Sự lưu hành và đặc tính di truyền của virus cúm gia cầm A/H5N6 tại một số tỉnh biên giới phía Bắc Việt Nam

Phạm Ngọc Thạch, Nguyễn Thị Lan, Đào Lê Anh*

Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài 14/9/2017; ngày chuyển phản biện 18/9/2017; ngày nhận phản biện 13/11/2017; ngày chấp nhận đăng 21/11/2017

Tóm tắt:

Mục đích của nghiên cứu này nhằm xác định sự lưu hành và đặc tính di truyền của virus cúm gia cầm A/H5N6 tại 5 tỉnh biên giới phía Bắc. Nghiên cứu đã tiến hành thu thập 15.248 mẫu swab và 2.830 mẫu nội tạng gà, vịt, ngan, chim cút tại một số chợ bán gia cầm sống ở 5 tỉnh Quảng Ninh, Lạng Sơn, Lào Cai, Lai Châu và Cao Bằng. Bằng phương pháp Realtime RT-PCR, những mẫu dương tính với virus cúm typ A được kiểm tra subtyp H5 và N6, sau đó giải trình tự mẫu dương tính với subtyp H5 và N6 bằng máy giải trình tự Beckman Coulter CEQ 8000, tiếp theo xây dựng cây sinh học phân tử của các chủng virus cúm A/H5N6. Kết quả cho thấy, các mẫu swab gà, vịt, ngan và chim cút tại cả 5 tỉnh nghiên cứu với tỷ lệ dương tính chung là 5,79%. Còn với mẫu nội tạng dương tính chiếm tỷ lệ thấp hơn là 2,05%. Mẫu nội tạng có tỷ lệ dương tính với virus cúm A/H5N6 thấp hơn (2,05%). Lựa chọn giải trình tự nucleotide 10 chủng virus cúm A/H5N6, kết quả phân tích nguồn gốc phát sinh loài cho thấy 10 chủng virus mang đoạn gen H5 đều thuộc clade 2.3.4.4 và nằm trong nhánh phát sinh cùng với chủng virus cúm A/H5N6 phân lập được ở Lào năm 2014 và chủng virus cúm A/H5N6 phân lập ở Trung Quốc năm 2013-2014. 10 chủng virus cúm mang đoạn gen N6 nằm trong cùng dòng Á - Âu (Euransian lineage). Trong đó, 5 chủng virus cúm nằm cùng nhánh phát sinh với chủng virus cúm A/H5N6 phân lập ở Lào và Trung Quốc năm 2014. Các chủng virus còn lại nằm cùng nhánh phát sinh với một số chủng virus cúm A/H5N6 và H6N6 phân lập ở Việt Nam năm 2011-2014. Những kết quả này có ý nghĩa quan trọng đối với công tác dự báo nguy cơ xảy ra bệnh cúm gia cầm A/H5N6 tại khu vực nghiên cứu.

Từ khoá: ***Đặc điểm sinh học phân tử, sự lưu hành, tỉnh phía Bắc, virus cúm A/H5N6.***

Chỉ số phân loại: *4.3*

Đặt vấn đề

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 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 [1]. Tại Việt Nam, virus cúm A/H5N6 cũng đã được phát hiện tại một số tỉnh biên giới phía Bắc (Chi Lăng, Tràng Định, Lạng Sơn; phố Lu, Bảo Thắng, Lào Cai) và một số tỉnh thuộc vùng Trung Bộ (Kỳ Thọ, Kỳ Anh, Hà Tĩnh; Trung Hải, Gio Linh, Quảng Trị; Tịnh Đông, Sơn Tịnh, Quảng Ngãi); tổng số gà, vịt, ngan và chim trĩ mắc bệnh cúm A/H5N6 và chết là 2.013 con, tổng số gia cầm phải tiêu hủy là 5.188 con (tại 6 hộ chăn nuôi). Kết quả xét nghiệm, giải trình tự gen các mẫu virus cúm A/H5N6 đã phát hiện tại Việt Nam cho thấy, chúng có tỷ lệ tương đồng trên 99% so với chủng virus cúm A/H5N6 gây tử vong trên người tại tỉnh Tứ Xuyên, Trung Quốc năm 2014 (A/Sichuan/2622/2014) [2].

