

NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO VÀ ĐÁNH GIÁ HIỆU LỰC CỦA KHÁNG THỂ IgY KHÁNG VI KHUẨN TẢ VÀ ĐỘC TỔ TẢ TRÊN THỰC NGHIỆM

HOÀNG TRUNG KIÊN ⁽¹⁾, HOÀNG ĐỨC HẬU ⁽²⁾, NGUYỄN ĐẠNG DŨNG ⁽¹⁾

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tiêu chảy cấp do nhiễm vi khuẩn tả (VKT) đường tiêu hóa, còn gọi là bệnh tả, là bệnh truyền nhiễm cấp tính, thường diễn biến nhanh. Theo kết quả thống kê của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) trong năm 2016 đã ghi nhận 132.121 trường hợp nhiễm VKT tại 38 quốc gia trên thế giới, trong đó 2.420 trường hợp tử vong (chiếm tỷ lệ 1,8%). Trong 5 năm gần đây, số người mắc và chết vì bệnh tả không có xu hướng giảm, tỷ lệ tử vong do mắc bệnh tả vẫn còn cao [6, 7, 8, 9, 10].

Bên cạnh công nghệ chế tạo kháng huyết thanh truyền thống từ động vật có vú, chế tạo kháng huyết thanh chứa kháng thể IgY trong lòng đỏ trứng gà cũng có nhiều ưu điểm. IgY là một kháng thể có trong huyết thanh gà mái được vận chuyển tích cực sang lòng đỏ trứng gà. Phương pháp tạo kháng thể IgY trong lòng đỏ trứng gà có một số ưu điểm so với phương pháp tạo kháng huyết thanh truyền thống như đơn giản và dễ thực hiện, giá thành chế phẩm thấp, sản lượng khá cao [3, 4].

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm chế tạo kháng thể đặc hiệu với VKT và độc tố tả (ĐTT) bằng công nghệ chế tạo IgY từ lòng đỏ trứng gà, đồng thời đánh giá hiệu quả kháng vi khuẩn tả và độc tố tả của kháng thể IgY đặc hiệu trong ống nghiệm và trên động vật thực nghiệm.

2. ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, vật liệu nghiên cứu

- Gà mái trên 20 tuần tuổi, được nuôi trong điều kiện đủ thức ăn, nước uống, với ánh sáng tự nhiên 10÷12 giờ/ngày.
- Chuột nhắt trắng 3÷5 ngày tuổi, trọng lượng trung bình 2,2÷2,5 gam.
- VKT: chủng *V. cholerae* O1 Ogawa phân lập từ phân bệnh nhân.
- ĐTT dạng bột đông khô, bảo quản ở 2÷8°C.
- Hoá chất, sinh phẩm: Môi trường nuôi cấy tăng sinh VKT: BHI broth, Nutrient agar; tá chất Freund hoàn chỉnh (CFA) và không hoàn chỉnh (IFA); amoni sulfate $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; cộng hợp IgG cừu kháng IgY-peoxidase; cơ chất o-phenylenediamine (OPD)

2.2. Phương pháp

2.2.1. Chế tạo kháng nguyên tế bào VKT và ĐTT

Cấy chủng VKT (lưu trữ trong labô) vào canh thang BHI, ở 37°C/24h; thu cặn tế bào, pha thanh huyền dịch 10^{11} CFU/ml; bất hoạt VKT ở 80°C (cách thủy)/20 phút. Trộn huyền dịch VKT lần lượt với tá chất CFA và IFA (tỷ lệ 1:1 về thể tích).

ĐTT dạng đông khô (5 mg) được hoàn nguyên và pha thành các nồng độ khác nhau, sau đó trộn với tá chất với CFA và IFA (tỷ lệ 1:1 về thể tích).

2.2.2. Gây miễn dịch tạo kháng thể IgY

Tiêm trong cơ ngực lớn, thể tích 1 ml kháng nguyên/1 con gà; tiêm nhắc lại 4÷6 lần, cách nhau 3 tuần; sử dụng tá chất FCA cho lần gây miễn dịch đầu tiên, và tá chất IFA cho các lần tiêm nhắc lại. Liều gây miễn dịch: VKT lần lượt là $0,375 \times 10^{10}$; $0,75 \times 10^{10}$; $1,5 \times 10^{10}$ và 3×10^{10} CFU/ml; ĐTT nồng độ 0,05 và 0,1 mg/ml.

