

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi là Tạ Thị Thu Hồng – Nghiên cứu sinh khóa 37, đơn vị đào tạo - Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương, chuyên ngành Vi sinh vật, xin cam đoan:

1. Đây là luận án nghiên cứu do nghiên cứu sinh thực hiện dưới sự hướng dẫn của TS. Trần Thị Nguyễn Hòa và TS. Dương Công Thành.
2. Các số liệu, thông tin và kết quả trong nghiên cứu là hoàn toàn trung thực, chính xác, khách quan, chưa từng được công bố trong bất cứ công trình nghiên cứu nào khác.

*Hà Nội, ngày tháng 12 năm 2022*

***Nghiên cứu sinh***

***Tạ Thị Thu Hồng***

## LỜI CẢM ƠN

Trong suốt quá trình học tập và thực hiện đề tài, tôi đã luôn nhận được sự giúp đỡ tận tình của Đơn vị công tác, Đơn vị đào tạo, các Thầy cô, đồng nghiệp của mình.

Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc tới hai người thầy hướng dẫn TS. Trần Thị Nguyễn Hòa và TS. Dương Công Thành đã tận tình chỉ dạy, chia sẻ, giúp đỡ, động viên tôi trong suốt quá trình thực tập. Trong đó tôi đặc biệt cảm ơn TS. Trần Thị Nguyễn Hòa đã trực tiếp hướng dẫn tôi học và xây dựng hệ thống phương pháp luận, cập nhật kiến thức, thực hiện nghiên cứu, góp ý và chỉnh sửa luận án.

Tôi xin bày tỏ lời biết ơn tới GS.TS. Lê Thị Quỳnh Mai - Phó Viện trưởng Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương đã giúp tôi trong những ngày đầu học tập và luôn động viên, quan tâm đến tôi trong quá trình thực hiện luận án.

Xin cảm ơn Phòng thí nghiệm vi rút đường ruột – Khoa vi rút, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương và các cán bộ thuộc phòng Thí nghiệm đã giúp đỡ không chỉ về trang thiết bị, hóa chất, sinh phẩm mà còn kỹ thuật xét nghiệm, tạo điều kiện tốt nhất cho tôi thực hiện nghiên cứu, hoàn thành luận án.

Xin cảm ơn cán bộ thuộc Trung tâm đào tạo và Quản lý Khoa học, Viện Vệ sinh Dịch tễ đã luôn tạo điều kiện giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu.

Cuối cùng tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành tới đồng nghiệp, gia đình đã là chỗ dựa tinh thần để tôi hoàn thành luận án

*Hà Nội, ngày tháng 12 năm 2022*

**Tác giả luận án**

***Tạ Thị Thu Hồng***

## MỤC LỤC

<b>LỜI CAM ĐOAN .....</b>	<b>i</b>
<b>LỜI CẢM ƠN .....</b>	<b>ii</b>
<b>DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT.....</b>	<b>vii</b>
<b>DANH MỤC BẢNG.....</b>	<b>viii</b>
<b>DANH MỤC HÌNH.....</b>	<b>ix</b>
<b>DANH MỤC BIỂU ĐỒ.....</b>	<b>x</b>
<b>ĐẶT VẤN ĐỀ .....</b>	<b>1</b>
<b>CHƯƠNG I – TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....</b>	<b>3</b>
1.1. Lược sử phát hiện bệnh Tay chân miệng.....	3
1.2. Đặc điểm bệnh học của bệnh Tay chân miệng .....	3
1.2.1. Bệnh Tay chân miệng.....	3
1.2.2. Phân loại độ lâm sàng bệnh Tay chân miệng .....	4
1.2.3. Biến chứng nặng của bệnh Tay chân miệng .....	5
1.3. Đặc điểm dịch tễ bệnh Tay chân miệng và tác nhân gây bệnh chủ yếu .....	6
1.3.1. Đường truyền và yếu tố tác động .....	6
1.3.2. Tình hình dịch tễ bệnh Tay chân miệng trên thế giới và nguyên nhân gây bệnh chủ yếu.....	7
1.3.3. Tình hình dịch tễ bệnh Tay chân miệng tại Việt Nam và nguyên nhân gây bệnh chủ yếu.....	10
1.4. Điều trị và dự phòng bệnh Tay chân miệng .....	12
1.4.1. Điều trị bệnh Tay chân miệng .....	12
1.4.2. Phòng bệnh Tay chân miệng .....	13
1.5. Đặc điểm lưu hành của các tác nhân vi rút đường ruột gây bệnh Tay chân miệng .....	14
1.6. Đặc điểm vi rút học.....	18
1.6.1. Phân loại .....	18
1.6.2. Hình thái cấu trúc vi rút đường ruột.....	20
1.6.3. Cấu trúc hệ gen của vi rút đường ruột.....	21

1.6.4. Vai trò quan trọng của vùng gen VP1 .....	23
1.6.5. Tính chất lý hóa.....	26
1.6.6. Quá trình nhân lên của vi rút đường ruột trong tế bào vật chủ .....	26
1.7. Chân đoán tác nhân vi rút đường ruột trong phòng thí nghiệm.....	29
1.7.1. Phân lập vi rút.....	29
1.7.2. Phản ứng trung hòa.....	30
1.7.3. Kỹ thuật xét nghiệm nhanh .....	30
1.7.4. Kỹ thuật RT-PCR và giải trình tự .....	30
1.8. Tình hình nghiên cứu tác nhân vi rút đường ruột gây bệnh Tay chân miệng.	31
1.8.1. Tình hình nghiên cứu đối với căn nguyên EV-A71 .....	31
1.8.2. Tình hình nghiên cứu đối với căn nguyên CV-A16 và CV-A6 .....	32
1.8.3. Tình hình nghiên cứu đối với các căn nguyên vi rút coxsackie và echo khác .....	34
<b>CHƯƠNG II: PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>35</b>
2.1. Đối tượng nghiên cứu .....	35
2.2. Địa điểm nghiên cứu.....	35
2.3. Thời gian nghiên cứu .....	35
2.4. Thiết kế nghiên cứu .....	35
2.4.1. Thiết kế nghiên cứu.....	35
2.4.2. Cỡ mẫu .....	36
2.4.3. Phương pháp chọn mẫu .....	37
2.4.4. Chỉ số, chỉ tiêu nghiên cứu .....	39
2.4.5. Lược đồ nghiên cứu.....	39
2.5. Vật liệu, sinh phẩm và thiết bị.....	40
2.5.1. Bộ môi định tít VRĐR và khuếch đại, giải trình tự vùng gen VP1.....	40
2.5.2. Vật tư, trang thiết bị .....	43
2.5.3. Hóa chất, sinh phẩm.....	43
2.6. Kỹ thuật thực hiện trong nghiên cứu .....	45
2.6.1. Kỹ thuật thu thập thông tin (sử dụng trong Mục tiêu 1) .....	45

2.6.2. Xử lý mẫu bệnh phẩm thu thập năm 2018 (sử dụng trong Mục tiêu 1)...	45
2.6.3. Tách chiết ARN (sử dụng trong Mục tiêu 1, 2) .....	45
2.6.4. Kỹ thuật RT-PCR chẩn đoán vi rút đường ruột chung và multiplex RT-PCR phát hiện EV-A71, CV-A6, CV-A16 và CV-A10 (sử dụng trong Mục tiêu 1).....	46
2.6.5. Kỹ thuật CODEHOP snRT-PCR/sequencing và khuếch đại một phần vùng gen VP1 định danh các vi rút đường ruột ngoài EV-A71, CV-A16, CV-A6, CV-A10 (sử dụng trong Mục tiêu 1).....	48
2.6.6. Thiết kế primer khuếch đại toàn bộ vùng gen VP1 của E-18 và CV-A24 (sử dụng trong Mục tiêu 2).....	51
2.6.7. Khuếch đại và giải trình tự gen VP1 (sử dụng trong Mục tiêu 2).....	53
2.6.8. Phân tích di truyền gen VP1 (sử dụng trong Mục tiêu 2) .....	55
2.7. Quản lý và phân tích số liệu .....	56
2.7.1. Quản lý số liệu.....	56
2.7.2. Phân tích số liệu .....	56
2.8. Đạo đức trong nghiên cứu .....	57
<b>CHƯƠNG III: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>58</b>
3.1. Đặc điểm lưu hành của các VRĐR ở trẻ em mắc TCM tại miền Bắc Việt Nam, giai đoạn 2008-2018 .....	58
3.1.1. Kết quả định tít vi rút đường ruột năm 2018 .....	58
3.1.2. Kết quả định tít vi rút đường ruột giai đoạn 2008-2018.....	58
3.1.3. Đặc điểm lưu hành của các tít vi rút đường ruột .....	60
3.2. 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 .....	71
3.2.1. Kết quả khuếch đại gen .....	71
3.2.2. Đặc điểm di truyền phân tử vùng gen VP1 của tít CV-A6.....	73
3.2.3. Đặc điểm di truyền phân tử vùng gen VP1 của tít CV-A16.....	80
3.2.4. Đặc điểm di truyền phân tử vùng gen VP1 của tít CV-A10.....	87
3.2.5. Đặc điểm phân tử vùng gen VP1 của tít CV-A2.....	91
3.2.6. Đặc điểm di truyền phân tử vùng gen VP1 của tít CV-A4.....	96

3.2.7. Đặc điểm di truyền phân tử vùng gen VP1 của týp E-18.....	101
3.2.8. Đặc điểm phân tử vùng gen VP1 của týp CV-A24.....	105
<b>CHƯƠNG IV: BÀN LUẬN.....</b>	<b>109</b>
4.1. Đặc điểm lưu hành của vi rút đường ruột gây bệnh Tay chân miệng tại miền Bắc Việt Nam, 2008-2018 .....	109
4.1.1. Đặc điểm các týp vi rút đường ruột theo thời gian .....	109
4.1.2. Đặc điểm các týp vi rút đường ruột trong nghiên cứu theo địa lý .....	114
4.1.3. Đặc điểm các týp vi rút đường ruột trong nghiên cứu theo độ tuổi .....	115
4.1.4. Đặc điểm các týp vi rút đường ruột trong nghiên cứu theo mức độ lâm sàng .....	116
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 .....	117
4.2.1. CV-A6 và CV-A16 lưu hành tại miền Bắc Việt Nam giai đoạn 2008-2018 thuộc sub genotype phổ biến lưu hành trên thế giới .....	117
4.2.2. CV-A10 thuộc VNM lineage gây bệnh Tay chân miệng tại miền Bắc Việt Nam giai đoạn 2008-2018 và sự mới nổi của của CHN lineage vào năm 2018. ....	120
4.2.3. CV-A2, CV-A4 gây bệnh Tay chân miệng tại miền Bắc Việt Nam giai đoạn 2008-2018 thuộc genotype phổ biến lưu hành nhưng có xu hướng hình thành nên dòng lưu hành mang tính địa phương (local lineage).....	122
4.2.4. CV-A2, CV-A4, E-18 và CV-A24 gây bệnh Tay chân miệng tại miền Bắc Việt Nam giai đoạn 2008-2018 tiêu biểu cho sự chuyển đổi về bệnh cảnh lâm sàng (clinical manifestation) .....	123
4.3. Hạn chế của đề tài.....	125
<b>KẾT LUẬN .....</b>	<b>127</b>
<b>KIẾN NGHỊ</b>	
<b>NHỮNG BÀI BÁO CÔNG BỐ CỦA NHÓM NGHIÊN CỨU</b>	
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b>	
<b>PHỤ LỤC</b>	

**DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT**

<b>Chữ viết tắt</b>	<b>Từ tiếng Anh đầy đủ</b>	<b>Từ, nghĩa tiếng Việt</b>
aa	Amino acid	Axit amin
ARN	Ribonucleic acid	Axit ribonucleic
ADN	Deoxyribonucleic acid	Axit Deoxy- ribonucleic
bp	Base pair	
CV-A6	Coxsackievirus A6	Vi rút Coxsackie A6
CV-A16	Coxsackievirus A16	Vi rút Coxsackie A16
CV-A10	Coxsackievirus A10	Vi rút Coxsackie A10
CV-A2	Coxsackievirus A2	Vi rút Coxsackie A2
CV-A4	Coxsackievirus A4	Vi rút Coxsackie A4
CV-A24	Coxsackievirus A24	Vi rút Coxsackie A24
cs		cộng sự
E-18	Echovirus 18	Vi rút Echo 18
EV-A71	Enterovirus type A71	Vi rút EV-A71
Exposed loop		Cấu trúc vòng bộc lộ ra bên ngoài
IRES	Internal ribosome entry site	Trình tự tiếp nhận ribosome bên trong
LMC	Acute Flaccid Paralysis	Liệt mềm cấp
ML	Maxium Likelihood	
nt	Nucleotide	
PTN		Phòng thí nghiệm
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction	Phản ứng khuếch đại chuỗi gen sao chép ngược
Sub genotype		Phân nhóm
TCM	Hand foot and mouth disease	Bệnh Tay chân miệng
VHH		Viêm họng hạt
VKM	Acute hemorrhagic conjunctivitis	Viêm kết mạc
VRDR		Vi rút đường ruột
VSDTTU		Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương
TCYTTG	World Health organization	Tổ chức Y tế thế giới

## DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Sự lưu hành của EV-A71 tại các quốc gia [125] .....	15
Bảng 1.2. Các kiểu vi rút đường ruột thuộc loài A, B, C và D [53, 129, 139] .....	19
Bảng 2.1. Cỡ mẫu và cách chọn mẫu trong nghiên cứu .....	38
Bảng 2.2. Danh sách môi sử dụng trong nghiên cứu .....	41
Bảng 2.3. Hóa chất, sinh phẩm dùng trong nghiên cứu .....	43
Bảng 3.1. Các tác nhân VRĐR được xác định trong giai đoạn 2008-2018 .....	59
Bảng 3.2. Số lượng các mẫu VRĐR gây bệnh TCM theo nhóm tuổi và năm .....	66
Bảng 3.3. Số lượng mẫu dương tính theo độ lâm sàng .....	69
Bảng 3.4. Số lượng mẫu TCM có đặc điểm lâm sàng liên quan đến viêm não/viêm màng não và hô hấp.....	71
Bảng 3.5. Kết quả giải trình tự thành công của các tít VRĐR .....	73
Bảng 3.6. Sự thay đổi axit amin tại các vị trí vòng chức năng trên VP1 của CV-A6 .....	78
Bảng 3.7. Sự thay đổi axit amin tại các vị trí vòng chức năng trên VP1 của CV-A16 .....	85
Bảng 3.8. Đột biến axit amin trên vùng gen VP1 của CV-A2 .....	94
Bảng 3.9. Đột biến trên vùng gen VP1 của CV-A4 giữa các trình tự trong nghiên cứu và trên thế giới.....	99
Bảng 3.10. Các đột biến axit amin trên vùng gen VP1 của E-18 .....	103
Bảng 3.11. Vị trí đột biến axit amin trên gen VP1.....	108
và tỷ lệ mẫu CV-A24 mang đột biến .....	108



## DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Đặc điểm của bệnh TCM diễn biến theo thời gian [88].....	4
Hình 1.2. Dịch TCM tại các nước thuộc khu vực Châu Á Thái Bình Dương, giai đoạn 1965-2015 [91].....	9
Hình 1.3. Sự lưu hành của EV-A71 tại Miền Trung Việt Nam [20] .....	17
Hình 1.4. Cấu trúc VRĐR và vị trí của 4 tiểu phần protein VP1, VP2, VP3, VP4 trên bề mặt vi rút [32].....	20
Hình 1.5. Mô hình cấu trúc hệ gen của vi rút đường ruột (EV-A71) [197].....	22
Hình 1.6. Cấu trúc các protein của vỏ capsid [52] .....	23
Hình 1.7. Vị trí kháng nguyên của một số tít vi rút đường ruột [26] .....	25
Hình 1.8. Chu trình nhân lên của vi rút đường ruột [32] .....	28
Hình 2.1. Lược đồ triển khai nghiên cứu .....	40
Hình 2.2. Sơ đồ quy trình thiết kế môi của E-18 và CV-A24.....	52
Hình 2.3. Lược đồ phản ứng RT-PCR và giải trình tự khuếch đại gen VP1 .....	54
Hình 2.4. Lược đồ phân tích di truyền gen VP1 .....	55
Hình 3.1. Sản phẩm điện di của CV-A10 .....	72
Hình 3.2. Cây phát sinh chủng loài trình tự gen VP1 của CV-A6.....	74
Hình 3.3. Sự đồng lưu hành của CV-A6 thuộc sub genogroup D3 tại Việt Nam và các nước trên thế giới .....	76
Hình 3.4. Cây phát sinh chủng loài trình tự gen VP1 của CV-A16.....	81
Hình 3.5. Sự đồng lưu hành của CV-A16 tại Việt Nam và các nước trên thế giới ..	83
Hình 3.6. Cây phát sinh chủng loài trình tự gen VP1 của CV-A10.....	88
Hình 3.7. Cây phát sinh chủng loài gen VP1 của CV-A10 thuộc lineage VNM.....	90
Hình 3.8. Cây phát sinh chủng loài trình tự gen VP1 của CV-A2.....	92
Hình 3.9. Cây phát sinh chủng loài trình tự gen VP1 của CV-A4.....	97
Hình 3.10. Vị trí các đột biến axit amin của CV-A4 .....	100
Hình 3.11. Cây phát sinh chủng loài trình tự gen VP1 của E-18.....	101
Hình 3.12. Cây phát sinh chủng loài trình tự gen VP1 CV-A24 .....	106

**DANH MỤC BIỂU ĐỒ**

Biểu đồ 3.1. Tính chu kỳ của CV-A6, CV-A16 giai đoạn 2011-2018 thông qua tỷ lệ % phát hiện trên toàn Miền Bắc (A), Thái Bình (B) và Hải Phòng (C).....	60
Biểu đồ 3.2. Số mẫu dương tính với VRĐR theo tháng trong năm.....	62
Biểu đồ 3.3. Phân bố mẫu dương tính với VRĐR gây bệnh TCM theo tỉnh/thành phố tại miền Bắc Việt Nam, giai đoạn 2008-2018.....	63
Biểu đồ 3.4. Phân bố CV-A6, CV-A16 và CV-A10 tại các tỉnh miền Bắc Việt Nam, giai đoạn 2008-2018.....	64
Biểu đồ 3.5. Sự phân bố các tác nhân theo nhóm tuổi.....	67
Biểu đồ 3.6. Tỷ lệ % theo độ lâm sàng của các tác nhân vi rút đường ruột .....	70

## 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.

## CHƯƠNG I – TỔNG QUAN TÀI LIỆU

### 1.1. Lược sử phát hiện bệnh Tay chân miệng

Bệnh Tay Chân Miệng (TCM) lần đầu tiên được mô tả tại Canada và New Zealand năm 1957. Bệnh được đặt tên là bệnh Tay Chân Miệng bởi Thomas Henry Flewett (1960) sau một vụ dịch ở Anh năm 1959 với tác nhân được xác định là coxsackie A16 (CV-A16) [24]. Sau đó, bệnh TCM xuất hiện phổ biến ở nhiều quốc gia như Trung Quốc, Pháp, Thái Lan, Việt Nam, Singapo... [4, 5, 7, 9, 97, 142, 187]. Vi rút đường ruột (VRĐR) được xem là tác nhân gây bệnh, trong đó VRĐR loài A gồm enterovirus A71 (EV-A71), coxsackie A6 (CV-A6), coxsackie A16 (CV-A16), coxsackie A10 (CVA-10) là các tác nhân lưu hành gây bệnh nổi trội.

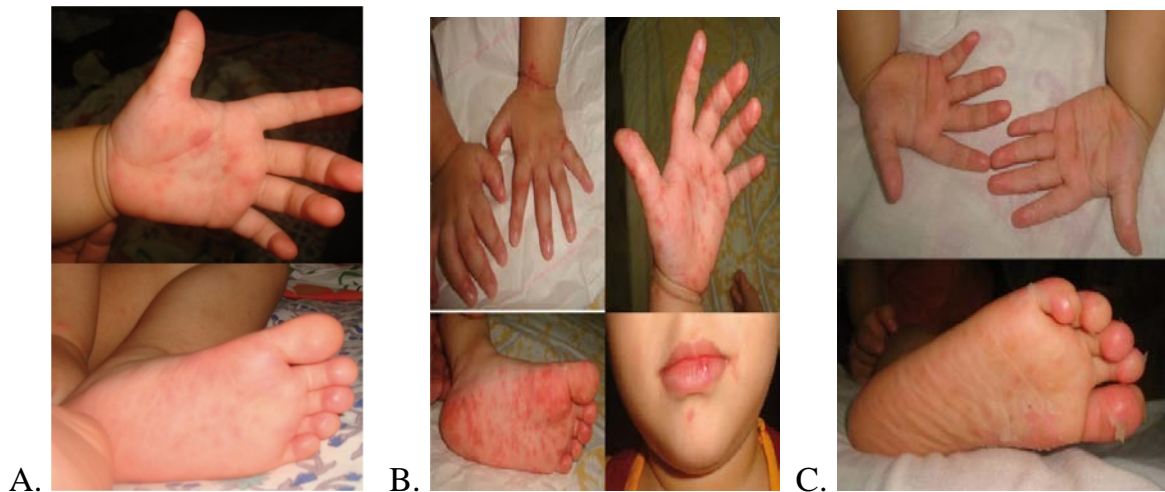
### 1.2. Đặc điểm bệnh học của bệnh Tay chân miệng

#### 1.2.1. Bệnh Tay chân miệng

Hầu hết ca bệnh TCM không có dấu hiệu lâm sàng hoặc ở thể nhẹ. Tỷ lệ nhỏ liên quan đến hội chứng lâm sàng điển hình. Quá trình bệnh lý có thể chia làm 4 giai đoạn. Cụ thể như sau [2]:

- **Giai đoạn ủ bệnh:** 3-7 ngày kể từ khi nhiễm. Trong giai đoạn này trẻ vẫn bình thường và thường không có triệu chứng.
- **Giai đoạn lây truyền:** 1-2 ngày đến vài ngày trước khi phát bệnh. Bệnh biểu hiện mạnh nhất trong tuần đầu, có thể kéo dài đến vài tuần sau đó, thậm chí cả sau khi bệnh nhân hết triệu chứng. Một số triệu chứng điển hình như: sốt nhẹ, mệt mỏi, đau họng, biếng ăn, tiêu chảy vài lần trong ngày.
- **Giai đoạn toàn phát:** Có thể kéo dài 3-10 ngày với các triệu chứng điển hình như: loét miệng, phát ban dạng phỏng nước tại các vị trí lòng bàn tay, lòng bàn chân, gối, mông; tồn tại trong thời gian ngắn ( $\leq 7$  ngày) sau đó có thể để lại vết thâm, rất hiếm khi loét hay bội nhiễm. Ngoài ra trẻ có thể sốt nhẹ và nôn. Nếu trẻ sốt cao và nôn nhiều dễ dẫn đến nguy cơ biến chứng. Một số biến chứng có thể xuất hiện như: biến chứng thần kinh, biến chứng tim mạch (viêm cơ tim, suy tim), biến chứng hô hấp (viêm phổi, phù phổi).
- **Giai đoạn lui bệnh:** Diễn ra sau giai đoạn toàn phát 3-5 ngày

- Trẻ hồi phục hoàn toàn. Nếu có biến chứng sẽ trở thành thể tối cấp: Bệnh diễn tiến rất nhanh, có các biến chứng nặng dẫn đến tử vong.
- Vi rút có khả năng đào thải qua phân trong vòng 2-4 tuần, cá biệt có thể lên tới 12 tuần sau nhiễm. Vi rút tồn tại, nhân lên ở trên đường hô hấp trên và đào thải qua dịch tiết từ họng hầu trong 2 tuần. Vi rút cũng có thể có nhiều trong dịch từ nốt phỏng nước, vết loét của bệnh nhân.



**Hình 1.1. Đặc điểm của bệnh TCM diễn biến theo thời gian [88]**

**Ghi chú**

- A. Nốt sần trên tay và bàn chân vào ngày thứ nhất
- B. Nốt sần và mụn nước tại vị trí tay, chân và miệng vào ngày thứ 3
- C. Tổn thương đang phục hồi vào ngày thứ 15

**1.2.2. Phân loại độ lâm sàng bệnh Tay chân miệng**

Theo quyết định số 1003/QĐ-BYT năm 2012 của Bộ Y tế, bệnh TCM chia thành 4 cấp độ lâm sàng dựa trên dấu hiệu và triệu chứng [2]:

- **Độ 1:** Chỉ loét miệng hoặc tổn thương da
- **Độ 2:** Chia làm độ 2a và 2b
  - Độ 2a: Có một trong các dấu hiệu: Bệnh sử co giật mình dưới 2 lần/30 phút và không ghi nhận lúc khám. Sốt trên 2 ngày, hay sốt trên 39°C, nôn, lừ đừ, khó ngủ, quấy khóc vô cớ.
  - Độ 2b: Có dấu hiệu thuộc nhóm 1 hoặc nhóm 2:

\* Nhóm 1: Có một trong các biểu hiện: Giật mình ghi nhận lúc khám, bệnh sử có giật mình  $\geq 2$  lần/30 phút, bệnh sử có giật mình kèm theo một dấu hiệu sau như ngủ gà, mạch nhanh  $>130$  lần/phút (khi trẻ nằm yên, không sốt).

\* Nhóm 2: Có một trong các biểu hiện: Sốt cao  $\geq 39,5^{\circ}\text{C}$  (đo nhiệt độ hậu môn), không đáp ứng với thuốc hạ sốt, mạch nhanh  $>150$  lần/phút (khi trẻ nằm yên, không sốt), thất điều: run chi, run người, ngồi không vững, đi loạng choạng, rung giật nhãn cầu, lác mắt, yếu chi hoặc liệt chi, liệt thần kinh sọ: nuốt sặc, thay đổi giọng nói...

- **Độ 3**: Có các dấu hiệu: mạch nhanh  $>170$  lần/phút (khi trẻ nằm yên, không sốt), một số trường hợp có thể mạch chậm (dấu hiệu rất nặng), vã mồ hôi, lạnh toàn thân hoặc khu trú ...
- **Độ 4**: Có một trong các dấu hiệu: Sốc, phù phổi cấp, tím tái,  $\text{SpO}_2 < 92\%$ , ngưng thở, thở nấc.

### ***1.2.3. Biến chứng nặng của bệnh Tay chân miệng***

Biến chứng thần kinh, hô hấp và tuần hoàn là các biến chứng thường gặp của bệnh TCM. Theo Tổ chức Y tế thế giới (TCYTTG) năm 2011, biến chứng của bệnh thường xảy ra sớm trong 24-72 giờ. Các biến chứng có thể dẫn đến tử vong. Tùy thuộc vào tác nhân gây bệnh, thời gian diễn ra biến chứng có thể khác nhau. Ví dụ: tác nhân EV-A71 có xu hướng gây ra biến chứng thần kinh trong giai đoạn cấp nhưng CV-A16 không có đặc điểm này. Khoảng 10%-30% số trường hợp nhập viện trong các vụ dịch TCM do EV-A71 tại châu Á tiến triển đến biến chứng thần kinh (viêm não, viêm màng não, liệt mềm cấp (LMC) [67, 81, 206]. Tổn thương viêm não trong TCM do EV-A71 thường khu trú tại vùng màng não-trung khu hô hấp tuần hoàn nên trẻ thường biểu hiện bệnh cảnh suy hô hấp tuần hoàn sau tổn thương thần kinh nhưng ít có biểu hiện rối loạn ý thức nặng hoặc không có rối loạn ý thức [41]. Ngoài ra, TCM cũng có thể gây nhiều biến chứng khác như viêm phổi, suy hô hấp, phù phổi cấp, viêm cơ tim, tăng huyết áp, suy tim, trụy mạch... Bệnh nặng thường có biến chứng thần kinh chỉ sau vài giờ có biểu hiện suy hô hấp tuần hoàn [184].

### **1.3. Đặc điểm dịch tễ bệnh Tay chân miệng và tác nhân gây bệnh chủ yếu**

#### **1.3.1. Đường truyền và yếu tố tác động**

TCM chủ yếu lây truyền theo đường tiêu hóa với nguồn lây chính do tiếp xúc trực tiếp với các dịch của cơ thể như nước bọt, phỏng nước, phân của người nhiễm bệnh hoặc mang mầm bệnh không có triệu chứng. Khả năng lây cao nhất diễn ra trong tuần đầu của bệnh. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra đặc điểm của bệnh TCM phụ thuộc vào các yếu tố: lứa tuổi, thời gian trong năm, vùng miền, điều kiện sinh hoạt...

Trẻ dưới 5 tuổi là đối tượng bị ảnh hưởng nhiều nhất, thường gặp ở trẻ nam nhiều hơn trẻ nữ [78]. Kết quả nghiên cứu của tác giả Bending J.W. và Fleming D.M. (năm 1994) cho thấy hầu hết bệnh nhân nhiễm bệnh có độ tuổi từ 1 đến 4 tuổi sống ở miền trung hoặc miền nam nước Anh và xứ Wales [33]. Nghiên cứu của J. Wang và cs giai đoạn 2012-2016 tại Thượng Hải (Trung Quốc) hay của Wang tại Trùng Khánh (Trung Quốc) từ 2013-2018 cũng chỉ ra độ tuổi nhiễm bệnh chủ yếu là 1-3 tuổi (trung bình là 2,15), tỷ lệ mắc theo giới tính nam/nữ là 1,8:1 [178, 180]. Một số yếu tố khác có thể tác động làm tăng khả năng lây truyền và bùng phát dịch như mật độ dân số cao, không gian sống chật chội, điều kiện vệ sinh kém, thiếu nhà vệ sinh, thiếu hoặc không có nước sạch phục vụ sinh hoạt hằng ngày.

Các ca bệnh nhỏ lẻ và các vụ dịch của bệnh TCM diễn ra rải rác quanh năm, khắp mọi nơi với điều kiện khí hậu khác nhau. Tại Thái Lan, nghiên cứu của tác giả Samphutthanon chỉ ra bệnh có thể xảy ra bất cứ thời điểm nào trong năm, đỉnh dịch rơi vào mùa mưa và lạnh. Ngược lại, nghiên cứu của Wang từ 2013-2018 tại Trùng Khánh (Trung Quốc) lại cho thấy đỉnh dịch diễn ra vào mùa xuân và hè [154, 180]. Phân tích của tác giả Onozuka và Hashizume về ảnh hưởng của nhiệt độ, độ ẩm đến tỷ lệ mắc bệnh tại Nhật Bản cho thấy độ tuổi dưới 4 có tỷ lệ mắc cao nhất, số ca mắc bệnh tăng trung bình 11,2% (95% CI: 3,2-19,8) khi nhiệt độ tăng trung bình 1°C/1 tuần, số ca mắc tăng trung bình 4,7% (95% CI:2,4) khi độ ẩm tăng 1% [134].



### ***1.3.2. Tình hình dịch tễ bệnh Tay chân miệng trên thế giới và nguyên nhân gây bệnh chủ yếu***

Bệnh TCM được mô tả lần đầu tại Toroto (Canada) năm 1957 [152]. Một số vụ dịch đã được mô tả những năm của thập niên 70-80 như tại Mỹ (1972-1977), Úc (1972-1973, 1986), Thụy Sĩ (1973), Bungari (1975), Hungary (1978), Pháp (1979)...Trong các vụ dịch này, EV-A71 là nguyên nhân chính gây bệnh [37, 124, 184].

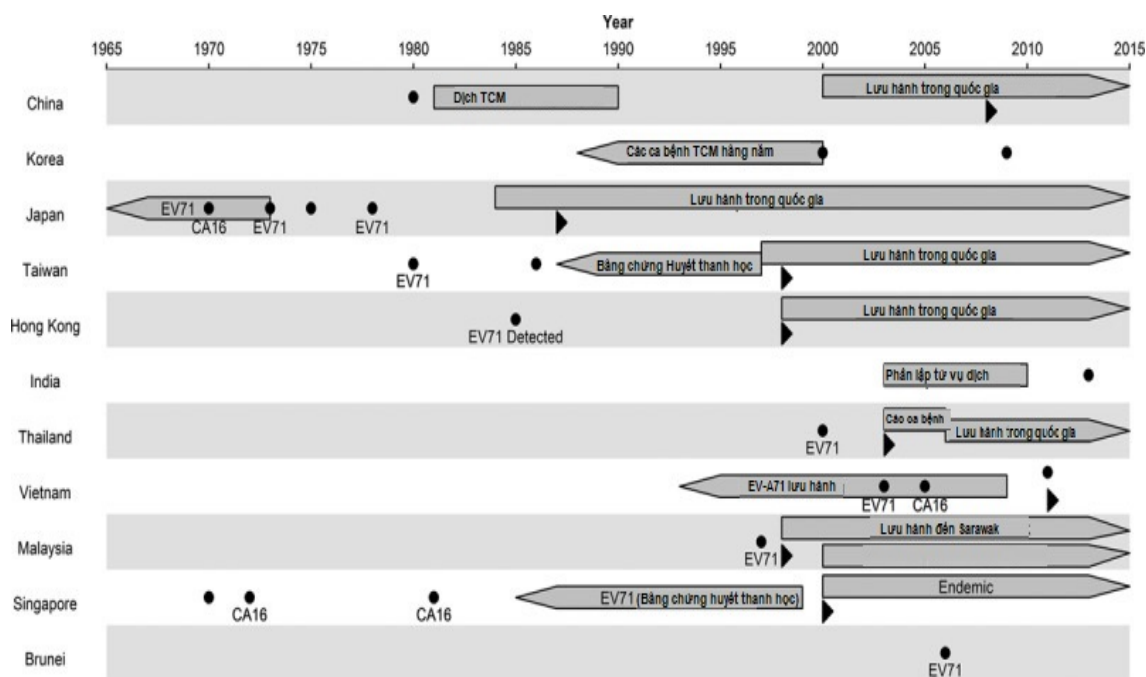
Trong hai thập kỷ qua, nhiều đợt bùng phát dịch TCM đã được báo cáo, đặc biệt tại khu vực Thái Bình Dương gồm Trung Quốc, Nhật Bản, Đài Loan... Tại Trung Quốc, theo báo cáo của TCYTTG, TCM đã bùng phát thành dịch tại thành phố Lâm Nghi (Sơn Đông) từ tháng 3-5/2007. Riêng ngày 22/5/2007, quốc gia này ghi nhận 1149 ca mắc, 84,4% số bệnh nhân là trẻ dưới 5 tuổi. Số ca bệnh nặng với các triệu chứng như sốt, có biến chứng thần kinh là 11 ca (0,9%) trong đó 3 trẻ dưới 3 tuổi (0,3%) đã mất trong vụ dịch [184]. 61459 ca TCM được phát hiện từ 1/1/2008-9/5/2008, trong đó có 36 trường hợp tử vong. Riêng ngày 5/5/2008 đã có 4496 ca mắc, 22 ca tử vong [183]. 5 tỉnh có số ca mắc cao nhất trong vụ dịch gồm Quảng Đông (11374 ca), An Huy (9235 ca), Chiết Giang (6134 ca), Sơn Đông (4566 ca) và Hà Nam (3230 ca) [184]. 92% tổng số ca mắc là bệnh nhân dưới 5 tuổi, 54,5% số ca được xác định là do EV-A71 gây ra [184]. Năm 2009, tại Trung Quốc đại lục số ca mắc lên tới con số kỷ lục 1155525 ca với 13810 ca bệnh nặng (1,2%) và 353 ca tử vong (0,03%). 93% số trường hợp này là ở trẻ dưới 5 tuổi, 75% số ca dưới 3 tuổi. EV-A71 là nguyên nhân gây ra 41% số ca mắc, 81% số ca bệnh nặng và 93% số ca tử vong [184]. Tháng 7/2018 có 377629 trường hợp mắc, số trường hợp tử vong tăng 27% so với cùng kỳ năm 2017, nâng tổng số ca bệnh TCM của Trung Quốc tính từ đầu năm lên >1000000 ca. Từ năm 2011, bên cạnh EV-A71 và CV-A16, tác nhân CV-A6 nổi lên và nhanh chóng chiếm ưu thế trở thành tốp vi rút gây bệnh chủ yếu tại một số địa phương như Thượng Hải (2011-2013), Quảng Đông (2013), Trường Xuân (2013), Bắc Kinh (2013, 2015)...[68, 97, 110, 191].

Tại Đài Loan, TCM được đưa vào hệ thống giám sát trọng điểm từ năm 1998 do sự lây lan phổ biến của bệnh. Trong 9 tháng (3-12/1998), quốc gia này ghi nhận 129106 ca mắc, 405 trường hợp nặng, 78 ca tử vong với hai đỉnh dịch vào tháng 6 và tháng 10 [42, 184]. Các ca bệnh nặng hầu hết ở trẻ dưới 5 tuổi. EV-A71 được xác định là nguyên nhân chính gây bệnh. Hai năm 2000-2001, quốc gia này xảy ra hai vụ dịch nhỏ với nguyên nhân chính là do EV-A71 và CV-A16. Trong 7 năm (1998-2005), số ca bệnh nặng hằng năm dao động 35-405 ca, trong đó 93% trường hợp là trẻ dưới 4 tuổi, 75% dưới 2 tuổi, tỷ lệ mắc theo giới tính nam/nữ là 1,5:1 [184].

Tại Nhật Bản, từ năm 1981, TCM được đưa vào chương trình giám sát của NESID theo luật giám sát các bệnh truyền nhiễm Nhật Bản với trên 3000 điểm lấy mẫu cố định tại phòng khám nhi khoa và bệnh viện. Một số vụ dịch lớn có thể kể đến vào các năm 1973 (3196 ca), 1978 (36301 ca), 2000 (205365 ca) và 2003 (172659 ca). EV-A71 là nguyên nhân gây ra đợt bùng phát dịch vào năm 2000, 2003. Xấp xỉ 90% số ca mắc có độ tuổi dưới 5. Từ năm 2010 trở về trước, hai tác nhân EV-A71 và CV-A16 được coi là hai tác nhân chính gây bệnh. Năm 2011, CV-A6 là tác nhân chính đã gây ra dịch TCM lớn nhất tại Nhật Bản kể từ năm 1981 với chu kỳ 2 năm [63, 65, 86].

Tại khu vực Đông Nam Á, các vụ dịch cũng được thường xuyên ghi nhận. Dịch TCM do EV-A71 lần đầu tiên xuất hiện trong giai đoạn 2-8/2006 tại Bruney với 1681 trẻ nhiễm, 2 trong số 3 trường hợp bệnh nặng đã tử vong do biến chứng thần kinh [184]. Tại Malaysia, trường hợp mắc TCM phát hiện đầu tiên tại tỉnh Sarawak (năm 1997). Trong 2 tháng (1/6/1997–30/8/1997) đã ghi nhận 2628 ca mắc. 39/889 trẻ nhập viện theo dõi bị viêm não vô khuẩn hoặc LMC. Sau năm 1997, dịch TCM xuất hiện trên toàn bán đảo này với 625 trẻ nhập viện, 11 trẻ tử vong. Trong 7 năm (1998-2005) đã có 2 vụ dịch xảy ra vào năm 2000 và 2003 với tác nhân chính là EV-A71. Tiếp đến có thêm hai vụ dịch vào năm 2006 và năm 2008/2009 [184]. Năm 2018, cả nước có 76776 trường hợp mắc, tăng hơn so với năm 2017. Tất cả các tỉnh/thành phố của Malaysia đều ghi nhận có sự gia tăng số ca mắc TCM trong đó tỉnh Selagor có số ca mắc nhiều nhất với 21282 ca [148]. Singapo đưa bệnh TCM vào

giám sát trong hệ thống y tế từ tháng 10/2000. Đây cũng là thời điểm (9-10/2000) xảy ra vụ dịch TCM lớn với 3790 ca mắc, 3 trường hợp tử vong. 73% số mẫu phân tích có kết quả EV-A71 là nguyên nhân gây bệnh. Trong 7 năm (2001-2007), kết quả giám sát tại nước này cho thấy lượng ca mắc lần lượt là 16228 ca (2002), 15256 ca (2005), 15282 ca (2006), 20003 ca (2007). Trẻ dưới 4 tuổi có tỷ lệ mắc cao nhất (62,2%-74,5%). EV-A71 và CV-A16 là hai tác nhân gây bệnh chính [184]. Tại Campuchia, năm 2012 bùng phát vụ dịch TCM do tác nhân EV-A71 phân nhóm C4 gây ra, có ít nhất 54 trẻ tử vong [74]. Tại Thái Lan, hai đợt bùng phát dịch vào năm 2012 và 2016 gây ảnh hưởng nghiêm trọng tới kinh tế xã hội. Trong đó, đợt bùng phát đầu tiên vào năm 2012 là đợt dịch lớn nhất trong một thập kỷ (2002-2012) với 45464 người nhiễm [176]. Năm 2018, bộ y tế Thái Lan công bố hơn 70000 trường hợp mắc, 3 trường hợp tử vong, hầu hết các ca nhiễm bệnh đều là trẻ dưới 5 tuổi [94].



**Hình 1.2. Dịch TCM tại các nước thuộc khu vực Châu Á Thái Bình Dương, giai đoạn 1965-2015 [91]**

**Ghi chú:**

- : Đợt bùng phát được báo cáo
- ▶ : Thời điểm TCM bắt đầu được giám sát hằng năm tại nước sở tại
- ⇨ : Mức độ lưu hành của bệnh TCM
- ⇩ : Tác nhân gây bệnh vẫn được xác định ngay cả khi không có vụ dịch bùng phát

Đối với các nước thuộc khu vực Tây Thái Bình Dương, bệnh TCM cũng được ghi nhận nhưng số liệu dịch tễ được lưu lại không nhiều. Hầu hết trên hệ thống giám sát chỉ ghi nhận các ca bệnh nặng và có biến chứng. Từ năm 1965-2008, Hà Lan ghi nhận 346 trường hợp nhiễm do EV-A71, trong đó năm 2007 được coi là đỉnh dịch với 58 trường hợp [155]. Tương tự, nghiên cứu tại Na Uy trong 2 năm (9/2001-11/2003) với 113 trẻ khỏe mạnh được xét nghiệm định kỳ và theo dõi lâm sàng từ ba tháng tuổi tới 28 tháng tuổi cho thấy EV-A71 lưu hành trên diện rộng, không biểu hiện triệu chứng. Tuy nhiên, hệ thống giám sát của quốc gia này EV-A71 lại chỉ đề cập đến các ca nhập viện do viêm não và TCM [184]. Năm 2011, Tây Ban Nha ghi nhận TCM bùng phát tại một trung tâm giữ trẻ tại Irun (thành phố Basque). Trong 8 tháng (4-12/2011) có 99 ca mắc đều là trẻ dưới 4 tuổi, trong đó 25 ca ở trung tâm giữ trẻ và 74 ca ở cộng đồng. Trong 49 mẫu bệnh phẩm xét nghiệm, tỷ lệ CV-A6 là 90% và CV-A10 là 7% [122]. Năm 2016, tại Pháp cũng báo cáo chỉ có 59 trường hợp bệnh nhi nặng liên quan đến EV-A71 và EV-D68 [28].

### ***1.3.3. Tình hình dịch tễ bệnh Tay chân miệng tại Việt Nam và nguyên nhân gây bệnh chủ yếu***

Bệnh TCM thực sự được xem là mối đe dọa nghiêm trọng đến sức khỏe cộng đồng tại Việt Nam khi dịch bệnh bùng phát cả nước vào năm 2011-2012 với tỷ lệ ca bệnh nặng và tử vong cao. TCM chính thức được đưa vào hệ thống báo cáo thường quy theo quy định tại Thông tư số 48/2010/TT-BYT ngày 31/12/2010 của Bộ Y tế [1]. Với đặc điểm địa lý trải dài trên 15 vĩ độ, khí hậu đa dạng và biến động giữa các vùng/miền là điều kiện thuận lợi cho bệnh diễn ra tại Bắc-Trung-Nam. Bên cạnh đó, thói quen sinh hoạt, môi trường sống ở nhiều nơi đặc biệt tại vùng sâu, vùng xa còn hạn chế khiến bệnh xuất hiện, phát triển nhanh chóng thành vụ dịch nếu không được giám sát tốt. Đối tượng mắc bệnh chủ yếu tập trung vào nhóm trẻ dưới 5 tuổi, đặc biệt là trẻ dưới 3 tuổi [5-8, 17, 18].

Tại miền Bắc Việt Nam, năm 2003 EV-A71/C4 chỉ được xác định trên một bệnh nhân viêm não cấp tính [15]. Giai đoạn 2005-2007, EV-A71/C5 đã được xác định ở 7 bệnh nhân bị LMC. Năm 2008, 88 trường hợp mắc bệnh TCM được báo cáo

từ 13 tỉnh. Kết quả phân lập từ 88 trường hợp xác nhận có 33 trường hợp (37,5%) dương tính với VRĐR, trong đó 9 trường hợp (27,3%) là với EV-A71, 23 trường hợp (69,7%) với CV-A16 và 1 trường hợp (3,1%) với CV-A10. Không có trường hợp nghiêm trọng hoặc tử vong nào được báo cáo [184]. Năm 2011, khi xảy ra đại dịch TCM, khu vực này đã ghi nhận 20529 ca mắc, 3 trường hợp tử vong [6]. Năm 2012, Bộ Y tế ghi nhận trên hệ thống giám sát thường xuyên có 51618 trường hợp mắc bệnh, không có ca tử vong. Bệnh xuất hiện ở tất cả các tỉnh/ thành miền Bắc, trong đó Hải Phòng, Hà Nội có số mắc cao nhất với hơn 3000 trường hợp mắc/tỉnh. Ca bệnh xuất hiện ở nhiều nhóm tuổi nhưng nhiều nhất ở nhóm dưới 5 (94,2%) [8]. Nghiên cứu tại phòng thí nghiệm (PTN) Vi rút đường ruột (Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương) trong hai năm trên cũng cho thấy 1046/1642 (63,70%) mẫu bệnh phẩm có kết quả dương tính với VRĐR. Trong đó gồm 534 mẫu (51,05%) dương tính với EV-A71, 268 mẫu (25,6%) với CV-A6 và 166 mẫu (15,8%) với CV-A16; 6% còn lại là các VRĐR khác. Hai năm 2013-2014, 563/784 mẫu bệnh phẩm (71,81%) của bệnh nhân nghi mắc TCM ở các tỉnh miền Bắc Việt Nam cho kết quả dương tính với VRĐR. Khi tiến hành định tít cho thấy 85 mẫu (15,1%) dương tính với EV-A71, 152 mẫu (27,0%) với CV-A6 và 199 mẫu (35,3%) với CV-A16. 66 mẫu (11,7%) là do các tác nhân VRĐR như CV-A10, CV-A12, CV-A24, các vi rút echo...gây ra. Năm 2013, EV-A71 và CV-A6 là hai tác nhân chính gây dịch. Năm 2014, CV-A16 lại trở thành tác nhân nổi trội chiếm 67,6% số mẫu TCM, EV-A71 giảm mạnh chỉ còn 3,8% và CV-A6 duy trì ở tỷ lệ 28,7% [18]. Năm 2015-2016, có 424/546 (77,66%) trường hợp dương tính với VRĐR. Kết quả xác định EV-A71 lần lượt chiếm tỷ lệ 31,2% và 29,3%; CV-A6 chiếm 58,7% và 33,6%; CV-A16 là 4,3% và 18,1%; CV-A10 là 0,7% và 10%. Các VRĐR khác ở mức độ tản phát gồm CV-A4, CV-A5, CV-A8, CV-A14, E-6... Bệnh xảy ra ở hầu hết các tháng trong năm, tập trung cao vào mùa thu đông. Tuổi mắc bệnh tập trung chính ở trẻ từ 7-36 tháng, cao nhất ở trẻ từ 12-24 tháng [10].

Tại Thành phố Hồ Chí Minh, 764 trẻ được chẩn đoán mắc TCM thông qua chương trình giám sát trọng điểm năm 2005 tại bệnh viện Nhi đồng với 96,2% số

trường hợp có độ tuổi dưới 5. VRĐR được phân lập từ 411 bệnh nhân (53,8%). Trong số đó 42,1% (173/411) số mẫu xác định là do EV-A71 và 52,1% (214/411) mẫu là CV-A16. Trong số các bệnh nhân nhiễm EV-A71 có 51 trường hợp (29,3%) bị biến chứng bệnh thần kinh cấp tính và 3 trường hợp (1,7%) đã tử vong [138]. Trong 3 năm 2010-2012, số ca mắc/tử vong qua các năm lần lượt là 10128/6 ca (2010); 70261/145 ca (năm 2011); 75268/41 ca (năm 2012). Nhóm tuổi có tỷ lệ mắc bệnh và tử vong cao là trẻ dưới 3 tuổi. Tác nhân gây bệnh chủ yếu là EV-A71 và có sự thay đổi từ sub genogroup EV-A71/C5 sang EV-A71/C4 [11]. Theo nghiên cứu của nhóm tác giả Đoàn Ngọc Minh Quân và cs từ 2013-2016, tại 20 tỉnh/ thành phía nam tỷ lệ nhiễm bệnh/tử vong dao động 47989/21 trường hợp (năm 2013), 55989/8 (năm 2014), 39217/5 (năm 2015), 30285/0 (năm 2016), tập trung chủ yếu ở nhóm dưới 5 tuổi (95,7%) trong đó 91,7% là trẻ dưới 3. Tác nhân gây bệnh TCM gây ra các ca mắc có độ lâm sàng từ 2b trở lên chủ yếu là EV-A71 (27,8% - 67,6%) và các VRĐR khác (15,6% - 21,7%) [13].

#### **1.4. Điều trị và dự phòng bệnh Tay chân miệng**

##### ***1.4.1. Điều trị 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 [3]. Hiện chưa có thuốc điều trị đặc hiệu cho bệnh TCM. Theo đó, mục tiêu điều trị 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, đặc biệt khi có dấu hiệu suy tuần hoàn, suy hô hấp. Cụ thể như hạ nhiệt khi trẻ bị sốt cao từ 38,5°C, cần cho trẻ sử dụng ngay thuốc hạ nhiệt acetaminophen (paracetamol), bù đủ nước và điện giải, bổ sung vitamin C, kẽm..., điều trị loét miệng, loét họng. Khi phát hiện triệu chứng viêm não-viêm màng não cần dùng thuốc chống co giật và chuyển lên tuyến trên để điều trị chuyên sâu. Bên cạnh đó, cần hướng dẫn cha mẹ nhận biết những dấu hiệu nguy cơ cao ở trẻ mắc bệnh TCM như sốt cao, li bì, nôn ói... để đưa trẻ đến cơ sở y tế kịp thời. Theo dõi kỹ các dấu hiệu lâm sàng chưa có nguy cơ từ 1-2 ngày hoặc sau 1 tuần khi trẻ bắt đầu hồi phục. Nếu trẻ có các dấu hiệu nặng hơn hoặc những triệu chứng bất thường, cần đưa

trở tới viện ngay. Một số thuốc đang trong giai đoạn nghiên cứu và thử nghiệm lâm sàng đã có dấu hiệu tốt cho việc điều trị hiện nay như pirodavir, lactferrin, enviroxime nhưng việc đưa các thuốc này áp dụng vào thực tế còn hạn chế [158].

#### **1.4.2. Phòng bệnh Tay chân miệng**

Nguyên tắc phòng bệnh và việc phòng bệnh TCM tại cơ sở y tế cũng như ngoài cộng đồng được hướng dẫn chi tiết tại quyết định số 1003/QĐ-BYT ngày 30/03/2012. Việc 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 [2, 3].

Do tác nhân chính gây bệnh TCM là EV-A71, do đó các nghiên cứu về vắc xin phòng EV-A71 đặc biệt được tập trung nghiên cứu. Một số loại vắc xin đơn giá phòng tác nhân EV-A71 như vắc xin giảm độc lực, vắc xin bất hoạt, vắc xin tái tổ hợp... Đây đều là các vắc xin tiềm năng nhằm mục tiêu kiểm soát và ngăn ngừa bệnh TCM do EV-A71 gây ra. Bốn loại vắc xin EV-A71 bất hoạt của Trung Quốc (Sinovac, Beijing Vigoo, CAMS) và Singapore (Inviragen) cũng đã được đưa vào thử nghiệm. Hiệu quả lâm sàng của vắc xin Trung Quốc đã được đánh giá trong các thử nghiệm pha III với hơn 30000 trẻ sơ sinh khỏe mạnh và trẻ nhỏ (6-35 tháng tuổi) tiêm hai liều vắc xin cách nhau 28 ngày. Tất cả ba loại đều bảo đảm an toàn, dung nạp tốt và có khả năng bảo vệ hơn 90% cho bệnh TCM do EV-A71 gây ra. Tuy nhiên, hiệu giá kháng thể thường giảm sau 6 tháng và vẫn có các phản ứng phụ như sốt, phản ứng tại vị trí tiêm. Các vắc xin này đã được cấp phép và lưu hành tại Trung Quốc (năm 2015-2016) [101]. Vắc xin được nghiên cứu chế tạo dựa trên các chủng phân lập C4 tại Trung Quốc nhưng đã được chứng minh là có tác dụng chéo với các kiểu gen EV-A71 khác lưu hành gây dịch vào các năm khác trên toàn cầu như B1, B4, B5, C2, C4 và C5. Tuy nhiên, vẫn còn một vài thách thức đối với việc sử dụng vắc xin EV-A71 trên toàn thế giới, bao gồm khả năng áp dụng đối với các chủng đại dịch EV-A71 khác nhau ở các quốc gia khác nhau, yêu cầu tiêu chuẩn quốc tế về sản xuất và kiểm soát chất lượng vắc xin, tiêu chuẩn hóa các phương pháp theo dõi và phát hiện nguyên nhân gây bệnh khác nhau. Do đó, việc đưa vắc xin EV-A71 ra thị trường vẫn còn là

một chặng đường dài. Tại Việt Nam, một loại vắc xin TCM kháng EV-A71 do tập đoàn Medigen tài trợ phát triển hiện đang nghiên cứu triển khai thử nghiệm lâm sàng tại huyện Cai Lậy (Tiền Giang). Vắc xin đa giá đối với hai tác nhân CV-A6 và CV-A16 hiện đang được cân nhắc phát triển theo nhiều hướng [3, 84, 104]. Đối với các týp VRĐR khác hiện chưa có vắc xin đặc hiệu để chủng ngừa.

### **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. Đồng thời, týp vi rút này cũng nguyên nhân chính của các ca có biến chứng trầm trọng liên quan đến thần kinh trung ương và tử vong. Tuy nhiên, các vụ dịch TCM quy mô lớn do CV-A16 và CV-A6 xảy ra hàng năm trên khắp thế giới và vẫn có ghi nhận về các ca bệnh nặng. Ngoài ra, sự chớm nổi của các kiểu VRĐR khác như CV-A10, CV-A4 và virus echo như E-11, E-18... gây dịch TCM, trong đấy có những ca có biểu hiện thần kinh nghiêm trọng cũng được báo cáo một cách lẻ tẻ [38, 71, 77, 119, 163]

Kiểu gen gốc của chủng EV-A71, BrCr-CA-70, được phân lập tại California vào năm 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 [39]. 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). Genogroup B và C tiếp tục được phân loại thành các sub genogroup nhỏ hơn từ B0-B5 và C1-C5 [77, 125, 197]. 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 [156, 168]. Genogroup C của EV-A71 được phát hiện vào những năm cuối của thế kỉ 20 (sub genogroup C1 tại Mỹ và Úc năm 1986, sub genogroup C2 tại Úc năm 1998-1999, subgenogroup C3 năm 200 tại Hàn Quốc, C4 năm 1998 tại Đài Loan và C5 tại Việt Nam năm 2005) và hiện nay đã trở thành genogroup lưu hành phổ biến trên toàn thế giới [40, 77, 168]. Sub genogroup C1 là phân nhóm phổ biến nhất tại Châu Âu và gây ra các vụ dịch tại Pháp, Phần Lan [126, 186]. Sub genogroup C2 cũng được ghi nhận tại Châu Âu trong suốt hai thập kỉ vừa qua và là nguyên nhân chính gây ra những vụ dịch TCM tại Đài Loan và Úc vào các



năm 1998-1999 [160]. Từ năm 1998-2017, các chủng EV-A71 phân lập ở Trung Quốc thuộc về các nhóm sub genogroup C2, C3, C4 [200]. Trái lại, tại Đài Loan, nghiên cứu cho thấy có sự khác nhau về sub genogroup chiếm ưu thế tùy từng giai đoạn. Cụ thể năm 1998 là C2, 2000-2001 là B4, 2004-2005 là C4 và 2008 là B5. Đối với genotype B, hai sub genogroup B1 và B2 lưu hành chính trong những năm 1970. Sub genogroup còn B2 được phân lập ở Úc và Nhật Bản vào năm 1980. Subgenogroup B4 được xác định tại Singapo vào năm 1997, tiếp tục lưu hành từ 2000-2002. Đồng thời sub genogroup B4 cũng là nguyên nhân chính của sự bùng phát dịch bệnh TCM lớn ở Nhật Bản, Malaysia và Singapo năm 2000. Năm 2003 nhóm phụ B4 đã được thay thế bởi nhóm phụ B5 ở Sarawak, và lưu hành chủ yếu tại Nhật Bản, Đài Loan [72, 109, 120, 174].

