

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT REAL-TIME PCR ĐỂ CHẨN ĐOÁN NHANH CÚM A/H5N1 VÀ VIRUS HỢP BÀO ĐƯỜNG HÔ HẤP

Nguyễn Tiến Minh¹, Dương Văn Cường¹, Phạm Minh Tuấn¹, Nguyễn Thanh Liêm², Ngô Thị Thi², Phạm Việt Hùng², Phùng Thị Bích Thủy², Cao Việt Tùng², Lê Thanh Hòa¹, Đồng Văn Quyền¹, Đinh Duy Kháng¹, Lê Trần Bình¹

¹Viện Công nghệ Sinh học

²Bệnh viện Nhi Trung ương

TÓM TẮT

Trong những năm vừa qua, dịch cúm gia cầm đã trở thành một thảm họa cho nước ta và một số nước trong khu vực. Cúm gia cầm đã tác động nghiêm trọng đến tốc độ tăng trưởng kinh tế và phát triển bền vững của nhiều quốc gia. Ngoài ra, sự tiềm ẩn một nguy cơ biến đổi của chủng cúm gia cầm để có thể gây ra đại dịch cũng là điều được cả thế giới quan tâm. Để phòng chống căn bệnh nguy hiểm này đòi hỏi phải có một phương pháp chẩn đoán nhanh sự lây nhiễm virus cúm A/H5N1 để đưa ra phác đồ điều trị hiệu quả, giúp giảm thiểu các ca tử vong và cung cấp các thông tin kịp thời cho công tác phòng chống dịch. Trong nghiên cứu này, chúng tôi công bố kết quả ứng dụng kỹ thuật Real-time PCR để chẩn đoán cúm A/H5N1 và RSV. Kết quả cho thấy, sử dụng kỹ thuật Real-time PCR với cặp mồi đặc hiệu thuộc gen MA, gen H5 của virus cúm A/H5N1, và gen mã hóa protein dung hợp của virus RSV có thể phát hiện nhanh các tác nhân gây bệnh nguy hiểm này trong vòng 2 h. Đặc biệt, sử dụng kỹ thuật multiplex Real-time PCR với hai cặp mồi đặc hiệu thuộc gen MA và gen H5 của virus cúm A/H5N1 có thể phát hiện cùng một lúc cúm type A và phân type H5. Kết quả này có ý nghĩa thực tiễn to lớn, giúp rút ngắn đáng kể thời gian chẩn đoán cúm A/H5N1 cũng như tiết kiệm được hoá chất, sinh phẩm trong nghiên cứu.

Từ khóa: Chẩn đoán nhanh, gen MA, gen H5, Real-time PCR, virus cúm A/H5N1, virus hợp bào đường hô hấp

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

Cúm gà là một bệnh truyền nhiễm cấp tính của các loài chim, kể cả gia cầm và thủy cầm, do các phân type khác nhau thuộc nhóm virus cúm A, họ Orthomyxoviridae gây nên (Gorman *et al.*, 1992). Biến chủng virus cúm gây bệnh ở gia cầm được chia theo tính gây bệnh với hai mức độ độc lực khác nhau (Horimoto, Kawaoka, 2001; Mo *et al.*, 1997). Nguy cơ về một đại dịch sẽ bùng phát lại khi từ cuối năm 2003 đến đầu năm 2004, dịch cúm gia cầm đã lan rộng ra nhiều nước châu Á bao gồm Hàn Quốc, Nhật Bản, Trung Quốc, Việt Nam, Campuchia, Lào, Thái Lan và Indonesia. Tại các nước này, hàng triệu gia cầm đã bị chết và bị tiêu hủy do nhiễm virus cúm A/H5N1. Đáng lo ngại hơn khi H5N1 có thể nhiễm từ gia cầm sang người với các triệu chứng lâm sàng rất trầm trọng và gây ra nhiều ca tử vong. Tính đến nay, virus H5N1 đã vượt ra khỏi phạm vi châu Á và lan sang cả các nước châu Âu như Rumani, Nga, Thụy Điển, Thổ Nhĩ Kỳ ... Theo thống kê của tổ chức Y tế thế giới (WHO), tính đến giữa tháng

9/2007 đã có 328 trường hợp mắc bệnh, trong đó có 200 trường hợp tử vong do virus A/H5N1.

