

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG

-----*-----

PHẠM THỊ PHƯƠNG THẢO

**ĐÁNH GIÁ TÁC ĐỘNG CỦA VẮC XIN ROTAVIN-
M1 ĐỐI VỚI SỰ LƯU HÀNH CỦA VI RÚT ROTA
VÀ MỘT SỐ VI RÚT KHÁC GÂY TIÊU CHẢY CẤP
Ở TRẺ EM TẠI NAM ĐỊNH VÀ THỪA THIÊN HUẾ**

Ngành: Vi sinh vật học

Mã số: 9 42 01 07

LUẬN ÁN TIẾN SỸ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

- 1. PGS.TS. NGUYỄN VĂN TRANG**
- 2. GS.TS NGUYỄN ĐĂNG HIỀN**

HÀ NỘI – 2022

LỜI CAM ĐOAN

Sau một thời gian học tập và thực hiện đề tài nghiên cứu, tôi đã hoàn thành chương trình học tập theo quy định cho nghiên cứu sinh và hoàn thành Luận án tiến sĩ với đề tài: **“Đánh giá tác động của vắc xin Rotavin-M1 đối với sự lưu hành của vi rút Rota và một số vi rút khác gây tiêu chảy cấp ở trẻ em tại Nam Định và Thừa Thiên Huế”**.

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu do tôi thực hiện dưới sự hướng dẫn của PGS.TS Nguyễn Văn Trang và GS.TS. Nguyễn Đăng Hiền và sự đồng ý của GS.TS. Đặng Đức Anh - chủ nhiệm đề tài “Đánh giá hiệu quả của vắc xin phòng tiêu chảy do vi rút Rota ở trẻ em tại Việt Nam”. Các số liệu và kết quả trong luận án là trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ công trình của tác giả nào khác.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm với những cam kết của mình cũng như nội dung của luận án.

Hà Nội, ngày tháng năm 2022

Người cam đoan

Phạm Thị Phương Thảo

LỜI CẢM ƠN

Trong suốt thời gian học tập, nghiên cứu và thực hiện Luận án **“Đánh giá tác động của vắc xin Rotavin-M1 đối với sự lưu hành của vi rút Rota và một số vi rút khác gây tiêu chảy ở trẻ em tại Nam Định và Thừa Thiên Huế”**, tôi đã luôn nhận được sự giúp đỡ, hỗ trợ tận tình của các Quý thầy cô, các nhà khoa học, các bạn bè, đồng nghiệp ...

Trước tiên, tôi xin bày tỏ lời cảm ơn chân thành, sâu sắc tới PGS.TS Nguyễn Vân Trang– người thầy đã luôn tận tình hướng dẫn, chia sẻ, giúp đỡ, chỉ bảo và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu, chuẩn bị và hoàn thành Luận án.

Tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến Thầy hướng dẫn, GS.TS. Nguyễn Đăng Hiền đã luôn động viên, quan tâm và tạo mọi điều kiện thuận lợi, hỗ trợ cho tôi suốt thời gian học tập và thực hiện Luận án.

Tôi cũng xin trân trọng cảm ơn các Lãnh đạo và cán bộ Phòng Đào tạo Sau Đại học thuộc Trung tâm Đào tạo và Quản lý Khoa học, phòng Nghiên cứu phát triển vắc xin và sinh phẩm thuộc Trung tâm Nghiên cứu y sinh, các Quý thầy cô của Viện Vệ sinh dịch tễ Trung Ương và Ban Lãnh đạo Trung Tâm Nghiên cứu sản xuất vắc xin và Sinh phẩm Y Tế đã hướng dẫn, giúp đỡ, tạo mọi điều kiện tốt nhất để tôi hoàn thành khoá học và luận án.

Tôi cũng xin trân trọng cảm ơn Quỹ Bill-Melinda Gates, các nhà khoa học của Trung tâm kiểm soát bệnh tật (CDC - Mỹ), các Lãnh đạo và cán bộ Khoa Y tế công cộng (Viện Vệ sinh dịch tễ Trung Ương); Trung tâm Kiểm soát bệnh tật tỉnh Nam Định và Thừa Thiên Huế; Bệnh viện đa khoa và Trung tâm y tế Dự phòng huyện Hải Hậu, Trực Ninh, Xuân Trường, Giao Thủy (tỉnh Nam Định) và bệnh viện đa khoa huyện Phú Vang, Hương Trà (tỉnh Thừa Thiên Huế) tham gia Dự Án “Đánh giá hiệu quả của vắc xin phòng tiêu chảy do vi rút Rota ở trẻ em tại Việt Nam” đã hỗ trợ và giúp đỡ tôi thực hiện nghiên cứu.

Tôi xin chân thành cảm ơn bạn bè, đồng nghiệp của Tôi đang công tác tại Trung Tâm Nghiên cứu sản xuất vắc xin và Sinh phẩm Y Tế và gia đình đã động viên, khích lệ, tạo điều kiện và giúp đỡ Tôi trong suốt quá trình thực hiện và hoàn thành luận án này.

Hà Nội, ngày 03 tháng 08 năm 2022

Phạm Thị Phương Thảo

MỤC LỤC

Trang phụ bìa	
LỜI CAM ĐOAN	ii
LỜI CẢM ƠN	iii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT	x
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	xi
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	xiii
MỞ ĐẦU.....	1
Chương 1- TỔNG QUAN.....	3
1.1. Các vi rút gây tiêu chảy cấp ở trẻ em dưới 5 tuổi ở Việt Nam	3
1.2. Vi rút Rota	3
1.2.1. Hình thái và cấu trúc	3
1.2.2. Phân loại vi rút Rota	4
1.2.2.1. Nhóm và phân nhóm của vi rút Rota	4
1.2.2.2. Các typ huyết thanh vi rút Rota nhóm A.....	5
1.2.2.3. Các kiểu gen của vi rút Rota nhóm A	5
1.2.2.4. Phân loại theo hệ gen (Gene constellations)	5
1.2.3. Các phương pháp phát hiện vi rút Rota	6
1.2.4. Dịch tễ học bệnh tiêu chảy cấp do vi rút Rota.....	7
1.2.4.1. Phương thức lây nhiễm	7
1.2.4.2. Phân bố theo mùa	7
1.2.4.3. Nhóm tuổi dễ mắc bệnh và đặc tính miễn dịch với vi rút Rota	8
1.2.5. Đặc điểm di truyền của vi rút Rota	8
1.2.5.1. Các kiểu gen GP phổ biến của vi rút Rota	8
1.2.5.2. Chủng vi rút Rota đột biến và các nhánh trong mỗi kiểu gen GP.....	8
1.2.5.3. Chủng vi rút Rota mới do tái tổ hợp bất thường các đoạn gen	9
1.2.5.4. Chủng vi rút Rota mới do tái tổ hợp đoạn gen có nguồn gốc từ động vật	9
1.3. Vắc xin phòng tiêu chảy cấp do vi rút Rota	10
1.3.1. Các loại vắc xin phòng tiêu chảy cấp do vi rút Rota	10
1.3.2. Hiệu quả của vắc xin phòng tiêu chảy cấp do RV.....	12
1.3.2.1. Hiệu quả phòng bệnh của vắc xin	12
1.3.2.2. Hiệu quả của vắc xin với các chủng lưu hành.....	13

1.3.3. Tác động của vắc xin phòng tiêu chảy cấp do vi rút Rota với gánh nặng bệnh TCC và sự lưu hành các chủng vi rút.....	15
1.3.3.1. Tác động của vắc xin phòng tiêu chảy cấp và tỉ lệ nhiễm vi rút Rota ở trẻ em nhập viện dưới 5 tuổi	15
1.3.3.2. Vắc xin tác động đến tỉ lệ phân bố lưu hành các chủng vi rút Rota	16
1.3.4. Các phương pháp đánh giá tác động và hiệu quả của vắc xin phòng tiêu chảy cấp do vi rút Rota	17
1.3.4.1. Thiết kế nghiên cứu đánh giá tác động của vắc xin làm giảm gánh nặng bệnh tiêu chảy cấp do vi rút Rota.....	18
1.3.4.2. Thiết kế nghiên cứu để đánh giá hiệu quả vắc xin.....	19
1.3.4.3. Đánh giá tác động của chủng ngừa đến các kiểu gen RV lưu hành	22
1.4. Vi rút Noro, Astro và Sapo gây tiêu chảy cấp ở trẻ em	22
1.4.1. Vi rút Noro.....	22
1.4.1.1. Hình thái, cấu trúc	22
1.4.1.2. Phân loại vi rút Noro	24
1.4.1.3. Các phương pháp phát hiện vi rút Noro	25
1.4.1.4. Dịch tễ học bệnh tiêu chảy cấp do vi rút Noro.....	25
1.4.1.5. Đặc điểm di truyền của vi rút Noro.....	27
1.4.2. Vi rút Astro	28
1.4.2.1. Hình thái, cấu trúc	28
1.4.2.2. Phân loại vi rút Astro	30
1.4.2.3. Các phương pháp phát hiện vi rút Astro	31
1.4.2.4. Dịch tễ học của bệnh tiêu chảy cấp do vi rút Astro	33
1.4.2.5. Đặc điểm di truyền của vi rút Ast	35
1.4.3. Vi rút Sapo	35
1.4.3.1. Hình thái, cấu trúc	36
1.4.3.2. Phân loại vi rút Sapo	36
1.4.3.3. Các phương pháp phát hiện vi rút Sapo	37
1.4.3.4. Dịch tễ học bệnh tiêu chảy cấp do vi rút Sapo.....	37
1.4.3.5. Đặc điểm di truyền của Sav	41
1.5. Đặc điểm chung của các địa điểm tham gia nghiên cứu	41
CHƯƠNG 2 - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	43
2.1. Đối tượng, thời gian, địa điểm nghiên cứu.....	43
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu	43

2.1.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu	43
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	44
2.2.1. Thiết kế nghiên cứu	44
2.2.2. Phương pháp lựa chọn đối tượng.....	45
2.2.2.1 Lựa chọn đối tượng để đánh giá tác động Rotavin-M1 đến tỉ lệ nhiễm và đặc điểm kiểu gen của vi rút Rota ở trẻ em tiêu chảy cấp dưới 5 tuổi (mục tiêu 1A, 1B).....	45
2.2.2.2 Lựa chọn đối tượng tham gia đánh giá hiệu quả vắc xin Rotavin-M1 bằng thiết kế nghiên cứu bệnh-chứng TNC (mục tiêu 1C).....	45
2.2.2.3 Lựa chọn đối tượng để đánh giá tác động Rotavin-M1 đến tỉ lệ nhiễm và đặc điểm kiểu gen của vi rút Noro, Astro và Sapo ở trẻ em tiêu chảy cấp dưới 5 tuổi (mục tiêu 2)	46
2.2.3. Cỡ mẫu cho nghiên cứu	46
2.2.3.1. Cỡ mẫu để đánh giá tác động của vắc xin Rotavin-M1 đến tỉ lệ nhiễm RV (mục tiêu 1A).....	46
2.2.3.2. Cỡ mẫu để đánh giá tác động của vắc xin Rotavin-M1 đến tỉ lệ nhiễm và đặc điểm kiểu gen của RV (mục tiêu 1B)	46
2.2.3.3. Cỡ mẫu đánh giá hiệu quả của vắc xin Rotavin-M1 (mục tiêu 1C).....	47
2.2.3.4. Cỡ mẫu cho nghiên cứu tỉ lệ lưu hành NV, Ast và Sav (mục tiêu 2)	48
2.2.4. Biến số nghiên cứu	49
2.3. Nội dung nghiên cứu và kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu	50
2.3.1. Thu thập dữ liệu nghiên cứu từ tháng 12/2016-11/2017	50
2.3.2. Nội dung nghiên cứu (từ 12/2017-5/2021).....	51
2.3.2.1. Tuyển chọn đối tượng tham gia nghiên cứu.....	51
2.3.2.2. Kỹ thuật thu thập thông tin.....	54
2.3.2.3. Lấy mẫu, bảo quản bệnh phẩm	54
2.3.2.4. Chọn mẫu ngẫu nhiên xét nghiệm.....	55
2.3.2.5. Triển khai uống vắc xin Rotavin-M1 cho trẻ từ 8-16 tuần (từ 12/2017-11/2020)	55
2.3.2.6. Các phương pháp xét nghiệm và phân tích di truyền.....	55
2.6.2.7. Phân tích số liệu	58
2.4. Không chế sai số.....	59
2.5. Đạo đức trong nghiên cứu	60

Chương 3- KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	62
3.1. Tỷ lệ nhiễm và đặc điểm kiểu gen của vi rút Rota ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1.....	62
3.1.1. Số ca và tỷ lệ nhiễm vi rút Rota ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1	62
3.1.1.1. Đặc điểm chung của các ca tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi....	62
3.1.1.2. Tỷ lệ nhiễm vi rút Rota ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi theo giới tính	63
3.1.1.3. Tỷ lệ nhiễm vi rút Rota ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi hàng tháng	64
3.1.1.4. Tỷ lệ nhiễm vi rút Rota ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi hàng năm trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1	66
3.1.1.5. Tỷ lệ nhiễm vi rút Rota ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi theo nhóm tuổi	68
3.1.2. Đặc điểm lưu hành kiểu gen của vi rút Rota trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1	70
3.1.2.1. Đặc điểm phân bố lưu hành các kiểu gen G của vi rút Rota.....	70
3.1.2.2. Đặc điểm phân bố lưu hành các kiểu gen P của vi rút Rota.....	72
3.1.2.3. Đặc điểm phân bố lưu hành các tổ hợp kiểu gen GP của vi rút Rota	74
3.1.3. Hiệu quả bảo vệ của vắc xin Rotavin-M1	76
3.1.3.1. Hiệu quả bảo vệ của vắc xin Rotavin-M1 theo nhóm tuổi và mức độ lâm sàng	76
3.1.3.2. Hiệu quả bảo vệ của vắc xin Rotavin-M1 với các kiểu gen phổ biến của vi rút Rota	78
3.1.4. Đặc điểm di truyền của một số chủng vi rút Rota	79
3.1.4.1. Sự đa dạng về di truyền của vi rút Rota chủng G1P[8] và mối liên hệ với vắc xin phòng tiêu chảy cấp do vi rút Rota	79
3.1.4.2. Sự đa dạng về di truyền chủng vi rút G8P[8].....	86
3.2. Tỷ lệ nhiễm và đặc điểm lưu hành của các vi rút Noro, Astro và Sapo ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1.....	91
3.2.1. Tỷ lệ nhiễm vi rút Noro, Astro và Sapo ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi	91

3.2.1.1. Tỷ lệ nhiễm vi rút Noro, Astro và Sapo ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi theo giới tính.....	91
3.2.1.2. Tuổi nhiễm vi rút Noro, Astro và Sapo ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi	93
3.2.1.3. Tỷ lệ nhiễm vi rút Noro, Astro và Sapo ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi hàng tháng	94
3.2.1.4. Tỷ lệ nhiễm vi rút Noro, Astro và Sapo ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi hàng năm trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1	97
3.2.1.5. Tỷ lệ nhiễm vi rút Noro, Astro và Sapo ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi theo tình trạng uống vắc xin Rotavin-M1	99
3.2.1.6. Tỷ lệ nhiễm vi rút Noro, Astro và Sapo ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi tại theo nhóm tuổi và tình trạng uống vắc xin Rotavin-M1	100
3.2.2. Sự phân bố của các vi rút gây TCC ở trẻ em nhập viện dưới 5 tuổi trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1	101
3.2.2.1. Sự phân bố các vi rút gây TCC ở trẻ em nhập viện dưới 5 tuổi trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1	101
3.2.2.2. Sự phân bố các tác nhân vi rút gây TCC ở trẻ em nhập viện dưới 5 tuổi trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1 theo độ tuổi	103
3.2.3. Đặc điểm lưu hành nhóm gen, kiểu gen của vi rút Noro, Astro và Sapo ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi.....	106
3.2.3.1. Đặc điểm lưu hành các nhóm gen vi rút Noro	106
3.2.3.2. Đặc điểm lưu hành các chủng vi rút Astro.....	107
3.2.3.3. Đặc điểm lưu hành các chủng vi rút Sapo.....	108
3.2.4. Đặc điểm di truyền của vi rút Astro.....	109
Chương 4- BÀN LUẬN.....	111
4.1. Tỷ lệ nhiễm và đặc điểm kiểu gen của vi rút Rota ở trẻ em tiêu chảy cấp dưới 5 tuổi trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1	111
4.2. Tỷ lệ nhiễm và đặc điểm lưu hành của vi rút Noro, Astro và Sapo ở trẻ em tiêu chảy cấp dưới 5 tuổi trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1	127
Hạn chế của nghiên cứu	134
KẾT LUẬN	136
KIẾN NGHỊ	138
DANH MỤC TÀI LIỆU ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN.....	

TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	- 140 -
PHỤ LỤC.....	- 1 -
Phụ lục 01: Phiếu chấp thuận tham gia nghiên cứu	- 1 -
Phụ lục 02: Phiếu điều tra bệnh tiêu chảy cấp.....	- 3 -
Phụ lục 03A: Giấy chứng nhận chấp thuận của Hội đồng Đạo đức của Viện Vệ sinh dịch tễ TW (Số: IRB-VN01057-19/2016).....	- 6 -
Phụ lục 03B: Giấy chứng nhận chấp thuận gia hạn của Hội đồng Đạo đức Viện Vệ sinh Dịch tễ TW (số: IRB-VN01057-19/2016/IORG-0008555).....	- 7 -
Phụ lục 04: Thang điểm mức độ nghiêm trọng của Vesikari cho đánh giá triệu chứng tiêu chảy cấp ở trẻ em [ruuska, 1990 #405]	- 8 -
Phụ lục 05: Quy trình xác định vi rút rota dương tính trên mẫu phân bằng phương pháp ELISA (sử dụng kit Rotaclone)	- 9 -
Phụ lục 06: quy trình tách chiết ARN từ mẫu phân	- 12 -
Phụ lục 07: Quy trình phản ứng RT-PCR định typ G, P của vi rút Rota	- 14 -
Phụ lục 08: Kỹ thuật multiplex realtime RT-PCR phát hiện vi rút Noro.....	- 20 -
Phụ lục 09: Kỹ thuật multiplex realtime RT-PCR phát hiện vi rút Astro và Sapo .	- 23 -
Phụ lục 10: Quy trình chuẩn bị sản phẩm ADN tinh sạch cho giải trình tự cho chủng G1P[8] của vi rút Rota và vi rút Astro theo nguyên lý Sanger	- 27 -
Phụ lục 11: Quy trình giải trình tự bộ gen bằng phương pháp giải trình tự thế hệ mới (NGS)	- 30 -
Phụ lục 12A: Tỷ lệ tương đồng Nucleotide và acid amin gen VP7 của các chủng RV G1P[8] trong nghiên cứu với 1 số chủng G1 tại Việt Nam tham khảo trên Genbank.....	32
Phụ lục 12B: Tỷ lệ tương đồng Nucleotide và acid amin gen VP4 của các chủng RV G1P[8] trong nghiên cứu với 1 số chủng G1 tại Việt Nam tham khảo trên Genbank.....	- 34 -
Phụ lục 13: Cây phát sinh chủng loại các gen bên trong của chủng G8P[8]	-35-
Phụ lục 14A: Biến đổi acid amin trong vùng Epitope của NSP3 giữa các chủng G8 đang nghiên cứu và chủng vắc xin	-39-
Phụ lục 14B: Biến đổi acid amin trong vùng Epitope của NPS4 giữa các chủng G8 đang nghiên cứu và chủng vắc xin	-40-

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

ADN	Deoxyribonucleic Acid	Axit Deoxyribonucleic
ARN	Ribonucleic Acid	Axit Ribonucleic
Ast	Astrovirus	Vi rút Astro
CDC	Centers for Disease Control and Prevention	Trung tâm Kiểm soát và phòng ngừa dịch bệnh
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	Kỹ thuật miễn dịch gắn enzyme
GRSN	Global Rotavirus Surveillance Network	Mạng lưới Giám sát RV toàn cầu
HICs	High income countries	Các nước thu nhập cao
HMICs	High- Middle income countries	Các nước thu nhập trung bình - cao
IgA	Immuno globulin A	Globulin miễn dịch A
IQR	Interquartile range	Khoảng tứ phân vị
LICs	Low income countries	Các nước thu nhập thấp
LMICs	Low-to-middle income countries	Các nước thu nhập thấp đến trung bình
MICs	Middle income countries	Các nước thu nhập trung bình
NSP	Non-structure Protein	Protein phi cấu trúc
NV	Norovirus	Vi rút Noro
OD	Optical density	Mật độ quang học
OR	Odd ratio	Tỉ suất chênh
RR	Risk Reduction	Độ giảm tỉ lệ nhiễm
RT- PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi Polymerase phiên mã ngược
RV	Rotavirus	RV
Sav	Sapovirus	Vi rút Sapo
TCC		Tiêu chảy cấp
TCMR		Tiêm chủng Mở rộng
TCQG		Tiêm chủng Quốc gia
TCYTTG	World Health Organization	Tổ chức Y tế Thế giới
TNC	Test negative control	Nghiên cứu bệnh-chứng với ca chứng có xét nghiệm âm tính
VP	viral protein	Protein của vi rút

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Tỷ lệ lưu hành vi rút Astro trên thế giới [27]	34
Bảng 1.2. Tỷ lệ dương tính với vi rút Sapo ở bệnh nhân bị tiêu chảy cấp [122].....	39
Bảng 1.3. Các huyện được triển khai uống vắc xin Rotavin-M1.....	42
Bảng 2.1. Yêu cầu cỡ mẫu của các ca bệnh cho phép đánh giá hiệu quả vắc xin với các tỉ lệ bao phủ dự kiến khác nhau và các tỉ lệ ca bệnh: ca chứng khác nhau [174]	
47	
Bảng 3.1. Đặc điểm chung của các ca tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi tại Nam Định và Huế, 12/2016-5/2021	62
Bảng 3.2. Tỷ lệ nhiễm vi rút Rota ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi theo giới tính ở Nam Định và Huế, 12/2016-5/2021	63
Bảng 3.3. Tỷ lệ nhiễm RV ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi hàng năm tại Nam Định (4/2017 - 3/2021) và Huế (1/2017 – 12/2020)	66
Bảng 3.4. Tỷ lệ nhiễm vi rút Rota ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi hàng năm theo các nhóm tuổi tại Nam Định (4/2017 - 3/2021) và Huế (1/2017 – 12/2020)	
68	
Bảng 3.5. Hiệu quả bảo vệ của Rotavin-M1 theo nhóm tuổi từ 6 đến 23 tháng tuổi theo mức độ lâm sàng, 2017-2021	76
Bảng 3.6. Hiệu quả bảo vệ của vắc xin Rotavin-M1 với các kiểu gen phổ biến của vi rút Rota tại Nam Định và Huế, 2017-2021.....	78
Bảng 3.7. Tỷ lệ tương đồng nucleotide, acid amin và phân loại nhánh di truyền trên VP7, VP4 của một số chủng vi rút Rota kiểu gen G1P[8] nghiên cứu với chủng vi rút vắc xin	79
Bảng 3.8A. Biến đổi acid amin trong các epitope kháng nguyên của gen VP7 của các chủng G1P[8] trong nghiên cứu và chủng G1 tham chiếu và các chủng vi rút vắc xin	83
Bảng 3.8B. Biến đổi acid amin trong các epitope kháng nguyên của gen VP4 của các chủng G1P[8] trong nghiên cứu và chủng G1 tham chiếu và các chủng vi rút vắc xin	84
Bảng 3.9. Đặc điểm phân loại 11 đoạn gen của các chủng G8P[8]	88
Bảng 3.10A. Biến đổi acid amin trong vùng Epitope của VP7 giữa các chủng G8 đang nghiên cứu và chủng vắc xin.....	89
3.10B. Biến đổi acid amin trong vùng Epitope của VP8* (thuộc VP4) giữa các chủng G8P[8] nghiên cứu và chủng vắc xin.....	89

Bảng 3.10C. Biến đổi acid amin trong vùng Epitope của VP5 (thuộc VP4) giữa các chủng G8 nghiên cứu và chủng vắc xin	90
Bảng 3.11. Tỷ lệ nhiễm vi rút Noro, Astro và Sapo ^(a) ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi theo giới tính tại Nam Định và Huế, 12/2016-11/2020.....	91
Bảng 3.12. Tỷ lệ nhiễm vi rút Noro, Astro và Sapo ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi hàng năm tại Nam Định, 3/2017-11/2020 và Huế, 1/2017-11/2020	97
Bảng 3.13. Tỷ lệ nhiễm vi rút Noro, Astro và Sapo ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi tại Nam Định và Huế theo tình trạng uống vắc xin Rotavin-M1, 12/2016-11/2020 ^(a)	99
Bảng 3.14. Tỷ lệ nhiễm vi rút Noro, Astro và Sapo ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện theo nhóm tuổi và tình trạng uống vắc xin Rotavin-M1, 12/2016-11/2020	100
Bảng 3.15. Sự phân bố các nhóm gen NV lưu hành tại Nam Định và Huế (2016-2020)	106
Bảng 3.16. Sự phân bố của các chủng vi rút Astro lưu hành tại Nam Định và Huế (2016-2021).....	107
Bảng 3.17. Sự phân bố của các chủng vi rút Sapo lưu hành tại Nam Định và Huế (2016-2020).....	108

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Hình minh họa thành phần hóa học và cấu trúc của vi rút Rota (chủng SA11) [115]	4
Hình 1.2. Cấu trúc genome vi rút Noro, protein cấu trúc và phi cấu trúc [37]	23
Hình 1.3. Phân loại vi rút Noro dựa trên đa dạng trình tự acid amin trong protein capsid toàn bộ gen VP1 [37]	24
Hình 1.4. Phân bố các kiểu gen của vi rút Noro gây TCC ở trẻ em trên toàn cầu, 2004 -2012 [76]	28
Hình 1.5. Genome và các sản phẩm polyprotein của vi rút Astro [29]	30
Hình 1.6. Sơ đồ cấu trúc của genome vi rút Sapo [124]	36
Hình 2.1. Thời gian triển khai các hoạt động nghiên cứu	43
Hình 2.2. Các địa điểm thu thập mẫu nghiên cứu tại Việt Nam	44
Hình 2.3. Sơ đồ tóm tắt tuyển chọn đối tượng đủ tiêu chuẩn để đánh giá tác động của vắc xin Rotavin-M1 đến tỉ lệ nhiễm RV (mục tiêu 1A) và đặc điểm kiểu gen GP (mục tiêu 1B) và đánh giá hiệu quả vắc xin (mục tiêu 1C)	51
Hình 2.4. Sơ đồ tuyển chọn mẫu cho phát hiện tỉ lệ nhiễm và đặc điểm lưu hành của các vi rút Noro, Astro và Sapo (mục tiêu 2)	52
Hình 3.1A. Số ca và tỉ lệ nhiễm RV hàng tháng tại Nam Định, 12/2016-5/2021	64
Hình 3.1B. Số ca và tỉ lệ nhiễm RV hàng tháng tại Huế, 12/2016-5/2021	65
Hình 3.2. Tuổi trung vị nhiễm vi rút Rota ở Nam Định (4/2017 - 3/2021) và Huế (1/2017 – 12/2020)	69
Hình 3.3. Tỉ lệ lưu hành các kiểu gen G của vi rút Rota tại Nam Định, 4/2017-3/2021 và Huế, 1/2017-12/2020	70
Hình 3.4. Tỉ lệ lưu hành các kiểu gen G của vi rút Rota hàng năm tại Nam Định, 4/2017-3/2021 và Huế, 1/2017-12/2020	71
Hình 3.5. Tỉ lệ lưu hành các kiểu gen P của vi rút Rota tại Nam Định, 4/2017-3/2021 và Huế, 1/2017-12/2020	72
Hình 3.6. Tỉ lệ lưu hành các kiểu gen P của vi rút Rota hàng năm tại Nam Định, 4/2017-3/2021 và Huế, 1/2017-12/2020	73
Hình 3.7. Tỉ lệ lưu hành các kiểu gen GP của vi rút Rota hàng năm tại Nam Định, 4/2017-3/2021 và Huế, 1/2017-12/2020	74
Hình 3.8A. Cây phát sinh chủng loại trên gen VP7 của các chủng RV G1P[8] (2021) và các chủng vắc xin	80

Hình 3.8B. Cây phát sinh chủng loại trên gen VP[4] của các chủng RV G1P[8] (2021) và các chủng vắc xin	81
Hình 3.9A. Cây phát sinh chủng loại trên gen VP7 của các chủng G8P[8], (2016-2021).....	86
Hình 3.9B. Cây phát sinh chủng loại của các gen VP4 của các chủng G8P[8].....	87
Hình 3.10. Tuổi nhiễm vi rút Noro, Astro và Sapo ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1, 12/2016-11/2020.....	93
Hình 3.11A. Số ca và tỉ lệ nhiễm NV hàng tháng tại Nam Định và Huế, 12/2016-11/2020.....	94
Hình 3.11B. Số ca và tỉ lệ nhiễm Ast hàng tháng tại Nam Định và Huế, 12/2016-11/2020.....	95
Hình 3.11C. Số ca và tỉ lệ nhiễm Sav hàng tháng tại Nam Định và Huế, 12/2016-11/2020.....	96
Hình 3.12. Sự phân bố các tác nhân vi rút gây TCC ở trẻ em < 5 tuổi trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1 tại Nam Định, 4/2017-11/2020 và Huế, 1/2017-11/2020	102
Hình 3.13. Sự phân bố tác nhân gây TCC ở trẻ em theo độ tuổi trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1 tại Nam Định, 4/2017-11/2020 và Huế , 1/2017-11/2020.....	104
Hình 3.14. Cây phát sinh chủng loại của các chủng vi rút Astro, 2016-2020	109

MỞ ĐẦU

Có hơn 20 tác nhân khác nhau có thể gây ra bệnh tiêu chảy cấp ở trẻ em và được chia làm 3 nhóm chính: vi rút, vi khuẩn và ký sinh trùng [26]. Các tác nhân vi rút gây viêm dạ dày ruột cấp ở người là: vi rút Rota, vi rút Noro, vi rút Sapo, vi rút Astro và vi rút Adeno [26]. Trong số đó, vi rút Rota là nguyên nhân hàng đầu gây tiêu chảy nặng, mất nước ở trẻ em dưới 5 tuổi, ước tính gây ra hơn 500.000 ca tử vong ở trẻ em và hơn 2 triệu ca nhập viện trên toàn thế giới năm 2000 [180]. Vi rút Noro liên quan đến khoảng 18% các ca tiêu chảy cấp toàn cầu và gây ra khoảng 200.000 ca tử vong hàng năm, với khoảng 70.000 ca ở các nước đang phát triển [37]. Tương tự, vi rút Astro và Sapo cũng đóng vai trò quan trọng gây ra các đợt bùng phát tiêu chảy cấp ở mọi lứa tuổi trên toàn thế giới. Các nghiên cứu dịch tễ trong thập kỷ qua cho thấy tỉ lệ nhiễm vi rút Astro và Sapo ở trẻ em khoảng 5% và 4,4% nhưng gánh nặng của các tác nhân là đáng kể ở các nước đang phát triển [48, 172].

Từ năm 2006 đến nay, có 4 loại vắc xin phòng tiêu chảy cấp do vi rút Rota đã được sử dụng trong chương trình tiêm chủng Quốc gia của 118 nước [177], giúp giảm 59 - 77% số trẻ tử vong do vi rút Rota ở giai đoạn 2013 -2017 so với năm 2000 [180], giảm 59% (IQR, 46–74) số ca tiêu chảy cấp nhập viện ở trẻ em <5 do vi rút Rota [33]. Ở nhiều quốc gia sử dụng vắc xin, vai trò của các vi rút gây tiêu chảy cấp khác ngày càng tăng, nhiều nơi vi rút Noro trở thành tác nhân chính gây tiêu chảy cấp, thay thế vi rút Rota [26, 31, 65, 133].

Ở Việt Nam, tiêu chảy cấp do vi rút Rota là một gánh nặng đáng kể, gây ra 2.700–5.400 ca tử vong mỗi năm, chiếm 4–8% tỉ lệ tử vong ở trẻ cùng lứa tuổi [122] với tỉ lệ nhiễm vi rút Rota khoảng gần 50% [7, 79]. Vi rút Novo, Astro và Sapo lần lượt liên quan đến 6-36,3%, 0,6-13,9% và 0,8-1,4% ca tiêu chảy cấp nhập viện ở trẻ em. Các vắc xin phòng tiêu chảy cấp do vi rút Rota đã được lưu hành tại Việt Nam từ năm 2008 ở thị trường dịch vụ với độ bao phủ thấp và ảnh hưởng vắc xin đến tỉ lệ nhiễm vi rút Rota chưa được đánh giá tại Việt Nam.

Tuy nhiên, nhìn chung hiệu quả bảo vệ của vắc xin phòng tiêu chảy cấp do vi rút Rota khác nhau ở một số quốc gia. Hiệu quả của Rotarix là 58% và RotaTeq là 45% ở các nước có tỉ lệ tử vong ở trẻ em cao. Hiệu quả này thấp hơn ở các nước có tỉ lệ tử vong thấp ở trẻ em (tương ứng là 83% và 85%) [82]. Có nhiều yếu tố có thể ảnh hưởng làm giảm hiệu quả của các vắc xin đường uống khi sử dụng trong thực tế như: sự khác biệt về dịch tễ học với tỉ lệ nhiễm vi rút Rota cao ở một số nơi, sự đồng

nh nhiễm với các tác nhân gây bệnh đường ruột khác, yếu tố về dinh dưỡng, về miễn dịch ở niêm mạc, sữa mẹ, kháng thể từ mẹ và sử dụng đồng thời các vắc xin khác [57]... Ngoài ra, hiệu quả của vắc xin với mỗi chủng vi rút Rota lưu hành khác nhau [57, 64, 140]. Do vậy, với đặc điểm đa dạng các chủng vi rút Rota lưu hành và sự xuất hiện các chủng mới có thể ảnh hưởng đến hiệu quả chung của vắc xin.

Vắc xin Rotavin-M1 do POLYVAC, Việt Nam sản xuất có kết quả thử nghiệm lâm sàng 3 giai đoạn với tỉ lệ chuyển đổi kháng thể đạt yêu cầu và tương đương với Rotarix [5, 43]. Vắc xin được cấp phép từ 2012 với hơn 2 triệu liều vắc xin được sử dụng tại Việt Nam nhưng chưa được đánh giá hiệu quả bảo vệ thực tế trong cộng đồng. Do đó, việc đánh giá hiệu quả của vắc xin này và đánh giá tác động làm giảm gánh nặng của bệnh tiêu chảy cấp do vi rút Rota là cần thiết. Đây là số liệu đầu tiên giúp những nhà hoạch định chính sách cân nhắc lợi ích thực tế của việc triển khai uống vắc xin Rotavin-M1 trong chương trình Tiêm chủng mở rộng và có các biện pháp ứng phó thích hợp. Việc chứng minh hiệu quả của Rotavin-M1 là thông tin quan trọng trong hồ sơ đăng ký, xuất khẩu sản phẩm này. Ngoài ra, các thông tin về đặc điểm lưu hành, đặc điểm di truyền của các vi rút Rota và các vi rút gây tiêu chảy cấp khác sẽ giúp các nhà khoa học định hướng nghiên cứu dịch tễ về các tác nhân này sau khi vắc xin được sử dụng trong chương trình Tiêm chủng mở rộng Việt Nam.

Với ý nghĩa khoa học và thực tiễn trên, chúng tôi đã triển khai cho uống vắc xin Rotavin-M1 đồng thời với các vắc xin khác trong chương trình Tiêm chủng mở rộng với mô hình đại diện ở Nam Định và Thừa Thiên Huế từ 12/2017-11/2020 và thực hiện đề tài: ***“Đánh giá tác động của vắc xin Rotavin-M1 đối với sự lưu hành của vi rút Rota và một số vi rút khác gây tiêu chảy cấp ở trẻ em tại Nam Định và Thừa Thiên Huế”***.

Mục tiêu chính của nghiên cứu:

1. Xác định tỉ lệ nhiễm và đặc điểm kiểu gen của vi rút Rota gây ở trẻ em tiêu chảy cấp dưới 5 tuổi trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1 tại Nam Định và Thừa Thiên Huế, 6/2016 - 5/2021.
2. Phát hiện tỉ lệ nhiễm và đặc điểm lưu hành của vi rút Noro, Astro và Sapo gây tiêu chảy cấp ở trẻ em dưới 5 tuổi trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1 tại Nam Định và Thừa Thiên Huế, 6/2016 - 5/2021.

Chương 1- TỔNG QUAN

1.1. Các vi rút gây tiêu chảy cấp ở trẻ em dưới 5 tuổi ở Việt Nam

Bệnh TCC ở trẻ em có nhiều căn nguyên khác nhau như vi khuẩn, vi rút và ký sinh trùng. Trong số các tác nhân gây TCC ở trẻ em dưới 5 tuổi, RV là nguyên nhân hàng đầu gây tử vong trên thế giới và ở Việt Nam [180]. Dữ liệu giám sát tại Việt Nam năm 2001 ước tính các ca tử vong liên quan đến RV ở trẻ em <5 tuổi chiếm 4%–8% tổng số ca tử vong ở các nhóm tuổi này, chiếm 2700–5400 ca tử vong mỗi năm [122]. Tỷ lệ nhiễm RV ở những ca TCC nhập viện ở mức cao, chiếm 58,05% (1998 - 2011) và có xu hướng giảm nhẹ những năm gần đây (từ 54,7% năm 2012 xuống còn 36,6% vào năm 2015) nhưng chưa có đánh giá về tác động của vắc xin RV đến sự thay đổi này [7, 79]. Đặc điểm lưu hành các kiểu gen của RV gây TCC ở Việt Nam thay đổi theo thời gian và theo địa điểm giám sát. Các kiểu gen GP phổ biến (G1P[8], G3P[8], G2P[4], G4P[8] và G9P[8]) chiếm 64,44%, trong đó G1P[8] chiếm tỷ lệ cao nhất trong giai đoạn từ 1998 đến 2011[7]. Từ 2014-2018, có sự xuất hiện và chiếm ưu thế của G8P[8] ở một số điểm giám sát [79, 166].

Ngoài ra, một số nghiên cứu về tác nhân vi rút khác như vi rút Noro, Astro và Sapo cũng là nguyên nhân gây TCC ở trẻ em dưới 5 tuổi. Trong số 3 tác nhân vi rút mới phát hiện này ở Việt Nam, vi rút NV là một trong những tác nhân quan trọng nhất liên quan đến TCC ở Việt Nam với tỷ lệ nhiễm NV từ 6-36,3%. Tỷ lệ nhiễm vi rút Ast dao động trong khoảng 0,6-13,9% và Sav chiếm 0,8-1,4% ca TCC nhập viện. Nhóm gen NV GII phổ biến nhất, trong đó kiểu gen GII.4, GII.3 xuất hiện thường xuyên trong nhiều giai đoạn nghiên cứu [76, 119, 161, 168]. Kiểu gen Sav GI.1, GI.2 và GII.1 được phát hiện trong một nghiên cứu [161] và kiểu gen của HAst-1 chiếm ưu thế lưu hành ở Việt Nam [121].

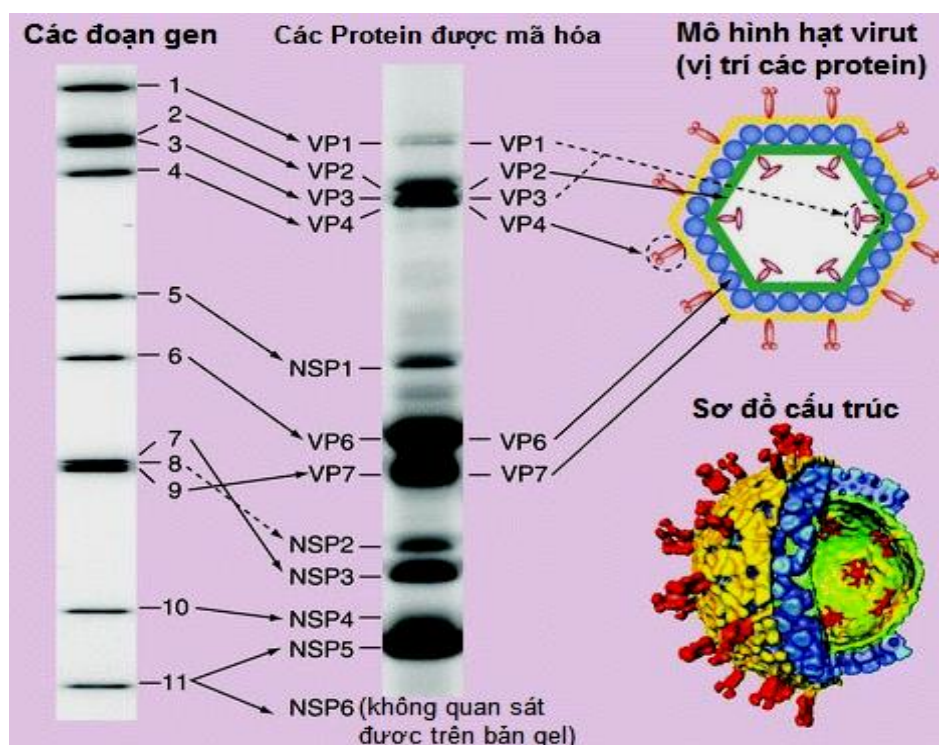
1.2. Vi rút Rota

1.2.1. Hình thái và cấu trúc

Vi rút Rota thuộc họ *Reoviridae* - họ duy nhất trong vi sinh vật có genome là sợi RNA kép, phân đoạn [113]. Hạt RV hoàn chỉnh có đường kính khoảng 60-80nm, hình bánh xe có các gai ngắn. Nucleocapsid của vi rút gồm 3 lớp đồng tâm chứa 11 đoạn RNA kép. Capsid có dạng đối xứng khối đa diện 20 mặt gồm 132 capsomer. Cấu trúc capsid của RV gồm 3 lớp. Lớp ngoài cùng là VP4 và VP7. Lớp capsid trong

chứa protein cấu trúc VP6, chiếm 50% hạt vi rút. VP7 tương tác với phần chóp của VP6. Các gai VP4 nhô ra có kích thước 10 – 12 nm và tương tác với VP7 và VP6 giúp duy trì chính xác hình dạng và chức năng của vi rút. Trong cùng là lớp lõi chứa các protein VP1, VP2 và VP3 [113, 178].

Vật liệu di truyền của RV có chiều dài khoảng 18 nghìn cặp bazơ, trọng lượng phân tử từ 11.10^6 - 14.10^6 Dalton. Mỗi gen mã hoá cho protein cấu trúc hoặc phi cấu trúc [113]. Những đoạn gen này được đánh số theo thứ tự phân bố của chúng trên bản gel polyacrylamide. Hạt vi rút chứa 6 protein cấu trúc và 6 protein phi cấu trúc. Đoạn gen số 4, 9 mã hoá cho các protein capsid lớp ngoài VP4 và VP7. Các gen số 1, 2, 3 và 6 lần lượt mã hoá cho các protein VP1, VP2, VP3 và VP6. Các gen còn lại mã hoá cho các protein phi cấu trúc, là những protein do vi rút tạo ra khi xâm nhiễm vào tế bào.



Hình 1.1. Hình minh họa thành phần hóa học và cấu trúc của vi rút Rota (chủng SA11) [115]

1.2.2. Phân loại vi rút Rota

1.2.2.1. Nhóm và phân nhóm của vi rút Rota

RV gây bệnh ở người và động vật được chia thành 10 nhóm A đến J [153] dựa vào tính kháng nguyên và di truyền của VP6. Trong đó, nhóm A hay gặp nhất, gây ra

hầu hết các vụ dịch TCC nặng ở trẻ em. Nhóm B thường gây TCC ở người lớn và nhóm C cũng gây bệnh ở trẻ em nhưng hiếm gặp [113].

1.2.2.2. *Các typ huyết thanh vi rút Rota nhóm A*

Năm 1985, RV được phân loại dựa vào tính kháng nguyên của các protein capsid lớp ngoài gồm typ huyết thanh G (đại diện cho VP7) và typ P huyết thanh (đại diện cho VP4). Sử dụng phương pháp ELISA với kháng thể đơn dòng đặc hiệu typ huyết thanh G hoặc bằng phản ứng trung hoà giảm đám hoại tử, được xác định bởi phản ứng trung hoà chéo với các mẫu huyết thanh động vật đa dòng [74].

1.2.2.3. *Các kiểu gen của vi rút Rota nhóm A*

Trong khi các phương pháp sinh học phân tử phát triển, nhưng lại thiếu các kháng thể đặc hiệu typ huyết thanh, phân loại RV theo typ huyết thanh đã được thay thế bằng phân loại theo kiểu gen. Các kiểu gen G (G-genotype) và P (P-genotype) được phân loại dựa trên gen VP7 và gen VP4. Các kiểu gen G được xác định bởi trình tự của các vùng biến đổi và trình tự của cả đoạn gen VP7. VP4 được phân cắt thành VP8* và VP5 khi chịu tác dụng của trypsin. Trình tự đoạn VP8* khác với trình tự VP5 và chứa nhiều vùng đặc hiệu typ huyết thanh P hơn nên chỉ trình tự của VP8* mới được sử dụng để phân loại một số kiểu gen P (như P[34], P[23]) [111]. Cho đến nay, ít nhất 36 kiểu gen G được đánh số từ G1 đến G36 và 51 kiểu gen P khác nhau đã được biết đến [111, 178].

1.2.2.4. *Phân loại theo hệ gen (Gene constellations)*

Hạn chế của hệ thống phân loại theo G/P chỉ dựa trên 2 gen (VP7 và VP4) mà bỏ qua 9 gen còn lại của RV, không cung cấp đầy đủ thông tin cần thiết để đánh giá tính đa dạng di truyền, động lực tiến hóa và các mối quan hệ giữa các chủng RV đồng lưu hành. Với sự tiến bộ trong công nghệ giải trình tự gen, năm 2008, hệ thống phân loại cho chủng ngừa nhóm A dựa trên trình tự hoàn chỉnh của mỗi phân đoạn trong bộ genome vi rút hoàn chỉnh. Trong hệ thống này, các đoạn gen VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6 được kí hiệu bởi chữ viết tắt Gx-P[x] - Ix-Rx-Cx- Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx (x = số Ả Rập > 1). Trên cơ sở toàn bộ genome RV, có hai kiểu gen chính không kể G và P gồm kiểu gen 1: I1-R1-C1-M1- A1-N1-T1-E1-H1 được gọi là kiểu gen giống Wa (Wa-like) và kiểu gen 2: I2-R2-C2-M2-A2-N2- T2-E2-H2 được gọi là kiểu gen giống DS-1 (DS-1-like) đã được chứng minh trên toàn thế giới [72, 110, 112]. Kiểu thứ 3 các gen của RV ở người được gọi là kiểu

giống AU-1 (AU-1- like) (I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3) được cho là có nguồn gốc từ mèo hoặc chó [117].

1.2.3. Các phương pháp phát hiện vi rút Rota

Có nhiều phương pháp giúp phát hiện RV như:

- *Phương pháp soi RV trên kính hiển vi điện tử (EM)*: phát hiện trực tiếp vi rút trong mẫu bệnh phẩm với độ đặc hiệu tương đương phương pháp ELISA nhưng độ nhạy không cao, phải sử dụng thiết bị đắt tiền, rất khó thực hiện khi số lượng mẫu bệnh phẩm lớn và không thể phân biệt giữa các nhóm RV [182].
- *Phương pháp phát hiện kháng nguyên RV*:

Phương pháp ngưng kết hạt Latex: Hạt latex được gắn với kháng thể kháng RV để phát hiện kháng nguyên của vi rút. Đây là kỹ thuật chẩn đoán nhanh, không cần nhiều trang thiết bị nhưng độ nhạy và đặc hiệu không bằng phương pháp ELISA [182].

Phương pháp miễn dịch gắn enzyme (ELISA): Phương pháp này dựa vào sự kết hợp giữa kháng nguyên với kháng thể để phát hiện kháng nguyên RV trong phân. Phương pháp này có độ nhạy cao, dễ áp dụng khi có nhiều bệnh phẩm nên được sử dụng rộng rãi trên thế giới để phát hiện RV.

- *Phương pháp phát hiện acid Nucleic*:

Kỹ thuật điện di trên gel polyacrylamide (PAGE): sau khi tách chiết RNA, các đoạn RNA có trọng lượng phân tử khác nhau được điện di trên gel polyacrylamide và nhuộm với ethidium bromide hoặc bạc nitrate. Kỹ thuật này có độ nhạy, đặc hiệu cao nhưng cần nhân lực trình độ cao và mất thời gian thực hiện [182].

Kỹ thuật RT- PCR: phương pháp có thể phát hiện RV trong mẫu phân với mật độ vi rút (ít hơn 1000 hạt vi rút) thấp hơn so với nồng độ cần thiết để phát hiện bằng EM và ELISA [182]. Kiểu gen VP4 (kiểu gen P) và gen VP7 (kiểu gen G) của RV được xác định bằng phương pháp này. Ngoài ra, người có thể dựa vào vùng ổn định của gen VP6 để phát hiện một loạt các chủng RV trong mẫu phân [182].

Kỹ thuật realtime-PCR (qRT-PCR): kỹ thuật qRT-PCR có một số ưu điểm so với RT-PCR truyền thống, bao gồm tăng độ nhạy, độ đặc hiệu, thời gian nhanh hơn và định lượng được tải lượng vi rút. Phương pháp qRT-PCR đã được phát triển để

phát hiện RV trên các gen như: VP6, NSP3 và NSP4 và 1 số gen khác[58, 83, 98] [19].

Giải trình tự bằng phương pháp Sanger hoặc giải trình tự gen thế hệ mới (NGS): Trình tự của mỗi gen được giải trình tự được so sánh với trình tự RV có sẵn trong ngân hàng gen hoặc bằng cách gửi trình tự đến một công cụ định kiểu gen tự động, trực tuyến (<http://rotac.regatools.be/>) để xác định đặc điểm kiểu gen. Phân loại đầy đủ bộ gen của các chủng RV cung cấp dữ liệu về dịch tễ học phân tử, mối quan hệ tiến hóa giữa các chủng RVA đang lưu hành và cũng như mối liên hệ giữa các chủng RVA ở động vật và người.

Trong số các phương pháp, ELISA được TCYTTG khuyến cáo sử dụng trong các chương trình giám sát dịch tễ bệnh TCC. Mặc dù các phương pháp RT-PCR, qRT-PCR... có độ nhạy cao, có thể phát hiện RV với tải lượng vi rút thấp và phát hiện trong các trường hợp TCC do tác nhân đồng nhiễm khác có khả năng gây ra các triệu chứng chứ không phải do RV nên không được khuyến cáo để chẩn đoán bệnh TCC do RV [176, 182].

1.2.4. Dịch tễ học bệnh tiêu chảy cấp do vi rút Rota

1.2.4.1. Phương thức lây nhiễm

Mật độ hạt vi rút trong phân bệnh nhân và thải ra ngoài với số lượng lớn có thể đạt đến 10^{10} - 10^{11} /gram phân, trong khi chỉ cần với mật độ 10-100 hạt vi rút đã có khả năng gây bệnh [151]. RV lây qua đường phân-miệng từ người này sang người khác qua đường ăn uống. Ngoài ra, cách thức lây truyền từ người sang động vật hoặc ngược lại được xác nhận trong tự nhiên, nhiều chủng RV ở người có các đoạn gen tương tự với gen của RV động vật đã được xác nhận [3, 180].

1.2.4.2. Phân bố theo mùa

Tính chất phân bố theo mùa của RV rất khác nhau trên thế giới. Ở các nước khí hậu ôn đới, TCC do RV thường xuất hiện vào mùa đông. Ở các nước nhiệt đới và các nước đang phát triển, yếu tố mùa ít rõ rệt hơn, bệnh có thể gặp quanh năm. Một số nghiên cứu đã theo đuổi việc xác định mối liên hệ giữa liên quan theo mùa của RV với các điều kiện khác như nhiệt độ, lượng mưa và độ ẩm, nhưng cho đến nay vẫn chưa đủ cơ sở để có thể kết luận được [178]. Một nghiên cứu cho thấy mức thu nhập của một quốc gia là yếu tố dự báo sự phân bố theo mùa mạnh nhất [129]. Tỷ lệ sinh

cao và tỉ lệ nhiễm cao hơn được cho là các yếu tố có thể tạo điều kiện cho RV lưu hành quanh năm ở một số vùng [134].

1.2.4.3. Nhóm tuổi dễ mắc bệnh và đặc tính miễn dịch với vi rút Rota

Trẻ thường nhiễm RV ở độ tuổi dưới 5 tuổi, trong đó nhóm trẻ 6 đến 24 tháng tuổi thường bị nhiễm cao nhất. Nhìn chung, ở các nước đang phát triển tuổi nhiễm RV lần đầu thường xảy ra ở trẻ dưới 1 tuổi [30]. Ngược lại, phần lớn các ca nhiễm RV ở trẻ em ở các nước phát triển xảy ra sau 1 tuổi. Trong số các yếu tố ảnh hưởng đến tuổi nhiễm RV, sự khác biệt về phân bố theo mùa có thể dẫn đến phơi nhiễm vi rút quanh năm ở các nước đang phát triển, được cho là nguyên nhân dẫn đến nhiễm RV sớm ở trẻ em [30]. Vi rút Rota cũng có thể gây nhiễm ở trẻ lớn hơn và người lớn, nhưng phần lớn các trường hợp này không có triệu chứng hoặc ở mức độ nhẹ đến trung bình [4, 101, 178].

1.2.5. Đặc điểm di truyền của vi rút Rota

1.2.5.1. Các kiểu gen GP phổ biến của vi rút Rota

Số lượng các kiểu gen G và P của chủng ngừa được phát hiện ngày càng tăng tạo ra sự đa dạng các kiểu gen lưu hành. Có hơn 70 tổ hợp kiểu gen G và P đã được báo cáo từ hơn 100 quốc gia trên toàn thế giới [129]. Mặc dù các chủng RV lưu hành đa dạng và sự biến động theo không gian và thời gian ở những quốc gia đã và chưa triển khai uống vắc xin phòng TCC do RV, có 6 kiểu gen GP được báo cáo phổ biến nhất, chiếm 73% số mẫu nghiên cứu (G1P[8], 31,2%; G2P[4], 13,0%; G3P[8], 10,7%; G9P[8], 10,2%; G4P[8], 5,0%; G12P[8], 2,7%) [52]. Tỉ lệ lưu hành của 6 kiểu gen này dao động theo các khu vực, chiếm từ 62,7% (Châu Phi) đến 96,9% (Châu Âu). Trong đó, G1P[8] chiếm ưu thế ở tất cả các khu vực từ 20,4–47,7% (trừ khu vực Châu Mỹ) [52]. Ngoài ra, còn một số kiểu gen khác như: G12P[6], G1P[6], G2P[8] và G9P[6] thường thấy ở 1 số vùng của Châu Phi [42].

1.2.5.2. Chủng vi rút Rota đột biến và các nhánh trong mỗi kiểu gen GP

Phân tích trình tự cho thấy các epitopes kháng nguyên của protein VP7 và VP4 ở các chủng G và P giống nhau thường có nhiều acid amin biến đổi. Các đột biến điểm còn tạo ra các nhánh khác nhau trong cùng một kiểu gen GP và có thể đồng lưu hành trong một địa điểm, một thời điểm [52]. Chủng vắc xin RotaTeq có P[8] nhánh I trong khi các chủng lưu hành trong giai đoạn 2006-2009 chủ yếu là P[8] nhánh II và nhánh III [101]. Những đột biến có thể làm thay đổi tính kháng nguyên của chủng

RV mới như chủng vắc xin G1P[8] của Rotariq giảm độc lực so với các chủng hoang dại. Sự thay đổi acid amin của các chủng hoang dại có thể ảnh hưởng đến hiệu quả của vắc xin. Một nghiên cứu đã chứng minh hiệu giá của kháng huyết thanh trung hòa đặc hiệu kiểu G bị ảnh hưởng bởi thành phần acid amin trong epitope kháng nguyên VP7, ngay cả khi protein VP7 có cùng kiểu G [52].

1.2.5.3. *Chủng vi rút Rota mới do tái tổ hợp bất thường các đoạn gen*

Có thể do áp lực chọn lọc đã giúp duy trì các protein của vi rút hoạt động lý tưởng trong quá trình sao chép vi rút, do yêu cầu về sự tương thích giữa các protein nên G1 hầu như luôn đi cùng với P[8] và VP6 thuộc kiểu gen 1, trong khi G2 hầu như luôn là thành phần của vi rút có chứa P[4] và protein VP6 trong kiểu gen 2. Mặc dù RV có thể hoán vị gen thông qua tái tổ hợp, nhưng trong hầu hết các trường hợp đều tạo ra chủng vi rút thế hệ sau kém tiến hóa hơn so với vi rút trước, khiến cho vi rút tái tổ hợp sau không thể chiếm ưu thế lưu hành [52]. Tuy nhiên, ở các nước đang phát triển, áp lực chọn lọc nhằm duy trì kiểu gen chiếm ưu thế có thể bị ảnh hưởng bởi sự xáo trộn liên tục của các gen thông qua sự đồng nhiễm và tái tổ hợp. Phân lập các chủng RV ở các nước đang phát triển cho thấy không có các kiểu gen khác hoàn toàn thuộc kiểu 1 hoặc kiểu 2 điển hình cho các chủng vi rút G/P phổ biến toàn cầu [52].

Gần đây phát hiện các chủng tái tổ hợp bất thường gồm GP thường kết hợp với kiểu gen 1 lại kết hợp với kiểu gen 2 (giống DS-1) [12]. Trong báo cáo ở Thái Lan, RV (G1,3,4,9P[8]-I2) với kiểu giống DS-1 đã phổ biến ở trẻ em và người lớn kể từ năm 2013 với xu hướng tiếp tục tăng cho đến năm 2016 ở các tỉnh khác nhau [41, 128]. Các nghiên cứu về trẻ em bị nhiễm chủng G1P[8] giống DS-1 cho thấy không có sự khác biệt đáng kể về mức độ nghiêm trọng so với bệnh gây ra bởi G1P[8] kiểu Wa.

Việc tái tổ hợp này có tác động đáng kể đến cộng đồng, có khả năng mang lại một số lợi thế cho sự lan truyền và tồn tại của vi rút, mặc dù mức độ nghiêm trọng TCC có thể không bị ảnh hưởng. Trong khi các dữ liệu về hiệu quả của vắc xin chống lại bất thường G3P[8] kiểu DS-1, G1P[8], G2P[4] kiểu giống DS-1... chưa được chứng minh rõ ràng.

1.2.5.4. *Chủng vi rút Rota mới do tái tổ hợp đoạn gen có nguồn gốc từ động vật*

Các kiểu gen G và P của RV nhóm A được phát hiện ở rất nhiều loài động vật và lưu hành phổ biến tùy thuộc mỗi loài. Ví dụ ở lợn, G3, G4, G5, G9, và G11 phổ

biến trong khi G6, G8 và G10 lại rất phổ biến ở bò... Ngược lại, G3 được phát hiện ở hầu hết các loài động vật. Kiểu gen typ P đặc hiệu loài hơn vì mỗi typ P chỉ phổ biến ở một hay hai loài động vật. Chỉ có P[6] xuất hiện ở các người và lợn còn các typ P[4] và P[8] phổ biến ở người nhưng rất hiếm gặp ở động vật [101].

Một số chủng RV gây nhiễm ở động vật đã vượt qua hàng rào ngăn cản loài để gây nhiễm cho người và dẫn đến hình thành chủng mới lây lan rộng rãi ở người. Các chủng RV kiểu gen G3 có phạm vi vật chủ rộng, bao gồm người, mèo, bò, chó, ngựa, lợn, thỏ, cừu, khỉ và dơi, kết hợp với nhiều kiểu gen P. Chủng G3P[8] từ ngựa xuất hiện ở Thái Lan và Úc từ năm 2013 và phổ biến những năm gần đây [41, 128]. Chủng G3P[8] kiểu giống DS-1 bất thường này đã được xác định ở một số quốc gia có phạm vi bao phủ vắc xin, với tỉ lệ lây nhiễm khác nhau tùy thuộc vào các mô hình địa lý và thời gian, bao gồm Úc, Đức, Hungary, Mỹ, Brazil, Nhật Bản, Thái Lan và Malaysia, Việt Nam [24, 128]. Mỗi quan hệ di truyền giữa VP7, VP4 và NSP4 trong khung các gen bên trong kiểu 2 có thể do chủng G3P[8] từ ngựa có thể đã tiến hóa từ nhiều lần tái tổ hợp. Việc xác định các gen RV từ ngựa trong quần thể người nhấn mạnh mối liên kết tiến hóa gần gũi giữa RV ở động vật và người và làm xuất hiện các chủng RV mới.

Chủng G8 từ bò lần đầu tiên được đặc trưng ở người ở trẻ em Indonesia vào năm 1984 [71] và xuất hiện ngày càng thường xuyên ở nhiều nước và trở thành chủng phổ biến ở các nước Châu Phi [155]. Năm 2006, chủng này được tìm thấy ở Croatia và có liên quan chặt chẽ với chủng G8 châu Phi [47]. Các kiểu gen G8 cũng được báo cáo ở Anh [150], Slovenia có mối quan hệ gần gũi với chủng từ bò Cody I801 hơn chủng từ người và là bằng chứng cho sự tái tổ hợp đoạn gen giữa RV từ người-động vật [152]. Chủng G8 đã được báo cáo gần đây ở một số nước Châu Á và trở thành chủng phổ biến ở nhiều nơi như: Thái Lan [154], Campuchia, Malaysia [94], Việt Nam [75], Nhật Bản [87] và Hàn Quốc [92] và 1 số nước Châu Mỹ: Brazil [62, 145] và Chile [103].

1.3. Vắc xin phòng tiêu chảy cấp do vi rút Rota

1.3.1. Các loại vắc xin phòng tiêu chảy cấp do vi rút Rota

Có 4 loại vắc xin uống, từ chủng RV sống giảm độc lực được TCYTTG tiền đánh giá năm 2008 và đang sử dụng toàn cầu là: Rotarix (GSK, Bỉ) và RotaTeq (Merck, Mỹ) (2008) và Rotavac (Bharat Biotech) và Rotasiil (Serum Institute of India Pvt. Ltd) [32].

RotaTeq là vắc xin đa giá kết hợp giữa vi rút có nguồn gốc từ bò và người [W179-9 (G1P[5]), SC-2 (G2P[5]), WI78-8 (G3P[5]), BrB-9 (G4P[5]), và WI79-4 (G6P[8])]. Những chủng này được tạo ra bằng cách lai giữa chủng RV từ bò giảm độc lực tự nhiên WC3 với năm chủng RV của người với biểu hiện kháng nguyên G1, G2, G3 G4 và P[8]. Vắc xin được khuyến cáo cho trẻ uống 3 liều vào thời điểm trẻ 2, 4 và 6 tháng tuổi [32]. Vắc xin RotaTeq được chứng minh có hiệu lực bảo vệ đạt 64,2% ở các nước Ghana, Kenya, Mali. Tại các nước châu Á, vắc xin này có hiệu lực 72,5% tại Việt Nam nhưng chỉ đạt 54,7% ở Bangladesh [55]

Rotarix là vắc xin đơn giá, sống giảm độc lực được sử dụng bằng đường uống cho trẻ sơ sinh lúc 2 và 4 tháng tuổi. Thành phần của vắc xin là vi rút RIX4414 thuộc chủng G1P[8] ở người. Các thử nghiệm lâm sàng được tiến hành tại 7 nước ở châu Á và châu Phi không cho hiệu quả bảo vệ cao như ở các nước châu Mỹ và châu Âu. Vắc xin Rotarix có hiệu quả phòng bệnh trong một năm đầu đời của trẻ đạt 61,7% ở Malawia và Nam phi (châu Phi) là 61,7% [55].

Rotavac là một loại vắc xin sống giảm độc lực có nguồn gốc từ một chủng G9P[11] tổ hợp từ người và bò được phân lập từ trẻ sơ sinh ở Ấn Độ. Vắc xin được dùng liều cho trẻ sơ sinh 6-12 tuần tuổi và được cấp phép sử dụng ở Ấn Độ vào đầu năm 2014. Trong các thử nghiệm giai đoạn III, hiệu lực của vắc xin Rotavac đạt 56,4% (95% CI: 36,6-70,1%) trong năm đầu đời và hiệu quả trong năm thứ hai là 49% (95% CI: 17,5-68,4%) hiệu quả tương tự như RotaTeq và Rotarix ở các nước đang phát triển [32].

Rotasiil được cấp phép tại Ấn Độ vào tháng 1/2017. Chủng BRV-PV gồm các chủng RV tái tổ hợp của người-bò với các kiểu gen RV phổ biến nhất (G1, G2, G3, G4 và G9). Rotasiil được dùng bằng đường uống cho trẻ sơ sinh với ba liều lúc 6, 10, và 14 tuần tuổi, cùng lúc với các vắc xin khác tại Ấn Độ. Ở Nigeria, hiệu lực của vắc xin ngăn ngừa ca TCC nặng do RV là 67% (95% CI: 50–78%). Ở Ấn Độ, hiệu lực của vắc xin ngăn ngừa ca TCC nặng do RV trong năm đầu đời là 33% (95% CI: 12–49) [32].

Rotavin-M1 là vắc xin sống giảm độc lực, từ các chủng G1P[8] do POLYVAC, Việt Nam sản xuất. Chủng G1P [8] được chọn làm ứng cử viên vắc-xin trong số ba chủng RV có kiểu gen G1P [8], G1P [4] và G4P [6] được phân lập từ trẻ sơ sinh Việt Nam bị tiêu chảy và thích nghi với nuôi cấy tế bào [11, 102]. Vắc xin đã được thử lâm sàng 3 giai đoạn với gần 1000 trẻ em Việt Nam, chứng minh được tính

an toàn và tạo đáp ứng miễn dịch tốt ở trẻ em. Kết quả thử lâm sàng giai đoạn 2 cho thấy tỉ lệ trẻ có chuyển đổi kháng thể IgA sau khi uống vắc xin cao nhất là 73% (95%CI: 58-88%) ở nhóm uống 2 liều - $10^{6,3}$ FFU / liều, cách nhau 2 tháng, tương tự như ở nhóm uống Rotarix (58%, 95% CI (42-73%)) [5, 43]. Kết quả thử lâm sàng giai đoạn 3 trên 799 trẻ uống vắc xin Rotavin-M1 cho thấy tỉ lệ chung chuyển đổi kháng thể IgA ở nhóm uống vắc xin là 80,6% ở sau 1 tháng hoàn thành liều 2. Sau 1 năm, tỉ lệ chuyển đổi kháng thể ở nhóm uống vắc xin là 73,8% ở Thái Bình và 76,5% ở Phú Thọ (Thông tin trong bản hướng dẫn sử dụng vắc xin của Nhà sản xuất được Bộ Y tế phê duyệt).

Vắc xin này được cấp phép tại Việt Nam năm 2012 và cho đến nay hơn 2 triệu liều vắc xin được sử dụng tại Việt Nam, góp phần đáng kể vào việc phòng ngừa RV cho trẻ em. Nhưng cho đến nay, chưa có nghiên cứu nào đánh giá hiệu quả bảo vệ của vắc xin này trong cộng đồng.

1.3.2. Hiệu quả của vắc xin phòng tiêu chảy cấp do RV

1.3.2.1. Hiệu quả phòng bệnh của vắc xin

Kết quả thử nghiệm lâm sàng của Rotarix và RotaTeq cho thấy hiệu lực của vắc xin là khác nhau giữa các khu vực và quốc gia. Hiệu lực bảo vệ của Rotarix và RotaTeq ở các nước LICs ở Châu Phi và Châu Á trong khoảng từ 51% đến 64%. Hiệu lực bảo vệ của các vắc xin này của khá cao ở các nước HMICs (từ 85% đến 98%) và thay đổi theo kiểu gen RV lưu hành [129].

Gần đây, TCYTTG đã phân loại thành 3 nhóm nước: nước đang phát triển tỷ lệ tử vong cao, nước đang phát triển tỷ lệ tử vong thấp và các nước phát triển, dựa trên vị trí địa lý, tình trạng phát triển kinh tế và nhân khẩu học, và các mô hình tử vong" của trẻ em và người lớn [181]. Phân tích tổng hợp dữ liệu hiệu quả sau khi sử dụng vắc xin trong thực tế theo thường quy từ năm 2006 đến 2016 cho thấy hiệu quả của Rotarix ngăn các ca TCC do RV là 58% (95% CI: 51 – 65%) và 45% (95% CI: 43 - 92%), còn với RotaTeq ở các nước có tỉ lệ tử vong ở trẻ em cao. Tỉ lệ này thấp hơn nhiều so với các nước có tỉ lệ tử vong ở trẻ em thấp (tương ứng là 83% và 85%) [82].

Một số nghiên cứu chỉ ra hiệu quả bảo vệ của vắc xin có xu hướng giảm khi trẻ hơn 1 tuổi. Hiệu quả bảo vệ của Rotarix với trẻ dưới 12 tháng tuổi lần lượt đạt 86% (95% CI: 81–90%), 77% (95% CI: 66–85%) và 63% (95% CI: 54–70%) ở các nước có tỉ lệ tử vong ở trẻ em thấp, trung bình và cao, trong khi hiệu quả của Rotarix

ở trẻ 12–23 tháng tuổi thấp hơn, tương ứng là 86% (81–90), 54% (23–73), 58% (38–72). Tương tự, hiệu quả của RotaTeq ở trẻ em dưới 12 tháng (86%, 95% CI: 76–92%) thấp hơn hiệu quả ở trẻ 12–23 tháng tuổi (84%, 95% CI: 79–89%) ở các nước có tỉ lệ tử vong ở trẻ em thấp [34].

Các vắc xin này có khả năng bảo vệ ngăn các ca bệnh nặng với hiệu quả cao. Ở những nước có tỉ lệ tử vong ở trẻ em trung bình và cao, hiệu quả bảo vệ của Rotarix với những ca bệnh nặng (điểm Vesikari ≥ 11) là 54% (95% CI: -54-73%) và rất nặng (điểm Vesikari ≥ 15) là 64% (95% CI: -114 - 83%). Hiệu quả bảo vệ với ca bệnh nặng và rất nặng của RotaTeq lần lượt là 57% (95% CI: 51 - 63%) và 72% (95% CI: 58 – 86%) [82]. Còn Rotavac có thể ngăn chặn hơn 50% trường hợp TCC nặng do RV ở trẻ Ấn Độ < 2 tuổi [149].

Hiệu quả của vắc xin có liên quan chặt chẽ với tỉ lệ bao phủ vắc xin ở các nước ở Châu Mỹ và Châu Âu nhưng ngược lại ít liên quan ở các nước Châu Phi và Châu Á. Với tỉ lệ bao phủ vắc xin trên giới hạn trung bình, hiệu quả của vắc xin ở Đức và Moldova vẫn hơn 80%. Trong khi, sau hơn 6 năm giám sát hiệu quả ở Ghana với tỉ lệ bao phủ 93–100%, hiệu quả đạt 55,5% chống các ca TCC nặng. Mặc dù tỉ lệ bao phủ vắc xin cao ở Châu Phi và Đông Nam Á nhưng hiệu quả vắc xin tổng thể ngăn tất cả các ca TCC do RV chỉ đạt từ 54% đến 76% [169].

Vắc xin phòng TCC do RV cũng có khả năng tạo miễn dịch cộng đồng. Tác động này lần đầu tiên được quan sát thấy ở Mỹ trong số những trẻ sơ sinh không đủ điều kiện uống (> 6 tháng) và hiệu quả bảo vệ gián tiếp 50% ở người lớn [100]. Nghiên cứu tại Đức cho thấy khả năng bảo vệ gián tiếp của vắc xin là 26% (95% CI: 23–30) ở những trẻ không uống vắc xin được miễn dịch cộng đồng [131]. Các tác động bảo vệ cộng đồng này của vắc xin phòng TCC do RV đã được báo cáo trong một số nước HMICs khác, nhưng sự bảo vệ gián tiếp này dường như không được quan sát ở các nước LICs [143]. Do vậy, để khuyến khích miễn dịch cộng đồng do RV trong những khu vực có tỉ lệ nhiễm RV cao, cần duy trì việc chủng ngừa và mở rộng phạm vi bao phủ vắc xin.

1.3.2.2. Hiệu quả của vắc xin với các chủng lưu hành

Vắc xin Rotarix và RotaTeq đã được chứng minh có khả năng chống lại các chủng RV có trong vắc xin và không có vắc xin trong các nghiên cứu về hiệu lực và hiệu quả [149]. Xu hướng chung, Rotarix có hiệu quả cao đối với các chủng có kháng nguyên P[8] như G3P[8], G4P[8] và G9P[8] [140] và có hiệu quả bảo vệ cao chống

lại kiểu gen G9P[4] mới nổi ở Mexico (94%) [185]. Ở một số các quốc gia có tỉ lệ tử vong ở trẻ em cao như Nam Phi, hiệu quả của Rotarix khoảng 71% với kiểu gen phổ biến G12P[8], 62% với các kiểu gen chứa G hoặc P giống vắc xin và 52% với các kiểu gen khác hoàn toàn với vắc xin [64]. Tuy nhiên, hiệu quả của các vắc xin này chống lại các kiểu gen RV giống và khác thành phần của vắc xin đều cao ở Châu Âu, Bắc Mỹ và Trung Mỹ, đạt mức trung bình ở Nam Mỹ và dưới trung bình ở châu Á và châu Phi [57].

Phân tích tổng hợp từ 2006-2014 cho thấy ở các nước HICs, hiệu quả của Rotarix chống lại kiểu gen G1P[8], cùng G1 hoặc P[8] và kiểu gen khác hoàn toàn với vắc xin lần lượt là 94% (95% CI: 80–98%), 71% (95% CI: 39–86%) và 87% (95% CI: 76–93%), trong khi ở các nước MICs hiệu quả lần lượt là 59% (95% CI: 36–73%), 72% (95% CI: 58–81%) và 47% (95% CI: 28–61%). Đối với RotaTeq ở các nước HICs, hiệu quả chống lại các kiểu gen cùng loại, khác một phần và khác hoàn toàn với chủng vắc xin tương ứng là 83% (95% CI: 78–87%), 82% (95% CI: 70–89%) và 75% (95% CI: 47–88%), trong khi ở các nước MICs thì hiệu quả lần lượt đạt 70% (95% CI: 58–78%), 37% (95% CI: 10–56%), và 87% (95% CI: 38–97%) [93].

1.3.2.3. Một số yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả của vắc xin

Tất cả các loại vắc xin phòng TCC do RV được cấp phép hiện nay đều là vắc xin uống, từ chủng RV sống, giảm độc lực nên các yếu tố ảnh hưởng tới sự hấp thụ và nhân lên của chủng vắc xin trong ruột được dự đoán là các yếu tố cơ bản ảnh hưởng đến hiệu quả của vắc xin, đặc biệt là ở Châu Phi và Đông Nam Á. Những yếu tố ảnh hưởng này bao gồm: tỉ lệ nhiễm RV ở các nước đang phát triển sớm hơn và các yếu tố miễn dịch ở niêm mạc, dạ dày, sữa mẹ... [57]. Ở các nước đang phát triển, 80% các trường hợp nhiễm RV lần đầu ở trẻ dưới 1 tuổi, với trẻ từ 6 đến 9 tháng tuổi dễ bị TCC nặng nhất do RV. Để vắc xin phòng TCC do RV có hiệu quả nhất trẻ em cần được uống vắc xin phòng TCC trước khi bị nhiễm RV lần đầu. Điều này gây khó khăn ở các nước đang phát triển bởi trẻ nhiễm RV và mắc bệnh xảy ra sớm hơn và thiếu hụt các nguồn lực y tế để triển khai chương trình TCQG kịp thời và đầy đủ [57].

Hệ vi sinh vật đường ruột của trẻ sơ sinh ở các nước đang phát triển khác biệt đáng kể so với trẻ ở các nước phát triển với lượng vi khuẩn phát triển quá mức, có nhiều ký sinh trùng và các bệnh nhiệt đới. Sự tương tác của hệ vi khuẩn đường ruột với vi rút vắc xin có thể làm giảm hiệu giá của vi rút khi nhiễm các tế bào đích trong ruột non, là nơi vi rút nhân lên để tạo ra các phản ứng miễn dịch. Các vi sinh vật lây

nhễm theo đường phân-miệng như: vi khuẩn tả, vi rút bại liệt, *Klebsiella*, *E. Coli* và *Bacteroides*... có thể liên quan, làm giảm hiệu quả của vắc xin phòng TCC do RV [57].

