

THIẾT LẬP QUY TRÌNH TỔNG HỢP *IN VITRO* PHÂN ĐOẠN RNA CỦA 5 LOÀI VIRUS EBOLA

ĐINH THỊ THU HẰNG ⁽¹⁾, BÙI TIẾN SỸ ⁽²⁾, HỒ HỮU THỌ ⁽¹⁾,
NGUYỄN THÁI SƠN ⁽³⁾, HOÀNG XUÂN SỬ ⁽¹⁾

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sự việc virus Ebola (Ebola virus - EBOV) gây dịch bệnh gần đây ở Tây Phi đã khẳng định tầm quan trọng của các công cụ chẩn đoán nhanh, chính xác tác nhân này cũng như những thách thức trong phát triển các xét nghiệm chẩn đoán tối ưu [2]. EBOV thuộc họ *Filoviridae* (bộ Mononegavirales), genome là RNA sợi đơn âm không phân mảnh, có vỏ ngoài, là một trong hai tác nhân (cùng với virus Marburg) gây ra các vụ dịch sốt xuất huyết nguy hiểm trên người và động vật linh trưởng [5]. Hệ gen của các Filovirus có kích thước gần 19 kb, chứa 7 gen được sắp xếp theo thứ tự sau: Gen nucleoprotein (NP) - viral protein 35 (VP) - VP40 (protein nền) - glycoprotein (GP) - VP30 (protein phiên mã sao chép) - VP24 (protein nền) - RNA polymerase (L - RNA polymerase phụ thuộc RNA) [6]. Trong đó, glycoprotein xuyên màng trên bề mặt của virion giúp bám dính, hòa màng với màng tế bào và xâm nhập vào trong tế bào chủ, có vai trò chính trong tính độc của virus [7]. EBOV bao gồm 5 loài đều có khả năng gây bệnh gồm: Zaire Ebola virus (ZEBOV), Sudan Ebola virus (SEBOV), Bundibugyo Ebola virus (BEBOV) (đều xuất phát từ Châu Phi), Cote d'Ivoire Ebola virus (CIEBOV hay Tai Forest, TEBOV) - là 4 loài gây bệnh ở người, loài thứ 5 là Reston Ebola virus (REBOV) từ Philipine gây bệnh ở các loài linh trưởng. Mặc dù hiện nay chưa có bằng chứng về REBOV gây bệnh ở người nhưng trong quá trình tiến hóa, có thể xuất hiện nhiều đột biến để trở thành chủng nguy hiểm. Do đó, công tác dự phòng sẵn sàng chẩn đoán xác định chính xác 5 loài EBOV trên là cần thiết.

