

SINH THÁI DỊCH TỄ HỌC CÚM A/H5 TẠI QUẢNG BÌNH

Phạm Hồng Kỳ^{1,2}, Phạm Minh Hằng², Nguyễn Việt Không²

TÓM TẮT

Sự xuất hiện và lây truyền virus cúm gia cầm (AIV) vẫn là các vấn đề quan trọng đối với động vật hoang dã và sức khỏe con người ở nhiều nơi trên thế giới. Sự bùng phát và lưu hành của virus này đã được nghiên cứu trong các hệ sinh thái khác nhau. Tuy nhiên, các yếu tố quyết định về sinh thái liên quan đến nguy cơ cúm gia cầm độc lực cao (HPAI) được cho là sự khác nhau về các điều kiện sinh thái nông nghiệp, môi trường, địa lý và các yếu tố nguy cơ. Nghiên cứu này nhằm mục đích phân tích đặc điểm sinh thái dịch tễ cúm A/H5 ở Quảng Bình năm 2016 để tìm ra các giải pháp can thiệp phòng dịch tốt hơn. Kết quả nghiên cứu cho thấy 2 yếu tố như số giờ nắng và chim hoang dã có liên quan chặt chẽ đến huyết thanh dương tính và sự lưu hành của virus cúm A/H5 ở Quảng Bình. Năm chủng virus H5N6 được phát hiện tại Quảng Bình có mức tương đồng với các chủng H5N6 phát hiện tại Việt Nam (89-99%) và các nước khác (96-97%). Phân tích phả hệ cho thấy những chủng virus này thuộc clade 2.3.4.4C và có quan hệ gần với các chủng virus cúm gia cầm H5N6 gần đây được phát hiện ở Việt Nam, Trung Quốc, Hàn Quốc và Nhật Bản. Việc kết hợp các giải pháp kỹ thuật bao gồm hạn chế các yếu tố nguy cơ, tiêm phòng, giám sát sau tiêm phòng, nâng cao hiểu biết về CGC của người chăn nuôi có thể giảm sự lây nhiễm virus A/H5 vào đàn gia cầm ở mức hộ chăn nuôi.

Từ khóa: sinh thái, cúm gia cầm, H5N6, cây phả hệ, tỉnh Quảng Bình

Ecological epidemiology of Avian influenza H5 in Quang Binh

Pham Hong Ky, Pham Minh Hang, Nguyen Viet Khong

SUMMARY

The occurrence and transmission of Avian influenza virus (AIV) are still important issues to the wildlife animals and human health in many places around the world. The outbreaks and circulations of this virus were studied in different ecological systems. However, the ecological determinants associated with risk of highly pathogenic avian influenza (HPAI) which was considered as the differences on the geographical, environmental, agricultural ecology conditions and the risky factors. This study aimed to characterize the ecological epidemiology of avian influenza virus H5 in Quang Binh province in 2016 so as to find out the better intervention solutions in HPAI H5 epidemic prevention. The studied results showed that 2 factors, such as sunlight hour number and wildlife birds related closely to avian influenza A/H5 sero-prevalence and avian influenza virus circulation in Quang Binh province. There were 5 avian influenza A (H5N6) virus strains detected in Quang Binh having similarity level of HA gene sequence up to 89-99% in comparison with those of H5N6 virus strains isolated in Viet Nam and 96-97% with the isolates in other countries. Genetic and phylogenetic analyses revealed that these viruses were classified into the genetic clade 2.3.4.4C and were closely related to HPAI (H5N6) viruses that recently detected in Viet Nam, China, South Korea and Japan. Combination of the technical solutions including reduction of the risky factors, vaccination, surveillance in post-vaccination, improvement on the avian influenza knowledge for the poultry farmers could reduce the transmission of avian influenza virus at the farm levels.

Keywords: ecology, Avian Influenza, H5N6, phylogenetic tree, Quang Binh province.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sự xuất hiện một bệnh truyền nhiễm kết hợp hai yếu tố: sự xâm nhập của mầm bệnh vào trong một quần thể miễn cảm và sự lây lan, sự duy trì mầm bệnh

trong quần thể đó. Sinh thái có thể ảnh hưởng một hoặc cả hai yếu tố trên và được công nhận có vai trò quan trọng trong sự xuất hiện của bệnh (Antian và cs, 2003). Vai trò của các yếu tố sinh thái đối với sự xuất hiện và duy trì của virus cúm gia cầm (CGC) đã được thảo luận dựa trên sự nghiên cứu sinh thái và tiến hóa. Vai trò của hệ sinh thái tự nhiên và nhân

¹ Chi cục Chăn nuôi và Thú y tỉnh Quảng Bình

² Viện Thú y

tạo và các thành phần của chúng đối với sự tiến hóa virus cúm gia cầm độc lực cao (HPAI) đã được mô tả (Lebarbenchon và cs, 2010). Các nghiên cứu đã tập trung vào các yếu tố môi trường góp phần đến sự xuất hiện và tồn tại của virus HPAI ở một số quốc gia để làm rõ vai trò của chúng trong dịch tễ học HPAI (Williams và cs, 2008). Tuy nhiên, gần đây sự gia tăng các báo cáo về dịch H5N8, H5N6, H7N9, ngoài H5N1 ở nhiều nước Á-Âu (Verhagen và cs, 2015) đã làm mới sự quan tâm đến phân bố không gian và thời gian, sự lưu hành và sinh thái của CGC.

