

# **XÁC ĐỊNH CÁC NHÓM KHÁNG NGUYÊN 1.1 VÀ 2.3.2.1 CỦA VIRUT CÚM A/H5N1 XUẤT HIỆN MỚI TẠI VIỆT NAM QUA PHÂN TÍCH ĐẶC ĐIỂM DI TRUYỀN VÀ PHẢ HỆ GEN HEMAGGLUTININ (H5) GIAI ĐOẠN 2004-2011**

*Nguyễn Thị Bích Nga và Lê Thanh Hòa*

*Viện Công nghệ sinh học-Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

## **TÓM TẮT**

Từ năm 2003 đến nay, đã có nhiều genotyp và nhóm kháng nguyên (clade) của virut cúm A/H5N1 được ghi nhận trong quần thể gia cầm tại Việt Nam. Về genotyp, có Z và G (bao gồm VN1-VN9); về nhóm kháng nguyên có clade (nhóm) 1 điển hình, xâm nhập vào Việt Nam từ 2003, clade 2.3.4 xuất hiện sau 2007 và clade 2.3.2 trong những năm gần đây. Từ các mẫu bệnh phẩm thu thập trong giai đoạn 2004 – 2011, toàn bộ gen HA (H5) (1704 – 1707 bp) của 14 chủng virut cường độc A/H5N1 đã được thu nhận bằng phương pháp PCR và giải trình tự sau khi tách dòng. Phân tích đặc điểm di truyền của gen H5 và mối quan hệ phả hệ nguồn gốc đã cho thấy: đến thời điểm hiện nay, tại Việt Nam, clade 1.1 đã xuất hiện cùng clade 1 cổ điển ở phía Nam và clade 2.3.2.1 đã thay thế clade 2.3.4 lưu hành từ 2007 trước đây, ở phía Bắc. Các chủng phân lập sau 2008 tại phía Nam (chủ yếu ở Đồng bằng sông Mê Kông) thuộc clade 1.1 và các chủng phía Bắc phân lập giữa năm 2011 (tại Quảng Trị) thuộc clade 2.3.2.1, hoàn toàn giống với A/Hubei/1/2010(H5N1) (GenBank: CY098758) gây chết người tại Trung Quốc năm 2010. Đây là một nhóm kháng nguyên mới có tính kháng nguyên khác biệt được xác định theo Tổ chức Nông lương thế giới (FAO) đưa ra từ 8/2011. Như vậy, sự xâm nhập và tiến hoá của virut cúm gia cầm A/H5N1 tại Việt Nam đã làm xuất hiện mới một số nhóm kháng nguyên, có thể làm thay đổi tính kháng nguyên dẫn đến gia cầm được tiêm phòng vaccin thuộc clade 1 thực hiện từ 2006, bị ảnh hưởng hoặc không bảo hộ miễn dịch.

**Từ khoá:** Cúm gia cầm,, Virut A/H5N1, HPAI, Nhóm kháng nguyên (clade), Genotyp, Tính kháng nguyên.

## **EMERGENCE OF NEW CLADE 1.1 AND 2.3.2.1 AVIAN INFLUENZA VIRUS (H5N1) IN VIETNAM BASED ON GENETIC AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF HEMAGGLUTININ (H5) DURING 2004-2011**

*Nguyen Thi Bich Nga and Le Thanh Hoa*

### **SUMMARY**

Since 2003 to date, there have been a number of genotypes and clades of avian influenza virus A/H5N1 recognized in avian population in Vietnam. Regarding to genotypes, there are genotype Z and G (namely, VN1-VN9); and those of clades ie., classical clade 1 introduced since 2003, clade 2.3.4 from 2007 and clade 2.3.2 in recent years. From isolates collected during 2004 – 2011, the entire sequence of hemagglutinin HA (H5) (1704 – 1707 bp) for 14 virulent strains of A/H5N1 was obtained by using PCR and sequencing after cloning. Genetic and phylogenetic analysis of HA (H5) revealed that by now in Vietnam, clade 1.1 has newly emerged and coexists with classical clade 1 in Southern; and clade 2.3.2.1 completely replaced clade 2.3.4 circulating since 2007 in Northern Vietnam. Isolates collected after 2008 in Southern (mainly, in Mekong Delta), belong to clade 1.1; and those isolated in Mid of 2011 (in Quang Tri province) to clade 2.3.2.1, highly identical to the human fatal A/Hubei/1/2010(H5N1) (GenBank: CY098758) strain of China. These viruses were grouped to the 2.3.2.1, a newly defined clade by FAO since August, 2011. It is concluded that during 2004-2011, due to introduction and evolution of avian influenza A/H5N1, there have been a number of clades emerged in Vietnam, with changes in genetic and antigenic properties that may affect protection in immunized poultry with vaccine of clade 1 applied nationwide since 2006.

