

ĐẶC ĐIỂM PHÂN TỬ CỦA VIRÚT CÚM A/H5N1 LƯU HÀNH TẠI MIỀN BẮC VIỆT NAM, 2003-2008

LÊ QUỲNH MAI - Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung Ương

TÓM TẮT

Virút cúm gia cầm độc lực cao A/H5N1 đã được ghi nhận không chỉ gây bệnh cho gia cầm mà còn gây bệnh viêm đường hô hấp cấp nguy hiểm cho người. Trường hợp nhiễm virút cúm gia cầm đầu tiên tại Việt Nam được xác định vào cuối năm 2003 và đến nay đã có 119 trường hợp được ghi nhận trong đó 59 trường hợp tử vong. Virút cúm gia cầm A/H5N1 có đặc điểm tiến hóa về di truyền học tương tự các virút cúm A đã biết. Nghiên cứu của chúng tôi trên 23 chủng virút cúm gia cầm độc lực cao phân lập trên người tại miền Bắc Việt Nam, 2003-2008 cho thấy hầu hết các phân đoạn gen của virút cúm A/H5N1 nhóm vào 2 kiểu hình kháng nguyên là clade 1 và clade 2.3.4. Tuy nhiên gen NA lại biểu hiện trên 3 kiểu hình kháng nguyên là clade 1, clade 2.3.2 và clade 2.3.4 tương tự với virút cúm gia cầm A/H5N1 lưu hành trên gia cầm tại Việt Nam và Trung Quốc trong cùng thời gian.

Từ khóa: virút cúm gia cầm độc lực cao A/H5N1, kiểu hình kháng nguyên, gen HA, gen NA.

SUMMARY

The highly pathogenic avian influenza (HPAI) A/H5N1 virus are causing of poultry outbreak as well as acute severe pneumonia in human. The 1st confirmed A/H5N1 case was recognized in Vietnam in the end of 2003 and up to now, 119 confirmed cases were reported, of those 59 deaths. The genetic evolution of HPAI/H5N1 is similar known influenza A viruses and led to antigen changing that caused of endemic or pandemic so far. Our study analyzes 23 strains of A/H5N1 isolated from A/H5N1 patients in the North of Vietnam during 2003-2008 period by molecular characterization. The results showed that most of genetic fragments clustered into clade 1 and clade 2.3.4, however, the NA gen have diverged into clade 1, clade 2.3.2 and clade 2.3.4 that referred to poultry isolates in Vietnam and China at same period.

Keywords: Highly pathogenic avian influenza (HPAI) A/H5N1 virus, clade, HA gene, NA gene

ĐẶT VẤN ĐỀ

Virút cúm gia cầm độc lực cao H5N1 (HPAI/H5N1) được biết đến như một tác nhân mới gây viêm đường hô hấp cấp nặng có tỷ lệ tử vong cao. Trường hợp nhiễm cúm A/H5N1 đầu tiên được ghi nhận tại Hồng Kông năm 1997 và xuất hiện tại Việt Nam vào cuối năm 2003 cùng với dịch bùng phát trên đàn gia cầm ghi nhận tại 59/63 tỉnh/thành trong cả nước. Đến nay, virút cúm gia cầm A/H5N1 đã thường xuyên xuất hiện trên đàn gia cầm và tiếp tục gây bệnh cho người. Tại Việt Nam, 119 người đã được xác định nhiễm virút cúm A/H5N1 và 59 người tử vong [3].

Virút cúm A với đặc tính tiến hóa nhanh do sự thay đổi vật liệu di truyền trong quá trình nhân lên đã ảnh hưởng nhiều đến chiến lược sản xuất vaccine toàn cầu, virút cúm gia cầm A/H5N1 cũng mang đặc điểm này. Tim hiểu sự thay đổi về phân tử trong các vật liệu di truyền của virút cúm A/H5N1 phân lập trên người tại miền Bắc Việt Nam trong giai đoạn 2003-2008 nhằm đánh giá khả năng tiến hóa của virút liên quan đến thay đổi về đặc điểm kháng nguyên và so sánh với các virút cúm A/H5N1 lưu hành trên gia cầm trong cùng thời gian là mục đích nghiên cứu của chúng tôi.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Hai mươi ba (23) chủng virút cúm A/H5N1 phân lập từ bệnh phẩm đường hô hấp (dịch họng, dịch phế quản, dịch tỵ hầu) của các bệnh nhân nhiễm virút cúm A/H5N1 tại miền Bắc Việt Nam trong giai đoạn 2003-2008 (bảng 1).