Ngoài ra, các thành phần có trong sữa mẹ như các kháng thể đặc hiệu với RV cho trẻ sơ sinh vào khoảng thời gian uống vắc xin được coi là yếu tố đầu tiên làm giảm hiệu giá vi rút khi đến ruột non. Nhưng một số nghiên cứu ở Nam Phi, Ấn Độ và Việt Nam đã chứng minh việc dùng sữa mẹ trong thời gian uống vắc xin không có ảnh hưởng của đến tỉ lệ chuyển đổi huyết thanh [160]. Tuy nhiên, một nghiên cứu khác ở Mexico lại chứng minh việc cho con bú có liên quan đến việc làm giảm đáp ứng miễn dịch với vắc xin phòng TCC do RV. Nghiên cứu này cho thấy tác dụng ức chế của các thành phần sữa mẹ có ảnh hưởng đến phản ứng miễn dịch thể dịch nên sữa mẹ vẫn là một yếu tố tiềm năng cần lưu ý [57].

Các bệnh ức chế miễn dịch mạn tính và suy dinh dưỡng, cụ thể là sự thiếu hụt các vi chất dinh dưỡng như kẽm cũng làm giảm khả năng đáp ứng miễn dịch và hiệu quả với vắc xin đường uống của cơ thể. Tương tự, bổ sung kẽm đã được chứng minh là làm giảm tần suất và mức độ nghiêm trọng của bệnh tiêu chảy và bệnh hô hấp ở trẻ em. Ngoài ra, gánh nặng của việc nhiễm HIV, bệnh lao và sốt rét kết hợp với sự thiếu hụt dinh dưỡng ở nặng ở nơi có thu nhập thấp cũng có thể góp phần làm giảm khả năng miễn dịch và hiệu quả của vắc xin phòng TCC do RV [57].

1.3.3. Tác động của vắc xin phòng tiêu chảy cấp do vi rút Rota với gánh nặng bệnh TCC và sự lưu hành các chủng vi rút

1.3.3.1. Tác động của vắc xin phòng tiêu chảy cấp và tỉ lệ nhiễm vi rút Rota ở trẻ em nhập viện dưới 5 tuổi

Vắc xin Rotarix và RotaTeq được cấp phép năm 2006 và được TCYTTCG khuyến cáo các nước sử dụng trong chương trình TCQG của các nước từ năm 2009 [32]. Đến hết năm 2021, có 118 quốc gia đã đưa vắc xin phòng TCC do RV vào chương trình TCQG với khoảng 49% độ bao phủ toàn cầu [177]. Kết quả phân tích tổng hợp từ 105 bài báo từ 49 quốc gia (với 90% các nước đã triển khai uống vắc xin Rotarix và/hoặc RotaTeq) từ 2006 đến 2019 cho thấy sau khi sử dụng vắc xin phòng TCC do RV trong chương trình TCQG, số ca TCC nhập viện ở trẻ em <5 do RV đã giảm 59% (IQR, 46–74%), số ca TTC giảm 36% (IQR, 23–47%) và số tử vong do TCC giảm 36% (IQR, 28–46%) [33]. Tác động của vắc xin càng rõ rệt ở những nước có tỉ lệ tử vong thấp, nhóm trẻ nhỏ và những nước có độ bao phủ vắc xin cao.

Kết quả tổng hợp từ Mạng lưới Giám sát RV toàn cầu (GRSN) từ năm 2008 đến 2016 ở 82 quốc gia, tỉ lệ nhiễm RV sau khi cho uống vắc xin giảm 39,6% (IQR: 35,4 - 43,8%) so với giai đoạn trước uống vắc xin. Mức giảm ở mỗi khu vực giám sát điểm có sự thay đổi, dao động thấp nhất từ 26,4% (IQR: 15,0–37,8%) ở khu vực Đông Địa Trung Hải đến 55,2% (IQR: 43,0–67,4%) ở khu vực Châu Âu. Sự phân bố theo độ tuổi có xu hướng dịch lên nhóm tuổi lớn hơn ở những vùng đã uống vắc xin [23].

Mặc dù hiệu quả bảo vệ của mỗi loại vắc xin ở một số nước LICs bị giảm nhưng việc triển khai uống các vắc xin này đã làm giảm đáng kể số ca TCC nhập viện, số ca nhiễm và số ca tử vong do RV, góp phần làm giảm gánh nặng bệnh. Do vậy, TCYTTG đã khuyến nghị triển khai cho uống vắc xin phòng TCC do RV toàn cầu cho tất cả trẻ sơ sinh để giảm nguy cơ TCC cho tất cả các khu vực trên thế giới với mục tiêu tỉ lệ bao phủ vắc xin đạt 90% và ít nhất 80% quận/huyện/khu vực ở mỗi quốc gia được chủng ngừa [177].

1.3.3.2. *Vắc xin tác động đến tỉ lệ phân bố lưu hành các chủng vi rút Rota*

Một số nghiên cứu ở những quốc gia đã triển khai uống vắc xin Rotarix và RotaTeq những năm gần đây đã tạo áp lực chọn lọc cho các kiểu gen RV lưu hành [138]. Ở Úc, trước khi triển khai uống vắc xin thường quy, G1 là kiểu gen phổ biến nhất, sau đó là G2, G4, G3 và G9. Sau khi giới thiệu vắc xin, các kiểu gen G1, G2, G3, G4, G9 vẫn tiếp tục lưu hành và thêm các kiểu gen G12, G8 và G10 đã được báo cáo với tỉ lệ xuất hiện tăng lên, cho thấy các kiểu gen lưu hành sau khi sử dụng vắc xin ở Úc trở nên đa dạng hơn. Kiểu gen G12P[8] chiếm ưu thế ở các bang sử dụng RotaTeq, trong khi chủng eG3P[8] (chủng G3 có nguồn gốc từ ngựa) và G2P[4] chiếm ưu thế ở các bang sử dụng Rotarix [138]. Sự xuất hiện của G12P[8] và eG3P[8] có nguồn gốc từ ngựa đã được xác định ở nhiều khu vực khác có mức độ bao phủ vắc xin RotaTeq hơn 90% [108]. Một nghiên cứu khác ở Nhật sau khi triển khai uống vắc xin, kiểu gen phổ biến chuyển từ G3P[8] và G1P[8] sang G2P[4], G2P[8], G9P[8] và G8P[8] là kiểu gen ít gặp trước đó [77]. Sự lưu hành phổ biến chủng G2P[4] thuộc nhóm gen giống DS-1 đã được báo cáo ở một số các khu vực sử dụng Rotarix (thuộc nhóm gen giống Wa) [104, 138]. Do có nhóm gen giống DS-1 khác với chủng vắc xin nên hiệu quả của vắc xin chống lại G2P[4] khá thấp, đặc biệt ở các nước LMICs thường có nhiều chủng đa dạng lưu hành phổ biến [38, 135]. Khi Rotavac được sử dụng trong chương trình TCMR ở Ấn Độ, có sự thay đổi chủng lưu hành phổ biến từ

G1P[8] sang G3P[8] nhưng dường như đó là sự thay đổi tự nhiên, không liên quan đến việc sử dụng vắc xin sống giảm độc lực [170].

Việc sử dụng các vắc xin sống, giảm độc lực dạng uống này có thể dẫn đến sự phát sinh các chủng RV mới, làm tăng tính đa dạng của các chủng lưu hành. Một số nghiên cứu ở Brazil đã chỉ ra sự tái tổ hợp tự nhiên giữa chủng vắc xin Rotarix và chủng RV hoang dại. Một số các tái tổ hợp được xác định như sau: một chủng mang gen VP1 có nguồn gốc Rotarix kết hợp của một chủng hoang dại và một chủng mang gen VP2 có nguồn gốc từ chủng hoang dại kết hợp với chủng vắc xin Rotarix. Chủng mang gen VP2, NSP1 và NSP5 từ một chủng hoang dại và các đoạn gen còn lại của bộ gen có nguồn gốc từ chủng vắc xin Rotarix [139]. Ngoài ra, một số trẻ nhiễm RV có chứa trình tự của các gen VP7, VP4 và NSP2 của Rotarix trong khi chúng không uống và không tiếp xúc với trẻ uống vắc xin [28]. Ở Úc, có 4 ca nhiễm G1P[8] do sự sắp xếp đoạn gen giữa các chủng vắc xin G1P[5] và G6P[8] của RotaTeq [51]. Ở Nhật Bản, người ta phát hiện 4 ca nhiễm hoàn toàn từ chủng vắc xin Rotarix và 2 ca có sự sắp xếp tổ hợp gen giữa chủng vắc xin và chủng vi rút hoang dại [84].

Có 1 số bằng chứng cho thấy G2P[4] là phổ biến ở các quốc gia sử dụng Rotarix trong khi G1P[8], G2P[4] và G3P[8] phổ biến ở các quốc gia sử dụng RotaTeq [86]. Có thể việc triển khai uống vắc xin phòng TCC do RV đã gây ra một sự thay đổi đáng kể trong biến động kiểu gen tự nhiên của RV [86, 135]. Tuy nhiên, một số các báo cáo không thể kết luận mối liên quan của biến động chủng RV với áp lực của vắc xin và sự tiến hoá, bao gồm các kiểu gen mới, chọn lọc tự nhiên thông qua tái tổ hợp [39] [188].

1.3.4. Các phương pháp đánh giá tác động và hiệu quả của vắc xin phòng tiêu chảy cấp do vi rút Rota

Hiệu lực trong số các loại vắc xin trong các thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên có đối chứng trước cấp phép dao động từ 85% –98% ở những nước MICs và từ 50% –64% ở những nước LICs [156]. Tuy nhiên, các thử nghiệm lâm sàng được thực hiện trong điều kiện lý tưởng, chưa phản ánh hiệu quả của vắc xin trong điều kiện thực tế. Đặc biệt, ở các nước đang phát triển với gánh nặng bệnh do RV lớn với sự đa dạng các chủng RV lưu hành là những thách thức lớn nhất đối với hiệu quả vắc xin. Do đó, khi đưa vắc xin vào sử dụng, việc đánh giá hiệu quả của các loại vắc xin này trong điều kiện thực tế và theo dõi tác động của việc chủng ngừa đến gánh nặng bệnh TCC do RV là ưu tiên hàng đầu.

Các phương pháp theo dõi, đánh giá tác động của vắc xin phòng TCC do RV ở các quốc gia được TCYTTG hướng dẫn gồm các nội dung sau [176]:

- Đánh giá tác động của vắc xin (tức là, việc đưa vào sử dụng một loại vắc xin có làm giảm gánh nặng bệnh do RV hay không?);
- Đánh giá hiệu quả vắc xin (vắc xin có hiệu quả trên thực địa như trong các thử nghiệm lâm sàng);
- Giám sát khả năng thay đổi chủng lưu hành trong quần thể được sử dụng vắc xin dự phòng.

1.3.4.1. Thiết kế nghiên cứu đánh giá tác động của vắc xin làm giảm gánh nặng bệnh tiêu chảy cấp do vi rút Rota

Đánh giá tác động của vắc xin dựa trên việc theo dõi các xu hướng bệnh TCC do RV có ưu điểm là phản ánh tác động thực tế của việc chủng ngừa làm giảm tỉ lệ mắc và tử vong do RV. Hơn nữa, do RV chiếm 30% -50% tổng số ca TCC nhập viện ở trẻ nhỏ nên tác động của việc chủng ngừa có thể thấy rõ ngay cả khi chỉ có dữ liệu về việc nhập viện do TCC do mọi nguyên nhân [176]. Tuy nhiên, nhược điểm của phương pháp này là khó xác định liệu những thay đổi tự nhiên hàng năm trong xu hướng ca bệnh có liên quan đến việc uống vắc xin hay không và cần có mức độ bao phủ vắc xin khá cao (> 60-70%) trong cộng đồng. Ngoài ra, cần theo dõi giai đoạn trước chủng ngừa tương ứng để so sánh với giai đoạn trước uống vắc xin và cần hạn chế các yếu tố gây nhiễu trong cả quá trình đánh giá. Có 2 phương pháp đáp ứng các mục tiêu theo dõi xu hướng bệnh nhằm đánh giá tác động của vắc xin là:

- Phân tích các nguồn dữ liệu chính, ví dụ như dựa trên hệ thống giám sát chủ động bệnh TCC.
- Phân tích các nguồn dữ liệu thứ cấp như trong dữ liệu quốc gia về số ca nhập viện do TCC.

Mục đích của việc sử dụng vắc xin là làm giảm gánh nặng bệnh TCC do RV và giảm các ca bệnh TCC nặng nhập viện nên giám sát số ca bệnh dựa trên hệ thống giám sát tích cực tại bệnh viện là rất thích hợp. Việc quản lý và thu thập các thông tin (như: nhân chủng học, triệu chứng, tình trạng uống vắc xin) và lấy mẫu bệnh phẩm để xét nghiệm RV, xác định kiểu gen lưu hành... của các ca TCC nhập viện được thực hiện dễ dàng. Các dữ liệu chuyên sâu khác có thể được thu thập sau đó (hoặc đồng thời) cho các nghiên cứu tính hiệu quả của vắc xin phòng TCC do RV (ví dụ: nghiên cứu bệnh-chứng). Tuy nhiên, khó khăn của việc giám sát chủ động là yêu cầu

cao về nhân lực, nguồn lực... nên chỉ thực hiện giám sát điểm, cần lựa chọn quần thể đại diện (cỡ mẫu, địa điểm, thời gian giám sát...), có đủ năng lực, kinh nghiệm thực hiện, hạn chế yếu tố ảnh hưởng để phản ánh đúng xu hướng chung của bệnh. Ở những nước chưa triển khai sử dụng vắc xin như Việt Nam thì thiết kế nghiên cứu can thiệp cộng đồng tự đánh giá trước và sau uống vắc xin dựa trên hệ thống giám sát TCC chủ động ở bệnh viện là thiết kế hợp lý, hiệu quả.

1.3.4.2. Thiết kế nghiên cứu để đánh giá hiệu quả vắc xin

Trong giai đoạn đầu giới thiệu vắc xin phòng TCC do RV ở một quốc gia, đặc biệt là ở những địa điểm không có đủ dữ liệu cơ bản trước khi đưa vào sử dụng vắc xin, đánh giá hiệu quả của vắc xin trên thực địa hoặc kết hợp với theo dõi các xu hướng đồng thời là một giải pháp thích hợp. Hai phương pháp dịch tễ học được TCYTTG và CDC Châu Âu khuyến cáo sử dụng bao gồm[176]:

- Nghiên cứu thuần tập: Hiệu quả của vắc xin được ước tính nguy cơ tương đối (RR-Relative risk) của những trường hợp TCC ở những người đã được uống vắc xin so sánh với những người chưa được uống vắc xin trong quần thể nghiên cứu [53].
- Nghiên cứu bệnh-chứng: Hiệu quả của vắc xin được ước tính bằng cách so sánh nguy cơ (Odd) của việc chủng ngừa giữa ca TCC và ca chứng [54, 176].

Trong thiết kế nghiên cứu bệnh-chứng được TCYTTG khuyến cáo sử dụng [54]. Ưu điểm của thiết kế nghiên cứu bệnh-chứng là chi phí hợp lý và thời gian để tiến hành nghiên cứu và có cơ hội phân tích các thông số quan tâm khác (ví dụ: hiệu quả của vắc xin khi không uống đủ liều, hiệu quả chống lại các chủng RV cụ thể, thời gian bảo vệ và với việc sử dụng đồng thời với OPV) và cũng xác định các yếu tố nguy cơ tiềm ẩn dẫn đến việc uống vắc xin kém hiệu quả (ví dụ, cho con bú, tình trạng kinh tế xã hội...). Nghiên cứu bệnh-chứng cũng có thể được sử dụng để đánh giá tác động của vắc xin đối với việc giảm tỉ lệ tử vong do RV [176].

Tuy nhiên, nghiên cứu bệnh-chứng có thể khó thực hiện và phù hợp hơn với các địa điểm nghiên cứu được chọn có cơ sở hạ tầng và năng lực đảm bảo yêu cầu cần thiết. Nghiên cứu cần được thực hiện một cách lý tưởng khi độ bao phủ từ 20 đến 80%, vì nếu tỉ lệ bao phủ ngoài khoảng có thể ảnh hưởng đến kết quả tính hiệu quả [176]. Ngoài ra, các bước thực hiện của một nghiên cứu bệnh - chứng thường phức tạp và cần các điều kiện lý tưởng nên cần lập kế hoạch chi tiết cho nghiên cứu trước

thực hiện hoặc trước khi triển khai cho uống vắc xin trong chương trình TCMR. Ngoài ra, cần tham khảo ý kiến của các nhà nghiên cứu có kinh nghiệm thực địa trước đây để thiết kế và thực hiện các nghiên cứu này.

Trong nghiên cứu bệnh-chứng, ca chứng phải đại diện cho quần thể đích và phải giống yếu tố gây nhiều tiềm ẩn với ca bệnh. Có 2 nghiên cứu bệnh-chứng thường được sử dụng như sau:

- Nghiên cứu bệnh-chứng truyền thống (traditional case-control): ca chứng được lựa chọn trong cộng đồng (ví dụ, trẻ em ở cùng địa bàn) hoặc các ca nhập viện không phải do TCC, có nhiều đặc điểm tương đồng với quần thể ca bệnh [176].
- Nghiên cứu bệnh-chứng với ca chứng có xét nghiệm âm tính (test-negative control - TNC): ca bệnh và ca chứng có các triệu chứng lâm sàng giống nhau nhưng ca chứng có kết quả xét nghiệm âm tính với tác nhân gây bệnh. Nghiên cứu bệnh-chứng này đã phát triển trong vài thập kỷ gần đây. Các nghiên cứu TNC đã được áp dụng chủ yếu để ước tính hiệu quả vắc xin cúm [127] cũng như ước tính hiệu quả chống lại các bệnh khác, bao gồm cả RV [148, 157, 176].

Thiết kế nghiên cứu TNC có ưu điểm làm giảm sự sai lệch gây nhiều vì các ca bệnh nhiễm tác nhân và ca chứng không nhiễm tác nhân có các triệu chứng tương tự nhau nên cần tìm kiếm sự chăm sóc sức khỏe tương tự nhau (cùng nhập viện) và có thể tương tự về các đặc điểm khác như: tuổi, bệnh đi kèm hoặc khả năng tiếp cận với dịch vụ chăm sóc sức khỏe. Nghiên cứu này cũng dễ dàng thực hiện hơn và kinh tế hơn vì không cần tuyển chọn nhóm chứng bên ngoài cộng đồng. Bằng cách thu thập dữ liệu chủng ngừa trước khi biết kết quả xét nghiệm thì có thể tránh được sự sai lệch trong việc đánh giá việc chủng ngừa giữa ca bệnh và ca chứng thông qua các nghiên cứu TNC.

Thiết kế nghiên cứu TNC vẫn có thể có sai lệch vì các ca chứng không nhiễm có thể không đại diện cho toàn bộ quần thể có ca bệnh có nhiễm. Đặc biệt, ước tính hiệu quả từ các nghiên cứu của TNC có thể bị sai lệch nếu việc sử dụng vắc xin có ảnh hưởng đến các tác nhân gây bệnh khác làm tăng khả năng ca chứng được đưa vào nghiên cứu [127]. Điều này có thể xảy ra do sự nhiễm chéo của vi rút hoặc bảo vệ chéo. Ngoài ra, cả hai loại thiết kế nghiên cứu bệnh-chứng trên đều có thể sai lệch do các xét nghiệm chẩn đoán RV không đúng và xác định sai tình trạng chủng ngừa. Nếu độ đặc hiệu của xét nghiệm ELISA phát hiện RV là 90% thì sai số hiệu quả tính bằng 2 phương pháp này thấp hơn hiệu quả thực tế 20% và hiệu quả của nghiên cứu TNC

thường thấp hơn [66]. Tuy nhiên, xét nghiệm ELISA được TCYTTG khuyến cáo sử dụng để chẩn đoán RV có độ nhạy và độ đặc hiệu đều trên 99% [176] và không có bằng chứng chắc chắn rằng vắc xin phòng RV có ảnh hưởng đến tỉ lệ tiêu chảy do các tác nhân không phải RV. Một số nghiên cứu đã chứng minh nếu độ nhạy của phương pháp xét nghiệm ELISA là 96%, độ đặc hiệu là 100%, hiệu quả thực tế của vắc xin ở mỗi nghiên cứu trong khoảng 30-100% thì hiệu quả của vắc xin ước tính khi thực hiện với thiết kế phương pháp TNC và phương pháp truyền thống chênh lệch tuyệt đối chỉ trong khoảng 0,2 % [157].

Để đánh giá hiệu quả của vắc xin ngăn ngừa các ca TCC nặng nhập viện thì nghiên cứu thuần tập tương lai dường như không còn khả thi do sau uống vắc xin, tỉ lệ các ca TCC nặng ít nên cần cỡ mẫu nghiên cứu lớn với yêu cầu về nguồn lực và nhân lực lớn. Tuy nhiên, theo hướng dẫn của CDC Châu Âu, ở một số nước thành viên của Châu Âu hoặc khu vực có đầy đủ cơ sở dữ liệu điện tử về các ca nhiễm RV và tình trạng chủng ngừa và dễ dàng trích xuất thông tin có thể đánh giá hiệu quả của vắc xin phòng TCC do RV bằng cách nghiên cứu thuần tập hồi cứu [53]. Đối tượng nghiên cứu bao gồm trẻ em đủ điều kiện uống vắc xin. Dữ liệu chủng ngừa, tình trạng bệnh có thể được xác định thông qua trích xuất từ cơ sở dữ liệu máy tính từ các nguồn: bệnh viện, bảo hiểm y tế, sổ đăng ký. Nhược điểm của phương pháp là khó thu thập đầy đủ các yếu tố gây nhiễu tiềm ẩn như những khác biệt về tình trạng sức khỏe, điều kiện nhân khẩu học và biện pháp điều trị ở trẻ được chủng ngừa so với trẻ không được chủng ngừa. Các yếu tố gây nhiễu cần lưu ý thu thập thêm thông tin bao gồm: tình trạng mắc các bệnh mạn tính, các chỉ số về tình trạng nhân khẩu học, các loại vắc xin khác nhau [53]... Do vậy, với điều kiện của một số nước đang phát triển, rất khó để đánh giá hiệu quả với thiết kế thuần tập hồi cứu. Ngay cả ở Nhật Bản, thông tin về tình trạng chủng ngừa cũng không có đầy đủ và không có sẵn dữ liệu giám sát các ca điều trị ngoại trú hoặc nhập viện vì TCC nặng [25].

Khi sử dụng thiết kế TNC ở 1 số quốc gia thu nhập thấp ở Châu Phi và Châu Á để tính toán hiệu quả của vắc xin phòng TCC do RV, hiệu quả của vắc xin này gần tương đương với hiệu lực của vắc xin trong thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên có đối chứng trước cấp phép [148]. Do vậy, thiết kế nghiên cứu TNC là một thiết kế nghiên cứu dịch tễ học thích hợp và có độ tin cậy cao để ước tính hiệu quả của vắc xin phòng TCC do RV [66, 148].

1.3.4.3. *Đánh giá tác động của chủng ngừa đến các kiểu gen RV lưu hành*

Sự thay đổi tỉ lệ lưu hành các chủng RV là rất quan trọng để đánh giá tác động của vắc xin, giải thích cho hiệu quả vắc xin khác nhau với mỗi chủng và theo dõi những thay đổi xu hướng lưu hành có thể xảy ra liên quan đến việc chủng ngừa. Ví dụ, các chủng có nguồn gốc từ động vật, chủng hiếm gặp ở người và các chủng tái tổ hợp từ các chủng hoang dại và chủng vắc xin có thể trở nên phổ biến hơn sau khi sử dụng vắc xin. Trong mỗi cơ sở tiến hành giám sát bệnh TCC do RV, cần thu thập thông tin về các chủng RV lưu hành tại địa phương.

- Để xác định các chủng RV phổ biến trước và sau khi đưa vắc xin vào;
- Để hiểu rõ hơn về sự tiến hóa của RV, và sự xuất hiện của các chủng vi rút mới trong tự nhiên và các chủng tái tổ hợp từ các chủng hoang dại và chủng vắc xin.

Hai phương pháp chính đã được sử dụng để định typ RV. Có thể xác định typ huyết thanh với các kháng thể đơn dòng để xác định protein G. Các kháng thể đơn dòng đã được sản xuất và xác định được 50–80% typ huyết thanh. Phương pháp được sử dụng thường xuyên hơn là xác định kiểu gen GP bằng phương pháp RT-PCR. Hầu hết các phòng thí nghiệm có thể dễ dàng thực hiện phương pháp RT-PCR. Hơn nữa, xác định kiểu gen RT-PCR đã chứng tỏ hiệu quả cao, cho phép định typ 90–95% các chủng [176].

1.4. **Vi rút Noro, Astro và Sapo gây tiêu chảy cấp ở trẻ em**

1.4.1. **Vi rút Noro**

Nghiên cứu đưa ra bằng chứng NV có khả năng lây nhiễm cho người ở mọi lứa tuổi và thường liên quan đến các trường hợp TCC lẻ tẻ và các vụ dịch TCC trên toàn thế giới. Các vụ dịch này thường xảy ra ở điều kiện bán trú như trường học, bệnh viện, nhà dưỡng lão, nhà trẻ. Hằng năm có hơn 677 triệu trường hợp nhiễm NV và gây ra khoảng 200.000 ca tử vong trên toàn cầu. Phần lớn các trường hợp tử vong này xảy ra ở các nước thu nhập thấp [37].

1.4.1.1. **Hình thái, cấu trúc**

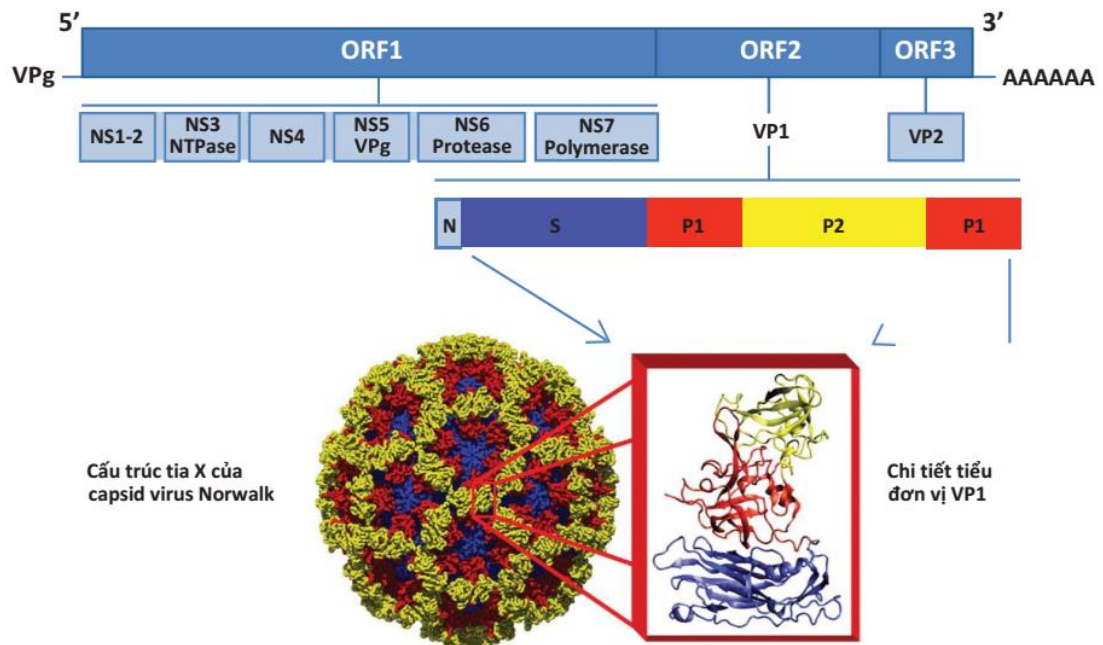
NV là thành viên của chi Norovirus trong họ *Caliciviridae*. Hạt virion NV được tạo thành bởi cấu trúc đơn của vỏ capsid hình khối 20 mặt đối xứng. Bề mặt điển hình của hạt vi rút mang hình dáng lõm của cái cốc. Vỏ capsid gồm có 90 dimer của một protein vỏ đơn, có trọng lượng phân tử là 58 kD. NV thường nhỏ và không

có màng bao quanh, có ARN sợi đơn (+), với đường kính khoảng 27-35 nm và có khả năng lây nhiễm cho người và động vật [37].

Genome của NV là ARN sợi dương, dài 7.400-7.700 nucleotide, chứa 45% - 56% cytosine + guanin (C + G). Bộ gen có đầu 5' có protein VPg, có vai trò thiết yếu trong sự lây nhiễm của vi rút và dịch mã ban đầu; ở đầu 3' có thêm đuôi poly A sau khi tổng hợp gen tạo ổn định cho phân tử và hỗ trợ trong dịch mã [37].

Genome của vi rút có 3 khung đọc mở (ORF1, ORF2, và ORF3). ORF1 mã hóa cho một polyprotein được cắt bởi enzyme thủy phân protein, tạo thành 6 protein như: NTPase, protease và ARN polymerase phụ thuộc ARN (RdRp)... Do vậy, đầu 5' của genome mã hóa cho một tiền chất của các protein phi cấu trúc liên quan đến phiên mã và sao chép [37].

ORF2 chủ yếu mã hóa cho protein vỏ VP1, một protein cấu trúc với vai trò quan trọng trong sự nhân lên của vi rút và có vai trò xác định tính kháng nguyên của vi rút. Protein này bao gồm một vùng vỏ (S) nằm ở đáy của capsid và vùng nhô ra (P) và được chia nhỏ hơn nữa thành P1 và vùng P2. ORF3 là được coi là vùng biến đổi nhất trong genome và mã hóa protein cơ bản (VP2) tương tác với ARN của genome khi hình thành virion.

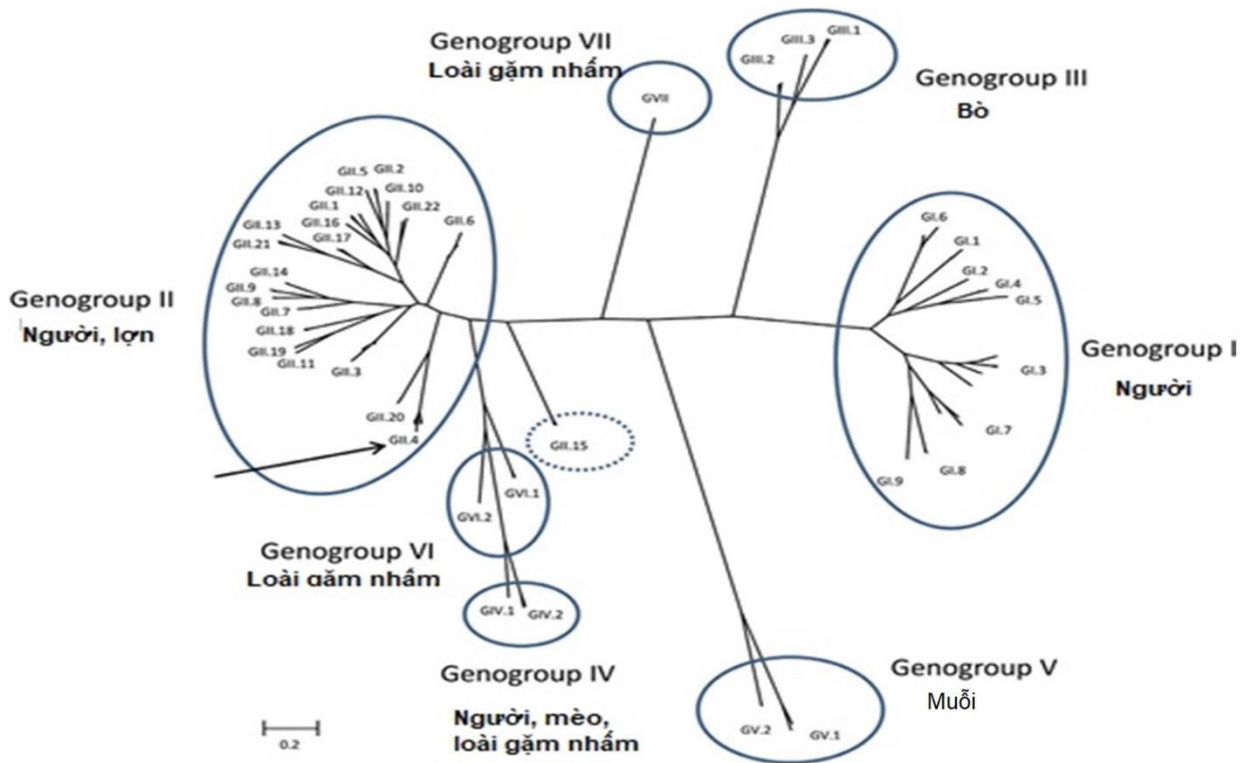


Hình 1.2. Cấu trúc genome vi rút Noro, protein cấu trúc và phi cấu trúc [37]

1.4.1.2. Phân loại vi rút Noro

Vi rút Noro có tính đa dạng di truyền. NV ở người không thể nuôi cấy được trên tế bào nên không thể phân loại dựa trên việc trung hòa với huyết thanh đặc hiệu kháng vi rút (typ huyết thanh). Như vậy, NV được phân loại dựa trên phân nhóm phát sinh loài theo trình tự acid amin của toàn bộ vùng gen mã hóa VP1.

Vi rút Noro được phân loại theo nhóm gen (genogroup), kiểu gen (genotype) và cụm gen (genocluster). Hiện nay, NV được phân loại thành 7 nhóm gen khác nhau từ GI đến GVII. Trong các nhóm gen, NV được chia tiếp thành các kiểu gen, trong đó có ít nhất 31 kiểu gen đã được báo cáo. NV ở người thuộc nhóm GI (9 kiểu gen), GII (17 kiểu gen) và GIV (1 kiểu gen). Các nhóm gen khác được tìm thấy ở loài bò và các loài chuột, cừu, lợn, chó [37].



Hình 1.3. Phân loại vi rút Noro dựa trên đa dạng trình tự acid amin trong protein capsid toàn bộ gen VP1 [37]

Các phân tích về trình tự toàn bộ chiều dài genome của NV đã chỉ ra rằng các chủng vi rút trong một nhóm gen thường có hơn 69% tương đồng về nucleotide, trong khi các chủng trong các nhóm gen khác chỉ chiếm 51-56% sự tương đồng. Ngoài ra,

sự phân loại dựa trên trình tự nucleotide của gen mã hóa protein vỏ capsid cho thấy rằng các trình tự chệch nhau bởi 60% giữa các nhóm gen và 20- 30% giữa các kiểu gen. Trong cùng cụm gen, trình tự vỏ capsid của vi rút thường rất giống nhau [37].

1.4.1.3. Các phương pháp phát hiện vi rút Noro

Có nhiều phương pháp thích hợp để phát hiện nhiễm NV. Những phương pháp này bao gồm: soi trên hiển vi điện tử trực tiếp (EM), hiển vi điện tử miễn dịch (IEM), ngưng kết hồng cầu miễn dịch (IAHA), miễn dịch phóng xạ (RIA), miễn dịch enzym (EIA), sắc ký miễn dịch (IC), RT-PCR, real-time PCR và giải trình tự acid nucleic. Trong số những phương pháp này thì RT-PCR, real-time PCR và giải trình tự nucleic acid được sử dụng rộng rãi để phát hiện và xác định kiểu gen của NV [37].

Sau thành công về tạo dòng và giải trình tự genome vi rút NV, kỹ thuật RT-PCR được sử dụng rộng rãi để phát hiện NV. Các mẫu được lựa chọn là mẫu phân từ bệnh nhân TCC, tách chiết ARN, khuếch đại genome ARN của chúng và giải trình tự các sản phẩm khuếch đại. Ngoài ra, các kỹ thuật sinh học phân tử khác như: PCR-miễn dịch, RT-LAMP và real-time PCR đang được sử dụng do những kỹ thuật này nhanh và nhạy hơn phương pháp RT-PCR. Phương pháp real-time RT-PCR đã được phát triển để phát hiện nhanh NV trong một số lượng lớn các mẫu phân trong suốt mùa dịch bệnh và các vụ dịch của NV [37].

Trong những năm gần đây, một số bộ sinh phẩm ELISA dùng để phát hiện NV trong các mẫu phân đã được phát triển và thương mại hóa. Mặc dù các mẫu phân có thể được thử nghiệm trực tiếp bằng những sinh phẩm ELISA mà không cần bước tách chiết nhưng độ nhạy của ELISA thấp hơn nhiều so với RT-PCR [37]. Độ nhạy thấp là hạn chế của ELISA, điều đó làm cho kỹ thuật này không phù hợp cho việc phát hiện trực tiếp NV trong các mẫu phân.

1.4.1.4. Dịch tễ học bệnh tiêu chảy cấp do vi rút Noro

NV được coi là căn nguyên phổ biến nhất gây bùng phát bệnh TCC do vi rút lây truyền qua nước và thức ăn với tỉ lệ mắc bệnh cao nhất là ở trẻ em dưới 5 tuổi. Trước khi triển khai uống vắc xin phòng RV, NV được phát hiện chiếm từ 3% đến 31% trong số trẻ em nhập viện vì TCC trên toàn thế giới [90, 130].

a) Phân bố theo mùa

Xu hướng phân bố theo mùa ở một số nước LICs, LMICs ở Châu Á, Đông Nam Á, Bắc Phi / Trung Đông, Tây Phi, Đông Phi và Trung và Nam Mỹ không rõ ràng, rất khác nhau giữa các nghiên cứu ở các khu vực này. Hai nghiên cứu ở Nicaragua đều báo cáo mức độ phát hiện NV đạt đỉnh điểm vào đầu mùa mưa vào tháng 6 và tháng 7. Một nghiên cứu ở Bangladesh đã báo cáo việc phát hiện NV trong cả năm với đỉnh điểm số mắc cao ghi nhận trong những tháng mùa hè nóng nực từ tháng 3 đến tháng 4. Nghiên cứu khác ở Bangladesh kéo dài ba năm và báo cáo tỉ lệ phát hiện vào mùa đông và mùa hè cao hơn một chút so với mùa mưa. Một nghiên cứu khác của Bangladesh phát hiện thấy đỉnh hoạt động của NV trong khoảng từ tháng 1 đến tháng 3 năm 2004, tương ứng với những tháng lạnh hơn trong năm. Không có xu hướng rõ ràng nào có thể nhận thấy được từ những nghiên cứu này [107]. Một nghiên cứu kéo dài hai năm ở miền tây Ấn Độ cho thấy đỉnh điểm phát hiện NV vào tháng 3, trùng với độ ẩm giảm, lượng mưa tối thiểu và nhiệt độ cao hơn. Các nghiên cứu khác từ Ấn Độ không cung cấp dữ liệu rõ ràng về thời vụ [107].

b) Phân bố theo địa lý và thời gian

Tổng hợp từ 175 bài báo với hơn 180.000 ca bị TCC từ 2008-2014, tỉ lệ lưu hành chung trên toàn thế giới của NV là 18% (95% CI: 17–20). NV được phát hiện nhiều hơn ở các nước phát triển (20%) và các nước đang phát triển có tỉ lệ tử vong ở trẻ em thấp (19%), cao hơn ở các nước có tỉ lệ tử vong ở trẻ em cao (14%) [20]. Tỉ lệ lưu hành thấp hơn ở các nước thu nhập thấp có thể là do sự phổ biến của các mầm bệnh khác được kiểm soát qua cải thiện nước sinh hoạt và vệ sinh, chứ không phải là số ca nhiễm NV thấp hơn ở các nước đang phát triển.

c) Phân bố theo nhóm tuổi và triệu chứng

Tổng hợp từ 64 nghiên cứu đánh giá về tỉ lệ lưu hành NV tại các khu vực đại diện cho 8 nước LICs (15 nghiên cứu) và 21 nước LMICs (49 nghiên cứu) từ 1997–2018 cho biết tỉ lệ NV được phát hiện là 14% trong số người có các triệu chứng TCC và 8% ở nhóm không có triệu chứng. NV được phát hiện thường xuyên hơn trong các trường hợp TCC có triệu chứng ở LMICs (15%) so với LICs (11%) [107]. Các nghiên cứu ở trẻ em <5 tuổi, NV được phát hiện thường xuyên nhất ở trẻ em <12 tháng tuổi (trong 5 nghiên cứu) và ở trẻ em <2 tuổi (trong 16 nghiên cứu). Có 10 nghiên cứu báo cáo tuổi trung bình trẻ dương tính với NV khoảng 6–15,5 tháng tuổi [107].

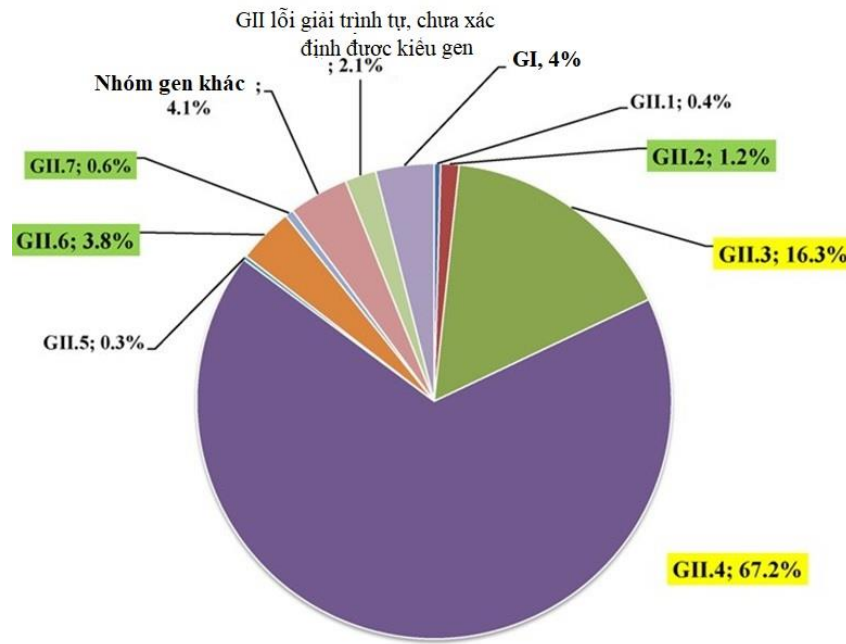
d) Hiện tượng đồng nhiễm vi rút Noro

Kết quả từ 26 nghiên cứu từ 15 nước LMICs và 4 nước LICs đã phát hiện có 73,5% ca nhiễm NV đơn lẻ và 768 ca (26,5%) đồng nhiễm với các tác nhân gây TCC khác nhau. Phần lớn là đồng nhiễm NV / RV (18,3%), và 8,2% các tác nhân khác. Tỷ lệ đồng nhiễm trong các nghiên cứu khác nhau dao động từ 5% đến 76,7%, với mức trung bình là 26,7% [107].

1.4.1.5. Đặc điểm di truyền của vi rút Noro

Thông qua việc giám sát dịch tễ của NV trên thế giới đã cho thấy vai trò chủ yếu của những chủng có nhóm gen GII, đặc biệt là những chủng có kiểu gen GII.4 chiếm ưu thế là nguyên nhân của các vụ dịch (hiện tại ước tính khoảng 80% của tất cả các trường hợp lây nhiễm), các biến thể GII.4 mới thường xuất hiện theo chu kỳ 2-3 năm được quan sát ở nhiều nơi [37].

Tổng hợp các kết quả được công bố từ năm 2004 đến 2012 từ 37 nghiên cứu, kiểu gen dựa trên protein capsid VP1 của 2968 mẫu nhiễm NV thấy tỷ lệ của GII.4 và GII.3 là 67,2% và 16,3% tương ứng (Hình 1.5). Các kiểu gen phân bố toàn cầu khác bao gồm GII.6 và GII.2, cùng chiếm 5% số chủng. Trong khi GII.4 chiếm ưu thế ở hầu hết các quốc gia và thời kỳ nghiên cứu (dao động đáng kể từ 19% ở Jordan đến 100% ở Bangladesh và Libya). Ở Nhật Bản, tần suất tương đối của GII.4 thay đổi từ 76% còn 35% trong 3 năm liên tiếp. GII.3 là kiểu gen trội thường xuyên nhất ở một số quốc gia như Jordan (41%), Trung Quốc (46%) và Nhật Bản (43–53%) tùy thuộc vào giai đoạn nghiên cứu [76]. Trong thời gian này, một số biến thể GII.4 mới đã xuất hiện. Các biến thể lưu hành trên toàn cầu bao gồm GII.4 / 2002 (2002–2006), GII.4 / 2004 (2003–2008), GII.4 / 2006a (2006–2009), GII.4 / 2006b (2006–2010), GII.4 / 2008 (2008–2010), và một số biến thể có lưu hành chỉ ở một số khu vực địa lý GII.4 / 2003 và GII.4 / 2007 chủ yếu được tìm thấy ở các nước Châu Á [76].



Hình 1.4. Phân bố các kiểu gen của vi rút Noro gây TCC ở trẻ em trên toàn cầu, 2004 -2012 [76]

Tổng hợp về phân bố các biến chủng GII.4 của NV ở các nước LICs, LMICs từ 1997–2018 cho thấy các biến thể mới được tạo ra ở ít nhất hai vị trí địa lý riêng biệt. Có 14 biến thể GII.4 của NV khác nhau đã được báo cáo từ năm 1997 đến 2015 trong LICs và LMICs. Trong các nước LICs, chủng NV là Yerseke 2006a, Osaka 2007, New Orleans 2009 và Sydney 2012 đại diện cho phần lớn các biến thể. Trong LMIC, chủng NV là Hunter 2004, Den Haag 2006b, New Orleans 2009 và Sydney 2012 được báo cáo thường xuyên nhất [107]. Một tác nhân vi rút khác gây TTC ở trẻ em được ghi nhận là vi rút Astro.

1.4.2. Vi rút Astro

Vi rút Astro ở người được phát hiện vào năm 1975, có khả năng lây nhiễm cho nhiều loài khác nhau, đặc biệt là động vật có vú và chim. Các ca nhiễm do Ast thường là đơn lẻ nhưng cũng có thể lây lan hệ thống và gây bệnh nặng ở những bệnh nhân bị suy giảm miễn dịch [29].

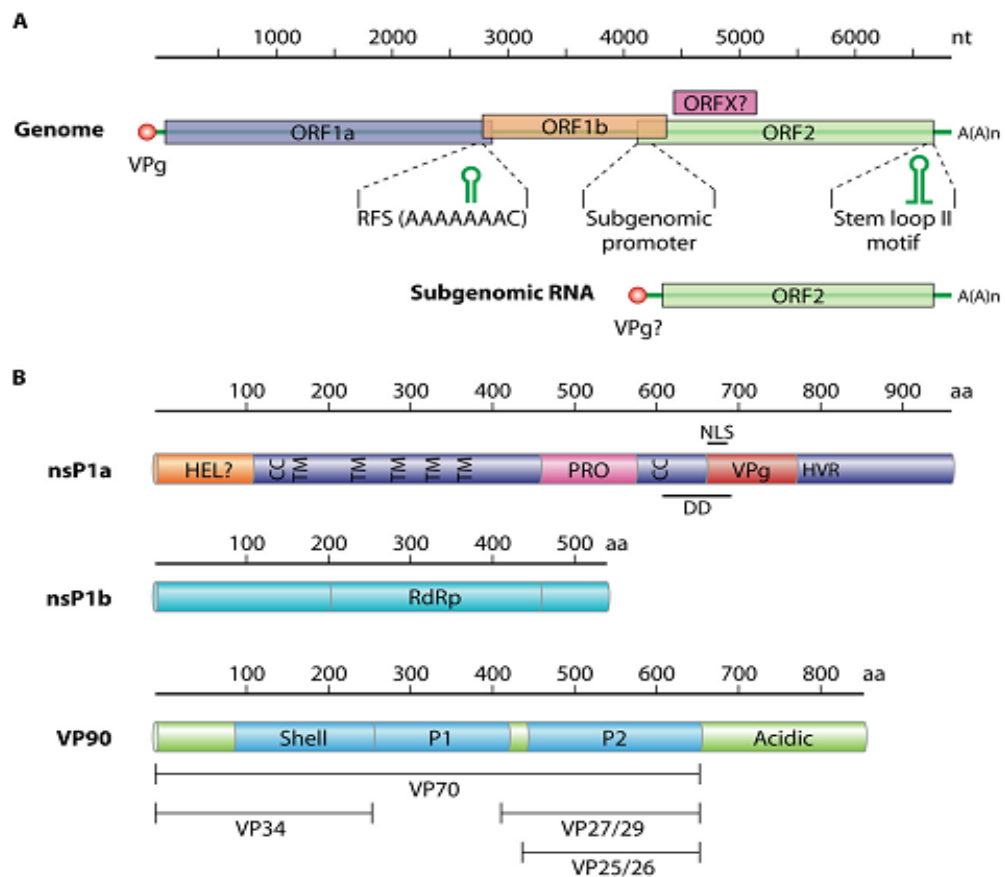
1.4.2.1. Hình thái, cấu trúc

Sử dụng kính hiển vi điện tử (EM) đã quan sát được các hạt Ast có kích thước 28-30 nm. Virion của Ast là một loại vi rút trần, không vỏ bao có 20 mặt đối xứng

với một bờ mịn và một ngôi sao năm hoặc sáu cánh phân biệt theo bề mặt của một số virion [29].

Genome của Ast là một ARN sợi đơn dương có kích thước khoảng 6,8kb (6,2-7,8 kb). Một protein VPg liên kết cộng hóa trị với đầu 5' của bộ gen (46). Bộ gen chứa ba khung đọc mở (ORF), được đặt tên tính từ đầu 5' đến đầu 3' là ORFa, ORF1b và ORF2. ORF1a và ORF1b mã hoá các protein phi cấu trúc tham gia vào quá trình nhân bản và dịch mã. ORF2 mã hóa các protein cấu trúc. Trong nhóm Ast điển hình và trong các Ast ở động vật có vú có một ORF mới, được gọi là ORFX, chồng chéo lên đến 5' của ORF2 [29].

Các hạt được lắp ráp từ protein tiền thân VP90 (khoảng 90 kDa), được tiếp tục xử lý để tạo ra protein VP70 bằng cách cắt đi một vùng đầu C (37). Các hạt chứa protein 70 kDa là chưa hoàn chỉnh và cần sự phân cắt bằng trypsin ở ngoại bào thông qua một con đường khá phức tạp tạo ra các hạt có khả năng lây nhiễm cao với các protein capsid từ 32 đến 34, 27 đến 29, và 25 đến 26 kDa (VP34, VP27 / 29 và VP25/26) (38). VP34 có nguồn gốc từ vùng đầu N của polyprotein có tính bảo thủ cao và tạo ra vỏ capsid, trong khi VP27 / 29 và VP25 / 26 đều bắt nguồn từ vùng đầu C để thay đổi và hình thành các gai đối xứng [29].



Hình 1.5. Genome và các sản phẩm polyprotein của vi rút Astro [29]

1.4.2.2. Phân loại vi rút Astro

Theo Ủy ban Quốc tế về phân loại vi rút (ICTV), họ *Astroviridae* chia thành hai chi: chi *Mamastrovirus* (MAst) lây nhiễm động vật có vú với 19 loài và chi *Avastrovirus* (AAst) lây nhiễm ở gia cầm với 3 loài (<https://ictv.global/taxonomy>) [29, 172].

Có 3 nhóm Ast khác nhau được công nhận gây bệnh ở người là: nhóm điển hình (MAst 1), Ast-MLB (hay MAst 6) và Ast-VA / HMO (gồm MAst 8 và MAst 9) [172]. Có 8 typ huyết thanh trong nhóm Ast điển hình (MAst 1) được công nhận là tác nhân phổ biến gây TCC ở người, kí hiệu từ HastV-1 đến HastV-8. Chúng giống nhau 63-84% acid amino ở mức độ capsid. Còn có các nhánh khác nhau trong mỗi typ huyết thanh với mức tương đồng 93-95% so với chủng tham chiếu là được coi là 1 nhánh mới. Trong đó, có khoảng 20 nhánh, trong đó HAsV-1 được chia thành 6 nhánh (1a đến 1f), HAsV-2 có 4 nhánh (2a đến 2d), HAsV-3 có 3 nhánh (3a-3c) và

HAstV-4 có 3 nhánh (4a đến 4c), HAstV-5 có 3 nhánh (5a-5c) và HAstV-6 có 2 nhánh (6a và 6b) [29, 44, 109, 171, 173].

Mặc dù các chủng thường được phân loại theo sự đa dạng của ORF2 và có mối tương quan cao giữa các typ huyết thanh và kiểu gen, nhóm HAst điển hình được phân loại dựa trên ORF1a. Dựa việc phân tích trên cây phát sinh loại của một trình tự đoạn ORF1a, có 2 nhóm được phân loại là nhóm gen A (bao gồm các typ huyết thanh HAstV-1 đến HAstV-5 và HAstV-8) và nhóm gen B (typ huyết thanh HAstV-6 và HAstV-7). Ngoài ra, còn một số chủng loại khác do sự tái tổ hợp các đoạn gen mã hóa protein cấu trúc và phi cấu trúc [29].

1.4.2.3. Các phương pháp phát hiện vi rút Astro

Mặc dù có thể nuôi cấy trên tế bào một số Ast điển hình nhưng sự phân lập vi rút trong nuôi cấy tế bào không áp dụng cho chẩn đoán Ast trong mẫu phân. Trước đây, Ast được phát hiện trực tiếp bằng kính hiển vi điện tử (EM). Quy trình này chỉ áp dụng trong phòng thí nghiệm, rất tốn kém, mất thời gian và cần nhân viên nhiều kinh nghiệm. Chỉ có 10% các hạt vi rút hiển thị cấu trúc bề mặt như sao đặc trưng và độ nhạy của phương pháp EM thấp, yêu cầu mật độ tối thiểu khoảng 10^7 hạt trên mỗi gram phân để quan sát vi rút [29, 61]. Mật độ vi rút thường được phát hiện trong 12 đến 48 giờ sau khi bắt đầu các triệu chứng nhưng sau đó số lượng hạt quá ít nên không phát hiện được bằng phương pháp EM. Việc sử dụng kháng thể để quan sát bằng kính hiển vi điện tử miễn dịch (IEM) hoặc kính hiển vi điện tử miễn dịch pha rắn (SPIEM) giúp tăng cường độ nhạy. Tuy nhiên, các kháng thể các nhóm khác nhau có rất ít nên gây hạn chế cho kỹ thuật này [29].

Phương pháp EIA được phát triển để phát hiện Ast điển hình trong mẫu phân. Các xét nghiệm này hữu ích giúp phát hiện nhanh chóng vi rút khi có nhiều mẫu cần phân tích và có độ nhạy cao tương đương phương pháp quan sát EM trực tiếp nhưng ít tốn thời gian hơn [40]. Ngoài ra, có một số test sắc ký miễn dịch học nhanh phát hiện nhanh Ast đang có mặt trên thị trường.

Sự ra đời của các kỹ thuật sinh học phân tử, dựa trên việc lai đầu dò và RT-PCR được phát triển với độ nhạy và đặc hiệu cao để chẩn đoán Ast trong phân. Mặc dù độ nhạy của việc lai đầu dò được mô tả là tương tự EIA [29, 61], thì ngược lại kỹ thuật RT-PCR chỉ cần 10 đến 100g bản sao genome trong mẫu phân. Tuy nhiên, độ nhạy của các phân tích phân tử này phụ thuộc rất nhiều vào các biến số như việc lựa chọn cặp mồi / đầu dò, điều kiện phản ứng khuếch đại enzyme, và hiệu quả của việc

tách chiết acid nucleic. Trong nhiều trường hợp, các nghiên cứu sử dụng EIA và RT-PCR song song được báo cáo giúp phát hiện các mẫu dương tính tốt hơn [29].

Các phương pháp RT-PCR thông thường vẫn được sử dụng rộng rãi trong nhiều phòng thí nghiệm để sàng lọc và định typ. Đã có các môi đặc hiệu dùng để phát hiện 8 serotype của HAdV điển hình. Mỗi Mon244 / Mon245 (và Mon269 / Mon270) bắt cặp với vùng 5' bảo tồn 5 của ORF2 và cho phép định typ bằng giải trình tự là một trong những môi được sử dụng rộng rãi nhất. Để phát ra AdV mới, các môi bắt cặp ORF1b được đưa ra. Các môi này giúp phát hiện tất cả AdV trên người và động vật đã biết. Các môi được thiết kế để phát hiện đặc biệt AdV-MLB và AdV-VA / HMO cũng có được mô tả [29].

Cuối cùng, kỹ thuật Microarray cũng được chứng minh là đặc biệt hữu ích cho việc phát hiện và định typ vi rút. Một trong những phương pháp dựa trên kỹ thuật Microarray có thể phân biệt được đại diện của tám typ huyết thanh của AdV điển hình, và một phương pháp tổng hợp khác giúp phát hiện đồng thời nhiều tác nhân vi rút gây TCC khác. Ngoài ra còn có kỹ thuật nhân bản dựa trên trình tự acid nucleic (NASBA) cũng được mô tả để phát hiện AdV [29].

Phương pháp cải tiến được áp dụng phổ biến gần đây là phương pháp RT-qPCR với độ nhạy, độ lặp cao và giảm nguy cơ nhiễm trong chẩn đoán AdV. Một số các phương pháp RT-qPCR đa môi đã được xuất bản cho phép phát hiện đồng thời AdV và các vi rút khác như RV, Sav [27, 81, 114, 167]. Các bộ sinh phẩm đơn dòng và đa dòng được giới thiệu trên thị trường. FilmArray (BioFire Diagnostics, Mỹ) giúp phát hiện đồng thời 23 tác nhân gây bệnh đường tiêu hóa từ phân, bao gồm AdV và 4 loại vi rút đường ruột khác [29].

Phương pháp giải trình tự thế hệ tiếp theo (NGS) có thể giải trình tự toàn bộ genome và tạo ra dữ liệu tối ưu hóa các đoạn môi hiện đang được sử dụng và sẽ giúp xác định các vùng gen bổ sung để phân tích. Hơn nữa, giải trình tự toàn bộ genome sẽ cung cấp thông tin di truyền và phát triển phương pháp hữu ích để xác định các chủng mới xuất hiện [29].

1.4.2.4. Dịch tễ học của bệnh tiêu chảy cấp do vi rút Astro

a) Phân bố theo nhóm tuổi

Vi rút Ast ảnh hưởng chủ yếu đến trẻ em dù có ghi nhận một số ca ở người lớn và người bị bệnh về miễn dịch. Độ tuổi trẻ nhiễm vi rút đa dạng từ lúc mới sinh đến trên 5 tuổi nhưng phổ biến hơn là ở trẻ dưới 2 tuổi [29].

b) Phân bố theo địa lý và thời gian

Nhiễm Ast điển hình xảy ra ở nhiều nơi trên toàn thế giới và chiếm từ 2 đến 9% số trường hợp TCC không do vi khuẩn ở trẻ em [29]. Các nghiên cứu về sự lưu hành Ast điển hình được thực hiện ở nhiều khu vực khác nhau. Tỷ lệ trung bình trên toàn thế giới là 11% với 7% và 23% số ca ở vùng thành thị và vùng sâu vùng xa. Tỷ lệ nhiễm Ast thường cao hơn ở các nước đang phát triển, mặc dù rất ít trường hợp bị mắc vi rút ở tiểu vùng Sahara Châu Phi. Tỷ lệ nhiễm Ast ở trẻ em bị TCC sử dụng kỹ thuật sàng lọc realtime- RT-PCR thời gian thực khoảng 5% (dao động từ 0 đến hơn 20%) [29, 172].

Xu hướng giảm tỷ lệ nhiễm Ast điển hình dường như đã xảy ra trong những năm gần đây. Điều này được minh chứng qua các nghiên cứu được thực hiện trong cùng một khu vực, ví dụ: ở Pháp hoặc Nhật Bản. Tỷ lệ nhiễm Ast vào những năm 1980 là 22%, trong khi năm 1990 là 15% và 5% vào những năm 2000. Tuy nhiên, tỷ lệ Ast dương tính ở Trung Quốc hoặc Nam Mỹ có xu hướng tăng lên. Tuy nhiên, do có sự khác biệt trong các phương pháp chẩn đoán và quần thể nghiên cứu nên khó so sánh kết quả các nghiên cứu này [29, 172].

c) Phân bố theo mùa

Nghiên cứu cho thấy, Ast cổ điển gây bệnh theo mùa với tỷ lệ nhiễm cao hơn ở các vùng ôn đới trong thời tiết lạnh và có sự sụt giảm đáng kể ở giai đoạn thời tiết ấm áp, Ast tiếp tục lưu hành quanh năm và cũng gây nhiễm vào mùa hè. Tính chất theo mùa có thể do Ast ổn định tốt hơn ở nhiệt độ thấp hơn tương tự như tác nhân RV và NV [29].

Ở các khu vực nhiệt đới, tỷ lệ nhiễm Ast có xu hướng xảy ra vào mùa mưa. Tuy nhiên, một số nghiên cứu đã không quan sát thấy một đỉnh trong năm. Một số chủng Ast không điển hình không thấy khác biệt về mùa. Trong một nghiên cứu, nhiễm Ast mới (MLB1, MLB2 và VA / HMO) được quan sát thấy trong tháng 3, 4, 5, 7 và 11 [29].

Bảng 1.1. Tỷ lệ lưu hành vi rút Astro trên thế giới [29]

Quốc gia và khu vực (giai đoạn nghiên cứu)	Tuổi	Tỷ lệ lưu hành (%)	Phương pháp phát hiện
Nam Phi			
Ai Cập (nông thôn, 1995–1998)	2	26,7	EIA
Tunisia (thành thị and nông thôn 2003–2005)	5	6,0	EIA
Sub-Saharan Africa			
Botswana (thành thị, 2001–2002)	5	2,7	EIA
Kenya (thành thị and nông thôn 1999–2005)	5	5,3	EIA
Ghana (thành thị, 2005–2006)	12	4,8	RT-PCR
Châu Á			
Thái Lan (thành thị, 1985–1987)	5	8,6	EIA
Nhật Bản (thành thị and nông thôn 1982–1992)	Trẻ < 10 tuổi	18	EIA
Trung Quốc (thành thị và nông thôn, 1998–2005)	5	5,5	EIA và RT-PCR
Việt Nam (thành thị, 2005–2006)	3	13,9	RT-PCR
Ấn Độ (thành thị, 2004–2008)	8 tuổi, người lớn	3,1	RT-PCR
Nhật Bản (thành thị 2008–2009)	Tất cả	1,7	RT-PCR
Bắc Mỹ			
Mexico (nông thôn, 1992–1995)	3	61	EIA và RT-PCR
USA (thành thị, 1993–1994)	3	20	EIA
USA (thành thị, 1996–1997)	Tất cả	6,9	EIA
Trung Mỹ			
Guatemala (nông thôn, 1987–1989)	3	38,6	EIA
Nam Mỹ			
Chile (thành thị, 1985–1987; 1993–1995)	3	23,5	EIA
Brazil (thành thị, 1990–1992)	2	5,8	EIA và RT-PCR
Argentina (thành thị, 1995–1998)	3	3,7	EIA và RT-

Quốc gia và khu vực (giai đoạn nghiên cứu)	Tuổi	Tỉ lệ lưu hành (%)	Phương pháp phát hiện
			PCR
Colombia và Venezuela (thành thị, 1997–1999)	5	5,0	EIA
Châu Âu			
Pháp (thành thị, 1995–1998)	3	6,0	EIA
Tây Ban Nha (thành thị, 1997–2000)	< 5	4,9	RT-PCR
Italy (thành thị, 1999–2000)	2	3,1	EIA
Đức (thành thị, 2000)	Tất cả	1,2	EIA
Pháp (thành thị, 2007)	5	1,8	EIA
Châu Úc			
Úc (thành thị, 1995)	5	4,2	Northern (ARN) dot blot

1.4.2.5. Đặc điểm di truyền của vi rút Ast

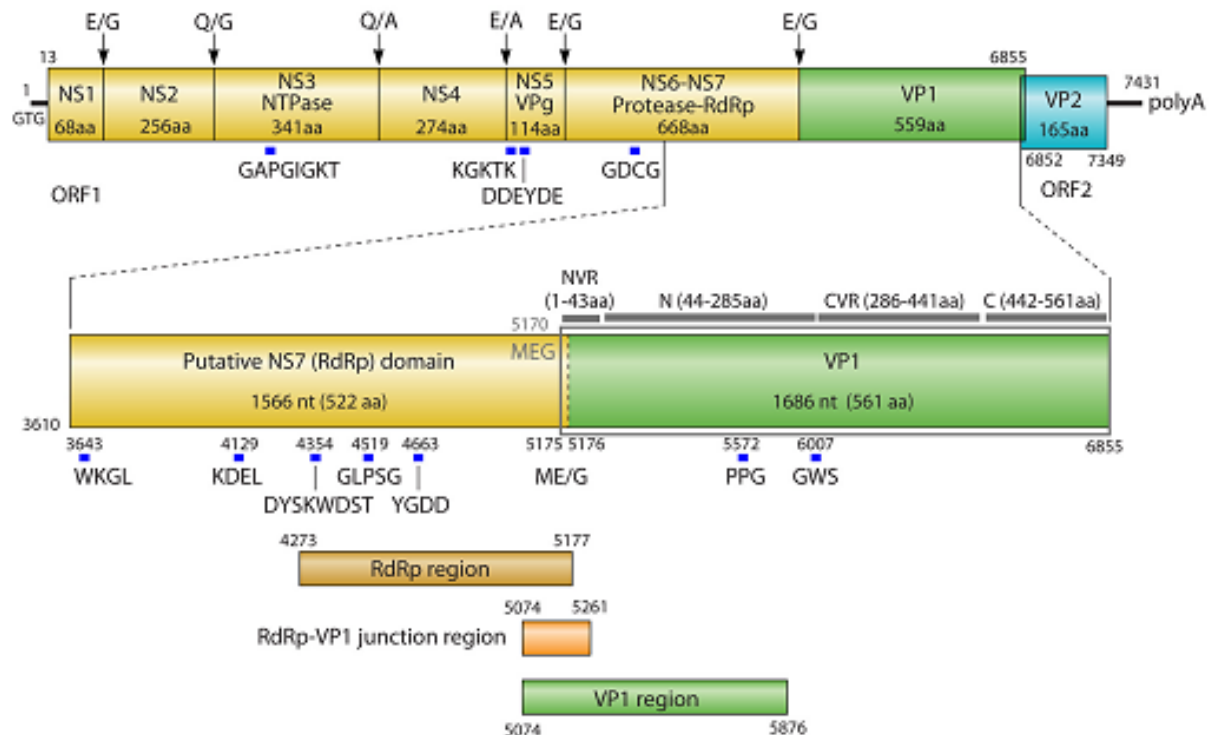
Khi sao chép RdRp lỗi xảy ra, dẫn đến sự tái tổ hợp giữa các đoạn gen mã hoá vùng cấu trúc và phi cấu trúc, do vi rút lây sang các loài vật chủ khác nhau càng làm tăng tính đa dạng và sự phức tạp đối với việc xác định các chủng Ast ở mức phân tử. Nhìn chung, HAstV-1 là chủng được phân lập thường xuyên nhất trên toàn thế giới. Tuy nhiên, có trường hợp ngoại lệ như ở Mexico, HAstV-2 được báo cáo là phổ biến nhất. Không thể xác định rõ chủng nào thường gặp thứ hai tùy thuộc vào từng vùng địa lý. Trẻ vẫn có thể bị nhiễm vi rút khác chủng. Một nghiên cứu đã quan sát thấy hầu hết trẻ dưới 2 tuổi bị nhiễm HAstV-1 và HAstV-3 trong khi trẻ trên 4 tuổi bị mắc HAstV-4. Do đó có thể khẳng định không có bảo vệ chéo giữa các chủng vi rút khác nhau [29, 172].

1.4.3. Vi rút Sapo

Vi rút Sapo gây TCC ở người và động vật. Chúng thuộc chi Sapovirus trong họ *Caliciviridae*. Chúng lây nhiễm và gây ra bệnh ở người ở mọi lứa tuổi, cả ở trường hợp nhiễm lẻ tẻ và sự bùng phát dịch. Các triệu chứng lâm sàng của Sapo gây TCC tương tự như bị nhiễm NV. Vi rút Sapo có khả năng truyền nhiễm cao và dễ lây lan ở những nơi có liên hệ mật thiết với nhau như trong trường học, trung tâm giữ trẻ, cơ sở chăm sóc dài hạn.

1.4.3.1. Hình thái, cấu trúc

Vi rút Sapo là vi rút ARN sợi đơn dương không có vỏ bọc. Hạt virion của Sav chứa 1 protein cấu trúc với cấu trúc đối xứng 20 mặt. Bộ gen của Sav có kích thước từ 7,1 đến 7,7 kb với đầu 3' là đuôi PolyA. Bộ gen của Sav chứa hai khung đọc mở (ORF 1 và 2). ORF 1 mã hóa 1 polyprotein dài, để tạo ra ít nhất 6 protein phi cấu trúc (NS1, NS2, NS3, NS4, NS5, và NS6-NS7) và một protein cấu trúc (VP1). ORF2 mã hoá protein cấu trúc VP2 [124].



Hình 1.6. Sơ đồ cấu trúc của genome vi rút Sapo [124]

1.4.3.2. Phân loại vi rút Sapo

Ủy ban Quốc tế về phân loại vi rút (ICTV) đã phân loại Sav thuộc chi Sapovirus trong họ *Caliciviridae*, được chia thành các nhóm gen hoặc kiểu gen ít nhất phải dựa vào toàn bộ trình tự vùng VP1. Việc phân loại di truyền của Sav dựa vào trình tự VP1 (trình tự gen và acid amin) được sử dụng rộng rãi bởi vì vùng này đa dạng hơn so với vùng RdRp và trình tự VP1 tương quan với kiểu hình vi rút (tức là tính kháng nguyên). Có 5 nhóm gen (GI đến GV) được công nhận và gần đây đã có 9 nhóm bổ sung (GVI đến GXIV) [125, 146].

Đến nay, Sav gây bệnh ở người đã được phân loại thành 4 nhóm gen (GI, GII, GIV và GV). Trong đó, mỗi nhóm gen GI và GII có thể được chia thành 7 kiểu gen

(từ GI.1 đến GI.7 và từ GII.1 đến GII.7). GIV chỉ có 1 chủng (GIV.1) và GV được chia làm 2 chủng (GV.1 và GV.2) [124].

1.4.3.3. Các phương pháp phát hiện vi rút Sapo

Phương pháp soi trên kính hiển vi điện tử (EM): Sav có đặc điểm hình thái khác các vi rút gây TCC khác do có theo hình thái bề mặt điển hình "Sao của David" khi quan sát bằng kính hiển vi điện tử. Nhưng phương pháp này có độ nhạy thấp so với phương pháp phát hiện acid nucleic [124].

Phương pháp phát hiện kháng nguyên: Các xét nghiệm ELISA đã được phát triển để phát hiện các kháng nguyên Sav của người và đã được sử dụng để phát hiện Sav từ các mẫu lâm sàng [69]. Tuy nhiên, các xét nghiệm này là không được sử dụng rộng rãi để chẩn đoán do khó phát hiện các chủng Sav khác nhau, độ nhạy thấp so với các phương pháp phát hiện acid nucleic và chưa có sản phẩm thương mại [124].

Các phương pháp phát hiện acid Nucleic: Phương pháp RT-PCR và realtime RT-PCR đã trở thành một phương pháp chủ yếu và thường quy để phát hiện các vùng bảo tồn trong vùng RdRp của Sav (ví dụ, p290 và p289) [123]. Phương pháp này cũng có thể áp dụng với các vi rút gây viêm dạ dày khác (NV, RV, và Ast) [27, 167]. Bộ môi sử dụng có trình tự tương đối giống nhau, đặc biệt là bộ môi liên quan đến RdRp-VP1. Kỹ thuật PCR hay RT-PCR đa môi sẽ tạo ra các sản phẩm khác nhau được phân biệt bằng điện di gel agarose. Phương pháp Realtime RT-PCR, Realtime PCR hoặc kỹ thuật Luminex được sử dụng để phát hiện Sav ở người cùng với các vi rút gây viêm dạ dày khác [97].

Phương pháp phát hiện acid nucleic nhạy hơn EM hoặc ELISA. Sử dụng vùng chức năng RdRp-VP1 là đích giúp phát hiện Ast với tỉ lệ cao nhất và được lựa chọn đầu tiên để sàng lọc Sav từ các bệnh phẩm lâm sàng. Phương pháp RT-PCR nhân bản vùng VP1 thường được sử dụng hơn vì các sản phẩm có thể được giải trình tự để xác định kiểu gen đáng tin cậy [80]. Hiện nay, có 1 số cặp môi đã chứng minh có khả năng phát hiện tất các nhóm gen của Sav người.

1.4.3.4. Dịch tễ học bệnh tiêu chảy cấp do vi rút Sapo

a) Phân bố theo mùa và nhóm tuổi

Các đợt bùng phát TCC do Sav xảy ra quanh năm ở mọi lứa tuổi. Tổng hợp kết quả của 45 công trình nghiên cứu từ 19 nước công bố trên PubMed and ScienceDirect từ năm 2004 – 2017, có 6/42 nghiên cứu báo cáo Sav có tính chất lưu

hành theo mùa, 16/42 nghiên cứu báo cáo thời gian phát hiện không giống nhau giữa các năm và 2/42 các nghiên cứu kết luận Sav được phát hiện trong suốt năm [105]. Vi rút Sapo được phát hiện chủ yếu vào mùa lạnh trong số các trường hợp bị TCC lẻ tẻ, mặc dù các đỉnh theo mùa khác nhau giữa các năm cũng có đã được báo cáo. Nhiễm Sav xảy ra nhiều hơn ở trẻ nhỏ hơn ở trẻ lớn hơn và người lớn [97].

Dữ liệu tổng hợp từ 106 bài báo từ 35 quốc gia từ 1990–2019, tỉ lệ lưu hành Sav ở trẻ em TCC < 5 tuổi là 3,4% (95%CI: 2,8–4,1%) [48]. Đồng nhiễm giữa Sav và nhiều loại vi rút đường ruột như: NV, RV, Ast, vi rút Adeno... cũng đã được báo cáo trong các đợt dịch TCC. Đồng nhiễm các chủng Sav khác nhau (giữa các nhóm gen khác nhau /kiểu gen) cũng được xác định từ một số vụ dịch TCC [124].

b) Phân bố theo địa lý và thời gian

Một báo cáo tổng hợp các dữ liệu từ 45 nghiên cứu công bố trên PubMed and ScienceDirect từ năm 2004 đến 2017 hiện có về việc phát hiện Sav ở trẻ bị TCC từ 19 nước LICs và MICs cho biết tỉ lệ hiện nhiễm Sav là 6,5% (0,2% to 39%). Có sự khác biệt rõ ràng về tỉ lệ nhiễm các nước LICs (10,40%) và MICs (5,86%) [105]. Tỉ lệ phát hiện Sav ở trẻ em ở một số nước Châu Phi được ghi nhận với tỉ lệ mắc bệnh khác nhau: ở Tunisia (0,8%), Burkina Faso (18%, 10,3%), và Nam Phi (4,1%, 7,7%) [105].

Tổng hợp kết quả nghiên cứu từ 1 số nước giai đoạn 1979-2014, tỉ lệ nhiễm Sav dao động trong khoảng từ 2,2% lên 12,7%, trong đó 8 nghiên cứu Sav đứng thứ hai trong số 4 tác nhân vi rút chính gây TCC lẻ tẻ [124].

