương năm 2021 chúng tôi chỉ mở rộng giám sát tiến hóa di truyền của vi rút nên sẽ không thu thập thông tin dịch tễ), các thông tin thu thập gồm:

- Đặc điểm nhân khẩu gồm: giới tính, tuổi, địa chỉ.
- Đặc điểm dịch tễ gồm: đối tượng là cộng đồng hay nhập cảnh, nước nào nhập cảnh về Việt Nam; sự tiếp xúc giữa các đối tượng, ngày khởi phát, ngày được lấy mẫu và tình trạng sống/chết của đối tượng nghiên cứu...

2.3.2. Thực hiện kỹ thuật real time RT-PCR phát hiện các mẫu dương tính SARS-CoV-2

Xác định sự hiện diện của vi rút SARS-CoV-2 trong mẫu bệnh phẩm bằng kỹ thuật real time RT-PCR với trình tự mồi và mẫu dò (phụ lục 1) đặc hiệu cho vi rút SARS-CoV-2 theo công bố của nhóm tác giả thuộc Viện nghiên cứu Berlin mà sau đó được Tổ chức Y tế Thế giới khuyến cáo sử dụng

cho chẩn đoán nhiễm SARS-CoV-2 [40]. Quy trình gồm các bước: (1) tách chiết RNA bằng bộ sinh phẩm QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN); (2) 5 μ l sản phẩm tách chiết được cho vào hỗn hợp phản ứng theo bộ sinh phẩm Superscript III platinum qRT-PCR (Invitrogen) gồm: 4,1 μ l H₂O, 12,5 μ l buffer, 0,4 μ l MgSO₄, 0,5 μ l môi xuôi, 0,5 μ l môi ngược, 0,5 μ l mẫu dò, 0,5 μ l hỗn hợp enzyme; (3) phản ứng real time RT-PCR được thực hiện trên máy ABI 7500 Fast real time PCR với chu trình nhiệt: 55⁰C/10 phút, 94⁰C/3 phút, 45 chu kỳ của 94⁰C/15 giây, 58⁰C/30 giây. Các mẫu bệnh phẩm được đánh giá là dương tính với SARS-CoV-2 khi có đường khuếch đại đặc trưng và có giá trị chu kỳ ngưỡng của kỹ thuật real time RT-PCR nhỏ hơn 40; nghi ngờ khi giá trị ngưỡng ≥ 40 và âm tính khi không có đường khuếch đại đặc trưng được áp dụng tại khoa Vi sinh miễn dịch, Viện Pasteur Nha Trang. Nhằm đủ nồng độ RNA cho giải mã gen, các mẫu có giá trị chu kỳ ngưỡng ≤ 30 và đường khuếch đại đặc trưng sẽ được chọn giải trình tự gene.

2.3.3. Khuếch đại bộ gene SARS-CoV-2 các mẫu có ct value ≤ 30

Tiến hành khuếch đại toàn bộ bộ gene SARS-CoV-2 đối với các mẫu dương tính với kỹ thuật real time RT-PCR có ct value ≤ 30 được sử dụng cho mục đích giải mã gene vi rút bao gồm các bước:

- Tổng hợp cDNA từ các RNA có giá trị ct value ≤ 30 .
- Thực hiện phản ứng PCR bằng 109 cặp mồi ARTIC V3 (phụ lục 2) [41] nhằm khuếch đại toàn bộ bộ gene SARS-CoV-2. Quy trình gồm các bước: (1) 2,5 μ l sản phẩm cDNA cho vào hỗn hợp phản ứng gồm 19 μ l Platinum PCR SuperMix High Fidelity, 3,6 μ l môi xuôi và môi ngược pool ARTIC V3 pool; (2) phản ứng PCR được thực hiện trên máy luân nhiệt PCR của hãng ABI với chu trình nhiệt: 94⁰C/2 phút; 30 chu kỳ của 94⁰C/15 giây, 55⁰C/30 giây, 68⁰C/5 phút; 68⁰C/15 phút
- Tinh sạch sản phẩm PCR bằng sinh phẩm AMPure XP.

2.3.4. Tạo thư viện bộ gene SARS-CoV-2

Tạo thư viện bộ gene SARS-CoV-2 của các mẫu bằng bộ sinh phẩm Nextera XT DNA library Prep kit của hãng Illumina/Mỹ gồm các bước:

- Cắt bộ gene SARS-CoV-2 ở các sản phẩm PCR thu được bằng enzyme cắt thành các đoạn DNA có chiều dài từ 300-400bp.
- Gắn index I7 và I5 vào các đoạn DNA của các mẫu sao cho một trong hai index I7, I5 khác nhau ở các mẫu.
- Tinh sạch sản phẩm DNA đã gắn index bằng sinh phẩm AMPure XP.
- Đo hàm lượng DNA cho từng mẫu bằng bộ sinh phẩm Qubit dsDNA HS Assay kit trên thiết bị đo Qubit 4 Fluorometer của hãng Thermo/Mỹ.
- Pha loãng các mẫu về nồng độ 4nM.

2.3.5. Giải trình tự bộ gene SARS-CoV-2 trên máy MiSeq/Mỹ

- Trộn 5 µl các mẫu nồng độ 4nM lại với nhau thành thư viện pool.
- Biến tính thư viện pool thành mạch đơn bằng 5 µl NaOH ở nồng độ 0,1M theo tỷ lệ 1:1.
- Dừng quá trình biến tính DNA thành mạch đơn bằng bộ sinh phẩm MiSeq Reagent Micro Kit v2/Mỹ thu được nồng độ thư viện 20pM.
- Đưa thư viện pool 20pM về 12pM.
- Tiến hành giải trình tự gene trên hệ máy MiSeq/Mỹ với bộ sinh phẩm MiSeq Reagent Micro Kit v2/Mỹ.
- Lắp ráp thành bộ gene hoàn chỉnh của SARS-CoV-2 bằng phần mềm <https://basespace.illumina.com> của hãng Illumina/Mỹ.
- Toàn bộ quá trình được thực hiện tại Khoa Vi sinh miễn dịch, Viện Pasteur Nha Trang.

2.3.6. Phân tích tiến hóa di truyền của SARS-CoV-2

- Định danh dòng SARS-CoV-2 của các mẫu thu nhận được bằng phần mềm Pangolin trực tuyến (<https://pangolin.cog-uk.io/>).
- So sánh trình tự gene của SARS-CoV-2 được phát hiện ở khu vực miền Trung Việt Nam năm 2020 với trình tự chủng gốc được phát hiện ở Vũ Hán và các nước trên thế giới (như châu Âu, châu Mỹ,

châu Á) bằng phần mềm trực tuyến NextClade tại <https://clades.nextstrain.org/>.

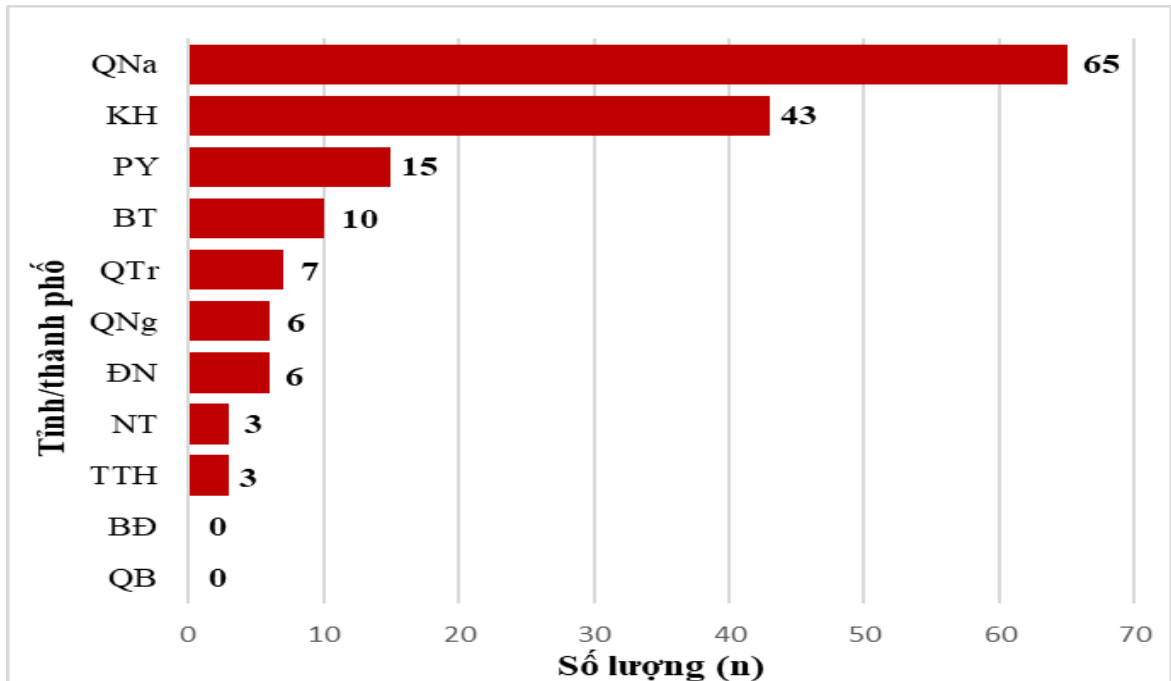
- So sánh trình tự gene của SAR-CoV-2 giữa đợt bùng phát dịch giai đoạn 1 (22/01/2020 đến 22/7/2020) với đợt bùng phát dịch giai đoạn 2 (23/7/2020 đến ngày 31/12/2020).
- So sánh trình tự gene của vi rút được phát hiện trên những ca bệnh trong cộng đồng với những ca bệnh nhập cảnh vào Việt Nam.
- So sánh trình tự gene của vi rút ở những ca tiếp xúc với nhau.
- Vẽ cây tiến hóa di truyền của SARS-CoV-2 ở khu vực miền Trung Việt Nam năm 2020 bằng phần mềm trực tuyến tại <https://clades.nextstrain.org/>.
- Phát hiện đột biến của SARS-CoV-2 ở các chủng bằng phần mềm trực tuyến tại <https://clades.nextstrain.org/>
- Các đột biến ở các chủng so với chủng gốc Vũ Hán sẽ được phát hiện bằng phần mềm trực tuyến CoV-GLUE tại <http://cov-glue.cvr.gla.ac.uk/>

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH ĐẶC ĐIỂM NHÂN KHẨU VÀ DỊCH TỄ MẪU NGHIÊN CỨU NĂM 2020

3.1.1. Số lượng chủng SARS-CoV-2 năm 2020 tại khu vực miền Trung Việt Nam giải trình tự gene thành công

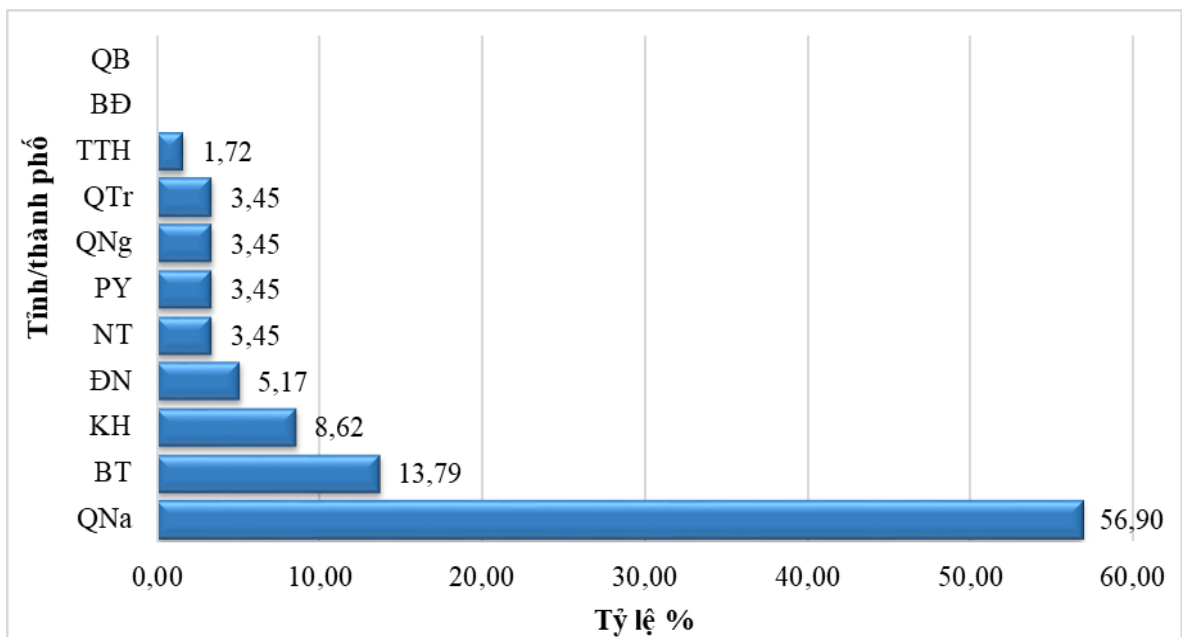
Viện Pasteur Nha Trang là đơn vị trực thuộc Bộ Y tế được giao nhiệm vụ hỗ trợ hoạt động phòng chống dịch các tỉnh miền Trung Việt Nam từ Quảng Bình vào đến Bình Thuận. Năm 2020, Viện Pasteur Nha Trang đã xét nghiệm khẳng định được 158 trường hợp dương tính với SARS-CoV-2. Trong đó Quảng Nam (65), Khánh Hòa (43) là hai tỉnh có số lượng nhiều nhất (hình 3.1).



Hình 3.1. Số lượng mẫu dương SARS-CoV-2 lưu tại Viện Pasteur Nha Trang năm 2020

Hoạt động giám sát biến chủng SARS-CoV-2 có ý nghĩa rất lớn trong công tác phòng chống dịch COVID-19 trong cả nước cũng như khu vực miền Trung Việt Nam. Được sự hỗ trợ của US.CDC, nhóm nghiên cứu chúng tôi đã tiến hành giải trình tự gene của 60 mẫu có giá trị ct value ≤ 30 và thu được 58 trình tự SARS-CoV-2 hoàn chỉnh trên 58 đối tượng trong năm 2020, 2 trình tự gen có độ bao phủ không đạt nên bị loại khỏi nghiên cứu. Trong đó, tỉnh Quảng Nam có số lượng trình tự thu được nhiều nhất chiếm tỷ lệ 56,90% đến

Bình Thuận (13,79%); Khánh Hòa (8,62%); Đà Nẵng (5,17%); 3,45% ở các tỉnh Quảng Trị, Quảng Ngãi, Phú Yên, Ninh Thuận; 1,72% Thừa Thiên Huế và không thu được trình tự gene SARS-CoV-2 ở các tỉnh Quảng Bình và Bình Định (hình 3.2). Những tháng đầu năm 2020 các ca nghi COVID-19 đều gửi mẫu về Viện Pasteur Nha Trang, thời điểm đó hai tỉnh Quảng Bình và Bình Định không phát hiện ca dương tính SARS-CoV-2 và sau khi dịch bùng phát mạnh ở Đà Nẵng các tỉnh/thành phố nhanh chóng thành lập các phòng xét nghiệm khẳng định dương tính SARS-CoV-2. Vì vậy, những tháng cuối năm 2020 các tỉnh/thành phố đã không gửi mẫu về Viện Pasteur Nha Trang nên hai tỉnh này không có mẫu dương tính lưu tại Khoa Vi sinh miễn dịch, Viện Pasteur Nha Trang đây là hạn chế của nghiên cứu khi không thu đầy đủ trình tự gene SARS-CoV-2 của 11 tỉnh miền Trung Việt Nam năm 2020.

