

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG**

BỘ Y TẾ

TẠ THỊ THU HỒNG

**NGHIÊN CỨU SỰ LƯU HÀNH VÀ ĐẶC ĐIỂM
PHÂN TỬ CỦA MỘT SỐ VI RÚT COXSACKIE VÀ
ECHO Ở TRẺ EM NGHI MẮC TAY CHÂN MIỆNG
TẠI MIỀN BẮC VIỆT NAM, 2008-2018**

**Chuyên ngành: Vi sinh vật học
Mã số: 9 42 01 07**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2022

CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU NÀY ĐƯỢC HOÀN THÀNH TẠI VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG

Người hướng dẫn khoa học:

1. TS. Trần Thị Nguyễn Hòa
2. TS. Dương Công Thành

- Phản biện 1: **PGS.TS. Nguyễn Quang Huy**
 *Trường Đại học Khoa học Tự Nhiên –
Đại học Quốc Gia Hà Nội*
- Phản biện 2: **PGS.TS. Nguyễn Thị Lan Phương**
 Viện vắc xin và sinh phẩm y tế
- Phản biện 3: **PGS.TS. Hoàng Đức Hạnh**
 Trường đại học Đại Nam

Luận án sẽ được bảo vệ tại Hội đồng đánh giá luận án cấp Viện họp tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

Vào hồi 9 giờ, ngày 15 tháng 12 năm 2022.

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Quốc gia
2. Thư viện Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương

DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ XUẤT BẢN LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Hoa - Tran Thi Nguyen, Nguyen The Anh, Dao Thi Hai Anh, Ngu Duy Nghia, Nguyen Thi Thu Trang, Vu Mạnh Hung, Ta Thi Thu Hong, Nguyen Thi Viet Ha, Nguyen Thi Ha, Tran Nhu Duong ang Nguyen Thi Hien Thanh, 2018. “Non-EV-A71 enteroviruses associated with hand, foot and mouth diseases among children aged under 5 years in Northern provinces, Vietnam, 2008-2018”. Vietnam Journal of Preventive Medicine, 28 (10): 15-28

2. Thi Nguyen Hoa-Tran, Anh The Nguyen, Anh Thi Hai Dao, Chikako Kataoka, Hong Thi Thu Ta, Ha Thi Viet Nguyen, Taichiro Takemura, Trang Thi Thu Nguyen, Hung Manh Vu, Thanh Thi Hien Nguyen, Hiroyuki Shimizu, 2020. “Genetic characterization of VP1 of coxsackieviruses A2, A4, and A10 associated with hand, foot, and mouth disease in Vietnam in 2012–2017: endemic circulation and emergence of new HFMD causing lineages”. Archives of Virology, doi 10.1007/s00705-020-04536-3

3. Thi Nguyen Hoa-Tran, Anh Thi Hai Dao, Anh The Nguyen, Chikako Kataoka, Taichiro Takemura, Chau Ha Pham, Hung Manh Vu, Hong Thi Thu Ta, Nguyen Thi Viet Ha, Tran Nhu Duong, Nguyen Thi Hien Thanh, Hiroyuki Shimizu, 2020. “Coxsackieviruses A6 and A16 associated with hand, foot, and mouth disease in Vietnam, 2008-2017: Essential information for rational vaccine design”. Vaccine, 38(52):8273-8285. doi: 10.1016/j.vaccine

4. Tạ Thị Thu Hồng, Nguyễn Thế Anh, Đào Thị Hải Anh, Nguyễn Thị Hiền Thanh, Trần Như Dương, Trần Thị Nguyễn Hòa, 2020. “Đặc điểm dịch tễ học phân tử và di truyền gen VP1 của vi rút Echo 18 gây bệnh Tay Chân Miệng tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam, năm 2016-2017”. Tạp chí y học dự phòng, tập 30, số 10.

5. Tạ Thị Thu Hồng, Nguyễn Thế Anh, Đào Thị Hải Anh, Vũ Mạnh Hùng, Dương Công Thành, Trần Như Dương, Trần Thị Nguyễn Hòa. 2022. “Phân tích đặc điểm gen VP1 của vi rút coxsackie A24 có liên quan đến bệnh Tay Chân Miệng tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam, 2013-2014”. Tạp chí y học dự phòng, tập 32, số 3 phụ bản

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh Tay chân miệng (TCM) là bệnh truyền nhiễm, thường gặp ở trẻ nhỏ dưới 5 tuổi. Bệnh lây chủ yếu qua đường tiêu hóa, nguồn lây chính từ nước bọt, phỏng nước và phân của trẻ nhiễm bệnh. Biểu hiện lâm sàng nổi bật của bệnh là tổn thương da, niêm mạc dưới dạng phỏng nước tại vị trí như niêm mạc miệng, lòng bàn tay, bàn chân, mông, gối. Phần lớn các trường hợp mắc bệnh diễn biến khỏi tự nhiên, tuy nhiên có thể xuất hiện một số biến chứng nguy hiểm như viêm não-viêm màng não, viêm cơ tim, biến chứng thần kinh, phù phổi cấp ... dẫn đến tử vong nếu không phát hiện và xử trí kịp thời.

Từ những năm 90 của thế kỉ XX, TCM đã trở thành bệnh phổ biến ở khu vực Châu Á Thái Bình Dương và trở thành vấn đề y tế được quan tâm. Nhiều vụ dịch lớn nhỏ đã được ghi nhận tại các quốc gia như Trung Quốc, Thái Lan, Singapore, Việt Nam, Đài Loan... Tác nhân gây bệnh TCM thuộc nhóm vi rút đường ruột (VRĐR). Trong đó, EV-A71 là tác nhân VRĐR chính gây bệnh và được quan tâm hơn do ca nhiễm thường kèm biến chứng nặng, có thể dẫn tới tử vong. Bệnh cạnh đó, các vụ dịch TCM quy mô lớn do CV-A16 và CV-A6 đã xảy ra trên thế giới với ca bệnh nặng. Một số coxsackie A khác, coxsackie B và vi rút echo... cũng là căn nguyên gây bệnh. Phần lớn các nghiên cứu khoa học tập trung trên tác nhân chính EV-A71, nghiên cứu về các VRĐR khác vẫn còn hạn chế. Công bố về VRĐR này đa phần dừng ở tỷ lệ phát hiện căn nguyên gây bệnh. Vậy câu hỏi đặt ra: đặc điểm dịch tễ, đặc điểm di truyền phân tử của căn nguyên VRĐR “ngoài EV-A71” gây bệnh TCM là gì? Một “bức tranh” toàn diện về các tác nhân gây bệnh TCM “ngoài EV-A71” bao gồm các nghiên cứu về đặc điểm dịch tễ học phân tử, đặc điểm di truyền phân tử của căn nguyên VRĐR “ngoài EV-A71” gây bệnh là hết sức cần thiết, góp phần hiểu rõ hơn về tác nhân, hỗ trợ công tác phòng, chống bệnh. Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành đề tài “Nghiên cứu sự lưu hành và đặc điểm phân tử của một số vi rút coxsackie và echo ở trẻ em nghi mắc Tay Chân Miệng tại Miền Bắc Việt Nam, 2008-2018” với mục tiêu cụ thể như sau:

Mục tiêu 1: Xác định đặc điểm lưu hành của các VRĐR ở trẻ em mắc TCM tại miền Bắc Việt Nam, giai đoạn 2008-2018

Mục tiêu 2: Phân tích đặc điểm phân tử vùng gen VP1 của một số tác nhân VRĐR coxsackie và echo có sự lưu hành nổi trội hoặc mới nổi trong giai đoạn nghiên cứu gồm CV-A6, CV-A16, CV-A10, CV-A2, CV-A4, E-18 và CV-A24.

Những điểm mới về khoa học và giá trị thực tiễn của đề tài:

Nghiên cứu được thực hiện trong thời gian dài (2008-2018) nên có ý nghĩa khoa học cao khi phân tích đặc điểm lưu hành của VRĐR theo thời gian, địa lý, độ tuổi mắc bệnh và độ lâm sàng.

Những kết quả trong nghiên cứu ngoài việc bổ sung những kiến thức hiện đang còn trống trong y văn đối với các týp VRĐR gây bệnh “ngoài EV-A71” mà còn giúp cho các nhà dịch tễ học có chiến lược phù hợp trong việc phòng và chống bệnh TCM.

Nghiên cứu cũng đặc biệt quan trọng trong thời điểm hiện tại khi cung cấp thông tin về hai tác nhân chính CV-A6 và CV-A16 cũng như các tác nhân phụ mới nổi/nổi trội trong việc nhận định chính xác hơn xu hướng nghiên cứu, sản xuất vắc xin phòng bệnh TCM

Cấu trúc của luận án

Luận án gồm: 130 trang không kể tài liệu tham khảo và phụ lục, có 17 bảng, 24 hình và 7 biểu đồ. Mở đầu 2 trang. Tổng quan 32 trang; Đối tượng và phương pháp nghiên cứu 23 trang; Kết quả 51 trang; Bàn luận 18 trang; Kết luận 3 trang và Kiến nghị 1 trang

Chương 1. TỔNG QUAN

1.1. Lược sử phát hiện bệnh Tay Chân Miệng

Bệnh Tay Chân Miệng (TCM) lần đầu được mô tả tại Canada và New Zealand (1957). Bệnh được đặt tên là bệnh TCM bởi Thomas Henry Flewett (1960) sau vụ dịch ở Anh (1959) do coxsackie A16 (CV-A16) gây ra. Vi rút đường ruột (VRĐR) là nguyên nhân gây bệnh.

1.2. Đặc điểm bệnh học của bệnh Tay chân miệng

Hầu hết ca bệnh TCM không có dấu hiệu lâm sàng hoặc ở thể nhẹ. Quá trình bệnh lý chia làm 4 giai đoạn (ủ bệnh, lây truyền, toàn phát và lui bệnh). Một số biến chứng như biến chứng thần kinh, biến chứng tim mạch, biến chứng hô hấp có thể xảy ra ở giai đoạn toàn phát và có thể diễn tiến rất nhanh, dẫn đến tử vong.