**Bảng 1.1. Sự lưu hành của EV-A71 tại các quốc gia [125]**

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

Quốc gia	Năm					
	1960–1969	1970–1979	1980–1989	1990–1999	2000–2009	2010–2016
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 bệnh nhân 27 tháng tuổi sống tại Hà Tây với biểu hiện lâm sàng của bệnh TCM kèm theo liệt chi và viêm não [15]. Năm 2005, 173/441 (42,1%) mẫu phân lập tại bệnh viện Nhi đồng Hồ Chí Minh được xác định là do EV-A71 gây bệnh. Khi phân tích cây phát sinh chủng loài cho thấy EV-A71 lưu hành trong vụ dịch thuộc 3 nhóm phân loại C1, C4, và một nhóm chưa từng xuất hiện ở Việt Nam và các nước láng giềng, C5. 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 chủng EV-A71 phân lập trong các năm 2003, 2005-2007 đã cho thấy có sự lưu hành của sub genogroup C5 [138]. Nghiên cứu của tác giả Lê Thị Kim Trang đối với sự lưu hành của EV-A71 tại khu vực miền Trung từ 2006 - 2014 đưa ra kết quả EV-A71 tại đây thuộc các sub genogroup C5, C4a và B5. Các chủng EV-A71 thuộc C5 được phát hiện trong năm 2006-2010, sau đó chúng được thay thế bởi C4a trong năm 2011 - 2012, và chuyển đổi sang chủng có kiểu gen B5 từ năm 2012 - 2014. Chủng có kiểu gen C5 có khả năng lây truyền từ chủng gây dịch ở miền Nam - Việt Nam năm 2005; chủng kiểu gen C4a tương đồng với các chủng gây dịch ở cả hai miền

Nam, Bắc nước ta từ năm 2011 - 2012, đây là chủng có khả năng xâm nhập vào Việt Nam từ chủng gây dịch ở Trung Quốc từ năm 2009 [20]

Các tỉnh khu vực miền Trung	Năm									
	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	
Quảng Bình	C5(1)			C5(1)			C5(1)			
Quảng Trị						C5(1)	C4a(4)		B5(5)	
T.Thiên Huế						C5(1)	C4a(3)		B5(5)	
Đà Nẵng			C5(3)			C5(2)	C4a(3)		B5(3)	
Quảng Nam						C4a(1)				
Quảng Ngãi			C5(1)		C5(2)	C4a(4)		B5(6)	C4a(1)	
Bình Định			C5(1)				C4a(6)		B5(5)	
Phú Yên						C4a(3)		B5(1)		
Khánh Hòa	C5(6)				C5(3)		C4a(5)		B5(4)	
Ninh Thuận						C4a(5)		B5(1)		
Bình Thuận			C5(4)			C5(1) C4a(2)			B5(5)	

**Hình 1.3. Sự lưu hành của EV-A71 tại Miền Trung Việt Nam [20]**

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 ba tác nhân chính gây bệnh TCM [35, 64, 80, 127, 135]. Trong đó, CV-A6 là tác nhân gây bệnh mới nổi gần đây, có sự thay đổi kiểu gen và đột ngột có kiểu hình gây bệnh và gây dịch rộng khắp tại Phần Lan năm 2008 [135]. Rất nhanh sau đó, dịch TCM do CV-A6 nhanh chóng lan rộng khắp các nước trên thế giới.

Ngoài EV-A71, CV-A16, CV-A6, các tác nhân VRĐR khác, 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 còn lại. Từ 2001-2007, nghiên cứu tại Singapo của tác giả Ang cho thấy tỷ lệ % gây bệnh của các VRĐR khác là 16% [27]. Tại Thượng Hải (Trung Quốc), nghiên cứu của tác giả M. Xu trong hai năm 2012-2013 chỉ ra bên cạnh căn nguyên chính là CV-A6 và EV-A71, tỷ lệ số ca TCM do các VRĐR phụ gây ra là 17,99 % (82/417 ca) [191]. Đặc biệt, theo nghiên cứu của

tác giả Jia Xie tại Quảng Châu (Trung Quốc - 2018) cho thấy số lượng mẫu do các VRĐR khác đã lên tới 433/1220 mẫu (35,49%) [188]. Nghiên cứu của Đoàn Ngọc Minh Quân tại miền Nam Việt Nam, cũng cho thấy số ca dương tính với VRĐR khác trong 4 năm (2013-2016) dao động từ 15,6%-21,7% (2013-15,6%, 2014-21,7%, 2015-17,3%, 2016-21,7%) [13]. Nghiên cứu các vi rút đường ruột gây bệnh TCM ở miền Bắc Việt Nam, 2015-2016 của Trần Thị Nguyễn Hòa và cộng sự xác định vi rút EV-A71 chiếm tỷ lệ 31,2% và 29,3%, vi rút CV-A6 chiếm 58,7% và 33,6%, CV-A16 chiếm 4,3% và 18,1%, vi rút CV-A10 chiếm 0,7% và 10% theo trình tự năm 2015-2016. Các vi rút đường ruột khác bao 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, echo 5, echo11, echo 18, enterovirus týp 96 là 11% và 4% các vi rút đường ruột không xác định được týp vi rút. Kiểu gen vi rút EV-71 là C4 và B5 [10].

## **1.6. Đặc điểm vi rút học**

### **1.6.1. Phân loại**

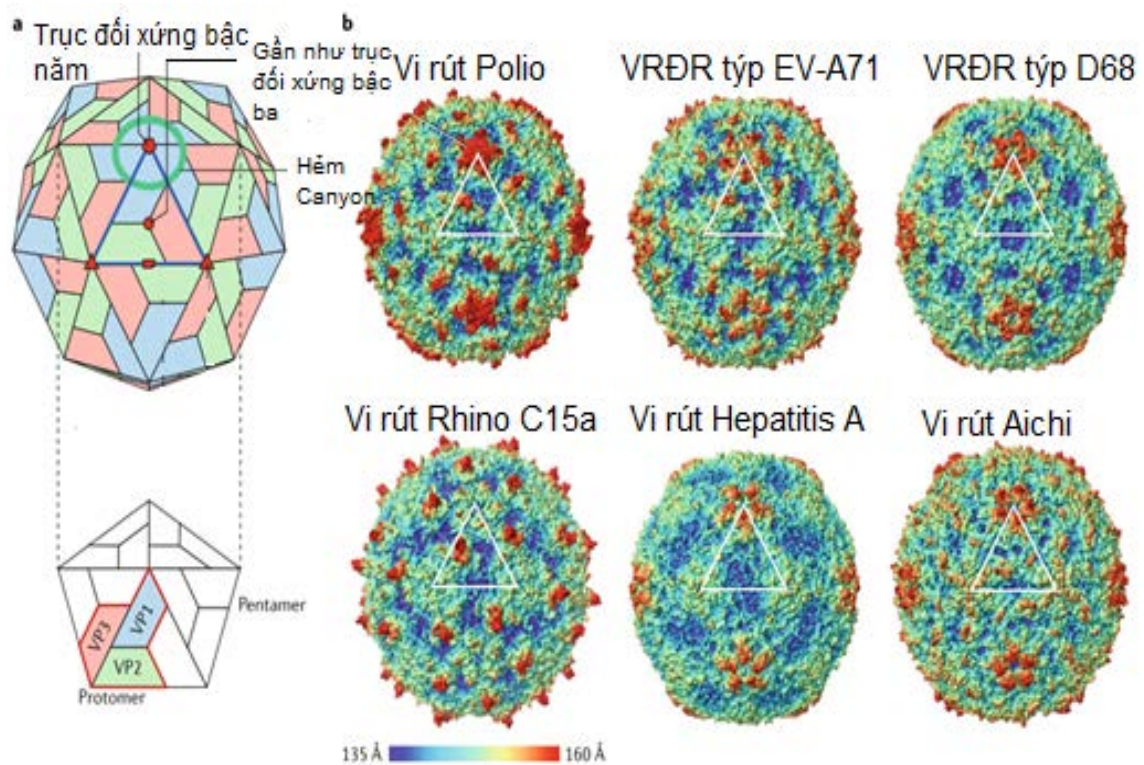
VRĐR thuộc chi *Enterovirus*, họ *Picornaviridea*. Dựa trên các đặc điểm gen do Ủy ban Quốc tế về Phân loại học vi rút ban hành, chi *Enterovirus* được chia làm 15 loài: *Enterovirus A-L*, *Rhinovirus A-C* (*Enterovirus A*, *Enterovirus B*, *Enterovirus C*, *Enterovirus D*, *Enterovirus E*, *Enterovirus F*, *Enterovirus G*, *Enterovirus H*, *Enterovirus I*, *Enterovirus J*, *Enterovirus K*, *Enterovirus L*, *Rhinovirus A*, *Rhinovirus B* và *Rhinovirus C*) [32, 53, 116, 117, 129, 139]. Các VRĐR thuộc loài A, B, C, D và vi rút Rhino A, B, C có khả năng gây bệnh cho người. Loài tiếp tục được phân chia thành các kiểu huyết thanh (serotype/type) (gọi chung là týp) VRĐR. Hiện đã phát hiện trên một trăm týp VRĐR gây bệnh ở người. Trong đó, loài B có số lượng týp nhiều nhất với 63 týp gồm các vi rút echo và coxsackie B, loài A gồm 25 kiểu huyết thanh, loài C có 23 kiểu và loài D là ít phổ biến nhất với 5 kiểu huyết thanh (Bảng 1.1). Tác nhân chính gây bệnh TCM gồm EV-A71, CV-A6, CV-A16, CVA-10 đều thuộc loài A [129, 139].

**Bảng 1.2. Các kiểu vi rút đường ruột thuộc loài A, B, C và D [53, 129, 139]**

<b>Loài</b>	<b>Các týp vi rút đường ruột</b>
Loài A (25 týp)	Coxsackie A2 (CV-A2), CV-A3, CV-A4, CV-A5, CV-A6, CV-A7, CV-A8, CV-A10, CV-A12, CV-A14, CV-A16, Enterovirus A71 (EV-A71), EV-A76, EV-A89, EV-A90, EV-A91, EV-A92, EV-A114, EV-A119, EV-A120, EV-A121, EV-A122 (Simian enteroviruses SV19), EV-A123 (Simian Enterovirus SV43), EV-A124 (Simian Enterovirus SV46), EV-A125 (Baboon Enterovirus A-3 - BA13)
Loài B (63 týp)	Coxsackie B1 (CV-B1), CV-B2, CV-B3, CV-B4, CV-B5, CV-B6, CV-A9, Echovirus1 (E-1), E-2, E-3, E-4, E-5, E-6, E-7, E-9, E-11, E-12, E-13, E-14, E-15, E-16, E-17, E-18, E-19, E-20, E-21, E-24, E-25, E-26, E-27, E-29, E-30, E-31, E-32, E-33, Enterovirus B69 (EV-B69), EV-B73, EV-B74, EV-B75, EV-B77, EV-B78, EV-B79, EV-B80, EV-B81, EV-B82, EV-B83, EV-B84, EV-B85, EV-B86, EV-B87, EV-B88, EV-B93, EV-B97, EV-B98, EV-B100, EV-B101, EV-B106, EV-B107, EV-B110 (từ tinh tinh), EV-B111, EV-B112 (từ tinh tinh), EV-B113 (từ khi đầu chó), EV-B114 (Simian Enterovirus SA5)
Loài C (23 týp)	Poliovirus 1 (PV-1), PV-2, PV-3, Coxsackie A1 (CV-A1), CV-A11, CV-A13, CV-A17, CV-A19, CV-A20, CV-A21, CV-A22, CV-A24, Enterovirus C95 (EV-C95), EV-C96, EV-C99, EV-C102, EV-C104, EV-C105, EV-C109, EV-C113, EV-C116, EV-C117, EV-C118.
Loài D (5 týp)	EV-D68, EV-D70, EV-D94, EV-D111 (từ người và tinh tinh), EV-D120 (từ khi đột)

### 1.6.2. Hình thái cấu trúc vi rút đường ruột

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 (capsid protomer). Mỗi tiểu đơn vị gồm 4 tiểu phần protein VP1, VP2, VP3, VP4. Ba tiểu đơn vị VP1, VP2, VP3 khá giống nhau, nằm ở phía trên bề mặt capsid, có chung cấu trúc tám tấm  $\beta$  đối song song. Các axit amin (aa) nối các tấm  $\beta$  và tạo nên các trình tự kéo dài bộc lộ ra bên ngoài của đầu N và C các tấm  $\beta$ , từ đó hình thành nên hình dạng bên ngoài và tính quyết định kháng nguyên đặc hiệu của các kiểu VRĐR [32, 201] (Hình 1.4).



**Hình 1.4. Cấu trúc VRĐR và vị trí của 4 tiểu phần protein VP1, VP2, VP3, VP4 trên bề mặt vi rút [32]**

**Ghi chú:**

- Mô hình cấu tạo của VRĐR
- Mô hình cấu trúc bề mặt của một số VRĐR và virus thuộc họ Picornaviridae

Trên các tiểu phần VP1, VP2, VP3 đều chứa vị trí thụ thể tế bào nhưng hầu hết các vị trí này được quy định bởi tiểu phần VP1. Tiểu phần VP4 nằm bên trong lớp capsid và bị myristol hóa (biến đổi lipit tại vị trí nhóm myristol cho phép tạo ra các liên kết yếu giữa protein - protein hoặc protein - lipit trong con đường truyền tín hiệu) [32, 129, 139]. Năm “capsid protomer” gộp lại thành đơn vị “pentamer” (casid pentamer) nằm đối xứng năm cánh tựa như “đỉnh ngôi sao”. Phía trên đỉnh trục “ngôi sao” là một hốc lõm sâu (canyon) có vai trò là vị trí gắn kết thụ thể của một số VRĐR. Phía nền của canyon là một “túi” kỵ nước (hydrophobic pocket) đi xuyên về phía trục đối xứng bậc năm. Vỏ capsid của hạt vi rút được tạo thành từ 12 “pentamer” [53]

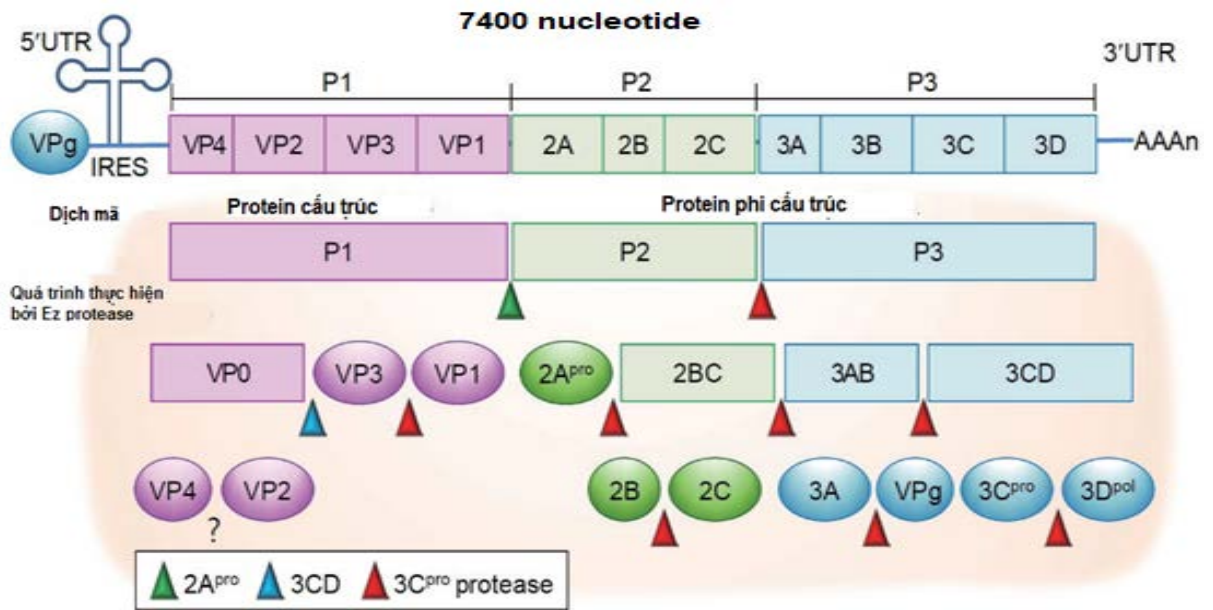
### ***1.6.3. Cấu trúc hệ gen của vi rút đường ruột***

Vật chất di truyền của VRĐR là một chuỗi ribonucleic axit (ARN) đơn, dương, có kích thước 7200-8500 nucleotide (nt), cuộn chặt trong lớp vỏ capsid. Hệ gen gồm: (1) 1 khung đọc mở (ORF) duy nhất mã hóa cho một polyprotein, (2) vùng không dịch mã (UTRs) tại đầu 5' và 3', (3) đuôi poly A [129, 131, 139, 201] (Hình 1.5).

Mô tả hệ gen theo thứ tự từ đầu 5' đến đầu 3' như sau:

Tại đầu 5' có một protein nhỏ VPg liên kết hóa trị thay cho cấu trúc nt được methyl hóa. Vùng không dịch mã (UTR) gồm các vùng không bảo tồn (stem-loop). Ví dụ: EV-A71 gồm 6 stem-loop. Trong đó stem-loop I “hình lá” tham gia vào quá trình tổng hợp ARN của vi rút, stem-loop II đến VI gồm các trình tự tiếp nhận ribosome bên trong (internal ribosome entry site-IRES) liên quan đến quá trình dịch mã protein. Các nt quan trọng về mặt chức năng được bảo tồn nằm ở vị trí gốc của stem-loop II, IV, V. Trong cấu trúc IRES còn chứa trình tự Yn-Xm-AUG gần đầu 3' là nơi liên kết với ribosome để bắt đầu quá trình dịch mã. Trong đó Yn là trình tự pyrimidine có chiều dài từ 8-10 nt, Xm là cầu nối giữa Yn và bộ ba AUG [129, 201].



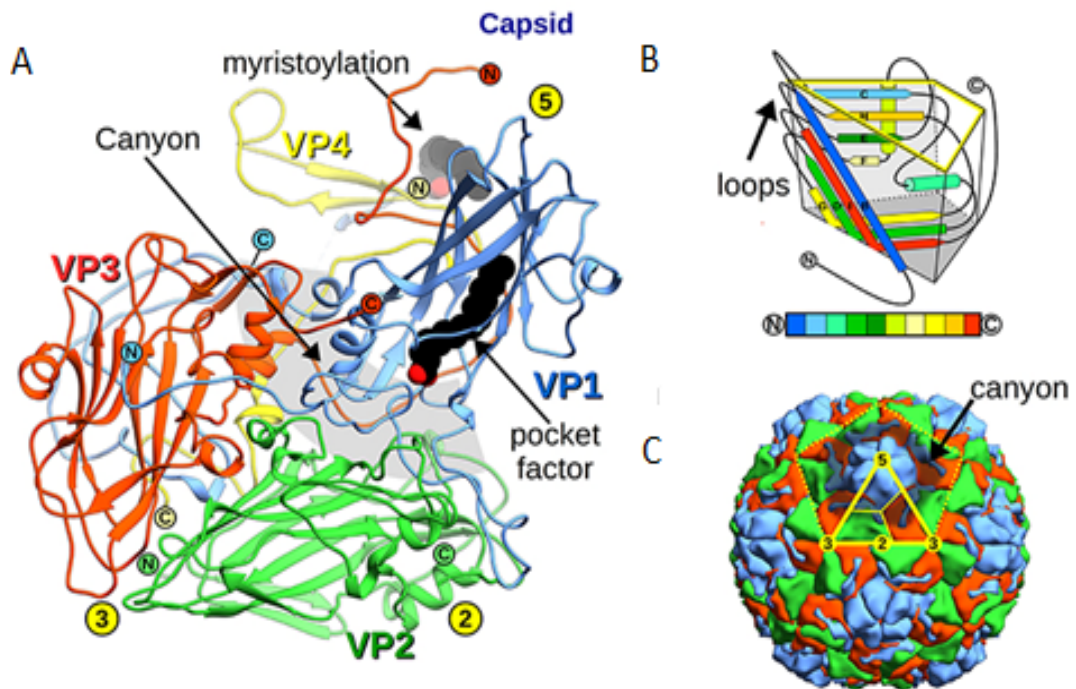


**Hình 1.5. Mô hình cấu trúc hệ gen của vi rút đường ruột (EV-A71) [197]**

Khung đọc mở (ORF) mã hóa cho một polyprotein duy nhất, là tổ hợp của ba polyprotein P1 (~2586 nt), P2 (~1,734 nt) và P3 (~2,259 nt). Vùng P1 mã hóa cho 4 protein cấu trúc (VP1-VP4) hình thành nên lớp vỏ capsid của vi rút. Theo thứ tự 5'-3', các protein lần lượt là VP4 (1A), VP2 (1B), VP3 (1C) và VP1 (1D). Giữa các protein không có vị trí codon dừng (stop codon). VP4 và VP2 tồn tại dưới dạng tiền phân cắt VP0. VP1 là protein capsid lớn nhất và nằm lộ ra bên ngoài bề mặt của vi rút nhiều nhất. Trên bề mặt VP1, VP2 và VP3 có kháng thể đặc hiệu và kháng thể trung hòa của vi rút trong đó VP1 là có nhiều nhất [53] (Hình 1.6).

Vùng P2 và P3 mã hóa cho 7 protein không cấu trúc: 2A<sup>pro</sup>, 2B, 2C, 3A, 3B<sup>VPg</sup>, 3C<sup>pro</sup>, 3D, 2A<sup>pro</sup>, 3C<sup>pro</sup> và 3C<sup>pro</sup>. Đây là các enzym protease có chức năng phân cắt polyprotein của VRĐR. Ví dụ: protein 2B làm ức chế quá trình tổng hợp protein, protein 2C vừa là NTPase vừa là phức chất sao chép trực tiếp trên màng tế bào, protein 2BC là nguyên nhân gây ra tính thấm thấu của màng tế bào, protein 3A đóng vai trò môi để tổng hợp vật chất di truyền. Vùng không dịch mã 3'-UTRs (~82nt) chứa 3 cấu trúc mã hóa stem-loop X, Y, Z và đuôi poly A có vai trò quan trọng trong việc tổng hợp sợi ARN âm [129].





**Hình 1.6. Cấu trúc các protein của vỏ capsid [52]**

**Ghi chú:**

- A. Mô hình cấu trúc của protomer, protein VP1 (xanh lam), VP2 (xanh lá cây), VP3 (cam) và VP4 (vàng). Vị trí của “pocket factor” được mô tả màu đen, “canyon” màu xám nhẹ
- B. Minh họa các vòng lặp (exposed loop)
- C. Cấu trúc tổng quan của capsid VRĐR. VP1 (xanh lam), VP2 (xanh lá cây) và VP3 (đỏ). Đường chấm màu vàng cho biết ranh giới của một “pentamer”.

Vùng không dịch mã 3'-UTRs (khoảng 81nt) chứa 3 cấu trúc mã hóa stem-loop X, Y, Z và đuôi poly A. Nghiên cứu đã chứng minh các điểm đột biến trong vùng 3'UTR sẽ làm mất ổn định tương tác vòng kissing (kissing stem-loops) giúp duy trì cấu trúc tổng thể vùng 3'UTR [129].

**1.6.4. Vai trò quan trọng của vùng gen VP1**

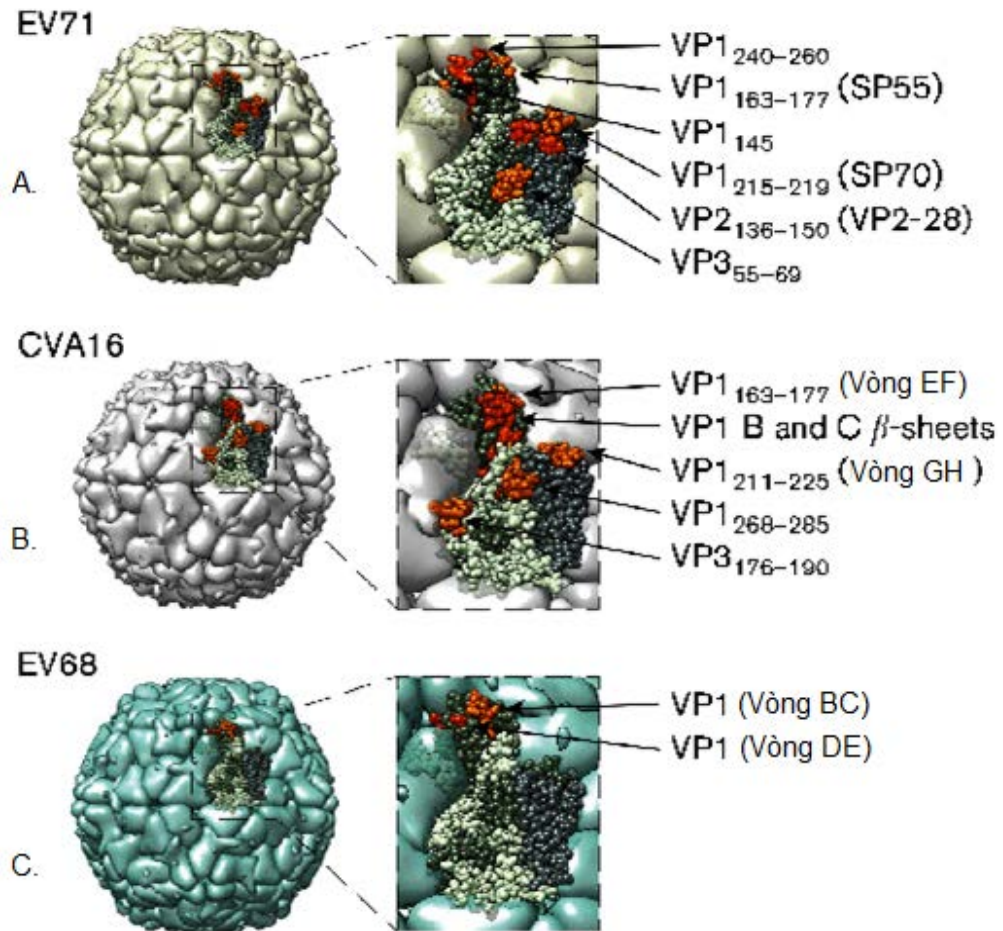
Tùy thuộc vào từng kiểu VRĐR mà vùng gen mã hóa VP1 có chiều dài khác nhau, dao động 834-951 nt (tương ứng 278 đến 317 aa). Cụ thể như vùng gen VP1 của CV-A16 là 891 nt (vị trí nt 2446 đến 3336 trên hệ gen), của CV-A6 là 915 nt (từ vị trí nt 2441 đến 3355) [177]. Vùng gen VP1 mã hóa cho phần protein bộc lộ ra bên ngoài nhiều nhất của lớp vỏ capsid. Về cấu trúc, VP1 có hai đặc điểm chính: (1) Là protein sơ cấp tạo nên hai cấu trúc quan trọng là “canyon” và “pocket factor”. Phần

đầu kỵ nước của “pocket factor” chủ yếu lộ ra trên bề mặt của hẻm “canyon”. (2) VP1 có các cấu trúc vòng (exposed loop) nằm trên bề mặt vi rút và xung quanh đỉnh năm cạnh của pentamer [52, 201].

Với đặc điểm cấu trúc trên, VP1 đóng góp vai trò quan trọng như:

VP1 góp phần vào việc giải phòng vật chất di truyền vào mạng lưới nội chất của tế bào chủ: Trong quá trình xâm nhập vi rút vào tế bào vật chủ, có sự đóng góp quan trọng của hai yếu tố “pocket factor” và “canyon” được tạo thành từ VP1. Cụ thể, sau khi xâm nhập vào tế bào vật chủ, VP1 liên kết với các thụ thể đặc hiệu – có cấu trúc tương tự với cấu trúc nếp gấp của “canyon”. Đây là nguyên nhân trực tiếp dẫn đến sự giải phóng của “pocket factor” khỏi “canyon”, gây mất ổn định của VRĐR, từ đó giải phóng vật chất di truyền vào mạng lưới nội chất của tế bào vật chủ [140, 153].

VP1 có các vị trí kháng nguyên trung hòa quan trọng: Với đặc điểm mang nhiều cấu trúc vòng nằm trên bề mặt của vi rút (exposed loop), nghiên cứu đã chỉ ra một số cấu trúc vòng góp phần tạo nên vị trí kháng nguyên trung hòa đặc hiệu. Nghiên cứu của nhóm tác giả Birgit Yvonne Reimann trên vi rút Polio cho thấy gen VP1 “đóng góp” 3 vị trí quan trọng trong khi VP2 và VP3 chỉ có 2 và 1 vị trí. Tác giả xác định vị trí kháng nguyên trung hòa này đối với vi rút coxsackie B4 (CV-B4) bằng cách “xây dựng” kháng nguyên của chủng “lai” giữa vi rút coxsackie B3 (CV-B3) và coxsackie B4 với cách gây đột biến. Trong vi rút “lai” có 5 aa của vòng BC (1 trong 5 vị trí vòng thuộc VP1) hình thành nên vị trí kháng nguyên của coxsackie B4. Vi rút “lai” được trung hòa và kết tủa bởi kháng huyết thanh đa giá đặc hiệu cho hai týp VRĐR này. Điều này chứng tỏ vi rút “lai” mang đặc tính kháng nguyên của cả hai týp coxsackie và do đó trong vi rút lai có sự hiện diện của vị trí kháng nguyên trung hòa đặc hiệu tại vòng BC [150]. Nghiên cứu khác của nhóm tác giả Zhiqiang Ku cũng phát hiện ba kháng thể trung hòa đơn dòng cùng bám vào 1 kháng nguyên tại vị trí của cấu trúc GH trên VP1 của EV-A71. Các kháng thể này có thể dẫn đến ức chế quá trình xâm nhập, cởi áo và giải phòng vật chất di truyền ARN của vi rút [92].



**Hình 1.7. Vị trí kháng nguyên của một số týp vi rút đường ruột [26]**

- A. Vị trí kháng nguyên đã biết của týp EV-A71  
 B. Vị trí kháng nguyên đã xác định của týp CV-A16  
 C. Vị trí kháng nguyên dự đoán của týp EV68

Đột biến trên vùng gen VP1 có tác động lớn đến khả năng gây bệnh và lưu hành của vi rút: Nghiên cứu trên EV-A71 mang đột biến aa G145E cho thấy biến thể này có sự nhô lên mạnh mẽ tại mẫu lâm sàng, mẫu mô thần kinh trung ương và mẫu mô thần kinh ngoại biên [89]. Nghiên cứu của tác giả Zainun Zaini và Peter McMinn đề cập đến sự xuất hiện đồng thời của hai đột biến G23V và I283V thuộc VP1 trên hầu hết các chủng CV-A10 thuộc phân nhóm (sub genotype) phổ biến C2 tại Trung Quốc và nhận định cho rằng hai đột biến này có liên quan đến sự lây lan phổ biến của sub genotype này tại Trung Quốc [82].

Như vậy, vùng gen mã hóa protein VP1 được chứng minh là vùng gen quan trọng quyết định đến tính kháng nguyên và tính độc lực của vi rút. VP1 có vai trò trong chu trình nhân lên của VRĐR. Những biến đổi trong vùng VP1 dễ dẫn đến thay đổi thành phần aa (đặc biệt tại các vị trí exposed loop), có thể làm thay đổi khả năng gây bệnh và đặc tính gây bệnh, từ đó hình thành biến chủng mới [160]. Vì vậy, vùng gen này là vùng đại diện thích hợp sử dụng trong nghiên cứu về quá trình phát sinh loài của VRĐR.

#### ***1.6.5. Tính chất lý hóa***

VRĐR có tính bền cao, có thể tồn tại trong môi trường axit yếu, duy trì hoạt tính gây nhiễm từ 1-3 giờ tại môi trường  $\text{pH} \leq 3$ . Điều này cho phép chúng có khả năng sống sót qua môi trường dạ dày, trôi xuống ruột là nơi chúng nhân lên. Ở điều kiện môi trường bên ngoài, VRĐR có khả năng tồn tại ở nhiệt độ phòng (22-25°C) trong vài ngày, 4°C trong vài tuần và vài năm tại nhiệt <0°C nên có thể sống sót trong thời gian dài [3, 53]. VRĐR có thể duy trì sự ổn định về mặt cấu trúc dưới tác động của hóa chất. Chúng trơ với các dung môi hữu cơ như ether và chloroform, bền với nhiều chất tẩy rửa tại nhiệt độ thường và các chất khử trùng như cồn 70%, isopropanol... Các đặc điểm lý sinh và hóa sinh này ảnh hưởng đến cơ chế bệnh sinh, sự lây truyền và đặc điểm dịch tễ học cơ bản của VRĐR. Tính ổn định về mặt cấu trúc và tồn tại được tại nhiều điều kiện môi trường khác nhau là nhân tố quan trọng đối với sự lây truyền của vi rút.

#### ***1.6.6. Quá trình nhân lên của vi rút đường ruột trong tế bào vật chủ***

Sự sao chép của VRĐR diễn ra tại tế bào chất. Quá trình nhân lên gồm các giai đoạn: (1) hấp thụ, xâm nhập và cởi áo, (2) phiên mã, sao chép và dịch mã, (3) lắp ráp và giải phóng. Kết quả sẽ xảy ra sự hủy hoại tế bào vật chủ.

- **Vi rút hấp thụ, xâm nhập**

VRĐR có thể sử dụng nhiều phương thức nhập bào hay xâm nhập khác nhau phụ thuộc vào týp VRĐR và dạng tế bào vật chủ. VRĐR bám vào một/nhiều thụ thể trên bề mặt tế bào dẫn đến việc tiêu hóa nội bào thông qua thụ thể trung gian. Thụ thể bám làm thay đổi nồng độ pH trong hệ thống túi nội bào, dẫn đến hiện tượng cởi áo

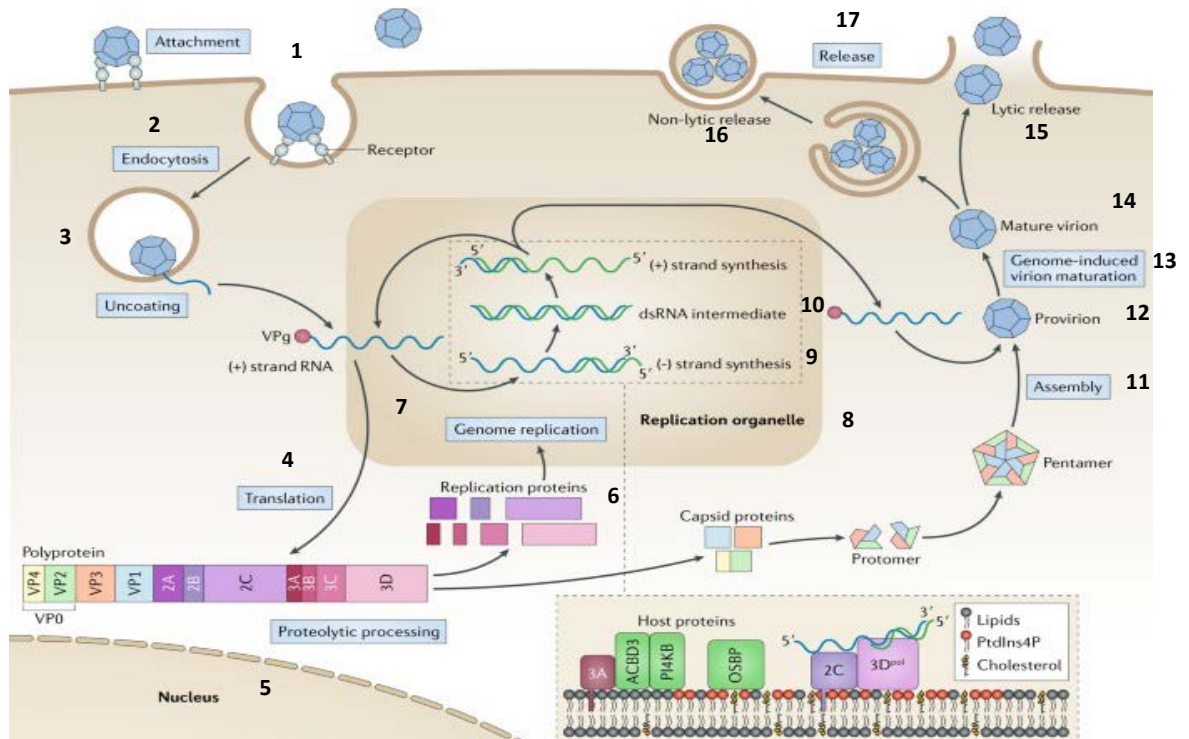
ở vi rút, giúp giải phóng hệ gen và đưa ra ngoài tế bào chất thông qua các lỗ tại màng tế bào. Tùy thuộc phương thức xâm nhập vào tế bào mà một VRĐR có nhiều dạng thụ thể khác nhau hoặc có thể phát hiện một loại thụ thể trên nhiều týp VRĐR. Ví dụ: thụ thể SCARB2 là thụ thể được tìm thấy tại týp EV-A71, CV-A16, CV-A7, CV-A14 hoặc tác nhân CV-A16 có các thụ thể SCARB2, PSGL1 [32, 107, 181].

- **Phiên mã, sao chép và dịch mã**

Quá trình phiên mã và sao chép sử dụng cùng loại enzym. ARN được giải phóng sẽ được sử dụng để tổng hợp các hạt vi rút thế hệ sau. Sau khi bỏ vỏ capsid, ARN được tự do trong bào tương. Sự tổng hợp protein diễn ra tại lưới nội mô có hạt. Sao chép ARN diễn ra trên bề mặt túi màng sinh chất kép thông qua việc sử dụng bản sao ARN sợi âm trung gian. ARN tạo ra ARN thông tin (mRNA) tham gia dịch mã tạo một polyprotein lớn duy nhất. Polyprotein được enzym protease 2A<sup>pro</sup>, 3C<sup>pro</sup>, 3CD<sup>pro</sup> phân cắt thành 10 protein đơn lẻ, có chức năng khác nhau gồm protein vỏ capsid (VP0, VP1, VP3), protein sao chép (2A-2C, 3A-3D) và một vài hợp chất trung gian. Ngoài chức năng phân cắt polyprotein thành các phân tử nhỏ, enzym protease còn phân cắt các mục tiêu thuộc tế bào, tối ưu hóa môi trường cho sự nhân lên của vi rút [107]. Hệ gen của VRĐR được sao chép trên cấu trúc màng nhờ enzym 3D<sup>pol</sup>. Enzym này sử dụng trong quá trình tổng hợp sợi âm tạo thành sợi ARN kép. Sợi âm đóng vai trò làm khuôn cho quá trình tổng hợp sợi dương. Sợi dương mới làm khuôn để dịch mã và tạo ra các hạt virion mới [32, 181].

- **Lắp ráp và giải phóng**

Quá trình lắp ráp và giải phóng được quyết định bởi các bước lắp ráp trung gian của vỏ capsid thông qua tiền chất và vỏ tiền capsid (procapsid). Phân tử ARN sợi đơn dương sẽ được bọc trong vỏ capsid tạo thành hạt tiền vi rút (provirus), sự phân cắt protein VP0 thành VP2 và VP4 tạo nên hạt vi rút hoàn chỉnh. Hạt vi rút hoàn chỉnh thoát ra khỏi tế bào chủ thông qua con đường giải phóng không phân giải nhờ các túi ngoại bào hoặc ly giải sẽ tiếp tục lây nhiễm vào tế bào khác [32, 181].



**Hình 1.8. Chu trình nhân lên của vi rút đường ruột [32]**

**Ghi chú:**

- (1) Attachment: Sự bám gắn của vi rút sau khi liên kết với thụ thể hoặc các thụ thể của nó và hấp thu nội bào trong tế bào,
- (2) Endocytosis: Nhập bào, vi rút đưa bộ gen ARN sợi dương (+) qua màng nội sinh chất vào tế bào chất.
- (3) Uncoating: Cởi áo.
- (4) Translation: Dịch mã - Sự dịch mã tạo ra một polyprotein đơn
- (5) Proteolytic processing: Quá trình phân giải protein: Polyprotein được phân cắt theo phương pháp phân giải thành các protein sao chép (2A – 2C và 3A – 3D) và protein capsid (VP0, VP1 và VP3).
- (6) Replication proteins: Các protein sao chép
- (7) Genome replication: Sự sao chép của vật chất di truyền ARN
- (8) Replication organelle: Vị trí diễn ra sự sao chép - Tại các bào quan trên tế bào chủ
- (9) Strand synthesis: Sự tổng hợp sợi âm (-) hoặc sợi dương (+)
- (10) ds ARN intermediate: Sợi ARN đôi
- (11) Assembly: Quá trình lắp ráp
- (12) Provirion: Hạt vi rút chưa hoàn chỉnh
- (13) Genome induced virion maturation: Quá trình tạo vi rút hoàn chỉnh
- (14) Mature virion: Hạt vi rút hoàn chỉnh
- (15) Lytic release: Quá trình giải phóng khỏi tế bào theo con đường ly giải
- (16) No-lytic release: Quá trình giải phóng khỏi tế bào không theo con đường ly giải
- (17) Release: Giải phóng khỏi tế bào



## **1.7. Chẩn đoán tác nhân vi rút đường ruột trong phòng thí nghiệm**

Để chẩn đoán VRĐR, loại mẫu lựa chọn phụ thuộc vào hệ thống cơ quan liên quan và phương pháp chẩn đoán sẵn có (cổ điển hay phân tử). Do sự liên quan của VRĐR và bệnh cần phải phân lập vi rút từ các tổn thương mô bệnh hay dịch lỏng. Loại mẫu được thu thập thường là mẫu phân, mẫu ngoáy trực tràng, dịch ngoáy họng, dịch nốt phỏng bảo quản trong môi trường vận chuyển tới PTN [3]. Mẫu phân do có chứa nồng độ vi rút cao thường cho kết quả phát hiện VRĐR cao nhất.

### **1.7.1. Phân lập vi rút**

Tiêu chuẩn vàng để xác định nhiễm VRĐR là nuôi cấy, phân lập vi rút trên các dòng tế bào/vật chủ đặc hiệu. Nuôi cấy vi rút trên tế bào đặc hiệu là kỹ thuật gây nhiễm vi rút (có trong mẫu bệnh phẩm) lên dòng tế bào nuôi thích hợp nhằm tăng sinh vi rút. Mặc dù không phải tất cả các VRĐR đều có thể phân lập trên môi trường nuôi cấy nhưng rất nhiều VRĐR có thể phát triển trên nhiều dòng tế bào động vật có vú. Một số dòng tế bào thường sử dụng như MDCK (Thận chó Madin Darby), RD (Tế bào u cơ vân ở người), CMK (Tế bào thận khỉ xanh Châu Phi)... Trong đó, RD và Vero được sử dụng rộng rãi trong việc phân lập EV-A71 và CV-A16 do có độ nhạy tương đối cao và có sự hủy hoại tế bào rõ ràng [205]. VRĐR khác nhau có khả năng phát triển khác nhau trên các dòng tế bào. Tùy thuộc vào mục đích thí nghiệm, trong quá trình nuôi cấy có thể sử dụng cùng lúc nhiều dòng tế bào. Ví dụ, để tìm hiểu cơ chế của CV-A16 khi nhiễm ảnh hưởng đến quá trình chết theo chu trình ở tế bào thần kinh và tế bào thần kinh đệm, tác giả Zhaolong Li đã nuôi cấy CV-A16 trên 6 dòng tế bào là RD, Magi, HEK293T, HepG2, A172 và SK-N-SH [105]. Hiện tại, phương pháp nuôi cấy không còn được áp dụng rộng rãi trong chẩn đoán do yêu cầu cao về cơ sở vật chất, năng lực xét nghiệm và tốn nhiều thời gian (mẫu bệnh phẩm phải xử lý trước khi phân lập, cần dòng tế bào phù hợp để nuôi cấy, thời gian nuôi cấy khoảng 14 ngày mới có kết quả). Kỹ thuật này chủ yếu dùng để lưu chủng vi rút sau đó được định danh bằng các phương pháp khác như trung hòa, miễn dịch và sinh học phân tử...[184].

### **1.7.2. Phản ứng trung hòa**

Đây là phương pháp tin cậy dùng để xác định VRĐR. Thời gian hoàn thành thí nghiệm mất từ 5-7 ngày [16, 184]. Nguyên lý của phương pháp dựa trên phản ứng trung hòa sử dụng kháng huyết thanh đặc hiệu. VRĐR sau khi phân lập trên tế bào nuôi cấy, sẽ được định danh bằng phản ứng trung hòa cổ điển sử dụng kháng huyết thanh đặc hiệu với týp VRĐR đã được kiểm định. Trên thực tế, các bộ kháng huyết thanh thương mại đặc hiệu của VRĐR nhóm A (EV-A71 và CV-A16) thường không có sẵn trên thị trường nên việc cung cấp cho các PTN gặp khó khăn. Bên cạnh đó, phương pháp có một số hạn chế đối với một vài mẫu phân lập VRĐR không được định týp do các nguyên nhân như nồng độ vi rút trong mẫu thấp, sự xuất hiện của týp huyết thanh mới, sự nhiễm khuẩn của mẫu lâm sàng...

### **1.7.3. Kỹ thuật xét nghiệm nhanh**

Phương pháp chẩn đoán nhanh (quicktest) được phát triển nhằm đáp ứng nhu cầu chẩn đoán trong thời gian ngắn, thao tác đơn giản. Phương pháp xét nghiệm dựa trên nguyên lý sắc ký miễn dịch pha rắn nhằm phát hiện định tính kháng nguyên hoặc kháng thể, hoặc cả kháng nguyên - kháng thể hoặc chất/ hợp chất (tùy từng loại sinh phẩm) trong mẫu bệnh phẩm. Các sinh phẩm thường có sẵn trên thị trường. Hiện tại, các sinh phẩm chẩn đoán nhanh EV-A71 được thương mại hóa hiện tại tập trung vào việc phát hiện kháng thể IgM kháng EV-A71 như sản phẩm của công ty SD Biotec, MyBiosource [123, 157, 184].

### **1.7.4. Kỹ thuật RT-PCR và giải trình tự**

Kỹ thuật RT-PCR và giải trình tự là kỹ thuật phát hiện và khuếch đại các đoạn gen đích của VRĐR dựa trên trình tự mỗi đặc hiệu được thiết kế trên vùng gen đích. Trên thực tế, việc ứng dụng kỹ thuật RT-PCR và giải trình tự vào việc xác định tác nhân gây bệnh phụ thuộc vào năng lực của từng phòng xét nghiệm, khả năng tài chính và kinh nghiệm quản lý vận hành. Hiện nay, các nghiên cứu dịch tễ học phân tử thường sử dụng vùng VP1 trong việc khuếch đại và giải trình tự vì đây là vùng gen bộc lộ và có tính trội miễn dịch nhất của protein capsid và vì thế thường thay đổi để đáp ứng với áp lực miễn dịch. Ưu điểm của phương pháp là có độ nhạy và độ đặc



hiệu cao, giúp chẩn đoán nhanh và trực tiếp các VRĐR từ mẫu bệnh phẩm lâm sàng. Kết quả có được chỉ sau một vài giờ kể từ khi thực hiện xét nghiệm. Bên cạnh đó, đây còn là công cụ mạnh cho việc nghiên cứu sự lưu hành của các chủng/biến thể mới trong nghiên cứu dịch tễ học bằng cách so sánh sự thay đổi về đặc điểm di truyền mới xác định với các công bố trước đó. Có nhiều kỹ thuật sinh học phân tử giúp cho việc chẩn đoán VRĐR như RT-PCR, realtime RT-PCR, nested RT-PCR/giải trình tự, multiplex RT-PCR... Sự phát triển phương pháp RT-PCR và giải trình tự một đoạn ngắn gen VP1 sử dụng primer có tính bảo thủ (consensus degenerate hybrid oligonucleotide primer - CODEHOP) với độ nhạy cao và độ đặc hiệu phổ rộng cho các kiểu huyết thanh VRĐR đã biết có thể định danh các VRĐR trực tiếp. Phương pháp RT-PCR hoặc RT-PCR đa môi (multiplex RT-PCR) cũng đã được phát triển để phát hiện các týp VRĐR như EV-A71, CV-A16, CV-A6... [20, 22, 56, 167, 184, 185]. Tùy thuộc vào điều kiện thực tế, và việc lựa chọn kỹ thuật xét nghiệm và sơ đồ xét nghiệm chẩn đoán VRĐR tùy thuộc vào từng PTN. Ví dụ như tại Hàn Quốc, trung tâm kiểm soát và phòng ngừa dịch bệnh Hàn Quốc (KDCD) từ năm 1999-2004 sử dụng phương pháp nuôi cấy tế bào, từ 2005-2007 sử dụng phương pháp RT-PCR, từ 2008-2011 sử dụng phương pháp Realtime RT-PCR với vùng gen 5' không mã hóa có độ dài 196nt và giải trình tự một phần đoạn gen VP1.

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

Tình hình nghiên cứu về tác nhân VRĐR gây bệnh rất khác nhau và đa dạng. Bên cạnh ba tác nhân chính là EV-A71, CV-A16 và CV-A6, đã bắt đầu ghi nhận có sự chớm nổi của các kiểu VRĐR khác như CV-A10, CV-A2, E-18, CV-A24 [6, 8, 19, 34, 38, 46, 71, 76, 82, 111, 119, 169, 202, 204].

#### **1.8.1. Tình hình nghiên cứu đối với căn nguyên EV-A71**

Các vụ dịch TCM do EV-A71 đã tạo điều kiện cho các nhà khoa học trên thế giới và tại Việt Nam có tài liệu để nghiên cứu sâu và chi tiết ở nhiều khía cạnh. Từ đặc điểm dịch tễ lưu hành đến sự phân loại của EV-A71 cũng đã được thống nhất và chi rõ trong từng giai đoạn cụ thể. Không chỉ vậy, dựa trên nghiên cứu cơ bản về mô hình cấu trúc tinh thể của protein capsid VP1, vùng liên kết kháng nguyên, kết hợp

thụ thể và vị trí aa quan trọng liên quan đến độc lực của vi rút EV-A71 cũng được xác định. Từ đây, những nỗ lực nghiên cứu và sản xuất vắc xin EV-A71 cũng đã tiến hành ở nhiều quốc gia bao gồm vắc xin bất hoạt, hạt giả vi rút, protein tái tổ hợp.... [84, 102, 197, 209]. Trong đó, nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng vắc xin bất hoạt đơn giá EV-A71 của nhóm tác giả Yan-Ping Li được phát triển và sản xuất với công ty Sinovac Biotech, sử dụng sub genotype C4 của EV-A71 làm cơ sở. Ngoài ra còn có các vắc xin bất hoạt của các công ty khác như Vigoo, Chinese of Medical Sciences. Các vắc xin này đã được cấp phép và lưu hành tại Trung Quốc (năm 2015-2016) với hiệu quả đạt trên 90% mặc dù hiệu giá kháng thể thường giảm sau 6 tháng và vẫn còn các phản ứng phụ như sốt, phản ứng tại vị trí tiêm...[101, 104, 209].

### ***1.8.2. Tình hình nghiên cứu đối với căn nguyên CV-A16 và CV-A6***

CV-A16 lần đầu được phân lập ở Nam Phi (năm 1951) nhưng không có báo cáo đặc điểm dịch tễ học TCM tại thời điểm đó [49]. Dựa trên sự khác biệt nt của vùng gen VP1, hiện nay CV-A16 được xếp vào hai kiểu gen (genotype) chính là A và B. Genotype B tiếp tục được chia làm các phân nhóm (sub genogroup) nhỏ gồm B1a-B1c và B2a-B2c. Tuy nhiên, cho đến thời điểm hiện tại, hệ thống phân loại kiểu gen của CV-A16 vẫn chưa có sự thống nhất hoàn toàn. Vì vậy, cần nhiều hơn nữa nghiên cứu sung thêm thông tin để xây dựng một hệ thống phân loại thống nhất hơn, một phương pháp xác định kiểu gen chính xác hơn [35].

Chủng gốc của CV-A6 được phân lập tại Mỹ năm 1949. Trong những năm trở lại đây, CV-A6 nổi lên như một nguyên nhân gây bệnh chủ yếu. Chính vì vậy, nghiên cứu về CV-A6 cũng được quan tâm. Phần lớn nghiên cứu tập trung ở đặc điểm dịch tễ thông qua các vụ dịch TCM trên thế giới như tại Pháp, Phần Lan, Tây Ban Nha, Đan Mạch, Trung Quốc, Nhật Bản...[38, 63, 86, 99, 119, 121, 122, 202]. Tại Việt Nam, tỷ lệ mắc và lưu hành giai đoạn 2011-2016 được công bố trong một số nghiên cứu như của tác giả Nguyễn Thị Hiền Thanh và Trần Thị Nguyễn Hòa [10, 17, 18]. Tại miền Nam Việt Nam, giai đoạn 2011-2015, nghiên cứu trên bệnh nhân TCM nhập viện của nhóm nhà khoa học thuộc đại học Oxford - Hồ Chí Minh và bệnh viện các bệnh truyền nhiễm - Hồ Chí Minh đã nhấn mạnh CV-A6 là tác nhân gây bệnh TCM

nổi trội tại miền Nam và chủng lưu hành thuộc lineage E2 (hay cluster A) [127]. Bên cạnh đó, nghiên cứu lâm sàng cho thấy nhiễm CV-A6 có thể dẫn đến nhiều triệu chứng lâm sàng từ không điển hình (nổi mụn nước, viêm họng mụn nước (herpangina)) đến các biến chứng rối loạn hệ thần kinh trung ương nghiêm trọng (viêm màng não vô khuẩn, viêm não) [38, 119, 162]. Tuy nhiên các nghiên cứu về đặc điểm sinh học phân tử, cơ chế gây bệnh và khả năng sinh miễn dịch của CV-A6 còn hạn chế.

Trên thực tế, đối với nghiên cứu sản xuất vắc xin, bên cạnh vắc xin đơn giá đối với tác nhân EV-A71 đã bước đầu thành công tại thị trường Trung Quốc cũng cần phát triển vắc xin đối với tác nhân CV-A16/CV-A6. Điều này có ý nghĩa rất lớn trong việc kiểm soát bệnh TCM. Hiện nay đã có một số công bố của các nhóm nghiên cứu về tính khả quan của việc sản xuất vắc xin với hai tác nhân này. Ví dụ, nghiên cứu của tác giả Ting Yang và cs (năm 2020) về tính sinh miễn dịch và hiệu quả bảo vệ của vắc xin sống giảm độc lực CV-A16 chủng K168-8Ac đánh giá trên mô hình khỉ *Rhesus* cho thấy có phản ứng miễn dịch mạnh, có khả năng bảo vệ một phần chống lại CV-A16 [195]. Một nghiên cứu khác của tác giả tác Zaixue Jiang (năm 2020) được thực hiện thông qua việc phát triển vắc xin đường uống chống lại tác nhân CV-A16 bằng cách tạo ra chủng vi khuẩn *Lactococcus lactis* tái tổ hợp biểu hiện vùng gen VP1 của CV-A16. Kết quả cho thấy “sản phẩm” tạo ra kháng thể bảo vệ chống lại CV-A16 do đó đây có thể là hướng đi tiềm năng trong việc sản xuất. Tuy nhiên cần có thêm thời gian để nghiên cứu sâu về tính an toàn và hiệu quả đối với cơ thể người [203]. Đối với tác nhân CV-A6, việc nghiên cứu và chế tạo vắc xin hiện vẫn còn nhiều trở ngại như vi rút khó được phân lập và nhân lên có hiệu quả trên dòng tế bào Vero và MRC-5 (hai môi trường tế bào phổ biến trong sản xuất vắc xin) hoặc còn thiếu các mô hình vật chủ để thực hiện việc thử nghiệm miễn dịch để đánh giá hiệu quả của vắc xin đối với phòng bệnh TCM mặc dù các mô hình chuột sơ sinh của EV-A71, CV-A16, CV-A6 và CV-A10 đã được xây dựng [108, 146, 208].