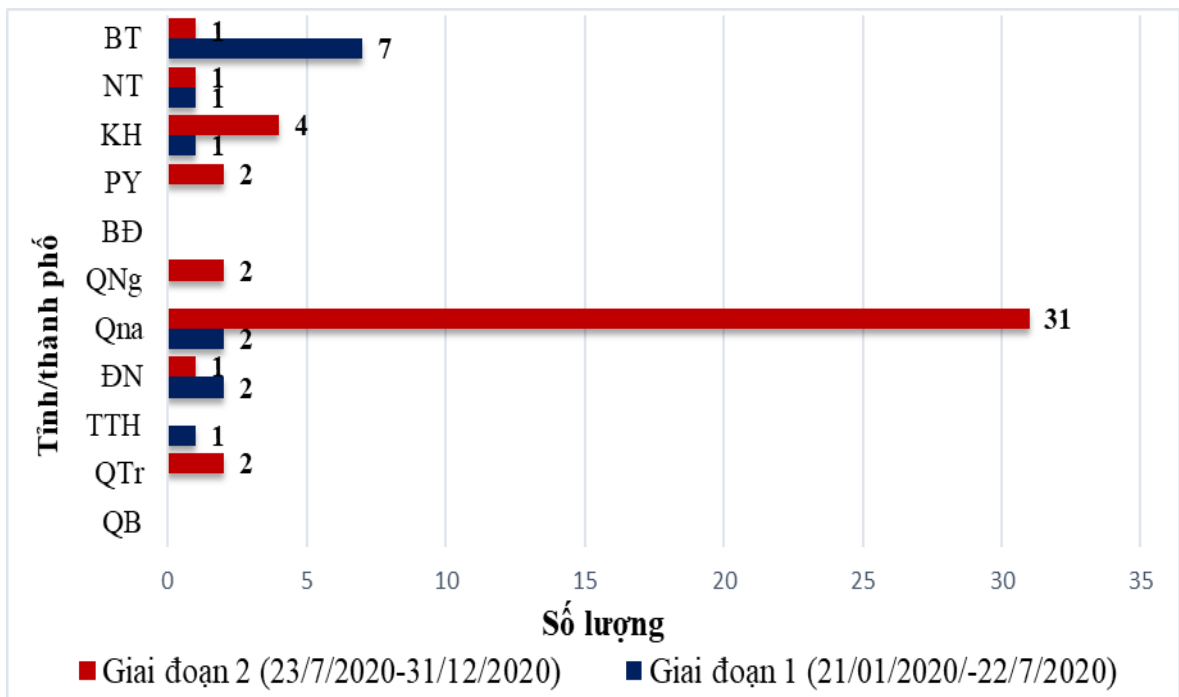


Hình 3.2. Số lượng trình tự bộ gene SARS-CoV-2 năm 2020 thu được ở khu vực miền Trung Việt Nam

3.1.2. Số lượng chủng SARS-CoV-2 thu được theo từng giai đoạn dịch COVID-19 của khu vực miền Trung năm 2020

Trong năm 2020, Khu vực miền Trung Việt Nam trải qua hai giai đoạn bùng phát dịch với quy mô, địa bàn, mức độ lây lan và hậu quả của giai đoạn sau phức tạp hơn giai đoạn trước. Giai đoạn một bắt đầu từ ngày 21/01/2020 đến 22/7/2020 khi phát hiện một ca nhiễm SARS-CoV-2 có tiền sử tiếp xúc với du khách người Trung Quốc dương tính được phát hiện đầu tiên ở thành

phố Hồ Chí Minh và giai đoạn hai bắt đầu từ ngày 23/07/2020 đến 31/12/2020 khi phát hiện một trường hợp dương tính SARS-CoV-2 trong cộng đồng không rõ nguồn lây tại thành phố Đà Nẵng. Sau đó, thành phố Đà Nẵng trở thành tâm dịch trong làn sóng thứ 2 và dịch COVID-19 nhanh chóng lan rộng ra một số tỉnh miền Trung như Quảng Nam, Quảng Ngãi, Quảng Trị, Khánh Hòa, Nghiên cứu này chúng tôi cũng thu được trình tự gene SARS-CoV-2 chủ yếu ở giai đoạn hai với 44 trình tự chiếm tỷ lệ 75,86% và tập trung chủ yếu ở Quảng Nam (70,46%) (hình 3.3). TP Đà Nẵng là tâm dịch trong làn sóng thứ hai tuy nhiên chúng tôi không thu được nhiều trình tự gene SARS-CoV-2 của Đà Nẵng do để đáp ứng với công tác phòng chống dịch khẩn cấp Bộ Y tế đã chỉ đạo khẩn trương thành lập nhiều phòng xét nghiệm khẳng định dương tính với SARS-CoV-2 tại thành phố vào thời điểm bùng phát dịch vì vậy mẫu bệnh phẩm không gửi về Viện Pasteur Nha Trang trong giai đoạn này mà chỉ gửi 1 mẫu của đối tượng dương tính không rõ nguồn lây đầu tiên nhằm khẳng định lại kết quả và xác định biến thể của SARS-CoV-2. Đây là hạn chế của nghiên cứu vì chưa thu được nhiều số lượng chủng tại tâm dịch Đà Nẵng vì vậy không đủ dữ liệu cho quá trình đánh giá sự tiến hóa của SARS-CoV-2 tại thành phố Đà Nẵng.



Hình 3.3. Số lượng trình tự bộ gene SARS-CoV-2 khu vực miền Trung thu được trong giai đoạn một và giai đoạn hai dịch COVID-19 năm 2020

3.1.3. Đặc điểm giới tính đối tượng nghiên cứu

Xét về giới tính của 58 đối tượng nghiên cứu, giới tính nam có sự tương đồng ở hai giai đoạn dịch với tỷ lệ lần lượt là 42,86% (giai đoạn 1 với số ca là 14); 43,18% (giai đoạn 2 với số ca là 44) và tương tự giới tính nữ chiếm tỷ lệ lần lượt ở hai giai đoạn là 57,14% và 56,82% (bảng 3.1).

Bảng 3.1. Kết quả phân theo giới tính của đối tượng nghiên cứu

Giới tính	Giai đoạn 1		Giai đoạn 2	
	Số mẫu (n)	Tỷ lệ %	Số mẫu (n)	Tỷ lệ %
Nam	6	42,86	19	43,18
Nữ	8	57,14	25	56,82
Tổng	14		44	

3.1.4. Đặc điểm nhóm tuổi đối tượng nghiên cứu

58 đối tượng trong nghiên cứu có độ tuổi trung bình 45,9 với nhỏ nhất là 2 tuổi và lớn nhất là 100 tuổi và nhóm tuổi trong độ tuổi lao động từ 18 đến 60 tuổi chiếm tỷ lệ cao nhất (63,79%) tiếp đến nhóm tuổi trong độ tuổi nghỉ hưu (25,86%) và chỉ phát hiện được 1 trường hợp 2 tuổi (bảng 3.2). Với nhóm tuổi trong độ tuổi lao động chiếm tỷ lệ cao nhất do mẫu thu được trong nghiên cứu chủ yếu là trong cộng đồng và nhóm tuổi trong độ tuổi lao động có giao tiếp nhiều hơn.

Bảng 3.2. Đặc điểm nhóm tuổi nghiên cứu

Nhóm tuổi	0 - < 6	6 - < 18	18 - ≤ 60	≥ 60
Số chủng thu được (n)	1	5	37	15
Tỷ lệ %	1,72	8,62	63,79	25,86

3.1.5. Tình trạng sống/chết của đối tượng nghiên cứu

3/58 đối tượng trong nghiên cứu tử vong gồm Quảng Nam (2 đối tượng) và Quảng Trị (1 đối tượng) trên nền tảng có bệnh nền và lớn tuổi gồm suy tim và suy thận mạn tính (1); già lớn tuổi (1) và 1 đối tượng bị đái tháo đường. Các

trường hợp tử vong đều là ca cộng đồng thuộc giai đoạn 2 của dịch và liên quan đến tâm dịch Đà Nẵng.

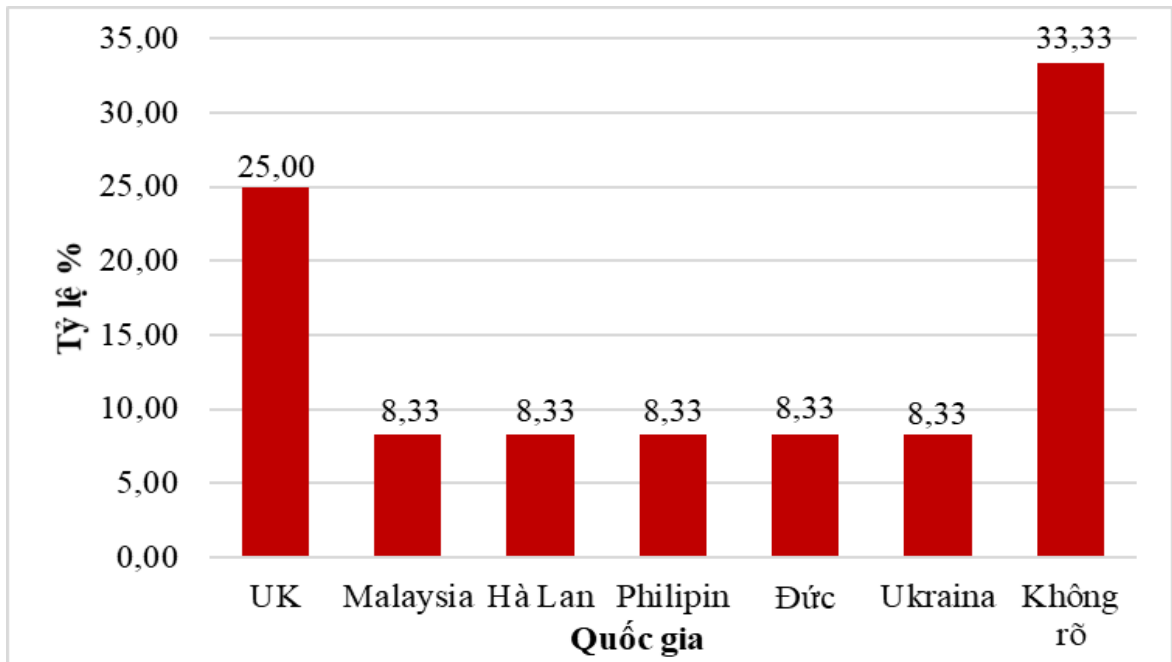
3.1.6. Kết quả phân tích đối tượng cộng đồng và nhập cảnh

58 trình tự gene SARS-CoV-2 được thu thập chủ yếu trên các đối tượng trong cộng đồng chiếm tỷ lệ 79,31%. Trong đó giai đoạn 1 chiếm tỷ lệ 64,29%; giai đoạn 2 có 37 đối tượng (84,09%) (bảng 3.3). Số lượng mẫu cộng đồng thu được ở giai đoạn hai nhiều hơn do giai đoạn này dịch bùng phát mạnh trong cộng đồng với 1.073 ca phát hiện [31] và tâm dịch là thành phố Đà Nẵng sau đó đến Quảng Nam, Quảng Ngãi là 2 tỉnh chịu ảnh hưởng nhiều nhất.

Bảng 3.3. Số lượng ca nhập cảnh và cộng đồng qua hai giai đoạn dịch

Đối tượng	Giai đoạn 1		Giai đoạn 2	
	Số mẫu (n)	Tỷ lệ %	Số mẫu (n)	Tỷ lệ %
Nhập cảnh	5	35,71	7	15,91
Cộng đồng	9	64,29	37	84,09
Tổng	14		44	

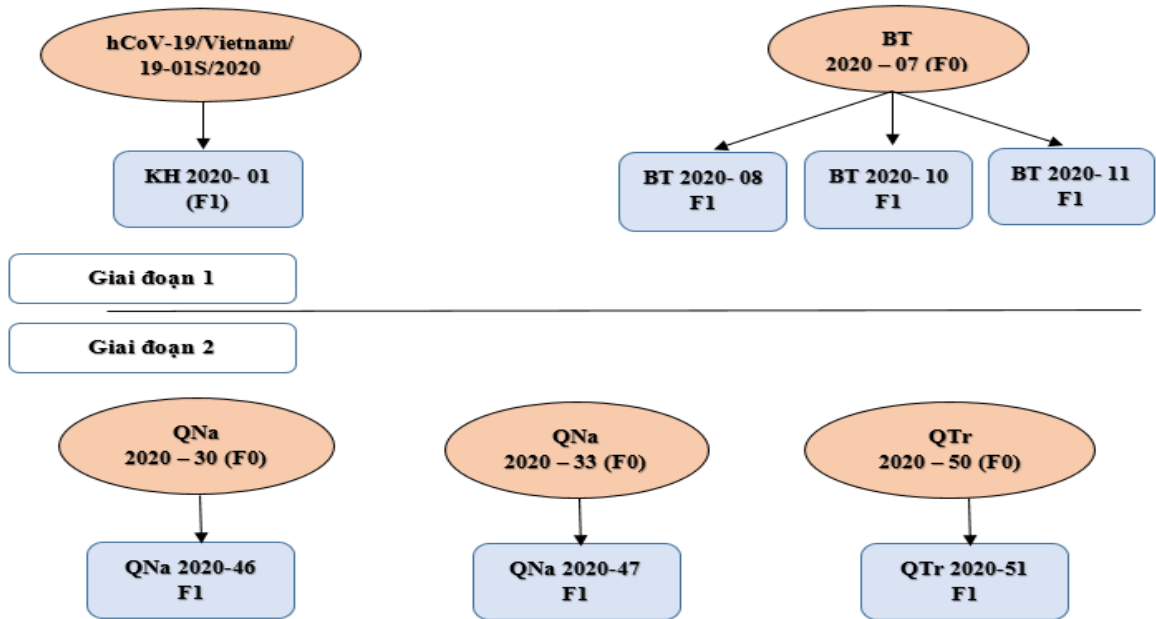
12 đối tượng nhập cảnh trong đó, nhập cảnh từ Vương Quốc Anh có 3 trường hợp chiếm tỷ lệ 25%; 8,33% ở các quốc gia Malaysia, Hà Lan, Philippin, Đức, Ukraina và 33,33% đối tượng không có thông tin dịch tễ quốc gia xuất cảnh về Việt Nam (hình 3.4). Đây là hạn chế của nghiên cứu vì các trường hợp này đều được thu thập từ tháng 8-12/2020 đây là thời điểm các đơn vị TTKSBT các tỉnh miền Trung khẩn trương phòng chống dịch COVID-19 đang lan rộng ra cộng đồng nên không thu thập đầy đủ thông tin quốc gia xuất cảnh của các đối tượng này và thời điểm này cũng có quy định của Bộ Y tế về việc cách ly các ca nhập cảnh vào Việt Nam ở các khu cách ly tập trung vì vậy thông tin các đối tượng nhập cảnh thu thập không đầy đủ.



Hình 3.4. Kết quả thu thập thông tin quốc gia xuất cảnh của các ca nhập cảnh

3.1.7. Kết quả phân tích ca tiếp xúc

Kết quả thu thập thông tin dịch tễ tiếp xúc của các đối tượng nghiên cứu từ phiếu điều tra của các tỉnh/thành phố gửi mẫu đã phát hiện, 3 đối tượng là F1 cùng tiếp xúc chung một F0 ở Bình Thuận trong giai đoạn 1 của dịch; 3 đối tượng là F1 của các F0 khác nhau ở Quảng Nam (2) và Quảng Trị (1) nhưng đều liên quan đến tâm dịch Đà Nẵng. Đặc biệt, chúng tôi cũng đã giải trình tự thành công ca cộng đồng đầu tiên tại Việt Nam được phát hiện tại Khánh Hòa là ca tiếp xúc với du khách người Trung Quốc du lịch đến Việt Nam được xác định dương tính vào ngày 22/01/2020 (hình 3.5.). Tuy nhiên, để khẳng định các trường hợp trên là F1 thì cần phải có kết quả phân tích đặc điểm di truyền cũng như cây phát sinh loài của các chủng thu được.