Trong thời gian vừa qua, các cơ quan chức năng tại các tỉnh Quảng Ninh, Lạng Sơn đã bắt giữ và xử lý nhiều vụ nhập lậu hàng chục nghìn gia cầm và trứng gia cầm qua biên giới (chủ yếu là gia cầm giống và trứng gia cầm giống). Kết quả xác minh một số ổ dịch cúm A/H5N6 vừa qua cho thấy, dịch xảy ra có liên quan đến việc buôn bán, vận chuyển gia cầm giống không rõ nguồn gốc, chưa qua kiểm dịch thú y. Như vậy, nguy cơ các chủng virus cúm mới tiếp tục xâm nhập vào Việt Nam thông qua các hoạt động nhập khẩu trái phép gia cầm và sản phẩm gia cầm qua các tỉnh biên giới, nhất là phía Bắc rất cao [2].

Để ngăn ngừa dịch cúm gia cầm A/H5N6 và các chủng virus cúm khác tiếp tục phát sinh và lây lan trên diện rộng, gây thiệt hại kinh tế và ảnh hưởng đến sức khỏe của cộng đồng, dữ liệu thông tin đầy đủ về sự lưu hành của virus cúm gia cầm A/H5N6 có ý nghĩa rất quan trọng. Xuất phát từ thực tế trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu *"Sự lưu hành và đặc tính di truyền của virus cúm gia cầm A/H5N6 tại một số tỉnh biên giới phía Bắc Việt Nam"* nhằm xác định được tỷ lệ lưu hành của virus cúm gia cầm A/H5N6 đang lưu hành trên đàn gia cầm tại các địa phương biên giới phía Bắc.

*Tác giả liên hệ: Email: daoleanh15071984@yahoo.com

The prevalence and genetic characteristics of avian influenza viruses subtype A/H5N6 in a number of northern border provinces in Vietnam

Ngoc Thach Pham, Thi Lan Nguyen, Le Anh Dao*

Faculty Veterinary Medicine, Vietnam National University of Agriculture

Received 14 September 2017; accepted 21 November 2017

Abtract:

The purpose of this study was to determine the prevalence and genetic characteristics of avian influenza viruses subtype A/H5N6 in five northern border provinces. In the study, 15.248 swab samples and 2.830 internal organ samples of birds were collected at a number of markets in Quang Ninh, Lang Son, Lao Cai, Lai Chau, and Cao Bang. Using the Realtime RT-PCR method, samples positive for influenza A viruses were tested for H5 and N6 subtypes, then sequenced using the Beckman Coulter CEQ 8000, and followed by phylogenetic analysis of A/H5N6 influenza strains. The results showed that the A/H5N6 virus prevalence of swab samples was 5.79%, and that of internal organ samples was lower (2.05%). Ten strains of A/H5N6 viruses were sequenced, and the results of phylogenetic analysis showed that ten strains of H5 subtype belong to the clade 2.3.4.4 and belong to the branch of the A/H5N6 influenza viruses isolated in Laos in 2014 and in China from 2013 to 2014. Ten strains of N6 subtype were in the same Eurasian lineage. Of which, five strains were in the same A/H5N6 viruses isolated in Laos and China in 2014, and the five other strains were located in the same branch with A/H5N6 and H6N6 viruses isolated in Vietnam from 2011 to 2014. These results are important to predict the risk of avian influenza A/H5N6 viruses in the study areas.

Keywords: *A/H5N6 virus, molecular biology, northern provinces, prevalence.*

Classification number: *4.3*

Vật liệu, phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

- Nghiên cứu được thực hiện tại 5 tỉnh Quảng Ninh, Lạng Sơn, Lai Châu, Cao Bằng và Lào Cai từ tháng 7/2015 đến 6/2017.

- Đối tượng nghiên cứu là gà, vịt, ngan và chim cút bán tại các chợ có buôn bán gia cầm sống. Mẫu dịch swab được lấy ngẫu nhiên từ gà, vịt, ngan và chim cút bán tại các chợ. Mẫu nội tạng được lấy từ các đối tượng nghi nhiễm virus cúm gia cầm.

- Các chủng virus cúm gia cầm tham chiếu trên Ngân hàng gen thế giới.

Phương pháp thực hiện

+ Phương pháp lấy và bảo quản mẫu: Thu mẫu swab hầu họng của gà, vịt, ngan và chim cút theo quy trình hướng dẫn trong QCVN 01-83:2011/ BNNPTNT [3].

+ Phát hiện sự có mặt của virus cúm gia cầm bằng phương pháp Realtime RT-PCR, ARN của virus được tách chiết bằng kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (Cat No./ID: 52906). Mẫu ARN sau khi tách chiết sẽ được hỗn hợp với các thành phần: 2X Reaction Mix, Primer, Probe, Platinum Taq, nước, ARN của virus. Tiến hành phản ứng khuếch đại sản phẩm trong máy PCR (CFX96 Realtime System - Biorad) với chu kỳ nhiệt 50^{0}C trong 15 phút, 95^{0}C trong 2 phút, 40 chu kỳ: 95^{0}C trong 15 giây, 60^{0}C trong 15 giây. Đọc kết quả Ct với giá trị Ct < 35 thì mẫu dương tính, giá trị Ct ≥ 35 thì mẫu âm tính.

