

## NGHIÊN CỨU SỰ LƯU HÀNH CỦA VIRUS CÚM A/H9N2 Ở GIA CẦM SỐNG BÁN TẠI MỘT SỐ CHỢ CỦA 4 TỈNH/THÀNH, MIỀN BẮC VIỆT NAM

*Vũ Đức Hạnh<sup>1</sup>, Phạm Hồng Trang<sup>1</sup>, Nguyễn Mạnh Thương<sup>2</sup>, Lại Văn Đàm<sup>3</sup>,  
Phạm Ngọc Thạch<sup>4</sup>, Trịnh Đình Thâu<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Minh Phương<sup>1</sup>,  
Nguyễn Văn Giáp<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Hằng<sup>1</sup>, Lại Thị Lan Hương<sup>1</sup>*

### TÓM TẮT

Gia cầm (gà và vịt) ở Việt Nam là vật chủ của các phân nhóm virus cúm gia cầm, bao gồm H5N1 và H9N2. Chúng tôi đã khảo sát tập quán mua bán gia cầm sống tại một số chợ ở 4 tỉnh/thành: Bắc Ninh, Hà Nội, Thái Nguyên, Hưng Yên có ảnh hưởng đến tỷ lệ mắc bệnh cúm gia cầm ở các địa bàn khảo sát. Trong tổng số 169 mẫu gia cầm dương tính với cúm A, tỷ lệ lưu hành của virus cúm subtype H9 đã được xác định ở chợ phố Hiến (Hưng Yên) là 20,7%, chợ Ngũ Hiệp (Hà Nội) là 27,2%, tiếp đến là chợ Đọ (Bắc Ninh) và chợ Ngan (Hưng Yên), thấp nhất ở chợ Túc Duyên (Thái Nguyên) và chợ Gà (Bắc Ninh), riêng gia cầm ở chợ Hà Vĩ (Hà Nội) đã được xác định là âm tính với H9. Kết quả phân tích cây phả hệ dựa vào trình tự gen HA cho thấy các chủng virus cúm thuộc subtype H9 chiếm ưu thế là phân nhánh Y280. Kết quả phân tích cây phả hệ dựa vào trình tự gen NA, thì lại cho thấy chủng virus cúm thuộc subtype H9 đều thuộc phân nhánh F98 like.

*Từ khóa:* Cúm gia cầm, H5N1, H9N2.

### Prevalence of H9N2 subtype Avian influenza viruses in alive poultry selling in some markets in 4 northern provinces, Viet Nam

*Vu Duc Hanh, Pham Hong Trang, Nguyen Manh Thuong, Lai Van Dam,  
Pham Ngoc Thach, Trinh Dinh Thau, Nguyen Thi Minh Phuong,  
Nguyen Van Giap, Nguyen Thi Hang, Lai Thi Lan Huong*

### SUMMARY

The poultry (chicken and duck) in Viet Nam are the host of H5N1 and H9N2 subtypes avian influenza viruses. We investigated the trading practices for the alive poultry at some markets in Bac Ninh, Thai Nguyen, Hung Yen provinces and Ha Noi City to determine the prevalence of avian influenza virus in the investigating areas. The studied result showed that from 169 positive poultry samples with avian influenza, the prevalence of H9 was determined to be 20.7% in Pho Hien market (Hung Yen), 27.2% in Ngu Hiep market (Ha Noi), followed by Do market (Bac Ninh) and Ngan market (Hung Yen), the lowest was in Tuc Duyen market (Thai Nguyen) and Ga market (Bac Ninh), the poultry in Ha Vi market (Ha Noi) was identified to be negative with H9. The result of analysing pedigree based on the HA gene sequence revealed that H9 subtype avian influenza virus strains belonged to sub-clade Y280. The result of analysing pedigree based on the NA gene sequences showed these strains belonged to F98 like branch.

*Keywords:* Avian influenza viruses, H5N1, H9N2.