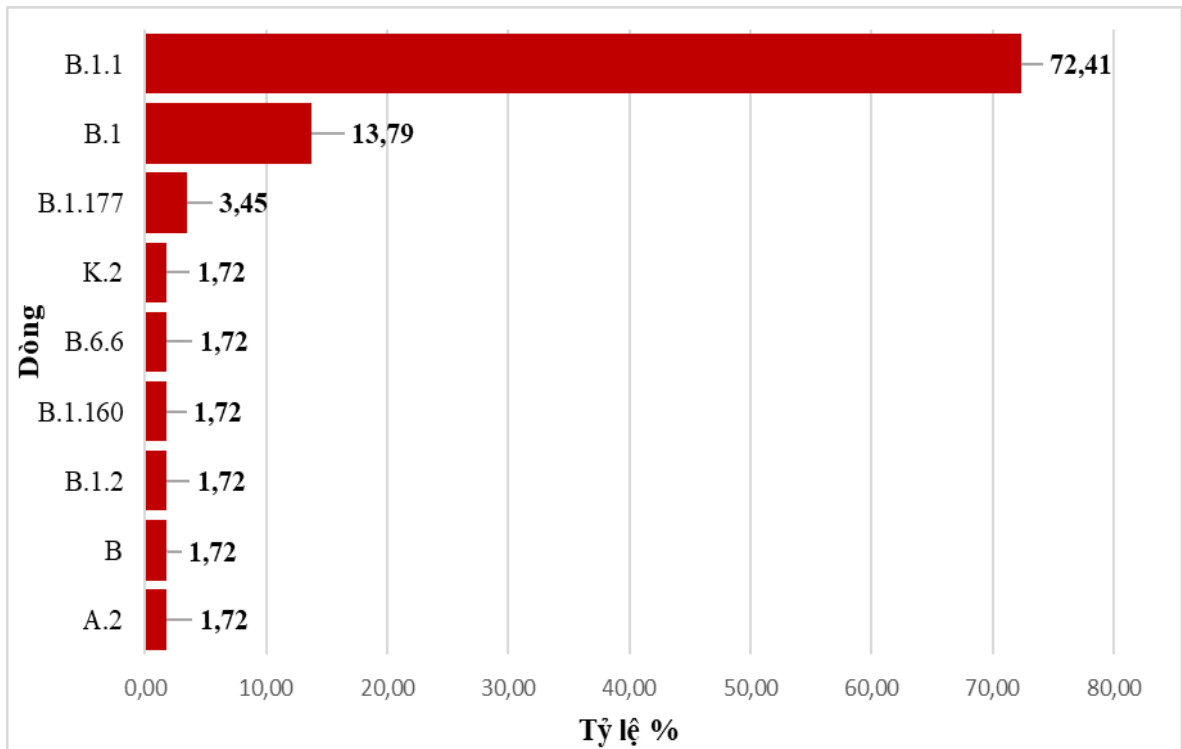


Hình 3.5. Kết quả thu thập thông tin dịch tễ của các ca tiếp xúc

3.2. PHÂN TÍCH ĐẶC ĐIỂM DI TRUYỀN SARS-COV-2 KHU VỰC MIỀN TRUNG VIỆT NAM NĂM 2020

3.2.1. Kết quả định danh các chủng SARS-CoV-2 khu vực miền Trung Việt Nam năm 2020

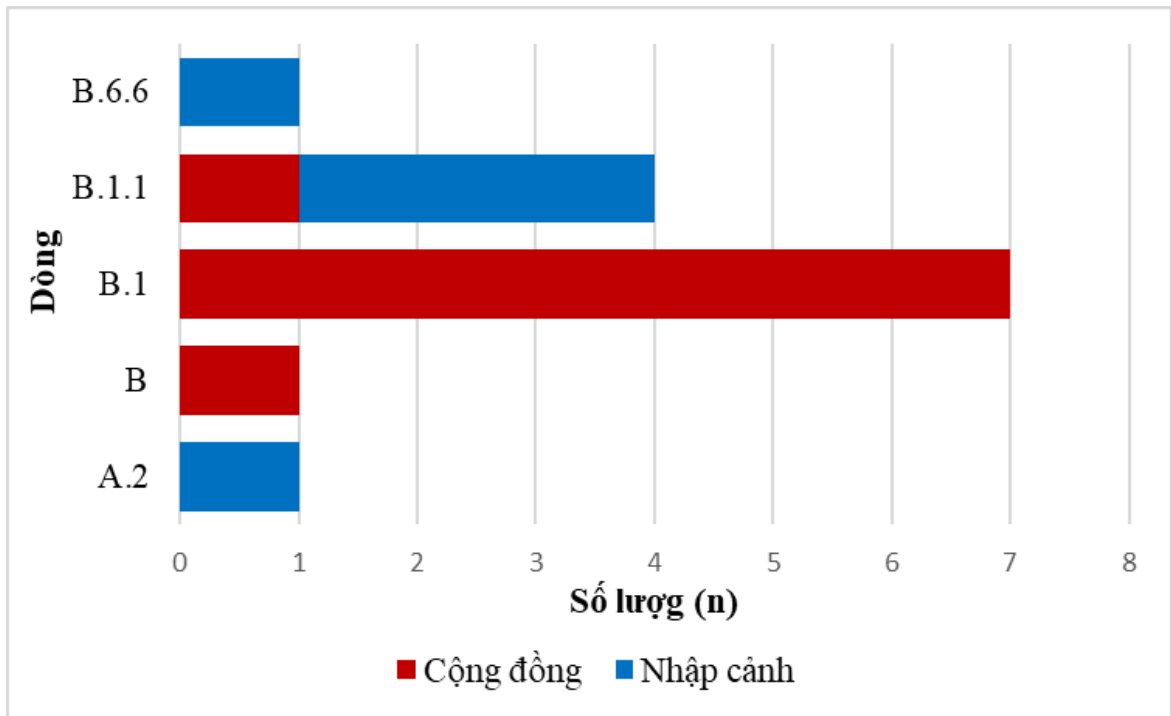
58 chủng SARS-CoV-2 thu được tại khu vực miền Trung Việt Nam năm 2020 đã phát hiện được 9 dòng gồm A.2, B, B.1, B.1.1, B.1.160, B.1.177, B.1.2, B.6.6 và K.2. Trong đó, dòng B.1.1 chiếm tỷ lệ cao nhất (72,41%), tiếp đến là B.1 (13,79%), B.1.177 (3,45%) và các dòng khác gồm A.2, B, B.1.160, B.1.2, B.6.6 đều phát hiện được 1 trường hợp chiếm tỷ lệ 1,72% (hình 3.6). Nghiên cứu này chưa phát hiện các biến thể đáng quan ngại đang lưu hành mạnh mẽ trên thế giới những tháng cuối năm 2020 như biến thể Gamma P1, biến thể Alpha B.1.1.7, Belta B.1.351 và biến thể Delta B.1.617.2. Chúng tôi công tác phòng chống dịch COVID-19 năm 2020 tại khu vực miền Trung đã đem lại hiệu quả cao khi thực hiện nhanh chóng công tác xét nghiệm phát hiện, truy vết và cách ly các ca dương tính cũng như các ca tiếp xúc nhằm hạn chế những biến thể đáng quan ngại xâm nhập vào khu vực miền Trung nói riêng và Việt Nam nói chung.



Hình 3.6. Kết quả định danh 58 chủng SARS-CoV-2 thu thập năm 2020 tại khu vực miền Trung Việt Nam

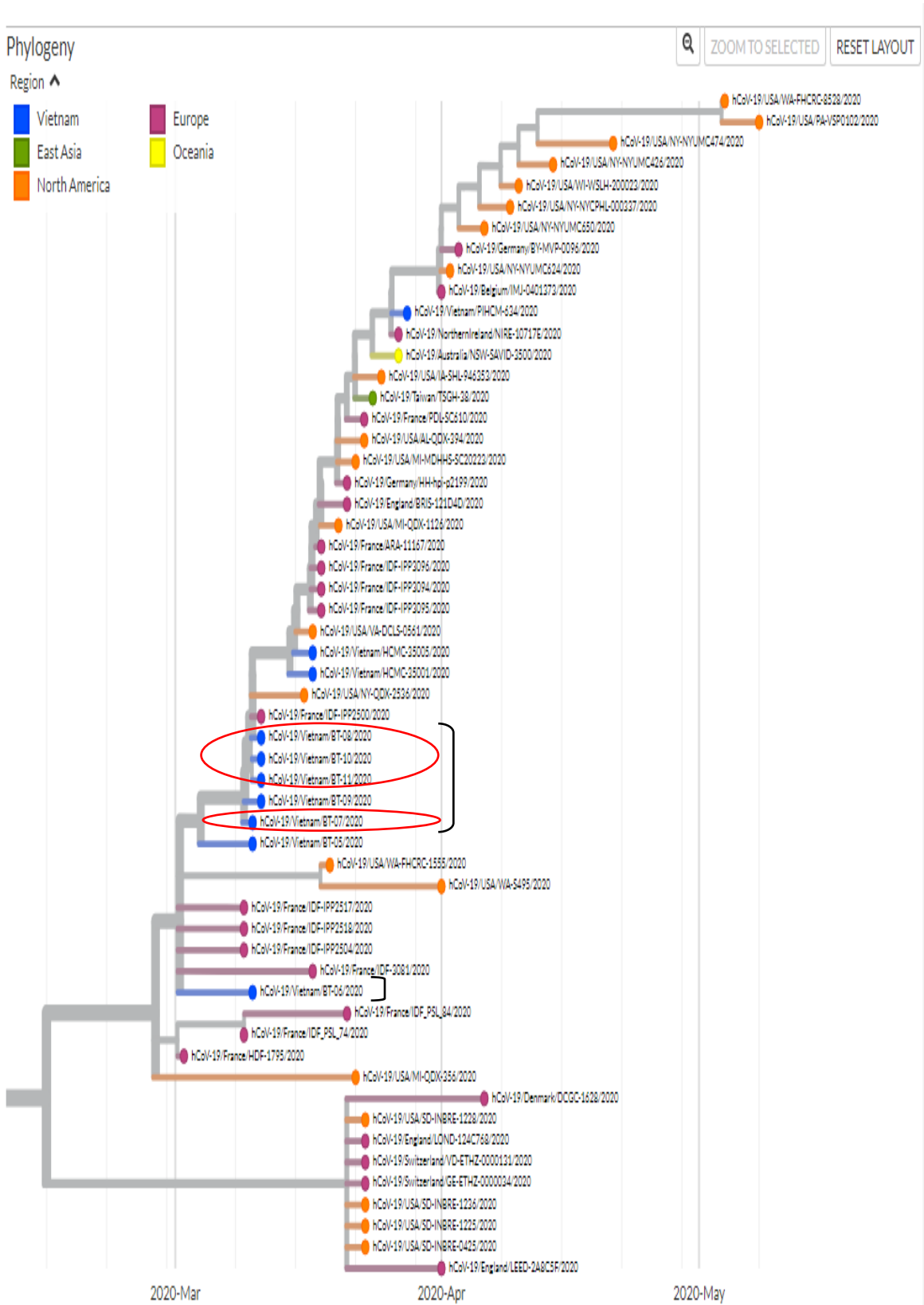
3.2.2. Sự lưu hành các dòng của SARS-CoV-2 trong giai đoạn một của dịch COVID-19 tại khu vực miền Trung

Trong giai đoạn một từ ngày 22/01/2020 đến 22/07/2020 của dịch COVID-19 tại khu vực miền Trung chúng tôi đã phát hiện được 7/14 chủng SARS-CoV-2 thuộc dòng B.1 trên những ca nhiễm trong cộng đồng tại Bình Thuận, 4/14 dòng B.1.1 của 3 ca nhập cảnh từ Anh và 1 ca là F1 của 2 du khách người Anh không có trong nghiên cứu, 1/14 dòng B là F1 của du khách người Trung Quốc dương tính đầu tiên tại Việt Nam (đều thuộc dòng B) và 1/14 dòng A.2, 1/14 dòng B.6.6 đều thu thập được từ 2 ca nhập cảnh (hình 3.7). Với kết quả này chúng tôi nhận thấy, tất cả các dòng phát hiện ở khu vực miền Trung Việt Nam trong giai đoạn 1 chỉ có dòng B.1 đã có sự lưu hành trong cộng đồng và dòng B.1.1 chưa có sự lây lan trong cộng đồng vì chỉ phát hiện trên đối tượng nhập cảnh và đối tượng F1 của ca nhập cảnh sau đó được cách ly. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu trên 44 bệnh nhân điều trị tại Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương Hà Nội [30].



Hình 3.7. Kết quả định danh các chủng lưu hành trong giai đoạn một của dịch COVID-19 tại khu vực miền Trung Việt Nam

Tháng 3/2020, khu vực miền Trung Việt Nam phát hiện một ổ dịch COVID-19 tại cộng đồng ở tỉnh Bình Thuận với 10 ca dương tính đều có liên quan đến một trường hợp du lịch từ Hoa Kỳ trở về (BN34). Chúng tôi đã tiến hành giải trình tự gene 8 mẫu dương tính có giá trị chu kỳ ngưỡng của kỹ thuật real time RT-PCR nhỏ hơn 30 lấy ở Bình Thuận và thu được 7/8 trình tự gene hoàn chỉnh đều là dòng B.1 (tuy nhiên không thu được trình tự gene của BN34 do kết quả giải trình tự gene có độ bao phủ không đạt). Kết quả phân tích cây phát sinh loài nhận thấy, 7 chủng cộng đồng tại Bình Thuận đều chung một nguồn lây và cùng nhánh với các chủng thu được ở Hoa Kỳ và Pháp tại thời điểm đó (hình 3.8). Với kết quả này có thể khẳng định các biện pháp truy vết, cách ly khẩn trương các trường hợp dương tính và tiếp xúc của Bộ Y tế đã đem lại hiệu quả cao khi không để dịch lây lan rộng ra cộng đồng.

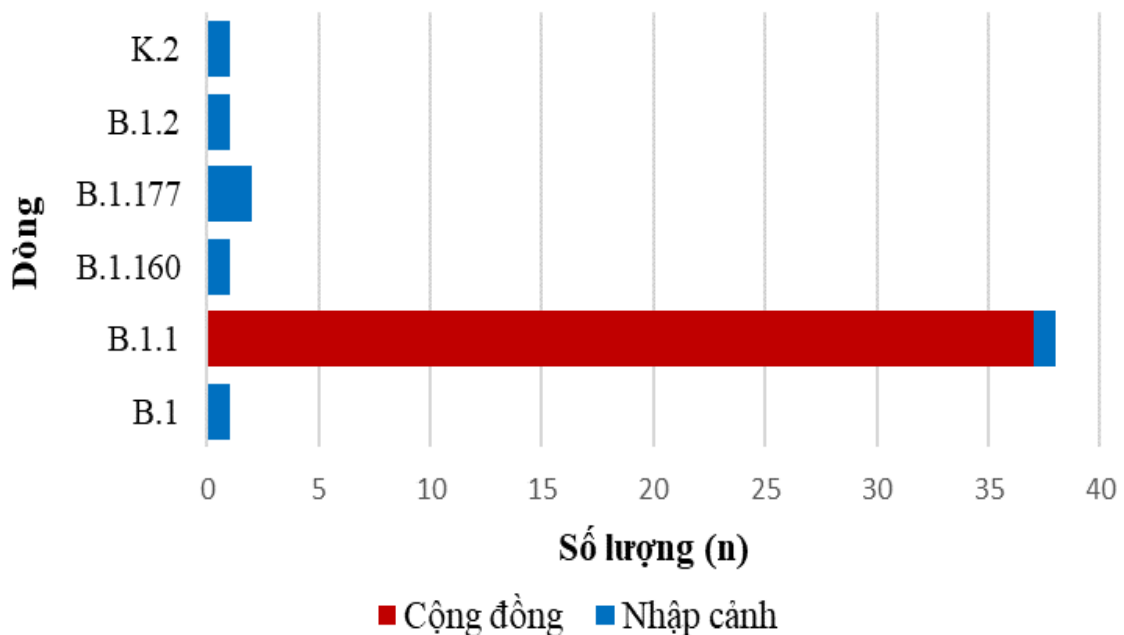


Hình 3.8. Cây phát sinh loài mô tả mối liên hệ di truyền các chủng được lấy trên các đối tượng cộng đồng ở Bình Thuận vào tháng 3/2020

Ghi chú: dấu]: 7 chủng cộng đồng thu thập tại Bình Thuận tháng 3/2020; vòng tròn màu đỏ: các ca có yếu tố dịch tễ tiếp xúc với nhau.

3.2.3. Sự lưu hành các dòng của SARS-CoV-2 trong giai đoạn hai của dịch COVID-19 tại khu vực miền Trung

38/44 chủng SARS-CoV-2 thuộc dòng B.1.1 chiếm tỷ lệ 86,36% được phát hiện ở giai đoạn 2 và chủ yếu được thu thập trên những đối tượng trong cộng đồng và có yếu tố dịch tễ liên quan đến tâm dịch Đà Nẵng (37/38 cộng đồng; 1/8 nhập cảnh). Các dòng B.1.177, B.1, B.1.160, B.1.2, K.2 chỉ được phát hiện trên những ca nhập cảnh với tỷ lệ lần lượt là 4,55%, 2,27%, 2,27%, 2,27%, 2,27% (hình 3.9). Với kết quả này chúng ta có thể thấy dòng B.1.1 là một trong những dòng phổ biến trên thế giới đã du nhập vào Việt Nam qua các du khách hoặc các đối tượng du lịch nước ngoài. Tuy công tác truy vết và cách ly của Bộ Y tế được triển khai chặt chẽ nhưng vẫn để diễn ra sự xâm nhập và lây lan nhanh chóng trong cộng đồng của dòng B.1.1 vào quý 3, 4 năm 2020 ở một số tỉnh miền Trung và miền Bắc Việt Nam. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu tại Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương Hà Nội và Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương [30], [32].



