

NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG DI TRUYỀN ENTEROVIRUS LƯU HÀNH TẠI VIỆT NAM

VU T. L. ⁽¹⁾, ROMANENKOVA N. I. ⁽³⁾, LUONG T. M. ⁽¹⁾, NGUYEN T. T. T. ⁽⁴⁾,
NGUYEN B. C. ⁽⁵⁾, HUYNH K. M. ⁽⁵⁾, LE K. T. ⁽⁵⁾, PHAM V. H. ⁽¹⁾,
PONOMAREVA N. V. ⁽²⁾, LEONOV A. V. ⁽²⁾, ZVEREV V. V. ⁽²⁾, MAKHOVA M. A. ⁽²⁾,
SELIVANOVA S. G. ⁽²⁾, DO T. H. ⁽⁵⁾, NOVIKOVA N. A. ⁽²⁾, GOLITSYNA L. N. ⁽²⁾

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiễm trùng do *Enterovirus* (EV) ở người là một nhóm bệnh truyền nhiễm gây ra bởi vi rút thuộc loài *Enterovirus* A-D (EV-A-D, hơn một trăm đại diện) thuộc giống *Enterovirus* thuộc họ *Picornaviridae* [1].

Lây nhiễm đường tiêu hóa của EV (EVI) có thể khác nhau về biểu hiện lâm sàng và mức độ nghiêm trọng của bệnh: từ dạng không có triệu chứng hoặc tình trạng sốt nhẹ đến viêm đa hệ thống nghiêm trọng, kèm theo tổn thương hệ thống tim mạch và thần kinh trung ương.

Ở Đông Nam Á, hình thức biểu hiện phổ biến nhất là phỏng nước do vi-rút ở miệng và tứ chi. Tên gọi theo danh pháp quốc tế: Bệnh Tay chân miệng - TCM. Bệnh này thường diễn tiến dễ dàng, nhưng đôi khi phức tạp bởi các hiện tượng bệnh lý từ hệ thần kinh hoặc tim mạch. Các biến chứng có thể dẫn đến rối loạn tri giác và vận động, và có thể tử vong do phù phổi hoặc viêm não [2-4]. Khả năng gây chết từ 0,5% đến 19,0% [2] tùy thuộc vào kiểu gen của vi-rút [5].

Ở những vùng nhiệt đới ẩm và xích đạo, khí hậu và tự nhiên chính là yếu tố thuận lợi cho sự lây lan và lưu hành quanh năm của *Enterovirus*. Điều này góp phần vào động lực tiến hóa của các chủng địa phương và ngoại lai, làm tăng khả năng hình thành các biến thể về đặc tính di truyền bệnh học, tăng độc lực và tiềm ẩn đại dịch.

Do đó, việc giám sát *Enterovirus* ở các vùng lưu hành bệnh có tầm quan trọng lớn đối với việc dự đoán sớm sự hình thành và lây lan của các biến thể *Enterovirus* gây dịch phạm vi toàn cầu. Đồng thời giám sát sự lưu hành của các biến thể *Enterovirus* còn hỗ trợ việc thực hiện kịp thời các biện pháp phòng ngừa và phát triển vắc-xin điều trị dự phòng. Hiện tại, vùng gene VP1, mã hóa cho protein cấu trúc capsid, là kháng nguyên chính cho sự nhận biết của hệ miễn dịch ở người, được các nhà nghiên cứu sử dụng phổ biến cho giám sát dịch tễ học phân tử của EV [6,7].

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

ARN từ bệnh phẩm lâm sàng thu thập trên bệnh nhân nhiễm trùng *Enterovirus* giai đoạn 2018-2021, được tách bằng kit Amplisens *Enterovirus*-FL, phân bố các mẫu được mô tả như dưới đây:

- 99 mẫu bệnh phẩm lâm sàng đã xác định non-EVA71 thu thập từ bệnh nhân mắc TCM tại bệnh viện đa khoa tại thành phố Đà Nẵng và Huế năm 2019.
- 113 mẫu bệnh phẩm đã xác định non-polio EV thu thập từ bệnh nhân nhiễm trùng EV các thể khác nhau (87 mẫu từ bệnh nhân TCM và 26 mẫu- từ bệnh nhân

liệt mềm cấp) ở một số tỉnh miền Nam (An Giang, Bà Rịa-Vũng Tàu, Bến Tre, Cà Mau, Đồng Nai, Kiên Giang, Sóc Trăng, Tây Ninh, Vĩnh Long, Cần Thơ, Thành phố Hồ Chí Minh) trong năm 2018-2019.

