

Tính Toán Kháng Thể Của Chứng Cúm Mới A/H7N9 Ở Cấp Cộng Đồng

Maciej F Boni^{1,2}, Nguyen Van Vinh Chau³, Nguyen Dong⁴, Stacy Todd^{1,5}, Nguyen Thi Duy Nhat¹, Erwin de Bruin⁶, Janko van Beek^{6,7}, Nguyen Tran Hien⁸, Cameron P Simmons^{1,2,9}, Jeremy Farrar^{1,2}, Marion Koopmans^{6,7}

1Oxford University Clinical Research Unit, Wellcome Trust Major Overseas Programme, Ho Chi Minh City, Vietnam

2Centre for Tropical Medicine, Nuffield Department of Clinical Medicine, University of Oxford, Oxford, UK

3The Hospital for Tropical Diseases, Ho Chi Minh City, Vietnam

4Khanh Hoa Provincial Hospital, Nha Trang, Vietnam

5Liverpool School of Tropical Medicine, Liverpool, UK

6National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, The Netherlands

7Department of Virology, Erasmus Medical Center, Rotterdam, The Netherlands

8National Institute for Hygiene and Epidemiology, Hanoi, Vietnam

9Nossal Institute for Global Health, University of Melbourne, Victoria, Australia

Correspondence: Maciej F Boni, Oxford University Clinical Research Unit, Hospital for Tropical Diseases, 764 Vo Van Kiet Street, District 5, Ho Chi Minh City, Vietnam, Email: mboni@oucru.org, Tel +84 83 923 7954, Fax +84 83 923 8904

© The Author 2013. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs licence (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>), which permits noncommercial

reproduction and distribution of the work, in any medium, provided the original work is not altered or transformed in any way, and that the work properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com

Tóm tắt

Hiện tại không có những dữ liệu mới để diễn tả khả năng miễn dịch của người đối với chủng cúm mới A/H7N9. Sử dụng 1723 mẫu huyết thanh đã được thu thập tại miền Nam Việt Nam, chúng tôi đã kiểm tra các kháng thể của 5 loại kháng nguyên cúm gia cầm sử dụng thí nghiệm Protein Microarray. Hàm lượng kháng thể trong dân số nói chung của dòng virus H7 là cao hơn hàm lượng kháng thể của dòng virus H5, và thấp hơn hàm lượng của H9. Hàm lượng kháng thể cao nhất quan sát được ở những dòng cúm người. Hàm lượng kháng nguyên cúm gia cầm tăng theo độ tuổi và trung bình nhân hàm lượng kháng thể các kháng nguyên cúm người. Không có sự khác biệt về hàm lượng kháng thể giữa khu vực nông thôn và thành thị trong nghiên cứu của chúng tôi.

Giới thiệu

Những đại dịch cúm thường có nguyên nhân khi virus gia cầm hoặc heo xâm nhập được vào cơ thể người thông qua tái tổ hợp hoặc đột biến. Không phải bất cứ trường hợp nhảy chéo loài nào cũng đều gây ra một đại dịch cúm, minh chứng là sự khác nhau được quan sát trong thập kỷ vừa rồi giữa những đợt bùng phát lẻ tẻ của cúm A/H5N1 và trận đại dịch cúm 2009 A/H1N1 đã lan tràn trên toàn cầu chỉ trong một vài tuần. Việc bùng phát hiện tại của dòng cúm A/H7N9 trên người tại Trung Quốc[1,2], với 130 ca bệnh được xác nhận dưới 3 tháng và chưa có bất kỳ xác nhận nào của việc truyền nhiễm từ người sang người, chủng cúm này xuất hiện khả năng truyền nhiễm cao hơn từ gia cầm sang người so với H5N1, nhưng chưa giống với mô hình truyền nhiễm của đại dịch 2009. Trong bất kỳ nghiên cứu dịch tễ nào, các đặc điểm lâm sàng và dịch tễ chính rất khó để xác định được trong những giai đoạn đầu của đợt bùng phát hoặc giai đoạn dịch, vì lý do này nên các kế hoạch chuẩn bị cho đại dịch được tiến hành trên toàn cầu để cố gắng giảm nhẹ hoặc làm chậm giai đoạn đầu của dịch và thu thập dữ liệu sớm.