WHO luôn lo ngại về một đại dịch cúm có thể xảy ra trên phạm vi toàn cầu và đã kêu gọi các nước cùng hợp tác trong phòng chống dịch cúm gia cầm H5N1. Rất nhiều công trình nghiên cứu về virus cúm A/H5N1, nhằm tìm ra liệu pháp điều trị cũng như phát triển được các vaccine dự phòng đã được tiến hành (Jain, 2006; Capua, Marangon, 2006). Bên cạnh đó, việc phát triển các phương pháp chẩn đoán nhanh, nhạy, và chính xác sự lây nhiễm của virus nguy hiểm này cũng thu hút được sự quan tâm của nhiều phòng thí nghiệm và các nhà khoa học trên toàn thế giới. Rất nhiều nghiên cứu đã thành công trong việc ứng dụng các kỹ thuật sinh học phân tử như PCR, Real-time PCR, các phương pháp miễn dịch... để chẩn đoán sự lây nhiễm của virus cúm (Valle *et al.*, 2006; Hoffmann *et al.*, 2007). Trong các công trình nghiên cứu trước đây, chúng tôi đã nghiên cứu tách dòng, giải mã và phân tích các gen thuộc bộ gen của virus cúm A/H5N1 phân lập trong nước (Nguyễn Tiến Minh *et al.*, 2004; Lê Thanh Hòa

et al., 2006).

Virus hợp bào hô hấp (RSV) là một tác nhân virus gây bệnh đường hô hấp quan trọng. Trẻ em dưới 2 tuổi bị nhiễm trùng hô hấp cấp do RSV có thể chiếm tới 20% còn từ 5 - 10 tuổi là 10% trong tổng số các trường hợp nhiễm trùng hô hấp. RSV có khả năng lây lan rất nhanh, nhất là trong môi trường tập thể, gia đình và có thể gây thành dịch. Ở Việt Nam, hàng năm vẫn xảy ra dịch nhiễm trùng đường hô hấp cấp do virus RSV, chiếm khoảng 10 - 38% ở trẻ em, trong đó khoảng 4% trường hợp dẫn đến tử vong, ước tính khoảng 20.000 trẻ em tử vong mỗi năm. Các triệu chứng nhiễm trùng RSV rất giống với cúm, vì vậy khi có dịch cúm như hiện nay thì chẩn đoán phân biệt là hết sức cần thiết.

Trong công trình này, chúng tôi nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật Real-time PCR, Multiplex Real-time PCR để chẩn đoán nhanh virus cúm A và virus hợp bào hô hấp.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Tách chiết RNA tổng số và tổng hợp cDNA

RNA tổng số được tách từ dịch phổi của bệnh nhân nhiễm virus cúm A/H5N1 bằng dung dịch Trizol của hãng Invitrogen theo quy trình hướng dẫn (www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/15596026.pdf). cDNA được tổng hợp nhờ bộ sinh phẩm SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR của hãng Invitrogen, sử dụng mỗi ngẫu nhiên (random primer). Real-time PCR được tiến hành với thiết bị LightCycler 2.0 và bộ sinh phẩm LightCycler FastStar DNA Master^{Plus} SYBR Green I của Roche.

Các cặp mồi dùng trong nghiên cứu

Cặp mồi xác định cúm type A:

CumART1: 5'-CTTCTAACCGAGGTGCAAACG-3';

CumART2: 5'-AGGGCATTTTGGACAAAKCGTCA-3'.

Cặp mồi xác định phân type cúm H5:

H5RT1: 5'-ACCCAACCACTATRTTTCCG-3';

H5RT2: 5'-TCTCTTTGAGGGCTATTTCTGAGG-3'.

Cặp mồi xác định virus hợp bào:

RSVRT1: 5'-AACAGTTTAACATTACCAAGTGA-3';

RSVRT2: 5'-TCATTGACTTGAGATATTGATGC-3'.