- 9 mẫu bệnh phẩm dương tính với EV qua sàng lọc mẫu bệnh phẩm từ bệnh nhân TCM và nhiễm trùng thần kinh tại tỉnh Thanh Hoá trong năm 2020-2021.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thực hiện định loại EV bằng cách giải trình tự một phần vùng VP1 của bộ gen [7, 8]. Các đoạn mồi oligonucleotide đặc hiệu cho loài được sử dụng để khuếch đại trình tự vùng VP1 của bộ gen CVA6. Việc giải trình tự gene được thực hiện bằng bộ kit DTCS Quick Start Kit trên hệ thống giải trình tự GenomeLab GeXP (Beckman Coulter, Hoa Kỳ) tại Viện Dịch tễ và Vi sinh mang tên Blokhina I.N., Rospotrebnadzor, Liên bang Nga.

Để phân tích phát sinh loài, nhóm nghiên cứu sử dụng trình tự nucleotide của bộ gen của các chủng vi-rút Coxsackie A6 (CVA6), được công bố trong cơ sở dữ liệu quốc tế và trình tự bộ gen các chủng *Enterovirus* thu thập được trong quá trình giám sát sự lưu hành của *Enterovirus* tại Liên bang Nga giai đoạn 2013-2021.

Việc đọc sửa và biên tập trình tự nucleotide, xây dựng cây phả hệ và phân tích mối quan hệ phát sinh loài được thực hiện bằng phần mềm MEGA 7.0 [9] và gói phần mềm Beast v1.8.1 [10].

2.3. Đạo đức trong nghiên cứu

Đề tài được thông qua Hội đồng đạo đức Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga trước khi tiến hành, mã số quyết định: 1129/CN-HĐĐĐ.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả giải trình tự vùng gene VP1 99 mẫu từ bệnh nhân TCM ở Đà Nẵng và Huế, đã xác định thành công 67/99 mẫu bao gồm: *Enterovirus A*: CVA4 (n=15), CVA6 (n=10), CVA2 (n=9), CVA8 (n=3), CVA10 (n=1), CVA16 (n=1), *Enterovirus B*: ECHO9 (n=4), ECHO11 (n=4), ECHO18 (n=3), CVB4 (n=2), ECHO16 (n=2), CVA9 (n=2), CVB1 (n=1).

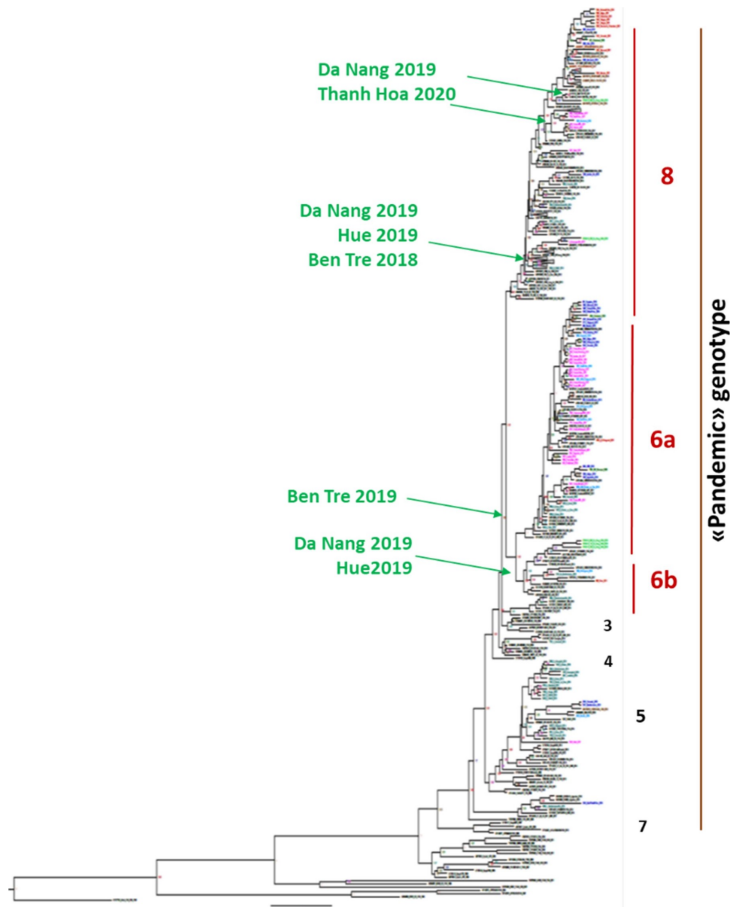
Với nhóm 113 mẫu từ các tỉnh miền Nam, được phát hiện thành công 10 tuýp: *Enterovirus A*: EV-A71 (n=67), CVA10 (n=26), CVA16 (n=7), CVA6 (n=2), CVA2 (n=1); *Enterovirus B*: ECHO11 (n=3), CVA9 (n=2), CB2 (n=2), ECHO6 (n=2), ECHO20 (n=2). Vi-rút CVA2 và CVA6 chỉ phát hiện ở bệnh nhân mắc TCM; EV-A71, CVA10 và CVA16 được tìm thấy ở cả bệnh nhân TCM và bệnh nhân liệt mềm cấp; *Enterovirus B* chỉ phát hiện ở bệnh nhân bị liệt mềm cấp tính.