1.3. Đặc điểm dịch tễ học bệnh Tay chân miệng

1.3.1. Tình hình dịch tễ trên thế giới

Từ sau năm 1957, một số vụ dịch TCM được mô tả như tại Mỹ (1972-1977), Úc (1972-1973, 1986), Thụy Sĩ (1973), Bungari (1975), Pháp (1979)...với EV-A71 là nguyên nhân chính gây bệnh. Hai thập kỷ qua, nhiều đợt bùng phát dịch TCM đã được báo cáo, đặc biệt tại khu vực Thái Bình Dương. Cụ thể tại Trung Quốc năm 2008 (61459 ca), năm 2009 (1155525 ca mắc, 13810 ca bệnh nặng, 353 ca tử vong), năm 2018 (377629 ca), tại Đài Loan năm 2008 (129106 ca mắc, 405 ca nặng, 78 ca tử vong), tại Nhật Bản năm 1973 (3196 ca), 1978 (36301 ca), 2000 (205365 ca) và 2003 (172659 ca)... Khu vực Tây Thái Bình Dương, bệnh cũng được ghi nhận nhưng số liệu lưu lại không nhiều. Hà Lan ghi nhận 346 trường hợp nhiễm do EV-A71 từ 1965-2008, Tây Ban Nha có 99 ca mắc ở Irun (4-12/2011). Tại Đông Nam Á, các vụ dịch diễn ra thường xuyên. Ở Malaysia, trường hợp mắc TCM phát hiện đầu tiên năm 1997. Từ 6-8/1997 ghi nhận 2628 ca mắc. Năm 2018, quốc gia này có 76776 ca. Tại Singapo vụ dịch TCM vào 9-10/2000 đã có 3790 ca mắc, 3 trường hợp tử vong do EV-A71. Tại Campuchia, năm 2012 bùng phát vụ dịch TCM do týp EV-A71/C4, đã có ít nhất 54 trẻ tử vong. Tại Thái Lan, hai đợt dịch lớn năm 2012 và 2016 gây ảnh hưởng nghiêm trọng. Trong đó, đợt dịch năm 2012 là đợt dịch lớn nhất với 45464 ca nhiễm.

1.3.2. Tình hình dịch tễ tại Việt Nam

TCM được đưa vào hệ thống báo cáo giám sát thường quy theo quy định tại Thông tư số 48/2010/TT-BYT (2010). Năm 2011, khi xảy

ra đại dịch TCM, khu vực này đã ghi nhận 20529 ca mắc, 3 ca tử vong. Năm 2012, ghi nhận trong hệ thống giám sát có 51618 ca mắc, không có tử vong. Năm 2015-2016, có 424/546 (77,66%) ca dương tính với VRĐR. Kết quả xác định nguyên nhân gây bệnh cho thấy tỷ lệ % EV-A71 lần lượt là 31,2% và 29,3%; CV-A6 là 58,7% và 33,6%; CV-A16 là 4,3% và 18,1%; CV-A10 là chiếm 0,7% và 10%. Các VRĐR khác gồm CV-A4, CV-A5, CV-A8, CV-A14, E-6... Tại Hồ Chí Minh, năm 2005 đã có 764 trẻ được chẩn đoán mắc TCM tại bệnh viện Nhi đồng. 3 năm (2010-2012), số ca mắc/tử vong lần lượt là 10128/6 ca (2010); 70261/145 ca (2011); 75268/41 ca (2012). Từ 2013-2016 tỷ lệ nhiễm bệnh/tử vong tại 20 tỉnh phía Nam lần lượt là 47989/21 ca (2013), 55989/8 ca (2014), 39217/5 ca (2015) và 30285/0 (2016).

1.4. Điều trị và dự phòng bệnh Tay chân miệng

Hầu hết các ca bệnh do TCM thường nhẹ và tự hồi phục. Tuy nhiên, việc chăm sóc hỗ trợ chuyên sâu có thể cần cho bệnh nhân biến chứng nặng. Hiện nay, chủ yếu là điều trị triệu chứng và các biện pháp điều trị tích cực để duy trì chức năng sống đối với những trường hợp nặng. Một số thuốc điều trị đang trong giai đoạn thử nghiệm lâm sàng có dấu hiệu tốt cho việc điều trị như pirodavir, lactferrin, enviroxime nhưng việc áp dụng vào thực tế còn hạn chế.

Nguyên tắc phòng bệnh và việc phòng bệnh TCM tại cơ sở y tế cũng như ngoài cộng đồng được hướng dẫn tại quyết định số 1003/QĐ-BYT năm 2012. Áp dụng các biện pháp phòng ngừa chuẩn, tránh tiếp xúc với nguồn lây, thực hành rửa tay sạch, khử khuẩn bề mặt, xử lý chất thải, sử dụng áo choàng và găng tay là biện pháp quan trọng để hạn chế nhiễm trùng và lây lan dịch bệnh.

1.5. Đặc điểm lưu hành của các tác nhân vi rút đường ruột gây bệnh Tay chân miệng

EV-A71 là tác nhân chính gây ra các vụ dịch TCM. Kiểu gen gốc là BrCr-CA-70 được phân lập tại California (1970) và là kiểu gen duy nhất trong nhóm A. Kiểu gen này đã không được phát hiện sau đó cho đến năm 2008 trong một vụ dịch tại tỉnh An Huy, (Trung Quốc). Genogroup B và C tiếp tục được phân loại thành các sub genogroup nhỏ hơn B0-B5 và C1-C5. Nhóm D và G lần đầu tiên được phát hiện tại Ấn Độ, còn genogroup E và E được phát hiện tại Châu Phi và Madagasca. Sự lưu hành các sub genogroup của EV-A71 tại một số nước minh họa chi tiết tại Bảng 1.1.

Bảng 1.1. Sự lưu hành của EV-A71 tại các quốc gia

Quốc gia	Năm					
	1960–1969	1970–1979	1980–1989	1990–1999	2000–2009	2010–2016
Singapo				B3, B4	B4, B5, C1	
Malaysia				B3, B4	B4, B5, C1	
Úc				B3, C2	C1	
Nhật Bản				B3, B4, C2	B4, B5, C2, C4a	C2
Hàn Quốc				B4, C2	C2, C3, C4a, C4b	C4a
Đài Loan				B4, C2	B4, B5, C4, C5	B5, C4
Trung Quốc					C4	C4, C4a
Campuchia						C4
Việt Nam						C4, B5
Pháp					C1, C2, C4	C4
Anh				C1	C1, C2	
Đức					C1, C2	
Áo					C1, C4	
Na Uy					C1	
Hà Lan	B0	B1	B1	C1	C1, C2	
Hungary		B1			C1, C4	
Bulgaria		B1				
Mỹ	A	B1	B1	C1, C2	C2	
Peru					C1	

Tại Việt Nam, EV-A71 được phân lập đầu tiên năm 2003 trên trẻ 27 tháng tuổi tại Hà Tây với biểu hiện lâm sàng của bệnh TCM kèm theo liệt chi và viêm não. Tại miền Bắc chưa có một vụ dịch lớn nào do EV-A71 gây ra nhưng vẫn phân lập được chủng EV-A71 rải rác ở những ca bệnh lâm sàng khác nhau (TCM, VN...). Kết quả nghiên cứu trong các năm 2003, 2005-2007 cho thấy có sự lưu hành của sub genogroup C5. Nghiên cứu của tác giả Lê Thị Kim Trang tại khu vực miền Trung từ 2006 - 2014 đưa ra kết quả EV-A71 thuộc các sub genogroup C5, C4a và B5. Tại miền Nam, năm 2005, 173/441 (42,1%) mẫu phân lập tại bệnh viện Nhi đồng Hồ Chí Minh được xác định là do EV-A71 và 3 sub genogroup C1, C4, và C5.

CV-A6 và CV-A16 là hai tác nhân gây bệnh đứng vị trí số 2 và 3. Trong vòng một thập niên trở lại đây, cùng với EV-A71 và CV-A16, CV-A6 trở thành tác nhân chính gây bệnh sau khi có sự thay đổi kiểu gen và đột ngột có kiểu hình gây bệnh và gây dịch rộng khắp, tại Phần Lan năm 2008. Rất nhanh sau đây dịch TCM do CV-A6 nhanh chóng lan rộng khắp các nước trên thế giới.

Các tác nhân VRĐR khác ngoại trừ ba vi rút kể trên, gồm các vi rút coxsackie nhóm A và B, các vi rút echo và các VRĐR mới xác định chiếm khoảng 10%-20% số ca TCM dương tính với VRĐR. Nghiên cứu tại Singapo của tác giả Ang từ 2001-2007 cho thấy tỷ lệ % gây bệnh của các VRĐR khác là 16%. Tại Thượng Hải (Trung Quốc), nghiên cứu của tác giả M. Xu trong hai năm 2012-2013 chỉ ra tỷ lệ % này là 17,99 % (82/417 ca). Đặc biệt, theo nghiên cứu của tác giả Jia Xie tại Quảng Châu (Trung Quốc) cho thấy tỷ lệ này đã lên tới 35,49% (433/1220 mẫu) năm 2018. Nghiên cứu của Đoàn Ngọc Minh Quân tại miền Nam Việt Nam trong 4 năm (2013-2016), cũng cho kết quả tương tự dao động từ 15,6%-21,7% (2013-15,6%, 2014-21,7%, 2015-17,3%, 2016-21,7%). Nghiên cứu tại miền Bắc Việt Nam, giai đoạn 2015-2016 của Trần Thị Nguyễn đã xác định các vi rút đường ruột khác gồm CV-A4, CV-A5, CV-A8, CV-A14, echo 6 và Polio Sabin 3 chiếm tỷ lệ 3,5%, CV-A1, CV-A2, CV-A4, CV-A5 và CV-A8, coxsackievirus B, E-5, E-11, E-18, enterovirus týp 96 là 11% và 4% là các VRĐR không xác định được týp.

1.6. Đặc điểm vi rút học

1.6.1. Phân loại

VRĐR thuộc chi Enterovirus, họ Picornaviridea. Chi Enterovirus chia làm 15 loài. Loài tiếp tục được phân chia thành các kiểu huyết thanh (týp) VRĐR. Hiện đã phát hiện trên một trăm týp VRĐR gây bệnh ở người.