Chương trình phản ứng Real-time PCR

Bước 1: Biến tính (denaturation) 95°C trong thời gian 5 phút. Bước 2: Chu trình lặp lại (cycling) 45 chu kỳ (95°C trong 5 giây, 58°C trong 5 giây, 72°C trong 15 giây). Bước 3: Xác định nhiệt độ nóng chảy (Melting Curves) của sản phẩm Real-time PCR, 95°C, 65°C trong thời gian 30 giây, 95°C. Bước 4: Làm mát sản phẩm Real-time PCR, 40°C trong thời gian 30 giây.

Đối với kỹ thuật Real-time PCR thông thường, sử dụng từng cặp mồi riêng rẽ và khuôn là cDNA tách từ bệnh phẩm. Tuy nhiên, đối với kỹ thuật multiplex Real-time PCR để xác định đồng thời type A và phân type H5, chúng tôi đã sử dụng đồng thời hai cặp mồi đặc hiệu type khuếch đại đoạn gen M và đặc hiệu phân type khuếch đại gen H5.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ứng dụng kỹ thuật Real-time-PCR để chẩn đoán cúm type A và phân type H5

Sử dụng phương pháp Real-time PCR để chẩn đoán virus cúm A và phân type H5N1 thuộc virus cúm type A có thể rút ngắn thời gian từ 6 h xuống còn 2 h với độ chính xác cao hơn so với phương pháp PCR thông thường. Real-time PCR còn có thể phân biệt được hai đoạn DNA có kích thước không khác biệt nhau nhiều nhờ phân tích điểm nóng chảy của sản phẩm PCR. Do đó, có thể tránh được các trường hợp dương tính giả đôi khi gặp phải với kỹ thuật PCR thông thường. Với cặp mồi CumART1, CumART2 khuếch đại gen MA, sản phẩm PCR thu được có kích thước tính theo lý thuyết là 245 bp và có điểm nóng chảy là 86,1°C. Trong khi đó cặp mồi H5RT1, H5RT2 khuếch đại gen H5, sản phẩm PCR thu được có kích thước tính theo lý thuyết là 394 bp và có điểm nóng chảy là 81,2°C. Sau khi tạo cDNA, mẫu cDNA được chia thành 3 ống để xác định độc lập cúm type A, phân type cúm H5 bằng Real-time PCR và một ống xác định đồng thời type A và phân type H5 bằng multiplex Real-time PCR. Kết quả ở hình 1 cho phép chúng tôi giả định rằng các cặp mồi và chương trình phản ứng PCR là tối ưu; các gen MA của cúm A, gen H5 của phân type H5N1 và gen mã hóa cho protein dung hợp của virus hợp bào hô hấp đã được khuếch đại đặc hiệu.

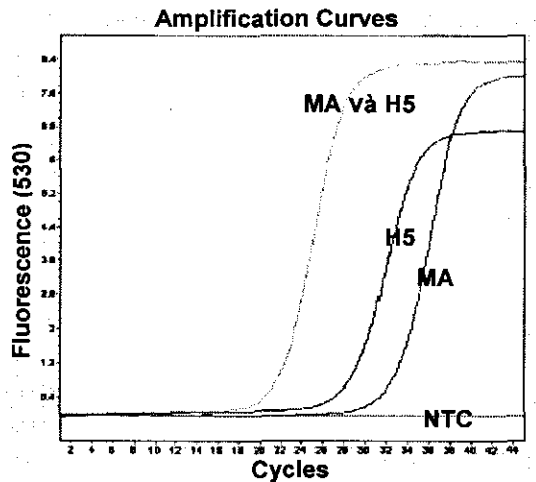
Tuy nhiên, để khẳng định kết quả này, chúng tôi

phân tích đường cong nóng chảy (Melting Curves) của sản phẩm PCR. Như đã nêu ở trên, sản phẩm PCR có kích thước khác nhau có thể sẽ có nhiệt độ nóng chảy khác nhau. Kết quả phân tích đường cong nóng chảy được nêu ở hình 2.

