

# **ĐỘC LỰC CỦA VIRUT CÚM GIA CẦM ĐỘC LỰC CAO H5N1 NHÁNH 7 HA TRÊN GIA CẦM**

**Nguyễn Tùng<sup>1,2</sup>, Nguyễn Hoàng Đăng<sup>2</sup>, Ngô Thu Hương<sup>2</sup>, Đỗ Thị Hoa<sup>2</sup>,  
Ken Inui<sup>3</sup>, Nguyễn Văn Cẩm<sup>4</sup>, Nguyễn Bá Hiên<sup>5</sup>**

## **TÓM TẮT**

Virut cúm gia cầm H5N1 độc lực cao đã gây nên dịch cúm gia cầm ở nhiều nước trên thế giới và ở Việt Nam. Từ khi virut cúm H5N1 lây lan vào Việt Nam, đã có nhiều dòng virut cúm có sự khác biệt di truyền trên gen HA khác nhau được phân loại thành các nhánh như nhánh 1, nhánh 2.3.2 và 2.3.4... đã và đang lưu hành trên gà, vịt và ngan ở Việt Nam. Từ cuối năm 2008, một virut H5N1 thuộc nhánh 7 HA đã được phát hiện và phân lập trên gà nhập lậu vào Việt Nam. Virut H5N1 nhánh 7 HA này đã được nghiên cứu về độc lực và khả năng gây bệnh trên một số loài gia cầm như gà, vịt và ngan tại Trung tâm Chẩn đoán thú y trung ương. Khi công cường độ virut này có độc lực cao trên gà, nhưng độc lực thấp cho thủy cầm (vịt và ngan) so với các virut H5N1 độc lực cao khác đang lưu hành ở Việt Nam.

Từ khoá: Virut cúm gia cầm H5N1 độc lực cao, Nhánh, Độc lực, Khả năng gây bệnh, Gia cầm

## **Virulence of highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1 virus clade 7HA in poultry**

**Nguyễn Tùng, Nguyễn Hoàng Đăng, Ngô Thu Hương, Đỗ Thị Hoa,  
Ken Inui, Nguyễn Văn Cẩm, Nguyễn Bá Hiên**

### **SUMMARY**

Highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1 viruses have caused many outbreaks throughout the world including Vietnam. Since the initial spreading of HPAI H5N1 to Vietnam, many genetically divergent avian influenza viruses based on HA genes classified as clades 1, 2.3.2, 2.3.4... have been circulating in chicken, duck and muscovy duck. In late 2008, a clade 7 H5N1 virus had been detected and isolated from seized chicken in the border. The virulence and pathogenicity of this virus had been studied in National Centre for Veterinary Diagnosis on chicken, duck and muscovy duck. This virus is virulent in chicken, but it has lower virulence when being challenged in waterfowl (duck and muscovy duck) comparing with other clades of virus circulating in Vietnam.

Key words: Highly pathogenic avian influenza H5N1 virus, Clade, Virulence, Pathogenicity, Poultry\

## **1. ĐẶT VẤN ĐỀ**

Từ cuối năm 2003, đầu năm 2004 virut cúm gia cầm độc lực cao (HPAI) đã lần đầu tiên gây nên nhiều ổ dịch trên gia cầm ở Việt Nam. Không chỉ gây thiệt hại cho ngành chăn nuôi gia cầm của Việt Nam, virut H5N1 độc lực cao đã lây lan sang con người và gây tử vong. Sau gần một năm dịch cúm dường như ngừng gây nên dịch trên gia cầm năm 2006, thì từ năm 2007 đến 2010 dịch cúm gia cầm do virut H5N1 liên tục xảy ra hàng năm với các mức độ khác nhau. Cùng thời gian trên virut H5N1 độc lực cao cũng liên tục gây nên dịch bệnh tại nhiều nước châu Á, châu Âu và châu Phi. Hiện nay virut H5N1 đã trở thành tác nhân gây nên dịch địa phương trên gia cầm ở nhiều nước trên thế giới.

