

Đánh giá hiệu lực vaccin cúm H5N1 (chủng NIBRG14) trên một số clade lưu hành ở Việt Nam năm 2011 và phân tích đặc tính di truyền của virus H5N1 clade 2.3.2.1b

**Đậu Huy Tùng^{1,2}, Đồng Văn Quyền², Nguyễn Tùng³, Nguyễn Nam Thắng⁵,
Trần Xuân Hạnh⁴, Kim Young Bong¹, Đinh Duy Kháng²**

Tóm tắt

Sự xuất hiện của dịch cúm gia cầm độc lực cao (HPAI) virus H5N1 và nguy cơ của đại dịch ở người đã nêu bật sự cần thiết của việc sử dụng vaccin phòng bệnh. Tuy nhiên, do việc lây lan nhanh chóng và sự tiến hóa liên tục của virus cúm gia cầm H5N1, phần lớn vaccin hiện đã không còn phù hợp với các clade virus mới xuất hiện gần đây. Chúng tôi tiến hành đánh giá hiệu quả của vaccin cúm, chủng NIBRG-14 (clade 1 A/Vietnam/1194/2004) chống lại các clade virus cúm gia cầm H5N1 lưu hành tại Việt Nam. Gia cầm được gây miễn dịch với liều vaccin tiêu chuẩn bằng cách tiêm dưới da sau đó công cường độc với ba loại virus cúm gia cầm H5N1 (clade 1, clade 2.3.2.1a và clade 2.3.2.1b) vào ngày thứ 21 sau tiêm chủng (pv). Kết quả cho thấy rằng NIBRG-14 bảo hộ được gia cầm chống lại clade 1 và clade 2.3.2.1a. Trong khi đó vaccin NIBRG-14 không bảo hộ được gia cầm khi công cường độc với clade 2.3.2.1b. Để tìm hiểu nguyên nhân vì rút H5N1 clade 2.3.2.1b (A/Duck/QuangNgai/1037/11) có thể chống lại hệ miễn dịch của gia cầm sau tiêm phòng, chúng tôi tiếp tục phân tích gen HA - một yếu tố quyết định độc tính quan trọng của virus. Kết quả phân tích trình tự axit amin cho thấy rằng virus này có chứa chuỗi SPQRRRRK -R / G tại các vùng phân cắt trong phân tử HA, có độc lực cao. Ngoài ra, chúng tôi đã xác định được nhiều đột biến với những thay thế amino acid trong HA: M226I, I239S nằm ở vùng N-link glycosyl và 2H, 45N, 53K 120D, 133A và 14N đột biến tại vùng đặc tính kháng nguyên, có thể ảnh hưởng đến thụ thể đặc hiệu cũng như yếu tố gây bệnh của virus. Đáng chú ý là, I239S và đột biến S133A chỉ có duy nhất ở A/Duck/QuangNgai/1037/2011, cho thấy rằng nó có thể liên quan đến khả năng virus né tránh hệ thống miễn dịch của vi-rút. Vì vậy, phân tích phát sinh loài cho thấy rằng những đột biến liên tục gen HA có thể tạo ra chủng kháng nguyên mới và có thể thay đổi độc lực của virus và giúp clade H5N1 2.3.2.1b kháng được vaccin chủng NIBRG-14.

Từ khóa: NIBRG-14, H5N1, công cường độc, đặc tính di truyền.

Immunological characterization of inactivated H5N1 (NIBRG14) vaccine against the recent Vietnamese H5N1 HPAIV clades and genetic characteristics of H5N1 clade 2.3.2.1b in Vietnam

**Dau Huy Tung, Dong Van Quyen, Nguyen Tung, Nguyen Nam Thang,
Tran Xuan Hanh, Kim Young Bong and Dinh Duy Khang**
Summary

The emergence of highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1 viruses and the risk of human pandemic have highlighted the need for advance stockpiling of vaccine. However, because of the rapid dissemination and ongoing evolution of avian H5N1 viruses, current vaccines may be sub-optimally matched to the actual pandemic virus. We reported here the evaluation of efficacy of NIBRG-14 vaccine (clade 1 A/Vietnam/1194/2004) against the H5N1 HPAI virus strains circulating in Vietnam. The birds were either vaccinated with single or booster dose of vaccine by subcutaneous injection then challenged with three H5N1 HPAI viruses (clade 1, clade 2.3.2.1a and clade 2.3.2.1b) at day 21 post-vaccination (p. v.). The results showed that NIBRG-14 protected birds from clade 1 and clade 2.3.2.1a infections. Notably, we observed that or booster dose of vaccine by subcutaneous

¹Đại học Konkuk, Hàn Quốc

²Viện Công nghệ Sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Trung tâm chẩn đoán thú y trung ương

⁴Công ty thuốc thú y NAVETCO

⁵Đại học Y Thái bình

injection then challenged with three H5N1 HPAI viruses (clade 1, clade 2.3.2.1a and clade 2.3.2.1b) at day 21 post-vaccination (p. v.). The results showed that NIBRG-14 protected birds from clade 1 and clade 2.3.2.1a infections. Notably, we observed that NIBRG-14 vaccine did not confer protection against clade 2.3.2.1b challenge virus. To get new insights of how H5N1 clade 2.3.2.1b (*A/Duck/QuangNgai/1037/11*) virus can escape from host immune response induced by the vaccine, we further analyzed the HA gene - a key virulence determinant of the virus. The result of amino acid sequence analyses indicated that this virus contained the sequence *SPQREERRK-R/G* at the cleavage site in the HA molecule, indicating its high virulence. Additionally, we identified numerous mutations with amino acid substitutions in the hemagglutinin: M226I, I239S located at N-link glycosylation site and 2H, 45N, 53K 120D, 133A and 14N mutations at antigenic site, which can affect receptor specificity as well as viral pathogenicity. Notably, I239S and S133A mutations are unique to *A/Duck/QuangNgai/1037/2011*, suggesting that it may involve in the virus ability to evade the host immune system. Taken together, phylogenetic analysis showed that continual mutations to the HA gene may generated novel antigenic strain and that probably changed the virulence of the virus and made the H5N1 clade 2.3.2.1b resistant to NIBRG-14 vaccine.

Key words: NIBRG-14, H5N1, Challenge, Genetic characterization.