2.2.3. Tách chiết, tinh sạch IgY từ trứng gà

Trộn lòng đỏ trứng gà với nước cất 4°C (tỷ lệ 1:9 về thể tích); ly tâm, thu dịch nổi; tua phân đoạn IgY bằng muối amoni sulfate; thẩm tích loại muối từ dung dịch IgY: sử dụng màng thẩm tích, trong 48 giờ với dung dịch PBS.

Sử dụng cột anion trên hệ thống sắc ký áp suất thấp, với hệ đệm gồm đệm A (Tris-HCl, pH 7,94) và đệm B (là đệm A bổ sung 0,5 M NaCl). Nạp đầy hệ thống sắc ký với đệm A; cho 2 ml dung dịch IgY sau thẩm tích chạy qua cột sắc ký (tốc độ 1ml/phút). Rửa giải thu hồi protein gắn cột bằng đệm B.

2.2.4. Xét nghiệm ELISA phát hiện kháng thể IgY đặc hiệu

2.2.4.1. Xét nghiệm ELISA phát hiện kháng thể IgY từ gà được gây miễn dịch với VKT (kháng thể IgY đặc hiệu với VKT)

Chuẩn bị khay phản ứng: 100 µl huyền dịch kháng nguyên VKT siêu nhiễm (5 µg protein/ml, trong NaHCO_3 0,1M; pH 9,6) ủ qua đêm ở 4°C trong các giếng của khay ELISA; rửa giếng 5 lần bằng đệm PBS-T (0,01% Tween20; pH 7,4); ủ giếng phản ứng với 150 µl BSA 1% ở 37°C/2 giờ; rửa giếng 5 lần bằng PBS-T.

Thực hiện phản ứng: Ủ 100µl mẫu thử (huyết thanh gà, hoặc dung dịch chứa IgY từ lòng đỏ trứng gà) trong giếng ở 37°C/1 giờ; rửa giếng 5 lần bằng PBS-T. Phát hiện IgY đặc hiệu kháng nguyên VKT: bổ sung 100 µl cộng hợp peroxidase - kháng thể kháng IgY gà; ủ khay phản ứng ở 37°C/1 giờ; rửa giếng 5 lần bằng PBS-T, tiếp đó bổ sung 100 µl OPD (0,5 mg/ml, mỗi 50 ml OPD bổ sung thêm 20 µl H_2O_2), giữ khay phản ứng trong buồng tối, ở nhiệt độ phòng/ 10 phút; ngừng phản ứng: 50 µl H_2SO_4 2M. Đo mật độ quang học (optical density - OD) của dung dịch phản ứng tại bước sóng 450 nm: giá trị OD tương quan thuận với hiệu giá kháng thể đặc hiệu.

2.2.4.2. Xét nghiệm ELISA phát hiện kháng thể IgY từ gà được gây miễn dịch với ĐTT (kháng thể IgY đặc hiệu với ĐTT)

Chuẩn bị khay phản ứng: Ủ 100 µl GM1 (0,2 µg/100µl, trong PBS 1X) trong giếng qua đêm ở nhiệt độ phòng. Rửa giếng 5 lần bằng PBS-T; ủ giếng với 150 µl BSA 1% ở 37°C/2 giờ; rửa giếng 5 lần bằng PBS-T, tiếp đó bổ sung 100 µl ĐTT (100 ng/ml), ủ 37°C/1 giờ; rửa giếng 5 lần bằng PBS-T.

Thực hiện phản ứng: theo phương pháp được mô tả tại mục 2.2.4.1.

