

XÂY DỰNG QUY TRÌNH TRUNG HÒA GIẢM ĐÁM HOẠI TỬ XÁC ĐỊNH HIỆU GIÁ KHÁNG THỂ TRUNG HÒA VI RÚT SARS-CoV-2

Nguyễn Hoàng Quân¹, Huỳnh Thị Kim Loan¹, Đào Huy Mạnh¹, Huỳnh Phương Thảo¹,
Hoàng Thị Như Đào¹, Phạm Thị Thu Hằng¹, Vũ Phạm Hồng Châu¹, Nguyễn Hoàng Anh¹,
Nguyễn Trung Hiếu¹, Nguyễn Thị Ngọc Thảo¹, Nguyễn Vũ Thương¹, Phạm Duy Quang¹

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Trong năm 2021, Việt Nam ghi nhận 1.729.792 ca mắc COVID-19, trong đó 1.726.428 ca ghi nhận trong nước và 32.133 ca tử vong. Riêng giai đoạn 4, đã có hơn 1,7 triệu ca mắc, trên 32 nghìn ca tử vong. Kỹ thuật trung hòa giảm đám hoại tử (PRNT) là phương pháp chuẩn trong nghiên cứu huyết thanh học và đánh giá hiệu quả của vắc xin.

Mục tiêu: Chúng tôi tiến hành xây dựng quy trình PRNT phát hiện kháng thể trung hòa vi rút SARS-CoV-2 nhằm xét nghiệm chẩn đoán, giám sát, nghiên cứu bệnh tại Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh

Phương pháp: Quy trình thực hiện trên phiên nhựa 12 giếng, dùng tế bào Vero E6 với nồng độ là $2,5 \times 10^5$ tế bào/giếng, huyết thanh bệnh nhân được pha loãng bậc 2 từ độ pha loãng 1:10 và chủng vi rút được sử dụng nồng độ là $2,5 \times 10^3$ đơn vị tạo đám hoại tử (PFU)/mL.

Kết quả: Quy trình được đánh giá độ đặc hiệu trên 43 mẫu thu thập trước khi dịch xảy ra trong đó có 13 mẫu có kháng thể kháng Flavivirus. Quy trình không phản ứng với Flavivirus và các mẫu thu nhận trước vụ dịch. Quy trình tương đồng với phương diện hóa phát quang Anti-SARS-CoV-2 (ElecSys®, Roche) trên 80 mẫu với hệ số kappa $k = 0,53$; p (Mc Nemar test) = 0,108.

Từ khóa: xây dựng quy trình, PRNT, SARS-CoV-2, kháng thể trung hòa, plaque

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF THE PLAQUE REDUCTION NEUTRALIZATION TEST FOR QUANTIFYING THE TITER OF NEUTRALIZING ANTIBODY FOR SARS-CoV-2

Nguyen Hoang Quan, Huynh Thi Kim Loan, Dao Huy Manh, Huynh Phuong Thao,
Hoang Thi Nhu Dao, Pham Thi Thu Hang, Vu Pham Hong Chau, Nguyen Hoang Anh,
Nguyen Trung Hieu, Nguyen Thi Ngoc Thao, Nguyen Vu Thuong, Pham Duy Quang

* Ho Chi Minh City Journal of Medicine * Vol. 27 - No. 1 - 2024: 60 - 65

Background: In 2021, Viet Nam recorded 1,729,792 cases of COVID-19, of which 1,726,428 cases were recorded domestically and 32,133 deaths. In phase 4 alone, there have been more than 1.7 million cases and over 32 thousand deaths. It is generally accepted that the plaque reduction neutralization test (PRNT) is the gold standard method in serological studies and for the evaluation of vaccine efficacy.

Objective: We developed a standard procedure to quantify neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 for testing, diagnosis, surveillance, and research on SARS-CoV-2 at Pasteur Institute in Ho Chi Minh City

Methods: The assay procedure was performed on a 12-well plate, using Vero E6 cells cultured with a cell concentration of 2.5×10^5 cells/well. Patient's serum was log2-diluted from a 1:10 dilution, and the concentration of the virus strain used was 2.5×10^3 PFU/mL.

