

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



NCS. ỨNG THỊ HỒNG TRANG

**ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC PHÂN TỬ CỦA VIRUS HỢP BÀO
HÔ HẤP TRÊN BỆNH NHÂN NHI VIÊM ĐƯỜNG HÔ HẤP
CẤP TÍNH NẶNG TẠI BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG VÀ
BỆNH VIỆN ĐA KHOA TỈNH QUẢNG NINH**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Hà Nội – 2025

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



NCS. Ứng Thị Hồng Trang

**ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC PHÂN TỬ CỦA VIRUS HỢP BÀO
HÔ HẤP TRÊN BỆNH NHÂN NHI VIÊM ĐƯỜNG HÔ HẤP
CẤP TÍNH NẶNG TẠI BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG VÀ
BỆNH VIỆN ĐA KHOA TỈNH QUẢNG NINH**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Ngành: Vi sinh vật học

Mã số: 9 42 01 07

**Xác nhận của Học viện
Khoa học và Công nghệ**

Người hướng dẫn 1

Người hướng dẫn 2

Hoàng Vũ Mai Phương

Nguyễn Huy Hoàng

Hà Nội – 2025

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án: “**Đặc điểm sinh học phân tử của virus hợp bào hô hấp trên bệnh nhân nhi viêm đường hô hấp cấp tính nặng tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh**” là công trình nghiên cứu của riêng tôi dưới sự hướng dẫn khoa học của tập thể hướng dẫn TS. Hoàng Vũ Mai Phương và GS.TS. Nguyễn Huy Hoàng.

Luận án sử dụng các mẫu bệnh phẩm lâm sàng trong “*Kế hoạch giám sát trọng điểm hội chứng cúm, nhiễm trùng đường hô hấp cấp tính nặng và bệnh tay chân miệng tại Việt Nam giai đoạn 2017-2020*”, số 4608/QĐ-BYT, được thực hiện tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương. Luận án sử dụng thông tin trích dẫn từ nhiều nguồn tham khảo khác nhau và các thông tin trích dẫn được ghi rõ nguồn gốc.

Các kết quả nghiên cứu của tôi được công bố chung với các tác giả khác đã được sự nhất trí của đồng tác giả khi đưa vào luận án. Các số liệu, kết quả được trình bày trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ một công trình nào khác ngoài các công trình công bố của tác giả.

Luận án được hoàn thành trong thời gian tôi làm nghiên cứu sinh tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hà Nội, ngày 24 tháng 4 năm 2025

Tác giả luận án



Ung Thị Hồng Trang

LỜI CẢM ƠN

Trước tiên, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc nhất tới TS. Hoàng Vũ Mai Phương-Trưởng khoa Vi rút, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương và GS.TS. Nguyễn Huy Hoàng-Viện trưởng Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã hướng dẫn tận tình và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu cũng như thực hiện luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn các đồng nghiệp tại Phòng thí nghiệm Cúm và Phòng thí nghiệm Các tác nhân vi rút đặc biệt truyền từ động vật sang người, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương đã luôn tạo điều kiện thuận lợi, đồng hành và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và thực hiện luận án tại đơn vị. Bằng những tình cảm chân thành nhất, tôi xin trân trọng cảm ơn sự giúp đỡ quý báu đó.

Trong quá trình nghiên cứu và học tập, tôi đã nhận được những ý kiến đóng góp quý báu của các nhà khoa học, các cán bộ nghiên cứu tại Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Những nhận xét và góp ý chuyên môn sâu sắc trong các buổi báo cáo, hội thảo đã giúp tôi hoàn thiện tốt nhất luận án của mình.

Nhân dịp này tôi cũng xin chân thành cảm ơn Ban giám đốc, tập thể cán bộ Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Ban giám đốc Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương đã tạo điều kiện thuận lợi nhất cho tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Sau cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc nhất đến gia đình, người thân và bạn bè đã luôn đồng hành và là nguồn động viên tinh thần to lớn đối với tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án.

Hà Nội, ngày 24 tháng 4 năm 2025

Tác giả luận án



Ung Thị Hồng Trang

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN.....	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT	vi
DANH MỤC CÁC BẢNG	ix
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ.....	x
MỞ ĐẦU.....	1
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU.....	4
1.1. Đặc điểm của virus hợp bào hô hấp	4
1.1.1. Đặc điểm chung của virus hợp bào hô hấp.....	4
1.1.2. Cấu trúc phân tử chức năng.....	6
1.1.3. Cơ chế nhân lên	14
1.1.4. Đa dạng di truyền virus hợp bào hô hấp	19
1.1.5. Đặc điểm dịch tễ học của virus hợp bào hô hấp	23
1.2. Các kỹ thuật chẩn đoán virus hợp bào hô hấp trong phòng thí nghiệm.....	26
1.2.1. Phương pháp khuếch đại axit nucleic.....	26
1.2.2. Phương pháp miễn dịch	27
1.2.3. Phương pháp phân lập.....	27
1.2.4. Phương pháp giải trình tự gen	28
1.3. Tình hình nghiên cứu virus hợp bào hô hấp hiện nay trên thế giới và Việt Nam	29
1.3.1. Tình hình nghiên cứu virus hợp bào hô hấp trên thế giới	29
1.3.2. Tình hình nghiên cứu virus hợp bào hô hấp ở Việt Nam	31
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	33
2.1. Đối tượng nghiên cứu	33
2.2. Thời gian, địa điểm nghiên cứu	33
2.2.1. Thời gian nghiên cứu	33

2.2.2.	<i>Địa điểm nghiên cứu</i>	33
2.3.	<i>Đạo đức trong nghiên cứu</i>	34
2.4.	<i>Sơ đồ thí nghiệm</i>	34
2.5.	<i>Các thiết bị, dụng cụ và hóa chất dùng trong nghiên cứu</i>	34
2.6.	<i>Phương pháp nghiên cứu</i>	36
2.6.1.	<i>Thu thập, vận chuyển, bảo quản mẫu bệnh phẩm hô hấp</i>	36
2.6.2.	<i>Tách chiết vật liệu di truyền</i>	36
2.6.3.	<i>Phản ứng realtime RT-PCR</i>	36
2.6.4.	<i>Phân lập virus hợp bào hô hấp</i>	38
2.6.5.	<i>Xác định chủng phân lập</i>	39
2.6.6.	<i>Giải trình tự hệ gen virus hợp bào hô hấp bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới</i>	39
2.6.7.	<i>Phân tích kết quả giải trình tự gen thế hệ mới</i>	45
2.6.8.	<i>Lắp ráp, chú giải hệ gen virus hợp bào hô hấp và tìm đột biến</i>	47
2.6.9.	<i>Xây dựng cây phát sinh chủng loại, phân nhóm di truyền</i>	47
2.6.10.	<i>Phân tích số liệu</i>	49
2.7.	<i>Đăng ký mã định danh cho các dữ liệu trình tự</i>	49
Chương 3.	KẾT QUẢ	50
3.1.	<i>Xác định sự lưu hành của virus hợp bào hô hấp trên bệnh nhân nhi viêm đường hô hấp cấp tính nặng tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh</i>	50
3.1.1.	<i>Đặc điểm các mẫu bệnh phẩm hô hấp thu thập</i>	50
3.1.2.	<i>Sự lưu hành của virus hợp bào hô hấp</i>	52
3.2.	<i>Đặc điểm sinh học phân tử của virus hợp bào hô hấp trên bệnh nhân nhi viêm đường hô hấp cấp tính nặng tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh</i>	56
3.2.1.	<i>Kết quả phân lập virus hợp bào hô hấp</i>	56
3.2.2.	<i>Kết quả giải trình tự hệ gen virus hợp bào hô hấp</i>	60
3.2.3.	<i>Đặc điểm sinh học phân tử các trình tự thu được</i>	64
3.2.4.	<i>Cây phát sinh chủng loại – Phân tích di truyền gen G</i>	69

3.2.5. Sự khác biệt axit amin trên cây phát sinh chủng loại.....	73
3.2.6. Động lực tiến hóa	80
Chương 4. BÀN LUẬN.....	85
4.1. Sự lưu hành của virus hợp bào hô hấp trên bệnh nhân nhi viêm đường hô hấp cấp tính nặng tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh	85
4.1.1. Tỷ lệ dương tính chung của virus hợp bào hô hấp	85
4.1.2. Tỷ lệ dương tính virus hợp bào hô hấp theo nhóm tuổi.....	86
4.1.3. Tỷ lệ dương tính virus hợp bào hô hấp theo giới tính	87
4.1.4. Tỷ lệ dương tính virus hợp bào hô hấp theo địa điểm nghiên cứu và năm thu mẫu	87
4.1.5. Mùa virus hợp bào hô hấp trong các năm nghiên cứu	88
4.1.6. Sự lưu hành các phân nhóm virus hợp bào hô hấp	89
4.1.7. Ảnh hưởng của virus SARS-CoV-2 và đại dịch COVID-19	91
4.2. Đặc điểm sinh học phân tử của virus hợp bào hô hấp trên bệnh nhân nhi viêm đường hô hấp cấp tính nặng tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh.....	93
4.2.1. Phân lập virus hợp bào hô hấp	93
4.2.2. Giải trình tự gen thế hệ mới	95
4.2.3. Đặc điểm hệ gen của virus hợp bào hô hấp.....	99
4.2.4. Đặc điểm sinh học phân tử và tiến hóa của RSV-A	101
4.2.5. Đặc điểm sinh học phân tử và tiến hóa của RSV-B	105
Chương 5. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	110
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	112
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	113
PHỤ LỤC.....	130

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Tên viết tắt	Tên đầy đủ tiếng Anh	Nghĩa tiếng Việt dùng trong luận án
AA	Acid amin	Axit amin
CPE	Cytopathic effect	Hiệu ứng huỷ hoại tế bào
CX3CR1	CX3C-chemokine receptor 1	
DFA	Direct fluorescent antibody	Kháng thể huỳnh quang trực tiếp
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control	Trung tâm kiểm soát và phòng ngừa bệnh tật Châu Âu
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	Xét nghiệm miễn dịch liên kết enzyme
ESS	Effective sample size	Cỡ mẫu hiệu quả
F	Fusion protein/gene	Protein/gen F
G	Attachment protein/gene	Protein/gen G
GE (ge)	Gene end	Tín hiệu kết thúc
GISAID	Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data	Sáng kiến Toàn cầu về Chia sẻ dữ liệu Cúm gia cầm
GS (gs)	Gene start	Tín hiệu khởi động gen
GTR	General-time reversible	Mô hình thay thế nucleotide có thể đảo ngược thời gian chung
HBD	Heparin-binding domain	Vị trí kẹp tóc
HPD	Highest posterior density	Khoảng mật độ hậu nghiệm cao nhất
HSPGs	Heparan sulfate proteoglycan	
HVR	Hypervariable region	Vùng siêu biến đổi
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1	Phân tử bám dính giữa các tế bào loại 1
ILI	Influenza-like illness	Hội chứng cúm
L	Large protein/gene	Protein/gen L
LE	Leader region	Vùng dẫn dắt

M	Matrix protein/gene	Protein/gen M
MCC	Maximum clade credibility tree	Cây phát sinh chủng loại với độ tin cậy tối đa
MCMC	Bayesian Markov Chain Monte Carlo	
N	Nucleoprotein/gene	Protein/gen N
NCBI	National Center for Biotechnology Information	Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học quốc gia của Mỹ
NGS	Next generation sequencing	Giải trình tự gen thế hệ mới
NS1	Non-structure protein/gene 1	Protein/gen phi cấu trúc 1
NS2	Non-structure protein/gene 2	Protein/gen phi cấu trúc 2
NT (nt)	Nucleotide	Nucleotide
ORF	Open reading frame	Khung đọc mở
P	Phosphoprotein	Protein P
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng trùng hợp chuỗi
PPV	Posterior probability value	Giá trị xác suất hậu nghiệm
RSV	Respiratory syncytial virus	Virus hợp bào hô hấp
RSV-A	Respiratory syncytial virus A	Virus hợp bào hô hấp phân nhóm A
RSV-B	Respiratory syncytial virus B	Virus hợp bào hô hấp phân nhóm B
RT-LAMP	Reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification	Phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt qua trung gian mạch vòng
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction	Phản ứng trùng hợp chuỗi phiên mã ngược
SARI	Severe acute respiratory infection	Viêm đường hô hấp cấp tính nặng
sG	Soluble-sG	
SH	Small hydrophobic protein/gene	Protein/gen nhỏ kỵ nước
TEM	Transmission electron microscopy	Kính hiển vi điện tử truyền qua

tMRCA	Time to most recent common ancestor	Thời gian xuất hiện tổ tiên chung gần nhất trên cây phát sinh gia hệ
TR (tr)	Trailer region	Vùng đuôi
US-CDC	Centre for Disease Control and Prevention	Trung tâm kiểm soát và phòng ngừa bệnh tật Hoa Kỳ
WGS	Whole genome sequencing	Giải trình tự toàn bộ hệ gen
WHO	World Health Organization	Tổ chức Y tế thế giới

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Các phương pháp chẩn đoán RSV trong phòng thí nghiệm.....	28
Bảng 2.1. Trình tự môi, probe và chu trình nhiệt trong phản ứng realtime RT-PCR chẩn đoán, phân nhóm RSV	37
Bảng 2.2. Thành phần hỗn hợp phản ứng realtime RT-PCR chẩn đoán và phân nhóm RSV	38
Bảng 2.3. Thành phần phản ứng và chu trình nhiệt của của phản ứng tạo cDNA.....	40
Bảng 2.4. Trình tự môi sử dụng để khuếch đại hệ gen phân nhóm RSV-A.....	41
Bảng 2.5. Trình tự môi sử dụng để khuếch đại hệ gen phân nhóm RSV-B	42
Bảng 2.6. Thành phần phản ứng và chu trình nhiệt khuếch đại 6 đoạn của hệ gen RSV..	43
Bảng 3.1. Đặc điểm dịch tễ các mẫu bệnh phẩm hô hấp trong nghiên cứu.....	50
Bảng 3.2. Tỷ lệ dương tính RSV theo địa điểm nghiên cứu	52
Bảng 3.3. Sự phân bố các trường hợp dương tính với RSV	53
Bảng 3.4. Sự phân bố các phân nhóm RSV theo năm nghiên cứu.....	55
Bảng 3.5. Kết quả phân lập virus RSV trên dòng tế bào Hep-2.....	57
Bảng 3.6. Số lượng chủng và bệnh phẩm hô hấp tiến hành giải trình tự gen thế hệ mới trong nghiên cứu.	60
Bảng 3.7. Kết quả giải trình tự hệ gen RSV bằng công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới trên hệ thống máy giải trình tự gen Illumina Miseq.....	62
Bảng 3.8. Vị trí, kích thước của các gen/protein trong hệ gen RSV.....	65
Bảng 3.9. Các đột biến và vị trí của chúng trong hệ gen RSV.....	68
Bảng 3.10. Ước tính sự khác biệt tiến hóa trình tự gen G giữa các lineage/nhóm của RSV-A.	81
Bảng 3.11. Ước tính sự khác biệt tiến hóa về trình tự gen G giữa các lineage/nhóm của RSV-B	83

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1.1. So sánh virus hợp bào hô hấp ở người (RSV) với các thành viên khác của họ Pneumoviridae [3].....	4
Hình 1.2. Hệ gen của virus hợp bào hô hấp (trên) và cấu trúc virion (dưới) [5].....	5
Hình 1.3. Virion RSV, protein và hệ gen [3].....	6
Hình 1.4. Sơ đồ hệ gen RSV từ đầu 3' đến đầu 5' [3].....	8
Hình 1.5. Cấu trúc protein G của RSV [16].....	10
Hình 1.6. Cấu trúc protein F của RSV [6].	11
Hình 1.7. Quá trình gắn màng và xâm nhập của RSV vào tế bào chủ [9].	15
Hình 1.8. Tổng quan về phiên mã và sao chép RNA [4].....	17
Hình 1.9. Vị trí nucleotide trong vùng dẫn dắt của hệ gen là quan trọng trong phiên mã và sao chép RNA [27].....	18
Hình 1.10. Cây phát sinh chủng loại hệ gen của RSV dựa trên các trình tự trên ViPR [14]	22
Hình 2.1. Sơ đồ chi tiết các bước tiến hành nghiên cứu.....	34
Hình 2.2. Quy trình giải trình tự hệ gen RSV bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới (NGS) trên hệ thống máy Miseq.....	40
Hình 2.3. Quy trình phân tích kết quả giải trình tự gen thế hệ mới bằng phần mềm CLC Genomics Workbench và chú giải các biến thể.....	46
Hình 3.1. Sự phân bố theo giới tính tại các điểm nghiên cứu.	51
Hình 3.2. Sự phân bố theo nhóm tuổi của các bệnh nhân nhi tham gia lấy mẫu nghiên cứu.	51
Hình 3.3. Tỷ lệ dương tính RSV theo nhóm tuổi giữa các năm trong nghiên cứu. ..	54
Hình 3.4. Sự lưu hành của virus hợp bào hô hấp theo thời gian.....	54
Hình 3.5. Sự lưu hành các phân nhóm RSV theo thời gian.....	56
Hình 3.6. Hình ảnh phân lập RSV trên dòng tế bào Hep-2 chụp bằng kính hiển vi quang học soi ngược với độ phóng đại 40X.....	58
Hình 3.7. Hình ảnh virus hợp bào hô hấp (RSV) trong dịch nổi phân lập virus trên dòng tế bào Hep-2 chụp dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) với độ phóng đại từ 1.000-20.000 lần.....	59
Hình 3.8. Điện di sản phẩm PCR khuếch đại hệ gen RSV.....	61

Hình 3.9. Kết quả một lần giải trình tự hệ gen RSV bằng công nghệ giải trình tự gen thể hệ mới trên hệ thống máy giải trình tự gen Illumina Miseq.	62
Hình 3.10. Kết quả so sánh dòng hàng một mẫu RSV-A với trình tự tham chiếu (EPI_ISL_412866-hRSV/A/England/397/2017) trên phần mềm CLC Genomics WorkBech 11.....	63
Hình 3.11. Hình ảnh xác định các đột biến axit amin trên hệ thống RSV Server của GISAID.....	67
Hình 3.12. Cây phát sinh chủng loại gen <i>G</i> phân nhóm RSV-A của các mẫu thu thập tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh giai đoạn 2017-2020.....	70
Hình 3.13. Cây phát sinh chủng loại kiểu gen BA9 gen <i>G</i> phân nhóm RSV-B của các mẫu thu thập tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh giai đoạn 2017-2020.	72
Hình 3.14. Sự khác biệt axit amin giữa lineage 1 kiểu gen RSV-A ON1 các mẫu của Việt Nam năm 2017-2020 so với trình tự chủng chuẩn kiểu gen ON1	74
Hình 3.15. Sự khác biệt axit amin giữa lineage 2 kiểu gen RSV-A ON1 các mẫu của Việt Nam năm 2017-2020 so với trình tự chủng chuẩn kiểu gen ON1	74
Hình 3.16. Sự khác biệt axit amin giữa lineage 3 kiểu gen RSV-A ON1 các mẫu của Việt Nam năm 2017-2020 so với trình tự chủng chuẩn kiểu gen ON1	75
Hình 3.17. Sự khác biệt axit amin giữa lineage 4 kiểu gen RSV-A ON1 các mẫu của Việt Nam năm 2017-2020 so với trình tự chủng chuẩn kiểu gen ON1	75
Hình 3.18. Sự khác biệt axit amin giữa lineage 5 kiểu gen RSV-A non-ON1 các mẫu của Việt Nam năm 2017-2020 so với trình tự chủng chuẩn kiểu gen ON1	76
Hình 3.19. Sự khác biệt axit amin vùng lặp HVR II và đoạn cuối trên gen <i>G</i> giữa 5 lineage các mẫu của Việt Nam năm 2017-2020 so với trình tự chủng chuẩn kiểu gen ON1.....	77
Hình 3.20. Sự khác biệt axit amin giữa lineage 1 kiểu gen RSV-B BA9 các mẫu của Việt Nam năm 2017-2020 so với trình tự chủng chuẩn kiểu gen BA.	78
Hình 3.21. Sự khác biệt axit amin giữa lineage 3 kiểu gen RSV-B BA9 các mẫu của Việt Nam năm 2017-2020 so với trình tự chủng chuẩn kiểu gen BA	78

Hình 3.22. Sự khác biệt axit amin trên gen <i>G</i> giữa 3 lineage thuộc kiểu gen RSV-B BA9 các mẫu của Việt Nam năm 2017-2020 so với trình tự chủng chuẩn kiểu gen BA.....	79
Hình 3.23. Kết quả tính toán tốc độ tiến hóa phân tử gen <i>G</i> của các trình tự RSV-A thu thập tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh giai đoạn 2017-2020.....	82
Hình 3.24. Kết quả tính toán tốc độ tiến hóa phân tử gen <i>G</i> của các trình tự RSV-B thu thập tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh giai đoạn 2017-2020.....	84

MỞ ĐẦU

Tính cấp thiết của vấn đề nghiên cứu

Virus hợp bào hô hấp (Respiratory syncytial virus - RSV) được phát hiện từ hơn 60 năm trước, là virus hô hấp phổ biến trong mùa đông và gây bệnh trên tất cả các độ tuổi. RSV là nguyên nhân chính của viêm tiểu phế quản trên khắp thế giới và có thể gây nên 70-80% các nhiễm trùng đường hô hấp dưới trong suốt mùa cao điểm. Nhiễm trùng đường hô hấp dưới ở trẻ nhỏ thường là viêm phổi, viêm tiểu phế quản. Nguyên nhân thường gặp nhất của viêm đường hô hấp dưới do virus là RSV. Theo ước tính, có tới 95% số trẻ bị nhiễm RSV trước khi được 2 tuổi. Đây cũng là nhóm tuổi có tỷ lệ tử vong do RSV cao nhất trong cộng đồng. Đến tuổi trưởng thành, con người vẫn có thể bị nhiễm RSV nhưng khả năng hồi phục nhanh hơn do hệ thống miễn dịch hoàn thiện. Tuy nhiên ở nhóm tuổi từ 60 tuổi trở lên, nguy cơ nhiễm RSV lại tăng lên. Giả thuyết được đưa ra là do hệ miễn dịch bị suy giảm, cũng tương tự như ở trẻ nhỏ do hệ miễn dịch chưa hoàn thiện.

RSV được chia thành hai phân nhóm RSV-A và RSV-B dựa trên đặc điểm di truyền và phân nhóm huyết thanh. Sự lưu hành các phân nhóm của RSV là khác ở các vùng khí hậu khác nhau. Các quốc gia ôn đới, mùa dịch chủ yếu là mùa đông và có thể kéo dài đến mùa xuân. Tại các nước nhiệt đới và cận nhiệt đới, dịch bệnh diễn ra gần như quanh năm, các quốc gia này lại chính là những nước kém phát triển, các nghiên cứu về RSV ít được thực hiện. Điều này cũng ảnh hưởng lớn tới đánh giá sự lưu hành của RSV tại các quốc gia này nói riêng và trên toàn thế giới nói chung.

Mỗi phân nhóm của RSV lại được chia thành nhiều kiểu gen khác nhau. Các nghiên cứu đã đưa ra kiểu gen của RSV là đặc trưng theo thời gian lưu hành. Tuy nhiên, thời điểm các kiểu gen này xuất hiện và chiếm ưu thế tại các quốc gia khác nhau là khác nhau. Hiện nay, các nghiên cứu về kiểu gen của RSV cũng như đặc điểm tiến hoá của các kiểu gen này rất ít, tập trung chủ yếu tại các quốc gia phát triển. Bên cạnh đó, việc phát triển vaccine cho RSV ở trẻ em vẫn đang ở giai đoạn thử nghiệm lâm sàng mà chưa được đưa vào sử dụng rộng rãi. Do đó, sự hiểu biết về cấu trúc phân tử, tiến hoá, cơ chế gây bệnh và đáp ứng miễn dịch của loại virus này đang rất được quan tâm. Nghiên cứu RSV cần được thực hiện đồng bộ không chỉ ở một vài quốc gia mà cần phải có dữ liệu của nhiều vùng lãnh thổ và khí hậu khác nhau để đưa ra cái nhìn toàn diện nhất.

Tại Việt Nam các nghiên cứu về RSV không được thực hiện nhiều. Các nghiên cứu này đều được thực hiện trước năm 2015. Trong đó, đặc điểm di truyền học được phân tích từ các mẫu thu thập trước năm 2012. Đặc biệt tại miền Bắc, chưa có một nghiên cứu đầy đủ và toàn diện nào về sự lưu hành của RSV nói chung cũng như trên

các bệnh nhân nhi viêm đường hô hấp cấp tính nặng nói riêng. Các nghiên cứu về đặc điểm sinh học phân tử, tiến hoá của RSV trên các mẫu thu thập tại các tỉnh miền Bắc chưa từng được thực hiện. Nghiên cứu về RSV từ trước tới nay chỉ coi RSV là một căn nguyên virus đồng nhiễm với các tác nhân hô hấp khác gây bệnh trên người. Do vậy, khoảng trống trong nghiên cứu RSV tại Việt Nam là rất lớn.

Từ năm 2017, trong kế hoạch giám sát trọng điểm nhiễm trùng đường hô hấp cấp tính nặng của Bộ Y tế đã lựa chọn các bệnh viện đại diện các khu vực để tiến hành thu thập mẫu. Bệnh viện Nhi Trung ương là bệnh viện tuyến cuối điều trị các bệnh trên trẻ nhỏ tại 28 tỉnh thành phía Bắc. Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh thuộc tỉnh Quảng Ninh đại diện cho vùng Đông Bắc, khu vực giao thương hàng hoá, phát triển du lịch và giáp với biên giới Trung Quốc. Đây là hai bệnh viện được lựa chọn làm điểm giám sát cho khu vực miền Bắc trong chương trình giám sát trọng điểm của Bộ Y tế. Xuất phát từ thực trạng này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài ***“Đặc điểm sinh học phân tử của virus hợp bào hô hấp trên bệnh nhân nhi viêm đường hô hấp cấp tính nặng tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh”*** để góp phần bổ sung những khoảng trống trong hiểu biết về RSV ở Việt Nam.

Mục tiêu nghiên cứu

Mục tiêu chung của nghiên cứu là theo dõi sự lưu hành và thay đổi di truyền của RSV tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh giai đoạn 2017-2020. Để thực hiện điều này nghiên cứu đã đưa ra hai mục tiêu cụ thể như sau:

- Mục tiêu 1: Xác định sự lưu hành của virus hợp bào hô hấp trên bệnh nhân nhi viêm đường hô hấp cấp tính nặng tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh.
- Mục tiêu 2: Xác định đặc điểm sinh học phân tử của virus hợp bào hô hấp tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh.

Nội dung nghiên cứu

Các nội dung thực hiện trong nghiên cứu để giải quyết các mục tiêu đã đề ra. Cụ thể các nội dung thực hiện theo từng mục tiêu như sau:

Nội dung 1:

- Thu thập mẫu bệnh phẩm hô hấp từ bệnh nhân nhi viêm đường hô hấp cấp tính nặng tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh trong giai đoạn 2017-2020.
- Tách chiết vật liệu di truyền RNA của virus, realtime RT-PCR chẩn đoán và phân nhóm RSV. Phân tích kết quả sự lưu hành của RSV.

Nội dung 2:

- Phân lập RSV trên dòng tế bào cảm nhiễm, kiểm tra sự nhân lên của các chủng virus.
- Giải trình tự toàn bộ hệ gen các chủng RSV và một số mẫu bệnh phẩm hô hấp dương tính. Xác định trình tự hệ gen, vị trí và kích thước các gen trên hệ gen. Xác định các đột biến trên các gen.
- Xây dựng cây phát sinh chủng loại của gen *G*. Tính toán khoảng cách di truyền và tốc độ tiến hóa của từng phân nhóm RSV.

Những đóng góp mới của luận án

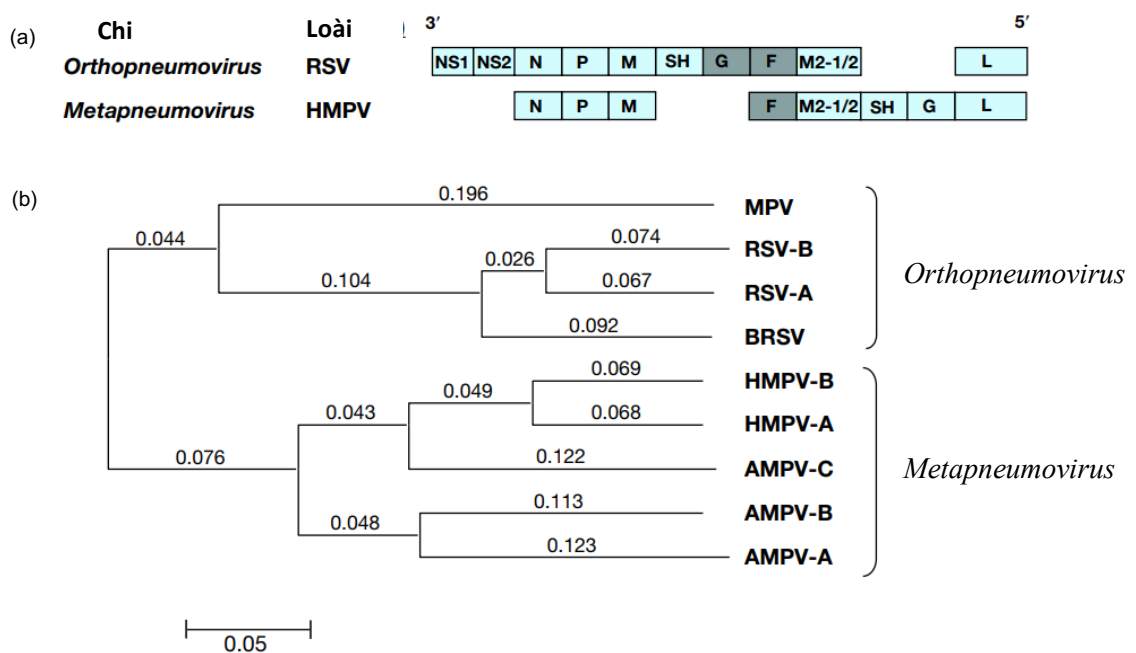
- Lần đầu tiên đặc điểm lưu hành của RSV tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh được công bố: tính chu kỳ, thời điểm gây dịch cũng như đỉnh dịch, phân nhóm lưu hành từng năm cũng được xác định và phân tích cụ thể.
- Đây là nghiên cứu đầu tiên được thực hiện trên đối tượng bệnh nhân thu thập tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh nói riêng và Việt Nam nói chung sau năm 2015. Hệ gen của RSV được giải trình tự bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới và công bố quốc tế. Các phân tích về đặc điểm di truyền, tiến hóa phân tử của toàn bộ chiều dài gen *G* thay vì vùng siêu biến đổi như các nghiên cứu trước đây đã đưa ra cái nhìn tổng quát, toàn diện hơn về quá trình tiến hóa, phát sinh chủng loại của RSV tại Việt Nam.

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Đặc điểm của virus hợp bào hô hấp

1.1.1. Đặc điểm chung của virus hợp bào hô hấp

Virus hợp bào hô hấp (Respiratory syncytial virus - RSV) thuộc bộ Mononegavirales, thành viên họ Paramyxoviridae, phân họ Pneumovirinae, chi *Orthopneumovirus* [1]. Năm 2016, phân họ Pneumovirinae được phân loại lại thành họ Pneumoviridae thuộc bộ Mononegavirales [2], [3]. Họ Pneumoviridae gồm hai chi *Metapneumovirus* (gồm 2 loài) và *Orthopneumovirus* (gồm 3 loài) phân loại dựa theo vật chủ của chúng. Chi *Metapneumovirus* gồm virus gây viêm phổi ở người (HMPV) và gia cầm (AMPV), chi *Orthopneumovirus* gồm RSV trên người (HRSV), RSV trên bò (BRSV) và virus viêm phổi trên chuột (MPV) [4]. Mối tương quan các thành viên của họ Pneumoviridae được thể hiện trong Hình 1.1.

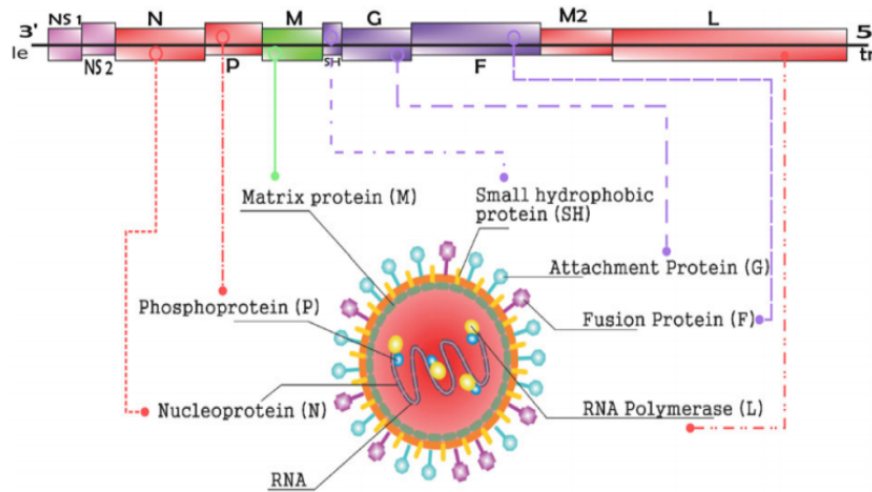


Hình 1.1. So sánh virus hợp bào hô hấp ở người (RSV) với các thành viên khác của họ Pneumoviridae [3].

(a) Sắp xếp thẳng hàng bản đồ gen của RSV và virus gây viêm phổi ở người (HMPV). (b) Mối quan hệ giữa các thành viên của hai chi thuộc họ Pneumoviridae dựa trên trình tự nucleotide của gen N.

RSV là virus có vỏ, hình cầu, vật liệu di truyền là một sợi RNA đơn âm, thẳng, không phân đoạn. Khối lượng phân tử 5×10^6 KDa, kích thước trung bình 120-300 nm. Hệ gen của virus mã hoá các protein và tạo nên nucleocapsid xoắn đối xứng, được bao bọc bởi vỏ ngoài là các gai glycoprotein F (Fusion) và G (Attachment), dài 11-12 nm (Hình 1.2) [5]. Đặc điểm đặc trưng của RSV khác với các thành viên khác

trong họ bao gồm số lượng gen, trật tự sắp xếp các gen trên hệ gen và thiếu sự hoạt động của hemagglutinin và neuraminidase [6].



Hình 1.2. Hệ gen của virus hợp bào hô hấp (trên) và cấu trúc virion (dưới) [5]. Chiều dài từ đầu 3'-le-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-tr đầu 5'. Mỗi gen (phía trên) mã hoá cho một protein tương ứng (phía dưới).

Hệ gen RSV chứa 10 gen mã hóa cho 11 protein: 3 protein vỏ (G, F, và SH); protein nội bào (M, ribonucleocapsid [N, P, L, và M2-1]); protein điều hoà (M2-2); và protein phi cấu trúc (NS1 và NS2).

Cũng như các virus khác trong họ Pneumoviridae, RSV có hệ gen RNA không phân đoạn, sợi đơn âm, với khoảng 15.200 nucleotide [7]. Mỗi gen mã hoá cho một protein chính, ngoại trừ mRNA M2 trùng khung đọc mở ORF mã hoá cho hai protein (M2-1, yếu tố của quá trình phiên mã và M2-2, một protein điều hoà). Bốn protein, N (nucleoprotein), P (phosphoprotein), L (RNA-dependent RNA polymerase), và M2-1 liên quan đến nucleocapsid. Lớp vỏ là ba protein bề mặt F (fusion – hoà màng), G (attachment – gắn màng), và SH (small non-glycosylated hydrophobic protein – tạo kênh ion) (Hình 1.2). Protein M (matrix) nằm ở mặt trong của lớp vỏ và có vai trò quan trọng trong sự tạo hình virus. Hai protein NS1 và NS2 là protein phi cấu trúc (nonstructure) có vai trò trong việc làm giảm phản ứng miễn dịch của cơ thể vật chủ với RSV bằng cách ức chế tế bào chết theo chương trình và tạo ra các interferon [8].

Hai glycoprotein bề mặt chính, F và G, là những kháng nguyên bề mặt quan trọng trong việc lây nhiễm và quyết định khả năng gây bệnh của virus [7]. Chúng là những kháng nguyên miễn dịch và là đích chính của phản ứng trung hoà. Glycoprotein G có chức năng bám gắn vào màng của tế bào chủ (với các *Paramyxovirus* khác, nhiệm vụ này là của hemagglutinin và neuraminidase). Protein F có vai trò trong quá trình xâm nhập ban đầu của virus vào tế bào vật chủ bằng cách hoà màng của virus với tế bào chủ và đẩy mạnh sự lan truyền của virus bằng cách

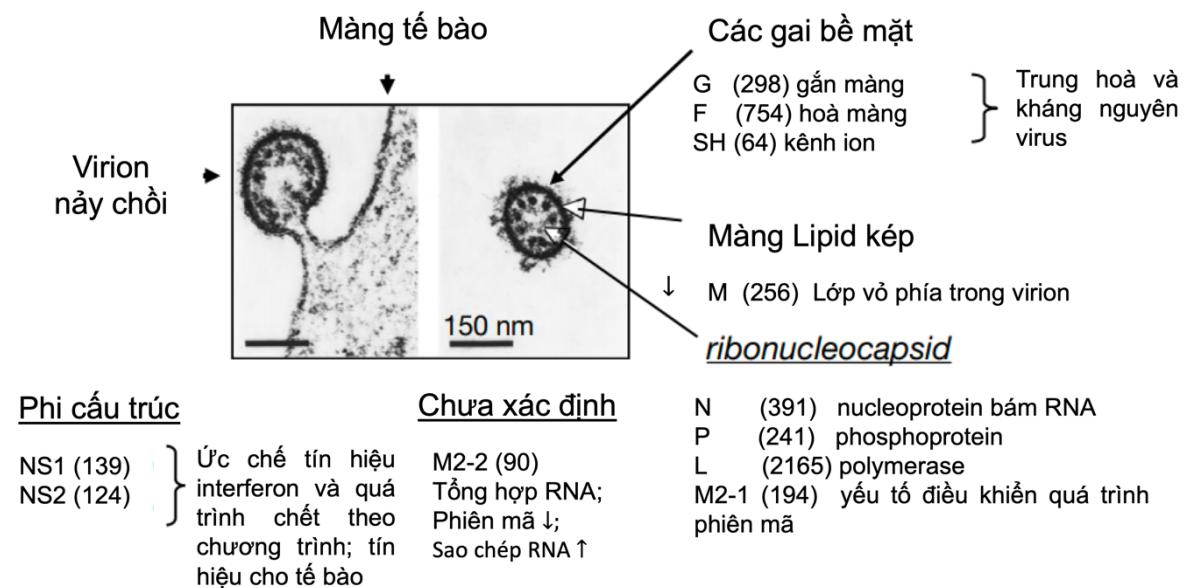
ghép chung các tế bào nhiễm với tế bào khoẻ mạnh bên cạnh, do đó tạo nên đặc tính hợp bào (syncytia) của RSV [1], [7].

RSV gồm 2 nhóm chính là RSV-A và RSV-B dựa trên sự khác nhau về kháng nguyên và di truyền của glycoprotein gắn màng G [9]. Sự biến đổi của protein G là lớn hơn nhiều so với các protein khác, cả trong cùng một nhóm và giữa hai nhóm RSV-A và RSV-B [10], [11]. Phân tích phân tử của vùng siêu biến đổi thứ hai (second hypervariable region – HVR) trong gen G được sử dụng phân nhóm các kiểu gen RSV [12]. Hai phân nhóm RSV-A và RSV-B có thể cùng lưu hành trong một mùa nhất định, với một hoặc hai kiểu gen nổi trội sau đó được thay thế trong những năm tiếp theo [13].

1.1.2. Cấu trúc phân tử chức năng

1.1.2.1. Cấu tạo virus

Virion RSV bao gồm một nucleocapsid được đóng gói trong một lớp vỏ lipid có nguồn gốc từ màng plasma tế bào chủ (Hình 1.3). Các virus được tạo ra trong nuôi cấy tế bào bao gồm các hạt hình cầu có đường kính 80-350 nm và thường chiếm ưu thế là các cấu trúc dạng sợi dài, đường kính 60-200 nm, chiều dài lên tới 10 μm [3].



Hình 1.3. Virion RSV, protein và hệ gen [3].

Hình ảnh virion RSV nảy chồi từ màng sinh chất của tế bào chủ (trái) và một virion hoàn chỉnh (phải). Các protein RSV, vị trí, chức năng của chúng trong virion, độ dài axit amin của protein trong ngoặc đơn.

Có tới 95% virus được nhân lên vẫn liên kết với bề mặt tế bào dưới dạng các hạt vì quá trình nảy chồi chưa thực hiện được. RSV dễ dàng bị mất tính lây nhiễm trong quá trình xử lý bằng sóng siêu âm, ánh sáng đèn có tia cực tím và đông - tan băng do tập hợp hạt virus mất tính ổn định [9].

Virion chứa nucleocapsid dạng xoắn được đóng gói trong vỏ lipoprotein thu được từ màng sinh chất của tế bào chủ trong quá trình nảy chồi [3]. Lớp vỏ này là lớp màng lipid kép, gồm ba glycoprotein bề mặt: protein lớn gắn màng G, protein hoà màng F và protein nhỏ kỵ nước SH (Hình 1.2 và 1.3). Ngoài ra còn có protein M (matrix protein) không bị glycosyl hóa ở mặt trong của lớp vỏ. Các glycoprotein virus tạo thành các homo-oligome riêng biệt xuất hiện dưới dạng các gai bề mặt ngắn (11-16nm). RSV thiếu hoạt động neuraminidase và hemagglutinin và được thay thế bởi hoạt động của hai protein bị sialyl hóa mạnh là G và F. Có bốn nucleocapsid/protein polymerase: nucleoprotein N, phosphoprotein P, yếu tố quá trình phiên mã M2-1 và tiểu đơn vị polymerase lớn L tạo thành cấu trúc xoắn đối xứng (Hình 1.2 và 1.3).

1.1.2.2. Hệ gen

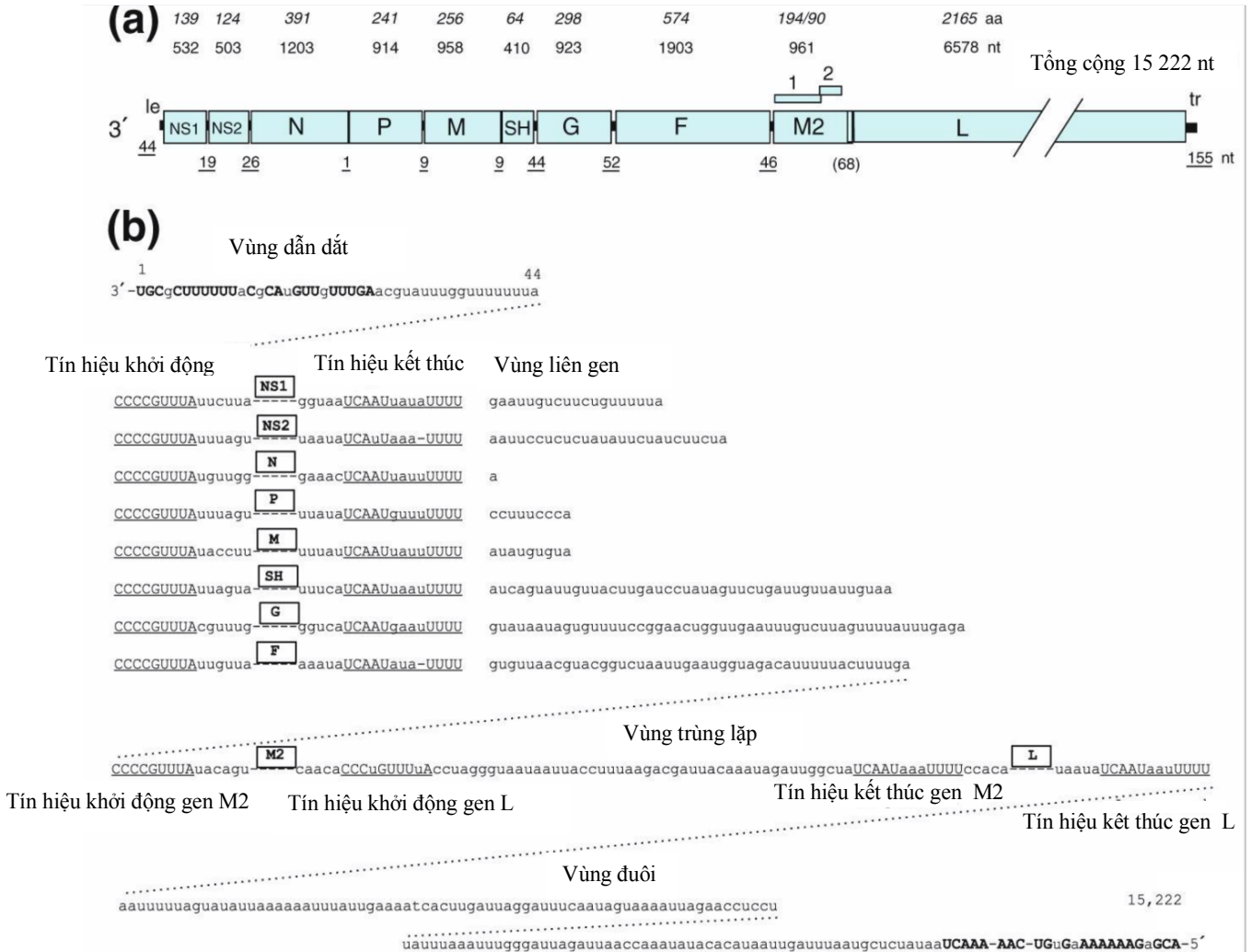
Hệ gen RSV không được gắn mũ methyl đầu 5' hay đuôi polyadenyl (PolyA) ở đầu 3'. Nó được bao bọc chặt với protein N cả trong virion và trong môi trường nội bào. Bên cạnh các vùng mã hóa, hệ gen RSV cũng bao gồm một vùng không mã hóa ngắn ở 2 đầu (vùng dẫn dắt - leader region LE và vùng đuôi - trailer region TR) cùng các vùng liên gen (intergenic regions) ngăn cách giữa các gen với nhau [5] (Hình 1.4a).

Hệ gen của RSV có 10 gen theo thứ tự: đầu 3' *NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L* đầu 5' (Hình 1.4a). Mỗi gen mã hóa một mRNA tương ứng. Mỗi mRNA mã hóa một protein chính duy nhất ngoại trừ M2, có hai khung đọc mở ORF riêng biệt chồng lên nhau một phần và mã hóa các protein M2-1 và M2-2. Khung đọc mở ORF M2-1 ở phía trước, sau khi phiên mã xong, các ribosome thoát khỏi khung đọc mở ORF M2-1 và tái tạo lại, sau đó được kích hoạt và tiếp tục dùng cho khung đọc mở ORF M2-2 ở phía sau [3].

Phần đầu 3' của hệ gen RSV bao gồm vùng dẫn dắt có 44 nucleotide nằm phía trước gen *NS1* (chủng chuẩn A2). Phần đầu 5' của hệ gen bao gồm vùng đuôi gồm 155 nucleotide theo sau gen *L* (Hình 1.4a) [4]. Mỗi gen bắt đầu bằng tín hiệu khởi động gen gồm 9 nucleotide có độ bảo thủ cao (9 nt gene start - GS) và kết thúc bằng tín hiệu kết thúc gồm 12-14 nucleotide có độ bảo thủ vừa phải (12-14 nt gene end - GE) trong đó kết thúc bằng 4-7 nucleotide U (trên mạch RNA) (Hình 1.4b) [3].

Chín gen đầu tiên được phân tách bằng các vùng liên gen có chiều dài khác nhau từ 1 đến 58 nucleotide với các chủng được giải trình tự cho đến nay. Các vùng liên gen này không có bất kỳ mô típ bảo thủ nào, tính bảo thủ của chúng là kém giữa các chủng với nhau [1], [9]. Khoảng cách giữa các vùng liên gen cũng khác nhau và không quan trọng, ngoại trừ tại một số vị trí nối giữa vài gen mà nucleotide đầu tiên của vùng liên gen là rất quan trọng đối với việc kết thúc mRNA. Hai gen cuối cùng, *M2* và *L*, trùng nhau 68 nucleotide. Cụ thể, tín hiệu khởi động gen GS của gen *L*

nằm ở phía trước 68 nucleotide của phần cuối gen *M2* (Hình 1.4) [3]. Sự trùng lặp tương tự xảy ra trong BRSV và sự trùng lặp gen xảy ra đối với một số gen ở một số thành viên của họ Rhabdoviridae và Filoviridae [3], [8], [14].



Hình 1.4. Sơ đồ hệ gen RSV từ đầu 3' đến đầu 5' [3].

(a): Thứ tự hệ gen RSV, mỗi hình chữ nhật đại diện cho một gen được phiên mã thành mRNA riêng biệt với chiều dài nucleotide (nt) và axit amin (aa) tương ứng hiển thị phía trên. Độ dài nucleotide vùng dẫn dắt (le), vùng liên gen và vùng đuôi (tr) được gạch chân. Vùng trùng lặp giữa gen *M2* và *L* được biểu thị chiều dài trong ngoặc đơn.

(b): Trình tự của vùng dẫn dắt, vùng liên gen, vùng trùng lặp và vùng đuôi. Các trình tự bảo thủ vùng 3' được in đậm. Các tín hiệu bắt đầu, kết thúc gen được gạch chân, các vị trí bảo tồn được in hoa.

1.1.2.3. Protein

Phiên mã và dịch mã RSV tương tự như các thành viên khác của bộ Mononegavirales, với một số ngoại lệ. 10 gen được phiên mã thành 10 mRNA đều có khung đọc mở duy nhất, trừ gen *M2* có 2 khung đọc mở trùng nhau [6]. 10 mRNA sau đó được dịch mã thành 11 protein. Bốn protein là thành phần của phức hợp

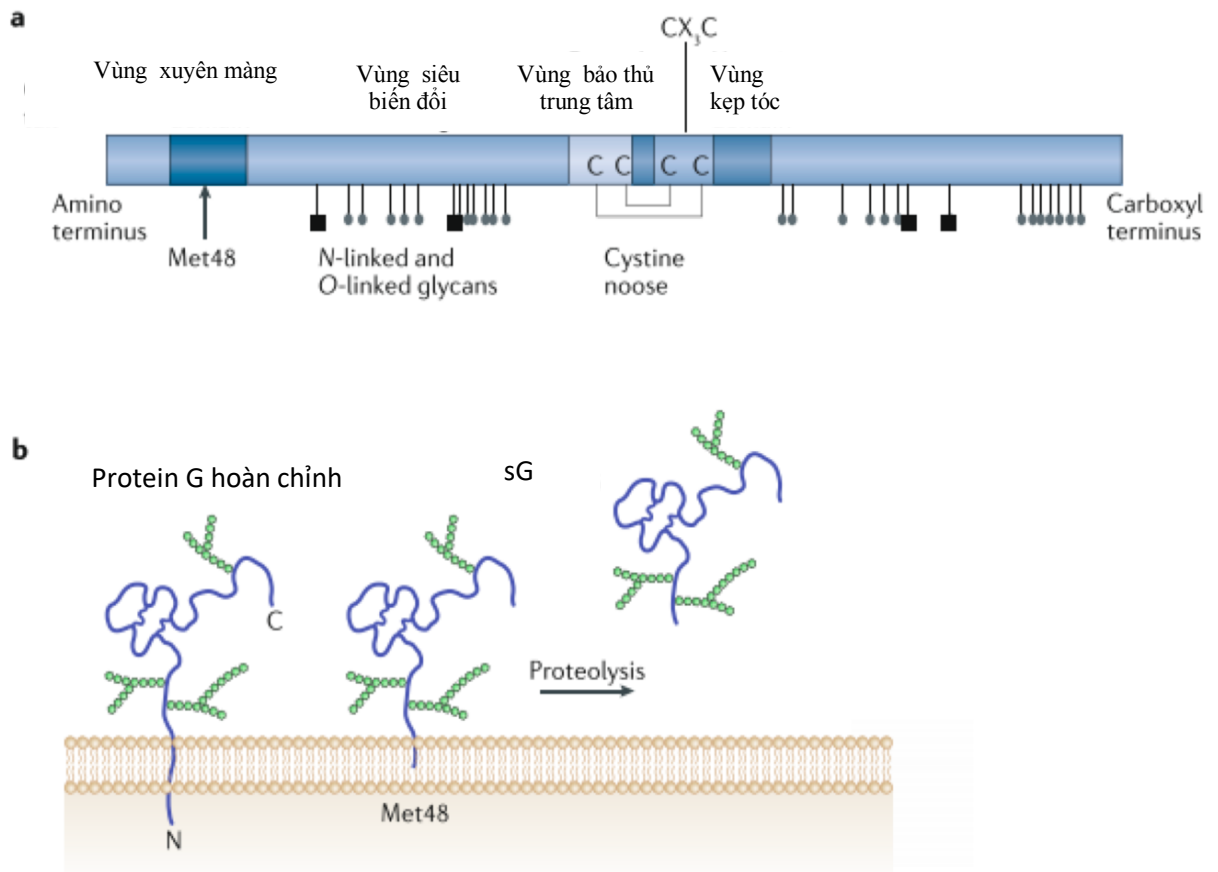
nucleocapsid và polymerase: nucleoprotein (N), phosphoprotein (P), yếu tố quá trình phiên mã (M2-1) và protein lớn (L). Ba glycoprotein xuyên màng là glycoprotein lớn (G), glycoprotein hòa màng (F) và protein nhỏ kỵ nước (SH). Ngoài ra còn có các protein phi cấu trúc (NS1, NS2) và matrix (M) (Hình 1.2).

Protein G

Protein G có kích thước 90 kDa với chiều dài khoảng 300 axit amin. Protein G là một glycoprotein lớn xuyên màng loại II và là protein có liên quan đến sự gắn màng giữa virus và tế bào chủ [7]. Protein G chứa một vùng kỵ nước duy nhất đóng vai trò là peptit tín hiệu và cũng là mỏ neo màng [15]. Màng neo này nằm gần đầu N của protein với hai phần ba đầu C của phân tử hướng ngoại bào [8].

Protein G không có tương đồng trình tự với các protein gắn màng *Paramyxovirus* khác, và không có chức năng hemagglutinate hoặc neuraminidase. Protein G bị glycosyl hóa nhiều với một vài chuỗi carbohydrat liên kết N và có khoảng 24-25 chuỗi liên kết O [16]. Ectodomain của protein G (phần protein màng kéo dài ra phía ngoại bào) bao gồm hai vùng phân tách lớn (mucin-like variable region). Các vùng phân tách lớn này được glycosyl hóa cao, giàu proline, serine và threonine, và được cho là có các cấu trúc siêu biến đổi (HVR – Hypervariable region) (Hình 1.5a). Các vùng này rất khác nhau giữa và trong hai phân nhóm kháng nguyên [17].

Giữa hai vùng HVR là vùng bảo thủ trung tâm (central conserved domain) nằm gần mucin-like region I và vùng vị trí kẹp tóc (heparin binding domain) nằm gần mucin-like region II (Hình 1.5a). Vùng bảo thủ trung tâm có trình tự 13 axit amin bảo thủ cao, bao phủ một phần với cystine noose lên phía đầu N của nó [16]. Cystine noose là cấu trúc loop bề mặt có chứa từ 1 tới nhiều liên kết disulfua. Lý do cho sự bảo thủ nghiêm ngặt của 13 axit amin này đến nay chưa được biết rõ [15]. Cystine noose của protein G trên RSV gồm 4 cystine tạo thành hai liên kết disulfua với dạng topology 1-4, 2-3; trong đó cystine thứ ba và bốn trong sự sắp xếp này tạo thành mô típ CX3C [3]. Những đặc điểm này của protein G cũng tương tự như của chất nhầy được tạo ra trong đường thở của người mặc dù khối lượng phân tử của protein G nhỏ hơn nhiều so với chất nhầy đường thở. Điều này cho thấy khả năng bắt chước chất nhầy đường hô hấp của protein G RSV [4].



Hình 1.5. Cấu trúc protein G của RSV [16].

(a): Chiều dài hoàn chỉnh của protein G và các vùng cấu trúc sau dịch mã. (b): Hai đồng dạng của protein G.

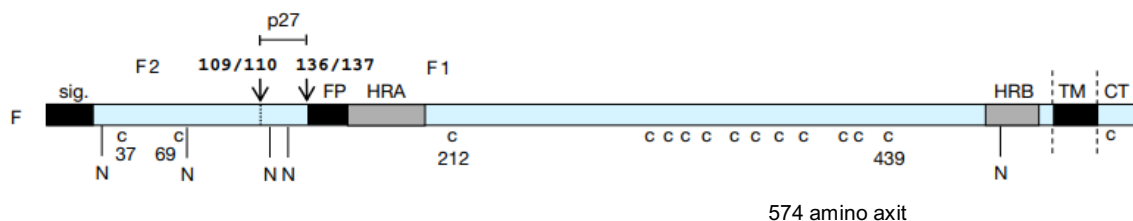
Protein G cũng được biểu hiện như một dạng đơn chất tiết ra từ tế bào (Soluble-sG). Sự dịch mã ở ATG thứ hai trong ORF (codon 48 – Met 48) nằm giữa vùng xuyên màng của protein G đã tạo ra sG (Hình 1.5b). sG đã được chứng minh là hoạt động như một kháng nguyên môi cho kháng thể kháng G và giảm hoạt động kháng virus của bạch cầu [7]. Chức năng của sG có vai trò quan trọng với sự phát triển của kháng thể đơn dòng thụ động hướng G. Dạng đơn chất sG này chiếm 20% tổng số protein G được tạo ra trong quá trình nuôi cấy tế bào, nhưng có tới 80% trong số đó được giải phóng khỏi các tế bào [3].

Protein G là protein có cấu trúc thay đổi liên tục theo thời gian giữa các chủng RSV và trình tự của nó đã được sử dụng trong nhiều nghiên cứu dịch tễ học và tiến hóa. Sự thay đổi này chủ yếu diễn ra ở 2 vùng HVR tạo ra các nhóm kháng nguyên của RSV (được gọi là RSV-A và RSV-B). Những nhóm này cũng được gọi là các phân typ (subtype) hoặc phân nhóm (subgroup) bởi vì các nghiên cứu huyết thanh học RSV ban đầu chỉ xác định được một kiểu huyết thanh duy nhất với hai kiểu kháng nguyên riêng biệt [7].

Protein F

Protein F của RSV có 574 axit amin và có cấu trúc tương tự như protein F của các thành viên trong họ Paramyxoviridae. Protein F trực tiếp tham gia vào quá trình xâm nhập của virus bằng sự hoà màng giữa virion và màng tế bào của vật chủ, giúp cho nucleocapsid đi vào trong tế bào chất [2]. Giai đoạn sau của quá trình nhiễm trùng, protein F cũng có khả năng hòa màng với các tế bào khỏe mạnh lân cận và tạo thành dạng hợp bào đa nhân syncytia. Đây là đặc điểm huỷ hoại tế bào và lan truyền của RSV [8], [18].

Protein F là một glycoprotein loại I, với một peptit tín hiệu được phân cắt ở đầu N sau aa25 và một neo màng đầu C [19]. Để trở thành một protein hoàn chỉnh có hoạt động chức năng, protein F phải được phân cắt tại hai vị trí đa bazơ được phân tách bởi 27 axit amin (peptide27; pep27, p27) gồm 2 hoặc 3 liên kết glycan (Hình 1.6). Protein F được tổng hợp như một tiền chất không hoạt động F0. Tiền chất này được kích hoạt bằng cách phân cắt ở hai vị trí (axit amin RARR↓E-109/110 và KKRKRR↓F-136/137) bởi một protease tế bào giống như furin. Điều này tạo ra 2 phân đoạn F1 và F2, thứ tự từ đầu N đến đầu C: F2 (109 axit amin), pep27 (27 axit amin) và F1 (438 axit amin). F1 và F2 vẫn được liên kết bởi hai liên kết disulfua (C-37/C-439 và C-69/C-212) [6].



Hình 1.6. Cấu trúc protein F của RSV [6].

Protein F được chia thành hai phân đoạn F1 và F2 tại hai vị trí đa bazơ 109/110 và 136/137. Giữa hai vị trí đa bazơ là 27 axit amin (p27).

Trong BRSV, pep27 có hoạt tính tachykinin (peptit có hoạt tính sinh học) và có thể đóng một vai trò trong việc thúc đẩy quá trình viêm, nhưng pep27 của RSV ở người không giống với một tachykinin và không có hoạt động dung hợp tuân theo mô hình chung của các protein F của *Paramyxovirus* [7]. Protein F của RSV thiếu hoạt tính hemagglutinin và có thêm liên kết disulfide giữa aa37 và aa439. Đầu N của tiểu đơn vị F1 chứa một đoạn axit amin kỵ nước, được gọi là peptit hòa màng (fusion peptide - FP trong Hình 1.6). Đầu N này chèn vào màng tế bào đích, sao cho bộ ba phân tử protein F có thể tạo cầu nối giữa virus và màng tế bào [3].

Không giống như protein G, trình tự của ectodomain protein F khác nhau khoảng 5% giữa RSV-A và RSV-B. Việc thiếu sự đa dạng trình tự của protein F giải thích kiểu huyết thanh đơn của RSV và hoàn toàn trái ngược với sự đa dạng trình tự

quan sát được của một số protein hòa màng loại I khác, như HIV-Env của HIV và haemagglutinin (HA) của cúm [7]. Do đó, protein F của RSV không trải qua quá trình trôi/trượt kháng nguyên như một chiến lược trốn tránh hệ thống miễn dịch của vật chủ. Điều này giúp cho protein F là mục tiêu lý tưởng để phát triển các loại vaccine và là mục tiêu của các kháng thể được sử dụng để điều trị dự phòng [6].

Protein SH

Gen *SH* mã hoá protein SH có chiều dài 64 axit amin (phân nhóm RSV-A) hoặc 65 axit amin (phân nhóm RSV-B). SH là một protein xuyên màng duy nhất của virion RSV, với một đầu N nội bào và đầu C hướng ngoại bào [20]. Chức năng của protein SH đến nay chưa được biết đến đầy đủ. Protein SH chủ yếu tập trung trên màng của thể Golgi trong các tế bào bị nhiễm bệnh, mặc dù các cụm protein SH cũng được quan sát thấy trên phức hợp ER và màng plasma [3], [20].

Một số loại protein SH khác nhau đã được phát hiện bao gồm dạng cắt ngắn N và hai biến thể glycan liên kết N, một trong số đó được biến đổi thêm bằng polylactosamine. Protein SH hình thành các cấu trúc giống như lỗ pentameric và tạo ra hoạt động giống như kênh ion chọn lọc điện tích dương cation [3]. Do đó, protein SH được xem như là một viroporin, một loại protein virus nhỏ có thể thay đổi tính thấm của màng và có thể ảnh hưởng đến sự nảy chồi và chết theo chương trình của các tế bào nhiễm virus [14].

Trong các nghiên cứu tại phòng thí nghiệm, RSV thiếu protein SH vẫn có thể tồn tại, và có thể tạo thành các hợp bào đa nhân syncytia. Các báo cáo khác cũng chỉ ra rằng, việc thiếu protein SH dẫn đến kiểu hình giảm độc lực ở trẻ em và hiệu quả tái bản trên chuột bị giảm mười lần [20]. Nhìn chung, những kết quả này cho thấy sự tham gia “mờ nhạt” của protein SH trong quá trình sao chép và cơ chế bệnh sinh của RSV.

Protein M

Protein M gồm 256 axit amin đóng vai trò chính trong hình thái của virion. Giai đoạn nhiễm trùng sớm, protein M được phát hiện trong nhân và có thể là nguyên nhân gây ức chế phiên mã vật chủ trong quá trình nhiễm RSV. Trong khi đó ở giai đoạn muộn hơn, protein M được phát hiện trong tế bào chất (nơi tổng hợp RNA virus) và trong màng plasma (nơi hình thành virion) [9]. Vai trò của protein M trong quá trình tổng hợp RNA của virus được xem như để chuẩn bị cho việc đóng gói vật liệu di truyền thành virion và trong việc vận chuyển nucleocapsid từ các thể vùi đến màng plasma [6]. Protein M không bắt buộc phải có trong quá trình hình thành các sợi virus (tiền thân của các virus có khả năng lây truyền), nhưng khi không có protein M, các sợi này vẫn bị còi cọc và chưa trưởng thành [7]. Protein M cùng với 3 loại protein F, protein G và protein SH tạo thành lớp vỏ bọc của virus.

Protein N

Protein N có 391 axit amin liên kết chặt chẽ với hệ gen và antigenome để tạo thành nucleocapsid xoắn ốc, tạo các khuôn để tổng hợp RNA và mRNA [4]. Ngoài ra, protein N cũng có vai trò trong việc chống lại miễn dịch bẩm sinh của vật chủ [5]. Nucleocapsid của RSV có hình dạng xoắn đối xứng và có bốn protein nucleocapsid trong virion thực hiện sao chép, phiên mã hệ gen RSV: protein nucleocapsid N, phosphoprotein P, yếu tố chống nhiễm trùng M2-1 và tiểu đơn vị polymerase lớn L [4].

Protein P

Protein P gồm 241 axit amin và là một yếu tố polymerase thiết yếu. Protein P tương tác với hai loại protein khác của virus: protein N và protein L. Protein P tương tác với protein N và tạo thành nucleocapsid. Trong khi đó, tương tác giữa protein P và L là tiểu đơn vị chính của RNA polymerase virus [4]. Chức năng của protein P là cho phép tính đặc hiệu của protein N đối với sự đóng gói RNA virus và mang lại sự ổn định của protein L trong phức hợp ribonucleo [4].

Protein P là protein RSV được phosphoryl hóa và chứa phosphate ở 10-12 vị trí. Các vị trí khác nhau này thể hiện tốc độ luân chuyển khác nhau do tác động qua lại giữa các kinase tế bào và phosphatase. Protein P cũng có vai trò trong việc phân tách protein M từ nucleocapsid trong quá trình tạo vỏ để bắt đầu dạng virus hoạt động [9].

Protein L

Protein L có 2.165 axit amin và có chiều dài rất giống với các Paramyxovirinae khác nhưng trình tự có sự tương đồng thấp và không rõ ràng dọc theo chiều dài phân tử [9]. Protein L của virus hợp bào hô hấp là một RNA polymerase phụ thuộc RNA (RdRp) của virus có chứa nhiều hoạt động enzyme cần thiết để sao chép. Cấu trúc protein L gồm 3 vùng bảo tồn có hoạt động enzyme: vùng RdRp, vùng polyribonucleotidyl transferase (PRNTase) và vùng methyltransferase (MTase) – xúc tác quá trình methyl hóa mũ [21]. Do đó protein L chịu trách nhiệm cho các hoạt động của enzyme trong quá trình sao chép và phiên mã của virus.

Protein M2-1 và M2-2

Protein M2-1 gồm 194 axit amin đảm bảo quá trình polymerase cả trong gen và giữa các gen, ngăn chặn sự tổng hợp các mRNA ngắn và cho phép phiên mã của các gen. Protein M2-1 bao gồm bốn chuỗi axit amin, mỗi chuỗi gồm 194 axit amin, tạo thành một tetra-protein đồng nhất bền [22]. M2-1 tương tác với protein P và với RNA, ưu tiên liên kết với các trình tự giàu polyA. M2-1 cũng được đề xuất tham gia vào quá trình lắp ráp RSV bằng cách tương tác với protein M. Tuy nhiên, điều này

còn gây tranh cãi vì các báo cáo khác cho thấy M2-1 không cần thiết cho sự hình thành các hạt virus [23].

Protein M2-2 gồm 90 axit amin được biểu hiện nội bào ở mức độ thấp, và trạng thái của nó là protein cấu trúc hay không cấu trúc đến nay vẫn chưa được xác định [3]. RSV tái tổ hợp bị xóa bỏ trình tự mã hóa protein M2-2 có quá trình tái bản chậm hơn RSV kiểu hoang dã trong nuôi cấy tế bào. Khi không có M2-2, sự phiên mã của virus sẽ tăng lên và sự sao chép của RNA bị giảm. Điều này gợi ý rằng, đối với RSV dạng tự nhiên, protein M2-2 chịu trách nhiệm một phần quá trình tổng hợp RNA từ phiên mã đến sao chép RNA diễn ra trong quá trình lây nhiễm và tạo ra các hệ gen mới để đóng gói [24].

Protein NS1 và NS2

Các protein không cấu trúc của virus (NS1 và NS2) chỉ có trong RSV mà không có trong các thành viên khác của họ *Pneumovirinae* [18]. NS1 và NS2 là các protein nhỏ, gồm 139 axit amin (NS1) và 124 axit amin (NS2). Hai protein này được cho là góp phần làm thay đổi phản ứng miễn dịch thông qua hoạt động ức chế lên quá trình sản xuất và phát tín hiệu interferon. Cơ chế này được thể hiện trong cả mô hình in vitro và thí nghiệm trên động vật [25].

Các protein NS được cho là những yếu tố quyết định chính đến phạm vi lây nhiễm cho vật chủ và độc lực của virus. Điều này đã được minh chứng bởi một nghiên cứu vaccine dự tuyển sử dụng BRSV với các gen NS của RSV người, chúng làm giảm phản ứng interferon và cho phép tái bản liên tục hệ gen của RSV [9]. Bên cạnh đó, protein NS cũng dường như ức chế quá trình chết theo chương trình của tế bào, tạo điều kiện thuận lợi hơn nữa cho sự phát triển của virus và điều chỉnh sự nhân lên của virus [5].

1.1.3. Cơ chế nhân lên

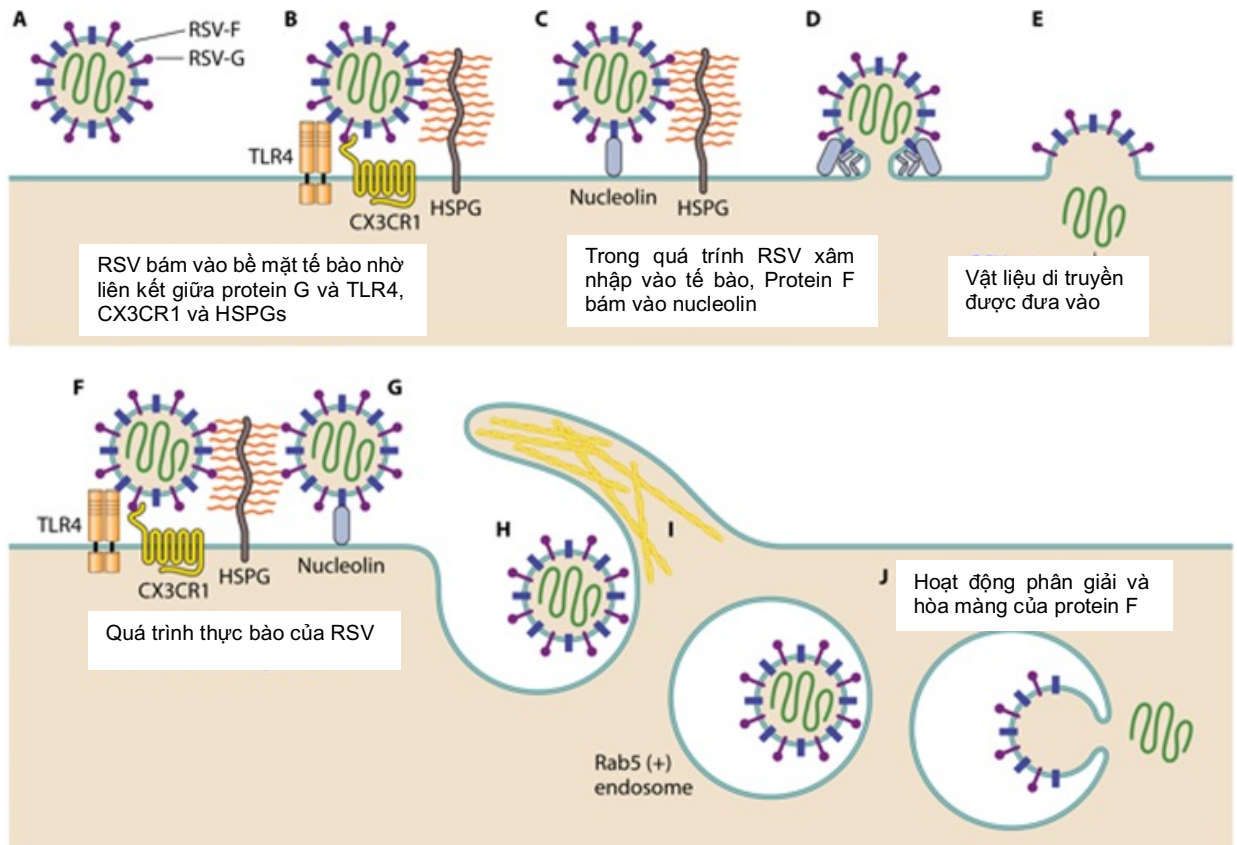
1.1.3.1. Xâm nhập

Có nhiều thụ thể receptor được cho là tham gia vào quá trình RSV xâm nhập vào tế bào vật chủ, bao gồm annexin II, CX3C-chemokine receptor 1 (CX3CR1), thụ thể tăng trưởng biểu bì (epidermal growth factor receptor - EGF), các lectin phụ thuộc canxi, thụ thể Toll-like 4 (TLR4), phân tử bám dính giữa các tế bào loại 1 (intercellular adhesion molecule 1 - ICAM-1), nucleolin, và heparan sulfate proteoglycan (HSPGs) [17], [26]. Điều thú vị là trong số các thụ thể này, annexin II, HSPGs và các lectin loại C được cho là liên kết với các vùng giàu carbohydrate của các protein RSV-F và RSV-G.