Trong số 18 phân nhóm HA khác nhau (H1 – H18), virus H5 và H7 có thể tiến triển theo hướng từ độc lực thấp sang độc lực cao. Sự hiện diện của gia cầm trên cạn tại các khu vực thường xuyên có chim nước hoang dã mang virus CGC có thể giúp cho virus CGC độc lực thấp (LPAI) biến đổi thành virus có độc lực cao hơn. Sự lưu thông LPAI ở gia cầm càng lớn, nguy cơ đột biến HPAI càng cao (Alexander, 2007). Virus LPAI lưu hành trong quần thể chim hoang dã, chủ yếu trong chim nước và chim nước di cư có thể được cho là vật chủ tự nhiên của chúng. Ở các loài vật chủ này có rất nhiều các phân nhóm HA/NA cùng lưu hành và mức độ tái tổ hợp của virus là rất lớn (Bahl và cs, 2009).

Các biện pháp phòng chống dịch CGC ở Quảng Bình bao gồm: Tiêu hủy các đàn gia cầm bị nhiễm bệnh và các đàn lân cận; hạn chế vận chuyển gia cầm khi có dịch và tiêm phòng. Mặc dù đã áp dụng những biện pháp này, vẫn chưa đạt được việc loại trừ dịch, virus CGC vẫn lưu hành và gây dịch ở các trang trại hay các hộ chăn nuôi (Báo cáo của Chi cục thú y Quảng Bình năm 2007, 2008, 2012, 2014, 2015, 2016). Để tìm hiểu nguyên nhân, chúng tôi tiến hành phân tích đặc điểm sinh thái dịch tễ học virus CGC (A/H5) ở Quảng Bình năm 2016 và đề xuất giải pháp phòng dịch.

II. NỘI DUNG, NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung

- Phân tích đặc điểm sinh thái liên quan đến sự lưu hành huyết thanh dương tính và virus cúm A/H5
- Phân tích đặc điểm sinh học phân tử HA của các chủng virus H5N6 phân lập tại Quảng Bình năm 2016
- Đề xuất giải pháp phòng dịch dựa trên tiếp

cận sinh thái dịch tễ học.

2.2. Nguyên liệu

2.2.1. Vật liệu

- Mẫu huyết thanh và mẫu swab hầu họng
- Các loại hóa chất và sinh phẩm cần thiết dùng trong sinh học phân tử: Kít tách chiết RNA (QIAgen), Kít One step RT-PCR (Invitrogen), Primers, kít tinh sạch sản phẩm PCR: QIAquick PCR purification Kít (QIA gen) ...

2.2.2. Địa điểm nghiên cứu

Các huyện: Lệ Thủy, Quảng Ninh, Bố Trạch, Quảng Trạch là những huyện có nguy cơ cao và đã xảy ra dịch CGC trong năm 2012 và 2014

Chợ buôn bán gia cầm: Đức Ninh (Đồng Hới); Kiến Giang (Lệ Thủy) và Ba Đồn (TT Ba Đồn)

Hộ chăn nuôi: Một số hộ chăn nuôi gia cầm thuộc bốn huyện nói trên.

2.2.3. Đối tượng nghiên cứu

- Hộ chăn nuôi gia cầm nhỏ lẻ, chăn nuôi thả đồng, chăn nuôi công nghiệp, hộ có dịch CGC năm 2012, 2014, hộ có mẫu giám sát dương tính với virus A/H5 (để điều tra và lấy mẫu)
- Vịt, ngan trên 2 tuần tuổi chưa tiêm phòng CGC tại các hộ chăn nuôi (mẫu huyết thanh). Đối với vịt, ngan dưới 2 tuần tuổi, không lấy huyết thanh do thời điểm này vịt vẫn còn kháng thể thụ động từ mẹ truyền sang nếu những đàn vịt, ngan bố mẹ được tiêm phòng vắc-xin CGC trước đó.
- Gia cầm sống bán tại chợ và trong các hộ chăn nuôi, chim hoang dã (đối với mẫu swab hầu họng)

2.3. Phương pháp nghiên cứu

- Số lượng mẫu

Được tính theo công thức

$$n = [1 - (1-p)^{\frac{1}{d}}] \times [N - \frac{d-1}{2}]$$

n: Số mẫu cần lấy

p: Xác suất để phát hiện được bệnh (0.95)

d: Số con mắc bệnh (d=NxP)

P: Tỷ lệ hiện mắc dự đoán

N: Tổng đàn vật nuôi

- Phương pháp lấy mẫu huyết thanh, bảo quản, và vận chuyển mẫu (theo hướng dẫn TCVN 8400-26: 2014)

- Thu thập mẫu swab hầu họng ở gà, vịt (theo hướng dẫn TCVN 8400-26: 2014)

- Phản ứng HI (Hemagglutination inhibition test- HI) (theo hướng dẫn TCVN 8400-26: 2014)

- Phương pháp chiết tách ARN từ các mẫu bệnh phẩm theo hướng dẫn của nhà sản xuất (QIAgen)

- Thực hiện phản ứng Realtime RT-PCR (RRT-PCR) theo hướng dẫn TCVN 8400-26: 2014

- Tinh sạch sản phẩm PCR bằng kit QIAquick PCR purification

- Giải trình tự gen HA bằng phương pháp Sanger dideoxy sequencing (Gene HA được gửi đi phân tích trình tự nucleotide ở Công ty 1st BASE, Singapore)

- Trình tự các gene HA được đăng ký trên Genbank (Accession No: LC342713; LC342714; LC342715; LC342716; LC342717)

