

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN

NGUYỄN LÊ KHÁNH HẰNG

NGHIÊN CỨU CĂN NGUYÊN CỦA CÁC VỤ DỊCH
CÚM NGƯỜI ĐẦU NHỮNG NĂM 2000
TẠI MIỀN BẮC VIỆT NAM

CHUYÊN NGÀNH : VI SINH VẬT HỌC
MÃ SỐ : 62 42 40 01

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

HÀ NỘI – 2010

**CÔNG TRÌNH ĐƯỢC HOÀN THÀNH TẠI:
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN**

Người hướng dẫn khoa học:

- 1. TS. Lê Thị Quỳnh Mai**
- 2. PGS. TS. Kiều Hữu Ảnh**

Phản biện 1: GS.TS. Phạm Văn Ty

Phản biện 2: PGS.TS. Nguyễn Trần Hiễn

Phản biện 3: PGS.TS. Đinh Duy Kháng

Luận án sẽ được bảo vệ trước hội đồng chấm luận án cấp Nhà nước họp tại Trường Đại học Khoa học Tự nhiên

Vào hồi.....ngàythángnăm 2010.

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư Viện Quốc gia
- Thư Viện Đại học Quốc gia Hà Nội
- Thư Viện Trường Đại học Khoa học Tự nhiên

**DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CỦA
TÁC GIẢ ĐÃ CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. **Huỳnh Phương Liên, Nguyễn Lê Khánh Hằng, Nghiêm Kim Hà, Nguyễn Công Đoàn, Hiroshi Suzuki, Reiko Saito (2005)**, “Nghiên cứu các chủng virút cúm và các virút gây viêm đường hô hấp cấp ở Hà nội, 2001”, *Tạp chí Y học Thực hành* (505), 3, tr. 23-26.
2. **Lê Quỳnh Mai, Nguyễn Lê Khánh Hằng, Đinh Tuấn Đức, Hoàng Vũ Mai Phương, Trần Thị Thu Hương, Trần Thị Nguyễn Hòa và cs (2005)**, “Nghiên cứu quy trình chẩn đoán sớm nhiễm virút cúm A/H5N1”, *Tạp chí Y học Dự phòng*, XV, 5 (76), tr. 12 – 16.
3. **Q. Mai Le, Maki Kiso, Kazuhiko Someya, Yuko T. Sakai, T. Hien Nguyen, Khanh L.K Nguyen, N. Dinh Pham, Ha H. Nguyen, Shinya Yamada, Yukiko Muramoto, Taisuke Horimoto, Ayato Takada, Hideo Goto, Takashi Suzuki, Yasuo Suzuki and Yoshihiro Kawaoka (2005)**, “Avian flu: isolation of drug-resistant H5N1 virus”, *Nature*, 437, pp. 1108.
4. **Hang L.K. Nguyen, Reiko Saito, Ha K. Nghiem, Makoto Nishikawa, Yugo Shobugawa, Doan C. Nguyen, Long T. Hoang, Lien P. Huynh, Hiroshi Suzuki (2007)**, “Epidemiology of Influenza in Hanoi, Vietnam, from 2001 to 2003”, *Journal of Infection* , 55, pp. 58-63.
5. **Danjuan Li, Reiko Saito, Mai T. Q. Le, Hang L. K. Nguyen, Yaushi Suzuki, Yugo Shobugawa, Duc T. Dinh, Phuong V.M. Hoang, Huong T.T. Tran, Ha K. Nghiem, Long T. Hoang, Lien P. Huynh, Hien T. Nguyen, Makoto Nishikawa, and Hiroshi Suzuki (2008)**, “Genetic Analysis of Influenza A/H3N2 and A/H1N1 Viruses circulating in Vietnam from 2001 to 2006”. *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (2), pp. 399-405.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Virút cúm (Influenza virus) là tác nhân chính gây ra các vụ dịch cúm hàng năm tại các nước nhiệt đới và cận nhiệt đới với tỷ lệ mắc và tử vong cao. Các vụ dịch cúm xảy ra thường do sự thay đổi tính kháng nguyên: thay đổi nhỏ kháng nguyên (antigenic drift) hoặc thay đổi lớn kháng nguyên (antigenic shift). Lịch sử đã ghi nhận các vụ đại dịch cúm xảy ra trong thế kỷ XX như đại dịch cúm Tây Ban Nha năm 1918 (A/H1N1), đại dịch cúm Châu Á năm 1957 (A/H2N2), đại dịch cúm Hồng Kông năm 1968 (A/H3N2)...là do sự trao đổi vật liệu di truyền giữa virút cúm người và virút cúm gia cầm.

Dịch cúm gia cầm do virút cúm A/H5N1 độc lực cao đã xuất hiện tại Hàn Quốc tháng 12/2003 và lan rộng sang một số nước Châu Á đang là mối quan tâm lo ngại hàng đầu. Cuối năm 2003, dịch cúm gia cầm A/H5N1 đã xuất hiện tại Việt Nam. Đến nay, dịch đã xuất hiện ở 61 tỉnh/thành trong cả nước với số gia cầm đã tiêu hủy là hơn 50 triệu con trong tổng số 300 triệu gia cầm mắc bệnh. Tính đến tháng 5/2009, đã có 15 quốc gia và vùng lãnh thổ xuất hiện virút cúm A/H5N1 trên người với 436 trường hợp mắc và 262 trường hợp tử vong, chiếm tỷ lệ 60%. Việt Nam là nước thứ hai trên thế giới xuất hiện virút cúm A/H5N1 trên người (28/12/2003). Kể từ trường hợp mắc đầu tiên cho đến nay (5/2009) tại Việt Nam có 111 trường hợp được xác định nhiễm cúm A/H5N1 với 56 ca tử vong, chiếm tỷ lệ 50,5%. Dịch xảy ra tại 36/64 tỉnh/ thành phố.

Sự lưu hành đồng thời virút cúm theo mùa (A/H1N1, A/H3N2 và B) và virút cúm A/H5N1 tại Việt Nam cũng như một số nước khác trên thế giới đã gây nên mối lo ngại về khả năng xuất hiện chủng virút cúm mới, có khả năng lây truyền dễ dàng từ người sang người. Vì vậy, giám sát sự lưu hành của các chủng virút cúm mùa và virút cúm A/H5N1 cũng như theo dõi đặc điểm di truyền học, sự biến đổi tính kháng nguyên là hết sức cần thiết. Xuất phát từ lý do trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài: ***“Nghiên cứu căn nguyên của các vụ dịch cúm người đầu những năm 2000 tại Miền Bắc Việt Nam ”***

Với mục tiêu:

1. *Xác định căn nguyên của các vụ dịch cúm trong giai đoạn 2001-2009.*
2. *Tìm hiểu đặc điểm di truyền học, tính kháng nguyên của các chủng virút cúm mùa A/H1N1, A/H3N2, B và virút cúm A/H5N1 lưu hành trong giai đoạn 2001-2009.*

Những đóng góp mới của luận án

1. Xác định được căn nguyên của các vụ dịch cúm cũng như thời gian lưu hành của virút cúm tại Miền Bắc Việt Nam giai đoạn 2001-2009. Điều này rất có ý nghĩa vì nếu dự đoán được thời điểm diễn ra vụ dịch có thể chủ động trong công tác phòng chống dịch.

2. Chứng minh sự tương đồng kháng nguyên của virút cúm mùa A/H1N1 và A/H3N2 lưu hành tại Miền Bắc Việt Nam với các chủng virút cúm được TCYTTG khuyến cáo cho sản xuất vắc xin khu vực Bắc Bán cầu theo từng năm.
3. Chứng minh sự không thay đổi các gen quyết định gắn bám của virút cúm A/H5N1 với tế bào khi chuyển túc chủ từ loài chim sang người. Điều này giải thích cho việc virút cúm A/H5N1 đã không lan truyền rộng rãi ở quần thể người.
4. Chứng minh được sự tiến hóa và lan truyền của virút cúm A/H5N1 dường như tại chính khu vực mà nó lưu hành và không phụ thuộc vào sự trao đổi tích hợp với virút cúm mới do chim di cư mang đến
5. Phát hiện được một số đột biến, thay đổi axit amin ở một số vị trí trên protein NA cụ thể là vị trí H275Y và I117V liên quan đến sự kháng hoặc giảm độ nhạy của thuốc. Điều này có ý nghĩa quan trọng trong công tác điều trị và dự phòng bệnh cúm.

Bố cục luận án: Luận án gồm 117 trang gồm:

Đặt vấn đề	2 trang
Chương 1: Tổng quan	30 trang
Chương 2: Đối tượng và phương pháp nghiên cứu	22 trang
Chương 3: Kết quả và bàn luận	60 trang
Kết luận	2 trang
Kiến nghị	1 trang

Luận án có 24 bảng và 28 hình vẽ. Trong 156 tài liệu tham khảo có 10 tài liệu tiếng Việt và 146 tài liệu tiếng Anh.

Chương 1 TỔNG QUAN

1.1. Virút cúm

1.1.1. Đặc điểm chung

Virút cúm thuộc họ *Orthomyxoviridae*, bao gồm 5 nhóm virút: virút cúm A, virút cúm B, virút cúm C, virút Thogoto và virút Isa. Virút cúm A được chia thành các phân týp dựa vào cấu trúc kháng nguyên bề mặt là HA (H1 –H16) và NA (N1-N9). Virút cúm B hầu như không quan sát được sự thay đổi về kháng nguyên bề mặt. Protein HA gây ngưng kết hồng cầu, có vai trò quyết định trong việc gắn virút vào tế bào chủ, protein NA có chức năng phá vỡ liên kết giữa virút và tế bào chủ để giải phóng virút ra khỏi tế bào nhiễm.

Gemone của virút cúm A, B gồm 8 phân đoạn và của virút cúm C là 7 phân đoạn ARN sợi đơn âm, có chiều dài khoảng 10 đến 15 kb. Mỗi phân đoạn

mã hoá cho 1 hoặc 2 protein cấu trúc hoặc không cấu trúc: (7 protein cấu trúc: PB1, PB2, PA, HA, NA, NP và M1 và 3 protein không cấu trúc- nonstructural protein: NS1, NS2 và M2 đối với virút cúm A và NB đối với virút cúm B - chỉ thấy ở tế bào nhiễm virút).

