

# 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

Dương Thị Thanh Thảo và Lý Thị Liên Khai <sup>1</sup>

## ABSTRACT

*This study was conducted to survey the Avian Influenza (AI) outbreak, virus circulation and initialized to analysis 2 gene segments such as HA (H5) and NA (N1) of AI virus (H5N1) at Ca Mau and Soc Trang provinces. They were amplified by Realtime RT-PCR and sequenced. The prevalence of AI virus, subtype H5 in Soc Trang was 1.67%, only in ducks and was not detected AI virus, subtype N1. The prevalence of AI virus, subtype H5 in Ca Mau was not detected. A total of 4 H5N1 samples at two provinces were isolated and their genome sequenced. Homology between two gene segments of 4 samples were evaluated by sequence comparison. By comparing with H5, N1 gene segments isolated in Vietnam and Asia countries, they were showed that homologous nucleotide and amino acid reached 92 – 98% in H5 gene segment and 92 - 99% , 91 - 99% in N1 gene segment, respectively. It was noteworthy that full-length H5, N1 gene segments were closely related to Guangdong strain which had originated from China.*

**Keywords:** Avian Influenza, H5N1, gene

**Title:** The prevalence of Avian influenza virus and initialized analysis gene segments such as HA (H5) of AI virus (H5N1) at Ca Mau and Soc Trang provinces

## TÓM TẮT

*Đề tài được thực hiện nhằm khảo sát sự lưu hành của virus cúm gia cầm và bước đầu nghiên cứu trình tự gene HA (H5) và NA (N1) của một số chủng virus cúm gia cầm, subtype H5N1 tại tỉnh Cà Mau và Sóc Trăng. Bằng kỹ thuật Realtime RT-PCR đã giúp phát hiện sự lưu hành của virus cúm gia cầm và với kỹ thuật giải mã gene đã bước đầu giải mã gene các chủng virus cúm gia cầm ở tỉnh Cà Mau và Sóc Trăng. Ở tỉnh Sóc Trăng có sự lưu hành của virus cúm gia cầm subtype H5 với tỷ lệ 1,67% , xảy ra chủ yếu là trên vịt, không phát hiện sự lưu hành của subtype N1. Ở tỉnh Cà Mau không phát hiện sự lưu hành của virus cúm gia cầm subtype H5N1. Kết quả giải mã gene từ 4 mẫu của chủng virus cúm gây bệnh trên gia cầm ở tỉnh Cà Mau và Sóc Trăng có mức độ tương đồng về nucleotide và amino acid 92 – 98% trong trình tự gene H5, và trong trình tự gene N1 có tỷ lệ tương đồng tương đối cao 92 - 99% về thành phần nucleotide, 91 - 99% về amino acid với các chủng đã phân lập ở Việt Nam trước đây và 1 số nước Châu Á. Các chủng virus thu nhận được có cùng nguồn gốc phát sinh với các chủng virus cúm gia cầm thuộc phân dòng Quảng Đông, Trung Quốc.*

**Từ khóa:** Cúm gia cầm, H5N1, gene

## 1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh cúm gia cầm là bệnh truyền nhiễm cấp tính do virus cúm type A, thuộc họ *Orthomyxoviridae* và đã gây nên dịch cúm ở gà, gà tây, ngan, vịt, ở một số loài động vật có vú khác và có khả năng gây nên đại dịch ở người (Ito *et al.*, 1998). Bệnh đã được Tổ chức dịch tễ thế giới (OIE - Office international des épizooties)

<sup>1</sup> Khoa Nông Nghiệp và Sinh Học Ứng Dụng, Trường Đại học Cần Thơ

xếp vào danh mục là một trong bốn bệnh nguy hiểm được tất cả các quốc gia đặc biệt quan tâm để khống chế, bao gồm bệnh Lở mồm long móng (FMD - Foot and Mouth Disease), bệnh Dịch tả heo cổ điển (CSF - Classical Swine Fever), bệnh Niu-cát-xon (ND - Newcastle Disease) và bệnh Cúm gia cầm (AI - Avian Influenza) (Capua *et al.*, 2002). Trong những năm gần đây, dịch cúm gia cầm vẫn xảy ra rải rác và tình hình dịch cúm gia cầm diễn biến phức tạp không những ở các quốc gia trên thế giới, trong khu vực Châu Á mà còn ở Việt Nam, đặc biệt là vùng Đồng bằng sông Cửu Long. Do đó, vấn đề được đặt ra cấp bách nhằm xây dựng chiến lược phòng chống thích hợp để hạn chế tổn thất về kinh tế, đồng thời bảo vệ sức khoẻ cộng đồng là phải chẩn đoán nhanh, kịp thời, chính xác các ổ dịch cúm gia cầm và hiểu rõ được sự lưu hành của virus cúm gia cầm. Bên cạnh đó, do một trong những đặc điểm quan trọng của virus cúm gia cầm là sự thay đổi kháng nguyên theo thời gian, hệ gene của virus cúm type A luôn biến đổi và thích ứng và phụ thuộc vào các mức độ độc lực khác nhau. Như vậy, nhu cầu về nguồn gene và nghiên cứu đặc tính phân tử của nguồn gene của chủng cúm type A, subtype H5N1 phân lập từ các loài mắc bệnh khác nhau ở Việt Nam là hết sức cần thiết. Xuất phát từ thực tế đó, chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài: **“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”** nhằm đạt được mục tiêu khảo sát sự lưu hành của virus cúm gia cầm tại tỉnh Cà Mau và Sóc Trăng, bước đầu nghiên cứu trình tự gene HA (H5), NA (N1) của một số chủng đại diện cho quần thể virus cúm gia cầm type A, subtype H5N1 tại tỉnh Cà Mau và Sóc Trăng và so sánh thành phần nucleotide gene HA(H5) này với các chủng đã tìm thấy ở Việt Nam và một số nước Châu Á.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Phương pháp lấy mẫu