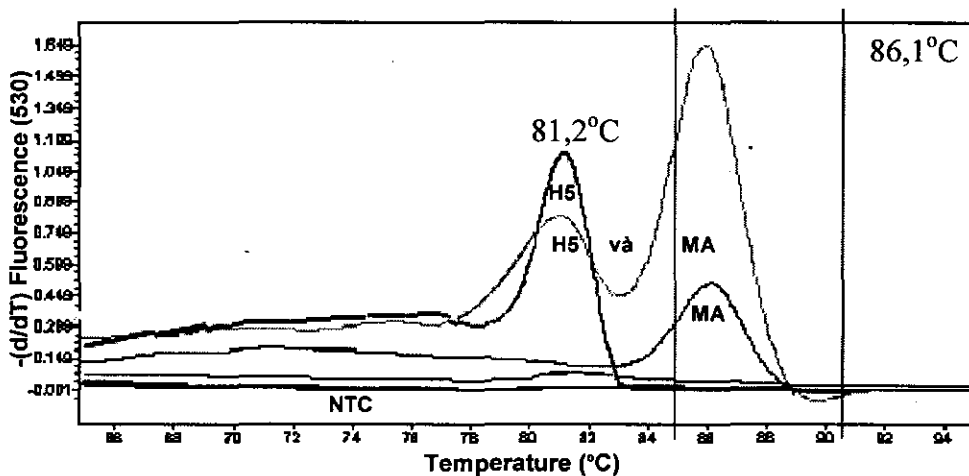
Ứng dụng kỹ thuật multiplex Real-time PCR để chẩn đoán đồng thời cúm type A và phân type H5

Việc chẩn đoán nhanh và chính xác các tác nhân gây bệnh để từ đó đưa ra các phác đồ điều trị luôn là mục tiêu của các phòng thí nghiệm. Trong công trình này, chúng tôi nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật

Multiplex Real-time PCR để phát hiện đồng thời cúm type A và phân type H5. Sử dụng đồng thời hai cặp mồi CumART1, CumART2 đặc hiệu cho cúm A và H5RT1, H5RT2 đặc hiệu cho phân type H5, bằng kỹ thuật multiplex Real-time PCR chúng tôi đã phát hiện đồng thời cúm type A và phân type H5. Điều này còn có ý nghĩa thực tiễn rất lớn, giúp tiết kiệm hóa chất, sinh phẩm và đặc biệt là thời gian cần thiết cho quá trình xét nghiệm. Kết quả này còn được phân tích tiếp bằng điện di trên gel agarose 1% để kiểm tra sản phẩm PCR trong các ống phản ứng. Kết quả kiểm tra được nêu trong hình 3.

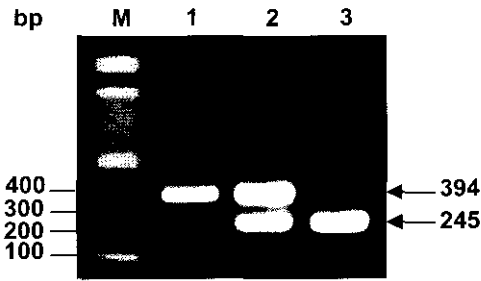


Hình 1. Đồ thị biểu hiện cường độ phát huỳnh quang của SYBR Green I đo ở bước sóng 530 nm tăng lên qua mỗi chu kỳ PCR. Mẫu âm tính (NTC) để tạo tín hiệu nền. Mẫu MA chạy bằng cặp mồi CumART1, CumART2 để phát hiện cúm type A. Mẫu H5 chạy bằng cặp mồi H5RT1, H5RT2 để phát hiện phân type H5. Mẫu MA và H5 chạy bằng cả hai cặp mồi CumART1, CumART2 và H5RT1, H5RT2 phát hiện đồng thời cúm type A và phân type H5.



Hình 2. Đường cong biểu thị nhiệt độ nóng chảy của sản phẩm PCR (Melting Curve). Mẫu âm tính (NTC) để tạo tín hiệu nền. Mẫu MA chạy bằng cặp mồi CumART1, CumART2 để phát hiện cúm type A. Mẫu H5 chạy bằng cặp mồi H5RT1, H5RT2 để phát hiện phân type H5. Mẫu MA và H5 chạy bằng cả hai cặp mồi CumART1, CumART2 và H5RT1, H5RT2 phát hiện đồng thời cúm type A và phân type H5.

Đúng như dự đoán của chúng tôi, khi phân tích đường cong nóng chảy, sản phẩm PCR của gen MA và gen H5 có nhiệt độ nóng chảy khác biệt nhau tương ứng 86,1°C và 81,2°C được biểu thị bằng 2 đỉnh tách biệt nhau. Dựa vào kết quả này chúng tôi có thể xác định được các mẫu nhiễm virus cúm A và mẫu nhiễm phân type H5 của cúm A.