### ***1.8.3. Tình hình nghiên cứu đối với các căn nguyên vi rút coxsackie và echo khác***

Do các VRĐR ngoài EV-A71, CV-A16, CV-A6 chiếm một tỷ lệ không hề nhỏ nên việc giám sát dịch TCM do tác nhân phụ gây ra là điều rất cần thiết. Tuy nhiên, hiện nay đa số các thông tin đề cập mới chỉ dừng lại ở việc thống kê tỷ lệ % lưu hành. Nghiên cứu về đặc điểm bệnh học, dịch tễ học phân tử, di truyền tiến hóa... của chúng trên thế giới nói chung và tại Việt Nam nói riêng còn nhiều hạn chế. Lý giải cho điều này có thể là do đây là tác nhân phụ mà hiện tại bệnh TCM mới chỉ tập trung nghiên cứu chủ yếu trên tác nhân chính. Ngoài ra, các tác nhân phụ này đồng thời là tác nhân chính gây ra các bệnh khác như viêm kết mạc (do CV-A24), viêm màng não (do E-18), viêm họng hạt (do CV-A2) nên chúng được tập trung nghiên cứu trên các bệnh này hơn [36, 43, 44, 48, 58, 196]. So với các bước tiến nhanh và cập nhật về EV-A71 thì nghiên cứu về CV-A16, CV-A6, CV-A10 và đặc biệt là các VRĐR khác còn là một khoảng trống, nhiều câu hỏi khoa học hiện còn bỏ ngỏ. Chính vì vậy, nghiên cứu sự lưu hành và đặc điểm phân tử của một số vi rút coxsackie và echo “ngoài EV-A71” góp phần làm sáng tỏ vai trò gây bệnh, sự lưu hành của CV-A16, CV-A6 cũng như một số kiểu VRĐR khác lưu hành nổi trội trong giai đoạn nghiên cứu như CV-A10, CV-A24, E-18...là điều cần thiết.

## CHƯƠNG II: 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 bệnh phẩm 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 phía Bắc gồm Bắc Giang, Bắc Kạn, Bắc Ninh, Cao Bằng, Điện Biên, Hà Giang, Hà Nam, Hà Nội, Hải Dương, Hải Phòng, Hòa Bình, Hưng Yên, Lai Châu, Lạng Sơn, Lào Cai, Nam Định, Ninh Bình, Phú Thọ, Quảng Ninh, Sơn La, Thái Bình, Thái Nguyên, Tuyên Quang, Vĩnh Phúc, Yên Bái, Thanh Hóa
- **Địa điểm phân tích mẫu:** Phòng thí nghiệm Vi rút đường ruột - Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương (PTN VRĐR - Viện VSDTTU)

### 2.3. Thời gian nghiên cứu

- **Thời gian thu thập mẫu:** Từ 2008 đến 2018

Cụ thể với từng mục tiêu như sau:

- **Mục tiêu 1:**

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

- **Mục tiêu 2:** Các mẫu được lựa chọn từ các mẫu đã được xác định dương tính với các týp VRĐR gồm CV-A6, CV-A16, CV-A10, CV-A4, CV-A2, CV-A24 và 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:** Được 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:** Được 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 thể theo từng giai đoạn như sau:
  - **Giai đoạn 2008-2017:** Sử dụng kết quả xét nghiệm xác định tít 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 tít với VRĐR.
  - **Giai đoạn 2018:** Mẫu bệnh phẩm thu thập từ bệnh nhân TCM kèm phiếu điều tra 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 tít VRĐR gây bệnh. Kết quả có 377 mẫu được xác định dương tính và tiến hành định tít 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 tít 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 tít VRĐR này được đưa vào thí nghiệm  
(Xem thêm lược đồ hình 2.1)

### 2.4.3. Phương pháp chọn mẫu

- **Tiêu chuẩn chọn mẫu:**
  - **Mục tiêu 1:**
    - ✓ **Giai đoạn 2008-2017:** Sử dụng kết quả định tít 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 phân, dịch ngoáy họng hoặc nốt phỏng) được chuyển về PTN. 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 300µl. 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

**Bảng 2.1. Cỡ mẫu và cách chọn mẫu trong nghiên cứu**

STT	Mục tiêu	Phương pháp chọn mẫu	Cỡ 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	<p><b>Giai đoạn 2008-2017:</b> 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 VSĐTTU</p> <p><b>Giai đoạn 2018:</b> 480 mẫu bệnh phẩm và phiếu điều tra gửi kèm</p>																		
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	<p>- <b>Đối với CV-A6 và CV-A16:</b> thực hiện lựa chọn mẫu theo ngẫu nhiên có hệ thống theo địa lý (tỉnh) và thời gian (tháng) thu thập mẫu</p> <p>- <b>Đối với CV-A10, CV-A2, CV-A4, CV-A24, E-18:</b> Toàn bộ các mẫu dương tính</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Tác nhân</th> <th>Số mẫu lựa chọn giải trình tự gen VP1/Số mẫu dương tính của mỗi týp (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <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><b>Tổng số mẫu giải trình tự</b></td> <td><b>590</b></td> </tr> </tbody> </table>	Tác nhân	Số mẫu lựa chọn giải trình tự gen VP1/Số mẫu dương tính của mỗi týp (%)	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%)	<b>Tổng số mẫu giải trình tự</b>	<b>590</b>
Tác nhân	Số mẫu lựa chọn giải trình tự gen VP1/Số mẫu dương tính của mỗi týp (%)																				
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%)																				
<b>Tổng số mẫu giải trình tự</b>	<b>590</b>																				



#### **2.4.4. Chỉ số, chỉ tiêu nghiên cứu**

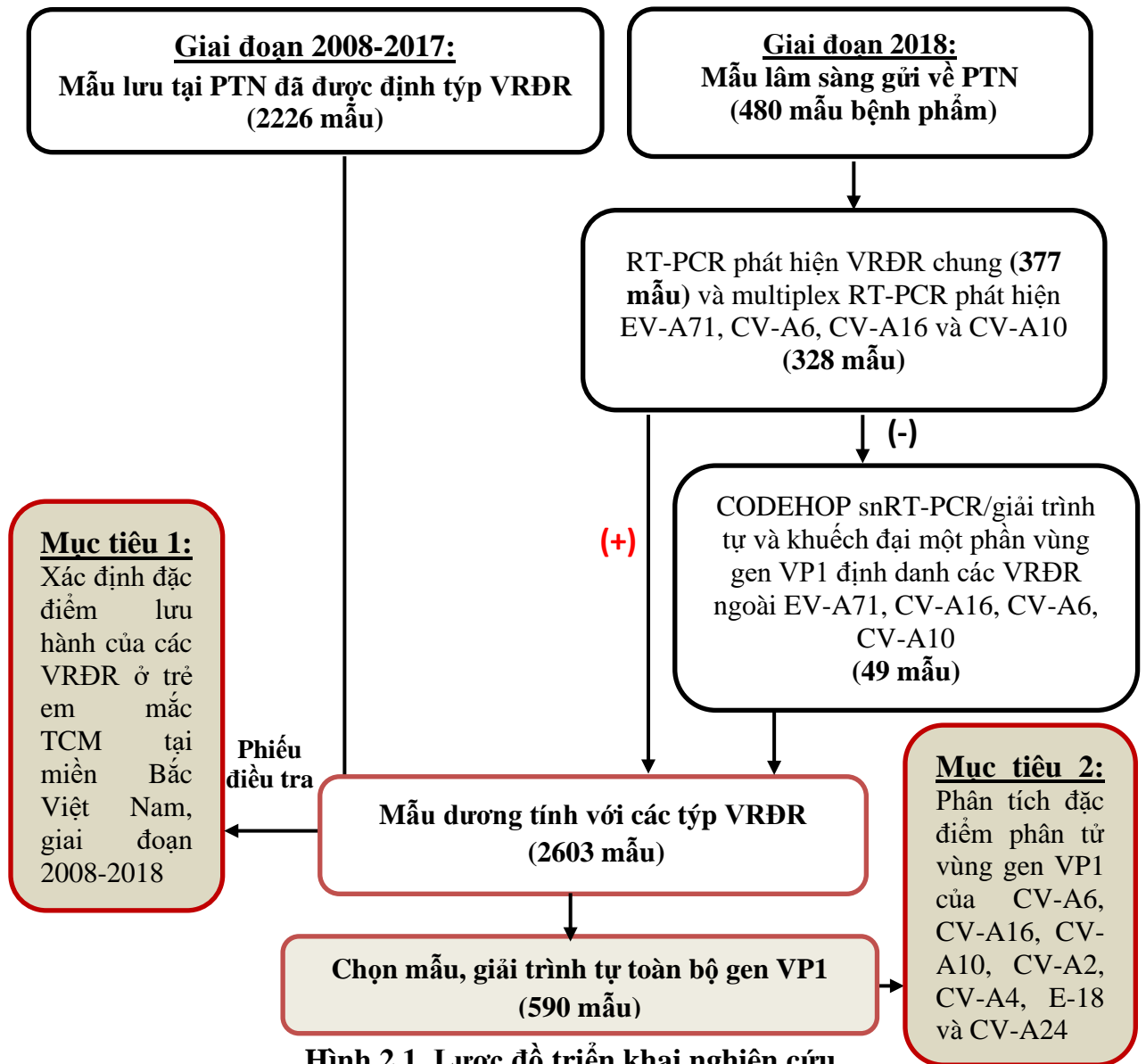
- **Mục tiêu 1:**

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

- **Mục tiêu 2:**

- Tỷ lệ khuếch đại gen VP1 của các týp 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 týp 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 týp 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

### 2.5.1. Bộ mồi định tít VRĐR và khuếch đại, giải trình tự vùng gen VP1

- Bộ mồi áp dụng trong xét nghiệm định tít VRĐR thuộc quy trình thường quy của PTN. Chi tiết bộ mồi tại Phụ lục 3
- Bộ mồi đặc hiệu khuếch đại toàn bộ vùng gen VP1 có được từ nguồn: (1) tham khảo từ các bài báo đã công bố, (2) của PTN VRĐR thiết kế, (3) Nghiên cứu sinh thiết kế bằng các phần mềm Primer designing tool (NCBI), Primer3 (v.0.4.0) (Bảng 2.2)

**Bảng 2.2. Danh sách môi sử dụng trong nghiên cứu**

TT	Tác nhân VRDR	Kích thước (nt)		Tên môi	Trình tự môi (5'-3')	Nguồn
		Đoạn VP1	Kích thước Sản phẩm PCR			
1	CV-A16	891	1161	CV-A16_2302F	ATG GTA YCA AAC YAA CTA TG	PTN
2				CV-A16_3105R	TAA TCY AGG TCA YTT GCT TG	VRDR –
3				CV-A16_2895F	AGT AYA TGT ATG TCC CRC G	Viện
4				CV-A16_3462R	GAR GAR ACT AAC ARG TCY CT	VSDTTU'
5	CV-A6	915	1051	CV-A6_2351F	AYA TYA TAG CTC TTG GAG CRG C	PTN
6				CV-A6_3050R	GGR TAR CCA TCA TAA AAC CA	VRDR –
7				CV-A6_2825F	ART TCA CYT TYG TRT CCA	Viện
8				CV-A6_3401R	CAC TCT RAA GTT ACC YAC ATA GAT	VSDTTU'
9	CV-A10	894	1210	CV-A10_2251F	AAG ACA GGT GGG AAT TAC G	PTN
10				CV-A10_3181R	TCT GAA GTA TCA GTT GCC AT	VRDR –
11				CV-A10_2700F	TCG ATT ATT RGG AAT RGT TA	Viện
12				CV-A10_3460R	CAG GTC TCG TGA ACT RTC TT	VSDTTU'
13	CV-A2,	CV-A2 -	1052	EV486F*	TGG TAI CAR ACI AAI TWY GTI GTN CC	[132]
14	CV-A4	861		EV488R*	GTI GGR TAI CCI TCI TAR AAC CAY TG	
15		CV-A4 -		EV487F*	ATG TWY GYI CCI CCI GGI GCN CC	
16		915		EV489R*	AYI GCI CCI SWI TGY TGN CC	

17				CV-A2_18F	TGC HAT AAC CAA CAC RGT RAA	PTN
18				CV-A2_183F	TGA RAR YYT SAT AGA RAC AA	VRĐR –
19				CV-A2_205R	TRT TYT TRT TRA CYA CAC AYC T	Viện
20				CV-A2_470R	GGA ACR TAC ATR TAY TGR AG	VSDTTU'
21				CV-A4_2638F	GAR ACH AGA TGT GTY GTD AA	
22				CV-A4_2692F	TTY TTC TCT AGR TCA GGA YT	
23				CV-A4_3201R	CAA ATA AAT GCG RAT CTG RAA	
24				CV-A4_3214R	CTC TYT THA RCC GCA ART AAA	
25	CV-A24	915	1025	A24_VP1_FullF*	CAA AGA GAA CTT TGT TTG CG	[44]
26				A24_VP1_FullR*	CCT CCA AAA GTA TTA ATG TTT TC	
27				A24_2416F	TTT AGC GTG CGT CTG TTG AG	Nghiên cứu
28				A24_3044R	AAA ACA CTG ACG GGT TYG AT	sinh thiết
29				A24_2813F	TAC ACA GAC ACA GTG CGA CT	kế
30				A24_3440R	CCT GCA ACR TAC ACC GCC AT	
31	E-18	861	990	E18_2397F	TRC GTT TGY TGA GRG ATA C	Nghiên cứu
32				E18_2952R	GTC CAA AAG ACA CTA GGG TT	sinh thiết
33				E18_2813F	TGC CAR GAT CAR GGR ACG CA	kế
34				E18_3386R	TGK GTW GCK ARG TGY CTG TT	

**Ghi chú:** Y = C/T; R=A/G; W=A/T; S=C/G K=G/T D=A/T/G H= A/T/C N=A/T/G/C

### 2.5.2. Vật tư, trang thiết bị

- Máy PCR (Thermo, Mỹ)
- Máy điện di ngang (Fisher scientific, Mỹ)
- Hệ thống máy giải trình tự gen (ABI 3730<sup>TM</sup> Genetic Analyser, Mỹ)
- Tủ an toàn sinh học (Esco, Singapo)
- Máy ly tâm (Thermo, Mỹ)
- Tủ mát 2-8°C (Sanyo, Nhật Bản)
- Tủ âm -30°C và -80°C (Sanyo, Nhật Bản)
- Máy đông khô (Thermo, Mỹ)
- Pipette đơn kênh, pipette đa kênh các thể tích (Thermo, Phần Lan)
- Cân điện tử (Ohaus, Mỹ)
- Máy lắc (IKA, Đức)
- Máy spindown (Eppendorf, Đức)
- Đầu côn có màng lọc các thể tích 10µl, 200µl, 1000µl (QSP, Mỹ)
- Ống 0,1ml, 1,5ml, 2ml, 15ml, 50ml (Eppendorf, Đức)
- Đĩa 96 vị trí thể tích 0,1ml (ABI, Mỹ)
- Lò vi sóng (Việt Nam)

### 2.5.3. Hóa chất, sinh phẩm

**Bảng 2.3. Hóa chất, sinh phẩm dùng trong nghiên cứu**

TT	Thông tin hóa chất, sinh phẩm			Mục đích
	Tên sinh phẩm	Hãng sản xuất	Mã số sản phẩm	
1	PBS	Sigma	MFCD00131855	Xử lý
2	Chloroform	Sigma	C0549-1QT	mẫu bệnh phẩm
3	QIAamp®Viral RNA Mini Kit	Quiagen	52906	Tách chiết ARN
4	Ethanol 99,9%	Sigma	459844	
5	High Pure Viral RNA Kit	Roche Life Science	1185882001	

6	GoScript™ Transcription System	Reverse	Promega Corporation	A5001	cDNA
7	GoTaq Green Master Mix 2X		Promega Corporation	201443	PCR và điện di
8	Agarose, LE, Analytical Grade		Promega Corporation	V3125	sản phẩm PCR
9	Subur™ Safe ADN gel stain 10.000X		Invitrogen – Thermo Fisher Scientific	S33102	
10	UltraPure™ TBE Buffer, 10X		Invitrogen – Thermo Fisher Scientific	15581044	
11	ADN Ladder 100		Promega Corporation	G8291	
12	ADN Ladder 1000		Promega Corporation	G5711	
13	ExoSAP-IT™ PCR Product Clean up Reagent		ABI – Thermo Fisher Scientific	78201	Tinh sạch sản phẩm PCR
14	BigDye® Terminator v3.1		ABI - Thermo Fisher Scientific	4334756	Gắn dye, tinh sạch sản phẩm
15	Sephadex® G-50		GE Heathcare	GE17-0042-01	khuếch đại
16	Hi-Di™ Formamide		ABI – Thermo Fisher Scientific	4401457	và đọc trình tự
17	POP-7™ Polymer		ABI – Thermo Fisher Scientific	4363935	
18	3730 Running Buffer (10X)		ABI – Thermo Fisher Scientific	4335613	

## 2.6. Kỹ thuật thực hiện trong nghiên cứu

### 2.6.1. Kỹ thuật thu thập thông tin (sử dụng trong Mục tiêu 1)

- 100% số mẫu trong nghiên cứu đều có phiếu điều tra (Phụ lục 1).
- Kiểm tra các thông tin đã thu thập gồm: Tuổi, mẫu bệnh phẩm thu thập (nơi gửi mẫu, ngày khởi phát, độ lâm sàng...)
- Các thông tin được kiểm tra, rà soát và nhập file excel
- Phân tích số liệu: Phân tích mối liên quan giữa sự phân bố của vi rút theo thời gian lưu hành, vùng địa lý, nhóm tuổi mắc bệnh, độ lâm sàng

### 2.6.2. Xử lý mẫu bệnh phẩm thu thập năm 2018 (sử dụng trong Mục tiêu 1)

- Loại mẫu được thu thập thường là mẫu phân, dịch ngoáy họng, dịch nốt phỏng. Mẫu dịch ngoáy họng và dịch nốt phỏng được bảo quản trong môi trường vận chuyển gửi về PTN [3]. Mẫu phân thường có chứa nồng độ vi rút cao nên được ưu tiên lựa chọn làm xét nghiệm trước nếu một ca bệnh có cả mẫu phân và các loại mẫu khác được thu thập.
- Cách xử lý mẫu:
  - *Bệnh phẩm phân*: Lấy khoảng 2g mẫu vào trong ống tuýp 50 ml (Ống falcon 50ml), bổ sung 10ml dung dịch PBS 1X, 5-10 hạt thủy tinh, 1ml chloroform. Vặn chặt nắp ống, dán parafilm kín nắp ống. Lắc ống bằng máy lắc (800 vòng/phút) trong 20 phút ở nhiệt độ phòng. Ly tâm 4000 vòng/phút x 20 phút ở 4°C. Hút 1ml dịch nổi chia vào ống tube 1,5 ml, bảo quản -30°C cho xét nghiệm tiếp theo.
  - *Bệnh phẩm dịch ngoáy họng và dịch nốt phỏng*: Bệnh phẩm đang được bảo quản trong ống môi trường vận chuyển vi rút. Lắc ống bằng máy lắc 800 vòng/phút x 20 phút ở nhiệt độ phòng. Chia 1ml dịch vào ống tube 1,5 ml và bảo quản ở -30°C cho xét nghiệm tiếp theo.

### 2.6.3. Tách chiết ARN (sử dụng trong Mục tiêu 1, 2)

- Sử dụng sinh phẩm Qiagen viral ARN mini kit (Qiagen) hoặc High Pure Viral RNA Kit (Roche)
- Quy trình thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Phụ lục 4, Phụ lục 5)

**2.6.4. Kỹ thuật RT-PCR chẩn đoán vi rút đường ruột chung và multiplex RT-PCR phát hiện EV-A71, CV-A6, CV-A16 và CV-A10 (sử dụng trong Mục tiêu 1)**

- Nguyên lý: ARN tách từ mẫu bệnh phẩm nghi nhiễm VRĐR được cho vào hỗn hợp RT để tạo cDNA. Sản phẩm cDNA được sử dụng làm khuôn trong các phản ứng PCR gồm: (1) phản ứng với môi thiết kế tại vùng 5'UTR, đặc hiệu chung với các VRĐR, (2) phản ứng với hai cặp môi thiết kế trên gen VP1, đặc hiệu cho vi rút CV-A6 và EVA-71; (3) phản ứng với hai cặp môi thiết kế trên gen VP1, đặc hiệu cho vi rút CV-A16 và CV-A10
- Bộ môi sử dụng chi tiết tại Phụ lục 3
- Cách tiến hành:

- Tổng hợp cDNA sử dụng môi ngẫu nhiên

Hỗn hợp phản ứng (Master Mix) gồm:

Thành phần	Thể tích /1 phản ứng (µl)
Nước tinh sạch	0,5
Đệm GoScript™ 5x	4
dNTP Mix (10mM)	1
MgCl <sub>2</sub>	1,5
Môi Random	1
Recombinant RNAsin	1
Enzym GoScript™ Reverse Transcriptase	1
RNA (bổ sung tại bước tổng hợp cDNA)	10
<b>Tổng</b>	<b>20</b>

Chu trình nhiệt

Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút: giây)
25	5:00
42	60:00
70	15:00
4	∞

- Phản ứng PCR

Hỗn hợp phản ứng cho PCR phát hiện VRĐR chung



<b>Thành phần</b>	<b>Thể tích/1 phản ứng (μl)</b>
Nước tinh sạch	16
Go Taq® Geen Master Mix	25
Môi xuôi (10 μM)	2
Môi ngược (10 μM)	2
cDNA (bổ sung tại bước PCR)	5
<b>Tổng</b>	<b>50</b>

Hỗn hợp phản ứng cho PCR phát hiện EV-A71 và CV-A6

<b>Thành phần</b>	<b>Thể tích/1 phản ứng (μl)</b>
Nước tinh sạch	8
GoTaq Green Master Mix	25
Môi xuôi CA6_3020F (10 μM)	3
Môi ngược CA6_3194R (10 μM)	3
Môi xuôi MAS01S (10 μM)	3
Môi ngược MAS02A (10 μM)	3
cDNA (bổ sung tại bước PCR)	5
<b>Tổng</b>	<b>50</b>

Hỗn hợp phản ứng cho PCR phát hiện CV-A16 và CV-A10

<b>Thành phần</b>	<b>Thể tích/1 phản ứng (μl)</b>
Nước tinh sạch	8
GoTaq Green Master Mix	25
Môi xuôi CA10_2700F (10 μM)	3
Môi ngược CA10_3181R (10 μM)	3
Môi xuôi CA16_2895F (10 μM)	3
Môi ngược CA16_3105R MAS02A (10 μM)	3
cDNA (bổ sung tại bước PCR)	5
<b>Tổng</b>	<b>50</b>

Chu trình nhiệt:

<b>Nhiệt độ (°C)</b>	<b>Thời gian (phút: giây)</b>	<b>Chu kỳ lặp</b>
95	5:00	1
94	0:45	} 50
55	0:45	
72	1:30	
72	4:00	1

- Điện di sản phẩm PCR:

- Kết quả RT-PCR được điện di trên gel 2%
- Mẫu được coi dương tính khi có xuất hiện băng đặc hiệu cho từng tác nhân. Kích thước sản phẩm PCR đặc hiệu như sau: VRĐR chung - 400 cặp base (bp), EV-A71 - 377bp, CV-A6 - 175bp, CV-A10 - 482bp, CV-A16 - 231bp
- Sự xuất hiện các sản phẩm PCR ở các vị trí không đặc hiệu hoặc không có sự hiện diện của sản phẩm PCR cho kết quả âm tính

**2.6.5. Kỹ thuật CODEHOP snRT-PCR/sequencing và khuếch đại một phần vùng gen VP1 định danh các vi rút đường ruột ngoài EV-A71, CV-A16, CV-A6, CV-A10 (sử dụng trong Mục tiêu 1)**

- Nguyên lý: ARN được tách chiết được dùng cho phản ứng cDNA, sử dụng hỗn hợp môi thiết kế trên vùng gen 2A. Sản phẩm cDNA sau đó sử dụng cho phản ứng PCR 1 với cặp môi thiết kế trên vùng gen VP3 và VP1 để thu được đoạn sản phẩm khuếch đại dài khoảng 762 bp. Phản ứng PCR 2 được tiếp tục với cặp môi khuếch đại đoạn gen VP1 dài khoảng 348-393 bp. Đoạn sản phẩm khuếch đại của PCR 2 được sử dụng để giải trình tự và phân tích di truyền, định danh kiểu huyết thanh VRĐR
- Quy trình được thực hiện với các mẫu được xác định dương tính với VRĐR chung và âm tính với EV-A71, CV-A16, CV-A6 và CV-A10 bằng kỹ thuật multiplex RT-PCR (mục 2.6.4)
- Bộ môi sử dụng chi tiết tại Phụ lục 3
- Cách tiến hành:

- Tổng hợp cDNA:

Hỗn hợp Maxter mix gồm:

Thành phần	Thể tích/1 phản ứng (µl)
Nước tinh sạch	1,5
Đệm GoScript™ 5x	2

<b>Thành phần</b>	<b>Thể tích/1 phản ứng (µl)</b>
dNTP Mix (10mM)	0,5
MgCl <sub>2</sub>	0,75
AN32,33,34,35 coctail (10µM)	0,5
Recombinant RNA sin	0,25
Emzym GoScript™ Reverse Transcriptase	0,5
RNA	4
<b>Tổng</b>	<b>10</b>

Chu trình nhiệt

<b>Nhiệt độ (°C)</b>	<b>Thời gian (phút: giây)</b>
25	5:00
42	60:00
70	15:00
4	∞

- *Phản ứng PCR*

Hỗn hợp Maxter mix cho PCR 1 gồm:

<b>Thành phần</b>	<b>Thể tích/1 phản ứng (µl)</b>
Nước tinh sạch	4,5
GoTaq Green Master Mix	12,5
Môi xuôi SO224 (10 µM)	1,5
Môi ngược SO222 (10 µM)	1,5
cDNA (bổ sung tại bước PCR)	5
<b>Tổng</b>	<b>25</b>

Hỗn hợp Maxter mix cho PCR 2 gồm:

<b>Thành phần</b>	<b>Thể tích/1 phản</b>
Nước tinh sạch	8
GoTaq Green Master Mix	12,5
Môi xuôi AN89F (10 µM)	2
Môi ngược AN88F (10 µM)	2
Sản phẩm PCR 1 (bổ sung tại bước PCR)	0,5
<b>Tổng</b>	<b>25</b>

Chu trình nhiệt của PCR1

Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút: giây)	Chu kỳ lặp
94	2:00	1
94	0:30	} 25
42	0:30	
72	1:00	
72	7:00	1
4	∞	

Chu trình nhiệt cho PCR 2

Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút: giây)	Chu kỳ lặp
95	5:00	1
94	0:30	} 25
55	0:30	
72	0:45	
72	5:00	1
4	∞	

- Điện di sản phẩm PCR: được thực hiện tương tự như sau khi xét nghiệm xác định tác nhân VRĐR chung, EV-A71, CV-A16, CV-A6 và CV-A10 (Trang 48)
- Tinh sạch sản phẩm PCR

Sử dụng sinh phẩm ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent để tinh sạch sản phẩm PCR nhằm loại bỏ các primer, ARN đơn và các nt thừa. Sinh phẩm được giữ tại -30°C. Sinh phẩm được đưa ra ngoài tủ âm và giữ trên gel lạnh trong suốt quá trình sử dụng. Trộn đều 5µl sản phẩm PCR với 2µl ExoSAP. Sản phẩm PCR sau tinh sạch được lưu giữ tại -30°C.

Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút: giây)
37	15:00
80	15:00
4	∞

- Giải trình tự:

Hỗn hợp phản ứng (Master Mix) gồm:

Thành phần	Thể tích /1 phản ứng (µl)
Big Dye Terminator	1
Nước không ion	5,8

<b>Thành phần</b>	<b>Thể tích /1 phản ứng (µl)</b>
Môi (10µM)	0,2
5x Sequencing Buffer	2
Sản phẩm RT-PCR đã tinh sạch	1,5
<b>Tổng số</b>	<b>10</b>

Chu trình nhiệt:

<b>Nhiệt độ (°C)</b>	<b>Thời gian (phút: giây)</b>	<b>Chu kỳ lặp</b>
96	1	1
96	10	} 35
50	5	
60	4	
72	10	1
4	∞	

- Tinh sạch sản phẩm PCR giải trình tự gen

Việc tinh sạch sản phẩm giải trình tự nhằm loại bỏ Bigdye terminators tồn dư và các thành phần khác trong dung dịch đệm (Buffers) trước khi tiến hành điện di mao quản nhằm thu được tín hiệu tốt hơn trên máy giải trình tự tự động. Sản phẩm PCR giải trình tự gen được tinh sạch bằng hóa chất Sephadex® G-50.

Quy trình thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Phụ lục 6)

- Chạy máy giải trình tự ABI 3730 Genetic Analyser

Thực hiện điện di trên máy giải trình tự ABI 3730 (Applied Biosystem, Mỹ) với gel POP-7. Trình tự nt được phân tích theo các thông số của phần mềm đi kèm theo máy

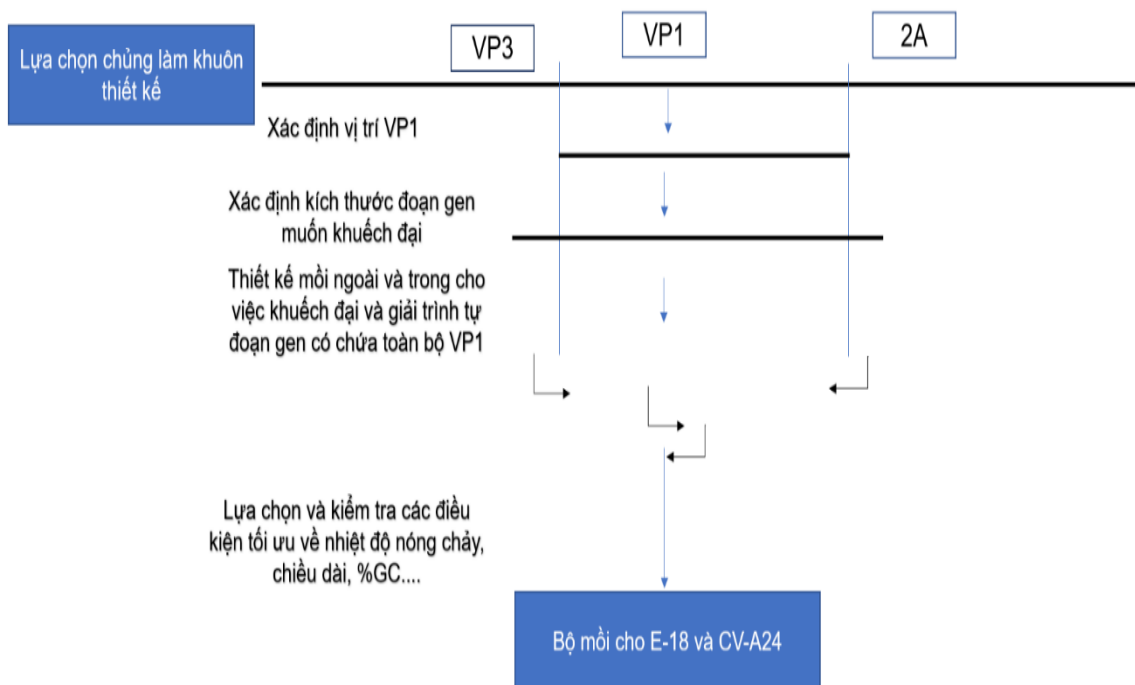
- Định danh các VRDR: Được thực hiện trên trang web phân tích tự động <http://www.rivm.nl/mpf/enterovirus/typingtool> .

#### **2.6.6. Thiết kế primer khuếch đại toàn bộ vùng gen VP1 của E-18 và CV-A24 (sử dụng trong Mục tiêu 2)**

- Sử dụng trình tự VP1 ngắn đã có chiều dài 330 nt của E-18 và CV-A24 làm khuôn nhằm lựa chọn chủng E-18 và CV-A24 trên ngân hàng Gen. Các chủng này được lựa chọn trên tiêu chí có đoạn VP1 hoàn chỉnh và trình tự nt độ tương

đồng cao nhất với các trình tự gần thuộc nghiên cứu. Chúng được lựa chọn đối với E-18 là chủng E-18 được phân lập tại Úc năm 2008 (NSW-V13A-2008-ECHO18) và của CV-A24 là chủng CV-A24 phân lập tại Nhật Bản năm 2011 (CA24v/Okinawa/5/2011).

- Xác định vị trí VP1 của chủng lựa chọn làm khuôn.
- Mồi thiết kế bao gồm bộ mồi ngoài (outer primer) trong đó mồi xuôi thuộc vùng gen VP3 và mồi ngược thuộc vùng gen 2A nhằm đảm bảo đoạn gen được khuếch đại sẽ bao trọn vùng gen VP1, các mồi trong (inner primer) được thiết kế đảm bảo khuếch đại các đoạn gen có chiều dài từ 500-800 bp và chồng lên nhau 1 phần nhằm đảm bảo có thể giải trình tự toàn bộ gen VP1. Các mồi thiết kế đảm bảo chiều dài tối ưu từ 18-25nt, nhiệt độ nóng chảy ( $T_m$ ) tương đồng, không chênh nhau quá  $2^\circ\text{C}$ , mật độ GC khoảng 50-60% và đảm bảo không hình thành cấu trúc dimer, kẹp tóc và lặp.
- Công cụ thiết kế mồi gồm: Primer designing tool (NCBI) và Primer 3 (v. 4.0)
- Danh sách mồi chi tiết tại Bảng 2.2.



**Hình 2.2. Sơ đồ quy trình thiết kế mồi của E-18 và CV-A24**

### 2.6.7. Khuếch đại và giải trình tự gen VP1 (sử dụng trong Mục tiêu 2)

- Nguyên lý: ARN tách từ mẫu dương tính với týp VRĐR trong nghiên cứu được cho vào hỗn hợp RT để tạo cDNA. Sản phẩm cDNA được sử dụng làm khuôn trong các phản ứng RT-PCR khuếch đại đoạn gen có chứa toàn bộ VP1. Sản phẩm khuếch đại của PCR sử dụng giải trình tự và phân tích di truyền.
- Bộ môi sử dụng cho từng týp VRĐR chi tiết tại Bảng 2.2
- Cách tiến hành:

- *Tổng hợp cDNA*: Hỗn hợp phản ứng (Master Mix) gồm:

Thành phần	Thể tích /1 phản ứng (µl)
Nước tinh sạch	0,75
GoScript™ 5x Reaction Buffer	3
dNTP Mix (10mM)	0,75
MgCl <sub>2</sub>	1,125
Random Primer	0,75
Recombinant RNAsin	0,375
GoScript™Reverse	0,75
RNA	7,5
Tổng	10

Chu trình nhiệt:

Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút: giây)
25	5:00
42	60:00
70	15:00
4	∞

- *Khuếch đại toàn bộ vùng gen VP1*:

Hỗn hợp phản ứng (Master Mix) gồm:

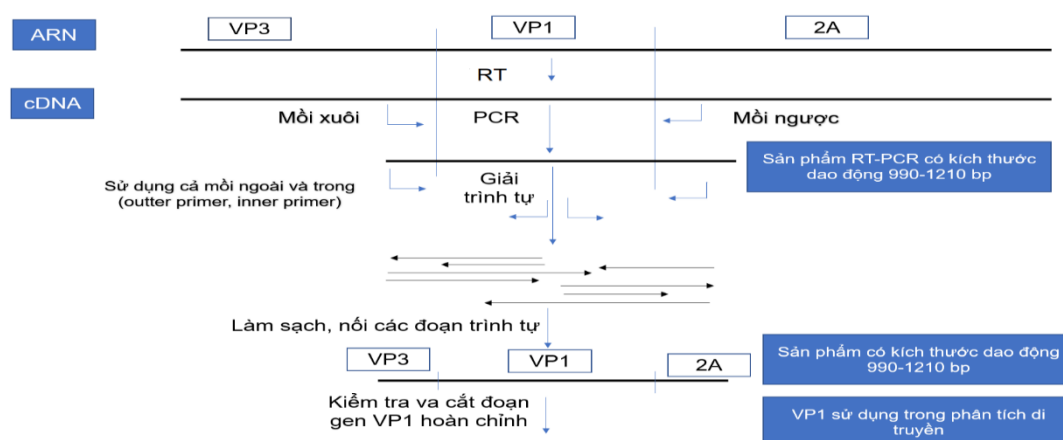
Thành phần	Thể tích/1 phản ứng (µl)
Nước tinh sạch	5,5
Go Taq6	12,5
Môi xuôi (10 µM)	1
Môi ngược (10 µM)	1

Thành phần	Thể tích/1 phản ứng (µl)
cDNA	5
Tổng	25

Chu trình nhiệt:

Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút: giây)	Chu kỳ lặp
95	5:00	1
95	0:45	} 50
45	0:45	
72	1:30	
72	4:00	1
4	∞	

- Điện di sản phẩm PCR: được thực hiện tương tự như sau khi xét nghiệm xác định tác nhân VRĐR chung, EV-A71, CV-A16, CV-A6 và CV-A10 (Trang 47-48)
- Giải trình tự toàn bộ vùng gen VP1: thực hiện tương tự như trong giải trình tự tại kỹ thuật 2.6.5 (trang 50-51). Bộ môi khuếch đại từng tít VRĐR chi tiết tại Bảng 2.2. Kết quả giải trình tự sau đó được phân tích các chuỗi nt, ghép các trình tự xác định bởi các môi khác nhau thành một trình tự hợp nhất bằng phần mềm Chromaspro 3.18
- Kiểm tra lại vị trí vùng gen đã khuếch đại: Được thực hiện trên trang web phân tích tự động <http://www.rivm.nl/mpf/enterovirus/typingtool>

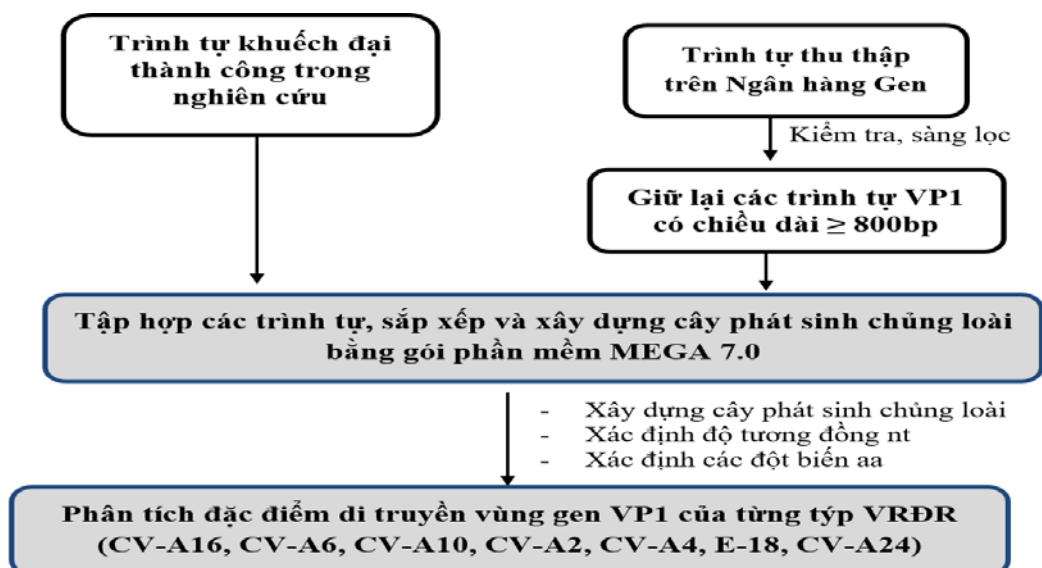


Hình 2.3. Lược đồ phản ứng RT-PCR và giải trình tự khuếch đại gen VP1



### 2.6.8. Phân tích di truyền gen VP1 (sử dụng trong Mục tiêu 2)

- Thu thập toàn bộ trình tự toàn/hoặc gần toàn bộ vùng VP1 của các chủng hiện đang có trên ngân hàng Gen (GeneBank) thông qua chức năng BLAST-NCBI bằng cách sử dụng trình tự gen VP1 của các mẫu nghiên cứu đã khuếch đại và giải trình tự thành công làm “khuôn dò” (query) để thu thập
- Sàng lọc, kiểm tra và giữ lại các trình tự có chiều dài >800 bp
- Tiến hành phân tích di truyền, so sánh bằng cách sử dụng gói phần mềm MEGA 7.0 [93]. Sự sắp xếp chuỗi trình tự được thực hiện bởi ClustalW. Cây di truyền phả hệ được xây dựng bởi phương pháp Maximum Likelihood (ML) trên mô hình tiến hóa phù hợp có giá trị tái lập (bootstrap) là 1000. Khoảng cách di truyền (p-distance) được tính toán để xác định độ khác biệt về nt, aa của mẫu.
- Vị trí các cấu trúc vòng chức năng được xác định bằng hai cách: (1) dựa trên các tài liệu đã công bố, (2) Mô hình hóa độ tương đồng (homology modeling) bằng cách sử dụng các mô hình cấu trúc phù hợp làm khuôn nhằm phỏng đoán vị trí cấu trúc dạng vòng (function loop) xuất hiện trên bề mặt VP1 và các vị trí trình diện kháng nguyên đối với một số vị trí chưa biết. Mô hình cấu trúc tương đồng được thực hiện tự động trên trang SWISS-MODEL (<http://www.swissmodel.expasy.org>). Việc mô phỏng và thể hiện cấu trúc protein được thực hiện trên NOC 3.01 (<http://www.noch.sourceforge.net>).
- Chiết xuất từ MEGA ra excel trình tự aa để xác định vị trí đột biến



Hình 2.4. Lược đồ phân tích di truyền gen VP1

## 2.7. Quản lý và phân tích số liệu

### 2.7.1. Quản lý số liệu

Thông tin cơ bản của mẫu thu thập cũng như hồ sơ xét nghiệm được nhập vào file excel, lưu tại máy tính của PTN VRĐR - Viện VSDTTU

Thông tin gồm mã xác định của mẫu bệnh phẩm, tên bệnh nhân, tuổi (tháng), giới tính, địa chỉ, điện thoại liên lạc, tên bệnh viện, đặc điểm lâm sàng, phương pháp điều trị, ngày khởi phát, ngày nhập viện, ngày lấy mẫu, loại bệnh phẩm.

Kết quả xét nghiệm của các mẫu sau khi thực hiện được nhập bổ sung, liên kết với dữ liệu dịch tễ học và lâm sàng cho từng mẫu bệnh phẩm.

### 2.7.2. Phân tích số liệu

- **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:** Đặc điểm di truyền gen VP1 được dựa trên các phần mềm và trang web gồm:

- <http://www.rivm.nl/mpf/enterovirus/typingtool>
- Chromaspro 3.18
- MEGA 7.0
- <http://www.swissmodel.expasy.org>
- NOC 3.01

- **Đảm bảo tính chính xác của thông tin mẫu và chất lượng xét nghiệm**

Quá trình nhập dữ liệu từ phiếu thu thập thông tin sang excel được kiểm tra chéo hai lần đảm bảo tránh sai sót. File dữ liệu được quản lý trên máy có mã khóa bảo mật

Thực hiện thí nghiệm bằng các quy trình chuẩn, tuân thủ thường quy tại PTN. Hệ thống thiết bị được hiệu chuẩn, đánh giá định kỳ. Hóa chất, sinh phẩm, vật tư tiêu hao sử dụng còn hạn sử dụng.

## **2.8. 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 III: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 3.1. Đặc điểm lưu hành của các VRĐR ở trẻ em mắc TCM tại miền Bắc Việt Nam, giai đoạn 2008-2018

#### 3.1.1. Kết quả định týp vi rút đường ruột năm 2018

Xét nghiệm 480 mẫu bệnh phẩm lâm sàng thu thập năm 2018 cho kết quả 377 mẫu dương tính với các týp VRĐR. Trong đó, số mẫu dương tính với EV-A71 là 205 mẫu (54,38%), CV-A6 là 97 mẫu (25,73%), CV-A16 là 1,33%, CV-A10 là 21 (5,57%). Có 23/377 mẫu không xác định được týp VRĐR. Số mẫu được định týp với các tác nhân VRĐR phụ là 26 mẫu (6,7%). Chi tiết tại Bảng 3.1

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

2603 mẫu dương tính với VRĐR trong giai đoạn 2008-2018. 2404 mẫu (92,35%) được định týp VRĐR (serotype) thành công 197 mẫu (7,65%) không xác định được týp. Tổng số 45 týp VRĐR đã được định danh, thuộc ba nhóm A, B và C với tỷ lệ tương ứng là 87,67% (2282/2603 mẫu), 3,46% (90/2603 mẫu) và 1,23% (32/2603 mẫu). Týp EV-A71 (nhóm A) có lượng mẫu nhiều nhất 912/2603 mẫu (35,04%). Các týp VRĐR còn lại được thu thập là 1691/2603 mẫu (64,96%). CV-A6 và CV-A16 đứng vị trí thứ 2 và 3 với lượng mẫu lần lượt là 729 mẫu (28,01%) và 503 mẫu (19,32%). CV-A10 ở vị trí thứ 4 với 68/2603 mẫu (2,61%). Các tác nhân phụ khác được phát hiện muộn hơn (từ năm 2010) với tỷ lệ dưới 1%. Tần suất xuất hiện của chúng thường không rải rác qua nhiều năm mà tập trung chủ yếu vào một giai đoạn nhất định như CV-A2 vào năm 2017, E-18 vào năm 2016-2017, CV-A24 năm 2013-2014. VRĐR nhóm B và C thấy có sự nổi bật về số lượng của tác nhân E-18 (0,35%) và CV-A24 (0,54%) (Bảng 3.1).

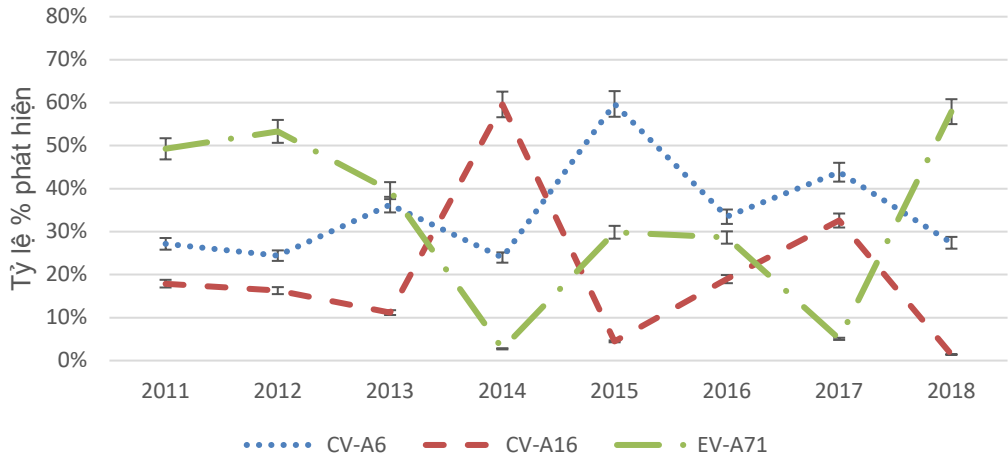
Trong khuôn khổ của đề tài, nghiên cứu sinh tập trung phân tích sự lưu hành và phân tích đặc điểm di truyền của các VRĐR gây bệnh không phải là EV-A71, gồm hai tác nhân chính là CV-A6, CV-A16 và đại diện các tác nhân phụ nổi trội khác của nhóm A là CV-A10, CV-A2 và CV-A4, nhóm B là E-18 và nhóm C là CV-A24.

**Bảng 3.1. Các tác nhân VRĐR được xác định trong giai đoạn 2008-2018**

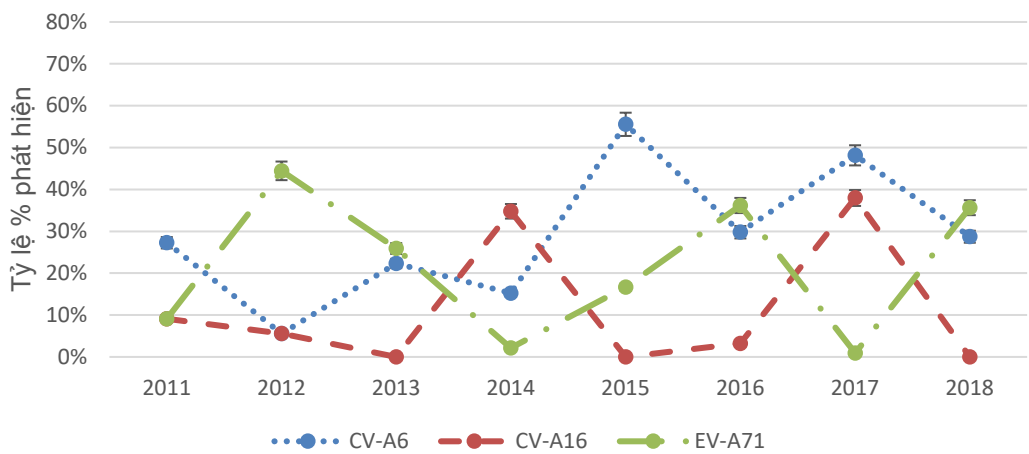
Nhóm/týp VRĐR	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	Tổng (n, %)		
	n = 32	n = 4	n = 8	n = 551	n = 492	n = 229	n = 316	n = 151	n = 258	n = 185	n = 377	n	%	
VRĐR nhóm A	EV-A71	6	1	4	234	249	85	8	40	71	9	205	912	35,04
	<b>CV-A6</b>				<b>129</b>	<b>114</b>	<b>78</b>	<b>70</b>	<b>80</b>	<b>83</b>	<b>78</b>	<b>97</b>	<b>729</b>	<b>28,01</b>
	<b>CV-A16</b>	<b>22</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>85</b>	<b>76</b>	<b>24</b>	<b>174</b>	<b>6</b>	<b>47</b>	<b>58</b>	<b>5</b>	<b>503</b>	<b>19,32</b>
	<b>CV-A10</b>	<b>1</b>			<b>3</b>		<b>5</b>	<b>10</b>	<b>1</b>	<b>26</b>	<b>1</b>	<b>21</b>	<b>68</b>	<b>2,61</b>
	<b>CV-A2</b>							<b>3</b>		<b>1</b>	<b>7</b>		<b>11</b>	<b>0,42</b>
	<b>CV-A4</b>					<b>2</b>		<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>11</b>	<b>2</b>	<b>22</b>	<b>0,84</b>
	Týp Coxsackie A khác (CV-A3, 5, 8, 12 14)				8	5	9		3	7	1	4	37	1,42
VRĐR nhóm B	<b>E-18</b>								<b>3</b>	<b>6</b>		<b>9</b>	<b>0,35</b>	
	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	<b>CV-A24</b>					<b>8</b>	<b>5</b>				<b>1</b>	<b>14</b>	<b>0,54</b>	
	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			

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

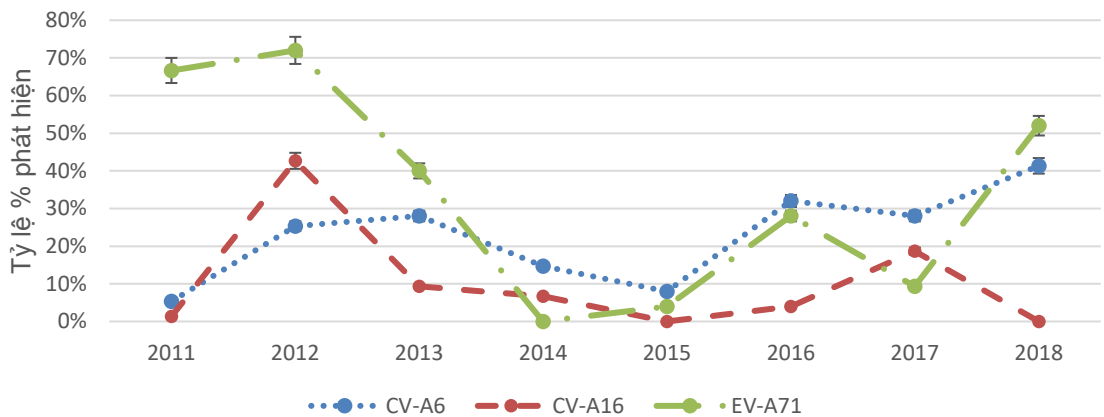
**A. Đặc điểm phân bố theo thời gian**



**A.**



**B.**



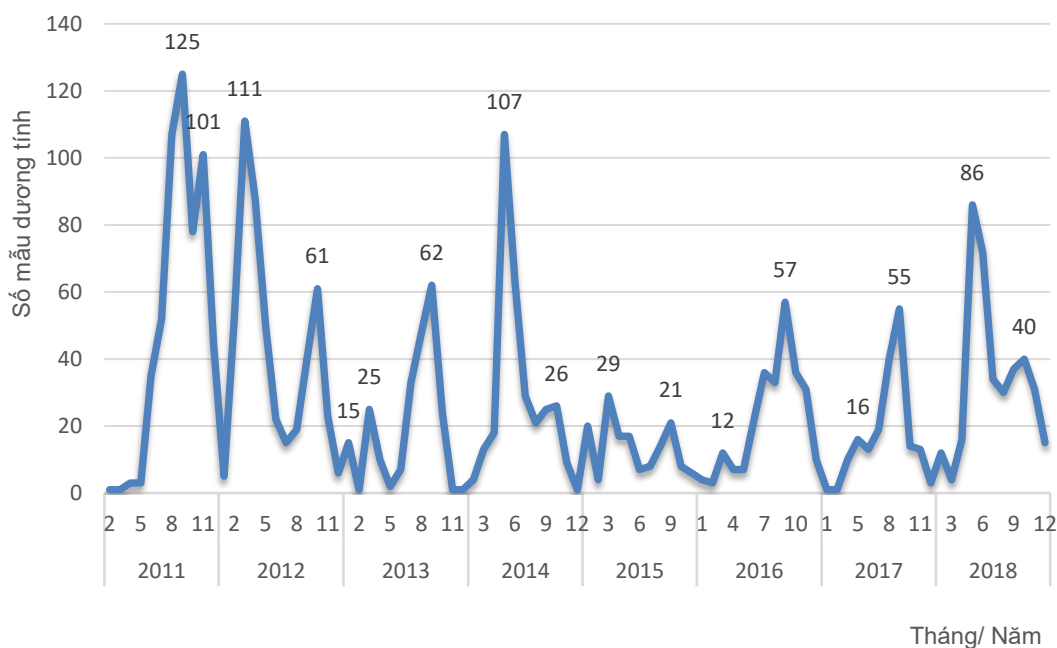
**C.**

**Biểu đồ 3.1. Tính chu kỳ của CV-A6, CV-A16 giai đoạn 2011-2018 thông qua tỷ lệ % phát hiện trên toàn Miền Bắc (A), Thái Bình (B) và Hải Phòng (C)**

CV-A16 được phát hiện hàng năm ở miền Bắc nhưng 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%). Biểu đồ 3.1 đã thể hiện sự lưu hành của CV-A16 theo thời gian ở miền Bắc nói chung cũng như tại hai tỉnh triển khai giám sát trọng điểm là Hải Phòng và Thái Bình có tính chu kỳ rõ ràng với các đỉnh hẹp, xuất hiện trong khoảng 1-2 năm (năm 2014, 2016-2017). Tác nhân EV-A71 cũng có đặc điểm tương tự về sự dao động lớn của các mẫu. EV-A71 có tỷ lệ phát hiện thấp nhất vào năm 2014 với 8/316 mẫu (2,53%) và 2017 là 9/175 mẫu (5,14%), cao nhất vào năm 2012 với 249/492 mẫu (50,61%) và năm 2018 là 205/377 mẫu (54,38%). Tuy nhiên, chu kỳ lưu hành của EV-A71 có xu hướng đỉnh rộng hơn khoảng 2-3 năm. Có sự liên quan mang tính chất “đảo nghịch” giữa việc 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 và sự chạm đáy của EV-A71 và 2018 có đặc điểm ngược lại.