Glycoprotein RSV-G liên kết với HSPGs (Hình 1.7), thụ thể này có nhiều trên nhiều loại tế bào và đặc biệt là trên các dòng tế bào bất tử, bao gồm cả tế bào Hep-2. Tuy nhiên, HSPGs không được tìm thấy trên bề mặt đỉnh của các tế bào biểu mô được

biệt hóa, nơi quá trình sao chép RSV diễn ra chính trong cơ thể người nhiễm bệnh [9].

Protein G của RSV cũng liên kết với CX3CR1 thể hiện trên bề mặt đỉnh của các tế bào biểu mô phế quản [7]. Ngoài ra, sự tương tác giữa protein G và CX3CR1 gây ra tín hiệu tế bào vì nó có khả năng điều chỉnh tính hướng các chất hoá học của bạch cầu. Khi kết hợp với nhau, sự tương tác giữa protein G của RSV và receptor CX3CR1 rất quan trọng đối với việc gắn các hạt virus vào bề mặt tế bào và tạo ra các sự kiện tín hiệu xuôi dòng do sự tương tác này [17].



Hình 1.7. Quá trình gắn màng và xâm nhập của RSV vào tế bào chủ [9].

Hai protein F và G tham gia vào quá trình xâm nhập của RSV qua các receptor trên bề mặt tế bào (A-E). Quá trình thực bào của RSV vào tế bào chủ (F-J).

Một số protein được cho là có tương tác với protein F và liên quan tới quá trình RSV xâm nhập vào tế bào như ICAM-1, EGF và nucleolin. Trong số các protein này thì nucleolin là liên kết mạnh nhất với protein F. Nhiều dữ liệu đã chỉ ra nucleolin tương tác với nhiều loại virus như Parainfluenza3 (PIV-3), Enterovirus, virus gây sốt xuất huyết Crimean–Congo, virus liên quan đến Adeno typ 2 (AAV-2) và HIV-1 [7], [17]. Vì nucleolin được tìm thấy với số lượng lớn hơn trên bề mặt các tế bào đang hoạt động phân chia, nên nó được xem là đóng vai trò quan trọng trong nhiễm trùng đường hô hấp dưới ở trẻ nhỏ vì phế nang của trẻ liên tục phát triển cho đến khoảng 2 tuổi [9].

Ngoài CX3CR1 và nucleolin, glycoprotein RSV-F và -G liên kết với một số các thụ thể khác trong quá trình xâm nhập tế bào. Như được hiển thị trong Hình 1.7, glycoprotein RSV-F liên kết với receptor TLR4 được biểu hiện trên các tế bào biểu mô phế quản đường thở và kích hoạt tín hiệu của virus trong quá trình xâm nhập. Tuy nhiên, TLR4 tự nó không đủ để RSV xâm nhập vào tế bào. Thay vào đó, RSV liên kết với TLR4 kích hoạt hoạt động kinase, hỗ trợ cho sự xâm nhập của các hạt RSV vào tế bào chủ. Mặc dù TLR4 không cần thiết cho quá trình lây nhiễm, TLR4 được xem như một cơ chế kích hoạt tín hiệu tế bào cần thiết cho sự xâm nhập của RSV, và do đó TLR4 được xem như receptor tín hiệu [9].

Trong hoặc sau khi liên kết với receptor, nucleocapsid RSV được truyền vào tế bào chất của tế bào chủ (Hình 1.7). Sự nội hóa này xảy ra khi lớp vỏ RSV hoà màng với tế bào chủ tại hoặc gần màng plasma [9], [17].

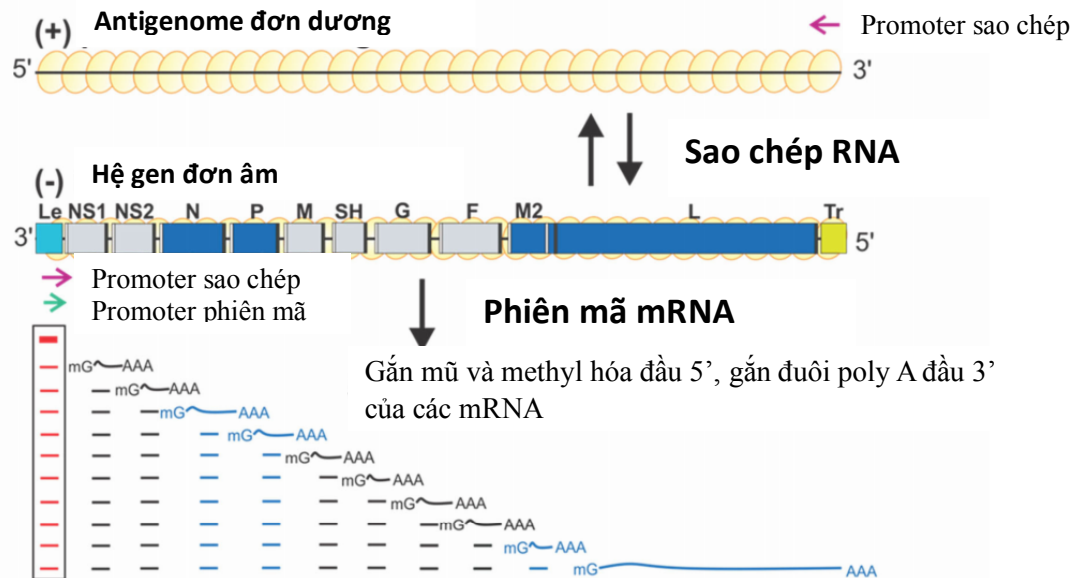
1.1.3.2. *Phiên mã*

Để phiên mã, polymerase tiếp cận vào đầu 3' của hệ gen và sao chép gen vào các mRNA tương ứng của chúng (Hình 1.8) bằng một quá trình tuần tự liên tục được điều khiển bởi tín hiệu bắt đầu GS và tín hiệu kết thúc GE [4]. Quá trình tổng hợp của mỗi mRNA bắt đầu bằng việc polymerase đối diện với nucleotide đầu tiên của tín hiệu GS. Do đó, tín hiệu GS kích hoạt sự bắt đầu tổng hợp mRNA. Ngoài ra, trình tự bổ sung của mRNA mới như một tín hiệu cho sự gắn mũ và methyl hóa mũ bởi polymerase [21]. Việc gắn mũ và/hoặc methyl hóa này là cần thiết cho sự kéo dài các mạch mRNA.

Polymerase tham gia vào quá trình tổng hợp mRNA không phản ứng khi gặp tín hiệu khởi động gen GS mới, nhưng gặp phải tín hiệu kết thúc gen GE sẽ kích hoạt gắn đuôi poly A vào mRNA, kết thúc phiên mã một mRNA. Sau đó xuất hiện yếu tố làm cho polymerase truyền qua phản ứng với tín hiệu khởi động gen GS mới [3]. Phức hợp ribosome của tế bào chủ sẽ dịch mã các protein từ bản sao mRNA của virus giống với các mRNA của tế bào. Việc kích hoạt polyadenyl hóa, kết thúc phiên mã ở các tín hiệu GE khác nhau không hoàn toàn hiệu quả và đôi khi polymerase tiếp tục tổng hợp thông qua gen tiếp theo. Điều này tạo ra các mRNA lỗi có chiều dài khác nhau chiếm khoảng 10% tổng số mRNA [3]. Tỷ lệ này chính là tỷ lệ sai sót trong quá trình phiên mã tạo ra các đoạn mRNA của RSV. Tuy nhiên điều này lại là cần thiết để tạo ra protein L.

Quá trình phiên mã diễn ra tuần tự một chiều và không cung cấp tín hiệu GS cho sự khởi đầu gen L, vì nó nằm ở phía trước của tín hiệu kết thúc GE của gen M2 (Hình 1.4b). Các nghiên cứu với các bản sao nhỏ cho thấy, sau khi hoàn thành phiên mã gen M2, các polymerase dò ngược lại bằng cách quét ngược để tìm tín hiệu bắt đầu gen GS của protein L [3]. Một phần của các tín hiệu M2-GE và L-GS trùng nhau.

Vùng trùng lặp đường như không chứa bất kỳ yếu tố hoạt động nào khác ngoài các yếu tố hoạt động *cis* (*cis*-acting elements). Hơn nữa, polymerase đã dò tìm theo cả hai hướng để phát hiện ra tín hiệu bắt đầu gen GS. Sự hiện diện của tín hiệu M2-GE trong gen *L* (do sự chồng chéo) làm cho 90% các bản sao mới của gen *L* được gắn thêm polyA và tín hiệu kết thúc. Quá trình tổng hợp mRNA của protein L có độ dài đầy đủ phụ thuộc vào “lỗi” của quá trình polymerase đọc ở tín hiệu M2-GE [3].



Hình 1.8. Tổng quan về phiên mã và sao chép RNA [4].

Các polymerase tiếp cận với hệ gen đơn âm của RSV ở đầu 3' để thực hiện phiên mã hoặc sao chép RNA. Các polymerase gắn vào antigenome ở đầu 3' và thực hiện bước thứ hai của quá trình sao chép RNA. Hai promoter của quá trình sao chép (màu tím) ở đầu 3' của hệ gen và antigenome và một promoter phiên mã (màu xanh) ở đầu 3' của hệ gen. Các mRNA với đầu 5' gắn mũ Metyl Guanosine (mG) và đầu 3' gắn đuôi poly-A (A_n) nằm dưới các gen tương ứng. Hệ gen và antigenome được bao bọc trong protein N (vòng tròn màu vàng).

Phiên mã RSV có sự không tương ứng giữa các gen với nhau, trong đó phiên mã giảm theo trật tự của gen trên mạch RNA (Hình 1.8). Tức là, các gen càng nằm gần đầu 3' thì có số lượng mRNA nhiều hơn, các gen càng nằm gần đầu 5' thì có số lượng mRNA ít hơn [27]. Điều này là điển hình cho Mononegavirales và xảy ra do một số polymerase phiên mã giải phóng và thoát khỏi hệ gen ở các điểm nối gen khác nhau [2], [3].

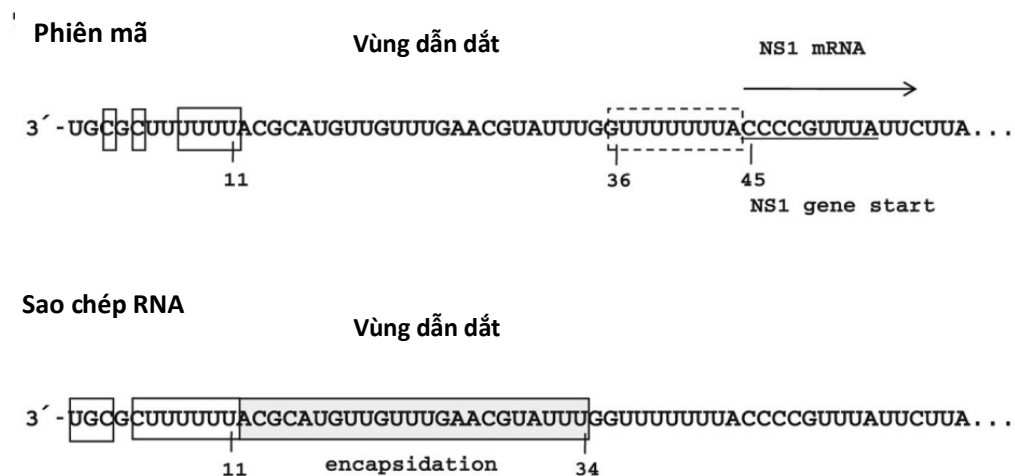
Các nghiên cứu với các bản sao nhỏ cho thấy N, P và L là các protein virus cần thiết cho phiên mã. Nhưng trong điều kiện chỉ gồm 3 protein này, quá trình phiên mã kết thúc sớm và không đặc hiệu trong vòng vài trăm nucleotide, các gen nằm ở gần đầu 5' cũng không được phiên mã một cách đầy đủ. Quá trình phiên mã đầy đủ đòi

hỏi phải có thêm protein M2-1. Protein M2-1 ngăn chặn sự tổng hợp các mRNA ngắn và cho phép phiên mã của các gen [22].

1.1.3.3. Sao chép

Sự sao chép RNA của RSV bắt đầu bằng việc polymerase đối diện với nucleotide đầu tiên ở đầu 3' của hệ gen. Các polymerase bỏ qua các tín hiệu bắt đầu gen GS và tín hiệu kết thúc gen GE và tạo ra một bản sao mạch đơn dương với đầy đủ chiều dài của hệ gen, antigenome (Hình 1.8). Một phần của antigenome được bổ sung thêm 1-3 nucleotide ở đầu 3', phần bổ sung này sẽ không được sao chép vào hệ gen RNA. Tầm quan trọng của việc bổ sung các nucleotide này chưa được biết đầy đủ, nhưng nó có thể đại diện cho một cơ chế điều chỉnh của promoter khởi động [4]. Số lượng antigenome được tạo ra ít nhất gấp 10 lần số lượng hệ gen ban đầu, vì promoter của antigenome hiệu quả hơn so với hệ gen và do sự tổng hợp từ hệ gen bị chia cho việc sao chép RNA và quá trình phiên mã [4], [21].

Các yếu tố hoạt động *cis* ở đầu 3' của hệ gen có liên quan đến việc bắt đầu phiên mã và sao chép RNA (Hình 1.8). Phiên mã đòi hỏi hai yếu tố trình tự: 11 nucleotide ở đầu 3' của hệ gen (vùng Le) và sự hiện diện của tín hiệu GS xuôi dòng gần đó. Ngoài ra, hiệu quả phiên mã được tăng lên nhờ sự hiện diện của trình tự giàu U được tìm thấy ở cuối của khu vực dẫn dắt (nucleotide 36-44) (Hình 1.8, 1.9) [4] [27].



Hình 1.9. Vị trí nucleotide trong vùng dẫn dắt của hệ gen là quan trọng trong phiên mã và sao chép RNA [27].

Các nucleotide trong khung (phía trên) là các nucleotide rất cần thiết của quá trình phiên mã. Các nucleotide trong khung (phía dưới) là các nucleotide cần thiết cho quá trình sao chép RNA của RSV.

Để sao chép RNA, 11 nucleotide đầu 3' của hệ gen là đủ để bắt đầu quá trình. Sự tổng hợp đầy đủ chiều dài RNA phụ thuộc vào sự hiện diện bổ sung của nucleotide 16-34, đặc biệt là tín hiệu đóng gói trong 34 nucleotide đầu tiên của hệ gen – promoter

sẽ bắt cặp vào 34 nucleotide này của vùng Le ở đầu 3' (Hình 1.9). Do đó, 11 nucleotide đầu 3' của hệ gen là một yếu tố khởi đầu cần thiết cho cả quá trình phiên mã và sao chép RNA. Các đột biến cho thấy rằng, quá trình phiên mã đặc biệt phụ thuộc vào các vị trí 3, 5, 8, 9, 10 và 11 [27]. Sự sao chép RNA cũng phụ thuộc vào các vị trí này, cũng như các vị trí 1, 2, 6 và 7 (Hình 1.9) [28].

Như đã đề cập phía trên, trình tự cụ thể giữa 24-26 nucleotide đầu 3' của hệ gen và antigenome là các yếu tố promoter bảo thủ. Trên hệ gen và antigenome, 11 nucleotide đầu tiên chỉ khác nhau ở vị trí số 4: nhiệm vụ trong hệ gen (4G) là ưu tiên cho quá trình phiên mã hơn sao chép RNA. Trong khi đó antigenome (4U hoặc 4C) là ngược lại, ưu tiên cho sao chép RNA hơn phiên mã [28]. Phân tích đột biến của promoter antigenome cho thấy rằng các đột biến thay thế nucleotide đơn ở vị trí 1-7 của promoter ảnh hưởng lên quá trình sao chép RNA là tương đương như đối với các đột biến trong hệ gen [27]. Các nghiên cứu sao chép nhỏ cho thấy 36 nucleotide đầu tiên của antigenome là đủ để bắt đầu và tổng hợp hệ gen với đầy đủ chiều dài. Tuy nhiên, hiệu suất của quá trình sao chép được tăng lên bởi các nucleotide 37-155 [29]. Do đó, những khác biệt nhỏ này giữa hai promoter góp phần tạo ra thứ bậc trong việc sản xuất RNA của mRNA, hệ gen và antigenome.

Phiên mã và sao chép đều được bắt đầu từ một promoter ở vùng dẫn dắt (Le) ở đầu 3' của hệ gen (Hình 1.8). Trong quá trình phiên mã, polymerase có thể tạo ra mRNA bằng cách phản ứng các tín hiệu GS và GE ở hai đầu mỗi gen. Tín hiệu GS giúp polymerase bắt đầu quá trình tổng hợp RNA. Tương tự với các virus khác, phần bổ sung của nó ở đầu 5' của RNA mới sinh cũng có chức năng, gắn mũ và methyl hóa. Tín hiệu GE giúp polymerase tạo đuôi polyA và giải phóng mRNA. Sau đó polymerase có thể quét hệ gen để định vị tín hiệu GS tiếp theo và khởi động lại quá trình tổng hợp mRNA. Một số polymerase tách khỏi khuôn mẫu tại mỗi vùng liên gen, dẫn đến giảm số lượng phiên mã từ đầu 3' đến đầu 5' của hệ gen [27]. Trong quá trình sao chép, polymerase bỏ qua các trình tự gen GS khi nó di chuyển dọc theo hệ gen, cho phép nó tiến đến phần cuối của hệ gen để tạo ra antigenome RNA. Promoter vùng Tr ở đầu 3' của antigenome sau đó phát tín hiệu tổng hợp hệ gen. Khả năng polymerase bỏ qua các tín hiệu gen GS khi nó đang tạo ra antigenome có thể là do RNA sao chép được bao bọc bằng nucleoprotein N khi nó được tổng hợp. Vì vậy, sự đóng gói là một yếu tố chính để phân biệt phiên mã và sao chép [27], [28].

1.1.4. Đa dạng di truyền virus hợp bào hô hấp

RSV được phân loại thành hai phân nhóm RSV-A và RSV-B dựa trên sự thay đổi kháng nguyên và dựa trên chủ yếu trình tự gen *G*, hai phân nhóm này được phân tách ra từ khoảng 350 năm trước [8]. RSV thể hiện tính thời vụ với nhiều kiểu gen,

thường cùng lưu hành với sự thay đổi ưu thế giữa các nhóm RSV-A và RSV-B sau một đến hai năm.

Cho đến nay, virus RSV-A đã được chia thành 12 kiểu gen (genotype) (GA1-GA7, SAA1, NA1-2, ON1-2) và virus RSV-B thành 32 kiểu gen (GB1-5, BA1-14, SAB1-4, URU1-2, NZB 1-2, BA-CCA, BA-CCB, BA-C, CBB và CB1) dựa trên sự biến đổi của gen *G* [3], [14]. Các cơ chế thúc đẩy sự ưu thế và thay đổi các kiểu gen cụ thể đến nay vẫn chưa được biết rõ. Sự thay thế các kiểu gen là đa yếu tố và liên quan tới khả năng miễn dịch của vật chủ, các giao tiếp xã hội, sự di cư của các cộng đồng cụ thể và các yếu tố virus bao gồm khả năng biến đổi hệ gen của chúng [5].

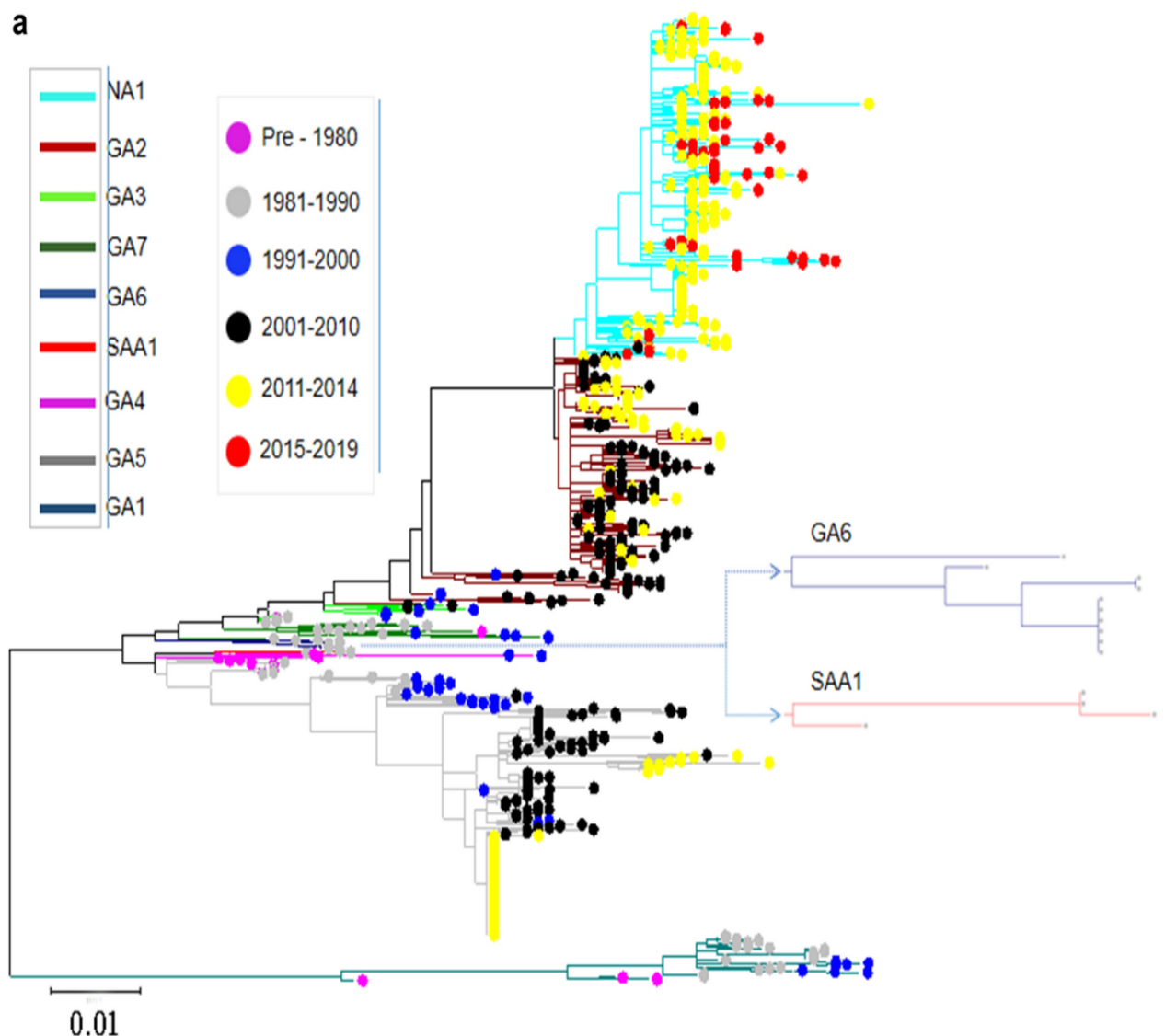
Từ các nghiên cứu kéo dài nhiều năm, RSV-A dường như chiếm ưu thế hơn RSV-B trên toàn thế giới [6]. Điều này được giả định là có liên quan đến mức độ biến đổi di truyền trong các kiểu gen của 2 phân nhóm, đặc biệt là trong gen mã hóa protein *G*. Với RSV-A biểu hiện mức độ biến đổi di truyền protein *G* cao hơn so với RSV-B [16]. Mức độ miễn dịch của cộng đồng đối với các kiểu gen cụ thể cũng có thể dẫn đến sự chọn lọc miễn dịch và ảnh hưởng đến sự lưu hành kiểu gen ưu thế [5].

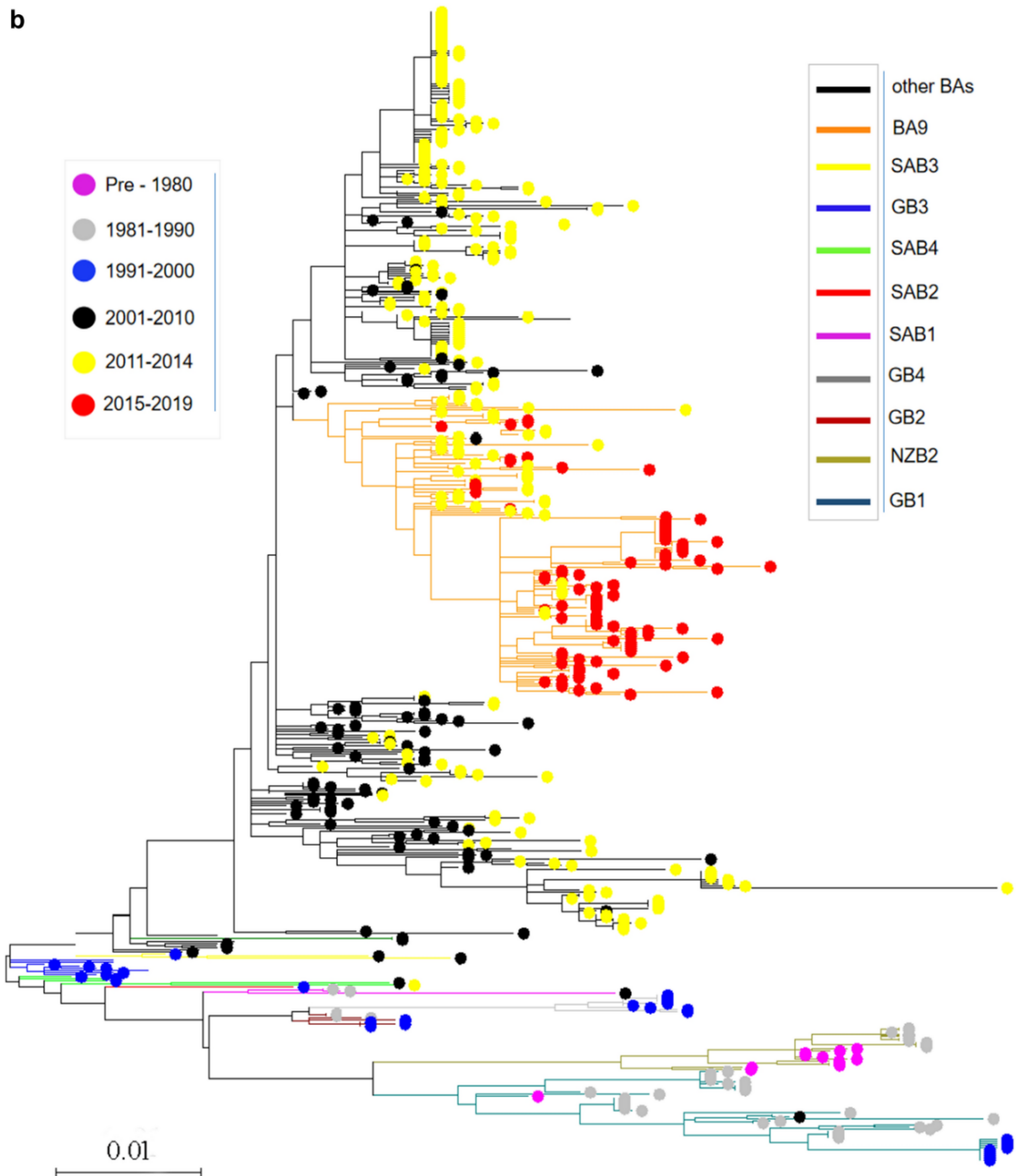
Để theo dõi lịch sử lan truyền của RSV, một nghiên cứu được thực hiện trên gần 2000 trình tự hệ gen của RSV-A và RSV-B từ cơ sở dữ liệu các virus gây bệnh (ViPR, <https://www.viprbrc.org/>) đã được thực hiện. Kết quả cho thấy, tỷ lệ phổ biến của các kiểu gen cho cả RSV-A và RSV-B là đặc trưng theo thời gian [14]. Đối với RSV-A, kiểu gen có thời gian gây dịch bệnh dài nhất là GA5, nhưng kiểu gen này đã biến mất từ năm 2015. Kiểu gen SAA1, GA7 và GA6 chỉ phổ biến vào những năm 1980 trở về trước. Kiểu gen GA1 và GA4 phổ biến trước năm 2000, GA3 phổ biến trước năm 2010, trong khi GA2 phổ biến giữa năm 2001 và 2014. Kể từ năm 2015, kiểu gen phổ biến duy nhất của RSV-A là ON1. Đây là kiểu gen được tách nhóm ra từ kiểu gen NA1 (Hình 1.10a). Đối với RSV-B, các kiểu gen chủ yếu phổ biến ở giai đoạn đầu (những năm 1970 và 1980) là GB1, GB2, GB4 và NZB2, các kiểu gen SAB1-4 phổ biến trong những năm 1990 đến 2000, các kiểu gen BA (BA1-BA14) chiếm ưu thế nhất trong 20 năm qua, và kể từ năm 2015, kiểu gen phổ biến duy nhất là BA9 (Hình 1.10b) [14].

Kiểu gen BA lần đầu tiên được xác định ở Buenos Aires vào năm 1999 là kết quả của sự sao chép 60 nucleotide ở vùng HVR của gen *G*. Từ đó các kiểu gen BA đã nhanh chóng phổ biến để chiếm ưu thế trên toàn cầu, tiếp tục bị đột biến và thích nghi thêm với từng vụ dịch ở các khu vực địa lý khác nhau [6]. Tương tự, kiểu gen RSV-A ON1 (trước đây được phân loại thuộc kiểu gen NA1) được xác định ở Canada vào năm 2010, có sự sao chép 72 nucleotide ở vùng HVR thứ hai của gen *G*, dẫn đến có thêm bảy vị trí O-glycosyl hóa trong protein [3], [8]. Điều này giúp cho việc phân nhóm hai RSV được thuận lợi về mặt sinh học phân tử. Cả hai kiểu gen mới này,

chúng đã nhanh chóng trở thành dạng chủ yếu được lưu hành trên toàn thế giới [10]. Hơn nữa, các biến thể trong RSV-A và RSV-B theo thời gian dường như tương quan với việc cảm ứng các kháng thể đơn dòng kháng G nhận biết các biểu mô chính mà virus lây nhiễm. Do đó cho thấy sự tiến hóa RSV theo hướng miễn dịch [7].

Phân tích các chủng RSV-B BA trong phòng thí nghiệm đã chỉ ra rằng sự nhân đôi các nucleotide trên gen *G* tác động đến cả quá trình gắn màng và sao chép của virus, mang lại ưu thế hơn so với các virus không có đoạn lặp. Kiểu gen này có 60bp được nhân đôi trong vùng HVR thứ 2 của gen *G*, khiến nó có chiều dài từ 312 axit amin đến 319 axit amin [5]. Phân tích trình tự kiểu gen BA từ nhiều địa điểm trên thế giới chứng minh rằng sự thay thế nhỏ axit amin trong vùng lặp lại cũng chịu áp lực tiến hóa [14]. Kiểu gen BA này có thể có lợi thế trong quá trình tiến hóa vì sự lặp lại này có thể thay đổi đặc tính kháng nguyên của protein. Điều này giúp virus trốn phản ứng miễn dịch của cơ thể, tạo điều kiện cho sự tái nhiễm. Hơn nữa, sự lặp lại giúp cho kiểu gen này được lan truyền đến nhiều nơi khác trên thế giới [5].





Hình 1.10. Cây phát sinh chủng loại hệ gen của RSV dựa trên các trình tự trên ViPR [14].

(a): Cây phát sinh chủng loại RSV-A. (b): Cây phát sinh chủng loại RSV-B.

Kiểu gen ON1 có tốc độ tiến hóa nhanh hơn đáng kể so với kiểu gen NA1, biến thể mới nổi trước đó của RSV-A [10]. Sự tiến hóa của ON1 được thúc đẩy bằng cách thay thế axit amin trong vùng siêu biến đổi, được cho là để chứa các epitope kháng nguyên để trung hòa các kháng thể [5]. Kiểu gen đã nhanh chóng lan truyền sang các quốc gia khác nhau chỉ trong vòng 4 năm. Các công bố đã chỉ ra rằng, trình tự của các chủng ON1 lưu hành gần đây khác với chủng ON1 ban đầu từ Canada. Từ

năm 2014, có ít nhất 3 lineage khác nhau đã được phân tách trong kiểu gen ON1 lưu hành trên thế giới [5]. Một số nghiên cứu gần đây đã bắt đầu mô tả các đột biến trong protein G dẫn đến xuất hiện sớm các stop codon và tăng thêm các phân nhóm nhỏ trong kiểu gen ON1 và BA [8]. Bên cạnh đó, phần lớn báo cáo đều ghi nhận sự đa dạng các đột biến axit amin cả trong vùng HVR lẫn các vùng khác của kiểu gen ON1 và BA trên toàn thế giới [10].

Phân tích trên gen *F* và *G* của các chủng phân lập gần đây từ năm 2015–2017 ở Hoa Kỳ cho thấy không chỉ những thay đổi trong gen *G* đang tiếp tục xảy ra, mà còn có những thay đổi ở các vị trí kháng nguyên đã biết trên gen *F* [30]. Phân tích gần đây về các chủng phân lập ở Kenya đã chỉ ra rằng những thay đổi axit amin thích ứng cũng đang được phát hiện trong các gen khác, bao gồm polymerase của virus (*L*) và *M2-1* [31]. Một nghiên cứu gần đây từ Lebanon đã xác định được thêm hai biến thể kiểu gen RSV-A là LBA1 và LBA2. Nghiên cứu này cũng đã chỉ ra một thay đổi làm tăng sự kháng palivizumab (thuốc điều trị dự phòng duy nhất có sẵn trên toàn thế giới đối với RSV) [32].

Trong một nghiên cứu khác, xây dựng cây gia hệ RSV dựa trên các trình tự có sẵn trên NCBI, sử dụng MEGA7 và thuật toán Maximum Likelihood, thay thế GTR. Mô hình cây này đã chứng minh rằng hệ thống phân loại kiểu gen dựa trên trình tự gen *G* thiếu cả sự phân biệt giữa các kiểu gen cũng như sự trùng lặp giữa các kiểu gen này [5]. So sánh mức độ đa dạng trong gen *G* với toàn bộ hệ gen là không giống nhau, dẫn đến có sự mâu thuẫn trong phân loại dựa trên chiều dài hệ gen so với các gen riêng lẻ, đặc biệt là gen *G*. Do đó, một danh pháp mới, cách phân nhóm mới dựa trên phân tích hệ gen, hoặc toàn bộ chiều dài gen *G* thay vì vùng HVR như trước đây rõ ràng là cần thiết khi việc giám sát phân tử RSV đối với sức khỏe cộng đồng trở nên phổ biến hơn [6].

1.1.5. Đặc điểm dịch tễ học của virus hợp bào hô hấp

1.1.5.1. Sự lưu hành virus hợp bào hô hấp

Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng 95% dân số đã trải qua nhiễm trùng RSV khi được 2 tuổi và ước tính rằng 2% những người bị nhiễm RSV trong độ tuổi này cần phải nhập viện [7]. Theo thống kê, RSV có dịch bệnh theo mùa rõ ràng ở cả vùng ôn đới và nhiệt đới, bắt đầu từ những tháng cuối hè ở vùng nhiệt đới và trong những tháng mùa đông trên các vùng ôn đới ở mỗi bán cầu [33]. Ở Bắc bán cầu, đỉnh dịch là giữa tháng 11 và tháng 3, ở Nam bán cầu đỉnh dịch là giữa tháng 6 và tháng 9 [34].

Một đánh giá toàn diện về dịch bệnh do RSV gây ra từ năm 1990 đến năm 2009 cho thấy mức độ nguy hiểm do RSV gây ra. Tại các nước ôn đới, thời gian đỉnh dịch kéo dài hơn so với bệnh cúm. Một số quốc gia thậm chí có đỉnh dịch kéo dài từ cuối mùa thu tới đầu mùa xuân [13]. Ngoài ra, ở một số khu vực, có các đỉnh dịch theo

nửa năm hoặc diễn ra quanh năm. Sự thay đổi cục bộ này cho thấy ảnh hưởng của môi trường, bao gồm độ ẩm, nhiệt độ và lượng mưa [18]. Tính thời vụ của RSV tại các quốc gia và khu vực khác nhau cần phải được hiểu rõ để cung cấp thông tin về các hình thức lây truyền và thời điểm phù hợp tiêm phòng vaccine trong tương lai [35].

Ở Bắc Mỹ, nhiễm trùng RSV thường sẽ xuất hiện vào tháng 10 hoặc tháng 11, với tỷ lệ nhiễm cao nhất là từ tháng 1 đến tháng 2 và các trường hợp nhiễm RSV cuối cùng xảy ra vào mùa xuân [9]. Tại Anh, nhiễm RSV thường xảy ra từ tháng 1 đến tháng 3 và có thể thay đổi từ năm này qua năm khác. Theo các báo cáo tại Trung Quốc, mùa RSV thường diễn ra từ tháng 12 năm trước tới tháng 2 năm sau, trùng với thời điểm mùa đông tại quốc gia này [16]. Các báo cáo từ Nam bán cầu như tại Úc đã chỉ ra, mùa RSV thường đạt đỉnh vào đầu mùa đông tại quốc gia này và kéo dài từ tháng 5 tới tháng 7 hàng năm [36].

Tại Đài Loan, các nghiên cứu đã chỉ ra RSV thường đạt đỉnh dịch từ mùa hè (tháng 8) tới giữa mùa thu (tháng 10) trong giai đoạn trước năm 2020 [37]. Ở những vùng khí hậu nhiệt đới hơn (chẳng hạn như Florida, Hoa Kỳ, trong giai đoạn 2012-2013), có xu hướng kéo dài mùa nhiễm RSV với sự khởi đầu sớm hơn, những trường hợp đầu tiên được báo cáo vào giữa mùa hè [9]. Myanmar cũng ghi nhận các trường hợp nhiễm RSV từ tháng 7 hàng năm và đỉnh dịch thường vào tháng 9-tháng 10, sau đó giảm nhanh vào tháng 11 và tháng 12 [38]. Có bằng chứng cho thấy có sự khác biệt các mùa RSV ở vùng khí hậu nhiệt đới, điều này đặt ra giả thuyết rằng vùng nhiệt đới bị nhiễm RSV quanh năm. Nhìn chung, tỷ lệ nhập viện do RSV đạt đỉnh khi nhiệt độ hàng năm ở mức thấp nhất và lượng mưa cao nhất [18]. Điều này có thể là do sự đông đúc trong nhà dẫn đến tốc độ truyền virus cao hơn ở các nước ôn đới [36], [39].

Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng, RSV gây bệnh theo chu kỳ riêng biệt ở các nước xích đạo và nhiệt đới. Ở các nước xích đạo Nam Mỹ, nhiệt độ và độ ẩm liên quan trực tiếp đến tần suất nhiễm RSV [13]. Tuy nhiên, dịch RSV không liên quan chặt chẽ hoặc ít chịu ảnh hưởng của nhiệt độ, độ ẩm và lượng mưa khi các địa điểm nhiệt đới trên toàn thế giới được so sánh trong một mùa RSV nhất định. Hơn nữa, trong một năm cụ thể, thời điểm bùng phát RSV thay đổi đáng kể giữa các khu vực nhiệt đới [40]. Điều này cho thấy rằng mặc dù có dịch RSV ở các vùng nhiệt đới, rất khó để dự đoán mùa bùng phát của RSV ở các khu vực này [33].

1.1.5.2. Các yếu tố ảnh hưởng tới nhiễm RSV

Một trong những đặc điểm đáng chú ý nhất của RSV là khả năng tái nhiễm của nó [9]. Các trường hợp nhiễm RSV lặp đi lặp lại đã được ghi nhận ở cả trẻ nhỏ và người lớn. Người ta ước tính rằng hơn 30% trẻ em bị tái nhiễm RSV trong suốt 3 năm theo dõi [5]. Tái nhiễm RSV ở người lớn khỏe mạnh được coi là phổ biến, với

hầu hết không có triệu chứng hoặc có các triệu chứng nhẹ ở đường hô hấp trên giống như cảm lạnh [41]. Tình trạng miễn dịch của vật chủ và các chủng RSV hiện đang lưu hành được cho là các yếu tố ảnh hưởng đến việc tái nhiễm [18].

Trong khi yếu tố nguy cơ lớn nhất đối với nhiễm RSV là độ tuổi [42], một số nghiên cứu dịch tễ học đã xác định được các yếu tố khác có thể làm tăng mức độ nghiêm trọng của nhiễm RSV. Các yếu tố đáng chú ý nhất là môi trường sống quá đông người, tiếp xúc với khói (nấu ăn và thuốc lá) [43], trẻ có bệnh mắc kèm, bệnh tinh bẩm sinh [44], mẹ mắc bệnh hen suyễn, tình trạng kinh tế thấp hơn bình quân đầu người của khu vực sống [45], mắc các bệnh mãn tính, trẻ sinh non, có anh chị em lớn hơn ở cùng hoặc tiêm chủng chậm cho trẻ sơ sinh có nguy cơ nhập viện cao hơn đáng kể [42]. Ở các nước phát triển, trẻ em dù được xem là khoẻ mạnh cũng bị nhiễm trùng cấp tính đường hô hấp dưới, với những trẻ sơ sinh bị bệnh đi kèm thì có nguy cơ càng cao [45].

Người cao tuổi dễ bị nhiễm RSV hơn do phản ứng miễn dịch bị suy giảm. Điều tương tự cũng xảy ra ở người nhận ghép tạng, mặc dù có cơ chế khác nhau [46]. Nói cách khác, những người có hệ thống miễn dịch bị ức chế, đặc biệt là chức năng miễn dịch của tế bào trung gian Th1 bị ức chế, có nguy cơ cao mắc bệnh và tử vong liên quan đến nhiễm trùng RSV [9].

1.1.5.3. Tương tác RSV và tác nhân khác

Nhiễm Enterovirus đạt cực đại vào mùa hè ở các vùng ôn đới, trong khi nhiễm virus cúm, RSV và nhiễm metapneumovirus ở người (hMPV) có tỷ lệ cao nhất trong những tháng mùa đông [9]. Các báo cáo dịch tễ học gần đây đã gợi ý rằng có thể có các tương tác virus học như cạnh tranh giữa nhiễm cúm và nhiễm RSV đã ảnh hưởng tới thời gian dịch hàng năm của hai loại virus này [46]. Ví dụ như ở Úc giai đoạn 2009-2015, mùa RSV trùng với mùa mưa và mùa đông, chậm hơn mùa của virus cúm 3 tuần [47]. Ở cấp độ toàn cầu, sự khởi đầu của đại dịch cúm H1N1pdm năm 2009 đã làm trì hoãn sự khởi phát mùa RSV trung bình từ 0,58 tháng đến 2,5 tháng [48].

Nhiều nghiên cứu khác nhau trên thế giới đã chỉ ra sự đồng nhiễm nhiều tác nhân trong các mẫu bệnh phẩm hô hấp. Các ví dụ đồng nhiễm bao gồm đồng nhiễm RSV-cúm và đồng nhiễm RSV-hMPV [49], [50], đồng nhiễm RSV với các loại vi khuẩn hô hấp khác [51]. Cho đến nay, các nghiên cứu về sự đồng nhiễm giữa RSV và các virus/vi khuẩn khác chỉ tập trung tại một số quốc gia. Khu vực như Châu Á, Châu Phi các nghiên cứu này vẫn chưa được thực hiện nhiều, kết quả cũng chỉ trong một vài năm mà chưa được tổng hợp nghiên cứu một cách đầy đủ [46].

Từ năm 2020 tới nay, sự diễn biến phức tạp của dịch bệnh do virus SARS-CoV-2 gây ra không chỉ dẫn tới cuộc khủng hoảng y tế trên toàn thế giới mà còn tác động to lớn tới sự lưu hành hành biến đổi của các tác nhân hô hấp khác trong đó có RSV.

Số ca nhập viện do nhiễm trùng đường hô hấp ở trẻ dưới 2 tuổi và các trường hợp nhiễm RSV, nhiễm cúm ở New Zealand giảm đáng kể [52]. Dịch bệnh COVID-19 khiến số ca nhập viện do RSV ở Mỹ giảm còn 0,03% từ tháng 12/2020 đến tháng 3/2021 và làm chậm mùa dịch RSV từ tháng 4 đến tháng 10 năm 2021 [53]. Theo nghiên cứu của Thongpan và cộng sự năm 2021, đỉnh dịch RSV tại Thái Lan năm 2020 bị chậm hơn 2 tháng so với mọi năm [54]. Tuy nhiên báo cáo tại Đài Loan lại ghi nhận xu hướng khác. Từ năm 2010-2019, tỷ lệ dương tính RSV chỉ đạt dưới 5% nhưng lại tăng đáng kể lên 33,2% vào năm 2020 và trở thành loại virus lưu hành chủ đạo tại vùng đảo này [11]. Bên cạnh đó, việc thay đổi chu kỳ lưu hành của virus và một quần thể vật chủ ít miễn dịch do thời gian nhiễm bệnh đã lâu tạo cơ hội cho RSV quay trở lại và có những biến đổi khác với những gì đã được nghiên cứu trước đó [55].

1.2. Các kỹ thuật chẩn đoán virus hợp bào hô hấp trong phòng thí nghiệm

1.2.1. Phương pháp khuếch đại axit nucleic

Một loạt các công trình nghiên cứu đã sử dụng phương pháp khuếch đại axit nucleic để phát hiện RSV-A và RSV-B từ bệnh phẩm hô hấp trong phòng thí nghiệm [25]. Các phương pháp có thể sử dụng các công nghệ dựa trên PCR (Polymerase Chain Reaction) hoặc các phương pháp khác như RT-LAMP (Reverse Transcriptase loop-mediated isothermal amplification) [56]. Trong đó, các phương pháp chẩn đoán dựa trên PCR như RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), realtime RT-PCR hoặc multiplex RT-PCR được sử dụng ở nhiều phòng xét nghiệm. Với việc sử dụng các cặp mồi đặc hiệu (RT-PCR, multiplex RT-PCR) và probe phù hợp (realtime RT-PCR) có thể xác định được sự có mặt của tác nhân gây bệnh RSV trong mẫu bệnh phẩm [27].

Các gen *M* và gen *N* ở cả hai phân nhóm RSV-A và RSV-B thường được sử dụng là gen đích trong các nghiên cứu chẩn đoán về RSV bằng các phương pháp dựa trên PCR [22], [56]. Phương pháp này hiện nay được sử dụng phổ biến nhất trong các nghiên cứu phát hiện sự có mặt của virus RSV tại các đơn vị nghiên cứu cũng như trong các phòng xét nghiệm của bệnh viện. Đặc biệt, realtime RT-PCR sử dụng các cặp mồi và probe đặc hiệu đang được coi như tiêu chuẩn mới trong chẩn đoán các tác nhân lây bệnh. Phương pháp này dần được sử dụng thay thế cho phương pháp phân lập trước đây do tiết kiệm thời gian, độ nhạy và độ đặc hiệu cao gấp nhiều lần [57].

Với RT-LAMP (phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt qua trung gian mạch vòng) là một phương pháp khuếch đại axit nucleic nhanh và nhạy được thực hiện trong điều kiện đẳng nhiệt, yêu cầu thiết bị ít phức tạp hơn PCR. Phương pháp này có thể mang lại kết quả trong thời gian ngắn và có thể được sử dụng để phát hiện nhiều loại virus, vi khuẩn. Tuy nhiên, công nghệ này có thể ảnh hưởng đến tính đặc

hiệu của xét nghiệm do sự khuếch đại theo cấp số nhân của mỗi dimers. Trong một số trường hợp, các sản phẩm LAMP không đặc hiệu được tạo ra dẫn tới hiện tượng dương tính giả [56]. Do vậy, phương pháp này chỉ mang tính sàng lọc mà không được dùng để chẩn đoán.

1.2.2. Phương pháp miễn dịch

Các xét nghiệm miễn dịch của RSV thực hiện chủ yếu nhằm mục đích nghiên cứu và hỗ trợ điều trị, ít được dùng để phát hiện trực tiếp giai đoạn cấp tính của bệnh [58]. Những phương pháp thường được sử dụng như kháng thể huỳnh quang trực tiếp (DFA), kháng thể huỳnh quang gián tiếp (IFA), ELISA,... DFA và IFA được thực hiện với số lượng tế bào biểu mô bệnh phẩm mũi/họng phải đủ lớn để xét nghiệm. Mẫu bệnh phẩm mà không đủ số lượng tế bào hoặc nguồn gốc từ các vị trí khác trong đường hô hấp không phù hợp với loại xét nghiệm này [59]. Phương pháp ELISA sử dụng mẫu bệnh phẩm máu để phát hiện sự có mặt của kháng thể/kháng nguyên kháng RSV. ELISA cũng như các xét nghiệm huyết thanh học khác của RSV đã được thực hiện từ khá sớm, đầu những năm 1990 [60].

Cho tới nay, rất nhiều các kit xét nghiệm thương mại huyết thanh/miễn dịch dành cho RSV đã được ra đời và sử dụng rộng rãi [58]. Các nghiên cứu trong phòng thí nghiệm chỉ mang tính chất nghiên cứu sâu hơn, cải tiến quy trình, tìm cách nâng cao hiệu quả phản ứng. Việc sử dụng ELISA hỗ trợ chẩn đoán điều trị phát hiện sớm kháng thể cũng được áp dụng trong nhiều đơn vị điều trị. Các kháng thể phát hiện của các phương pháp miễn dịch này là IgA, IgM, IgG kháng protein F hoặc N [61].

1.2.3. Phương pháp phân lập

Trước đây, các phương pháp nuôi cấy phân lập được xem là tiêu chuẩn vàng để chẩn đoán các tác nhân gây bệnh gồm cả virus hợp bào hô hấp [9]. Một số các dòng tế bào đã được sử dụng trong phân lập RSV như tế bào Hep-2, SIAT [62], A549, RD, MDCK [37], RhMK và các dòng tế bào khác như BEAS-2B [63]. Tuy nhiên hiện nay phương pháp phân lập chỉ dùng nghiên cứu do độ nhạy thấp, tốn kém thời gian và công sức.

Đặc điểm của RSV khi nhân lên trên tế bào cảm thụ là tạo thành hợp bào lớn, không gây ra hình ảnh huỷ hoại tế bào (CPE) điển hình dễ quan sát được như các virus hô hấp khác như virus cúm, virus adeno...[17]. Ngoài ra, thời gian gây nhiễm trên tế bào cũng dài, từ 7-14 ngày. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng, các mẫu lâm sàng dương tính với RSV có nồng độ tải lượng virus cao trong phản ứng realtime RT-PCR có tỷ lệ thành công thấp trong quá trình phân lập. Điều này là do bản chất không ổn định và không bền vững của chính các hạt RSV [9]. Bên cạnh đó, phân lập virus còn đòi hỏi trang thiết bị kính hiển vi điện tử truyền qua để chụp lại các hình ảnh nhân lên của virus trong tế bào chủ làm minh chứng cho quá trình phân lập thành

công. Thời gian gần đây, việc sử dụng các kỹ thuật phát hiện RSV dựa trên nuôi cấy trong các phòng xét nghiệm trong bệnh viện và các cơ sở nghiên cứu đã giảm đáng kể, việc sử dụng các xét nghiệm sinh học phân tử đã tăng lên [41]. Do vậy, phân lập virus chỉ có ý nghĩa quan trọng trong các nghiên cứu, còn chẩn đoán và điều trị đã có các phương pháp khác với độ nhạy và độ đặc hiệu cao hơn, chẳng hạn như realtime RT-PCR và multi RT-PCR.

1.2.4. Phương pháp giải trình tự gen

Giải trình tự gen, đặc biệt là giải trình tự gen thế hệ mới (Next Generation Sequencing - NGS) hoặc giải trình tự toàn bộ hệ gen (Whole genome sequencing - WGS) là một trong những phương pháp hiện đại nhất hiện nay được dùng trong chẩn đoán [9]. Vấn đề lớn nhất trong phương pháp này là trình tự hệ gen RNA của RSV hoặc trình tự hệ gen RNA/DNA của bất kỳ mầm bệnh nào khác có những đoạn được giải trình tự nhiều hơn hẳn phần còn lại [64]. Ngoài ra, tải lượng virus trong các mẫu bệnh phẩm lâm sàng phải đủ lớn mới thực hiện được phương pháp này [26].

Đối với các tác nhân hô hấp khác không phải RSV, giải trình tự gen có độ nhạy thay đổi so với các xét nghiệm RT-PCR/realtime RT-PCR [4]. Trong tương lai, giải trình tự gen và đặc biệt là giải trình tự toàn bộ hệ gen virus sẽ đóng vai trò ngày càng tăng trong việc xác định tác nhân gây bệnh và sự đa dạng của chúng trong các trường hợp đặc biệt. Với RSV, vai trò của phương pháp này bao gồm xác định sự có mặt cũng như đa dạng trong quá trình tiến hóa của RSV, các mô hình lây truyền của bệnh trong cộng đồng [65]. Bên cạnh vai trò chẩn đoán, NGS các mẫu chứa RSV đã giúp xác định tỷ lệ đột biến giữa hai nhóm RSV-A và RSV-B cũng như mô hình lưu hành toàn cầu của các phân nhóm này [11].

Các phương pháp chẩn đoán RSV trong phòng thí nghiệm được tổng hợp tóm tắt trong Bảng 1.1 .

Bảng 1.1. Các phương pháp chẩn đoán RSV trong phòng thí nghiệm

Phương pháp	Khuếch đại axit nucleic	Miễn dịch	Phân lập	Giải trình tự gen
Thời gian thực hiện	2-3 giờ	~1 giờ	7-14 ngày	2-3 ngày
Ưu điểm	- Độ nhạy rất cao - Dùng phân tích nhiều	- Nhanh - Có thể đánh giá mức độ đầy đủ của mẫu	- Đặc hiệu cao	- Độ đặc hiệu cao - Tìm hiểu sâu được các đặc tính sinh học phân tử của virus
Nhược điểm	- Trang thiết bị kỹ thuật cao	- Độ nhạy hạn chế	- Độ nhạy thấp	- Trang thiết bị kỹ thuật cao

	- Người thực hiện có trình độ - Chi phí cao	- Đòi hỏi người thực hiện có chuyên môn	- Thời gian thực hiện dài - Đòi hỏi trang thiết bị phòng thí nghiệm	- Người thực hiện có trình độ - Chi phí cao
Lưu ý	- Được xem như tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán hiện giờ - Có thể rất nhạy trong việc phát hiện virus ở nồng độ thấp không đáng kể về mặt lâm sàng	- Dùng kết hợp bổ sung với các phương pháp khác trong chẩn đoán điều trị.	- Được xem là tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán trước đây	- Chủ yếu dùng trong nghiên cứu và phát triển dự phòng

1.3. Tình hình nghiên cứu virus hợp bào hô hấp hiện nay trên thế giới và Việt Nam

1.3.1. Tình hình nghiên cứu virus hợp bào hô hấp trên thế giới

Một trong những vấn đề được nghiên cứu nhiều nhất về RSV hiện nay là gánh nặng bệnh tật do virus này gây ra. Theo ước tính các nghiên cứu từ năm 2001 đến 2021 tại hơn 20 quốc gia, gánh nặng bệnh tật do RSV gây ra trung bình là hơn 17.000 Bảng Anh cho một đợt điều trị nội trú với bệnh nhân trên 60 tuổi. Ở nhóm tuổi càng già, chi phí tiếp tục tăng lên theo độ tuổi của người bệnh [66]. Chi phí quản lý và điều trị cho các bệnh kèm theo hay biến chứng do nhiễm RSV ở nhóm người lớn tuổi cũng đưa ra con số cao hơn đáng kể so với nhóm tuổi trẻ em [67]. Một nghiên cứu về gánh nặng bệnh tật liên quan đến RSV ở 72 quốc gia GAVI (Liên minh toàn cầu về vaccine và tiêm chủng) đã ước tính có khoảng 20,8 triệu trường hợp nhiễm RSV; 1,8 triệu ca nhập viện khiến 40.000 ca tử vong mỗi năm với chi phí điều trị lên tới 611 triệu đô la Mỹ [68]. Nghiên cứu khác trên nhóm trẻ dưới 5 tuổi tại các quốc gia châu Âu đã đưa ra con số 57%-72% số trường hợp nhập viện vì viêm đường hô hấp là do RSV [69]. Khi xem xét tỷ lệ tử vong do RSV trên nhóm dưới 5 tuổi tại các quốc gia thu nhập thấp lại cao hơn hẳn các quốc gia thu nhập cao cả về số lượng ca tử vong cũng như tỷ lệ tử vong/số nhập viện [67].

Nhìn chung, tỷ lệ mắc bệnh do nhiễm RSV ở người trưởng thành bị viêm đường hô hấp là 28,4/1000 người mỗi năm ở các nước phát triển. Trường hợp có bệnh đi kèm thì tỷ lệ này sẽ tăng lên là 37,6/1000 người. Không có nghiên cứu nào được thực hiện tại các quốc gia đang phát triển trên nhóm người trưởng thành từ năm 1996-

2020 [44]. RSV là một trong những nguyên nhân chính gây hội chứng cúm (ILI) ở nhóm người từ 65 tuổi trở lên trên toàn thế giới [70], và được công nhận là nguyên nhân gây bệnh và tử vong đáng kể ở người cao tuổi từ những năm 1980 [9]. Trong những nghiên cứu gần đây, RSV là nguyên nhân gây ILI lớn thứ ba ở người cao tuổi, bên cạnh nhiễm enterovirus và virus cúm [70].

Các nghiên cứu về RSV trên trẻ em lại được thực hiện tương đối nhiều, đặc biệt là trẻ dưới 2 tuổi. Hơn 80% trẻ em bị viêm đường hô hấp dưới có liên quan đến RSV [69]. Hơn một nửa số ca tử vong do nhiễm trùng hô hấp tại bệnh viện là do RSV được ước tính đã xảy ra ở trẻ dưới 6 tháng tuổi [71]. Điều này dẫn đến số lượng các nghiên cứu về sự lưu hành và tỷ lệ mắc bệnh của RSV trên toàn thế giới dành cho trẻ em, đặc biệt là nhóm trẻ bị viêm đường hô hấp là tương đối lớn [72].

Tổ chức Y tế thế giới (WHO), Trung tâm kiểm soát bệnh tật Châu Âu (ECDC) và Hoa Kỳ (US-CDC) đã thực hiện việc giám sát RSV cùng với chương trình giám sát cúm của họ [73], [74]. Điều này đã giúp cho tình hình nghiên cứu RSV tại các nước phát triển nói chung được liên tục, mang tính hệ thống và đánh giá tương đối đầy đủ về tình trạng bệnh. Tuy nhiên lại các quốc gia đang phát triển, việc giám sát và nghiên cứu RSV chỉ được thực hiện mang tính nhỏ lẻ, rời rạc và thiếu hệ thống giám sát liên tục. Do đó, số liệu đưa ra thiếu tính đồng bộ và nhất quán [65]. Đây cũng là khu vực có số lượng nhiễm RSV cao, diễn ra quanh năm nhưng số lượng mẫu thu thập lại ít hơn rất nhiều so với các nước phát triển [75]. Điều này tạo ra sự chênh lệch rất lớn trong nghiên cứu RSV hiện nay.

Đặc điểm sinh học phân tử, tiến hóa của RSV để phục vụ việc nghiên cứu và phát triển vaccine cũng là một lĩnh vực được nhiều nhà khoa học quan tâm [46]. Dù có gánh nặng bệnh tật lớn, tỷ lệ nhiễm bệnh cao trên trẻ em và người lớn tuổi nhưng hiện nay chưa có loại vaccine nào phòng ngừa RSV được lưu hành trên thị trường [68]. Các loại vaccine chủ yếu đang ở giai đoạn thử nghiệm lâm sàng. Các nhóm đối tượng nguy cơ cao là đối tượng để phát triển vaccine như trẻ nhỏ dưới 2 tuổi, phụ nữ mang thai, người trên 60 tuổi [55].

Các nghiên cứu về sinh học phân tử của RSV tập trung chủ yếu trên gen *G* (nghiên cứu dịch tễ học phân tử, tiến hóa) hoặc gen *F* (nghiên cứu phát triển vaccine, kháng thể đơn dòng) [46]. Đặc biệt, vùng HVR của gen *G* là được nghiên cứu nhiều nhất [72]. Trong số 78 nghiên cứu về di truyền của RSV từ năm 2015-2020, chỉ có 22% số nghiên cứu được thực hiện ở các quốc gia có thu nhập thấp và trung bình, 9% các nghiên cứu giải trình tự hệ gen RSV. Trong số các nghiên cứu giải trình tự các gen đơn lẻ, gen *G* (chủ yếu là vùng HVR) chiếm 65/71 nghiên cứu, gen *F* và gen *SH* chỉ chiếm lần lượt 22 và 2 nghiên cứu [72]. Số lượng các nghiên cứu giải trình tự hệ gen cũng rất ít, hầu hết mẫu bệnh phẩm được thu thập từ các quốc gia phát triển, có

thu nhập cao [66]. Trong khi các nước có gánh nặng bệnh tật cao, tỷ lệ nhiễm bệnh lớn lại tập trung ở các quốc gia thu nhập thấp và trung bình, mẫu bệnh phẩm thu thập tại đây lại rất ít và không mang tính đại diện, chỉ chiếm 14,8% [72].

Một vấn đề nữa cũng được quan tâm hiện nay là việc phân loại các kiểu gen của RSV dựa trên đoạn HVR của gen *G* là chưa đầy đủ, dễ bị lỗi và thiếu chính xác. Do đó một quy trình phân loại mới đã được đề xuất dựa trên chiều dài của gen *G* và mối tương tác của gen *G* với các gen khác [10]. Điều này có nghĩa là, việc giải trình tự hệ gen RSV là một thực tiễn trong nghiên cứu RSV thời gian tới. Bên cạnh đó, mối tương tác của RSV và các căn nguyên hô hấp khác cũng là một hướng nghiên cứu không mới nhưng lại được nhiều chú ý thời gian gần đây. Đặc biệt trong và sau đại dịch Covid-19, sự ảnh hưởng của virus SARS-CoV-2 tới sự lưu hành và đáp ứng miễn dịch của RSV nói riêng và các virus hô hấp khác nói chung đang rất được nghiên cứu [76]. SARS-CoV-2 không chỉ làm ảnh hưởng, lùi thời điểm đỉnh dịch hàng năm mà tại nhiều quốc gia, virus này còn làm số lượng ca mắc cúm và RSV giảm còn bằng không [52], [77], [78]. Chính vì vậy, mối tương tác và ảnh hưởng của SARS-CoV-2 với RSV trong đại dịch và sau này cả về đặc điểm dịch tễ học và sinh học phân tử là vấn đề đang rất được nhiều nhà khoa học thực hiện phân tích và đánh giá.

1.3.2. Tình hình nghiên cứu virus hợp bào hô hấp ở Việt Nam

Các nghiên cứu về RSV ở Việt Nam được thực hiện chủ yếu trong giai đoạn 2009-2012 và tập trung ở miền Trung và miền Nam. Các nghiên cứu chủ yếu đưa ra tỷ lệ nhiễm RSV, lưu hành theo mùa và đồng nhiễm/tương tác với các tác nhân hô hấp khác [46]. Theo một số nghiên cứu tại Việt Nam từ năm 2010 đến 2015 cho thấy, tỷ lệ nhiễm RSV ở các trẻ dưới 5 tuổi bị nhiễm trùng hô hấp cấp tính nặng từ 35%-48% [49], [79]. Ngoài ra, sự lưu hành của RSV được ghi nhận thường vào các tháng mùa thu-đông cuối năm, khi nhiệt độ giảm thấp ở miền Bắc. Tỷ lệ nhiễm bắt đầu tăng cao trên 20% từ tháng 8-9, đạt đỉnh vào tháng 10-11 rồi giảm dần vào tháng 1 năm sau đó [49], [50], [79]. Các tỉnh khu vực miền Trung và miền Nam có sự khác biệt với miền Bắc, số ca nhiễm RSV được ghi nhận tăng cao nhất từ tháng 7 đến tháng 9, khi mà thời tiết nóng nhất và khô nhất [80], [81], [82].

Bên cạnh đó, sự lưu hành của các phân nhóm RSV cũng được phân tích theo các năm để tìm ra nhóm ưu thế. Hai phân nhóm RSV-A và RSV-B lưu hành đồng thời với nhau trong các nghiên cứu được thực hiện trước đây ở Việt Nam và RSV-A dường như là ưu thế hơn RSV-B trong các mùa 2010 [81], 2010-2012 [80]. Tuy nhiên, các nghiên cứu chỉ diễn ra trong 1 đến 2 năm, được thực hiện cách đây đã lâu và chỉ ở một vài tỉnh miền Trung, miền Nam.

Ngoài ra, một số nghiên cứu cũng đưa ra tỷ lệ đồng nhiễm nhất định giữa RSV và những virus hô hấp khác như cúm, adeno, á cúm 1, 2, 3, hMPV, Rhino... [49],

[79], [83] hay các vi khuẩn hô hấp khác [51], [84]. Các đồng nhiễm này là đồng nhiễm bậc 2 hoặc bậc 3. Dù vậy, trong các nghiên cứu này RSV chỉ là một trong các căn nguyên gây viêm đường hô hấp cấp tính nặng trên các bệnh nhân nằm viện [49], [83]. Mối tương tác của các tác nhân này chưa được phân tích kỹ và vai trò gây bệnh hô hấp chính là của tác nhân nào cũng chưa được làm rõ. Do đó, các kết quả này chỉ đánh giá được sự lưu hành của RSV và các virus hô hấp khác tại thời điểm nghiên cứu.

Cho tới nay, nghiên cứu về đặc điểm sinh học phân tử của RSV có rất ít. Hai nghiên cứu được thực hiện tại thành phố Hồ Chí Minh năm 2009-2010 và 2010-2011 đã chỉ ra kiểu gen lưu hành tại thời điểm đó chủ yếu là RSV-A GA2 và NA1, RSV-B BA9 [85], [86]. Báo cáo đầu tiên của Việt Nam ghi nhận kiểu gen RSV-A ON1 được phát hiện trên nhóm mẫu thu thập tại Nha Trang giai đoạn 2010-2012. Đây cũng là nghiên cứu duy nhất cho tới nay đi sâu phân tích tiến hóa phân tử của RSV tại Việt Nam [87]. Một nghiên cứu khác lấy mẫu đại diện tại 5 tỉnh trên cả ba miền Bắc Trung Nam từ năm 2012 tới đầu năm 2016 cũng đưa ra kết quả tương tự với sự lưu hành ưu thế của kiểu gen RSV-A ON1 và RSV-B BA9 [83]. Ba trên bốn nghiên cứu này chỉ giải trình tự vùng HVR của gen *G* để phân tích. Chỉ có một nghiên cứu đầu tiên giải trình tự hệ gen nhưng lại trên nhóm mẫu thu thập từ những năm trước 2010, thời điểm mà kiểu gen lưu hành rất khác so với hiện tại. Hầu hết các nghiên cứu đều chỉ dừng lại ở xây cây phát sinh gia hệ, xác định kiểu gen lưu hành mà ít các phân tích về thay đổi axit amin, tốc độ tiến hóa hay các đặc điểm sinh học phân tử khác.

Từ thực trạng này cho thấy, nghiên cứu về RSV ở Việt Nam không nhiều, chủ yếu được thực hiện cách đây hơn 10 năm và tập trung vào tỷ lệ nhiễm bệnh mà ít phân tích đặc tính di truyền hay tiến hóa của virus. Tính đến thời điểm hiện tại, chưa có báo cáo nào về gánh nặng bệnh tật cũng như ảnh hưởng của đại dịch COVID-19 tới RSV [46]. Mặc dù là căn nguyên hàng đầu gây viêm đường hô hấp cấp tính ở trẻ nhỏ nhưng lại ít được quan tâm nghiên cứu. Hệ thống giám sát RSV thường xuyên cũng chưa được xây dựng. Các công trình nghiên cứu từ trước tới nay mang tính nhỏ lẻ và tại chỗ. Chính vì vậy, rất cần có những nghiên cứu để thu hẹp khoảng trống trong nghiên cứu về RSV hiện nay ở Việt Nam.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là các mẫu bệnh phẩm hô hấp (dịch họng và dịch ty hầu) từ bệnh nhân nhi đã được chẩn đoán viêm đường hô hấp cấp tính nặng theo định nghĩa ca bệnh của Tổ chức Y tế thế giới về Viêm đường hô hấp cấp tính nặng (Severe Acute Respiratory Infection - SARI) [88].

Các trường hợp có những biểu hiện sau được định nghĩa là viêm đường hô hấp cấp tính nặng: Sốt trên 38°C, Ho, Khởi phát trong vòng 10 ngày và Có yêu cầu nhập viện. Các mẫu bệnh phẩm hô hấp được lấy từ các bệnh nhân này sẽ được đưa vào nghiên cứu dựa trên các tiêu chuẩn lựa chọn và tiêu chuẩn loại trừ như sau:

Tiêu chuẩn lựa chọn mẫu: Các mẫu bệnh phẩm hô hấp lấy đúng kỹ thuật trên bệnh nhân SARI nhi tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh; Phiếu điều tra ca bệnh và phiếu yêu cầu xét nghiệm có chữ ký của nhân viên y tế; Phiếu chấp thuận lấy mẫu của cha mẹ hoặc người giám hộ bệnh nhân nhi. Các mẫu đảm bảo đủ những tiêu chuẩn này sẽ được tiến hành xét nghiệm.

Tiêu chuẩn loại trừ mẫu: Các mẫu bệnh phẩm hô hấp bị tràn đổ trong quá trình lấy mẫu, vận chuyển; Các mẫu bị thiếu thể tích so với quy định; Que lấy mẫu bị thiếu hoặc thừa so với quy định; Các mẫu thiếu thông tin/không khớp thông tin trên ống đựng mẫu và phiếu điều tra, thiếu phiếu điều tra ca bệnh sẽ bị loại khỏi nghiên cứu.

Tổng cộng có 1563 mẫu bệnh phẩm hô hấp được thu thập có kèm theo phiếu điều tra ca bệnh và phiếu yêu cầu xét nghiệm của bác sĩ. Cha mẹ hoặc người giám hộ của bệnh nhân được giải thích rõ mục đích của việc lấy mẫu, thông tin bệnh nhân tham gia nghiên cứu, có chữ ký chấp thuận cho việc lấy mẫu bệnh phẩm hô hấp. Việc lựa chọn mẫu và thu thập thông tin dịch tễ theo Hướng dẫn giám sát SARI ban hành theo Quyết định số 1271/QĐ-BYT ngày 03/4/2017 [89].

2.2. Thời gian, địa điểm nghiên cứu

2.2.1. Thời gian nghiên cứu

Từ tháng 1 năm 2017 đến tháng 12 năm 2020 các mẫu bệnh phẩm hô hấp được thu thập tại hai bệnh viện và gửi mẫu hàng tuần đến phòng thí nghiệm.

