

## STUDY ON APPLYING RT-PCR METHOD IN IDENTITY JAPANESE ENCEPHALITIS LIVE ATTENUATED VACCINE

Nguyen Viet Anh\*, Do Thi Hong Anh, Nguyen Thi Ha,  
Tran Thi Phuong, Nguyen Thi Ly

*National Institute for Control of Vaccines and Biologicals*

*Received 3 January 2023*

*Accepted 2 April 2023*

**Abstract:** Identity antigen in vaccine is one of the requests for quality control of vaccine originated from virus or virus particles in which Reversed transcription Polymerase Chain Reaction method (or known as RT-PCR) is used widely. Electrophoresis is carried out for PCR product and read the result under UV light. Therefore, we perform a study to apply RT-PCR method in identity test of a live, attenuated Japanese encephalitis vaccine (IMOJEV) from Sanofi Pasteur and evaluate specific indicator to aim to reduce procedure, timing, chemicals and consumables expense. The results were shown that primers were designed to fit and specific to Japanese encephalitis (JE) virus. The size of RT-PCR product was 458 bp, electrophoresis bands were clear, specific to JE virus and unspecific to other live virus that parallelly joined in this study. Therefore, we can conclude that the identity procedure for IMOJEV vaccine was carried out and optimized based on condition and chemicals of Department of Quality control of viral vaccine. Research result shows the suitability and specificity of primers for JE vaccine and they can be applied for future study at Department of Quality control of viral vaccine in National Institute for Control of Vaccines and Biologicals (NICVB).

*Keywords: Identity, vaccine, Japanese Encephalitis, RT-PCR method, specific indicator.*

---

\* Corresponding author  
*E-mail address:* [anhnv.3010@gmail.com](mailto:anhnv.3010@gmail.com)  
<https://doi.org/10.56086/jcvb.v3i2.92>

## NGHIÊN CỨU ÁP DỤNG PHƯƠNG PHÁP RT-PCR VÀO THỬ NGHIỆM NHẬN DẠNG VẮC XIN VIÊM NÃO NHẬT BẢN SỐNG GIẢM ĐỘC LỰC

Nguyễn Việt Anh\*, Đỗ Thị Hồng Ánh, Nguyễn Thị Hà,

Trần Thị Phương, Nguyễn Thị Lý

*Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế*

*Nhận ngày 3 tháng 1 năm 2023*

*Chấp nhận đăng ngày 2 tháng 4 năm 2023*

**Tóm tắt:** Nhận dạng kháng nguyên trong vắc xin là một trong những yêu cầu cần thiết để kiểm định chất lượng vắc xin được sản xuất từ vi rút hoặc một mảnh của vi rút mà trong đó phương pháp phản ứng tổng hợp chuỗi polymerase sao chép ngược (RT-PCR) được ứng dụng rộng rãi. Sau đó, sản phẩm PCR được chạy điện di và đọc kết quả dưới đèn huỳnh quang. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu áp dụng phương pháp RT-PCR vào thử nghiệm nhận dạng của vắc xin viêm não Nhật Bản sống, giảm độc lực IMOJEV của Sanofi Pasteur và đánh giá tiêu chí độ đặc hiệu nhằm mục đích rút gọn được quy trình thực hiện, thời gian thử nghiệm, và chi phí hóa chất cũng như vật tư tiêu hao. Kết quả cho thấy, đoạn mồi được thiết kế phù hợp và đặc hiệu với vi rút viêm não Nhật Bản. Sản phẩm RT-PCR thu được cho kết quả sáng rõ, đúng kích thước (458 bp) và đặc hiệu với vi rút viêm não Nhật Bản, và không đặc hiệu với một số vi rút sống khác được thực hiện song song trong thử nghiệm. Vì vậy, chúng tôi có thể kết luận rằng quy trình nhận dạng vi rút viêm não Nhật Bản trong vắc xin IMOJEV đã được thiết kế và tối ưu hóa theo điều kiện và hóa chất của khoa Kiểm định vắc xin Vi rút. Kết quả nghiên cứu cho thấy đoạn mồi phù hợp và đặc hiệu với vi rút viêm não Nhật Bản, có thể sử dụng trong các nghiên cứu sau này tại khoa Kiểm định vắc xin Vi rút, Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế.

