

ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA CÁC CHỦNG VI RÚT CÚM A/H5N6 LƯU HÀNH TRÊN GIA CẦM TẠI MỘT SỐ TỈNH MIỀN TRUNG VIỆT NAM, THÁNG 9/2020- 3/2021

TRẦN THỊ NHÀI⁽¹⁾, MARCHENKO V. YU.⁽²⁾, BÙI THỊ HƯƠNG⁽¹⁾, NGUYỄN HỒNG QUANG⁽¹⁾,
NGUYỄN MẬU THẠCH⁽¹⁾, LÊ VĂN QUANG⁽¹⁾, GUDYMO A. S.⁽²⁾, GONCHAROVA N. I.⁽²⁾,
RYZHIKOV A. B.⁽²⁾, GAVRILOVA E. V.⁽²⁾

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi rút cúm A thuộc họ Orthomyxoviridae và có bộ gen phân đoạn bao gồm các đoạn ARN sợi đơn âm [1]. Vi rút cúm A được chia thành các phân nhóm dựa trên đặc điểm di truyền và kháng nguyên của hai glycoprotein bề mặt là hemagglutinin (HA) và neuraminidase (NA). Danh pháp của những loại vi rút này dựa trên sự kết hợp của các kiểu gen HA (H1 - H18) và NA (N1 - N11). Thủy cầm, đặc biệt là thủy cầm hoang dã, là nguồn chứa tự nhiên của tất cả các phân nhóm cúm A [2], ngoại trừ H17N10 và H18N11, được tìm thấy gần đây ở dơi [3,4]. Vi rút cúm A được phát hiện ở nhiều loại vật chủ bao gồm người, lợn, ngựa, chó, mèo và động vật biển có vú.

Tại Việt Nam, vi rút cúm độc lực cao H5N1 dòng Gs/GD được phát hiện vào năm 2001 [5] và nhiều clade đã được xác định kể từ đó [6-7]. Từ năm 2003 đến năm 2013, vi rút cúm độc lực cao H5N1 lưu hành rất rộng rãi tại Việt Nam, ban đầu là clade 1, sau đó là các clade 2.3.2 và 2.3.4 dần thay thế cho clade 1. Từ năm 2008 - 2009, các vi rút H5N1 clade 1.1 tiến hóa từ clade 1 đã trở nên chiếm ưu thế ở các tỉnh phía Nam và không còn phát hiện ở Việt Nam sau tháng 4/2014.

Cúm A H5N6 lần đầu tiên được phát hiện tại Việt Nam vào tháng 4 năm 2014 trên đàn gà nuôi tại huyện Trảng Định, tỉnh Lạng Sơn. Sau đó, H5N6 được phát hiện vào ngày 23 tháng 6 năm 2014 trên đàn vịt nuôi tại thôn Tân Sơn, xã Kỳ Thọ, huyện Kỳ Anh, tỉnh Hà Tĩnh. Kết quả xét nghiệm bằng giải trình tự gen của các mẫu vi rút cúm A/H5N6 phát hiện được cho thấy có sự tương đồng đến 99% với chủng vi rút cúm A/H5N6 gây tử vong đầu tiên trên người tại tỉnh Tứ Xuyên, Trung Quốc vào tháng 4/2014 [8].

Vi rút cúm gia cầm H5N1 tại Việt Nam từ năm 2018 đến nay thuộc nhánh 2.3.2.1c (chủ yếu tại khu vực Đồng bằng sông Cửu Long) và H5N6 2.3.4.4h, 2.3.4.4f, 2.3.4.4g (phân bố tại nhiều vùng trong cả nước). Phân tích các đặc tính sinh học cho thấy không có sự biến đổi lớn, có tính đặc hiệu với thụ thể bám trên gia cầm. Đến tháng 6 năm 2021 xuất hiện thêm chủng vi rút cúm A/H5N8 (thuộc nhánh 2.3.4.4b) tại 3 tỉnh là Hòa Bình, Cao Bằng, Quảng Ninh và lan rộng sang các tỉnh Miền Trung Việt Nam.

Tình hình vi rút cúm độc lực cao trên thế giới vẫn diễn biến phức tạp. Năm 2021, các đợt bùng phát do vi rút cúm gia cầm độc lực cao đã ghi nhận tại hơn 50 quốc gia ở châu Âu, châu Á và châu Phi. Các đợt bùng phát được gây ra bởi các biến thể khác nhau của vi rút cúm H5Nx, bao gồm vi rút cúm H5N1, H5N5, H5N6 và H5N8 [9].

