

# **NGHIÊN CỨU VIRUS CÚM A/H5N1 PHÂN DÒNG QUẢNG ĐÔNG VÀ PHÚC KIẾN GÂY BỆNH TRÊN GIA CẦM VÀ NGƯỜI TẠI VIỆT NAM QUA KHẢO SÁT ĐẶC ĐIỂM CHUỖI POLYPEPTIDE HA (H5)**

**NGUYỄN THỊ BÍCH NGA, LƯƠNG THỊ HỒNG VÂN,  
LÊ THANH HÒA**

## **ĐẶT VẤN ĐỀ**

Từ năm 2004 dịch cúm gia cầm A/H5N1 thể độc lực cao xuất hiện ở nhiều quốc gia trên thế giới trong đó có Việt Nam. Năm 2006 tạm lắng, từ đầu năm 2007 đến nay, dịch cúm tái bùng phát trên gia cầm ở nhiều địa phương trong cả nước và gây chết người với tỷ lệ cao. Một số công trình nghiên cứu về nguồn gốc phả hệ của virus cúm A/H5N1 trong thời gian vừa qua cho thấy đã có sự hòa trộn lưu hành giữa phân dòng Phúc Kiến (Fujian) thuộc nhóm kháng nguyên 2.3.4, với biến chủng phân dòng Quảng Đông thuộc clade 1.0, tất cả đều có nguồn gốc từ Trung Quốc (Nguyen và cs, 2008; Lê Thanh Hòa và cs, 2008). Đặc biệt, biến chủng cúm A/H5N1 thuộc phân dòng Phúc Kiến mới xuất hiện tại Việt Nam có tính gây bệnh cao đối với gia cầm và khả năng gây bệnh ở người với tỷ lệ tử vong cao hơn, chỉ tính từ cuối năm 2008 đến đầu năm 2009 đã có 5 người bị chết trong số 8 ca bệnh được xác định do mắc bệnh cúm gia cầm (>67,8%) (<http://www.moh.gov.vn>).

Trong số 8 phân đoạn (PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, MA, NS) của virus cúm A/H5N1 chứa hệ gen RNA một sợi đơn âm này, gen HA (H5) có vai trò quyết định tính độc lực, quá trình xâm nhiễm virus và khả năng gây ngưng kết hồng cầu và là đối tượng có sự thay đổi kháng nguyên liên tục trong quá trình tiến hóa và thích nghi (Bosch và cs, 1979; Baigent và McCauley, 2001; Cao Bảo Vân và cs, 2005). Phân tích đặc điểm biến đổi thành phần amino acid do gen H5 mã hóa cho phép xác định sự tiến hóa và phân

type, quan hệ tương đồng kháng nguyên- miễn dịch và phân định nhóm kháng nguyên (clade) củ chủng virus cúm A/H5N1 nghiên cứu (Lê Thanh Hòa và cs, 2008; Nguyen và cs, 2008). Các gen H5 của một số chủng phân lập tại Việt Nam đã được giải trình tự, bước đầu xác định rõ sự xuất hiện cúm gia cầm gây bệnh ở Việt Nam, đặc biệt là các tỉnh miền Bắc và miền Trung (Nguyen và cs, 2008).

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả phân tích thành phần polypeptide của gen H5, so sánh đặc điểm cấu trúc, điểm cắt của protease và đặc tính glycosyl hóa ở một số mẫu cúm A/H5N1 phân lập giai đoạn 2004 – 2008 gây bệnh trên gia cầm và trên người, nhằm đánh giá một số đặc tính sinh học của các chủng mới xâm nhập vào Việt Nam thuộc phân dòng Phúc Kiến (Trung Quốc) và mối liên quan chuỗi gen của chủng cúm A/H5N1 ở người và gia cầm.

