

Nghiên cứu chọn chủng ứng cử vắc-xin phòng bệnh tay, chân, miệng do virus EV71

Nguyễn Thị Yến Nhi^{1,2}, Võ Trần Ngọc Trinh¹, Phạm Lê Quốc Hưng³, Nguyễn Thị Hạnh Lan¹,
Hoàng Ngọc Khánh Quỳnh¹, Lê Thị Liên¹, Lê Hà Tâm Dương¹, Cao Thị Bảo Vân^{1,4*}

¹Viện Pasteur TP Hồ Chí Minh, 167 Pasteur, phường Võ Thị Sáu, quận 3, Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, 227 Nguyễn Văn Cừ, phường 4, quận 5, Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Trung tâm Kiểm soát Bệnh tật TP Hồ Chí Minh, 366A Âu Dương Lân, phường 3, quận 8, Hồ Chí Minh, Việt Nam

⁴Viện Công nghệ Y dược Văn Cao, 5 Ngõ 139, đường Phú Diễn, phường Phú Diễn, quận Bắc Từ Liêm, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 21/3/2022; ngày chuyển phản biện 25/3/2022; ngày nhận phản biện 18/4/2022; ngày chấp nhận đăng 21/4/2022

Tóm tắt:

Nghiên cứu được thực hiện nhằm chọn lựa chủng ứng cử cho việc nghiên cứu và sản xuất vắc-xin phòng bệnh tay, chân, miệng (TCM) do virus EV71 tại Việt Nam. Dữ liệu giám sát virus EV71 hàng năm của Viện Pasteur TP Hồ Chí Minh từ năm 2003 đến 2013 đã được sử dụng để dự đoán xu hướng tiến hoá. Trình tự vùng gen VP1 của 100 chủng EV71 của Việt Nam từ GenBank được sử dụng để đánh giá độ tương đồng tại một số epitope và tìm ra các trình tự phổ biến nhất. Kết quả, chủng EV71 kiểu gen phụ B5 mang tên B5-203P-2013 đã được chọn. Trải qua quá trình thích ứng và chọn dòng đơn trên tế bào Vero của chủng B5-203P-2013, B5-203P-2013-P10.1 đã được chọn làm chủng ứng cử cho vắc-xin EV71 với độ ổn định di truyền và đạt hiệu giá 10^8 TCID₅₀/ml cho đáp ứng kháng thể trung hoà chéo với các kiểu gen phụ khác như B5, C4, C5.

Từ khóa: chủng ứng cử EV71, đáp ứng kháng thể trung hoà chéo, kiểu gen phụ, thích ứng trên tế bào Vero.

Chỉ số phân loại: 3.3

1. Đặt vấn đề

Bệnh TCM là một bệnh truyền nhiễm phổ biến ở trẻ em, nhất là trẻ dưới 5 tuổi [1]. Bệnh do một nhóm Enterovirus thuộc họ Picornaviridae gây ra. Trong đó, virus EV71 được quan tâm nhiều nhất do chúng có thể gây các bệnh cảnh nặng, kèm theo biến chứng thần kinh, tim, phổi và thậm chí dẫn đến tử vong [2].

Virus EV71 lần đầu tiên được ghi nhận vào năm 1974. Năm 1997, dịch EV71 bùng phát và lan rộng tại khu vực châu Á - Thái Bình Dương. Sự lưu hành nổi trội và tái nổi trội, đa dạng về kiểu gen của EV71 đã gây ra các trận dịch với quy mô khác nhau trong khu vực. Tại Việt Nam, virus EV71 được phân lập lần đầu tiên vào năm 2003. Từ đó, nhiều đợt dịch TCM lớn, nhỏ có liên quan đến loại virus này liên tiếp xảy ra từ năm 2005 đến 2013 với hàng chục ngàn ca nhiễm và ít nhất 250 trường hợp tử vong.