2.2.5. Khảo sát tác dụng bảo vệ của kháng thể IgY kháng VKT và IgY kháng độc tố tả trên chuột nhắt trắng sơ sinh nhiễm VKT

Bảng 1. Tác dụng bảo vệ của kháng thể IgY kháng VKT và IgY kháng độc tố tả trên chuột nhắt trắng sơ sinh nhiễm VKT

Nhóm Can thiệp	1 (n = 30)	2 (n = 30)	3 (n = 30)	4 (n = 30)	5 (n = 30)
Gây nhiễm VKT (giờ 0)	50 µl NaCl 0,9%	50 µl VKT 10^8 CFU/ml	50 µl VKT 10^8 CFU/ml	50 µl VKT 10^8 CFU/ml	50 µl VKT 10^8 CFU/ml
Điều trị (giờ thứ 3 sau nhiễm VKT)	50 µl NaCl 0,9%	50 µl NaCl 0,9%	50 µl IgY kháng CFA*	50 µl IgY kháng VKT	50 µl IgY kháng ĐTT

(*) CFA: Complete Freund adjuvant - tá chất Freund hoàn chỉnh (sử dụng để trộn với kháng nguyên VKT hoặc kháng nguyên ĐTT khi gây miễn dịch cho gà mái).

Chuột nhắt trắng 3÷5 ngày tuổi (được tách khỏi chuột mẹ trước khi tiến hành thí nghiệm 3 giờ), gồm 5 nhóm, mỗi nhóm 30 con. Trong nhóm 1 (đối chứng sinh học), chuột được cho uống 50 µl NaCl 0,9%; ở nhóm 2, 3, 4 và 5, chuột được gây nhiễm VKT đường uống (50 µl huyền dịch VKT, mật độ 1×10^8 CFU/ml). 3 giờ sau khi gây nhiễm VKT, chuột nhóm 1 và 2 được cho uống 50 µl NaCl 0,9%; chuột nhóm 3 (đối chứng âm) được cho uống 50 µl dung dịch IgY (nồng độ IgY là 1 mg/ml) phân lập từ trứng gà gây miễn dịch với CFA (tá chất sử dụng khi gây miễn dịch); chuột nhóm 4 và 5 được cho uống lần lượt là 50 µl kháng thể IgY (nồng độ IgY là 1 mg/ml) kháng VKT và IgY kháng ĐTT. Ghi nhận số chuột sống sót cho đến khi chuột trong nhóm 2 (nhóm nhiễm VKT được điều trị bằng NaCl 0,9%) chết hoàn toàn.

2.2.6. Khảo sát tác dụng bảo vệ của kháng thể IgY kháng ĐTT trên mô hình động vật thực nghiệm nhiễm ĐTT

Bảng 2. Tác dụng bảo vệ của kháng thể IgY kháng ĐTT trên chuột nhắt trắng sơ sinh nhiễm ĐTT

Nhóm Can thiệp	1 (n = 30)	2 (n = 30)	3 (n = 30)	4 (n = 30)	5 (n = 30)
Gây nhiễm ĐTT	50 µl NaCl 0,9%	50 µl ĐTT 1 mg/ml	50 µl ĐTT 1 mg/ml	50 µl ĐTT 1 mg/ml	50 µl ĐTT 1 mg/ml
Điều trị (giờ thứ 3 sau nhiễm ĐTT)	50 µl NaCl 0,9%	50 µl NaCl 0,9%	50 µl IgY kháng CFA	50 µl IgY kháng VKT	50 µl IgY kháng ĐTT