¹Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh

Tác giả liên lạc ThS. Nguyễn Hoàng Quân

ĐT: 0389937525

Email: hoangquan.khtn@gmail.com

Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh, 27(1):60-65. DOI: [10.32895/hcjm.m.2024.01.09](https://doi.org/10.32895/hcjm.m.2024.01.09)

Results: With regard to the evaluation of the specificity of PRNT, there was no cross-reactivity with Flavivirus and no reaction with 43 blood samples collected before the outbreak. By testing 80 sera, results of this procedure were relatively comparable to that of the Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 electroluminescence (Roche) ($k=0.53$, p (McNemar test) = 0.108).

Keywords: PRNT, SARS-CoV-2, plaque, neutralizing antibody

ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi rút SARS-CoV-2 thuộc họ Coronaviridae có cấu trúc hình cầu, nucleocapsid đối xứng xoắn ốc⁽¹⁾. Bộ gen của vi rút là axit ribonucleic (ARN) sợi đơn cực dương dài khoảng 26 đến 32 kilobase. Vi rút corona gồm các protein S tạo các gai trên bề mặt vi rút, protein E (Envelope), M (Membran) và N (Nucleocapsid)^(2,3).

Kỹ thuật trung hòa giảm đám hoại tử (PRNT) nhằm phát hiện kháng thể trung hòa SARS-CoV-2 bằng phương pháp đếm các đám hoại tử do vi rút gây ra. Mặc dù mối tương quan huyết thanh học của khả năng bảo vệ đối với bệnh COVID-19 phụ thuộc vào nhiều yếu tố, việc xác định kháng thể trung hòa bằng PRNT vẫn là một phương pháp quan trọng trong đánh giá hiệu quả của vắc xin. Kỹ thuật PRNT cho vi rút SARS-CoV-2 cũng đã được một số nghiên cứu công bố^(4,5,6). Để chủ động các kỹ thuật phục vụ các nghiên cứu về vaccine phòng bệnh do vi rút SARS-CoV-2 cũng như các nghiên cứu về đáp ứng miễn dịch với SARS-CoV-2 tại Việt Nam, nghiên cứu này nhằm mục đích xây dựng quy trình PRNT xác định hiệu giá kháng thể trung hòa vi rút SARS-CoV-2 sống.

ĐỐI TƯỢNG-PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Chúng vi rút SARS-COV-2 có mã Gen Bank: MT192773 do Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh cung cấp.

Huyết thanh dương là mẫu bệnh phẩm từ bệnh nhân dương tính SARS-CoV-2 thu thập sau 12 ngày kể từ ngày có kết quả realtime RT-PCR dương tính và thực hiện điện hóa quang dương tính. Huyết thanh âm là mẫu huyết thanh của người khỏe mạnh có xét nghiệm realtime RT-PCR âm tính và điện hóa quang âm tính.

80 mẫu huyết thanh từ bệnh nhân dương tính với SARS-CoV-2 được thu thập sau 12 ngày khỏi bệnh được dùng để đánh giá độ tương đồng.

43 mẫu huyết thanh của người hiến máu khỏe mạnh được thu thập vào năm 2017 được dùng để đánh giá độ đặc hiệu của phương pháp.

Phương pháp nghiên cứu

Nuôi cấy tế bào Vero E6 (VE6)

Sử dụng môi trường Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) (Gibco, 11965-092) có chứa 1% penicillin-streptomycin (Gibco, 15140-122), 2,5% Natri bicarbonate (Gibco, 25080-094), 2,5% Herpes (Gibco, 15630-080); môi trường tăng sinh bổ sung 10% huyết thanh bào thai bê (FCS), môi trường duy trì bổ sung 2% FCS. Dung dịch TrypLe (Gibco, 12604013) dùng cắt liên kết tế bào. Tế bào VE6 được nhân lên trên phiến nhựa 12 giếng với mật độ khảo sát là 2×10^5 , $2,5 \times 10^5$, 3×10^5 tế bào/mL. Sau 1 ngày nhân tế bào đạt mật độ hơn 70% được dùng cho phản ứng PRNT.

Tạo stock và chuẩn độ vi rút

Chúng vi rút SARS-COV-2 được phân lập từ mẫu bệnh phẩm đã được giải trình tự gen vi rút (mã Gen Bank: MT192773) (stock P1) để tạo stock vi rút P2 cho các thực nghiệm PRNT⁽⁷⁾.