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu là 34 mẫu nội tạng gia cầm (ruột, phổi, thận, khí quản, lá lách) gom chung vào một ống fancel thu tại các hộ gia đình khi có gia cầm ốm hoặc chết tại các tỉnh Thanh Hóa, Nghệ An, Hà Tĩnh và Quảng Trị trong giai đoạn 9/2020-3/2021. Mẫu được lưu giữ ở -80°C .

Trong 34 mẫu nghiên cứu, bao gồm 16 mẫu từ gà (9 chết/7 sống), 13 mẫu từ vịt (7 chết/6 sống) và 5 mẫu từ ngan (3 chết/2 sống).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập vi rút trên phôi gà 9-10 ngày tuổi

Phân lập vi rút trên trứng gà có phôi được làm theo khuyến cáo thường quy của Tổ chức Y tế thế giới năm 2011 [10].

Mẫu nội tạng (ruột, phổi, thận, khí quản, lá lách) được đồng nhất bằng cách nghiền trong cối sứ vô trùng với dung dịch đệm phosphat có chứa kháng sinh hoặc sử dụng máy đồng nhất tự động (Tissue-Lizer, Qiagen), ly tâm 8000 vòng/phút trong 5 phút. Cấy 0,1 ml dịch nổi vào khoang niệu nang (allantoic) của phôi trứng gà. Sau 48 h-72h, xác định sự hiện diện của vi rút cúm A bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu (HA) sử dụng hồng cầu ngựa. Hiệu giá HA được xác định tại độ pha loãng cao nhất có khả năng gây ngưng kết hồng cầu.

2.2.2. Phương pháp Realtime RT-PCR

Tách RNA: Sử dụng bộ kit thương mại "RIBO-sorb" (AmpliSense, Nga), được đăng ký lưu hành tại Nga từ năm 2014, quy trình theo hướng dẫn của nhà sản xuất [11].

Phản ứng phiên mã ngược: Quá trình tổng hợp cDNA trên khuôn ARN REVERTA-L (AmpliSense, Nga) theo hướng dẫn của nhà sản xuất [12].

Realtime PCR: Sử dụng bộ kit AmpliSense® Influenza virus A-type-H5, H7, H9-Fl ("AmpliSense", Nga) [13], AmpliSense® Influenza virus A H5N1-FL (AmpliSense", Nga) theo hướng dẫn của nhà sản xuất [14].

2.2.3. Phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu

Phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu (HAI) được thực hiện để xác định đặc tính kháng nguyên vi rút cúm gia cầm được thực hiện theo quy trình của WHO [10]. Pha loãng dịch niệu nang đạt nồng độ 25 μl chứa 4 HAU vi rút cúm. Để tiến hành phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu đã sử dụng các kháng nguyên và huyết thanh tham chiếu cụ thể cho từng subtype lấy từ Bệnh viện Nhi đồng (Memphis, Tennessee, Hoa Kỳ). Theo khuyến nghị của WHO, huyết thanh được xử lý bằng RDE (Receptordestroying enzyme) để loại bỏ các chất ức chế bền nhiệt không đặc hiệu. Thêm 3 phần RDE vào một phần của huyết thanh. Đặt ống vào máy ổn nhiệt ở 37°C trong 18-20 giờ. Để loại bỏ chất ức chế bền nhiệt và vô hiệu hóa RDE, đặt ống vào bể ổn nhiệt ở 56°C trong 30-60 phút. Huyết thanh nghiên cứu được coi là dương tính nếu nghịch đảo hiệu giá kháng thể lớn hơn hoặc bằng 20.