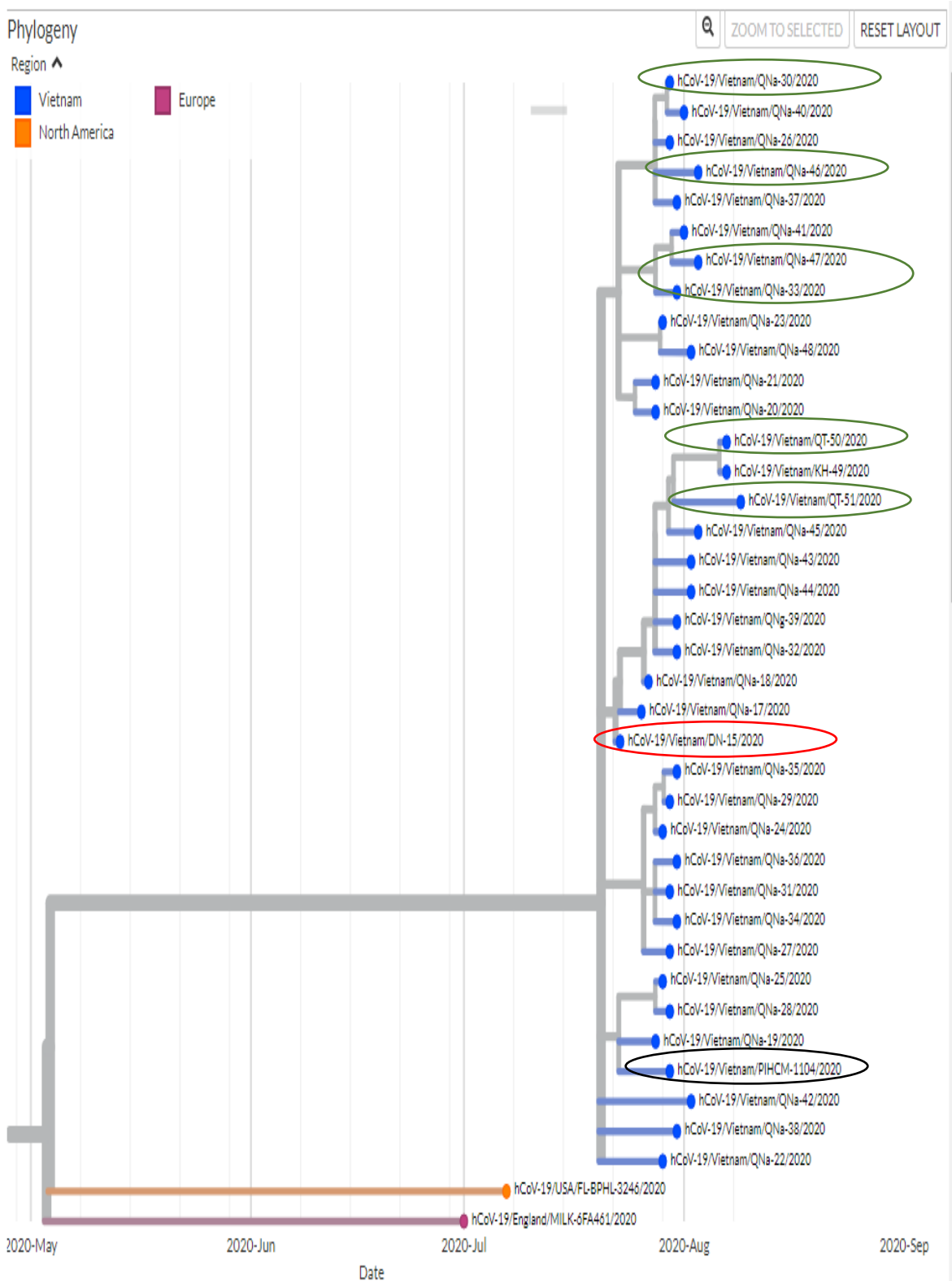
Hình 3.9. Kết quả định danh các chủng lưu hành trong giai đoạn hai của dịch COVID-19 tại khu vực miền Trung Việt Nam

Cây phát sinh loài các chủng thu được từ các đối tượng có yếu tố dịch tễ liên quan đến tâm dịch Đà Nẵng vào cuối tháng 7/2020 nhận thấy, tất cả chủng cộng đồng trong nghiên cứu đã tiến hóa tạo thành một nhánh riêng biệt trên cây phát sinh loài (hình 3.10). Qua đó khẳng định rằng, tất cả các chủng

này đều xuất phát từ cùng một nguồn lây và có sự lây lan ra một số tỉnh ngoài khu vực miền Trung như thành phố Hồ Chí Minh.

Xét về nguồn gốc của dịch COVID-19 trong giai đoạn 2 của khu vực miền Trung Việt Nam với tâm dịch Đà Nẵng, nghiên cứu đã thu được trình tự gene của chủng thu được trên đối tượng phát hiện dương tính đầu tiên tại Đà Nẵng vào ngày 23/07/2020. Sau khi phân tích cây phát sinh loài (hình 3.10), nghiên cứu có thể khẳng định mặc dù nguồn gốc của đợt dịch bệnh bùng phát này tại Đà Nẵng là chưa xác định được, tuy nhiên từ kết quả phân tích cây phát sinh loài cho thấy mối liên quan về dịch tễ của các ca bệnh phát hiện tại Đà Nẵng, các tỉnh miền Trung cũng như tại Thành phố Hồ Chí Minh. Cụ thể sự phân nhánh riêng biệt của các trình tự thu nhận được trên cây phát sinh loài chứng minh đợt dịch bệnh bùng phát xuất phát từ một nguồn lây.

Qua nghiên cứu có thể thấy rằng, việc giải trình tự gene vi rút có ý nghĩa rất lớn trong xác minh nguồn gốc của dịch để từ đó có thể đưa ra các chiến lược phòng chống dịch phù hợp như truy vết, cách ly các ca tiếp xúc cũng như đưa ra các chính sách giãn cách xã hội thích hợp trong từng giai đoạn của dịch COVID-19 nói riêng và dịch do các tác nhân khác nói chung. Vì vậy, đẩy mạnh hoạt động giải trình tự gene được Bộ Y tế chú trọng triển khai nhằm cung cấp dữ liệu cho nhiều hoạt động chống dịch như xác định biến thể lưu hành, truy tìm nguồn gốc dịch cũng như sản xuất vắc xin và thuốc điều trị.



Hình 3.10. Cây phát sinh loài mô tả mối liên hệ di truyền các chủng được lấy trên các đối tượng cộng đồng liên quan tâm dịch Đà Nẵng vào tháng 7/2020

Ghi chú: vòng tròn màu đỏ: ca phát hiện đầu tiên tại Đà Nẵng; màu xanh: các ca tiếp xúc với nhau; màu đen: ca phát hiện tại thành phố Hồ Chí Minh có yếu tố dịch tễ liên quan đến Đà Nẵng được lấy từ GISAID

3.3. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH ĐỘ BIẾN CÁC ĐÒNG

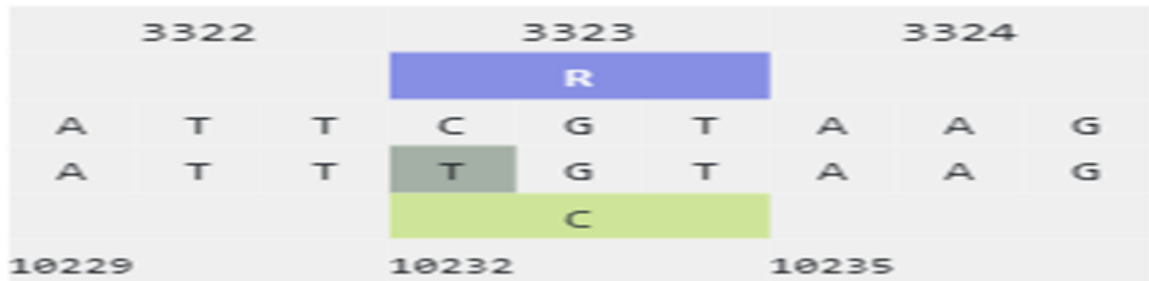
3.3.1. Kết quả phân tích đột biến chủng thuộc dòng B

Chủng SARS-CoV-2 thuộc dòng B trong nghiên cứu là chủng đầu tiên được phát hiện tại khu vực miền Trung Việt Nam có tiền sử tiếp xúc với du khách người Trung Quốc dương tính với SARS-CoV-2 đã được công bố ngày 22/01/2020 tại TP Hồ Chí Minh [28]. Khi so sánh với chủng gốc Vũ Hán, chủng tại khu vực miền Trung có độ tương đồng gene 99,3% và phát hiện đột biến mới C > T (10.232) làm thay đổi aa R > C (3.323) trên ORF1b đã xuất hiện trên chủng được thu thập trên du khách người Trung Quốc (hình 3.11) và phân tích cây phát sinh loài (hình 3.12) đã khẳng định rằng ca phát hiện đầu tiên tại khu vực miền Trung Việt Nam do lây từ du khách người Trung Quốc và tại thời điểm đó khu vực miền Trung chưa có sự lưu hành trong cộng đồng của SARS-CoV-2.

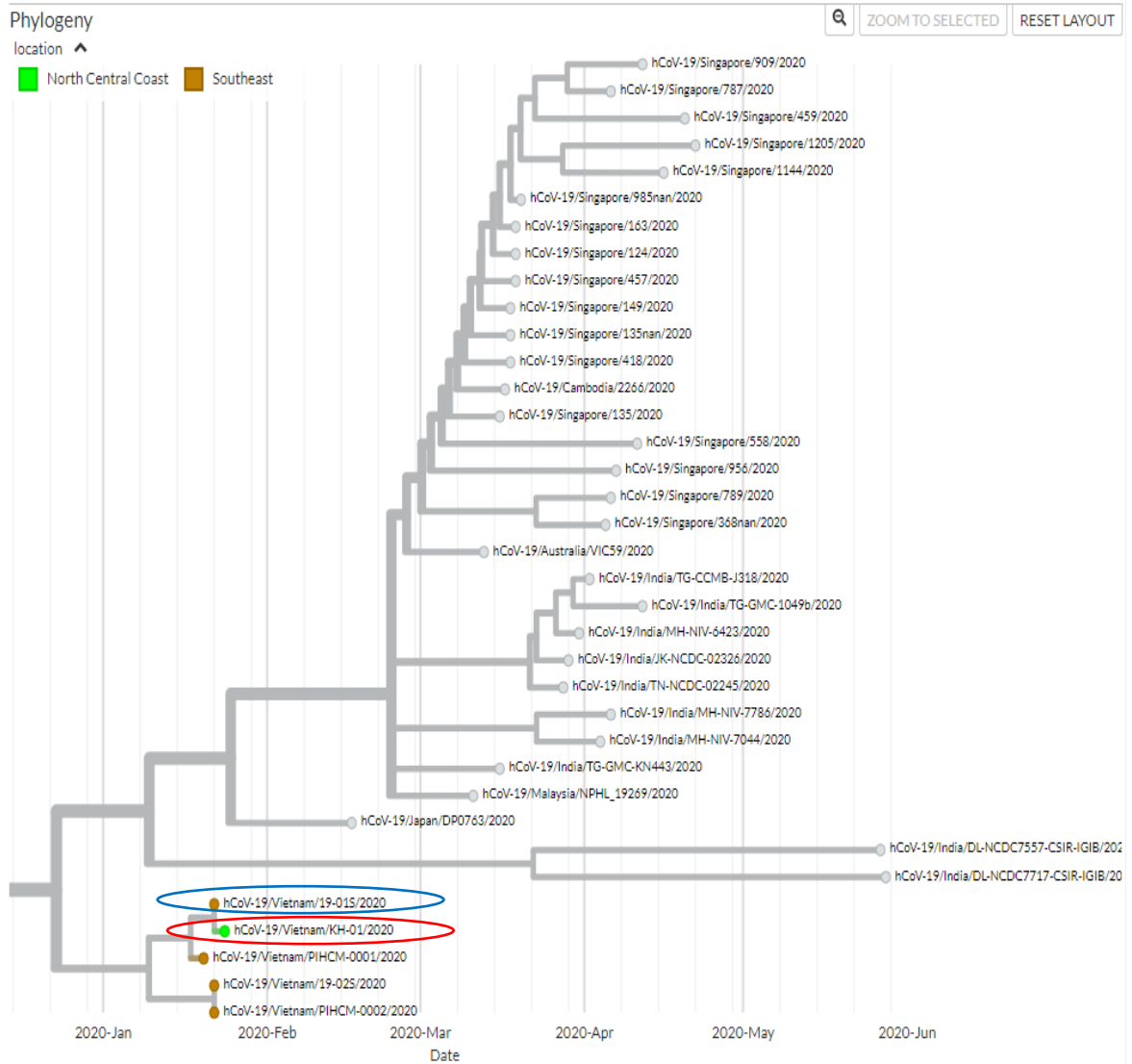
A

Đột biến tìm thấy trên trên chủng thuộc dòng B
 C > T (10.232) làm thay đổi aa R > C (3.323) trên ORF1b

B



Hình 3.11. (A) Đột biến tìm thấy trên chủng thuộc dòng B
 (B) vị trí các đột biến



Hình 3.12. Cây phát sinh loài mô tả mối liên hệ di truyền chủng phát hiện đầu tiên tại khu vực miền trung Việt Nam

Ghi chú: vòng tròn màu đỏ: ca phát hiện đầu tiên tại miền Trung; vòng tròn màu xanh: du khách người Trung Quốc phát hiện dương tính đầu tiên

3.3.2. Kết quả phân tích đột biến các chủng thuộc dòng B.1

Các chủng thuộc dòng B.1 sau khi so sánh với các trình tự đã được công bố trên thế giới đã phát hiện những đột biến mới trên những đối tượng lây nhiễm trong cộng đồng ở Bình Thuận được lấy mẫu trong tháng 3/2020 gồm: C>T (1.059), G>T (1.083) trên gene ORF1a và G>T (25.663) trên gene ORF3a đã dẫn đến thay đổi lần lượt các aa T>I (265), L>F (3.606) trên protein ORF1a và Q>H (57) trên protein ORF3a (Bảng 3.4). Với kết quả này chúng tôi đưa ra giả thuyết rằng bắt đầu có sự tiến hóa của dòng B.1 vào Việt Nam khi những đối tượng này đều là những ca có tiền sử tiếp xúc với bệnh

nhân mã số BN34 có yếu tố dịch tễ du lịch ở Hoa Kỳ. Tuy nhiên, để khẳng định giả thuyết này cần phải có trình tự gene của SARS-CoV-2 thu được trên BN34 để so sánh đối chiếu nhưng nghiên cứu không thu được trình tự của BN34 vì vậy đây là hạn chế của nghiên cứu vì chưa thể đánh giá được sự tiến hóa của vi rút đối với ổ dịch tại Bình Thuận.

Bảng 3.4. Kết quả phát hiện đột biến các chủng thuộc dòng B.1

Stt	Gene đột biến	Loại đột biến	Vị trí đột biến	Chủng lưu hành trên thế giới	Chủng tại khu vực miền Trung, Việt Nam	
					Chủng cộng đồng	Chủng nhập cảnh
1	ORF1a	C>T	1059	Không	Có	Không
2		G>T	11.083	Không	Có	Không
3	ORF1b	C>T	14.408	Có	Có	Có
4	ORF3a	G>T	25.563	Không	Có	Không
5	S	A>G	23.403	Có	Có	Có

3.3.3. Kết quả phân tích đột biến các chủng thuộc dòng B.1.1

42/58 chủng SARS-CoV-2 thuộc dòng B.1.1 thu được tại khu vực miền Trung Việt Nam năm 2020 đều mang các đột biến đặc trưng thuộc dòng B.1.1 đã được công bố trên thế giới gồm các đột biến C>T (14.408) làm thay đổi aa P>L (314) trên ORF1b; G>A (28.881, 28.882); G>C (28.883) làm thay đổi aa R>K (203) và G>R (204) trên N và A>G (23403) làm thay đổi aa D>G (614) trên S [42]. Tuy nhiên, 37/42 chủng dòng B.1.1 thu được tại cộng đồng liên quan đến tâm dịch Đà Nẵng ở giai đoạn 2 của dịch đã phát hiện được 1 đột biến mới A>C (12.772) làm thay đổi aa L>F (4.169) trên ORF1a khác với các chủng đã công bố trên thế giới (hình 3.13). Kết quả này tương đồng với phát hiện của nhóm nghiên cứu tại Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương [32].

A**Các đột biến tìm thấy trên các chủng thuộc dòng B.1.1**

C > T (14.408) làm thay đổi aa P > L (314) trên ORF1b

G > A (28.881, 28.882); G > C (28.883) làm thay đổi aa R > K (203) và G > R (204) trên N

A > G (23.403) làm thay đổi D > G (614) trên S

A > C (12.772) làm thay đổi aa L > F (4.169) ORF1a

B

Hình 3.13. (A) Các đột biến tìm thấy trên chủng thuộc dòng B.1.1

(B) Vị trí các đột biến

3.3.4. Kết quả phân tích đột biến các chủng nhập cảnh

Trong 6/9 dòng nhập cảnh gồm dòng A.2, B.1.160, B.1.177, B.1.2, B.6.6 và K.2 chỉ phát hiện 4 dòng gồm A2, B.1.160, B.1.177, B.1.2 thu được trên 5 chủng có các đột biến mới chủ yếu trên gene ORF so với các dòng đã được công bố trên thế giới (bảng 3.5). Tuy nhiên, do số lượng trình tự các dòng thu được trong nghiên cứu rất ít cũng như chưa phát hiện ở trong cộng đồng nên chúng tôi chưa thể đánh giá được ảnh hưởng đến tốc độ lây nhiễm và độc lực vì rút của các đột biến mới xuất hiện trên các dòng nhập cảnh thu được ở khu vực miền Trung năm 2020.