Chuẩn độ vi rút để xác định hiệu giá PFU/mL của stock P2. Stock P2 được pha loãng bậc 10 từ 10^{-1} đến 10^{-6} và gây nhiễm vào phiến nhựa tế bào VE6 12 giếng với môi trường duy trì có 1% methylcellulose (MC) (Wako Pure Chemical Industry, 136-02155), ủ trong tủ ấm 37°C có 5% CO_2 . Quan sát thăm tế bào tạo plaque dưới kính hiển vi. Khi xuất hiện plaque, cố định tế bào bằng formaldehyd 10% và nhuộm tế bào bằng dung dịch methylene tetrahydrate 0,45%. Đếm số plaque hình thành để tính hiệu giá

PFU/mL = Số plaque trung bình x độ pha loãng x 1000/ thể tích sử dụng⁽⁸⁾.

Stock vi rút được theo dõi tính ổn định theo nhiệt độ: nhiệt độ phòng làm thực nghiệm, nhiệt độ 37°C làm phản ứng trung hòa và theo dõi độ ổn định trong 3 tháng bảo quản ở -70°C.

Thực hiện phản ứng trung hòa

Mẫu huyết thanh bất hoạt ở 56°C trong 30 phút và pha loãng bậc 2 từ độ pha loãng 1:10 trong môi trường DMEM có 2% FBS.

Stock P2 đã xác định hiệu giá được pha loãng đạt nồng độ $2,5 \times 10^3$ PFU/mL trong môi trường DMEM có 2% FBS. Sau khi pha huyết thanh và vi rút, trộn huyết thanh và vi rút theo tỉ lệ 1:1, ủ ở 37°C trong 1 giờ.

Phức hợp huyết thanh vi rút được cho vào mỗi giếng tế bào (50 μ L/giếng), mỗi độ pha loãng huyết thanh thực hiện trên 2 giếng, ủ 37°C và 5% CO₂ trong 1 giờ. Sau đó, phủ 1-2 mL môi trường duy trì có 1% MC/giếng, ủ plate tế bào ở 37°C, 5% CO₂. Theo dõi sự tạo plaque dưới kính hiển vi, tiến hành cố định plate khi plaque quan sát rõ ràng bằng cách thêm vào mỗi giếng 1 mL dung dịch formaldehyde 10% và ủ 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó, tiến hành nhuộm tế bào bằng 0,5mL/giếng dung dịch methylene tetrahydrate 0,45% (Wako, 131-06985). Để khô plate ở nhiệt độ phòng. Đếm số plaque tạo thành trên từng giếng và tính số plaque trung bình 2 giếng ở mỗi độ pha loãng huyết thanh

Huyết thanh chứng dương và chứng âm: Huyết thanh dương là mẫu bệnh phẩm từ bệnh nhân dương tính SARS-CoV-2 thu thập sau 12 ngày kể từ ngày có kết quả realtime RT-PCR dương tính và thực hiện điện hóa quang dương tính. Huyết thanh âm là mẫu huyết thanh của người khỏe mạnh có xét nghiệm realtime RT-PCR âm tính và điện hóa quang âm tính.

Đánh giá độ tương đồng giữa 2 phương pháp PRNT và điện hóa quang Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 Roche: Thực hiện 80 mẫu huyết thanh từ bệnh nhân dương tính với SARS-CoV-2 được thu thập sau 12 ngày.

Đánh giá độ đặc hiệu: Thực hiện trên 43 mẫu huyết thanh của người hiến máu khỏe mạnh được thu thập vào năm 2017, trước khi xảy ra dịch COVID-19 vào năm 2019. Trong 43 mẫu huyết thanh này, 13 mẫu đã xác định dương tính với kháng thể trung hòa *Flavivirus* bằng kỹ thuật PRNT.

Tính hiệu giá kháng thể trung hòa

Hiệu giá kháng thể trung hòa là độ pha loãng huyết thanh thấp nhất làm giảm 50% số lượng plaque so với giếng chứng (PRNT50). Số plaque giếng chứng đạt số lượng từ 20-150 plaque thì thực hiện tính kết quả. Phương pháp sử dụng hệ số kappa⁽⁹⁾ để đánh giá độ tương đồng giữa hai phương pháp PRNT và điện hóa quang Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 (Roche).

Y đức

Nghiên cứu này đã được thông qua Hội đồng Đạo đức Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh, số: 05/CN-PAS, ngày 21/2/2020.