1.6.2. Hình thái cấu trúc vi rút đường ruột và vai trò của gen VP1

VRĐR không có vỏ bao, dạng hình cầu đối xứng 20 mặt, đường kính khoảng 30nm. Bên ngoài là lớp capsid hình cầu đối xứng được tạo thành bởi 60 tiểu đơn vị cấu trúc giống nhau. Mỗi tiểu đơn vị gồm 4 tiểu phần VP1-VP4. Ba tiểu đơn vị VP1, VP2, VP3 khá giống nhau, nằm ở phía trên còn tiểu phần VP4 nằm bên trong lớp capsid. Vật chất di truyền là một chuỗi ribonucleic axit (ARN) đơn, dương, kích thước 7200-8500 nucleotide (nt), cuộn chặt trong lớp vỏ capsid. Hệ gen gồm 1 khung đọc mở (ORF) duy nhất mã hóa cho một polyprotein, vùng không dịch mã (UTRs) tại đầu 5' và 3' và đuôi poly A. Tùy thuộc vào từng týp VRĐR mà vùng gen VP1 có chiều dài khác nhau (834-951 nt), trên bề mặt có nhiều vị trí kháng thể đặc hiệu và kháng thể trung hòa. Đây là vùng gen quan trọng quyết định đến tính kháng nguyên và tính độc lực của vi rút. Đột biến trên VP1 dễ dẫn đến thay đổi axit amin (aa), đặc tính gây bệnh, từ đó có thể hình thành biến chủng mới. Do đó, VP1 là

vùng gen này đại diện thích hợp trong nghiên cứu về quá trình phát sinh loài của VRĐR.

1.7. Tình hình nghiên cứu tác nhân vi rút đường ruột gây bệnh Tay chân miệng

1.7.1. Đối với týp EV-A71

Các vụ dịch TCM do EV-A71 tạo điều kiện cho các nhà khoa học có tài liệu để nghiên cứu sâu ở nhiều khía cạnh. Hệ thống phân loại của EV-A71 đã được thiết lập hoàn chỉnh dựa trên phân tích di truyền vùng gen VP1 với 7 genogroup (A-F). Đặc điểm lưu hành cụ thể từng kiểu gen cũng được theo dõi qua thời gian, quy mô gây dịch tại các quốc gia. Đồng thời, dựa trên nghiên cứu cơ bản về mô hình cấu trúc tinh thể của protein VP1, vùng liên kết kháng nguyên, kết hợp thụ thể và vị trí aa quan trọng liên quan đến độc lực của vi rút được xác định. Nghiên cứu sản xuất vắc xin EV-A71 đã tiến hành ở nhiều quốc gia. Có 4 loại vắc xin đã được Trung Quốc cấp phép (2015-2016) và lưu hành nội địa với hiệu quả đạt trên 90% mặc dù hiệu giá kháng thể thường giảm sau 6 tháng.

1.7.2. Đối với týp CV-A16, CV-A6

CV-A16 lần đầu được phân lập ở Nam Phi (1951) nhưng không có báo cáo đặc điểm dịch tễ về TCM tại thời điểm đó. Dựa trên sự khác biệt nt của vùng gen VP1, CV-A16 được xếp vào hai kiểu gen phân loại kiểu gen của CV-A16 vẫn chưa có sự thống nhất hoàn toàn.

CV-A6 nổi lên như một nguyên nhân gây bệnh chủ yếu gần đây nên nghiên cứu về tác nhân này được quan tâm. Phần lớn nghiên cứu tập trung vào đặc điểm dịch tễ và lâm sàng thông qua các vụ dịch TCM. Nghiên cứu đặc điểm sinh học phân tử, cơ chế gây bệnh và khả năng sinh miễn dịch của CV-A6 còn ít. Nghiên cứu sản xuất vắc xin còn nhiều trở ngại vì nhiều lý do như CV-A6 khó được phân lập và nhân lên hiệu quả trên dòng tế bào Vero và MRC-5, thiếu mô hình vật chủ để thực hiện thử nghiệm miễn dịch đánh giá hiệu quả của vắc xin.

1.7.3. Đối với các căn nguyên vi rút coxsackie và echo khác

Với tỷ lệ gây bệnh chiếm tới 10%-20% số ca TCM dương tính cho thấy tầm quan trọng của việc nghiên cứu các tác nhân VRĐR khác và công tác giám sát dịch TCM do tác nhân phụ gây ra là điều rất cần thiết. Hiện nay, đa số thông tin về chúng mới chỉ dừng lại tỷ lệ lưu hành. Thông tin đặc điểm di truyền phân tử, di truyền tiến hóa... trên thế giới và Việt Nam nhiều hạn chế. Chủ yếu mới được tập trung nghiên cứu

trên các bệnh mà các tít VRĐR này là tác nhân chính như viêm kết mạc (VKM), viêm màng não (VMN). Như vậy, so với bước tiến nhanh và cập nhật về EV-A71 thì nghiên cứu về CV-A16, CV-A6, và các tít VRĐR khác còn là khoảng trống. Vì vậy, nghiên cứu sự lưu hành và đặc điểm phân tử của một số vi rút coxsackie và echo góp phần làm sáng tỏ vai trò gây bệnh, sự lưu hành của CV-A16, CV-A6 và một số tít VRĐR khác là điều cần thiết.

Chương 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- **Mục tiêu 1:** Các mẫu dương tính với VRĐR đã xác định (2008-2017) và số ca TCM chưa xác định (năm 2018) thuộc chương trình giám sát bệnh TCM
- **Mục tiêu 2:** Mẫu được xác định mắc TCM do tác nhân VRĐR gồm CV-A6, CV-A16, CV-A10, CV-A2, CV-A4, E-18 và CV-A24

2.2. Địa điểm nghiên cứu

- **Địa điểm thu thập mẫu:** 26 tỉnh/thành miền Bắc
- **Địa điểm phân tích mẫu:** Phòng thí nghiệm Vi rút đường ruột - Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương

2.3. Thời gian nghiên cứu

- **Thời gian thu thập mẫu:** Từ 2008 - 2018. Cụ thể:

- Mục tiêu 1:

- ✓ **Giai đoạn 2008-2017:** Sử dụng kết quả đã có tại PTN VRĐR
- ✓ **Giai đoạn 2018:** Thu thập mẫu bệnh phẩm từ trẻ < 5 tuổi được xác định mắc TCM và gửi về PTN cùng phiếu điều tra ca bệnh.

- **Mục tiêu 2:** Mẫu được chọn từ các mẫu đã xác định dương tính với các tít CV-A6, CV-A16, CV-A10, CV-A4, CV-A2, CV-A24, E-18 và tiến hành khuếch đại toàn bộ vùng gen VP1.

- **Thời gian thực hiện nghiên cứu:** 1/2019 – 6/2022

2.4. Thiết kế nghiên cứu

2.4.1. Thiết kế nghiên cứu: Đây là nghiên cứu cắt ngang

- **Mục tiêu 1:** Thiết kế theo phương pháp dịch tễ học mô tả dựa trên thông tin điều tra cắt ngang được cung cấp cùng với mẫu bệnh phẩm xét nghiệm và kết quả định tít VRĐR tại PTN nhằm xác định đặc điểm lưu hành của các VRĐR ở trẻ em mắc TCM tại miền Bắc Việt Nam, giai đoạn 2008-2018

- **Mục tiêu 2:** Thực hiện dựa trên phương pháp nghiên cứu dịch tễ học mô tả thông qua phương pháp sinh học phân tử phân tích vùng gen VP1 tại PTN của các tác nhân VRĐR nổi trội trong giai đoạn nghiên cứu trừ EV-A71 (gồm CV-A6, CV-A16, CV-A10, CV-A2, CV-A4, E-18 và CV-A24) để đưa ra một số đặc điểm di truyền phân tử của các tác nhân này.

2.4.2. *Cỡ mẫu*

- **Mục tiêu 1:** Việc tính cỡ mẫu không áp dụng. Cụ như sau:

- **Giai đoạn 2008-2017:** Sử dụng kết quả xét nghiệm xác định týp VRĐR và thông tin từ phiếu điều tra đã có tại PTN VRĐR-Viện VSDTTU. Tổng số có 2226 mẫu được xác định dương tính và tiến hành định týp với VRĐR.

- **Giai đoạn 2018:** Mẫu bệnh phẩm thu thập từ bệnh nhân TCM kèm phiếu điều ca bệnh được gửi về PTN VRĐR-Viện VSDTTU. Tổng số có 480 mẫu bệnh phẩm. Toàn bộ 480 mẫu được xét nghiệm để xác định và định týp VRĐR gây bệnh. Kết quả có 377 mẫu được xác định dương tính và tiến hành định týp với VRĐR.

- **Mục tiêu 2:**

- **Đối với tác nhân CV-A6, CV-A16:** Do số lượng mẫu lớn nên số mẫu được chọn theo phương pháp chọn ngẫu nhiên có hệ thống, sử dụng phần mềm online <https://www.openepi.com/SampleSize/SSPropor.htm> với độ tin cậy 99,9%, dựa trên tỷ lệ dương tính và cân nhắc đến sự phân bố theo tháng và tỉnh của mỗi týp VRĐR.

- **Đối với tác nhân CV-A10, CV-A2, CV-A4, E-18 và CV-A24:** Toàn bộ mẫu được xác định dương tính với các týp VRĐR này.

2.4.3. *Phương pháp chọn mẫu*

- **Tiêu chuẩn chọn mẫu:**

- **Mục tiêu 1:**

✓ **Giai đoạn 2008-2017:** Sử dụng kết quả định týp VRĐR đã có và thông tin từ phiếu điều tra. Không áp dụng tiêu chuẩn chọn mẫu

✓ **Giai đoạn 2018:** Mẫu lâm sàng của các ca TCM thu thập trong chương trình giám sát. Mẫu được bảo quản ở 4°C và chuyển về PTN trong vòng 48-72 giờ. Nếu không gửi được ngay, mẫu bảo quản ở nhiệt độ -20°C và chuyển đến PTN trong điều kiện còn đông băng. Thông tin trên phiếu điều tra và ống tuýp chứa mẫu phải trùng khớp. Mẫu sử dụng mã số để mã hóa loại bỏ danh tính cá nhân

- **Mục tiêu 2:** Mẫu đã xử lý, được bảo quản lưu trữ tại PTN tại nhiệt độ -80°C theo đúng quy định của PTN. Thể tích mẫu trên $300\mu\text{l}$. Các mẫu trong, không có hiện tượng nhiễm trùng.

