

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO**

**BỘ Y TẾ**

**VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG**



**NGUYỄN VŨ SƠN**

**ĐẶC ĐIỂM PHÂN TỬ CỦA SARS-COV-2  
TẠI MIỀN BẮC VÀ MIỀN TRUNG  
VIỆT NAM, 2020-2021**

**Chuyên ngành : Vi sinh vật học**

**Mã số : 9 42 01 07**

**TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC**

**Hà Nội – 2024**

**CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU NÀY ĐƯỢC HOÀN THÀNH TẠI VIỆN VỆ  
SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG**

**Người hướng dẫn khoa học:**

- 1. PGS.TS. Nguyễn Lê Khánh Hằng***
- 2. TS. Hoàng Vũ Mai Phương***

**Phản biện 1: PGS.TS. Nguyễn Quang Huy – Trường  
Đại học Khoa học Tự nhiên – Đại học  
Quốc gia Hà Nội**

**Phản biện 2: PGS.TS. Vũ Thị Tường Vân – Bệnh viện  
Bạch Mai**

**Phản biện 3: TS. Trần Tôn – Viện Pasteur Thành phố  
Hồ Chí Minh**

Luận án sẽ được bảo vệ tại Hội đồng đánh giá luận án cấp Viện họp tại Viện Vệ  
sinh dịch tễ Trung ương.

Vào hồi... giờ ....., ngày .....tháng .....năm 2024.

*Có thể tìm hiểu luận án tại:*

1. Thư viện Quốc gia
2. Thư viện Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương

## **ĐẶT VẤN ĐỀ**

Bệnh truyền nhiễm do virus gây nên trong thế kỷ XXI đang là một thách thức lớn trong hệ thống Y tế tại Việt Nam và các quốc gia trên thế giới. Căn nguyên virus là nguyên nhân chủ yếu gây ra những vụ dịch nguy hiểm đe dọa tới sức khỏe của con người. Tháng 12/2019, một loại virus corona mới (Novel coronavirus – nCoV) đã được phát hiện tại thành phố Vũ Hán, Trung Quốc. Nghiên cứu về virus học, cho thấy nCoV có mối quan hệ với virus gây viêm đường hô hấp cấp (VĐHHC) năm 2003 (SARS-CoV), nCoV đã được đổi tên thành SARS-CoV-2. Đến nay, thế giới đã ghi nhận trên 773 triệu ca COVID-19 với 7 triệu ca tử vong (31/12/2023). Tại Việt Nam, trường hợp nhiễm SARS-CoV-2 đầu tiên được ghi nhận tại TP Hồ Chí Minh vào ngày 32/1/2020. Việt Nam đã trải qua 4 lần sóng dịch với tổng số ca được ghi nhận là 11.624.114 ca, 43.206 (0,4%) ca tử vong.

Biến thể SARS-CoV-2 đã ghi nhận bao gồm virus gốc Vũ Hán, biến thể Alpha (virus lần đầu được ghi nhận tại Anh tháng 9/2020), biến thể Beta (tại Nam Phi tháng 5/2020), biến thể Delta (tại Ấn Độ tháng 10/2020) và biến thể Omicron (tại Nam Phi tháng 11/2021). Sự xuất hiện các biến thể mới và giảm thiểu nguy cơ mắc bệnh COVID-19 cũng như các biến chứng liên quan là vấn đề được quan tâm trên toàn cầu. Việc nghiên cứu, xác định các đột biến đáng quan tâm của SARS-CoV-2 cần được cập nhật trong vắc xin COVID-19.

Vì vậy, để cập nhật các thông tin virus học của SARS-CoV-2, nghiên cứu “**Đặc điểm phân tử SARS-CoV-2 tại miền Bắc và miền Trung Việt Nam, 2020-2021**” được thực hiện với 2 mục tiêu:

1. Xác định tỷ lệ dương tính SARS-CoV-2 trong các mẫu thu thập tại miền Bắc Việt Nam bằng phương pháp Realtime RT-PCR, 2020-2021
2. Phân tích đặc điểm phân tử của SARS-CoV-2 tại miền Bắc và miền Trung Việt Nam bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới, 2020-2021.

### ***Những điểm mới về khoa học và giá trị thực tiễn của đề tài***

Lần đầu tiên áp dụng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới để phát hiện các biến thể virus SARS-CoV-2 lưu hành tại các tỉnh miền bắc và miền trung Việt Nam giai đoạn 2020-2021 từ đó giúp phát hiện sớm nguồn gốc các vụ dịch xảy ra

Nghiên cứu góp phần cung cấp thêm số liệu cụ thể về sự đa dạng của SARS-CoV-2 lưu hành tại Việt Nam tại thời điểm bắt đầu đại dịch. Mười hai (12) biến thể SARS-CoV-2 xuất hiện trong 2020-2021 cho thấy virus đã có nhiều biến đổi. Theo dõi sự biến đổi của bộ gen SARS-CoV-2 trong quá trình lưu hành giúp tăng cường

hiệu quả của các biện pháp phòng chống dịch, đặc biệt đối với những biến đổi làm tăng tính độc của vi rút.

Với diễn biến phức tạp của đại dịch COVID-19 do virus SARS-CoV-2 gây nên, việc đáp ứng kháng thể với virus sau tiêm vac-xin và/hoặc nhiễm virus được ghi nhận là chưa bền vững thì việc giám sát sự tiến hoá về di truyền học của SARS-CoV-2 là một trong những công cụ để có thể đánh giá tiến trình của đại dịch.

## **CẤU TRÚC CỦA LUẬN ÁN**

Luận án gồm 104 trang không kể tài liệu tham khảo và phụ lục, có 24 bảng, 30 hình. Đặt vấn đề 2 trang. Tổng quan 34 trang; đối tượng và phương pháp nghiên cứu 16 trang; kết quả nghiên cứu 32 trang; bàn luận 18 trang; kết luận 2 trang

## **Chương 1. TỔNG QUAN**

### **1.1. TÌNH HÌNH DỊCH COVID-19 TRÊN THẾ GIỚI VÀ TẠI VIỆT NAM**

Ngày 30/1/2020, Tổ chức Y tế thế giới (TTYTTG) đã ban bố “Tình trạng Y tế khẩn cấp về sức khỏe cộng đồng toàn cầu” đối với sự lây lan của virus corona bên ngoài Trung Quốc, mô tả đây là sự bùng phát chưa từng có tiền lệ. Ngày 11/2/2020, Ủy ban quốc tế về phân loại virus đã đặt tên cho virus nCoV là SARS-CoV-2 và bệnh gây viêm phổi lạ là COVID-19. Với sự lây lan rộng của dịch VĐHHC tại các quốc gia thuộc các châu lục khác nhau trên thế giới, ngày 11/3/2020 TCYTGT đã công bố dịch VĐHHC do SARS-CoV-2 trở thành “Đại dịch VĐHHC – COVID-19”. Tính đến ngày 12/2/2020, 45.171 trường hợp xác định nhiễm SARS-CoV-2, trong đó 44.730 (99%) trường hợp tại Trung Quốc đã được báo cáo, bao gồm 8.204 (18,2%) bệnh nhân ở trong tình trạng bệnh nặng và 1.068 trường hợp tử vong trên thế giới. Kể từ khi được ghi nhận, dịch tễ của bệnh COVID-19 thay đổi từng ngày, số ca mắc tăng gấp đôi khi tăng từ 6,4 đến 7,4 ngày. Tỷ lệ chết/mắc là 2,1%, cao hơn so với bệnh nhiễm trùng hô hấp thông thường như cúm mùa (tỷ lệ tử vong là 0,15-0,25%) nhưng COVID-19 thấp hơn rất nhiều với bệnh do virus corona khác, thấp hơn gần 5 lần so với SARS-CoV (10%), thấp hơn 17 lần so với MERS-CoV (34,4%).

Sự xâm nhập và lây truyền qua tiếp xúc gần của bệnh COVID-19 đã dấy lên quan ngại về tốc độ lây truyền từ người sang người tại Việt Nam, nước có chung đường biên giới với Trung Quốc với diện tích nhỏ và đông dân cùng với nguồn lực hạn chế. Theo Bộ Y tế, kể từ khi trường hợp COVID-19 đầu tiên được xác nhận vào ngày 23/1/2020 đến tháng 10/2023, Việt Nam đã trải qua 4 lần sóng dịch với tổng số ca được ghi nhận là 11.624.114 ca, 43.206 (0,4%) ca tử vong. Việt Nam đã tiêm hơn 266 triệu liều vắc xin phòng COVID-19.

## **1.2. BIẾN THỂ SARS-COV-2**

Tất cả các virus, bao gồm cả SARS-CoV-2 gây đại dịch COVID-19, đều thay đổi theo thời gian. Hầu hết các thay đổi ít hoặc không ảnh hưởng đến đặc tính của virus. Tuy nhiên, một số thay đổi có thể ảnh hưởng đến đặc tính của virus, như mức độ lây lan dễ dàng, mức độ nghiêm trọng của bệnh liên quan hoặc hiệu quả của vắc xin, thuốc điều trị, công cụ chẩn đoán hoặc các biện pháp xã hội và sức khỏe cộng đồng khác.

TCYTTG phối hợp với chính quyền các quốc gia, các nhà nghiên cứu tiến hóa virus và mạng lưới phòng thí nghiệm tham chiếu COVID-19 đại diện từ GISAID, Nextstrain, Pango theo dõi và đánh giá sự tiến triển của SARS-CoV-2 kể từ tháng 1 năm 2020. Vào cuối năm 2020, sự xuất hiện của các biến thể gây tăng nguy cơ đối với sức khỏe cộng đồng toàn cầu đã thúc đẩy việc mô tả đặc điểm của các Biến thể Quan tâm (VOI) và Các Biến thể Quan ngại (VOC), nhằm ưu tiên theo dõi và nghiên cứu toàn cầu, để có những đáp ứng phù hợp đối với đại dịch COVID-19.