Bảng 1.2. Tỷ lệ dương tính với vi rút Sapo ở bệnh nhân bị tiêu chảy cấp [124]

Nước	Thời gian nghiên cứu	Tuổi (năm)	Tỷ lệ Sav (+), % (số ca dương tính/tổng số)	Phương pháp phát hiện	Kiểu gen	Tỷ lệ dương tính với các vi rút khác (%)
Kenya	1991-1994	6	2,2 (32/1431)	ELISA	Không có	Không có
Phần Lan	1993-1995	2	9,3 (72/775)	Nested RT-PCR ^a	Không có	RV, 23,0; NV, 20,2; Ast, 8,8; Adv, 6,3
Anh	1993-1996	Tất cả	3,8 (92/2422)	RT-PCR ^b	Không có	NV, 36,0; RV, 31,3
Hà Lan	1998-1999	Tất cả	6,3 (43/687)	RT-PCR ^b	Không có	NV, 16,1; RV, 7,3; Adv, 3,8; Ast, 2,0
Nhật Bản	1998-2005	Tất cả	9,3 (195/2100)	Nested RT-PCR ^c	GI, GII, GIV, GV	NA
Nhật Bản	2002-2007	Tất cả	12,7 (81/639)	RT-PCR ^d	GI, GII, GIV, GV	NV, 40,7; RV, 7,7; Adv, 3,0; enterovirus, 2,0; Ast, 1,4
Nhật Bản	2002-2009	15	3,7 (146/3895)	RT-PCR ^e	GI, GII, GIV	Không có
Đan Mạch	2005-2007	3	8,8 (97/1104)	qRT-PCR ^f	GI, GII, GV	Không có
Anh	2006-2007	5	12,7 (74/583)	RT-PCR ^b	Không có	NV, 24,5; RV, 19,0
Mỹ	2008-2009	5	5,4 (42/782)	qRT-PCR ^f	Không có	NV, 21,4; RV, 18,0; Adv, 11,8; Ast, 4,9
Anh	2008-2009	Tất cả	8,8 (77/874)	qRT-PCR ^f	Không có	NV, 12,4; RV, 7,3; Adv, 3,4; Ast, 2,5
Canada	2008-2009	Tất cả	4,2 (107/2486)	qRT-PCR ^f	Không có	NV, 17,6; RV,

Nước	Thời gian nghiên cứu	Tuổi (năm)	Tỉ lệ Sav (+), % (số ca dương tính/tổng số)	Phương pháp phát hiện	Kiểu gen	Tỉ lệ dương tính với các vi rút khác (%)
Brazil	2012- 2014	Tất cả	3,5% (12/341)	Quantitative real-time PCR (qPCR)	GI.1 phổ biến, GI.2, GI.6, GII.1, GV.1	Không có
Nam Phi	2009-2013	Tất cả	7,7% (238/3103)	Real-time PCR	Không có	Không có
Trung Quốc	2014 - 2015	Tất cả	2,2% (9/412)	RT-PCR	Không có	2/412 các chủng Sav, 1/412 Salmonella, 1/412 Salmonella sp + AdV
Thái Lan	2006-2008	Tất cả	1,1% (11/41)	RT-PCR	Không có	2 mẫu đồng nhiễm NV-GII

^a Lần 1, Sapp36 / SLV-r-c; lần hai, S1, S2, S3-Sapp-rc

^b SR80-JV33

^c Lần 1, F11 / R1 hoặc F13,14, R13,14; lần 2, F21 / R2 hoặc F22 / R2.

^d SaV1F, -1,2,4F, -5F, -1245R

^e SLV5317-5749

^f SaV1F, -1,2,4F, -5F, -1245R và SaV124TP, SaV5TP

^g Các nhóm gen được xác định dựa trên một phần trình tự vùng VP1.

1.4.3.5. Đặc điểm di truyền của Sav

Sự lưu hành phổ biến các chủng Sav về di truyền tương tự ở nhiều quốc gia ở Châu Âu và sự thay đổi linh động của các kiểu gen và nhóm gen theo thời gian ở các bệnh nhân TCC sống cùng 1 vùng địa lý ở Nhật Bản đã được báo cáo. GIV.1 được phát hiện phổ biến tại Nhật Bản, Canada, Mỹ và châu Âu vào khoảng năm 2007. Sự thay đổi linh động của các nhóm gen Sav đã được phát hiện năm 2007 qua Mạng lưới phòng thí nghiệm chẩn đoán quốc gia ở Nhật Bản. Đây là một xu hướng khác biệt so với NV chỉ có kiểu gen GII.4 chiếm ưu thế trong thập niên trước ở Nhật Bản và ở nhiều quốc gia khác. Các nghiên cứu gần đây từ châu Âu cho biết sự thay đổi di truyền theo thời gian trong vùng VP1 của chủng GI.2 của Sav [124].

Trong số các kiểu gen Sav lưu hành ở các nước LICs và MICs từ 2004 đến 2017, GI.1 và GI.2 được coi là kiểu gen chiếm ưu thế (chiếm 90%), tiếp theo là GII.1, GII.2, GII.3, và GII.4 [105, 124].

1.5. Đặc điểm chung của các địa điểm tham gia nghiên cứu

Hai tỉnh Nam Định và Thừa Thiên Huế được lựa chọn để triển khai thí điểm việc cho uống vắc xin ở quy mô pilot cho nghiên cứu này dựa trên kinh nghiệm trong giám sát tiêu chảy, nhất là các dự án giám sát tiêu chảy thực hiện trong những năm gần đây. Các huyện thuộc 2 tỉnh trên được lựa chọn để triển khai uống vắc xin và giám sát có các đặc điểm đảm bảo được các yêu cầu của nghiên cứu, đó là:

- 1) Các huyện có số trẻ mới sinh hàng năm cao nhất trong tỉnh, do đó đảm bảo số lượng trẻ cần thiết cho đánh giá;
- 2) Trung tâm y tế dự phòng huyện và các trạm y tế xã có đủ năng lực và đủ cán bộ, được tập huấn thường xuyên về chủng ngừa để triển khai uống vắc xin;
- 3) Bệnh viện huyện có khoa nhi tập trung phần lớn trẻ thuộc khu vực, hạn chế khả năng mất theo dõi trẻ uống vắc xin có triệu chứng tiêu chảy cấp.

Tại Tỉnh Nam Định, các bệnh viện thuộc các vùng lân cận huyện Hải Hậu, Trực Ninh, Xuân Trường, Giao Thủy phục vụ người dân tại những địa phương này. Bốn quận/huyện này có dân số 882.600, trong đó có 15.700 trẻ em <1 tuổi. Bệnh viện Trung ương Huế là một bệnh viện chăm sóc tuyến khu vực với 13 phòng ban và 260 giường bệnh. Bệnh viện phục vụ tất cả các cư dân Thừa Thiên Huế và một số tỉnh lân cận. Hai bệnh viện cấp huyện nằm ở huyện Hương Trà và Phú Vang phục vụ các khu vực dân cư tương ứng. Hai huyện này có dân số 272.700, bao gồm 5600 trẻ em <1

tuổi. Dữ liệu được tìm kiếm trên website của Tổng Cục Thống kê (<https://www.gso.gov.vn/dan-so/>, năm 2014-2015).

Bảng 1.3. Các huyện được triển khai uống vắc xin Rotavin-M1

STT	Quận/Huyện	Tỉnh/Thành phố	Số sinh/năm
1	Xuân Trường (1 thị trấn +19 xã)	Tỉnh Nam Định	2942
2	Hải Hậu (3 thị trấn +32 xã)	Tỉnh Nam Định	5648
3	Trực Ninh (2 thị trấn +19 xã)	Tỉnh Nam Định	3320
4	Giao Thủy (22 xã)	Tỉnh Nam Định	3786
5	Hương Trà (16 xã)	Thừa Thiên Huế	2181
6	Phú Vang (20 xã)	Thừa Thiên Huế	3380

Bên cạnh đó đội ngũ các bác sĩ, các nhà khoa học về y tế cộng đồng, các nhà dịch tễ học, quản lý dữ liệu, khoa học xã hội và xác xuất thống kê làm việc tại trung tâm YTDP Tỉnh Nam Định và Thừa Thiên Huế có rất nhiều kinh nghiệm trong các nghiên cứu điều tra trên diện rộng về nhiều bệnh truyền nhiễm và phụ trách các chương trình TCMR.

Các dữ liệu giám sát TCC do RV thu thập từ 12/2012 đến 3/2015 tại Bệnh viện đa khoa Tỉnh Nam Định cho thấy có 1005 trường hợp TCC với tỉ lệ xét nghiệm dương tính với RV là 40%. Một đánh giá các dữ liệu giám sát TCC do RV tiến hành từ tháng 1/2014 đến tháng 1/2015 tại Bệnh viện Trung ương Huế đưa ra kết quả trong số 900 trường hợp TCC có 58% xét nghiệm dương tính với RV. Từ 2013-2015 kiểu gen lưu hành tại Huế cho thấy chủng RV G1P[8] (giống với chủng trong vắc xin phòng TCC do Rotavin-M1 và Rotarix) vẫn là chủng chiếm ưu thế, chiếm 80% chủng lưu hành. Hai địa điểm nghiên cứu có đặc điểm nhiễm vi rút trong năm khác nhau: tỉ lệ nhiễm vi rút cao ở những tháng mùa đông tại miền Bắc (Nam Định), trong khi đó tỉ lệ cao và tương đương quanh năm ở miền Trung (Thừa Thiên Huế). Số liệu này do Dự án hợp tác giữa Viện Vệ sinh dịch tễ TW và Đại học tổng hợp Nagasaki, Nhật Bản cung cấp. Do vậy, các địa điểm nghiên cứu này hoàn toàn đáp ứng được yêu cầu thiết kế nghiên cứu trong luận án.

CHƯƠNG 2 - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, thời gian, địa điểm nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Trẻ em tiêu chảy cấp dưới 5 tuổi tham gia chương trình giám sát TCC.

2.1.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu



Hình 2.1. Thời gian triển khai các hoạt động nghiên cứu

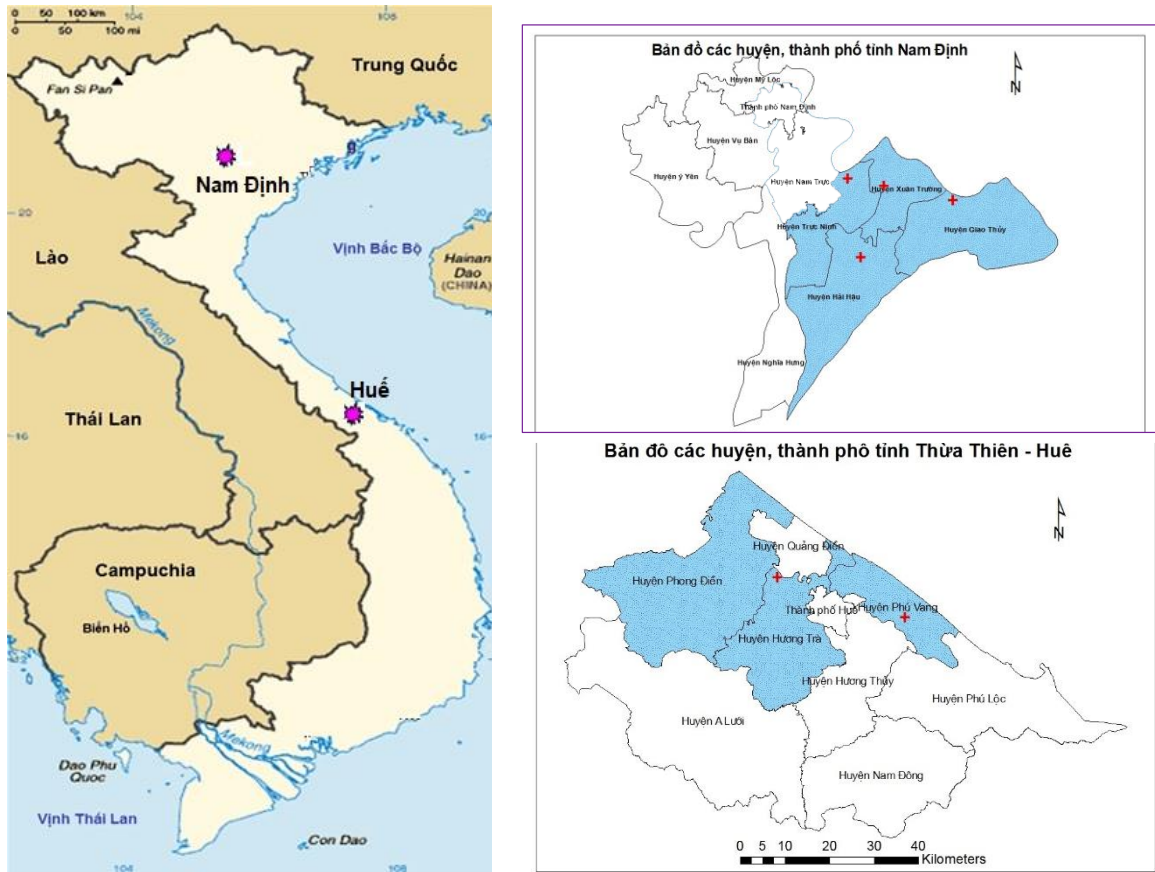
Từ 12/2017 đến 5/2021 ^(*), thực hiện giám sát TCC chủ động ở bệnh viện sau:

- Nam Định: bệnh viện Đa khoa huyện Hải Hậu, Giao Thủy, Xuân Trường, Trực Ninh;
- Huế: 2 bệnh viện huyện Hương Trà, Phú Vang và bệnh viện Trung ương Huế (bệnh viện Trung Ương Huế tham gia chỉ tham gia đến tháng 10/2018).

() Số liệu, thông tin về ca TCC và mẫu bệnh phẩm từ 12/2016 đến 11/2017 (trước uống vắc xin) được Dự án “Đánh giá hiệu quả của vắc xin phòng tiêu chảy do vi rút Rota ở trẻ em tại Việt Nam” thực hiện, lưu trữ và hỗ trợ cung cấp cho nghiên cứu sinh).*

Từ 12/2017 đến hết tháng 11/2020, triển khai uống vắc xin Rotavin-M1 cùng với các vắc xin khác trong chương trình TCMR ở 6 huyện (Hải Hậu, Trực Ninh, Xuân Trường và Giao Thủy (Nam Định) và Hương Trà, Phú Vang (Huế) với số lượng 16.000-19.000 trẻ/năm.

Các mẫu thu từ 12/2016 đến 6/2021 được bảo quản và xét nghiệm tại phòng Nghiên cứu phát triển vắc xin và sinh phẩm, Trung tâm Nghiên cứu y sinh, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung Ương.



Hình 2.2. Các địa điểm thu thập mẫu nghiên cứu tại Việt Nam

Chú thích:  là các địa điểm thu thập mẫu phân. Các huyện (in màu đậm) và bệnh viện (chữ thập) trong giám sát TCC

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

- Nghiên cứu can thiệp cộng đồng tự đối chứng trước và sau can thiệp để đánh giá tác động của vắc xin đến tỉ lệ nhiễm và đặc điểm lưu hành RV và các vi rút gây TCC khác (mục tiêu 1A, 1B và 2).
- Nghiên cứu bệnh-chứng TNC (với ca chứng xét nghiệm âm tính- Test Negative Control) để đánh giá hiệu quả của vắc xin Rotavin-M1 (mục tiêu 1C).

2.2.2. Phương pháp lựa chọn đối tượng

2.2.2.1 Lựa chọn đối tượng để đánh giá tác động Rotavin-M1 đến tỉ lệ nhiễm và đặc điểm kiểu gen của vi rút Rota ở trẻ em tiêu chảy cấp dưới 5 tuổi (mục tiêu 1A, 1B)

Toàn bộ trẻ tham gia chương trình giám sát TCC từ 12/2016-5/2021 được tuyển chọn thoả mãn tiêu chuẩn lựa chọn và không vi phạm các tiêu chuẩn loại trừ như sau:

• **Tiêu chuẩn lựa chọn:**

- Nhập viện và điều trị tại bệnh viện tham gia giám sát;
- Trẻ dưới 5 tuổi bao gồm trẻ từ 0 đến 4 tuổi 11 tháng và 29 ngày;
- Điều trị TCC bao gồm trẻ truyền dịch và theo dõi tại phòng cấp cứu hoặc phải nhập viện do TCC;
- TCC bao gồm đi ngoài 3 lần hoặc nhiều hơn trong vòng 24h với phân lỏng, nước trong thời gian dưới 14 ngày trước khi nhập viện;
- Gia đình chấp thuận tham gia nghiên cứu.

• **Tiêu chuẩn loại trừ:**

- Trẻ trên 5 tuổi (>60 tháng);
- Đã nhập viện vào bệnh viện khác >24h, sau đó chuyển sang bệnh viện này;
- Tiêu chảy kéo dài (14 ngày hoặc dài hơn) hoặc có máu trong phân;
- Nhập viện do các triệu chứng khác không phải do tiêu chảy;
- Gia đình không chấp thuận tham gia nghiên cứu.

2.2.2.2 Lựa chọn đối tượng tham gia đánh giá hiệu quả vắc xin Rotavin-M1 bằng thiết kế nghiên cứu bệnh-chứng TNC (mục tiêu 1C)

Ca bệnh: trẻ TCC nhập viện có xét nghiệm dương tính với RV;

Ca chứng (ca chứng xét nghiệm âm tính - test-negative control): trẻ nhập viện do TCC và có kết quả xét nghiệm âm tính với RV.

Đối tượng được tuyển chọn thoả mãn tiêu chuẩn lựa chọn và không vi phạm các tiêu chuẩn loại trừ như sau:

Tiêu chuẩn lựa chọn:

1. Trẻ bị dưới 5 tuổi, nhập viện do TCC, thoả mãn các tiêu chuẩn lựa chọn và loại trừ khi tham gia chương trình giám sát TCC tại các địa điểm nghiên cứu;
2. Trẻ ở độ tuổi uống vắc xin;
3. Nhập viện do TCC
4. Xác định rõ tình trạng uống vắc xin Rotavin-M1

Tiêu chuẩn loại trừ:

1. Không đạt tiêu chí tham gia giám sát TCC
2. Nhập viện trước thời điểm vắc xin đưa vào sử dụng
3. Không thuộc lứa tuổi uống vắc xin Rotavin-M1
4. Không xác định rõ tình trạng uống vắc xin Rotavin-M1

Lưu ý: trẻ được coi là đã uống vắc xin Rotavin-M1 nếu trẻ đã nhận được ít nhất một liều vắc xin trong ít nhất 14 ngày trước khi khởi phát bệnh TCC.

2.2.2.3 Lựa chọn đối tượng để đánh giá tác động Rotavin-M1 đến tỉ lệ nhiễm và đặc điểm kiểu gen của vi rút Noro, Astro và Sapo ở trẻ em tiêu chảy cấp dưới 5 tuổi (mục tiêu 2)

Đối tượng là những trẻ TCC được lựa chọn ngẫu nhiên từ các trẻ tham gia chương trình giám sát TCC từ 12/2016-11/2020, đã thoả mãn tiêu chuẩn lựa chọn và không vi phạm các tiêu chuẩn loại trừ như mục 2.3.1.

2.2.3. Cỡ mẫu cho nghiên cứu

2.2.3.1. Cỡ mẫu để đánh giá tác động của vắc xin Rotavin-M1 đến tỉ lệ nhiễm RV (mục tiêu 1A)

Toàn bộ số trẻ <5 tuổi mắc TCC nhập viện tại để phân tích giai đoạn trước và sau uống vắc xin (N=7228);

2.2.3.2. Cỡ mẫu để đánh giá tác động của vắc xin Rotavin-M1 đến tỉ lệ nhiễm và đặc điểm kiểu gen của RV (mục tiêu 1B)

- Giai đoạn trước uống vắc xin cần tối thiểu >100 mẫu/năm cho mỗi điểm giám sát theo quy định của TCYTTG [176]
- Các năm sau uống phân tích toàn bộ mẫu RV dương tính nếu không đủ 100 mẫu dương tính với RV.

2.2.3.3. Cỡ mẫu đánh giá hiệu quả của vắc xin Rotavin-M1 (mục tiêu 1C)

Tính toán cỡ mẫu dựa trên hiệu quả vắc xin 60-80% (tương đương hiệu quả của các vắc xin ở các nước có tỉ lệ tử vong ở trẻ em cao với Rotarix là 58% (95% CI: 51 – 65%) [82] và kết quả hiệu lực của vắc xin RotaTeq ở Việt Nam là 64% [187] (72,5%). Lựa chọn tỉ lệ ca bệnh: ca chứng = 1:2 hoặc 1:3 (để đảm bảo chính xác cao khi đánh giá hiệu quả theo hướng dẫn của TCYTTG [176]) . Lựa chọn độ tin cậy 95%, lực mẫu 80%, Sử dụng phần mềm WINPEPI, chương trình COMPARE2, (version 3.85 có sẵn trên trang <http://www.brixtonhealth.com/>) và theo hướng dẫn của TCYTTG [176], kết quả tính toán cỡ mẫu của ca bệnh tối thiểu với độ bao phủ vắc xin từ 20-90% được thể hiện ở bảng 2.1.

Từ bảng 2.1., nếu độ bao phủ là 70%, hiệu quả vắc xin 60%, tỉ lệ ca bệnh: ca chứng = 1:2 thì cần tối thiểu 167 ca bệnh và 334 ca chứng.

Bảng 2.1. Yêu cầu cỡ mẫu của các ca bệnh cho phép đánh giá hiệu quả vắc xin với các tỉ lệ bao phủ dự kiến khác nhau và các tỉ lệ ca bệnh: ca chứng khác nhau [176]

Ước tính độ bao phủ của vắc xin trong quần thể nghiên cứu (%)	Số ca bệnh cần thu được với giá trị hiệu quả ước tính (95% CI)		
	VE = 80% (95% CI: 60-90%)	VE = 70% (95% CI: 48- 83%)	VE = 60% (95% CI: 37- 75%)
Tỉ lệ ca TCC do RV – ca TCC không do RV đối chứng = 1:2			
90	101	162	243
80	77	103	148
70	66	91	167
60	79	98	126
50	99	117	143
40	132	150	175
30	196	209	235
20	302	326	354
Tỉ lệ ca TCC do RV – ca TCC không do RV đối chứng = 1:3			
90	79	131	203
80	77	87	126
70	60	81	110

Ước tính độ bao phủ của vắc xin trong quần thể nghiên cứu (%)	Số ca bệnh cần thu được với giá trị hiệu quả ước tính (95% CI)		
	VE = 80% (95% CI: 60-90%)	VE = 70% (95% CI: 48- 83%)	VE = 60% (95% CI: 37- 75%)
60	75	90	113
50	98	111	131
40	131	143	161
30	191	200	220
20	300	310	339

2.2.3.4. Cỡ mẫu cho nghiên cứu tỉ lệ lưu hành NV, Ast và Sav (mục tiêu 2)

Để tính cỡ mẫu cho nghiên cứu can thiệp, sử dụng công thức tính cỡ mẫu:

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

Trong đó: $P = (P_1 + P_2)/2$ với P_1, P_2 là tỉ lệ trước và sau can thiệp, $z_{1-\alpha/2} = 1,96$ (với $\alpha = 0,05$), $z_{1-\beta} = 0,84$ (với $\beta = 0,20$ hay lực mẫu = 0,80). Ước tính tỷ lệ nhiễm RV, NV trước uống (P_1) dựa trên các nghiên cứu tổng hợp trên thế giới tương ứng là 38%, 15% [23, 96, 107]; tỉ lệ nhiễm NV sau uống vắc xin (P_2) là 23%, 22% [67] nên cỡ mẫu tối thiểu là 147 và 482. Cỡ mẫu giai đoạn trước uống vắc xin ($N=519$) và sau uống vắc xin ($N=1148$) đạt yêu cầu khi so sánh tỉ lệ nhiễm RV, NV trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1.

Tỉ lệ phát hiện Ast, Sav trong một số nghiên cứu ở Việt Nam khá thấp và dao động 0,6-13,9% (với Ast) và 0,8-1,4% (với Sav). Một nghiên cứu tổng hợp tỉ lệ nhiễm Ast và Sav trên thế giới lần lượt là 4,5% [172] và 4,4% [48]. và ảnh hưởng của việc vắc xin phòng tiêu chảy do RV với đến tỉ lệ nhiễm Ast và Sav ở nhiều nước có nhiều mức độ khác nhau nên rất khó để ước tính tỉ lệ các tác nhân này sau uống. Nghiên cứu này bước đầu khảo sát tỉ lệ lưu hành Ast và Sav gây TCC ở trẻ em trước và sau uống vắc xin Rotavin nên chúng tôi sử dụng công thức thống kê của Fisher để tính cỡ mẫu:

$$n = \frac{Z_{1-\frac{\alpha}{2}}^2 P(1-P)}{d^2}$$

Tỷ lệ hiện mắc (P) trong các nghiên cứu trước đây trên thế giới với Ast là 4,5% [172], với Sav là 4,4% [48]. Độ lệch chuẩn (Z) với khoảng tin cậy 95% là 1,96. Để phát hiện với độ chính xác (d) là 2% đối với những tác nhân khác có tỷ lệ mắc bệnh dưới 10%. Tính toán cần ít nhất 413, 404 mẫu để phân tích tỉ lệ nhiễm của Ast và Sav. Do vậy, cỡ mẫu giai đoạn trước uống vắc xin (N=519) và sau uống vắc xin (N=1148) đạt yêu cầu để xác định tỉ lệ nhiễm của Ast và Sav trước và sau uống vắc xin.

2.2.4. *Biến số nghiên cứu*

- **Mục tiêu 1A:** Xác định tỉ lệ nhiễm RV ở trẻ em TCC dưới 5 tuổi trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1 tại Nam Định và Huế:
 - Số ca TCC nhập viện: tổng số, so sánh theo giới tính, mức độ lâm sàng, tuổi trung vị, độ tuổi, địa điểm... giai đoạn trước và sau uống;
 - Số ca dương tính và tỉ lệ dương tính với: tổng số, so sánh theo giới tính, mức độ lâm sàng, tuổi, mùa (hàng tháng), theo thời gian, theo điểm nghiên cứu, theo độ tuổi... giai đoạn trước và sau uống;
 - Mức độ lâm sàng của bệnh TCC được phân loại dựa trên thang điểm Vesikari 20 điểm thành theo mức nhẹ đến trung bình (điểm Vesikari: < 10 điểm), nặng (điểm Vesikari: 11-14) đến rất nặng (điểm Vesikari: >14 điểm) [95, 141]. Cách tính điểm Vesikari chi tiết theo phụ lục 04.
 - Tỉ lệ bao phủ vắc xin trong quần thể được ước tính bằng số trẻ em trong độ tuổi uống vắc xin đã nhập viện vì TCC không do RV (nhóm đối chứng).
 - Độ giảm tỉ lệ RV dương tính- RR (Risk Reduction) theo năm với khoảng tin cậy (95% CI) sử dụng công thức: **(1-tỉ lệ rủi ro) * 100**, với tỉ lệ rủi ro (risk ratio) được so sánh được giữa tỉ lệ ca RV dương giữa giai đoạn trước và sau khi giới thiệu vắc xin.
- **Mục tiêu 1B:** Xác định đặc điểm kiểu gen của RV ở trẻ em TCC dưới 5 tuổi trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1 tại Nam Định và Huế:
 - Số ca và tỉ lệ phân bố chủng thuộc kiểu gen G, P và kết hợp GP: tổng số, theo thời gian, theo điểm nghiên cứu... giai đoạn trước và sau uống;
 - Phân loại các nhánh của chủng RV G1P[8] (gen VP4, VP7) và toàn bộ gen của chủng G8P[8] và so sánh khác biệt acid amin và Nucleotit với vi rút vắc xin và các chủng đã lưu hành.

- **Mục tiêu 1C: Đánh giá hiệu quả của vắc xin Rotavin-M1**
 - Hiệu quả vắc xin: $VE = (1 - OR) * 100\%$, trong đó $OR = \text{Odd}$ của trẻ mắc TCC và xét nghiệm dương tính với RV được uống vắc xin/Odd của trẻ có xét nghiệm âm tính với RV được uống vắc xin
 - Hiệu quả bảo vệ được đánh giá theo mức độ lâm sàng, địa điểm, thời gian, độ tuổi, kiểu gen lưu hành phổ biến...;
- **Mục tiêu 2: Phát hiện tỉ lệ nhiễm và đặc điểm lưu hành của các vi rút (NV, Ast, Sav) ở trẻ em TCC dưới 5 tuổi trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1 tại Nam Định và Huế:**
 - Số ca dương tính và tỉ lệ dương tính với NV, Ast, Sav (gồm cả đơn nhiễm và đồng nhiễm): tổng số, so sánh theo giới tính, tuổi trung vị, mùa (hàng tháng), theo năm, theo độ tuổi, lịch sử uống vắc xin...
 - Tỉ lệ phân bố của các tác nhân gây TCC (RV, NV, Ast, Sav đơn nhiễm và các trường hợp đồng nhiễm) theo năm, theo địa điểm, theo độ tuổi.
 - Sự phân bố các nhóm/kiểu gen NV, Ast, Sav: theo năm, theo điểm nghiên cứu.
 - Phân nhánh các kiểu gen của Ast và so sánh với chủng tham chiếu.

2.3. Nội dung nghiên cứu và kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

2.3.1. Thu thập dữ liệu nghiên cứu từ tháng 12/2016-11/2017

Các thông tin về nhân khẩu học, triệu chứng lâm sàng, tình trạng uống vắc xin của mỗi ca TCC tham gia giám sát TCC được Dự án “Đánh giá hiệu quả của vắc xin phòng tiêu chảy do vi rút Rota ở trẻ em tại Việt Nam” cung cấp thông qua phiếu điều tra thông tin của mỗi trẻ. Tổng số trẻ TCC nhập viện dưới 5 tuổi trong thời gian này là 2.312 trẻ.

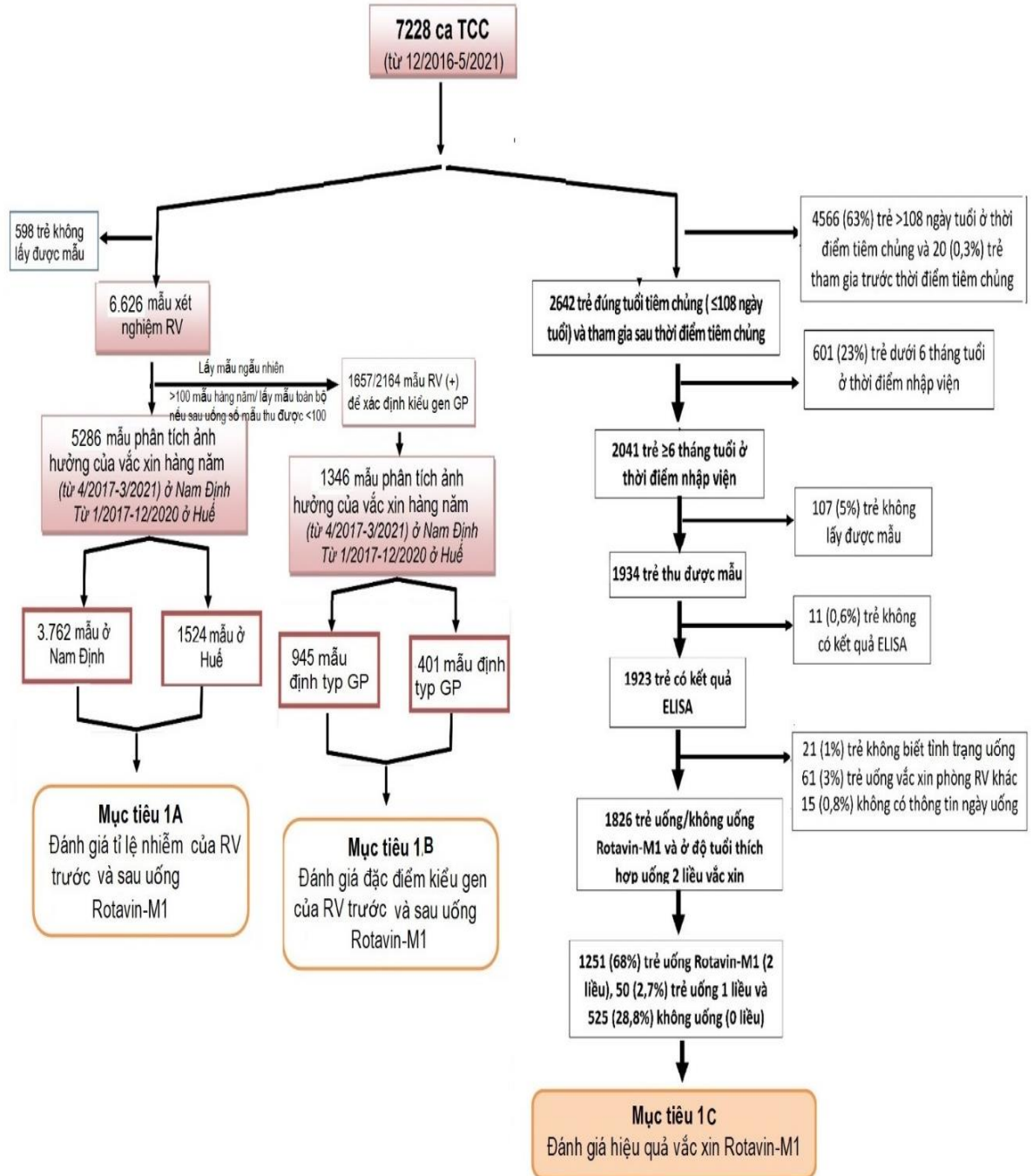
Ngoài ra, mẫu bệnh phẩm thu thập từ tháng 12/2016-11/2017 của các trẻ TCC được nhóm nghiên cứu của Dự án bảo quản và cung cấp.

Các nội dung nghiên cứu ở giai đoạn 12/2016-11/2017 (trước uống) và 12/2017-5/2021 (sau uống) như: lựa chọn đối tượng, thu thập thông tin, nhập dữ liệu, lấy và bảo quản mẫu bệnh phẩm... được thực hiện theo đúng quy trình được mô tả ở mục 2.3.2. để đảm bảo sự tương đồng của nghiên cứu.

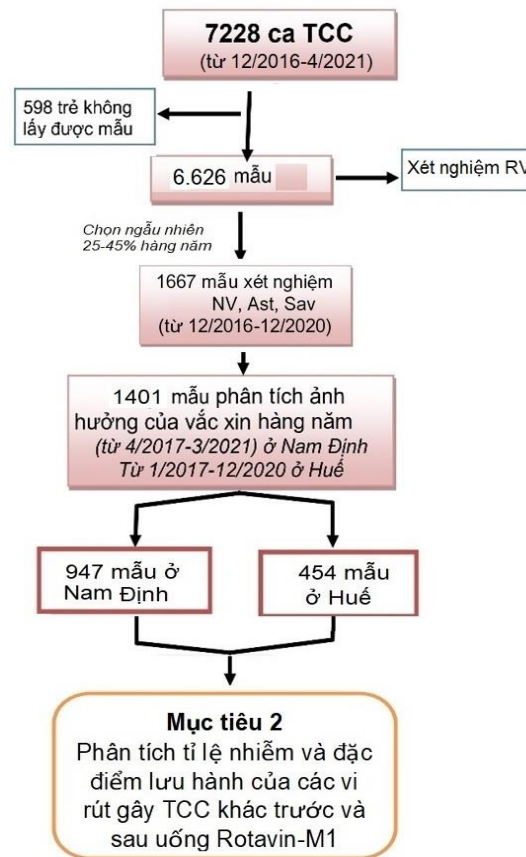
2.3.2. Nội dung nghiên cứu (từ 12/2017-5/2021)

2.3.2.1. Tuyển chọn đối tượng tham gia nghiên cứu

Sơ đồ lựa chọn đối tượng tham gia nghiên cứu như sau:



Hình 2.3. Sơ đồ tóm tắt tuyển chọn đối tượng đủ tiêu chuẩn để đánh giá tác động của vắc xin Rotavirin-M1 đến tỉ lệ nhiễm RV (mục tiêu 1A) và đặc điểm kiểu gen GP (mục tiêu 1B) và đánh giá hiệu quả vắc xin (mục tiêu 1C)



Hình 2.4. Sơ đồ tuyển chọn mẫu cho phát hiện tỉ lệ nhiễm và đặc điểm lưu hành của các vi rút Noro, Astro và Sapo (mục tiêu 2)

❖ Tuyển chọn đối tượng tham gia đánh giá tác động của vắc xin đến số ca và tỉ lệ nhiễm RV (mục tiêu 1A):

- Sau khi tuyển chọn và loại trừ theo quy định, giai đoạn từ tháng 12/2017-5/2021 thu thập được 4.916 trẻ <5 tuổi nhập viện;
- Để đánh giá tác động của vắc xin đến số ca và tỉ lệ nhiễm RV do TCC giai đoạn trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1, lựa chọn toàn bộ 7228 trẻ <5 tuổi nhập viện do TCC từ tháng 12/2016-5/2021, trong đó có 6626 mẫu (92%) được xét nghiệm RV tại các bệnh viện tại Nam Định và Huế để phân tích đặc điểm chung của quần thể và tỉ lệ nhiễm RV theo giới tính, theo mùa.
- Lựa chọn phân tích các mẫu từ tháng 4/2017 -3/2021^(*) ở Nam Định (3762 mẫu) và từ tháng 1/2017-12/2020 ở Huế (1528 mẫu) để phân tích thay đổi về số ca TTC do RV, tỉ lệ nhiễm hàng năm theo các biến số liên quan trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1.

(*) Do đặc điểm mùa nhiễm RV ở Nam Định kết thúc vào tháng 3 hàng năm nên năm trước uống sẽ được tính từ tháng 4/2017-3/2018 mặc dù, vắc xin được sử dụng từ tháng 12/2017 nhưng tỉ lệ bao phủ vắc xin Rotavin-M1 vẫn thấp từ tháng 1 đến tháng 3/2018 (<25%).

❖ Tuyển chọn đối tượng tham gia đánh giá tác động của vắc xin đến đặc điểm kiểu gen của RV (mục tiêu 1A)

- Lựa chọn ngẫu nhiên tổng số 1657/2164 (76,6%) mẫu xét nghiệm dương tính với RV được xác định kiểu gen GP, trong đó có 1187 mẫu ở Nam Định và 470 mẫu ở Huế từ tháng 12/2016-5/2021. Trong đó, năm trước uống vắc xin, chọn 40-50% mẫu RV dương tính ở mỗi địa điểm. Các năm sau uống vắc xin lựa chọn các mẫu RV dương tính để định typ mẫu có giá trị OD khi thực hiện ELISA trên giới hạn border line, có khoảng >80% mẫu dương tính được xác định kiểu gen.
- Phân tích 945/1187 mẫu ở Nam Định (4/2017-3/2021) và 401/471 mẫu ở Huế (1/2017-12 /2020) để so sánh sự khác biệt hàng năm giai đoạn trước và sau uống ở Nam Định.
- Chọn tất cả mẫu G1P[8] tái nổi ở Nam Định năm 2021 (giải trình tự được 26 mẫu);
- Chọn ngẫu nhiên 14 mẫu chủng G8P[8] từ 2016-2021 để phân tích di truyền.

❖ Tuyển chọn đối tượng tham gia đánh giá hiệu quả vắc xin Rotavin-M1 (mục tiêu 1B)

- Sau khi tuyển chọn và loại trừ theo quy định, có 1.826 trẻ đã được lấy mẫu phân, xét nghiệm RV và xác định tình trạng uống vắc xin Rotavin-M1 đủ điều kiện để đánh giá hiệu quả vắc xin, trong đó 1251 (68,5%) trẻ đã uống đầy đủ 2 liều, 50 (2,7%) trẻ uống 1 liều và 525 (28,8%) không uống vắc xin Rotavin-M1.
- Có 1655/1.826 (90,6%) trẻ đủ điều kiện phân tích hiệu quả vắc xin trẻ trong độ tuổi 6- 24 tháng và uống đủ 2 liều. Trong đó có 423 ca bệnh và 1232 ca chứng, đạt tỉ lệ gần 1:3, đảm bảo độ chính xác cao khi đánh giá hiệu quả vắc xin.

❖ Tuyển chọn đối tượng tham gia phát hiện tỉ lệ lưu hành NV, Ast và Sav trước và sau uống Rotavin-M1 (mục tiêu 2)

- Lấy mẫu ngẫu nhiên từ 25-45% tổng số mẫu của trẻ TCC thu thập hàng năm để kiểm tra các tác nhân NV, Ast, Sav (N=1667).
- Toàn bộ 370 mẫu NV được phân tích nhóm gen lưu hành, 51 chủng Ast và 40 chủng SaV được xác định kiểu gen lưu hành phổ biến.

2.3.2.2. *Kỹ thuật thu thập thông tin*

Tất cả trẻ tham gia nghiên cứu hoàn thiện phiếu chấp nhận tham gia nghiên cứu bằng văn bản (phụ lục 01) với xác nhận của bố/mẹ/người đại diện hợp pháp của trẻ và nghiên cứu viên. Mỗi trẻ tham gia cần hoàn thành các câu hỏi trong phiếu điều tra để thu thập các thông tin của những trẻ mắc TCC (phụ lục 02) bao gồm:

- Thông tin nhân khẩu học của trẻ (tên, tuổi, giới, ngày sinh, địa chỉ..), thông tin hộ gia đình... được thu thập bằng cách phỏng vấn với cha mẹ / người đại diện hợp pháp của đối tượng;
- Triệu chứng lâm sàng và thông tin điều trị cho bệnh nhân TCC như: tiêu chảy và số ngày tiêu chảy, nôn và số lần nôn, tình trạng mất nước, sốt, truyền dịch... theo hồ sơ bệnh án của trẻ ở bệnh viện
- Lịch sử uống vắc xin: các vắc xin phòng TCC do RV và các vắc xin khác trong TCMR được cán bộ tiêm chủng tuyến cơ sở ghi chép. Lịch sử uống vắc xin của trẻ đã xác nhận từ một bản sao sổ tiêm chủng cá nhân của trẻ, sổ quản lý tiêm chủng ở Trung tâm y tế xã hoặc thông tin trong phần mềm quản lý tiêm chủng.
- Các thông tin được bác sỹ điều trị, cán bộ tiêm chủng tuyến xã ghi chép vào mẫu báo cáo (phụ lục 2). Bộ phiếu điều tra được thiết kế để thu thập các thông tin của những trẻ mắc TCC.

Kết quả chẩn đoán của mỗi mẫu bệnh phẩm (gắn với mã số nghiên cứu của mỗi trẻ) được cán bộ phòng thí nghiệm điền vào phiếu trả lời kết quả, có ký xác nhận của cán bộ thực hiện và trưởng phòng thí nghiệm.

2.3.2.3. *Lấy mẫu, bảo quản bệnh phẩm*

Tại các điểm giám sát, mẫu phân (5-10 ml) thu được từ mỗi trường hợp nhập viện do TCC. Mẫu phân được thu thập từ tất cả các trường hợp tham gia trong vòng

48 giờ sau nhập viện để tránh nhiễm trùng bệnh viện. Mẫu phân được đặt trong một tuýp có nắp vô trùng và có nhãn đúng với thông tin đó bao gồm một số nhận dạng duy nhất và ngày thu thập.

Mẫu phân được bảo quản -20°C tại bệnh viện và chuyển đến Viện VSDTTU hàng tháng để làm xét nghiệm. Mẫu được san ra các tube thích hợp để kiểm tra các tác nhân gây bệnh TCC và được lưu trữ tại khoảng -70 °C để bảo quản mẫu trong thời gian dài.

2.3.2.4. *Chọn mẫu ngẫu nhiên xét nghiệm*

Sau khi thông tin của mỗi trẻ được nhập liệu (bộ phiếu điều tra như ở phụ lục 02), sử dụng phần mềm SPSS để lựa chọn ngẫu nhiên mẫu khi làm xét nghiệm dựa trên tổng số ca TCC thu thập trong năm, cỡ mẫu cần thiết và tỉ lệ mẫu lấy ngẫu nhiên.

2.3.2.5. *Triển khai uống vắc xin Rotavin-M1 cho trẻ từ 8-16 tuần (từ 12/2017-11/2020)*

- Rotavin-M1 trong nghiên cứu này sẽ được triển khai sử dụng đại trà tại 6 huyện: Hải Hậu, Trực Ninh, Xuân Trường và Giao Thủy (Nam Định) và Hương Trà, Phú Vang (TT.Huế) với số lượng khoảng 16.000-19.000 trẻ/năm.
- Từ 12/2017-11/2021, hàng tháng vắc xin Rotavin-M1 được cung cấp để uống theo lịch uống đầy đủ cho trẻ từ 8 tuần tuổi cùng thời điểm trẻ đến tiêm vắc xin 5:1 và uống OPV tại trạm y tế xã.
- Tất cả trẻ em từ 56-108 ngày tuổi sẽ được uống liều 1, liều thứ 2 được uống sau liều 1 là 1 tháng. Trong trường hợp chống chỉ định tại thời điểm uống vắc xin (do sức khỏe), trẻ sẽ được mời quay lại vào tháng sau. Liều trình vắc xin Rotavin-M1 cần hoàn thiện trước khi trẻ 6 tháng tuổi, theo khuyến cáo của nhà sản xuất, đã được Bộ Y tế phê duyệt.
- Quy trình bảo quản, khám sàng lọc trước uống, uống vắc xin, theo dõi các phản ứng sau tiêm, xử lý lọ sau tiêm theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất và theo đúng quy định tiêm chủng hiện hành.

2.3.2.6. *Các phương pháp xét nghiệm và phân tích di truyền*

a) *Phát hiện RV nhóm A bằng ELISA:*

Tất cả mẫu phân sau khi thu thập được kiểm tra sự hiện diện của kháng nguyên RV nhóm A ở người bằng bộ sinh phẩm Rotaclone thương mại (Meridian Bioscience,

Inc., Ohio, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Phương pháp này đã được TCYTTG phê duyệt trong việc đánh giá RV là nguyên nhân gây TCC [179]. Chi tiết được mô tả trong phụ lục 5.

b) Tách chiết axit nucleic:

Axit nucleic từ các mẫu vi rút được chiết xuất bằng hệ thống tự động QIAcube HT sử dụng bộ chiết xuất Cador Pathogen 96 Qiacube HT hoặc sử dụng QIAamp Viral RNA minikit (Qiagen, Hilden, Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Axit nucleic được bảo quản ở - 70° C cho đến khi phân tích. Chi tiết được mô tả trong phụ lục 6.

c) Phương pháp RT-PCR để xác định kiểu gen G, gen P của RV:

Các vùng gen VP7 và VP4 được khuếch đại bằng cách phản ứng RT-PCR sử dụng bộ sinh phẩm Qiagen Onestep RT-PCR (Qiagen, Hilden, Đức). Để xác định kiểu gen G, sử dụng các đoạn mồi theo hướng dẫn của Fujii và cộng sự [59], các đoạn mồi để xác định kiểu gen P được sử dụng theo Esona và cộng sự [56].

Điều kiện của phản ứng khuếch đại là: 50°C trong 30 phút, 95°C trong 15 phút và tiếp theo là 40 chu kỳ 94°C trong 1 phút (VP7) / 30 giây (VP4), 50°C trong 30 giây và 72°C trong 1 phút (VP7) / 45 giây (VP4) với bước kéo dài cuối cùng là 72°C trong 10 phút. Các sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2% và xác định kích thước dựa trên thang ADN 100 bp. Dựa trên kích thước đoạn gen của VP7-G1 và VP4-P[8] xác định kiểu gen G và P tương ứng với mỗi cặp mồi sử dụng (Chi tiết ở Phụ lục 7).

d) Phát hiện và xác định NV và nhóm gen NV bằng Multiplex Real-time RT – PCR

Các kiểu gen GI, GII và GIV của NV được phát hiện bằng cách sử dụng một bộ mồi và đầu dò theo hướng dẫn của Trujillo và cộng sự năm 2006 [165]. Các thành phần khác được chuẩn bị từ SuperScrip III platinum One-step qRT-PCR kit (Thermofisher, USA). Các điều kiện của phản ứng realtime RT-PCR như sau: 50°C trong 30 phút, 95°C trong 10 phút, 45 chu kỳ 94°C trong 20 giây, 60°C trong 60 giây.

Chu trình nhiệt được thực hiện trên máy Rotogen Q (Qiagen) và dữ liệu được phân tích bằng phần mềm Rotor Gene Q. Chi tiết trong Phụ lục 8.

e) Phát hiện vi rút Astro, Sapo bằng Multiplex Real-time RT-PCR:

Sử dụng đa cặp mồi và đầu dò theo hướng dẫn của Logan và cộng sự, 2007 [99] và Oka và cộng sự, 2006 [123]. Các thành phần khác từ SuperScrip III platinum

One-step qRT-PCR kit (Thermofisher, USA). Các điều kiện của phản ứng Realtime RT-PCR như sau: 50°C trong 30 phút, 95°C trong 15 phút, 45 chu kỳ 95°C trong 20 giây, 57°C trong 60 giây.

Chu trình nhiệt được thực hiện trên máy Rotogen Q (Qiagen) và dữ liệu được phân tích bằng phần mềm Rotor Gene Q. Chi tiết trong Phụ lục 9.

f) *Chuẩn bị mẫu để giải trình tự gen VP4 và VP7 của vi rút Rota chủng G1P[8] và vi rút Astro theo nguyên lý Sanger:*

Sử dụng cặp mồi Beg9-End9 để nhân bản đoạn gen VP7 (1062bp) và Con2-Con3 và kit Onestep RT-PCR (Qiagen- Hilden, Đức) để nhân bản đoạn gen VP4 (876bp) của 26 chủng RV G1P[8] trước khi giải trình tự [179].

Tương tự với Ast, sử dụng hệ mồi PreCAP1/82b (719 bp) để nhân bản đoạn gen của 51 mẫu Ast (2016-2021) [184]. Các bước nhân bản và tinh sạch xem chi tiết trong Phụ lục 10. Gửi mẫu tinh sạch được gửi đến hãng MacroGen – Hàn Quốc để giải trình tự theo nguyên lý Sanger.

g) *Giải trình tự 11 đoạn gen bằng phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới (NGS):*

Toàn bộ hệ gen của 14 chủng G8P[8] được giải trình tự với bộ kit NEBNext Ultra II RNA Library Prep kit for Illumina (New England BioLabs Inc., MA, USA) trên máy Illumina Miseq (Illumina, California, USA).

ARN sau khi tách chiết được xử lý loại bỏ ADN bằng kit DNase I (New England Biolabs, Massachusetts, Mỹ) ở 37°C trong 30 phút. Tủa ARN với dung dịch LiCl 2M trong 16h ở 4°C. Sau khi tủa, ly tâm 12000rpm trong 30 phút ở 4°C để thu dịch nổi và tinh sạch ARN bằng hạt từ Agencourt RNAClean XP Beads (Beckman Coulter, California, Mỹ). Nồng độ ARN đưa vào thư viện thuộc khoảng 5-1000ng. Bộ sinh phẩm Ultra II RNA library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs, Massachusetts, Mỹ) và NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (New England Biolabs, Massachusetts Mỹ) được sử dụng để tạo ra các phân đoạn thư viện có độ dài khoảng 300bp đã gắn mã adaptor theo hướng dẫn của nhà sản xuất, thư viện được tinh sạch bằng các hạt từ AMPure XP (Beckman Coulter, California, Mỹ). Các phân đoạn thư viện được chạy phân tích trên hệ thống máy MiSeq sequencer (Illumina, California, Mỹ) với bộ sinh phẩm MiSeq v2 (300cycles) kèm theo. Chi tiết trong Phụ lục 11.

- h) *Giải trình tự vi rút Sapo bằng phương pháp NGS:* gửi mẫu đi Viện Quốc gia các bệnh truyền nhiễm Nhật Bản (NIID) thực hiện.
- i) *Lập cây phát sinh chủng loại*

Các đoạn trình tự Nucleotide tham chiếu được tải xuống từ Genbank với các chủng đại diện cho các nhánh của VP7-G1 và VP4-P[8] của G1P[8], đại diện kiểu gen chủng G8P[8], đại diện cho các kiểu gen bên trong của bộ gen RV (kiểu gen giống Wa và DS-1), các chủng vắc xin và các chủng đại diện cho từ các nghiên cứu trước tại Việt Nam và thế giới được đưa vào phân tích.

Mã số định danh trên Genbank của mỗi chủng đã được ghi trước tên mỗi chủng trên cây phát sinh chủng loại. Chọn chủng đại diện, khác kiểu gen/nhóm gen để làm Outgroup của mỗi cây phát sinh chủng loại.

Sử dụng phần mềm Mega 11 (<https://www.megasoftware.net/>) để căn chỉnh và phân tích tỉ lệ tương đồng nucleotide và acid amin. Xây dựng cây phát sinh chủng loại của các đoạn gen RV bằng phần mềm Mega 11, phương pháp Maximum-likelihood, với bootstrap 1000 lần để đánh giá độ tin cậy của các nhánh, lựa chọn mô hình tham số thích hợp cho mỗi gen (find best model). Sử dụng mô hình tham số GTR+G+I cho gen VP1, VP2 và VP3, mô hình GTR+G cho gen VP4, mô hình T92+G+I cho gen VP6, VP7, mô hình T92+G cho NSP1, NSP2, và NSP5 và mô hình T92+G+I cho gen NSP3 và NSP4 trong phần mềm Mega 11.

Xác định các biến đổi acid amin được thực hiện bằng phần mềm Geneious Prime (<https://www.geneious.com/download/>).

2.6.2.7. Phân tích số liệu

a) *Nhập dữ liệu*

Nhập dữ liệu điều tra ca bệnh, mẫu phân, kết quả xét nghiệm mẫu RV dương tính/âm tính, kết quả định typ được nhập bằng phần mềm Epi Info (CDC, Mỹ). Dữ liệu ca bệnh, mẫu phân được nhập hàng tháng ngay sau khi nhận được phiếu điều tra và mẫu bệnh phẩm từ địa phương gửi về. Kết quả xét nghiệm mẫu RV dương tính/âm tính, kết quả định typ được nhập ngay khi có kết quả xét nghiệm.

b) *Xử lý số liệu*

- Các phân tích thống kê sẽ được tiến hành bằng phần mềm SPSS 22.0 (IBM, New York, USA) chạy trên nền Windows.

- Với các biến phân hạng, áp dụng kiểm định Khi bình phương 2 phía hoặc kiểm định Fisher để so sánh hai tỉ lệ của hai nhóm độc lập.
- Với biến định lượng (như tháng tuổi, điểm Vesikari), trong giai đoạn trước và sau khi giới thiệu vắc xin được so sánh bằng cách sử dụng kiểm tra tổng xếp hạng Wilcoxon (Wilcoxon rank sum test).
- Sử dụng mô hình tuyến tính tổng quát với hồi quy log nhị phân để ước lượng nguy cơ quy thuộc có hiệu chỉnh (OR adj) và khoảng tin cậy 95%. Tiêu chuẩn để lựa chọn vào mô hình đa biến sử dụng phương pháp thêm biến tiến cứu có lựa chọn kèm thêm các tiếp cận phù hợp đặc tính sinh học. Giá trị P nhỏ hơn 0,05 được coi là có ý nghĩa thống kê. Công thức tính hiệu quả vắc xin: $VE = (1 - OR) * 100\%$.

2.4. Không chế sai số

Nghiên cứu này sử dụng kỹ thuật phòng thí nghiệm chuẩn đã được thẩm định nên có độ chính xác cao, thiết bị, dụng cụ phòng thí nghiệm đạt yêu cầu, nhân viên xét nghiệm được đào tạo đầy đủ quy trình, số liệu được ghi chép và nhập đầy đủ trên các phần mềm quản lý đạt chất lượng nên sẽ hạn chế được sai số.

Các thông tin về lịch sử uống vắc xin vắc xin Rotavin-M1 và các vắc xin khác trong chương trình TCMR được điều tra bởi các cán bộ tiêm chủng dựa trên nhiều nguồn thông tin khác nhau như: sổ tiêm chủng cá nhân, sổ theo dõi tiêm chủng của cơ sở tiêm chủng, thông tin trong phần mềm TCQG... và in kèm theo phiếu điều tra. Ngoài ra, cán bộ nghiên cứu tăng cường kiểm chéo, ngẫu nhiên các thông tin cán bộ tiêm chủng cấp cơ sở cung cấp với các thông tin trên phần mềm TCQG.

Ca bệnh với các định nghĩa chính xác, tiêu chuẩn chọn lọc và tiêu chuẩn loại trừ, thông tin uống vắc xin được xác minh và kiểm soát về tuổi trong nghiên cứu bệnh - chứng TNC. Do đó sai số được giảm thiểu rất nhiều. Tuy nhiên, những sai số tiềm năng khác có thể đảm bảo sẽ được xem xét.

Ca bệnh viêm dạ dày ruột do RV có thể không được xác định bởi các hệ thống giám sát vì họ không thể cung cấp một mẫu phân trước khi xuất viện hoặc không đủ cơ sở vật chất cần thiết khi đang tiến hành giám sát. Một số trẻ em bị viêm dạ dày ruột do RV có thể không được chăm sóc y tế, trong khi những trẻ khác có thể tới điều trị ở một bệnh viện khác. Nếu ca bệnh không tới các bệnh viện tham gia, và có khó

tiếp cận với dịch vụ chăm sóc sức khỏe kém, trẻ đó có thể có ít cơ hội để nhận vắc xin phòng TCC do RV hơn ca bệnh tới các bệnh viện. Sự sai số lựa chọn này có thể dẫn đến một đánh giá thấp hiệu quả vắc xin.

Một hình thức sai số khác lựa chọn xuất phát từ sự khác biệt tiềm tàng giữa các bậc cha mẹ đồng ý tham gia vào việc đánh giá và những người từ chối. Ví dụ, cha mẹ có con em bị bệnh nặng có thể từ chối tham gia vào việc đánh giá. Để giảm thiểu vai trò của sự sai số này, cha mẹ từ chối không tham gia nghiên cứu sẽ được hỏi lý do từ chối của họ, và cán bộ y tế sẽ nỗ lực giải thích cho cha mẹ trẻ về ý nghĩa của nghiên cứu. Tương tự như vậy, các bậc cha mẹ có con em bị bệnh ít nghiêm trọng có thể được xuất viện trước khi cán bộ y tế tiếp cận họ để điều tra. Gia đình bỏ lỡ cơ hội để tham gia cũng sẽ được coi như một phần của việc đánh giá.

Phòng vãn ca bệnh sẽ được tiến hành trong khu vực riêng bất cứ khi nào có thể. Nhân viên sẽ được đào tạo để trả lời câu hỏi bệnh nhân về các chủ đề nhạy cảm và để cung cấp giấy giới thiệu để nhân viên tư vấn. Các điểm giám sát sẽ duy trì một liên kết giữa tên và định danh duy nhất. Tất cả các tài liệu này sẽ được duy trì trong tủ khóa mà nhân viên có thẩm quyền mới có quyền truy cập. Dữ liệu điện tử sẽ được lưu trữ trong cơ sở dữ liệu mật khẩu bảo vệ mà nhân viên có thẩm quyền mới có quyền truy cập.

2.5. Đạo đức trong nghiên cứu

- Đảm bảo sự riêng tư của đối tượng nghiên cứu. Các thông tin về cá nhân của đối tượng nghiên cứu sẽ được bảo mật theo đúng các quy định của Hội đồng y đức độc lập. Để tránh việc tiết lộ thông tin cá nhân của đối tượng nghiên cứu, tất cả số liệu của đối tượng nghiên cứu sẽ chỉ do cán bộ dự án kiểm tra và phân tích. Sau khi số liệu đã được làm sạch, các thông tin nhận dạng của đối tượng nghiên cứu sẽ được loại bỏ khỏi cơ sở dữ liệu để tránh khả năng nhận dạng ra đối tượng nghiên cứu. Tất cả các thông tin nhận dạng của đối tượng nghiên cứu trong số liệu sẽ không được sử dụng khi phân tích số liệu để bảo vệ sự riêng tư của đối tượng.
- Người tham gia nghiên cứu tham gia hoàn toàn tự nguyện, không ép buộc.
- Người tham gia nghiên cứu có quyền từ chối tham gia nghiên cứu ở bất kỳ thời điểm nào, và mẫu sẽ được loại bỏ.

Do các mẫu nghiên cứu của Luận án được sử dụng hoàn toàn từ Dự án “Đánh giá hiệu quả của vắc xin phòng bệnh TCC do RV ở trẻ em tại Việt Nam. Các vấn đề y đức trong nghiên cứu của luận án đã được Hội đồng Đạo đức của Viện vệ sinh dịch tễ thông qua theo chứng nhận số: IRB-VN01057-19/2016 được phê duyệt ngày 15/7/2016 (Phụ lục 3A) và giấy chứng nhận gia hạn thời gian nghiên cứu đến tháng 5/2021 (phụ lục 3B).

Chương 3- KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Tỷ lệ nhiễm và đặc điểm kiểu gen của vi rút Rota ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1

3.1.1. Số ca và tỷ lệ nhiễm vi rút Rota ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1

3.1.1.1. Đặc điểm chung của các ca tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi

Bảng 3.1. Đặc điểm chung của các ca tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi tại Nam Định và Huế, 12/2016-5/2021

Đặc điểm chung		Nam Định	Huế	Tổng	p
		N (% ^(a))	N (% ^(a))	N (% ^(a))	
Giới tính	Nam	2877 (61,8%)	1547 (60,3%)	4424 (61,2%)	ref
	Nữ	1785 (38,2%)	1019 (39,7)	2804 (38,8%)	0,222
Độ tuổi (tháng)	< 6	571 (12,3%)	375 (14,6%)	946 (13,1%)	ref
	6 - 11	1406 (30,1%)	774 (30,2%)	2180 (30,2%)	0,030
	12-17	1193 (25,6%)	515 (20,1%)	1708 (23,6%)	0,000
	18 - 23	600 (12,9%)	332 (12,9%)	932 (12,9%)	0,072
	24 - 59	892 (19,1%)	570 (22,2%)	1462 (20,2%)	0,749
Tuổi trung vị (tháng) (IQR)		13,5 (8,6-20,7)	13,3 (7,6-22,3)	13,4 (8,2-21,3)	0,694
Mức độ triệu chứng	Nhẹ	1206 (25,9%)	1725 (67,2%)	2931 (40,6%)	ref
	Trung bình-nặng	3456 (74,1%)	841 (32,8%)	4297 (59,4%)	0.000
Điểm Vesikari trung vị (IQR)		11 (9-13)	9 (7-11)	10 (8-12)	0,000
Địa điểm nghiên cứu	Giao Thủy	1186 (25,5%)			
	Hải Hậu	2250 (48,2%)			
	Trực Ninh	576 (12,4%)			
	Xuân Trường	650 (14,0%)			
	Hương Trà		527 (20,5%)		
	Phú Vang		1102 (42,9%)		
	TW Huế ^(b)		937 (36,5%)		
Tổng		4662(100,0%)	2566(100,0%)	7228 (100%)	

^(a) Tỷ lệ phân bố trong quần thể

^(b) Bệnh viện Trung ương Huế dừng tham gia từ 10/2018

Ref: tham chiếu

Bảng 3.1. thể hiện đặc điểm chung của 7.228 trẻ em < 5 tuổi nhập viện do TCC đủ tiêu chuẩn và đồng ý tham gia nghiên cứu từ 12/2016 - 5/2021 với 4.662 trẻ ở Nam Định và 2.566 trẻ ở Huế. Kết quả cho thấy số bé trai nhập viện nhiều hơn bé gái, (61,8% ở Nam Định và 60,3% ở Huế) và phân bố theo giới tính không khác biệt giữa 2 tỉnh ($p>0,05$). Nhóm trẻ TCC từ 6-17 tháng tuổi nhập viện nhiều nhất (>50% ở 2 tỉnh). Tuổi trung vị của trẻ TCC nhập viện là 13,4 tháng tuổi (IQR: 8,2-21,3) và không khác biệt giữa 2 tỉnh ($p>0,05$). Các ca TCC mức nặng và trung bình ở Nam Định cao hơn rõ rệt tỉ lệ này ở Huế ($p=0,000$). Điểm Vesikari trung vị ở Nam Định (11, IQR: 9-13) cao hơn đáng kể ở Huế (9, IQR: 7-11) ($p=0,000$). Ở Nam Định, Hải Hậu thu được nhiều mẫu nhất (48,2%) và thấp nhất là Trực Ninh (12,4%). Ở Huế, 42,9% ca TCC ở Phú Vang, 20,5% ca TCC ở Hương Trà và 36,5% ở bệnh viện TW Huế.

3.1.1.2. Tỉ lệ nhiễm vi rút Rota ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi theo giới tính

Bảng 3.2. Tỉ lệ nhiễm vi rút Rota ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi theo giới tính ở Nam Định và Huế, 12/2016-5/2021

Giới tính	Nam Định		Huế		Tổng	
	n/N (%) RV (+)	p ^(a)	n/N (%) RV (+)	p	n/N (%) RV (+)	p ^(b)
Nam	943/2692 (35,0%)	0,346	356/1340 (26,6%)	0,570	1299/4032 (32,2%)	0,000
Nữ	610/1674 (36,4%)		255/920 (27,7%)		865/2594 (33,3)	0,000
Tổng	1553/4366 (35,6%)		611/2260 (27%)		2164/6626 (32,6%)	

^(a): phân tích khác biệt tỉ lệ nhiễm bằng χ^2 theo giới tính

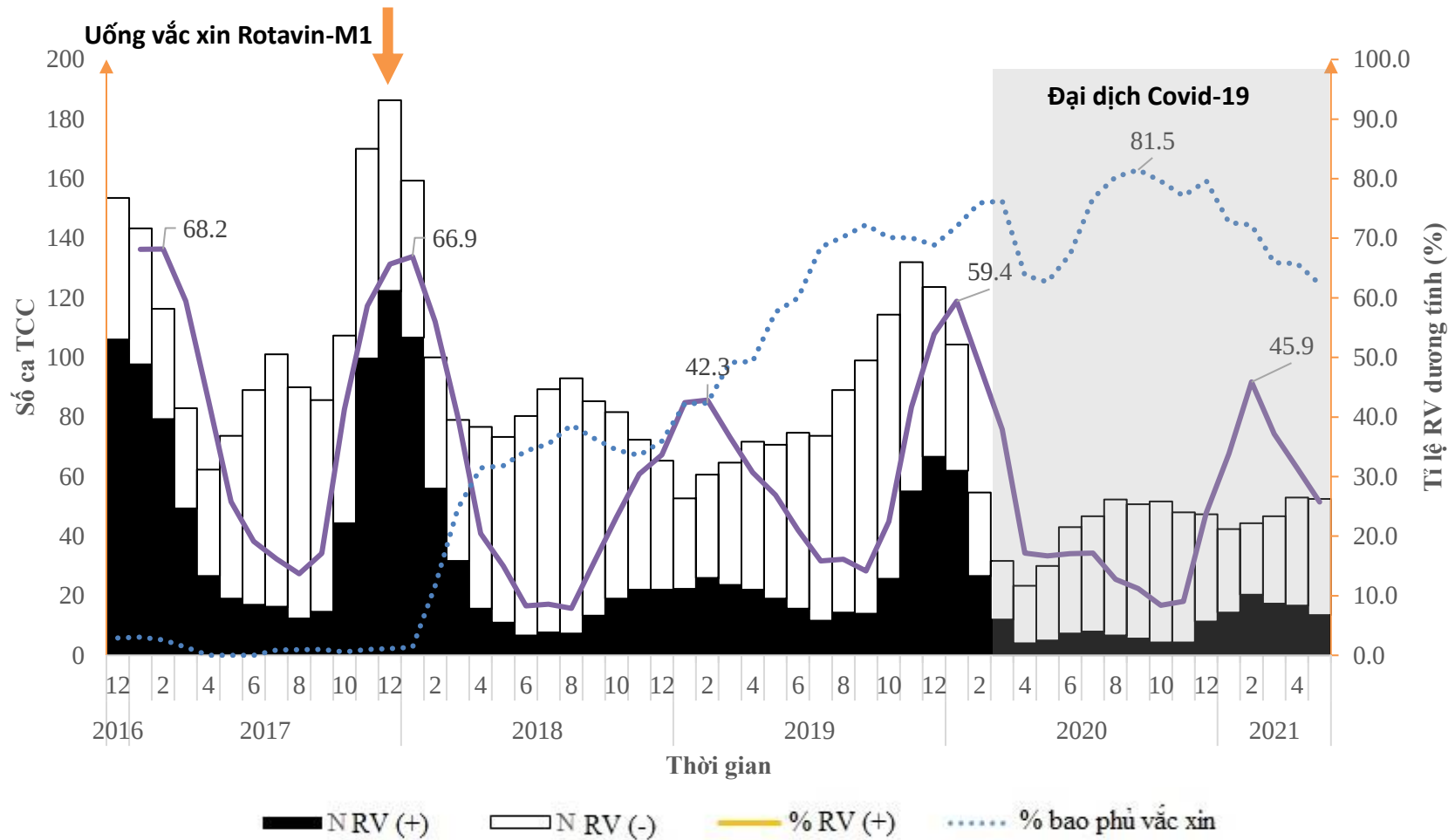
^(b): phân tích khác biệt tỉ lệ nhiễm bằng χ^2 theo địa điểm

Trong số 7228 trẻ TCC tham gia nghiên cứu, có 6.626 trẻ (92%) lấy được mẫu và được xét nghiệm ELISA phát hiện RV trong toàn bộ thời gian nghiên cứu (12/2016-5/2021). Có 2164 mẫu (32,6%) phát hiện dương tính với RV, trong đó có 1553 ca (35,6%) ca ở Nam Định và 611 ca (27,0%) ở Huế (bảng 3.2).

Ở Nam Định, tỉ lệ nhiễm RV ở bé trai là 35,0% và bé gái là 36,4% và sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p>0,05$. Ở Huế, tỉ lệ nhiễm RV ở cả 2 giới đều có thấp hơn ở Nam Định có ý nghĩa thống kê ($p=0,000$), lần lượt 26,6% ở bé trai và 27,7% với bé gái và không khác biệt theo giới ($p>0,05$) (bảng 3.2).

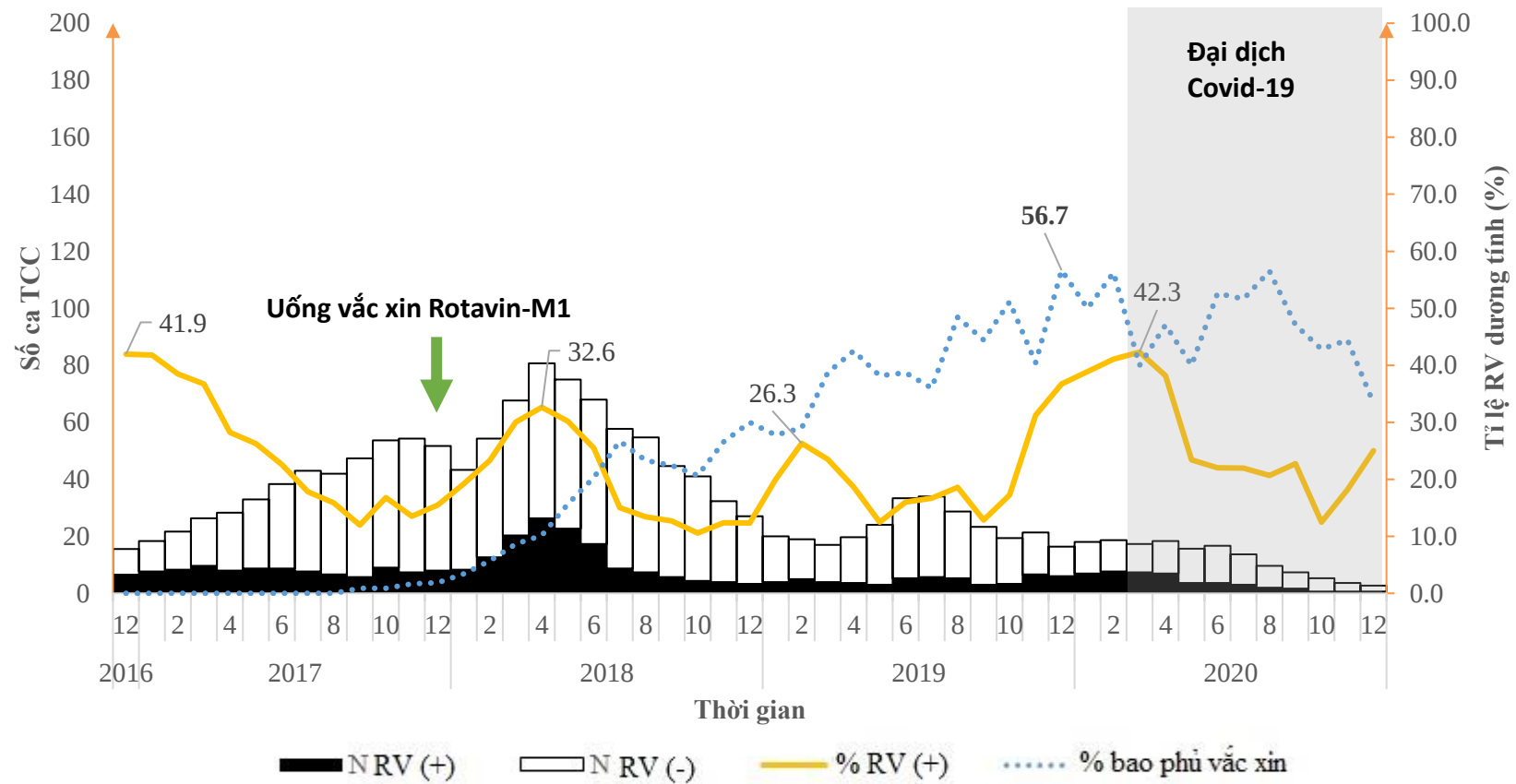
3.1.1.3. Tỷ lệ nhiễm vi rút Rota ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi hàng tháng

A. Nam Định (N=4662)



Hình 3.1A. Số ca và tỷ lệ nhiễm RV hàng tháng tại Nam Định, 12/2016-5/2021

B. T.T. Huế (N=2566)



Hình 3.1B. Số ca và tỉ lệ nhiễm RV hàng tháng tại Huế, 12/2016-5/2021

Kết quả cho thấy ở Nam Định, số ca nhiễm RV và tỉ lệ RV dương tính phân bố rõ rệt theo mùa, cao nhất vào mùa đông (từ tháng 10 năm trước đến tháng 3 năm sau). Tỉ lệ này đạt đỉnh vào tháng 1 năm 2017 và 2018 (tương ứng 68,2% và 66,9%). Tuy nhiên, sau khi triển khai uống Rotavin-M1, đỉnh nhiễm có xu hướng giảm dần với tỉ lệ nhiễm RV cao nhất hàng năm lần lượt là 42,3%, 59,4% và 45,9% từ 2/2019-2/2021. Từ tháng 3/2020, trùng với đại dịch COVID-19 toàn cầu, số ca TCC nhập viện do mọi nguyên nhân đã giảm mạnh. Tỉ lệ bao phủ ít nhất một liều Rotavin-M1 đạt 77% với tháng cao nhất đạt 81,5% (Hình 3.1A).

Tại Huế, mùa lưu hành phổ biến RV từ tháng 1 đến tháng 6 hàng năm. Tỉ lệ nhiễm RV cao nhất vào tháng 12/2016 (41,9%), tháng 4/2018 (32,6%), tháng 2/2019 (26,3%) và 3/2020 (42,3%) nhưng đỉnh nhiễm không rõ rệt. Số ca TCC nhập viện cũng giảm mạnh từ tháng 3/2020, trùng thời điểm với dịch COVID-19. Tỉ lệ bao phủ ít nhất một liều Rotavin-M1 đạt 42%, thấp hơn rõ rệt ở Nam Định (Hình 3.1B).