2.2.2. Địa điểm nghiên cứu

Các mẫu bệnh phẩm hô hấp được thu thập từ hai điểm giám sát ở miền Bắc là Bệnh viện Nhi Trung ương (thành phố Hà Nội) và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh (tỉnh Quảng Ninh).

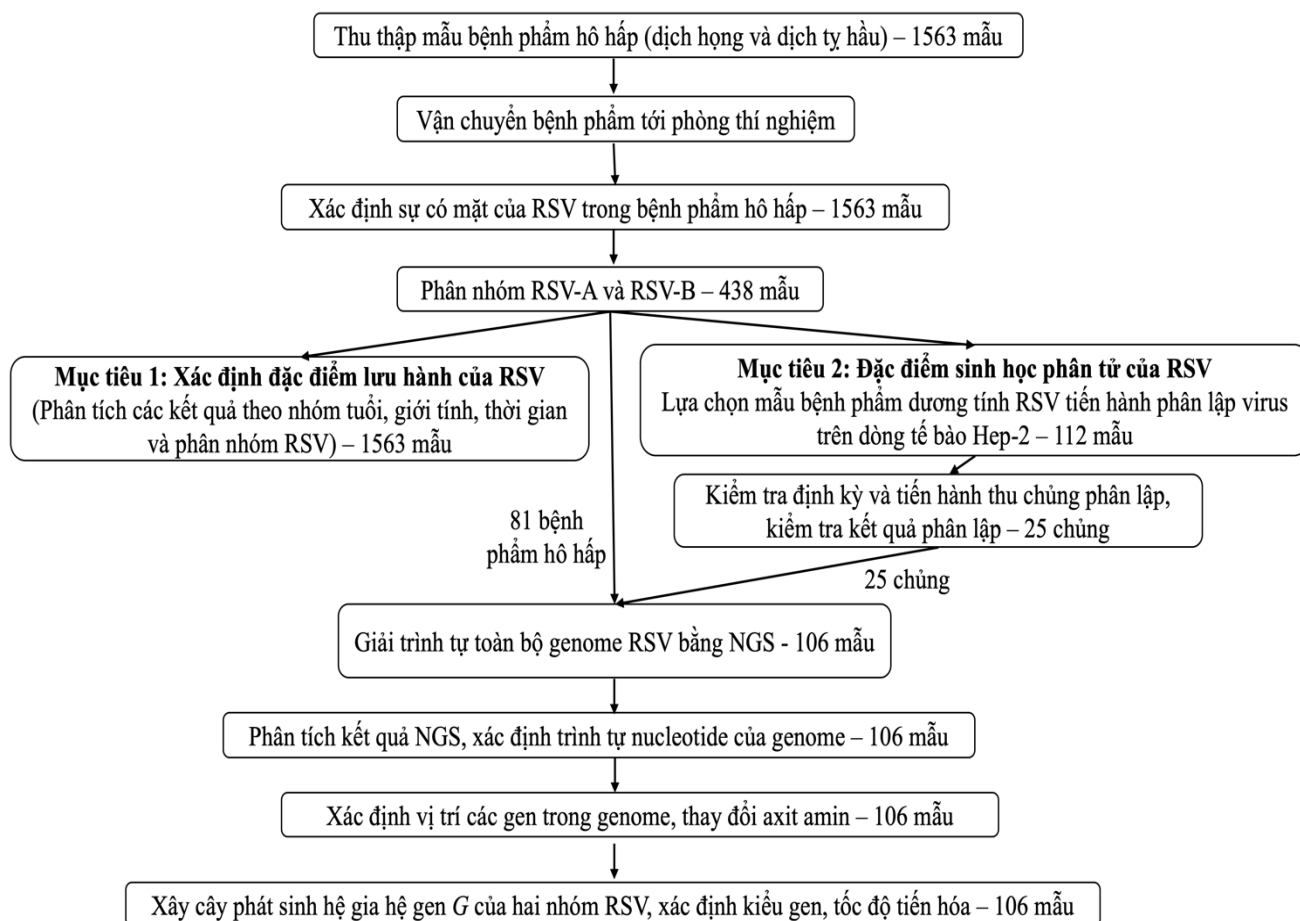
Các mẫu này sau đó được vận chuyển tới Phòng thí nghiệm Cúm – Khoa Virus – Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương để tiến hành chẩn đoán xác định RSV và các phân tích khác.

2.3. Đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện dựa trên kế hoạch và ý đức của Quyết định số 4608/QĐ-BYT ngày 11 tháng 10 năm 2017 của Bộ Y tế về việc ban hành “Kế hoạch giám sát trọng điểm hội chứng cúm, nhiễm trùng đường hô hấp cấp tính nặng và bệnh tay chân miệng tại Việt Nam giai đoạn 2017-2020” (Phụ lục 1).

2.4. Sơ đồ thí nghiệm

Các bước thực hiện của nghiên cứu được thể hiện như Hình 2.1.



Hình 2.1. Sơ đồ chi tiết các bước tiến hành nghiên cứu

2.5. Các thiết bị, dụng cụ và hóa chất dùng trong nghiên cứu

Các máy móc, thiết bị và hóa chất dùng trong nghiên cứu này thuộc sự quản lý và sử dụng của Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

Các thiết bị sử dụng chính bao gồm: Tủ đông -80°C (Sanyo, Nhật Bản); tủ đông -20°C (Sanyo, Nhật Bản); tủ mát (Sanyo, Nhật Bản); máy ly tâm lạnh 5430R (Eppendorf, Đức), tủ an toàn sinh học cấp II (Airtech, Nhật Bản); máy lắc vortex IKA MS3 Digital (IKA, Đức); máy Spindown MyFuge mini (Benchmark Scientific, Mỹ); máy realtime PCR ABI 7500 fast (Thermo Fisher Scientific, Mỹ); máy realtime CFX96 Touch 96-well (Bio-Rad, Mỹ); Máy MiniAmp PCR thermal cyclers (Thermo

Fisher Scientific, Mỹ); máy điện di (Bio-Rad, Mỹ); máy soi gel và chụp ảnh điện di UVP BioDoc-It2 (Analytik Jena, Đức); tủ ấm CO₂ (Thermo Fisher Scientific, Mỹ); máy block nhiệt (Eppendorf, Đức); kính hiển vi soi ngược (Olympus, Nhật Bản); kính hiển vi quang học điện tử truyền qua JEM 1010 (Transmission Electron Microscopy – TEM) (Jeol, Nhật Bản); máy đo huỳnh quang Qubit 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Mỹ); máy giải trình tự gen Illumina Miseq (Illumina, Mỹ).

Các dụng cụ thí nghiệm được sử dụng bao gồm: tube môi trường vận chuyển kèm que ngoáy họng/tỵ hầu (Copan, Mỹ); micropipette đơn kênh và đa kênh (Eppendorf, Đức); ống eppendorf tách chiết mẫu và làm thí nghiệm các thể tích 1,5ml và 2,0ml (Biologix, Mỹ); strip 8 ống PCR (Thermo Fisher Scientific, Mỹ); ống dùng cho máy đo Qubit (Thermo Fisher Scientific, Mỹ); giá từ tube 0,2ml (Thermo Fisher Scientific, Mỹ); đầu côn có lọc các loại (Corning, Mỹ); phiên nuôi cấy tế bào 12 giếng (Corning, Mỹ); chai nuôi cấy tế bào (Corning, Mỹ); giấy parafilm, giấy thấm...

Hóa chất sử dụng trong luận án gồm: Kit tách chiết QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Đức), sinh phẩm realtime SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR (Invitrogen, Mỹ); sinh phẩm realtime AgPath-ID One-Step RT-PCR kit (Life Technology, Mỹ); kit tổng hợp cDNA SuperScript IV VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Mỹ); sinh phẩm PCR khuếch đại hệ gen virus Platinum SuperFi II Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Mỹ); tinh sạch sản phẩm PCR ExoSAP-IT PCR Cleanup Reagent (Thermo Fisher Scientific, Mỹ); hóa chất đo nồng độ DNA Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Mỹ); Kit chuẩn bị thư viện Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, Mỹ); bộ index cho thư viện Illumina Nextera XT Index Kit (Illumina, Mỹ); hóa chất tinh sạch thư viện AmPure XP Bead (Beckman Coulter, Mỹ); bộ kit Miseq Reagent Micro Kit V2 (300 cycles) (Illumina, Mỹ); agarose (Thermo Fisher Scientific, Mỹ); hóa chất pha đệm chạy điện di DNA (TBE); DNA thang chuẩn 1kb (Thermo Fisher Scientific, Mỹ); thuốc nhuộm SYBR Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific, Mỹ); hóa chất nhuộm âm bản phosphotungstic acid (PTA), bacitracine, glutaraldehyde, amonium acetate soi kính hiển vi điện tử truyền qua (Merck, Đức); môi trường nuôi cấy tế bào D-MEM (Gibco, Mỹ); kháng sinh Kanamycin sulfate, Ciprofloxacin HCL, kháng sinh penicillin – streptomycin (Merck, Đức); Bovin Serum Albumin (Gibco, Mỹ); HEPES (Gibco, Mỹ); cồn tuyệt đối (Merck, Đức); NaOH (Merck, Đức).

2.6. Phương pháp nghiên cứu

2.6.1. Thu thập, vận chuyển, bảo quản mẫu bệnh phẩm hô hấp

Nghiên cứu thu thập 1563 mẫu bệnh phẩm hô hấp từ các bệnh nhân nhi bị viêm đường hô hấp cấp tính nặng (như trình bày tại Mục 2.1) bằng tăm bông ngoáy họng và ngoáy ty hầu, được bảo quản trong môi trường vận chuyển Copan (Copan, Mỹ).

Mẫu bệnh phẩm hô hấp sau khi thu thập được bảo quản trong điều kiện -70°C tại cơ sở thu mẫu. Hàng tuần, các mẫu bệnh phẩm hô hấp sẽ được vận chuyển đến phòng thí nghiệm tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương trong các bình tích lạnh. Nhiệt độ đảm bảo từ $2-8^{\circ}\text{C}$.

Tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, các mẫu bệnh phẩm hô hấp đủ tiêu chuẩn được bảo quản trong tủ lạnh âm sâu -70°C cho đến khi thực hiện xét nghiệm.

2.6.2. Tách chiết vật liệu di truyền

Mẫu bệnh phẩm hô hấp được tách chiết bằng kit tách chiết QIAampViral RNA Mini Kit (Qiagen, Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Quy trình tách chiết được thực hiện theo Quy trình tách chiết mẫu bệnh phẩm hô hấp của Phòng thí nghiệm Cúm – Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

Tóm tắt quy trình như sau: 140 μL bệnh phẩm hô hấp trộn cùng với 560 μL AVL có chứa 5,6 μL RNA carrier. Dung dịch đồng nhất thì ủ hỗn hợp trên 10 phút để đảm bảo ly giải. Sau đó bổ sung 560 μL ethanol 100% rồi trộn đều. Chuyển hỗn hợp này lên cột lọc có màng silicagel và ly tâm loại bỏ dung dịch. Cột lọc này tiếp tục được rửa lần lượt với 500 μL dung dịch AW1 và AW2. Cuối cùng RNA sẽ được thu hồi bằng 60 μL dung dịch đệm AVE.

2.6.3. Phản ứng realtime RT-PCR

Xác định sự có mặt của virus trong mẫu bệnh phẩm bằng phương pháp realtime RT-PCR sử dụng sinh phẩm AgPath-ID One-Step RT-PCR kit (Life Technology, Mỹ). Cặp mồi (RSV-For và RSV-Rev) và probe (RSV-Probe) đặc hiệu phát hiện RSV theo quy trình của Trung tâm kiểm soát bệnh tật Hoa Kỳ [90] chạy trên hệ thống máy realtime ABI 7500-fast và Bio-Rad CFX 96. Các mẫu bệnh phẩm sau khi được xác định là dương tính sẽ được phân nhóm cũng bằng phương pháp realtime RT-PCR sử dụng cặp mồi và probe thiết kế trên vùng gen *N* với sinh phẩm Invitrogen SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen, Mỹ). Trình tự mồi và probe xác định phân nhóm RSV theo bài báo của Do và cộng sự [91]. Cặp mồi chung để xác định cả

hai phân nhóm RSV là RSV-N For và RSV-N Rev. Probe cho RSV-A là Probe A0108LNA và cho RSV-B là Probe B0108LNB như trong Bảng 2.1. Môi và probe được đặt tổng hợp nhân tạo bởi công ty LGC Biosearch Technology (Mỹ).

Bảng 2.1. Trình tự môi, probe và chu trình nhiệt trong phản ứng realtime RT-PCR chẩn đoán, phân nhóm RSV

Mục tiêu	Tên môi/probe	Trình tự nucleotide	Chu trình nhiệt
Chẩn đoán phát hiện RSV [90]	RSV-For	GGCAAATATGGAAACATACGTG AA	50°C: 10 phút 95°C: 5 phút 45 chu kỳ { 95°C: 15 giây 55°C : 1 phút
	RSV-Rev	TCTTTTCTAGGACATTGTAYTG AACAG	
	RSV-Probe	FAM-5'- CTGTGTATGTGGAGCCTTCGTG AAGCT-BHQ1	
Phân nhóm RSV [91]	RSV N-For	GGATTCTACCATATATTGA	50°C: 30 phút 95°C: 15 phút 45 chu kỳ { 95°C: 30 giây 45°C: 1 phút
	RSV N-Rev	GAAGTKAGGAAATTGAGT	
	Probe A0108LNA (RSV-A)	HEX-5'- CAAAAGCATCATTATTATCTTT- BHQ1	
	Probe B0108LNA (RSV-B)	FAM-5'- CAAAAGCATCATTGCTGTCATT- BHQ1	

Thành phần phản ứng realtime RT-PCR chẩn đoán và phân nhóm RSV như trong Bảng 2.2.

Bảng 2.2. Thành phần hỗn hợp phản ứng realtime RT-PCR chẩn đoán và phân nhóm RSV

Thành phần phản ứng chẩn đoán RSV	Thể tích (μ L)	Thành phần phản ứng phân nhóm RSV	Thể tích (μ L)
Sinh phẩm AgPath-ID One-Step RT-PCR		Sinh phẩm Invitrogen SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR	
2X RT-PCR buffer	12,5	2X Master mix	12,5
25X RT-PCR enzyme mix	1,0	SuperScript III enzyme mix	0,5
50X RSV-For	0,5	RSV N-For (20nM)	0,5
50X RSV-Rev	0,5	RSV N-Rev (20nM)	0,5
50X RSV-Probe	0,5	Probe A0108LNA (10 μ M)	0,5
H ₂ O	5,0	Probe B0108LNA (10 μ M)	0,5
RNA	5,0	H ₂ O	5,0
		RNA	5,0
Tổng thể tích	25,0	Tổng thể tích	25,0

2.6.4. Phân lập virus hợp bào hô hấp

Những mẫu có kết quả dương tính RSV với giá trị Ct<25 sẽ được lấy bệnh phẩm hô hấp để tiến hành phân lập virus theo quy trình phân lập các virus hô hấp khác của Phòng thí nghiệm Cúm, Khoa Vi rút, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

Nguyên vật liệu cần thiết cho quá trình này gồm: 500 μ L mẫu bệnh phẩm hô hấp; kháng sinh Kanamycin sulfate (C_M = 250 μ g/mL) và Ciprofloxacin-HCL (C_M = 10 mg/mL) được trộn với nhau theo tỷ lệ 1:1 để tạo thành kháng sinh xử lý mẫu; tế bào Hep-2 một lớp trên các phiến nuôi cấy tế bào hoặc chai nuôi cấy tế bào 25 cm³; môi trường duy trì tế bào D-MEM (có bổ sung Albumin 1%, HEPES 1M, kháng sinh penicillin – streptomycin).

Tóm tắt quy trình như sau: trộn 500 μ L mẫu bệnh phẩm hô hấp cùng với 20 μ L hỗn hợp kháng sinh xử lý mẫu, ủ ở 33°C trong 30-60 phút. Sau đó, cấy chuyển hỗn hợp mẫu được xử lý này sang phiến nuôi cấy tế bào Hep-2. Bổ sung thêm 1,5 mL môi trường duy trì tế bào D-MEM, ủ trong tủ ấm 35°C và theo dõi hiện tượng CPE hàng ngày (trong 7 ngày). Đối với các mẫu có CPE, mẫu bệnh phẩm sẽ được cấy chuyển hoặc được khuếch đại để thu được dung dịch chứa virus với thể tích lớn hơn. Trường hợp không có CPE ở lần cấy thứ 1 và thứ 2, mẫu phân lập sẽ được cấy chuyển.

Các bước khi cấy chuyển cũng tương tự như lần 1, trong đó, môi trường trong phiên nuôi cấy sẽ được chuyển sang phiên nuôi cấy mới. Mỗi mẫu bệnh phẩm hô hấp được cấy chuyển không quá 3 lần để thu được chủng virus.

2.6.5. Xác định chủng phân lập

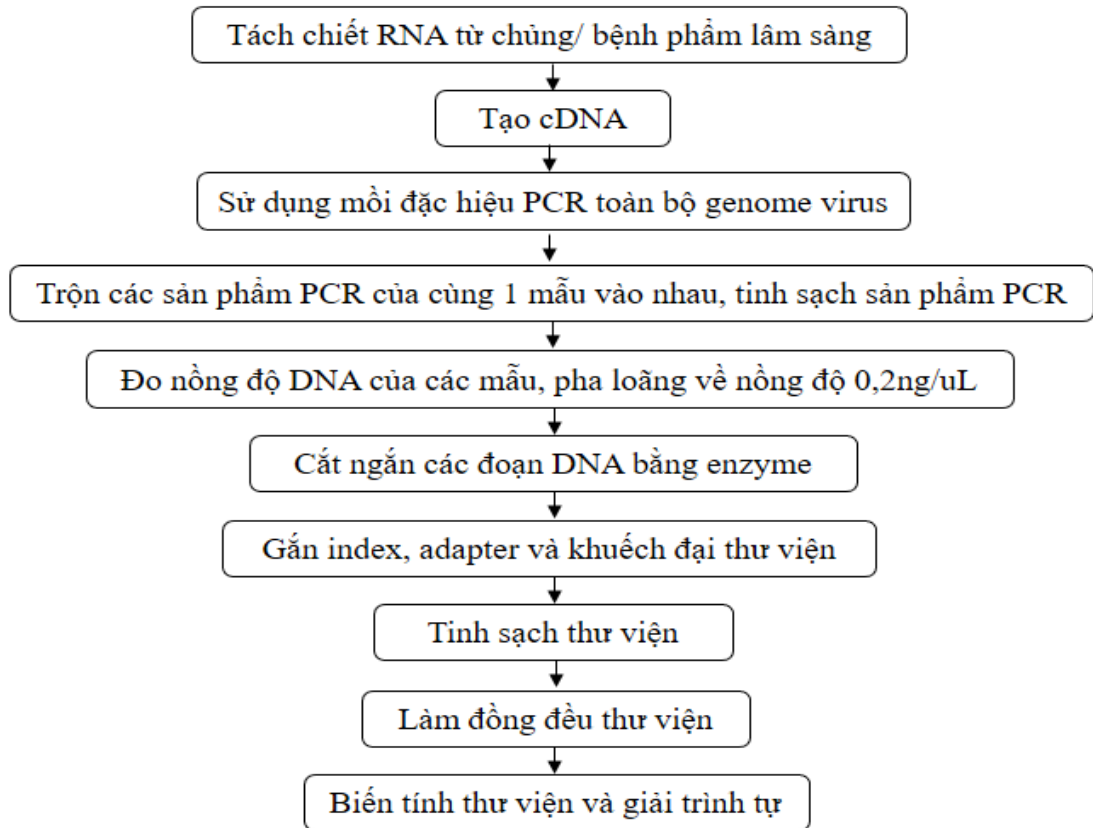
Các mẫu nuôi cấy có CPE hoặc sau lần cấy chuyển thứ 3 được kiểm tra sự có mặt của virus bằng phương pháp realtime RT-PCR theo quy trình chẩn đoán RSV trong mẫu hô hấp và quan sát dưới kính hiển vi. Dịch nuôi cấy được tách chiết RNA và chạy realtime RT-PCR giống như với mẫu bệnh phẩm hô hấp để xác định chủng RSV. Kết quả realtime RT-PCR có giá trị Ct <20 thì được coi là có kết quả phân lập thành công theo quy trình phân lập các virus hô hấp khác của Phòng thí nghiệm Cúm, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương. Khuếch đại thể tích dịch nuôi cấy virus, bước cấy chuyển sẽ được thực hiện trên chai nuôi cấy tế bào thể tích 25cm³ hoặc 75cm³.

Để khẳng định RSV đã được nhân lên trên dòng tế bào Hep-2, dịch nổi tế bào từ các phiên nuôi cấy được mang đi nhuộm âm bản để soi dưới kính hiển vi điện tử truyền qua. Phương pháp này được thực hiện trên giấy parafilm theo phương pháp nhỏ giọt, sử dụng lưới đồng có phủ màng collodion-cacbon. Đầu tiên, dịch nuôi cấy virus được nhỏ lên bề mặt parafilm. Đặt lưới đồng có phủ màng collodion-cacbon lên bề mặt giọt bacitracine 0,01% để tăng sự hút bám mẫu. Chuyển lưới sang giọt mẫu trong 10 phút để hấp phụ virus lên màng. Chuyển lưới này sang dung dịch cố định glutaraldehyde 1% để cố định mẫu. Rửa phần dung dịch dư thừa và các phần không gắn kết bằng dung dịch amonium acetate 0,1%. Nhuộm lưới bằng dung dịch PTA 0,25%. Để lưới khô trong không khí và quan sát dưới kính hiển vi điện tử truyền qua. Chú ý giữa các bước thực hiện phải hút sạch dung dịch thừa bằng giấy thấm để có được hình ảnh nhuộm đẹp.

2.6.6. Giải trình tự hệ gen virus hợp bào hô hấp bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới

Đối với các chủng RSV thu được sẽ giải trình tự toàn bộ hệ gen. Trường hợp các chủng virus này không đủ mang tính đại diện theo năm nghiên cứu, địa điểm nghiên cứu và phân nhóm thì lựa chọn thêm các mẫu bệnh phẩm hô hấp để tiến hành giải trình tự. Các mẫu bệnh phẩm hô hấp được lựa chọn có tải lượng virus cao, có giá trị Ct <25, đại diện theo thời gian lấy mẫu, địa điểm lấy mẫu, phân nhóm RSV, nhóm tuổi và giới tính.

Quy trình giải trình tự hệ gen của RSV bằng kỹ thuật NGS được tóm tắt như Hình 2.2. Hóa chất sử dụng, bộ sinh phẩm và trình tự mỗi sẽ được mô tả chi tiết trong từng bước thực hiện của quy trình.



Hình 2.2. Quy trình giải trình tự hệ gen RSV bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới trên hệ thống máy Miseq.

*** Tách chiết RNA từ chủng/bệnh phẩm hô hấp và tổng hợp cDNA**

Quy trình tách chiết chủng và bệnh phẩm hô hấp để thực hiện giải trình tự gen cũng tương tự như quy trình tách chiết RNA từ bệnh phẩm hô hấp trong mục 2.6.2.

cDNA được tổng hợp từ khuôn RNA của chủng/bệnh phẩm hô hấp bằng bộ sinh phẩm SuperScript IV VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Mỹ). Thành phần phản ứng và chu trình nhiệt như Bảng 2.3.

Bảng 2.3. Thành phần phản ứng và chu trình nhiệt của của phản ứng tạo cDNA.

Thành phần phản ứng cDNA	Thể tích (μL)	Chu trình nhiệt
SuperScript IV VILO Master Mix (5X)	5	25°C: 10 phút 50°C: 20 phút 85°C: 5 phút 4°C: ∞
H ₂ O	15	
RNA	5	
Tổng thể tích	25	

* **Khuếch đại hệ gen RSV**

Sinh phẩm dùng trong phản ứng PCR khuếch đại hệ gen của RSV là Platinum SuperFi II Green PCR Master Mix (Invitrogen, Mỹ). Trình tự mỗi và chu trình nhiệt được tham khảo từ công bố của Langedijk [66] và Agoti [92] có thay đổi cho phù hợp với tình hình thực tế của đề tài. Trình tự mỗi khuếch đại hệ gen của hai phân nhóm RSV như Bảng 2.4 và Bảng 2.5. Mỗi được đặt tổng hợp nhân tạo bởi công ty LGC Biosearch Technology (Mỹ). Thành phần phản ứng, chu trình nhiệt PCR của hai phân nhóm giống nhau và được trình bày trong Bảng 2.6.

Bảng 2.4. Trình tự mỗi sử dụng để khuếch đại hệ gen phân nhóm RSV-A

Mảnh	Tên mỗi	Trình tự (5'-3')	Vị trí nucleotide bắt đầu trên hệ gen	Kích thước sản phẩm PCR (bp)
1A [92]	rsva52	TGTGCATGTTATTACAAGTAGTGA TATTTG	26	2853
	rsva39	CTTCTCTTAAACCAACCATGGCAT C	2879	
2A [92]	rsva117	ATAAGAGATGCCATGGTTGGTTTA AGA	2849	2825
	rsva1688	CAACTCCATTGTTATTTGCCCCA	5674	
3A [92]	rsva1820	GCAGCATATGCAGCAA CAATC	5207	2996
	rsva312	AGGATATTTGTCAGGTAGTATCATT ATTTTGG	8203	
4A [66]	RSVA- fragment 3-Fw	CGAGGTCATTGCTTGAATGG	7598	3818
	RSVA- fragment 3-Rev	CACCACCACCAAATAACATGG	11416	
5A [92]	rsva350	AGAACTCAGTGTAGGTAGAATGTT TG	10363	2712
	rsva385	ATCAGTTATATATCCCTCTCCCCAA TCTT	13075	
6A [92]	rsva1232	ATTGGGTGTATGCATCTATAGATAA CAAG	12387	2596
	rsva4066	GTTGTATAACAAACTACCTGTGAT TTAATCAG	14983	

Bảng 2.5. Trình tự mỗi sử dụng để khuếch đại hệ gen phân nhóm RSV-B

Mảnh	Tên mỗi	Trình tự (5'-3')	Vị trí nucleotide bắt đầu trên hệ gen	Kích thước sản phẩm PCR (bp)
1B [92]	rsvb3	TGGGGCAAATAAGAATTTGATAAG TGC	44	2893
	rsvb50	AGTCTTGCCATAGCC TCTAACCT	2937	
2B [92]	rsva117	ATAAGAGATGCCATGGTTGGTTTA AGA	2849	2825
	rsva1688	CAACTCCATTGTTATTTGCCCCA	5674	
3B [66]	RSVB- fragment 2-Fw	AAGGGTTAGCCCATCCAAMC	4935	4396
	RSVB- fragment 2-Rev	TGCTAAGGCTGATGTCTTTCC	9331	
4B [66]	RSVB- fragment 3-Fw	GTCCTCGTCTGARCAAATTGC	8815	3456
	RSVB- fragment 3-Rev	TAGGTCCTCTTTCACCACGAG	12271	
5B [92]	rsva350	AGAACTCAGTGTAGGTAGAATGTT TG	10363	2712
	rsva385	ATCAGTTATATATCCCTCTCCCCAA TCTT	13075	
6B [92]	rsvb165	TTCAAAATTGCATAAGTTTTGGTC TTAGC	12653	2324
	rsvb1199	ATAGTACACTACCTGTTATTTTAAT CAGCTTCT	14977	

Bảng 2.6. Thành phần phản ứng và chu trình nhiệt khuếch đại 6 đoạn của hệ gen RSV

Thành phần phản ứng PCR	Thể tích (μL)	Chu trình nhiệt
Platinum SuperFi II Green PCR Master Mix (2X)	10	98°C: 2 phút, 40 chu kỳ: { 98°C: 15 giây 50°C: 30 giây 72°C: 3 phút 72°C: 10 phút 4°C: ∞
H ₂ O	6.5	
Primer forward (5μM)	1	
Primer reverse (5μM)	1	
cDNA	1.5	
Tổng thể tích	20	

Sản phẩm PCR sau đó được điện di trên gel agarose 1% có bổ sung thuốc nhuộm SYBER Safe DNA Gel Stain. Sản phẩm được điện di ở điều kiện 135V trong 10 phút rồi soi với đèn UV.

*** Trộn các sản phẩm PCR của cùng một mẫu, tinh sạch sản phẩm PCR**

Với các mẫu kiểm tra điện di đều có các băng ở kích thước mong muốn sẽ được tiến hành trộn với nhau. Mỗi mẫu gồm 6 mảnh kích thước như trong Bảng 2.4 hoặc 2.5, được lấy cùng thể tích (5 μL) rồi trộn vào nhau trong một ống mới để tạo thành 1 mẫu duy nhất. Trộn đều hỗn hợp này rồi tiến hành tinh sạch.

Tinh sạch sản phẩm PCR với sinh phẩm ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific, Mỹ) theo tỷ lệ 10 μL sản phẩm PCR trộn với 4 μL ExoSAP-IT. Trộn đều hỗn hợp rồi chạy chu trình nhiệt 37°C trong 30 phút, biến tính hóa chất còn lại ở nhiệt độ 80°C trong 15 phút. Kết thúc chu trình nhiệt đã thu được sản phẩm PCR tinh sạch.

*** Đo nồng độ sản phẩm PCR sau tinh sạch pha loãng về nồng độ 0,2 ng/μL**

Nồng độ DNA được xác định bằng bộ hóa chất Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Mỹ). Chuẩn bị dung dịch Qubit working solution bằng cách trộn 199 μL Qubit Buffer và 1 μL Qubit Reagent. Với 2 mẫu chuẩn Standard 1 và Standard 2, dung dịch Qubit working solution là 190 μL và 10 μL mẫu chuẩn. Với mẫu cần đo DNA, dung dịch Qubit working solution là 197 μL và 3 μL mẫu. Tổng thể tích cuối cùng ở mỗi ống đo nồng độ là 200 μL. Trộn đều các ống, ủ tránh ánh sáng trong 2 phút rồi đo nồng độ trên máy Qubit 3.0 Fluorometer.

Tiến hành pha loãng mẫu về nồng độ 0,2 ng/μL với buffer EB theo công thức $C1 \times V1 = C2 \times V2$ để chuẩn bị cho bước tiếp theo. Các mẫu đã pha loãng nồng độ nên được tiến hành thí nghiệm tiếp theo ngay sau đó, tránh để qua đêm vì có thể ảnh hưởng đến kết quả các bước sau..

*** Cắt ngắn các đoạn DNA bằng enzyme**

Các mẫu DNA đã pha loãng về nồng độ 0,2 ng/ μ L sẽ được chuẩn bị thư viện với bộ chuẩn bị thư viện Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, Mỹ) và Nextera XT Index Kit (Illumina, Mỹ). Bước đầu tiên của quá trình này là cắt ngắn các đoạn DNA kích thước dài thành các đoạn ngắn hơn bằng enzyme của bộ kit.

Đầu tiên hút 5 μ L DNA mỗi mẫu ở nồng độ 0,2 ng/ μ L vào tube mới. Bổ sung thêm 10 μ L hóa chất TD (Tagment DNA Buffer) rồi trộn đều. Tiếp theo bổ sung 5 μ L hóa chất ATM (Amplicon Tagment Mix), trộn đều rồi ủ ở 55°C trong 5 phút. Khi hết thời gian, ngay lập tức thêm 5 μ L hóa chất NT (Neutralize Tagment Buffer) để dừng quá trình cắt ngắn DNA của enzyme. Hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút để phản ứng xảy ra hoàn toàn.

*** Gắn index, adapter và khuếch đại thư viện**

Bước tiếp theo của chuẩn bị thư viện là gắn index, adapter vào các đoạn DNA bị cắt ngắn và khuếch đại các đoạn DNA này lên. Các thư viện được ủ ở nhiệt độ phòng trong bước trên sẽ được bổ sung các cặp index i5 và i7 tương ứng với các trình tự nhận diện mẫu. Lập sơ đồ/bảng cho các mẫu tương ứng với index để dùng khai báo thông tin giải trình tự ở bước sau.

Mỗi ống mẫu bổ sung 5 μ L index i5 và 5 μ L index i7 theo sơ đồ đã lập. Cho tiếp mỗi ống 15 μ L hỗn hợp phản ứng NPM (Nextera PCR Master Mix). Trộn đều các ống thư viện và chạy máy PCR với chu trình nhiệt như sau: 72°C trong 3 phút, 95°C trong 30 giây, 15 chu kỳ tiếp theo (95°C trong 30 giây, 55°C trong 30 giây, 72°C trong 30 giây), kéo dài với 72°C trong 5 phút.

*** Tinh sạch thư viện**

Thư viện mẫu sau khi khuếch đại được tinh sạch bằng sinh phẩm AMPure XP Bead với tỷ lệ 1:1 (50 μ L thư viện : 50 μ L AMPure XP Bead). AMPure XP Bead hoạt động trên nguyên tắc tinh sạch bằng các hạt từ. Khi trộn DNA với các hạt bead, chúng sẽ liên kết với các DNA từ kích thước lớn tới kích thước nhỏ tùy theo lượng bead cho vào. Do đó, để thu được nhiều đoạn DNA thư viện có kích thước mong muốn trên 300bp, nhóm nghiên cứu đã sử dụng tỷ lệ DNA và bead là 1:1.

Sau khi bổ sung bead theo tỷ lệ tính toán, hỗn hợp được trộn đều và ủ ở nhiệt độ phòng 5 phút rồi cho lên giá từ. Chờ 2 phút để hạt từ có gắn DNA bị giữ chặt tại điểm tiếp xúc với giá từ, hút bỏ toàn bộ dịch nổi rồi rửa các hạt từ này với dung dịch còn 80% 2 lần. Hút sạch lượng còn dư và để khô trong điều kiện nhiệt độ phòng khoảng 5-10 phút. Bổ sung 50 μ L buffer RSB (Resuspension Buffer) vào để thu hồi DNA từ hạt bead. Trộn đều hỗn hợp cho tan hết bead vào buffer, cho lên giá từ chờ cho dung dịch trong rồi hút 47 μ L dịch nổi chứa DNA thư viện đã được tinh sạch sang ống lưu DNA mới.

*** Làm đồng đều thư viện**

Các thư viện đã được tinh sạch sẽ đo nồng độ bằng kit Qubit dsDNA HS Assay. Kích thước thư viện được kiểm tra bằng phương pháp điện di 5 μ L mỗi thư viện với agarose gel 2%, 100V trong 15 phút. Nồng độ mỗi thư viện được tính toán theo công thức sau: $nM = 10^6 \times (\text{nồng độ thư viện ng}/\mu\text{L}) / [(\text{kích thước thư viện bp}) \times 660 \text{ g/mol}]$. Nồng độ các thư viện cuối cùng được đưa về cùng một nồng độ là 4nM, sử dụng công thức: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$. Các thư viện được trộn với cùng một thể tích (5 μ L - 10 μ L) để trở thành một thư viện chung duy nhất. Sau đó tiếp tục đo nồng độ thư viện này để sử dụng cho bước tiếp theo.

*** *Biến tính thư viện và giải trình tự***

Sau khi đo nồng độ thư viện chung duy nhất, tiến hành biến tính thư viện từ sợi đôi DNA thành sợi đơn bằng dung dịch NaOH 0,2N. Các bước thực hiện như sau: lấy 5 μ L thư viện mẫu chung (ví dụ nồng độ 4nM) trộn cùng 5 μ L NaOH 0,2N, trộn đều và ủ ở nhiệt độ phòng 5 phút cho phản ứng giãn mạch DNA. Hết thời gian ủ bổ sung ngay 990 μ L buffer HT1, trộn đều được thư viện chung nồng độ 20pM.

Từ thư viện nồng độ 20pM, pha loãng về nồng độ chạy máy Miseq với bộ sinh phẩm tương ứng bằng buffer HT1. Trong nghiên cứu này sử dụng bộ sinh phẩm Miseq Reagent Micro Kit V2 (300 cycles) và nồng độ chạy máy là 11-12pM. Thư viện sau đó được tiến hành giải trình tự trên hệ thống máy Miseq.

2.6.7. Phân tích kết quả giải trình tự gen thế hệ mới

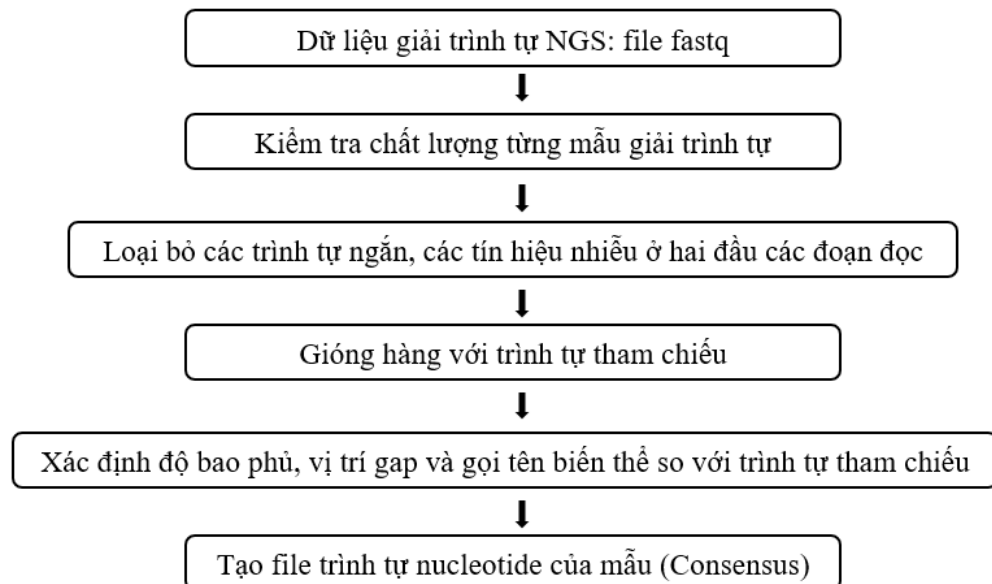
Kết quả thu được sau khi kết thúc quá trình giải trình tự NGS trên hệ thống máy Miseq là dữ liệu định dạng bằng file FASTQ. Dữ liệu giải trình tự sẽ được xử lý trên hệ thống các phần mềm tích hợp sẵn trong máy giải trình tự. Đầu tiên phần mềm Local Run Manager và Miseq Control Software sẽ xử lý hình ảnh và tạo các kết quả đọc nucleotide của từng chu kỳ chạy. Sau đó, phân tích đám mây Basespace Sequence Hub cho phép lưu trữ các kết quả giải trình tự và theo dõi các kết quả chạy trực tuyến. Ngoài ra, các phân tích đám mây này còn giúp chia sẻ dữ liệu kết quả chạy giải trình tự và đánh giá từng lần chạy dựa trên các chỉ số phân tích.

Độ chính xác của các kết quả đọc nucleotide giải trình tự được ghi lại dưới dạng điểm chất lượng (Phred quality score) xác định khả năng một nucleotide bị gọi tên không chính xác. Điểm chất lượng (Q) của một nucleotide nhất định được tính bằng công thức $Q = -10 \log_{10}(e)$, trong đó e là xác suất ước tính của lệnh gọi sai tên nucleotide. Do đó, điểm chất lượng càng cao, xác suất gọi tên sai càng thấp. Cụ thể: Q10 - độ chính xác gọi tên nucleotide là 90%; Q20 - độ chính xác gọi tên nucleotide là 99%; Q30 - độ chính xác gọi tên nucleotide là 99,9%; Q40 - độ chính xác gọi tên nucleotide là 99,99%. Vì vậy, với kết quả giải trình tự NGS hệ gen RSV trên hệ thống máy Miseq, yêu cầu đặt ra là kết quả phải có tỷ lệ Q30 và Q40 mỗi Read chạy là trên

80%; tỷ lệ tạo thành công các cluster (% Occupancy) là trên 70%; tỷ lệ cluster đạt chất lượng (% Cluster Passing Filter) là trên 70%.

Từ các file fastq của mẫu, dữ liệu sẽ được phân tích bằng phần mềm thương mại dành riêng cho các kết quả giải trình tự gen thế hệ mới của công ty Qiagen - phần mềm CLC Genomics Workbench 11 [93]. Trình tự phân tích kết quả như Hình 2.3. Đây là phần mềm với công nghệ tiên tiến, các tính năng và thuật toán đặc thù để phân tích các kết quả NGS từ Illumina, Ion Torrent, Pac Bio...

Để phân tích dữ liệu giải trình tự gen NGS, đầu tiên các file fastq của từng mẫu được đánh giá sơ bộ chất lượng giải trình tự (QC Report). Bước này giúp cho người phân tích biết được kết quả mẫu chạy có tốt không, dữ liệu có đủ lớn và tin cậy để phân tích không, có nhiều đoạn ngắn hay bị lỗi (tín hiệu NNNN) không. Ngoài ra, các thông số kỹ thuật phân tích trong bước phân tích tiếp theo cũng được đưa ra: số nucleotide cần cắt ở hai đầu của các đoạn đọc (reads); loại bỏ các trình tự ngắn và tín hiệu nhiễu (Trim). Khi có các reads này chỉ gồm các nucleotide có độ tin cậy cao, chúng sẽ được so sánh dòng hàng với trình tự tham chiếu (reference) của từng phân nhóm RSV tương ứng. Trình tự tham chiếu của RSV-A là EPI_ISL_412866-hRSV/A/England/397/2017 và của RSV-B là EPI_ISL_1653999-hRSV/B/Australia/VIC-RCH056/2019. Đây là hai trình tự tham khảo chính của các phân tích so sánh di truyền RSV trên cơ sở dữ liệu GISAID (Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data - Sáng kiến Toàn cầu về Chia sẻ dữ liệu Cúm gia cầm) và RSV Server [94].



Hình 2.3. Quy trình phân tích kết quả giải trình tự gen thế hệ mới bằng phần mềm CLC Genomics Workbench và chú giải các biến thể.

Phần mềm CLC Genomics Workbench sẽ đưa ra các báo cáo về mức độ bao phủ của các read trong mẫu so với trình tự tham chiếu; số lượng/tỷ lệ read đúng hàng và không đúng hàng với trình tự tham chiếu; số lượng read nhiều nhất, ít nhất và trung bình đi qua một vị trí... Từ đó, xác định các vị trí bị gap trong hệ gen của RSV nếu có, khoảng cách bị gap là bao nhiêu nucleotide. Ngoài ra, các vị trí biến thể (NSP, chèn, xóa) cũng được chỉ ra và đánh dấu bằng màu sắc. Trình tự nucleotide hệ gen mỗi mẫu RSV (consensus) sẽ được lưu dưới dạng file fasta và xuất liệu để tiện cho các phân tích di truyền tiếp theo.

2.6.8. Lắp ráp, chú giải hệ gen virus hợp bào hô hấp và tìm đột biến

Khi so sánh thẳng hàng với trình tự tham chiếu, các vị trí nucleotide có sự khác biệt với trình tự này sẽ được đánh dấu để nhận biết. Nếu các read qua vị trí này có sự đồng thuận > 90%, sự sai khác này chính là sự khác nhau có ý nghĩa giữa mẫu giải trình tự và trình tự tham chiếu. Vị trí này sẽ là đột biến nucleotide/axit amin tương ứng. Trường hợp sự đồng thuận < 90%, cần tiến hành phân tích chi tiết các read đi qua vị trí này và xác định là sai số của quá trình trim hay là hai nucleotide khác nhau, nếu khác nhau làm thay đổi axit amin thì tiến hành phân tích như hai trình tự độc lập.

Từ kết quả consensus hệ gen thu được, xác định vị trí mở đầu và kết thúc của từng gen; vùng liên gen khi so sánh với trình tự tham chiếu tương ứng bằng phần mềm AliView phiên bản 1.28 [95]. Sau đó xác định vị trí, kích thước các protein và axit amin khác so với chủng tham chiếu để tạo các chú giải. Sử dụng hệ thống RSV Server và GISAIID để phân tích và tìm các vị trí axit amin thay đổi, vai trò của các biến thể trong gen cũng như ảnh hưởng tới quá trình xâm nhập và nhân lên của virus.

2.6.9. Xây dựng cây phát sinh chủng loại, phân nhóm di truyền

*** Xây dựng cây phát sinh chủng loại**

Tiến hành xây cây phát sinh chủng loại dựa trên vùng gen *G* của hai phân nhóm RSV vì đây là gen có nhiều biến đổi, việc phân nhóm di truyền các kiểu gen cũng dựa trên gen *G*. Lựa chọn trình tự tham khảo là các trình tự RSV-A và RSV-B trên thế giới và Việt Nam trong các năm gần đây. Các trình tự này được lấy trên hệ thống GISAIID và NCBI (National Center for Biotechnology Information – Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học quốc gia của Mỹ). Thông tin thời điểm lấy mẫu cũng được thu thập để phục vụ phân tích.

Trình tự gen *G* các mẫu nghiên cứu và tham khảo được sắp xếp thẳng hàng bằng phương pháp ClustalW của phần mềm MEGA X [96]. Sử dụng phần mềm BEAST v2.7.0 [97] để xây cây phát sinh chủng loại theo thời gian và tính toán động lực tiến hóa của từng phân nhóm RSV bằng phương pháp Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC). Để lựa chọn mô hình thay thế nucleotide phù hợp nhất sử dụng phần mềm jModelTest v2.1.7 [98] tính toán trên số lượng trình tự phân tích của

từng nhóm RSV. Mô hình thay thế nucleotide có thể đảo ngược thời gian chung (General-time reversible – GTR) với sự thay đổi tốc độ phân phối gamma (gamma-distribution - Γ) giữa các vị trí được lựa chọn là mô hình tối ưu nhất.

Đầu tiên trình tự sắp xếp thẳng hàng của các gen *G* nghiên cứu và tham khảo được đưa vào phần mềm BEAUti v2.7.0 (thuộc phần mềm BEAST v2.7.0) kèm với các thông tin thời gian thu thập mẫu. Mô hình đồng hồ tiến hóa là Optimised Relaxed Clock được sử dụng để xây cây phát sinh chủng loại và Strick Clock để ước tính tốc độ tiến hóa. Thời gian xuất hiện tổ tiên chung gần nhất trên cây (time to Most Recent Common Ancestor - tMRCA) được tính toán bằng mô hình Bayesian Skyline Coalescent Tree Priors, với giả định tỷ lệ thay thế các nucleotide giữa các nhánh là không giống nhau. Cây phát sinh được thực hiện với phần mềm BEAST v2.7.0 với chiều dài chuỗi MCMC là 200 triệu generation cho tất cả các tham số với tính log sau mỗi 5000 bước.

Tree Annotator v2.7.0 (thuộc phần mềm BEAST v2.7.0) đã tạo ra cây phát sinh chủng loại với độ tin cậy tối đa (Maximum Clade Credibility tree - MCC tree) sau khi loại bỏ 10% giá trị burn-in. Sử dụng FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) để minh họa cây phát sinh chủng loại theo thời gian, chia nhóm di truyền và các thay thế axit amin trên các nhánh. Sau khi tính toán, kết quả cây gia hệ của BEAST được phần mềm Tracer v1.7.2 (<https://github.com/beast-dev/tracer/releases/tag/v1.7.2>) phân tích và tính toán tốc độ tiến hóa của gen *G*. Các giá trị cỡ mẫu hiệu quả (Effective Sample Size – ESS) cho tất cả các tham số ước tính trong các phân tích MCMC trong nghiên cứu phải >200. Tỷ lệ trung bình, giá trị trung vị và các khoảng giá trị không chắc chắn được thể hiện bằng giá trị 95% highest posterior density (khoảng mật độ hậu nghiệm cao nhất - HPD).

** Phân nhóm di truyền, xác định thay thế axit amin*

Các kiểu gen của RSV được xác định dựa vào kiểu gen của trình tự tham khảo đã được công bố và vị trí của chúng trên cây phát sinh chủng loại. Các phân nhóm di truyền, lineage trong từng kiểu gen được xác định dựa trên giá trị bootstrap và posterior probability value (giá trị xác suất hậu nghiệm - PPV). Giá trị này với bootstrap > 70% và PPV > 0,7 được cho là có ý nghĩa.

Sự tạo thành các nhánh trên cây phát sinh chủng loại với thay đổi axit amin được dựa trên phần mềm AliView. Phần mềm này cho phép người dùng nhóm các trình tự tương tự nhau thành một nhóm và so sánh với trình tự tham chiếu để tìm ra khác biệt axit amin cũng như vị trí của chúng trên gen. Trình tự tham chiếu của RSV-A là chủng chuẩn kiểu gen ON1 có nguồn gốc từ Canada năm 2010 (mã số Genbank

là JN257693) và của RSV-B là chủng chuẩn kiểu gen BA từ Argentina năm 1999 (mã số Genbank là AY333364).

Tính toán p-distance (Pairwise-distance: khoảng cách theo cặp) giữa các phân nhóm di truyền, lineage của RSV bằng phần mềm MEGA X. Kết quả này cho phép phân định các kiểu gen của RSV về mặt di truyền một cách chính xác dựa trên các ước tính về sự khác biệt tiến hóa giữa các nhóm trình tự.

2.6.10. Phân tích số liệu

Thông tin người bệnh và các kết quả xét nghiệm được nhập vào hệ thống phần mềm quản lý mẫu bệnh phẩm FileMaker Pro (Claris International - <https://store.claris.com/individuals>) của Phòng thí nghiệm Cúm - Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương để tiến hành lưu trữ thông tin và chuẩn bị cho phân tích số liệu.

Phân tích mối tương quan giữa tỷ lệ dương tính RSV theo địa điểm nghiên cứu, nhóm tuổi, giới tính và theo năm nghiên cứu sử dụng kiểm định Chi bình phương (Chi-Square χ^2) bằng phần mềm phân tích các thông số dịch tễ học Stata phiên bản 14.0 (<https://www.stata.com/stata14/>).

Phần mềm Microsoft Excel (Microsoft Office) được sử dụng để phân tích các đặc điểm dịch tễ học, lập các bảng và vẽ biểu đồ.

2.7. Đăng ký mã định danh cho các dữ liệu trình tự

Các mẫu giải trình tự gen sẽ được đăng ký mã định danh trên cơ sở dữ liệu gen của GISAID. Mỗi trình tự sẽ được đăng ký với các thông tin dịch tễ của người bệnh (tuổi, giới, địa điểm và thời gian thu mẫu); thông tin kết quả giải trình tự (hệ thống máy giải trình tự, phần mềm phân tích, số lượng read trung bình qua từng nucleotide...); thông tin về bản quyền trình tự; người chịu trách nhiệm về tính chính xác của thông tin cũng như cách thức liên hệ với người đăng ký trình tự.

Trình tự hệ gen của 56 mẫu RSV-A và 50 RSV-B gồm cả chủng phân lập và mẫu bệnh phẩm hô hấp có mã số từ EPI_ISL_16282709 đến EPI_ISL_16282764 (RSV-A), EPI_ISL_16289246 đến EPI_ISL_16289295 (RSV-B) trên cơ sở dữ liệu của GISAID. Danh sách và thông tin chi tiết các trình tự và mã định danh tương ứng trong luận án xem thêm phần Phụ lục 4 và Phụ lục 5.

Chương 3. KẾT QUẢ

3.1. Xác định sự lưu hành của virus hợp bào hô hấp trên bệnh nhân nhi viêm đường hô hấp cấp tính nặng tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh

3.1.1. Đặc điểm các mẫu bệnh phẩm hô hấp thu thập

Các mẫu bệnh phẩm hô hấp được tiến hành thu thập theo tiêu chuẩn lựa chọn mẫu SARI của WHO từ tháng 1/2017 tới tháng 12/2020 tại Bệnh viện Nhi Trung ương (Hà Nội) và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh (Quảng Ninh). Đặc điểm dịch tễ các mẫu này được tổng hợp trong Bảng 3.1. Cụ thể, có tổng cộng 1563 mẫu đã được thu thập từ các bệnh nhân nhi bị viêm đường hô hấp cấp tính nặng. Trong đó tại Bệnh viện Nhi Trung ương thu được 967 mẫu, số mẫu thu thập tại Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh là 596 mẫu bệnh phẩm hô hấp.

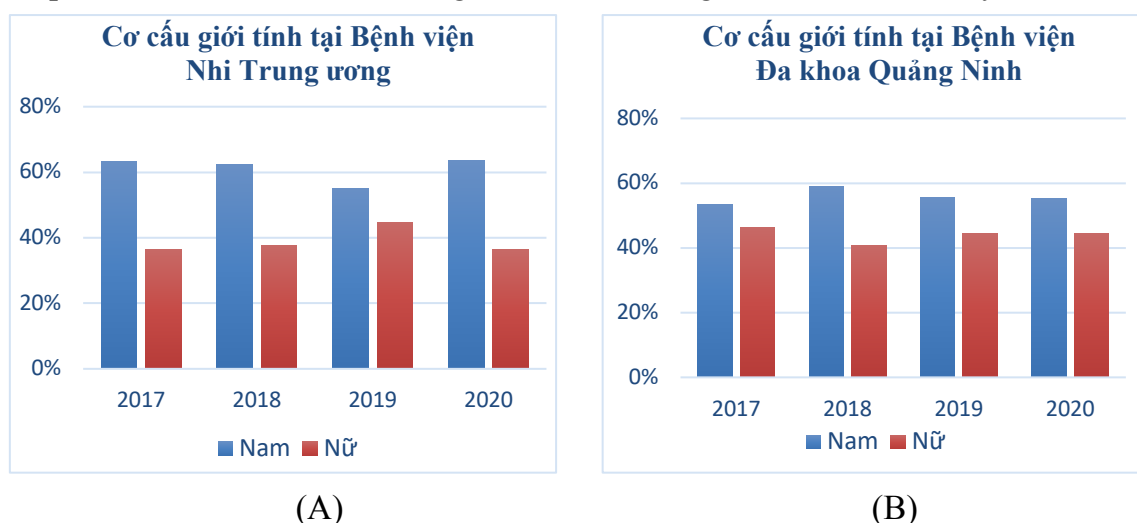
Bảng 3.1. Đặc điểm dịch tễ các mẫu bệnh phẩm hô hấp trong nghiên cứu

Đặc điểm	Năm 2017	Năm 2018	Năm 2019	Năm 2020	Tổng số mẫu
Sự phân bố theo địa điểm nghiên cứu – n (%)					
BV Nhi TW	396 (77,34)	260 (61,9)	187 (50,82)	124 (47,15)	967
BV ĐK QN	116 (22,34)	160 (38,1)	181 (49,18)	139 (52,85)	596
Tổng số	512 (100)	420 (100)	368 (100)	263 (100)	1563
Sự phân bố theo giới tính – n (%)					
Nam	313 (61,13)	256 (60,95)	204 (55,43)	156 (59,32)	929
Nữ	199 (38,87)	164 (39,05)	164 (44,57)	107 (40,68)	634
Tổng số	512 (100)	420 (100)	368 (100)	263 (100)	1563
Sự phân bố theo nhóm tuổi – n (%)					
Dưới 1 tuổi	282 (55,08)	192 (45,71)	29 (7,88)	38 (14,45)	541
Từ 1 đến 2 tuổi	117 (22,85)	105 (25,00)	59 (16,03)	44 (16,73)	325
Từ 2 đến 5 tuổi	68 (13,28)	88 (20,95)	84 (22,83)	64 (24,33)	304
Trên 5 tuổi	45 (8,79)	35 (8,33)	196 (53,26)	117 (44,49)	393
Tổng số	512 (100)	420 (100)	368 (100)	263 (100)	1563

BV Nhi TW: Bệnh viện Nhi Trung ương

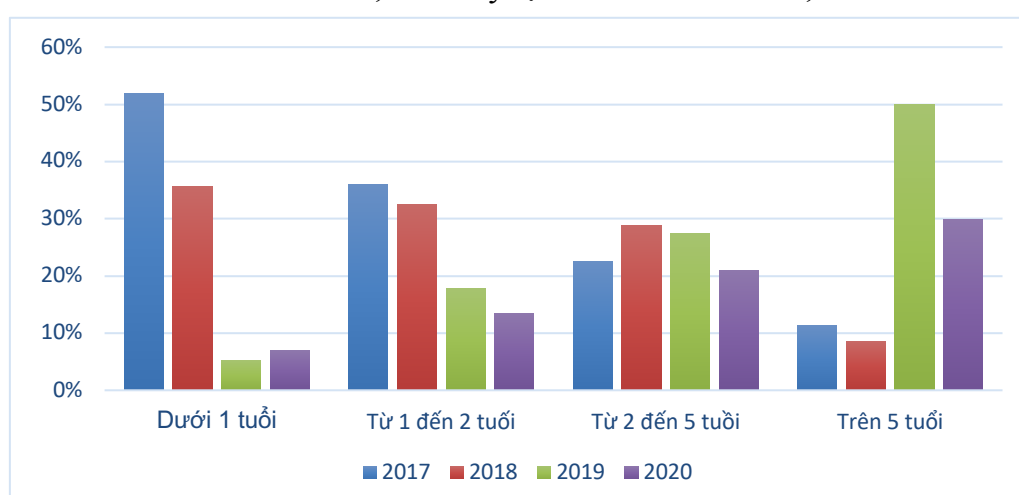
BV ĐK QN: Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh

Trong 4 năm nghiên cứu, số mẫu thu thập giảm dần theo từng năm. Năm 2017 thu thập được nhiều mẫu nhất với 512 mẫu nghiên cứu, theo sau là số mẫu thu được các năm 2018 và 2019 lần lượt là 420 mẫu và 368 mẫu (Bảng 3.1). Số lượng mẫu thu thập năm 2020 tại cả hai điểm nghiên cứu chỉ bằng 51,37% số mẫu này năm 2017.



Hình 3.1. Sự phân bố theo giới tính tại các điểm nghiên cứu.
(A) Bệnh viện Nhi Trung ương. (B) Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh.

Kết quả phân bố giới tính của các mẫu trong nghiên cứu với tỷ lệ nam gấp gần 1,5 lần nữ (929 nam so với 634 nữ). Điều này có nghĩa là, số mẫu thu thập từ các bệnh nhân nhi có giới tính nam nhiều hơn nhiều so với các bệnh nhân nhi có giới tính nữ. Kết quả này được thấy trong cả 4 năm nghiên cứu và trên cả hai địa điểm nghiên cứu (Hình 3.1). Đặc biệt tại Bệnh viện Nhi Trung ương năm 2017, số lượng bệnh nhân nam là 251 so với nữ là 145, tức là tỷ lệ nam so với nữ là 1,73 lần.



Hình 3.2. Sự phân bố theo nhóm tuổi của các bệnh nhân nhi tham gia lấy mẫu nghiên cứu.

Về nhóm tuổi, trẻ em dưới 1 tuổi là nhóm chiếm số lượng nhiều nhất, 541 mẫu chiếm 34,61%. Các nhóm tuổi khác, từ 1 đến 2 tuổi, từ 2 đến 5 tuổi và trên 5 tuổi đều có số lượng gần như tương đương nhau, dao động quanh 20%. Tỷ lệ nhóm trẻ dưới 1 tuổi cao hơn nhiều so với các nhóm tuổi khác trong năm 2017 và 2018, lần lượt là 282 mẫu (55,08%) và 192 mẫu (45,71%) (Hình 3.2). Ngược lại, ở nhóm trên 5 tuổi, tỷ lệ ưu thế lại thấy trong năm 2019 là 195 mẫu (52,99%) và năm 2020 là 117 mẫu (44,49%). Tóm lại, hai năm đầu tiên nhóm tuổi dưới 1 chiếm số lượng lớn còn hai năm sau nhóm trẻ trên 5 tuổi chiếm số lượng lớn hơn các nhóm tuổi khác.

3.1.2. Sự lưu hành của virus hợp bào hô hấp

3.1.2.1. Tỷ lệ dương tính chung virus hợp bào hô hấp

Từ kết quả chẩn đoán xác định RSV bằng phương pháp realtime RT-PCR, các số liệu được tổng hợp và phân tích. Tỷ lệ dương tính trong giai đoạn 2017-2020 tại Bệnh viện Nhi Trung ương là 33,3% và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh là 19,46%. Tỷ lệ dương tính chung của cả nghiên cứu trong bốn năm là 28,02% (Bảng 3.2). Như vậy, Bệnh viện Nhi Trung ương có tỷ lệ dương tính RSV cao gấp 1,71 lần so Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh ($p < 0,05$).

Bảng 3.2. Tỷ lệ dương tính RSV theo địa điểm nghiên cứu

	Bệnh viện Nhi Trung ương n* (%)	Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh n (%)	Tổng cộng n (%)
Số mẫu dương tính RSV	322 (33,30 %)	116 (19,46 %)	438 (28,02 %)
Số mẫu âm tính RSV	645 (66,70 %)	480 (80,54 %)	1125 (71,98 %)
Tổng	967 (100,00 %)	596 (100,00 %)	1563 (100,00 %)
Ý nghĩa thống kê	$p < 0,05$ (Kiểm định Chi bình phương)		

n*: Số lượng mẫu

Các tính toán về tỷ lệ dương tính RSV năm 2017 cũng cao hơn hẳn các năm khác với 36,13% (Bảng 3.3). Tỷ lệ này cao hơn các năm 2018, 2019 và 2020 từ 1,39 đến 1,73 lần. Sự khác nhau này là có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Khi xem xét số lượng mẫu thu thập theo giới tính thì nam chiếm nhiều hơn nữ ở cả hai điểm nghiên cứu và trong bốn năm thu mẫu. Tỷ lệ dương tính RSV ở nam

giới cũng cao hơn nữ (58,45% so với 41,55%). Giữa các năm cũng ghi nhận tỷ lệ dương tính RSV ở nam giới luôn cao hơn nữ giới (Bảng 3.3). Đặc biệt, năm 2017 tỷ lệ này ở nam/nữ là 1,72 lần. Sự khác nhau về tỷ lệ nhiễm RSV ở nam và nữ trong cả nghiên cứu và giữa năm 2017 với các năm khác là có ý nghĩa.

Nhóm dưới 1 tuổi không chỉ có số lượng mẫu thu thập lớn mà tỷ lệ dương tính với RSV của nhóm này trong 4 năm nghiên cứu cũng cao hơn các nhóm khác ($p < 0,05$) (Bảng 3.3). Bên cạnh đó, phân tích nhóm dưới 5 tuổi và trên 5 tuổi cho thấy có sự khác biệt đáng kể về tỷ lệ nhiễm RSV từ 2-4 lần ($p < 0,05$).

Năm 2017, tỷ lệ dương tính RSV của nhóm dưới 1 tuổi nhiều hơn tỷ lệ dương tính RSV của các nhóm tuổi khác từ khoảng 3 tới 17 lần. Tuy nhiên, năm 2019 và 2020, nhóm tuổi này lại có tỷ lệ dương tính thấp dưới 20% và ít hơn các nhóm tuổi khác (Hình 3.3).

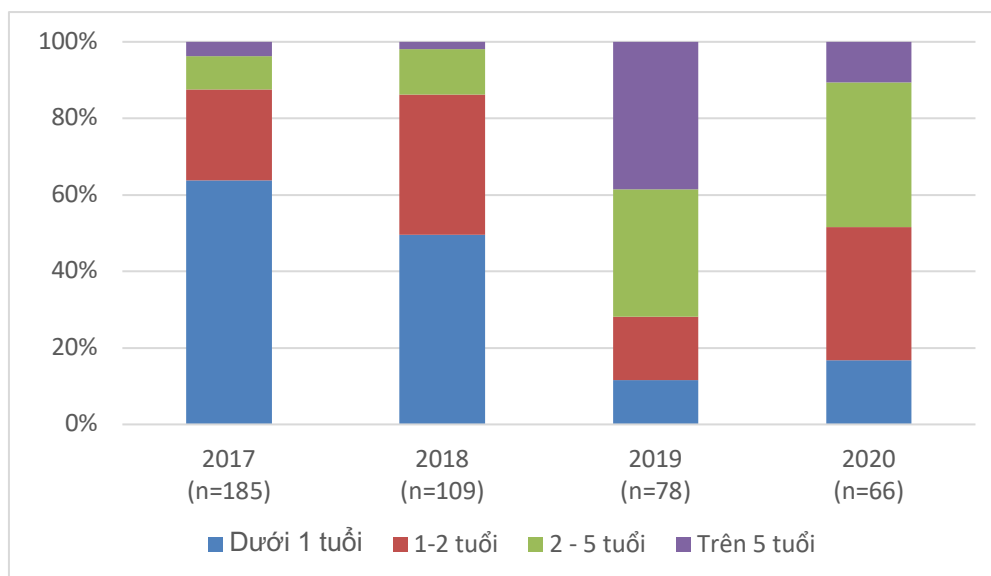
Bảng 3.3. Sự phân bố các trường hợp dương tính với RSV

	2017 n^a (%)	2018 n (%)	2019 n (%)	2020 n (%)	2017-2020 n (%)	Ý nghĩa thống kê^b
Phân bố các ca bệnh RSV theo năm						
Dương tính	185 (36,13)	109 (25,95)	77 (20,92)	67 (25,48)	438 (28,02)	$p < 0,05$ (năm 2017 so với các năm khác)
Âm tính	327 (63,87)	311 (74,05)	291 (79,08)	196 (74,52)	1,125 (71,98)	
Tổng số	512 (100,00)	420 (100,00)	368 (100,00)	263 (100,00)	1,563 (100,00)	
Phân bố số ca dương tính RSV theo giới tính						
Nam	117 (63,24)	64 (58,72)	40 (51,95)	36 (53,73)	256 (58,45)	$p < 0,05$
Nữ	68 (36,76)	45 (41,28)	38 (48,05)	31 (46,27)	182 (41,55)	
Phân bố số ca dương tính RSV theo nhóm tuổi						
Dưới 1 tuổi	118 (63,78)	54 (49,54)	9 (11,69)	11 (16,42)	192 (43,84)	$p < 0,05$ (Nhóm dưới 1 tuổi so với các nhóm tuổi khác; nhóm trên 5 tuổi và dưới 5 tuổi)
1-2 tuổi	44 (23,78)	40 (36,7)	13 (16,88)	23 (34,33)	120 (27,4)	
2 - 5 tuổi	16 (8,66)	13 (11,93)	26 (33,76)	25 (37,31)	80 (18,26)	
Trên 5 tuổi	7 (3,78)	2 (1,83)	30 (36,96)	7 (10,45)	46 (10,5)	

n^a: Số lượng mẫu

Ý nghĩa thống kê^b: kiểm định Chi bình phương

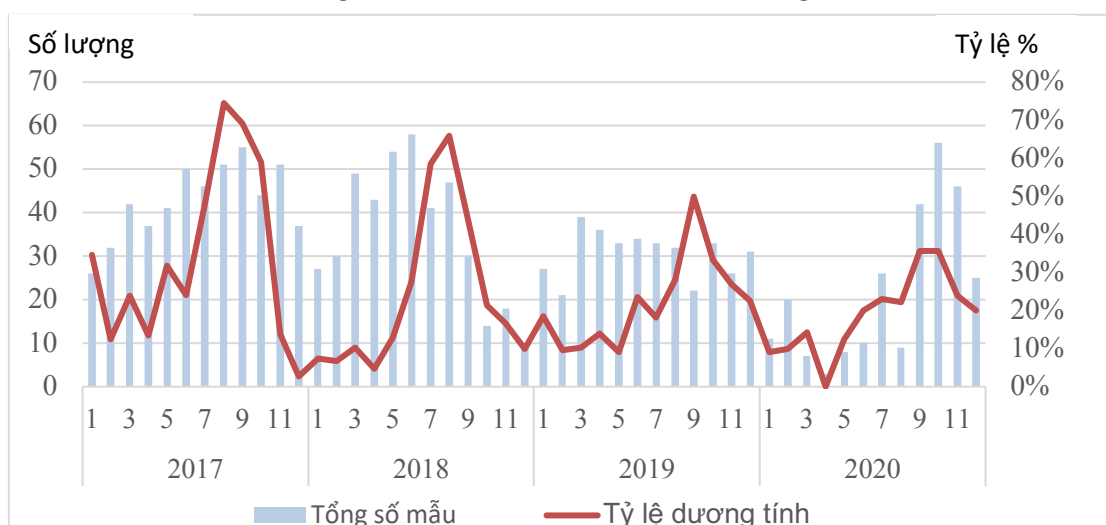
Năm 2019 ghi nhận tỷ lệ dương tính RSV nhóm trên 5 tuổi cao nhất trong các nhóm tuổi và trong 4 năm nghiên cứu (36,96%). Trong khi đó, tỷ lệ này năm 2018 là 1,83%. Đây cũng là tỷ lệ dương tính theo nhóm tuổi thấp nhất trong cả nghiên cứu (Bảng 3.3 và Hình 3.3.)



Hình 3.3. Tỷ lệ dương tính RSV theo nhóm tuổi giữa các năm trong nghiên cứu.

3.1.2.2. Sự lưu hành theo thời gian của virus hợp bào hô hấp

Từ kết quả nghiên cứu trong 4 năm cho thấy dịch do virus hợp bào hô hấp mang tính chu kỳ. Số lượng các trường hợp dương tính RSV được phát hiện gần như quanh năm nhưng tỷ lệ dương tính tăng lên từ tháng 6-11. RSV tạo đỉnh dịch hàng năm thường vào tháng 8 hoặc tháng 9, với tỷ lệ dương tính có thể lên tới gần 80% số lượng mẫu thu thập (Hình 3.4). Tuy có đỉnh dịch nhưng tỷ lệ dương tính giữa các năm khác nhau lại khác nhau, giảm dần từ 75% năm 2017 xuống 36% năm 2020.



Hình 3.4. Sự lưu hành của virus hợp bào hô hấp theo thời gian.

Từ tháng 1 đến tháng 5 hàng năm là thời điểm tỷ lệ ca dương tính RSV giảm thấp. Năm 2018 và 2020, tỷ lệ này là dưới 10%. Tuy nhiên năm 2017 và 2019 tỷ lệ này dao động từ 10%-20%.

3.1.2.3. Sự lưu hành theo phân nhóm của virus hợp bào hô hấp

Kết quả phân nhóm RSV-A và RSV-B được thể hiện trong Bảng 3.4. Năm 2017 và 2018, hai nhóm RSV-A và RSV-B cùng lưu hành và có tỷ lệ dương tính gần như tương đương nhau, với RSV-A có tỷ lệ cao hơn RSV-B không đáng kể. Đặc biệt năm 2020 tỷ lệ RSV-A/RSV-B là 2,14 lần. Ngược lại, năm 2019 là năm duy nhất tỷ lệ RSV-B cao hơn RSV-A với 60,3% so với 39,7%. Sự khác biệt ở hai năm này là có ý nghĩa với $p < 0,05$. Nhìn chung cả giai đoạn nghiên cứu, tỷ lệ dương tính RSV-A vẫn cao hơn tỷ lệ dương tính RSV-B nhưng sự khác biệt này không có nhiều ý nghĩa thống kê.

Năm 2017 còn ghi nhận 3 trường hợp đồng nhiễm RSV-A và RSV-B, chiếm 1,6% số ca dương tính. Trong đó, Bệnh viện Nhi Trung ương có hai trường hợp đồng nhiễm vào tháng 7 và tháng 10; Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh có một trường hợp đồng nhiễm vào tháng 9. Các năm khác không ghi nhận trường hợp đồng nhiễm nào (Bảng 3.4).

Bảng 3.4. Sự phân bố các phân nhóm RSV theo năm nghiên cứu.