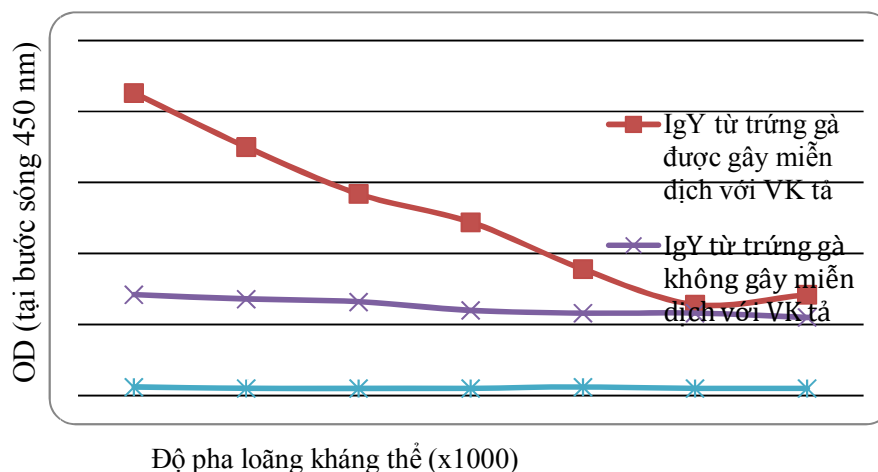
Chuẩn bị động vật thí nghiệm tương tự như mô tả tại mục 2.2.5, gồm 5 nhóm, mỗi nhóm 30 con. Trong nhóm 1 (đối chứng sinh học), chuột được cho uống 50 µl NaCl 0,9%; ở nhóm 2, 3, 4 và 5, chuột được gây nhiễm ĐTT đường uống (50 µl, nồng độ 1 mg/ml). 3 giờ sau khi gây nhiễm ĐTT, chuột ở nhóm 1 và 2 được cho uống 50 µl NaCl 0,9%; chuột nhóm 3 (đối chứng âm) được cho uống 50 µl dung dịch IgY (nồng độ IgY là 1 mg/ml) từ trứng gà gây miễn dịch với CFA; chuột nhóm 4 và 5 được cho uống 50 µl kháng thể IgY (nồng độ IgY là 1 mg/ml) kháng lần lượt VKT và ĐTT. Ghi nhận số chuột sống sót cho đến khi chuột trong nhóm 2 (nhiễm VKT được điều trị bằng NaCl 0,9%) chết hoàn toàn.

2.2.7. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thu thập trong nghiên cứu được xử lý bằng các thuật toán thống kê (so sánh các số trung bình quan sát bằng kiểm định T-test; so sánh các tỷ lệ bằng thuật toán χ^2 ; so sánh thời gian sống thêm của động vật thực nghiệm giữa các nhóm bằng phương pháp xây dựng đường cong sống sót Kaplan - Meier) trên các phần mềm Microsoft Excel và SPSS 20.0.

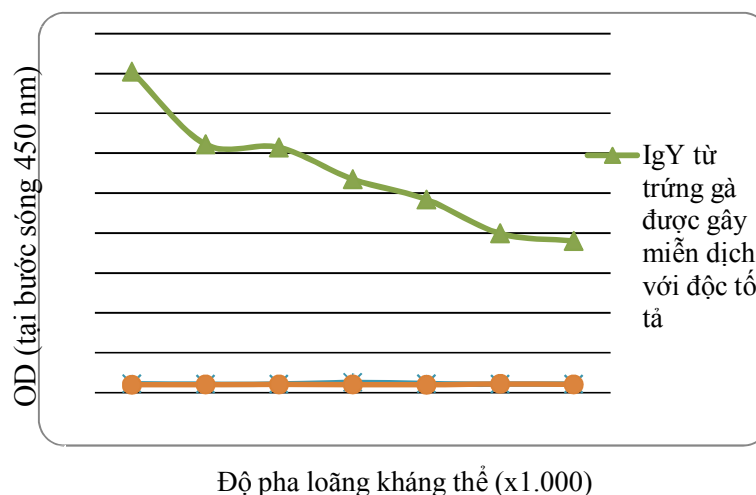
3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Chế tạo kháng thể kháng VKT và kháng ĐTT từ lòng đỏ trứng gà



Hình 1. Phản ứng ELISA đánh giá hoạt tính kháng thể IgY kháng VKT từ lòng đỏ trứng gà

Kháng thể IgY từ trứng gà được gây miễn dịch với kháng nguyên VKT có phản ứng đặc hiệu với kháng nguyên VKT ở mức pha loãng kháng thể 1/64.000.



Hình 2. Phản ứng ELISA đánh giá hoạt tính kháng thể IgY đặc hiệu với ĐTT từ lòng đỏ trứng gà

Kết quả phản ứng ELISA được trình bày trong hình 2 cho thấy kháng thể IgY có phản ứng đặc hiệu với ĐTT, khi nồng độ kháng thể là 1/200.000.

Kết quả của nhóm tác giả phù hợp với một số kết quả được công bố trước đây [1, 2, 5]. Kết quả này một lần nữa chứng minh phương pháp gây miễn dịch trên gà là phù hợp cho mục đích tạo kháng thể IgY.