2.2.4. Phương pháp đánh độ nhạy với chất ức chế neuraminidase

Độ nhạy của các chủng vi rút cúm A H5N6 với các chất ức chế neuraminidase thực hiện bằng máy đo huỳnh quang TECAN infinite F200. Phương pháp huỳnh quang dựa trên phép đo cường độ huỳnh quang của sản phẩm cuối cùng 4-methylumbelliferone được giải phóng từ chất nền 2'- (4-methylumbelliferyl) -ADN-acetylneuraminic acid (Munana) do hoạt động enzym của neuraminidase của vi rút cúm.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Tỷ lệ nhiễm vi rút cúm gia cầm tại một số tỉnh miền Trung Việt Nam, 9/2020-3/2021

Trong tổng số 34 mẫu nghiên cứu thì số lượng mẫu có hiệu giá HA là 11/34 mẫu (32%). Trong 11 mẫu có hiệu giá HA, nghiên cứu xác định phân type vi rút cúm bằng kỹ thuật Realtime RT-PCR với các bộ sinh phẩm của AmpliSense, Nga, được đăng lý lưu hành tại Liên bang Nga năm 2014. Kết quả đã phát hiện 11/34 (32%) mẫu dương tính với vi rút cúm A/H5N6 (bảng 1), không phát hiện mẫu dương tính với vi rút cúm A/H5N1.

Bảng 1. Các phân typ vi rút cúm A lưu hành trên gia cầm tại một số tỉnh miền Trung Việt Nam, 9/2020-3/2021 bằng phương pháp PCR

TT	Ngày lấy mẫu	Tỉnh	Huyện	Xã, phường	Loài	Nguồn gốc	Kết luận
1	07/9/2020	Quảng Trị	Vĩnh Linh	Vĩnh Lâm	Gà	Ồ dịch	(+) A/H5N6
2	14/9/2020	Thanh Hóa	Nông Cống	Tân Thọ	Vịt	Ồ dịch	(+) A/H5N6
3	15/10/2020	Thanh Hóa	Bá Thước	Cổ Lũng	Vịt	Ồ dịch	(+) A/H5N6
4	16/11/2020	Thanh Hóa	Thành phố	Quảng Thành	Gà	Ồ dịch	(+) H5N6
5	21/12/2020	Nghệ An	Quỳnh Lưu	Quỳnh Tân	Gà	Ồ dịch	(+) H5N6
6	28/12/2020	Nghệ An	Quỳnh Lưu	Quỳnh Tân	Gà	Ồ dịch	(+) H5N6
7	28/12/2020	Nghệ An	Quỳnh Lưu	Quỳnh Tân	Gà	Ồ dịch	(+) H5N6
8	18/01/2021	Nghệ An	Yên Thành	Liên Thành	Gà	Ồ dịch	(+) H5N6
9	4/2/2021	Hà Tĩnh	Thạch Hà	Thạch Văn	Vịt	Ồ dịch	(+) H5N6
10	11/2/2021	Thanh Hóa	Ngọc Lặc	Kiên Thọ	Gà	Ồ dịch	(+) H5N6
11	15/3/2021	Thanh Hóa	Thường Xuân	Tân Thành	Gà	Ồ dịch	(+) H5N6

Theo tài liệu báo cáo của Cục Thú Y cho biết tính từ đầu năm 2020, trên cả nước đã có 44 ổ dịch CGC, bao gồm 39 ổ dịch do vi rút cúm A/H5N6 và 05 ổ dịch do vi rút cúm A/H5N1. Tổng số gia cầm chết, buộc tiêu hủy là 137 180 con. Số liệu cho thấy chủng vi rút cúm gia cầm A/H5N6 lưu hành rất phổ biến tại Việt Nam, chiếm 88,63% ổ dịch trên cả nước [15], số liệu nghiên cứu của đề tài cũng phù hợp với số liệu của Cục Thú Y công bố. Nghiên cứu của Nguyễn Trung Nam và cộng sự cũng cho thấy các subtype H5N6 đang lưu hành tại Việt Nam có nguồn gốc thuộc dòng Tứ Xuyên năm 2014 hoặc cụm Nhật Bản - Hàn Quốc [16].

Cũng trong thời điểm từ đầu năm 2020 đến 12/3/2020 thế giới đã ghi nhận các ổ dịch bệnh CGC tại 11 quốc gia và vùng lãnh thổ, cụ thể: Chủng vi rút Cúm A/H5N1 gây bệnh trên gia cầm tại Ấn Độ, Trung Quốc, Chủng vi rút A/H5N6 tại Nigeria, Trung Quốc, A/H5N8 tại Cộng hòa Séc, Đức, Hungary, Ba Lan, Rumania, Slovakia, Nam Phi, chủng vi rút A/H5N2 và A/H5N5 tại Đài Loan. Như vậy, rõ ràng là chủng vi rút cúm A/H5N6 đã lưu hành tại Việt Nam và một số nước trong khu vực trong giai đoạn trên.