KẾT QUẢ

Kết quả nuôi cấy tế bào Vero E6

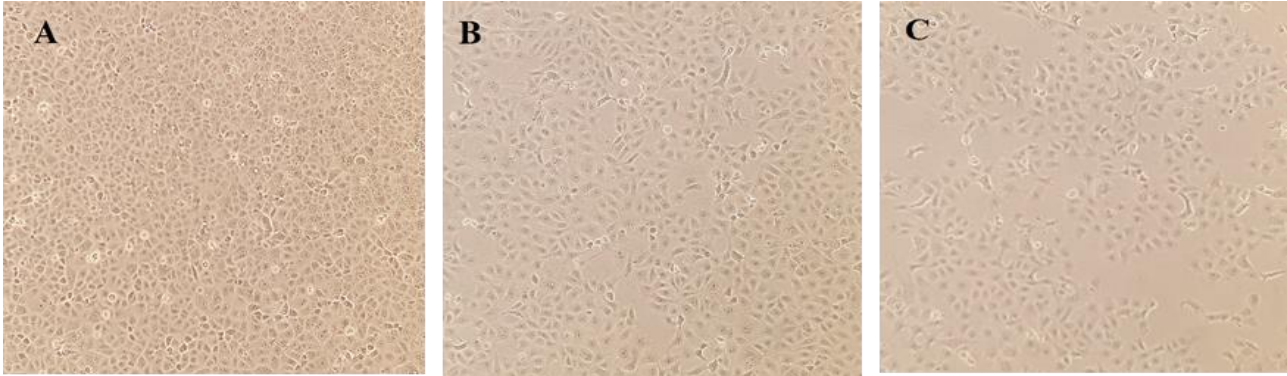
Tế bào VE6 được nhân ra phiến nhựa 12 giếng với mật độ $2,0 \times 10^5$, $2,5 \times 10^5$, $3,0 \times 10^5$ tế bào/mL sau 24 giờ nuôi cấy thì tỷ lệ tế bào phát triển dưới đáy giếng thành một lớp với mật độ tương ứng là 50%, >70% và >90% được quan sát (Hình 1).

Chọn mật độ tế bào $2,5 \times 10^5$ tế bào/mL để sử dụng (Hình 1B), mật độ này tạo thành một thảm tế bào kín cho giai đoạn duy trì tế bào trong 4 - 6 ngày. Đối với mật độ $2,0 \times 10^5$ tế bào/mL thì thảm tế bào không phủ kín (Hình 1C). Mật độ $3,0 \times 10^5$ tế bào/mL dễ bị long ra khi nhuộm (Hình 1A). Phiến nhựa 12 giếng được chuẩn bị với 1 mL tế bào $2,5 \times 10^5$ tế bào/mL mỗi giếng.

Kết quả tạo stock vi rút

Stock vi rút P1 được cấy trên chai tế bào VE6 để tạo stock vi rút P2. Hai chai tế bào 75cm² tạo được 30 ống vi rút stock P2 với thể tích 0,5mL/ống. Chuẩn độ stock vi rút P2 có hiệu giá là $5,8 \times 10^6$ PFU/mL. Bảng 2 trình bày kết quả khảo sát sự ổn định của stock P2 theo

nhiệt độ phòng và ở các điều kiện 37°C trong 1 giờ, 2 giờ và 3 giờ.



Hình 1. Tế bào vero E6 sau 1 ngày nuôi cấy: A) Mật độ 3,0×10⁵ tế bào/mL, B) Mật độ 2,5×10⁵ tế bào/mL và C) Mật độ 2,0×10⁵ tế bào/mL

Bảng 2. Kết quả theo dõi độ ổn định theo nhiệt độ phòng và nhiệt độ 37°C

Thời gian	0 giờ	1 giờ	2 giờ	3 giờ
Nhiệt độ phòng 37°C	5,8 × 10 ⁶	4,3 × 10 ⁶	3,7 × 10 ⁶	3,3 × 10 ⁶
		2,4 × 10 ⁶	1,4 × 10 ⁶	0,9 × 10 ⁶