+ Trình tự kiểm tra: Thực hiện phản ứng Realtime RT-PCR phát hiện virus cúm typ A (xác định gen M), mẫu dương tính với cúm typ A tiếp tục kiểm tra subtype H5 và N6, theo các cặp mồi (primers) và probe như sau:

Tên mồi	Ký hiệu mồi/ probe	Trình tự (5'-3')	Tài liệu tham khảo
M	Probe	FAM-TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG-BHQ1	[4]
	Mồi xuôi	GACCRATCCTGTCACCTCTGAC	
	Mồi ngược	AGGGCATTYTGGACAAAKCGTCTA	
H5-9S	Mồi xuôi	ACATATGACTACCCACARTATTCAG	
	Probe	FAM-TCAACAGTGGCGAGTTCCCTAGCA-BHQ1	
	Mồi ngược 1	AGACCAGCTAYCATGATTGC	
	Mồi ngược 2	AAACCAGCCACTATGATTGC	
N6-1	Probe	CCCCACCAATGGGAACTG	
	Mồi xuôi	FAM-CCAATAACAGGAGGGAGCCCAGACCC-BHQ1	
	Mồi ngược	TCTAGGAATGCAAACCCTTTTACC	

+ Sử dụng máy giải trình tự gen tự động Beckman Coulter CEQ 8000 (Mỹ), hoạt động theo cơ sở của phương pháp Sanger. Quá trình thực hiện giải trình tự bao gồm các bước cơ bản sau: 1) Phản ứng PCR sequencing; 2) Tinh sạch sản phẩm PCR giải trình tự. Sản phẩm của phản ứng PCR sequencing sẽ được tinh sạch bằng Ethanol kèm theo hóa chất và hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất (Beckman Coulter - Mỹ); 3) Chuyển sản phẩm sau khi tinh sạch vào đĩa chạy mẫu để tiến hành giải trình tự; 4) Thu nhận, xử lý và phân tích dữ liệu của chuỗi gen.

Kết quả thu được được xử lý bằng phần mềm Genetyx để xử lý và thu nhận chuỗi gen cần nghiên cứu với bộ mã di truyền. Phân tích xác nhận chuỗi gen thu được thông qua chương trình Blast trên Ngân hàng gen (GenBank) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Truy cập ngân hàng gen thu nhận và xác định sự tương đồng về nucleotide của các chuỗi gen tương ứng của virus với các phân đoạn gen thu được trong nghiên cứu. Thành phần amino axit của virus được thu nhận bằng cách sử dụng bộ mã của vi sinh vật bậc thấp (bộ mã vi khuẩn - bacterial code) có trong ngân hàng gen và so sánh thông qua chương trình genetyx.

+ Xây dựng cây sinh học phân tử: Xây dựng cây sinh học phân tử trên cơ sở trình tự gen của chủng virus thu được bằng phần mềm MEGA5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) với giá trị bootrap là 1.000 lần lặp lại.

+ Số liệu được phân tích bằng Excel và phần mềm GrapthPad Prism 6.

Kết quả và thảo luận

Kết quả phát hiện virus cúm gia cầm A/H5N6 từ mẫu dịch swab và mẫu nội tạng thu thập được

Đề tài đã tiến hành thu thập 15.248 mẫu swab và 2.830 mẫu nội tạng gà, vịt, ngan và chim cút tại một số chợ bán gia cầm sống ở 5 tỉnh biên giới phía Bắc, gồm: Lạng Sơn, Quảng Ninh, Lai Châu, Lào Cai và Cao Bằng. Toàn bộ mẫu swab và mẫu nội tạng được tách chiết ARN, sau đó kiểm tra bằng phương pháp Realtime RT-PCR. Kết quả xác định được 1.287 mẫu swab (chiếm tỷ lệ 8,44%) và 114 mẫu nội tạng dương tính với virus cúm typ A (4,02%). Mẫu cho kết quả dương tính với virus cúm typ A tiếp tục được kiểm tra virus cúm gia cầm subtype H5 và N6 bằng Realtime RT-PCR. Kết quả được tổng hợp tại bảng 1.