Khi một trận dịch lớn có thể xảy ra thì thông tin quan trọng cần có là mô hình miễn dịch của cộng đồng để có thể đánh giá được những mục tiêu cần bảo vệ và dự đoán tỉ lệ bị tấn công, những tham số về virus học cho phép xây dựng các chuẩn đoán và có thể xác nhận hiệu quả của các loại thuốc hay các loại vaccine, mức độ rộng lớn của bệnh, và nguy cơ nhiễm bệnh nghiêm trọng. Dữ liệu thu thập sẽ có sự ưu tiên khác nhau dựa trên các dấu hiệu dịch tễ ban đầu của việc truyền nhiễm từ động vật sang người có biểu hiện rời rạc (H5N1) hay thống nhất (H7N9), hoặc một trận đại dịch lan truyền nhanh chóng (2009 H1N1).

Một khía cạnh của việc chuẩn bị đối phó với những trận dịch lớn không nhận được nhiều sự quan tâm đó là phân tích các dữ liệu huyết thanh trong giai đoạn đầu của dịch, dù cho những dữ liệu này có thể được sử dụng để thông báo tình trạng sức khỏe và y tế của cộng đồng đối với trạng thái miễn dịch nói chung của dân số trong suốt khoảng thời gian quan trọng này. Chúng tôi thảo luận đề tài này thông qua việc trình bày dữ liệu huyết thanh của cộng đồng trong một dự án đang diễn ra ở miền Nam Việt Nam, và đề xuất phương pháp tốt nhất để giải thích những kết quả này trong bối cảnh của trận đại dịch vừa bùng phát.

Bối cảnh và phương pháp

Từ năm 2010, việc thu thập mẫu huyết thanh theo độ tuổi được tiến hành tại Bệnh viện Bệnh Nhiệt Đới thành phố Hồ Chí Minh và Bệnh Viện Đa Khoa Khánh Hòa tại thành phố Nha Trang, 300km về phía Bắc của thành phố Hồ Chí Minh. Thành phố Hồ Chí Minh là một thành phố đông dân với ước tính chừng 7.5 triệu dân số ở thời điểm hiện tại. Nha Trang, với dân số 400,000 người, là thành phố của tỉnh Khánh Hòa, bệnh viện Đa Khoa Khánh Hòa phục vụ điều trị bệnh cho người dân trong thành phố cũng như những khu vực nông thôn lân cận. Các mẫu huyết thanh ẩn danh và không chứa liên kết được thu thập ở khoa Sinh Hóa bệnh viện Nhiệt Đới HCM và khoa Huyết Học bệnh viện Đa khoa Khánh Hòa, những mẫu huyết thanh này được sử dụng cho mục đích phân tích hàm lượng kháng thể cúm. Các mẫu huyết thanh này đại diện cho dân số tại mỗi khu vực xung quanh bệnh viện. Việc tiêm phòng Vac xin cúm mùa tại Việt Nam không phổ biến, và vì thế không tương ứng với cấp độ của kháng thể cúm. Đề cương nghiên cứu được thông qua bởi Hội Đồng Đạo Đức Nghiên Cứu tại Đại Học Oxford, và Hội Đồng Đạo Đức và Khoa Học tại bệnh viện Bệnh Nhiệt Đới thành phố Hồ Chí Minh.

Toàn bộ 1723 mẫu được thu thập giữa năm 2010 và 2012 – 939 từ Hồ Chí Minh và 784 từ Khánh Hòa, và được kiểm tra kháng thể IgG tại vùng HA1 của 5 dòng virus cúm gia cầm và 11 dòng virus cúm người (Bảng S1) theo phương pháp Protein Microarray [3-5]. Một trong số năm dòng cúm gia cầm là virus A/Gà/Hà Lan/1/2003 (H7N7), kháng nguyên này có tỉ lệ protein HA1 chia sẻ tới 96% sự tương đồng với HA1 của dòng H7N9 đầu tiên tại Trung Quốc (A/Thượng Hải/2/2013, A/An Huy/1/2013 [1]). Chỉ 10 vị trí Amino acid khác biệt giữa 2 chuỗi này: V38I, T112A, D165N, I170V, T180A, I193V, I227M, E261G, N289D và E303R (việc đánh số HA như trong [2]). Hai vị trí cuối không xuất hiện trong các vùng này do liên quan với việc gắn kháng thể trung hòa virus, và những thay đổi được giữ lại có tính bảo lưu lớn, nhưng những đột biến gen xét đơn lẻ khác để diễn tả các đặc tính của kháng nguyên virus. Tuy nhiên, mức độ tương đồng cao làm nó giống như đã có phản ứng huyết thanh chéo đáng kể giữa các heamagglutinin từ 2 virus.