Mẫu lấy ngẫu nhiên từ tháng 1 đến tháng 12 năm 2009. Mẫu thu thập ở các đàn gia cầm thịt, và gia cầm đang đẻ trứng nuôi chăn thả trên đồng. Mẫu swab được lấy trên 60 đàn gia cầm chưa tiêm phòng vaccine cúm ở tỉnh Cà Mau và Sóc Trăng (30 đàn/tỉnh) bằng cách dùng tampon vô trùng lấy mẫu swab (dịch hầu họng, ổ nhóp), lấy 20 mẫu swab/đàn, gộp 5 swab/1 mẫu xét nghiệm, cho vào môi trường vận chuyển mẫu Transport Medium. Như vậy, ở 2 tỉnh tiến hành lấy 240 mẫu swab xét nghiệm (2 tỉnh \* 30 đàn/tỉnh \* 4 mẫu swab xét nghiệm/1 đàn = 240 mẫu), sau khi mẫu thu thập được bảo quản lạnh, vận chuyển về phòng thí nghiệm để xét nghiệm tìm virus cúm gia cầm. Và để phân tích trình tự gene H5 của virus cúm, chúng tôi lấy 4 mẫu bệnh phẩm (đầu và cổ, lách, phổi) để xét nghiệm tìm virus cúm gia cầm và nghiên cứu trình tự gene HA (H5).

### 2.2 Phương pháp phân tích mẫu

Sau khi vận chuyển về phòng thí nghiệm, mẫu swab được xử lý thành huyền dịch, sau đó ly tâm ở 3.500g/10 phút để thu lấy dịch nổi bên trên, chiết tách RNA bằng Qiagen Kit (*theo hướng dẫn của nhà sản xuất*) và tìm virus cúm gia cầm bằng phương pháp Realtime RT-PCR. Đối với mẫu bệnh phẩm được nghiền nhỏ, làm thành huyền dịch 20% (1 gram bệnh phẩm + 4 ml dung dịch bảo quản). Sau đó đem huyền dịch 20% ly tâm ở 3.500 g/10 phút, thu phần dịch nổi bên trên và tiến hành chiết xuất RNA bằng bộ Qiagen Kit và thu nhận toàn bộ gene H5 và N1 bằng phương pháp RT-PCR, tách dòng và giải trình trình tự, phân tích thu nhận chuỗi

gene H5 thu được. Các mẫu thu thập được tiến hành xét nghiệm theo quy trình xét nghiệm, tiêu chuẩn quy trình ngành thú y của Cục Thú y (2006, 2008).

### 2.3 Phương pháp xử lý số liệu

Số sánh số liệu bằng phương pháp  $\chi^2$  (sử dụng phần mềm Minitab 13.0) và xử lý số liệu các chuỗi gene thu nhận được với các chuỗi có trong Ngân hàng gene quốc tế (GenBank) bằng chương trình GENEDOC2.5

## 3 KẾT QUẢ THẢO LUẬN

### 3.1 Kết quả khảo sát sự lưu hành của virus cúm gia cầm tại tỉnh Cà Mau và Sóc Trăng

**Bảng 1: Kết quả xét nghiệm virus cúm gia cầm, subtype H5**

Tỉnh	Số mẫu xét nghiệm	Số mẫu dương tính/SMXN			Số mẫu dương tính subtype H5	Tỷ lệ (%)
		Gà	Vịt	Ngan		
Cà Mau	120	0/30	0/90	-	0	0,0
Sóc Trăng	120	-	2/90	0/30	2	1,67
<b>Tổng</b>	<b>240</b>	<b>0/30</b>	<b>2/180</b>	<b>0/30</b>	<b>2</b>	<b>0,83</b>

Qua kết quả ở bảng 1 cho thấy, có sự khác biệt về tỷ lệ lưu hành của virus cúm gia cầm, subtype H5 tại tỉnh Cà Mau và Sóc Trăng. Tỷ lệ lưu hành của virus cúm gia cầm, subtype H5 tại tỉnh Sóc Trăng là 1,67% và chủ yếu là ở vịt, trong khi đó không phát hiện có lưu hành virus cúm gia cầm, subtype H5 ở tỉnh Cà Mau.