<sup>1</sup> Viện sau đại học, Đại học Nông nghiệp Hà Nội ; <sup>2</sup> Trung tâm Chẩn đoán thú y trung ương;  
<sup>3</sup> FAO; <sup>4</sup> Trung tâm thú y cộng đồng; <sup>5</sup> Khoa Thú y, Đại học Nông nghiệp Hà Nội

Các nghiên cứu và công tác giám sát sự lưu hành của virus trên thế giới cho thấy virus cúm H5N1 đã liên tục biến đổi và có độc lực khác nhau. Báo cáo đầu tiên về virus H5N1 là về virus A/Goose/Guangdong/1/96, một virus có độc lực trung bình từ một ổ dịch trên ngỗng năm 1996 ở Quảng Châu-Trung Quốc (*Webster và Govorkova, 2006; Xu và cs, 1999*). Từ đó đến nay, virus đã biến đổi tạo nên nhiều dòng virus khác nhau và lây lan, lưu hành nhanh chóng tới các châu lục khác. Khi tập trung phân tích trình tự chuỗi acid amin của các glycoprotein HA (một trong 2 kháng nguyên bề mặt của virus cúm) của các dòng virus H5N1, nhóm các chuyên gia của FAO, OIE và WHO đã xác định được một hệ thống phân loại các dòng virus H5N1 độc lực cao dựa trên gen HA của virus này. Với hệ thống định danh này các dòng virus H5N1 độc lực cao được phân thành 10 nhánh (clade) từ 0 đến 9 với virus nhánh 0 là thủy tổ (A/Goose/Guangdong/1/96). Các nhánh của virus H5N1 độc lực cao cho đến nay đã phân bố khắp nhiều nước từ châu Á sang đến châu Âu và châu Phi. Đến nay, đã có nhiều nhánh virus H5N1 (*Nguyen TD và cs, 2008; wan và cs, 2008...*) xâm nhập vào Việt Nam như các nhánh 3, nhánh 1, nhánh 5, nhánh 2 (phân nhánh 2.3.2 và 2.3.4) và nhánh 0.

Để không chế dịch cúm gia cầm xảy ra, ngành thú y đã áp dụng rất nhiều biện pháp khác nhau, trong đó các biện pháp chính là tiêm phòng vắc xin cúm gia cầm, phát hiện nhanh và tiêu hủy gia cầm ốm, chết... Bên cạnh đó một hoạt động rất quan trọng là thực hiện việc giám sát sự lưu hành của virus cúm gia cầm trên các đàn gia cầm ở Việt Nam nhằm dự báo cho việc sử dụng vắc xin một cách hiệu quả. Việc giám sát sự lưu hành virus trên gia cầm bao gồm cả việc giám sát gia cầm nhập lậu từ biên giới cũng như gia cầm được buôn bán tại chợ. Từ những chương trình giám sát này chúng tôi đã phát hiện ra một nhánh virus cúm H5N1 mới ở Việt Nam cuối năm 2008 là virus H5N1 nhánh 7 HA, sau đó trong năm 2009 virus thuộc nhánh này đã tiếp tục được phát hiện tại một chợ gia cầm sống tại Hải Dương (*Nguyen T và cs, 2009*). Virus này đã được xác định đặc tính di truyền và đặc tính kháng nguyên, cho thấy có sự khác biệt rất lớn với các virus thuộc các nhánh khác đã và đang lưu hành tại Việt Nam. Trước đó virus thuộc nhánh 7 HA mới chỉ được phát hiện ở Trung Quốc, và Myanmar. Trung Quốc đã sản xuất vắc xin cúm gia cầm từ một chủng virus của nhánh này (A/chicken/Shanxi/2/2006) còn gọi là vắc xin H5N1 Re-4. Virus này cũng đã từng được phát hiện trên bệnh nhân 24 tuổi ở Bắc Kinh tử vong do mắc cúm năm 2003 (theo <http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMc066058>) và chủng virus phân lập từ bệnh nhân này có tên là A/Beijing/01/2003.

Nhằm xác định độc lực và khả năng gây bệnh của virus H5N1 nhánh 7 HA, chúng tôi thực hiện thí nghiệm công cường độc cho gà, vịt và ngan. Đây sẽ là cơ sở để hiểu biết thêm về virus cúm H5N1 giúp cho công tác phòng chống dịch bệnh cúm gia cầm ở Việt Nam.