Ngoài kháng nguyên dòng H7, đĩa microarray còn bao gồm một kháng nguyên dòng H9 và 3 dòng kháng nguyên dòng H5 (H5/04, H5/07, và H5/10, xem Bảng S1). Phản ứng huyết thanh được thực hiện trên các pha loãng 4 lần (1:20, 1:80, 1:320, 1:1280), và hàm lượng kháng thể được tính thông qua việc fit đường log-logistic 4 tham số đối với 8 hiển thị phát quang (các điểm nhân hai với mỗi kháng nguyên) sử dụng các điểm uốn cong như là sự đo lường hàm lượng cho mẫu đó [5]. Theo cách phân tích này hàm lượng kháng nguyên có thể nhận mọi giá trị từ 20 đến 1280. Hàm lượng kháng nguyên rơi ra ngoài khoảng này được ghi nhận là 10 và 1810. Thí nghiệm đã được xác nhận trong đại dịch cúm 2009 H1N1 bằng cách so sánh kết quả với thí nghiệm Haemagglutination Inhibition (HI), phản ứng của kháng nguyên H5, H7 và H9 được xác nhận bằng cách sử dụng huyết thanh từ thỏ và gà đã được tiêm phòng[5]. Phân tích thống kê được thực hiện với R version 3.0.0 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria), và MATLAB (Mathworks, Natick, MA). Dữ liệu người chăn nuôi gia cầm được lấy từ Tổng Cục Thống Kê Việt Nam.

Các kết quả

Các kháng thể liên kết với dòng kháng nguyên H7 có hàm lượng cao hơn kháng thể liên kết với H5; hàm lượng của H9 là cao nhất giữa các dòng kháng nguyên gia cầm. Các trung bình nhân hàm lượng kháng thể (GMT) là 23.1 với H9 (95% CI 21.8-24.4), 19.0 với H7 (18.1-20.0), 13.5 cho cả H5/10 và H5/07 (13.1-13.9), và 11.1 với H5/04(10.9 – 11.3), trong khi đó trung bình nhân hàm lượng của kháng nguyên cúm người từ 60 đến 200. Điều này xác định rằng miễn dịch với dòng virus H7 là thấp và có thể so sánh điều đó với các virus cúm gia cầm khác. Thí nghiệm Microarray là nhạy hơn HI hoặc microneutralization (MN), nhưng nó vẫn chưa được xác định liệu rằng liên kết khác nhau được quan sát giữa H5, H7 và H9 có thể chuyển thành những khác biệt trong bảo vệ lâm sàng. Bởi vì các hàm lượng kháng thể được tính toán từ những thí nghiệm của chúng tôi không được so sánh trực tiếp với HI/MN, không có ngưỡng giá trị được lựa chọn đại diện cho phản ứng dương tính hoặc bảo vệ lâm sàng. Không thể liên kết những hàm lượng này với việc tiếp xúc hoặc lây nhiễm trước đây, vì những thí nghiệm huyết thanh này chưa được kiểm nghiệm cho H7N9. So sánh GMT của H7 với các kháng nguyên khác trên array, có lý do để nói rằng việc tiếp xúc trước đây với virus gia cầm H7 là tương tự với các virus cúm gia cầm khác.

Hình 1 chỉ ra các điểm phân vị cho toàn bộ các các phân phối của hàm lượng cũng như điểm tứ phân vị cao nhất của chúng; điểm tứ phân vị cao nhất được chỉ ra như là phần quan trọng của hàm lượng cho mỗi kháng nguyên tương đương với 10 và phần cao hơn cuối của mỗi phân phối thể hiện hầu hết các biến. Từng cặp khác nhau giữa các phân phối là quan trọng cho cả kiểm tra Kolmogorov-Smirnov (KS) và kiểm tra Wilcoxon Rank-Sum (WR) (toàn bộ giá trị $P < 10^{-5}$), ngoại trừ sự so sánh giữa H5/07 và H5/10 có sự phân phối các hàm lượng rất giống nhau. Các hàm lượng giống nhau giữa H9, H7 và H5 là phù hợp với [6,7] nhưng không phải toàn bộ [8,9] khảo sát trước đây về huyết thanh trong nhiều nghiên cứu dân số khác nhau.