- Chuỗi nucleotide được sắp xếp, chỉnh lề bằng phần mềm BioEdit. So sánh với các chủng khác trong ngân hàng gene và lập cây phả hệ bằng phần mềm DNASTAR theo thông số Neighbor-Joining (NP), Bootstrap với 1000 lần lặp lại

- Mối tương quan giữa hai biến (đặc điểm sinh thái và huyết thanh dương tính với cúm A/H5) được phân tích bằng cách sử dụng phân tích tương quan của Pearson. Tất cả phân tích có giá trị $P < 0,05$ được coi là có ý nghĩa thống kê.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân tích đặc điểm sinh thái liên quan đến sự lưu hành huyết thanh dương tính và virus cúm A/H5

Đặc điểm sinh thái liên quan đến sự lưu hành huyết thanh dương tính virus Cúm A/H5

Trong khoảng thời gian từ tháng 5-9/2016, 400 mẫu huyết thanh vịt, ngan (vịt, ngan chạy đồng và vịt, ngan nuôi nhốt) trước tiêm phòng đã được thu thập tại bốn huyện Lệ Thủy, Quảng Ninh, Bố Trạch, Quảng Trạch theo từng tháng: mỗi tháng 100 mẫu (riêng tháng 6 là thời điểm xả đàn nên không thực hiện lấy mẫu), 25 mẫu mỗi huyện,

1 đàn/hộ, 5-8 mẫu huyết thanh/đàn (theo tỷ lệ hiện mắc dự đoán 35%). Tổng số mẫu huyết thanh dương tính 136/400 với kháng nguyên H5 (Phạm Hồng Kỳ và cs, 2018).

Qua phân tích mối liên quan các yếu tố sinh thái tự nhiên và nhân tạo đối với sự lưu hành huyết thanh dương tính với cúm A/H5 trình bày ở Bảng 1 cho thấy yếu tố giờ nắng có liên quan chặt chẽ với huyết thanh dương tính ($R=1$; $p=0,03$). Số giờ nắng liên quan tỷ lệ thuận với huyết thanh dương tính có thể do tập tính kiếm ăn của chim trời và tập quán chăn nuôi vịt, ngan chạy đồng của các hộ chăn nuôi ở đây. Tại những ngày có nhiều giờ nắng, chim trời, cò, diệc bay về và đậu ở ruộng lúa, đầm, kênh kiếm ăn rất nhiều. Chúng ăn thóc rơi, ốc, tôm, cua và thải phân ở những ruộng lúa, đầm, kênh này. Cũng những ngày nắng, bà con chăn nuôi lừa vịt ngan ra ruộng lúa, đầm, kênh đó; tạo thuận lợi cho sự tiếp xúc giữa chim trời, cò, diệc và phân của chúng (có thể chứa virus CGC) với vịt, ngan chạy đồng. Kết quả virus CGC có thể truyền lây từ chim trời, cò, diệc sang vịt, ngan chạy đồng thông qua môi trường, thức ăn, nước uống. Các yếu tố lượng mưa, nhiệt độ, độ ẩm, diện tích trồng lúa, số lượng gia cầm và mật độ dân số... chưa thấy có mối liên hệ với sự lưu hành huyết thanh dương tính ($p>0,05$). Tuy nhiên, nghiên cứu của Waziri và cs, 2017 chỉ ra rằng nhiệt độ và lượng mưa có ảnh hưởng gấp 2 lần đến sự lưu hành huyết thanh dương tính H5 trong đàn gia cầm nuôi tại hai tỉnh thuộc Nigeria năm 2013. Nguyên nhân của sự khác biệt này có thể do phương thức chăn nuôi, điều kiện tiểu khí hậu, tập tính di cư của chim trời ở Quảng Bình khác so với ở Nigeria. Vào mùa mưa ở châu Phi, nguồn thức ăn như hoa, trái cây, côn trùng cho chim hoang dã tăng lên dẫn đến sự phong phú các loài chim và gia tăng sự lây truyền virus cúm gia cầm từ những con chim bị nhiễm bệnh sang những con chim mắc cầm. Mùa mưa cũng trùng với sự xuất hiện của các loài chim di cư ở Châu Phi, làm gia tăng số lượng chim, tạo cơ hội lây lan virus ở những nơi có mật độ chim di cư cao (Gaidet, 2016) và cũng làm tăng diện tích đất ngập nước, tạo môi trường thuận lợi cho chim trời cư trú, sinh sản, và tiếp xúc với gia cầm nuôi tại đây (Waziri và cs, 2017).

Các yếu tố lượng mưa, nhiệt độ, độ ẩm, mặc dù có hệ số $R > 0,5-0,9$ nhưng không tương quan

thuận với huyết thanh dương tính do mùa mưa tại Quảng Bình kéo dài từ tháng 9 đến tháng 1 hàng năm, đặc biệt là từ tháng 9 đến tháng 11 là đợt mưa chính trong năm. Thời gian thu hoạch lúa vụ Hè-Thu của Quảng Bình vào đầu tháng 9 trước mùa mưa bão. Mùa chim di cư đến Quảng Bình từ tháng 6 đến tháng 9. Do đó mặc dù tháng 9 có lượng mưa nhiều nhưng cơ hội tiếp xúc giữa chim trời và vịt ngan chạy đồng ở Quảng Bình ít hơn nên huyết thanh dương tính của tháng này

thấp nhất (19/100 mẫu) so với các tháng 5 (44/100 mẫu), 7 (43/100 mẫu), và 8 (30/100 mẫu) (Phạm Hồng Kỳ và cs, 2018). Bên cạnh đó độ ẩm không khí và nhiệt độ trung bình ở Quảng Bình thuộc loại cao với độ ẩm > 80% và nhiệt độ $\approx 30^{\circ}\text{C}$. Kết quả nghiên cứu của Lowen và cs, 2007 cho thấy độ ẩm không khí 25-30% và nhiệt độ $< 20^{\circ}\text{C}$ thuận lợi cho sự lan truyền virus CGC và ngược lại, độ ẩm không khí 80% và nhiệt độ $> 20^{\circ}\text{C}$ sẽ làm chậm sự lan truyền của virus.