## **1.3. CHẨN ĐOÁN TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM**

### **1.3.1. Phương pháp Realtime RT-PCR**

Xét nghiệm realtime RT-PCR (Reverse Transcriptase- Polymerase chain reaction) có khả năng xác định nhanh sự nhiễm virus thông qua xác định vật liệu di truyền của virus bằng khả năng phát hiện đoạn RNA đặc hiệu được ứng dụng để định lượng DNA, RNA, chẩn đoán các virus gây bệnh như SARS-CoV-2, cúm A/H5N1, A/H1N1/09 đại dịch.. Realtime RT-PCR hiện được coi là phương pháp có độ chính xác cao nhất để xét nghiệm khẳng định các ca nhiễm SARS-CoV-2. Phương pháp này dựa trên các vùng gen đích như ORF1ab, E, N để xác định sự có mặt của virus trong bệnh phẩm dịch đường hô hấp. Thời kì đầu đại dịch, các phòng thí nghiệm chuẩn thức của TCYTTG đã công bố vùng gen đích sử dụng trong chẩn đoán để các nước trên thế giới có thể tham khảo thực hiện: phòng thí nghiệm Charite – Berlin, Đức, Viện các bệnh truyền nhiễm quốc gia Nhật Bản (NIID), Trung tâm kiểm soát bệnh tật Mỹ (US-CDC)

### **1.3.2. Phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới**

Đầu những năm 2000, công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới đã được phát triển với nhiều hệ thống khác nhau nhằm mục đích giải trình tự các đoạn DNA có kích thước lớn, như nhiễm sắc thể hay hệ gen sinh vật. Các phương pháp giải trình tự thế hệ mới (NGS) khác nhau đã được sử dụng thành công gần đây để truy tìm nguồn gốc và tìm hiểu sự tiến hóa của các tác nhân lây nhiễm, điều tra sự lây lan và các chuỗi lây truyền của các đợt bùng phát, COVID-19 cũng như tạo điều kiện phát triển các xét nghiệm chẩn đoán phân tử hiệu quả và nhanh chóng và góp phần vào việc kiểm

tìm các phương pháp điều trị và vắc xin. Sự phát triển của các phương pháp giải trình tự hiệu quả và nhanh chóng để tái tạo lại trình tự hệ gen của SARS-CoV-2, tác nhân gây bệnh của COVID-19, là cơ sở cho việc thiết kế các xét nghiệm phân tử chẩn đoán và đề ra các biện pháp và chiến lược hiệu quả để giảm thiểu sự lan truyền của đại dịch.

## **Chương 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU NỘI DUNG 1**

**Nội dung:** Xác định tỷ lệ dương tính SARS-CoV-2 trong các mẫu thu thập tại miền Bắc Việt Nam bằng phương pháp Realtime RT-PCR, 2020-2021.

#### **2.1.1. Đối tượng nghiên cứu**

- Các mẫu bệnh phẩm thu thập từ những ca bệnh nghi nhiễm SARS-CoV-2 theo QĐ 3351/QĐ-BYT (29/7/2020) và QĐ 3468/QĐ-BYT (07/8/2020) của Bộ Y tế

#### **2.1.2. Cỡ mẫu, thời gian và địa điểm**

- Giai đoạn từ tháng 1/2020-8/2020: toàn bộ các mẫu bệnh phẩm (dịch tỵ hầu, dịch họng, dịch nội khí quản) thu thập từ những ca bệnh nghi nhiễm SARS-CoV-2 tại 28 tỉnh/thành miền Bắc Việt Nam.

- Giai đoạn từ tháng 9/2020-12/2021 các mẫu bệnh phẩm dương tính với SARS-CoV-2 từ 28 tỉnh/thành miền Bắc Việt Nam gửi tới Viện VSDTTU.

#### **2.1.4. Phương pháp xét nghiệm**

##### **2.1.4.1. Phương pháp Realtime RT-PCR xác định SARS-CoV-2**

##### **2.1.4.2. Đo tải lượng virus**

##### **2.1.4.3. Phân lập virus SARS-CoV-2**

#### **2.1.5. Đạo đức trong nghiên cứu**

Nghiên cứu đã được chấp thuận của Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học số 03/CN-HĐĐĐ ngày 21/02/2020 tại Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh và nghiên cứu Y sinh học số HĐĐĐ – 16/2020 ngày 25/09/2020 tại Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

### **2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU MỤC TIÊU 2**

**Nội dung:** Phân tích đặc điểm phân tử của SARS-CoV-2 tại miền Bắc và miền Trung Việt Nam bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới (NGS), 2020-2021.

#### **2.2.1. Đối tượng nghiên cứu**

+ Mẫu lâm sàng: lựa chọn các mẫu bệnh phẩm có giá trị Ct <30  
+ Mẫu phân lập: các mẫu có hiện tượng huỷ hoại tế bào (CPE) được thu hoạch và kiểm tra nồng độ bằng xét nghiệm Realtime RT-PCR.

### **2.2.2. Cỡ mẫu, thời gian và địa điểm**

Từ tháng 1/2020 đến tháng 12/2021, 595 mẫu có giá trị  $C_t < 30$  đủ tiêu chuẩn được chọn để thực hiện giải trình tự gen, xác định các biến thể SARS-CoV-2 lưu hành. Các mẫu được địa diện cho 20 tỉnh/thành phố ở miền Bắc và 3 tỉnh miền Trung

### **2.2.3. Phương pháp xét nghiệm**

Giải trình tự gen thế hệ mới (NGS) đã được phát triển với nhiều hệ thống khác nhau nhằm mục đích giải trình tự các đoạn DNA có kích thước lớn, như nhiễm sắc thể hay hệ gen sinh vật. Trong đó, giải trình tự gen Illumina là hệ thống xác định trình tự gen thành công và phổ biến nhất. Illumina đọc trình tự nucleotide thông qua quá trình sinh tổng hợp trên cả 2 sợi DNA được gắn bản (flowcell), không sử dụng môi đặc hiệu. Tín hiệu phát quang được thu thập dưới dạng chụp ảnh. Các nucleotide sau đó được sắp xếp và ghép đoạn theo phần mềm phân tích dữ liệu của hệ thống Illumina.

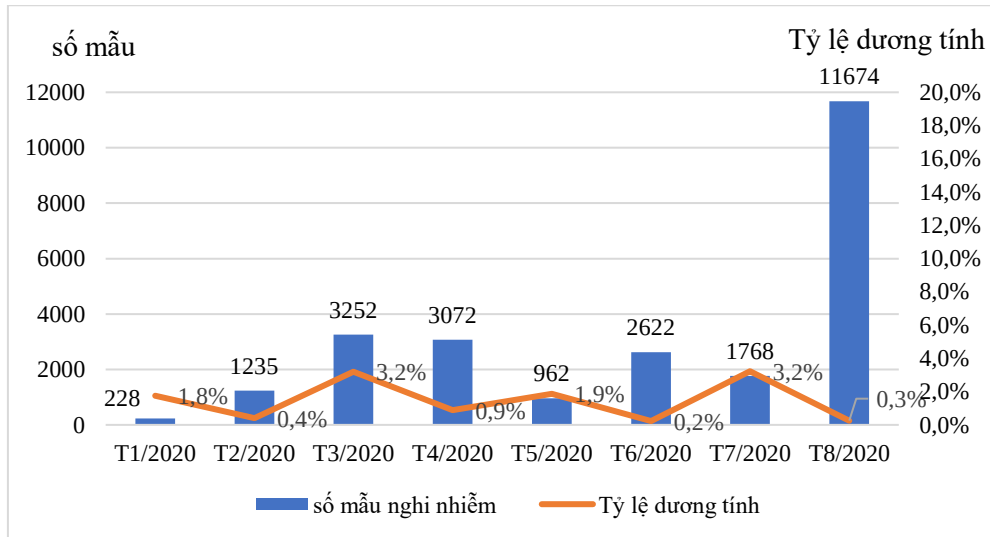
### **2.2.4. Quản lý và phân tích dữ liệu**

## **CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ**

### **3.1. XÁC ĐỊNH TỶ LỆ DƯƠNG TÍNH SARS-COV-2 TRONG CÁC MẪU THU THẬP TẠI MIỀN BẮC VIỆT NAM BẰNG PHƯƠNG PHÁP RELTIME RT-PCR, 2020-2021**

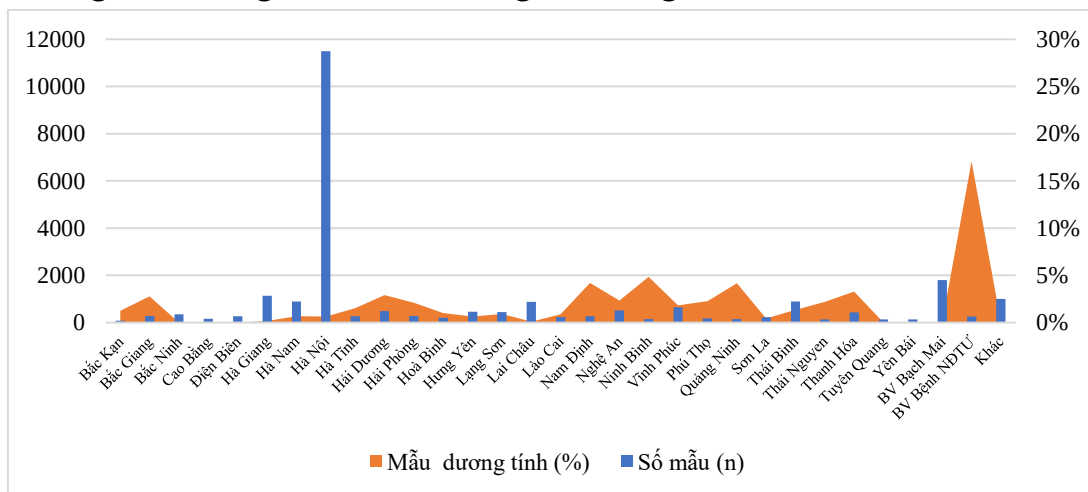
#### **3.1.1. Tỷ lệ dương tính SARS-CoV-2 theo tháng và theo địa điểm thu thập, 1/2020-8/2020**

Tổng số mẫu bệnh phẩm lâm sàng nghi nhiễm SARS-CoV-2 từ 28 Trung tâm Kiểm soát bệnh tật tỉnh (CDC) và bệnh viện tại miền Bắc Việt Nam gửi tới Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương (VSDTTU) xét nghiệm trong 8 tháng là 24.813 ca nghi nhiễm. Trong đó, tỷ lệ nam là 12.798/24.813 (51,5%), nữ là 12.015/24.813 (48,5%). Nhóm tuổi >18-49 tuổi chiếm tỷ lệ cao nhất 57,6%, đó là nhóm tuổi lao động nên tần xuất tiếp xúc cao hơn các nhóm tuổi còn lại, tiếp đến là lứa tuổi học sinh >6-18 tuổi (11,9%), các nhóm tuổi trẻ nhỏ và người lớn tuổi >49 tuổi có số ca nghi nhiễm thấp hơn. Trong những tháng đầu xảy ra dịch, có rất nhiều ca nghi nhiễm chưa thu thập đủ thông tin độ tuổi (12,9%)



**Hình 3.1. Mẫu bệnh phẩm nghi nhiễm SARS-CoV-2 thu thập theo tháng tại miền Bắc Việt Nam, 1/2020 – 8/2020**

Tháng 03/2020 và tháng 08/2020 là hai tháng thu thập được số mẫu cao nhất với số mẫu >3000 mẫu và gần 12.000 mẫu. Thời điểm tháng 3/2020 là thời kỳ cao trào của làn sóng dịch thứ nhất với 16 ca bệnh được xác định dương tính, trong đó 12 trường hợp dương tính tại Sơn Lôi, Vĩnh Phúc, đi lao động và trở về từ Vũ Hán. Số mẫu nghi nhiễm tháng 8/2020 là bắt đầu vào làn sóng dịch thứ 2, đó cũng là thời điểm xảy ra dịch COVID-19 tại Đà Nẵng, cả thành phố thực hiện giãn cách xã hội. Kết quả xét nghiệm Realtime RT-PCR xác định 251 (1%) mẫu dương tính với SARS-CoV-2. Tỷ lệ mẫu dương tính tháng 3/2020 và tháng 7/2020 ghi nhận nhiều nhất là 3,2%.