CV-A6 được phát hiện lần đầu năm 2011. Kết quả tại bảng 3.1 cho thấy CV-A6 là tốp vi rút có số lượng mẫu lớn thứ hai trong nghiên cứu. 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 kỳ lưu hành của CV-A6 cho thấy dạng sóng yếu hoặc tính chu kỳ không rõ ràng (Biểu đồ 3.1).

So về số lượng mẫu, CV-A10 là tác nhân đứng ở vị trí số 4 với 68/2603 mẫu (2,82%). Về số lượng mẫu và tỷ lệ % thì tác nhân này thấp hơn nhiều khi so với EV-A71, CV-A6 hay CV-A16. Tuy nhiên, khi so với các tác phụ khác, số lượng của CV-A10 nhiều hơn hẳn. Năm 2016 và 2018, lượng mẫu CV-A10 được phát hiện cao nhất (48/68 mẫu, 70,59%). Thậm chí, năm 2016, tác nhân này còn chiếm hơn 10% tổng số mẫu TCM dương tính với VRĐR (26/258 mẫu, 10,08%) (Bảng 3.1).



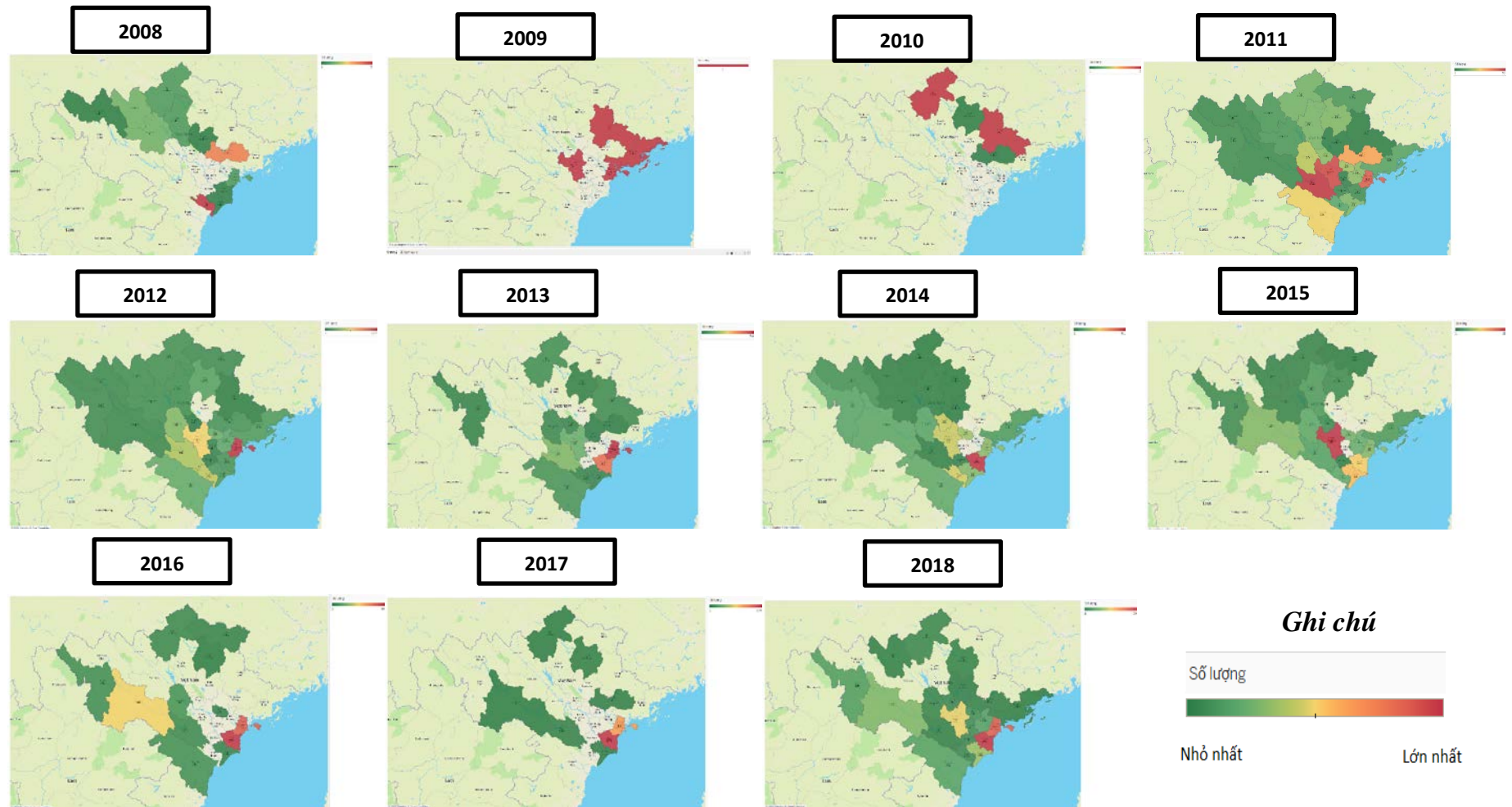
**Biểu đồ 3.2. Số mẫu dương tính với VRĐR theo tháng trong năm**

Số mẫu dương tính với VRĐR theo các tháng trong năm thể hiện trong biểu đồ 3.2 Năm 2011, số mẫu dương tính nhiều nhất vào quý III và IV (tiết thu - đông). Cụ thể: tháng 9 có 125/551 mẫu (22,68%) và tháng 11 có 101/551 mẫu (18,33%). Các năm còn lại có hai đỉnh vào xuân-hè và thu-đông. Năm 2012, 2014, lượng mẫu dương tính cao nhất xuất hiện vào tháng 3 (xuân-hè) và tháng 5 (hè). Các năm 2013, 2016 và 2019 đỉnh cao nhất rơi vào tháng 9 là giao mùa hè-thu.

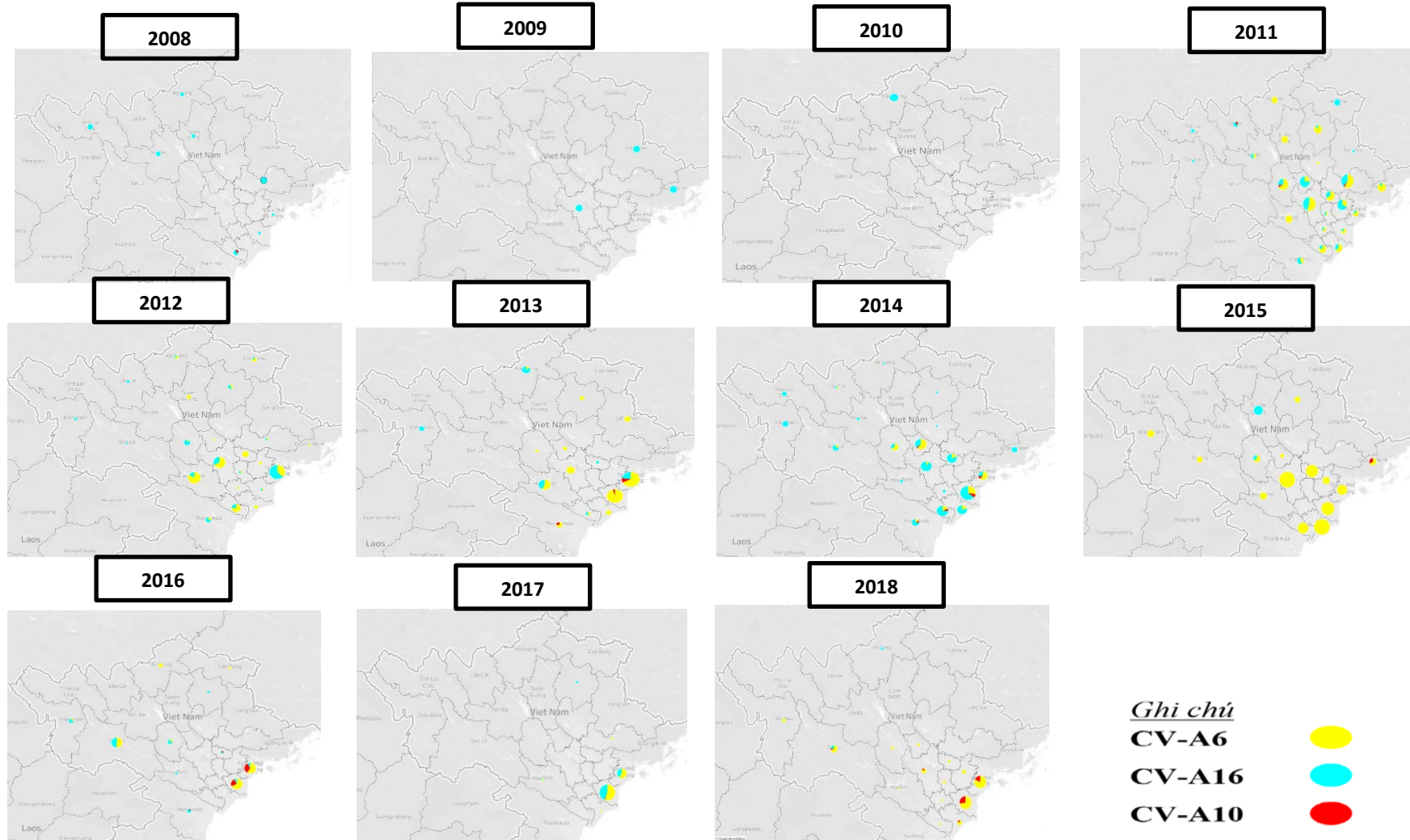
### ***B. Đặc điểm phân bố theo địa lý***

VRĐR gây bệnh được ghi nhận tại 26 tỉnh/thành phố phía Bắc. Trước năm 2011, sự phân bố của VRĐR chỉ hạn chế tại 10 tỉnh (2008), 4 tỉnh (2009, 2010). Năm 2011-2012 là hai năm dịch TCM xuất hiện tại tất cả 26 tỉnh/thành trong nghiên cứu. Hai tỉnh có triển khai giám sát trọng điểm luôn có số lượng mẫu cao nhất so với các địa phương khác với 510/2603 mẫu (19,6%) tại Hải Phòng và 454/2603 mẫu (17,45%) tại Thái Bình. Tỉnh Thái Nguyên có số mẫu thấp nhất, có 4 mẫu xuất hiện rải rác vào các năm 2008, 2011, 2014 và 2018 với 1 mẫu/năm (0,15%) (Biểu đồ 3.3, Phụ lục 2).





**Biểu đồ 3.3. Phân bố mẫu dương tính với VRĐR gây bệnh TCM theo tỉnh/thành phố tại miền Bắc Việt Nam, giai đoạn 2008-2018**



**Biểu đồ 3.4. Phân bố CV-A6, CV-A16 và CV-A10 tại các tỉnh miền Bắc Việt Nam, giai đoạn 2008-2018**

Sự lưu hành rộng ở nhiều tỉnh/thành của hai tác nhân CV-6, CV-A16 được thể hiện tại biểu đồ 3.4. CV-A6 đã được phát hiện tại 25 tỉnh trong suốt giai đoạn nghiên cứu. Trong đó, năm 2011 CV-A6 lưu hành tại nhiều địa phương nhất (20 tỉnh) và năm 2017 là thấp nhất (5 tỉnh). Đối với CV-A16 đã phát hiện được tại 26/26 tỉnh trong 10 năm. Năm 2011 và 2014 là nhiều nhất (21 tỉnh vào năm 2011 và 20 tỉnh vào năm 2014) và năm 2010 và 2018 là thấp nhất (1 tỉnh vào năm 2010, 2 tỉnh vào năm 2018). CV-A10 lưu hành tại 13 tỉnh/thành trong 10 năm qua. Số lượng nhiều nhất là tại Thái Bình (27/68 mẫu, 39,71%) và Hải Phòng (26/68 mẫu, 38,24%) (Bảng 3.1, Biểu đồ 3.4, Phụ lục 2).

Sự lưu hành của các tác nhân phụ diễn khác nhau tùy thuộc vào từng tít vi rút. CV-A4 xuất hiện tại 8 tỉnh/thành trong 6 năm thì CV-A2 chỉ tập trung tại hai tỉnh. Tác nhân phụ luôn được phát hiện tại Hải Phòng và Thái Bình. CV-A24 được phát hiện tại Hải Phòng 2 năm (2013, 2014) và Thái Bình 3 năm (2013, 2014, 2016).

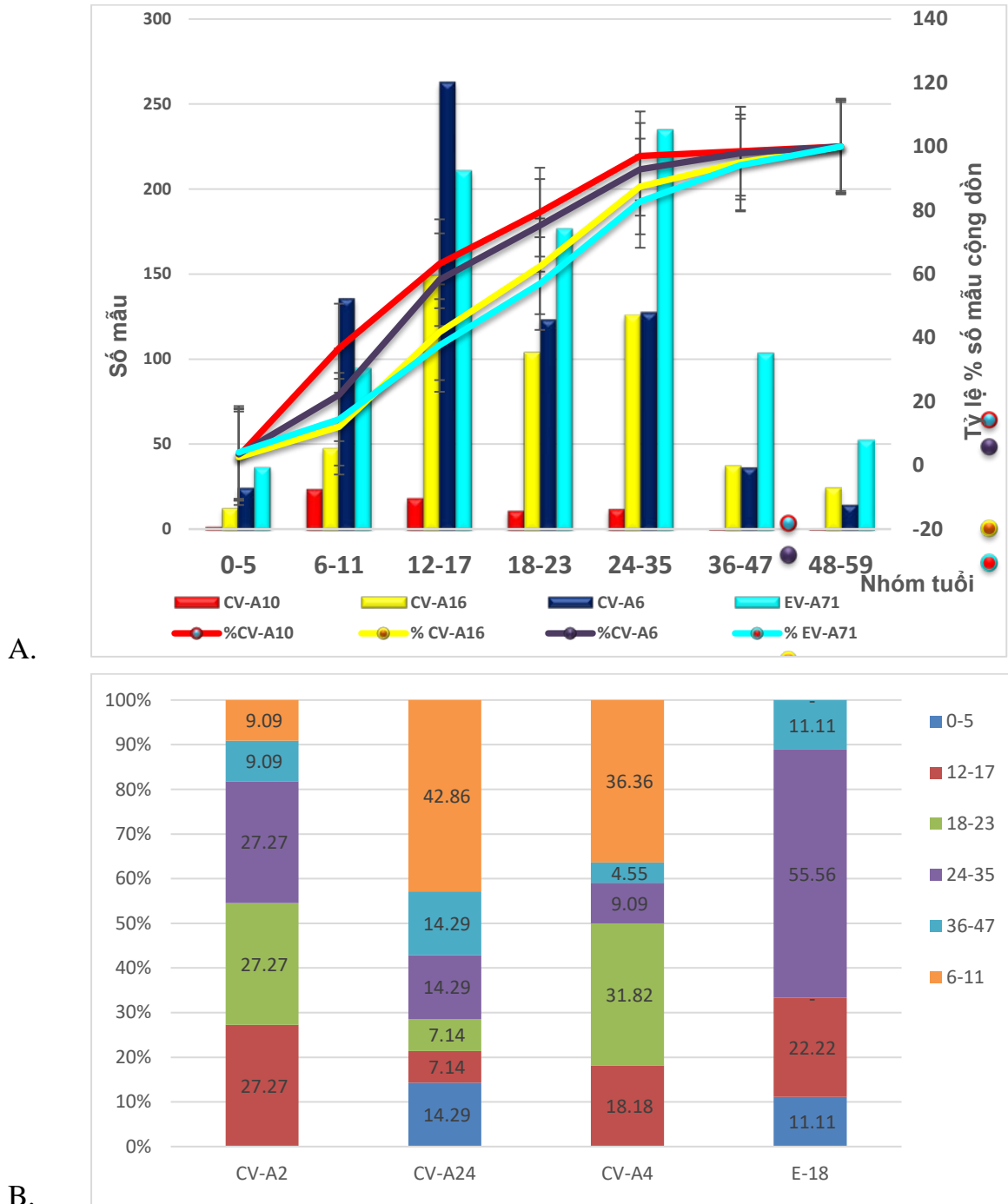
### ***C. Đặc điểm phân bố theo nhóm tuổi***

**Bảng 3.2. Số lượng các mẫu VRĐR gây bệnh TCM theo nhóm tuổi và năm**

Năm	Nhóm tuổi (theo tháng)							Tổng số	
	0-5	6-11	12-17	18-23	24-35	36-47	48-60		
2008	n	1	-	4	6	14	5	2	32
	%	3,13	-	12,5	18,75	43,75	15,63	6,25	100
2009	n	-	1	1	0	1	1		4
	%	-	25	25	-	25	25	-	100
2010	n	-	1	1	1	3	0	2	8
	%	-	12,5	12,5	12,5	37,5	-	25	100
2011	n	24	68	145	110	138	44	22	551
	%	4,36	12,34	26,32	19,96	25,05	7,99	3,99	100
2012	n	26	57	106	88	119	59	37	492
	%	5,28	11,59	21,54	17,89	24,19	11,99	7,52	100
2013	n	13	49	58	42	44	16	7	229
	%	5,68	21,4	25,33	18,34	19,21	6,99	3,06	100
2014	n	15	51	98	66	59	22	5	316
	%	4,75	16,14	31,01	20,89	18,67	6,96	2,71	100
2015	n	4	19	48	30	32	12	6	151
	%	2,65	12,58	31,79	19,87	21,19	7,95	3,97	100
2016	n	9	30	95	41	59	17	7	258
	%	3,49	11,63	36,82	15,89	22,87	6,59	2,71	100
2017	n	3	27	68	36	36	11	4	185
	%	1,62	14,59	36,76	19,46	19,46	5,95	2,16	100
2018	n	7	62	113	77	81	27	10	377
	%	1,86	16,45	29,97	20,42	21,49	7,16	2,65	100
<b>Tổng số</b>	<b>n</b>	<b>102</b>	<b>365</b>	<b>737</b>	<b>497</b>	<b>586</b>	<b>214</b>	<b>102</b>	<b>2603</b>
	<b>%</b>	<b>3,92</b>	<b>14,02</b>	<b>28,31</b>	<b>19,09</b>	<b>22,51</b>	<b>8,22</b>	<b>3,92</b>	<b>100</b>

Phân tích đặc điểm phân bố theo nhóm tuổi cho thấy số mẫu dương tính với VRĐR tập trung chủ yếu ở các nhóm tuổi từ 6 tháng đến dưới 3 tuổi với tỷ lệ cộng dồn lên đến 83,93%, trong số đó tỷ lệ ở độ tuổi từ 12-17 tháng là cao nhất (737/2603

mẫu, 28,31%). Tỷ lệ dương tính trong nhóm 0-5 tháng và 48-60 tháng thấp nhất, đều là 3,92% (102/2603 mẫu) (Bảng 3.2).



**Biểu đồ 3.5. Sự phân bố các tác nhân theo nhóm tuổi**

**Ghi chú:**

- A. Sự phân bố của EV-A71, CV-A6, CV-A16 và CV-A10 theo nhóm tuổi
- B. Sự phân bố của các tác nhân phụ theo nhóm tuổi

Biểu đồ 3.5 minh họa sự phân bố của các tác nhân theo độ tuổi (tháng tuổi). Đối với các tác nhân chính, nhóm tuổi mắc bệnh chủ yếu là trẻ dưới 3 tuổi (tỷ lệ mắc do EV-A71, CV-A6, CV-A16 và CV-A10 lần lượt 82,78%, 91,5%, 87,48% và 97,06%). Tỷ lệ % tích lũy (cộng dồn) số mẫu CV-A6 và CV-A10 từ nhóm 6-11 tháng đến 24-35 tháng cao hơn so CV-A16 và EV-A71 (>10,63%). Tỷ lệ % mắc bệnh của CV-A10 cao nhất ở nhóm 6-11 tháng, của CV-A6 là từ 12-17 tháng còn của CV-A16 là gần tương đương nhau qua các nhóm 12-17 tháng, 18-23 tháng và 24-35 tháng. Tỷ lệ % mắc bệnh thấp nhất của CV-A6 là 48-59 tháng, CV-A16 ở nhóm từ 0-5 tháng. Đối với CV-A10, hai nhóm đều có tỷ lệ thấp nhất là nhóm tuổi 36-47 tháng và 48-59 tháng (1,47%).

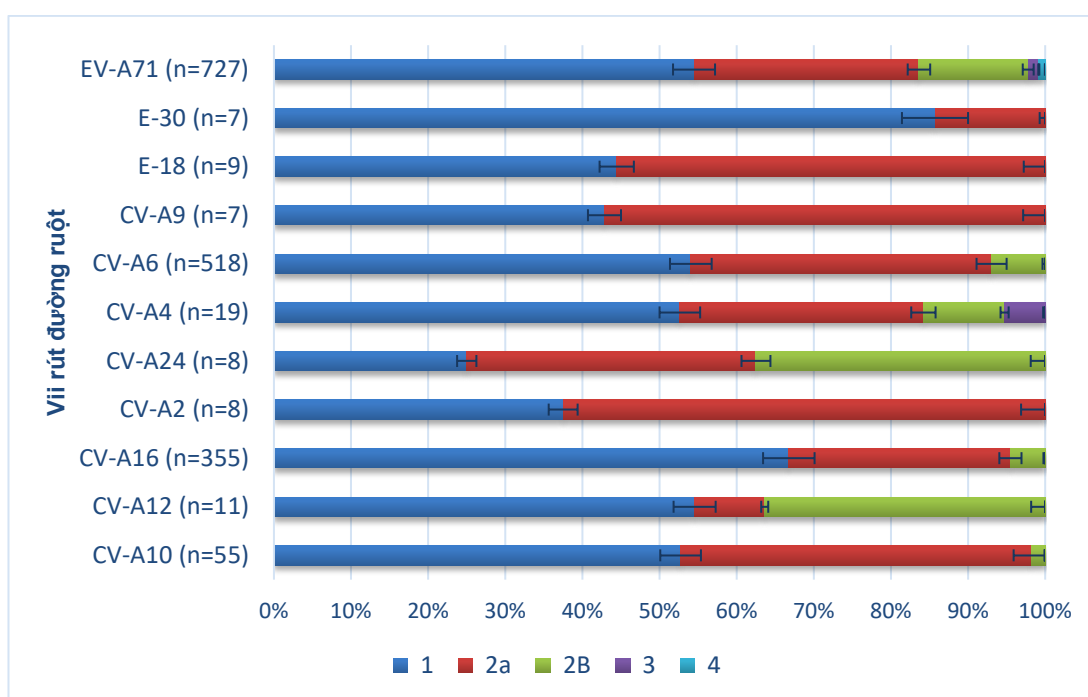
Biểu đồ 3.5.B cho thấy đối với các tác nhân phụ khác, không có mẫu nào thuộc nhóm 48-59 tháng tuổi. Số lượng mắc bệnh không đồng đều tại các nhóm tuổi khác nhau. Ví dụ số mẫu CV-A4 cao nhất tại nhóm tuổi 6-11, 12-17 và 18-23 tháng. Mặc dù có số mẫu hạn chế, CV-A4 và CV-A2 cũng cho thấy rằng có tới 95% (21/22 mẫu) và 90,91% (10/11 mẫu) trẻ em bị nhiễm CV-A4 và CV-A2, ở độ tuổi dưới 3.

***D. Đặc điểm phân bố theo độ lâm sàng***

**Bảng 3.3. Số lượng mẫu dương tính theo độ lâm sàng**

Năm	Phân độ lâm sàng					Tổng	
	Độ 1	Độ 2a	Độ 2b	Độ 3	Độ 4		
<b>2008</b>	n	10	-	-	-	-	10
	%	100					100
<b>2009</b>	n	1	-	-	-	-	1
	%	100					100
<b>2010</b>	n	4	-	-	-	-	4
	%	100					100
<b>2011</b>	n	361	27	16	5	-	409
	%	88,26	6,6	3,91	1,22	-	100
<b>2012</b>	n	303	56	28	2	2	391
	%	77,49	14,32	7,16	0,51	0,51	100
<b>2013</b>	n	26	28	23	2	1	80
	%	32,5	35	28,75	2,5	1,25	100
<b>2014</b>	n	113	55	-	2	-	170
	%	66,47	32,35	-	1,18	-	100
<b>2015</b>	n	60	64	10	-	-	134
	%	44,78	47,76	7,67	-	-	100
<b>2016</b>	n	105	105	41	-	1	252
	%	41,67	41,67	16,27		0,4	100
<b>2017</b>	n	52	105	3	-	-	160
	%	32,5	65,63	1,88	-	-	100
<b>2018</b>	n	88	188	61	3	2	342
	%	25,73	54,97	17,84	0,88	0,58	100
<b>Tổng cộng</b>	n	<b>1123</b>	<b>628</b>	<b>182</b>	<b>14</b>	<b>6</b>	<b>1953</b>
	%	<b>57,50</b>	<b>32,15</b>	<b>9,32</b>	<b>0,72</b>	<b>0,31</b>	<b>100</b>

Số mẫu có thông tin về độ lâm sàng là 1953/2603 mẫu (75,03%). Bảng 3.3 cho thấy có 1751 mẫu (89,65%) có độ lâm sàng nhẹ (độ lâm sàng 1 là 1123 mẫu và 628 mẫu là độ lâm sàng 2a), 182 mẫu (9,32%) ở mức độ 2b, 14 mẫu (0,72%) ở độ lâm sàng 3 và 6 mẫu (0,31%) ở độ lâm sàng 4. Độ lâm sàng 1 và 2a chiếm chủ yếu ở tất cả các năm. Năm 2018, số mẫu có độ lâm sàng nặng (từ 2b trở lên) cao nhất (66 mẫu), tiếp đến là 2016 (42 mẫu) và 2013 (26 mẫu).



**Biểu đồ 3.6. Tỷ lệ % theo độ lâm sàng của các tác nhân vi rút đường ruột**

Trong số 1226 mẫu do tác nhân VRĐR “ngoài EV-A71” có 1143 mẫu ở độ lâm sàng 1 và 2a (93,2%). Như vậy, độ lâm sàng 1 và 2a vẫn chiếm chủ yếu ở các tác nhân này. Tại biểu đồ 3.6 cho thấy, 16,37% (119/727 mẫu) EV-A71 có độ lâm sàng từ 2b trở lên. Các tác nhân còn lại gây ra 82 trường hợp có độ lâm sàng nặng (2b và 3). 1 trường hợp độ lâm sàng 3 do CV-A4 gây ra. E-18, CV-A2 chỉ gây ra các trường hợp ở độ lâm sàng nhẹ 1, 2a. Trong số các trường hợp mắc CV-A24 có tới 37,5% có độ lâm sàng nặng (2b).



**Bảng 3.4. Số lượng mẫu TCM có đặc điểm lâm sàng liên quan đến viêm não/viêm màng não và hô hấp**

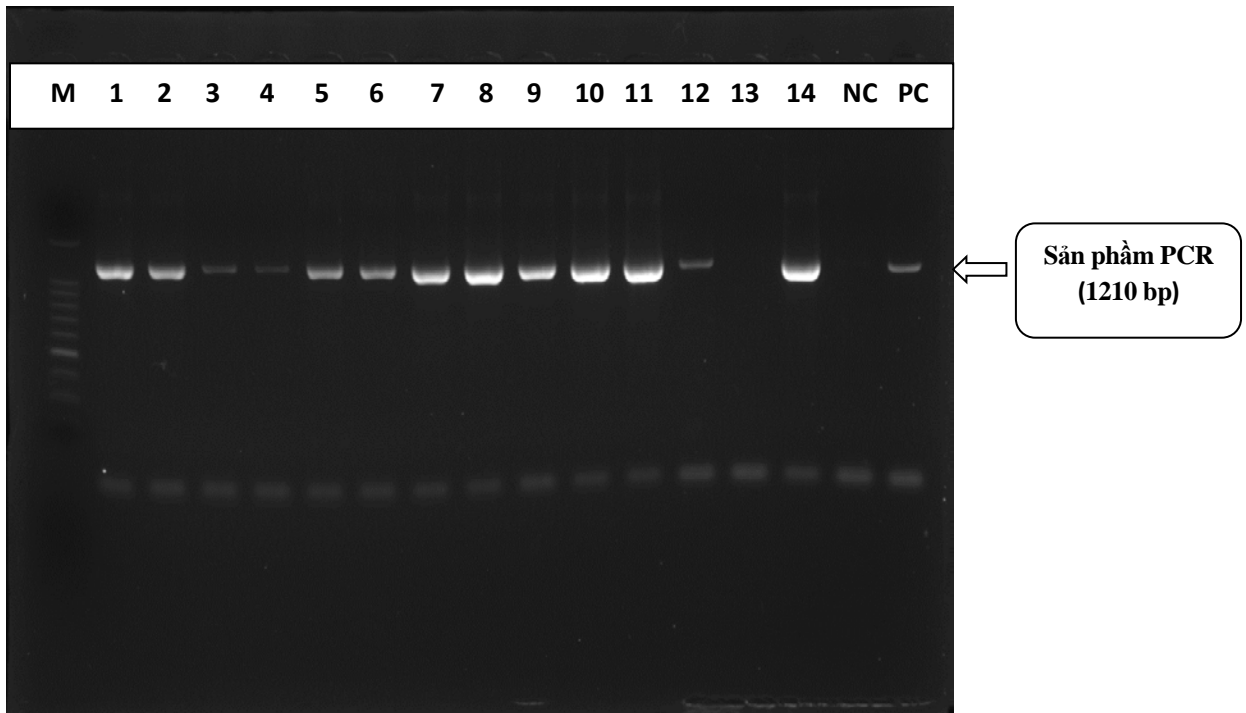
Tác nhân VRĐR	Viêm não/ viêm màng não			Hô hấp			Tổng số		
	Độ lâm sàng	2b	3	4	2b	3	4	n	%
	EV-A71	35	7	2	1		2	47	75,81
Tác nhân VRĐR ngoài "EV-A71"	CV-A16	2						11	17,74
	CV-A6	5							
	E-6	1							
	CV-A4		1						
	PV-2		1						
	CV-A18						1		
	VRĐR không xác định	3	1						4
<b>Tổng cộng</b>		<b>46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

Bảng 3.4 chi tiết 62 trường hợp nặng (độ lâm sàng 2b trở lên) trong nghiên cứu có liên quan đến biểu hiện thần kinh (viêm màng não/viêm não) và vấn đề hô hấp. Trong đó, 11 trường hợp (17,74%) do tốp vi rút CV-A16, CV-A6, CV-A4, E-6, PV-2 và CV-A18 gây ra.

### **3.2. 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**

#### **3.2.1. Kết quả khuếch đại gen**

Sản phẩm PCR khuếch đại với các cặp gen đặc hiệu trên vùng VP3 và 2A và được điện di trên gel agarose và kiểm tra độ dài phù hợp với yêu cầu.



**Hình 3.1. Sản phẩm điện di của CV-A10**

**Ghi chú:**

*PC : Chứng dương*

*M: Thang điện di có trọng lượng phân tử 100bp*

*NC : Chứng âm*

*Từ 1-14: Mẫu trong nghiên cứu*

Hình 3.1 minh họa ảnh điện di sản phẩm RT-PCR của CV-A10 với độ dài sản phẩm PCR là 1210 bp phù hợp kích thước mong muốn khuếch đại. Các mẫu khuếch đại thành công được kiểm tra lại vị trí đoạn khuếch đại bằng web <http://www.rivm.nl/mpf/enterovirus/typingtool>. Kết quả kiểm tra khẳng định lại trên trang web trùng với kết quả định danh trước đây là các týp VRĐR CV-A6, CV-A16, CV-A10, CV-A2, CV-A4, E-18 và CV-A24. Các trình tự thu được đạt yêu cầu cho việc phân tích tiếp theo khi đoạn trình tự khuếch đại là liên tục và có chiều dài trên 800nt.

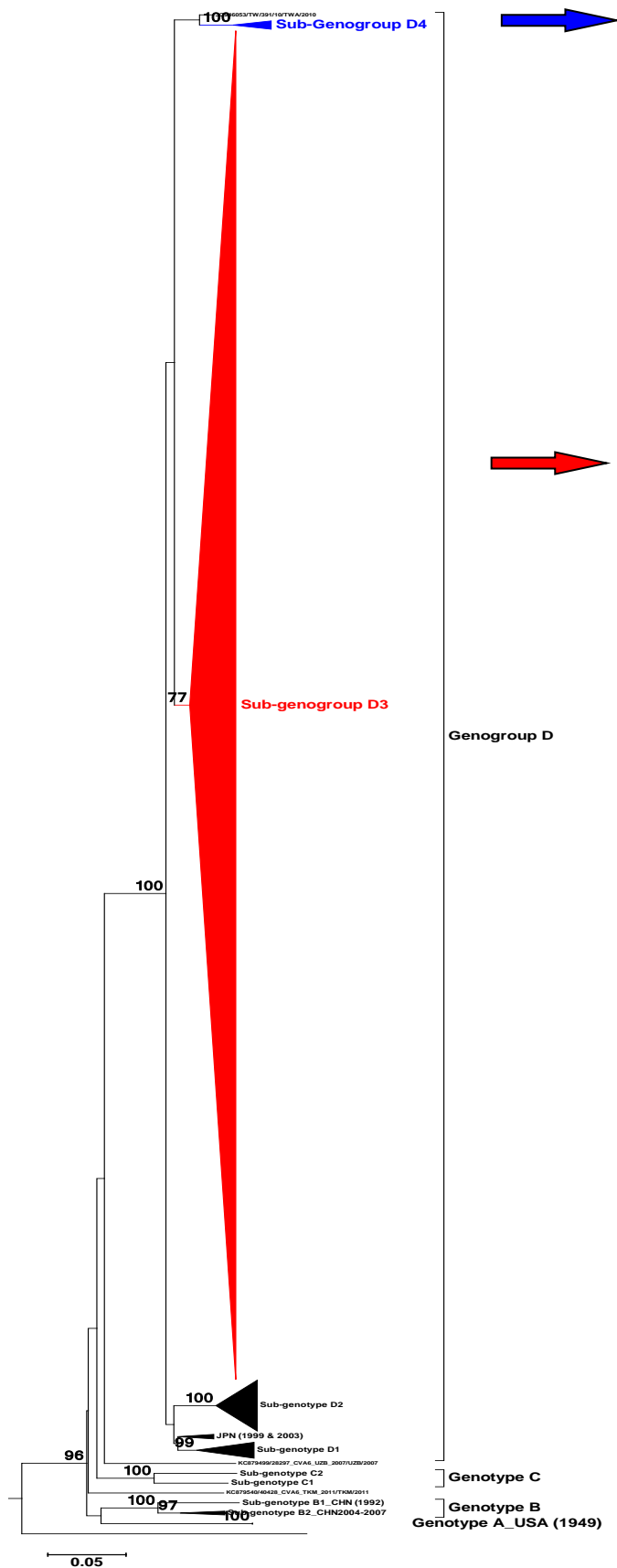
**Bảng 3.5. Kết quả giải trình tự thành công của các týp VRĐR**

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)

Số lượng mẫu giải trình tự thành công của từng týp VRĐR được thể hiện tại Bảng 3.5. Danh sách chi tiết của các mẫu giải trình tự thành công được trình bày từ Phụ lục 7 đến Phụ lục 13).

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

Cây phát sinh chủng loài được xây dựng dựa trên tổng số 1929 trình tự hoàn chỉnh/gần hoàn chỉnh gen VP1 ( $\geq 800$  nt) gồm 203 trình tự thuộc đề tài và toàn bộ các trình tự của CV-A6 thu thập từ ngân hàng Gen (GenBank) (thu thập hết năm 2019). Danh sách các mẫu chi tiết các mẫu trong nghiên cứu tại Phụ lục 7.



### Sự phân bố về địa lý/thời gian của sub-genogroup D4:

- Miền Bắc VN/2011-2012
- Đái Loan / 2007-2010
- Nga/2010

### Sự phân bố về địa lý/thời gian của sub-genogroup D3:

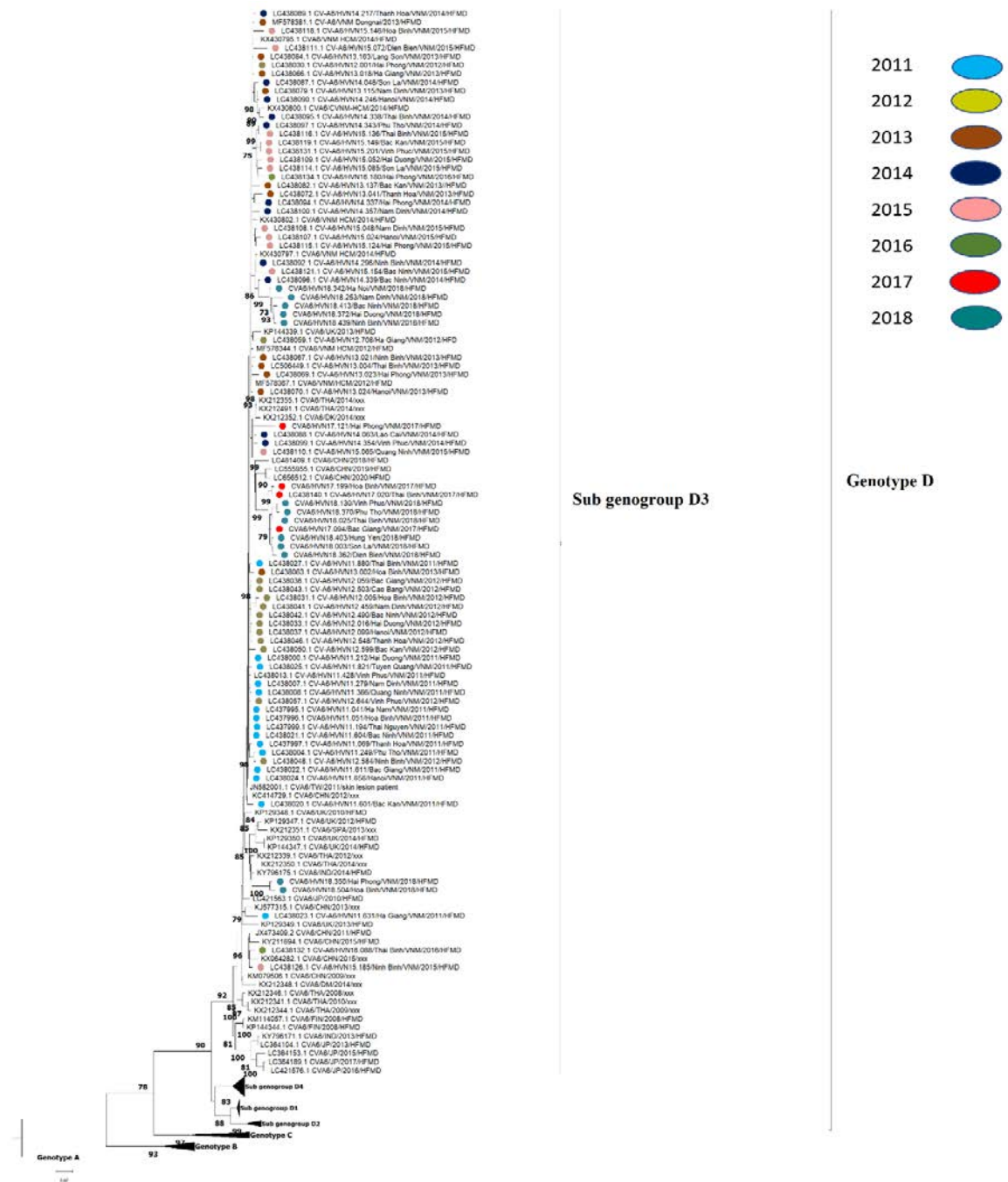
- Miền Bắc VN/2017-2018
- Miền Nam VNM/2011-2015
- Trung Quốc/2005-2018
- Ấn Độ/2009-2014
- Nhật Bản/2011-2013
- Thái Lan/2009-2014
- Đái Loan/2009-2011
- Phần Lan/2008
- Pháp/2010
- Tây Ban Nha/2008-2014
- Đan Mạch/2014

**Hình 3.2. Cây phát sinh chủng loài trình tự gen VP1 của CV-A6**

#### **Ghi chú:**

Cây được xây dựng bằng phương pháp ML, dựa trên toàn bộ các trình tự CV-A6 trong nghiên cứu và trên ngân hàng Gen. Chủng ngoài (outgroup) CV-A10 (AY421767.1) được loại bỏ nhằm tăng độ phân tách của các nhánh trong cây phát sinh. Giá trị bootstrap dưới 70% được ẩn trên cây

Cây phát sinh chủng loài CV-A6 trên hình 3.2 được chia làm 4 genotype (A-D). Genotype A là chủng gốc (prototype) (AY421764.1, AF081297.1). Genotype B gồm mẫu thu thập tại Trung Quốc trong giai đoạn 1992, 2004-2005. Các mẫu thu thập tại Trung Quốc (1996), Ấn Độ (2007) thuộc genotype C. Genotype D là genotype lớn nhất gồm hầu hết CV-A6 phân lập trên bệnh nhân TCM trên thế giới từ 2008-2018. Các trình tự CV-A6 trong nghiên cứu phân bố vào 2 sub genogroup D3 và D4. 4/203 trình tự (1,97%) từ các mẫu CV-A6 thu thập tại Yên Bái (2011), Bắc Kạn (2011), Quảng Ninh (2012) và Hà Nội (2012) thuộc sub genogroup D4. Trong sub genogroup này còn các trình tự được thu thập từ mẫu tại Nga và Đài Loan năm 2007 và 2010. 199/203 trình tự (98,03%) còn lại từ 2011-2018 thuộc sub genogroup D3 – là sub genogroup lớn nhất trong genotype D.



**Hình 3.3. Sự đồng lưu hành của CV-A6 thuộc sub genogroup D3 tại Việt Nam và các nước trên thế giới**

**Ghi chú:**

- Cây được xây dựng bằng phương pháp ML, dựa trên 85 trình tự CV-A6 trong nghiên cứu được lựa chọn theo năm và tỉnh (1 trình tự/1 tỉnh/1 năm) và 61 trình tự CV-A6 trên Genbank được lựa chọn từ các genotype/sub genogroup. Giá trị bootstrap dưới 70% được ẩn trên cây.
- Các chủng của Việt Nam được đánh dấu theo màu khác nhau của năm từ 2011-2018

Để phân tích mối tương quan về đặc điểm lưu hành CV-A6 của đề tài cùng với các mẫu tại các khu vực địa lý khác trong sub genogroup D3, chúng tôi tiến hành xây dựng cây phát sinh chủng loài dựa trên 85 trình tự CV-A6 trong nghiên cứu được lựa chọn theo năm và tỉnh (1 trình tự/1 tỉnh/1 năm) và 61 trình tự CV-A6 trên Genbank được lựa chọn từ các genotype/sub genogroup. Kết quả thể hiện tại hình 3.3. CV-A6 của đề tài cùng với các mẫu được phân lập tại miền Nam Việt Nam và một số các nước khác cùng thời gian tập trung thành cụm (cluster). Cụ thể như nhóm mẫu của năm 2011-2012 và các mẫu thu thập miền Nam Việt Nam (2011-2012), Trung Quốc (2011) và Đài Loan (2009-2010); các mẫu thu được giai đoạn 2013-2015 và CV-A6 tại miền Nam Việt Nam giai đoạn 2012-2015, Đài Loan và Anh năm 2013; mẫu năm 2016-2017 với mẫu phân lập tại Trung Quốc cùng thời điểm (2015-2016), các mẫu năm 2018 có mối liên quan với các mẫu năm 2018-2020 tại Trung Quốc. Độ tương đồng nt giữa các trình tự CV-A6 của nghiên cứu và các trình tự CV-A6 gần nhất trên thế giới thuộc cùng sub genogroup D3 lên tới 99%.

**Bảng 3.6. Sự thay đổi axit amin tại các vị trí vòng chức năng trên VP1 của CV-A6**

Vòng chức năng	Vị trí axit amin	Đột biến axit amin phổ biến (xếp theo thứ tự giảm dần) / Số lượng trình tự mang đột biến							Axit amin của kiểu hình chiểu ưu thế tại các vị trí đột biến (xếp theo thứ tự giảm dần)	
		1	2	3	4	5	6	7	1 (1202/1929)	2 (281/1929)
<b>IgG/IgM epitope</b>	42	A (1923)	T(2)	P (2)	S (1)	? (1)			A	A
	44	Q (1927)	H (2)						Q	Q
	51	S (1924)	T (3)	I (1)	N (1)				S	S
	52	S (1927)	Y (2)						S	S
	54	A (1861)	S (67)	D (1)					A	A
<b>BC</b>	88	V (1925)	A (2)	I (1)	? (1)				V	V
	89	V (1924)	I (3)	M (2)					V	V
	90	E (1921)	K (5)	V (2)	? (1)				E	E
	92	K (1925)	E (3)	N (1)					K	K
	96	T (1915)	A (12)	I (2)					T	T
	97	S (1845)	N (82)	R (1)	? (1)				S	S
	98	L (1895)	P (21)	Q (12)	V (1)				L	L
	99	D (1920)	N (7)	E (2)					D	D
	101	Y (1927)	F (2)						Y	Y
<b>DE</b>	<b>137</b>	<b>N (1527)</b>	<b>S (387)</b>	<b>G (12)</b>	<b>D (2)</b>	<b>R (1)</b>			<b>N</b>	<b>S</b>
	138	D (1906)	N (23)						D	D
	140	T (1925)	S (2)	K (1)	P (1)				T	T
	143	G (1924)	R (5)						G	G
	145	L (1926)	M (3)						L	L
	146	L (1924)	A (2)	V (2)	I (1)				L	L

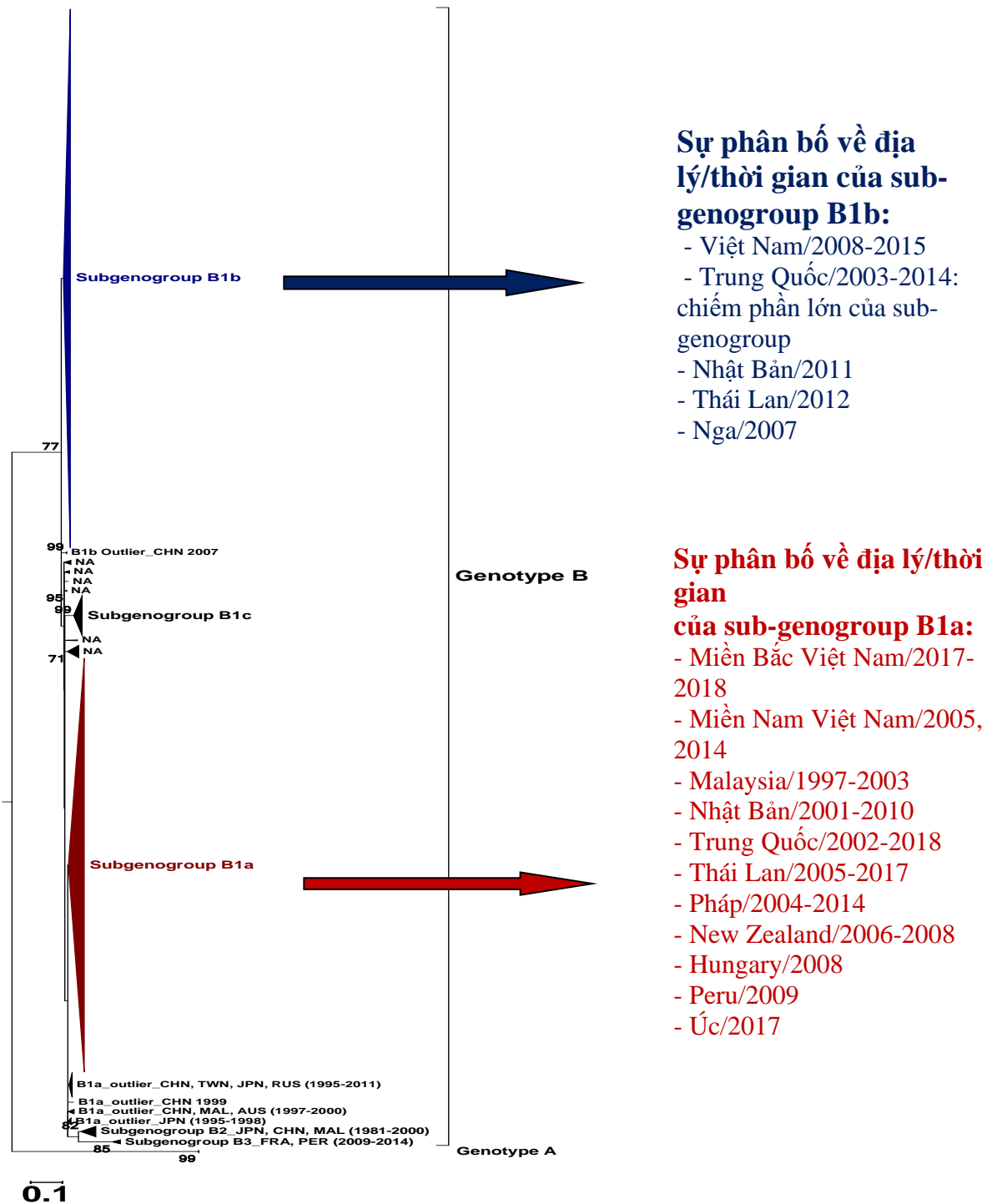


	151	V (1913)	I (12)	A (1)					V	V
<b>EF</b>	158	P (1927)	R (2)						P	P
	160	S (1875)	G (51)	N (3)					S	S
	162	K (1927)	I (2)						K	I
	165	Q (1927)	R (2)						Q	Q
	168	T (1922)	N (2)	I (4)	? (1)				T	T
	172	P (1926)	Q (20)	R (2)	A (1)				P	P
<b>GH</b>	205	T (1925)	S (3)	I (1)					T	T
	208	E (1927)	D (2)						E	E
	210	K (1914)	N (11)	R (2)	E (1)	? (1)			K	K
	212	A (1910)	T (9)	S (3)	V (3)	G (1)			A	A
	213	T(1875)	A (47)	I (2)	S (1)				T	T
	216	Q (1922)	H (3)	P (2)	? (2)				Q	Q
	217	Y (1927)	N (2)						Y	Y
<b>HI</b>	236	S (1915)	A (12)	F (2)					S	S
<b>PEP91</b>	267	M (1924)	I (2)	V (2)	R (1)				M	M
	268	V (1903)	I (19)	L (4)	A (3)				V	V
	270	N (1922)	K (3)	D (1)	S (1)	?/- (2)			N	N
	271	Y (1919)	H (8)	?/- (2)					Y	Y
	273	T (1920)	A (3)	S (3)	P (1)	?/- (2)			T	T
	274	Y (1926)	S (2)	- (1)					Y	Y
	275	S (1898)	N (15)	G (7)	I (1)	C (1)	R (1)	?/- (6)	S	S
	276	Q (1924))	R (2)	P (1)	- (2)				Q	Q
	277	T (1921)	A (3)	I (3)	- (2)				T	T
	278	I (1920)	V (4)	K (1)	M (1)	?/- (3)			I	I

Vị trí cấu trúc kháng nguyên trung hòa và các vòng chức năng (functional loop) trên vùng gen VP1 lần lượt là: vị trí yếu tố quyết định kháng nguyên (epitope) IgG/IgM (aa 39-54), cấu trúc vòng BC (aa 88-101), vòng DE (aa 137-151), vòng EF (aa 158-172), vòng GH (aa 203-217), vòng HI (aa 235-239) và PEP91 (aa 266-278) [25, 151, 159, 190]. Kết quả chi tiết phân tích sự biến đổi aa được trình bày tại bảng 3.6. Có sự biến đổi aa tại 45 vị trí tại các vòng chức năng. Tại mỗi vị trí đó, có một aa chiếm ưu thế, ổn định và xuất hiện với tỷ lệ dao động từ 79,16% (1527/1929 trình tự được phân tích) (vị trí aa N137 thuộc vòng DE) đến 98,32% (1898/1929 trình tự) (P158 thuộc vòng EF). Sự kết hợp và duy trì ổn định của các aa tại các vị trí trong cấu trúc vòng chức năng dẫn đến một/ một số kiểu hình tổ hợp các kiểu trình tự aa của các vòng chức năng (amino acid polymorphism of functional loops) (từ đây gọi tắt là “kiểu hình”) điển hình và nổi trội của CV-6. Kiểu hình vòng chức năng nổi trội nhất có số lượng là 1202/1929 trình tự (62,31%) được đặc trưng bởi aa N137 (N137 featuring polymorphism) với các aa chiếm ưu tại các vị trí còn lại. 158 trình tự (77,8%) CV-A6 của đề tài thuộc kiểu hình nổi trội nhất này. Kiểu hình đứng thứ hai là sự kết hợp của aa S137 với các aa chiếm ưu thế tại 44 vị trí khác có số lượng là 281/1929 trình tự (14,6%). 11 trình tự CV-A6 trong đề tài thuộc kiểu hình này.

### **3.2.3. Đặc điểm di truyền phân tử vùng gen VP1 của týp CV-A16**

Cây phát sinh chủng loài được xây dựng dựa 2334 trình tự VP1 hoàn chỉnh/gần hoàn chỉnh ( $\geq 800$  nt) của CV-A16 gồm 131 trình tự thuộc đề tài và 2203 trình tự được thu thập trên Genbank tính đến hết năm 2019. Danh sách các mẫu chi tiết các mẫu trong nghiên cứu tại Phụ lục 8.