Bảng 3.5. Kết quả phát hiện đột biến các chủng nhập cảnh

Stt	dòng	Gene	Đột biến	Vị trí	Thay thế aa	Vị trí	
1	A.2	ORF1b	G>C	19.613	R>T	2.049/ trên ORF1b	
2	B.1.177 (chủng NT2020-54)	ORF1a	T>C	1.209	M>T	315/ trên ORF1a	
			G>T	11.132	A>S	3.623/ trên ORF1a	
3	B.1.177 (chủng 2020-56)	ORF1a	C>T	3.411	A>V	1.049/ trên OFF1a	
4	B.1.160	ORF1a	C>T	1.655	V>F	464/ trên ORF1a	
			C>T	12.116	L>F	3.951/ trên ORF1a	
		ORF1b	C>T	16.343	S>L	959/ trên ORF1b	
		ORF3a	C>T	25.460	A>V	23/ trên ORF3a	
5	B.1.2	N	C>A	29.330	L>M	353/ trên N	
			ORF1a	C>T	6.525	T>I	2.807/ trên N
				G>T	6.865	K>N	2.200/ trên ORF1a
				G>A	8.083	M>I	2.606/ ORF1a
ORF1b	C>T	14.408	P>L	314 ORF1b			

3.4. PHÂN TÍCH ĐẶC ĐIỂM DI TRUYỀN CỦA VI RÚT TRÊN CÁC ĐỐI TƯỢNG TIẾP XÚC

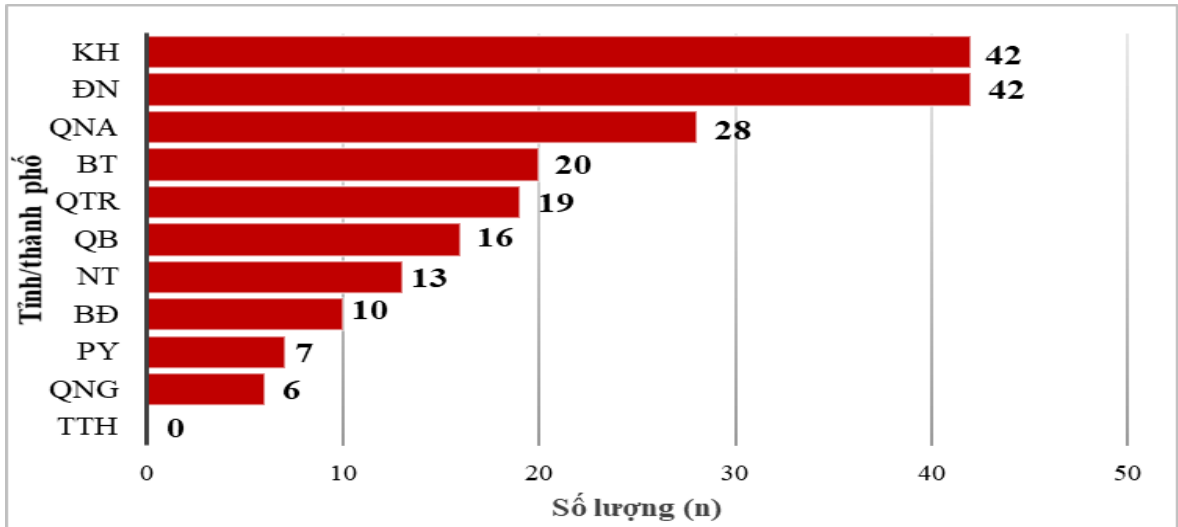
So sánh đặc điểm di truyền của vi rút thu được trên các đối tượng tiếp xúc ở Bình Thuận, Quảng Nam và Quảng Trị cho thấy độ tương đồng cao và không phát hiện các đột biến mới ở các ca tiếp xúc với nhau. Tuy nhiên, kết

qua nghiên cứu cây phát sinh loài đã chỉ ra rằng 3 đối tượng dương tính không phải là F1 được lấy mẫu vào tháng 3 của Bình Thuận (hình 3.8) nhưng đều chung nguồn lây cũng như ở Quảng Nam (2) và Quảng Trị (1) được lấy mẫu vào tháng 8/2020 không phải là đối tượng F1 nhưng có chung nguồn lây từ Đà Nẵng (hình 3.10). Qua kết quả này đã cho chúng ta thấy rằng, để xác định nguồn lây cũng như xếp loại đối tượng tiếp xúc với nhau thì phải tiến hành giải trình tự gen kết hợp với điều tra dịch tễ mới có thể khẳng định được chính xác nguồn lây cũng như ca tiếp xúc.

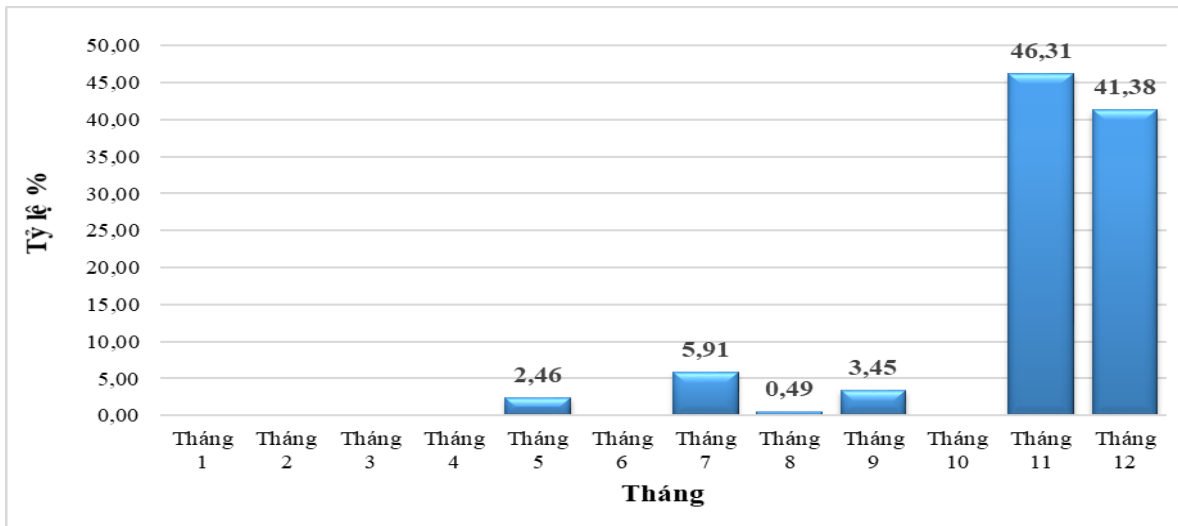
3.5. MỞ RỘNG GIÁM SÁT BIẾN CHỨNG SARS-COV-2 NĂM 2021

3.5.1. Số lượng trình tự gene SARS-CoV-2 thu được năm 2021

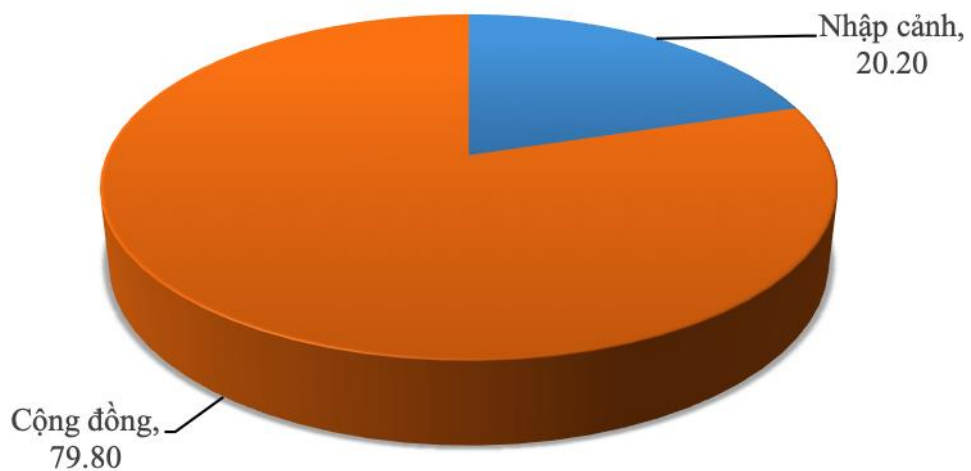
Năm 2021 tình hình dịch COVID-19 trên thế giới diễn ra rất phức tạp với tỷ lệ lây lan và độc lực của vi rút tăng nhanh do sự xuất hiện của biến thể Delta B.1.617.2 những tháng cuối năm 2020 tại Ấn Độ sau đó nhanh chóng lan rộng ra thế giới những tháng đầu năm 2021. Đứng trước tình hình đó, Bộ Y tế đã chỉ đạo tăng cường giám sát biến chủng SARS-CoV-2 nhằm đánh giá nguy cơ lây lan biến thể Delta B.1.617.2 vào Việt Nam qua đó đưa ra chiến lược phòng chống dịch hiệu quả với biến thể này. Tại khu vực miền Trung Việt Nam, trong hoạt động giám sát biến thể SARS-CoV-2 từ sự hỗ trợ của US.CDC, viện Pasteur Nha Trang đã nhanh chóng tiến hành giải trình tự gene SARS-CoV-2 và thu được 203 trình tự của vi rút với đối tượng trong cộng đồng là chủ yếu (79,80%) (hình 3.16) và tập trung chủ yếu vào tháng 11-12/2021 (hình 3.15). Trong 203 chủng, Khánh Hòa và Đà Nẵng có số lượng nhiều nhất với 42 chủng chiếm tỷ lệ (20,69%) tiếp đến là Quảng Nam (13,79), Bình Thuận (9,85), Quảng Trị (9,36%), Quảng Bình (7,88%), Ninh Thuận (6,40%), ... riêng tỉnh Thừa Thiên Huế không thu được trình tự (hình 3.14).



Hình 3.14. Số lượng chủng thu được tại khu vực miền Trung năm 2021



Hình 3.15. Thời gian thu thập chủng SARS-CoV-2 năm 2021



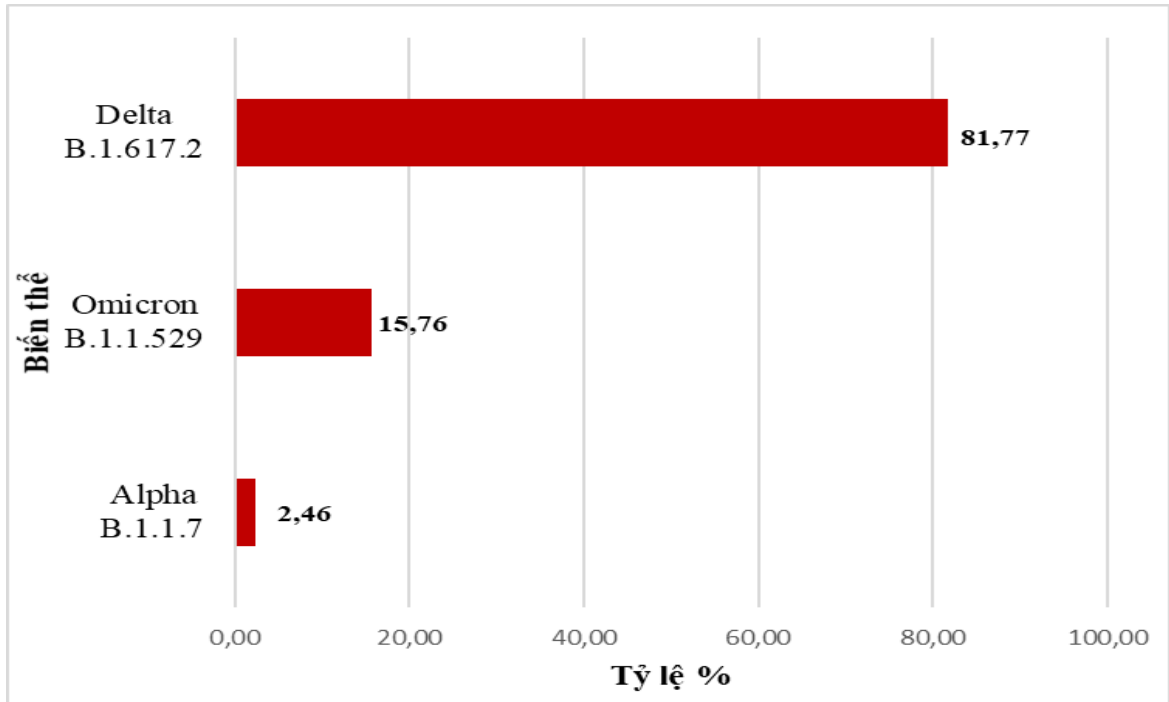
Hình 3.16. Đối tượng thu thập chủng SARS-CoV-2 năm 2021

3.5.2. Kết quả phát hiện biến thể SARS-CoV-2 năm 2021

Khi phân tích sự lưu hành các biến thể SARS-CoV-2 ở khu vực miền Trung Việt Nam năm 2021, chúng tôi nhận thấy biến thể Delta B.1.617.2 là biến thể chiếm ưu thế ở khu vực (chiếm tỷ lệ 81,77%) (hình 3.17, 18) và chủ yếu trên những đối tượng cộng đồng (97,59%). Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của nhóm tác giả ở Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương Hà Nội và Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới thành phố Hồ Chí Minh [35]. Nghiên cứu cũng phát hiện 5 biến thể Alpha B.1.1.7 vào tháng 01/2021 và 32 biến thể Omicron B.1.1.529 vào cuối tháng 12/2021 chỉ phát hiện trên các ca nhập cảnh và chưa thấy sự lưu hành ở cộng đồng (bảng 3.6)



Hình 3.17. Cây tiến hóa di truyền 203 chủng SARS-CoV-2 tại khu vực miền Trung năm 2021

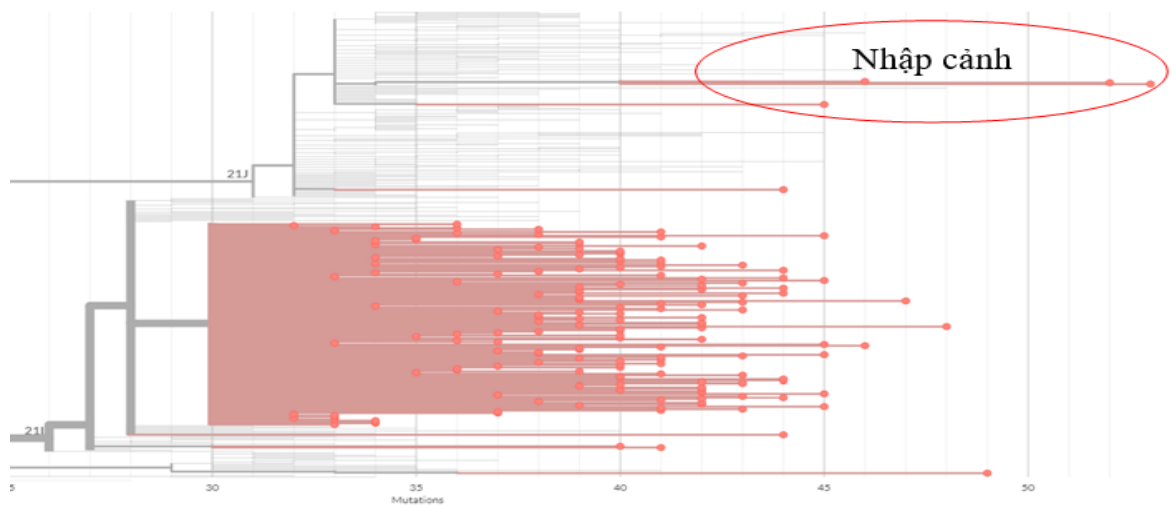


Hình 3.18. Kết quả phát hiện biến thể SARS-CoV-2 năm 2021 tại khu vực miền Trung

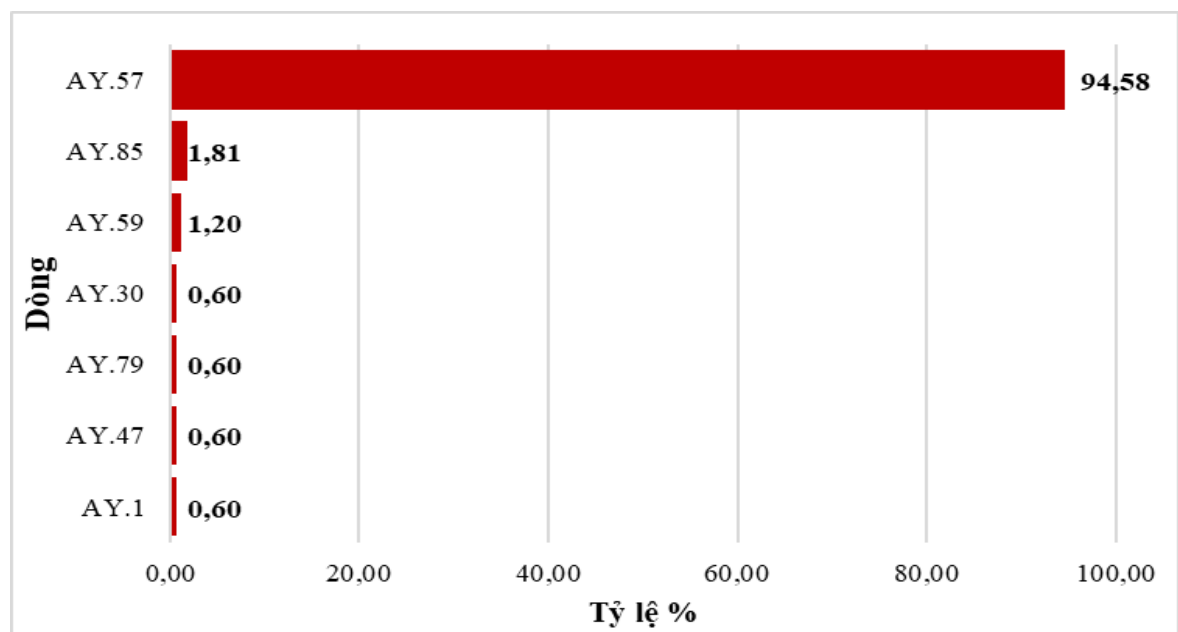
Bảng 3.6. Kết quả phân bố cộng đồng và nhập cảnh các biến thể SARS-CoV-2 tại khu vực miền Trung năm 2021

Stt	Tỉnh	Kết quả phát hiện biến thể					
		Alpha (B.1.1.7)		Delta (B.1.617.2)		Omicron (B.1.1.529)	
		Cộng đồng	Nhập cảnh	Cộng đồng	Nhập cảnh	Cộng đồng	Nhập cảnh
1	Quảng Bình			16			
2	Quảng Trị		4	14	1		
3	Thừa Thiên Huế						
4	Đà Nẵng			38	1		3
5	Quảng Nam		1				27
6	Quảng Ngãi			6			
7	Bình Định			10			
8	Phú Yên			7			
9	Khánh Hòa			38	2		2
10	Ninh Thuận			13			
11	Bình Thuận			20			
Tổng cộng		0	5	162	4	0	32

Kết quả phân tích tiến hóa của biến thể Delta B.1.617.2 cho thấy, dòng AY.57 (95,48%) lưu hành chính tại khu vực miền Trung Việt Nam năm 2021 và chủ yếu trên đối tượng cộng đồng (hình 3.19, 20) phù hợp với nghiên cứu của nhóm tác giả ở Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương Hà Nội và Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới thành phố Hồ Chí Minh [35, 36]. Kết quả này đã thể hiện được chiến lược giãn cách xã hội và các ly những đối tượng nhập cảnh về Việt Nam của Bộ Y tế năm 2021 đã đem lại hiệu quả cao trong việc hạn chế được sự xâm nhập nhiều dòng của biến thể Delta khi mà năm 2021 có trên 200 dòng của biến thể Delta được ghi nhận trên thế giới.