## **NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP**

Bệnh phẩm nghiên cứu

Bệnh phẩm virus cúm A/H5N1 trong nghiên cứu này thu thập từ gia cầm bị bệnh tại một số tỉnh thành trong cả nước: Đồng Tháp (2008, 1 chủng), Hải Dương (208, 1 chủng), Nghệ An (2007, 2 chủng), An Giang (2005, 1 chủng), Hậu Giang (2005, 1 chủng); Vĩnh Long (2005, 1 chủng); Hà Nội (2004, 2 chủng). Chuỗi gen H5 thu từ mẫu người tử vong vì cúm năm 2007, do các tác giả khác thực hiện, đăng ký trong Ngân hàng gen (số: EU294369 v EU294370), được chúng tôi sử dụng để phân tích và so sánh với các

chúng thu từ gia cầm (Bảng 1).

Tách chiết RNA tổng số và thực hiện RT – PCR thu nhận gen H5

RNA tổng số được tách chiết sử dụng bộ hóa chất QIAGEN). Cặp mồi thu nhận toàn bộ gen H5 là H5F (5'- TCTGTCAAATGGAGAAAATAGTG-3') và H5R(5'-TTAAATGCAAATTCTGCATTG3-), cho sản phẩm có độ dài khoảng 1,7 kb. Phản ứng RT- PCR một bước (one-step) thu toàn bộ gen H5 cho thực hiện với chu trình nhiệt: 42°C trong 60 phút; sau đó 1 chu kỳ ở 95°C trong 10 phút; 35 chu kỳ (94°C/1phút; 55°C/1phút; 72°C/2phút); và chu kỳ cuối cùng ở 72°C trong 10 phút. Điện di trên agarose 1% để kiểm tra sản phẩm RT-PCR.

Thu nhận chuỗi gen H5 và phân tích số liệu

Trình tự amino acid gen H5 được xử lý bằng chương trình GENEDOC2.5 (Nicholas và Nicholas,

1997), sử dụng bộ mã vi sinh vật bậc thấp (bacterial code). Các chuỗi gen H5 tương ứng có trong ngân hàng gen (<http://www.ncbi.nlm.gov/>), được thu thập, trong đó có 2 chuỗi H5 từ virus cúm gây bệnh trên người Việt Nam, để đối chiếu và so sánh (Bảng 1).

Vị trí chuỗi nối giữa HA<sub>1</sub> và HA<sub>2</sub> được đặc biệt chú ý khi phân tích đánh giá đặc tính phân tử của gen H5. Các sai khác thành phần amino acid của gen H5, chức năng của các vị trí amino acid chủ chốt và các vị trí glycosyl hóa được phân tích và xem xét, so sánh với một số kết luận đã được nghiên cứu và khảo sát thực nghiệm trước đây (Vines, 1998; Cao Bảo Vân và cs, 2005; Hilleman, 2002)

Bảng 1. Danh sách các biến chủng A/H5N1 của Việt Nam và thế giới, cung cấp chuỗi polypeptide H5 sử dụng để so sánh và phân tích

S TT	Kí hiệu tên mẫu	Kí hiệu chủng	Dòng virus	Năm phân lập	Nước phân lập	Loài mắc	Số đăng kí GenBank
1	A-CkDT382-(08)(H5N1)	CkDT382-08	QD	2008	Việt Nam	Gà	Đang đăng kí
2	A-DKMB2-(08)(H5N1)	DkMB2-08	QD	2008	Việt Nam	Vịt	Đang đăng kí
3	A-DkAG-(05)(H5N1)	DkAG-05	QD	2005	Việt Nam	Vịt	EF051514
4	A-CkHG4-(05)(H5N1)	CkHG4-05	QD	2005	Việt Nam	Gà	EF051513
5	A-CkVL-(05)(H5N1)	CkVL-05	QD	2005	Việt Nam	Gà	EF057808
6	A-CkHD1-(04)(H5N1)	CkHD1-04	QD	2004	Việt Nam	Gà	EF057807
7	A-MdGL-(04)(H5N1)	MdGL-04	QD	2004	Việt Nam	Ngan	EF051515
8	A-DkNA72(07)(H5N1)	DkNA72-07	FJ	2007	Việt Nam	Vịt	Đang đăng kí
9	A-DkNA114(07)(H5N1)	DkNA114-07	FJ	2007	Việt Nam	Vịt	Đang đăng kí
10	A-VN-HN3 1342-cl1-(07)(H5N1)	A-VN-cl1-07	FJ	2007	Việt Nam	Người	EU294369
11	A-VN-HN3 1342-cl2-(07)(H5N1)	A-VN-cl2-07	FJ	2007	Việt Nam	Người	EU294370
12	A- CN-Jiangsu-(07)(H5N1)	A-CN-07	FJ	2007	Trung Quốc	Người	EU434686
13	A-Dk-Fujian-9713-(05)(H5N1)	DkCN9713-05	FJ	2005	Trung Quốc	Vịt	DQ992820
14	A-Dk-VN-37-(07)(H5N1)	DkVN37-07	FJ	2007	Việt Nam	Vịt	CY029655
15	A-Dk-VN-50(07)(H5N1)	DkVN50-07	FJ	2007	Việt Nam	Vịt	CY029711
16	A-Dk-Fujian9821-(05)(H5N1)	DkCN9821-05	FJ	2005	Trung Quốc	Vịt	DQ992821