Hiện nay, bệnh TCM vẫn chưa có thuốc điều trị, vắc-xin đang là chiến lược tốt nhất để kiểm soát dịch bệnh. Nhiều loại vắc-xin phòng TCM đã và đang được phát triển, tuy nhiên nhờ những ưu thế như tính an toàn cao, khả năng miễn dịch tốt và có thể được phát triển nhanh hơn nhờ vào việc tham khảo các công nghệ hiện có, chỉ có vắc-xin toàn phần bất hoạt đang được nghiên cứu và thử nghiệm lâm sàng tại các quốc gia và vùng lãnh thổ như Đài Loan, Singapore,

Hàn Quốc. Vắc-xin của Trung Quốc đã được thương mại hoá nhưng chỉ được sử dụng trong nội địa nước này [3]. Một đặc điểm chung của các vắc-xin này là được phát triển dựa trên đặc điểm của các chủng virus lưu hành tại từng khu vực, điển hình như chủng C4a đã được sử dụng ở Trung Quốc; 2 chủng B3 và B4 tương ứng được sử dụng ở Singapore và Đài Loan [4]. Hiệu quả bảo vệ của chúng đối với các chủng lưu hành tại Việt Nam hầu như chưa được ghi nhận. Trong khi đó, đặc điểm về dịch tễ học phân tử của virus EV71 tại Việt Nam có nhiều điểm khác biệt, các kiểu gen EV71 đã được ghi nhận lại là C1, C4, C5 và B5 [5]. Do đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu chọn lọc chủng EV71 ứng cử và tạo ngân hàng chủng cho việc nghiên cứu sản xuất vắc-xin phòng bệnh TCM do virus EV71 dựa trên chủng đại diện cho các chủng đang lưu hành tại Việt Nam.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Chủng virus: Chủng ứng cử cho vắc-xin EV71 (B5) và chủng để đánh giá phản ứng miễn dịch chéo được phân lập tại Viện Pasteur TP Hồ Chí Minh, một số chủng dùng trong đánh giá đáp ứng miễn dịch chéo được nhận từ Đơn vị Nghiên cứu lâm sàng của Đại học Oxford (OUCRU).

Tế bào: Virus EV71 được nuôi cấy trên dòng tế bào Vero (ECAAC No.88020401).

*Tác giả liên hệ: Email: vancao.pasteur@gmail.com

Selection of candidate strains for hand, foot and mouth disease vaccine against enterovirus 71

Thi Yen Nhi Nguyen^{1,2}, Tran Ngoc Trinh Vo¹, Le Quoc Hung Pham³,
Thi Hanh Lan Nguyen¹, Ngoc Khanh Quynh Hoang¹,
Thi Lien Le¹, Ha Tam Duong Le¹, Thi Bao Van Cao^{1,4*}

¹Pasteur Institute Ho Chi Minh City, 167 Pasteur, Vo Thi Sau Ward, District 3, Ho Chi Minh, Vietnam

²University of Natural Sciences, Vietnam National University - Ho Chi Minh City,
227 Nguyen Van Cu, Ward 4, District 5, Ho Chi Minh, Vietnam

³Ho Chi Minh City Center for Disease Control, 366A Au Duong Lan, Ward 3, District 8, Ho Chi Minh, Vietnam

⁴Van Cao Institute of Medical Technology, 5 Lane 139, Phu Dien Street, Phu Dien Ward, Bac Tu Liem District, Hanoi, Vietnam

Received 21 March 2022; revised 18 April 2022; accepted 21 April 2022

Abstract:

The study aimed to select candidate strains from Vietnam for the development of the hand, foot and mouth disease (HFMD) vaccine against enterovirus 71 (EV71). Annual EV71 virus surveillance data of Pasteur Institute in Ho Chi Minh city from 2003 to 2013 was used to predict evolutionary trends. One hundred VP1 sequences of Vietnam strains from the GenBank database were used to evaluate the identity of acid amin sequences and identify the consensus sequences at key epitopes. As a result, the subgenogroup B5 strain named B5-203P-2013 was selected. The strain was adapted on Vero cells by multiple passages and plaque isolated. The strain B5-203P-2013-P10.1 was selected as a candidate strain for the HFMD vaccine due to possessing genetic stability, high titer of 10^8 TCID₅₀/ml and cross-neutralising antibody responses against other subgenogroups B5, C4, C5.

Keywords: adaptation on Vero cells, cross-neutralising antibody responses, EV71 candidate strain, subgenogroup.

Classification number: 3.1

2.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng Thí nghiệm sinh học phân tử, Khoa Vi sinh miễn dịch, Viện Pasteur TP Hồ Chí Minh trong thời gian từ năm 2016 đến 2018.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Phân tích xu hướng tiến hoá và so sánh trình tự: Nghiên cứu sử dụng dữ liệu giám sát EV71 hàng năm đối với virus EV71 của Viện Pasteur TP Hồ Chí Minh liên tục trong khoảng thời gian từ năm 2003 đến 2013 nhằm đánh giá sự thay đổi các kiểu gen để chọn kiểu gen đại diện. Tiếp theo, chúng tôi sử dụng dữ liệu trình tự vùng gen VP1 của 100 chủng EV71 thuộc

các kiểu gen phụ B5, C1, C4 và C5 lưu hành tại các vùng địa lý khác nhau của Việt Nam từ năm 2003 đến 2013 từ GenBank. Phần mềm BioEdit được sử dụng để so sánh các trình tự tương đồng để nhận diện các kiểu hình tương đồng cao tại các vị trí epitope quan trọng. Chúng có sự tương đồng cao nhất với các chủng khác tại các vị trí này mang các vùng quyết định kháng nguyên phổ biến nhất được chọn làm chủng ứng cử.

