

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG NGHIỆP HÀ NỘI**

NGUYỄN TÙNG

**NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐẶC TÍNH SINH HỌC CỦA VI RÚT
CÚM A/H5N1 CLADE 7 PHÂN LẬP Ở VIỆT NAM**

LUẬN ÁN TIẾN SỸ

CHUYÊN NGÀNH: KỸ SINH TRÙNG VÀ VI SINH VẬT HỌC THÚ Y

HÀ NỘI, NĂM 2013

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG NGHIỆP HÀ NỘI**

NGUYỄN TÙNG

**NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐẶC TÍNH SINH HỌC CỦA VI RÚT
CÚM A/H5N1 CLADE 7 PHÂN LẬP Ở VIỆT NAM**

CHUYÊN NGÀNH: KỸ SINH TRÙNG VÀ VI SINH VẬT HỌC THÚ Y

MÃ SỐ: 62.64.01.04

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

TS NGUYỄN BÁ HIÊN

TS NGUYỄN VĂN CẨM

HÀ NỘI, NĂM 2013

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan: công trình khoa học này là của tôi, các số liệu và kết quả nghiên cứu trong luận án này trung thực và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tôi xin cam đoan: mọi sự giúp đỡ cho việc thực hiện đề tài nghiên cứu và hoàn thành luận án đều được cảm ơn. Các thông tin trích dẫn trong luận án đều chính xác và được nêu rõ nguồn gốc.

Hà nội, tháng 10 năm 2013
Tác giả

Nguyễn Tùng

LỜI CẢM ƠN

Trong suốt quá trình thực hiện đề tài và hoàn thành bản luận án, tôi luôn nhận được sự giúp đỡ của nhiều tổ chức và cá nhân. Nhân dịp này tôi xin cảm ơn Ban Giám hiệu, Ban Quản lý Đào tạo, Khoa Thú y, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội đã tạo điều kiện cho tôi được theo học chương trình đào tạo nghiên cứu sinh tại trường.

Tôi xin chân thành cảm ơn Lãnh đạo và các cán bộ của Trung tâm Chẩn đoán Thú y đã tạo điều kiện thuận lợi và giúp đỡ cho tôi hoàn thành đề tài nghiên cứu của mình.

Tôi xin cảm ơn tập thể cán bộ thuộc bộ môn Vi sinh vật – Truyền nhiễm, khoa Thú y, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội, đã giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến Thầy giáo, TS Nguyễn Bá Hiên, Khoa Thú y, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội và TS Nguyễn Văn Cẩm – Hội Thú y, là những người thầy hướng dẫn khoa học, trực tiếp giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện đề tài và hoàn thành luận án.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến những đồng nghiệp công tác tại các tổ chức và cơ quan quốc tế như FAO, CDC, USDA đã hỗ trợ và cung cấp tài liệu cũng như các nguyên liệu cần thiết để tôi thực hiện nghiên cứu.

Tôi luôn biết ơn gia đình, bạn bè và đồng nghiệp đã luôn bên cạnh, động viên và giúp đỡ tôi hoàn thành nghiên cứu và luận án.