Qua kết quả khảo sát, chúng tôi nhận thấy rằng ở tỉnh Cà Mau sở dĩ chúng tôi không phát hiện được sự hiện diện của virus cúm gia cầm, subtype H5 có thể do sau khi dịch bệnh xảy ra, các cơ quan chuyên môn đã thực hiện đồng bộ các biện pháp phòng chống dịch, sử dụng các chất sát trùng để vệ sinh tiêu độc chuồng trại, khu vực bãi chăn thả, mà virus cúm type A tương đối nhạy cảm với các tác nhân bất hoạt vật lý hay hoá học, ở pH acid hay quá kiềm làm giảm khả năng lây nhiễm của virus (Murphy *et al.*, 1996; Webster, 1998). Mặt khác, số lượng gia cầm bị tiêu huỷ trong đợt dịch rất nhiều trong khi tổng đàn gia cầm của Cà Mau rất ít, chủ yếu là chăn nuôi nhỏ lẻ nên số lượng gia cầm còn lại có khả năng là không phát hiện được sự hiện diện của virus.

Qua khảo sát, chúng tôi phát hiện sự lưu hành virus chủ yếu ở trên đàn vịt và tỷ lệ virus cúm gia cầm, subtype H5 ở tỉnh Sóc Trăng là 1,67%. Và qua số liệu điều tra, tổng hợp cho thấy sau đợt dịch cúm, số lượng gia cầm bị tiêu huỷ ở Sóc Trăng là tương đối ít khi so với tổng đàn và chăn nuôi gia cầm ở Sóc Trăng tập trung với quy mô khác nhau, lưu lượng vịt chạy đồng lớn, mà vịt có thể mang trùng trong khoảng thời gian nhất định nên số lượng gia cầm còn lại khi lấy mẫu swab thì khả năng phát hiện virus có thể xảy ra.

Điều này có thể do ở vịt khi nhiễm virus H5N1 có thể không biểu hiện triệu chứng lâm sàng và được xem là loài mang trùng, “phát tán thầm lặng – silent spread” virus ra môi trường bên ngoài, phù hợp với kết quả nghiên cứu của WHO (2007).

Từ kết quả có sự lưu hành của virus cúm ở tỷ lệ 1,67% ở tỉnh Sóc Trăng trên các đàn gia cầm chưa được tiêm phòng vaccine kết hợp với phương thức chăn nuôi vịt

chạy đồng tại địa phương, cho chúng tôi thấy rằng tỉnh Sóc Trăng là địa phương có nguy cơ rất cao bị tái phát dịch cúm gia cầm. Bởi vì, khi các đàn vịt chạy đồng từ địa phương này sang địa phương khác thường tiếp xúc với rất nhiều đàn gia cầm khác và có thể lây truyền virus gây bệnh cho những đàn gia cầm khác.

Ở tỉnh Cà Mau, tuy không phát hiện sự lưu hành của virus cúm gia cầm, subtype H5 nhưng khi so sánh với các tỉnh trong vùng ĐBSCL như Kiên Giang có tỷ lệ lưu hành virus cúm gia cầm là 1,05% và ở tỉnh Trà Vinh là 2,92% (Cơ quan Thú y Vùng VII, 2009) và nguồn gia cầm, sản phẩm gia cầm trong tỉnh không đủ đáp ứng nhu cầu tiêu dùng, chủ yếu nhập từ các tỉnh vùng ĐBSCL nên khả năng dịch cúm gia cầm cũng có thể bị tái phát.

**Bảng 2: Kết quả xét nghiệm virus cúm gia cầm, subtype N1**

Tỉnh	Số mẫu xét nghiệm	Số mẫu dương tính/SMXN			Số mẫu dương tính subtype N1	Tỷ lệ (%)
		Gà	Vịt	Ngan		
Cà Mau	120	0/30	0/90	-	0	0
Sóc Trăng	120	-	0/90	0/30	0	0
<b>Tổng</b>	<b>240</b>	<b>0/30</b>	<b>0/180</b>	<b>0/30</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

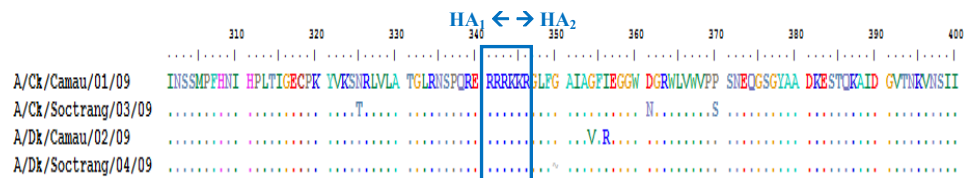
Qua kết quả bảng 2 cho thấy, các mẫu swab ở 2 tỉnh Cà Mau và Sóc Trăng đều âm tính với virus cúm gia cầm, subtype N1. Kết hợp với bảng 1, ta thấy đàn gia cầm của tỉnh Sóc Trăng có thể nhiễm virus cúm gia cầm với subtype khác, có thể là N2, N3, N4, N5, N6, N7 hay N8.

