

На правах рукописи

НГУЕН

Тхи Тхань Тхао

**ХАРАКТЕРИСТИКА ЭНТЕРОВИРУСОВ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В ЮЖНОМ
ВЬЕТНАМЕ, И ИХ РОЛЬ В ЭТИОЛОГИИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

1.5.10 Вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург
2026

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Научный руководитель:

Романенкова Наталья Ивановна – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории этиологии и контроля вирусных инфекций, руководитель группы полиомиелита и других энтеровирусных инфекций, Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Официальные оппоненты:

Иванова Ольга Евгеньевна – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории полиомиелита и других энтеровирусных инфекций с референс-центром ВОЗ по надзору за полиомиелитом Федерального государственного автономного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита).

Юминова Надежда Васильевна – доктор биологических наук, зам. Заведующего отделом Вирусологии им. акад. О.Г. Анджаридзе, главный научный сотрудник лаборатории эпидемиологии, анализа и мониторинга инфекционных заболеваний, профессор аспирантуры Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова».

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Хабаровский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Защита диссертации состоится _____ на заседании диссертационного совета Д 21.1.017.01 при ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России (197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 15/17)

Тел.: (812) 499 15 00

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России (197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 15/17) и на сайте www.influenza.spb.ru.

Автореферат разослан «____» _____ 2026 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета Д 21.1.01.017
Кандидат биологических наук

Амосова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Энтеровирусная инфекция (ЭВИ), вызываемая вирусами рода Enterovirus разных типов, отличается высокой контагиозностью, широким распространением, наличием бессимптомного вирусоносительства и разнообразием клинических форм и типов энтеровирусов.

Полиомиелит – тяжелая неврологическая инфекция с клиникой острого вялого паралича, которая вызывается полиовирусами (Poliovirus 1-3) и может закончиться остаточным параличом. С 1988 года действует Глобальная программа ликвидации полиомиелита. Основным способом выявления случаев полиомиелита является надзор за синдромом острого вялого паралича (ОВП) с лабораторной диагностикой всех случаев ОВП у детей в возрасте до 15 лет. Пять регионов ВОЗ из шести сертифицированы как свободные от полиомиелита. Дикая полиовирус (ДПВ) типа 1 циркулирует в Афганистане и Пакистане. Кроме Poliovirus 1-3 энтеровирусы видов Enterovirus alphacoxsackie, betacoxsackie и coxsackierol могут вызвать ОВП.

Энтеровирусная инфекция вариабельна по клиническим проявлениям и тяжести: от легкой лихорадки до генерализованной инфекции с поражением центральной нервной системы. Надзор за ЭВИ во Вьетнаме основан на мониторинге случаев вирусной пузырчатки полости рта и конечностей (hand, foot and mouth disease, HFMD) с типичной сыпью на руках, ногах и слизистой полости рта. В 2012 году в Южном Вьетнаме создана система надзора за HFMD с обязательной лабораторной диагностикой тяжелых и смертельных случаев ЭВИ – тяжелого экономического бремени для Вьетнама [Nhan L.N.T, 2019]. Высокая социально-экономическая значимость ЭВИ и массовые вспышки заболевания требуют изучения закономерностей развития ситуации с ЭВИ, постоянного контроля заболеваемости различными клиническими формами ЭВИ, совершенствования диагностики и профилактики инфекции. Необходимо изучение вирусологических и молекулярных свойств энтеровирусов, выявленных у больных, особенностей циркуляции среди населения в разные периоды в отдельных провинциях Южного Вьетнама, и разработка профилактических мер в целях снижения заболеваемости энтеровирусной инфекцией во Вьетнаме.

Степень разработанности темы исследования

Создание национальной программы борьбы с полиомиелитом во Вьетнаме имело решающее значение для реализации плана ликвидации инфекции в стране. Вьетнам был аккредитован как свободная от полиомиелита страна в составе Западно-Тихоокеанского региона ВОЗ в 2000 году. Финальный этап ликвидации полиомиелита сопровождался широким применением во Вьетнаме оральной полиовирусной вакцины (ОПВ) для плановой трехкратной иммунизации детей в возрасте двух, трех и четырех месяцев, с 2019 года введена четвертая прививка инактивированной полиовирусной вакциной (ИПВ) в возрасте пять месяцев. Это привело к снижению циркуляции вакцинных полиовирусов – источника образования

полиовирусов вакцинного происхождения (ПВВП, VDPV), близких по вирулентности к диким вирусам. Сократилось число случаев острого вялого паралича, вызванных полиовирусами (вакцинными или ПВВП). Широкая циркуляция неполиомиелитных энтеровирусов (НПЭВ) вызвала рост числа случаев ЭВИ, часто осложненных, менингитами и вялыми параличами.

После первой вспышки HFMD в Хошимине в 2003 г. [Van Tu P., 2007] наблюдали рост заболеваемости в 2011-2012 гг. (113000 случаев HFMD, 170 летальных исходов [Nguyen N.T., 2014]), эпидемия распространилась на Вьетнам. В 2013-2017гг. число больных и смертей в стране снизилось, но заболеваемость была выше, чем до начала эпидемии, затем заболеваемость и летальность периодически росли [Hong N.T.T., 2018]. Министерство здравоохранения Вьетнама признало HFMD высоко опасным заболеванием, подлежащим еженедельной отчетности. В 2012 г. в Южном Вьетнаме создана система надзора за этой инфекцией с постоянным контролем циркуляции энтеровирусов и вирусологической диагностикой тяжелых и летальных случаев инфекции с изучением выделенных энтеровирусов.

Анализ вирусологических и молекулярных характеристик неполио энтеровирусов, выделенных от больных неполио ЭВИ, контроль смены доминирующих типов и генотипов циркулирующих энтеровирусов и установление их роли в развитии различных клинических форм ЭВИ является актуальной научной задачей и имеет важное значение для прогнозирования эпидемической ситуации с ЭВИ в Южном Вьетнаме, и принятия профилактических мер.

Цель исследования

Изучить вирусологические и молекулярные свойства энтеровирусов, особенности их циркуляции среди населения Южного Вьетнама, и роль энтеровирусов в этиологии инфекционных заболеваний.

Задачи исследования:

1. Определить частоту выделения полиовирусов и неполиомиелитных энтеровирусов от больных с диагнозом синдром острого вялого паралича в Южном Вьетнаме.

2. Установить виды и типы неполиомиелитных энтеровирусов, связанных с энтеровирусной инфекцией в Южном Вьетнаме, и оценить роль доминирующих в циркуляции энтеровирусов в качестве этиологических агентов клинических форм энтеровирусной инфекции.

3. Оценить распространенность неполиомиелитных энтеровирусов разных типов среди населения Южного Вьетнама. Определить ведущую клиническую форму неполио энтеровирусной инфекции в Южном Вьетнаме и выявить связанные с ней энтеровирусы.

4. Установить лидирующий в этиологии ведущей клинической формы энтеровирусной инфекции тип неполиомиелитного энтеровируса и оценить его роль в этиологии инфекций, обусловленных энтеровирусами.

5. Охарактеризовать молекулярные особенности и филогенетические связи ряда неполиомиелитных энтеровирусов, наиболее широко циркулирующих среди населения Южного Вьетнама и часто выявляемых у больных с энтеровирусной инфекцией.

Научная новизна

На основе анализа вирусологических и молекулярных свойств энтеровирусов, выделенных от пациентов с острым вялым параличом и различными формами энтеровирусной инфекции, показаны изменения типов и генотипов неполиомиелитных энтеровирусов (НПЭВ), циркулировавших среди населения Южного Вьетнама, в течение многих лет наблюдения. Выявлены типы и генотипы энтеровирусов, которые доминировали в циркуляции и вызывали вспышки неполио ЭВИ. Впервые дан анализ вспышек неполио ЭВИ в ряде провинций Южного Вьетнама за многие годы с учетом клинических форм инфекции. Изучена роль ведущих типов и генотипов энтеровирусов как этиологических агентов клинических форм неполио ЭВИ в Южном Вьетнаме. Установлена роль энтеровируса 71 как этиологического агента HFMD – ведущей клинической формы энтеровирусной инфекции в Южном Вьетнаме. Штаммы ЭВ71 также выявляли при энтеровирусном менингите и при синдроме острого вялого паралича.

Теоретическая и практическая значимость полученных результатов

Комплексный подход к диагностике неполио ЭВИ с использованием вирусологических и молекулярных методов исследования позволил получить новые систематизированные данные о циркуляции неполио энтеровирусов разных типов и генотипов в Южном Вьетнаме за многие годы, в том числе в провинциях. Созданы предпосылки для предотвращения рисков, связанных с неполио ЭВИ в Южном Вьетнаме. Налажен систематический мониторинг циркуляции энтеровирусов. Особое внимание уделено появлению и распространению новых вариантов НПЭВ, что позволит прогнозировать развитие подъемов заболеваемости ЭВИ и своевременно принимать меры профилактики, основанные на новых технологических решениях.

Положения, выносимые на защиту

1. Выделение полиовирусов, в основном вакцинных кроме двух штаммов ПВВП2, от больных с синдромом острого вялого паралича не превышало 1%. Выделение от этих пациентов 11,6% неполиомиелитных энтеровирусов связано с их широкой циркуляцией в Южном Вьетнаме и неврологическими осложнениями неполио энтеровирусной инфекции.

2. Доминирование в циркуляции энтеровирусов вида А (alphacoxsackie), включая энтеровирус 71, обусловило преобладание HFMD – вирусной пузырчатки полости рта и конечностей среди клинических форм неполио энтеровирусной инфекции. Смена типов и генотипов энтеровирусов в ходе многолетней циркуляции приводила к периодическим подъемам заболеваемости энтеровирусной инфекцией в Южном Вьетнаме.

3. Энтеновирус 71 был лидирующим этиологическим агентом вирусной пузырьчатки полости рта и конечностей (HFMD) – ведущей формы неполио энтеровирусной инфекции в Южном Вьетнаме. Энтеновирус 71 был выявлен, наряду с энтеровирусами вида В (betacoxsackie), у больных с диагнозами энтеровирусный менингит и синдром острого вялого паралича.

4. Изученные штаммы энтеровируса 71, циркулировавшие в Южном Вьетнаме, принадлежали к двум генотипам – генотипу С4 (большинство штаммов) и генотипу В5. Идентифицированные штаммы энтеровируса Коксаки А10, выявленные у больных, в основном принадлежали к генотипу F3, один штамм вируса Коксаки А10 был отнесен к генотипу F1.

Методология исследования

Методологической основой исследования послужило сочетание вирусологических и молекулярно-биологических методов исследования. В исследовании применяли выделение энтеровирусов на стандартизованных линиях клеток (RD, L20В и Vero). Идентификацию полиовирусов проводили методом внутритиповой дифференциации. Для молекулярных исследований использовали выделение РНК, ПЦР с обратной транскрипцией, секвенирование генома и филогенетический анализ полио- и энтеровирусов. Более подробно использованные методы исследования отражены в разделе «Материалы и методы».

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Основные научные положения диссертации соответствуют п. 4, п. 8, п. 10 паспорта научной специальности 1.5.10. «Вирусология».

Реализация результатов работы

В Базу данных GenBank депонированы полные нуклеотидные последовательности области генома VP1 67 вирусов ЭВ71 под номерами MW139687 – MW139744, OR947996 — OR948003.

Результаты исследования представлены в двух учебных пособиях для специалистов разного профиля – педиатры, инфекционисты, вирусологи и эпидемиологи.

1. Справочное пособие «Надзор и контроль вирусных инфекций, актуальных для Социалистической Республики Вьетнам». Санкт-Петербург. 2018. 72 с.
2. Справочное пособие «Совершенствование эпидемиологического надзора и диагностики энтеровирусной инфекции в Социалистической Республике Вьетнам». Санкт-Петербург. 2022. 80 с. (русский, вьетнамский). ISBN978-5-904405-56-4.

Результаты, полученные в данном исследовании, полезны многим специалистам (эпидемиологам, вирусологам, инфекционистам). Они используются в лекциях Медицинских университетов Вьетнама и могут использоваться для обучения на медицинских факультетах.

Личный вклад автора

Личный вклад автора заключается в освоении научной литературы, планировании и проведении вирусологических исследований материала от больных с синдромом ОВП и с ЭВИ,

молекулярно-генетических исследований и анализе полученных результатов с целью установления роли часто циркулирующих в Южном Вьетнаме неполио энтеровирусов в этиологии энтеровирусной инфекции. Постановка задач, обобщение и анализ результатов исследований, статистическая обработка, подготовка публикаций, написание текстов диссертации и автореферата также выполнены автором. При участии автора в международную базу данных GenBank депонированы полные нуклеотидные последовательности области генома VP1 67 вирусов ЭВ71 под номерами MW139687 – MW139744 и OR947996 — OR948003.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 132 страницах, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 4 глав собственных исследований, обсуждения и заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 152 источника. Текст содержит 22 таблицы и 29 рисунков.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Надзор за синдромом острого вялого паралича проведен в 29 провинциях Южного Вьетнама в соответствии с Программой ликвидации полиомиелита ВОЗ и Национальной программой по надзору и вирусологической диагностике клинических форм ЭВИ – HFMD (вирусная пузырчатка полости рта и конечностей) и энтеровирусный менингит – в 20 провинциях Южного Вьетнама. Материалом для исследования служили образцы клинического материала от госпитализированных детей в возрасте до 15 лет. Было исследовано более 11 тысяч проб (табл.1).

Таблица 1

Число проб, исследованных в вирусологической лаборатории в 2010-2021 годах

Источник образцов	Количество образцов		
	Фекалии	Мазки из ротоглотки	Всего
первичный диагноз – острый вялый паралич	2143	0	2143
первичный диагноз – менингит/ менингоэнцефалит	0	1004	1004
Первичный диагноз – вирусная пузырчатка полости рта и конечностей	1186	6790	7976
Всего			11123

Выделение полиовирусов и неполиомиелитных энтеровирусов проводили вирусологическим методом на трех клеточных линиях: RD, L20B и Vero по алгоритму ВОЗ. Идентификацию полиовирусов осуществляли методом ПЦР (внутритипная дифференциация полиовирусов). Тип неполио энтеровирусов определяли молекулярно-биологическими методами (ПЦР с последующим секвенированием генома вирусов). Филогенетические связи исследуемых

изолятов и референтных изолятов устанавливали, используя базу данных GenBank. Последовательности исследованных изолятов и референтных штаммов выравнивали по принципу ClustalW. Статистическую значимость различий между количественными показателями оценивали с использованием параметрических тестов (t-теста Стьюдента). Принятая в настоящей работе величина уровня значимости (P) составляла 0,05.

Результаты собственных исследований

Поиск и идентификация полиовирусов и неполиомиелитных энтеровирусов у детей с синдромом острого вялого паралича

За двенадцать лет в Южном Вьетнаме из проб от 2143 пациентов с диагнозом ОВП было выделено 22 полиовируса, что составило 1%. Из 22 изолированных полиовирусов 20 штаммов были вакцинными, два полиовируса были классифицированы как полиовирусы вакцинного происхождения типа 2 (ПВВП2/VDPV2). Всего идентифицировано шесть полиовирусов типа 1, пять ПВ типа 2 и 11 полиовирусов типа 3 (табл.2). Важно подчеркнуть, что ДПВ не выделены, а последние полиовирусы вакцинного происхождения типа 2 были изолированы до глобального перехода к вакцинации двухвалентной ОПВ вместо используемой ранее трехвалентной ОПВ.