*Từ khóa:* Nhận dạng, vắc xin, viêm não Nhật Bản, phương pháp RT-PCR, độ đặc hiệu.

### 1. Đặt vấn đề

Vi rút viêm não Nhật Bản thuộc họ Flaviviridae, chi Flavivirus nhóm B, là thành viên của vi rút Arbo (arthropod borne virus) do côn trùng tiết túc truyền cho động vật có xương sống qua đường máu, đặc biệt là muỗi *Culex tritaeniorhynchus* [1]. Chúng vi rút được sử dụng để sản xuất vắc xin viêm não Nhật Bản thuộc genotype 3 bao gồm Nakayama, Beijing-1, Beijing-3 và SA-14-14-2 vì những nghiên cứu trước

đây đã chứng minh các chủng này chủ yếu được phân lập trên người và có khả năng bảo vệ chéo với các chủng khác [2][3]. Hiện nay chưa có thuốc đặc trị cho bệnh viêm não Nhật Bản nên việc tiêm vắc xin là biện pháp phòng chống hiệu quả nhất. Ở Việt Nam, hai loại vắc xin viêm não Nhật Bản được sử dụng rộng rãi là vắc xin bất hoạt Jevax (VABIOTECH) được sản xuất từ chủng Nakayama và vắc xin sống giảm độc lực IMOJEV (Sanofi Pasteur) được

sản xuất trên tế bào thường trực VERO từ chủng SA14-14-2 có nguồn gốc từ Trung Quốc [4][5]. Bằng công nghệ DNA tái tổ hợp, IMOJEV được tạo ra bằng cách thay thế hai đoạn gen tiền màng (prM) và vỏ (E) của vắc xin vi rút gây bệnh sốt vàng 17D-204 bằng đoạn gen tương ứng của vi rút viêm não Nhật Bản chủng SA14-14-2 [6]. Vắc xin phòng chống viêm não Nhật Bản thế hệ mới IMOJEV đã được cấp phép và sử dụng ở hầu hết các nước nằm trong vùng dịch lưu hành, trong đó có Việt Nam từ năm 2019.

Hiện nay, có rất nhiều phương pháp được sử dụng để nhận dạng kháng nguyên có trong vắc xin như gây nhiễm trên tế bào, miễn dịch huỳnh quang, ELISA... nhưng phản ứng chuỗi polymerase phiên mã ngược (hay RT-PCR) là phương pháp được ứng dụng vào thử nghiệm nhận dạng vắc xin để rút ngắn quy trình thực hiện, tiết kiệm thời gian, chi phí hóa chất và vật tư tiêu hao. Nguyên lí cơ bản của RT-PCR là khuếch đại một đoạn gen RNA rồi phiên mã ngược thành DNA bổ sung (cDNA). Sản phẩm RT-PCR sau đó được chạy điện di trên thạch agarose và đọc dưới đèn huỳnh quang [7][8]. Đối với vắc xin viêm não Nhật Bản IMOJEV, chúng tôi áp dụng phương pháp RT-PCR với đoạn gen được khuếch đại nằm trên vùng vỏ (E) có độ dài 458 bp có điểm đầu ở nucleotit 281 và cuối ở 739. Độ đặc hiệu là một trong những tiêu chí quan trọng nhất đối với thử nghiệm nhận dạng vắc xin IMOJEV được đánh giá trong đề tài này bằng cách thực hiện song song với các vắc xin sống giảm độc lực khác.

## 2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Quy trình thử nghiệm nhận dạng vắc xin viêm não Nhật Bản sống, giảm độc lực bằng phương pháp RT-PCR được thực hiện trên vắc xin viêm não Nhật Bản IMOJEV (Sanofi Pasteur) lô 08A1907GA, hạn dùng 04/04/2022.

### 2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- Thời gian: Từ tháng 05/2021 đến tháng 07/2021

- Địa điểm: Phòng thí nghiệm của khoa kiểm định vắc xin Vi rút, Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế.