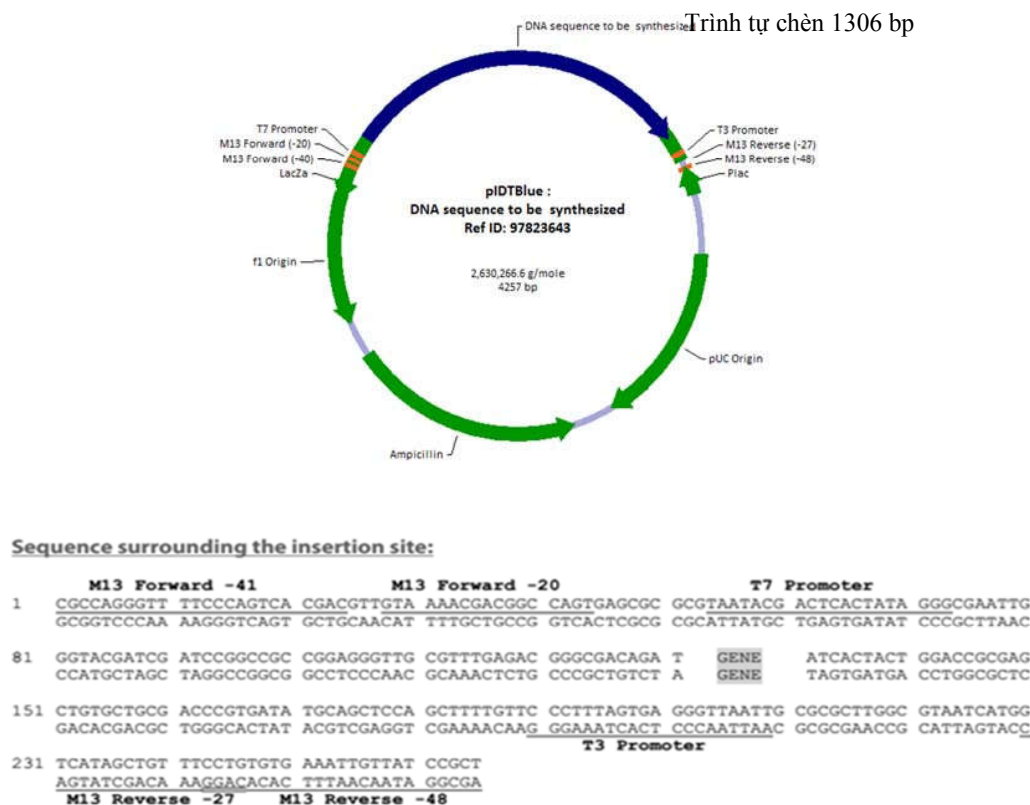
Các xét nghiệm phân tử phát hiện RNA là có giá trị trong chẩn đoán EBOV, trong đó kỹ thuật RT-PCR phát triển bởi Trung tâm Kiểm soát và Phòng ngừa dịch bệnh Hoa Kỳ (Centers for Disease Control and Prevention, USA - CDC) được đánh giá lần đầu tiên trên mẫu huyết thanh được thu thập từ những bệnh nhân cấp tính trong vụ dịch ở Kikwit 1995. Kỹ thuật realtime RT-PCR cho phép rút ngắn thời gian chẩn đoán EBOV đã được phát triển và thử nghiệm trên mẫu huyết thanh bệnh nhân từ năm 2000 [5]. Những ưu điểm nổi bật là thực hiện nhanh và trên nhiều loại mẫu bệnh phẩm khác nhau cũng như dễ dàng phát triển cho phù hợp với sự biến đổi nhanh chóng vật liệu di truyền của virus (các biến chủng virus) [4]. Trong quá trình chẩn đoán, việc có thể bất hoạt virus bằng hóa chất trước khi tách chiết RNA cho phép thực hiện các bước tiếp theo như với các tác nhân truyền nhiễm thông thường khác mà không đòi hỏi điều kiện phòng thí nghiệm an toàn sinh học cấp 4 (Biosafety level 4, BSL-4) như phương pháp nuôi cấy hay chẩn đoán huyết thanh [2, 9]. Để đáp ứng yêu cầu về an ninh quốc phòng, phòng chống dịch bệnh, việc phát triển kit chẩn đoán phân tử để phát hiện nhanh, chính xác các loài EBOV trên cơ sở các mẫu chuẩn dương là cần thiết. Tuy nhiên, 5 loài EBOV đều rất nguy hiểm và không có sẵn mẫu chuẩn, việc tiếp cận theo hướng các mẫu plasmid tổng hợp đã được khuyến cáo trên

thể giới. Hướng nghiên cứu này cho phép chủ động về nguồn mẫu chuẩn chứng dương - cơ sở trong thiết kế, đánh giá kỹ thuật cũng như khắc phục được những đòi hỏi khắt khe về an toàn sinh học khi thao tác trực tiếp với mẫu bệnh phẩm [3]. Do đó, nhóm nghiên cứu đã thực hiện công trình này để thiết lập quy trình tổng hợp *in vitro* các mẫu chuẩn dương RNA của 5 loài EBOV gây bệnh trên cơ sở các mẫu plasmid tổng hợp, ứng dụng cho thiết kế và đánh giá kỹ thuật RT-PCR xác định EBOV.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Tế bào và vector: Tế bào khả biến *E. coli* DH5 α -T1 (one shot max efficiency DH5 α -T1)[*end A1 rec A1 hsd R17 sup E44 gyp A96 thi-1 relA1 Δ lac U169 (ϕ 80 lacZM15)*] của hãng Invitrogen được sử dụng để nhân dòng các plasmid tổng hợp. 05 plasmid tái tổ hợp chứa trình tự chèn là gen nucleoprotein (NP) và một phần vùng 3'UTR của 5 loài EBOV là ZEBOV, SEBOV, BEBOV, TEBOV và REBOV tương ứng là pIDTBlue-ZE (4257 bp chứa trình tự chèn 1306 bp), pIDTBlue-SE (3841 bp chứa trình tự chèn 890 bp), pIDTBlue-BE (3841 bp chứa trình tự chèn 890 bp), pIDTBlue-TE (3847 bp chứa trình tự chèn 896 bp) và pIDTBlue-RE (3867 bp chứa trình tự chèn 916 bp), được nhóm nghiên cứu thiết kế và đặt tổng hợp từ hãng Integrated DNA Technologies (IDT- Mỹ). Sơ đồ plasmid thiết kế được minh họa ở hình 1.