Таблица 2

Выделение полиовирусов от детей с синдромом ОВП в 2010-2021 годах

Год	Число случаев ОВП	Число выделенных полиовирусов	Типы изолированных полиовирусов (ПВ)		
			ПВ1	ПВ2	ПВ3
2010	109	1	-	-	1
2011	189	2	1	1	-
2012	291	5	2	2	1
2013	227	2	1	-	1
2014	136	-	-	-	-
2015	175	-	-	-	-
2016	165	8	1	2	5
2017	194	-	-	-	-
2018	173	4	1	-	3
2019	177	-	-	-	-
2020	225	-	-	-	-
2021	82	-	-	-	-
Всего	2.143	22 (1%)	6	5	11

В 2012 г. Вьетнам сообщил о двух случаях ОВП, вызванных полиовирусами вакцинного происхождения (ПВВП2) у детей из малодоступных районов и этнических меньшинств. Низкий уровень охвата вакцинацией способствовал передаче полиовирусов от вакцинированных не вакцинированным, что привело к образованию ПВВП. Один ребенок не был вакцинирован, второй получил две дозы ОПВ. Остаточных параличей у детей не выявлено. Полиовирусы, выделенные из двух проб от каждого ребенка, являлись ПВВП2. Секвенирование участка VP1 генома полиовирусов показало, что штаммы SV3127LR-VP1 и SV3128LR-VP1 от первого

ребенка имели по шесть нуклеотидных замен в области генома VP1, отличие от эталонного вируса Сэбина типа 2 было 0,66%. Штамм SV3129LR-VP1 от второго ребенка имел пять нуклеотидных замен, штамм SV3130LR-VP1 – шесть замен, процент дивергенции был равен 0,66%.

Анализ вакцинального статуса 2143 детей с диагнозом синдром острого вялого паралича показал, что подавляющее большинство из них (90%) были привиты против полиомиелита в соответствии с Национальным календарем прививок Вьетнама. Семь детей, у которых были выделены полиовирусы, не получили три дозы ОПВ, включая детей, инфицированных ПВВП2.

У 249 из 2143 больных с диагнозом ОВП были выделены неполиомиелитные энтеровирусы, процент выделения составил 11,6 % (табл. 3). Из 249 детей, из от которых изолировали НПЭВ, большая часть больных (69,4%) были в возрасте до 36 месяцев, 30,6% детей были старше трех лет ($p < 0,05$). Из 249 изолированных НПЭВ удалось идентифицировать 239 вирусов трех видов: вида А (Enterovirus alphacoxsackie), вида В (Enterovirus betacoxsackie) и вида С (Enterovirus coxsackiepol).

Таблица 3

Типы неполио энтеровирусов, идентифицированные у больных ОВП в 2012-2021 годах

Годы	Число вирусов	Типы неполиомиелитных энтеровирусов*
2010	12	1CVA10, 1CVB4, 1CVB5, 1E6, 2E29, 1E30, 1EVA71, 1EVB75, 1EVB81, 1EVB84
2011	19	1CVA4, 1CVB1, 1CVB3, 2CVB5, 1E3, 1E9, 2E14, 1E25, 1E33, 3EVA71, 3EVA75, 1EVB88
2012	35	1CVA9, 1CVA10, 1CVB5, 1E3, 1E11, 2E14, 1E33, 23EVA71, 3EVB79
2013	23	3CVA10, 1CVA14, 1CVA24, 2CVB2, 1CVB3, 2CVB4, 1E6, 1E7, 4E11, 1E25, 5EVA71,
2014	15	1CVA6, 2CVA10, 1CVA16, 3E11, 1E30, 2EVA71
2015	17	1CVA9, 1CVA16, 2CVB2, 1E3, 1E6, 1E9, 1E11, 1E25, 7EVA71
2016	14	1CVA4, 1CVA9, 6CVA10, 1CVA21, 1CVB5, 1E11, 3E18
2017	33	13CVA16, 4CVB4, 5CVB5, 1E3, 2E7, 1E9, 2E11, 2E13, 2E14, 1EVB81
2018	22	1CVA9, 5CVA10, 1CVA16, 2CVB2, 2E6, 1E11, 2E20, 8EVA71
2019	15	2CVA10, 1CVA16, 1CVB4, 2E3, 2E11, 1E14, 5E18, 1EVA71
2020	22	10CVA4, 2CVA8, 4CVA10, 1E6, 3E14, 2EVA71
2021	22	1CVA4, 1CVB1, 3CVB3, 2E16, 15EVA71
Всего	249/239	67EVA71, 4EVB75, 3EVB79, 2EVB81, 1EVB84, 1EVB88, 13CVA4, 1CVA6, 2CVA8, 4CVA9, 24CVA10, 1CVA14, 17CVA16, 1CVA21, 1CVA24, 2CVB1, 6CVB2, 5CVB3, 8CVB4, 10CVB5, 6E3, 6E6, 3E7, 3E9, 15E11, 2E13, 10E14, 2E16, 8E18, 2E20, 3E25, 2E29, 2E30, 2E33

*CVA – Коксаки А, CVB – Коксаки В, E - ECHO

Спектр НПЭВ, выявленных у детей с диагнозом ОВП, был обширным: идентифицировано 239 энтеровирусов 34 типов. Доля 125 вирусов вида А (alphacoxsackie) была самой высокой. Из

семи типов вирусов вида А штаммы ЭВ71 составили более половины, в 2012 году 23 из 24 случаев ОВП были вызваны энтеровирусом 71. Энтеровирусы вида В (betacoxsackie) были представлены 25 типами. Доля вирусов вида С (coxsackierol) была наименьшей (2,1%), вирусов вида D (deconjuncti) не было (рис.1).

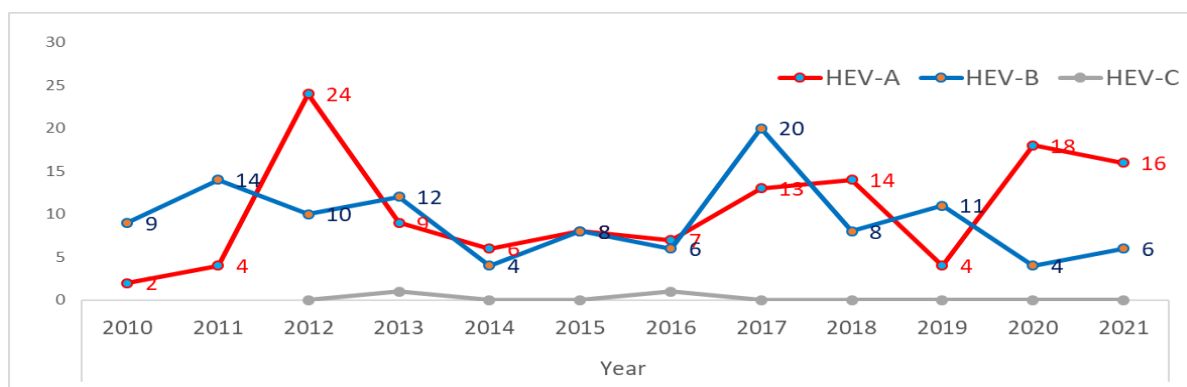


Рисунок 1. Выделение неполиомиелитных энтеровирусов от больных с диагнозом синдром острого вялого паралича в 2010-2021 годах.

Данные о выделении 1% полиовирусов у детей с синдромом ОВП высветили две ключевые позиции: устойчивое поддержание свободного от полиомиелита статуса Вьетнама с искоренением диких полиовирусов благодаря эффективности надзора и массовой вакцинации детей, но снижение охвата вакцинацией в двух районах привело к циркуляции ПВВП2; выделение от больных ОВП 11,6% НПЭВ доказывает растущую роль широко циркулирующих в Южном Вьетнаме НПЭВ в этиологии неполио ЭВИ, часто осложненной неврологической симптоматикой, в период после ликвидации диких полиовирусов в стране.

Этиология различных клинических форм неполио энтеровирусной инфекции

Неполио ЭВИ повсеместно распространена в Южном Вьетнаме. Основным компонентом надзора за ЭВИ во Вьетнаме является контроль и диагностика лидирующей клинической формы ЭВИ (HFMD), которая является одной из тяжелейших проблем здравоохранения Вьетнама. Инфекция чаще поражает детей ранних возрастов, отличается высоким уровнем заболеваемости и летальности в связи с тяжестью течения. В 2012-2021 гг. 632651 случай (104 смертельных) был зафиксирован в 20 провинциях Южного Вьетнама, чаще в густо населенных и индустриальных. Больше всего случаев инфекции зарегистрировано в 2012 и в 2017-2019 гг. Провинции Бариа-Вунг Тау, Донг Тап, Бин Донг, Донг Най, Лонг Ан и город Хошимин отличались самой высокой заболеваемостью, процент случаев инфекции составил 49-70% от всех случаев в стране (рис. 2).

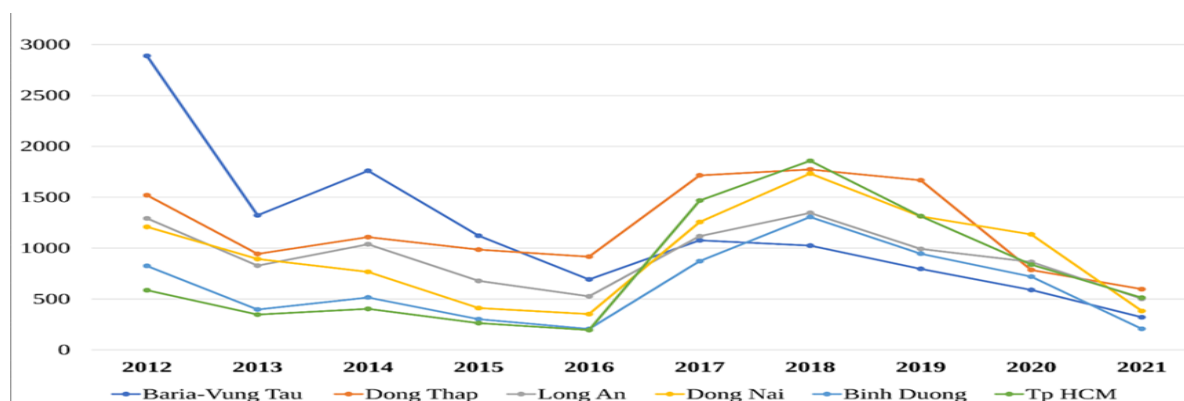


Рисунок 2. Число случаев HFMD у детей в 6 провинциях Южного Вьетнама, 2012-2021 гг.

При вирусологическом исследовании 7976 клинических проб от детей с вирусной пузырчаткой рта и конечностей было идентифицировано 3611 неполио энтеровирусов (табл. 4).

Таблица 4

Типы энтеровирусов, идентифицированных у больных вирусной пузырчаткой полости рта и конечностей в Южном Вьетнаме в 2012-2021 годах

Годы	Число вирусов	Типы энтеровирусов
2012	240	212EVA71, 10CVA6, 3CVA10, 15CVA16
2013	186	174EVA71, 2CVA6, 3CVA10, 6CVA16, 1CVA24
2014	135	90EVA71, 1CVA2, 1CVA5, 12CVA6, 19CVA10, 10CVA16, 1CVB3, 1ECHO16
2015	242	157EVA71, 4CVA2, 4CVA4, 3CVA5, 37CVA6, 3CVA8, 2CVA9, 29CVA16, 1CVB4, 2E16
2016	415	320EVA71, 2CVA2, 1CVA4, 3CVA5, 2CVA6, 7CVA8, 69CVA10, 9CVA16, 1CVB3, 1E18
2017	561	250EVA71, 6CVA2, 9CVA4, 11CVA5, 154CVA6, 13CVA8, 6CVA10, 106CVA16, 1CVB3, 5CVB4
2018	535	196EVA71, 31CVA2, 18CVA4, 17CVA5, 105CVA6, 6CVA8, 154CVA10, 4CVA16
2019	543	80EVA71, 39CVA2, 15CVA4, 15CVA5, 247CVA6, 14CVA8, 53CVA10, 75CVA16, 3CVB4, 2E18
2020	418	39EVA71, 4CVA2, 35CVA4, 235CVA6, 39CVA8, 35CVA10, 1CVA16, 2CVB3, 28CVB4
2021	336	253EVA71, 3CVA2, 5CVA4, 11CVA5, 26CVA6, 4CVA8, 2CVA9, 17CVA10, 4CVB3, 4CVB4, 7E16
Всего	3611	1771EVA71, 90CVA2, 87CVA4, 61CVA5, 830CVA6, 90CVA8, 359CVA10, 255CVA16, 1CVA24, 4CVA9, 9CVB3, 36CVB4, 5CVB5, 10ECHO16, 3ECHO18

К виду А (*Enterovirus alphacoxsackie*) отнесены 98% вирусов, включая 1771 вирус ЭВ71, который был лидирующим этиологическим агентом вирусной пузырчатки рта и конечностей. Другие ЭВ, связанные с этой формой ЭВИ, принадлежали к разным типам ЭВ – Коксаки А 6, А10 и А16. В 2012-2016 годах доминировали штаммы ЭВ71, в 2017-2020 гг. другие ЭВ Коксаки А выявляли чаще, с 2021 года энтеровирус 71 вновь занял лидирующую позицию (рис. 3).

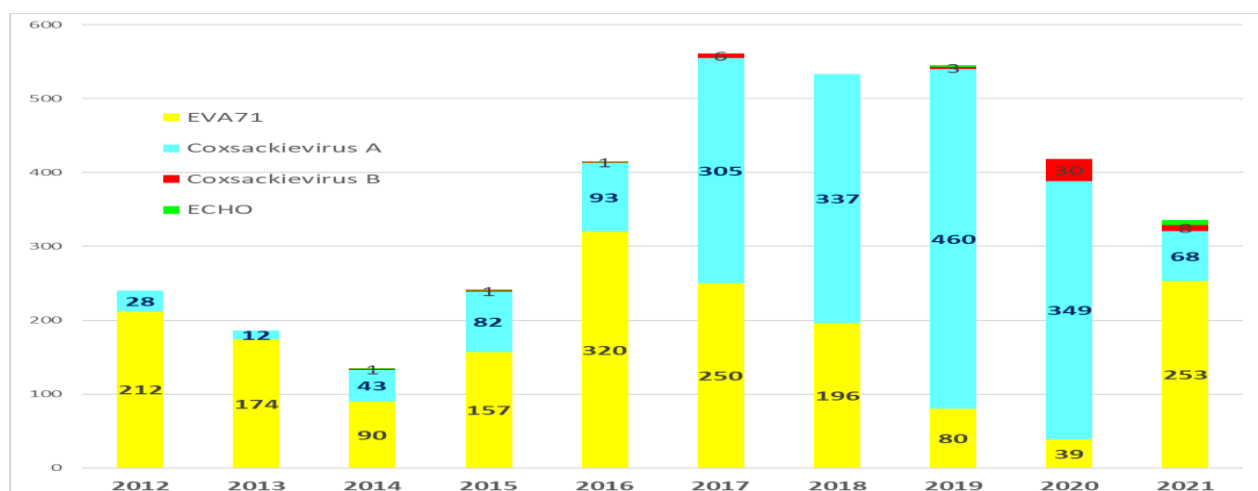


Рисунок 3. Динамика детекции энтеровирусов вида А у больных HFMD детей в Южном Вьетнаме в 2012-2021 годах.

Случаи вирусной пузырчатки полости рта и конечностей в основном были клинически тяжелыми (89,3%) с неврологическими и сердечно-легочными осложнениями в виде менингита, энцефалита, миокардита или отека легких, в 1% случаев наступили летальные исходы (табл. 5). Более 90% больных были дети в возрасте до трех лет, 7% детей были в возрасте от трех до 15 лет. При этом мальчики болели достоверно чаще девочек ($p < 0,05$).

Таблица 5

Сведения о пациентах с диагнозом вирусная пузырчатка полости рта и конечностей с учетом клинической картины, пола и возраста больных, 2012-2021 гг.