Hà Nội, tháng 10 năm 2013

Tác giả

Nguyễn Tùng

MỤC LỤC

	Trang
Lời cảm ơn	i
Lời cam đoan	ii
Mục lục	iii
Danh mục các ký hiệu, các chữ viết tắt	v
Danh mục các bảng	vi
Danh mục các hình	viii
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1. Lịch sử bệnh cúm gia cầm	4
1.1.1. Lịch sử bệnh trên thế giới	4
1.1.2. Bệnh cúm gia cầm ở Việt Nam	7
1.2. Nguyên nhân của bệnh cúm gia cầm	9
1.2.1. Đặc điểm sinh học phân tử của virus cúm gia cầm	10
1.2.2. Kháng nguyên của virus cúm gia cầm	14
1.2.3. Đặc điểm tiến hóa và hình thành genotype của virus cúm gia cầm giai đoạn 1996-2008	20
1.2.4. Tính thích ứng đa vật chủ của virus cúm A/H5N1	29
1.2.5. Cơ chế xâm nhiễm gây bệnh của virus cúm A trong tế bào vật chủ	30
1.2.6. Độc lực và khả năng gây bệnh của virus cúm gia cầm	32
1.2.7. Triệu chứng lâm sàng của gia cầm mắc bệnh cúm	34
1.2.8. Bệnh tích của gia cầm mắc cúm gia cầm	36
1.3. Chẩn đoán bệnh	36
1.3.1. Chẩn đoán dựa vào dịch tễ học	36
1.3.2. Chẩn đoán dựa vào triệu chứng và bệnh tích	36
1.3.3. Chẩn đoán phòng thí nghiệm	37
1.4. Vaccin phòng bệnh cúm gia cầm	37
1.4.1. Tình hình sử dụng vắc-xin cúm gia cầm trên thế giới	39
1.4.2. Tình hình sử dụng vắc-xin cúm gia cầm tại Việt Nam	41
1.5. Tình hình nghiên cứu cúm gia cầm ở Việt Nam	42
CHƯƠNG 2. NỘI DUNG – NGUYÊN LIỆU – PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	44
2.1. Nội dung	46
2.1.1. Phân lập và giám định virus cúm gia cầm A/H5N1 từ các mẫu dịch ngoáy ở nhóp	46
2.1.2. Xác định đặc tính di truyền học của virus cúm A/H5N1 clade 7	46
2.1.3. Xác định một số đặc tính sinh học của virus A/H5N1 clade 7	46
2.1.4. Xác định đặc tính kháng nguyên (tính tương đồng kháng nguyên)	46
2.1.5. Xác định hiệu lực của vaccin H5N1 Re-1	46
2.2. Địa điểm nghiên cứu	46
2.3. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu	47
2.3.1. Vật liệu nghiên cứu	47
2.3.2. Phương pháp nghiên cứu	47

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN	59
3.1. Phân lập và giám định virus cúm gia cầm H5N1 clade 7	59
3.2. Xác định đặc tính di truyền của virus cúm A/H5N1 thuộc clade 7 phân lập ở Việt Nam	62
3.2.1. Giải trình tự gen HA (H5) và phân tích cây phả hệ sử dụng chuỗi gen H5	62
3.2.2. Giải trình tự gen NA(N1) và phân tích cây phả hệ dựa trên chuỗi nucleotide của gen N1	71
3.2.3. Giải trình tự gen M và phân tích cây phả hệ dựa trên chuỗi nucleotide của gen M	78
3.3. Xác định một số đặc tính sinh học của chủng virus A/H5N1 clade 7 A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008	84
3.3.1. Tính thích ứng trên phôi gà (xác định chỉ số EID ₅₀)	84
3.3.2. Tính thích ứng trên tế bào xơ phôi gà (xác định chỉ số TCID ₅₀)	89
3.3.3. Kết quả xác định độc lực của virus cúm A/H5N1 clade 7	92
3.3.4. Kết quả đánh giá độ bài thải virus trên động vật thí nghiệm	103
3.3.5. Đánh giá khả năng nhiễm đa phủ tạng của virus cúm A/H5N1 clade 7	106
3.3.6. Xác định đặc tính kháng nguyên của các chủng virus cúm A/H5N1 clade 7 phân lập ở Việt Nam.	113
3.3.7. Đánh giá khả năng bảo hộ của vaccin Re-1 đối với virus cúm A/H5N1HA clade 7 trên gà.	116
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	121
Tài liệu tham khảo	124
Công trình công bố liên quan đến luận án	135
Phụ lục	136