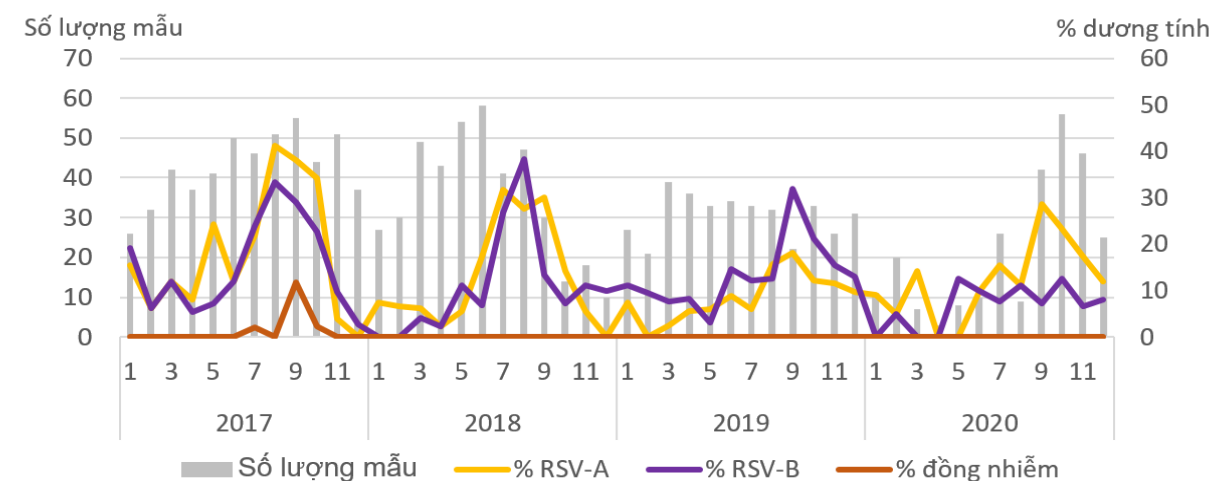
	2017	2018	2019	2020	2017-2020
Số mẫu (n ^a)	512	420	368	263	1563
RSV (+) (n)	185	109	78	66	438
RSV-A (n) (%)	99 (53,51)	59 (54,13)	31 (39,74)	45 (68,18)	234 (53,42)
RSV-B (n) (%)	83 (44,87)	50 (45,87)	47 (60,26)	21 (31,82)	201 (45,89)
RSV-A&B (n) (%)	3 (1,62)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	3 (0,69)
Ý nghĩa thống kê ^b			$p < 0,05$		

n^a: Số lượng mẫu

Ý nghĩa thống kê^b: Kiểm định Chi bình phương

Tính chu kỳ dịch RSV được thể hiện qua sự chiếm ưu thế của các nhóm trong từng năm. Năm 2017 và 2018 hai nhóm RSV cùng lưu hành song song với nhau tạo nên đỉnh dịch vào tháng 8-9 với tỷ lệ dương tính khoảng 40% ở mỗi nhóm (Hình 3.5). Năm 2019 RSV-B chiếm ưu thế hơn RSV-A và cũng tạo đỉnh dịch vào tháng 9 với tỷ

lệ dương tính RSV-B là hơn 30%. Tuy nhiên năm 2020 chỉ RSV-A tạo đỉnh dịch với tỷ lệ dương tính khoảng 30% tại thời điểm tháng 9. Năm 2020 cũng ghi nhận tỷ lệ dương tính RSV-B gần như không thay đổi trong suốt thời gian cao điểm và duy trì ổn định 10% từ tháng 5 đến hết tháng 12 năm 2020.



Hình 3.5. Sự lưu hành các phân nhóm RSV theo thời gian.

3.2. Đặc điểm sinh học phân tử của virus hợp bào hô hấp trên bệnh nhân nhi viêm đường hô hấp cấp tính nặng tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh

3.2.1. Kết quả phân lập virus hợp bào hô hấp

3.2.1.1. Tỷ lệ phân lập

Từ các mẫu dương tính RSV trong hai năm 2017 và 2018, lựa chọn được 112/294 mẫu bệnh phẩm hô hấp có giá trị Ct < 25 để tiến hành phân lập trên dòng tế bào Hep-2. Kết quả thu được của quá trình phân lập như Bảng 3.5.

Số mẫu thực hiện phân lập của RSV-A và RSV-B lần lượt là 59 và 53 mẫu, nhưng số chủng thu được của từng phân nhóm lại khác nhau lần lượt là 18 chủng và 7 chủng. Số lượng này tương đương với tỷ lệ phân lập RSV-A là 30,51% và RSV-B là 13,21%. Như vậy, phân nhóm RSV-A có hiệu quả phân lập cao hơn phân nhóm RSV-B ($p < 0,05$).

Theo địa điểm nghiên cứu, tại Bệnh viện Nhi Trung ương có 22/81 mẫu phân lập thành công, với tỷ lệ là 27,16%. Trong khi đó, tại Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh có 3/31 mẫu phân lập thành công, với tỷ lệ là 9,68%. Như vậy, tỷ lệ phân lập thành công chủng RSV từ mẫu bệnh phẩm hô hấp của Bệnh viện Nhi Trung ương cao gấp gần 3 lần so với Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh ($p < 0,05$). Điều đặc biệt là tại Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh, trong số các mẫu RSV-B mang đi phân lập thì không thu được chủng nào. Toàn bộ số chủng phân lập thu được của RSV-B đều được thu thập tại Bệnh viện Nhi Trung ương. Từ kết quả này cho thấy, sự khác biệt

trong tỷ lệ phân lập với giữa hai nhóm RSV và giữa các điểm nghiên cứu là khác nhau có ý nghĩa thống kê.

Bảng 3.5. Kết quả phân lập virus RSV trên dòng tế bào Hep-2.

Năm	Số lượng mẫu phân lập			Số lượng chủng thu được		
RSV-A						
	BV Nhi TW-N ^a	BV ĐK QN-N	Tổng -N	BV Nhi TW n ^b (n/N %)	BV ĐK QN n (n/N %)	Tổng n (n/N %)
2017	21	17	38	9 (42,86)	1 (5,88)	10 (26,32)
2018	16	5	21	6 (37,5)	2 (40,0)	8 (38,1)
2017-2018	37	22	59	15 (40,54)	3 (13,64)	18 (30,51)
RSV-B						
	BV Nhi TW-N	BV ĐK QN-N	Tổng -N	BV Nhi TW n (n/N %)	BV ĐK QN n (n/N %)	Tổng n (n/N %)
2017	25	6	31	4 (16,0)	0 (0,0)	4 (12,9)
2018	19	3	22	3 (15,79)	0 (0,0)	3 (13,64)
2017-2018	44	9	53	7 (15,91)	0 (0,0)	7 (13,21)
Tổng số	81	31	112	22 (27,16)	3 (9,68)	25 (22,32)

N^a: Số lượng mẫu phân lập; n^b: Số lượng chủng thu được

BV Nhi TW: Bệnh viện Nhi Trung ương BV ĐK QN: Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh

Tổng cộng có 25 chủng RSV được khuếch đại thành công. Các chủng đã được lập danh sách và lưu giữ tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương tại nhiệt độ âm 70°C. Thông tin chi tiết các chủng này được thể hiện trong Phụ lục 3.

Tỷ lệ phân lập chung của cả nghiên cứu là 22,32% (25/112). Trong số 25 chủng phân lập được, có 18 chủng (72%) là RSV-A và 7 chủng (28%) RSV-B. Theo địa điểm nghiên cứu, có 22 chủng (88%) phân lập thu mẫu từ Bệnh viện Nhi Trung ương và 3 chủng (12%) phân lập thu mẫu từ Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh.

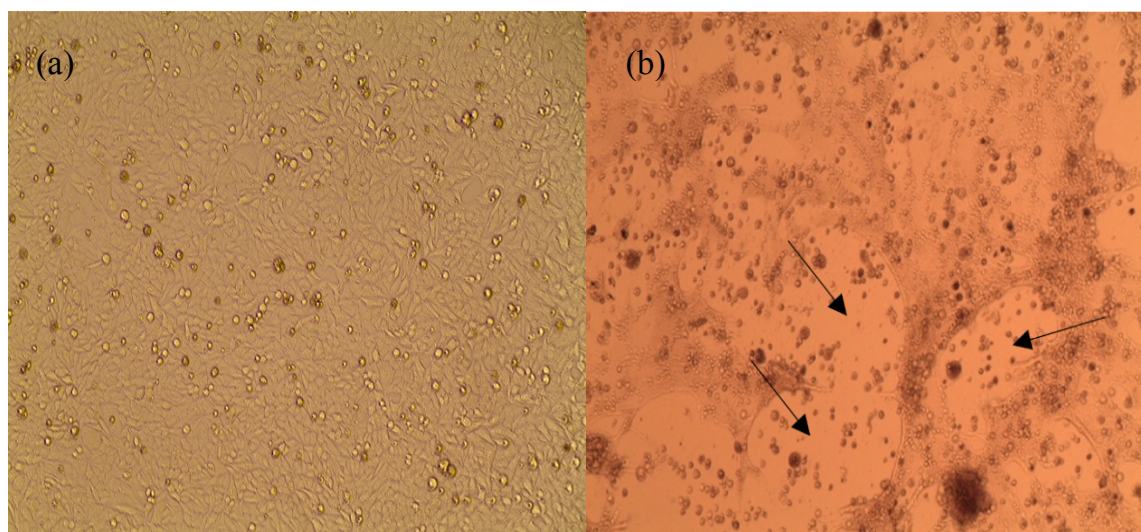
Tỷ lệ phân lập giữa hai năm 2017 và 2018 cũng có sự khác nhau. Năm 2017 có 14/69 chủng phân lập thành công (20,29%). Năm 2018 có 11/43 chủng phân lập thành công (25,59%). Sự khác nhau về tỷ lệ phân lập giữa hai năm không có ý nghĩa thống kê.

3.2.1.2. Đặc điểm các chủng RSV thu được

Trong số 25 chủng phân lập thành công, 24 chủng có nguồn gốc từ bệnh nhân nhi dưới 2 tuổi. Chỉ có duy nhất 1 chủng RSV-A được phân lập thành công từ bệnh nhân nhi trên 2 tuổi, chiếm 4%. Trong số các chủng, nguồn gốc chủng từ trẻ dưới 1 tuổi là 17 chủng (68%), từ 1-2 tuổi là 7 chủng (28%).

Số chủng có nguồn gốc từ bệnh nhân nam cũng nhiều hơn nữ (15 so với 10, tương ứng 60% so với 40%). Kết quả realtime RT-PCR dịch nổi phân lập của các chủng này cho thấy giá trị Ct trong khoảng từ 15-19 (Phụ lục 3).

Bên cạnh việc kiểm tra chủng phân lập bằng phương pháp sinh học phân tử, quan sát dịch nổi nuôi cấy virus tại các thời điểm khác nhau cũng cho thấy kết quả phân lập RSV thành công bằng kính hiển vi quang học soi ngược và kính hiển vi điện tử truyền qua. Hình ảnh tế bào Hep-2 một lớp trong phiên nuôi cấy và sự hủy hoại của virus nhân lên gây ra hiện tượng CPE được chụp lại như Hình 3.6.



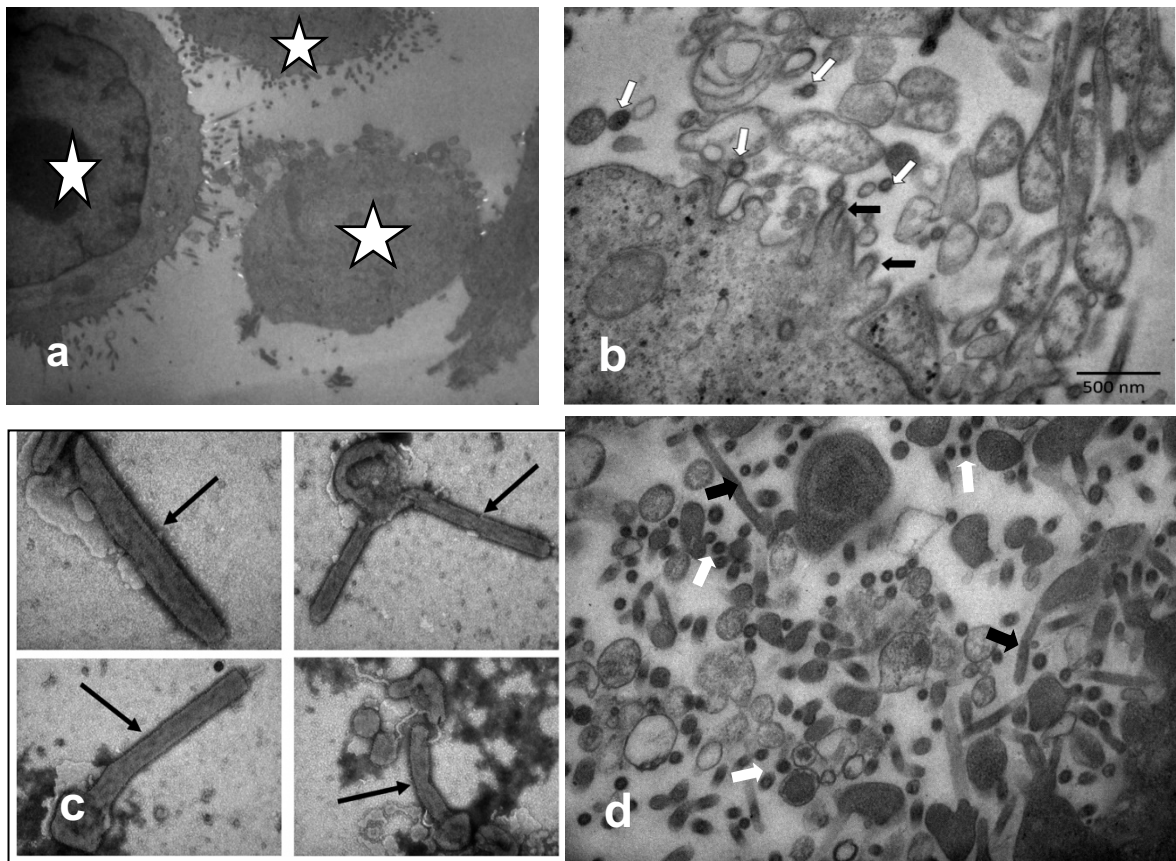
Hình 3.6. Hình ảnh phân lập RSV trên dòng tế bào Hep-2 chụp bằng kính hiển vi quang học soi ngược với độ phóng đại 40X.

(a). Tế bào Hep-2 một lớp trên bề mặt phiên phân lập.

(b). Hình ảnh tế bào Hep-2 bị virus nhân lên và phá hủy tạo thành hiện tượng CPE (mũi tên màu đen).

Để khẳng định RSV đã nhân lên thành công trên dòng tế bào Hep-2, hình ảnh virus nhân lên, nảy chồi, tách ra khỏi tế bào và các giai đoạn khác nhau được chụp ảnh dưới kính hiển vi điện tử truyền qua. Các giai đoạn này được thể hiện trong Hình 3.7.

RSV nhân lên trong tế bào Hep-2 sẽ phá hủy tế bào, hòa màng với các tế bào bên cạnh để tạo thành các dạng hợp bào điển hình của quá trình lây nhiễm RSV. Các hợp bào hô hấp này có kích thước lớn hơn tế bào Hep-2 rất nhiều lần và gây nên hiện tượng hủy hoại tế bào CPE trong môi trường nuôi cấy (Hình 3.7a). Đây là dạng nhân lên của virus dễ quan sát nhất bằng kính hiển vi quang học soi ngược hoặc kính hiển vi điện tử truyền qua với độ phóng đại từ 100-1000 lần.



Hình 3.7. Hình ảnh virus hợp bào hô hấp (RSV) trong dịch nổi phân lập virus trên dòng tế bào Hep-2 chụp dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) với độ phóng đại từ 1.000-20.000 lần.

(a). Hình ảnh virus nhô lên trong tế bào, hòa màng các tế bào cạnh nhau tạo thành các dạng hợp bào (hình ngôi sao màu trắng). (b). Hình ảnh RSV nảy chồi ra khỏi màng tế bào Hep-2 và tạo thành các cấu trúc dạng thun dài (mũi tên màu đen). Các hạt virus được giải phóng hoàn toàn khỏi màng tế bào Hep-2 có cấu trúc hình cầu điển hình trong dịch nổi môi trường phân lập virus (mũi tên màu trắng). (c). Các hình dạng khác nhau của RSV sau khi nảy chồi từ màng tế bào Hep-2 khi được quan sát dưới kính hiển vi điện tử truyền qua. (d). Các hạt virus RSV được phân cắt hoàn toàn (mũi tên màu trắng) từ các cấu trúc nảy chồi ban đầu (mũi tên màu đen) và trở nên chiếm đa số trong môi trường dịch nuôi cấy virus.

Trong quá trình RSV nhô lên và giải phóng ra bên ngoài, virus sẽ được bao bọc bởi lớp màng ngoài của tế bào Hep-2 và nảy chồi (Hình 3.7b). Màng ngoài của tế bào bị kéo dài ra do các hạt virus chưa trưởng thành tập hợp lại để chuẩn bị cho quá trình giải phóng ra bên ngoài. Thông thường, các tập hợp RSV này sẽ kéo dài màng tế bào ra thành dạng dải/sợi rồi mới được nảy chồi thành tổ chức độc lập trong môi trường nuôi cấy. Lúc này RSV có dạng hình thun dài và thẳng, thun dài và cuộn ở giữa, hình que xoắn một đầu hay dạng sợi chia nhỏ (Hình 3.7c). Các hình dạng

này là tùy thuộc vào việc virus nảy chồi và tồn tại trong môi trường phân lập, đảm bảo cho virus được nhân lên và giải phóng nhiều nhất.

Với chỉ một lần nảy chồi nhưng do có kích thước dạng que/sợi gồm nhiều virus bên trong nên số lượng các hạt virus được tạo ra nhiều hàng chục tới hàng trăm lần. Các hình dạng RSV này sẽ tiến hành phân chia và giải phóng hàng trăm hạt virus độc lập vào môi trường nuôi cấy (Hình 3.7d). Đây cũng là thời điểm quá trình virus nhân lên và giải phóng hoàn toàn khỏi tế bào Hep-2. Tiến hành thu chủng cất giữ và phân tích di truyền sâu hơn về RSV cũng được thực hiện tại thời điểm này.

3.2.2. *Kết quả giải trình tự hệ gen virus hợp bào hô hấp*

3.2.2.1. *Đặc điểm các mẫu giải trình tự gen thể hệ mới*

Lựa chọn các mẫu giải trình tự gồm toàn bộ số chủng RSV thu được và một số mẫu bệnh phẩm hô hấp. Các mẫu bệnh phẩm hô hấp và chủng đại diện cho năm thu thập, địa điểm nghiên cứu, phân nhóm RSV, tuổi, giới tính. Thông tin chi tiết các mẫu này được trình bày trong Bảng 3.6.

Bảng 3.6. Số lượng chủng và bệnh phẩm hô hấp tiến hành giải trình tự gen thể hệ mới trong nghiên cứu.

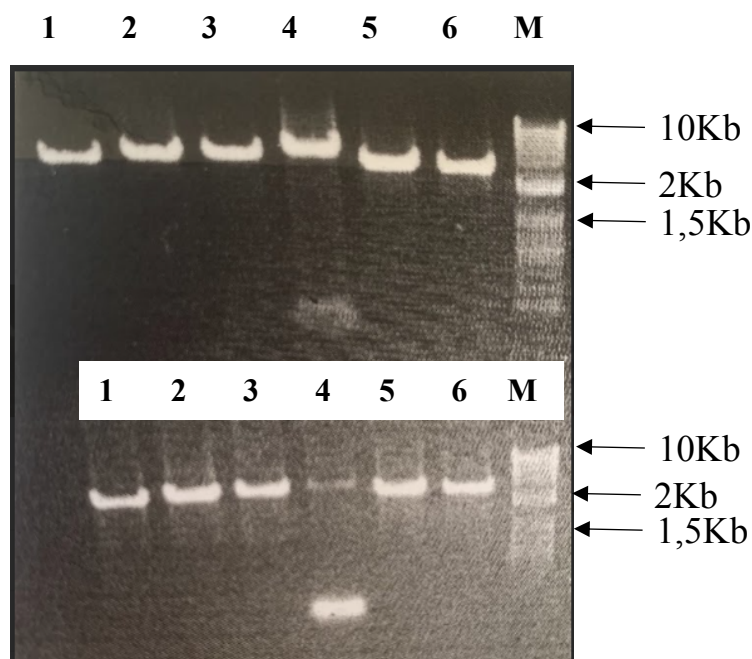
Năm	Bệnh viện Nhi Trung ương		Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh		Tổng số
	Số lượng chủng	Số lượng bệnh phẩm hô hấp	Số lượng chủng	Số lượng bệnh phẩm hô hấp	
RSV-A					
2017	9	6	1	3	19
2018	6	0	2	6	14
2019	0	5	0	7	12
2020	0	9	0	2	11
2017-2020	15	20	3	18	56
RSV-B					
2017	4	12	0	6	22
2018	3	8	0	3	12
2019	0	3	0	4	7
2020	0	7	0	2	9
2017-2020	7	28	0	15	50

Tổng cộng có 56 mẫu RSV-A và 50 mẫu RSV-B (chủng và bệnh phẩm hô hấp) được tiến hành giải trình tự hệ gen bằng kỹ thuật giải trình tự gen thể hệ mới. Trong số 56 mẫu RSV-A có 18 chủng phân lập và 38 mẫu bệnh phẩm hô hấp thu thập từ cả hai địa điểm và trong 4 năm nghiên cứu. Tương tự như vậy, RSV-B gồm 7 chủng

phân lập và 43 bệnh phẩm hô hấp được tiến hành giải trình tự gen NGS. Thông tin chi tiết các mẫu như mã số, tuổi, giới tính, thời gian thu thập, địa điểm lấy mẫu như trong Phụ lục 4 và Phụ lục 5 của luận án.

3.2.2.2. Kết quả khuếch đại hệ gen của RSV

Khuếch đại hệ gen của RSV, 6 cặp mồi đặc hiệu với mỗi nhóm RSV được sử dụng trong phản ứng PCR trong các ống phản ứng khác nhau. Sản phẩm DNA được tiến hành điện di kiểm tra trên gel agarose 1% (Hình 3.8).



Hình 3.8. Điện di sản phẩm PCR khuếch đại hệ gen RSV.

Các giếng 1-6 tương ứng với sản phẩm PCR của 6 cặp mồi RSV-A (phía trên) và RSV-B (phía dưới). Kích thước các sản phẩm PCR từ khoảng 2,5Kb-3,8Kb (RSV-A) hoặc 2,3Kb-4,4Kb (RSV-B). M: Marker 1Kb.

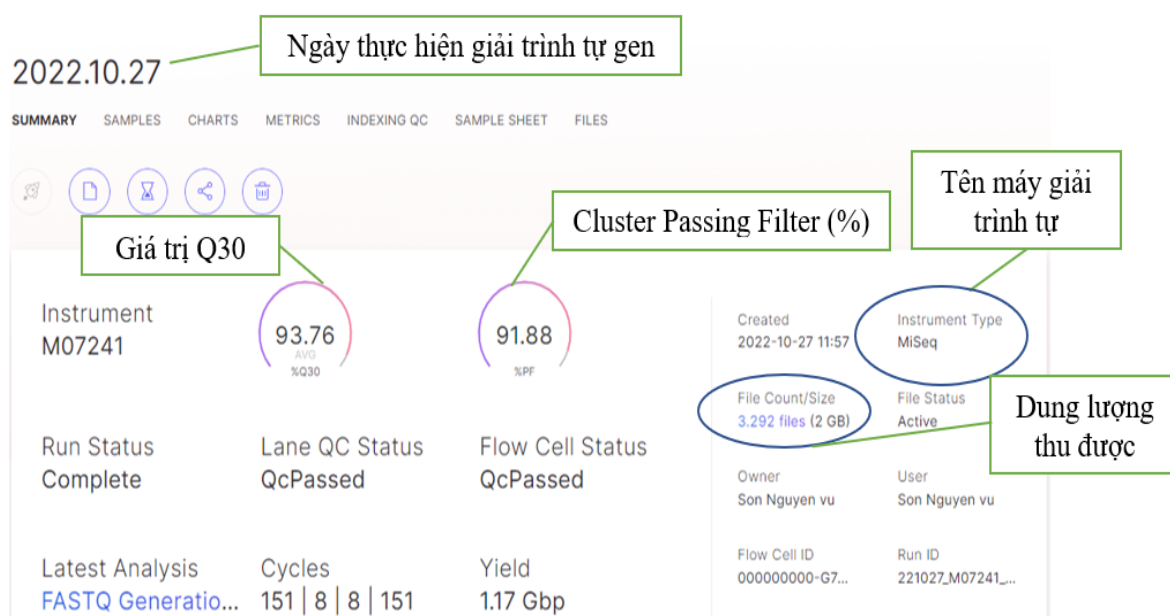
Kết quả từ Hình 3.8 cho thấy sản phẩm phản ứng PCR được nhận lên rõ ràng, kích thước phù hợp với tính toán lý thuyết của mồi thiết kế và đặc hiệu. Lượng DNA thu được đủ lớn để tiến hành tinh sạch và thực hiện các bước tiếp theo của quá trình giải trình tự gen NGS.

3.2.2.3. Kết quả giải trình tự gen thế hệ mới

Dữ liệu giải trình tự hệ gen các mẫu RSV thu được sau khi giải trình tự 4 lần trên hệ thống máy Illumina Miseq. Các thông số mỗi lần giải trình tự được thể hiện trong Bảng 3.7 và Hình 3.9.

Bảng 3.7. Kết quả giải trình tự hệ gen RSV bằng công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới trên hệ thống máy giải trình tự gen Illumina Miseq.

Lần giải trình tự	Tổng dung lượng thu được (Gb)	Số mẫu giải trình tự	Giá trị Q30 (%)	Tỷ lệ tạo cụm giải trình tự thành công (%)
Lần 1	1,9	28	92,46	91,56
Lần 2	2,0	28	91,56	90,78
Lần 3	1,8	24	94,73	92,16
Lần 4	2,0	26	93,76	91,88



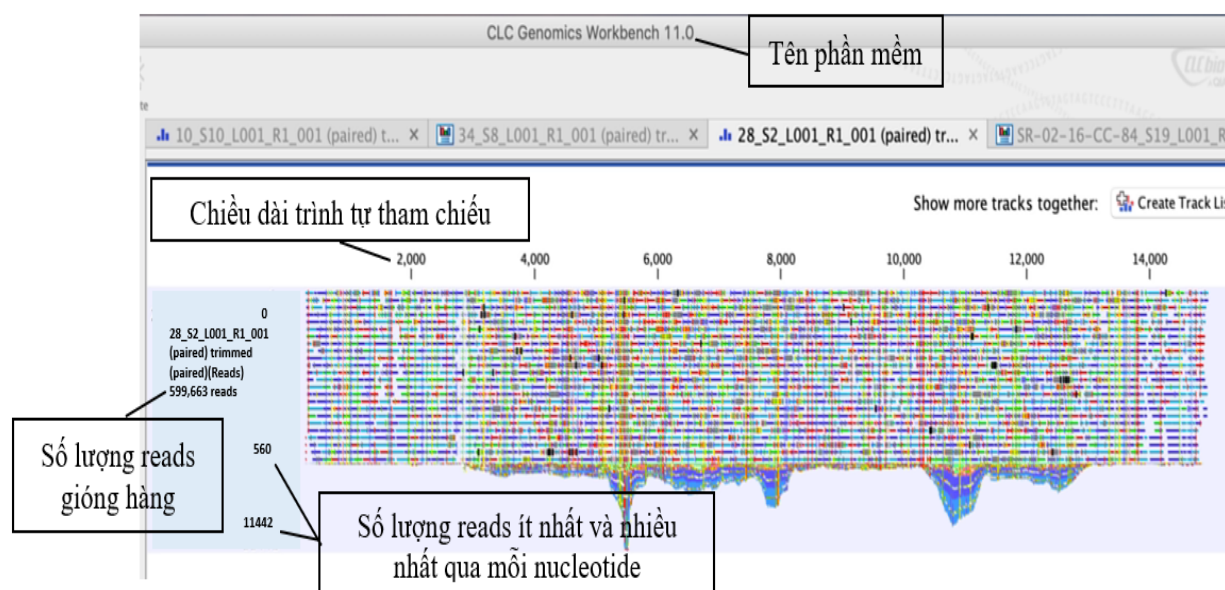
Hình 3.9. Kết quả một lần giải trình tự hệ gen RSV bằng công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới trên hệ thống máy giải trình tự gen Illumina Miseq.

Dung lượng đầu ra của mỗi lần giải trình tự từ 1,8Gb-2,0Gb. Tỷ lệ tạo các cụm giải trình tự thành công và đạt chất lượng đều trên 90% (%Cluster Passing Filter). Trung bình mỗi lần thực hiện từ 24-28 mẫu RSV. Tỷ lệ dữ liệu trình tự có điểm chất lượng Phred trên 30 (Q30) là trên 91% cho thấy chất lượng đọc trình tự có độ chính xác cao. Kết quả sơ bộ một lần giải trình tự thành công với các thông số kỹ thuật như Hình 3.9.

3.2.2.4. Phân tích kết quả giải trình tự gen thế hệ mới

Các file dữ liệu Fastq của mỗi mẫu được nhập vào phần mềm CLC Genomics WorkBench 11.0 để phục vụ cho việc phân tích kết quả NGS. Sau khi đánh giá sơ bộ chất lượng giải trình tự, mỗi mẫu đều có số lượng các đoạn đọc đủ lớn để phân tích

(trên 500.000 read/mẫu). Sau khi loại bỏ các trình tự lỗi, ngắn, các tín hiệu nhiễu ở hai đầu, các reads này được sắp xếp và so sánh với trình tự tham chiếu tương ứng với mỗi phân nhóm RSV (RSV-A là EPI_ISL_412866-hRSV/A/England/397/2017 và RSV-B là EPI_ISL_1653999-hRSV/B/Australia/VIC-RCH056/2019). Tỷ lệ các read đúng hàng thành công so với tổng số read được tạo ra ở cả hai phân nhóm RSV-A và RSV-B đều đạt trên 98%. Như vậy, trung bình mỗi mẫu có ít nhất 490.000 read (98%) được so sánh đúng hàng với trình tự tham chiếu, các reads này đều thuộc hệ gen của RSV (Hình 3.10).



Hình 3.10. Kết quả so sánh thẳng hàng một mẫu RSV-A với trình tự tham chiếu (EPI_ISL_412866-hRSV/A/England/397/2017) trên phần mềm CLC Genomics WorkBench 11.

Số lượng read sau khi được trims và so sánh đúng hàng với trình tự tham chiếu của mỗi mẫu được thể hiện dưới tên mẫu. Mỗi nucleotide của trình tự tham chiếu có số lượng read nhiều nhất và ít nhất đi qua được thể hiện dạng số và dạng mật độ bao phủ bằng màu sắc.

Từ kết quả so sánh đúng hàng các reads của mẫu với trình tự tham chiếu cho thấy tỷ lệ các reads được đối chiếu trùng với hệ gen của RSV đều đạt trên 98% tổng số reads thu được từ kết quả giải trình tự. Trung bình độ sâu bao phủ của các reads qua mỗi nucleotide đạt từ 2000X-3450X đối với RSV-A và từ 2330X-4010X đối với RSV-B (Xem thêm phần Phụ lục 4 và Phụ lục 5). Tỷ lệ bao phủ >1000X của các mẫu đều đạt trên 95%. Tất cả các mẫu đều bao phủ toàn bộ chiều dài trình tự tham chiếu và không có khoảng trống nào trong hệ gen. Các kết quả này cho thấy các trình tự thu được có độ tin cậy cao.

3.2.3. Đặc điểm sinh học phân tử các trình tự thu được

3.2.3.1. Vị trí các gen trong hệ gen – lắp ráp và chú giải gen

Từ kết quả so sánh dòng hàng với trình tự tham chiếu, trình tự nucleotide trong hệ gen RSV của từng mẫu được tạo thành và lưu dưới dạng file fasta trong phần mềm CLC Genomics WorkBench 11. Để xác định vị trí các gen của RSV trong hệ gen, trình tự nucleotide của từng mẫu sẽ được so sánh với trình tự chuẩn đại diện cho từng phân nhóm RSV (trình tự tham chiếu dùng trong phân tích kết quả NGS). Vị trí các gen từ nucleotide đầu tiên tới nucleotide cuối cùng được đánh số dựa trên chiều dài hệ gen của từng mẫu. Kết quả tổng hợp như trong Bảng 3.8.

Phân nhóm RSV-A với 10 gen mã hóa cho 11 protein sắp xếp lần lượt theo thứ tự từ chiều 3'-5': *NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L*. Trong đó gen *M2* mã hóa cho 2 protein M2-1 và M2-2 nằm chồng lên nhau một phần (Bảng 3.8). Do đó, vị trí nucleotide mở đầu của M2-2 nằm trong vùng ORF của M2-1. Tổng thể chiều dài hệ gen của RSV-A từ vị trí nucleotide đầu tiên của gen *NS1* tới nucleotide cuối cùng của gen *L* là 14.885-14.889 nucleotide tùy thuộc vào từng mẫu. Với RSV-B, chiều dài hệ gen là 14.958-14.967 nucleotide tùy thuộc vào từng mẫu. Kích thước hệ gen khác nhau giữa các mẫu trong cùng một phân nhóm là do các trình tự này có chiều dài gen *G* khác nhau, các vùng liên gen với chiều dài nucleotide khác nhau. Ngoài ra, giữa hai phân nhóm RSV-A và RSV-B cũng có chiều dài hệ gen khá khác biệt nhau do chiều dài các gen khác nhau (gen *SH*, *G*, *M2-1* và *L*) (Bảng 3.8).

Dù có kích thước hệ gen khác nhau trong cùng một phân nhóm RSV-A hoặc RSV-B nhưng các trình tự đều có chiều dài từng gen giống nhau (trừ gen *G*). Trong nhóm RSV-A, gen *G* có hai chiều dài là 894 và 897 nucleotide, tương ứng với 298 axit amin (51 trình tự) và 299 axit amin (5 trình tự). Trong nhóm RSV-B, gen *G* có hai chiều dài là 933 và 954 nucleotide, tương ứng với 311 axit amin (36 trình tự) và 318 axit amin (14 trình tự). Các gen *SH*, *M2-1* và *L* của RSV-B cũng dài hơn RSV-A 3 nucleotide, tương ứng với 1 axit amin. Những gen còn lại ở cả hai phân nhóm có chiều dài giống nhau.

Bảng 3.8. Vị trí, kích thước của các gen/protein trong hệ gen RSV.

Gen/ Protein	RSV-A				RSV-B			
	Vị trí nucleotide bắt đầu ^a	Vị trí nucleotide kết thúc ^b	Chiều dài gen (nucleotide)	Chiều dài protein (axit amin)	Vị trí nucleotide bắt đầu ^a	Vị trí nucleotide kết thúc ^b	Chiều dài gen (nucleotide)	Chiều dài protein (axit amin)
NS1/NS1	25	444	420	140	52	471	420	140
	70	489			57	476		
NS2/NS2	554	928	375	125	579	953	375	125
	597	971			584	958		
N/N	1066	2241	1176	392	1092	2267	1176	392
	1109	2284			1097	2272		
P/P	2273	2998	726	242	2300	3025	726	242
	2317	3042			2305	3030		
M/M	3182	3952	771	257	3215	3985	771	257
	3224	3994			3220	3990		
SH/SH	4222	4416	195	65	4254	4451	198	66
	4265	4459			4259	4456		
G/G ^c	4608	5502/5505	894/897	298/299	4635	5567/5588	933/954	311/318
	4650	5544/5547			4646	5578/5599		
F/F	5581	7305	1725	575	5672	7396	1725	575
	5623	7347			5676	7400		

M2/ M2-1	7524	8108	585	195	7616	8203	588	196
	7566	8150			7627	8214		
M2/ M2-2	8042	8314	273	91	8169	8441	273	91
	8084	8356			8180	8452		
L/L	8486	14913	6498	2166	8514	15014	6501	2167
	8457	14954			8518	15018		

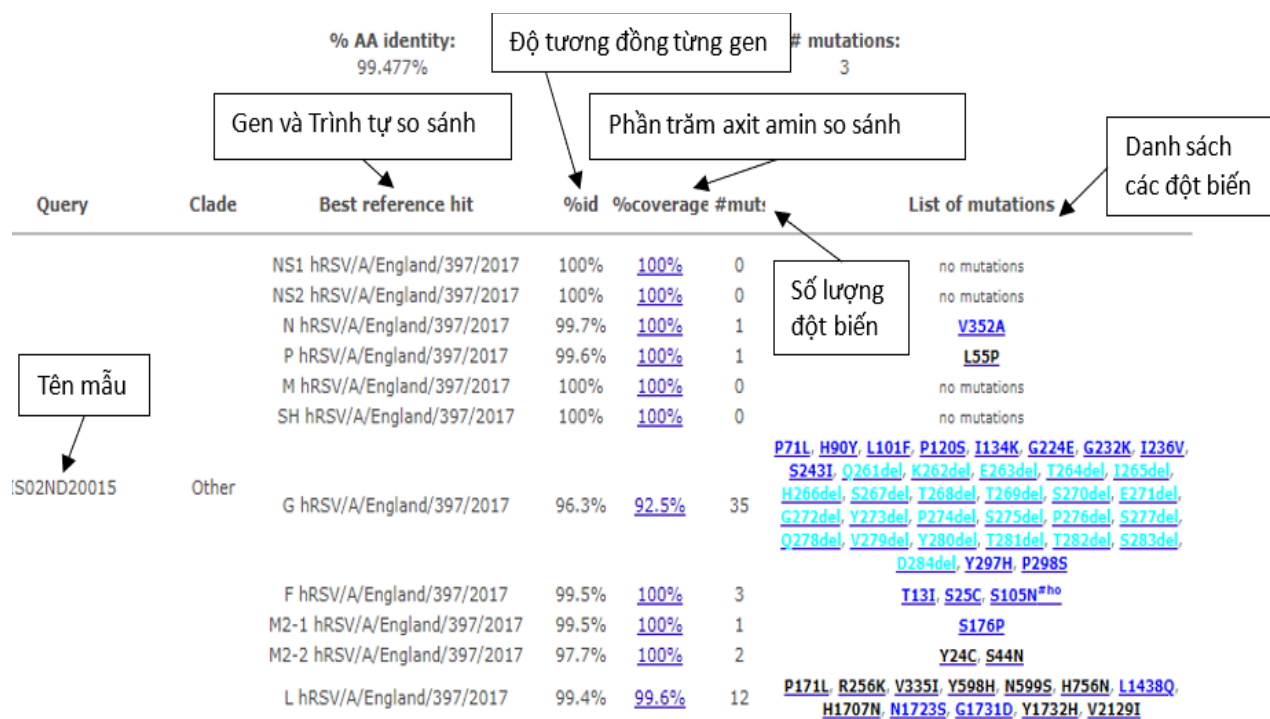
^a: Vị trí nucleotide mở đầu của từng gen, tùy theo mẫu mà vị trí này khác nhau. Vị trí nucleotide mở đầu ngắn nhất (dòng trên) và dài nhất (dòng dưới) của cùng một gen trong số các mẫu được giải trình tự gen.

^b: Vị trí nucleotide kết thúc của từng gen, tùy theo mẫu mà vị trí này khác nhau. Vị trí nucleotide kết thúc ngắn nhất (dòng trên) và dài nhất (dòng dưới) của cùng một gen trong số các mẫu được giải trình tự gen.

^c: Gen G ở cả hai phân nhóm RSV-A và RSV-B có hai chiều dài khác nhau. Do đó vị trí nucleotide kết thúc cũng có 2 vị trí khác nhau. Chiều dài nucleotide và axit amin cũng có 2 số liệu khác nhau.

3.2.3.2. Xác định các thay đổi axit amin trên gen

Hệ gen RSV của các mẫu được xác định đột biến nucleotide so với trình tự tham chiếu trong phần mềm CLC Genomics WorkBench 11. Sau đó, các đột biến này tiếp tục được kiểm tra trên hệ thống RSV Server của GISAID để xác định những thay đổi liên quan đến axit amin, vị trí của chúng trên gen (Hình 3.11).



Hình 3.11. Hình ảnh xác định các đột biến axit amin trên hệ thống RSV Server của GISAID.

Từ kết quả so sánh với chủng tham chiếu tương ứng (RSV-A là EPI_ISL_412866-hRSV/A/England/397/2017 và RSV-B là EPI_ISL_1653999-hRSV/B/Australia/VIC-RCH056/2019), độ tương đồng về axit amin, tỷ lệ axit amin được so sánh cũng như số lượng và vị trí các thay thế trên gen được thể hiện trong Bảng 3.9. Các trình tự trong nghiên cứu có độ bao phủ axit amin 100% các gen tương ứng của trình tự tham chiếu (trừ gen *G* và gen *F*). Đặc biệt, gen *G* của RSV-A có độ tương đồng thấp nhất trong số các gen (94,9%-97,6%) khi so sánh với trình tự tham chiếu, có từ 31-37 khác biệt về axit amin được ghi nhận trong các mẫu giải trình tự. Trong đó, 24 axit amin (tương ứng với 72 nucleotide) tại vị trí 261-284 trên gen *G* (vùng HVR thứ hai) bị bớt đi so với trình tự tham chiếu được ghi nhận ở tất cả các mẫu giải trình tự gen. Ngoài ra còn có các đột biến khác trên gen *G* nhưng gặp rải rác ở các mẫu (Bảng 3.9).

Bảng 3.9. Các đột biến axit amin và vị trí tương ứng trong hệ gen RSV.

Gen mã hoá protein	Độ tương đồng (%)	Tỷ lệ axit amin được so sánh (%)	Số lượng đột biến axit amin	Danh sách các đột biến axit amin hay gặp
RSV-A				
Trình tự tham chiếu EPI_ISL_412866-hRSV/A/England/397/2017				
<i>NS1</i>	99,3-100	100	0-1	
<i>NS2</i>	99,2-100	100	0-1	
<i>N</i>	99,7	100	1	V352A
<i>P</i>	97,4-98,8	100	2-5	L55P
<i>M</i>	99,6-100	100	0-1	
<i>SH</i>	98,5-100	100	0-1	
<i>G</i>	94,9-97,6	92,5	31-37	Q261del, K262del, E263del, T264del, I265del, H266del, S267del, T268del, T269del, S270del, E271del, G272del, Y273del, P274del, S275del, P276del, S277del, Q278del, V279del, Y280del, T281del, T282del, S283del, D284del
<i>F</i>	99,7-100	100	0-2	
<i>M2-1</i>	99,0-99,5	100	1-2	S176P
<i>M2-2</i>	96,6-98,9	100	1-3	Y24C, S44N
<i>L</i>	99,6-99,7	99,8-100	6-11	P171L, R256K, L1438Q, N1723S, G1731D
RSV-B				
Trình tự tham chiếu RSV B là EPI_ISL_1653999-hRSV/B/Australia/VIC-RCH056/2019				
<i>NS1</i>	99,3-100	100	0-1	
<i>NS2</i>	99,2-100	100	0-1	
<i>N</i>	99,2-99,7	100	1-3	V97I
<i>P</i>	99,6-100	100	0-2	
<i>M</i>	100	100	0	
<i>SH</i>	98,5-100	100	0-1	D64N
<i>G</i>	95,8-98,8	99,7-100	1-13	A74V
<i>F</i>	99,5-100	100	0-3	
<i>M2-1</i>	99,5-100	100	0-1	
<i>M2-2</i>	97,8-99,8	100	1-2	I2T
<i>L</i>	99,6-99,9	99,6-100	3-8	T1987I

Các gen *NS1*, *NS2*, *M* và *SH* ở các mẫu RSV-A có độ tương đồng cao về axit amin với trình tự tham chiếu. Sự tương đồng thường là 100% trừ một số trường hợp chỉ có khác biệt duy nhất 1 axit amin. Sự khác biệt này là không phổ biến và không có axit amin đặc trưng. Gen *N*, *P*, *F*, *M2-1*, *M2-2* ở tất cả các mẫu có số lượng đột biến dao động từ 1-5 axit amin và có 1-2 axit amin đặc trưng gặp ở đa số các mẫu. Sự thay đổi axit amin tại vị trí 352 từ Valine sang Alanine (V352A) trên gen *N* là duy nhất và có mặt trên toàn bộ 56 mẫu giải trình tự của RSV-A. Gen *L* là gen có kích thước lớn nhất trong hệ gen nên số lượng biến thể cũng nhiều hơn các gen khác (6-11 axit amin) nhưng vẫn ít hơn gen *G*. Có 5/2166 khác biệt axit amin được ghi nhận gặp ở tất cả các mẫu RSV-A (Bảng 3.9).

Với RSV-B, xu hướng tương tự cũng được nhìn thấy trên các gen *NS1*, *NS2*, *M*, *SH*, *M2-1* có độ tương đồng cao với trình tự tham chiếu. Đa số có độ tương đồng 100%, chỉ một vài mẫu có khác biệt 1 axit amin. Tuy nhiên, RSV-B có độ bảo thủ cao hơn RSV-A do có số lượng gen tương đồng cao hơn RSV-A (5 so với 4), sự khác biệt nằm ở gen *M2-1*. Hơn nữa, gen *M* của RSV-B là gen duy nhất ở cả hai phân nhóm không phát hiện được bất kỳ thay đổi về axit amin nào giữa trình tự mẫu trong nghiên cứu và trình tự tham chiếu. Độ tương đồng của mẫu và trình tự tham chiếu về axit amin đạt 100%, độ bao phủ gen đạt 100% (Bảng 3.9).

Sự khác biệt axit amin giữa hai phân nhóm RSV còn thấy trên gen *G*. Dù cùng có số lượng đột biến lớn hơn hẳn các gen khác, gen *G* của RSV-A bị mất 24 axit amin ở tất cả các mẫu trong khi ở RSV-B chỉ là thay thế axit amin đơn thuần của từng mẫu. Số lượng thay đổi axit amin từ 1-13 và A74V là đột biến chung duy nhất phát hiện ở 50/50 mẫu RSV-B được giải trình tự.

3.2.4. Cây phát sinh chủng loại – Phân tích di truyền gen *G*

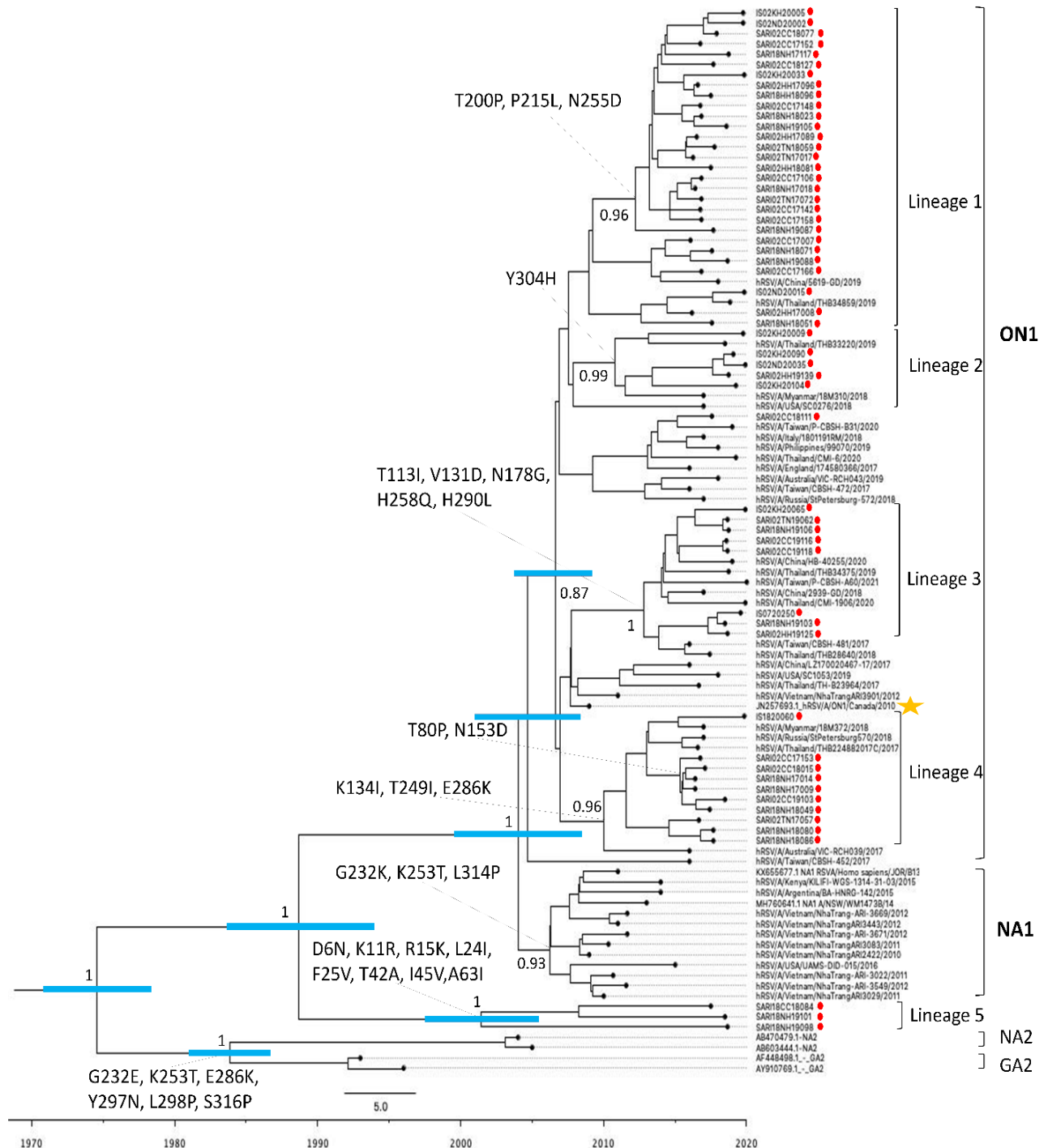
3.2.4.1. Cây phát sinh chủng loại gen *G* RSV-A và phân nhóm di truyền

Nhằm xác định mối quan hệ của các virus hợp bào hô hấp được giải trình tự trong nghiên cứu với các trình tự hiện lưu hành trên thế giới và ở Việt Nam trong quá khứ, đồng thời xác định các phân nhóm di truyền và tốc độ tiến hóa của RSV, cây phát sinh chủng loại gen *G* của hai phân nhóm RSV đã được xây dựng.

Lựa chọn các trình tự tham khảo của các nước châu Á xung quanh và thế giới, trình tự chuẩn của kiểu gen ON1, kết hợp với thông tin thời gian thu thập mẫu, cây phát sinh chủng loại gen *G* theo thời gian của RSV-A đã được xây dựng như Hình 3.12.

Các trình tự tham khảo của thế giới trên cây phát sinh chủng loại chủ yếu được lấy từ các công trình khoa học đã công bố có thu mẫu từ năm 2016-2021. Các trình tự này là trình tự toàn bộ gen *G* (vùng ORF của gen *G*) và đã được xác định phân nhóm di truyền. Với các chủng của Việt Nam trước đây, do giới hạn về số lượng

ngiên cứu được thực hiện nên chỉ các chủng thu thập năm 2010-2012 được giải trình tự và lấy làm trình tự tham khảo. Ngoài ra, chủng chuẩn với từng kiểu gen ON1, NA1, NA2, GA2 cũng được chọn làm trình tự tham khảo trên cây phát sinh chủng loại. Phương pháp xây cây phát sinh chủng loại có kết hợp thông tin thời gian thu mẫu của phần mềm BEAST giúp phân tích được nhiều đặc điểm di truyền của RSV.



Hình 3.12. Cây phát sinh chủng loại gen *G* phân nhóm RSV-A của các mẫu thu thập tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh giai đoạn 2017-2020.

Các mẫu trong nghiên cứu có đánh dấu chấm đỏ ở cuối tên. Chúng chuẩn kiểu gen ON1 có hình sao màu cam ở cuối tên. Phân nhóm di truyền (lineage và genotype) được xác định và nhóm ở bên phải hình. Tại các nhánh của cây có thể hiện các thay đổi axit amin trong nhánh đó và giá trị xác suất hậu nghiệm (posterior probability value). Các thanh ngang màu xanh thể hiện thời gian phân tách thành nhánh và khoảng mật độ hậu nghiệm (95%HPD) của thời điểm này. Trục ngang bên dưới từ trái sang phải thể hiện năm giúp cho tính toán thời gian phân tách các nhánh của cây phát sinh chủng loại. Thanh tỷ lệ đại diện cho thời gian tính bằng năm. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng bằng phần mềm BEAST v2.7.0.

Trong số 56 chủng phân lập/bệnh phẩm hô hấp giải trình tự gen thể hệ mới của RSV-A thu thập tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh giai đoạn 2017-2020 có 53 trình tự thuộc kiểu gen RSV-A ON1 và 3 trình tự thuộc kiểu gen RSV-A non-ON1 (Hình 3.12). Trong số 53 trình tự thuộc kiểu gen RSV-A ON1 được chia thành 4 lineage (lineage 1-4).

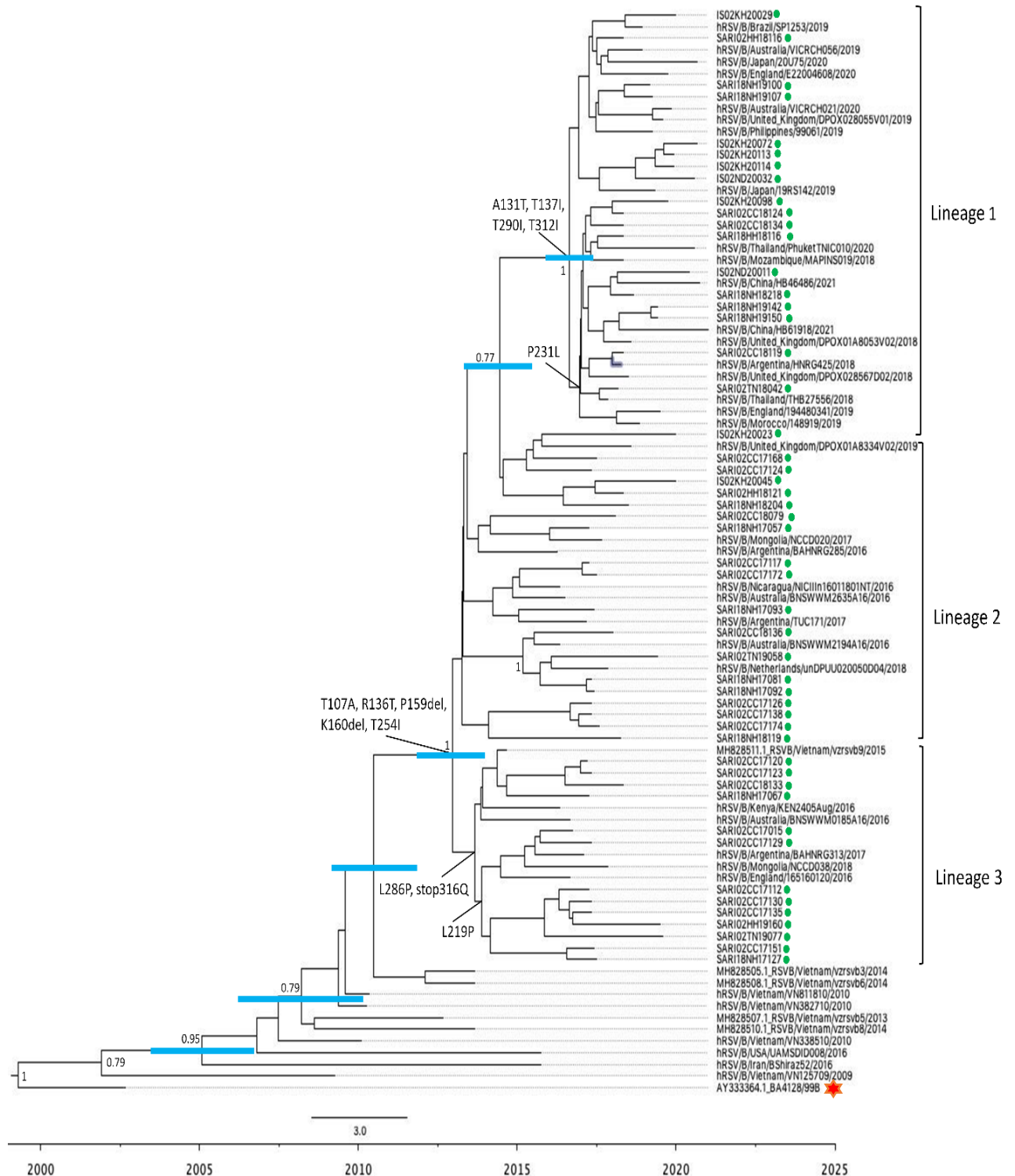
Lineage 1 gồm 29 trình tự được thu thập từ năm 2017-2020 và có quan hệ gần về mặt di truyền với các chủng có nguồn gốc từ Trung Quốc, Thái Lan năm 2019. 22/29 trình tự có chung 3 đột biến đặc trưng T200P, P215L, N255D. Lineage 2 gồm 5 trình tự được thu thập từ cuối năm 2019 (1 mẫu) và năm 2020 (4 mẫu). Lineage này phân tách với các trình tự khác trên cây phát sinh chủng loại bằng đột biến Y304H. Lineage 3 gồm 9 trình tự thu thập chủ yếu trong hai năm 2019 và 2020. Lineage 3 cùng nhóm với các chủng lưu hành tại Đài Loan, Thái Lan, Trung Quốc năm 2019-2021. Các đột biến điển hình để phân biệt lineage này là T113I, V131D, N178G, H25Q và H290L. Lineage 4 gồm 10 trình tự chủ yếu thu thập từ năm 2017-2018, có 1 trình tự thu thập năm 2019 và 1 trình tự thu thập năm 2020. Lineage này cùng nhóm với các chủng thể giới lưu hành cùng thời điểm có nguồn gốc từ Myanmar, Nga, Thái Lan. Các thay đổi axit amin đặc trưng cho lineage này là K134I, E286K.

RSV-A có 3 trình tự thuộc kiểu gen non-ON1 và tạo thành lineage 5. Kiểu gen này gồm 1 mẫu thu thập năm 2018 và 2 mẫu thu thập năm 2019 (Hình 3.12). Các trình tự này đều được thu thập tại Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh. Lineage này cũng tách biệt so với kiểu gen ON1, NA1, NA2 hay GA2 của RSV-A bằng 8 đột biến D6N, K11R, R15K, L24I, F25V, T42A, I45V, A63I.

3.2.4.2. Cây phát sinh chủng loại gen *G* RSV-B và phân nhóm di truyền

Cây phát sinh chủng loại gen *G* của RSV-B được xây dựng bằng phần mềm BEAST có sử dụng thời gian thu thập mẫu để giúp tính toán các đặc tính di truyền tương tự như cây phát sinh chủng loại của RSV-A. Các trình tự tham khảo được thu thập từ các công trình công bố trước đây có xác định kiểu gen. Về nguồn gốc, các trình tự này được thu thập từ các quốc gia láng giềng Châu Á và các nước khác trên

thế giới, chủ yếu trong khoảng thời gian từ năm 2016 đến năm 2021. Các trình tự của Việt Nam trước năm 2015 cũng có một số đại diện. Chủng chuẩn của kiểu gen RSV-B BA cũng có trong cây phát sinh chủng loại nhằm củng cố thêm các phân nhóm di truyền trên cây (Hình 3.13).



Hình 3.13. Cây phát sinh chủng loại kiểu gen BA9 gen G phân nhóm RSV-B của các mẫu thu thập tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh giai đoạn 2017-2020.

Các mẫu trong nghiên cứu có đánh dấu chấm xanh lá cây ở cuối tên. Chủng chuẩn kiểu gen BA có hình sao màu đỏ ở cuối tên. Phân nhóm di truyền (lineage) được xác định và nhóm ở bên phải hình vẽ. Tại các nhánh của cây có thể hiện các thay đổi axit amin trong nhánh đó và giá trị xác suất hậu nghiệm (posterior probability value). Các thanh ngang màu xanh dương thể hiện thời gian phân tách thành nhánh và khoảng mật độ hậu nghiệm (95% HPD) của thời điểm này. Trục ngang bên dưới từ trái sang phải thể hiện năm giúp cho tính toán thời gian phân tách các nhánh của cây phát sinh chủng loại. Thanh tỷ lệ đại diện cho thời gian tính bằng năm. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng bằng phần mềm BEAST v2.7.0.

Tất cả 50 chủng/mẫu bệnh phẩm hô hấp RSV-B được giải trình tự gen NGS trong nghiên cứu được thu thập tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh giai đoạn 2017-2020 đều thuộc kiểu gen RSV-B BA9 (Hình 3.13). Các trình tự này được chia thành 3 lineage: lineage 1- 3.

Lineage 1 gồm 18 trình tự nghiên cứu, được thu thập từ cuối năm 2018 đến năm 2020. Lineage này gồm các chủng RSV-B lưu hành tại Nhật Bản, Trung Quốc, Thái Lan, Philippin... cùng thời điểm với các mẫu có nguồn gốc từ Việt Nam. Có 4 thay đổi axit amin đặc trưng cho lineage 1 là A131T, T137I, T290I, T312I. Lineage 2 gồm 19 trình tự thu thập chủ yếu năm 2017-2018 và duy nhất 1 trình tự thu thập năm 2020. Lineage này gồm các chủng từ Argentina, Mông Cổ, Úc, Hà Lan... Thời điểm thu các mẫu này từ năm 2016-2019.

Lineage 3 gồm 13 trình tự thu thập tại Việt Nam giai đoạn 2017-2019. Đột biến axit amin đặc trưng cho lineage này là L286P và Stop316Q. Chiều dài nucleotide và axit amin của các trình tự thuộc lineage 3 cũng khác lineage 1 và lineage 2 do có đột biến từ stop codon thành glutamin. Các trình tự của Việt Nam năm 2009-2014 thuộc kiểu gen BA9 cũng được lựa chọn làm trình tự tham khảo trên cây phát sinh chủng loại nhưng lại không nằm trong 3 lineage này (Hình 3.13).

3.2.5. Sự khác biệt axit amin trên cây phát sinh chủng loại

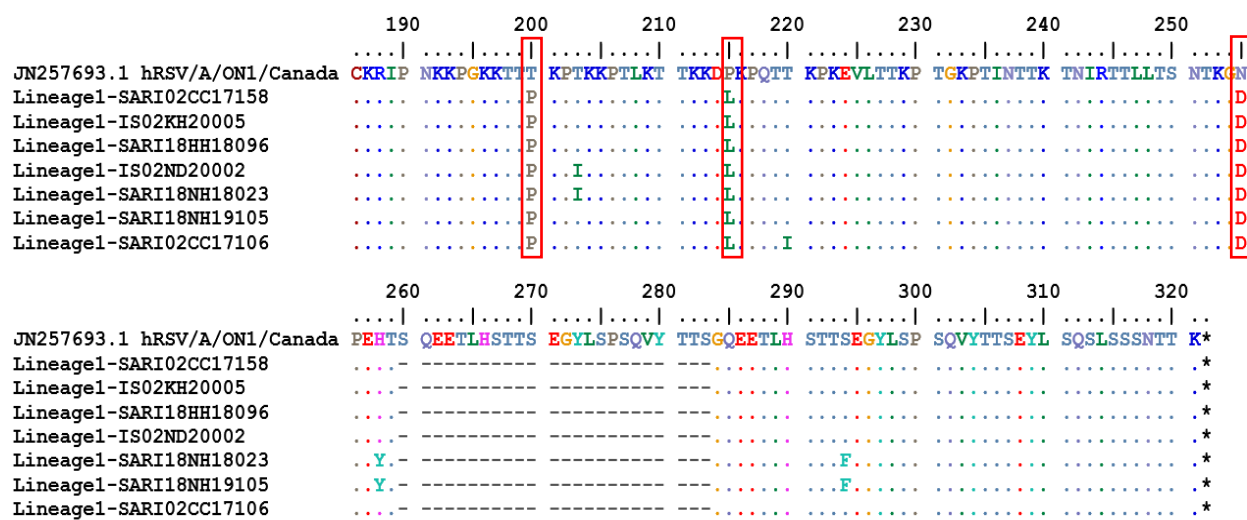
Để xác định sự khác biệt axit amin giữa các nhánh trên cây phát sinh chủng loại, các trình tự trên cây được so sánh với trình tự chủng chuẩn tương ứng với từng phân nhóm RSV. Trình tự chủng chuẩn dùng phân tích là kiểu gen RSV-A ON1 (JN257693) và kiểu gen BA (AY333364).

3.2.5.1. Phân nhóm RSV-A

Phần lớn các trình tự của nghiên cứu trong lineage 1 RSV-A (22/29) có sự khác biệt so với chủng chuẩn kiểu gen ON1 tại 3 axit amin trên gen G: T200P, P215L và N255D (Hình 3.14).

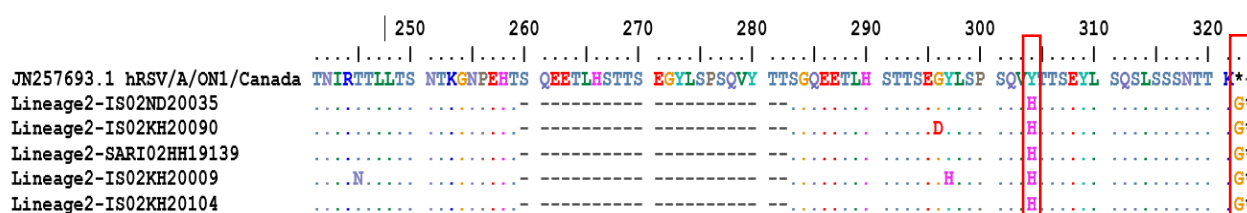
Lineage 2 của các mẫu giải trình tự gen phân nhóm RSV-A kiểu gen ON1 chỉ có 1 axit amin đặc trưng duy nhất tách lineage này ra so với các trình tự khác là

Y304H trên gen *G*. Lineage này gồm 5 mẫu và đều có chiều dài gen *G* nhiều hơn 1 axit amin so với chiều dài chủng chuẩn kiểu gen ON1. Sự thay đổi nucleotide làm bộ ba kết thúc chuyển thành glycine (G) (stop322G) rồi sau đó mới xuất hiện mã kết thúc. Điều này làm chiều dài các mẫu trong lineage 2 không chỉ thêm 1 axit amin ở C terminal của gen *G* so với trình tự so sánh mà còn dài hơn 1 axit amin so với 51 trình tự còn lại của RSV-A (Hình 3.15 và Hình 3.19).



Hình 3.14. Sự khác biệt axit amin giữa lineage 1 kiểu gen RSV-A ON1 các mẫu của Việt Nam năm 2017-2020 so với trình tự chủng chuẩn kiểu gen ON1 (JN257693).

Ba axit amin đặc trưng cho lineage 1 được đánh dấu trong các khung màu đỏ. Số phía trên là vị trí axit amin trên gen *G*. “.”: vùng trình tự tương đồng, “-”: axit amin bị mất, “*”: mã kết thúc.

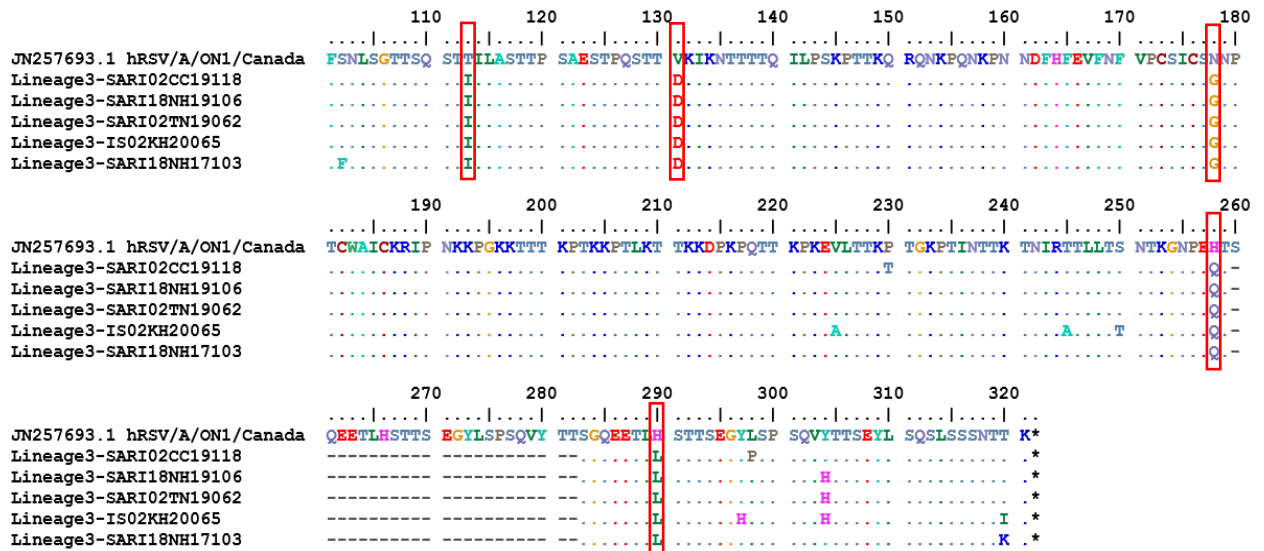


Hình 3.15. Sự khác biệt axit amin giữa lineage 2 kiểu gen RSV-A ON1 các mẫu của Việt Nam năm 2017-2020 so với trình tự chủng chuẩn kiểu gen ON1 (JN257693).

Axit amin đặc trưng cho lineage 2 được đánh dấu trong các khung màu đỏ. Số phía trên là vị trí axit amin trên gen *G*. “.”: vùng trình tự tương đồng, “-”: axit amin bị mất, “*”: mã kết thúc.

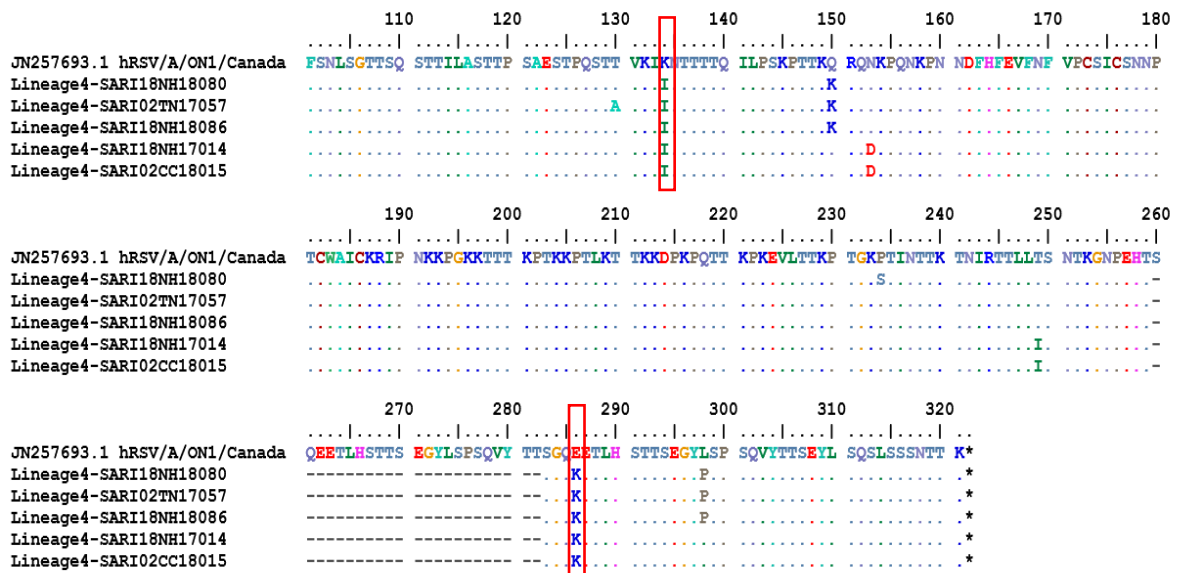
Lineage 3 có 5 thay đổi axit amin so với trình tự chủng chuẩn kiểu gen ON1 là: T113I, V131D, N178G, H258Q, H290L (Hình 3.16). Trong số 5 đột biến này, 4 trên 5 sự thay đổi nằm trên vùng biến đổi HVR I và HVR II của gen *G*. H290L thuộc

vùng HVR II và vùng lặp 72 nucleotide (24 axit amin) đặc trưng của kiểu gen ON1 (Hình 3.19).



Hình 3.16. Sự khác biệt axit amin giữa lineage 3 kiểu gen RSV-A ON1 các mẫu của Việt Nam năm 2017-2020 so với trình tự chuẩn kiểu gen ON1 (JN257693).

Năm axit amin đặc trưng cho lineage 3 được đánh dấu trong các khung màu đỏ. Số phía trên là vị trí axit amin trên gen G. “.”: vùng trình tự tương đồng, “-”: axit amin bị mất, “*”: mã kết thúc.