Ghi chú: QD: Quảng Đông; FJ: Phúc Kiến

## KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Kết quả so sánh trình tự amino acid

Chuỗi polypeptide H5 của các chủng virus liệt kê ở Bảng 1, do chúng tôi thu nhận qua các năm: 2004 (CkHD1, MdGL), năm 2005 (DkAG, CkHG4, CkVL) năm 2007 (DkNA72, DkNA114) và 2008 (CkDT382, DKMB2) được so sánh với một số chủng phân lập từ người và gia cầm của Việt Nam và Trung Quốc. Mười sáu chuỗi H5 thuộc về dòng Quảng Đông (7chủng) có độ dài 568 amino acid, Phúc Kiến (9 chủng) có độ dài 567 amino acid được sử dụng so sánh. Thành phần amino acid của H5 của phân dòng Phúc Kiến và dòng Quảng Đông có 19 vị trí sai khác chủ yếu. Kết quả so sánh sai khác amino acid.

Chủng CkDT-08 (Đồng Tháp) tuy là chủng thuộc dòng Quảng Đông nhưng lại có sự khác biệt ở một số vị trí, so với các chủng phân lập nơi khác của chính dòng Quảng Đông. Vị trí 226 được cho là có vai trò quyết định khả năng gắn kết với thụ thể trên tế bào miễn cảm của người (Vines, 1998; Cao Bảo Vân, 2005; Nguyen và cs, 2008). Tất cả các chủng kể cả

chủng phân lập trên người Việt Nam đều có amino acid V (Valine) ở vị trí 226, nhưng ở chủng CkDT382-08 đã có sự khác biệt (V↔T). Như vậy, có thể chủng virus phân dòng Quảng Đông mới phân lập này (2008) đã có những đột biến ở một số vị trí quan trọng so với các chủng phân lập trước đây (2004,2005).

Các chủng phân lập trên người tử vong ở Việt Nam năm 2007 được xác định thuộc phân dòng Phúc Kiến, có mức độ biến đổi amino acid tương ứng với các chủng Phúc Kiến, có mức độ biến đổi amino acid tương ứng với các chủng Phúc Kiến, có mức độ biến đổi amino acid tương ứng với các chủng Phúc Kiến của Việt Nam và Trung Quốc

Kết quả phân tích chuỗi amino acid điểm cắt protease của H5

Điểm cắt của protease ở giữa polypeptide H5 phân định HA<sub>1</sub> và HA<sub>2</sub>. Trình tự mã hóa điểm cắt protease trong gen H5 của các chủng thuộc phân dòng Phúc Kiến đã xóa đi 1 amino acid Lysine (K) dẫn đến motif chuỗi nối ở các chủng Phúc Kiến bị thay đổi chỉ còn lại 4 amino acid (-RRRK-) so với motif (-RRRKK-) của các chủng Quảng Đông (Lé

Thanh Hòa, 2005, 2008).

Chủng CkDT382 được phân lập năm 2008 thuộc dòng Quảng Đông đã có sự khác biệt tại vị trí điểm cắt protease đó là sự thay đổi của amino acid R ↔ G (Arginine ↔ Glycine) (RRRKK ↔ GRRKK).