Kết quả giải trình tự vùng VP1 của bộ gen các chủng *Enterovirus* xác định trên bệnh nhân nhiễm trùng thần kinh từ tỉnh Thanh Hóa phát hiện vi-rút ECHO4 (n=3), ECHO25 (n=1), ECHO30 (n=1); trên bệnh nhân mắc TCM - CVA6 (n=3), CVA8 (n=1).

Như vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi đã xác định được 20 tuýp *Enterovirus*, trong đó CVA6 được phát hiện trong các mẫu từ những vùng khác nhau của Việt Nam.

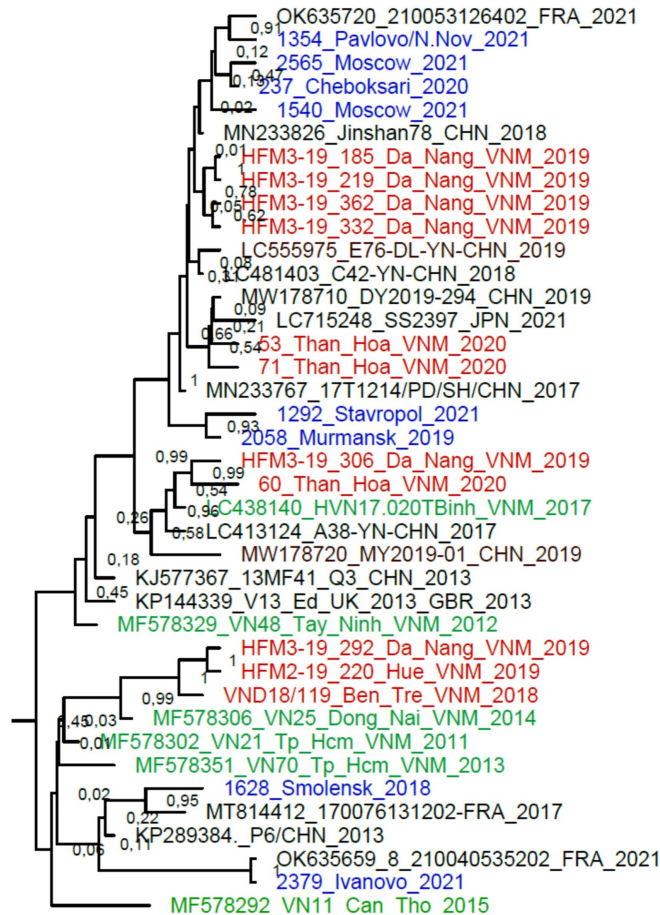
Trong những năm gần đây, CVA6 là một trong những tác nhân gây bệnh TCM phổ biến ở nhiều nước trên thế giới. Ở Nga, kể từ năm 2014, vi-rút này hàng năm chiếm tỷ lệ lớn nhất trong cơ cấu các tác nhân gây nhiễm trùng *Enterovirus* [10]. Tại Việt Nam cũng như một số nước khác trong khu vực Đông Nam Á và Thái Bình Dương, CVA6 hiện là tác nhân gây bệnh TCM phổ biến thứ hai [11, 12]. Sự hoạt động trở lại và lây lan đại dịch của CVA6 có liên quan đến việc hình thành một biến thể di truyền mới. Hiện tại, không có cách phân loại kiểu gen chung cho CVA6 được chấp nhận, do đó, trong nghiên cứu này đã sử dụng thuật ngữ kiểu gen “vụ dịch” để biểu thị kiểu gen virus mới này. Trong nghiên cứu trước đây tại Liên bang Nga, kết quả phân tích trình tự gen 1D của các chủng CVA6 đã phân biệt được 8 kiểu phụ liên quan đến biến thể “vụ dịch”: 1-8 [10].