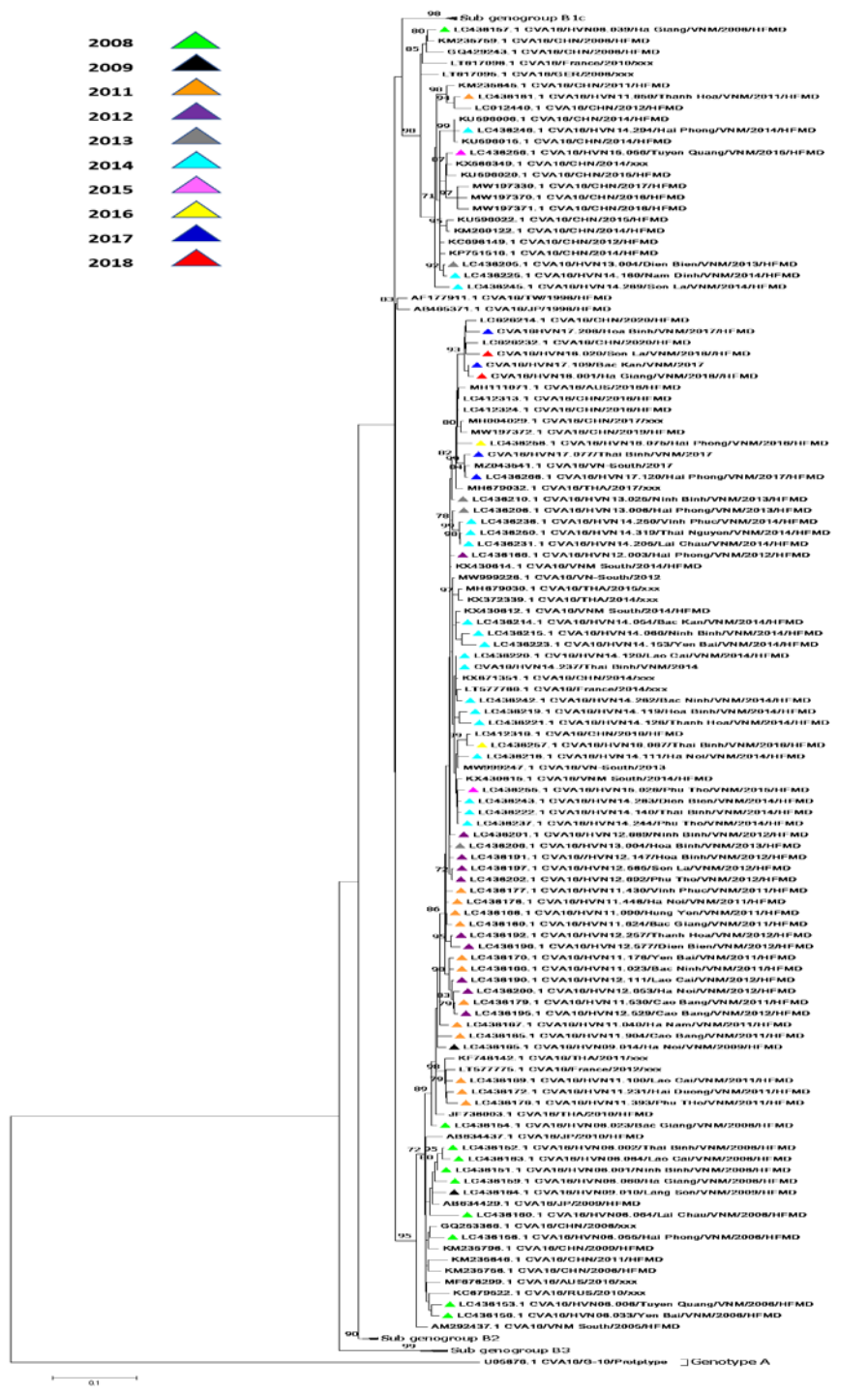


**Hình 3.4. Cây phát sinh chủng loài trình tự gen VP1 của CV-A16**

**Ghi chú:**

- Cây được xây dựng bằng phương pháp ML, dựa trên toàn bộ các trình tự CV-A16 trong nghiên cứu và trên ngân hàng Gen. Chủng ngoài (outgroup) CV-A10 (AY421767.1) được loại bỏ nhằm tăng độ phân tách của các nhánh trong cây phát sinh. Giá trị bootstrap dưới 70% được ẩn trên cây

Cây phát sinh chủng loài của CV-A16 trên hình 3.4 cho thấy ngoại trừ 04 trình tự của chủng gốc (prototype) U05876.1 và 3 chủng thu thập tại Trung Quốc) thuộc genotype A, còn lại đều thuộc genotype B. Genotype này được chia là 3 sub genotype là B1, B2 và B3. B1 là sub genotype lớn nhất và tiếp tục được chia là 3 sub genogroup nhỏ là B1a, B1b, B1c. B1a và B1b là hai sub genogroup chính gồm phần lớn trình tự CV-A16 lưu hành trên thế giới trong hai thập kỷ qua. Phân nhóm B1b là phân nhóm gồm hầu hết các mẫu thu thập tại Trung Quốc và lẻ tẻ tại một số quốc gia khác ở một số năm từ 2008-2015. Phân nhóm B1a gồm CV-A16 lưu hành ở rất nhiều quốc gia khác nhau trong thời gian dài như Việt Nam (2005-2017), Malaysia (1997-2006), Nhật Bản (2001-2010), Trung Quốc (2007-2020), Thái Lan (2000-2017). 8/131 mẫu (6,11%) từ 2008-2015 thuộc sub genogroup B1b, 123/131 mẫu (93,89%) còn lại thuộc sub genogroup B1a lưu hành từ 2008.



**Hình 3.5. Sự đồng lưu hành của CV-A16 tại Việt Nam và các nước trên thế giới**

**Ghi chú:**

- Cây được xây dựng bằng phương pháp ML, dựa trên 85 trình tự CV-A6 trong nghiên cứu được lựa chọn theo năm và tỉnh (1 trình tự/1 tỉnh/1 năm) và 61 trình tự trên ngân hàng Genbank được lựa chọn theo theo genotype/sub genogroup. Giá trị bootstrap dưới 70% được ẩn trên cây

- Các chủng của Việt Nam được đánh dấu theo màu khác nhau của năm từ 2008-2018

Các chủng CV-A16 tại miền Bắc Việt Nam từ 2008-2018 trong nghiên cứu có xu hướng tập trung thành cụm và lưu hành đồng thời với trình tự thu thập từ các nước trong cùng thời gian. Cụ thể như các mẫu CV-A16 thu thập năm 2008 tập trung thành nhóm cùng CV-A16 lưu hành trên thế giới giai đoạn 2006-2012, mẫu CV-A16 giai đoạn 2011-2016 cùng nhóm với mẫu thu thập tại miền Nam Việt Nam năm 2014, Trung Quốc và Pháp từ 2014-2018, CV-A16 lưu hành từ 2016-2018 thuộc cùng một nhóm với mẫu của Trung Quốc giai đoạn 2017-2018, Thái Lan giai đoạn 2015-2018. Tại sub genogroup B1b, CV-A16 tại miền Bắc Việt Nam từ năm 2008-2015 có cùng sự đồng lưu hành tít VRĐR này ở Trung Quốc từ 2008-2014 (Hình 3.5)

**Bảng 3.7. Sự thay đổi axit amin tại các vị trí vòng chức năng trên VP1 của CV-A16**

Vòng chức năng	Vị trí axit amin	Đột biến axit amin phổ biến (xếp theo thứ tự giảm dần) / Số lượng trình tự mang đột biến						Axit amin của kiểu hình chiếu ưu thế tại các vị trí đột biến (xếp theo thứ tự giảm dần)	
		1	2	3	4	5	6	1 (1701/2334)	2 (114/2334)
IgM/IgG epitope	43	V (2289)	I (39)	L (4)	A (2)			V	V
	48	Q (2331)	R (2)	T (1)				Q	Q
	51	E (2329)	D (2)	K (2)	Q (1)			E	E
	57	N (2332)	S (2)					N	N
BC	92	I (2232)	V (2)					I	I
	94	T (2315)	A (14)	S (4)	I (1)			T	T
	97	T (2328)	I (3)	N (2)	A (1)			T	T
	98	T (2309)	M (19)	A (4)	I (1)	K (1)		T	T
	99	G (2328)	D (6)					G	G
	101	Q (2330)	R (3)	H (1)				Q	Q
	102	N (2323)	D (11)					N	N
	103	T (2328)	A (5)	I (1)				T	T
	104	D (2304)	E (1)	G (1)	N (28)			D	D
	105	G (2331)	S (3)					G	G
DE	145	E (2269)	V (55)	Q (4)	A (2)	T (1)	G (1)	E	E
	148	P (2330)	S (3)	L (1)				P	P
	150	L (2330)	F (2)	I (1)	? (1)			L	L
<b>EF</b>	<b>164</b>	<b>T (2186)</b>	<b>K (143)</b>	<b>A (5)</b>				<b>T</b>	<b>K</b>
	169	F (2328)	L (3)	S (3)				F	F

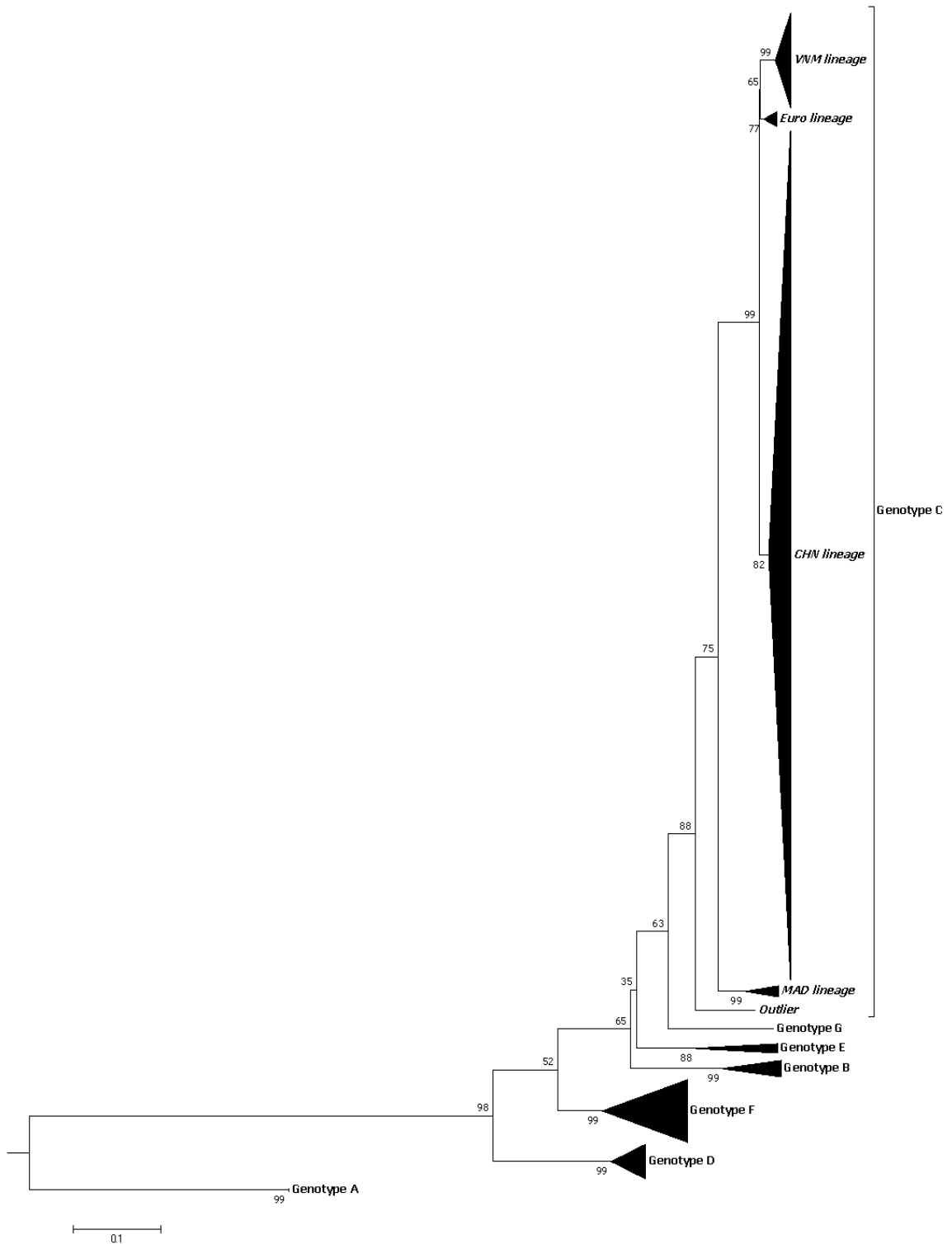
	170	A (2332)	T (2)					A	A
GH	213	E (2328)	A (4)	K (1)	Q (1)			E	E
	215	L (2309)	F (4)	P (19)	S (1)	V (1)		L	L
	216	L (2325)	Q (5)	P (3)	? (1)			L	L
	217	A (2326)	S (5)	E (3)				A	A
	218	N (2295)	D (29)	S (10)				N	N
	219	D (2330)	V (3)	G (1)				D	D
	220	L (2320)	I (7)	A (4)	M (3)			L	L
HI	240	T (2192)	A (96)	I (39)	N (3)	S (3)	V (1)	T	T
	241	E (2292)	K (31)	Q (1)				E	E
	242	K (2332)	E (2)					K	K
	244	P (2329)	S (2)	R (1)	T (1)	K (1)		P	P
PEP91	273	F (2329)	L (1)	S (1)	Y (3)			F	F
	274	K (2329)	R (4)	E (1)				K	K
	275	T (2315)	A (14)	P (2)	S (3)			T	T
	276	N (2330)	S (2)	Y (2)				N	N
	279	Y (2279)	F (5)	H (3)	C (2)	L (1)		Y	Y
	280	K (2287)	R (3)	- (47)				K	K
	282	N (2365)	D (13)	S (8)	K (1)	- (47)		N	N
	283	D (2284)	A (2)	- (48)				D	D
	284	I (2269)	V (14)	L (1)	D (1)	- (49)		I	I
285	K (2259)	N (14)	R (11)	S (1)	- (50)		K	K	



Vị trí cấu trúc kháng nguyên trung hòa và các vòng chức năng trên bề mặt VP1 lần lượt là IgG/IgM epitope (aa 43-58), vòng BC (aa 92-106), vòng DE (142-156), vòng EF (163-177), vòng GH (208-222), và PEP91 (271-285) [25, 151, 159, 190]. Bảng 3.7 thể hiện chi tiết 41 vị trí tại các cấu trúc này có sự biến đổi aa. Tương tự CV-A6, tại mỗi vị trí đó, có một aa chiếm ưu thế, duy trì bền vững qua vài thập kỷ và sự xuất hiện có tỷ lệ dao động 93,65% (2186/2334 trình tự) (vị trí aa N137 thuộc vòng DE) đến 99,99% (2332/2334 trình tự) (A170 thuộc EF). Việc kết hợp và duy trì ổn định của các aa này tạo nên kiểu gen điển hình và nổi trội. Kiểu hình nổi trội nhất của CV-A16 có tỷ lệ 72,88% (1701/2334 trình tự được phân tích) là sự kết hợp của aa T164 với các aa chiếm ưu thế ở các vị trí còn lại (T164 featuring polymorphism). 114/2334 trình tự (4,88%) là kiểu hình nổi trội thứ hai có sự kết hợp của aa K164 với các aa chiếm ưu thế khác (K164 featuring secondary dominant polymorphism). 80,15% (105/131 trình tự) CV-A16 trong nghiên cứu thuộc kiểu hình nổi trội thứ 2. Đột biến K164 còn được tìm thấy trong các chủng được thu thập tại miền Nam Việt Nam, Pháp (năm 2014), Trung Quốc, Thái Lan (năm 2016-2017). Có 26 trình tự CV-A16 trong nghiên cứu (19,84%) được phân lập từ năm 2008-2015 thuộc kiểu hình nổi trội thứ nhất.

#### **3.2.4. Đặc điểm di truyền phân tử vùng gen VP1 của týp CV-A10**

Cây phát sinh chủng loài được xây dựng dựa trên 1346 trình tự VP1 hoàn chỉnh/gần hoàn chỉnh ( $\geq 800$  bp) gồm 46 trình tự thuộc nghiên cứu và 1300 trình tự VP1 được công bố tính đến tháng 3/2022 trên ngân hàng Gen. Danh sách các mẫu chi tiết các mẫu trong nghiên cứu tại Phụ lục 9.

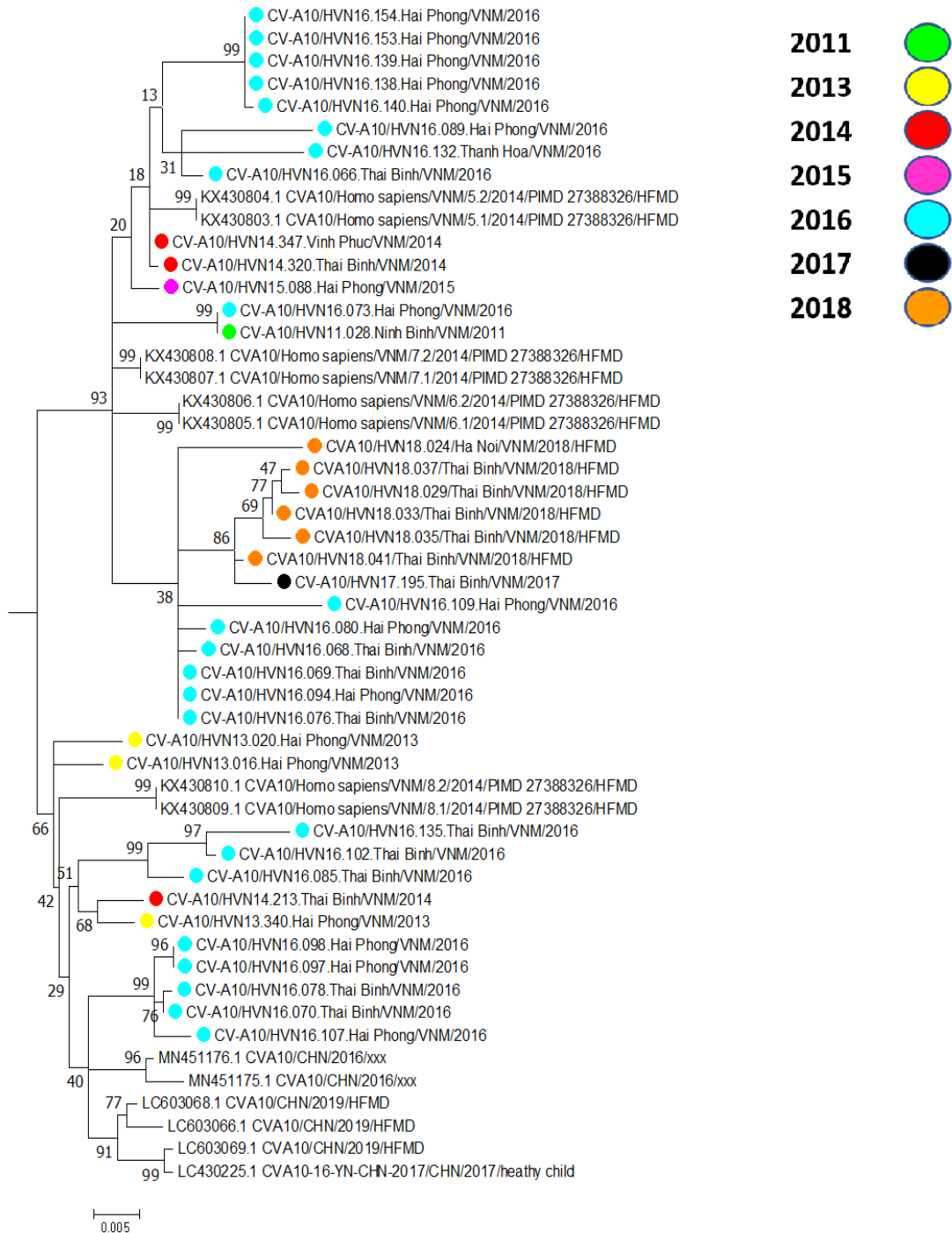


**Hình 3.6. Cây phát sinh chủng loài trình tự gen VP1 của CV-A10**

**Ghi chú:**

Cây được xây dựng bằng phương pháp ML, mô hình “GTR+G+I”, giá trị tái lập (bootstrap) 1000. Chủng ngoài (outgroup) CV-A6 (AY421764.1) được loại bỏ nhằm tăng độ phân tách các nhánh trong cây phát sinh. Giá trị bootstrap dưới 70% được ẩn trên cây

Cây phát sinh chủng loài thể hiện tại hình 3.6 cho thấy các chủng CV-A10 chia làm 7 genotype từ A-G. Genotype A là chủng gốc (prototype strain) Kowalik thu thập tại Mỹ năm 1950 (AY421767.1; AF081300.1). Genotype B, E và F gồm các trình tự được thu thập từ mẫu CV-A10 tại nhiều quốc gia giai đoạn 2003-2004 như trên bệnh nhân LMC tại Nga, Ấn Độ, Georgia, Đông Timo, Cộng hòa Trung Phi, Cộng hòa Chad, bệnh nhân tiêu chảy tại Ấn Độ và Trung Quốc, bệnh nhân TCM tại Trung Quốc. Genotype D gồm CV-A10 được thu thập trên bệnh nhân TCM tại Châu Âu giai đoạn 2008-2013, bệnh nhân LMC tại Nga (2008-2010) và Ấn Độ (2010, 2017). Genotype C là genotype lớn nhất gồm trình tự được phân lập mẫu của bệnh nhân TCM tại Trung Quốc (2008-2019), Úc (2016-2017), Tây Ban Nha và Pháp (2008-2010) và Việt Nam (2008-2018). Trong đó CV-A10 thu thập tại Trung Quốc chiếm chủ yếu. Genotype C được chia làm 04 dòng (lineage) chính: Madagasca (MAD lineage), Châu Âu (Euro lineage), Trung Quốc (CHN lineage) và Việt Nam (VNM lineage). Các chủng CV-A10 thuộc genotype C phân chia vào 2 lineage là CHN lineage và VNM lineage. 8/46 trình tự (17,39%) còn lại gồm 1 trình tự của mẫu thu thập năm 2014 tại Ninh Bình và 7/13 trình tự (53,84) thu thập năm 2018 thuộc CHN lineage. Các trình tự có độ có độ tương đồng nt dao động 97,3%-100%. 38/46 (82,61%) trình tự còn lại thuộc VNM lineage.



**Hình 3.7. Cây phát sinh chủng loài gen VP1 của CV-A10 thuộc lineage VNM**

**Ghi chú**

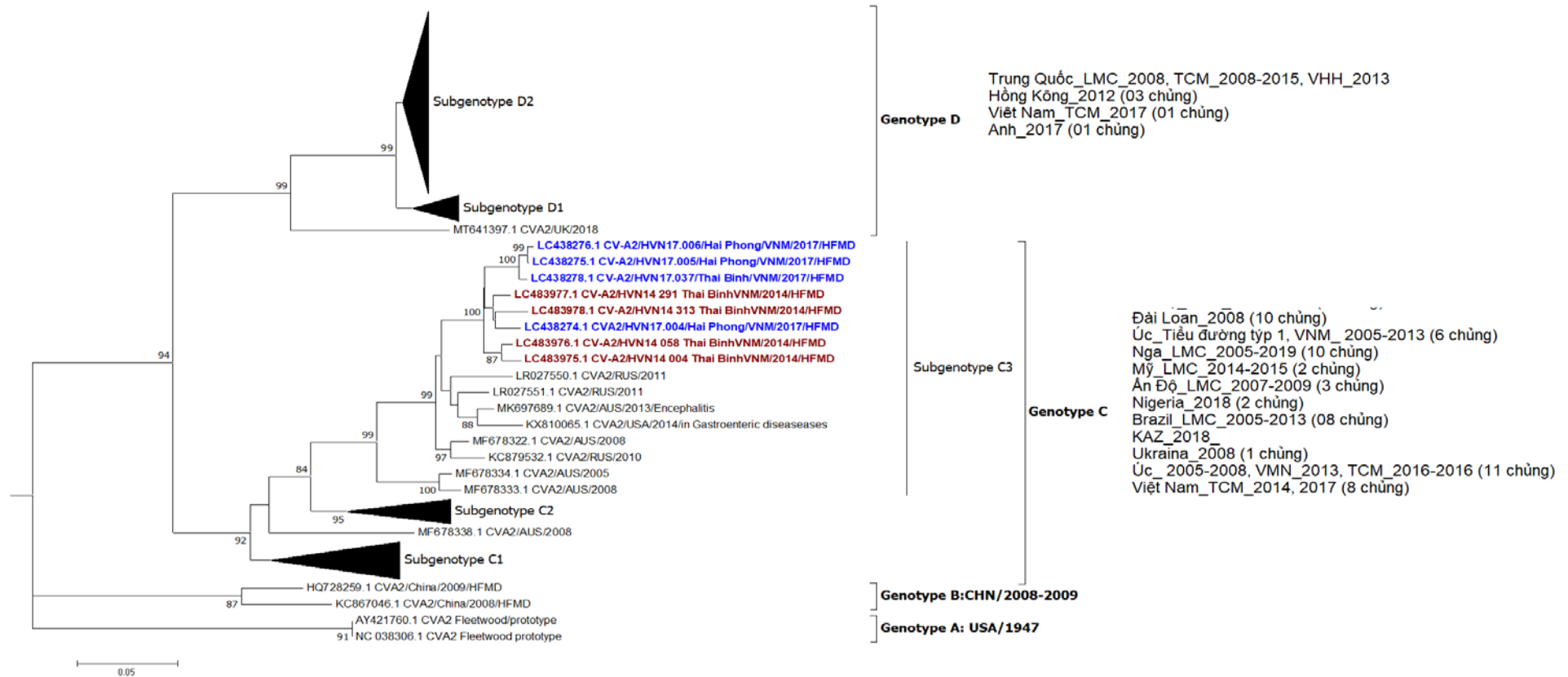
- Cây được xây dựng bằng phương pháp ML, mô hình “GTR+G+I”, giá trị tái lập (bootstrap) 1000. Chủng ngoài (outgroup) CV-A6 (AY421764.1) được loại bỏ nhằm tăng độ phân tách các nhánh trong cây phát sinh. Giá trị bootstrap dưới 70% được ẩn trên cây
- Các chủng của Việt Nam được đánh dấu theo màu khác nhau của năm từ 2011-2018

Hình 3.7 thể hiện rõ các chủng CV-A10 thuộc VNM lineage. Ngoài 38 chủng CV-A10 trong nghiên cứu còn có 8 chủng thu thập tại miền Nam Việt Nam (năm 2014) và 06 chủng thu thập từ Trung Quốc rải rác tại các năm 2016-2017 (3 chủng) và 2019 (3 chủng trên bệnh nhân TCM).

Vị trí dự đoán của cấu trúc vòng lần lượt là BC (aa 92-106), DE (aa 141-155), EF (aa 162-176), FG (aa 183), GH (aa 207-221) và HI (aa 239-243). Vị trí dự đoán có chứa kháng nguyên IgG/IgM có vai trò tăng cường sự xâm nhập của vi rút là từ aa 43 đến 58. Các chủng CV-A10 trong cùng genotype (nhưng khác lineage) không có sự khác biệt aa tại các vòng cấu trúc dự đoán ngoại trừ một vài đột biến điểm lẻ tại một vài mẫu như đột biến N94D (mẫu 13.340), D97N (mẫu 16.089). Một điểm lý thú được tìm thấy là tại các mẫu CV-10 trên VNM lineage có sự thay đổi aa tại vị trí aa 265 và 284 theo thời gian. Cụ thể I265/T284 (2013) → I265/A284 (năm 2014) → V265/T284 (năm 2014, 2015, 2016) → I265/T284 (năm 2016 tại chủng chiếm ưu thế) → I265/S284 (năm 2017) → I265/A284 (năm 2018 tại chủng chiếm ưu thế).

### **3.2.5. Đặc điểm phân tử vùng gen VP1 của tít CV-A2**

Cây phát sinh chủng loài được xây dựng dựa trên 189 trình tự VP1 hoàn chỉnh hoặc/và gần hoàn chỉnh ( $\geq 800$  bp) của CV-A2. Trong đó gồm có 9 trình tự trong nghiên cứu và 180 trình tự hiện có trên GenBank (thu thập đến tháng 9/2021). Danh chi tiết các mẫu trong nghiên cứu tại Phụ lục 10.



**Hình 3.8. Cây phát sinh chủng loài trình tự gen VP1 của CV-A2**

**Ghi chú:**

- Cây được xây dựng bằng phương pháp ML, mô hình “K2+G”, giá trị tái lập (bootstrap) 1000. Chủng ngoài (outgroup) CV-A5 (AY421763.1) được loại bỏ nhằm tăng độ phân tách của các nhánh trong cây phát sinh chủng. Giá trị bootstrap dưới 70% được ẩn trên cây
- Chữ viết tắt: LCM-Liệt mềm cấp; VNM-Viêm màng não; TCM-Tay Chân Miệng, VHH-Viêm họng hạt

Hình 3.8 thể hiện cây phát sinh chủng loài của CV-A2 được chia làm bốn genotype từ A-D. Genotype A là chủng gốc (prototype) Fleetwood/USA/1947 (NC038306, AY421763). Genotype B gồm 2 trình tự từ mẫu thu thập trên bệnh nhân TCM tại Trung Quốc năm 2008-2009. Genotype C có 53 trình tự chia làm 3 sub genotype C1-C3 trên mẫu của bệnh nhân LMC tại Brazil (2005-2006, 2008-2009, 2011-2013) và Ấn Độ (2007-2009) và bệnh nhân viêm não tại Úc (2013). Genotype D là genotype có số lượng chủng CV-A2 nhiều nhất trên cây phát sinh chủng loài, chủ yếu gồm các mẫu được phân lập tại Trung Quốc từ 2009-2019 trên bệnh nhân TCM. Trừ 01 chủng (outlier) của Anh năm 2018 (MT641397.1), số còn lại phân bố vào 2 sub genotype là D1 (16 mẫu từ Trung Quốc, 2009-2013) và D2 (mẫu của Trung Quốc từ 2010 đến nay, 01 mẫu của Việt Nam và 04 mẫu tại Hồng Kông năm 2012).

9 mẫu CV-A2 được giải trình tự thành công trong nghiên cứu được thu thập năm 2014 (4 mẫu) và năm 2017 (5 mẫu) tại Hải Phòng và Thái Bình. Các mẫu thu thập năm 2014 đều thuộc Thái Bình. Năm 2017, 1 mẫu thu thập tại Thái Bình và 4 mẫu còn lại tại Hải Phòng. 8/9 trình tự (88,89%) tập trung thành nhóm địa phương (local lineage) trong subgenotype C3 với giá trị bootstrap lên đến 100% và độ tương đồng nt dao động từ 94,0%-99,4%. Sub genotype C3 còn gồm các trình tự CV-A2 được thu thập trên bệnh nhân tiêu đường tại Úc (năm 2005-2008), VHH tại Nhật Bản (năm 2010-2012), bệnh nhân LMC tại Nga (năm 2010-2011) và Mỹ năm 2014. Trình tự của mẫu 17.005 và 17.006 (Hải Phòng năm 2017) có độ tương đồng nt cao nhất (99,4%). Năm 2017 (năm nổi trội của CV-A2), sự khác biệt nt của các trình tự dao động trong khoảng 0,6%-5,6%, trong khi tỷ lệ % giữa các trình tự này với các trình tự được phân lập năm 2014 và 2016 dao động 3,4%-6,3%. Duy nhất mẫu 17.033 thu thập tại Hải Phòng (2017) thuộc genotype D.

**Bảng 3.8. Đột biến axit amin trên vùng gen VP1 của CV-A2**

Genotype/ Subgenotype	Chủng	Trình tự axit amin									
		27	73	102	215	231	233	234	258	275	287
A	AY421760.1 CVA2 Fleetwood/prototype	S	K	A	N	G	F	S	I	N	A
B	HQ728259.1 CVA2/China/2009/HFMD	.	.	T	.	.	.	.	V	.	.
	JN203502.1 CVA2/India/2007-2009/AFP	.	.	S	T	.	.	.	V	.	.
	KC879509.1 CVA2/Ukraine/2008	.	.	S	T	.	.	.	V	.	.
	KC879510.1 CVA2/RUS/2008	.	.	S	T	.	.	.	V	.	.
C1	MH111018.1 CVA2/AUS/2017/HFMD	.	.	G	T	.	.	.	V	.	.
	MT212630.1 CVA2/Brazil/2008/AFP	.	.	S	A	.	.	.	V	.	.
	MT212634.1 CVA2/Brazil/2012/AFP	.	.	N	A	.	.	.	V	.	.
C2	MT212629.1 CVA2/Brazil/2006/AFP	.	.	S	A	.	.	.	V	.	.
	MF678333.1 CVA2/AUS/2008	.	.	S	A	.	.	.	V	.	.
	MF678334.1 CVA2/AUS/2005	.	.	S	A	.	.	.	V	.	.
	MF678322.1 CVA2/AUS/2008	.	.	G	T	.	.	.	V	.	.
	MK697689.1 CVA2/AUS/2013/Encephalitis	.	.	S	T	.	.	.	V	.	.
	LR027551.1 CVA2/RUS/2011	.	R	S	T	.	.	.	V	.	.
	LC483975.1 CV-A2/HVN14 004 Thai BinhVNM/2014/HFMD	.	.	S	T	.	L	.	-	-	-
	LC483976.1 CV-A2/HVN14 058 Thai BinhVNM/2014/HFMD	.	.	S	T	.	.	.	-	-	-
	LC438274.1 CVA2/HVN17.004/Hai Phong/VNM/2017/HFMD	.	.	S	T	.	.	.	V	.	.
	LC483977.1 CV-A2/HVN14 291 Thai BinhVNM/2014/HFMD	.	.	S	T	.	.	.	-	-	-
C3	LC483978.1 CV-A2/HVN14 313 Thai BinhVNM/2014/HFMD	.	.	S	T	V	L	T	-	-	-

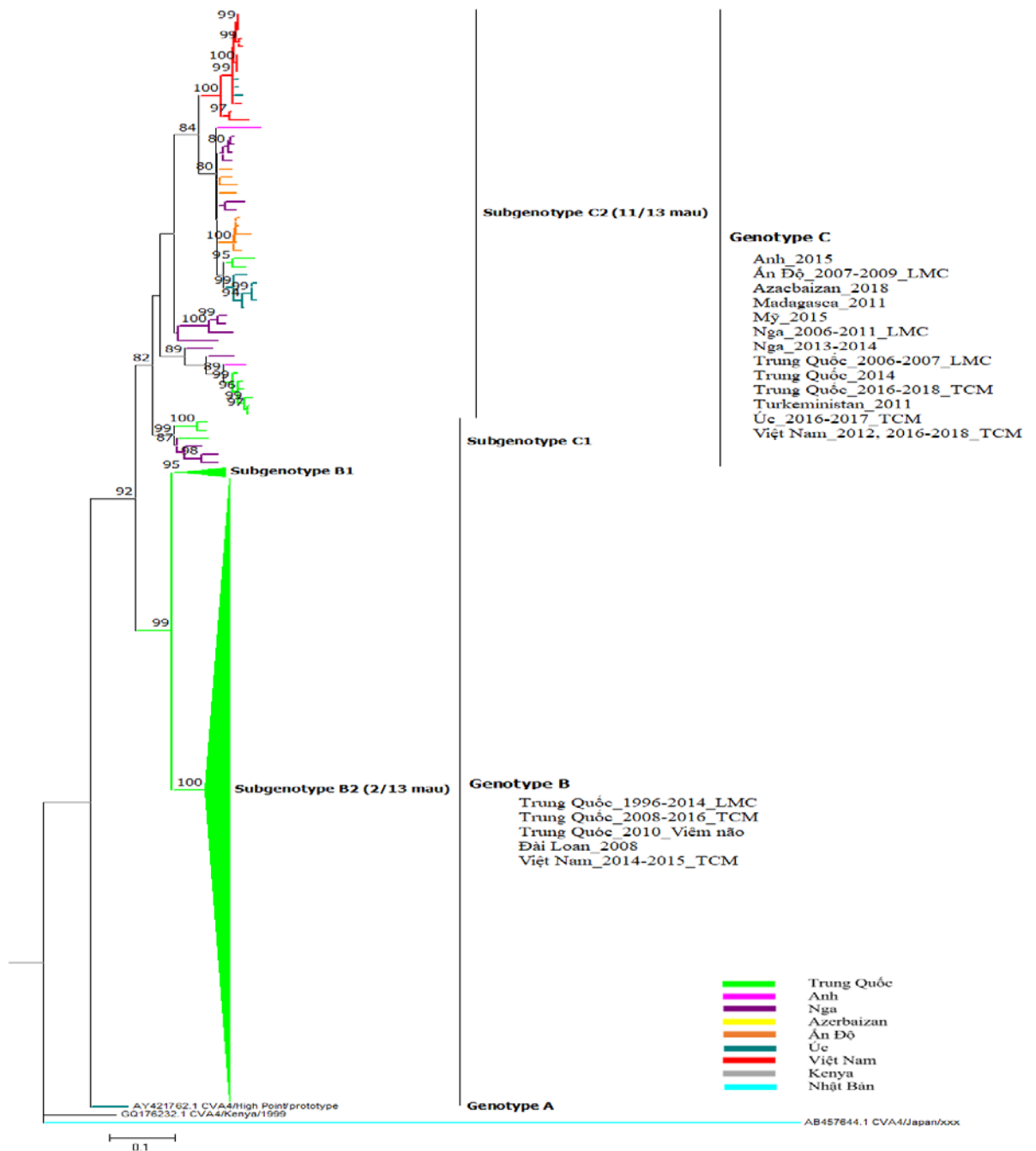


	LC438275.1 CV-A2/HVN17.005/Hai Phong/VNM/2017/HFMD	L	R	S	T	.	.	.	.	K	G
	LC438276.1 CV-A2/HVN17.006/Hai Phong/VNM/2017/HFMD	L	R	S	T	.	.	.	.	R	G
	LC438278.1 CV-A2/HVN17.037/Thai Binh/VNM/2017/HFMD	.	R	S	T	.	.	.	.	.	.
	LC438277 CV-A2/HVN17.033/Hai Phong/VNM/2017/HFMD	.	.	S	S	.	.	.	V	K	-
	JX867333.1 CVA2/HongKong/2012	.	.	S	S	.	.	.	V	.	.
	KC867047.1 CVA2/China/2009/HFMD	.	.	S	S	.	.	.	V	.	.
	KC867055.1 CVA2/China/2012/HFMD	.	.	S	S	.	.	.	V	.	.
	KU677985.1 CVA2/China/2013/HFMD	.	.	N	S	.	.	.	V	.	.
	KU677986.1 CVA2/China/2015/HFMD	.	.	G	S	.	.	.	V	.	.
	KU677987.1 CVA2/China/2015/HFMD	.	.	G	S	.	.	.	V	.	.
	KX156344.1 CVA2/China/2014/HFMD	.	.	S	S	.	.	.	V	.	.
	KX156361.1 CVA2/China/2013/HFMD	.	.	S	S	.	.	.	V	.	.
	KX595281.1 CVA2/China/2013/Herpangina severe	.	.	S	S	.	.	.	V	.	.
	KX595282.1 CVA2/China/2013/Herpangina mild	.	.	G	S	.	.	.	V	.	.
	KX595284.1 CVA2/China/2015/HFMD severe	.	.	S	S	.	.	.	V	.	.
	MG214257.1 CVA2/CHina/2013/Herpangina	.	.	G	S	.	.	.	V	.	.
	MG926783.1 CVA2/China/2017/HFMD	.	.	S	S	.	.	.	V	.	.
	MG926810.1 CVA2/China/2017/HFMD	.	.	S	S	.	.	.	V	.	.
	MH716173.1 CVA2/China/2015/HFMD	.	.	S	S	.	.	.	V	.	.
	MT641397.1 CVA2/UK/2018	.	.	S	S	.	.	.	V	.	.
	MT847604.1 CVA2/China/2018	.	.	G	S	.	.	.	V	.	.
	MT992622.1 CVA2/China/2017 HFMD	.	R	S	S	.	.	.	V	.	.
D	MW179457.1 CVA2/China/2019	.	.	G	S	.	.	.	V	.	.

Vị trí dự đoán của các vòng chức năng (functional loop) của CV-A2 được xác định lần lượt là BC (vị trí aa 93-107), DE (aa 142-156), EF (aa 163-177), FG (aa 184), GH (aa 208-222) và HI (aa 240-244). Các trình tự CV-A2 của Việt Nam xuất hiện một vài đột biến đặc trưng trên VP1 được thể hiện tại bảng 3.8. Đột biến K73R được phát hiện tại 3 mẫu 17.005, 17.006 (thu thập tại Hải Phòng) và 17.037 (thu thập tại Thái Bình). Đây đều là các mẫu thu được tại Quý II năm 2017 – là giai đoạn phân lập được nhiều CV-A2 nhất. Aa R73 này còn được tìm thấy tại chủng phân lập tại Nga năm 2011 (CV-A2/42115/RUS/2011) và Trung Quốc năm 2011 (HN202009). Đột biến aa đặc trưng khác là S27L, N275K/R và A287G được tìm thấy tại hai mẫu 17.005 và 17.006 (Hải Phòng năm 2017) và I258 tại 2 mẫu trên và mẫu 17.037 (Thái Bình năm 2017). Tất cả các đột biến này đều không thuộc vị trí của các vòng chức năng.

### **3.2.6. Đặc điểm di truyền phân tử vùng gen VP1 của týp CV-A4**

Cây phát sinh chủng loài được xây dựng dựa trên 409 trình tự VP1 hoàn chỉnh hoặc/và gần hoàn chỉnh ( $\geq 800$  bp) của CV-A4 gồm 13 trình tự trong nghiên cứu và 396 trình tự hiện có trên Genbank tính đến tháng 8/2021. Danh sách chi tiết các mẫu trong nghiên cứu tại Phụ lục 11.



**Hình 3.9. Cây phát sinh chủng loài trình tự gen VP1 của CV-A4**

**Ghi chú**

- Cây được xây dựng bằng phương pháp ML, mô hình “GTR+G+I”, giá trị tái lập (bootstrap) 1000. Chủng ngoài (outgroup) CV-A6 (AY421764.1) được loại bỏ nhằm tăng độ phân tách của các nhánh trong cây phát sinh chủng. Giá trị bootstrap dưới 70% được ẩn trên cây

- Các chủng của các quốc gia được phân biệt qua được đánh dấu theo màu khác nhau

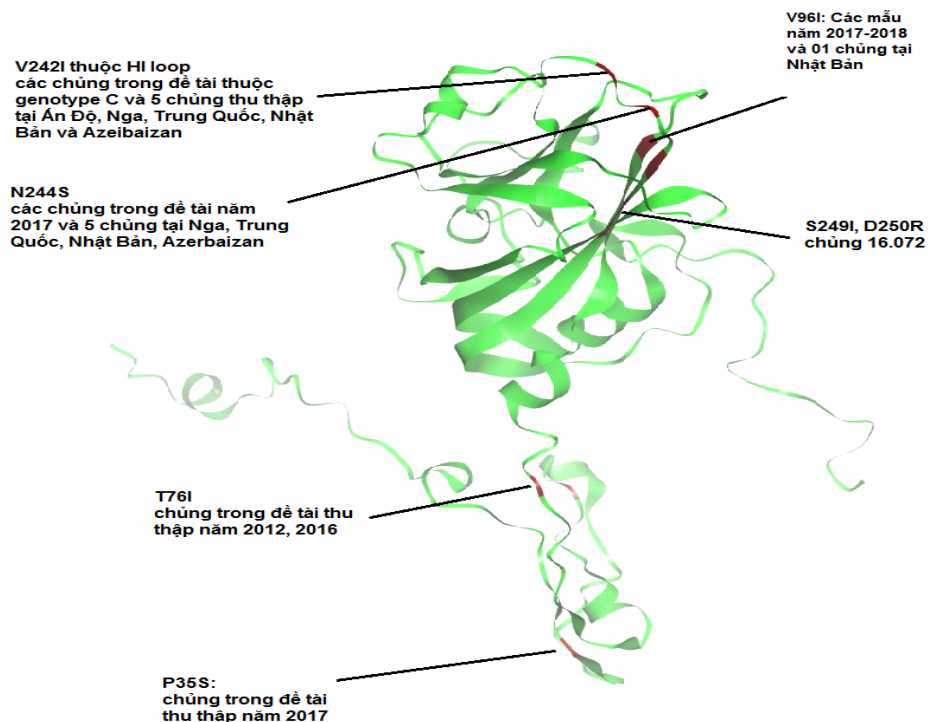
- Chữ viết tắt: LMC- Liệt mềm cấp, TCM-Tay Chân Miệng

Hình 3.9 thể hiện các genotype của CV-A4 trên cây phát sinh chủng loài. Ngoại trừ 2 trình tự outlier (AB457644.1, GQ176232.1), có thể chia các chủng CV-A4 thành 3 genotype A-C. Genotype A là chủng gốc (prototype strain) HighPoint/USA/xxx (AY421762.1). Số trình tự còn lại phân bố trong 2 genotype B và C. Genotype B có số lượng trình tự lớn nhất (350/409 trình tự). Phần lớn trong số đó là từ các mẫu được phân lập ở Trung Quốc trong thời gian giai đoạn 2006-2020 trên bệnh nhân LMC và TCM. Genotype này chia làm 2 sub genotype B1 và B2. Sub genotype B1 gồm 5 trình tự phân lập tại Trung Quốc trước năm 2006 (1996-2006), số còn lại thuộc B2. Sub genotype B2 gồm các trình tự CV-A2 từ mẫu thu thập tại Trung Quốc (giai đoạn 2006-2020), Úc (2016-2017), Đài Loan (2008), Anh (2014) và Việt Nam (2014-2015) (mẫu 14.038 thu thập tại Thái Bình năm 2014 và 15.127 tại Hải Phòng năm 2015). Genotype C có số lượng trình tự ít hơn so với genotype B nhưng chúng được thu thập từ các mẫu tại nhiều nước trên thế giới như Nga, Trung Quốc, Việt Nam, Ấn Độ, Turkmenistan, Mỹ, Úc... Genotype C phân chia làm 2 sub genotype C1 và C2.

Các mẫu được giải trình tự thành công được thu thập rải rác nhiều năm tại Hải Phòng và Thái Bình. Các năm 2012, 2014, 2015, 2016 và 2018 mỗi năm chỉ có 1 mẫu. Riêng năm 2017 có 8 mẫu. 11/13 (84,61%) 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 (ngoại trừ 03 trình tự thu thập tại Úc năm 2016 trên bệnh nhân TCM) là 8,1%-16,7%. 8/11 trình tự 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.



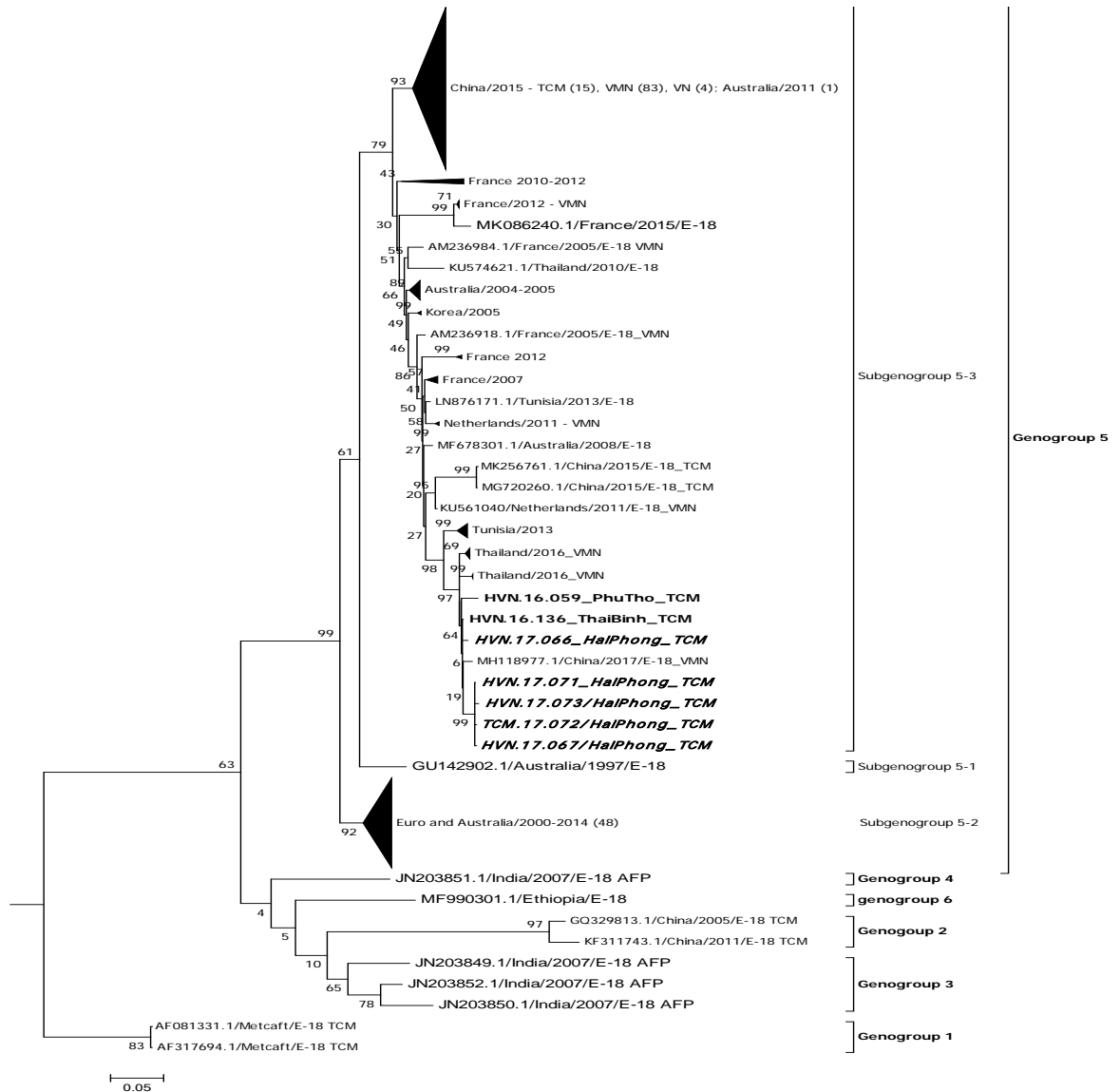
Bảng 3.9 minh họa cụ thể vị trí dự đoán của các vòng chức năng (functional loop) của CV-A4 được xác định lần lượt là BC (aa 93-107), DE (aa 142 - 156), EF (aa 163-177), FG (aa 184), GH (aa 208-222) và HI (aa 240-244) và các đột biến aa trên vùng VP1 tại các chủng CV-A4 tại Việt Nam và trên thế giới. Các trình tự CV-A4 từ mẫu thu thập năm 2017 (giai đoạn CV-A4 chiếm ưu thế trong nghiên cứu) xuất hiện đột biến khác với CV-A4 của năm 2012 và 2016 tại các vị trí aa 35, 76, 96 và 247. Ngoài ra, hai đột biến S249I và D250R phát hiện thấy tại chủng năm 2016 (mẫu 16.072). Các aa S35, T37, I96, V242 và S244 chỉ được tìm thấy tại trình tự của các mẫu tại Việt Nam thuộc sub genotype C2 khác với trình tự thu thập tại các nước khác trong cùng phân nhóm. Trong đó, aa I96 chỉ được tìm thấy tại mẫu năm 2017-2018 và 1 chủng thu thập tại Nhật Bản, aa V242 được tìm thấy tại tất cả các mẫu CV-A4 của miền Bắc Việt Nam và 5 chủng tại Ấn Độ, Nga, Azerbaijan, Trung Quốc và Nhật Bản. Aa I96 thuộc vòng BC còn V242 và S244 thuộc vòng HI. Đột biến S56T tại vị trí được cho có chứa vị trí kháng nguyên IgG/IgM và thúc đẩy quá trình xâm nhập của vi rút (aa 44-59) chỉ xuất hiện tại mẫu 17.016 và 16.021 (Hình 3.10)



**Hình 3.10. Vị trí các đột biến axit amin của CV-A4**

### 3.2.7. Đặc điểm di truyền phân tử vùng gen VP1 của týp E-18

Cây phát sinh chủng loài được xây dựng trên tổng số 214 trình tự hoàn chỉnh/ gần hoàn chỉnh ( $\geq 800$ nt) toàn bộ vùng gen VP1 của E-18, bao gồm 7 trình tự trong nghiên cứu và 208 trình tự thu thập được trên ngân hàng Gen tại thời điểm nghiên cứu. Danh sách các mẫu chi tiết trong nghiên cứu tại Phụ lục 12.



**Hình 3.11. Cây phát sinh chủng loài trình tự gen VP1 của E-18**

#### Ghi chú

Cây được xây dựng bằng phương pháp ML, mô hình “K2+G”, giá trị tái lặp (bootstrap) 1000. Chủng ngoài (outgroup) CV-A6 (AY421764.1) được loại bỏ nhằm tăng độ phân tách của các nhánh trong cây phát sinh chủng. Giá trị bootstrap dưới 70% được ẩn trên cây  
 Chữ viết tắt: TCM – Tay Chân Miệng; AFP – Liệt mềm cấp; VMN – Viêm màng não

Sự phân loại thành 6 genogroup của E-18 trên cây phát sinh chủng loài được thể hiện tại hình 3.11. Genogroup 1 là chủng gốc Metcalf thu thập trên bệnh nhân tiêu chảy. Genogroup 2 gồm hai mẫu thu thập trên bệnh nhân TCM tại Trung Quốc (năm 2005, 2011). Genogroup 3 và 4 gồm các mẫu được thu thập tại Ấn Độ năm 2007 liên quan đến bệnh nhân LMC. Duy nhất 1 mẫu E-18 thu thập từ môi trường nước tại Ethiopia là genogroup 6. Genogroup 5 là nhóm lớn nhất trong cây phát sinh chủng loài, chứa 206/214 (96,3%) số trình tự phân tích và chia thành 3 sub genogroup là 5-1, 5-2 và 5-3. Phân nhóm 5-1 có 1 mẫu, 5-2 có 48 mẫu phân lập trên bệnh nhân viêm màng não, chủ yếu tại Châu Âu (Đức, Pháp, Nga) giai đoạn 2000 – 2014 và Úc giai đoạn từ 2000-2001. Phân nhóm 5-3 là phân nhóm chính, bao gồm các chủng E-18 lưu hành ở nhiều nước trên thế giới từ năm 2004 đến nay, chủ yếu từ bệnh nhân viêm màng não và một số ít bệnh nhân TCM tại Trung Quốc (năm 2015-2016). Tất cả 7 mẫu E-18 tại miền Bắc Việt Nam năm 2016 - 2017 đều thuộc phân nhóm 5-3.

Trong phân nhóm 5-3, mẫu E-18 tại Việt Nam nằm gần nhất với 1 mẫu E-18 phân lập trên bệnh nhân VMN tại Trung Quốc năm 2017 và với các mẫu E-18 gây VMN tại Thái Lan năm 2016, có độ tương đồng trình tự gen VP1 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, Tunisia, Úc, Pháp...từ 88,3% - 96,4%. Riêng với nhóm mẫu E-18 gây bệnh TCM ở Trung Quốc, độ tương đồng gen VP1 khi so sánh mẫu Việt Nam là 88,4% - 90,4%. Hai mẫu năm 2016 là 16.059 tại Phú Thọ và 16.136 tại Thái Bình, có độ tương đồng trình tự nt cao, 99,5%. Độ tương đồng gen VP1 của các mẫu năm 2017 dao động từ 97,5% - 100%. Mẫu 17.066 tại Hải Phòng có độ tương đồng với hai mẫu năm 2016 là 99,3% - 99,5%, cao hơn so với các chủng thu thập cùng năm tại cùng tỉnh là 97,5% - 97,9%. Độ tương đồng aa vùng VP1 của các mẫu E-18 tại Việt Nam là 98,5% - 100%. So sánh với mẫu E-18 khác thuộc phân nhóm 5-3 khác giá trị này là 92,1% - 100%. Đặc biệt, trình tự aa của mẫu 17.066 tại Hải Phòng, ngoài tương đồng 100% với các mẫu E-18 Việt Nam, còn hoàn toàn tương đồng với hai mẫu E-18 phân lập từ bệnh nhân VMN tại Hà Lan năm 2011. Độ tương đồng trình tự aa khi so sánh với nhóm mẫu gây VMN ở Trung Quốc (năm 2017) và Thái Lan (năm 2016) là 97,8%–99,6%.



**Bảng 3.10. Các đột biến axit amin trên vùng gen VP1 của E-18**

Nhóm/ Phân nhóm	Tên chủng	Trình tự axit amin													
		Vòng BC (78-89)				*	Vòng DE (137-152)			*	*	Vòng HI (218-226)		*	*
		78	84	89	104	137	152	215	216	218	226	262	275		
5.3	HVN.16.136/ThaiBinh_TCM	E	N	T	M	H	V	Y	I	S		V	D		
	HVN.17.066/HaiPhong_TCM	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
	HVN.17.073/HaiPhong_TCM	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
	HVN.17.072/HaiPhong_TCM	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
	HVN.17.071/HaiPhong_TCM	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
	HVN.17.067/HaiPhong_TCM	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
	HVN.16.059/PhuTho_TCM	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
	MH427208.1/Thailand/2016/E-18_VMN	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
	MH427207.1/Thailand/2016/E-18_VMN	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
	KY303801.1/China/2015/E-18_VMN	.	.	.	.	.	.	F	V	.	.	.	.		
	MG720258.1/China/2015/E-18_TCM	.	S	.	.	.	.	F	V	.	.	.	.		
	MG720257.1/Chia/2015/E-18_VN	.	.	.	.	.	.	F	V	.	.	.	.		
	KY828852.1/Chia/2015/E-18_TCM	.	.	.	.	.	.	F	V	.	.	.	.		
	MG720260.1/China/2015/E-18_TCM	.	.	.	.	.	.	F	.	.	.	.	.		