Từ kết quả Realtime RT-PCR kiểm tra virus cúm A/H5N6 (bảng 1), chúng tôi đã phát hiện virus cúm A/H5N6 từ các mẫu swab gà, vịt, ngan và chim cút tại cả 5 tỉnh nghiên cứu có tỷ lệ dương tính chung là 5,79%. Còn mẫu nội tạng, phát hiện mẫu dương tính với virus cúm A/H5N6 chiếm tỷ lệ thấp hơn là 2,05%. Riêng tỉnh Lào Cai mẫu nội tạng thu thập từ những gia cầm nghi nhiễm cúm đều âm tính với virus cúm A/H5N6. Như vậy, virus cúm A/H5N6 lưu hành rất phổ biến tại các tỉnh biên giới phía Bắc Việt Nam.

Kết quả chẩn đoán virus cúm A/H5N6 trên mẫu swab thu được tỷ lệ dương tính khác nhau giữa các tỉnh. Cao nhất là Lạng Sơn (8,13%), thấp nhất là Cao Bằng (3,41%). Các tỉnh Quảng Ninh, Lai Châu và Lào Cai có tỷ lệ dương tính với virus cúm A/H5N6 từ 4,70 đến 6,18%.

Kết quả sự lưu hành virus cúm gia cầm A/H5N6 trong nghiên cứu cùng với thực tế thấy xuất hiện lẻ tẻ các ổ dịch cúm H5N6 tại các địa phương, đưa ra cảnh báo nguy cơ dịch cúm gia cầm do virus cúm chủng A/H5N6 có thể xảy ra bất kỳ lúc nào, tại mọi địa điểm có nuôi và buôn bán gia cầm. Sự lưu hành virus A/H5N6 rộng kết hợp với tình trạng vận chuyển, buôn bán, giết mổ gia cầm thiếu kiểm soát tại các chợ gia cầm sống là điều kiện tiên quyết để bùng phát dịch cúm.

Chúng tôi xác định sự lưu hành virus cúm A/H5N6 theo đối tượng nghiên cứu, kết quả thể hiện ở bảng 2.

Bảng 1. Kết quả xét nghiệm virus cúm *subtype H5 và N6* với mẫu swab và mẫu nội tạng bằng phương pháp Realtime RT-PCR.

TT	Tỉnh thu mẫu	Kết quả Realtime RT-PCR					
		Mẫu swab			*Mẫu nội tạng*		
		Số mẫu kiểm tra	Số mẫu (+) với A/H5N6	Tỷ lệ (%)	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu (+) với A/H5N6	Tỷ lệ (%)
1	Lạng Sơn	2.975	242	8,13	520	26	5,00
2	Quảng Ninh	3.090	191	6,18	730	18	2,47
3	Lào Cai	3.085	145	4,70	460	0	0,00
4	Lai Châu	3.042	201	6,61	550	8	1,45
5	Cao Bằng	3.050	104	3,41	570	6	1,05
	Tổng số	**15.248**	**883**	**5,79**	**2.830**	**58**	**2,05**

Bảng 2. Tỷ lệ nhiễm virus cúm A/H5N6 trong 2 năm 2015-2016 theo đối tượng nghiên cứu.

TT	Loài lấy mẫu	Kết quả phản ứng Realtime RT-PCR					
		Mẫu swab			*Mẫu nội tạng*		
		Số mẫu kiểm tra	Số mẫu dương tính với A/H5N6	Tỷ lệ (%)	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu dương tính với A/H5N6	Tỷ lệ (%)
1	Gà	9.744	582	5,97	1.300	25	1,92
2	Vịt, ngan	4.710	258	5,48	990	24	2,42
3	Chim cút	794	43	5,42	540	9	1,67
	Tổng	**15.248**	**883**	5,79	2.830	**58**	**2,05**

Kết quả Realtime RT-PCR phát hiện virus cúm A/H5N6 trên mẫu swab và mẫu nội tạng (bảng 2) theo từng đối tượng cho biết mẫu swab gà có tỷ lệ nhiễm cúm A/H5N6 là 5,97%. Còn đối tượng vịt, ngan và chim cút có tỷ lệ dương tính tương ứng là 5,48 và 5,42%; tuy nhiên tỷ lệ nhiễm này không khác biệt về mặt thống kê nên giữa các đối tượng khả năng nhiễm virus cúm A/H5N6 là như nhau. Tương tự mẫu swab, tỷ lệ nhiễm virus cúm A/H5N6 của mẫu nội tạng gà, vịt, ngan và chim cút không có sự sai khác về mặt thống kê

Theo kết quả xét nghiệm 15.420 mẫu swab gia cầm của Cục Thú y do FAO hỗ trợ thực hiện tại 68 chợ buôn bán gia cầm sống trên địa bàn 32 tỉnh, thành phố từ tháng 12/2015 đến tháng 2/2016 cho thấy, 91% số tỉnh đã phát hiện virus cúm A, 53% số tỉnh có virus H5N6. Tỷ lệ lưu hành trên gà bán tại chợ đối với virus H5N6 là 1,32%; tỷ lệ dương tính trên vịt bán tại chợ đối với virus H5N6 là 5,32% [5]. Kết quả phát hiện virus cúm A/H5N6 trên vịt của chúng tôi cũng thu được tỷ lệ cao, khá tương đồng với giám sát trên của FAO, chứng tỏ vịt là đối tượng có tiềm ẩn nguy cơ lây nhiễm cao virus cúm A/H5N6.