### 2.3. Vật liệu, hóa chất

- Mẫu chuẩn: Vắc xin mẫu chuẩn quốc gia viêm não Nhật Bản (mã MCGQ/01)

- Mẫu đối chứng: vắc xin sốt vàng (Stamaril) (Sanofi Pasteur, Pháp) lô R3N082V, hạn dùng 31/10/2021; vắc xin thủy đậu (Varicella vaccine) (Green Cross, Hàn Quốc) lô S50120004, hạn dùng 19/01/2022;

- Hóa chất: Bộ kit tách chiết RNA QIAamp Viral RNA (Qiagen); bộ kit chạy RT-PCR One step RT-PCR (Qiagen), thang chuẩn DNA ladder (Biolab), thuốc nhuộm dyng gel (Biolab), thạch agarose (Merck), dung môi TAE 50X (Serva), safeview (ABM), ethanol (Merck), diluted water (Invitrogen)

- Trang thiết bị: Cân điện tử (Mettler Toledo), tủ an toàn sinh học (Nuair), máy lắc (IKA), máy li tâm minispin (Eppendorf), máy PCR (Applied Biosystem), máy điện di (BCE), đèn đọc huỳnh quang (BCE), pipet đơn kênh 10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 200  $\mu$ L và 1000  $\mu$ L (Eppendorf hoặc Gilson), khay gel lạnh (Eppendorf)

- Vật tư tiêu hao: Tuýp nhựa tiết trùng 2 ml (Eppendorf), tuýp PCR 0.2 ml (Eppendorf), găng tay (Việt Nam), khẩu trang (Việt Nam), đầu côn 10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 200  $\mu$ L và 1000  $\mu$ L (Eppendorf), túi đựng rác thải (Việt Nam)

#### 2.4. Phương pháp nghiên cứu

a. Thiết kế môi đặc hiệu cho vắc xin viêm não Nhật Bản: Cặp môi được thiết kế đặc hiệu cho một đoạn gen nằm trên phần vỏ (E) của vi rút viêm não Nhật Bản, có chiều dài 20 amino axit với điểm đầu ở nucleotit 281 và điểm cuối ở 739, nhiệt độ nóng chảy ( $T_m$ ) là 60°C và phần trăm GC% là 55.00%. Cặp môi đặc hiệu của vắc xin viêm não Nhật Bản cho sản phẩm RT-PCR cho sản phẩm PCR kích thước 458 bp, có trình tự như sau:

Môi xuôi (Primer F): 5'- AAG GCT TCA CTG ATC GTG GG-3'

Môi ngược (Primer R): 5'-CGT GCG CCT CTT CAA ATT CC-3'

b. Tóm tắt quy trình tách chiết RNA theo bộ kit QIAamp Viral RNA (Qiagen): Cho 560  $\mu$ L dung dịch AVL, 140  $\mu$ L mẫu chuẩn/ mẫu thử, 5.6  $\mu$ L carrier ARN (tARN) vào tuýp eppendorf 1.5 ml và ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, sau đó thêm 560  $\mu$ L cồn tuyệt đối. Lấy hỗn dịch trên vào cột lọc silica, ly tâm 8000 vòng/ 1 phút, loại bỏ nước nổi, giữ nguyên cột lọc rồi thêm 500  $\mu$ L dung dịch AW1, ly tâm 8000 vòng/ 1 phút. Sau khi loại bỏ nước nổi, thêm 500  $\mu$ L dung dịch AW2, ly tâm 13000 vòng/ 1 phút, loại bỏ nước nổi, thay tuýp eppendorf 1.5 ml mới bên dưới cột lọc. Thêm 60  $\mu$ L dung dịch AVE vào cột lọc, ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 phút rồi ly tâm 8000 vòng/

1 phút. Loại bỏ cột lọc và bảo quản mẫu trong tuýp eppendorf ở nhiệt độ 2-8°C nếu thực hiện các bước tiếp theo trong ngày hoặc ở nhiệt độ -20°C.

c. Tóm tắt thành phần và chu trình nhiệt của phản ứng RT-PCR: Thành phần cho phản ứng 50  $\mu$ L bao gồm 5X One step (10  $\mu$ L), dNTP (2  $\mu$ L), môi xuôi (2  $\mu$ L), môi ngược (2  $\mu$ L), enzyme (2  $\mu$ L), Q solution (5  $\mu$ L), nước (17  $\mu$ L) và mẫu RNA (10  $\mu$ L). Sau khi cho hết các thành phần vào tuýp eppendorf 0.2ml, ly tâm nhẹ để loại bỏ bong bóng rồi cho vào máy PCR chạy với chu trình nhiệt: 50°C (30 phút)- 1 chu kỳ, 95°C (3 phút)- 1 chu kỳ, 94°C (1 phút)- 45 chu kỳ, 52°C (1 phút)- 45 chu kỳ, 72°C (1 phút)- 45 chu kỳ, 72°C (10 phút)- 1 chu kỳ, 4°C ( $\infty$ ).