Год	Число больных	Степень тяжести			Пол		Возраст		
		Легкая форма	Тяжелая форма	Летальные исходы	Жен.	Муж.	0-12 мес.	13-36 мес.	3-14 лет
2012	243	12	211	20	82	161	84	146	13
2013	191	2	181	8	78	113	45	135	11
2014	137	24	113	0	62	75	18	96	23
2015	252	36	216	0	106	146	37	185	30
2016	423	55	368	0	148	275	123	262	38
2017	578	51	527	0	221	357	119	438	21
2018	550	32	516	2	218	332	113	414	23
2019	560	127	433	0	219	341	129	364	67
2020	419	37	382	0	167	252	100	308	11
2021	347	18	326	3	130	217	63	256	28
	3700	394 (10.7%)	3273 (88.4%)	33 (0,9%)	1431 (38.7%)	2269 (61.3%)	831 (22.4)	2604 (70.4%)	265 (7.2%)

С 2012 по 2021 годы при вирусологическом исследовании проб от больных с первичным диагнозом энтеровирусный менингит/менингоэнцефалит было выделено и идентифицировано 228 энтеровирусов 24 типов. К виду А (Enterovirus alphacoxsackie) отнесено 57% штаммов, к виду В (Enterovirus betacoxsackie) принадлежали 42,5% энтеровирусов, один штамм – EV-D68, выявленный в 2018 г., принадлежал к виду D (0,5%). Частота обнаружения идентифицированных энтеровирусов вида А и вида В от больных в разные годы не была одинаковой. В 2012-2014, 2016

и 2021 гг. преобладали вирусы вида А, а в 2015 и 2017-2019 годах превалировали вирусы вида В (рис. 4).

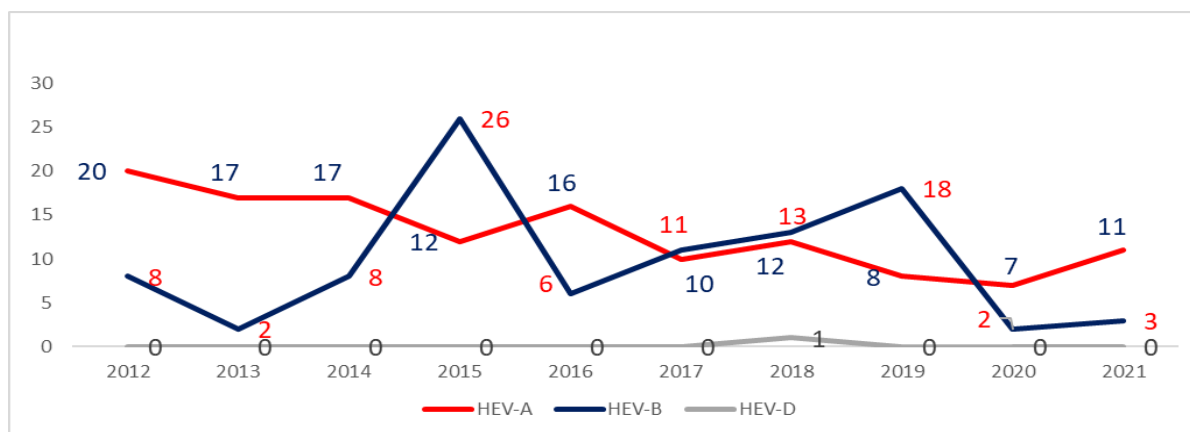


Рисунок 4. Выделение неполиомиелитных энтеровирусов видов А, В и D от больных с диагнозом энтеровирусный менингит/менингоэнцефалит в 2012-2021гг. в Южном Вьетнаме.

Высокий процент вирусов вида А у больных с этой формой инфекции связан с широкой циркуляцией в Южном Вьетнаме ЭВ71, который лидировал среди 130 вирусов вида А, составив 74%. Второе место занял вирус Коксаки А6 (10% от вирусов вида А). Суммарная доля вирусов Коксаки А2, А4, А5, А8, А12 и А16 составила 16%. Эти вирусы и ЭВ71 известны как типичные возбудители вирусной пузырчатки рта и конечностей (рис. 5).

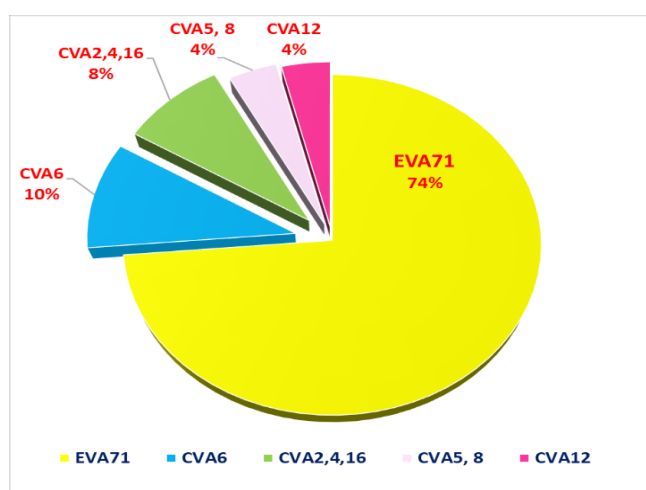


Рисунок 5. Типы энтеровирусов вида А, идентифицированных у больных энтеровирусным менингитом или менингоэнцефалитом в Южном Вьетнаме в 2012-2021 годах.

Доля энтеровирусов вида В (*E. betacoxsackie*) составила 42,5% от всех вирусов, идентифицированных у больных энтеровирусным менингитом (рис. 6). Без учета энтеровируса 71 доля вирусов вида В была выше доли ЭВ вида А. Среди 14 типов вирусов вида В процент вирусов Коксаки В1, В2, В3, В4, и В5 был наибольшим – 53,6%. Превалировали вирусы Коксаки В4 (20%), Коксаки В3 (12%), Коксаки В5 (11%) и вирусы Коксаки В1 и В2, в сумме составившие 10%. Доля вирусов ЕСНО среди 43 вирусов вида В была равна 44,4%, лидерство принадлежало вирусу ЕСНО 11 (16%). Энтеровирусы В разных типов, такие как ЕСНО 6, ЕСНО 9, ЕСНО 11,

ЕСНО 30 и Коксаки А9, известны как типичные этиологические агенты энтеровирусного менингита.

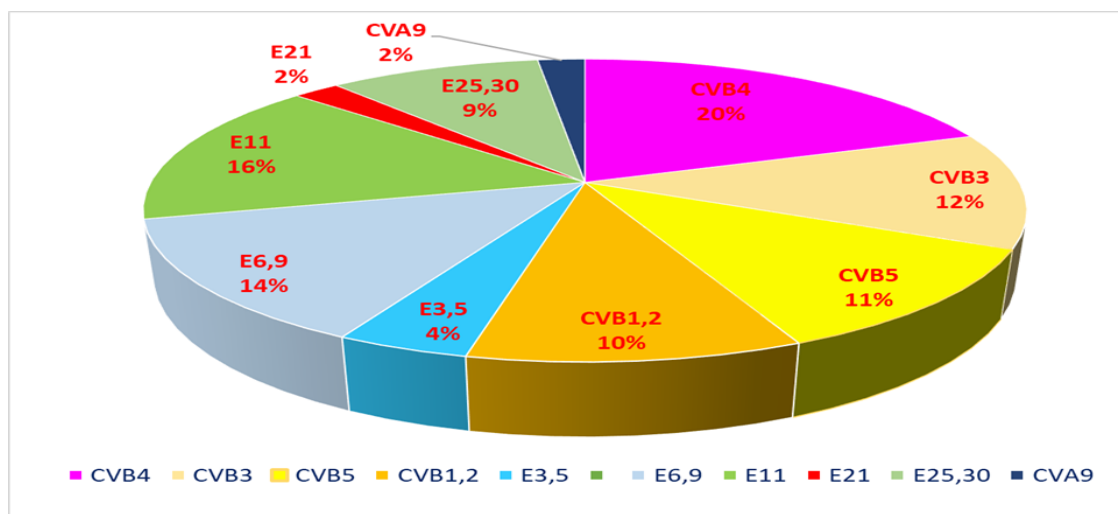


Рисунок 6. Типы энтеровирусов вида В, идентифицированных у больных энтеровирусным менингитом/менингоэнцефалитом в Южном Вьетнаме в 2012-2021 годах.

У больных с различными клиническими формами неполио ЭВИ были выявлены вирусы четырех видов. Энтеровирусы видов С (Enterovirus coxsackiepol) и D (Enterovirus deconjuncti) были обнаружены крайне редко. Вид А (Enterovirus alphacoxsackie) был представлен вирусами Коксаки А 10 типов – этиологическими агентами HFMD, вирусной пузырчатки полости рта и конечностей. ЭВ71 лидировал среди всех энтеровирусов, найденных у больных различными формами ЭВИ. Вирусы вида В (Enterovirus betacoxsackie): Коксаки А9, Коксаки В типов 1-6 и вирусы ЕСНО разных типов, идентифицированные у больных детей, чаще были связаны с энтеровирусными менингитами. Данными многолетнего вирусологического исследования проб от больных с разными диагнозами показано, что энтеровирус 71 был обнаружен при различных клинических формах инфекции.

Роль энтеровируса 71 как этиологического агента инфекционных заболеваний в Южном Вьетнаме

На протяжении многих лет изучения неполио ЭВИ Вьетнам пережил несколько пиков активной циркуляции энтеровируса 71, сопровождавшихся массовыми вспышками ЭВИ (2012, 2016, 2021). Ведущей формой неполио ЭВИ в Южном Вьетнаме была HFMD – вирусная пузырчатка полости рта и конечностей, основным возбудителем этой инфекции являлся ЭВ71, он же был источником распространения заболевания. Данными многолетнего вирусологического исследования проб от больных с разными диагнозами показано, что энтеровирус 71 являлся одним из наиболее частых этиологических агентов инфекционных заболеваний с разной клинической картиной. Вирус ЭВ71 был идентифицирован у больных с диагнозами вирусная пузырчатка полости рта и конечностей, и энтеровирусный менингит/менингоэнцефалит, а также

у пациентов с первичным диагнозом синдром острого вялого паралича. Процент штаммов ЭВ71 среди идентифицированных неполио энтеровирусов был высоким у больных со всеми изученными формами инфекции, поскольку с этим вирусом был связан широкий спектр серьезных осложнений (менингит/менингоэнцефалит, сердечно-легочные проявления, а также острые вялые параличи, характерные для полиомиелита).

Для оценки роли энтеровируса 71 в этиологии инфекционных заболеваний в Южном Вьетнаме важно учесть следующие данные. У больных с диагнозом синдром острого вялого паралича процент штаммов энтеровируса 71 (67 из 239 идентифицированных у них неполио ЭВ) был равен 28%. Из 228 вирусов, найденных у пациентов с диагнозом энтеровирусный менингит/менингоэнцефалит, 96 штаммов были идентифицированы как ЭВ71, что составило 42%, остальные 132 вируса были энтеровирусами вида В. Самая тесная связь энтеровируса 71 выявлена со случаями вирусной пузырчатки полости рта и конечностей, где доля обнаружения штаммов вируса ЭВ71 (1771) была наибольшей, составив 49% от выделенных от этих пациентов неполио энтеровирусов (табл. 6).

Таблица 6

Выделение вирусов ЭВ71 от пациентов с различными инфекционными заболеваниями в Южном Вьетнаме с 2010 по 2021 годы.

Год	ОВП (239 ЭВ)		Менингит/ энцефалит (228 ЭВ)		Пузырчатка полости рта и конечностей (3611 ЭВ)	
	ЭВ71	другие ЭВ	ЭВ71	другие ЭВ	ЭВ71	другие ЭВ
2010	1	10				
2011	3	15				
2012	23	11	18	10	212	28
2013	5	17	15	4	174	12
2014	2	8	16	9	90	45
2015	7	9	10	28	157	86
2016	0	14	15	7	320	95
2017	0	33	3	18	250	312
2018	8	14	6	20	196	337
2019	1	14	4	22	80	465
2020	2	20	4	5	39	379
2021	15	7	5	9	253	84
Всего	67 (28%)	172 (72%)	96 (42%)	132 (58%)	1771(49%)	1840 (51%)

Штаммы вируса ЭВ71 интенсивно циркулировали в разных провинциях Южного Вьетнама. Особенно много случаев инфекции, вызванных энтеровирусом ЭВ71, зафиксировано в городе Хошимин и провинциях Донг Тап, Кан То, Анзянг и Тай-Нинь.

Самой многочисленной группой среди пациентов с выявленными вирусами ЭВ71 были дети от 13 до 36 месяцев (72%), что достоверно превышало долю детей других возрастов ($p < 0,05$). При этом мальчики (62%) болели достоверно чаще ($p < 0,05$) девочек (38%) (табл. 7).

Случаи инфекционных заболеваний, связанных с ЭВ71 в Южном Вьетнаме

Диагноз	Число случаев	Распределение по полу		Распределение по возрасту			
		мальчики	девочки	0-6 мес.	7-12 мес.	13-36 мес.	3-14 лет
ОВП	67	38	29	1	8	48	10
Менингит	96	68	28	6	10	70	10
Вирусная пузырчатка рта и конечностей	1771	1093	678	66	254	1278	173
Всего	1934	1199 (62%)	735 (38%)	73 (3%)	272 (15%)	1396 (72%)	193 (10%)

Проведенные исследования позволили установить лидирующую роль энтеровируса 71 в циркуляции среди населения и его важное значение в этиологии инфекционных заболеваний для Южного Вьетнама. Полученные результаты доказывают необходимость усиления эффективности контроля циркуляции энтеровируса 71, прогнозирования вспышек неполио энтеровирусной инфекции, связанных с ЭВ71. Повышение эффективности контроля и мер профилактики энтеровирусной инфекции станет своевременным шагом для укрепления национальной и региональных программ надзора за инфекционными заболеваниями.

Молекулярная характеристика некоторых неполио энтеровирусов, широко циркулировавших в Южном Вьетнаме

Были изучены молекулярные особенности и филогенетические связи важных в этиологии ЭВИ и наиболее широко циркулировавших в Южном Вьетнаме в последние годы НПЭВ. Прежде всего это энтеровирусы, принадлежащих к виду А (*E. alphacoxsackie*), доминировавшие все годы в циркуляции среди НПЭВ. Особенно важно было изучить молекулярные характеристики энтеровируса 71 и энтеровируса Коксаки А10, выявленных у обследованных пациентов.

Молекулярная характеристика энтеровируса 71, циркулировавшего в большинстве провинций Южного Вьетнама с 2010 по 2021 годы

Молекулярный анализ штаммов энтеровируса 71, лидировавшего в циркуляции среди населения многие годы, показал, что 88% штаммов ЭВ71 принадлежали к генотипу С4 и 12% изученных штаммов ЭВ71 были отнесены к генотипу В5. Изученные штаммы вируса ЭВ71 были идентифицированы у больных с диагнозом вирусная пузырчатка полости рта и конечностей, а также выделены от пациентов с синдромом острого вялого паралича. Штаммы энтеровируса 71 генотипа С4, составившие основную часть изученных штаммов. ЭВ71, циркулировавших в Южном Вьетнаме, имели высокую степень родства со штаммами энтеровируса 71, которые были обнаружены в Китае. Эти вирусы также были близки штаммам из Тайваня и Малайзии. Вирусы

ЭВ71 генотипа С4, выявленные в 2018-2019 гг. в случаях вирусной пузырчатки рта и конечностей, и острых вялых параличей, отличались от вирусов, выявленных в 2003-2005 и 2011-2012 годах во время вспышек неполио энтеровирусной инфекции в Южном и Северном Вьетнаме. Штамм VND18/227, идентифицированный у одного пациента с тяжелым клиническим течением вирусной пузырчатки полости рта и конечностей, был близок к штаммам вируса ЭВ71 (99,2–99,4% гомологии) генотипа С4, выявленным в Германии в тот же временной период (рис. 7).

