

## SỰ PHÁT SINH VIRUS CÚM A/H5N6 Ở VIỆT NAM

*Nguyễn Đăng Thọ<sup>1</sup>, Cán Xuân Minh<sup>3</sup>, Đỗ Thị Hoa<sup>1</sup>, Nguyễn Hoàng Đăng<sup>1</sup>,  
Đàm Thị Vui<sup>1</sup>, Mai Thùy Dương<sup>1</sup>, Nguyễn Việt Không<sup>2</sup>, Tô Long Thành<sup>1</sup>*

### TÓM TẮT

Dịch cúm gia cầm do virus H5N6 phát hiện ở Việt Nam vào tháng 4 năm 2014 tại Lạng Sơn và sau đó còn phát hiện ở nhiều tỉnh/thành khác thuộc miền Bắc và miền Trung. Lần đầu tiên dịch cúm gia cầm ở Việt Nam được phát hiện do 1 subtype khác, không phải H5N1 đã làm dấy lên những quan tâm về tỉ lệ nhiễm, nguồn gốc và sự tiến hóa của virus này. Trong 2 năm (2014-2015), chúng tôi đã thu thập và phân tích 18 mẫu virus cúm A/H5N6 từ các ổ dịch trên gia cầm ở các tỉnh thuộc Miền Bắc và Miền Trung. Các kết quả phân tích hệ cho thấy, các virus H5N6 Việt Nam có cùng kiểu phân nhánh ở tất cả các gene thành 2 dòng Tứ Xuyên và Giang Tây, Trung Quốc. Sự xuất hiện virus H5N6 là do sự tái tổ hợp của các virus cúm khác nhau, với gene HA từ virus cúm gia cầm cúm A/H5, clade 2.3.4.4, gene NA có nguồn gốc từ các virus cúm H6N6, các gene nội PB2, PB1, NP, PA, M, NS có nguồn gốc từ virus H5N1. Tuy nhiên, khác với các virus H5N6 dòng Tứ Xuyên, phần lớn các virus H5N6 dòng Giang Tây có sự thay thế gene PB2 từ các virus H6N6. Ngoài ra, dịch cúm H5N6 ở Việt Nam năm 2014 chủ yếu do dòng Tứ Xuyên, nhưng từ năm 2015 lại chủ yếu do dòng Giang Tây và có xu hướng thay thế các virus dòng Tứ Xuyên. Các kết quả này cũng gợi ý rằng sự tái tổ hợp liên tiếp đã làm xuất hiện những virus cúm A/H5N6 mới và tiềm ẩn nguy cơ những đợt dịch cúm lớn do virus A/H5N6 gây ra ở Việt Nam.

*Từ khóa:* cúm gia cầm, A/H5N6, Việt Nam, clade 2.3.4.4, nguồn gốc virus A/H5N6

### Origination of A/H5N6 virus in Viet Nam

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

### SUMMARY

Avian influenza (AI) outbreaks caused by H5N6 viruses in poultry were first detected in April 2014 in Lang Son province and then they were identified in many other provinces in the North and Central of Viet Nam. For the first time, the AI outbreak caused by viruses of a different subtype other than the H5N1, that has raised concerns about the prevalence, origin and evolution of these viruses in Viet Nam. In 2 years (2014 -2015), we obtained and analyzed 18 A/H5N6 isolates from poultry outbreaks in provinces of the North and Central, Viet Nam. The phylogenetic analysis showed that the Viet Nam H5N6 viruses had the same phylogenetic topology in all genes and splitted into 2 lineages: Sichuan and Jiangxi, China. The appearance of H5N6 virus was due to reassortants of the different influenza viruses, HA gene originated from H5 viruses, clade 2.3.4.4, NA gene derived from the H6N6 viruses, internal genes: PB2, PB1, NP, PA, M, NS derived from H5N1 viruses. Unlike the Sichuan-lineage H5N6 viruses, most of Jiangxi-lineage H5N6 viruses derived from H6N6 viruses. Noticeably, in 2014, the Sichuan lineage viruses were predominant in H5N6 AI outbreaks, but from 2015, the Jiangxi lineage were predominant and had a tendency to replace the Sichuan lineage. These results also suggest that the continuing intra subtype reassortments will result in the appearance of novel H5N6 influenza viruses and potential to cause major H5N6 influenza epidemics in Viet Nam.

*Keywords:* avian influenza, H5N6, Viet Nam, clade 2.3.4.4, H5N6 original

<sup>1</sup> Trung tâm Chẩn đoán Thú y Trung ương

<sup>2</sup> Viện Thú y Quốc gia

<sup>3</sup> Chi cục Thú y Hà Nội

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Virus cúm gia cầm độc lực cao (HPAI) A/H5N1 lần đầu tiên phân lập được ở Trung Quốc năm 1996 (Xu và cs, 1999) và trở nên đáng quan ngại vào năm 1997, khi có 18 ca nhiễm và 6 ca tử vong do virus H5N1 ở Hồng Kông được ghi nhận (Chan, 2002). Virus cúm gia cầm H5N1 tái nổi vào cuối năm 2003 và kể từ đó, đã lây lan trên gia cầm ở hơn 60 nước ở châu Á, châu Âu, châu Mỹ, châu Phi và Trung Đông (http://www.oie.int/, 2005-2016). Sự truyền lây virus cúm từ gia cầm sang người cũng được báo cáo ở 16 quốc gia, gây ra 854 ca bệnh trên người, trong đó 450 ca tử vong (WHO, 2016).