Hình 1. Cấu trúc plasmid pIDTBlue-ZE chứa trình tự NP và 3'UTR của ZEBOV

Cặp mồi trong phản ứng one-step RT-PCR: Thiết kế cho xác định cả 5 loài EBOV đã được nhóm nghiên cứu công bố [1].

Bảng 1. Trình tự mồi sử dụng trong nghiên cứu

Tên mồi	Trình tự (5'-3')	Kích thước sản phẩm (bp)
Ebo-pan-Fwd	GTGTGCGARTAACTAYGAGGAAG	830
Ebo-pan-Rev3	GGCATGGCAGCMARTGTTCTC	

Nghiên cứu được thiết kế theo phương pháp thực nghiệm mô tả và phân tích trong phòng thí nghiệm sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử, với các thiết bị thuộc Phòng Vi sinh và các mầm bệnh sinh học, Trung tâm Nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nghiên cứu tạo dòng gen

Các plasmid đặt tổng hợp được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α bằng phương pháp sốc nhiệt (42°C trong 45 giây). Các plasmid tạo dòng thành công được tiến hành kiểm tra bằng các enzyme cắt giới hạn như *Bgl*II, *Xmn*I, *Ava*I, *Eco*RI, thành phần, điều kiện phản ứng thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Thermo Scientific) và giải trình tự, so sánh với các trình tự tham chiếu của EBOV trên thế giới sử dụng chương trình Blast.

2.2.2. Tổng hợp RNA *in vitro*

Năm dòng plasmid được tinh sạch theo quy trình của nhà sản xuất. Nồng độ các mẫu plasmid được đo bằng hệ thống NanoDrop 1000. Plasmid được cắt mở vòng ở một vị trí duy nhất, sử dụng enzyme cắt giới hạn *Pci*I. Đầu phiên mã của sản phẩm đích là trình tự chức năng phiên mã T7, đầu còn lại tự do là trình tự nhận biết của enzyme cắt giới hạn *Pci*I. Sản phẩm plasmid mạch thẳng được tinh sạch, đủ nồng độ được sử dụng làm nguyên liệu cho quá trình tổng hợp RNA *in vitro* bằng TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit. Thành phần của phản ứng phiên mã gồm: 5X TranscriptAid Reaction Buffer; 10 mM dNTPs mix; ~ 0,8÷1 μ g DNA plasmid; 2 μ l TranscriptAid Enzyme Mix; DEPC-treated water vừa đủ thể tích 20 μ l, ủ hỗn hợp phản ứng ở điều kiện 37°C trong 2 giờ. Loại mẫu DNA plasmid thừa bằng cách bổ sung 2 μ l DNaseI, sau đó ủ tiếp trong 15 phút ở 37°C. Các mẫu sản phẩm RNA tổng hợp *in vitro* được tinh sạch, điện di kiểm tra trên gel agarose 1% có chứa thuốc nhuộm Redsafe (Introbio) trong đệm TBE 0,5%, hiệu điện thế 75V/60 phút, chụp ảnh và lưu kết quả trên máy UVP (Eppendorf). Toàn bộ trang thiết bị, đồ tiêu hao, hóa chất sử dụng phải đảm bảo không có RNase.