Bảng 1. Phân tích đặc điểm sinh thái liên quan đến sự lưu hành huyết thanh dương tính virus A/H5 tỉnh Quảng Bình

Các yếu tố	Hệ số (R)	Sai số chuẩn (SE)	95% khoảng tin cậy (CI)	Giá trị P
Lượng mưa	0,9	6,1	-44, 8	0,1
Nhiệt độ	0,58	0,05	-1,2; 0,26	0,42
Độ ẩm	0,59	0,23	-0,2; 0,75	0,4
Giờ nắng	1	0,88	0,9; 8,5	0,03
Mật độ dân số	0,3	2,3	-10,9; 8,8	0,5
Diện tích trồng lúa	0,9	0,07	-0,06; 0,54	0,1
Tỷ lệ trang trại chăn nuôi	0,4	1,2	-4,3; 5,7	0,6
Số lượng gia cầm	0,52	6,7	-23; 35	0,6

Đặc điểm sinh thái liên quan đến sự lưu hành virus cúm A/H5

Vào mùa mưa bão hàng năm, những đàn chim, cò di cư từ hướng biển bay vào các cánh đồng của Quảng Bình để tránh bão và tìm kiếm thức ăn. Đây cũng là lúc những thợ bẫy chim bắt đầu đánh bắt và bày bán chim tại đây. Việc lấy mẫu swab hầu họng của chim hoang dã được thực hiện tại một số chợ ở Đồng Hới tại thời điểm này. Tổng số 10 mẫu swab đơn (5 cò và 5 diệc) đã được lấy và được gộp thành 2 mẫu gộp (5 mẫu đơn/1 mẫu gộp).

Phân tích sự lưu hành của virus cúm A/H5 ở chim hoang dã và gia cầm, thủy cầm nuôi cho thấy cả hai mẫu swab gộp chim hoang dã dương tính với gene M và có một mẫu (diệc xám) dương tính với virus H5 và N6. Ở gia cầm và thủy cầm nuôi, trong 58 mẫu swab gộp có 13 mẫu dương tính với cúm A và trong số đó có 4 mẫu (vịt) dương tính với H5 và N6. Không có mẫu dương tính với N1 (bảng 2).

Bảng 2. Phân tích mối quan hệ giữa chim trời, gia cầm nuôi và sự lưu hành virus cúm A/H5

Đối tượng	Số mẫu	Dương tính gene M	Dương tính H5	Dương tính N1	Dương tính N6
Chim trời	2	2	1	0	1
Gà, vịt	58	13	4	0	4

Chim hoang dã là nguy cơ tiềm tàng đối với an toàn sinh học vì chúng có thể truyền mầm bệnh

vào các trang trại chăn nuôi gia cầm. Bằng cách tăng tần suất tiếp xúc giữa gia cầm nuôi và

chim bị nhiễm bệnh, hoặc giữa các loại gia cầm lẫn cầm và phân, vật liệu có chứa virus có thể làm tăng khả năng lây truyền và phát tán virus và cũng có thể dẫn đến sự đa dạng các chủng virus CGC lưu hành. Chăn nuôi gia cầm nông hộ rất phổ biến ở Quảng Bình, đặc biệt là vịt chăn thả đồng hoặc ở ao hồ, kênh rạch. Do đó, với điều kiện sinh thái nông nghiệp ở đây và mô hình sử dụng đất trong vùng đất ngập nước thì sự tiếp xúc giữa chim trời và gia cầm, thủy cầm nuôi là rất phổ biến. Vịt chăn thả chạy đồng có thể dễ dàng tiếp xúc với nhiều loài chim hoang dã (cò, diệc) tìm kiếm thức ăn trong các cánh đồng canh tác, ví dụ: trong ruộng lúa. Các loài chim hoang dã bị săn bắt thường được tiêu thụ ở địa phương hoặc được vận chuyển đến những nơi khác. Các loài chim hoang dã này thường bị giữ trong môi trường làng

xã trước khi được bán ở các chợ gia cầm sống và từ đó chúng có thể dễ dàng tiếp xúc với gia cầm nuôi. Trên thế giới đã có nhiều phát hiện CGC độc lực cao H5Nx ở chim hoang dã tại châu Âu, châu Phi và châu Á từ 2016 đến 2017 (OIE, 2017). Do đó, việc giám sát dịch bệnh ở chim hoang dã và gia cầm nuôi là điều bắt buộc để ngăn chặn sự bùng phát dịch bệnh gia cầm. Các khuyến nghị an toàn sinh học là hạn chế tiếp xúc giữa gia cầm nuôi với nước, đất hoặc vật liệu có thể đã tiếp xúc với chim nước hoang dã hoặc phân chim hoang dã.