Trong khuôn khổ hợp tác nghiên cứu Việt-Nga, 15 chủng CVA6 đã được xác định, kèm theo nghiên cứu các đặc điểm di truyền và mối quan hệ phát sinh loài của các chủng CVA6 Việt Nam. Kết quả phân tích trình tự gen 1D cho thấy 11 chủng thuộc kiểu phụ thứ 8 của kiểu gen “vụ dịch” CVA6, 4 chủng thuộc kiểu phụ 6b (hình 1).



Hình 1. Cây phả hệ xây dựng bằng thuật toán MCMC trong phiên bản BEAST v1.8.4 dựa trên phân tích trình tự vùng VP1 của bộ gen các chủng vi-rút Coxsackie A6

Các chủng thuộc kiểu gen phụ thứ 8 không đồng nhất về mặt di truyền và có 4 biến thể (hình 2).

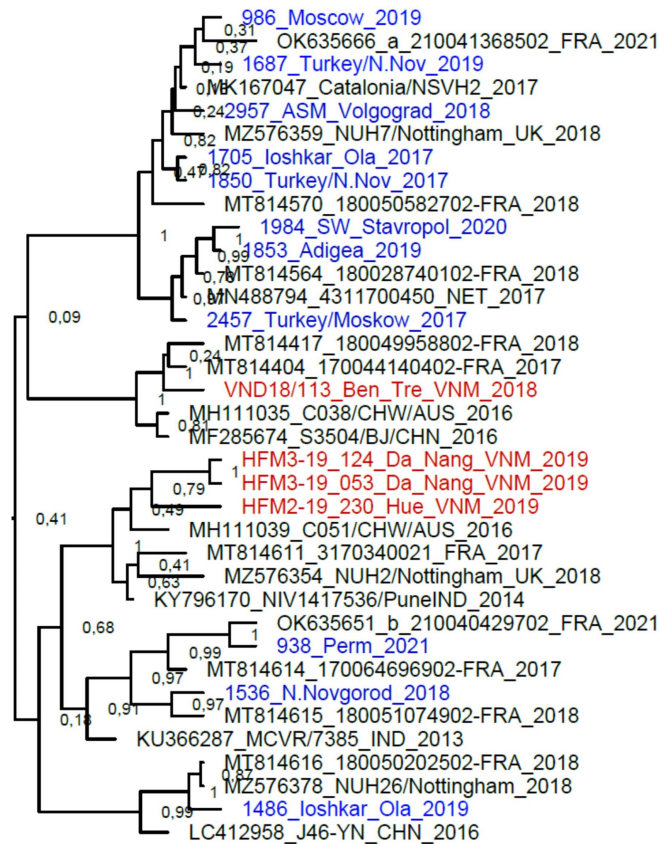


Hình 2. Mối quan hệ phát sinh loài của vi-rút Coxsackie A6 thuộc kiểu phụ thứ 8

Phông chữ màu đỏ - các chủng thu thập tại Việt Nam được xác định trong nghiên cứu này, phông chữ xanh lá cây - trước đó vào năm 2012-2017, màu xanh lam - các chủng thu thập tại Nga