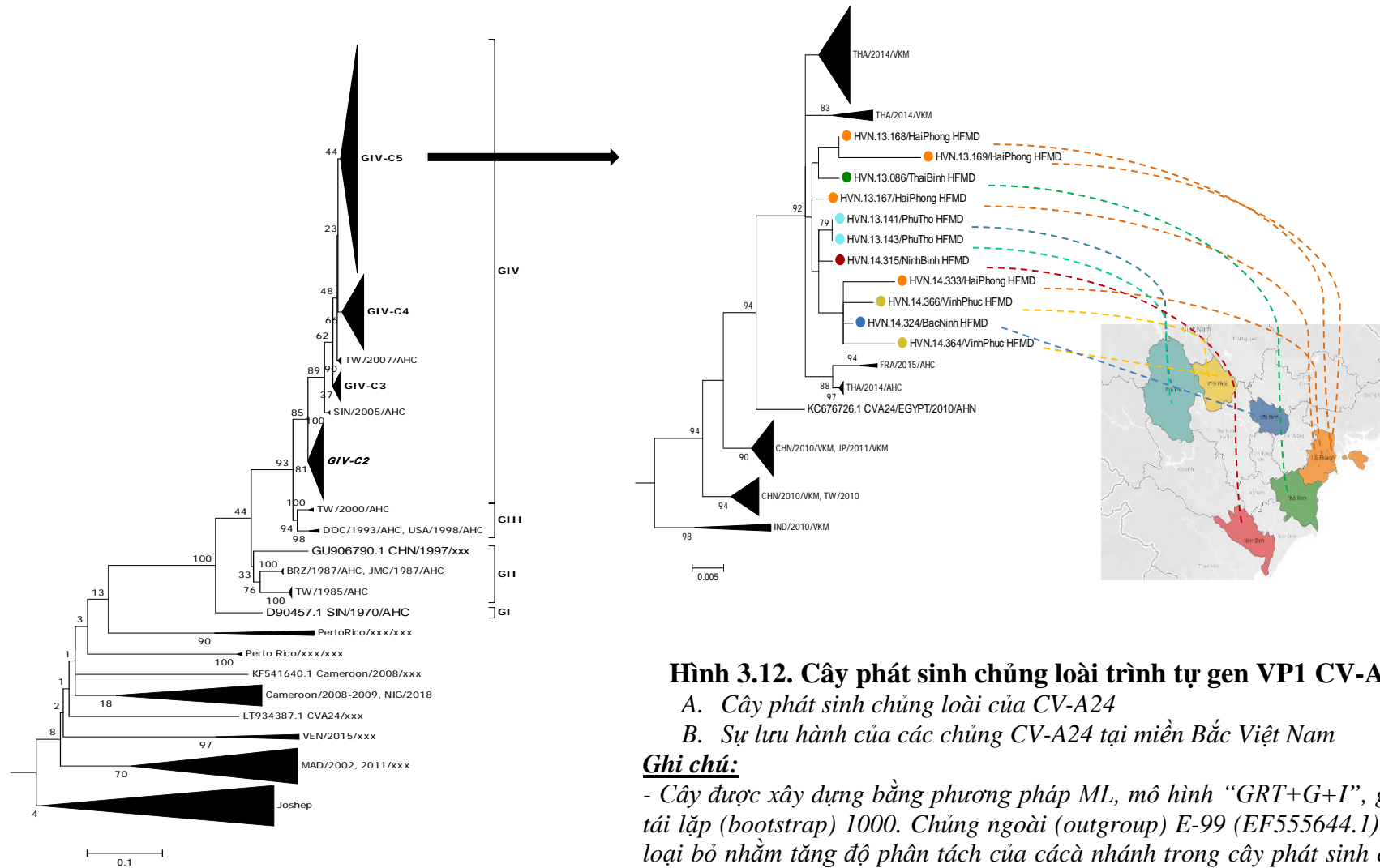
	KY303806.1/China/2015/E-18_MN	.	.	.	L	.	.	F	V	.	.	.	.
	MG720244.1/China/2015/E-18_TCM	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	MG720243.1/China/2015/E-18_TCM	.	.	.	.	.	.	F	.	.	.	.	.
	KU561038.1/Netherland/2011/E-18_VMN	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	KU561039.1/Netherland/2011/E-18_VMN	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
5.2	GU142902.1/Australia 1997/E-18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	E
5.1	AY208092.1/France/E-18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	E
	KX139454.1Germany/2010/E-18_VMN	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
6	MF990301.1/Ethiopia/E-18	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.
4	JN203851.1/India/2007/E-18_AFP	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.
3	JN203850.1/India/2007/E-18_AFP	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.
	JN203852.1/India/2007/E-18_AFP	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.
	JN203849.1/India/2007/E-18_AFP	.	R	.	.	.	.	.	V	.	.	N	.
2	GQ329813.1/China/2005/E-18_TCM	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	T	E
	KF311743.1/China/2011/E-18_TCM	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	T	E
1	AF081331.1/Metcaft/E-18	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	AF317694.1/Metcaft/E-18	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

\*: Vị trí axit amin đột biến ngoài vị trí cấu trúc vòng trên vùng gen VP1 xuất hiện tại một số chủng

Bảng 3.10 thể hiện cụ thể kết quả so sánh trình tự aa tại các vòng chức năng BC (aa 78-89), DE (aa 137-152) và HI (aa 218-226) giữa các chủng E-18 tại Việt Nam và trên thế giới. Kết quả không phát hiện thấy sự khác biệt giữa mẫu E-18 Việt Nam và các mẫu khác thuộc nhóm 5-3. Ví dụ, trên vòng BC, các mẫu E-18 Việt Nam mang đột biến điển hình của các chủng thuộc nhóm gen 5 là đột biến tại vị trí 84 (R→N). Một số đột biến lẻ tẻ tại các vị trí không quan trọng, quan sát thấy giữa mẫu E-18 Việt Nam và các nước khác như: (1) Đột biến được cho là chỉ xuất hiện ở các mẫu E-18 gây bệnh VN và TCM tại Trung Quốc là M104L, Y215F, và I216V không thấy xuất hiện ở các mẫu E-18 tại Việt Nam [47]; (2) Các chủng E-18 Việt Nam có xuất hiện đột biến N10D, tương tự các nước khác trên thế giới trừ Trung Quốc [47]; (3) Đột biến V262T/A và D275E xuất hiện ở E-18 gây TCM tại Trung Quốc (năm 2005, 2011) và gây VN tại Pháp, tuy nhiên lại không xuất hiện tại các mẫu E-18 Việt Nam và mẫu Trung Quốc năm 2015 phân lập trên bệnh nhân TCM và VMN.

### **3.2.8. Đặc điểm phân tử vùng gen VP1 của tít CV-A24**

Cây phát sinh chủng loài được xây dựng trên tổng số 343 trình tự hoàn chỉnh/gần hoàn chỉnh gen VP1 ( $\geq 800$ nt) gen VP1 gồm 11 trình tự trong nghiên cứu, 331 trình tự gen VP1 của CV-A24 thu thập trên GenBank (tháng 12/2021) và 1 trình tự VP1 của E-99 sử dụng làm nhóm ngoài (out group). Danh sách các mẫu chi tiết trong nghiên cứu tại Phụ lục 13.



**Hình 3.12. Cây phát sinh chủng loài trình tự gen VP1 CV-A24**

A. Cây phát sinh chủng loài của CV-A24

B. Sự lưu hành của các chủng CV-A24 tại miền Bắc Việt Nam

**Ghi chú:**

- Cây được xây dựng bằng phương pháp ML, mô hình “GRT+G+I”, giá trị tái lập (bootstrap) 1000. Chủng ngoài (outgroup) E-99 (EF555644.1) được loại bỏ nhằm tăng độ phân tách của các nhánh trong cây phát sinh chủng loài. Giá trị bootstrap dưới 70% được ẩn trên cây
- Các chủng của Việt Nam được đánh dấu theo màu khác nhau theo tỉnh
- Chữ viết tắt: VKM – Viêm kết mạc; HFMD – Tay Chân Miệng

Cây phát sinh chủng loài thể hiện tại hình 3.12 có các đặc điểm sau: (1) Được chia làm 2 cụm chính. Cụm 1 bao gồm các chủng thuộc chủng gốc Joshep được thu thập từ Nam phi, Puerto Rico và Mỹ, cụm 2 gồm các chủng biến thể CV-A24 (CV-A24 variant - CV-A24v) bắt đầu được phát hiện và phân lập từ năm 1970 tại Singapore và là tác nhân chính gây bệnh VKM từ các nước Thái Lan, Pháp, Brazil.... (3) Cụm 2 được chia là 4 genotype (GI - GIV). Trong đó có sự tiến hóa theo thời gian. GI bao gồm chủng gốc của nhóm là chủng được phát hiện lần đầu tiên trong dịch VKM tại Singapore năm 1970. GII bao gồm 10 trình tự thu thập tại Đài Loan (1985), Brazil và Jamaica (1987), Trung Quốc (1997). GIII là 4 chủng thu thập tại Dominica (1993), Mỹ (1998) và Đài Loan (2000-2001). GIV là phân nhóm lớn nhất trong cụm 2 và chứa số lượng chủng lớn nhất của cây phả hệ (258/343 trình tự) được chia làm các subgenotype GIV-C2 đến GIV-C5. GIV-C2 bao gồm các trình tự có được từ mẫu thu thập tại Tây Ban Nha (2003-2005), Brazil (2004), Gabon (2008). Trình tự thu thập tại Indonesia và Trung Quốc giai đoạn 2007-2008 thuộc phân nhóm GIV-C3. Phân nhóm GIV-C4 bao gồm các trình tự trên toàn thế giới từ năm 2007-2018 như Indonesia (2007), Kenya (2010), Brazil (2009, 2017-2018), Mexico (2017). Tất cả 11 mẫu CV-A24 giải trình tự thành công đều thuộc phân nhóm GIV-C5 với các chủng thu thập tại Thái Lan trong dịch VKM cùng năm, Trung Quốc (2010), Nhật Bản năm 2010-2011.

Các trình tự CV-A24v thu thập trong nghiên cứu được phân bố tại 6 tỉnh/thành, có độ tương đồng nt từ 97,4%-100%. Hai mẫu thu thập tại Phú Thọ năm 2013 (mẫu 13.143 và 13.141) có 100% độ tương đồng. Sự khác biệt về trình tự aa của VP1 giữa các mẫu CV-A24 tại Việt Nam dao động từ 0% - 3,8%. Trình tự gen VP1 của CV-A24v Việt Nam có độ tương đồng gần nhất với các chủng gây bệnh VKM tại Thái Lan năm 2014, lên đến >99% (96,7%-99,3%).

**Bảng 3.11. Vị trí đột biến axit amin trên gen VP1  
và tỷ lệ mẫu CV-A24 mang đột biến**

Vị trí thay đổi axit amin	Số lượng mẫu mang đột biến		
	CV-A24v		CV-A24 (n=73)
	Tại Việt Nam (n=11)	Trên thế giới (n=259)	
S11T	11 (100%)	253 (97,68%)	7 (9,59%)
L25H/P	10 (90,91%)	244 (94,21%)	7 (9,59%)
S32L/P	10 (90,91%)	253 (97,68%)	9 (12,33%)
K103R	11 (100%)	249 (96,14%)	9 (12,33%)
A111P	-	2 (0,77%)	65 (89,04%)
D116N	-	2 (0,77%)	57 (78,08%)
L159I	-	2 (0,77%)	65 (89,04%)
V224T/A/D	-	2 (0,77%)	63 (86,3%)
Y230F	-	1 (0,39%)	42 (57,53%)
F250Y	11 (100%)	254 (98,07%)	11 (15,07%)
I259V	-	1 (0,39%)	44 (60,27%)

Vị trí các vòng chức năng (functional loop) được xác định là BC (vị trí aa 95 - 99), DE (aa 145 - 155) và HI (aa 247 - 254). Trình tự aa có độ tương đồng với nhóm mẫu CV-A24 gây bệnh VKM tại các nước như Thái Lan, Trung Quốc, Đài Loan, Nhật Bản và Ai Cập. Bảng 3.11 liệt kê cụ thể các đột biến điển hình để phân biệt giữa CV-A24v gây bệnh VKM và CV-A24 cũng được tìm thấy ở nhóm mẫu CV-A24v gây bệnh TCM tại Việt Nam là S11T, L25H/P, S32L/P, A111P, D116N, L159I, V224T/A/D, Y230F, F250Y, I259V. Bên cạnh đó, các mẫu thu thập tại Hải Phòng là 13.168 và 14.315 tại Ninh Bình xuất hiện các đột biến A171G, T294Y, A298S, V299R và T304Y. Đây là các đột biến chỉ thấy xuất hiện tại 2 trình tự từ Thái Lan gây bệnh VKM cùng thời điểm năm 2014.

## **CHƯƠNG IV: BÀN LUẬN**

Tác nhân gây bệnh TCM là vi rút VRĐR. Trong đó, EV-A71, CV-A16, CV-A6 và CV-A10 là các týp vi rút gây bệnh thường gặp, một số VRĐR khác thuộc coxsackie loài A, B và các vi rút echo... cũng là căn nguyên gây bệnh. Trái với lượng lớn nghiên cứu về EV-A71, các nghiên cứu về VRĐR khác còn hạn chế. Đa phần nghiên cứu hiện nay dừng ở phát hiện tỷ lệ gây bệnh. Luận văn là một trong những nghiên cứu bài bản đầu tiên mang tính hệ thống theo trong thời gian dài phân tích sự lưu hành của các VRĐR “ngoài EV-A71” và đặc điểm di truyền phân tử gen VP1 của chúng. Nghiên cứu góp phần bổ sung các thông tin về vai trò gây bệnh, sự lưu hành về hai tác nhân chính CV-A6 và CV-A16 cũng như cung cấp các thông tin hiện đang thiếu trên y văn đối với các tác nhân phụ gây bệnh nổi trội gồm CV-A10, CV-A2, CV-A4, E-18 và CV-A24. Chính vì vậy, đề tài nghiên cứu không chỉ mang tính mới đối với thời sự khoa học tại Việt Nam mà còn cập nhật với thời sự khoa học quốc tế, bắt kịp "nhu cầu" nghiên cứu khoa học đang được các nhà khoa học quốc tế quan tâm.

### **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 týp vi rút đường ruột theo thời gian**

Trong giai đoạn 2008-2018, tại miền Bắc Việt Nam, EV-A71 là tác nhân gây bệnh nổi trội nhất. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu được công bố trước đây tại Việt Nam như tại miền Bắc là của các nhóm tác giả Trần Như Dương, Nguyễn Thị Hiền Thanh (năm 2011, 2012), của Trần Thị Nguyễn Hòa và cs (năm 2015-2016) hoặc tại miền Nam của tác giả Hoàng Quốc Cường tại Đồng Tháp (năm 2014) [5, 6, 8, 10, 17]... So sánh với nghiên cứu tại quốc gia khác trong khu vực cũng thấy có kết quả tương đồng. Cụ thể EV-A71 là tác nhân chiếm ưu thế nhất tại Thượng Hải, Trường Sa (Trung Quốc) năm 2012-2013, Trùng Khánh (Trung Quốc) từ 2009-2016, Thái Lan (2017) [45, 142, 145, 191]. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu cũng cho thấy vai trò quan trọng của các týp VRĐR “ngoài EV-A71” trong việc gây bệnh TCM khi chiếm đến 64,96% tổng số mẫu dương tính. Đặc biệt như năm 2017, VRĐR “ngoài EV-A71” đã

chiếm tới 97,26%. Điều này nhấn mạnh tầm quan trọng giám sát các tác nhân VRĐR “ngoài EV-A71” bên cạnh EV-A71 trong giám sát bệnh TCM.

Tác nhân CV-A6 phân lập lần đầu tiên năm 1949 tại Mỹ nhưng được coi là căn nguyên của một bệnh nhiễm vi rút không triệu chứng và phần lớn bị bỏ qua cho đến năm 2008 khi có sự xuất hiện biến thể đi kèm với sự thay đổi về kiểu hình lâm sàng, CV-A6 bắt đầu gây dịch bệnh TCM ở Phần Lan [35, 38]. Sau đó, CV-A6 nhanh chóng lan rộng ra các quốc gia, trở thành tác nhân chính gây ra bệnh TCM, thậm chí có những năm còn chiếm ưu thế rất cao, làm “lu mờ” EV-A71 và CV-16. Trên thế giới, CV-A6 có liên quan đến sự bùng phát bệnh TCM một số nước như Tây Ban Nha năm 2011 (90% trường hợp mắc), Thái Lan năm 2012 (~ 33% số ca mắc), Bắc Kinh (Trung Quốc) năm 2013 (35,4% số ca mắc). Thời gian bắt đầu xuất hiện và gây bệnh TCM của CV-A6 tại Việt Nam là vào khoảng năm 2010, lưu hành rộng rãi từ năm 2011. Tại miền Nam Việt Nam, nghiên cứu của tác giả Nguyễn Tố Anh cho thấy tỷ lệ phát hiện CV-A6 năm 2011 là 6%, gia tăng nhanh ở giai đoạn 2012-2015 với tỷ lệ tương ứng là 13%, 15%, 32% và 29% [99, 122, 127, 143]. Kết quả của đề tài cho thấy CV-A6 được phát hiện lần đầu tiên vào năm 2011 với tỷ lệ phát hiện cao (129/551 mẫu, 23,41%), lưu hành trên nhiều tỉnh/thành đã góp phần cung cấp bằng chứng thực tế cho giả thuyết về thời điểm bắt đầu lưu hành của CV-A6 ở Việt Nam cũng như bổ sung thêm minh chứng cho sự bùng phát của CV-A6 trong giai đoạn 2011-2012 trên thế giới [127].

CV-A16 là một trong hai tác nhân chính gây bệnh phổ biến “ngoài EV-A71”. Các đợt bùng phát TCM trên quy mô lớn do nhiễm CV-A16 đã được ghi nhận tại Úc (1991), Anh và xứ Wales (1994), Singapo (2002, 2005, 2007), Đài Loan (1999-2006), Ấn Độ (2009), Bắc Kinh-Trung Quốc (2007) [27, 33, 59, 87, 210]. Trong đề tài, CV-A16 xuất hiện sớm hơn CV-A6 vào năm 2008. Hai năm 2009-2010 không thấy có nhưng lại có tỷ lệ cao vào năm 2011, 2012, 2014 và 2017. Điều này tương tự như kết quả nghiên cứu tại các quốc gia lân cận. Cụ thể tại Singapo trong nghiên cứu kéo dài 7 năm (2001-2007) tỷ lệ phát hiện CV-A16 dao động từ 5,5% - 76,2% và là tít VRĐR chiếm ưu thế vào các năm 2002 (76,2%), 2004 (66,8%), 2007 (64,9%) [27]. Một ví dụ khác là nghiên cứu được thực hiện tại Quảng Châu (Trung Quốc) từ 2008 - 2010 cũng



cho thấy tỷ lệ CV-A16 là 23% hoặc tại Bắc Kinh (Trung Quốc) từ 2009 -2015 thì có tỷ lệ nhiễm dao động hàng năm 28,9 %-54,3% [99].

Đa phần nghiên cứu về CV-A6 và CV-A16 tập trung trong khoảng thời gian ngắn (vài năm) do đó chưa đủ để có thể xác định được đặc điểm quy luật lưu hành của chúng. Dựa trên thời gian thu thập mẫu dài, đề tài bước đầu đã làm rõ đặc điểm quy luật lưu hành của hai týp VRĐR này tại miền Bắc Việt Nam. Xu hướng trở thành tác nhân lưu hành nổi trội trong năm của CV-A16 thường có mối tương quan “ngược” với EV-A71. Nghiên cứu của tác giả tác giả Ya Fang Hu (2021) tại Bắc Kinh giai đoạn 2010 - 2019 đưa ra nhận định lưu hành của CV-A6 trái chiều với CV-A16 và EV-A71. Năm 2012, khi CV-A16 và EV-A71 là tác nhân gây bệnh chính thì CV-A6 rất thấp. Năm 2013 có sự đảo lại khi CV-A6 trở thành tác nhân chính và thay thế cho CV-A16 và EV-A71 [75]. Như vậy, sự lưu hành của CV-16 và EV-A71 tại quốc gia này không có quy luật ngược chiều. Điều đó cho thấy chu kỳ lưu hành và mối liên quan giữa ba tác nhân chính tại mỗi quốc gia có thể có sự khác biệt. Chính vì vậy, cần có sự theo dõi lâu dài để xác định thay đổi mang tính chu kỳ của ba tác nhân và mối liên quan của chúng trên phạm vi toàn cầu.

So với EV-A71 hay CV-A6 và CV-A16, lượng mẫu CV-A10 rất thấp (68/2603 mẫu, 2,61%) nhưng cao hơn các tác nhân phụ khác rất nhiều. CV-A10 xuất hiện lần đầu trong nghiên cứu vào năm 2008. Cùng thời điểm này chúng cũng được phát hiện tại Tây Ban Nha trên bệnh nhân đồng nhiễm TCM và nấm móng [55]. Ba năm 2009, 2010 và 2012 không phát hiện được mẫu nào, các năm còn lại đều xuất hiện và có xu hướng tăng dần qua các năm thông qua số lượng mẫu thu thập được tăng vào các năm 2014, 2016, 2018. Tương tự như CV-A6, CV-A10 là một týp VRĐR được coi là tác nhân mới nổi của bệnh TCM. CV-A10 đột ngột chiếm ưu thế trở thành týp huyết thanh chiếm ưu thế hoặc đứng thứ hai trong các đợt bùng phát bệnh TCM đã được báo cáo ở Phần Lan (2008), ở Pháp (2010), hoặc nhận định của tác giả Tianjiao Ji tại Trung Quốc (2018) khi nghiên cứu tác nhân này trong 8 năm (2008-2016) [38, 82, 111, 119].

Thời gian dài (2008-2018) là cơ hội tốt cho việc thực hiện nghiên cứu về đặc điểm lưu hành và di truyền phân tử của CV-A4, CV-A2, E-18 và CV-A24 liên quan

đến bệnh TCM mà chưa được báo cáo trước đây ở Việt Nam. Các tác nhân này thường chủ yếu được đề cập trên bệnh VHH, VN, VKM. Các đợt bùng dịch VHH, VN hay VKM do chúng gây ra thường xuyên được báo cáo ở Pháp, Nhật Bản, Đài Loan, Trung Quốc, Hàn Quốc và Thái Lan, và những vi rút này luôn được xác định là tác nhân gây bệnh chính [31, 43, 44, 48, 51, 58, 61, 62, 79, 95, 119, 171]. Chính vì vậy, chúng được tập trung nghiên cứu trên phương diện là tác nhân gây các bệnh này chứ không phải là bệnh TCM. Tuy nhiên, các báo cáo về CV-A2, CV-A4, E-18 liên quan đến các trường hợp lẻ tẻ và bùng phát bệnh TCM và không phải bệnh TCM ngày càng tăng. Chính vì vậy, gần đây chúng bắt đầu được đề cập trong một số nghiên cứu như CV-A2, CV-A4, E-18 tại Trung Quốc, E-11 tại Thái Lan [29, 51, 66, 194, 204]. Điều này cho thấy mặc dù thực tế đây là các tác nhân phụ nhưng do là vi rút ARN có khả năng tiến hóa cao nên các VRĐR đã liên tục xuất hiện biến đổi, đã là tác nhân chính gây các bệnh khác và hoàn toàn có thể trở thành tác nhân gây bệnh TCM mới nổi. Do đó cần có nghiên cứu về sự lưu hành cũng như đặc điểm dịch tễ của các tác nhân phụ này nhằm hỗ trợ giám sát đối với dịch TCM [66, 115, 179, 194, 204].

Hai tác giả Margarita Pons Salort và Nicholas C.Grassly đã nghiên cứu về chu kỳ lưu hành của các kiểu VRĐR, bao gồm E-18 [141]. Sự bùng phát lưu hành gây bệnh VN/VMN của E-18 năm 2005/2006 được cho là liên quan đến sự thay đổi tính kháng nguyên, cùng thời điểm với sự xuất hiện của nhóm gen 5/phân nhóm gen 5-3 và với đột biến R84N trên vòng BC. Theo dự đoán của hai tác giả trên, E-18 sẽ xuất hiện trở lại sau khoảng 10 năm, vào khoảng 2015/2016. Dự đoán này khá phù hợp với tái lưu hành nổi trội của E-18 gây bệnh VN/VMN và TCM tại Trung Quốc năm 2015-2016 và Việt Nam năm 2016-2017 [47, 204]. Điều đáng lưu ý, mặc dù sự thay đổi kháng nguyên bề mặt được cho là góp phần tạo nên sự đa dạng và tăng khả năng lan truyền, bùng phát dịch của vi rút. Phân tích đặc điểm di truyền của E-18 cho thấy các chủng lưu hành gây bệnh TCM tại Việt Nam thuộc cùng phân nhóm 5-3 với các chủng gây bệnh VN/VMN và không có sự xuất hiện bất kỳ đột biến có ý nghĩa tại các vùng kháng nguyên quan trọng. Độ tương đồng nt cao với các chủng VMN tại Thái Lan và Trung Quốc (giai đoạn 2016-2017) trong cùng một thời điểm cho thấy

giữa các chủng E-18 gây bệnh VMN và TCM không có sự khác biệt về vật liệu di truyền. Kết quả nghiên cứu gợi ý sự xuất hiện E-18 tại Việt Nam sẽ mang cùng quy luật đồng lưu hành hay xuất hiện cùng thời điểm với các chủng ở các nước lân cận lưu hành gây bệnh viêm não và viêm màng não.

Trong giai đoạn 1986-2009, nghiên cứu của tác giả Magilé c. Fonseca và cs đã chỉ ra 5 vụ dịch VKM do CV-A24 tại Cu Ba có sự đồng xuất hiện cùng thời điểm với các vụ dịch các nước khác trên thế giới như Mexico, Trung Quốc, Thái Lan, Đài Loan và chu kỳ lưu hành của CV-A24v sẽ khoảng 5 năm/lần [60]. Chủng CV-A24 trong đề tài được thu thập chủ yếu vào năm 2013-2014 (13/14 mẫu) cùng thời điểm với các chủng thuộc nhóm CV-A24v gây dịch VKM tại Thái Lan. Đồng thời sau 5 năm, năm 2018 lại phát hiện được 1 mẫu CV-A24. Điều này cho thấy có thể CV-A24 gây bệnh TCM cũng sẽ tuân theo quy luật về chu kỳ lưu hành 5 năm như đối với dịch VKM.

Ngoại trừ năm 2015, số mẫu TCM được thu thập ở tất cả các tháng và sự dao động không quá khác biệt, các năm còn lại đều thấy xuất hiện “tháng đỉnh dịch”. Ba năm 2012, 2014 và 2018 đỉnh dịch cao nhất luôn rơi các tháng xuân hè/hè trong khi các năm còn lại đỉnh cao nhất lại rơi vào các tháng cuối năm các tháng. Điều đó cho thấy bệnh TCM tại miền Bắc có sự đa dạng trong quy luật phát triển nhưng có xu hướng gia tăng vào các tháng xuân hè (tháng 3-5) và/hoặc tháng hè thu (tháng 8-10). Nhận định này của nghiên cứu khá tương đồng với các nghiên cứu của nhóm tác giả khác ở cùng thời điểm tại miền Bắc Việt Nam như Nguyễn Ngọc Quỳnh, Hoàng Đức Hạnh tại Hà Nội giai đoạn 2011-2014, Trần Như Dương năm 2011-2012, Nguyễn Hiền Thanh năm 2013-2014, Trần Thị Nguyễn Hòa năm 2015-2016 [6, 8-10, 14, 17]. So sánh với nghiên cứu thực hiện tại miền Nam thấy có sự khác biệt về đỉnh dịch giữa hai miền. Miền Bắc năm thường có hai đỉnh dịch rõ ràng, đỉnh cao nhất xê dịch tùy thuộc vào điều kiện từng năm, còn tại miền Nam lại có xu hướng đạt đỉnh cao nhất vào tháng 9 [11, 13]. Điều này có thể là do điều kiện thời tiết khác biệt của hai miền. Tại miền Bắc, các đỉnh dịch xuất hiện khi có sự thay đổi nhiệt độ và khí hậu từ nồm ẩm sang nắng nóng (xuân hè) và nắng nóng sang mát dịu (hè thu) trong khi tại miền Nam dịch gia tăng khi bước vào mùa mưa với độ ẩm tăng cao. Xu hướng có các tháng dịch cao

điểm trong nghiên cứu cũng xuất hiện tại các nước lân cận. Ví dụ: tại Trung Quốc, dịch TCM cũng xuất hiện đỉnh dịch vào tầm tháng 4-6 và tháng 10-12, tại Nhật Bản là tháng 7 và tháng 9, tại Thái Lan là tháng 1-3 và 7-9 [65, 82, 91, 100, 115, 145, 147, 178]. Tuy nhiên, vị trí đỉnh dịch cao nhất trong năm có sự khác biệt đặc trưng cho từng nước. Giai đoạn 2006-2016, Trung Quốc thường có đỉnh dịch thứ nhất (tháng 4-6) cao hơn đỉnh dịch thứ 2 (tháng 10-12) còn tại miền Bắc Việt Nam lại không có quy luật này. Điều này có thể do sự khác biệt mang tính đặc trưng của địa lý, nhiệt độ, độ ẩm, mật độ dân cư, điều kiện vệ sinh và đặc điểm tác nhân gây bệnh của từng nơi là khác nhau [145]. Bên cạnh đó, các mẫu được thực hiện trong nghiên cứu đều được thu thập trong chương trình giám sát hằng năm. Lượng mẫu được thu thập phụ thuộc ít/nhiều vào việc triển khai của chương trình do đó để có cái nhìn khái quát hơn cần có lượng mẫu thu thập các tháng trong năm đều hơn và không phụ thuộc vào yếu tố chủ quan của chương trình.

#### ***4.1.2. Đặc điểm các týp vi rút đường ruột trong nghiên cứu theo địa lý***

Hai tác nhân chính CV-A6 và CV-A16 có sự lưu hành rộng tại nhiều địa phương. Trong năm đại dịch bùng phát trong cả nước (2011-2012) hai tác nhân này có mặt ở 26/26 tỉnh của nghiên cứu. Những năm thấp điểm nhất, CV-A6 cũng phát hiện được tại 5 tỉnh (năm 2017) và CV-A16 là 2 tỉnh (năm 2015, 2018). Điều này cho thấy sự lưu hành của CV-A6 và CV-A16 tại miền Bắc Việt Nam có diện rộng trên toàn quốc.

Trong 10 năm, CV-A10 được phát hiện trên tổng số 13 tỉnh/ thành như Thái Bình, Hải Phòng, Thanh Hóa, Ninh Bình. Trong đó tập trung chủ yếu tại Hải Phòng và Thái Bình. Các tỉnh còn lại xuất hiện nhỏ lẻ một mẫu. Điểm đáng lưu ý, là tại Hải Phòng và Thái Bình luôn phát hiện được CV-A10 ở tất cả các năm. Điều này cho thấy, mặc dù số lượng mẫu thu thập của CV-A10 so với CV-A6 hoặc CV-A16 không nhiều nhưng CV-A10 vẫn âm ỉ lưu hành. Thậm chí 2016 và 2018 tỷ lệ cao hơn dao động từ khoảng từ 5%-10% số mẫu dương tính (2016 là 26/258 mẫu, 10,07%) và 2018 là 21/377 mẫu, 5,57%). Điều này cho thấy tác nhân CV-A10 hoàn toàn có thể bùng phát thành các vụ dịch ở nhiều tỉnh/thành.

Sự phân bố của các týp VRĐR phụ không trải rộng trên nhiều tỉnh/ thành như CV-A6 hay CV-A16 nhưng mỗi týp VRĐR khác nhau lại có nét riêng. Đối với CV-A2 hay E-18, sự phân bố mà chỉ giới hạn ở một vài tỉnh (Hải Phòng, Thái Bình, Phú Thọ) gợi ý sự lưu hành của các týp VRĐR này hiện tại chỉ có thể giới hạn ở mức độ địa phương. Trái lại, các mẫu CV-A4 hay CV-A24 có sự phân bố không tập trung tại một địa điểm mà rải rác tại 7-8 tỉnh cho thấy tác nhân này không giới hạn trong mức độ lẻ tẻ vài nơi có mà thể lây lan trên diện rộng [44]. Đặc điểm này của các tác nhân phụ cũng tương đồng với nghiên cứu trên thế giới. Ví dụ nghiên cứu của tác giả Min Wang tại Sơn Đông -Trung Quốc (2019) cho thấy có 21 mẫu CV-A4 gây bệnh TCM từ năm 2014-2016 phổ biến tại 11 địa phương trong tỉnh [179].

#### ***4.1.3. Đặc điểm các týp vi rút đường ruột trong nghiên cứu theo độ tuổi***

Nhóm tuổi mắc bệnh chủ yếu là từ 12-23 tháng. Kết quả hoàn toàn phù hợp với các công bố trước đây về lứa tuổi mắc TCM tại Việt Nam cũng như nước ngoài như của tác giả Trần Thị Nguyễn Hòa và cs (năm 2015-2016), Đỗ Trần Hùng tại Cần Thơ (năm 2011), Đoàn Ngọc Minh Quân tại Miền Nam Việt Nam (2013-2016), tác giả Zhang Jing (2008-2009), Li Qi và cs (2009-2016) tại Trung Quốc [10, 12, 13, 85, 145]. Độ tuổi mắc bệnh thấp nhất là từ 0-5 tháng và 48-60 tháng. Giải thích cho điều này là do trẻ dưới 1 tuổi chủ yếu bú mẹ. Sữa mẹ chứa yếu tố miễn dịch đã thúc đẩy quá trình phát triển của hệ tiêu hóa, ngăn chặn xâm nhập phát triển của vi rút lạ. Điều đó giúp trẻ có khả năng chống lại quá trình nhiễm bệnh. Do đó tỷ lệ nhiễm bệnh dưới 1 tuổi thấp. Giai đoạn từ 1-2 tuổi, trẻ bắt đầu có ý thức tìm tòi, cầm – nắm – gắp các thứ để tìm hiểu thế giới nhưng còn quá nhỏ để có nhận thức về việc tự vệ sinh cá nhân trong sinh hoạt hằng ngày. Bên cạnh đó, độ tuổi này nguồn sữa mẹ cung cấp không còn như xưa đồng thời trẻ không còn sống trong môi trường chỉ có gia đình mà bắt đầu đi nhà trẻ. Điều này khiến trẻ có thể tiếp xúc với các nguồn lây bệnh (nếu có) nhiều hơn. Do đó, tỷ lệ trẻ nhiễm bệnh tăng cao lên nhanh chóng. Cùng với thời gian, hệ thống miễn dịch của trẻ hoàn thiện, do đó, khi trẻ trên 3 tuổi và đặc biệt trên 5 tuổi, tỷ lệ mắc bệnh TCM của trẻ thấp đi rất nhiều [106, 147].

Một điểm đáng lưu ý là hai tác nhân CV-A6 và CV-A10 cho thấy có độ tuổi mắc bệnh “sớm hơn” so với các kiểu huyết thanh gây bệnh TCM “truyền thống” là EV-A71 và CV-A16. Đây là một điểm mới đáng lưu ý khi trước đây có báo cáo rằng không có sự khác biệt đáng kể về phân bố tuổi giữa bệnh TCM do CV-A6 và các bệnh TCM do HEVA khác ở Châu Á [35]. Ngoài nguyên nhân lý giải chung ở trên, theo nghiên cứu huyết thanh học, trên 50% trẻ em dưới 5 tuổi thiếu kháng thể trung hoà chống lại EV-A71 và CV-A16 và mức độ kháng thể chống lại VRĐR tăng theo tuổi, do đó có nhiễm trùng không triệu chứng [211]. Đối với các tác nhân phụ không phát hiện thấy có mẫu TCM nào thuộc nhóm tuổi từ 48-59 tháng. Tại các nhóm tuổi khác có số lượng các mẫu thu thập không đồng đều. Tuy nhiên các nghiên cứu tương tự về độ tuổi mắc bệnh của các tác nhân phụ hiện vẫn còn hạn chế để có thể thực hiện việc so sánh.

#### ***4.1.4. Đặc điểm các tít vi rút đường ruột trong nghiên cứu theo mức độ lâm sàng***

TCM là bệnh tương đối lành tính, phần lớn trường hợp nhiễm diễn biến tự khỏi, tuy nhiên bệnh có khả năng gây ra dịch lớn và có thể gây một số biến chứng nguy hiểm như viêm não – viêm màng não, viêm cơ tim, phù phổi cấp dẫn đến tử vong nếu không được phát hiện sớm và xử trí kịp thời [184]. Điều này phù hợp với kết quả nghiên cứu khi tại miền Bắc giai đoạn 2008-2018 khi có tới hơn 89% (1751/1953) số trường hợp ở mức độ lâm sàng nhẹ (độ lâm sàng 1 và 2a). Số trường hợp ở mức độ lâm sàng nặng trên 2b trên 10%. Như vậy, bên cạnh việc kiểm soát dịch bệnh TCM, triển khai nghiên cứu vắc xin cũng như điều trị đối với TCM là một điều hết sức cần thiết. So sánh với nghiên cứu khác của các tác giả trong nước, kết quả nghiên cứu của đề tài có nét tương đồng. Cụ thể, tỷ lệ % mẫu TCM có độ lâm sàng nhẹ tại miền Bắc của nhóm tác giả Trần Như Dương năm 2011 là 99,3%, của Ngô Huy Tú và cs giai đoạn 2012-2014 có tỷ lệ độ lâm sàng 1 và 2 là (96,51%), tại miền Nam là 97,7% (năm 2011) và 96,1% (năm 2012) theo nghiên cứu của Phan Công Hùng [6, 11, 21].

Ngoài tác nhân CV-A6 và CV-A16, tác nhân phụ là CV-A24 và CV-A4 cũng ghi nhận có trường hợp độ lâm sàng nặng (2b). Các trường hợp nhiễm CV-A4 thường không có triệu chứng nhưng tác nhân này cũng dẫn đến một phổ rộng các bệnh lâm

sàng từ nhẹ tới nặng hoặc thậm chí tử vong như herpangina, viêm cơ tim ... [23, 103]. CV-A24 đã từng gây ra các vụ dịch viêm kết mạc lớn tại nước Singapo (2005), Trung Quốc (2010), Pháp (2015) [36, 114, 196]. Trong một nghiên cứu được thực hiện trong giai đoạn 2011-2014 ở miền Nam Việt Nam, cho thấy 27% tổng số mẫu TCM có mức độ lâm sàng từ 2b có tác nhân gây bệnh là VRĐR phụ [14]. Trong đề tài, 11/62 các trường hợp nặng liên quan đến biến chứng thần kinh và hô hấp do VRĐR “ngoài EV-A71” gây ra. Do đó, việc xuất hiện các ca bệnh nặng liên quan đến TCM của các tác nhân này cần được cân nhắc xem xét đồng thời phân tích mối liên quan giữa các chủng gây bệnh TCM và các 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**

VP1 là vùng tập trung chủ yếu các vị trí quyết định kháng nguyên, độc lực vi rút, sự tương tác giữa vi rút và tế bào vật chủ. Nghiên cứu cũng chỉ ra VP1 là vùng gen có tính biến đổi lớn. Sự biến đổi liên tục trên vùng gen VP1 có thể là cơ chế sinh học phân tử giải thích sự tồn tại và lưu hành của vi rút trong cộng đồng.

Các nghiên cứu dịch tễ học phân tử thường sử dụng gen VP1 vì VP1 là vùng bộc lộ và có tính trội miễn dịch nhất trong số các protein của vỏ capsid và vì thế thường thay đổi để đáp ứng với áp lực của miễn dịch. Phân tích đặc điểm di truyền phân tử gen VP1 còn là công cụ có giá trị trong việc truy vết sự lưu hành của các chủng VRĐR bằng cách so sánh những biến đổi di truyền nguồn gốc tiến hóa và địa lý của một chủng vi rút nào đó. Đối với phân tích dịch tễ học phân tử, trình tự toàn bộ gen VP1 nên được xác định và phân tích tuy việc định danh chỉ cần một đoạn ngắn trong VP1. Ngoài ra, các phân tích di truyền phân tử VP1 còn có ý nghĩa trong nghiên cứu và phát triển vắc xin phòng bệnh TCM.

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

Nghiên cứu trong khoảng thời gian dài đã cung cấp các thông tin đầu tiên về sự lưu hành của của hai tác nhân gây bệnh chính “ngoài EV-A71” là CV-A6 và CV-A16

tại miền Bắc Việt Nam về chu kỳ lưu hành, độ tuổi nhiễm bệnh chủ yếu, mức độ lâm sàng mà các nghiên cứu trước đây chưa làm sáng tỏ [73, 127]. CV-A6 và CV-A16 là hai týp VRDR được phát hiện nhiều nhất, thường xuyên nhất và cao hơn nhiều so với CV-A10 hay các tác nhân phụ khác. CV-A6 và CV-A16 cũng cho thấy sự phân bố toàn cầu. Sự lưu hành phổ biến của CV-A6 và CV-A16 đã được ghi nhận trong nhiều nghiên cứu trước đây thực hiện tại nhiều quốc gia [35, 49, 113, 127]. Thay đổi về tỷ lệ lưu hành của CV-A16 được thể hiện trong nghiên cứu kéo dài 3 năm tại Bắc Kinh và Quảng Châu (Trung Quốc) và một nghiên cứu khác kéo dài 7 năm tại Singapo [30, 113]. Tại Việt Nam, nghiên cứu của tác giả Nguyễn Tô Anh và cs trong 5 năm (2011-2015) đã phân tích tiến hóa trên gen VP1 của CV-A6 có liên quan đến các đợt bùng phát dịch TCM tại Việt Nam và đưa ra nhận định CV-A6 bắt đầu lưu hành vào tháng 10/2011 (95% CI, 5/2010-3/2011) [127]. Trong nghiên cứu này, đề tài đã cung cấp bằng chứng cho giả thuyết về thời gian bắt đầu lưu hành CV-A6 gây bệnh TCM ở Việt Nam và trở thành týp VRDR gây bệnh TCM chiếm ưu thế trong năm 2011 tương tự như nghiên cứu tại Nhật Bản [141]. Sự thay đổi kiểu hình có thể liên quan đến sự phân bố toàn cầu của cụm gen CV-A6 ở châu Âu (từ năm 2008) và châu Á (từ năm 2010) bao gồm cả CV-A6 tại Nhật Bản và có thể tại cả Việt Nam vào cùng thời điểm.

Sub genogroup D3 là phân nhóm gen lớn nhất, chứa phần lớn các chủng CV-A6 mới nổi, lưu hành gây bệnh TCM từ năm 2008 như các chủng phân lập tại Nhật Bản từ năm 2010, tại Trung Quốc từ năm 2008, miền Nam Việt Nam giai đoạn 2011-2015... [121, 161, 177]. Phần lớn các trình tự CV-A6 trong nghiên cứu (>98%) thuộc về sub genogroup D3. Bên cạnh đó, các trình tự CV-A6 trong đề tài 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 này có khả năng lưu hành gây bệnh mang tính toàn cầu. Ngoài ra, genotype và sub genogroup lớn nhất mà các trình tự CV-A6 của Việt Nam thuộc về cũng bao gồm tất cả trình tự CV-A6 được báo cáo là có liên quan đến bệnh TCM có độ lâm sàng nặng tại Trung Quốc và Việt Nam [46, 127]. Sự lưu hành liên tục của CV-A6 thuộc D3 ở Trung Quốc đại lục giai đoạn 2008-2013 của tác giả Yang Song cũng đã nhận định có sự dịch chuyển của sub genogroup CV-A6 tại



nước này trong giai đoạn 7 năm. Tác giả cho thấy có tới 734/807 trình tự thuộc sub genogroup này, xuất hiện vào năm 2008 đồng lưu hành cùng D2, trở thành kiểu gen chiếm ưu thế vào năm 2009, đạt đỉnh cao nhất vào năm 2013 và khẳng định là nguyên nhân gây bệnh TCM chủ yếu trong tương lai [161]. 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. Đáng lưu ý là trong năm 2017-2018 đã có sự dao động về độ tương đồng nt cao của CV-A6 (giá trị tương ứng là 89,9%-100% và 87%-100%) và chia thành các cụm nhỏ, sự khác biệt trình tự nt của các trình tự giữa các năm lên đến >10% tạo nên sự đa dạng về nguồn gốc của tít VRĐR trong thời gian này.

Các mẫu CV-A16 trong nghiên cứu đều thuộc genotype B, phân bố trên cả hai sub genogroup B1a (2008-2015) và B1b (2008-2018). Kết quả này tương tự với nghiên cứu của nhiều tác giả như Si-Jie He (2010), Wei Yong (2015), Zhenlu Sun (2018), Long Cheng (2020) tại Trung Quốc, Pirom Noisumdaeng (2018) tại Thái Lan... [46, 70, 131, 166, 199]. Trong sub genogroup B1a, CV-A16 có xu hướng nằm cùng nhóm với CV-A16 lưu hành tại nhiều quốc gia như Trung Quốc, Thái Lan, Úc, Malaysia... và chúng hiện lưu hành tại miền Nam Việt Nam cùng năm và theo thời gian chúng có sự đồng chuyển đổi tương tự các nước lân cận [49, 70, 137, 199].

Vắc xin là cách hiệu quả nhất để phòng ngừa và kiểm soát bệnh TCM. Phân tích về địa lý cho thấy CV-A16 và CV-A6 có sự lưu hành toàn cầu [69]. Các nghiên cứu tại Việt Nam cũng đưa ra nhận định tương tự đối với CV-A6 và CV-A16 khi các chủng Việt Nam tiến hóa tương tự như các chủng lưu hành trên toàn cầu. 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 của CV-A6 và CV-A16 trên toàn thế giới trong nhiều thập kỷ qua [96, 161, 207]. Hơn nữa, phân nhóm và kiểu gen phụ lớn nhất mà các chủng Việt Nam thuộc về cũng bao gồm tất cả các chủng CV-A6 và CV-A16 được báo cáo là có liên quan đến bệnh TCM nghiêm trọng ở Trung Quốc [159]. Nghiên cứu về sự lưu hành của kiểu sub genogroup D3 của CV-A6 tại Trung Quốc từ 2008-2015, tác giả Song đã đưa ra câu hỏi sau khi xuất hiện và tiếp tục tiến hóa, liệu có một kiểu gen (hoặc kiểu gen phụ) sẽ liên tục lưu hành trong một thời gian

tương tự như sub genogroup B1 của CV-A16 không? [207]. Kết quả có được từ đề tài đã cho thấy sub genogroup D3 của CV-A6 và subgenogroup B1 của CV-A16 vẫn luôn lưu hành dai dẳng và chiếm ưu thế. Do đó, hai sub genogroup này nên là đích quan trọng trong việc phân tích thông tin của CV-A6 và CV-A16 để thiết kế vắc xin. Vắc xin EV-A71 hiện nay đã qua giai đoạn thử nghiệm lâm sàng và được đưa vào sử dụng ở Trung Quốc từ năm 2016 [102, 209]. Các nghiên cứu về EV-A71 cho thấy tít VRDR này có sự thay đổi và quay trở lại trong việc lưu hành của các phân nhóm EV-A71 ở các quốc gia khác nhau trong đó có Việt Nam [56, 90, 128, 175]. Riêng tại Trung Quốc, sub genogroup C4 của EV-A71 được duy trì nhất quán ổn định và rất hiếm có sự xuất hiện của các sub genogroup khác lưu hành quốc tế tại đây trong hơn hai thập kỉ qua. Điều đó dẫn đến sự phát triển của vắc xin EV-A71 tại quốc gia này dựa trên phân nhóm gen C4 và chỉ giới hạn lưu hành tại thị trường nước này [57, 102]. Với thông tin cung cấp trong đề tài cho thấy, CV-A6 thuộc sub genogroup D3 có tính chất chiếm ưu thế và lưu hành toàn cầu. Việc nghiên cứu vắc xin đối với tác nhân CV-A6 thuộc sub genogroup này sẽ đáp ứng được việc phòng ngừa bệnh TCM không chỉ dừng lại ở một quốc gia cụ thể. Đối với CV-A16, các chủng thuộc cả sub genogroup B1a và B1b. Sub genogroup B1b tuy có số lượng lớn như phần lớn lại là các chủng thuộc Trung Quốc. Tại Việt Nam, 123/131 mẫu trong nghiên cứu thuộc B1a - là kiểu gen phụ có sự đa dạng của rất nhiều chủng tại nhiều quốc gia trên thế giới. Do đó, việc sản xuất vắc xin đối với tác nhân CV-A16 cần và nên dựa trên cả hai phân nhóm B1a và B1b để đảm bảo có thể sử dụng rộng rãi tại nhiều quốc gia không chỉ tại một quốc gia. Điều này đã được minh chứng thông qua nghiên cứu mới nhất của tác giả Yi Sheng Suna năm 2022 bước đầu vắc xin bất hoạt của CV-A16 ở chuột nhảy mã CV-A16 393 cho thấy các kháng thể được tạo ra có khả năng trung hòa cả B1a và B1b [165]. 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 thuộc VNM lineage gây bệnh Tay chân miệng tại miền Bắc Việt Nam giai đoạn 2008-2018 và sự mới nổi của CHN lineage vào năm 2018.***

CV-A10 là tác nhân đứng đầu trong nhóm tác nhân phụ. Việc triển khai đề tài

trong giai đoạn dài (2008-2018) tại miền Bắc Việt Nam đã tạo cơ hội để thực hiện nghiên cứu phân tử về CV-A10 liên quan đến bệnh TCM chưa được đề cập trước đây. Đây là tác nhân mới nổi gây ra nhiều vụ dịch TCM trên thế giới như Phần Lan (2008), Pháp (2010), Trung Quốc (2008-2012) [38, 71, 119]. Tương tự CV-A6, CV-A10 gần đây đã thu hút chú ý như một tác nhân chính gây bệnh TCM, bao gồm các trường hợp nặng [82, 111]. Trong đề tài này, CV-A10 được phát hiện năm 2008, đặc biệt chiếm tỷ lệ cao (>10%) tổng số các VRĐR được phân lập vào năm 2016 tại hai tỉnh Thái Bình và Hải Phòng. Bên cạnh đó, việc CV-A10 đôi khi nổi lên như một týp VRĐR chiếm ưu thế trong các vụ dịch TCM ở cả miền Bắc và miền Nam Việt Nam từ năm 2013 cho thấy CV-A10 đã xuất hiện, lưu hành tại Việt Nam trong một khoảng thời gian dài và cần được giám sát như một tác nhân chính.

Cây phát sinh chủng loài của CV-A10 được xây dựng cho kết quả tương tự hệ thống phân loại của một số tác giả trước đó như Ji T. (2018), Huifang T.(2017) [76, 82, 169]. Giai đoạn 2008-2017, ngoài trừ 1 mẫu thu thập tại Ninh Bình năm 2014 (mẫu 14.300) thuộc CHN lineage, 32 mẫu (96,97%) CV-A10 từ năm 2011 đến 2018 thuộc VNM lineage với độ tương đồng nt cao, các trình tự thu thập từ mẫu năm 2016 độ tương đồng lên đến 100%. Bên cạnh đó, trong VNM lineage, chỉ có 6 trình tự (11,53%) xuất hiện lẻ tẻ từ Trung Quốc các năm 2016, 2017 (trên người khỏe mạnh) và 2019 (trên bệnh nhân TCM). Điều này cho thấy đây là lineage được hình thành từ CV-A10 lưu hành tại Việt Nam, đồng thời có sự di chuyển về địa lý sang quốc gia khác. Năm 2018, 6/13 mẫu (46,15%) năm 2018 thu thập tại Hà Nội và Thái Bình, tiếp tục thuộc VNM lineage và có độ tương đồng nt cao so với các trình tự thu thập tại Thái Bình và Hải Phòng năm 2016-2017 gợi ý cho thấy các chủng CV-A10 năm 2016-2017 đã tiếp tục lưu hành và lan rộng sang tỉnh/ thành khác (Hà Nội).

7/13 mẫu (53,84%) còn lại của năm 2018 thuộc CHN lineage. Tất cả các mẫu này đều được thu thập tại Hải Phòng và Thái Bình với độ tương đồng nt trên 99%. Đồng thời, độ tương đồng nt của chúng với các mẫu thu thập tại Trung Quốc cùng thời điểm dao động (97,29%-99,55%) cao hơn so với trình tự thu thập năm 2014 (96,72%-97,96%) cùng lineage. Điều này cho thấy năm 2018, CHN lineage đã có sự xuất hiện

lại tại Việt Nam (sau khi năm 2014 chỉ có 1 mẫu và sau đó không thấy có xuất hiện từ năm 2015-2017) với lượng mẫu nhiều hơn, lưu hành giới hạn trong một vài địa phương. Theo tác giả Tianjiao Ji, hai đột biến G23V, I283V tại CHN lineage 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 [82]. CV-A10 thuộc CHN lineage xuất hiện tại Việt Nam năm 2018 đều mang các đột biến. Điều này đưa ra câu hỏi về khả năng lưu hành của CV-A10 thuộc CHN lineage tại Việt Nam trong các năm tiếp theo. Liệu có sự thay thế của các chủng thuộc 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 có sự 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 giai đoạn 2008-2018 thuộc genotype phổ biến lưu hành nhưng có xu hướng hình thành nên dòng lưu hành mang tính địa phương (local lineage)***

Dựa trên cơ sở phân tích cây phát sinh chủng loài gen VP1, các chủng CV-A4 và CV-A2 của Việt Nam có hai đặc điểm. Trước hết, chúng thuộc genotype phổ biến. Cây phát sinh chủng loài của CV-A2, có sự phân loại các genotype tương tự như hệ thống phân loại của các tác giả Yuwei Weang (2017), Yang (2018) [182, 193, 194]. Trong đó, 8/9 mẫu CV-A2 thuộc genotype C - nơi tập trung các chủng được thu thập từ Nga, Mỹ, Ấn Độ, Úc, Anh ... trên các đối tượng bệnh nhân LMC, VN. Tương tự, 11/13 trình tự CV-A4 của nghiên cứu cũng tập trung trong sub genotype C2 (thuộc genotype C) là sub genotype có sự đa dạng của CV-A4 thu thập tại nhiều nước Trung Quốc, Ấn Độ, Úc... và hầu hết liên quan đến các bệnh không phải TCM [112, 149]. Như vậy cả hai tít VRĐR này đều thuộc genotype phổ biến lưu hành toàn cầu, gây ra các bệnh khác 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”. Cụ thể, 8/9 mẫu CV-A2 thuộc sub genotype C3 với giá trị bootstrap lên đến 100%, đồng thời sự có 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. Tương tự như vậy, đối với CV-

A4, 11/13 trình tự 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. Bên cạnh đó, 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. Theo nghiên cứu của tác giả Yang và cs, các chủng CV-A2 gây bệnh TCM ở Trung Quốc từ năm 2008 có sự lưu hành dai dẳng của CV-A2 thuộc genotype D [193]. Ngược lại, trong nghiên cứu của chúng tôi, hầu hết các chủng CV-A2 ở Việt Nam thuộc một dòng địa phương duy nhất của genotype C. Hai điểm này của CV-A4 và CV-A2 cho là minh chứng cho giả thuyết rằng sự lưu hành của CV-A2 hay CV-A4 phụ thuộc vào vị trí địa lý và khả năng lưu hành phổ biến như đã được đề cập trong một số nghiên cứu trước đây [83, 193, 194].

Năm 2014, có xuất hiện xuất hiện 2 chủng CV-A4 thu thập năm 2014 thuộc genotype B. Tuy nhiên, sau năm 2014, không thấy xuất hiện genotype B nữa. Vậy, liệu trong tương lai, genotype B này có khả năng lưu hành song song cùng với sub genotype C2 hay không? Đối với CV-A2, tại năm lưu hành nổi trội (năm 2017) có phát hiện 1 mẫu (17.033 thu thập Hải Phòng) thuộc genotype D là genotype có số lượng mẫu chủ yếu được phân lập tại Trung Quốc cho thấy genotype “nội địa” này đã có “dấu hiệu” xuất hiện tại Việt Nam. Việc genotype này có trở thành genotype chiếm ưu gây bệnh chủ yếu thế tương tự như đang diễn ra tại Trung Quốc cũng là câu hỏi được đưa ra với việc giám sát CV-A2 [193].