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Viết tắt	Tên đầy đủ
AI	Avian Influenza
CDC	Center of Disease Control and Prevention
CEF	Chicken Embryo Fibroblast
CK	Chicken
cs	cộng sự
Ct	Cycle Threshold
DEF	Duck Embryo Fibroblast
Dk	Duck
EID ₅₀	Embryo Infection Dose 50%
ELD ₅₀	Embryo Lethal Dose 50%
FAO	Food and Agriculture Organisation
HA	Hemagglutinin
HI	Hemagglutination Inhibition
HPAI	Highly Pathogenic Avian Influenza
IHC	Immuno Histochemistry
LPAI	Low Pathogenic Avian Influenza
M	Matrix protein
MDCK	Mardine Darby Canine Kidney
MDEF	Muscovy Duck Embryo Fibroblast
MDT	Mean Death Time
MEGA	Molecular Evolution Genetic Analysis
NA	Neuraminidase
NCBI	National Center for Biotechnonology Information
NCVD	National Centre for Veterinary Diagnostics
NP	Nucleoprotein
NS	Non-strutural protein
OIE	Office International des Epizooties
PA	Polymerase acidic
PB1	Polymerase basic protein 1
PB2	Polymerase basic protein 2
RNA	Ribonucleic acid
RRT-PCR	Realtime Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction
TCID ₅₀	Tissue Culture Infection Dose 50%
WHO	World Health Organisation

DANH MỤC CÁC BẢNG

TT	Tên bảng	Trang
1.1.	Tổng số trường hợp nhiễm cúm gia cầm A/H5N1 ở người báo cáo cho WHO đến 4/2012	6
1.2.	Một số đặc điểm triệu chứng của gia cầm mắc cúm A/H5N1	34
1.3.	Một số loại vaccin phòng cúm gia cầm H5N1 đang được sử dụng trên thế giới	40
1.4.	Kết quả tiêm phòng vaccin cúm gia cầm chương trình quốc gia	41
2.1.	Bảng tổng hợp số liệu tính toán theo phương pháp Reed-Muench	49
2.2.	Primer và probe để phát hiện virus cúm gia cầm A/H5N1	52
2.3.	Chuẩn bị mix (hỗn hợp phản ứng cho Realtime RT-PCR	52
2.4.	Chuẩn bị mix (hỗn hợp phản ứng) RT-PCR giải trình tự gen	55
2.5.	Trình tự primer để giải trình tự gen(theo quy trình CDC)	56
3.1.	Kết quả xét nghiệm virus từ chương trình giám sát biên giới	60
3.2.	Kết quả giải trình tự gen và phân tích cây phát sinh loài các mẫu virus cúm A/ H5N1 phát hiện ở Lạng Sơn	62
3.3.	Danh sách các chủng virus cúm A/H5N1 dùng để so sánh và lập cây phát sinh loài dựa trên gen H5	66
3.4.	So sánh mức độ khác biệt về di truyền trên gen HA của 5 chủng virus A/H5N1 clade 7 với một số chủng tham chiếu	69
3.5.	Danh sách các chủng virus A/H5N1 sử dụng để so sánh và lập cây phát sinh loài dựa trên N1	74
3.6.	So sánh mức độ khác biệt về di truyền trên gen N1 của 5 chủng virus cúm A/H5N1 clade 7 với một số chủng tham chiếu	77
3.7.	Danh sách các chủng virus cúm A/H5N1 sử dụng để so sánh và lập cây phát sinh loài dựa trên gen M	80
3.8.	So sánh mức độ khác biệt về di truyền trên gen M của 5 chủng virus cúm A/H5N1 clade 7 với một số chủng tham chiếu	83
3.9.	Theo dõi thời gian gây chết phôi	85
3.10.	Kết quả theo dõi tỷ lệ sống/chết của phôi trứng khi gây nhiễm virus A/Chicken/Vietnam/NCVD-016/2008	86
3.11.	Theo dõi thời gian virus gây nhiễm lên tế bào CEF	89
3.12.	Kết quả theo dõi bệnh tích tế bào trên CEF khi gây nhiễm virus A/Chicken/Vietnam/NCVD-016/2008	90
3.13.	Các axit amin vùng “cleavage site” của virus cúm H5N1 độc lực cao clade 7 và một số chủng virus tham chiếu	93
3.14.	Kết quả đánh giá độc lực của virus cúm A/H5N1 clade 7 trên gia cầm	95
3.15.	Kết quả theo dõi lâm sàng của gà thí nghiệm	96
3.16.	Đánh giá độ bài thải virus khi gây nhiễm bằng virus A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008	103
3.17.	Kết quả xét nghiệm RRT-PCR đối với một số loại phủ tạng gà gây bệnh bằng virus A/H5N1 clade 7 và chuyển đổi sang nồng độ virus	107