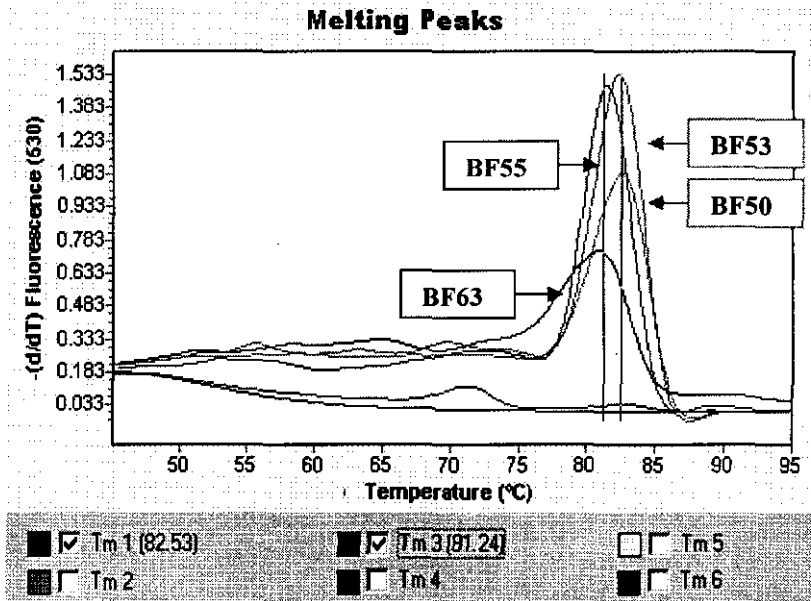


Hình 3. Sản phẩm sau khi thực hiện Real-time PCR và Multiplex Real-time PCR bằng điện di trên gel agarose 1%. M: Marker DNA 100 bp; 1: Sản phẩm khuếch đại đoạn gen H5 (phát hiện phân type H5) bằng cặp mồi H5RT1, H5RT2; 2: Sản phẩm khuếch đại đoạn gen M (phát hiện cúm type A) bằng cặp mồi CumART1, CumART2; 3: Sản phẩm khuếch đại cả hai đoạn gen H5 và MA (phát hiện đồng thời cúm type A và phân type H5) bằng Multiplex Realtime PCR khi chạy với cả hai cặp mồi.

Kết quả điện di trên gel agarose (Hình 3) hoàn toàn trùng hợp với kết quả ghi nhận tín hiệu phát quang nhờ hệ thống LightCycler 2.0. Điều này khẳng định lại một lần nữa độ chính xác của kỹ thuật Real-time PCR.

Ứng dụng kỹ thuật Real-time PCR để chẩn đoán virus hợp bào hô hấp (RSV)

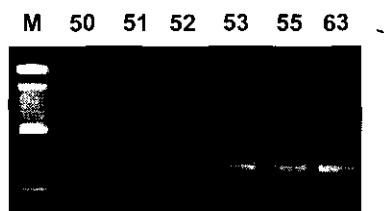
Virus hợp bào hô hấp là một trong những nguyên nhân chính gây bệnh viêm phổi hoặc viêm cuống phổi ở trẻ sơ sinh và trẻ em dưới một tuổi. RSV cũng gây ra một số triệu chứng lâm sàng giống các triệu chứng do H5N1 gây ra. Vì vậy, việc chẩn đoán virus này cũng rất cần thiết để đưa ra phác đồ điều trị phù hợp. Nhiều phương pháp chẩn đoán RSV đã được phát triển, bao gồm phương pháp phân lập virus, phát hiện kháng nguyên virus, phát hiện RNA, phát hiện sự gia tăng kháng thể trong huyết thanh... Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật Real-time PCR để phát hiện RSV với các bệnh phẩm là dịch tiết đường hô hấp thu nhận từ người bệnh có dấu hiệu hô hấp cấp. Phương pháp nghiên cứu được tiến hành tương tự như đối với cúm, tuy nhiên sử dụng cặp mồi RSVRT1, RSVRT2 để khuếch đại gen mã hóa protein dung hợp đặc hiệu cho RSV. Sản phẩm PCR được khuếch đại tính theo lý thuyết có độ dài 380 bp và có nhiệt độ nóng chảy là 82,53°C. Kết quả phát hiện RSV bằng Real-time PCR được nêu trong hình 4.