• **Tiêu chuẩn loại trừ mẫu**

- **Mục tiêu 1:**

- ✓ **Giai đoạn 2008-2017:** Không áp dụng
- ✓ **Giai đoạn 2018:** Mẫu lấy, bảo quản và vận chuyển không đúng theo quy định. Mẫu không có phiếu điều tra.

- **Mục tiêu 2:** Mẫu không đủ thể tích và chất lượng như yêu cầu

• **Phương pháp chọn mẫu:**

Bảng 2.1: Cỡ mẫu và cách chọn mẫu trong nghiên cứu

STT	Mục tiêu	Phương pháp chọn mẫu	Cơ mẫu																		
1	Xác định đặc điểm lưu hành của các VRĐR ở trẻ em mắc TCM tại miền Bắc Việt Nam, giai đoạn 2008-2018	Kết quả xét nghiệm dương tính với các tác nhân VRĐR gây bệnh và thông tin trên phiếu thu thập thông tin	Giai đoạn 2008-2017: 2226 mẫu đã có kết quả định danh VRĐR và kèm phiếu điều tra ca bệnh. Số liệu đã có sẵn tại PTN VRĐR – Viện VSDTTU Giai đoạn 2018: 480 mẫu bệnh phẩm và phiếu điều tra gửi kèm																		
2	Phân tích đặc điểm phân tử vùng gen VP1 của các tác nhân VRĐR có sự lưu hành nổi trội hoặc mới nổi gồm CV-A6, CV-A16, CV-A10, CV-A2, CV-A4, E-18 và CV-A24	- Đối với CV-A6 và CV-A16: thực hiện lựa chọn mẫu theo ngẫu nhiên có hệ thống theo địa lý (tỉnh) và thời gian (tháng) thu thập mẫu - Đối với CV-A10, CV-A2, CV-A4, CV-A24, E-18: Toàn bộ các mẫu dương tính	<table><tr><th>Tác nhân</th><th>Số mẫu lựa chọn giải trình tự gen VP1/Số mẫu dương tính của mỗi tốp (%)</th></tr><tr><td>CV-A16</td><td>195/503 (38,77%)</td></tr><tr><td>CV-A6</td><td>290/729 (39,78%)</td></tr><tr><td>CV-A10</td><td>68/68 (100%)</td></tr><tr><td>CV-A2</td><td>11/11 (100%)</td></tr><tr><td>CV-A4</td><td>22/22 (100%)</td></tr><tr><td>E-18</td><td>14/14 (100%)</td></tr><tr><td>CV-A24</td><td>9/9 (100%)</td></tr><tr><td>Tổng số mẫu giải trình tự</td><td>590</td></tr></table>	Tác nhân	Số mẫu lựa chọn giải trình tự gen VP1/Số mẫu dương tính của mỗi tốp (%)	CV-A16	195/503 (38,77%)	CV-A6	290/729 (39,78%)	CV-A10	68/68 (100%)	CV-A2	11/11 (100%)	CV-A4	22/22 (100%)	E-18	14/14 (100%)	CV-A24	9/9 (100%)	Tổng số mẫu giải trình tự	590
Tác nhân	Số mẫu lựa chọn giải trình tự gen VP1/Số mẫu dương tính của mỗi tốp (%)																				
CV-A16	195/503 (38,77%)																				
CV-A6	290/729 (39,78%)																				
CV-A10	68/68 (100%)																				
CV-A2	11/11 (100%)																				
CV-A4	22/22 (100%)																				
E-18	14/14 (100%)																				
CV-A24	9/9 (100%)																				
Tổng số mẫu giải trình tự	590																				

2.4.4. Chỉ số, chỉ tiêu nghiên cứu

• **Mục tiêu 1:**

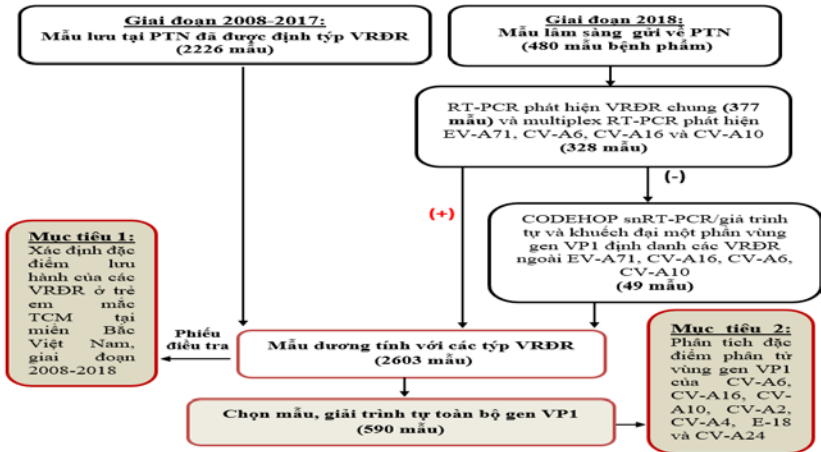
- Tỷ lệ định tốp các VRĐR ở trẻ mắc TCM năm 2018
- Tỷ lệ các tốp VRĐR liên quan đến bệnh TCM, 2008-2018
- Đặc điểm lưu hành các tốp VRĐR theo thời gian, địa lý, nhóm tuổi và độ lâm sàng

• **Mục tiêu 2:**

- Tỷ lệ khuếch đại gen VP1 của các tốp VRĐR CV-A6, CV-A16, CV-A10, CV-A2, CV-A4, E-18 và CV-A24
- Đặc điểm cây phát sinh loài xây dựng dựa trên toàn bộ vùng gen VP1 của các tốp VRĐR CV-A6, CV-A16, CV-A10, CV-A2, CV-A4, E-18 và CV-A24. Đặc điểm di truyền phân tử của vùng VP1 (gồm tỷ lệ tương đồng nt, xác định các điểm đột biến aa) của các tốp CV-A6, CV-A16, CV-A10, CV-A2, CV-A4, E-18 và CV-A24

- So sánh sự tương đồng và khác biệt vùng VP1 của các týp VRĐR này tại Việt Nam và trên thế giới

2.4.5. *Lược đồ nghiên cứu*



Hình 2.1. Lược đồ triển khai nghiên cứu

2.5. Vật liệu, sinh phẩm và thiết bị

- **Bộ môi:** Bộ môi thí nghiệm có được từ: (1) tham khảo từ bài báo đã công bố, (2) của PTN VRĐR thiết kế, (3) NCS thiết kế
- **Hóa chất sinh phẩm:** QIAampViral RNA Mini Kit, GoScript Reverse Transcription System, GoTaq™Green Master Mix 2X, ...
- **Thiết bị, vật tư:** máy PCR, máy giải trình tự gen, tủ an toàn sinh học, máy ly tâm, tủ lạnh, pipette, đầu côn có màng lọc, ống tuýp...

2.6. Quản lý và phân tích số liệu

- **Quản lý số liệu:** Quản lý trên file Excel
- **Phương pháp phân tích số liệu:**
 - **Mục tiêu 1:** Số liệu được xử lý và thực hiện phân tích trên trang web dịch tễ <http://vassarstats.net>

- **Mục tiêu 2:** Dựa trên các phần mềm và trang web

- **Đảm bảo tính chính xác của thông tin mẫu và chất lượng xét nghiệm:** Quá trình nhập liệu được kiểm tra. Bảo mật file dữ liệu. Thực hiện thí nghiệm bằng quy trình chuẩn. Thiết bị được hiệu chuẩn định kỳ. Hóa chất, sinh phẩm, vật tư sử dụng còn hạn

2.7. Đạo đức trong nghiên cứu

- Các mẫu trong nghiên cứu sử dụng nguồn mẫu được thu thập trong chương trình giám sát bệnh TCM, được thực hiện tại Viện

VSDTTU'. Việc sử dụng mẫu bệnh phẩm và phiếu điều tra cho mục đích nghiên cứu được sự cho phép của Bộ Y tế theo quyết định số 6493/QĐ-BYT năm 2016. Nghiên cứu giải trình tự và phân tích toàn bộ vùng gen VP1 được thực hiện như một phần công việc của đề tài được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (Nafosted) (đề tài mã số 106-YS.04-2016.12) và của dự án hợp tác Viện Các bệnh truyền nhiễm Quốc Gia Nhật Bản-NIID và Viện VSDTTU'.

- Các số liệu liên quan đến luận án đã công bố trong các bài báo Quốc gia và Quốc tế đều được sự đồng ý của các đồng tác giả.

- Thông tin cá nhân của đối tượng trong nghiên cứu được mã hóa dưới dạng mã số. Các kỹ thuật thực hiện trong nghiên cứu chỉ thực hiện trên mẫu bệnh phẩm đã xử lý, không gây tổn hại đến sức khỏe của đối tượng nghiên cứu. Các thông tin thu thập trong đề tài phục vụ mục đích duy nhất là nghiên cứu khoa học.