Toàn bộ quá trình phân lập virút cúm A/H5N1 được thực hiện tại phòng thí nghiệm (PTN) an toàn sinh học cấp độ 3 (BSL-3) tại Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương theo thường quy của Tổ chức Y tế thế giới [4]

Phương pháp nghiên cứu

Vật liệu di truyền của virút cúm (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 primer U12 (5'-AGCAAAAGCAGG-3') để tổng hợp cADN từ ARN theo quy trình của bộ sinh phẩm SuperScript™ III reverse transcriptase (Invitrogen).

- Sản phẩm cADN thu được sẽ được sử dụng để khuếch đại toàn bộ 8 phân đoạn gen của virút cúm A/H5N1 (HA; NA; NP; NS1; M; PB1; PB2 và PA) bằng phương pháp PCR chuẩn khi sử dụng bộ sinh phẩm ProofStart DNA Polymerase (Qiagen- Mỹ) với DNA polymerase và các cặp mồi 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 mồi thích hợp. Phản ứng Sequencing thực hiện trên máy giải trình tự ABI 3100 (ABI, Foster City, Mỹ) và được kiểm tra trên cả hai đầu 3' và 5'. Trình tự chuỗi nucleotide được sắp xếp và thu thập bằng phần mềm SeqSpace 2.1 (ABI- Mỹ).

- Cây gia hệ được xây dựng trên các thông số đã biết được xử lý bằng phần mềm ClustalW và dựng cây bằng phương pháp Neighbor-Joining (NJ), độ tiến hóa được ước tính toán theo chỉ số nhân lên của bootstrap (100 neighbor-joining bootstrap).

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Toàn bộ 8 phân đoạn gen của 23 chủng virút cúm A/H5N1 phân lập tại miền Bắc Việt Nam, 2003-2008 đã được phân tích sự tiến hóa về mặt di truyền. Các chủng virút cúm A/H5N1 Việt Nam cũng được so sánh với các chủng virút A/H5N1 đại diện lưu hành trên thế giới trong cùng thời gian. Cây gia hệ của các phân đoạn gen đều lấy gốc là chủng virút cúm A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1). Chủng virút cúm A/H5N1 này phân lập trên ngỗng tại Miền Nam Trung Quốc được cho là tổ tiên của virút cúm A/H5N1 đang lưu hành hiện nay [2].

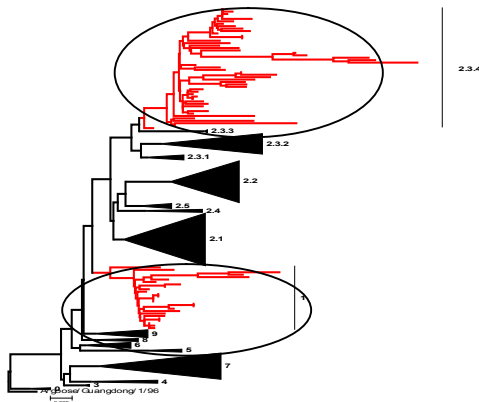
Bảng 1: Các chủng virút cúm A/H5N1 phân lập tại miền Bắc Việt Nam 2003-2008.