Virus cúm gia cầm H5N1 có thể truyền lây qua chim di trú, chúng có vai trò như những vector mang trùng góp phần làm lây lan virus tới những khu vực mới, thông qua sự di cư đường dài và lây truyền cho gia cầm qua tiếp xúc trực tiếp hoặc gián tiếp (Liu và cs, 2005; Wang và cs, 2008; Sakoda và cs, 2012). Kể từ khi tái nổi, virus cúm gia cầm luôn được xem là tác nhân có thể gây đại dịch cúm, tuy nhiên khả năng truyền lây trực tiếp của chúng từ người sang người vẫn chưa được chứng minh. Ngày nay, dịch cúm do virus H5N1 đã trở thành dịch địa phương trên gia cầm ở nhiều nước và khu vực như Trung Quốc, Đông Nam Á và châu Phi và đã tiến hóa gene H5 thành nhiều dòng phả hệ khác nhau (Smith và cs, 2015). Trong số 40 clade H5N1 đã được xác định, các clade 1, 1.1.1, 1.1.2, 2.3.4, 2.3.4.1, 2.3.4.2, 2.3.4.3, 2.3.2.1, 2.3.2.1a, 2.3.2.1b, 2.3.2.1c từng rất phổ biến ở Việt Nam. Bên cạnh sự tiến hóa gene H5, các gene nội của virus cúm H5N1 cũng thường tổ hợp với các gene của các virus cúm subtype khác đang lưu hành trong đàn gia cầm để tạo thành những chủng virus cúm có tổ hợp gene mới (Neumann và cs, 2010; Zhao và cs, 2008). Cụ thể, một chủng virus tổ hợp mới có cúm A/H5N5 được phát hiện năm 2008, và nhiều chủng virus có tổ hợp gene khác có cúm A/H5N2, H5N3, H5N6, và H5N8 cũng được báo cáo trong thời gian này hoặc sau năm 2010 (Gu và cs, 2013). Một điểm chung là các virus đều mang gene H5 có nguồn gốc từ virus H5N1 clade 2.3.4 đã từng lưu hành

ở Trung Quốc từ năm 2005. Năm 2014, virus cúm A/H5N6 và H5N8 đã được phát hiện trên loài gia cầm ở 12 nước châu Á (Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật Bản: H5N8; Trung Quốc, Lào và Việt Nam: H5N6), châu Âu (Đức, Hà Lan, Anh, Ý và Nga: H5N8) và Bắc Mỹ (Canada, Mỹ: H5N2 và H5N8). Năm 2015, virus cúm H5 có tổ hợp với các gene N khác nhau này đã được báo cáo thuộc về clade 2.3.4.4 (Smith et al., 2015).

Trong số những virus cúm A/H5 clade 2.3.4.4 tổ hợp mới là subtype cho đến nay được ghi nhận gây bệnh trên người. Từ tháng 2 năm 2014 đến tháng 1 năm 2016, virus H5N6 đã gây ít nhất 8 ca nhiễm trên người, trong đó có 4 ca tử vong ở các tỉnh của Trung Quốc, bao gồm Hồ Nam (Hunan), Tứ Xuyên (Sichuan), Quảng Đông (Guangdong) và Vân Nam (Yunnan) (Zhang và cs, 2016; Zhang và cs, 2016; Pan và cs, 2016; Mok và cs, 2016; Yang và cs, 2015). Ở Việt Nam, virus H5N6 lần đầu tiên được phát hiện gây dịch trên gia cầm vào tháng 4 năm 2014 (Nguyễn Đăng Thọ và cs, 2016) và đã lây lan rộng trên gia cầm ở nhiều tỉnh miền Bắc và miền Trung, nhưng cho đến nay chưa có ca bệnh nào do virus cúm H5N6 được ghi nhận trên người.

Qua các báo cáo của Trung Quốc và Lào, virus H5N6 xuất hiện từ năm 2013-2014 đều có chung gene H5 có nguồn gốc từ virus H5N1 clade 2.3.4 và phân thành 2 dòng chính là dòng Tứ Xuyên (Sichuan) và Giang Tây (Jiangxi) (Bi và cs, 2015). Gene NA của chúng có nguồn gốc từ virus H6N6 ở miền Nam và miền Đông Trung Quốc khoảng năm 2010 (Bi và cs, 2016). Nhưng các gene nội của virus H5N6 có thể có nguồn gốc rất khác nhau, từ các virus H5N1 clade 2.3.2.1b, H6N6 hoặc H9N2 lưu hành ở Trung Quốc và Đông Nam Á (Bi và cs, 2015; 2016; Shen và cs, 2015; Wong và cs, 2015). Sự tổ hợp gene giữa virus H5N1 với các subtype virus cúm khác nhau có thể tạo ra các chủng virus H5 có độc lực và khả năng thích ứng khác nhau trên gia cầm và người. Virus cúm H5N6 xuất hiện ở Việt Nam từ năm 2014 đến nay cũng có gene H5 có nguồn gốc từ virus H5N1

clade 2.3.4 và phân thành 2 dòng chính là Tứ Xuyên và Giang Tây (Nguyễn Đăng Thọ và cs, 2016), Tuy nhiên, sự phát sinh của chúng cho đến nay vẫn chưa được làm rõ. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sẽ phân tích toàn bộ gene của 18 chủng virus cúm H5N6 phân lập được ở các tỉnh của Việt Nam trong năm 2014 và 2015.