Hình 3.19. Cây tiến hóa di truyền của biến thể Delta B.1.617.2 năm 2021 tại khu vực miền Trung Việt Nam



Hình 3.20. Kết quả phân tích các dòng của biến thể Delta B.1.617.2

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Trong năm 2020, tại Khu vực miền Trung phát hiện 9 dòng của SARS-CoV-2 lưu hành và B.1.1 là dòng chiếm ưu thế (72,41%) và chủ yếu vào giai đoạn 2 của dịch. Các dòng K.2, B.1.2, B.6.6, B.1.177, B.1.160 và A.2 chỉ phát hiện được ở các ca nhập cảnh.

Nghiên cứu đã phát hiện được 1 đột biến ở dòng B.1.1 so với các chủng trên thế giới của các đối tượng cộng đồng liên quan đến tâm dịch Đà Nẵng. Tuy nhiên, nghiên cứu chưa thu được toàn bộ trình tự bộ gene của toàn bộ khu vực và tại tâm dịch Đà Nẵng ở giai đoạn 2 của dịch nên chưa thể đánh giá đầy đủ sự tiến hóa của vi rút ở từng giai đoạn.

Khi mở rộng hoạt động giám sát gene của SARS-CoV-2 tại khu vực miền Trung Việt Nam năm 2021 đã phát hiện biến thể Delta B.1.617.2 chiếm ưu thế (81,77%) và chủ yếu được phát hiện trong cộng đồng (97,59%). Biến thể Omicron B.1.1.529 đã phát hiện tại khu vực miền Trung trên các ca nhập cảnh vào cuối năm 2021 nhưng chưa thấy sự lây lan ra cộng đồng.

KIẾN NGHỊ

Cần phải tiếp tục duy trì hoạt động giám sát gene của SARS-CoV-2 để phục vụ cho công tác phòng chống dịch và sản xuất vắc xin có thể đáp ứng bảo vệ đối với những biến thể mới của SARS-CoV-2.

Tiếp tục mở rộng nghiên cứu đặc tính di truyền và mối tương quan giữa đặc tính di truyền với đặc điểm lâm sàng ca bệnh do SARS-CoV-2 gây ra cũng như các đáp ứng miễn dịch liên quan để cung cấp thêm dữ liệu độc lực của vi rút.

Đưa giải mã gene vào công tác phòng chống dịch bệnh truyền nhiễm mới nổi nói chung nhằm tăng cường năng lực giám sát dịch bệnh trên cả nước, cung cấp thông tin chính xác, kịp thời qua đó hỗ trợ phòng chống dịch hiệu quả.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

Do Thai Hung, Nguyen Bao Trieu, Do Thi Thu Thuy, Allison Olmsted., Trinh Hoang Long, Nguyen Duc Duy, Huynh Kim Mai, Bui Thi Thu Hien, Nguyen Van Van, Tran Van Kiem, Vo Thi Thuy Trang, Nguyen Truong Duy, Ton That Thanh., Huynh Van Dong, Philip Gould, Matthew Moore, 2022, Systematic sequencing of imported cases leads to detection of SARS-CoV-2 B.1.1.529 (Omicron) variant in central Viet Nam, *Western Pacific Surveillance and Response Journal*, 13 (4), pp. 1-4

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Li Q., Guan X., Wu P., Wang X., Feng Z., 2020, Early transmission dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-infected Pneumonia, *New England Journal of Medicine*, 382, pp. 1199-1207.
2. WHO, <https://covid19.who.int>.
3. Jin Y., Yang H., Ji W., Wu W., Chen S., Zhang W., Duan G., 2020, Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of COVID-19, *Viruses*, 12, pp. 372
4. Naqvi A.A., Fatima K., Mohammad T., Fatima U., Singh I.K., Singh A., Atif S.M., Hariprasad G., Hasan G.M., Hassan M.I., 2020, Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach, *Biochimica Biophysica Acta Molecular Basis Disease*, 1866, 165878.
5. Lu R., Zhao X., Li J., Niu P., Tan W., 2020, Genomic characterisation and epidemiology of 2019 Novel Coronavirus: Implications for virus origins and receptor binding, *Lancet*, 395, pp. 565-574.
6. Zhang Y., 2020, The epidemiological characteristics of an outbreak of 2019 Novel Coronavirus diseases (COVID-19) in China, *Chinese journal of Epidemiology*, 4, pp. 145–151.
7. Lu X., Zhang L., Du H., Zhang J., Wong G.W.K., 2020, SARS-CoV-2 infection in children, *New England Journal of Medicine*, 382, pp. 1663-1665.
8. Chau N.V.V., Hong N.T.T., Ngoc N.M., Thanh T.T., Tan L.V., 2020, Superspreading event of SARS-CoV-2 infection at a Bar, Ho Chi Minh city, Vietnam, *Emerging Infectious Diseases Journal*, 27, pp. 310-314.
9. Tung P., 2020, Genetic diversity and evolution of SARS-CoV-2, *Elsevier*, 81, 104260.
10. Garcés - Ayala F., Arai - Rodríguez A., Mendieta - Condado E., Rodríguez-Maldonado A.P., Ramírez-González J.E., 2020, Full genome sequence of the first SARS-CoV-2 detected in Mexico, *Archives of Virology*, 165, pp. 2095-2098.

11. Rehman S., Mahmood T., Aziz E., Batool, R., 2020, Identification of novel mutations in SARS-COV-2 isolates from Turkey, *Archives of Virology*, 165, pp. 2937–2944.
12. Sheikh J.A., Singh J., Singh H., Jamal S., Khubaid M., Kohli S., Dobrindt U., Rahman S.A., Ehtesham N.Z., Hasnain S.E., 2020, Emerging genetic diversity among clinical isolates of SARS-CoV-2: Lessons for today, *Elsevier*, 84, 104330.
13. Caccuri F., Zani A., Messali S., Giovanetti M., Caruso A., 2020, A persistently replicating SARS-CoV-2 variant derived from an asymptomatic individual, *Journal of Translational Medicine*, 18, 362
14. Hodcroft E.B., Zuber M., Nadeau S., Vaughan T.G., Neher R.A., 2021, Spread of a SARS-CoV-2 variant through Europe in the Summer of 2020, *Nature*, 595, pp. 707–712.
15. Zhang Y., Pan Y., Zhao X., Shi W., Chen Z., Zhang S., Liu P., Wu G., 2020, Genomic characterization of SARS-CoV-2 identified in a reemerging COVID-19 outbreak in Beijing's Xinfadi market in 2020, *Journal of Biosafety and Health*, 2, pp. 202-205.
16. Rambaut A., Holmes E.C., O'Toole Á., Hill V., McCrone J.T., Pybus O.G., 2020, A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology, *Nature Microbiology*, 5, pp. 1403–1407.
17. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants>.
18. Graham M.S., Sudre C.H., May A., Antonelli M., Steves C.J., 2021, Changes in symptomatology, reinfection, and transmissibility associated with the SARS-CoV-2 variant B.1.1.7: an ecological study, *Lancet Public Health*, 6, pp. 335 – 345.
19. Zárate S., Taboada B., Muñoz-Medina J.E., Iša P., Arias C.F., 2022, The Alpha variant (B.1.1.7) of SARS-CoV-2 failed to become dominant in Mexico, *Microbiol Spectr*, 10.

20. Tegally H., Wilkinson E., Giovanetti M., Iranzadeh A., de Oliveira T., 2021, Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa, *Nature*, 592, pp. 438–443.
21. Ramesh S., Govindarajulu M., Parise R.S., Neel L., Moore T., 2021, Emerging SARS-CoV-2 variants: A review of its mutations, its implications and vaccine efficacy, *Vaccines*, 9, pp. 1195.
22. Dejnirattisai W., Zhou D., Supasa P., Liu C., Sreaton G.R., 2021, Antibody evasion by the P.1 strain of SARS-CoV-2, *AcCell Press journal*, 184, pp. 2939-2954.
23. Bhattacharya M., Chatterjee S., Sharma A.R., Lee S.S., Chakraborty C., 2022, Delta variant (B.1.617.2) of SARS-CoV-2: Current understanding of infection, transmission, immune escape, and mutational landscape, *Folia Microbiologica*, 68, pp. 17-28.
24. Cherian S., Potdar V., Jadhav S., Yadav P., Gupta N., Das M., Rakshit P., Team N., 2021, SARS-CoV-2 spike mutations, L452R, T478K, E484Q and P681R, in the Second wave of COVID-19 in Maharashtra, India, *Microorganisms*, 9, 1542.
25. Mlcochova P., Kemp S.A., Dhar, M.S., Papa G., Meng B., Gupta R.K., 2021, SARS-CoV-2 B.1.617.2 Delta variant replication and immune evasion, *Nature*, 599, pp. 114-119.
26. Thakur V., Ratho R.K., 2021, Omicron (B.1.1.529): A new SARS-CoV-2 variant of concern mounting worldwide fear, *Journal of Medical Virology*, 94, pp. 1821-1824.
27. Manjunath R., Gaonkar S.L., Saleh E.A.M., Husain, K., 2022, A comprehensive review on Covid-19 Omicron (B.1.1.529) variant, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29, 103372.
28. Lan P.T., Thuong N.V., Loan H.T.K., Loan H.T.K., Manh D.H., Quang P.D., 2020, Clinical features, isolation, and complete genome sequence of severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 from the first two patients in Vietnam, *Journal of Medical Virology*, 92, pp. 2209-2215.

29. Manh D.H., Lan P.T., Thang C.M., Quang L.Q., Thuong N.V., 2021, Genome-wide analysis of SARS-CoV-2 strains circulating in Vietnam: Understanding the nature of the epidemic and role of the D614G mutation, *Journal of Medical Virology*, 93, pp. 5660-5665
30. Tam N.T., Thach P.N., Trang V.D., Trang N.T., Van Door H.R., 2020, Genetic diversity of SARS-CoV-2 and clinical, epidemiological characteristics of COVID-19 patients in Hanoi, Vietnam, *Plos One*, Published November 17.
31. Bộ Y tế, <https://covid19.gov.vn>.
32. Phuong H.V.M., Tung T.S., Trang U.T.H., Hang N.L.K., Mai L.Q., 2021, Novel mutation of SARS-CoV-2, Vietnam, July 2020, *Emerging Infectious Diseases*, 27, pp. 1519-1521.
33. Manh D.H., Hieu N.T., Thinh N.V., Anh N.H., Lan P.T., 2021, New SARS-CoV-2 variant of concern imported from the United Kingdom to Vietnam, December 2020, *Journal of Medical Virology*, 93, pp. 2628-2630.
34. Son N.V., Trang U.T.H., Phuong H.V.M., Thanh L.T., Mai L.T.Q., 2022, Genetic variants of SARS-CoV-2 circulated from Northern and Central Vietnam from January 2020 - April 2021, Vietnam, *Journal of Preventive Medicine*, 32, pp. 62-71.
35. Tam N.T., Anh N.T., Tung T.S., Thach P.N., Tan L.V., 2023, Spatiotemporal evolution of SARS-CoV-2 Alpha and Delta variants during large nationwide outbreak of COVID-19, Vietnam, 2021, *Emerging Infectious Diseases Journal*, 29, pp. 102-106
36. Nguyễn Kim Thư, Lê Văn Duyệt, 2023, Đặc điểm hệ gene biến thể Alpha và Delta của sars-cov-2 ở bệnh nhân Covid-19 điều trị tại Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Trung ương, *Tạp chí nghiên cứu y học*, 163, tr. 37-46.
37. Nguyễn Thị Hải Hà, Phạm Lê Anh Tuấn, Nguyễn Thị Tâm, 2023, Xác định biến thể SARS-COV-2 trên mẫu bệnh nhân Bắc Giang trong vụ dịch 2021 bằng công nghệ giải trình tự thế hệ mới, *Tạp chí nghiên cứu y học*, 163, tr. 55-62.

38. Bộ Y tế, Quyết định số 3468/QĐ-BYT ngày 07 tháng 08 năm 2020 về việc ban hành “Hướng dẫn tạm thời giám sát và phòng, chống COVID-19”
39. <https://www.epicov.org>
40. WHO, Diagnostic testing for SARS-CoV-2, Interim guidance, 11 September, 2020.
41. <https://artic.network/ncov-2019>.
42. <http://cov-glue.cvr.gla.ac.uk>

PHỤ LỤC

Phụ lục 1. Trình tự môi và mẫu dò của kỹ thuật real time RT-PCR phát hiện SARS-CoV-2

Stt	Tên	Trình tự
1	Môi xuôi	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG
2	Môi ngược	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA
3	Probe	FAM – CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC - 3BHQ

Phụ lục 2. Trình tự 109 cặp môi ARTIC V3 cho phản ứng PCR khuếch đại bộ gen SARS-CoV-2

Stt	Môi xuôi	Môi ngược
1	ACCAACCAACTTTCGATCT CTTGT	CATCTTTAAGATGTTGACGT GCCTC
2	CTGTTTTACAGGTTTCGCGA CGT	TAAGGATCAGTGCCAAGCT CGT
3	CGGTAATAAAGGAGCTGG TGCC	AAGGTGTCTGCAATTCATA GCTCT
4	GGTGTATACTGCTGCCGTG AAC	CACAAGTAGTGGCACCTTCT TTAGT
5	TGGTGAAACTTCATGGCA GACG	ATTGATGTTGACTTTCT CTTTTTGGAGT
6	GGTGTTGTTGGAGAAGGT TCCG	TAGCGGCCTTCTGTAAAAC ACG
7	ATCAGAGGCTGCTCGTGTT GTA	TGCACAGGTGACAATTTGTC CA
8	CATTTGCATCAGAGGCTGC TCG	AGGTGACAATTTGTCCACC GAC
9	AGAGTTTCTTAGAGACGG TTGGGA	GCTTCAACAGCTTCACTAGT AGGT
10	TCCCACAGAAGTGTTAAC AGAGGA	ATGACAGCATCTGCCACAA CAC
11	TTCCCACAGAAGTGTTAAC AGAGG	GACAGCATCTGCCACAACA CAG

12	TGAGAAGTGCTCTGCCTAT ACAGT	TCATCTAACCAATCTTCTTC TTGCTCT
13	GGAATTTGGTGCCACTTCT GCT	TCATCAGATTCAACTTGCAT GGCA
14	AAACATGGAGGAGGTGTT GCAG	TTCACTCTTCATTTCCAAAA AGCTTGA
15	TCGCACAAATGTCTACTTA GCTGT	ACCACAGCAGTTAAAACAC CCT
16	CATCCAGATTCTGCCACTC TTGT	AGTTTCCACACAGACAGGC ATT
17	TGGCAATCTTCATCCAGAT TCTGC	TGCGTGTTTCTTCTGCATGT GC
18	ACAGTGCTTAAAAAGTGT AAAAGTGCC	AACAGAAACTGTAGCTGGC ACT
19	AGTGCTTAAAAAGTGTA AAGTGCCT	ACTGTAGCTGGCACTTTGAG AGA
20	AATTTGGAAGAAGCTGCT CGGT	CACAACCTTGCGTGTGGAGG TTA
21	CTTCTTTCTTTGAGAGAAG TGAGGACT	TTTGTTGGAGTGTTAACAAT GCAGT
22	TGGAAATACCCACAAGTT AATGGTTTAAAC	AGCTTGTTTACCACACGTAC AAGG
23	ACTTCTATTAAATGGGCAG ATAACAACCTGT	GCTTGTTTACCACACGTACA AGG
24	GCTGTTATGTACATGGGCA CACT	TGTCCAACCTTAGGGTCAATT TCTGT
25	ACAAAGAAAACAGTTACA CAACAACCA	ACGTGGCTTTATTAGTTGCA TTGTT
26	TGGCTATTGATTATAAACA CTACACACCC	TAGATCTGTGTGGCCAACCT CT
27	GGCTATTGATTATAAACAC TACACACCCT	GATCTGTGTGGCCAACCTCT TC
28	ACTACCGAAGTTGTAGGA GACATTATACT	ACAGTATTCTTTGCTATAGT AGTCGGC
29	ACAACACTAACATAGTT ACACGGTGT	ACCAGTACAGTAGGTTGCA ATAGTG
30	AGGCATGCCTTCTTACTGT ACTG	ACATTCTAACCATAGCTGA AATCGGG