Giải trình tự virus cúm gia cầm A/H5N6

Lựa chọn 10 mẫu dương tính với virus cúm A/H5N6 đem giải trình tự gen nhằm xác định đặc tính di truyền của chủng virus này tại phía Bắc Việt Nam.

Sau khi tiến hành kỹ thuật Realtime RT-PCR và thu được sản phẩm, tiến hành tinh sạch sản phẩm của phản ứng RT-PCR bằng KIT (QIAquick PCR Purification Kit của hãng Qiagen). Tinh sạch sản phẩm PCR sequence, sau đó tiến hành giải trình tự gen trực tiếp từ sản phẩm PCR sau khi tinh sạch. Quá trình giải trình tự được thực hiện bằng máy giải trình tự Beckman Coulter CEQ 8000 của Mỹ tại Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ sinh học thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

Bảng 3. Danh sách các chủng virus cúm A/H5N6 được lựa chọn giải trình tự gen.

TT	Ký hiệu mẫu	Loài
1	1001QN	Gà
2	162QN	Vịt
3	835LCH	Vịt
4	931LC	Gà
5	950LS	Gà
6	1097CB	Vịt
7	1173LS	Chim cút
8	1932LCH	Gà
9	2103CB	Gà
10	2930LCH	Gà

Ghi chú: QN: Quảng Ninh; LC: Lào Cai; LS: Lạng Sơn; LCH: Lai Châu; CB: Cao Bằng.

Bảng 4. Sự tương đồng về trình tự nucleotide của đoạn gen H5 giữa 10 chủng virus cúm gia cầm A/H5N6.

	162QN	835LCH	931LC	950LS	1001QN	1097CB	1173LS	1932LCH	2103CB	2930LCH
162QN	100,00									
835LCH	97,14	100,00								
931LC	97,13	98,19	100,00							
950LS	97,77	97,15	97,35	100,00						
1001QN	98,39	96,50	97,13	98,59	100,00					
1097CB	96,46	94,93	95,59	97,55	97,32	100,00				
1173LS	98,60	97,78	97,14	98,19	98,39	96,91	100,00			
1932LCH	97,34	97,15	96,92	99,21	98,18	97,12	98,60	100,00		
2103CB	96,91	96,72	96,48	98,80	97,75	96,68	97,77	98,80	100,00	
2930LCH	98,39	96,50	97,13	98,59	99,60	97,32	98,39	98,18	97,75	100,00

Ghi chú: Mức tương đồng về trình tự nucleotide của đoạn gen H5 giữa những chủng virus cúm gia cầm A/H5N6 nằm ở dưới đường chéo.

Bảng 5. Sự tương đồng về trình tự nucleotide của đoạn gen N6 giữa 10 chủng virus cúm gia cầm A/H5N6.

	162QN	835LCH	931LC	950LS	1001QN	1097CB	1173LS	1932LCH	2103CB	2930LCH
162QN	100,00									
835LCH	90,97	100,00								
931LC	90,23	97,36	100,00							
950LS	90,23	97,36	99,61	100,00						
1001QN	99,41	90,71	89,96	89,96	100,00					
1097CB	98,81	91,00	90,26	90,26	98,61	100,00				
1173LS	91,24	98,61	97,58	97,58	90,97	91,27	100,00			
1932LCH	89,61	98,61	96,50	96,50	89,33	89,65	97,56	100,00		
2103CB	92,15	90,61	89,59	89,59	91,90	93,09	90,34	89,26	100,00	
2930LCH	89,37	98,20	96,07	96,07	89,37	89,40	97,14	98,81	88,74	100,00

Ghi chú: Mức tương đồng về trình tự nucleotide của đoạn gen N6 giữa những chủng virus cúm gia cầm A/H5N6 nằm ở dưới đường chéo.

Chuỗi nucleotide thu được sau khi giải trình tự được xử lý bằng các phần mềm Genetyx và SEQ 8000 trên máy tính, được xác thực bằng cách Blash trực tiếp qua Ngân hàng gen thế giới, sau đó được lưu trữ trên hệ thống máy chủ để phục vụ cho việc trích xuất và truy cứu dữ liệu.