1.1.2. Tính đa dạng về vật liệu di truyền và sự tiến hóa của virút cúm A

Virút cúm A có đối tượng gây nhiễm phong phú: gia cầm (gà, vịt, ngan...), thủy cầm, chim di cư, động vật có vú và người nên vật liệu di truyền ARN của virút luôn chịu tác động của vật chủ trong quá trình thâm nhiễm, phiên mã, nhân lên, tích hợp, nảy chồi và giải phóng thế hệ mới ra khỏi tế bào chủ. Kết quả của quá trình này là các biến đổi trong vật liệu di truyền (đột biến - mutation), hoặc có sự pha trộn các phân đoạn gen của virút cúm A khác nhau khi cùng đồng nhiễm trên một tế bào (trao đổi và tích hợp - reassortment). Hệ quả của nó là sự thay đổi kháng nguyên: **thay đổi nhỏ kháng nguyên (antigenic drift)** hoặc **thay đổi lớn kháng nguyên (antigenic shift)**. Đó chính là nguyên nhân gây ra các vụ dịch lẻ tẻ hoặc đại dịch cúm. Những thay đổi trong vật liệu di truyền của virút cúm A là động lực cho sự tiến hóa của nó.

1.1.3. Sự tiến hóa của virút cúm B

Virút cúm B chỉ lưu hành ở người và hải cẩu. Khác với virút cúm A, sự tiến hóa của virút cúm B xảy ra với tần suất thấp. Đến nay, virút cúm B lưu hành trên thế giới được chia thành 2 dòng: dòng B/Victoria/2/87-like virus và dòng B/Yamagata/16/88-like virus.

1.2. Tình hình dịch cúm trên thế giới

Trong thế kỷ XX đã ghi nhận 4 đại dịch cúm trên người xảy ra: đại dịch cúm “Tây Ban Nha” (1918-1919), đại dịch cúm “Châu Á” (1957), đại dịch cúm “Hong Kông” (1968) và đại dịch cúm “Nga” (1977). Và đặc biệt, cuối thế kỷ XX và đầu thế kỷ XXI xuất hiện dịch cúm A/H5N1 lây truyền từ gia cầm sang người. Dịch xuất hiện tại đầu tiên tại Hong Kông vào tháng 5/1997. Tính đến nay, đã có 15 quốc gia và vùng lãnh thổ xuất hiện virút cúm A/H5N1 trên người với 436 trường hợp mắc và 262 trường hợp tử vong, chiếm tỷ lệ 60%.

1.3. Tình hình dịch cúm tại Việt Nam

1.3.1. Dịch cúm mùa

Tại Việt Nam, hội chứng cúm (ILI) là một trong 26 bệnh truyền nhiễm có tỷ lệ mắc cao nhất trong các bệnh truyền nhiễm gây dịch ở nước ta. Tỷ lệ hội chứng cúm trung bình trong 5 năm (2001-2005) là 2040,4/100.000 dân, đứng đầu trong 10 bệnh có tỷ lệ mắc cao nhất tại Việt Nam. Trong 2 năm 2006-2007, tỷ lệ hội chứng cúm/bệnh nhân đến khám tại các điểm giám sát bệnh viện là 12,5% và tỷ lệ bệnh nhân hội chứng cúm được xét nghiệm dương tính với vi rút cúm bằng kỹ thuật RT-PCR là 18,4%.

1.3.2. Dịch cúm A/H5N1

Trường hợp mắc cúm A/H5N1 trên người đầu tiên tại Việt Nam ngày 26 tháng 12 năm 2003 là bệnh nhân tại Hà Nam. Kể từ trường hợp mắc đầu tiên

cho đến nay (5/2009) tại Việt Nam có 111 trường hợp được xác định nhiễm cúm A/H5N1 với 56 ca tử vong. Dịch xảy ra tại 36/64 tỉnh/ thành phố.

1.4. Đặc điểm lâm sàng và sinh bệnh học

1.4.1. Đặc điểm lâm sàng

* **Cúm mùa:** sốt cao $> 38^{\circ}\text{C}$, ho hoặc đau họng

* **Cúm A/H5N1:** sốt cao $> 38^{\circ}\text{C}$, ho khan khó thở, X-quang phổi có tổn thương viêm phổi không điển hình và không có chẩn đoán nào khác.

1.4.2. Sinh bệnh học

Nhiễm trùng gây ra bởi virút cúm đầu tiên là viêm đường hô hấp trên. Nhiễm trùng gây ra bởi virút cúm A thường để lại những dấu hiệu sinh bệnh học tại đường hô hấp dưới. Các chứng viêm thanh quản, khí quản, phế quản cấp xuất hiện cùng với triệu chứng viêm long đường hô hấp và phù nề. Nhiễm trùng gây ra bởi virút cúm A/H5N1 bao gồm triệu chứng máu khó đông, thận hư, tan hạch bạch huyết và tổn thương phổi.

1.5. Dịch tễ học bệnh cúm

1.5.1. Phương thức và thời gian lây truyền

Virút cúm được lây truyền từ người sang người theo đường hô hấp: trong quá trình nói, ho, khạc, hắt hơi...

Virút cúm A/H5N1 lây truyền từ động vật sang người qua đường tiếp xúc trực tiếp giữa gia cầm nhiễm bệnh và người hoặc ăn thịt gia cầm đã bị nhiễm bệnh.

1.5.2. Nguồn bệnh và ổ chứa

Virút cúm A có một hệ vật chủ rộng rãi. Các loài gia cầm hoang dại, vịt và các loại thủy cầm là các ổ chứa, nơi ẩn náu đầu tiên của 16 phân týp HA và 9 phân týp NA đã biết. Một loài vật chủ tự nhiên khác của virút cúm A đó là động vật có vú và người. Virút cúm týp B chỉ lưu hành rộng rãi ở người.

1.5.2. Tính cảm nhiễm và đáp ứng miễn dịch

Tính cảm nhiễm: Mọi cá thể đều có thể nhiễm cúm và mắc bệnh cúm.

Đáp ứng miễn dịch: Trong nhiễm trùng tiên phát, các kháng thể đặc hiệu với hemagglutinin IgA, IgM và IgG xuất hiện ở dịch mũi, có vai trò quan trọng trong ngăn chặn sự nhiễm virút, hoạt động của nó diễn ra tại bề mặt màng nhày của bộ máy hô hấp. Trong nhiễm virút thứ phát, kháng thể IgG hạn chế sự nhân lên của virút và interferon cũng giúp cho sự hồi phục có hiệu quả.

1.6. Biện pháp dự phòng và kiểm soát bệnh cúm

1.6.1. Thuốc kháng virút

* **Amantadine và Rimantadine (flumadine):** ngăn cản sự xâm nhập của virút bằng cách ức chế hoạt động của kênh ion M2, do đó ngăn cản sự “cởi áo” của virút. Amantadine được sử dụng để điều trị bệnh nhân nhiễm cúm A. Sự kháng thuốc cũng như những phản ứng phụ sau khi dùng thuốc kháng virút là vấn đề đáng quan tâm.

* **Oseltamivir (Tamiflu) và Zanamivir (Relenza):** Ngăn cản sự giải phóng virút khỏi tế bào nhiễm nhờ ức chế hoạt động của enzyme neuraminidase (NA). Việc

sử dụng thuốc kháng virút như oseltamivir hay amantadine đều có những hạn chế nhất định.

1.6.2. Vắc xin cúm

Vắc xin cúm mùa (A/H3N2, A/H1N1 và B) hiện tại có nhiều loại khác nhau: vắc xin bất hoạt (inactivated vaccine), vắc xin sống giảm độc lực (Live attenuated influenza virus - LAIV) và vắc xin bất hoạt bằng công nghệ di truyền ngược (reassortment vaccine). Hiện tại, vắc xin cúm mùa đang dùng phổ biến là vắc xin bất hoạt, đa giá (thành phần vắc xin bao gồm virút cúm A/H1N1, A/H3N2 và B).

1.6.2.1. Vắc xin cúm A/H5N1

Hiện nay, vắc xin phòng bệnh cúm A/H5N1 cho người của các hãng Sanofi Pasteur – Pháp, Novartis - Thụy Sĩ, GlaxoSmithKline – Anh... đã được cấp giấy phép lưu hành. Tại Việt Nam, vắc xin cúm A/H5N1 đã được sản xuất ở quy mô phòng thí nghiệm và đang được thử nghiệm lâm sàng.

1.7. Chẩn đoán trong phòng thí nghiệm

1.7.1. Phương pháp phát hiện kháng nguyên

- *Thử nghiệm chẩn đoán nhanh (Quicktest)*: kháng thể đơn dòng có trong que thử kết hợp với kháng nguyên nucleoprotein hoặc neuraminidase của virút cúm.

- *Phân lập và định typ virút*: Phân lập virút được coi là “tiêu chuẩn vàng” trong giám sát cúm. Hiện nay, có 2 hệ thống phân lập được TCYTTC khuyến cáo là phân lập trên trứng gà đạt tiêu chuẩn (Specific Pathogenic Free - SPF) 10-11 ngày tuổi và trên dòng tế bào thường trực thận chó (Mardin-Darby canine kidney cells - MDCK). Virút sau khi phân lập được xác định đặc tính kháng nguyên bằng phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu (HI).

- *Thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang (Immunofluorescent assay - IFA)*

1.7.2. Phương pháp phát hiện vật liệu di truyền

- *Phương pháp RT-PCR*: có khả năng xác định nhanh sự nhiễm virút thông qua xác định vật liệu di truyền của virút bằng khả năng phát hiện đoạn ARN đặc hiệu của virút cúm trong mẫu bệnh phẩm lâm sàng.

- *Phương pháp Real time RT-PCR*: được ứng dụng để định lượng ADN, ARN, chẩn đoán các virút gây bệnh như virút cúm A/H5N1, RSV...

- *Phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt qua trung gian vòng phiên mã ngược (RT-LAMP)*: khuếch đại ADN trong điều kiện đẳng nhiệt, thời gian tiến hành phản ứng ngắn.

- *Phương pháp xác định trình tự gen (Sequence)*: xác định đặc điểm di truyền học, xây dựng cây gia hệ trên cơ sở so sánh gen HA, NA và M của virút cúm, từ đó xác định tần suất tiến hóa, các đột biến trên một số gen liên quan đến khả năng tăng độc lực của virút, giảm độ nhạy của thuốc kháng virút cũng như phát hiện các yếu tố tiềm tàng của sự trao đổi và tích hợp của virút cúm A/H5N1 và các chủng virút cúm đang lưu hành.

1.7.3. Phương pháp phát hiện kháng thể

- *Phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu (Hemagglutination Inhibition test - HI)*: xác định kháng thể kháng HA đặc hiệu virút cúm (antiheamagglutinin) khi kết hợp với kháng nguyên chuẩn (A/H1, A/H3, A/H5, B...)
- *Phản ứng trung hoà vi lượng (Microneutralization test - MN)*: phát hiện kháng thể kháng đặc hiệu virút cúm A/H5N1 và kháng thể kháng các phân týp virút cúm gia cầm khác mà phản ứng HI không có khả năng phát hiện được.
- *Thử nghiệm hấp phụ miễn dịch gắn enzyme (Enzyme linked – immusorbent assay - ELISA)*: được sử dụng rộng rãi để phát hiện kháng thể IgG và IgM kháng virút cúm.