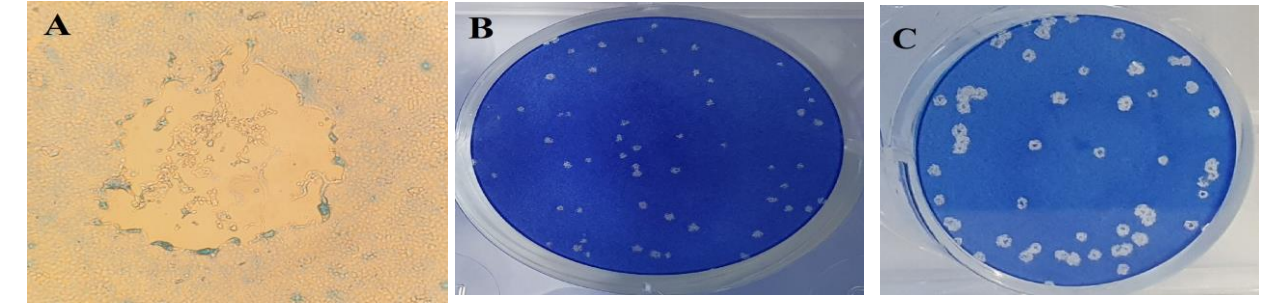
Khi bảo quản vi rút 37°C thì sau mỗi 1 giờ nồng độ vi rút giảm đi 50%. Trong khi đó ở điều kiện nhiệt độ phòng, vi rút chỉ giảm đi từ 20%-30% so với lượng vi rút ban đầu sau 1 giờ, sau đó thì lượng vi rút thay đổi không đáng kể. Như vậy, nhiệt độ và thời gian trực tiếp ảnh hưởng đến chất lượng của dung dịch vi rút làm việc. Nhiệt độ càng cao, thời gian càng lâu thì lượng vi rút sống sẽ giảm đi càng nhiều.

Để khảo sát sự ổn định của chủng vi rút trong điều kiện bảo quản -70°C, vi rút được bảo quản và được khảo sát nồng độ mỗi tháng trong vòng 3 tháng. Từ kết quả ban đầu là 5,8×10⁶ kết quả sau 1 tháng, 2 tháng và 3 tháng tương ứng là 5,6×10⁶, 5,5×10⁶, và 4,8×10⁶ PFU.

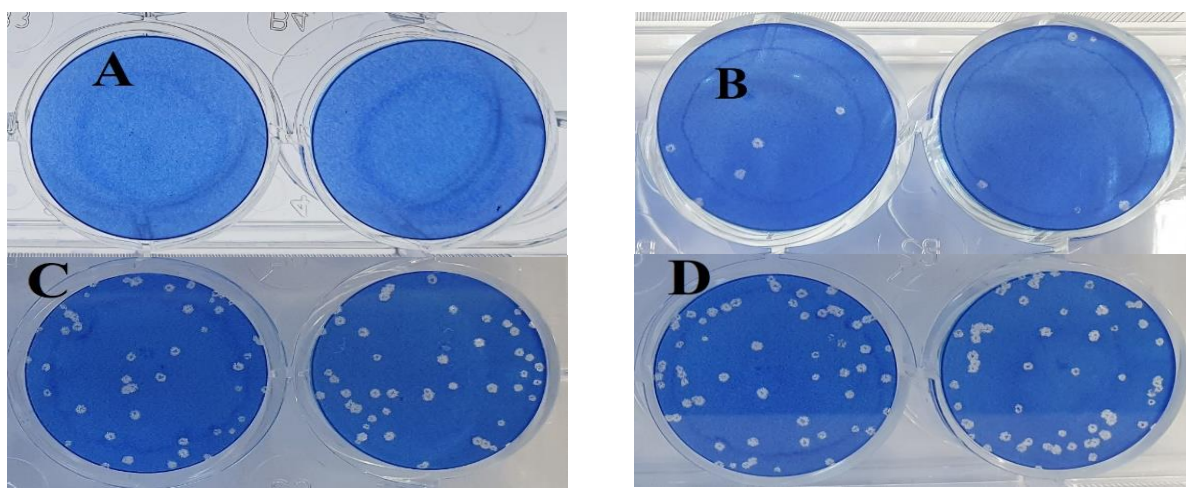
Trong 3 tháng lưu trữ -70°C, hiệu giá vi rút giảm lần lượt trong một, hai và ba tháng là 3,4%, 4,8% và 17,2%. Môi trường bảo quản vi rút có 2% FBS, nhiệt độ bảo quản là -70°C thì hiệu giá vi rút có thể giảm khoảng 10% (trung bình 3 tháng là 8,5%). Do đó, trong quá trình làm phản ứng PRNT, khi pha stock vi rút cần phải tính độ pha loãng phù hợp để đạt nồng độ vi rút cho thực nghiệm.