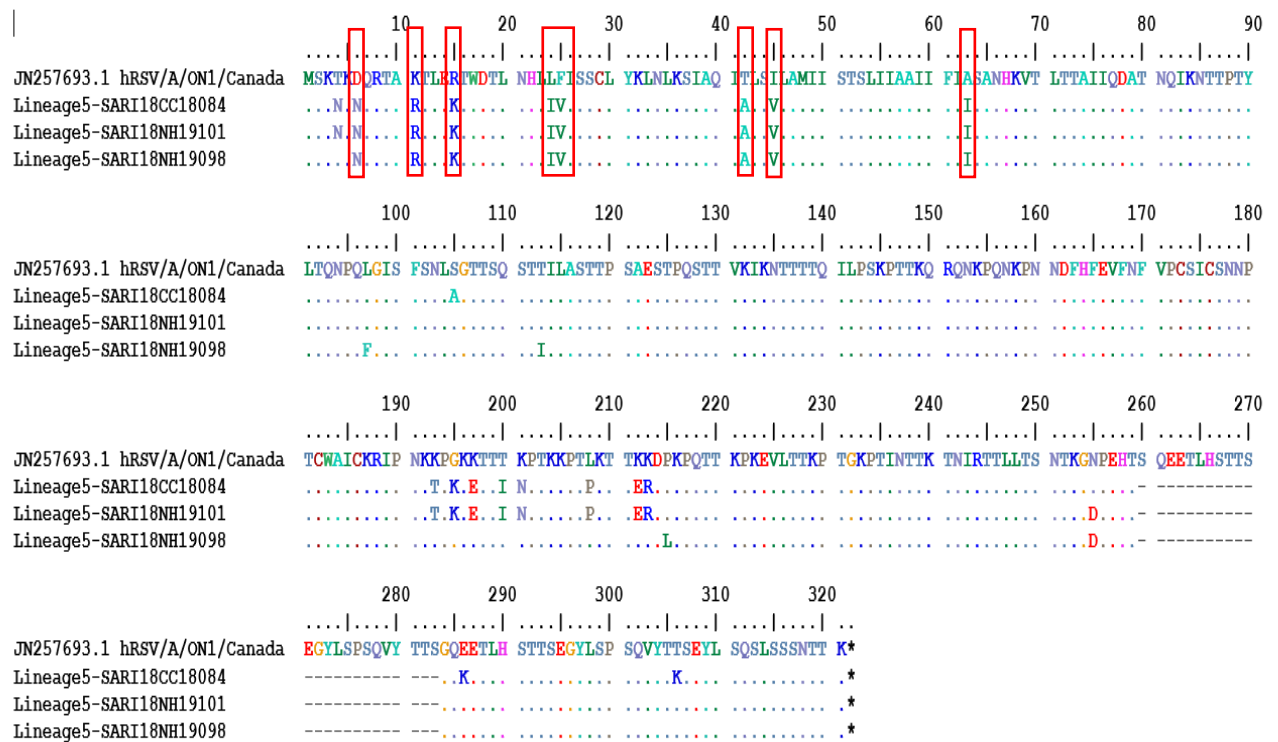


Hình 3.17. Sự khác biệt axit amin giữa lineage 4 kiểu gen RSV-A ON1 các mẫu của Việt Nam năm 2017-2020 so với trình tự chuẩn kiểu gen ON1 (JN257693).

Hai axit amin đặc trưng cho lineage 4 được đánh dấu trong các khung màu đỏ. Số phía trên là vị trí axit amin trên gen G. “.”: vùng trình tự tương đồng, “-”: axit amin bị mất, “*”: mã kết thúc.

Lineage 4 của các mẫu NGS có trình tự khác 2 axit amin so với trình tự chủng chuẩn ON1 so sánh là K134I và E286K (Hình 3.17). Trong đó, K134I nằm trong vùng siêu biến đổi HVR I, E286K nằm trong vùng siêu biến đổi HVR II và thuộc vùng lặp 72 nucleotide (24 axit amin) đặc trưng của kiểu gen ON1 (Hình 3.19).

Lineage 5 là lineage không thuộc kiểu gen ON1 (RSV-A non-ON1 genotype) và chỉ có 3 trình tự. Sự khác biệt axit amin của lineage này so với trình tự chủng chuẩn kiểu gen ON1 tương đối nhiều: D6N, K11R, R15K, L24I, F25V, T42A, I45V, A63I (Hình 3.18). Tuy nhiên, các thay thế axit amin này không thuộc vùng ectodomain (axit amin 66-321) mà nằm xuyên màng và phía bên trong màng của virus.



Hình 3.18. Sự khác biệt axit amin giữa lineage 5 kiểu gen RSV-A non-ON1 các mẫu của Việt Nam năm 2017-2020 so với trình tự chủng chuẩn kiểu gen ON1 (JN257693).

Các axit amin đặc trưng cho lineage 5 được đánh dấu trong các khung màu đỏ. Số phía trên là vị trí axit amin trên gen G. “.”: vùng trình tự tương đồng, “-”: axit amin bị mất, “*”: mã kết thúc.

Dù thuộc kiểu gen RSV-A ON1 hay RSV-A non-ON1 thì tất cả các mẫu RSV-A thu thập ở Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh năm 2017-2020 đều không có 72 nucleotide lặp lại (tương ứng với 24 axit amin) trên vùng HVR của gen G (Bảng 3.8 và Hình 3.19). Các trình tự này nằm ở vị trí axit amin 260-283 và 284-307 với thứ tự như sau: GQEETLHSTTSEGYLSPSQVYTTS. Tuy nhiên,

dù không có 72 nucleotide lặp lại nhưng 53/56 mẫu RSV-A của Việt Nam đều thuộc kiểu gen ON1 trên cây phát sinh chủng loại, nằm cùng với các chủng khác trên thế giới có vùng lặp lại (Hình 3.12).

Trong Hình 3.19, mỗi lineage đều có 3 đại diện để so sánh đóng hàng với trình tự chủng chuẩn kiểu gen ON1. Sự khác biệt axit amin xung quanh vùng 72 nucleotide lặp lại cũng được thấy rõ trên lineage 2, lineage 3 và lineage 4 với sự thay đổi axit amin tương ứng là H304Y, H290L và E286K. Riêng các mẫu trong lineage 2 có chiều dài nhiều hơn một axit amin so với các mẫu thuộc lineage khác và chủng chuẩn kiểu gen ON1 ở vị trí axit amin 322.

	240	250	260	270	280	290	300	310	320
JN257693.1 hRSV/A/ON1/Canada	TGKPTINTTKTNIRITLLTSNTKGNPEHTSQEETLHSTTSEGYLSPSQVYTTSSQEETLHSTTSEGYLSPSQVYTTSEYLSQSLSSSNTTK*								
Lineage 1 - SARI02CC17158			D						*
Lineage 1 - SARI18NH19105			D	Y		F			*
Lineage 1 - SARI02HH17096			D						*
Lineage 2 - IS02ND20035							H		G*
Lineage 2 - IS02KH20090						D	H		G*
Lineage 2 - SARI02HH19139							H		G*
Lineage 3 - IS0720250			Q			L			K*
Lineage 3 - SARI02CC19116			Q			L	P		*
Lineage 3 - SARI02CC19118			Q			L	P		*
Lineage 4 - SARI02CC18015						K			*
Lineage 4 - SARI18NH18049						K			*
Lineage 4 - SARI02CC19103						K			*
Lineage 5 - SARI18CC18084	KP	P				K		K	*
Lineage 5 - SARI18NH19101			D						*
Lineage 5 - SARI18NH19098			D						*

Hình 3.19. Sự khác biệt axit amin vùng lặp HVR II và đoạn cuối trên gen G giữa 5 lineage các mẫu của Việt Nam năm 2017-2020 so với trình tự chủng chuẩn kiểu gen ON1 (JN257693).

Vị trí trong khung là vùng lặp 24 axit amin (tương ứng với 72 nucleotide) thuộc vùng HVR II, số phía trên là vị trí axit amin trên gen G. “.”: vùng trình tự tương đồng, “-”: axit amin bị mất, “*”: mã kết thúc.

3.2.5.2. Phân nhóm RSV-B

Các mẫu giải trình tự gen NGS phân nhóm RSV-B thu thập tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh giai đoạn 2017-2020 được chia thành 3 lineage. Tuy nhiên sự khác biệt giữa các lineage đặc trưng bởi các thay đổi axit amin lại không được rõ ràng như với phân nhóm RSV-A. Riêng lineage 2 không có đột biến axit amin đặc trưng cho lineage.

Lineage 1 RSV-B kiểu gen BA9 khi so sánh với trình tự chủng chuẩn kiểu gen BA có nguồn gốc từ Argentina năm 1999 (AY333364) có 4 đột biến: A131T, T137I, T290I, T312I (Hình 3.20). Cả 4 đột biến này đều thuộc vùng siêu biến đổi HVR của gen G. Các mẫu thuộc lineage 1 kiểu gen RSV-B BA9 của Việt Nam có chiều dài 312 axit amin, ngắn hơn so với trình tự chủng chuẩn BA 3 axit amin.

		10	20	30	40	50	60	70	80
AY333364.1	BA4128/99B	MSKNKNQRTA	RTLEKTDWTL	NHLIVISSCL	YKLNLSIAQ	IALLSVLAMI	STSLIIAAAI	PIISANHKVT	LTTVTVQTIK
Lineage1-IS02ND20032									
Lineage1-SARI18HH18116									
Lineage1-SARI02HH18116									
Lineage1-SARI18NH19150									
Lineage1-SARI18NH19142									
		90	100	110	120	130	140	150	160
AY333364.1	BA4128/99B	NHTEKNITTY	LTQVSPERVS	PSKQLTTTPP	IYTN SATISP	NTKSETHHTT	AQTKGFTTTP	TQNNKPSTKP	RPKNPPKKPK
Lineage1-IS02ND20032									
Lineage1-SARI18HH18116									
Lineage1-SARI02HH18116									
Lineage1-SARI18NH19150									
Lineage1-SARI18NH19142									
		170	180	190	200	210	220	230	240
AY333364.1	BA4128/99B	DDYHFEVFNF	VPCSI CGNNQ	LCKSICKTIP	SNKP KKKPTI	KPTNKPPTKT	TNKRDPKKLA	KTLKKETTIN	PTKKPTPKTT
Lineage1-IS02ND20032									
Lineage1-SARI18HH18116									
Lineage1-SARI02HH18116									
Lineage1-SARI18NH19150									
Lineage1-SARI18NH19142									
		250	260	270	280	290	300	310	
AY333364.1	BA4128/99B	ERDTSTSQST	VLDTTTSKHT	ERDTSTSQST	VLDTTTSKHT	IQQQSLHSTT	PENTPNSTQT	PTASEPSTSN	STQKL*
Lineage1-IS02ND20032									
Lineage1-SARI18HH18116									
Lineage1-SARI02HH18116									
Lineage1-SARI18NH19150									
Lineage1-SARI18NH19142									

Hình 3.20. Sự khác biệt axit amin giữa lineage 1 kiểu gen RSV-B BA9 các mẫu của Việt Nam năm 2017-2020 so với trình tự chủng chuẩn kiểu gen BA (AY333364).

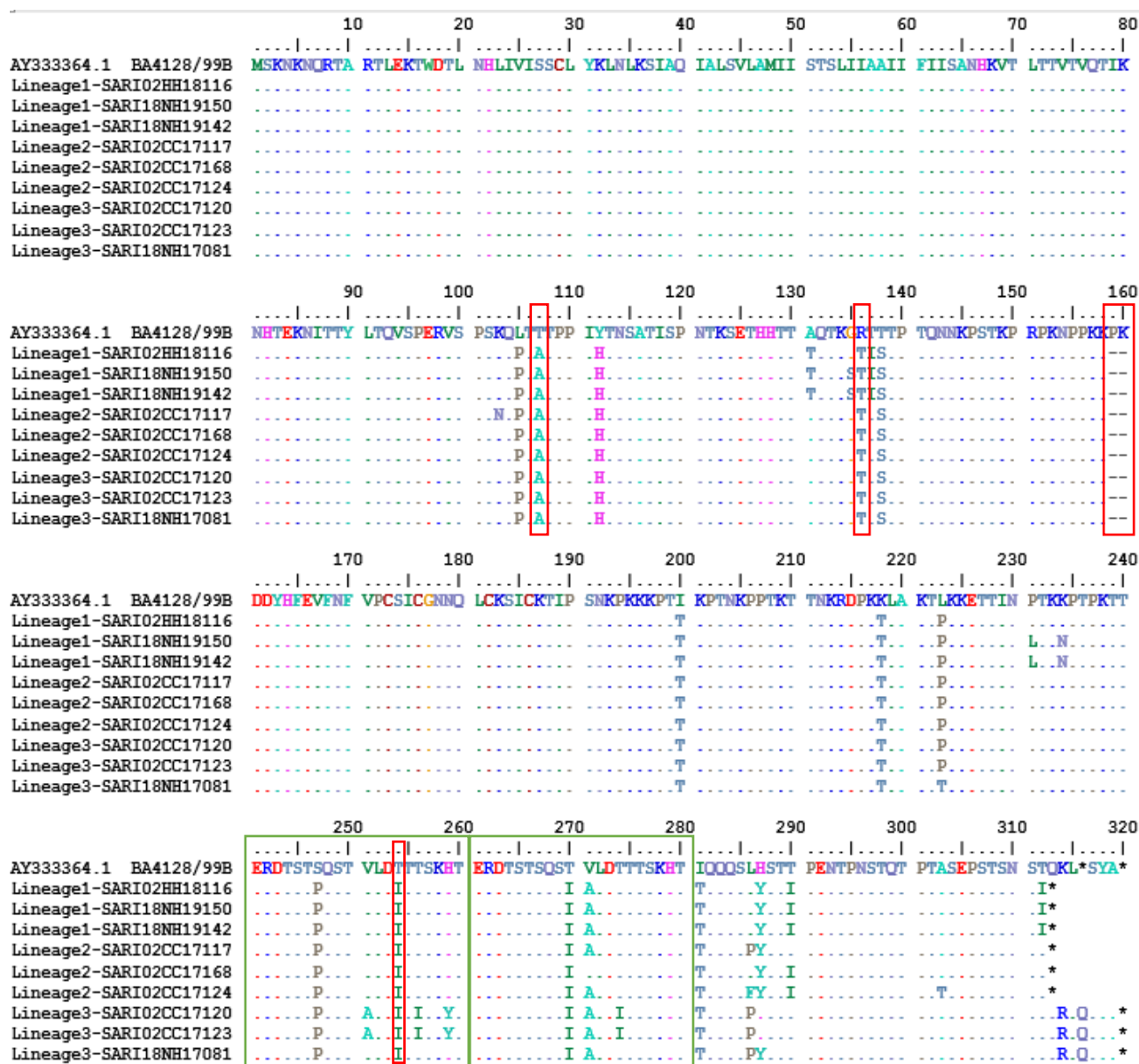
Bốn axit amin đặc trưng cho lineage 1 được đánh dấu trong các khung màu đỏ, số phía trên là vị trí axit amin trên gen *G*. “.”: vùng trình tự tương đồng, “-”: axit amin bị mất, “*”: mã kết thúc.

		280	290	300	310	320
AY333364.1	BA4128/99B	VLDTTTSKHT	IQQQSLHSTT	PENTPNSTQT	PTASEPSTSN	STQKL*SYA*
Lineage3-SARI18NH17067		AF.....	T.....	P.....		R.QP.*
Lineage3-SARI02CC17120		A..I.....	T.....	P.....		R.Q.*
Lineage3-SARI02CC17123		A..I.....	T.....	P.....		R.Q.*
Lineage3-SARI02CC18133		A..I.....	T.....	P.....		R.Q.*
Lineage3-SARI18NH17081		A.....	T.....	P.....		R.Q.*
Lineage3-SARI02TN19077			T.....	P.....		R.Q.*
Lineage3-SARI02CC17130			T.....	P.....		R.Q.*
Lineage3-SARI02CC17135			T.....	P.....		R.Q.*
Lineage3-SARI02CC17112			T.....	P.....		R.Q.*
Lineage3-SARI02HH19160			T.....	P.....		R.Q.*
Lineage3-SARI02CC17151		M.....	T.....	P.....		R.Q.*
Lineage3-SARI18NH17127		M.....	T.....	P.....		R.Q.*
Lineage3-SARI02CC17015		A.....	T.....	P.....		R.Q.*

Hình 3.21. Sự khác biệt axit amin giữa lineage 3 kiểu gen RSV-B BA9 các mẫu của Việt Nam năm 2017-2020 so với trình tự chủng chuẩn kiểu gen BA (AY333364).

Axit amin đặc trưng cho lineage 3 được đánh dấu trong các khung màu đỏ, số phía trên là vị trí axit amin trên gen *G*. “.”: vùng trình tự tương đồng, “-”: axit amin bị mất, “*”: mã kết thúc.

Lineage 3 kiểu gen RSV-B BA9 các mẫu trong nghiên cứu được đặc trưng bởi thay đổi L286P trên gen *G*. Ngoài ra, các mẫu này cũng có chiều dài 319 axit amin thay vì 315 axit amin như trình tự chủng chuẩn BA do xuất hiện đột biến từ stop codon thành Glutamin (stop316Q) (Hình 3.21).



Hình 3.22. Sự khác biệt axit amin trên gen G giữa 3 lineage thuộc kiểu gen RSV-B BA9 các mẫu của Việt Nam năm 2017-2020 so với trình tự chủng chuẩn kiểu gen BA (AY333364).

Vị trí trong khung màu xanh là vùng lặp 20 axit amin (tương ứng với 60 nucleotide) thuộc vùng HVR. Axit amin đặc trưng cho các mẫu RSV-B trong nghiên cứu

được đánh dấu trong các khung màu đỏ. Số phía trên là vị trí axit amin trên gen *G*. “.”: vùng trình tự tương đồng, “-”: axit amin bị mất, “*”: mã kết thúc.

Tất cả 50 mẫu RSV-B giải trình tự gen trong nghiên cứu có 5 khác biệt về axit amin so với trình tự chủng chuẩn BA: T107A, R136T, P159del, K160del, và T254I (Hình 3.22). Trong đó, thay đổi T254I nằm trong vùng lặp lại 60 nucleotide của kiểu gen BA9. Vì thuộc kiểu gen BA9 nên trong vùng HVR của gen *G*, các mẫu của Việt Nam đều có vùng lặp lại 60 nucleotide (tương ứng 20 axit amin) tại vị trí axit amin 241-260 và 261-280 với thứ tự như sau: ERDTSTSQSTVLDTTTSKHT. Bên cạnh đó, 50 trình tự RSV-B của Việt Nam đều bớt đi 6 nucleotide (CCAAAA) tương ứng với 2 axit amin (PK) ở vị trí 159-160 trên gen *G*. Ngoài ra, các trình tự thuộc lineage 3 cũng có chiều dài gen *G* nhiều hơn các trình tự thuộc lineage khác là 7 axit amin (319 axit amin so với 312 axit amin).

3.2.6. Động lực tiến hóa

3.2.6.1. Động lực tiến hóa của RSV-A

Tính toán khoảng cách di truyền (*p*-distance) của các lineage Việt Nam với các nhóm/kiểu gen khác trên cây phát sinh chủng loại giúp đánh giá được mức độ tương đồng và khác biệt về mặt di truyền giữa các nhóm này với nhau. Sự khác biệt tiến hóa của các mẫu giải trình tự gen RSV-A trong nghiên cứu được thể hiện trong Bảng 3.10.

Khoảng cách di truyền giữa 4 lineage từ lineage 1 đến lineage 4 dao động từ 0,0185-0,0315. Trong khi đó, lineage 5 lại có khác biệt di truyền lớn hơn hẳn so với 4 lineage còn lại với *p*-distance = 0,0761-0,0876 (Bảng 3.10).

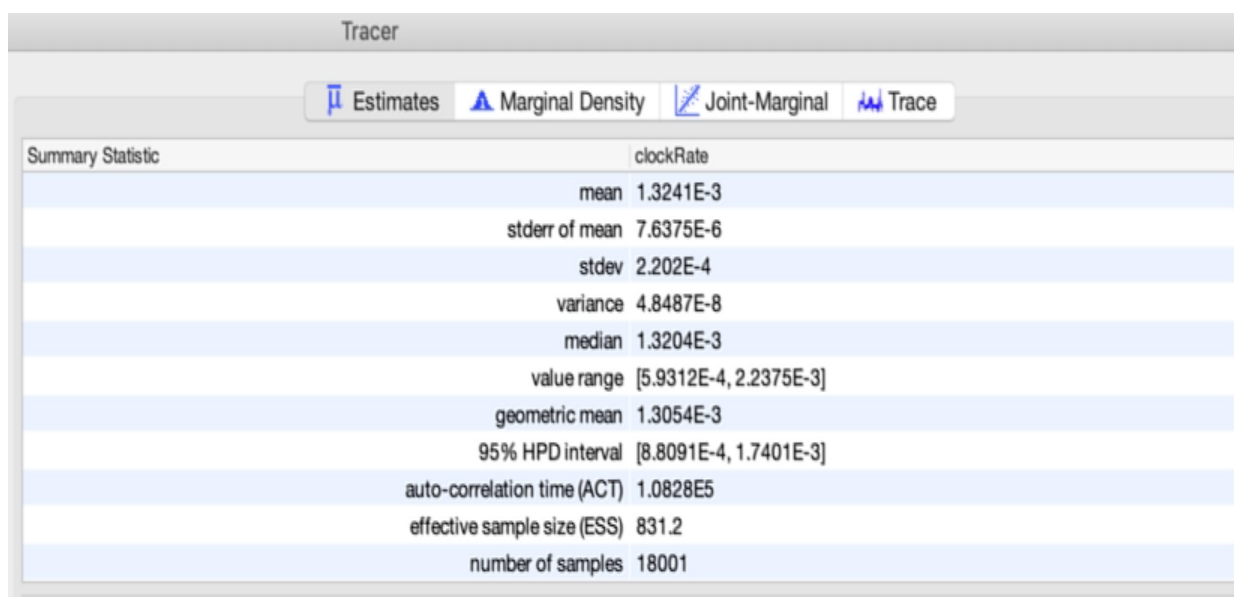
Lineage 1-4 so với các trình tự khác trên thế giới trong kiểu gen này (ON1-TG) có sự khác biệt tiến hóa không nhiều (0,0267-0,0329). Ngược lại, lineage 5 so với nhóm ON1-TG lại có *p*-distance=0,072. Khi ước tính tất cả 53 mẫu của kiểu gen ON1 trong nghiên cứu với các mẫu cùng kiểu gen của Việt Nam trước đây, dù có sự khác biệt lớn nhất ở 72 nucleotide lặp lại tại HVR của gen *G* nhưng khoảng cách di truyền của hai nhóm này là không lớn (0,026).

Tại các nhánh chia lineage trên cây phát sinh chủng loại, giá trị xác suất hậu nghiệm luôn lớn hơn 0,96. Đặc biệt tại điểm node của lineage 5, giá trị xác suất hậu nghiệm bằng 1, chứng tỏ sự khác biệt giữa lineage này với các kiểu gen khác trên cây phát sinh chủng loại (Hình 3.12). Nhìn chung, sự khác biệt tiến hóa giữa lineage 5 và các lineage khác, các kiểu gen khác của RSV-A trên cây phát sinh chủng loại là tương đối lớn và có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Bảng 3.10. Ước tính sự khác biệt tiến hóa trình tự gen *G* giữa các lineage/nhóm của RSV-A*.

	Lineage 1	Lineage 2	Lineage 3	Lineage 4	Lineage 5	ON1-TG	NA1	NA2	GA1	GA2
Lineage 1										
Lineage 2	0,0251									
Lineage 3	0,0270	0,0315								
Lineage 4	0,0185	0,0271	0,0238							
Lineage 5	0,0761	0,0875	0,0876	0,0815						
ON1-TG	0,0276	0,0329	0,0302	0,0267	0,0720					
NA1	0,0342	0,0380	0,0391	0,0358	0,0628	0,0421				
NA2	0,0776	0,0772	0,0761	0,0688	0,0855	0,0783	0,0606			
GA1	0,2395	0,2299	0,2350	0,2281	0,2511	0,2331	0,2004	0,1725		
GA2	0,0623	0,0624	0,0665	0,0605	0,0994	0,0680	0,0555	0,0398	0,1659	

*: Các phân tích tiến hóa được thực hiện trên phần mềm MEGA X với mô hình Maximum Composite Likelihood, giá trị bootstrap là 1000. Lineage 1-5 tương ứng với 5 lineage RSV-A các mẫu giải trình tự gen NGS của Việt Nam trong nghiên cứu. ON1-TG là các trình tự tham khảo trên thế giới thuộc kiểu gen ON1 trên cây phát sinh chủng loại. NA1, NA2, GA1, GA2 tương ứng với trình tự tham khảo các kiểu gen NA1, NA2, GA1, GA2 trên cây phát sinh chủng loại.



Summary Statistic		clockRate
mean		1.3241E-3
stderr of mean		7.6375E-6
stdev		2.202E-4
variance		4.8487E-8
median		1.3204E-3
value range		[5.9312E-4, 2.2375E-3]
geometric mean		1.3054E-3
95% HPD interval		[8.8091E-4, 1.7401E-3]
auto-correlation time (ACT)		1.0828E5
effective sample size (ESS)		831.2
number of samples		18001

Hình 3.23. Kết quả tính toán tốc độ tiến hóa phân tử gen *G* của các trình tự RSV-A thu thập tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh giai đoạn 2017-2020.

Ước tính được thực hiện bằng phần mềm BEAST v2.7.0 và Tracer v1.7.2.

Cây phát sinh chủng loại bằng phương pháp MCMC được xây dựng để ước tính tốc độ tiến hóa phân tử và tiến hóa theo thời gian của RSV-A gen *G* cho các chủng Việt Nam và toàn cầu. Tốc độ tiến hóa tổng thể của RSV-A gen *G* ở Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh giai đoạn 2017-2020 theo ước tính là $1,32 \times 10^{-3}$ thay thế/vị trí/năm [95% HPD: $8,81 \times 10^{-4}$ - $1,74 \times 10^{-3}$] (Hình 3.23). Cây phát sinh chủng loại MCC gen *G* phân nhóm RSV-A (Hình 3.12) được chia tỷ lệ theo thời gian đã chứng minh rằng thời gian xuất hiện tổ tiên chung gần nhất trên cây (tMRCA) được ước tính là vào khoảng năm 2007 (95% HPD: 2004-2009) đối với kiểu gen ON1. Còn đối với kiểu gen non-ON1 (lineage 5), thời gian xuất hiện tổ tiên chung gần nhất trên cây ước tính vào năm 2002 (95% HPD: 1998-2006). Ngoài ra, cây phát sinh chủng loại theo thời gian cũng thể hiện sự khác biệt di truyền của các trình tự trong nghiên cứu đối với cả kiểu gen ON1 và non-ON1, hai kiểu gen này được tách ra từ rất lâu, khoảng năm 1989 (95% HPD: 1984-1994) (Hình 3.12).

3.2.6.2. Động lực tiến hóa của RSV-B

Bảng 3.11 thể hiện kết quả tính toán khoảng cách di truyền tiến hóa của các mẫu RSV-B trong nghiên cứu với các nhóm khác trên cây phát sinh chủng loại giúp đánh giá được mức độ tương đồng và khác biệt về mặt di truyền giữa các nhóm này

với nhau. Tất cả 50 mẫu giải trình tự thể hệ mới của RSV-B trong nghiên cứu được chia thành 3 lineage và đều thuộc kiểu gen BA9.

Khác biệt tiến hóa của các mẫu trong nghiên cứu với các mẫu tham khảo trên thế giới cùng thuộc một kiểu gen BA9 là không cao, p -distance = 0,0236. Khi so sánh từng lineage của các mẫu giải trình tự gen RSV-B ở Việt Nam với các trình tự tham khảo của thể giới trên cây phát sinh chủng loại, khoảng cách di truyền ước tính cũng không khác biệt nhiều so với giá trị tính chung các mẫu này với nhau (0,0205-0,0265) (Bảng 3.11).

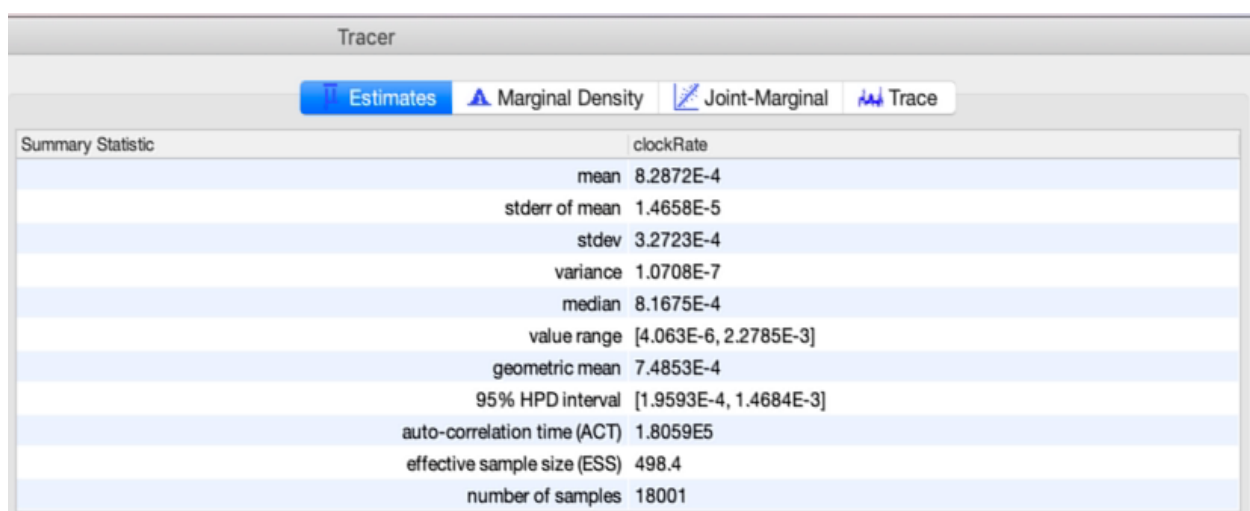
Bảng 3.11. Ước tính sự khác biệt tiến hóa về trình tự gen G giữa các lineage/nhóm của RSV-B*

	Lineage 1	Lineage 2	Lineage 3	BA9-TG	BA9-VN QK
Lineage 1					
Lineage 2	0,0256				
Lineage 3	0,0293	0,0255			
BA9-TG	0,0205	0,0247	0,0265		
BA9-VN QK	0,0418	0,0399	0,0399	0,0371	

*: Các phân tích tiến hóa được thực hiện trên phần mềm MEGA X với mô hình Maximum Composite Likelihood, chỉ số bootstrap là 1000. Lineage 1-3 tương ứng với 3 lineage RSV-B các mẫu giải trình tự gen NGS của Việt Nam trong nghiên cứu. BA9-TG là các trình tự tham khảo trên thế giới thuộc kiểu gen BA9 trên cây phát sinh chủng loại. BA9-VN QK là các trình tự RSV-B BA9 của Việt Nam trước đây, được lấy làm trình tự tham khảo trên cây phát sinh chủng loại.

Tuy nhiên, khi so sánh với các trình tự của Việt Nam trong quá khứ cùng thuộc kiểu gen BA9, sự khác biệt tiến hóa của các mẫu trong nghiên cứu thay đổi từ 0,0399 đến 0,0418. Giá trị này cao hơn p -distance của các mẫu trong nghiên cứu với các mẫu BA9 thế giới trên cây phát sinh chủng loại. Dù vậy, sự khác biệt trong ước tính khoảng cách di truyền này không có ý nghĩa thống kê.

Việc chia các lineage của phân nhóm RSV-B trong nghiên cứu cũng không thật sự rõ ràng như của phân nhóm RSV-A. Tại các node chia lineage trên cây phát sinh chủng loại, giá trị xác suất hậu nghiệm của lineage 1 và lineage 3 đều bằng 1 nhưng của lineage 2 lại nhỏ hơn 0,7 (Hình 3.13).



Hình 3.24. Kết quả tính toán tốc độ tiến hóa phân tử gen *G* của các trình tự RSV-B thu thập tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh giai đoạn 2017-2020.

Ước tính được thực hiện bằng phần mềm BEAST v2.7.0 và Tracer v1.7.2.

Tính toán về tốc độ tiến hóa phân tử theo thời gian của gen *G* phân nhóm RSV-B các trình tự của Việt Nam giai đoạn 2017-2020 là $8,29 \times 10^{-4}$ thay thế/vị trí/năm [95% HPD: $1,96 \times 10^{-4} - 1,47 \times 10^{-3}$] (Hình 3.24). Dựa vào ước tính trên cây phát sinh chủng loại, thời điểm xuất hiện tổ tiên chung gần nhất của các trình tự RSV-B Việt Nam kiểu gen BA9 trong nghiên cứu là khoảng năm 2013 (95% HPD: 2012-2014) (Hình 3.13). Ngoài ra, nếu tính toàn bộ các trình tự có kiểu gen BA9 của Việt Nam trên cây phát sinh chủng loại (các trình tự trong nghiên cứu và các trình tự tham khảo) thì thời điểm xuất hiện tổ tiên chung gần nhất là năm 2005 (95% HPD: 2003-2007).

Chương 4. BÀN LUẬN

4.1. Sự lưu hành của virus hợp bào hô hấp trên bệnh nhân nhi viêm đường hô hấp cấp tính nặng tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh

4.1.1. Tỷ lệ dương tính chung của virus hợp bào hô hấp

Việc lựa chọn các mẫu theo tiêu chuẩn viêm đường hô hấp cấp tính nặng SARI để nghiên cứu RSV cũng như các tác nhân hô hấp khác đã được thực hiện ở nhiều nghiên cứu và nhiều nơi trên thế giới [13]. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ dương tính chung của RSV trên các bệnh nhân nhi bị viêm đường hô hấp cấp tính nặng trong giai đoạn 2017-2020 tại hai Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh là 28,02%. Tỷ lệ này tương tự như các nghiên cứu ở Philippin (28,1%) [99], Ả Rập (26%) [100], Myanmar (24,5%) [38], Trung Quốc (23,7%) [101]. Tuy nhiên, tỷ lệ dương tính RSV trong nghiên cứu lại cao hơn so với các báo cáo tại Thái Lan (13,2%) [102], Colombia (12,02%) [103], Mỹ (7,7%) [104], Châu Phi (14,6%) [105] và thấp hơn so với Lào (41%) [106], Brazil (56%) [18], Châu Âu (46%) [105]. Điều này cho thấy, không có sự tương đồng về tỷ lệ nhiễm RSV tại các quốc gia trong cùng thời điểm. Dù có cùng vị trí địa lý và điều kiện khí hậu nhưng tỷ lệ dương tính RSV lại mang tính cục bộ, các quốc gia khác nhau có tỷ lệ nhiễm RSV khác nhau. Ngoài ra, tỷ lệ nhiễm RSV bị ảnh hưởng bởi sự khác biệt trong kích thước mẫu thu thập, thời gian giám sát giữa các nghiên cứu cũng như độ tuổi của bệnh nhân lấy mẫu xét nghiệm.

Tỷ lệ nhiễm RSV trong các nghiên cứu tại Việt Nam cũng rất đa dạng. Tại miền Trung Việt Nam, các công bố khoa học đã đưa ra tỷ lệ dương tính RSV trên bệnh nhân nhi bị viêm đường hô hấp trong giai đoạn 2010-2012 là 23% [107], 2007–2012 là 26,8% [82]. Các nghiên cứu tại thành phố Hồ Chí Minh năm 2009-2010 và 2010-2011 đưa ra tỷ lệ nhiễm RSV tương ứng là 48% [85] và 23,8% [86]. Tại miền Bắc, nghiên cứu đã chỉ ra tỷ lệ nhiễm RSV trên bệnh nhân SARI dưới 5 tuổi là 32% [49] và với bệnh nhân dưới 2 tuổi tỷ lệ này là 36,5% [50]. Một nghiên cứu khác thu thập các mẫu bệnh phẩm SARI từ năm địa điểm đại diện ở Việt Nam trong giai đoạn 2012–2016 cho thấy tỷ lệ dương tính với RSV là 22,8% [83].

Nhìn chung, tỷ lệ dương tính với RSV ở bệnh nhân nhi viêm đường hô hấp tại Việt Nam dao động ở mức khoảng 20–30%, tùy thuộc vào địa điểm nghiên cứu, thời gian thu thập mẫu và tuổi của bệnh nhân. Các nghiên cứu về RSV thực hiện tại Việt Nam chủ yếu thu mẫu trước năm 2016, so với nghiên cứu này tỷ lệ nhiễm RSV cũng không có sự khác biệt nhiều. Các nghiên cứu sau năm 2016 thường chỉ coi RSV là một trong số các tác nhân gây bệnh hô hấp mà không nghiên cứu độc lập, độ tuổi lấy

mẫu cũng tập trung vào nhóm nguy cơ cao [49]. Chính vì vậy mà các nghiên cứu này có tỷ lệ nhiễm RSV cao hơn các nghiên cứu trước đây và cao hơn trong nghiên cứu này. Tuy nhiên, khi chỉ xét nhóm tuổi dưới 2 hoặc dưới 5 tuổi, thì kết quả trong nghiên cứu này cũng có tỷ lệ cao (Bảng 3.3). Mặt khác, yếu tố độ tuổi cũng là một trong những nguyên nhân chính quyết định tỷ lệ nhiễm RSV ở trẻ nhỏ [105]. Những điều này đã dẫn tới sự sai khác về kết quả trong các nghiên cứu không chỉ ở Việt Nam mà trên thế giới.

Sự khác biệt tỷ lệ nhiễm RSV cho thấy sự đa dạng về tỷ lệ dương tính RSV theo thời gian nghiên cứu, địa điểm thu mẫu, độ tuổi lấy mẫu và khu vực địa lý khí hậu [46]. Do đó, sự so sánh về tỷ lệ dương tính chỉ mang tính chất tương đối và đại diện cho địa điểm và thời gian thu mẫu [65], [66]. Để có so sánh toàn diện và khách quan về tỷ lệ nhiễm RSV nói chung, cần thực hiện các chương trình giám sát dài hạn và cố định tại các địa điểm lấy mẫu nhằm đảm bảo tính nhất quán của kết quả. Việc giám sát RSV đã được thực hiện ở nhiều quốc gia trên thế giới như Mỹ, các quốc gia trong Liên minh Châu Âu, chương trình giám sát của WHO [74], [75]. Tại Việt Nam, tuy chưa có hệ thống giám sát độc lập dành riêng cho RSV nhưng đã có sự giám sát các căn nguyên virus gây bệnh đường hô hấp trên đối tượng SARI ở cả người lớn và trẻ em [49].

4.1.2. Tỷ lệ dương tính virus hợp bào hô hấp theo nhóm tuổi

Các nghiên cứu đưa ra tỷ lệ dương tính RSV rất khác nhau do nhóm tuổi thực hiện khác nhau. Đa số đều thực hiện trên nhóm trẻ dưới 5 tuổi nên tỷ lệ dương tính tương đối cao [108]. Khi xem xét tỷ lệ dương tính ở nhóm dưới 1 tuổi và từ 1-2 tuổi trong nghiên cứu này cũng có kết quả trên 70%.

Phân tích chi tiết tỷ lệ nhiễm RSV theo các nhóm tuổi trong 4 năm nghiên cứu, nhóm dưới 1 tuổi không chỉ có số lượng mẫu thu thập lớn mà tỷ lệ dương tính với RSV của nhóm này cũng cao hơn hẳn các nhóm khác với $p < 0,05$. Nhóm 1-2 tuổi cũng có tỷ lệ dương tính RSV cao. Tỷ lệ dương tính trong nghiên cứu này thường cao thứ hai sau nhóm dưới 1 tuổi, dao động từ 17%-37%. Do đó, trẻ em dưới 2 tuổi có tỷ lệ nhiễm RSV cao hơn các trẻ trên 2 tuổi. Trẻ dưới 2 tuổi cũng là nhóm tuổi được rất nhiều nghiên cứu về RSV tập trung thu mẫu [17], [46].

Ngoài ra, sự khác biệt về tỷ lệ dương tính RSV giữa nhóm từ 5 tuổi trở xuống và nhóm lớn hơn 5 tuổi trong nghiên cứu này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Điều này có nghĩa là, các trẻ dưới 5 tuổi có nguy cơ mắc RSV cao hơn các trẻ trên 5 tuổi. Nguy cơ mắc bệnh ở trẻ dưới 5 tuổi cao hơn từ 2-4 lần so với nhóm trẻ trên 5 tuổi. Xu hướng này cũng được thấy trong nghiên cứu khác, trong đó yếu tố nguy cơ cao nhất đối với nhiễm RSV là tuổi tác [42], [105]. Do đó, đối tượng nghiên cứu có độ tuổi khác nhau sẽ cho ra các kết quả nghiên cứu với tỷ lệ dương tính RSV khác nhau.

Đặc biệt, năm 2019 nhóm tuổi này có tỷ lệ nhiễm RSV cao nhất trong khi nhóm dưới 1 tuổi lại có tỷ lệ thấp nhất. 2019 cũng là năm mà nhóm trẻ càng lớn tuổi thì tỷ lệ dương tính RSV càng cao (Bảng 3.3 và Hình 3.3.)

Tuy nhiên, cũng giống các quốc gia đang phát triển khác, nghiên cứu tỷ lệ mắc bệnh do RSV ở Việt Nam nhìn chung chưa chú ý tới các nhóm đối tượng khác ngoài nhóm trẻ em và đặc biệt là trẻ dưới hai tuổi. Các nhóm nguy cơ thấp hơn như trẻ trên 5 tuổi hoặc nhóm người cao tuổi, người có bệnh lý nền ít được thu mẫu [46]. Do đó, kết quả của nghiên cứu này ở nhóm trẻ trên 5 tuổi với tỷ lệ dương tính chung là 10,5% góp phần bổ sung thêm những hiểu biết vào khoảng trống trong nghiên cứu RSV tại Việt Nam nói riêng và thế giới nói chung.

4.1.3. Tỷ lệ dương tính virus hợp bào hô hấp theo giới tính

Sự lựa chọn và thu thập mẫu là ngẫu nhiên tại các địa điểm nghiên cứu do đó số lượng thu mẫu giữa các năm và các điểm có sự khác nhau. Tuy nhiên, số trẻ là nam giới bị viêm đường hô hấp cấp tính nặng phải nhập viện điều trị được lấy mẫu là cao hơn số trẻ là nữ. Sự khác biệt này được quan sát thấy ở tất cả các năm thu mẫu và các điểm thu mẫu (Bảng 3.1 và Hình 3.1).

Nam giới được lấy mẫu nhiều hơn nữ giới và số lượng các trường hợp dương tính với RSV cũng cao hơn nữ giới ở cả hai địa điểm thu mẫu trong bốn năm nghiên cứu. Nhìn chung tỷ lệ dương tính RSV ở nam giới cao hơn nữ giới với 58,45% so với 41,55%. Giữa các năm cũng ghi nhận tỷ lệ dương tính RSV ở nam giới có xu hướng cao hơn ở nữ giới (Bảng 3.3). Kết quả tương tự cũng được quan sát thấy tại các nghiên cứu trên thế giới và ở Việt Nam [84], [102]. Trẻ em mới sinh, yếu tố giới tính dường như cũng đóng vai trò quyết định sự lây nhiễm RSV khi bé trai có nguy cơ mắc bệnh cao hơn bé gái [109]. Một nghiên cứu tương tự khác thực hiện tại Bệnh viện Nhi Trung ương từ tháng 6 đến tháng 12 năm 2019 cũng đưa ra kết luận tương tự, bệnh do RSV gây ra chủ yếu gặp trên bệnh nhân nam với tỷ lệ nam/nữ là 2/1 [110].

4.1.4. Tỷ lệ dương tính virus hợp bào hô hấp theo địa điểm nghiên cứu và năm thu mẫu

Tỷ lệ dương tính trong giai đoạn 2017-2020 tại Bệnh viện Nhi Trung ương là 33,3% và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh là 19,46%. Theo phân tích, địa điểm Bệnh viện Nhi Trung ương có tỷ lệ dương tính RSV cao gấp 1,71 lần so Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh. Bệnh viện Nhi Trung ương còn là bệnh viện tuyến cuối điều trị cho trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ, do đó số ca bệnh viêm đường hô hấp cấp tính nặng nhập viện nhiều hơn so với các bệnh viện khác. Số mẫu thu thập ban đầu tại Bệnh viện Nhi Trung ương nhiều gấp 1,62 lần (967/596) số mẫu thu thập tại Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh. Số lượng ca bệnh dương tính RSV cũng cao gấp 2,78 lần (322/116). Điều này chứng tỏ, các trường hợp viêm đường hô hấp cấp tính nặng ở

Bệnh viện Nhi Trung ương nhiễm RSV nhiều hơn ở Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh. Tỷ lệ dương tính RSV tại hai địa điểm thu mẫu này khác nhau có ý nghĩa thống kê.

Năm 2017 không chỉ có số lượng mẫu thu thập nhiều nhất mà tỷ lệ dương tính RSV cũng cao hơn hẳn các năm khác (36,13%) và cao hơn trung bình của nghiên cứu. Tỷ lệ này nhiều gấp 1,39-1,73 lần tỷ lệ dương tính RSV các năm khác. Sự khác biệt này không mang tính chất ngẫu nhiên mà có ý nghĩa về mặt thống kê. Tuy nhiên, lý giải cho sự khác biệt về tỷ lệ nhiễm RSV của năm 2017 so với các năm khác không thật sự rõ ràng. Từ các số liệu của nghiên cứu cho thấy, năm 2017 cũng là năm mà tỷ lệ dương tính của nhóm tuổi dưới 1 cao nhất trong tất cả các nhóm tuổi và trong 4 năm thu mẫu (63,78%). Có thể chính tỷ lệ nhiễm RSV của nhóm tuổi dưới 1 tăng mạnh đã khiến tỷ lệ dương tính năm 2017 tăng và tạo sự khác biệt với các năm khác. Để củng cố cho giả thuyết này cần có thêm các phân tích dịch tễ học của các mẫu trong giai đoạn nghiên cứu cũng như cần tiến hành thêm các nghiên cứu sự lưu hành khác của RSV tại cùng địa điểm thu mẫu trong các năm tiếp theo để có đánh giá toàn diện và chính xác.

4.1.5. Mùa virus hợp bào hô hấp trong các năm nghiên cứu

Một hạn chế trong các nghiên cứu về RSV ở Việt Nam như đã đề cập phía trên là thời gian nghiên cứu thường ngắn nên việc xác định mùa dịch là rất khó khăn và mang tính địa phương [46]. Với kết quả của nghiên cứu này, mẫu bệnh phẩm được thu thập liên tục trong bốn năm từ 2017 tới 2020, với 1563 mẫu tại hai địa điểm nghiên cứu là Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh. Các kết quả phân tích theo thời gian sẽ cho ra đặc điểm lưu hành, tính mùa vụ của RSV.

Dịch RSV ở miền Bắc Việt Nam nói chung và trong nghiên cứu này nói riêng có tính chu kỳ khá rõ ràng. Các trường hợp nhiễm RSV được phát hiện gần như quanh năm nhưng tỷ lệ dương tính tăng lên từ tháng 6 tới tháng 11. Do vậy, mùa dịch RSV hàng năm dao động từ khoảng tháng 6 tới tháng 11 và đỉnh dịch thường vào tháng 8 hoặc tháng 9 (Hình 3.4), thời điểm cuối mùa hè đầu mùa thu tại miền Bắc. Tại thời điểm đỉnh dịch, tỷ lệ dương tính RSV có thể lên tới gần 80% số lượng mẫu thu thập (Hình 3.4). Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Althouse thực hiện ở Nha Trang, RSV diễn ra cao điểm từ tháng 7 đến tháng 11, tháng 8 có tỷ lệ cao nhất [82]. Khi nghiên cứu các tác nhân hô hấp trên bệnh nhân viêm đường hô hấp cấp tính nặng tại miền Nam, tính mùa vụ và thời điểm dịch cũng được ghi nhận từ tháng 5 tới tháng 10 [83]. Điều này chứng tỏ mùa dịch RSV tại Việt Nam diễn ra cao điểm từ tháng 5, tháng 6 tới tháng 10 hoặc 11 hàng năm, đỉnh dịch thường xuất hiện vào tháng 8-tháng 9.

Mặc dù có mùa dịch rõ ràng với đỉnh dịch vào các tháng hè thu nhưng sự lưu hành của RSV được quan sát thấy quanh năm. Khi gặp điều kiện thuận lợi (độ ẩm, lượng mưa) thì tỷ lệ này sẽ tăng lên nhanh chóng và tạo thành mùa dịch RSV [72]. Tại Nha Trang (miền Trung) và thành phố Hồ Chí Minh (miền Nam), khí hậu thường chia hai mùa khô và mùa mưa, sự lưu hành của RSV cũng chịu sự ảnh hưởng của yếu tố khí hậu này nên có tỷ lệ dương tính khá thay đổi. Tại miền Nam năm 2010-2011, mùa dịch vào mùa mưa (tháng 5-11), mùa khô (tháng 12 đến tháng 4 năm sau) gần như không ghi nhận ca dương tính RSV nào [83], [86]. Nha Trang năm 2010-2012, RSV lưu hành từ khoảng tháng 5-tháng 11 và tạo đỉnh dịch vào thời điểm mùa khô và nóng (từ tháng 7 đến tháng 9 hàng năm) [82], [111]. Các thời điểm khác số ca dương tính RSV ghi nhận không đáng kể. Từ các kết quả này cho thấy, RSV dường như lưu hành quanh năm ở miền Bắc (khí hậu cận nhiệt đới) và theo mùa mưa/khô ở miền Trung và miền Nam (khí hậu nhiệt đới).

Tính theo mùa của RSV ở các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới khác tương tự như Việt Nam chưa được xác định rõ ràng [105]. Ở những vùng khí hậu có lượng mưa hàng năm cao (ví dụ như Bangladesh, Guatemala, Thái Lan, Singapore, Malaysia), nhiễm RSV thường đạt đỉnh điểm trong những tháng ẩm ướt [112]. Ở các vùng khí hậu ẩm/nóng như Trung Quốc và khí hậu khô hạn như Ai Cập, tỷ lệ nhiễm RSV đạt đỉnh điểm trong những tháng mát mẻ hơn [113]. Ở các nước xích đạo Nam Mỹ, nhiệt độ và độ ẩm liên quan trực tiếp đến tần suất nhiễm RSV. Tuy nhiên, dịch RSV không liên quan mật chẽ hoặc ít chịu ảnh hưởng của nhiệt độ, độ ẩm và lượng mưa khi các địa điểm nhiệt đới trên toàn thế giới được so sánh trong một mùa RSV nhất định [13]. Hơn nữa, trong một năm cụ thể, thời điểm bùng phát RSV thay đổi đáng kể giữa các khu vực nhiệt đới [40]. Điều này cho thấy rằng mặc dù có dịch RSV ở các vùng nhiệt đới, rất khó để dự đoán mùa bùng phát của RSV ở các khu vực này và sự ảnh hưởng của các khu vực này với nhau.

4.1.6. Sự lưu hành các phân nhóm virus hợp bào hô hấp

Virus hợp bào hô hấp RSV cũng giống như virus cúm, các phân nhóm của nó có thể cùng lưu hành song song với nhau hoặc một phân nhóm có thể chiếm ưu thế hơn trong mùa dịch hàng năm [46], [49]. Điều này đã dẫn tới việc cần phải xem xét sự lưu hành của các phân nhóm RSV. Trong nghiên cứu này, hai phân nhóm RSV-A và RSV-B cùng lưu hành với nhau từ năm 2017 tới 2020. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận trong nghiên cứu của Lu và cộng sự nghiên cứu tại Việt Nam trong ba năm 2013-2015, RSV-A và RSV-B cũng lưu hành đồng thời với nhau và mỗi phân nhóm chiếm ưu thế một năm [83].

Năm 2017-2018, hai phân nhóm cùng lưu hành với tỷ lệ dương tính gần như tương đương nhau, không thể hiện sự vượt trội của phân nhóm này so với phân nhóm

còn lại. Nghiên cứu tại Thái Lan năm 2017 cũng có cả 2 phân nhóm cùng lưu hành nhưng RSV-B có tỷ lệ cao hơn RSV-A, trong khi đó năm 2018 lại là mùa của RSV-A [102]. Hàn Quốc năm 2017 là sự ưu thế của RSV-A còn 2018 là sự ưu thế của RSV-B [114]. Điều này hơi khác sự lưu hành của RSV tại Việt Nam như trong nghiên cứu.

Các phân nhóm khác nhau có sự lưu hành khác nhau ở các quốc gia. Từ 2010-2019, dữ liệu của các nước Hà Lan, New Zealand, Bồ Đào Nha, Singapore cho thấy, sự lưu hành đồng thời của hai phân nhóm RSV với RSV-A là 54% so với RSV-B là 46% [65]. Trong nghiên cứu này, năm 2017-2018 hai phân nhóm của RSV cùng lưu hành với nhau và không có phân nhóm chiếm ưu thế. Như vậy, xu hướng lưu hành của RSV ở Việt Nam là tương tự một số quốc gia trên thế giới.

Năm 2019, RSV-A chiếm ưu thế ở Argentina (91%) và Anh (62,5%), trong khi RSV-B chiếm ưu thế ở Úc (75%), Ấn Độ (98%) và Nam Phi (64,4%) [115]. Tại Thượng Hải, Trung Quốc cũng chứng kiến sự lưu hành ưu thế của RSV-B so với RSV-A (75,8% so với 24,2%) [116]. Tại Đài Loan lại có xu hướng khác, RSV-A lưu hành với tỷ lệ cao hơn RSV-B [11]. Năm 2019 tại hai điểm nghiên cứu, RSV-B có tỷ lệ dương tính cao gần gấp hai lần so với RSV-A (60,26% so với 39,74%). Như vậy, sự lưu hành các phân nhóm của Việt Nam vừa có sự tương tự với một số quốc gia vừa khác các quốc gia khác.

Năm 2020 RSV-B là loại lưu hành phổ biến ở: Argentina (93%), Australia (54%), Ấn Độ (100%) và Anh (73%). Riêng Nam Phi, RSV-A chiếm ưu thế (61%) hơn RSV-B tại thời điểm này. Tại Canada, RSV-A và RSV-B cùng lưu hành với nhau năm 2019-2020 [115]. Trong khi đó, phân nhóm chiếm ưu thế trong nghiên cứu này năm 2020 là RSV-A, với tỷ lệ cao gấp 2,14 lần so với RSV-B. Những kết quả này cho thấy, dù ở cùng một vùng khí hậu ôn đới, nhiệt đới hay cận nhiệt đới, sự lưu hành của một phân nhóm RSV ở một quốc gia không bị ảnh hưởng bởi lưu hành của nó ở các nước khác [13], [46]. Sự phân phối và chiếm ưu thế của từng phân nhóm RSV là theo khu vực và mang tính riêng lẻ.

Một số nghiên cứu trước đây không tìm thấy mối tương quan giữa các phân nhóm và đặc điểm lưu hành hoặc mức độ nghiêm trọng của bệnh, trong khi những nghiên cứu khác đã chỉ ra rằng RSV-A phổ biến và độc lực cao hơn RSV-B [18]. Tại Việt Nam, nghiên cứu sự lưu hành các phân nhóm RSV chưa nhiều. Chủ yếu chỉ đưa ra các tỷ lệ dương tính mà thiếu phân tích sự ưu thế trong các mùa do thời gian nghiên cứu ngắn. Các báo cáo về giám sát các phân nhóm RSV cũng không liên tục mà gián đoạn theo từng năm [46]. Tuy nhiên đã có nghiên cứu chỉ ra rằng RSV-A dường như gây bệnh nặng và thời gian điều trị tại viện lâu hơn RSV-B [111]. Do vậy, xét tổng thể giai đoạn 2017-2020, RSV-A vẫn có tỷ lệ dương tính cao hơn RSV-B.

Năm 2020 trong khi tỷ lệ nhiễm RSV-B gần như không đổi cả năm thì RSV-A vẫn diễn ra như mọi năm và tạo đỉnh dịch duy nhất vào tháng 9/2020 (Hình 3.5). Đây cũng là năm duy nhất của nghiên cứu chỉ có một đỉnh dịch của một phân nhóm ưu thế mà không phải hai đỉnh như các năm khác. Dù là năm cùng lưu hành với nhau 2017-2018 hay RSV-B chiếm ưu thế năm 2019 thì vào thời điểm đỉnh dịch hàng năm, hai phân nhóm này vẫn có xu hướng tạo đỉnh dịch cùng nhau. Đây cũng là kết quả theo dõi sự lưu hành của RSV theo thời gian dài nhất được thực hiện từ trước đến nay. Các dữ liệu ban đầu đưa ra được đặc điểm lưu hành của các phân nhóm tại một số khu vực đại diện miền Bắc nước ta. Dù cùng lưu hành hay chiếm ưu thế trong một năm, thời điểm gây dịch và tạo đỉnh dịch hàng năm vẫn không thay đổi. Điều này góp phần đưa ra các cảnh báo cho người dân về thời điểm nguy cơ xảy ra dịch để có các biện pháp phòng bệnh thích hợp.

Sự đồng nhiễm RSV-A và RSV-B cũng được ghi nhận ở một số báo cáo tuy tỷ lệ này không nhiều [46]. Trong số hơn 1500 ca bệnh SARI được thu thập trong bốn năm nghiên cứu, chỉ có 3 trường hợp đồng nhiễm 2 phân nhóm RSV được ghi nhận, chiếm 0,69% số mẫu dương tính. Cả ba trường hợp này đều được thu thập vào thời điểm dịch là tháng 7, tháng 9 và tháng 10 năm 2017. Một kết quả tương tự cũng được ghi nhận tại Brazil trong giai đoạn 2016-2018 có năm trường hợp đồng nhiễm RSV-A và RSV-B được báo cáo [18]. Tuy nhiên các trường hợp này không quá phổ biến và cũng gặp trên nhiều tác nhân hô hấp khác như cúm, sởi,...[117].

4.1.7. Ảnh hưởng của virus SARS-CoV-2 và đại dịch COVID-19

Năm 2020 chứng kiến số lượng mẫu thu thập tại cả hai địa điểm nghiên cứu giảm đi đáng kể so với các năm khác, chỉ bằng 51,36% so với năm 2017. Điều này chứng tỏ số lượng bệnh nhân mắc hội chứng viêm đường hô hấp cấp tính nặng phải nhập viện giảm đáng kể. Kéo theo đó, là số lượng ca dương tính RSV năm 2020 cũng thấp hơn các năm khác. Tỷ lệ dương tính theo phân nhóm vì vậy mà cũng khác biệt so với các năm khác. Một trong những lý do dẫn tới điều này là sự xuất hiện của virus SARS-CoV-2.

Sự diễn biến phức tạp của dịch bệnh do virus SARS-CoV-2 gây ra không chỉ dẫn tới cuộc khủng hoảng y tế trên toàn thế giới mà còn tác động to lớn tới sự lưu hành của các tác nhân hô hấp khác trong đó có RSV. Các dữ liệu báo cáo từ WHO đã chỉ ra sự thay đổi mùa lưu hành của RSV ở cả bắc bán cầu và nam bán cầu [118]. Tại châu Âu, một vài quốc gia như Áo, Anh, Ý,... ghi nhận sự giảm đáng kể các trường hợp nhiễm RSV từ tháng 3 năm 2020, thời điểm bắt đầu đại dịch COVID-19 [119]. Các quốc gia Nam Mỹ không có ca bệnh RSV dương tính nào từ tháng 5/2020 đến tháng 8/2020 [120]. Tại Hàn Quốc, tỷ lệ dương tính RSV và cúm, cũng như các trường hợp nhập viện do những virus này gây nên cũng gần như bằng không vào nửa đầu

năm 2021 – thời điểm đỉnh dịch hàng năm. Mùa đông 2020-2021 trở thành năm đầu tiên sau hơn 20 năm giám sát các tác nhân virus hô hấp tại Hàn Quốc mà không công bố dịch RSV hay các thông báo về cúm mùa [77]. Tại Nhật Bản, Iran, Canada, Bỉ, Tây Ban Nha,... cũng ghi nhận sự chuyển dịch mùa RSV hoặc không có dịch RSV trong thời gian dịch COVID 19 bùng phát mạnh [118].

Trong cuộc chiến với đại dịch COVID-19 từ đầu năm 2020, các biện pháp can thiệp như phong tỏa toàn quốc được thực hiện, lệnh hạn chế đi lại và đóng cửa trường học được áp dụng tại nhiều nơi, giãn cách xã hội, đóng cửa biên giới, hạn chế đi lại quốc tế và can thiệp không dùng thuốc, chẳng hạn như vệ sinh tay và bắt buộc đeo khẩu trang tại nơi công cộng [78]. Các quy định này cũng được áp dụng ở Việt Nam tại các địa phương tiến hành thu mẫu đã góp phần làm giảm sự lây truyền RSV qua các giọt bắn và tiếp xúc, gián tiếp làm ảnh hưởng tới tỷ lệ dương tính của RSV năm 2020 [140]. Hoạt động kinh doanh, sản xuất, du lịch và học tập tại các địa phương tiến hành thu mẫu không bị ảnh hưởng nhiều. Trẻ em đi học tại chỗ trong cả năm học, ngoại trừ 2 tuần phong tỏa trong tháng 4 năm 2020. Nhóm trẻ mẫu giáo (dưới 6 tuổi) gần như không đi học trong cả năm 2020 [121]. Lý do này cũng giải thích số mẫu thu thập trong năm 2020 lại thấp hơn rất nhiều so với các năm khác. Phân bố nhóm tuổi của trẻ dưới 1 tuổi, từ 1-2 tuổi cũng giảm mạnh (Bảng 3.1). Điều này đã góp phần làm ảnh hưởng đến các kết quả của nghiên cứu về tỷ lệ dương tính chung, tỷ lệ dương tính theo nhóm tuổi và theo các năm.

Mặc dù số lượng mẫu thu thập và làm xét nghiệm RSV thấp trong nửa đầu năm 2020, từ tháng 9 số lượng mẫu đã tăng trở lại và đảm bảo vẫn có mùa dịch với đỉnh dịch tương tự mọi năm. Tuy tỷ lệ mẫu dương tính RSV năm 2020 không thấp hơn các năm khác nhiều nhưng tỷ lệ các ca bệnh dương tính vào thời điểm đỉnh dịch lại giảm hơn hẳn (36% so với trên 50%) (Hình 3.4). Kết quả này cho thấy rằng đại dịch COVID-19 có thể ảnh hưởng đến tỷ lệ nhiễm RSV ở hai bệnh viện lấy mẫu. Tuy nhiên, thời gian nghiên cứu chỉ bao gồm năm đầu tiên xảy ra đại dịch, dữ liệu RSV từ những năm tiếp theo bị gián đoạn và không được phân tích nên các kết luận về ảnh hưởng của virus SARS-CoV-2 hay của đại dịch COVID-19 lên sự lưu hành của RSV cần được nghiên cứu toàn diện hơn.

Sự lưu hành của các phân nhóm RSV trong năm 2020 tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh lại cho thấy rõ sự khác biệt tác động của COVID-19. Trong ba năm 2017-2019, dù phân nhóm nào chiếm ưu thế thì phân nhóm còn lại cũng vẫn tạo đỉnh dịch và có tỷ lệ dương tính thấp hơn không đáng kể. Số liệu năm 2020 lại khác hẳn, đỉnh dịch vẫn diễn ra vào thời điểm như mọi năm nhưng tỷ lệ dương tính giữa các tháng không có nhiều chênh lệch như những năm trước. Nói cách khác, độ dốc của đồ thị dương tính RSV không bằng các năm khác,

đỉnh dịch cũng không “cao” bằng các năm khác (Hình 3.5). Bên cạnh đó, dù mùa dịch 2020 chủ yếu do RSV-A gây ra, nhưng RSV-B vẫn duy trì tỷ lệ dương tính không đổi, dao động quanh 10% mà không tạo thành đỉnh dịch như RSV-A. Các kết quả bước đầu này đã cho thấy xu hướng của Việt Nam cũng tương đồng với một số nghiên cứu trên thế giới khi đại dịch COVID-19 diễn ra đã ảnh hưởng tới sự lưu hành của nhiều loại virus, vi khuẩn gây bệnh hô hấp khác [122]. Tuy nhiên, để có thể đưa ra kết luận hiệu quả của các biện pháp can thiệp này hay sự cạnh tranh của SARS-CoV-2 với RSV ở Việt Nam cần có thêm nhiều nghiên cứu hơn nữa.

Bên cạnh đó, việc thay đổi chu kỳ lưu hành của virus và một quần thể vật chủ ít miễn dịch do thời gian nhiễm bệnh đã lâu tạo cơ hội cho RSV quay trở lại và có những biến đổi khác với những gì đã được nghiên cứu trước đó [123]. Việc giảm sự lây truyền RSV trong thời điểm dịch COVID-19 sẽ dẫn đến sự gia tăng của các trẻ có ít miễn dịch hoặc chưa từng mắc bệnh. Do đó, nguy cơ của nhóm trẻ này là dễ mắc bệnh hơn trong tương lai [37], [120].

Trẻ sơ sinh được sinh ra từ những bà mẹ chưa tăng cường khả năng miễn dịch đối với RSV sẽ không được bảo vệ [124]. Khi RSV lưu hành trở lại, sẽ có một quần thể lớn các cá thể chưa có miễn dịch và sẽ gây ra các vụ dịch lớn và nghiêm trọng hơn [120]. Một mô hình toán học dự đoán rằng các biện pháp kiểm soát dịch COVID-19 càng kéo dài thì sự lan truyền RSV càng giảm, các vụ dịch trong tương lai của RSV sẽ càng lớn hơn [78]. Xét đến tỷ lệ tử vong cao do nhiễm RSV không chỉ ở trẻ sơ sinh mà còn ở người già trong thời gian trước đây, cần có những nỗ lực để ngăn chặn một tương lai dịch RSV nghiêm trọng xảy ra không chỉ trên phạm vi toàn cầu mà cả ở các quốc gia đang phát triển trong đó có Việt Nam. Thực hiện tiếp tục giám sát RSV, các ổ chứa và các kiểu gen lưu hành cần được gấp rút triển khai ở nước ta để không xảy ra tình trạng dịch chồng dịch, chưa hết dịch bệnh hô hấp này thì dịch khác như RSV lại diễn ra.

4.2. Đặc điểm sinh học phân tử của virus hợp bào hô hấp trên bệnh nhân nhi viêm đường hô hấp cấp tính nặng tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh

4.2.1. Phân lập virus hợp bào hô hấp

Nghiên cứu này tiến hành phân lập 112 mẫu bệnh phẩm hô hấp được thu thập từ các bệnh nhân nhi bị viêm đường hô hấp cấp tính nặng năm 2017 và 2018 có giá trị Ct < 25 với RSV. Phương pháp thực hiện này cũng tương tự như các quốc gia khác trên thế giới [125]. Trước đây, quy trình phân lập RSV có thể thực hiện trên các dòng tế bào như Hep-2, A549 [126], Vero, BEAS-2B [63], HAE [127], HBE [128]. Nhưng hiện nay, tế bào Hep-2 được sử dụng phổ biến hơn cả do có hiệu quả phân lập cao [63]. Một nghiên cứu tại Brazil đã chỉ ra, hiệu quả phân lập RSV trên dòng tế bào

Hep-2 có thể lên tới 37,3%. Các mẫu bệnh phẩm được bảo quản tại điều kiện 20°C từ 1-15 tháng trong môi trường vận chuyển virus [129]. Điều này cho thấy, việc sử dụng tế bào Hep-2 để phân lập là phù hợp với thực tế nghiên cứu.

Kết quả realtime RT-PCR các chủng phân lập chứng tỏ lượng virus nhân lên trong môi trường nuôi cấy lớn (Ct trong khoảng 15-19). Hình ảnh dưới kính hiển vi điện tử truyền qua cho thấy cấu trúc bên ngoài rõ ràng và đặc trưng cho hình thái của RSV (Hình 3.7). Từ quá trình virus nhân lên trong tế bào Hep-2 tạo thành các dạng hợp bào, virus nảy chồi dạng sợi dài và giải phóng ra bên ngoài tế bào đến các hạt virus hình cầu độc lập trong môi trường nuôi cấy đều được chụp ảnh minh chứng. Ngoài ra, những hình dạng khác nhau của tập hợp các hạt virus khi giải phóng khỏi tế bào Hep-2 cũng được chụp hình lại. Điều này minh chứng sự phân lập thành công và thu được các chủng RSV của nghiên cứu.

So sánh với các virus hô hấp thông thường khác như Adeno, Cúm, RSV có hiệu suất phân lập lại không cao [2], [25]. Tỷ lệ phân lập thành công trong nghiên cứu này là 22,32% (25/112). Giữa các năm 2017, 2018 có sự dao động nhưng không có ý nghĩa thống kê (20,29% và 25,59%). Điều này cho thấy, tỷ lệ chung của phân lập RSV trên các mẫu bệnh phẩm hô hấp có Ct < 25 là khoảng 22%. Các nghiên cứu khác có kết quả phân lập rất dao động, từ 10-50% số mẫu tiến hành phân lập và thu được chủng [9]. Tỷ lệ phân lập RSV thành công phụ thuộc vào nhiều yếu tố như cách thiết kế nghiên cứu, loại bệnh phẩm thu thập, đối tượng lấy mẫu, phương thức vận chuyển và cách bảo quản mẫu bệnh phẩm. Do đó, rất khó để đưa ra tỷ lệ phân lập thành công chung RSV của tất cả các nghiên cứu [125].

Ngoài ra, thời gian thu mẫu tại các địa điểm kéo dài, không vận chuyển ngay tới phòng xét nghiệm, điều kiện bảo quản liên tục thay đổi (từ -70°C lúc thu mẫu, 2-8°C khi vận chuyển, -70°C tại phòng thí nghiệm cho tới lúc xét nghiệm). Cách thu thập mẫu, nhiệt độ lưu giữ bệnh phẩm hô hấp, quá trình đông-tan băng nhiều lần rồi mới tiến hành thí nghiệm đều ảnh hưởng đến kết quả phân lập. RSV là virus nhân lên và tạo thành dạng hợp bào, không bền với nhiệt độ và dễ bị ảnh hưởng bởi quá trình đông tan băng do tập hợp các hạt virus mất tính ổn định [9], [46]. Vì vậy, tỷ lệ phân lập RSV thành công của nghiên cứu không cao.

Các mẫu bệnh phẩm hô hấp được lựa chọn phân lập đều là những mẫu có tải lượng virus cao (Ct < 25) nhưng có thể do ảnh hưởng các yếu tố trên nên hiệu suất chỉ đạt 22,32%. Bên cạnh đó, việc lựa chọn dòng tế bào Hep-2 để phân lập virus được coi là lựa chọn tối ưu nhất. Khả năng nhân lên của RSV trên dòng tế bào Hep-2 cao gấp 10 lần dòng tế bào A549 [126] và gấp 100 lần dòng tế bào SIAT [62] trong 96 giờ phân lập. Nếu tất cả các mẫu dương tính realtime RT-PCR với RSV đều được

phân lập, không quan tâm tới tải lượng virus cao hay thấp và lựa chọn dòng tế bào khác Hep-2 thì tỷ lệ phân lập thành công sẽ giảm xuống rất nhiều.

Nghiên cứu được thiết kế lấy mẫu trên các bệnh nhân nhi nên độ tuổi từ 16 trở xuống. Tuy nhiên, các mẫu được lựa chọn thực hiện phân lập chủ yếu thuộc nhóm trẻ dưới 2 tuổi. Điều này cho thấy, trẻ nhỏ khi mắc RSV có thể có tải lượng virus thường cao hơn nhóm trẻ lớn và hiệu quả phân lập cũng cao hơn. Theo như phân tích của Battles và McLellan, 95% dân số mắc RSV lần đầu trong đời lúc nhỏ hơn 2 tuổi và 2% trong số này phải nhập viện điều trị [7]. Độ tuổi lớn hơn, trẻ vẫn tiếp tục bị mắc RSV nhưng tỷ lệ thấp hơn và lượng virus dường như cũng không cao bằng lúc nhỏ [35]. Điều này phù hợp với sự phân bố lứa tuổi trong nghiên cứu, 96% (24/25) chủng phân lập thành công từ nhóm trẻ dưới 2 tuổi, chỉ có một chủng duy nhất phân lập thành công từ trẻ 4 tuổi.