Chương 3. KẾT QUẢ

3.1. Đặc điểm lưu hành của các vi rút đường ruột

3.1.1. Kết quả định typ vi rút đường ruột năm 2018

377 mẫu có kết quả dương tính. Cụ thể: 205 mẫu (54,38%) với EV-A71, 97 mẫu (25,73%) với CV-A6, 5 mẫu (1,33%) với CV-A16, 21 mẫu (5,57%) với CV-A10, 26 mẫu (6,7%) với tác nhân VRĐR phụ và 23 mẫu (6,1%) không xác định được typ VRĐR (Bảng 3.1)

3.1.2. Kết quả định typ vi rút đường ruột giai đoạn 2008-2018

2603 mẫu dương tính với VRĐR. 2404 mẫu (92,35%) được định typ VRĐR thành công. 197 mẫu (7,65%) không xác định được typ VRĐR. 912 mẫu (35,04%) dương tính với EV-A71. Các typ VRĐR khác là 1691 mẫu (64,96%). Trong đó, 729 mẫu với CV-A6 và 503 mẫu với CV-A16. CV-A10 có 68 mẫu (2,61%). Tác nhân phụ có tỷ lệ dưới 1%. E-18 và CV-A24 là 2 typ VRĐR nổi trội của nhóm B và C (Bảng 3.1)

3.1.3. Đặc điểm lưu hành của các typ vi rút đường ruột

A. Đặc điểm phân bố theo thời gian

CV-A16 có sự dao động lớn về tỷ lệ phát hiện. CV-A16 có lượng mẫu thấp nhất năm 2018 (5/377 mẫu, 1,41%), cao vào năm 2014 (174/316 mẫu, 59,59%) và năm 2017 (58/185 mẫu, 32,58%). CV-A16 có tính chu kỳ rõ ràng với các đỉnh hẹp, xuất hiện khoảng 1-2 năm. EV-A71 cũng có đặc điểm tương tự về sự dao động lớn của các mẫu. Chu kỳ lưu hành của EV-A71 có xu hướng đỉnh rộng hơn khoảng 2-3 năm.

Bảng 3.1. Kết quả định typ VRĐR theo năm

Nhóm/typ VRĐR		2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	Tổng (n, %)	
		n = 32	n = 4	n = 8	n = 551	n = 492	n = 229	n = 316	n = 151	n = 258	n = 185	n = 377	n	%
VRĐR nhóm A	EV-A71	6	1	4	234	249	85	8	40	71	9	205	912	35,04
	CV-A6				129	114	78	70	80	83	78	97	729	28,01
	CV-A16	22	3	3	85	76	24	174	6	47	58	5	503	19,32
	CV-A10	1			3		5	10	1	26	1	21	68	2,61
	CV-A2							3		1	7		11	0,42
	CV-A4					2		4	2	1	11	2	22	0,84
	Týp Coxsackie A khác (CV-A3, 5, 8, 12 14)				8	5	9		3	7	1	4	37	1,42
VRĐR nhóm B	E-18									3	6		9	0,35
	E-11					1		4		1		3	9	0,35
	E-30				6	1		1					8	0,31
	E-6				1	3	1		1		1	1	8	0,31
	CV-A9					3	1	2			2		8	0,31
	Týp Coxsackie B khác (CV-B1, 3, 4, 5)				2	2	1	2		1		6	14	0,54
	Týp Echo khác (E1,3,5,7,9, 12,13,14,16,19,25,21,33), EV-B80			1	3	9	1	4		2	4	6	30	1,15
	VRĐR nhóm C	CV-A24						8	5				1	14
CV-A1						1		1		4		1	7	0,27
Vi rút Polio (PV1, PV2, PV3)					1			3	1				5	0,19
Týp Coxsackie A khác (CV-A1, 13, 18, 20, 22) và EV-C96					3	1	2	1		1		2	10	0,38
VRĐR không xác định týp		3			76	25	14	24	17	10	7	23	199	7,65
Tổng số VRĐR dương tính		32	4	8	551	492	229	316	151	260	185	337	2603	100
Tổng số ca bệnh TCM		480												

Có sự liên quan mang tính chất “đảo nghịch” giữa lưu hành của CV-A16 và EV-A71. Năm CV-A16 ở “đỉnh” cao của sự lưu hành đồng thời xảy ra việc EV-A71 đang ở “đáy”. Cụ thể năm 2014 và 2017 là sự nổi lên của CV-A16, chạm đáy của EV-A71 và 2018 có đặc điểm ngược lại.

CV-A6 được phát hiện lần đầu năm 2011 và có tỷ lệ % phát hiện hàng năm dao động từ 23,97% (năm 2014) đến 59,7% (năm 2015). Sự dao động về tỷ lệ % lượng mẫu của CV-A6 không quá khác biệt như EV-A71 và CV-A16. Chu kì lưu hành của CV-A6 cho thấy dạng sóng yếu hoặc tính chu kỳ không rõ ràng (Biểu đồ 3.1).

B. Đặc điểm phân bố theo địa lý

Trước năm 2011, sự phân bố của VRDR hạn chế tại 10 tỉnh (2008), 4 tỉnh (2009, 2010). Năm 2011-2012, dịch TCM xuất hiện tại 26 tỉnh. Hai tỉnh triển khai giám sát trọng điểm luôn có lượng mẫu cao nhất với 510/2603 mẫu (19,6%) tại Hải Phòng và 454/2603 mẫu (17,45%) tại Thái Bình. Thái Nguyên có số mẫu thấp nhất, xuất hiện vào năm 2008, 2011, 2014 và 2018 (1 mẫu/năm). CV-6, CV-A16, CV-A10 có sự phân bố rộng. Sự lưu hành của các tác nhân phụ khác nhau tùy thuộc vào từng tít vi rút.

C. Đặc điểm phân bố theo nhóm tuổi

Số mẫu dương tính với VRDR tập trung chủ yếu ở nhóm từ 6 tháng-3 tuổi với tỷ lệ cộng dồn lên đến 83,93%, trong đó ở độ tuổi 12-17 tháng là cao nhất (737/2603 mẫu, 28,31%). Tỷ lệ dương tính nhóm 0-5 tháng và 48-60 tháng thấp nhất, 3,92% (102/2603 mẫu). Tỷ lệ % cộng dồn mẫu CV-A6 và CV-A10 dưới 3 tuổi cao hơn so CV-A16 và EV-A71 (10,63%).

D. Đặc điểm phân bố theo độ lâm sàng

Bảng 3.2. Số lượng mẫu TCM có đặc điểm lâm sàng liên quan đến viêm não/viêm màng não và hô hấp

Tác nhân VRDR		Viêm não/ viêm màng não			Hô hấp			Tổng số	
Độ lâm sàng		2b	3	4	2b	3	4	n	%
Tác nhân VRDR ngoài EV-A71"	EV-A71	35	7	2	1		2	47	75,81
	CV-A16	2						11	17,74
	CV-A6	5							
	E-6	1							
	CV-A4		1						
	PV-2		1						
	CV-A18					1			
VRDR không xác định		3	1					4	6,45
Tổng cộng		46	10	2	1	1	2	62	100

1953 mẫu (75,03%) có thông tin về độ lâm sàng. 1751 mẫu (89,65%) có độ lâm sàng nhẹ (1, 2a), 182 mẫu (9,32%) ở độ 2b, 14 mẫu (0,72%) ở độ 3 và 6 mẫu (0,31%) ở độ lâm sàng 4. 11/62 (17,74%) ca bệnh nặng có liên quan đến biểu hiện thần kinh (VN/VMN) và vấn đề hô hấp do các týp phụ gây ra (Bảng 3.2).

3.2. Phân tích đặc điểm di truyền phân tử gen VP1 của CV-A6, CV-A16, CV-A10, CV-A2, CV-A4, E-18 và CV-A24 giai đoạn 2008-2018

3.2.1. Kết quả khuếch đại gen

Lượng mẫu giải trình tự thành công của từng týp VRĐR như sau:

Bảng 3.3 Kết quả giải trình tự khuếch đại thành công gen VP1

STT	Týp VRĐR	Số mẫu lựa chọn	Số mẫu khuếch đại thành công (n (%))
1	CV-A6	290	203 (70,0)
2	CV-A16	195	131 (67,18)
3	CV-A10	68	46 (67,64)
4	CV-A2	11	9 (81,82)
5	CV-A4	22	13 (59,1)
6	E-18	9	7 (77,80)
7	CV-A24	14	11 (78,57)

3.2.2. Đặc điểm di truyền phân tử gen VP1 của týp CV-A6

Cây phát sinh chủng loài xây dựng dựa trên 1929 trình tự hoàn chỉnh/gần hoàn chỉnh gen VP1 (≥ 800 nt) gồm 203 trình tự thuộc đề tài và toàn bộ trình tự của CV-A6 từ ngân hàng Gen (GenBank). Cây phát sinh chủng loài chia làm 4 genotype (A-D). 4/203 mẫu (1,97%) CV-A6 thu thập tại Yên Bái (2011), Bắc Kạn (2011), Quảng Ninh (2012) và Hà Nội (2012) thuộc sub genogroup D4 cùng với mẫu tại Nga và Đài Loan (2007, 2010). 199/203 mẫu (2011-2018) thuộc sub genogroup D3. Trong sub genogroup D3, CV-A6 của đề tài cùng với mẫu được phân lập tại miền Nam Việt Nam và một số các nước khác cùng thời gian tập trung thành cụm (cluster). 45 vị trí aa biến đổi tại các vòng chức năng. Mỗi vị trí có một aa chiếm ưu thế, ổn định và duy trì qua vài thập kỷ với giá trị dao động từ 79,16% (aa N137 thuộc DE) đến 98,32% (P158 thuộc EF). Sự kết hợp và duy trì ổn định của các aa này dẫn đến các kiểu hình điển hình và nổi trội. Số lượng kiểu hình nổi trội nhất là 1202/1929 trình tự (62,31%) đặc trưng bởi aa N137 (N137 featuring polymorphism) với các aa chiếm ưu thế còn lại. 158 trình tự (77,8%) CV-A6 thuộc kiểu hình nổi trội nhất này. 281/1929 trình tự (14,6%) thuộc kiểu hình nổi trội thứ hai (kết hợp của aa S137 với các aa chiếm ưu thế) trong đó có 11 trình tự CV-A6.

3.2.3. Đặc điểm di truyền phân tử gen VP1 của tít CV-A16

Cây phát sinh chủng loài gồm 131 trình tự thuộc đề tài và 2203 trình tự trên Genbank. Ngoài trừ 4 chủng (chủng gốc và 3 chủng thu thập tại Trung Quốc) thuộc genotype A, còn lại thuộc genotype B. 8/131 mẫu (6,11%) thuộc sub genogroup B1b, 123/131 trình tự (93,89%) thuộc subgenogroup B1a. Có 41 vị trí aa biến đổi tại các vòng chức năng. Mỗi vị trí có một aa chiếm ưu thế, ổn định và duy trì với giá trị dao động từ tỷ lệ % 93,65% (2186/2334 trình tự) (aa N137 thuộc DE) đến 99,99% (2332/2334 trình tự) (aa A170 thuộc EF). Kiểu hình nổi trội nhất có tỷ lệ 72,88% (1701/2334 trình tự) là sự kết hợp của aa T164 với các aa chiếm ưu thế (T164 featuring polymorphism). 114/2334 trình tự (4,88%) là kiểu hình nổi trội thứ hai là sự kết hợp của aa K164 với các aa (K164 featuring secondary dominant polymorphism). 80,15% (105/13 mẫu) CV-A16 thuộc kiểu hình nổi trội thứ 2 và 26 mẫu (19,84%) thuộc kiểu hình nổi trội nhất.