Bốn chủng thu thập từ Đà Nẵng tạo thành một cụm riêng biệt. Các chủng này có quan hệ gần gũi nhất về mặt di truyền với vi-rút lưu hành ở Trung Quốc vào năm 2018. Hai chủng từ tỉnh Thanh Hóa được xếp vào nhóm với các vi-rút được phân lập ở Trung Quốc vào năm 2019 và ở Nhật Bản năm 2021. Các chủng HFM3-19_306_Da_Nang và 69_Than_Hoa_2020 (từ mẫu thu ở Thanh Hoá) (hình 2) cho thấy mối quan hệ di truyền chặt chẽ với vi-rút được xác định tại Thái Bình, năm 2017 [11]. Một cụm tiếp theo gồm các chủng VND18/119_Ben_Tre, HFM2-19_220_Hue, và HFM3-19_292_Da_Nang, kết nhóm với các chủng đã công bố ở miền Nam trong giai đoạn từ 2011 trở lại đây [12], đây có thể là vi-rút CVA6 đặc hữu lưu hành ở Việt Nam.

Ba chủng thu thập tại miền Trung Việt Nam, thuộc kiểu gen 6, cho thấy có mối quan hệ với các chủng vi-rút Cocksackie A6, mà sự lưu hành trong quá khứ gần đây đã được ghi nhận ở các nước Châu Âu, Úc và Ấn Độ (hình 3).



Hình 3. Mối quan hệ phát sinh loài của vi-rút Cocksackie A6 kiểu gen phụ 6b

Chủng EV từ tỉnh Bến Tre là chủng vi-rút gần giống nhất về mặt di truyền với các loài vi-rút được xác định vào năm 2016-2018 ở Trung Quốc, Úc và Pháp. Trước đây, không ghi nhận sự lưu hành của CVA6 kiểu gen phụ 6 ở Việt Nam. Có thể thời gian trước đã có sự nhập nội các chủng CVA6 kiểu gen 6 từ nước ngoài vào lãnh thổ Việt Nam.

Trên cây phả hệ thấy có sự tách nhánh rõ ràng giữa chủng ở miền Nam và cụm các chủng Đà Nẵng. Như vậy có thể thấy xu hướng CAV6 ở miền Trung và miền Nam có sự khác biệt về tiến hóa. Điều này cần được nghiên cứu thêm, để xác định đây là nhánh tiến hóa độc lập từ bản địa, hay do có nguồn gốc lây nhiễm từ bên ngoài vào lãnh thổ Việt Nam. Theo y văn nói chung, CAV6 có biểu hiện lâm sàng chủ yếu là chân tay miệng, hoặc loét miệng, ít biến chứng hơn so với EV71 [11, 15]. Trong nghiên cứu này chưa phân tích đặc điểm lâm sàng của các bệnh nhân nhiễm CAV6, tuy nhiên dựa trên các số liệu sẵn có, nhóm thực hiện sẽ tiến hành mô tả về độc lực của các chủng này trong nghiên cứu tiếp theo.

Trước đó, các đặc điểm di truyền và mối quan hệ phát sinh loài của các chủng EV-A71 và CVA10 đã được xác định trong mẫu bệnh phẩm thu thập từ bệnh nhân các tỉnh phía Nam Việt Nam [13, 14]. Giai đoạn 2018-2019 ở Nam Việt Nam, kiểu gen C4 chiếm ưu thế trong cấu trúc kiểu gen EVA71 (89,8% tổng số chủng được nghiên cứu). 78% các trường hợp nhiễm EV-A71 được nghiên cứu thuộc ba tỉnh: Đồng Tháp, Bến Tre và An Giang. Theo kết quả phân tích phát sinh loài, các chủng EV-A71 được nghiên cứu ở Việt Nam có quan hệ họ hàng gần gũi với các vi-rút lưu hành ở Đông Nam Á, khu vực Thái Bình Dương và khác biệt so với các vi-rút được xác định ở Nga [13]. Chủng CVA10 phân lập từ những bệnh nhân nhiễm trùng *Enterovirus* thể nặng và liệt mềm cấp tính ở miền Nam Việt Nam thuộc kiểu phụ F3 chiếm đa số, một dòng thuộc kiểu phụ F1. Hầu hết các chủng CVA10 thuộc kiểu phụ F3 đã hình thành một nhóm phát sinh loài quan trọng cùng với các chủng Trung Quốc được phân lập trong năm 2017-2018 ở tỉnh Vân Nam. Trong những năm trước, không ghi nhận sự lưu hành CVA10 kiểu gen phụ này ở Việt Nam [14].