Một vấn đề khác là tỷ lệ phân lập thành công giữa hai phân nhóm RSV có sự khác biệt đáng kể. Số lượng mẫu bệnh phẩm hô hấp của hai phân nhóm thực hiện phân lập gần như tương đương nhau nhưng số chủng thu được lại rất khác nhau. RSV-A thu được 18/59 chủng (30,51%) so với RSV-B thu được 7/53 chủng (13,21%). Sự khác nhau về tỷ lệ phân lập thành công này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) đã cho thấy phân lập RSV-A có hiệu suất cao hơn RSV-B. Tuy vậy, có rất ít nghiên cứu đưa ra tỷ lệ phân lập thành công của từng phân nhóm RSV. Do vậy, cần thêm các nghiên cứu khác để có thể đưa ra kết luận RSV-A có khả năng phân lập thành công cao hơn RSV-B hoặc đây chỉ là kết quả mang tính đặc trưng cho nghiên cứu này.

Sự chênh lệch tỷ lệ phân lập thành công còn thấy ở địa điểm thu mẫu. Bệnh viện Nhi Trung ương có tỷ lệ phân lập thành công RSV cao hơn Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh (27,16% so với 9,68%). Đặc biệt là không thu được chủng RSV-B nào từ các mẫu tiến hành phân lập của Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh. Toàn bộ số chủng RSV-B thu được của nghiên cứu đều được thu thập tại Bệnh viện Nhi Trung ương. Kết quả này cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa trong tỷ lệ phân lập giữa hai điểm nghiên cứu và hai phân nhóm RSV.

4.2.2. Giải trình tự gen thế hệ mới

4.2.2.1. Lựa chọn mẫu giải trình tự gen

Ngày nay, với sự phát triển của lĩnh vực khoa học, nhiều nghiên cứu sâu về sinh học phân tử có thể thực hiện trực tiếp từ mẫu bệnh phẩm lâm sàng mà không cần dùng tới chủng phân lập [130]. Hơn nữa, sự sai sót trong quá trình phân lập có thể dẫn tới thay đổi về mặt di truyền của đối tượng nghiên cứu. Trong quá trình nhân lên trên các dòng tế bào cảm nhiễm cũng tương tự như quá trình nhân lên của virus trong cơ thể vật chủ, sự trao đổi chéo, tích hợp hay sao chép gặp lỗi hoàn toàn có thể xảy ra [128]. Ví dụ như với virus SARS-CoV-2, trình tự của các chủng phân lập trên tế

bào và trình tự các chủng được giải trình tự trực tiếp từ bệnh phẩm lâm sàng có sự sai khác nhau. Điều này là do virus không có cơ chế đọc sửa lỗi trong quá trình sao chép nên đã tạo ra các đột biến ngẫu nhiên sau mỗi chu kỳ lây nhiễm [131]. Do đó, hiện nay xu hướng sử dụng các mẫu lâm sàng để xác định trình tự hệ gen đang ngày càng phát triển. Những đột biến/thay đổi về nucleotide trên hệ gen virus có thể xảy ra trong quá trình phân lập, do đó, giải trình tự gen trực tiếp từ bệnh phẩm giúp phân tích chính xác hệ gen hơn, có thể tiết kiệm thời gian, kịp thời đánh giá tình hình dịch bệnh và đáp ứng phòng chống dịch nhanh chóng hơn [132]. Ngoài ra, việc giải trình tự trực tiếp từ bệnh phẩm lâm sàng sẽ giúp cho sự đa dạng mẫu được giải trình tự. Các mẫu được lựa chọn không nhất thiết phải có tải lượng virus cao, nhiều mẫu chỉ cần có Ct < 25 đã được tiến hành giải trình tự [133].

Mặt khác, việc phát triển vaccine hiện nay không nhất thiết phải sử dụng chủng phân lập. Công nghệ vaccine tái tổ hợp là một sự phát triển mới trong lĩnh vực vaccine [55]. Với sự ra đời của các vaccine mRNA mà điển hình là vaccine phòng COVID-19 trong thời gian qua là một minh chứng cho điều này. Bên cạnh đó, trong số các vaccine RSV đang nghiên cứu và thử nghiệm, có nhiều loại là mRNA, có loại là các mảnh/tiểu đơn vị protein [41]. Trong số năm loại vaccine đáng chú ý nhất hiện nay đang thử nghiệm trên trẻ em, phụ nữ mang thai và người trên 60 tuổi, không có loại nào là virus giảm độc lực [134]. Điều này cho thấy, trong phạm vi phát triển vaccine phòng RSV, các chủng phân lập không phải lựa chọn hàng đầu của các nhà nghiên cứu.

Thực tế này đã chỉ ra, liệu chúng ta có nên tiếp tục phân lập tất cả các mẫu dương tính có được để thu chủng của các tác nhân vi sinh vật nghiên cứu hay cần thay đổi chiến lược. Nói cách khác là lựa chọn đại diện các mẫu theo thời gian, khu vực nghiên cứu rồi mang đi phân lập trên các dòng tế bào cảm nhiễm, tốn kém thời gian, công sức và đích đến cuối cùng là giải trình tự các chủng này. Chiến lược mới hiện nay, là giải trình tự nói chung hay giải trình tự gen thế hệ mới nói riêng là công cụ hỗ trợ chẩn đoán, điều trị và nghiên cứu. Do đó, việc giải trình tự được thực hiện trước, phân tích các đặc tính di truyền tìm điểm khác biệt rồi lựa chọn ra các chủng mong muốn phân lập và lưu trữ. Điều này vừa đáp ứng nhanh được mục tiêu tìm hiểu đặc tính sinh học phân tử vừa giảm áp lực thời gian và công sức trong việc phân lập các tác nhân gây bệnh nói chung và RSV nói riêng [132]. Chiến lược này đã được áp dụng rất thành công trong cuộc chiến với đại dịch COVID-19 [131]. Với việc nghiên cứu RSV, các nhà khoa học cũng đã bắt đầu dịch chuyển theo xu hướng chung này. Phân lập virus sẽ thực hiện sau khi giải trình tự gen trực tiếp các mẫu lâm sàng.

Trong hai năm 2017-2018, số mẫu dương tính của RSV cao hơn nhiều so với năm 2019-2020 nên lượng mẫu có tải lượng virus cao cũng nhiều hơn. Nếu hiệu quả

phân lập virus trên các mẫu bệnh phẩm hô hấp có Ct < 25 giữa các năm này tương đương nhau, tức là khoảng 22,32% thì số chủng RSV thu được năm 2019-2020 không vượt quá 20 chủng. Bên cạnh đó, RSV-B lại có số lượng mẫu dương tính nhỏ hơn rất nhiều so với RSV-A. Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh vừa có ít chủng RSV-A vừa không có chủng RSV-B nào phân lập thành công. Vấn đề này đặt ra sự không cân bằng khi chỉ giải trình tự chủng RSV.

Từ thực tế trên, cùng với kết quả phân lập với tỷ lệ không cao, sự không tương xứng giữa các chủng RSV theo phân nhóm, địa điểm, độ tuổi nghiên cứu, nhóm nghiên cứu đã tiến hành lựa chọn kết hợp cả chủng virus phân lập và mẫu bệnh phẩm hô hấp để tiến hành giải trình tự gen phục vụ cho các nghiên cứu sinh học phân tử tiếp theo. Việc lựa chọn mẫu mang tính đại diện sẽ đảm bảo cho kết quả về đặc điểm sinh học phân tử tiến hóa của RSV tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh trong giai đoạn 2017-2020 được thống nhất.

4.2.2.2. *Hiệu quả giải trình tự hệ gen virus*

Từ dữ liệu giải trình tự gen cho thấy, các chủng virus và bệnh phẩm hô hấp RSV được thực hiện giải trình tự gen thế hệ mới có kết quả tốt. Dù là bệnh phẩm hô hấp hay chủng phân lập thì cũng không có sự khác biệt về hiệu quả khuếch đại hệ gen RSV và giải trình tự gen. Các thông số kỹ thuật cho thấy các lần giải trình tự gen thành công, chất lượng mẫu thu được tốt, dữ liệu fastq của từng mẫu có Q30 trên 91%. Do đó, mỗi mẫu đều có số lượng đoạn đọc đủ lớn để phân tích và chất lượng từng đoạn đọc có độ chính xác cao, hạn chế sai sót/lỗi trong quá trình giải trình tự.

Trước đây, việc giải trình tự gen thế hệ mới sử dụng các môi không đặc hiệu chủ yếu để nghiên cứu quần thể vi sinh vật hoặc tìm tác nhân gây bệnh mới. Sử dụng môi không đặc hiệu cho giải trình tự gen một tác nhân cụ thể sẽ dẫn tới hiệu quả không cao, nhất là trên các mẫu bệnh phẩm lâm sàng [135]. Vì vậy, khi nghiên cứu hoặc chẩn đoán một tác nhân gây bệnh đã biết, giải trình tự các đoạn PCR khuếch đại trên các vùng gen đích (amplicon) sẽ mang lại hiệu quả cao hơn. Đây cũng là xu hướng trong nghiên cứu các bệnh truyền nhiễm và bệnh di truyền hiện nay [132].

Việc cần lựa chọn hệ thống môi PCR khuếch đại hệ gen của RSV bằng các đoạn DNA kích thước ngắn hơn là cần thiết để tăng hiệu quả của quá trình giải trình tự. Các nghiên cứu trên thế giới về giải trình tự gen các đối tượng cụ thể (cúm, SARS-CoV-2, sởi, sốt xuất huyết...) cho thấy có thể thực hiện giải trình tự dựa trên các đoạn amplicon [132], [136], [137]. Hiệu quả của việc giải trình tự nucleotide dựa trên PCR amplicon làm hiệu suất giải trình tự hệ gen tăng lên so với giải trình tự gen sử dụng môi không đặc hiệu [137]. Từ năm 2015, một số nghiên cứu đã sử dụng các cặp môi đặc hiệu để khuếch đại toàn bộ chiều dài hệ gen của RSV. Kích thước đoạn gen PCR từ 1kb đến 4,5kb tùy nghiên cứu [36]. Trung bình có từ 4 đến 20 cặp primer cho mỗi

phân nhóm. Các cặp primer này thiết kế để bao phủ toàn bộ chiều dài hệ gen từ vị trí nucleotide trước mã mở đầu của gen *NS1* tới sau mã kết thúc của gen *L* [138]. Với RSV, sự thay đổi chủ yếu xảy ra trên gen *G* và phân nhóm RSV cũng trên gen này nên nhiều nghiên cứu tập trung giải trình tự riêng gen *G* hoặc vùng HVR của gen *G* [18]. Để đánh giá sâu hơn ở cấp độ phân tử di truyền và tiến hoá của RSV vẫn cần giải trình tự hệ gen. Do vậy, xu hướng nghiên cứu RSV hiện nay và tương lai là giải trình tự hiệu quả hệ gen của virus, tối ưu hoá được quá trình này để tăng số lượng và chất lượng trình tự của gen.

Các nghiên cứu ở Việt Nam trước đây chủ yếu tập trung vào tỷ lệ dương tính RSV hoặc coi RSV như một trong những căn nguyên hô hấp để nghiên cứu. Đặc điểm sinh học phân tử cũng ít được nghiên cứu, chủ yếu trên vùng HVR mà ít có nghiên cứu phân tích toàn bộ gen *G* và các vùng gen khác [46]. Nghiên cứu trên các bệnh nhân nhi tại thành phố Hồ Chí Minh năm 2010-2012 hay tại Nha Trang 2012-2016 cũng đều chỉ giải trình tự vùng HVR của gen *G* [81], [83]. Chỉ có nhóm nghiên cứu của Lien Anh Ha Do và cộng sự là có sử dụng giải trình tự hệ gen của RSV để phân tích [139]. Đây cũng là ấn phẩm khoa học duy nhất công bố kết quả giải trình tự hệ gen của RSV tại Việt Nam cho tới nay. Tuy nhiên, những mẫu này lại thu thập trước năm 2012 và ở thành phố Hồ Chí Minh nên chỉ phản ánh được các chủng lưu hành cách đây đã lâu và tại một địa phương cụ thể.

Khác với các nghiên cứu trên, kết quả trình bày trong luận án này là kết quả bước đầu của nghiên cứu đặc điểm di truyền của RSV tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh trong bốn năm 2017-2020. Dù thu thập mẫu tại hai địa điểm nghiên cứu nhưng Bệnh viện Nhi Trung ương là đơn vị nhận bệnh nhân tuyến cuối ở miền Bắc, tập trung trẻ bị bệnh về hô hấp từ tất cả 28 tỉnh thành miền Bắc, nguồn mẫu đa dạng không phải từ một địa phương cụ thể nên mang tính đại diện cho cả khu vực. Việc lựa chọn mẫu giải trình tự từ chủng phân lập và bệnh phẩm hô hấp để đảm bảo tính đại diện về phân nhóm RSV, thời gian, địa điểm lấy mẫu, độ tuổi của trẻ. Kết quả phân tích đủ lớn để phản ánh được xu hướng thực tế của RSV tại thời điểm nghiên cứu. Giải trình tự gen thể hệ mới bằng môi đặc hiệu khuếch đại các đoạn DNA của hệ gen RSV tương tự như nhiều nghiên cứu trên thế giới gần đây đảm bảo cho kết quả có độ tin cậy.

Việc phân tích kết quả giải trình tự gen bằng các phần mềm bản quyền thương mại đảm bảo sự chính xác, khách quan của dữ liệu. Trung vị độ sâu bao phủ của các reads qua mỗi nucleotide đều đạt trung bình 2000X-4000X, không có khoảng trống trong hệ gen của mẫu là minh chứng cho thấy hiệu quả của giải trình tự gen thành công. Các trình tự này cũng được công bố và lưu trữ trên cơ sở dữ liệu GISAID với

mã định danh cho từng chủng. Do vậy, các trình tự thu được này có độ tin cậy cao và hoàn toàn phù hợp để phân tích đặc điểm di truyền tiến hóa phân tử của RSV.

4.2.3. Đặc điểm hệ gen của virus hợp bào hô hấp

Các gen mã hóa protein ở hai phân nhóm RSV được xác định vị trí trên hệ gen từ nucleotide đầu tiên tới nucleotide cuối cùng. Chiều dài của từng gen theo nucleotide và axit amin cũng được đưa ra ở cả hai phân nhóm. Giữa các mẫu có thể có sự tương đồng hoặc khác nhau nên vị trí bắt đầu/kết thúc của gen cũng như chiều dài có sự khác biệt. Vùng liên gen do đó cũng có sự khác nhau. Tuy nhiên trong nghiên cứu này, chúng tôi chỉ tập trung vào các gen mã hóa protein mà không phân tích vùng liên gen, vùng dẫn dắt và vùng đuôi của hệ gen. Đây là lần đầu tiên các vị trí này của RSV thu thập tại miền Bắc Việt Nam được công bố.

Do lựa chọn hệ thống môi tạo các amplicon khác nhau và trình tự tham chiếu khác nhau nên vị trí bắt đầu của gen *NS1* (gen đầu tiên trong hệ gen) của hai phân nhóm khác nhau, RSV-A bắt đầu từ vị trí nucleotide 25 đến 70 còn RSV-B bắt đầu từ vị trí nucleotide 52 đến 57. Sự khác biệt vị trí bắt đầu của nucleotide còn tùy thuộc vào vùng dẫn dắt của từng mẫu. Tuy nhiên, dù vị trí mở đầu khác nhau nhưng chiều dài gen *NS1* của hai phân nhóm vẫn là 420 nucleotide (hay 140 axit amin). Tương tự như vậy, các gen *NS2*, *N*, *P*, *M*, *F* và *M2-2* của hai phân nhóm đều có chiều dài giống nhau. Gen *SH* của RSV-B có nhiều hơn 3 nucleotide so với RSV-A nên chiều dài protein là 66 axit amin (RSV-B) so với 65 axit amin (RSV-A). Gen *M2-1* và *L* của phân nhóm RSV-B cũng nhiều hơn 3 nucleotide so với RSV-A nên chiều dài protein cũng nhiều hơn 1 axit amin. Đây là xu hướng bình thường do RSV-A và RSV-B thuộc các kiểu gen khác nhau [20].

Sự khác nhau rõ rệt giữa hai phân nhóm được thấy trên gen *G*, gen có nhiều sự biến đổi và được tập trung nghiên cứu nhiều nhất. Gen *G* ở RSV-A dài 894 hoặc 897 nucleotide tương ứng với 298 hoặc 299 axit amin. Trong khi đó, RSV-B có chiều dài gen *G* là 933 hoặc 954 nucleotide, tương ứng với 311 hoặc 318 axit amin. Lý giải cho sự khác biệt này là do RSV-A trong nghiên cứu thuộc kiểu gen ON1 và non-ON1 đều không có 72 nucleotide lặp lại ở vùng HVR. Ngược lại, RSV-B được giải trình tự gen thuộc kiểu gen BA9, có 60 nucleotide lặp lại ở vùng HVR. Kết quả này cũng được thấy rõ trong Bảng 3.8 thể hiện các biến thể và vị trí của chúng trong hệ gen của gen *G*.

Như đã đề cập phía trên, các gen *NS1*, *NS2*, *M* có chiều dài giống nhau ở hai phân nhóm và cũng có độ tương đồng cao về trình tự axit amin giữa các mẫu với nhau. Tuy nhiên, RSV-B có độ bảo thủ cao hơn RSV-A, tốc độ tiến hóa nói chung cũng chậm hơn RSV-A nên ít có sự khác biệt về axit amin hơn [35]. Các gen còn lại cũng có số lượng đột biến của RSV-A nhiều hơn RSV-B, đặc biệt là gen *G* (Bảng 3.9).

Kết quả phân tích các đoạn gen cho thấy, gen *G* có tốc độ thay đổi đáng kể so với các gen khác, rất phù hợp với nhiều nghiên cứu đã được thực hiện. Các gen khác cũng thay đổi nhưng tốc độ chậm hơn và không nhiều đột biến bằng gen *G* [14]. Do vậy, phân tích đặc điểm phân tử tiến hóa của các gen khác gen *G* trong hệ gen RSV ít được thực hiện. Ngoài ra, giải trình tự gen truyền thống chủ yếu tập trung vào gen *G* (vùng HVR), một số giải trình tự vùng gen *F* và *SH* [72]. Do đó, giải trình tự gen toàn bộ hệ gen RSV không chỉ giúp nghiên cứu xác định kiểu gen dựa vào gen *G*, đánh giá phát triển kháng thể đơn dòng, tạo các loại vaccine tái tổ hợp trên gen *F* và *SH* mà còn giúp đánh giá mối tương tác toàn diện của các gen với nhau, các yếu tố phân tử quyết định kiểu gen mà không phải chỉ mình gen *G*.

Nghiên cứu về giải trình tự hệ gen của RSV Việt Nam đầu tiên được thực hiện trên các mẫu thu thập tại Hồ Chí Minh năm 2009-2010 [139] cũng cho kết quả tương tự như nghiên cứu này. Chiều dài các protein của hai phân nhóm RSV gần như tương đương nhau trừ gen *G*. Mặc dù trong nghiên cứu ở Hồ Chí Minh kiểu gen RSV-A là NA1 và GA5, còn kiểu gen của nghiên cứu này là ON1 và non-ON1 nhưng chiều dài 9/11 gen mã hóa protein giống nhau. Sự sai khác về chiều dài nucleotide/axit amin được thấy ở gen *M2-2* và gen *G*. Trong nghiên cứu này gen *M2-2* dài 273 nucleotide còn nghiên cứu tại Hồ Chí Minh là 267 nucleotide, có 6 nucleotide khác biệt tương ứng với chiều dài 2 axit amin. Gen *G* trong nghiên cứu ở Hồ Chí Minh chỉ có một chiều dài 894 nucleotide còn nghiên cứu của chúng tôi có hai chiều dài khác nhau là 894 nucleotide và 897 nucleotide. Với RSV-B kiểu gen lưu hành là BA9 và BA10 tại Hồ Chí Minh còn trong nghiên cứu này là BA9. Sự khác nhau về chiều dài gen chỉ thấy trên gen *G*. Trong kết quả của Hồ Chí Minh gen *G* dài 939 nucleotide còn nghiên cứu này là 933 nucleotide và 954 nucleotide. Các kết quả này cho thấy, chiều dài các gen dường như không bị ảnh hưởng bởi kiểu gen khác nhau trừ gen *G*. Do vậy, gen *G* vẫn là đích nghiên cứu tập trung khi muốn tìm hiểu về RSV do sự biến đổi liên tục của nó.

Thực tế là các nghiên cứu về RSV ở Việt Nam rất ít. Các phân tích giải trình tự gen càng không nhiều [46]. Theo như tìm hiểu của chúng tôi, tính đến nay ở Việt Nam mới chỉ có hai công bố về giải trình tự hệ gen RSV. Đầu tiên là nghiên cứu thực hiện tại thành phố Hồ Chí Minh trên các mẫu thu thập năm 2009-2010 [139], là đại diện cho các mẫu RSV tại miền Nam và chưa có thêm bất kỳ một công bố nào giải trình tự gen RSV dù chỉ là vùng HVR của gen này từ năm 2015 đến nay. Kết quả giải trình tự gen RSV của luận án này là công bố đầu tiên và duy nhất về giải trình tự gen RSV trên các mẫu thu thập tại miền Bắc Việt Nam [125], [140]. Miền Trung chưa có công bố giải trình tự hệ gen RSV, chỉ có các kết quả giải trình tự vùng HVR của gen *G* trên các mẫu giai đoạn 2010-2012 [87]. Kể từ đó không có thêm nghiên cứu nào

về RSV được thực hiện. Thực tế này cho thấy khoảng trống trong các nghiên cứu về đặc điểm sinh học phân tử của RSV tại Việt Nam là rất lớn và chưa được quan tâm như các quốc gia khác tại châu Á cũng như trên thế giới.

4.2.4. Đặc điểm sinh học phân tử và tiến hóa của RSV-A

4.2.5.1. Đặc điểm sinh học phân tử của RSV-A

Nghiên cứu đặc điểm sinh học phân tử của RSV-A thường dựa chủ yếu vào các đặc điểm của gen *G*. Gen *G* mã hóa protein G có cấu trúc thay đổi liên tục theo thời gian và trình tự được sử dụng trong các phân tích di truyền và tiến hóa [26], [38]. Sự thay đổi của gen *G* diễn ra chủ yếu ở vùng siêu biến đổi HVR I và HVR II, tạo ra các nhóm kháng nguyên khác nhau của RSV (được gọi là RSV-A và RSV-B). Đây cũng chính là hai phân nhóm di truyền của RSV [11]. Vì vậy, phân tích các đặc điểm sinh học phân tử và tiến hóa của gen *G* chính là phân tích đặc điểm sinh học phân tử và tiến hóa của RSV.

Trong nghiên cứu này, tất cả các mẫu RSV-A giải trình tự gen tại Việt Nam giai đoạn 2017-2020 đều không có 72 nucleotide lặp lại ở vùng HVR trên gen *G* [125], [140]. Dù thuộc kiểu gen ON1 hay non-ON1 thì vẫn không có vùng lặp này. Kiểu gen ON1 có nguồn gốc từ kiểu gen NA1, được xác định ở Canada năm 2010 và đặc trưng bởi sự sao chép 72 nucleotide ở vùng HVR II của gen *G* [141]. Vì vậy, đa số các trình tự RSV-A của Việt Nam dù không có 72 nucleotide lặp lại mà vẫn được phân loại là kiểu gen ON1 trên cây phát sinh gia hệ gen *G* là một điều đặc biệt [140].

Tabatabai và cộng sự đã đề cập tới việc mất đoạn sao chép 72 nucleotide lặp lại ở kiểu gen ON1 trong nghiên cứu trên bệnh nhân mắc bệnh về máu [142]. Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu quá trình tiến hóa của RSV ở Đài Loan trong 20 năm cũng cho thấy sự pha trộn của các chủng RSV có đoạn lặp lại 72 nucleotide và không có đoạn lặp lại trên cây phát sinh chủng loại của kiểu gen ON1 [143]. Điều này cho thấy, các trình tự RSV-A không có đoạn lặp lại được xác định là kiểu gen ON1 trên cây phát sinh chủng loại không chỉ có ở Việt Nam mà còn ở nhiều nước từ các năm trước đây. Hơn nữa, việc phân loại RSV cho thấy sự chông chéo giữa các kiểu gen ON1 và NA1 cho thấy một vùng trung gian bao gồm cả trình tự có và không có 72 nucleotide lặp lại [10], [143]. Do vậy, việc cần thiết hiện nay là nên xây dựng một định nghĩa kiểu gen mới dựa trên cả phân tích đặc điểm di truyền, khác biệt axit amin và cây phát sinh chủng loại. Ngoài ra, việc tính toán *p*-distance của các nhóm trình tự trên cây phát sinh chủng loại để làm căn cứ xác định khoảng cách di truyền tiến hóa đang là xu hướng được nhiều nhà khoa học lựa chọn khi xác định các kiểu gen của RSV [10].

Trong số 53 trình tự thuộc kiểu gen RSV-A ON1 được chia thành 4 lineage và có các thay đổi axit amin đặc trưng cho từng lineage này. Lineage 1 có nhiều trình tự

RSV-A nhất (29 trình tự) được thu thập trong cả 4 năm nghiên cứu. Lineage 1 cũng có 3 khác biệt axit amin so với trình tự chủng chuẩn kiểu gen ON1 tại vị trí tạo cấu trúc kẹp tóc HBD (T200P và P215L) và HVR II (N255D) [9]. Tuy nhiên các vị trí axit amin này không phải là vị trí quan trọng và có mặt trên tất cả các mẫu nên không có nhiều ảnh hưởng tới các đặc tính di truyền. Số lượng trình tự nhiều, trải dài trong các năm nghiên cứu, các điểm lấy mẫu đều có đại diện chứng tỏ lineage 1 là nhóm ưu thế và phổ biến ở Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh giai đoạn 2017-2020. Kết quả tương tự cũng thấy ở các chủng thể giới lưu hành cùng thời điểm như Đài Loan [11], [37] và Ý [144].

Lineage 2 dù chỉ có 5 trình tự RSV-A của Việt Nam nhưng lại có đặc điểm di truyền khác biệt. Các trình tự thuộc lineage này ngoài đặc trưng bởi đột biến H304Y thì có sự thay đổi axit amin từ stop codon thành glycine (stop322G). Do vậy các trình tự này nhiều hơn 1 axit amin so với các trình tự Việt Nam khác. Đột biến H304Y được cho là có ảnh hưởng đáng kể đến khả năng gây bệnh và phản ứng miễn dịch của RSV do nằm gần vị trí kháng nguyên (axit amin 265-273) [145]. Hơn nữa, các mẫu của Việt Nam thuộc lineage này đều thu thập từ cuối năm 2019 và năm 2020, cùng thời điểm với các chủng lưu hành tại Myanmar [146], Trung Quốc, Thái Lan [37]. Như vậy, xu hướng lưu hành các chủng RSV tại nghiên cứu này là tương tự như nhiều quốc gia trong khu vực Châu Á.

Lineage 3 cũng gồm đa số các mẫu thu thập tại Việt Nam năm 2019-2020 và có số lượng đột biến nhiều nhất, 5 thay đổi về axit amin. Trong đó, 4/5 đột biến thuộc vùng HVR I và HVR II của gen *G*, 1 đột biến (H290L) thuộc vùng 72 nucleotide lặp lại. Các thay đổi này tương tự như các trình tự của Đài Loan 2020 [11]. Lineage 2 và lineage 3 gồm đa số các trình tự năm 2019-2020 trong nghiên cứu, điều này đặt ra giả thuyết các mẫu của Việt Nam thu thập năm 2019-2020 được chia ra thành 2 lineage chính (lineage 2 và lineage 3) với các đột biến đặc trưng khác nhau và cũng theo xu hướng chung của các quốc gia xung quanh.

Lineage 4 gồm chủ yếu các mẫu thu thập năm 2017-2018 và có hai thay đổi axit amin trên các vùng HVR khác nhau. Như vậy, các mẫu của Việt Nam năm 2017-2018 cũng chia thành 2 lineage chính (lineage 1 và lineage 4). Hai lineage này cũng gồm đa số các trình tự tham khảo của thế giới năm 2017 và 2018.

Lineage 5 là lineage duy nhất không thuộc kiểu gen ON1 mà thuộc kiểu gen non-ON1 với 3 trình tự năm 2018-2019 đều có nguồn gốc từ Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh. Sự khác biệt axit amin của lineage này với trình tự chủng chuẩn kiểu gen ON1 cũng là nhiều nhất trong số các lineage với 8 đột biến. Tuy nhiên các đột biến này thuộc N-terminal và đều nằm trên vị trí xuyên màng virus mà không phải thuộc vùng ectodomain ngoại bào [1], [9]. Do đó không ảnh hưởng tới chức năng lây

nhễm của virus. Tuy nhiên, nếu chỉ phân tích vùng ectodomain hoặc HVR của gen *G* như đại đa số nghiên cứu đang thực hiện thì 3 trình tự của lineage này sẽ tương tự như các trình tự khác của Việt Nam chỉ có khác biệt đáng kể ở 72 nucleotide lặp lại. Vì vậy 3 trình tự này sẽ được phân loại trên cây phát sinh chủng loại là kiểu gen ON1 [140]. Điều này cho thấy sự khác biệt khi xem xét đặc tính di truyền của RSV trên một phần gen *G* và trên toàn bộ chiều dài gen *G* là rất khác nhau. Sự cần thiết của việc giải trình tự toàn bộ gen *G* là xu hướng phân tích để đảm bảo sự toàn diện, tính chính xác của các thay đổi sinh học phân tử, tiến hóa của RSV.

Các nghiên cứu trước đây ở Việt Nam chỉ tập trung vào giải trình tự vùng HVR của gen *G* mà hiếm khi giải trình tự toàn bộ chiều dài gen *G* hay hệ gen [46]. Do vậy, trình tự tham khảo từ Việt Nam trong quá khứ trên cây phát sinh chủng loại không nhiều, địa điểm thu thập là miền Trung và thời điểm thu mẫu đã lâu, chủ yếu là kiểu gen ON1 năm 2012. Các trình tự này lại không thuộc bất kỳ lineage nào của Việt Nam trong nghiên cứu này. Sự khác biệt về thời gian, địa điểm thu mẫu đã tạo ra sự khác biệt di truyền đáng kể khi so sánh các trình tự này với trình tự trong nghiên cứu (Hình 3.12). Các trình tự Việt Nam trước đây có đủ chiều dài gen *G* để phân tích lại thuộc kiểu gen NA1. Do vậy, ngoài việc cùng kiểu gen ON1 thì các trình tự của Việt Nam từ trước tới nay không có nhiều điểm chung, khoảng cách di truyền trên cây phát sinh chủng loại là khá lớn. Khoảng trống nghiên cứu trong hệ gen RSV nói chung và RSV-A nói riêng tại Việt Nam là khá lớn so với các nước khác trên thế giới và các quốc gia xung quanh. Xây dựng hệ thống giám sát sự lưu hành và phân tích đặc điểm di truyền của RSV tại Việt Nam là vấn đề cấp thiết trong giai đoạn hiện nay để có dữ liệu đầy đủ đánh giá khách quan và toàn diện về loại virus gây viêm đường hô hấp thường gặp này cũng như gánh nặng bệnh tật mà nó gây ra cho cộng đồng.

4.2.5.2. Động lực tiến hóa của RSV-A

Các mẫu RSV-A của Việt Nam trong nghiên cứu được chia thành 5 lineage trên cây phát sinh chủng loại và khoảng cách di truyền của các lineage này với nhau cũng rất khác nhau. Do cùng một kiểu gen ON1, lineage 1-4 có sự khác biệt tiến hóa giữa chúng không nhiều, *p*-distance dao động từ 0,0185-0,0315. Ngược lại, lineage 5 do không cùng kiểu gen với 4 lineage còn lại nên sự khác biệt tiến hóa khá lớn, từ 0,0761 tới 0,0876. Khoảng cách di truyền này là đủ lớn để xác định là một kiểu gen mới dựa trên giá trị trung bình khoảng cách di truyền giữa các kiểu gen của RSV-A với giá trị ngưỡng là 0,049 [147]. Giá trị *p*-distance của lineage 5 so với các trình tự trên cây phát sinh chủng loại kiểu gen ON1 (chỉ gồm các chủng tham khảo của thế giới), NA1, NA2, GA1, GA2 luôn lớn hơn 0,06. Giá trị xác suất hậu nghiệm của lineage 5 với các nhóm khác tại điểm node phân tách bằng 1. Điều này chứng tỏ sự

khác biệt di truyền tương đối lớn và có ý nghĩa giữa 3 mẫu của Việt Nam thuộc lineage 5 so với các kiểu gen còn lại trên cây phát sinh chủng loại.

Để xác định kiểu gen, phân nhóm di truyền mà lineage 5 có thể được phân loại cần có thêm các phân tích sâu hơn về đặc điểm di truyền và so sánh với nhiều trình tự tham khảo của thế giới và các quốc gia lân cận cùng thời điểm thu mẫu. Kết quả trong luận án chỉ là bước đầu xác định sự khác biệt của ba trình tự này về đặc điểm di truyền và tiến hóa của chúng. Ngoài ra, việc bổ sung thêm kết quả giải trình tự gen các mẫu từ Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh năm 2018-2019 để xác định thêm các mẫu tương tự cũng là một hướng nghiên cứu đáng được cân nhắc, góp phần phân tích sự đa dạng kiểu gen của RSV ở Việt Nam.

Kiểu gen ON1 lần đầu xuất hiện và được báo cáo vào năm 2010, được cho là có nguồn gốc từ kiểu gen NA1 có thêm 72 nucleotide lặp lại ở vùng HVR của gen *G* [114], [148]. Ước tính thời gian cho tổ tiên chung gần nhất trên cây phát sinh gia hệ (tMRCA) trong nghiên cứu này chỉ ra rằng kiểu gen ON1 đã tiến hóa từ kiểu gen NA1 vào khoảng năm 2007 (95% HPD: 2004-2009) (Hình 3.12). Các chủng ON1 lần đầu tiên được tìm thấy ở Việt Nam vào năm 2012 [149] và dữ liệu của nghiên cứu chỉ ra rằng kiểu gen ON1 đã phân tách từ kiểu gen NA1 trong 5 năm trước khi trường hợp được báo cáo đầu tiên [80]. Kết quả phân tích của hai nghiên cứu dù trên các vùng gen khác nhau (ORF và HVR của gen *G*), hai quần thể mẫu khác nhau (miền Bắc và Nha Trang), thời điểm thu mẫu khác nhau (2017-2020 và 2010-2012) nhưng đều chỉ ra cùng một ước tính về tMRCA của kiểu gen ON1 là năm 2007. Điều này cho thấy khả năng rất cao là kiểu gen ON1 của Việt Nam thực sự phân tách từ kiểu gen NA1 vào khoảng năm 2007.

Một nghiên cứu khác thu mẫu tại 5 bệnh viện đại diện cho 5 tỉnh từ miền Bắc đến miền Nam cho thấy tMRCA trung bình đối với kiểu gen RSV-A ON1 nói chung là 2008.1 (95%HPD: 2008-2009) [83]. Ước tính này là muộn hơn so với hai nghiên cứu trên nhưng vẫn sớm hơn so với các tính toán về thời điểm xuất hiện tổ tiên chung gần nhất ở Myanmar [38], Hàn Quốc [114]. Mặt khác, các ước tính về tMRCA của kiểu gen ON1 xuất phát từ kiểu gen NA1 vào khoảng năm 2007 lại phù hợp với các nghiên cứu được thực hiện ở Bangladesh [150], tây bắc Trung Quốc và Philippines [99]. Như vậy, ước tính về thời điểm phân tách của kiểu gen ON1 trong nghiên cứu là tương tự với nhiều quốc gia trên thế giới. Tuy có sự sai khác với một số quốc gia khác nhưng có thể do sự khác biệt về địa lý, phân nhóm lưu hành chiếm ưu thế hoặc cách tính toán và các thông số cài đặt tính toán khác nhau dẫn đến sự sai khác về thời điểm.

Tốc độ tiến hóa phân tử của các chủng ON1 tại Nha Trang năm 2010-2012 [87] được ước tính là $2,55 \times 10^{-2}$ thay thế/vị trí/năm và nhanh hơn so với nghiên cứu

tại này là $1,32 \times 10^{-3}$ thay thế/vị trí/năm. Tuy nhiên, nghiên cứu này sử dụng vùng HVR của gen *G* để tạo cây phát sinh chủng loại và tính toán tốc độ tiến hóa thay vì toàn bộ gen *G* như trong nghiên cứu của luận án. Có một số công bố chỉ ra rằng tốc độ tiến hóa của vùng HVR nhanh hơn các vùng khác và toàn bộ gen [10], [11]. Do vậy, kết quả của Nha Trang nhanh hơn của nghiên cứu này về tốc độ tiến hóa của kiểu gen ON1 là điều dễ hiểu.

Khi so sánh với các quốc gia khác, tốc độ tiến hóa phân tử của RSV kiểu gen ON1 nhanh hơn được ghi nhận ở Myanmar ($1,39 \times 10^{-2}$ thay thế/vị trí/năm) [38] và đông bắc Trung Quốc ($1,26 \times 10^{-2}$ thay thế/vị trí/năm) [151]. Trong trường hợp của New South Wales, tốc độ tiến hóa trung bình là $7,06 \times 10^{-4}$ thay thế/vị trí/năm [152] và thấp hơn so với nghiên cứu của luận án. Khi tính toán với bộ dữ liệu toàn cầu, ước tính tốc độ tiến hóa là $5,72 \times 10^{-4}$ thay thế/vị trí/năm [153]. Kết quả này cho thấy tốc độ tiến hóa chung kiểu gen ON1 của thế giới chậm hơn so với tốc độ các mẫu ở nghiên cứu này. Mặt khác, báo cáo trước đây của Hirano và cộng sự đã chỉ ra rằng tốc độ tiến hóa phân tử của kiểu gen ON1 ở Nhật Bản và các quốc gia châu Á khác được ước tính là $2,03 \times 10^{-3}$ (thay thế/vị trí/năm) [148]. Nghiên cứu ở Bangladesh cho thấy tốc độ tiến hóa của kiểu gen ON1 là $2,07 \times 10^{-3}$ (thay thế/vị trí/năm) [150]. Các công bố này cho thấy tốc độ tiến hóa là tương tự với tốc độ của RSV-A tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh giai đoạn 2017-2020. Như vậy, các trình tự của RSV-A kiểu gen ON1 thu thập trong nghiên cứu này tiến hóa với tốc độ chậm hơn so với trước đây và ở một số quốc gia nhưng lại tương tự như một số quốc gia châu Á khác và nhanh hơn khi so sánh trên phạm vi toàn cầu.

Do sự khác biệt về độ dài của trình tự gen *G* được phân tích (vùng HVR, ectodomain, ORF), thời điểm thu mẫu và phân nhóm RSV chiếm ưu thế nên dẫn tới sự khác biệt về tốc độ tiến hóa phân tử khá rõ ràng [154]. Ngoài ra, sự khác biệt về tính thời vụ của RSV ở các vùng khí hậu nhiệt đới và ôn đới cũng có thể đóng một vai trò quan trọng trong quá trình tiến hóa của virus [35], [155]. Vì vậy, việc giám sát với các quần thể dân số lớn hơn sẽ là cần thiết để hiểu rõ hơn về các đặc điểm tiến hóa phân tử của RSV tại từng quốc gia và trên phạm vi toàn cầu.

4.2.5. Đặc điểm sinh học phân tử và tiến hóa của RSV-B

4.2.5.1. Đặc điểm sinh học phân tử của RSV-B

Cây phát sinh chủng loại của phân nhóm RSV-B khác với RSV-A là có các trình tự của Việt Nam trước đây là trình tự tham khảo, các trình tự này cùng kiểu gen với kết quả của nghiên cứu. Điều này cho thấy, sự ít biến đổi về đặc điểm sinh học phân tử của phân nhóm RSV-B so với RSV-A.

Tất cả 50 mẫu thu thập tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh năm 2017-2020 được giải trình tự có kết quả phân tích phát sinh

chủng loại thuộc kiểu gen BA9. Kiểu gen BA9 có nguồn gốc từ kiểu gen BA, lần đầu được công bố năm 1999 ở Argentina và có 60 nucleotide lặp lại trên vùng HVR của gen *G* [26], [35]. Kể từ đó, các kiểu gen BA (BA1-BA14) chiếm ưu thế trên toàn thế giới [14]. Trên phạm vi toàn cầu, từ năm 2015 kiểu gen BA9 trở thành kiểu gen phổ biến duy nhất của phân nhóm RSV-B [154]. Kiểu gen BA9 được phát hiện từ những năm 2009 trên các mẫu thu thập tại miền Nam Việt Nam. Cho tới nay, kiểu gen này vẫn là kiểu gen chủ đạo của các chủng RSV-B [81].

Trên cây phát sinh chủng loại RSV-B kiểu gen BA9, các mẫu của nghiên cứu này được phân nhóm vào 3 lineage. Khác với RSV-A, các trình tự thu thập năm 2020 của RSV-B chủ yếu nằm trong lineage 1 này mà không chia thành 2 lineage. Điều này cho thấy tính ổn định về mặt di truyền của RSV-B là tương đối tốt hơn so với RSV-A [114], [156]. Lineage 1 RSV-B cũng gồm các mẫu có chiều dài 312 axit amin, ngắn hơn so với trình tự chủng chuẩn BA của Argentina năm 1999 là 3 axit amin. Lineage 1 cũng ghi nhận 4 thay thế axit amin trên cả hai vùng HVR của gen *G*. Trong đó đột biến T290I và T312I cũng được báo cáo trong các nghiên cứu khác trên các chủng BA9 tạo thành các lineage đặc trưng lưu hành năm 2018-2019 [156]. Do vậy, đây là hai biến thể chỉ điểm tạo thành các lineage mới của kiểu gen BA9 với các mẫu thu thập từ sau năm 2018 [155].

Lineage 2 gồm chủ yếu các mẫu thu thập năm 2017-2018 và không có biến thể đặc trưng cho lineage này. Các trình tự tham khảo của thế giới cùng thời điểm có nguồn gốc từ Argentina, Mông Cổ, Úc, Hà Lan,... cho thấy sự đa dạng và phổ biến của lineage này [140]. Tuy nhiên, dù không có sự phân hóa sâu sắc như RSV-A, các trình tự của RSV-B kiểu gen BA9 dường như có sự phân hóa theo thời gian, các chủng cùng khoảng thời gian thu thập có xu hướng tập trung vào các nhóm tương ứng với nhau [154].

Lineage 3 gồm các mẫu thu thập năm 2017-2019 của nghiên cứu. Ngoài ra còn có 1 mẫu của Việt Nam năm 2015 trong nghiên cứu trước đây cũng thuộc lineage này. Lineage 3 của RSV-B được đặc trưng bởi đột biến L286P trên gen *G*. Bên cạnh đó, các mẫu trong lineage này cũng có chiều dài 319 axit amin thay vì 315 axit amin như chủng chuẩn kiểu gen BA do xuất hiện đột biến từ stop codon thành Glutamin (stop316Q) (Hình 3.21). Vì vậy, 13 trình tự RSV-B kiểu gen BA9 lineage 3 của Việt Nam 2017-2019 có chiều dài protein G nhiều hơn 7 axit amin so với 37 trình tự còn lại. Chiều dài gen *G* của RSV-B khác nhau cũng được ghi nhận trong các nghiên cứu tại Myanmar [38], Ấn Độ [157], Ả Rập [145].

Dù cây phát sinh gia hệ RSV-B kiểu gen BA9 so với cây phát sinh gia hệ RSV-A có nhiều các trình tự tham khảo của Việt Nam trước đây hơn, thời điểm thu mẫu cũng gần hơn và trải dài nhiều năm (2009-2015 so với 2011-2012) nhưng khoảng

cách di truyền giữa các trình tự trong quá khứ và của nghiên cứu này vẫn là rất lớn. Các mẫu của Việt Nam trước đây đều thuộc kiểu gen BA9 nhưng thuộc các phân nhóm khác, không nằm trong lineage 1-3. Chỉ có duy nhất một mẫu năm 2015 là thuộc lineage 3 gồm các mẫu thu thập năm 2017-2018. Vì vậy, dù cùng kiểu gen BA9, các chủng RSV của Việt Nam có xu hướng chia thành các phân nhóm/lineage khác nhau theo từng giai đoạn.

4.2.5.2. Động lực tiến hóa của RSV-B

Do cùng thuộc kiểu gen BA9, nên các phân tích động lực tiến hóa của RSV-B chỉ tập trung vào các trình tự trong cùng kiểu gen mà không so sánh đa dạng như RSV-A. Sự khác biệt di truyền giữa các trình tự trong nghiên cứu với các trình tự tham khảo của thế giới là không cao, p -distance=0,0236. Giá trị này tương tự như sự khác biệt di truyền giữa các mẫu của nghiên cứu với các mẫu tham khảo thế giới của kiểu gen ON1 tại Việt Nam. Khi phân tích khoảng cách di truyền của kiểu gen BA9 các nghiên cứu khác trên thế giới cũng đưa ra giá trị tương tự [155].

Tuy nhiên, khi so sánh giữa các trình tự của Việt Nam trong nghiên cứu này với các chủng lưu hành trước đây, sự khác biệt tiến hóa dao động từ 0,0399 đến 0,0418. Giá trị này cao hơn hẳn p -distance của các mẫu trong nghiên cứu với các chủng tham khảo thế giới trong kiểu gen BA9 (Bảng 3.11). Lý giải cho điều này là do tuy cùng thuộc kiểu gen BA9 nhưng như phân tích ở trên, các trình tự của Việt Nam trước đây thuộc phân nhóm khác. Giá trị xác suất hậu nghiệm tại điểm phân tách các trình tự của nghiên cứu với phần còn lại của cây phát sinh chủng loại (gồm cả các mẫu Việt Nam trước đây) có giá trị bằng 1, được đặc trưng bởi 5 đột biến trên gen *G*. Kiểu gen BA9 được phân tích là chia thành hai cluster lớn dựa trên sự thay thế axit amin tại các vị trí 107, 136 và 254 của protein *G* [158]. Ba vị trí này lại nằm trong số 5 đột biến tạo thành nhánh bao gồm các trình tự của Việt Nam năm 2017-2020. Vì vậy, sự khác biệt di truyền được củng cố bởi giá trị xác suất hậu nghiệm, p -distance và các biến thể đặc trưng đã chỉ ra các trình tự của Việt Nam từ năm 2014 trở về trước thuộc cluster khác với các trình tự trong nghiên cứu này.

Mặc dù các trình tự RSV-B trong nghiên cứu được chia thành 3 lineage nhưng không thực sự rõ ràng như của RSV-A. Giá trị xác suất hậu nghiệm phân tách lineage 1 với phần còn lại của cây phát sinh chủng loại bằng 1 nhưng của lineage 2 và lineage 3 lại nhỏ hơn 0,7. Lineage 1 và lineage 3 có các đột biến đặc trưng cho từng lineage nhưng lineage 2 thì không có. Như vậy chỉ có lineage 1 là vừa có giá trị xác suất hậu nghiệm đủ lớn và biến thể đặc trưng để củng cố sự khác biệt tiến hóa so với phần còn lại của cây phát sinh chủng loại. Hai lineage còn lại chỉ là sự phân nhánh tạm thời và có thể chỉ mang tính theo thời gian như các phân tích phía trên.

Kiểu gen BA9 lần đầu tiên được phát hiện ở Việt Nam trong nghiên cứu thực hiện tại thành phố Hồ Chí Minh năm 2009 [139]. Cùng lưu hành với kiểu gen BA9 khi đó còn có kiểu gen BA10. Hai kiểu gen này tiếp tục phổ biến ở Hồ Chí Minh trong các năm 2010-2012 [81], [86]. Tại miền Trung Việt Nam, kiểu gen BA9 và BA10 cũng được phát hiện trong nghiên cứu của Yoshida và cộng sự năm 2010-2012 [111]. Nghiên cứu của Lu Lu và cộng sự giải trình tự gen RSV ở Đồng Tháp năm 2013-2015 chỉ thu được kiểu gen BA9 [83]. Từ đó tới nay, không có thêm bất kỳ nghiên cứu giải trình tự gen RSV-B nào được thực hiện ở Việt Nam. Trong nghiên cứu của chúng tôi cũng chỉ thu được một kiểu gen duy nhất của RSV-B là BA9 trong 4 năm. Điều này cũng phù hợp với xu hướng của thế giới khi nhận định từ sau năm 2015 kiểu gen BA9 trở thành kiểu gen phổ biến duy nhất của phân nhóm RSV-B [155].

Thời gian ước tính xuất hiện tổ tiên chung gần nhất trên cây phát sinh chủng loại của kiểu gen BA9 trong quần thể mẫu ở Đồng Tháp là khoảng năm 2010 (95% HPD: 2010-2011) [83]. Đây cũng là kết quả duy nhất về tMRCA của RSV-B ở Việt Nam cho tới nay. Tuy nhiên trong nghiên cứu của chúng tôi, tMRCA của kiểu gen BA9 là năm 2005 (95% HPD: 2003-2007). Ước tính này cách khá xa so với ước tính của Lu Lu và cộng sự. Theo các nghiên cứu trên thế giới thời gian xuất hiện của kiểu gen BA9 khá sớm. Một số quốc gia có cùng thời gian ước tính với nghiên cứu này như Argentina (2004) [154], các quốc gia Bắc Âu (2004), Mỹ (2005) [157], Nhật Bản (2005) [159], Malaysia (2006) [160]. Một số nước có ước tính thời gian xuất hiện kiểu gen BA9 muộn hơn như Ấn Độ (2009) [161], Iran (2009), Myanmar (2009) [162], Ả Rập (2014) [100].

RSV-A được đánh giá là nguy hiểm hơn RSV-B do khả năng lây nhiễm và gây bệnh nặng hơn, thời gian nằm viện lâu hơn ở trẻ em [111]. Vì vậy, trên thế giới xu hướng RSV-A được tập trung nghiên cứu nhiều hơn RSV-B và Việt Nam cũng không phải ngoại lệ. Nếu như RSV-A có nghiên cứu đề động lực tiến hóa được thực hiện ở cả miền Trung [87] và miền Nam [83], [139] thì RSV-B lại không có tính toán nào về tốc độ tiến hóa phân tử từ trước tới nay. Các nghiên cứu chỉ thiết lập cây phát sinh chủng loại và phân tích phân nhóm di truyền, đưa ra được ước tính về thời gian xuất hiện tổ tiên chung gần nhất của kiểu gen BA9 [46], [125]. Vì vậy, kết quả trong nghiên cứu này về tốc độ tiến hóa phân tử của gen *G* RSV-B kiểu gen BA9 của các trình tự thu thập tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh giai đoạn 2017-2020 là kết quả duy nhất của Việt Nam được công bố từ trước tới nay.

Tốc độ tiến hóa phân tử gen *G* của kiểu gen BA9 ở Việt Nam là $8,29 \times 10^{-4}$ thay thế/vị trí/năm [95% HPD: $1,96 \times 10^{-4}$ – $1,47 \times 10^{-3}$]. Khi so sánh phân tích trên phạm vi toàn cầu, tốc độ tiến hóa của gen *G* RSV-B là $7,62 \times 10^{-4}$ thay thế/vị trí/năm. Tốc độ

tương tự cũng được thấy trong công bố của Úc $7,56 \times 10^{-4}$ thay thế/vị trí/năm [152]. Tuy nhiên, tốc độ tiến hóa của gen *G* RSV-B trong nghiên cứu lại thấp hơn một số quốc gia khác như Myanmar ($2,12 \times 10^{-2}$) [162], Đài Loan ($2,87 \times 10^{-3}$) [143], Ấn Độ ($4,03 \times 10^{-3}$) [157], Trung Quốc ($4,53 \times 10^{-3}$) [163]. Như vậy, tốc độ tiến hóa phân tử của gen *G* RSV-B kiểu gen BA9 ở Việt Nam nhìn chung là chậm hơn so với các nước xung quanh và bằng tốc độ chung của thế giới.

Thông thường tại các quốc gia, tốc độ tiến hóa của RSV-A và RSV-B thường tương đương nhau hoặc lệch nhau không nhiều [152], [162]. Điều này lại không thấy ở các trình tự RSV trong nghiên cứu này. Tốc độ tiến hóa của gen *G* của RSV-A nhanh hơn tốc độ của RSV-B 1,6 lần ($1,32 \times 10^{-3}$ so với $8,29 \times 10^{-4}$). Tốc độ tiến hóa của RSV-A là tương tự như nhiều nghiên cứu khác. Tốc độ này có thể nhanh hơn, chậm hơn hoặc bằng với nhiều quốc gia. Nhưng RSV-B lại không như vậy. Đa số các nghiên cứu đều đưa ra tốc độ tiến hóa của RSV-B nhanh hơn ở Việt Nam và tương đương với RSV-A trong cùng nghiên cứu [14]. Như vậy, các trình tự RSV-B của Việt Nam giai đoạn 2017-2020 có tốc độ tiến hóa gen *G* khác biệt, chậm hơn RSV-A và nhiều nước. Do không có dữ liệu của nghiên cứu trước đây với RSV-B tại Việt Nam nên nhận định này chỉ là kết luận ban đầu. Để có thể khẳng định cần tiến hành thêm các nghiên cứu khác như giải trình tự thêm các mẫu RSV-B, mở rộng số lượng mẫu phân tích sau năm 2020 và phân tích tiến hóa trên hệ gen.

* Hạn chế của nghiên cứu

Kết quả nghiên cứu đã giải trình tự toàn bộ hệ gen của virus RSV và tập trung phân tích các thay đổi di truyền trên gen *G*. Tuy nhiên, các gen *F* và *SH* cũng là các gen quan trọng, đóng vai trò trong việc lây nhiễm của RSV vào tế bào vật chủ và là đích đến của các nghiên cứu phát triển vaccine lại chưa được phân tích sâu. Vì vậy, hạn chế của luận án là thiếu các phân tích về đặc điểm tiến hoá của gen *F* và gen *SH*. Khi có đủ bộ dữ liệu về di truyền và tiến hoá của cả 3 gen *G*, *F*, và *SH*, kết quả của nghiên cứu sẽ thực sự có vai trò quan trọng trong nghiên cứu về RSV tại Việt Nam cũng như trên thế giới.

Chương 5. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Từ các kết quả của nghiên cứu có thể đưa ra một số kết luận sau:

Các kết quả của mục tiêu 1:

1. Đã có bộ dữ liệu về tỷ lệ dương tính RSV trên bệnh nhân nhi viêm đường hô hấp cấp tính nặng tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh giai đoạn 2017-2020 là 28,02%. Nhóm dưới 1 tuổi có nguy cơ nhiễm RSV cao hơn các nhóm tuổi khác. Nam giới có xu hướng nhiễm RSV cao hơn nữ giới trong thời gian nghiên cứu.

2. Đã xác định được sự lưu hành của hai phân nhóm RSV-A và RSV-B tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh theo thời gian. RSV được phát hiện gần như quanh năm, mùa dịch thường từ tháng 6 đến tháng 11, đỉnh dịch vào tháng 8 - tháng 9 hàng năm. Năm 2020 là năm duy nhất chỉ có RSV-A tạo đỉnh dịch còn RSV-B lưu hành rải rác trong năm.

Các kết quả của mục tiêu 2:

3. Đã phân lập được 25 chủng (18 chủng RSV-A và 7 chủng RSV-B) tại hai điểm nghiên cứu. Giải trình tự toàn bộ hệ gen 25 chủng và 81 mẫu bệnh phẩm hô hấp thuộc hai phân nhóm (56 trình tự RSV-A và 50 trình tự RSV-B).

4. Đã nghiên cứu và xác định được toàn bộ trình tự hệ gen RSV của các chủng phân lập và một số mẫu đại diện, từ đó tìm ra đặc điểm sinh học phân tử của hệ gen RSV trong nghiên cứu. Các trình tự RSV-A thuộc kiểu gen ON1 và kiểu gen non-ON1. Các trình tự RSV-B thuộc kiểu gen BA9. Tất cả các trình tự RSV-A trong nghiên cứu đều không có 72 nucleotide lặp lại trên vùng siêu biến đổi thứ 2 trên gen *G*.

5. Đã đánh giá được tốc độ tiến hoá phân tử gen *G* của RSV tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh giai đoạn 2017-2020 là $1,32 \times 10^{-3}$ thay thế/vị trí/năm (RSV-A) và $8,29 \times 10^{-4}$ thay thế/vị trí/năm (RSV-B). Tốc độ tiến hoá của RSV-A là tương tự như nhiều quốc gia. Tốc độ tiến hoá của RSV-B là chậm hơn so với các quốc gia khác.

Tính mới của đề tài

- Đã xác định được đặc điểm lưu hành, tính mùa vụ, phân nhóm lưu hành của các chủng RSV tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh giai đoạn 2017-2020.

- Đã nghiên cứu và xác định được toàn bộ trình tự hệ gen RSV của một số mẫu đại diện và từ đó tìm ra các đặc điểm sinh học phân tử của hệ gen ở các chủng nghiên cứu. Đã ước tính được tốc độ tiến hoá phân tử của gen *G* của RSV tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh giai đoạn 2017-2020.

KIẾN NGHỊ

Cần tiếp tục phân tích các biến đổi di truyền và tiến hoá trên gen *F* và *SH* của các chủng và bệnh phẩm hô hấp đã được giải trình tự gen trong nghiên cứu này. Các kết quả sẽ phục vụ cho mục tiêu nghiên cứu phát triển vaccine và kháng thể đơn dòng của RSV trong tương lai.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

Ung Thi Hong Trang, Hoang Vu Mai Phuong, Nguyen Huy Hoang, Nguyen Vu Son, Le Thi Thanh, Nguyen Le Khanh Hang, Vuong Duc Cuong, Tran Thi Thu Huong, Nguyen Thi Hien, Nguyen Phuong Anh, Le Quynh Mai, “Circulation of human respiratory syncytial virus and new ON1 genotype in northern Viet Nam, 2017–2020”, *Western Pacific Surveillance and Response Journal*, vol. 14, no. 4, pp. 1–9, 2023.

DOI: <https://doi.org/10.5365/wpsar.2023.14.4.990>

Ung Thi Hong Trang, Hoang Vu Mai Phuong, Nguyen Huy Hoang, Le Thi Thanh, Nguyen Vu Son, Nguyen Co Thach, Vuong Duc Cuong, Tran Thi Thu Huong, Pham Thi Hien, Nguyen Phuong Anh, Nguyen Thi Sang, Nguyen Le Khanh Hang, Le Quynh Mai, “Molecular characteristics of respiratory syncytial virus (RSV) isolated in the North Vietnam, 2017-2018”, *Academia Journal of Biology*, vol. 44, no. 4, pp. 101–100, 2022.

DOI: <https://doi.org/10.15625/2615-9023/17209>

Ứng Thị Hồng Trang, Hoàng Vũ Mai Phương, Nguyễn Huy Hoàng, “Dịch tễ học phân tử của vi rút hợp bào hô hấp”, *Tạp chí Y học Dự phòng*, Tập 32, số 2, trang 20–31, 2022.

DOI: <https://doi.org/10.51403/0868-2836/2022/581>

Nguyễn Thị Sang, Nguyễn Vũ Sơn, **Ứng Thị Hồng Trang**, Vương Đức Cường, Phạm Thị Hiền, Trần Thị Thu Hương, Nguyễn Phương Anh, Lê Thị Thanh, Nguyễn Cơ Thạch, Hoàng Vũ Mai Phương, Lê Thị Quỳnh Mai, Nguyễn Lê Khánh Hằng, “Tác nhân vi rút gây viêm đường hô hấp cấp tính nặng (SARI) trên các bệnh nhân nội trú tại bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh, 2018-2019”, *Tạp chí Y học Dự phòng*, Tập 32, số 2, trang 129-138, 2022.

DOI: <https://doi.org/10.51403/0868-2836/2022/596>

Thi Hong Trang Ung, Vu Mai Phuong Hoang, Huy Hoang Nguyen, Le Khanh Hang Nguyen, Phuong Anh Nguyen, Quynh Mai Le, “Molecular epidemiology of human Respiratory Syncytial virus in Viet Nam National Children’s Hospital”, International Conference on Health Science and Technology (ICHST-2023), 2024, Viet Nam.

DOI: 10.1109/ICHST59286.2023.10565331

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] E. E. Walsh and C. B. Hall, 2015, *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, Elsevier, pp. 1948-1960.e3.
- [2] H. C. Meissner, 2018, *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*, Elsevier, pp. 1162-1165.
- [3] T. J. Ruckwardt, P. L. Collins, and B. S. Graham, 2018, *Reference Module in Biomedical Sciences*, Elsevier, pp. 1–16.
- [4] D. Cao, Y. Gao, and B. Liang, 2021, Structural insights into the respiratory syncytial virus rna synthesis complexes, *Viruses*, 13(5), pp. 1–14.
- [5] K. N. A. Pangesti, M. Abd El Ghany, M. G. Walsh, A. M. Kesson, and G. A. Hill-Cawthorne, 2018, Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus, *Reviews in Medical Virology*, 28(2), pp. 1–11.
- [6] I. N. Mammias, S. B. Drysdale, B. Rath, M. Theodoridou, G. Papaioannou, A. P. Papatheo, E. Koutsounaki, C. Koutsaftiki, E. Kozanidou, V. Achtsidis, P. Korovessi, G. P. Chrousos, D. A. Spandidos, 2020, Update on current views and advances on RSV infection (Review), *International Journal of Molecular Medicine*, 46(2), pp. 509–520.
- [7] M. B. Battles and J. S. McLellan, 2019, Respiratory syncytial virus entry and how to block it, *Nature Reviews Microbiology*, 17(4), pp. 233–245.
- [8] M. C. Pandya, S. M. Callahan, K. G. Savchenko, and C. C. Stobart, 2019, A Contemporary View of Respiratory Syncytial Virus (RSV) Biology and Strain-Specific Differences, *Pathogens*, 8(2), p. 67.
- [9] C. Griffiths, S. J. Drews, D. J. Marchant, 2017, Respiratory Syncytial Virus : Infection, Detection, and New Options for Prevention and Treatment, *Clinical Microbiology Reviews*, 30(1), pp. 277–319.
- [10] S. Goya, M. Galiano, I. Nauwelaers, A. Trento, P. J. Openshaw, A. S. Mistchenko, M. Zambon, M. Viegas, 2020, Toward unified molecular surveillance of RSV: A proposal for genotype definition, *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 14(3), pp. 274–285.
- [11] W. H. Lin, F. T. Wu, Y. Y. Chen, C. W. Wang, H. C. Lin, C. C. Kuo, W. C. Lai, 2022, Unprecedented outbreak of respiratory syncytial virus in Taiwan associated with ON1 variant emergence between 2010 and 2020, *Emerging Microbes and Infections*, 11(1), pp. 1000–1009.
- [12] T. Shi, D. A. Mcallister, K. L. O. Brien, E. A. F. Simoes, S. A. Madhi, B. D. Gessner, F. P. Polack, 2017, Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus

- in young children in 2015: a systematic review and modelling study, *The Lancet*, 390, pp. 946–958.
- [13] L. Staadegaard, S. Caini, S. Wangchuk, B. Thapa, W. A. F. Almeida, F. C. Carvalho, R. A. Fasce, 2021, Defining the seasonality of respiratory syncytial virus around the world: National and subnational surveillance data from 12 countries, *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 6, pp. 1–10.
 - [14] J. M. Yu, Y. H. Fu, X. L. Peng, Y. P. Zheng, and J. S. He, 2021, Genetic diversity and molecular evolution of human respiratory syncytial virus A and B, *Scientific Reports*, 11(1), pp. 1–11.
 - [15] J. S. McLellan, W. C. Ray, Mark E. Peeples, 2014, Structure and Function of RSV Surface Glycoproteins, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 372, pp. 83–104.
 - [16] X. Zhao, C. Wang, H. Jiang, H. Zhang, F. Fang, M. Chen, Z. Yuan, Z. Teng, J. Liu, X. Zhang, 2022, Analysis of circulating respiratory syncytial virus A strains in Shanghai, China identified a new and increasingly prevalent lineage within the dominant ON1 genotype, *Frontiers in Microbiology*, 13(8), pp. 1–11.
 - [17] Z. Shang, S. Tan, and D. Ma, 2021, Respiratory syncytial virus: from pathogenesis to potential therapeutic strategies, *International Journal of Biological Sciences*, 17(14), pp. 4073–4091.
 - [18] L. A. Vianna, M. M. Siqueira, L. P. B. Volpini, I. D. Louro, and P. C. Resende, 2021, Seasonality, molecular epidemiology, and virulence of Respiratory Syncytial Virus (RSV): A perspective into the Brazilian Influenza Surveillance Program, *PLoS ONE*, 16(5), pp. 1–20.
 - [19] F. M. Muñoz, G. K. Swamy, S. P. Hickman, S. Agrawal, P. A. Piedra, G. M. Glenn, N. Patel, A. M. August, I. Cho, L. Fries, 2019, Safety and Immunogenicity of a Respiratory Syncytial Virus Fusion (F) Protein Nanoparticle Vaccine in Healthy Third-Trimester Pregnant Women and Their Infants, *The Journal of Infectious Diseases*, 220(11), pp. 1802–1815.
 - [20] J. To, W. Surya, and J. Torres, 2016, *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, Elsevier, pp. 307–355.
 - [21] M. S. A. Gilman, C. Liu, A. Fung, I. Behera, P. Jordan, P. Rigaux, N. Ysebaert, 2019, Structure of the Respiratory Syncytial Virus Polymerase Complex, *Cell*, 179(1), pp. 193–204.e14.
 - [22] C. Bouillier, G. Cosentino, T. Léger, V. Rincheval, C. Richard, A. Desquesnes, D. Sitterlin, 2019, The Interactome analysis of the Respiratory Syncytial Virus protein M2-1 suggests a new role in viral mRNA metabolism post-

- transcription, *Scientific Reports*, 9(1), pp. 15258.
- [23] M. Selvaraj, K. Yegambaram, E. J. A. A. Todd, C. Richard, R. L. Dods, G. M. Pangratiou, C. H. Trinh, 2018, The Structure of the Human Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein Bound to the Interaction Domain of the Phosphoprotein P Defines the Orientation of the Complex, *American Society for Microbiology Journal*, 9(6), pp. e01554-18.
 - [24] E. J. McFarland, R. A. Karron, P. Muresan, C. K. Cunningham, M. E. Valentine, C. Perlowski, B. Thumar, 2018, Live-Attenuated Respiratory Syncytial Virus Vaccine Candidate With Deletion of RNA Synthesis Regulatory Protein M2-2 is Highly Immunogenic in Children, *The Journal of Infectious Diseases*, 217(9), pp. 1347–1355.
 - [25] R. Barr, C. A. Green, C. J. Sande, and S. B. Drysdale, 2019, Respiratory syncytial virus: diagnosis, prevention and management, *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 6, pp. 204-225.
 - [26] C. Griffiths, S. J. Drews, and D. J. Marchant, 2017, Respiratory syncytial virus: Infection, detection, and new options for prevention and treatment, *Clinical Microbiology Reviews*, 30(1), pp. 277–319.
 - [27] S. L. Noton, C. Z. Tremaglio, and R. Fearn, 2019, Killing two birds with one stone: How the respiratory syncytial virus polymerase initiates transcription and replication, *PLoS Pathogens*, 15(2), pp. 1–8.
 - [28] A. York, 2019, A close-up of respiratory syncytial virus replication, *Nature Reviews Microbiology*, 17(11), pp. 646–646.
 - [29] T. N. Cressey, S. L. Noton, K. Nagendra, M. R. Braun, and R. Fearn, 2018, Mechanism for de novo initiation at two sites in the respiratory syncytial virus promoter, *Nucleic Acids Research*, 46(13), pp. 6785–6796.
 - [30] B. Lu, H. Liu, D. E. Tabor, A. Tovchigrechko, Y. Qi, A. Ruzin, M. T. Esser, H. Jin, 2019, Emergence of new antigenic epitopes in the glycoproteins of human respiratory syncytial virus collected from a US surveillance study, 2015–17, *Scientific Reports*, 9(1), p. 3898.
 - [31] J. R. Otieno, E. M. Kamau, J. W. Oketch, J. M. Ngoi, A. M. Gichuki, S. Binter, G. P. Otieno, 2018, Whole genome analysis of local Kenyan and global sequences unravels the epidemiological and molecular evolutionary dynamics of RSV genotype ON1 strains, *Virus Evolution*, 4(2), pp.101-110.
 - [32] H. Abou-El-Hassan, E. Massaad, N. Soudani, A. Assaf-Casals, R. Shaker, M. L. Khoury, S. Ghanem, 2019, Detection of ON1 and novel genotypes of human respiratory syncytial virus and emergence of palivizumab resistance in Lebanon, *PLOS ONE*, 14(2), pp. e0212687.

- [33] Y. Li, R. M. Reeves, X. Wang, Q. Bassat, W. A. Brooks, C. Cohen, D. P. Moore, 2019, Global patterns in monthly activity of influenza virus, respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, and metapneumovirus: a systematic analysis, *The Lancet Global Health*, 7(8), pp. e1031–e1045.
- [34] C. M. Midgley, A. K. Haynes, J. L. Baumgardner, C. Chommanard, S. W. Demas, M. M. Prill, G. R. Abedi, A.T. Curns, J. T. Watson, S. I. Gerber, 2018, Determining the Seasonality of Respiratory Syncytial Virus in the United States: The Impact of Increased Molecular Testing, *Journal of Infectious Disease*, 216(3), pp. 345–355.
- [35] J.-M. Yu, Y.-H. Fu, X.-L. Peng, Y.-P. Zheng, and J.-S. He, 2021, Genetic diversity and molecular evolution of human respiratory syncytial virus A and B, *Scientific Reports*, 11(1), p. 12941.
- [36] F. Di Giallonardo, J. Kok, M. Fernandez, I. Carter, J. Geoghegan, D. Dwyer, E. Holmes, J. S. Eden, 2018, Evolution of Human Respiratory Syncytial Virus (RSV) over Multiple Seasons in New South Wales, Australia, *Viruses*, 10(9), pp. 476.
- [37] T. Y. Lin, H. Chi, C. Y. Kuo, H. P. Tsai, J. R. Wang, C. C. Liu, C. F. She, 2022, Outbreak of respiratory syncytial virus subtype ON1 among children during COVID-19 pandemic in Southern Taiwan, *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 12(138), pp. 478-488.
- [38] W. W. Phyu, K. T. Z. Htwe, R. Saito, Y. Kyaw, N. Lin, C. Dapat, H. Osada, 2021, Evolutionary analysis of human respiratory syncytial virus collected in Myanmar between 2015 and 2018, *Infection, Genetics and Evolution*, 93, pp. 104927.
- [39] R. M. Reeves, M. V. Wijhe, S. Tong, T. Lehtonen, L. Stona, A. C. Teirlinck, L. V. Fernandez, 2020, Respiratory Syncytial Virus-Associated Hospital Admissions in Children Younger Than 5 Years in 7 European Countries Using Routinely Collected Datasets, *The Journal of Infectious Diseases*, 222(7), pp. S599–S605.
- [40] M. A. Londono-Avendano, M. Peláez-Moreno, E. López Medina, M. S. Moreno Turriago, and B. Parra Patiño, 2021, Transmission of Respiratory Syncytial Virus genotypes in Cali, Colombia, *Influenza and other Respiratory Viruses*, 15(4), pp. 521–528.
- [41] J. Shan, P. N. Britton, C. L. King, and R. Booy, 2021, The immunogenicity and safety of respiratory syncytial virus vaccines in development: A systematic review, *Influenza and other Respiratory Viruses*, 15(4), pp. 539–551.
- [42] P. Hardelid, M. Verfuenden, J. McMenamin, R. L. Smyth, and R. Gilbert, 2019,

- The contribution of child, family and health service factors to respiratory syncytial virus (RSV) hospital admissions in the first 3 years of life: birth cohort study in Scotland, 2009 to 2015, *Eurosurveillance*, 24(1), pp. 1-10.
- [43] S. A. Taleb, A. A. Al Thani, K. Al Ansari, and H. M. Yassine, 2018, Human respiratory syncytial virus: pathogenesis, immune responses, and current vaccine approaches, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 37(10), pp. 1817–1827.
- [44] T. Shi, S. Vennard, F. Jasiewicz, R. Brogden, H. Nair, H. Campbell, 2022, Disease Burden Estimates of Respiratory Syncytial Virus related Acute Respiratory Infections in Adults With Comorbidity: A Systematic Review and Meta-Analysis, *The Journal of Infectious Diseases*, 226(1), pp. S17–S21.
- [45] A. Wu, P. J. Budge, J. Williams, M. R. Griffin, K. M. Edwards, M. Johnson, Y. Zhu, 2015, Incidence and Risk Factors for Respiratory Syncytial Virus and Human Metapneumovirus Infections among Children in the Remote Highlands of Peru, *PLoS ONE*, 10(6), pp. 1–13.
- [46] Ứng Thị Hồng Trang, Hoàng Vũ Mai Phương, Nguyễn Huy Hoàng, 2022, Dịch tễ học phân tử của vi rút hợp bào hô hấp, *Tạp chí Y học Dự phòng*, 32(2), tr. 20–31.
- [47] S. Paynter, 2015, Humidity and respiratory virus transmission in tropical and temperate settings, *Epidemiology and Infection*, 143(6), pp. 1110–1118.
- [48] Y. Li, X. Wang, T. Msosa, J. Murdock, and H. Nair, 2021, The impact of the 2009 influenza pandemic on the seasonality of human respiratory syncytial virus : A systematic analysis, *Influenza and other Respiratory Viruses*, 15(6), pp. 804-812.
- [49] Hoàng Vũ Mai Phương, Lê Thị Thanh, Nguyễn Vũ Sơn, Ứng Thị Hồng Trang, Vương Đức Cường, Nguyễn Lê Khánh Hằng, Phạm Thị Hiền, Trần Thu Hương, Hoàng Thu Hương, Nguyễn Phương Anh, 2017, Một số căn nguyên vi rút hô hấp gây nhiễm trùng đường hô hấp cấp tính nặng ở bệnh nhi dưới 5 tuổi tại Viện Nhi trung ương năm 2016, *Tạp chí Y học Dự phòng*, 27(8), tr. 255–261.
- [50] Nguyễn Thị Thanh Phúc, Trần Thanh Tú, 2014, Một số đặc điểm dịch tễ học viêm đường hô hấp dưới cấp tính do vi rút ở trẻ em 2 tháng đến 2 tuổi khám tại Bệnh viện Nhi Trung ương, *Tạp chí Y học Dự phòng*, 24(4), tr. 28–32.
- [51] Q. Do, T. M. Dao, T. N. T. Nguyen, Q. A. Tran, H. T. Nguyen, and T. T. Ngo, 2020, Procalcitonin Identifies Bacterial Coinfections in Vietnamese Children with Severe Respiratory Syncytial Virus Pneumonia, *BioMed Research International*, 2020, pp.1-6.