**3.2 Kết quả giải mã gene H5 trên gia cầm tại tỉnh Cà Mau và Sóc Trăng**



Ghi chú: A: Virus cúm type A; Ck: Chicken – Gà; Dk: Duck – Vịt

**Hình 1: Vị trí điểm cắt của protease trên trình tự nucleotide gene H5 giữa các chủng phân lập được tại tỉnh Cà Mau và Sóc Trăng**



Ghi chú: A: Virus cúm type A; Ck: Chicken – Gà; Dk: Duck – Vịt

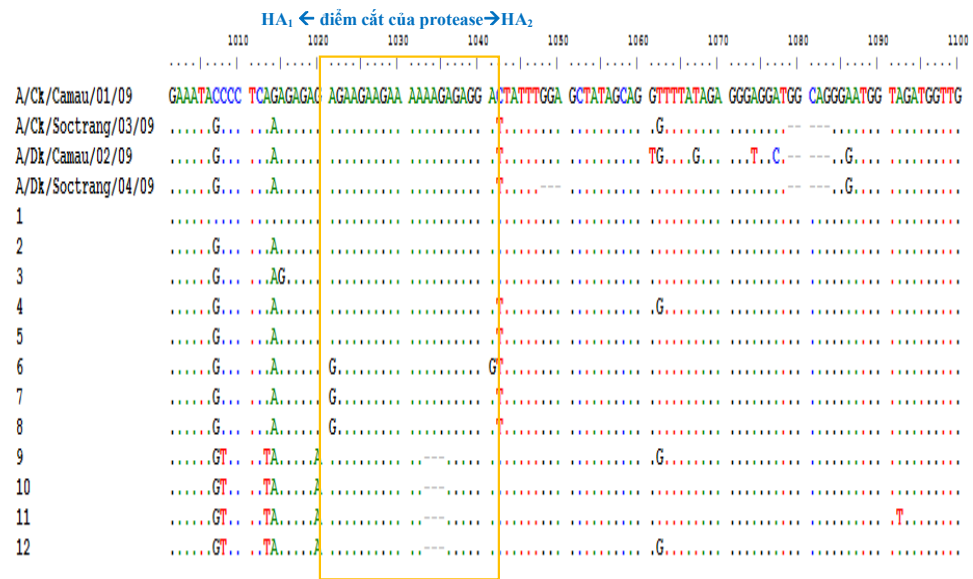
**Hình 2: Vị trí điểm cắt của protease trên trình tự amino acid của gene H5 giữa các chủng phân lập được tại tỉnh Cà Mau và Sóc Trăng**

**Bảng 3: Các vị trí sai khác về nucleotide và amino acid trong chuỗi gene H5 của chủng phân lập được từ các tỉnh Cà Mau và Sóc Trăng.**

Loài	Ký hiệu chủng so sánh	Số vị trí sai khác trong chuỗi gene H5			
		Nucleotide		Amino acid	
		Số vị trí sai khác	Tổng số	Số vị trí sai khác	Tổng số
Gà	A/Ck/Camau/01/2009	<i>A ↔ G: 17 vị trí</i> (43, 53, 88, 147, 467, 550,	<b>38</b>	<i>F ↔ L: 1 vị trí</i> (6);	<b>10</b>
	A/Ck/Soctran g/03/2009	567, 570, 579, 822, 828, 852, 948, 1081, 1251, 1395, 1536); <i>A ↔ C: 5 vị trí</i> (129, 481, 645, 974, 1108); <i>T ↔ C: 15 vị trí</i> (16, 174, 282, 336, 366, 399, 732, 744, 867, 870, 984, 1248, 1389, 1506, 1628); <i>T ↔ G: 1 vị trí</i> (688)		<i>E ↔ K: 2 vị trí</i> (15, 30); <i>Q ↔ R: 1 vị trí</i> (18); <i>K ↔ R: 1 vị trí</i> (156); <i>S ↔ A: 1 vị trí</i> (230); <i>N ↔ T: 1 vị trí</i> (325); <i>D ↔ Q: 1 vị trí</i> (184); <i>D ↔ N: 1 vị trí</i> (361); <i>P ↔ S: 1 vị trí</i> (370).	
Vịt	A/Dk/Camau/02/2009	<i>A ↔ G: 5 vị trí</i> (615, 714, 1293, 1401,	<b>15</b>	<i>K ↔ R: 1 vị trí</i> (156); <i>N ↔ S: 1 vị trí</i> (171); <i>V ↔ R: 1 vị trí</i> (354); <i>R ↔ I: 1 vị trí</i> (356); <i>V ↔ X: 1 vị trí</i> (459); <i>I ↔ M: 1 vị trí</i> (546); <i>L ↔ S: 1 vị trí</i> (560); <i>E ↔ L: 1 vị trí</i> (566); <i>F ↔ I: 1 vị trí</i> (567).	<b>9</b>
	A/Dk/Soctran g/04/2009	1491); <i>A ↔ T: 3 vị trí</i> (1074, 1697, 1699). <i>A ↔ C: 1 vị trí</i> (1077); <i>T ↔ C: 2 vị trí</i> (1344, 1679); <i>T ↔ G: 4 vị trí</i> (1061, 1062, 1067, 1638).			
<b>Tổng</b>			<b>53</b>		<b>19</b>