**Hình 3.2. Mẫu bệnh phẩm nghi nhiễm SARS-CoV-2 thu thập tại 28 tỉnh/thành và bệnh viện tại miền Bắc Việt Nam, 1/2020 – 8/2020**

Số lượng mẫu thu thập cao nhất tại Hà Nội với 11.501 mẫu, Bệnh viện Bạch Mai là 1800 mẫu. Trong 28 CDC gửi mẫu, 5 tỉnh có số lượng mẫu nghi nhiễm > 500 mẫu là Hà Giang (1031 mẫu), Thái Bình (859 mẫu), Lai Châu (813 mẫu), Hà Nam (774 mẫu) và Vĩnh Phúc (605 mẫu). Các tỉnh còn lại có số lượng mẫu nghi nhiễm <



500 mẫu, trong đó Bắc Kạn là tỉnh có số mẫu nghi nhiễm thấp nhất (79 mẫu). Ngoài ra, trong nghiên cứu có 995 mẫu (3,2%) thiếu thông tin về địa điểm gửi mẫu

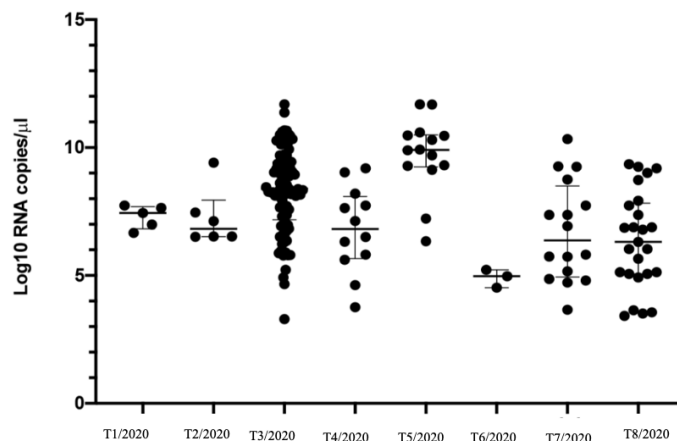
### 3.1.2. Phân tích mối tương quan giữa các mẫu dương tính SARS-CoV-2 theo giá trị Ct và nồng độ RNA, 1/2020-8/2020

**Bảng 3.2. So sánh các mẫu dương tính theo giá trị Ct ở nhóm người nhập cảnh và nhóm cộng đồng tại Việt Nam**

| Nhóm             | Số mẫu dương tính |               | Tổng số    |
|------------------|-------------------|---------------|------------|
|                  | Ct value < 30     | Ct value ≥ 30 |            |
| <b>Nhập cảnh</b> | 138               | 57            | 195        |
| <b>Cộng đồng</b> | 34                | 22            | 56         |
| <b>Tổng số</b>   | <b>172</b>        | <b>79</b>     | <b>251</b> |

Trong giai đoạn tổng số 251 mẫu dương tính, giá trị Ct trung bình là 28 chu kỳ ( IQR 22,3-32, 14-38). Trong đó, 77% (195/251) mẫu bệnh nhân nhập cảnh từ Trung Quốc, Anh, các nước Châu Âu và Mỹ. Tỷ lệ mẫu cộng đồng là 23,3% (56/251) thu thập tại Vĩnh Phúc và Hà Nội. Kết quả Realtime RT-PCR cho thấy 172/251 mẫu (68,5%) có giá trị Ct ≤ 30. Các ca SARS-CoV-2 nhập cảnh và các ca trong cộng đồng có giá trị Ct < 30 lần lượt là 70,7% và 60,7%, không có sự khác biệt đáng kể ( $p > 0,05$ ) (Bảng 3.2).

#### \*Định lượng RNA trong mẫu bệnh phẩm dương tính SARS-CoV-2

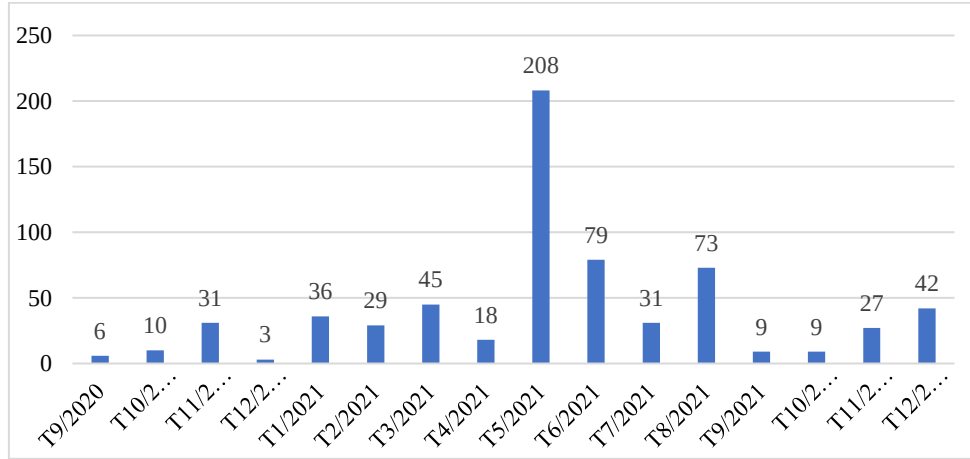


**Hình 3.3. Định lượng RNA SARS-CoV-2 trong mẫu bệnh phẩm lâm sàng dương tính tại miền Bắc Việt Nam, 1/2020-8/2020**

Nồng độ virus cao: tải lượng virus trong các mẫu lâm sàng  $> 1,83.10^9$  copies/μl (giá trị Ct < 22);

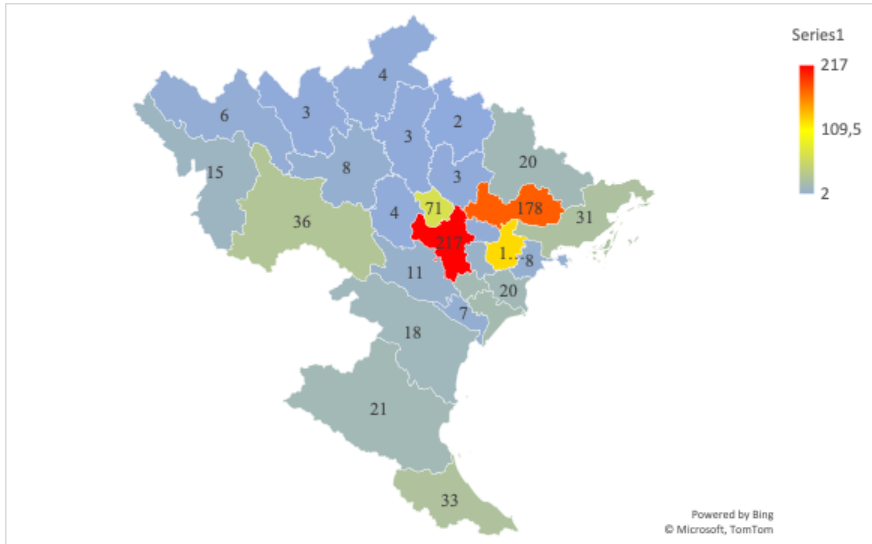
Nồng độ virus trung bình:  $2,29.10^6$  copies/ $\mu$ l < tải lượng virus <  $1,83.10^9$  copies/ $\mu$ l (giá trị  $22 \leq Ct < 32$ ); Nồng độ virus thấp: tải lượng virus trong các mẫu lâm sàng <  $2,29.10^6$  copies/ $\mu$ l (giá trị  $Ct \geq 32$ )

3.1.3. Phân bố các ca nhiễm SARS-CoV-2 tại miền Bắc Việt Nam, 2020-2021



**Hình 3. 1. Các trường hợp khẳng định dương tính phân bố theo thời gian, 9/2020 –12/2021**

Kể từ tháng 9/2020, các mẫu được xét nghiệm dương tính với SARS-CoV-2 tại các Trung tâm Kiểm soát Bệnh tật các tỉnh/ thành phố và các bệnh viện, được gửi tới Viện VSDTTU để thực hiện xét nghiệm khẳng định. Tổng số mẫu được khẳng định dương tính là 656 mẫu. Đầu năm 2021, số ca dương tính tăng cùng thời điểm dịch COVID-19 bùng phát tại Hải Dương, từ tháng 1/2021 - 3/2021 với số ca khẳng định dương tính lần lượt là 36, 29 và 45 trường hợp. Tháng 5/2021 là tháng có số mẫu dương tính cao nhất với 208 mẫu, cao gấp nhiều lần so với các tháng trước đó. Đây chính là thời điểm bùng phát dịch tại Bắc Giang và Bắc Ninh, là hai tỉnh có rất nhiều khu công nghiệp với số lượng tập trung công nhân lớn (Hình 3.5). Dịch xảy ra tại Bắc Giang, Bắc Ninh ghi nhận lớn hơn tại Hải Dương. Các tháng tiếp theo vào tháng 6, 7, 8/2021 vẫn tiếp tục ghi nhận các ca bệnh dương tính cao.



**Hình 3. 2. Phân bố các ca dương tính SARS-CoV-2 theo tỉnh, 2020-2021**

Trong 2 năm 2020-2021, 4 tỉnh/thành phố có số ca nhiễm SARS-CoV-2 nhiều nhất là Hà Nội (217 ca), Bắc Giang (178 ca), Hải Dương (125 ca) và Vĩnh Phúc (71 ca), 6 tỉnh có số mắc > 20 ca như Nghệ An, Hà Tĩnh, Thái Bình, Sơn La, Quảng Ninh, Lạng Sơn. Các tỉnh còn lại có số ca mắc < 20 ca, và một số tỉnh chỉ ghi nhận ca bệnh rất thấp như Lào Cai (3), Tuyên Quang (3), Thái Nguyên (3) Bắc Kan (2) (Hình 3.7).

### 3.1.4. Phân lập SARS-CoV-2

**Bảng 3.3. Môi tương quan giữa giá trị Ct và tỷ lệ phân lập SARS-CoV-2 trên tế bào Vero E6**

| Giá trị Ct     | Số lượng mẫu phân lập | Số mẫu có CPE, n (%) |
|----------------|-----------------------|----------------------|
| ≤20            | 28                    | 18 (64)              |
| 21–25          | 20                    | 10 (50)              |
| 26–30          | 20                    | 1 (5)                |
| >30            | 13                    | 0 (0)                |
| <b>Tổng số</b> | <b>81</b>             | <b>29 (36)</b>       |

Trong những tháng đầu của vụ dịch, nghiên cứu đã sử dụng 81/251 (32,3%) các mẫu dương tính, được bảo quản thích hợp và có thể tích đủ để gây nhiễm trên tế bào Vero E6. Kết quả thu được 29 (36%) chủng SARS-CoV-2. Trong đó, 20/29 mẫu

xuất hiện hiện tượng huỷ hoại tế bào (CPE) trong khoảng thời gian từ 72 đến 96 giờ, và 9/29 mẫu còn lại xuất hiện CPE ở lần cấy truyền thứ 2. Trong 28 mẫu có giá trị Ct <20, 18 mẫu (64%) phân lập được virus; 20 trường hợp có giá trị Ct là 20–25 có 10 mẫu (50%) phân lập được virus. Không có virus nào được phân lập từ các mẫu có giá trị Ct >30 (n=13) (Bảng 3.3).