Kết quả xây dựng quy trình

Quy trình được được thực hiện trên mẫu chứng dương âm. Plaque được đếm vào các ngày 5, 6 và 7 sau khi gây nhiễm. Kết quả cho thấy sau 5 ngày có thể nhuộm để đếm plaque, kích thước plaque cũng tăng dần theo ngày nhuộm. Khi đọc plaque: kích thước plaque quá nhỏ khi đọc sẽ dễ bỏ sót plaque, kích thước plaque lớn thì bị chồng lấp các plaque với nhau. Dựa vào kích thước plaque hình thành, chọn ngày thứ 6 sau khi gây nhiễm để nhuộm tế bào (Hình 2).



Hình 2. Đám hoại tử khi quan sát: A) Quan sát dưới kính hiển vi. B) Plaque sau 5 ngày gây nhiễm. C) Plaque sau 6 ngày gây nhiễm. D) Plaque sau 7 ngày gây nhiễm



Hình 3. Kết quả thực hiện kỹ thuật trung hòa giảm đám hoại tử: A) Chứng tế bào. B) Chứng dương. C) Chứng âm. D) Chứng vi rút

Ở Hình 3: chứng vi rút có số plaque trên mỗi giếng lần lượt là 56 và 58, mẫu chứng âm số plaque là 49 và 50, mẫu chứng dương pha loãng 80 có số plaque là 5 và 5, mẫu chứng tế bào không xuất hiện plaque. Kết quả thu nhận được cho thấy mẫu chứng dương cho hiệu giá kháng thể trung hòa ở độ pha loãng là 1:80, mẫu chứng âm không cho hiệu giá kháng thể trung hòa.

Kết quả so sánh 2 phương pháp và đánh giá độ đặc hiệu

Trong số 80 mẫu huyết thanh bệnh nhân COVID-19, 35 mẫu âm tính và 45 mẫu dương tính bằng phương pháp điện hóa phát quang với Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 (Roche). Kết quả PRNT xác định được 38 mẫu dương tính và 42 mẫu âm tính được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả so sánh giữa PRNT và điện hóa phát quang Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 (Roche)

PRNT	Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 (Roche)		Tổng cộng
	Dương tính	Âm tính	
Dương tính	32	6	38
Âm tính	13	29	42
Tổng cộng	45	35	80

Kết quả thực hiện PRNT từ quy trình được xây dựng khá tương đồng với kết quả của phương pháp điện hóa phát quang với Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 (Roche) với hệ số kappa là 0,53 ($p=0,108$).

Không phát hiện kháng thể trung hòa vi rút SARS-CoV-2 ở 43 mẫu huyết thanh người hiến máu khỏe mạnh được thu thập từ năm 2017 bằng kỹ thuật PRNT. Như vậy, kỹ thuật PRNT được xây dựng không cho phản ứng chéo với kháng thể kháng *Flavivirus* và không cho phản ứng với các mẫu thu thập trước khi dịch bệnh xảy ra.

BÀN LUẬN

Quy trình PRNT có nhiều bước khác nhau do đó cần có sự tuân thủ nghiêm ngặt ở mỗi bước để tránh sai sót trong quá trình thực hiện. Việc sử dụng tế bào trong giai đoạn tăng trưởng và độ phủ khoảng 70% giếng để thực hiện PRNT giúp tối ưu kết quả đạt được.

Mặt khác, kết quả cho thấy nồng độ vi rút thay đổi theo thời gian và điều kiện bảo quản do đó cần kiểm tra nồng độ vi rút trong mỗi lần thực hiện. Khi thực hiện chuẩn độ hiệu giá vi rút cho PRNT, cần để vi rút ở 37°C 1 giờ trước khi gây nhiễm để điều kiện phản ứng giống như khi thực hiện PRNT⁽¹⁰⁻¹¹⁾.

Khi so sánh với phương pháp điện hóa phát quang của Roche thì có sự tương đồng giữa 2 phương pháp. Tuy nhiên trong có có 24% mẫu cho kết quả sai lệch giữa 2 phương pháp. 13 mẫu cho kết quả dương tính với phương pháp enzyme liên kết miễn dịch (ELISA) nhưng cho kết quả âm tính với PRNT.