## **II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1 Vật liệu**

- Gà, vịt và ngan từ 4-6 tuần tuổi âm tính kháng thể cúm gia cầm H5
- Virus cúm H5N1 nhánh 7 HA phân lập từ mẫu dịch ngoáy ổ nhóp từ gia cầm nhập lậu vùng biên giới phía Bắc (A/chicken/Vietnam/NCVD 016-2008(H5N1), FJ842476.1)
- Trứng gà có phôi 9-10 ngày tuổi, môi trường tế bào xơ phôi gà (CEF)
- Kít chiết tách Qiagen Rneasy minikit và kít realtime PCR Invitrogen superscriptIII qRT-PCR
- Hóa chất và những nguyên liệu dụng cụ cần thiết khác

### **2.2 Phương pháp**

- Virus được chuẩn độ trên môi trường tế bào xơ phôi gà (CEF) để tính liều gây nhiễm tế bào 50% (TCID<sub>50</sub>) theo phương pháp Reed and Muench.
- Tiến hành công cường độc cho gà, vịt và ngan bằng cách nhiễm qua đường mũi với liều 10<sup>6</sup>TCID<sub>50</sub>/con.

- Quan sát động vật thí nghiệm hàng ngày từ 10-14 ngày và ghi chép các biểu hiện lâm sàng, tính điểm theo thang điểm từ 0-3 (0 là bình thường; 1 là ốm nhẹ, bỏ ăn; 2 là ốm nặng, nằm liệt; 3 là chết).
- Dùng tăm bông ngoáy hầu họng của gia cầm thí nghiệm vào ngày thứ 4 hoặc khi chết, bảo quản trong dung dịch PBS, xét nghiệm bằng phản ứng Realtime RT-PCR (rRT-PCR) để xác định khả năng nhân lên và bài thải của virus H5N1 trong cơ thể.

### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1 Kết quả độc lực của virus cúm H5N1 nhánh 7 HA

Thí nghiệm công cường độc virus cúm gia cầm H5N1 được tiến hành tại chuồng nuôi động vật an toàn sinh học của Trung tâm Chẩn đoán thú y trung ương. Động vật thí nghiệm (gà, vịt và ngan) được nuôi ổn định 3 ngày tại chuồng trước khi công. Mỗi động vật thí nghiệm được công cường độc với liều  $10^6$  TCID<sub>50</sub> virus qua đường nhỏ mũi. Kết quả theo dõi độc lực được trình bày trong bảng 1:

**Bảng 1: Kết quả đánh giá độc lực trên gia cầm**

Động vật thí nghiệm	Số lượng	Chết	Tỷ lệ(%)	Điểm lâm sàng	Thời gian chết trung bình (MDT)(ngày)
Gà	11	11	100	1.9	5,4
Vịt	10	0	0	0	0
Ngan	10	0	0	0	0

Kết quả thí nghiệm cho thấy virus cúm H5N1 nhánh 7 HA (A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008) gây chết 100% số gà được công cường độc. Theo tiêu chí về độc lực của virus cúm gia cầm của Tổ chức thú y thế giới-OIE (*OIE Terrestrial Manual 2009*), nếu một virus cúm gây chết ít nhất 75% số gà được công cường độc sẽ được coi là virus cúm độc lực cao. Như vậy virus cúm H5N1 nhánh 7 HA là virus cúm có độc lực cao đáp ứng tiêu chí phân loại của OIE.

Thời gian gây chết gà trung bình-MDT (Mean death time) của virus H5N1 nhánh 7 là 5,4 ngày, kết quả này là dài hơn khi so sánh với thời gian gây chết trung bình của virus nhánh 1 (2,0 ngày) và virus nhánh 2.3.4 (1,2 ngày) (kết quả không trình bày trong nghiên cứu này). Cụ thể là gà được công cường độc bằng virus nhánh 7 đến ngày thứ 4 sau khi công mới bắt đầu thể hiện một số triệu chứng nhẹ như bỏ ăn, hoặc nằm một chỗ, và chỉ có 1 con chết; trong 2 ngày tiếp theo, số gà còn lại lần lượt ốm và chết hết. Kết quả cụ thể về theo dõi thí nghiệm được trình bày ở bảng 2.