<sup>1</sup> Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

<sup>2</sup> Chi cục Chăn nuôi và Thú y Lai Châu

<sup>3</sup> Trường Đại học Thú y, Đại học quốc gia Chungbuk, Hàn Quốc

<sup>4</sup> Chi cục Thú y vùng VI

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở Việt Nam, các công trình nghiên cứu được đăng tải trên các Tạp chí Khoa học Thú y và Tạp chí Y học dự phòng mới chỉ tập trung nghiên cứu chủng virus cúm gia cầm độc lực cao A/H5N1, trong khi đó, các chủng virus cúm gia cầm độc lực thấp như A/H9N2, A/H7N9... đã gây ra các vụ dịch tại châu Âu và châu Á. Bắt đầu từ năm 2013, hoạt động giám sát được bổ sung và bắt đầu ở các tỉnh dọc theo biên giới Trung Quốc để thúc đẩy phát hiện sớm virus H7N9. Theo Nguyễn Lê Khánh Hằng (2014), nghiên cứu giám sát chủ động sự lưu hành của virus cúm trên gia cầm (vịt, ngan) khoẻ mạnh tại 38 chợ buôn bán, điểm giết mổ gia cầm tại Hà Nội từ năm 2012-2014 bằng phương pháp phân lập và Realtime PCR cho thấy tỷ lệ nhiễm virus cúm A trên gia cầm là khá cao (154/720 mẫu, chiếm 21,4%); đã phân lập được 12 phân typ virus cúm A trong đó có 2 phân typ virus cúm gia cầm độc lực cao A/H5N1 (26,6%), A/H5N6 (5,8%) và 10 phân typ virus cúm gia cầm độc lực thấp (104/154 mẫu; chiếm 67,6%). Tỷ lệ nhiễm virus cúm phân typ H5N1 và H9N2 trên ngan là 7,5% và 2,8% cao hơn trên vịt là 3,9% và 1,1%; cho thấy ngan là ổ chứa tiềm tàng virus cúm gia cầm. Virus cúm A/H5N1 lưu hành nhiều vào mùa đông-xuân (từ tháng 1 đến tháng 4), các phân typ virus cúm H9N2 lưu hành rải rác quanh năm.

Hiện nay, bệnh xuất hiện hầu như ở các nước trên thế giới với tất cả 16 subtype HA và 9 subtype NA khác nhau đã được xác định trên các loài đã cầm và gia cầm. Từ cuối năm 2003 đến nay, bệnh cúm gia cầm subtype H5N1 độc lực cao (HPAI) đã xuất hiện tại một số nước châu Á, trong đó có Việt Nam, sau đó lan sang các nước châu Âu và Trung Đông. Bệnh có nguy cơ lây lan rộng, gây thiệt hại nặng nề cho ngành chăn nuôi và được ghi nhận truyền lây, gây tử vong cho người (theo WHO), đe dọa sức khỏe cộng đồng. Người ta cho rằng sự hiểu biết dịch tễ và biến đổi của virus cúm H9N2 trong chăn nuôi gia cầm có thể cung cấp một cảnh báo sớm, quan trọng về sự xuất hiện đại dịch (Liu và cộng sự, 2014a; Liu và cộng sự, 2014b).

Để phát hiện và theo dõi sự biến đổi của virus cúm gia cầm và một số chủng virus cúm nguy hiểm tại Việt Nam, đồng thời tăng cường giám

sát cúm gia cầm có nguy cơ xâm nhiễm vào Việt Nam, chúng tôi thực hiện chương trình giám sát virus cúm gia cầm trên gà, vịt và môi trường tại các chợ, điểm thu gom, buôn bán gia cầm sống nhằm mục đích giám sát sự lưu hành virus cúm gia cầm typ A/H9N2 ở gia cầm sống bán tại một số chợ của 4 tỉnh/thành miền Bắc Việt Nam.

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

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Gia cầm sống: Lấy mẫu swab hầu-họng của gà, vịt sống bán tại các chợ buôn bán gia cầm ở Bắc Ninh, Hà Nội, Thái Nguyên, Hưng Yên. Không lấy mẫu từ những loài gia cầm khác như ngan, ngỗng.

- Mẫu môi trường: Lấy mẫu swab môi trường (mẫu phân tươi, mẫu nước thải, mẫu nước uống, mẫu chất thải trên lông nhót gia cầm) tại chợ buôn bán gia cầm ở Bắc Ninh, Hà Nội, Thái Nguyên, Hưng Yên.