### **3.2. PHÂN TÍCH ĐẶC ĐIỂM PHÂN TỬ CỦA SARS-COV-2 TẠI MIỀN BẮC VÀ MIỀN TRUNG VIỆT NAM BẰNG KỸ THUẬT GIẢI TRÌNH TỰ GEN THỂ HỆ MỚI, 2020-2021**

#### **3.2.1. Thông tin các mẫu giải trình tự**

Tổng số 595/907 (65,6%) mẫu có giá trị Ct < 30 đủ tiêu chuẩn được chọn để thực hiện giải trình tự gen, đại diện cho 20 tỉnh ở miền Bắc và 3 tỉnh ở miền Trung (Nghệ An, Hà Tĩnh và Đà Nẵng). Số mẫu được thực hiện giải trình tự nhiều là các tỉnh/thành phố xảy ra các vụ dịch lớn như Vĩnh Phúc (29 mẫu), Đà Nẵng (60 mẫu), Hải Dương (64 mẫu) và Bắc Giang (92 mẫu), Hà Nội (145 mẫu)

#### **3.2.2. Các biến thể SARS – CoV – 2 tại miền Bắc và miền Trung Việt Nam, 2020 – 2021**

**Bảng 3.4: Các biến thể SARS – CoV – 2 được thu thập tại miền Bắc và miền Trung Việt Nam, 2020 - 2021**

| <b>Phân loại WHO</b> | <b>Phân loại theo Nextstrain (dòng)</b> | <b>Phân loại theo Pangolin (biến thể)</b>                             | <b>Mẫu cộng đồng</b> | <b>Mẫu nhập cảnh</b> | <b>Tổng</b> |
|----------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------|-------------|
|                      | 19A                                     | B, B.3, B.4, B.39, B.40                                               | 7                    | 2                    | 9           |
|                      | 19B                                     | A, A.5                                                                | 5                    | 3                    | 8           |
|                      | 20A                                     | B1, B1.22, B.1.566, B.1.36.8, B.1.36.22, B.1.36.18, B.1.36.36         | 9                    | 15                   | 24          |
|                      | 20B                                     | B.1.1.317, B.1.1.284, B.1.1, B.1.1.274, B.1.1.25, B.1.1.306, B.1.1.10 | 68                   | 17                   | 85          |

|                |             |                                              |     |    |     |
|----------------|-------------|----------------------------------------------|-----|----|-----|
|                | 20C         | B.1, B.1.577, B.1.637                        | 7   | 2  | 9   |
|                | 20D         | B.1.1.1, C.16                                | 1   | 2  | 3   |
|                | 20E (EU1)   | B.1.177.8, B.1.177.54                        | 2   | 3  | 5   |
| Alpha          | 20I/501Y.V1 | B.1.1.7                                      | 111 | 7  | 118 |
| Beta           | 20H/501Y.V2 | B.1.351                                      | 1   | 5  | 6   |
|                | 21A         | B.1.617.2                                    | 0   | 1  | 1   |
|                | 21I         | AY.54, AY.57, AY.60, AY.75, AY.80, B.1.617.2 | 309 | 4  | 313 |
| Delta          | 21J         | AY.23, AY.79, AY.85, AY.122, B.1.617.2       | 10  | 4  | 14  |
| <b>Tổng số</b> |             |                                              | 530 | 65 | 595 |

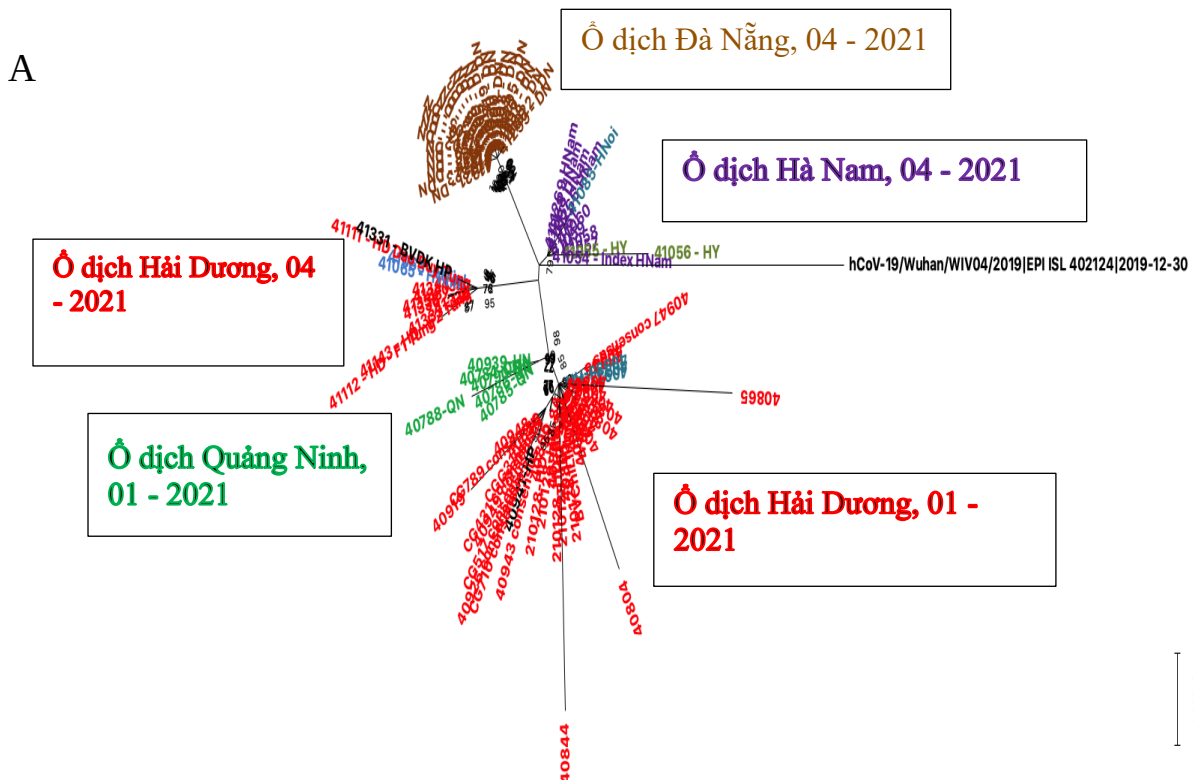
Theo phân loại của Nexstrain, 12 dòng SARS-CoV-2 được ghi nhận trong nghiên cứu. Trong đó, virus gốc Vũ Hán – Hu D164 có 7 dòng (19A, 19B, 20A, 20B, 20C, 20D, 20E-EU1), biến thể Alpha (20I/501Y.V1) và Beta (20H/501Y.V2) mỗi biến thể có 1 dòng và biến thể Delta có 3 dòng (21A, 21I, 21 J). Trong mỗi dòng theo phân loại Nextstrain lưu hành các biến thể SARS-CoV-2 khác nhau theo phân loại PANGOLIN. Dòng 20A và 20B theo đó có 7 biến thể khác nhau.

**Bảng 3.5. Các biến thể SARS-CoV-2 phân bố trong các làn sóng dịch**

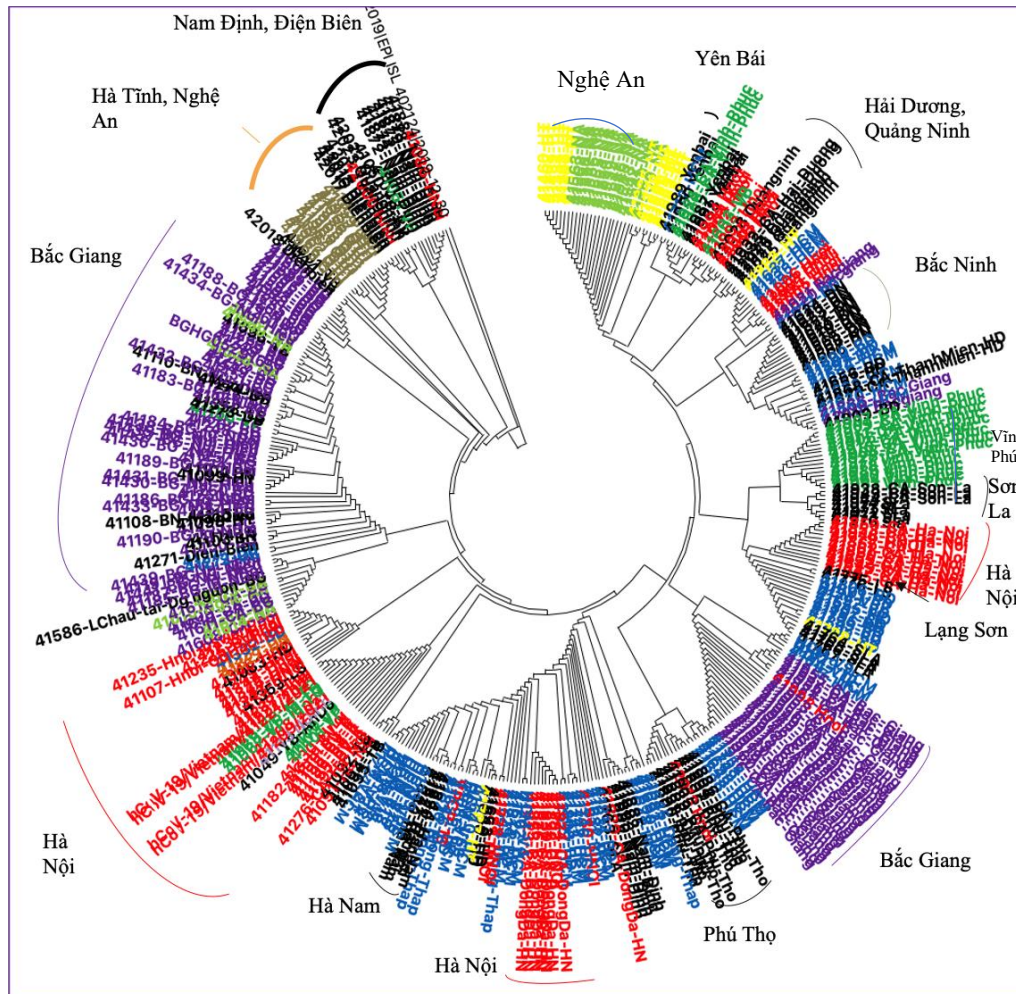
| Tỉnh/ Tp                                                              | Số ca | Theo Nextstrain<br>(Dòng)    | Theo Pangolin (biến thể)                                                    |
|-----------------------------------------------------------------------|-------|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| <b>Làn sóng dịch thứ nhất COVID-19 (Từ 23/01 đến 24/07/2020) [22]</b> |       |                              |                                                                             |
| Hà Nội                                                                | 48    | 19A, 19B, 20A, 20B, 20C, 20D | A, B, B.1, B.1.1, B.1.1.1, B.1.1.10, B.1.1.317, B.1.22, B.1.566, B.39, B.40 |
| Thanh Hoá                                                             | 14    | 20B                          | B.1.1.25                                                                    |
| Thái Bình                                                             | 12    | 20A, 20B                     | B.1, B.1.1                                                                  |
| Ninh Bình                                                             | 7     | 19A, 20A, 20B, 20D           | B, B.1, B.1.1, B.1.1.1, B3                                                  |