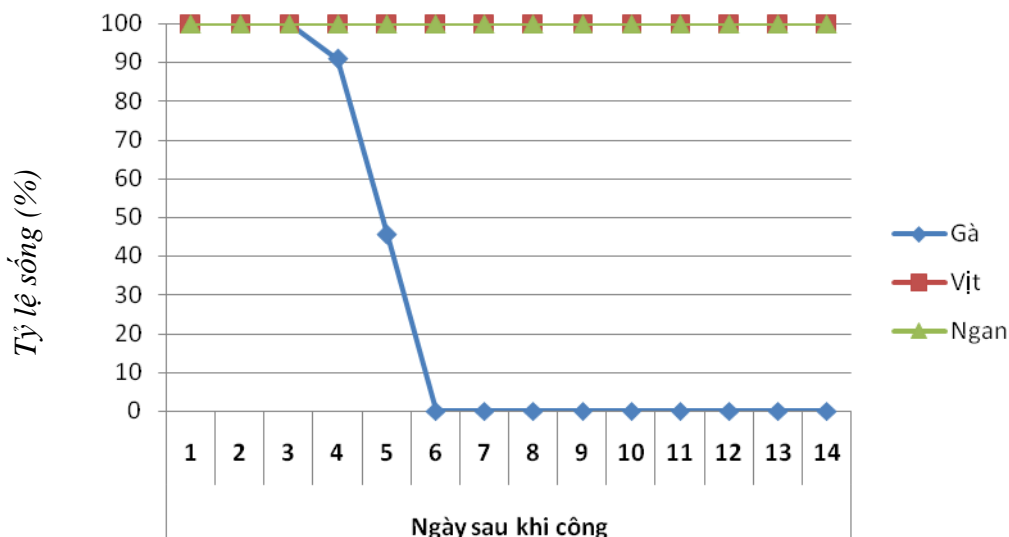
**Bảng 2: Theo dõi lâm sàng của gà thí nghiệm**

Ký hiệu gà	Ngày sau công					
	1	2	3	4	5	6
C1	0	0	0	1	2	3
C2	0	0	0	3		
C3	0	0	0	2	2	3
C4	0	0	0	1	3	
C5	0	0	0	1	2	3
C6	0	0	0	1	1	3
C7	0	0	0	1	3	
C8	0	0	0	2	3	
C9	0	0	0	2	3	
C10	0	0	0	1	2	3
C11	0	0	0	2	3	

Như đề cập ở trên các virus H5N1 nhánh 1 và nhánh 2.3.4 thường giết chết gà trong khoảng thời gian 1-2 ngày sau khi công. Điều này cho thấy virus H5N1 nhánh 7 HA tuy là virus cúm gia cầm độc lực cao, nhưng độc lực của chúng so với virus của 2 nhánh kia dường như là thấp hơn. Như vậy, nếu gà nhiễm virus H5N1 nhánh 7, chúng sẽ có khả năng kéo dài thời gian ủ bệnh, và có thể sẽ kéo dài thời gian thải virus ra môi trường hơn so với các virus thuộc các nhánh khác đang lưu hành ở Việt Nam.

Phát hiện này cũng có ý nghĩa quan trọng đối với chương trình khống chế bệnh khi khả năng gia cầm nhiễm bệnh sẽ làm chậm quá trình chẩn đoán bệnh lâm sàng tại thực địa và kéo dài thời gian bị bệnh cũng như kéo dài thời gian bài thải virus trước khi chết. Điều này cũng làm tăng yếu tố nguy cơ cho sức khỏe của con người.

**Biểu đồ: Tỷ lệ sống của GCTN sau khi công cường độ**



Cùng với liều gây nhiễm như trên và cùng thời gian theo dõi, nhưng khi công cường độ virus này cho vịt và ngan, tất cả số vịt và ngan đều còn sống sau khi kết thúc thí nghiệm. Thêm vào đó, toàn bộ số vịt và ngan trên đều khỏe mạnh, ăn uống bình thường và không thể hiện bất kỳ triệu chứng lạ nào trong suốt 2 tuần theo dõi. Điều này là khác biệt khi so sánh với độc lực của virus nhánh 1 và nhánh 2.3.4. Trong nghiên cứu của Jeong Ki-Kim và cộng sự, khi nghiên cứu khả năng gây bệnh của một số virus cúm H5N1 trên vịt nhà (Jeong Ki-Kim và cs, 2008), tỷ lệ chết của vịt khi công cường độ virus cúm là 70% và 80% lần lượt đối với virus nhánh 1 và nhánh 2.3.4.