I Giới thiệu

Sau khi các trường hợp lây nhiễm H5N1 trên người đã được báo cáo tại Hồng Kông, vi rút cúm gia cầm H5N1 đã gây ra sự bùng nổ đại dịch trong các trang trại gia cầm và các bệnh lây nhiễm trên người với tỷ lệ tử vong tới 60%[1, 2]. Bệnh có thể gây ra bởi tiếp xúc với gia cầm bị nhiễm H 5N1 mà không được bảo vệ [3]. Mặc dù chưa có bằng chứng virus cúm gia cầm lây nhiễm từ người sang người, nhưng vẫn có nguy cơ nổ ra một đại dịch cúm.

Việt Nam là một trong những nước bị ảnh hưởng nhiều nhất bởi dịch cúm gia cầm H5N1. Các ổ dịch H 5N1 ở gia cầm trong nhiều năm qua đã gây ra đại dịch gây thiệt hại lớn về kinh tế.

Để góp phần phòng chống dịch cúm có hiệu quả, chúng tôi đã sản xuất vaccine H 5N1 (*A/Vietnam/1194/2004-NIBRG-14*), sử dụng trứng gà có phôi trong phòng thí nghiệm. Hiệu quả của vaccine phụ thuộc vào chủng vaccine phù hợp với virus lưu hành virus. Một số nghiên cứu cho thấy nhiều clades có mặt tại Việt Nam như clade 2.3.2 và clade 2.3.4 đã chiếm ưu thế ở miền bắc Việt Nam. Trong khi đó clade 1 đã được tìm thấy để gây ra hầu hết các ổ dịch ở miền Nam Việt Nam[4]. Một số nghiên cứu còn cho thấy sự có mặt của clade 7[5] cũng như clade 2.3.2.1a và clade 2.3.2.1b. Theo WHO, clade 2.3.2.1b lần đầu tiên được phát hiện ở gia cầm trong năm 2009 tại Việt Nam và phát triển từ virus trước đây đã được lưu hành tại Việt Nam từ năm 2005. Các virus clade 2.3.2.1b là loại virus có sức đề kháng miễn dịch cao với vaccine sản xuất từ các chủng gần như được có mặt rộng rãi hơn trong gia cầm và chim hoang dã.

Các biến đổi của virus cúm gây ra khó khăn trong việc kiểm soát và phòng ngừa cúm. WHO gần đây đã báo cáo rằng các vaccine gia cầm H5N1 hiện đang được sử dụng tại Việt Nam không bảo vệ gia cầm chống lại các clade H 5N1 mới. Vì vậy, có một nhu cầu cấp thiết cho một sự hiểu biết chuyên sâu của các yếu tố đóng góp vào độc lực và sức đề kháng của các clade virus cúm mới được xác định. Vì vậy, mục tiêu của chúng tôi trong nghiên cứu này là: (1) để đánh giá hiệu quả NIBRG -14 vaccine miễn dịch bằng cách công cường độc với clade virus H5N1 lưu hành tại Việt Nam, và (2) phân tích làm rõ thêm làm thế nào virus clade 2.3.2.1b lại có thể thích ứng và vượt qua miễn dịch của vaccine hiện đang lưu hành.

II. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Vaccine và virus

Vaccine được sử dụng trong nghiên cứu này được sản xuất từ chủng H5N1 (NIBRG-14) được tạo ra với gen H5 và N1 từ chủng *A/Vietnam/1194/2004* (H5N1) và phần còn lại của các phân đoạn (PB2, PB1, PA, NP, M, NS) từ *A / Puerto Rico/8/34* chủng (H1N1) bằng

phương pháp di truyền ngược. Virut vaccin được nhân lên trong dịch niệu của phôi trứng gà 10 ngày tuổi. Dịch niệu được thu hoạch sau 72 giờ nhiễm và đã được làm trong bằng cách ly tâm ở 8000vòng/ phút trong 10 phút ở 4⁰ C như được mô tả trước đây. Virut được thu hoạch và bất hoạt bằng formalin và nhũ dầu để tạo thành một loại vaccin nhũ nước trong dầu.

A/H5N1 virut (nhánh 1, nhánh 2.3.2.1a), được phân lập từ gà chết trong đợt bùng phát của dịch cúm gia cầm H5N1 ở Việt Nam, được cung cấp bởi Trung tâm chẩn đoán thú y TƯ 1, Cục Thú y, Việt Nam. Clade 2.3.2.1b (A/Duck/QuangNgai/1037/2011 - DkQN37/11) được phân lập vào năm 2011 từ vịt chết ở Quảng Ngãi, Việt Nam.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Gây miễn dịch trên gà và vịt

Gà ISA hai tuần tuổi (trọng lượng cơ thể 100 ± 0.8 g) và vịt Super M (trọng lượng cơ thể $250,0 \pm 1$ g) được mua từ Công ty gia cầm (Hà Nội, Việt Nam). Gia cầm thí nghiệm được chia thành 3 nhóm, mỗi nhóm 10 gia cầm (Bảng 1). Các nhóm thử nghiệm đã được tiêm như sau: tiêm dưới da 0,5 ml / liều vào lúc 14 ngày tuổi và liều tăng cường vào ngày thứ 21 sau khi tiêm mũi đầu tiên. Mẫu huyết thanh được thu thập từ cả hai nhóm (một liều và liều tăng cường). Đánh giá hiệu lực được dựa trên Hiệu giá kháng thể HI. Hiệu giá HI $>3\log_2$ được coi là đạt yêu cầu[6].

2.2.2 Công cường độc và quan sát lâm sàng

Những gia cầm được tiêm phòng và đối chứng không tiêm vaccin, sau 21 ngày đã được thử thách với virut độc lực cao A/H5N1 (clade 1, 2.3.2.1a và 2.3.2.1b) theo hướng dẫn Tổ chức Y tế thế giới. Mỗi gia cầm đã được nhỏ 0,1 ml virut vào đường mũi vào ngày thứ 21 sau khi tiêm liều duy nhất và liều tăng cường tương ứng. Dấu hiệu lâm sàng, tỷ lệ tử vong, và trọng lượng được theo dõi sau khi thử thách. Mẫu huyết thanh được thu thập từ tất cả các gia cầm trước khi công để kiểm tra sự hiện diện của kháng thể chống lại H5N1 bằng HI.