Hình 4. Kỹ thuật Real-time PCR phát hiện RSV trong 6 mẫu bệnh phẩm (BF) từ bệnh nhi có triệu chứng hô hấp cấp.

Trong số 6 mẫu, 2 mẫu (BF51, BF52) không có tín hiệu phát quang; 4 mẫu (BF50, BF53, BF55 và BF63) cho tín hiệu phát quang. Tuy nhiên chỉ có 2 mẫu BF50 và BF53 cho nhiệt độ nóng chảy đúng với nhiệt độ nóng chảy của sản phẩm khuếch đại từ RSV tính theo lý thuyết (82,53°C). Các mẫu BF55 và BF63 cho nhiệt độ nóng chảy thấp hơn (81,24°C). Như vậy có khả năng đây là sản phẩm phụ hình thành trong quá trình chạy PCR.

Tương tự như đối với cúm, chúng tôi tiến hành kiểm tra sản phẩm PCR sau khi chạy Real-time PCR bằng điện di trên gel agarose 1%.



Hình 5. Sản phẩm sau khi chạy Real-time PCR phát hiện RSV trong các mẫu bệnh phẩm BF50, BF51, BF52, BF53, BF55, BF63, bằng điện di trên gel agarose 1%.

Kết quả ở hình 5 một lần nữa khẳng định ưu điểm của kỹ thuật Real-time PCR trong chẩn đoán cúm so với các phương pháp sinh học phân tử khác như kỹ thuật PCR thông thường. Kết quả phản ánh đúng với kết quả của Real-time PCR. Các mẫu bệnh phẩm BF51, BF52 không cho sản phẩm PCR; các mẫu BF50, BF53, BF55, BF63 cho sản phẩm PCR rất giống nhau. Vì vậy, nếu chỉ bằng PCR bình thường rất dễ đi đến kết luận cả bốn mẫu này đều dương tính với RSV. Real-time PCR có độ nhạy và độ chính xác cao hơn, giúp hạn chế các kết quả dương tính giả của các phương pháp chẩn đoán khác. Kết quả này có ý nghĩa vô cùng quan trọng trong việc đưa ra các phác đồ điều trị, giúp giảm thiểu thiệt hại và nguy cơ tử vong gây ra bởi virus cúm.

Để khẳng định lại một cách chắc chắn, chúng tôi đã tách dòng và giải trình tự hai mẫu đại diện là BF50 và BF55. Kết quả cho thấy, mẫu BF50 đúng là trình tự đoạn gen mã hóa protein dung hợp của RSV với độ tương đồng cao (98%) so với các trình tự tương ứng công bố trong Ngân hàng gen quốc tế. Trong khi đó mẫu BF55 chính là một đoạn DNA được khuếch đại từ nhiễm sắc thể thứ 3 của người.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phát triển thành công kỹ thuật Real-time PCR để phát hiện nhanh và chính xác virus cúm A và RSV từ các bệnh phẩm của bệnh nhân viêm đường hô hấp cấp. Đặc biệt, ứng dụng kỹ thuật Multiplex Real-time PCR, sử dụng 2 cặp mồi đặc hiệu cho gen MA và gen H5, chúng tôi có thể phát hiện đồng thời cúm type A và phân type H5 trong một lần xét nghiệm.