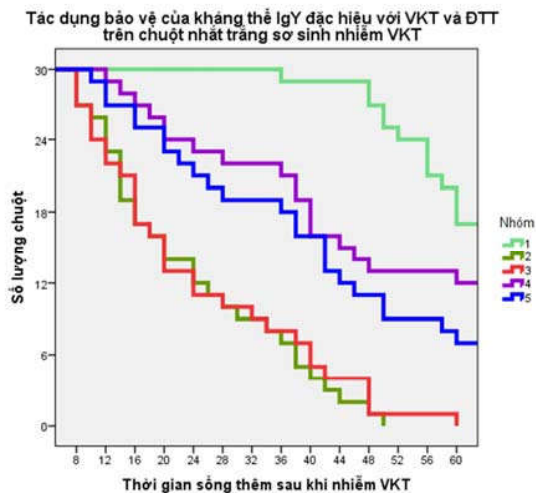
3.2. Tác dụng bảo vệ của kháng thể IgY đặc hiệu với VKT và ĐTT trên mô hình động vật gây bệnh tả thực nghiệm

3.2.1. Tác dụng bảo vệ của kháng thể IgY đặc hiệu với VKT và ĐTT trên chuột nhắt trắng sơ sinh nhiễm VKT

Bảng 3. Tỷ lệ chuột sống sót ở các nhóm sau khi nhiễm VKT

Thông số \ Nhóm	1 (n = 30)	2 (n = 30)	3 (n = 30)	4 (n = 30)	5 (n = 30)
Gây nhiễm VKT	50 µl NaCl 0,9%	50 µl VKT 10 ⁸ CFU/ml	50 µl VKT 10 ⁸ CFU/ml	50 µl VKT 10 ⁸ CFU/ml	50 µl VKT 10 ⁸ CFU/ml
Điều trị (3h sau nhiễm VKT)	50 µl NaCl 0,9%	50 µl NaCl 0,9%	50 µl IgY kháng FCA	50 µl IgY kháng VKT	50 µl IgY kháng ĐTT
Số chuột còn sống sau 60 giờ	17	0	0	12	7
Tỷ lệ chuột sống sau 60 giờ (%)	56,7	0	0	40	23,3

Tỷ lệ sống sót sau 60 giờ nhiễm VKT của động vật thực nghiệm trong các nhóm 4 và 5 (chuột nhiễm VKT được điều trị bằng kháng thể IgY đặc hiệu lần lượt với VKT và với ĐTT, đường uống) cao hơn rõ rệt so với chuột thuộc nhóm 2 (nhiễm VKT, điều trị bằng giả dược NaCl 0,9%) và nhóm 3 (nhiễm VKT, điều trị bằng IgY không đặc hiệu với VKT hoặc ĐTT).



Hình 3. Thời gian sống thêm của chuột nhiễm VKT được uống kháng thể IgY kháng VKT và IgY kháng ĐTT

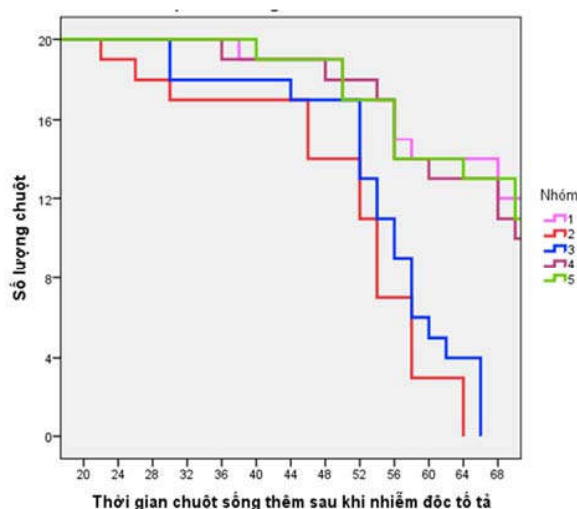
Tổng thời gian sống thêm ở nhóm chuột được điều trị bằng kháng thể IgY kháng VKT (nhóm 4), và nhóm chuột được điều trị bằng kháng thể IgY kháng ĐTT (nhóm 5) cao hơn rõ rệt so với nhóm đối chứng âm (nhóm 2 và 3) với $p < 0,001$.