d. Tóm tắt quy trình điện di sản phẩm PCR: Hâm nóng 1g thạch agarose với 70 ml dung môi TAE 1X để thạch tan hoàn toàn, đợi thạch nguội 50-60°C thêm 3.5  $\mu$ L safeview và lắc đều. Đổ thạch vào khuôn, lấp lược và để nguội đến khi thạch đông rồi cho thạch vào bể điện di. Hộn đều 10  $\mu$ L sản phẩm PCR với 3.5  $\mu$ L thuốc nhuộm dyng gel rồi tra mẫu vào giếng (đối với mẫu chứng âm, hỗn 10  $\mu$ L nước cất với 3.5  $\mu$ L thuốc nhuộm dyng gel). Chạy điện di ở dòng điện 80V trong 45 phút. Sau khi chạy hết chu trình điện di, nhẹ nhàng lấy thạch ra khỏi khuôn, cho vào máy đọc huỳnh quang và đọc kết quả.

e. Tiêu chuẩn đánh giá: Thử nghiệm đạt yêu cầu đối với tiêu chí độ đặc hiệu khi kết quả điện di có xuất hiện các băng sáng ở thang chuẩn, có băng sáng ở kích thước 458 bp ở mẫu chuẩn viêm não Nhật Bản và vắc xin IMOJEV, không có băng sáng xuất

hiện ở các mẫu vắc xin đối chứng Stamaril, Varicella và mẫu chứng âm. Thử nghiệm được coi là không đạt yêu cầu khi xuất hiện băng sáng ở các mẫu vắc xin đối chứng và mẫu chứng âm.

### 3. Kết quả

Sau khi tách chiết vắc xin mẫu chuẩn quốc gia viêm não Nhật Bản, mẫu thử IMOJEV và mẫu đối chứng Stamaril và Varicella (Theo mục b phần 2.4), tiêu chí độ đặc hiệu được thực hiện 6 lần cho phản

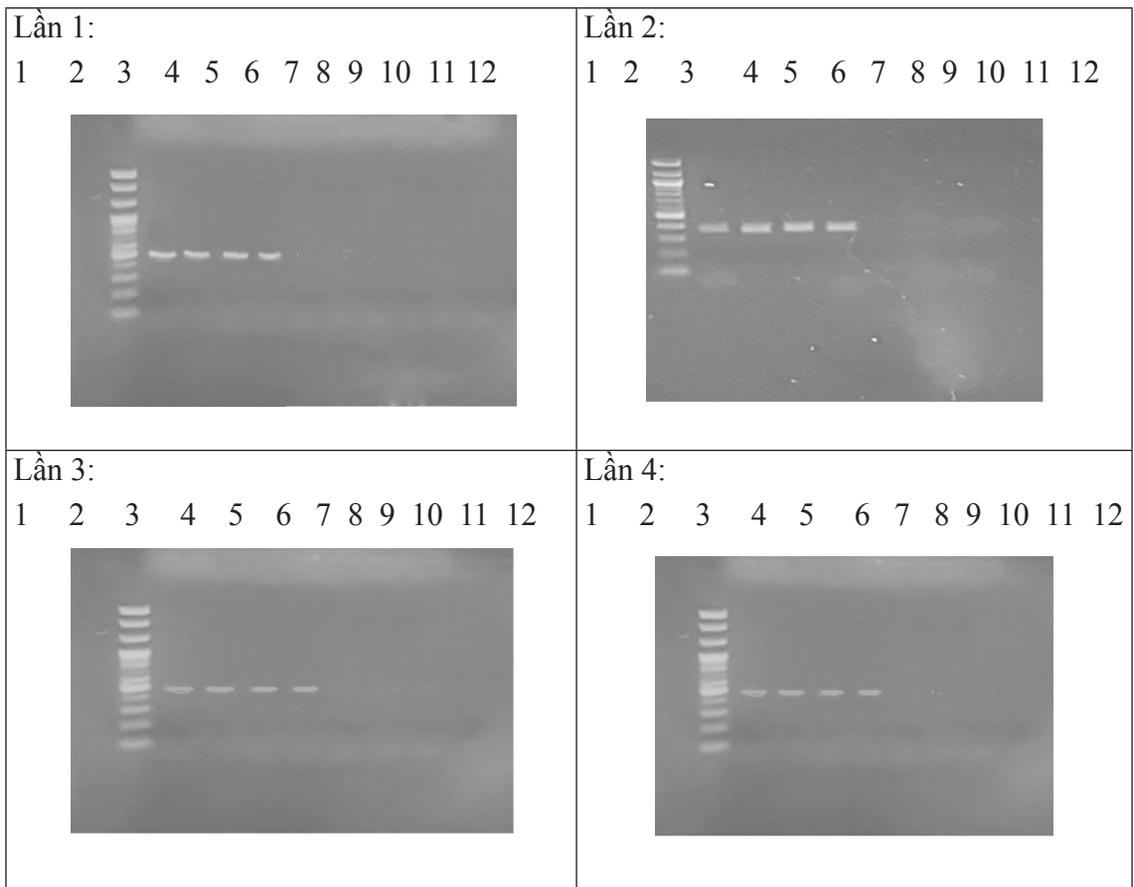
ứng RT-PCR (Theo mục c phần 2.4) với cặp mồi đặc hiệu cho viêm não Nhật Bản đều cho kết quả điện di với thang chuẩn sáng, các băng rõ ràng, có băng xuất hiện trên thạch mẫu chuẩn viêm não Nhật Bản và mẫu thử IMOJEV đúng với kích thước của thành phần viêm não Nhật Bản (458 bp), và không có băng xuất hiện trong mẫu chứng âm (nước), và mẫu vắc xin đối chứng (vắc xin sốt vàng Stamaril và vắc xin thủy đậu Varicella). Kết quả được tổng hợp trong bảng dưới đây:

