

VIRUS CÚM GIA CẦM ĐỘC LỰC CAO H5N6 Ở VIỆT NAM NĂM 2014

*Nguyễn Đăng Thọ^{1,2}, Nguyễn Hoàng Đăng¹, Đàm Thị Vui¹, Đỗ Thị Hoa¹,
Mai Thùy Dương¹, Nguyễn Thị Diệp¹, Nguyễn Việt Không², Tô Long Thành¹*

TÓM TẮT

Tháng 4/2014, virus cúm độc lực cao chủng H5N6 lần đầu tiên được phát hiện trên gà ở tỉnh Lạng Sơn và sau đó còn phát hiện được ở nhiều tỉnh khác thuộc Miền Bắc và Miền Trung. Tổng số 10 mẫu từ ổ dịch và các chương trình giám sát dương tính với virus H5N6 đã được thu thập trong năm 2014. Theo kết quả phân tích gene hệ gen H5, các virus H5N6 Việt Nam thuộc subclade 2.3.4.4 của clade 2.3.4. Trong đó, 9 virus có quan hệ gần gũi với chủng virus H5N6 (A/Sichuan/26221/2014 (H5N6)) gây tử vong trên người ở Tứ Xuyên, Trung Quốc vào tháng 4/2014 và 1 virus còn lại có quan hệ rất gần với chủng H5N6 gây bệnh trên gia cầm ở Lào năm 2014. Phân tích đặc tính phân tử cho thấy tất cả các virus H5N6 Việt Nam đều có độc lực cao đối với gà, có tính kháng nguyên tương tự với vaccine Re-5 hơn là với Re-6 và NIBRG-14 và vẫn thích hợp với thụ thể bám của gia cầm, nhưng sự thích hợp này có thể bị ảnh hưởng do thiếu một điểm đường hóa tại vị trí 154 của HA. Chỉ số độc lực của virus H5N6 Việt Nam (A/Ck/Vietnam/LangSon/14-A324/2014 (H5N6)) là 2,84. Virus H5N6 đã lây lan rộng ở Miền Bắc và Miền Trung Việt Nam và đã phân hóa thành ít nhất 2 dòng virus mới. Do vậy, những thay đổi sinh học của chúng cần phải được theo dõi.

Từ khóa: Virus cúm gia cầm, Chủng H5N6, Đặc tính phân tử HA, Chỉ số độc lực, Việt Nam

Highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses in Viet Nam in 2014

*Nguyen Dang Tho, Nguyen Hoang Dang, Dam Thi Vui, Do Thi Hoa,
Mai Thuy Duong, Nguyen Thi Diep, Nguyen Viet Khong, To Long Thanh*

SUMMARY

In April, 2014, Highly pathogenic avian influenza H5N6 virus was firstly detected in the diseased chickens in Lang Son province and it was identified later in many other provinces in the North and the Centre of the country. A total of 10 positive samples with H5N6 viruses from outbreaks and surveillance programs were collected in 2014. According to the result of phylogenetic analysis of H5 gene, H5N6 viruses of Viet Nam belonged to the sub-clade 2.3.4.4 within the clade 2.3.4. Of which, 9 viruses were closely related to the H5N6 virus strain (A/Sichuan/26221/2014(H5N6)) that caused a fatal human case in Sichuan province, China in April, 2014 and the remaining virus was closely related with the H5N6 virus of Laos in March, 2014. The analyzed result of molecular characteristics revealed that all of the Vietnamese H5N6 viruses were highly pathogenic to chicken, antigenically similar to Re-5 rather than Re-6 vaccine and NIBRG-14 vaccine was still suitable for the avian-type binding receptors but this suitability might be effected due to loss of a glycosylation site at position 154 in HA. The pathogenic index of the Vietnamese H5N6 viruses (A/Ck/Vietnam/LangSon/14-A324/2014 (H5N6)) was 2.84. The H5N6 viruses were already transmitted widely in the North and Centre of Viet Nam and varied into at least 2 new lineages. Therefore, the biological alterations of these H5N6 viruses need to be monitored.

Keywords: HPAI virus, H5N6 strain, HA molecular characteristics, Pathogenic index, Viet Nam

¹ Trung tâm Chẩn đoán Thú y Trung ương

² Viện Thú y Quốc gia

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Những năm gần đây, virus cúm gia cầm H5N1 không còn là tác nhân duy nhất gây bệnh cúm gia cầm độc lực cao tại nhiều quốc gia trên thế giới. Các chủng virus cúm gia cầm thuộc các subtype khác như H5N5, H5N8, H5N2 đã xuất hiện tại Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật Bản, Hà Lan, Đức, Anh, Mỹ và Canada (de Vries et al., 2015; Lee et al., 2014; Liu et al., 2013). Đây là những virus tái tổ hợp của nhiều virus thuộc các subtype khác nhau đồng lưu hành trên thủy cầm (vịt) như H5N1, H5N2, H6N2, và H6N5. Gần đây nhất, virus cúm gia cầm H5N6 đã được phát hiện tại các nước láng giềng với Việt Nam như ở Lào: Virus cúm gia cầm H5N6 được phát hiện trên gia cầm bệnh vào tháng 3 năm 2014 (Wong et al., 2015); Đáng chú ý hơn, ở Trung Quốc: một người đàn ông ở tỉnh Sichuan, phía Tây Trung Quốc đã chết với vài triệu chứng viêm phổi do virus cúm gia cầm H5N6 vào tháng 4 năm 2014; virus H5N6 cũng đã được phát hiện ở đàn gà trong trang trại của bệnh nhân (WHO, 2014b).