## II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1 Mẫu virus

Mẫu nghiên cứu là các mẫu mô bệnh phẩm (não, phổi, khí quản, lách, thận) hoặc dịch ngoáy hầu họng từ gà, vịt, chim trĩ đã được xác định dương tính với H5N6 bằng phương pháp realtime RT-PCR (Nguyễn Đăng Thọ và cs., 2016) trong thời gian từ năm 2014 đến năm 2015. Mẫu nghiên cứu được lựa chọn trên cơ sở không trùng nhau về địa điểm hoặc thời gian lấy mẫu. Tổng số mẫu nghiên cứu là 18, trong đó năm 2014 là 6, năm 2015 là 12 mẫu (bảng 1).

**Bảng 1. Danh sách mẫu virus cúm A/H5N6 được lựa chọn nghiên cứu**

TT	Ngày lấy mẫu	Tỉnh	Huyện	Loài	KH mẫu	H5N6
1	22/04/2014	Lạng Sơn	Tràng Định	Gà	14-A324	+
2	25/06/2014	Hà Tĩnh	Kỳ Anh	Vịt	14-A338	+
3	08/08/2014	Lào Cai	Bảo Thắng	Trĩ	14-A367	+
4	21/08/2014	Quảng Trị	Gio Linh	Vịt	14-A392	+
5	15/09/2014	Quảng Ngãi	Quảng Ngãi	Vịt	14-A503	+
6	17/09/2014	Quảng Nam	Núi Thành	Vịt	14-A504	+
7	28/07/2015	Nghệ An	Quyên Lưu	Ngan	15-A52	+
8	04/08/2015	Hòa Bình	Lạc Thủy	Gà	15-A55	+
9	17/08/2015	Hà Nội	Thường Tín	Vịt	15-A57	+
10	18/08/2015	Lào Cai	Bảo Thắng	Gà	15-A59	+
11	13/08/2015	Hải Phòng	Tiên Lãng	Gà	15-A62	+
12	03/03/2015	Quảng Ngãi	Sơn Tịnh	Vịt	15-A63	+
13	03/06/2015	Quảng Ngãi	Nghĩa Hành	Vịt	15-A70	+
14	16/04/2015	Hà Nam	Kim Bảng	Gà	15-A122	+
15	21/09/2015	Hà Nội	Ứng Hòa	Gà	15-A128	+
16	25/09/2015	Lai Châu	Tam Đường	Gà	15-A129	+
17	01/10/2015	Lào Cai	Bảo Thắng	Ngan	15-A140	+
18	12/10/2015	Nam Định	Trực Ninh	Vịt	15-A146	+

### 2.2 Giải trình tự

Các mẫu nghiên cứu được gửi đến phòng thí nghiệm cúm của Trung tâm phòng chống dịch bệnh Hoa Kỳ (Atlanta, GA, USA). Tại đây, mẫu được nhân lên trên phôi trứng gà 9-11 ngày tuổi. Sau khi ủ ở 37°C khoảng 2-3 ngày, nước trứng được thu hoạch và chiết tách ARN của virus bằng kit RNeasy của Qiagene. Các mẫu ARN được sử

dụng làm khuôn mẫu khuếch đại thành sản phẩm PCR bằng kit access quick one-step RT-PCR (Promega) và các primer đặc hiệu với H5N6. Các đoạn gene có kích thước từ 400 – 600 bp được giải mã bằng hệ thống Applied Biosystem 3730 xl và hóa chất giải trình tự dye terminator (life technologies). Toàn bộ khung đọc mở của các gene được tạo thành với ít nhất 3 đoạn gene ghép lại bằng phần mềm sequencer (5.0).

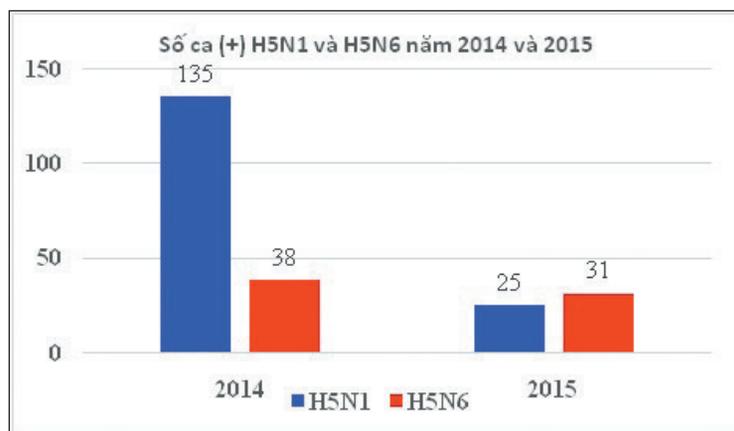
### 2.3 Phân tích phả hệ

Mỗi đoạn gene trong số 8 gene của các virus được chuẩn bị thành một bộ dữ liệu riêng bao gồm gene của các virus H5N6 của Việt Nam trong nghiên cứu này, các virus tham chiếu của tổ chức WHO năm 2014 và 2015 và các virus liên quan được xác định bằng phân tích Blast. Tất cả các phân tích phả hệ được thực hiện trên phần mềm MEGA 6.0, phương pháp Maximum likelihood dựa trên mô hình được xác định bằng công cụ Find best DNA/protein models của MEGA 6.0. Độ tin cậy của phân tích phả hệ được kiểm tra bằng phân tích bootstrap với 1000 lần lặp lại. Các nhánh phả hệ có giá trị bootstrap  $\geq 95$  là đáng tin cậy. Phần trăm tương

đồng nucleotide giữa các gene được tính toán bằng công cụ Sequence identity matrix trong phần mềm Bioedit.

### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Trong thời gian năm 2014 - 2015, Trung tâm Chẩn đoán Thú y Trung ương đã thu thập được 229 mẫu virus cúm A/H5N1 và A/H5N6 từ các ổ dịch ở 27 tỉnh/thành trên cả nước, trong đó các mẫu dương tính H5N6 bắt đầu được phát hiện từ tháng 4/2014. Kết thúc năm 2014, tổng số mẫu dương tính với virus cúm H5N1 và H5N6 lần lượt là 135 và 38, nhưng năm 2015, con số này là 25 và 31 (biểu đồ 1).



**Biểu đồ 1. Số ca dương tính H5N1 và H5N6 năm 2014 và 2015**

Điều này đã cho thấy xu hướng dịch cúm gia cầm tăng lên hơn so với H5N1, mặc dù năm 2015 không có đợt dịch lớn nào do virus cúm gia cầm gây ra. Tuy nhiên virus H5N6 chưa được phát hiện ở các tỉnh phía Nam cho đến cuối năm 2015 (theo báo cáo của Cục Thú y, 2016).

Trong khoảng thời gian từ tháng 4 năm 2014 đến cuối năm 2015, chúng tôi đã lựa chọn được 18 mẫu virus H5N6 để nghiên cứu. Những mẫu này được lựa chọn trên cơ sở không trùng nhau về địa điểm hoặc thời gian lấy mẫu (bảng 1).

Toàn bộ 8 đoạn gene của 18 virus H5N6 được giải trình tự để phân tích phả hệ và so sánh

với các chủng virus tham chiếu để chứng minh nguồn gốc và sự tiến hóa của các virus H5N6 ở Việt Nam. Theo kết quả phân tích phả hệ gene HA, virus H5N6 của Việt Nam năm 2014 và 2015 thuộc về clade 2.3.4.4 và chia thành 2 subclade là 2.3.4.4a và 2.3.4.4b (biểu đồ 2), giống như các kết quả nghiên cứu trước đây (Nguyễn Đăng Thọ và cs, 2016). Giá trị bootstrap tại gốc của các subclade này đều cao và đạt mức 100, cho thấy sự hình thành 2 subclade này có độ tin cậy cao. So sánh trình tự gene HA cho thấy, sự tương đồng gene HA (ở mức độ nucleotide) của các chủng virus H5N6 Việt Nam trong từng subclade là rất cao, từ 98,6% – 99,7% (subclade