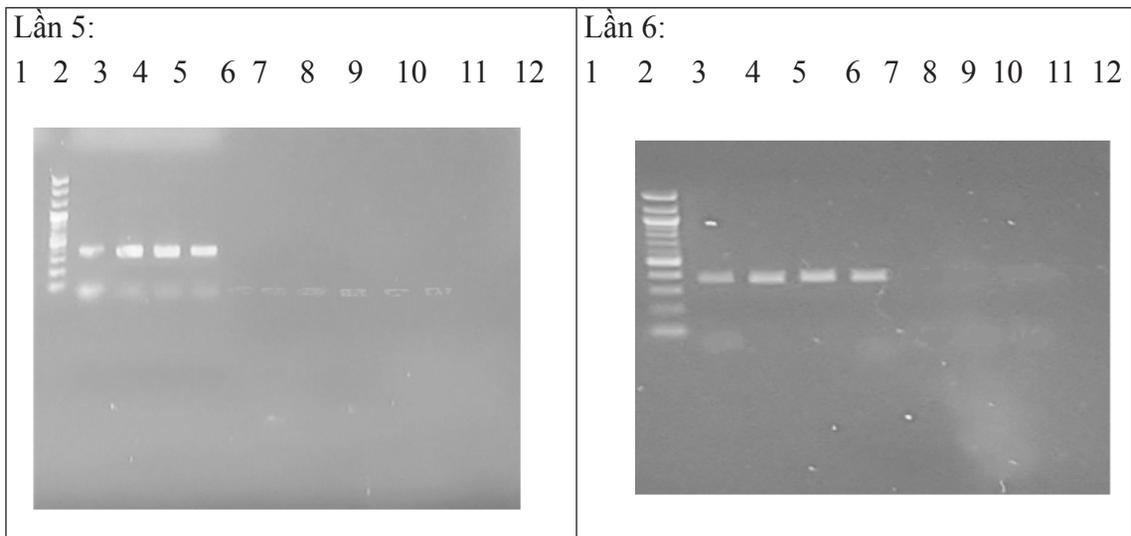
Lần thực hiện	Ngày thực hiện	Kết quả
1	10-11/06/2021	- Thang chuẩn sáng, các băng rõ ràng - Có băng xuất hiện trên thạch của mẫu chuẩn, mẫu thử IMOJEV, đúng với kích thước của thành phần viêm não Nhật Bản (458bp) - Không có băng xuất hiện trong mẫu chứng âm, mẫu thử Varicella và Stamaril.
2	24-25/06/2021	- Thang chuẩn sáng, các băng rõ ràng - Có băng xuất hiện trên thạch của mẫu chuẩn, mẫu thử IMOJEV, đúng với kích thước của thành phần viêm não Nhật Bản (458bp) - Không có băng xuất hiện trong mẫu chứng âm, mẫu thử Varicella và Stamaril.
3	29-30/06/2021	- Thang chuẩn sáng, các băng rõ ràng - Có băng xuất hiện trên thạch của mẫu chuẩn, mẫu thử IMOJEV, đúng với kích thước của thành phần viêm não Nhật Bản (458bp) - Không có băng xuất hiện trong mẫu chứng âm, mẫu thử Varicella và Stamaril.
4	05-06/07/2021	- Thang chuẩn sáng, các băng rõ ràng - Có băng xuất hiện trên thạch của mẫu chuẩn, mẫu thử IMOJEV, đúng với kích thước của thành phần viêm não Nhật Bản (458bp) - Không có băng xuất hiện trong mẫu chứng âm, mẫu thử Varicella và Stamaril.