Sự sai lệch này có thể do phương pháp điện hóa phát quang xác định giá trị kháng thể tổng sinh ra khi bệnh nhân nhiễm vi rút, tuy nhiên kháng thể này không trung hòa hoặc trung hòa chưa đạt đến 50% vi rút dẫn đến kỹ thuật PRNT cho kết quả âm tính. Có 6 mẫu phương pháp điện hóa phát quang cho kết quả âm tính nhưng kỹ thuật PRNT cho kết quả dương tính. Nguyên nhân dẫn đến sự sai lệch này có thể do phương pháp điện hóa phát quang dựa trên phản ứng sinh học kết hợp với phản ứng hóa học trong khi kỹ thuật PRNT dựa trực tiếp vào phản ứng sinh học nên sẽ hạn chế được các phản ứng trung gian trong quá trình xét nghiệm hơn so với điện hóa phát quang⁽⁹⁾.

KẾT LUẬN

Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh đã xây dựng quy trình PRNT phát hiện kháng thể trung hòa kháng vi rút SARS-CoV-2. Quy trình xét nghiệm được thực hiện trên phiến nhựa 12 giếng nuôi tế bào VE6 với nồng độ tế bào là $2,5 \times 10^5$ tế bào/ giếng, huyết thanh bệnh nhân được pha loãng bậc 2 bắt đầu từ 1:10, chủng vi rút được sử dụng với nồng độ là $2,5 \times 10^3$ PFU/mL. Quy trình đạt độ đặc hiệu cao và không cho phản ứng chéo với Flavivirus. Quy trình góp phần vào công tác xét nghiệm chẩn đoán cho giám sát, nghiên cứu huyết thanh học cũng như nghiên cứu vắc xin phòng chống bệnh do vi rút SARS-CoV-2.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Su S, Wong G, Shi W, Liu J, et al (2016). Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. *Trends Microbiol*, 24(6):490-502. doi: 10.1016/j.tim.2016.03.003.
2. Cavanagh D (2007). Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet Res*, 38(2):281 -297. doi: 10.1051/vetres:2006055.
3. Ismail MM, Tang AY, Saif YM (2003). Pathogenicity of turkey coronavirus in turkeys and chickens. *Avian Dis*, 47(3):515 - 522. doi: 10.1637/5917.
4. Muruato AE, Fontes-Garfias CR, Ren P, Garcia-Blanco MA, et al (2020). A high-throughput neutralizing antibody assay for Covid-19 diagnosis and vaccine evaluation. *Nat Commun*, 11(1):4059. doi: 10.1038/s41467-020-17892-0.
5. Okba NMA, Müller MA, Li W, Wang C, et al (2020). Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2-specific antibody responses in coronavirus disease patients. *Emerg Infect Dis*, 26(7):1478 - 1488. doi: 10.3201/eid2607.200841.
6. Perera RAPM, Ko R, Tsang OTY, Hui DSC, et al (2021). Evaluation of a SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test for detection of antibody in human, canine, cat and hamster sera. *J Clin Microbiol*, 59(2):e02504-e02520. doi: 10.1128/JCM.02504-20.
7. Lan T. Phan, Thuong V. Nguyen, et al (2020). Clinical features, isolation, and complete genome sequence of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 from the first two patients in Vietnam. *Journal of Medical Virology*, 92(10):2209-2215. doi: 10.1002/jmv.26075.
8. Baer A, Kehn-Hall K (2014). Viral concentration determination through plaque assays: using traditional and novel overlay systems. *J Vis Exp*, (93):e52065. doi: 10.3791/52065.
9. Đỗ Huy Mạnh (2011). Hoàn thiện quy trình tinh chế kháng thể đơn dòng ỉ sản xuất cộng hợp 6B6C gắn enzyme HRP dùng trong bộ kit MAC-ELISA xét nghiệm sốt xuất huyết Dengue. *Luận văn thạc sĩ Sinh học*, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Thành phố Hồ Chí Minh.
10. Bewley KR, et al (2021). Quantification of SARS-CoV-2 neutralizing antibody by wild-type plaque reduction neutralization, microneutralization and pseudotyped virus neutralization assays. *Nature protocol*, 16(6):3114-3140. doi: 10.1038/s41596-021-00536-y.
11. Zhou P, Fan H, Lan T, Yang XL, et al (2018). Fatal swine acute diarrhoea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin. *Nature*, 556(7700):255-258. doi: 10.1038/s41586-018-0010-9.

Ngày nhận bài: 24/03/2024

Ngày chấp nhận đăng bài: 09/05/2024

Ngày đăng bài: 14/05/2024