3.2. Đặc tính kháng nguyên của các chủng vi rút cúm A/H5N6

Đặc tính kháng nguyên vi rút cúm A/H5N6 trên gia cầm lưu hành tại một số tỉnh miền Trung Việt Nam được xác định bằng phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu (HAI), sử dụng kháng nguyên tham chiếu và kháng huyết thanh chồn sương tham chiếu, cũng như kháng nguyên của các chủng vi rút cúm A/H5 đã phân lập trước đây ở Nga (bảng 2). Kháng nguyên tham chiếu thuộc clade 2.3.4.4b, 2.3.4.4c, 2.3.4.4f, 2.3.4.4g, 2.3.4.4h.

Các chủng vi rút cúm A/H5N6 cho thấy có ái lực với dòng A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6) Clade 2.3.4.4h, đã lưu hành tại Nga vào năm 2018. Dữ liệu thu được phù hợp với phân tích phát sinh loài, cho thấy sự tương đồng cao của các chủng được nghiên cứu với chủng A/Guangdong/18SF020/2018 (H5N6), được WHO khuyến nghị làm chủng dự tuyển sản xuất vắc xin năm 2018, cũng như chủng A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6). Các chủng này thuộc dòng di truyền 2.3.4.4h.

Bảng 2. Phản ứng ức chế ngưng kết của vi rút H5N6 nhánh 2.3.4.4 với hồng cầu ngựa

Vi rút	Sub-type	Clade	Kháng huyết thanh chồn sương tham chiếu (Reference ferret antisera)						
			A/Astrakhan/3212/2020	A/Dalmatian pelican/Astrakhan/344-11/2021	A/gyrfalcon/Washington/41088/2014 RG43A	A/Northern Pintail/Washington/40964/2014	A/chicken/Vietnam/NCVD-15A59/2015	A/chicken/Dong Nai/25437VTC/2019	A/common gull/Saratov/1676/2018
			2.3.4.4b	2.3.4.4b	2.3.4.4c	2.3.4.4c	2.3.4.4f	2.3.4.4g	2.3.4.4h
Kháng nguyên tham chiếu									
A/Astrakhan/3212/2020	H5N8	2.3.4.4b	160	640	320	80	20	160	<20
A/Dalmatian pelican/Astrakhan/344-11/2021	H5N5	2.3.4.4b	640	1280	640	160	80	160	20
A/gyrfalcon/Washington/41088/2014 RG43A	H5N8	2.3.4.4c	160	160	160	80	<20	80	<20
A/Northern Pintail/Washington/40964/2014	H5N2	2.3.4.4c	320	320	320	160	40	160	<20
A/chicken/Vietnam/NCVD-15A59/2015	H5N6	2.3.4.4f	640	640	640	320	320	160	80

Vi rút	Sub-type	Clade	Kháng huyết thanh chồn sương tham chiếu (Reference ferret antisera)						
			A/Astrakhan/3212/2020	A/Dalmatian pelican/Astrakhan/344-11/2021	A/gyrfalcon/Washington/41088/2014 RG43A	A/Northern Pintail/Washington/40964/ 2014	A/chicken/Vietnam/NCVD-15A59/2015	A/chicken/Dong Nai/25437VTC/2019	A/common gull/Saratov/1676/ 2018
			2.3.4.4b	2.3.4.4b	2.3.4.4c	2.3.4.4c	2.3.4.4f	2.3.4.4g	2.3.4.4h
A/chicken/Dong Nai/25437VTC/2019	H5N6	2.3.4.4g	640	1280	640	320	160	640	40
A/common gull/Saratov/1676/ 2018	H5N6	2.3.4.4h	<20	<20	<20	<20	<20	<20	160
Kháng nguyên nghiên cứu									
A/chicken/Thanh Hoa/V3S3VTC/2020	H5N6	2.3.4.4h	<20	<20	<20	<20	<20	<20	80
A/duck/Thanh Hoa/5331VTC/2020	H5N6	2.3.4.4h	<20	<20	<20	<20	<20	<20	80
A/chicken/Ha Tinh/514VTC/2021	H5N6	2.3.4.4h	<20	<20	<20	<20	<20	<20	160
A/chicken/Nghe An/7007VTC/2020	H5N6	2.3.4.4h	<20	<20	<20	<20	<20	<20	160
A/duck/Thanh Hoa/4643VTC/2020	H5N6	2.3.4.4h	<20	<20	<20	<20	<20	<20	80
A/muscovy duck/Nghe An/6873VTC/2020	H5N6	2.3.4.4h	<20	<20	<20	<20	<20	<20	80
A/chicken/Thanh Hoa/6081VTC/2020	H5N6	2.3.4.4h	<20	<20	<20	<20	<20	<20	40
A/chicken/Thanh Hoa/1351VTC/2021	H5N6	2.3.4.4h	<20	<20	<20	<20	<20	<20	80
A/muscovy duck/Nghe An/7006VTC/2020	H5N6	2.3.4.4h	<20	<20	<20	<20	<20	<20	40
A/muscovy duck/Nghe An/259VTC/2021	H5N6	2.3.4.4h	<20	<20	<20	<20	<20	<20	80

Phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu (HAI) cho thấy sự tương đồng về kháng nguyên giữa các vi rút cúm lưu hành trong nghiên cứu với các vi rút khuyến cáo sử dụng trong thành phần vắc xin hàng năm, là cơ sở để lựa chọn vi rút trong thành phần vắc xin cũng như hiệu quả bảo vệ của vắc-xin.

3.3. Kết quả đánh giá độ nhạy cảm với chất ức chế neuraminidase và khả năng lây nhiễm

Trong nghiên cứu này, khả năng lây nhiễm được nghiên cứu trên phôi gà đang phát triển 9 ngày tuổi, tất cả các vi rút subtype A/H5N6 đều cho thấy mức độ lây nhiễm cao đối với phôi gà. Lượng vi rút lây nhiễm trong dịch ối dao động từ 8,8 đến 9,2 log EID₅₀/ml (bảng 3). Sự thay thế axit amin trong neuraminidase của vi rút cúm liên quan đến việc đề kháng hoặc nhạy cảm với chất ức chế neuraminidase.

Xét nghiệm ức chế Neuraminidase được sử dụng để xác định tính nhạy cảm của vi rút cúm dựa trên tín hiệu huỳnh quang theo khuyến cáo của WHO [17]. Các vi rút cúm A/H5N6 lưu hành có giá trị IC50 từ 0,34 đến 3,4 đều nhạy với zanamivir và IC50 từ 0,1 đến 1 đều nhạy với oseltamivir. Không có giá trị IC50 chung cho tất cả các vi rút cúm A, mà dựa vào giá trị của vi rút tham chiếu mà xác định độ nhạy/kháng thuốc của từng subtype. Nếu tỷ lệ (IC50 của vi rút nghiên cứu)/(IC50 của vi rút tham chiếu) ≤ 10 thì các vi rút nghiên cứu nhạy với thuốc kháng neuraminidase. Nếu $10 < (IC50 \text{ của vi rút nghiên cứu}) / (IC50 \text{ của vi rút tham chiếu}) < 100$ thì vi rút kém nhạy với neuraminidase và $(IC50 \text{ của vi rút nghiên cứu}) / (IC50 \text{ của vi rút tham chiếu}) > 100$ thì vi rút không nhạy với chất kháng neuraminidase là zanamivir và oseltamivir.

Bảng 3. Đặc tính sinh học của các chủng vi rút cúm A/H5N6

Các chủng	Subtype	Chuẩn độ vi rút trong phôi trứng gà, log10 EID50/ml	Độ nhạy với Zanamivir/oseltamivir, IC50 nM
Virus tham chiếu			
A/wigeon/Sakha/1/2014	H5N8	6,2 ± 0,5	
A/rook/Chany/32/2015	H5N1	8,7 ± 0,4	
A/great crested grebe/Tyva/34/2016	H5N8	9,3 ± 0,3	1,05/0,55
A/chicken/Sergiyev Posad/38/2017	H5N8	9,2 ± 0,6	0,34/0,48
A/chicken/Kostroma/1718/2017	H5N2	8,9 ± 0,4	1,35/0,10
A/common gull/Saratov/1676/2018	H5N6	8,9 ± 0,6	1,75/0,48
Virus nghiên cứu			
A/chicken/Quang Tri/V4S4VTC/2020	H5N6	9,2 ± 0,3	
A/chicken/Thanh Hoa/V3S3VTC/2020	H5N6		1,80/0,44
A/muscovy duck/Nghe An/6873VTC/2020	H5N6		1,55/0,41
A/chicken/Nghe An/7007VTC/2020	H5N6		1,69/0,46
A/muscovy duck/Nghe An/7006VTC/2020	H5N6	8,8 ± 0,4	1,75/0,53
A/muscovy duck/Nghe An/259VTC/2021	H5N6		1,70/0,40
A/chicken/Thanh Hoa/1351VTC/2021	H5N6		1,67/0,46
A/chicken/Thanh Hoa/6081VTC/2020	H5N6	9,2 ± 0,3	1,59/0,45
A/duck/Thanh Hoa/5331VTC/2020	H5N6		1,55/0,55
A/chicken/Ha Tinh/514VTC/2021	H5N6	9,0 ± 0,5	2,13/0,52
A/duck/Thanh Hoa/4643VTC/2020	H5N6		1,87/0,45