3.18.	Phân bố bệnh tích vi thể và nhuộm IHC phát hiện kháng nguyên virus cúm H5N1A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008	109
3.19.	Kết quả xác định đặc tính kháng nguyên của virus cúm A/H5N1 clade 7 phân lập được bằng phản ứng HI	115
3.20.	Kết quả theo dõi thí nghiệm công cường độ gà tiêm vacxin cúm gia cầm H5N1 Re-1	118

DANH MỤC CÁC HÌNH

TT	Tên hình	Trang
1.1.	Bản đồ phân bố các ca cúm A/H5N1 trên thế giới (tính đến 2009)	5
1.2.	Biểu đồ biểu diễn dịch cúm gia cầm do virus cúm A/H5N1 theo thời gian	8
1.3.	(A) Mô phỏng hình thái của virus cúm, (B) Hình thái kính hiển vi điện tử	10
1.4.	Mô hình hệ gen virus cúm A	14
1.5.	Mô phỏng cấu trúc kháng nguyên Haemalutinin và Neuraminidase	15
1.6.	Sơ đồ minh họa đột biến điểm của các phân đoạn gen virus cúm A	20
1.7.	Sơ đồ minh họa hiện tượng trộn kháng nguyên của virus cúm A/H5N1 và H3N2	20
1.8.	Cây phả hệ dựa trên gen HA các virus cúm A/H5N1 độc lực cao	22
1.9.	Sự tiến hóa của các clade virus A/H5N1 theo thời gian	23
1.10.	Sự phân bố của các clades virus cúm gia cầm trên thế giới từ 2003-2009	24
1.11.	Thời gian xuất hiện của các clade H5N1 ở Việt Nam từ 2001-2007	25
1.12.	Hình 1.12. Sự phân bố các clade virus A/H5N1 khác nhau theo không gian	27
1.13.	Các genotype của virus cúm gia cầm A/H5N1 độc lực cao	28
1.14.	Mối quan hệ lây nhiễm và thích ứng các loài vật chủ của virus cúm A	30
1.15.	Mô hình cơ chế xâm nhiễm và nhân lên của virus cúm A ở tế bào chủ	31
1.16.	Minh họa vùng “Cleavage site” của virus cúm độc lực thấp (LPAI)	33
2.1.	Sơ đồ bố trí primer giải trình tự gen H5, N1 và M virus cúm A/H5N1	52
3.1.	Hình 3.1. Bản đồ nơi phát hiện được virus A/H5N1 clade 7	61
3.2.	Cây phả hệ dựa trên gen H5 của các virus A/H5N1 clade 7	62
3.3.	Hiện tượng chèn và xóa các axit amin tại vị trí cleavage site của các chủng virus A/H5N1 clade 7 phân lập ở Việt Nam	71
3.4.	Cây phả hệ dựa trên gen N1 các virus A/H5N1 clade 7	73
3.5.	Cây phả hệ dựa trên gen M các virus A/H5N1 clade 7	79
3.6.	Kiểm tra đặc tính gây ngưng kết hồng cầu (phản ứng HA)	87
3.7.	Kết quả kiểm tra bệnh tích phôi sau khi gây nhiễm bằng chủng virus cúm A/H5N1 clade 7 phân lập tại Việt Nam	88
3.8.	Hình ảnh tế bào CEF và DEF khi phân lập và chuẩn độ virus	92
3.9.	Một số hình ảnh bệnh tích đại thể gà gây bệnh bằng virus A/H5N1 Clade 7 (A/Chicken/Vietnam/NCVD 016)	98
3.10.	Một số hình ảnh thể hiện bệnh tích đại thể ở gà gây bệnh bằng virus A/H5N1 clade 2.3.4 và 2.3.2	99