

SỰ KHÁC NHAU VỀ KIỂU HÌNH HA CỦA VIRÚT CÚM GIA CẦM ĐỘC LỰC CAO A/H5N1 GÂY BỆNH CHO NGƯỜI TẠI VIỆT NAM

LÊ QUỲNH MAI - Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương

TÓM TẮT

Virút cúm gia cầm độc lực cao A/H5N1 lưu hành tại Việt Nam được biểu hiện đa dạng về kiểu hình HA liên quan nhiều đến đặc tính kháng nguyên, trong đó kiểu hình HA clade 1 và clade 2 được xác định gây bệnh cho người và kiểu hình HA clade 2 cũng đã phát triển thành các nhóm khác nhau trên cơ sở thay đổi về một số axit amin. Nghiên cứu của chúng tôi tìm hiểu sự khác biệt của kiểu hình HA clade 1 và clade 2.3.4 tại Việt Nam nhằm xác định các đột biến chỉ điểm liên quan đến sự thay đổi kiểu hình HA. Kết quả nghiên cứu đã chỉ ra có sự khác nhau trung bình $15,5 \pm 3,0$ axit amin (tương đồng 97% axit amin trong protein HA) của clade 1 và clade 2.3 lưu hành tại Việt Nam. Clade 2.3 (A/Vietnam/30850/2005) bị thiếu axit amin Lysin (K) tại vị trí 328 trong khu vực phân tách protein HA và có 16 axit amin thay đổi trong các vị trí từ 94 đến 326 trong protein HA liên quan đến sự phân chia kiểu hình HA clade 1 (A/Vietnam/1203/2004) và clade 2.3 (A/Vietnam/30850/2005).

Từ khóa: virút cúm gia cầm độc lực cao A/H5N1, kiểu hình HA, axit amin.

SUMMARY

The highly pathogenic avian influenza (HPAI) A/H5N1 virus circulation in Vietnam is variant of clade HA genes. There are two clade HA genes (clade 1 and clade 2.3.4) were recognized as causing of human disease. Among them, growing diversity of clade 2 HA were classified base on mutation of amino acids. Our study to understand differences of clade 1 and clade 2.3 HA genes due to determine signal mutations. Our results showed that: median $15,5 \pm 3,0$ amino acid difference (approximate 97% homologous) between clade 1 and clade 2.3. Clade 2.3 (A/Vietnam/30850/2005) pose a lacking of Lysine (K) at position 328 on HA cleavage site and differences of 16 amino acids among position 94 to 326 are related to classify clade 1 (A/Vietnam/1203/2004) and clade 2 (A/Vietnam/30850/2005) HA genes.

Keywords: Highly pathogenic avian influenza (HPAI) A/H5N1 virus, clade HA genes, amino acid.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Virút cúm gia cầm độc lực cao (HPAI) A/H5N1 xuất hiện và lan rộng trong khu vực Đông Nam Châu Á đến khu vực Trung Á, Tây Á, Trung Đông, Châu Âu và Châu Phi. Trường hợp nhiễm virút cúm gia cầm A/H5N1 đầu tiên được ghi nhận tại Hồng Kông năm 1997 và đã được ghi nhận là một tác nhân mới gây bệnh cho người. Các nghiên cứu về di truyền học virút cúm A/H5N1 tại Hồng Kông năm 1997 cho thấy virút cúm này có gen HA xuất phát từ gốc là virút cúm gia cầm tại Quảng Đông, 1996 (A/Goose/Guangdong/1/96) và các virút cúm A/H5N1 có xuất phát điểm là virút A/Goose/Guangdong/1/96 tiếp tục lan rộng và lưu hành trong khu vực Châu Á [6].