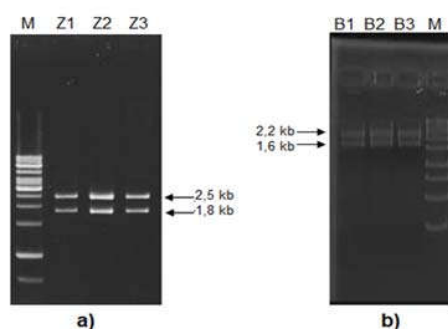
2.2.3. Đánh giá sản phẩm RNA *in vitro* bằng kỹ thuật one-step RT-PCR

Sản phẩm tổng hợp RNA *in vitro* được kiểm tra, đo nồng độ, độ tinh sạch, đánh giá bằng kỹ thuật one-step RT-PCR xác định cả 5 loài EBOV. Thành phần phản ứng one-step RT-PCR: 1X Buffer; 1 μ l RT enzyme; 0,4 mM dNTPs; 0,5 μ M Ebo-pan-Fwd/Rev3; 5 μ l RNA; H₂O vừa đủ thể tích 25 μ l (QIAGEN One-step RT-PCR kit). Chu trình nhiệt: (50°C x 30 phút) (95°C x 15 phút) (94°C x 30 giây; 50°C x 30 giây; 72°C x 45 giây) x 35 chu kỳ; 72°C x 10 phút; duy trì ở 25°C, điện di kiểm tra sản phẩm trên gel agarose 1,2%, nhuộm ethidium bromide. Các thí nghiệm đều được tiến hành đồng thời phản ứng có RT enzyme (RT(+)) và không có RT enzyme (RT(-)) để kiểm tra độ tinh sạch của sản phẩm RNA tổng hợp. Đồng thời RNA tổng hợp *in vitro* được đánh giá độ ổn định hàng tháng ở điều kiện bảo quản -80°C.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Nghiên cứu tạo dòng gen

EBOV là mầm bệnh nguy hiểm được CDC xếp vào nhóm A các tác nhân có nguy cơ khủng bố sinh học. Tuy nhiên, hiện nay chưa có trường hợp lâm sàng nhiễm EBOV được báo cáo tại Việt Nam, do đó chưa có chủng EBOV để thiết lập chứng dương cho xét nghiệm chẩn đoán phân tử. Vì vậy, để chủ động nguồn nguyên liệu phục vụ cho nghiên cứu, đồng thời bảo đảm an toàn sinh học, nhóm tác giả đã lựa chọn cách tiếp cận nghiên cứu là lựa chọn vùng gen NP và một phần vùng 3'UTR có tính bảo tồn cao của ZEBOV chủng tham chiếu Makona-J0107 (mã số: KP759768) từ vị trí nucleotide 1- nucleotide 1306 của trình tự RNA đơn (+), thiết kế trong vector tạo dòng thích hợp, đảm bảo chứa trình tự khởi đầu phiên mã T7 promoter. Plasmid này được đặt tổng hợp có tên pIDTBlue-ZE, cung cấp dưới dạng đông khô với khối lượng 4 μ g. Tương tự cho plasmid thiết kế tổng hợp của 4 loài EBOV còn lại, đồng thời, do có sự khác biệt đáng kể về mặt di truyền giữa 5 loài EBOV dẫn đến các trình tự chèn tương ứng cũng có sự khác biệt (mục 2.1).



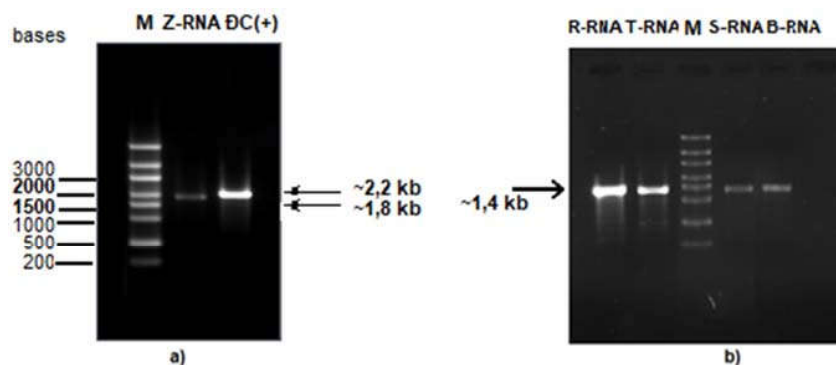
Hình 2. Kiểm tra sản phẩm cắt của plasmid tái tổ hợp chứa gen NP và một phần vùng 3'UTR của ZEBOV và BEBOV

a) Z1-Z3: Sản phẩm cắt bằng enzyme giới hạn *Bgl*II và *Xmn*I trên các dòng khuẩn lạc đánh số 1-3 của ZEBOV; b) B1-B3: Sản phẩm cắt bằng enzyme giới hạn *Eco*RI và *Xmn*I trên các dòng khuẩn lạc đánh số 1-3 của BEBOV; M: Thang chuẩn DNA 1kb (Thermo Scientific).