Kết quả của nghiên cứu này dựa trên phân tích vùng gene VP1, tuy có hạn chế là chỉ một phần của hệ gene EV, nhưng đây là vùng gene được nhiều tác giả khác tham khảo [6, 12, 15]. Để nghiên cứu sâu hơn về dịch tễ học phân tử của các chủng EV lưu hành tại Việt Nam thì cần có nghiên cứu mở rộng trên toàn bộ hệ gene, kết hợp với mạng lưới giám sát dịch tễ học trên quy mô lớn hơn.

4. KẾT LUẬN

Đã phân tích ARN TỪ 221 mẫu bệnh phẩm lâm sàng thu thập trên bệnh nhân nhiễm trùng *Enterovirus* giai đoạn 2018-2021, xác định được 20 tuýp EV gồm: CVA2, CVA4, CVA5, CVA6, CVA8, CVA10, CVA16, EV-A71, CVA9, CVB1, CVB2, CVB4, ECHO4, ECHO6, ECHO9, ECHO11, ECHO16, ECHO29, ECHO25, ECHO30. Dựa trên kết quả phân tích phát sinh loài, có thể kết luận rằng quần thể vi - rút *Enterovirus* lưu hành ở Việt Nam được đặc trưng bởi sự không đồng nhất rõ ràng về chủng loại và di truyền, được đại diện bởi cả hai biến thể tương đồng với chủng lưu hành ở Trung Quốc, và các chủng đặc hữu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Zell R., Delwart E., Gorbalenya A. E., et al., *ICTV virus taxonomy profile: picornaviridae*, J. Gen. Virol., 2017, **98**(10):2421-2422.
2. Nguyen T. T. T., Donato C., Trang V. T. H., Kien N. T., Trang P. M. M. T., Khanh T. Q., Nguyet D. T., Sessions O. M., Cuong H. Q., Lan P. T., Huong V. T. Q., Van Doorn H. R., Vijaykrishna D., *Evolution and Spatiotemporal Dynamics of Enterovirus A71 Subgenogroups in Vietnam*, J. Infect. Dis., 2017, **216**(11):1371-1379.
3. Le Nguyen Thanh Nhan, et al., *Clinical, etiological and epidemiological investigations of hand, foot and mouth disease in southern Vietnam during 2015-2018*, PLoS neglected tropical diseases, 2020, **14**(8):e0008544.
4. Puenpa J., Auphimai C., Korkong S., Vongpunsawad S., Poovorawan Y., *Enterovirus A71 Infection, Thailand, 2017*, Emerg. Infect. Dis., 2018, **24**(7):1386-1387.