|                                                                             |    |                    |                                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------------------|----|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Vĩnh Phúc                                                                   | 6  | 19A, 19B, 20B      | A, B.1.1, B.1.1.317, B4                                                         |
| Quảng Ninh                                                                  | 2  | 20B                | B.1.1                                                                           |
| Lai Châu                                                                    | 1  | 20B                | B.1.1                                                                           |
| Hưng Yên                                                                    | 1  | 19B                | A                                                                               |
| Thái Nguyên                                                                 | 1  | 20B                | B.1.1                                                                           |
| <b><i>Làn sóng dịch thứ hai COVID-19 (Từ 25/07/2020 đến 27/01/2021)</i></b> |    |                    |                                                                                 |
| Hải Dương                                                                   | 39 | 20A, 20B, 20E, 20I | B.1.1, B.1.1.284, B.1.1.317, B.1.1.417, B.1.1.7, B.1.177.8, B.1.36.36, B.1.36.8 |
| Đà Nẵng                                                                     | 17 | 20B                | B.1.1                                                                           |
| Hà Nội                                                                      | 10 | 20A, 20B, 20H      | B.1, B.1.1, B.1.1.306, B.1.351                                                  |
| Bắc Giang                                                                   | 8  | 20I                | B.1.1.7                                                                         |
| Quảng Ninh                                                                  | 7  | 20I                | B.1.1.7                                                                         |
| Nam Định                                                                    | 6  | 20A, 20B, 20E      | B.1, B.1.1, B.1.1.274, B.1.1.317, B.1.177.54                                    |
| Hà Nam                                                                      | 3  | 20A, 20B           | B.1.1, B.1.36.18, B.1.36.22                                                     |
| Lạng Sơn                                                                    | 2  | 20B                | B.1.1                                                                           |
| Bắc Ninh                                                                    | 1  | 20D                | C.16                                                                            |
| Hưng Yên                                                                    | 1  | 20C                | B.1.577                                                                         |
| Thái Bình                                                                   | 1  | 20B                | B.1.1                                                                           |
| Thanh Hoá                                                                   | 1  | 20B                | B.1.1                                                                           |
| <b><i>Làn sóng dịch thứ ba COVID-19 (Từ 28/01 đến 26/04/2021)</i></b>       |    |                    |                                                                                 |
| <b>Đà Nẵng</b>                                                              | 29 | 20I                | B.1.1.7                                                                         |
| Hà Nội                                                                      | 21 | 20C, 20I           | B.1.1.7, B.1.637                                                                |
| Hải Dương                                                                   | 14 | 20I, 20H           | B.1.1.7, B.1.351                                                                |
| Hà Nam                                                                      | 12 | 20I                | B.1.1.7                                                                         |
| Hà Tĩnh                                                                     | 2  | 20I                | B.1.1.7                                                                         |
| Hải Phòng                                                                   | 1  | 20I                | B.1.1.7                                                                         |
| <b><i>Làn sóng dịch thứ tư COVID-19 (Từ 27/04 đến hết 2021)</i></b>         |    |                    |                                                                                 |
| Bắc Giang                                                                   | 84 | 21I                | AY.57                                                                           |
| Hà Nội                                                                      | 66 | 21A, 21I, 21J      | AY.57, AY.75, AY.79, AY.80, B.1.617.2                                           |
| Nghệ An                                                                     | 24 | 21I                | AY.57                                                                           |
| Vĩnh Phúc                                                                   | 23 | 21I                | AY.57, AY.80, B.1.617.2                                                         |
| Hà Tĩnh                                                                     | 18 | 21I                | AY.57                                                                           |

|                |    |          |                         |
|----------------|----|----------|-------------------------|
| Sơn La         | 14 | 21I      | AY.57                   |
| <b>Đà Nẵng</b> | 14 | 21I      | AY.57                   |
| Nam Định       | 13 | 21I, 21J | AY.57, AY.23            |
| Điện Biên      | 12 | 21I, 21J | AY.57, AY.60, AY.85     |
| Hải Dương      | 11 | 21I      | AY.57                   |
| Hà Nam         | 11 | 21I      | AY.57, B.1.617.2        |
| Phú Thọ        | 10 | 21I      | AY.57                   |
| Lạng Sơn       | 7  | 21I      | AY.57                   |
| Quảng Ninh     | 7  | 21I, 21J | AY.57, AY.122           |
| Thái Bình      | 5  | 21I      | AY.57                   |
| Yên Bái        | 5  | 21I      | AY.57, AY.54, B.1.617.2 |
| Bắc Ninh       | 4  | 21I      | AY.57                   |



những đặc điểm khác nhau, thể hiện trên cây phát sinh loài được tách thành 2 nhóm riêng biệt với giá trị bootstrap 77 (Hình 3.12). Trong tháng 4/2021, xem xét virus gây dịch ở Đà Nẵng, Hải Dương và Hà Nam cho thấy bộ gen của SARS-CoV-2 lưu hành tại Đà Nẵng tạo thành một nhóm riêng biệt, khác với bộ gen SARS-CoV-2 của 2 điểm còn lại. Như vậy, mặc dù SARS-CoV-2 trong 5 ổ dịch đều thuộc biến thể 20I nhưng ở mỗi thời điểm và địa điểm chúng lại xuất hiện với những nét đặc trưng khác nhau trong bộ gen.



**Hình 3. 4. Cây phát sinh loài biến thể Delta lưu hành tại miền Bắc và một số tỉnh miền Trung Việt Nam, 2021**

Cây phát sinh loài biến chủng Delta lưu hành tại Việt Nam thể hiện sự đa dạng của SARS-CoV-2. Nhóm 84 mẫu từ Bắc Giang và 66 mẫu từ thành phố Hà Nội tuy được xác định thuộc nhóm AY.57 nhưng được chia thành những cụm nhỏ khác nhau. Nhóm mẫu thành phố Hà Nội có ít nhất 6 nhóm trong đó thể hiện các virus trong từng nhóm có sự tương đồng cao với nhau và với các virus có nguồn gốc từ tỉnh khác (Vĩnh Phúc, thành phố Hồ Chí Minh). Nhóm mẫu Bắc Giang chia thành 2 nhóm lớn và có sự giao thoa với các mẫu của Vĩnh Phúc và Hà Nội. Các mẫu từ Nghệ An, Hà Tĩnh có sự



tương đồng với nhau và tạo thành một nhóm riêng biệt trên cây phát sinh loài. Các mẫu nhóm gốc 21A (B.1.617.2) gồm mẫu đến từ Yên Bái, Vĩnh Phúc, Hà Nội có sự tương đồng cao nằm trong cùng một nhóm (Hình 3.14).

### 3.2.3. Sự thay đổi nucleotide và axit amin trong hệ gen SARS-CoV-2, 2020-2021

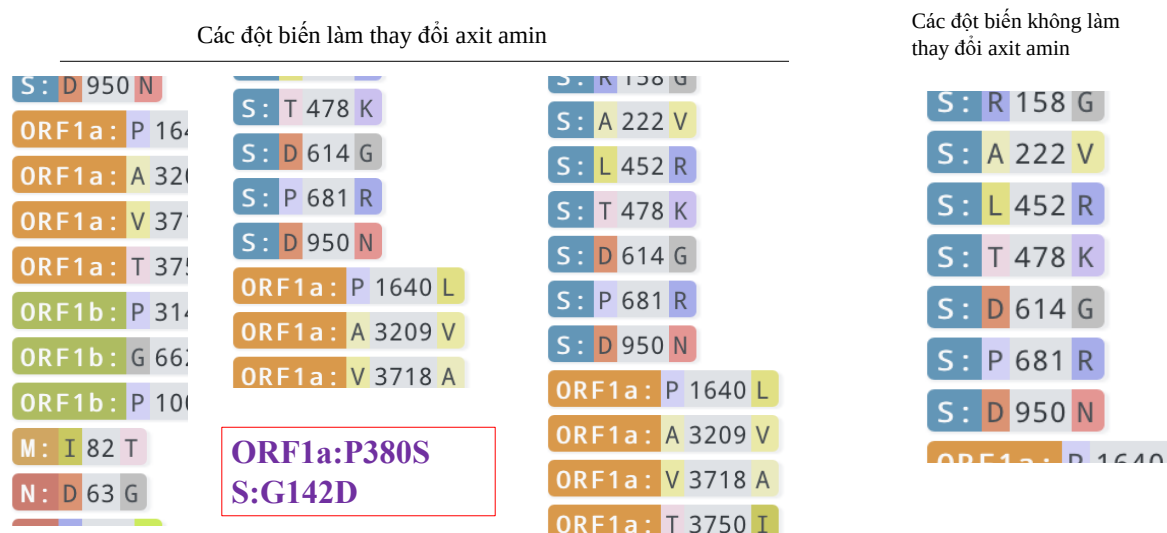
**Bảng 3. 1. Sự thay đổi axit amin trên protein S của các biến thể SARS-CoV-2 so với chủng gốc Vũ Hán , 2020 - 2021**

| Dòng virus<br>(Nextstrain) | Các điểm đột biến trên protein S                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 19A                        | T22I, C1250F                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 19B                        | E406K                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 20A                        | G75R, <b>D614G</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 20B                        | D80Y, G184S, <b>D614G</b> , A672V, Q677H, D808H, I834N, D950N, S1037L, V1122A, Q1208H                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 20C                        | D80G, C131W, F133Y, F135Y, C136S, D138K, L141M, F157S, G261A, A264D, <b>L452R</b> , <b>A522E</b> , G550S, L552K, T553K, E554K, S555*, N556K, <b>D614G</b> , T859N, D950H, V963A, E1195A, I1198L, E1202D, A1222D, M1229T, C1235S                                                                                                                                                                 |
| 20D                        | <b>D614G</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 20E                        | L18F, L176F, A222V, <b>D614G</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 20H                        | L18F, D80A, D215G, L241*, L242*, A243*, <b>K417N</b> , <b>E484K</b> , <b>N501Y</b> , <b>D614G</b> , A701V                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 20I                        | H69*, V70*, I105K, F106Y, G107N, D111E, Y144*, D287Y, <b>E324K</b> , <b>A348S</b> , <b>N501Y</b> , A570D, <b>D614G</b> , P681H, T716I, L878I, G889V, A890E, G891A, I934V, S982A, L1012*, I1013S, A1015D, I1018S, A1020Y, A1026G, T1027S, K1028I, S1030P, D1041E, S1051F, F1052N, Q1054H, H1058T, F1062L, Q1071*, D1118H, Y1209D, P1213Q, I1216S, D1257E, D1260Y, V1264E, H1271K, Y1272K, T1273K |
| 21A                        | L5F, T19R, L54F, V62G, H66L, K77T, R78I, I101R, I105N, C136P, P139Q, G142D, E156*, F157*, R158G, N188T, P209H, G219S, A222V, L229V, N234D, <b>L452R</b> , <b>T478K</b> , <b>D614G</b> , <b>P681R</b> , D950N                                                                                                                                                                                    |