Qua kết quả ở hình 1, 2 và bảng 3 cho thấy trong 4 chuỗi gene H5 ở các loài gà, vịt ở 2 tỉnh Cà Mau và Sóc Trăng có sự sai khác về nucleotide tại các vị trí khác nhau (ở những vị trí được đóng khung trên hình). Sai khác nucleotide xảy ra ở 38 vị trí của 2 chuỗi gene loài gà và 15 vị trí của 2 chuỗi gene loài vịt của 2 tỉnh Cà Mau và

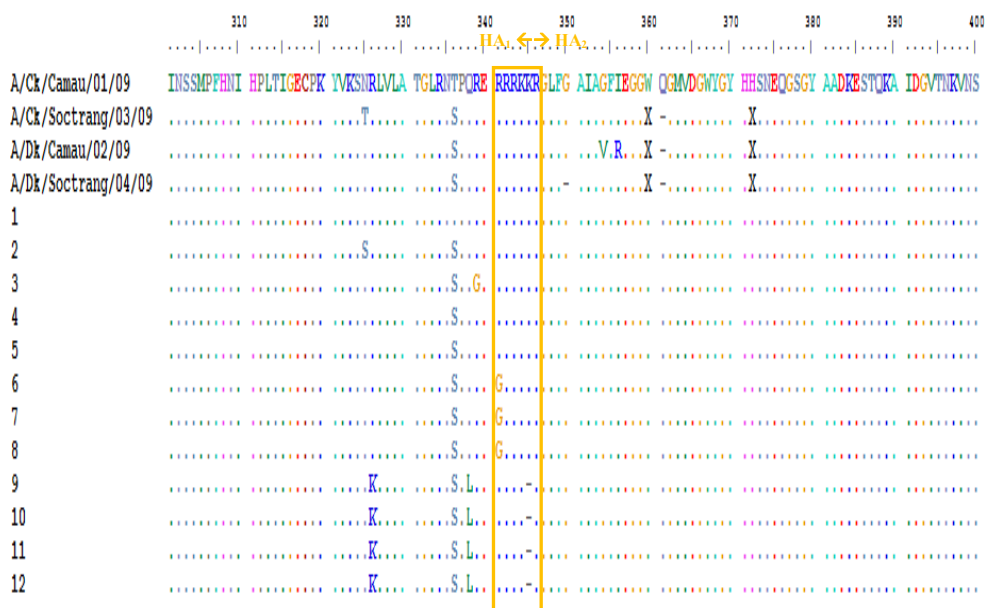
Sóc Trăng. Hầu hết sự biến đổi nucleotide xảy ra chủ yếu ở loại hình A ↔ G và T ↔ C và sự sai khác này mang tính chất đơn lẻ, không làm thay đổi lớn các thành phần amino acid. Sai khác về amino acid xảy ra ở 10 vị trí của 2 chuỗi gene loài gà và 9 vị trí của 2 chuỗi gene loài vịt và hầu như không có sự biến đổi lớn. Nhưng trong trình tự chuỗi nối HA<sub>1</sub> và HA<sub>2</sub> (vị trí điểm cắt của protease từ vị trí nucleotide 1.020 đến 1.040 hay từ vị trí amino acid từ 341 đến 345) giữa 4 chủng phân lập được thì không có sự sai khác và motif của các chủng này là **-RRRKK-**, thuộc chủng virus cúm gia cầm thể độc lực cao, dòng Quảng Đông (Trung Quốc). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Nguyễn Tiên Dũng *et al.*, (2005, 2008), Lê Thanh Hòa *et al.*, (2005) và Nguyễn Bích Nga (2006). Tuy nhiên, do tính chất phức tạp của virus cúm gia cầm subtype H5N1 luôn biến đổi, thích ứng và thay đổi độc lực nên những biến đổi trên cũng có thể làm cho virus cúm gia cầm tích lũy những nucleotide thay đổi, sẽ có thể làm thay đổi acid amin theo thời gian, làm cho chúng tiến hóa ngày càng khác xa với các chủng virus ban đầu qua các đợt dịch, có thể làm dịch bệnh ở mức độ nghiêm trọng hơn hay nhẹ hơn.



Ghi chú: A: Virus cúm type A; Ck: Chicken – Gà; Dk: Duck – Vịt; Gs: Goose – Ngỗng

- |                                |                              |                           |
|--------------------------------|------------------------------|---------------------------|
| 1. A/Gs/Guandong/1/1996        | 5. A/Viet Nam/1194/2004      | 9. A/Dk/Fujian/720/20062  |
| 2. A/Ck/Guandong/178/2004      | 6. A/Dk/Hau Giang/07-12/2007 | 10. A/Dk/Fujian/9713/2005 |
| 3. A/Ck/India/Navapur7972/2006 | 7. A/Dk/Bac Lieu/07-09/2007  | 11. A/Dk/Fujian/1734/2005 |
| 4. A/Ck/Ha Tay/ Vietnam04/2004 | 8. A/Ck/Bac Lieu/07-10/2007  | 12. A/Dk/Laos/3295/2006   |

**Hình 3: Vị trí điểm cắt của protease trên trình tự nucleotide của gene H5 giữa các chủng phân lập được tại tỉnh Cà Mau và Sóc Trăng với các chủng đã phân lập ở Việt Nam trước đây và 1 số nước Châu Á**