Hàm lượng kháng thể của toàn bộ các kháng nguyên cúm gia cầm tăng theo độ tuổi như đã dự đoán (Hình 2), và điều này được giải thích chủ yếu bởi sự tăng hàm lượng kháng thể đối với virus cúm người (Biểu đồ S1). Nếu chúng ta giả định rằng việc nhiễm virus cúm gia cầm là hiếm, như vậy sự giải thích có nhiều khả năng nhất cho các dấu hiệu của hàm lượng kháng nguyên cúm gia cầm mà chúng ta quan sát được là phản ứng chéo của kháng thể bởi sự nhiễm virus cúm người trước đó [10]. Độ đa dạng của kháng thể cúm tăng theo độ tuổi, khi các cá thể tích lũy một danh mục các kháng thể đối với những lần nhiễm cúm khác nhau, và có thể phỏng đoán rằng những tập hợp kháng thể này có khả năng liên kết kháng nguyên của một số chủng cúm gia cầm cụ thể [11].

Không có sự khác biệt về hàm lượng kháng thể giữa hai địa điểm được điều tra trong dữ liệu này (các kiểm tra KS và WR, sau khi trích ra 100 mẫu con không có sự thay thế để phù hợp với phân phối độ tuổi giữa 2 khu vực; Biểu đồ S2), mặc dù thực tế rằng 38% hộ gia đình ở Khánh Hòa có nuôi gà, so sánh với 5.4% các hộ gia đình tại Hồ Chí Minh. Mặc khác nó cũng hợp lý khi tại Khánh Hòa việc tiếp xúc cúm người là thấp hơn so với Hồ Chí Minh và việc tiếp xúc cúm gia cầm là cao hơn ở Hồ Chí Minh. Mặc dù Sơ đồ S1 chỉ ra rằng khi hồi quy log-hàm lượng của kháng thể cúm gia cầm lên độ tuổi và log-GMT của kháng thể cúm người, chúng tôi không thấy bất cứ sự khác biệt trong việc hồi quy hệ số theo khu vực. Vì thế, dữ liệu không có bất cứ bằng chứng nào cho thấy những người chăn nuôi gia cầm gây ảnh hưởng lên hàm lượng kháng thể IgG của các chủng haemagglutinin gia cầm trong cộng đồng nói chung.

Thảo luận

Mặc dù không thể xác nhận về huyết thanh trong những tháng đầu của đại dịch bởi thiếu chứng dương, việc đo lường huyết thanh có thể cung cấp nhiều thông tin khi so sánh trên nhóm tuổi và các kháng nguyên. Giá trị của việc so sánh các hàm lượng kháng thể đối với kháng nguyên trong một viễn cảnh tiền đại dịch tiềm năng là nó có thể cảnh báo chúng ta tình huống nguy hiểm đặc biệt khi các phản ứng kháng thể chéo đối với một virus mới xuất hiện là thấp hơn dự kiến; nó đã có thể trở thành một trường hợp nếu liên kết H7 thấp hơn liên kết H5 trong nghiên cứu của chúng tôi. Với suy nghĩ về sự chuẩn bị cho đại dịch, sự so sánh kháng nguyên – kháng nguyên mặt khác có thể được sử dụng trong việc phát triển vac xin ưu tiên cho virus H7 hơn là cho virus H9, nếu các hàm lượng cao hơn của H9 có tương quan đến cấp độ bảo vệ lâm sàng. Sự so sánh các hàm lượng kháng thể trên nhóm tuổi có thể hữu dụng cho việc chống lại những trận dịch lớn, mặc dù các kết quả sẽ không luôn luôn có giá trị vào đúng thời điểm, như trong trường hợp 2009 [13].