3.1.1.4. Tỉ lệ nhiễm vi rút Rota ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi hàng năm trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1

Bảng 3.3. Tỉ lệ nhiễm RV ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi hàng năm tại Nam Định (4/2017 - 3/2021) và Huế (1/2017 – 12/2020)

Địa điểm	Giai đoạn	Thời gian	RV dương tính	Mức giảm nguy cơ	Tỉ lệ bao phủ vắc xin
			n / N (%)	RR (95%CI)	n / N (%)
Nam Định (N=3762)	Trước uống	4/2017-3/2018 ^(a)	562/1301 (43,2%)	Ref ^(c)	18/670 (2,7%)
	Sau uống	Năm thứ nhất	190/898 (21,2%)	51,0% (43,6- 57,5%)	243/680 (35,7%)
		Năm thứ hai	339/1039 (32,6%)	24,5% (15,9- 32,2%)	445/681 (66,8%)
		Năm thứ ba ^(b)	103/524 (19,7%)	54,5% (45,3- 62,1%)	315/420 (75,0%)
		Tổng	632/2461 (25,7%)	40,6% (34,8- 45,8%)	1013/1781 (56,9%)
Huế (N=1524)	Trước uống	1/2017 - 12/2017 ^(a)	92/453 (20,3%)	ref	2/320 (0,6%)
	Sau uống	Năm thứ nhất	129/649 (19,9%)	2,1% (-24,3- 22,9%)	73/433 (16,9%)
		Năm thứ hai	62/279 (22,2%)	-9,4% (-45,6- 17,7%)	80/191 (41,9%)

Địa điểm	Giai đoạn	Thời gian	RV dương tính	Mức giảm nguy cơ	Tỉ lệ bao phủ vắc xin
			n / N (%)	RR (95%CI)	n / N (%)
		Năm thứ ba ^(b)	41/143 (28,7%)	-41,2% (-93,7- -3,1%)	49/99 (49,5%)
		Tổng	232/1071 (21,6%)	-6,7% (-32,3- 14,0%)	202/723 (27,9%)

^(a) Mùa nhiễm RV ở Nam Định từ tháng 10 đến tháng 3 năm sau và do 3 tháng đầu năm 2018 tỉ lệ uống thấp (<25%), năm trước uống được tính từ 4/2017-3/2018 và năm thứ nhất, thứ hai, thứ ba sau uống lần lượt từ 4/2018-3/2019, 4/2019-3/2020, 4/2020-3/2021. Ở Huế, mùa nhiễm RV từ tháng 1 đến tháng 6 nên năm nghiên cứu sẽ tính từ tháng 1 đến tháng 12. Năm trước uống từ 1-12/2017 và năm thứ nhất, thứ hai, thứ ba sau uống lần lượt từ tháng 1-12/2018, 1-12/2019 và 1-12/2020.

^(b) Số ca nhập viện do TCC giảm mạnh trong thời gian này do đại dịch COVID-19 toàn cầu.

^(c) Ref: giá trị tham chiếu

Ở Nam Định, số ca TCC nhập viện hàng năm có xu hướng giảm rõ rệt theo thời gian, từ 1301 ca xuống (trước uống) còn 524 ca sau 3 năm triển khai uống vắc xin Rotavin-M1, đặc biệt từ tháng 3 năm 2020 trùng với thời điểm bắt đầu đại dịch COVID-19. Tương tự, số ca dương tính với RV cũng giảm (từ 562 ca (trước uống) còn 103 ca vào năm thứ ba sau uống). Tỉ lệ dương tính với RV giảm đáng kể 40,6% (95%CI: 34,8% - 45,8%) sau 3 năm sau uống vắc xin. Mức giảm tỉ lệ nhiễm RV nhiều nhất ở năm thứ nhất (RR: 51,0 %, 95%CI: 43,6% -57,5%) và năm thứ ba (RR: 54,5%; 95%CI: 45,3% -62,1%) sau uống vắc xin, cao hơn đáng kể so với năm thứ hai sau uống (RR: 24,5%; 95 % CI: 15,9% -32,2%). Tỉ lệ bao phủ với ít nhất một liều Rotavin-M1 tăng từ 35,7% (năm đầu tiên) lên 75,0% (năm thứ ba sau uống vắc xin).

Tỉ lệ dương tính với RV ở trẻ em <5 tuổi ở Huế (20,3%) ở giai đoạn trước khi uống vắc xin thấp hơn rõ rệt ở Nam Định (43,2%). Sau ba năm triển khai uống vắc xin, số ca TCC và số ca TCC do RV có xu hướng giảm vào năm thứ hai và thứ ba sau uống vắc xin. Tuy nhiên, không thấy có sự thay đổi đáng kể nào về tỉ lệ ca dương tính với RV nói chung ở trẻ em <5 tuổi (RR: -6,7%; 95%CI: -32,3% -14,0%) so với giai đoạn trước khi triển khai uống vắc xin Rotavin-M1 (Bảng 3.3). Tỉ lệ bao phủ với ít nhất một liều Rotavin-M1 cho tất cả trẻ em <5 tuổi tăng từ 16,9% trong năm đầu tiên triển khai uống vắc xin Rotavin-M1 lên 49,5% trong năm thứ ba sau uống. Tương tự như Nam Định, số ca TCC nhập viện do mọi nguyên nhân đã giảm mạnh bắt đầu từ tháng 3 năm 2020 trùng với thời điểm bắt đầu đại dịch COVID-19 toàn cầu (Bảng 3.3).

3.1.1.5. Tỷ lệ nhiễm vi rút Rota ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi theo nhóm tuổi

Bảng 3.4. Tỷ lệ nhiễm vi rút Rota ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi hàng năm theo các nhóm tuổi tại Nam Định (4/2017 - 3/2021) và Huế (1/2017 – 12/2020)

Địa điểm	Giai đoạn	Thời gian	Nhóm trẻ <12 tháng tuổi			Nhóm 12-23 tháng tuổi			Nhóm trẻ 24-59 tháng tuổi		
			RV dương tính	Mức giảm nguy cơ	Tỷ lệ bao phủ	RV dương tính	Mức giảm nguy cơ	Tỷ lệ bao phủ	RV dương tính	Mức giảm nguy cơ	Tỷ lệ bao phủ
			n / N (%)	RR (95%CI)	n / N (%)	n / N (%)	RR (95%CI)	n / N (%)	n / N (%)	RR (95%CI)	n / N (%)
Nam Định (N=3762)	Trước uống	4/2017-3/2018 ^(a)	191/565 (33,8%)	ref ^(b)	17/362 (4,7%)	265/518 (51,2%)	ref	1/228 (0,4%)	106/218 (48,6%)	ref	0/80 (0,0%)
	Sau uống	Năm thứ nhất	45/382 (11,8%)	65,2% (53,1- 74,1%)	212/332 (63,9%)	100/363 (27,5%)	46,2% (35,1- 55,3%)	29/248 (11,7%)	45/153 (26,9%)	39,5% (19,9- 54,3%)	2/100 (2,0%)
		Năm thứ hai	96/448 (21,4%)	36,6% (21,7- 48,7%)	280/347 (80,7%)	147/367 (40,1%)	21,7% (9,0- 32,7%)	166/214 (77,6%)	96/224 (42,9%)	11,9% (-8,1- 28,1%)	9/120 (7,5%)
		Năm thứ ba	42/242 (17,4%)	48,7% (30,8- 61,9%)	155/200 (77,5%)	37/180 (20,6%)	59,8% (45,8- 70,2%)	122/143 (85,3%)	24/102 (23,5%)	51,6% (29,6- 66,8%)	38/77 (49,4%)
		Tổng	183/1072 (17,1%)	49,5% (39,8- 57,6%)	647/879 (73,6%)	284/910 (31,2%)	39,0% (30,7- 46,3%)	317/605 (52,4%)	165/479 (34,4%)	29,2% (14,8- 41,1%)	49/297 (16,5%)
Huế (N=1524)	Trước uống	1/2017 - 12/2017 ^(a)	32/211 (15,2%)	ref	2/164 (1,2%)	30/115 (26,1%)	ref	0/83 (0,0%)	30/127 (23,6%)	ref	0/73 (0,0%)
	Sau uống	Năm thứ nhất	44/268 (16,4%)	-8,3% (-64,4- 28,7%)	71/219 (32,4%)	50/214 (23,4%)	10,4% (-32,5- 39,5%)	2/138 (1,4%)	35/167 (21,0%)	11,3% (-36,3- 42,3%)	0/76 (0,0%)
		Năm thứ hai	18/126 (14,3%)	5,8% (-60,6- 44,8%)	51/106 (48,1%)	25/89 (28,1%)	-7,7% (-69,4- 31,5%)	29/60 (48,3%)	19/64 (29,7%)	-25,7% (-105,1- 23,0%)	0/25 (0,0%)
		Năm thứ ba	22/90 (24,4%)	-61,2% (-158,9- 0,6%)	39/67 (58,2%)	13/36 (36,1%)	-38,4% (-135,7- 18,7%)	8/23 (34,8%)	6/17 (35,3%)	-49,4% (-205,6- 27,0%)	2/9 (22,2%)
		Tổng	84/484 (17,4%)	-14,4% (-66,3- 21,2%)	161/392 (41,1%)	88/339 (26,0%)	0,5% (-42,1- 30,3%)	39/221 (17,6%)	60/248 (24,2%)	-2,4% (-50,2- 30,1%)	2/110 (1,8%)

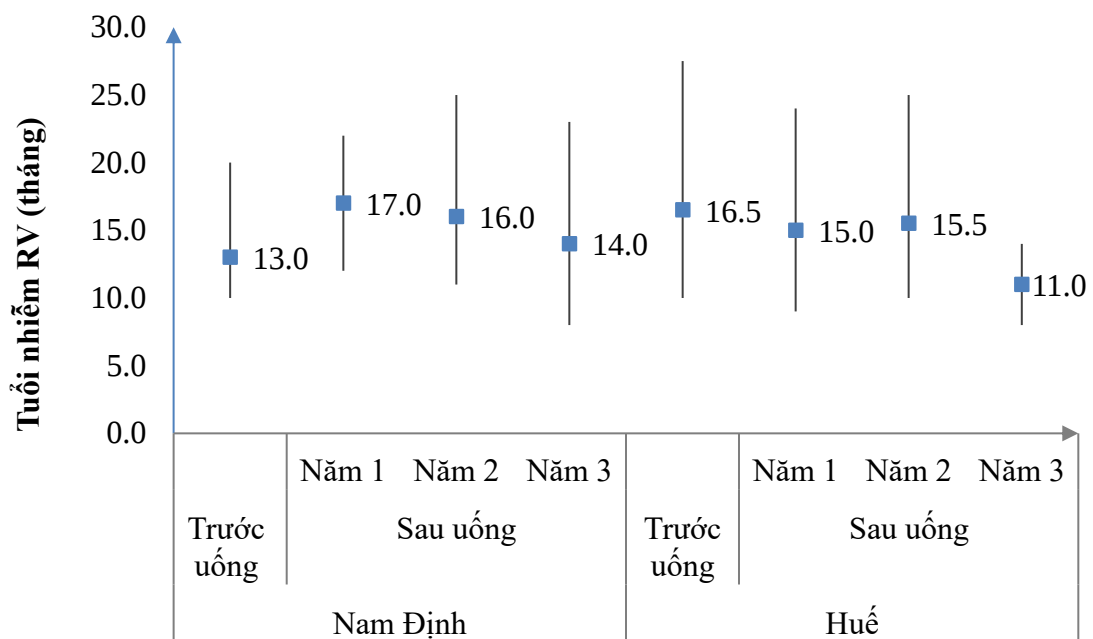
^(a) Năm thứ nhất, thứ hai, thứ ba sau uống ở Nam Định lần lượt từ 4/2018-3/2019, 4/2019-3/2020, 4/2020-3/2021. Ở Huế, năm thứ nhất, thứ hai, thứ ba sau uống lần lượt từ tháng 1/2018-12/2018, 1/2019-12/2019 và 1/2020-12/2020.

^(b) Ref: giá trị tham chiếu

Kết quả ở bảng 3.4 cho thấy ở Nam Định, tỉ lệ nhiễm RV giảm rõ rệt nhất ở trẻ em <12 tháng tuổi và giảm ít nhất ở trẻ em 24-59 tháng tuổi. Với nhóm trẻ < 12 tháng tuổi, mức giảm nguy cơ nhiễm RV là 49,5% (95%CI: 39,8%; 57,6%) sau 3 năm triển khai uống vắc xin, giảm nhiều hơn nhóm trẻ em 24-59 tháng tuổi với RR=29,2% (95%CI: 14,8%; 41,1%). Tỉ lệ bao phủ cao nhất đạt được trong nhóm trẻ <12 tháng tuổi và 12-23 tháng tuổi, đây là các nhóm tuổi đủ điều kiện được uống vào cuối thời kỳ giám sát.

Ở Huế, so với giai đoạn trước khi uống vắc xin, không có sự thay đổi đáng kể nào về tỉ lệ dương tính của RV trong ba năm sau khi triển khai uống vắc xin Rotavin-M1 ở các nhóm tuổi (Bảng 3.4). Tỉ lệ bao phủ cao nhất (58,2%) đạt được ở nhóm <12 tháng tuổi trong năm thứ ba sau khi triển khai uống vắc xin Rotavin-M1. Không có năm nào hoặc nhóm tuổi nào khác đạt được độ bao phủ Rotavin-M1 một liều 50% hoặc cao hơn.

❖ **Tuổi nhiễm vi rút Rota hàng năm:**



Hình 3.2. Tuổi trung vị nhiễm vi rút Rota ở Nam Định (4/2017 - 3/2021) và Huế (1/2017 – 12/2020)

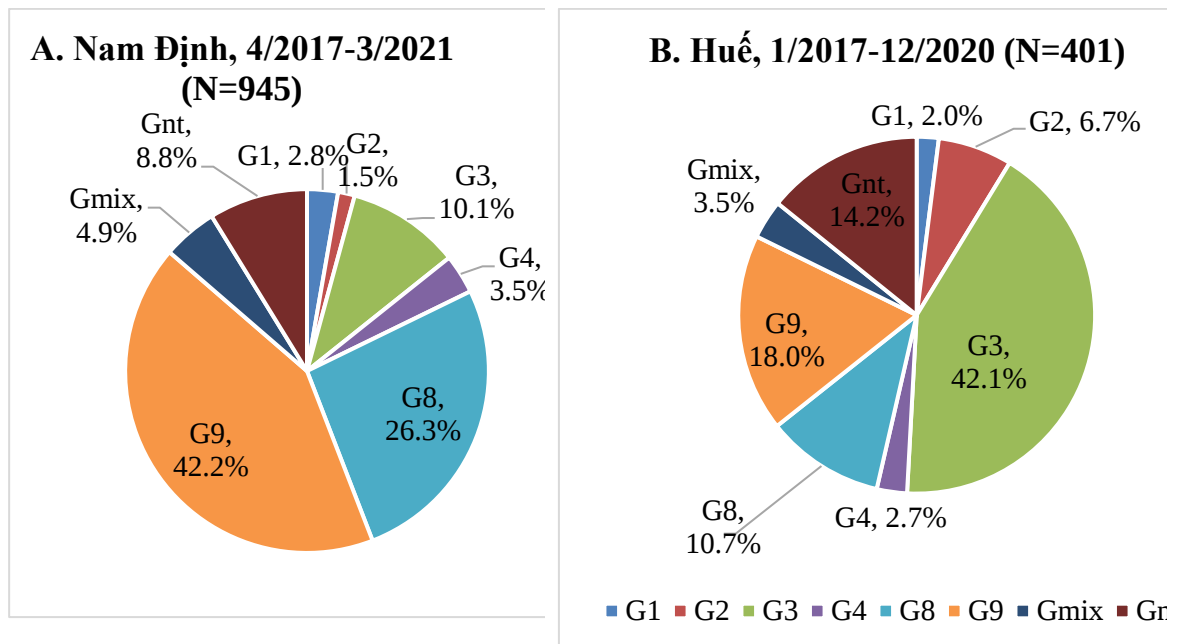
Ở Nam Định, độ tuổi trung vị của trẻ em bị TCC nhập viện do RV tăng từ 13 tháng tuổi (IQR: 10- 20 tháng) trong giai đoạn trước khi triển khai uống vắc xin Rotavin-M1 đến 17 tháng tuổi (IQR: 12-22 tháng; $p = 0,001$) trong năm đầu tiên và

đến 16 tháng tuổi (IQR: 11- 25 tháng; $p = 0,001$) vào năm thứ hai sau khi uống vắc xin. Trong năm thứ 3 sau uống vắc xin Rotavin-M1 xảy ra đại dịch COVID-19 toàn cầu, độ tuổi trung bình trẻ nhiễm RV nhập viện là 14 tháng (IQR: 8-23 tháng tuổi; $p = 0,65$) (Hình 3.2).

Ở Huế, độ tuổi trung vị của trẻ nhập viện do RV không thay đổi đáng kể, từ 16,5 tháng tuổi (IQR: 10- 27,5 tháng tuổi) trong giai đoạn trước khi uống vắc xin so với năm thứ nhất là 15 tháng (IQR: 9- 24 tháng; $p = 0,30$) và năm thứ hai là 15,5 tháng (IQR: 10- 25 tháng; $p = 0,66$) sau khi triển khai uống vắc xin Rotavin-M1 và giảm xuống 11 tháng (IQR: 8- 14 tháng; $p = 0,004$) trong năm thứ ba sau khi triển khai uống vắc xin Rotavin-M1 (Hình 3.2).

3.1.2. Đặc điểm lưu hành kiểu gen của vi rút Rota trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1

3.1.2.1. Đặc điểm phân bố lưu hành các kiểu gen G của vi rút Rota



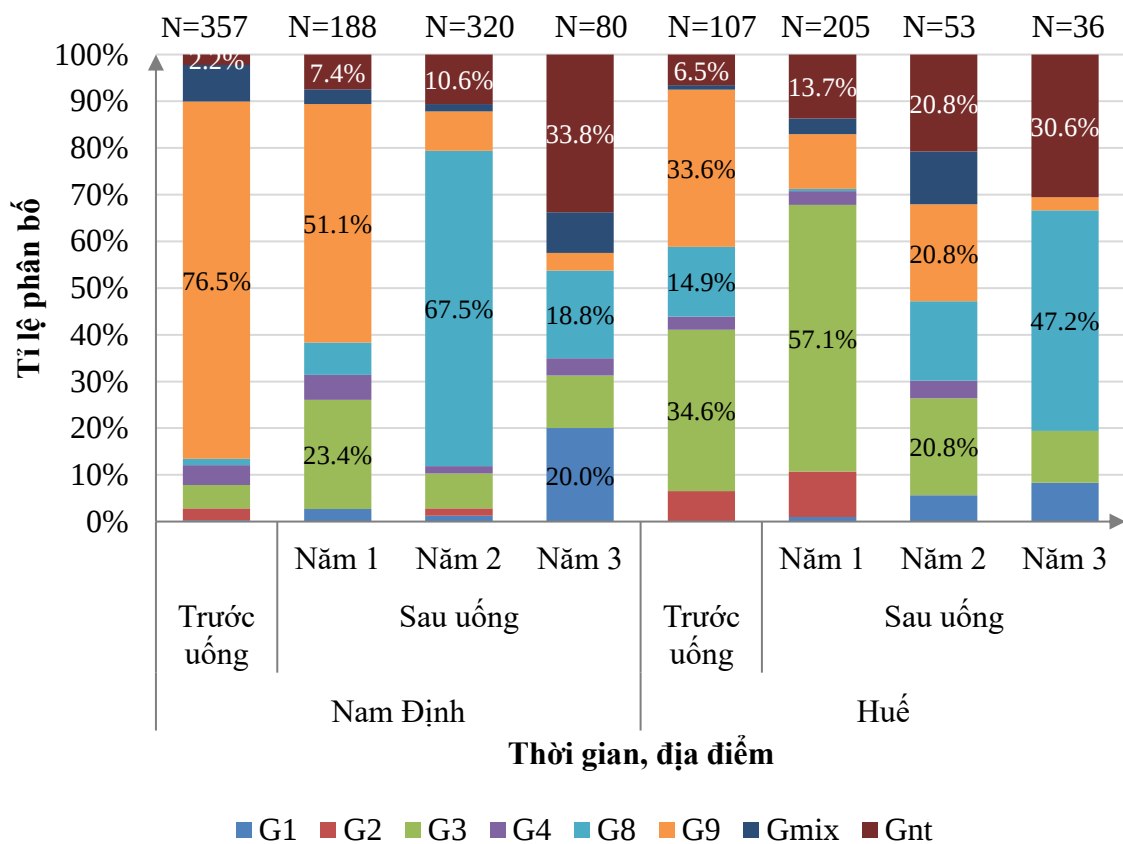
Gmix: Đồng nhiễm các kiểu gen G

Gnt: Không xác định được kiểu gen G

Hình 3.3. Tỷ lệ lưu hành các kiểu gen G của vi rút Rota tại Nam Định, 4/2017-3/2021 và Huế, 1/2017-12/2020

Tương tự như các phân tích ở mục trước, để so sánh sự khác biệt phân bố kiểu gen G hàng năm chúng tôi lựa chọn thời điểm phân tích là 4/2017-3/2021 ở Nam

Định (945/1187 mẫu) và từ 1/2017-12/2020 ở Huế (401/470 mẫu). Kết quả cho thấy ở Nam Định, G9 phổ biến nhất với 42,2%, tiếp đó là G8 (26,3%) và G3 (10,1%). Ngược lại, ở Huế, G3 chiếm tỉ lệ cao nhất với 42,1% và sau đó là G9 và G8 lần lượt chiếm 18,0% và 10,7%. G2 xuất hiện ở Huế (6,7%) nhiều hơn ở Nam Định (1,4%). Chủng G1 đều hiếm gặp ở cả Nam Định và Huế. Tỉ lệ G hỗn hợp gồm nhiều kiểu gen G xuất hiện 4,9% ở Nam Định và 3,5% ở Huế. Các mẫu không xác định được kiểu gen G chiếm 8,8% tổng số mẫu ở Nam Định và chiếm tỉ lệ 14,2% ở Huế (Hình 3.3A và 3.3B).



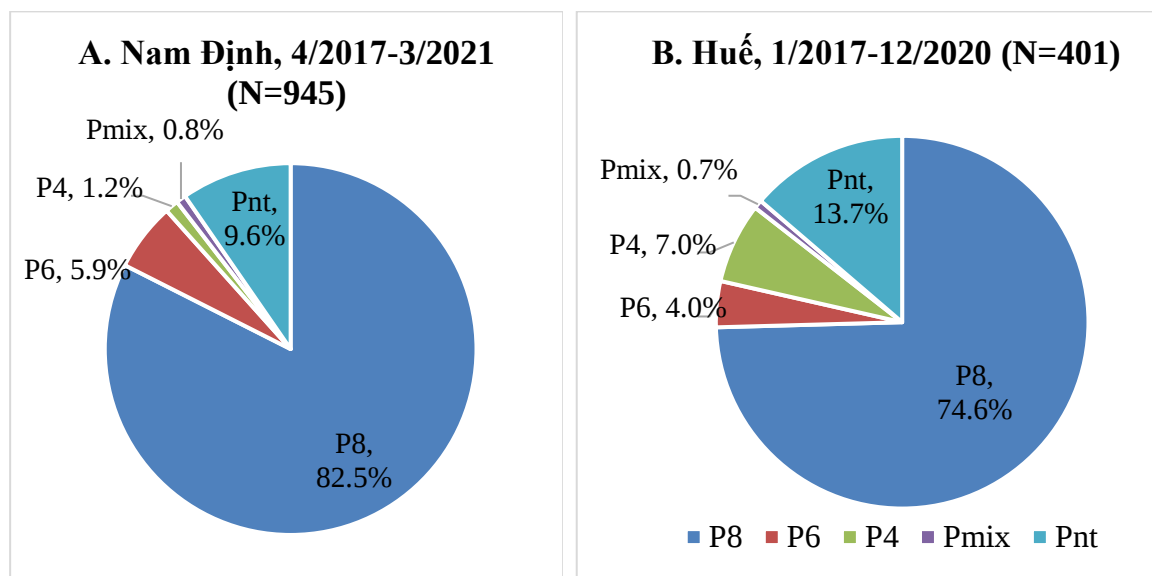
Hình 3.4. Tỉ lệ lưu hành các kiểu gen G của vi rút Rota hàng năm tại Nam Định, 4/2017-3/2021 và Huế, 1/2017-12/2020

Kết quả ở Hình 3.4 thể hiện sự phân bố của mỗi kiểu gen G thay đổi rõ rệt theo thời gian tại Nam Định và Huế. Tại Nam Định, G9 là chủng phổ biến nhất ở Nam Định trong 2 năm từ 4/2017-3/2019 lần lượt chiếm 76,5% và 51,1% nhưng ít xuất hiện trong 2 năm tiếp theo. Ngược lại, G8 hầu như không xuất hiện ở năm trước uống và năm thứ nhất sau uống vắc xin (4/2017-3/2019) nhưng đã chiếm ưu thế lưu hành với 67,5% vào năm thứ hai sau uống nhưng chiếm 18,8% vào năm tiếp theo. Chủng

G1 rất ít gặp trong 3 năm từ tháng 4/2017-3/2019 nhưng đến tháng 4/2020-3/2021 đã trở thành chủng phổ biến nhất với tỉ lệ 20,0%. G3 xuất hiện trong các năm, cao nhất là năm thứ nhất sau uống (4/2108-3/2019) với 23,4%. Các G khác là G2, G4 và G hỗn hợp ít gặp (<7,8%) trong thời gian nghiên cứu. Các trường hợp không xác định kiểu gen G tăng rõ rệt theo thời gian, từ 2,2% ở năm đầu tiên nghiên cứu lên 33,8% ở năm cuối cùng (Hình 3.4).

Ở Huế, sự lưu hành các kiểu gen G cũng có xu hướng thay đổi theo thời gian. G3 là chủng lưu hành phổ biến nhất trong 2 năm đầu từ 2017-2018 với tỉ lệ 34,6% và 57,1% và chiếm tỉ lệ ít dần (20,8% và 11,1%) trong 2 năm tiếp theo. G9 xuất hiện với tỉ lệ cao (33,6%) ở năm trước uống (2017) và ít gặp dần (2,8%-20,8%) trong ba năm uống vắc xin. G8 trở thành chủng phổ biến chiếm 47,2% vào năm 2020 trong khi các năm trước đó chỉ chiếm tỉ lệ <17%. G1 hầu như không xuất hiện từ 2017- 2019, và chiếm 8,3% năm 2020 (Hình 3.4).

3.1.2.2. Đặc điểm phân bố lưu hành các kiểu gen P của vi rút Rota



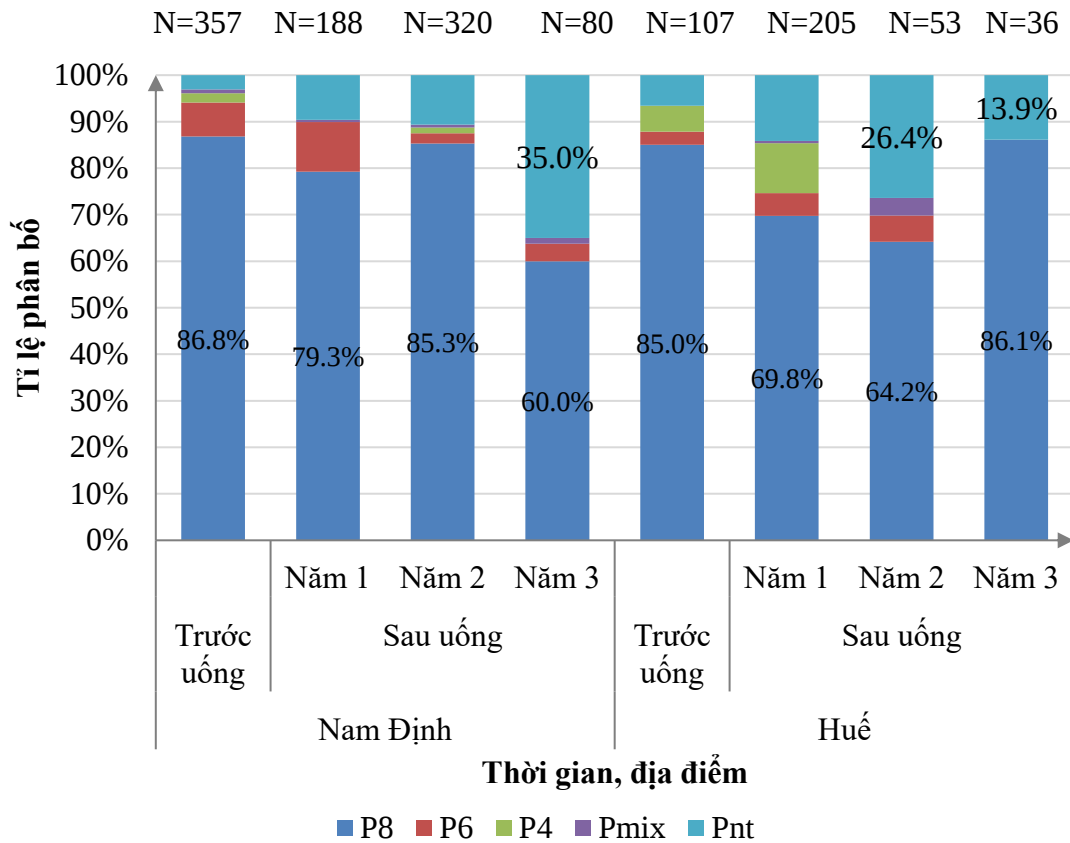
Pmix: Đồng nhiễm các kiểu gen P

Pnt: Không xác định được kiểu gen P

Hình 3.5. Tỉ lệ lưu hành các kiểu gen P của vi rút Rota tại Nam Định, 4/2017-3/2021 và Huế, 1/2017-12/2020

Sự phân bố kiểu gen P tại Nam Định và Huế được thể hiện qua Hình 3.5A và 3.5B. Khác với sự đa dạng của kiểu gen G, sự phân bố của kiểu gen P không khác biệt nhiều giữa 2 địa điểm nghiên cứu. P[8] là kiểu gen lưu hành phổ biến nhất ở Nam

Định (82,5%) và Huế (74,6%). Ở Nam Định, kiểu gen P[6] chiếm tỉ lệ lưu hành 5,9%, cao hơn tỉ lệ 1,2% của kiểu gen P[4]. Ở Huế, P[4] chiếm tỉ lệ 7,0%, cao hơn P[6] chỉ chiếm 4,0%. Có 13,7% trường hợp không xác định được kiểu gen P ở Huế, cao hơn ở Nam Định với tỉ lệ 9,6%.

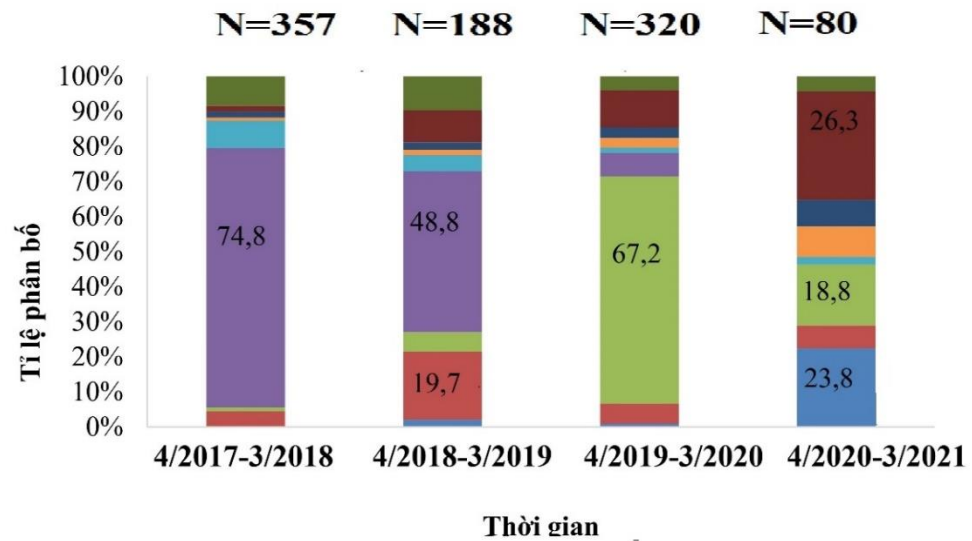


Hình 3.6. Tỉ lệ lưu hành các kiểu gen P của vi rút Rota hàng năm tại Nam Định, 4/2017-3/2021 và Huế, 1/2017-12/2020

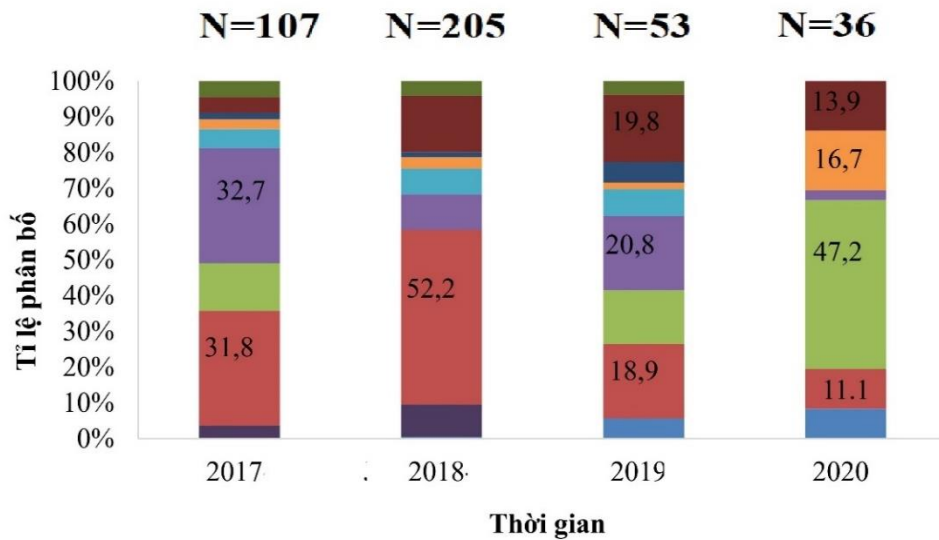
Kết quả ở Hình 3.6 thể hiện tỉ lệ phân bố kiểu gen P hàng năm tại Nam Định và Huế trước và sau uống vắc xin. Sự phân bố lưu hành của mỗi kiểu gen P ít có sự thay đổi theo thời gian. Tại Nam Định và Huế, P[8] là kiểu gen phổ biến nhất trong thời gian nghiên cứu, và có xu hướng giảm theo thời gian. Tỉ lệ không xác định được kiểu gen tăng dần đều theo thời gian từ 3,1% đến 35,0% ở Nam Định và từ 6,5% đến 26,4% ở Huế. Kiểu gen P[6], P[4] và P hỗn hợp ít khi xuất hiện nên không thấy rõ xu hướng thay đổi theo năm.

3.1.2.3. Đặc điểm phân bố lưu hành các tổ hợp kiểu gen GP của vi rút Rota

A. Nam Định (4/2017-3/2021), N=945



B. Huế, 01/2017-12/2020 (N=401)



GPmix: Đồng nhiễm các kiểu gen G và/hoặc P; Gnt: Không xác định được kiểu gen G
Pnt: Không xác định được kiểu gen P; Khác: Các chủng GP hiếm gặp

Hình 3.7. Tỷ lệ lưu hành các kiểu gen GP của vi rút Rota hàng năm tại Nam Định, 4/2017-3/2021 và Huế, 1/2017-12/2020

Kết quả cho thấy ở Nam Định, năm trước khi triển khai uống vắc xin Rotavin-M1 từ tháng 4 năm 2017 đến tháng 3 năm 2018, kiểu gen ưu thế lưu hành là G9P[8] (74,8%). Năm đầu tiên sau uống (tháng 4/ 2018 đến tháng 3/2019), G9P[8] vẫn là kiểu gen phổ biến (48,8%), G3P[8] (19,7%). Kiểu gen G8P[8] (67,2%) chiếm ưu thế lưu hành trong năm thứ hai (tháng 4/2019 đến tháng 3/2020). Trong năm thứ ba sau uống vắc xin (tháng 4/2020 đến tháng 3/2021), G1P[8] (23,8%) và G8P[8] (18,8%) là các kiểu gen phổ biến nhất mặc dù 26,3% mẫu bệnh phẩm dương tính với RV không thể xác định được kiểu gen và 16,3% số mẫu chỉ xác định một phần kiểu gen (kiểu gen G hoặc kiểu gen P) (Hình 3.7A).

Tương tự như ở Nam Định, các kiểu gen lưu hành chiếm ưu thế thay đổi theo thời gian ở T.T. Huế (Hình 3.7B). Trong năm chưa triển khai uống vắc xin Rotavin-M1, từ tháng 1/2017 đến tháng 12/2017, G9P[8] (32,7%) và G3P[8] (31,8%) là các kiểu gen lưu hành phổ biến nhất. Đến năm thứ nhất sau uống (năm 2018), G3P[8] (52,2%) là kiểu gen được phát hiện phổ biến nhất. Năm thứ hai (năm 2019), G9P[8] (20,8%) và G3P[8] (18,9%) lại là các kiểu gen lưu hành phổ biến nhất nhưng có 18,9% mẫu bệnh phẩm không thể được xác định được kiểu gen (G và P), có 9,4% chỉ xác định một phần kiểu gen (kiểu gen G hoặc P). Đến năm thứ ba sau uống vắc xin (năm 2020), G8P[8] (47,2%) là kiểu gen phổ biến nhất và trong số có 13,9% mẫu kiểm tra không xác định kiểu gen G và P, có 16,7% mẫu chỉ có một phần kiểu gen G hoặc P.

3.1.3. Hiệu quả bảo vệ của vắc xin Rotavin-M1

3.1.3.1. Hiệu quả bảo vệ của vắc xin Rotavin-M1 theo nhóm tuổi và mức độ lâm sàng

Bảng 3.5. Hiệu quả bảo vệ của Rotavin-M1 theo nhóm tuổi từ 6 đến 23 tháng tuổi theo mức độ lâm sàng, 2017-2021

Độ tuổi (tháng)	Số liều	Bất kỳ mức độ nào				Mức trung bình đến nặng ^(a)			
		RV dương tính n/N (%)	RV âm tính n/N (%)	VE thô (95%CI)	VE hiệu chỉnh ^(b) (95% CI)	RV dương tính n/N (%)	RV âm tính n/N (%)	VE thô (95%CI)	VE hiệu chỉnh ^(b) (95% CI)
Tổng (6-23)	0 liều	156/423 (36,9%)	333/1232 (27,0%)	Ref ^(c)	Ref	85/226 (37,6%)	333/1232 (27,0%)	Ref	Ref
	2 liều	267/423 (63,1%)	899/1232 (73,0%)	37% (20- 50%)	46% (28%, 59%)	141/226 (62,4%)	899/1232 (73,0%)	39% (17- 54%)	57% (39- 70%)
6-11	0 liều	73/197 (37,1%)	223/754 (29,6%)	Ref	Ref	34/96 (35,4%)	223/754 (29,6%)	Ref	Ref
	2 liều	124/197 (62,9%)	531/754 (70,4%)	29% (1- 49%)	41% (11- 60%)	62/96 (64,6%)	531/754 (70,4%)	23% (-20- 51%)	52% (18- 72%)
12-17	0 liều	58/159 (36,5%)	73/338 (21,6%)	Ref	Ref	37/89 (41,6%)	73/338 (21,6%)	Ref	Ref
	2 liều	101/159 (63,5%)	265/338 (78,4%)	52% (27- 68%)	55% (27- 73%)	52/89 (58,4%)	265/338 (78,4%)	61% (36- 76%)	71% (46- 84%)
18-23	0 liều	25/67 (37,3%)	37/140 (26,4%)	Ref	Ref	14/41 (34,2%)	37/140 (26,4%)	Ref	Ref
	2 liều	42/67 (62,7%)	103/140 (73,6%)	40% (-12- 68%)	43% (-40- 76%)	27/41 (65,9%)	103/140 (73,6%)	31% (-46- 67%)	27% (-138- 77%)
12-23	0 liều	83/226 (36,7%)	110/478 (23,0%)	Ref	Ref	51/130 (39,2%)	110/478 (23,0%)	Ref	Ref
	2 liều	143/226 (63,3%)	368/478 (77,0%)	48% (27- 63%)	49% (23- 66%)	79/130 (60,8%)	368/478 (77,0%)	54% (30- 69%)	61% (35- 76%)

^(a) TCC từ trung bình đến nặng được xác định khi điểm Vesikari ≥ 11

^(b) Hiệu quả bảo vệ của vắc xin được hiệu chỉnh cho tháng và năm sinh, tháng và năm nhập viện, tỉnh và giới tính

^(c) Ref: giá trị tham chiếu để so sánh

Có 2642/7228 trẻ TCC nhập viện trong độ tuổi uống vắc xin (≤ 108 ngày tuổi) tham gia sau thời điểm triển khai uống vắc xin Rotavin-M1 cùng các vắc xin khác trong chương trình TCMR được đưa vào phân tích hiệu quả vắc xin Rotavin-M1, trong đó có 2041 trẻ nhập viện ≥ 6 tháng tuổi (ngoài độ tuổi uống vắc xin). Có 1.826 trẻ (89%) đã được lấy mẫu phân, xét nghiệm RV và xác định tình trạng uống vắc xin Rotavin-M1 đủ điều kiện để đánh giá hiệu quả vắc xin, trong đó 1251 (68,5%) trẻ đã uống đầy đủ 2 liều, 50 (2,7%) trẻ uống 1 liều và 525 (28,8%) không uống vắc xin Rotavin-M1. Có 1655/1.826 (90,6%) trẻ đủ điều kiện phân tích hiệu quả vắc xin trẻ trong độ tuổi 6- 24 tháng và uống đủ 2 liều. Đây là nhóm tuổi được quan tâm nhất vì là nhóm tuổi chủ yếu nhiễm RV và vắc xin phòng TCC có hiệu quả bảo vệ rõ rệt nhất (theo kết quả của nhiều nghiên cứu hiệu quả của các loại vắc xin trước đây). Do vậy, để cỡ mẫu đủ tin cậy nên trong các phân tích tiếp theo, chúng tôi sẽ tập trung phân tích hiệu quả ở nhóm tuổi này uống đủ 2 liều, trong đó có 423 ca xét nghiệm dương tính với RV (ca bệnh) và 1232 ca xét nghiệm âm tính với RV (ca chứng) với tỉ lệ bệnh: chứng gần 1:3.

Kết quả ở bảng 3.5 cho thấy hiệu quả bảo vệ của vắc xin Rotavin-M1 ngăn ca TCC nhập viện do RV ở trẻ từ 6-23 tháng tuổi đã uống đủ 2 liều là 46% (95%CI: 28-59%). Trong các nhóm tuổi, hiệu quả bảo vệ với nhóm trẻ từ 12-17 tháng tuổi là cao nhất, đạt 55% (95%CI: 27- 73%). Khi uống đủ 2 liều Rotavin-M1 có hiệu quả bảo vệ ngăn các ca TCC nhập viện do RV mức trung bình và nặng (thang điểm Vesikari ≥ 11) là 57% (95%CI: 39-70%), cao hơn hiệu quả với bất kỳ mức độ nghiêm trọng nào. Ở tất cả các nhóm tuổi, hiệu quả bảo vệ ngăn ca bệnh trung bình và nặng đều cao hơn hiệu quả của vắc xin với bất kỳ mức độ nghiêm trọng, trong đó với nhóm tuổi 12-17 tháng hiệu quả cao nhất đạt 71% (95%CI: 46-84%). Hiệu quả bảo vệ của vắc xin ngăn các ca bệnh mức trung bình-nặng khi trẻ 2 tuổi vẫn đạt 61% (95%CI: 35 - 76%) và hiệu quả tương ứng với bất kỳ mức độ bệnh nào đạt 49% (95%CI: 23 - 66%).

3.1.3.2. *Hiệu quả bảo vệ của vắc xin Rotavin-M1 với các kiểu gen phổ biến của vi rút Rota*

Bảng 3.6. Hiệu quả bảo vệ của vắc xin Rotavin-M1 với các kiểu gen phổ biến của vi rút Rota tại Nam Định và Huế, 2017-2021

Chủng	Số liều	Bất kỳ mức độ nào				Mức trung bình đến nặng ^(a)			
		RV dương tính n/N (%)	RV âm tính n/N (%)	VE thô (95%CI)	VE hiệu chỉnh ^(b) (95% CI)	RV dương tính n/N (%)	RV âm tính n/N (%)	VE thô (95%CI)	VE hiệu chỉnh ^(b) (95% CI)
G8P[8]	0 liều	49/150 (32,7%)	333 /232 (27,0%)	Ref ^(c)	ref	29/90 (32,2%)	333/1232 (27,0%)	ref	ref
	2 liều	101/150 (67,3%)	899/232 (73,0%)	24% (-10- 47%)	48% (17- 67%)	61/90 (67,8%)	899/1232 (73,0%)	22% (-23- 51%)	58% (25- 77%)
G9P[8]	0 liều	20/42 (47,6%)	333/1232 (27,0%)	ref	ref	14/23 (60,9%)	333/1232 (27,0%)	ref	ref
	2 liều	22/42 (52,4%)	899/1232 (73,0%)	59% (24- 78%)	52% (-2- 78%)	9/23 (39,1%)	899/1232 (73,0%)	76% (46- 90%)	72% (23- 90%)
G3P[8]	0 liều	29/56 (51,8%)	333/1232 (27,0%)	ref	ref	11/21 (52,4%)	333/1232 (27,0%)	ref	ref
	2 liều	27/56 (48,2%)	899/1232 (73,0%)	65% (41- 80%)	46% (-5- 72%)	10/21 (47,6%)	899/1232 (73,0%)	66% (20- 86%)	61% (-17- 87%)
G1P[8]	0 liều	11/24 (45,8%)	333/1232 (27,0%)	ref	ref	7/16 (43,8%)	333/1232 (27,0%)	ref	ref
	2 liều	13/24 (54,2%)	899/1232 (73,0%)	56% (1- 81%)	77% (28- 93%)	9/16 (56,3%)	899/1232 (73,0%)	52% (-29- 82%)	94% (60- 99%)

^(a) TCC từ trung bình đến nặng được xác định khi điểm Vesikari ≥ 11

^(b) Hiệu quả bảo vệ của vắc xin được hiệu chỉnh cho tháng và năm sinh, tháng và năm nhập viện, tỉnh và giới tính

^(c) Ref: giá trị tham chiếu để so sánh

Hiệu quả của vắc xin Rotavin-M1 với 1 số kiểu gen RV lưu hành phổ biến khác nhau. Hiệu quả bảo vệ của vắc xin cao nhất với kiểu gen G1P[8] là 77% (95%CI: 28- 93%) và tiếp theo là G9P[8] với hiệu quả là 52% (95%CI: -2- 78%), G8P[8] (48%, (95%CI: 17- 67%)), G3P[8] (46%, (95%CI: -5-72%)) (Bảng 3.6).

Hiệu quả của vắc xin ngăn các ca bệnh trung bình đến nặng đối với mỗi kiểu gen lưu hành phổ biến đều cao hơn hiệu quả với bất kỳ triệu chứng nào. hiệu quả với chủng G1P[8] cao nhất với 94% (95% CI: 60- 99%), tiếp theo là G9P[8] (72%, (95% CI: 23- 90%)), G3P[8] (61%, (95% CI: -17- 87%)) và G8P[8] (58%, (95% CI: 25- 77%)) (Bảng 3.6).

3.1.4. Đặc điểm di truyền của một số chủng vi rút Rota

3.1.4.1. Sự đa dạng về di truyền của vi rút Rota chủng G1P[8] và mối liên hệ với vắc xin phòng tiêu chảy cấp do vi rút Rota

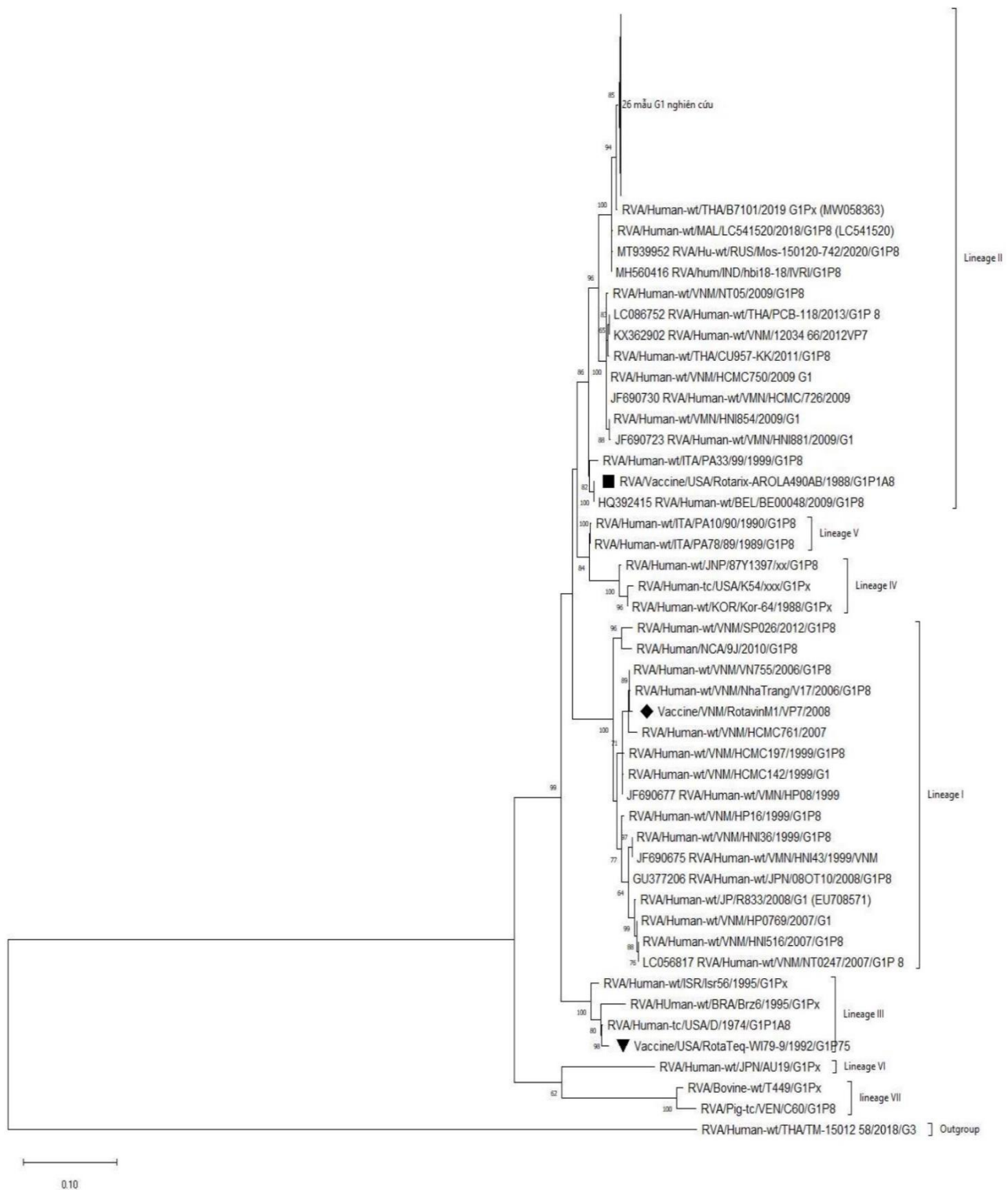
3.1.4.1.1. Tỷ lệ tương đồng Nucleotide, acid amin và phân loại nhánh của vi rút Rota kiểu gen G1P[8] lưu hành tại Nam Định năm 2021 và các chủng vắc xin

Có 30/45 chủng G1P[8] được phát hiện ở Nam Định năm 2021, trong đó 26 mẫu được giải trình tự gen VP7 và VP4 thành công, lập cây phát sinh chủng loại, so sánh trình tự Nucleotide và acid amin với các chủng vắc xin và chủng lưu hành trước đây tại Việt Nam. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.7, hình 3.8A-B, bảng trong phụ lục 12A và 12B như sau:

Bảng 3.7. Tỷ lệ tương đồng nucleotide, acid amin và phân loại nhánh di truyền trên VP7, VP4 của một số chủng vi rút Rota kiểu gen G1P[8] nghiên cứu với chủng vi rút vắc xin

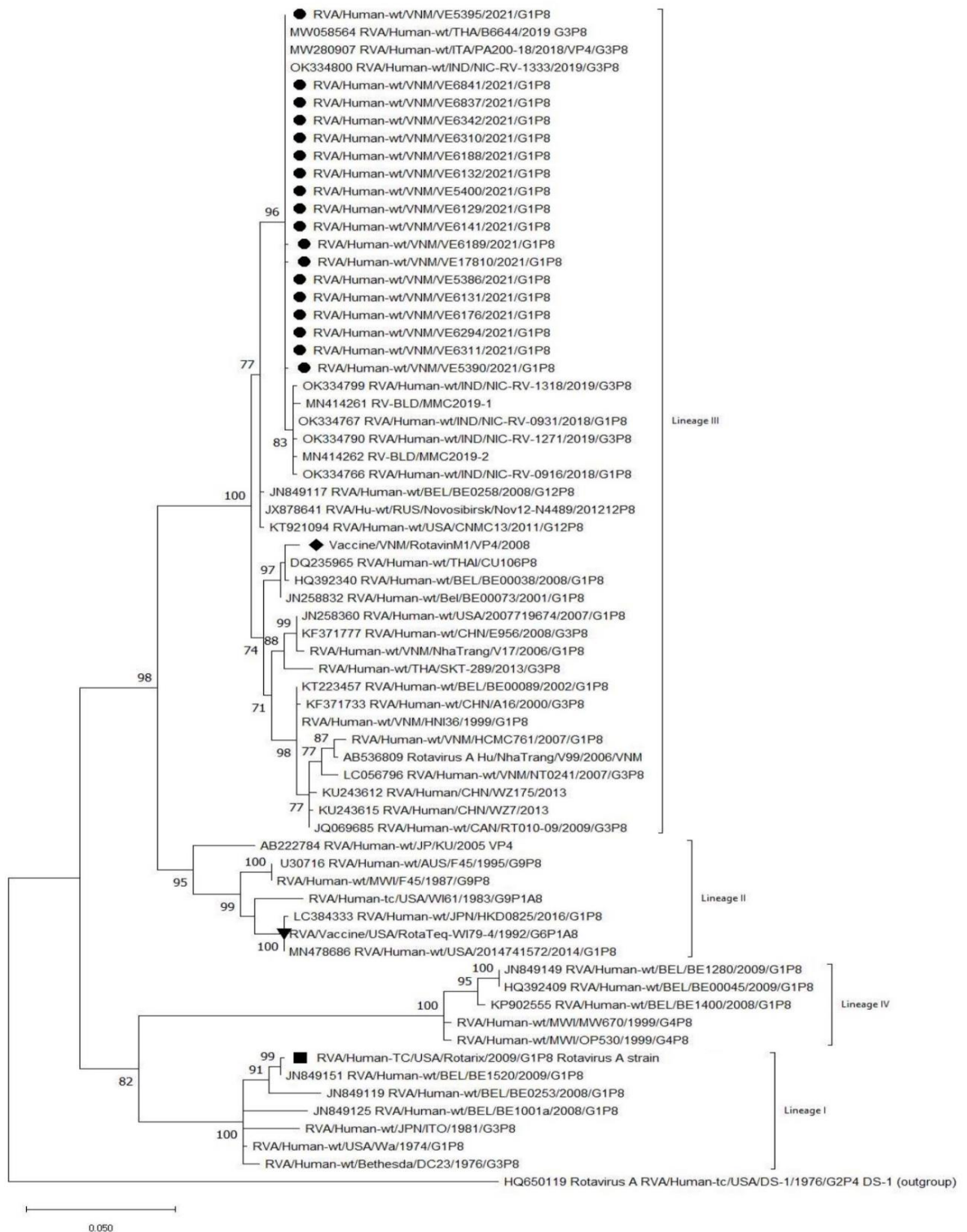
	VP7-G1			VP4-P8		
	Nhánh	Nu (%)	aa (%)	Nhánh	Nu (%)	aa (%)
Chủng G1P[8] (2021)	II	ref	ref	III	ref	ref
Rotavin-M1	I	91,7-92,0	92,4-93,2	III	97,4-97,5	97,1-97,6
Rotarix	II	96,0-96,1	95,4-95,8	I	90,8-91,1	91,4-91,8
RotaTeq	III	90,7-90,8	92,8-93,2	II	93,4-93,6	96,7-97,1

Ref: giá trị tham chiếu



(Hình tam giác biểu thị cho RotaTeg, hình vuông biểu thị cho Rotarix)

Hình 3.8A. Cây phát sinh chủng loại trên gen VP7 của các chủng RV G1P[8] (2021) và các chủng vắc xin



(Chấm tròn biểu thị các mẫu nghiên cứu, hình thoi biểu thị cho Rotavin-M1, hình tam giác biểu thị cho RotaTeg, hình vuông biểu thị cho Rotarix)

Hình 3.8B. Cây phát sinh chủng loại trên gen VP[4] của các chủng RV G1P[8] (2021) và các chủng vắc xin

Kết quả phân tích tỉ lệ tương đồng nucleotide, acid amin và phân loại các nhánh trên cây phát sinh chủng loại với gen VP7-G1 được thể bảng 3.7. và hình 3.8A. Kết quả cho thấy các chủng RV G1P[8] hiện nay đều có G1 nhánh II, cùng nhánh với Rotarix với tương đồng về nucleotide (96,0-96,1%) và acid amin (95,4-95,8%). Các chủng RV G1P[8] này khác nhánh với Rotavin-M1 (có G1 nhánh I) với độ tương đồng khá thấp về Nucleotide (91,7-92,0%) và acid amin (92,4-93,2%) và khác nhánh với chủng W179-9 (G1P[5]) của RotaTeq (có G1 nhánh III) và mức tương đồng thấp nhất về nucleotide (90,7-90,8 %) và acid amin (92,8-93,2%).

Đoạn gen VP4-P[8] của chủng G1P[8] đang lưu hành cùng nhánh III với chủng vắc xin Rotavin-M1 với mức tương đồng khá cao (97,4-97,5%) về nucleotide và 97,1-97,6% về acid amin Chủng này khác nhánh với 2 loại vắc xin còn lại là Rotarix (P[8] nhánh I) và chủng W179-4 (G6P[8]) của RotaTeq (P[8] nhánh II), với tỉ lệ tương đồng lần lượt 90,8-91,1% về trình tự nucleotide, 91,4-91,8% về acid amin với Rotarix và 93,4-93,6% về nucleotide, 96,7-97,1% acid amin với RotaTeq (Bảng 3.7. và hình 3.8B.). Từ kết quả trên cho thấy chủng G1P[8] đang lưu hành có G1 nhánh II với P[8] nhánh III, khác hoàn toàn với vắc xin Rotavin-M1 (G1 nhánh I và P[8] nhánh III), Rotarix (G1 nhánh II và P[8] nhánh I) và RotaTeq (G1 nhánh III và P[8] nhánh II).

Kết quả phân tích tỉ lệ tương đồng Nucleotide và acid amin giữa các chủng G1 và chủng P[8] lưu hành tại Việt Nam từ 1999 đến nay trên gen VP7 và VP4 được thể phụ lục 12A,12B và trên cây phát sinh chủng loại hình 3.8A-B. Các chủng phân bố tại Việt Nam từ 1999 đến 2007 có gen VP7-G1 nhánh I và khoảng từ 2009-nay đã chuyển sang nhánh II, cùng nhánh với chủng G1P[8] được phân lập năm 2021. Các mẫu từ 1999-2007 chỉ tương đồng với các chủng gần đây 91,2-92,4% về Nucleotide và 92-94,9% về acid amin, trong khi 1 số mẫu phân tích từ năm 2009 có tỉ lệ tương đồng cao hơn (91,7-97,3% về Nucleotide và 97,3 -98,5%% về acid amin) với chủng gần đây. Các chủng VP4-P[8] đã lưu hành tại Việt Nam từ năm 1999-2009 đều thuộc nhánh III, tương tự với chủng P[8] hiện nay với tỉ lệ tương đồng 96,5-97,7% về Nucleotide và 97,1-98,8% về acid amin so chủng năm 2021.

3.1.4.1.2. Các acid amin biến đổi chủng vi rút Rota G1P[8] lưu hành tại Việt Nam từ 1999 đến nay và chủng vắc xin

Bảng 3.8A. Biến đổi acid amin trong các epitope kháng nguyên của gen VP7 của các chủng G1P[8] trong nghiên cứu và chủng G1 tham chiếu và các chủng vi rút vắc xin

ST T	ID	Năm	Vị trí acid amin ^(a)																															
			19	28	29	33	37	41	42	46	49	55	57	65	66	68	74	75	91	94 (b)	97 (b)	101	108	116	123 (b)	141	147 (c)	170	179	202	208	217 (c)	218	268
1	WI79-9 (RotaTeq)	1992	L	R	I	I	F	T	V	A	R	L	L	A	V	T	E	V	T	N	D	T	T	V	S	F	S	V	G	T	Q	M	I	V
2	RIX441 (Rotarix)	1988	.	.	.	.	S	Y	.	.	.	.	T	.	A	G	I	.	.	E	S	.	.	.	L	N	I	.	M	.	.	V	.	
3	Rotavin-M1	2008	.	Q	.	.	.	F	.	.	K	.	I	T	.	S	G	.	.	S	E	S	.	.	N	L	N	I	.	.	R	T	V	I
4	HP16	1999	.	.	.	.	.	S	.	.	K	.	I	T	.	S	G	.	.	S	E	S	.	.	N	L	.	I	.	.	.	T	V	I
5	HCMC142	1999	.	.	.	.	.	F	.	.	K	.	I	T	.	S	G	.	.	S	E	S	.	.	N	L	N	I	.	.	.	T	V	I
6	HP08	1999	.	.	.	.	.	F	.	.	K	.	I	T	.	S	G	.	.	S	E	S	.	.	N	L	N	I	.	.	.	T	V	I
7	HCMC197	1999	F	.	.	.	.	F	.	.	K	.	I	T	.	S	G	.	.	S	E	S	.	.	N	L	N	I	.	.	.	T	V	I
8	HNI36	1999	.	.	.	.	.	S	.	.	K	.	I	T	.	S	G	.	N	S	E	S	.	.	N	L	N	I	.	.	.	T	V	I
9	VN755	2006	.	Q	.	.	.	F	.	.	K	.	I	T	.	S	G	.	.	S	E	S	.	.	N	L	N	I	.	.	.	T	V	I
10	HCMC761	2007	.	Q	.	.	.	F	.	.	K	.	I	T	.	S	G	.	.	S	E	S	.	.	N	L	N	I	.	.	.	T	V	I
11	HNI516	2007	.	.	.	.	.	S	I	.	K	.	I	T	.	S	.	I	N	S	E	S	.	I	N	L	N	I	.	.	.	T	V	I
12	HP0769	2007	.	.	.	.	.	S	I	.	K	.	I	T	.	S	.	I	N	S	E	S	.	I	N	L	N	I	.	.	.	T	V	I
13	NT0247	2007	.	.	.	.	.	S	I	.	K	.	I	T	.	S	.	I	N	S	E	S	.	I	N	L	N	I	.	.	.	T	V	I
14	NT05	2009	.	.	M	.	S	S	.	.	.	I	.	.	A	A	G	I	.	.	E	S	I	.	.	L	N	I	.	.	.	.	V	.
15	HCMC750	2009	.	.	M	.	S	S	.	.	.	I	.	.	A	A	G	I	.	.	E	S	I	.	.	L	N	I	.	.	.	.	V	.
16	NT169	2009	.	.	M	.	S	S	.	.	.	I	.	.	A	A	G	I	.	.	E	S	I	.	.	L	N	I	.	.	.	.	V	.
17	HCMC/726	2009	.	.	M	.	S	S	.	.	.	I	.	.	A	A	G	I	.	.	E	S	I	.	.	L	N	I	.	.	.	.	V	.
18	HNI881	2009	.	.	M	.	S	S	.	.	.	I	.	.	A	A	G	I	.	.	E	S	I	.	.	L	N	I	.	.	.	.	V	.
19	12034_66	2012	.	.	M	.	S	S	.	.	.	I	.	.	A	A	G	I	.	.	E	S	I	.	.	L	D	I	.	.	.	.	V	.
20	VE5386	2021	F	Q	M	L	S	S	.	T	.	I	.	.	A	A	G	I	.	.	E	S	.	.	.	L	N	I	E	.	.	.	V	.
21	VE5392	2021	F	Q	M	L	S	S	.	T	.	I	.	.	A	A	G	I	.	.	E	S	.	.	.	L	N	I	E	.	.	.	V	.
22	VE6131	2021	F	Q	M	L	S	S	.	T	.	I	.	.	A	A	G	I	.	.	E	S	I	.	.	L	N	I	.	.	.	.	V	.
23	VE6132	2021	F	Q	M	L	S	S	.	T	.	I	.	.	A	A	G	I	.	.	E	S	I	.	.	L	N	I	.	.	.	.	V	.
24	VE6155	2021	F	Q	M	L	S	S	.	T	.	I	.	.	A	A	G	I	.	.	E	S	.	.	.	L	N	I	E	.	.	.	V	.
25	VE6166	2021	F	Q	M	L	S	S	.	T	.	I	.	.	A	A	G	I	.	.	E	S	.	.	.	L	N	I	.	.	.	I	V	.
26	VE6310	2021	F	Q	M	L	S	S	.	T	.	I	.	.	A	A	G	I	.	.	E	S	.	.	.	L	N	I	E	.	.	.	V	.
27	VE6841	2021	F	Q	M	L	S	S	.	T	.	I	I	.	A	A	G	I	.	.	E	S	.	.	.	L	N	I	.	.	.	.	V	.
28	Các mẫu khác	2021	F	Q	M	L	S	S	.	T	.	I	.	.	A	A	G	I	.	.	E	S	.	.	.	L	N	I	.	.	.	.	V	.

Bảng 3.8B. Biến đổi acid amin trong các epitope kháng nguyên của gen VP4 của các chủng G1P[8] trong nghiên cứu và chủng G1 tham chiếu và các chủng vi rút vắc xin

ST T	ID	Năm	Vị trí acid amin ^(d)																													
			35	51	63	78	91	106	108	113 (e)	120	121	125 (e)	128	131 (e)	135 (e)	144	145	150 (f)	160	162	167	173	189	195 (f)	199	216	236	252	254	255	268
1	RIX441 (Rotarix)	1988	I	D	P	N	V	V	I	N	M	I	S	F	S	N	R	S	E	D	R	F	V	S	N	T	N	P	D	I	V	R
2	RotaTeq	1992	V	G	.	I	.	.	.	.	T	V	N	.	R	D	.	.	.	.	K	L	I	N	D	I	.	S	E	T	I	.
3	Rotavin- M1	2008	V	G	S	T	.	I	V	D	N	V	N	.	R	D	T	G	D	.	.	L	I	N	G	.	.	S	.	T	I	G
4	HNI36	1999	V	G	.	S	.	I	V	D	N	V	N	.	R	D	.	G	D	.	.	L	I	N	G	.	.	S	.	T	I	.
5	NhaTrang/ V17	2006	V	G	.	T	I	I	V	D	N	V	N	.	R	D	.	G	D	E	.	L	I	N	G	.	S	S	.	T	I	
6	NhaTrang/ V99	2006	V	G		S		I	V	D	S	V	N		R	D		G	D			L	I	N	G			S		T		
7	HCMC761	2007	V	G	.	S	.	I	V	D	S	V	N	.	R	D	.	G	D	.	.	L	I	N	G	.	.	S	.	T	I	.
8	NT0241	2007	V	G		S		I	V	D	N	V	N		R	D		G	D			L	I	N	G			S		T		
9	VE5390	2021	V	G	.	T	.	I	V	.	N	V	N	.	R	D	.	G	D	.	K	L	I	N	D	.	.	S	.	T	I	.
10	VE5395	2021	V	G	.	T	.	I	V	.	N	V	N	.	R	D	.	G	D	.	K	L	I	N	D	.		S	.	T	I	.
11	VE6189	2021	V	G	.	T	.	I	V	.	N	V	N	.	R	D	.	G	D	.	K	L	I	N	D	.	.	S	.	T	I	.
12	VE17810	2021	V	G	.	T	.	I	V	.	N	V	N	L	R	D	.	G	D	.	K	L	I	N	D	.	.	S	.	T	I	.
13	Các mẫu khác	2021	V	G	.	T	.	I	V	.	N	V	N	.	R	D	.	G	D	.	K	L	I	N	D	.	.	S	.	T	I	.

Ghi chú:

^(a) Vùng ô đậm màu là các acid amin thuộc vùng epitope của VP7

^(b) Acid amin thuộc vùng Epitope 7-1a của VP7

^(c) Acid amin thuộc vùng Epitope 7-2 của VP7

Các acid amin bị biến đổi so với chủng tham chiếu RotaTeq trong vùng epitope được khoanh vùng trong ô chữ nhật ^(d) Bôi đậm màu là các acid amin thuộc vùng epitope của VP4

^(e) Acid amin thuộc vùng epitope 8-3 của VP4

^(f) Acid amin thuộc vùng epitope 8-1 của VP4

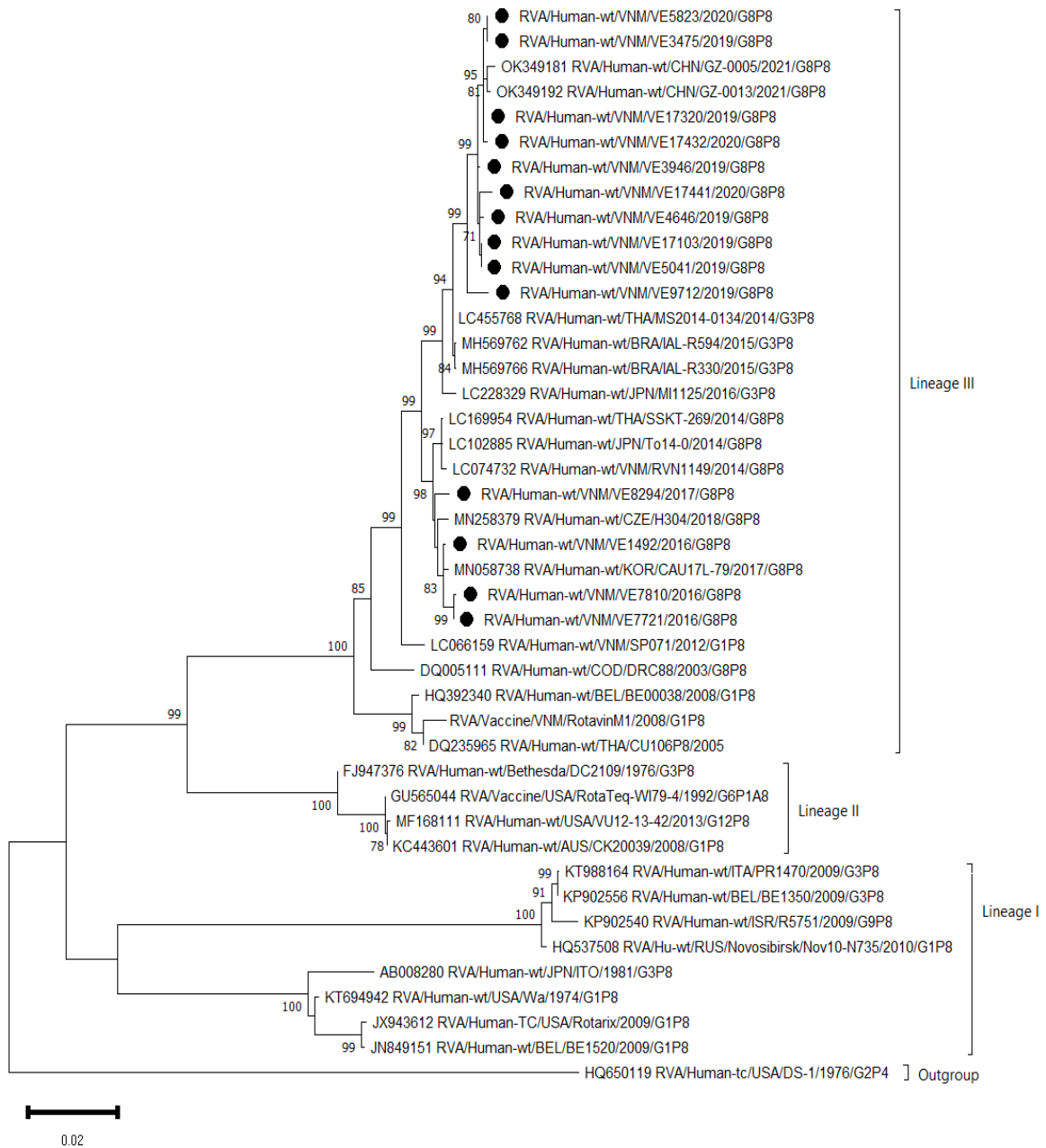
Các acid amin bị biến đổi so với chủng tham chiếu Rotarix trong vùng epitope được khoanh vùng trong ô chữ nhật

So sánh sự khác biệt các acid amin thuộc vùng kháng nguyên của protein VP7-G1 (gồm 3 vùng 7-1-a, 7-1-b và 7-2) và protein VP4-P8 (gồm 4 epitope từ 8-1 đến 8-4) và các acid amin vùng khác của 1 số chủng G1P[8] lưu hành từ 1999-2021 và các chủng vi rút vắc xin tại Việt Nam, kết quả ở bảng 3.8A cho thấy, các chủng hiện nay có khác biệt acid amin ở vị trí N94S, S123N trong vùng epitope 7-1-a và vị trí M217T của epitope 7-2 trên protein VP7 so với vắc xin Rotavin-M1. Các mẫu nghiên cứu cũng khác biệt với RotaTeq ở vị trí E97D ở epitope 7-1a và N147S ở epitope 7-2 và không khác biệt acid amin với Rotarix (nhánh II) ở các vùng epitop trên gen này.

Các chủng G1 giai đoạn 1999-2007 có khác biệt ở N94S, S123N và M217T trong vùng epitope so với chủng đang lưu hành. Các mẫu G1 năm 2009 không có sự khác biệt acid amin ở 3 vị trí này so với các mẫu đang nghiên cứu. So sánh biến đổi acid amin giữa các chủng nghiên cứu năm 2021, chỉ có 1 mẫu (VE6166) trong số 26 mẫu nghiên cứu có khác biệt 1 acid amin ở vị trí I217M thuộc epitope 7-2. Có 7 mẫu có thay đổi acid amin ở vùng không mang tính kháng nguyên, gồm 1 mẫu ở vị trí I57L, 2 mẫu ở I108T và 4 mẫu ở E179G.

Kết quả trên bảng 3.8B. cho thấy cho thấy các chủng P[8] hiện nay khác Rotavin-M1 ở vị trí acid amin 195 trên epitope 8-1 và vị trí acid amin 113 trên epitop 8-3 của VP4-P[8]. Vắc xin Rotarix có 4 biến đổi (D195N trên epitope 8-1, N125S, R131S và D135N trên epitope 8-3), trong khi RotaTeq chỉ khác 1 vị trí D150E trong vùng kháng nguyên so với chủng hiện nay. Các mẫu P[8] thu thập năm 2021 khá tương đồng nhau, không khác biệt acid amin trong vùng kháng nguyên và chỉ có 1 mẫu xuất hiện 1 biến đổi acid amin ở vị trí L128F không thuộc vùng kháng nguyên. Biến đổi này không quan sát thấy ở mẫu vắc xin và mẫu P[8] trước đó.

Hình 3.9A. Cây phát sinh chủng loại trên gen VP7 của các chủng G8P[8], (2016-2021)



(Các dấu chấm tròn được sử dụng để biểu thị các chủng đang nghiên cứu)

Hình 3.9B. Cây phát sinh chủng loại của các gen VP4 của các chủng G8P[8]

Kết quả cho thấy tất cả các chủng G8 đều thuộc nhánh IV, cùng nhánh với chủng được phát hiện ở Việt Nam năm 2014-2015 và các chủng lưu hành ở Đông Nam Á, Nhật Bản, Châu Mỹ từ 2012 đến nay nhưng khác với chủng G8P[8] phổ biến ở Châu Phi (nhánh I và V) hoặc ở Châu Âu giai đoạn 2006-2011 (nhánh I). Các mẫu nghiên cứu không có thay đổi đáng kể nào từ năm 2016-2020 (thay đổi trình tự nucleotide và acid amin tương ứng là 0,1% -0,8%) (Hình 3.9A).

Gen VP4 của nhánh G8P[8] (Hình 3.9B) đều thuộc nhánh III (100%). Gen VP4 của các chủng G8P[8] nhánh III có độ tương đồng 91,7% đến 92,4% về nucleotide với chủng WI79-4 của RotaTeq có P[8] thuộc nhánh II và tương đồng 89,1% đến 90,2% với chủng RIX441 nhánh I của Rotarix. Các chủng G8P[8] nghiên cứu không có sự thay đổi đáng kể qua các năm từ 2016 đến 2020, tỉ lệ biến đổi trình tự nucleotide và acid amin lần lượt là 0,8% -1,9%.