|     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 21I | T19R, R34L, N61K, V62G, T63P, W64R, H66R, A67V, H69N, V70F, G75A, F79I, D80N, F86L, V90D, F92V, T95I, I100K, T109A, S116A, C131R, F133L, G142D, Y144*, K150R, E156*, F157*, R158G, F194L, R214L, A222V, V227L, I233F, A262S, P330L, <b>L452R</b> , <b>T478K</b> , T573I, T588I, <b>D614G</b> , S640F, A647S, S680F, V687I, <b>P681R</b> , D950N, T1027I, A1087S, G1124V, V1228L |
| 21J | T19R, V62G, V90D, T95I, D111V, I128H, E132Q, G142D, E156*, F157*, R158G, I233M, <b>L452R</b> , <b>T478K</b> , <b>D614G</b> , <b>P681R</b> , M731I, D950N                                                                                                                                                                                                                        |

Phân tích trình tự gen các biến thể SARS-CoV-2 lưu hành cho thấy có sự thay đổi về nucleotide trên toàn bộ hệ gen của virus. Cho thấy đột biến trên nucleotide xảy ra trên hầu hết các đoạn gen và tạo ra sự đa dạng trong kiểu gen của virus. Sự thay đổi về axit amin được ghi nhận nhiều nhất trên protein ORF1a, sau đó là S và N. Các đột biến trên protein S của virus lưu hành tại miền Bắc và Trung Việt Nam cho thấy có sự tương đồng với các biến thể trên thế giới (Bảng 3.8). Các đột biến trên protein S của virus lưu hành tại miền Bắc và Trung Việt Nam cho thấy có sự tương đồng với các biến thể trên thế giới (Bảng 3.8). Một số đột biến trên protein S mang tính đặc trưng cho biến thể: E406K (19B), L452R và A522E (20C), K417N, E484K, N501Y (20H), E324K, A348S, N501Y (20I), L452R, P681R (21A, 21I, 21J). Các đột biến D614G, N501Y được ghi nhận làm thay đổi bề mặt tiếp xúc của protein S và thụ thể ACE-2 trên tế bào biểu mô đường hô hấp ở người của SARS-CoV-2 trong nghiên cứu tương đồng với các virus lưu hành trên thế giới.

### AY.57 = “21I + ...”



### **Hình 3. 5. Các đột biến trên biến thể AY.57**

Biến thể Delta AY.57/21I, ngoài việc mang các đột biến đặc trưng của dòng 21I như là thay đổi axit amin (9 vị trí), mất axit amin (2 vị trí) đã xảy ra trên protein S, 8 axit amin thay đổi trên protein ORF1a, 4 vị trí thay đổi axit amin trên protein M và 6 sự khác biệt axit amin thuộc protein ORF3a, 7a, 8 và 9b của SARS-CoV-2 lưu hành tại Việt Nam. Ngoài ra, 7 sự thay đổi của nucleotide nhưng không làm thay đổi axit amin cũng đã được ghi nhận. Các đột biến này khi so sánh với các dòng virus khác lưu hành trên thế giới đã xác định được 2 đột biến mang tính đặc trưng riêng là G142D và P380S, do vậy AY.57 đã được PANGOLIN ghi nhận là một biến thể virus lưu hành đặc trưng tại Việt Nam

## **CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN**

### **4.1. XÁC ĐỊNH TỶ LỆ DƯƠNG TÍNH SARS-COV-2 TRONG CÁC MẪU THU THẬP TẠI MIỀN BẮC VIỆT NAM BẰNG PHƯƠNG PHÁP RELTIME RT-PCR, 2020-2021**

4.1.1. Tỷ lệ dương tính SARS-CoV-2 tại miền Bắc và miền Trung Việt Nam bằng phương pháp Realtime RT-PCR, 2020-2021

Tổng số 251 (1,0%) mẫu được phát hiện dương tính bằng phương pháp Realtime RT-PCR, phần lớn các trường hợp dương tính phát hiện từ các trường hợp nhập cảnh 195/251 (77,7%). Tỷ lệ dương tính với SARS-CoV-2 phát hiện ở miền Bắc Việt Nam tương tự các nước Tây Thái Bình Dương, Hàn Quốc 1%, New Zealand 0,18% trong cùng thời điểm. Tỷ lệ dương tính thấp hơn tỷ lệ công bố của TCYTTG tại châu Âu 19%, Đông Nam Á 21% và châu Mỹ là 48% . Chính sách kiểm soát dịch bệnh của các nước châu Âu như Anh, Pháp, Tây Ban Nha hay Mỹ...là tạo “miễn dịch cộng đồng” với 2/3 dân số nhiễm virus và sản sinh kháng thể, hoặc nghiên cứu, sản xuất được vắc xin với khả năng phân phối rộng rãi. Các trường hợp SARS-CoV-2 được xác nhận tại mỗi địa điểm thu thập ở miền Bắc phần lớn là các trường hợp nhập cảnh từ bên ngoài, từ Trung Quốc, Châu Âu, Anh, Nga, Mỹ và một số quốc gia châu Á khác, nơi SARS-CoV-2 lưu hành với tỷ lệ lưu hành cao. Tỷ lệ nhiễm COVID-19 thấp trong cộng đồng ở miền Bắc cũng như toàn Việt nam thể hiện chiến lược phòng chống COVID-19 có hiệu quả tại thời điểm chưa có biện pháp dự phòng hữu hiệu ( vắc xin) và thuốc kháng virus đặc trị cũng như vị trí địa lý cạnh Trung Quốc là nơi đang bùng phát dịch mạnh.

#### 4.1.2. Tải lượng RNA SARS-CoV-2 và mối tương quan giữa tải lượng virus và giá trị Ct, 1/2020-8/2020

Giá trị Ct của các mẫu SARS-CoV-2, không có sự khác biệt giữa nhóm nhập cảnh và nhóm cộng đồng có giá trị Ct < 30. Giá trị Ct trong các mẫu bệnh phẩm lâm sàng trong nghiên cứu tại miền Bắc và một số tỉnh miền Trung Việt Nam tương tự như các nghiên cứu ở châu Âu. Phần lớn các mẫu đều có giá trị Ct <30, điều này cho thấy khả năng lây nhiễm cao của SARS-CoV-2. Trong theo dõi, cách ly, xét nghiệm các bệnh nhân nhiễm SARS-CoV-2, lấy mẫu liên tiếp trong khoảng thời gian cách ly, khoảng cách trung bình giữa các lần lấy mẫu là 4 ngày, hơn 50% mẫu thứ hai và 25% từ mẫu thứ ba vẫn dương tính cho thấy virus tồn tại kéo dài.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phân loại tải lượng virus theo tải lượng virus thông qua số bản copy RNA/ul xác định trên mẫu xét nghiệm (Hình 3.3), và chia thành 3 mức độ: cao, trung bình, và thấp tương đương với giá trị Ct <22 (cao);  $22 \leq \text{Ct} < 32$  (trung bình) và Ct >32 (thấp), việc phân loại mẫu theo tải lượng virus cho phép dự báo khả năng thành công khi thực hiện các nghiên cứu tiếp theo bằng phương pháp giải trình tự gen, phân lập virus.

#### 4.1.3. Phân lập SARS-CoV-2

Kết quả ghi nhận có 20/29 (68,9%) mẫu bệnh phẩm xuất gây nhiễm có biểu hiện CPE trên tế bào cảm nhiễm trong vòng 72-96 giờ, thời gian xuất hiện hiện tượng huỷ hoại tế bào (CPE) tương tự với thời gian ủ bệnh trên lâm sàng, kết quả trên phù hợp với các báo cáo tại Trung quốc trên những bệnh nhân nhiễm SARS-CoV-2 năm 2019 có thời gian ủ bệnh từ 4-6 ngày. Sử dụng kết quả phân lập virus với các thông tin về thời gian xuất hiện CPE cho phép xác định chu kỳ lây nhiễm của virus để điều chỉnh chiến lược xét nghiệm cũng như cách ly trong công tác phòng chống dịch bệnh tại cộng đồng.

### 4.2. ĐẶC ĐIỂM PHÂN TỬ CỦA VIRUS SARS – COV - 2 TẠI MIỀN BẮC VÀ MIỀN TRUNG VIỆT NAM, 2020-2021

Giải trình tự gen thế hệ mới (Next-generation sequencing- NGS) là một công nghệ mới được áp dụng tại Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương từ năm 2017, đây là phương pháp cho phép thu được toàn bộ trình tự của hệ gen trong một lần thực hiện, tuy nhiên để có kết quả giải trình tự gen theo công nghệ NGS thành công phụ thuộc vào nhiều yếu tố, đặc biệt là chất lượng mẫu. Nghiên cứu của chúng tôi thực hiện đã lựa chọn các mẫu có nồng độ virus cao (Ct <30) để thực hiện, tỉ lệ thành công (thu được toàn bộ trình tự gen SARS-CoV-2) là 92.2% (549/595 mẫu)

Nghiên cứu của chúng tôi đã xác định sự đa dạng hệ gen của SARS – CoV - 2 tại miền Bắc và miền Trung Việt Nam lưu hành trong giai đoạn nghiên cứu (từ tháng

1 năm 2020 đến tháng 12 năm 2021). Sự đa dạng này được xác định xảy ra trong cả nhóm nhập cảnh và nhóm cộng đồng trong nước, tổng số 12 dòng virus SARS-CoV-2 (theo phân loại Nextstrain) tương đương với 42 loại virus (theo phân loại Pangolin) được ghi nhận trong nghiên cứu tại cả 2 nhóm mẫu thu thập tại cộng đồng và khu cách ly người nhập cảnh (Bảng 3.5). Trong đó có 03 biến thể đã được phát hiện đó là Alpha ( 20I/501Y.V1- B.1.1.7); Beta ( 20H/501Y.V2- B.1.1.351) và Delta với các dòng 21A (B.1.617.2) ; 21I ( AY.54; AY.57; AY.60; AY.75; AY.80; B.1.617.2) và 21J ( AY.23; AY.79; AY.85; AY.122, B.1.617.2)