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Định nghĩa ca bệnh

*** Bệnh nhân viêm đường hô hấp nghi nhiễm virút cúm mùa**

- Sốt cao trên 38°C.
- Đau đầu, đau mũi, ho khan, có thể kèm theo viêm long đường hô hấp.

*** Bệnh nhân viêm đường hô hấp cấp nghi nhiễm virút cúm A/H5N1**

- Sốt cao trên 38°C
- Biểu hiện hô hấp: chảy nước mũi, ho, khò khè, khó thở
- XQ phổi có tổn thương
- Bạch cầu dưới 5000/mm³
- Có yếu tố dịch tễ liên quan (tiếp xúc với gia cầm ốm, ăn thịt gia cầm ốm...)

2.1.2. Cỡ mẫu, thời gian và địa điểm

*** Mẫu bệnh phẩm của bệnh nhân nghi nhiễm virút cúm mùa:** thu thập trong 8 năm (2001- 2008) tại Hà Nội và các tỉnh Miền Bắc Việt Nam: 15.403 bệnh nhân.

*** Mẫu bệnh phẩm của bệnh nhân nghi nhiễm virút cúm A/H5N1:** thu thập trong 6 năm (6/2003-5/2009) tại một số tỉnh Miền Bắc Việt Nam: 1.739 bệnh nhân.

2.2. Vật liệu

2.2.1. Mẫu bệnh phẩm: Dịch ngoáy họng hoặc dịch nội khí quản.

2.2.2. Tế bào: Tế bào thường trực thận chó (Mardin- Darby Canine Kidney cells): MDCK (CDC - Mỹ).

2.2.3. Sinh phẩm

- Sinh phẩm sử dụng cho phản ứng RT-PCR, Realtime RT-PCR, phản ứng xác định trình tự chuỗi nucleotide: Qiagen, Invitrogen và ABI.

2.3. Phương pháp

2.3.1. Phân lập virút: trên tế bào MDCK theo thường quy của Viện VSDTTU

2.3.2. Định typ virút bằng phản ứng ngăn ngưng kết hồng cầu (HI): Phản ứng được tiến hành theo thường quy của Viện VSDTTU.

2.3.3. Phương pháp RT-PCR

2.3.4. Phương pháp Real-time RT-PCR

2.3.5. Phương pháp xác định trình tự gen (Sequence)

2.3.6. Phương pháp xử lý số liệu: Số liệu nghiên cứu được nhập, xử lý và tính toán trên phần mềm Access. Sử dụng phương pháp Tukey's test để đánh giá sự khác biệt thống kê giữa phương pháp phân lập virút và phương pháp RT-PCR. Sử dụng phần mềm DNASTar và MEGA 4 để xây dựng cây gia hệ bằng phương pháp Neighbor Joining, TreeExplorer.

2.3.7. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu: Các thông tin cá nhân của đối tượng nghiên cứu được bảo mật theo đúng điều khoản của Hội đồng Y đức. Kết quả nghiên cứu thu được chỉ phục vụ cho mục đích khoa học và bảo vệ sức khỏe của cộng đồng, không được sử dụng với bất kỳ mục đích nào khác.

Chương 3

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Các vụ dịch cúm xảy ra tại Hà Nội và Miền Bắc Việt Nam, 2001-2009

3.1.1. Giám sát sự lưu hành của virút cúm mùa tại Hà Nội, 2001-2005

Từ năm 2001 đến 2005, phòng thí nghiệm Virút Hô hấp, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương đã hợp tác với Trường Đại học Niigata, Nhật Bản tiến hành giám sát chủ động sự lưu hành của virút cúm tại 4 điểm ở Hà Nội: phòng khám nhi Bệnh viện Nhi Trung Ương, Bệnh viện Bạch Mai và 2 phòng khám Nhi tư nhân thuộc quận Thanh Xuân và Hai Bà Trưng.

Phương pháp: phân lập virút trên tế bào MDCK theo thường quy của Viện VSDTTU.

Bảng 3.1. Kết quả phân lập virút cúm mùa tại Hà Nội, 2001-2005

Năm	Số mẫu phân lập	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)
2001	2182	74	3,4
2002	1462	13	1,0
2003	1064	32	3,0
2004	1091	32	2,9
2005	1264	39	3,1
Tổng số	7063	190	2,7

Trong tổng số 7063 mẫu bệnh phẩm nghi nhiễm cúm trong 5 năm (2001-2005) tại Hà Nội, chúng tôi đã phân lập được 190 chủng virút cúm, chiếm tỷ lệ 2,7% (bảng 3.1). Phương pháp phân lập virút được coi là “tiêu chuẩn vàng” trong chẩn đoán nhiễm virút nói chung. Tuy nhiên, nếu chỉ áp dụng duy nhất phương pháp này để xác định nhiễm virút cúm thì kết quả thu được dường như chưa phản ánh đầy đủ về tỷ lệ nhiễm virút cúm trong hội chứng cúm. Phương pháp này cho phép tìm hiểu được sự thay đổi đặc tính kháng nguyên – hệ quả của quá trình tiến hóa của virút cúm A thông qua các hiện tượng “thay đổi nhỏ kháng nguyên” (antigenic drift) và “thay đổi lớn kháng nguyên” (antigenic shift).

3.1.2. Dịch cúm mùa tại Miền Bắc Việt Nam, 2006 – 2008

Bắt đầu từ năm 2006 đến nay, dự án giám sát cúm Quốc gia (GSCQG) do Trung tâm Kiểm soát và Phòng bệnh (CDC - Mỹ) tài trợ đã được triển khai tại 15 điểm giám sát thuộc 4 khu vực: Miền Bắc, Miền Trung, Miền Nam và Tây Nguyên. Trong đó, Miền Bắc có 7 điểm giám sát bao gồm: Viện Các bệnh truyền nhiễm và nhiệt đới Quốc gia, Viện Nhi Trung Ương, phòng khám đa khoa Thanh Xuân, phòng khám Đa khoa Bà Triệu, TTYT huyện Kiên Xương-Thái Bình, TTYT thị xã Hòa Bình, TTYT huyện Cao Lộc – Lạng Sơn

Giám sát sự lưu hành của virút cúm bằng phương pháp RT-PCR theo thường quy của Viện VSDTTU.

Bảng 3.2. Kết quả xác định sự lưu hành của virút cúm mùa tại Miền Bắc, 2006 – 2008 bằng phương pháp RT – PCR

Năm	Số mẫu xét nghiệm	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)
2006	2340	516	22.1
2007	3046	556	18.3
2008	2954	544	18.4
Tổng số	8340	1616	19,4

Trong tổng số 8340 mẫu bệnh phẩm thu thập trong 3 năm (2006-2008), chúng tôi xác định được 1616 mẫu dương tính với virút cúm bằng kỹ thuật RT-PCR, chiếm tỷ lệ 19,4% (bảng 3.2). Kết quả này đã khẳng định được vai trò gây bệnh của virút cúm mùa tại Việt Nam cũng như bước đầu cho phép mô tả chi tiết về sự lưu hành, sự tiến hóa cũng như cung cấp những thông tin dự báo về thành phần của vắc xin cúm theo mùa cho Việt Nam và các nước có cùng điều kiện khí hậu.

Phương pháp RT-PCR được lựa chọn trong giám sát cúm tại Việt Nam trong giai đoạn này do sự xuất hiện và gây bệnh cho người của virút cúm gia cầm A/H5N1 được khẳng định. Việc lựa chọn phương pháp phòng thí nghiệm (PTN) có khả năng phát hiện nhiễm virút cúm đồng thời đảm bảo sự an toàn cho người tiếp xúc và hạn chế tối đa khả năng lây nhiễm trong cộng đồng là yêu

cầu cấp thiết. RT-PCR dùng trong chẩn đoán cúm là phương pháp an toàn, dễ triển khai, có thể tiến hành tại phòng thí nghiệm an toàn sinh học cấp độ 2 (BSL 2). Trong khi đó, phân lập virút cúm đòi hỏi điều kiện an toàn sinh học nghiêm ngặt hơn (phòng thí nghiệm an toàn sinh học cấp độ 3 - BSL3).

3.1.3. Dịch cúm lây truyền từ gia cầm sang người do virút cúm A/H5N1 tại Miền Bắc Việt Nam, 6/2003 – 5/2009

Bảng 3.3. Kết quả xác định bệnh nhân nhiễm virút cúm A/H5N1 bằng phương pháp RT-PCR tại một số tỉnh Miền Bắc Việt Nam, 6/2003 - 5/2009

Năm	Số bệnh nhân	Số bệnh nhân dương tính	Tỷ lệ %
2003	16	3	18,8
2004	283	11	3,9
2005	682	52	7,6
2006	138	0	0
2007	254	8	3,2
2008	215	6	2,8
2009 (31/5/2009)	151	3	2,0
Tổng số	1739	83	4,8

Từ tháng 6/2003 đến tháng 5/2009, trong tổng số 1739 bệnh nhân VDHHC nghi nhiễm virút A/H5N1 đã xác định được 83 bệnh nhân nhiễm virút cúm A/H5N1 tại Miền Bắc Việt Nam bằng phương pháp RT-PCR. Tỷ lệ mắc trung bình là 4,8% (bảng 3.3). Năm 2006 không có trường hợp bệnh nhân nào nhiễm virút cúm A/H5N1.