Phân tích trên cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự các đoạn gen khác được thể hiện ở phụ lục 13. Kết quả được tổng hợp trong bảng sau:

Bảng 3.9. Đặc điểm phân loại 11 đoạn gen của các chủng G8P[8]

STT	Tên mẫu	Năm	Kiểu gen -nhánh										
			VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
1.	14 chủng G8P[8]	2016-2020	G8-IV	P[8]-III	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
2.	Rotarix-RIX441	1988	G1-II	P[8]-I	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
3.	RotaTeq-WI79-9	1992	G1-III	P[5]	I2	R2	C2	M1	A3	N2	T6	E2	H3
4.	RotaTeq-SC2-9	1992	G2	P[5]	I2	R2	C2	M1	A3	N2	T6	E2	H3
5.	RotaTeq-WI79-4	1992	G6	P[8]-II	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3
6.	RotaTeq-WI78-8	1992	G3	P[5]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3
7.	RotaTeq-BrB-9	1992	G4	P[5]	I2	R2	C2	M2	A3	N2	T6	E2	H3
8. ^(a)	COD/DRC88	2003	G8-V	P[8]-III	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
9.	MWI/ QEC287	2006	G8-V	P[8]-III	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
10.	Croatia/CR2006	2006	G8-I	P[8]-III	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
11.	VNM/RVN1149	2014	G8-IV	P[8]-III	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
12.	JPN/To14-0	2014	G8-IV	P[8]-III	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
13.	THA/SSL-55	2014	G8-IV	P[8]-III	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
14.	KOR/CAU17L-79	2017	G8-IV	P[8]-III	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
15.	CHN/GZ0005	2021	G8-IV	P[8]-III	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2

^(a) Các mẫu từ 8-15 là 1 số mẫu tham chiếu lấy từ Genbank với mã định danh với mỗi gen như trên hình 3.9A-B và phụ lục 13. Các kí hiệu đầu là nguồn gốc mẫu, trong đó VMN: Việt Nam, CDO: Congo, MWI: Malawi, JPN: Nhật Bản, THAI: Thái Lan, KOR: Hàn Quốc, CHN: Trung Quốc. Vùng ô đậm màu thể hiện các kiểu gen khác với chủng G8P[8] đang nghiên cứu.

Kết quả phân tích cho thấy 14 chủng G8P[8] thu thập từ năm 2016-2020 đều có các gen bên trong thuộc kiểu giống DS-1: G8-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2. Các chủng G8P[8] trong nghiên cứu này tương đồng với các chủng G8P[8] lưu hành ở Việt Nam từ 2014-2015 và ở 1 số nước ở Châu Á như: Nhật Bản, Hàn Quốc, Trung Quốc, Thái Lan... và khác hoàn toàn với chủng vắc xin Rotarix và RotaTeq.

3.1.4.2.2. Sự biến đổi acid amin trong vùng epitope của chủng vi rút G8P[8] lưu hành tại Việt Nam

Bảng 3.10A. Biến đổi acid amin trong vùng Epitope của VP7 giữa các chủng G8 đang nghiên cứu và chủng vắc xin

ST T	Mã chủng	Kiểu gen- nhánh	7-1a							7-1b							7-2									
			87	91	104	123	125	129	130	201	211	212	213	238	242	143	145	146	147	148	190	217	221	264		
1	Rotarix- RIX441	G1-II	T	T	Q	S	V	V	D	Q	N	V	D	N	T	K	D	Q	N	L	S	M	N	G		
2	RotaTeq- WI79-9	G1-III	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.		
3	RotaTeq- WI78-8	G3	.	.	.	D	A	.	.	.	D	A	N	K	D	.	.	A	T	.	.	E	A	.		
4	RotaTeq- WI79-4	G6	V	N	.	D	A	.	E	.	N	P	D	N	A	.	.	S	T	Q	.	T	T	.		
5	RotaTeq- BrB-9	G4	S	T	.	N	L	I	.	.	D	T	A	D	T	R	A	S	G	E	.	T	S	.		
6	RotaTeq- SC2-9	G2	A	N	.	D	T	M	N	.	D	V	S	N	S	R	D	N	T	S	D	I	S	.		
7	VE17441	G8-IV	.	.	.	D	S	I	N	.	D	T	T	.	.	.	N	A	D	S	.	E	A	.		
8	VE17432	G8-IV	.	.	.	D	S	I	N	.	D	T	T	.	.	.	N	A	D	S	.	E	A	.		
9	VE17320	G8-IV	.	.	.	D	S	I	N	.	D	T	T	.	.	.	N	A	D	S	.	E	A	.		
10	VE17103	G8-IV	.	.	.	D	S	I	N	.	D	T	T	.	.	.	N	A	D	S	.	E	A	.		
11	VE9712	G8-IV	.	.	.	D	S	I	N	.	D	T	T	.	.	.	N	A	D	S	.	E	A	.		
12	VE8294	G8-IV	.	.	.	D	A	I	N	.	D	T	T	.	.	.	N	A	.	S	.	E	A	.		
13	VE7810	G8-IV	.	.	.	D	A	I	N	.	D	T	T	.	.	.	N	A	.	S	.	E	A	.		
14	VE7721	G8-IV	.	.	.	D	A	I	N	.	D	T	T	.	.	.	N	A	.	S	.	E	A	.		
15	VE5823	G8-IV	.	.	.	D	S	I	N	.	D	T	T	.	.	.	N	A	D	S	.	E	A	.		
16	VE5041	G8-IV	.	.	.	D	S	I	N	.	D	T	T	.	.	.	N	A	D	S	.	E	A	.		
17	VE4646	G8-IV	.	.	.	D	S	I	N	.	D	T	T	.	.	.	N	A	D	S	.	E	A	.		
18	VE3946	G8-IV	.	.	.	D	S	I	N	.	D	T	T	.	.	.	N	A	D	S	.	E	A	.		
19	VE3475	G8-IV	.	.	.	D	S	I	N	.	D	T	T	.	.	.	N	A	D	S	.	E	A	.		
20	VE1492	G8-IV	.	.	.	D	A	I	N	.	D	T	T	.	.	.	N	A	.	S	.	E	A	.		

3.10B. Biến đổi acid amin trong vùng Epitope của VP8* (thuộc VP4) giữa các chủng G8P[8] nghiên cứu và chủng vắc xin

STT	Mã chủng	Kiểu gen- nhánh	8-1					8-2					8-3					8-4		
			100	146	148	150	188	190	195	196	180	183	113	125	131	132	135	87	88	89
1	RotaTeq-WI79-4	P[8]-II	D	S	Q	E	S	T	D	I	T	R	N	N	R	N	D	N	T	N
2	Rotarix-RIX441	P[8]-I	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	S	S	.	N	.	.	.
3	VE17441	P[8]-III	.	G	.	D	.	.	G	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.
4	VE17320	P[8]-III	.	G	.	D	.	.	G	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.
5	VE17103	P[8]-III	.	G	.	D	.	.	G	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.
6	VE9712	P[8]-III	.	G	.	D	.	.	S	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.
7	VE8294	P[8]-III	.	.	.	D	.	.	N	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.
8	VE7810	P[8]-III	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.
9	VE7721	P[8]-III	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.
10	VE5823	P[8]-III	.	G	.	D	.	.	G	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.
11	VE5041	P[8]-III	.	G	.	D	.	.	G	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.
12	VE4646	P[8]-III	.	G	.	D	.	.	G	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.

STT	Mã chủng	Kiểu gen-nhánh	8-1					8-2				8-3				8-4			
			100	146	148	150	188	190	195	196	180	183	113	125	131	132	135	87	88
13	VE3946	P[8]-III	.	G	.	D	.	.	G	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.
14	VE3475	P[8]-III	.	G	.	D	.	.	G	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.
15	VE17432	P[8]-III	.	G	.	D	.	.	G	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.
16	VE1492	P[8]-III	.		.	D	.	.	.	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.

Bảng 3.10C. Biến đổi acid amin trong vùng Epitope của VP5 (thuộc VP4) giữa các chủng G8 nghiên cứu và chủng vắc xin

STT	Mã chủng	Kiểu gen-nhánh	5-1					5-2		5-3	5-4	5-5
			384	386	393	398	440	441	434	459	429	306
1	RotaTeq WI79-4	P[8]-II	H	S	W	G	R	T	P	E	L	R
2	Rotarix RIX441	P[8]-I	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3	VE17441	P[8]-III	D	N	.	.	.	.	.	.	.	.
4	VE17320	P[8]-III	D	N	.	.	.	.	.	.	.	.
5	VE17103	P[8]-III	D	N	.	.	.	.	.	.	.	.
6	VE9712	P[8]-III	D	N	.	.	.	.	.	.	.	.
7	VE8294	P[8]-III	D	.	.	.	.	.	.	.	.	.
8	VE7810	P[8]-III	D	.	.	.	.	.	.	.	.	.
9	VE7721	P[8]-III	D	.	.	.	.	.	.	.	.	.
10	VE5823	P[8]-III	D	N	.	.	.	.	.	.	.	.
11	VE5041	P[8]-III	D	N	.	.	.	.	.	.	.	.
12	VE4646	P[8]-III	D	N	.	.	.	.	.	.	.	.
13	VE3946	P[8]-III	D	N	.	.	.	.	.	.	.	.
14	VE3475	P[8]-III	D	N	.	.	.	.	.	.	.	.
15	VE17432	P[8]-III	D	N	.	.	.	.	.	.	.	.
16	VE1492	P[8]-III	D	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Kết quả cho thấy trong 14 chủng G8P[8] phân tích, có 3 chủng xuất hiện 2 biến đổi acid amin trong vùng epitope của VP7 (S125A và D147N) so với các chủng khác. Trong vùng này có 22 acid amin, chủng G8 của nghiên cứu này khác biệt 12-13 acid amin với chủng RIX441(VP7-G1) của Rotarix và WI79-9 (VP7-G1) trong RotaTeq, khác 8-10 acid amin so với chủng WI78-8 (VP7-G3) của RotaTeq và khác 14-16 acid amin với các chủng WI79-4 (VP7-G6), BrB-9 (VP7-G4), SC2-9 (VP7-G6) của RotaTeq (bảng 3.10A). Các chủng G8P[8] này có 4 acid amin thay đổi so với chủng WI79-4 của RotaTeq (S146G, E150D, D195G/N, N113D) trong vùng epitop VP8* và có 2 vị trí khác biệt so với chủng WI79-4 (H384D, S386N) trong vùng epitop VP5 (thuộc VP4) (bảng 3.10B, 3.10C).

Kết quả ở phụ lục 14A và 14B cho thấy, các chủng G8 nghiên cứu khác 9 acid amin so với các chủng RIX441 của Rotarix trong vùng kháng nguyên của gen NPS3. (V8A; T14S; K93R; M103L; T104L; D142E; I193V; L281I; I282L) và khác 11-12 acid amin so với Rotarix trong vùng kháng nguyên của gen NSP4.

3.2. Tỷ lệ nhiễm và đặc điểm lưu hành của các vi rút Noro, Astro và Sapo ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1

3.2.1. Tỷ lệ nhiễm vi rút Noro, Astro và Sapo ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi

3.2.1.1. Tỷ lệ nhiễm vi rút Noro, Astro và Sapo ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi theo giới tính

Bảng 3.11. Tỷ lệ nhiễm vi rút Noro, Astro và Sapo ^(a) ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi theo giới tính tại Nam Định và Huế, 12/2016-11/2020

Tác nhân	Giới tính	Trước uống ^(b)	Sau uống	p ^(c)	p ^(d)
		n/N (%)	n/N (%)		
Nam Định (N=1203)					
NV	Nam	32/252 (12,7%)	158/490 (32,2%)	0,000	0,145
	Nữ	29/170 (17,1%)	72/291 (24,7%)	0,054	
	Tổng	61/422 (14,5%)	230/781 (29,4%)	0,000	
Ast	Nam	21/252 (8,3%)	21/490 (4,3%)	0,024	0,237
	Nữ	9/170 (5,3%)	10/291 (3,4%)	0,333	
	Tổng	30/422 (7,1%)	31/781 (4,0%)	0,018	
Sav	Nam	23/252 (9,1%)	29/490 (5,9%)	0,105	0,433
	Nữ	11/170 (6,5%)	16/291 (5,5%)	0,668	
	Tổng	34/422 (8,1%)	45/781 (5,8%)	0,125	
Huế (N=464)					
NV	Nam	3/54 (5,6%)	43/211 (20,4%)	0,010	0,826
	Nữ	3/43 (7,0%)	30/156 (19,2%)	0,056	
	Tổng	6/97 (6,2%)	73/367 (19,9%)	0,001	
Ast	Nam	2/54 (3,7%)	13/211 (6,2%)	0,486	0,310
	Nữ	7/43 (16,3%)	9/156 (5,8%)	0,025	
	Tổng	9/97 (9,3%)	22/367 (6,0%)	0,249	
Sav	Nam	4/54 (7,4%)	10/211 (4,7%)	0,493	0,709
	Nữ	1/43 (2,3%)	8/156 (5,1%)	0,687	
	Tổng	5/97 (5,2%)	18/367 (4,9%)	0,920	

^(a) Tỷ lệ nhiễm mỗi tác nhân bao gồm cả đơn nhiễm và đồng nhiễm

^(b) Giai đoạn trước uống vắc xin được tính từ trước tháng 4/2018 ở Nam Định và trước tháng 1/2018 ở Huế

^(c): phân tích khác biệt tỷ lệ nhiễm bằng χ^2 giữa 2 giai đoạn trước và sau uống

^(d): phân tích khác biệt tỉ lệ nhiễm bằng χ^2 theo giới tính

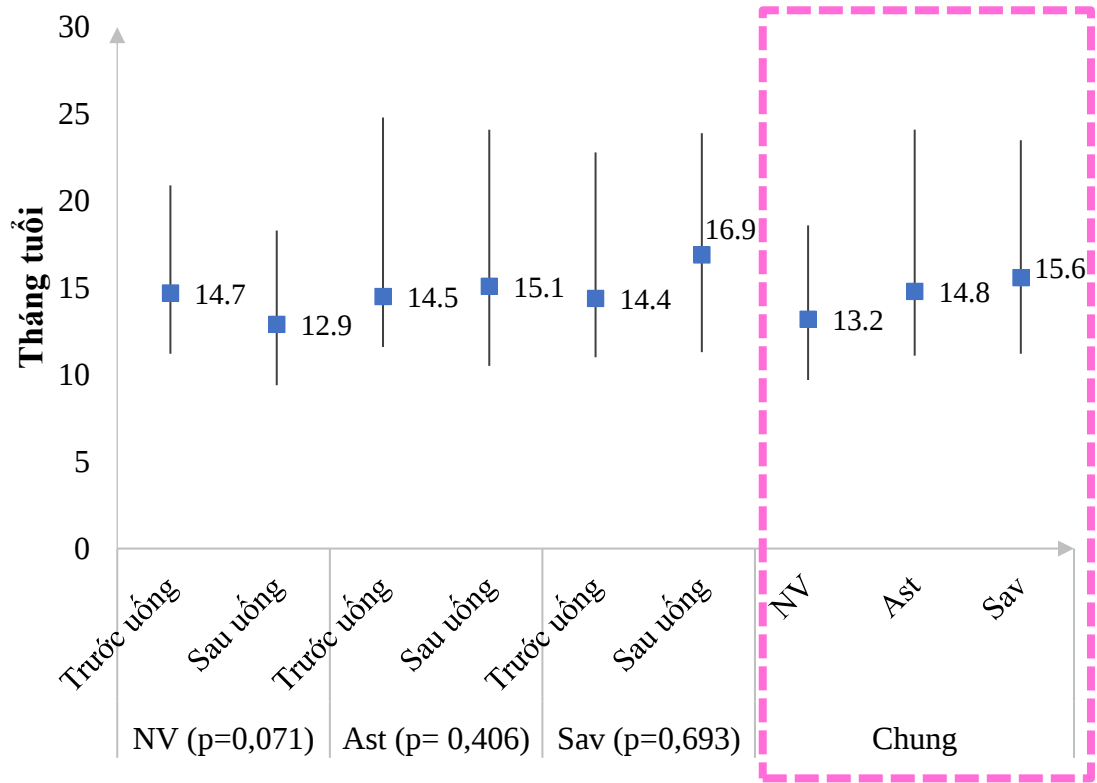
Trong số các mẫu đã được kiểm tra xác định RV, lựa chọn ngẫu nhiên 25-45% hàng năm, tổng số 1667 mẫu thu thập từ tháng 12/2016 đến tháng 11/2020 được kiểm tra đồng thời 3 tác nhân vi rút gây TCC là NV, Ast và Sav. Tổng số mẫu kiểm tra dương tính với NV là 370/1667 (22,2%), chiếm tỉ lệ cao nhất trong số 3 tác nhân vi rút. Số mẫu dương tính với Ast và Sav lần lượt là 92/1667 (5,5%) và 102/1667 (6,1%).

Kết quả ở bảng 3.11 thể hiện tỉ lệ nhiễm NV, Ast và Sav phân loại theo giới tính từ 12/2016-11/2020 không có sự khác biệt giữa bé trai và bé gái ở cả 2 địa điểm nghiên cứu ($p>0,05$). Ở cả Nam Định và Huế, tỉ lệ bé trai nhiễm NV giai đoạn sau uống vắc xin tăng rõ rệt ở giai đoạn sau uống vắc xin, từ 12,7% lên 32,2% ở Nam Định và tăng từ 5,6% lên 20,4% ở Huế, $p<0,05$). Tỉ lệ nhiễm RV ở bé gái ở giai đoạn sau uống vắc xin cũng có xu hướng tăng lên nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$)

Ngược lại với NV, tỉ lệ nhiễm Ast ở cả 2 giới ở Nam Định và Huế đều giảm ở giai đoạn sau uống vắc xin, rõ rệt nhất ở bé trai ở Nam Định và bé gái ở Huế có tỉ lệ nhiễm giảm có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$), trong khi tỉ lệ bé nhiễm Ast giảm ở bé gái Nam Định và bé trai ở Huế không có ý nghĩa ($p>0,05$). Tương tự Ast, tỉ lệ bé trai và gái nhiễm Sav ở cả 2 địa điểm có xu hướng giảm ở giai đoạn sau uống vắc xin nhưng không có ý nghĩa thống kê (với $p>0,05$).

Ở cả 2 địa điểm nghiên cứu, tỉ lệ nhiễm NV ở giai đoạn sau uống vắc xin đều tăng rõ rệt so với tỉ lệ này ở giai đoạn trước uống vắc xin, từ 14,5% lên 29,4% ở Nam Định, từ 6,2% lên 19,9% ở Huế với $p<0,05$. Ngược lại, tỉ lệ nhiễm Ast trước giảm dần giai đoạn sau uống so với giai đoạn trước uống ở Nam Định (7,1% còn 4,0%, $p=0,018$) nhưng tỉ lệ nhiễm Ast không thay đổi giữa 2 giai đoạn ở Huế ($p>0,05$). Tỉ lệ nhiễm Sav trước và sau uống không có khác biệt ở cả Nam Định và Huế ($p>0,05$) (bảng 3.11).

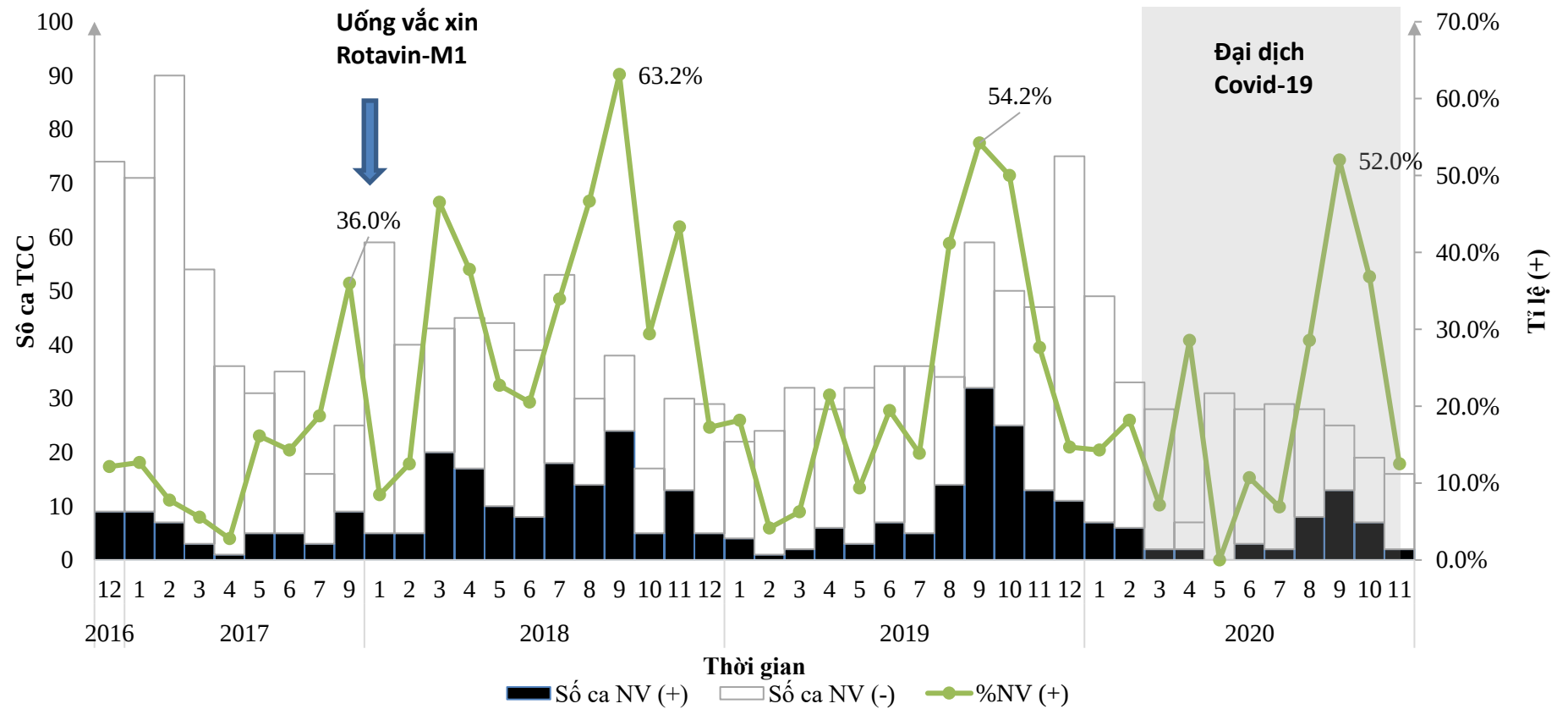
3.2.1.2. Tuổi nhiễm vi rút Noro, Astro và Sapo ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi



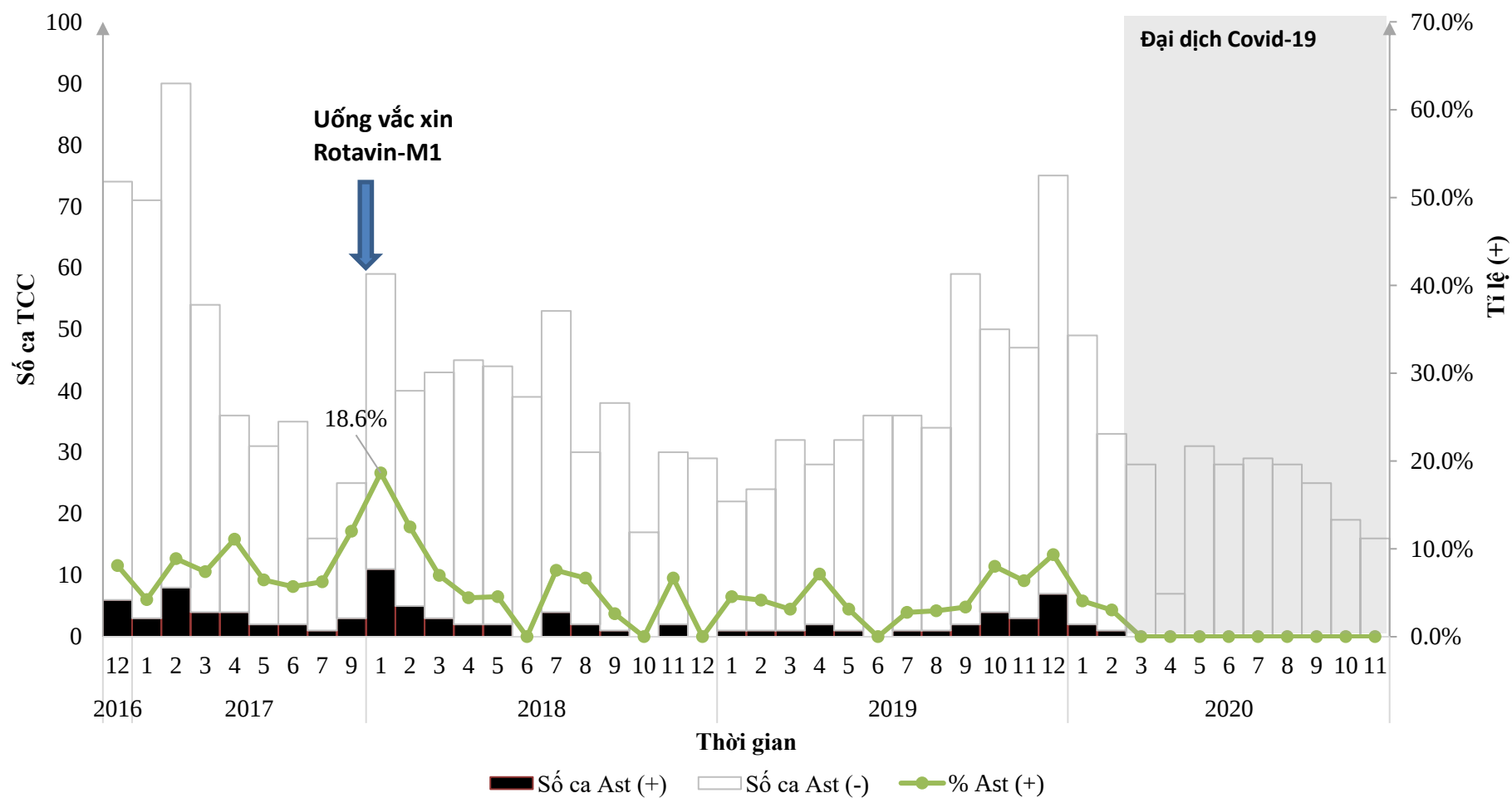
Hình 3.10. Tuổi nhiễm vi rút Noro, Astro và Sapo ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1, 12/2016-11/2020

Tuổi trung vị của trẻ nhiễm NV là 13,2 tháng (IQR: 9,7-18,6), nhỏ hơn tuổi nhiễm Ast là 14,8 (IQR: 11,1-24,1) và Sav là 15,6 (IQR: 11,2-23,5). Tuổi nhiễm NV ở giai đoạn sau uống vắc xin là 12,9 (IQR: 9,4-18,3) thấp hơn ở giai đoạn trước uống vắc xin là 14,7 (IQR: 11,2-20,9), tuy nhiên khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p=0,071$). Các ca nhiễm Ast và Sav trong 2 giai đoạn trước và sau uống cũng không thay đổi có ý nghĩa thống kê.

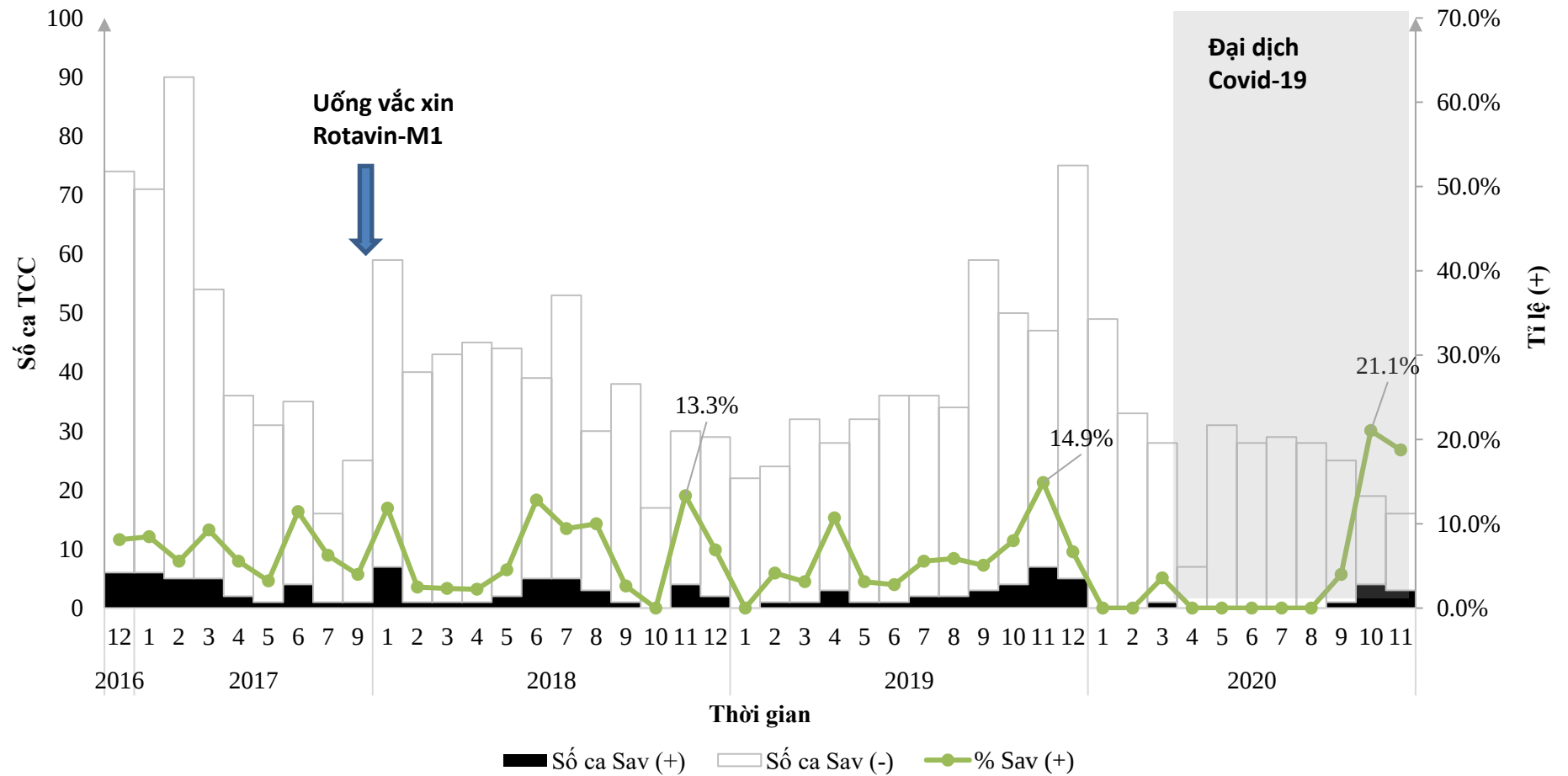
3.2.1.3. *Tỉ lệ nhiễm vi rút Noro, Astro và Sapo ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi hàng tháng*



Hình 3.11A. Số ca và tỉ lệ nhiễm NV hàng tháng tại Nam Định và Huế, 12/2016-11/2020



Hình 3.11B. Số ca và tỉ lệ nhiễm Ast hàng tháng tại Nam Định và Huế, 12/2016-11/2020



Hình 3.11C. Số ca và tỉ lệ nhiễm Sav hàng tháng tại Nam Định và Huế, 12/2016-11/2020

Số ca và tỉ lệ nhiễm NV phân bố rõ rệt khá rõ rệt theo mùa từ tháng 8 đến tháng 10 hàng năm. Trong hơn 4 năm nghiên cứu, tỉ lệ NV dương tính tăng và đạt đỉnh vào tháng 9 hàng năm lần lượt là 36,0%, 63,2%, 54,2% và 52% (hình 3.11A). Đỉnh nhiễm của của các năm sau uống đều cao năm chưa triển khai uống, trong đó năm thứ nhất sau uống tỉ lệ cao nhất và giảm nhẹ vào các năm sau.

Tỉ lệ nhiễm Ast cao nhất đạt 18,6% vào tháng 1/2018 nhưng không lặp lại vào những năm khác. Giữa các tháng, số ca phát hiện ít, tỉ lệ thấp, đa số <10%, cao thấp, xen kẽ cao thấp và ở không quan sát thấy đỉnh ở thời điểm nào trong năm. Như vậy, Ast không có sự phân bố rõ rệt theo mùa (Hình 3.11B)

Tỉ lệ nhiễm SaV hàng tháng từ 0-14,9% và 3 năm sau uống thấy đạt giá trị cao nhất vào tháng 10-11 (13,3% vào tháng 11/2018, 14,9% vào tháng 11/2019 và 21,1% vào tháng 10/2020). Tuy nhiên, năm 2016 và 2017, có 1 số thời điểm mùa hè cũng có tỉ lệ khá cao (11,4% vào tháng 6/2017, 12,8% vào tháng 6/2018, 10,7% vào 4/2020). Do vậy, xu hướng phân bố theo mùa của Sav chưa rõ ràng (hình 3.11C).

3.2.1.4. *Tỉ lệ nhiễm vi rút Noro, Astro và Sapo ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi hàng năm trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1*

Bảng 3.12. Tỉ lệ nhiễm vi rút Noro, Astro và Sapo ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi hàng năm tại Nam Định, 3/2017-11/2020 và Huế, 1/2017-11/2020

Địa điểm	Giai đoạn	Thời gian	NV dương tính	Ast dương tính	Sav dương tính
			n/N (%)	n/N (%)	n/N (%)
Nam Định (N=947)	Trước uống ^(a)	04/2017-03/2018	33/166 (19,9%)	13/166 (7,8%)	15/166 (9,0%)
	Sau uống ^(a)	Năm thứ nhất	91/254 (35,3%)	12/254 (4,7%)	15 /254 (5,9%)
		Năm thứ hai	104/382 (27,2%)	19/382 (5,0%)	22/382 (5,8%)
		Năm thứ ba ^(a)	35/145 (24,1%)	0 (0%)	8 (5,5%)
		Tổng	230/781 (29,4%)	31/781 (4,0%)	45/781 (5,8%)

Địa điểm	Giai đoạn	Thời gian	NV dương tính	Ast dương tính	Sav dương tính
			n/N (%)	n/N (%)	n/N (%)
Huế (N=454)	Trước uống ^(a)	2017	6/87 (6,9%)	9/87 (10,3%)	4/87 (4,6%)
	Sau uống ^(a)	Năm thứ nhất	43/190 (22,6%)	17/190 (8,9%)	11/190 (5,8%)
		Năm thứ hai	25/107 (23,4%)	4/107 (3,7%)	6/107 (5,6%)
		Năm thứ ba ^(b)	5/70 (7,1%)	1/70 (1,4%)	1/70 (1,4%)
		Tổng	73/367(19,9%)	22/367 (6,0%)	18/367 (4,9%)

(a) Tương tự RV, giai đoạn trước uống vắc xin ở Nam Định từ tháng 4/2017-3/2018, năm thứ nhất, thứ hai, thứ ba sau uống lần lượt từ 4/2018-3/2019, 4/2019-3/2020, 4/2020-11/2020. Ở Huế, giai đoạn trước uống vắc xin được tính từ tháng 1/2017-12/2017 và năm thứ nhất, thứ hai, thứ ba sau uống lần lượt từ tháng 1/2018-12/2018, 1/2019-12/2019 và 1/2020-11/2020.

(b) Số ca nhập viện do TCC giảm mạnh trong thời gian này do đại dịch COVID-19 toàn cầu

Tỉ lệ NV dương tính cả ở Nam Định và Huế đều có xu hướng theo thời gian tương tự nhau. Tỉ lệ nhiễm NV thấp nhất ở năm “trước uống”, tương ứng với 19,9% và 6,9% ở Nam Định và Huế. Tỉ lệ nhiễm NV cao nhất (35,3%) ở Nam Định vào năm thứ 1 và cao nhất ở Huế (23,4%) vào năm thứ hai sau uống và giảm vào các năm sau. Tỉ lệ nhiễm NV sau khi triển khai uống vắc xin Rotavin-M1 Rotavin-M1 ở Nam Định và Huế cao hơn trước uống có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) (bảng 3.12).

Khác với NV, tỉ lệ ca Ast dương tính có xu hướng giảm dần theo thời gian cả ở Nam Định và Huế. Ở Nam Định, tỉ lệ nhiễm Ast giảm từ 7,8% ở năm “trước uống” xuống còn 4,7%, 5,0% trong năm thứ nhất và thứ hai và không xuất hiện vào năm thứ ba sau uống. Sự khác biệt tỉ lệ nhiễm Ast giai đoạn trước và sau uống có ý nghĩa với $p < 0,05$. Tỉ lệ này ở Huế cũng giảm nhẹ từ 10,3% trước uống còn 8,9% vào năm thứ nhất sau uống và tiếp tục giảm còn 3,7 và 1,4% vào 2 năm cuối cùng, tuy nhiên khác biệt giữa 2 giai đoạn không có ý nghĩa thống kê với $p = 0,111$ (bảng 3.12).

Tương tự Ast, tỉ lệ nhiễm Sav cũng có xu hướng giảm hàng năm từ 9,0% còn 5,5% ở Nam Định và từ 4,6% còn 1,4% ở Huế, tuy nhiên sự khác biệt theo năm không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$ ở cả 2 địa điểm (bảng 3.12).

3.2.1.5. *Tỉ lệ nhiễm vi rút Noro, Astro và Sapo ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi theo tình trạng uống vắc xin Rotavin-M1*

Bảng 3.13. Tỉ lệ nhiễm vi rút Noro, Astro và Sapo ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi tại Nam Định và Huế theo tình trạng uống vắc xin Rotavin-M1, 12/2016-11/2020^(a)

Địa điểm	Các tác nhân vi rút	Không uống (N=977)	Đã uống (N=512) ^(b)	Tổng (N=1489)	p
		n (%)	n (%)	n (%)	
Nam Định (N=1063)	NV	141 (21,7)	133 (32,2)	274 (25,8)	0,000
	Ast	41 (6,3)	13 (3,1)	54 (5,1)	0,023
	Sav	50 (7,7)	19 (4,6)	69 (6,5)	0,047
Huế (N=426)	NV	56 (17,2)	21 (21,2)	77 (18,1)	0,361
	Ast	24 (7,4)	4 (4,0)	28 (6,6)	0,948
	Sav	17 (5,2)	5 (5,1)	22 (5,2)	0,097

^(a) Có 158 trường hợp không biết thông tin uống hoặc sử dụng vắc xin phòng TCC do RV khác

^(b) Đối tượng uống 1 hoặc 2 liều vắc xin

Ở Nam Định, tỉ lệ mắc TCC do các tác nhân vi rút NV, Ast, Sav ở nhóm uống và không uống đều khác biệt có ý nghĩa thống kê. Tỉ lệ nhiễm NV ở nhóm uống là 32,2%, cao hơn có ý nghĩa tỉ lệ này ở nhóm không uống với 21,7% ($p=0,000$). Ngược lại, tỉ lệ nhiễm Ast, Sav ở nhóm uống là 3,1%; 4,6% đều thấp hơn có ý nghĩa tỉ lệ nhiễm các tác nhân này ở nhóm không uống tương ứng là 6,3% và 7,7% ($p<0,05$) (bảng 3.13).

Ở Huế có xu hướng tương tự Nam Định với tỉ lệ nhiễm NV ở nhóm uống cao hơn và tỉ lệ nhiễm của Ast, Sav ở nhóm uống thấp hơn các tỉ lệ này ở nhóm không uống nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê với $p>0,05$ (bảng 3.13).

3.2.1.6. *Tỉ lệ nhiễm vi rút Noro, Astro và Sapo ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi tại theo nhóm tuổi và tình trạng uống vắc xin Rotavin-M1*

Bảng 3.14. Tỉ lệ nhiễm vi rút Noro, Astro và Sapo ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện theo nhóm tuổi và tình trạng uống vắc xin Rotavin-M1, 12/2016-11/2020

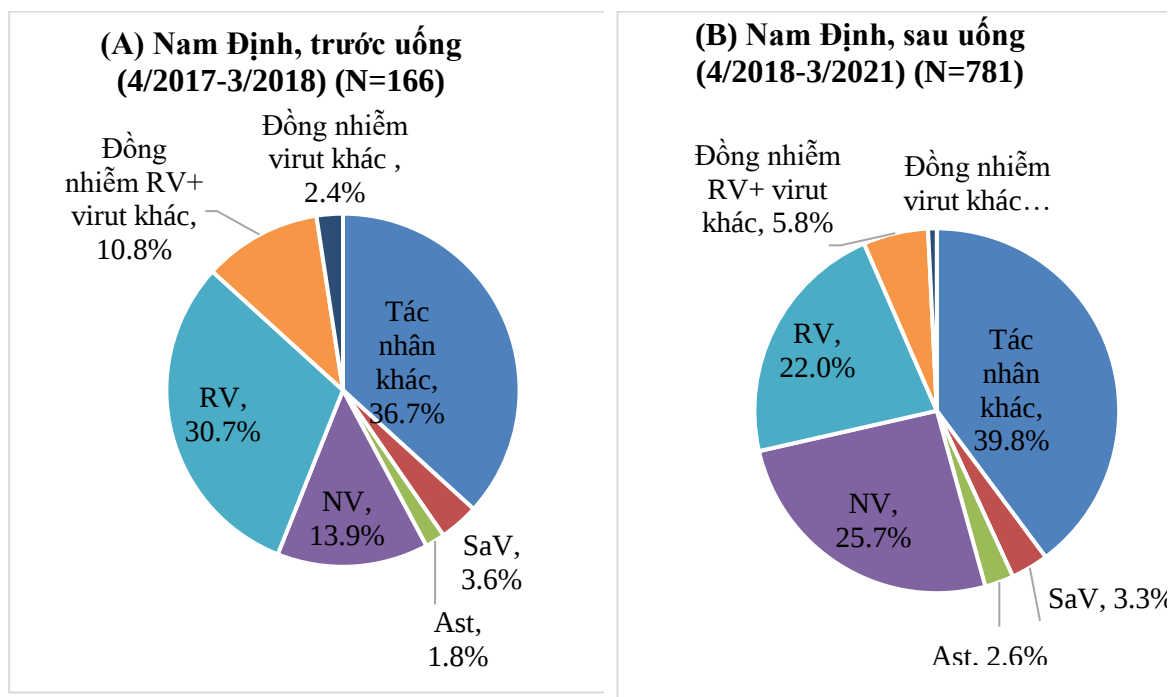
Tác nhân	Nhóm tuổi	Số ca, tỉ lệ (+)			p
		Không uống (N=977)	Đã uống (N=512)	Tổng (N=1489)	
NV	<6	9 (9,2)	15 (14,9)	24 (12,1)	0,220
	6-11	54 (22,1)	74 (32,0)	128 (26,9)	0,015
	12-17	66 (27,6)	42 (39,6)	108 (31,3)	0,026
	18-23	35 (24,3)	19 (38,0)	54 (27,8)	0,063
	24-59	33 (13,1)	4 (16,7)	37 (13,4)	0,542
	Tổng	197 (20,2)	154 (30,1)	351 (23,6)	0,000
Ast	<6	3 (3,1)	2 (2,0)	5 (2,5)	-
	6-11	20 (8,2)	7 (3,0)	27 (5,7)	0,015
	12-17	18 (7,5)	4 (3,8)	22 (6,4)	0,188
	18-23	9 (6,3)	2 (4,0)	11 (5,7)	0,732
	24-59	15 (6,0)	2 (8,3)	17 (6,2)	0,649
	Tổng	65 (6,7)	17 (3,3)	82 (5,5)	0,007
Sav	<6	1 (1,0)	0	1 (0,5)	-
	6-11	17 (7,0)	11 (4,8)	28 (5,9)	0,308
	12-17	16 (6,7)	8 (7,5)	24 (7,0)	0,774
	18-23	17 (11,8)	2 (4,0)	19 (9,8)	0,166
	24-59	16 (6,3)	3 (12,5)	19 (6,9)	0,255
	Tổng	67 (6,9)	24 (4,7)	91 (6,1)	0,097

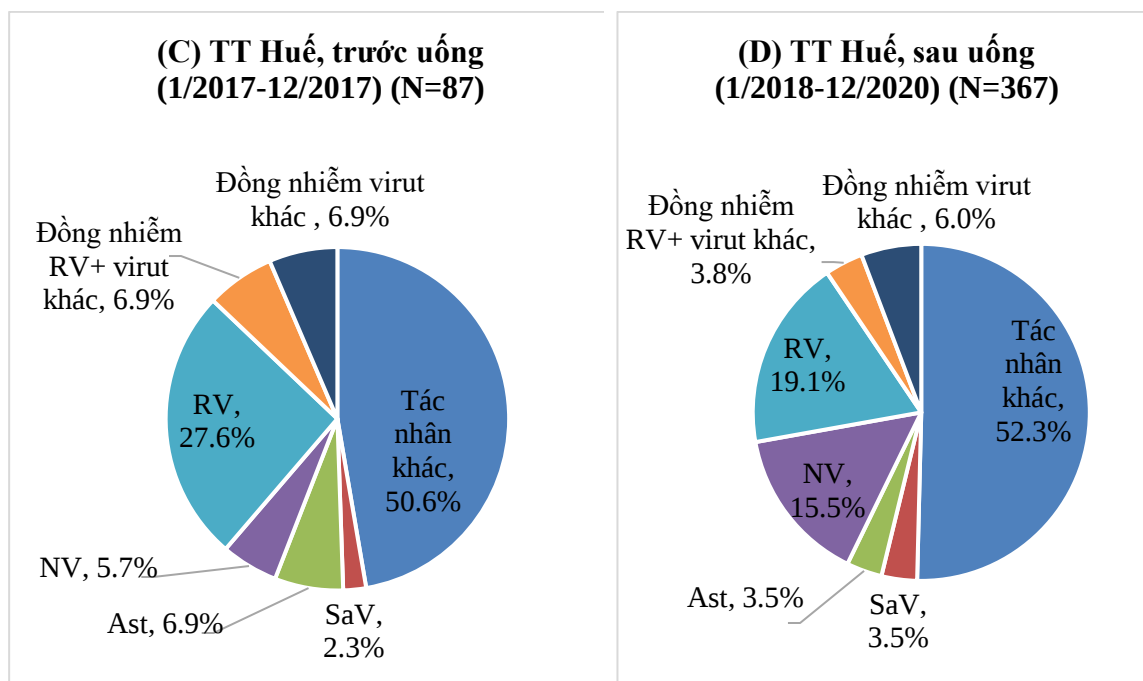
Bảng 3.14 thể hiện tỉ lệ nhiễm các tác nhân vi rút gây TCC ở nhóm uống và không uống theo độ tuổi. Nhìn chung, tỉ lệ nhiễm NV ở trẻ đã uống ở tất cả nhóm tuổi đều cao hơn tỉ lệ nhiễm NV ở các nhóm tương ứng không uống. Tuy nhiên, chỉ ở nhóm 6-11 tháng và 12-17 tháng, tỉ lệ nhiễm NV của nhóm uống và không uống có khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p=0,015$ và $p=0,026$.

Tỉ lệ nhiễm Ast ở trẻ đã uống và không uống không có khác biệt ($p>0,05$), ngoại trừ nhóm 6-11 tháng tuổi, tỉ lệ nhiễm Ast của nhóm đã uống thấp hơn có nghĩa thống kê tỉ lệ này ở nhóm chưa uống ($p=0,015$). Tỉ lệ nhiễm Sav của nhóm đã và không uống tương ứng với mỗi độ tuổi không khác biệt ở ý nghĩa với $p>0,05$.

3.2.2. Sự phân bố của các vi rút gây TCC ở trẻ em nhập viện dưới 5 tuổi trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1

3.2.2.1. Sự phân bố các vi rút gây TCC ở trẻ em nhập viện dưới 5 tuổi trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1





Hình 3.12. Sự phân bố các tác nhân vi rút gây TCC ở trẻ em < 5 tuổi trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1 tại Nam Định, 4/2017-11/2020 và Huế, 1/2017-11/2020

Để phân tích mối quan hệ của các tác nhân vi rút gây TCC với nhau giai đoạn trước và sau uống, chúng tôi phân tích sự phân bố các tác nhân gây TCC ở trẻ em. Kết quả tại hình 3.12A-D thể hiện sự phân bố các tác nhân gây TCC ở Nam Định và Huế trước và sau thực hiện uống vắc xin Rotavin-M1.

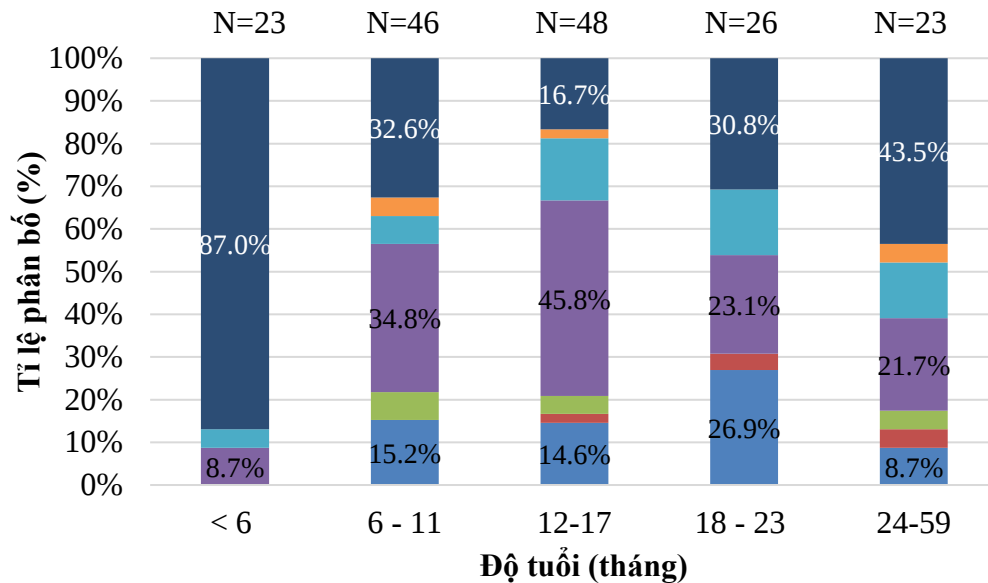
Ở Nam Định, số ca TCC do nhiễm 4 vi rút chiếm 63,3% tổng trường hợp TCC do mọi nguyên nhân ở giai đoạn trước uống vắc xin và giảm còn 60,2% ở giai đoạn sau uống vắc xin. Tỷ lệ phân bố của các tác nhân RV giảm từ 30,7 % xuống 22,0% và các ca đồng nhiễm RV với các tác nhân khác cũng giảm từ 10,8% xuống 5,8%. Ngược lại, ca nhiễm NV chiếm tỷ lệ phân bố cao hơn ở giai đoạn sau uống vắc xin (từ 13,9% lên 25,7%) và đã trở thành tác nhân gây TCC phổ biến nhất. Sự phân bố các ca Ast và Sav chiếm tỷ lệ ít và không thay đổi rõ rệt ở 2 giai đoạn (Hình 3.12A-B).

Ở Huế, các ca nhiễm 4 vi rút này chỉ chiếm tỷ lệ thấp hơn ở Nam Định, chiếm 49,4% tổng số ca do mọi nguyên nhân ở giai đoạn trước uống vắc xin và giảm dần còn 47,7% ở giai đoạn sau uống vắc xin. tỷ lệ phân bố có giảm từ 27,6% còn 19,1% ở giai đoạn sau uống vắc xin nhưng RV vẫn là tác nhân phổ biến nhất gây TCC trong số 4 tác nhân. Các trường hợp đồng nhiễm RV với các tác nhân khác phân bố giảm

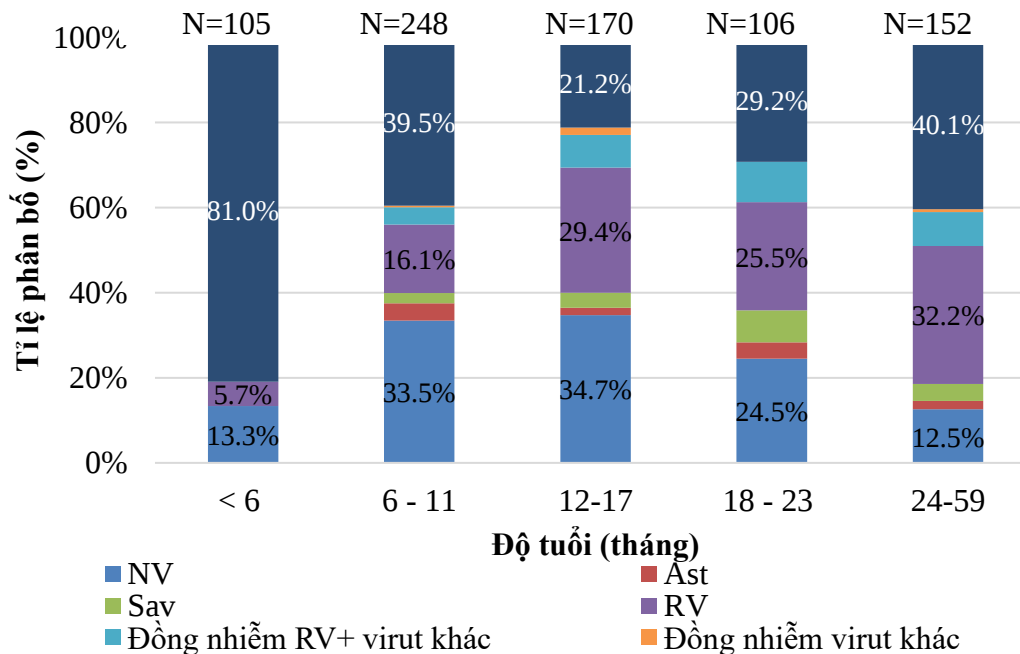
(từ 6,9% còn 3,8%). NV phân bố với tỉ lệ ngày càng cao, từ 5,7% lên 15,5% và là nguyên nhân thứ 2 gây TCC. Tương tự, các ca Ast và SaV chiếm tỉ lệ phân bố nhỏ và không thay đổi rõ rệt ở 2 giai đoạn (hình 3.12C-D).

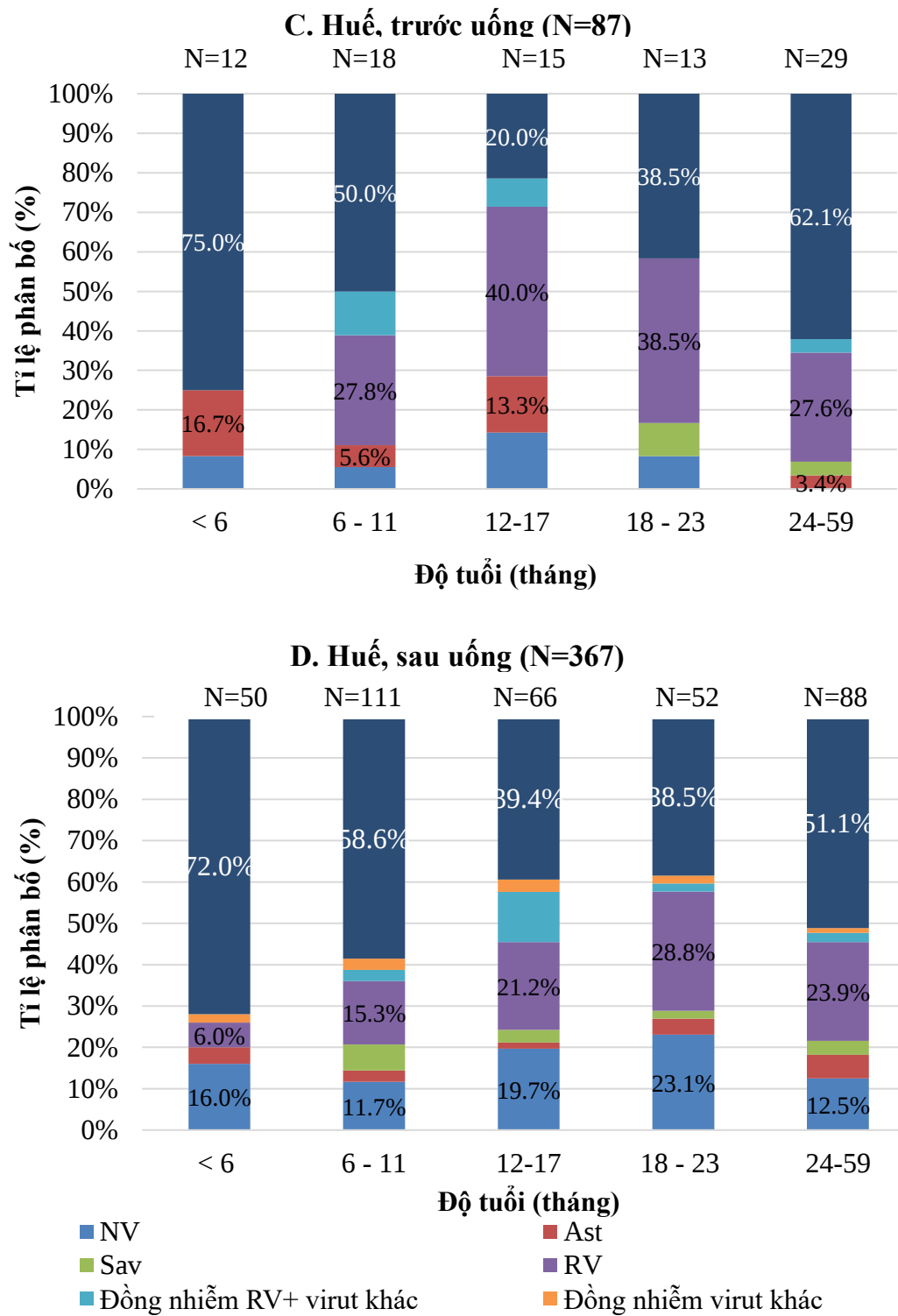
3.2.2.2. Sự phân bố các tác nhân vi rút gây TCC ở trẻ em nhập viện dưới 5 tuổi trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1 theo độ tuổi

A. Nam Định, trước uống (N=166)



B. Nam Định, sau uống (N=781)





Hình 3.13. Sự phân bố tác nhân gây TCC ở trẻ em theo độ tuổi trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1 tại Nam Định, 4/2017-11/2020 và Huế, 1/2017-11/2020

Hình 3.13A và 3.13B thể hiện sự phân bố tác nhân gây TCC ở trẻ em theo độ tuổi giai đoạn trước và sau uống ở Nam Định. Ở cả 2 giai đoạn, các vi rút RV, NV, Ast và Sav là nguyên nhân chủ yếu gây TCC ở trẻ em > 6 tháng tuổi, rõ rệt nhất là nhóm 12-17 tháng với 83,3% và 78,8% số ca TCC là do các vi rút này (tương ứng với giai đoạn trước và sau uống). Giai đoạn trước uống vắc xin, RV là tác nhân phổ biến nhất trong số 4 tác nhân vi rút gây TCC cho trẻ <5 tuổi ở hầu hết các nhóm tuổi, đặc biệt là nhóm trẻ 6-11 tháng và 12-17 tháng tuổi với 34,8% và 45,8% ca TTC do nhiễm RV. Sau khi triển khai uống, các ca đơn nhiễm và đồng nhiễm RV chiếm tỉ lệ thấp dần ở hầu hết các và NV trở thành tác nhân phổ biến nhất trong số các tác nhân vi rút, thay thế RV ở nhóm trẻ 6-11 tháng và 12-17 tháng tuổi (tương ứng chiếm tỉ lệ 33,5% và 34,7%). Ast và Sav chiếm tỉ lệ nhỏ ở các nhóm tuổi và không quna sát rõ xu hướng thay đổi.

Ở cả 2 giai đoạn, các ca TCC nhập viện do nhiễm các tác nhân vi rút này ở Huế chiếm tỉ lệ thấp hơn ở Nam Định, nổi bật nhất là nhóm 12-17 tháng tuổi với các ca TCC do nhiễm 4 vi rút có tỉ lệ phân bố cao nhất. Xu hướng phân bố ở Huế cũng ghi nhận việc giảm tỉ lệ phân bố của các ca đơn nhiễm và đồng nhiễm RV và sự gia tăng tỉ lệ phân bố của NV tương tự Nam Định ở các nhóm tuổi > 6 tháng tuổi ở giai đoạn sau uống vắc xin. Tuy nhiên, RV vẫn là tác nhân gây bệnh phổ biến nhất ở cả 2 giai đoạn.

3.2.3. Đặc điểm lưu hành nhóm gen, kiểu gen của vi rút Noro, Astro và Sapo ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi

3.2.3.1. Đặc điểm lưu hành các nhóm gen vi rút Noro

Bảng 3.15. Sự phân bố các nhóm gen NV lưu hành tại Nam Định và Huế (2016-2020)

Địa điểm	N gen NV	Trước uống ^(a)	Sau uống	Tổng
		n/N (%)	n/N (%)	n/N (%)
Nam Định (N=263)	GI	1/33 (3,0%)	4/230 (1,7%)	5/263 (1,9%)
	GII	31/33 (93,9%)	217/230 (94,3%)	248/263 (94,3%)
	GIV	-	2/230 (0,9%)	2/263 (0,8%)
	Gmix	1/33 (3,0%)	7/230 (3,0%)	8/263 (3,0%)
Huế (N=79)	GI	-	2/73 (2,7%)	2/79 (2,5%)
	GII	6/6 (100,0%)	70/73 (95,9%)	76/79 (96,2%)
	GIV	-	-	-
	Gmix	-	1/73 (1,4%)	1/79 (1,3%)

^(a) Từ 12/2016-11/2020, giai đoạn trước uống vắc xin được tính từ trước tháng 4/2018 tại Nam Định và trước tháng 1/2018 ở Huế

“-”: Không phát hiện

Trong số 370/1667 mẫu phát hiện NV dương tính, GII là chủng có ưu thế lưu hành cao nhất với 248/263 ca (chiếm 94,3%) ở Nam Định và 76/79 ca (chiếm 96,2%) ở Huế. Sự phân bố các ca ở giai đoạn trước uống và sau uống vắc xin không có khác biệt đáng kể, GII luôn là chủng chiếm ưu thế tuyệt đối ở cả 2 giai đoạn. GI được phát hiện với tỉ lệ nhỏ, tương ứng là 1,9% và 2,5% ở Nam Định và Huế. GIV xuất hiện ở Nam Định với 2/263 ca (chiếm 0,8%) và không được phát hiện ở Huế. Tất cả các ca đồng nhiễm ở cả 2 địa điểm đều là GII kết hợp với các chủng G khác, trong đó 8/9 ca đồng nhiễm GII và GI, 1 ca nhiễm đồng thời GII và GIV.

3.2.3.2. Đặc điểm lưu hành các chủng vi rút Astro

Bảng 3.16. Sự phân bố của các chủng vi rút Astro lưu hành tại Nam Định và Huế (2016-2021)

Địa điểm	Kiểu gen Ast	Trước uống ^(a)	Sau uống	Tổng
		n/N (%)	n/N (%)	n/N (%)
Nam Định (N=33)	HAstV-1	1/6 (16,7%)	17/27 (63,0%)	18/33 (54,5%)
	HAstV-2	2/6 (33,3%)	8/27 (29,6%)	10/33 (30,3%)
	HAstV-4	-	2/27 (7,4%)	2/33 (6,1%)
	HAstV-5	3/6 (50,0%)	-	3/33 (9,1%)
Huế (N=18)	HAstV-1	3/6 (50,0%)	2/12 (16,7%)	5/18 (27,8%)
	HAstV-2	-	2/12 (16,7%)	2/18 (11,1%)
	HAstV-4	-	8/12 (66,7%)	8/18 (44,4%)
	HAstV-5	3/6 (50,0%)	-	3/18 (16,7%)

^(a) Giai đoạn trước uống vắc xin được tính từ trước tháng 4/2018 ở Nam Định và trước tháng 1/2018 ở Huế

“-”: Không phát hiện

Trong số 51 ca nhiễm Ast từ 2016-2021 được giải trình tự và xác định kiểu gen, có 4 kiểu gen HAST được lưu hành, trong đó kiểu gen HAstV-1 được phát hiện với tỉ lệ cao nhất ở Nam Định (54,5%), tiếp theo HAstV-2 (30,3%) và HAstV-4, HAstV-5 chiếm tỉ lệ nhỏ. Tuy nhiên, ở Huế HAstV-4 được phát hiện phổ biến hơn (44,4%), tiếp theo HAstV-1 (27,8%), HAstV-5 và HAstV-2.

Sự lưu hành các kiểu gen phổ biến ở Nam Định và Huế có sự thay đổi theo thời gian. Ở Nam Định, HAstV-5 phổ biến ở giai đoạn trước uống vắc xin (50%) nhưng HAstV-1 phổ biến giai đoạn sau uống vắc xin (63,0%). Ở Huế, HAstV-5 và HAstV-1 phổ biến ở giai đoạn trước uống vắc xin (chiếm 50,0% mỗi loại) nhưng HAstV-4 lại phổ biến giai đoạn sau uống vắc xin (66,7%), đều tập trung từ 2018-2019.

3.2.3.3. Đặc điểm lưu hành các chủng vi rút Sapo

Bảng 3.17. Sự phân bố của các chủng vi rút Sapo lưu hành tại Nam Định và Huế (2016-2020)

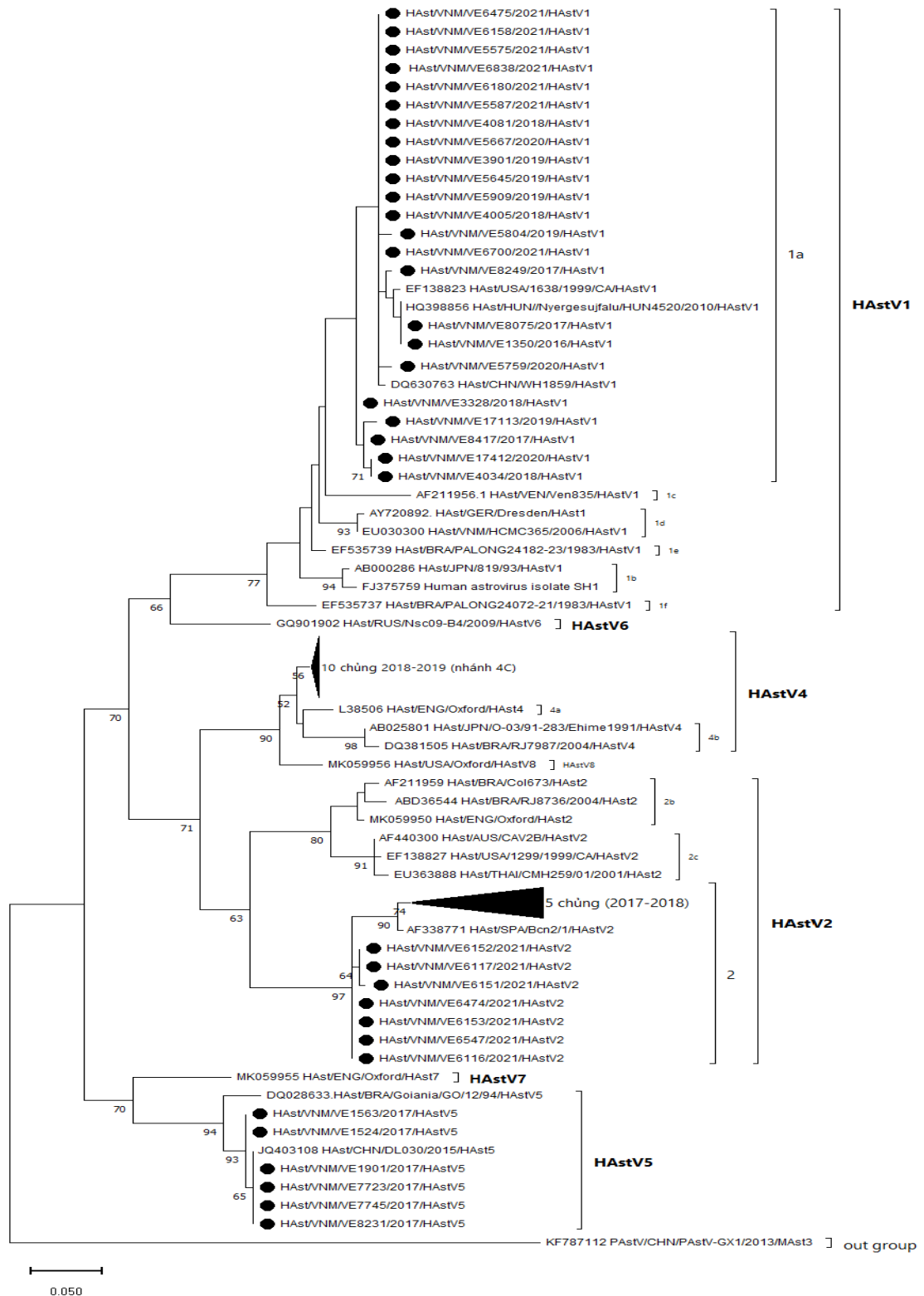
Địa điểm	Kiểu gen Sav	Trước uống ^(a)	Sau uống	Tổng
		<i>n/N (%)</i>	<i>n/N (%)</i>	<i>n/N (%)</i>
Nam Định (N=32)	GI.1	5/9 (55,6%)	8/23 (34,8%)	13/32 (40,6%)
	GI.2	-	3/23 (13,0%)	3/32 (9,4%)
	GII.1	1/9 (11,1%)	3/23 (13,0%)	4/32 (12,5%)
	GII.2	1/9 (11,1%)	2/23 (8,7%)	3/32 (9,4%)
	GII.3	-	2/23 (8,7%)	2/32 (6,3%)
	GII.5	1/9 (11,1%)	-	1/32 (3,1%)
	GII.7	1/9 (11,1%)	1/23 (4,3%)	2/32 (6,3%)
	GIV.1	-	3/23 (13,0%)	3/32 (9,4%)
	GV.1	-	1/23 (4,3%)	1/32 (3,1%)
Huế (N=8)	GI.1	-	3/7 (42,9%)	3/8 (37,5%)
	GI.2	-	1/7 (14,3%)	1/8 (12,5%)
	GII.1	-	1/7 (14,3%)	1/8 (12,5%)
	GII.2	-	1/7 (14,3%)	1/8 (12,5%)
	GII.3	1/1 (100,0%)	-	1/8 (12,5%)
	GII.5	-	1/7 (14,3%)	1/8 (12,5%)

^(a) Giai đoạn trước uống vắc xin được tính từ trước tháng 4/2018 ở Nam Định và trước tháng 1/2018 ở Huế

“-”: Không phát hiện

Trong số 40 ca Sav được giải trình tự NGS và xác định kiểu gen, chủng GI.1 được phát hiện với tỉ lệ cao nhất ở cả Nam Định và Huế, tương ứng với 13/32 (40,6%) và 3/8 (37,5%). Tại Nam Định, chủng GI.1 chiếm tỉ lệ cao với 5/9 (55,6%) ở giai đoạn trước uống và 8/23 (34,8%) ở giai đoạn sau uống vắc xin. Các chủng Sav lưu hành khá đa dạng với sự xuất hiện của nhiều chủng: GI.2, GII.1, GII.2, GII.3, GII.5, GII.7, GIV.1 và GV.1 nhưng tần suất xuất hiện thấp.

3.2.4. Đặc điểm di truyền của vi rút Astro



(Các dấu chấm tròn được sử dụng để biểu thị các chủng đang nghiên cứu)

Hình 3.14. Cây phát sinh chủng loại của các chủng vi rút Astro, 2016-2020

Kết quả phân tích 51 chủng Ast từ 2016-2021 trên cây phát sinh chủng loại cho thấy, các chủng trong mỗi kiểu gen đều thuộc 1 nhánh gen. Tất cả 23 chủng phân lập từ 2016-2021 có kiểu gen HAstV-1 đều thuộc nhánh 1a. Tương tự, 12 mẫu từ 2017-2021 có kiểu gen HAstV-2 đều thuộc nhánh 2a., trong khi 10 chủng HAstV-4 từ 2018-2019 đều thuộc nhánh 4c và chủ yếu tập trung ở Huế.

Như vậy, tổng hợp tại 2 địa điểm nghiên cứu, nhánh gen HAstV-1a là nhánh lưu hành phổ biến nhất với 45,1%, tiếp theo là HAstV-2a (23,5%) HAstV-4c (19,6%) và HAstV-5 (11,8%) trong suốt 5 năm theo dõi.

Chương 4- BÀN LUẬN

4.1. Tỷ lệ nhiễm và đặc điểm kiểu gen của vi rút Rota ở trẻ em tiêu chảy cấp dưới 5 tuổi trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1

✓ *Số ca và tỷ lệ nhiễm vi rút Rota ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1*

Tỷ lệ nhiễm RV hàng năm trong nghiên cứu này ở giai đoạn trước khi triển khai uống ở Nam Định là 43,2%, khá tương đồng với các nghiên cứu khác ở Việt Nam gần đây. Nghiên cứu giám sát lưu hành của RV từ năm 2012 – 2015 ở 3 điểm giám sát ở khu vực Bắc, Trung, Nam cho thấy tỷ lệ RV dương tính là 46,7% và giảm dần hàng năm (từ 54,7% năm 2012 còn 36,6% vào năm 2015) [79]. Hai nghiên cứu khác tại Bệnh viện Nhi đồng Thành phố Hồ Chí Minh trong giai đoạn từ 2015 đến tháng 6/2017 và giai đoạn từ 2013 đến 2018 cho thấy tỷ lệ dương tính với RV lần lượt là 45,3% và 46,8% [13, 166]. Ngoài ra, số liệu giám sát RV từ hầu hết các nước trong khu vực Đông Nam Á, là khu vực chưa áp dụng các chương trình uống vắc xin quốc gia cho vắc xin phòng TCC do RV giai đoạn từ 2008- 2018 cũng cho kết quả tương tự với 40,78% ca TCC do nhiễm RV [94]. Số liệu tổng hợp từ 49 quốc gia cũng có tỷ lệ trung bình các mẫu xét nghiệm dương tính với RV ở trẻ em <5 tuổi nhập viện vì TCC là 40% (IQR, 28–45%) trước khi triển khai uống vắc xin phòng TCC do RV[33]. Như vậy, tỷ lệ nhiễm RV ở Nam Định giai đoạn trước uống vắc xin có đặc điểm tương đồng với tình hình TCC do RV chung ở Việt Nam và các nước trong khu vực chưa triển khai uống vắc xin.

Tuy nhiên, tỷ lệ nhiễm RV ở Huế trước uống khá thấp (20,3%), trong đó tỷ lệ nhiễm ở cả 2 bệnh viện huyện tham gia nghiên cứu là Hương Trà (16,2%) và Phú Vang (21,7%) thấp hơn rõ rệt tỷ lệ nhiễm RV ở bệnh viện TW Huế giám sát cùng thời điểm (39,7%). Bệnh viện TW Huế là bệnh viện tuyến đầu, tập trung nhiều ca bệnh TCC nặng ở nhiều địa phương khác nhau, bao gồm các ca bệnh từ 2 huyện Hương Trà và Phú Vang. Trong nghiên cứu này, có 1 số lượng đáng kể mẫu nghiên cứu được thu thập ở bệnh viện TW Huế đến từ trẻ sinh sống ở 2 huyện trên. Năm 2017, có 102 ca (chiếm 30% số ca nhập bệnh viện TW Huế) có địa chỉ ở 2 huyện Hương Trà, và Phú Vang với tỷ lệ phát hiện RV khoảng 36%, cao hơn tỷ lệ phát hiện RV trong số các mẫu thu được ở 2 huyện này. Đây là một trong số các bằng chứng rõ ràng, phản ánh tình trạng bệnh viện Đa khoa của 2 huyện Phú Vang và Hương Trà đã không thu thập đủ mẫu ca bệnh trên địa bàn, từ đó làm cho cỡ mẫu nghiên cứu giảm và không phản

ảnh đầy đủ tình trạng nhiễm RV thực tế trên địa bàn 2 huyện này. Ngoài ra, khi so sánh với kết quả giám sát tại Bệnh viện Trung ương Huế (2014 -2015) có 58% xét nghiệm dương tính với RV thì tỉ lệ nhiễm RV ở bệnh viện TW Huế và 2 huyện năm 2017 đều thấp hơn đáng kể. Điều này có thể do vai trò ảnh hưởng của các tác nhân gây TCC không phải RV hoạt động mạnh, từ đó làm giảm tỉ lệ nhiễm RV. Tuy nhiên, trong giới hạn nghiên cứu này chưa có đủ số liệu để khẳng định giả thuyết trên.