Tên chủng virút	Ngày thu thập mẫu	Địa chỉ	Tình trạng bệnh nhân	Loại bệnh phẩm
A/Vietnam/UT3028/2003	12/2003	Ha Nam	Tử vong	DPQ ^a
A/Vietnam/UT3028II/2003	12/2003	Ha Nam	Tử vong	DPQ
A/Vietnam/UT3030/2003	12/2003	Nam Định	Tử vong	DPQ
A/Vietnam/UT3035/2003	12/2003	Bac Giang	Hồi phục	DH ^b
A/Vietnam/UT3040/2004	1/2004	Bac Ninh	Tử vong	DTH ^c
A/Vietnam/UT3040II/2004	1/2004	Bac Ninh	Tử vong	DPQ
A/Vietnam/UT3047III/2004	1/2004	Bac Binh	Tử vong	DTH
A/Vietnam/UT3062/2004	1/2004	Bac Giang	Tử vong	DTH
A/Vietnam/UT30259/2004	7/2004	Ha Tay	Tử vong	DPQ
A/Vietnam/30262III/2004	8/2004	Ha Tay	Tử vong	DPQ
A/Vietnam/UT30408III/2005	2/2005	Thai binh	Hồi phục	DTH
A/Vietnam/UT30850/2005	10/2005	Ha Noi	Tử vong	DPQ
A/Vietnam/UT31203A/2007	5/2007	Vinh Phuc	Hồi phục	DTH
A/Vietnam/UT31239/2007	6/2007	Thanh Hoa	Hồi phục	DH
A/Vietnam/UT31244II/2007	6/2007	Ha Nam	Tử vong	DTH
A/Vietnam/UT31244III/2007	6/2007	Ha Nam	Tử vong	DTH
A/Vietnam/UT31312II/2007	6/2007	Ha Tay	Tử vong	DPQ
A/Vietnam/31388/2007	12/2007	Son La	Tử vong	DPQ
A/Vietnam/UT31394II/2008	1/2008	Tuyen Quang	Tử vong	DPQ
A/Vietnam/UT31412II/2008	2/2008	Hai Duong	Tử vong	DPQ
A/Vietnam/UT31413II/2008	3/2008	Ninh Binh	Tử vong	DPQ
A/Vietnam/31432/2008	4/ 2008	Phu Tho	Tử vong	DTH

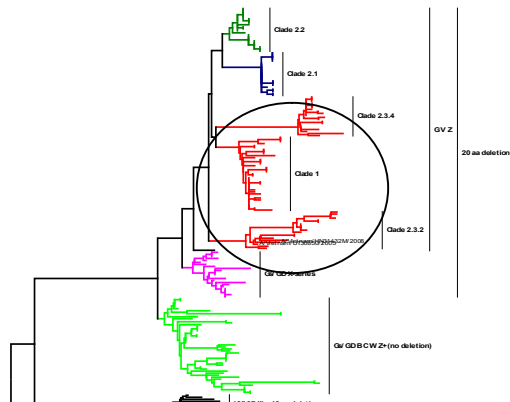
^a: Dịch phế quản; ^b: Dịch hang; ^c: Dịch ty hầu

Sự tiến hóa về di truyền của virút cúm A/H5N1 được ghi nhận thông qua các kiểu hình kháng nguyên (clade) được hình thành. Tại gen HA có 9 clade đã được hình thành và các virút cúm A/H5N1 phân lập trên người tại Việt Nam tập trung vào clade 1 và 2.3.4 (hình 1). Trên cây gia hệ của gen NA, sự khác biệt của các clade không rõ ràng, tuy nhiên có hai clade chính là clade 1 và clade 2 cũng được ghi nhận trong đó các virút cúm A/H5N1 của nghiên cứu được nhóm vào clade 1, clade 2.3.2 và clade 2.3.4 (hình 1).

Tương tự như vậy, các gen còn lại M, NS, PB1, PB2, PA và NP, các virút cúm A/H5N1 trong nghiên cứu cũng tập trung nhóm tại clade 1 và clade 2.3.4 (hình 2,3,4).



Gen HA

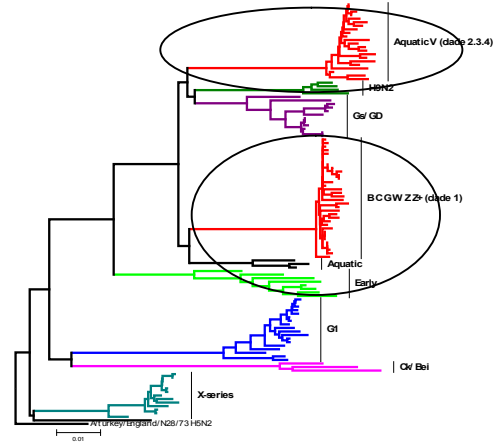


Gen NA

Hình 1. Cây gia hệ gen HA và NA của virút cúm A/H5N1 lưu hành tại miền Bắc Việt Nam, 2003-2008