Thích ứng chủng virus trên tế bào Vero và chọn dòng đơn chủng thích ứng: Quá trình thích ứng được thực hiện thông qua việc cấy chuyển ở độ pha loãng thấp qua nhiều đời cấy chuyển nhằm chọn lọc được các chủng thích nghi với tế bào Vero. Các mẫu sau các đời cấy chuyển được kiểm tra hiệu giá TCID₅₀, những mẫu cho hiệu giá tốt tiếp tục được chọn lọc cho đến khi chủng có khả năng phát triển tốt trên tế bào Vero tại mật độ gây nhiễm thấp và có hiệu giá cao (trên 10^7 TCID₅₀/ml). Tại đời cấy chuyển cuối cùng, các dòng đơn của chủng sẽ được chọn lọc thông qua kỹ thuật tạo plaque.

Kiểm tra tính ổn định di truyền của chủng thích ứng đã thích nghi: Trình tự gen VP1 trên chủng ứng cử ban đầu và sau khi thích ứng được khuếch đại bằng phương pháp RT-PCR với cặp mồi đặc hiệu và giải trình tự theo phương pháp Sanger. Các trình tự gen mục tiêu sau đó được xử lý, lắp ráp nhờ sự hỗ trợ của phần mềm CLC Main Workbench 5.5 và BioEdit.

Kiểm tra tính sinh miễn dịch chéo: Chủng virus sau khi được thích nghi và chọn lọc được nuôi cấy tăng sinh trên tế bào Vero, dịch virus sau đó được thu hoạch, tinh chế và bất hoạt tạo thành kháng nguyên. Chuột nhắt trắng chủng Balb/c (BioLASCO Taiwan Co., Ltd) 6-8 tuần tuổi (5 con) được tiêm 2 liều kháng nguyên hàm lượng 1 µg phối trộn với tá chất nhôm (Alhydrogel) tại các thời điểm tuần thứ nhất và thứ tư. Chuột được thu máu vào tuần thứ 8, máu được tách huyết thanh để tiến hành đánh giá miễn dịch chéo với các chủng C4, C5, B5 qua phản ứng trung hoà.

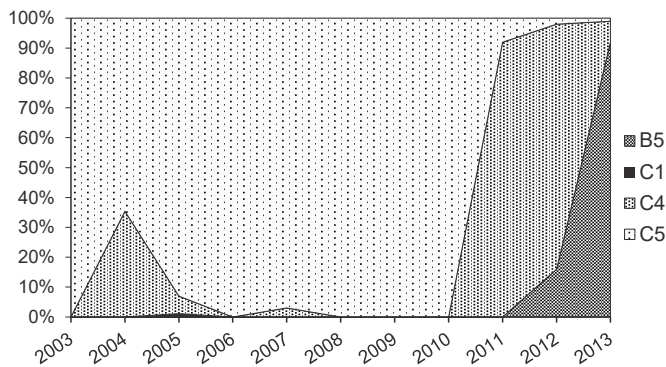
Phản ứng trung hoà xác định hiệu giá kháng thể trung hoà virus của các mẫu huyết thanh chuột. Các mẫu huyết thanh chuột được pha loãng bậc 2 từ độ pha loãng 1/10 ban đầu và ủ với 100 TCID₅₀ virus các chủng C4, C5, B5 trên các đĩa 96 giếng tương ứng đã được cấy tế bào Vero mật độ 2×10^4 tế bào/giếng 24 giờ trước đó, ủ ở điều kiện 37°C và 5% CO₂, ghi nhận dấu hiệu hủy hoại tế bào (cytopathogenic effect) sau 5 ngày gây nhiễm. Hiệu giá kháng thể trung hoà được tính là nghịch đảo của độ pha loãng thấp nhất không ghi nhận dấu hiệu hủy hoại tế bào.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Chọn chủng bằng phân tích dữ liệu dịch tễ học phân tử