Sự phân tích hoàn hảo huyết thanh dịch tễ trong giai đoạn đầu của đại dịch có thể liên kết số lượng khác nhau của huyết thanh đến số lượng lượng khác nhau trong tỉ lệ lây nhiễm trong cộng đồng, nhưng các thí nghiệm và phương pháp phân tích cần thiết thì cần phải thêm nhiều năm nữa mới có thể tạo lập liên kết này. Đối với những mầm bệnh làm miễn dịch hoàn hảo, liên kết này có thể hình thành bởi vì tỉ lệ phần trăm các cá nhân miễn dịch hoàn hảo có thể được đánh đồng với phần trăm suy giảm trong số lượng các mầm bệnh được sản sinh cơ bản (nếu các mô hình trộn lẫn được biết và xem như là thống nhất). Đối với cúm, mặc dù vậy, độ đa dạng của kháng nguyên là cao và một phần miễn dịch ở mức chuẩn; vì thế, hiện tại không sẵn sàng để có thể liên kết việc đánh giá miễn dịch trong bất cứ nghiên cứu về cúm nào với số lượng sự giảm độ nhạy cảm, sao chép virus, hoặc khả năng lây nhiễm.

Những nghiên cứu lâm sàng và dịch tễ ưu tiên là phần quan trọng của việc chống lại những trận dịch lớn. Nếu bệnh nhân, việc liên lạc, và các chứng âm từ những đợt nhiễm sớm nhất có thể thu thập được và theo dõi về huyết thanh, thì sự xác nhận các kết quả huyết thanh dương tính và âm tính có thể được sẵn sàng sau hai đến ba tháng, phụ thuộc vào tỉ lệ lan truyền, các trường hợp nguy hiểm, và việc thu thập. Trong năm

2009, những kết quả huyết thanh có thể đến quá chậm, nhưng đối với việc truyền nhiễm yếu hơn của đợt bùng phát H7N9 và H5N1, việc giải thích về huyết thanh có thể đảm nhận vị trí tốt trước khi đợt bùng phát trở thành đại dịch.

Nếu việc đáp ứng huyết thanh ở cộng đồng tại Việt Nam được xem như là đại diện cho các nước khác ở Đông và Nam á, các kết quả được trình bày ở đây có thể nói với chúng ta vài điều về các cấp độ quan hệ giữa miễn dịch và sự bảo vệ tại khu vực này. Điều này cho chúng ta một lý do khác để tìm kiếm một sự hiểu biết tốt hơn về sự lưu thông cúm toàn cầu. Nếu niềm tin hiện tại cho rằng sự lưu thông và pha trộn cúm toàn cầu là trong khoảng thời gian ngắn [14, và trong tài liệu tham khảo], thì những quang cảnh miễn dịch tạo nên bởi những trận dịch cúm phải tương tự trên các quốc gia. Sử dụng các mô hình vac xin quốc gia như nguyên nhân [15], các nghiên cứu huyết thanh từ một số lượng giới hạn các khu vực nghiên cứu có thể được sử dụng để xác nhận sự đáp ứng toàn cầu. Nếu các nghiên cứu phối hợp phân hồi trên huyết thanh được nhận thức là quá khó khăn hoặc quá khoa học, một giải pháp đơn giản hơn có thể được sử dụng cho yêu cầu này thông qua việc bảo quản những mẫu huyết thanh vừa được thu thập, mẫu huyết thanh này có thể vừa được thí nghiệm hoặc sẵn sàng cho thí nghiệm cho một lớp rộng của những mầm bệnh quan trọng.

Miễn dịch cấp độ cộng đồng xuất hiện thấp đối với cúm A/H7N9 và có thể so sánh được với những virus cúm gia cầm khác mà chúng ta quan sát được. Tại miền Nam Việt Nam, chúng tôi không thấy bằng chứng rằng cúm H7N9 hiện tại đang bùng phát đại diện cho một đỉnh của tăng băng trôi của việc lây nhiễm H7N9 đang diễn ra trên diện rộng. Chúng tôi nhận thấy không có sự khác biệt giữa hai khu vực với mức độ chủ sở hữu gia cầm là thấp và cao, điều này có nghĩa là những người chăn nuôi gia cầm không tạo ra bất kỳ ảnh hưởng nào lên việc tiếp xúc với cúm gia cầm hoặc cấp độ kháng thể cúm gia cầm của cộng đồng nói chung. Nếu dịch H7N9 phát triển thành dịch lây giữa người, các kết quả hiện tại sẽ được xem như là đường chuẩn cho việc giải thích huyết thanh học cấp độ cộng đồng sau đợt lây nhiễm đầu tiên.