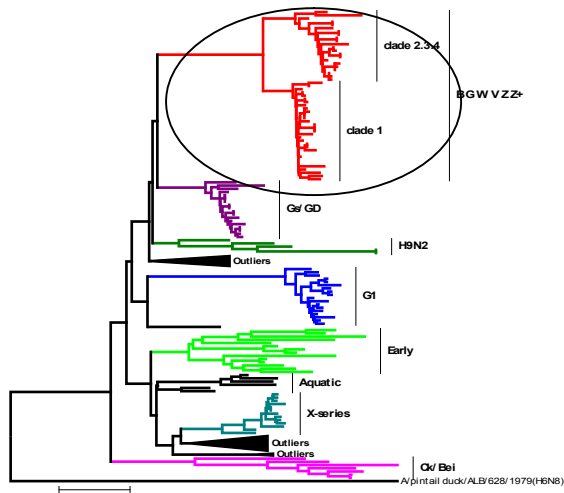


Gen PB2

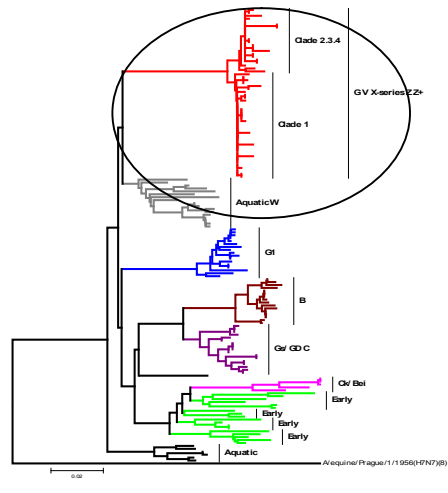


Gen PA

Hình 2. Cây gia hệ gen PB2 và PA của virút cúm A/H5N1 lưu hành tại miền Bắc Việt Nam, 2003-2008

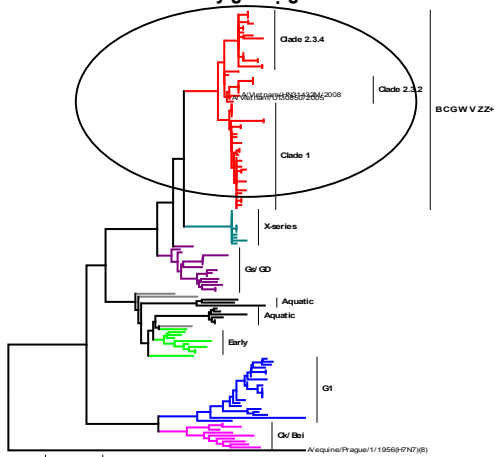


Gen PB1

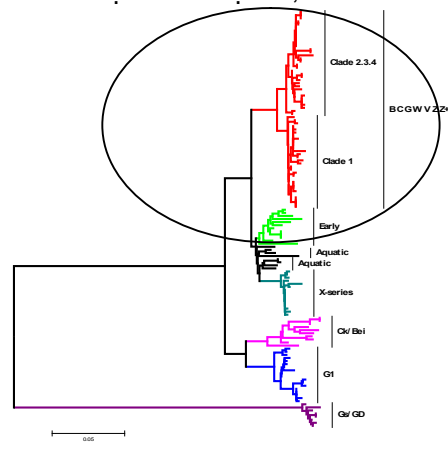


Gen NP

Hình 3. Cây gia hệ gen PB1 và NP của virút cúm A/H5N1 lưu hành tại miền Bắc Việt Nam, 2003-2008



Gen M



Gen NS

Hình 4. Cây gia hệ gen M và NS của virút cúm A/H5N1 lưu hành tại miền Bắc Việt Nam, 2003-2008

BÀN LUẬN

Sự tiến hóa về di truyền học của virút cúm A là một trong những đặc tính quan trọng của virút trong quá trình duy trì sự tồn tại của mình trên các vật chủ. Đặc tính này đã làm thay đổi đặc tính kháng nguyên giúp cho virút cúm A trốn khỏi các miễn dịch bảo vệ đã biết và tạo ra các vụ dịch hoặc đại dịch mới ảnh hưởng lớn tới sức khỏe cộng đồng. Các vụ dịch hoặc đại dịch đã được ghi nhận trong suốt thế kỷ 20 như đại dịch cúm Tây Ban Nha 1918, đại dịch cúm Hồng Kông năm 1968... và gần đây nhất là đại dịch cúm A/H1N1/2009. Virút cúm gia cầm A/H5N1 đã vượt qua hàng rào loài gây bệnh cho một số động vật có vú khác như ngựa, hổ và người... Các đột biến về di truyền là nguyên nhân chính giúp virút cúm gia cầm A/H5N1 có thể vượt qua hàng rào loài và có thể là tiềm tàng của các vụ dịch/ đại dịch cúm cho người trong tương lai. Nghiên cứu tìm hiểu sự tiến hóa thông qua việc phân tích đặc điểm vật liệu di truyền của virút cúm A/H5N1 phân lập trên người tại miền Bắc Việt Nam trong những năm 2003-2008 sẽ phân nào giúp tìm hiểu khả năng tiến hóa của virút và hiệu quả của vaccine (nếu có) để góp phần phòng bệnh có hiệu quả.