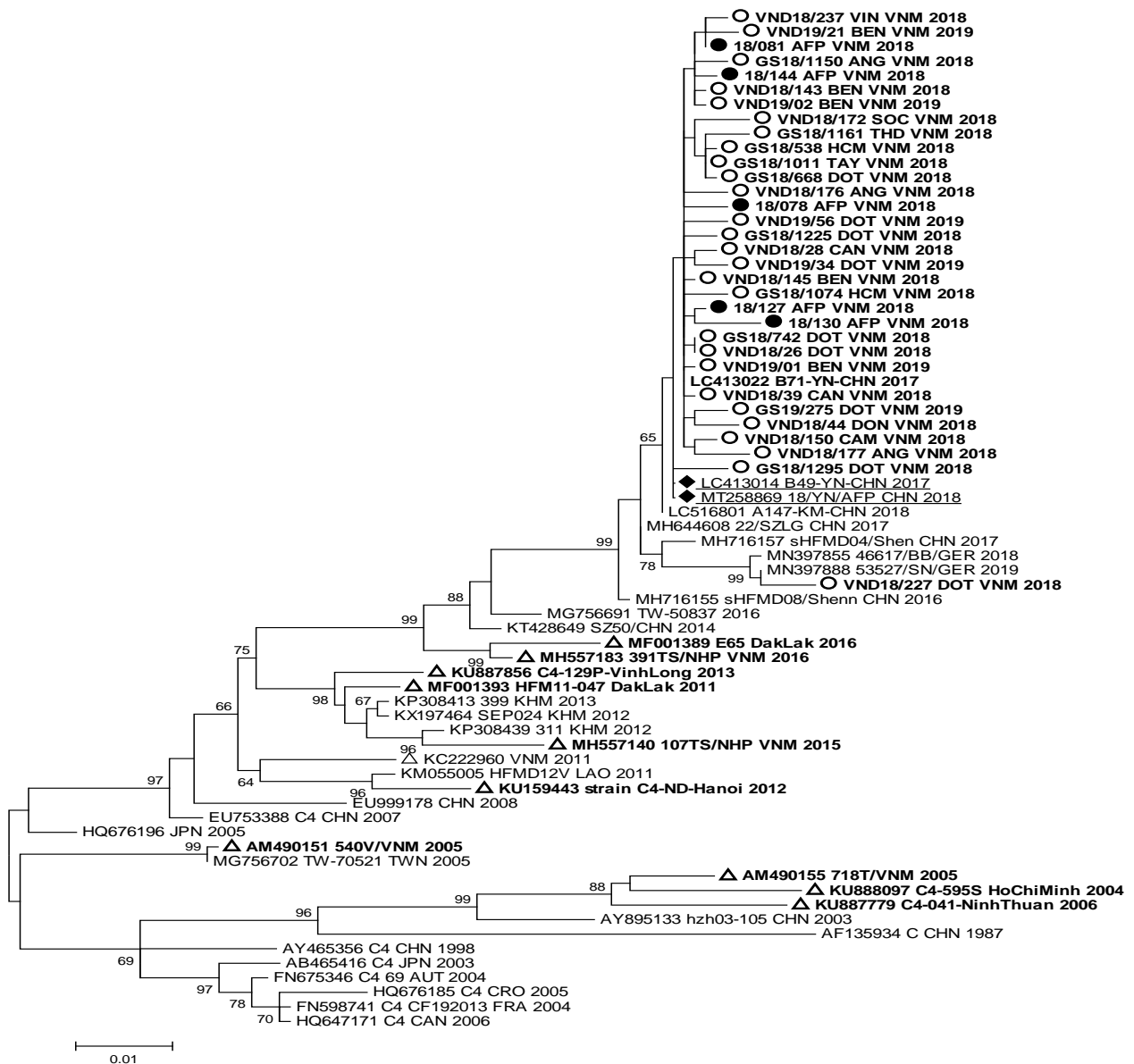


Рисунок 7. Филогенетические связи штаммов вируса ЭВ 71 генотипа С4, идентифицированных в Южном Вьетнаме: ○ - штаммы, выделенные от пациентов с вирусной пузырчаткой полости рта и конечностей, в Южном Вьетнаме; ● - штаммы, выделенные от пациентов с ОВП в Южном Вьетнаме; △ - вьетнамские штаммы, описанные в других исследованиях; ◆ - штаммы, идентифицированные у пациентов из китайской провинции Юньнань.

Нуклеотидные последовательности изученных штаммов энтеровируса 71 генотипа B5, которые были идентифицированы у больных с диагнозом HFMD (вирусная пузырчатка полости рта и конечностей), а также у больных с диагнозом синдром острого вялого паралича в 2018-2019 гг., образовали монофилетическую группу. Все штаммы энтеровируса 71 генотипа B5 имели тесную связь с вирусами ЭВ71 генотипа B5, выявленными в Китае в 2017 году. В то же время эти штаммы отличались от штаммов энтеровируса 71 генотипа B5, циркулировавших во Вьетнаме в период с 2011 по 2016 годы (рис. 8).



Рисунок 8. Филогенетические связи штаммов энтеровируса 71 генотипа B5, выявленных в Южном Вьетнаме: ○ - штаммы, выделенные от пациентов с вирусной пузырчаткой полости рта и конечностей из Южного Вьетнама; ● - штаммы, выделенные от больных с острым вялым параличом из Южного Вьетнама; △ - вьетнамские штаммы, описанные в других исследованиях.

Молекулярная характеристика штаммов энтеровируса Коксаки А10 (СVA10), циркулировавших в Южном Вьетнаме

Были изучены молекулярные характеристики штаммов Коксаки А10, идентифицированных у больных в Южном Вьетнаме. Эти штаммы сравнили со штаммами Коксаки А10, выделенными и идентифицированными в других странах Юго-Восточной Азии, а также в России. Штаммы

вируса Коксаки А10, обнаруженные у обследованных больных, принадлежали к трем генотипам С, Е и F3 (рис. 9). Большинство штаммов от обследованных больных, проанализированных в данном исследовании, принадлежали к генотипу F3, а один штамм, выделенный от пациента с тяжелым заболеванием, принадлежал к генотипу F1. Штаммы из Южного Вьетнама имели генетическое родство со штаммами вируса Коксаки А10 из Китая и других стран Юго-Восточной Азии.

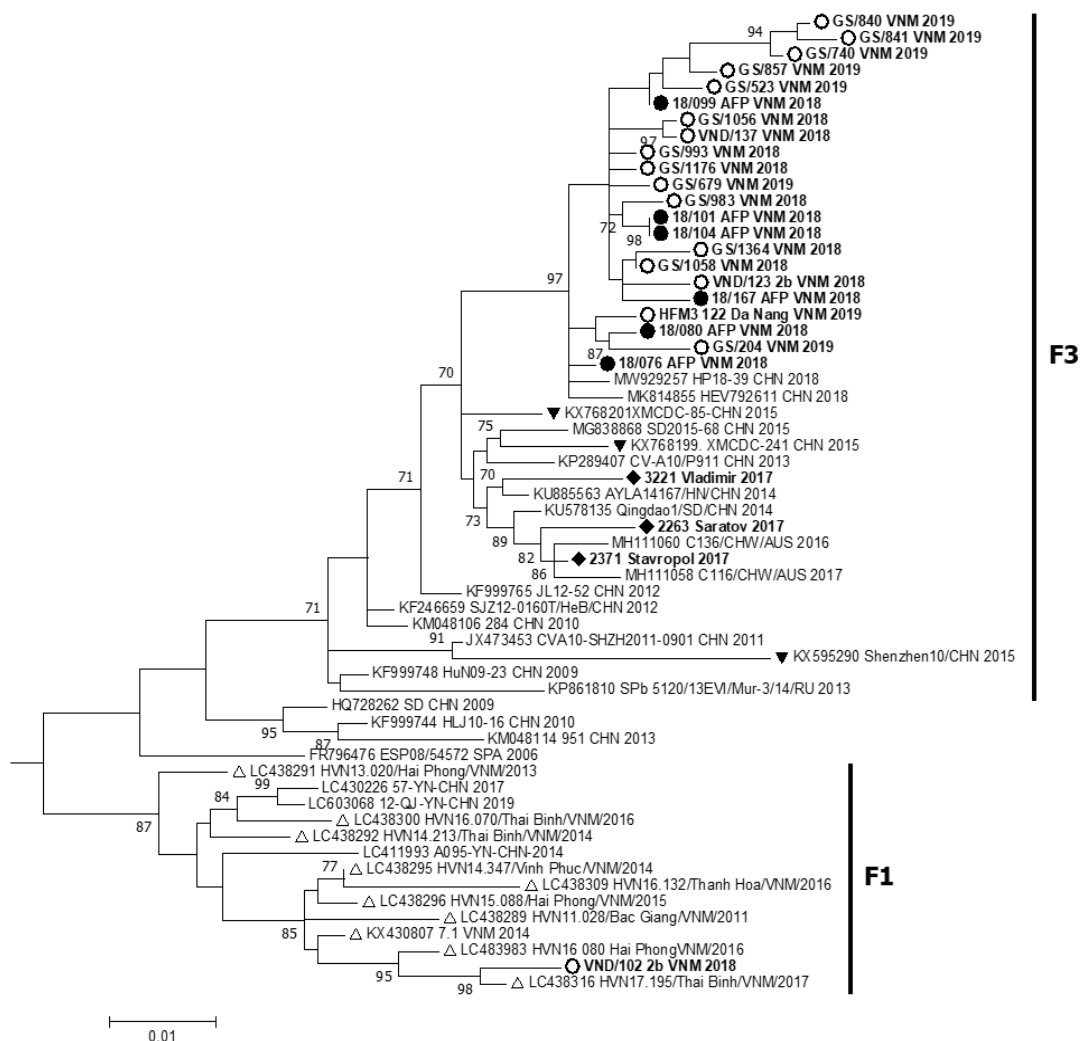


Рисунок 9. Филогенетические связи штаммов Коксаки А10 генотипа F, идентифицированными во Вьетнаме и в других странах, включая РФ: ○ - штаммы, выявленные у пациентов с вирусной пузырчаткой полости рта и конечностей из Южного Вьетнама; ● - штаммы, выделенные от больных с острым вялым параличом из Южного Вьетнама; Δ - вьетнамские штаммы, описанные в других исследованиях.

Выводы

1. От 2143 больных с синдромом острого вялого паралича за 12 лет было выделено 22 полиовируса (1%), 20 штаммов были вакцинными, два штамма ПВВП2 были полиовирусами вакцинного происхождения, что свидетельствует о высоком качестве надзора и вакцинации в Южном Вьетнаме. Выявление у тех же пациентов 11,6% неполиомиелитных энтеровирусов, часто циркулировавших в Южном Вьетнаме, связано с тяжелыми неврологическими осложнениями неполио энтеровирусной инфекции.

2. Многолетний анализ циркуляции неполиомиелитных энтеровирусов позволил выявить доминирование вирусов вида А (alphacoxsackie), 3798 штаммов этих вирусов составили 93% от всех выявленных энтеровирусов. Этиологическая связь энтеровирусов вида А с HFMD – вирусной пузырчаткой полости рта и конечностей обусловила ведущую роль этой клинической формы неполио энтеровирусной инфекции в Южном Вьетнаме. Энтеровирусы вида В (betacoxsackie) чаще были связаны с диагнозом энтеровирусный менингит.

3. Установлено, что энтеровирус 71 являлся основным этиологическим агентом энтеровирусной инфекции в Южном Вьетнаме, включая ее ведущую форму. Штаммы вируса ЭВ71 были выявлены у пациентов с различными диагнозами: в 49% у больных HFMD – вирусной пузырчаткой полости рта и конечностей, в 42% у больных с энтеровирусным менингитом и в 28% у больных с синдромом острого вялого паралича. Смена типов и генотипов энтеровирусов приводила к периодическим подъемам заболеваемости энтеровирусной инфекцией.

4. Показано, что связанные с энтеровирусом 71 случаи HFMD – вирусной пузырчатки полости рта и конечностей, часто осложненные в Южном Вьетнаме тяжелыми неврологическими симптомами как менингит или острый вялый паралич на ранних сроках болезни, в ряде случаев были диагностированы и зарегистрированы как энтеровирусный менингит или как синдром острого вялого паралича.

5. Молекулярным анализом установлено, что 88% изученных штаммов энтеровируса 71 принадлежали к генотипу С4, 12% штаммов энтеровируса 71 были отнесены к генотипу В5, энтеровирусы этих генотипов широко циркулировали в Южном Вьетнаме. Большая часть изученных штаммов энтеровируса Коксаки А10 принадлежала к генотипу F3, один штамм являлся вирусом Коксаки А10 генотипа F1.

Практические рекомендации

1. Врачам педиатрам, инфекционистам и вирусологам рекомендуется использовать данные, опубликованные в изданных по материалам данного исследования справочных пособиях для оптимизации диагностики синдрома острого вялого паралича и различных клинических форм неполио энтеровирусной инфекции.

2. Врачам вирусологам и эпидемиологам полезно использовать данные диссертации для работы рекомендации по организации вирусологических исследований и профилактических мероприятий в отношении различных клинических форм энтеровирусной инфекции.

Перспектива дальнейшей разработки темы

Планируется дальнейшая разработка данной тематики с постоянным мониторингом циркуляции полиовирусов и неполио энтеровирусов в провинциях Южного Вьетнама, а также с расширением молекулярных исследований.

Список публикаций по теме диссертации

Статьи в научных журналах и изданиях, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для опубликования основных результатов диссертационных исследований и приравненных к ним:

1. Nguyen N.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, vol. 216, no.11, pp. 1371-1379.

2. Голицына Л.Н., Нгуен Т.Т.Т., Романенкова Н.И., Лыонг М.Т., Ву Л.Т., Канаева О.И., Бичурина М.А., Новикова Н.А. Энтеновирусная инфекция в Социалистической Республике Вьетнам // Инфекция и иммунитет. – 2019. – Т.9, №3-4. – С. 467-475.
3. Hoang C.Q., Nguyen T.T.T., Ho N.X., Nguyen H.D., Nguyen A.B., Nguyen T.H.T., Phan H.C., Phan L.T. Transmission and serotype features of hand foot and mouth disease in household contacts in Dong Thap, Vietnam. BMC Infect Dis., 2019, vol. 19, no.1, pp. 933.
4. Hoang C.Q., Nguyen H.D., Ho N.X., Vu T.H.T., Pham T.T.M., Nguyen K.T., Nguyen H.T., Hoang L.T., Clapham H., Nguyen T.T.T., Phan L.T. Incidence of Infection of Enterovirus 71 and Coxsackieviruses A6 and A16 among Household Contacts of Index Cases in Dong Thap Province, Southern Vietnam. Biomed Res Int, 2020, no.1, 9850351.
5. Nguyet L.A., Thanh T.T., Nhan L.N.T., Hong N.T.T., Nhu L.N.T., Van H.M.T., Ny N.T.H., Anh N.T., Han D.D.K., Tuan H.M., Huy V.Q., Viet H.L., Cuong H.Q., Nguyen T.T.T., Viet D.C., Khanh T.H., Thwaites L., Clapham H., Hung N.T., Chau N.V.V., Thwaites G., Ha D.Q., van Doorn H.R., Tan L.V. Neutralizing Antibodies against Enteroviruses in Patients with Hand, Foot and Mouth Disease. Emerg Infect Dis., 2020, vol. 26, no.2, pp. 298-306.
6. Chiu M.L., Luo S.T., Chen Y.Y., Chung W.Y., Duong V., Dussart P., Chan Y.F., Perera D., Ooi M.H., Nguyen T.T.T., Truong H.K., Lee M.S. Establishment of Asia-Pacific Network for Enterovirus Surveillance. Vaccine, 2020, vol. 38, no.1, pp.1-9.
7. 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: ЗНиСО. – 2021. – № 4 (337). – С. 43-49.
8. Romanenkova N.I., Golitsyna L.N., Nguyen T.T.T., Ponomareva N.V., Leonov A.V., Kanaeva O.I., Zverev V.V., Selivanova S.G., Rozaeva N.R., Luong M.T., Bichurina M.A., Novikova N.A. Epidemiological and etiological aspects of enterovirus infection in Russia and Vietnam// Russian Journal of Infection and Immunity. – 2021. – V. 11., N. 5. – P. 905-916.
9. Nguyen T.T., Chiu C.H., Lin C.Y., Chiu N.C., Chen P.Y., Le T.T.V., Le D.N., Duong A.H., Nguyen V.L., Huynh T.N., Truong H.K., Phan T.L., Nguyen T.T.T., Shih S.R., Huang C.G., Weng Y.J., Hsieh E.F., Chang S., Chen C., Tai I.C., Huang L.M. Efficacy, safety, and immunogenicity of an inactivated, adjuvanted enterovirus 71 vaccine in infants and children: a multiregional, double blind, randomized, placebo-controlled, phase 3 trial. Lancet, 2022, vol. 399, no.10336, pp. 1708-1717.
10. Romanenkova N.I., Nguyen T.T.T., Golitsyna L.N., Ponomareva N.V., Rozaeva N.R., Kanaeva O.I., Leonov A.V., Novikova N.A., Bichurina M.A. Enterovirus 71-Associated Infection in South Vietnam: Vaccination Is a Real Solution. Vaccines (Basel), 2023, vol.11, no.5, pp. 931.
11. Romanenkova N., Nguyen T.T.T., Rozaeva N., Kanaeva O., Evseeva V., Bichurina M. Surveillance of acute flaccid paralysis and poliomyelitis on some territories of Russia and South Viet Nam. Part 1. Polioviruses and paralysis. Russian Journal of Infection and Immunity. – 2023. – Vol. 13, N. 2. – P. 329-337.