Giải trình tự 10 chủng virus A/H5N6 thu thập được tại 5 tỉnh biên giới phía Bắc năm 2015 (bảng 3), chúng tôi thu được trình tự nucleotide đoạn H5 và N6 có độ dài lần lượt là 514 nucleotide và 513 nucleotide.

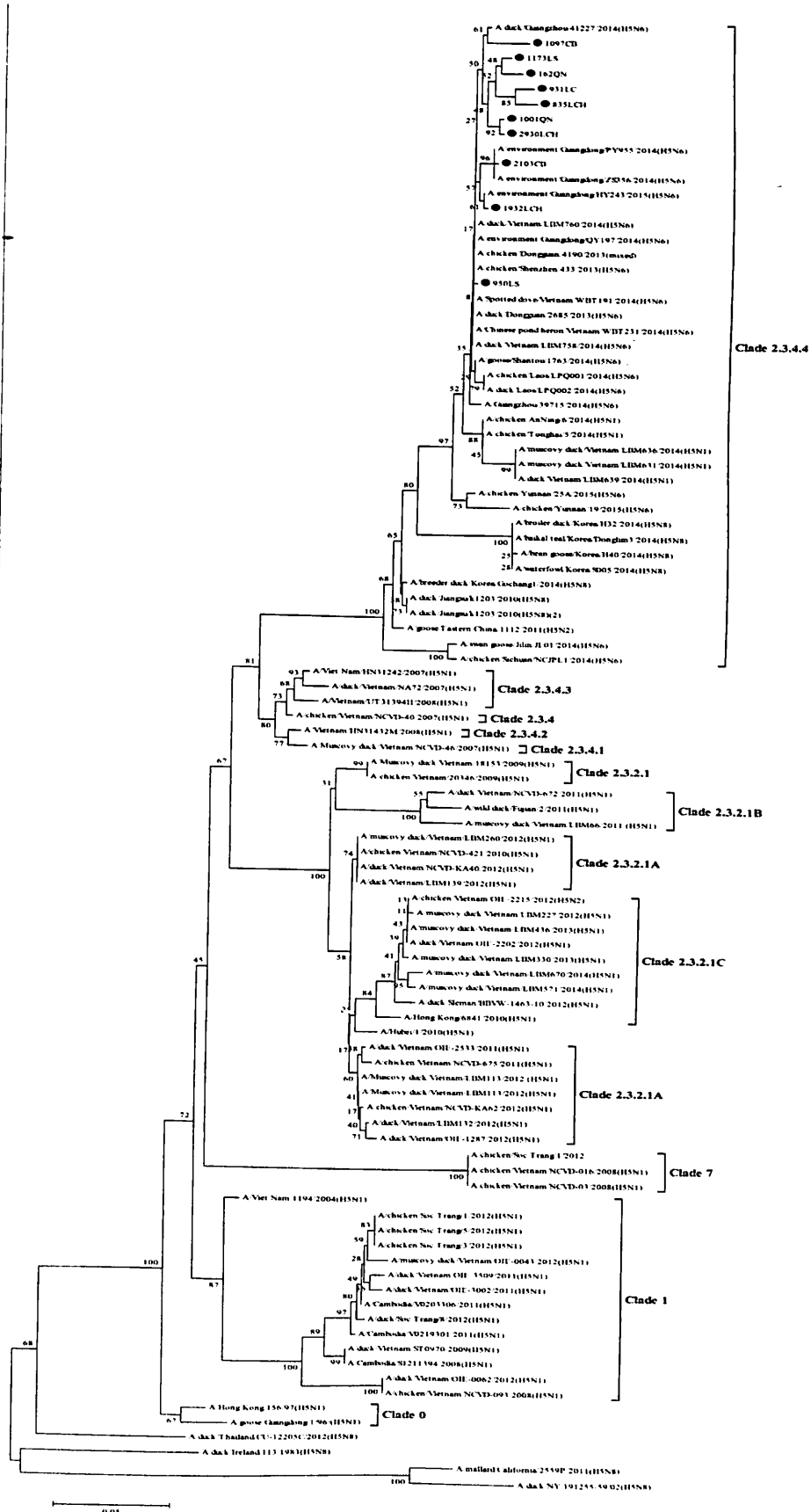
Kết quả so sánh trình tự nucleotide ở đoạn gen H5 và N6 cho thấy, giữa 10 chủng virus cúm gia cầm có sự sai khác về thành phần nucleotide và có sai khác tại 39 vị trí ở trình tự gen H5 và 74 vị trí ở trình tự gen N6.

Chúng tôi so sánh mức độ tương đồng về trình tự nucleotide gen H5 và N6 giữa 10 chủng virus cúm gia cầm được thống kê tại bảng 4 và bảng 5.