**Key words:** Avian influenza, A/H5N1 virus, HPAI, Clade, Genotype, Antigenicity.

## **ĐẶT VẤN ĐỀ**

Cúm gia cầm thể độc lực cao (Highly Pathogenic Avian Influenza - HPAI) do virus cúm A/H5N1 gây ra là bệnh truyền nhiễm cấp tính có tốc độ lây lan nhanh với tỷ lệ gây chết cao (Li và cs, 2011). Từ năm 2003 đến nay, dịch cúm gia cầm HPAI đã bùng phát ở nhiều nước trên thế giới, trong đó có Việt Nam. Trải qua từng giai đoạn, cúm A/H5N1 xuất hiện tại Việt Nam gồm nhiều genotyp và nhóm kháng nguyên (clade) khác nhau, trong đó có genotyp G và Z, được phân chia thành VN1 (2001), VN2-VN3 (2003), VN4-VN5 (2005) VN6-VN7-VN8-VN9 (2007) và các nhóm kháng nguyên chủ yếu là clade 1, clade 2.3.2 và clade 2.3.4 (Wan và cs, 2008; Nguyen và cs, 2008).

Gần đây, giai đoạn 2009-2011, một số phân nhóm kháng nguyên mới được hình thành tại Việt Nam, trong đó có phân nhóm 1.1 tập trung ở phía Nam và Đồng bằng sông Cửu Long và phân nhóm 2.3.2.1 tại các tỉnh phía Bắc. Theo thông báo của Tổ chức Nông lương thế giới (FAO) và Tổ chức Y tế thế giới (WHO), hiện nay đã phát hiện các phân nhóm kháng nguyên 1.1 và 2.3.2.1 ở Việt Nam, Đông Á và Đông Nam Á (FAO, 2011; ). Do gia cầm tiêm vaccin cúm gia cầm thuộc clade 1 không bảo hộ được với virus cúm A/H5N1 clade 2.3.2.1 trong thực tế, nên Chính phủ đã có công văn 3410/VPCP-KTN ngày 26/5/2011 tạm đình chỉ chương trình phòng cúm bằng vaccin ở các tỉnh phía Bắc.

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả xác định các clade 1.1 và 2.3.2.1 xuất hiện mới tại Việt Nam trên cơ sở dữ liệu gen H5 của các mẫu bệnh phẩm thu nhận từ các tỉnh thành trong cả nước giai đoạn 2004 – 2011, phân tích so sánh và xác định clade theo tiêu chuẩn/tiêu chí của FAO/WHO/OIE.

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

### **2.1. Nguyên liệu**

Mẫu nghiên cứu là chất thẩm dịch (exudate) và niêm mạc của hầu-họng-khí-phế quản hoặc huyền dịch bệnh phẩm chứa virus cường độc cúm A/H5N1 thu thập từ gia cầm bị bệnh/chết do các cơ sở thú y cung cấp, được vô hoạt bằng nhiệt độ để đảm bảo an toàn sinh học. Mẫu bệnh phẩm thu nhận từ các tỉnh Hưng Yên, Hà Nội, Nghệ An, Khánh Hòa, Tiền Giang, An Giang, Vĩnh Long, Cần Thơ, Kiên Giang, Trà Vinh và Quảng Trị (Bảng 1). Bên cạnh danh pháp, chúng tôi sử dụng tên viết tắt của 14 chủng trong phân tích, cụ thể:

- DkMB2-07:** A/Duck/Vietnam/MB2/2007(H5N1);
- DkAG-05:** A/Duck/Vietnam/AG/2005(H5N1);
- CkVL-05:** A/Chicken/Vietnam/VL/2005(H5N1);
- CkHD1-04:** A/Chicken/Vietnam/HD1/2004(H5N1);
- MdGL-04:** A/MuscovyDuck/Vietnam/GL/2004(H5N1);
- CkKH-2010:** A/Chicken/Vietnam/KH/2010(H5N1)
- Dk0970-09:** A/Duck/Vietnam/0970/2009(H5N1);
- CkDT382-08:** A/Duck/Vietnam/DT382/2008(H5N1);
- CkKG88-08:** A/Chicken/Vietnam/KG88/2008(H5N1);
- CkTV98-08:** A/Ck/Vietnam/TV98/2008(H5N1);
- DkQT801-2011:** A/Duck/Vietnam/QT801/2011(H5N1);
- DkQT802-2011:** A/Duck/Vietnam/QT802/2011(H5N1);
- DkNA72-07:** A/duck/Vietnam/NA72/2007(H5N1);
- DkNA114-07:** A/duck/Vietnam/NA114/2007(H5N1)

### **2.2. Phương pháp nghiên cứu**

#### ***2.2.1 Phương pháp tách chiết ARN tổng số, thực hiện RT-PCR thu nhận gen H5***

Sử dụng bộ hoá chất QIAamp Viral RNA kit (QIAGEN), RNA tổng số (có ARN của hệ gen virus) được tách chiết trực tiếp từ bệnh phẩm, theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Phản ứng RT-

PCR được thực hiện với cặp mồi H5F: 5'-TCTGTCAAAATGGAGAAAATAGTG-3' và H5R: 5'-TTAAATGCAAATTCTGCATTG-3' theo chu trình nhiệt: 1 chu kỳ ở 42°C trong 60 phút, 1 chu kỳ ở 95°C trong 15 phút, sau đó 35 chu kỳ ở 94°C trong 1 phút, 55°C trong 1 phút; 72°C trong 2 phút và cuối cùng 1 chu kỳ ở 72°C trong 10 phút. Điện di kiểm tra trên thạch agarose 1%, sản phẩm toàn bộ gen H5 (khoảng 1,7 kb), được tinh sạch bằng bộ sinh phẩm QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN), nối vào vector pCR2.1 (Invitrogen), chuyển nạp vào tế bào khả biến *E. coli*, tách dòng, chọn lọc DNA tái tổ hợp mang gen H5 và giải trình tự trên máy ABI 3100 Avant Genetic Analyzer (Mỹ) tại Viện Công nghệ sinh học hoặc gửi sang Hàn Quốc.

### **2.2.2 Xử lý chuỗi gen và phân tích số liệu**

Trình tự các chuỗi nucleotid được xử lý bằng các phần mềm bao gồm SeqEd1.03, AsemblyLIGNv1.9c và hệ chương trình MacVector8.2 (Accelrys Inc) trên máy tính Macintosh. So sánh đôi chiều và xử lý số liệu các chuỗi thu nhận và Ngân hàng gen (Genbank) bằng GENEDOC2.5 (Nicolas và Nicolas, 1997). Thành phần amino acid được thu nhận bằng cách sử dụng bộ mã của vi khuẩn (bacterial code). Trình tự H5 của các chủng được so sánh về thành phần nucleotid và amino acid, xem xét mối quan hệ phả hệ nguồn gốc và xác định nhóm kháng nguyên, sử dụng chương trình MEGA4.0 phương pháp 'kết nối liền kề' NJ (Neighbor-JoiningNJ) với hệ số tin tưởng 1000 bootstrap (Tamura và cs, 2007).

## **III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

### **3.1. Thu nhận gen H5 bằng phản ứng RT-PCR**

Phản ứng RT-PCR một bước (one step RT-PCR, Invitrogen Inc.) được sử dụng để thu nhận gen H5. Tất cả các thành phần (mồi, khuôn, thành phần phản ứng) được cho vào cùng một lúc và thực hiện liên tục cả hai giai đoạn: giai đoạn RT chuyển đổi ARN thành cADN và giai đoạn nhân gen (PCR).

Gen H5 được nhân lên với cặp mồi H5F - H5R, cho sản phẩm RT-PCR gen H5 của các chủng virut cúm A/H5N1 do chúng tôi phân lập từ năm 2004 đến năm 2011, được trình bày ở Hình 1-2. Kết quả điện di trên thạch agarose cho thấy sản phẩm có kích thước khoảng 1,7 kb, hiển thị rõ ràng, đúng như dự kiến. Các sản phẩm gen H5 được tinh sạch và nối trực tiếp vào vector pCR2.1 của bộ TA-Cloning kit (Invitrogen) để lưu giữ và giải trình tự. Sau khi có chuỗi nucleotide của gen H5, các chuỗi này được sử dụng để truy cập Ngân hàng gen sử dụng chương trình BLAST nhằm thu thập các chuỗi đã công bố để phân tích so sánh đặc điểm và mối quan hệ nguồn gốc phả hệ. Danh sách các chủng được liệt kê ở Bảng 1.

### **3.2. Kết quả xác định phân nhóm kháng nguyên mới 1.1**

Chuỗi nucleotid của H5 của 28 chủng, bao gồm cả 10 chủng chúng tôi phân lập giai đoạn 2004 - 2010 tại Việt Nam, được so sánh phân tích và xác lập mối quan hệ phả hệ nguồn gốc, nhằm xác định nhóm kháng nguyên của các chủng virut cúm A/H5N1. Kết quả xác lập cây phả hệ được trình bày ở Hình 1.

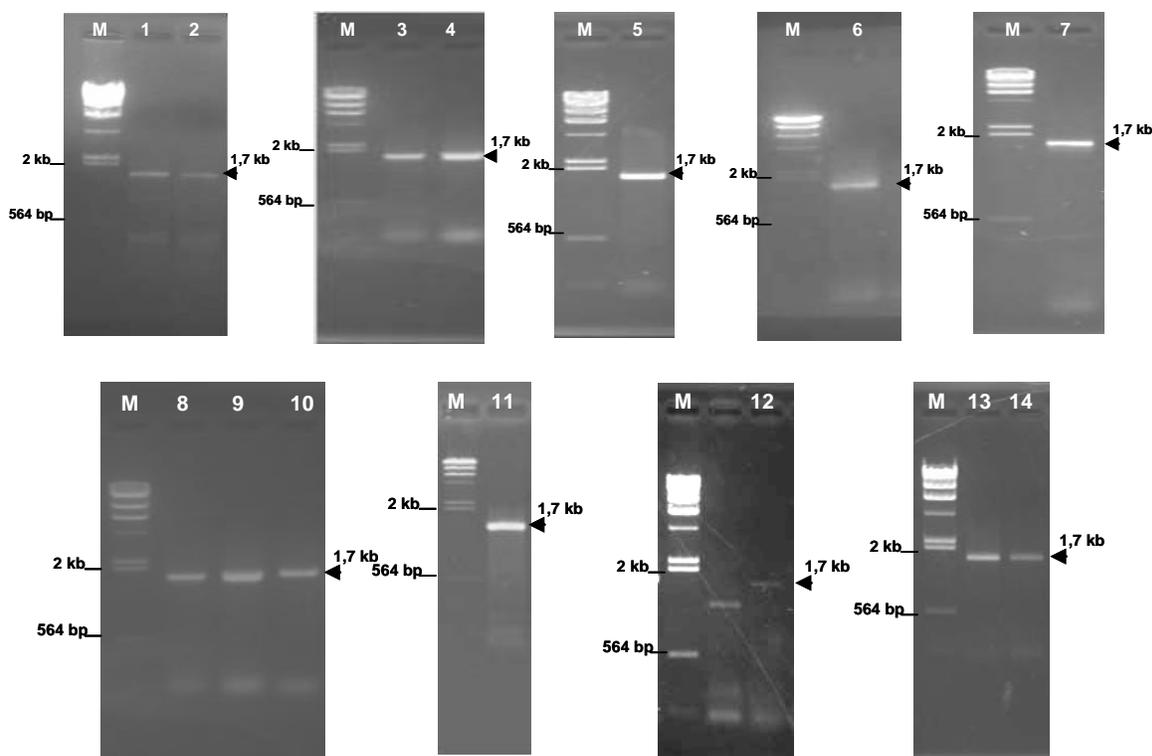
Kết quả ở Hình 1 cho thấy:

- Năm chủng virut cúm A/H5N1 do chúng tôi phân lập giai đoạn 2004 - 2007 (gồm CkHD1-04; MdGL-04; CkVL05, DkAG-05 và DkMB2-07) được xếp cùng nhóm với 2 chủng đã được WHO xác định thuộc clade 1, phân lập ở người là A-VN-1194-04(H5N1), số đăng ký: EF541402; và A-VN-1203-04(H5N1), số đăng ký: EF541403. Tập hợp cùng với các chủng này là A-HN-30408-05(H5N1) (GenBank: AB239125) và một số chủng của Thái Lan phân lập năm 2005 (Ck-TL-NIAH108-05(H5N1), AB450565); năm 2006 (A-TL-NBL1-06, GQ466176) và năm 2008 (Ck-TL-CU-354-08, CY047457).

Năm chủng khác của chúng tôi phân lập ở các năm 2008 - 2010 (CkDT382-08; CkKG88-08; CkTV98-08; Dk0970-09 và CkHK-2010), được xác định nằm trong phân nhánh thuộc clade 1.1 xuất hiện mới tại Việt Nam, cùng với các chủng Md-VN-OIE-559-2011 (GenBank:

AB636524) và một chủng phân lập ở người của Campuchia là A-Cambodia-R0405050-2007(H5N1), số đăng ký: FJ225472; và một số chủng của Việt Nam năm 2006 (MdBT-342-06(H5N1), EU124167; Dk-VN-CaM-498A-06(H5N1), EU124164); năm 2007 (Ck-VN29-07(H5N1), CY029631; DkBL-07(H5N1), GU052526).

Như vậy, trong số các chủng chúng tôi phân lập của ở phía Nam, chủ yếu là ở đồng bằng sông Cửu Long, kết quả cho thấy, những chủng phân lập từ 2004 - 2005 hoàn toàn thuộc clade 1; còn các chủng phân lập gần đây (2008 - 2010) thuộc clade 1.1, mới được ghi nhận bởi FAO và WHO/OIE/FAO (FAO, 2011; WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group, 2008; WHO, 2011).



Hình 1: Điện di kiểm tra sản phẩm RT-PCR gen H5 trên thạch agarose 1% của 14 chủng nghiên cứu.

Ghi chú: M: Chỉ thị phân tử ADN của thực khuẩn thể Lamda được cắt bằng HindIII. Sản phẩm RT-PCR gen H5 (~1,7 kb) bao gồm: 1. Chủng CkHD1(04); 2. Chủng MdGL(04); 3. Chủng DkAG(05); 4. Chủng CkVL(05); 5. Chủng DkNA72(2007); 6. Chủng DkNA114(2007); 7. Chủng DkMB2(2007); 8. Chủng CkDT382(08); 9. Chủng CkKG88(08); 10. Chủng CkTV98(08). 11. Chủng Dk0970(09) 12. Chủng CkKH(2010); 13. Chủng DkQT801(2011); 14. Chủng DkQT802(2011).

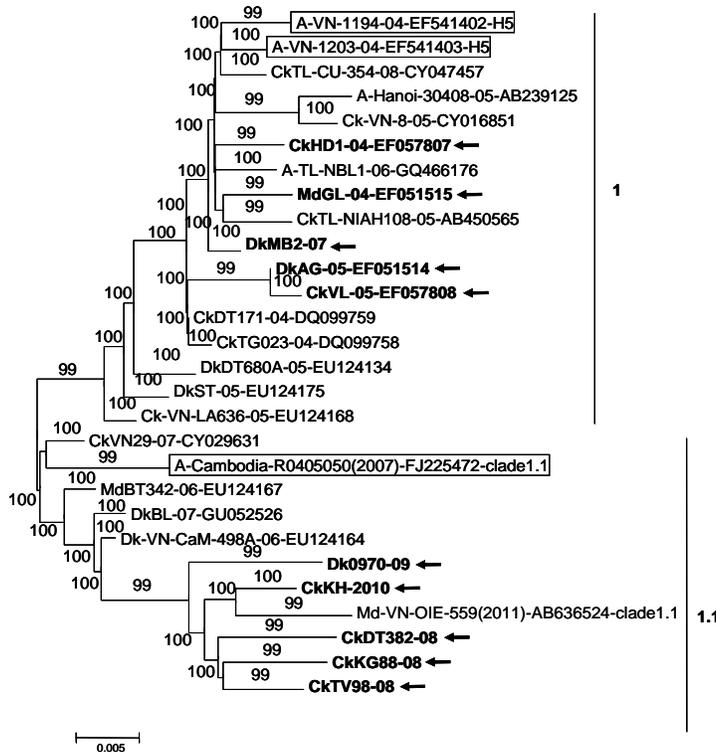
**Bảng 1: Danh sách các chủng virut cúm A/H5N1 sử dụng gen H5 trong so sánh, phân tích và xây dựng mối quan hệ phả hệ nguồn gốc**

Số TT	Ký hiệu chủng	Nhóm kháng nguyên (clade)	Vật chủ	Thời gian phân lập	Quốc gia	Số đăng ký trong Ngân hàng gen
1.	A/Vietnam/1194/2004 (H5N1)	1	Người	2004	Việt Nam	EF541402
2.	A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)	1	Người	2004	Việt Nam	EF541403
3.	A/Chicken/Thailand/CU-354/2008 (H5N1)	1	Gà	2008	Thái Lan	CY047457
4.	A/Duck/Vietnam/MB2/ 2007(H5N1)*	1	Vịt	2007	Việt Nam	Đang đăng ký
5.	A/Duck/Vietnam/AG/2005(H5N1)*	1	Vịt	2005	Việt Nam	EF051514
6.	A/Chicken/Vietnam/VL/ 2005 (H5N1)*	1	Gà	2005	Việt Nam	EF057808

7.	A/Chicken/Vietnam/HD1/2004(H5N1)*	1	Gà	2004	Việt Nam	EF057807
8.	A/Muscovy Duck/Vietnam/GL/2004 (H5N1)*	1	Ngan	2004	Việt Nam	EF051515
9.	A/Thailand/NBL1/2006 (H5N1)	1	Người	2006	Thái Lan	GQ466176
10.	A/chicken/Suphanburi/NIAH108192/2005(H5N1)	1	Gà	2005	Thái Lan	AB450565
11.	A/Chicken/Vietnam/LA636/2005(H5N1)	1	Gà	2005	Việt Nam	EU124168
12.	A/Duck/Vietnam/Dong Thap 680A/2005(H5N1)	1	Vịt	2005	Việt Nam	EU124134
13.	A/Duck/Vietnam/Soc Trang 680C/2005(H5N1)	1	Vịt	2005	Việt Nam	EU124175
14.	A/Hanoi/30408/2005(H5N1)	1	Người	2005	Việt Nam	AB239125
15.	A/chicken/Viet Nam/8/2005(H5N1)	1	Gà	2005	Việt Nam	CY016851
16.	A/chicken/Viet Nam/DT-171/2004(H5N1)	1	Gà	2004	Việt Nam	DQ099759
17.	A/chicken/Viet Nam/TG-023/2004(H5N1)	1	Gà	2004	Việt Nam	DQ099758
18.	A/Muscovy Duck Vietnam/OIE/559/2011	1.1	Ngan	2011	Việt Nam	AB636524
19.	A/Chicken/Vietnam/KH/2010(H5N1)*	1.1	Gà	2010	Việt Nam	Đang đăng ký
20.	A/Duck/Vietnam/0970/2009(H5N1)*	1.1	Vịt	2009	Việt Nam	Đang đăng ký
21.	A/Duck/Vietnam/DT382/2008(H5N1)*	1.1	Gà	2008	Việt Nam	Đang đăng ký
22.	A/Chicken/Vietnam/KG88/2008(H5N1)*	1.1	Gà	2008	Việt Nam	Đang đăng ký
23.	A/Ck/Vietnam/TV98/2008(H5N1)*	1.1	Gà	2008	Việt Nam	Đang đăng ký
24.	A/duck/BacLieu/07-09/2007(H5N1)	1.1	Vịt	2007	Việt Nam	GU052526
25.	A/Chicken/Vietnam/29/2007(H5N1)	1.1	Gà	2007	Việt Nam	CY029631
26.	A/Cambodia/R0405050/2007(H5N1)	1.1	Người	2007	Campuchia	FJ225472
27.	A/Duck/Vietnam/Ca Mau/498A/2006 (H5N1)	1.1	Vịt	2006	Việt Nam	EU124164
28.	A/Muscovy Duck/Vietnam/ BenTre/342/2006	1.1	Vịt	2006	Việt Nam	EU124167
29.	A/duck/Vietnam/568/2005(H5N1)	2.3.2	Vịt	2005	Việt Nam	DQ320939
30.	A/Muscovy duck/Vietnam/1455/2006(H5N1)	2.3.2	Ngan	2006	Việt Nam	CY029535
31.	A/little egret/Hong Kong/8863/2007(H5N1)	2.3.2.1	Cò	2007	Trung Quốc	CY036205
32.	A/Muscovy duck/Vietnam/18153/2009(H5N1)	2.3.2.1	Ngan	2009	Việt Nam	JN055369
33.	A/duck/Hokkaido/WZ83/2010(H5N1)	2.3.2.1	Vịt	2010	Nhật Bản	AB612901
34.	A/Hubei/1/2010(H5N1)	2.3.2.1	Người	2010	Trung Quốc	CY098758
35.	A/duck/Lao/471/2010(H5N1)	2.3.2.1	Vịt	2010	Lào	CY098352
36.	A/Crow-Bangladesh/11rs/1984/11/2011(H5N1)	2.3.2.1	Quạ	2011	Bangladesh	JN795913
37.	A/Duck/Vietnam/QT801/2011(H5N1)*	2.3.2.1	Vịt	2011	Việt Nam	JN936881
38.	A/Duck/Vietnam/QT802/2011(H5N1)*	2.3.2.1	Vịt	2011	Việt Nam	JN936882
39.	A/tufted duck/Fukushima/16/2011(H5N1)	2.3.2.1	Vịt	2011	Nhật Bản	AB629698
40.	A/Mallard duck/Korea/W401/2011(H5N1)	2.3.2.1	Ngan	2011	Hàn Quốc	JN202558
41.	A/Anhui/1/2005(H5N1)	2.3.4	Người	2005	Trung Quốc	DQ371928
42.	A/chicken/Fujian/584/2006(H5N1)	2.3.4	Gà	2006	Trung Quốc	DQ992831
43.	A/Guizhou/1/2009(H5N1)	2.3.4.1	Người	2009	Trung Quốc	CY098737
44.	A/Hunan/2/2009(H5N1)	2.3.4.1	Người	2009	Trung Quốc	CY098751
45.	A/Chicken/Bangladesh/11rs/1984/30/2011(H5N1)	2.3.4.2	Gà	2011	Bangladesh	JN795924
46.	A/Vietnam/HN31432M/2008(H5N1)	2.3.4.2	Người	2008	Việt Nam	HM114617
47.	A/chicken/Vietnam/27310/2009(H5N1)	2.3.4.3	Gà	2009	Việt Nam	JN055384
48.	A/chicken/Vietnam/18082/2009(H5N1)	2.3.4.3	Gà	2009	Việt Nam	JN055370
49.	A/Vietnam/UT31413II/2008(H5N1)	2.3.4.3	Người	2008	Việt Nam	HM114609
50.	A/Vietnam/UT31412II/2008(H5N1)	2.3.4.3	Người	2008	Việt Nam	HM114601
51.	A/Vietnam/UT31394II/2008(H5N1)	2.3.4.3	Người	2008	Việt Nam	HM114593
52.	A/duck/Vietnam/NA72/2007(H5N1)*	2.3.4.3	Vịt	2007	Việt Nam	Đang đăng ký
53.	A/duck/Vietnam/NA114/2007(H5N1)*	2.3.4.3	Vịt	2007	Việt Nam	Đang đăng ký

54.	A/Viet Nam/HN31242/2007(H5N1)	2.3.4.3	Người	2007	Việt Nam	EU294369
55.	A/Vietnam/UT31312II/2007(H5N1)	2.3.4.3	Người	2007	Việt Nam	HM114577
56.	A/Vietnam/HN31388M1/2007(H5N1)	2.3.4.3	Người	2007	Việt Nam	HM114585
57.	A/duck/Ha Tinh/07-53/2007(H5N1)	2.3.4.3	Vịt	2007	Việt Nam	GU050428
58.	A/duck/Nghe An/07-49/2007(H5N1)	2.3.4.3	Vịt	2007	Việt Nam	GU050421
59.	A/duck/Phu Tho/07-48/2007(H5N1)	2.3.4.3	Vịt	2007	Việt Nam	GU050413
60.	A/muscovy duck/Son La/07-85/2007(H5N1)	2.3.4.3	Ngan	2007	Việt Nam	GU050491

Ghi chú: Các chủng có ký hiệu (\*) là các chủng do chúng tôi thu nhận.



**Hình 2: Cây phả hệ xác định sự hình thành phân nhóm kháng nguyên mới clade 1.1** dựa trên thành phần nucleotid của gen H5 (28 chủng so sánh), bằng chương trình MEGA4.1, phương pháp “kết nối liên kế” NJ (Neighbor-Joining) với hệ số tin tưởng 1000 bootstrap. Mũi tên chỉ dẫn là các chủng (10 chủng) trong nghiên cứu của chúng tôi. Các chủng đóng khung được WHO khuyến cáo sử dụng làm nguồn cung cấp gen kháng nguyên kiến tạo giống để sản xuất vaccin.

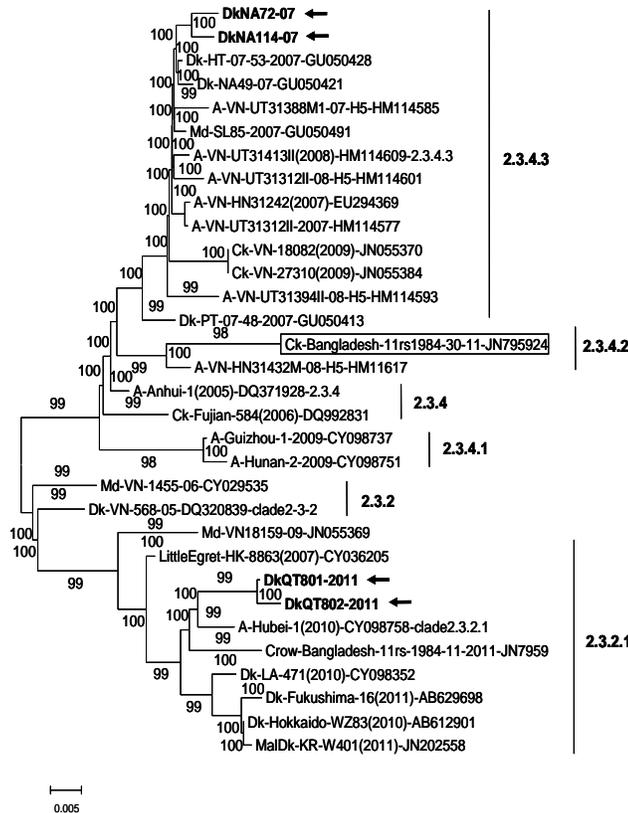
### 3.3. Kết quả xác định phân nhóm kháng nguyên mới 2.3.2.1 và 2.3.4.3

Chuỗi nucleotid H5 của 32 chủng bao gồm cả 2 chủng chúng tôi phân lập năm 2007 tại Nghệ An (DkNA72-07 và DkNA114-07) và 2 chủng tháng 7 năm 2011 tại Quảng Trị (DkQT-801-2011 và DkQT-802-2011) được so sánh phân tích với các chủng đã được WHO công bố (WHO, 2011) và xác lập mối quan hệ phả hệ nguồn gốc, nhằm xác định nhóm kháng nguyên của các chủng này. Kết quả xác lập cây phả hệ được trình bày ở Hình 3.

Kết quả ở Hình 3 cho thấy:

- Hai chủng DkNA72-07 và DkNA114-07 thuộc phân nhánh clade 2.3.4.3 cùng với một số chủng đã được phân lập ở gia cầm và người trong các năm 2007, 2008 và 2009, trong đó có chủng A-VN-UT31413II-2008(H5N1), GenBank: HM114609 thuộc clade 2.3.4.3 (WHO, 2011).
- Hai chủng phân lập năm 2011 là DkQT801-2011 và DkQT802-2011 nằm trong clade 2.3.2.1, một clade mới do FAO xác lập và có quan hệ gần với một chủng gây chết người của

Trung Quốc là A-Hubei-1-2010(H5N1), GenBank: CY098758. Mức độ đồng nhất của gen H5 ở các chủng này đạt 98,5% (không trình bày ở đây). Như vậy, có thể chủng gây bệnh trên người này của Trung Quốc đã xâm nhập vào Việt Nam, lưu lạc đâu đó trong quần thể cúm gia cầm, cho đến khi xảy ra các ổ dịch giữa năm 2011 và được phát hiện.



**Hình 3: Cây phả hệ xác định sự hình thành phân nhóm kháng nguyên mới clade 2.3..2.1 và 2.3.4.3, dựa trên thành phần nucleotid của gen H5 (32 chủng so sánh), bằng chương trình MEGA4.1, phương pháp “kết nối liền kề” NJ (Neighbor-Joining) với hệ số tin tưởng 1000 bootstrap. Mũi tên chỉ dẫn là các chủng (4 chủng) trong nghiên cứu của chúng tôi. Các chủng đồng khung được WHO khuyến cáo sử dụng làm nguồn cung cấp gen kháng nguyên kiến tạo giống để sản xuất vaccin.**

**Một số bàn luận:**

- Cho đến nay, sau gần 10 năm xuất hiện tại Việt Nam, virus cúm A/H5N1 đã trở thành một tác nhân nguy hiểm cho gia cầm và cộng đồng và là mối nguy cơ càng gia tăng khi vaccin hiện nay không có đáp ứng miễn dịch đối với các chủng virus thuộc các clade mới xuất hiện năm 2011. Theo kết quả thí nghiệm của Cục Thú y liên quan đến clade 2.3.2.1 xuất hiện năm 2011 cho thấy, sau khi công cường độc 100% gà bị chết trong vòng 3 ngày và 20% vịt chết trong vòng 7 ngày. Như vậy nhóm virus này có độc lực cao với gà hơn đối với vịt và miễn dịch do vaccin đang sử dụng thuộc clade 1 đã không bảo hộ đối với các chủng cúm A/H5N1 cường độc thuộc clade 2.3.2.1 mới xuất hiện này.

- Hiện nay, clade 1.1 mới nảy sinh đang thay thế clade 1 có từ giai đoạn 2004 - 2005 ở hầu hết các tỉnh phía Nam. Đồng thời, trong năm 2011, clade 2.3.2.1 đã được phát hiện ở một số tỉnh phía Bắc Việt Nam và vùng duyên hải miền Trung thay thế cho clade 2.3.2 và 2.3.4 trước đây (FAOAIDEnews, 2011).

- Tại Việt Nam, từ khi xuất hiện đến nay, đã có sự tồn tại của nhiều nhóm kháng nguyên khác nhau, trong đó có phân nhóm xuất hiện mới, được công bố trong năm 2011 là clade 2.3.2.1.

Clade 2.3.2.1 được tiến hoá từ clade 2.3.2 đã được phát hiện từ chim hoang dã, sau đó là ở gia cầm ở Trung Quốc (vùng Thanh Hải), Mông Cổ, Nga, Nhật Bản, Hàn Quốc, Lào và Hồng Kông và mới đây là Việt Nam (WHO, 2011; Hu và cs, 2011).

- Hiện tại ở Việt Nam chưa phát hiện virus cúm A/H5N1 clade 2.3.2.1 ở người. Tuy nhiên do chưa có vaccine tiêm phòng cho gia cầm đối với clade 2.3.2.1 mới này và gia cầm hoàn toàn bỏ ngõ không được bảo hộ miễn dịch, tạo điều kiện cho virus clade 2.3.2.1 có thể tiếp tục biến đổi trở thành nguy cơ đáng lo ngại gây bệnh trên người (WHO, 2011). Do đó, việc quan trọng cần làm là phải tăng cường công tác giám sát virus cúm ở gia cầm, chủ động áp dụng các biện pháp phòng chống thích hợp, nhằm ngăn chặn sự lây truyền ở gia cầm và ngăn chặn lây truyền từ gia cầm sang người.

#### IV. KẾT LUẬN

Trong các chủng nghiên cứu của chúng tôi từ năm 2004 đến năm 2011, có 4 phân nhóm kháng nguyên được xác định đó là clade 1, clade 1.1, clade 2.3.4.3 và clade 2.3.2.1, trong đó clade 1.1 và clade 2.3.2.1 là các phân nhóm kháng nguyên mới, gây chết người ở các nước bên cạnh Việt Nam. Sự xuất hiện mới của clade 1.1 và 2.3.2.1 đòi hỏi cần có loại vaccine phù hợp tính kháng nguyên để tạo miễn dịch cho quần thể gia cầm, bảo vệ gia cầm và hạn chế nguy cơ gây bệnh ở người tại Việt Nam.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- 1.FAO (2011). Bird Flu rears its head again 29-08-2011  
<http://www.fao.org/news/story.en/item/87196/icode/>
- 2.FAOAIDEnews (2011). Animal Influenza Disease Emergency, Situation Update 80, Bird flu Rears its Head Again:Increased Preparedness and Surveillance Urged Against Variant Strain.
- 3.Hu X, Liu D, Wang M, Yang L, Wang M, Zhu Q, et al. (2011). Clade 2.3.2 avian influenza virus (H5N1), Qinghai Lake region, China, 2009-2010. *Emerg Infect Dis*, 17(3):560-2.
- 4.Li XH, Tian HD, Heiner M and Li DM (2011). Global occurrence and spread of highly pathogenic avian influenza virus of the subtype H5N1. *Avian Dis*, 55(1):21-8.
- 5.Nguyen TD, Nguyen TV, Vijaykrishna D, Webster RG, Guan Y, Peiris MJS and Smith GJD (2008), Multiple Sublineages of Influenza A Virus (H5N1) Vietnam 2005-2007. *Emerging Infec Dis*, 14(4):632-636.
- 6.Nicholas KB and Nicholas HJ Jr (1997). Genedoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. [www.psc.edu/biomed/genedoc](http://www.psc.edu/biomed/genedoc). Distributed by the author.
- 7.Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S (2007). MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 24:1596–1599.
- 8.Wan XF, Nguyen T, Davis CT, Smith CB, Zhao ZM, Carrel M, Inui K, Do HT, Mai DT, Jadhao S, Balish A, Shu B, Luo F, Emch M, Matsuoka Y, Lindsom SE, Cox NJ, Nguyen CV, Klimov A and Donis RO (2008), Evolution of highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses in Vietnam between 2001 and 2007. *PLoS One*, 3(10):e3462.
- 9.WHO (2011). Antigenic and genetic characteristics of zoonotic influenza viruses and development of candidate vaccine viruses for pandemic preparedness. WHO report, September, 2011  
<http://www.who.int/influenza/resources/documents/201109h5h9vaccinevirutupdate.pdf>.
- 10.WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group (2008). Toward a Unified Nomenclature System for Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1), *Emerg Infect Dis*, 14(7): e1.