5. Thoa Le P. K., Chiang P. S., Khanh T. H., Luo S. T., Dan T. N., Wang Y. F., Thuong T. C., Chung W. Y., Hung N. T., Wang J. R., Nhan Le N. T., Thinh Le Q., Su I. J., Dung T. D., Lee M. S., *Genetic and antigenic characterization of enterovirus 71 in Ho Chi Minh City, Vietnam*, PLoS One, 2013, **8**(7):1-6.
6. Nix W. A., Oberste M. S., Pallansch M. A., *Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens*, J. Clin. Microbiol., 2006, **44**:2698-2704.
7. Голицына Л. Н., Патент № 2743352 Российская Федерация, *Способ дифференциальной амплификации фрагмента области VP1 генома энтеровирусов видов Enterovirus A и Enterovirus B*, № 2020117726: заявл. 19.05.2020: опубл. 17.02.2021, Правообладатель ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Бюллетень ФИПС «Изобретения. Полезные модели», 2021 г., № 5.
8. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S., *MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods*, Mol. Biol. Evol., 2011, **28**:273-2739.
9. Drummond A. J., Suchard M. A., Xie D., Rambaut A., *Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7.*, Mol. Biol. Evol., 2012, **29**(8):1969-73.
10. Голицына Л. Н., Зверев В. В., Парфенова О. В., Епифанова Н. В., Сашина Т. А., Кашников А. Ю., Григорьева Г. И., Новикова Н. А., *Вирус Коксаки А6 в Российской Федерации в 2014 году*, Дальневосточный журнал инфекционной патологии, 2015, **28**:12-20.
11. Anh N. T., Nhu L. N. T., Van H. M. T., Hong N. T. T., Than T. T., Hang V. T. T., Ny N. T. H., Nguyet L. A., Phuong T. T. L., Nhan L. N. T., Hung N. T., Khan T. H., Tuan H. M., Viet H. L., Nam N. T., Viet D. C., Qui P. T., Wills B., Sabanathan S., Chau N. V. V., Thwaites L., Van Doorn H. R., Thwaites G., Rabaa M. A., Tan L. V., *Emerging Cocksackievirus A6 causing hand foot and mouth disease, Vietnam*, Emerg. Infect. Dis., 2018, **24**(4):654-661.
12. Hoa-Tran T. N., Dao A. T. H., Nguyen A. T., Kataoka C., Takemura T., Pham C. H., Vu H. M., Hong T. T. T., Ha N. T. V., Duong T. N., Thanh N. T. H., Shimizu H., *Cocksackieviruses A6 and A16 associated with hand, foot, and mouth disease in Vietnam, 2008-2017: Essential information for rational vaccine design*, Vaccine, 2020, **38**(52):8273-8285.
13. Голицына Л. Н., Зверев В. В., Пономарева Н. В., Романенкова Н. И., Нгуен Т. Т. Т., Канаева О. И., Селиванова С. Г., Леонов А. В., Розаева Н. Р., Кашников А. Ю., Бичурина М. А., Новикова Н. А., *Молекулярно-эпидемиологический мониторинг циркуляции вируса Коксаки А10, Здоровье населения и среда обитания*, 2021 г., **4**(337):43-49.

14. Romanenkova L. N. Golitsyna T. T. T. Nguyen N. V., Ponomareva, A. V. Leonov, O. I. Kanaeva, V. V. Zverev, S. G. Selivanova, N. R. Rozaeva, M. A. Bichurina, N.A. Novikova, *Epidemiological and etiological aspects of enterovirus infection in Russia and Vietnam*, Инфекция и Иммуитет, 2021, **11**(5):895-908.
15. Puenpa J., et al., *Hand, foot, and mouth disease caused by coxsackievirus A6, Thailand 2012*, Emerg. Infect. Dis. 2013, **19**(4):641-643.

SUMMARY

STUDY OF THE GENETIC DIVERSITY OF ENTEROVIRUSES CIRCULATING IN THE SOCIALIST REPUBLIC OF VIETNAM

Molecular genetic studies of 221 strains of enteroviruses isolated from patients with HFMD and neuroinfections from different provinces of Vietnam in 2018-2021 were carried out. 20 types of enteroviruses have been identified: CVA2, CVA4, CVA5, CVA6, CVA8, CVA10, CVA16, EV-A71, CVA9, CVB1, CVB2, CVB4, ECHO4, ECHO6, ECHO9, ECHO11, ECHO16, ECHO29, ECHO25, ECHO30. Genetic heterogeneity of Vietnamese enterovirus strains has been established.

Keywords: Enteroviruses, genotypes, circulation monitoring, bệnh tay chân miệng, nhiễm trùng do Enterovirus.

Nhận bài ngày 01 tháng 8 năm 2022

Phản biện xong ngày 03 tháng 10 năm 2022

Hoàn thiện ngày 19 tháng 11 năm 2022

⁽¹⁾ Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga

⁽²⁾ Viện Dịch tễ và Vi sinh mang tên Blokhina I.N., Rospotrebnadzor, Liên bang Nga

⁽³⁾ Viện Dịch tễ và Vi sinh mang tên Pasteur tại Saint-Peterburg, Rospotrebnadzor, Liên bang Nga

⁽⁴⁾ Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh

⁽⁵⁾ Viện Pasteur Nha Trang

Liên hệ: **Vũ Thị Loan**

Viện Y sinh Nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga

Số 63 Nguyễn Văn Huyền, Nghĩa Đô, Cầu Giấy, Hà Nội

Điện thoại: 0981791148; Email: vtloan194@gmail.com