Sau 3 năm triển khai uống vắc xin Rotavin-M1 thường quy cùng các vắc xin khác trong chương trình TCMR tại 4 huyện của Nam Định và 2 huyện của Huế, tổng số ca TCC nhập viện, số ca TCC do RV hàng năm đều giảm ở 2 địa điểm so với thời điểm chưa triển khai cho uống vắc xin này. Xu hướng giảm ca TCC nhập viện ở Nam Định giảm rõ rệt hơn ngay từ năm đầu tiên sau uống (30,9%) và sau 3 năm (giảm 59,7%), còn ở Huế các chỉ số này chỉ giảm vào năm thứ 2 và thứ 3 sau uống với mức giảm 68,4%. Tương tự, số TCC do RV giảm 81,7% ở Nam Định và 55,4% ở Huế sau 3 năm uống vắc xin. Tuy nhiên, vào năm thứ 3 sau uống, số ca nhập viện do TCC do mọi nguyên nhân và số ca TCC do RV đều giảm mạnh, có thể do trùng thời điểm với đại dịch COVID-19 bắt đầu từ đầu năm 2020. Ở các địa điểm nghiên cứu, 1 số thời điểm bị áp dụng các biện pháp can thiệp như: giãn cách xã hội, cách ly...nên việc tiếp cận các dịch vụ y tế bị hạn chế. Nhiều ca TCC bố mẹ trẻ sẽ lựa chọn biện pháp thay thế như: điều trị tại nhà hoặc điều trị ngoại trú, đặc biệt với những ca bệnh nhẹ-trung bình. Ngoài ra, trong tình hình bệnh dịch, các biện pháp 5K được áp dụng triệt để với việc tăng cường ý thức và các biện pháp vệ sinh cá nhân, vệ sinh môi trường sống, hạn chế tiếp xúc... nên hạn chế được nhiều loại bệnh lây nhiễm nói chung và bệnh TCC do các tác nhân như vi rút, vi khuẩn.

Trong giai đoạn dịch Covid-19, tỉ lệ nhiễm RV ở Nam Định (19,7%) giảm so với các năm, trong khi ở Huế tỉ lệ nhiễm RV tăng cao nhất (28,7%) trong các năm nghiên cứu. Ngoài tác động của việc sử dụng vắc xin thì tỉ lệ nhiễm RV có thể còn liên quan đến các tác nhân gây TCC khác hoặc yếu tố nhiễu khác...Nghiên cứu ở Ba Lan cho thấy tỉ lệ ca TCC do vi khuẩn không bị ảnh hưởng bởi các hạn chế do dịch Covid do các nguồn lây nhiễm khác nhau. Các ca TCC do vi khuẩn gây ra có thể do vệ sinh kém hoặc tiêu thụ thực phẩm hoặc nước bị nhiễm vi khuẩn, và mức độ nghiêm trọng của những ca bệnh này buộc bệnh nhân phải tìm kiếm sự trợ giúp y tế, bất kể đại dịch [159]. Do vậy, tỉ lệ nhiễm 1 số tác nhân TCC như RV, NV được ghi nhận tăng ở Ba Lan [159] trong khi tỉ lệ này được ghi nhận giảm ở nhiều nước trong giai đoạn dịch COVID-19 [88, 158]. Dịch Covid-19 là 1 yếu tố không liên quan đến uống

vắc xin có thể gây nhiều kết quả nhưng nhìn chung kết quả nghiên cứu đã phản ánh xu hướng giảm gánh nặng bệnh TCC liên quan đến triển khai uống vắc xin Rotavin-M1. Tuy nhiên, mức độ ảnh hưởng của việc triển khai uống vắc xin Rotavin-M1 ở 2 địa điểm nghiên cứu là khác nhau.

Mức giảm tỉ lệ dương tính với RV sau 3 năm uống Rotavin-M1 là 40,6% ở Nam Định, tương đương với mức giảm 39,6% (95%CI: 35,4 - 43,8%) sau uống RotaTeq và Rotarix khi tổng hợp dữ liệu từ Mạng lưới Giám sát RV toàn cầu (GRSN) (2008-2016) ở 82 quốc gia [23]. Mức giảm này cao hơn mức giảm ở Khu vực Đông Địa Trung Hải (26,4%, 95%CI: 15,0–37,8%), thấp hơn mức giảm ở khu vực Châu Âu (55,2%, 95%CI: 43,0–67,4%). Ở những nước triển khai chương trình uống quốc gia, tỉ lệ nhiễm RV chỉ còn 23,0% (95%CI: 0,7 - 57,7%) [23].

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh mức giảm tỉ lệ nhiễm RV khác nhau ở các nhóm tuổi và liên quan đến mức độ bao phủ vắc xin. Ở nhóm trẻ < 1 tuổi, tỉ lệ nhập viện do RV giảm 43% (IQR, 38–58%) khi tỉ lệ bao phủ vắc xin phòng TCC do RV là <65%, giảm 79% (IQR, 63–82%) với tỉ lệ bao phủ là 65%–84% và 85% (IQR, 75–94%) với tỉ lệ bao phủ $\geq 85\%$ [33]. TCYTTG đã khuyến cáo để chứng minh tác động rõ rệt của vắc xin đến bệnh TCC do RV thì cần có mức độ bao phủ vắc xin khá cao (> 60-70%) trong cộng đồng [176].

Với tỉ lệ bao phủ ít nhất một liều vắc xin Rotavin-M1 ở Nam Định là 77%, độ giảm tỉ lệ dương tính với RV ở trẻ em <5 tuổi ở Nam Định sau 3 năm sau uống vắc xin là 40,6%, giảm rõ rệt nhất ở năm thứ nhất là 51,0 % và nhóm trẻ < 12 tháng tuổi (49,5%). Vì giới hạn độ tuổi được sử dụng để uống vắc xin Rotavin-M1, trẻ em từ 16 tuần tuổi trở lên sẽ không đủ điều kiện để được uống vắc xin Rotavin-M1. Tỉ lệ bao phủ vắc xin trong quần thể tăng chậm hơn đạt 35,7% trong năm đầu tiên và đạt mức cao nhất là 70-75% trong năm thứ ba sau khi giới thiệu vắc xin tại Nam Định. Ngoài ra, tỉ lệ bao phủ cao nhất đạt được trong nhóm trẻ <12 tháng tuổi và 12-23 tháng tuổi, đây là các nhóm tuổi đủ điều kiện được uống vào cuối thời kỳ giám sát. Mức độ bao phủ thấp này để lại một nhóm trẻ em nhạy cảm tích lũy trong năm thứ hai sau khi uống vắc xin và có khả năng làm tăng sự lưu hành của RV trong quần thể. Điều này có thể là nguyên nhân dẫn đến tỉ lệ trẻ có kết quả RV dương tính trong năm thứ hai sau uống vắc xin tăng so với năm đầu tiên giới thiệu sau vắc xin và giảm vào năm sau đó và đỉnh mùa năm thứ hai trong giai đoạn 3 năm sau uống và mức giảm nguy cơ nhiễm RV ở nhóm trẻ <12 tháng tuổi là rõ rệt nhất.

Xu hướng phân bố hai năm một lần rõ rệt giữa các năm cao và thấp xen kẽ đã quan sát được ở 1 số nước trong thập kỷ đầu tiên sau khi triển khai vắc xin phòng TCC do RV như ở Mỹ, Ba Lan, Haiti và một số quốc gia khác [68, 159]. Sự thay đổi hai năm một lần về số lượng trẻ em nhập viện ở những nơi này có thể do những thay đổi về tính nhạy cảm của quần thể. Tỷ lệ trẻ em từ 12–23 tháng tuổi được uống đủ liều vắc xin phòng TCC do RV ở Mỹ vẫn thấp hơn đáng kể so với các loại vắc xin dành cho trẻ sơ sinh khác; trong số trẻ em sinh năm 2016–2017, tỉ lệ bao phủ ước tính là 75% đối với vắc xin phòng TCC do RV và 93% đối với vắc xin DTaP (bạch hầu, uốn ván, ho gà) [35, 68]. Mức độ bao phủ dưới mức tối ưu dẫn đến sự tích lũy trẻ em nhạy cảm trong khoảng thời gian 2 năm, dẫn đến một mùa gia tăng hoạt động của RV. Mô hình này không được quan sát thấy ở các quốc gia với tỉ lệ bao phủ vắc xin vượt quá 85% [22]. Trong nghiên cứu đó, trẻ em từ 1–4 tuổi chiếm gần 2/3 tổng số trẻ em nhập viện. Có tới 39% sự khác biệt về số ca nhập viện ở nhóm tuổi này được giải thích bằng số ca bệnh ở nhóm tuổi này trong năm trước đó. Do đó, sự tích lũy của một nhóm dân số dễ mắc bệnh ở nhóm tuổi này có thể là động lực của tính thời vụ được quan sát hai năm một lần. Trong nghiên cứu này, độ bao phủ ở các địa điểm nghiên cứu đạt khoảng 80% nên cần theo dõi thêm và lưu ý mô hình 2 năm 1 lần có thể có ở Việt Nam.

Do tỉ lệ bao phủ vắc xin Rotavin-M1 ở Huế (42%) thấp hơn đáng kể ở Nam Định và thấp hơn cả ngưỡng được TCYTTG khuyến cáo để đánh giá tác động của vắc xin. Tỷ lệ ca nhập viện do RV ở trẻ em <5 tuổi giai đoạn trước uống vắc xin thấp gần $\frac{1}{2}$ so với Nam Định và trong 3 năm sau uống vắc xin Rotavin-M1 tỉ lệ này dao động trong khoảng 17,9-24,5% hàng năm và không xác định được xu hướng thay đổi giai đoạn trước và sau uống. Ngoài ra, Bệnh viện TW Huế ngừng tham gia từ tháng 10/2018 và bị loại khỏi các phân tích xu hướng nên làm giảm số lượng trẻ em được đưa vào phân tích, đặc biệt ở Huế. Tỷ lệ bao phủ thấp và tỉ lệ RV dương tính trước uống thấp có thể là nguyên nhân giải thích cho việc tác động của vắc xin Rotavin-M1 không rõ rệt ở Huế.

Tác động của vắc xin sẽ phụ thuộc vào hiệu quả của vắc xin, thời gian hoàn thành lịch uống và tỉ lệ uống. Ví dụ, ở Malawi, sự giảm đồng thời tỉ lệ ca TCC nhập viện do RV ở trẻ sơ sinh đã được chứng minh với sự gia tăng tỉ lệ bao phủ vắc xin (75% vào năm 2013, 92% vào năm 2014, và 95% vào năm 2015). Tương tự, dữ liệu sau uống từ Ấn Độ cho thấy tỉ lệ TCC do RV giảm nhiều hơn từ các bang có tỉ lệ bao phủ vắc xin cao hơn [169]. Do vậy, các quốc gia nhanh chóng đạt được và duy trì

mức độ bao phủ cao vắc xin phòng TCC do RV để giảm được gánh nặng bệnh tật do RV một cách bền vững [23, 33].

Kết quả của nghiên cứu này đã chứng minh sự phân bố RV theo mùa ở 2 địa điểm nghiên cứu ở Nam Định (miền Bắc) và Huế (miền Trung) có sự khác biệt. Các ca nhiễm RV ở Nam Định phổ biến vào các tháng mùa đông và ở Huế các ca nhiễm tập trung từ tháng 1 đến tháng 6 hàng năm. Kết quả này tương tự với các nghiên cứu khác trước đó cho rằng các đỉnh nhiễm RV thay đổi theo khu vực liên quan đến khí hậu miền Bắc Việt Nam với mùa đông lạnh và khô còn miền Trung và miền Nam với khí hậu nhiệt đới quanh năm [2, 79]. Nghiên cứu giám sát điểm RV của Huyền và cộng sự giai đoạn 2012-2015 đã nhận định mùa của RV từ tháng 12 đến tháng 5 năm sau ở tập trung hầu hết các trường hợp TCC do RV (77,1%) [79]. Ở miền Bắc, cao điểm nhiễm RV từ tháng 11 đến tháng 1 và dương tính thấp nhất từ tháng 7 đến tháng 8, còn với khu vực miền Trung, cao điểm từ tháng 2 đến tháng 4 và mức dương thấp nhất từ khoảng tháng 6 đến tháng 10 nhưng tác giả cũng nhận định kiểu phân bố này không rõ ràng ở miền Trung và miền Nam Việt Nam với khí hậu nhiệt đới quanh năm [79].

Khi không có tác động trực tiếp như việc uống vắc xin thì nhiều nhà nghiên cứu đưa ra nhận xét sự phân bố theo mùa ở mỗi khu vực ổn định, tính chất nhiễm RV theo mùa không thay đổi như trong kết quả nghiên cứu của Huyền và cộng sự trong thời gian 4 năm thời kỳ trước uống tại Việt Nam [79]. Kết quả nghiên cứu ở một số nước khu vực Đông Nam Á chưa triển khai uống vắc xin Rotavin-M1 phòng TCC do RV [94]. Tuy nhiên, theo kinh nghiệm của một số nước đã thực hiện uống vắc xin, sự phân bố theo mùa của RV có thay đổi. Ví dụ như ở Phần Lan, tính theo mùa của các ca TCC do RV chuyển từ mùa đông sang mùa xuân sau khi triển khai uống vắc xin trong chương trình TCQG. Trước năm 2009 ở Phần Lan, TCC do RV thường xảy ra từ tháng 1 đến tháng 3, và một vài năm sau chủ yếu từ tháng 3 đến tháng 5 [73]. Sự phân bố theo mùa của RV không rõ ràng trong thời kỳ sau uống là một dấu hiệu tốt cho thấy việc uống vắc xin phòng TCC do RV thường quy đã phá vỡ mô hình dịch tễ học của nó [73]. Trong nghiên cứu này, đã thấy đỉnh nhiễm RV ở Nam Định của các năm sau uống vẫn theo quy luật vào các tháng mùa đông nhưng giảm rõ rệt. Do vậy, việc theo dõi sự phân bố theo mùa RV là cần thiết giai đoạn sau uống vắc xin.

Độ tuổi nhiễm RV trung vị giai đoạn trước uống vắc xin là 13 tháng (IQR: 10-20) và có xu hướng tăng lên giai đoạn sau uống vắc xin (17 tháng, (IQR: 12-22) trong năm đầu tiên và 16 tháng (IQR: 11- 25) vào năm thứ hai sau uống). Một cuộc giám sát toàn cầu ở 82 quốc gia, độ tuổi trung vị của các ca dương tính với RV là 12 tháng (IQR 7 - 20) trong giai đoạn trước khi uống vắc xin, và 15 tháng (9 - 25; $p < 0,0001$) sau khi triển khai uống vắc xin Rotavin-M1 phòng RV [23]. Ở Brazil, dữ liệu cho thấy tuổi trung vị nhiễm RV tăng hơn 7 tháng sau khi uống vắc xin phòng RV [23].

✓ ***Đặc điểm kiểu gen của vi rút Rota trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1***

Các kiểu gen phổ biến nhất ở Nam Định và Huế đều thay đổi theo thời gian. Vào năm trước uống, kiểu gen G9P[8] chiếm ưu thế ở Nam Định (74,8%) và Huế (32,7%). Sau uống vắc xin, G9P[8] vẫn phổ biến ở Nam Định (48,4%) ở năm thứ nhất, tiếp đó là G8P[8] (67,2%) và G1P[8] (23,8%) vào năm thứ hai và thứ ba sau uống. Ở Huế, trong 3 năm sau uống kiểu gen phổ biến lần lượt là G3P[8] (52,2%) G9P[8] (20,8%) và G8P[8] (47,2%).

Các nghiên cứu trước đây tại Việt Nam đã khẳng định các kiểu gen GP tại Việt Nam luôn đa dạng, phức tạp, thay đổi theo thời gian và địa lý với sự xen kẽ, luân phiên cá chủng chiếm ưu thế, đặc biệt với kiểu gen G. Giai đoạn 1998-2009, các kiểu gen G1 phổ biến nhất (35,33%), sau đó đến G3 (28,28%), trong đó G1 phổ biến trong nhiều năm nhưng xen kẽ 1 số năm là chủng G2, G9 và G3 chiếm ưu thế. Kiểu gen G1 phổ biến nhất ở miền Nam nhưng G3 lại chiếm ưu thế ở miền Bắc. Theo chiều từ Bắc-Nam, tỉ lệ lưu hành G3 có xu hướng giảm dần và G1 tăng dần [1, 7]. Tuy nhiên, đến giai đoạn 2013-2018, G3 là kiểu gen phổ biến nhất ở khu vực miền Nam (46,3%) [166]. Ngược lại, P[8] luôn là kiểu gen P phổ biến nhất Việt Nam và các typ khác ít xuất hiện [1, 7, 166].

Các nghiên cứu khác từ 2012 - 2015 tại 3 điểm giám sát đại diện của 3 miền của Việt Nam cho thấy G1P[8] phổ biến nhất từ 2012 – 2013 (lần lượt chiếm 80% và 82% tổng số mẫu), G2P[4] chiếm 36% và 28% ca TCC vào 2 năm 2014-2015. G8P[8] hầu như không xuất hiện năm 2012 và 2013 nhưng trở nên chiếm ưu thế (31%) vào năm 2015 [79]. Giai đoạn 2013-2018, G3P[8] là kiểu gen phổ biến nhất tại miền Nam, chủng G1P[8] chỉ phổ biến (69,9%) năm 2013 và sau đó không xuất hiện ngược lại G8P[8] mới xuất hiện năm 2014 và chiếm 47,2% năm 2016 [12, 13, 166]. Kết quả giám sát điểm vi rút rota tại miền Bắc và miền Trung Việt Nam cho thấy sự lưu hành

của G2P[4] từ 1/2012-5/2018 có sự thay đổi đột ngột theo từng giai đoạn. Tỷ lệ phát hiện G2P[4] là 16,38% (2012-2013) và 42,09% (2014-2015) sau đó giảm dần còn 3% trong quý 4 năm 2017 và tăng lên 40,35% trong tháng 4 và 5/2018 [16]. Tuy nhiên, các nghiên cứu tại các thời điểm và địa điểm giám sát khác nhau đã phản ánh đặc điểm phân bố đa dạng kiểu gen GP tại Việt Nam.

So sánh với số liệu giám sát RV từ 2008–2018 ở Đông Nam Á, nơi hầu hết các nước trong khu vực Đông Nam Á vẫn chưa áp dụng các chương trình uống vắc xin RV quốc gia, sự phân bố kiểu gen chủ yếu nhất của RV đã thay đổi, ngoại trừ Lào và Malaysia. Trong năm 2009– 2013, kiểu gen chiếm ưu thế nhất là G1P[8] và G2P[4], nhưng từ năm 2014 đã thay đổi thành những kiểu gen hiếm và bất thường là G3P[8], G8P[8] và G9P[8]. Một số kiểu gen RV không phổ biến như G2P[8], G8P[6], G5P[19], G9P[4], G9P[6] và G1P7 [5] đã được phát hiện. Việc uống vắc xin phòng TCC do RV có thể tạo áp lực chọn lọc, làm tăng tỉ lệ các chủng không phải vắc xin. Tại Philippines, Rotarix được đưa vào sử dụng từ vào tháng 7 năm 2012, tần suất các trường hợp TCC do G1P[8] gây ra đã giảm trong khi sự lưu hành của G9P[8] tăng lên đáng kể [94]. Tương tự Malaysia, sự thay đổi kiểu gen lưu hành và sự xuất hiện các chủng mới đã được quan sát ở Campuchia. G1P[8] chiếm ưu thế trong các năm 2010, 2011 và 2012 (lần lượt là 74, 66 và 79%), trong khi kiểu gen G2P[4] chiếm ưu thế từ 2013 (54%) đến 2014 (44%). Chủng không phổ biến trước đây là G8P[8] cũng xuất hiện vào năm 2014 (21%) và tăng vào năm 2015 (41%), cùng với sự xuất hiện của G9P[8] (10%). Đến năm 2016, việc phát hiện kiểu gen G9P[8] đã tăng lên 18%, và G3P[8] trở thành kiểu gen phổ biến nhất (63%) [94]. Ở Myanmar, G12P[8] được phát hiện từ năm 2009 đến 2012, dao động từ 28,3% năm 2009 đến 70% năm 2011. G2P[4] trở thành chủng chiếm ưu thế nhất trong năm 2012–2013, tiếp theo là G1P[8] trong năm 2013–2014. G9P[8] chỉ bao gồm 1% các chủng RV vào năm 2011 và tăng lên 97,5% vào năm 2014. Trong khi vào năm 2015, phần lớn (90%) các chủng RV bao gồm G9P[8] (54%) và G3P[8] (36%). G9P[8] xuất hiện ở Myanmar vào năm 2011 và là chủng phổ biến nhất vào năm 2014 và 2015 [94]. Ở Thái Lan, G3P[8] là chủng lưu hành phổ biến 2015 (47,3%) và 2016 (89,8%) [94]. Như vậy, các chủng lưu hành phổ biến giai đoạn 2016-2021 ở Nam Định và Huế có nhiều đặc điểm tương đồng với các nước ở Đông Nam Á với sự xuất hiện và phổ biến của G8P[8], G9P[8] là những chủng ít gặp ở các giai đoạn trước.

Vào năm thứ hai và thứ ba sau uống vắc xin (2019-2021), số lượng các mẫu dương tính với RV nhưng với tải lượng vi rút rất thấp, dẫn đến việc tách chiết ARN

và việc xác định kiểu gen trở nên khó khăn và dẫn đến tỉ lệ mẫu không thể xác định kiểu gen ngày càng tăng lên. Ở năm thứ ba sau uống, tổng mẫu bệnh phẩm dương tính với RV rất ít mà có đến 26,3% mẫu không thể xác định được kiểu gen và 16,3% số mẫu chỉ xác định một phần kiểu gen (kiểu gen G hoặc P) ở Nam Định và có 13,9% mẫu kiểm tra không xác định kiểu gen G và P và 16,7% mẫu chỉ có một phần kiểu gen G hoặc P ở Huế. Tuy nhiên, trong số mẫu không xác định được kiểu gen có 1 số mẫu có giá trị OD khá cao. Các mẫu này cũng có thể liên quan đến những biến đổi di truyền của các chủng này hay áp lực chọn lọc của vắc xin, tuy nhiên, cần phân tích thêm đặc điểm di truyền của các chủng này để có thêm cơ sở khẳng định cho giả thiết này.

Một trong những chủng cần lưu ý là chủng G1P[8] đã phổ biến ở Việt Nam trong nhiều năm và là thành phần có trong 3 vắc xin đang lưu hành tại Việt Nam là Rotavin-M1, Rotarix và RotaTeq. G1P[8] đã chiếm tỉ lệ cao nhất trong số các chủng lưu hành ở Việt Nam giai đoạn 1998-2009 [7]. Tỉ lệ lưu hành G1P[8] tại 3 điểm giám sát TCC giảm mạnh của từ 82% năm 2013 xuống còn 15% năm 2015 [79]. Ở miền nam Việt Nam tỉ lệ chủng G1P[8] giảm nhanh từ 69,9% năm 2013 còn 0% vào năm 2017 và 2018 [166]. Trong nghiên cứu này, tỉ lệ lưu hành G1P[8] trong giai đoạn 2016-2021 chiếm 2,7%, nhìn chung thấp hơn nhiều so với một số nghiên cứu giai đoạn trước đó và chỉ tăng đột biến vào năm 2021 tại Nam Định.

Chủng G1P[8] đột ngột chiếm ưu thế sau giai đoạn triển khai uống vắc xin phòng RV thường quy cũng đã xảy ra tương tự ở 1 số nơi trên thế giới. Ở một vùng thuộc nước Úc, sau 43 tháng thực hiện triển khai uống vắc xin Rotarix, một vụ dịch bùng phát do chủng G1P[8] xảy ra với 43 ca được ghi nhận [50]. Chủng G1P[8] trong đợt dịch này được khẳng định tương đồng cao và có mối quan hệ di truyền chặt chẽ với các chủng toàn cầu nên người ta đưa ra giả thiết chủng mới được du nhập thay thế các chủng đặc hữu đã có tại Úc [50].

Ngoài ra, có nhiều trường hợp chủng G1P[8] lưu hành liên quan đến vắc xin phòng TCC do RV. Các vắc xin đều từ các chủng RV sống giảm độc lực và 3 vắc xin lưu hành tại Việt Nam hiện nay đều từ chủng G1P[8] hoặc có thành phần là G1 và P[8]. Với các phương pháp phát hiện RV có độ nhạy cao hơn đang được sử dụng gần đây, nhiều nghiên cứu cho thấy việc lây nhiễm vi rút vắc xin trong phân thải ra phổ biến hơn những gì người ta nghĩ trước đây, ở cả trường hợp có triệu chứng hay không có triệu chứng với 21% đến 94% người uống vắc xin đã được phát hiện có vi rút vắc xin RotaTeq vào một thời điểm nào đó sau liều uống đầu tiên [78].

Có 1 số trường hợp chủng G1P[8] lưu hành gây TCC có nguồn gốc từ chủng vắc xin phòng TCC do RV. Một nghiên cứu ở Anh trong 3 năm triển khai uống toàn quốc Rotarix đã phát hiện 215/2637 (8%) ca nhiễm RV G1P[8] có nguồn gốc từ chủng Rotarix, trong đó có 41 ca TCC và 4/41 ở mức nặng. Hầu hết các trường hợp nhiễm RV trong 7 tuần sau uống vắc xin và 10 trong 17 ca nhiễm RV sau hơn 7 tuần bị suy giảm miễn dịch nghiêm trọng (SCID) [63]. Tương tự trường hợp sử dụng RotaTeq thường quy tại Úc, trong số 13 trẻ nhiễm RV có nguồn gốc vắc xin sau uống bị TCC, có 4 ca nhiễm G1P[8] do sự sắp xếp đoạn gen giữa các chủng vắc xin G1P[5] và G6P[8] và 7/13 trường hợp liên quan đến bệnh lý tiềm ẩn có thể ảnh hưởng đến chức năng miễn dịch [51]. Một nghiên cứu ở Nhật Bản sau khi triển khai uống toàn quốc 2 Rotarix và RotaTeq đã chỉ ra có 1,6% (6/372 ca) ca RV G1P[8] có nguồn gốc từ Rotarix gây TCC cho trẻ nhập viện sau 2-14 ngày uống. Trong đó có 4 ca nhiễm hoàn toàn từ chủng Rotarix và 2 ca có sự sắp xếp tổ hợp gen giữa chủng vắc xin và chủng vi rút hoang dại. Tuy nhiên, 4/6 trường hợp này đồng nhiễm với RV hoang dại và tác nhân gây TCC khác như: NV, E.Coli và vi rút đường ruột [84]. Nghiên cứu ở Phần Lan đã phát hiện thấy 8% trẻ em nhập viện vì TTC do RV có nguồn gốc vắc xin. Trong số các chủng này, kiểu gen G1 được phát hiện ở 81%. Tất cả trẻ em bị RV có nguồn gốc vắc xin cũng được nghiên cứu kiểm tra để phát hiện các vi rút khác gây TCC. Chỉ có 2 trẻ nhiễm G1P[8] không có dấu hiệu đồng nhiễm với các mầm bệnh khác; do đó, những trường hợp bị TCC này có thể có liên quan nhân quả với RV có nguồn gốc vắc xin. Trong số 2 trường hợp đó, 1 trường hợp là trẻ 3 tháng tuổi mới được uống vắc xin, và trường hợp còn lại là trẻ 7 tuổi chưa được uống vắc xin. Có thể còn có các trường hợp có triệu chứng liên quan đến G1P[8] không được ghi nhận đầy đủ nếu triệu chứng viêm dạ dày ruột nhẹ tại bệnh viện [73]. Như vậy, đa số trường hợp nhiễm G1P[8] bị có nguồn gốc từ vắc xin xảy ra sau uống vắc xin thời gian ngắn và TCC được coi là một trong tác dụng phụ khi sử dụng vắc xin phòng RV sống giảm độc lực đường uống. Tuy nhiên, 1 số ca TCC do nhiễm RV G1P[8] có liên quan đến vắc xin sau khi uống vắc xin thời gian dài có 1 số vấn đề về bệnh lý nền, tình trạng suy giảm miễn dịch hay đồng nhiễm tác nhân khác...

Với trường hợp chủng G1P[8] tái xuất hiện và phổ biến tại Nam Định năm 2021 gây TCC mức nặng và vừa, không có khác biệt về triệu chứng lâm sàng giữa nhóm trẻ đã uống và không uống vắc xin ($p=0,363$). Các ca ở Nam Định khác với nhóm trẻ ở Anh có triệu chứng nhẹ hơn nhóm không uống vắc xin. Ở Nam Định, nhóm uống vắc xin xuất hiện triệu chứng sau hơn 3 tháng uống, trẻ nhiễm RV > 1

tuổi cách xa thời điểm uống, khác hoàn toàn các trường hợp nhiễm RV do vắc xin sau uống vắc xin ở Anh và Nhật xuất hiện sau thời gian uống được quan sát ở [63] [84]. Do vậy, các trường hợp TCC ở Nam Định không phải là tác dụng phụ của vi rút vắc xin nhân lên gây ra và ít có khả năng trẻ bị nhiễm RV trực tiếp từ chủng vi rút vắc xin thải ra môi trường. Tuy nhiên, không thể loại trừ khả năng lây nhiễm chủng vắc xin trong môi trường từ những trẻ nhiễm khác. Các vấn đề về tình trạng miễn dịch, bệnh lý của trẻ, đồng nhiễm tác nhân gây TCC khác... có thể là các yếu tố làm tăng nguy cơ nhiễm chủng vắc xin và làm tăng triệu chứng bệnh.

Với các dữ liệu trong nghiên cứu, hiện chưa thể khẳng định tác động của vắc xin đến xu hướng phân bố của các chủng lưu hành phổ biến hay các chủng hiếm gặp cũng như mô hình phân bố chủng. Các chủng lưu hành phổ biến có thể theo xu hướng chung của 1 số nước trong khu vực lân cận. Hiệu quả của vắc xin với mỗi chủng sẽ được phân tích ở mục sau.

Trong thời gian nghiên cứu 5 năm của nghiên cứu này, G8P[8] trở thành chủng phổ biến thứ hai sau G9P[8] ở Việt Nam. Chủng G8P[8] trở nên phổ biến ở Nam Định và Huế trong khoảng 2019 -2020. Chủng G8 là một loại RV giống bò lần đầu tiên được đặc trưng ở người ở trẻ em Indonesia vào năm 1984 [71]. Sự xuất hiện của chủng G8 RV ngày càng thường xuyên ở nhiều nước và trở thành chủng phổ biến ở các nước Châu Phi [155]. Chủng G8 đã được báo cáo gần đây ở một số nước Châu Á: Thái Lan năm 2013/2014 [154], Campuchia, Malaysia [94], Việt Nam năm 2014[75], Nhật Bản năm 2014 [87] và Hàn Quốc năm 2017/2018 [92] nhưng rất hiếm gặp ở Trung Quốc [186] [158]. Các chủng G8 rất phổ biến ở một số quốc gia ở Châu Phi [101], Brazil [62, 145] và Chile [103]. Ở Châu Âu, sự xuất hiện của các chủng G8P[8] RV rất lẻ tẻ. Năm 2006, chủng này được tìm thấy ở Croatia và có liên quan chặt chẽ với chủng G8 châu Phi [47]. Các kiểu gen G8 cũng được báo cáo ở Anh [150], Slovenia có mối quan hệ gần gũi với chủng từ bò Cody I801 hơn chủng từ người và là bằng chứng cho sự tái tổ hợp đoạn gen giữa RV từ người-động vật [152] và Đức [132].

Như vậy, sau khi uống vắc xin Rotavin-M1, các chủng lưu hành phổ biến hàng năm thay đổi so với năm trước uống vắc xin với sự lưu hành giảm dần của G9P[8] và sự tăng dần của G8P[8] và G1P[8]. Tuy nhiên, do không có các nghiên cứu khác cùng thời điểm nên không thể so sánh, xác nhận việc xuất hiện thường xuyên chủng G8P[8] tại 2 địa điểm và chủng G1P[8] tại Nam Định là xu hướng chung hay có liên quan đến việc uống vắc xin Rotavin-M1.

✓ **Hiệu quả của vắc xin Rotavin-M1**

Kết quả của nghiên cứu khẳng định uống đủ 2 liều Rotavin-M1 có hiệu quả 46% ngăn ngừa ca TCC nhập viện do RV ở các mức độ ở trẻ 6-23 tháng tuổi. Hiệu quả bảo vệ của Rotavin-M1 trong nghiên cứu này tương đồng với hiệu quả của Rotarix và RotaTeq đã được cấp phép sử dụng trên toàn cầu vào năm 2006 tại 1 số quốc gia có tỉ lệ tử vong cao. Tổng hợp từ dữ liệu sau lưu hành của 24 quốc gia cho thấy hiệu quả của Rotarix ngăn các ca TCC do RV là 58% (95% CI: 51 – 65%) và 45% (95% CI: 43 - 92%) với RotaTeq ở các nước có tỉ lệ tử vong ở trẻ em cao. Tuy nhiên, hiệu quả của Rotavin-M1 ở Việt Nam thấp hơn rõ rệt hiệu quả Rotarix (83%) và RotaTeq (85%) ở các nước có tỉ lệ tử vong ở trẻ em thấp [82].

Tương tự như các vắc xin khác, hiệu quả bảo vệ của Rotavin-M1 ngăn 57% các ca TCC do RV mức độ nặng ở nhóm trẻ <2 tuổi [82]. Ở nhóm trẻ <2 tuổi, Rotarix có thể 35 - 63% trường hợp TCC do RV nặng ở các nước có tỉ lệ tử vong ở trẻ em cao. Vắc xin RotaTeq có thể ngăn 41% - 57% các trường hợp TCC do RV nghiêm trọng ở các nước có tỉ lệ tử vong ở trẻ em cao trong nhóm tuổi < 2 này [82]. Rotavac có thể ngăn chặn hơn 50% trường hợp TCC do RV nghiêm trọng ở trẻ em Ấn Độ < 2 tuổi, là một quốc gia có tỉ lệ tử vong ở trẻ em cao [149].

Ở 1 số nước, hiệu quả có xu hướng giảm khi trẻ ≥ 12 tháng, giảm trung bình 23% ở một số nước có tỉ lệ tử vong ở trẻ em cao và giảm 4% với những nước có tỉ lệ tử vong ở trẻ em thấp so với hiệu quả ở nhóm <12 tháng [82]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, hiệu quả bảo vệ khi trẻ 12-23 tháng tuổi không giảm so với nhóm trẻ <12 tháng. Hiệu quả bảo vệ khi trẻ 12-23 tuổi đạt 49% (95%CI: 23 - 66%), và hiệu quả phòng các ca trung bình-nặng đạt 61% (95%CI: 35 - 76%). Vắc xin Rotavin-M1 có hiệu quả bảo vệ kéo dài đến khi trẻ 2 tuổi có ý nghĩa lớn giúp giảm gánh nặng bệnh TCC do RV do đặc điểm dịch tễ ở Việt Nam phần lớn trẻ em nhiễm RV ở độ tuổi 6-17 tháng tuổi.

Tham khảo nghiên cứu thuần tập tại miền Nam Việt Nam đánh giá hiệu quả vắc xin với có 199 trẻ (3,9%) mới uống 1 liều, 130 trẻ (2,5%) uống đủ liều vắc xin đang được sử dụng trên thị trường dịch vụ (Rotavin-M1, Rotarix và RotaTeq) trong tổng cộng có 4593 trẻ em nhập viện dưới 5 tuổi, hiệu quả đạt 69,7% (95%CI: 53,3–80,6%) ở những trẻ được uống đầy đủ và 58,6% (95%CI: 44,1–69,4%) ở những người đã uống ít nhất một liều vắc xin. Hiệu quả cao nhất ở trẻ 24–59 tháng tuổi (77,4% và 100% đối với trẻ đã uống ít nhất một liều vắc xin và trẻ được uống đầy đủ, tương

ứng) và thấp nhất ở trẻ 12–23 tháng 47,6% và 55,5 % đối với những người đã được uống ít nhất một liều vắc xin và những người đã được uống đầy đủ, tương ứng); tuy nhiên, sự khác biệt của hiệu quả theo độ tuổi là không đáng kể [166]. Tuy nhiên, dữ liệu nghiên cứu của Trương và cộng sự dựa trên trẻ nhập viện đã được uống vắc xin tự nguyện nên trẻ có thể trong gia đình có điều kiện kinh tế xã hội cao hơn nên ít đại diện cho quần thể chung và nghiên cứu này không đủ sức mạnh thống kê để đánh giá VE đối với một số kiểu gen vì số lượng trẻ em đã được tiêm chủng rất nhỏ. Do thiết kế giữa 2 nghiên cứu khác biệt và được tiến hành ở các vùng miền khác nhau với các loại vắc xin khác nhau nên có sự khác biệt về kết quả khác nhau giữa 2 nghiên cứu.

So sánh với nghiên cứu hiệu lực của vắc xin RotaTeq được thực hiện trên 900 trẻ em ở Nha Trang (Việt Nam) với thiết kế thử nghiệm đa trung tâm, mù đôi, có đối chứng với giả dược, phân bổ ngẫu nhiên với tỉ lệ 1: 1 uống ba liều uống vắc xin hoặc giả dược, kết hợp với các loại vắc xin thông thường cho trẻ sơ sinh bao gồm vắc xin bại liệt uống. Kết quả hiệu lực của vắc xin là 63,9% (95% CI: 9,6–90,9) trong suốt gần 2 năm theo dõi. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra kết quả nghiên cứu hiệu lực của vắc xin được thực hiện trong điều kiện lí tưởng với các đối tượng được tuyển chọn theo tiêu chí chặt chẽ nên thường cao hơn nghiên cứu hiệu lực trong điều kiện thực với nhiều yếu tố ảnh hưởng thực tế không thể loại trừ [169] và TCYTTG đã nhấn mạnh việc tiến hành nghiên cứu hiệu quả vắc xin trong thực tế để có đánh giá toàn diện tác động của vắc xin [176]. Do vậy, kết quả hiệu lực của RotaTeq cao hơn kết quả đánh giá hiệu quả của Rotavin-M1 có thể giải thích được và không thể so sánh chất lượng của 2 loại vắc xin này.

Vắc xin Rotavin-M1 có đủ khả năng bảo vệ chống lại nhiều kiểu gen khác nhau lưu hành trong giai đoạn giám sát, cao nhất là với chủng G1P[8] (hiệu quả chung 77% (95%CI: 28- 93%), hiệu quả 94% (95% CI: 60- 99%) với ca bệnh trung bình đến nặng), là chủng có thành phần GP giống vắc xin. Hiệu quả với các chủng phổ biến có cùng thành phần P[8] giống vắc xin là G9P[8] (52%), G8P[8] (48%), G3P[8] (46%). Hiệu quả ngăn các ca bệnh trung bình-nặng do các chủng lần lượt là: G9P[8] (72%), G3P[8] (61%) và G8P[8] (58%). Hiệu quả của vắc xin Rotavin-M1 với các chủng chứa P[8] thấp hơn hiệu quả với chủng G1P[8] chứa cả thành phần G1 và P[8] tương tự vắc xin.

Phân tích tổng hợp về hiệu quả của vắc xin với các chủng RV từ 2006-2014 cho thấy hiệu quả của Rotarix chống lại chủng G1P[8], chủng G1 hoặc P[8] và chủng

khác loại hoàn toàn lần lượt là 94%, 71% và 87% ở các nước thu nhập cao, trong khi ở các nước thu nhập trung bình hiệu quả lần lượt là 59%, 72% và 47%. Đối với RotaTeq hiệu quả chống lại các chủng cùng loại, khác một phần và khác hoàn toàn với chủng vắc xin tương ứng là 83%, 82% và 75%, trong khi ở các nước thu nhập trung bình, hiệu quả lần lượt đạt 37%, 70% và 87% [93]. Ở các nước có thu nhập trung bình, hiệu quả của Rotarix thấp hơn 14-16% giữa các chủng khác chủng vắc xin một phần (kiểu gen G1 hoặc P[8] ($p = 0,06$) và chủng khác hoàn toàn ($p = 0,04$) so với các chủng cùng với chủng vắc xin (Hiệu quả với chủng cùng loại: 81% (95% CI: 69-88%); hiệu quả bảo vệ với chủng khác chủng vắc xin một phần: 67% (95% CI: 54-76%); hiệu quả với chủng khác hoàn toàn chủng vắc xin: 65% (95% CI: 51-75%) [36].

Giống như các vắc xin phòng TCC do RV khác, Rotavin-M1 là sống giảm độc lực, sử dụng đường uống nên bất kỳ yếu tố liên quan đến “tiếp nhận” vắc xin này trong ruột đều có thể ảnh hưởng hiệu quả của vắc xin. Các yếu tố ảnh hưởng đến niêm mạc của vật chủ như: độ axit của dạ dày, sự đa dạng của hệ vi sinh vật đường ruột, tương tác của sữa mẹ tại thời điểm uống vắc xin, bệnh đường ruột do môi trường, vắc xin sử dụng đồng thời ... có thể làm ảnh hưởng đến giai đoạn hấp phụ, nhân lên của RV vắc xin và ảnh hưởng đến đáp ứng miễn dịch cuối cùng [57]. Các bệnh ức chế miễn dịch mạn tính và suy dinh dưỡng, cụ thể là sự thiếu hụt các vi chất dinh dưỡng như kẽm cũng làm giảm khả năng đáp ứng miễn dịch và hiệu quả với vắc xin đường uống của cơ thể. Ngoài ra, gánh nặng của việc nhiễm HIV, bệnh lao và sốt rét kết hợp với sự thiếu hụt dinh dưỡng ở nặng ở nơi có thu nhập thấp cũng có thể góp phần làm giảm khả năng miễn dịch và hiệu quả của vắc xin phòng TCC do RV [57]. Sự hấp thụ vắc xin phòng TCC do RV kém trong ruột đã được dự đoán là một yếu tố cơ bản chính ảnh hưởng đến hiệu quả của vắc xin, đặc biệt là ở Châu Phi và Đông Nam Á [57].

Nghiên cứu ở Việt Nam về các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả và hiệu lực của vắc xin Rotateq đã chứng minh Rotateq không làm ảnh hưởng đến hiệu lực của OPV mặc dù OPV làm giảm một vài đáp ứng miễn dịch của Rotateq nhưng theo nghiên cứu cho thấy không làm ảnh hưởng tới khả năng chống lại virus Rota [8]. Nghiên cứu khác tại Việt Nam về mối liên hệ giữa kháng thể trong sữa mẹ ảnh hưởng đến vắc xin phòng vi rút Rota. Các kháng thể trung hòa chống lại chủng RV G1P [8] không được phát hiện trong gần một nửa số mẫu sữa mẹ (45–48%), trong khi phần lớn các mẫu còn lại có hiệu giá kháng thể thấp. Mặc dù có hiệu giá kháng thể thấp nhưng sữa mẹ

vẫn làm giảm hiệu giá chủng vắc xin Rotavin-M1 trong nghiên cứu In vitro, ngay cả với tỷ lệ sữa-vi-rút là 1: 8 [6, 160].

Các yếu tố kể trên cũng có thể ảnh hưởng đến hiệu quả vắc xin Rotavin-M1 sử dụng tại Việt Nam giống trường hợp các vắc xin khác. Do vậy, sau khi vắc xin phòng TCC do RV được sử dụng thường quy ở Việt Nam thì cần có các nghiên cứu khác tìm hiểu và phân tích các yếu tố ảnh hưởng này để từ đó có biện pháp cải thiện hiệu quả phòng bệnh vắc xin.

Nghiên cứu này cho thấy vắc xin Rotavin-M1 có hiệu quả tương tự như hiệu quả của 1 số vắc xin khác đang lưu hành như: Rotarix, RotaTeq và Rotavac ở các nước thu nhập thấp. Vắc xin Rotavin-M1 có hiệu quả tốt giúp ngăn các ca TCC mức trung bình-nặng trong 2 năm đầu đời của trẻ. Kết quả trên giúp các nhà hoạch định chính sách triển khai vắc xin vào TCMR với tỉ lệ bao phủ hợp lý để đảm bảo phòng bệnh và giảm gánh nặng bệnh TCC một cách hiệu quả nhất.

✓ ***Đặc điểm di truyền của chủng vi rút Rota G1P[8]***

So sánh về di truyền, chủng G1P[8] đang lưu hành có khác biệt 3 biến đổi ở vị trí S123N, N94S và M217T so với chủng vắc xin Rotavin-M1 trong vùng epitope của VP7-G1. Ở nhiều nghiên cứu khác, các chủng G1 nhánh II khác cũng không có biến đổi này nhưng các chủng G1 nhánh I thường xuyên gặp 3 biến đổi thay thế acid amin này [189, 190]. Sự ghép cặp của chủng G1P[8] giữa G1 nhánh II với P[8] nhánh III khác hoàn toàn với 3 vắc xin đang được lưu hành tại Việt Nam nhưng tương tự như các chủng đang lưu hành ở Pakistan [142]. Trong khi, vắc xin Rotavin-M1 có G1 nhánh I ghép với P[8] nhánh III, tương tự với các chủng lưu hành ở Việt Nam từ 1997-2007 [162] và giống với chủng đã được báo cáo ở Bỉ, Ấn Độ... [89, 189, 190]. Với những dữ liệu trên gen VP7 và VP4, có thể khẳng định chủng G1P[8] đang lưu hành tại Việt Nam không có nguồn gốc hoàn toàn từ các chủng vắc xin đang được sử dụng hiện nay. Tuy nhiên, có thể có trường hợp tái sắp xếp các đoạn gen khác giữa chủng lưu hành với chủng vắc xin và cần so sánh toàn bộ hệ gen RV G1P[8] của chủng lưu hành và chủng vắc xin để có nhận định đầy đủ.

Về nguồn gốc phát sinh, khi so sánh với 1 số chủng đang lưu hành trên thế giới hiện nay thấy chủng G1 tại Việt Nam có trình tự acid amin tương đồng đến 98,9-99,2% với chủng được phát hiện ở Thái Lan năm 2019 (RVA/Human-wt/THA/B7101/2019_G1Px) với mã trên Genbank là MW058363 và chủng phát hiện Malaysia năm 2018 (RVA/Human-wt/MAL/LC541520/2018/G1P[8]) có mã

LC541520 [128, 164]. Từ đó, có thể giả thiết nguồn gốc chủng G1P[8] hiện nay có thể vào Việt Nam từ các nước lân cận trên thế giới, tương tự trường hợp ở Úc [13]. Sau 43 tháng thực hiện uống Rotarix, một vụ dịch bùng phát do chủng G1P[8] xảy ra với 43 ca được ghi nhận ở 1 số vùng của Úc. Trình tự acid amin và nucleotide của các chủng G1P[8] trong đợt dịch này cũng được khẳng định không liên quan đến vi rút vắc xin, có tương đồng cao và có mối quan hệ di truyền chặt chẽ với các chủng lưu hành ở nhiều nước khác nên người ta đưa ra giả thiết chủng mới được du nhập thay thế các chủng đặc hữu đã có tại Úc [50].

Tuy nhiên, gen VP7 xuất hiện nhiều biến đổi hơn gen VP4, các chủng G1 ở Việt Nam đã có sự biến đổi di truyền theo thời gian, từ 1998-2007 các chủng có G1 nhánh I nhưng từ 2008-2009 có xuất hiện và dần thay thế bằng các chủng G1 nhánh II [162] [1, 49]. Chủng hiện nay có 1 số đặc điểm giống với chủng lưu hành năm 2009-2012 như: cùng kết hợp nhánh (G1 nhánh II và P[8] nhánh III), không khác biệt về acid amin ở vùng kháng nguyên, tương đồng 97,8-98,5% và 97,1-97,6% về acid amin lần lượt với VP7 và VP4. Một số chủng G1P[8] có khung giống DS-1 hay khung Wa phân lập 2012/2013 đều có G1 nhánh I và P[8] nhánh III [118], dường như không có liên quan đến các chủng nghiên cứu. Việc thiếu thông tin các chủng G1P[8] những trước uống (trước năm 2016)- và sau uống (2017-2020) tại Việt Nam làm cho không thể chứng minh giả thiết liệu có mối liên quan hoặc biến đổi từ các chủng G1P[8] lưu hành trước thời điểm uống với các chủng phổ biến gần đây hay không, liệu có vắc xin phòng TCC Rotavin-M1 có tạo áp lực chọn lọc với chủng này không.

Ngoài ra, việc chưa giải trình tự các đoạn gen khác của các chủng G1P[8] năm 2021 ở Nam Định nên cũng không chủng này có khung loại nào (DS-1 hay Wa)? Những biến đổi di truyền và cơ chế trốn thoát miễn dịch nào của chủng này ảnh hưởng đến việc giảm hiệu quả bảo vệ của vắc xin? Do vậy, cần phân tích di truyền toàn bộ hệ gen các chủng G1P[8] và nhiều nghiên cứu về dịch tễ học và miễn dịch để giải thích cơ chế miễn dịch hay có những ứng phó thích hợp khi nghiên cứu, sản xuất vắc xin phòng TCC do RV trong tương lai.

✓ ***Đặc điểm di truyền của chủng vi rút Rota G8P[8]***

Trong thời gian nghiên cứu 5 năm của nghiên cứu này, G8P[8] trở thành chủng phổ biến thứ hai sau G9P[8] ở Việt Nam. Chủng G8P[8] trở nên phổ biến ở Nam Định và Huế trong khoảng 2019 -2020. Gần đây, sự xuất hiện của chủng G8 RV ngày càng thường xuyên ở nhiều nước và trở thành chủng phổ biến ở các nước Châu Phi [155]. Chủng G8 đã được báo cáo gần đây ở một số nước Châu Á: Thái Lan năm

2013/2014 [154], Campuchia, Malaysia [94], Việt Nam năm 2014[75], Nhật Bản năm 2014 [87] và Hàn Quốc năm 2017/2018[92] nhưng rất hiếm gặp ở Trung Quốc [186] [158]. Các chủng G8 rất phổ biến ở một số quốc gia ở Châu Phi [101], Brazil [62, 145] và Chile [103]. Ở Châu Âu, sự xuất hiện của các chủng G8P[8] RV rất lẻ tẻ. Năm 2006, chủng này được tìm thấy ở Croatia và có liên quan chặt chẽ với chủng G8 châu Phi [47]. Các kiểu gen G8 cũng được báo cáo ở Anh [150], Slovenia có mối quan hệ gần gũi với chủng từ bò Cody I801 hơn chủng từ người và là bằng chứng cho sự tái tổ hợp đoạn gen giữa RV từ người-động vật [152] và Đức [132].

Các chủng G8P[8] trong nghiên cứu này có các gen bên trong giống DS-1, tương tự chủng được phát hiện ở Châu Á như: Thái Lan (2013-2014), Việt Nam (2014-2015), Nhật Bản (2014), Hàn Quốc (2017), Quảng Châu, Trung Quốc (năm 2021) [85] [75, 87, 154] và chủng ở Châu Mỹ như: Argentinian (2017-2018) [46] và có khoảng cách xa với các chủng G8P[8] khung DS1 ở Châu Phi và chủng ở Châu Âu (2006-2011)[47]. Các gen VP7 của các chủng này có nguồn gốc từ RV G8 ở người thay vì RV có nguồn gốc từ động vật. Các chủng lưu hành ở Trung Quốc có thể bắt nguồn bằng cách sắp xếp đoạn gen giữa G8P[8] và các chủng kiểu gen khác lưu hành ở Đông Nam Á trong những năm gần đây [174]. Chủng từ Nhật phổ biến (39,2%) năm 2014 có G8 nguồn gốc từ một dòng bò từ châu Á và các gen VP1 và NSP4 cũng được cho là có nguồn gốc từ dơi. Các gen VP7 của các chủng G8P[8] ở người được phân lập ở Đông Nam Á dường như có mối quan hệ chặt chẽ với các chủng từ bò ở châu Á. Tám đoạn gen (VP2 – VP4, VP6, NSP1–NSP3, và NSP5) của các chủng G8P[8] ở người Đông Nam Á có liên quan chặt chẽ với các chủng P[8] giống DS-1 đã xuất hiện và lây lan ở Nhật Bản và các nước khác ở Châu Á kể từ năm 2012 [70, 87].

Trường hợp G8P[8] phổ biến ở các điểm nghiên cứu sau 3 năm triển khai uống vắc xin cũng tương tự ở Nhật Bản, nơi đã cho uống thường quy vắc xin Rotarix và RotaTeq cho trẻ em. Năm 2014 và 2017, G8P[8] đã gây một vụ dịch ở Nhật Bản, lần lượt với 50-55% và 66% trẻ nhiễm chủng này [70, 87]. Đặc biệt lưu ý, tỉ lệ nhiễm G8P[8] ở trẻ được uống (61,1%) và không được uống (65,5%) gần như tương đương nhau trong năm 2017. Không có hiệu quả đáng kể nào với nhưng ca bệnh nhẹ do chủng G8P[8] (14%, 95% CI: -140% đến 70%). Tuy nhiên, vắc xin cho thấy hiệu quả cao đối với ca bệnh trung bình (VE: 75%, 95% CI: 1–40%) và ca nặng nặng (VE: 92%, 95% CI: 60–98%). Trẻ được uống vắc xin có ít có triệu chứng nghiêm trọng hơn những đứa trẻ chưa được uống [70].

Mặc dù, trong nghiên cứu này hiệu quả của Rotavin-M1 với chủng G1P[8] và G8P[8] vẫn đảm bảo. Chủng G8P[8] là chủng khác 1 phần với chủng vắc xin. Mặc dù cơ chế bảo vệ dị chủng bằng vắc xin phòng TCC do RV vẫn chưa rõ ràng, nhưng có thể protein VP4 (P-type) trong vắc xin quan trọng hơn protein VP7 (G-type) đối với việc phòng bệnh. Tuy nhiên, cần lưu ý giám sát thêm lưu hành của chủng này và hiệu quả của vắc xin với chủng này trong thời gian tới.

Kết quả phân tích, giải trình tự của chủng G1P[8] và G8P[8] góp phần cung cấp nhưng hiểu biết về đa dạng di truyền của các chủng RV, góp phần lý giải một phần mối quan hệ giữa việc triển khai uống vắc xin và các chủng RV lưu hành. Ngoài ra, kết quả trình tự các chủng này được đăng tải trên Genbank sẽ giúp các nghiên cứu khác có thể tham khảo và so sánh.

4.2. Tỷ lệ nhiễm và đặc điểm lưu hành của vi rút Noro, Astro và Sapo ở trẻ em tiêu chảy cấp dưới 5 tuổi trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1

✓ *Tỷ lệ nhiễm vi rút Noro, Astro và Sapo ở trẻ em tiêu chảy cấp dưới 5 tuổi*

Nghiên cứu này đã chỉ ra rằng NV là tác nhân vi rút quan trọng thứ hai (tỷ lệ nhiễm 22,2%) trong số các nguyên nhân gây TCC cho trẻ em nhập viện < 5 tuổi và có sự khác biệt giữa 2 địa điểm nghiên cứu và 2 giai đoạn trước và sau uống (14,5% ở Nam Định và 6,2% Huế giai đoạn trước uống và 29,4 ở Nam Định và 19,9% ở Huế giai đoạn sau uống). Ngay cả khi không có tác động của vắc xin phòng TCC do RV, một số nghiên cứu trước đây ở Việt Nam đặc cho thấy sự khác biệt khá lớn về tỷ lệ nhiễm NV tùy thuộc vào từng thời điểm và địa điểm nghiên cứu. Một số nghiên cứu từ 2007-2012 ở miền Bắc, tỷ lệ phát hiện NV khá cao là 36,3% (2007-2008) ở Hà Nội, 31% (2011-2012) ở Thái Bình và 19% (2010-2012) ở 1 số tỉnh miền Bắc [10, 14, 161, 163]. Một kết quả nghiên cứu từ 2012-2013 ở Hà Nam cho thấy tỷ lệ phát hiện NV ở nhóm trẻ TCC là 34,9% (đơn nhiễm là 26% và đồng nhiễm với RV là 8,9%) [9, 10]. Một nghiên cứu khác của T. N. Hoa-Tran và cộng sự tại Hà Nội và Khánh Hoà từ năm 2012 đến 2015 cho kết quả có 28,2% (90/319 mẫu) dương tính với NV (dao động hàng năm từ 23,4 đến 33,0%) [74]. Một số nghiên cứu ở miền Nam chỉ ra tỷ lệ nhiễm NV ở trẻ TCC là 20,6% (2009-2010) và có 42% ca nhiễm NV trong tổng số ca TCC âm tính với RV (2014) [18, 116]. Gần đây, NV được phát hiện với 21,9% ở trẻ TCC nhập viện ở Bệnh viện Nhi Trung Ương (Hà Nội) từ tháng 1-21/2017 [15].

Tỷ lệ nhiễm NV trong nghiên cứu này cao hơn tỷ lệ NV toàn cầu trong số các bệnh viêm dạ dày ruột cấp tính là 16% trong 20 năm (1997 to 2021) [96]. Tỷ lệ nhiễm

NV giai đoạn trước uống ở Nam Định (14,5%) và Huế (6,2%) khác tương đồng với tỉ lệ nhiễm NV tổng hợp chung từ các nước LIC và LMIC (14% số người có các triệu chứng). Vì rút Noro được phát hiện thường xuyên hơn ở trẻ em TCC dưới 5 tuổi ở các nước LMICs (17%) so với các nước LICs (11%) [107]. Một nghiên cứu tổng hợp từ 2008-2014, tỷ lệ lưu hành NV ở các ca TCC nhập viện (17%) thấp hơn các ca điều trị ngoại trú (20%) và NV được phát hiện thường xuyên hơn ở các nước phát triển (20%) và các nước đang phát triển (19%) có tỷ lệ tử vong thấp, cao hơn đáng kể tỉ lệ nhiễm ở các nước có tỷ lệ tử vong cao (14%) [21]. Tỷ lệ lưu hành NV thấp hơn ở các nước LIC và các nước có tỉ lệ tử vong cao được lí giải do sự phổ biến của các mầm bệnh khác được kiểm soát qua cải thiện nước và điều kiện vệ sinh, không phải do số ca nhiễm NV ở các nước LIC thấp hơn các nước khác phát triển hơn [107].

Sự phân bố NV theo rõ rệt theo mùa vào tháng 8 đến tháng 10 hàng năm trong nghiên cứu này tương đồng với một số nghiên cứu tại miền Bắc Việt Nam. Một nghiên cứu từ 11/2007-10/2008 cho biết tỉ lệ nhiễm NV thấp nhất vào tháng 4 (9,5%), cao nhất vào tháng 9 (81,5% tổng số mẫu âm tính với RV) [161]. Một nghiên cứu khác tại Hà Nam (2012-2013) chỉ rõ bệnh TCC do nhiễm NV gặp quanh năm, cao điểm vào tháng 4, 5, 7, 11 [9]. Do sự khác biệt của khí hậu ở một số vùng ở Việt Nam, một số nghiên cứu ở miền Nam Việt Nam báo cáo phát hiện NV cao điểm vào mùa mưa hoặc vào cuối mùa mưa, có mối tương quan tuyến tính thuận giữa lượng mưa và nhiễm NV [116]. Trong hầu hết các nghiên cứu ở các khu vực địa lý khác nhau trên thế giới, NV được phát hiện quanh năm với đỉnh hoạt động của NV thay đổi giữa các tháng nhưng tính chất theo mùa không rõ ràng, rất khác nhau giữa các nghiên cứu khác nhau [107].

Tỉ lệ Ast dương tính trong nghiên cứu này chiếm 5,5% và tỉ lệ lưu hành ở Huế cao hơn ở Nam Định và giảm dần ở giai đoạn sau uống vắc xin (tương ứng giai đoạn trước và sau uống là 7,1% và 4,0% ở Nam Định và 9,3% và 6,0% Huế). Tỉ lệ này ở 2 địa điểm và 2 giai đoạn đều cao hơn kết quả của một số nghiên cứu khác ở Thành phố Hồ Chí Minh (0,6%) giai đoạn 2002-2003 và ở Thái Bình (2,4%) từ 2011-2012 nhưng thấp hơn kết quả nghiên cứu tại Thành phố Hồ Chí Minh từ 2005-2006 với tỉ lệ phát hiện 13,9% [14, 120, 121]. Nghiên cứu này không quan sát thấy sự phân bố Ast rõ ràng theo mùa trong khi một nghiên cứu khác ở miền Nam Việt Nam (2005 – 2006) cho thấy Ast phổ biến vào cuối mùa khô và đầu mùa mưa [121].

Vi rút Astro được phát hiện với tỉ lệ từ 3% và 20% ở trẻ em TCC trên thế giới và tỉ lệ nhiễm Ast thường cao hơn ở các nước đang phát triển, mặc dù rất ít trường hợp bị mắc vi rút ở tiểu vùng Sahara Châu Phi [147]. So sánh giữa các nghiên cứu cùng sử dụng kỹ thuật sàng lọc realtime RT-PCR, tỉ lệ phát hiện Ast khoảng 5% (dao động từ 0 đến hơn 20%) [29, 172]. Mặc dù có xu hướng giảm tỉ lệ nhiễm Ast điển hình những năm gần đây từ 22% (1980) còn 15% (1990) và 5% vào những năm 2000 [29] nhưng tỉ lệ Ast dương tính ở Trung Quốc hoặc Nam Mỹ lại có xu hướng tăng lên. Tuy nhiên, do có sự khác biệt trong các phương pháp chẩn đoán và quần thể nghiên cứu nên khó so sánh kết quả các nghiên cứu này [29, 172].

Tỉ lệ Sav được phát hiện trong nghiên cứu này là 5,7% (trong khoảng 4,8-8,1%) và không quan sát được tính chất phân bố rõ ràng theo mùa nhưng 1 số năm các ca nhiễm Sav xuất hiện nhiều nhất vào tháng 10-11. Tỉ lệ này cao hơn so với các nghiên cứu khác ở miền Bắc là 1,4% trong giai đoạn 2007 - 2008 với hầu hết các mẫu được phát hiện trong các tháng lạnh (tháng 10 - tháng 2) [161]. Kết quả từ 1 nghiên cứu ở miền Nam cho kết quả tỉ lệ phát hiện Sav là 0,8% (2002-2003) và 1,2% (2005-2006) và phân bố mùa khô hoặc mùa mưa (tháng 7) [105, 119, 120]. Tuy nhiên, kết quả này dường như cao hơn tỉ lệ phổ biến Sav trên toàn cầu với 4,4% trong giai đoạn từ 2008 đến 2014 [48]. Kết quả này thấp hơn tỉ lệ lưu hành Sav là 6,19% (0,2-39%) ở 19 nước LMIC giai đoạn 2004 – 2017 với 6/42 nghiên cứu chỉ ra tính chất lưu hành theo mùa của Sav, 16/42 nghiên cứu báo cáo thời gian phát hiện không nhất quán và 2/42 các nghiên cứu kết luận Sav được phát hiện trong suốt năm [105].

Khi so sánh kết quả của về tỉ lệ lưu hành các tác nhân vi rút gây TCC với 1 số nghiên cứu tương tự về các tác nhân virus gây TCC ở trẻ em <5 tuổi nhập viện tại Việt Nam ở các thời điểm và địa điểm khác nhau nên có sự khác biệt kết quả khá lớn. Ngoài yếu tố địa điểm và thời gian nghiên cứu, các yếu tố khác như: kỹ thuật xét nghiệm, phương pháp lấy mẫu ... của mỗi nghiên cứu cũng có thể ảnh hưởng đến các kết quả. Một nghiên cứu đã so sánh kết quả của các nghiên cứu sử dụng RT-PCR thông thường, những nghiên cứu sử dụng xét nghiệm realtime RT-PCR cho tỷ lệ phát hiện Sav cao hơn (5,6%) [48]. Ngoài ra, tất cả các nghiên cứu ở Việt Nam trước đây đều thực hiện trước giai đoạn uống vắc xin phòng TCC do RV nên không có thông tin để biện luận về mối quan hệ và ảnh hưởng của vắc xin đến sự lưu hành của các tác nhân vi rút gây TCC này. Do vậy, để so sánh mức độ ảnh hưởng của vắc xin Rotavin-M1 đến lưu hành của vi rút gây TCC khác như NV, Ast, Sav thì cần dựa vào

kết quả của các nghiên cứu ở các quốc gia đã triển khai sử dụng vắc xin phòng TCC do RV.

Đây là kết quả nghiên cứu đầu tiên về tỉ lệ nhiễm NV cũng như tác nhân Ast, Sav trong điều kiện vắc xin phòng TCC do RV được sử dụng thường quy ở quy mô pilot ở Việt Nam. Ở giai đoạn sau uống vắc xin Rotavin-M1, vai trò của các tác nhân vi rút khác ngày càng quan trọng, đặc biệt là NV, tỉ lệ nhiễm NV tăng rõ rệt ở cả 2 địa điểm nghiên cứu (từ 19,9% lên 29,4% ở Nam Định và từ 6,9% lên 19,9% Huế). Tỉ lệ nhiễm NV ở Nam Định ở nhóm đã uống vắc xin (32,2%) cao hơn so với nhóm không uống (21,7%) với $p=0,000$ và rõ rệt nhất ở nhóm 6-17 tháng tuổi.

Dường như không quan sát thấy số ca nhiễm NV tăng thời gian hay theo tình trạng uống vắc xin sau khi triển khai uống Rotavin-M1. Do xu hướng giảm dần tổng số ca TCC (do giảm số ca nhiễm RV) hàng năm, ở nhóm đã uống vắc xin, đặc biệt ở nhóm 6-17 tháng tuổi nên tỉ lệ nhiễm NV cũng như tỉ lệ phân bố sẽ có xu hướng cao hơn. NV là tác nhân bị ảnh hưởng gián tiếp rõ ràng hơn các tác nhân khác do NV là tác nhân gây TCC phổ biến thứ hai sau RV. Mức độ ảnh hưởng ở Nam Định nơi có tỉ lệ uống Rotavin-M1 đạt 77% rõ rệt hơn. Cỡ mẫu nghiên cứu của NV để so sánh tỉ lệ trước và sau uống vắc xin, trong nhóm không uống và có uống vắc xin đảm bảo yêu cầu lớn hơn cỡ mẫu tối thiểu và giá trị p có ý nghĩa thống kê nên kết quả có độ tin cậy cao.

Nghiên cứu đã chỉ ra có mối liên quan giữa việc uống vắc xin Rotavin-M1 với tỉ lệ nhiễm Ast giảm (từ 7,8% trước uống còn 4,0% sau uống ở Nam Định với $p<0,05$). Cỡ mẫu nghiên cứu ở Nam Định cao hơn yêu cầu cỡ mẫu tối thiểu nên kết quả là tin cậy. Ast có tỉ lệ nhiễm ở nhóm không uống cao hơn nhóm đã uống vắc xin rõ rệt ở nhóm 6-11 tháng với $p<0,05$ nhưng cỡ mẫu phân tầng ở nhóm 6-11 tháng là 244 và 233 tương ứng với nhóm không và có uống vắc xin, nhỏ hơn cỡ mẫu yêu cầu tối thiểu để so sánh 2 tỉ lệ này nên chưa thể kết luận thay đổi ở nhóm này. Kết quả của nghiên cứu cho thấy dường như việc uống vắc xin này không ảnh hưởng rõ rệt đến tỉ lệ nhiễm và phân bố của Sav cả ở Huế và Nam Định ($p>0,05$).

Tương tự, ở nhiều nước có uống vắc xin phòng RV trong TCMR, NV trở thành nguyên nhân hàng đầu gây viêm dạ dày ruột ở trẻ em và các vi rút khác góp phần nặng nề hơn vào gánh nặng bệnh tật ở trẻ em. Ở Peru, tỉ lệ nhiễm của NV là 29,1% (95% CI: 28,0 - 32,3), cao hơn so với RV (8,9%; 95% CI: 6,8 - 9,7) Sau khi uống vắc xin phòng TCC do RV [26]. Tương tự ở Nicaragua, NV đã trở thành nguyên nhân vi

rút hàng đầu gây TCC tại bệnh viện với tỉ lệ 27%, cao hơn tỉ lệ của Sav (15%) và RV (14%) [31]. Một nghiên cứu thuần tập ở Na Uy giai đoạn trước và sau uống Rotarix (2014-2017) với 600 trẻ em nhập viện dưới 5 tuổi để phát hiện bốn loại vi rút (RV, NV, Ast và Adv) với 81% mẫu dương tính với ít nhất một trong bốn tác nhân. So sánh tỉ lệ nhiễm vi rút giữa 2 giai đoạn trước và sau uống thấy tỉ lệ nhiễm RV giảm rõ rệt từ 82,6% còn 36,5%; NV tăng từ 8,5% đến 33%; Ast giảm từ 1,5% còn 0,9% và đồng nhiễm giảm từ 6,3% còn 2,6%, các ca đồng nhiễm sau uống giảm rõ nhất ở nhóm RV+NV, RV+Ast [65].

Tuy nhiên, ảnh hưởng của vắc xin phòng TCC do RV đến tỉ lệ nhiễm Ast và Sav ở mỗi quốc gia với mức độ khác nhau. Ở Ấn Độ, tỉ lệ nhiễm Ast và Sav trước uống vắc xin ở mức khá cao và tăng rất rõ rệt ở giai đoạn sau uống vắc xin (từ 7,89% đến 18,85%) và Sav tăng từ 4,67% đến 17,33% [136]. Ở Kenya, giai đoạn sau uống vắc xin phòng TCC do RV (2016-2019) ngoài việc tỉ lệ nhiễm RV giảm (23,3% so với 13,8%) và NV tăng (6,6% so với 10,9%) thì tỷ lệ lưu hành của Ast (2,4% so với 3,2%), và Sav (4,6% so với 2,6%) không thay đổi có ý nghĩa thống kê so với giai đoạn trước uống vắc xin (2003 và 2013) [91].

Mặc dù việc lấy mẫu ngẫu nhiên hàng năm với số lượng theo yêu cầu để phân tích các tác nhân vi rút NV, Ast, Sav có thể không bị ảnh hưởng bởi ca nhập viện do Covid-19 nhưng không loại trừ khả năng ảnh hưởng của dịch đến tỉ lệ nhiễm các tác nhân này ở năm 2020-2021. Nghiên cứu ở Ba Lan cho thấy tỉ lệ ca TCC do vi khuẩn không bị ảnh hưởng bởi các hạn chế do dịch Covid do các nguồn lây nhiễm khác nhau với mức độ nghiêm trọng buộc bệnh nhân phải tìm kiếm sự trợ giúp y tế, bất kể đại dịch [159]. Một nghiên cứu ở Tây Ban Nha trước giai đoạn trước và sau đại dịch Covid-19 (2019-2021) cho thấy tỉ lệ nhiễm các tác nhân vi rút gây TCC (RV, NV, Ast, Sav) giảm từ 29,8% còn 7,7%, trong đó tỉ lệ nhiễm NV giảm từ 15,5% còn 4,7%, Ast giảm từ 3,1 xuống 0,4% và Sav từ 6,6% còn 0,2%, chỉ duy nhất tỉ lệ nhiễm RV không thay đổi [106]. Do vậy, yếu tố ảnh hưởng đến đặc điểm lưu hành của NV, Ast và Sav ngoài việc triển khai uống Rotavin-M1 còn có thể có nhiều yếu tố khác, nên cần theo dõi, phân tích thêm ở các nghiên cứu tiếp theo.

Kết quả ban đầu của nghiên cứu đã chứng minh sự chiếm ưu thế lớn hơn cũng như sự thay đổi 1 số đặc điểm phân bố của các tác nhân khác gây TCC nhiễm, đặc biệt là NV trong khoảng thời gian 3 năm sau uống vắc xin Rotavin-M1. Do vậy, sau khi triển khai sử dụng vắc xin phòng TCC do RV trong tương lai, cần có thêm các

theo dõi, đánh giá lưu hành của các tác nhân vi rút gây TCC này trong thời gian dài, xem xét đặc điểm lưu hành và các yếu tố khác ảnh hưởng đến đặc điểm lưu hành của các vi rút này.

✓ ***Đặc điểm nhóm gen/kiểu gen lưu hành của vi rút Noro, Astro và Sapo ở trẻ em tiêu chảy cấp dưới 5 tuổi***

Nhóm gen lưu hành của vi rút Noro phổ biến là GII ở cả Nam Định (94,3%) và Huế (96,2%) cả giai đoạn trước và sau uống. Kết quả này tương tự với hầu hết các nghiên cứu ở Việt Nam giai đoạn trước ở tất cả các địa điểm nghiên cứu. Từ 2007-2013 ở miền Bắc, nhóm gen GII (chủ yếu là NV GII.4 và GII.3) chiếm 94,5% [17]. Một nghiên cứu khác ở Hà Nội và Khánh Hoà từ 2012–2015 đã chỉ rõ có 86% mẫu nhiễm NV nghiên cứu thuộc nhóm gen G.II, trong đó GII.4 và GII.3 chiếm tỉ lệ nhiều nhất lần lượt 55% và 22% [74].

Một hạn chế của nghiên cứu này là chưa xác định kiểu gen và biến chủng lưu hành phổ biến trong giai đoạn từ 12/2016-6/2021. Các nghiên cứu ở Việt Nam và thế giới đều chỉ ra nhóm gen GII rất đa dạng. Nghiên cứu từ 1997–2015 ở 14 nước ở Châu Á, Châu Phi, Châu Mỹ cho thấy có 28 kiểu gen (9 GI, 19 GII) đã được lưu hành trong các nước LMIC và 30 kiểu gen (9 GI, 1 GI không xác định và 20 GII) ở các nước LIC, trong đó GII.4 được phát hiện với tỉ lệ cao nhất ở tất cả các quốc gia, 4 là kiểu gen phổ biến nhất [107]. Một đặc điểm cần lưu ý của NV là sự xuất hiện và tiến hóa của kiểu gen NV GII.4 tạo các biến chủng gây dịch mới, chủ yếu là do đột biến trong vùng P2 của ORF2, là vùng siêu biến của capsid và là vùng tiếp xúc nhiều nhất với tế bào chủ. Các đột biến trong vùng P2 có thể dẫn đến những thay đổi đáng kể ở vùng quyết định trình tự kháng nguyên (Epitope) quan trọng, dẫn đến vi rút có thể thoát khỏi các kháng thể đã được tạo ra do tiếp xúc với các chủng NV từ trước [37]. Một nghiên cứu tổng hợp (2004-2012) đã chỉ ra, một số biến thể GII.4 mới đã xuất hiện với các biến thể lưu hành trên toàn cầu bao gồm GII.4 / 2002 (2002–2006), GII.4 / 2004 (2003–2008), GII.4 / 2006a (2006–2009), GII.4 / 2006b (2006– 2010), GII.4 / 2008 (2008–2010), và một số biến thể có lưu hành chỉ ở một số khu vực địa lý GII.4 / 2003 và GII.4 / 2007 chủ yếu được tìm thấy ở các nước Châu Á [76]. Một số nghiên cứu ở Việt Nam (2007-2013) đã chỉ ra biến động kiểu gen của NV lưu hành tại miền Bắc Việt với sự xuất hiện các biến chủng GII.4 mới như: biến chủng GII.4 2006b chiếm ưu thế trong những năm 2007-2008 đã dần thay thế bởi biến chủng Sydney-2012 trong năm 2013 và biến chủng New Orleans-2009 tồn tại trong giai đoạn 2010-

2012 và không xuất hiện trong năm 2013 [17]. Do vậy, cần có các nghiên cứu sâu hơn nữa về kiểu gen và các biến chủng NV lưu hành để có định hướng phát triển vắc xin phòng NV thích hợp trong tương lai.

Trong số 51 ca nhiễm Ast từ 2016-2021 trong nghiên cứu này, có 4 nhánh gen lưu hành, tương ứng với 4 kiểu gen, trong đó HAstV-1a là nhánh phổ biến nhất ở Nam Định (54,5%), trong khi HAstV-4 phổ biến hơn ở Huế (44,4%, chủ yếu từ 2018-2019). Sự lưu hành các kiểu gen lưu hành phổ biến trong giai đoạn nghiên cứu này có sự khác biệt theo thời gian và địa điểm. Có rất ít nghiên cứu tại Việt Nam về lưu hành kiểu gen và nhánh gen của Ast để so sánh với kết quả của nghiên cứu này. Chỉ có một nghiên cứu giai đoạn 2002-2003 và 2005-2006 ở miền Nam đều khẳng định tất cả các mẫu Ast đều là HAstV-1 và các mẫu năm 2005-2006 thuộc nhánh HAstV-1d [120, 121].