3.2. Phân tích đặc điểm sinh học phân tử gen HA của các chủng virus H5N6 được phát hiện tại Quảng Bình năm 2016

Phân tích trình tự gen của các chủng H5N6 được phát hiện tại Quảng Bình

Bảng 3. Kết quả so sánh độ tương đồng gen HA các chủng virus H5N6 phân lập tại Quảng Bình với các chủng virus phân lập ở địa phương khác

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1 A/CK/ZJ/727155/2014	100																			
2 A/DK/Laos/XBY004/2014	99	100																		
3 A/TURTL/Wuhan/WHBJ12/2014	98	98	100																	
4 A/SW/Guangdong/1/2014	99	99	98																	
5 A/DK/VN/LBM360c1-4-1/2013	89	89	89	90	100															
6 A/DK/WZ/YHQL22/2014	96	95	95	96	90	100														
7 A/DK/QuangNinh/4c111/2013	95	94	94	95	89	95	100													
8 A/ENV/Korea/W544/2016	98	97	97	97	88	95	94	100												
9 A/teal/Tottori/2/2016	97	97	97	97	88	95	93	99	100											
10 A/Pintail/Tottori/b37/2016	97	97	97	97	88	95	93	99	99	100										
11 A/DK/QuangBinh/LBM0818/2016	97	97	98	97	89	95	93	96	96	96	100									
12 A/DK/QuangBinh/LBM0908/2016	97	97	97	97	89	94	93	96	96	96	99	100								
13 A/DK/QuangBinh/LBM0909/2016	97	97	97	97	89	94	93	96	96	96	99	99	100							
14 A/Heron/QuangBinh/LBM0910/2016	97	97	97	97	89	94	93	96	96	96	99	99	99	100						
15 A/DK/QuangBinh/LBM0911/2016	97	97	98	97	89	95	93	96	96	96	99	99	99	99	100					
16 A/duck/Vietnam/LBM837/2015	98	97	96	98	89	95	93	96	96	96	98	98	98	98	99	100				
17 A/MK/QuangNinh/254/2016	98	97	96	98	89	95	93	96	96	96	98	98	98	98	98	99	100			
18 A/chicken/NhaTrang/127/2015	98	98	97	98	89	95	94	97	97	97	97	97	97	97	97	98	98	100		
19 A/MK/Vietnam/LBM757/2014	99	98	98	99	89	95	94	98	98	98	97	97	97	97	97	97	97	98	100	
20 A/MK/VN/LBM756/2014	99	98	98	99	89	95	94	98	98	98	97	97	97	97	97	97	97	98	99	100

Gen HA của 5 chủng virus H5N6 được phát hiện tại Quảng Bình năm 2016 đã được khuếch

đại và giải mã trực tiếp với chiều dài gen hoàn chỉnh là 1704bp (phân tích trình tự gen HA được

thực hiện tại công ty 1st BASE, Singapore), tương đương với 567 amino acid, và được công bố trên Genbank với các mã số (Accession Numbers): LC342713; LC342714; LC342715; LC342716; LC342717.

Kết quả so sánh mức độ tương đồng về trình tự nucleotide (nt) chỉ ra rằng cả 5 chủng có mức tương đồng với nhau là 99%, tương đồng với các chủng H5N6 ở các địa phương khác tại Việt nam từ 89-99%, các nước lân cận (Trung Quốc, Lào) từ 93-97% và các nước Đông Á (Hàn Quốc, Nhật Bản) 96% (bảng 3). Như vậy 5 chủng virus được phát hiện tại Quảng Bình có độ tương đồng cao với các chủng virus phân lập được ở các nước xung quanh gợi ý rằng các biến chủng virus mới đã xâm nhập vào Việt Nam từ những nước đó. Những biến đổi về trình tự nt so với các chủng virus đã phát hiện ở Việt Nam (2013-2016) từ 1-11% như chủng A/DK/VN/LBM360c1-4-1/2013 độ tương đồng chỉ 89%, A/DK/QuangNinh/4c111/2013 là 93%. Nhưng với các chủng phân lập năm 2015 và 2016 tại Hà Nội, Quảng Ninh và Nha Trang (A/duck/Vietnam/LBM837/2015, A/chicken/NhaTrang/127/2015,

A/MK/QuangNinh/254/2016), mức tương đồng khá cao 97-99%, gợi ý rằng các biến chủng virus xâm nhập vào Việt Nam năm 2013 đã có những đột biến trong di truyền của chúng. Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của các nhóm tác giả Nguyễn Đăng Thọ và cs, 2016; Nguyen và cs, 2017; Thanh và cs, 2018.

Phân tích trình tự amino acid của các chủng H5N6 phân lập tại Quảng Bình

HA là protein bề mặt chính chịu trách nhiệm liên kết với các vị trí bám dính thụ thể (receptor) trên màng tế bào, cho phép virion xâm nhập vào tế bào. Ở virus CGC độc lực cao, vùng mã hóa vị trí phân tách của protein HA có chứa nhiều amino acid mang tính kiềm (arginine và lysine) cho phép sự phân tách của phân tử HA bằng các protease nội sinh tế bào phân bố rộng rãi trong các tế bào của cơ thể (Senne và cs, 1996). Cấu trúc phân tử này rất quan trọng trong việc xác định độc lực của các chủng virus bởi nó cho phép virus nhân lên trong rất nhiều loại tế bào, gây hủy hoại tế bào và gây chết ở gà với tỷ lệ gần 100% (Kim và cs, 2009).