3.2.4. Đặc điểm di truyền phân tử gen VP1 của tít CV-A10

Cây phát sinh chủng loài gồm 46 trình tự thuộc đề tài và 1300 trình tự hoàn chỉnh/gần hoàn chỉnh gen VP1 (≥ 800 nt) trên Genbank. Cây phát sinh chủng loài chia làm 7 genotype từ A-G. Genotype C lớn nhất, chia làm 04 dòng (lineage) chính: MAD lineage, Euro lineage, CHN lineage, VNM lineage. 8 mẫu (17,39%) gồm 1 mẫu thu thập năm 2014 và 7 mẫu năm 2018 thuộc CHN lineage, độ tương đồng nt 97,3%-100%. 38/46 (82,61%) trình tự còn lại cùng 8 trình tự thu thập từ mẫu tại miền Nam Việt Nam (2014) và 6 trình tự từ Trung Quốc (2016-2017 và 2019) thuộc VNM lineage. Không có sự khác biệt aa tại các vòng cấu trúc ngoại trừ một vài đột biến điểm lẻ tại vài mẫu như N94D (mẫu 13.340), D97N (mẫu 16.089). Có sự thay đổi tại vị trí aa 265 và 284 qua các giai đoạn xuất hiện tại VNM lineage.

3.2.5. Đặc điểm di truyền phân tử gen VP1 của tít CV-A2

Cây phát sinh chủng loài được xây dựng dựa 9 trình tự trong nghiên cứu và 180 trình tự hoàn chỉnh/gần hoàn chỉnh gen VP1 (≥ 800 nt) trên GenBank, chia làm bốn genotype (A-D). 8/9 trình tự (88,89%) trong đề tài tập trung thành nhóm địa phương (local lineage) trong sub genotype C3 với giá trị bootstrap lên đến 100% và độ tương đồng nt dao động từ 94,0%-99,4%. Duy nhất mẫu 17.033 thu thập tại Hải Phòng (2017) thuộc genotype D. Các trình tự CV-A2 của Việt Nam xuất hiện một vài đột biến đặc trưng như K73R phát hiện tại 3 mẫu (17.005, 17.006, 17.037), S27L, N275K/R và A287G tại hai mẫu (17.005, 17.006), I258 tại 2 mẫu trên và mẫu 17.037. Các đột biến đều không thuộc của vòng chức năng.

3.2.6. Đặc điểm phân tử vùng VP1 của tít CV-A4

Cây phát sinh chủng loài được xây dựng dựa 13 trình tự trong nghiên cứu và 396 trình tự hoàn chỉnh/gần hoàn chỉnh gen VP1 ($\geq 800\text{nt}$) trên Genbank. Ngoại trừ 2 trình tự outlier, các chủng CV-A4 chia vào 3 genotype A-C. 11/13 (84,62%) trình tự khuếch đại thành công thuộc sub genotype C2 và tập trung tạo thành một lineage riêng với giá trị tái lập 100% và khác biệt nt trong nhóm dao động 0%-7% và với các trình tự khác thuộc cùng genotype C (trừ 03 mẫu TCM thu thập tại Úc năm 2016) là 8,1%-16,7%. 8/11 mẫu thu thập tại Hải Phòng năm 2017. Có 5/11 trình tự (45,45%) có độ tương đồng nt lên đến trên 99%. Các trình tự CV-A4 thu thập từ mẫu tại Hải Phòng năm 2017 có độ tương đồng nt với các trình tự thu thập từ mẫu của Thái Bình năm 2017 dao động từ 98,2%-99,2% và cao hơn khi so sánh với trình tự của mẫu tại Hải Phòng năm 2016 (93,4%-96,8%). Hai mẫu 14.038 và 15.127 thuộc sub genotype B2 phân bố gần với CV-A4 của Trung Quốc năm 2012, 2014 và 2019 liên quan đến bệnh TCM.

3.2.7. Đặc điểm phân tử gen VP1 của tít E-18

Cây phát sinh chủng loài xây dựng trên tổng số 7 trình tự trong nghiên cứu và 208 trình tự hoàn chỉnh/gần hoàn chỉnh gen VP1 ($\geq 800\text{nt}$) Genbank. Cây phát sinh chủng loài chia làm 6 genogroup (1-6). Nhóm 5 là nhóm lớn nhất, chia thành ba sub genogroup là 5-1, 5-2 và 5-3. Phân nhóm 5-3 là phân nhóm chính, gồm các chủng E-18 lưu hành ở nhiều nước từ năm 2004 và chủ yếu từ bệnh nhân VMN, số ít bệnh nhân TCM tại Trung Quốc (2015-2016). 7 mẫu E-18 đều thuộc phân nhóm 5-3 và nằm gần nhất với 1 mẫu phân lập trên bệnh nhân VMN tại Trung Quốc (2017) và với các mẫu E-18 gây VMN tại Thái Lan (2016), có độ tương đồng nt dao động 96,4%-98,8%. Độ tương đồng gen VP1 giữa mẫu Việt Nam so với mẫu thuộc nhóm 5-3 lưu hành ở các nước còn lại như Trung Quốc, Úc, Pháp... từ 88,3%-96,4%. Độ tương đồng aa vùng VP1 của các mẫu E-18 tại Việt Nam là 98,5%-100% và với mẫu E-18 khác thuộc 5-3 là 92,1%-100%. Không phát hiện sự khác biệt aa giữa mẫu E-18 Việt Nam và các mẫu thuộc nhóm 5-3.

3.2.8. Đặc điểm di truyền phân tử gen VP1 của tít CV-A24

Cây phát sinh chủng loài được xây dựng dựa trên 11 trình tự trong nghiên cứu, 331 trình tự CV-A24 hoàn chỉnh/gần hoàn chỉnh gen VP1 ($\geq 800\text{nt}$) trên GenBank và chia làm 2 cụm. Cụm 1 gồm các chủng thuộc chủng gốc Joshep thu thập từ Nam phi, Puerto Rico và Mỹ, cụm 2 gồm các chủng biến thể CV-A24 được phát hiện và phân lập từ năm 1970 tại Singapo và là tác nhân chính gây bệnh VKM từ các nước Thái Lan, Pháp,

Brazil... Cụm 2 chia là 4 genotype (GI-GIV). GIV là phân nhóm lớn nhất, (258/343 trình tự) được chia làm các subgenotype GIV-C2 đến GIV-C5. 11 mẫu CV-A24 đều thuộc phân nhóm GIV-C5 với các chủng thu thập trong dịch VKM tại Thái Lan (2014), Trung Quốc (2010), Nhật Bản (2010-2011). Các trình tự CV-A24v độ tương đồng nt 97,4%-100% và độ tương đồng gần nhất với chủng gây bệnh VKM tại Thái Lan (2014), lên đến trên 99%. Các đột biến điển hình S11T, L25H/P, S32L/P, A111P, D116N, L159I, V224T/A/D, Y230F, F250Y, I259V phân biệt giữa CV-A24v gây bệnh VKM và CV-A24 cũng được tìm thấy ở mẫu nghiên cứu.

Chương 4. BÀN LUẬN

4.1. Đặc điểm lưu hành của vi rút đường ruột gây bệnh Tay chân miệng tại Miền Bắc Việt Nam, 2008-2018

4.1.1. Đặc điểm các tít vi rút đường ruột theo thời gian

EV-A71 là tác nhân gây bệnh nổi trội nhất. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây tại Việt Nam. Bên cạnh đó, nghiên cứu cũng cho thấy tầm quan trọng của các tác nhân “ngoài EV-A71” khi chiếm tới xấp xỉ 2/3 số các ca mắc.

CV-A6 trong đề tài được phát hiện lần đầu năm 2011, tỷ lệ % cao góp phần cung cấp bằng chứng cho giả thuyết về thời điểm bắt đầu lưu hành của CV-A6 ở Việt Nam cũng như bổ sung minh chứng cho sự bùng phát giai đoạn 2011-2012 trên thế giới. Đề tài bước đầu nhận định quy luật lưu hành của CV-A6 và CV-A16 tại miền Bắc. Xu hướng trở thành tác nhân lưu hành nổi trội của CV-A16 thường có mối tương quan “ngược” với EV-A71. Nghiên cứu của Ya F. H. tại Bắc Kinh (2010-2019) nhận định sự lưu hành của CV-A6 trái chiều với CV-A16 và EV-A71. Như vậy, mối liên quan về chu kỳ lưu hành của ba tác nhân này tại mỗi quốc gia là khác nhau nên cần theo dõi để xác định đặc điểm lưu hành trên toàn cầu.

Tác giả Margarita P. S. và Nicholas C.G. dự đoán E-18 xuất hiện trở lại sau khoảng 10 năm (năm 2015/2016). Dự đoán này khá phù hợp với tái lưu hành của E-18 gây bệnh VN/VMN và TCM tại Trung Quốc (2015-2016), Việt Nam (2016-2017). E-18 của đề tài thuộc cùng phân nhóm 5-3 với chủng gây bệnh VN/VMN và không có đột biến có ý nghĩa tại các vùng kháng nguyên quan trọng gợi ý chúng mang cùng quy luật đồng lưu hành với các chủng gây bệnh VN/VMN. Nghiên cứu của tác giả Magilê c. Fonseca đã chỉ ra 5 vụ dịch VKM do CV-A24 tại Cu Ba có sự đồng xuất hiện với vụ dịch tại các nước như Mexico, Trung Quốc, Thái Lan...với chu kỳ khoảng 5 năm/lần. 13/14 mẫu CV-A24 được thu thập vào 2013-2014

cùng thời điểm CV-A24v gây dịch VKM tại Thái Lan. Sau 5 năm (2018) lại phát hiện được 1 mẫu CV-A24. Do đó, CV-A24 gây bệnh TCM có thể cũng tuân theo chu kỳ lưu hành 5 năm như đối với dịch VKM.