Phân bố kiểu gen Ast tương tự với xu hướng chung toàn cầu là HAstV-1 chiếm hơn 50% các trường hợp [45, 172]. Ở 1 số nước gần Việt Nam như Thái Lan cùng thời điểm (2017-2021), HAstV-1 được phát hiện chiếm 56,4% chủng Ast lưu hành [175]. Có sự thay đổi dòng lưu hành từ 1d sang 1a trong kiểu gen HAstV-1 nhưng do các nghiên cứu ở Việt Nam không theo dõi liên sự lưu hành kiểu gen của Ast nên không rõ thời điểm xuất hiện dịch chuyển này. Xu hướng dịch chuyển các nhánh trong kiểu gen HAstV-1 tương tự như ở Italia với sự thay đổi một số nhánh theo thời gian với HAstV-1a được phát hiện từ 2007 đến 2012 và xuất hiện lại năm 2014, trong khi HAstV-1b xuất hiện năm 2000 rồi biến mất và tái xuất hiện vào năm 2007 và HAstV-1d xuất hiện lẻ tẻ ở 1 số thời điểm trong suốt 14 năm [45]. Tuy nhiên, ở Brazil lại có xu hướng khác, dòng HAstV-1a đã được phát hiện trong 10 năm liên tục (1990-2000) mà không có sự thay thế dòng mới [60]. Do vậy, sự thay đổi dòng lưu hành trong cùng một kiểu gen phần nào phản ánh sự đa dạng di truyền của Ast tại Việt Nam.

Ngoài sự thay đổi các nhánh khác nhau trong cùng một kiểu gen, sự xuất hiện và phổ biến HAstV-4 tại Huế thời gian ngắn (2018-2019) thay thế cho các chủng khác thể hiện vai trò ngày càng tăng của chủng này liên quan đến các vụ dịch TCC do Ast tại Huế. Tương tự, một nghiên cứu tại Trung Quốc từ 2015-2016 đã chỉ ra dù HAstV-1 (36,7%) là kiểu gen phổ biến nhất, nhưng có sự gia tăng đáng kể về tỷ lệ lưu hành HAstV-4 từ 12/2015 đến 3/2016 [183]. Do vậy, sự phân bố đa dạng các kiểu gen khác nhau, các nhánh khác nhau trong mỗi kiểu gen có sự thay đổi theo địa lý và

thời gian nên cần chú trọng đến việc giám sát các kiểu gen, các nhánh lưu hành của Ast trong tương lai.

Có 9 kiểu gen của Sav thuộc 4 nhóm gen đều được phát hiện ở Nam Định và Huế trong nghiên cứu này và dường như không khác biệt rõ rệt giữa 2 giai đoạn nghiên cứu không. Trong đó, nhóm GI chiếm tỉ lệ phân bố cao nhất (50%) và kiểu gen GI.1 được phát hiện nhiều nhất (khoảng 40%). Một nghiên cứu ở Việt Nam (2007-2008) đã phát hiện 3 kiểu gen GI.1, GI.2, GII.1 trong số 7 mẫu phân tích [161]. Tương tự ở Nhật Bản từ 2014-2017, có 6 kiểu gen Sav cùng lưu hành là: GI.1, GII.1, GIV.1, GI.2, GI.3 và GII.3, trong đó GI.1 (83.3%) là kiểu gen phổ biến nhất, cao hơn tỉ lệ phân bố GI.1 trong nghiên cứu này và nhiều nghiên cứu khác [126]. Ở Thái Lan (2019-2020), GI.1 (71.4 %) là kiểu gen phổ biến nhất, sau đó là GI.2 và GII.5 (14.3 % mỗi loại) [137]. Ở 1 số nước khác như Peru, tỉ lệ phân bố kiểu gen này từ 29,0% đến 63,4% [144]. Kết quả tổng hợp từ 47 nghiên cứu về kiểu gen của Sav cho thấy GI là nhóm gen phổ biến nhất với tỷ lệ phát hiện từ 15–100% trong số các mẫu được xác định kiểu gen. Nhóm gen GII đã được báo cáo với mức phát hiện nằm trong khoảng từ 2–65% mẫu bệnh phẩm. Các nhóm GIV và GV lần lượt được báo cáo với tỷ lệ phát hiện dao động từ 3–100% đối với GIV và 1–14% đối với GV [48]. Kết quả nghiên cứu này cho thấy sự lưu hành đa dạng về di truyền của các chủng Sav tại Việt Nam. Do vậy, cần tiếp tục theo dõi xu hướng lưu hành các chủng này trong tương lai.

Hạn chế của nghiên cứu

Do việc triển khai cho uống vắc xin Rotavin-M1 vào tháng 12/2017, đúng cao điểm nhiễm RV ở Nam Định. Do đó, giai đoạn trước uống vắc xin bao gồm 3 tháng (tháng 1-tháng 3) năm 2018, có 1 số trẻ đã được uống vắc xin trong 3 tháng này mặc dù tỉ lệ bao phủ đến tháng 3 vẫn thấp (25%). Điều này có thể ảnh hưởng đến số ca nhiễm RV và tỉ lệ nhiễm ở giai đoạn trước uống vắc xin thấp, dẫn đến độ giảm số ca nhiễm RV và tỉ lệ nhiễm ở các năm sau uống so với năm trước uống bị giảm, từ đó dẫn đến đánh giá tác động của vắc xin những năm tiếp theo bị giảm. Tuy nhiên, với điều kiện dịch tễ học của bệnh ở Việt Nam, nhiễm RV ở những nhóm trẻ được uống sớm nhất (~6 tháng) là không phổ biến và do đó có thể ít ảnh hưởng đến ước tính giảm.

Ngoài ra, bệnh viện TW Huế đã ngừng tham gia từ tháng 10/2018 trong giai đoạn sau uống vắc xin và bị loại khỏi các phân tích xu hướng nên làm giảm số lượng

trẻ em được đưa vào phân tích, đặc biệt ở Huế. Tỷ lệ bao phủ vắc xin thấp hơn ở tỉnh Huế là 2 yếu tố kết hợp với nhau làm cho xu hướng theo dõi ảnh hưởng của vắc xin ở Huế rất khó xác định.

Trong những năm giám sát sau uống vắc xin, có nhiều trường hợp nhẹ hơn được ghi nhận và tải lượng vi rút có khả năng thấp hơn trong những trường hợp này khiến việc xác định kiểu gen trở nên khó khăn và dẫn đến tỷ lệ mẫu không thể xác định kiểu gen tăng lên, ảnh hưởng đến nhận định về chủng lưu hành phổ biến ở giai đoạn này.

Một yếu tố ảnh hưởng đến kết quả của nghiên cứu này là đại dịch COVID-19 toàn cầu đã bắt đầu vào năm thứ ba sau khi đưa vắc xin Rotavin-M1 vào sử dụng và có khả năng ảnh hưởng đến ca nhập viện trong giai đoạn này. Nhìn chung số trẻ nhập viện do tiêu chảy đã giảm đáng kể ở cả hai tỉnh nên ảnh hưởng đến việc đánh giá tác động của vắc xin.

Mặc dù có 1 số hạn chế nhưng đây là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam đánh giá tác động của việc sử dụng vắc xin phòng TCC trong chương trình TCMR thường quy tại Việt Nam. Khi so sánh với kết quả các nghiên cứu tại nhiều địa điểm trên thế giới cho thấy Rotavin-M1 có hiệu quả rõ rệt, tương tự các loại vắc xin khác nhau như: Rotarix, RotaTeq, Rotavac đã được sử dụng ở nhiều nước. Như vậy, kết quả nghiên cứu đã chứng minh việc sử dụng vắc xin Rotavin-M1 cùng các vắc xin khác trong chương trình TCMR tại Nam Định và Huế đã làm giảm gánh nặng bệnh TCC do RV và khi độ bao phủ càng cao thì tác động càng rõ rệt.

KẾT LUẬN

1. Tỷ lệ nhiễm và đặc điểm kiểu gen của vi rút Rota ở trẻ em tiêu chảy cấp nhập viện dưới 5 tuổi trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1

Tác động của việc triển khai uống Rotavin-M1 ở Nam Định trong 3 năm với tỉ lệ bao phủ 77% rất rõ rệt, làm giảm 40,6% tỉ lệ nhiễm vi rút Rota với mức giảm nhiều nhất trong năm đầu tiên (51,0%) và ở trẻ < 12 tháng tuổi (49,5%). Tác động của vắc xin này ở Huế chưa rõ rệt với độ bao phủ 42%, không có sự thay đổi đáng kể về tỉ lệ nhiễm vi rút Rota dương tính ở trẻ < 5 tuổi trước và sau uống vắc xin.

Kiểu gen GP phổ biến thay đổi ở giai đoạn trước và sau uống vắc xin và khác biệt ở các địa điểm nghiên cứu. Các kiểu gen phổ biến nhất ở Nam Định trước uống và năm đầu tiên sau uống là G9P[8] (74,8% và 48,4%) sau đó thay đổi thành G8P[8] (67,2%) và G1P[8] (23,8%) trong năm thứ hai và thứ ba sau uống. Các kiểu phổ biến nhất ở Huế giai đoạn trước uống vắc xin là G9P[8] (32,7%), sau đó thay đổi thành G3P[8] (52,2%) G9P[8] (20,8%) và G8P[8] (47,2%) trong 3 năm sau uống. Chủng G1P[8] tái xuất hiện ở Nam Định năm 2021 không có nguồn gốc từ chủng vắc xin. Chủng G8P[8] từ 2016-2021 đều có khung giống DS-1 (G8-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2) và không thay đổi đáng kể về di truyền theo thời gian.

Hiệu quả bảo vệ của vắc xin đạt 46% (95%CI: 28- 59%) với nhóm trẻ 6-23 tháng tuổi. Hiệu quả bảo vệ ngăn các ca bệnh mức trung bình-nặng là 57 % (95%CI: 39- 70%). Hiệu quả vắc xin không giảm khi trẻ 2 tuổi so với nhóm trẻ 1 tuổi. Vắc xin có hiệu quả khác nhau với mỗi chủng khác nhau, cao nhất là G1P[8] (77%) và thấp hơn các chủng chứa P[8] (G9P[8] (52%), G8P[8] (48%) và G3P[8] (46%)). Hiệu quả ngăn ca bệnh trung bình đến nặng do chủng G1P[8] cao nhất (94%), tiếp theo là G9P[8] (72%); G3P[8] (61%) và G8P[8] (58%).

2. Tỷ lệ nhiễm và đặc điểm lưu hành của vi rút Noro, Astro và Sapo ở trẻ em tiêu chảy dưới 5 tuổi trước và sau uống vắc xin Rotavin-M1

Vai trò của vi rút Noro ngày càng tăng rõ rệt với tỉ lệ nhiễm vi rút Noro tăng rõ rệt (từ 19,9 lên 29,4% ở Nam Định và từ 6,9% lên 19,9% Huế) và trở thành tác nhân vi rút gây tiêu chảy cấp phổ biến nhất (25,7%) ở Nam Định, thay vi rút Rota, đặc biệt ở nhóm trẻ 6-17 tháng tuổi giai đoạn sau uống vắc xin.

Tỉ lệ nhiễm Astro giảm (từ 7,8% còn 4,0% ở Nam Định) nhưng tỉ lệ nhiễm Astro ở Huế và vi rút Sapo ở 2 địa điểm không thay đổi trước và sau uống.

Ở Nam Định, nhóm đã uống vắc xin có tỉ lệ nhiễm vi rút Noro cao hơn, tỉ lệ nhiễm Astro và Sapo thấp hơn nhóm không uống vắc xin ($p < 0,05$) nhưng ở Huế, tỉ lệ nhiễm 3 tác nhân này ở 2 nhóm không khác biệt.

Nhóm gen ưu thế nhất của vi rút Noro là GII ở cả Nam Định (94,3%) và Huế (96,2%). Các kiểu gen của vi rút Astro phân bố khác nhau theo địa điểm (HAstV-1 phổ biến nhất ở Nam Định với 54,5% và HAstV-4 được phát hiện nhiều hơn ở Huế với 44,4%) và có sự thay đổi chủng lưu hành phổ biến theo thời gian. Các kiểu gen của vi rút Sapo lưu hành đa dạng, trong đó kiểu gen GI.1 được phát hiện với tỉ lệ cao nhất ở cả Nam Định (40,6%) và Huế (37,5%).

KIẾN NGHỊ

- Vắc xin Rotavin-M1 có hiệu quả bảo vệ cao ngăn các ca bệnh trung bình-nặng (57%) và nhiều chủng phổ biến lưu hành tại Việt Nam. Việc uống vắc xin Rotavin-M1 làm giảm rõ rệt gánh nặng của bệnh tiêu chảy cấp do vi rút Rota ở những nơi có tỉ lệ bao phủ cao. Do vậy, chúng tôi đề xuất đưa vắc xin Rotavin-M1 vào TCMR để triển khai cho uống cho trẻ em và đảm bảo đạt mức độ bao phủ vắc xin nhanh chóng và duy trì ở mức tối ưu để đạt hiệu quả phòng bệnh lâu dài;
- Với vai trò ngày càng tăng của các tác nhân gây tiêu chảy cấp ở trẻ em dưới 5 tuổi, đặc biệt là vi rút Noro sau khi uống vắc xin phòng tiêu chảy cấp do vi rút Rota nên cần tăng cường giám sát lưu hành tỉ lệ nhiễm và đặc điểm các chủng lưu hành, đưa ra biện pháp phòng ngừa hiệu quả và phát triển vắc xin phòng các vi rút gây tiêu chảy cấp khác trong tương lai;
- Tiếp tục phân tích di truyền toàn bộ hệ gen của 1 số chủng vi rút Rota phổ biến/tái nổi/chủng không xác định kiểu gen ở giai đoạn sau uống vắc xin (G1P[8], G9P[8]...) và các chủng vắc xin có hiệu quả bảo vệ thấp để tìm hiểu nguyên nhân, cơ chế bảo vệ cũng góp phần định hướng phát triển vắc xin phòng vi rút Rota mới trong tương lai.
- Tiếp tục giám sát xu hướng lưu hành vi rút Rota ở Huế và tìm hiểu các yếu tố có thể ảnh hưởng đến tác động và hiệu quả của vắc xin.

DANH MỤC TÀI LIỆU ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Prevalence of viral gastroenteritis pathogens among hospitalized children under 5 year of age in the process of introducing the rotavirus vaccine in the routine immunization, *Tạp chí Y Học Dự phòng*. Tập 32, số 4- 2022, p.74-81;
2. Sự tái nổi kiểu gen vi rút Rota G1P[8] ở Nam Định năm 2020-2021 không có nguồn gốc từ vắc xin, *Tạp chí Y Học Dự phòng*. Tập 32, số 7- 2022, p.60-71

TÀI LIỆU THAM KHẢO

I. TIẾNG VIỆT

1. Bùi Đức Nguyên, Nguyễn Vân Trang, Nguyễn Đăng Hiền, Đặng Đức Anh (2013), "Mức độ biến đổi khác nhau trong Gen VP7 của các chủng vi rút Rota lưu hành phổ biến ở Việt Nam trong giai đoạn 1998 - 2012", *Tạp chí Y Học Dự phòng*. Tập XXIII, số 7 (143).
2. Dương Thị Hồng, Đặng Thị Thanh Huyền (2016), "Đặc điểm bệnh tiêu chảy cấp do vi rút Rota tại một số điểm giám sát năm 2014", *Tạp chí Y Học Dự phòng*. Tập XXVI, số 5 (178)
3. Đặng Đức Anh (2010), *Rotavirus: dịch tễ, miễn dịch và vắc xin*, NXB Y học, Hà Nội.
4. Đặng Đức Anh, Nguyễn Thị Hồng Hạnh, Phan Thị Ngà và cs (2010), *Virus y học*, NXB Y học, Hà Nội.
5. Đặng Đức Anh, Nguyễn Vân Trang (2014), "Đáp ứng miễn dịch ở trẻ sau khi uống vắc xin Rotavin - M1 với liều và lịch khác nhau", *Tạp chí Y Học Dự phòng*. Tập XXIV, số 5 (154).
6. Nguyễn Anh Tuấn, Đặng Đức Anh, Nguyễn Vân Trang, Lê Thị Luân, Lê Thị Hồng Nhung, Lê Thị Kim Anh, Ngô Mai Hoa, Vũ Thị Bích Hậu, Baoming Jiang (2011), "Kháng thể trong sữa mẹ và ảnh hưởng đến vắc xin phòng vi rút Rota ở Việt Nam", *Tạp chí Y Học Dự phòng*. Số 2 (120), pp. 10-20.
7. Nguyễn Đăng Hiền, Phạm Thị Phương Thảo, Lê Thị Luân (2010), "Giám sát chủng virut Rota lưu hành gây bệnh tiêu chảy tại Việt Nam từ 1998 – 2009", *Tạp chí Y học dự phòng*. 21(1), pp. 5 – 9.
8. Nguyễn Gia Khánh, Đặng Đức Anh, Nguyễn Thị Hiền Anh, Vũ Đình Thiêm, Trương Tấn Minh, Lê Thị Phương Mai, Lê Hữu Thọ, Phù Quốc Việt (2011), "Ảnh hưởng của vắc xin bại liệt đường uống (OPV) đến tính sinh miễn dịch và hiệu lực của vắc xin Rotateq", *Tạp chí Y Học Dự phòng*. Số 5 (123), pp. 105-111.
9. Nguyễn, Minh Hiệp (2017), *Thực trạng nhiễm Norovirus và mối liên quan với kháng nguyên nhóm máu ở bệnh nhi dưới 5 tuổi điều trị tại bệnh viện Đa khoa Hà Nam năm 2012-2013*, Luận án Tiến sỹ, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung Ương.
10. Nguyễn Minh Hiệp, Phạm Ngọc Hùng, Nguyễn Phương Anh, Trần Đắc Tiến, Đặng Đình Thoảng, Phan Thị Ngà, Đặng Đức Anh, Nguyễn Vân Trang (2016),

"Tình trạng nhiễm vi rút noro, vi rút rota và một số đặc điểm lâm sàng ở trẻ em mắc tiêu chảy ở Hà Nam", *Tạp chí Y Học Dự phòng*, p. 121.

11. Nguyễn, Thúy Hường (2008), *Nghiên cứu virut rota lưu hành tại Việt Nam và chọn dòng virut thích hợp trên nuôi cấy tế bào*, Sinh học, Viện Công nghệ Sinh học.
12. Phạm Mai Thùy Trang, Nguyễn Thị Ngọc Phượng, Vũ Thị Huyền Trang, Nguyễn Trung Kiên, Trần Quốc Khánh, Đặng Thị Nguyệt, Hoàng Lê Phúc, Cao Hữu Nghĩa, Nguyễn Thị Thanh Thảo (2015), "Sự lưu hành và genotype của Rotavirus gây bệnh tiêu chảy tại Bệnh viện Nhi Đồng 1 TP. Hồ Chí Minh, 2012 – 2014.", *Tạp chí Y Học Dự phòng*. Tập XXV, số 5 (165)
13. Phạm Mai Thùy Trang, Vũ Thị Huyền Trang, Nguyễn Trung Kiên, Trần Quốc Khánh, Hoàng Lê Phúc, Vũ Thị Quế Hương, Nguyễn Thị Thanh Thảo (2017), "Sự thay đổi genotype của rotavirus gây bệnh tiêu chảy cấp tại Bệnh viện Nhi Đồng 1 thành phố Hồ Chí Minh, 2015 – 06/2017", *Tạp chí Y Học Dự phòng*. Tập 27, số 11, p. 102.
14. Phạm Thị Hà Giang, Nguyễn Văn Trang, Lê Thị Hồng Nhung, Phạm Xuân Ninh, Nguyễn Thị Hồng Hạnh và Nguyễn Trần Hiền (2013), "Phát hiện tác nhân vi khuẩn và vi rút gây tiêu chảy ở trẻ em dưới 5 tuổi tại Thái Bình", *Tạp chí Y Học Dự phòng*. Tập XXIII, số 11 (147).
15. Phùng Thị Bích Thủy, Phạm Thu Hiền, "Xác định tỷ lệ nhiễm rotavirus và norovirus và một số yếu tố liên quan tới tiêu chảy cấp của bệnh nhi điều trị tại Bệnh viện Nhi Trung ương", *Tạp chí Y học Việt Nam*. Tháng 10. - Số 02. , pp. tr. 96-99.
16. Vũ Mạnh Hùng, Nguyễn Thị Thu Trang, Nguyễn Thị Hiền Thanh, Futoshi Hasebe, Osamu Nakagomi, Trần Thị Nguyễn Hòa (2018), "Sự biến đổi đặc điểm di truyền của vi rút Rota G2P[4] lưu hành tại một số tỉnh miền Bắc và miền Trung Việt Nam, 2012 – 2018", *Tạp chí Y Học Dự phòng*. Tập 28, số 7.
17. Vũ Thị Bích Hậu, Đặng Đức Anh, Nguyễn Văn Trang (2013), "Biến động genotype của Norovirus lưu hành tại miền Bắc Việt Nam từ 2007 - 2013: Xuất hiện các subgenotype GII.4 mới nhưng vẫn duy trì tương tác kháng nguyên nhóm máu", *Tạp chí Y Học Dự phòng*. Tập XXIII, số 11 (147).
18. Vũ Thị Huyền Trang, Nguyễn Trung Kiên, Phạm Mai Thùy Trang, Trần Quốc Khánh, Nguyễn Ngọc Minh Tâm, Nguyễn Thị Thanh Thảo, Vũ Thị Quế Hương (2017), "Sự lưu hành và các chủng của vi rút noro gây bệnh tiêu chảy

tại Bệnh viện Nhi Đồng 1 thành phố Hồ Chí Minh, 2014", *Tạp chí Y Học Dự phòng*. Tập 27, số 11.

II. TIẾNG ANH

19. Adlhoch, C., et al. (2011), "Highly sensitive detection of the group A Rotavirus using Apolipoprotein H-coated ELISA plates compared to quantitative real-time PCR", *Virol J.* 8, p. 63.
20. Ahmed, S. M., et al. (2014), "Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis", *Lancet Infect Dis.* 14(8), pp. 725-730.
21. Ahmed, Sharia M., et al. (2014), "Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis", *The Lancet Infectious Diseases.* 14(8), pp. 725-730.
22. Ai, C. E., Steele, M., and Lopman, B. (2020), "Disease burden and seasonal impact of improving rotavirus vaccine coverage in the United States: A modeling study", *PLoS One.* 15(2), p. e0228942.
23. Aliabadi, N., et al. (2019), "Global impact of rotavirus vaccine introduction on rotavirus hospitalisations among children under 5 years of age, 2008-16: findings from the Global Rotavirus Surveillance Network", *Lancet Glob Health.* 7(7), pp. e893-e903.
24. Amit, L. N., et al. (2021), "Emergence of equine-like G3 strains as the dominant rotavirus among children under five with diarrhea in Sabah, Malaysia during 2018-2019", *PLoS One.* 16(7), p. e0254784.
25. Araki, Kaoru, et al. (2018), "Effectiveness of monovalent and pentavalent rotavirus vaccines in Japanese children", *Vaccine.* 36(34), pp. 5187-5193.
26. Ballard, S. B., et al. (2022), "Enteropathogen Changes After Rotavirus Vaccine Scale-up", *Pediatrics.* 149(1).
27. Bennett, S. and Gunson, R. N. (2017), "The development of a multiplex real-time RT-PCR for the detection of adenovirus, astrovirus, rotavirus and sapovirus from stool samples", *J Virol Methods.* 242, pp. 30-34.
28. Boom, Julie A., et al. (2012), "Symptomatic Infection and Detection of Vaccine and Vaccine-Reassortant Rotavirus Strains in 5 Children: A Case Series", *The Journal of Infectious Diseases.* 206(8), pp. 1275-1279.
29. Bosch, A., Pintó, R. M., and Guix, S. (2014), "Human astroviruses", *Clin Microbiol Rev.* 27(4), pp. 1048-74.

30. Bresee, J. S., et al. (1999), "Current status and future priorities for rotavirus vaccine development, evaluation and implementation in developing countries", *Vaccine*. 17(18), pp. 2207-22.
31. Bucardo, F., et al. (2014), "Predominance of norovirus and sapovirus in Nicaragua after implementation of universal rotavirus vaccination", *PLoS One*. 9(5), p. e98201.
32. Burke, R. M., et al. (2019), "Current and new rotavirus vaccines", *Curr Opin Infect Dis*. 32(5), pp. 435-444.
33. Burnett, E., Parashar, U. D., and Tate, J. E. (2020), "Global Impact of Rotavirus Vaccination on Diarrhea Hospitalizations and Deaths Among Children <5 Years Old: 2006-2019", *J Infect Dis*. 222(10), pp. 1731-1739.
34. Burnett, E., Parashar, U. D., and Tate, J. E. (2020), "Real-world effectiveness of rotavirus vaccines, 2006-19: a literature review and meta-analysis", *Lancet Glob Health*. 8(9), pp. e1195-e1202.
35. Burnett, Eleanor, et al. (2022), "Trends in Rotavirus Laboratory Detections and Internet Search Volume Before and After Rotavirus Vaccine Introduction and in the Context of the Coronavirus Disease 2019 Pandemic—United States, 2000–2021", *The Journal of Infectious Diseases*, p. jiac062.
36. Cates, J. E., et al. (2021), "Do Rotavirus Strains Affect Vaccine Effectiveness? A Systematic Review and Meta-analysis", *Pediatr Infect Dis J*. 40(12), pp. 1135-1143.
37. CDC (2015), "Global Burden of Norovirus and Prospects for Vaccine Development", *CDC*.
38. Clarke, E. and Desselberger, U. (2015), "Correlates of protection against human rotavirus disease and the factors influencing protection in low-income settings", *Mucosal Immunology*. 8(1), pp. 1-17.
39. Cowley, D., et al. (2016), "Emergence of a novel equine-like G3P[8] inter-genogroup reassortant rotavirus strain associated with gastroenteritis in Australian children", *J Gen Virol*. 97(2), pp. 403-410.
40. Cubitt, W. D., et al. (1999), "Application of electronmicroscopy, enzyme immunoassay, and RT-PCR to monitor an outbreak of astrovirus type 1 in a paediatric bone marrow transplant unit", *Journal of Medical Virology*. 57(3), pp. 313-321.

41. Chansaenroj, J., et al. (2020), "High prevalence of DS-1-like rotavirus infection in Thai adults between 2016 and 2019", *PLoS One*. 15(6), p. e0235280.
42. Chawla-Sarkar, M., et al. (2020), "A decade-long temporal analyses of human group-A rotavirus among children with gastroenteritis: Prevaccination scenario in West Bengal, eastern India", *J Med Virol*. 92(8), pp. 1334-1342.
43. Dang, D. A., et al. (2012), "A dose-escalation safety and immunogenicity study of a new live attenuated human rotavirus vaccine (Rotavin-M1) in Vietnamese children", *Vaccine*. 30 Suppl 1, pp. A114-21.
44. De Grazia, S., et al. (2011), "Surveillance of human astrovirus circulation in Italy 2002-2005: emergence of lineage 2c strains", *Clinical Microbiology and Infection*. 17(1), pp. 97-101.
45. De Grazia, Simona, et al. (2016), "Temporal variation in the distribution of type-1 human astrovirus lineages in a settled population over 14 years", *Archives of Virology*. 161(6), pp. 1633-1637.
46. Degiuseppe, Juan Ignacio and Stupka, Juan Andrés (2021), "Emergence of unusual rotavirus G9P[4] and G8P[8] strains during post vaccination surveillance in Argentina, 2017–2018", *Infection, Genetics and Evolution*. 93, p. 104940.
47. Delogu, R., et al. (2013), "Full-genome characterization of a G8P[8] rotavirus that emerged among children with diarrhea in Croatia in 2006", *J Clin Microbiol*. 51(5), pp. 1583-8.
48. Diez Valcarce, M., et al. (2021), "Global distribution of sporadic sapovirus infections: A systematic review and meta-analysis", *PLoS One*. 16(8), p. e0255436.
49. Do, L. P., et al. (2016), "Molecular characterisation of wild-type G1P[8] and G3P[8] rotaviruses isolated in Vietnam 2008 during a vaccine trial", *Arch Virol*. 161(4), pp. 833-50.
50. Donato, C. M., et al. (2014), "Characterization of a G1P[8] rotavirus causing an outbreak of gastroenteritis in the Northern Territory, Australia, in the vaccine era", *Emerg Microbes Infect*. 3(7), p. e47.
51. Donato, C. M., et al. (2012), "Identification of strains of RotaTeq rotavirus vaccine in infants with gastroenteritis following routine vaccination", *J Infect Dis*. 206(3), pp. 377-83.

52. Doro, R., et al. (2014), "Review of global rotavirus strain prevalence data from six years post vaccine licensure surveillance: is there evidence of strain selection from vaccine pressure?", *Infect Genet Evol.* 28, pp. 446-61.
53. ECDC (2013), Effectiveness of rotavirus vaccination: Generic study protocol for retrospective case control studies based on computerised databases, Editor^Editors, Stockholm.
54. ECDC (2013), Generic study protocol for retrospective case control studies based on computerised databases, Editor^Editors, Stockholm.
55. editor, World Health Organization (2009), "Rotavirus vaccines:an update", *Wkly Epidemiol Rec.* 84(50), pp. 533-40.
56. Esona, M. D., et al. (2015), "Multiplexed one-step RT-PCR VP7 and VP4 genotyping assays for rotaviruses using updated primers", *J Virol Methods.* 223, pp. 96-104.
57. Folorunso, O. S. and Sebolai, O. M. (2020), "Overview of the Development, Impacts, and Challenges of Live-Attenuated Oral Rotavirus Vaccines", *Vaccines (Basel).* 8(3).
58. Freeman, M. M., et al. (2008), "Enhancement of detection and quantification of rotavirus in stool using a modified real-time RT-PCR assay", *J Med Virol.* 80(8), pp. 1489-96.
59. Fujii, Y., et al. (2019), "Improvement of Rotavirus Genotyping Method by Using the Semi-Nested Multiplex-PCR With New Primer Set", *Front Microbiol.* 10, p. 647.
60. Gabbay, Yvone B., et al. (2007), "Molecular epidemiology of astrovirus type 1 in Belém, Brazil, as an agent of infantile gastroenteritis, over a period of 18 years (1982–2000): Identification of two possible new lineages", *Virus Research.* 129(2), pp. 166-174.
61. Glass, R. I., et al. (1996), "The changing epidemiology of astrovirus-associated gastroenteritis: a review", *Arch Virol Suppl.* 12, pp. 287-300.
62. Gomez, M. M., et al. (2010), "Detection of uncommon rotavirus A strains P[8]G8 and P[4]G8 in the city of Rio de Janeiro, 2002", *J Med Virol.* 82(7), pp. 1272-6.
63. Gower, C. M., et al. (2020), "Vaccine-derived rotavirus strains in infants in England", *Arch Dis Child.* 105(6), pp. 553-557.

64. Groome, M. J., et al. (2014), "Effectiveness of monovalent human rotavirus vaccine against admission to hospital for acute rotavirus diarrhoea in South African children: a case-control study", *Lancet Infect Dis.* 14(11), pp. 1096-1104.
65. Gibory, M., et al. (2020), "Effect of rotavirus vaccine implementation on the prevalence of coinfections with enteric viruses in Norway", *J Med Virol.*
66. Haber, M., et al. (2018), "A comparison of the test-negative and traditional case-control study designs with respect to the bias of estimates of rotavirus vaccine effectiveness", *Vaccine.* 36(33), pp. 5071-5076.
67. Halasa, N., et al. (2021), "The Changing Landscape of Pediatric Viral Enteropathogens in the Post-Rotavirus Vaccine Era", *Clin Infect Dis.* 72(4), pp. 576-585.
68. Hallowell BD, Parashar UD, Curns A, DeGroot NP, Tate JE. (2019), "Trends in the Laboratory Detection of Rotavirus Before and After Implementation of Routine Rotavirus Vaccination — United States, 2000–2018.", *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2019. 68(24);539–54.
69. Hansman, G. S., et al. (2006), "Development of an antigen ELISA to detect sapovirus in clinical stool specimens", *Archives of Virology.* 151(3), pp. 551-561.
70. Hara, M. and Nakagomi, O. (2018), "Role of rotavirus vaccination on an emerging G8P[8] rotavirus strain causing an outbreak in central Japan", *Vaccine.* 36(34), p. 5109.
71. Hasegawa, A., et al. (1984), "Isolation of human rotaviruses with a distinct RNA electrophoretic pattern from Indonesia", *Microbiol Immunol.* 28(6), pp. 719-22.
72. Heiman, E. M., et al. (2008), "Group A human rotavirus genomics: evidence that gene constellations are influenced by viral protein interactions", *J Virol.* 82(22), pp. 11106-16.
73. Hemming-Harlo, M., et al. (2017), "Sustained High Effectiveness of RotaTeq on Hospitalizations Attributable to Rotavirus-Associated Gastroenteritis During 4 Years in Finland", *J Pediatric Infect Dis Soc.* 6(4), pp. 317-323.
74. Hoa-Tran, T. N., et al. (2017), "Molecular epidemiology of noroviruses detected in Vietnamese children with acute gastroenteritis from 2012 to 2015", *J Med Microbiol.* 66(1), pp. 34-45.

75. Hoa-Tran, T. N., et al. (2016), "Abrupt emergence and predominance in Vietnam of rotavirus A strains possessing a bovine-like G8 on a DS-1-like background", *Arch Virol*. 161(2), pp. 479-82.
76. Hoa-Tran, T. N., et al. (2013), "Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants", *J Clin Virol*. 56(3), pp. 185-93.
77. Hoque, S. A., et al. (2020), "Distribution of rotavirus genotypes in Japan from 2015 to 2018: Diversity in genotypes before and after introduction of rotavirus vaccines", *Vaccine*. 38(23), pp. 3980-3986.
78. Hsieh, Y. C., et al. (2014), "Comparison of virus shedding after lived attenuated and pentavalent reassortant rotavirus vaccine", *Vaccine*. 32(10), pp. 1199-204.
79. Huyen, D. T. T., et al. (2018), "Epidemiology of acute diarrhea caused by rotavirus in sentinel surveillance sites of Vietnam, 2012-2015", *Vaccine*. 36(51), pp. 7894-7900.
80. Iizuka, Setsuko, et al. (2013), "Detection of Multiple Human Sapoviruses from Imported Frozen Individual Clams", *Food and Environmental Virology*. 5(2), pp. 119-125.
81. Jiang, Yixiang, et al. (2014), "Simultaneous Detection of Five Enteric Viruses Associated with Gastroenteritis by Use of a PCR Assay: a Single Real-Time Multiplex Reaction and Its Clinical Application", *Journal of Clinical Microbiology*. 52(4), pp. 1266-1268.
82. Jonesteller, C. L., et al. (2017), "Effectiveness of Rotavirus Vaccination: A Systematic Review of the First Decade of Global Postlicensure Data, 2006-2016", *Clin Infect Dis*. 65(5), pp. 840-850.
83. Jothikumar, N., Kang, G., and Hill, V. R. (2009), "Broadly reactive TaqMan assay for real-time RT-PCR detection of rotavirus in clinical and environmental samples. JIN2@cdc.gov", *J Virol Methods*. 155(2), pp. 126-31.
84. Kaneko, M., et al. (2017), "Identification of vaccine-derived rotavirus strains in children with acute gastroenteritis in Japan, 2012-2015", *PLoS One*. 12(9), p. e0184067.
85. Kim, J. H., et al. (2020), "Detection of an unusual G8P[8] rotavirus in a Rotarix-vaccinated child with acute gastroenteritis using Nanopore MinION sequencing: A case report", *Medicine (Baltimore)*. 99(40), p. e22641.

86. Kirkwood, Carl D., et al. (2011), "Distribution of Rotavirus Genotypes After Introduction of Rotavirus Vaccines, Rotarix® and RotaTeq®, into the National Immunization Program of Australia", *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 30(1), pp. S48-S53.
87. Kondo, K., et al. (2017), "Clinical and Molecular Characteristics of Human Rotavirus G8P[8] Outbreak Strain, Japan, 2014", *Emerg Infect Dis*. 23(6), pp. 968-972.
88. Kraay, Alicia N M, et al. (2021), "Impact of Nonpharmaceutical Interventions for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 on Norovirus Outbreaks: An Analysis of Outbreaks Reported By 9 US States", *The Journal of Infectious Diseases*. 224(1), pp. 9-13.
89. Kulkarni, R., et al. (2014), "Sequence analysis of VP7 and VP4 genes of G1P[8] rotaviruses circulating among diarrhoeic children in Pune, India: a comparison with Rotarix and RotaTeq vaccine strains", *Vaccine*. 32 Suppl 1, pp. A75-83.
90. Khoury, H., et al. (2011), "Burden of rotavirus gastroenteritis in the Middle Eastern and North African pediatric population", *BMC Infect Dis*. 11, p. 9.
91. Lambisia, Arnold, et al. (2020), "Epidemiological Trends of Five Common Diarrhea-Associated Enteric Viruses Pre- and Post-Rotavirus Vaccine Introduction in Coastal Kenya", *Pathogens*. 9, p. 660.
92. Lee, Su-Kyung, et al. (2018), "Emergence of G8P[6] rotavirus strains in Korean neonates", *Gut Pathogens*. 10.
93. Leshem, Eyal, et al. (2014), "Distribution of rotavirus strains and strain-specific effectiveness of the rotavirus vaccine after its introduction: a systematic review and meta-analysis", *The Lancet Infectious Diseases*. 14(9), pp. 847-856.
94. Lestari, F. B., et al. (2020), "Rotavirus infection in children in Southeast Asia 2008-2018: disease burden, genotype distribution, seasonality, and vaccination", *J Biomed Sci*. 27(1), p. 66.
95. Lewis, Kristen (2011), Vesikari clinical severity scoring system manual, PATH, Editor^Editors, p. 51.
96. Liao, Y., et al. (2021), "Global prevalence of norovirus in cases of acute gastroenteritis from 1997 to 2021: An updated systematic review and meta-analysis", *Microb Pathog*. 161(Pt A), p. 105259.

97. Liu, Jie, et al. (2011), "Multiplex reverse transcription PCR Luminex assay for detection and quantitation of viral agents of gastroenteritis", *Journal of Clinical Virology*. 50(4), pp. 308-313.
98. Logan, C., O'Leary, J. J., and O'Sullivan, N. (2006), "Real-time reverse transcription-PCR for detection of rotavirus and adenovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis in children", *J Clin Microbiol*. 44(9), pp. 3189-95.
99. Logan, C., O'Leary, J. J., and O'Sullivan, N. (2007), "Real-time reverse transcription PCR detection of norovirus, sapovirus and astrovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis", *J Virol Methods*. 146(1-2), pp. 36-44.
100. Lopman, B. A., et al. (2011), "Infant rotavirus vaccination may provide indirect protection to older children and adults in the United States", *J Infect Dis*. 204(7), pp. 980-6.
101. Lu, Y.; Zhang, Z.; Xie, H.; Su, W.; Wang, H.; Wang, D.; Lu, J. . 2021, 9, (2021), "The Rise in Norovirus-Related Acute Gastroenteritis During the Fight Against the COVID-19 Pandemic in Southern China", *Front. Public Health*. 9, p. 785373.
102. Luan le, T., et al. (2009), "Development and characterization of candidate rotavirus vaccine strains derived from children with diarrhoea in Vietnam", *Vaccine*. 27 Suppl 5, pp. F130-8.
103. Lucero, Y., et al. (2019), "Predominance of Rotavirus G8P[8] in a City in Chile, a Country Without Rotavirus Vaccination", *J Pediatr*. 204, pp. 298-300.e1.
104. Luchs, A.; Timenetsky Mdo, C. (2016), "Group A rotavirus gastroenteritis: Post-vaccine era, genotypes and zoonotic transmission", *Einstein (Sao Paulo)*. 14, pp. 278–287.
105. Magwalivha, M., et al. (2018), "Prevalence of Human Sapovirus in Low and Middle Income Countries", *Adv Virol*. 2018, p. 5986549.
106. Maldonado-Barrueco, Alfredo, et al. (2022), "Impact of the SARS-CoV-2 Pandemic on the Prevalence and Incidence of Gastrointestinal Viruses in Children up to Five Years Old: a Retrospective Cohort Study", *Microbiology Spectrum*. 10(3), pp. e02669-21.
107. Mans, J. (2019), "Norovirus Infections and Disease in Lower-MiddleandLow-Income Countries, 1997(-)2018", *Viruses*. 11(4).

108. Markkula, Jukka, et al. (2017), "Rotavirus epidemiology 5–6 years after universal rotavirus vaccination: persistent rotavirus activity in older children and elderly", *Infectious Diseases*. 49(5), pp. 388-395.
109. Martella, Vito, et al. (2013), "Lineage diversification and recombination in type-4 human astroviruses", *Infection, Genetics and Evolution*. 20, pp. 330-335.
110. Matthijnssens, J., et al. (2008), "Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains", *J Virol*. 82(7), pp. 3204-19.
111. Matthijnssens, J., et al. (2011), "Multiple reassortment and interspecies transmission events contribute to the diversity of feline, canine and feline/canine-like human group A rotavirus strains", *Infect Genet Evol*. 11(6), pp. 1396-406.
112. McDonald, S. M., et al. (2009), "Evolutionary dynamics of human rotaviruses: balancing reassortment with preferred genome constellations", *PLoS Pathog*. 5(10), p. e1000634.
113. McNeal, Monica Malone and Bernstein, David I. (2009), "Rotavirus- Chapter 35", in Barrett, Alan D. T. and Stanberry, Lawrence R., Editors, *Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases*, Academic Press, London, pp. 645-669.
114. Mori, Kohji, et al. (2013), "Multiplex real-time PCR assays for the detection of group C rotavirus, astrovirus, and Subgenus F adenovirus in stool specimens", *Journal of Virological Methods*. 191(2), pp. 141-147.
115. Mossel E, Estes M, Ramig F. Coding assignments and virion locations of rotavirus proteins and 3D structure of the rotavirus particle, https://www.reoviridae.org/dsRNA_virus_proteins/rotavirus%20figure.htm, Editor^Editors, Internet, Internet.
116. My, P. V., et al. (2013), "Endemic norovirus infections in children, Ho Chi Minh City, Vietnam, 2009-2010", *Emerg Infect Dis*. 19(6), pp. 977-80.
117. Nakagomi, O., et al. (1990), "Molecular identification by RNA-RNA hybridization of a human rotavirus that is closely related to rotaviruses of feline and canine origin", *J Clin Microbiol*. 28(6), pp. 1198-203.

118. Nakagomi, T., et al. (2017), "Evolution of DS-1-like G1P[8] double-gene reassortant rotavirus A strains causing gastroenteritis in children in Vietnam in 2012/2013", *Arch Virol.* 162(3), pp. 739-748.
119. Nguyen, T. A., et al. (2008), "Norovirus and sapovirus infections among children with acute gastroenteritis in Ho Chi Minh City during 2005-2006", *J Trop Pediatr.* 54(2), pp. 102-13.
120. Nguyen, T. A., et al. (2007), "Diversity of viruses associated with acute gastroenteritis in children hospitalized with diarrhea in Ho Chi Minh City, Vietnam", *J Med Virol.* 79(5), pp. 582-90.
121. Nguyen, Tuan Anh, et al. (2008), "Identification of human astrovirus infections among children with acute gastroenteritis in the Southern Part of Vietnam during 2005–2006", *Journal of Medical Virology.* 80(2), pp. 298-305.
122. Nguyen, V. M., et al. (2001), "The epidemiology and disease burden of rotavirus in Vietnam: sentinel surveillance at 6 hospitals", *J Infect Dis.* 183(12), pp. 1707-12.
123. Oka, T., et al. (2006), "Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction", *J Med Virol.* 78(10), pp. 1347-53.
124. Oka, T., et al. (2015), "Comprehensive review of human sapoviruses", *Clin Microbiol Rev.* 28(1), pp. 32-53.
125. Oka, Tomoichiro, et al. (2012), "Human sapovirus classification based on complete capsid nucleotide sequences", *Archives of Virology.* 157(2), pp. 349-352.
126. Okitsu, S., et al. (2021), "Diversity of human sapovirus genotypes detected in Japanese pediatric patients with acute gastroenteritis, 2014-2017", *J Med Virol.* 93(8), pp. 4865-4874.
127. Orenstein, E. W., et al. (2007), "Methodologic issues regarding the use of three observational study designs to assess influenza vaccine effectiveness", *Int J Epidemiol.* 36(3), pp. 623-31.
128. Pasittungkul, S., et al. (2021), "High prevalence of circulating DS-1-like human rotavirus A and genotype diversity in children with acute gastroenteritis in Thailand from 2016 to 2019", *PeerJ.* 9, p. e10954.
129. Patel, M. M., et al. (2013), "Global seasonality of rotavirus disease", *Pediatr Infect Dis J.* 32(4), pp. e134-47.

130. Patel, M. M., et al. (2008), "Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis", *Emerg Infect Dis.* 14(8), pp. 1224-31.
131. Pietsch, C. and Liebert, U. G. (2019), "Rotavirus vaccine effectiveness in preventing hospitalizations due to gastroenteritis: a descriptive epidemiological study from Germany", *Clinical Microbiology and Infection.* 25(1), pp. 102-106.
132. Pietsch, C., et al. (2009), "Molecular characteristics of German G8P[4] rotavirus strain GER1H-09 suggest that a genotyping and subclassification update is required for G8", *J Clin Microbiol.* 47(11), pp. 3569-76.
133. Pitkänen, Oskari, Markkula, Jukka, and Hemming-Harlow, Maria (2022), "Sapovirus, Norovirus and Rotavirus Detections in Stool Samples of Hospitalized Finnish Children With and Without Acute Gastroenteritis", *The Pediatric Infectious Disease Journal.* 41(5), pp. e203-e207.
134. Pitzer, V. E., et al. (2011), "Influence of birth rates and transmission rates on the global seasonality of rotavirus incidence", *J R Soc Interface.* 8(64), pp. 1584-93.
135. Pitzer, Virginia E., et al. (2015), "Did Large-Scale Vaccination Drive Changes in the Circulating Rotavirus Population in Belgium?", *Scientific Reports.* 5(1), p. 18585.
136. Praharaj, I., et al. (2020), "Enteric virus detection from acute gastroenteritis cases in a tertiary care hospital before and after rotavirus vaccine introduction, India: 2012-2019", *International Journal of Infectious Diseases.* 101, pp. 506-507.
137. Phengma, Phitchakorn, et al. (2022), "Molecular epidemiology and characterization of norovirus and sapovirus in pediatric patients with acute diarrhea in Thailand, 2019–2020", *Journal of Infection and Public Health.* 15(9), pp. 1013-1019.
138. Roczo-Farkas, Susie, et al. (2018), "The Impact of Rotavirus Vaccines on Genotype Diversity: A Comprehensive Analysis of 2 Decades of Australian Surveillance Data", *The Journal of Infectious Diseases.* 218(4), pp. 546-554.
139. Rose, Tatiana Lundgren, et al. (2013), "Evidence of Vaccine-related Reassortment of Rotavirus, Brazil, 2008–2010", *Emerging Infectious Disease journal.* 19(11), p. 1843.

140. Ruiz-Palacios, Guillermo M., et al. (2006), "Safety and Efficacy of an Attenuated Vaccine against Severe Rotavirus Gastroenteritis", *New England Journal of Medicine*. 354(1), pp. 11-22.
141. Ruuska, Tarja and Vesikari, Timo (1990), "Rotavirus Disease in Finnish Children: Use of Numerical Scores for Clinical Severity of Diarrhoeal Episodes", *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 22(3), pp. 259-267.
142. Sadiq, A. and Bostan, N. (2020), "Comparative Analysis of G1P[8] Rotaviruses Identified Prior to Vaccine Implementation in Pakistan With Rotarix and RotaTeq Vaccine Strains", *Front Immunol*. 11, p. 562282.
143. Sahakyan, G., et al. (2016), "Impact and Effectiveness of Monovalent Rotavirus Vaccine in Armenian Children", *Clin Infect Dis*. 62 Suppl 2, pp. S147-54.
144. Sánchez, Gerardo J, et al. (2017), "Epidemiology of Sapovirus Infections in a Birth Cohort in Peru", *Clinical Infectious Diseases*. 66(12), pp. 1858-1863.
145. Santos, N., et al. (1998), "Detection of rotavirus types G8 and G10 among Brazilian children with diarrhea", *J Clin Microbiol*. 36(9), pp. 2727-9.
146. Scheuer Kelly, A., et al. (2013), "Prevalence of Porcine Noroviruses, Molecular Characterization of Emerging Porcine Sapoviruses from Finisher Swine in the United States, and Unified Classification Scheme for Sapoviruses", *Journal of Clinical Microbiology*. 51(7), pp. 2344-2353.
147. Schultz-Cherry, Stacey (2012), "Astrovirus Research: Essential Ideas, Everyday Impacts, Future Directions", Springer.
148. Schwartz, L. M., et al. (2017), "Rotavirus vaccine effectiveness in low-income settings: An evaluation of the test-negative design", *Vaccine*. 35(1), pp. 184-190.
149. Soares-Weiser, K., et al. (2019), "Vaccines for preventing rotavirus diarrhoea: vaccines in use", *Cochrane Database of Systematic Reviews*(3).
150. Steele, A. D., et al. (1999), "Comparative studies of human rotavirus serotype G8 strains recovered in South Africa and the United Kingdom", *J Gen Virol*. 80 (Pt 11), pp. 3029-3034.
151. Steele, J. C., Jr. (1999), "Rotavirus", *Clin Lab Med*. 19(3), pp. 691-703.
152. Steyer, A., et al. (2007), "Rotavirus genotypes in Slovenia: unexpected detection of G8P[8] and G12P[8] genotypes", *J Med Virol*. 79(5), pp. 626-32.

153. Suzuki, H. (2019), "Rotavirus Replication: Gaps of Knowledge on Virus Entry and Morphogenesis", *Tohoku J Exp Med.* 248(4), pp. 285-296.
154. Tacharoenmuang, R., et al. (2016), "Full Genome Characterization of Novel DS-1-Like G8P[8] Rotavirus Strains that Have Emerged in Thailand: Reassortment of Bovine and Human Rotavirus Gene Segments in Emerging DS-1-Like Intergenogroup Reassortant Strains", *PLoS One.* 11(11), p. e0165826.
155. Tapia, M. D., et al. (2012), "Secondary efficacy endpoints of the pentavalent rotavirus vaccine against gastroenteritis in sub-Saharan Africa", *Vaccine.* 30 Suppl 1, pp. A79-85.
156. Tate, J. E., et al. (2016), "Global, Regional, and National Estimates of Rotavirus Mortality in Children <5 Years of Age, 2000-2013", *Clin Infect Dis.* 62 Suppl 2, pp. S96-s105.
157. Tate, J. E., et al. (2016), "Use of Patients With Diarrhea Who Test Negative for Rotavirus as Controls to Estimate Rotavirus Vaccine Effectiveness Through Case-Control Studies", *Clin Infect Dis.* 62 Suppl 2, pp. S106-14.
158. Tian, Y., et al. (2021), "Group A rotavirus prevalence and genotypes among adult outpatients with diarrhea in Beijing, China, 2011-2018", *J Med Virol.* 93(11), pp. 6191-6199.
159. Toczyłowski, K., et al. (2021), "Rotavirus gastroenteritis in children hospitalized in northeastern Poland in 2006-2020: Severity, seasonal trends, and impact of immunization", *Int J Infect Dis.* 108, pp. 550-556.
160. Trang, N. V., et al. (2014), "Prevalence of rotavirus antibodies in breast milk and inhibitory effects to rotavirus vaccines", *Hum Vaccin Immunother.* 10(12), pp. 3681-7.
161. Trang, N. V., et al. (2012), "Detection and molecular characterization of noroviruses and sapoviruses in children admitted to hospital with acute gastroenteritis in Vietnam", *J Med Virol.* 84(2), pp. 290-7.
162. Trang, N. V., et al. (2012), "Genetic variation in the VP7 gene of rotavirus G1P[8] strains isolated in Vietnam, 1998-2009", *Virus Res.* 165(2), pp. 190-6.
163. Trang, N.V., et al. (2014), "Association between norovirus and rotavirus infection and histo-blood group antigen types in Vietnamese children", *J Clin Microbiol.* 52(5), pp. 1366-74.

164. Trinh, Q. D., et al. (2007), "Sequence analysis of the VP7 gene of human rotavirus G1 isolated in Japan, China, Thailand, and Vietnam in the context of changing distribution of rotavirus G-types", *J Med Virol.* 79(7), pp. 1009-16.
165. Trujillo, A. A., et al. (2006), "Use of TaqMan real-time reverse transcription-PCR for rapid detection, quantification, and typing of norovirus", *J Clin Microbiol.* 44(4), pp. 1405-12.
166. Truong, D. T. T., et al. (2021), "Rotavirus genotype trends from 2013 to 2018 and vaccine effectiveness in southern Vietnam", *Int J Infect Dis.* 105, pp. 277-285.
167. Van Maarseveen, N. M., et al. (2010), "Diagnosis of viral gastroenteritis by simultaneous detection of Adenovirus group F, Astrovirus, Rotavirus group A, Norovirus genogroups I and II, and Sapovirus in two internally controlled multiplex real-time PCR assays", *J Clin Virol.* 49(3), pp. 205-10.
168. Van Trang, N., et al. (2014), "Association between norovirus and rotavirus infection and histo-blood group antigen types in Vietnamese children", *J Clin Microbiol.* 52(5), pp. 1366-74.
169. Varghese, T., Kang, G., and Steele, A. D. (2022), "Understanding Rotavirus Vaccine Efficacy and Effectiveness in Countries with High Child Mortality", *Vaccines (Basel).* 10(3).
170. Varghese, Tintu, et al. (2021), "Rotavirus Strain Distribution before and after Introducing Rotavirus Vaccine in India", *Pathogens.* 10(4), p. 416.
171. Victoria, Matías, et al. (2007), "Genotypes and molecular epidemiology of human astroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil", *Journal of Medical Virology.* 79(7), pp. 939-944.
172. Vu, D. L., et al. (2017), "Epidemiology of Classic and Novel Human Astrovirus: Gastroenteritis and Beyond", *Viruses.* 9(2).
173. Walter, J. E., et al. (2001), "Molecular characterization of a novel recombinant strain of human astrovirus associated with gastroenteritis in children", *Archives of Virology.* 146(12), pp. 2357-2367.
174. Wang, Si-Jie, et al. (2022), First isolation and Genetic characterization of G8P[8] rotavirus strains emerged recently from Guangzhou, China, Editor^Editors, Research Square.

175. Wei, Hongyu, et al. (2021), "High divergence of human astrovirus genotypes circulating in pediatric patients hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand, 2017–2020", *Scientific Reports*. 11(1), p. 23266.
176. WHO (2008), Generic protocol for monitoring impact of rotavirus vaccination on gastroenteritis disease burden and viral strains, Editor^Editors, World Health Organization, Geneva.
177. WHO (2021), Global immunization coverage 2021, Editor^Editors, WHO, Geneva, Switzerland.
178. WHO (2020), *The immunological basis for immunization series: module 21: rotavirus vaccines*, Immunological basis for immunization series;module 21, World Health Organization, Geneva.
179. WHO (2009), Manual of rotavirus detection and characterization methods, Editor^Editors, World Health Organization, Geneva.
180. WHO (2021), *Rotavirus vaccines: WHO position paper – July 2021*, World Health Organization.
181. WHO (2003), The World health report : 2003 : shaping the future, Editor^Editors, World Health Organization, Geneva.
182. Wilde, J., et al. (1991), "Improved detection of rotavirus shedding by polymerase chain reaction", *Lancet*. 337(8737), pp. 323-6.
183. Wu, L., et al. (2020), "Epidemiology and Genetic Characterization of Classical Human Astrovirus Infection in Shanghai, 2015-2016", *Front Microbiol*. 11, p. 570541.
184. Yan, Hainian, et al. (2003), "Detection of norovirus (GI, GII), Sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR", *Journal of Virological Methods*. 114(1), pp. 37-44.
185. Yen, Catherine, et al. (2011), "Monovalent Rotavirus Vaccine Provides Protection Against an Emerging Fully Heterotypic G9P[4] Rotavirus Strain in Mexico", *The Journal of Infectious Diseases*. 204(5), pp. 783-786.
186. Yu, J., et al. (2019), "Prevalence of rotavirus and rapid changes in circulating rotavirus strains among children with acute diarrhea in China, 2009-2015", *J Infect*. 78(1), pp. 66-74.
187. Zaman, K., et al. (2010), "Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in Asia: a

randomised, double-blind, placebo-controlled trial", *Lancet*. 376(9741), pp. 615-23.

188. Zeller, M., et al. (2015), "Genome-Wide Evolutionary Analyses of G1P[8] Strains Isolated Before and After Rotavirus Vaccine Introduction", *Genome Biol Evol.* 7(9), pp. 2473-83.
189. Zeller, M., et al. (2017), "Comparative analysis of the Rotarix™vaccine strain and G1P[8]rotaviruses detected before and after vaccine introduction in Belgium. ", *PeerJ*. 5, p. e2733.
190. Zeller, M., et al. (2012), "Genetic analyses reveal differences in the VP7 and VP4 antigenic epitopes between human rotaviruses circulating in Belgium and rotaviruses in Rotarix and RotaTeq", *J Clin Microbiol.* 50(3), pp. 966-76.

PHỤ LỤC

Phụ lục 01: Phiếu chấp thuận tham gia nghiên cứu

BỘ Y TẾ VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG	SỞ Y TẾ TỈNH NAM ĐỊNH / THỪA THIÊN - HUẾ TRUNG TÂM YTDP TỈNH
PHIẾU CHẤP THUẬN THAM GIA NGHIÊN CỨU	
TÊN NGHIÊN CỨU: ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ CỦA VẮC XIN PHÒNG TIÊU CHẨY DO ROTAVIRUS Ở TRẺ EM TẠI VIỆT NAM	
Tên đầy đủ của trẻ: _____	 VE4917
Mã số nghiên cứu của trẻ: _____	
Tên cha mẹ/người đại diện hợp pháp: <u>Bùi Thị Xuyên</u>	
Quan hệ với trẻ: <u>Mẹ</u>	
Bằng việc ký vào phiếu này, tôi xác nhận tất cả các nội dung sau:	
• Tôi đã đọc toàn bộ Tờ Thông tin (hoặc đã được nghe toàn bộ thông tin) và được giải thích về những gì sẽ thực hiện với con tôi cũng như những gì tôi được yêu cầu thực hiện. Tôi đã có cơ hội đặt câu hỏi và tôi hiểu rằng tôi có thể đặt thêm các câu hỏi về nghiên cứu này vào bất kỳ lúc nào. • Tôi sẽ được cung cấp một bản có chữ ký của Phiếu chấp thuận tham gia nghiên cứu này để giữ lại tham khảo. • Tôi đồng ý cung cấp thông tin cá nhân và các thông tin liên quan đến bệnh tiêu chảy và tiền sử tiêm vắc xin, gia đình của con tôi cho nghiên cứu và cho lấy mẫu phân của cháu để phục vụ nghiên cứu. • Tôi hiểu rằng tôi có toàn quyền rút con mình khỏi nghiên cứu vào bất kỳ lúc nào mà không phải giải thích về quyết định đó và việc đó không ảnh hưởng đến quyền lợi chăm sóc y tế của con tôi. • Tôi tự nguyện đồng ý cho con mình tham gia vào nghiên cứu này. • Tôi ủy quyền cho nghiên cứu viên tiếp cận các hồ sơ bệnh án của bệnh viện nơi con tôi điều trị để phục vụ nghiên cứu.	
Đánh dấu (X) vào MỘT trong hai lựa chọn bên dưới:	
☒ Tôi ĐỒNG Ý cho sử dụng mẫu của con tôi cho những nghiên cứu khác, và những nghiên cứu này được cấp có thẩm quyền cho phép.	
HOẶC	
☐ Tôi KHÔNG ĐỒNG Ý lưu giữ mẫu của con tôi cho các nghiên cứu khác và mẫu này cần được hủy bỏ sau khi nghiên cứu này hoàn thành.	
Tên đầy đủ của cha mẹ/người đại diện hợp pháp: <u>Bùi Thị Xuyên</u>	
Chữ ký của cha mẹ/người đại diện hợp pháp: <u>Xuyên</u>	
Quan hệ với trẻ: <u>Mẹ</u>	Ngày ký: <u>16 / 9 / 2019</u>
Phiếu chấp thuận (dành cho giám sát tiêu chảy) phiên bản 2.0, 16/11/2016	
Trang: 4 / 5	

BỘ Y TẾ
VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG

SỞ Y TẾ TỈNH
NAM ĐỊNH / THỪA THIÊN - HUẾ
TRUNG TÂM YTDP TỈNH

Dành cho người làm chứng (nếu Bố/Mẹ/người đại diện hợp pháp không thể đọc/ký)

Tôi chứng nhận rằng tôi đã chứng kiến việc các nội dung nghiên cứu trong phiếu thông tin này đã được đọc và thảo luận với cha mẹ/người đại diện hợp pháp. Những nội dung này bao gồm các rủi ro và lợi ích khi tham gia nghiên cứu, và họ có quyền rút con mình khỏi nghiên cứu bất kỳ lúc nào. Tôi cũng đã chứng kiến việc cha mẹ/người đại diện hợp pháp được tạo cơ hội đặt câu hỏi và làm rõ các thông tin được cung cấp. Tôi cũng chứng nhận rằng cha mẹ/người đại diện hợp pháp đã đồng ý cho con họ tham gia nghiên cứu này. Tôi ký tên vào phiếu này nhằm cung cấp bằng chứng về các thủ tục tôi đã chứng kiến.

Tên đầy đủ của người làm chứng: _____

Chữ ký của người làm chứng: _____

Ngày ký: ____/____/20____

Điểm chỉ của cha/mẹ trẻ: _____

Tuyên bố của nghiên cứu viên (hoặc người được nghiên cứu viên chỉ định thực hiện thủ tục đồng ý tham gia nghiên cứu):

Tôi xác nhận rằng tôi đã giải thích bản chất và mục đích của nghiên cứu này, cũng như các lợi ích và rủi ro tiềm ẩn liên quan đến việc tham gia cho cha mẹ/người đại diện hợp pháp của trẻ được đề cập ở trên, vào ngày ghi trên phiếu đồng ý này. Tôi đã trả lời các câu hỏi được đưa ra và đã chứng kiến việc ký tên ở bên trên.

01 bản copy của phiếu chấp thuận này đã được đưa cho bố/mẹ trẻ.

BS: Bùi Thị Hương

Tên nghiên cứu viên/người lấy phiếu tình nguyện: _____

Chữ ký nghiên cứu viên/người lấy phiếu tình nguyện: _____

Ngày ký 16/9 /2019

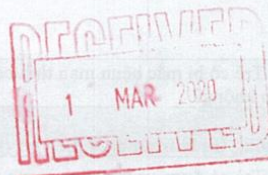
Phụ lục 02: Phiếu điều tra bệnh tiêu chảy cấp

Đánh giá hiệu quả vắc xin Rotavin-M1 ở Việt Nam Phiên bản 3.4 - 08/05/2018

PHIẾU ĐIỀU TRA BỆNH TIÊU CHẢY CẤP Ở TRẺ EM DƯỚI 5 TUỔI

Tiêu chuẩn tuyển chọn: Trẻ phải thỏa mãn tất cả 6 tiêu chuẩn sau mới chọn vào điều tra.

- ☒ Trẻ dưới 5 tuổi (từ 0 ngày tuổi đến trước ngày sinh nhật lần thứ 5)
- ☐ Đi ngoài phân lỏng hoặc nước, không có nhầy máu trong phân, từ 3 lần trở lên trong bất kỳ 24 giờ nào kể từ khi bị tiêu chảy
- ☒ Chưa điều trị nội trú ở các bệnh viện khác trong đợt tiêu chảy này.
- ☒ Thời gian từ khi bắt đầu bị tiêu chảy đến khi vào viện dưới 14 ngày.
- ☒ Nhập viện điều trị nội trú có triệu chứng tiêu chảy cấp trong vòng 24h kể từ khi nhập viện
- ☒ Gia đình đã chấp thuận tham gia nghiên cứu. Ngày ký phiếu: 16/9/2019



A. THÔNG TIN CA BỆNH		4. Người điều tra: <u>Bùi Thị Hương</u>	
1 Ngày thu thập số liệu: <u>16/9/2019</u> Ngày tháng năm		2a Mã vạch: _____	
		2b Số bệnh án: <u>141786</u>	
		2c Số thẻ bảo hiểm: <u>1813636 224 67294 36908</u>	
3 Bệnh viện: <u>Độc lập Hải Phòng</u>			
5 Họ và tên trẻ: _____			
6 Địa chỉ: Phường/Xã: <u>Hải Phòng</u> Huyện/Thành Phố: <u>Hải Phòng</u> Tỉnh: <u>Nam Định</u>			
7 Ngày nhập viện (Ngày/Tháng/Năm): <u>16/9/2019</u>			
8 Tuổi của trẻ: <u>18</u> Tháng (tròn)		9 Ngày sinh (Ngày/Tháng/Năm): <u>3/1/03/2018</u>	
10 Giới tính: ☒ Nam ☐ Nữ			
11 Cân nặng hiện tại: <u>9,5</u> kg		12 Chiều cao hiện tại: <u>80</u> cm	
13 Tên cha/mẹ/người bảo trợ: <u>Bùi Thị Hương</u>		14 Số điện thoại: <u>098 6.557 447</u>	
B. BỆNH SỬ LÂM SÀNG - Tại thời điểm nhập viện		Người điều tra: <u>Bùi Thị Hương</u>	
15 Ngày khởi phát (Ngày/Tháng/Năm): <u>15/9/2019</u>			
16a Ngày bắt đầu tiêu chảy (Ngày/Tháng/Năm): <u>15/9/2019</u>		16b Số ngày trẻ tiêu chảy (tính đến thời điểm nhập viện) <u>02</u> (ngày) (Điền 99 nếu không biết)	
17 Số lần tiêu chảy nhiều nhất trong vòng bất kỳ 24h nào trong đợt tiêu chảy này		<u>02</u> lần (Điền 99 nếu không biết)	
18 Trẻ có nôn không? (Nếu không nôn hoặc không biết, chuyển sang câu Q21)	☒ Có	2 Không	9 Không biết
19 Số ngày trẻ có nôn (tính đến thời điểm nhập viện)		<u>02</u> ngày (Điền 99 nếu không biết)	
20 Số lần nôn nhiều nhất trong vòng bất kỳ 24h nào trong đợt tiêu chảy này		<u>02</u> lần (Điền 99 nếu không biết)	
21 Trẻ có được uống dung dịch bù điện giải (ORESOL) trước khi nhập viện không?	1 Có	2 Không	9 Không biết
22 Trẻ có được truyền dịch trước khi nhập viện không?	1 Có	2 Không	9 Không biết
23 Khi nhập viện (trước khi bù dịch) tình trạng của trẻ như thế nào?	1 Tỉnh táo	2 Kích thích/Vật vã	3 Li bì/Khó đánh thức
24 Khi nhập viện, mắt trẻ có bị trũng không?	☒ Có	2 Không	
25 Khi nhập viện (trước khi bù dịch) tình trạng khát nước của trẻ như thế nào?	1 Uống bình thường, không khát	2 Khát, uống nước	3 Uống ít hoặc không thể uống

Đánh giá hiệu quả vắc xin Rotavin-M1 ở Việt Nam

Phiên bản 3.4 - 08/05/2018

26 Khi nhập viện (trước khi bù dịch), tình trạng đàn hồi của dạ vùng bụng của trẻ như thế nào?	1	Đàn hồi rất nhanh	2	Đàn hồi sau 1-2 giây	3	Đàn hồi chậm (trên 2 giây)	
27 Tình trạng mất nước	1	Không mất nước	2	Có mất nước	3	Mất nước nặng	4 Shock giảm thể tích tuần hoàn
28 Trẻ có bị mắc bệnh mạn tính/bệnh kèm theo nào không?	1	Có, ghi rõ <u>Viên long</u>	2	Không	9	Không biết	
Thông tin lâm sàng và điều trị (khi trẻ xuất viện)				Người điều tra: <u>Bác Thị Hương</u>			
29 Trẻ có được truyền dịch trong thời gian nằm viện không?	1	Có	2	Không			
30 Trẻ có sử dụng Oresol trong thời gian nằm viện không?	1	Có	2	Không			
31 Trẻ có bị sốt trong đợt tiêu chảy cấp này không?	1	Có	2	Không			
32 Nhiệt độ cao nhất của trẻ đo được ở nhà/ở bệnh viện từ khi mắc bệnh?					<u>38,0</u> °C (ghi 99 nếu không biết)		
33 Có lấy được mẫu phân không	1	Có	2	Không	34 Ngày lấy mẫu (Ngày/Tháng/Năm): <u>16/09/2017</u>		

C. TÌNH TRẠNG KHI RA VIỆN				Người điều tra: <u>Vũ Thị Hoa</u>			
35 Ngày ra viện (Ngày/Tháng/Năm): <u>20/09/2017</u>							
36 Tình trạng khi ra viện:	1	Khỏi bệnh	2	Tử vong	3	Chuyển viện	4 Gia đình xin về
	5	Trốn viện	9	Khác: _____			

D. PHÒNG VẤN CHA, MẸ, NGƯỜI NHÀ CỦA TRẺ				Người điều tra: <u>Bác Thị Hương</u>			
37 Quan hệ của Anh/Chị với trẻ	1	Mẹ (đẻ/nhau)	2	Bố (đẻ/nhau)	3	Họ hàng	4 Người bảo trợ hợp pháp
38 Có bao nhiêu người, kể cả trẻ em, sống trong cùng nhà nơi trẻ đang sống (ngủ qua đêm thường xuyên trong vòng 3 tháng trở lại đây)							<u>04</u> người
39 Kể cả trẻ đang mắc tiêu chảy, có bao nhiêu trẻ dưới 5 tuổi (chưa đến ngày sinh nhật lần thứ 5) trong cùng nhà (ngủ cùng nhà với trẻ bệnh ít nhất 4 đêm/tuần, trong vòng 3 tháng trở lại đây)							<u>01</u> người
40 Tuổi của người mẹ khi trẻ nhập viện (ghi 99 nếu không biết)							<u>30</u> tuổi
41 Trình độ học vấn cao nhất của người mẹ	1	Không đi học	2	Tiểu học	3	Trung học cơ sở	4 Trung học phổ thông
42 Tình trạng hôn nhân của người mẹ	1	Đã kết hôn	2	Đơn thân	3	Ly dị	4 Sống chung
43 Trình độ học vấn cao nhất của người cha (nếu có)	1	Không đi học	2	Tiểu học	3	Trung học cơ sở	4 Trung học phổ thông
44 Hộ gia đình có điện không?	1	Có	2	Không			
45 Nguồn nước chính hộ gia đình hay sử dụng để ăn uống	1	Nước máy riêng cho hộ gia đình	2	Vòi nước chung với cụm dân cư	3	Nước giếng khoan	4 Nước giếng có mái che
	5	Nước giếng không có mái che	6	Nước hồ/sông/suối	9	Khác, ghi rõ _____	

Đánh giá hiệu quả vắc xin Rotavin-M1 ở Việt Nam

Phiên bản 3.4 - 08/05/2018

46 Hộ gia đình có những vật dụng gì dưới đây				
a. Đái	1	Có	2	Không
b. Tivi	1	Có	2	Không
c. Tủ lạnh	1	Có	2	Không
d. Xe đạp	1	Có	2	Không
e. Xe máy	1	Có	2	Không
f. Ô tô	1	Có	2	Không
g. Thuyền/tàu	1	Có	2	Không
h. Điện thoại di động/Điện thoại bàn	1	Có	2	Không
i. Máy vi tính	1	Có	2	Không

E. SỐ TIÊM CHỦNG HOẶC LỊCH SỬ TIÊM CHỦNG CỦA TRẺ

Người điều tra: Lâm Quang Đại

Cán bộ y tế cần hỏi số tiêm chủng trẻ. Nếu người nhà có mang theo sổ tiêm chủng, sử dụng thông tin trong sổ để trả lời các câu dưới đây. Nếu có sổ tiêm chủng nhưng không mang theo, đề nghị người nhà mang sổ đến để hoàn thiện thông tin về lịch sử tiêm chủng sau. Nếu không có sổ, sử dụng thông tin ghi lại từ sổ theo dõi tiêm chủng của trạm y tế nơi trẻ đăng ký tiêm chủng. Photocopy sổ tiêm chủng của trẻ hoặc sổ theo dõi tiêm chủng của trạm y tế để làm bằng chứng

47 Trẻ đã được tiêm chủng bất kỳ loại vắc xin nào chưa? ☒ 1 Có ☐ 2 Chưa ☐ 9 Không biết

48 Trẻ đã tiêm/ uống những loại vắc xin nào dưới đây? 7/7 Hút Tay

Loại vắc xin	Có	Không	Không biết	Ngày tiêm/uống (Ngày/tháng/năm)	Nơi tiêm/uống VX 1= Trạm YT; 2= BV; 3= Khác; 9= K/biết	Nguồn thông tin 1=Sổ TC cá nhân; 2=Sổ TC của phòng tiêm/TYT; 3= Phần mềm QLTC		
a. Vắc xin Rotavin-M1 Liều 1	1	2	9	25/10/2018	1, Ghi rõ: <u>Hút Tay</u>	1	2	3
b. Vắc xin Rotavin-M1 Liều 2	1	2	9	25/07/2018	1, Ghi rõ: <u>Hút Tay</u>	1	2	3
c. Vắc xin Rota khác Liều 1	1	2	9	1/1/	1, Ghi rõ: <u>Hút Tay</u>	1	2	3
d. Vắc xin Rota khác Liều 2	1	2	9	1/1/	1, Ghi rõ: <u>Hút Tay</u>	1	2	3
e. Vắc xin Rota khác Liều 3	1	2	9	1/1/	1, Ghi rõ: <u>Hút Tay</u>	1	2	3
f. Vắc xin BCG (sơ sinh)	1	2	9	25/04/2018	1, Ghi rõ: <u>Hút Tay</u>	1	2	3
g. Vắc xin bại liệt uống hoặc tiêm Liều 1	3	2	9	25/06/2018	1, Ghi rõ: <u>Hút Tay</u>	1	2	3
h. Vắc xin bại liệt uống hoặc tiêm Liều 2	1	2	9	25/07/2018	1, Ghi rõ: <u>Hút Tay</u>	1	2	3
i. Vắc xin bại liệt uống hoặc tiêm Liều 3	1	2	9	25/08/2018	1, Ghi rõ: <u>Hút Tay</u>	1	2	3
j. Vắc xin 5:1, liều 1	1	2	9	25/06/2018	1, Ghi rõ: <u>Hút Tay</u>	1	2	3
k. Vắc xin 5:1, liều 2	1	2	9	25/07/2018	1, Ghi rõ: <u>Hút Tay</u>	1	2	3
l. Vắc xin 5:1, liều 3	1	2	9	25/08/2018	1, Ghi rõ: <u>Hút Tay</u>	1	2	3
m. Vắc xin sởi (đơn)	1	2	9	25/02/2019	1, Ghi rõ: <u>Hút Tay</u>	1	2	3
n. Vắc xin Sởi-Rubella	1	2	9	1/1/	1, Ghi rõ: <u>Hút Tay</u>	1	2	3

GIÁM SÁT VIÊN kiểm tra:

- Hoàn thành thông tin Mục E ☒
- Phiếu điều tra điền đầy đủ thông tin ☒
- Thông tin phiếu điều tra phù hợp thông tin Bệnh án ☒

Ngày 20 tháng 09 năm 20 19

Lâm Quang Đại

GIÁM SÁT VIÊN ký và ghi rõ họ tên

Phụ lục 03A: Giấy chứng nhận chấp thuận của Hội đồng Đạo đức của Viện Vệ sinh dịch tễ TW (Số: IRB-VN01057-19/2016)

**BỘ Y TẾ
VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG**

Số: IRB – VN01057 – 19/2016

**V/v: Chấp thuận các vấn đề
ĐĐNCYSH**

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

**CHỨNG NHẬN CHẤP THUẬN CỦA HỘI ĐỒNG ĐẠO ĐỨC
TRONG NGHIÊN CỨU Y SINH**

Căn cứ vào Quyết định số: 278/QĐ-VSDTTU ngày 23/03/2016 của Viện trưởng Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương về việc thành lập Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học để xét duyệt các vấn đề đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học.