Ghi chú: A: Virus cúm type A; Ck: Chicken – Gà; Dk: Duck – Vịt; Gs: Goose – Ngỗng

- |                                |                              |                           |
|--------------------------------|------------------------------|---------------------------|
| 1. A/Gs/Guandong/1/1996        | 5. A/Viet Nam/1194/2004      | 9. A/Dk/Fujian/720/2006   |
| 2. A/Ck/Guandong/178/2004      | 6. A/Dk/Hau Giang/07-12/2007 | 10. A/Dk/Fujian/9713/2005 |
| 3. A/Ck/India/Navapur7972/2006 | 7. A/Dk/Bac Lieu/07-09/2007  | 11. A/Dk/Fujian/1734/2005 |
| 4. A/Ck/HaTay/ Vietnam04/2004  | 8. A/Ck/Bac Lieu/07-10/2007  | 12. A/Dk/Laos/3295/2006   |

**Hình 4: Vị trí điểm cắt của protease trên trình tự amino acid của gene H5 giữa các chủng phân lập được tại tỉnh Cà Mau và Sóc Trăng với các chủng đã phân lập ở Việt Nam trước đây và 1 số nước Châu Á**

Khi so sánh về trình tự amino acid, chúng tôi thu được kết quả thể hiện qua bảng 4. Qua kết quả ở hình 3, 4 và bảng 4, chúng tôi thấy rằng trình tự amino acid trong chuỗi gene H5 ở các chủng phân lập được từ 4 mẫu của 2 tỉnh Cà Mau và Sóc Trăng với các chủng phân lập ở Việt Nam trước đây và 1 số nước Châu Á không có sự sai khác nhau nhiều. Trong trình tự chuỗi nội HA<sub>1</sub> và HA<sub>2</sub> (vị trí điểm cắt của protease từ vị trí nucleotide 1.020 đến 1.040 hay từ vị trí amino acid từ 341 đến 345) giữa 4 chủng phân lập được có motif là **-RRRKK-**, không có sự sai khác với các chủng virus cúm gia cầm thể độc lực cao, dòng Quảng Đông khi so sánh từ chủng 1 đến 8. Nhưng khi so sánh với chủng 9 đến 12 (dòng Phúc Kiến) thì có sự sai khác trong chuỗi nucleotide và amino acid. Chủng Phúc Kiến bị thiếu hụt 1 acid amin Lysin làm thay đổi motif của chúng là **-RRRKK-**. Điều này cho thấy rằng, 4 chủng virus phân lập được từ tỉnh Cà Mau và Sóc Trăng thuộc nhóm HPAI, dòng Quảng Đông. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Nguyễn Tiến Dũng *et al* (2005, 2008), Lê Thanh Hòa *et al.*, (2005) và Nguyễn Bích Nga (2006).

**Bảng 4: Các vị trí sai khác các amino acid trong chuỗi gene H5 của các chủng phân lập được ở Cà Mau và Sóc Trăng với các chủng đã phân lập ở Việt Nam trước đây và một số nước Châu Á**

STT	Danh pháp các chủng so sánh	Loài mắc bệnh	Vị trí sai khác các amino acid trong chuỗi gene H5				
			156	243	326	429	449
1	A/Gs/Guandong/1/1996	Ngỗng	R	E	R	Q	K
2	A/Ck/Guandong/178/2004	Gà	R	G	R	K	R
3	A/Ck/India/Navapur7972/2006	Gà	R	E	R	K	R
4	A/Ck/HaTay/ Vietnam04/2004	Gà	K	E	R	K	R
5	A/Viet Nam/1194/2004	Người	K	E	R	K	R
6	A/Dk/Hau Giang/07-12/2007	Vịt	K	E	R	K	R
7	A/Dk/Bac Lieu/07-09/2007	Vịt	K	E	R	K	R
8	A/Ck/Bac Lieu/07-10/2007	Gà	K	E	R	K	R
9	A/Dk/Fujian/720/2006	Vịt	T	D	K	K	-
10	A/Dk/Fujian/9713/2005	Vịt	T	D	K	K	R
11	A/Dk/Fujian/1734/2005	Vịt	T	D	K	K	R
12	A/Dk/Laos/3295/2006	Vịt	T	D	K	K	R
13	A/Ck/Cantau/01/2009	Gà	R	E	R	K	K
14	A/Dk/Cantau/02/2009	Vịt	R	E	R	R	R
15	A/Ck/Soctrang/03/2009	Gà	R	E	R	R	R
16	A/Dk/Soctrang/04/2009	Vịt	K	E	R	R	R

Để so sánh tỉ lệ tương đồng (%) về thành phần nucleotide và amino acid trong chuỗi gene H5 của các chủng phân lập được tại Cà Mau và Sóc Trăng với các chủng đã phân lập ở Việt Nam trước đây và một số nước Châu Á, chúng tôi sử dụng chương trình GENDOC2.5, kết quả thể hiện trên bảng 5.