Ở Việt Nam, từ tháng 4 tới tháng 12 năm 2014, 7 ổ dịch cúm gia cầm dương tính với cúm A sub-type H5 nhưng âm tính với sub-type N1 đã được báo cáo. Ổ dịch đầu tiên được phát hiện ở Lạng Sơn vào tháng 4 năm 2014, dịch bệnh sau đó đã được phát hiện ở Hà Tĩnh, Lào Cai, Quảng Trị và Quảng Ngãi. Những mẫu bệnh phẩm này đã được xác định subtype bằng phương pháp RT-PCR tại Trung tâm Chẩn đoán Thú y Trung ương và có kết quả dương tính với subtype H5N6. Do vậy, Việt Nam rất có thể phải chịu những ảnh hưởng do dịch cúm H5N6 tương tự như ở Lào và Trung Quốc. Tuy nhiên mối quan hệ như thế nào giữa các chủng virus H5N6 ở Việt Nam, Lào và Trung Quốc là chưa được biết và liệu các biện pháp phòng chống dịch cúm H5N1 có phải thay đổi cho phù hợp với cúm H5N6 hay không, cần phải được tìm

hiều.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi báo cáo về sự xuất hiện của dịch cúm gia cầm thể độc lực cao A/H5N6, phân tích hệ và một số đặc tính phân tử liên quan đến kháng nguyên của chúng.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Mẫu

Mẫu nghiên cứu bao gồm 15 mẫu mô bệnh phẩm (não, phổi, khí quản, lách, thận) hoặc dịch ngoáy hầu họng từ gà, vịt, chim trĩ từ ổ dịch hoặc các chương trình giám sát ở các tỉnh thu thập trong thời gian từ tháng 4 tới tháng 12 năm 2014 và đã được các Cơ quan Thú y vùng xét nghiệm dương tính với cúm A/H5 nhưng âm tính N1 bằng phương pháp realtime RT-PCR (TCVN 8400-26:2014). Mẫu bệnh phẩm được nghiền thành huyền dịch 1/10 trong PBS pH=7,2.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Phương pháp RT-PCR định type, subtype virus cúm gia cầm

Các huyền dịch bệnh phẩm hoặc dịch hầu họng được tách chiết ARN bằng RNAeasy Mini Kit (Qiagen Cat. No.74106) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Phương pháp RT-PCR định type cúm A (gen M), subtype H5 và xác định subtype NA được thực hiện với kit One-step RT-PCR kit (SuperScript III One- Step RT-PCR RT-PCR system với Platinum® Taq DNA Polymerase, Cat. No. 12574-108, Qiagen) và các cặp mồi đặc hiệu gen M, H5 (Fouchier et al., 2000; Tsukamoto et al., 2008) và NA từ N1-N9 (Tsukamoto et al., 2009) DNA</keyword><keyword>Viral Proteins/*genetics</keyword></keywords><dates><year>2009</year><pub-dates><date>Jul</date></pub-dates></dates><isbn>1098-660X (Electronic. Các cặp mồi phát hiện được gen M, H5 và N6 liệt kê trong bảng 1.

Bảng 1. Danh mục các cặp mồi phát hiện được gen M, H5 và N6 của virus cúm

Gen	Vị trí sequence	Gene HA chuẩn	Kích thước	Trình tự primers (5'-->3')
M	H5-918F	Không công bố	244	CTTCTAACCGAGGTCGAAACG
	H5-1166			AGGGCATTGTTGGACAAAG/TCGTCTA
H5	H5-918F	U69277	249	CCARTRGGKGCKATAAAAYTC
	H5-1166			KGTCTGCWGCRTAYCCRCTY
N6	N6-57F	CY005464	264	AGGAATGACACTATCSGTAGTAAG
	N6-307R			GAYAGRATRTGCCATGAGTTYAC

^a Mã ký hiệu những bazơ nitric hỗn hợp : B, C/G/T; D, A/G/T; K, G/T; M, A/C; R, A/G; V, A/C/G; W, A/T; Y, C/T.

2.2.2 Giải trình tự gen và phân tích hệ

Giải trình tự gen được thực hiện với các mẫu virus dương tính H5N6. Các đoạn gen HA1 và HA2 của virus được khuếch đại bằng kit PCR superMix (Cat. No. 11306-016, Invitrogen) với 2 cặp mồi đặc hiệu gen HA1 và HA2. Tất cả các mồi xuôi và ngược được gắn với đoạn trình tự M13 (chữ đậm) tương ứng để làm thuận lợi cho việc giải trình tự gen, Cặp 1: S17_H5-F1 - **TGT AAA ACG ACG GCC** AGT AGC AAA AGC AGG GGT YTA AT, S18_H5-1111R - **CAG GAA ACA GCT** ATG ACC CAT ACC AAC CAT CTA YCA TTC C; Cặp 2: S19_H5-F751- **TGT AAA ACG ACG GCC** AGT AYG CMT AYA ARA TTG TCA AG, S20_H5-R1773- **CAG GAAACA GCT** ATG ACA GTA GAA ACA AGG GTG TTT TTA ACT ACA AT (Hoffmann et al., 2001). Các phản ứng giải trình tự theo 2 chiều (xuôi, ngược) được thực hiện tại Macrogen, Inc (Seoul, Hàn Quốc). Các trình tự gen HA1 và HA2 được ráp nối trong Bioedit version 7.2.5 thành các trình tự gen HA đầy đủ, khoảng 1700 bp. Cây hệ gen H5 của các virus trong nghiên cứu này và các virus tham chiếu trong ngân hàng gen (Genbank), GISAD, dữ liệu của Trung tâm Chẩn đoán Thú y Trung ương (NCVD) xây dựng để phân tích bằng phần mềm MEGA 6, phương pháp Maximum likelihood, mô hình GTR + G, độ tin cậy của phân tích hệ được kiểm tra bằng phân tích bootstrap

1000 lần. Các phân nhánh H5 (clades) trong cây hệ được xác định theo tiêu chí của WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group (Group, 2008; Group, 2012).

2.2.3 Phân tích đặc tính phân tử

Đặc tính phân tử của các virus được so sánh dựa vào trình tự aa có liên quan đến các vị trí bám thụ thể, kháng nguyên và phân cắt HA (Cai et al., 2012). Vị trí các aa được đánh số theo H5 (Claas et al., 1998).

2.2.4 Đánh giá độc lực virus

Thí nghiệm đánh giá độc lực được thực hiện bằng phương pháp tiêm tĩnh mạch virus H5N6 (A/Ck/Vietnam/LangSon/14-A324/2014) theo hướng dẫn của OIE (OIE, 2015) để đánh giá chỉ số IVPI, cách 24 giờ kiểm tra gà một lần trong thời gian 10 ngày, mỗi lần quan sát, mỗi gà sẽ được cho điểm là 0 nếu bình thường, 1 nếu ốm, 2 nếu ốm nặng và 3 nếu chết. Chỉ số IVPI là điểm trung bình trên số gà trên số lần quan sát trong thời gian 10 ngày. Virus được kết luận là thuộc thể độc lực cao khi có chỉ số IVPI > 1,2.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả RT-PCR

Trong khoảng thời gian từ cuối tháng 4 tới tháng 12 năm 2014, nhiều mẫu ổ dịch cúm gia cầm và mẫu giám sát đã được các phòng thí

nghiệm của các Cơ quan thú y vùng xác định là dương tính với virus cúm A/H5, nhưng âm tính với subtype N1 bằng phương pháp realtime RT-PCR (TCVN 8400-26:2014) tại các tỉnh Lào Cai, Lạng Sơn, Hà Tĩnh, Quảng Trị, Quảng Nam và Quảng Ngãi. Tổng số 12 mẫu ổ dịch (mô bệnh phẩm) và 3 mẫu giám sát (dịch hầu họng) dương tính virus cúm A/H5 nhưng âm tính N1 được thu thập gửi về NCVD để xác định subtype. Kết quả 15 mẫu đã dương tính cúm A và subtype H5, N6 bằng phương pháp RT-PCR (Bảng 2). Kết quả này cho thấy, dịch cúm A/

H5N6 bắt đầu xuất hiện từ cuối tháng 4 năm 2014 và có sự lưu hành rộng rãi trên nhiều tỉnh thuộc Miền Bắc và Miền Trung của Việt Nam. Tuy nhiên, không nhiều ổ dịch cúm gia cầm đã xảy ra trong thời gian từ cuối tháng 4 đến tháng 12, năm 2014 (10 ổ dịch/cả nước) như đã diễn ra trong thời gian đầu năm, từ tháng 1 đến đầu tháng 4, năm 2014 (39 ổ dịch) (OIE: Follow-up report No.4; No.18, 2014 và report No.11, 2015, <http://www.oie.int/en>). Do đó, virus H5N6 có thay thế virus H5N1 trong thời gian tới là rất khó để suy đoán trong thời điểm này.

Bảng 2. Danh sách mẫu dương tính virus cúm A/H5N6 được phát hiện năm 2014

TT	Ngày lấy mẫu	Tỉnh	Huyện	Loài	Nguồn gốc	Kí hiệu PTN	Kết luận
1	22/4/2014	Lạng Sơn	Tràng Định	Gà	Ổ dịch 1	14-A324	(+)H5N6
2	27/6/2014	Hà Tĩnh	Kỳ Anh	Vịt	Ổ dịch 2	14-A338	(+)H5N6
3	8/8/2014	Lào Cai	Bảo Thắng	Trĩ	Ổ dịch 3	14-A367	(+)H5N6
4	21/8/2014	Quảng Trị	Gio Linh	Vịt	Ổ dịch 4	14-A392	(+)H5N6
5	25/8/2014	Quảng Trị	Gio Linh	Vịt	Ổ dịch 4	14-A415	(+)H5N6
6	25/8/2014	Quảng Trị	Gio Linh	Vịt	Ổ dịch 4	14-A418	(+)H5N6
7	27/8/2014	Quảng Ngãi	Sơn Tịnh	Vịt	Ổ dịch 5	14-A421	(+)H5N6
8	17/9/2014	Phú Thọ	Hạ Hòa	Vịt	Giám sát	14-A427	(+)H5N6
9	17/9/2014	Phú Thọ	Lâm Thao	Vịt	Giám sát	14-A428	(+)H5N6
10	17/9/2014	Phú Thọ	Yên Lập	Vịt	Khỏe	14-A431	(+)H5N6
11	15/9/2014	Quảng Ngãi	Quảng Ngãi	Vịt	Ổ dịch 6	14-A503	(+)H5N6
12	17/9/2018	Quảng Nam	Núi Thành	Vịt	Ổ dịch 7	14-A504	(+)H5N6
13	17/9/2018	Quảng Nam	Núi Thành	Vịt	Ổ dịch 7	14-A505	(+)H5N6
14	2/11/2014	Lạng Sơn	Không biết	Gà	Giám sát	14-A526	(+)H5N6
15	26/12/2014	Lạng Sơn	Tràng Định	Vịt	Ổ dịch 8	14-A540	(+)H5N6

3.2 Phân tích hệ các chủng virus cúm gia cầm

Cây hệ đã được xây dựng dựa trên gen H5 của 10 chủng virus đại diện theo vị trí địa lý và thời gian gây bệnh trong nghiên cứu này bao gồm: 14-A324, 14-A338, 14-A367, 14-A392, 14-A415, 14-A418, 14-A421, 14-A503, 14-A526, 14-A540 (Bảng 2, Bảng 3) và các chủng virus tham chiếu. Kết quả phân tích cho thấy cả 10 chủng virus H5N6 của Việt Nam thuộc clade 2.3.4 khi so sánh với các chủng virus tham chiếu

thuộc clade 2.3.4 như: A/Anhui/1/2005 (H5N1) (Group, 2012), A/Chicken/Fujian/584/2006 (H5N1) (Wan et al., 2008) và chủng vaccin Re-5 A/Duck/Anhui/1/2006 (H5N1) (Gu et al., 2013) (Biểu đồ 1). Tuy nhiên những virus H5N6 Việt Nam không nằm cùng nhóm với các virus HPAI H5 khác thuộc các subclade được xác định trước đây như clade 2.3.4.1, 2.3.4.2 và 2.3.4.3 (WHO, 2014a) mà hình thành nên một nhánh virus mới. Mức độ tương đồng về nucleotide giữa gen HA

của những virus H5N6 với những virus thuộc các subclade 2.3.4.1, 2.3.4.2 và 2.3.4.3 chỉ đạt từ 92%-93%.

Kể từ năm 2008, nhiều chủng virus cúm HPAI/H5 với subtype NA không phải N1 như H5N2, H5N5, H5N6, H5N8 đã xuất hiện ở Trung Quốc (Liu et al., 2013; Qi et al., 2014; Wu et al., 2014; Zhao et al., 2012). Trong hai năm 2013-2014, các chủng virus HPAI H5Nx cũng đã được phát hiện ở nhiều vùng lãnh thổ khác ngoài Trung Quốc như Lào, Nhật Bản, Hàn Quốc, châu Âu, Mỹ, Canada (de Vries et al., 2015; Lee et al., 2014; Wong et al., 2015). Các báo cáo phân tích hệ gen HA của những virus HPAI H5Nx cũng cho thấy chúng thuộc về clade 2.3.4 nhưng không nằm trong các subclade 2.3.4.1, 2.3.4.2 và 2.3.4.3, mà tạo thành những nhánh virus mới trong clade 2.3.4 (Biểu đồ 1). Theo tiêu chí định nghĩa clade của Nhóm nghiên cứu tiến hóa virus cúm H5N1 WHO/OIE/FAO (Group, 2008), phần lớn những virus cúm HPAI H5Nx phát hiện trong năm 2013-2014 đều được các tác giả nghiên cứu phân loại vào subclade 2.3.4.6. Tuy nhiên, Tổ chức y tế thế giới đã khuyến cáo sử dụng subclade 2.3.4.4 gọi thay cho subclade 2.3.4.6 từ ngày 12/1/2015 (WHO, 2015b). Kết quả phân tích trong nghiên cứu này cũng cho thấy các virus H5N6 của Việt Nam thuộc về clade 2.3.4.4 (Biểu đồ 2). Trong đó 9 chủng có quan hệ gần gũi với chủng H5N6 (A/Sichuan/26221/2014) phát hiện được từ một ca tử vong ở người ở Sichuan (Trung Quốc) vào tháng 4 năm 2014 (WHO, 2014b) với sự tương đồng về nucleotide là 98,0-99,3% và một chủng có quan hệ gần gũi với chủng H5N6 phát hiện được ở Lào tháng 3 năm 2014 (A/chicken/Laos/LPQ001/2014) và ở tỉnh Quảng Đông, Trung Quốc (A/duck/Guangdong/GD01/2014) (Wong et al., 2015) với sự tương đồng về nucleotide là trên 99,0%. Để tiện cho việc phân tích sau này, các virus cùng nhóm với chủng virus H5N6 A/Sichuan/26221/2014 gọi là subsubclade 2.3.4.4 a, các virus cùng nhóm với chủng virus H5N6 A/chicken/Laos/LPQ001/2014 gọi là subsubclade 2.3.4.4 b. Ngoài ra các chủng virus H5N8 của Hàn Quốc, Đài Loan, Nhật Bản,

Trung Quốc (Bắc Kinh), Anh, Thụy Điển, Hà Lan, Đức và các chủng virus H5N2 phát hiện ở Mỹ năm 2014 nằm cùng nhóm với nhau và được đặt tên là subsubclade 2.3.4.4 c (Biểu đồ 2).

Các subsubclade 2.3.4.4a, 2.3.4.4b, 2.3.4.4c trong nghiên cứu này có thể được coi là những clade mới vì chúng đáp ứng các tiêu chí định nghĩa clade của Nhóm nghiên cứu tiến hóa virus cúm H5N1 WHO/OIE/FAO. Một clade/subclade mới được xác định dựa trên hình thái học của cây hệ gen H5 và một số tiêu chí sau: (1) phải có ít nhất 4 chủng virus cùng chung một nút (node), (2) khoảng cách trung bình nucleotide (Kimura 2-parameter) bên trong nhóm < 1,5% và giữa các nhóm > 1,5%, (3) giá trị bootstrap (1000 lần neighbor-joining bootstrap) tại điểm nút xác định clade ≥ 60 (Group, 2008). Trong nghiên cứu này các subsubclade 2.3.4.4 a, 2.3.4.4 b, 2.3.4.4 c và 2.3.4.4 d lần lượt có khoảng cách nucleotide trong nhóm là 0,96%, 0,67%, 1,13% và 0,44% và khoảng cách ngoài nhóm từ 3,5% -5,5%, tại các nút xác định clade đều có giá trị bootstrap từ 95-100. Sự xuất hiện các clade/subclade virus cúm mới là sự báo hiệu rằng các chủng virus có thể có những biến đổi về mặt kháng nguyên. Do đó đánh giá lại hiệu quả vacxin cần phải được tiến hành với những chủng virus thuộc clade/subclade mới.

3.3 Đặc tính sinh học phân tử của virus cúm H5N6 ở Việt Nam 2014

Tại vị trí phân cắt protein HA của cả 10 chủng H5N6 của Việt Nam (Bảng 3) đều có chứa nhiều amino acid cơ bản, đặc điểm này cho phép suy đoán rằng các chủng virus cúm H5N6 trên là thuộc thể độc lực cao (HPAI) (Senne et al., 1996; Steinhauer, 1999). Vị trí phân cắt trên protein HA của các virus có 3 kiểu chính PLREKRRKR/ (7 chủng), PLRERRRKR/ (2 chủng) PLREKRRRR/ (1 chủng) và đều có sự khác biệt với protein HA của các virus khác không thuộc clade 2.3.4 ở vị trí Q322L (theo H5) (Bảng 4). Tại các vị trí bên vũng trong túi gắn thụ thể (receptor binding pocket) của protein HA, bao gồm E186, R216, G221, Q222 và G226 đều không có sự thay đổi, điều này cho thấy protein HA của các virus vẫn có tính đặc

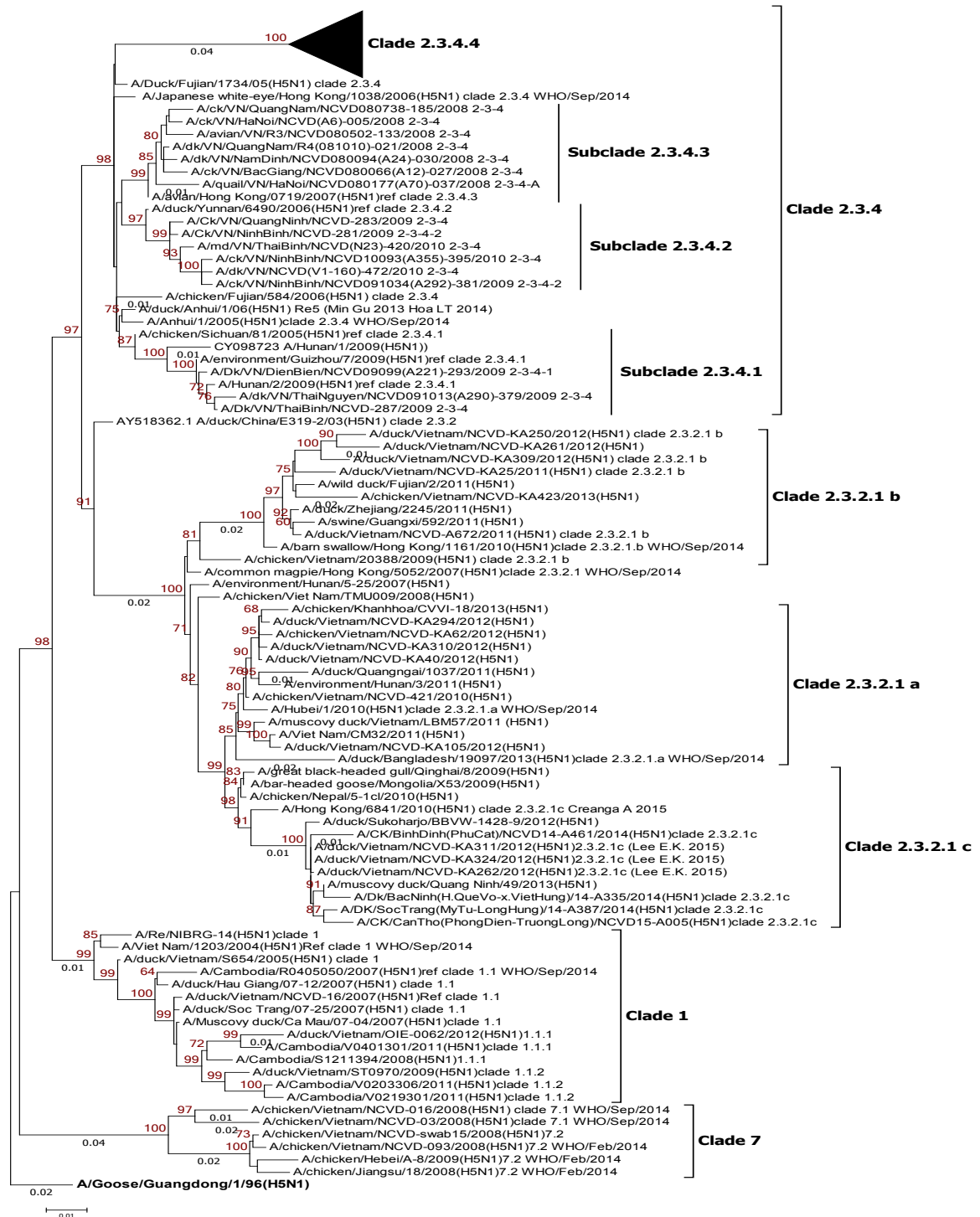
hiệu gắn với acid sialic bởi mối liên kết α -2,3 mà chỉ có ở mô của gia cầm (Matrosovich et al., 1999).

So sánh aa tại 21 vị trí liên quan kháng nguyên và gắn thụ thể (Cai et al., 2012) trên protein HA của các virus subclade 2.3.4.4 (H5N6) Việt Nam và các virus thuộc các clade khác cho thấy virus clade 1 (H5N1) có nhiều khác biệt nhất so với virus subclade 2.3.4.4 (H5N6), từ 13-15 aa, tiếp đến là clade 2.3.2.1 (H5N1), từ 9-10 aa và clade 2.3.4 (H5N1), chỉ khác biệt từ 6-7 aa (Bảng 5). So sánh bên trong subclade 2.3.4.4, các virus subsubclade 2.3.4.4 a và 2.3.4.4 b có 2 sự thay đổi aa tại các vị trí kháng nguyên là T140M và I162M. Ngoài ra, chủng A/DK/Vietnam/QuangTri/14-A418/2014 (H5N6) và A/Dk/Vietnam/QuangNgai/14-A415/2014 (H5N6) thuộc subsubclade 2.3.4.4 a không có sự thay đổi tại D45 so với các virus clade 2.3.4,

trong khi tất cả các virus H5N6 khác thuộc sub-subclade 2.3.4.4 a và 2.3.4.4 b có sự thay đổi D45N (Bảng 4). Các chủng H5N6 của Việt Nam bao gồm cả subsubclade 2.3.4.4 a và 2.3.4.4 b không có sự thay đổi aa tại V210, trong khi các virus H5N6 của Lào có sự thay đổi V201E. Sự biến đổi aa tại các vị trí liên quan kháng nguyên trên protein HA có thể giúp cho virus thoát khỏi kháng thể trung hòa hiện có của vật chủ đối với các chủng virus trước đây và tiến hóa trở thành những biến chủng có tính chất kháng nguyên mới. Tuy nhiên sự khác biệt kháng nguyên dựa vào suy đoán từ những biến đổi về di truyền cần phải được kiểm chứng bằng các thí nghiệm phân tích kháng nguyên. Phương pháp ngăn trở ngưng kết hồng cầu (HI) là tiêu chuẩn vàng đã được nhiều phòng thí nghiệm trên khắp thế giới sử dụng để đánh giá đặc tính kháng nguyên của các chủng virus cúm trong nhiều thập kỷ qua.

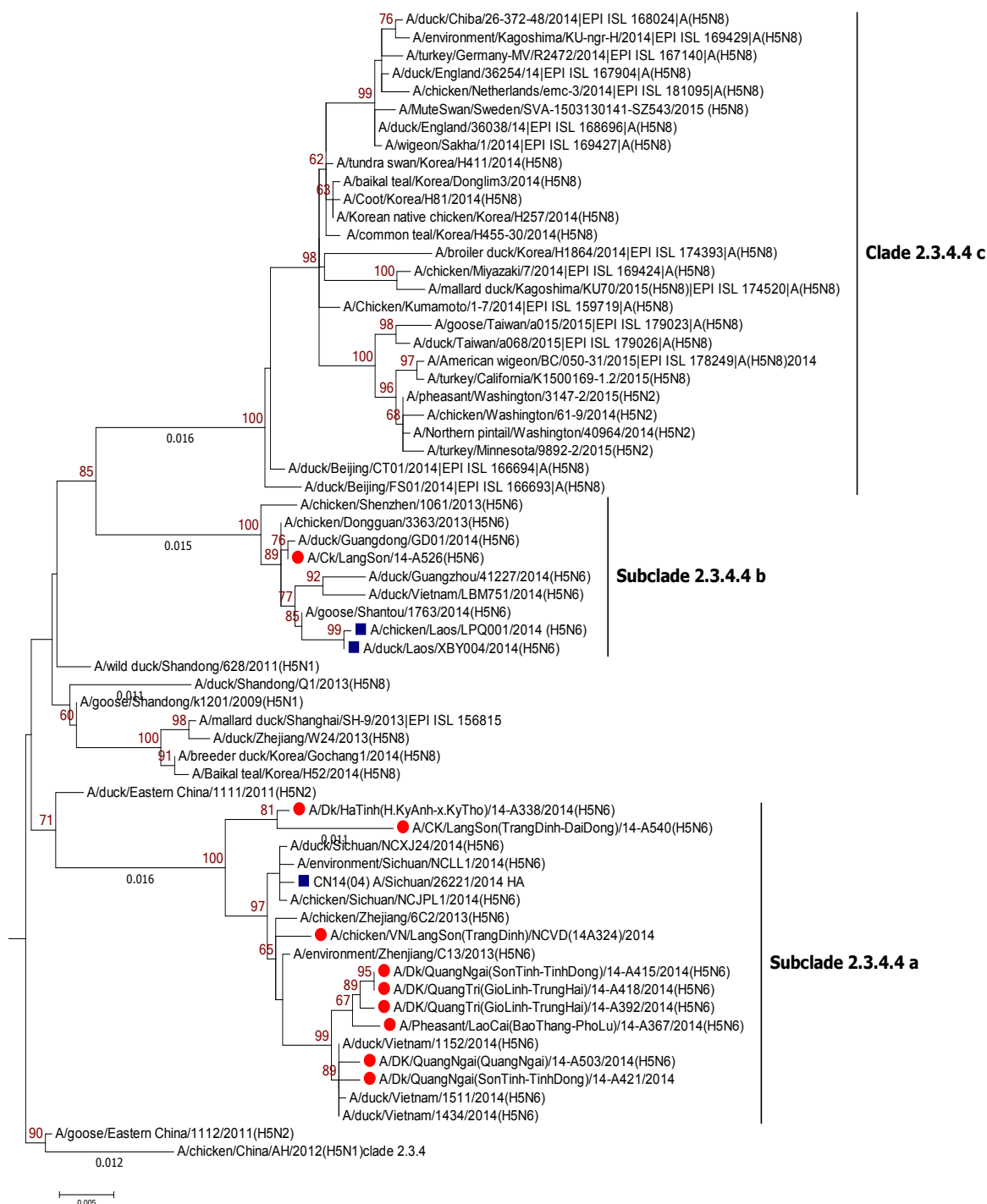
Bảng 3. Trình tự aa tại điểm phân cắt (Cleavage site) giữa HA1 và HA2 của các virus H5N6 Việt Nam, Trung Quốc và Lào

TT	KH PTN	Tên virus	Cleavage site	H5 clade
		Vị trí các aa tại điểm phân cắt (theo H5)	321, 322-----330	
1	-	A/Viet Nam/1203/2004(H5N1)	PQRERRRRKKR/	1
2	-	A/common magpie/Hong Kong/5052/2007(H5N1)	PQRERRRR-KR/	2.3.2.1
3	-	A/Hubei/1/2010(H5N1)	PQRERRRR-KR/	2.3.2.1 a
4	-	A/barn swallow/Hong Kong/1161/2010(H5N1)	PQIERRRRRKR/	2.3.2.1 b
5	-	A/Hong Kong/6841/2010(H5N1)	PQRERRRR-KR/	2.3.2.1 c
6	-	A/duck/Anhui/1/06	PLRERRRR-KR/	2.3.4
7	-	CN14(04)_A/Sichuan/26221/2014	PLREKRRR-KR/	2.3.4.4 a
8	14-A324	A/Ck/Vietnam/LangSon/14-A324/2014 (H5N6)	PLREKRRR-KR/	2.3.4.4 a
9	14-A338	A/Dk/Vietnam/HaTinh/14-A338/2014 (H5N6)	PLREKRRR-KR/	2.3.4.4 a
10	14-A367	A/Pheasant/Vietnam/LaoCai/14-A367/2014 (H5N6)	PLREKRRR-KR/	2.3.4.4 a
11	14-A392	A/Dk/Vietnam/QuangTri/14-A392/2014 (H5N6)	PLRERRRR-KR/	2.3.4.4 a
12	14-A415	A/Dk/Vietnam/QuangNgai/14-A415/2014 (H5N6)	PLREKRRR-KR/	2.3.4.4 a
13	14-A418	A/Dk/Vietnam/QuangTri/14-A418/2014 (H5N6)	PLREKRRR-KR/	2.3.4.4 a
14	14-A421	A/Dk/Vietnam/QuangNgai/14-A421/2014 (H5N6)	PLREKRRR-KR/	2.3.4.4 a
15	14-A526	A/Ck/Vietnam/LangSon/14-A526 (H5N6)	PLREKRRR-KR/	2.3.4.4 b
16	14-A503	A/Dk/Vietnam/QuangNgai/14-A503/2014 (H5N6)	PLREKRRR-RR/	2.3.4.4 a
17	14-A540	A/Ck/Vietnam/LangSon/14-A540/2014 (H5N6)	PLREKRRR-KR/	2.3.4.4 a
18	-	A/chicken/Laos/LPQ001/2014(H5N6)	PLREKRRR-KR/	2.3.4.4 b
19	-	A/duck/Laos/XBY004/2014(H5N6)	PLREKRRR-KR/	2.3.4.4 b



Biểu đồ 1. Cây hệ của các chủng virus cúm H5 Việt Nam 2014 và các chủng virus thuộc các clade khác nhau đã lưu hành ở Việt Nam

Các giá trị phía trên nhánh là giá trị Bootstrap 1000 lần, chỉ hiển thị các giá trị ≥ 60
 Các giá trị phía dưới nhánh là độ dài của nhánh, chỉ hiển thị các giá trị $\geq 0,01$



Biểu đồ 2. Cây hệ của các chủng virus cúm H5N6, clade 2.3.4.4 ở Việt Nam 2014

● Các chủng virus H5N6 Việt Nam 2014

■ Các chủng virus H5N6 Lào và Trung Quốc 2014

Các giá trị phía trên nhánh là giá trị Bootstrap 1000 lần, chỉ hiển thị các giá trị ≥ 60

Các giá trị phía dưới nhánh là độ dài của nhánh, chỉ hiển thị các giá trị $\geq 0,01$

Bảng 4. So sánh khác biệt aa tại các vị trí kháng nguyên^a trên HA của virus cúm A/H5N6 và virus vacxin ở Việt Nam 2013-2014

TT	Virus	Clade	Vi trí amino acid ^b																				
			C	A			RBS	A			B			D			252	263	282				
				71	83	86		94	120	124	133	140	141	154	156	162				174	175	184	210
1			45	71	83	86	94	120	124	133	140	141	154	156	162	174	175	184	210	227	252	263	282
2	NIBRG-14 H5N1	1	D	-	-	V	D	-	S	S	K	S	N	T	R	V	-	-	-	E	-	-	M
3	Re-6 H5N1	2.3.2.1b	-	-	-	-	-	D	D	A	N	S	D	A	K	V	-	-	-	-	-	-	M
4	Re-5 H5N1	2.3.4	D	-	-	-	-	-	D	S	K	-	-	T	R	-	-	-	-	-	-	A	-
5	A/Sichuan/26221/2014 (H5N6) ^c	2.3.4.4 a	N	I	A	A	N	S	N	A	T	P	N	A	I	I	L	A	V	D	Y	T	I
6	14-A324(H5N6)	2.3.4.4 a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	14-A338 (H5N6)	2.3.4.4 a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	14-A367 (H5N6)	2.3.4.4 a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	14-A392 (H5N6)	2.3.4.4 a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	14-A415 (H5N6)	2.3.4.4 a	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	14-A418 (H5N6)	2.3.4.4 a	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	14-A421 (H5N6)	2.3.4.4 a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	14-A503(H5N6)	2.3.4.4 a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	14-A540 (H5N6)	2.3.4.4 a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	A/chicken/Laos /LPQ001/2014 (H5N6)	2.3.4.4 b	-	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	M	-	-	-	E	-	-	-	-
16	14-A526(H5N6)	2.3.4.4 b	-	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-

Vị trí amino acide có liên quan đến kháng nguyên theo (Cai et al. (2012))

Vị trí amino acid được đánh số theo trình tự HA H5 và tương ứng với các vùng kháng nguyên A, B, C hoặc D và các vị trí bám thụ thể RBS theo HA H3

Chủng virus H5N6 của Trung Quốc (A/Sichuan/26221/2014 (H5N6)) được dùng để làm tham chiếu so sánh

3.4 Đánh giá chỉ số độc lực

Thí nghiệm được tiến hành trên 10 gà không có kháng thể kháng virus cúm gia cầm. Kết quả là tất cả gà đều có biểu hiện bệnh và chết trong thời gian 1-2 ngày sau khi công cường độc

virus H5N6 qua tĩnh mạch, toàn bộ 10/10 gà đã chết vào ngày thứ 3, chỉ số độc lực IVPI của virus được tính toán là 2,84 (Bảng 5). Theo OIE (2015), virus cúm gia cầm có chỉ số IVPI > 1,2 là virus thuộc thể độc lực cao.

Bảng 5. Kết quả đánh giá chỉ số độc lực IVPI trên gà

Số gà	Hiệu giá kháng thể HI (log2)			Điểm lâm sàng hàng ngày (1: ốm; 2: ốm nặng; 3: chết)										
	Ngày 0			Ngày sau công cường độc										Chỉ số độc lực IVPI
	VN 1203 clade 1	Anhui clade 2.3.4	Hubei clade 2.3.2.1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	0	0	0	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2,70
2	0	0	0	0	2	3	3	3	3	3	3	3	3	2,60
3	0	0	0	0	2	3	3	3	3	3	3	3	3	2,60
4	0	0	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3,00
5	0	0	0	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2,90
6	0	0	0	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2,70
7	0	0	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3,00
8	0	0	0	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2,90
9	0	0	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3,00
10	0	0	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3,00
Chỉ số độc lực IVPI trung bình														2,84

IVPI: intravenous pathogenicity index

IV. KẾT LUẬN

Virus cúm gia cầm H5N6 lần đầu tiên được phát hiện gây bệnh trên gia cầm tại tỉnh Lạng Sơn, Việt Nam vào tháng 4 năm 2014. Sự lưu hành của virus đã được phát hiện ở một số tỉnh thành như Lạng Sơn, Lào Cai, Phú Thọ, Hà Tĩnh, Quảng Trị, Quảng Nam và Quảng Ngãi thuộc Miền Bắc và Miền Trung Việt Nam từ tháng 4 - 12 năm 2014, nhưng chúng chưa xuất hiện ở các tỉnh phía Nam.

Tất cả các virus cúm gia cầm H5N6 từ các ổ dịch ở Việt Nam trong năm 2014 đều là virus cúm gia cầm độc lực cao, có chỉ số độc lực IVPI là 2,84 và đều thuộc subclade 2.3.4.4, là

subclade thứ 4 trong clade 2.3.4, bên cạnh các subclade 2.3.4.1, 2.3.4.2 và 2.3.4.3. Các virus H5N6, clade 2.3.4.4 Việt Nam được chia thành 2 nhánh chính là nhánh virus giống với chủng A/Sichuan/26221/2014 (H5N6) của Trung Quốc và nhánh virus giống với chủng A/chicken/Laos/LPQ001/2014 của Lào. Trong nghiên cứu này, 2 nhánh virus đã được đặt tên lần lượt là 2.3.4.4 a (Trung Quốc) và 2.3.4.4 b (Lào) theo tiêu chí định nghĩa clade của Nhóm nghiên cứu tiến hóa virus cúm H5N1 WHO/OIE/FAO.

Các virus H5N6, subclade 2.3.4.4 Việt Nam có ít khác biệt nhất so với chủng vaccin Re-5 (clade 2.3.4) tại các vị trí amino acid liên quan đến kháng nguyên trên HA, tiếp đến là chủng

vacxin Re-6 (clade 2.3.2.1) và NIBRG-14 (clade 1). Do vậy vacxin Re-5 có thể là phù hợp nhất để sử dụng phòng bệnh do virus H5N6 trên gia cầm.

Tính đặc hiệu với thụ thể bám gia cầm của các virus H5N6 Việt Nam là không thay đổi, do đó chúng chưa có khả năng lây truyền trực tiếp từ người sang người.

Sự xuất hiện của chủng virus cúm gia cầm độc lực cao subtype H5N6, clade 2.3.4.4 là một thách thức mới trong công tác phòng chống dịch cúm gia cầm tại Việt Nam vì chúng là chủng virus có protein H5 có thể kết hợp với nhiều subtype NA khác nhau. Trong quá trình kết hợp đó, sự cân bằng giữa các hoạt động của HA và NA có thể tạo ra những tổ hợp HA và NA mới có khả năng lây nhiễm vượt qua hàng rào loài. Do vậy, cần tiếp tục các chương trình giám sát để theo dõi sự lây lan, tiến hóa và thay đổi phạm vi vật chủ của các virus H5, clade 2.3.4.4 nói chung và các virus H5N6 nói riêng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Dung Nguyen, T., Vinh Nguyen, T., Vijaykrishna, D., Webster, R.G., Guan, Y., Malik Peiris, J.S., Smith, G.J., 2008. Multiple sublineages of influenza A virus (H5N1), Vietnam, 2005-2007. *Emerg Infect Dis* 14, 632-636.
- Gu, M., Zhao, G., Zhao, K., Zhong, L., Huang, J., Wan, H., Wang, X., Liu, W., Liu, H., Peng, D., Liu, X., 2013. Novel variants of clade 2.3.4 highly pathogenic avian influenza A(H5N1) viruses, China. *Emerg Infect Dis* 19, 2021-2024.
- Lee, Y.J., Kang, H.M., Lee, E.K., Song, B.M., Jeong, J., Kwon, Y.K., Kim, H.R., Lee, K.J., Hong, M.S., Jang, I., Choi, K.S., Kim, J.Y., Lee, H.J., Kang, M.S., Jeong, O.M., Baek, J.H., Joo, Y.S., Park, Y.H., Lee, H.S., 2014. Novel reassortant influenza A(H5N8) viruses, South Korea, 2014. *Emerg Infect Dis* 20, 1087-1089.
- Nguyen, T., Rivaller, P., Davis, C.T., Hoang, T., Balish, A., Dang, N.H., Jones, J., Vui, D.T., Simpson, N., Huong, N.T., Shu, B., Loughlin, R., Ferdinand, K., Lindstrom, S.E., York, I.A., Klimov, A., Donis, R.O., 2012. Evolution of highly pathogenic avian influenza (H5N1) virus populations in Vietnam between 2007 and 2010. *Virology* 432, 405-416.
- Wan, X.F., Nguyen, T., Davis, C.T., Smith, C.B., Zhao, Z.M., Carrel, M., Inui, K., Do, H.T., Mai, D.T., Jadhao, S., Balish, A., Shu, B., Luo, F., Emch, M., Matsuoka, Y., Lindstrom, S.E., Cox, N.J., Nguyen, C.V., Klimov, A., Donis, R.O., 2008. Evolution of highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses in Vietnam between 2001 and 2007. *PLoS One* 3, e3462.
- WHO 2014b. WHO China statement on H5N6.
- WHO 2015a. Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A(H5N1) reported to WHO, 2003-2015.
- WHO/OIE/FAO, 2014. Revised and updated nomenclature for highly pathogenic avian influenza A (H5N1) viruses. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 8, 384-388.
- Wong, F.Y., Phommachanh, P., Kalpravidh, W., Chanthavisouk, C., Gilbert, J., Bingham, J., Davies, K.R., Cooke, J., Eagles, D., Phiphakhavong, S., Shan, S., Stevens, V., Williams, D.T., Bounma, P., Khambounheuang, B., Morrissy, C., Douangngeun, B., Morzaria, S., 2015. Reassortant highly pathogenic influenza A(H5N6) virus in Laos. *Emerg Infect Dis* 21, 511-516.
- Zhao, G., Gu, X., Lu, X., Pan, J., Duan, Z., Zhao, K., Gu, M., Liu, Q., He, L., Chen, J., Ge, S., Wang, Y., Chen, S., Wang, X., Peng, D., Wan, H., Liu, X., 2012. Novel reassortant highly pathogenic H5N2 avian influenza viruses in poultry in China. *PLoS One* 7, e46183.

Nhận ngày 20-10-2015

Phản biện ngày 10-11-2015