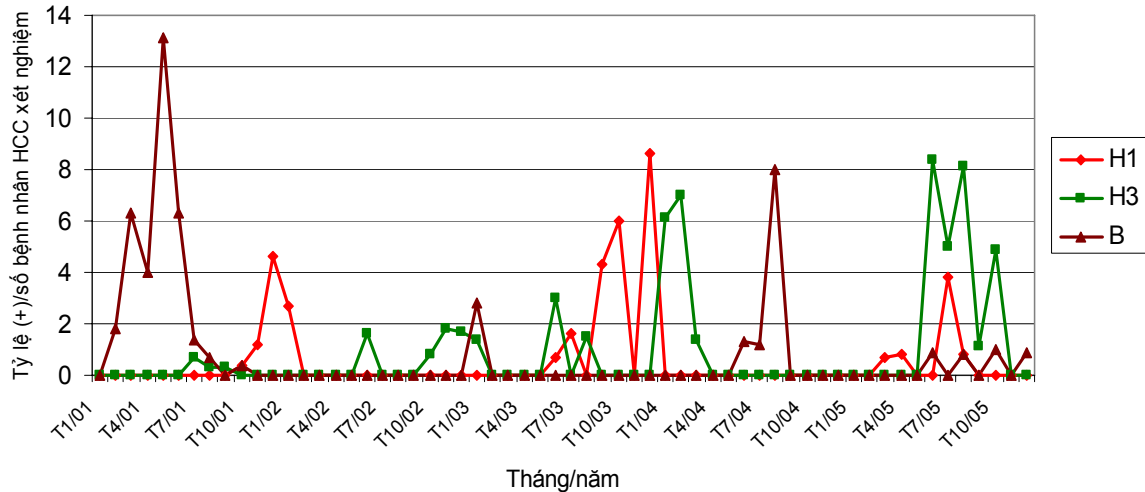
3. 2. CĂN NGUYÊN CÁC VỤ DỊCH CÚM MÙA, 2001 – 2008

3.2.1. Căn nguyên các vụ dịch cúm tại Hà Nội, 2001-2005

Bảng 3.4. Kết quả xác định các phân týp virút cúm tại Hà Nội, 2001-2005 bằng phương pháp HI

Năm	Cúm A/H1N1	Cúm A/H3N2	Cúm B	Tổng số
2001	13	4	57	74
2002	5	8	0	13
2003	23	7	2	32
2004	0	23	9	32
2005	6	29	4	39
Tổng số	47	71	72	190

Kết quả giám sát sự lưu hành virút cúm trong giai đoạn 2001-2005 tại Hà Nội cho thấy: virút cúm B là virút đóng vai trò gây bệnh chính trong năm 2001. Virút cúm A/H3N2 đóng vai trò nổi trội - xuất hiện 3 năm 2002, 2004 và 2005 và năm 2003 là virút cúm A/H1N1 (bảng 3.4).



Hình 3.7. Sự lưu hành của các phân tý virút cúm theo tháng tại Hà Nội, 2001 – 2005.

Virút cúm lưu hành quanh năm với các phân tý virút cúm khác nhau (hình 3.7). Đây là những năm đầu triển khai hệ thống giám sát cúm, chúng tôi tiến hành giám sát bằng phương pháp phân lập virút nên kết quả phân nào còn hạn chế. Vì vậy, các tháng lưu hành virút cúm lưu hành chủ yếu trong mỗi năm là chưa rõ ràng.

3.2.2. Căn nguyên các vụ dịch cúm mùa tại Miền Bắc, 2006-2008

Bảng 3.6. Kết quả xác định sự lưu hành của các phân tý virút tại Miền Bắc Việt Nam 2006 – 2008 bằng phương pháp RT-PCR

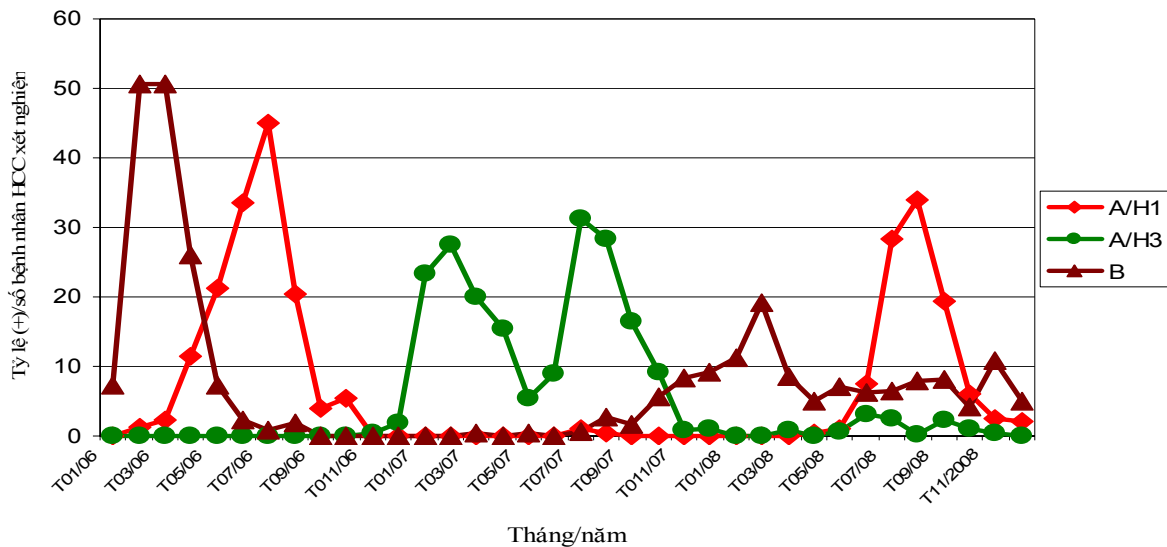
Năm	Cúm A/H1N1	Cúm A/H3N2	Cúm B	Tổng số
2006	336	6	174	516
2007	4	482+2*	68	556
2008	283+2**	31+1*	227	544
Tổng số	623+2**	519+3*	469	1616

* : đồng nhiễm virút cúm A/H3N2 và B

** : đồng nhiễm virút cúm A/H1N1 và B

Virút cúm B xuất hiện trong cả 3 năm nghiên cứu, trong đó cao nhất là năm 2008. Virút cúm A/H1N1 và virút cúm A/H3N2 xuất hiện xen kẽ giữa các năm: virút cúm A/H1N1 xuất hiện năm 2006 và năm 2008, virút cúm A/H3N2 xuất hiện năm 2007. Trong cả 3 năm đều có sự lưu hành xen kẽ của virút cúm A và virút cúm B Trong đó, căn nguyên chủ yếu gây dịch năm

2006 và năm 2008 là virút cúm A/H1N1, năm 2007 là virút cúm A/H3N2. (bảng 3.6).



Hình 3.9. Sự lưu hành của virút cúm mùa theo tháng tại Miền Bắc Việt Nam, 2006 – 2008

Virút cúm lưu hành quanh năm (hình 3.9), thường tập trung vào 2 thời điểm là cuối mùa xuân (tháng 2-3) và giữa mùa hè (tháng 7-8). Trong đó, virút cúm B là căn nguyên chủ yếu gây ra các vụ dịch vào cuối mùa xuân (2006 và 2008), virút cúm A/H1N1 hoặc A/H3N2 là căn nguyên chủ yếu gây ra các vụ dịch vào giữa mùa hè.

3.2.3. Đặc điểm di truyền học của virút cúm mùa, 2001-2007

3.2.3.1. Đặc điểm di truyền học của virút cúm mùa A/H1N1, 2001-2006

Cây gia hệ HA (35 chủng) và NA (20 chủng) của virút cúm A/H1N1 được xây dựng dựa trên phương pháp Neighbour Joining (NJ), sử dụng chủng A/New Caledonia/20/99 (H1N1) làm gốc cây gia hệ. Kết quả phân tích vật liệu di truyền cho thấy gen HA và NA của virút cúm mùa A/H1N1 được chia thành 4 nhóm: I, II, III và IV (bảng 3.9).

Bảng 3.9. Phân nhóm vật liệu di truyền gen HA và NA virút cúm A/H1N1 theo năm, 2001-2006

Nhóm	Năm lưu hành	
	Gen HA	Gen NA
I	2001 – 2002	2001 và 2002
II	2001, 2002 và 2003	2002 và 2003
III	2005 và 2006	2005 và 2006
IV	2006	2006

* **Đặc điểm di truyền học gen HA của virút cúm A/H1N1:** So sánh với chủng virút cúm A/H1N1 sử dụng trong thành phần vắc xin năm 2001-2006 của Bắc

Bán cầu (A/New Caledonia/20/99), các chủng phân lập tại Miền Bắc Việt Nam có gen HA thuộc nhóm I, II, III, có 5 axit amin thay đổi so với chủng virút sử dụng vắc xin cúm mùa giai đoạn 2001 – 2006. Chủng virút cúm mùa A/H1N1 xuất hiện vào tháng 5/2006 (A/Hanoi/BM344/06) có gen HA thuộc nhóm IV và có 12 axit amin thay đổi. Chủng virút này có độ tương đồng cao (99%) so với chủng A/Solomon Island/3/06 sử dụng cho vắc xin cúm mùa 2007-2008.

*** Đặc điểm di truyền học gen NA của virút cúm A/H1N1:** Gen NA của virút cúm mùa A/H1N1 trong giai đoạn 2001-2006 cũng phân tách thành 4 nhóm I, II, III và IV. Trong đó nhóm I bao gồm các chủng virút lưu hành năm 2001 và 2002 và có độ tương đồng cao với chủng virút A/New York/241/01. Các chủng virút lưu hành trong năm 2003 tạo thành một nhóm độc lập - nhóm II, và có độ tương đồng cao với chủng A/Hanoi/1863/01. Tại nhóm III - nhóm bao gồm các chủng virút lưu hành năm 2005 và 2006, tuy được tập trung thành trong một nhóm, nhưng có sự tách thành các nhánh nhỏ theo năm lưu hành trên cả 2 gen HA và NA.

Tuy 4 nhóm được hình thành trong quá trình thiết lập cây gia hệ nhưng các nhóm I, II và III đều có xuất phát điểm chung, có độ tương đồng cao trên cả gen HA và NA trong khi nhóm IV được phân tách rõ ràng và kết quả là sự thay đổi về đặc tính kháng nguyên của virút cúm A/H1N1 bắt đầu. Như vậy, virút cúm mùa A/H1N1 lưu hành tại Hà nội từ năm 2001-2007 có kiểu hình của gen HA và NA tương đối ổn định, ít thay đổi, biến đổi từ chủng A/New Caledonia/20/99 (2001-2006) - A/Solomon Island/3/06 (2007-2008). Gen HA và gen NA biến đổi độc lập theo một trật tự liên tiếp (bảng 3.9).

3.2.3.2. Đặc điểm di truyền học của virút cúm A/H3N2, 2001-2007

Cây gia hệ HA và NA của virút cúm A/H3N2 được xây dựng dựa trên phương pháp Neighbour Joining (NJ), sử dụng chủng A/Moscow/10/99 (H3N2) làm gốc cây gia hệ. Gen HA của virút cúm mùa A/H3N2 được chia thành 4 nhóm: I, II, III và IV; trong khi đó gen NA được chia thành 2 nhóm: I và II (bảng 3.10).