Hiện tượng trao đổi và tích hợp giữa các virút lưu hành đồng thời trong cùng thời điểm đã đưa đến hiện tượng nhiều kiểu gen (genotype) của virút cúm A/H5N1 được phát hiện khi giám sát virút học các vụ dịch cúm gia cầm. Tại Việt Nam, dịch cúm gia cầm lần đầu tiên được xác định vào năm 2003 và những trường hợp người nhiễm cúm gia cầm A/H5N1 cũng được phát hiện vào tháng 12 năm 2003. Trong quá trình lưu hành trên quần thể gia cầm cũng như gây bệnh cho người từ năm 2003 đến nay, virút cúm gia cầm A/H5N1 cũng đã được ghi nhận có 9 genotype tương đương với 6 kiểu hình HA (HA clade), trong đó clade 1 và clade 2.3.4 được xác định gây bệnh cho người tại Việt Nam [5]. Sự đa dạng về kiểu hình HA sẽ ảnh hưởng lớn đến hiệu quả phòng và chống bệnh bằng vaccine. Nghiên cứu này của chúng tôi với mục đích so sánh sự khác biệt về axit amin trong protein HA, phát hiện các axit amin có khả năng thay đổi kiểu hình HA và khả năng miễn dịch chéo nếu có khi sử dụng vaccine với gen HA clade 1 hoặc gen HA clade 2.3.4.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

- Vật liệu di truyền của virút (ARN) được tách chiết từ nước nổi nuôi cấy tế bào (Tissue Culture Fluid- TCF) bằng bộ sinh phẩm tách chiết ARN - QIAamp, Qiagen-Mỹ. Quy trình tách chiết thực hiện theo thường quy của bộ sinh phẩm.

- Sử dụng mỗi U12 (5'-AGCAAAGCAGG-3') để tổng hợp sợi ADN bổ trợ (cDNA) từ ARN theo quy trình của bộ sinh phẩm SuperScript™ III reverse transcriptase (Invitrogen).

- Sản phẩm cDNA thu được sẽ được sử dụng để khuếch đại toàn bộ gen HA bằng phương pháp PCR chuẩn khi sử dụng bộ sinh phẩm ProofStart DNA Polymersase (Qiagen- Mỹ) với DNA polymerase và các cặp mỗi đặc hiệu cho mỗi phân đoạn gen của virút cúm A/H5N1.

- Sản phẩm PCR được tinh khiết bằng bộ sinh phẩm MinElute PCR Purification (Qiagen- Mỹ). Hỗn hợp sequencing bao gồm BigDye@ 3.1, sản phẩm PCR cùng với các cặp mỗi thích hợp. Phản ứng sequencing thực hiện trên máy giải trình tự ABI 3100 (ABI, Foster City, Mỹ) và được kiểm tra trên cả 2 đầu 3' và 5'. Trình tự chuỗi nucleotide được sắp xếp và thu thập bằng phần mềm SeqSpace 2.1 (ABI- Mỹ).

- Các thông số tham khảo của các virút đại diện cho chủng chuẩn (prototype) được thu thập trên Ngân hàng dữ liệu ADN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

- Sử dụng phần mềm MEGA 4 để xác định số lượng axit amin phân chia và tính toán giá trị khác nhau trong từng clade, subclade hoặc giữa các clade, subclade [3].

- Phản ứng ngăn ngưng kết hồng cầu (HI) được sử dụng để đánh giá đặc tính kháng nguyên bằng hồng cầu gà tây.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Sự khác nhau về các axit amin giữa HA clade 1 và clade 2

Bảng 1. Sự khác nhau về axit amin giữa các virút trong cùng clade hoặc subclade

	Số axit amin khác nhau \pm Sd (X \pm Sd)
Clade 1	2,6 \pm 0,5
Clade 2	11,8 \pm 1,8
Subclade 2.1	4,9 \pm 1,3
Subclade 2.2	6,4 \pm 1,2
Subclade 2.3	7,4 \pm 1,5

Kết quả bảng 1 cho thấy sự khác nhau về axit amin của các virút trong clade 1 là 2,6 \pm 0,5 axit amin, trong khi sự khác nhau của các virút cúm trong clade 2 là 11,8 \pm 1,8 axit amin và các subclade 2.1, 2.2, 2.3 từ 4,9 \pm 1,3 đến 7,4 \pm 1,5 axit amin.