2.2.3 Phản ứng ngăn trở ngưng kết hồng cầu HI

Kháng thể trong các mẫu huyết thanh đã được xác định bởi HI theo hướng dẫn sử dụng[7]. Huyết thanh được xử lý ở 56⁰C trong 30 phút để làm bất hoạt chất ức chế không đặc hiệu. Huyết thanh trong các giếng sau đó được ủ với 4 đơn vị HA của kháng nguyên H5, 15 phút ở nhiệt độ phòng. Giếng đối chứng đã được lấp đầy với nước muối đệm phosphate (PBS). Sau đó, 0,5% (v / v) hồng cầu đã được thêm vào mỗi giếng. Hiệu giá kháng thể HI đã được xác định như mô tả trước đây[8]. Hiệu giá kháng thể tương ứng với đối ứng pha loãng huyết thanh cao nhất mà vẫn ức chế ngưng kết được ghi nhận là hiệu giá HI thực tế thể hiện như một giá trị log₂. Hiệu giá trung bình hình học (GMT) kháng thể HI của mỗi nhóm được xác định và so sánh, và hiệu giá bằng hoặc lớn hơn 3 log₂ được coi phù hợp[9].

2.3.4 Kiểm tra Real-time RT-PCR

Tất cả gà, vịt được chủng ngừa được lấy bệnh phẩm từ dịch ngoáy cổ họng vào ngày thứ 3 sau khi công. Tổng số RNA được phân lập từ những gia cầm sử dụng thuốc thử TRIzol theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Invitrogen) với một số sửa đổi[10]. Phiên mã ngược được thực hiện với hệ thống tổng hợp đầu tiên TM Superscript III -Strand (Invitrogen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các cDNA sau đó đã được sử dụng như một khuôn để phân tích real-time PCR bằng sử dụng môi HA đặc hiệu.

2.3.5 Nhân dòng và giải mã gen HA

RT-PCR một bước (Invitrogen) được sử dụng để khuếch đại gen HA có chiều dài đầy đủ với các cặp môi cụ thể như mô tả. Các phóng đại được sắp xếp theo trình tự trên một hệ thống ứng dụng tự động 3730 bằng cách sử dụng chu trình tự nhuộm hóa học (Ứng dụng hệ thống sinh học). Trình tự gen HA đã được gửi vào cơ sở dữ liệu GenBank với mã số gia nhập JQ898146.1.

2.3.6 Phân tích cây phả hệ

Cây phả hệ được tạo ra dựa trên genHA gen khung đọc mở (ORF) sử dụng phương pháp neighbor-joining (NJ) và chương trình MEGA 4.0 (<http://www.megasoftware.net/mega.html>). Bước thiết lập cây phả hệ được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp neighbor-joining (NJ) thực hiện trong MEGA 4.0 với 1000 lần lặp

lại. Cây phả hệ được bắt nguồn từ Clade 0, A/goose/Guangdong/1/1996 (GsGd1/96). Sự không đồng nhất nucleotide và amino acid trong số DkQN 37/11, clade 2.3.2.1b và vi rút nhánh khác, cũng như một số chủng H 5N1 đại diện cho các clades H 5N1 đã được tính toán bằng phương pháp so sánh của gen HA, ORF.

III. Kết quả nghiên cứu

3.1 Đáp ứng miễn dịch sau tiêm

Chúng tôi quan sát gia cầm được tiêm phòng cho thấy có dấu hiệu mệt mỏi trong 3 ngày đầu sau khi tiêm chủng, nhưng đã phát triển bình thường sau đó. Không có biểu hiện viêm nơi tiêm, không bị sốt hoặc tử vong.

Mẫu huyết thanh của gia cầm đã được kiểm tra đáp ứng miễn dịch sau tiêm vắc-xin, NIBRG-14, HI, bằng cách sử dụng kháng nguyên H5N1 (A/chicken/Scotland/59).

Bảng 1: Đáp ứng miễn dịch của gà và vịt sau khi tiêm

Liều gây nhiễm	Gà dương tính/ Tổng số	Đơn vị HI – GMTlog2		Vịt dương tính/Tổng số	Đơn vị HI – GMTlog2	
		Lô miễn dịch	Lô đối chứng		Lô miễn dịch	Lô đối chứng
Tiêm 1 mũi	7/10	3.7	0	6/10	3.2	0
	8/10	4.4	0	4/10	3.1	0
	8/10	3.9	0	5/10	3.4	0
Tổng số (%)	23/30 (76.6%)	4.0	0	15/30 (50%)	3.2	0
Tiêm 2 mũi	10/10	6.7	0	9/10	5.0	0
	10/10	6.2	0	10/10	4.8	0
	10/10	6.5	0	8/10	4.4	0
Tổng số (%)	30/30 (100%)	6.46	0	27/30 (90%)	4.7	0

Hai tuần sau liều đầu tiên, 76,6% của những con gà đã phát hiện phản ứng HI chống lại virus vắc-xin với giá trị GMT từ 3,7 đến 4,4 log₂. Tuy nhiên, 3 tuần sau liều thứ hai, 100% gà có kháng thể HI với GMTs khác nhau, từ 6,2 đến 6,7 log₂. Trong khi đó ở vịt là 50%, 3,2 log₂ và 90% và 4,7 log₂ quan sát thấy sau khi nhận được liều duy nhất và tăng cường, tương ứng (bảng 1). Ở lô đối chứng chỉ tiêm nước muối PBS, kháng thể miễn dịch đã không được quan sát thấy (bảng 1). Kết quả này chỉ ra rằng vắc-xin được sử dụng trong nghiên cứu đã gây được đáp ứng miễn dịch. Không có sự khác biệt về trọng lượng giữa các lô thí nghiệm. Ngoài ra, vắc-xin gây hiệu giá kháng thể miễn dịch cao (bảng 1). Như vậy, vắc-xin được sử dụng trong nghiên cứu này được coi là hiệu quả.