Sự thay đổi ở amino acid 226 (V ↔ T) của vị trí bám dính thụ thể cũng là vấn đề cần xem xét về khả năng lây nhiễm của virus gia cầm sang người.

Kết quả phân tích đặc tính glycosyl hóa của chuỗi protein H5

Các virus cúm A thường có mức độ đột biến điểm cao làm thay thế một số nucleotide tại những vị trí mà ở đó có thể tạo nên các amino acid mới có khả năng tiếp nhận cacbon hydrate tạo nên hiện tượng glycosyl hóa. Hiện tượng glycosyl hóa thường xảy ra tại các vị trí có dạng: N-X-(S/T), X: bất kỳ amino acid nào, trừ Proline, có thể làm thay đổi đặc tính kháng nguyên của chuỗi protein H5 (Baigent và McCauley, 2001).

Đây là điểm khác biệt về phương thức đột biến của protein HA ở các chủng phân dòng Quảng Đông, thường là đột biến “giãn nở” (expansion) amino acid tại vị trí chuỗi nối của HA<sub>1</sub>-HA<sub>2</sub>. Như vậy virus cúm A/H5N1 gia cầm ở Việt Nam có tỷ lệ tử vong cao hơn so với năm 2005 trở về trước, nguyên nhân là do đột biến xóa gen này dẫn đến sự gia tăng độc lực hay những nguyên nhân phân tử khác, là điều cần khám phá.

Hai chủng virus được phân lập trên gia cầm năm 2007 (DkNA 114) thuộc phân dòng Phúc Kiến. Kết quả này cho thấy tại Việt Nam hiện nay có sự đa nhiễm của chủng Quảng Đông (clade 1) và phân dòng Phúc Kiến (clade 2.3.4). (Lê Thanh Hòa, 2008; Nguyen và cs, 2008)

Bảng 2: Các vị trí amino acid có glycosyl hóa gen H5 của virus cúm A/H5N1

Số TT	Vị trí glycosyl hóa trong chuỗi gen H5	Phúc Kiến	Quảng Đông
I	27 – 29	NST	NST
II	39 - 41	NVT	NVT
III	171 – 172	NNT	NST
IV	181 - 183	NNT	NNT
V	392 – 394	NSS	NSS
VI	500 – 503	NGT	NGT
VII	559 - 561	NGS	NGS

Kết quả cho thấy tất cả các chủng đều có đầy đủ 7 vị trí, không có sự khác biệt về các vị trí liên quan đến khả năng glycosyl hóa giữa của chuỗi protein H5 giữa các phân dòng Phúc Kiến phân lập trên người và trên gia cầm năm 2007. So sánh giữa các chủng Phúc Kiến với các chủng Quảng Đông chỉ có 6 vị trí glycosyl hóa giống nhau. Tại vị trí thứ III, có sự thay thế (S ↔ N) ở các chủng Phúc Kiến tạo thành –NNT–, trong khi ở chủng Quảng Đông là –NST– (Bảng 2). Sự thay đổi này vẫn nằm trong khung của hiện tượng glycosyl hóa. Hiện tượng glycosyl hóa xảy ra nhiều hơn ở phần protein H5 đầu –NH<sub>2</sub> trong HA<sub>1</sub>(5 vị trí) so với HA<sub>2</sub> (2 vị trí) ở đầu –COOH.

Tuy nhiên đã có sự khác biệt khi phân tích đột biến thay đổi vùng bám dính thụ thể (tính xâm nhập

vào tế bào cảm nhiễm) giữa phân dòng Phúc Kiến và Quảng Đông tại vị trí amino acid 145: S ↔ L. Đặc biệt ở chủng CkD382-08 tại vị trí 149 đã bị thay đổi từ S ↔ A (Bảng 2)