Để chủ động về nguồn nguyên liệu, mẫu plasmid cung cấp được tạo dòng trong tế bào *E. coli*. Mẫu plasmid thu được từ quá trình tạo dòng đều được tinh sạch và kiểm tra bằng enzyme cắt giới hạn. Kết quả, 5 mẫu plasmid tương ứng cho 5 loài EBOV đều được tạo dòng thành công, cho sản phẩm có kích thước đúng như thiết kế (hình 2). Đồng thời, kết quả giải trình tự nucleotide 5 dòng plasmid tái tổ hợp đã khẳng định chính xác kết quả tạo dòng thành công (dữ liệu không trình bày).

3.2. Tổng hợp RNA *in vitro*

Sau khi cắt bằng enzyme giới hạn tạo DNA mạch thẳng, đầu phiên mã của sản phẩm đích là trình tự chức năng phiên mã promoter T7 RNA Polymerase, cách trình tự đích một khoảng tối ưu, đầu còn lại là vị trí cắt enzyme giới hạn. Sản phẩm RNA *in vitro* của cả 5 loài EBOV gây bệnh đạt nồng độ $900 \div 1400$ ng/ μ l (tương đương 10^{12} copies/ μ l), độ tinh sạch A260/280 từ $1,8 \div 2,1$. So sánh với sản phẩm tổng hợp RNA trong nghiên cứu của Pang Z. khi thực hiện phiên mã RNA trực tiếp gen NP của các virus gây sốt xuất huyết thu được RNA nồng độ từ $200 \div 1185$ ng/ μ l, nồng độ các mẫu RNA tổng hợp *in vitro* trong công trình này cao hơn [8]. Điều này có thể được lý giải bởi quá trình phiên mã thông qua tạo dòng đã tạo nguồn nguyên liệu chất lượng cho phiên mã tổng hợp *in vitro* (hình 3).



Hình 3. Kiểm tra sản phẩm tổng hợp RNA của 5 loài EBOV

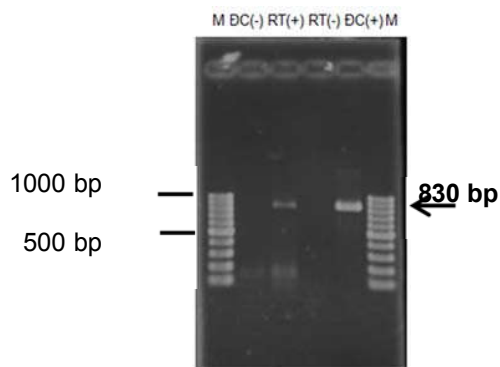
M: RiboRuler RNA Ladder (Thermo Scientific); ĐC(+): Mẫu chứng dương;
Z-RNA, R-RNA, T-RNA, S-RNA, B-RNA. Sản phẩm RNA *in vitro* của
ZEBOV, REBOV, TEBOV, SEBOV và BEBOV

Kết quả điện di của mẫu ZEBOV cho thấy, sản phẩm RNA tổng hợp *in vitro* có chiều dài khoảng 1,8 kb (lý thuyết là 1806 bases), 4 loài còn lại có chiều dài khoảng 1,4 kb đúng theo lý thuyết, còn mẫu đối chứng dương có kích thước 2,2 kb. Như vậy, bước đầu quá trình tổng hợp RNA *in vitro* của EBOV đã thành công.

3.3. Đánh giá sản phẩm RNA *in vitro* bằng kỹ thuật one-step RT-PCR

Sản phẩm RNA mới được tổng hợp được pha loãng trong nước khử ion đã xử lý diethylpyrocarbonate (DEPC), không có nuclease thành các dung dịch chứng dương RNA có nồng độ xác định, được đánh giá bằng RT-PCR có bước RT (RT (+)) và không có bước RT (RT (-)).