3.2.2. Tác dụng bảo vệ của kháng thể IgY đặc hiệu với VKT và ĐTT trên chuột nhắt trắng sơ sinh nhiễm ĐTT

Bảng 4. Tỷ lệ chuột sống sót ở các nhóm sau khi nhiễm ĐTT

Nhóm Thông số	1 (n = 30)	2 (n = 30)	3 (n = 30)	4 (n = 30)	5 (n = 30)
Gây nhiễm VKT	50 μ l NaCl 0,9%	50 μ l ĐTT 1mg/ml	50 μ l ĐTT 1mg/ml	50 μ l ĐTT 1mg/ml	50 μ l ĐTT 1mg/ml
Điều trị (3h sau nhiễm VKT)	50 μ l NaCl 0,9%	50 μ l NaCl 0,9%	50 μ l IgY kháng FCA	50 μ l IgY kháng VKT	50 μ l IgY kháng ĐTT
Tỷ lệ chuột sống sau 66h	70%	0%	0%	65%	65%

Chuột nhiễm ĐTT điều trị bằng IgY kháng VKT (nhóm 4) và chuột nhiễm ĐTT điều trị bằng IgY kháng ĐTT (nhóm 5) có tỷ lệ sống sót sau 66 giờ nhiễm ĐTT cao hơn rõ rệt (65%) so với chuột nhiễm ĐTT điều trị giả được NaCl 0,9% (nhóm 2) và chuột nhiễm ĐTT điều trị bằng IgY không đặc hiệu với ĐTT (nhóm 3).



Hình 4. Thời gian sống thêm của chuột nhiễm ĐTT được điều trị bằng IgY kháng VKT và kháng ĐTT

Chuột thuộc nhóm 2 (nhiễm ĐTT, điều trị bằng giả dược) và nhóm 3 (nhiễm ĐTT điều trị bằng IgY không đặc hiệu) có tổng thời gian sống thêm tương đương nhau (tỷ lệ sống sót tại thời điểm 66 giờ của cả 2 nhóm này là 0%). Tổng thời gian sống thêm ở chuột thuộc nhóm 4 (nhiễm ĐTT, điều trị bằng IgY kháng VKT) và nhóm 5 (nhiễm ĐTT, điều trị bằng IgY kháng ĐTT) là tương đương nhau ($p > 0,05$) và cao hơn nhiều so với thời gian sống thêm của chuột nhóm 2 và 3 ($p < 0,001$).

Kết quả nghiên cứu của nhóm tác giả phù hợp với kết quả của Hirai về tác dụng điều trị của kháng thể IgY kháng VKT trên chuột nhắt trắng sơ sinh nhiễm VKT. Nhóm nghiên cứu này cũng chứng minh tác dụng điều trị bệnh tả thực nghiệm của IgY kháng CTB [5].

Cùng với đánh giá tác dụng bảo vệ của kháng thể IgY đặc hiệu với VKT và ĐTT trên chuột nhắt trắng gây nhiễm VKT, nhóm tác giả đã khảo sát tác dụng bảo vệ của kháng thể IgY đặc hiệu với ĐTT trên chuột nhắt trắng gây nhiễm ĐTT với liều gây nhiễm là 50 μ l dung dịch ĐTT nồng độ 1 mg/ml cho một chuột nhắt trắng sơ sinh (bảng 4). Kết quả cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về thời gian sống thêm giữa các nhóm chuột bị gây nhiễm ĐTT nhưng được điều trị bằng kháng thể IgY đặc hiệu ĐTT, so với chuột nhiễm ĐTT nhưng không điều trị bằng kháng thể IgY đặc hiệu ĐTT. Như vậy, kháng thể IgY đặc hiệu ĐTT, bên cạnh tác dụng điều trị trên động vật nhiễm VKT, còn thể hiện tác dụng điều trị khi động vật nhiễm độc trực tiếp với ĐTT. Điều này có thể có ý nghĩa thực tiễn quan trọng trong trường hợp nguồn nước ăn uống hoặc thực phẩm bị nhiễm ĐTT khi mà kháng thể kháng VKT sẽ không thể hiện tác dụng bảo vệ.

4. KẾT LUẬN

Đã tách và tinh sạch kháng thể IgY từ lòng đỏ trứng gà đặc hiệu với VKT và với ĐTT bằng phương pháp gây miễn dịch trên gà mái. Hoạt tính kháng thể IgY sau tinh sạch: IgY đặc hiệu VKT có phản ứng đặc hiệu với kháng nguyên VKT ở độ pha loãng 1/64.000; IgY đặc hiệu ĐTT có phản ứng đặc hiệu với kháng nguyên ĐTT ở độ pha loãng 1/200.000.