31	GCAATTGTTTTTCAGCTAT TTTGCAGT	ACTGTAGTGACAAGTCTCTC GCA
32	TTGTGATACATTCTGTGCT GGTAGT	TCCGCACTATCACCAACATC AG
33	ACTACAGTCAGCTTATGTG TCAACC	AATACAAGCACCAAGGTCA CGG
34	ACATAGAAGTTACTGGCG ATAGTTGT	TGTTTAGACATGACATGAA CAGGTGT
35	ACTTGTGTTCCTTTTTGT GCTGC	AGTGTACTCTATAAGTTTTG ATGGTGTGT
36	GCACAATAATGGTGACT TTTTGCA	ACCACTAGTAGATACACAA ACACCAG
37	TTCTGAGTACTGTAGGCAC GGC	ACAGAATAAACACCAGGTA AGAATGAGT
38	TGGTGAATACAGTCATGT AGTTGCC	AGCACATCACTACGCAACT TTAGA
39	ACTTTTGAAGAAGCTGCG CTGT	TGGACAGTAAACTACGTCA TCAAGC
40	TCCCATCTGGTAAAGTTGA GGGT	AGTGAAATTGGGCCTCATA GCA
41	TGTTTCGCATTCAACCAGGA CAG	ACTTCATAGCCACAAGGTT AAAGTCA
42	TTAGCTTGGTTGTACGCTG CTG	GAACAAAGACCATTGAGTA CTCTGGA
43	ACACACCACTGGTTGTTAC TCAC	GTCCACACTCTCCTAGCACC AT
44	ACTGTGTTATGTATGCATC AGCTGT	CACCAAGAGTCAGTCTAAA GTAGCG
45	AGTATTGCCCTATTTTCTT CATAACTGGT	TGTA ACTGGACACATTGAG CCC
46	TGCACATCAGTAGTCTTAC TCTCAGT	CATGGCTGCATCACGGTCA AAT
47	GTTCCCTTCCATCATATGC AGCT	TGGTATGACAACCATTAGTT TGGCT
48	TGCAAGAGATGGTTGTGTT CCC	CCTACCTCCCTTTGTTGTGT TGT
49	TACGACAGATGTCTTGTGC TGC	AGCAGCATCTACAGCAAAA GCA

50	TGCCACAGTACGTCTACA AGCT	AACCTTTCCACATACCGCA GAC
51	CCACAGTACGTCTACAAG CTGG	CGCAGACGGTACAGACTGT GTT
52	TACCTACAACCTTGTGCTAA TGACCC	AAATTGTTTCTTCATGTTGG TAGTTAGAGA
53	AGTATGTACAAATACCTA CAACTTGTGCT	TTCATGTTGGTAGTTAGAGA AAGTGTGTC
54	TGTCGCTTCCAAGAAAAG GACG	CACGTTCACCTAAGTTGGCG TA
55	CGCTTCCAAGAAAAGGAC GAAGA	CACGTTCACCTAAGTTGGCG TAT
56	AGGACTGGTATGATTTTGT AGAAAACCC	AATAACGGTCAAAGAGTTT TAACCTCTC
57	TGTTGACACTGACTTAACA AAGCCT	TAGATTACCAGAAGCAGCG TGC
58	AGGAATTACTIONTGTGTATGC TGCTGA	TGACGATGACTTGGTTAGC ATTAATACA
59	GTTGATAAGTACTTTGATT GTTACGATGGT	TAACATGTTGTGCCAACCAC CA
60	TCAATAGCCGCCACTAGA GGAG	AGTGCATTAACATTGGCCGT GA
61	CATCAGGAGATGCCACAA CTGC	GTTGAGAGCAAATTCATG AGGTCC
62	AGCAAAATGTTGGACTGA GACTGA	AGCCTCATAAAACCTCAGGT TCCC
63	TGAGTTAACAGGACACAT GTTAGACA	AACCAAAAACCTTGTCCATT AGCACA
64	ACTCAACTTTACTTAGGAG GTATGAGCT	GGTGTACTCTCCTATTTGTA CTTTACTGT
65	ACCTAGACCACCACTTAA CCGA	ACACTATGCGAGCAGAAGG GTA
66	ATTCTACACTCCAGGGACC ACC	GTAATTGAGCAGGGTCGCC AAT
67	TGATTTGAGTGTTGTCAAT GCCAGA	CTTTTCTCCAAGCAGGGTTA CGT
68	TCACGCATGATGTTTCATC TGCA	AAGAGTCCTGTTACATTTTC AGCTTG

69	TGATAGAGACCTTTATGAC AAGTTGCA	GGTACCAACAGCTTCTCTAG TAGC
70	TGTTTATCACCCGCGAAGA AGC	ATCACATAGACAACAGGTG CGC
71	GGCACATGGCTTTGAGTTG ACA	GTTGAACCTTTCTACAAGCC GC
72	TGTTAAGCGTGTTGACTGG ACT	ACAAACTGCCACCATCACA ACC
73	TCGATAGATATCCTGCTAA TTCCATTGT	AGTCTTGTA AAAAGTGTTCCA GAGGT
74	GCTGGCTTTAGCTTGTGGG TTT	TGTCAGTCATAGAACAAAC ACCAATAGT
75	GGGTGTGGACATTGCTGCT AAT	TCAATTTCCATTTGACTCCT GGGT
76	GTTGTCCAACAATTACCTG AAACTTACT	CAACCTTAGAAACTACAGA TAAATCTTGGG
77	ACAGGTTTCATCTAAGTGTG TGTGT	CTCCTTTATCAGAACCAGCA CCA
78	TGTCGCAAAATATACTCA ACTGTGTCA	TCTTTATAGCCACGGAACCT CCA
79	ACAAAAGAAAATGACTCT AAAGAGGGTTT	TGACCTTCTTTTAAAGACAT AACAGCAG
80	ACAAATCCAATTCAGTTGT CTTCCTATTC	TGGAAAAGAAAGGTAAGAA CAAGTCCT
81	ACACGTGGTGTTTATTACC CTGAC	ACTCTGAACTCACTTTCCAT CCAAC
82	CAATTTTGTAATGATCCAT TTTTGGGTGT	CACCAGCTGTCCAACCTGA AGA
83	ACATCACTAGGTTTCAAAC TTTACTTGC	GCAACACAGTTGCTGATTCT CTTC
84	AGAGTCCAACCAACAGAA TCTATTGT	ACCACCAACCTTAGAATCA AGATTGT
85	AGGGCAAACCTGGAAAGAT TGCT	ACACCTGTGCCTGTAAACC AT
86	GGGCAAACCTGGAAAGATT GCTGA	ACCTGTGCCTGTAAACCAT TGA
87	CCAGCAAACCTGTTTGTGGAC CTA	CAGCCCCTATTAACAGCCT GC

88	CAACTTACTCCTACTTGGC GTGT	TGTGTACAAAACTGCCAT ATTGCA
89	GTGGTGATTCAACTGAAT GCAGC	CATTTTCATCTGTGAGCAAAG GTGG
90	TTGCCTTGGTGATATTGCT GCT	TGGAGCTAAGTTGTTTAAACA AGCG
91	GCACTTGGAAAACTTCAA GATGTGG	GTGAAGTTCTTTTCTTGTGC AGGG
92	GGGCTATCATCTTATGTCC TTCCCT	TGCCAGAGATGTCACCTAA ATCAA
93	TCCTTTGCAACCTGAATTA GACTCA	TTGACTCCTTTGAGCACTG GC
94	TGCTGTAGTTGTCTCAAGG GCT	AGGTGTGAGTAAACTGTTA CAAACAAC
95	ACTAGCACTCTCCAAGGG TGTT	ACACAGTCTTTTACTCCAGA TTCCC
96	TCAGGTGATGGCACAACA AGTC	ACGAAAGCAAGAAAAAGA AGTACGC
97	CGACTACTAGCGTGCCTTT GTA	ACTAGGTTCCATTGTTCAAG GAGC
98	CCATGGCAGATTCCAACG GTAC	TGGTCAGAATAGTGCCATG GAGT
99	GTACGCGTTCCATGTGGTC ATT	ACCTGAAAGTCAACGAGAT GAAACA
100	CGCGTTCCATGTGGTCATT CAA	ACGAGATGAAACATCTGTT GTCACT
101	ACACAGACCATTCCAGTA GCAGT	TGAAATGGTGAATTGCCCTC GT
102	TCACTACCAAGAGTGTGTT AGAGGT	TTCAAGTGAGAACCAAAG ATAATAAGCA
103	TTTGTGCTTTTTAGCCTTTC TGCT	AGGTTCTGGCAATTAATTG TAAAAGG
104	TGAGGCTGGTTCTAAATCA CCCA	AGGTCTTCCTTGCCATGTTG AG
105	GGCCCCAAGGTTTACCCA ATAA	TTTGGCAATGTTGTTCTTG AGG
106	TGAGGGAGCCTTGAATAC ACCA	CAGTACGTTTTTGCCGAGGC TT

107	GCCAACAACAACAAGGCC AAAC	TAGGCTCTGTTGGTGGGAAT GT
108	TGGATGACAAAGATCCAA ATTTCAAAGA	ACACACTGATTAAAGATTG CTATGTGAG
109	AACAATTGCAACAATCCA TGAGCA	TTCTCCTAAGAAGCTATTAA AATCACATGG

Phụ lục 3. Danh sách 2 chủng du khách người Trung Quốc tham khảo

Stt	Tên chủng	Mã chủng
2	hCoV-19/Vietnam/19-01S/2020	EPI_ISL_418269

Phụ lục 4. Danh sách 58 chủng năm 2020 tải lên <https://www.epicov.or>

Stt	Tên chủng	Mã chủng
1	hCoV-19/Vietnam/KH2020-01/2020	EPI_ISL_17373276
2	hCoV-19/Vietnam/H2020-02/2020	EPI_ISL_17373275
3	hCoV-19/Vietnam/QNa2020-03/2020	EPI_ISL_17373285
4	hCoV-19/Vietnam/DN2020-04/2020	EPI_ISL_17373272
5	hCoV-19/Vietnam/BT2020-05/2020	EPI_ISL_17373265
6	hCoV-19/Vietnam/BT2020-06/2020	EPI_ISL_17373266
7	hCoV-19/Vietnam/BT2020-07/2020	EPI_ISL_17373267
8	hCoV-19/Vietnam/BT2020-08/2020	EPI_ISL_17373268
9	hCoV-19/Vietnam/BT2020-09/2020	EPI_ISL_17373269
10	hCoV-19/Vietnam/BT2020-10/2020	EPI_ISL_17373270
11	hCoV-19/Vietnam/BT2020-11/2020	EPI_ISL_17373271
12	hCoV-19/Vietnam/NT2020-12/2020	EPI_ISL_17373281
13	hCoV-19/Vietnam/DN2020-13/2020	EPI_ISL_17373273

14	hCoV-19/Vietnam/QNa2020-14/2020	EPI_ISL_17373286
15	hCoV-19/Vietnam/DN2020-15/2020	EPI_ISL_17373274
16	hCoV-19/Vietnam/QNg2020-16/2020	EPI_ISL_17373318
17	hCoV-19/Vietnam/QNa2020-17/2020	EPI_ISL_17373287
18	hCoV-19/Vietnam/QNa2020-18/2020	EPI_ISL_17373288
19	hCoV-19/Vietnam/QNa2020-19/2020	EPI_ISL_17373289
20	hCoV-19/Vietnam/QNa2020-20/2020	EPI_ISL_17373290
21	hCoV-19/Vietnam/QNa2020-21/2020	EPI_ISL_17373291
22	hCoV-19/Vietnam/QNa2020-22/2020	EPI_ISL_17373292
23	hCoV-19/Vietnam/QNa2020-23/2020	EPI_ISL_17373293
24	hCoV-19/Vietnam/QNa2020-24/2020	EPI_ISL_17373294
25	hCoV-19/Vietnam/QNa2020-25/2020	EPI_ISL_17373295
26	hCoV-19/Vietnam/QNa2020-26/2020	EPI_ISL_17373296
27	hCoV-19/Vietnam/QNa2020-27/2020	EPI_ISL_17373297
28	hCoV-19/Vietnam/QNa2020-28/2020	EPI_ISL_17373298
29	hCoV-19/Vietnam/QNa2020-29/2020	EPI_ISL_17373299
30	hCoV-19/Vietnam/QNa2020-30/2020	EPI_ISL_17373300
31	hCoV-19/Vietnam/QNa2020-31/2020	EPI_ISL_17373301
32	hCoV-19/Vietnam/QNa2020-32/2020	EPI_ISL_17373302
33	hCoV-19/Vietnam/QNa2020-33/2020	EPI_ISL_17373303
34	hCoV-19/Vietnam/QNa2020-34/2020	EPI_ISL_17373304

35	hCoV-19/Vietnam/QNa2020-35/2020	EPI_ISL_17373305
36	hCoV-19/Vietnam/QNa2020-36/2020	EPI_ISL_17373306
37	hCoV-19/Vietnam/QNa2020-37/2020	EPI_ISL_17373307
38	hCoV-19/Vietnam/QNa2020-38/2020	EPI_ISL_17373308
39	hCoV-19/Vietnam/QNg2020-39/2020	EPI_ISL_17373319
40	hCoV-19/Vietnam/QNa2020-40/2020	EPI_ISL_17373309
41	hCoV-19/Vietnam/QNa2020-41/2020	EPI_ISL_17373310
42	hCoV-19/Vietnam/QNa2020-42/2020	EPI_ISL_17373311
43	hCoV-19/Vietnam/QNa2020-43/2020	EPI_ISL_17373312
44	hCoV-19/Vietnam/QNa2020-44/2020	EPI_ISL_17373313
45	hCoV-19/Vietnam/QNa2020-45/2020	EPI_ISL_17373314
46	hCoV-19/Vietnam/QNa2020-46/2020	EPI_ISL_17373315
47	hCoV-19/Vietnam/QNa2020-47/2020	EPI_ISL_17373316
48	hCoV-19/Vietnam/QNa2020-48/2020	EPI_ISL_17373317
49	hCoV-19/Vietnam/KH2020-49/2020	EPI_ISL_17373277
50	hCoV-19/Vietnam/QT2020-50/2020	EPI_ISL_17373320
51	hCoV-19/Vietnam/QT2020-51/2020	EPI_ISL_17373321
52	hCoV-19/Vietnam/KH2020-52/2020	EPI_ISL_17373278
53	hCoV-19/Vietnam/KH2020-53/2020	EPI_ISL_17373279
54	hCoV-19/Vietnam/KH2020-55/2020	EPI_ISL_17373280
55	hCoV-19/Vietnam/NT2020-54/2020	EPI_ISL_17373282

56	hCoV-19/Vietnam/PY2020-56/2020	EPI_ISL_17373283
57	hCoV-19/Vietnam/PY2020-57/2020	EPI_ISL_17373284
58	hCoV-19/Vietnam/BT2020-58/2020	EPI_ISL_17383071

Phụ lục 3. Danh sách 203 chủng năm 2021 tải lên <https://www.epicov.or>

Stt	Tên chủng	Mã chủng
1	hCoV-19/Vietnam/QNg2021-01/2021	EPI_ISL_9170832
2	hCoV-19/Vietnam/QNg2021_02/2021	EPI_ISL_9646455
3	hCoV-19/Vietnam/QNg2021-03/2021	EPI_ISL_9170833
4	hCoV-19/Vietnam/QNg2021-07/2021	EPI_ISL_9170834
5	hCoV-19/Vietnam/BT2021-02/2021	EPI_ISL_9170835
6	hCoV-19/Vietnam/BT2021-03/2021	EPI_ISL_9170836
7	hCoV-19/Vietnam/BT2021-04/2021	EPI_ISL_9066435
8	hCoV-19/Vietnam/QB2021_02/2021	EPI_ISL_9646456
9	hCoV-19/Vietnam/QB2021-03/2021	EPI_ISL_9170838
10	hCoV-19/Vietnam/QB2021-04/2021	EPI_ISL_9066434
11	hCoV-19/Vietnam/QB2021-05/2021	EPI_ISL_9170837
12	hCoV-19/Vietnam/KH2021_01/2021	EPI_ISL_9647488
13	hCoV-19/Vietnam/KH2021_02/2021	EPI_ISL_9647489
14	hCoV-19/Vietnam/KH2021_03/2021	EPI_ISL_9647490
15	hCoV-19/Vietnam/KH2021_04/2021	EPI_ISL_9647491