Đặc điểm di truyền học trong kết quả của chúng tôi đã cho thấy: clade 1 và clade 2.3.4 tương ứng với đặc tính kháng nguyên là các kiểu gen (genotype) chính lưu hành trên các virút cúm A/H5N1 gây bệnh cho người tại miền Bắc cũng như toàn lãnh thổ Việt Nam. Nghiên cứu của Wan và cs [5] trên toàn bộ các virút cúm gia cầm A/H5N1 lưu hành tại Việt Nam trong giai đoạn 2001-2007 cho thấy có 9 loại kiểu gen (từ genotype 1 – VN1 đến genotype 9 – VN9) tương đương với 6 kiểu hình kháng nguyên (clade 0, clade 1, clade 2.3.2, clade 2.3.4, clade 3, và clade 5) nhưng chỉ có clade 1 và clade 2.3.4 được ghi nhận gây bệnh cho người tại Việt Nam.

Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy trong hầu hết các phân đoạn gen của virút cúm A/H5N1 đều nhóm vào 2 nhóm chính là clade 1 và clade 2.3.4. Tuy nhiên tại gen NA các virút cúm A/H5N1 trong nghiên cứu lại nhóm vào 3 phân nhóm chính là clade 1, clade 2.3.2 và clade 2.3.4. Kiểu hình 2.3.2 của virút cúm A/H5N1 trong nghiên cứu này được ghi nhận tại các virút phân lập trên gia cầm tại Việt Nam và Trung Quốc trong cùng thời gian, kết quả trên cho phép nghĩ đến sự đột

biến, trao đổi và tích hợp giữa virút cúm gia cầm A/H5N1 gây bệnh cho người và gia cầm vẫn đang tiếp tục, khả năng tiềm tàng xuất hiện một kiểu hình kháng nguyên mới là có thể [1]. Vì vậy, việc theo dõi, kiểm soát sự tiến hóa của virút cúm gia cầm A/H5N1 là một công việc cần thiết trong hoạt động phòng chống cúm gia cầm tại Việt Nam.

KẾT LUẬN

- 7 phân đoạn gen (HA, NP, M, NS, PB1, PB2 và PA) của virút cúm A/H5N1 đều thuộc 2 kiểu hình kháng nguyên là clade 1 và clade 2.3.4.

- Phân đoạn gen NA virút cúm A/H5N1 biểu hiện trên 3 kiểu hình kháng nguyên là clade 1, clade 2.3.2 và clade 2.3.4 tương tự với virút cúm gia cầm A/H5N1 lưu hành trên gia cầm tại Việt Nam và Trung Quốc trong cùng thời gian.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. 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", *Emerg Infect Dis*, 14, pp. 632-636.
2. Wallace RG, Hodac H, Lathrop RH, Fitch WM (2007), "A statistical phylogeography of influenza A H5N1", *Proc Natl Acad Sci USA*, 104, pp. 4473-4478.
3. World Health Organization (WHO). Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A(H5N1) Reported to WHO, 16 March 2011. Available: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2011_03_16/en/index.html. Accessed 2011 March 18.
4. World Health Organization (WHO). Recommendations and laboratory procedures for detection of avian influenza A (H5N1) virus in specimens from suspected human cases. Available: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/RecAllabtestsAug07.pdf. Accessed 2011 March 17.
5. Xiu-Feng Wan, Tung Nguyen, C. Todd Davis, Catherin B. Smith, Zi-Ming Zhao, Margaret Carrel, Kenjiro Inui, Hoa T.Do, Duong T.Mai, Samadhan Jadhao, Amanda Balish, Bo Shu, Feng Luo, Micheal Emch, Yumiko Matsuoka, Stephen e Lindstrom, Nancy J Cox, Cam V Nguyen, Alexander Klimov, Ruben O. Donis (2008), "Evolution of Highly Pathogenic H5N1 Avian Influenza Viruses in Vietnam between 2001 to 2007", *PLoS ONE*, 3 (10), e3462.