Bảng 3.10. Phân nhóm vật liệu di truyền gen HA và NA virút A/H3N2 theo năm, 2001 - 2006

Nhóm	Năm lưu hành	
	Gen HA	Gen NA
I	2002	2002 – 2003
II	2003	2004-2005
IIIa, IIIb	2003-2004, 2005	
IV	2005	

*** Đặc điểm di truyền học gen HA của virút cúm A/H3N2:** Hình ảnh cây gia hệ HA của virút cúm A/H3N2 lưu hành tại Miền Bắc Việt Nam đã mô tả rất rõ sự

tiến hóa về vật liệu di truyền của phân tít này. Các nhóm virút cúm A/H3N2 hình thành trong giai đoạn này có độ phân tách rõ rệt, liên quan chặt chẽ với năm lưu hành virút: nhóm I, II, III và IV. Đặc biệt, nhóm III được chia ra thành 2 nhóm phụ là IIIa và IIIb, tuy cùng một nhóm do có độ tương đồng cao, nhưng nhóm IIIb đã thể hiện chiều hướng phân tách thành nhóm IV và dường như là gốc của nhóm IV. Kết quả trên gợi ý rằng sự tiến hóa của virút cúm A/H3N2 tại Miền Bắc Việt Nam có thể là quá trình tự tiến hóa trong chính cá thể virút, không phụ thuộc nhiều vào yếu tố bên ngoài (tích hợp bởi các gen của virút cúm khác). Virút cúm A/H3N2 lưu hành tại Việt Nam năm 2001-2006 đã thực hiện sự tiến triển theo trình tự từ chủng A/Panama/2007/99 (2001-2002) đến A/Fujian/411/02 (2003-2004) và A/Wincosin/67/05 (2005).

Năm 2007, chúng tôi tiến hành phân tích virút cúm A/H3N2 lưu hành tại ba khu vực Miền Bắc, Miền Trung và Miền Nam để tìm hiểu ảnh hưởng của yếu tố địa lý. Kết quả cây gia hệ gen HA cho thấy có sự tương đồng lớn giữa virút cúm A/H3N2 lưu hành tại Miền Trung và Miền Nam. Trong khi virút cúm A/H3N2 lưu hành tại Miền Bắc thì tập trung vào một nhóm riêng biệt và không có sự đan xen với các virút phân lập tại Miền Trung và Miền Nam. Như vậy, sự tiến hóa của virút cúm A/H3N2 tại Việt Nam năm 2007 có khả năng chịu ảnh hưởng của yếu tố địa lý và nghiên cứu này cần phải tiến hành tiếp tục vào những năm tiếp theo.

*** Đặc điểm di truyền học gen NA của virút cúm A/H3N2:** Gen NA của virút cúm A/H3N2 lưu hành tại Việt Nam giai đoạn 2001-2007 chỉ tập trung vào 2 nhóm chính là :

- Nhóm I: gồm các virút lưu hành năm 2002-2003.
- Nhóm II : gồm các virút lưu hành năm 2004-2005.

*** Đặc điểm di truyền học của virút cúm mùa lưu hành tại Miền Bắc Việt Nam năm 2001-2007**

- Tính đa dạng di truyền của virút cúm A/H1N1 thấp hơn virút cúm A/H3N2. Trong 8 năm nghiên cứu, virút cúm A/H1N1 có 2 lần thay đổi cấu trúc di truyền (từ A/New Caledonia/20/99 sang A/Solomon Islands/3/06) trong khi cúm A/H3N2 thay đổi 4 lần (A/Panama/2007/99 (2001-2002) - A/Fujian/411/02 (2002- 2003) - A/Wincosin/67/05 (2006-2007) đến A/Brisbane/10/07

- Sự đa dạng di truyền của gen HA phổ biến hơn gen NA trong cả 2 phân tít A/H1N1 và A/H3N2 tại Miền Bắc Việt Nam.

- Tại các vùng địa lý khác nhau (Miền Bắc, Miền Trung và Miền Nam), sự đa dạng di truyền của virút cúm A/H3N2 cũng có thể quan sát được.

3.2.4. Đặc tính kháng nguyên của virút cúm mùa, 2001-2008

Virút cúm A/H1N1 xuất hiện vào các năm 2003, 2006 và 2008 và đặc tính kháng nguyên của các chủng virút cúm mùa A/H1N1 ít thay đổi trong 6 năm (2001-2006), giống chủng A/New Caledonia/20/99 (bảng 3.13). Sau 1 năm gián đoạn (2007) đến năm 2008, chủng virút cúm A/H1N1 xuất hiện trở lại tại Miền

Bắc Việt Nam với đặc tính kháng nguyên mới, tương tự chủng A/Brisbane/59/07.

Trong 6 năm quan sát, đặc tính kháng nguyên của chủng virút cúm mùa A/H3N2 lưu hành tại Miền Bắc Việt Nam đã nhiều lần thay đổi từ A/Panama/2007/99 (2001-2002) thành A/Fujian/411/02 (2003), đến A/Wincosin/67/05 (2005) và A/Brisbane/10/07 (2007). Hệ quả của sự thay đổi đặc tính kháng nguyên từ A/Panama/2007/99 (2001-2002) thành A/Fujian/411/02 (2003) là các vụ dịch lớn được ghi nhận tại các nước Châu Á, Mỹ, Nam Phi... năm 2003-2004

Kháng nguyên virút cúm B lưu hành trên thế giới được chia thành 2 dòng: dòng Yamagata (B/Yamagata/16/88-lineage viruses) và dòng Victoria (B/Victoria/2/87-lineage viruses). Đặc tính kháng nguyên của virút cúm B lưu hành tại Việt Nam trong nghiên cứu của chúng tôi cũng được xác định thuộc 2 dòng này. Sự hiện diện dòng kháng nguyên Yamagata được xác định tại Miền Bắc Việt Nam vào các năm 2001 và 2005, dòng Victoria vào các năm 2003, 2004, 2006-2008.

Bảng 3.13. Đặc tính kháng nguyên của virút cúm mùa tại Miền Bắc Việt Nam bằng phương pháp HI, 2001-2008

Năm	Đặc tính kháng nguyên		
	Virút cúm A/H1N1	Virút cúm A/H3N2	Virút cúm B
2001	A/New Caledonia/20/99	A/Panama/2007/99	B/Yamanashi/166/98 B/Johannesburg/5/99 (<i>Yamagata lineage</i>)
2002	A/New Caledonia/20/99	A/Panama/2007/99	
2003	A/New Caledonia/20/99	A/Panama/2007/99 A/Fujian/411/02	B/HongKong/330/01 (<i>Victoria lineage</i>)
2004		A/Panama/2007/99	B/Sichuan/379/99 (<i>Victoria lineage</i>)
2005	A/New Caledonia/20/99	A/Wincosin/67/05	B/Shanghai/361/02 B/Frolida/0/04 (<i>Yamagata lineage</i>)
2006	A/New Caledonia/20/99		B/Ohio/01/05 (<i>Victoria lineage</i>)
2007		A/Brisbane/10/07	B/Ohio/01/05 (<i>Victoria lineage</i>)
2008	A/Brisbane/59/07	A/Brisbane/10/07	B/Ohio/01/05 (<i>Victoria lineage</i>)

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy đặc tính kháng nguyên của virút cúm mùa lưu hành tại Việt Nam nói chung và Miền Bắc nói riêng đều tương tự với chủng sử dụng cho sản xuất vắc xin trong giai đoạn 2001- 2008. Điều này

có nghĩa lớn trong việc phát triển và sử dụng vắc xin cúm tại Việt Nam trong tương lai.

3.3. CĂN NGUYÊN GÂY VIÊM PHỔI NẶNG DO VIRÚT CÚM A/H5N1 TẠI MIỀN BẮC VIỆT NAM, 6/2003-5/2009

3.3.1. Một số đặc điểm chung

3.3.1.1. Tuổi và giới

Trong số 83 trường hợp nhiễm virút cúm A/H5N1 ở Miền Bắc có 46 bệnh nhân nam (chiếm 55,4%) và 37 bệnh nhân nữ (chiếm 44,6 %). Tuổi nhiễm virút cúm A/H5N1 được xác định từ 4 tháng đến 81 tuổi, tuổi trung bình là 28 (clade 1 và 2), trong đó nhóm tuổi từ 21 - 30 tuổi chiếm tỷ lệ cao nhất (26,5%). Đây có thể là những đối tượng ở lứa tuổi lao động và tần suất tiếp xúc trực tiếp với các yếu tố nguy cơ sẽ cao hơn so với trẻ nhỏ (<15 tuổi) hoặc người già (>60 tuổi).

3.3.1.2. Tỷ lệ tử vong/ mắc

Bảng 3.17. Số tử vong/ mắc của bệnh nhân nhiễm virút cúm A/H5N1 tại Miền Bắc Việt Nam, 6/2003 - 5/2009

Năm	Số mắc	Số tử vong	Tỷ lệ %
2003	3	3	100
2004	11	8	72,7
2005	52	10	19,2
2007	8	5	62,5
2008	6	5	83,3
2009 (31/5/2009)	3	3	100
Tổng số	83	34	41,0

Tính đến 31/5/2009, tại Miền Bắc có 83 trường hợp nhiễm, 34 trường hợp tử vong, chiếm tỷ lệ 41% (bảng 3.17). Năm 2003 và năm 2009 có tỷ lệ tử vong cao nhất (100%). Tỷ lệ tử vong phụ thuộc vào độc lực của virút cũng như hệ thống miễn dịch của cơ thể. Kết quả nghiên cứu về vật liệu di truyền của virút cúm A/H5N1 lưu hành tại Việt Nam cho thấy: virút lưu hành tại Việt Nam từ năm 6/2003-5/2009 vẫn có trình tự chuỗi axit amin tại vị trí phân tách HA1 và HA2 ***RERRRKKRGL*** hoặc ***RERR*KKRGL*** và ***RERRR*KRGL*** quy định độc lực của chủng virút cúm gia cầm A/H5N1 cho dù sự tiến hóa của virút từ clade 1 sang clade 2.3 đã được ghi nhận. Một kết quả ghi nhận trong nghiên cứu này là không phát hiện trường hợp nhiễm virút cúm A/H5N1 ở người năm 2006. Điều này có thể được giải thích là chiến dịch tiêm vắc xin bất hoạt H5N1 và H5N2 cho gia cầm vào tháng 8/2005 tại Việt Nam có hiệu quả nhất định.

3.3.1.3. Sự phân bố các trường hợp nhiễm virút cúm A/H5N1 theo tháng

Các trường hợp nhiễm virút cúm A/H5N1 xuất hiện tập trung nhiều vào mùa đông - xuân (tháng 12 đến tháng 3 năm tiếp theo). Tại Miền Bắc, thời gian

đó nhiệt độ thấp (khoảng 12-18°C) và độ ẩm tương đối cao, có thể là điều kiện thích hợp cho virút cúm gia cầm A/H5N1 phát triển. So sánh với tình hình dịch cúm tại gia cầm trong cùng thời điểm cho thấy tất cả các đỉnh điểm của cúm gia cầm đều ở giai đoạn trước và sau Tết, tại thời điểm đó mật độ gia cầm tăng mạnh, khả năng khuếch tán virút trong đàn gia cầm cao và khả năng lây bệnh cho người cũng được ghi nhận.