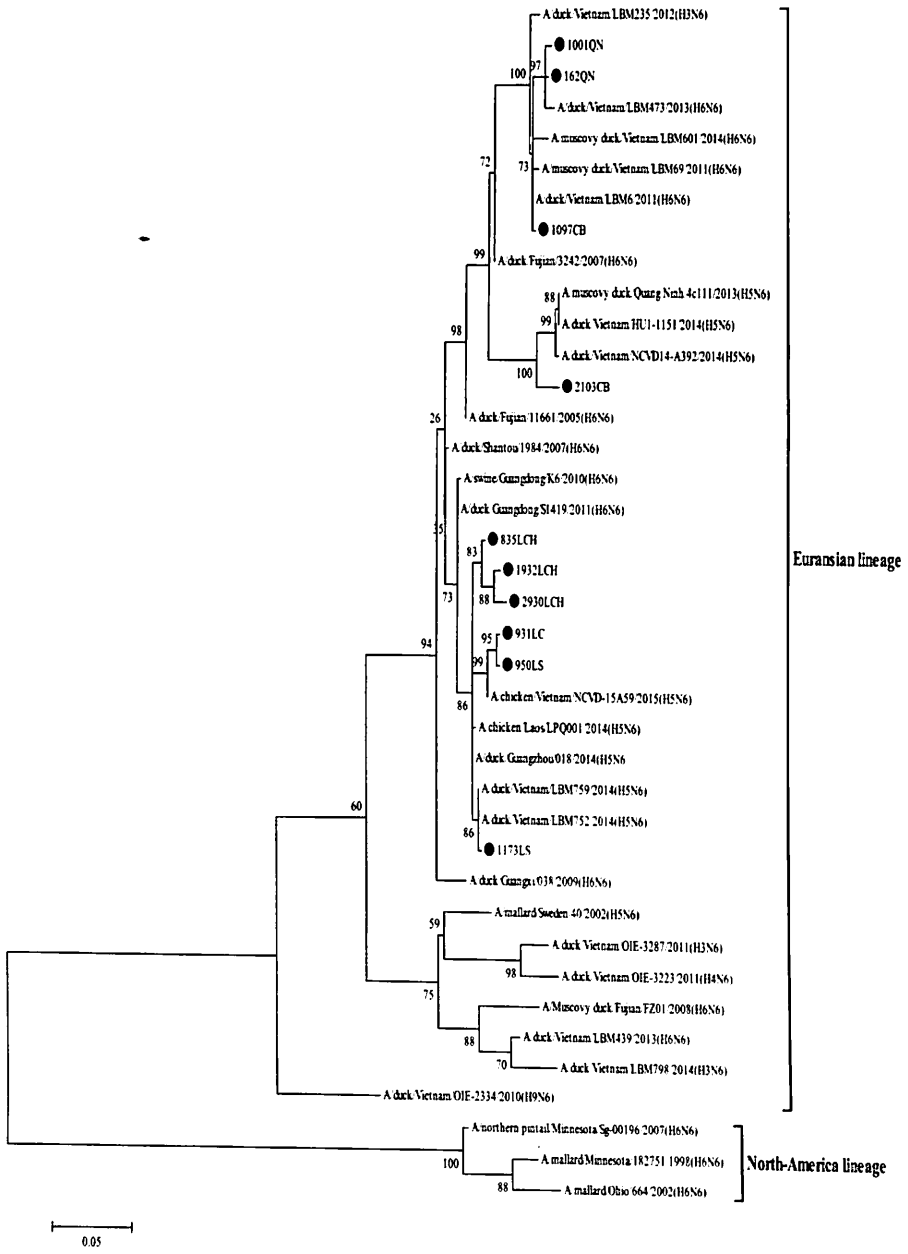
Kết quả so sánh mức độ tương đồng về trình tự nucleotide gen H5 và N6 giữa 10 chủng virus cúm gia cầm lần lượt là 94,93-99,60% và 88,74-99,61%.

Sau khi so sánh mức độ tương đồng về nucleotide giữa các chủng virus cúm gia cầm A/H5N6, dựa vào phần mềm MEGA6 chúng tôi tiến hành xây dựng cây sinh học phân tử để xác định nguồn gốc phát sinh của 10 chủng virus nghiên cứu. Kết quả phân tích nguồn gốc phát sinh của các chủng virus nghiên cứu được thể hiện tại hình 1 và 2.