Список использованных сокращений

- ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
 ДПВ – дикий полиовирус
 ИПВ – инактивированная полиовирусная вакцина
 ОВП – острый вялый паралич (синдром)
 ОПВ – оральная полиовирусная вакцина
 ПВ – полиовирус
 ПВВП (VDPV) – полиовирус вакцинного происхождения
 ПЦР – полимеразная цепная реакция
 ЭВ – энтеровирус; НПЭВ – неполиомиелитный энтеровирус
 ЭВИ – энтеровирусная инфекция
 HFMD – hand, foot and mouth disease, вирусная пузырчатка полости рта и конечностей

As a manuscript

NGUYEN

Thi Thanh Thao

**CHARACTERISTICS OF ENTEROVIRUSES CIRCULATING IN SOUTH VIETNAM AND
THEIR ROLE IN ETIOLOGY OF INFECTIOUS DISEASES**

1.5.10 Virology

ABSTRACT

of dissertation for the degree of Candidate of Medical Sciences (PhD)

Saint Petersburg

2026

22

The study was conducted at the St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing.

Scientific Supervisor:

Natalya Ivanovna Romanenkova, PhD, Medical Sciences, Leading Researcher, Laboratory of etiology and control of viral infections, Head of polio and other enterovirus infections group, Federal State Budgetary Scientific Institution "St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology" of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing.

Official Reviewers:

Olga Evgenievna Ivanova, MD, Doctor of Medical Sciences, Leading Researcher, Laboratory of polio and other enterovirus infections with WHO Reference Center, Federal State Autonomous Scientific Institution "M.P. Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immunobiological Preparations, Russian Academy of Sciences (Poliomyelitis Institute)".

Nadezhda Vasilievna Yuminova, Doctor of Biological Sciences, Deputy Head of A.G. Anjaparidze Virology Department, Chief Researcher, Laboratory of epidemiology, analysis and monitoring infectious diseases, Professor of Federal State Budgetary Scientific Institution "I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serums".

Leading Organization:

Federal State Budgetary Scientific Institution "Khabarovsk Research Institute of Epidemiology and Microbiology" of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing.

The dissertation defense will take place at the Dissertation Council meeting at the A.A. Smorodintsev Research Institute of Influenza of the Russian Ministry of Health (15/17 Prof. Popov Street, St. Petersburg, 197376).

Tel.: (812) 499 15 00

The dissertation is available in the library of the A.A. Smorodintsev Research Institute of Influenza of the Russian Ministry of Health (15/17 Prof. Popov St., St. Petersburg, 197376) and on the website www.influenza.spb.ru.

Abstract was sent “ _____ ” _____

Academic Secretary
Dissertation Council D 21.1.01.017
Candidate of Biological Sciences (PhD)

Irina Viktorovna Amosova

GENERAL CHARACTERISTICS OF THE WORK

Enterovirus infection (EVI) is highly contagious, widespread and has the diverse clinical forms, asymptomatic or generalised. Multiple types of enteroviruses can cause it.

Poliomyelitis is a severe neurological infection caused by Polioviruses 1-3 manifested as acute flaccid paralysis that can lead to residual paralysis. The Global Polio Eradication Program has been in place since 1988. The effective way to detect polio cases is through surveillance for acute flaccid paralysis (AFP) syndrome, with laboratory testing of all AFP cases in children under 15 years of age. Currently, five of the six WHO regions are certified as polio-free. Wild poliovirus (WPV) type 1 circulates in Afghanistan and Pakistan. Non-polio enteroviruses of three species (Enterovirus alphacoxsackie, Enterovirus betacoxsackie and Enterovirus coxsackiepol including Poliovirus 1-3) can also cause acute flaccid paralysis syndrome.

EVI varies in clinical manifestations and severity, from mild fever to generalized diseases affecting the cardiovascular and central nervous systems, which often complicated by severe neurological diseases as meningitis which can lead to death. Surveillance for EVI in Vietnam bases on monitoring cases of hand, foot and mouth disease (HFMD) with typical rash on the hands, feet, and oral mucosa. In 2012, a surveillance system for HFMD was established in South Vietnam, with laboratory diagnosis of severe and fatal cases. HFMD is a significant economic burden for Vietnam [Nhan L.N.T, 2019]. The high socioeconomic significance of enterovirus infection and widespread outbreaks of infection require a study of EVI patterns, ongoing monitoring enterovirus circulation among population and cases of various clinical forms of EVI and improving prevention of enterovirus infection.

It is necessary to study the virological and molecular properties of non-polio EV detected in patients, the EV circulation among the population at different time and provinces of Southern Vietnam, and to develop preventive measures to reduce the incidence of non-polio EVI in Vietnam,

The degree of the research topic development

The establishment of a national polio control program in Vietnam was crucial to the implementation of the country's polio eradication plan. Vietnam was accredited as a polio-free country within the WHO Western Pacific Region in 2000. The final stage of polio eradication was achieved through the widespread use of oral poliovirus vaccine (OPV) for three-dose immunization of children at 2, 3, and 4 months of age. Since 2019, a fourth dose of inactivated poliovirus vaccine (IPV) has been added at 5 months of age. This has reduced the circulation of vaccine and vaccine-derived polioviruses (VDPVs), which are similar in virulence to wild-type viruses. Cases of acute flaccid paralysis caused by polioviruses (Sabin-like or VDPVs) have also decreased. The widespread circulation of non-polio enteroviruses (NPEVs) led to an increase in the incidence of EVI, often complicated by conditions such as flaccid paralysis.

Following the first outbreak of hand, foot, and mouth disease in Ho Chi Minh City in 2003 [Van Tu P., 2007], an increase in incidence recorded in 2011-2012, when 170 of 113,121 HFMD cases were fatal [Nguyen N.T., 2014], the epidemic spread throughout Vietnam. From 2013-2017, the number of patients and deaths in Vietnam decreased, but the incidence rate was higher than before the epidemic. Periodic increases in incidence and mortality were then observed [Hong N.T.T., 2018]. The Vietnamese Ministry of Health classified HFMD as a disease with high epidemic potential with weekly reporting. In 2012, the surveillance system for HFMD was established in South Vietnam, with continuous monitoring of non-polio EV circulation and virological diagnosis of severe and fatal cases of infection, studying isolated enteroviruses.

Analysis of virological and molecular characteristics of non-polio EV isolated from patients with EVI, monitoring the changes in dominant types and genotypes of circulating non-polio enteroviruses, and evaluation of their role in the development of various clinical forms of EVI is a scientific challenge and is essential for predicting the epidemic situation with non-polio EVI in South Vietnam and for implementation of preventive measures against non-polio enterovirus infection.

Purpose of the study

To study the virological and molecular properties of enteroviruses, the characteristics of their circulation among the population of South Vietnam, and the role of enteroviruses in the etiology of infectious diseases.

Research objectives:

1. To determine the frequency of poliovirus and non-polio enterovirus isolation from patients with acute flaccid paralysis syndrome in South Vietnam.
2. To reveal the species and types of non-polio enteroviruses associated with non-polio enterovirus infection in South Vietnam, and to evaluate the role of dominated in circulation non-polio enteroviruses as etiological agents of various clinical forms of enterovirus infection.
3. To evaluate the prevalence of various types of non-polio enteroviruses among the population of South Vietnam. To reveal the leading clinical form of non-polio enterovirus infection in South Vietnam and to determine the types of non-polio enteroviruses associated with this form of infection.
4. To determine the leading in circulation type of non-polio enterovirus and to evaluate the role of this enterovirus as etiological agents of various clinical forms of infection in South Vietnam.
5. To characterize the molecular features and phylogenetic relationships of enteroviruses most widely circulated in South Vietnam and frequently detected in patients with non-polio enterovirus infection.

Scientific novelty

Based on an analysis of the virological and molecular properties of enteroviruses isolated from patients with acute flaccid paralysis and various forms of enterovirus infection, changes in the types and

genotypes of non-polio enteroviruses circulating among the population of South Vietnam over a long-term observation period were demonstrated. The types and genotypes of enteroviruses that dominated circulation and caused outbreaks of enterovirus infection in different years were identified. For the first time, an analysis of enterovirus infection outbreaks in several provinces of South Vietnam over a long period was conducted, taking into account the clinical forms of this infection. The role of leading types and genotypes of enteroviruses as etiologic agents of clinical forms of enterovirus infection in South Vietnam was assessed. The role of enterovirus 71 as the leading etiologic agent of enterovirus infection in South Vietnam has been established.

Theoretical and practical significance of the obtained results

A comprehensive approach to diagnosing non-polio enterovirus infection using virological and molecular research methods has yielded new, systematic data on the circulation of non-polio enteroviruses of various types and genotypes in South Vietnam over many years. The preconditions for preventing risks associated with enterovirus infection in South Vietnam have been created. Systematic monitoring of enterovirus circulation has been established. Particular attention is paid to the emergence and spread of new enterovirus variants. This will allow us to predict the development of enterovirus infection outbreaks and promptly implement preventive measures based on new technological solutions, including those in the field of enterovirus vaccination.

Statements submitted for defense

1. The isolation of polioviruses, mainly vaccine-like except two VDPV2, from patients with acute flaccid paralysis did not exceed 1%. The isolation from such patients 11,6% of non-polio enteroviruses was connected with their widespread circulation in South Vietnam and with neurologic complications of non-polio enterovirus infection.

2. The predominance in circulation of species A enteroviruses (Enterovirus alphacoxsackie), including EVA71, determined the domination of HFMD among clinical forms of non-polio enterovirus infection. The changes in types and genotypes of species A enteroviruses in the course of long-term circulation led to periodic peaks of enterovirus infection in South Vietnam.

3. Enterovirus 71 was the main etiological agent of the leading form of non-polio enterovirus infection in South Vietnam. Enterovirus 71 was found as well as enteroviruses of species B (Enterovirus betacoxsackie) in patients with enterovirus meningitis and acute flaccid paralysis syndrome.

4. Most studied enterovirus 71 strains circulated in South Vietnam belonged to the C4 genotype, some strains were represented by B5 genotype. Identified strains of Coxsackievirus A10 isolated from patients mainly belonged to F3 genotype, one strain belonged to F1 genotype.

Research methodology

The study's methodological basis was a combination of virology and molecular biology research methods. Enteroviruses were isolated using standardized cell lines (RD, L20B and Vero). Poliovirus

identification was performed by rRT-PCR ITD test. Molecular studies included RNA extraction, reverse transcription PCR, genome sequencing, and phylogenetic analysis of enteroviruses. A more detailed description of the research methods is provided in the "Materials and Methods" section.

Conformity of the dissertation to the passports of scientific specialities

The main scientific statements of the dissertation correspond to paragraphs 4, 8, and 10 of the passport of scientific specialty 1.5.10. "Virology".

Implementation of work results

Complete nucleotide sequences of the VP1 genome region of 67 EVA71 viruses have been deposited in the GenBank database under accession numbers MW139687–MW139744, OR947996–OR948003. The study results are presented in two textbooks for specialists in various fields—pediatricians, infectious disease specialists, virologists, and epidemiologists:

1. Reference manual "Surveillance and Control of Viral Infections in the Socialist Republic of Vietnam." St. Petersburg, 2018, 72 pages.

2. Reference manual "Improving Epidemiological Surveillance and Diagnostics of Enterovirus Infection in the Socialist Republic of Vietnam." St. Petersburg, 2022, 80 pages (Russian, Vietnamese). ISBN 978-5-904405-56-4.

The results obtained in this study are useful to many specialists (epidemiologists, virologists, infectious disease specialists, and others). They are used in lectures at medical universities in Vietnam and can be used in other medical schools.

Personal contribution of the author

The author's personal contribution includes reviewing the scientific literature, planning and conducting virological studies of material from patients with AFP syndrome and non-polio EVI, conducting molecular studies, and analysing the results to establish the role of non-polio enteroviruses frequently circulating in South Vietnam in the etiology of enterovirus infection. The author analysed the research results, summarize them, performed statistical processing and wrote the texts of the dissertation and abstract. Complete nucleotide sequences of VP1 genome region of 67 Enterovirus 71 strains have been deposited in the GenBank database under accession numbers MW139687–MW139744, OR947996–OR948003.

Volume and structure dissertation

The dissertation is 132 pages long and consists of an introduction, literature review, materials and methods, four chapters of original research, a discussion and conclusion, conclusions, practical recommendations, and a bibliography of 152 sources, including domestic and international ones. The text contains 22 tables and 29 figures. The author analyzed the research results, summarize them, performed statistical processing and wrote the texts of the work.

MAIN CONTENT OF THE WORK

Materials and methods

Surveillance for acute flaccid paralysis syndrome was conducted in 29 provinces of Vietnam in accordance with the WHO Polio Eradication Program. Surveillance and Virological Diagnosis of EVI was done in 20 provinces of Southern Vietnam in accordance with the National Program for Surveillance and Virological Diagnosis of Enterovirus infection. Clinical specimens from hospitalized children under 15 years old were studied. More than 11,000 samples were analyzed (table 1).

Table 1

Number of samples tested in the virology laboratory in 2010-2021

Source of samples	Number of samples		
	Feces	Oropharyngeal swabs	Total
primary diagnosis – acute flaccid paralysis	2143	0	2143
primary diagnosis – meningitis/ meningoencephalitis	0	1004	1004
primary diagnosis – Hand, Foot and Mouth Disease	1186	6790	7976
Total			11123

Enteroviruses were isolated in cell lines: RD, L20B and Vero according to the WHO algorithm. Polioviruses were identified by rRT-PCR ITD/VDPV (intratypic differentiation/vaccine-derived polioviruses) and sequencing. The non-polio type Enteroviruses were also identified using molecular biological methods (PCR followed by sequencing of the viral genome). Phylogenetic relationships of the studied isolates and reference isolates were established using the Base GenBank. Sequences of the studied isolates and reference strains were aligned using ClustalW. The statistical significance of differences between quantitative parameters was assessed using parametric tests (Student's t-test). The significance level (P) adopted in this study was 0.05.

Results of own research

Search and identification of polio and non-polio enteroviruses in children with acute flaccid paralysis syndrome

Over a twelve-year period, 22 polioviruses (1%) were isolated from samples from 2,143 patients with acute flaccid paralysis syndrome in Southern Vietnam. Of the 22 isolated polioviruses, 20 were vaccine (Sabin-like) polioviruses, and two were classified as vaccine-derived poliovirus type 2 (VDPV2). A total of six polioviruses of type 1, five PV type 2, and eleven PV type 3 were identified (Table 2). It is important to emphasize that no WPVs were isolated, and the last vaccine-derived polioviruses of type 2 were isolated before the global transition to bivalent OPV vaccination instead of the previously used trivalent OPV.