5	15-16/07/2021	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Thang chuẩn sáng, các băng rõ ràng</li> <li>- Có băng xuất hiện trên thạch của mẫu chuẩn, mẫu thử IMOJEV, đúng với kích thước của thành phần viem não Nhật Bản (458bp)</li> <li>- Không có băng xuất hiện trong mẫu chứng âm, mẫu thử Varicella và Stamaril.</li> </ul>
6	20-21/07/2021	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Thang chuẩn sáng, các băng rõ ràng</li> <li>- Có băng xuất hiện trên thạch của mẫu chuẩn, mẫu thử IMOJEV, đúng với kích thước của thành phần viem não Nhật Bản (458bp)</li> <li>- Không có băng xuất hiện trong mẫu chứng âm, mẫu thử Varicella và Stamaril.</li> </ul>

**Bảng 1. Kết quả RT-PCR cho tiêu chí độ đặc hiệu đối với thử nghiệm nhận dạng vắc xin IMOJEV**

**Hình ảnh 6 lần điện di sản phẩm RT-PCR cho kết quả như sau:**





**Hình 1. Kết quả điện di với cặp mồi đặc hiệu cho viêm não Nhật Bản**

Trong đó: 1- Thang chuẩn

2- Mẫu chuẩn viêm não Nhật Bản

3, 4, 5 – Mẫu vắc xin IMOJEV

6, 7, 8 - Mẫu vắc xin đối chứng Stamaril (Thành phần Sốt vàng)

9, 10, 11 - Mẫu vắc xin đối chứng Varicella (Thành phần Thủy đậu)

12- Chứng âm

#### 4. Bàn luận

Từ hình ảnh điện di 6 lần chạy RT-PCR đối với mẫu chuẩn, mẫu thử và mẫu đối chứng, RNA vi rút sốt vàng hay thủy đậu có trong vắc xin Stamaril và Varicella đều không bắt cặp với cặp mồi trong khi đó, kết quả điện di mẫu chuẩn quốc gia viêm não Nhật Bản và mẫu thử vắc xin IMOJEV đều có băng sáng ở kích thước 458 bp thể hiện sự đặc hiệu đối với cặp mồi này. Vì vậy, cặp mồi này đặc hiệu cho vi rút viêm não Nhật Bản.

Thử nghiệm nhận dạng vắc xin viêm não Nhật Bản IMOJEV được đánh giá về tiêu chí độ đặc hiệu do nhận dạng kháng nguyên trong vắc xin chỉ định tính mà không cần định lượng, vì vậy phương pháp RT-PCR được lựa chọn thay cho các phương pháp nhận dạng khác như gây

miễn dịch trên tế bào, miễn dịch huỳnh quang hay ELISA. Đối với các phương pháp gây miễn dịch trên tế bào hay miễn dịch huỳnh quang, độ đặc hiệu cao do sử dụng kháng thể đặc hiệu cho viêm não Nhật Bản tuy nhiên thời gian thử nghiệm sẽ kéo dài từ 5-7 ngày ủ tế bào, ngoài ra, các hóa chất cố định tế bào hay nhuộm tế bào như formaldehyde hay crystal violet đều là các chất độc hại, có thể ảnh hưởng đến sức khỏe của nhân viên trực tiếp thực hiện. ELISA cũng là một phương pháp có độ đặc hiệu cao do nguyên lý cơ bản của ELISA là phản ứng của phức hợp kháng nguyên- kháng thể, ngoài ra, đây cũng là một phương pháp có thời gian thực hiện chỉ trong một ngày, tuy nhiên, nhược điểm của phương pháp ELISA là cần hóa chất của nhà sản xuất như kháng thể đặc hiệu cho viêm não Nhật Bản. Vì vậy,