**Bảng 5: Tỷ lệ tương đồng (%) về thành phần nucleotide (trên đường chéo) và acid amin (dưới đường chéo) của các trình tự gene HA (H5) giữa các chủng phân lập được ở Cà Mau và Sóc Trăng, ở Việt Nam trước đây và 1 số nước Châu Á**

		Tỷ lệ tương đồng (%) về thành phần nucleotide của gene H5																
		NC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
		AA																
Tỷ lệ tương đồng (%) về acid amin của gene H5	1		92	96	97	93	93	92	96	97	93	93	96	93	92	93	93	
	2	97		94	97	92	93	93	98	98	95	94	97	95	93	94	93	
	3	92	93		96	95	98	93	95	95	98	94	95	98	93	94	95	
	4	95	98	92		94	98	93	95	95	98	94	95	98	93	94	98	
	5	94	98	99	94		95	94	96	96	98	95	96	98	94	95	98	
	6	98	95	92	93	97		94	95	96	98	95	96	97	93	94	98	
	7	93	95	95	93	95	95		95	92	95	95	98	93	95	93	98	
	8	93	95	95	93	95	95	97		98	95	96	98	94	96	97	95	
	9	94	96	96	94	96	96	98	92		96	96	93	94	95	96	95	
	10	96	97	95	95	95	94	97	95	94		93	93	93	93	92	98	
	11	94	95	98	98	96	97	95	98	96	98		93	94	93	92	96	
	12	92	92	92	92	92	92	93	96	95	94	94		95	94	93	97	
	13	97	98	95	96	95	95	99	95	95	93	93	95		97	98	97	
	14	93	94	98	98	98	95	99	92	95	95	93	95	95		98	95	
	15	97	99	95	95	95	95	94	96	95	95	94	96	96	97		95	
	16	96	97	95	95	95	98	98	95	95	95	94	98	92	95	98		

Ghi chú: NC: Nucleotide, AA: Amino acid; A: Virus cúm type A; Ck: Chicken – Gà; Dk: Duck – Vịt; Gs: Goose – Ngỗng.

- |                                |                             |                           |
|--------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| 1. A/Gs/Guandong/1/1996        | 7. A/Dk/Bac Lieu/07-09/2007 | 13. A/Ck/Camau/01/2009    |
| 2. A/Ck/Guandong/178/2004      | 8. A/Ck/Bac Lieu/07-10/2007 | 14. A/Dk/Camau/02/2009    |
| 3. A/Ck/India/Navapur7972/2006 | 9. A/Dk/Fujian/720/2006     | 15. A/Ck/Soctrang/03/2009 |
| 4. A/Ck/HaTay/ Vietnam04/2004  | 10. A/Dk/Fujian/9713/2005   | 16. A/Dk/Soctrang/04/2009 |
| 5. A/Viet Nam/1194/2004        | 11. A/Dk/Fujian/1734/2005   |                           |
| 6. A/Dk/Hau Giang/07-12/2007   | 12. A/Dk/Laos/3295/2006     |                           |

Qua kết quả bảng 5 cho thấy rằng khi so sánh các chủng phân lập tại 2 tỉnh Cà Mau và Sóc Trăng có tỷ lệ tương đồng cao so với các chủng virus cúm đã phân lập ở Việt Nam trước đây và 1 số nước Châu Á. Mức độ tương đồng giữa các chủng so sánh về nucleotide và acid amin giữa các chủng so sánh từ 92 – 98%, biên độ chênh lệch 6%. Điều này chứng tỏ rằng giữa các chủng so sánh chúng có cùng một nguồn gốc tiến hóa. Tuy có sự khác nhau về nucleotide và amino acid giữa các chủng so sánh nhưng chưa có đột biến quá mức, vượt khỏi mức độ tương đồng phân type, do vậy chúng vẫn đại diện cho các chủng virus cúm gia cầm H5N1 đương nhiên. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Lê Thanh Hòa *et al.*, (2006) và Nguyễn Bích Nga (2006), virus cúm lưu hành ở khu vực phía Nam có mức độ tương đồng cao, xuất phát từ virus thuộc dòng Quảng Đông.

Với phương pháp trên, chúng tôi đã thu nhận chuỗi gene N1 và qua phân tích kết quả thấy rằng có sự sai khác ở các chuỗi gene nhưng chủ yếu là sai khác đơn lẻ, xảy ra chủ yếu ở loại hình  $A \leftrightarrow G$  và  $T \leftrightarrow C$ , ít làm thay đổi các thành phần amino acid. Khi so sánh về trình tự nucleotide, trình tự amino acid, cho thấy rằng các chủng phân lập tại 2 tỉnh Cà Mau và Sóc Trăng có tỷ lệ tương đồng cao so với các chủng virus cúm đã phân lập ở Việt Nam trước đây và 1 số nước Châu Á. Mức độ tương đồng giữa các chủng so sánh về nucleotide và acid amin giữa các chủng so sánh từ 92 – 98%, biên độ chênh lệch 6%. Điều này chứng tỏ rằng giữa các chủng so sánh chúng có cùng một nguồn gốc tiến hóa. Tuy có sự khác nhau về nucleotide và amino acid giữa các chủng so sánh nhưng chưa có đột biến quá mức, vượt khỏi mức độ tương đồng phân type, do vậy chúng vẫn đại diện cho các chủng virus cúm gia cầm H5N1 đương nhiệm. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Lê Thanh Hòa *et al.*, (2006) và Nguyễn Bích Nga (2006).