Kháng thể IgY đặc hiệu với VKT có tác dụng điều trị trên chuột nhắt trắng sơ sinh nhiễm VKT (1×10^8 CFU). Kháng thể IgY đặc hiệu với ĐTT có tác dụng điều trị trên chuột nhắt trắng sơ sinh nhiễm ĐTT (50 μ l, nồng độ 1 mg/ml).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hoàng Trung Kiên, Đỗ Khắc Đại, *Nghiên cứu chế tạo kháng thể kháng Edwardsiella ictaluri gây bệnh mù gan ở cá tra bằng công nghệ tạo kháng thể IgY ở gà*, Tạp chí thông tin y dược, Số đặc biệt về Miễn dịch học, 2010:71-76.
2. Tim Sunnary, Đỗ Minh Trung, Lê Thu Hồng, Lê Văn Đông, *Nghiên cứu chế tạo kháng thể từ lòng đỏ trứng gà kháng trực khuẩn mủ xanh bằng phương pháp gây miễn dịch cho gà mái đẻ trứng*, Tạp chí y dược học quân sự, 2011, 5(36):120-125.
3. Adhan M Abdou, Mujo Kim, Kenji Sato, *Functional proteins and peptides of Hen's Egg Origin*, Licensee Intech, 2013, chapter 5:116-144.
4. Araújo A.S., Lobato Z.I., Chávez-Olortegui C., Velarde D.T., *Brazilian IgY-Bothrops antivenom: Studies on the development of a process in chicken egg yolk*, Toxicon, 2010, 55(4):44-739.

5. Kazuyuki Hirai, Hideyuki Arimitsu, Koji Umeda, Kenji Yokota, Lianhua Shen, Kiyoshi Ayada, Yoshikatsu Kodama, Takao Tsuji, Yoshikazu Hirai, Keiji Oguma, *Passive oral immunization by egg yolk immunoglobulin (IgY) to *Vibrio cholerae* effectively prevents cholera*, Acta Medica Okayama, 2010, **64**(3):163-170.
6. World Health Organization, Cholera, *Weekly Epidemiological Record*, No.36, 2017, **92**:521-536.
7. World Health Organization, Cholera, *Weekly Epidemiological Record*, No.38, 2016, **91**:433-440.
8. World Health Organization, Cholera, *Weekly Epidemiological Record*, No.40, 2015, **90**:517-528.
9. World Health Organization, Cholera, *Weekly Epidemiological Record*, No.31, 2014, **89**:345-356.
10. World Health Organization, Cholera, *Weekly Epidemiological Record*, No.31, 2013, **88**:321-336.

SUMMARY

RESEARCH ON PRODUCTION AND PROTECTIVE EFFECT OF YOLK IMMUNOGLOBULIN AGAINST *VIBRIO CHOLERA* AND CHOLERATOXIN ON EXPERIMENTAL ANIMAL

Cholera, an acute infectious disease caused by the *Vibrio cholerae*, which usually develops rapidly. Egg yolk immunoglobulin (IgY) used to treat and prevent cholera. In this study, IgY antibodies against *V. cholerae* and cholera toxin were created by immunization method for egg-laying hens. The eggs of immunized hens were collected for isolating antibodies against *V. cholerae* and cholera toxin from yolk. These IgY antibodies had shown activity after purification, the *V. cholera* and cholera toxin specific IgY antibody had a specific response to antigen at 1/64,000 dilution and 1/200,000 dilution, respectively. In addition, the protective activity of antibodies was also carried out on animal model as *V. cholera* (1×10^8 CFU) and cholera toxin (1 mg/ml) injected mice. Subsequently, IgY antibody protected mice against *V. cholerae* as well as cholera toxin.

Từ khóa: Cholera toxin, IgY, V. cholerae.

Nhận bài ngày 23 tháng 9 năm 2017

Hoàn thiện ngày 20 tháng 10 năm 2017

⁽¹⁾ Học viện Quân y

⁽²⁾ Viện Y sinh nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga