

DOI:10.22144/ctu.jsi.2016.058

## SỰ LƯU HÀNH VÀ BIẾN ĐỔI DI TRUYỀN CỦA VIRUS CÚM GIA CẦM TYPE A H5N1 TRÊN GIA CẦM TẠI MỘT SỐ TỈNH ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Tiền Ngọc Tiên, Quách Thúy Lan, Nguyễn Khoa và Lý Thị Liên Khai

Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

### Thông tin chung:

Ngày nhận: 05/08/2016

Ngày chấp nhận: 25/10/2016

### Title:

Circulation and genetic variation of type A H5N1 avian influenza virus on poultry in some provinces in the Mekong Delta

### Từ khóa:

Cúm gia cầm, Gà, Type A H5N1, Việt Nam, Vịt

### Keywords:

Avian influenza, Chicken, Duck, Type A H5N1, Vietnam

### ABSTRACT

Avian influenza disease is an acute infectious disease of avian caused by Orthomyxoviridae virus. The present study on the circulation and genetic variation of type A H5N1 avian influenza virus in Hau Giang, Soc Trang, Tra Vinh and Vinh Long provinces has been conducted by sampling swabs on poultry (healthy chicken and duck) trading at live bird market or slaughterhouses. The swab samples were tested using Real time RT-PCR technique to identify type A H5N1 avian influenza virus and to define the rate of prevalence and further implement HA gene sequencing for determination of genetic variation and clade. It was shown that the average prevalence of type A H5N1 avian influenza virus on poultry in above provinces in the Mekong delta was 6,5% whereas the prevalence of type A H5N1 avian influenza virus on duck and chicken was 9,7% and 4%, respectively. Besides, results of genetic variation investigation showed that nucleotide differentiation between circulating strains in the provinces and the reference strain A/Hong Kong/6841/2010 was from 2.3 – 3.2%. The amino acid sequence motif at connecting position between HA1 and HA2 segment was Q-ERRRKR-G and similar to the sequence of reference strain A/Hong Kong/6841/2010. The strains of type A H5N1 avian influenza virus circulating in the provinces of Hau Giang, Soc Trang, Tra Vinh and Vinh Long belong to virus clade of 2.3.2.1c.

### TÓM TẮT

Cúm gia cầm là bệnh truyền nhiễm cấp tính của loài gia cầm do virus cúm thuộc họ Orthomyxoviridae gây ra. Trong nghiên cứu sự lưu hành và biến đổi di truyền của virus cúm gia cầm type A H5N1 tại các tỉnh Hậu Giang, Sóc Trăng, Trà Vinh và Vĩnh Long đã tiến hành lấy mẫu dịch hầu họng (swab) trên gà, vịt khỏe bán tại các chợ và các lò giết mổ. Các mẫu dịch hầu họng được xét nghiệm bằng kỹ thuật Real time RT-PCR để định danh virus cúm gia cầm type A H5N1 nhằm xác định tỷ lệ lưu hành. Giải trình tự gene HA đối với một số mẫu đại diện để xác định sự biến đổi di truyền và clade virus. Kết quả cho thấy, tỷ lệ lưu hành của virus cúm gia cầm type A H5N1 trên gia cầm tại bốn tỉnh vùng Đồng bằng sông Cửu Long (Hậu Giang, Sóc Trăng, Trà Vinh, Vĩnh Long) là 6,5%, tỷ lệ lưu hành trên vịt là 9,7% và trên gà là 4%. Bên cạnh đó, kết quả khảo sát sự biến đổi di truyền cho thấy, tỷ lệ nucleotide của các chủng virus cúm gia cầm type A H5N1 lưu hành tại các địa phương sai khác so với chủng virus tham chiếu A/Hong Kong/6841/2010 từ 2,3-3,2%. Trình tự các acid amin ở vị trí nối kết giữa đoạn HA1 và HA2 là Q-ERRRKR-G tương đồng với trình tự của chủng virus tham chiếu A/Hong Kong/6841/2010. Các chủng virus cúm gia cầm type A H5N1 lưu hành tại các tỉnh Hậu Giang, Sóc Trăng, Trà Vinh và Vĩnh Long thuộc clade 2.3.2.1c

Trích dẫn: Tiền Ngọc Tiên, Quách Thúy Lan, Nguyễn Khoa và Lý Thị Liên Khai, 2016. Sự lưu hành và biến đổi di truyền của virus cúm gia cầm Type A H5N1 trên gia cầm tại một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. Số chuyên đề: Nông nghiệp (Tập 2): 142-151.

## 1 GIỚI THIỆU

Cúm gia cầm (Avian Influenza) là bệnh truyền nhiễm cấp tính của nhiều loài gia cầm, do virus cúm A thuộc họ *Orthomyxoviridae* gây ra. Virus cúm được phân làm hai loại là có độc lực cao HPAI (High Pathogenic Avian Influenza) và loại có độc lực thấp LPAI (Low Pathogenic Avian Influenza). Sự phân loại này dựa trên cơ sở khả năng của virus gây bệnh cho gia cầm (OIE, 2015). Năm 2015, các ổ dịch cúm gia cầm H5N1 đã xuất hiện tại 18 xã, phường của 17 huyện, thị xã thuộc 11 tỉnh, thành phố (Cà Mau, Trà Vinh, Vĩnh Long, Sóc Trăng, thành phố Cần Thơ, Đăk Lăk, Hà Tĩnh, Kom Tum, Nghệ An, Ninh Thuận, Thanh Hóa). Số gia cầm mắc bệnh là 14.138 con, số gia cầm bị tiêu hủy là hơn 16.128 con (Cục Thú y, 2015).

Bên cạnh đó, theo Cục Thú y kết quả giám sát sự lưu hành của virus cúm gia cầm type A H5N1 của năm 2014 cho thấy có sự lưu hành virus cúm gia cầm type A H5N1 trên vịt buôn bán tại các chợ với tỷ lệ lưu hành là 4,13%; clade virus cúm gia cầm type A H5N1 đang lưu hành và gây bệnh tại Đồng bằng sông Cửu Long là clade 1.1 và 2.3.2.1c (Cục Thú y, 2014).

Đồng bằng Sông Cửu Long có ngành chăn nuôi gia cầm phát triển, đặc biệt là vịt được chăn nuôi phổ biến theo phương thức chạy đồng, nên khả năng làm lây lan bệnh cúm gia cầm type A H5N1 từ các đàn vịt sang các quần thể gia cầm khác là rất cao. Vì vậy, việc xác định được tỷ lệ lưu hành của virus cúm gia cầm type A H5N1 trên gia cầm có ý nghĩa rất quan trọng trong công tác dự báo nguy cơ xảy ra bệnh cúm gia cầm. Xuất phát từ những thực tế trên chúng tôi tiến hành nghiên cứu “**Sự lưu hành và biến đổi di truyền của virus cúm gia cầm type A H5N1 trên gia cầm tại một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long**” nhằm xác định được tỷ lệ lưu hành và biến đổi di truyền của virus cúm gia cầm type A H5N1 đang lưu hành trên gia cầm tại các địa phương thuộc Đồng bằng sông Cửu Long.

## 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Vật liệu

Nghiên cứu được thực hiện tại tỉnh Hậu Giang, Sóc Trăng, Trà Vinh, Vĩnh Long, Cơ quan Thú y vùng VII và Trường Đại học Cần Thơ từ tháng 01/2015 đến 12/2015.

Đối tượng nghiên cứu là gà, vịt khỏe bán tại các chợ hoặc trong các lò giết mổ. Mẫu dịch hầu họng (swab) được lấy ngẫu nhiên từ gà, vịt bán tại các chợ hoặc tại các lò giết mổ, gộp 5 mẫu dịch hầu

họng của 5 con gia cầm (cùng loài) thành 1 mẫu xét nghiệm và cho vào dung dịch bảo quản mẫu. Tại mỗi tỉnh, lấy 18 mẫu swab gộp trên vịt và 24 mẫu swab gộp trên gà. Tổng cộng tại 4 tỉnh lấy 72 mẫu gộp trên vịt và 96 mẫu gộp trên gà.

Trình tự nucleotide của các chủng virus cúm gia cầm type A H5N1 tham chiếu A/Hong Kong/6841/2010/H5N1 (clade 2.3.2.1c; HQ636461), A/Hubei/1/2010/H5N1 (clade 2.3.2.1a; CY098758), A/barn Swallow/Hong Kong/1161/2010/H5N1 (clade 2.3.2.1b; KC357320), A/Vietnam/1203/2004 (clade 1; HM006759), A/Goose/Guangdong/1/1996 (clade 0; AF144305).

### 2.2 Xác định virus cúm gia cầm type A H5N1 bằng kỹ thuật Real time RT-PCR (Cục Thú y, 2014)

Quy trình, nguyên liệu, cặp mồi và đoạn dò xét nghiệm virus cúm gia cầm type A H5N1 thực hiện theo hướng dẫn của Cục Thú y.

Mẫu swab vận chuyển về phòng thí nghiệm được lắc đều và loại bỏ các que tăm bông sau đó ly tâm ở 3.500g/10 phút, thu phần dịch nổi ở trên tiến hành chiết xuất RNA (quy trình chiết xuất theo hướng dẫn của nhà sản xuất, sử dụng bộ kit MagMAX 96 AI/ND RNA Isolation kit – Mỹ và bộ kit Taco – Đài Loan), thực hiện xét nghiệm bằng kỹ thuật Real time RT-PCR để phát hiện virus cúm gia cầm type A subtype H5N1.

Thành phần của hỗn hợp nguyên liệu (Master mix) (Invitrogen Superscript III Platinum One step qRT-PCR Kit – Mỹ), thể tích cho mỗi phản ứng là 15 µl bao gồm nước không có enzyme phá hủy RNA và DNA :4,3 µl; dung dịch đệm (2x): 7,5 µl; Mồi xuôi, ngược (20µM) và đoạn dò (6µM): 0,9 µl; Enzyme: 0,3 µl. Cho 13 µl hỗn hợp nguyên liệu vào ống tube (0,2 ml), cho tiếp 2 µl mẫu RNA vào ống tube (0,2 ml), đặt ống vào máy Realtime RT-PCR thực hiện chu trình luân nhiệt như sau: 1 chu kỳ [50°C trong 15 phút, 95°C trong 2 phút], sau đó 40 chu kỳ [95°C trong 10 giây, 60°C trong 40 giây] đọc tín hiệu huỳnh quang ở bước annealing-extension (60°C trong 40 giây) (SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit Product Information Sheet). Xét nghiệm được thực hiện trên máy real time RT-PCR IQ5 của hãng sản xuất Biorad Inc.

### 2.3 Đọc kết quả

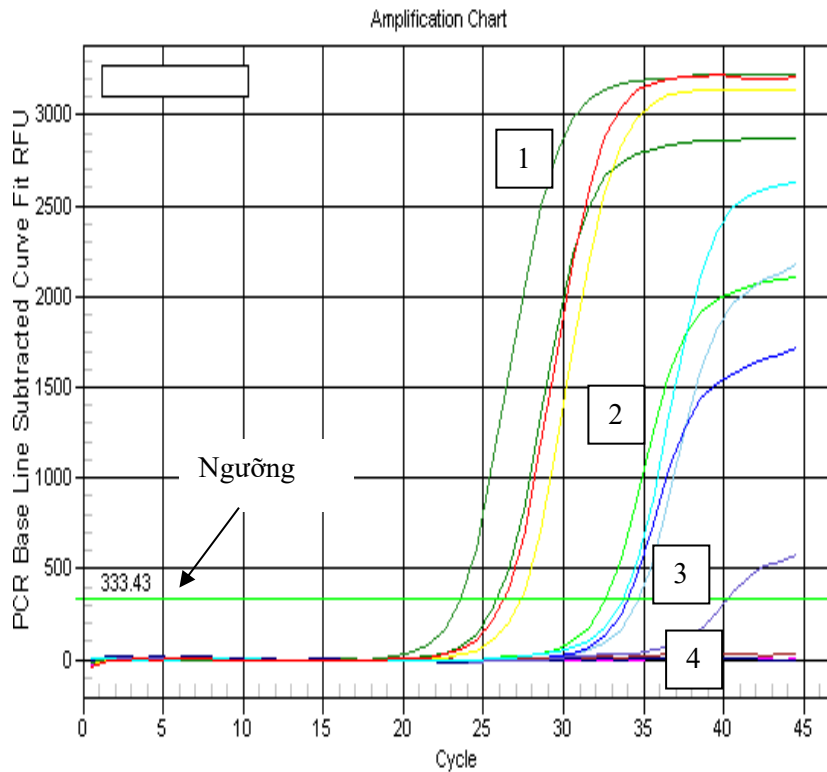
Kết quả được công nhận khi đối chứng dương tính có Ct (cycle threshold) như đã biết (28 – 31 Ct)

Đối chứng âm: không có Ct

Mẫu dương tính: có giá trị Ct ≤ 35

Mẫu âm tính: không có giá trị Ct

Mẫu nghi ngờ dương tính: có Ct value >35



**Hình 1: Các đường chuẩn biểu diễn số lượng đơn vị huỳnh quang của kỹ thuật rRT-PCR**

(1): mẫu dương tính mạnh, (2): mẫu dương tính yếu, (3): mẫu nghi ngờ, (4): mẫu âm tính

Xác định biến đổi di truyền và nhánh virus cúm gia cầm type A H5N1 lưu hành bằng kỹ thuật giải trình tự và phân tích trình gene HA.

Để giải trình tự đoạn gene HA của virus cúm gia cầm type A H5N1, chúng tôi sử dụng hai cặp primer đặc hiệu để thực hiện khuếch đại bằng phương pháp RT-PCR. Cặp mồi thứ nhất khuếch đại đoạn gene HA1 có kích thước sản phẩm khuếch đại là 1100 bp và cặp mồi thứ hai khuếch đại đoạn gene HA2 cũng có kích thước sản phẩm khuếch đại là 1100 bp. Các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu theo hướng dẫn của Trung tâm Phòng chống và Kiểm soát dịch bệnh của Mỹ (CDC).

Mồi xuôi:

5' AGCAAAAGCAGGGGTGTYTAAT 3', mồi ngược: 5' CCATACCAACCATCTAYCATTCC 3'.

Các primer được dùng trong phản ứng RT-PCR để thu được đoạn gene HA2:

Mồi xuôi:

5'AYGCMTAYAARATTGTCAAG 3' mồi ngược:

5' AGTAGAAACAAGGGTGTTTTAACTACAAT 3'

Thành phần của hỗn hợp nguyên liệu (Master mix) (Invitrogen Superscript III Platinum One step qRT-PCR Kit – Mỹ), thể tích mỗi phản ứng là 25 µl bao gồm nước không có enzyme phá hủy RNA và DNA: 18,75 µl; dung dịch đệm (2x): 3 µl; mồi xuôi và ngược (20µM): 2 µl; Enzyme: 0,25 µl. Cho 13 µl hỗn hợp nguyên liệu vào ống tube (0,2 ml), cho tiếp 2 µl mẫu RNA vào ống tube (0,2 ml), đặt ống vào máy Realtime RT-PCR thực hiện chu trình luân nhiệt như sau: 1 chu kỳ [50°C trong 30 phút, 94°C trong 3 phút], sau đó 35 chu kỳ [94°C trong 15 giây, 60°C trong 45 giây] và chu kỳ cuối cùng là 72°C trong 8 phút (SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit Product Information Sheet).

Kiểm tra kích thước sản phẩm khuếch đại bằng phương pháp điện di trên thạch 2%. Sản phẩm

khuếch đại của đoạn gene HA1 và HA2 có kích thước 1100bp.

Chọn những mẫu có sản phẩm khuếch đại đoạn gene HA1 và HA2 đúng kích thước (1.100bp) theo thiết kế gửi đi Công ty Macrogen, Hàn Quốc giải trình tự gene.

**Phương pháp xử lý số liệu**

Các chuỗi trình tự đoạn gene HA của virus cúm gia cầm type A H5N1 được xử lý và phân tích bằng phần mềm Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 6.0; Tamura *et al.*, 2013)

Sau khi có kết quả giải trình tự đoạn gene HA1 và HA2 thì sử dụng phần mềm Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 6.0;

Tamura *et al.*, 2013) để liên kết, so sánh với các chủng tham chiếu từ ngân hàng gene bằng chức năng liên kết (Alignment by ClustalW), sau đó cắt bỏ những phần trùng lặp trình tự nucleotide giữa đoạn gene HA1 và HA2 và ghép nối hai đoạn lại với nhau thành một chuỗi hoàn chỉnh; phân tích nhằm xác định sự biến đổi di truyền bằng chức năng liên kết (Alignment by ClustalW) và xác định phân nhóm virus cúm gia cầm type A H5N1 bằng phương pháp kết nối liên kề (Neighbor-Joining method) với hệ số Bootstap 1.000 lần lặp lại.

Các số liệu được xử lý bằng Fixer và Yates.

**3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**3.1 Kết quả khảo sát sự lưu hành của virus cúm gia cầm type A H5N1 trên gia cầm**

**Bảng 1: Tỷ lệ lưu hành của virus cúm gia cầm type A H5N1 trên gia cầm**

Tỉnh	SM XN	SMDT H5N1	Tỷ lệ (%)	Vịt			Gà		
				SM XN	SMDT H5N1	Tỷ lệ (%)	SM XN	SMDT H5N1	Tỷ lệ (%)
Hậu Giang	42	2	4,8	18	1	5,5 <sup>b</sup>	24	1	4
Sóc Trăng	42	2	4,8	18	2	11,1	24	0	0
Trà Vinh	42	2	4,8	18	1	5,5 <sup>b</sup>	24	1	4
Vĩnh Long	42	5	11,9	18	3	16,7 <sup>a</sup>	24	2	8
			P (Ho) = 0,69469			EPT = 3.59E+10			EPT = 5.38E+10
<b>Tổng</b>	<b>168</b>	<b>11</b>	<b>6,5</b>	<b>72</b>	<b>7</b>	<b>9,7</b>	<b>96</b>	<b>4</b>	<b>4,0</b>

SMXN: Số mẫu xét nghiệm; SMDT: Số mẫu dương tính

Bảng trên cho thấy tỷ lệ lưu hành của virus cúm gia cầm type A H5N1 trên gia cầm tại các tỉnh Hậu Giang, Sóc Trăng và Trà Vinh là tương tự nhau (4,8%), trong khi đó tỉnh Vĩnh Long có tỷ lệ lưu hành cao hơn các tỉnh còn lại (11,9%) nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê (P (Ho) = 0,69496). Điều này có thể là do dịch bệnh cúm gia cầm type A H5N1 đã trở thành dịch địa phương (xảy ra hằng năm từ năm 2003 đến nay) tại các tỉnh vùng Đồng bằng sông Cửu Long nên virus cúm type A H5N1 lưu hành rộng rãi trong quần thể gia cầm tại các địa phương. Tỷ lệ lưu hành tại các địa phương nằm trong khoảng từ 4,8 – 11,9% là thông tin cảnh báo khả năng gây ra các ổ dịch cúm gia cầm type A H5N1 nhưng khả năng này không cao do tất cả các địa phương khảo sát trong nghiên cứu này đang triển khai chương trình tiêm phòng vaccine phòng bệnh cúm cho gia cầm.

Bên cạnh đó, theo FAO (2011) Đồng bằng sông Cửu Long là vùng lây truyền virus cúm gia cầm H5N1 nội vùng. Khi có một chủng virus cúm H5N1 lưu hành trong một quần thể gia cầm, những đàn nhiễm virus cúm gia cầm nhưng không có biểu hiện lâm sàng nhưng lây truyền virus cúm gia cầm sang cho các đàn gia cầm nhiễm khác. Tần suất tiếp xúc giữa các đàn là điều cần thiết và quan

trọng để duy trì nguồn bệnh. Vào thời điểm đầu năm 2014, tại các tỉnh vùng Đồng bằng sông Cửu Long đã có sự xâm nhập của nhánh virus cúm gia cầm type A H5N1 (2.3.2.1c) lưu hành và gây bệnh trên gia cầm song song với nhánh virus 1.1 đã xâm nhập từ năm 2003 (Cục Thú y, 2014). Do vậy, khi khảo sát sự lưu hành sẽ phát hiện sự hiện diện của virus cúm gia cầm type A H5N1 tại hầu hết các địa phương.

Tỷ lệ lưu hành của virus cúm gia cầm type A H5N1 tại Sóc Trăng trong nghiên cứu này là 4,8% cao hơn so với kết quả nghiên cứu của Dương Thị Thanh Thảo và Lý Thị Liên Khai (2010) có tỷ lệ lưu hành là 1,67%. Bên cạnh đó, tỷ lệ lưu hành tại các tỉnh Hậu Giang, Sóc Trăng và Trà Vinh là 4,8% cao hơn nhưng không nhiều so với tỷ lệ lưu hành của virus cúm gia cầm type A H5N1 của cả nước năm 2014 có tỷ lệ lưu hành là 4,13% (Cục Thú y, 2014).

Tỷ lệ lưu hành của virus cúm gia cầm type A H5N1 trên vịt tại 4 tỉnh thuộc vùng Đồng bằng sông Cửu Long khá cao (9,7%). Trong đó, tỉnh Vĩnh Long có tỷ lệ lưu hành cao nhất (16,7%) so với các tỉnh còn lại nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê (EPT = 3.59E+10). Theo Hulse Post *et al.* (2005), vịt là loài mang trùng

virus cúm gia cầm type A H5N1 và có thể truyền lây virus cho các đàn gia cầm khác khi tiếp xúc trực tiếp với chúng. Các tỉnh vùng Đồng bằng sông Cửu Long có tổng đàn vịt lớn hơn gà và nuôi trong tất cả các tháng của năm nên virus cúm gia cầm type A H5N1 có thể lưu hành tại đây trong khoảng thời gian rất dài. Đồng thời, phương thức chăn nuôi vịt chạy đồng tại Đồng bằng sông Cửu Long tạo điều kiện cho sự lây truyền virus cúm gia cầm type A H5N1 giữa các đàn vịt và các đàn gia cầm khác diễn ra dễ dàng.

Để duy trì được sự lưu hành của virus cúm gia cầm type A H5N1 trong thời gian dài trên quần thể gia cầm thì cần thiết phải có một số yếu tố như: các đàn vịt hơn 4 tháng tuổi, các đàn gà đẻ không được tiêm phòng đúng cách hoặc có hệ miễn dịch yếu (do bệnh, kích thích, vận chuyển hay dinh dưỡng kém), chuỗi thị trường (những chợ gia cầm đầu mối, bãi tập kết, lò mổ, thương lái) (FAO, 2011). Các tỉnh thuộc vùng Đồng bằng sông Cửu Long có đầy đủ các yếu tố như nhận định trên đã tạo điều kiện thuận lợi cho virus cúm gia cầm type A H5N1 lưu hành trên đàn gia cầm (đặc biệt là các đàn vịt) tại nhiều địa phương và được duy trì trong khoảng thời gian dài

Tỷ lệ lưu hành của virus cúm gia cầm type A H5N1 trên gà tại 4 tỉnh thuộc vùng Đồng bằng sông Cửu Long là 4 % và vịt là 9,7%. Trong đó, tỉnh Vĩnh Long có tỷ lệ lưu hành cao nhất (8%) so với các tỉnh còn lại là Hậu Giang (4%) và Trà Vinh (4%) nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê (EPT = 5.38E+10). Trong khi đó, sự lưu hành của virus cúm type A H5N1 trên gà tại tỉnh Sóc Trăng là không phát hiện được. Tỷ lệ lưu hành của virus cúm gia cầm type A H5N1 tại Hậu Giang (4%), Trà Vinh (4%) và Vĩnh Long (8%) cao hơn so với kết quả nghiên cứu của Lưu Hữu Mạnh (2009) là không có sự lưu hành của virus cúm gia cầm type A H5N1 trên gà vào năm 2008 tại Hậu Giang và An Giang.

Phạm vi lưu hành của virus cúm H5N1 trên gà là 3/4 tỉnh, trong khi đó trên vịt là 4/4 tỉnh khảo sát. Theo Chang Won Lee *et al.* (2005) và Hulse Post *et al.* (2005), các kết quả nghiên cứu của hai nhóm tác giả này cho thấy vịt là loài mang trùng virus cúm gia cầm type A H5N1 trong thời gian dài. Trong các loài gia cầm thì gà và gà tây là loài cảm nhiễm nhất và có các biểu hiện triệu chứng lâm sàng của bệnh khi bị nhiễm virus cúm gia cầm type A H5N1. Vì vậy, gà không thể mang trùng virus cúm gia cầm type H5N1. Tuy nhiên, khảo sát của chúng tôi cũng đã phát hiện được sự lưu hành của virus cúm gia cầm H5N1 trên gà tại một số tỉnh, kết quả này có thể là do gà bị nhiễm virus cúm H5N1 từ vịt. Bởi vì qua việc khảo sát tình hình

buôn bán gia cầm tại các chợ và các lò mổ gia cầm đã cho thấy gà, vịt được vận chuyển đến các chợ, lò giết mổ trong cùng một dụng cụ và được bày bán chung trên cùng một kệ được xếp chồng lên nhau hoặc xếp xen kẽ nhau với cự ly rất gần hoặc trong khu nuôi nhốt chờ giết mổ của các lò mổ.

### 3.2 Kết quả khảo sát sự lưu hành của virus cúm gia cầm type A H5N1 trên gia cầm theo địa điểm lấy mẫu

Trong 12 địa điểm lấy mẫu giám sát sự lưu hành của virus cúm gia cầm type A H5N1 thì 9 địa điểm đã có sự lưu hành của virus chiếm tỷ lệ 75%. Trong đó, tỉnh Vĩnh Long có tỷ lệ lưu hành của virus cúm gia cầm H5N1 tại các địa điểm lấy mẫu cao nhất (100%). Bên cạnh đó, các tỉnh còn lại là Hậu Giang, Sóc Trăng và Trà Vinh có 2/3 địa điểm có sự hiện diện của virus cúm gia cầm type A H5N1.

**Bảng 2: Tỷ lệ lưu hành của virus cúm gia cầm type A H5N1 theo địa điểm lấy mẫu**

Tỉnh	Chợ/Lò mổ	Chợ có mẫu dương tính H5N1
Hậu Giang	Lò mổ Long Mỹ	1
	Chợ Kinh Cù	0
	Lò mổ Ngã Bảy	1
Sóc Trăng	Chợ Huỳnh Hữu Nghĩa	1
	Chợ Trần Đề	0
	Chợ Ngã Năm	1
Trà Vinh	Chợ Càng Long	1
	Chợ Cầu Kè	1
	Chợ Tiểu Cần	0
Vĩnh Long	Chợ TT Tam Bình	1
	Chợ Vĩnh Xuân	1
	Chợ TT Vũng Liêm	1
Tổng	12	9

Tuy nhiên, với kết quả trên có thể nhận định rằng, virus cúm gia cầm H5N1 lưu hành trên phạm vi khá rộng tại các địa phương vì theo các thông tin thu thập được trong khi lấy mẫu (phiếu thông tin thu thập mẫu swab gia cầm) cho thấy gia cầm bán tại các chợ hoặc trong các lò giết mổ không những có nguồn gốc tại địa phương mà còn có nguồn gốc từ một số huyện hoặc tỉnh lân cận.

### 3.3 Kết quả giải trình tự gene HA và sự biến đổi di truyền của virus cúm type A H5N1 lưu hành trên gia cầm

Trong tổng số 11 mẫu có kết quả dương tính với virus cúm gia cầm type A H5N1 tiến hành chọn một số mẫu đạt yêu cầu xét nghiệm để thực hiện giải trình tự gene HA. Kết quả đã giải trình tự được 7 mẫu, các đoạn gene HA giải trình tự được

trong nghiên cứu có chiều dài từ 1645 – 1714 nucleotide, kết quả so sánh sự biến đổi thành phần nucleotide và acid amin của các chủng virus phân

lập được trong nghiên cứu được trình bày trong Bảng 3.

**Bảng 3: Số vị trí sai khác thành phần nucleotide (phía trên đường chéo) và acid amin (phía dưới đường chéo) so sánh giữa các chủng virus cúm type A H5N1 phân lập được trong nghiên cứu.**

	NC	Số lượng nucleotide sai khác giữa các chủng virus cúm type A H5N1						
		AA	1	2	3	4	5	6
Số lượng acid amin sai khác giữa các chủng virus cúm type A H5N1	1		6	30	35	30	22	9
	2	2		26	31	28	20	5
	3	11	9		37	41	33	29
	4	8	6	10		41	37	34
	5	7	5	13	9		16	31
	6	3	1	9	5	4		23
	7	2	0	9	6	5	1	

1: A/Duck/VL/07/2015; 2: A/Chick/VL/178/2015; 3: A/Duck/VL/186/2015; 4: A/Duck/VL/189/2015; 5: A/Chick/HG/210/2015; 6: A/Duck/ST/259/2015; 7: A/Chick/VL/329/2015

Kết quả so sánh cho thấy có sự khác biệt ở mức độ nucleotide và acid amin giữa các gene HA của virus H5N1 trong nghiên cứu. Số lượng các nucleotide sai khác nằm trong khoảng từ 6 - 41 (tỷ lệ tương đồng từ 97,5 - 99,5%), tỷ lệ tương đồng này cao hơn so với kết quả nghiên cứu của Dương Thị Thanh Thảo và Lý Thị Liên Khai (2011) có tỷ lệ tương đồng giữa các chủng virus phân lập được tại Sóc Trăng và Cà Mau từ 92 - 98%. Chủng virus A/Duck/VL/07/2015 (1) và A/Chick/VL/178/2015 (2) có sự sai lệch rất ít (6 nucleotide) cả hai chủng này đều được phát hiện tại huyện Trà Ôn, tỉnh

Vĩnh Long. Trong khi đó, chủng virus A/Chick/HG/210/2015 (5) lưu hành tại Hậu Giang có sự sai khác lớn hơn (từ 28 - 41 nucleotide) so với các chủng virus lưu hành tại Vĩnh Long (1: A/Duck/VL/07/2015; 2: A/Chick/VL/178/2015; 3: A/Duck/VL/186/2015; 4: A/Duck/VL/189/2015). Chủng virus A/Duck/ST/259/2015 (6) lưu hành tại tỉnh Sóc Trăng có tỷ lệ tương đồng cao hơn đối với chủng A/Chick/HG/210/2015 (5) với số lượng nucleotide sai khác là 16, trong khi đó số lượng sai khác so với các chủng khác là từ 20 - 37 nucleotide.

**Bảng 4: Một số vị trí sai khác của các nucleotide so sánh giữa 7 gene HA của virus cúm gia cầm type A H5N1 trong nghiên cứu**

A/Duck/VL/07/2015	A	A	T	C	C	A	G	C	A	A	C	T	T	G	G	G	C	A
A/Chick/VL/178/2015	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Duck/VL/186/2015	.	G	.	.	.	.	A	.	.	.	T	.	.	.	.	A	.	.
A/Duck/VL/189/2015	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C
A/Chick/HG/210/2015	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.
A/Duck/ST/259/2015	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Chick/VL/329/2015	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Duck/VL/07/2015	A	C	C	A	A	A	A	G	G	A	C	A	G	G	C	A	T	
A/Chick/VL/178/2015	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
A/Duck/VL/186/2015	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	A	.	.	.	
A/Duck/VL/189/2015	.	.	.	.	C	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	C	
A/Chick/HG/210/2015	.	T	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	
A/Duck/ST/259/2015	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	
A/Chick/VL/329/2015	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
A/Duck/VL/07/2015	G	A	A	C	T	A	A	C	A	A	C	T	C	C	T	A	A	
A/Chick/VL/178/2015	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
A/Duck/VL/186/2015	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	T	.	.	.	
A/Duck/VL/189/2015	.	G	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	
A/Chick/HG/210/2015	.	G	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	.	G	.	
A/Duck/ST/259/2015	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	
A/Chick/VL/329/2015	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	

A/Duck/VL/07/2015	A	G	G	C	A	A	A	C	G	C	T	T	C	A	A	T	T	C
A/Chick/VL/178/2015	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Duck/VL/186/2015	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	C	.	.	.
A/Duck/VL/189/2015	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	C	.	.	C	.	.	.
A/Chick/HG/210/2015	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	T
A/Duck/ST/259/2015	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.
A/Chick/VL/329/2015	.	.	A	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Duck/VL/07/2015	G	A	A	T	T	G	C	T	C	C	G	A	T	C	G	G	C	T
A/Chick/VL/178/2015	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Duck/VL/186/2015	.	G	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Duck/VL/189/2015	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	A	.	C
A/Chick/HG/210/2015	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.
A/Duck/ST/259/2015	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	T	.	.	.	.	.
A/Chick/VL/329/2015	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

**Bảng 5: Sự biến đổi di truyền (nucleotide) của các chủng virus cúm gia cầm type A H5N1 trong nghiên cứu so sánh với chủng tham chiếu A/Hong Kong/6841/2010**

Tỉnh	Ký hiệu	Loài gia cầm	Tổng số nucleotide	Số vị trí biến đổi (*)	Tỷ lệ (%)
Hậu Giang	A/Chick/HG/210/2015	Gà	1.711	56	3,2
Sóc Trăng	A/Duck/ST/259/2015	Vịt	1.668	50	2,9
Vĩnh Long	A/Duck/VL/07/2015	Vịt	1.645	41	2,4
	A/Duck/VL/186/2015	Vịt	1.709	49	2,8
	A/Duck/VL/189/2015	Vịt	1.701	44	2,5
	A/Chick/VL/178/2015	Gà	1.695	41	2,4
	A/Chick/VL/329/2015	Gà	1.714	42	2,4

\* Kết quả so sánh với chủng virus cúm gia cầm type A H5N1 tham chiếu A/Hong Kong/6841/2010

Kết quả đã giải trình tự được 7 gene HA của virus cúm gia cầm type A H5N1 lưu hành trên gà và vịt (3 virus lưu hành trên gà và 4 virus lưu hành trên vịt). Tổng số nucleotide đã giải trình tự được cao nhất là 1714 và thấp nhất là 1645, điều này

khẳng định đã giải mã thành công trình tự nucleotide của gene HA của virus gia cầm type A H5N1. Kết quả này cũng tương tự như kết quả nghiên cứu giải trình tự nucleotide gene HA của virus cúm gia cầm type A H5N1 của các tác giả Trịnh Quang Vui và Lê Thanh Hòa (2008) và Lê Thanh Hòa và ctv. (2015).

**Bảng 6: Số lượng nucleotide sai khác so với chủng virus cúm gia cầm type A H5N1 tham chiếu A/Hong Kong/6841/2010**

Tỉnh	Ký hiệu	Loài gia cầm	Nucleotide sai khác
Hậu Giang	A/Chick/HG/210/2015	Gà	T*↔G (2), A*↔G (28) C*↔T (20), A*↔C (2), T*↔A (3)
Sóc Trăng	A/Duck/ST/259/2015	Vịt	T*↔G (2), A*↔G (24) C*↔T (18), A*↔C (2), T*↔A (2)
Vĩnh Long	A/Duck/VL/07/2015	Vịt	T*↔G (2), A*↔G (20) C*↔T (14), A*↔C (3), T*↔A (1)
	A/Duck/VL/186/2015	Vịt	T*↔G (2), A*↔G (25) C*↔T (16), T*↔A (2)
	A/Duck/VL/189/2015	Vịt	T*↔G (1), A*↔G (15) C*↔T (20), A*↔C (3), T*↔A (2)
Vĩnh Long	A/Chick/VL/178/2015	Gà	T*↔G (2), A*↔G (20) C*↔T (10), A*↔C (3), T*↔A (1)
	A/Chick/VL/329/2015	Gà	T*↔G (2), A*↔G (21) C*↔T (13), A*↔C (3), T*↔A (1)

\* Nucleotide của chủng virus cúm gia cầm type A H5N1 tham chiếu A/Hong Kong/6841/2010

**Bảng 6: Một số vị trí sai khác của các nucleotide so sánh với chủng virus A/Hong Kong/6841/2010**

**Ký hiệu**

<b>A/Hong Kong/6841/2010</b>	G	C	A	G	G	T	T	G	A	C	A	C	A	T	T	A	G	A
A/Duck/VL/07/2015	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Duck/VL/186/2015	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Duck/VL/189/2015	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Chick/HG/210/2015	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.
A/Duck/ST/259/2015	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.
A/Chick/VL/329/2015	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Chick/VL/178/2015	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>A/Hong Kong/6841/2010</b>	G	A	T	C	T	T	G	T	A	G	C	A	G	G	A	T	G	G
A/Duck/VL/07/2015	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Duck/VL/186/2015	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Duck/VL/189/2015	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Chick/HG/210/2015	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Duck/ST/259/2015	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Chick/VL/329/2015	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A/Chick/VL/178/2015	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>A/Hong Kong/6841/2010</b>	A	A	T	A	T	C	A	A	T	G	T	A	G	C	A	A	G	
A/Duck/VL/07/2015	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
A/Duck/VL/186/2015	.	G	.	.	C	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	G	A	
A/Duck/VL/189/2015	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
A/Chick/HG/210/2015	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
A/Duck/ST/259/2015	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
A/Chick/VL/329/2015	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	T	.	.	.	.	.	.	
A/Chick/VL/178/2015	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	

Việc tiến hành so sánh trình tự nucleotide đoạn gene HA của 7 chủng virus đã giải trình tự với chủng virus tham chiếu A/Hong Kong/6841/2010 đã cho thấy tỷ lệ khác biệt thấp nhất là 2,4% và cao nhất là 3,2% với số lượng sai khác từ 41 - 56 nucleotide. Điều này cho thấy trình tự nucleotide của các chủng virus lưu hành tại 4 tỉnh Hậu Giang, Sóc Trăng, Trà Vinh, Vĩnh Long khá tương đồng nhau và có tỷ lệ tương đồng ở mức độ nucleotide so với chủng tham chiếu từ 96,8% - 97,6%.

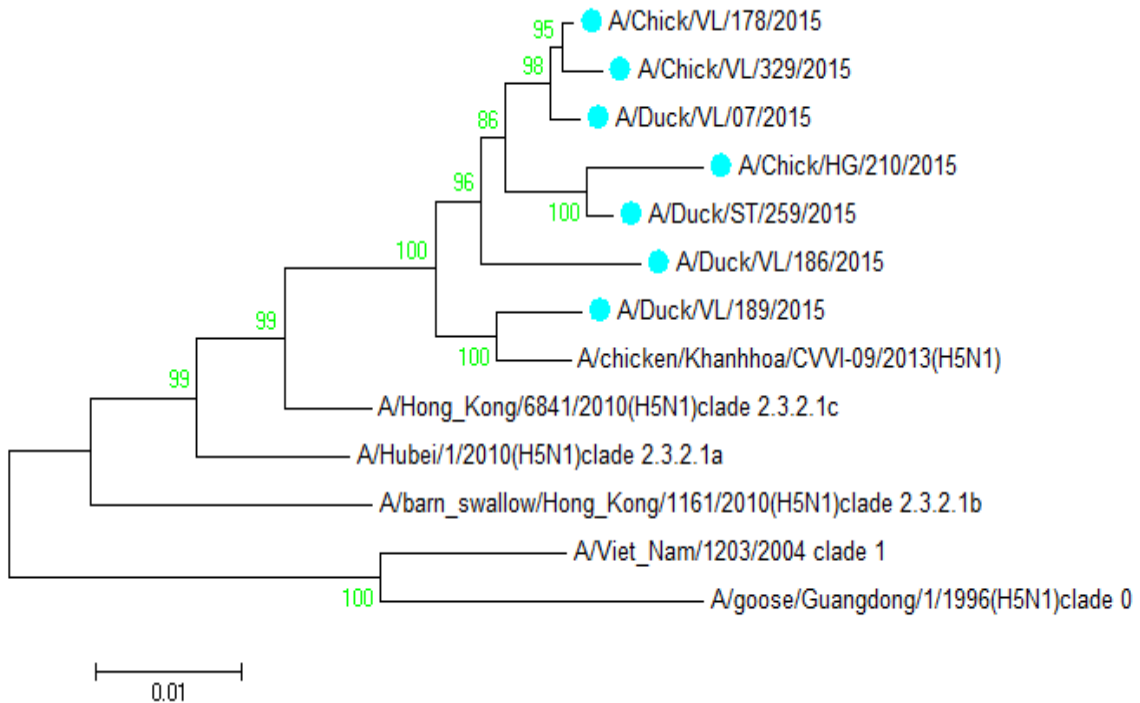
Bên cạnh đó, kết quả phân tích trình tự các acid amin của tất cả các protein HA thu nhận được trong nghiên cứu cho thấy, đoạn nối giữa HA1 và HA2 (cleavage site) có trình tự là Q-ERRRKR-G tương đồng với trình tự của chủng virus cúm gia cầm type A H5N1 độc lực cao tham chiếu A/Hong Kong/6841/2010. Đồng thời kết quả này cũng giống với kết quả nghiên cứu của Lê Thanh Hòa (2015).

**Kết quả xác định clade virus cúm type A H5N1 lưu hành trên gia cầm**

Để xác định clade virus cúm gia cầm type A H5N1, phần mềm MEGA 6.0 đã được sử dụng để phân tích. Bên cạnh các chủng virus đã giải trình tự trong nghiên cứu này, chúng tôi còn sử dụng thêm trình tự của các chủng virus tham chiếu gồm A/Hong Kong/6841/2010/H5N1 (clade 2.3.2.1c; HQ636461), A/Hubei/1/2010/H5N1 (clade 2.3.2.1a; CY098758), A/barn Swallow/Hong Kong/1161/2010/H5N1 (clade 2.3.2.1b; KC357320), A/Vietnam/1203/2004 clade 1; HM006759), A/Goose/Guangdong/1/1996 (clade 0; AF144305) để vẽ cây phả hệ xác định clade virus. Kết quả được trình bày trong Hình 2

Việc phân tích trình tự gene HA và vẽ cây phả hệ của các chủng virus cúm gia cầm type A H5N1 bằng phần mềm MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013) đã xác định được tất cả các chủng virus đã giải trình tự đều thuộc clade virus 2.3.2.1c.





**Hình 2: Cây phả hệ các chủng virus cúm gia cầm type A H5N1**

Cây phả hệ được xây dựng bằng phần mềm MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013) với phương pháp kết nối liền kề (Neighbor-Joining method) và hệ số Bootstrap 1000 lần lặp lại. Danh pháp các phân nhóm virus dựa trên các tiêu chí của WHO/OIE/FAO (2014). Các chủng virus của nghiên cứu này được đánh dấu bằng các hình tròn màu xanh

Các chủng virus cúm gia cầm type A H5N1 lưu hành tại các tỉnh Hậu Giang, Sóc Trăng, Trà Vinh và Vĩnh Long nằm cùng phân nhánh với chủng virus A/Hong Kong/6841/2010 (clade 2.3.2.1c). Trong đó, các chủng virus lưu hành tại tỉnh Vĩnh Long A/Duck/VL/07/2015, A/Chick/VL/329/2015, A/Chick/VL/178/2015 có mối quan hệ rất gần nhau (nằm cùng trong một phân nhánh), hai chủng virus còn lại A/Duck/VL/186/2015, A/Duck/VL/189/2015 thuộc một phân nhánh khác. Các chủng virus lưu hành tại Hậu Giang (A/Chick/HG/210/2015) và Sóc Trăng (A/Duck/ST/259/2015) thuộc cùng một phân nhóm.

#### 4 KẾT LUẬN

Sau khi thực hiện nghiên cứu sự lưu hành và biến đổi di truyền của virus cúm gia cầm type A H5N1 trên gia cầm tại một số tỉnh vùng Đồng bằng sông Cửu Long chúng tôi có một số kết luận như sau:

- Tỷ lệ lưu hành trung bình của virus cúm gia cầm type A H5N1 trên gia cầm tại một số tỉnh vùng Đồng bằng sông Cửu Long (Hậu Giang, Sóc Trăng, Trà Vinh, Vĩnh Long) năm 2015 là 6,5%.

- Virus cúm gia cầm type A H5N1 lưu hành trên gà chiếm tỷ lệ 4% thấp hơn trên vịt và có tỷ lệ lưu hành là 9,7%.

- Virus cúm gia cầm type A H5N1 lưu hành tại 9/12 (75%) địa điểm lấy mẫu (chợ và lò mổ).

- Tỷ lệ nucleotide của các chủng virus cúm gia cầm type A H5N1 lưu hành tại các địa phương sai khác so với chủng virus tham chiếu A/Hong Kong/6841/2010 từ 2,4 - 3,2%.

- Trình tự các acid amin ở vị trí nối kết giữa đoạn HA1 và HA2 đoạn quy định độc lực là Q-ERRRKR-G, tương đồng với trình tự của chủng virus cúm gia cầm type A H5N1 độc lực cao tham chiếu A/Hong Kong/6841/2010.

- Các chủng virus cúm gia cầm type A H5N1 lưu hành tại các tỉnh Hậu Giang, Sóc Trăng, Trà Vinh và Vĩnh Long thuộc clade virus 2.3.2.1c.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Chang Won Lee, David L. Suarez, Terrence M. Tumpey, Haan-Woo Sung, Yong - Kuk Kwon, Youn-Jeong Lee, Jun-Gu Choi, Seong-Joon Joh, Min-Chul Kim, Eun-Kyoung Lee, Jong-Myung Park, Xiuhua Lu, Jacqueline M. Katz, Erica Spackman, David E. Swayne and Jae-Hong Kim, 2005. Characterization of Highly Pathogenic

- H5N1 Avian Influenza A Viruses Isolated from South Korea. *Journal of Virology*, Mar. 2005, p. 3692–3702.
- Cục Thú y, 2015. Báo cáo tổng kết công tác phòng chống dịch bệnh gia súc, gia cầm năm 2015.
- Dương Thị Thanh Thảo và Lý Thị Liên Khai, 2011. Khảo sát sự lưu hành và bước đầu giải trình tự gene của virus cúm gia cầm subtype H5N1 tại tỉnh Cà Mau và Sóc Trăng. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, 2011:20a 7-17.
- Food and Agriculture Organization (FAO), 2011. Cách tiếp cận đồng bộ về sức khỏe gia cầm và chăn nuôi gia cầm an toàn.
- Hulse-Post D. J., K. M. Sturm-Ramirez, J. Humberd, P. Seiler, E. A. Govorkova, S. Krauss, C. Scholtissek, P. Puthavathana, C. Buranathai, T. D. Nguyen, H. T. Long, T. S. P. Naipospos, H. Chen, T. M. Ellis, Y. Guan, J. S. M. Peiris, and R. G. Webster, 2005. Role of domestic ducks in the propagation and biological evolution of highly pathogenic H5N1 influenza viruses in Asia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:10682–10687.
- Lê Thanh Hòa, Nguyễn Thị Bích Nga, Đỗ Thị Roan, Đoàn Thị Thanh Hương, 2015. Phân tích đặc điểm gen kháng nguyên HA (H5) và NA (N1) của các chủng virus cúm A/H5N1 clade 2.3.2.1 thu thập năm 2014 ở Việt Nam. Hội nghị khoa học Chăn nuôi Thú y toàn quốc năm 2015. Nhà xuất bản Nông nghiệp, trang 473-479.
- Lưu Hữu Mạnh, Nguyễn Bá Thành, Trương Thị Kim Dung, Đặng Thanh Tùng, Nguyễn Hiền Trung, Xâm Văn Lang, Châu Bora, Nguyễn Thị Thanh Tâm, 2009. Một số kết quả nghiên cứu về bệnh cúm gia cầm (Avian Influenza) ở Đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 11, 237-245.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*:30 2725-2729.
- Trần Quang Vui, Lê Thanh Hòa, 2008. Nghiên cứu thành phần gen H5 của virus cúm A/H5N1 phân lập từ vịt tại Thừa Thiên Huế. *Tạp chí khoa học, Đại học Huế*, Số 46, năm 2008.
- World Health Organization/World Organisation for Animal Health/Food and Agriculture Organization (WHO/OIE/FAO) H5N1 Evolution Working Group (2014) Revised and updated nomenclature for highly pathogenic avian influenza A (H5N1) viruses. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 8(3), 384–388.