- [52] A. Trenholme, R. Webb, S. Lawrence, S. Arrol, S. Taylor, S. Ameratunga, and C. A. Byrnes, 2021, COVID-19 and infant hospitalizations for seasonal respiratory virus infections, New Zealand, 2020, *Emerging Infectious Diseases*, 27(2), pp. 641–643.
- [53] R. E. Baker, S. W. Park, W. Yang, G. A. Vecchi, C. Jessica, and B. T. Grenfell, 2020, The impact of COVID-19 nonpharmaceutical interventions on the future dynamics of endemic infections, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(48), pp. 30547–30553.
- [54] R. A. Karron and R. E. Black, 2017, Determining the burden of respiratory syncytial virus disease : the known and the unknown, *The Lancet*, 390(10098), pp. 917–918.
- [55] L. Drew, 2023, Will a new wave of RSV vaccines stop the dangerous virus?, *Nature*, 614(7946), pp. 20–20.
- [56] I. Takayama, M. Nakauchi, H. Takahashi, K. Oba, S. Semba, A. Kaida, H. Kubo, 2019, Development of real-time fluorescent reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay with quenching primer for influenza virus and respiratory syncytial virus, *Journal of Virological Methods*, 267, pp. 53–58.
- [57] J.-H. Kim, Y. H. Roh, J. G. Ahn, M. Y. Kim, K. Huh, J. Jung, and J. Kang, 2021, Respiratory syncytial virus and influenza epidemics disappearance in Korea during the 2020–2021 season of COVID-19, *International Journal of Infectious Diseases*, 110, pp. 29–35.
- [58] L. Gong, C. Wu, M. Lu, C. Huang, Y. Chen, Z. Li, G. Huang, D. Liu, X. Tang, 2021, Analysis of Incidence and Clinical Characteristics of RSV Infection in Hospitalized Children: A Retrospective Study, *Risk Management and Healthcare Policy*, 14, pp. 1525–1531.
- [59] K. M. Rabon-Stith, C. B. McGuinness, B. Saunders, L. Edelman, V. R. Kumar, and M. L. Boron, 2013, Laboratory testing trends for respiratory syncytial virus, 2007–2011, *Journal of Clinical Virology*, 58(3), pp. 575–578.
- [60] J. U. Nyiro, P. K. Kiyuka, M. N. Mutunga, C. J. Sande, P. K. Munywoki, J. A. G. Scott, D. J. Nokes, 2019, Agreement between ELISA and plaque reduction neutralisation assay in Detection of respiratory syncytial virus specific antibodies in a birth Cohort from Kilifi, coastal Kenya, *Wellcome Open Research*, 4, p. 33.
- [61] G. Berbers, L. Mollema, F. van der Klis, G. den Hartog, and R. Schepp, 2021, Antibody Responses to Respiratory Syncytial Virus: A Cross-Sectional Serosurveillance Study in the Dutch Population Focusing on Infants Younger

- Than 2 Years, *The Journal of Infectious Diseases*, 224(2), pp. 269–278.
- [62] C. A. A. Beauchemin, Y.-I. Kim, Q. Yu, G. Ciaramella, and J. P. DeVincenzo, 2019, Uncovering critical properties of the human respiratory syncytial virus by combining in vitro assays and in silico analyses, *PLOS ONE*, 14(4), p. e0214708.
 - [63] W. Van Der Gucht, K. Stobbelaar, M. Govaerts, T. Mangodt, C. Barbezange, A. Leemans, B. D. Winter, 2019, Isolation and characterization of clinical RSV isolates in Belgium during the winters of 2016-2018, *Viruses*, 11(11), pp. 1–19.
 - [64] I. Maljkovic Berry, M. C Melendrez, K. A. Bishop-Lilly, W. Rutvisuttinunt, S. Pollett, E. Talundzic, L. Morton, and R. G. Jarman, 2019, Next Generation Sequencing and Bioinformatics Methodologies for Infectious Disease Research and Public Health: Approaches, Applications, and Considerations for Development of Laboratory Capacity, *The Journal of Infectious Diseases*, 221, pp. S292-S307.
 - [65] L. Staaedegaard, S. Caini, S. Wangchuk, B. Thapa, W. A. F. Almeida, F. C. Carvalho, R. A. Fasce, 2021, The Global Epidemiology of RSV in Community and Hospitalized Care: Findings from 15 Countries, *Open Forum Infectious Diseases*, 8(7), pp.1-11.
 - [66] A. C. Langedijk, R. J. Lebbink, C. Naaktgeboren, A. Evers, M. C. Viveen, A. Greenough, A. Greenough, Global molecular diversity of RSV - The ‘iNFORM RSV’ study, *BMC Infectious Diseases*, 20(1), pp. 1–8.
 - [67] Y. Li, X. Wang, D. M. Blau, M. T. Caballero, D. R. Feikin, C. J. Gill, S. A. Madhi, 2022, Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in children younger than 5 years in 2019: a systematic analysis, *The Lancet*, 399(10340), pp. 2047–2064.
 - [68] X. Li, L. Willem, M. Antillon, J. Bilcke, M. Jit, and P. Beutels, 2020, Health and economic burden of respiratory syncytial virus (RSV) disease and the cost-effectiveness of potential interventions against RSV among children under 5 years in 72 Gavi-eligible countries, *BMC Medicine*, 18(1), p. 82.
 - [69] R. M. Reeves, M. V. Wijhe, S. Tong, T. Lehtonen, L. Stona, A. C. Teirlinck, L. V. Fernandez, 2020, Respiratory Syncytial Virus-Associated Hospital Admissions in Children Younger Than 5 Years in 7 European Countries Using Routinely Collected Datasets, *The Journal of Infectious Diseases*, 222(Supplement_7), pp. S599–S605.
 - [70] A. R. Falsey, J. E. McElhaney, J. Beran, G. A. Essen, X. Duval, M. Esen, F. Galtier, 2014, Respiratory Syncytial Virus and Other Respiratory Viral

- Infections in Older Adults With Moderate to Severe Influenza-like Illness, *The Journal of Infectious Diseases*, 209(12), pp. 1873–1881.
- [71] M. C. Nunes, C. L. Cutland, S. Jones, A. Hugo, R. Madimabe, E. A. F. Simões, A. Weinberg, S. A. Madhi, 2016, Duration of Infant Protection Against Influenza Illness Conferred by Maternal Immunization, *JAMA Pediatrics*, 170(9), pp. 840-847.
- [72] A. C. Langedijk, E. R. Harding, B. Konya, B. Vrancken, R. J. Lebbink, A. Evers, J. Willemsen, P. Lemey, L. J. Bont, 2022, A systematic review on global RSV genetic data: Identification of knowledge gaps, *Reviews in Medical Virology*, 32(3), pp. 1-8.
- [73] A. Ruzin, S. T. Pastula, E. Levin-Sparenberg, X. Jiang, J. Fryzek, A. Tovchigrechko, B. Lu, 2018, Characterization of circulating RSV strains among subjects in the OUTSMART-RSV surveillance program during the 2016-17 winter viral season in the United States, *PLOS ONE*, 13(7), p. e0200319.
- [74] World Health Organization, 2019, *Who Strategy for Global Respiratory Syncytial Virus Surveillance Project Based on the Influenza Platform*”, Geneva, Switzerland.
- [75] D. E. Tabor, F. Fernandes, A. C. Langedijk, D. Wilkins, R. J. Lebbink, A. Tovchigrechko, A. Ruzin, 2020, Global Molecular Epidemiology of Respiratory Syncytial Virus from the 2017–2018 INFORM-RSV Study, *Journal of Clinical Microbiology*, 59(1), pp.e01828-20.
- [76] I. Thongpan, P. Vichaiwattana, S. Vongpunsawad, and Y. Poovorawan, 2021, Upsurge of human rhinovirus infection followed by a delayed seasonal respiratory syncytial virus infection in Thai children during the coronavirus pandemic, *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 15(6), pp. 711–720.
- [77] J.-H. Kim, Y. H. Roh, J. G. Ahn, M. Y. Kim, K. Huh, J. Jung, and J. Kang, 2021, Respiratory syncytial virus and influenza epidemics disappearance in Korea during the 2020–2021 season of COVID-19, *International Journal of Infectious Diseases*, 110, pp. 29–35.
- [78] G. Di Mattia, R. Nenna, E. Mancino, V. Rizzo, A. Pierangeli, A. Villani, F. Midulla, 2021, During the COVID-19 pandemic where has respiratory syncytial virus gone?, *Pediatric Pulmonology*, 56(10), pp. 3106-3109.
- [79] Trịnh Hoàng Long, Nguyễn Bảo Triệu, Huỳnh Kim Mai, Đoàn Thị Thanh Thủy, Hoàng Thị Ngọc Anh, Trần Thị Như Anh, Viên Quang Mai, 2017, Đánh giá sự lưu hành của một số vi rút gây viêm đường hô hấp cấp tính ở Khánh Hòa năm 2016, *Tạp chí Y học Dự phòng*, 27(8), tr. 506–512.

- [80] K. Yoshihara, M. N. Le, M. Okamoto, A. C. A. Wadagni, H. A. Nguyen, M. Toizumi, E. Pham, 2016, Association of RSV-A ON1 genotype with Increased Pediatric Acute Lower Respiratory Tract Infection in Vietnam, *Scientific Reports*, 6(1), pp. 27856.
- [81] T. A. Tuan, T. T. Thanh, N. T. T. Hai, L. B. B. Tinh, L. T. N. Kim, L. A. H. Do, N. T. T. Chinh, 2015, Characterization of hospital and community-acquired respiratory syncytial virus in children with severe lower respiratory tract infections in Ho Chi Minh City, Vietnam, 2010, *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 9(3), pp. 110–119.
- [82] B. M. Althouse, T. T. Thanh, N. T. T. Hai, L. B. B. Tinh, L. T. N. Kim, L. A. H. Do, N. T. T. Chinh, 2018, Seasonality of respiratory viruses causing hospitalizations for acute respiratory infections in children in Nha Trang, Vietnam, *International Journal of Infectious Diseases*, 75, pp. 18–25.
- [83] L. Lu, G. Robertson, J. Ashworth, A. P. Hong, T. Shi, A. Ivens, G. Thwaites, S. Baker, M. Woolhouse, 2020, Epidemiology and Phylogenetic Analysis of Viral Respiratory Infections in Vietnam, *Frontiers in Microbiology*, 11(5), pp. 1–13.
- [84] Nguyễn Thị Trang, Khu Thị Khánh Dung, 2021, Một số yếu tố liên quan đến viêm phổi sơ sinh nặng có nhiễm virus hợp bào hô hấp tại Trung tâm Sơ sinh Bệnh viện Nhi Trung ương, *Tạp chí Nghiên cứu và Thực hành Nhi khoa*, 5(5), tr. 39-46.
- [85] L. A. H. Do, J. E. Bryant, A. T. Tran, B. H. Nguyen, T. T. L. Tran, Q. H. Tran, Q. B. Vo, 2016, Respiratory syncytial virus and other viral infections among children under two years old in southern Vietnam 2009-2010: Clinical characteristics and disease severity, *PLoS ONE*, 11(8), pp. e0160606.
- [86] D. N. Tran, T. M. H. Pham, M. T. Ha, T. T. L. Tran, T. K. H. Dang, L. M. Yoshida, S. Okitsu, S. Hayakawa, M. Mizuguchi, H. Ushijima, 2013, Molecular Epidemiology and Disease Severity of Human Respiratory Syncytial Virus in Vietnam, *PLoS ONE*, 8(1), pp. e45436.
- [87] K. Yoshihara, M. N. Le, M. Okamoto, A. C. A. Wadagni, H. A. Nguyen, M. Toizumi, E. Pham, 2016, Molecular evolution of respiratory syncytial virus subgroup A genotype NA1 and ON1 attachment glycoprotein (G) gene in central Vietnam, *Infection, Genetics and Evolution*, 45, pp. 437–446.
- [88] World Health Organization, 2013, *Global Epidemiological Surveillance Standards for Influenza*, Geneva, Switzerland.
- [89] Bộ Y tế, 2017, *Quyết định về việc ban hành “Hướng dẫn giám sát nhiễm trùng đường hô hấp cấp tính nặng (SARI)”*, Số 1271/QĐ-BYT, Việt Nam.
- [90] Centre for Disease Control and Prevention, 2015, *Real-Time RT-PCR Assays*

for Non-Influenza Respiratory Viruses Centers for Disease Control and Prevention, United State of America.

- [91] L. A. H. Do, H. R. V. Doorn, J. E. Bryant, M. N. Nghiem, V. C. N. Van, C. K. Vo, M. D. Nguyen, T. H. Tran, J. Farrar, M. D. Jong, 2012, A sensitive real-time PCR for detection and subgrouping of human respiratory syncytial virus, *Journal of Virological Methods*, 179(1), pp. 250–255.
- [92] C. N. Agoti, J. R. Otieno, P. K. Munywoki, A. G. Mwihuri, P. A. Cane, D. J. Nokes, P. Kellam, M. Cotten, 2015, Local Evolutionary Patterns of Human Respiratory Syncytial Virus Derived from Whole-Genome Sequencing, *Journal of Virology*, 89(7), pp. 3444–3454.
- [93] QIAGEN, 2018, QIAGEN CLC Genomics Workbench Features.
- [94] Y. Shu and J. McCauley, 2017, GISAID: Global initiative on sharing all influenza data – from vision to reality, *Eurosurveillance*, 22(13), pp. 30494.
- [95] A. Larsson, 2014, AliView : a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets, 30(22), pp. 3276–3278.
- [96] S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, and K. Tamura, 2018, MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms, *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), pp. 1547–1549.
- [97] R. Bouckaert, T. G. Vaughan, J. Barido-Sottani, S. Duchêne, M. Fourment, A. Gavryushkina, J. Heled, 2019, BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis, *PLOS Computational Biology*, 15(4), pp. e1006650.
- [98] D. Darriba, G. L. Taboada, R. Doallo, and D. Posada, 2012, jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing, *Nature Methods*, 9(8), pp. 772–772.
- [99] R. Malasao, M. Okamoto, N. Chaimongkol, T. Imamura, K. Tohma, I. Dapat, C. Dapa, 2015, Molecular Characterization of Human Respiratory Syncytial Virus in the Philippines, 2012-2013, *PLOS ONE*, 10(11), pp. e0142192.
- [100] A. Ahmed, S. H. Haider, S. Parveen, M. Arshad, H. A. Alsenaidy, A. O. Baaboud, K. F. Mobaireek, M. M. AlSaadi, A. M. Alsenaidy, W. Sullender, 2016, Co-Circulation of 72bp Duplication Group A and 60bp Duplication Group B Respiratory Syncytial Virus (RSV) Strains in Riyadh, Saudi Arabia during 2014, *PLOS ONE*, 11(11), pp. e0166145.
- [101] P. Hu, T. Zheng, J. Chen, T. Zhou, Y. Chen, X. Xu, X. Pei, 2017, Alternate circulation and genetic variation of human respiratory syncytial virus genotypes in Chengdu, West China, 2009-2014, *Journal of Medical Virology*, 89(1), pp. 32–40.

- [102] I. Thongpan, S. Vongpunsawad, and Y. Poovorawan, 2020, Respiratory syncytial virus infection trend is associated with meteorological factors, *Scientific Reports*, 10(1), pp. 10931.
- [103] M. A. Londono-Avendano, M. Peláez-Moreno, E. López Medina, M. S. Moreno Turriago, and B. Parra Patiño, 2021, Transmission of Respiratory Syncytial Virus genotypes in Cali, Colombia, *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 15(4), pp. 521–528.
- [104] A. Fowlkes, A. Giorgi, D. Erdman, J. Temte, K. Goodin, S. Di Lonardo, Y. Sun, 2014, Viruses Associated With Acute Respiratory Infections and Influenza-like Illness Among Outpatients From the Influenza Incidence Surveillance Project, 2010–2011, *The Journal of Infectious Diseases*, 209(11), pp. 1715–1725.
- [105] N. Suleiman-Martos, A. Caballero-Vázquez, J. L. Gómez-Urquiza, L. Albendín-García, J. L. Romero-Béjar, and G. A. Cañadas-De la Fuente, 2021, Prevalence and Risk Factors of Respiratory Syncytial Virus in Children under 5 Years of Age in the WHO European Region: A Systematic Review and Meta-Analysis, *Journal of Personalized Medicine*, 11(5), pp. 416.
- [106] V. H. Nguyen, A. Dubot-Pérès, F. M. Russell, D. A. B. Dance, K. Vilivong, S. Phommachan, C. Syladeth, 2017, Acute respiratory infections in hospitalized children in Vientiane, Lao PDR – the importance of Respiratory Syncytial Virus, *Scientific Reports*, 7(1), pp. 9318.
- [107] L. M. Yoshida, M. Suzuki, H. A. Nguyen, M. N. Le, T. D. Vu, H. Yoshino, W. P. Schmidt, 2013, Respiratory syncytial virus: Co-infection and paediatric lower respiratory tract infections, *European Respiratory Journal*, 42(2), pp. 461–469.
- [108] World Health Organization, 2017, *WHO Meeting of Mid-term Review of the RSV Surveillance Pilot Based on the Global Influenza Surveillance and Response System 18 – 20 December 2017*, United State of America.
- [109] O. Atay, S. Pekcan, B. Gokturk, and M. Ozdemir, 2020, Risk factors and clinical determinants in bronchiolitis, *Turkish Thoracic Journal*, 21(3), pp. 156–162.
- [110] T. H. H. Le, T. T. H. Hoang, T. Le Nguyen, P. T. Hoang, and M. L. Dang, 2020, Epidemiological and Clinical Features of Patients Suffering from Severe Pneumonia Caused by RSV in the Respiratory Center of the Viet Nam National Children’s Hospital, *Journal of Pediatrics*, Viet Nam, 4(5), pp. 23-28.
- [111] K. Yoshihara, M. N. Le, M. Okamoto, A. C. A. Wadagni, H. A. Nguyen, M. Toizumi, E. Pham, 2016, Association of RSV-A ON1 genotype with Increased Pediatric Acute Lower Respiratory Tract Infection in Vietnam, *Scientific*

Reports, 6(6), pp. 27856.

- [112] M. Suryadevara and J. B. Domachowske, 2021, Epidemiology and Seasonality of Childhood Respiratory Syncytial Virus Infections in the Tropics, *Viruses*, 13(4), pp. 696.
- [113] M. Tin Tin Htar, M. S. Yerramalla, J. C. Moïsi, and D. L. Swerdlow, 2020, The burden of respiratory syncytial virus in adults: a systematic review and meta-analysis, *Epidemiology and Infection*, 148, pp. e48.
- [114] K. W. Yun, E. H. Choi, and H. J. Lee, 2020, Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus for 28 consecutive seasons (1990-2018) and genetic variability of the duplication region in the G gene of genotypes ON1 and BA in South Korea, *Archives of Virology*, 165(5), pp. 1069–1077.
- [115] M. Chadha, S. Hirve, C. Bancej, I. Barr, E. Baumeister, B. Caetano, M. Chittaganpitch, 2020, Human respiratory syncytial virus and influenza seasonality patterns-Early findings from the WHO global respiratory syncytial virus surveillance, *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 14(6), pp. 638–646,
- [116] R. Jia, L. Lu, L. Su, Z. Lin, D. Gao, H. Lv, M. Xu, P. Liu, L. Cao, and J. Xu, 2022, Resurgence of Respiratory Syncytial Virus Infection During COVID-19 Pandemic Among Children in Shanghai, China, *Frontiers in Microbiology*, 13, pp. 1-9.
- [117] J. Reina and J. Dueñas, 2019, Respiratory co-infections between influenza viruses and respiratory syncytial virus (2014–2017), *Anales de Pediatría (English Edition)*, 90(2), pp. 118–119.
- [118] Y.-C. Chuang, K.-P. Lin, L.-A. Wang, T.-K. Yeh, and P.-Y. Liu, 2023, The Impact of the COVID-19 Pandemic on Respiratory Syncytial Virus Infection: A Narrative Review, *Infection and Drug Resistance*, 16, pp. 661–675.
- [119] M. Redlberger-Fritz, M. Kundi, S. W. Aberle, and E. Puchhammer-Stöckl, 2021, Significant impact of nationwide SARS-CoV-2 lockdown measures on the circulation of other respiratory virus infections in Austria, *Journal of Clinical Virology*, 137, pp. 104795.
- [120] F. H. Varela, M. C. Scotta, M. Polese-Bonatto, I. T. S. Sartor, C. F. Ferreira, I. R. Fernandes, G. O. Zavaglia, W. A. F. Almeida, D. Arakaki-Sanchez, L. A. Pinto, G. A. Nader Bastos, L. A. Nasi, M. Falavigna, P. M. Pitrez, R. T. Stein, 2021, Absence of detection of RSV and influenza during the COVID-19 pandemic in a Brazilian cohort: Likely role of lower transmission in the community, *Journal of Global Health*, 11, pp. 05007.
- [121] V. T. Hoang, T. D. Pham, Q. T. Nguyen, D. C. Nguyen, D. T. Nguyen, T. B.

- Nguyen, T. K. T. Tran, 2022, Seroprevalence of SARS-CoV-2 among high-density communities and hyper-endemicity of COVID-19 in Vietnam, *Tropical Medicine & International Health*, 27(5), pp. 515–521
- [122] K. Leuzinger, T. Roloff, R. Gosert, K. Sogaard, K. Naegel, K. Rentsch, R. Bingisser, C. H. Nickel, H. Pargger, S. Bassetti, J. Bielicki, N. Khanna, S. Tschudin, A. Widmer, V. Hinic, M. Battegay, A. Egli, H. H. Hirsch, 2020, Epidemiology of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Emergence Amidst Community-Acquired Respiratory Viruses, *The Journal of Infectious Diseases*, 222(8), pp. 1270–1279.
- [123] B. Abu-Raya, M. Viñeta Paramo, F. Reicherz, and P. M. Lavoie, 2023, Why has the epidemiology of RSV changed during the COVID-19 pandemic?, *Clinical Medicine*, 61, pp. 102089.
- [124] E. Baraldi, G. C. Lisi, C. Costantino, J. H. Heinrichs, P. Manzoni, M. Riccò, M. Roberts, N. Vassilouthis, 2022, RSV disease in infants and young children: Can we see a brighter future?, *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 18(4), e2079322.
- [125] T. H. T. Ung, M. P. H. Vu, H. H. Nguyen, T. T. Le, V. S. Nguyen, C. T. Nguyen, D. C. Vuong, T. T. H. Tran, T. H. Pham, P. A. Nguyen, T. S. Nguyen, L. K. H. Nguyen, Q. M. Le, 2022, Molecular characteristics of respiratory syncytial virus (RSV) isolated in the North Vietnam, 2017-2018, *Academia Journal of Biology*, 44(4), pp. 101–100.
- [126] A. Rajan, F. Piedra, L. Aideyan, T. McBride, M. Robertson, H. L. Johnson, G. M. Aloisio, 2022, Multiple Respiratory Syncytial Virus (RSV) Strains Infecting HEp-2 and A549 Cells Reveal Cell Line-Dependent Differences in Resistance to RSV Infection, *Journal of Virology*, 96(7), pp. e01904-21.
- [127] P. F. Wright, M. R. Ikizler, R. A. Gonzales, K. N. Carroll, J. E. Johnson, and J. A. Werkhaven, 2005, Growth of Respiratory Syncytial Virus in Primary Epithelial Cells from the Human Respiratory Tract, *Journal of Virology*, 79(13), pp. 8651–8654.
- [128] T. King, A. Mejias, O. Ramilo, and M. E. Peeples, 2021, The larger attachment glycoprotein of respiratory syncytial virus produced in primary human bronchial epithelial cultures reduces infectivity for cell lines, *PLOS Pathogens*, 17(4), pp. e1009469.
- [129] I. Nunes and F. Moura, 2006, Isolation of respiratory syncytial virus from nasopharyngeal aspirates stored at 20°C from one to fifteen months after collection, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(4), pp. 451–453.
- [130] Q. Miao, Y. Ma, Q. Wang, J. Pan, Y. Zhang, W. Jin, Y. Yao, 2018,

- Microbiological Diagnostic Performance of Metagenomic Next-generation Sequencing When Applied to Clinical Practice, *Clinical Infectious Diseases*, 67, (suppl_2), pp. S231–S240.
- [131] B. M. Hussien, D. K. Sabir, Y. Karim, K. K. Karim, and H. J. Hidayat, 2022, Genome sequence analysis of SARS-COV-2 isolated from a COVID-19 patient in Erbil, Iraq, *Applied Nanoscience*, 13, pp. 31-47.
- [132] T. H. T. Ung, M. P. H. Vu, T. T. Le, V. S. Nguyen, L. K. H. Nguyen, D. C. Vuong, T. T. H. Tran, P. A. Nguyen, Q. M. Le, 2021, Exploring SARS-CoV-2 genome with iSeq 100 Next Generation Sequencing, *Vietnam Journal of Preventive Medicine*, 30(9), pp. 18–25.
- [133] H. Liu, B. Lu, D. E. Tabor, A. Tovchigrechko, D. Wilkins, H. Jin, S. A. Madhi, N. Soofie, M. T. Esser, and M. C. Nunes, 2020, Characterization of human respiratory syncytial virus (RSV) isolated from HIV-exposed-uninfected and HIV-unexposed infants in South Africa during 2015-2017, *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 14(4), pp. 403–411.
- [134] WHO Expert Committee on Biological Standardization, 2020, “*Guidelines on the quality, safety and efficacy of respiratory syncytial virus vaccines*”. Geneva, Switzerland.
- [135] C. Wang, D. Yan, J. Huang, N. Yang, J. Shi, S. Pan, G. Lin, 2022, The clinical application of metagenomic next-generation sequencing in infectious diseases at a tertiary hospital in China, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, pp. 1-9.
- [136] L. Wang, T. F. Fan, C. J. Castro, R. I. L. Marine, L. C. Magaña, M. Esona, T. C. T. Peret, and N. J. Thornburg, 2022, Next-generation sequencing of human respiratory syncytial virus subgroups A and B genomes, *Journal of Virological Methods*, 299, pp. 114335.
- [137] X. M. Pei, M. H. Y. Yeung, A. N. N. Wong, H. F. Tsang, A. C. S. Yu, A. K. Y. Yim, and S. C. C. Wong, 2023, Targeted Sequencing Approach and Its Clinical Applications for the Molecular Diagnosis of Human Diseases, *Cells*, 12(3), pp. 493.
- [138] Y. Ma, H. Jiang, Z. Wan, S. Li, Y. Li, W. Wang, X. Jin, Y. Li, and C. Zhang, 2021, Evolutionary dynamics of group A and B respiratory syncytial virus in China, 2009-2018, *Archives of Virology*, 166(9), pp. 2407–2418.
- [139] L. A. H. Do, A. Wilm, H. R. V. Doorn, H. M. Lam, S. Sim, R. Sukumaran, A. T. Tran, 2015, Direct whole-genome deep-sequencing of human respiratory syncytial virus A and B from Vietnamese children identifies distinct patterns of inter- and intra-host evolution, *Journal of General Virology*, 96(12), pp. 3470–

3483.

- [140] T. H. T. Ung, M. P. H. Vu, H. H. Nguyen, V. S. Nguyen, T. T. Le, L. K. H. Nguyen, D. C. Vuong, T. T. H. Tran, T. H. Pham, P. A. Nguyen, Q. M. Le, 2023, Circulation of human respiratory syncytial virus and new ON1 genotype in northern Viet Nam, 2017–2020, *Western Pacific Surveillance and Response Journal*, 14(4), pp. 1–9.
- [141] M. C. Pandya, S. M. Callahan, K. G. Savchenko, and C. C. Stobart, 2019, A Contemporary View of Respiratory Syncytial Virus (RSV) Biology and Strain-Specific Differences, *Pathogens*, 8(2), pp. 67.
- [142] J. Tabatabai, A. Thielen, N. Lehnert, M. Daeumer, and P. Schnitzler, 2018, Respiratory syncytial virus A in haematological patients with prolonged shedding: Premature stop codons and deletion of the genotype ON1 72-nucleotide-duplication in the attachment G gene, *Journal of Clinical Virology*, 98, pp. 10–17.
- [143] H. Chi, K.-L. Hsiao, L.-C. Weng, C.-P. Liu, and H.-F. Liu, 2019, Persistence and continuous evolution of the human respiratory syncytial virus in northern Taiwan for two decades, *Scientific Reports*, 9(1), pp. 4704.
- [144] F. Midulla, G. D. Mattia, R. Nenna, C. Scagnolari, A. Viscido, G. Oliveto, L. Petrarca, 2020, Novel Variants of Respiratory Syncytial Virus A ON1 Associated With Increased Clinical Severity of Bronchiolitis, *The Journal of Infectious Diseases*, 222(1), pp. 102–110.
- [145] H. A. Al-Sharif, S. A. El-Kafrawy, J. M. Yousef, T. A. Kumosani, M. A. Kamal, N. A. Khathlan, R. M. Kaki, A. A. Alnajjar, and E. I. Azhar, 2020, Dominance of the ON1 Genotype of RSV-A and BA9 Genotype of RSV-B in Respiratory Cases from Jeddah, Saudi Arabia, *Genes*, 11(11), pp. 1323.
- [146] W. W. Phyu, K. T. Z. Htwe, R. Saito, Y. Kyaw, N. Lin, C. Daput, H. Osada, 2021, Evolutionary analysis of human respiratory syncytial virus collected in Myanmar between 2015 and 2018, *Infection, Genetics and Evolution*, 93, pp. 104927.
- [147] A. Trento, L. Ábrego, R. Rodríguez-Fernández, M. I. González-Sánchez, F. González-Martínez, A. Delfraro, J. M. Pascale, J. Arbiza, and J. A. Melero, 2015, Conservation of G-Protein Epitopes in Respiratory Syncytial Virus (Group A) Despite Broad Genetic Diversity: Is Antibody Selection Involved in Virus Evolution?, *Journal of Virology*, 89(15), pp. 7776–7785.
- [148] A. Hibino, R. Saito, K. Taniguchi, H. Zaraket, Y. Shobugawa, T. Matsui, and Hiroshi Suzuki, 2018, Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus among children in Japan during three seasons and hospitalization risk of

- genotype ON1, *PLOS ONE*, 13(1), pp. e0192085.
- [149] X. Liang, D. Liu, D. Chen, L. Guo, H. Yang, Y. Shi, Y. Wang, 2019, Gradual replacement of all previously circulating respiratory syncytial virus A strain with the novel ON1 genotype in Lanzhou from 2010 to 2017, *Medicine*, 98(19), pp. e15542.
- [150] M. E. Hossain, M. Z. Rahman, M. Islam, A. F. Hoque, M. K. Sumiya, M. N. Begum, M. M. Alam, 2022, Pre COVID-19 molecular epidemiology of respiratory syncytial virus (RSV) among children in Bangladesh, *Heliyon*, 8(10), pp. e11043,
- [151] Y. Zheng, L. Liu, S. Wang, Z. Li, M. Hou, J. Li, X. Yu, W. Zhang, and Shucheng Hua, 2017, Prevailing genotype distribution and characteristics of human respiratory syncytial virus in northeastern China, *Journal of Medical Virology*, 89(2), pp. 222–233.
- [152] F. Di Giallonardo, J. Kok, M. Fernandez, I. Carter, J. Geoghegan, D. Dwyer, E. Holmes, and J. Eden, 2018, Evolution of human respiratory syncytial virus (RSV) over multiple seasons in New South Wales, Australia, *Viruses*, 10(9), pp. 1–13.
- [153] S. A. Schobel, K. M. Stucker, M. L. Moore, L. J. Anderson, E. K. Larkin, J. Shankar, J. Bera, 2016, Respiratory Syncytial Virus whole-genome sequencing identifies convergent evolution of sequence duplication in the C-terminus of the G gene, *Scientific Reports*, 6(1), pp. 26311.
- [154] S. Goya, M. F. Lucion, M. H. Shilts, M. V. Juárez, A. Gentile, A. S. Mistchenko, M. Viegas, and Suman R Das, 2023, Evolutionary dynamics of respiratory syncytial virus in Buenos Aires: Viral diversity, migration, and subgroup replacement, *Virus Evolution*, 9(1), pp.1-10.
- [155] X. Chen, Y. Zhu, W. Wang, C. Li, S. An, G. Lu, R. Jin, 2021, A multi-center study on Molecular Epidemiology of Human Respiratory Syncytial Virus from Children with Acute Lower Respiratory Tract Infections in the Mainland of China between 2015 and 2019, *Virologica Sinica*, 36(6), pp. 1475–1483.
- [156] M. Jiang, Y. Xu, H. Wu, R. Zhu, Y. Sun, D. Chen, F. Wang, 2023, Changes in endemic patterns of respiratory syncytial virus infection in pediatric patients under the pressure of nonpharmaceutical interventions for COVID-19 in Beijing, China, *Journal of Medical Virology*, 95(1), pp. 1-13.
- [157] M. S. H. Haider, W. H. Khan, F. Deeba, S. Ali, A. Ahmed, I. H. Naqvi, R. Dohare, 2018, BA9 lineage of respiratory syncytial virus from across the globe and its evolutionary dynamics, *PLOS ONE*, 13(4), pp. e0193525.
- [158] J. C. Muñoz-Escalante, A. Comas-García, S. Bernal-Silva, and D. E. Noyola,

- 2021, Respiratory syncytial virus B sequence analysis reveals a novel early genotype, *Scientific Reports*, 11(1), pp. 3452.
- [159] I. C. Dapat, Y. Shobugawa, Y. Sano, R. Saito, A. Sasaki, Y. Suzuki, A. Kumaki, 2010, New Genotypes within Respiratory Syncytial Virus Group B Genotype BA in Niigata, Japan, *Journal of Clinical Microbiology*, 48(9), pp. 3423–3427.
- [160] C.-S. Khor, I.-C. Sam, P.-S. Hooi, and Y.-F. Chan, 2013, Displacement of predominant respiratory syncytial virus genotypes in Malaysia between 1989 and 2011, *Infection, Genetics and Evolution*, 14, pp. 357–360.
- [161] E. A. F. Simões, V. Dani, V. Potdar, R. Crow, S. Satav, M. S. Chadha, D. Hessong, P. Carosone-Link, S. Palaskar, A. Satav, 2021, Mortality From Respiratory Syncytial Virus in Children Under 2 Years of Age: A Prospective Community Cohort Study in Rural Maharashtra, India, *Clinical Infectious Diseases*, 73, (Supplement_3), pp. S193–S202.
- [162] W. W. Phyu, K. T. Z. Htwe, R. Saito, Y. Kyaw, N. Lin, C. Dapat, H. Osada, 2021, Evolutionary analysis of human respiratory syncytial virus collected in Myanmar between 2015 and 2018, *Infection, Genetics and Evolution*, 93, pp. 104927.
- [163] J. Song, H. Wang, J. Shi, A. Cui, Y. Huang, L. Sun, X. Xiang 2017, Emergence of BA9 genotype of human respiratory syncytial virus subgroup B in China from 2006 to 2014, *Scientific Reports*, 7(1), pp. 16765.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1: Quyết định về việc ban hành “Kế hoạch giám sát trọng điểm hội chứng cúm, nhiễm trùng đường hô hấp cấp tính nặng và bệnh tay chân miệng tại Việt Nam giai đoạn 2017-2020”

Phụ lục 2: Danh sách các mẫu bệnh phẩm dương tính RSV thu thập từ bệnh nhân nhi viêm đường hô hấp cấp tính nặng tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh, 2017-2020.

Phụ lục 3: Danh sách các chủng RSV phân lập từ bệnh nhân nhi viêm đường hô hấp cấp tính nặng thu thập tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh, 2017-2020

Phụ lục 4: Danh sách trình tự genome RSV-A đăng ký mã định danh trên cơ sở dữ liệu GISAID

Phụ lục 5: Danh sách trình tự genome RSV-B đăng ký mã định danh trên cơ sở dữ liệu GISAID

Phụ lục 6: Tờ trình sử dụng mẫu lưu và giấy xác nhận cho phép sử dụng mẫu lưu của Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương

Phụ lục 1

BỘ Y TẾ

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Số: 4608/QĐ-BYT

Hà Nội, ngày 11 tháng 10 năm 2017

QUYẾT ĐỊNH

Về việc ban hành “Kế hoạch giám sát trọng điểm hội chứng cúm, nhiễm trùng đường hô hấp cấp tính nặng và bệnh tay chân miệng tại Việt Nam giai đoạn 2017-2020”

BỘ TRƯỞNG BỘ Y TẾ

Căn cứ Nghị định số 75/2017/NĐ-CP ngày 20 tháng 6 năm 2017 của Chính phủ quy định chức năng, nhiệm vụ, quyền hạn và cơ cấu tổ chức Bộ Y tế;
Xét đề nghị của Cục trưởng Cục Y tế dự phòng, Bộ Y tế,

QUYẾT ĐỊNH:

Điều 1. Ban hành kèm theo Quyết định này “Kế hoạch giám sát trọng điểm hội chứng cúm (ILI), nhiễm trùng đường hô hấp cấp tính nặng (SARI) và bệnh tay chân miệng (TCM) tại Việt Nam giai đoạn 2017-2020”.

Điều 2. Viện Vệ sinh dịch tễ, Viện Pasteur là đầu mối phối hợp với Sở Y tế các tỉnh, thành phố tổ chức triển khai các điểm giám sát trên địa bàn phụ trách, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương là đầu mối tổng hợp báo cáo số liệu về Bộ Y tế (Cục Y tế dự phòng) theo kế hoạch đã được phê duyệt.

Điều 3. Quyết định này có hiệu lực kể từ ngày ký, ban hành.

Điều 4. Các ông, bà: Chánh Văn phòng Bộ; Chánh Thanh tra Bộ; Vụ trưởng, Cục trưởng các Vụ, Cục thuộc Bộ Y tế; Viện trưởng Viện Vệ sinh dịch tễ, Viện Pasteur; Giám đốc các cơ sở khám bệnh, chữa bệnh trực thuộc Bộ Y tế; Giám đốc Sở Y tế; Giám đốc Trung tâm Y tế dự phòng, Trung tâm Truyền thông giáo dục sức khỏe, Bệnh viện đa khoa các tỉnh, thành phố trực thuộc Trung ương; Thủ trưởng các đơn vị có liên quan chịu trách nhiệm thi hành Quyết định này./.

Nơi nhận:

- Như Điều 4;
- BT. Nguyễn Thị Kim Tiến (để báo cáo);
- Các Đồng chí Thứ trưởng (để phối hợp);
- Công TTĐT Bộ Y tế;
- Lưu: VT, DP.

KT. BỘ TRƯỞNG
THỨ TRƯỞNG



Nguyễn Thanh Long

BỘ Y TẾ

KẾ HOẠCH

GIÁM SÁT TRỌNG ĐIỂM HỘI CHỨNG CÚM, NHIỄM TRÙNG ĐƯỜNG HÔ HẤP CẤP TÍNH NẶNG VÀ BỆNH TAY CHÂN MIỆNG TẠI VIỆT NAM GIAI ĐOẠN 2017-2020

*(Ban hành kèm theo Quyết định số 4608/QĐ-BYT ngày 11 tháng 10 năm 2017
của Bộ trưởng Bộ Y tế)*

Hà Nội, tháng 10 năm 2017

MỤC LỤC

PHẦN I. ĐẶT VẤN ĐỀ.....	4
PHẦN II. NỘI DUNG GIÁM SÁT	6
A. GIÁM SÁT TRỌNG ĐIỂM HỘI CHỨNG CÚM (ILI)	6
I. Mục tiêu	6
II. Phương pháp và nội dung giám sát	6
1. Điểm giám sát.....	6
2. Đối tượng giám sát	6
3. Chọn mẫu.....	7
4. Thu thập thông tin dịch tễ.....	7
5. Các chỉ số giám sát.....	7
6. Lấy mẫu, bảo quản, vận chuyển bệnh phẩm	8
7. Tổ chức xét nghiệm bệnh phẩm và phản hồi, báo cáo kết quả xét nghiệm	8
8. Quản lý dữ liệu và quy định về báo cáo	9
B. GIÁM SÁT TRỌNG ĐIỂM SARI	9
I. Mục tiêu	9
II. Phương pháp và nội dung giám sát	9
1. Địa điểm giám sát.....	9
2. Đối tượng giám sát	10
3. Chọn mẫu.....	10
4. Thu thập thông tin dịch tễ.....	10
5. Các chỉ số giám sát.....	10
6. Lấy mẫu, bảo quản, vận chuyển bệnh phẩm	11
7. Tổ chức xét nghiệm bệnh phẩm và phản hồi, báo cáo kết quả xét nghiệm	11
8. Quản lý dữ liệu và quy định về báo cáo	11
C. GIÁM SÁT TRỌNG ĐIỂM TAY CHÂN MIỆNG	11
I. Mục tiêu	11
II. Nội dung và phương pháp giám sát.....	11
1. Địa điểm giám sát.....	11
2. Đối tượng giám sát	12

3. Chọn mẫu.....	12
4. Thu thập thông tin dịch tễ.....	12
5. Các chỉ số giám sát.....	12
6. Lấy mẫu, bảo quản, vận chuyển bệnh phẩm của bệnh nhân TCM	13
7. Tổ chức xét nghiệm bệnh phẩm và phản hồi, báo cáo kết quả xét nghiệm	13
8. Quản lý dữ liệu và quy định về báo cáo	13
PHẦN III. TỔ CHỨC THỰC HIỆN	14
PHẦN IV. KINH PHÍ GIÁM SÁT TRỌNG ĐIỂM.....	16
PHẦN V. PHỤ LỤC	17
Phụ lục 1: Dự toán kinh phí giám sát trọng điểm ILI, SARI, TCM tại Việt Nam, giai đoạn 2017-2020	17
Phụ lục 2: Hướng dẫn lấy mẫu, đóng gói, bảo quản, vận chuyển, lưu trữ, xét nghiệm và các biểu mẫu báo cáo giám sát trọng điểm hội chứng cúm	31
I. Lấy mẫu, đóng gói, bảo quản và vận chuyển bệnh phẩm.....	31
II. Nhận, bảo quản và lưu trữ bệnh phẩm tại phòng thí nghiệm	31
III. Quy trình xét nghiệm.....	31
IV. Các biểu mẫu thống kê, báo cáo giám sát hội chứng cúm	31
Phụ lục 3: Hướng dẫn lấy mẫu, đóng gói, bảo quản, vận chuyển, lưu trữ, xét nghiệm và các biểu mẫu báo cáo giám sát trọng điểm bệnh tay chân miệng.....	44
I. Lấy mẫu, đóng gói, bảo quản và vận chuyển bệnh phẩm.....	44
II. Hướng dẫn xử lý bệnh phẩm phân, dịch nốt phỏng và dịch ngoáy họng.....	46
III. Quy trình xét nghiệm.....	48
IV. Các biểu mẫu thống kê, báo cáo giám sát bệnh tay chân miệng.....	49

DANH MỤC VIẾT TẮT

BVĐK	Bệnh viện đa khoa
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations Tổ chức Lương thực và Nông nghiệp Liên Hiệp Quốc
ILI	Influenza-like illness Hội chứng cúm
PCR	Polymerase Chain Reaction Phản ứng trùng hợp chuỗi
RT - PCR	Phản ứng chuỗi trùng hợp phiên mã ngược
Real time RT - PCR	Phản ứng chuỗi trùng hợp theo thời gian thực
SARI	Severe Acute Respiratory Infection Nhiễm trùng đường hô hấp cấp tính nặng
TCM	Tay chân miệng
TCMR	Tiêm chủng mở rộng
TTYTDP	Trung tâm Y tế dự phòng
USCDC	United State Centers for Disease Control and Prevention Trung tâm Kiểm soát và Phòng ngừa dịch bệnh Hoa Kỳ
VSDT	Vệ sinh dịch tễ
VRĐR	Vì rút đường ruột
WHO	World Health Organization Tổ chức Y tế Thế giới

PHẦN I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây tình hình dịch bệnh trên thế giới diễn biến phức tạp, nhiều dịch bệnh mới nổi và nguy hiểm phát sinh, gia tăng đột biến tại nhiều nước trên thế giới, gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe và kinh tế cho cộng đồng, kể cả các quốc gia phát triển.

Dịch bệnh cúm A(H7N9) tiếp tục xảy ra tại Trung Quốc, đợt dịch lần thứ 5 bắt đầu từ tháng 10 năm 2016 tới nay là đợt dịch lớn nhất với hơn 742 trường hợp mắc, 227 trường hợp tử vong tại 30 tỉnh, thành phố, trong đó có hai tỉnh Vân Nam, Quảng Tây có chung đường biên giới với Việt Nam. Từ năm 2013 đến nay, ghi nhận 5 đợt dịch với tổng số 1.589 trường hợp mắc, 616 trường hợp tử vong. WHO và FAO thông báo đã phát hiện sự biến đổi gen từ độc lực thấp sang độc lực cao của vi rút cúm A(H7N9). Bệnh dịch cúm A(H5N1) tiếp tục xảy ra tại Ai Cập, ghi nhận 03 trường hợp mắc, 01 tử vong; tích lũy từ năm 2003 đến tháng 7/2017 ghi nhận 859 trường hợp mắc, 453 trường hợp tử vong tại 16 quốc gia. Tại Việt Nam, từ năm 2015 đến nay không ghi nhận trường hợp mắc cúm A(H7N9), cúm A(H5N1), cúm A(H5N6) trên người, tuy nhiên liên tục ghi nhận các ổ dịch cúm A(H5N1), cúm A(H5N6) trên gia cầm tại nhiều tỉnh, thành phố trong cả nước, nên luôn có nguy cơ rất cao lây nhiễm sang người và bùng phát dịch bệnh.

Các số liệu trong vòng 10 năm giám sát hội chứng cúm (từ năm 2006) cho thấy các vi rút cúm lưu hành quanh năm ở Việt Nam, với tỉ lệ mắc cúm hàng năm khoảng 21%; trong khi đó, tỉ lệ nhiễm cúm ở các bệnh nhân mắc hội chứng nhiễm trùng đường hô hấp cấp tính nặng (SARI) và bệnh nhân viêm phổi nặng nghi do vi rút dao động trong khoảng từ 12% đến 17%. Kết quả xét nghiệm 1.370 mẫu SARI: Tỷ lệ (+) 19,7%, tương tự các năm trước: H1N1 (9,3%); H3N2 (2,5%), B (7,9%).

Bệnh tay chân miệng: bệnh vẫn lưu hành ở mức cao tại một số nước khu vực châu Á - Thái Bình Dương, tại Trung Quốc ghi nhận 2.141.471 trường hợp mắc, 204 trường hợp tử vong; Nhật Bản, ghi nhận 61.965 trường hợp mắc; Sing-ga-po ghi nhận 39.911 trường hợp mắc. Tại Việt Nam, tích lũy từ đầu năm 2017 đến tuần 38, cả nước ghi nhận 71.645 trường hợp mắc tại 63 tỉnh, thành phố, trong đó có 32.356 trường hợp nhập viện, không có trường hợp tử vong. So với cùng kỳ năm 2016, số trường hợp nhập viện tăng 11,1%. Số mắc tích lũy tăng cao tập trung tại một số tỉnh, thành phố tại miền Nam như Đồng Nai (tỷ lệ mắc/100.000 dân là 245), TP. Hồ Chí Minh (234), Bà Rịa Vũng Tàu (198), Đồng Tháp (184) và Bình Dương (163). Sự lưu hành của các chủng vi rút gây bệnh tay chân miệng ảnh hưởng rất lớn đến nguy cơ gây biến chứng của bệnh, các trường hợp tử vong hầu hết là do nhiễm chủng EV71.

Hoạt động của hệ thống giám sát bệnh truyền nhiễm gây dịch của Việt Nam thực hiện theo Thông tư số 54/2015/IT-BYT ngày 28/12/2015 về việc Hướng dẫn chế độ thông tin báo cáo và khai báo bệnh, dịch bệnh truyền nhiễm thay thế Thông tư số 48/2010/TT-BYT ngày 31 tháng 12 năm 2010 của Bộ

trường Bộ Y tế. Đây là một hệ thống giám sát hoạt động thường xuyên và thống nhất trên toàn quốc từ tuyến xã, phường lên đến tuyến Trung ương cả ở hệ dự phòng và các cơ sở điều trị. Tuy nhiên, để làm rõ đặc điểm dịch tễ học, tác nhân gây bệnh, véc tơ truyền bệnh và các yếu tố nguy cơ, hàng năm, Bộ Y tế đã triển khai Hệ thống giám sát trọng điểm cho một số bệnh ưu tiên như: ILI, SARI, TCM, sốt xuất huyết, bệnh do vi rút Zika, viêm não Nhật Bản, dịch hạch... Trong đó một số bệnh đã được đầu tư kinh phí giám sát từ Chương trình mục tiêu quốc gia hoặc kinh phí của Bộ Y tế hoặc từ các dự án được tài trợ.

Nhằm mục đích đảm bảo duy trì việc triển khai GSTĐ bền vững, làm căn cứ huy động nguồn lực, Bộ Y tế xây dựng Kế hoạch giám sát trọng điểm hội chứng cúm (ILI), hội chứng nhiễm trùng đường hô hấp cấp tính nặng (SARI), bệnh tay chân miệng giai đoạn 2017-2020 với mục tiêu thu thập số liệu một cách chính xác, kịp thời và đầy đủ hơn các thông tin cơ bản về dịch tễ học, các yếu tố nguy cơ và các đặc điểm về tác nhân gây bệnh để làm cơ sở dự báo, lập kế hoạch phòng chống dịch bệnh trong các năm tiếp theo.

PHẦN II. NỘI DUNG GIÁM SÁT

A. GIÁM SÁT TRỌNG ĐIỂM HỘI CHỨNG CÚM (ILI)

I. Mục tiêu

1. Mô tả đặc điểm dịch tễ học của các trường hợp bệnh cúm theo các yếu tố thời gian (tuần, tháng, năm, mùa), địa điểm (tỉnh, khu vực, nông thôn, thành thị) và con người (tuổi, giới,...).

2. Xác định đặc tính kháng nguyên, tính kháng thuốc, đặc điểm di truyền của các vi rút cúm lưu hành và phát hiện ra các chủng vi rút mới.

3. Cung cấp thông tin cho việc đánh giá gánh nặng bệnh cúm và dự báo dịch bệnh cúm và chia sẻ với hệ thống mạng lưới giám sát cúm toàn cầu.

II. Phương pháp và nội dung giám sát

1. Điểm giám sát

a) Số lượng: chọn tối thiểu 2 điểm giám sát (bệnh viện) tại mỗi vùng sinh thái theo từng khu vực.

b) Tiêu chuẩn lựa chọn điểm giám sát:

- Mức độ giao lưu lớn.

- Phân bố theo khu vực thành thị, nông thôn.

- Các Bệnh viện giám sát trọng điểm ưu tiên những điểm có thể lồng ghép giám sát các bệnh truyền nhiễm khác và có lưu lượng bệnh nhân đến khám đủ lớn, tối thiểu 50 bệnh nhân/ tuần.

- Các đơn vị tham gia cần cam kết hợp tác chặt chẽ, đội ngũ cán bộ có năng lực đủ khả năng trong việc thực hiện các hoạt động chuyên môn giám sát trọng điểm, có khả năng duy trì lâu dài hoạt động giám sát.

c) Các điểm giám sát trọng điểm hội chứng cúm

Khu vực	Vùng	Tên điểm giám sát	2017	2018	2019	2020
Miền Bắc	Đông Bắc	BV huyện Cao Lộc, tỉnh Lạng Sơn	x	x	x	x
	Đồng bằng sông Hồng	BV huyện Kiến Xương, tỉnh Thái Bình	x	x	x	x
Miền Trung	Duyên hải Nam Trung bộ	BV ĐK Khu vực Ninh Hòa, Khánh Hòa	x	x	x	x
		BV Trung ương Huế	T1-9			
		BV huyện Phú Vang, Thừa Thiên Huế	T10-12	x	x	x
Tây Nguyên	Tây Nguyên	BV ĐK tỉnh Đắk Lắk	x	x	x	x
		BV ĐK tỉnh Kon Tum	x	x	x	x
Miền Nam	Đông Nam bộ	BV ĐK huyện Xuân Lộc, tỉnh Đồng Nai	x	x	x	x
	Tây Nam bộ	BV ĐK huyện Cái Bè, tỉnh Tiền Giang	x	x	x	x

2. Đối tượng giám sát

Là trường hợp bệnh điều trị ngoại trú với biểu hiện nhiễm trùng đường hô hấp cấp tính bao gồm:

- Sốt $\geq 38^{\circ}\text{C}$ và
- Ho và
- Khởi phát trong vòng 10 ngày.

3. Chọn mẫu

- Hàng ngày, bác sĩ ở phòng khám bệnh khám chọn và lấy mẫu của 2 trường hợp bệnh phù hợp định nghĩa trường hợp bệnh trong ngày làm việc (từ thứ 2 đến thứ 6). Điều tra trường hợp bệnh theo biểu mẫu quy định (Mẫu 1, Phụ lục 2).

- Số mẫu cần thu thập/điểm giám sát:

$10 \text{ mẫu/điểm giám sát/tuần} \times 52 \text{ tuần/năm} = 520 \text{ mẫu/điểm giám sát/năm}$.

Nếu trong ngày không có đủ 02 trường hợp mắc ILI để lấy mẫu, có thể lấy bù trong các ngày tiếp theo cho đến thứ Sáu của tuần đó, nếu đến thứ Sáu không đủ thì dừng lại (không lấy bù vào thứ Bảy và Chủ nhật và các tuần sau).

4. Thu thập thông tin dịch tễ

Các điểm giám sát lấy mẫu sử dụng các phiếu, biểu mẫu theo quy định:

- Phiếu điều tra thông tin trường hợp hội chứng cúm: điều tra thông tin về tuổi, giới, nghề nghiệp, địa chỉ, ngày khởi phát, ngày lấy mẫu, tiền sử tiêm vắc xin phòng cúm và sử dụng thuốc kháng vi rút (Mẫu 1, Phụ lục 2).

- Phiếu báo cáo thống kê hàng tuần: thống kê số lượng bệnh nhân đến khám, số trường hợp mắc hội chứng cúm đến khám theo nhóm tuổi, danh sách trường hợp mắc hội chứng cúm được lấy mẫu (Mẫu 2, Phụ lục 2).

5. Các chỉ số giám sát

a) Các chỉ số về dịch tễ học hội chứng cúm

- Tỷ lệ bệnh nhân mắc hội chứng cúm trên tổng số bệnh nhân đến khám.
- Tỷ lệ, phân bố bệnh nhân mắc hội chứng cúm được lấy mẫu trong giám sát theo nhóm tuổi, giới tính, địa dư, thời gian.

b) Đặc điểm vi rút học và sự lưu hành của vi rút cúm

- Tỷ lệ phần trăm dương tính với các tuýp vi rút cúm (bao gồm cả cúm A và B) trong tổng số mẫu được xét nghiệm.

- Tỷ lệ phần trăm dương tính với từng phân tuýp (A(H5N1), A(H5N6), A(H7N9), A(H3N2), A(H1N1pdm); B; đồng nhiễm,...) trong tổng số xét nghiệm dương tính với cúm theo thời gian (tuần, tháng).

- Tỷ lệ phần trăm của từng tuýp vi rút trong tổng số mẫu xét nghiệm dương tính theo thời gian (tuần, tháng).

- Tỷ lệ phần trăm dương tính theo từng tuýp và theo khu vực.

- Tỷ lệ phần trăm dương tính theo nhóm tuổi, giới.

- Đặc tính kháng nguyên, đặc điểm di truyền của các chủng cúm lưu hành tại Việt Nam.

6. Lấy mẫu, bảo quản, vận chuyển bệnh phẩm

- Tiến hành lấy mẫu trên đối tượng mắc hội chứng cúm phù hợp định nghĩa. Mẫu bệnh phẩm có thể là một trong các loại: dịch ngoáy họng, dịch ngoáy mũi, dịch tỵ hầu. Thực hiện theo đúng quy trình kỹ thuật lấy mẫu bệnh phẩm (Phụ lục 2).

- Bảo quản bệnh phẩm: Bệnh phẩm sau khi lấy được bảo quản ở 4⁰C-8⁰C (trong vòng 72 giờ) trước khi được vận chuyển tới các phòng xét nghiệm của Viện VSDT, Viện Pasteur. Đối với các điểm giám sát ở xa không có điều kiện vận chuyển trong vòng 72 giờ thì bệnh phẩm phải được bảo quản trong tủ ở nhiệt độ -70⁰C ngay sau khi thu thập (Phụ lục 2).

- Vận chuyển bệnh phẩm: vận chuyển ít nhất 1 lần/tuần từ điểm giám sát về TTYTDP và 1 lần/tuần từ TTYTDP về các Viện VSDT, Viện Pasteur để xét nghiệm. Các điểm giám sát thuộc khu vực nào quản lý thì chuyển mẫu bệnh phẩm về Viện khu vực đó.

- Tại các Viện VSDT, Viện Pasteur, bệnh phẩm được xét nghiệm ngay hoặc được bảo quản ở nhiệt độ -70⁰C chờ xét nghiệm.

7. Tổ chức xét nghiệm bệnh phẩm và phản hồi, báo cáo kết quả xét nghiệm

Khi bệnh phẩm, phiếu điều tra trường hợp bệnh (Mẫu 1, Phụ lục 2) và phiếu lấy mẫu bệnh phẩm (Mẫu 5, Phụ lục 2) được chuyển đến phòng xét nghiệm của Viện VSDT, Viện Pasteur, bên giao và bên nhận phải ký xác nhận vào Sổ giao nhận bệnh phẩm, Phiếu giám sát ILI, Báo cáo tuần (Mẫu 3, Phụ lục 2).

7.1. Xét nghiệm bệnh phẩm

Sau khi nhận được bệnh phẩm từ các điểm giám sát được phân công phụ trách, phòng xét nghiệm tại các Viện VSDT, Viện Pasteur sẽ tiến hành xét nghiệm các mẫu bệnh phẩm trước thứ Năm hàng tuần theo Hướng dẫn nhận, bảo quản, lưu trữ, xét nghiệm bệnh phẩm ILI (Phụ lục 2) để đảm bảo kết quả xét nghiệm được gửi đến các đơn vị liên quan đúng thời gian quy định.

7.2. Phản hồi, báo cáo kết quả xét nghiệm

- Sau khi hoàn thành xét nghiệm, phòng xét nghiệm của Viện VSDT, Viện Pasteur sẽ tổng hợp kết quả vào Bảng kết quả xét nghiệm bệnh nhân ILI (Mẫu 6, Phụ lục 2). Mẫu 6, Phụ lục 2 sẽ được gửi đến các điểm giám sát và các khoa dịch tễ tại các Viện VSDT, Viện Pasteur trước 16h00 vào thứ Sáu hàng tuần. Trong trường hợp cần xác định lại kết quả thì phòng xét nghiệm của Viện VSDT, Viện Pasteur sẽ thông báo cho các đơn vị nhận kết quả xét nghiệm về các mẫu cần xác định lại, đồng thời báo cáo kết quả phải được gửi đến các đơn vị này trước 16h00 thứ Hai của tuần kế tiếp.

- Đối với các tác nhân mới hoặc nguy hiểm, trong đó có vi rút cúm A/H5 hoặc A/H7, kết quả phải được thông báo ngay theo quy định hiện hành. Trong trường hợp kết quả xét nghiệm không được gửi trả cho các điểm giám sát theo

thời gian quy định, phòng xét nghiệm của Viện VSDT, Viện Pasteur cần thông báo cho các đơn vị khi nào họ có thể nhận được kết quả và giải thích.

- Đối với các tác nhân cúm A không phân tuýp được, các Viện gửi mẫu bệnh phẩm đến các phòng xét nghiệm tham chiếu để xác định.

8. Quản lý dữ liệu và quy định về báo cáo

- Viện VSDT Trung ương là đầu mối thu thập thông tin về xét nghiệm và các số liệu giám sát.

- Các Viện VSDT, Viện Pasteur có trách nhiệm định kỳ tổng hợp gửi báo cáo hàng tuần về tiến độ thực hiện, số liệu giám sát, kết quả xét nghiệm về Viện VSDT Trung ương và Cục Y tế dự phòng.

- Viện VSDT Trung ương sẽ tổng hợp báo cáo Bộ Y tế (Cục Y tế dự phòng) hàng tuần.

B. GIÁM SÁT TRỌNG ĐIỂM HỘI CHỨNG NHIỄM TRÙNG ĐƯỜNG HÔ HẤP CẤP TÍNH NẶNG (SARI)

I. Mục tiêu

- Thu thập, phân tích một cách hệ thống và thường xuyên dữ liệu dịch tễ học của các trường hợp SARI tại một số bệnh viện trọng điểm.

- Xác định sự lưu hành của các chủng vi rút cúm và một số vi rút đường hô hấp khác thường gặp gây SARI tại Việt Nam.

- Xây dựng cơ sở dữ liệu về mức độ hoạt động của vi rút cúm và một số vi rút đường hô hấp thường gặp khác gây SARI nhằm đóng góp cho việc dự báo dịch bệnh cúm và nhiễm trùng đường hô hấp cấp tính nặng.

II. Phương pháp và nội dung giám sát

1. Địa điểm giám sát

Tại các bệnh viện tuyến Trung ương, tỉnh, huyện.

Viện VSDT, Viện Pasteur khu vực thực hiện lựa chọn điểm giám sát theo các nội dung sau:

- a) Số lượng: chọn từ 1 đến 2 điểm giám sát (bệnh viện) tại mỗi vùng sinh thái theo mỗi khu vực.

- b) Tiêu chuẩn lựa chọn:

- Các bệnh viện đa khoa tuyến trung ương, tỉnh, huyện có số lượng bệnh nhân SARI nhập viện đủ lớn (trung bình ≥ 10 bệnh nhân SARI/tuần).

- Có mô hình bệnh tật đa dạng.

- Có đủ điều kiện, trang thiết bị, đội ngũ cán bộ có đủ khả năng thực hiện các hoạt động chuyên môn giám sát SARI.

- Phối hợp chặt chẽ và cam kết duy trì hoạt động giám sát lâu dài.

c) Các điểm giám sát trọng điểm SARI

Khu vực	Vùng	Tên điểm giám sát	2017	2018	2019	2020
Miền Bắc	Đông Bắc	Bệnh viện đa khoa tỉnh Quảng Ninh	x	x	x	x
	Tây Bắc	Bệnh viện đa khoa tỉnh Điện Biên	x	x	x	x
	Đồng bằng sông Hồng	BV Nhi Trung ương	x	x	x	x
Miền Trung	Duyên hải Nam Trung bộ	BV ĐK tỉnh Khánh Hòa	x	x	x	x
		BV Trung ương Huế	T1-9			
		BV huyện Phú Vang, Thừa Thiên Huế	T10-12	x	x	x
Tây Nguyên	Tây Nguyên	BV ĐK tỉnh Đắk Lắk	x	x	x	x
Miền Nam	Đông Nam bộ	Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới TP. HCM	x	x	x	x
		Bệnh viện Nhi đồng 1 TP. HCM	x	x	x	x
	Tây Nam bộ	Bệnh viện đa khoa An Giang	x	x	x	x
		Bệnh viện đa khoa Đồng Tháp	x	x	x	x

2. Đối tượng giám sát

Áp dụng định nghĩa trường hợp bệnh SARI của Tổ chức Y tế thế giới năm 2014 như sau (cho tất cả các độ tuổi):

Một trường hợp nhiễm trùng đường hô hấp cấp tính nặng với các tiêu chí sau:

- Tiền sử bị sốt hoặc sốt với nhiệt độ đo được $\geq 38^{\circ}\text{C}$; và
- Ho; và
- Khởi phát trong vòng 10 ngày; và
- Yêu cầu nhập viện (bệnh nhân nội trú).

3. Chọn mẫu

a) Số mẫu cần thu thập/điểm giám sát:

10 mẫu/điểm giám sát/tuần x 52 tuần/năm = 520 mẫu/điểm giám sát/năm.

b) Cách chọn: theo Hướng dẫn giám sát SARI ban hành theo Quyết định số 1271/QĐ-BYT ngày 03/4/2017.

4. Thu thập thông tin dịch tễ

Thực hiện theo Hướng dẫn giám sát SARI ban hành theo Quyết định số 1271/QĐ-BYT ngày 03/4/2017.

5. Các chỉ số giám sát

5.1. Đặc điểm dịch tễ học SARI tại Việt Nam

Thu thập và phân tích các chỉ số sau:

- Tỷ lệ mắc SARI trên tổng số lượt bệnh nhân nhập viện.
- Tỷ lệ, phân bố số mắc và tử vong do SARI theo thời gian, địa điểm, con người.
- Tỷ lệ tử vong do SARI trong tổng số lượt bệnh nhân SARI nhập viện.
- Tỷ lệ tử vong do SARI trong tổng số tử vong do tất cả các nguyên nhân.

5.2. Sự lưu hành của vi rút cúm và một số vi rút đường hô hấp khác thường gặp gây SARI tại Việt Nam

Thu thập và phân tích các chỉ số sau:

- Tỷ lệ phần trăm từng tác nhân vi rút gây SARI trong tổng số những trường hợp SARI được xét nghiệm theo thời gian, địa điểm, con người.
- Tỷ lệ phần trăm các phân tuýp vi rút cúm trong tổng số trường hợp SARI nhiễm vi rút cúm theo thời gian, địa điểm, con người.

6. Lấy mẫu, bảo quản, vận chuyển bệnh phẩm của bệnh nhân SARI

Theo Hướng dẫn giám sát SARI ban hành theo Quyết định số 1271/QĐ-BYT ngày 03/4/2017.

7. Tổ chức xét nghiệm bệnh phẩm và phản hồi, báo cáo kết quả xét nghiệm

Thực hiện theo Hướng dẫn giám sát SARI ban hành theo Quyết định số 1271/QĐ-BYT ngày 03/4/2017.

8. Quản lý dữ liệu và quy định về báo cáo

Thực hiện theo Hướng dẫn giám sát SARI ban hành theo Quyết định số 1271 /QĐ- BYT ngày 03/4/2017.

C. GIÁM SÁT TRỌNG ĐIỂM BỆNH TAY CHÂN MIỆNG

I. Mục tiêu

- Mô tả đặc điểm dịch tễ học của các trường hợp bệnh tay chân miệng theo các yếu tố thời gian (tuần, tháng, năm, mùa), địa điểm (tỉnh, khu vực, nông thôn, thành thị) và con người (tuổi, giới,...).
- Xác định sự lưu hành, đặc điểm di truyền của các chủng vi rút đường ruột gây bệnh tay chân miệng.
- Cung cấp thông tin cho việc dự báo dịch bệnh tay chân miệng.

II. Nội dung và phương pháp giám sát

1. Địa điểm giám sát

Tại các bệnh viện tuyến tỉnh, huyện.

Viện VSDT, Viện Pasteur khu vực thực hiện lựa chọn điểm giám sát theo các nội dung sau:

a) Số lượng: chọn ít nhất 1 điểm giám sát (bệnh viện) tại mỗi khu vực.

b) Tiêu chuẩn lựa chọn:

- Địa điểm giám sát được lựa chọn ở 4 khu vực trong cả nước và cần có sự đa dạng về các đặc điểm kinh tế xã hội, địa dư (nông thôn, thành thị, miền núi, duyên hải, hải đảo ...), mức độ giao lưu (trung tâm kinh tế, du lịch, cửa khẩu ...).

- Các điểm giám sát bệnh nhân được lựa chọn tại các Bệnh viện đa khoa có số lượng trường hợp bệnh tay chân miệng lớn; ưu tiên những điểm có thể lồng ghép giám sát các bệnh truyền nhiễm khác như ILI, SARI, sốt xuất huyết,

...

- Các đơn vị tham gia cần cam kết hợp tác chặt chẽ, đội ngũ cán bộ có năng lực đủ khả năng trong việc thực hiện các hoạt động chuyên môn giám sát trọng điểm, có khả năng duy trì lâu dài hoạt động giám sát.

c) Các điểm giám sát bệnh tay chân miệng

Khu vực	Vùng	Tên điểm giám sát	2017	2018	2019	2020
Miền Bắc	Đồng bằng sông Hồng	BV Trẻ em Hải Phòng	x	x	x	x
		BV Nhi tỉnh Thái Bình	x	x	x	x
Miền Trung	Bắc Trung bộ	BV huyện Hương Thủy, tỉnh TT Huế	x	x	x	x
		Bệnh viện Phụ Sản - Nhi Đà Nẵng	x	x	x	x
	Nam Trung bộ	BVĐK khu vực Ninh Hòa, tỉnh Khánh Hòa	x	x	x	x
Tây Nguyên	Tây Nguyên	BVĐK huyện Buôn Đôn, tỉnh Đắk Lắk	x	x	x	x
Miền Nam	Đông Nam bộ	BV Nhi đồng 1 TP. Hồ Chí Minh	x	x	x	x
		BVĐK tỉnh Tây Ninh	x	x	x	x
	Tây Nam bộ	BV Nhi đồng Cần Thơ	x	x	x	x
		BVĐK tỉnh Đồng Tháp	x	x	x	x

2. Đối tượng giám sát

Là trường hợp bệnh, khởi phát trong vòng 7 ngày có các triệu chứng sau:

- Sốt;
- Phát ban, chủ yếu dạng phỏng nước ở một hoặc các vị trí lòng bàn tay, lòng bàn chân, đầu gối, mông, miệng, có thể kèm theo loét ở miệng.

3. Chọn mẫu

- Tại mỗi điểm giám sát chọn 2 bệnh nhân thỏa mãn tiêu chí lựa chọn đối tượng giám sát trong ngày làm việc (từ thứ 2 đến thứ 6). Điều tra trường hợp bệnh theo biểu mẫu quy định (Mẫu 1, phụ lục 3).

- Số mẫu cần thu thập/điểm giám sát:

$10 \text{ mẫu/điểm giám sát/tuần} \times 52 \text{ tuần/năm} = 520 \text{ mẫu/điểm giám sát/năm}$.