3.2 Công cường độc với vi rút clade 1, clade 2.3.2.1a và clade 2.3.2.1b

Để đánh giá hiệu quả của vắc-xin NIBRG-14, chúng tôi thực hiện công cường độc (bảng 2). Gà và vịt đã được tiêm phòng với vaccine NIBRG 14 và sau đó công cường độc bằng nhỏ mũi với các vi rút H 5N1 clade 1, clade 2.3.2.1a và clade 2.3.2.1b, với một liều gây chết 10⁶TCID₅₀. Mười gia cầm trong mỗi nhóm (gà, vịt) đã được sử dụng để công với mỗi clade virus. Dấu hiệu bệnh đã được theo dõi. Tỷ lệ sống sót của những gia cầm được công với ba loại virus đã được thể hiện trong Bảng 2. Như có thể thấy, trong nhóm gia cầm chỉ nhận được liều duy nhất của vắc-xin, 20% số gà được tiêm phòng đã chết trong vòng 5 ngày sau khi công với clade 1, và 20% và 100% đối với clade 2.3.2.1a và clade 2.3.2.1b, tương ứng. Ngược lại, tất cả những gà đối chứng đã chết trong ngày 5. Tương tự như vậy, trong nhóm gà đã nhận được hai liều vắc-xin, tỷ lệ sống sót là 80%, 100% và 10% khi công với clade 1, clade 2.3.2.1a và clade 2.3.2.1b, tương ứng. Một sự tương quan đã được quan sát giữa hiệu giá HI và tỉ lệ sống sót.

Tương tự như vậy, vịt được tiêm một liều vaccine có tỷ lệ sống 90%, 100% và 10% khi thách thức với clade 1, clade 2.3.2.1a và clade 2.3.2.1b, tương ứng (Bảng 2). Tất cả vịt được tiêm 2 liều vắc-xin có tỷ lệ bảo hộ khá cao, tương ứng là 100%, 100% và 30% với clade 1,

clade 2.3.2.1a và clade 2.3.2.1b. Trong khi đó, ở nhóm đối chứng (không tiêm) là 20%, 60% và 0% khi công với clade 1, clade 2.3.2.1a và clade 2.3.2.1b.

Bảng 2: Kết quả theo dõi lâm sàng sau khi công cường độc với vi rút H5N1 clade 1, clade 2.3.2.1a và clade 2.3.2.1b.

Động vật thí nghiệm	Clade vi rút dùng công	Lô miễn dịch		Lô đối chứng	
		Số lượng	Sống/tổng số	Số lượng	Chết/Tổng số
Gà tiêm 1 mũi	1	10	8/10 (80%)	5	5/5 (100%)
	2.3.2.1a	10	8/10 (80%)	5	5/5 (100%)
	2.3.2.1b	10	0/10 (0%)	5	5/5 (100%)
Gà tiêm 2 mũi	1	10	8/10 (80%)	5	5/5 (100%)
	2.3.2.1a	10	10/10 (100%)	5	5/5 (100%)
	2.3.2.1b	10	1/10 (10%)	5	5/5 (100%)
Vịt tiêm 1 mũi	1	10	9/10 (90%)	5	4/5 (80%)
	2.3.2.1a	10	10/10 (100%)	5	2/5 (40%)
	2.3.2.1b	10	1/10 (10%)	5	5/5 (100%)
Vịt tiêm 2 mũi	1	10	10/10 (100%)	5	4/5 (80%)
	2.3.2.1a	10	10/10 (100%)	5	2/5 (40%)
	2.3.2.1b	10	3/10 (30%)	5	5/5 (100%)

Gia cầm được chia thành lô tiêm 1 mũi và lô tiêm 2 mũi với NIBRG-14 vắc xin và công cường độc với liều 10^6 TCID₅₀ vi rút clade 1, clade 2.3.2.1a và clade 2.3.2.1b.

3.3 Đánh giá độ bài thải của vi rút sau khi công cường độc bằng phương pháp Real time RT-PCR

Người ta cho rằng một khi được tiêm chủng, các loài động vật sẽ có khả năng ức chế virus nhân lên và sau đó trung hòa chúng. Tính nhạy cảm của gà và vịt với virus H5N1 được biết là khác nhau. Một số nghiên cứu đã tiết lộ rằng vịt có khả năng chống virus được đánh giá cao hơn so với gà. Để đánh giá sự nhân lên của virus trong các loài động vật được tiêm phòng cũng như trong nhóm kiểm soát chúng tôi sử dụng kỹ thuật RT-PCR. Các kết quả được trình bày trong Bảng 3. Chúng tôi quan sát thấy rằng gia cầm được tiêm vắc xin có khả năng ức chế nhân lên của virus. Virus giảm đáng kể (2-3 lần) trong tất cả các gia cầm được tiêm vắc xin so với đối chứng. Kết quả này cũng phù hợp với độ chuẩn virus được xác định bằng HI (Bảng 1) và với tỷ lệ sống sót được xác định bởi công cường độc (Bảng 2). Virus nhân lên rất mạnh mẽ trong các gia cầm đối chứng, đặc biệt là gà không được tiêm vắc-xin (Bảng 3).

Bảng 3: Kết quả đánh giá độ bài thải của vi rút.

Động vật thí nghiệm	Clade vi rút dùng công	Mức độ bài thải của vi rút trung bình (3 ngày sau công)			
		Gà thí nghiệm	Gà đối chứng	Vịt thí nghiệm	Vịt đối chứng
Tiêm 1 mũi	1	1.3	3.4	1.1	1.8
	2.3.2.1a	2.0	3.6	1.4	2.8
	2.3.2.1b	2.7	3.0	3.2	3.4
Tiêm 2 mũi	1	1.8	3.2	1.0	1.8
	2.3.2.1a	1.5	3.0	0.5	3.0
	2.3.2.1b	2.0	3.0	2.4	3.0

Giá trị từ 0 đến 4: 4 rất cao (Ct < 20); 3 cao (Ct = 20-25); 2 bình thường (Ct = 25-30); 1 thấp (Ct = 30-35); and 0 không có (Ct > 35).

3.4 Nhân dòng, xác định trình tự gen HA và phân tích cây phả hệ

Để có được những hiểu biết mới về cách clade 2.3.2.1b có thể thoát khỏi phản ứng miễn dịch sau khi tiêm vắc xin chủng NIBRG-14, chúng tôi nhân bản và giải trình tự các phân đoạn HA và sau đó phân tích đặc trưng bởi các phát sinh loài. Các dữ liệu cho thấy rằng chủng virus phân lập được (DkQN37/11) liên quan di truyền chặt chẽ với virus

A/duck/Vietnam/OIE-2533/2011 (GenBank: AB700635.1) và virus A/Hubei/1/2010 (GenBank: CY098758.1) với 99% và nhận dạng 98% ở cấp độ nucleotide, tương ứng, cho thấy rằng chúng chung một tổ tiên.

Các kết quả phân tích phát sinh loài cũng cho thấy khoảng cách tiến hóa giữa ba loại virus trong nghiên cứu này. Chúng tập trung vào nhóm khác nhau như được chỉ ra bởi chiều dài của các clade trên cây phát sinh loài (Hình 1). DkQN37/11 xuất hiện chiếm vị trí trung gian trong cây phả hệ. Để định lượng khác nhau về di truyền giữa các virus H5N1 khác, phương pháp so sánh cặp (Kimura 2 tham số mô hình với 1000 bootstrap) của tỷ lệ phần trăm (%) nucleotide và amino axit khác nhau đã được tạo ra (Bảng 4).

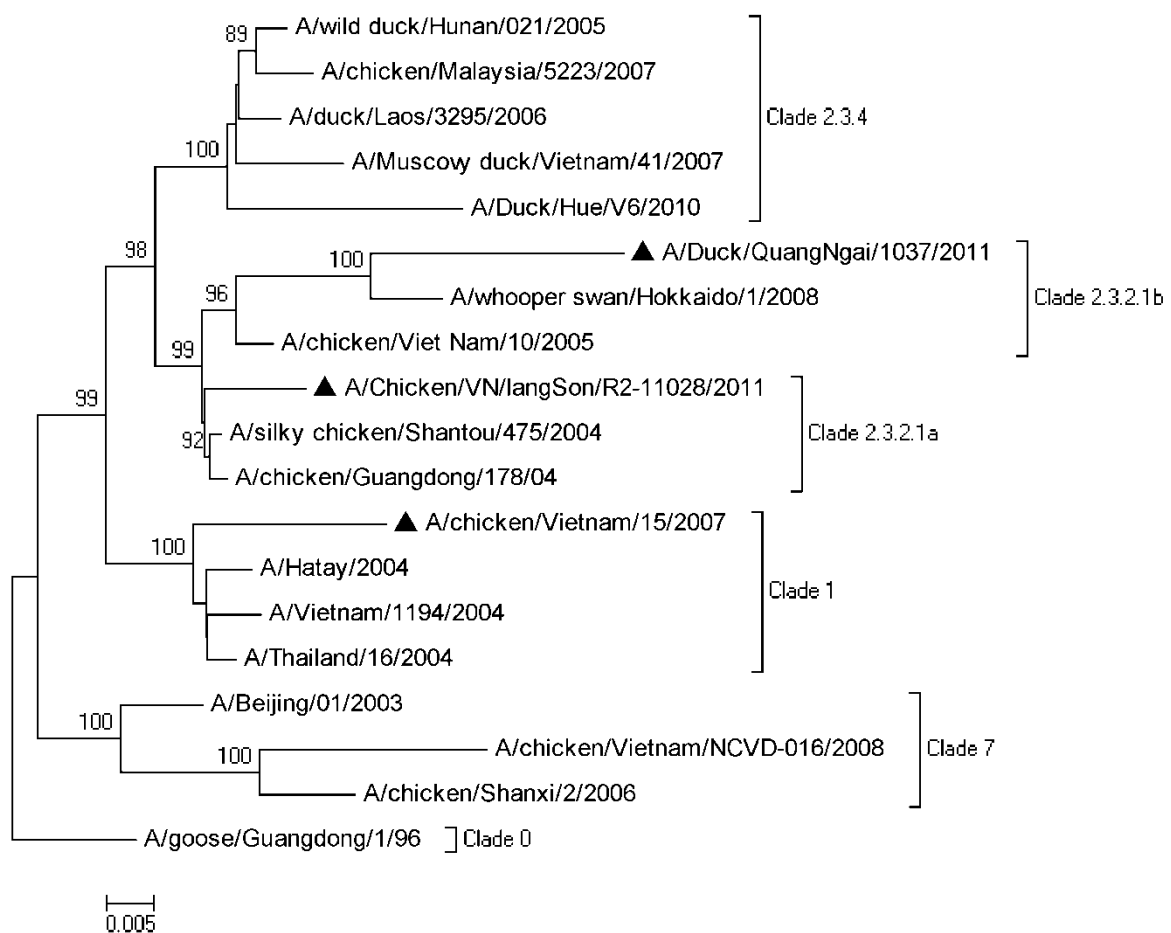
Bảng 4: Sự khác biệt nucleotide và axit amin gen HA của vi rút H5N1 clade

2.3.2.1b DkQN37/11 với các clade khác.

Clade vi rút	▲ A/Duck/QuangNgai/1037/11**	
	% nucleotide	% axit amin
A/goose/Guangdong/1/96* Clade 0	8.2	0.8
A/Hatay/2004 Clade 1	7.0	0.7
A/Vietnam/1194/2004 Clade 1	6.8	0.7
A/Thailand/16/2004 Clade 1	6.5	0.7
▲ A/chicken/Vietnam/15/2007 Clade 1	7.9	0.7
A/chicken/Guangdong/178/04 Clade 2.3.2.1a	5.1	0.6
A/silky_chicken/Shantou/475/2004 Clade 2.3.2.1a	5.1	0.6
▲ A/Chicken/VN/langSon/R2-11028/2011 Clade 2.3.2.1a	5.7	0.6
A/whooper_swan/Hokkaido/1/2008 Clade 2.3.2.1b	3.5	0.5
A/chicken/Viet_Nam/10/2005 Clade 2.3.2.1b	4.7	0.6
A/Muscovy_duck/Vietnam/41/2007 Clade 2.3.4	7.0	0.7
A/duck/Laos/3295/2006 Clade 2.3.4	6.6	0.6
A/chicken/Malaysia/5223/2007 Clade 2.3.4	7.0	0.7
A/wild_duck/Hunan/021/2005 Clade 2.3.4	6.6	0.6
A/Duck/Hue/V6/2010 Clade 2.3.4	8.4	0.8
A/Beijing/01/2003 Clade 7	8.6	0.8
A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 Clade 7	11.1	0.9
A/chicken/Shanxi/2/2006 Clade 7	10.0	0.9

Tỷ lệ phần trăm (%) nucleotide khác nhau được hiển thị trong loại thường xuyên, tỷ lệ phần trăm (%) axit amin khác nhau được hiển thị in đậm. *: Những con số trong ngoặc đơn cho thấy vi rút H5N1 nhánh chỉ mỗi WHO / OIE / FAO danh pháp (WHO / OIE / FAO, 2008; http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/ hướng dẫn / danh pháp / en /). **: HA phát sinh loài nhóm mới của clade 2.3.2.1b được xác định ở Quảng Ngãi); ▲: virus được sử dụng trong nghiên cứu.