3.3.2. Phân lập virút cúm A/H5N1 bằng phương pháp gây nhiễm trên tế bào MDCK (BSL 3)

Bảng 3.19. Kết quả phân lập virút cúm A/H5N1 tại Miền Bắc Việt Nam, 6/2003- 5/2009

Năm	Số mẫu dương tính RT-PCR	Số mẫu phân lập virút	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ %
2003	3	3	3	100
2004	11	11	5	45,5
2005	52	15	5	33,3
2007	8	8	6	75,0
2008	6	6	6	100
2009 (31/5/2009)	3	3	3	100
Tổng số	83	46	28	60,9

Trong 6 năm (6/2003 – 5/2009), tổng số 46 mẫu phân lập có 28 mẫu dương tính, chiếm tỷ lệ 60,9% (bảng 3.19). Năm 2003, 2008 và 2009 có tỷ lệ phân lập virút cúm A/H5N1 đạt 100%. Kết quả phân lập phụ thuộc vào một số yếu tố như: thời điểm lấy mẫu, loại bệnh phẩm, chất lượng bệnh phẩm, điều kiện bảo quản và vận chuyển mẫu...

3.3.3. Đặc tính tiến hóa của virút cúm A/H5N1 tại Miền Bắc Việt Nam, 6/2003 – 5/2009

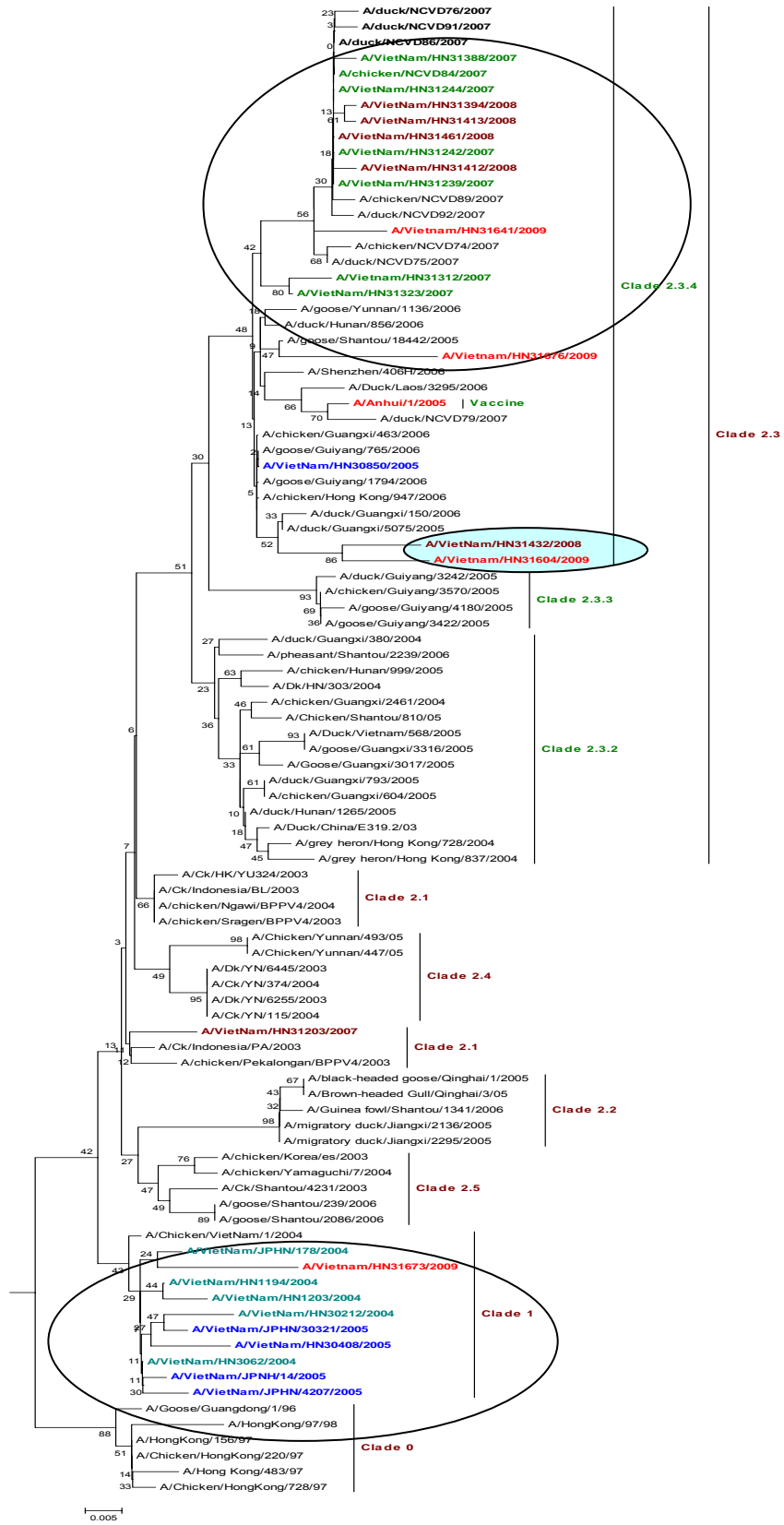
Chúng tôi đã tiến hành phân tích 25 chủng virút cúm A/H5N1 phân lập được từ năm 6/2003-5/2009 để đánh giá đặc tính tiến hóa của virút:

- Phân tích trình tự chuỗi nucleotide, xây dựng cây gia hệ HA và NA.
- Xác định sự thay đổi các axit amin liên quan đến độc lực của virút, quá trình thích ứng của virút cúm A/H5N1 từ gia cầm sang người và độ nhạy cảm của virút với các thuốc kháng virút: Oseltamivir.

3.3.3.1. Đặc điểm di truyền học gen HA

* *Cây gia hệ gen HA*: (hình 3.19)

Tại Miền Bắc Việt Nam, đặc điểm di truyền gen HA của virút cúm A/H5N1 lưu hành tại 6/2003- 5/2009 được chia thành 2 clade tương đương với 2 kháng nguyên khác nhau: clade1 và clade 2. Trong đó:



Hình 3.19. Cây gia hệ gen HA (455 axit amin) virút cúm A/H5N1 tại Miền Bắc Việt Nam, 2003-2009

+ Clade 1: bao gồm 9 chủng virút phân lập tại Miền Bắc Việt Nam từ 12/2003 đến 7/2005. Các virút trong clade này có độ tương đồng cao (99,7-99,9%) so với chủng dự tuyến vắc xin A/Vietnam/1194/04. Chủng virút A/Vietnam/HN31673/2009 phân lập từ bệnh phẩm của bệnh nhân tại tỉnh Đồng Tháp tháng 3/2009 cũng thuộc clade này.

+ Clade 2: bao gồm 15 chủng virút cúm A/H5N1 phân lập tại Miền Bắc Việt Nam bắt đầu từ tháng 10/2005 (chủng xuất hiện đầu tiên tại Việt Nam là A/HN30850/2005) đến hiện tại (tháng 5/2009). Trong clade 2, các virút cúm A/H5N1 lưu hành tại Miền Bắc Việt Nam tập trung chủ yếu tại (98,9% - 99,7%) trong khi độ tương đồng với chủng dự tuyến vắc xin cho nhánh 2.3 (A/Anhui/1/2005) chỉ đạt < 98%. Trên cây gia hệ nhánh 2.3.4, các chủng virút cúm A/H5N1 lưu hành trong năm 2007-2008 có độ tương đồng cao, trong khi chủng virút phân lập năm 2009 (A/HN 31604/2009) tách thành 1 nhánh với chủng phân lập sau cùng năm 2008 (A/HN31432/2009). Thông tin trên phù hợp với nhận định về tần suất tiến hóa của virút cúm A/H5N1 thuộc clade 2 dường như nhanh hơn so với clade 1. Phần lớn các virút lưu hành tại Miền Bắc Việt Nam thuộc clade 2.3.4 và cùng clade với virút lưu hành tại Miền Nam Trung Quốc trong cùng thời điểm.

Cây gia hệ gen HA trong nghiên cứu này cũng cho thấy rõ ràng về đặc điểm lưu hành của virút cúm A/H5N1 tại Việt Nam: các virút lưu hành tại Việt Nam trong những năm đầu của dịch (12/2003- 10/2005) đều thuộc clade 1, cùng chung nhóm với các virút lưu hành tại khu vực Đông Nam Châu Á như: Lào, Campuchia, Thái Lan. Từ giữa năm 2005, các virút lưu hành tại Miền Bắc Việt Nam đã chuyển sang clade 2.3 và phân tách rõ ràng thành 2.3.4 vào các năm 2007 đến 2009. Từ giữa năm 2005 đến tháng 3/2009, không có báo cáo về nhiễm virút cúm A/H5N1 trên người tại Miền Nam Việt Nam. Tuy nhiên, đến tháng 3/2009 tại Đồng Tháp đã ghi nhận trường hợp nhiễm cúm A/H5N1 và virút phân lập từ bệnh nhân này đã được xác định là thuộc clade 1. Kết quả trên cũng phù hợp với phân tích các virút lưu hành trên gia cầm tại Miền Nam Việt Nam trong cùng thời điểm và cùng nhóm với các virút lưu hành tại Thái Lan, Campuchia trong năm 2007-2008. Sự lưu hành đồng thời nhiều clade trên gia cầm đã đưa ra gợi ý rằng có thể virút cúm A/H5N1 xâm nhập từ Miền Nam Trung Quốc vào Việt Nam, nơi mà virút clade 2.3.4 đã lưu hành trước đó.

Kết quả trên cho thấy, sự lưu hành của virút cúm A/H5N1 tại Việt Nam đã có sự khác biệt rõ rệt giữa 2 miền: Bắc và Nam. Không giống giả thuyết vào những năm 2003-2004 cho rằng virút cúm gia cầm A/H5N1 được lan truyền tới các vùng miền khác nhau trên thế giới thông qua tập quán di cư của chim hoang dại. Các thông tin thu được gần đây đã cho thấy: đặc điểm di truyền học virút cúm gia cầm dường như được khoanh vùng rõ ràng :

- + Clade 1 : tập trung tại các nước Campuchia, Thái Lan.
- + Clade 2.1 : tập trung tại Indonesia.
- + Clade 2.2 : tập trung tại các nước Thổ Nhĩ Kỳ, Ai Cập....

+ Clade 2.3 : tập trung tại Miền Nam Trung Quốc; Miền Bắc Việt Nam....

Như vậy, sự tiến hóa và lan truyền của virút cúm A/H5N1 dường như tại chính khu vực mà nó lưu hành và không phụ thuộc vào sự trao đổi tích hợp với virút mới do chim di cư mang đến. Giả thuyết này cũng phù hợp với thực tế tại Việt Nam khi phân tích vật liệu di truyền của virút cúm A/H5N1 lưu hành trên gia cầm từ năm 2001 -2007. Nghiên cứu của Xiu và cs cho thấy có 9 kiểu gen (genotype) tương đương với 7 clade khác nhau lưu hành tại Việt Nam, trong đó 5 kiểu gen (VN3, VN6, VN7, VN8, VN9) được phát hiện năm 2007. Phân tích gen HA cho thấy VN6 và VN 9 thuộc clade 2.3.4 và đặc biệt VN9 được phát hiện có sự trao đổi và tích hợp giữa clade 1 và clade 2.

*** Vị trí các axit amin trên protein HA của virút cúm gia cầm A/H5N1 liên quan đến việc gắn với thụ thể tế bào chủ**

Virút cúm A/H5N1 mang đặc tính của virút cúm gia cầm, đó là có ái lực bám vào thụ thể galactose trên tế bào chủ tại vị trí 2.3 (SA α - 2,3 Gal), trong khi virút cúm người (cúm theo mùa A/H1N1, A/H3N2...) có ái lực mạnh bám vào thụ thể galactose trên tế bào chủ tại vị trí 2.6 (SA α - 2,6 Gal). Đặc tính này chính là một trong những yếu tố hạn chế khả năng lây truyền của virút cúm gia cầm A/H5N1 sang người. Một số axit amin trên gen HA được xác định có liên quan đến kiểu gắn bám vào thụ thể tế bào chủ của virút cúm A/H5N1 là các axit amin tại vị trí Gly139Arg, Asn182Lys, Gln192Arg, Asn193Lys và Ser223Asn. Khi các đột biến tại vị trí này xuất hiện có thể ảnh hưởng đến thay đổi kiểu gắn bám của virút cúm A/H5N1 từ (SA α - 2,3 Gal) thành (SA α - 2,6 Gal) và hệ quả là virút cúm gia cầm có khả năng hoạt động giống như virút cúm mùa và sẽ tăng khả năng gây bệnh cho người.



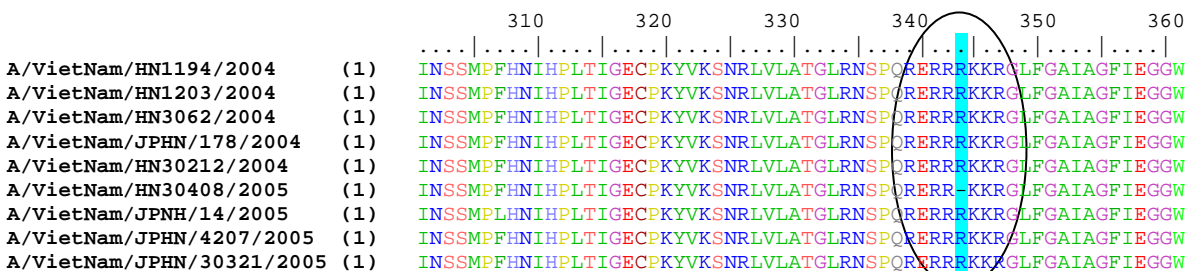
Hình 3.21. Các vị trí axit amin trên protein HA của virút cúm gia cầm A/H5N1 liên quan đến việc gắn với thụ thể tế bào chủ tại Miền Bắc Việt Nam, 6/2006 – 5/2009

Kết quả phân tích trong nghiên cứu của chúng tôi cho thấy các axit amin tại các vị trí liên quan đến kiểu gắn bám của virút cúm A/H5N1 lưu hành tại Việt

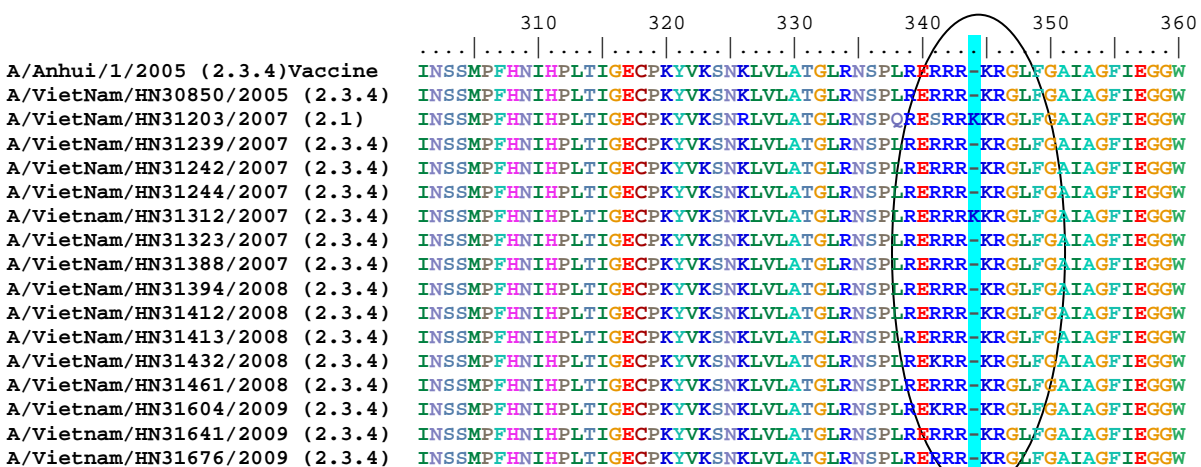
Nam (bao gồm cả clade 1 và 2) đều không thay đổi. Điều này chứng tỏ virút vẫn còn ái lực đối với tế bào gia cầm tại vị trí (SA α - 2,3 Gal).

*** Các axit amin trên protein HA liên quan đến độc lực của virút cúm A/H5N1**

Virút cúm gia cầm A/H5N1 được chia thành 2 loại: virút có độc lực cao (HPAI) và virút có độc lực thấp (LPAI). Sự phân chia này dựa vào khả năng gây chết gà hàng loạt của virút. Nghiên cứu sự khác nhau của 2 loại virút này, Steinhauer DA (1999) cho thấy tại vùng phân tách HA1 và HA2 của virút cúm A/H5N1 có độc lực cao (HPAI) có thêm một trình tự axit amin *RERRRKKRGL* (tại vị trí 339-348) trong khi các virút cúm A/H5N1 có độc lực thấp (LPAI) không có trình tự này. Các axit amin này sẽ giúp protein HA có thể phân tách dễ dàng thành 2 tiểu protein HA1 và HA2 dưới sự tác động của enzyme furin có trong biểu mô đường hô hấp, ruột,... và có khả năng lây nhiễm tới nhiều cơ quan khác nhau: phổi, ruột, lách.... Và đó là nguyên nhân gây suy đa phủ tạng dẫn đến tử vong. Trong khi các virút cúm A/H5N1 độc lực thấp (LPAI) chỉ có thể sử dụng enzyme của tế bào biểu mô đường hô hấp trên là trypsin để phân tách protein HA, vì vậy hạn chế khả năng lây nhiễm và gây bệnh cho cơ quan đường hô hấp và ruột.



Hình 3.22. Trình tự axit amin tại vùng phân tách HA1 và HA2 trên gen HA của virút cúm A/H5N1 thuộc clade 1 (6/2003 - 7/2005)



Hình 3.23. Trình tự axit amin tại vùng phân tách HA1 và HA2 trên gen HA của virút cúm A/H5N1 thuộc clade 2 (10/2005 - 5/2009)

Trong nghiên cứu của chúng tôi, các virút cúm A/H5N1 lưu hành tại Miền Bắc Việt Nam từ 6/2003 đến 5/2009 đều có các axit amin dư tại khu vực

phân tách HA và một số chủng được xác định có sự thiếu hụt của 1 axit amin Arginin (**R**) tại vị trí 343 (**RE₃₄₃RR*KKRGL**) (hình 3.22) hoặc 1 axit amin Lysine (**K**) ở vị trí 344 (**RE₃₄₄RRR*KRGL**) (hình 3.23). Như vậy, các virút cúm A/H5N1 lưu hành tại Miền Bắc Việt Nam vẫn là các virút có độc lực cao. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu trên virút cúm A/H5N1 lưu hành trên gia cầm tại Việt Nam trong cùng thời điểm.

*** Sự tương đồng các axit amin trên protein HA của chủng virút cúm A/H5N1 lưu hành tại Miền Bắc Việt Nam và các chủng dự tuyển vắc xin**

Tại Việt Nam, đến thời điểm hiện tại có 2 clade khác nhau của virút cúm A/H5N1 đã xuất hiện và việc theo dõi sự tương đồng về mặt kháng nguyên thông qua các phân tích trình tự chuỗi axit amin trên protein HA là rất quan trọng. Kết quả này không những quan sát được tần suất thay đổi của kháng nguyên mà còn có thể đánh giá được hiệu quả của vắc xin phát triển trên chủng virút được TCYTTC khuyến cáo.

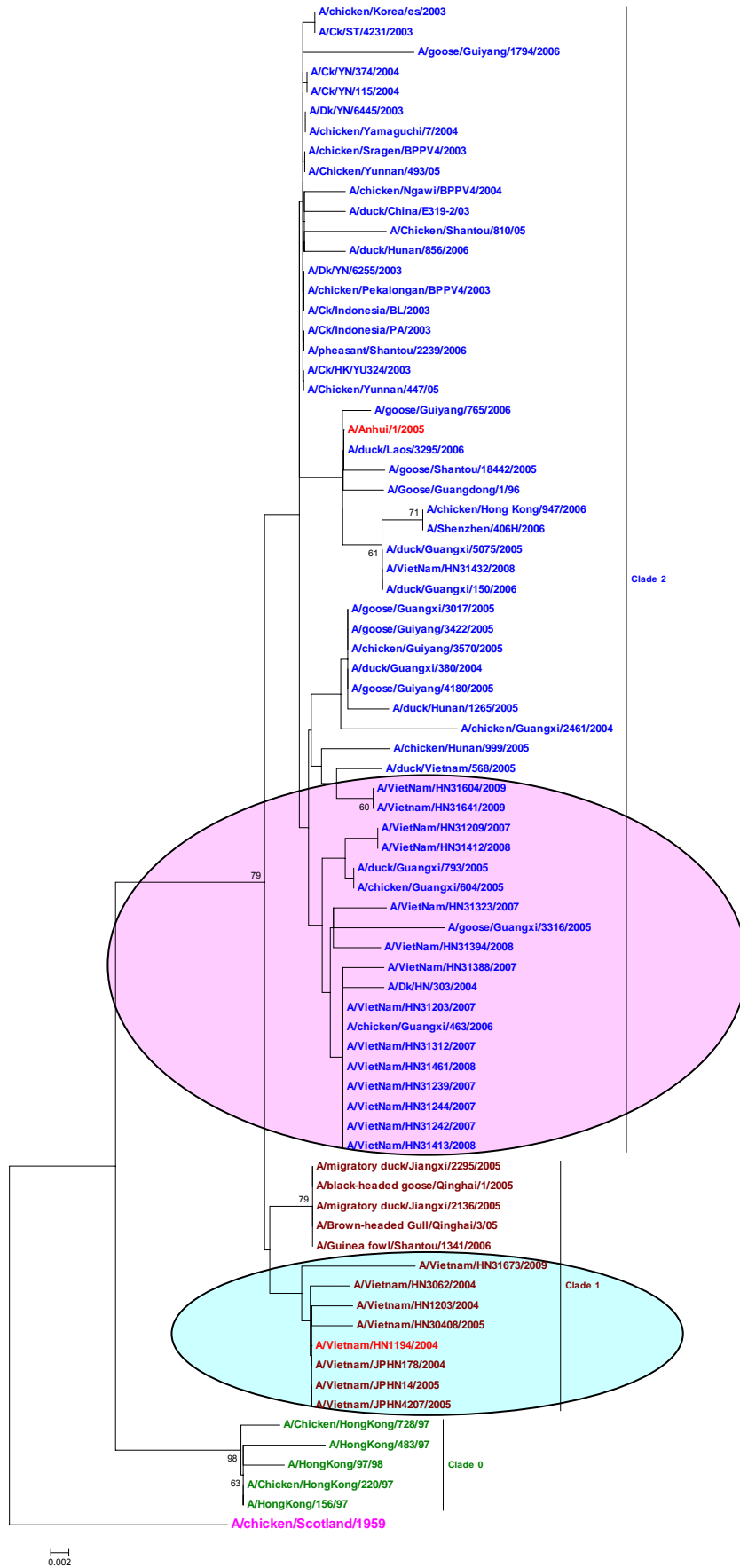
+ Chủng vắc xin dự tuyển cho virút cúm A/H5N1 thuộc clade 1: Chủng A/Vietnam/1194/04 được sử dụng làm chủng chuẩn để so sánh. Trong số 9 chủng virút cúm A/H5N1 thuộc clade 1 phân lập từ các bệnh nhân năm 2003-2005 tại Miền Bắc Việt Nam cho thấy sự tương đồng cao của các chủng virút cúm A/H5N1 thuộc clade 1 với chủng dự tuyển vắc xin, số axit amin thay đổi tối đa là 4 (A/VietNam/JPHN/30321/2005) trong tổng số 455 axit amin được xác định trên protein HA.