### 2.2. Địa điểm nghiên cứu

- Xét nghiệm được thực hiện tại Phòng thí nghiệm trọng điểm - Học viện Nông nghiệp VN

- Thời gian thực hiện từ tháng 7/2018 đến 12/2019.

### 2.3. Nội dung nghiên cứu

- Phát hiện sự lưu hành của virus cúm gia cầm typ A/H9N2 trên gà, vịt sống bán tại các chợ buôn bán gia cầm ở Bắc Ninh, Hà Nội, Thái Nguyên, Hưng Yên.

- Xác định mối liên hệ di truyền của các chủng virus dựa vào trình tự gen HA và NA.

### 2.4. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.4.1. Phương pháp lấy mẫu tại các chợ gia cầm sống

- Đối với gà, vịt: Tại mỗi chợ, mỗi lần lấy 40 mẫu swab hầu-họng của gà sống, 40 mẫu swab hầu-họng của vịt sống

- Mẫu môi trường: 40 mẫu (tương đương với 8 mẫu gộp) gồm:

+ Mẫu 1: Phân tươi của gia cầm bán tại chợ.

Dùng 4 swab ngoáy vào 4 góc dưới lồng nhốt gia cầm và 1 swab ngoáy vào chính giữa khu vực dưới lồng và cho vào ống môi trường. Gộp 5 mẫu swab đơn này thành 2 mẫu xét nghiệm, gộp ngay tại chợ.

+ Mẫu 2: Chất thải dính trên lồng nhốt gia cầm (gà, vịt). Lấy 10 mẫu swab đơn và gộp thành 2 mẫu xét nghiệm.

+ Mẫu 3: Nước thải tại chợ. Lấy 10 swab mẫu nước thải của chợ và gộp thành 2 mẫu xét nghiệm.

+ Mẫu 4: Nước uống của gia cầm tại chợ. Lấy 5 swab mẫu nước uống của gia cầm tại chợ và gộp thành 2 mẫu xét nghiệm.

Xét nghiệm virus cúm gia cầm A/H9N2 bằng phản ứng Realtime PCR.

#### 2.4.2. Phản ứng Realtime RT-PCR xét nghiệm cúm gia cầm A/H9N2

##### \* Máy móc và nguyên liệu

- Hệ thống chiết tách RNA
- Máy Realtime PCR
- Bộ Micropipette các cỡ
- Kit chiết tách RNA (Qiagen)
- Kit realtime PCR: Realtime TaqMan RT-PCR
- Primer và probe.

##### \* Cách tiến hành

Chiết tách RNA: Áp dụng theo quy trình của nhà sản xuất như sau:

- Nhỏ 500µl dịch swab vào ống ly tâm 1,5ml cùng với 500µl buffer RLT có bổ sung 1% β-ME,

lắc đều trên máy vortex rồi ly tâm nhẹ.

- Thêm 500µl cồn EtOH 70% vào ống, lắc mạnh bằng máy vortex rồi ly tâm nhẹ.

- Chuyển tất cả dịch nổi sang cột lọc Rneasy Qiagen, ly tâm trong 15 giây với tốc độ 10.000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng.

- Nhỏ 700µl dung dịch rửa 1 (RW1 buffer) vào cột lọc Rneasy Qiagen, ly tâm trong 15 giây với tốc độ 10.000 vòng/phút, thay ống thu mới vào cột lọc.

- Nhỏ 500µl dung dịch rửa RPE buffer và ly tâm trong 15 giây với tốc độ 10.000 vòng/phút, thay ống thu mới vào cột lọc, lặp lại lần 2 với dung dịch rửa RPE buffer.

- Thay ống thu mới, ly tâm cột lọc và ống thu trong 2 phút với tốc độ 12.000 vòng/phút. Bỏ ống thu.

- Đặt cột lọc vào ống thu RNA, nhỏ 50µl Rnase Free Water vào cột lọc, ủ ở nhiệt độ phòng ít nhất 1 phút. Tách RNA bằng cách ly tâm trong vòng 1 phút với tốc độ 10.000 vòng/phút. Bỏ cột lọc, giữ lại ống thu trong ống thu RNA.

- Bảo quản mẫu RNA thu được ở 4°C trong thời gian ngắn trước khi chạy Realtime PCR, nếu sau 24h nên bảo quản mẫu ở 20°C hoặc thấp hơn.

- Đọc kết quả xét nghiệm virus cúm gia cầm A/H9N2 bằng phản ứng Realtime RT-PCR (M. Ben Shabat *et al.*, 2010).

Các mẫu dương tính với cúm có Ct <35, gen H9 có Ct < 38.

**Bảng 1. Primer và probe dùng trong phản ứng Realtime RT-PCR**

Primer	H9F	GGAAGAATTAATTATTATTGGTCGGTAC
	H9R	GCCACCTTTTTTCAGTCTGACATT
Probe	H9PRO	FAM-5 -AACCAGGCCAGACATTGCGAGTAAGATCC-3 -TAMRA

#### 2.4.3. Phương pháp phân tích trình tự gen

Trình tự gen tham chiếu của virus cúm gia cầm subtype H9N2 được tham khảo theo các công bố trước đây (Chu *et al.*, 2016; Mai Thuy *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016). Mỗi liên hệ giữa các chủng virus

cúm subtype H9 thu thập được ở Việt Nam cũng được làm rõ trên cơ sở phân tích với các trình tự gen virus cúm lưu hành ở Việt Nam, được công bố trên GenBank.

Trình tự gen được căn chỉnh (alignment) bằng

phần mềm MAFFT (Katoh *et al.*, 2017). Phần mềm MEGA (Kumar *et al.*, 2016) sẽ được sử dụng để xây dựng cây phát sinh chủng loại dựa vào các gen mã hóa protein HA, NA. Thuật toán dựng cây phát sinh chủng loại là Neighbor joining, với số lần thực hiện phân tích bootstrap là 1000 lần. Biểu diễn và hiệu chỉnh cây phát sinh chủng loại bằng phần mềm FigTree v1.4.3.

#### 2.4.4. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học bằng phần mềm Minitab 14.0 và Excell 2013. Phép thử "Khi bình phương" được sử dụng để so sánh sự sai khác giữa các tỷ lệ. Giá trị  $p < 0,05$  đã được sử dụng để chỉ các số liệu sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê.

### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Sự lưu hành của virus cúm A

**Bảng 2. Kết quả xét nghiệm virus cúm subtype H9 với các mẫu thu được bằng phương pháp Realtime RT-PCR**

Chợ	Tỉnh	Gen M Ct <35 (%)	Gen H9 Ct <38 (%)	Subtype Undetermind
Thị Cầu	Bắc Ninh	21 (12,4)	15 (13,7)	
Đọ	Bắc Ninh	31 (18,3)	18 (16,5)	2
Gà	Bắc Ninh	6 (3,5)	3 (2,7)	
Hà Vĩ	Hà Nội	2 (1,1)	0 (0,0)	
Ngũ Hiệp	Hà Nội	46 (27,2)	26 (23,8)	
Túc Duyên	Thái Nguyên	11 (6,5)	7 (6,4)	
Ngan	Hưng Yên	17 (10)	14 (12,6)	
Phổ Hiến	Hưng Yên	35 (20,7)	26 (23,8)	
<b>Tổng</b>		<b>169</b>	<b>109</b>	<b>2</b>

Ghi chú: Ct: Cycle threshold

Trong tổng số 169 mẫu dương tính với cúm A, chúng tôi xác định subtype H9 bằng kỹ thuật Realtime PCR. Bảng 2 cho thấy sự lưu hành của virus cúm subtype H9 ở chợ Ngũ Hiệp (Hà Nội) và Phố Hiến (Hưng Yên) (23,8%) là cao nhất, tiếp đến là chợ Đọ (Bắc Ninh), chợ Thị Cầu (Bắc Ninh) và chợ Ngan (Hưng Yên), thấp nhất ở Túc Duyên (Thái Nguyên) và chợ Gà (Bắc Ninh), riêng chợ Hà Vĩ (Hà Nội) âm tính với H9.

#### 3.2. Mối liên hệ di truyền dựa vào trình tự gen HA và NA

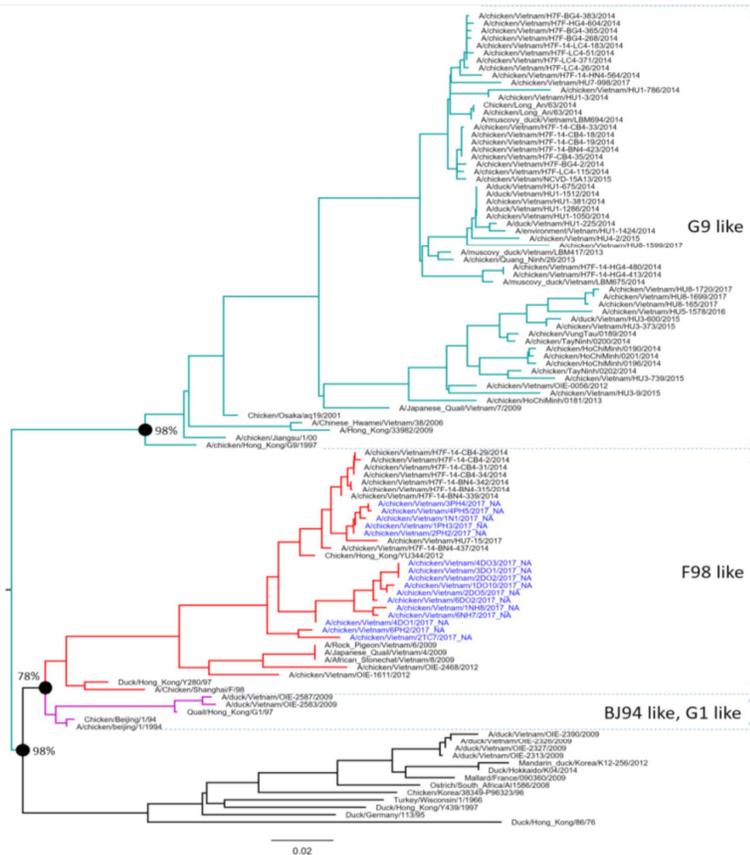
##### 3.2.1. Mối liên hệ di truyền dựa vào trình tự gen HA

Dựa vào gen HA, các chủng virus thuộc subtype H9 được chia thành 2 nhánh (lineage) chính là nhánh Bắc Mỹ (North American) và

nhánh Á-Âu (Eurasian). Trong nhánh Á-Âu, kết quả phân tích cũng cho thấy có 3 phân nhánh (sublineage), đó là Y439, G1 và Y280. Giá trị bootstrap tại các điểm phân nhánh chính của cây phả hệ đều  $> 90\%$  (hình 1). Dựa vào sự phân nhóm, dễ thấy các chủng virus cúm subtype H9 phát hiện được ở Việt Nam đều thuộc về cả 3 phân nhánh, trong đó chiếm ưu thế là phân nhánh Y280. Các chủng virus cúm thuộc phân nhánh này được phát hiện liên tục trong một khoảng thời gian dài, từ năm 2009 đến 2017. Trong phân nhánh Y280 này, 16 chủng virus thu thập trong nghiên cứu này được chia thành 2 nhánh nhỏ với giá trị bootstrap là 100%. Các chủng này nằm chung nhóm với các chủng virus cúm subtype H9 được phát hiện ở một số tỉnh miền Bắc và Thừa Thiên Huế (Chu *et al.*, 2016; Mai Thuy *et al.*, 2016).



Hình 1. Cây phả hệ của các chủng virus cúm dựa vào trình tự gen HA



Hình 2. Cây phả hệ của các chủng virus cúm dựa vào trình tự gen NA

### 3.2.2. *Mối liên hệ di truyền dựa vào trình tự gen NA*

Kết quả phân tích cây phả hệ dựa vào trình tự gen NA cho thấy 16 chủng virus cúm thuộc subtype H9 đều thuộc phân nhánh F98 like (đánh dấu màu xanh, hình 2). Các chủng virus này cũng được phân nhóm gần với các chủng virus được tìm thấy ở một số tỉnh như Bắc Ninh (2014), Cao Bằng (2014) (Mai Thuy *et al.*, 2016). Kết quả phân tích cây phả hệ cũng cho thấy có sự đa dạng của subtype H9N2 lưu hành ở Việt Nam, với 2 phân nhánh chính lưu hành là F98 like và G9 like.

## IV. KẾT LUẬN

Trong tổng số 169 mẫu dương tính với cúm A, sự lưu hành của virus cúm subtype H9 ở chợ Ngũ Hiệp (Hà Nội) và Phố Hiến (Hưng Yên) là cao nhất (đều là 23,8%), tiếp đến là chợ Đọ (Bắc Ninh), chợ Thị Cầu (Bắc Ninh) và chợ Ngạn (Hưng Yên), thấp nhất ở Túc Duyên (Thái Nguyên) và chợ Gà (Bắc Ninh), riêng chợ Hà Vĩ (Hà Nội) âm tính với H9.

Kết quả phân tích cây phả hệ dựa vào trình tự gen HA cho thấy các chủng virus cúm subtype H9 chiếm ưu thế thuộc phân nhánh Y280. Kết quả phân tích cây phả hệ dựa vào trình tự gen NA, 16 chủng virus cúm subtype H9 đều thuộc phân nhánh F98 like.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chu D. H., M. Okamoto, K. Matsuno, T. Hiono, K. Ogasawara, L. T. Nguyen, L. Van Nguyen, T. N. Nguyen, T. T. Nguyen, D. Van Pham, D. H. Nguyen, T. D. Nguyen, T. L. To, H. Van Nguyen, H. Kida and Y. Sakoda, 2016. Genetic and antigenic characterization of H5, H6 and H9 avian influenza viruses circulating in live bird markets with intervention in the center part of Vietnam. *Vet Microbiol.* 192, 194-203.
2. Katoh Kazutaka, John Rozewicki and Kazunori D. Yamada, 2017. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics.*
3. Kumar S., G. Stecher and K. Tamura, 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* 33 (7): 1870-1874.
4. Liu Yu-Fu, Han-Zhang Lai, Lin Li, Yu-Peng Liu, Wen-Yan Zhang, Ren Gao, Wen-Ke Huang, Qin-Fang Luo, Yan Gao, Qiong Luo, Xiao-Yu Xie, Jia-Hua Xu and Rui-Ai Chen, 2016. Endemic variation of H9N2 Avian influenza virus in China. *Avian Diseases.* 60 (4): 817-825, 819.
5. Mai Thuy Duong, Thomas Peacock, Bich Vu Thi Ngoc, Thomas Fabrizio, Dang Nguyen Hoang, Nguyen Dang Tho, Diep Nguyen, Minh Nguyen, Hoa Nguyen Minh Le, Trang Hau Thi Thu, Marc Choisy, Ken Inui, Scott Newman, Nguyen Vu Trung, H. Rogier van Doorn, To Long Thanh, Munir Iqbal and Juliet Bryant, 2016. Prevalence and diversity of H9N2 avian influenza in chickens of Northern Vietnam, 2014. *Infection, Genetics and Evolution*, Volume 44, 530-540.
6. M. Ben Shabat, R. Meir, R. Haddas, E. Lapin, I. Shkoda, I. Raibstein, S. Perk, I. Davidson, 2010. Development of a Realtime TaqMan RT-PCR assay for the detection of H9N2 avian influenza viruses. *Journal of virological methods* 168(1-2):72-7.
7. Nguyễn Lê Khánh Hằng, Lê Thị Thanh, Trần Thị Mai Hưng, Lương Minh Tân, Phạm Thị Thu Hằng, Lê Thị Quỳnh Mai, 2014. Tỷ lệ lưu hành kháng thể kháng vi rút cúm A/H5N1, A/H7N9 của người buôn bán, nuôi và giết mổ gia cầm, thủy cầm ở miền Bắc Việt Nam, 2014, *Tạp chí Y học dự phòng.* Tập XXV, số 8 (168) 2015.

Ngày nhận 12-1-2020

Ngày phản biện 3-2-2020

Ngày đăng 1-5-2020