Lưu ý: Nếu trong ngày không có đủ 02 bệnh nhân TCM để lấy mẫu, có thể lấy bù trong các ngày tiếp theo cho đến thứ Sáu của tuần đó, nếu đến thứ Sáu không đủ thì dừng lại (không lấy bù vào thứ Bảy và Chủ nhật và các tuần sau).

4. Thu thập thông tin dịch tễ

Điều tra theo mẫu phiếu điều tra trường hợp bệnh (Mẫu 1, Phụ lục 3) thỏa mãn đối tượng giám sát.

5. Các chỉ số giám sát

- Tỷ lệ, phân bố mắc, chết do bệnh tay chân miệng theo nhóm tuổi, giới tính, địa dư, thời gian, tuýp vi rút.
- Tỷ lệ chết/mắc (CFR) do bệnh tay chân miệng.
- Tỷ lệ bệnh tay chân miệng trong tổng số bệnh nhân đến khám bệnh tại các điểm giám sát.

- Tỷ lệ phần trăm dương tính với các tuýp vi rút gây bệnh tay chân miệng trong tổng số mẫu được xét nghiệm.

- Tỷ lệ phần trăm dương tính với các tuýp vi rút gây bệnh tay chân miệng trong tổng số xét nghiệm theo thời gian (tuần, tháng).

- Tỷ lệ phần trăm của từng tuýp vi rút trong tổng số mẫu xét nghiệm dương tính theo địa dư, theo nhóm tuổi.

- Tỷ lệ phần trăm các kiểu gen của vi rút đường ruột tuýp 71 (EV-A71) gây bệnh tay chân miệng lưu hành tại Việt Nam.

6. Lấy mẫu, bảo quản, vận chuyển bệnh phẩm của bệnh nhân TCM

- Mẫu bệnh phẩm thu thập có thể là mẫu phân, mẫu ngoáy họng và dịch nốt phỏng. Mỗi trường hợp bệnh nên lấy đủ hai mẫu phân và dịch ngoáy họng/dịch nốt phỏng.

- Lấy mẫu, bảo quản, vận chuyển mẫu bệnh phẩm theo Hướng dẫn giám sát và phòng chống bệnh tay chân miệng (Phụ lục 3).

7. Tổ chức xét nghiệm bệnh phẩm và phản hồi, báo cáo kết quả xét nghiệm

Khi bệnh phẩm, phiếu điều tra trường hợp bệnh (Mẫu 1, Phụ lục 3) và Phiếu yêu cầu xét nghiệm (Mẫu 2, Phụ lục 3) được chuyển đến phòng xét nghiệm của Viện VSDT, Viện Pasteur khu vực, bên giao và bên nhận phải ký xác nhận vào Sổ giao nhận bệnh phẩm, Phiếu điều tra trường hợp bệnh, Báo cáo tuần (Mẫu 4, Phụ lục 3).

7.1. Xét nghiệm bệnh phẩm

Sau khi nhận được bệnh phẩm từ các điểm giám sát được phân công phụ trách, phòng xét nghiệm tại các Viện khu vực sẽ tiến hành xét nghiệm các mẫu bệnh phẩm trước thứ Năm hàng tuần theo Hướng dẫn xử lý, xét nghiệm bệnh phẩm TCM (Phụ lục 4) để đảm bảo kết quả xét nghiệm được gửi đến các đơn vị liên quan đúng thời gian quy định.

7.2. Phản hồi, báo cáo kết quả xét nghiệm

Sau khi hoàn thành xét nghiệm, phòng xét nghiệm của Viện VSDT, Viện Pasteur sẽ điền kết quả vào Phiếu trả lời kết quả xét nghiệm trong Mẫu 3, Phụ lục 3 và gửi đến các điểm giám sát và các khoa dịch tễ tại các Viện VSDT, Viện Pasteur trước 16h00 vào thứ Sáu hàng tuần. Trong trường hợp cần xác định lại kết quả thì phòng xét nghiệm của Viện VSDT, Viện Pasteur sẽ thông báo cho các đơn vị nhận kết quả xét nghiệm về các mẫu cần xác định lại, đồng thời báo cáo kết quả phải được gửi đến các đơn vị này trước 16h00 thứ Hai tuần kế tiếp.

8. Quản lý dữ liệu và quy định về báo cáo

- Các điểm giám sát có trách nhiệm định kỳ tổng hợp gửi báo cáo về tiến độ thực hiện, số liệu giám sát về các Viện VSDT, Viện Pasteur phụ trách.

- Các Viện VSDT, Viện Pasteur tổng hợp gửi báo cáo về tiến độ thực hiện, số liệu giám sát, kết quả xét nghiệm về Viện VSDT Trung ương để tổng hợp báo cáo Bộ Y tế (Cục Y tế dự phòng).

PHẦN III. TỔ CHỨC THỰC HIỆN

1. Cục Y tế dự phòng

- Tham mưu cho Bộ trưởng Bộ Y tế trong việc xây dựng kế hoạch và tổ chức thực hiện kế hoạch giám sát trọng điểm ILI, SARI, TCM trên phạm vi toàn quốc.

- Giải quyết thủ tục cấp phép nhập khẩu bộ môi, mẫu chứng theo văn bản đề xuất của các Viện VSDT, Viện Pasteur.

- Chỉ đạo, đôn đốc, kiểm tra, các địa phương, đơn vị triển khai các hoạt động giám sát trọng điểm theo kế hoạch được phân công.

2. Cục Quản lý Khám, chữa bệnh

- Chỉ đạo, đôn đốc các bệnh viện (các điểm giám sát) tham gia giám sát trọng điểm.

- Phối hợp kiểm tra giám sát việc thực hiện giám sát trọng điểm tại các điểm giám sát.

3. Vụ Trang thiết bị và Công trình Y tế

- Giải quyết thủ tục cấp phép nhập khẩu sinh phẩm chẩn đoán invitro, vật tư tiêu hao y tế phục vụ cho hoạt động xét nghiệm giám sát trọng điểm theo kế hoạch, văn bản đề xuất của các Viện VSDT, Viện Pasteur.

- Hỗ trợ và giải quyết thủ tục nhập khẩu phục vụ công tác giám sát đối với sinh phẩm y tế, vật tư tiêu hao chưa được cấp phép tại Việt Nam.

4. Vụ Kế hoạch – Tài chính, Bộ Y tế

- Cấp chuyển kinh phí giám sát trọng điểm cho các Viện VSDT, Viện Pasteur và các đơn vị theo kế hoạch được Lãnh đạo Bộ phê duyệt.

- Tham mưu cho Lãnh đạo Bộ Y tế về tạo nguồn, sử dụng các nguồn lực từ ngân sách nhà nước, Tổ chức Y tế thế giới (WHO), Trung tâm Phòng ngừa và Kiểm soát dịch bệnh Hoa Kỳ (USCDC) và các tổ chức trong và ngoài nước cho công tác giám sát trọng điểm phòng chống dịch bệnh.

5. Các Viện VSDT, Viện Pasteur

- Xây dựng kế hoạch, triển khai, tổ chức thực hiện hoạt động giám sát trọng điểm ILI, SARI và TCM.

- Hướng dẫn, tập huấn, hỗ trợ kỹ thuật giám sát, lấy mẫu, bảo quản, vận chuyển, xét nghiệm... cho các đơn vị tham gia giám sát trọng điểm theo khu vực được phân công.

- Tổ chức tiếp nhận, mua sắm sinh phẩm, hóa chất, vật tư tiêu hao, dụng cụ cho việc lấy mẫu, bảo quản, vận chuyển và xét nghiệm theo quy định. Phân bổ cho các đơn vị theo kế hoạch.

- Tiếp nhận mẫu xét nghiệm, thực hiện xét nghiệm theo quy trình hướng dẫn. Quản lý mẫu, lưu mẫu, chia sẻ và tiêu hủy mẫu bệnh phẩm tuân thủ quy định về chế độ quản lý mẫu bệnh phẩm.

- Thông tin kết quả xét nghiệm cho các điểm giám sát và các Viện VSDT, Viện Pasteur theo quy định.

- Tổng hợp phân tích kết quả xét nghiệm, đưa ra nhận định, dự báo, cảnh báo sớm tình hình dịch bệnh.

- Bảo đảm an toàn sinh học tại phòng xét nghiệm phù hợp với từng cấp độ.

- Các Viện VSDT, Viện Pasteur có trách nhiệm kiểm tra, giám sát, đôn đốc, hỗ trợ hoạt động giám sát trọng điểm tại các điểm giám sát trên địa bàn khu vực phụ trách.

- Viện VSDT Trung ương có trách nhiệm kiểm tra, đôn đốc, thúc đẩy hoạt động và tổng hợp số liệu giám sát trọng điểm tại Viện VSDT, Viện Pasteur và các điểm giám sát trên phạm vi cả nước.

6. Sở Y tế các tỉnh, thành phố

- Tổ chức thực hiện kế hoạch giám sát trọng điểm trên địa bàn tỉnh, thành phố. Bố trí đầy đủ nhân lực, trang thiết bị cho thực hiện giám sát trọng điểm tại địa phương. Chỉ đạo các điểm giám sát và các đơn vị liên quan thực hiện giám sát trọng điểm theo đúng nội dung và yêu cầu của kế hoạch đã được phê duyệt.

- Tổ chức kiểm tra, giám sát việc thực hiện giám sát trọng điểm tại các đơn vị có liên quan và tại các điểm giám sát.

7. TTYTDP các tỉnh, thành phố có điểm giám sát trọng điểm

- Đề xuất kế hoạch, tổ chức thực hiện giám sát trọng điểm trên địa bàn.

- Phối hợp với bệnh viện (điểm giám sát) lấy mẫu, bảo quản, vận chuyển mẫu theo quy định về các Viện VSDT, Viện Pasteur khu vực.

- Phối hợp phân bổ kịp thời sinh phẩm, hóa chất, vật tư tiêu hao... cho các điểm giám sát trên địa bàn.

- Tăng cường năng lực xét nghiệm nhằm tiến tới tự xét nghiệm ILI, TCM.

- Đôn đốc, kiểm tra các hoạt động giám sát trọng điểm trên địa bàn.

8. Các điểm giám sát

- Thực hiện giám sát trọng điểm theo kế hoạch.

- Khám, phát hiện đối tượng giám sát, điều tra theo mẫu phiếu, lấy mẫu, bảo quản, vận chuyển mẫu bệnh phẩm theo đúng các yêu cầu và hướng dẫn giám sát trọng điểm được Bộ Y tế phê duyệt, bảo đảm an toàn sinh học và chất lượng mẫu bệnh phẩm.

- Sử dụng thiết bị, nguồn lực sẵn có tại bệnh viện để thực hiện việc bảo quản mẫu bệnh phẩm theo quy định.

- Thực hiện việc tổng hợp kết quả và báo cáo theo quy định.

PHẦN IV. KINH PHÍ GIÁM SÁT TRỌNG ĐIỂM

1. Nguyên tắc

- Theo Luật ngân sách, kinh phí cho công tác giám sát trọng điểm được phân bổ cho các Viện VSDT, Viện Pasteur và các đơn vị thực hiện.
- Định mức chi tiêu cho các hoạt động của giám sát trọng điểm theo các qui định hiện hành.

2. Kế hoạch kinh phí: chi tiết tại Phụ lục 1.

- Nguồn kinh phí thường xuyên của các Viện VSDT, Viện Pasteur.
- Nguồn ngân sách nhà nước không thường xuyên.
- Nguồn kinh phí của Dự án Tăng cường năng lực thực hiện an ninh y tế toàn cầu tại Việt Nam (GHS) do Trung tâm Kiểm soát và phòng ngừa dịch bệnh Hoa Kỳ (USCDC) tài trợ và sự hỗ trợ của Tổ chức Y tế thế giới (WHO).
- Các nguồn kinh phí hợp pháp khác.

**KT. BỘ TRƯỞNG
THỨ TRƯỞNG**



Nguyễn Thanh Long

Phụ lục 2:

**DANH SÁCH CÁC MẪU BỆNH PHẨM DƯỚI TÍNH RSV THU THẬP TỪ BỆNH NHÂN NHI VIÊM ĐƯỜNG
HÔ HẤP CẤP TÍNH NẶNG TẠI BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG VÀ BỆNH VIỆN ĐA KHOA TỈNH QUẢNG NINH, 2017-2020**

STT	Mã bệnh phẩm	Giới tính	Tuổi	Ngày lấy mẫu	Năm thu mẫu	Địa điểm thu mẫu	Giá trị Ct Realtime RT-PCR
1	SARI-02-CC-17-002	Nam	1,5 tháng	1/4/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	26
2	SARI-02-CC-17-007	Nam	4 tháng	1/12/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	32
3	SARI-02-CC-17-014	Nam	15 tháng	1/27/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	22
4	SARI-02-CC-17-015	Nữ	2 tháng	1/28/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	18
5	SARI-02-CC-17-016	Nam	6,5 tháng	1/28/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	23
6	SARI-02-CC-17-019	Nam	4,5 tuổi	2/2/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	20
7	SARI-02-CC-17-021	Nam	12 tháng	2/8/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	28
8	SARI-02-CC-17-033	Nữ	5 tháng	3/1/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	26
9	SARI-02-CC-17-044	Nam	1,5 tháng	3/16/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	20
10	SARI-02-CC-17-054	Nữ	12 tháng	4/5/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	36
11	SARI-02-CC-17-063	Nam	6 tháng	4/20/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	24
12	SARI-02-CC-17-067	Nữ	8 tháng	4/27/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	32
13	SARI-02-CC-17-076	Nam	21 tháng	5/13/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	32
14	SARI-02-CC-17-077	Nam	8 tháng	5/18/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	28
15	SARI-02-CC-17-078	Nữ	13 tháng	5/18/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	24
16	SARI-02-CC-17-081	Nữ	2,5 tuổi	5/24/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	22
17	SARI-02-CC-17-086	Nữ	5,5 tháng	5/31/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	38
18	SARI-02-CC-17-089	Nữ	1,5 tháng	6/9/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	28
19	SARI-02-CC-17-092	Nam	1 tháng	6/10/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	18
20	SARI-02-CC-17-101	Nam	6 tháng	6/28/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	22

21	SARI-02-CC-17-103	Nam	23 tháng	6/29/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	19
22	SARI-02-CC-17-110	Nam	14 tháng	7/12/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	28
23	SARI-02-CC-17-111	Nam	8 tháng	7/13/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	24
24	SARI-02-CC-17-112	Nam	1 tháng	7/14/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	22
25	SARI-02-CC-17-113	Nam	8 tháng	7/19/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	34
26	SARI-02-CC-17-114	Nam	12 tháng	7/19/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	34
27	SARI-02-CC-17-115	Nữ	4 tháng	7/20/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	26
28	SARI-02-CC-17-117	Nam	1,5 tháng	7/28/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	22
29	SARI-02-CC-17-118	Nam	19 tháng	7/28/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	28
30	SARI-02-CC-17-119	Nữ	3,5 tuổi	7/29/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	26
31	SARI-02-CC-17-120	Nam	1 tháng	7/29/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	24
32	SARI-02-CC-17-121	Nam	2 tháng	8/6/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	24
33	SARI-02-CC-17-123	Nữ	3 tháng	8/6/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	20
34	SARI-02-CC-17-124	Nam	2,5 tháng	8/6/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	22
35	SARI-02-CC-17-126	Nam	10 tháng	8/9/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	20
36	SARI-02-CC-17-127	Nữ	2 tuổi	8/10/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	22
37	SARI-02-CC-17-128	Nữ	11 tháng	8/10/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	26
38	SARI-02-CC-17-129	Nữ	2,5 tháng	8/16/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	22
39	SARI-02-CC-17-130	Nam	2 tháng	8/17/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	24
40	SARI-02-CC-17-133	Nam	2 tháng	8/23/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	32
41	SARI-02-CC-17-135	Nam	2 tháng	8/26/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	18
42	SARI-02-CC-17-138	Nam	1,5 tháng	8/30/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	20
43	SARI-02-CC-17-139	Nam	3 tháng	8/31/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	24
44	SARI-02-CC-17-140	Nam	1,5 tháng	8/31/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	26
45	SARI-02-CC-17-141	Nam	7 tháng	9/7/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	28
46	SARI-02-CC-17-142	Nam	11 tháng	9/7/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	20
47	SARI-02-CC-17-143	Nữ	3 tuổi	9/7/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	26

48	SARI-02-CC-17-144	Nam	3 tuổi	9/7/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	22
49	SARI-02-CC-17-145	Nữ	6 tuổi	9/13/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	24
50	SARI-02-CC-17-146	Nữ	2 tuổi	9/13/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	36
51	SARI-02-CC-17-147	Nam	1,5 tuổi	9/14/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	23
52	SARI-02-CC-17-148	Nam	8 tháng	9/14/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	22
53	SARI-02-CC-17-149	Nam	1 tháng	9/21/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	23
54	SARI-02-CC-17-151	Nữ	1 tháng	9/22/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	19
55	SARI-02-CC-17-152	NNữ	3 tháng	9/22/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	16
56	SARI-02-CC-17-153	Nam	01 tháng	9/27/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	13
57	SARI-02-CC-17-155	Nam	3 tháng	9/28/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	30
58	SARI-02-CC-17-156	Nam	1,5 tháng	9/28/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	23
59	SARI-02-CC-17-158	Nam	1 tháng	10/5/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	24
60	SARI-02-CC-17-159	Nữ	2 tháng	10/6/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	20
61	SARI-02-CC-17-160	Nam	1 tháng	10/7/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	25
62	SARI-02-CC-17-161	Nữ	17 tháng	10/11/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	26
63	SARI-02-CC-17-162	Nam	2 tháng	10/12/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	26
64	SARI-02-CC-17-166	Nữ	1,5 tháng	10/19/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	22
65	SARI-02-CC-17-168	Nam	1,5 tháng	10/20/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	24
66	SARI-02-CC-17-172	Nam	1 tháng	10/26/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	20
67	SARI-02-CC-17-174	Nam	1,5 tháng	11/2/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	18
68	SARI-02-CC-17-175	Nữ	2,5 tháng	11/2/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	20
69	SARI-02-CC-17-177	Nam	2 tháng	11/10/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	26
70	SARI-02-HH-17-005	Nữ	15 tháng	1/11/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	24
71	SARI-02-HH-17-007	Nam	10 tháng	1/12/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	26
72	SARI-02-HH-17-009	Nữ	11 tháng	1/17/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	24
73	SARI-02-HH-17-012	Nữ	15 tuổi	1/19/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	30
74	SARI-02-HH-17-033	Nam	12 tháng	3/6/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	24

75	SARI-02-HH-17-037	Nữ	7 tháng	3/14/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	22
76	SARI-02-HH-17-040	Nam	3 tháng	3/16/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	18
77	SARI-02-HH-17-042	Nam	2 tháng	3/22/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	32
78	SARI-02-HH-17-043	Nam	2 tháng	3/22/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	37
79	SARI-02-HH-17-044	Nam	2 tháng	3/22/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	32
80	SARI-02-HH-17-045	Nam	2 tháng	3/30/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	24
81	SARI-02-HH-17-058	Nam	2 tháng	4/21/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	30
82	SARI-02-HH-17-067	Nam	1 tuổi	5/5/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	30
83	SARI-02-HH-17-076	Nữ	11 tháng	5/19/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	28
84	SARI-02-HH-17-084	Nam	2 tuổi	6/2/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	26
85	SARI-02-HH-17-087	Nam	5 tuổi	6/9/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	32
86	SARI-02-HH-17-089	Nam	9 tháng	6/16/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	20
87	SARI-02-HH-17-090	Nam	12 tháng	6/16/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	23
88	SARI-02-HH-17-095	Nam	2 tháng	6/23/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	30
89	SARI-02-HH-17-096	Nam	7 tháng	6/23/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	34
90	SARI-02-HH-17-099	Nam	5 tháng	6/28/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	28
91	SARI-02-HH-17-100	Nam	8 tháng	6/30/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	26
92	SARI-02-HH-17-105	Nam	2 tháng	7/16/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	22
93	SARI-02-HH-17-107	Nam	8 tháng	7/16/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	30
94	SARI-02-HH-17-108	Nam	6 tháng	7/16/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	20
95	SARI-02-HH-17-110	Nam	14 tháng	7/15/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	37
96	SARI-02-HH-17-112	Nam	12 tháng	7/19/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	26
97	SARI-02-HH-17-113	Nam	4 tháng	8/4/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	26
98	SARI-02-HH-17-115	Nam	2 tháng	8/4/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	22
99	SARI-02-HH-17-116	Nam	2 tuổi	8/4/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	22
100	SARI-02-HH-17-117	Nam	2 tháng	8/10/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	30
101	SARI-02-HH-17-118	Nam	11 tháng	8/10/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	30

102	SARI-02-HH-17-121	Nam	17 tháng	8/18/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	32
103	SARI-02-HH-17-123	Nữ	1 tháng	8/18/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	26
104	SARI-02-HH-17-124	Nam	20 tháng	8/18/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	32
105	SARI-02-HH-17-125	Nữ	9 tháng	8/24/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	20
106	SARI-02-HH-17-126	Nữ	3 tháng	8/26/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	28
107	SARI-02-HH-17-129	Nam	1 tháng	9/1/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	22
108	SARI-02-HH-17-130	Nam	2 tháng	9/1/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	30
109	SARI-02-HH-17-131	Nam	2 tháng	9/1/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	32
110	SARI-02-HH-17-132	Nữ	8 tuổi	9/1/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	24
111	SARI-02-HH-17-133	Nữ	14 tháng	9/6/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	34
112	SARI-02-HH-17-134	Nam	2 tháng	9/6/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	26
113	SARI-02-HH-17-137	Nam	1 tháng	9/14/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	30
114	SARI-02-HH-17-139	Nữ	3 tuổi	9/14/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	22
115	SARI-02-HH-17-140	Nữ	2 tháng	9/14/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	38
116	SARI-02-HH-17-141	Nam	2 tháng	9/20/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	24
117	SARI-02-HH-17-142	Nam	1 tháng	9/20/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	31
118	SARI-02-HH-17-144	Nữ	7 tháng	9/20/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	19
119	SARI-02-HH-17-146	Nam	20 tháng	9/27/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	22
120	SARI-02-HH-17-147	Nam	2,5 tháng	9/27/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	26
121	SARI-02-HH-17-150	Nam	2 tuổi	10/5/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	29
122	SARI-02-HH-17-152	Nam	17 tháng	10/5/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	35
123	SARI-02-HH-17-153	Nam	7 tháng	10/12/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	30
124	SARI-02-HH-17-154	Nữ	3 tuổi	10/12/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	36
125	SARI-02-HH-17-157	Nữ	3 tháng	10/20/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	32
126	SARI-02-HH-17-160	Nam	2 tuổi	10/20/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	24
127	SARI-02-HH-17-161	Nữ	1 tháng	10/26/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	34
128	SARI-02-HH-17-162	Nam	11 tuổi	10/26/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	30

129	SARI-02-HH-17-167	Nữ	2 tuổi	11/2/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	29
130	SARI-02-HH-17-173	Nam	12 tháng	11/27/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	28
131	SARI-02-TN-17-010	Nam	3 tháng	2/12/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	22
132	SARI-02-TN-17-012	Nữ	14 tháng	2/19/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	19
133	SARI-02-TN-17-017	Nam	22 tháng	3/10/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	21
134	SARI-02-TN-17-027	Nam	2 tháng	4/16/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	21
135	SARI-02-TN-17-036	Nữ	2 tháng	5/19/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	30
136	SARI-02-TN-17-049	Nữ	21 tháng	7/22/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	22
137	SARI-02-TN-17-051	Nam	6 tháng	7/30/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	24
138	SARI-02-TN-17-055	Nữ	1 tháng	8/11/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	30
139	SARI-02-TN-17-056	Nữ	10 tuổi	8/26/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	26
140	SARI-02-TN-17-057	Nữ	4 tháng	8/26/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	28
141	SARI-02-TN-17-058	Nữ	2,5 tháng	9/2/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	24
142	SARI-02-TN-17-059	Nữ	3 tháng	9/2/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	26
143	SARI-02-TN-17-063	Nữ	1 tháng	9/22/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	28
144	SARI-02-TN-17-067	Nam	2 tháng	10/6/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	29
145	SARI-02-TN-17-068	Nam	3 tuổi	10/6/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	35
146	SARI-02-TN-17-070	Nam	5 tháng	10/15/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	36
147	SARI-02-TN-17-071	Nam	4 tháng	10/20/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	30
148	SARI-02-TN-17-072	Nam	2 tháng	10/20/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	25
149	SARI-02-TN-17-073	Nữ	13 tháng	10/29/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	32
150	SARI-02-TN-17-074	Nam	14 tháng	10/29/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	32
151	SARI-02-TN-17-077	Nam	1 tháng	11/11/2017	2017	Bệnh viện Nhi Trung ương	20
152	SARI-02-CC-18-012	Nam	3 tuổi	1/29/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	26
153	SARI-02-CC-18-030	Nữ	10 tháng	3/1/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	28
154	SARI-02-CC-18-031	Nữ	18 tháng	3/2/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	28
155	SARI-02-CC-18-047	Nữ	8 tháng	3/30/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	22

156	SARI-02-CC-18-077	Nữ	8 tháng	5/24/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	24
157	SARI-02-CC-18-078	Nam	3 tháng	5/25/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	24
158	SARI-02-CC-18-079	Nam	17 tháng	5/25/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	22
159	SARI-02-CC-18-089	Nam	16 tháng	6/14/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	34
160	SARI-02-CC-18-094	Nam	12 tháng	6/22/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	24
161	SARI-02-CC-18-097	Nữ	17 tháng	6/27/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	24
162	SARI-02-CC-18-098	Nam	4 tháng	6/27/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	22
163	SARI-02-CC-18-099	Nam	17 tháng	6/27/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	30
164	SARI-02-CC-18-102	Nữ	7 tháng	7/7/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	24
165	SARI-02-CC-18-105	Nữ	2 tuổi	7/11/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	29
166	SARI-02-CC-18-107	Nữ	5 tháng	7/12/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	26
167	SARI-02-CC-18-108	Nữ	9 tháng	7/12/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	21
168	SARI-02-CC-18-109	Nữ	3 tuổi	7/20/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	32
169	SARI-02-CC-18-110	Nam	13 tháng	7/20/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	24
170	SARI-02-CC-18-113	Nữ	7 tháng	7/27/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	26
171	SARI-02-CC-18-116	Nam	1 tháng	7/28/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	18
172	SARI-02-CC-18-118	Nữ	16 tháng	8/1/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	13
173	SARI-02-CC-18-119	Nam	16 tháng	8/1/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	13
174	SARI-02-CC-18-120	Nữ	8 tháng	8/2/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	18
175	SARI-02-CC-18-121	Nữ	1 tháng	8/10/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	23
176	SARI-02-CC-18-124	Nữ	1,5 tháng	8/11/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	22
177	SARI-02-CC-18-125	Nam	9 tháng	8/17/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	24
178	SARI-02-CC-18-126	Nữ	5 tháng	8/17/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	26
179	SARI-02-CC-18-127	Nữ	4 tháng	8/17/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	24
180	SARI-02-CC-18-130	Nam	9 tháng	8/23/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	22
181	SARI-02-CC-18-133	Nữ	1 tháng	8/30/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	19
182	SARI-02-CC-18-134	Nam	2 tháng	8/30/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	21

183	SARI-02-CC-18-136	Nữ	13 tháng	8/31/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	21
184	SARI-02-CC-18-140	Nữ	2 tháng	9/8/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	24
185	SARI-02-CC-18-145	Nữ	10 tháng	9/19/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	32
186	SARI-02-CC-18-146	Nữ	4 tháng	9/20/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	25
187	SARI-02-CC-18-147	Nữ	4 tháng	9/22/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	26
188	SARI-02-HH-18-023	Nam	14 tháng	2/25/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	34
189	SARI-02-HH-18-024	Nữ	2 tuổi	2/25/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	32
190	SARI-02-HH-18-041	Nam	6 tháng	3/31/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	34
191	SARI-02-HH-18-050	Nam	17 tháng	4/15/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	28
192	SARI-02-HH-18-057	Nam	10 tháng	4/27/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	34
193	SARI-02-HH-18-063	Nam	7 tháng	5/6/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	34
194	SARI-02-HH-18-064	Nữ	2 tuổi	5/6/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	26
195	SARI-02-HH-18-073	Nam	9 tháng	5/23/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	30
196	SARI-02-HH-18-081	Nam	2 tuổi	6/7/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	18
197	SARI-02-HH-18-084	Nữ	12 tháng	6/7/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	34
198	SARI-02-HH-18-085	Nam	4 tháng	6/14/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	34
199	SARI-02-HH-18-088	Nam	7 tháng	6/14/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	24
200	SARI-02-HH-18-094	Nam	8 tháng	6/28/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	34
201	SARI-02-HH-18-097	Nam	4 tháng	7/6/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	26
202	SARI-02-HH-18-101	Nam	13 tháng	7/15/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	21
203	SARI-02-HH-18-102	Nam	3 tháng	7/15/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	31
204	SARI-02-HH-18-103	Nữ	3 tháng	7/15/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	37
205	SARI-02-HH-18-106	Nữ	4 tháng	7/22/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	20
206	SARI-02-HH-18-107	Nữ	3 tháng	7/22/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	20
207	SARI-02-HH-18-112	Nữ	2 tháng	7/27/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	17
208	SARI-02-HH-18-114	Nữ	3 tuổi	8/5/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	29
209	SARI-02-HH-18-115	Nam	1 tháng	8/5/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	20

210	SARI-02-HH-18-116	Nam	1 tháng	8/5/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	15
211	SARI-02-HH-18-117	Nam	11 tháng	8/12/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	28
212	SARI-02-HH-18-118	Nam	8 tháng	8/12/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	30
213	SARI-02-HH-18-120	Nữ	1 tháng	8/12/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	23
214	SARI-02-HH-18-121	Nam	17 tháng	8/19/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	20
215	SARI-02-HH-18-123	Nam	1 tuổi	8/19/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	23
216	SARI-02-HH-18-125	Nam	16 tháng	8/26/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	20
217	SARI-02-HH-18-127	Nam	14 tháng	8/26/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	28
218	SARI-02-HH-18-128	Nữ	2 tuổi	8/26/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	24
219	SARI-02-HH-18-129	Nam	1 tháng	9/7/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	26
220	SARI-02-HH-18-137	Nam	3 tháng	9/23/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	34
221	SARI-02-HH-18-138	Nam	11 tháng	9/23/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	31
222	SARI-02-HH-18-139	Nam	2 tháng	9/23/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	23
223	SARI-02-HH-18-140	Nữ	4 tháng	9/23/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	32
224	SARI-02-TN-18-013	Nam	5 tháng	3/2/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	22
225	SARI-02-TN-18-042	Nam	17 tháng	6/8/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	24
226	SARI-02-TN-18-048	Nữ	2 tuổi	7/6/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	26
227	SARI-02-TN-18-059	Nữ	15 tháng	8/17/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	36
228	SARI-02-TN-18-062	Nam	11 tháng	8/24/2018	2018	Bệnh viện Nhi Trung ương	17
229	SARI-18-NH-17-009	Nam	17 tháng	5/8/2017	2017	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	24
230	SARI-18-NH-17-014	Nam	3 tuổi	5/15/2017	2017	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	22
231	SARI-18-NH-17-018	Nữ	21 tháng	5/19/2017	2017	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	22
232	SARI-18-NH-17-023	Nam	18 tháng	5/26/2017	2017	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	20
233	SARI-18-NH-17-024	Nữ	4 tuổi	5/24/2017	2017	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	32
234	SARI-18-NH-17-048	Nam	20 tháng	7/3/2017	2017	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	24
235	SARI-18-NH-17-049	Nam	2 tuổi	7/4/2017	2017	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	22
236	SARI-18-NH-17-051	Nam	7 tháng	7/6/2017	2017	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	20

237	SARI-18-NH-17-057	Nam	7 tuổi	7/14/2017	2017	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	26
238	SARI-18-NH-17-067	Nữ	22 tháng	7/28/2017	2017	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	22
239	SARI-18-NH-17-071	Nữ	2 tuổi	8/3/2017	2017	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	27
240	SARI-18-NH-17-074	Nam	3 tuổi	8/8/2017	2017	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	22
241	SARI-18-NH-17-075	Nữ	8 tháng	8/9/2017	2017	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	36
242	SARI-18-NH-17-076	Nữ	2 tuổi	8/10/2017	2017	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	28
243	SARI-18-NH-17-077	Nữ	2 tuổi	8/11/2017	2017	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	26
244	SARI-18-NH-17-080	Nam	6 tháng	8/17/2017	2017	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	22
245	SARI-18-NH-17-081	Nam	15 tháng	8/17/2017	2017	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	18
246	SARI-18-NH-17-083	Nữ	4 tuổi	8/22/2017	2017	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	30
247	SARI-18-NH-17-086	Nam	3 tuổi	8/25/2017	2017	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	24
248	SARI-18-NH-17-087	Nữ	19 tháng	8/28/2017	2017	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	26
249	SARI-18-NH-17-088	Nam	18 tháng	8/29/2017	2017	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	26
250	SARI-18-NH-17-089	Nam	21 tháng	8/30/2017	2017	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	24
251	SARI-18-NH-17-092	Nam	5 tuổi	9/4/2017	2017	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	24
252	SARI-18-NH-17-093	Nam	20 tháng	9/5/2017	2017	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	24
253	SARI-18-NH-17-095	Nữ	10 tháng	9/12/2017	2017	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	28
254	SARI-18-NH-17-103	Nữ	4 tháng	9/21/2017	2017	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	15
255	SARI-18-NH-17-103	Nữ	4 tháng	9/21/2017	2017	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	15
256	SARI-18-NH-17-106	Nữ	22 tháng	9/27/2017	2017	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	19
257	SARI-18-NH-17-107	Nữ	10 tuổi	9/28/2017	2017	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	31
258	SARI-18-NH-17-110	Nam	7 tháng	10/5/2017	2017	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	24
259	SARI-18-NH-17-117	Nữ	23 tháng	10/16/2017	2017	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	22
260	SARI-18-NH-17-127	Nữ	10 tháng	10/31/2017	2017	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	20
261	SARI-18-NH-17-132	Nam	16 tháng	11/7/2017	2017	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	34
262	SARI-18-NH-17-149	Nữ	3 tuổi	12/1/2017	2017	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	28
263	SARI-18-NH-18-004	Nam	6 tháng	1/12/2018	2018	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	35

264	SARI-18-NH-18-068	Nam	8 tuổi	5/2/2018	2018	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	38
265	SARI-18-NH-18-096	Nam	15 tháng	6/18/2018	2018	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	27
266	SARI-18-NH-18-098	Nam	2 tuổi	6/20/2018	2018	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	17
267	SARI-18-NH-18-099	Nam	3 tuổi	6/21/2018	2018	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	32
268	SARI-18-NH-18-100	Nam	5 tuổi	6/28/2018	2018	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	26
269	SARI-18-NH-18-101	Nam	4 tuổi	6/28/2018	2018	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	26
270	SARI-18-NH-18-105	Nữ	2 tuổi	7/4/2018	2018	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	21
271	SARI-18-NH-18-110	Nam	2 tuổi	7/12/2018	2018	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	24
272	SARI-18-NH-18-111	Nam	24 tháng	7/13/2018	2018	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	28
273	SARI-18-NH-18-115	Nữ	3 tuổi	7/20/2018	2018	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	23
274	SARI-18-NH-18-116	Nam	18 tháng	7/24/2018	2018	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	28
275	SARI-18-NH-18-117	Nam	21 tháng	7/25/2018	2018	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	17
276	SARI-18-NH-18-119	Nam	19 tháng	7/27/2018	2018	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	19
277	SARI-18-NH-18-120	Nam	20 tháng	7/30/2018	2018	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	23
278	SARI-18-NH-18-126	Nam	12 tháng	8/8/2018	2018	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	26
279	SARI-18-NH-18-130	Nữ	15 tháng	8/15/2018	2018	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	23
280	SARI-18-NH-18-132	Nữ	3 tuổi	8/16/2018	2018	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	22
281	SARI-18-NH-18-135	Nữ	23 tháng	8/21/2018	2018	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	22
282	SARI-18-NH-18-136	Nam	20 tháng	8/22/2018	2018	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	26
283	SARI-18-NH-18-142	Nam	6 tuổi	8/30/2018	2018	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	31
284	SARI-18-NH-18-144	Nữ	3 ngày	9/4/2018	2018	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	28
285	SARI-18-NH-18-156	Nam	2 tuổi	9/20/2018	2018	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	28
286	SARI-18-NH-18-157	Nữ	3 tuổi	9/25/2018	2018	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	34
287	SARI-18-NH-18-161	Nữ	3 tuổi	9/27/2018	2018	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	35
288	SARI-18-NH-18-169	Nam	5 tuổi	10/10/2018	2018	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	28
289	SARI-18-NH-18-176	Nam	2 tuổi	10/18/2018	2018	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	26
290	SARI-18-NH-18-183	Nam	4 tuổi	10/30/2018	2018	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	29

291	SARI-18-NH-18-188	Nữ	13 tháng	11/5/2018	2018	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	20
292	SARI-18-NH-18-200	Nữ	2 tuổi	11/21/2018	2018	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	32
293	SARI-18-NH-18-204	Nam	2 tuổi	11/27/2018	2018	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	30
294	SARI-18-NH-18-218	Nam	5 tuổi	12/18/2018	2018	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	17
295	SARI-18-ND-19-101	Nữ	1 tuổi	10/11/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	32
296	SARI-18-NH-19-011	Nam	4 tháng	1/16/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	38
297	SARI-18-NH-19-013	Nữ	12 tuổi	1/22/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	22
298	SARI-18-NH-19-019	Nam	21 tuổi	1/31/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	27
299	SARI-18-NH-19-023	Nữ	0 ngày	2/12/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	38
300	SARI-18-NH-19-047	Nam	19 tháng	3/26/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	38
301	SARI-18-NH-19-062	Nữ	16 tháng	4/12/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	35
302	SARI-18-NH-19-064	Nam	9 tháng	4/22/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	37
303	SARI-18-NH-19-069	Nam	9 tháng	5/8/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	36
304	SARI-18-NH-19-088	Nam	13 tháng	6/12/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	32
305	SARI-18-NH-19-095	Nam	3 tuổi	6/20/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	35
306	SARI-18-NH-19-097	Nữ	4 tuổi	6/25/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	26
307	SARI-18-NH-19-100	Nữ	21 tháng	6/27/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	25
308	SARI-18-NH-19-107	Nam	8 tháng	7/17/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	23
309	SARI-18-NH-19-120	Nam	6 tháng	6/20/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	36
310	SARI-18-NH-19-129	Nữ	10 tháng	8/22/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	19
311	SARI-18-NH-19-135	Nữ	2 tuổi	9/4/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	23
312	SARI-18-NH-19-141	Nữ	3 tuổi	9/17/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	36
313	SARI-18-NH-19-142	Nữ	2 tuổi	9/17/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	25
314	SARI-18-NH-19-150	Nữ	17 tháng	9/30/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	18
315	SARI-18-NH-19-151	Nam	2 tuổi	10/3/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	32
316	SARI-18-NH-19-169	Nam	2 tuổi	11/1/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	22
317	SARI-18-NH-19-171	Nữ	2 tuổi	11/1/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	26

318	SARI-18-NH-19-174	Nam	2 tuổi	11/7/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	36
319	SARI-18-NH-19-193	Nam	12 tháng	12/6/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	36
320	SARI-18-NH-19-201	Nam	2 tuổi	12/19/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	36
321	SARI-18-NH-19-205	Nữ	2 tuổi	12/26/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	25
322	IS-02-ĐT-20-002	Nam	12 tháng	09/09/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	25
323	IS-02-ĐT-20-003	Nam	8 tuổi	09/09/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	21
324	IS-02-ĐT-20-004	Nữ	19 tháng	11/09/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	30
325	IS-02-KH-20-005	Nữ	3 tuổi	9/15/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	19
326	IS-02-KH-20-006	Nữ	2 tuổi	9/15/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	25
327	IS-02-KH-20-007	Nữ	2 tuổi	9/16/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	38
328	IS-02-KH-20-009	Nam	2 tuổi	9/16/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	22
329	IS-02-KH-20-021	Nữ	8 tháng	9/30/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	25
330	IS-02-KH-20-022	Nữ	3 tuổi	10/6/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	27
331	IS-02-KH-20-023	Nam	3 tuổi	10/6/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	19
332	IS-02-KH-20-026	Nữ	17 tháng	10/7/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	27
333	IS-02-KH-20-029	Nam	2 tuổi	10/12/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	28
334	IS-02-KH-20-033	Nữ	14 tháng	10/14/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	16
335	IS-02-KH-20-035	Nam	4 tháng	10/19/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	24
336	IS-02-KH-20-036	Nam	13 tháng	10/20/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	22
337	IS-02-KH-20-037	Nữ	17 tháng	10/20/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	23
338	IS-02-KH-20-045	Nam	3 tuổi	10/28/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	21
339	IS-02-KH-20-048	Nam	15 tháng	11/3/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	19
340	IS-02-KH-20-049	Nam	29 tháng	11/3/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	18
341	IS-02-KH-20-057	Nam	25 tháng	11/18/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	36
342	IS-02-KH-20-061	Nam	19 tháng	11/18/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	35
343	IS-02-KH-20-065	Nữ	8 tháng	11/24/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	22
344	IS-02-KH-20-068	Nữ	2 tuổi	10/25/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	36

345	IS-02-KH-20-070	Nữ	3 tuổi	11/30/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	30
346	IS-02-KH-20-071	Nam	33 tháng	12/2/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	22
347	IS-02-KH-20-072	Nam	8 tháng	12/2/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	30
348	IS-02-KH-20-074	Nam	16 tháng	12/9/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	36
349	IS-02-NĐ-20-002	Nam	2 tuổi	9/10/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	19
350	IS-02-NĐ-20-008	Nam	9 tháng	9/17/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	30
351	IS-02-NĐ-20-011	Nam	14 tháng	9/27/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	23
352	IS-02-NĐ-20-013	Nam	22 tháng	9/27/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	22
353	IS-02-NĐ-20-015	Nam	2 tuổi	10/1/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	20
354	IS-02-NĐ-20-018	Nam	2 tuổi	10/2/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	20
355	IS-02-NĐ-20-019	Nam	23 tháng	10/8/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	26
356	IS-02-NĐ-20-021	Nam	3 tuổi	10/16/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	37
357	IS-02-NĐ-20-023	Nữ	2 tuổi	10/16/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	27
358	IS-02-NĐ-20-026	Nam	4 tuổi	10/23/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	25
359	IS-02-NĐ-20-027	Nam	1 tuổi	10/30/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	29
360	IS-02-NĐ-20-032	Nữ	12 tháng	11/12/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	19
361	IS-02-NĐ-20-035	Nam	26 tháng	11/19/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	22
362	IS-02-NĐ-20-036	Nữ	3 tuổi	11/19/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	25
363	IS-02-NĐ-20-038	Nam	8 tháng	11/19/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	24
364	IS-02-NĐ-20-043	Nữ	20 tháng	12/11/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	20
365	IS-07-19-007	Nam	13 tuổi	1/18/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	26
366	IS-07-19-010	Nữ	9 tuổi	1/22/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	28
367	IS-07-19-036	Nam	6 tuổi	2/20/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	35
368	IS-07-19-059	Nam	9 tuổi	3/5/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	36
369	IS-07-19-068	Nam	16 tuổi	3/15/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	34
370	IS-07-19-070	Nữ	11 tuổi	3/18/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	31
371	IS-07-19-092	Nữ	7 tuổi	4/1/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	30

372	IS-07-19-118	Nam	4 tuổi	4/17/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	26
373	IS-07-19-126	Nam	5 tuổi	4/22/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	25
374	IS-07-19-152	Nữ	6 tuổi	5/10/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	29
375	IS-07-19-179	Nam	4 tuổi	5/30/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	23
376	IS-07-19-193	Nữ	5 tuổi	6/10/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	30
377	IS-07-19-204	Nam	11 tuổi	6/19/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	34
378	IS-07-19-205	Nữ	7 tuổi	6/19/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	33
379	IS-07-19-230	Nữ	5 tuổi	7/4/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	32
380	IS-07-19-231	Nữ	4 tuổi	7/5/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	35
381	IS-07-19-240	Nam	6 tuổi	7/10/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	30
382	IS-07-19-267	Nữ	3 tuổi	7/29/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	23
383	IS-07-19-270	Nam	5 tuổi	7/30/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	35
384	IS-07-19-278	Nam	9 tuổi	8/5/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	19
385	IS-07-19-279	Nam	8 tuổi	8/6/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	27
386	IS-07-19-280	Nữ	12 tuổi	8/6/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	31
387	IS-07-19-290	Nữ	5 tuổi	8/13/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	20
388	IS-07-19-297	Nữ	7 tuổi	8/16/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	33
389	IS-07-19-308	Nữ	7 tuổi	8/26/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	25
390	IS-07-19-315	Nam	8 tuổi	8/30/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	26
391	IS-07-19-317	Nữ	10 tuổi	8/30/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	25
392	IS-07-19-319	Nam	6 tuổi	9/3/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	28
393	IS-07-19-330	Nữ	7 tuổi	9/9/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	32
394	IS-07-19-340	Nam	5 tuổi	9/17/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	32
395	IS-07-19-349	Nam	12 tuổi	9/23/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	25
396	IS-07-19-351	Nữ	6 tuổi	9/24/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	26
397	IS-07-19-353	Nữ	9 tuổi	9/26/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	30
398	IS-07-19-354	Nữ	4 tuổi	9/26/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	25

399	IS-07-19-362	Nam	7 tuổi	10/1/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	21
400	IS-07-19-363	Nữ	5 tuổi	10/3/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	19
401	IS-07-19-380	Nam	5 tuổi	10/15/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	30
402	IS-07-19-383	Nam	6 tuổi	10/17/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	32
403	IS-07-19-392	Nữ	5 tuổi	10/23/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	24
404	IS-07-19-397	Nam	5 tuổi	10/29/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	34
405	IS-07-19-399	Nam	5 tuổi	10/26/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	29
406	IS-07-19-401	Nữ	6 tuổi	10/30/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	28
407	IS-07-19-402	Nam	3 tuổi	10/31/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	25
408	IS-07-19-409	Nữ	4 tuổi	11/5/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	29
409	IS-07-19-419	Nữ	4 tuổi	11/13/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	34
410	IS-07-19-433	Nữ	4 tuổi	11/22/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	37
411	IS-07-19-439	Nam	5 tuổi	11/25/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	31
412	IS-07-19-459	Nam	5 tuổi	12/9/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	31
413	IS-07-19-471	Nam	4 tuổi	12/16/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	23
414	IS-07-19-476	Nữ	10 tuổi	12/17/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	31
415	IS-07-19-481	Nam	6 tuổi	12/20/2019	2019	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	21
416	IS-07-20-006	Nữ	5 tuổi	1/14/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	30
417	IS-07-20-063	Nam	6 tuổi	2/25/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	27
418	IS-07-20-065	Nữ	5 tuổi	2/27/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	28
419	IS-07-20-081	Nam	4 tuổi	3/9/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	22
420	IS-07-20-176	Nam	4 tuổi	5/20/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	24
421	IS-07-20-220	Nữ	5 tuổi	6/19/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	25
422	IS-07-20-221	Nữ	5 tuổi	6/22/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	26
423	IS-07-20-244	Nữ	6 tuổi	7/9/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	24
424	IS-07-20-250	Nữ	3 tuổi	7/14/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	27
425	IS-07-20-253	Nữ	5 tuổi	7/15/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	21

426	IS-07-20-260	Nữ	5 tuổi	7/21/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	25
427	IS-07-20-261	Nữ	6 tuổi	7/21/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	23
428	IS-07-20-263	Nam	4 tuổi	7/22/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	27
429	IS-07-20-283	Nữ	2 tuổi	8/7/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	22
430	IS-07-20-305	Nam	3 tuổi	8/30/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	32
431	IS-07-20-312	Nam	7 tuổi	9/8/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	30
432	IS-07-20-334	Nam	5 tuổi	9/22/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	26
433	IS-07-20-348	Nữ	7 tuổi	9/30/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	27
434	IS-07-20-353	Nữ	1 tuổi	10/6/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	22
435	IS-07-20-390	Nam	4 tuổi	10/30/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	23
436	IS-07-20-395	Nữ	1 tuổi	11/5/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	25
437	IS-07-20-452	Nữ	8 tuổi	12/16/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	20
438	IS-18-20-060	Nam	2 tuổi	10/15/2020	2020	Bệnh viện Đa khoa Quảng Ninh	24

**Phụ lục 3: DANH SÁCH CÁC CHỨNG RSV PHÂN LẬP TỪ BỆNH NHÂN NHI VIÊM ĐƯỜNG HÔ HẤP CẤP TÍNH NẶNG
THU THẬP TẠI BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG VÀ BỆNH VIỆN ĐA KHOA TỈNH QUẢNG NINH, 2017-2020**

STT	Mã bệnh phẩm	Giới tính	Tuổi	Năm thu mẫu	Phân nhóm RSV	Giá trị Ct kết quả realtime RT-PCR chủng	Địa điểm*
1	SARI02CC17007	Nam	4 tháng	2017	A	15	BV Nhi TW
2	SARI02CC17092	Nam	1 tháng	2017	A	16	BV Nhi TW
3	SARI02CC17103	Nam	23 tháng	2017	A	18	BV Nhi TW
4	SARI02CC17111	Nam	8 tháng	2017	A	16	BV Nhi TW
5	SARI02CC17148	Nam	8 tháng	2017	A	19	BV Nhi TW
6	SARI02CC17158	Nam	1 tháng	2017	A	15	BV Nhi TW
7	SARI02CC17166	Nữ	1,5 tháng	2017	A	19	BV Nhi TW
8	SARI02TN17057	Nữ	4 tháng	2017	A	17	BV Nhi TW
9	SARI02TN17059	Nữ	3 tháng	2017	A	15	BV Nhi TW
10	SARI18NH17018	Nữ	21 tháng	2017	A	15	BV ĐK QN
11	SARI02CC18077	Nữ	8 tháng	2018	A	16	BV Nhi TW
12	SARI02CC18147	Nữ	4 tháng	2018	A	15	BV Nhi TW

13	SARI02HH18081	Nam	2 tuổi	2018	A	17	BV Nhi TW
14	SARI02CC1884	Nữ	1 tháng	2018	A	18	BV Nhi TW
15	SARI02CC18106	Nam	8 tháng	2018	A	18	BV Nhi TW
16	SARI02HH1808	Nữ	13 tháng	2018	A	15	BV Nhi TW
17	SARI18NH18101	Nam	4 tuổi	2018	A	15	BV ĐK QN
18	SARI18HH1896	Nam	4 tháng	2018	A	17	BV ĐK QN
19	SARI02CC17015	Nữ	2 tháng	2017	B	15	BV Nhi TW
20	SARI02CC17124	Nam	2,5 tháng	2017	B	16	BV Nhi TW
21	SARI02CC17130	Nam	2 tháng	2017	B	15	BV Nhi TW
22	SARI02TN17017	Nam	22 tháng	2017	B	18	BV Nhi TW
23	SARI02HH18116	Nam	1 tháng	2018	B	16	BV Nhi TW
24	SARI02CC18136	Nữ	13 tháng	2018	B	18	BV Nhi TW
25	SARI02TN18042	Nam	17 tháng	2018	B	19	BV Nhi TW

*: BV Nhi TW (Bệnh viện Nhi Trung ương); BV ĐK QN (Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ninh).

Phụ lục 4:
DANH SÁCH TRÌNH TỰ GENOME RSV-A ĐĂNG KÝ MÃ ĐỊNH DANH TRÊN CƠ SỞ DỮ LIỆU GISAID

STT	Mã định danh	Tên chủng virus RSV	Nguồn gốc ^a	thời gian thu mẫu (Năm-tháng)	Địa điểm thu mẫu ^b	Giới tính	Tuổi	Loại mẫu	Hệ thống máy giải trình tự	Phần mềm phân tích	Trung vị độ sâu bao phủ	Đơn vị lưu mẫu ^c
1	EPI_ISL_16282709	hRSV/A/Vietnam/IS02KH20005-F/2020	BPLS	2020-9	HN	Nữ	3 tuổi	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
2	EPI_ISL_16282710	hRSV/A/Vietnam/IS02KH20009-F/2020	BPLS	2020-9	HN	Nam	2 tuổi	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
3	EPI_ISL_16282711	hRSV/A/Vietnam/IS02KH20033-F/2020	BPLS	2020-10	HN	Nữ	14 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
4	EPI_ISL_16282712	hRSV/A/Vietnam/IS02KH20065-F/2020	BPLS	2020-11	HN	Nữ	8 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
5	EPI_ISL_16282713	hRSV/A/Vietnam/IS02KH20090-F/2020	BPLS	2020-1	HN	Nam	23 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
6	EPI_ISL_16282714	hRSV/A/Vietnam/IS02KH20104-F/2020	BPLS	2020-3	HN	Nam	12 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
7	EPI_ISL_16282715	hRSV/A/Vietnam/IS02ND20002-F/2020	BPLS	2020-9	HN	Nam	2 tuổi	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
8	EPI_ISL_16282716	hRSV/A/Vietnam/IS02ND20015-F/2020	BPLS	2020-10	HN	Nam	2 tuổi	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
9	EPI_ISL_16282717	hRSV/A/Vietnam/IS02ND20035-F/2020	BPLS	2020-11	HN	Nam	26 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
10	EPI_ISL_16282718	hRSV/A/Vietnam/IS0720250-F/2020	BPLS	2020-7	HN	Nữ	3 tuổi	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
11	EPI_ISL_16282719	hRSV/A/Vietnam/IS1820060-F/2020	BPLS	2020-10	QN	Nam	2 tuổi	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
12	EPI_ISL_16282720	hRSV/A/Vietnam/SARI02CC17007-F/2017	Chủng	2017-1	HN	Nam	4 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
13	EPI_ISL_16282721	hRSV/A/Vietnam/SARI02CC17106-F/2017	Chủng	2017-10	HN	Nam	1.5 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
14	EPI_ISL_16282722	hRSV/A/Vietnam/SARI02CC17142-F/2017	Chủng	2017-9	HN	Nam	11 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
15	EPI_ISL_16282723	hRSV/A/Vietnam/SARI02CC17148-F/2017	Chủng	2017-9	HN	Nam	8 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
16	EPI_ISL_16282724	hRSV/A/Vietnam/SARI02CC17152-F/2017	BPLS	2017-9	HN	Nữ	3 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
17	EPI_ISL_16282725	hRSV/A/Vietnam/SARI02CC17153-F/2017	BPLS	2017-9	HN	Nam	01 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
18	EPI_ISL_16282726	hRSV/A/Vietnam/SARI02CC17158-F/2017	Chủng	2017-10	HN	Nam	1 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
19	EPI_ISL_16282727	hRSV/A/Vietnam/SARI02CC17166-F/2017	Chủng	2017-10	HN	Nữ	1.5 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW

20	EPI_ISL_16282728	hRSV/A/Vietnam/SARI02CC18015-F/2018	Chủng	2018-1	HN	Nữ	2 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
21	EPI_ISL_16282729	hRSV/A/Vietnam/SARI02CC18077-F/2018	Chủng	2018-11	HN	Nam	1 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
22	EPI_ISL_16282730	hRSV/A/Vietnam/SARI02CC18111-F/2018	Chủng	2018-7	HN	Nam	8 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
23	EPI_ISL_16282731	hRSV/A/Vietnam/SARI02CC18127-F/2018	BPLS	2018-8	HN	Nữ	2 tuổi	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
24	EPI_ISL_16282732	hRSV/A/Vietnam/SARI02CC19103-F/2019	BPLS	2019-6	HN	Nam	23 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
25	EPI_ISL_16282733	hRSV/A/Vietnam/SARI02CC19116-F/2019	BPLS	2019-7	HN	Nam	1 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
26	EPI_ISL_16282734	hRSV/A/Vietnam/SARI02CC19118-F/2019	BPLS	2019-8	HN	Nữ	16 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
27	EPI_ISL_16282735	hRSV/A/Vietnam/SARI02HH17008-F/2017	BPLS	2017-2	HN	Nữ	10 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
28	EPI_ISL_16282736	hRSV/A/Vietnam/SARI02HH17089-F/2017	BPLS	2017-6	HN	Nam	9 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
29	EPI_ISL_16282737	hRSV/A/Vietnam/SARI02HH17096-F/2017	BPLS	2017-7	HN	Nam	3 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
30	EPI_ISL_16282738	hRSV/A/Vietnam/SARI02HH18081-F/2018	Chủng	2018-6	HN	Nam	2 tuổi	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
31	EPI_ISL_16282739	hRSV/A/Vietnam/SARI02HH19125-F/2019	BPLS	2019-8	HN	Nam	16 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
32	EPI_ISL_16282740	hRSV/A/Vietnam/SARI02HH19139-F/2019	BPLS	2019-9	HN	Nam	2 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
33	EPI_ISL_16282741	hRSV/A/Vietnam/SARI02TN17017-F/2017	Chủng	2017-3	HN	Nam	22 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
34	EPI_ISL_16282742	hRSV/A/Vietnam/SARI02TN17057-F/2017	Chủng	2017-8	HN	Nữ	4 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
35	EPI_ISL_16282743	hRSV/A/Vietnam/SARI02TN17072-F/2017	BPLS	2017-10	HN	Nam	2 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
36	EPI_ISL_16282744	hRSV/A/Vietnam/SARI02TN18059-F/2018	Chủng	2018-9	HN	Nữ	3 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
37	EPI_ISL_16282745	hRSV/A/Vietnam/SARI02TN19062-F/2019	BPLS	2019-8	HN	Nam	11 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
38	EPI_ISL_16282746	hRSV/A/Vietnam/SARI18HH18096-F/2018	Chủng	2018-6	QN	Nam	4 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
39	EPI_ISL_16282747	hRSV/A/Vietnam/SARI18NH17009-F/2017	BPLS	2017-5	QN	Nam	17 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
40	EPI_ISL_16282748	hRSV/A/Vietnam/SARI18NH17014-F/2017	BPLS	2017-5	QN	Nam	3 tuổi	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
41	EPI_ISL_16282749	hRSV/A/Vietnam/SARI18NH17018-F/2017	Chủng	2017-5	QN	Nữ	21 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
42	EPI_ISL_16282750	hRSV/A/Vietnam/SARI18NH17103-F/2017	Chủng	2017-9	QN	Nữ	4 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
43	EPI_ISL_16282751	hRSV/A/Vietnam/SARI18NH17117-F/2017	BPLS	2017-10	QN	Nữ	23 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
44	EPI_ISL_16282752	hRSV/A/Vietnam/SARI18NH18023-F/2018	BPLS	2018-5	QN	Nam	18 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics	> 2000X	VSDTTW

										Workbench 11		
45	EPI_ISL_16282753	hRSV/A/Vietnam/SARI18NH18049-F/2018	BPLS	2018-7	QN	Nam	2 tuổi	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
46	EPI_ISL_16282754	hRSV/A/Vietnam/SARI18NH18051-F/2018	BPLS	2018-7	QN	Nam	7 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
47	EPI_ISL_16282755	hRSV/A/Vietnam/SARI18NH18071-F/2018	BPLS	2018-8	QN	Nữ	2 tuổi	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
48	EPI_ISL_16282756	hRSV/A/Vietnam/SARI18NH18080-F/2018	BPLS	2018-8	QN	Nam	6 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
49	EPI_ISL_16282757	hRSV/A/Vietnam/SARI18NH18086-F/2018	Chủng	2018-8	QN	Nam	3 tuổi	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
50	EPI_ISL_16282758	hRSV/A/Vietnam/SARI18NH19087-F/2019	BPLS	2019-8	QN	Nữ	19 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
51	EPI_ISL_16282759	hRSV/A/Vietnam/SARI18NH19088-F/2019	BPLS	2019-8	QN	Nam	18 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
52	EPI_ISL_16282760	hRSV/A/Vietnam/SARI18NH19098-F/2019	BPLS	2019-6	QN	Nam	2 tuổi	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
53	EPI_ISL_16282761	hRSV/A/Vietnam/SARI18NH19101-F/2019	BPLS	2019-6	QN	Nam	4 tuổi	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
54	EPI_ISL_16282762	hRSV/A/Vietnam/SARI18NH19105-F/2019	BPLS	2019-7	QN	Nữ	2 tuổi	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
55	EPI_ISL_16282763	hRSV/A/Vietnam/SARI18NH19106-F/2019	BPLS	2019-9	QN	Nữ	22 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
56	EPI_ISL_16282764	hRSV/A/Vietnam/SARI18CC18084-F/2020	Chủng	2018-6	QN	Nữ	2 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW

^a: BPLS (Bệnh phẩm lâm sàng).

^b: HN (Hà Nội), QN (Quảng Ninh).

^c: VSDTTW (Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương).

Phụ lục 5:
DANH SÁCH TRÌNH TỰ GENOME RSV-B ĐĂNG KÝ MÃ ĐỊNH DANH TRÊN CƠ SỞ DỮ LIỆU GISAID

STT	Mã định danh	Tên chủng virus RSV	Nguồn gốc ^a	Thời gian thu mẫu (Năm-tháng)	Địa điểm thu mẫu ^b	Giới tính	Tuổi	Loại mẫu	Hệ thống máy giải trình tự	Phần mềm phân tích	Trung vị độ sâu bao phủ	Đơn vị lưu mẫu ^c
1	EPI_ISL_16289246	hRSV/B/Vietnam/IS02KH20023-F/2020	BPLS	2020-10	HN	Nam	3 tuổi	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
2	EPI_ISL_16289247	hRSV/B/Vietnam/IS02KH20029-F/2020	BPLS	2020-10	HN	Nam	2 tuổi	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
3	EPI_ISL_16289248	hRSV/B/Vietnam/IS02KH20045-F/2020	BPLS	2020-10	HN	Nam	3 tuổi	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
4	EPI_ISL_16289249	hRSV/B/Vietnam/IS02KH20072-F/2020	BPLS	2020-12	HN	Nam	8 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
5	EPI_ISL_16289250	hRSV/B/Vietnam/IS02KH20098-F/2020	BPLS	2020-1	HN	Nữ	4 tuổi	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
6	EPI_ISL_16289251	hRSV/B/Vietnam/IS02KH20113-F/2020	BPLS	2020-3	HN	Nam	6 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
7	EPI_ISL_16289252	hRSV/B/Vietnam/IS02KH20114-F/2020	BPLS	2020-3	HN	Nữ	11 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
8	EPI_ISL_16289253	hRSV/B/Vietnam/IS02ND20011-F/2020	BPLS	2020-9	HN	Nam	14 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
9	EPI_ISL_16289254	hRSV/B/Vietnam/IS02ND20032-F/2020	BPLS	2020-11	HN	Nữ	12 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
10	EPI_ISL_16289255	hRSV/B/Vietnam/SARI02CC17015-F/2017	Chủng	2017-1	HN	Nữ	2 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
11	EPI_ISL_16289256	hRSV/B/Vietnam/SARI02CC17112-F/2017	BPLS	2017-7	HN	Nam	1 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
12	EPI_ISL_16289257	hRSV/B/Vietnam/SARI02CC17117-F/2017	BPLS	2017-7	HN	Nam	1.5 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
13	EPI_ISL_16289258	hRSV/B/Vietnam/SARI02CC17120-F/2017	BPLS	2017-7	HN	Nam	1 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
14	EPI_ISL_16289259	hRSV/B/Vietnam/SARI02CC17123-F/2017	BPLS	2017-8	HN	Nữ	3 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
15	EPI_ISL_16289260	hRSV/B/Vietnam/SARI02CC17124-F/2017	Chủng	2017-8	HN	Nam	2.5 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
16	EPI_ISL_16289261	hRSV/B/Vietnam/SARI02CC17126-F/2017	BPLS	2017-8	HN	Nam	10 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
17	EPI_ISL_16289262	hRSV/B/Vietnam/SARI02CC17129-F/2017	BPLS	2017-8	HN	Nữ	2.5 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
18	EPI_ISL_16289263	hRSV/B/Vietnam/SARI02CC17130-F/2017	Chủng	2017-8	HN	Nam	2 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
19	EPI_ISL_16289264	hRSV/B/Vietnam/SARI02CC17135-F/2017	BPLS	2017-8	HN	Nam	2 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
20	EPI_ISL_16289265	hRSV/B/Vietnam/SARI02CC17138-F/2017	BPLS	2017-8	HN	Nam	1.5 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW

21	EPI_ISL_16289266	hRSV/B/Vietnam/SARI02CC17151-F/2017	BPLS	2017-9	HN	Nữ	1 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
22	EPI_ISL_16289267	hRSV/B/Vietnam/SARI02CC17167-F/2017	BPLS	2017-10	HN	Nam	1.5 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
23	EPI_ISL_16289268	hRSV/B/Vietnam/SARI02CC17168-F/2017	BPLS	2017-10	HN	Nam	1.5 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
24	EPI_ISL_16289269	hRSV/B/Vietnam/SARI02CC17172-F/2017	BPLS	2017-10	HN	Nam	1 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
25	EPI_ISL_16289270	hRSV/B/Vietnam/SARI02CC17174-F/2017	BPLS	2017-11	HN	Nam	1.5 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
26	EPI_ISL_16289271	hRSV/B/Vietnam/SARI02CC18079-F/2018	BPLS	2018-5	HN	Nam	17 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
27	EPI_ISL_16289272	hRSV/B/Vietnam/SARI02CC18119-F/2018	BPLS	2018-8	HN	Nam	16 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
28	EPI_ISL_16289273	hRSV/B/Vietnam/SARI02CC18124-F/2018	BPLS	2018-8	HN	Nữ	1.5 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
29	EPI_ISL_16289274	hRSV/B/Vietnam/SARI02CC18133-F/2018	BPLS	2018-8	HN	Nữ	1 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
30	EPI_ISL_16289275	hRSV/B/Vietnam/SARI02CC18134-F/2018	BPLS	2018-8	HN	Nam	2 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
31	EPI_ISL_16289276	hRSV/B/Vietnam/SARI02CC18136-F/2018	Chùng	2018-8	HN	Nữ	13 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
32	EPI_ISL_16289277	hRSV/B/Vietnam/SARI02HH19160-F/2019	BPLS	2019-10	HN	Nam	2 tuổi	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
33	EPI_ISL_16289278	hRSV/B/Vietnam/SARI02HH18116-F/2018	Chùng	2018-8	HN	Nam	1 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
34	EPI_ISL_16289279	hRSV/B/Vietnam/SARI02HH18121-F/2018	BPLS	2018-8	HN	Nam	17 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
35	EPI_ISL_16289280	hRSV/B/Vietnam/SARI02TN19058-F/2019	BPLS	2019-9	HN	Nữ	2.5 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
36	EPI_ISL_16289281	hRSV/B/Vietnam/SARI02TN19077-F/2019	Chùng	2019-11	HN	Nam	1 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
37	EPI_ISL_16289282	hRSV/B/Vietnam/SARI02TN18042-F/2018	Chùng	2018-6	HN	Nam	17 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
38	EPI_ISL_16289283	hRSV/B/Vietnam/SARI18NH17057-F/2017	BPLS	2017-7	QN	Nam	7 tuổi	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
39	EPI_ISL_16289284	hRSV/B/Vietnam/SARI18NH17067-F/2017	BPLS	2017-7	QN	Nữ	22 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
40	EPI_ISL_16289285	hRSV/B/Vietnam/SARI18NH17081-F/2017	BPLS	2017-8	QN	Nam	15 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
41	EPI_ISL_16289286	hRSV/B/Vietnam/SARI18NH17092-F/2017	Chùng	2017-9	QN	Nam	5 tuổi	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
42	EPI_ISL_16289287	hRSV/B/Vietnam/SARI18NH17093-F/2017	BPLS	2017-9	QN	Nam	20 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
43	EPI_ISL_16289288	hRSV/B/Vietnam/SARI18NH17127-F/2017	BPLS	2017-10	QN	Nữ	10 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
44	EPI_ISL_16289289	hRSV/B/Vietnam/SARI18NH18119-F/2018	BPLS	2018-7	QN	Nam	19 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
45	EPI_ISL_16289290	hRSV/B/Vietnam/SARI18HH18116-F/2018	BPLS	2018-8	QN	Nam	1 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics	> 2000X	VSDTTW

										Workbench 11		
46	EPI_ISL_16289291	hRSV/B/Vietnam/SARI18NH18218-F/2018	BPLS	2018-12	QN	Nam	5 tuổi	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
47	EPI_ISL_16289292	hRSV/B/Vietnam/SARI18NH19100-F/2019	BPLS	2019-6	QN	Nữ	21 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
48	EPI_ISL_16289293	hRSV/B/Vietnam/SARI18NH19107-F/2019	BPLS	2019-7	QN	Nam	8 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
49	EPI_ISL_16289294	hRSV/B/Vietnam/SARI18NH19142-F/2019	BPLS	2019-9	QN	Nữ	2 tuổi	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW
50	EPI_ISL_16289295	hRSV/B/Vietnam/SARI18NH19150-F/2019	BPLS	2019-9	QN	Nữ	17 tháng	Dịch tỵ hầu	Illumina Miseq	CLC Genomics Workbench 11	> 2000X	VSDTTW

^a: BPLS (Bệnh phẩm lâm sàng)

^b: HN (Hà Nội), QN (Quảng Ninh)

^c: VSDTTW (Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

Hà Nội, ngày 22.10.tháng 01.. năm 2021

TỜ TRÌNH SỬ DỤNG MẪU LƯU

Kính gửi: Ban lãnh đạo Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương

Tôi là: **Ứng Thị Hồng Trang** Học hàm, học vị: **Thạc sĩ**

Cơ quan công tác: **Khoa vi rút, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương**

Chức vụ: **Nghiên cứu viên**

Với mong muốn thực hiện luận án Tiến sĩ sinh học với tên đề tài: “Nghiên cứu đặc điểm sinh học phân tử của virus hợp bào hô hấp trên bệnh nhân nhi viêm đường hô hấp cấp tính nặng”, chuyên ngành: Vi sinh vật học, mã số: 9 42 01 07 tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Thay mặt nhóm nghiên cứu kính trình lãnh đạo Viện đồng ý cho Thạc sĩ Ứng Thị Hồng Trang được sử dụng các mẫu bệnh phẩm lâm sàng và các kết quả của “**Kế hoạch giám sát trọng điểm hội chứng cúm, nhiễm trùng đường hô hấp cấp tính nặng và bệnh tay chân miệng tại Việt Nam giai đoạn 2017-2020**” theo Quyết định 4608/QĐ-BYT ngày 11 tháng 10 năm 2017 của Bộ Y tế hiện đang được lưu tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

Nhóm nghiên cứu cam kết sử dụng số liệu và mẫu bệnh phẩm đúng mục đích của nghiên cứu.

Trân trọng cảm ơn!

Xác nhận của lãnh đạo khoa Vi rút

Người đề nghị



Nguyễn Lê Khánh Hằng

Ứng Thị Hồng Trang

Hà Nội, ngày 22 tháng 01 năm 2021

GIẤY XÁC NHẬN

Tôi là: **Đặng Đức Anh** Học hàm, học vị: **Giáo sư, Tiến sĩ**
Cơ quan công tác: **Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.**
Chức vụ: **Viện trưởng**

Là người chịu trách nhiệm lưu trữ mẫu bệnh phẩm lâm sàng và các kết quả trong: **“Kế hoạch giám sát trọng điểm hội chứng cúm, nhiễm trùng đường hô hấp cấp tính nặng và bệnh tay chân miệng tại Việt Nam giai đoạn 2017-2020”** theo Quyết định 4608/QĐ-BYT ngày 11 tháng 10 năm 2017 của Bộ Y tế.

Theo đề nghị của nhóm nghiên cứu, tôi đồng ý cho ThS. Ứng Thị Hồng Trang sử dụng mẫu bệnh phẩm lâm sàng và các kết quả của Kế hoạch giám sát trọng điểm hội chứng cúm, nhiễm trùng đường hô hấp cấp tính nặng và bệnh tay chân miệng tại Việt Nam giai đoạn 2017-2020 làm kết quả nghiên cứu của luận án tiến sĩ: **“Nghiên cứu đặc điểm sinh học phân tử của virus hợp bào hô hấp trên bệnh nhân nhi viêm đường hô hấp cấp tính nặng”**, chuyên ngành: **Vi sinh vật học**, mã số: **9 42 01 07** tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Trân trọng./.

Người xác nhận


GS.TS. ĐẶNG ĐỨC ANH