Phân tích sự phân bố của SARS-CoV-2 theo địa điểm, trong làn sóng dịch COVID-19 thứ nhất và thứ hai tại Việt Nam cho thấy dòng 20B được phát hiện tại nhiều tỉnh thành với số lượng lớn tại Đà Nẵng, Hải Dương, là những nơi bùng phát dịch mạnh trong cộng đồng. Trong thời gian này (từ 23/01 đến 24/07/2020; từ 25/07/2020 đến 27/01/2021), có nhiều ca nhiễm COVID-19 đến Việt Nam từ Anh và các nước Châu Âu. Do vậy, việc phát hiện dòng 20B trong nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với cập nhật vào tháng 5/2020 khi dòng 20B chiếm ưu thế ở Anh, Mỹ, Nhật, các nước Châu Âu và một số quốc gia Nam Mỹ. Làn sóng dịch thứ 3 (28/01/2021 - 26/04/2021) tại Việt Nam được gây ra chủ yếu bởi biến thể 20I, khác với làn sóng dịch thứ 2 có nhiều biến thể cùng song hành tồn tại (Bảng 3.6). Tại miền Bắc và miền Trung Việt Nam, các tỉnh/thành phố gửi mẫu thực hiện giải trình tự gen gồm Đà Nẵng, Hà Nội, Hải Dương, Hà Nam, Hà Tĩnh, Hải Phòng. Đây là các tỉnh/thành phố có số lượng bệnh nhân COVID-19 đông tại thời điểm này. Theo dõi sự xuất hiện của virus dòng 20B, Pangolin đã ghi nhận sự xuất hiện của virus từ tháng 7/2020 tại Anh, sau đó lan tới Mỹ, các nước châu Âu và châu Á, đạt đỉnh vào tháng 11/2020.

Phân tích về các đột biến phát hiện trong nghiên cứu cho thấy, dòng 20B đã được ghi nhận mang một số đột biến có thể làm tăng khả năng lây lan trong cộng đồng được tìm thấy ở nhiều tỉnh thành của Việt Nam. Dòng này lây lan nhanh hơn các dòng 19A, 19B hay 20A, tương tự với báo cáo của các nước trên thế giới và trong khu vực. Nghiên cứu cũng xác định một số đột biến quan trọng trên protein S là D614G, và đột biến trên protein N là R203K, G204R của dòng 20B tại miền Bắc và miền Trung Việt Nam đã được ghi nhận giống với dòng 20B đang lưu hành trên thế giới tại thời điểm đó. Tương tự, số lượng đột biến trên protein S của dòng 20A được ghi nhận gồm hai đột biến G75R, D614G. Trong đó D614G được coi là đột biến quan trọng đặc trưng cho dòng 20A giúp protein S ổn định hơn, gắn chặt vào ACE-2 làm tăng khả năng lan truyền virus trong quần thể. Dòng 20B, số lượng đột biến axit amin trên protein S (11 axit amin) tăng gấp 5 lần so với dòng 20A và vẫn bao gồm D614G (Bảng 3.8). Các đột biến trên đã thể hiện trên cây phát sinh loài của dòng 20B đã tách thành một nhóm

riêng biệt, khác với dòng 19A và 19B lưu hành trước đó (Hình 3.12). Trong vòng 4 tháng, từ tháng 1 – 4/2020, SARS-CoV-2 đã thay đổi trên hệ gen tạo ra các biến thể có khả năng thích nghi với biểu mô đường hô hấp của người tốt hơn, lây lan nhanh hơn trong quần thể. Đây cũng là nguyên nhân chính của hai vụ dịch trong cộng đồng tại Hải Dương và Đà Nẵng năm 2020.

Với dòng 20B, số ca mắc COVID-19 tăng nhanh, và dòng 20B/B.1.1 tại Đà Nẵng là những ca tử vong đầu tiên tại Việt Nam. Theo các báo cáo từ Bộ Y tế, các trường hợp tử vong đều có liên quan đến tình trạng bệnh nền (ung thư, tiểu đường, tim mạch...). Như vậy, nhiễm SARS-CoV-2 có thể gây các biến chứng cho bệnh nhân COVID-19 khi đã mắc các bệnh mạn tính.

#### ***\*Biến thể Alpha/20I/B.1.1.7 và Beta/B.1.315***

Vào cuối tháng 1/2021, có 2 đợt bùng phát dịch lớn tại tỉnh Hải Dương và Quảng Ninh khởi phát làn sóng dịch COVID-19 thứ 3 tại Việt Nam. Kết quả giải trình tự gen cho thấy dòng 20I/B.1.1.7 xuất hiện thay thế dòng 20B trước đó và được TCYTQG báo cáo là một biến thể đáng lo ngại của SARS-CoV-2, đặt tên là Alpha. Cây phát sinh loài của các biến thể SARS-CoV-2 ở miền Bắc và miền Trung Việt Nam cho thấy sự khác biệt lớn của biến thể Alpha so với các virus trước đó. Có nguồn gốc di truyền từ dòng 20B, tuy nhiên với số lượng axit amin đột biến trên protein S là 40 axit amin, biến thể Alpha đã tách nhánh để tạo thành một nhánh riêng biệt (Hình 3.11). Theo dõi sự tiến hoá của virus, các nhà khoa học đã nhận thấy có sự đột biến nucleotide trên gen S với số lượng nhiều hơn các gen khác, nhưng biểu hiện kiểu hình (thay đổi axit amin) trên khoảng 40 vị trí. Trong các vị trí đột biến, sự thay đổi trên protein S tại vị trí N501Y đã làm thay đổi miền liên kết của protein S với thụ thể ACE-2 trên tế bào biểu mô đường hô hấp, dẫn đến khả năng lây truyền cao hơn so với các virus ban đầu. Do đó, biến thể Alpha trở thành biến thể chủ đạo của SARS-CoV-2 không chỉ ở Việt Nam mà còn ở các nước khác trên thế giới trong khoảng thời gian từ tháng 1-3/2021. Ngoài biến thể Alpha (dòng 20I), làn sóng dịch thứ 3 còn ghi nhận sự xuất hiện của biến thể Beta (dòng 20H/B.1.351). Đây là biến thể xuất hiện 5/6 ca bệnh có nguồn gốc từ Nam Phi và 1 ca bệnh trong cộng đồng tại Việt Nam. Hai dòng 20H, 20I được báo cáo có sự thay đổi trên protein S tại vị trí tương tác với thụ thể ACE-2. Tuy nhiên, dòng 20H còn mang các đột biến mất axit amin tại vị trí 242-244 nghi ngờ liên quan đến khả năng trốn tránh miễn dịch, làm giảm khả năng bảo vệ của vắc xin phòng COVID-19.

Khi so sánh trình tự gen và xây dựng cây phát sinh loài, SARS-CoV-2 lưu hành tại Việt Nam đã có sự phân nhóm có liên quan đến một số ổ dịch do biến thể Alpha ở các tỉnh Hải Dương, Quảng Ninh, Hà Nam và Đà Nẵng (Hình 3.12). Ổ dịch ở tỉnh Hải

Dương phát triển thành ổ dịch lớn ở khu công nghiệp. Sau 3 tháng, ổ dịch mới ở Đà Nẵng được hình thành, gây ra làn sóng COVID-19 ở miền Trung Việt Nam. Từ những kết quả phân tích này có thể hiểu rõ hơn về nguồn gốc, đặc điểm của SARS-CoV-2 gây ra các vụ dịch tại các tỉnh, mặc dù vẫn là biến thể Alpha nhưng với mỗi nhóm (cluster) lại có những đặc điểm khác nhau (nucleotide) và có thể phân biệt thông qua giải trình tự gen. Nghiên cứu trên các virus lưu hành tại Đà Nẵng được thực hiện để hiểu sâu hơn về tình huống này cho thấy có những đột biến nucleotide đặc trưng cho các bệnh nhân COVID-19 có nguồn gốc từ bệnh viện, các ca nhiễm cộng đồng (Hình 3.12).

Hệ gen của biến thể Alpha với hơn 40 đột biến axit amin, được báo cáo là một biến thể đáng lo ngại. Vì vậy, việc giám sát thường xuyên và chủ động hệ gen SARS-CoV-2 là một việc cần thiết trong phòng thí nghiệm.

#### ***\*Biến thể Delta/21A,21I, 21J***

Biến thể Delta (B.1.617) được phát hiện đầu tiên tại Ấn Độ (tháng 10/2020), sau đó lan ra các nước trong khu vực và trên thế giới (tháng 12/2020), trở thành biến thể giám sát (Variant under Monitoring – VUMs) và biến thể quan tâm (Variant of Concern - VOIs), lưu hành mang các đột biến tạo ưu thế cho sự lây truyền trong quần thể là các đột biến D614G, L452R, P681R, và T478K, K417N trên protein. Đặc biệt, đột biến L452R tại vị trí axit amin 452 khi thay thế arginine bằng leucine dẫn đến protein S gắn kết với thụ thể ACE2 bền chặt hơn so với các biến thể Alpha, Beta. Đột biến L452R có thể ngăn chặn tế bào T-CD8 tiêu diệt và loại bỏ virus [100]. Vì vậy, đột biến L452R là đột biến đáng quan tâm và đã được đưa vào để lựa chọn sản xuất vắc xin từ khi xuất hiện biến thể Delta. Một đột biến quan trọng khác đó là đột biến P681R với sự thay thế arginine bằng proline ở vị trí axit amin 681 dẫn đến gia tăng khả năng phân tách của protein S thành 2 phần S1 và S2 giúp cho khả năng gắn kết của virus vào tế bào chủ tốt hơn. Điều đó dẫn đến biến thể Delta lây lan với tốc độ gấp đôi so với biến thể Alpha. Biến thể Delta được chứng minh là tăng nguy cơ nhập viện cao hơn 108%, nhập viện trong tình trạng nặng (ICU) cao hơn 235% và nguy cơ tử vong cao hơn 133% so với biến thể gốc Vũ Hán. Chính vì vậy, tại Việt Nam, tính đến tháng 9/2021 số ca tử vong tăng mạnh lên đến hơn 15.000 người.

Từ cuối tháng 4/2021-12/2021, nghiên cứu đã thực hiện giải trình tự gen với số lượng lớn 328 virus (Bảng 3.5), các mẫu này thu thập tại các đợt bùng phát dịch trong cộng đồng Việt Nam. Với đặc tính của biến thể Delta là có tải lượng virus cao ( $C_t < 30$ ) nên kết quả thành công thu được trong giải trình tự toàn bộ hệ gen của virus cũng cao.