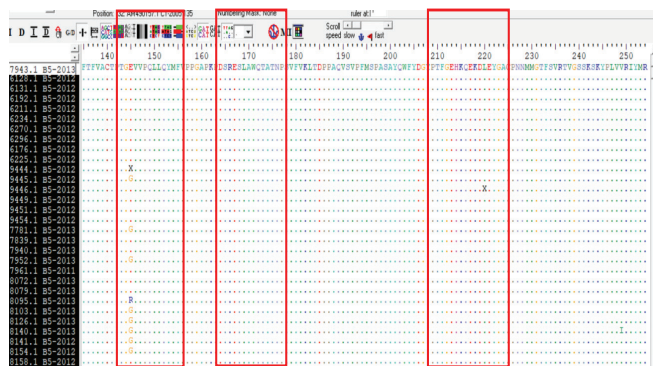
Dữ liệu phân tích xu hướng tiến hoá của các chủng EV71 tại Việt Nam từ năm 2003 đến 2013 cho thấy, có sự chuyển dịch sự lưu hành của kiểu gen C4 sang kiểu gen B5, trong đó đỉnh điểm của sự hiện diện kiểu gen C4 là năm 2011. Năm 2012 chủng C4 vẫn chiếm ưu thế nhưng có sự xuất hiện và thay thế dần của chủng B5 từ năm 2011 (hình 1). Cho đến năm

2013, chủng B5 đã chiếm ưu thế và gần như hoàn toàn thay thế chủng C4. Với xu hướng đó, chúng tôi chọn những chủng mang kiểu gen B5 để phân tích trình tự nhằm chọn ra được 1 chủng ứng cử cho vắc-xin EV71.



Hình 1. Phân bố kiểu gen phụ của virus EV71 theo thời gian.

Với mục tiêu tạo ra vắc-xin có tính sinh miễn dịch với các chủng EV71 đang và sẽ lưu hành trong tương lai gần, chúng tôi tiến hành phân tích sự tương đồng giữa các vùng epitope quan trọng trên trình tự gen VP1 của một số kiểu gen phụ EV71. Các vùng chứa epitope quan trọng trên phân tử VP1 được biết đến hiện nay bao gồm từ axit amin 41-55, 142-156, 163-177 và 208-225.



Hình 2. So sánh trình tự tại các vị trí epitop của các chủng EV71 trong nghiên cứu.

Khi tiến hành phân tích trình tự gen VP1 giữa các chủng EV71 đưa vào nghiên cứu, chúng tôi phát hiện vùng epitope trung hòa tại vị trí 208-225 có mức độ bảo tồn cao và giống nhau 100% ở hầu hết các chủng với trình tự YPTFGEHKQEKDLEYGAC (hình 2). Đây là một trong các vùng epitope trung hòa quan trọng và được sử dụng phổ biến trong các nghiên cứu vắc-xin peptit chống lại virus EV71. Các nghiên cứu trước đây cho thấy, huyết thanh kháng SP70 được tổng hợp từ đoạn peptit 208-222 (YPTFGEHKQEKDLEY) giúp bảo vệ 70-80% chuột sơ sinh nhiễm các chủng EV71 mang kiểu gen C2, C4, B2, B4 và B5 tại hiệu giá kháng thể trung hòa 1:32 [6].

Trong vùng epitope 142-156, vị trí 145 được xem là có liên quan đến độc tính của virus. Ở đây chúng tôi chọn chủng mang axit glutamic tại vị trí này do đại diện cho phần lớn chủng B5 và hầu hết các chủng C4, C5. Đột biến thay thế glycine (G) hoặc glutamine (Q) thành axit glutamic (E) tại vị trí axit amin 145 trên VP1 độc lập hoặc kết hợp với sự thay đổi các axit amin khác chịu trách nhiệm cho sự thích nghi và độc lực cho sự lây nhiễm trên chuột [7]. Ở người, đột biến VP1-E145Q đã được tìm thấy trong các trường hợp nhiễm EV71 nặng. Hơn nữa, R. Li và cs (2011) [8] cũng đã báo cáo về các đột biến khác có liên quan đến tỷ lệ lưu hành hơn trong các trường hợp nặng của EV71 như VP1-145G/Q/R.

Với epitope vùng axit amin 41-55, vị trí 43 mang axit glutamic (E) ở các chủng B5 được hình thành dưới áp lực chọn lọc dương của các chủng B5 lưu hành tại Việt Nam [9]. Các chủng ở kiểu gen C đều mang lysine (K) ở vị trí này.