Giải Thích Hình

Hình 1. Các điểm phân vị chỉ ra những so sánh của sự phân phối hàm lượng giữa 5 kháng nguyên ($n=1723$, phía trên bên trái). Các giá trị hàm lượng và các kháng nguyên đặc biệt được đánh nhãn trên cả 2 trục tọa độ. Mười điểm phân vị phụ tại phần thấp hơn bên phải của hình chỉ ra các điểm phân vị của tứ phân vị lớn nhất của các cá thể ($n=431$) với trung bình nhân các hàm lượng kháng thể cao nhất trên năm kháng nguyên gia cầm. Toàn bộ so sánh phân phối cặp chỉ ra thống kê quan trọng rằng các phân phối là khác nhau (toàn bộ $P < 10^{-5}$, Kolmogorov-Smirnov và Wilcoxon Rank-Sum) ngoại trừ cho 2 bảng đánh dấu “NS”. Các kháng nguyên được viết tắt là A/Vietnam/1194/2004 (**H5/04**), A/CamPu Chia/R0405050/2007 (**H5/07**), A/Hubei/1/2010 (**H5/10**), A/Gà/Hà Lan/1/2003 (**H7**), và A/Guinea Fowl/Hong Kong/WF10/1999 (**H9**).

Hình 2: Biểu đồ phân tán của hàm lượng kháng thể bởi kháng nguyên và nhóm tuổi. Các đường màu đỏ chỉ các điểm phân vị thứ 70, 80, và 90 của các điểm dữ liệu. Một đường đơn màu đỏ ở 10 xác định rằng các phân vị thứ 70, 80, và 90 của dữ liệu được thiết lập toàn bộ bằng 10.

Hỗ Trợ Tài Chính

Nghiên cứu này được hỗ trợ bởi tổ chức Wellcome Trust [098511/Z/12/Z, 089276/B/09/7, 097465/B/11/Z, 084368/Z/07/Z], tổ chức British Medical Association [HC Roscoe 2011], và Dutch Ministry of Economic Affairs, Agriculture, and Innovation, Castellum Project.

Tính Pháp Lý

Toàn bộ các tác giả báo cáo không có những xung đột tiềm ẩn.