+ Chủng vắc xin dự tuyển cho clade 2: Chủng virút A/Anhui/01/2005 được giới thiệu là chủng vắc xin dự tuyển cho clade 2.3. So sánh với chủng này, các virút cúm A/H5N1 thuộc clade 2.3 lưu hành tại Miền Bắc Việt Nam năm 2007 và 2008 đã có sự thay đổi 5-10 axit amin trong protein HA (A/VietNam/HN31203/2007), trong khi chủng virút A/HN30850/2005 (chủng đầu tiên được xác định thuộc clade 2.3) chỉ có 4 axit amin thay đổi so với chủng dự tuyển vắc xin. Kết quả trên cũng phù hợp với việc phân tích sự tiến hóa của virút cúm A/H5N1 thuộc clade 2.3.4 tại Miền Bắc Việt Nam cũng như tại Trung Quốc. Sự thay đổi axit amin trong protein HA với chiều hướng tăng dần theo thời gian sẽ là thách thức trong việc phát triển vắc xin có hiệu lực bảo vệ cao để phòng chống virút cúm gia cầm A/H5N1.

3.3.3.2. Đặc điểm di truyền học gen NA

*** Cây gia hệ gen NA: (hình 3.24)**

Gen NA của virút cúm A/H5N1 lưu hành tại Miền Bắc từ năm 6/2003-5/2009 cũng chia thành clade tương tự như gen HA, đó là clade 1 và clade 2. Tuy nhiên, không giống gen HA, trong clade 2 của gen NA các nhánh nhỏ phân tách không rõ ràng và có độ tương đồng trong cùng clade cao hơn. Gen NA của các virút thuộc clade 1 (lưu hành từ 2003-2005) có trình tự nucleotide tương đồng với chủng gốc A/China/GD/01/2006 là 99,3% trong khi các virút thuộc clade 2 (lưu hành năm 2007- 2008) có trình tự nucleotide tương đồng với



Hình 3.24. Cây gia hệ gen NA (379 axit amin) virút cúm A/H5N1 tại Miền Bắc Việt Nam, 6/2003-5/2009

chủng gốc là 98,2%. Cũng tương tự như gen HA, trong cây gia hệ gen NA có 1 chủng virút cúm A/H5N1 lưu hành tại Miền Nam Việt Nam (A/VN/HN31673/2009) vào tháng 3/2009 vẫn thuộc clade 1.

Trên protein NA, chúng tôi tập trung vào phân tích sự thay đổi của axit amin liên quan đến sự giảm độ nhạy hoặc kháng thuốc kháng virút Oseltamivir.

*** Kết quả xác định đột biến trên gen NA liên quan đến sự kháng hoặc giảm độ nhạy của thuốc kháng virút cúm A/H5N1: Oseltamivir (Tamiflu)**

Kết quả phân tích vật liệu di truyền trên protein NA của virút cúm A/H5N1 từ 6/2003 đến 5/2009 tại Miền Bắc Việt Nam cho thấy đã phát hiện được đột biến axit amin tại vị trí H275Y của chủng virút cúm A/Vietnam/HN30408/2005 thuộc clade 1, không phát hiện được đột biến tại vị trí H275Y và N295S của virút cúm A/H5N1 thuộc clade 2. Tuy nhiên, đã xác định được đột biến axit amin tại vị trí I117V trên virút cúm A/H5N1 thuộc clade 2: 1 chủng virút năm 2007 (A/Vietnam/HN31209/2007) và 1 chủng virút năm 2008 (A/Vietnam/HN31412/2008).

Một số công bố gần đây đã khẳng định rằng các đột biến tại axit amin tại các vị trí 117, 275 và 295 thực sự gây nên hiện tượng giảm độ nhạy hoặc kháng thuốc Oseltamivir của virút cúm A (A/H1N1, A/H1N1s và A/H5N1). Kết quả nghiên cứu này càng có ý nghĩa quan trọng khi vắc xin cúm A/H5N1 hiện tại chưa phổ biến, thuốc kháng virút Oseltamivir dường như là phương tiện duy nhất có thể sử dụng trong điều trị và phòng chống nhiễm virút cúm. Tuy nhiên, những kết quả nghiên cứu này cần được phát triển sâu hơn trong tương lai và cần có sự phối hợp với các nghiên cứu trên gia cầm để giám sát được các đột biến tự nhiên (không chịu áp lực trực tiếp của Oseltamivir) trong gia cầm có liên quan đến hiện tượng này.

KẾT LUẬN

1. Về căn nguyên của các vụ dịch cúm tại Miền Bắc Việt Nam giai đoạn 2001-2009.

- Virút cúm A/H1N1 là căn nguyên chủ yếu gây dịch trong 3 năm: 2003, 2006 và 2008.
- Virút cúm A/H3N2 là căn nguyên chủ yếu gây dịch trong 4 năm: 2002, 2004, 2005 và 2007.
- Virút cúm B là căn nguyên chủ yếu gây dịch năm 2001.
- Virút cúm A/H5N1 là một trong những căn nguyên gây viêm phổi nặng từ tháng 12/2003 đến tháng 5/2009.

Virút cúm mùa lưu hành quanh năm, thường tập trung vào 2 thời điểm là cuối mùa xuân (tháng 2-3) và giữa mùa hè (tháng 7-8). Virút cúm A/H5N1 xuất hiện tập trung chủ yếu vào mùa đông – xuân.

2. Về đặc điểm di truyền học, tính kháng nguyên của các chủng virút cúm

2.1. Các chủng virút cúm theo mùa, 2001-2008.

Virút cúm theo mùa A/H1N1 có kiểu hình của gen HA và NA tương đối ổn định, ít thay đổi, biến đổi từ chủng A/New Caledonia/20/99 (2001-2006) - A/Solomon Island/3/06 (2007-2008). Gen HA và gen NA biến đổi độc lập theo một trật tự liên tiếp.

Virút cúm theo mùa A/H3N2 có sự thay đổi đa dạng về kiểu hình của gen HA và NA, biến đổi từ chủng A/Panama/2007/99 (2002-2003) – A/Fujian/411/02 (2003) – A/Wincosin/67/05 (2005) đến A/Brisbane/10/07 (2007-2008). Gen HA biến đổi nhanh hơn gen NA và biến đổi độc lập theo một trật tự liên tiếp.

Sự biến đổi về vật liệu di truyền ở virút cúm A/H3N2 xảy ra thường xuyên hơn virút cúm A/H1N1.

Đặc tính kháng nguyên của virút cúm theo mùa đều tương đồng với chủng sử dụng cho sản xuất vắc xin trong giai đoạn 2001- 2008 theo khuyến cáo của TCYTTG.

2.2. Virút cúm A/H5N1, 6/2003-5/2009

Virút cúm A/H5N1 lưu hành tại miền Bắc, Việt Nam bao gồm 2 clade: virút cúm A/H5N1 lưu hành giai đoạn 12/2003 – 10/2005 thuộc clade 1; từ năm 10/2005 đến 5/2009, virút cúm A/H5N1 thuộc clade 2.3.4.

Các chủng virút cúm A/H5N1 thuộc clade 1 và 2.3.4 vẫn là những chủng có độc lực cao, có ái lực đối với thụ thể gia cầm tại vị trí (SA α - 2,3 Gal) trên tế bào chủ.

Một số đột biến axit amin trên protein NA liên quan đến sự giảm độ nhạy hoặc kháng thuốc Oseltamivir được ghi nhận: đột biến axit amin tại vị trí H275Y (A/Vietnam/HN30408/2005) và đột biến axit amin tại vị trí I117V (A/VietNam/HN31209/2007 và A/VietNam/HN31412/2008).

KIẾN NGHỊ

Từ những kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi xin nêu một số kiến nghị sau:

1. Áp dụng phương pháp RT-PCR trong giám sát và chẩn đoán sớm nhiễm virút cúm mùa và virút cúm A/H5N1.
2. Tiếp tục giám sát sự lưu hành của virút cúm mùa và virút cúm A/H5N1 để xác định được tần suất tiến hoá, yếu tố tiềm tàng của sự trao đổi và tích hợp của virút cúm mùa và virút cúm A/H5N1, H1N1/09 đại dịch, khả năng thay đổi tính kháng nguyên liên quan đến giảm khả năng bảo vệ của vắc xin tương thích.
3. Giám sát các đột biến liên quan đến hiện tượng kháng hoặc giảm độ nhạy của thuốc kháng virút (Amantadine và Oseltamivir), phối hợp với các nghiên cứu trên gia cầm để giám sát được các đột biến tự nhiên (không chịu áp lực trực tiếp của thuốc kháng virút) trong gia cầm có liên quan đến hiện tượng này.