Trong nghiên cứu, biến thể Delta được xác nhận bắt đầu lưu hành tại Việt Nam với 10 biến thể, trong đó chủ yếu là AY.57 (90,5%) tiếp theo đó là biến thể B.1.617.2

(3,1%), AY.23(2,1%), AY.80 (1,2%), AY.85 (1,2%)...Mặc dù các nghiên cứu trên thế giới có ghi nhận dòng phổ biến của nhóm này là B.1.617.2; tại Việt Nam, trong giai đoạn đầu lưu hành biến thể Delta có ghi nhận dòng lưu hành chủ yếu là B.1.617.2 do phát hiện các ca nhiễm đầu tiên của đoàn chuyên gia Ấn Độ và Trung Quốc cách ly ở Yên Bái. Sau thời gian cách ly, đoàn chuyên gia đã di chuyển đến các tỉnh Vĩnh Phúc, Đà Nẵng, Hà Nội, Bắc Giang...khi trong đoàn đã có người mắc COVID-19, từ đây dịch bắt đầu lây lan ở Đà Nẵng, Hà Nội, Vĩnh Phúc. Trong giai đoạn này, biến thể AY.57 lưu hành phổ biến trên khắp các tỉnh/thành phố và đã gây ra các đợt bùng phát lớn ở Bắc Giang và Hà Nội.

Thực hiện chính sách kiểm soát nghiêm ngặt được áp dụng trong làn sóng dịch thứ 4 tại Việt Nam với việc hạn chế di chuyển nội địa cùng với việc kiểm soát biên giới chặt chẽ có thể là yếu tố quyết định làm cho biến thể AY.57 tập trung chủ yếu ở Việt Nam và giới hạn ở các tỉnh/ thành phố. Các virus lưu hành tại Việt Nam mang đầy đủ các đột biến quan trọng của biến thể Delta là D614G, L452R, P681R, T478K và có thêm các đột biến đặc trưng D142G trên protein S, P380S trên ORF1a, cùng với các đột biến khác trên protein M, ORF3a, ORF 7a, ORF 8, ORF 9b tạo nên biến thể AY.57.

Nghiên cứu xác định sự tiến hoá của biến thể Delta (B.1.617.2) thể hiện sự phân tách thành 3 dòng 21A; 21I và 21J tương đương với 9 biến thể (AY.54; AY.57; AY.60; AY.75; AY.80; AY.23; AY.79; AY.85; AY.122) lưu hành tại Việt Nam, trong đó biến thể AY.57 được xác định là biến thể đặc trưng cho Việt Nam. Biến thể AY.57 được GISAID ghi nhận lần đầu tiên phát hiện tại Việt Nam (tháng 4/2021) và sau đó được ghi nhận tại các nước khác trên thế giới. Sự đa dạng di truyền của biến thể Delta cũng được thể hiện khi phân tích cây phát sinh loài cho thấy có sự phân nhóm rõ ràng theo tỉnh/thành phố, tuy nhiên vẫn có sự giao thoa của các biến thể trong các địa phương xảy ra dịch. Sự xuất hiện các dòng cũng như sự tiến hoá phân tách dòng của biến thể Delta phản ánh quy mô dịch SARS-CoV-2 tại Việt Nam trong thời gian tháng 5-12/2021. Đó là một làn sóng dịch lớn nhất với số nhiễm lớn 1.727.398 và số tử vong 32.359, dịch xuất hiện trên toàn quốc và gây hậu quả nặng nề tại khu vực phía Nam, đặc biệt tại thành phố Hồ Chí Minh.

Mỗi biến thể đã phát triển thành một nhánh riêng: AY.23, AY.79 là nhánh virus lưu hành chính tại Singapore và Indonesia; AY.54 lưu hành chính tại Mỹ; AY.57 là nhánh virus lưu hành chính tại Việt Nam; AY.60, AY.75, AY.80, AY.122 là các biến thể virus lưu hành chính tại Châu Âu; AY.85 lưu hành chủ yếu tại Thái Lan (Bảng 4.1). Từ các thông tin này, có thể xác định được nguồn gốc của các biến thể lưu hành tại Việt Nam, đồng thời có thể so sánh được sự khác biệt giữa các virus lưu hành.



## KẾT LUẬN

### 1. Tỷ lệ dương tính SARS-CoV-2 trong các mẫu thu thập tại miền Bắc Việt Nam bằng phương pháp Realtime RT- PCR, 2020-2021

Trong 8 tháng đầu của đại dịch COVID-19 (1/2020-8/2020), tỷ lệ nhiễm SARS-CoV-2 tại 28 tỉnh/thành phố miền Bắc và một số tỉnh miền Trung Việt Nam là 1,0% với 251 mẫu dương tính.

Các trường hợp dương tính với SARS-CoV-2 được lấy mẫu liên tiếp 4 ngày/lần trong thời gian theo dõi, cách ly. SARS-CoV-2 tồn tại kéo dài khi hơn 50% mẫu thứ hai và 25% từ mẫu thứ ba vẫn dương tính.

Giá trị Ct và tải lượng virus được tiến hành như một công cụ để dự đoán độc lực của virus. Giá trị Ct trung bình của mẫu bệnh phẩm dương tính là 28 chu kỳ (IQR 22,3-32, 14-38). Giá trị tải lượng virus trung bình là  $8,4.10^7$  copies/ $\mu$ l (IQR:  $2,29.10^6$  -  $1,83.10^9$  copies/ $\mu$ l,  $1.95.10^3$  –  $4.95.10^{11}$ ), trong đó tải lượng virus ở mức cao có thể đóng vai trò cảnh báo để bắt đầu quá trình cách ly nhằm giảm khả năng lây truyền SARS-CoV-2.

Có mối tương quan chặt chẽ giữa giá trị Ct và tỷ lệ dương tính trong nuôi cấy virus, cho thấy rằng giá trị Ct có thể được sử dụng làm một tiêu chí xác định khả năng lây nhiễm SARS-CoV-2 trên người.

### 2. Đặc điểm phân tử của SARS-CoV-2 tại miền Bắc và miền Trung Việt Nam, 2020-2021

Trong giai đoạn 2020-2021, 12 dòng virus khác nhau của SARS - CoV-2 thuộc nhóm virus Vũ Hán và 3 biến thể Alpha, Beta, Delta được ghi nhận. Trong đó, nhóm virus Vũ Hán được xác định có 7 dòng (19A, 19B, 20A, 20B, 20C, 20D, 20E-EU1; biến thể Alpha (20I/501Y.V1) và biến thể Beta (20H/501Y.V2) có 1 dòng và biến thể Delta có 3 dòng (21A, 21I và 21J).

Trong năm 2020, dòng 20B lưu hành chủ yếu với 11 axit amin đột biến trên protein S, trong đó có đột biến D614G là đột biến quan trọng giúp protein S ổn định hơn, gắn chặt vào ACE-2 làm tăng khả năng lan truyền virus trong quần thể. Đây cũng là nguyên nhân chính của hai vụ dịch trong cộng đồng tại Hải Dương và Đà Nẵng năm 2020.

Biến thể Alpha/20I có nguồn gốc di truyền từ dòng 20B với 40 axit amin đột biến trên protein S đã tách nhánh để tạo thành một nhóm riêng biệt. Trong các vị trí đột biến, sự thay đổi tại vị trí N501Y đã làm thay đổi miền liên kết của protein S với thụ thể ACE-2 trên tế bào biểu mô đường hô hấp, dẫn đến khả năng lây truyền cao hơn so với các virus trước đó. Biến thể Alpha/20I là căn nguyên của 5 chùm ca bệnh

gây vụ dịch tại 4 tỉnh/thành phố Đà Nẵng, Hải Dương, Quảng Ninh, Hà Nam từ tháng 1/2021-4/2021.

Biến thể Delta với 3 dòng 21A, 21I và 21J được ghi nhận từ cuối tháng 4/2021. Các virus lưu hành tại Việt Nam mang đầy đủ các đột biến quan trọng của biến thể Delta là D614G, L452R, P681R, T478K và có thêm các đột biến đặc trưng D142G trên protein S, P380S trên ORF1a, cùng với các đột biến khác trên protein M, ORF3a, ORF 7a, ORF 8, ORF 9b tạo nên biến thể AY.57. Biến thể Delta/AY.57 (90,5%) chiếm ưu thế, đã được Pangoli ghi nhận là một dòng virus đặc trưng lưu hành tại Việt Nam.

### **KHUYẾN NGHỊ**

Từ những kết quả nghiên cứu trên chúng tôi đưa ra một số khuyến nghị sau:

1. Phát triển chiến lược giám sát SARS-CoV-2 thông qua giải trình tự gen thể hệ mới để tiếp cận với hệ thống giám sát dịch toàn cầu.
2. Phân tích các mối liên quan giữa bệnh cảnh lâm sàng và sự thay đổi trong hệ gen SARS-CoV-2 tại Việt Nam để có thể nghiên cứu sâu hơn về các đột biến có liên quan đến tình trạng tăng nặng và tử vong của bệnh

## DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ

- 1. Nguyen Vu Son**, Ung Thi Hong Trang, Hoang Vu Mai Phuong, Le Thi Thanh, Nguyen Co Thach, Nguyen Le Khanh Hang, Vuong Duc Cuong, Nguyen Phuong Anh, Tran Thi Thu Huong, Le Thi Quynh Mai (2022). Genetic variants of SARS-CoV-2 circulated from Northern and Central Vietnam from January 2020 - April 2021. Vietnam Journal of Preventive Medicine 2022; 32 (9): 62 – 71. DOI: <https://doi.org/10.51403/0868-2836/2022/924>.
- 2. Nguyễn Vũ Sơn**, Ứng Thị Hồng Trang, Hoàng Vũ Mai Phương, Vương Đức Cường, Nguyễn Phương Anh, Lê Thị Thanh, Lê Thị Quỳnh Mai, Nguyễn Lê Khánh Hằng (2023). Đặc điểm di truyền học của biến thể SARS-CoV-2 Delta lưu hành tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam, 2021. Tạp chí Y học dự phòng, 33 (6): 31-39. DOI: <https://doi.org/10.51403/0868-2836/2023/1379>.
- 3.** Hang Khanh Le Nguyen, **Son Vu Nguyen**, Phuong Mai Vu Hoang, Thanh thi Le, Huong thi Thu Tran, Long Hai Pham Nguyen, Thai Quang Pham, Thuy thanh Nguyen, Anh Duc Dang, Anh Phuong Nguyen and Mai thi Quynh Le (2021). Virological characteristics of cases of COVID-19 in northern Viet Nam, January–May 2020. Western Pacific surveillance and response, WPSAR Vol 12, No 4, 2021 | doi: 10.5365/wpsar.2021.12.4.833.
- 4.** Hoang Vu Mai Phuong, Ung Thi Hong Trang, **Nguyen Vu Son**, Le Thi Thanh, Nguyen Le Khanh Hang, Vuong Duc Cuong, Tran Thi Thu Huong, Pham Thi Hien, Nguyen Phuong Anh, Nguyen Co Thach, Le Thi Quynh Mai (2020). Detecting SARS-CoV-2 by Realtime RT-PCR in clinical samples collected in the North of Vietnam. Vietnam Journal of Preventive Medicine, 2020, 30 (9): 11-17. DOI: <https://doi.org/10.51403/0868-2836/2020/114>