Bảng 4. Phân tích đặc tính sinh học phân tử HA gen của các chủng virus cúm H5N6 phân lập tại Quảng Bình

Tên virus	Phân nhánh HA	Vị trí phân cắt	Vị trí bám dính thụ thể						
			110	158	160	224	226	228	318
A/duck/Vietnam/QuangBinh/LBM0909/2016	2.3.4.4	RERRRKR/GLF	H	N	T	N	Q	G	T
A/duck/Vietnam/QuangBinh/LBM0908/2016	2.3.4.4	RERRRKR/GLF	H	N	T	N	Q	G	T
A/Heron/Vietnam/QuangBinh/LBM0910/2016	2.3.4.4	RERRRKR/GLF	H	N	T	N	Q	G	T
A/duck/Vietnam/QuangBinh/LBM0818/2016	2.3.4.4	RERRRKR/GLF	H	N	T	N	Q	G	T
A/duck/Vietnam/QuangBinh/LBM0911/2016	2.3.4.4	RERRRKR/GLF	H	N	T	N	Q	G	T

Qua phân tích trình tự amino acid thì cả 5 chủng H5N6 trong nghiên cứu này (bảng 4) đều thuộc clade 2.3.4.4 và có motif phân cắt chứa nhiều amino acid kiềm (polybasic haemagglutinin cleavage site- pHAcs) thuộc thể độc lực cao được công bố bởi Offlu (2018). Tất cả năm chủng virus HPAI H5N6 có amino acid glutamine ở vị trí 226 và glycine ở vị trí 228 là liên kết ưu tiên với các

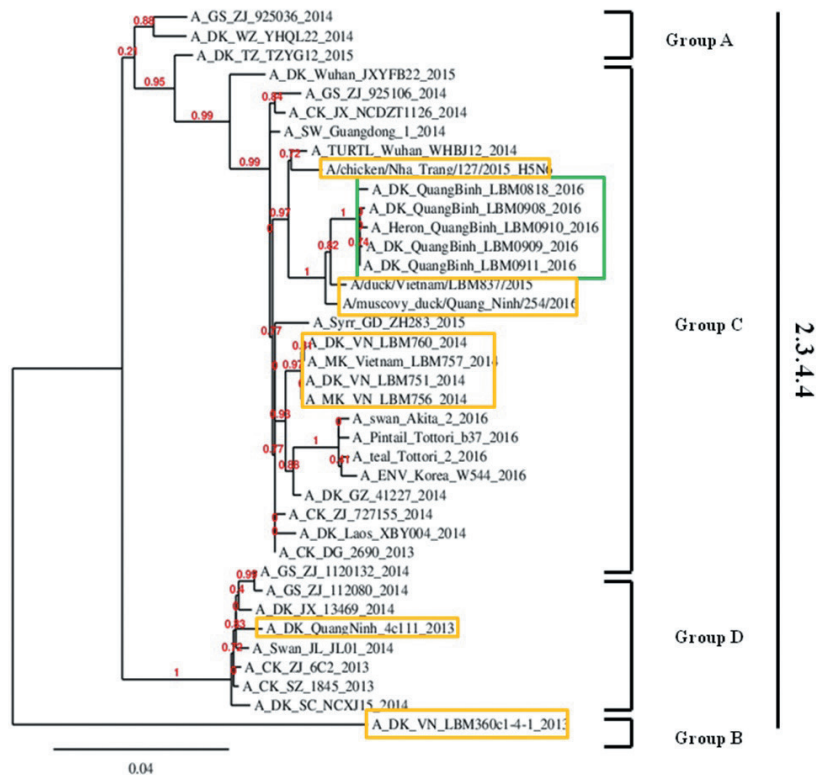
receptor sialic acid nối với các chuỗi đường thông qua liên kết α -2,3 điển hình cho virus CGC hay avian-like receptors.

Phân tích phả hệ của các chủng H5N6 phân lập tại Quảng Bình

Clade 2.3.4.4 HA đã được phân loại thành 4 nhóm. Nhóm A (Buan2-like) và nhóm B (Gochang1-

like) đại diện bởi A/duck/Korea/ Buan2/ 2014 và A / breederduck /Korea/ Gochang1/ 2014 gây ra các vụ dịch CGC ở Hàn Quốc năm 2014-2015 (Lee và cs, 2014, 2015). Nhóm C và nhóm D bao gồm chủ yếu là virus H5N6 và được phân thành “major group” và “minor group”, trong đó virus ở “major group” lưu hành ở Jiangxi, Guangdong, Yunnan và “minor group” lưu hành ở Jilin, Shandong, Jiangsu, Zhejiang, Hubei, Hunan, Jiangxi, Guangdong, Yunnan (Bi và cs, 2016).

Phân tích phả hệ dựa trên gene HA cho thấy 5 chủng virus được phát hiện tại Quảng Bình năm 2016 được phân loại vào nhóm di truyền 2.3.4.4C và quan hệ gần với các chủng HPAI H5N6 phân lập gần đây ở Việt Nam, Trung Quốc, Hàn Quốc và Nhật Bản (Hình 1). Virus H5N6 nhóm C đã gây bùng phát dịch ở Trung Quốc kể từ năm 2013, và virus nhóm C đã được phân lập từ nhiều loài vật chủ khác nhau bao gồm chim hoang dã, gia cầm, chim bồ câu, lợn, mèo và con người (Bi và cs,



2016). Nhóm virus này vào Lào và Việt Nam năm 2014 và Hồng Kông năm 2015 (Yuan và cs, 2016). Năm 2016, virus nhóm C đã được xác định ở Hàn Quốc và Nhật Bản (Kwon và cs, 2017; Okamatsu và cs, 2017).