Bảng 2. Sự khác nhau về axit amin của các chủng virút giữa các clade và subclade

	Số axit amin khác nhau \pm Sd (X \pm Sd)				
	Clade 1	Clade 2	2.1	2.2	2.3
Clade 1	-	-	-	-	-
Clade 2	13,7 \pm 2,5	-	-	-	-
Subclade 2.1	11,4 \pm 2,1	-	-	-	-
Subclade 2.2	15,4 \pm 3,1	-	14,1 \pm 2,8	-	-
Subclade 2.3	15,5 \pm 3,0	-	13,9 \pm 2,4	16,6 \pm 3,2	-

Kết quả bảng 2 cho thấy sự khác nhau giữa các virút thuộc clade 1 và clade 2 nhìn chung là 13,7 \pm 2,5 axit amin, trong đó clade 1 khác subclade 2.1 là 11,4 \pm 2,1 axit amin, subclade 2.2 là 15,4 \pm 3,1 axit amin và subclade 2.3 là 15,5 \pm 3,0 axit amin. Sự khác nhau giữa subclade 2.1 và 2.2 được xác định là 14,1 \pm 2,8 axit amin và 13,9 \pm 2,4 axit amin với subclade 2.3. Tương tự như vậy subclade 2.2 được xác định khác subclade 2.3 là 16,6 \pm 3,2 axit amin.

Bảng 3. Các axit amin khác biệt giữa clade 1 và clade 2 trên gen HA (Vị trí axit amin đánh số theo trình tự H3HA)

Vị trí axit amin	1	2.1	2.2	2.3	2.3
Virút đại diện	A/Vietnam/1203/04	A/Indonesia/5/05	A/Swan/Mongolia/24/05	A/Duck/Hunan/15/04	A/Vietnam/30850/05
80	I71		L		
91	A83		I		
94	V86	T	A	A	A
101	D94	S	N	N	N
129	S124	D	D	D	D
133A	L129	S	S	S	S
142	Q138	L			
144	K140	S	R		T
145	S141	P			P
158	N154		D		
159	S155		N	N	N
160	T156		A	A	
166	R162	K			
178	V174				I
185	P181				S
193	K189	R	R		

204	V200	I			
213	L209				
216	R212	K	K	K	K
225	G221			R	
237	E227			D	D
255A	Y252		N		
266	T263	A		A	A
272	L269			V	V
285	M282		I		I
313	R310			K	K
325	Q322				L
328	K328			Thiếu	Thiếu

Bảng 3 cho thấy có 28 vị trí trên gen HA1 liên quan đến sự phân chia clade HA khi các axit amin ở đoạn gen này thay đổi và kết quả của sự khác nhau này là sự phân chia thành các clade hoặc subclade. Virút cúm A/Vietnam/30850/2005 thuộc subclade 2.3 có 16 axit amin thay đổi so với virút cúm A/Vietnam/1203/2004 thuộc clade 1 và thiếu một axit amin Lysin (K) tại vị trí 328 trong khu vực phân tách HA1 và HA2.

Đặc tính kháng nguyên của các virút clade 1 và clade 2.

Bảng 4. Kết quả HAI đánh giá đặc tính kháng nguyên của virút cúm A/H5N1 giữa các clade

Virút (Kháng nguyên)	Kháng huyết thanh chuẩn *				
	HA Clade	VN 1203	Indo5	wsMG24 4	dkHN1 5
A/Vietnam/1203/04	1	160	20	5	160
A/Indonesia/5/05	2.1	5	640	80	40
A/whooper swan/Mongolia/244/05	2.2	20	160	640	10
A/duck/Hunan/15/04	2.3	20	80	5	320
A/Vietnam/30850/05	2.3	5	80	5	40

*Cung cấp bởi TCYTTG

Bảng 4 cho thấy hiệu giá kháng thể giữa virút thuộc clade 1 (A/Vietnam/1203/04) và subclade 2.3 (A/Vietnam/30850/05) khi tương tác với kháng huyết thanh chuẩn thuộc clade 1 (A/Vietnam/1203/04) tương ứng là 160 đơn vị HAI và 5 đơn vị HAI. Như vậy, có sự khác biệt 6 bậc trong đáp ứng kháng nguyên - kháng thể giữa clade 1 và subclade 2.3 lưu hành tại Việt Nam.

BÀN LUẬN

Virút cúm gia cầm độc lực cao phân typ A/H5N1 vẫn tiếp tục gây ảnh hưởng lớn đến kinh tế và sức khỏe cộng đồng tại một số nước Châu á và Châu Phi. Sự tiến hóa của virút cùng với các virút cúm theo mùa khác luôn là những mối nguy cơ tiềm tàng của dịch hoặc đại dịch cúm trong tương lai [1,2]. Tại Việt Nam, sau gần 10 năm xuất hiện và gây dịch, virút rút cúm gia cầm A/H5N1 đã trở thành một tác nhân nguy hiểm cho sức khỏe cộng đồng và mối nguy cơ lại càng tăng khi vaccine sử dụng cho gia cầm dường như chưa đạt được hiệu quả mong muốn. Nghiên cứu của chúng tôi đã chỉ rõ, tuy chỉ có khoảng 16 axit amin thay đổi trên protein HA (bảng 3) đã tạo ra một kiểu hình clade HA khác và tương ứng với sự thay đổi này là một kiểu kháng nguyên mới (từ clade 1 sang subclade 2.3). Kết