Với vùng epitope 163-177, chúng tôi ghi nhận có sự bảo toàn cao giữa các chủng kiểu gen phụ với nhau. Điều này tương tự với một số phát hiện trước đây là có sự bảo toàn cao giữa các kiểu gen phụ trong cùng kiểu gen và các kiểu gen với nhau, duy chỉ có chủng nguyên thủy BrCr (kiểu gen A) là có sự khác biệt về axit amin tại vị trí 167 và 172 [10].

Qua việc so sánh trình tự và tìm vùng bảo tồn ở các vị trí epitope, chúng tôi đã chọn ra 1 chủng B5 (GeneBank KU887943.1) làm chủng ứng cử. Chủng có tên gọi B5-203P-2013 được phân lập từ 1 bệnh nhi có triệu chứng TCM mức độ 2B ở Tiền Giang năm 2013. Chủng này mang trình tự các vùng epitope phổ biến cho phần lớn chủng B5 phân tích cũng như các chủng C1, C4 và C5.

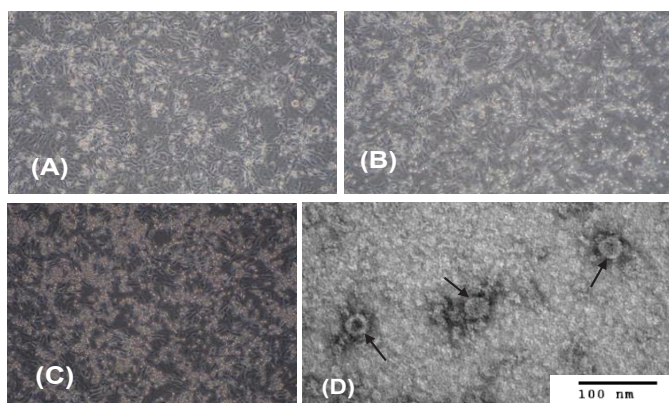
3.2. Thích nghi chủng trên tế bào Vero và chọn dòng đơn chủng thích ứng

Kết quả cấy chuyển cho thấy hiệu giá và mức độ xâm nhiễm tế bào của chủng chọn lọc tăng dần chứng tỏ sự thích ứng dần của chủng trên tế bào Vero. Độ pha loãng của các đời cấy sau thấp hơn đời cấy trước cho đến khi đạt sự ổn định. Sau 9 lần cấy chuyển, chủng chọn lọc cho hiệu giá cao nhất với $TCID_{50}$ đạt $\sim 10^8$ $TCID_{50}/ml$ so với 10^3 $TCID_{50}/ml$ của lần cấy đầu tiên (bảng 1).

Bảng 1. Hiệu giá của chủng B5-203P-2013 qua các đời thích ứng khác nhau.

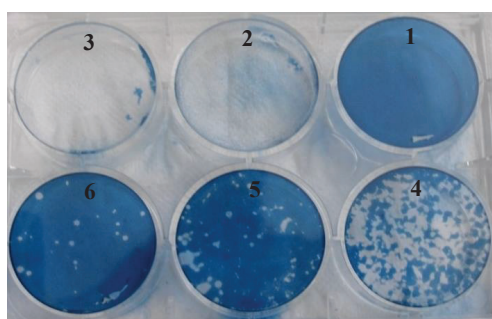
Số đời thích ứng	Độ pha loãng	Hiệu giá virus thu được ($TCID_{50}/ml$)
1	10^{-2}	$10^{3.2}$
2	10^{-3}	$10^{3.2}$
3	10^{-4}	$10^{4.7}$
4	10^{-5}	10^6
5	10^{-6}	$10^{7.4}$
6	10^{-6}	$10^{7.7}$
7	10^{-6}	$10^{8.2}$
8	10^{-6}	10^8
9	10^{-6}	10^8

Tại các đời cấy thứ 8 và 9, hiệu giá virus thu được đạt cao nhất sau 96 giờ gây nhiễm khi các tế bào đã bị huỷ hoại gần như hoàn toàn (hình 3).



Hình 3. Kết quả gây nhiễm của chủng ứng cử. (A, B, C) Tế bào bị huỷ hoại sau 48, 72 và 96 giờ gây nhiễm; (D) Hình ảnh virus EV71 trong dịch nuôi cấy được chụp dưới kính hiển vi điện tử truyền suốt (vị trí mũi tên).