3.3. Đề xuất giải pháp phòng dịch CGC dựa trên tiếp cận sinh thái dịch tễ học

Việc loại trừ sinh học đặc biệt khó đạt được khi:

Chăn thả tự do, chăn thả chạy đồng do gia cầm có khả năng tiếp xúc với chim hoang dã và các động vật nuôi khác như lợn, chó, mèo. Chăn

nuôi hỗn hợp gà với vịt hoặc ngan, ngộ độc tạo điều kiện cho virus truyền lây từ vịt, ngan, ngộ độc sang gà (Sun và cs, 2014; Phạm Hồng Kỳ và cs, 2018). Sử dụng nguồn nước bề mặt bị ô nhiễm cho gia cầm uống có thể đưa virus vào các trại chăn nuôi (Verhagen và cs, 2017; Phạm Hồng Kỳ và cs, 2018). Virus CGC có thể nhân lên ở động vật gặm nhấm mà không cần thích nghi, dẫn đến số lượng virus cao trong phổi và mũi ở các động vật này. Virus có trong nước mũi và nước bọt có thể truyền sang gia cầm lành qua tiếp xúc (Velkers và cs, 2017). Vacxin CGC được sử dụng để phòng ngừa, quản lý hoặc tiêu diệt virus từ gia cầm và

các loài chim khác. Đôi khi vacxin có hiệu lực thấp do sự trôi dạt kháng nguyên (Swayne, 2012) hoặc mức độ miễn dịch thấp, đặc biệt ở các đàn gia cầm trong những hộ chăn nuôi nhỏ lẻ (Sun và cs, 2014). Nhiều chủ hộ chăn nuôi thiếu hiểu biết về CGC và các biện pháp an toàn sinh học (Farrell và cs, 2015).

Để đạt được loại trừ sinh học, bất kỳ mối liên hệ nào có thể nhận thấy được giữa động vật bị nhiễm, các khu vực bị ô nhiễm xung quanh các khu nuôi gia cầm với gia cầm nuôi cần phải tránh.

IV. KẾT LUẬN

- Hai yếu tố sinh thái là số giờ nắng và chim hoang dã có liên quan chặt chẽ đến huyết thanh dương tính và sự lưu hành của virus H5Nx ở Quảng Bình.

- Năm chủng virus H5N6 được phát hiện tại Quảng Bình có độ tương đồng với các chủng H5N6 phân lập tại Việt Nam (89-99%) và các nước khác (96-97%).

- Phân tích phả hệ cho thấy những chủng virus này thuộc clade 2.3.4.4C và có quan hệ gần với các chủng virus cúm gia cầm H5N6 gần đây được phân lập tại Việt Nam, Trung Quốc, Hàn Quốc và Nhật Bản.

- Để giảm sự lây nhiễm virus cúm A/H5 vào đàn gia cầm mức hộ chăn nuôi, các giải pháp nên được thực hiện bao gồm hạn chế hoặc loại bỏ các yếu tố nguy cơ (địa điểm chăn nuôi gần đường giao thông chính: <500m; địa điểm chăn nuôi cạnh ao, ngôi công cộng; nuôi chung nhiều loại gia cầm; chăn nuôi thả đồng; sử dụng nước ao, hồ trong chăn nuôi; gia cầm chăn nuôi tiếp xúc với chim trời) kết hợp với tiêm phòng, giám sát sau tiêm phòng và nâng cao hiểu biết về CGC và chăn nuôi an toàn sinh học cho người chăn nuôi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alexander DJ (2007). An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine* 25(30):5637-44
- Antia R, Regoes R, Koella J, Bergstrom C (2003). The role of evolution in the emergence of infectious diseases. *Nature* 426, 658–661
- Bahl J, Vijaykrishna D, Holmes EC, Smith GJ, Guan Y (2009). Gene flow and competitive exclusion of avian influenza A virus in natural reservoir hosts. *Virology* 390(2):289-297
- Báo cáo của Chi cục Quảng Bình năm 2007, 2008, 2012, 2014, 2015, 2016.
- Bi Y, Chen Q, Wang Q, Chen J, Jin T, Wong G, Quan C, Liu J, Wu J, Yin R, Zhao L, Li M, Ding Z, Zou R, Xu W, Li H, Wang H, Tian K, Fu G, Huang Y, Shestopalov A, Li S, Xu B, Yu H, Luo T, Lu L, Xu X, Luo Y, Liu Y, Shi W, Liu D, Gao GF (2016). Genesis, evolution and prevalence of H5N6 avian influenza viruses in China. *Cell Host Microbe* 20, 810-821
- Farrell PC, Hunter C, Truong B, Bunning M (2015). Control of highly pathogenic avian influenza in Quang Tri province, Vietnam: voices from the human – animal interface. *Rural Remote Health* 15(3):3044
- Gaidet N (2016). Ecology of Avian Influenza Virus in Wild Birds in Tropical Africa. *Avian Dis.* 60(1 Suppl): 296-301
- Kim JK, Negovetich NJ, Forrest HL, Webster RG (2009). Ducks: the “Trojan horses” of H5N1 influenza. *Influenza Other Respir Viruses* 3(4):121-8
- Kwon JH, Lee DH, Swayne DE, Noh JY, Yuk SS, Erdene-Ochir TO, Hong WT, Jeong JH, Jeong S, Gwon GB, Lee S, Song CS (2017). Reassortant clade 2.3.4.4 avian influenza A(H5N6) virus in a wild mandarin duck, South Korea, 2016. *Emerg Infect Dis* 23: 822-826
- Lebarbenchon C, Feare CJ, Renaud F, Thomas F, Gauthier-Clerc M (2010). Persistence of highly pathogenic avian influenza viruses in natural ecosystems. *Emerg Infect Dis.* 16(7):1057-62
- Lee YJ, Kang HM, Lee EK, Song BM, Jeong J, Kwon YK, Kim HR, Lee KJ, Hong MS, Jang I, Choi KS, Kim JY, Lee HJ, Kang MS, Jeong OM, Baek JH, Joo YS, Park YH, Lee HS (2014). Novel reassortant Influenza A(H5N8) viruses, South Korea, 2014. *Emerg Infect Dis.* 20(6):1087-1089