Table 2

Poliovirus isolation from children with AFP syndrome in 2010–2021

Year	Number of AFP cases	Number of isolated polioviruses	Types of isolated polioviruses (PV)		
			PV1	PV2	PV3
2010	109	1	-	-	1
2011	189	2	1	1	-
2012	291	5	2	2	1
2013	227	2	1	-	1
2014	136	-	-	-	-
2015	175	-	-	-	-
2016	165	8	1	2	5
2017	194	-	-	-	-
2018	173	4	1	-	3
2019	177	-	-	-	-
2020	225	-	-	-	-
2021	82	-	-	-	-
Total	2.143	22 (1%)	6	5	11

In 2012, Vietnam reported two cases of AFP caused by vaccine-derived polioviruses (VDPV2) in children from hard-to-reach areas and ethnic minorities. Low vaccination coverage led to the spontaneous accumulation of mutations during poliovirus transmission from vaccinated to unvaccinated individuals, resulting in the formation of VDPV. One child was unvaccinated, and the other received only two doses of OPV. No residual paralysis was observed in the children. The PVs isolated from two samples from each child were VDPV2. Genome sequencing revealed that the SV3127LR-VP1 and SV3128LR-VP1 strains from the first child each had six nucleotide substitutions in the VP1 genome region, with a 0.66% difference from the Sabin reference virus type 2. The SV3129LR-VP1 strain from the second child had five nucleotide substitutions, the SV3130LR-VP1 strain had six substitutions (divergence 0.66%).

Analysis of the vaccination status of 2,143 children diagnosed with acute flaccid paralysis revealed that the majority (90%) were vaccinated against polio in accordance with the National Immunization Schedule. Seven children with polioviruses did not receive three doses of OPV, including those infected with VDPV2.

Non-polio enteroviruses were isolated from 249 of 2,143 patients with AFP diagnosis. 239 enteroviruses were identified. The percentage of NPEV isolated was 11.6% (Table 3). Of the 249 children with detection non-polio EV, 69.4% of them were under three years old, 30.6% of children were older ($p < 0.05$).

Table 3

Types of non-polio enteroviruses identified in patients with acute flaccid paralysis in 2012-2021

Years	Viruses	Non-polio types enteroviruses
2010	12	1CVA10, 1CVB4, 1CVB5, 1E6, 2E29, 1E30, 1EVA71, 1EVB75, 1EVB81, 1EVB84
2011	19	1CVA4, 1CVB1, 1CVB3, 2CVB5, 1E3, 1E9, 2E14, 1E25, 1E33, 3EVA71, 3EVA75, 1EVB88
2012	35	1CVA9, 1CVA10, 1CVB5, 1E3, 1E11, 2E14, 1E33, 23EVA71, 3EVB79
2013	23	3CVA10, 1CVA14, 1CVA24, 2CVB2, 1CVB3, 2CVB4, 1E6, 1E7, 4E11, 1E25, 5EVA71,
2014	15	1CVA6, 2CVA10, 1CVA16, 3E11, 1E30, 2EVA71
2015	17	1CVA9, 1CVA16, 2CVB2, 1E3, 1E6, 1E9, 1E11, 1E25, 7EVA71
2016	14	1CVA4, 1CVA9, 6CVA10, 1CVA21, 1CVB5, 1E11, 3E18
2017	33	13CVA16, 4CVB4, 5CVB5, 1E3, 2E7, 1E9, 2E11, 2E13, 2E14, 1EVB81
2018	22	1CVA9, 5CVA10, 1CVA16, 2CVB2, 2E6, 1E11, 2E20, 8EVA71
2019	15	2CVA10, 1CVA16, 1CVB4, 2E3, 2E11, 1E14, 5E18, 1EVA71
2020	22	10CVA4, 2CVA8, 4CVA10, 1E6, 3E14, 2EVA71
2021	22	1CVA4, 1CVB1, 3CVB3, 2E16, 15EVA71
Total	249/239	67EVA71, 4EVB75, 3EVB79, 2EVB81, 1EVB84, 1EVB88, 13CVA4, 1CVA6, 2CVA8, 4CVA9, 24CVA10, 1CVA14, 17CVA16, 1CVA21, 1CVA24, 2CVB1, 6CVB2, 5CVB3, 8CVB4, 10CVB5, 6E3, 6E6, 3E7, 3E9, 15E11, 2E13, 10E14, 2E16, 8E18, 2E20, 3E25, 2E29, 2E30, 2E33

Spectrum of NPEV isolated from patients with AFP over 12 years was extensive and included 34 types. The proportion of 125 viruses of species A (Enterovirus alphacoxsackie) was the highest. Among seven types of them Enterovirus 71 (67 strains) accounted for more than a half. In 2012, 23 of the 24 cases of AFP were associated with enterovirus 71. Enteroviruses of species B (Enterovirus betacoxsackie) were represented by 25 types. The proportion of viruses of species C (Enterovirus coxsackiepol) was 2.1%, and not a single species D virus was identified (Fig. 1).

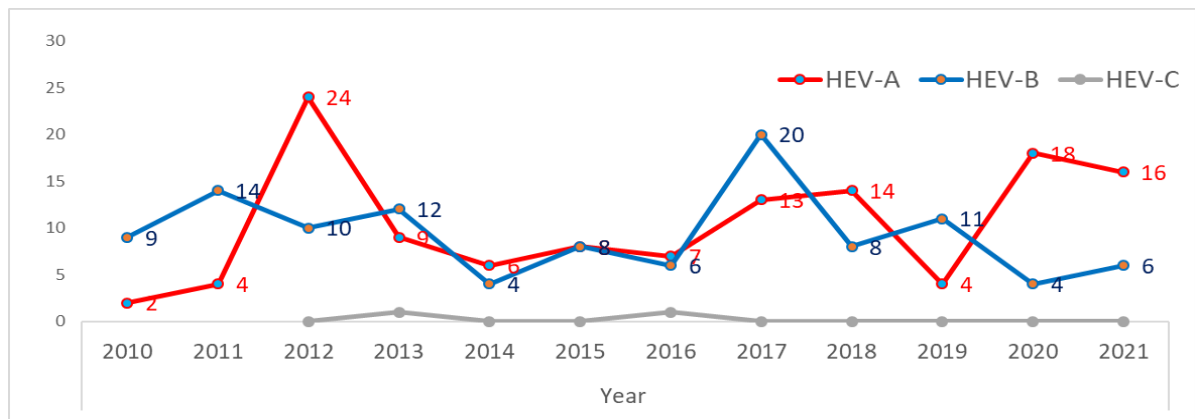


Figure 1. Isolation of non-polio enteroviruses of three species from patients with acute flaccid paralysis syndrome in 2010-2021.

Isolation of 1% of polioviruses in children with AFP syndrome highlighted two key points: the sustainable maintenance of the polio-free status of Vietnam with the eradication of wild polioviruses due to the effectiveness of surveillance and mass vaccination of children, the decline in vaccination coverage in two districts led to the circulation of vaccine-derived PV; the isolation of 11.6% of non-polio enteroviruses from patients with AFP demonstrate the growing role of viruses widely circulating in South Vietnam in the etiology of EVI with neurological symptoms in the period after the eradication of wild polioviruses in the country.

The etiology of various clinical forms of enterovirus infection

Non-polio EVI is widespread in Vietnam, especially in Southern provinces. A key component of EVI surveillance in Vietnam is the monitoring and diagnosis HFMD, the main clinical form of EVI in Vietnam and one of the most serious public health problems in Vietnam. HFMD primarily affects young children, it is characterized by severity. From 2012 to 2021, 632,651 HFMD cases, including 104 fatal, were recorded in South Vietnam, in densely populated and highly industrialized areas. HFMD cases were recorded in 2012 and in 2017-2019, mainly in the provinces Ba Ria-Vung Tau, Dong Thap, Binh Dong, Dong Nai, Long An and Ho Chi Minh City with 49-70% of HFMD in the whole country (Fig. 2).

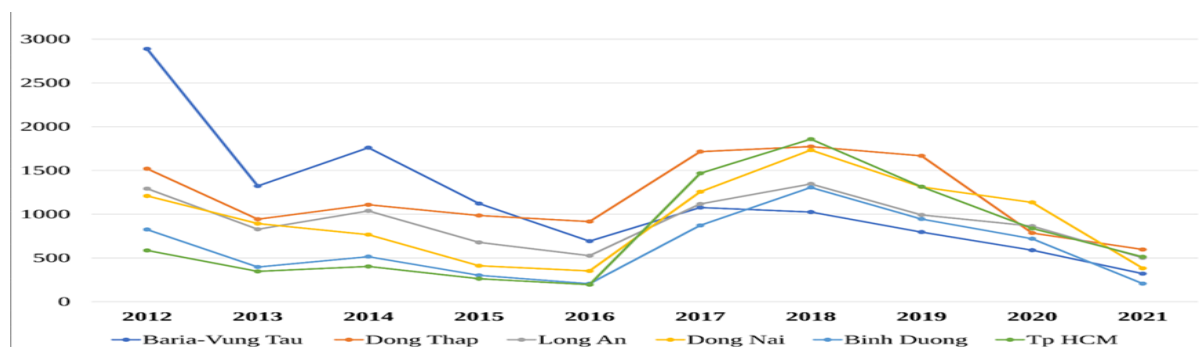


Figure 2. Number of cases of hand, mouth and foot disease in children under 15 years of age in six provinces of South Vietnam in 2012-2021.

3,611 non-polio enteroviruses were isolated of 7,976 clinical samples from children with hand, mouth and foot disease (Table 4).

Table 4

Types of enteroviruses identified in patients with hand, mouth and foot disease in South Vietnam in 2012-2021

Years	Viruses	Enterovirus types
2012	240	212EVA71, 10CVA6, 3CVA10, 15CVA16
2013	186	174EVA71, 2CVA6, 3CVA10, 6CVA16, 1CVA24
2014	135	90EVA71, 1CVA2, 1CVA5, 12CVA6, 19CVA10, 10CVA16, 1CVB3, 1ECHO16
2015	242	157EVA71, 4CVA2, 4CVA4, 3CVA5, 37CVA6, 3CVA8, 2CVA9, 29CVA16, 1CVB4, 2E16
2016	415	320EVA71, 2CVA2, 1CVA4, 3CVA5, 2CVA6, 7CVA8, 69CVA10, 9CVA16, 1CVB3, 1E18
2017	561	250EVA71, 6CVA2, 9CVA4, 11CVA5, 154CVA6, 13CVA8, 6CVA10, 106CVA16, 1CVB3, 5CVB4
2018	535	196EVA71, 31CVA2, 18CVA4, 17CVA5, 105CVA6, 6CVA8, 154CVA10, 4CVA16
2019	543	80EVA71, 39CVA2, 15CVA4, 15CVA5, 247CVA6, 14CVA8, 53CVA10, 75CVA16, 3CVB4, 2E18
2020	418	39EVA71, 4CVA2, 35CVA4, 235CVA6, 39CVA8, 35CVA10, 1CVA16, 2CVB3, 28CVB4
2021	336	253EVA71, 3CVA2, 5CVA4, 11CVA5, 26CVA6, 4CVA8, 2CVA9, 17CVA10, 4CVB3, 4CVB4, 7E16
Total	3611	1771EVA71, 90CVA2, 87CVA4, 61CVA5, 830CVA6, 90CVA8, 359CVA10, 255CVA16, 1CVA24, 4CVA9, 9CVB3, 36CVB4, 5CVB5, 10ECHO16, 3ECHO18

Ninety-eight percent of viruses belonged to species A (Enterovirus alphacoxsackie), enterovirus 71 (1,771 strains) was the leading etiologic agent of HFMD. Other EVs of species A associated with HFMD were represented by Coxsackie A viruses of different types, most frequently Coxsackie A6, 10, and 16. In 2012–2016, EVA71 strains were prevalent; from 2017 to 2020, other Coxsackie A viruses were detected frequently; since 2021, enterovirus 71 has again taken the leading position (Fig. 3).

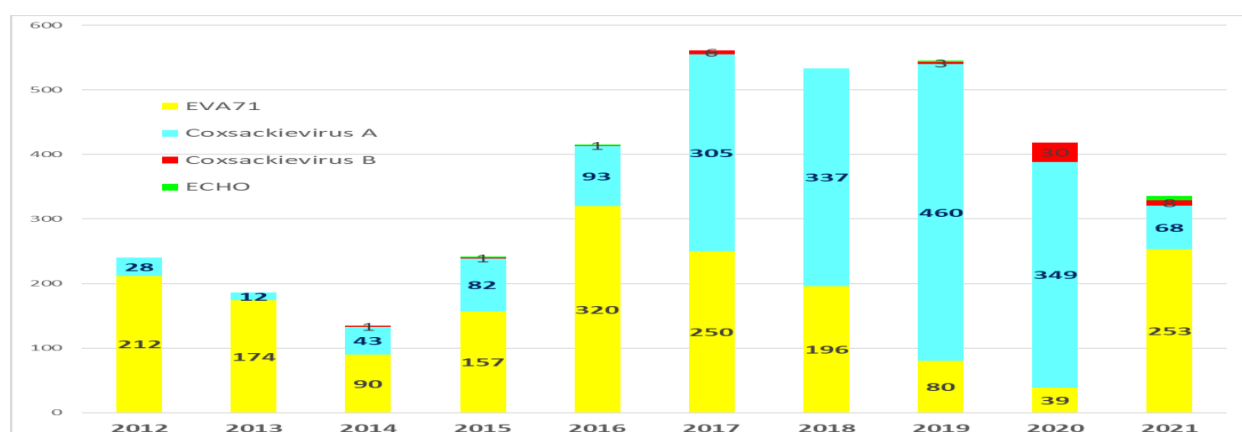


Figure 3. Detection of species A EV in patients with HFMD in South Vietnam in 2012–2021.

Cases of hand, foot, and mouth disease were mostly severe (89.3%), with neurological and cardiopulmonary complications such as meningitis, encephalitis, myocarditis, or pulmonary edema; fatal outcomes occurred in 1% of cases (Table 5). More than 90% of patients were children under three years

of age, and 7% were between three and 15 years of age. Boys were significantly more likely to be affected than girls ($p < 0.05$).

Table 5

Data on patients with HFMD, including clinical picture, gender and age of patients

Year	Patients' Number	Severity			Sex		Age		
		Mild	Severe	Fatal	Girls	Boys	0-12 month	0-36 month	3-14 years
2012	243	12	211	20	82	161	84	146	13
2013	191	2	181	8	78	113	45	135	11
2014	137	24	113	0	62	75	18	96	23
2015	252	36	216	0	106	146	37	185	30
2016	423	55	368	0	148	275	123	262	38
2017	578	51	527	0	221	357	119	438	21
2018	550	32	516	2	218	332	113	414	23
2019	560	127	433	0	219	341	129	364	67
2020	419	37	382	0	167	252	100	308	11
2021	347	18	326	3	130	217	63	256	28
	3700	394 (10.7%)	3273 (88.4%)	33 (0.9%)	1431 (38.7%)	2269 (61.3%)	831 (22.4)	2604 (70.4%)	265 (7.2%)

From 2012 to 2021, 228 enteroviruses of 24 types were identified during virological testing of samples from patients with a primary diagnosis of enteroviral meningitis / meningoencephalitis. 57% of strains were classified as species A, 42.5% belonged to species B, and one strain EVD68, identified in 2018, belonged to species D (0.5%). The detection rate of identified enteroviruses of species A and species B from patients varied across years. In 2012-2014, 2016, and 2021, species A viruses predominated, while in 2015 and 2017-2019, species B viruses prevailed (Fig. 4).