Sau 9 đời cấy chuyển, chủng đã đạt được độ ổn định về hiệu giá cũng như đạt được hiệu giá tăng sinh đủ cao cho việc sản xuất vắc-xin, chúng tôi tiến hành nuôi cấy tạo plaque cho chủng để chọn dòng đơn bằng phương pháp Plaque assay (hình 4). Plaque mang ký hiệu B5-203P-2013-P10.1 được chọn sản xuất do đạt được hiệu giá trên 10^8 TCID₅₀/ml.



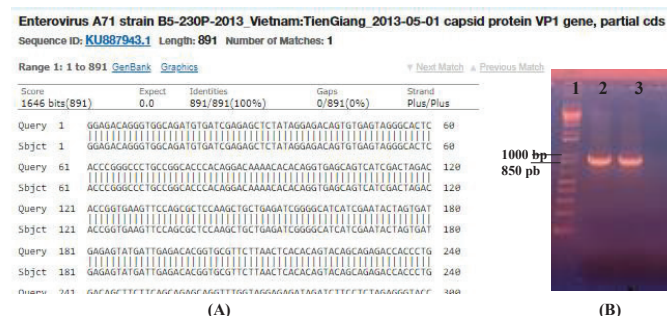
Hình 4. Kết quả tạo plaque trong đời cấy thứ 10. Giếng 1 là đối chứng tế bào; giếng 2, 3, 4, 5, 6 tương ứng các nồng độ pha loãng của virus 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} và 10^{-5} .

Việc chọn chủng bằng phương pháp plaque assay đã được nhiều nhóm nghiên cứu ứng dụng trong việc chọn ra những chủng thuần có khả năng tăng sinh tốt đã thích nghi với hệ thống nuôi cấy qua quá trình chọn lọc [11, 12].

3.3. Sự ổn định di truyền trên gen VP1

Trình tự gen VP1 trên chủng B5-203P-2013 ban đầu và sau khi thích ứng thành công B5-203P-2013-P10.1 được khuếch đại bằng phương pháp RT-PCR với cặp mồi đặc hiệu. Kết quả điện di sản phẩm khuếch đại trên gel agarose 2% cho thấy, xuất hiện một vạch có kích thước tương ứng với vạch 891 bp trên thang chuẩn (1 Kb Plus DNA Ladder,

Invitrogen (hình 5B). Kết quả phân tích cho thấy, trình tự gen VP1 của mẫu sau 10 đời cấy chuyển (B5-203P-2013-P10.1) tương đồng 100% so với mẫu virus ban đầu (B5-203P-2013) (hình 5).



Hình 5. Thu nhận gen VP1 của chủng chọn lọc. (A) Gen VP1 được khuếch đại qua phản ứng PCR; (B) So sánh trình tự gen VP1 của chủng B5-203P-2013-P10.1 sau khi thích ứng thành công trên tế bào Vero.

Như vậy, gen VP1 của chủng B5-203P-2013-P10.1 hoàn toàn ổn định khi thích ứng trên tế bào Vero.

Từ kết quả trên, chủng B5-203P-2013-P10.1 được chọn để tăng sinh làm ngân hàng chủng sản xuất do đạt hiệu giá tăng sinh tốt và ổn định di truyền trên vùng gen VP1.

3.4. Khả năng trung hoà chéo của chủng ứng cử

Để kiểm tra khả năng cho đáp ứng miễn dịch chéo của chủng B5-203P-2013-P10.1, chúng tôi chọn đại diện của các kiểu gen khác nhau đã từng lưu hành tại Việt Nam như C1, C4, C5 và B5 để đánh giá.

Kết quả bảng 2 cho thấy, khả năng trung hòa của huyết thanh với các kiểu gen khác nhau đều đạt mức trên 128. Hiện tại, vẫn chưa có sự thống nhất mức kháng thể trung hoà cần thiết ở người là bao nhiêu, tuy nhiên ở chuột, mức kháng thể trung hoà cần cao hơn 128. Đây là mức kháng thể tối thiểu bảo vệ chuột sơ sinh trong các thí nghiệm thử thách với mô hình miễn dịch thụ động trên chuột [13]. Như vậy, huyết thanh từ chuột nhất trắng được tiêm vắc-xin B5-203P-2013-P10.1 có thể cho đáp ứng miễn dịch chéo với các chủng EV71 khác bao gồm C4, C5 và B5, mặc dù khả năng trung hòa chủng C5 kém hơn so với B5 và C4.

Bảng 2. Khả năng đáp ứng miễn dịch chéo của thể kháng thể 5-203P-2013-P10.1.