Kết quả cho thấy mẫu chứng dương RNA tổng hợp *in vitro* của EBOV pha loãng có nồng độ là 10^6 copies/ μ l khi được kiểm tra bằng kỹ thuật RT-PCR đều cho băng đặc hiệu 830 bp, trong khi đó các mẫu chứng âm không cho băng đích. Các mẫu khi thực hiện phản ứng RT-PCR không bổ sung enzyme RT đều không cho sản phẩm (hình 4). Đồng thời, các mẫu RNA tổng hợp *in vitro* có độ ổn định trên 12 tháng khi bảo quản ở điều kiện -80°C (dữ liệu không trình bày). Như vậy, chứng dương RNA của EBOV đã tổng hợp thành công phục vụ cho các bước thiết lập quy trình chế tạo kit chẩn đoán EBOV.



Hình 4. Đánh giá RNA *in vitro* ZEBOV bằng kỹ thuật one-step RT-PCR
M. Marker 100 bp (Thermo Scientific); ĐC(-): Mẫu chứng âm; ĐC(+): Mẫu chứng dương;
RT-PCR có enzyme RT, RT-PCR không có enzyme RT

Hiện nay, có nhiều lựa chọn loại chứng dương sử dụng trong thiết kế kỹ thuật xét nghiệm dựa trên acid nucleic. Tuy nhiên, việc sử dụng plasmid - loại được sử dụng phổ biến nhất, như một chứng dương cho RT-PCR và realtime RT-PCR là không tối ưu vì DNA không thể kiểm soát chất lượng của bước phiên mã ngược và một bản sao RNA không tương ứng với một bản sao DNA do quá trình phiên mã ngược phụ thuộc vào nhiều yếu tố như enzyme, hiệu suất của phản ứng phiên mã [10]. Một số tác giả sử dụng chứng dương RNA quy từ hiệu giá PFU (Plaque forming unit) cũng chưa phù hợp vì PFU chỉ sử dụng có những virus có hoạt tính tạo vết tan (Plaque). Ngoài ra, trên thực tế còn có thể có những phần tử không có tính gây nhiễm và hiệu giá RNA thường cao hơn ít nhất 1000 lần so với PFU nên không thể kiểm soát được hiện tượng âm tính giả ở những mẫu có một lượng khuôn mẫu thấp [5, 10]. Chính vì vậy, tổng hợp *in vitro* RNA của EBOV khắc phục được những hạn chế của việc sử dụng RNA tách chiết trực tiếp từ bệnh phẩm hay chủng virus, như không phải tiếp xúc thường xuyên với bệnh phẩm, chứng dương định lượng được, hiệu giá cao có thể tạo ra được lượng 150 μ g RNA từ 1 μ g mẫu trong khoảng thời gian 2 giờ. Mặt khác, với plasmid tổng hợp cho phép chủ động thiết kế các trình tự nucleotide theo định hướng nghiên cứu mà không phải phụ thuộc vào một trình tự nhất định từ một chủng virus trên mẫu lâm sàng. Đồng thời, vật liệu RNA tổng hợp *in vitro* đã được chứng minh có độ ổn định, đồng nhất, tinh khiết, không bị nhiễm RNA/DNA từ vật chủ và từ những tác nhân khác (như đồng nhiễm virus hay vi khuẩn) nên tránh được hiện tượng cạnh tranh giữa các tác nhân.