Chủng virus điển hình từ mỗi clades H5N1, phổ biến nhất trong khu vực Đông Nam Á, được đưa vào nghiên cứu này như là tài liệu tham khảo. Gen HA 2.3.2.1b hiển thị chuỗi phân kỳ rất ít so với whooper / swan/Hokkaido/1/2008. (WsHok1/08) (3,5% và 0,5% ở cấp độ nucleotide và amino acid, tương ứng) (Bảng 4). Trong khi đó, khác nhau từ các virus khác xem xét trong nghiên cứu này, được khoảng 4,7-11,1 và 0,6 đến 0,9 ở mức độ nucleotide và amino acid, tương ứng.



Hình 1: Mối quan hệ phát sinh loài của các trình tự nucleotide của HA ước tính với thuật toán Neighbor joining bằng cách sử dụng phiên bản MEGA 4.0. Cây cấu trúc liên kết được hỗ trợ bởi phân tích bootstrap với 1000 sao chép và xác suất sau từ phân tích BMCMC. Các giá trị được thể hiện trong ngoặc đơn (NJ / BMCMC). Các đột biến vi rút H5N1, 2011, được mô tả như hình tam giác. ▲ clades HPAIV vi rút H5N1 được sử dụng trong nghiên cứu.

3.5 Phân tích trình tự axit amin gen HA

Kết quả phân tích trình tự của 17 gen HA cho thấy virus H5N1 thay đổi di truyền mã hóa. Được biết, kháng nguyên HA đóng một vai trò quan trọng trong độc lực của virus cúm gia cầm. Phân tích chi tiết của các trình tự phân chia và sự tiến hóa của chúng sẽ cung cấp cho những hiểu biết về sinh bệnh học của virus H5N1. Tất cả ba clades virus H5N1 được sử dụng trong nghiên cứu này có chứa các chuỗi axit amin SPQRERRRK -R / G tại các vùng phân cắt trong phân tử HA, cho thấy chúng có độc lực cao (Bảng 5). Trình tự phân cắt tương tự như của virus A/chicken/Guangdong/178/04 và virus A/silky chicken/Shantou/475/2004 (Bảng 5). Các acid amin trong chuỗi phân tích gen HA cũng có những phát hiện nói trên, chúng tôi kết luận rằng chủng H5N1 Việt Nam (DkQN37/11) thuộc về cụm di truyền giống như A/whooper swan/Hokkaido/1/2008 và A/chicken / VietNam/10/2005 (Bảng 5, hình 1).

Tất cả các đoạn chính trong thụ thể gắn kết (RBD) được bảo tồn trong phần lớn các chủng H5, (Bảng 4). Tuy nhiên, DkQN37/11 sở hữu một đột biến kép (M226I, I239S), trong các vùng liên kết (Bảng 4) cho thấy virus ưu tiên liên kết với các thụ thể gia cầm. Đột biến có khả năng để điều chỉnh đặc hiệu thụ thể trong các kiểu huyết thanh H₅ là không rõ ràng, nhưng chúng có thể ảnh hưởng đến đặc tính ràng buộc. Thật thú vị, đột biến duy nhất I 239S đến từ DkQN 37/11, trong khi virus cha mẹ, chủng Quảng Đông (Gs / Gd) và các virus khác trong nghiên cứu này không cho thấy có đột biến đó, rằng đây là vấn đề quan trọng đối với gene gây bệnh của virus.

Từ đó thấy rằng vùng N-link glycosyl của protein HA có thể ảnh hưởng đến tính độc lực và gây bệnh của vi rút cúm bằng kháng nguyên epitope của protein HA. Ở đây chúng tôi thấy rằng tất cả các clades vi rút được khảo sát có vùng N -link trình tự N-S-T (154-156) mà vẫn không thay đổi gì kể từ năm 2004, nhưng WsHok1/08 và DkQN37/11 đã thay đổi trình tự này thành trình tự D-N-A.

Tiếp theo chúng tôi phân tích các vùng kháng nguyên trên HA của DkQN37/11. Đột biến tại các vùng kháng nguyên đã được tìm thấy tại vị trí 2H, 45N, 53K 120D, 133A và 14N, chỉ ra rằng hầu hết các vùng này đã trải qua những lựa chọn tích cực. Mặc dù các phân tích phát sinh loài dựa trên HA gen cho thấy DkQN37/11 và A/whooper_swan/Hokkaido/1/2008 được nhóm vào cùng một clade 2.3.2.1b, nhưng chúng không phải là chính xác giống như chúng ta so sánh thụ thể gắn (RBD) của chúng và các vùng kháng nguyên. DkQN37/11 có hai đột biến (I239S tại RBD và S133A) tại vùng kháng nguyên so với của A/whooper_swan/Hokkaido/1/2008 (Bảng 5). Ngược lại, hai phân lập có đột biến (Q2H) và cả hai có N ở vị trí 140 (N140), K53 và D150 tại vùng kháng nguyên (Bảng 5) là khác nhau từ các phân lập khác xem xét trong nghiên cứu này. Kết quả chỉ ra rằng DkQN37/11 vi rút đã trải qua sự trôi dạt di truyền như được chỉ ra bởi thay đổi axit amin tại vùng kháng nguyên cũng như liên kết N-glycosyl (Bảng 5).

Bảng 5. So sánh các chuỗi axit amin của hemagglutinin của DkQN37/11 cô lập với vi rút H5N1.