Chủng virus	Trung bình nhân hiệu giá kháng thể trung hòa (GMT)
5-203P-2013-P10.1 (chủng vắc-xin)	243
EV71/B5 VN282-18 (2014)	160
EV71/C4-11 (2011)	211
EV71/C4 VN313-18 (2018)	184
EV71/C5-11 (2011)	139

Các đột biến và tái tổ hợp thường xuyên xảy ra trong quá trình tiến hóa của virus EV71, do đó việc phản ứng chéo có thể chống lại nhiều loại virus EV71 khác nhau là một chiến lược quan trọng trong định hướng phát triển vắc-xin. Phản ứng kháng thể trung hòa được xem là một chỉ số quan trọng trong đáp ứng miễn dịch với EV71, thường được sử dụng để đánh giá hiệu quả của vắc-xin. Một trong những tiêu chí đánh giá hiệu quả của một vắc-xin EV71 là kháng thể được tạo ra có khả năng trung hoà các chủng thuộc nhóm gen khác. Vào năm 2020, Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) đã ban hành các khuyến nghị về chất lượng, an toàn và hiệu quả của vắc-xin EV71 bất hoạt. Trong đó có một điều quan trọng nổi bật là cần nghiên cứu khả năng cho phản ứng chéo của kháng thể trung hoà do vắc-xin tạo ra [14]. Một số nghiên cứu đã tập trung vào tìm hiểu tính kháng nguyên của các chủng EV71. Nghiên cứu của K. Mizuta và cs (2009) [15] cho thấy, kiểu gen B kích hoạt được kháng thể trung hoà cho phản ứng chéo với các chủng B2, B4, B5, C1, C2 và C4 mạnh hơn kháng thể của kiểu gen C. Gần đây nhất, nghiên cứu của P. Liu và cs (2021) [10] về kháng thể trung hoà được tạo ra từ 10 kiểu gen A, B0-B4, C2, C4 và C5 được xác định có khả năng trung hoà chéo với chính những chủng này. Kết quả cho thấy, các kiểu gen A, B và C đều tạo ra kháng thể có khả năng trung hoà với các nhóm kiểu gen khác. Tuy nhiên có sự khác nhau về mức độ trung hoà ở các kiểu gen. Tại Việt Nam, sau khi thay thế chủng C4 vào năm 2013, chủng B5 lưu hành rải rác trong cộng đồng cho đến năm 2018 thì chủng C4 quay trở lại chiếm ưu thế và chủng B5 được ghi nhận rải rác [16]. Tuy nhiên, trong một nghiên cứu đánh giá kháng thể trung hoà ở các bệnh nhân TCM Việt Nam, kháng thể của những bệnh nhân nhiễm chủng B5 lưu hành trong giai đoạn 2013-2015 tại Việt Nam cho thấy khả năng trung hoà với chủng C4 của năm 2018 và không có sự khác biệt với khả năng trung hoà với chính chủng B5 [17]. Có thể nhận thấy ở đây là các kiểu gen phụ của EV71 có thể xuất hiện mang tính chu kỳ nên việc giám sát để chọn chủng đại diện phù hợp và có phản ứng chéo với nhiều kiểu gen phụ khác nhau là điều quan trọng.

4. Kết luận

Từ việc phân tích xu hướng tiến hoá và phân tích trình tự tương đồng của các epitope trong vùng gen VP1, qua quá trình thích ứng và chọn dòng đơn trên tế bào Vero, chúng tôi đã thu được chủng mang EV71 có kiểu gen phụ B5 mang tên 5-203P-2013-P10.1 làm chủng ứng cử cho vắc-xin EV71. Chủng này có tính ổn định di truyền so với chủng gốc ban đầu và cho khả năng tăng sinh tốt trên tế bào Vero với hiệu giá 10^8 TCID₅₀/ml. Đồng thời có khả năng trung hoà chéo với các kiểu gen phụ khác lưu hành tại Việt Nam như B5, C4 và C5.

LỜI CẢM ƠN

Chúng sử dụng trong nghiên cứu được phân lập, định danh và cung cấp bởi Phòng Xét nghiệm virus đường ruột,