4. KẾT LUẬN

- Vi rút cúm gia cầm độc lực cao A/H5N6 clade 2.3.4.4.h đã lưu hành trên gia cầm tại một số tỉnh miền Trung Việt Nam giai đoạn tháng 9/2020-3/2021, không phát hiện được sự lưu hành của vi rút cúm A/H5N1. Các vi rút cúm A/H5N6 có độ tương đồng cao về mặt kháng nguyên với chủng A/Guangdong/18SF020/2018 (H5N6) trong thành phần vắc xin năm 2018.

- Kết quả nghiên cứu cho thấy sự chiếm ưu thế của các chủng vi rút cúm A độc lực cao H5N6 Clade 2.3.4.4h mà không phát hiện ra các chủng vi rút cúm A H5N1. Các Subtype A H5N6 thuộc Clade 2.3.4.4h, có sự tương đồng cao với chủng A/Guangdong/18SF020/2018 (H5N6). Các chủng nghiên cứu đều có khả năng lây nhiễm cao trên phôi trứng gà.

- Nghiên cứu độ nhạy cảm của các chủng với các chất ức chế neuraminidase cho thấy các chủng vi rút cúm A H5N6 đang lưu hành hiện nay đều nhạy cảm với thuốc kháng vi rút oseltamivir và zanamivir. Điều này cho thấy thuốc oseltamivir và zanamivir vẫn phát huy tác dụng trong việc điều trị nếu đại dịch cúm xảy ra.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Krammer F., Smith G. J. D., Fouchier R. A. M., Peiris M., Kedzierska K., Doherty P. C., Palese P., Shaw M. L., Treanor J., Webster R. G., Sastrem A. G., *Influenza*, Nat. Rev. Dis. Primers, 2018, **4**:1-21.
2. Russell C. J., Hu M., Okda F. A., *Influenza hemagglutinin protein stability, activation, and pandemic risk*, Trends Microbiol, 2018, **26**:841- 853.
3. Tong S., Li Y., et al, *A distinct lineage of influenza A virus from bats*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2012, **109**:4269-4274.
4. Tong S., Zhu X., Li, Y., Shi M., Zhang J., Bourgeois M., Yang H., Chen X., Recuenco S., Gomez J., *New world bats harbor diverse influenza A viruses*, PLoS Pathog., 2013, **9**:e1003657.
5. Le T. H., Nguyen N. T., *Evolutionary dynamics of highly pathogenic avian influenza A/H5N1 HA clades and vaccine implementation in Vietnam*, Clin. Exp. Vaccine Res., 2014, **3**:117-127.
6. Nguyen D. T., Jang Y., Nguyen T. D., *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., 2017, **91**(5):e01708-16.
7. Nguyen L. T., Stevenson M. A., Firestone S. M., *Spatiotemporal and risk analysis of H5 highly pathogenic avian influenza in Vietnam, 2014 - 2017*, Prev. Vet. Med., 2020, **178**:104678.