### 3.2 Kết quả đánh giá độ bài thải virus

Bên cạnh việc theo dõi lâm sàng hàng ngày trong suốt thời gian thực hiện thí nghiệm công cường độ, chúng tôi đã tiến hành thu thập mẫu dịch ngoáy hầu họng của những con chết hoặc những con sống vào ngày thứ 4 sau khi công. Các tăm bông ngoáy hầu họng được bảo quản trong dung dịch PBS, sau đó chiết tách RNA bằng kit Qiagen Rneasy minikit, và xét nghiệm bằng phản ứng rRT-PCR theo quy trình xét nghiệm của Cục Thú y.

Kết quả xét nghiệm rRT-PCR được thể hiện bằng giá trị Ct (Cycle threshold – giá trị ngưỡng vòng của phản ứng). Giá trị Ct có tỷ lệ nghịch với mức độ virus có trong mẫu kiểm tra. Nghĩa là nếu lượng virus cao thì Ct thấp và ngược lại. Mẫu có giá trị Ct ≤ 35 là dương tính.

**Bảng 3: Kết quả đánh giá bài thải virus bằng phản ứng rRT-PCR**

Động vật thí nghiệm	Dương tính rRT-PCR(con)	Tỷ lệ (%)	Giá trị Ct trung bình	Mức độ bài thải virus (max=++++)
Gà	11/11	100	23,1	+++
Vịt	0/10	0	(-)	0
Ngan	8/10	80	31,0	+

Do giá trị Ct và tỷ lệ nghịch với lượng virus có trong mẫu xét nghiệm, nên chúng tôi quy ước giá trị Ct sang mức độ từ + đến ++++ để dễ biểu thị kết quả về lượng virus có trong mẫu kiểm tra. Cụ thể như sau: Mẫu có Ct ≤ 20 được coi là ++++, Ct từ >20 đến ≤ 25 được coi là +++, Ct từ >25 đến ≤ 30 được coi là ++ và Ct từ >30 đến ≤ 35 được coi là +. Dựa vào mức độ của từng mẫu riêng lẻ và tính trung bình cho từng loài động vật thí nghiệm.

Kết quả nhiễm bệnh như đã thấy khi quan sát lâm sàng đã rất rõ trên gà, toàn bộ số gà mắc bệnh, chết đồng thời cũng dương tính virus cúm 100% khi xét nghiệm bằng phản ứng rRT-PCR. Khi xét nghiệm mẫu trên vịt thấy toàn bộ các mẫu kiểm tra đều âm tính, chứng tỏ virus H5N1 nhánh 7 HA không có khả năng gây nhiễm, hoặc thích nghi trên vịt. Tuy nhiên, kết quả xét nghiệm rRT-PCR đối với các mẫu dịch ngoáy họng ngan lại có kết quả khác với kết quả của các mẫu từ vịt công cường độc. Có 8 trên 10 mẫu ngan dương tính virus cúm, mặc dù toàn bộ số ngan đều khỏe mạnh về mặt lâm sàng như đã trình bày ở trên.

Như vậy vịt không hề nhiễm virus H5N1 nhánh 7 HA sau khi công, nhưng ngan vẫn có khả năng nhiễm virus này. Tuy số ngan bị nhiễm virus là khá cao (80%), nhưng mức độ bài thải virus không cao, chủ yếu là ở mức độ (+). Các nghiên cứu trước đây cho thấy virus cúm H5N1 độc lực dạng cổ điển thường có độc lực cao trên gà nhưng không gây nhiễm cho thủy cầm giống như virus H5N1 nhánh 7. Tuy nhiên, chúng vẫn có khả năng nhân lên rất tốt trên thủy cầm và bài thải với lượng lớn ra ngoài. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy, ngược lại virus H5N1 nhánh 7 HA có khả năng gây nhiễm rất hạn chế trên thủy cầm. Có một điều thú vị là, khi chúng tôi thử gây nhiễm virus nhánh 7 trên môi trường tế bào xơ phôi vịt và xơ phôi ngan, virus này lại có khả năng nhân lên rất tốt giống như khả năng nhân lên trên tế bào xơ phôi gà (kết quả không trình bày).