Lời cảm ơn: Để hoàn thành công trình này, chúng tôi đã nhận được kinh phí từ đề tài độc lập cấp nhà nước "Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng, dịch tễ học, phương pháp chẩn đoán sớm, phác đồ điều trị hiệu quả và dự phòng bệnh viêm đường hô hấp cấp do virus H5N1, virus cúm A và virus hợp bào hô hấp ở Việt Nam" do PGS. TS. Nguyễn Thanh Liêm chủ nhiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Capua I, Marangon S, (2006) Control of avian influenza infections in poultry with emphasis on vaccination. *Expert Rev Anti Infect Ther* 4(5): 751-757. Review.
- Gorman OT, Bean WJ, Webster RG (1992) Evolutionary processes in influenza viruses: divergence, rapid evolution and stasis. *Curr Top Microbiol* 172: 75-97.
- Hoffmann B, Harder T, Starick E, Depner K, Werner O, Beer M (2007) Rapid and highly sensitive pathotyping of avian influenza A H5N1 virus by using Real-Time reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 45(2): 600-603.
- Horimoto T, Kawaoka Y (2001) Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. *Clin Microbiol Rev* 14(1): 129-149.
- Jain AK (2006) Avian human influenza: diagnosis, case management and treatment. *J Indian Med Assoc* 104(7): 372, 374-376, 378.
- Lê Thanh Hòa, Nguyễn Thị Bích Nga, Đinh Duy Kháng, Phan Văn Chí, Nông Văn Hải, Trương Nam Hải, Lê Trần Bình (2006) Nghiên cứu biến đổi thành phần H5 của virus cúm A/H5N1 của vịt An Giang trên cơ sở so sánh với các chủng trong khu vực. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 4(1): 23-30.
- Mo IP, Brugh M, Fletcher OJ, Rowland GN, Swayne DE (1997) Comparative pathology of chickens experimentally inoculated with avian influenza viruses of low and high pathogenicity. *Avian Dis* 41: 125-136.
- Nguyễn Tiến Minh, Bạch Thị Như Quỳnh, Nguyễn Thị

Ngọc Diệp, Bùi Hoàng Anh, Dương Hồng Quân, Nguyễn Thị Hồng Hạnh, Nguyễn Thị Thu Trang, Nguyễn Thanh Liêm, Nông Văn Hải, Lê Thanh Hòa, Đinh Duy Khang, Lê Trần Bình (2004) Tách dòng, xác định trình tự và phân tích gen mã hóa Hemagglutinin (HA) của virus cúm A (H5N1) từ một bệnh nhân. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 2(3): 279-286.

Valle L, Amicizia D, Bacilieri S, Banfi F, Riente R, Durando P, Sticchi L, Gasparini R, Esposito C, Icardi G, Ansaldi F (2006) Performance testing of two new one-step real time PCR assays for detection of human influenza and avian influenza viruses isolated in humans and respiratory syncytial virus. *J Prev Med Hyg* 47(4): 127-133.

APPLICATION OF REAL-TIME PCR FOR RAPID DETECTION OF INFLUENZA A AND RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS

Nguyen Tien Minh¹, Duong Van Cuong¹, Pham Minh Tuan¹, Nguyen Thanh Liem², Ngo Thi Thi², Pham Viet Hung², Phung Thi Bich Thuy², Cao Viet Tung², Le Thanh Hoa¹, Dong Van Quyen¹, Dinh Duy Khang^{1,*}, Le Tran Binh¹

¹*Institute of Biotechnology*

²*National Institute of Pediatrics*

SUMMARY

In the past few years, avian influenza outbreaks have been disaster for Vietnam and for some countries in the region. Avian influenza impacts seriously on the economic and sustainable development of many countries. In addition, an implicit threat of avian influenza change in the antigenicity and pathogenicity leading to the influenza pandemics has been also high on the agenda of the world. Therefore, in order to protect us from being infected by influenza virus, a method for rapid detection of this virus is urgently needed. In this study, we have applied Real-time PCR for detection of influenza virus and respiratory syncytial virus (RSV), which are currently spreading in Vietnam. As regard to influenza, primers were designed to amplify specific sequences of gene MA and gene H5 of A/H5N1 influenza viruses. While for RSV, primers were directed to region of a gene encoding fusion protein. The results showed that using real-time-PCR assay on the LightCycler 2.0 system with above mentioned primers, we could rapidly detect influenza A and the H5 avian influenza hemagglutinin (HA) subtype, and RSV within two hours. Particularly, we have developed a multiplex Real-time-PCR (RT-PCR) assay for the simultaneous detection and typing of influenza A and the H5 avian influenza hemagglutinin (HA) subtype.

Keywords: *A/H5N1 influenza virus, H5 gene, MA gene, Real-time PCR, respiratory syncytial virus, rapid diagnosis*

* Author for correspondence: Tel: 84-4-7563386; Fax: 84-4-8363144; E-mail: khangvspt@ibt.ac.vn