8. Nguyễn Đăng Thọ, Nguyễn Hoàng Đăng, Đàm Thị Vui, Đỗ Thị Hoa, Mai Thùy Dương, Nguyễn Thị Điệp, Nguyễn Viết Không, Tô Long Thành, *Virus cúm gia cầm độc lực cao H5N6 ở Việt Nam năm 2014*, Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y, 2016, Tập XXIII, 1:18-28.
9. WHO, *Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza*, 2011.
10. <https://interlabservice.ru/catalog/reagents/?sid=1403&id=10991>
11. <https://interlabservice.ru/catalog/reagents/?sid=1185&id=5947>
12. <https://biochemmack.ru/catalog/element/16390/44861/>
13. <https://www.amplisens.ru/upload/iblock/dde/Influenza%20virus%20A-H5N1-FL.pdf>
14. *Báo cáo công tác phòng, chống dịch bệnh gia súc, gia cầm*, Tài liệu phục vụ Hội nghị trực tuyến thúc đẩy sản xuất nông nghiệp trong điều kiện dịch bệnh Covid-19, Cục Thú Y, Hà Nội ngày 12/3/2020.
15. Nguyen Trung Nam, Nguyen Hung Chi, Chu Hoang Ha, Do Thi Roan, NguyenThi Bich Nga, Le Thanh Hoa, *Evolutionary characterization of clades 2.3.4.4 h5n6 and 2.3.2.1c h5n1 hpai viruses in Vietnam (2013 - 2019) revealed distinct reassortants from distant spillovers*, Vietnam Journal of Biotechnology, 2022, **20**(2):231-243.
16. Nguyen Trung Nam, Nguyen Hung Chi, Chu Hoang Ha, Do Thi Roan, Nguyen Thi Bich Nga, Le Thanh Hoa. *Evolutionary characterization of clades 2.3.4.4 h5n6 and 2.3.2.1c h5n1 hpai viruses in Vietnam(2013-2019) revealed distinct reassortants from distant spillovers*, Vietnam Journal of Biotechnology, 2022, **20**(2):231-243.
17. <https://www.who.int/teams/global-influenza-programme/laboratory-network/quality-assurance/antiviral-susceptibility-influenza/neuraminidase-inhibitor>.

SUMMARY

BIOLOGICAL CHARACTERISTICS AND GENERAL CHARACTERISTICS OF A H5N6 INFLUENZA VIRUSES CIRCULATING IN SOME CENTRAL PROVINCE OF VIETNAM, PERIOD 2020-2021

Recently, beside high-pathogenic A/H5N1 avian influenza virus, A/H5N6 subtype also dominated and caused out-break of bird flu in central provinces of Vietnam. The surveillance had isolated 11 strains of A/H5N6 among 34 households with sick and/or death poultries, with none of A/H5N1. Analysis of phylogenetic tree showed close association of these A/H5N6 strains with A/common gull/Saratov/1676/2018 isolated in Russia, in 2018. Also, they had similar antigenic characteristics with vaccine candidate strain A/Guangdong/18SF020/2018 (H5N6),

as WHO recommendation in 2018. Investigation of virulent among these strains showed A/H5N6 having high pathogenicity and contagious feature with chicken embryos. Surveillance of avian influenza virus in poutries, detection of exchanging, compatible, and interaction of infection between human - poultry, plays important role in forecasting of emerging newly pandemic influenza virus in Vietnam.

Keywords: *Avian influenza virus, strain H5N6, antigenic characteristics H5N6, vi rút cúm gia cầm, chủng H5N6, đặc điểm kháng nguyên H5N6*

Nhận bài ngày 08 tháng 8 năm 2022

Phản biện xong ngày 12 tháng 10 năm 2022

Hoàn thiện ngày 14 tháng 11 năm 2022

⁽¹⁾ *Trung tâm Nhiệt đới Việt-Nga*

⁽²⁾ *Trung tâm Vi rút và công nghệ sinh học “Vector”, Rospotrebnadzor, Liên bang Nga*

Liên hệ: ThS. Trần Thị Nhài

Viện Y sinh Nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga

Địa chỉ: 63 Nguyễn Văn Huyền, Nghĩa Đô, Cầu Giấy, Hà Nội.