Vi rút	Clade	Vùng cắt gien HA	Vùng gắn thụ thể		Vùng N-link Glycosylation	Vùng đặc tính kháng nguyên					
			226	239		2	45	53	120	133	140
A/goose/Guangdong/1/96	0	TPQRRRRRK KR/G	M	I	NSA	Q	N	R	S	S	R
A/Hatay/2004	1	SPQRRRRRK KR/G	M	I	NST	Q	D	R	S	S	K
A/Vietnam/1194/2004	1	SPQRRRRRK KR/G	M	I	NST	Q	D	R	S	S	K
A/Thailand/16/2004	1	SPQRRRRRK KR/G	M	I	NST	Q	D	R	S	S	K
▲ A/chicken/Vietnam/15/2007	1	SPQREGRRK KR/G	M	I	NST	Q	D	R	S	A	K
A/chicken/Guangdong/178/04	2.3.2.1a	SPQRRRRRK- R/G	M	I	NNA	Q	D	R	S	S	S
A/silky_chicken/Shantou/475/2004	2.3.2.1a	SPQRRRRRK- R/G	M	I	NNA	Q	D	R	S	S	S
▲ A/Chicken/VN/langSon/R2-11028/2011	2.3.2.1a	SPQRRRRRK- R/G	M	I	NNA	Q	D	R	S	S	S
A/whooper_swan/Hokkaido/1/2008	2.3.2.1b	NPQRRRRRK- R/G	<u>I</u>	I	<u>DNA</u>	<u>H</u>	<u>N</u>	<u>K</u>	<u>D</u>	S	<u>N</u>
A/chicken/Viet_Nam/10/2005	2.3.2.1b	SPQRRRRRK- R/G	<u>I</u>	I	NNA	Q	D	<u>K</u>	S	S	S
▲ A/Duck/QuangNgai/1037/2011	2.3.2.1b	SPQRRRRRK- R/G	<u>I</u>	<u>S</u>	<u>DNA</u>	<u>H</u>	<u>N</u>	<u>K</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>N</u>
A/Muscovy_duck/Vietnam/41/2007	2.3.4	SPLRRRRRK- R/G	M	I	NNT	Q	D	R	S	S	V
A/duck/Laos/3295/2006	2.3.4	SPLRRRRRK- R/G	M	I	NNT	Q	D	R	S	S	T
A/chicken/Malaysia/5223/2007	2.3.4	NPLRRRRRK- R/G	M	I	NNT	Q	D	R	S	S	T
A/wild_duck/Hunan/021/2005	2.3.4	SPLRRRRRK- R/G	M	I	NNT	Q	D	R	S	S	T

A/Duck/Hue/V6/2010	2.3.4	SPLRERRRK-R/G	M	I	NNT	Q	D	R	S	S	T
A/Beijing/01/2003	7	APQREGRRK-KR/G	M	I	NNT	Q	D	R	S	S	R
A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008	7	APQREGRRR-KR/G	M	I	NNT	Q	D	K	S	A	E
A/chicken/Shanxi/2/2006	7	APQREGRRK-KR/G	M	I	NNT	Q	D	K	S	S	K

Dữ liệu hiển thị trong gạch dưới cho thấy đột biến di truyền của clade 2.3.2.1b. Dữ liệu hiển thị dưới dạng chữ nghiêng cho thấy đột biến cụ thể của DkQN37/11 HPAIV H5N1.

IV. Thảo luận

Virut cúm có 3 loại khác nhau bao gồm A, B, và C. Trong số các loại, loại A là gây bệnh cao và có thể lây nhiễm một loạt các ký chủ và lưu trữ rộng, có khả năng dẫn đến dịch bệnh và các đại dịch. Sự khác nhau của virut cúm H5N1 tạo ra một số thách thức như ng ỗ lực để kiểm soát bệnh. Tái tổ hợp, tính chất phân đoạn duy nhất của virut cúm cho phép pha trộn và kết hợp của gen có thể dẫn đến việc tạo ra một phân nhóm mới. Ngoài ra, sự xuất hiện của một clade mới với các đặc tính kháng nguyên khác nhau và tính nhạy cảm của virut hơn so với dòng ở các ổ dịch trước đây ở Việt Nam, là sự cần thiết để giám sát kịp thời và phát triển của các vắc-xin mới. Nó đã được báo cáo trước năm 2007, rằng virut cúm gia cầm H5N1 được phân lập từ gia cầm và người ở Việt Nam là virut clade 1 [12]; Tuy nhiên trong những năm gần đây có bằng chứng chứng minh rằng các clades khác (clade 2.3.2.1a và clade 2.3.2.1b) đã lưu hành tại Việt Nam.

Để ngăn ngừa H5N1 lây lan, vaccin có hiệu quả được yêu cầu. Vaccin chủng NIBRG-14 thuộc clade 1. Rõ ràng là hiệu quả của vaccin dựa trên mức độ phù hợp tồn tại giữa các chủng vaccin là thách thức. Trong nghiên cứu này, chúng tôi muốn đánh giá xem chủng vaccin (NIBRG-14) đảo ngược di truyền có nguồn gốc từ tái tổ hợp giữa A/Vietnam1994/2004 (H5N1) và A / Puerto Rico (PR) / 8/34, được cung cấp bởi WHO có thể gây ra phản ứng miễn dịch đối với virut cúm gia cầm phổ biến ở Việt Nam. Dữ liệu của chúng tôi cho thấy rằng vaccin chủng NIBRG-14 gây miễn dịch đầy đủ và gây kháng thể HA ở gia cầm được tiêm vaccin. Vaccin gây ra miễn dịch và bảo hộ được 80% đến 100% gà và vịt từ clade 1 và clade 2.3.2.1a. Đáng chú ý, chúng tôi thấy rằng vắc-xin này là ít hơn hoặc thậm chí không có hiệu quả đối với clade 2.3.2.1b. Hiện nay chúng tôi không có thể suy đoán các cơ chế chính xác của clade này có thể thoát khỏi hệ thống miễn dịch gây ra bởi vaccin NIBRG-14. Nói cách khác, các nghiên cứu thêm cần được thực hiện đặc trưng với clade 2.3.2.1b để hiểu tại sao và làm thế nào chúng lại thoát khỏi hệ thống miễn dịch.

Trong năm 2011, sự bùng phát của dịch cúm gia cầm đã được báo cáo ở nhiều tỉnh của Việt Nam. Để kiểm soát dịch bệnh, Việt Nam đã sản xuất vaccin bằng cách sử dụng các chủng virut có nguồn gốc từ người (A/Vietnam/1194/2004 [H5N1]), được phát triển bởi di truyền ngược. Vaccin này cho thấy có hiệu quả cao và góp phần đáng kể vào phòng, chống nhiễm vi rút H5N1 tại Việt Nam. Tuy nhiên, trong năm 2011 bùng phát dịch H5N1, chúng tôi tìm thấy virut (DkQN37/11) phân lập từ vịt trên địa bàn tỉnh Quảng Ngãi có khả năng kháng chủng NIBRG-14. Để đạt được tốt hơn sự hiểu biết của chủng này có thể né tránh từ hệ thống ký chủ miễn dịch, chúng tôi thực hiện phân tích gene HA. Các dữ liệu cho thấy nó thuộc về clade 2.3.2.1b, được phát triển từ clade 2.3.2 gây ra bùng phát dịch ở Việt Nam và các nước châu Á khác trước năm 2009.