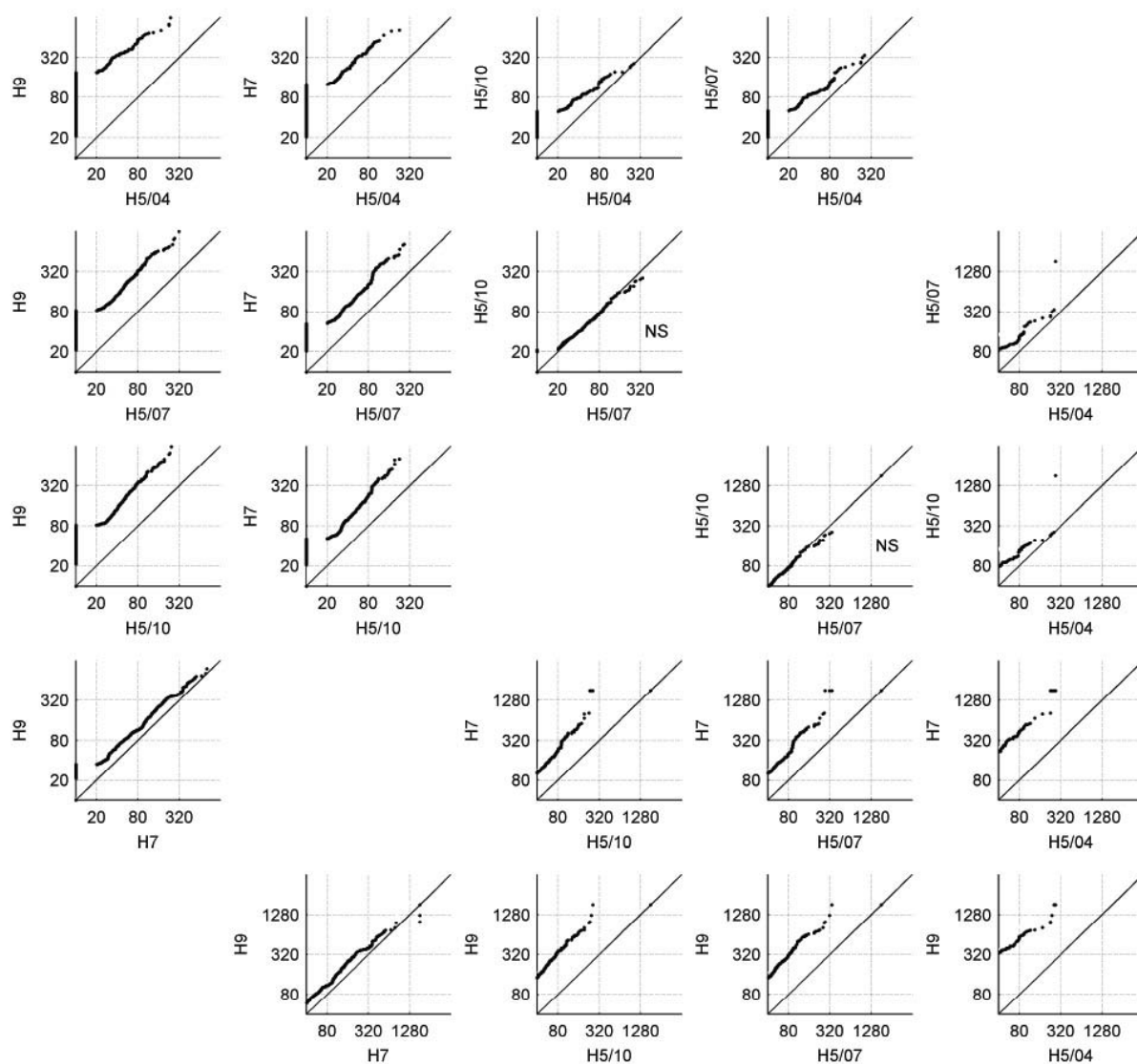
Lời Cảm Ơn

Chúng tôi xin được cảm ơn TT Hien, HDT Nghia, DN Vinh, HLA Huy, JE Bryant, HR van Doorn, NT Hung, TTN Thao, PH Anh, TD Nguyen, MD de Jong, M Wolbers, and NM Ferguson đã hỗ trợ cho nghiên cứu, thí nghiệm, và quản lý những thành phần khác của dự án. Chúng tôi cảm ơn các tác giả, tài liệu nguồn, và những phòng thí nghiệm (WHO Trung Tâm Cúm Quốc Gia Trung Quốc) cho những chuỗi trình tự từ dữ liệu GISAID's EpiFlu.

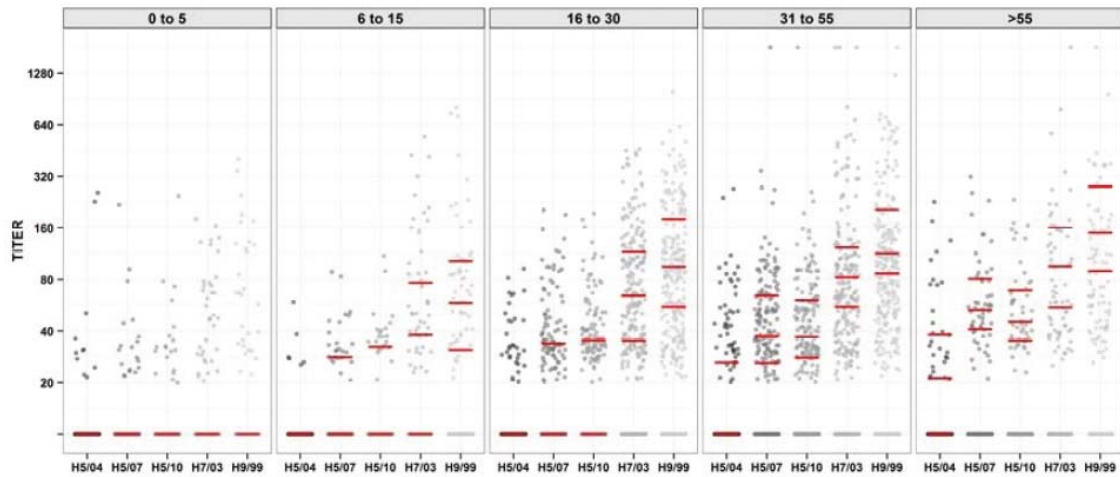
Tài liệu tham khảo

1. