

Nghiên cứu khoa học

SỰ LƯU HÀNH VÀ BIẾN ĐỔI DI TRUYỀN CỦA VIRUS CÚM GIA CẦM TYPE A/H5N6 TẠI TỈNH TRÀ VINH, ĐỒNG THÁP VÀ KIÊN GIANG

Trương Thành Sĩ¹, Tiền Ngọc Tiên², Lý Thị Liên Khai¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành nhằm xác định sự lưu hành và biến đổi di truyền của virus cúm gia cầm type A/H5N6 tại 3 tỉnh Trà Vinh, Đồng Tháp và Kiên Giang. 432 mẫu swab hầu-họng được thu thập từ gà, vịt bán tại các điểm buôn bán, thu gom gia cầm tại 12 chợ thuộc 12 huyện của 3 tỉnh khảo sát, trung bình 36 mẫu/huyện. Bằng phương pháp realtime RT-PCR, những mẫu dương tính với virus cúm type A được kiểm tra subtype H5 và N6. Các mẫu sau khi được xác định có kết quả dương tính với virus cúm gia cầm type A/H5N6 được chọn để giải trình tự gen H5 và xây dựng cây phả hệ của các chủng virus cúm A/H5N6 để so sánh với các chủng tham chiếu trên GenBank. Kết quả nghiên cứu cho thấy có sự lưu hành của virus cúm gia cầm type A/H5N6 trong quần thể gà, vịt tại tỉnh Trà Vinh và Kiên Giang với tỷ lệ thấp là 1,39%. Tỷ lệ lưu hành của virus cúm gia cầm type A/H5N6 ở gà là 1,54% và ở vịt là 1,16%. Kết quả phân tích sự biến đổi nucleotide ở gà và vịt tại tỉnh Trà Vinh cho thấy sự tương đồng nucleotide giữa các chủng virus đang lưu hành tại tỉnh này (95,32%) và sự sai khác về amino acid so với các chủng virus khác ở Việt Nam và các chủng trên thế giới là 1,9- 12,2%. Các chủng virus cúm type A/H5N6 phân lập tại tỉnh Trà Vinh thuộc clade 2.3.4.4c và nằm trong nhánh phát sinh cùng với các chủng virus phân lập được trên vịt và vịt xiêm tại Việt Nam năm 2017-2019 và chủng virus phân lập trên ngỗng tại Trung Quốc năm 2016.

Từ khóa: Sự lưu hành, đặc tính di truyền, virus cúm type A/H5N6, gà, vịt, Trà Vinh, Đồng Tháp, Kiên Giang.

Circulation and genetic variation of type A/H5N6 avian influenza virus in poultry in Tra Vinh, Dong Thap and Kien Giang provinces

Truong Thanh Si, Tien Ngoc Tien, Ly Thi Lien Khai

SUMMARY

The study was conducted to determine the circulation and genetic variation of type A/H5N6 avian influenza virus in Tra Vinh, Dong Thap, and Kien Giang provinces. A total of 432 oropharyngeal swab samples were collected from chickens and ducks in 12 poultry markets of 12 districts in 3 studied provinces, average of 36 samples per district. By realtime RT-PCR method, the positive samples of type A were tested for subtypes H5 and N6. These positive samples of type A H5N6 avian influenza virus were selected for sequencing H5 gene, and was built a phylogenetic tree of type A/H5N6 virus for comparison with the reference strains in GenBank. The studied results showed that the circulation of type A/H5N6 avian influenza virus in chicken and duck populations in Tra Vinh and Kien Giang provinces appeared at low rate (1.39%). The circulation rate of type A/H5N6 avian influenza virus in chickens was 1.54% and in ducks was 1.16%. The result of nucleotide genetic variation analysis showed that the nucleotide similarity among type A/H5N6 avian influenza virus circulating in chicken and duck strains in Tra Vinh province was 95.32% and the amino acid difference between other reported strains in Viet Nam and in the world was 1.9 - 12.2%. The type A/H5N6 avian influenza virus strains circulating in Tra Vinh province belonged to the clade 2.3.4.4c and in the same phylogenetic branch with A/H5N6 influenza virus strains isolated in Viet Nam in 2017-2019 and isolated in China in 2016.

Keywords: Circulation, genetic characteristics, type A/H5N6 influenza virus, chicken, duck, Tra Vinh, Dong Thap, Kien Giang provinces.

¹ Bộ môn Thú y, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

² Chi cục Thú y vùng VII

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cúm gia cầm (Avian influenza) là một bệnh do virus cúm gia cầm type A, thuộc họ *Orthomyxoviridae* gây ra (Lamb và Krug, 1996). Virus cúm được phân làm hai loại là có độc lực cao (HPAI - High pathogenic Avian influenza) và có độc lực thấp (LPAI - Low pathogenic Avian influenza). Đây là nhóm virus có biên độ vật chủ rộng, được phân chia thành nhiều subtype khác nhau dựa trên hai kháng nguyên bề mặt capsid của hạt virus là HA và NA (De Wit và Fouchier, 2008). Nhóm virus cúm A có 18 subtype HA từ H1 đến H18 và 11 subtype NA từ N1 đến N11. Sự tổ hợp giữa các subtype HA và NA sẽ tạo ra nhiều subtype khác nhau. Mặt khác, virus cúm A có đặc tính quan trọng là dễ dàng đột biến trong gen NA và HA hoặc trao đổi các gen với nhau, trong quá trình xâm nhiễm và tồn tại lây truyền giữa các loài vật chủ, dẫn đến việc tạo nên nhiều subtype có độc tính và khả năng gây bệnh khác nhau (Nguyễn Bá Hiên và ctv, 2014).

Kể từ năm 2014, HPAI type A/H5N6 là nguyên nhân gây ra các đợt bùng phát dịch trên diện rộng ở các loài chim trên khắp Trung Quốc, Nhật Bản và Đông Nam Á. Năm 2018, các đợt dịch bùng phát lớn ở chim đã được báo cáo từ Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc, Đài Loan, Hồng Kông và Việt Nam. Philippines cũng đã báo cáo về H5N6 ở gia cầm (OIE, 2018). Virus này có khả năng gây bệnh cao ở chim và đã được phân lập từ cả gia cầm và chim hoang dã.

Tháng 4 năm 2014, Tổ chức Y tế thế giới lần đầu tiên báo cáo một trường hợp người nhiễm virus cúm gia cầm type A/H5N6 ở Trung Quốc (WHO, 2014). Tính đến ngày 24 tháng 12 năm 2019, tổng số 24 trường hợp nhiễm cúm gia cầm type A/H5N6 ở người đã được báo cáo từ 10 tỉnh khác nhau trên khắp Trung Quốc. Bốn trong số những trường hợp này là ở trẻ em, 2 trong số đó chỉ bị bệnh nhẹ. Trong số 20 trường hợp người lớn còn lại, tất cả đều mắc bệnh nặng và ít nhất 15 trường hợp tử vong (WHO, 2019).

Ở nước ta, chỉ trong tháng 1 năm 2021, cả nước đã xảy ra 40 ổ dịch cúm gia cầm tại 14 tỉnh, thành phố, buộc phải tiêu hủy trên 100.000 con gia cầm. Nguy cơ dịch cúm gia cầm type A/H5N1 và type A/H5N6 tiếp tục lây lan và xảy ra trên phạm vi rộng là rất cao. Tại tỉnh Trà Vinh, Đồng Tháp và Kiên Giang, do đặc thù địa hình, tổng đàn gia cầm lớn cũng như tập quán chăn nuôi truyền thống là một trong những điều kiện góp

phần cho dịch cúm gia cầm, đặc biệt là chủng virus cúm gia cầm type A/H5N6 có cơ hội bùng phát. Trước tình hình đó, cần có những nghiên cứu sâu rộng hơn để nhà khoa học và người nông dân có thể từng bước nắm rõ căn nguyên, sự phân bố cũng như sự biến đổi di truyền của virus cúm gia cầm type A/H5N6 đang lưu hành tại địa phương. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định sự lưu hành và biến đổi di truyền của virus cúm gia cầm type A/H5N6 trên đàn gia cầm tại các địa phương ở tỉnh Trà Vinh, Đồng Tháp và Kiên Giang.

II. NỘI DUNG, NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Khảo sát sự lưu hành của virus cúm gia cầm type A/H5N6 tại tỉnh Trà Vinh, Đồng Tháp và Kiên Giang

- Khảo sát sự biến đổi di truyền của virus cúm gia cầm type A/H5N6 lưu hành tại tỉnh Trà Vinh, Đồng Tháp và Kiên Giang.

2.2. Nguyên liệu

Nghiên cứu được tiến hành từ tháng 10 năm 2020 đến tháng 6 năm 2022 tại tỉnh Trà Vinh, Đồng Tháp, Kiên Giang; mẫu được phân tích tại Chi cục Thú y vùng VII và trường Đại học Cần Thơ.

Đối tượng nghiên cứu là gà, vịt được bán tại các chợ, điểm buôn bán, thu gom gia cầm thuộc 3 tỉnh Trà Vinh, Đồng Tháp và Kiên Giang. Số lượng mẫu dịch hầu-họng lấy khảo sát là 30 con gia cầm trên một chợ hoặc điểm buôn bán hoặc điểm thu gom gia cầm trên một lần lấy mẫu và được gộp thành 6 mẫu xét nghiệm (gộp 5 con theo loài gia cầm). Mỗi tỉnh tiến hành lấy mẫu tại 4 huyện khác nhau gồm 1 chợ hoặc 1 điểm buôn bán hoặc 1 điểm thu gom gia cầm x 6 lần lặp lại (tổng số tối thiểu là 36 mẫu/huyện).

Hai chủng A/Chicken/VN/TV1483/2020/H5N6 và A/Duck/VN/TV2783/2020/H5N6 phân lập được tại tỉnh Trà Vinh và 15 chủng virus cúm gia cầm type A/H5N6 tham chiếu trên Ngân hàng Gen.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Lấy mẫu

Phương pháp lấy mẫu swab hầu-họng của gà, vịt dựa theo hướng dẫn của QCVN 01-83:2011/

BNNPTNT. Dùng tấm bông vô trùng ngoáy lấy dịch hầu-họng của từng con gia cầm cần xét nghiệm. Mỗi con gia cầm lấy 1 mẫu dịch ngoáy hầu-họng. Gộp 5 tấm bông đã lấy dịch hầu-họng của 5 con gia cầm lại thành 1 mẫu gộp cho vào cùng một ống đựng mẫu đã có dung dịch bảo quản virus cúm.

2.3.2. Realtime RT - PCR

Mẫu sau khi lấy về sẽ được xử lý và tiến hành chiết tách RNA của virus bằng bộ kit Qiagen® Rneasy extraction.

Thành phần của hỗn hợp nguyên liệu (Master mix) của phản ứng realtime RT-PCR xác định virus cúm type A, subtype H5 và subtype N6 được thực hiện theo hướng dẫn của Cục Thú y năm 2014. Sau khi chuẩn bị xong hỗn hợp Master mix, đặt tube chứa hỗn hợp vào máy nhân gen chạy theo chương trình nhiệt đã được cài đặt trên máy theo từng type, phân type cần xác định. Quá trình này được tiến hành theo trình tự: thực hiện phản ứng realtime RT-PCR phát hiện virus cúm type A, khi có mẫu dương tính với virus cúm type A thì mới tiếp tục kiểm tra phân type H5 và N6 (Cục Thú y, 2014).

Điều kiện phản ứng được công nhận: Mẫu đối chứng dương tính (chuẩn độ trước) có giá trị Ct ≤ 25 (± 2 Ct), mẫu đối chứng âm tính không có Ct (chu kỳ ngưỡng). Tất cả các đường cong biểu diễn số lượng đơn vị huỳnh quang phải có dạng đường chuẩn. Mẫu có giá trị Ct ≤ 35 được coi là dương tính. Mẫu không có Ct là âm tính. Mẫu có giá trị $35 < Ct \leq 40$ được coi là nghi ngờ (Cục Thú y, 2014).

2.3.3. Giải trình tự và phân tích trình tự gen HA của virus cúm gia cầm type A/H5N6

Các mẫu sau khi được xác định có kết quả dương tính với virus cúm gia cầm type A/H5N6 bằng phương pháp realtime RT-PCR sẽ được chọn để thực hiện khuếch đại gen HA. Sau quá trình khuếch đại gen, điện di trên thạch agarose 2% để kiểm tra kích thước sản phẩm khuếch đại. Chọn những mẫu có sản phẩm khuếch đại gen HA có kích thước đúng theo thiết kế (1.000bp) gửi giải trình tự gen tại Công ty TNHH Nam Khoa.

Khi đã có kết quả giải trình tự gen HA, sử dụng phần mềm MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) để phân tích, so sánh, đối chiếu các điểm tương

đồng, không tương đồng trong chuỗi nucleotide của đoạn gen HA nhằm xác định sự biến đổi của virus cúm gia cầm type A/H5N6 đang lưu hành trên gia cầm ở các địa điểm trong nghiên cứu này với các chủng tham chiếu trên Ngân hàng Gen.

2.3.4. Xây dựng cây phả hệ từ các chủng virus cúm gia cầm type A/H5N6

Xây dựng cây phả hệ trên cơ sở trình tự gen HA của virus cúm gia cầm type A/H5N6 hoàn chỉnh thu được bằng phần mềm MEGA X với giá trị bootstrap là 1.000 lần lặp lại. Ngoài các chủng virus cúm gia cầm type A/H5N6 thu được, nghiên cứu sẽ tiến hành chọn thêm một số các chủng virus cúm gia cầm type A/H5N6 đã công bố ở Việt Nam và một số nước ở châu Á.

2.3.5. Xử lý số liệu

Số liệu thô về mẫu được xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel 2016. Số liệu cần phân tích để so sánh: nếu giá trị kỳ vọng ≥ 5 , xử lý số liệu bằng phương pháp Chi-square, Minitab 16.0; nếu giá trị kỳ vọng ≥ 2 và < 5 , xử lý số liệu bằng phương pháp Chi-square Yates test, Excel 2016; nếu giá trị kỳ vọng < 2 , xử lý số liệu bằng phương pháp Fisher's exact test. So sánh đối chiếu và xử lý số liệu các chuỗi nucleotide bằng chương trình MEGA X.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả khảo sát sự lưu hành của virus cúm gia cầm type A/H5N6 trên gia cầm tại tỉnh Trà Vinh, Đồng Tháp và Kiên Giang

Kết quả khảo sát tại 3 tỉnh Trà Vinh, Đồng Tháp và Kiên Giang thu được 6 mẫu dương tính với subtype N6 nên tỷ lệ lưu hành của virus cúm type A/H5N6 cũng là 1,39%. Kết quả cho thấy có sự lưu hành của virus cúm gia cầm type A/H5N6 trong quần thể gia cầm tại 3 tỉnh nghiên cứu với tỷ lệ thấp. Điều này có thể do đặc điểm tình hình dịch bệnh, vùng địa lý và công tác phòng chống dịch bệnh tại 3 tỉnh nghiên cứu rất có hiệu quả. Trong đó, Trà Vinh, Kiên Giang là 2 tỉnh có sự lưu hành của virus cúm type A/H5N6 với tỷ lệ lần lượt là 2,78% và 1,39%; không phát virus cúm type A/H5N6 tại tỉnh Đồng Tháp.

Bảng 1. Tỷ lệ lưu hành của virus cúm type A/H5N6 trên gia cầm tại tỉnh Trà Vinh, Đồng Tháp và Kiên Giang

Tỉnh	SMXN	Số mẫu dương tính							
		Type A	Tỷ lệ (%)	H5	Tỷ lệ (%)	N6	Tỷ lệ (%)	H5N6	Tỷ lệ (%)
Trà Vinh	144	90	62,50	16	11,11	4	2,78	4	2,78
Kiên Giang	144	93	64,58	23	15,97	2	1,39	2	1,39
Đồng Tháp	144	98	68,06	18	12,50	0	0,00	0	0,00
					P>0,05				P>0,05
Tổng	432	281	65,05^a	57	13,19^b	6	1,39	6	1,39^c

Ghi chú: SMXN: Số mẫu xét nghiệm

Kết quả cho thấy tại 2 tỉnh Trà Vinh và Kiên Giang không chỉ có riêng virus cúm type A/H5N6 đang lưu hành trên đàn gia cầm. Cụ thể là trong 432 mẫu xét nghiệm, có 281 mẫu dương tính với virus cúm type A (chiếm tỷ lệ 65,05%) nhưng chỉ có 57 mẫu dương tính với subtype H5 (chiếm tỷ lệ 13,19%), trong khi đó tỷ lệ dương tính với subtype N6 chỉ chiếm 1,39% và khác biệt này rất có ý nghĩa thống kê với $P=0,000$. Điều này có thể là do nhóm virus cúm type A có 18 subtype HA từ H1-H18 và 11 subtype NA từ N1-N11 và sự kết hợp giữa các subtype HA - NA sẽ tạo ra nhiều subtype khác nhau về độc tính cũng như khả năng gây bệnh (Tong *et al.*, 2013; Howley và Knipe, 2020) nên có kết quả chênh lệch trên (bảng 1). Kết quả nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu gần đây của Le *et al.* (2022) khi tiến hành giám sát đàn gia cầm tại các hộ

chăn nuôi gà thả vườn, trại chăn nuôi an toàn sinh học, chợ và các điểm thu gom gia cầm sống ở Nam Định, Lạng Sơn, Huế, Vĩnh Long, Đồng Tháp, An Giang, Bạc Liêu, Cà Mau từ năm 2009 – 2019, cho biết trên đàn gia cầm nuôi ở Việt Nam hiện nay lưu hành nhiều chủng virus cúm gia cầm như H3N2, H3N6, H4N6, H5N1, H5N2, H5N6, H6N6, H7N7, H9N2, H9N6, H10N3, H10N6, H11N6 và một số chủng khác. Do đó, mặc dù tỷ lệ lưu hành của virus cúm type A/H5N6 trên gia cầm tại tỉnh Trà Vinh, Đồng Tháp và Kiên Giang là tương đối thấp nhưng vẫn là mối nguy tiềm tàng khi chúng có thể dễ dàng tái tổ hợp lại tạo thành các chủng mới có khả năng lây nhiễm cao hơn.

Kết quả khảo sát sự lưu hành của virus cúm gia cầm type A/H5N6 theo đối tượng nghiên cứu được thể hiện qua bảng 2.

Bảng 2. Kết quả khảo sát sự lưu hành của virus cúm gia cầm type A/H5N6 trên gà, vịt tại tỉnh Trà Vinh, Đồng Tháp và Kiên Giang

Loài gia cầm	SMXN	Số mẫu dương tính							
		Type A	Tỷ lệ (%)	H5	Tỷ lệ (%)	N6	Tỷ lệ (%)	H5N6	Tỷ lệ (%)
Gà	259	165	63,71	33	12,74	4	1,54	4	1,54
Vịt	173	116	67,05	24	13,87	2	1,16	2	1,16
			P>0,05		P>0,05				P>0,05
Tổng	432	281	65,05	57	13,19	6	1,39	6	1,39

Ghi chú: SMXN: Số mẫu xét nghiệm

Kết quả nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ dương tính với virus cúm gia cầm type A/H5N6 trên gà là 1,54% và trên vịt là 1,16%; không khác nhau

với $P(H_0) = 0,931$; do đó giữa 2 đối tượng này khả năng nhiễm virus cúm A/H5N6 là như nhau. Nguyên nhân có thể do tập quán chăn nuôi gia

cầm ở các địa phương giống nhau (cách thức chăm sóc, chuồng trại, hình thức chăn thả, thức ăn, nước uống cũng như tập quán chăn thả chung cả gà và vịt ở nông hộ). Gà và vịt được nhốt chung với nhau ở các chợ, điểm buôn bán, điểm thu gom gia cầm có thể là nguyên nhân khiến cho tỷ lệ lưu hành của virus cúm gia cầm type A/H5N6 ở 2 loài này là như nhau. Song song đó, 3 tỉnh Trà Vinh, Đồng Tháp, Kiên Giang trong nghiên cứu đều thuộc khu vực đồng bằng sông Cửu Long, cùng chịu ảnh hưởng của khí hậu nhiệt đới gió mùa, có điều kiện giao thông đường thủy, cách thức vận chuyển, buôn bán hàng hóa, gia cầm là như nhau nên dẫn đến tỷ lệ lưu hành của virus cúm type A/H5N6 trên gà và vịt không có sự khác biệt.

3.2. Kết quả giải trình tự và phân tích trình tự gen HA của virus cúm gia cầm type A/H5N6 lưu hành trên gia cầm tại tỉnh Trà Vinh

Nhằm nghiên cứu trình tự gen H5 của virus cúm gia cầm type A/H5N6 đang lưu hành trong nghiên cứu, chúng tôi chọn 2 mẫu gồm 1 mẫu gà và 1 mẫu vịt phân lập tại tỉnh Trà Vinh được đặt tên là A/Chicken/VN/TV1483/2020/H5N6 và A/Duck/VN/TV2783/2020/H5N6 để tiến hành giải trình tự gen. Kết quả giải trình tự gen HA của 2 chủng virus phân lập được ở tỉnh Trà Vinh về trình tự nucleotide được thể hiện qua hình 1. Kết quả so sánh trình tự gen H5 của 2 chủng A/Chicken/VN/TV1483/2020/H5N6 và A/Duck/VN/TV2783/2020/H5N6 được thể hiện qua bảng 3.

Bảng 3. Kết quả so sánh sự sai khác về nucleotide trong đoạn gen H5 của virus cúm gia cầm type A/H5N6 giải trình tự được trên gia cầm ở tỉnh Trà Vinh

Ký hiệu 2 chủng so sánh	Nucleotide		Tỷ lệ tương đồng
	Nucleotide sai khác (*)	Vị trí sai khác	
A/Chicken/VN/TV1483/2020/H5N6 A/Duck/VN/TV2783/2020/H5N6	A↔G (26)		95,32%
		6; 30; 59; 69; 72; 81; 83; 109; 119; 274; 291; 347; 366; 390; 404; 424; 538; 540; 559; 568; 597; 603; 631; 711; 735; 785;	
	T↔C (5)	90	
		434	
		510	
		644	
		723	
	G↔C (2)	66	
		71	
	A↔C (2)	539	
		649	
	A↔T (1)	55	
	G↔T (1)	141	
Tổng vị trí sai khác		37	

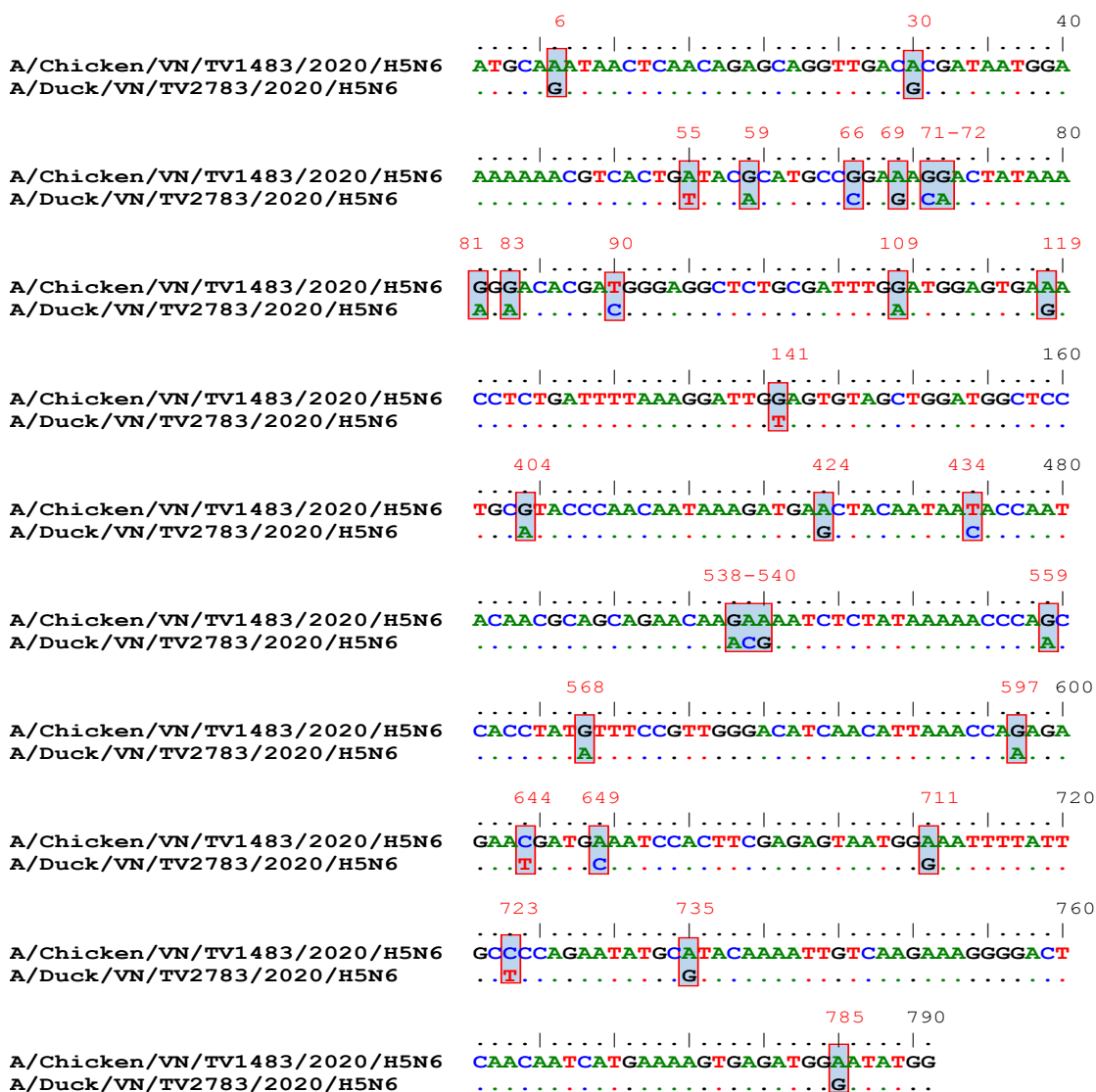
Ghi chú: (*) Số vị trí nucleotide sai khác, A: Adenine, G: Guanine, T: Thymine, C: Cytosine

Kết quả giải trình tự và phân tích chuỗi gen H5 của chủng A/Chicken/VN/TV1483/2020/H5N6 trên gà và A/Duck/VN/TV2783/2020/H5N6 trên vịt ở tỉnh

Trà Vinh đã thu nhận được chuỗi gen H5 có độ dài 791 nucleotide. Kết quả cho thấy có sự khác nhau về trình tự nucleotide trên gen H5 của 2 chủng virus phân

lập trên gà và vịt tại tỉnh Trà Vinh: A/Chicken/VN/TV1483/2020/H5N6 và A/Duck/VN/TV2783/2020/H5N6. Sự sai khác nucleotide xảy ra ở 37 vị trí (hình 1), các biến đổi nucleotide xảy ra chủ yếu ở loại hình A↔G có 26 vị trí nucleotide sai khác và T↔C có 5 vị trí sai khác (bảng 3); chiếm tỷ lệ sai khác 4,68%. Kết quả cho thấy tỷ lệ đồng nhất nucleotide giữa 2 chủng A/Chicken/VN/TV1483/2020/H5N6 và A/Duck/VN/TV2783/2020/H5N6 là 95,32%. Kết quả nghiên

cứ phù hợp với báo cáo của Phạm Ngọc Thạch và ctv (2016) khi nghiên cứu đặc tính di truyền của virus cúm gia cầm A/H5N6 tại một số tỉnh biên giới phía Bắc cho thấy mức độ tương đồng về trình tự nucleotide gen H5 giữa các chủng virus cúm gia cầm A/H5N6 phân lập được là 94,93-99,60%. Kết quả nghiên cứu cho thấy chủng virus cúm A/H5N6 được phát hiện trên gà có sự tương đồng cao với chủng virus cúm A/H5N6 lưu hành trên vịt.



Hình 1. Trình tự một số đoạn nucleotide sai khác trên gen H5 giữa 2 chủng phân lập được ở Trà Vinh

Để nhìn thấy rõ hơn sự biến đổi di truyền của 2 chủng phân lập được trong nghiên cứu, chọn thêm 20 trình tự gen HA của virus cúm

gia cầm A/H5N6 trên GenBank để tiến hành phân tích và so sánh sự sai khác ở cấp độ amino acid (bảng 4).

Bảng 4. Kết quả so sánh tỷ lệ phần trăm (trên đường chéo) và số lượng (dưới đường chéo) amino acid sai khác trên đoạn gen HA của virus cúm gia cầm type A/H5N6 giải trình tự được trong nghiên cứu và các chủng tham chiếu với chiều dài đoạn so sánh là 262 amino acid

Chủng virus H5N6	Tỷ lệ amino acid sai khác (%)																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1		4,8	12,1	8,2	7,9	8,3	8,2	12,2	8,6	8,4	11,5	8,6	8,9	8,0	8,6	6,1	9,4	5,2	3,9	4,1	4,1	3,9
2	13		10,5	6,9	6,7	7,1	6,9	10,9	7,3	7,2	10,0	7,3	7,6	6,8	7,6	4,7	8,2	3,7	2,4	1,9	1,9	1,9
3	32	28		6,0	6,0	6,1	6,0	0,4	6,7	6,5	1,0	6,9	7,2	6,1	7,2	8,0	7,5	8,2	8,7	9,5	9,5	9,3
4	21	18	16		0,5	0,9	0,0	6,1	1,1	1,0	5,2	1,4	1,9	0,6	1,7	3,0	2,4	3,6	4,7	5,5	5,5	5,2
5	21	17	16	1		0,6	0,5	6,1	0,6	0,5	5,2	1,1	1,7	0,4	1,4	2,7	2,2	3,3	4,4	5,2	5,2	4,9
6	22	19	16	2	2		0,9	6,3	1,3	1,1	5,3	1,5	2,0	0,5	1,8	3,1	2,6	3,7	4,8	5,6	5,6	5,3
7	21	18	16	0	1	2		6,1	1,1	1,0	5,2	1,4	1,9	0,6	1,7	3,0	2,4	3,6	4,7	5,5	5,5	5,2
8	32	29	1	16	16	16	16		6,8	6,7	1,4	7,1	7,3	6,3	7,3	8,2	7,6	8,3	8,9	9,7	9,7	9,4
9	22	19	17	3	2	3	3	18		0,1	5,9	1,8	2,3	1,0	2,0	3,3	2,8	4,0	5,1	5,9	5,9	5,6
10	22	19	17	3	1	3	3	17	0		5,7	1,7	2,2	0,9	1,9	3,2	2,7	3,9	4,9	5,7	5,7	5,5
11	30	26	3	14	14	14	14	4	15	15		6,1	6,4	5,3	6,4	7,5	6,7	7,6	8,2	9,0	9,0	8,7
12	22	19	18	4	3	4	4	19	5	4	16		1,8	1,3	0,5	3,3	2,3	4,0	5,1	5,9	5,9	5,6
13	23	20	19	5	4	5	5	19	6	6	17	5		1,8	2,0	4,1	0,5	4,5	5,3	5,6	5,6	5,9
14	21	18	16	2	1	1	2	16	3	2	14	3	5		1,5	2,8	2,3	3,5	4,5	5,3	5,3	5,1
15	22	20	19	4	4	5	4	19	5	5	17	1	5	4		3,6	2,6	4,3	5,3	6,1	6,1	5,9
16	16	12	21	8	7	8	8	21	9	8	20	9	11	7	9		4,7	1,4	2,4	3,2	3,2	3,0
17	25	21	20	6	6	7	6	20	7	7	17	6	1	6	7	12		5,1	5,9	6,1	6,1	6,4
18	14	10	21	9	9	10	9	22	10	10	20	10	12	9	11	4	13		1,3	2,3	2,3	1,8
19	10	6	23	12	12	13	12	23	13	13	21	13	14	12	14	6	15	3		1,0	1,0	0,5
20	11	5	25	14	14	15	14	25	15	15	24	15	15	14	16	8	16	6	3		0,0	0,5
21	11	5	25	14	14	15	14	25	15	15	24	15	15	14	16	8	16	6	3	0		0,5
22	10	5	24	14	13	14	14	25	15	14	23	15	15	13	15	8	17	5	1	1	1	

Ghi chú: (1) A/Chicken/VN/TV1483/2020(H5N6); (2) A/Duck/VN/TV2783/2020(H5N6); (3) A/muscovy duck/Quang Ninh/4c111/2013(H5N6); (4) A/Spotted dove/Vietnam/WBT191/2014(H5N6);(5) A/goose/Shantou/1763/2014(H5N6);(6) A/environment/Guangdong/PY955/2014(H5N6); (7) A/duck/Vietnam/LBM760/2014(H5N6); (8) A/duck/Vietnam/NCV/D14-A392/2014(H5N6); (9) A/chicken/Laos/LPQ001/2014(H5N6); (10) A/duck/Laos/LPQ002/2014(H5N6); (11) A/chicken/Sichuan/NCJPL1/2014(H5N6);(12) A/chicken/Vietnam/NCV/D-15A59/2015(H5N6);(13) A/chicken/Vietnam/NCV/D-15A55/2015(H5N6);(14) A/environment/Guangdong/HY243/2015(H5N6); (15) A/chicken/NhaTrang/129/2015(H5N6); (16) A/goose/Yangzhou/YZ587/2016(H5N6);(17) A/muscovy duck/Quang Ninh/254/2016(H5N6); (18) A/muscovy duck/Vietnam/HU7-20/2017(H5N6);(19) A/duck/Vietnam/HN5149/2018(H5N6); (20) A/Duck/VietNam/HU12-1305/2019(H5N6); (21) A/Duck/VietNam/HU12-1470/2019(H5N6); (22) A/Duck/VietNam/HU12-982/2019(H5N6).

Kết quả so sánh sự sai khác ở cấp độ amino acid cho thấy, số lượng amino acid các đoạn gen HA của 2 chủng virus cúm type A/H5N6 trong nghiên cứu và các chủng tham chiếu có sai khác thấp nhất là 5 amino acid và cao nhất là 32 amino acid; tương ứng với tỷ lệ sai khác từ 1,9 - 12,2%. Hay nói cách khác, đoạn gen HA của 2 chủng virus cúm type A/H5N6 phân lập được trên gia cầm trong nghiên cứu và các chủng tham chiếu có tỷ lệ tương đồng từ 87,8-98,1% (sai khác 5 - 32 amino acid). Trong đó, chủng virus A/Duck/

VietNam/HU12-1305/2019(H5N6), A/Duck/VietNam/HU12-1470/2019(H5N6), A/Duck/VietNam/HU12-982/2019(H5N6) gây bệnh trên vịt được phân lập tại Việt Nam năm 2019 có tỷ lệ tương đồng cao (98,1%; sai khác 5 amino acid) so với 2 chủng A/Chicken/VN/TV1483/2020/H5N6 trên gà và A/Duck/VN/TV2783/2020/H5N6 trên vịt ở tỉnh Trà Vinh trong nghiên cứu này. Kết quả phân tích cho thấy, có sự biến đổi amino acid trên đoạn gen H5 của 2 chủng virus cúm gia cầm type A/H5N6 trên gà và vịt tại Trà Vinh.

Bảng 5. Kết quả phân tích trình tự các amino acid trên đoạn gen H5 của virus cúm gia cầm type A/H5N6 giải trình tự được trên gia cầm ở tỉnh Trà Vinh và các chủng tham chiếu

Chủng virus H5N6	Vị trí liên kết thụ thể					
	133-137	158-160	187	193	196	225-228
	LGVSA	NDA	N	N	K	GQRG
A/Chicken/VN/TV1483/2020/H5N6	-	-	-	-	-	-
A/Duck/VN/TV2783/2020/H5N6	-	-	-	-	-	-
A/muscovy duck/Quang Ninh/4c111/2013(H5N6)	-	-	-	-	-	-
A/Spotted dove/Vietnam/WBT191/2014(H5N6)	-	-	-	-	-	-
A/goose/Shantou/1763/2014(H5N6)	-	-	-	-	-	-
A/environment/Guangdong/PY955/2014(H5N6)	-	-	-	-	-	-
A/duck/Vietnam/LBM760/2014(H5N6)	-	-	-	-	-	-
A/duck/Vietnam/NCVD14-A392/2014(H5N6)	-	-	D	-	-	-
A/chicken/Laos/LPQ001/2014(H5N6)	-	-	-	-	-	-
A/duck/Laos/LPQ002/2014(H5N6)	-	-	-	-	-	-
A/chicken/Sichuan/NCJPL1/2014(H5N6)	-	-	-	-	-	-
A/chicken/Vietnam/NCVD-15A59/2015(H5N6)	-	-	-	-	-	-
A/chicken/Vietnam/NCVD-15A55/2015(H5N6)	-	-	-	S	-	-
A/environment/Guangdong/HY243/2015(H5N6)	-	-	-	-	-	-
A/chicken/NhaTrang/129/2015(H5N6)	-	-	-	-	-	-
A/goose/Yangzhou/YZ587/2016(H5N6)	-	-	-	-	-	-
A/muscovy duck/Quang Ninh/254/2016(H5N6)	-	-	-	S	-	-
A/muscovy duck/Vietnam/HU7-20/2017(H5N6)	-	-	-	D	-	-
A/duck/Vietnam/HN5149/2018(H5N6)	-	-	-	D	-	-
A/Duck/VietNam/HU12-1305/2019(H5N6)	-	-	-	-	-	-
A/Duck/VietNam/HU12-1470/2019(H5N6)	-	-	-	-	-	-
A/Duck/VietNam/HU12-982/2019(H5N6)	-	-	-	D	-	-

Ghi chú: “-”: không biến đổi, A: Alanine, D: Asit aspartic, G: Glycine, K: Lysine, L: Leucin, N: Asparagine, Q: Glutamin, R: Arginin, S: Serin, V: Valine

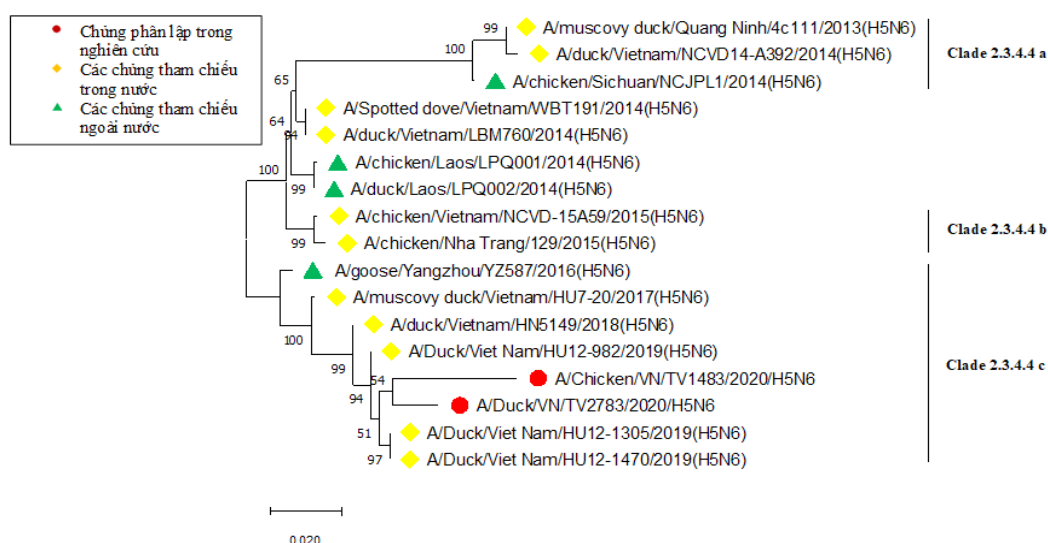
Kết quả phân tích cho thấy 2 chủng A/Chicken/VN/TV1483/2020/H5N6 và A/Duck/VN/

TV2783/2020/H5N6 trong nghiên cứu không có sự biến đổi tại các vị trí liên kết thụ thể của virus

cúm gia cầm type A/H5N6. Tuy nhiên, chủng A/Chicken/VN/TV1483/2020/H5N6 có sự biến đổi amino acid hoàn toàn so với các chủng tham chiếu tại vị trí 31I, 32R, 35E, 36R, 40G, 42D, 49D, 59W, 104K, 167N, 192E, 242E. Đối với chủng A/Duck/VN/TV2783/2020/H5N6, nghiên cứu nhận thấy có sự biến đổi amino acid hoàn toàn so với các chủng tham chiếu tại các vị trí 35E, 42D, 223I. Mặt khác, 2 chủng cũng có sự biến đổi giống với các virus A/Duck/VietNam/HU12-1305/2019(H5N6), A/Duck/VietNam/HU12-1470/2019(H5N6), A/Duck/VietNam/HU12-982/2019(H5N6) gây bệnh trên vịt được phân lập tại Việt Nam năm 2019 tại

các vị trí 16I, 18Q, 90P, 91H, 151L, 233Y. Kết quả cho thấy, trình tự amino acid trên đoạn gen H5 của 2 chủng virus cúm gia cầm type A/H5N6 trên gà và vịt tại Trà Vinh chỉ biến đổi tại các vị trí không đặc hiệu.

Sau khi so sánh mức độ tương đồng về nucleotide và amino acid giữa các chủng virus cúm gia cầm A/H5N6, chúng tôi tiếp tục xây dựng cây phả hệ để xác định nguồn gốc phát sinh của 2 chủng virus nghiên cứu. Kết quả phân tích nguồn gốc phát sinh của các chủng virus nghiên cứu được thể hiện tại hình 2.



Hình 2. Cây phả hệ của 2 chủng virus cúm gia cầm type A/H5N6 trong nghiên cứu và các chủng tham chiếu

Kết quả xây dựng cây phả hệ đã xác định chủng A/Chicken/VN/TV1483/2020/H5N6 phân lập trên gà và A/Duck/VN/TV2783/2020/H5N6 trên vịt ở tỉnh Trà Vinh thuộc phân nhánh 2.3.4.4c vì nằm cùng phân nhánh với chủng virus trên ngỗng tại Trung Quốc năm 2016: A/goose/Yangzhou/YZ587/2016(H5N6) và các chủng trên vịt: A/duck/Vietnam/HN5149/2018(H5N6), A/Duck/VietNam/HU12-1305/2019(H5N6), A/Duck/VietNam/HU12-1470/2019(H5N6), A/Duck/VietNam/HU12-982/2019(H5N6); vịt xiêm A/muscovy duck/Vietnam/HU7-20/2017(H5N6) tại Việt Nam năm 2017-2019.

IV. KẾT LUẬN

Có sự lưu hành của virus cúm gia cầm type A/H5N6 trên gà, vịt tại tỉnh Trà Vinh và Kiên Giang với tỷ lệ lưu hành thấp (1,39%) và tỷ lệ lưu hành của virus cúm gia cầm type A/H5N6 trên gà (1,54%) và vịt (1,16%) là như nhau.

Tỷ lệ tương đồng nucleotide giữa các chủng virus cúm gia cầm type A/H5N6 đang lưu hành tại tỉnh Trà Vinh là 95,32% và sự sai khác amino acid so với các chủng virus khác ở Việt Nam và các chủng trên thế giới là 1,9- 12,2%.

Các chủng virus cúm gia cầm type A/H5N6 lưu hành trên gà cầm ở Trà Vinh thuộc phân nhánh 2.3.4.4c.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. De Wit, E., and Fouchier, R. A., 2008. Emerging influenza. *Journal of Clinical Virology*, 41(1), 1-6.
2. Howley, M. and Knipe, D., 2020. Orthomyxoviruses. pp. 649–673. In: *Fields Virology: Emerging Viruses*, 7th ed., Wolters Kluwer: Philadelphia, PA, USA.
3. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.
4. Lamb, R. A., and Krug, R. M., 1996. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. In *Virology* (B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley, Eds., pp. 1353 – 1394. Raven Press, New York.
5. Le, K.T., Isoda, N., Nguyen, L.T., Chu, D.H., Van Nguyen, L., Phan, M.Q., Nguyen, D.T., Nguyen, T.N., Tien, T.N., Le, T.T. and Hiono, T., 2022. Risk profile of low pathogenicity avian influenza virus infections in farms in southern Vietnam. *Journal of Veterinary Medical Science*, pp.22-0011.
6. Nguyễn Bá Hiên, Phạm Sỹ Lăng, Nguyễn Thị Lan, Nguyễn Tùng, Đỗ Ngọc Thúy, Trần Quang Vui, Huỳnh Mỹ Lệ, Trịnh Đình Thâu, Lê Văn Phan, Phạm Đức Phúc và Phạm Thị Mỹ Dung, 2014. *Bệnh cúm ở người và động vật*. NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
7. OIE, 2018. Update on avian influenza H5 and H7 in animals, 2018. <https://www.oie.int/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2018>.
8. Phạm Ngọc Thạch, Nguyễn Thị Lan, Đào Lê Anh, 2017. Sự lưu hành và đặc tính di truyền của virus cúm gia cầm type A/H5N6 tại một số tỉnh biên giới phía Bắc Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và công nghệ Việt Nam* – tập 60, số 2: 2.2018.
9. QCVN 01- 83:2011/BNNT. Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về bệnh động vật – Yêu cầu chung lấy mẫu bệnh phẩm, bảo quản và vận chuyển. Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn. Ngày ban hành: 25/10/2011.
10. TCVN 8400-26:2014. Tiêu chuẩn quốc gia về bệnh động vật – Quy trình chẩn đoán – Phần 26: Bệnh Cúm gia cầm H5N1. Bộ Nông nghiệp và phát triển nông thôn, 2014.
11. Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, Yang H, Chen X, Recuenco S, Gomez J, Chen LM, Johnson A, Tao Y, Dreyfus C, Yu W, McBride R, Carney PJ, Gilbert AT, Chang J, Guo Z, Davis CT, Paulson JC, Stevens J, Rupprecht CE, Holmes EC, Wilson IA, Donis RO, 2013. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLOS Pathogens*. 9 (10): e1003657. doi:10.1371/journal.ppat.1003657.
12. World Health Organization, 2019. Influenza at the human-animal interface. 25 November 2019.
13. World Health Organization. WHO China statement on H5N6. 7 May 2014. <http://www.wpro.who.int/china/mediacentre/releases/2014/20140507/en/>

Ngày nhận 1-8-2022

Ngày phản biện 5-10-2022

Ngày đăng 1-11-2022