Viện Pasteur TP Hồ Chí Minh và Đơn vị Nghiên cứu lâm sàng của Đại học Oxford (OUCRU). Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J. Zhao, F. Jiang, L. Zhong, et al. (2016), "Age patterns and transmission characteristics of hand, foot and mouth disease in China", *BMC Infect. Dis.*, **16**(1), DOI: 10.1186/s12879-016-2008-y.
- [2] P. Chong, C.C. Liu, Y.H. Chow, et al. (2015), "Review of enterovirus 71 vaccines", *Clin. Infect. Dis.*, **60**(5), pp.797-803, DOI: 10.1093/cid/ciu852.
- [3] M.L. Li, B.S. Tolbert, G. Brewer, et al. (2021), "Enterovirus A71 vaccines", *Vaccines (Basel)*, **9**(3), DOI: 10.3390/vaccines9030199.
- [4] S. Esposito, N. Principi (2018), "Hand, foot and mouth disease: Current knowledge on clinical manifestations, epidemiology, aetiology and prevention", *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **37**(3), pp.391-398, DOI: 10.1007/s10096-018-3206-x.
- [5] J.L. Geoghegan, D. Kühnert, R.A. Halpin, et al. (2015), "Phylogenetics of enterovirus A71-associated hand, foot, and mouth disease in Viet Nam", *J. Virol.*, **89**(17), pp.8871-8879, DOI: 10.1128/JVI.00706-15.
- [6] D.G. Foo, S. Alonso, M.C. Phoon, et al. (2007), "Identification of neutralizing linear epitopes from the VP1 capsid protein of enterovirus 71 using synthetic peptides", *Virus Res.*, **125**(1), pp.61-68, DOI: 10.1016/j.virusres.2006.12.005.
- [7] M. Arita, Y. Ami, T. Wakita, et al. (2008), "Cooperative effect of the attenuation determinants derived from poliovirus sabin 1 strain is essential for attenuation of enterovirus 71 in the NOD/SCID mouse infection model", *J. Virol.*, **82**(4), pp.1787-1797, DOI: 10.1128/JVI.01798-07.
- [8] R. Li, Q. Zou, L. Chen, et al. (2011), "Molecular analysis of virulent determinants of enterovirus 71", *PLOS ONE*, **6**(10), DOI: 10.1371/journal.pone.0026237.
- [9] T.T.T. Nguyen, C. Donato, T.H.T. Vu, et al. (2017), "Evolution and spatiotemporal dynamics of enterovirus A71 subgenogroups in Vietnam", *J. Infect. Dis.*, **216**(11), pp.1371-1379, DOI: 10.1093/infdis/jix500.
- [10] P. Liu, Y. Yuan, B. Cui, et al. (2021), "Cross-antigenicity between EV71 sub-genotypes: Implications for vaccine efficacy", *Viruses*, **13**(5), DOI: 10.3390/v13050720.
- [11] Y.F. Tseng, A.Y.C. Hu, M.L. Huang, et al. (2011), "Adaptation of high-growth influenza H5N1 vaccine virus in Vero cells: Implications for pandemic preparedness", *PLOS ONE*, **6**(10), DOI: 10.1371/journal.pone.0024057.
- [12] N.S. Ogando, T.J. Dalebout, J.C.Z. Dobbe, et al. (2020), "SARS-coronavirus-2 replication in Vero E6 cells: Replication kinetics, rapid adaptation and cytopathology", *J. Gen. Virol.*, **101**(9), pp.925-940, DOI: 10.1099/jgv.0.001453.
- [13] C.K. Yu, C.C. Chen, C.L. Chen, et al. (2000), "Neutralizing antibody provided protection against enterovirus type 71 lethal challenge in neonatal mice", *J. Biomed. Sci.*, **7**(6), pp.523-528, DOI: 10.1007/BF02253368.
- [14] D. Lei, E. Griffiths, J. Martin, et al. (2020), "WHO working group meeting to develop WHO recommendations to assure the quality, safety and efficacy of enterovirus 71 vaccines", *Vaccine*, **38**(32), pp.4917-4923, DOI: 10.1016/j.vaccine.2020.05.001.
- [15] K. Mizuta, Y. Aoki, A. Suto, et al. (2009), "Cross-antigenicity among EV71 strains from different genogroups isolated in Yamagata, Japan, between 1990 and 2007", *Vaccine*, **27**(24), pp.3153-3158, DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.03.060.
- [16] N.T.N. Le, T.T.H. Nguyen, N.T.N. Le, et al. (2018), "Severe enterovirus A71 associated hand, foot and mouth disease, Vietnam, 2018: Preliminary report of an impending outbreak", *Eurosurveillance*, **23**(46), DOI: 10.2807/1560- 7917. ES.2018.23.46.1800590.
- [17] A.N. Lam, T.T. Tran, N.T.N. Le, et al. (2020), "Neutralizing antibodies against enteroviruses in patients with hand, foot and mouth disease", *Emerg. Infect. Dis.*, **26**(2), pp.298-306, DOI: 10.3201/eid2602.190721.