Trên cơ sở biên bản họp Hội đồng ngày 29/6/2016 về đề cương thực hiện nghiên cứu của đề tài (*có biên bản kèm theo*) và bản giải trình về việc chỉnh sửa đề cương của chủ nhiệm đề tài sau phiên họp. Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương chấp thuận về các khía cạnh khoa học và đạo đức trong nghiên cứu đối với đề tài sau:

1. Tên đề tài/dự án: *Đánh giá hiệu quả của vắc xin phòng tiêu chảy do Rotavirus ở trẻ em tại Việt Nam*
2. Chủ nhiệm đề tài: *GS. TS. Đặng Đức Anh*
3. Đơn vị chủ trì: *Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương*
4. Địa điểm triển khai nghiên cứu: *Tỉnh Nam Định, Thừa Thiên Huế.*
5. Thời gian nghiên cứu: *48 tháng, tính từ khi được Bộ Y tế phê duyệt (dự kiến từ tháng 7/2016 – 7/2020)*

Ngày chấp nhận (cho phép): Ngày 15 tháng 7 năm 2016

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG

NGUYỄN TRẦN HIỀN

ỦY VIÊN THƯ KÝ

PHAN THỊ NGÀ



Phụ lục 03B: Giấy chứng nhận chấp thuận gia hạn của Hội đồng Đạo đức Viện Vệ sinh Dịch tễ TW (số: IRB-VN01057-19/2016/IORG-0008555)

VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG
Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học
IRB -VN01057/ IORG 0008555

No: HDDĐ - 22/2020

Hà Nội, ngày 30 tháng 10 năm 2020

GIẤY CHỨNG NHẬN
Chấp thuận của Hội đồng đạo đức cơ sở

Hồ sơ mới []

Hồ sơ chỉnh sửa []

Hồ sơ gia hạn [X]

Đề cương sau đây đã được Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương xem xét và chấp thuận theo Quy tắc chung và các quy định của pháp luật hiện hành về đạo đức trong nghiên cứu y sinh học.

- Tên nghiên cứu: Đánh giá hiệu quả vắc xin phòng bệnh tiêu chảy do rotavirus ở trẻ em Việt Nam
- Chủ nhiệm đề tài: GS. TS. Đặng Đức Anh
- Tổ chức chủ trì: Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương
- Nhà tài trợ: CDC Foundation, Hoa Kỳ
- Địa điểm triển khai: Tỉnh Nam Định, Thừa Thiên Huế
- Đối tượng và cỡ mẫu: Trẻ em dưới 5 tuổi nhập viện do tiêu chảy cấp (3.500 trẻ/ năm tại các bệnh viện trong nghiên cứu, 63.000 trẻ uống vắc xin Rotavin – M1
- Thời gian nghiên cứu: 7/2016 – 6/2021
- Các tài liệu sau đây đã được chấp thuận để sử dụng trong nghiên cứu:

TT	Tên tài liệu	Phiên bản	Ngày
1.	Đề cương nghiên cứu	01	31/7/2019
2.	Bản cung cấp thông tin và thỏa thuận tham gia nghiên cứu	01	31/7/2019

Giấy chứng nhận có giá trị từ ngày ký đến ngày 30 tháng 6 năm 2021. *duy*



PHÓ VIỆN TRƯỞNG
Trần Như Dương

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG

GS. TS. Vũ Sinh Nam

Phụ lục 04: Thang điểm mức độ nghiêm trọng của Vesikari cho đánh giá triệu chứng tiêu chảy cấp ở trẻ em [ruuska, 1990 #405]

Thông tin triệu chứng	Giá trị điểm
Thời gian tiêu chảy (ngày)	
1-4	1
5	2
> = 6	3
Số lần tiêu chảy tối đa mỗi 24 giờ:	
1-3	1
4-5	2
> = 6	3
Thời gian nôn (ngày):	
1	1
2	2
> = 3	3
Số lần nôn mửa tối đa mỗi 24 giờ:	
1	1
2-4	2
> = 5	3
Nhiệt độ (°C):	
<37,0	0
37,1-38,4	1
38,5-38,9	2
> = 39	3
Mất nước:	
1-5%	2
> = 6%	3
Điều trị	
Bù nước	1
Nhập viện	2

Phụ lục 05: Quy trình xác định vi rút rota dương tính trên mẫu phân bằng phương pháp ELISA (sử dụng kit Rotaclone)

1. Nguyên lý của quy trình

Quy trình xác định sự có mặt của RV dựa vào tính đặc hiệu kháng nguyên - kháng thể, gồm các bước cơ bản như sau: Kháng thể kháng RV được gắn trên bề mặt đĩa Elisa. Kháng nguyên vi rút trong mẫu được gắn vào kháng thể trên đĩa. Kháng thể biết trước được phủ lên bề mặt, kháng thể này có gắn với enzyme. Khi thêm cơ chất, enzyme sẽ biến đổi cơ chất này và tạo tín hiệu có thể xác định được. Với nguyên lý trên, elisa giúp xác định sự có mặt hay không có mặt cũng như lượng kháng nguyên trong mẫu nghiên cứu

Ưu điểm quan trọng nhất của phương pháp ELISA là độ nhạy cao, có thể phát hiện được phức hợp nhỏ KN-KT, cho phép xác định sự xuất hiện nhanh RV trong bệnh phẩm.

Hạn chế: xuất hiện dương tính giả ở 1 số ít mẫu.

Độ nhạy, độ đặc hiệu: Kit Rotaclone đã được thực hiện tại 2 phòng thí nghiệm độc lập ở Đông Bắc và Tây Nam Mỹ trên 121 mẫu phân trẻ em bị viêm dạ dày ruột và so sánh với kết quả thu được của EM.

Kết quả so sánh được thể hiện dưới bảng sau:

		EM		EM/RNA		Kallestad	
		+	-	+	-	+	-
Rotaclone	+	36	3	38	1	29	0
	-	0	35	0	35	7	49
Độ nhạy		100%		100%		81%	
Độ đặc hiệu		92%		97%		100%	
Agreement		96%		99%		92%	

- Với kit Rotaclone, nồng độ virus có thể đo được là 5.0×10^5 /mL.

2. Thiết bị, nguyên liệu, hóa chất

2.1. Thiết bị:

- Vortex
- Máy rửa ELISA

- Máy đọc ELISA
- Tủ lạnh 4-8°C
- Hood an toàn sinh học cấp II

2.2. *Hoá chất:* Bộ kit phát hiện RV ELISA Premier Rotaclone (Meridian Premier™, Ohio, USA)

2.3. *Dụng cụ*

- Đĩa 96 giếng Maxisorp
- Tuýp 2mL
- Chai 250mL
- Pippet nhựa 15mL
- Pippet aid
- Khay đựng dịch pha loãng
- Đầu côn khử trùng P1000, P200, P10

3. Quy Trình:

3.1. *Chuẩn bị:*

- Kiểm tra chéo giữa nhãn dán trên mẫu xét nghiệm với mẫu đơn yêu cầu xét nghiệm để đảm bảo mẫu bệnh phẩm được xác nhận đúng. Kiểm tra xem số lượng và chất lượng mẫu có thể dùng được trong xét nghiệm không.

Các biện pháp an toàn

- Mặc áo choàng và đi găng khi tiếp xúc với mẫu bệnh phẩm
- Phải làm trong hood
- Rác thải sau khi làm xong xét nghiệm phải để đúng nơi quy định

3.2. *Quy trình tiến hành*

1. Mang plate và sinh phẩm ra khỏi tủ lạnh, để ở nhiệt độ thường
2. Pha loãng mẫu với tỉ lệ 1:10 (100 µL mẫu phân + 900 µL dung dịch pha loãng mẫu)
3. Cho 100 µL chứng dương và 100 µL chứng âm vào giếng đã định.
4. Cho 100 µL mẫu đã pha loãng vào các giếng của đĩa 96 giếng có trong Kit.
5. Cho 100 µL enzyme cộng hợp vào tất cả các giếng. Ủ 1 h ở nhiệt độ phòng.
6. Sau thời gian ủ, rửa đĩa 5 lần bằng nước cất 2 lần (300 ul)
7. Cho 100 µL cơ chất A vào tất cả các giếng.
8. Cho 100 µL cơ chất B vào tất cả các giếng

9. Ủ 10 phút.

10. Cho 100 μ L dung dịch dừng phản ứng vào tất cả các giếng.

11. Đọc tại bước sóng 450nm hoặc 450/620nm

12. Điều kiện đọc kết quả:

- OD của chứng âm phải nhỏ hơn 0,15 và chứng dương phải lớn hơn 0,3 tại bước sóng 450 nm
- Cut-off = 0,15

13. Đọc kết quả:

Khi các điều kiện đọc kết quả đạt yêu cầu thì kết luận

- Mẫu phân dương tính sẽ có OD > Cut-off
- Mẫu phân âm tính khi có OD $\leq$ Cut-off

Lưu ý các trường hợp bất thường:

1. Mẫu chứng âm không lên màu. Nếu thấy xuất hiện màu nghĩa là mẫu âm chưa chính xác, đã bị nhiễm. Không công nhận kết quả và làm lại xét nghiệm theo chỉ dẫn của quy trình một cách nghiêm ngặt hơn.
2. Mẫu chứng dương có màu xanh. Nếu không thấy có màu có thể do:
 - Cho nhầm mẫu chứng dương vào giếng khác
 - Mẫu chứng dương không tốt
 - Hóa chất, sinh phẩm hoặc thiết bị có vấn đề (sinh phẩm hết hạn, không đảm bảo nhiệt độ)

Không công nhận kết quả. Lặp lại xét nghiệm tuân thủ chặt chẽ theo hướng dẫn trong quy trình. Nếu vẫn không phù hợp như cũ, kiểm tra lại quy trình, máy móc, trang thiết bị, sinh phẩm.

Phụ lục 06: quy trình tách chiết ARN từ mẫu phân

1. Nguyên lý của Kit tách chiết RNA (QiaAamp Viral RNA Mini Kit, hãng Qiagen)

Mẫu được ly giải trong các điều kiện biến tính cao để bất hoạt RNase và bảo vệ RNA nguyên vẹn. Sau đó sử dụng môi trường đệm để tạo điều kiện thích hợp giúp RNA liên kết với màng QIAamp và các mẫu được tra vào cột QIAamp Mini. RNA liên kết với màng và các tạp chất bị loại đi bằng hai loại đệm rửa khác nhau. RNA tinh sạch sẽ được hòa tan trong đệm đặc biệt không chứa RNase. Các RNA được tinh sạch không chứa protein, nuclease, các tạp chất và các chất ức chế khác.

2. Nguyên vật liệu và thiết bị:

2.1. Kit tách chiết RNA: QIAamp Viral RNA Mini Kit hoặc tách chiết tự động bằng Cador pathogen 96 QIAcube HT Kit (QIAGEN, Hilden, Đức).

2.2. Thiết bị, dụng cụ và hóa chất khác:

- Máy tách chiết tự động Qiacube HT-Qiagen (QIAGEN, Hilden, Đức)
- Máy lắc vortex
- Máy ly tâm
- Bể ổn nhiệt
- Pipetman và đầu côn tương ứng, ống Eppendorf, giá để ống...
- Dung dịch Vertrel, cồn tuyệt đối

3. Quy trình

- *Các bước chuẩn bị*

- *Chuẩn bị AVL-carrier RNA (1µg/µl)*

Pha carrier RNA với AVE để đạt nồng độ 1µg/µl. Thêm AVL với dung dịch carrier RNA theo công thức:

$$Y = n \times 0,56 \text{ (ml)}$$

$$Z = 10 \times Y \text{ n(µl)}$$

Trong đó: n: số mẫu cần tách RNA

Y: thể tích đệm AVL

Z: thể tích carrier RNA-đệm AVE.

- *Chuẩn bị đệm rửa AW1 và AW2:* Trước khi sử dụng lần đầu tiên, thêm cồn ethanol (96-100%) vào đệm rửa.

- *Quy trình tách RNA:*

- Hút 100 µl mẫu phân trong 900 ml PBS để tạo dung dịch 10%.
- Hút 200 µl dung dịch mẫu phân 10% vào ống Eppendorf và thêm 200 µl vertrel/mẫu.
- Lắc vortex trong 1 phút và li tâm 3.000 vòng/phút trong 10 phút.
- Hút 140 µl dịch chiết pha trên vào 1 ống Eppendorf khác và thêm 560 µl/mẫu AVL-AVE - RNA carrier).
- Lắc, ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Thêm 560 µl/mẫu Ethanol tuyệt đối
- Lắc, ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 phút.
- Tra 630 µl lên cột QIAamp Mini Spin lần 1 và li tâm 8.000 vòng/phút trong 1 phút.
- Thêm tiếp 630 µl mẫu vào cột và li tâm 8.000 vòng/phút trong 1 phút. Thay ống thu mẫu (collect tube) bằng ống mới.
- Cho 500 µl dung dịch rửa AW1 (có ethanol) vào cột và li tâm 8.000 vòng/phút trong 1 phút. Thay ống thu mẫu (collect tube) bằng ống mới.
- Cho 500 µl dung dịch rửa AW2 (có ethanol) vào cột và li tâm 14.000 vòng/phút trong 3 phút. Thay ống thu mẫu (collect tube) bằng eppendofit 1,7 ml mới.
- Thêm 50 µl AVE (elution solution) và ủ ở nhiệt độ phòng 1 phút.
- Li tâm 8000 vòng/ phút để thu RNA mẫu (khoảng $V_{\text{RNA thu được}}$ /mẫu: 35 µl)

Phụ lục 07: Quy trình phản ứng RT-PCR định typ G, P của vi rút Rota

1. Nguyên lý

- Dưới tác dụng của enzym phiên mã ngược (AMV) và môi đặc hiệu, cDNA được tạo ra từ khuôn là ARN. Các đoạn DNA tiếp tục được nhân lên lượng lớn nhờ enzym có hoạt tính polymerase và môi đặc hiệu để định typ G, P từ khuôn cDNA.
- Phương pháp điện di dựa vào đặc tính cấu trúc của các acid nucleic. Đó là các đại phân tử tích điện âm đồng đều trên khắp bề mặt nên khi chịu tác động của điện trường chúng sẽ di chuyển từ cực âm về cực dương của điện trường. Các nucleic acid trong gel agarose sẽ quan sát được dưới tia tử ngoại (UV) nhờ một dung dịch nhuộm có tên là RedSafe. Tùy theo độ dài của sản phẩm PCR cần phân tích là bao nhiêu để chọn nồng độ gel agarose, dòng điện và thời gian thích hợp.
- Để ước lượng độ dài của đoạn gen đã được khuếch đại, sử dụng thang ADN chuẩn (ADN ladder). Đây là tập hợp nhiều trình tự ADN kích thước đã biết trước. Khi chạy điện di các mẫu cần phân tích sẽ chạy cùng với thang ADN chuẩn để so sánh.

2. Thiết bị, dụng cụ, nguyên vật liệu

2.1. Hóa chất và sinh phẩm

- Kit, Green MasterMix (Promega) hoặc Qiagen Onestep RT-PCR (QiaGen, Hilden, Đức)
- Môi đặc hiệu dùng để định genotype G, P

Định type	Vòng	Tên môi		Trình tự
G	1	VP7 C-040F		CTCCTTTTAATGTATGGTATTGAATA
		VP7 C-941R		GTATAAAANACTTGCCACCATTTTTT
	2	Gmi x	VP7 C-	ACTTGCCACCATTTTTTCCA
			G1-297F	GTATTATCCAACCTGAAGCAAGTAC
			G2-401F	TTAAAGACTACAATGATATTACTACA
			G3-809F	CAAGGGAAAACGTRGCAGTTA
			G3e-757F	CTAGATGTTACTACGGCTAC
			G4-478F	TTCGCTTCTGGTGAGGAGTTG
			G8-179F	TTACRCCATTTGTAAATTCACAG
			G9-606F	GATGGGACARTCTTGTACCATA
			G12-669F	TACRACAACCGACGTCACA

		P mix	VP4uF	TGG YTT CVC TCA TTT ATA GAC A
			P[4]-R5	GCA TYC CTA CAA GTC TAT TAY TAG
			P[6]-R2	ACC ATC GAG TAC TGG YTC TAT YGT TG
			P[8]-R2	GYG GTT CAA YAG CAA CKA CT
			P[101]-4T-1	TGA GAC ATG CAA TTG GAC
P			P[10]-5T-1	ATC ATA GTT AGT AGT CGG

- RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology, Hàn Quốc).

- Thang ADN 100 bp (New England BioLabs, Massachusetts, Mỹ)

- H₂O-DEPC

- Dung dịch đệm TAE

- Thạch điện di

- Đệm chạy mẫu 6X (6X loading dye)

2.2. Dụng cụ

- Pippetman: 10; 20; 100; 200 và 1000 µl

- Đầu côn lọc: 10; 30; 100; 200 và 1000 µl (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Mỹ).

- Ống eppendoft 0,2ml; 0,5ml; 1,5ml; 2,2ml; strip 8 ống 0,2 ml (Biofact, Daejeon, Hàn Quốc)

- Giá tích lạnh, đá giữ lạnh

- Khay điện di và lược, giấy parafilm

- Các vật liệu cần thiết khác như: găng dùng 01 lần, giấy thấm,...

2.3. Trang thiết bị

- Tủ -20 ± 5⁰C

- Máy PCR Mastercycler X50s Eppendoft (Eppendoft, Humburg, Đức),

- Nguồn điện di (Biorad, Mỹ), bể điện di (Sigma, Mỹ)

- Máy chụp gel (Biorad, California, Mỹ).

- Hood chuyên dùng cho mix PCR

3. Các bước tiến hành

3.1. Trộn các thành phần phản ứng vòng 1

- Chuẩn bị biểu mẫu xét nghiệm RT-PCR định genotype G, P- RV (MS5-QTKT-2.04.03-BM01). Ghi tên mẫu, tên chứng dương, chứng âm và tính tổng số phản ứng thực hiện
- Lấy hóa chất và sinh phẩm tủ $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$. Làm tan các hóa chất sinh phẩm, trộn đều sau đó ly tâm nhanh và giữ trên đá cho đến khi sử dụng.
- Tiến hành trộn các sinh phẩm cho phản ứng trong hood dùng riêng cho mix PCR

Sinh phẩm (G)	Sinh phẩm (P)	Thể tích (μl)	Số lượng phản ứng (N)
H ₂ O-DEPC	H ₂ O-DEPC	5	5xN
5X Onestep RT-	5X Onestep RT-	3	3 xN
dNTP mix	dNTP mix	0,6	0,6 xN
Bộ môi G (10 μM)	Bộ môi P	1,8	1,8 xN
OneStep RT-PCR	OneStep RT-PCR	0,6	0,6 xN
Tổng số		11	11xN

- Trộn đều hỗn hợp sinh phẩm, chia 11 μl vào các ống PCR/strips 0,2ml. Đặt trên giá tích lạnh
- Tại phòng cho mẫu, mẫu ARN (sau khi được làm tan bằng và ly tâm nhanh để tránh các giọt đọng trên nắp). Trộn đều, ly tâm nhanh. Biến tính mẫu ở 65°C trong 5 phút. Đặt ống chứa mẫu biến tính lên đá khoảng 1 phút, sau đó ly tâm nhanh.
- Thêm 4 μl ARN sau biến tính vào tuýp 0,2ml đã chứa 22 μl hỗn hợp sinh phẩm cho phản ứng RT-PCR. Trộn đều các thành phần phản ứng, sau đó ly tâm nhanh.

3.2. Cài đặt thiết bị chạy RT-PCR vòng 1.

- Cài đặt các thông số khi vận hành máy:

Định typ G

Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Chu kỳ lặp	Tên chương trình
50	30:00 phút	1	RT-PCR G-RV
95	15:00 phút	1	
94	1:00 phút	40	
50	0:30 phút		
72	1:00 phút		
72	10:00	1	

10	∞		
----	---	--	--

Định typ P

Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Chu kỳ lặp	Tên chương trình
50	30:00 phút	1	RT-PCR P-RV
95	15:00 phút	1	
94	0:30 phút	35	
50	01:30 phút		
72	0:45 phút		
72	7:00	1	
10	∞		

- Khởi động máy và kiểm tra chương trình trước khi chạy máy PCR theo yêu cầu xét nghiệm. Đặt các ống 0,2ml vào máy. Bắt đầu chương trình chạy
- Ghi chép vào Nhật ký sử dụng máy.
- Sau khi kết thúc quá trình chạy máy, mang các mẫu sang phòng điện di và tiến hành điện di sản phẩm RT-PCR.

3.3. Trộn các thành phần phản ứng vòng 2

- Lấy hóa chất và sinh phẩm từ $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$. Làm tan các hóa chất sinh phẩm, trộn đều sau đó ly tâm nhanh và giữ trên đá cho đến khi sử dụng.
- Tiến hành trộn các sinh phẩm cho phản ứng trong hood dùng riêng cho mix PCR

Sinh phẩm (G)		Thể tích (μl)	Số lượng phản ứng (N)
H ₂ O-DEPC		10	10xN
2X Green		12,5	12,5 xN
Mồi Gmix (10μM)		0,5	0,5 xN
Tổng số		23	23xN

- Trộn đều hỗn hợp sinh phẩm, chia 23μl vào các ống PCR/strips 0,2ml. Đặt trên giá tích lạnh
- Tại phòng cho mẫu, 2μl sản phẩm RT-PCR (sau khi được làm tan băng và ly tâm nhanh để tránh các giọt đọng trên nắp) được thêm vào tuýp 0,2ml đã chứa 23μl hỗn

hợp sinh phẩm cho phản ứng PCR2. Trộn đều các thành phần phản ứng, sau đó ly tâm nhanh.

3.4. Cài đặt thiết bị chạy PCR vòng 2.

- Cài đặt các thông số khi vận hành máy:

Định typ G

Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Chu kỳ lặp	Tên chương trình
95	2:00 phút	1	PCR2 G-RV
95	0:30 phút	35	
50	0:30 phút		
72	1:00 phút		
72	10:00	1	
10	∞		

3.5. Điện di sản phẩm

- Chuẩn bị thạch 2% đã bổ sung RedSafe với nồng độ cuối cùng là 1X.
- Đặt thạch vào bể điện di theo đúng chiều dòng điện từ âm sang dương rồi cho dung dịch đệm TAE 1X ngập bản thạch sao cho dung dịch đệm cách mặt thạch từ 1-2mm.
- Ghi vị trí các mẫu chạy điện di và thang ADN chuẩn vào MS5-QTKT2.04.01-BM02
- Đưa 8µl mỗi sản phẩm PCR vào 01 giếng của bản thạch.
- Nhỏ 4 µl thang ADN chuẩn 100 bp vào 1 giếng của thạch
- Đóng nắp của bể điện di, chọn dòng điện 120V và thời gian 90 phút (xem MS5-HDTB12.05).
- Bảo quản sản phẩm PCR còn lại ở tủ $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$
- Tắt máy điện di, đặt bản thạch ngay ngắn trên máy đọc gel và chụp ảnh (xem MS5-HDTB12.06)

3.6. Nhận định kết quả

- Kết quả được chấp nhận khi:
 - + Chứng dương: có băng đặc hiệu tương đương với kích thước của cặp mồi thiết kế.
 - + Chứng âm phản ứng (NTC), chứng âm tách chiết (NC): âm tính.
- Kết quả âm tính: sự xuất hiện sản phẩm PCR ở các vị trí không đặc hiệu hoặc không có sự hiện diện của sản phẩm PCR.

- Kết quả định typ G, P: genotype G, P của RV được xác định khi sản phẩm PCR tương ứng có kích thước như sau:

Độ dài sản phẩm khuếch đại (bp)	Genotype
636	G1
532	G2
124	hG3
176	eG3
455	G4
754	G8
327	G9
264	G12
497	P[4]
199	P[6]
339	P[8]
391	P[101]
583	P[10]

Phụ lục 08: Kỹ thuật multiplex realtime RT-PCR phát hiện vi rút Noro

1. Nguyên lý

- Dưới tác dụng của enzym phiên mã ngược và mỗi đặc hiệu, cDNA được tạo ra từ khuôn là ARN. Các đoạn DNA tiếp tục được nhân lên lượng lớn nhờ enzym có hoạt tính polymerase và mỗi đặc hiệu để định typ G, P từ khuôn cDNA.

- Sau đó, đầu dò oligonucleotide (probe) được gắn ở đầu 5' một chất phát tín hiệu huỳnh quang (reporter) và ở đầu 3' là một chất thu nhận tín hiệu (quencher). Probe được thiết kế gắn với trình tự đích của mầm bệnh ở giữa mỗi xuôi và mỗi ngược của phản ứng PCR. Ở giai đoạn gắn mỗi, probe gắn đặc hiệu vào trình tự đích, khi đó tín hiệu huỳnh quang phát ra từ Reporter đều bị Quencher dập tắt. Trong giai đoạn kéo dài khi mỗi xuôi của phản ứng được kéo dài đến vị trí gắn của Probe thì DNA polymerase sẽ phá hủy các liên kết gắn giữa probe với trình tự đích và đồng thời phá hủy probe, làm cho Reporter và Quencher không còn ở gần nhau. Kết quả reporter phát ra tín hiệu huỳnh quang và hệ thống máy realtime PCR sẽ thu nhận tín hiệu huỳnh quang phát này. Tín hiệu huỳnh quang thu được tỉ lệ thuận với nồng độ các probe bị phá hủy. Tín hiệu này tăng lên gấp đôi sau mỗi chu kỳ khuếch đại. Dựa vào tín hiệu huỳnh quang thu được của mẫu bệnh phẩm và các mẫu chuẩn, phần mềm sẽ tính toán ra nồng độ ban đầu của vật chất di truyền trong mẫu thử..

2. Thiết bị, dụng cụ, nguyên vật liệu

2.1. Hóa chất và sinh phẩm

STT	Hóa chất/Sinh phẩm
1	DEPC-H ₂ O
2	5X Onestep qRT-PCR mixture
3	Onestep qRT-PCR Enzyme Mix
4	Pri. GI (3045-3046) 20 μ M
5	Pro. GI (FAM) (3047) 10 μ M
6	Pri. GII (3001-3002) 20 μ M
7	Pro. GII (Cy5) (3003) 10 μ M
8	Pri. GIV (3054-3057) 20 μ M
9	Pro. GIV.1 (HEX) (3058) 10 μ M
10	Pro. GIV.2 (HEX) (3059) 10 μ M

11	Chứng nội bộ: Plas. NV. GI, Plas. NV. GII, Plas. NV. GIV
----	--

2.2. Dụng cụ

- Pippetman: 10; 20; 100; 200 và 1000 μ l
- Đầu côn lọc: 10; 30; 100; 200 và 1000 μ l
- Ống 0,2ml, 0,5ml, 1,5ml, 2,2ml, strip 8 ống 0,2 ml
- Giá tích lạnh, đá giữ lạnh
- Các vật liệu cần thiết khác như: găng dùng 01 lần, giấy thấm,...

2.3. Trang thiết bị

- Máy Realtime
- Tủ $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$
- Hood mix PCR

3. Quy trình tiến hành

3.1. Tiến hành mix PCR

- ☐ Làm tan hóa chất, sinh phẩm từ tủ $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$, vortex hóa chất spindown và giữ trên đá cho đến khi sử dụng
- ☐ Tiến hành trộn phản ứng Realtime RT-PCR (chưa có mẫu) theo bảng tính sau
- ☐ **MIX Multiplex**

STT	Thành phần	V(μ l)/ 1 phản ứng	Nồng độ cuối cùng
1	H ₂ O Rnase	5,8	-
2	5X Onestep qRT-PCR mixture	4	1X
3	Onestep qRT-PCR Enzyme Mix	1,6	1X
4	Mg ²⁺ 25mM	1,6	2mM
5	Pri. GI 20 μ M	0,6	0,6 μ M
6	Pro. GI (FAM) 10 μ M	0,4	0,2 μ M
7	Pri. GII 20 μ M	0,6	0,6 μ M
8	Pro. GII (Cy5) 10 μ M	0,4	0,2 μ M
9	Pri. GIV 20 μ M	0,6	0,6 μ M
10	Pro. GIV.1 (HEX) 10 μ M	0,2	0,1 μ M
11	Pro. GIV.2 (HEX) 10 μ M	0,2	0,1 μ M

12	Tổng	16	-
----	------	----	---

☐ Trộn đều ống sau đó ly tâm nhanh để tránh đọng các giọt dung dịch trên thành ống
Chú ý: Hạn chế tối đa sự tiếp xúc của ống sau khi trộn các thành phần phản ứng với ánh sáng

☐ Chia 16 μ l các thành phần phản ứng đã được trộn đều vào ống Eppendorf 0,1ml

3.2. Chuẩn bị mẫu

☐ ARN được lấy ra từ tủ âm sâu, làm tan băng, vortex sau đó spindown

☐ Biến tính ARN ở 65°C, 5 phút, sau đó để ngay vào đá ít nhất 1 phút, spindown

☐ Thêm 4 μ l ARN mẫu vào các ống Eppendorf 0,1ml (thứ tự các mẫu theo trình tự ở bảng 72 giằng dưới đây)

☐ Trộn đều các thành phần trong ống Eppendorf 0.1ml, đặt vào máy Rotogen Q

3.3. Cài đặt chương trình chạy

☐ Mở chương trình phần mềm RotoGenQ (biểu tượng trên desktop của máy tính)

☐ Chọn two-step, chọn new

☐ Chọn Holding: 50°C trong 30 phút

☐ Chọn insert after, chọn new hold temperature, chọn Holding 2: 95°C trong 15 phút

☐ Chọn cycling: 95°C trong 20 giây, 60°C trong 40 giây

☐ Chọn Acquiring: On Green/Red/Yellow

☐ Chọn FL kênh Green 10 - 20, set Gain 8. Kênh Red, Yellow FL không đổi, Gain 5

☐ Thực hiện phản ứng 45 chu kỳ

☐ Chọn “Start Run” đặt tên file

☐ Cửa sổ “Edit Samples” hiện ra, điền tên mẫu tương ứng với vị trí trên Rotor

☐ Sau khi hoàn thành điền mẫu, chọn OK

☐ Trả mẫu về vị trí ban đầu

3.4. Xử lý kết quả

☐ Sau khi đợi máy chạy xong, ta tiến hành đặt các chuẩn cho kết quả:

☐ Chọn “Analysis” => ”Quantitation” => ”Cycling” tương ứng với bước sóng của chất đánh dấu => “Show”

☐ Chọn cửa sổ Quatitation Analysis => Chọn Threshold, đặt mức Threshold cao hơn, sát với đối chứng âm và thấp hơn đối chứng dương (Thông thường đặt ở một mức cố định cho mỗi xét nghiệm)

☐ Chọn Adjust Scale: Đặt Maximum ở $10^{0.5}$, Minimum ở 10^{-3}

☐ Chọn Threshold: 0.03

☐ Chọn Outlier Removal: 15%

☐ Đọc kết quả: Chọn “Reports” à “Cycling” bước sóng đã chọn ban đầu à “Quantitation” ♦ “Show”. Đến đây sẽ hiện ra một bảng có đầy đủ thông tin về

phản ứng đã thực hiện. Chọn “To word” để chuyển báo cáo sang dạng Word ◇
Chọn “continue” để hoàn thiện quá trình chuyển file. Lưu file vào vị trí

Phụ lục 09: Kỹ thuật multiplex realtime RT-PCR phát hiện vi rút Astro và Sapo

1. Nguyên lý

- Dưới tác dụng của enzym phiên mã ngược và môi đặc hiệu, cDNA được tạo ra từ khuôn là ARN. Các đoạn DNA tiếp tục được nhân lên lượng lớn nhờ enzym có hoạt tính polymerase và môi đặc hiệu để định typ G, P từ khuôn cDNA.

- Sau đó, đầu dò oligonucleotide (probe) được gắn ở đầu 5' một chất phát tín hiệu huỳnh quang (reporter) và ở đầu 3' là một chất thu nhận tín hiệu (quencher). Probe được thiết kế gắn với trình tự đích của mầm bệnh ở giữa môi xuôi và môi ngược của phản ứng PCR. Ở giai đoạn gắn môi, probe gắn đặc hiệu vào trình tự đích, khi đó tín hiệu huỳnh quang phát ra từ Reporter đều bị Quencher dập tắt. Trong giai đoạn kéo dài khi môi xuôi của phản ứng được kéo dài đến vị trí gắn của Probe thì DNA polymerase sẽ phá hủy các liên kết gắn giữa probe với trình tự đích và đồng thời phá hủy probe, làm cho Reporter và Quencher không còn ở gần nhau. Kết quả reporter phát ra tín hiệu huỳnh quang và hệ thống máy realtime PCR sẽ thu nhận tín hiệu huỳnh quang phát này. Tín hiệu huỳnh quang thu được tỉ lệ thuận với nồng độ các probe bị phá hủy. Tín hiệu này tăng lên gấp đôi sau mỗi chu kỳ khuếch đại. Dựa vào tín hiệu huỳnh quang thu được của mẫu bệnh phẩm và các mẫu chuẩn, phần mềm sẽ tính toán ra nồng độ ban đầu của vật chất di truyền trong mẫu thử..

2. Thiết bị, dụng cụ, nguyên vật liệu

2.1. Hóa chất và sinh phẩm

STT	Hóa chất	
1	Biofact 5X Onestep qRT-PCR mixture (QiaGen, Hilden, Đức)	
2	Biofact Onestep qRT-PCR Enzyme Mix (QiaGen, Hilden, Đức)	
3	Primer Sav - 20uM	Sav1F
4		Sav124F
5		Sav5F

6		Sav1245R
7	Probe Sav - 10uM	Pro.Sav124
8		Sav5TP
9	Primer Ast - 20uM	
10	Probe Ast - 10uM	
13	Chứng dương	Pls Sav
14		Plas.Ast
15	Chứng âm	NTC
16	H ₂ O Rnase	

2.2. Dụng cụ

- Pippetman: 10; 20; 100; 200 và 1000 µl
- Đầu côn lọc: 10; 30; 100; 200 và 1000 µl
- Ống 0,2ml, 0,5ml, 1,5ml, 2,2ml, strip 8 ống 0,2 ml
- Giá tích lạnh, đá giữ lạnh
- Các vật liệu cần thiết khác như: găng dùng 01 lần, giấy thấm,...

23. Trang thiết bị

- Tủ -20 ± 5°C
- Hood mix PCR
- Hood tra RNA
- Máy Realtime

3. Quy trình tiến hành

3.1. Chuẩn bị Mix:

- ☐ Làm tan hóa chất, sinh phẩm từ tủ -70 ± 5°C, vortex hóa chất spindown và giữ trên đá cho đến khi sử dụng
- ☐ Tiến hành trộn phản ứng Realtime RT-PCR (chưa có mẫu) theo bảng tính sau
- ☐ **MIX**

STT	Thành phần	V(µl)/ 1 phản ứng	Nồng độ cuối cùng
-----	------------	----------------------	----------------------

1	H ₂ O Rnase	7,5	-
2	5X Onestep qRT-PCR mixture	4	1X
3	Onestep qRT-PCR Enzyme Mix	2	1X
4	Mg ²⁺ 25mM	1,6	2mM
5	Primer Sav - 20uM (5001-5002-5007-5003) (20mM)	0,5	0,5uM
6	Probe Sav - 10uM (5004-5008) (10mM)	0,4	0,2uM
7	Pri.Ast 7016.17.L2 (20mM)	0,5	0,5uM
8	Pro.Ast 7018-L3 (10mM)	0,4	0,2uM
9	Pri RCV - 20uM (2097.98.L2.A4)	0,5	0,5uM
10	Pro RCV - 10uM (2099-L3.A4)	0,4	0,2uM
11	Tổng	16	-

- Trộn đều ống sau đó ly tâm nhanh để tránh đọng các giọt dung dịch trên thành ống

Chú ý: Hạn chế tối đa sự tiếp xúc của ống sau khi trộn các thành phần phản ứng với ánh sáng

- Chia 16μl các thành phần phản ứng đã được trộn đều vào ống Eppendorf 0,1ml

3.2. Chuẩn bị mẫu

- RNA được lấy ra từ tủ âm sâu, làm tan băng, vortex sau đó spindown
- Biến tính RNA ở 65°C trong 5 phút, sau đó để ngay vào đá ít nhất 1 phút, spindown

- Trộn đều các thành phần trong ống Eppendorf 0,1ml, đặt vào máy Rotogen Q

3.3. Cài đặt chương trình chạy

- Mở chương trình phần mềm RotoGenQ (biểu tượng trên desktop của máy tính)
- Chọn Two-step, chọn new
- Chọn Holding: 50°C trong 30 phút
- Chọn insert after, chọn new hold temperature, chọn Holding 2: 95°C trong 15 phút
- Chọn cycling: 95°C trong 20 giây, 57°C trong 60 giây

- ☐ Chọn kênh màu: Yellow
- ☐ Thực hiện phản ứng 45 chu kỳ
- ☐ Chọn “Start Run” đặt tên file
- ☐ Cửa sổ “Edit Samples” hiện ra, điền tên mẫu tương ứng với vị trí trên Rotor
- ☐ Sau khi hoàn thành điền mẫu, chọn OK
- ☐ Trả mẫu về vị trí ban đầu

3.4. Xử lý kết quả

- ☐ Sau khi đợi máy chạy xong, ta tiến hành đặt các chuẩn cho kết quả:
- ☐ Chọn “Analysis” => ”Quantitation” => ”Cycling” tương ứng với bước sóng của chất đánh dấu” => “Show”
- ☐ Chọn cửa sổ Quatitation Analysis => Chọn Threshold, đặt mức Threshold cao hơn, sát với đối chứng âm và thấp hơn đối chứng dương (Thông thường đặt ở một mức cố định cho mỗi xét nghiệm)
- ☐ Chọn Adjust Scale: Đặt Maximum ở $10^{0,5}$, Minimum ở 10^{-3}
- ☐ Chọn Threshold: 0,03 to 0,04
- ☐ Chọn Outlier Removal: 15%
- ☐ Đến đây sẽ hiện ra một bảng có đầy đủ thông tin về phản ứng đã thực hiện. Chọn “To word” để chuyển báo cáo sang dạng Word --> Chọn “continute” để hoàn thiện quá trình chuyển file.

Phụ lục 10: Quy trình chuẩn bị sản phẩm ADN tinh sạch cho giải trình tự cho chủng G1P[8] của vi rút Rota và vi rút Astro theo nguyên lý Sanger

1. Thiết bị, dụng cụ, nguyên vật liệu

1.1. Hóa chất và sinh phẩm

STT	Hóa chất/Sinh phẩm
1	H2O-DEPC
2	5X Onestep RT-PCR buffer
3	dNTP mix
4	OneStep RT-PCR Enzyme Mix
5	Primer Beg 9 -End 9 (cho VP7 của RV)
6	Primer Con2 –Con3 (cho VP4 củaRV)
7	Primer PreCAP1/82b (cho Ast)
8	Chứng âm
9	Chứng dương
10	Nuclease-Free Water
11	Ethanol 100%
12	Membrane binding solution
13	Membrane Wash Solution

1.2. Dụng cụ

- Wizard sv gel and PCR clean-up system -Promega
- Pippetman: 10; 20; 100; 200 và 1000 µl
- Đầu côn lọc: 10; 30; 100; 200 và 1000 µl
- Ống 0,2ml; 0,5ml; 1,5ml; 2,2ml; strip 8 ống 0,2 ml
- Giá tích lạnh, đá giữ lạnh

1.3. Trang thiết bị

- Tủ $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$
- Hood mix PCR
- Máy PCR
- Máy QIAgility
 - Máy đo nồng độ DNA – Qubit (Thermo Fisher Scientific, Mỹ).

- Máy ly tâm

2. Quy trình tiến hành

2.1. Phản ứng RT-PCR nhân bản đoạn gen VP7, VP4 của vi rút Rota

- ☐ Làm tan hóa chất, sinh phẩm từ tủ $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ và giữ trên đá cho đến khi sử dụng
- ☐ Tiến hành trộn phản ứng RT-PCR (chưa có mẫu) theo bảng tính sau:
- ☐ Chuẩn bị Mix :

STT	Thành phần	V/22ul/1pư	Nồng độ cuối cùng
1	H2O-DEPC	9	-
2	5X Onestep RT-PCR buffer	5	1X
3	dNTP mix 10mM	1	400uM
4	Beg9 (hoặc con2 cho VP4)	2,5	1uM
5	End9 (hoặc con3 cho VP4)	2,5	1uM
6	OneStep RT-PCR Enzyme Mix	1	-
7	Tổng	21	-

- ☐ Trộn đều, ly tâm nhanh hỗn dịch mix. Chia 16 ul hỗn dịch mix 1 vào các ống 0,2 ml
- ☐ Tại phòng cho mẫu, RNA được lấy ra từ tủ âm sâu, làm tan băng và ly tâm nhanh.
- ☐ Thêm 4ul mẫu vào ống 0,2 ml pha loãng (đã chứa 16ul DEPC)
- ☐ Trộn đều, ly tâm nhanh. Biến tính mẫu ở 65°C trong 5 phút.
- ☐ Đặt ống chứa mẫu biến tính lên đá khoảng 1 phút, sau đó ly tâm nhanh
- ☐ Cho 4ul mẫu đã pha loãng vào ống chứa 16 ul hỗn dịch mix G, P. Trộn đều, ly tâm nhanh và đặt vào máy PCR
- ☐ Chọn chương trình chạy:

VP7: 50°C -30phút, 95°C -15phút, 40 chu kỳ (94°C -1phút, 42°C -2 phút, 72°C -1phút), 72°C -10phút, 4°C .

VP4: 50°C-30phút, 95°C-15phút, 40 chu kỳ (94°C-1phút, 50°C-2 phút, 72°C-1phút), 72°C-10phút, 4°C.

- Sau khi phản ứng kết thúc, bảo quản sản phẩm PCR:

2.1. Phản ứng RT-PCR nhân bản đoạn của vi rút Astro

Các bước tiến hành tương tự với RV, thay bằng hệ mồi PreCAP1/82b

- Chọn chương trình chạy:

50°C-30phút, 95°C-15phút, 40 chu kỳ (94°C-1phút, 55°C-2 phút, 72°C-1phút), 72°C-10phút, 4°C.

2.3. Tinh sạch DNA qua cột

1. Chuẩn bị: Thêm 375 ml dung dịch Ethanol (96-100)% vào lọ chứa Membrane Wash Solution

2. Thực hiện

- Thêm dung dịch Membrane binding solution vào mỗi tube 1,5ml đã chứa sản phẩm phản ứng PCR với tỉ lệ 1:1 .Vortex, spindown
- Chuyển toàn bộ hỗn dịch vào cột hứng
- Ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 phút
- Ly tâm 8000 vòng/phút trong 1 phút. Loại bỏ dịch
- Thêm 700 µl dung dịch Membrane Wash Solution vào cột
- Ly tâm 8000 vòng/phút trong 1 phút. Loại bỏ dịch
- Thêm 500 µl dung dịch Membrane Wash Solution vào cột
- Ly tâm 8000 vòng/phút trong 1 phút. Loại bỏ dịch
- Ly tâm khô 12.000vòng/phút trong 5 phút. Loại bỏ dịch
- Chuyển cột sang ống 1.5 ml mới. Thêm 30 µl H₂O-DEPC vào giữa cột
- Ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 phút
- Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 1 phút. DNA sau khi tinh sạch được lưu giữ ở -20°C

Phụ lục 11: Quy trình giải trình tự bộ gen bằng phương pháp giải trình tự thế hệ mới (NGS)

1. Nguyên lý

2. Thiết bị, dụng cụ, nguyên vật liệu

2.1. Hóa chất và sinh phẩm

STT	Hóa chất/Sinh phẩm
1	DNase I kit (New England Biolabs, Massachusetts, Mỹ)
2	Ultra II RNA library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs, Massachusetts, Mỹ)
3	NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (New England Biolabs, Massachusetts, Mỹ)
4	Agencourt RNAClean XP Beads (Beckman Coulter, California, Mỹ)
5	Miseq v2 reagen kit (300cycles) (Illumina, California, Mỹ)
6	Ampure XP beads (Beckman Coulter, California, Mỹ)

2.2. Dụng cụ

- Wizard sv gel and PCR clean-up system -Promega
- Pippetman: 10; 20; 100; 200 và 1000 µl
- Đầu côn lọc: 10; 30; 100; 200 và 1000 µl
- Ống 0,2ml; 0,5ml; 1,5ml; 2,2ml; strip 8 ống 0,2 ml
- Giá tích lạnh, đá giữ lạnh

2.3. Trang thiết bị

- Máy PCR Mastercycler X50s Eppendof (Eppendof, Humburg, Đức),
- Máy giải trình tự gen Illumina Miseq (Illumina, California, Mỹ).
- Máy QIAgility
- Hood mix PCR
- Máy ly tâm
- Tủ -20 ± 50C

3. Quy trình tiến hành

- Tách chiết RNA (như phụ lục 6)
- Xử lý loại bỏ ADN bằng kit DNase I (New England Biolabs, Massachusetts, Mỹ) ở 37°C trong 30 phút.

- Tủa ARN với dung dịch LiCl 2M trong 16h ở 4°C
- Tinh sạch tủa LiCl bằng ly tâm 12000rpm trong 30 phút ở 4°C để thu dịch nổi
- Tinh sạch ARN bằng hạt từ Agencourt RNAClean XP Beads (Beckman Coulter, California, Mỹ) (1h30').
- Nồng độ ARN đưa vào thư viện thuộc khoảng 5-1000ng.
- Bộ sinh phẩm Ultra II RNA library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs, Massachusetts, Mỹ) và NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (New England Biolabs, Massachusetts Mỹ) được sử dụng để tạo ra các phân đoạn thư viện có độ dài khoảng 300bp đã gắn mã adaptor theo hướng dẫn của nhà sản xuất, thư viện được tinh sạch bằng các hạt từ AMPure XP (Beckman Coulter, California, Mỹ). Các phân đoạn thư viện được chạy phân tích trên hệ thống máy MiSeq sequencer (Illumina, California, Mỹ) với bộ sinh phẩm MiSeq v2 (300 chu kỳ) kèm theo.
- RNA fragmentation and priming (20 phút)
- First strand cDNA synthesis (PM) (1h20')
- Second strand cDNA synthesis (1h20')
- Tinh sạch ds cDNA bằng AMPure XP beads (tỉ lệ 1.8X) (1h30')
- End Repair/dA-tail of cDNA library (1h20') AM
- Adaptor Ligation (1h)
- Size selection of Adaptor-ligated DNA (2h)
- PCR enrichment of Adaptor Ligated DNA (1h 20')
- Tinh sạch sản phẩm PCR (1h30')

Phụ lục 12A: Tỷ lệ tương đồng Nucleotide và acid amin gen VP7 của các chủng RV G1P[8] trong nghiên cứu với 1 số chủng G1 tại Việt Nam tham khảo trên Genbank

S T T	Mã mẫu nghiên cứu	Nă m (nhá nh)	Tỉ lệ tương đồng với mẫu tham chiếu (gồm ID, mã Genbank, năm và nhánh)																							
			HP16		HCMC1 42		HNI36		HP08		VN755		NhaTran g/V17		HNI510		HP0769		NT0247		HCMC 750		HCMC /726		VMN_120 34_66	
			JF6906 79		JF6906 89		JF6906 7		JF6906 773		DQ5129 72						JF6907 04		LC0568 17		HG917 354,		JF6907 30		KX362902	
			1999 (I)		1999 (I)		1999 (I)		1999 (I)		2006 (I)		2006 (I)		2007 (I)		2007 (I)		2007 (I)		2009 (II)		2009 (II)		2012(II)	
			% Nu	% aa	% Nu	% aa	% Nu	% aa	% Nu	% aa	% Nu	% aa	% Nu	% aa	% Nu	% aa	% Nu	% aa	% Nu	% aa	% Nu	% aa	% Nu	% aa	% Nu	% aa
1	VE5386	2021 (II)	92,1	92,9	91,8	92,9	92,1	92,9	92,1	93,2	91,8	93,2	91,7	93,9	91,4	93,2	91,4	92,0	91,4	93,2	91,7	97,8	97,1	97,8	96,8	97,3
2	VE5392	2021 (II)	92,2	92,9	92,0	92,9	92,2	92,9	91,9	93,2	91,9	93,2	91,8	93,9	91,5	93,2	91,5	92,0	91,2	93,2	91,8	97,8	97,0	97,8	96,7	97,3
3	VE6131	2021 (II)	92,1	92,9	91,9	92,9	92,1	92,9	92,1	93,2	91,8	93,2	91,7	93,9	91,4	93,2	91,4	92,0	91,4	93,2	91,7	98,5	97,1	98,5	96,8	98,1
4	VE6132	2021 (II)	92,1	92,9	92,0	92,9	92,1	92,9	92,1	93,2	91,8	93,2	91,7	93,9	91,4	93,2	91,4	92,0	91,4	93,2	91,7	98,5	97,1	98,5	96,8	98,1
5	VE6155	2021 (II)	92,1	92,9	92,0	92,9	92,1	92,9	92,1	93,2	91,8	93,2	91,7	93,9	91,4	93,2	91,4	92,0	91,4	93,2	91,7	97,8	97,1	97,8	96,8	97,3
6	VE6166	2021 (II)	92,4	92,9	92,0	92,9	92,4	92,9	92,1	93,2	92,1	93,2	92,0	93,9	91,7	93,2	91,7	92,0	91,4	93,2	92,0	97,8	97,1	97,8	96,8	97,3
7	VE6310	2021 (II)	92,1	92,9	92,0	92,9	92,1	92,9	92,1	93,2	91,8	93,2	91,7	93,9	91,4	93,2	91,4	92,0	91,4	93,2	91,7	97,8	97,1	97,8	96,8	97,3
8	VE6835	2021 (II)	92,1	93,2	91,8	93,2	92,1	93,2	92,1	93,5	91,8	93,5	91,7	94,3	91,4	93,5	91,4	92,4	91,4	93,5	91,7	98,0	97,1	98,0	96,8	97,7
9	VE6841	2021 (II)	92,2	93,5	91,8	93,5	92,2	93,5	92,0	93,9	92,0	93,2	91,8	94,7	91,5	93,2	91,5	92,8	91,2	93,2	91,8	97,8	97,0	97,8	96,7	97,3
10	VE5390	2021 (II)	92,2	93,2	92,0	93,2	92,2	93,2	92,1	93,5	92,0	93,5	91,8	94,3	91,5	93,5	91,5	92,8	91,4	93,5	91,8	98,0	97,1	98,0	96,8	97,7
11	VE5395	2021 (II)	92,2	93,2	92,0	93,2	92,2	93,2	92,1	93,5	92,0	93,5	91,8	94,3	91,5	93,5	91,5	92,4	91,4	93,5	91,8	98,0	97,1	98,0	96,8	97,7

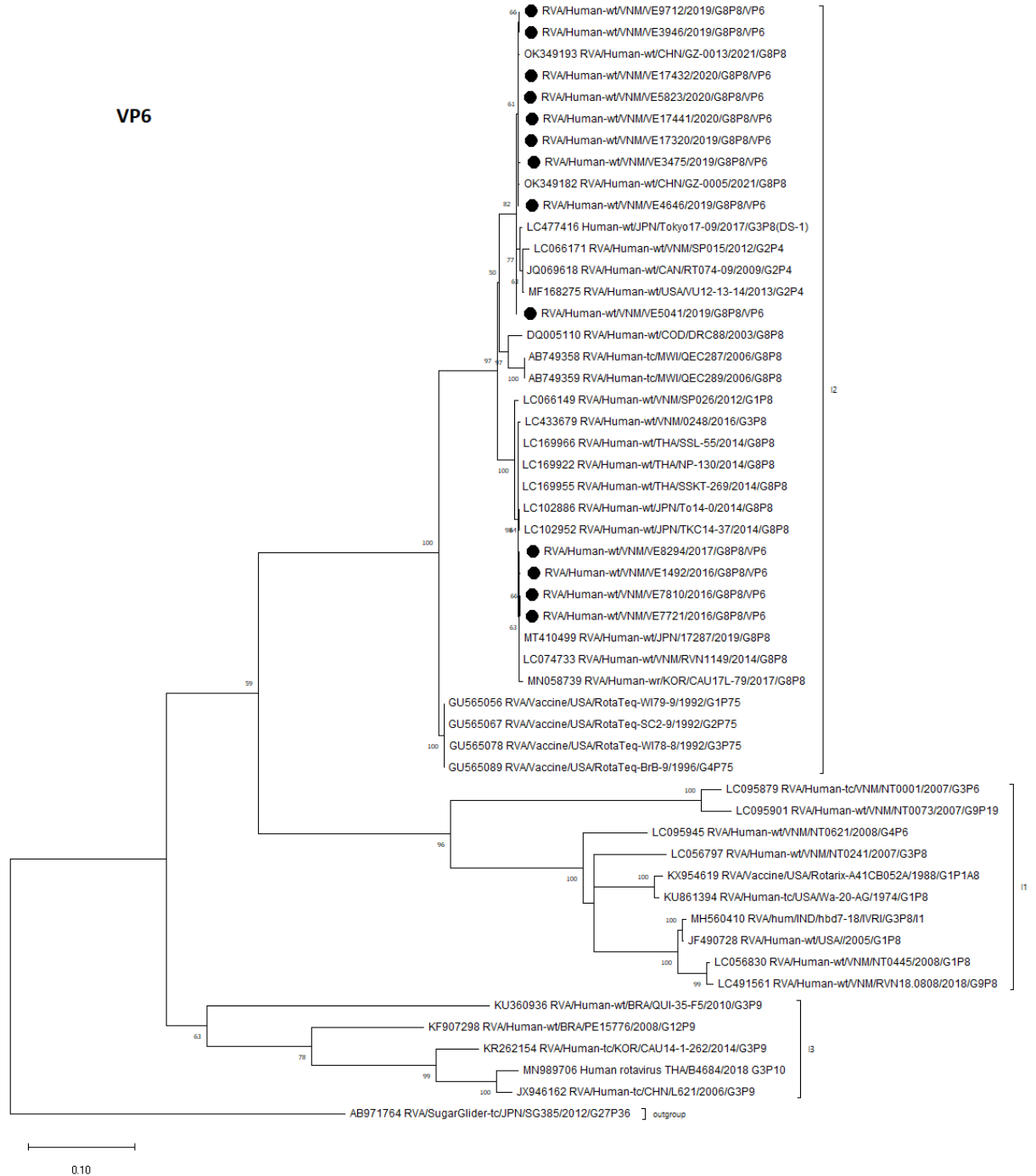
S T T	Mã mẫu nghiên cứu	Nă m (nhá nh)	Tỉ lệ tương đồng với mẫu tham chiếu (gồm ID, mã Genbank, năm và nhánh)																							
			HP16		HCMC1 42		HNI36		HP08		VN755		NhaTran g/V17		HNI510		HP0769		NT0247		HCMC 750		HCMC /726		VMN_120 34_66	
			JF6906 79		JF6906 89		JF6906 7		JF6906 773		DQ5129 72						JF6907 04		LC0568 17		HG917 354,		JF6907 30		KX362902	
			1999 (I)		1999 (I)		1999 (I)		1999 (I)		2006 (I)		2006 (I)		2007 (I)		2007 (I)		2007 (I)		2009 (II)		2009 (II)		2012(II)	
			% Nu	% aa	% Nu	% aa	% Nu	% aa	% Nu	% aa	% Nu	% aa	% Nu	% aa	% Nu	% aa	% Nu	% aa	% Nu	% aa	% Nu	% aa	% Nu	% aa	% Nu	% aa
12	VE5400	2021 (II)	92,2	93,2	91,8	93,2	92,2	93,2	92,1	93,5	92,0	93,5	91,8	94,3	91,5	93,5	91,5	92,4	91,4	93,5	91,8	98,0	97,1	98,0	96,8	97,7
12	VE6129	2021 (II)	92,2	93,2	92,0	93,2	92,2	93,2	92,0	93,5	92,0	93,5	91,8	94,3	91,5	93,5	91,5	92,4	91,2	93,5	91,8	98,0	97,0	98,0	96,7	97,7
14	VE6130	2021 (II)	92,2	93,2	92,1	93,2	92,2	93,2	92,1	93,5	92,0	93,5	91,8	94,3	91,5	93,5	91,5	92,4	91,4	93,5	91,8	98,0	97,1	98,0	96,8	97,7
15	VE6140	2021 (II)	92,2	93,2	91,9	93,2	92,2	93,2	92,1	93,5	92,0	93,5	91,8	94,3	91,5	93,5	91,5	92,4	91,4	93,5	91,8	98,0	97,1	98,0	96,8	97,7
16	VE6141	2021 (II)	92,2	93,2	92,0	93,2	92,2	93,2	92,2	93,5	92,0	93,5	91,8	94,3	91,5	93,5	91,5	92,4	91,5	93,5	91,8	98,0	97,0	98,0	96,7	97,7
17	VE6162	2021 (II)	92,2	93,2	92,0	93,2	92,2	93,2	92,0	93,5	92,0	93,5	91,8	94,3	91,5	93,5	91,5	92,4	91,2	93,5	91,8	98,0	97,0	98,0	96,7	97,7
18	VE6176	2021 (II)	92,2	93,2	92,0	93,2	92,2	93,2	92,1	93,5	91,9	93,5	91,8	94,3	91,5	93,5	91,5	92,4	91,4	93,5	91,8	98,0	97,1	98,0	96,8	97,7
19	VE6188	2021 (II)	92,2	93,2	91,8	93,2	92,2	93,2	92,0	93,5	92,0	93,5	91,8	94,3	91,5	93,5	91,5	92,4	91,2	93,5	91,8	98,0	97,3	98,0	97,0	97,7
20	VE6189	2021 (II)	92,2	93,2	92,0	93,2	92,2	93,2	92,0	93,5	92,0	93,5	91,8	94,3	91,5	93,5	91,5	92,4	91,2	93,5	91,8	98,0	97,3	98,0	97,0	97,7
21	VE6230	2021 (II)	92,2	93,2	92,0	93,2	92,2	93,2	92,1	93,5	92,0	93,5	91,8	94,3	91,5	93,5	91,5	92,4	91,4	93,5	91,8	98,0	97,1	98,0	96,8	97,7
22	VE6311	2021 (II)	92,2	93,2	91,8	93,2	92,2	93,2	92,1	93,5	92,0	93,5	91,8	94,3	91,5	93,5	91,5	92,4	91,4	93,5	91,8	98,0	97,1	98,0	96,8	97,7
23	VE6342	2021 (II)	92,2	93,2	92,0	93,2	92,2	93,2	92,1	93,5	92,0	93,5	91,8	94,3	91,5	93,5	91,5	92,4	91,4	93,5	91,8	98,0	97,1	98,0	96,8	97,7
24	VE6837	2021 (II)	92,2	93,2	92,0	93,2	92,2	93,2	92,1	93,5	92,0	93,5	91,8	94,3	91,5	93,5	91,5	92,4	91,4	93,5	91,8	98,0	97,1	98,0	96,8	97,7

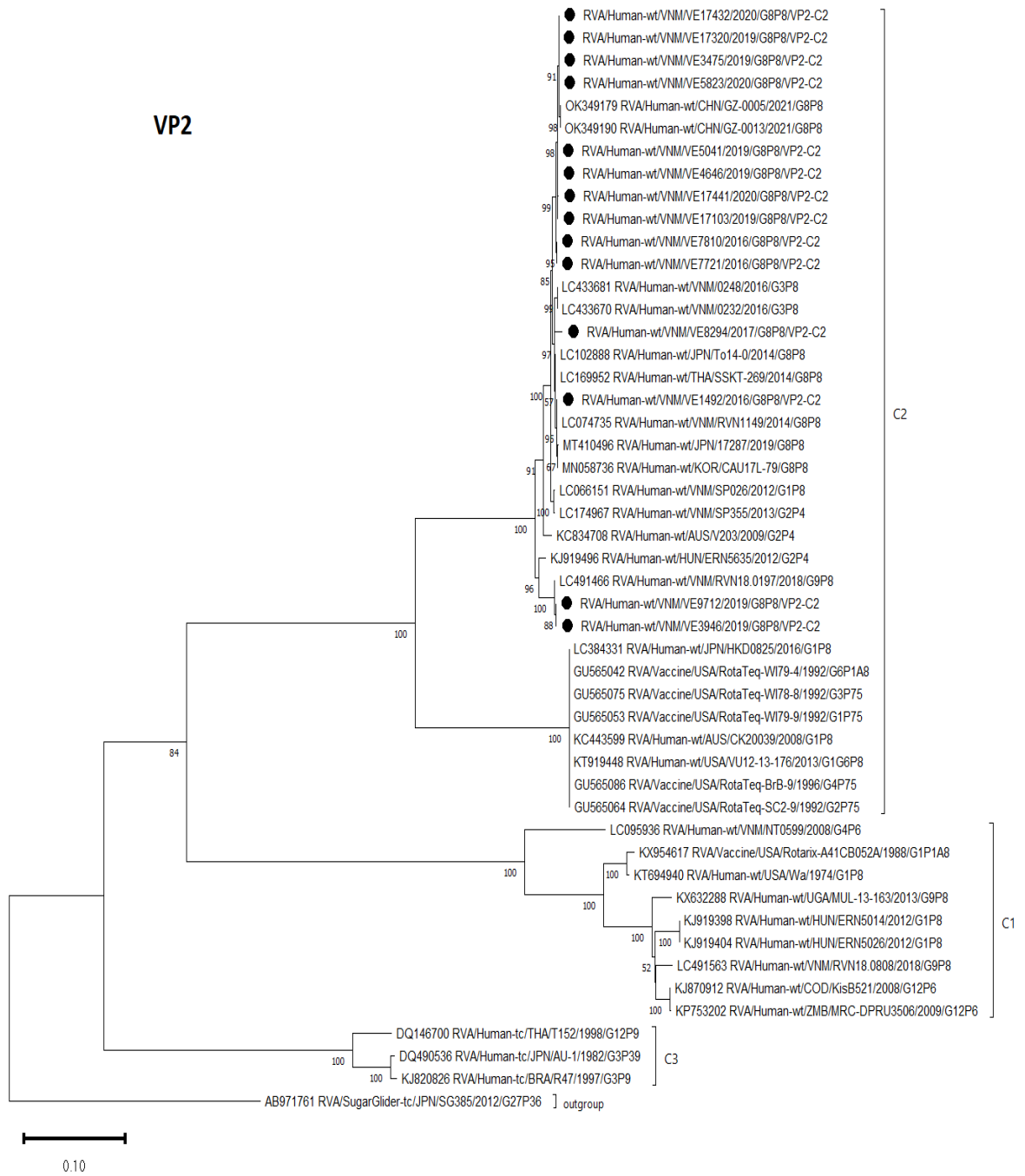
Phụ lục 12B: Tỷ lệ tương đồng Nucleotide và acid amin gen VP4 của các chủng RV G1P[8] trong nghiên cứu với 1 số chủng G1 tại Việt Nam tham khảo trên Genbank

STT	Mẫu nghiên cứu	Năm (nhánh)	Tỷ lệ tương đồng với mẫu tham chiếu (gồm ID, mã Genbank, năm và nhánh)									
			HNI36		NhaTrang/V17		NhaTrang/V99		NT0241		HCMC761	
			JN790713		AB536802		AB536809		LC056796		JN790717	
			1999 (III)		2006 (III)		2006 (III)		2007(III)		2007(III)	
			% Nu	% aa	% Nu	% aa	% Nu	% aa	% Nu	% Nu	% aa	% Nu
1	VE5386	2021 (III)	97,7	98,4	97,4	97,6	96,8	98,8	96,7	98,8	96,6	97,6
2	VE5390	2021 (III)	97,6	98,4	97,5	97,6	96,7	98,8	96,6	98,8	96,5	97,6
3	VE5395	2021 (III)	97,7	98,4	97,4	97,6	96,8	98,8	96,8	98,8	96,6	97,6
4	VE5400	2021 (III)	97,7	98,4	97,4	97,6	96,8	98,8	96,7	98,8	96,6	97,6
5	VE6129	2021 (III)	97,7	98,4	97,4	97,6	96,8	98,8	96,7	98,8	96,6	97,6
6	VE6131	2021 (III)	97,7	98,4	97,4	97,6	96,8	98,8	96,7	98,8	96,6	97,6
7	VE6132	2021 (III)	97,7	98,4	97,4	97,6	96,8	98,8	96,7	98,8	96,6	97,6
8	VE6141	2021 (III)	97,7	98,4	97,4	97,6	96,8	98,8	96,7	98,8	96,6	97,6
9	VE6176	2021 (III)	97,7	98,4	97,4	97,6	96,8	98,8	96,7	98,8	96,6	97,6
10	VE6188	2021 (III)	97,7	98,4	97,4	97,6	96,8	98,8	96,7	98,8	96,6	97,6
11	VE6189	2021 (III)	97,6	98,4	97,2	97,6	96,7	98,8	96,6	98,8	96,5	97,6
12	VE6294	2021 (III)	97,7	98,4	97,4	97,6	96,8	98,8	96,7	98,8	96,6	97,6
13	VE6310	2021 (III)	97,7	98,4	97,4	97,6	96,8	98,8	96,7	98,8	96,6	97,6
14	VE6311	2021 (III)	97,7	98,4	97,4	97,6	96,8	98,8	96,7	98,8	96,6	97,6
15	VE6342	2021 (III)	97,7	98,4	97,4	97,6	96,8	98,8	96,7	98,8	96,6	97,6
16	VE6837	2021 (III)	97,7	98,4	97,4	97,6	96,8	98,8	96,7	98,8	96,6	97,6
17	VE6841	2021 (III)	97,7	98,4	97,4	97,6	96,8	98,8	96,7	98,8	96,6	97,6
18	VE17810	2021 (III)	97,6	98,0	97,2	97,1	96,7	98,37	96,6	98,37	96,5	97,1

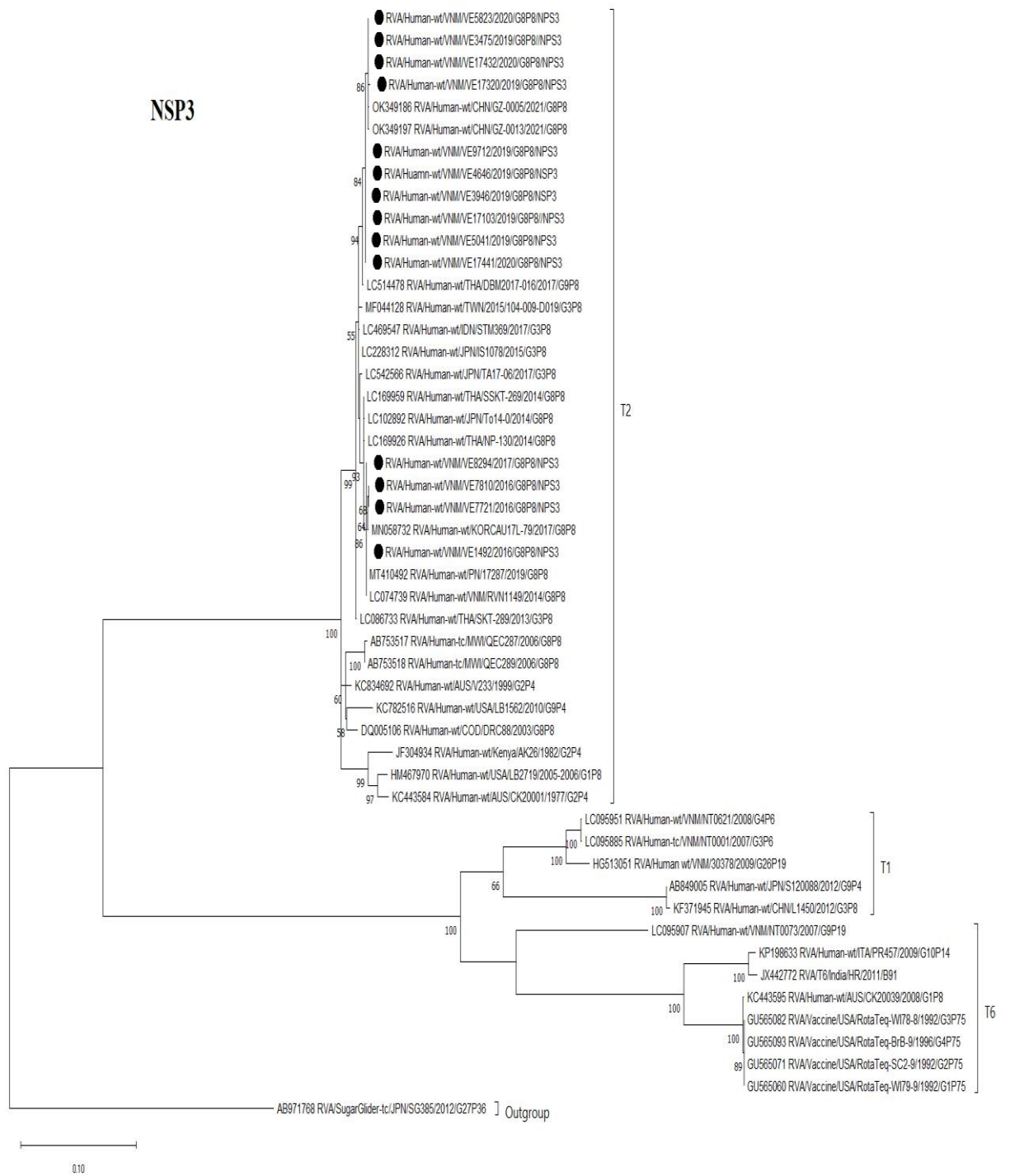
Phụ lục 13: Cây phát sinh chủng loại các gen bên trong của chủng G8P[8]

(dấu chấm tròn được sử dụng để biểu thị các chủng đang nghiên cứu)

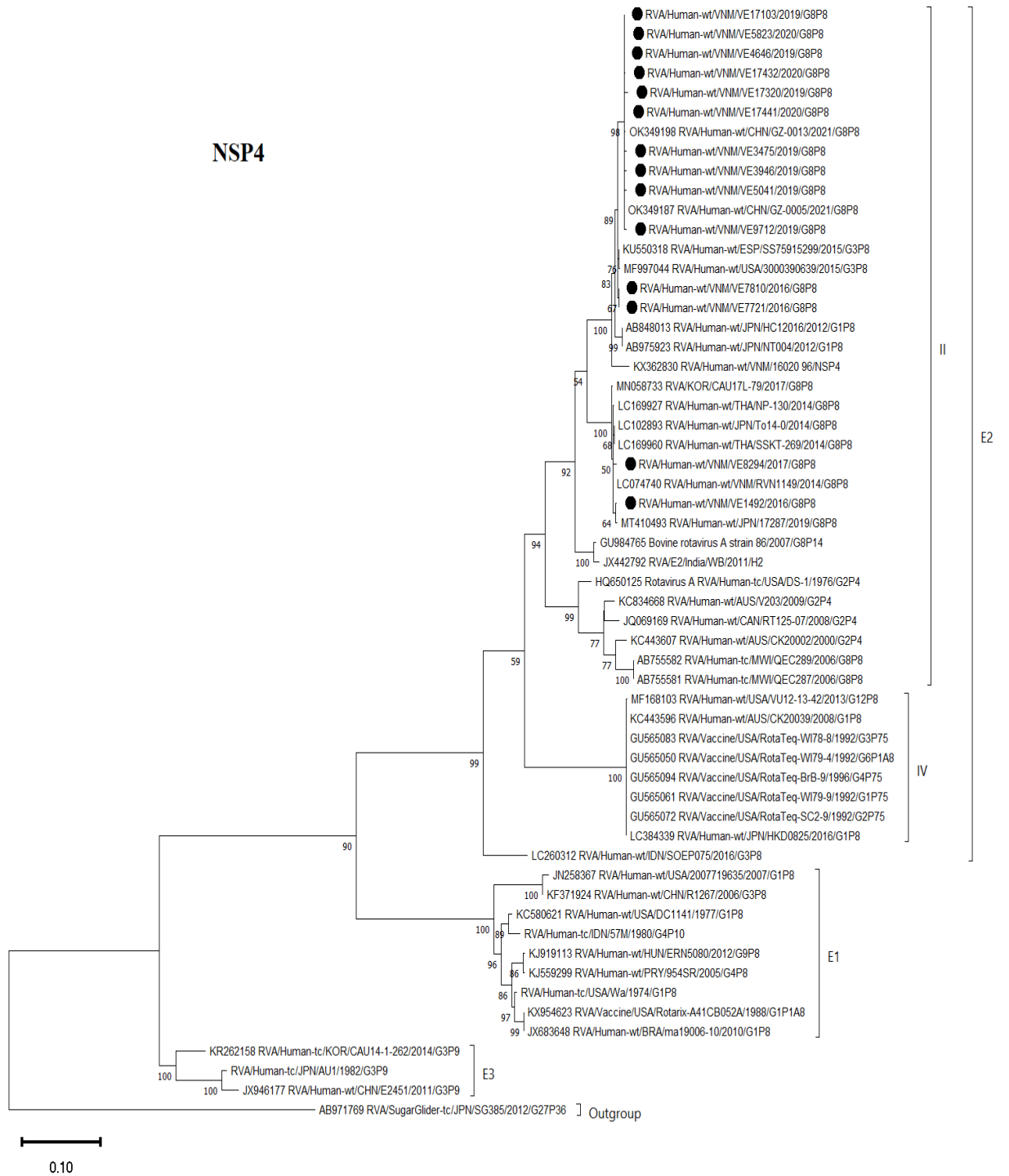




NSP3



NSP4



Phụ lục 14A: Biến đổi acid amin trong vùng Epitope của NSP3 giữa các chủng G8 đang nghiên cứu và chủng vắc xin

STT	Mã chủng	Kiểu gen	BD (1-147aa)							RoXaN-BD(167-231aa)		eIF4G-BD (267-310aa)	
			8	14	91	93	103	104	142	186	193	281	282
1	Rotarix RIX441	T1	V	T	V	K	M	T	D	N	I	L	I
2	VE17441	T2	A	S	.	R	L	L	E	.	V	I	L
3	VE17320	T2	A	S	.	R	L	L	E	.	V	I	L
4	VE17103	T2	A	S	.	R	L	L	E	.	V	I	L
5	VE9712	T2	A	S	.	R	L	L	E	.	V	I	L
6	VE8294	T2	A	S	.	R	L	L	E	.	V	I	L
7	VE7810	T2	A	S	.	R	L	L	E	.	V	I	L
8	VE7721	T2	A	S	.	R	L	L	E	.	V	I	L
9	VE5823	T2	A	S	.	R	L	L	E	.	V	I	L
10	VE5041	T2	A	S	.	R	L	L	E	.	V	I	L
11	VE4646	T2	A	S	.	R	L	L	E	.	V	I	L
12	VE3946	T2	A	S	.	R	L	L	E	.	V	I	L
13	VE3475	T2	A	S	.	R	L	L	E	.	V	I	L
14	VE17432	T2	A	S	.	R	L	L	E	.	V	I	L
15	VE1492	T2	A	S	.	R	L	L	E	.	V	I	L

Phụ lục 14B: Biến đổi acid amin trong vùng Epitope của NPS4 giữa các chủng G8 đang nghiên cứu và chủng vắc xin

STT	Mã chủng	Kiểu gen	Epitope ASIII					Epitope ASII					Epitope ASI						
			121	131	133	136	137	138	139	140	141	142	148	153	154	157	160	161	169
1	Rotarix RIX 441	E1	I	H	N	T	R	P	V	D	V	I	F	I	K	D	E	S	S
2	VE17103	E2	.	Y	K	V	Q	S	I	G	E	.	I	V	.	E	.	.	K
3	VE9712	E2	.	.	K	V	Q	S	I	G	E	.	I	V	.	E	.	.	K
4	VE8294	E2	.	.	R	V	Q	S	A	G	E	.	I	V	.	E	.	.	K
5	VE7810	E2	.	Y	K	V	Q	S	I	G	E	.	I	V	.	E	.	.	K
6	VE7721	E2	.	Y	K	V	Q	S	I	G	E	.	I	V	.	E	.	.	K
7	VE5823	E2	.	Y	K	V	Q	S	I	G	E	.	I	V	.	G	.	.	K
8	VE5041	E2	.	Y	K	V	Q	S	I	G	E	.	I	V	.	E	.	.	K
9	VE4646	E2	.	Y	K	V	Q	S	I	G	E	.	I	V	.	E	.	.	K
10	VE3946	E2	.	Y	K	V	Q	S	I	G	E	.	I	V	.	E	.	.	K
11	VE3475	E2	.	Y	K	V	Q	S	I	G	E	.	I	V	.	E	.	.	K
12	VE17432	E2	.	Y	K	V	Q	S	I	.	E	.	I	—	—	—	—	—	—
13	VE1492	E2	.	.	R	V	Q	S	A	G	E	.	I	—	—	—	—	—	—

“_” không đọc kết quả