Cho đến nay, chúng tôi đã theo dõi nhưng chưa phát hiện thấy virus này trong các ổ dịch cúm gia cầm, ngoại trừ trên một số gia cầm tại chợ gia cầm sống khi tiến hành chương trình giám sát virus. Điều này có thể là do virus này không có hoặc ít có khả năng thích nghi trên thủy cầm, mà thủy cầm có thể là yếu tố chính làm lây lan virus cúm ngoài môi trường.

#### **IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ**

##### **4.1 Kết luận**

Kết quả nghiên cứu đã cho thấy virus H5N1 nhánh 7 HA, A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008, phân lập từ gia cầm nhập lậu là:

- Virus có khả năng gây bệnh, có độc lực cao gây chết 100% gà, thời gian chết kéo dài tới 5,4 ngày, thấp hơn so với các virus cúm gia cầm độc lực cao H5N1 nhánh 1 và nhánh 2.3.4 đang lưu hành ở Việt Nam đã được nghiên cứu.

- Virus có khả năng gây nhiễm rất hạn chế cho ngan, không gây nhiễm cho vịt và hoàn toàn không có độc lực với 2 loài thủy cầm này.

- Virus bài thải sau khi công ở gà là khá cao (+++), ở ngan là thấp (+), ở vịt là không bị nhiễm.

##### **4.2 Đề nghị**

Bên cạnh việc nghiên cứu về độc lực, khả năng gây bệnh và bài thải của virus H5N1 nhánh 7 HA trên gia cầm, cũng rất cần thiết nghiên cứu về khả năng bảo hộ của vaccin cúm gia cầm hiện nay đang được sử dụng tại Việt Nam chống lại virus này khi mà virus này đã gây nên dịch tại Trung Quốc và Myanmar.

#### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Fatal Infection with Influenza A (H5N1) Virus in China, *The New England Journal of Medicine*, n engl j med 354;25 www.nejm.org june 22, 2006, <http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMc066058>

2. Nguyen, T., C. T. Davis, W. Stembridge, B. Shu, A. Balish, K. Inui, H. T. Do, H. T. Ngo, X. Wan, M. McCarron, S. E. Lindstrom, N. J. Cox, C. V. Nguyen, A. Klimov, and R. O. Donis.

Characterization of a highly pathogenic avian influenza H5N1 virus sublineage in poultry seized at ports of entry into Vietnam. *Virology* 10:250–256. 2009.

3. Nguyen, T. D., T. V. Nguyen, D. Vijaykrishna, R. G. Webster, Y. Guan, M. J. Peiris, and G. J. Smith. Multiple sublineages of influenza A virus (H5N1), Vietnam, 2005–2007. *Emerg. Infect. Dis.* 14:632–636.2008.

4. Wan, X.-F., T. Nguyen, C. T. Davis, C. B. Smith, Z.-M. Zhao, M. Carrel, K. Inui, H. T. Do, D. T. Mai, S. Jadhao, A. Balish, B. Shu, F. Luo, M. Emch, Y. Matsuoka, S. E. Lindstrom, N. J. Cox, C. V. Nguyen, A. Klimov, and R. O. Donis. Evolution of highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses in Vietnam between 2001 and 2007. *PLoS ONE* 3: e3462. 2008.

5. World Health Organization/World Organisation for Animal Health/Food and Agriculture Organization H5N1 Evolution Working Group. Toward a unified nomenclature system for highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) [Internet]. *Emerg. Infect. Dis.* 14, [modified 2008; cited 2009 November 20]. Available from: <http://www.cdc.gov/EID/content/14/7/e1.html>

6. Xu, X ., Subbarao, K., Cox, N. J., Guo, Y. Genetic characterisation of the pathogenic influenza A/goose/Guangdong/1/96(H5N1) virus: similarity of its heamalutination genes to those of H5N1 viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong. *Virology* 261,15-19.1999.