4.1.2. Đặc điểm dịch tễ học theo địa lý

Hai tác nhân chính CV-A6 và CV-A16 có sự lưu hành rộng tại nhiều địa phương. CV-A10 được phát hiện ở 13 tỉnh. Đáng lưu ý, Hải Phòng và Thái Bình luôn phát hiện được CV-A10 ở tất cả các năm tác nhân này có mặt cho thấy CV-A10 hoàn toàn có thể bùng phát thành vụ dịch ở nhiều địa phương. Sự phân bố của các týp VRĐR phụ khác nhau. CV-A2 hay E-18 phân bố chỉ giới hạn ở một vài tỉnh trái lại, CV-A4 hay CV-A24 cho thấy tác nhân này có thể lây lan trên diện rộng.

4.1.3. Đặc điểm phân bố theo độ tuổi

Nhóm tuổi mắc bệnh chủ yếu là từ 12-23 tháng. Kết quả phù hợp với các công bố trước đây về lứa tuổi mắc TCM như của tác giả Trần Thị Nguyễn Hòa (2015-2016), Đoàn Ngọc Minh Quân (2013-2016), Zhang Jing (2008-2009), Li Qi (2009-2016). Việc CV-A6 và CV-A10 có độ tuổi mắc bệnh “sớm hơn” so với týp VRĐR “truyền thống” là EV-A71 và CV-A16 là điểm mới khi trước đây có báo cáo cho rằng không có sự khác biệt về phân bố tuổi bệnh TCM do CV-A6 và do HEVA khác ở Châu Á.

4.1.4. Đặc điểm dịch tễ học theo độ lâm sàng

Hơn 89% (1751/1953 mẫu) ở mức độ lâm sàng nhẹ (1, 2a) phù hợp với nhận định về bệnh TCM. Với kết quả 11/62 trường hợp nặng liên quan đến biến chứng thần kinh và hô hấp do VRĐR “ngoài EV-A71” gây ra, tác nhân phụ CV-A24 và CV-A4 cũng ghi nhận có trường hợp nặng (2b) dẫn đến lưu ý cần được cân nhắc đồng thời phân tích mối liên quan giữa các chủng gây bệnh TCM và bệnh khác.

4.2. Đặc điểm di truyền phân tử VP1 của CV-A6, CV-A16, CV-A10, CV-A2, CV-A4, E-18 và CV-A24 gây bệnh Tay chân miệng tại miền Bắc Việt Nam, 2008-2018

4.2.1. CV-A6 và CV-A16 lưu hành tại miền Bắc Việt Nam, 2008-2018 thuộc sub genotype phổ biến lưu hành trên thế giới

Trên 98% số trình tự CV-A6 của nghiên cứu thuộc sub genogroup D3-phân nhóm gen lớn nhất, chứa phần lớn các chủng CV-A6 mới nổi, lưu hành gây bệnh TCM từ năm 2008. Các trình tự CV-A6 có độ tương đồng nt cao với nhau và với các chủng khác trên thế giới trong cùng khoảng thời gian. Điều đó cho phép nhận định các chủng CV-A6 thuộc đề tài có tính lưu hành mang tính toàn cầu. Kết quả của đề tài góp phần cung cấp

bằng chứng cho thấy sự lưu hành bền bỉ và chiếm ưu thế của sub genogroup D3 của CV-A6 tại Việt Nam.

Mẫu CV-A16 phân bố trên cả hai sub genogroup B1a (2008-2015) và B1b (2008-2018). Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Si-Jie He (2010), Wei Y. (2015), Zhenlu S. (2018), Long Ch. (2020) tại Trung Quốc, Pirom N. (2018) tại Thái Lan. Trong sub genogroup B1a, CV-A16 có xu hướng nằm cùng nhóm với chủng CV-A16 lưu hành tại miền Nam Việt Nam và nhiều quốc gia (Trung Quốc, Thái Lan, Úc, Malaysia...).

Phần lớn các mẫu phân tích cho thấy CV-A6 và CV-A16 thuộc về phân nhóm/kiểu gen lớn nhất, chịu trách nhiệm về sự lưu hành trên toàn thế giới trong nhiều thập kỷ qua. Hai sub genogroup này nên là đích quan trọng trong việc phân tích thông tin để thiết kế vắc xin. Việc nghiên cứu vắc xin đối với tác nhân CV-A6 thuộc sub genogroup D3 đáp ứng được việc phòng ngừa không chỉ dừng lại ở một quốc gia cụ thể. Đối với CV-A16, tuy sub genogroup B1b có số lượng trình tự lớn nhưng phần lớn lại từ Trung Quốc. 123/131 mẫu trong nghiên cứu thuộc B1a - là kiểu gen phụ có sự đa dạng của rất nhiều chủng tại nhiều quốc gia. Do đó, việc sản xuất vắc xin đối với tác nhân CV-A16 cần dựa trên cả hai phân nhóm B1a và B1b để đảm bảo có thể sử dụng rộng rãi tại nhiều quốc gia. Đồng thời các chủng CV-A6 và CV-A16 tại Việt Nam hoàn toàn có thể trở thành ứng viên cho việc nghiên cứu vắc xin.

4.2.2. CV-A10 gây bệnh Tay chân miệng tại miền Bắc Việt Nam thuộc VNM lineage, 2008-2018 và sự mới nổi của CHN lineage vào năm 2018

32 mẫu (96,97%) CV-A10 từ 2011-2018 thuộc VNM lineage với độ tương đồng nt cao. Cho thấy đây là lineage được hình thành từ CV-A10 lưu hành tại Việt Nam. Năm 2018, 6/13 mẫu (46,15%) năm 2018 tiếp tục thuộc VNM lineage và có độ tương đồng nt cao so với các trình tự thu thập năm 2016-2017 gợi ý cho thấy trong VNM lineage các chủng CV-A10 năm 2016-2017 đã tiếp tục lưu hành.

7/13 mẫu (53,85%) của năm 2018 thuộc CHN lineage với độ tương đồng nt trên 99%. Độ tương đồng nt của chúng với các mẫu thu thập tại Trung Quốc cùng thời điểm cao hơn so với trình tự thu thập năm 2014 cùng lineage. Như vậy, CHN lineage đã có sự xuất hiện lại tại Việt Nam (năm 2014 chỉ có 1 mẫu) với lượng mẫu nhiều hơn. Ngoài ra, CV-A10 thuộc CHN lineage mang đột biến G23V, I283V được coi có thể là nguyên nhân gây thay đổi cấu trúc và chức năng của VP1 và làm tăng tốc độ lây lan của vi rút nhanh hơn. Liệu có sự thay thế CHN lineage thay cho VNM lineage trong tương lai hay có sự song song tồn tại của CHN lineage và

VNM lineage? Do đó cần theo dõi giám sát chặt chẽ xu hướng xuất hiện, lưu hành của CV-A10 các năm tiếp theo.

4.2.3. CV-A2, CV-A4 gây bệnh Tay chân miệng tại miền Bắc Việt Nam, 2008-2018 thuộc genotype phổ biến lưu hành nhưng có xu hướng hình thành nên dòng lưu hành mang tính địa phương (local lineage)

8/9 mẫu CV-A2 thuộc genotype C - nơi tập trung các chủng thu thập từ Nga, Mỹ, Ấn Độ, Úc, Anh ... trên bệnh nhân LMC, VN. Tương tự, 11/13 trình tự CV-A4 cũng tập trung trong sub genotype C2 là sub genotype có sự đa dạng của CV-A4...và hầu hết liên quan đến các bệnh không phải TCM. Cả hai tít VRĐR này đều thuộc genotype phổ biến lưu hành toàn cầu, gây ra các bệnh khác nhau như LCM, VN. Bên cạnh đó, xu hướng tiến hóa trong các dòng di truyền của chính CV-A2 và CV-A4 đã thể hiện “tính ổn định địa phương” hoặc “lưu hành đặc hữu”. Các mẫu CV-A2 thuộc sub genotype C3 với giá trị bootstrap lên đến 100%, tương đồng nt lên đến 99,4% gợi ý việc chúng có chung nguồn gốc (original clone) và hình thành nên một lineage nhỏ trong sub genotype C2. 11/13 trình tự CV-A4 có độ khác biệt nt dưới 7% và khác với các trình tự khác thuộc cùng genotype C là 8,1%-17,6% cho thấy sự tập trung thành local lineage của CV-A4. Các mẫu CV-A4 thu thập năm 2016–2017 đều thuộc kiểu genotype được tìm thấy tại mẫu phân lập tại Hà Nội năm 2012 (genotype C). Điều này cho thấy các mẫu nổi trội có nguồn gốc chung với chủng lưu hành tại địa phương bốn năm trước. Đây là bằng chứng cho giả thuyết lưu hành của CV-A2 hay CV-A4 phụ thuộc vào vị trí địa lý và khả năng lưu hành phổ biến đã được đề cập trong một số nghiên cứu trước đây.

4.2.4. CV-A2, CV-A4, E-18 và CV-A24 gây bệnh Tay chân miệng tại miền Bắc Việt Nam, 2008-2018 tiêu biểu cho sự chuyển đổi về bệnh cảnh lâm sàng (clinical manifestation)

Hầu hết/tất cả các chủng CV-A4, CV-A2, E-18 hay CV-A24 của Việt Nam thuộc về kiểu gen gồm các chủng có liên quan đến các bệnh không phải TCM. CV-A2 và CV-A4 thuộc về genotype có sự đa dạng về địa lý lưu hành và gây ra các bệnh không phải TCM. 100% các chủng E-18 cùng phân nhóm 5-3 với các chủng gây bệnh VN/VMN còn CV-A24 thuộc về GIV-C5 gồm các chủng gây bệnh VKM. Trình tự aa tại vị trí vòng chức năng của CV-A2 và CV-A4 không có sự khác biệt giữa các chủng Việt Nam gây bệnh TCM và các chủng gây LMC hay VHH trên thế giới. E-18 không có sự xuất hiện bất kỳ đột biến có nghĩa nào tại các vùng kháng nguyên quan trọng. CV-A24 có sự tương đồng cao lên đến 100% về trình tự nt và aa của VP1 giữa các mẫu phát hiện tại Việt Nam với các chủng gây VKM tại Thái Lan.