16	hCoV-19/Vietnam/NT2021_05/2021	EPI_ISL_9646457
17	hCoV-19/Vietnam/NT2021_06/2021	EPI_ISL_9647492
18	hCoV-19/Vietnam/NT2021_07/2021	EPI_ISL_9647493
19	hCoV-19/Vietnam/NT2021_08/2021	EPI_ISL_9646458
20	hCoV-19/Vietnam/NT2021_09/2021	EPI_ISL_9646459
21	hCoV-19/Vietnam/DN2021_10/2021	EPI_ISL_9646460
22	hCoV-19/Vietnam/DN2021_11/2021	EPI_ISL_9647494
23	hCoV-19/Vietnam/DN2021_12/2021	EPI_ISL_9646461
24	hCoV-19/Vietnam/DN2021_13/2021	EPI_ISL_9647495
25	hCoV-19/Vietnam/DN2021_14/2021	EPI_ISL_9646462
26	hCoV-19/Vietnam/DN2021_15/2021	EPI_ISL_9646463
27	hCoV-19/Vietnam/NT2021_16/2021	EPI_ISL_9647496
28	hCoV-19/Vietnam/NT2021_17/2021	EPI_ISL_9647497
29	hCoV-19/Vietnam/NT2021_18/2021	EPI_ISL_9647498
30	hCoV-19/Vietnam/NT2021_19/2021	EPI_ISL_9647499
31	hCoV-19/Vietnam/KH2021_20/2021	EPI_ISL_9647500
32	hCoV-19/Vietnam/KH2021_21/2021	EPI_ISL_9647501
33	hCoV-19/Vietnam/KH2021_22/2021	EPI_ISL_9647502
34	hCoV-19/Vietnam/KH2021_23/2021	EPI_ISL_9647503
35	hCoV-19/Vietnam/KH2021_24/2021	EPI_ISL_9647504
36	hCoV-19/Vietnam/KH2021_25/2021	EPI_ISL_9647505

37	hCoV-19/Vietnam/DN2021_26/2021	EPI_ISL_9647506
38	hCoV-19/Vietnam/DN2021_27/2021	EPI_ISL_9647507
39	hCoV-19/Vietnam/DN2021_28/2021	EPI_ISL_9647508
40	hCoV-19/Vietnam/DN2021_29/2021	EPI_ISL_9647509
41	hCoV-19/Vietnam/DN2021_30/2021	EPI_ISL_9647511
42	hCoV-19/Vietnam/NT2021_32/2021	EPI_ISL_9647512
43	hCoV-19/Vietnam/NT2021_33/2021	EPI_ISL_9647513
44	hCoV-19/Vietnam/NT2021_34/2021	EPI_ISL_9647514
45	hCoV-19/Vietnam/NT2021_35/2021	EPI_ISL_9647515
46	hCoV-19/Vietnam/QTr2021_36/2021	EPI_ISL_9647516
47	hCoV-19/Vietnam/QTr2021_37/2021	EPI_ISL_9647517
48	hCoV-19/Vietnam/QTr2021_38/2021	EPI_ISL_9647518
49	hCoV-19/Vietnam/QTr2021_39/2021	EPI_ISL_9647519
50	hCoV-19/Vietnam/QTr2021_40/2021	EPI_ISL_9647520
51	hCoV-19/Vietnam/PY2021_41/2021	EPI_ISL_9647521
52	hCoV-19/Vietnam/PY2021_42/2021	EPI_ISL_9647522
53	hCoV-19/Vietnam/PY2021_43/2021	EPI_ISL_9647523
54	hCoV-19/Vietnam/PY2021_44/2021	EPI_ISL_9647524
55	hCoV-19/Vietnam/QB2021_46/2021	EPI_ISL_9647525
56	hCoV-19/Vietnam/QB2021_47/2021	EPI_ISL_9647526
57	hCoV-19/Vietnam/QB2021_48/2021	EPI_ISL_9647527

58	hCoV-19/Vietnam/QB2021_49/2021	EPI_ISL_9647528
59	hCoV-19/Vietnam/QTr2021_50/2021	EPI_ISL_9647529
60	hCoV-19/Vietnam/QTr2021_51/2021	EPI_ISL_9647530
61	hCoV-19/Vietnam/QTr2021_52/2021	EPI_ISL_9647531
62	hCoV-19/Vietnam/QTr2021_53/2021	EPI_ISL_9647532
63	hCoV-19/Vietnam/QTr2021_54/2021	EPI_ISL_9647533
64	hCoV-19/Vietnam/DN2021_55/2021	EPI_ISL_9647534
65	hCoV-19/Vietnam/DN2021_56/2021	EPI_ISL_9670629
66	hCoV-19/Vietnam/DN2021_57/2021	EPI_ISL_9670630
67	hCoV-19/Vietnam/DN2021_58/2021	EPI_ISL_9670631
68	hCoV-19/Vietnam/DN2021_59/2021	EPI_ISL_9670632
69	hCoV-19/Vietnam/DN2021_60/2021	EPI_ISL_9670633
70	hCoV-19/Vietnam/KH2021_61/2021	EPI_ISL_9670634
71	hCoV-19/Vietnam/KH2021_62/2021	EPI_ISL_9670635
72	hCoV-19/Vietnam/KH2021_63/2021	EPI_ISL_9670636
73	hCoV-19/Vietnam/KH2021_64/2021	EPI_ISL_9670637
74	hCoV-19/Vietnam/KH2021_65/2021	EPI_ISL_9670638
75	hCoV-19/Vietnam/KH2021_66/2021	EPI_ISL_9670639
76	hCoV-19/Vietnam/KH2021_68/2021	EPI_ISL_9670640
77	hCoV-19/Vietnam/KH2021_69/2021	EPI_ISL_9670641
78	hCoV-19/Vietnam/KH2021_70/2021	EPI_ISL_9670642

79	hCoV-19/Vietnam/BT2021_71/2021	EPI_ISL_9670643
80	hCoV-19/Vietnam/BT2021_72/2021	EPI_ISL_9670644
81	hCoV-19/Vietnam/BT2021_73/2021	EPI_ISL_9670645
82	hCoV-19/Vietnam/BT2021_74/2021	EPI_ISL_9670646
83	hCoV-19/Vietnam/BT2021_75/2021	EPI_ISL_9670647
84	hCoV-19/Vietnam/BT2021_76/2021	EPI_ISL_9670648
85	hCoV-19/Vietnam/BT2021_77/2021	EPI_ISL_9670649
86	hCoV-19/Vietnam/BT2021_78/2021	EPI_ISL_9670650
87	hCoV-19/Vietnam/BT2021-79/2021	EPI_ISL_8994189
88	hCoV-19/Vietnam/BT2021-80/2021	EPI_ISL_8994205
89	hCoV-19/Vietnam/BT2021-81/2021	EPI_ISL_8994208
90	hCoV-19/Vietnam/BT2021-82/2021	EPI_ISL_8994200
91	hCoV-19/Vietnam/BT2021_85/2021	EPI_ISL_9691648
92	hCoV-19/Vietnam/BT2021_86/2021	EPI_ISL_9691664
93	hCoV-19/Vietnam/BT2021_87/2021	EPI_ISL_9691651
94	hCoV-19/Vietnam/BT2021_88/2021	EPI_ISL_9691677
95	hCoV-19/Vietnam/BT2021_89/2021	EPI_ISL_9691642
96	hCoV-19/Vietnam/BD2021_90/2021	EPI_ISL_9670651
97	hCoV-19/Vietnam/BD2021_91/2021	EPI_ISL_9670652
98	hCoV-19/Vietnam/BD2021_92/2021	EPI_ISL_9670653
99	hCoV-19/Vietnam/BD2021_93/2021	EPI_ISL_9670654

100	hCoV-19/Vietnam/BD2021_94/2021	EPI_ISL_9670655
101	hCoV-19/Vietnam/KH2021_95/2021	EPI_ISL_9670656
102	hCoV-19/Vietnam/KH2021_96/2021	EPI_ISL_9670657
103	hCoV-19/Vietnam/KH2021-97/2021	EPI_ISL_8994190
104	hCoV-19/Vietnam/KH2021-98/2021	EPI_ISL_8994196
105	hCoV-19/Vietnam/KH2021-99/2021	EPI_ISL_8994206
106	hCoV-19/Vietnam/KH2021-100/2021	EPI_ISL_8994207
107	hCoV-19/Vietnam/KH2021-101/2021	EPI_ISL_8994203
108	hCoV-19/Vietnam/KH2021-102/2021	EPI_ISL_8994184
109	hCoV-19/Vietnam/KH2021-103/2021	EPI_ISL_8994191
110	hCoV-19/Vietnam/KH2021-104/2021	EPI_ISL_8994198
111	hCoV-19/Vietnam/QB2021-105/2021	EPI_ISL_8994194
112	hCoV-19/Vietnam/QB2021-106/2021	EPI_ISL_8994186
113	hCoV-19/Vietnam/QB2021-107/2021	EPI_ISL_8994193
114	hCoV-19/Vietnam/QB2021-108/2021	EPI_ISL_8994195
115	hCoV-19/Vietnam/BD2021_109/2021	EPI_ISL_9670658
116	hCoV-19/Vietnam/BD2021_110/2021	EPI_ISL_9670659
117	hCoV-19/Vietnam/BD2021_111/2021	EPI_ISL_9670660
118	hCoV-19/Vietnam/BD2021_112/2021	EPI_ISL_9670661
119	hCoV-19/Vietnam/BD2021_113/2021	EPI_ISL_9670662
120	hCoV-19/Vietnam/DN2021-114/2021	EPI_ISL_9003849

121	hCoV-19/Vietnam/DN2021-115/2021	EPI_ISL_9003861
122	hCoV-19/Vietnam/DN2021-116/2021	EPI_ISL_9003847
123	hCoV-19/Vietnam/DN2021-117/2021	EPI_ISL_9003851
124	hCoV-19/Vietnam/DN2021-118/2021	EPI_ISL_9003840
125	hCoV-19/Vietnam/DN2021-119/2021	EPI_ISL_9003878
126	hCoV-19/Vietnam/QNa2021-120/2021	EPI_ISL_8936412
127	hCoV-19/Vietnam/QNa2021-121/2021	EPI_ISL_8979248
128	hCoV-19/Vietnam/QNa2021-123/2021	EPI_ISL_8979247
129	hCoV-19/Vietnam/QNa2021-124/2021	EPI_ISL_8994210
130	hCoV-19/Vietnam/QNa2021-125/2021	EPI_ISL_8994202
131	hCoV-19/Vietnam/QNa2021-126/2021	EPI_ISL_8994188
132	hCoV-19/Vietnam/QNa2021-127/2021	EPI_ISL_8994199
133	hCoV-19/Vietnam/QNa2021-128/2021	EPI_ISL_8994187
134	hCoV-19/Vietnam/QNa2021-129/2021	EPI_ISL_8994211
135	hCoV-19/Vietnam/QNa2021-130/2021	EPI_ISL_8994209
136	hCoV-19/Vietnam/QNa2021-131/2021	EPI_ISL_8994197
137	hCoV-19/Vietnam/QNa2021-132/2021	EPI_ISL_8994201
138	hCoV-19/Vietnam/QNa2021-133/2021	EPI_ISL_8994204
139	hCoV-19/Vietnam/QNa2021-134/2021	EPI_ISL_8994192
140	hCoV-19/Vietnam/DN2021-135/2021	EPI_ISL_9003853
141	hCoV-19/Vietnam/DN2021-136/2021	EPI_ISL_9003865

142	hCoV-19/Vietnam/DN2021-137/2021	EPI_ISL_9003857
143	hCoV-19/Vietnam/DN2021-138/2021	EPI_ISL_9003839
144	hCoV-19/Vietnam/DN2021-139/2021	EPI_ISL_9003845
145	hCoV-19/Vietnam/DN2021-140/2021	EPI_ISL_9003869
146	hCoV-19/Vietnam/DN2021-141/2021	EPI_ISL_9003867
147	hCoV-19/Vietnam/DN2021-142/2021	EPI_ISL_9003833
148	hCoV-19/Vietnam/DN2021-143/2021	EPI_ISL_9003876
149	hCoV-19/Vietnam/DN2021-144/2021	EPI_ISL_9003838
150	hCoV-19/Vietnam/DN2021-145/2021	EPI_ISL_9003877
151	hCoV-19/Vietnam/DN2021-146/2021	EPI_ISL_9003872
152	hCoV-19/Vietnam/DN2021-147/2021	EPI_ISL_9003855
153	hCoV-19/Vietnam/DN2021-148/2021	EPI_ISL_9003856
154	hCoV-19/Vietnam/DN2021-149/2021	EPI_ISL_9003863
155	hCoV-19/Vietnam/DN2021-150/2021	EPI_ISL_9003842
156	hCoV-19/Vietnam/DN2021-151/2021	EPI_ISL_9003836
157	hCoV-19/Vietnam/DN2021-152/2021	EPI_ISL_9003873
158	hCoV-19/Vietnam/DN2021-153/2021	EPI_ISL_9003874
159	hCoV-19/Vietnam/QNa2021-154/2021	EPI_ISL_9003868
160	hCoV-19/Vietnam/QNa2021-155/2021	EPI_ISL_9003850
161	hCoV-19/Vietnam/QNa2021-157/2021	EPI_ISL_9003871
162	hCoV-19/Vietnam/QNa2021-158/2021	EPI_ISL_9003852

163	hCoV-19/Vietnam/QNa2021-160/2021	EPI_ISL_9003846
164	hCoV-19/Vietnam/QNa2021-161/2021	EPI_ISL_9003841
165	hCoV-19/Vietnam/QNa2021-162/2021	EPI_ISL_9003858
166	hCoV-19/Vietnam/QNa2021-163/2021	EPI_ISL_9003848
167	hCoV-19/Vietnam/QNa2021-164/2021	EPI_ISL_9003854
168	hCoV-19/Vietnam/QNa2021-165/2021	EPI_ISL_9003843
169	hCoV-19/Vietnam/QNa2021-166/2021	EPI_ISL_9003835
170	hCoV-19/Vietnam/QNa2021-167/2021	EPI_ISL_9003860
171	hCoV-19/Vietnam/QNa2021-168/2021	EPI_ISL_9003864
172	hCoV-19/Vietnam/KH2021-170/2021	EPI_ISL_9003870
173	hCoV-19/Vietnam/KH2021-171/2021	EPI_ISL_9003866
174	hCoV-19/Vietnam/KH2021-172/2021	EPI_ISL_9003875
175	hCoV-19/Vietnam/KH2021-173/2021	EPI_ISL_9003837
176	hCoV-19/Vietnam/KH2021-174/2021	EPI_ISL_9003859
177	hCoV-19/Vietnam/KH2021-175/2021	EPI_ISL_9003862
178	hCoV-19/Vietnam/KH2021-176/2021	EPI_ISL_9003834
179	hCoV-19/Vietnam/QB2021_178/2021	EPI_ISL_9691647
180	hCoV-19/Vietnam/QB2021_179/2021	EPI_ISL_9691640
181	hCoV-19/Vietnam/QB2021_180/2021	EPI_ISL_9691645
182	hCoV-19/Vietnam/QB2021_181/2021	EPI_ISL_9691641
183	hCoV-19/Vietnam/QT2021_182/2021	EPI_ISL_9691653

184	hCoV-19/Vietnam/QT2021_183/2021	EPI_ISL_9691668
185	hCoV-19/Vietnam/QT2021_184/2021	EPI_ISL_9691669
186	hCoV-19/Vietnam/QT2021_185/2021	EPI_ISL_9691650
187	hCoV-19/Vietnam/QT2021_186/2021	EPI_ISL_9691659
188	hCoV-19/Vietnam/QNg2021-187/2021	EPI_ISL_17373322
189	hCoV-19/Vietnam/QNg2021-188/2021	EPI_ISL_17373323
190	hCoV-19/Vietnam/QTr2021-193/2021	EPI_ISL_17373328
191	hCoV-19/Vietnam/QTr2021-194/2021	EPI_ISL_17373329
192	hCoV-19/Vietnam/QNa2021-195/2021	EPI_ISL_17373330
193	hCoV-19/Vietnam/QTr2021-196/2021	EPI_ISL_17373331
194	hCoV-19/Vietnam/QTr2021-197/2021	EPI_ISL_17373332
195	hCoV-19/Vietnam/KH2021-198/2021	EPI_ISL_17373333
196	hCoV-19/Vietnam/KH2021-199/2021	EPI_ISL_17373334
197	hCoV-19/Vietnam/KH2021-200/2021	EPI_ISL_17373335
198	hCoV-19/Vietnam/KH2021-201/2021	EPI_ISL_17373336
199	hCoV-19/Vietnam/KH2021-202/2021	EPI_ISL_17373337
200	hCoV-19/Vietnam/KH2021-203/2021	EPI_ISL_17373338
201	hCoV-19/Vietnam/PY2021-204/2021	EPI_ISL_17373339
202	hCoV-19/Vietnam/PY2021-205/2021	EPI_ISL_17373340
203	hCoV-19/Vietnam/PY2021-206/2021	EPI_ISL_17373341