Từ kết quả phân tích nguồn gốc phát sinh loài dựa vào sự sai khác nucleotide đoạn gen H5 và N6 của 10 chủng virus cúm là 1001QN, 162QN, 835LCH, 931LC, 950LS, 1097CB, 1173LS, 1932LCH, 2103CB, 2930LCH cho thấy: 1) 10 chủng virus mang đoạn gen H5 đều thuộc clade 2.3.4.4 và 10 chủng virus cúm nằm trong nhánh phát sinh cùng với chủng virus cúm A/H5N6 phân lập được ở Lào năm 2014 và chủng virus cúm A/H5N6 phân lập ở Trung Quốc năm



Hình 1. Cây sinh học phân tử của các chủng virus A/H5N6 nghiên cứu dựa trên trình tự nucleotide gen H5.



Hình 2. Cây sinh học phân tử của các chủng virus A/H5N6 nghiên cứu dựa trên trình tự nucleotide gen N6.

2013-2014. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu di truyền học gen HA virus cúm A/H5N6 của Nguyễn Lê Khánh Hằng và Lê Thị Quỳnh Mai (2016), tác giả đã xác định clade 2.3.4.4 là clade mới xuất hiện bao gồm các virus cúm A/H5N6, H5N8 và H5N2 lưu hành tại Việt Nam, Trung Quốc, Đài Loan, Nhật Bản [6]; 2) 10 chủng virus cúm mang đoạn gen N6 nằm trong cùng dòng Á - Âu (Eurasian lineage). Trong đó, 5 chủng virus gồm 835LCH, 1932LCH, 2930LCH, 931LC và 950LS nằm cùng nhánh phát sinh với chủng virus cúm A/H5N6 phân lập ở Lào năm 2014 và ở Trung Quốc năm 2014. Các chủng virus 1001QN, 162QN, 1097CB và 2103CB nằm cùng nhánh phát sinh với một số chủng virus cúm A/H5N6 và H6N6 phân lập ở Việt Nam năm 2011-2014.

Kết luận

1. Kết quả kiểm tra virus cúm A/H5N6 bằng phản ứng Realtime RT-PCR với 15.248 mẫu swab và 2.830 mẫu nội tạng của gà, vịt, ngan và chim cút tại cả 5 tỉnh nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ dương tính chung từ các mẫu swab là 5,79%, từ mẫu nội tạng cho tỷ lệ dương tính với virus A/H5N6 là 2,05%. Không có sự khác nhau về nguy cơ nhiễm virus cúm A/H5N6 trên các đối tượng gà, vịt, ngan và chim cút.

2. Giải trình tự nucleotide 10 mẫu virus cúm A/H5N6, mức độ tương đồng về trình tự nucleotide gen H5 và N6 giữa 10 chủng virus cúm gia cầm lần lượt là 94,93-99,60% và 88,74-99,61%.

3. Kết quả xác định 10 chủng virus mang gen H5 đều thuộc clade 2.3.4.4 và gần gũi với virus cúm A/H5N6 ở Lào và Trung Quốc. 10 chủng virus cúm chứa gen N6 nằm trong cùng dòng Á - Âu (Eurasian lineage). Trong đó, 5 chủng virus cúm nằm cùng nhánh phát sinh với chủng virus cúm A/H5N6 phân lập ở Lào và Trung Quốc, số còn lại nằm cùng nhánh phát sinh với virus cúm A/H5N6 và H6N6 phân lập ở Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] OIE - World organisation for animal health (2005), *Avian influenza. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals*, http://www.oie.int/ Eng/info_ev/en_AI_avianinfluenza.htm.

[2] Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2014), *Công điện khẩn (số 7115/CĐ-BNN-TY ngày 4/9/2014) về việc tăng cường các biện pháp cấp bách phòng, chống dịch cúm gia cầm H5N6 và các chủng virus cúm gia cầm khác.*

[3] Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2014), *QCVN 01-83:2011/BNNPTNT: Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về bệnh động vật - Yêu cầu chung lấy mẫu bệnh phẩm, bảo quản và vận chuyển.*

[4] H.G. Heine, A.J. Foord, J. Wang, S. Valdeter, S. Walker, C. Morrissy, F.Y. Wong, B. Meehan (2015), "Detection of highly pathogenic zoonotic influenza virus H5N6 by reverse-transcriptase quantitative polymerase chain reaction", *Virology Journal*, pp.12-18, doi: 10.1186/s12985-015-0250-3.

[5] Cục Thú y (2016), *Báo cáo chuyên đề công tác thú y năm 2016 và kế hoạch công tác thú y năm 2017.*

[6] Nguyễn Lê Khánh Hằng, Lê Thị Quỳnh Mai (2016), "Đặc điểm vi rút cúm A/H5N1 và A/H5N6 trên gia cầm tại Việt Nam 2012-2015", *Tạp chí Y tế dự phòng*, **Tập XXVI, số 10(183)**, tr.126-134.