Điện thoại: 098.666.7234; Email: tbnnhai@yahoo.com

NGHIÊN CỨU TỶ LỆ PHÂN BỐ CÁC LOÀI *Nontuberculous mycobacteria* PHÂN LẬP ĐƯỢC TẠI BỆNH VIỆN 74 TRUNG ƯƠNG BẰNG PHƯƠNG PHÁP GIẢI TRÌNH TỰ GEN *hsp65*

VŨ THỊ THƯƠNG⁽¹⁾, PHẠM VIỆT HÙNG⁽¹⁾, PHẠM THỊ HÀ GIANG^(1,2), BÙI THỊ THANH NGÀ⁽¹⁾,
VŨ QUANG DIỄN⁽³⁾, GIANG MẠNH CHIẾN⁽³⁾, LƯU VĂN ĐOÀN⁽³⁾, LÊ THỊ LAN ANH⁽¹⁾

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây bên cạnh gánh nặng bệnh lao và lao kháng thuốc, bệnh do vi khuẩn lao không điển hình (*Nontuberculous mycobacteria* - NTM) gây ra cũng là một trong những vấn đề cấp bách đang được quan tâm. Vi khuẩn lao (*Mycobacterium tuberculosis* - MTB) và vi khuẩn NTM thuộc chi *Mycobacteria*, có thể gây bệnh cho người, vật nuôi và động vật hoang dã [1]. NTM là vi khuẩn hiếu khí, hình que, không di động, tồn tại trong môi trường tự nhiên như đất, nước, cát, sỏi đá, bụi... [2]. Dựa theo tốc độ sinh trưởng trên môi trường thạch Lowenstein-Jensen, NTM được chia thành 2 nhóm: *Mycobacteria* phát triển nhanh (RGM) có thời gian nuôi cấy dưới 7 ngày và *mycobacteria* phát triển chậm (SGM) có thời gian nuôi cấy kéo dài đến vài tuần [2]. Tỷ lệ mắc bệnh do NTM ngày càng gia tăng nhanh chóng trên toàn thế giới, ước tính 4,1-14,1 trường hợp mắc NTM trên 100 000 dân (2013) [2]. Tỷ lệ mắc NTM vào khoảng 10/100 000 dân tại Úc và Bắc Mỹ; 2/100 000 dân ở Châu Âu [3]. Hiện nay việc chẩn đoán phân biệt MTB và NTM vẫn là một thách thức lớn do sự giống nhau giữa MTB và NTM về biểu hiện lâm sàng, chụp X-quang phổi hay nhuộm Ziehl-Neelsen [4]. Tại Mỹ, trong số các bệnh nhân nghi ngờ mắc lao đa kháng thuốc do không đáp ứng điều trị từ 2-3 tháng bằng thuốc chống lao hàng 1, có khoảng 30% bệnh nhân nhiễm NTM chứ không phải là MTB [5]. Đối với MTB, Chương trình Chống lao Quốc gia và Bộ y tế đã có phác đồ điều trị tiêu chuẩn, còn với NTM cần phác đồ điều trị cá thể dựa trên loài NTM mắc phải, mỗi loài có phác đồ điều trị riêng biệt [6]. Vì vậy, việc định danh được loài NTM gây bệnh sẽ giúp bác sĩ lâm sàng lựa chọn phác đồ điều trị hiệu quả và rút ngắn thời gian điều trị cho bệnh nhân.

Dựa theo phương pháp truyền thống, có thể phân loài NTM thông qua quan sát hình thái khuẩn lạc, tốc độ tăng trưởng và sắc tố trên một số môi trường chọn lọc hoặc dựa trên các đặc điểm sinh hóa như thử nghiệm niacin, catalase, khử nitrat, urease, pyrazinamidase hoặc arylsulfatase [7], [8]. Tuy nhiên, các phương pháp này có những hạn chế do tốn thời gian và khó phân biệt chính xác tới cấp độ loài. Các xét nghiệm sinh hóa truyền thống dần được thay thế bằng các phương pháp phân tử để định danh loài NTM như lai đầu dò (LPA), multiplex PCR, realtime PCR,... hay giải trình tự gen đích [9]. Phương pháp LPA chỉ phát hiện được 27 loài NTM, multiplex PCR, realtime PCR chỉ phát hiện phân biệt MTB/NTM hoặc một số loài NTM loài phổ biến trong khi đó có hơn 200 loài NTM đã được phát hiện. Ngoài ra, thông tin về sự đa dạng loài NTM ở Việt Nam còn rất hạn chế. Vì vậy, phương pháp giải trình tự gen được coi là tiêu chuẩn vàng để định danh đến cấp độ loài NTM. Một số gen đích như *16S rRNA* mã hoá cho ribosom 16S RNA, gen *rpoB* mã hoá cho tiểu phần β -subunit RNA polymerase hay gen *hsp65* mã hoá cho protein 65 kDa