4. KẾT LUẬN

Đã thiết lập thành công quy trình tổng hợp RNA *in vitro* của 5 loài EBOV gây bệnh là ZEBOV, SEBOV, BEBOV, TEBOV, REBOV từ các mẫu plasmid tổng hợp với hiệu suất cao gồm các bước: (1) Tạo dòng mẫu plasmid tổng hợp trong tế bào *E. coli*; (2) Tổng hợp RNA *in vitro* sử dụng TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit; (3) Đánh giá sản phẩm RNA *in vitro* bằng điện di trên gel agarose 1% và kỹ thuật one step RT-PCR.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Văn An, Nguyễn Thái Sơn, Bùi Tiến Sỹ, Hoàng Xuân Sửu, Hồ Hữu Thọ, Đinh Thị Thu Hằng, *Phát triển kỹ thuật reverse transcription polymerase chain reaction xác định virus Ebola*, Tạp chí Y Dược học Quân sự, 2016, **41**(8):74-79.
2. Broadhurst M.J., Brooks T.J., Pollock N.R., *Diagnosis of Ebola Virus Disease: Past, Present, and Future*, Clin Microbiol Rev, 2016, **29**(4):93-773.
3. Burd E.M., *Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases*, Clin Microbiol Rev, 2010, **23**(3):76-550.
4. Formenty P., Leroy E.M., Epelboin A., Libama F., Lenzi M., Sudeck H., Yaba P., Allarangar Y., Boumandouki P., Nkounkou V.B., Drosten C., Grolla A., Feldmann H., Roth C., *Detection of Ebola virus in oral fluid specimens during outbreaks of Ebola virus hemorrhagic fever in the Republic of Congo*, Clin Infect Dis, 2006, **42**(11):1521-1526.
5. Gibb T.R., Norwood D.A., Woollen N., Henchal E.A., *Development and evaluation of a fluorogenic 5' nuclease assay to detect and differentiate between Ebola virus subtypes Zaire and Sudan*, J Clin Microbiol, 2001, **39**(11):30-4125.
6. Huang Y., Wei H., Wang Y., Shi Z., Raoul H., Yuan Z., *Rapid detection of filoviruses by real-time TaqMan polymerase chain reaction assays*, Virol Sin, 2012, **27**(5):7-273.
7. Licata J.M., Johnson R.F., Han Z., Harty R.N., *Contribution of ebola virus glycoprotein, nucleoprotein, and VP24 to budding of VP40 virus-like particles*, J Virol, 2004, **78**(14):7344-51.
8. Pang Z., Li A., Li J., Qu J., He C., Zhang S., Li C., Zhang Q., Liang M., Li D., *Comprehensive multiplex one-step real-time TaqMan qRT-PCR assays for detection and quantification of hemorrhagic fever viruses*, PLoS One, 2014, **9**(4): e95635.
9. Sanchez A., Ksiazek T.G., Rollin P.E., Miranda M.E., Trappier S.G., Khan A.S., Peters C.J., Nichol S.T., *Detection and molecular characterization of Ebola viruses causing disease in human and nonhuman primates*, J Infect Dis, 1999, **179**(1):S164-9.

10. Towner J.S., Rollin P.E., Bausch D.G., Sanchez A., Crary S.M., Vincent M., Lee W.F., Spiropoulou C.F., Ksiazek T.G., Lukwiya M., Kaducu F., Downing R., Nichol S.T., *Rapid diagnosis of Ebola hemorrhagic fever by reverse transcription-PCR in an outbreak setting and assessment of patient viral load as a predictor of outcome*, J Virol, 2004, **78**(8):41-4330.

SUMMARY

DEVELOPMENT OF A NOVEL ASSAY FOR *IN VITRO* SYNTHESIS OF THE RNA FRAGMENTS SPECIFYING 5 EBOLA VIRUS SPECIES

An *in vitro* transcribed RNA protocol of 5 pathogenic Ebola virus species ZEBOV, SEBOV, BEBOV, TEBOV, REBOV using synthesized plasmids was established with high efficient and following steps: (1) Cloning synthesized plasmids containing NP sequence and 3'UTR region of EBOV in *E. coli*; (2) 20 µl volume *in vitro* RNA transcription reaction: 5X TranscriptAid Reaction Buffer; 10 mM dNTPs mix; 0.8 - 1 µg plasmid DNA; 2 µl TranscriptAid Enzyme Mix and DEPC-treated water, 37 °C /2 hours, 2 µl DNase I, 37 °C /15 minutes by TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit. (3) Evaluation of *in vitro* transcribed RNA by electrophoresis and one-step RT-PCR assay. The *in vitro* transcribed RNA of 5 Ebola virus species with 900-1400 ng/µl concentration and from 1.8-2.1 A260/A280 ratio.

Từ khóa: 5 species, Ebola virus, RNA in vitro, synthesized plasmid.

Nhận bài ngày 21 tháng 8 năm 2017

Hoàn thiện ngày 20 tháng 10 năm 2017

⁽¹⁾ *Trung tâm Nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y*

⁽²⁾ *Bệnh viện Trung ương Quân đội 108*

⁽³⁾ *Bệnh viện Quân y 103, Học viện Quân y*