12. Lee DH, Torchetti MK, Winker K, Ip HS, Song CS, Swayne DE (2015). Intercontinental spread of Asian-Origin H5N8 to North America through Beringia by Migratory Birds. *J Virol.* 89(12): 6521-6524
 13. Lowen CA, Mubareke S, Steel J, Palese P (2007). Influenza virus transmission is dependent on relative humidity and temperature. *PLoS Pathogens* 3: 151
 14. Nguyễn Đăng Thọ, Nguyễn Hoàng Đăng, Đàm Thị Vui, Đỗ Thị Hoa, Mai Thùy Dương, Nguyễn Thị Diệp, Nguyễn Viết Không, Tô Long Thành (2016). Virus cúm gia cầm độc lực cao H5N6 ở Việt Nam năm 2014. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y XXIII* 1: 18-28
 15. Nguyen DT, Jang Y, Nguyen TD, Jones J, Shepard SS, Yang H, Gerloff N, Fabrizio T, Nguyen LV, Inui K, Yang G, Creanga A, Wang L, Mai DT, Thor S, Stevens J, To TL, Wentworth DE, Nguyen T, Pham DV, Bryant JE, Davis CT (2017). Shifting Clade Distribution, Reassortment, and Emergence of New Subtypes of Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5) Viruses Collected from Vietnamese Poultry from 2012 to 2015. *J Virol.* 91(5). pii: e01708-1716
 16. Offlu (2018). Influenza A Cleavage Sites
 17. OIE (2017) OIE Situation Report for Avian Influenza
 18. Okamatsu M, Ozawa M, Soda K, Takakuwa H, Haga A, Hiono T, Matsuu A, Uchida Y, Iwata R, Matsuno K, Kuwahara M, Yabuta T, Usui T, Ito H, Onuma M, Sakoda Y, Saito T, Otsuki K, Ito T, Kida H (2017). Characterization of highly pathogenic avian influenza virus A(H5N6), Japan, November 2016. *Emerg Infect Dis* 23: 691-695
 19. Phạm Hồng Kỳ, Phạm Minh Hằng, Nguyễn Viết Không (2018). Khảo sát sự lưu hành virus Cúm A/H5 và một số yếu tố nguy cơ lây nhiễm virus vào đàn gia cầm của Tỉnh Quảng Bình (2012-2016). *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y XXV* 3: 15-22
 20. Senne DA, Panigrahy B, Kawaoka Y, Pearson JE, Süss J, Lipkind M, Kida H, Webster RG (1996). Survey of the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential. *Avian Dis.* 1996 40(2):425-37
 21. Sun H, Liu J (2014). *Assessment of vaccination strategies against highly pathogenic avian influenza in China.* *Front. Agr. Sci. Eng.* 1(4): 277-281
 22. Swayne DE (2012). Impact of Vaccines and Vaccination on Global Control of Avian Influenza. *Avian Diseases* 56: 818- 828
 23. Thanh HD, Tran VT, Nguyen DT, Hung VK, Kim W (2018). Novel reassortant H5N6 highly pathogenic influenza A viruses in Vietnamese quail outbreaks. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 56: 45-57
 24. Velkers FC, Blokhuis SJ, Veldhuis Kroeze EJB, Burt SA (2017). The role of rodents in avian influenza outbreaks in poultry farms: a review. *Vet Q.* 37(1):182-194
 25. Verhagen JH, Herfst S, Fouchier RAM (2015). How a virus travels the world. *Science.* 347:616-617
 26. Verhagen JH, Lexmond P, Vuong O, Schutten M, Guldemeester J, Osterhaus AD, Elbers AR, Slaterus R, Hornman M, Koch G, Fouchier RA (2017). Discordant detection of avian influenza virus subtypes in time and space between poultry and wild birds; Towards improvement of surveillance programs. *PLoS One.* 12(3):e0173470
 27. Waziri MI, Abdu PA, Sa'idu L, Bello M (2017). Seroepidemiology and assessment of risk factors for the spread of avian influenza in birds in two Nigerian states. *Vet Med Sci.* 3(4):227-238
 28. Williams RAJ, Fasina FO, Peterson AT (2008). Predictable ecology and geography of avian influenza (H5N1) transmission in Nigeria and West Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 102:471-479
 29. Yuan R, Wang Z, Kang Y, Wu J, Zou L, Liang L, Song Y, Zhang X, Ni H, Lin J, Ke C (2016). Continuing reassortant of H5N6 subtype highly pathogenic avian influenza virus in Guangdong. *Front Microbiol* 7: 520
- Ngày nhận 7-4-2018
 Ngày phản biện 27-5-2018
 Ngày đăng 1-7-2018