Phân tích rõ hơn, chúng tôi thấy rằng các gene HA có chứa các axit amin tại vùng phân cắt HA chỉ ra đặc điểm dịch cúm gia cầm [13]. Trình tự amino axit vẫn không thay đổi kể từ khi ổ dịch đầu tiên của clade 2.3.2. Bảo tồn các vùng glycosyl 154-156 của virus tại Việt Nam và các nước khác trong các clade 0, clade 1, clade 2 và clade 7 cho thấy các yếu tố độc lực của virus trong khu vực. Wang et al. đã cho rằng các epitope kháng nguyên N-liên kết glycosyl HA 1 có sự ràng buộc của nó ảnh hưởng đến tính kháng nguyên virus, nhân rộng trong ký chủ và dẫn đến đáp ứng kháng thể thấp hơn [14]. Sự thay đổi kháng nguyên H5 vùng

liên kết DNA N-glycosyl (154-156) chỉ ra những đặc điểm rất độc đáo của clade 2.3.2.1b, DkQN37/11, do đó có thể làm tăng lây lan của virus trong gia cầm và chim hoang dã. Kết quả này sẽ có ích như là một cơ sở xây dựng chủng vắc-xin. Hơn nữa, các axit amin liên quan đến thụ thể vùng liên kết 226I và 239S đã bị thay đổi đối với DkQN 37/11 ưu tiên liên kết với các thụ thể gia cầm theo báo cáo trước đây[15]. Kết quả này cho phép chúng ta suy đoán rằng sức mạnh virus liên kết với tổ chức tế bào theo một cách mới mà hệ thống miễn dịch của vật chủ không thể nhận ra và loại bỏ chúng. Chúng tôi cũng quan sát thấy một loạt các đột biến tại H2, N45, K53, D120, A133, N140 nằm tại vị trí kháng nguyên khác nhau từ phần còn lại của các clades kiểm tra và công bố các đột biến H5N1[16]. DkQN37/11,239S là một điểm đột biến mà không thể được tìm thấy trong bất kỳ clades khác.

Hiện nay, chúng tôi không biết cơ chế chính xác mà virus DkQN37/11 né tránh hệ thống miễn dịch, nhưng quan sát của chúng tôi rằng những đột biến ở HA sẽ có một vai trò quan trọng việc kháng lại chủng virus vắc xin NIBRG-14. Dữ liệu của chúng tôi cho rằng các chủng virus vắc xin dựa trên các clade cũ (tức là, clade 1 A/Vietnam/1194/2004, clade 2.1.3 A/Indonesia/5/2005, clade 2.2 A/bar-headed-goose/Qinghai/1/2005, clade 2.3.4 A/Anhui/1/2005)[5] không có khả năng chống lại clade 2.3.2.1b, H5N1 (DkQN37/11) và nhấn mạnh sự cần thiết cho phát triển các loại vắc xin mới hiệu quả chống lại các virus mới này.

Tài liệu tham khảo

1. FAO, - New avian influenza flare-ups. <http://www.fao.org/newsroom/en/news/2008/1000775/index.html>. 2008).
2. WHO, - Avian Influenza http://www.who.int/mediacentre/factsheets/avian_influenza/en/index.html. 2011).
3. Yang, Y., et al., - Detecting human-to-human transmission of avian influenza A (H5N1). *Emerg Infect Dis.* **13** (9)(2007) 1348-53.
4. Dung Nguyen, T., et al., - Multiple sublineages of influenza A virus (H5N1), Vietnam, 2005-2007. *Emerg Infect Dis.* **14** (4)(2008) 632-6.
5. Nguyen, T., et al., - Characterization of a highly pathogenic avian influenza H5N1 virus sublineage in poultry seized at ports of entry into Vietnam. *Virology.* **387** (2)(2009) 250-6.
6. Hobson, D., et al., - The role of serum haemagglutination-inhibiting antibody in protection against challenge infection with influenza A2 and B viruses. *J Hyg (Lond).* **70** (4)(1972) 767-77.
7. Webster, R., N. Cox, and K. Stohr, - WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance. Geneva (Switzerland): World Health Organization. 2002).
8. Allan, W.H., J.E. Lancaster, and B. Toth, - Newcastle disease vaccines, their production and use, pp. 57-62. In: FAO Animal Production Health, Series-10. United Nations, Rome. 1978).
9. Moro de Sousa, R.L., H.J. Montassier, and A.A. Pinto, - Detection and quantification of antibodies to Newcastle disease virus in ostrich and rhea sera using a liquid phase blocking enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol.* **7** (6)(2000) 940-4.
10. Monne, I., et al., - Development and validation of a one-step real-time PCR assay for simultaneous detection of subtype H5, H7, and H9 avian influenza viruses. *J Clin Microbiol.* **46** (5)(2008) 1769-73.
11. Peyre, M., et al., - Avian influenza vaccines: a practical review in relation to their application in the field with a focus on the Asian experience. *Epidemiol Infect.* **137** (1)(2009) 1-21.
12. Le, M.T., et al., - Influenza A H5N1 clade 2.3.4 virus with a different antiviral susceptibility profile replaced clade 1 virus in humans in northern Vietnam. *PLoS One.* **3** (10)(2008) e3339.

13. Claas, E.C., et al., - Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet*. **351** (9101)(1998) 472-7.
14. Wang, W., et al., - Glycosylation at 158N of the hemagglutinin protein and receptor binding specificity synergistically affect the antigenicity and immunogenicity of a live attenuated H5N1 A/Vietnam/1203/2004 vaccine virus in ferrets. *J Virol*. **84** (13)(2010) 6570-7.
15. Matrosovich, M., et al., - The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J Virol*. **73** (2)(1999) 1146-55.
16. Cattoli, G., et al., - Antigenic drift in H5N1 avian influenza virus in poultry is driven by mutations in major antigenic sites of the hemagglutinin molecule analogous to those for human influenza virus. *J Virol*. **85** (17)(2011) 8718-24.