## KẾT LUẬN

Chuỗi nối HA<sub>1</sub>-HA<sub>2</sub> từ motif (-RRRKK-) (Quảng Đông) biến đổi thành (-RRRK-) (Phúc Kiến); vị trí 226 là Valine (V) ở tất cả các chủng, khác với Threonine (T) ở chủng CkDT382-08. Hiện tượng glycosyl hóa (7 vị trí) vẫn có đầy đủ, tuy vị trí số III ở phân dòng Quảng Đông là NST và phân dòng Phúc Kiến là NNT. Các chủng phân lập trên người ở Việt Nam không có đặc tính nào khác biệt đặc biệt với các chủng phân lập trên gia cầm. Hiện nay tại Việt Nam đã có sự hòa trộn lưu hành giữa phân dòng Phúc Kiến (Fujian) thuộc subclade 2.3.4 cùng với biến chủng dòng Quảng Đông thuộc clade 1.0, tất cả đều có thể gây bệnh và gây tử vong ở người

## SUMMARY

The entire H5 polypeptide (Hemagglutinin subtype 50 for the Guangdong (7isolates) and Fujian sublinages (2 isoates) collected by us in Vietnam during 2004-2008 was obtained, sequenced and comparatively analyzed with those of Vietnam and China (Guangdong and Fujian, isolated from human and poultry) for composition, structure, the sequence of protease cleavage between HA<sub>1</sub> and HA<sub>2</sub> and glycosylation. The H5 gene is 1707 bp (568 amino acid) at the Guangdong and 1704 bp at the Fujian strains. Results revealed that there are a number of variations in the polypeptide H5; at the protease site linking HA<sub>1</sub> – HA<sub>2</sub>, motif (-RRRKK-) (Guangdong) is replaced by (RRRK-) (Fujian); and at 226<sup>th</sup> position, Valine (V) found in all the strains but Threonine (T) in the CkDT382-08 isolate Glycosylation (7 sites) remain available in all the strains, although at the III site, strains of the special changes in comparison to those of avian origin. Studies indicated that currently in Vietnam, there is a mix of strains of the Fujian (subclade: 2.3.4) and Guangdong (clade 1.0) co-circulating to infect and cause fatality in humans.

Keywords: A/H5N1, Hemagglutinin (HA), Guangdong sublineage, pathogenicity, mutation, glycosylation.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Baigent ST and MccCauey JW (2001). Glycosyl of haemagglutinin and stalk-length of neuraminidase combine to regulate the growth of avian influenza viruses in tissue culture. *Virus Res* 79(1-2): 177-185
- Bosch FX, Orlich M, Klenk HD and Root R (1979). The structure of the hemagglutinin: a determinant for the pathogenicity of Influenza virus. *Virology* 95: 197-207
- Cao Bảo Vân, Võ Hồ Hồng Hà, Ngô Thanh Long, Lê Hà Tâm Dương (2005). Đánh giá về độc tính và khả năng lây cho người của virus cúm H/H5N1 qua các vụ dịch 2004-2005 tại miền Nam Việt Nam qua giám sát đột biến gene. *Tạp chí Y học dự phòng, tập*

15, số 6, tr.5-10.

4. Hilleman M. (2002). Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control". *Vaccine* 20 (25-26): 3068-3087.

5. Lê Thanh Hòa, Nguyễn Thị Bích Nga, Trần Quang Vui, Nguyễn Mạnh Kiên, Nguyễn Xuân Vũ, Lê Trần Bình (2008). Phát hiện biến chủng virus cúm A/H5N1 dòng Phúc Kiến gây bệnh trên gia cầm/người tại Việt Nam; trang 699-702. Hội nghị khoa học toàn quốc lần thứ tư: Hóa sinh và Sinh học phân tử phục vụ nông, sinh, y học và công nghiệp thực phẩm (Hà Nội, 16-17/10/2008). NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội (924 trang).

6. Nguyen TD, Nguyen TV, Vijaykrishna D, Webster RG, Guan Y, Peiris MJS and Smith GJD (2008). Multiple Sublineages of Influenza A Virus(H5N1), Vietnam, 2005-2007. *Emerging Infectious Diseases* 14(4): 632-636

7. Nicholas KB and Nicholas HB (1997). Genedoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments

8. Vines A. (1998). The role of influenza A virus hemagglutinin residues 226 and 228 in receptor specificity and host range restriction. *J. Virol* 72(9): 7626-7631.