E-18 gây bệnh TCM năm 2016-2017 và các chủng VMN tại Thái Lan và Trung Quốc tại giai đoạn 2016-2017. CV-A24 năm 2013-2014 diễn ra cùng thời điểm dịch VKM tại Thái Lan (2014), dịch TCM và VHH tại Trung Quốc (2013-2014). Điều này gợi ý có sự thay đổi/bổ sung thêm bệnh cảnh lâm sàng (clinical manifestation) tại các týp VRĐR phụ. Cụ thể như E-18 gây VN đã xuất hiện thêm đặc tính gây bệnh TCM, CV-A24 gây bệnh VKM đặc biệt là các chủng tại Thái Lan (CV-A24v), chỉ bổ sung thêm đặc tính gây bệnh mới ngoài VKM.

4.3. Hạn chế của đề tài

Mẫu được thu thập trong chương trình giám sát dịch TCM nên lượng mẫu gửi về PTN phụ thuộc vào thực tế triển khai chương trình. Nghiên cứu hiện đang phân tích vùng gen VP1, chưa phân tích các gen khác hoặc toàn bộ hệ gen của các tác nhân. Do đó chưa đánh giá đầy đủ về đặc điểm phân tử của các týp VRĐR này. Số lượng nghiên cứu về các tác nhân CV-A2, CV-A4, E-18 và CV-A24 đối với bệnh TCM còn hạn chế. Do đó, chưa có số liệu phong phú có thể có sự so sánh đặc điểm di truyền phân tử của chúng tại Việt Nam đối với các nước khác trên thế giới đối với bệnh TCM.

KẾT LUẬN

1. Đặc điểm lưu hành của các VRĐR “ngoài EV-A71” ở trẻ em mắc TCM tại miền Bắc Việt Nam, giai đoạn 2008-2018

• Tỷ lệ phát hiện

- 2404/2603 mẫu dương tính với VRĐR được định danh. EV-A71 là 35,04% tổng số mẫu dương tính, 44 týp VRĐR còn lại chiếm 64,96%. Trong đó, CV-A6, CV-A16 và CV-A10 là ba týp chính, chiếm tỷ lệ lần lượt là 28,01%, 19,32% và 2,61%. Các VRĐR khác đều có tỷ lệ dưới 1%, điển hình như CV-A4 (0,84%), CV-A24 (0,54%), CV-A2 (0,42%), E-18 (0,35%), E-30 (0,31%), E-6 (0,31%), CV-A9 (0,31%) và CV-A1 (0,27%).

• Đặc điểm phân bố theo thời gian

- Tỷ lệ phát hiện CV-A16 hàng năm có dao động từ 1,41%-59,59%. Sự lưu hành của CV-A16 có tính chu kỳ, các đỉnh kéo dài khoảng 1-2 năm và mang tính chất “đảo nghịch” với chu kỳ lưu hành của EV-A71.

- CV-A6 liên tục duy trì là một trong ba týp VRĐR lưu hành nổi trội giai đoạn 2011-2018, tỷ lệ phát hiện hàng năm dao động 23,97% - 59,7%. Tính chu kỳ của CV-A6 không rõ ràng như CV-A16, EV-A71.

- CV-A10, CV-A4, CV-A2, E-18 và CV-A24 thỉnh thoảng lưu hành nổi trội trong thời gian ngắn, tỷ lệ có thể đến 2,67% (CV-A24 năm 2013) hoặc 10,07% (CV-A10 năm 2016).

- **Đặc điểm phân bố về địa lý**

- CV-A6 và CV-A16 có sự lưu hành trên 26 tỉnh miền Bắc, CV-A10 phát hiện ở 13 tỉnh, tuy nhiên sự phân bố có thể biến động theo năm, tùy thuộc vào thời điểm lưu hành gây dịch của từng týp. Sự phân bố của các VRĐR khác như CV-A2, CV-A4, CV-A24 và E-18 hạn chế từ 2-8 tỉnh, thường tập trung ở hai tỉnh Thái Bình, Hải Phòng

- **Đặc điểm phân bố theo nhóm tuổi**

- Số mẫu dương tính với VRĐR tập trung ở các nhóm tuổi từ 6 tháng đến dưới 3 tuổi, với tỷ lệ tích lũy lên đến 83,93%.

- Sự phân bố của tác nhân gây bệnh “mới nổi” CV-A6 và CV-A10 có xu hướng “trẻ hóa” so với tác nhân “truyền thống” EV-A71 và CV-A16: tỷ lệ phần trăm tích lũy ở các nhóm tuổi từ 6 tháng đến 3 tuổi do nhiễm CV-A6 và CV-10 cao hơn 10,63% so với EV-A71 và CV-A16.

- **Đặc điểm phân bố theo độ lâm sàng**

- 93,2% các ca TCM liên quan đến nhiễm VRĐR “ngoài EV-A71” ở thể nhẹ (1 và 2a) nhưng vẫn có những trường hợp ngoại lệ về sự phân bố bao gồm CV-A4 (15,78% số ca có độ lâm sàng 2b và 3) và CV-A24 (37,5% có độ lâm sàng 2b).

- 17,74% số ca thể nặng kèm biến chứng thần kinh hoặc/và hô hấp có liên quan nhiễm CV-A6, CV-A16, E-6, PV-2, CV-A4 và CV-A18.

2. Đặc điểm di truyền phân tử vùng VP1 của CV-A6, CV-A16, CV-A10, CV-A2, CV-A4, E-18 và CV-A24, giai đoạn 2008-2018

- 98,03% số mẫu CV-A6 trong nghiên cứu thuộc CV-A6_D3 và 93,89% mẫu CV-A16 thuộc CV-A16_B1a, là sub-genotype/sub-genogroup lớn nhất và gồm các chủng CV-A6 và CV-A16 lưu hành gây bệnh TCM trên thế giới hơn một thập niên trở lại.

- Trình tự aa trên các vùng chức năng VP1 của các chủng CV-A6 và CV-A16 Việt Nam tương đối bảo thủ: 77,8% CV-A6 miền Bắc Việt Nam mang kiểu hình “CV-A6/N137-featuring”, cũng là kiểu hình chiếm ưu thế (62,31%) của CV-A6 trên thế giới. Tuy nhiên, 80,15% mẫu CV-A16 miền Bắc Việt Nam mang đột biến K164, là kiểu hình xếp thứ hai (4,88%) của CV-A16 trên thế giới; Ngược lại, kiểu hình chiếm ưu thế “T164 featuring polymorphism” trên toàn cầu (72,88%) chỉ đứng thứ 2 (19,84%) trong tổng số CV-A16 tại miền Bắc Việt Nam.

- CV-A10 lưu hành tại miền Bắc Việt Nam thuộc genotype C, là genotype bao gồm các chủng gây bệnh TCM tại một số nước trên thế giới từ năm 2008. 82,61% CV-A10 Việt Nam thuộc về “VNM lineage”; tuy

nhiên, đáng lưu ý là sự mới nổi của CV-A10_CHN lineage vào năm 2018, chiếm 53,84% tổng số CV-A10 lưu hành cùng năm.

- 88,89% CV-A2 và 84,61% CV-A4 trong nghiên cứu lần lượt thuộc về sub-genotype C3 và sub-genotype C2, là sub-genotype bao gồm các chủng gây các loại bệnh khác trên thế giới trong hơn một thập kỷ qua. Tương tự CV-A10, phần lớn CV-A2 (88,89%) và CV-A4 (84,61%) lưu hành tại Việt Nam tập trung ở lineage mang tính địa phương và mang các đột biến trên VP1 đặc trưng riêng, bao gồm đột biến trên vùng chức năng BC và HI ở một số chủng CV-A4.

- 100% mẫu E-18 thuộc phân nhóm gen 5-3, là phân nhóm gen lớn nhất, chứa các mẫu E-18 phân lập từ bệnh nhân VN/VMN trên thế giới từ năm 2004 và từ bệnh nhân TCM ở Trung Quốc năm 2015 - 2016.

- 100% CV-A24 gây bệnh TCM ở Việt Nam đều thuộc phân nhóm GIV-C5, phân nhóm gen lớn nhất chứa các chủng CV-A24v gây dịch VKM trên thế giới.

- Nghiên cứu trên CV-A2, CV-A4, E-18 và CV-A24 đã cung cấp bằng chứng về xu hướng bổ sung/chuyển đổi đặc tính gây bệnh/bệnh cảnh lâm sàng (clinical manifestation) của các VRĐR để trở thành các tác nhân gây bệnh TCM như từng xảy ra với CV-A6 và CV-A10

KIẾN NGHỊ

- Kết quả nghiên cứu gợi ý rằng sự phát triển một vắc-xin TCM có tác dụng bảo vệ phổ rộng và hiệu quả, ít nhất tại Việt Nam, ngoài kháng EV-A71 còn phải nhắm đến CV-A6 và CV-A16 với vai trò là những tác nhân VRĐR chính gây bệnh TCM. Các chủng CV-A6 và CV-A16 phân lập tại Việt Nam cũng như dữ liệu về đặc điểm di truyền phân tử của chúng có thể sử dụng trong việc nghiên cứu và sản xuất vắc xin.

- Nghiên cứu nhấn mạnh tầm quan trọng trong việc tiếp tục giám sát sự lưu hành của các VRĐR “ngoài EV-A71”, đặc biệt đối với tác nhân phụ/hiếm gặp như CV-A2, CV-A4, CV-A24 và E-18... để có thể xác định rõ vai trò là “tác nhân gây bệnh TCM” hay “tác nhân gây những bệnh tương tự bệnh TCM” và để hiểu hơn về đặc điểm lưu gây bệnh của những typ/biến thể vi rút mới nổi. Nghiên cứu trên toàn bộ hệ gen cũng cần được thực hiện để hiểu đầy đủ hơn về những thay đổi di truyền tiến hóa và cơ chế phân tử liên quan đến sự tồn tại và lưu gây bệnh của các VRĐR “ngoài EV-A71” trong cộng đồng