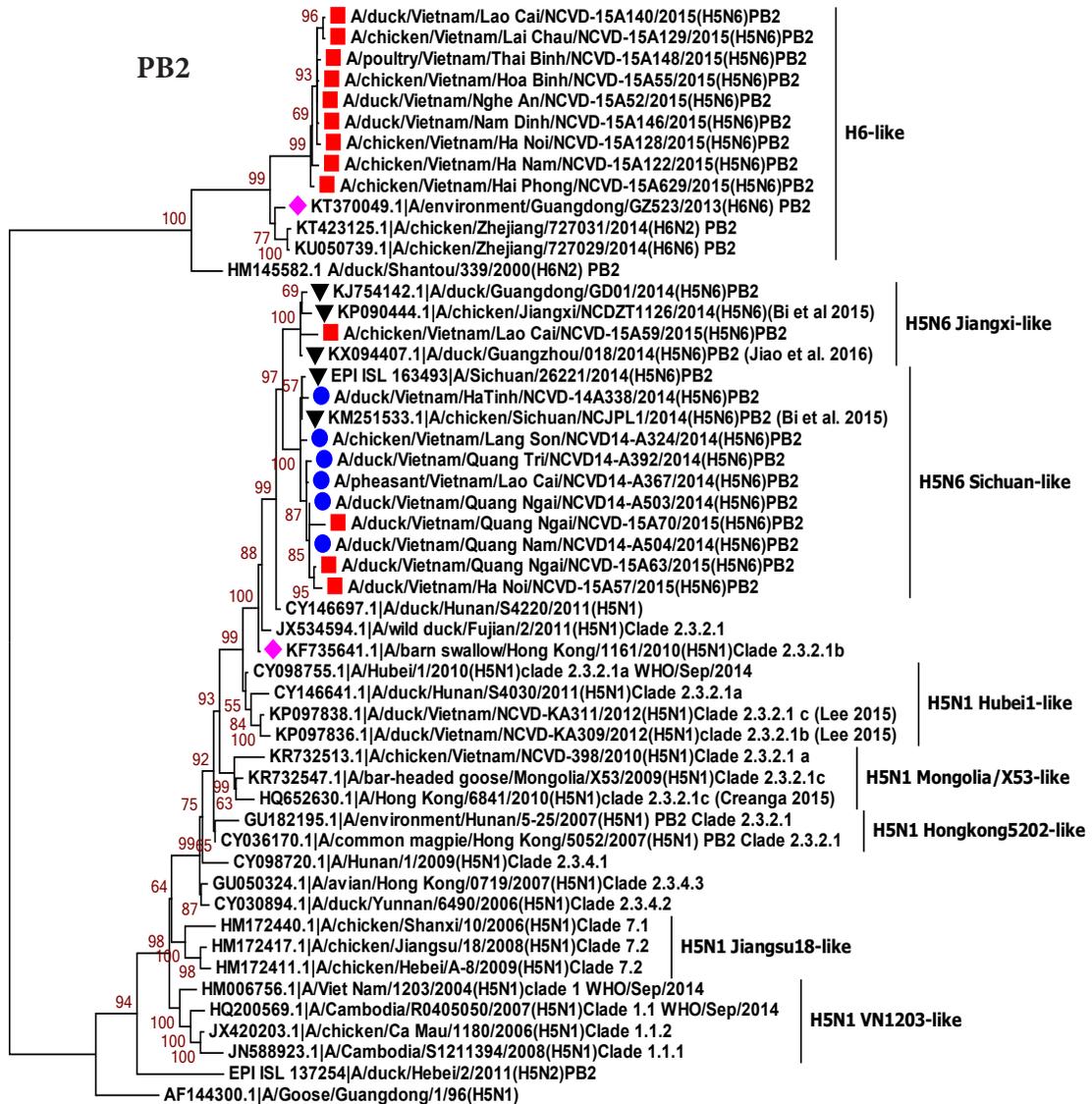
2.3.4.4a) và 98,3% - 99,7% (subclade 2.3.4.4b). Trong khi đó, sự tương đồng về gene HA giữa 2 subclade này chỉ là 94,3%-94,8%. Các chủng virus H5N6 Việt Nam thuộc subclade 2.4.4.4a có sự tương đồng gene HA cao với chủng virus H5N6 đại diện cho dòng Tứ Xuyên là A/chicken/Sichuan/NCJPL1/2014(H5N6) (Bi và cs, 2015) (98,8%-99,4%) và A/Sichuan/26221/2014 (H5N6), chủng gây ca tử vong đầu tiên ở người (WHO/Feb/2015) (98,7%-99,3%). Ngược lại các chủng virus H5N6 Việt Nam thuộc clade 2.3.4.4b có sự tương đồng gene HA cao với các virus H5N6 đại diện cho dòng Giang Tây là A/chicken-/Jiangxi/NCDZT1126/2014(H5N6) (Bi và cs, 2015) (98,1%-98,5%) và A/duck/Guang-zhou/018-/2014(H5N6) (Jiao và cs, 2016) (98,1%-98,5%). Từ kết quả phân tích phả hệ và so sánh trình tự gene HA, có thể nói các virus H5N6 Việt Nam clade 2.3.4.4a thuộc dòng virus H5N6 Tứ Xuyên và các virus 2.3.4.4b thuộc dòng virus H5N6 Giang Tây xuất hiện ở Trung Quốc năm 2014 (Bi và cs, 2015). Các subclade 2.3.4.4a và 2.3.4.4b đều nằm trong clade 2.3.4 cũng gợi ý rằng gene HA của virus H5N6 có nguồn gốc từ các virus cúm HPAI H5N1 lưu hành ở Trung Quốc và Việt Nam mà chủng H5N1 tổ tiên chung gần nhất là chủng A/Duck/Eastern China/108/2008 (H5N1). Tuy nhiên gene HA của các virus H5N6 clade 2.3.4.4a và 2.3.4.4b không bắt nguồn trực tiếp từ các virus H5N1 mà dường như thông qua các virus như A/Duck/Hebei/2/2011(H5N2) và A/Duck/Guangdong/wy19/2008(H5N5), là những virus được hình thành do sự tổ hợp gene của virus cúm A/H5N1 với các virus cúm subtype khác như H5N2, H6N2, H6N5 (Liu và cs. 2013).

Phân tích phả hệ gene NA cho thấy các virus H5N6 Việt Nam năm 2014-2015 cũng có sự phân nhánh tương tự như đối với gene HA thành 2 nhánh thuộc 2 dòng Tứ Xuyên và Giang Tây (biểu đồ 2). Giá trị bootstrap tại gốc của mỗi nhánh là 100 cho thấy sự hình thành nhánh có độ tin cậy cao. Tuy nhiên cả 2 dòng virus này đều có nguồn gốc chung từ các virus H6N6 ở Quảng Đông - Trung Quốc năm 2009 và 2010 như A/Swine/Guangdong/K6/2010(H6N6), A/

Goose/Guangdong/S4362/2009(H6N6). Mức độ tương đồng nucleotide gene NA giữa các virus H5N6 Việt Nam dòng Tứ Xuyên là 98,4% - 100% và dòng Giang Tây là 98,1%-100%. Trong khi đó, sự tương đồng giữa 2 dòng virus này chỉ từ 88,3%-89,5%. So sánh với các chủng virus tham chiếu, các virus H5N6 Việt Nam dòng Tứ Xuyên có sự tương đồng với chủng A-/chicken/Sichuan/NCJPL1/2014(H5N6) từ 98%-99% và các virus H5N6 Việt Nam dòng Giang Tây tương đồng với chủng A/chicken/Jiangxi/NCDZT1126/2014(H5N6) từ 97,8%-98,4%. Kết quả này đã chứng tỏ gene NA của các virus H5N6 có quan hệ rất gần với gene NA của các virus H5N6 của Trung Quốc theo các dòng Tứ Xuyên và Giang Tây tương ứng.

Phân tích phả hệ các gene nội PB2, PB1, PA, NP, M và NS cho thấy, các virus H5N6 Việt Nam và các virus H5N6 Trung Quốc đều có chung kiểu phân nhánh thành các dòng Tứ Xuyên và Giang Tây (biểu đồ 4) như đã thấy ở gene HA và NA. Riêng gene PB2 có sự xuất hiện thêm dòng PB2 có nguồn gốc từ các virus cúm H6 lưu hành trong môi trường và trên gia cầm ở Guangdong, Trung Quốc từ năm 2000, trong nghiên cứu này gọi là dòng H6-like (biểu đồ 3). Các virus H5N6 Việt Nam có các gene nội thuộc dòng Tứ Xuyên cũng là các virus có gene HA và NA thuộc dòng Tứ Xuyên, bao gồm các chủng 14-A324, 14-A367, 14-A392, 14-A503, 15-A57 15-A63, 15-A70 (bảng 1).

Ngược lại, các virus H5N6 Việt Nam có gene nội thuộc dòng Giang Tây cũng là các virus có gene HA và NA thuộc dòng Giang Tây bao gồm các chủng 15-A148, 15-A128, 15-A55, 15-A140, 15-A129, 15-A52, 15-A146, 15-A629, 15-A122, 15-A59 (bảng 1). Tuy nhiên, chỉ có 1 (15-A59) trong số các virus này là có đủ 6 gene nội thuộc dòng Giang Tây, hầu hết virus còn lại chỉ có 5 gene nội thuộc dòng Giang Tây, gene PB2 của chúng có nguồn gốc từ các virus cúm H6 như đã đề cập ở trên. Cụ thể, phân tích hệ gene PB2 cho thấy, các virus H5N6 Việt Nam dòng Giang Tây, nằm cùng nhóm với virus tham chiếu như A/environment-/Guangdong/

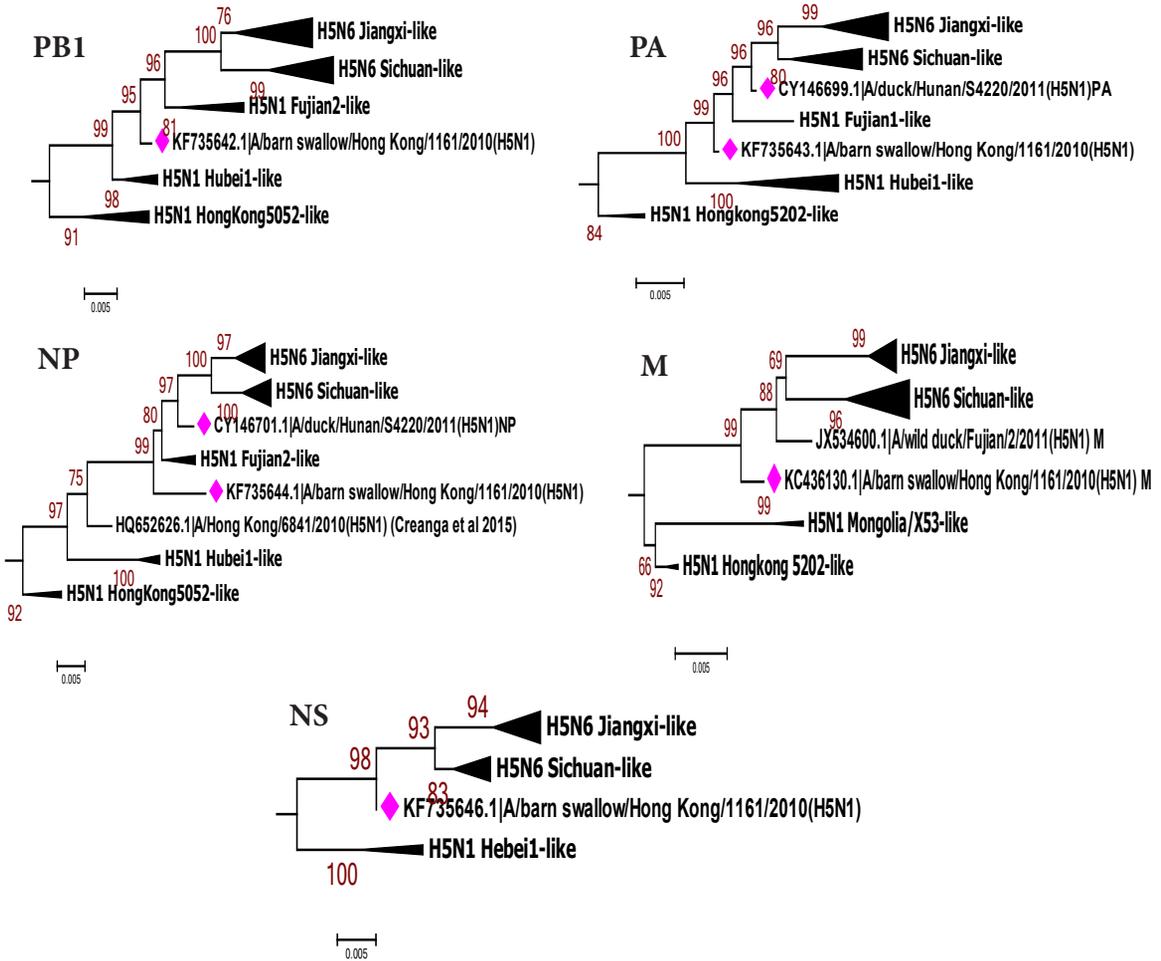


**Biểu đồ 3. Phả hệ gene PB2 của các virus H5N6 Việt Nam năm 2014-2015**

GZ523/2013(H6N6) ở Guangdong, Trung Quốc (Yuan và cs, 2016) và đều nằm trong nhóm H6-like. Giá trị bootstrap tại gốc của nhóm là 99 chứng tỏ mối quan hệ giữa các virus trong nhóm có độ tin cậy cao và rất có thể các virus H5N6 năm 2015 có nguồn gốc gene PB2 từ các virus H6N6 năm 2013 ở Quảng Đông, Trung Quốc mà

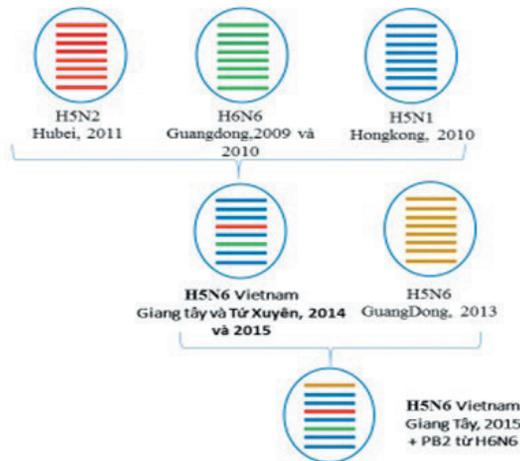
chúng có quan hệ gần nhất là A/environment/Guang-dong/GZ523/2013(H6N6).

Về mức độ tương đồng gene, so sánh giữa các virus H5N6 Việt Nam dòng Tứ Xuyên với các virus tham chiếu như A/chicken/Sichuan/NCJPL1/2014(H5N6) và chủng A/



◆ Các chủng virus có thể cung cấp gene cho virus H5N6

**Biểu đồ 4. Phả hệ gene PB1, PA, NP, M và NS của các virus H5N6 Việt Nam năm 2014-2015**



**Biểu đồ 5. Mô hình tổ hợp gene của các virus H5N6 ở Việt Nam năm 2014 và 2015**

Sichuan/26221/2014(H5N6) cho thấy sự tương đồng gene PB2: 98,5%-99,7%; PB1: 98,5%-99,4%; PA: 98,6%-99,3%; NP: 98,6%-99,2%; M: 99,5%-99,7%; NS: 98,7%-99,3%. Tương tự, so sánh các virus H5N6 Việt Nam dòng Giang Tây với các virus tham chiếu như dòng A/chicken/Jiangxi/NCDZT1126/2014(H5N6) và A/duck/Guangzhou/018/2014-(H5N6) có sự tương đồng gene PB2 (chỉ số sánh 15-A59): 98,5-99%; PB1: 97,1%-98,7%; PA: 98,3%-99,0%; NP: 98,7%-99,5%; M: 99,2%-99,5%; NS: 98,3%-99,1. Sự tương đồng gene PB2 của các virus H5N6 Việt Nam và virus tham chiếu trong nhóm H6-like như A/environment/Guangdong/GZ523/2013(H6N6) (Yuan và cs, 2016) là 97,1%-98,1%. Sự tương đồng gene PB2 giữa các virus H5N6 Việt Nam và H6 Trung Quốc là không cao do chúng có sự phân nhánh trong nhóm mà các virus H5N6 năm 2015 của Việt Nam nằm tách riêng so với các virus H6 của Trung Quốc. Điều này chứng tỏ sự tiếp tục tiến hóa của gene PB2 của các virus H5N6 của Việt Nam. Sự biến đổi gene PB2 đã được chứng minh là có thể làm cho virus thích nghi được trên các vật chủ mới (Ozaki và cs, 2014).

Qua phân tích phả hệ với các trình tự hiện có trên genebank, các virus H5N6 Việt Nam thuộc 2 dòng chính là Tứ Xuyên và Giang Tây, chúng có sự tổ hợp từ 3 subtype virus là H5N2, H6N6 và H5N1 (biểu đồ 5). Trong đó gene HA từ chủng virus A/Duck/Hebei/2/2011(H5N2), gene NA từ chủng A/Swine/Guangdong/K6/2010(H6N6) hoặc A/Goose/Guangdong/S4362-/2009(H6N6), các gene nội PB2, PB1, PA, NP, M, NS từ chủng A/barn swallow/Hongkong/1161/2010(H5N1). Tuy nhiên phần lớn các virus H5N6 dòng Giang Tây ở Việt Nam năm 2015 có gene PB2 từ chủng A/Environment/Guang-dong/GZ523/2013(H6N6) (Biểu đồ 5). Những phát hiện này cho thấy các virus H5N6 rất dễ dàng trao đổi gene với các virus cúm thuộc các subtype khác.

#### IV. KẾT LUẬN

Virus cúm A/H5N6 lưu hành tại Việt Nam chia thành 2 dòng chính là Tứ Xuyên thuộc clade

2.3.4.4a và Giang Tây thuộc clade 2.3.4.4b. Cả 2 dòng virus này đều đã xuất hiện từ năm 2014, nhưng các virus cúm lưu hành trong năm 2015 đa phần là virus cúm A/H5N6 clade 2.3.4.4b.

Nguồn gốc của virus cúm A/H5N6 lưu hành hiện tại chứa các gene mã hóa protein PB2, PB1, NP, PA, M và NS có nguồn gốc từ virus cúm A/H5N1, NA từ virus cúm A/H6N6 và HA từ virus cúm A/H5N2. Riêng các virus H5N6 dòng Giang Tây có sự thay đổi gene mã hóa PB2 và có nguồn gốc từ virus cúm A/H6N6. Sự lưu hành đa subtype của virus cúm gia cầm tại Việt Nam đòi hỏi cần tăng cường những hoạt động giám sát và đánh giá tính phù hợp của vacxin phục vụ công tác quản lý và phòng chống dịch bệnh đạt hiệu quả cao.

*Lời cảm ơn: Nghiên cứu này có sự dụng kinh phí của đề tài độc lập cấp quốc gia mã số ĐTDL.CN-10/15 “Nghiên cứu sự phân bố các biến chủng (clade) mới của virus cúm A/H5N1 trên đàn gia cầm ở Việt Nam làm cơ sở cho việc phòng chống dịch bệnh đạt hiệu quả cao”.*

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Đăng Thọ, Nguyễn Hoàng Đăng, Đàm Thị Vui, Đỗ Thị Hoa, Mai Thùy Dương, Nguyễn Thị Diệp, Nguyễn Việt Không, Tô Long Thành, (2016). Virus cúm gia cầm độc lực cao H5N6 ở Việt Nam năm 2014. *Khoa học kỹ thuật thú y*. XXIII;1, 18-28
2. Bi Y., Mei K., Shi W, Liu D., Yu X., Gao Z., Zhao L., Gao G.F., Chen J., Chen Q., (2015). Two novel reassortants of avian influenza A (H5N6) virus in China. *J Gene Virol*. 96(Pt 5):975-81.
3. Cheng M.C., Soda K., Lee M.S., Lee S.H., Sakoda Y., Kida H., Wang C.H., (2010). Isolation and characterization of potentially pathogenic H5N2 influenza virus from a chicken in Taiwan in 2008. *Avian Dis*. 54, 885–893.
4. Gu M., Huang J., Chen Y., Chen J., Wang X., Liu X., Liu X., (2012). Genome sequence of a natural reassortant H5N2 avian influenza virus from domestic mallard ducks in eastern

- China. *J. Virol.* 86, 12463–12464.
5. 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(12):2021-4.
  6. Kim H.R., Park C.K., Oem, J.K., Bae Y.C., Choi J.G., Lee O.S., Lee Y.J., (2010). Characterization of H5N2 influenza viruses isolated in South Korea and their influence on the emergence of a novel H9N2 influenza virus. *J. Gener. Virol.* 91, 1978–1983.
  7. Li K.S., Guan Y., Wang J., Smith G.J.D., Xu K.M., Duan L., Rahardjo A.P., Puthavathana P., Buranathai C., Nguyen T.D., Estoepongastie A.T.S., Chaisingh A., Auewarakul P., Long H.T., Hanh N.T.H., Webby R.J., Poon L.L.M., Chen H., Shortridge K.F., Yuen K.Y., Webster R.G., Peiris J.S.M., (2004). Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature.* 430, 209–213.
  8. Liu C.G., Liu M., Liu F., Lv R., Liu D.F., Qu L.D., Zhang Y., (2013). Emerging multiple reassortant H5N5 avian influenza viruses in ducks, China, 2008. *Vet Microbiol.* 27;167(3-4):296-306.
  9. Lu G., Rowley T., Garten R., Donis R.O., (2007). FluGeneome: a web tool for Genotyping influenza A virus. *Nucleic Acids Res.* 35, 275–279.
  10. Mi Z., Liu W., Fan H., An X., Pei G., Wang W., Xu X., Ma, M., Zhang Z., Cao W., et al., (2013). Complete Genome Sequence of Avian Influenza Virus A/chicken/Jiangsu/1001/-2013(H5N2), Demonstrating Continuous Reassortance of H5N2 in China. *Geneome Announc.* 1.
  11. Neumann G., Green M. A. & Macken C. A., (2010). Evolution of highly pathogenic avian H5N1 influenza viruses and the emergence of dominant variants. *J Gene Virol* 91, 1984–1995.
  12. Ozaki H, Guan Y, Peiris M, Webster R, Takada A, Webby R. (2014). Effect of the PB2 and M Genes on the Replication of H6 Influenza Virus in Chickens. *Influenza Res Treat.* 2014:547839.
  13. Sakoda Y., Ito H., Uchida Y., Okamatsu M., Yamamoto N., Soda K., Nomura N., Kuribayashi S., Shichinohe S. & other authors (2012). Reintroduction of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus by migratory water birds, causing poultry outbreaks in the 2010–2011 winter season in Japan. *J Gene Virol.* 93, 541–550.
  14. Smith GJ, Donis RO; World Health Organization/World Organisation for Animal Health/Food and Agriculture Organization (WHO/OIE/FAO) H5 Evolution Working Group, (2015). Nomenclature updates resulting from the evolution of avian influenza A(H5) virus clades 2.1.3.2a, 2.2.1, and 2.3.4 during 2013–2014. *Influenza Other Respir Viruses.* 9(5):271-6.
  15. Wang G., Zhan D., Li L., Lei F., Liu B., Liu D., Xiao H., Feng Y., Li J. & other authors (2008). H5N1 avian influenza re-emergence of Lake Qinghai: phylogenetic and antigenic analyses of the newly isolated viruses and roles of migratory birds in virus circulation. *J Gene Virol* 89, 697–702.
  16. Wong FY, Phommachanh P, Kalpravidh W, Chanthavisouk C, Gilbert J, Bingham J, Davies KR, Cooke J, Eagles D, Phiphakhavong S, Shan S, Stevens V, Williams DT, Bounma P, Khambounheuang B, Morrissy C, Douangneun B, Morzaria S. (2015). Reassortant highly pathogenic influenza A(H5N6) virus in Laos. *Emerg Infect Dis.* 21(3):511-6
  17. Zhao Z. M., Shortridge K. F., Garcia M., Guan Y. & Wan, X.-F. (2008). Genotypic diversity of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses. *J Gene Virol* 89, 2182–2193.

Ngày nhận 15-2-2017

Phản biện ngày 6-3-2017