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

Trên thế giới, tác nhân CV-A2 chưa được nghiên cứu nhiều, chủ yếu tập trung trên đối tượng bệnh nhân mắc LMC hoặc VHH [50, 79, 193, 198]. Đối với bệnh TCM, có một vài báo cáo lẻ tẻ của tác giả Y. F. Hu (2011), Qian Yang (2016) cho thấy tác nhân này đã xuất hiện và gây bệnh tại Trung Quốc [76, 194]. Tại Việt Nam, CV-A2 chỉ mới được đề cập đến trong một số bài báo về đặc điểm dịch tễ chung của các tác

nhân TCM, chưa phân tích sâu về đặc điểm phân tử [170]. Típ VRĐR CV-A4 được phân lập lần đầu tiên từ nước thải trong đợt bùng phát dịch bại liệt tại Bắc Carolina (Mỹ) năm 1948 (chủng AY421762.1) [118, 133]. Từ năm 2003, các ca bệnh và đợt dịch bùng phát do CV-A4 đã được phát hiện và CV-A4 cũng được phát hiện lưu hành với tần suất ngày càng tăng tại một số quốc gia trên thế giới như Trung Quốc, Đài Loan, Singapore, Thái Lan, Úc [51, 54, 144, 172, 187, 192]. CV-A4 được báo cáo là một nguyên nhân trong các vụ vùng phát dịch TCM năm 2009, 2014, 2016 tại Trung Quốc, dịch sốt tại Bắc Kinh (Trung Quốc) năm 2011, VHH và TCM tại Đài Loan năm 2004, 2006, tại Trung Quốc năm 2015, 2016, 2018, viêm mạch máu (bệnh Kawasaki) tại Nhật Bản năm 2015, LMC tại Singapore (2008), Ấn Độ (2008) [23, 51, 66, 98, 173, 187]. Với E-18, típ VRĐR này thường được báo cáo là căn nguyên gây bệnh VN/VMN ở người mặc dù có báo cáo lẻ tẻ của hai mẫu thuộc nhóm gen 2 gây bệnh TCM tại Trung Quốc năm 2005 và năm 2011 [164]. Còn CV-A24 thu hút sự chú ý trong nghiên cứu vì nằm trong nhóm 10 tác nhân VRĐR có số mẫu cao nhất khi tổng kết kết quả giám sát VRĐR gây bệnh TCM tại miền Bắc Việt Nam giai đoạn 2008-2018. Thực tế nghiên cứu của bốn típ VRĐR trên cho thấy cần hiểu biết nhiều hơn về sự đa dạng của các tác nhân gây bệnh TCM.

Hầu hết/tất cả các chủng CV-A4, CV-A2, E-18 hay CV-A24 của Việt Nam thuộc về kiểu gen trước đây bao gồm các chủng được phân lập ở nhiều quốc gia khác nhau và có liên quan đến các bệnh không phải TCM. Như phân tích ở mục 4.2.3, 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. Cây phát sinh chủng loài cho thấy 100% các chủng E-18 ở cùng phân nhóm 5-3 với các chủng gây bệnh VN/VMN còn CV-A24 thuộc về nhóm GIV-C5 gồm các chủng gây bệnh VKM. Bên cạnh đó, so sánh về trình tự aa tại vị trí vòng chức năng của CV-A2 và CV-A4 không thấy có sự khác biệt giữa các chủng Việt Nam gây bệnh TCM và các chủng gây LMC hay VHH trên thế giới. Các chủng E-18 gây bệnh VMN và TCM không có sự khác biệt về vật liệu di truyền, tương tự với công bố trước đây của Chen và cs công bố năm 2019 [47]. E-18 không có sự xuất hiện bất kỳ đột biến có ý nghĩa tại các vùng kháng nguyên quan trọng. Sự tương đồng cao lên đến

100% về trình tự nt và aa của VP1 giữa các mẫu CV-A24 phát hiện tại Việt Nam với các chủng gây VKM tại Thái Lan. Không chỉ có vậy, sự xuất hiện và gây bệnh/dịch bệnh TCM của các chủng VRĐR này diễn ra đồng thời đi kèm với các chủng ở các nước lân cận. Sự lưu hành của CV-A2 ở các tỉnh miền Bắc Việt Nam (2016-2017) diễn ra gần như cùng thời điểm xuất hiện các ca bệnh TCM tại Trung Quốc (2015-2016). E-18 gây bệnh TCM tại Việt Nam năm 2016-2017 trong cùng một thời điểm với các chủng VMN tại Thái Lan và Trung Quốc (giai đoạn 2016 - 2017) và có độ tương đồng cao. Sự xuất hiện tác nhân CV-A24 gây bệnh TCM tại các tỉnh miền Bắc Việt Nam vào năm 2013-2014 diễn ra cùng thời điểm xuất hiện dịch VKM tại Thái Lan (2014), dịch TCM và VHH tại Giang Tô (Trung Quốc) năm 2013-2014 [44, 189]. Tất cả các đặc điểm trên đưa ra có sự thay đổi/bổ sung thêm bệnh cảnh lâm sàng (clinical manifestation) tại các tốp VRĐR phụ. Cụ thể như với E-18 là sau khi thay đổi tính kháng nguyên và trở nên lưu hành gây bệnh VN/VMN nổi trội năm 2005/2006, phân nhóm gen 5-3 đã xuất hiện thêm đặc tính gây bệnh mới, là bệnh TCM hoặc nhóm mẫu CV-A24 gây bệnh TCM tại Việt Nam (2013-2014) với các chủng CV-A24 gây bệnh VKM trên thế giới (CV-A24v) không thay đổi về đặc điểm kháng nguyên mà chỉ bổ sung thêm đặc tính gây bệnh mới ngoài VKM. Sự thay đổi đặc tính gây bệnh này tương tự với báo cáo của CV-A6 khi thay đổi đặc tính gây bệnh, chuyển từ tác nhân gây viêm họng mụn nước thành tác nhân chính gây bệnh TCM sau giai đoạn 2008-2011 [141].

### **4.3. Hạn chế của đề tài**

Đây là một trong số ít nghiên cứu đầu tiên cung cấp các thông tin về đặc điểm dịch tễ học VRĐR và đặc điểm sinh học phân tử vùng gen VP1 của các tác nhân VRĐR “ngoài EV-A71” gây bệnh TCM tại miền Bắc Việt Nam giai đoạn 2008-2018. Tuy nhiên, nghiên cứu còn có một số hạn chế.

Trước hết, do toàn bộ lượng mẫu được thập trong chương trình giám sát dịch TCM, do đó, lượng mẫu được gửi về PTN phụ thuộc vào việc thực tế triển khai chương trình hằng năm. Vào các tháng đầu năm (Quý I), lượng mẫu nhận về thường ít do đó đặc điểm về đỉnh dịch vào các tháng xuân hè của bệnh TCM không được thể hiện rõ.

Nghiên cứu của luận án hiện đang mới chỉ giới hạn vào vùng gen VP1 chưa phân tích các gen khác như VP3, 2A hoặc toàn bộ hệ gen của các tác nhân. Do đó chưa thể đánh giá đầy đủ về đặc điểm phân tử của các týp VRĐR này.

Hiện nay, số lượng các nghiên cứu về vai trò các týp vi rút CV-A2, CV-A4, E-18 và CV-A24 trong việc gây bệnh TCM còn hạn chế. Chủ yếu các nghiên cứu đối với các týp VRĐR này được đề cập là trên các bệnh chính do chúng gây ra như viêm não/ viêm màng não, đau mắt đỏ... 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:**

- Trong tổng số 2603 mẫu dương tính với VRĐR, có 2404 mẫu được định danh, EV-A71 chiếm 35,04% tổng số mẫu dương tính và 44 tốp VRĐR còn lại chiếm 64,96%.

- Trong 44 tốp VRĐR “ngoài EV-A71”, CV-A6, CV-A16 và CV-A10 là ba tốp 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-11 (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 sự thay đổi, 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 được phát hiện đầu tiên vào năm 2011, liên tục duy trì là một trong ba tốp VRĐR lưu hành nổi trội giai đoạn 2011-2018, với tỷ lệ phát hiện hàng năm dao động từ 23,97% - 59,7%. Tính chu kỳ của CV-A6 không thể hiện rõ ràng như CV-A16 và 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 rộng rãi trên 26 tỉnh miền Bắc, CV-A10 được phát hiện ở 13 (50%) tỉnh, tuy nhiên sự phân bố có thể biến động theo năm, tùy thuộc vào thời điểm lưu hành gây dịch của từng tốp.

- 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 Thái Bình và Hải Phòng là hai tỉnh có chương trình giám sát trọng điểm nên số mẫu được xét nghiệm nhiều hơn.

- **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 theo nhóm tuổi của tác nhân gây bệnh TCM “mới nổi” CV-A6 và CV-A10 có xu hướng “trẻ hóa” so với sự phân bố của tác nhân “truyền thống” EV-A71 và CV-A16: tỷ lệ phần trăm tích ở các nhóm trẻ từ 6 tháng đến 3 tuổi lũy 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 TCM thể nặng kèm biến chứng thần kinh hoặc/và hô hấp có liên quan đến 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 về CV-A6\_D3 và 93,89% mẫu CV-A16 thuộc CV-A16\_B1a, đều là sub-genotype/sub-genogroup lớn nhất và bao 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 toàn 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 đều 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.
- Mẫu E-18 của Việt Nam đều 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.
- Toàn bộ 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 và có sự tương đồng cao (lên đến >99%) về trình tự nucleotide và axit amin vùng VP1 giữa các mẫu CV-A24v gây bệnh TCM tại Việt Nam và VKM tại Thái Lan và Trung Quốc.
- 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 đề 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.

## NHỮNG BÀI BÁO CÔNG BỐ CỦA NHÓM NGHIÊN CỨU

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

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### Tiếng Việt

1. Bộ Y tế (2010), Thông tư hướng dẫn chế độ khai báo, thông tin, báo cáo bệnh truyền nhiễm (48/2010/TT-BYT).
2. Bộ Y tế (2012), "1003/QĐ-BYT Về việc ban hành hướng dẫn chẩn đoán, điều trị bệnh Tay Chân Miệng".
3. Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương (2020), *Vi rút Y học*, Nhà xuất bản Y học.
4. Đào Thị Hải Anh, Vũ Hồng Nga, Nguyễn Thị Hiền Thanh, Lê Thị Quỳnh Mai, (2011), "Dịch tễ học phân tử vi rút đường ruột tıp 71 lưu hành ở Việt nam năm 2005-2008", *Tạp chí Y học dự phòng*. Tập XXI, số 3 (121), tr. 78-85.
5. Hoàng Quốc Cường, Hồ Xuân Nguyên, Nguyễn Thị Thanh Thảo và cs (2017), "Đặc điểm dịch tễ và xét nghiệm bệnh Tay Chân Miệng trong hộ gia đình tại Đồng Tháp, Việt Nam năm 2014", *Tạp chí Y học dự phòng*. Tập XXVII, số 11, tr. 120-128.
6. Trần Như Dương, Ngô Huy Tú, Vũ Đình Thiêm (2012), "Dịch tay chân miệng tại miền Bắc Việt nam, 2011", *Tạp chí Y học dự phòng* Tập XXII, số 7 (134), tr. 42-50.
7. Trần Như Dương, Nguyễn Trần Hiền, Ngũ Duy Nghĩa và cs, (2016), "Kết quả giám sát trọng điểm một số bệnh truyền nhiễm tại Miền Bắc Việt Nam, 2012-2015", *Tạp chí Y học dự phòng*. Tập XXVI, số 10 (183); tr. 10-19.
8. Trần Như Dương, Phạm Thị Cẩm Hà và cs (2013), "Đặc điểm dịch Tay Chân Miệng tại Miền Bắc Việt Nam, năm 2012", *Tạp chí Y học dự phòng*. Tập XXIII, số 11 (147), tr. 134-141.
9. Hoàng Đức Hạnh, Nguyễn Nhật Cẩm, Dương Hữu Huân và cs (2014), "Một số đặc điểm dịch tễ học bệnh Tay Chân Miệng tại Hà Nội năm 2013", *Tạp chí Y học dự phòng*. Tập XXIV, số 10 (159), tr. 24-29.
10. Trần Thị Nguyễn Hòa, Nguyễn Thế Anh, Đào Thị Hải Anh và cs (2017), "Các vi rút đường ruột gây bệnh Tay Chân Miệng ở Miền Bắc Việt Nam, 2015-2016", *Tạp chí Y học dự phòng*. Tập 27, số 8, tr. 492-498.

11. Phan Công Hùng, Nguyễn Thị Phương Thúy, Đoàn Ngọc Minh Quân và cs (2013), "Đặc điểm dịch tễ của dịch tay chân miệng tại khu vực phía Nam năm 2010-2012", *Tạp chí Y học dự phòng*. Tập XXIII, số 10 (146), tr. 172-180.
12. Trần Đỗ Hùng, Nguyễn Thị Bích Anh và cs (2013), "Một số đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng ở trẻ em mắc bệnh tay chân miệng nhập viện tại Bệnh viện Nhi đồng Cần Thơ năm 2011", *Tạp chí Y học Dự phòng*. Tập XXIII, số 2 (137), tr. 75-79.
13. Đoàn Ngọc Minh Quân, Phan Công Hùng, Nguyễn Thị Thanh Thảo và cs (2017), "Đặc điểm dịch tễ bệnh Tay Chân Miệng tại các tỉnh khu vực phía Nam, giai đoạn 2013-2016", *Tạp chí Y học dự phòng*. Tập 27, số 11, tr. 129-134.
14. Nguyễn Ngọc Quỳnh, Trần Thị Minh Huệ, Hoàng Đức Hạnh và cs (2016), "Một số đặc điểm dịch tễ học bệnh Tay Chân Miệng tại Hà Nội từ năm 2011-2014", *Tạp chí Y học dự phòng*. Tập XXVI, Số 2 (175), tr. 31-38.
15. Nguyễn Thị Hiền Thanh (2004), "Dịch tễ học phân tử chủng vi rút đường ruột týp 71 (EV71) phân lập năm 2003 tại tỉnh Hà Tây", *Tạp chí Y học Dự phòng*. Tập XIV, số 4 (68), tr. 12-18.
16. Nguyễn Thị Hiền Thanh, Đào Thị Hải Anh, Lê Thị Quỳnh Mai (2011), "Ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử (semi-nested PCR/Sequencing) xác định các týp vi rút đường ruột gây bệnh tay chân miệng ở người năm 2009-2010 từ các mẫu lâm sàng", *Tạp chí Y học dự phòng*. Tập XXI, số 3 (121), tr. 36-44.
17. Nguyễn Thị Hiền Thanh, Đào Thị Hải Anh, Lê Thị Thanh Hương và cs (2013), "Căn nguyên vi rút đường ruột gây bệnh Tay Chân Miệng ở Miền Bắc Việt Nam, năm 2011-2012", *Tạp chí Y học dự phòng*. Tập XXIII, số 12 (148), tr. 58-63.
18. Nguyễn Thị Hiền Thanh, Trần Thị Nguyễn Hòa, Nguyễn Thế Anh và cs (2016), "Các vi rút đường ruột gây dịch bệnh Tay Chân Miệng ở Miền Bắc Việt Nam, 2013-2014", *Tạp chí Y học dự phòng*. XXVI, Số 10 (183), tr. 20-26.

19. Lê Thị Kim Trang, Huỳnh Kim Mai, Diệp Thùy Dung và cs (2017), "Sự lưu hành của Coxsackievirus A16, Coxsackievirus A10 và Coxsackievirus A6 gây dịch bệnh Tay Chân Miêng ở khu vực Miền Trung năm 2016", *Tạp chí Y học dự phòng*. Tập 27, số 8, tr. 557-561.
20. Lê Thị Kim Trang, Trịnh Thị Xuân Mai, Huỳnh Kim Mai và cs (2017), "Nghiên cứu kiểu gen của Enterovirus 71 lưu hành tại Miền Trung Việt Nam từ 2006-2014", *Tạp chí Y học dự phòng*. Tập 27, số 8, tr. 499-505.
21. Ngô Huy Tú, Nguyễn Duy Nghĩa, Vũ Đình Thiêm và cs (2015), "Một số đặc điểm dịch tễ bệnh tay chân miệng trong giám sát trọng điểm khu vực miền Bắc, 2012-2014", *Tạp chí Y học Dự phòng*. Tập XXV, Số 8 (168), tr. 114-120.
22. Lê Văn Tuấn, Nguyễn Thị Tuyết Vân và cs (2018), "Đặc điểm phân tử chủng Enterovirus 71 phân lập ở Đắc Lắc", *Tạp chí Nghiên cứu Y học*. 112 (3), tr. 8-18.

#### Tiếng Anh

23. Akuzawa N., Harada N., Hatori T., et al (2014), "Myocarditis, hepatitis, and pancreatitis in a patient with coxsackievirus A4 infection: a case report", *Virology Journal* 11(3).
24. Alsop J., Flewett T. H., Foster J. R. (1960), "Hand foot and mouth disease in Birmingham in by 1959", *Brisish Medical Journal*, pp. 1708-1711.
25. Anasir M. I., Poh C. L. (2019), "Advances in Antigenic Peptide-Based Vaccine and Neutralizing Antibodies against Viruses Causing Hand, Foot, and Mouth Disease", *International Journal of Molecular Sciences*. 20(1256-1273).
26. Anastasina M., Domanska A., Pal K. Butcher S. (2017), "Human Picornaviruses Associated with Neurological Diseases and Their Neutralization by Antibodies", *The Journal of general Virology*. 98(6): 1145-1158.



27. Ang L. W., Koh B. K, Chan K.P., et al (2009), "Epidemiology and Control of Hand, Foot and Mouth Disease in Singapore, 2001-2007", *Annals Academy of Medicine*. 38 pp. 106-112.
28. Antona D., Kossoroto M., Schuffenecker I., et al (2016), "Severe paediatric conditions linked with EV-A71 and EV-D68, France, May to October 2016", *Euro Surveill*. 21 (46).
29. Apisarnthanarak A., Kitphati R, Pongsuwann Y. et al (2005), "Echovirus Type 11: Outbreak of Hand-Foot-and-Mouth Disease in a Thai Hospital Nursery", *Clinical Infectious Diseases*. 41 (9); pp. 1361-1362.
30. Aswathyraj S., Arunkumar G., Alidjinou E. K., Hober D. (2016), "Hand, foot and mouth disease (HFMD): emerging epidemiology and the need for a vaccine strategy", *Med Microbiol Immunol*. 205(5), pp. 397-407.
31. Baggen J., Hurdiss D. L., Zocher G., et al (2018), "Role of enhanced receptor engagement in the evolution of a pandemic acute hemorrhagic conjunctivitis virus", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United states of America*. 115(2), pp. 397-402.
32. Baggen J., Thibaut H. J., Strating J. R. P. M., et al (2018), "The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it", *Nature Review Microbiology*. 16, pp. 368-381.
33. Bendig J. W., Fleming D. M. (1996), "Epidemiological, virological, and clinical features of an epidemic of hand, foot, and mouth disease in England and Wales", *Communicable disease report*. 24;6(6), pp. 81-86.
34. Bian L., Gao F., Mao Q., et al (2019), "Hand, foot, and mouth disease associated with coxsackievirus A10: more serious than it seems", *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 17 (4), pp. 233-242.
35. Bian L., Wang Y., Yao X., et al (2015), "Coxsackievirus A6: a new emerging pathogen causing hand, foot and mouth disease outbreaks worldwide", *Expert review of anti-infective therapy*. 13(9), pp. 1061-1071.

36. Bin W., Xian Q., Ke X., et al (2014), "Genetic Characteristics of the Coxsackievirus A24 Variant Causing Outbreaks of Acute Hemorrhagic Conjunctivitis in Jiangsu, China, 2010", *Plos One*. 9.
37. Blomberg J., Lycke E., Ahlfors K., et al (1974), "New enterovirus type associated with epidemic of aseptic meningitis and/or hand-foot-and-mouth disease", *The Lancet Infectious Diseases*. p. 112.
38. Blomqvist S., Klemola P., Kaijalainen S., et al (2010), "Co-circulation of coxsackieviruses A6 and A10 in hand, foot and mouth disease outbreak in Finland", *Journal of Clinical Virology*. 48, pp. 49-54.
39. Brown B. A., Oberste M. S., Alexander J. P., et al (1999), "Molecular Epidemiology and Evolution of Enterovirus 71 Strains Isolated from 1970 to 1998", *Journal of Virology*. 73 (12), pp. 9969–9975.
40. Cardoso M. J., Perera D., Brown A. B., et al, "Molecular Epidemiology of Human Enterovirus 71 Strains and Recent Outbreaks in the Asia-Pacific Region: Comparative Analysis of the VP1 and VP4 Genes", *Emerging Infectious Diseases* 9 (4), pp. 461-468.
41. Chan L. G., Ong F. G. L., Ho K. K., et al (2000), "Deaths of Children during an Outbreak of Hand, Foot, and Mouth Disease in Sarawak, Malaysia: Clinical and Pathological Characteristics of the Disease", *Clinical Infectious Diseases*. 31, pp. 678-683.
42. Chang L. Y., King C. C., Hsu K. H., et al (2002), "Risk Factors of Enterovirus 71 Infection and Associated Hand, Foot, and Mouth Disease/Herpangina in Children During an Epidemic in Taiwan", *Pediatrics*. 109(6).
43. Chansaenroj J., Auphimai C., Puenpa J., et al (2017), "High prevalence of coxsackievirus A2 in children with herpangina in Thailand in 2015", *Virus disease*. 28 (1), pp. 111-114.
44. Chansaenroj J., Vongpunsawad S., Puenpa J., et al (2015), "Epidemic outbreak of acute haemorrhagic conjunctivitis caused by coxsackievirus A24 in Thailand, 2014", *Epidemiology and Infection*. 143(14), pp. 3087-3093.

45. Chen J. F., Zhang R. S., Ou X. H., et al (2014), "The role of enterovirus 71 and coxsackievirus A strains in a large outbreak of hand, foot, and mouth disease in 2012 in Changsha, China", *International Journal of Infectious Diseases*. 28, pp. 17-25.
46. Chen L., Xu S. J., Yao X. J., et al (2020), "Molecular epidemiology of enteroviruses associated with severe hand, foot and mouth disease in Shenzhen, China, 2014-2018", *Archives of Virology* 165(10), pp. 2213-2227.
47. Chen X., Ji T., Guo J., et al (2019), "Molecular Epidemiology of Echovirus 18 Circulating in Mainland China from 2015 to 2016 ", *Virologica Sinica*. 34(1), pp. 50–58.
48. Chen X. P., Sun S. Z., Guo J. Y., et al (2016), "Complete Genome Sequence Analysis of Echovirus 18 Associated with Aseptic Meningitis in Hebei Province, China, in 2015", *Genome Announcement*. 4 (5).
49. Chen X., Tan X., Li J., et al (2013), "Molecular epidemiology of coxsackievirus A16: intratype and prevalent intertype recombination identified", *PLoS One*. 8(12).
50. Chiang K. L., Wei S. H., Fan H. C., et al (2019), "Outbreak of recombinant coxsackievirus A2 infection and polio-like paralysis of children, Taiwan, 2014", *Science Direct*. 60(1), pp. 95-99.
51. Chu P. Y., Lu P. L., Tsai Y. L., et al (2011), "Spatiotemporal phylogenetic analysis and molecular characterization of coxsackievirus A4", *Infection, Genetics and Evolution*. 11 (6);, pp. 1426–1435.
52. Cifuentes J. O., Moratorio G. (2019), "Evolutionary and Structural Overview of Human Picornavirus Capsid Antibody Evasion", *Frontiers in Cellular Infection Microbiology*. 9.
53. *Clinical Virology* (2017), ed. 4.
54. Cobbin J. C. A., Britton P. N., Burrell R., et al (2018), "A complex mosaic of enteroviruses shapes community-acquired hand, foot and mouth disease transmission and evolution within a single hospital", *Virus Evolution*. 4(2).

55. Davia J. L., Bel P. H., Ninet V. Z., et al (2011), "Onychomadesis outbreak in Valencia, Spain associated with hand, foot, and mouth disease caused by enteroviruses", *Pediatric Dermatology* 28(1), pp. 1-5.
56. Donato C., Le T. H., Nguyen T. H., et al (2016), "Genetic characterization of Enterovirus 71 strains circulating in Vietnam in 2012", *Virology*. 495, pp. 1-9.
57. Du Z., Zhao Y., Luo Y., et al (2019), "Ongoing change of severe hand, foot, and mouth disease pathogens in Yunnan, China, 2012 to 2016", *J Med Virol*. 91 (5), pp. 881-885.
58. Enfissi A., Joffret M. L., Delaune D., et al (2017), "Coxsackievirus A24 Variant Associated with Acute Haemorrhagic Conjunctivitis Cases, French Guiana, 2017", *Intervirology*. 60(6), pp. 271-275.
59. Ferson M. J. , Bell S. M. (1991), "Outbreak of Coxsackievirus A16 Hand, Foot, and Mouth Disease in a Child Day-Care Center", *American Journal of Public Health*. 81 (12); 1675-1676.
60. Fonseca M. C., Pupo-Merino M., Garcia-Gonzalez L. A., et al (2020), "Molecular evolution of coxsackievirus A24v in Cuba over 23-years, 1986-2009", *Scientific Report*. 10, pp. 13761-13763.
61. Fonseca M. C., Pupo-Merino M., Garcia-Gonzalez L. A., et al (2021), "Molecular Characterization of Coxsackievirus A24v from Feces and Conjunctiva Reveals Epidemiological Links", *Microorganisms*. 9(531).
62. Fragoso-Fonseca D. E., Escobar-Escamilla N., Rodriguez-Maldonado A. P., et al (2020), "Complete genome sequence of a coxsackievirus type A24 variant causing an outbreak of acute haemorrhagic conjunctivitis in southeastern Mexico in 2017", *Archives of Virology*. 165 (4), 1015-1018.
63. Fujimoto T., Iizuka S., Enomoto M., et al (2012), "Hand, Foot, and Mouth Disease Caused by Coxsackievirus A6, Japan, 2011", *Emerging Infectious Diseases* 18(2), pp. 336-337.

64. Gaunt E., Harvala H., Osterback E, et al (2015), "Genetic characterization of human coxsackievirus A6 variants associated with atypical hand, foot and mouth disease: a potential role of recombination in emergence and pathogenicity", *Journal of General Virology*. 96, pp. 1067-1079.
65. Gonzalez G., Carr M. J., Kobayashi M., et al (2019), "Enterovirus-Associated Hand-Foot and Mouth Disease and Neurological Complications in Japan and the Rest of the World", *International Journal of Molecular Sciences*. 20 (20), pp. 5201 - 5217.
66. Guo W. P., Chen G. Q., Xie G. C., et al (2020), "Mosaic genome of Human Coxsackievirus A4 associated with herpangina and HFMD in Yancheng, China, 2016 and 2018", *International Journal of Infectious Diseases*. 96, pp. 538-540.
67. Hamaguchi T., Fujisawa H., Sakai K., et al (2008), "Acute Encephalitis Caused by Intrafamilial Transmission of Enterovirus 71 in Adult", *Emerging Infectious Diseases* 14(5), pp. 828-830.
68. Han Jian-Feng, Xu S., Zhang Y., et al (2014), "Hand, foot, and mouth disease outbreak caused by coxsackievirus A6, China, 2013", *Journal of Infection*. 69(3), pp. 303-305.
69. Hassel C., Mirand A., Farkas A., et al (2017), "Phylogeography of Coxsackievirus A16 Reveals Global Transmission Pathways and Recent Emergence and Spread of a Recombinant Genogroup", *Journal Virology*. 91(18), pp. 630-647.
70. He S. J., Han J. F., Ding X. X., et al (2013), "Characterization of enterovirus 71 and coxsackievirus A16 isolated in hand, foot, and mouth disease patients in Guangdong, 2010", *International Journal of Infectious Diseases*. 17(11), pp. 1025-1030.
71. He Y. Q., Chen L., Xu W. B., et al (2013), "Emergence, circulation, and spatiotemporal phylogenetic analysis of coxsackievirus a6- and coxsackievirus a10-associated hand, foot, and mouth disease infections from

- 2008 to 2012 in Shenzhen, China", *Journal Clinical Microbiol.* 51(11), pp. 3560-3566.
72. Herrero L. J., Lee C. S., Hurrelbrink R. J., et al (2003), "Molecular epidemiology of enterovirus 71 in peninsular Malaysia, 1997-2000", *Archives of Virology.* 148(7), pp. 1369-1385.
  73. Hoang M. T. V., Nguyen T. A., Tran T. T., et al; (2019), "Clinical and aetiological study of hand, foot and mouth disease in southern Vietnam, 2013-2015: Inpatients and outpatients", *International Journal of Infectious Diseases.* 80, pp. 1-9.
  74. Horwood P. F., Andronico A., Tarantola A., et al (2016), "Seroepidemiology of Human Enterovirus 71 Infection among Children, Cambodia", *Emerging Infectious Diseases* 22 (1), pp. 92-95.
  75. Hu Y. F., Jia L. P., Yu F. Y., et al (2021), "Molecular epidemiology of coxsackievirus A16 circulating in children in Beijing, China from 2010 to 2019", *World Journal of Pediatrics* 17(5), pp. 508-516.
  76. Hu Y. F., Yang F., Du J., et al (2011), "Complete genome analysis of coxsackievirus A2, A4, A5, and A10 strains isolated from hand, foot, and mouth disease patients in China revealing frequent recombination of human enterovirus A", *Journal of Clinical Microbiology.* 49 (7), pp. 2426-34.
  77. Huang S. W., Cheng D., Wang J. R. (2019), "Enterovirus A71: virulence, antigenicity, and genetic evolution over the years", *Journal of Biomedical Science.* 26(1), pp. 81-89.
  78. Huang X., Wei H., Wu S., et al (2015), "Epidemiological and etiological characteristics of hand, foot, and mouth disease in Henan, China, 2008-2013", *Scientific Report.* 5, pp. 8904-8912.
  79. Ivanova O. E., Shakaryan A. K., Morozova N. S., et al (2022), "Cases of Acute Flaccid Paralysis Associated with Coxsackievirus A2: Findings of a 20-Year Surveillance in the Russian Federation", *Microorganisms.* 10(1).

80. Iwai M., Masaki A., Hasegawa S, et al (2009), "Genetic Changes of Coxsackievirus A16 and Enterovirus 71 Isolated from Hand, Foot, and Mouth Disease Patients in Toyama, Japan between 1981 and 2007", *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 62, pp. 254-259.
81. Jang S., Suh S. I., Ha S. M., et al (2012), "Enterovirus 71-related encephalomyelitis: usual and unusual magnetic resonance imaging findings", *Neuroradiology*. 54(3), pp. 239-245.
82. Ji T. , Guo Y., Huang W, et al (2018), "The emerging sub-genotype C2 of CoxsackievirusA10 Associated with Hand, Foot and Mouth Disease extensively circulating in mainland of China", *Scientific Report*. 8, pp. 13357-13366.
83. Ji T., Guo Y., Lv L., et al (2019), "Emerging recombination of the C2 sub-genotype of HFMD-associated CV-A4 is persistently and extensively circulating in China", *Scientific Report*. 9(1), pp. 13668 - 13677.
84. Jiang L., Wang J., Zhang C., et al (2020), "Effectiveness of enterovirus A71 vaccine in severe hand, foot, and mouth disease cases in Guangxi, China", *Vaccine*. 38(7), pp. 1804-1809.
85. Jing Z., Ling S. L., Rui C. Z., Dong Z. W., et al (2011), "Characterization of Hand, Foot, and Mouth Disease in China between 2008 and 2009", *Biomedical and Environmental Sciences*. 24(3).
86. Kanbayashi D., Kaida A., Yamamoto S. P., et al (2017), "Impact of Coxsackievirus A6 emergence on hand, foot, and mouth disease epidemic in Osaka City, Japan", *Journal of Medical Virology*. 89(12), pp. 2116-2121.
87. Kar B. R., Dwibedi B, . Kar S. K (2013), "An Outbreak of Hand, Foot and Mouth Disease in Bhubaneswar, Odisha", *Indian Pediatrics*. 50(1), pp. 139-142.
88. Kashyap R. R., Kashyap, R. S. (2015), "Hand, foot and mouth disease - a short case report", *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*. 7(2), pp. 336-338.

89. Kataoka Ch., Suzuki T, Kotani O., et al (2015), "The Role of VP1 Amino Acid Residue 145 of Enterovirus 71 in Viral Fitness and Pathogenesis in a Cynomolgus Monkey Model", *PLoS Pathogens*. 11 (7).
90. Khanh T. H., Sabanathan, S., Thanh, T. T., et al (2012), "Enterovirus 71-associated hand, foot, and mouth disease, Southern Vietnam, 2011", *Emerging Infectious Diseases*. 18 (12), pp. 2002-2005.
91. Koh W. M., Bogich T., Siegel K., et al (2016), "The Epidemiology of Hand, Foot and Mouth Disease in Asia: A Systematic Review and Analysis", *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 35(10), pp. 285-300.
92. Ku Z., Ye X., Shi J., et al (2015), "Single Neutralizing Monoclonal Antibodies Targeting the VP1 GH Loop of Enterovirus 71 Inhibit both Virus Attachment and Internalization during Viral Entry", *Journal of Virology*. 89(23), pp. 12084-12095.
93. Kumar S., Stecher G., Tamura K (2016), "MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets", *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*. 33(7), pp. 1870-1874.
94. Laor P., Apidechkul T.; Khunthason S.; et al (2020), "Association of environmental factors and high HFMD occurrence in northern Thailand", *BMC Public Health*. 20(1), pp. 1829-1837.
95. Laxmivandana R., Yergolkar P., Rajeshwari M., Chitambar S. D. (2014), "Genomic characterization of coxsackievirus type A24 strains associated with acute flaccid paralysis and rarely identified Hopkins syndrome", *Archives of Virology*. 159(11), pp. 3125-3129.
96. Le N. T. N, Truong H. K. Nguyen T. T. H., et al (2020), "Clinical, etiological and epidemiological investigations of hand, foot and mouth disease in southern Vietnam during 2015 - 2018", *PLoS Neglected tropical diseases*. 14(8), p. e0008544.



97. Li J-S., Dong X-G., Qin M., et al, (2016), "Outbreak of hand, foot, and mouth disease caused by coxsackievirus A6 in a Juku in Fengtai District, Beijing, China, 2015", *Springer plus*. 5(1), pp. 1650-1654.
98. Li J. S., Don X. G., Qin M., et al (2015), "Outbreak of febrile illness caused by coxsackievirus A4 in a nursery school in Beijing, China", *Virology Journal*. 12, pp. 92-97.
99. Li J., Sun Y., Du Y., et al (2016), "Characterization of Coxsackievirus A6- and Enterovirus 71-Associated Hand Foot and Mouth Disease in Beijing, China, from 2013 to 2015", *Frontiers in Microbiology*. 7, pp. 391-403.
100. Li J., Yang Z., Wang Z., et al (2019), "The surveillance of the epidemiological and serotype characteristics of hand, foot, mouth disease in Neijiang city, China, 2010-2017: A retrospective study", *PLoS One*. 14(6).
101. Li M. L., Shih S. R., Tolbert, B. S., Brewer, G. (2021), "Enterovirus A71 Vaccines", *Vaccines*. 9(3), pp. 199-209.
102. Li R., Liu L., Mo Z., et al (2014), "An inactivated enterovirus 71 vaccine in healthy children", *The new england journal of medicine*. 370(9), pp. 829-837.
103. Li W., Gao H. H., Zhang Q., et al (2016), "Large outbreak of herpangina in children caused by enterovirus in summer of 2015 in Hangzhou, China", *Scientific Report*. 6
104. Li Y. P., Liang Z. L., Gao Q., et al (2012), "Safety and immunogenicity of a novel human Enterovirus 71 (EV71) vaccine: a randomized, placebo-controlled, double-blind, Phase I clinical trial", *Vaccine*. 30(22), pp. 3295-3303.
105. Li Z., Yu J., Liu L., et al (2014), "Coxsackievirus A16 infection induces neural cell and non-neural cell apoptosis in vitro", *PLoS One*. 9(10).
106. Lin H., Sun L., Lin J, et al (2014), "Protective effect of exclusive breastfeeding against hand, foot and mouth disease", *BMC Infectious Diseases* 14, pp. 645-651.

107. Linden L. van der, Wolthers, K. C., Kuppeveld, F. J. M. van (2015), "Replication and Inhibitors of Enteroviruses and Parechoviruses", *Viruses*. 7(8), pp. 4529-4562.
108. Liu Ch. Ch., Guo M. S., Wu S. R., et al (2016), "Immunological and biochemical characterizations of coxsackievirus A6 and A10 viral particles", *Antiviral Research*. 129, pp. 58-66.
109. Liu M. Y., Liu W., Luo J., et al (2011), "Characterization of an outbreak of hand, foot, and mouth disease in Nanchang, China in 2010", *PLoS One*. 6(9).
110. Lu J., Zeng H., Zheng H., et al; (2014), "Hand, foot and mouth disease in Guangdong, China, in 2013: new trends in the continuing epidemic", *Clinical Microbiology and Infection* 20(7), pp. 442-445.
111. Lu Q. B., Zhang X. A., Wo Y., et al (2012), "Circulation of Coxsackievirus A10 and A6 in Hand-FootMouth Disease in China, 2009–2011", *Plos One*. 7(12), p. 8.
112. Lukashev A. N., Shumilina E. Y., Belalov I. S., et al (2014), "Recombination strategies and evolutionary dynamics of the Human enterovirus A global gene pool", *Journal of General Virology*. 95, pp. 868-873.
113. Mao Q., Wang Y., Yao X., et al (2014), "Coxsackievirus A16: epidemiology, diagnosis, and vaccine", *Hum Vaccin Immunother*. 10(2), pp. 360-368.
114. Marguerite N., Brottet E., Pagès F., et al (2016), "A major outbreak of conjunctivitis caused by coxsackievirus A24, Réunion, January to April 2015", *Europe's journal on infectious disease surveillance, epidemiology, prevention and control*. 21(26).
115. Mauleekoonphairoj J., Puenpa J., Korkong S., et al (2015), "Prevalence of Human enterovirus among patients with hand, foot and mouth disease and herpangina in Thailand 2013", *Southeast asian J trop Med public health*. 46 (6).
116. Melnick J. L. (1993), "The discovery of the enteroviruses and the classification of poliovirus among them", *Biologicals*. 21(4), pp. 305-309.

117. Melnick J. L. (1996), "My role in the discovery and classification of the enterovirus", *Annual Reviews Microbiology*. 50, pp. 1-24.
118. Melnick J. M. (1950), "Studies on the Coxsackie viruses; properties, immunological aspects and distribution in nature", *The Bulletin*. 26, pp. 342–356.
119. Mirand A., Henquell C., Archimbaud C., et al (2012), "Outbreak of hand, foot and mouth disease/herpangina associated with coxsackievirus A6 and A10 infections in 2010, France: a large citywide, prospective observational study", *Clinical Microbiology and Infection* 18(5), pp. 110-118.
120. Mizuta K., Abiko C., Murata T., et al (2005), "Frequent importation of enterovirus 71 from surrounding countries into the local community of Yamagata, Japan, between 1998 and 2003", *Journal of clinical microbiology*. 43(12), pp. 6171-6175.
121. Mizuta K., Tanaka S., Komabayashi K., et al (2019), "Phylogenetic and antigenic analyses of coxsackievirus A6 isolates in Yamagata, Japan between 2001 and 2017", *Vaccine*. 37(8), pp. 1109-1117.
122. Montes M., Artieda J., Piñeiro L. D., et al (2013), "Hand, Foot, and Mouth Disease Outbreak and Coxsackievirus A6, Northern Spain, 2011", *Emerging Infectious Diseases* 19(4), pp. 676-679.
123. MyBioSource (2017), "Enterovirus 71 (EV71) IgM Rapid Test Kit. Catalog". No: MBS2548635. 7th Edition.
124. Nagy G., Takatsy S., Kykan E., et al (1982), "Virological Diagnosis of Enterovirus Type 71 Infections: Experiences Gained During an Epidemic of Acute CNS Diseases in Hungary in 1978", *Archives of Virology*. 71, pp. 217-227.
125. Nayak G., Bhuyan S. K., Bhuyan R., et al (2022), "Global emergence of Enterovirus 71: a systematic review", *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*. 11(1), pp. 78-88.

126. Ngangas S. T., Lukashev A., Jugie G., et al (2019), "Multirecombinant Enterovirus A71 Subgenogroup C1 Isolates Associated with Neurologic Disease, France, 2016-2017", *Emerging Infectious Diseases*. 25(6), pp. 1204-1208.
127. Nguyen T. A., Le N. T. N., Hoang M. T. V., et al (2018), "Emerging Coxsackievirus A6 Causing Hand, Foot and Mouth Disease, Vietnam", *Emerging Infectious Diseases*. 24(4).
128. Nguyen T. T. T., Donato C., Vu T. H. T., et al (2017), "Evolution and Spatiotemporal Dynamics of Enterovirus A71 Subgenogroups in Vietnam", *The Journal of Infectious Diseases*. 216(11), pp. 1371-1379.
129. Nikonov O. S., Chernykh E. S., Garber M. B., Nikonova E. Yu. (2017), "Enteroviruses: Classification, Diseases They Cause, and Approaches to Development of Antiviral Drugs", *Biochemistry (Moscow)*. 82(13), pp. 1615-1631.
130. Nix W. A., Oberste M. S., Pallansch M. A (2006), "Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens", *Journal of Clinical Microbiology*. 44(8), pp. 2698-2704.
131. Noisumdaeng P., Sangsiriwut K., Prasertsopon J., et al; (2018), "Complete genome analysis demonstrates multiple introductions of enterovirus 71 and coxsackievirus A16 recombinant strains into Thailand during the past decade", *Emerging Microbes & Infections*. 7(1), pp. 214-226.
132. Oberste M. S., Maher. K., Williams. A. J., et al (2006), "Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses", *Journal of General Virology*. 87, pp. 119-128.
133. Oberste M. S., Penaranda S., Maher K., Pallansch M. A. (2004), "Complete genome sequences of all members of the species Human enterovirus A", *Journal of General Virology* 85(6), pp. 1597-1607.

134. Onozuka D., Hashizume M. (2011), "The influence of temperature and humidity on the incidence of hand, foot, and mouth disease in Japan", *Science of the Total Environment*. 410-411, pp. 119-125.
135. Osterback R., Koskinen S., Merilahti P., et al (2014), "Genome Sequence of Coxsackievirus A6, Isolated during a Hand-Foot-and-Mouth Disease Outbreak in Finland in 2008", *Genome Announcements*. 2(5).
136. Perera D., Podin Y., Akin W., et al (2004), "Incorrect identification of recent Asian strains of Coxsackievirus A16 as human enterovirus 71: Improved primers for the specific detection of human enterovirus 71 by RT PCR", *BMC infection disease*. 4.
137. Perera D., Yusof. M. A., Podin Y., et al (2007), "Molecular phylogeny of modern coxsackievirus A16", *Archives of Virology*.
138. Phan V. T. , Nguyen T. T. T, Perera D., et al (2007), "Epidemiologic and Virologic Investigation of Hand, Foot, and Mouth ,Disease, Southern Vietnam, 2005", *Emerging Infectious Diseases* 13 (11), pp. 1733-1741.
139. *The Picornavirus Pages*, accessed, from <https://www.picornaviridae.com>.
140. Plevka P., Perera R., Cardoso J., et al (2012), "Crystal Structure of Human Enterovirus 71", *Science*. 336, p. 1274.
141. Pons-Salort M., Grassly N. C. (2018), "Serotype-specific immunity explains the incidence of diseases caused by human enteroviruses", *Virology*. 361, pp. 800–803
142. Puenpa J., Auphimai Ch., Korkong S., et al (2018), "Enterovirus A71 Infection, Thailand, 2017", *Emerging Infectious Diseases*. 24(7), pp. 1386-1387.
143. Puenpa J., Chieochansin T., Linsuwanon P., et al (2013), "Hand, foot, and mouth disease caused by coxsackievirus A6, Thailand, 2012", *Emerging Infectious Diseases*. 19(4), pp. 641-643.
144. Puenpa J., Mauleekoonphairoj J., Linsuwanon P., et al (2014), "Prevalence and Characterization of Enterovirus Infections among Pediatric Patients with

Hand Foot Mouth Disease, Herpangina and Influenza like Illness in Thailand, 2012", *Plos One*. 9(6).

145. Qi L., Tang W., Zhao H., et al (2018), "Epidemiological Characteristics and Spatial-Temporal Distribution of Hand, Foot, and Mouth Disease in Chongqing, China, 2009-2016", *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 15(2), pp. 270-281.
146. Qian S. S., Wei Z. N., Jin W. P., et al (2021), "Efficacy of a coxsackievirus A6 vaccine candidate in an actively immunized mouse model", *Emerging Microbes & Infections*. 10(1), pp. 763-773.
147. Qiu J., Yan H., Cheng N., et al (2019), "The Clinical and Epidemiological Study of Children with Hand, Foot, and Mouth Disease in Hunan, China from 2013 to 2017", *Scientific Report*. 9(1), pp. 11662 -11670.
148. Rajamoorthy Y., Tin O. H., Taib N. M, et al (2022), "Parents' knowledge and awareness towards hand foot mouth disease in Malaysia: A survey in Selangor", *Clinical Epidemiology and Global Health*. 15.
149. Rao C. D., Yergolkar P., Shankarappa K. S (2012), "Antigenic diversity of enteroviruses associated with nonpolio acute flaccid paralysis, India, 2007-2009", *Emerging Infectious Diseases*. 18(11), pp. 1833-1840.
150. Reimann B. Y., Ronand Z. R., Rienhard K. (1991), "Mapping of a Neutralizing Antigenic Site of Coxsackievirus B4 by Construction of an Antigen Chimera", *Virology*. 65(7), pp. 3475-3480.
151. Ren J., Wang X., Zhu L., et al (2015), "Structures of Coxsackievirus A16 Capsids with Native Antigenicity: Implications for Particle Expansion, Receptor Binding, and Immunogenicity", *Journal of Virology*. 89(20), pp. 10500-10511.
152. Robinson C. R., Doane F. W., Rhodes A. J. (1958), "Report of an outbreak of febrile illness with pharyngeal lesions and exanthem: Toronto, summer 1957 isolation of group A Coxsackie virus", *The Canadian Medical Association Journal* 79(8), pp. 617-621.

153. Rossmann M. G. (1994), "Viral cell recognition and entry", *Protein Science*. 3(10), pp. 1712-1725.
154. Samphutthanon R., Tripathi N. K., Ninsawat S., Duboz R. (2013), "Spatio-temporal distribution and hotspots of Hand, Foot and Mouth Disease (HFMD) in northern Thailand", *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 11(1), pp. 312-336.
155. Sanden S. van der, Koopmans M., Uslu G., et al (2009), "Epidemiology of enterovirus 71 in the Netherlands, 1963 to 2008", *Journal of clinical microbiology*. 47(9), pp. 2826-2833.
156. Saxena V. K., Sane S., Nadkarni S. S., et al (2015), "Genetic diversity of enterovirus A71, India", *Emerging Infectious Diseases*. 21(1), pp. 123-126.
157. SD Standard Diagnostics, INC (2016), SD EV71 IgM (43FK50), Editor^Editors.
158. Shang L. Xu M., Yin Z. (2013), "Antiviral drug discovery for the treatment of enterovirus 71 infections", *Antiviral Research*. 97(1), pp. 183-194.
159. Shi J., Huang X., Liu Q., Huang Z. (2013), "Identification of conserved neutralizing linear epitopes within the VP1 protein of coxsackievirus A16", *Vaccine*. 31 (17), pp. 2130 -2136.
160. Solomon T., Lewthwaite P., Perera D., et al (2010), "Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71", *The Lancet Infectious Diseases*. 10(11), pp. 778-790.
161. Song Y., Zhang Y., Ji T., et al (2017), "Persistent circulation of Coxsackievirus A6 of genotype D3 in mainland of China between 2008 and 2015", *Scientific Report*. 4, pp. 5491-5502.
162. Stewart C. L., Chu E. Y., Introcaso C. E., et al (2013), "Coxsackievirus A6-induced hand-foot-mouth disease", *JAMA Dermatol*. 149(12), pp. 1419-1421.
163. Su T., Zhou Y., Zhu Y., et al (2015), "Molecular characterization of a new human echovirus 11 isolate associated with severe hand, foot and mouth disease in Yunnan, China, in 2010", *Arch Virol*. 160 (7), , pp. 2343-2347.

164. Sun G., Yi M., Tian H, et al (2014), "A novel human enterovirus recombinant from a child with diarrhea", *Achieves of Virology*. 159 (2), pp. 333-337.
165. Sun Y. S., Xia Y., Xu F., et al (2022), "Development and evaluation of an inactivated coxsackievirus A16 vaccine in gerbils", *Emerg Microbes Infect.* 11(1), pp. 1994-2006.
166. Sun Z., Zhang G., Guo P., et al (2017), "Epidemiological characterizations, pathogen spectrum and molecular characteristics of Coxsackievirus A16 from patients with HFMD in Yantai, Shandong, China between 2011 and 2015", *Human vaccines and Immunotherapeutics*. 13(8), pp. 1831-1838.
167. Tan E. L., Yong L. L., Quak S. H., et al (2008), "Rapid detection of enterovirus 71 by real-time TaqMan RT-PCR", *Journal of Clinical Virology*. 42(2), pp. 203-206.
168. Tee K. K., Lam T. T., Chan Y. F., et al (2010), "Evolutionary genetics of human enterovirus 71: origin, population dynamics, natural selection, and seasonal periodicity of the VP1 gene", *Journam of virology*. 84(7), pp. 3339-3350.
169. Tian H., Zhang Y, Sun Q, et al (2014), "Prevalence of Multiple Enteroviruses Associated with Hand, Foot, and Mouth Disease in Shijiazhuang City, Hebei Province, China: Outbreaks of Coxsackieviruses A10 and B3", *Plos One*. 9(1).
170. Tran T. N. H, Nguyen T. A., Dao T. H. A., et al (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), pp. 15-28.
171. Tsai H. P., Huang S. W., Wu F. L., et al (2011), "An echovirus 18-associated outbreak of aseptic meningitis in Taiwan: epidemiology and diagnostic and genetic aspects", *Journal of Medical Microbiology* 60 (90), pp. 1360–1365.
172. Tseng F. C., Huang H. C., Chi C. Y., et al (2007), "Epidemiological survey of enterovirus infections occurring in Taiwan between 2000 and 2005: analysis



- of sentinel physician surveillance data", *Journal of Medical Virology*. 79(12), pp. 1850–1860.
173. Ueda Y., Kenzaka T., Noda A., et al (2015), "Adult-onset Kawasaki disease (mucocutaneous lymph node syndrome) and concurrent Coxsackievirus A4 infection: a case report", *International Medical Case Reports Journal*. 8, pp. 225-230.
  174. Van der Sanden S., Van der Avoort H., Lemey P., et al (2010), "Evolutionary trajectory of the VP1 gene of human enterovirus 71 genogroup B and C viruses", *Journal of General Virology* 91, pp. 1949-1958.
  175. Van H. M. T., Anh N. T., Hong N. T. T., et al (2019), "Enterovirus A71 Phenotypes Causing Hand, Foot and Mouth Disease, Vietnam", *Emerging Infectious Diseases*. 25(4), pp. 788-791.
  176. Verma S., Razzaque M. A., Sangtongdee U., et al (2020), "Hand, Foot, and Mouth Disease in Thailand: A Comprehensive Modelling of Epidemic Dynamics", *Computational and Mathematical Methods in Medicine*. 2021.
  177. Wang H., Yu W., Xu T., et al (2019), "Molecular characteristic analysis for the VP1 region of coxsackievirus A6 strains isolated in Jiujiang area, China, from 2012 to 2013", *Medicine*. 98(14).
  178. Wang J., Teng, Z., Cui X., et al (2018), "Epidemiological and serological surveillance of hand-foot-and-mouth disease in Shanghai, China, 2012-2016", *Emerging Microbes & Infections*. 7(1), pp. 8-19.
  179. Wang M., Li J., Yao M. X., et al (2019), "Genome Analysis of Coxsackievirus A4 Isolates From Hand, Foot, and Mouth Disease Cases in Shandong, China", *Frontiers in Microbiology*. 10.
  180. Wang Y., Zhao H., Ou R., et al (2020), "Epidemiological and clinical characteristics of severe hand-foot-and-mouth disease (HFMD) among children: a 6-year population-based study", *BMC Public Health*. 20(1), pp. 101-11.

181. Wells A. I., Coyne C. B. (2019), "Enteroviruses: A Gut-Wrenching Game of Entry, Detection, and Evasion", *Viruses*. 11(5), pp. 460-479.
182. Weng Y., Chen W., He W., et al (2017), "Serotyping and Genetic Characterization of Hand, Foot, and Mouth Disease (HFMD)-Associated Enteroviruses of No-EV71 and Non-CVA16 Circulating in Fujian, China, 2011-2015", *Medical Science Monitor*. 23, pp. 2508-2518.
183. WHO (2008), "Enterovirus, China", *Wkly Epidemiol Rec*. 83, 169–70.
184. WHO (2010), *A Guide to Clinical Management and Public Health Response for Hand, Foot and Mouth Disease (HFMD)*.
185. WHO (2015), "Enterovirus Surveillance Guidelines".
186. Wiczorek M., Purzyńska M., Krzysztozek A., et al (2018), "Genetic characterization of enterovirus A71 isolates from severe neurological cases in Poland", *Journal of Medical Virology*. 90(2), pp. 372-376.
187. Wu Y., Yeo A., Phoon M.C., et al (2010), "The largest outbreak of hand; foot and mouth disease in Singapore in 2008: The role of enterovirus 71 and coxsackievirus A strains", *International Journal of Infectious Diseases*. 14(12), pp. 1076–1081.
188. Xie J., Yang X-H., Hu S-Q., et al (2020), "Co-circulation of coxsackieviruses A-6, A-10, and A-16 causes hand, foot, and mouth disease in Guangzhou city, China", *BMC Infectious Diseases*. 20(1), pp. 271-281.
189. Xin Y., Bian L. L., Lu W. W., et al (2017), "Epidemiological and etiological characteristics of herpangina and hand foot mouth diseases in Jiangsu, China, 2013-2014", *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 13(4), pp. 823-830.
190. Xu L., Zheng Q., Li S., et al (2017), "Atomic structures of Coxsackievirus A6 and its complex with a neutralizing antibody", *Nature communications*. 8(1), pp. 505-516.
191. Xu M., Su L, Cao L., et al (2015), "Genotypes of the Enterovirus Causing Hand Foot and Mouth Disease in Shanghai, China, 2012-2013", *PLoS One*. 10(9).

192. Yang F., Zhang T., Hu Y., et al (2011), "Survey of enterovirus infections from hand, foot and mouth disease outbreak in China, 2009", *Virology Journal*. 8, pp. 508-511.
193. Yang Q., Gu X., Zhang Y., et al (2018), "Persistent circulation of genotype D coxsackievirus A2 in mainland of China since 2008", *PLoS One*. 13(9).
194. Yang Q., Zhang Y., Yan D., et al (2016), "Two Genotypes of Coxsackievirus A2 Associated with Hand, Foot, and Mouth Disease Circulating in China since 2008", *PLoS One*. 11(12), pp. 1285-1286.
195. Yang T., Xie T., Li H., et al (2020), "Immune responses of a CV-A16 live attenuated candidate strain and its protective effects in rhesus monkeys", *Emerging Microbes & Infections*. 9(1), pp. 2136-2146
196. Yeo D. S. Y. , Seah S. G. K. , Chew J. S. W. Chew, et al (2007), "Molecular identification of coxsackievirus A24 variant, isolated from an outbreak of acute hemorrhagic conjunctivitis in Singapore in 2005", *Archives of Virology*. 152, pp. 2005–2016.
197. Yi E. J., Shin Y. J., Kim J. H., et al (2017), "Enterovirus 71 infection and vaccines", *Clinical experimental vaccine research*. 6(1), pp. 4-14.
198. Yip C. C. Y., Lau S. K., Woo P. C., et al (2013), "Recombinant coxsackievirus A2 and deaths of children, Hong Kong, 2012", *Emerging Infectious Diseases* 19(8), pp. 1285-1288.
199. Yon W., Qiao M., Shi L., et al (2016), "Genetic characteristics of coxsackievirus A16 associated with hand, foot, and mouth disease in Nanjing, China", *The Journal of Infection Developing Countries*. 10(2), pp. 168-175.
200. Yu H., Chen W., Chang H., et al (2010), "Genetic analysis of the VP1 region of enterovirus 71 reveals the emergence of genotype A in central China in 2008", *Virus Genes*. 41(1), pp. 9-13.
201. Yuan J., Mao L., Wu J., et al (2018), "Enterovirus A71 Proteins: Structure and Function", *Frontiers in microbiology* 9, pp. 286-294.