phương pháp RT-PCR được áp dụng vào thử nghiệm nhận dạng cho vắc xin viêm não Nhật Bản IMOJEV. Ưu điểm của phương pháp này là rút ngắn thời gian thử nghiệm, thay vì 5-7 ngày gây nhiễm trên tế bào, phương pháp RT-PCR thực hiện trong 1 ngày; giảm chi phí, vật tư tiêu hao và ít độc hại hơn các phương pháp khác vì không sử dụng các hóa chất nhuộm (Crystal violet, formaldehyde) trên tế bào hay axit để dừng phản ứng trong ELISA, ngoài ra, thay vì sử dụng chất nhuộm ethidium bromide, một chất có thể gây ung thư, được dùng trong quá trình điện di, quy trình đã thay thế sử dụng chất nhuộm safe view nhỏ trực tiếp vào thạch để giảm độc hại cho nhân viên thực hiện [13]. Một ưu điểm khác của phương pháp RT-PCR đó là không bị phụ thuộc vào hóa chất chuẩn nội bộ của nhà sản xuất, giúp quá trình kiểm định vắc xin được thực hiện nhanh chóng và độc lập.

## V. KẾT LUẬN

Tiêu chí độ đặc hiệu cho thử nghiệm nhận dạng vắc xin viêm não Nhật Bản đạt yêu cầu với hiệu suất 100% trong 6 lần thực hiện, cặp môi không bắt cặp với các vi rút sống khác như sốt vàng hay thủy đậu. Quy trình thử nghiệm nhận dạng vắc xin viêm não Nhật Bản bằng phương pháp RT-PCR phù hợp với điều kiện tại Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế. Kết quả của nghiên cứu này là bước đầu để ứng dụng phương pháp RT-PCR cho thử nghiệm nhận dạng vắc xin IMOJEV, cần thực hiện thẩm định thêm các tiêu chí như độ mạnh và giới hạn phát hiện (LOD) theo quy trình thẩm định của Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế.

## Tài liệu tham khảo

- [1] WHO [Internet]. *Japanese Encephalitis*. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/japanese-encephalitis>
- [2] Huỳnh Phương Liên. *Vi rút viêm não Nhật bản và vắc xin phòng bệnh*. NXB y học, Hà Nội 2007.
- [3] Sang Im Yun, Lee Young Min. *Japanese encephalitis: The virus and vaccines*. Hum Vaccin Immunother 2013; 10: 1-17.
- [4] MIMS [Internet]. *IMOJEV vaccine, Japanese encephalitis, Full prescribing info*. Available at: <https://www.mims.com/malaysia/drug/info/imojev?type=full>
- [5] Yongxin Yu. *Development of Japanese Encephalitis attenuated live vaccine virus SA14-14-2 and its characteristics*. Intechopen.com, January 9<sup>th</sup>, 2013. Available at: <https://www.intechopen.com/chapters/40757>
- [6] Mohan Babu Appaiahgari, Sudhanshu Vрати. *IMOJEV: a Yellow fever virus-based novel Japanese encephalitis vaccine*, Pubmed, 2010 Dec; 9(120): 1371-84.
- [7] John T. Corthell. *Basic molecular protocols in neuroscience: Tips, tricks, and pitfalls*, 2014. Chapter 4: Reverse transcription (RT) and polymerase chain reaction (PCR), pages 27-40.
- [8] Robert E. Farrell Jr. *RNA Methodologies* (4<sup>th</sup> edition), 2010. Chapter 18: RT-PCR: A science and an art form, pages 385-448.
- [9] MSD manual [internet] Phiên bản dành cho chuyên gia. *Tổng quan về virus*. Available at: <https://www.msdmanuals.com/vi-vn/chuy%C3%AAn-gia/b%E1%BB%87nh-truy%E1%BB%81n-nhi%E1%BB%85m/virus/t%E1%BB>