qua phân tích tại bảng 4 cho thấy, virút cúm subclade 2.3 có đáp ứng miễn dịch rất thấp (< 5 đơn vị HAI) khi tương tác với kháng thể chuẩn của clade 1. Kết quả trên đã cho thấy khả năng tái nhiễm với virút cúm gia cầm với kiểu hình HA khác là có thể và vaccine phòng chống virút cúm gia cầm A/H5N1 hiện vẫn là thách thức lớn với các nước nông nghiệp đang chịu tác động của dịch cúm gia cầm như Việt Nam. Kết quả nghiên cứu trên cũng cho thấy vai trò quan trọng của vùng gen HA1 trong việc tạo ra sự đa dạng của kiểu hình HA trong virút cúm gia cầm A/H5N1, tuy chỉ có 28 vị trí liên quan đến sự đa dạng kiểu hình giữa clade 1 và clade 2 HA, nhưng sự xuất hiện thay đổi tại các vị trí khác nhau đã tạo ra 6 kiểu hình phụ khác và phổ biến hay gặp hiện tại là các subclade 2.1; 2.2 hoặc 2.3. Những sự tiến hóa gần đây đã cho thấy nhiều nhánh phụ đã phát triển từ những kiểu hình trên, điển hình là subclade 2.3.4, hiện đang lưu hành phổ biến tại Việt Nam. Sự tiến hóa là đặc tính quan trọng của virút cúm A trong quá trình duy trì nòi giống. Tuy nhiên với sự đa dạng về vật chủ của virút cúm gia cầm A/H5N1 và ổ chứa tự nhiên là gia cầm, chim di cư, việc giám sát sự tiến hóa để kiểm soát sự đa dạng về kiểu hình HA là rất cần thiết cho công tác phòng chống đại dịch cúm trong tương lai [4].

KẾT LUẬN

- Kiểu hình HA clade 1 và subclade 2.3 lưu hành tại Việt Nam có sự khác biệt trung bình là $15,5 \pm 3,0$ axit amin;

- Kiểu hình chủng chuẩn subclade 2.3 (A/Vietnam/30850/2005) thiếu axit amin Lysin (K) tại vị trí 328 trong khu vực phân tách protein HA và có 16

axit amin thay đổi trên protein HA liên quan đến sự phân chia kiểu hình chủng chuẩn HA clade 1 (A/Vietnam/1203/2004) và subclade 2.3 (A/Vietnam/30850/2005).

- Hiệu giá đáp ứng kháng thể giữa virút thuộc clade 1 và subclade 2.3 khi tương tác với kháng huyết thanh chuẩn thuộc clade 1 là có sự khác biệt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Altmuller A, Fitch WM, Scholtissek C (1989). "Biological and genetic evolution of the nucleoprotein gene of human influenza A viruses", *J Gen Virol.* (Pt 8):2111-9.
2. Li KS, Guan Y, Wang J, Smith GJ, Xu KM, Duan L, et al (2004). "Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia", *Nature*; 430(6996):209-13.
3. Tamura K, Dudley J, Nai M, Kumar S (2007), "MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics analysis (MEGA) software version 4.0", *Mol Biol Evol*, 24 (8), pp. 1596-1599.
4. WHO (2005). "Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia", *Emerg Infect Dis*, 11(10):1515-21.
5. Xiu-Feng Wan, Tung Nguyen, C. Todd Davis, Catherin B. Smith, Zi-Ming Zhao, Margaret Carrel, et al (2008), "Evolution of Highly Pathogenic H5N1 Avian Influenza Viruses in Vietnam between 2001 to 2007", *PLoS ONE*, 3 (10), e3462.
6. Xu X, Subbarao, Cox NJ, Guo Y (1999). "Genetic characterization of the pathogenic influenza A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) virus: similarity of its hemagglutinin gene to those of H5N1 viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong", *Virology*, 261(1):15-9.