202. Yumeng G., Guangyuan M., Yong X., et al (2019), "An outbreak of Coxsackievirus A6 infection in adults of a collective unit, China, 2019", *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. 2022.
203. Zaixue J., Xingui T., Lu X., et al (2020), "An oral vaccine against CVA16 (Coxsackievirus A16) was developed by constructing a recombinant *Lactococcus lactics*", *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 19(5), pp. 927-932.
204. Zhang H., Zhao Y., Liu H., et al (2017), "Molecular characterization of two novel echovirus 18 recombinants associated with hand-foot-mouth disease", *Scientific Report*. 7(1).
205. Zhang X., Shi J., Ye X., et al (2017), "Coxsackievirus A16 utilizes cell surface heparan sulfate glycosaminoglycans as its attachment receptor", *Emerging Microbes & Infections*. 6(7).
206. Zhang Y., Tan X. J., Wang H. Y, et al (2009), "An outbreak of hand, foot, and mouth disease associated with subgenotype C4 of human enterovirus 71 in Shandong, China", *Journal of Clinical Virology*. 44, pp. 262–267.
207. Zhang Y., Wang D., Yan D., et al (2010), "Molecular Evidence of Persistent Epidemic and Evolution of Subgenotype B1 Coxsackievirus A16-Associated Hand, Foot, and Mouth Disease in China", *Journal of Clinical Microbiology*. 48(2), pp. 619–622.
208. Zhou Y., Shen C., Zhang C., et al (2016), "Yeast-produced recombinant virus-like particles of coxsackievirus A6 elicited protective antibodies in mice", *Antiviral Res*. 132, pp. 165-169.
209. Zhu F., Xu W., Xia J., et al (2014), "Efficacy, safety, and immunogenicity of an enterovirus 71 vaccine in China", *The new england journal of medicine*. 370(9), pp. 818-828.
210. Zhu, J., Luo, Z., Wang, J., et al; (2013), "Phylogenetic analysis of Enterovirus 71 circulating in Beijing, China from 2007 to 2009", *PLoS One*. 8(2), p. e56318.

211. Zhu Z., Zhu S., Guo X., et al (2010), "Retrospective seroepidemiology indicated that human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 circulated widely in central and southern China before large-scale outbreaks from 2008", *Virology Journal*. 7.
212. Zoll G. J., Melchers W. J. G., Kopecka H., et al (1992), "General Primer-Mediated Polymerase Chain Reaction for Detection of Enteroviruses: Application for Diagnostic Routine and Persistent Infections", *Journal of clinical microbiology*. 30 (1), pp. 160-165.

## PHỤ LỤC

### Phụ lục 1

#### PHIẾU ĐIỀU TRA BỆNH TAY CHÂN MIỆNG

1. Họ và tên bệnh nhân: ..... 2. Ngày tháng năm sinh: ...../...../.....  
3. Giới tính: Nam  Nữ  4. Dân tộc: .....  
5. Họ tên mẹ (bố, người chăm sóc): .....  
6. Điện thoại: .....  
7. Địa chỉ: Thôn/xóm/tổ: ..... Xã: ..... Huyện:  
..... Tỉnh: .....  
8. Ngày khởi bệnh: ...../...../..... 9. Ngày vào viện ...../...../.....  
10. Tên cơ sở điều trị: ..... 11. Địa chỉ cơ sở điều trị: .....  
12. Lý do vào viện: .....  
13. Những triệu chứng chính từ lúc khởi phát đến khi nhập viện:  
-  Sốt -  Ban dạng phỏng nước -  Dấu hiệu màng não  
-  Đau họng +  ở tay +  ở chân -  Quấy khóc  
-  Mệt mỏi +  ở mông +  ở đầu gối -  Giật mình  
-  Chán ăn -  Loét miệng -  Co giật  
-  Tiêu chảy -  Ban dạng khác -  Liệt mềm cấp  
-  Nôn -  Rối loạn tim mạch, hô hấp  
-  Rối loạn tri giác  
14. Phân độ lâm sàng khi nhập viện: 1 2a 2b 3 4  
15. Trẻ có đi học không (*mầm non, nhà trẻ, mẫu giáo, nhóm trẻ gia đình*):  
có không  
16. Lấy mẫu và kết quả xét nghiệm:  
Phân Ngày lấy: ...../...../..... Kết quả (nơi làm XN điền):.....  
Dịch ngoáy họng: Ngày lấy: .../.../..... Kết quả (nơi làm XN điền):.....  
17. Phân độ lâm sàng nặng nhất trong cả quá trình bị bệnh :  
1 2a 2b 3 4

Ngày điều tra: ...../...../.....

Người điều tra  
(Ký, ghi rõ họ tên)

## Phụ lục 2

### Sự phân số mẫu TCM dương tính với týp vi rút đường ruột theo tỉnh/thành

STT	Tỉnh	Năm										Tổng số	
		2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017		2018
1	Bắc Giang	7		1	45	11	1				2	2	69
2	Bắc Kạn			1	21	18	2	1	3	2	2	3	53
3	Bắc Ninh				26	25	1	25	9	3		8	97
4	Cao Bằng				9	8			1	4			22
5	Điện Biên				6	8	3	13	3	8		14	55
6	Hà Giang	2		3	19	10	7	1	2	6	1	5	56
7	Hà Nam				5	2		2	1			5	15
8	Hà Nội		1		67	54	19	31	32			46	250
9	Hải Dương				23	21			8			15	67
10	Hải Phòng	2	1		63	107	79	22	10	75	69	82	510
11	Hòa Bình				72	42	23	2	6	7	3	2	157
12	Hưng Yên				2	4						7	13
13	Lai Châu	1			5	7		7					20
14	Lạng Sơn		1	3	1	2	6						13
15	Lào Cai	3			9	9		2	2			2	27
16	Nam Định	1			21	13	3	21	18	4	1	33	115
17	Ninh Bình	9			14	45	3	32	7			5	115
18	Phú Thọ				30	32	5	13	7	10		4	101
19	Quảng Ninh		1		13	15		10	5			1	45
20	Sơn La				5	6		14	10	44	1	27	107
21	Thái Bình	1			6	11	64	69	17	86	106	94	454
22	Thái Nguyên	1			1			1				1	4
23	Thanh Hóa				36	23	9	15		9		16	108
24	Tuyên Quang	2			20	9		2	5				38
25	Vĩnh Phúc				23	1	4	31	3			5	67
26	Yên Bái	3			9	9		2	2				25
	<b>Tổng số</b>	32	4	8	551	492	229	316	151	258	185	377	2063

### Phụ lục 3

#### Danh sách môi thực hiện phản ứng RT-PCR, multiplex RT-PCR và CODEHOP snRT-PCR/sequencing định tít VRĐR năm 2018

Phản ứng	Tên môi	Trình tự (5'-3')	Vị trí gen	Mục đích phát hiện	Sản phẩm PCR	Tài liệu tham khảo
<b>RT-PCR chẩn đoán vi rút đường ruột chung và multiplex RT-PCR chẩn đoán CV-A6, CV-A16</b>						
Phát hiện VRĐR	5'UTR F1	CAA GCA CTT CTG TTT CCC CGG	5'UTR	VRĐR	440	[212]
	5'UTR F2	ATT GTC ACC ATA AGC CA				
Đồng phát hiện EV-A71, CV-A6	MAS01S	TAA TAG CAY TRG CGG CAG CCC A	VP1	EV-A71	377	[136]
	MAS02A	AGA GGG AGR TCT ATC TCY CC				
	CA6_3020F	CRA CRG CTT ATC AGT GGT TTT A	VP1	CVA6	175	PTN VRĐR
	CA6_3194R	TTA ATT CTC ATR TAC ACY CG				- Viện VSDTTU'
Đồng phát hiện CV-A16 và CV-A10	CA16-2895F	AGT AYA TGT ATG TCC CRC	VP1	CV-A16	231	PTN VRĐR
	CA16-3105R	TAA TCY AGG TCA YTT GCT TG				- Viện VSDTTU'
	CA10_2700F	TGG ATT AGT RGG AGT RGT TA	VP1	CVA10	482	
	CA10_3181R	TCT GTA GTT TTA GTT GGC TT				



---

**Kỹ thuật CODEHOP snRT-PCR/sequencing và khuếch đại vùng gen VP1**

---

cDNA	AN32	GTY TGC CA	2A	Toàn bộ VRĐR, vi rút rhino	Không áp dụng	[130]
	AN33	GAY TGC CA				
	AN34	CCR TCR TA				
	AN35	RCT YTG CCA				
PCR 1	SO224	GCI ATG YTI GGI ACI CAY RT	VP3	762	Toàn bộ VRĐR, vi rút rhino A và B	[130]
	SO222	C ICC IGG IGG IAY RWA CAT	VP1			
PCR 2	AN89	CCA GCA CTG ACA GCA GYN GAR AYN GG	VP1	348-393		[130]
	AN88	TAC TGG ACC ACC TGG NGG NAY RWA CAT	VP1			

---

#### **Phụ lục 4**

##### **Quy trình tách chiết ARN bằng sinh phẩm Qiagen viral ARN mini kit (Qiagen)**

- ✓ Cho 560 µl AVL có chứa 5,6µl carrier ARN vào ống có thể tích 1,5 ml.
- ✓ Tra 140 µl mẫu vào ống đã có chứa hỗn hợp AVL và carrier ARN, trộn đều.
- ✓ Ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút.
- ✓ Tra thêm 560µl cồn (96–100%) vào hỗn hợp trên, trộn đều.
- ✓ Chuyển hỗn hợp lên cột lọc, ly tâm 8000 vòng/phút x 1 phút, chuyển cột sang ống hứng mới.
- ✓ Tra 500 AW1 vào cột, ly tâm 8000 vòng/phút x 1 phút, chuyển cột lọc sang ống hứng mới.
- ✓ Tra 500 AW2 vào cột lọc, ly tâm 14000 vòng/phút x 3 phút, chuyển cột lọc sang ống mới.
- ✓ Ly tâm khan với tốc độ 14000 vòng/phút.
- ✓ Chuyển cột lọc sang ống 1,5 ml,
- ✓ Tra 60 µl dung dịch AVE vào, ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 phút.
- ✓ Ly tâm 8000 vòng/1 phút x 1 phút, vứt bỏ cột lọc, cất ARN trong tủ -80°C

## Phụ lục 5

### Quy trình tách chiết ARN bằng sinh phẩm hoặc High Pure Viral RNA Kit (Roche)

- ✓ Tra 200 $\mu$ l mẫu vào tuýp có chứa sẵn 400 $\mu$ l Lysis Buffer
- ✓ Trộn đều trong vòng 15 giây
- ✓ Chuyển toàn bộ mẫu vào cột lọc (cột lọc để sẵn trong tuýp thu thập dịch ly tâm)
- ✓ Ly tâm ống ở tốc độ 8000g trong 1 phút
- ✓ Chuyển cột ly tâm sang tuýp mới
- ✓ Tra thêm 500 $\mu$ l Inhibitor removal buffer vào cột lọc
- ✓ Ly tâm ống ở tốc độ 8000g trong 1 phút
- ✓ Chuyển cột ly tâm sang tuýp mới
- ✓ Tra 450 $\mu$ l Wash Buffer.
- ✓ Ly tâm ống ở tốc độ 8000g trong 1 phút
- ✓ Chuyển cột ly tâm sang tuýp mới
- ✓ Tra 450 $\mu$ l Wash Buffer.
- ✓ Ly tâm ống ở tốc độ 13000g/phút x 1 phút
- ✓ Ly tâm ống ở tốc độ 13000 trong vòng 10 giây để loại bỏ hết Wash Buffer trong cột
- ✓ Chuyển cột ly tâm sang tuýp 1.5ml mới
- ✓ Tra 50 $\mu$ l Elution Buffer
- ✓ Ủ trong 1 phút
- ✓ Ly tâm ống ở tốc độ 8000g/ phút x 1 phút
- ✓ Bỏ cột ly tâm, giữ lại dung thích ARN thu được tại tuýp 1.5ml
- ✓ ARN được lưu trữ tại tủ -80°C

## **Phụ lục 6**

### **Quy trình tinh sạch sản phẩm giải trình tự bằng hóa chất Sephadex® G-50**

- ✓ Lấy 1,5g bột Sephadex® G-50
- ✓ Tra 20ml nước cất, trộn đều bằng máy lắc
- ✓ Chia 800 $\mu$ l vào các tuýp có cột lọc
- ✓ Để qua đêm để tạo thành các cột gel
- ✓ Ly tâm 7500 vòng / phút trong 2 phút để cô gel.
- ✓ Chuyển các cột gel vào tuýp 1,5ml có đánh mã số mẫu
- ✓ Tra toàn bộ lượng sản phẩm PCR vào cột gel
- ✓ Ly tâm 3000 vòng/phút x 2 phút.
- ✓ Loại bỏ gel. Thu dung dịch có được trong tuýp 1,5ml
- ✓ Mẫu được đông khô
- ✓ Tra 15 $\mu$ l HiDi Formide
- ✓ Chuyển 10  $\mu$ l mẫu vào đĩa 96 giếng để tiến hành giải trình tự

## Phụ lục 7

### Kết quả thực hiện giải trình tự vùng gen VP1 các mẫu CV-A6

STT	Mã số mẫu/ Tên chủng	Độ dài	STT	Mã số mẫu/ Tên chủng	Độ dài
1	CVA6/HVN17.082/Thai_Binh/VNM/2017/HFMD	915	103	LC438054.1_CV-A6/HVN12.633/Ninh_Binh/VNM/2012/HFMD	870
2	CVA6/HVN17.089/Thai_Binh/VNM/2017/HFMD	915	104	LC438055.1_CV-A6/HVN12.636/Hanoi/VNM/2012/HFMD	915
3	CVA6/HVN17.094/Bac_Giang/VNM/2017/HFMD	915	105	LC438056.1_CV-A6/HVN12.639/Ninh_Binh/VNM/2012/HFMD	912
4	CVA6/HVN17.105/Thai_Binh/VNM/2017/HFMD	915	106	LC438057.1_CV-A6/HVN12.644/Vinh_Phuc/VNM/2012/HFMD	900
5	CVA6/HVN17.121/Hai_Phong/VNM/2017/HFMD	915	107	LC438058.1_CV-A6/HVN12.650/Hai_Phong/VNM/2012/HFMD	909
6	CVA6/HVN17.150/Thai_Binh/VNM/2017/HFMD	915	108	LC438059.1_CV-A6/HVN12.708/Ha_Giang/VNM/2012/HFD	900
7	CVA6/HVN17.162/Thai_Binh/VNM/2017/HFMD	915	109	LC438060.1_CV-A6/HVN12.716/Bac_Ninh/VNM/2012/HFMD	912
8	CVA6/HVN17.174/Hai_Phong/VNM/2017/HFMD	915	110	LC438061.1_CV-A6/HVN12.717/Nam_Dinh/VNM/2012/HFMD	903
9	CVA6/HVN17.199/Hoa_Binh/VNM/2017/HFMD	915	111	LC438062.1_CV-A6/HVN12.736/Hoa_Binh/VNM/2012/HFMD	906
10	CVA6/HVN17.201/Thai_Binh/VNM/2017/HFMD	915	112	LC438063.1_CV-A6/HVN13.002/Hoa_Binh/VNM/2013/HFMD	873
11	CVA6/HVN17.205/Thai_Binh/VNM/2017/HFMD	915	113	LC438064.1_CV-A6/HVN13.008/Thai_Binh/VNM/2013/HFMD	867
12	CVA6/HVN17.211/Thai_Binh/VNM/2017/HFMD	915	114	LC438065.1_CV-A6/HVN13.011/Hoa_Binh/VNM/2013/HFMD	915
13	CVA6/HVN17.214/Thai_Binh/VNM/2017/HFMD	915	115	LC438066.1_CV-A6/HVN13.018/Ha_Giang/VNM/2013/HFMD	834
14	CVA6/HVN18.003/Son_La/VNM/2018/HFMD	915	116	LC438067.1_CV-A6/HVN13.021/Ninh_Binh/VNM/2013/HFMD	915
15	CVA6/HVN18.016/Son_La/VNM/2018/HFMD	915	117	LC438068.1_CV-A6/HVN13.022/Thai_Binh/VNM/2013/HFMD	915
16	CVA6/HVN18.025/Thai_Binh/VNM/2018/HFMD	915	118	LC438069.1_CV-A6/HVN13.023/Hai_Phong/VNM/2013/HFMD	840

17	CVA6/HVN18.130/Vinh_Phuc/VNM/2018/HFMD	915	119	LC438070.1_CV-A6/HVN13.024/Hanoi/VNM/2013/HFMD	915
18	CVA6/HVN18.253/Nam_Dinh/VNM/2018/HFMD	879	120	LC438071.1_CV-A6/HVN13.027/Hai_Phong/VNM/2013/HFMD	888
19	CVA6/HVN18.286/Thai_Binh/VNM/2018/HFMD	914	121	LC438072.1_CV-A6/HVN13.041/Thanh_Hoa/VNM/2013/HFMD	906
20	CVA6/HVN18.313/Hai_Phong/VNM/2018/HFMD	841	122	LC438073.1_CV-A6/HVN13.044/Hai_Phong/VNM/2013/HFMD	915
21	CVA6/HVN18.328/Son_La/VNM/2018/HFMD	915	123	LC438074.1_CV-A6/HVN13.053/Hai_Phong/VNM/2013/HFMD	891
22	CVA6/HVN18.336/Hai_Phong/VNM/2018/HFMD	915	124	LC438075.1_CV-A6/HVN13.076/Hanoi/VNM/2013/HFMD	912
23	CVA6/HVN18.342/Ha_Noi/VNM/2018/HFMD	915	125	LC438076.1_CV-A6/HVN13.092/Thai_Binh/VNM/2013/HFMD	915
24	CVA6/HVN18.344/Thai_Binh/VNM/2018/HFMD	915	126	LC438077.1_CV-A6/HVN13.101/Thai_Binh/VNM/2013/HFMD	912
25	CVA6/HVN18.350/Hai_Phong/VNM/2018/HFMD	915	127	LC438078.1_CV-A6/HVN13.112/Hanoi/VNM/2013/HFMD	914
26	CVA6/HVN18.362/Dien_Bien/VNM/2018/HFMD	915	128	LC438079.1_CV-A6/HVN13.115/Nam_Dinh/VNM/2013/HFMD	882
27	CVA6/HVN18.370/Phu_Tho/VNM/2018/HFMD	915	129	LC438080.1_CV-A6/HVN13.125/Hoa_Binh/VNM/2013/HFMD	915
28	CVA6/HVN18.372/Hai_Duong/VNM/2018/HFMD	915	130	LC438081.1_CV-A6/HVN13.127/Thai_Binh/VNM/2013/HFMD	915
29	CVA6/HVN18.374/Hai_Phong/VNM/2018/HFMD	915	131	LC438082.1_CV-A6/HVN13.137/Bac_Kan/VNM/2013/HFMD	870
30	CVA6/HVN18.378/Nam_Dinh/VNM/2018/HFMD	915	132	LC438083.1_CV-A6/HVN13.139/Nam_Dinh/VNM/2013/HFMD	906
31	CVA6/HVN18.381/Dien_Bien/VNM/2018/HFMD	915	133	LC438084.1_CV-A6/HVN13.163/Lang_Son/VNM/2013/HFMD	915
32	CVA6/HVN18.386/Phu_Tho/VNM/2018/HFMD	915	134	LC438085.1_CV-A6/HVN13.164/Lang_Son/VNM/2013/HFMD	915
33	CVA6/HVN18.397/Thai_Binh/2018/HFMD	915	135	LC438086.1_CV-A6/HVN13.181/Thanh_Hoa/VNM/2013/HFMD	915
34	CVA6/HVN18.403/Hung_Yen/2018/HFMD	915	136	LC438087.1_CV-A6/HVN14.048/Son_La/VNM/2014/HFMD	915
35	CVA6/HVN18.408/Hai_Phong/2018/HFMD	915	137	LC438088.1_CV-A6/HVN14.063/Lao_Cai/VNM/2014/HFMD	912
36	CVA6/HVN18.412/Hai_Duong/VNM/2018/HFMD	915	138	LC438089.1_CV-A6/HVN14.217/Thanh_Hoa/VNM/2014/HFMD	915
37	CVA6/HVN18.413/Bac_Ninh/VNM/2018/HFMD	833	139	LC438090.1_CV-A6/HVN14.246/Hanoi/VNM/2014/HFMD	906

38	CVA6/HVN18.417/Ha_Noi/VNM/2018/HFMD	915	140	LC438091.1_CV-A6/HVN14.265/Thai_Binh/VNM/2014/HFMD	822
39	CVA6/HVN18.428/Thai_Binh/VNM/2018/HFMD	915	141	LC438092.1_CV-A6/HVN14.296/Ninh_Binh/VNM/2014/HFMD	915
40	CVA6/HVN18.431/Thai_Binh/VNM/2018/HFMD	915	142	LC438094.1_CV-A6/HVN14.337/Hai_Phong/VNM/2014/HFMD	885
41	CVA6/HVN18.438/Hai_Phong/VNM/2018/HFMD	915	143	LC438095.1_CV-A6/HVN14.338/Thai_Binh/VNM/2014/HFMD	894
42	CVA6/HVN18.439/Ninh_Binh/VNM/2018/HFMD	915	144	LC438096.1_CV-A6/HVN14.339/Bac_Ninh/VNM/2014/HFMD	915
43	CVA6/HVN18.484/Hai_Phong/VNM/2018/HFMD	912	145	LC438097.1_CV-A6/HVN14.343/Phu_Tho/VNM/2014/HFMD	915
44	CVA6/HVN18.496/Hai_Phong/VNM/2018/HFMD	915	146	LC438098.1_CV-A6/HVN14.344/Phu_Tho/VNM/2014/HFMD	915
45	CVA6/HVN18.499/Ha_Noi/VNM/2018/HFMD	915	147	LC438099.1_CV-A6/HVN14.354/Vinh_Phuc/VNM/2014/HFMD	915
46	CVA6/HVN18.501/Son_La/VNM/2018/HFMD	915	148	LC438100.1_CV-A6/HVN14.357/Nam_Dinh/VNM/2014/HFMD	915
47	CVA6/HVN18.504/Hoa_Binh/VNM/2018/HFMD	915	149	LC438101.1_CV-A6/HVN14.372/Vinh_Phuc/VNM/2014/HFMD	912
48	LC437995.1_CVA6/HVN11.041/Ha_Nam/VNM/2011/HFMD	867	150	LC438103.1_CV-A6/HVN14.382/Hai_Phong/VNM/2014/HFMD	885
49	LC437996.1_CVA6/HVN11.051/Hoa_Binh/VNM/2011/HFMD	888	151	LC438104.1_CV-A6/HVN14.389/Vinh_Phuc/VNM/2014/HFMD	912
50	LC437997.1_CV-A6/HVN11.069/Thanh_Hoa/VNM/2011/HFMD	849	152	LC438106.1_CV-A6/HVN14.392/Nam_Dinh/VNM/2014/HFMD	915
51	LC437999.1_CV-A6/HVN11.194/Thai_Nguyen/VNM/2011/HFMD	915	153	LC438107.1_CV-A6/HVN15.024/Hanoi/VNM/2015/HFMD	915
52	LC438000.1_CV-A6/HVN11.212/Hai_Duong/VNM/2011/HFMD	915	154	LC438108.1_CV-A6/HVN15.048/Nam_Dinh/VNM/2015/HFMD	908
53	LC438001.1_CV-A6/HVN11.217/Bac_Giang/VNM/2011/HFMD	870	155	LC438109.1_CV-A6/HVN15.052/Hai_Duong/VNM/2015/HFMD	804
54	LC438002.1_CV-A6/HVN11.221/Hoa_Binh/VNM/2011/HFMD	915	156	LC438110.1_CV-A6/HVN15.065/Quang_Ninh/VNM/2015/HFMD	894
55	LC438004.1_CV-A6/HVN11.249/Phu_Tho/VNM/2011/HFMD	915	157	LC438111.1_CV-A6/HVN15.072/Dien_Bien/VNM/2015/HFMD	822

56	LC438007.1_CV-A6/HVN11.279/Nam_Dinh/VNM/2011/HFMD	915	158	LC438112.1_CV-A6/HVN15.080/Nam_Dinh/VNM/2015/HFMD	900
57	LC438008.1_CV-A6/HVN11.366/Quang_Ninh/VNM/2011/HFMD	915	159	LC438113.1_CV-A6/HVN15.084/Hoa_Binh/VNM/2015/HFMD	882
58	LC438009.1_CV-A6/HVN11.390/Phu_Tho/VNM/2011/HFMD	909	160	LC438114.1_CV-A6/HVN15.085/Son_La/VNM/2015/HFMD	915
59	LC438010.1_CV-A6/HVN11.412/Quang_Ninh/VNM/2011/HFMD	915	161	LC438115.1_CV-A6/HVN15.124/Hai_Phong/VNM/2015/HFMD	915
60	LC438011.1_CV-A6/HVN11.414/Bac_Kan/VNM/2011/HFMD	846	162	LC438116.1_CV-A6/HVN15.136/Thai_Binh/VNM/2015/HFMD	915
61	LC438012.1_CV-A6/HVN11.418/Bac_Kan/VNM/2011/HFMD	885	163	LC438117.1_CV-A6/HVN15.145/Nam_Dinh/VNM/2015/HFMD	915
62	LC438013.1_CV-A6/HVN11.428/Vinh_Phuc/VNM/2011/HFMD	876	164	LC438118.1_CV-A6/HVN15.146/Hoa_Binh/VNM/2015/HFMD	915
63	LC438014.1_CV-A6/HVN11.457/Hai_Duong/VNM/2011/HFMD	915	165	LC438119.1_CV-A6/HVN15.149/Bac_Kan/VNM/2015/HFMD	915
64	LC438015.1_CV-A6/HVN11.480/Phu_Tho/VNM/2011/HFMD	897	166	LC438120.1_CV-A6/HVN15.151/Hai_Phong/VNM/2015/HFMD	901
65	LC438016.1_CV-A6/HVN11.528/Nam_Dinh/VNM/2011/HFMD	855	167	LC438121.1_CV-A6/HVN15.154/Bac_Ninh/VNM/2015/HFMD	915
66	LC438017.1_CV-A6/HVN11.565/Phu_Tho/VNM/2011/HFMD	915	168	LC438122.1_CV-A6/HVN15.160/Thai_Binh/VNM/2015/HFMD	915
67	LC438018.1_CV-A6/HVN11.569/Quang_Ninh/VNM/2011/HFMD	915	169	LC438123.1_CV-A6/HVN15.163/Bac_Ninh/VNM/2015/HFMD	915
68	LC438019.1_CV-A6/HVN11.574/Hoa_Binh/VNM/2011/HFMD	870	170	LC438124.1_CV-A6/HVN15.174/Nam_Dinh/VNM/2015/HFMD	915
69	LC438020.1_CV-A6/HVN11.601/Bac_Kan/VNM/2011/HFMD	915	171	LC438125.1_CV-A6/HVN15.179/Bac_Kan/VNM/2015/HFMD	906
70	LC438021.1_CV-A6/HVN11.604/Bac_Ninh/VNM/2011/HFMD	909	172	LC438126.1_CV-A6/HVN15.185/Ninh_Binh/VNM/2015/HFMD	915
71	LC438022.1_CV-A6/HVN11.611/Bac_Giang/VNM/2011/HFMD	915	173	LC438127.1_CV-A6/HVN15.189/Bac_Ninh/VNM/2015/HFMD	912



72	LC438023.1_CV-A6/HVN11.631/Ha_Giang/VNM/2011/HFMD	915	174	LC438128.1_CV-A6/HVN15.190/Dien_Bien/VNM/2015/HFMD	915
73	LC438024.1_CV-A6/HVN11.656/Hanoi/VNM/2011/HFMD	912	175	LC438129.1_CV-A6/HVN15.191/Hoa_Binh/VNM/2015/HFMD	915
74	LC438025.1_CV-A6/HVN11.821/Tuyen_Quang/VNM/2011/HFMD	903	176	LC438130.1_CV-A6/HVN15.196/Nam_Dinh/VNM/2015/HFMD	915
75	LC438026.1_CV-A6/HVN11.828/Ha_Giang/VNM/2011/HFMD	897	177	LC438131.1_CV-A6/HVN15.201/Vinh_Phuc/VNM/2015/HFMD	915
76	LC438027.1_CV-A6/HVN11.880/Thai_Binh/VNM/2011/HFMD	891	178	LC438132.1_CV-A6/HVN16.088/Thai_Binh/VNM/2016/HFMD	912
77	LC438028.1_CV-A6/HVN11.953/Tuyen_Quang/VNM/2011/HFMD	873	179	LC438133.1_CV-A6/HVN16.144/Thai_Binh/VNM/2016/HFMD	915
78	LC438029.1_CV-A6/HVN11.993/Bac_Ninh/VNM/2011/HFMD	915	180	LC438134.1_CV-A6/HVN16.180/Hai_Phong/VNM/2016/HFMD	915
79	LC438030.1_CV-A6/HVN12.001/Hai_Phong/VNM/2012/HFMD	912	181	LC438135.1_CV-A6/HVN16.227/Thai_Binh/VNM/2016/HFMD	915
80	LC438031.1_CV-A6/HVN12.005/Hoa_Binh/VNM/2012/HFMD	912	182	LC438136.1_CV-A6/HVN16.248/Thai_Binh/VNM/2016/HFMD	915
81	LC438032.1_CV-A6/HVN12.006/Hoa_Binh/VNM/2012/HFMD	894	183	LC438137.1_CV-A6/HVN16.271/Hai_Phong/VNM/2016/HFMD	915
82	LC438033.1_CV-A6/HVN12.016/Hai_Duong/VNM/2012/HFMD	915	184	LC438138.1_CV-A6/HVN16.293/Hai_Phong/VNM/2016/HFMD	915
83	LC438034.1_CV-A6/HVN12.025/Hoa_Binh/VNM/2012/HFMD	912	185	LC438139.1_CV-A6/HVN16.326/Hai_Phong/VNM/2016/HFMD	915
84	LC438035.1_CV-A6/HVN12.026/Hai_Phong/VNM/2012/HFMD	915	186	LC438140.1_CV-A6/HVN17.020/Thai_Binh/VNM/2017/HFMD	915
85	LC438036.1_CV-A6/HVN12.059/Bac_Giang/VNM/2012/HFMD	915	187	LC438141.1_CV-A6/HVN17.025/Thai_Binh/VNM/2017/HFMD	915
86	LC438037.1_CV-A6/HVN12.099/Hanoi/VNM/2012/HFMD	915	188	LC438142.1_CV-A6/HVN17.051/Hai_Phong/VNM/2017/HFMD	915
87	LC438038.1_CV-A6/HVN12.226/Hanoi/VNM/2012/HFMD	915	189	LC438143.1_CV-A6/HVN17.057/Thai_Binh/VNM/2017/HFMD	915

88	LC438039.1_CV-A6/HVN12.235/Quang_Ninh/VNM/2012/HFMD	861	190	LC438144.1_CV-A6/HVN17.065/Thai_Binh/VNM/2017/HFMD	915
89	LC438040.1_CV-A6/HVN12.452/Bac_Ninh/VNM/2012/HFMD	849	191	LC438145.1_CV-A6/HVN17.099/Thai_Binh/VNM/2017/HFMD	915
90	LC438041.1_CV-A6/HVN12.459/Nam_Dinh/VNM/2012/HFMD	915	192	LC438146.1_CV-A6/HVN17.113/Thai_Binh/VNM/2017/HFMD	915
91	LC438042.1_CV-A6/HVN12.490/Bac_Ninh/VNM/2012/HFMD	915	193	LC438147.1_CV-A6/HVN17.147/Hai_Phong/VNM/2017/HFMD	915
92	LC438043.1_CV-A6/HVN12.503/Cao_Bang/VNM/2012/HFMD	912	194	LC438148.1_CV-A6/HVN17.165/Thai_Binh/VNM/2017/HFMD	915
93	LC438044.1_CV-A6/HVN12.505/Nam_Dinh/VNM/2012/HFMD	912	195	LC438149.1_CV-A6/HVN17.171/Hai_Phong/VNM/2017/HFMD	915
94	LC438045.1_CV-A6/HVN12.519/Hanoi/VNM/2012/HFMD	915	196	LC438150.1_CV-A6/HVN17.180/Thai_Binh/VNM/2017/HFMD	915
95	LC438046.1_CV-A6/HVN12.548/Thanh_Hoa/VNM/2012/HFMD	837	197	LC506446.1_CV-A6/HVN11.506/Thai_Binh/VNM/2011/HFMD	915
96	LC438047.1_CV-A6/HVN12.580/Thanh_Hoa/VNM/2012/HFMD	915	198	LC506448.1_CV-A6/HVN13.063/Hai_Phong/VNM/2013/HFMD	915
97	LC438048.1_CV-A6/HVN12.584/Ninh_Binh/VNM/2012/HFMD	915	199	LC506449.1_CV-A6/HVN13.004/Thai_Binh/VNM/2013/HFMD	915
98	LC438049.1_CV-A6/HVN12.595/Cao_Bang/VNM/2012/HFMD	914	200	LC506451.1_CV-A6/HVN15.144/Hai_Phong/VNM/2015/HFMD	915
99	LC438050.1_CV-A6/HVN12.599/Bac_Kan/VNM/2012/HFMD	867	201	LC506452.1_CV-A6/HVN16.117/Thai_Binh/VNM/2016/HFMD	915
100	LC438051.1_CV-A6/HVN12.614/Cao_Bang/VNM/2012/HFMD	912	202	LC506453.1_CV-A6/HVN16.231/Hai_Phong/VNM/2016/HFMD	915
101	LC438052.1_CV-A6/HVN12.625/Ninh_Binh/VNM/2012/HFMD	912	203	LC506454.1_CVA6/HVN17.123/Hai_Phong/VNM/2017/HFMD	915
102	LC438053.1_CV-A6/HVN12.627/Ha_Giang/VNM/2012/HFMD	912	204		

**Phụ lục 8****Kết quả thực hiện giải trình tự vùng gen VP1 các mẫu CV-A16**

<b>STT</b>	<b>Mã số mẫu/ Tên chủng</b>	<b>Độ dài</b>	<b>STT</b>	<b>Mã số mẫu/ Tên chủng</b>	<b>Độ dài</b>
1	LC438151.1_CVA16/HVN08.001/Ninh_Binh/VNM/2008/HFMD	891	66	LC438218.1_CVA16/HVN14.111/Ha_Noi/VNM/2014/HFMD	891
2	LC438152.1_CVA16/HVN08.002/Thai_Binh/VNM/2008/HFMD	891	67	LC438219.1_CVA16/HVN14.119/Hoa_Binh/VNM/2014/HFMD	891
3	LC438153.1_CVA16/HVN08.008/Tuyen_Quang/VNM/2008/HFMD	891	68	LC438220.1_CVA16/HVN14.120/Lao_Cai/VNM/2014/HFMD	891
4	LC438154.1_CVA16/HVN08.023/Bac_Giang/VNM/2008/HFMD	891	69	LC438221.1_CVA16/HVN14.128/Thanh_Hoa/VNM/2014/HFMD	891
5	LC438156.1_CVA16/HVN08.033/Yen_Bai/VNM/2008/HFMD	891	70	LC438222.1_CVA16/HVN14.140/Thai_Binh/VNM/2014/HFMD	891
6	LC438157.1_CVA16/HVN08.039/Ha_Giang/VNM/2008/HFMD	891	71	LC438223.1_CVA16/HVN14.153/Yen_Bai/VNM/2014/HFMD	891
7	LC438158.1_CVA16/HVN08.055/Hai_Phong/VNM/2008/HFMD	891	72	LC438224.1_CVA16/HVN14.160/Bac_Ninh/VNM/2014/HFMD	891
8	LC438159.1_CVA16/HVN08.060/Ha_Giang/VNM/2008/HFMD	888	73	LC438225.1_CVA16/HVN14.180/Nam_Dinh/VNM/2014/HFMD	891
9	LC438160.1_CVA16/HVN08.064/Lai_Chau/VNM/2008/HFMD	867	74	LC438226.1_CVA16/HVN14.182/Nam_Dinh/VNM/2014/HFMD	891
10	LC438161.1_CVA16/HVN08.074/Yen_Bai/VNM/2008/HFMD	891	75	LC438227.1_CVA16/HVN14.191/Ha_Noi/VNM/2014/HFMD	891
11	LC438162.1_CVA16/HVN08.083/Lao_Cai/VNM/2008/HFMD	849	76	LC438228.1_CVA16/HVN14.195/Ha_Noi/VNM/2014/HFMD	891
12	LC438163.1_CVA16/HVN08.084/Lao_Cai/VNM/2008/HFMD	891	77	LC438229.1_CVA16/HVN14.197/Ha_Noi/VNM/2014/HFMD	891
13	LC438164.1_CVA16/HVN09.010/Lang_Son/VNM/2009/HFMD	869	78	LC438230.1_CVA16/HVN14.201/Ninh_Binh/VNM/2014/HFMD	891
14	LC438165.1_CVA16/HVN09.014/Ha_Noi/VNM/2009/HFMD	873	79	LC438231.1_CVA16/HVN14.205/Lai_Chau/VNM/2014/HFMD	891
15	LC438166.1_CVA16/HVN11.023/Bac_Ninh/VNM/2011/HFMD	891	80	LC438232.1_CVA16/HVN14.206/Lai_Chau/VNM/2014/HFMD	891
16	LC438167.1_CVA16/HVN11.040/Ha_Nam/VNM/2011/HFMD	891	81	LC438233.1_CVA16/HVN14.216/Thanh_Hoa/VNM/2014/HFMD	891

17	LC438168.1_CVA16/HVN11.090/Hung_Yen/VNM/2011/HFMD	891	82	LC438234.1_CVA16/HVN14.221/Thai_Binh/VNM/2014/HFMD	891
18	LC438169.1_CVA16/HVN11.100/Lao_Cai/VNM/2011/HFMD	891	83	LC438235.1_CVA16/HVN14.233/Ninh_Binh/VNM/2014/HFMD	891
19	LC438170.1_CVA16/HVN11.178/Yen_Bai/VNM/2011/HFMD	891	84	LC438237.1_CVA16/HVN14.244/Phu_Th/VNM/2014/HFMD	891
20	LC438171.1_CVA16/HVN11.214/Vinh_Phuc/VNM/2011/HFMD	891	85	LC438238.1_CVA16/HVN14.250/Vinh_Phuc/VNM/2014/HFMD	891
21	LC438172.1_CVA16/HVN11.231/Hai_Duong/VNM/2011/HFMD	855	86	LC438239.1_CVA16/HVN14.256/Vinh_Phuc/VNM/2014/HFMD	891
22	LC438173.1_CVA16/HVN11.255/Nghe_An/VNM/2011/HFMD	867	87	LC438240.1_CVA16/HVN14.266/Ha_Noi/VNM/2014/HFMD	891
23	LC438174.1_CVA16/HVN11.361/Vinh_Phuc/VNM/2011/HFMD	891	88	LC438241.1_CVA16/HVN14.278/Ha_Tinh/VNM/2014/HFMD	891
24	LC438175.1_CVA16/HVN11.371/Hai_Duong/VNM/2011/HFMD	891	89	LC438242.1_CVA16/HVN14.282/Bac_Ninh/VNM/2014/HFMD	891
25	LC438176.1_CVA16/HVN11.393/Phu_Tho/VNM/2011/HFMD	891	90	LC438243.1_CVA16/HVN14.283/Dien_Bien/VNM/2014/HFMD	891
26	LC438177.1_CVA16/HVN11.430/Vinh_Phuc/VNM/2011/HFMD	891	91	LC438244.1_CVA16/HVN14.285/Ninh_Binh/VNM/2014/HFMD	891
27	LC438178.1_CVA16/HVN11.448/Ha_Noi/VNM/2011/HFMD	891	92	LC438245.1_CVA16/HVN14.289/Son_La/VNM/2014/HFMD	891
28	LC438179.1_CVA16/HVN11.530/Cao_Bang/VNM/2011/HFMD	891	93	LC438246.1_CVA16/HVN14.294/Hai_Phong/VNM/2014/HFMD	891
29	LC438180.1_CVA16/HVN11.624/Bac_Giang/VNM/2011/HFMD	888	94	LC438247.1_CVA16/HVN14.309/Bac_Ninh/VNM/2014/HFMD	891
30	LC438181.1_CVA16/HVN11.650/Thanh_Hoa/VNM/2011/HFMD	891	95	LC438248.1_CVA16/HVN14.313/Son_La/VNM/2014/HFMD	891
31	LC438182.1_CVA16/HVN11.667/Ha_Noi/VNM/2011/HFMD	891	96	LC438249.1_CVA16/HVN14.314/Ninh_Binh/VNM/2014/HFMD	891
32	LC438183.1_CVA16/HVN11.815/Bac_Ninh/VNM/2011/HFMD	891	97	LC438250.1_CVA16/HVN14.319/Thai_Nguyen/VNM/2014/HFMD	891
33	LC438184.1_CVA16/HVN11.865/Bac_Ninh/VNM/2011/HFMD	858	98	LC438251.1_CVA16/HVN14.321/Thai_Binh/VNM/2014/HFMD	891
34	LC438185.1_CVA16/HVN11.904/Cao_Bang/VNM/2011/HFMD	891	99	LC438252.1_CVA16/HVN14.327/Hai_Phong/VNM/2014/HFMD	891
35	LC438186.1_CVA16/HVN12.003/Hai_Phong/VNM/2012/HFMD	858	100	LC438253.1_CVA16/HVN14.336/Hai_Phong/VNM/2014/HFMD	891
36	LC438187.1_CVA16/HVN12.027/Hai_Phong/VNM/2012/HFMD	827	101	LC438254.1_CVA16/HVN14.340/Ninh_Binh/VNM/2014/HFMD	891
37	LC438188.1_CVA16/HVN12.053/Hai_Phong/VNM/2012/HFMD	891	102	LC438255.1_CVA16/HVN15.026/Phu_Tho/VNM/2015/HFMD	891

38	LC438189.1_CVA16/HVN12.057/Hai_Phong/VNM/2012/HFMD	891	103	LC438256.1_CVA16/HVN15.056/Tuyen_Quang/VNM/2015/HFMD	891
39	LC438190.1_CVA16/HVN12.111/Lao_Cai/VNM/2012/HFMD	891	104	LC438257.1_CVA16/HVN16.067/Thai_Binh/VNM/2016/HFMD	891
40	LC438191.1_CVA16/HVN12.147/Hoa_Binh/VNM/2012/HFMD	891	105	LC438258.1_CVA16/HVN16.075/Hai_Phong/VNM/2016/HFMD	891
41	LC438192.1_CVA16/HVN12.257/Thanh_Hoa/VNM/2012/HFMD	891	106	LC438259.1_CVA16/HVN16.082/Hai_Phong/VNM/2016/HFMD	891
42	LC438193.1_CVA16/HVN12.432/Thanh_Hoa/VNM/2012/HFMD	891	107	LC438260.1_CVA16/HVN16.087/Thai_Binh/VNM/2016/HFMD	891
43	LC438194.1_CVA16/HVN12.502/Thanh_Hoa/VNM/2012/HFMD	891	108	LC438261.1_CVA16/HVN16.091/Thai_Binh/VNM/2016/HFMD	858
44	LC438195.1_CVA16/HVN12.529/Cao_Bang/VNM/2012/HFMD	891	109	LC438262.1_CVA16/HVN16.120/Hai_Phong/VNM/2016/HFMD	891
45	LC438196.1_CVA16/HVN12.577/Dien_Bien/VNM/2012/HFMD	891	110	LC438263.1_CVA16/HVN17.060/Thai_Binh/VNM/2017/HFMD	891
46	LC438197.1_CVA16/HVN12.585/Son_La/VNM/2012/HFMD	891	111	LC438264.1_CVA16/HVN17.062/Thai_Binh/VNM/2017/HFMD	891
47	LC438198.1_CVA16/HVN12.600/Thanh_Hoa/VNM/2012/HFMD	855	112	LC438266.1_CVA16/HVN17.103/Thai_Binh/VNM/2017/HFMD	891
48	LC438199.1_CVA16/HVN12.649/Hai_Phong/VNM/2012/HFMD	891	113	LC438267.1_CVA16/HVN17.108/Thai_Binh/VNM/2017/HFMD	891
49	LC438200.1_CVA16/HVN12.653/Ha_Noi/VNM/2012/HFMD	885	114	LC438268.1_CVA16/HVN17.120/Hai_Phong/VNM/2017/HFMD	891
50	LC438201.1_CVA16/HVN12.689/Ninh_Binh/VNM/2012/HFMD	891	115	LC438269.1_CVA16/HVN17.129/Hai_Phong/VNM/2017/HFMD	891
51	LC438202.1_CVA16/HVN12.692/Phu_Tho/VNM/2012/HFMD	891	116	LC438270.1_CVA16/HVN17.132/Hai_Phong/VNM/2017/HFMD	891
52	LC438203.1_CVA16/HVN12.719/Ha_Noi/VNM/2012/HFMDds	891	117	LC438271.1_CVA16/HVN17.152/Thai_Binh/VNM/2017/HFMD	891
53	LC438204.1_CVA16/HVN12.738/Ninh_Binh/VNM/2012/HFMD	891	118	LC438272.1_CVA16/HVN17.159/Thai_Binh/VNM/2017/HFMD	891
54	LC438205.1_CVA16/HVN13.004/Dien_Bien/VNM/2013/HFMD	891	119	LC438273.1_CVA16/HVN17.177/Hai_Phong/VNM/2017/HFMD	891
55	LC438206.1_CVA16/HVN13.004/Hoa_Binh/VNM/2013/HFMD	891	120	LC438155.1_CVA16/HVN08.028/Bac_Giang/VNM/2008/HFMD	891
56	LC438207.1_CVA16/HVN13.005/Hai_Phong/VNM/2013/HFMD	888	121	CVA16/HVN14.119/Hoa_Binh/VNM/2014/HFMD	891
57	LC438208.1_CVA16/HVN13.008/Hai_Phong/VNM/2013/HFMD	891	122	CVA16/HVN17.084/Thai_Binh/VNM/2017/HFMD	891
58	LC438209.1_CVA16/HVN13.022/Hai_Phong/VNM/2013/HFMD	858	123	CVA16/HVN17.149/Thai_Binh/VNM/2017/HFMD	891

59	LC438210.1_CVA16/HVN13.025/Ninh_Binh/VNM/2013/HFMD	891	124	CVA16/HVN17.156/Thai_Binh/VNM/2017/HFMD	891
60	LC438212.1_CVA16/HVN13.090/Hoa_Binh/VNM/2013/HFMD	891	125	CVA16/HVN17.188/Bac_Kan/VNM/2017/HFMD	891
61	LC438213.1_CVA16/HVN14.037/Thai_Binh/VNM/2014/HFMD	891	126	CVA16/HVN18.001/Ha_Giang/VNM/2018//HFMD	891
62	LC438214.1_CVA16/HVN14.054/Bac_Kan/VNM/2014/HFMD	891	127	CVA16/HVN18.015/Ha_Giang/VNM/2018//HFMD	891
63	LC438215.1_CVA16/HVN14.086/Ninh_Binh/VNM/2014/HFMD	891	128	CVA16/HVN18.020/Son_La/VNM/2018//HFMD	890
64	LC438216.1_CVA16/HVN14.094/Nam_Dinh/VNM/2014/HFMD	891	129	CVA16/HVN18.168/Son_La/VNM/2018//HFMD	891
65	LC438217.1_CVA16/HVN14.099/Bac_Ninh/VNM/2014/HFMD	891	130	CVA16/HVN17.208/Hoa_Binh/VNM/2017/HFMD	891

## Phụ lục 9

### Kết quả thực hiện giải trình tự vùng gen VP1 các mẫu CV-A10

STT	Mã số mẫu/ Tên chủng	Độ dài
1	CV-A10/HVN11.028.Ninh_Binh/VNM/2011	894
2	CV-A10/HVN13.016.Hai_Phong/VNM/2013	894
3	CV-A10/HVN13.020.Hai_Phong/VNM/2013	894
4	CV-A10/HVN13.340.Hai_Phong/VNM/2013	894
5	CV-A10/HVN14.213.Thai_Binh/VNM/2014	894
6	CV-A10/HVN14.300.Ninh_Binh/VNM/2014	894
7	CV-A10/HVN14.320.Thai_Binh/VNM/2014	894
8	CV-A10/HVN14.347.Vinh_Phuc/VNM/2014	894
9	CV-A10/HVN15.088.Hai_Phong/VNM/2015	894
10	CV-A10/HVN16.066.Thai_Binh/VNM/2016	894
11	CV-A10/HVN16.068.Thai_Binh/VNM/2016	894
12	CV-A10/HVN16.069.Thai_Binh/VNM/2016	894
13	CV-A10/HVN16.070.Thai_Binh/VNM/2016	894
14	CV-A10/HVN16.073.Hai_Phong/VNM/2016	894
15	CV-A10/HVN16.076.Thai_Binh/VNM/2016	894
16	CV-A10/HVN16.078.Thai_Binh/VNM/2016	894
17	CV-A10/HVN16.080.Hai_Phong/VNM/2016	894
18	CV-A10/HVN16.085.Thai_Binh/VNM/2016	894
19	CV-A10/HVN16.089.Hai_Phong/VNM/2016	894
20	CV-A10/HVN16.094.Hai_Phong/VNM/2016	894
21	CV-A10/HVN16.097.Hai_Phong/VNM/2016	894
22	CV-A10/HVN16.098.Hai_Phong/VNM/2016	894
23	CV-A10/HVN16.102.Thai_Binh/VNM/2016	894
24	CV-A10/HVN16.107.Hai_Phong/VNM/2016	894
25	CV-A10/HVN16.109.Hai_Phong/VNM/2016	894

26	CV-A10/HVN16.132.Thanh_Hoa/VNM/2016	894
27	CV-A10/HVN16.132.Thanh_Hoa/VNM/2016	894
28	CV-A10/HVN16.138.Hai_Phong/VNM/2016	894
29	CV-A10/HVN16.139.Hai_Phong/VNM/2016	894
30	CV-A10/HVN16.140.Hai_Phong/VNM/2016	894
31	CV-A10/HVN16.153.Hai_Phong/VNM/2016	894
32	CV-A10/HVN16.154.Hai_Phong/VNM/2016	894
33	CV-A10/HVN17.195.Thai_Binh/VNM/2017	894
34	CVA10/HVN18.019/Thai_Binh/VNM/2018/HFMD	894
35	CVA10/HVN18.024/Ha_Noi/VNM/2018/HFMD	894
36	CVA10/HVN18.029/Thai_Binh/VNM/2018/HFMD	894
37	CVA10/HVN18.031/Thai_Binh/VNM/2018/HFMD	868
38	CVA10/HVN18.032/Thai_Binh/VNM/2018/HFMD	894
39	CVA10/HVN18.033/Thai_Binh/VNM/2018/HFMD	894
40	CVA10/HVN18.035/Thai_Binh/VNM/2018/HFMD	894
41	CVA10/HVN18.037/Thai_Binh/VNM/2018/HFMD	894
42	CVA10/HVN18.041/Thai_Binh/VNM/2018/HFMD	894
43	CVA10/HVN18.058/Hai_Phong/VNM/2018/HFMD	894
44	CVA10/HVN18.059/Hai_Phong/VNM/2018/HFMD	894
45	CVA10/HVN18.067/Hai_Phong/VNM/2018/HFMD	791
46	CVA10/HVN18.071/Thai_Binh/VNM/2018/HFMD	894



## Phụ lục 10

### Kết quả thực hiện giải trình tự vùng gen VP1 các mẫu CV-A2

STT	Mã số mẫu/ Tên chủng	Độ dài
1	LC438274.1_CVA2/HVN17.004/Hai_Phong/VNM/2017/HFMD	802
2	LC438275.1_CV-A2/HVN17.005/Hai_Phong/VNM/2017/HFMD	802
3	LC438276.1_CV-A2/HVN17.006/Hai_Phong/VNM/2017/HFMD	802
4	LC438277_CV-A2/HVN17.033/Hai_Phong/VNM/2017/HFMD	837
5	LC438278.1_CV-A2/HVN17.037/Thai_Binh/VNM/2017/HFMD	865
6	LC483975.1_CV-A2/HVN14_004_Thai_BinhVNM/2014/HFMD	767
7	LC483976.1_CV-A2/HVN14_058_Thai_BinhVNM/2014/HFMD	767
8	LC483977.1_CV-A2/HVN14_291_Thai_BinhVNM/2014/HFMD	751
9	LC483978.1_CV-A2/HVN14_313_Thai_BinhVNM/2014/HFMD	765

## Phụ lục 11

### Kết quả thực hiện giải trình tự vùng gen VP1 các mẫu CV-A4

STT	Mã số mẫu/ Tên chủng	Độ dài
1	LC438279.1_CVA4/HVN12.555/Hanoi/VNM/2012/HFMD	896
2	LC438280.1_CVA4/HVN14.038/Thai_Binh/VNM/2014/HFMD	794
3	LC438281.1_CVA4/HVN16.072/Hai_Phong/VNM/2016/HFMD	845
4	LC438282.1_CVA4/HVN17.015/Hai_Phong/VNM/2017/HFMD	903
5	LC438283.1_CVA4/HVN17.016/Hai_Phong/VNM/2017/HFMD	895
6	LC438284.1_CVA4/HVN17.027/Hai_Phong/VNM/2017/HFMD	888
7	LC438285.1_CVA4/HVN17.028/Hai_Phong/VNM/2017/HFMD	895
8	LC438286.1_CVA4/HVN17.029/Hai_Phong/VNM/2017/HFMD	885
9	LC438287.1_CVA4/HVN17.030/Hai_Phong/VNM/2017/HFMD	914
10	LC438288.1_CVA4/HVN17.031/Hai_Phong/VNM/2017/HFMD	888
11	LC483979.1_CVA4/HVN15_127_Hai_PhongVNM/2015/HFMD	845
12	LC483980.1_CVA4/HVN17_021_Thai_BinhVNM/2017/HFMD	883

## Phụ lục 12

### Kết quả thực hiện giải trình tự vùng gen VP1 các mẫu E-18

STT	Mã số mẫu/ Tên chủng	Độ dài
1	HVN.16.136/ThaiBinh_TCM	826
2	HVN.17.066/HaiPhong_TCM	861
3	HVN.17.073/HaiPhong_TCM	838
4	HVN.17.072/HaiPhong_TCM	860
5	HVN.17.071/HaiPhong_TCM	861
6	HVN.17.067/HaiPhong_TCM	861
7	HVN.16.059/PhuTho_TCM	861

### Phụ lục 13

#### Kết quả thực hiện giải trình tự vùng gen VP1 các mẫu CV-A24

STT	Mã số mẫu/ Tên chủng	Độ dài
1	HVN.13.086/ThaiBinh_HFMD	915
2	HVN.13.141/PhuTho_HFMD	915
3	HVN.13.143/PhuTho_HFMD	915
4	HVN.13.167/HaiPhong_HFMD	912
5	HVN.13.168/HaiPhong_HFMD	905
6	HVN.13.169/HaiPhong_HFMD	851
7	HVN.14.315/NinhBinh_HFMD	905
8	HVN.14.324/BacNinh_HFMD	907
9	HVN.14.333/HaiPhong_HFMD	851
10	HVN.13.141/PhuTho_HFMD	816
11	HVN.13.141/PhuTho_HFMD	909