#### 4 KẾT LUẬN

Qua thời gian thực hiện đề tài, chúng tôi có những kết luận sau:

Có sự lưu hành của virus cúm gia cầm subtype H5 trên đàn gia cầm ở tỉnh Sóc Trăng với tỷ lệ thấp (1,67%) và chủ yếu là ở vịt.

Bước đầu đã xác định thành công trình tự gene HA (H5) và NA (N1) của 4 chủng đại diện cho quần thể virus cúm gia cầm type A, subtype H5N1 tại tỉnh Cà Mau và Sóc Trăng.

Các chủng phân lập được ở tỉnh Cà Mau và Sóc Trăng có mức độ tương đồng tương đối cao về nucleotide và amino acid giữa các chủng so sánh từ 92 – 98% trong chuỗi gene H5 và 92 - 99% về thành phần nucleotide, 91 - 99% về amino acid trong chuỗi gene N1 khi so sánh với các chủng đã phân lập ở Việt Nam trước đây và 1 số nước Châu Á.

Trình tự gene H5 và N1 không có biến đổi lớn về trình tự nucleotide và amino acid và thuộc phân dòng Quảng Đông, Trung Quốc.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Capua I., Terregino, C., Cattoli, G. Mutinelli, F. and Rodriguez, J.F. (2002), Development of a DIVA(Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuramidase for the control of avian influenza. *Avian Pathol* 32: 47-55
- Cơ quan Thú y Vùng VII (2009), Báo cáo tổng kết công tác thú y năm 2009.
- Cục Thú y (2006), Tiêu chuẩn quy trình ngành Thú y, NXB Nông Nghiệp, Hà Nội.
- Cục Thú y (2008), Quy trình xét nghiệm virus cúm gia cầm (phát hiện M, H5, N1) bằng phương pháp Real time RT-PCR.
- Ito T., and Kawaoka Y., (1998), Avian influenza. p. 126–136. In Nicholson KG, Webster R.G, Hay A.J. Textbook of influenza. Blackwell Sciences Ltd., Oxford, United Kingdom.
- Ito T., Couceiro J.N, Kelm S., Baum L.G, Krauss S., Castrucci M.R, Donatelli I., Kida H., Paulson J.C, Webster R.G, and Kawaoka Y., (1998), Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol* 72: 7367–7373.
- Lê Thanh Hoà, Đinh Duy Kháng, Phan Văn Chi, Nông Văn Hải, Trương Nam Hải, Lê Trần Bình (2006), Nghiên cứu sinh học phân tử các chủng virus cúm A/H5N1 phân lập ở Việt

- Nam tại Viện Công nghệ sinh học. Hội nghị khoa học kỷ niệm 30 năm Viện Khoa học Công nghệ Việt Nam. Hà Nội, 19/5/2005, tr 75 – 82.
- Murphy B.R, and Webster (1996), Orthomyxoviruses. In Fields BN, Knipe DM, Howley PM. Fields Virology, 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa: 1397-1445.
- Nguyễn Bích Nga (2006), Phân lập, lưu giữ và nghiên cứu đặc tính phân tử gene HA (H5) và NA (N1) của một số chủng virus cúm A, subtype H5 trên gia cầm ở Việt Nam. Luận án Thạc sĩ khoa học Nông nghiệp. Viện khoa học và sự sống - Đại Học Thái Nguyên.
- Nguyễn Tiến Dũng, Đào Thanh Vân, Bùi Ngọc Anh, Kenjiro Inui, Bùi Nghĩa Vương, Nguyễn Thế Vinh, Nguyễn Bá Thành, Trương Thị Kim Dung (2005), Giám sát tình trạng nhiễm virus cúm gia cầm tại Đồng bằng sông Cửu Long cuối năm 2004. Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y, tập XII, số 2, trang 13-18.
- Nguyễn Tiến Dũng, Malik Periris, Robert Webster, Đào Thanh Vân, Bùi Ngọc Anh, Nguyễn Thế Vinh, Kent Inui, Bùi Nghĩa Vương, Nguyễn Việt Không, Ngô Thanh Long (2005), Nguồn gốc virus cúm gia cầm H5N1 tại Việt Nam năm 2003-2004. Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y, tập XI, số 3, trang 6-14.
- Nguyễn Tiến Dũng, Nguyễn Thế Vinh, Dhanasekaran vijaykrishna, Robert G. Weber, Yi Guan, J.S Malik Peiris và Gavin J.D. Smith (2008), Sự đa dạng của các dòng virus cúm A (H5N1) tại Việt Nam từ 2005-2007. Tạp chí khoa học kỹ thuật thú y, tập XV, (4) trang 9-16.
- Webster R.G, (1998), Influenza: an emerging disease. Emerg Infect Dis 4: 436–441.
- WHO/GIPSN: The World Health Organization Global Influenza Program Surveillance Network (2007), Evolution of H5N1 Avian Influenza Viruses in Asia.