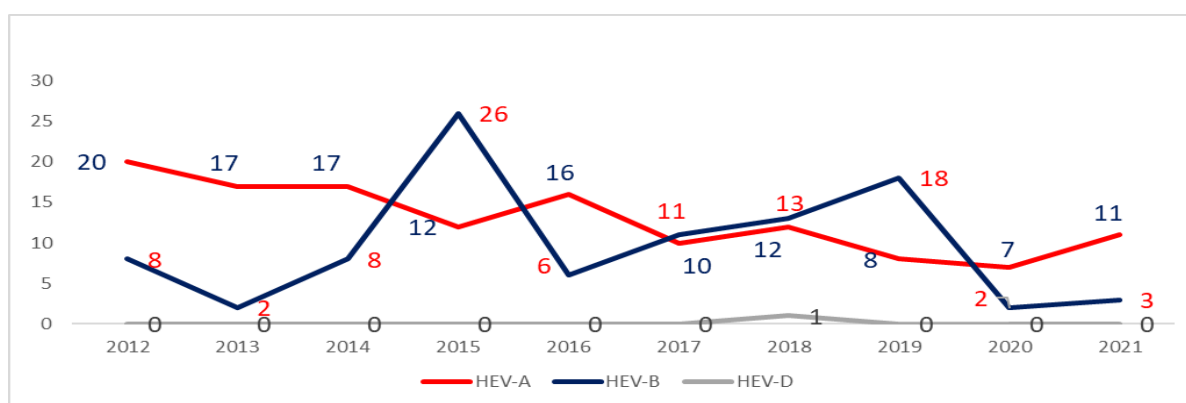


Figure 4. Isolation of three species enteroviruses from patients with enterovirus meningitis.

The high percentage of species A viruses in patients with this form of infection is associated with the wide circulation of enterovirus 71 in South Vietnam. EVA71 was the leader (74%) among 130 species A enteroviruses, coxsackievirus A6 was second (10% of all species A viruses). Total share of coxsackieviruses A2, 4, 5, 8, and 12 was 16%. These viruses and EV71 are known as the typical etiological agents of HFMD (Fig. 5).

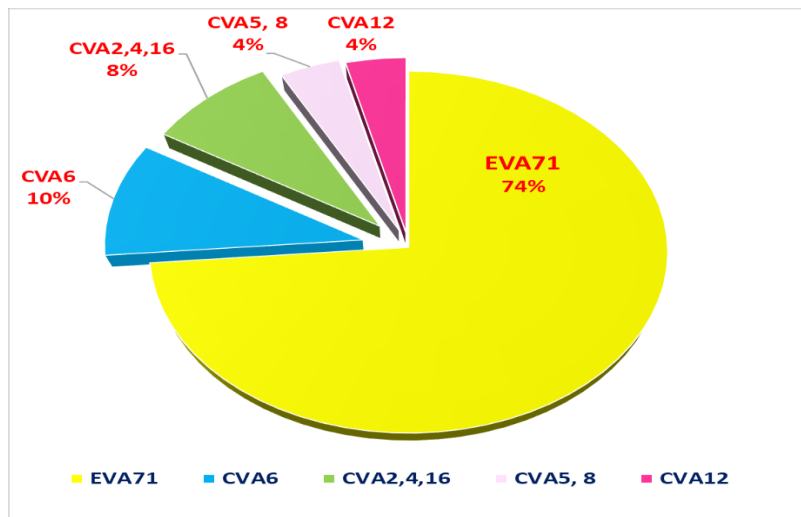


Figure 5. Species A EVs identified in patients with enterovirus meningitis in South Vietnam.

The proportion of species B enteroviruses (14 different types) was 42.5% of EV detected in patients with enterovirus meningitis (Fig. 6). This proportion was higher than the proportion of species A enteroviruses except EVA71. Among species B viruses, the percentage of Coxsackieviruses B1, B2, B3, B4, and B5 was the highest - 53.6% (52 viruses). Coxsackievirus B4 was predominant (20%), followed by Coxsackievirus B3 (12%), Coxsackievirus B5 (11%) and Coxsackieviruses B1 and B2 (10% together). The proportion of Echoviruses among species B viruses was 44.4 %, the leadership belonged to Echo 11 virus (15 viruses). Enteroviruses B of different types, such as Echo 6, Echo 9, Echo 11, Echo 30 and Coxsackie A9 are known as typical etiologic agents of enteroviral meningitis.

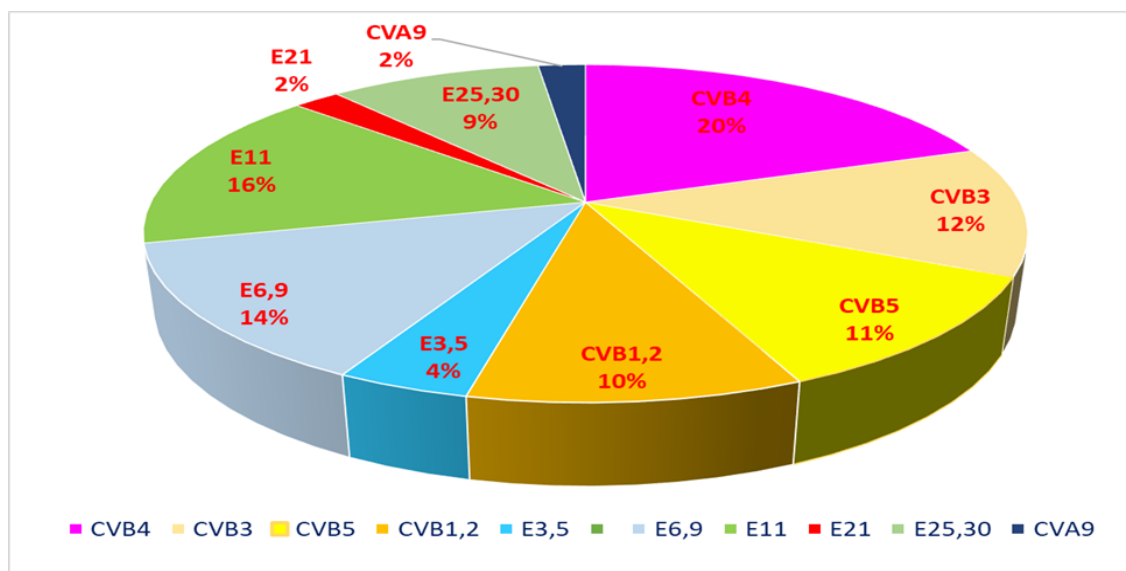


Figure 6. Species B EV identified in patients with enterovirus meningitis in South Vietnam.

Enteroviruses of four species were identified in patients with various clinical forms of non-polio EVI. Enteroviruses of species C and D were detected very rarely. Species A was represented by ten types of Coxsackievirus A, the predominant etiologic agents HFMD. Enterovirus 71 was the leader among all the viruses found in patients with various clinical forms of non-polio EVI. Representatives of Species B (Coxsackie A9, Coxsackie B 1-5 and Echo viruses) identified in patients were more often associated

with enterovirus meningitis. Analysis of the results of long-term virological study of samples from children with various forms of non-polio EVI showed that enterovirus 71 dominated in the etiology of various clinical forms of infection, it was associated with a wide range of severe complications – meningitis, cardiopulmonary manifestations, and even of acute flaccid paralysis.

The role of enterovirus 71 as an etiologic agent of infectious diseases in South Vietnam

Over the years of studying non-polio EVI, Vietnam has experienced several peaks of enterovirus 71 circulation, accompanied by massive outbreaks (2012, 2016, 2021). The leading form of non-polio EVI in South Vietnam and the country has been HFMD. The main causative agent of this clinical form has always been EVA71, which was also the source of EVI spread. Enterovirus 71 was also one of the most important etiologic agents of infectious diseases with diverse clinical manifestations. This virus was identified in patients with HFMD, and enterovirus meningitis. Enterovirus 71 strains were as well identified in patients with a primary diagnosis of acute flaccid paralysis. The percentage of EVA71 among identified species A enteroviruses was high in patients with all diseases studied.

To evaluate the role of enterovirus 71 as an etiologic agent of infectious diseases in South Vietnam, it is important to consider the following data. The number of enterovirus 71 strains (67) isolated from 2,143 patients diagnosed with acute flaccid paralysis was 3.1%, the percentage of 67 EVA71 strains among 239 non-polio EV isolated in AFP patients was 28%. Among 228 viruses found in patients with enterovirus meningitis, 96 strains (42%) were identified as EVA71, while 132 strains (58%) were species B viruses. The closest enterovirus 71 association was found with HFMD: 1,771 (49%) EV71 strains isolated from these patients (Table 6).

Table 6

Isolation of EVA71 viruses from patients with various clinical forms of infections

Year	AFP (n=239)		Meningitis (n=228)		HFMD (n=3611)	
	EVA71	other EVs	EVA71	other EVs	EVA71	other EVs
2010	1	10				
2011	3	15				
2012	23	11	18	10	212	28
2013	5	17	15	4	174	12
2014	2	8	16	9	90	45
2015	7	9	10	28	157	86
2016	0	14	15	7	320	95
2017	0	33	3	18	250	312
2018	8	14	6	20	196	337
2019	1	14	4	22	80	465
2020	2	20	4	5	39	379
2021	15	7	5	9	253	84
Total	67 (28%)	172 (72%)	96 (42%)	132 (58%)	1771 (49%)	1840 (51%)

Non-polio EV circulated intensively in South Vietnam. High incidence of EVA71 infection was recorded in Ho Chi Minh City and the provinces Dong Thap, An Giang, and Tay Ninh. The most affected population group were children aged 13 to 36 months. Boys (62%) were more susceptible than girls (38%) with $p < 0.05$ (Table 6).

Table 6

Cases of infectious diseases associated with EVA71 in South Vietnam

Diagnosis	Number of cases	Gender distribution		Age distribution			
		boys	girls	0-6 months	7-12 months	13-36 month	3-14 years
AFP	67	38	29	1	8	48	10
Meningitis	96	68	28	6	10	70	10
HFMD	1771	1093	678	66	254	1278	173
Total	1934	1199 (62%)	735 (38%)	73 (3%)	272 (15%)	1396 (72%)	193 (10%)

The leading role of enterovirus 71 in human circulation and in the etiology of various clinical forms of infectious diseases has been established. Thus it is necessary to strengthen the effectiveness of EVA71 monitoring in South Vietnam and to predict outbreaks of non-polio enterovirus infection associated with this virus. Improving the monitoring effectiveness and preventive measures for enterovirus infection, will be an appropriate step in strengthening national and regional surveillance programs.

Molecular characteristics of some non-polio enteroviruses that circulated widely in South Vietnam

Non-polio enteroviruses isolated in South Vietnam during the last decade were studied, especially enteroviruses of species A, which were dominated enterovirus in circulation. It was important to study the molecular characteristics of enterovirus 71 and Coxsackievirus A10 identified in the examined patients.

Molecular characteristics of circulated enterovirus 71 strains

Analysis of the enterovirus 71 strains identified in patients with HFMD and patients with acute flaccid paralysis showed that 88% of the studied enterovirus 71 strains belonged to the C4 genotype. 12% of the enterovirus 71 strains were classified as genotype B5 strains.

Most of the EVA71 strains of the C4 genotype were highly related to enterovirus 71 strains detected in China which were also closely related to the strains from Taiwan and Malaysia. EVA71 viruses of the C4 genotype identified in 2018–2019 from HFMD cases and from AFP patients differed from viruses identified in 2003–2005 and in 2011–2012 during outbreaks of HFMD in South and North

Vietnam. Strain VND18/227, identified in one of the patients with the severe clinical form of complicated case of HFMD, was closely related to EVA71 strains (99.2–99.4% homology) of the genotype C4 strains identified in Germany during the same period (Figure 7).

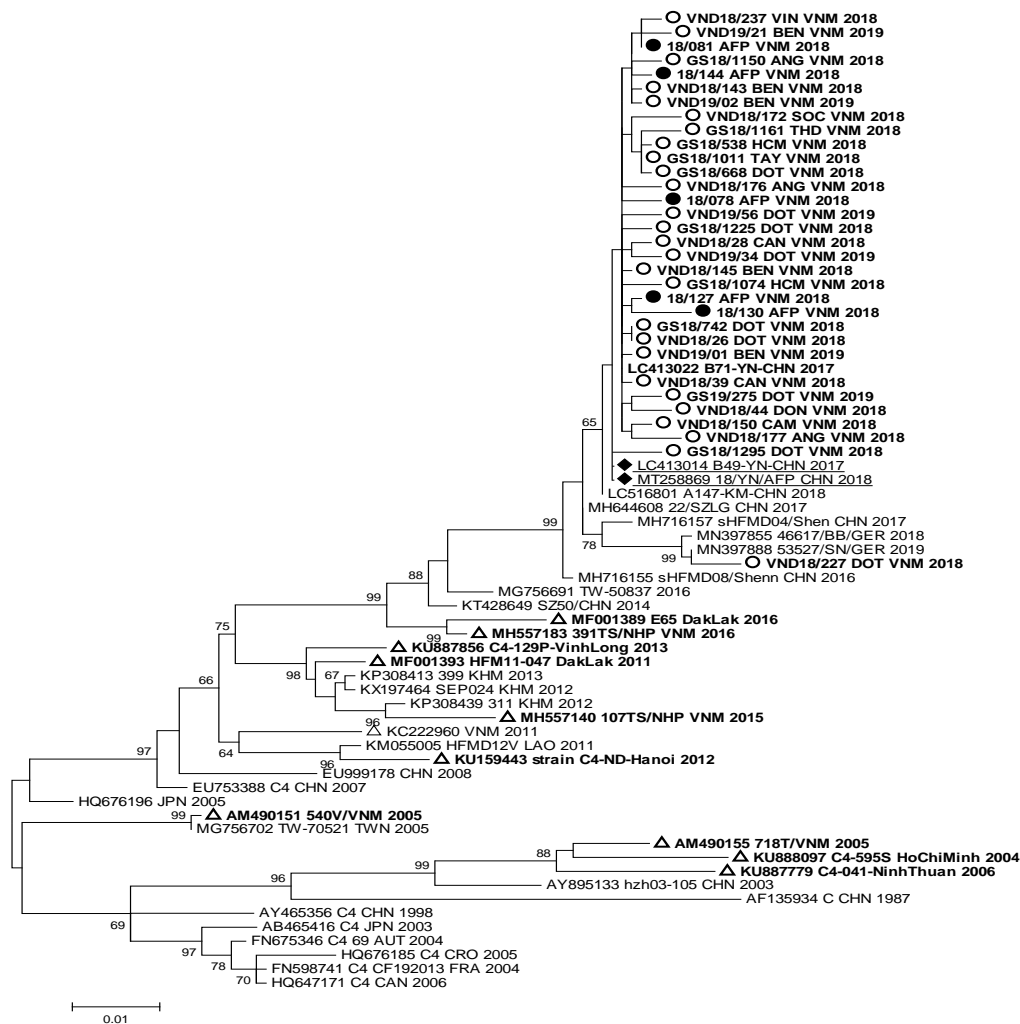


Figure 7. Phylogenetic relationships of EVA71 genotype C4 strains identified in Vietnam: ○ - strains isolated from patients with hand, foot, and mouth disease in southern Vietnam; ● - strains isolated from patients with AFP in southern Vietnam; Δ - Vietnamese strains described in other studies; ◆ - strains identified in patients with AFP from Yunnan Province, China

The sequences of studied EVA71 strains of the B5 genotype, which were isolated and/or identified in patients with HFMD and in patients with acute flaccid paralysis, formed a monophyletic group (Fig. 8). All the enterovirus 71 strains of the B5 genotype showed close relationship with enterovirus of the B5 genotype identified in China in 2017, but they differed from the enterovirus EVA71 strains of the B5 genotype circulated in Vietnam from 2011 till 2016.

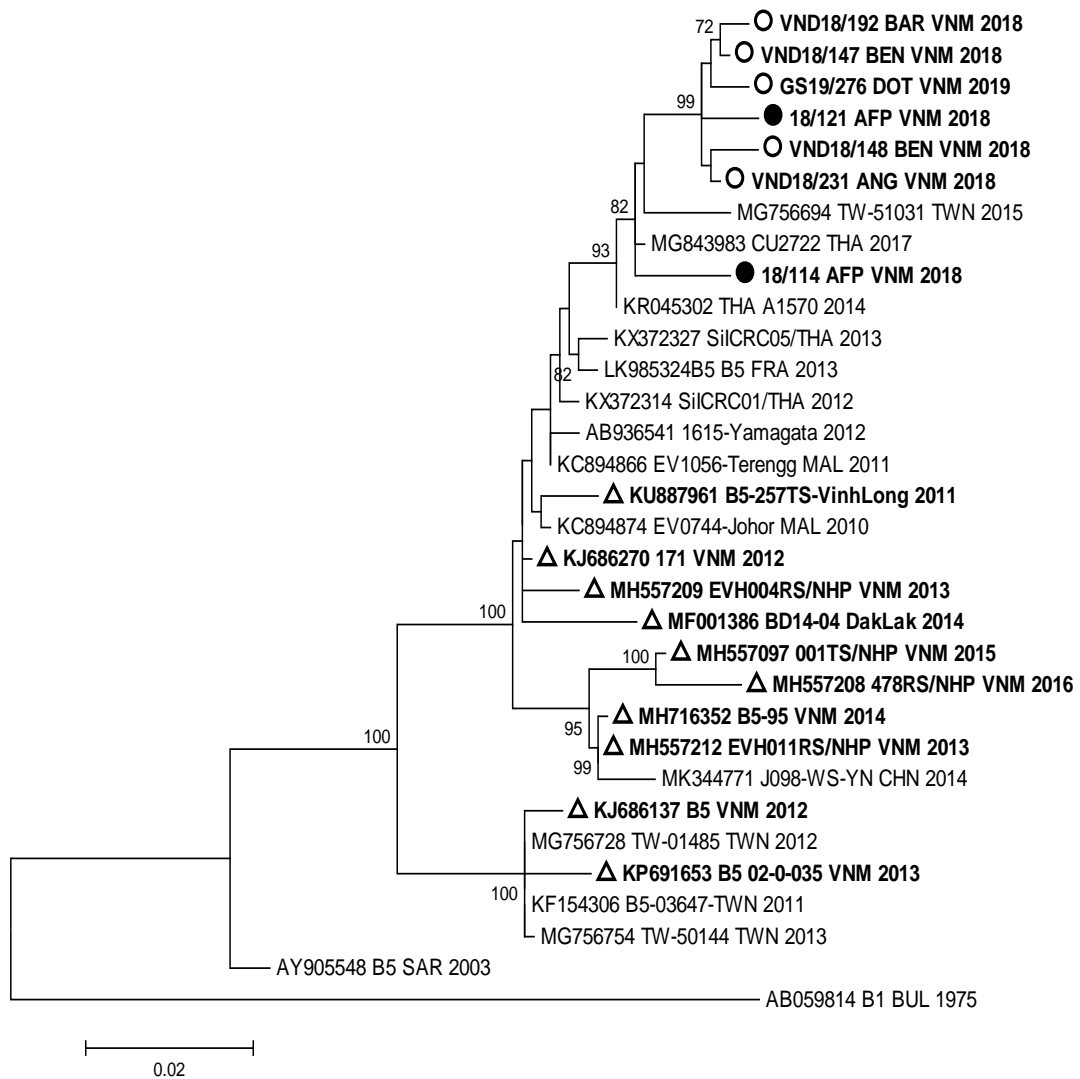


Figure 8. Phylogenetic relationships of enterovirus EVA71 genotype B 5 strains identified in South Vietnam: ○ - strains isolated from patients with hand, foot, and mouth disease from South Vietnam; ● - strains isolated from patients with AFP from South Vietnam; △ - Vietnamese strains described in other studies.

Molecular characterization of enterovirus CVA10 strains circulating in South Vietnam

The molecular characteristics of Coxsackievirus A10 strains identified in patients in South Vietnam were studied. These strains were compared with Coxsackievirus A10 strains isolated and identified in other countries of Southeast Asia, as well as in Russia. CVA10 strains detected in the examined patients belonged to three genotypes: C, E, and F3 (Fig. 9). Most of the strains from the examined patients analysed in this study belonged to the F3 genotype, and one strain isolated from a patient with severe HFMD case belonged to the F1 genotype. The strains from South Vietnam were genetically related to Coxsackieviruses A10 virus strains from China and other countries of Southeast Asia.

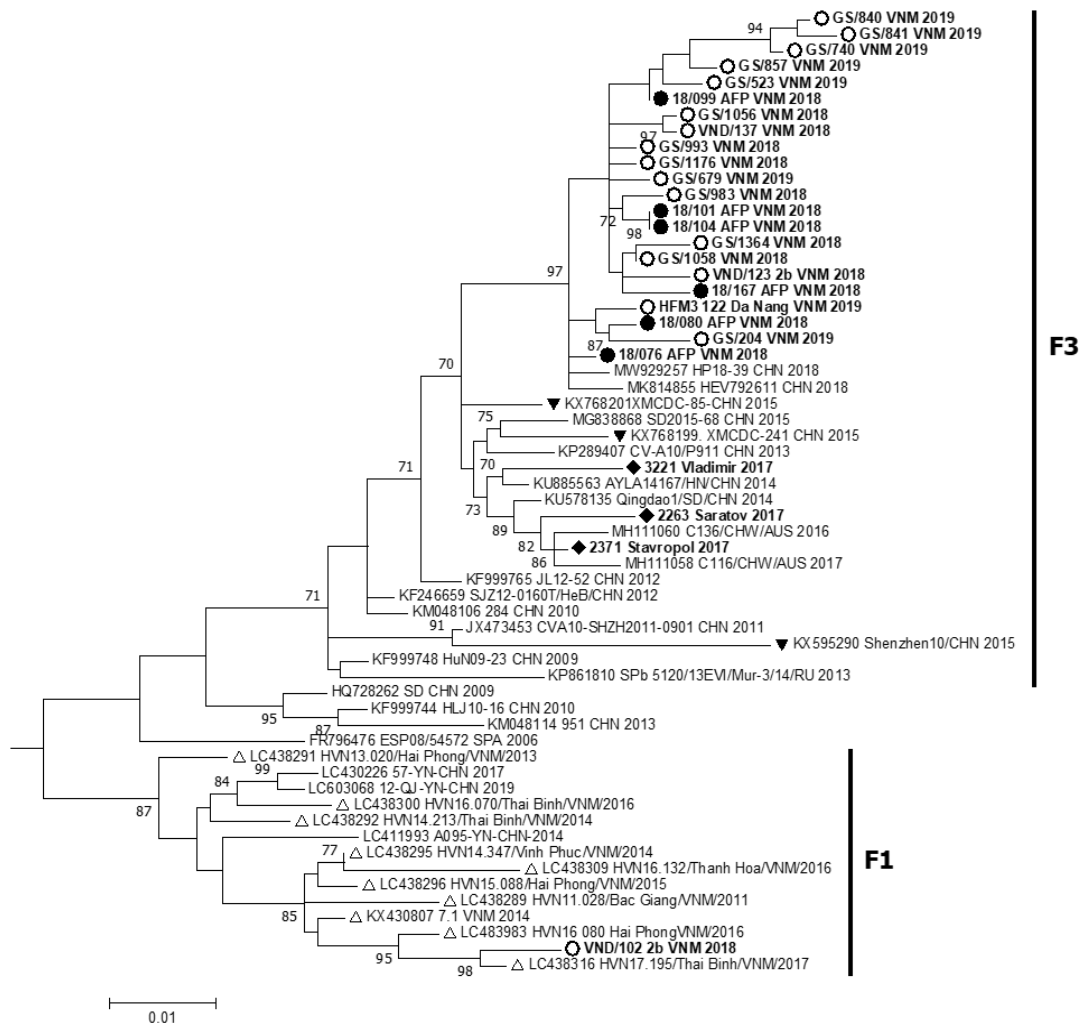


Figure 9. Coxsackie A10 genotype F strains identified in Vietnam and other countries.

Conclusions

1. From 2143 patients with acute flaccid paralysis syndrome during 12 years 22 poliovirus strains (1%) were isolated. Only two of them were vaccine-derived polioviruses – VDPV2, that proved high quality surveillance and vaccination policy in South Vietnam. The isolation from this patients 11.6% of non-polio enteroviruses largely circulated in South Vietnam connected with severe neurologic complications of non-polio enterovirus infection.

2. The long-term analysis of non-polio enterovirus circulation revealed the domination of species A enteroviruses (alphacoxsackie), these 3798 strains constituted 93% of isolated enteroviruses. Etiological association of species A enteroviruses with HFMD caused the leading role of this clinical form of non-polio enterovirus infection in South Vietnam. Species B enteroviruses (betacoxsackie) were more often found in patients with enterovirus meningitis.

3. Enterovirus 71 was the main etiological agent of non-polio enterovirus infection in South Vietnam including its leading form HFMD. EVA71 strains were detected in patients with different clinical diagnosis: in 49% of HFMD patients, in 42% of enterovirus meningitis patients, and in 28% of

acute flaccid paralysis patients. The changes in enteroviruses types and genotypes led to periodical peaks of enterovirus infection incidence in South Vietnam.

4. It was revealed that associated with enterovirus 71 HFMD cases in South Vietnam often complicated by severe neurological symptoms as meningitis and acute flaccid paralysis in early stages of infection were registered and hospitalised under the diagnosis enterovirus meningitis or acute flaccid paralysis.

5. Molecular analysis showed that 88% of studied enterovirus 71 strains belonged to the C4 genotype, and 12% of enterovirus 71 strains were representatives of the B5 genotype, enteroviruses of both genotypes largely circulated in South Vietnam. Most studied Coxsackievirus A10 strains belonged to the F3 genotype, and one Coxsackievirus A10 strain belonged to F1 genotype.

Practical recommendations

1. Pediatricians, infectious disease specialists, and virologists are advised to use the data published in reference manuals based on the materials of this study to optimize diagnostic work for acute flaccid paralysis syndrome, meningitis/ meningoencephalitis, hand, foot, and mouth disease, and other clinical forms of non-polio enterovirus infection.

2. Virologists and epidemiologists are advised to use the recommendations for organizing virological research and preventive measures for various clinical forms of enterovirus infection for further work.

Prospects for further development of the topic

The data obtained in the study will supplement the knowledge about the genetic diversity of non-polio enteroviruses in Vietnam and will allow us to estimate the frequency of non-polio circulation enteroviruses of different types and genotypes in Vietnam.

List of publications on the topic of the dissertation

Articles in scientific journals and publications included in the list of peer-reviewed scientific publications recommended by the Higher Attestation Commission of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation for the publication of the main results of dissertation research and equivalent publications:

12. Nguyen N.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, vol. 216, no.11, pp. 1371-1379.

13. Golitsyna L.N., Nguyen T.T.T., Romanenkova N.I., Lyong M.T., Vu L.T., Kanaeva O.I., Bichurina M.A., Novikova N.A. Enterovirus infection in the Socialist Republic of Vietnam // *Infection and immunity*. 2019. Vol.9, No.3-4. P. 467-475.

14. Hoang C.Q., Nguyen T.T.T., Ho N.X., Nguyen H.D., Nguyen A.B., Nguyen T.H.T., Phan H.C., Phan L.T. Transmission and serotype features of hand foot and mouth disease in household contacts in Dong Thap, Vietnam. *BMC Infect Dis.*, 2019, vol. 19, no.1, pp. 933.

15. Hoang C.Q., Nguyen H.D., Ho N.X., Vu T.H.T., Pham T.T.M., Nguyen K.T., Nguyen H.T., Hoang L.T., Clapham H., Nguyen T.T.T., Phan L.T. Incidence of Infection of Enterovirus 71 and

Coxsackieviruses A6 and A16 among Household Contacts of Index Cases in Dong Thap Province, Southern Vietnam. *Biomed Res Int*, 2020, no.1, 9850351.

16. Nguyet L.A., Thanh T.T., Nhan L.N.T., Hong N.T.T., Nhu L.N.T., Van H.M.T., Ny N.T.H., Anh N.T., Han D.D.K., Tuan H.M., Huy V.Q., Viet H.L., Cuong H.Q., Nguyen T.T.T., Viet D.C., Khanh T.H., Thwaites L., Clapham H., Hung N.T., Chau N.V.V., Thwaites G., Ha D.Q., van Doorn H.R., Tan L.V. Neutralizing Antibodies against Enteroviruses in Patients with Hand, Foot and Mouth Disease. *Emerg Infect Dis.*, 2020, vol. 26, no.2, pp. 298-306.

17. Chiu M.L., Luo S.T., Chen Y.Y., Chung W.Y., Duong V., Dussart P., Chan Y.F., Perera D., Ooi M.H., Nguyen T.T.T., Truong H.K., Lee M.S. Establishment of Asia-Pacific Network for Enterovirus Surveillance. *Vaccine*, 2020, vol. 38, no.1, pp.1-9.

18. Golitsyna L.N., Zverev V.V., Ponomareva N.V., Romanenkova N.I., Nguyen T.T.T., Kanaeva O.I., Selivanova S.G., Leonov A.V., Rozaeva N.R., Kashnikov A.Yu., Bichurina M.A., Novikova N.A. Molecular epidemiological monitoring of Coxsackie A10 virus circulation // *Population Health and Habitat: ZNiSO* . 2021. No. 4 (337). P. 43-49.

19. Romanenkova N.I., Golitsyna L.N., Nguyen T.T.T., Ponomareva N.V., Leonov A.V., Kanaeva O.I., Zverev V.V., Selivanova S.G., Rozaeva N.R., Luong M.T., Bichurina M.A., Novikova N.A. Epidemiological and etiological aspects of enterovirus infection in Russia and Vietnam// *Russian Journal of Infection and Immunity*. – 2021. – V. 11., N. 5. – P. 905-916.

20. Nguyen T.T., Chiu C.H., Lin C.Y., Chiu N.C., Chen P.Y., Le T.T.V., Le D.N., Duong A.H., Nguyen V.L., Huynh T.N., Truong H.K., Phan T.L., Nguyen T.T.T., Shih S.R., Huang C.G., Weng Y.J., Hsieh E.F., Chang S., Chen C., Tai I.C., Huang L.M. Efficacy, safety, and immunogenicity of an inactivated, adjuvanted enterovirus 71 vaccine in infants and children: a multiregional, double blind, randomized, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*, 2022, vol. 399, no.10336, pp. 1708-1717.

21. Romanenkova N.I., Nguyen T.T.T., Golitsyna L.N., Ponomareva N.V., Rozaeva N.R., Kanaeva O.I., Leonov A.V., Novikova N.A., Bichurina M.A. Enterovirus 71-Associated Infection in South Vietnam: Vaccination Is a Real Solution. *Vaccines (Basel)*, 2023, vol.11, no.5, pp. 931.

22. Romanenkova N., Nguyen T.T.T., Rozaeva N., Kanaeva O., Evseeva V., Bichurina M. Surveillance of acute flaccid paralysis and poliomyelitis on some territories of Russia and South Viet Nam. Part 1. Polioviruses and paralysis. *Russian Journal of Infection and Immunity*. – 2023. – Vol. 13, N. 2. – P. 329-337.

List of abbreviations used

AFP – acute flaccid paralysis (syndrome)

EV – enterovirus ; NPEV – non-polio enterovirus

EVI – enterovirus infection

HFMD – hand, foot and mouth disease

IPV – inactivated poliovirus vaccine

OPV – oral poliovirus vaccine

PCR – polymerase chain reaction

PV – poliovirus

VDPV (vaccine-derived poliovirus)

WHO – World Health Organization

WPV – wild poliovirus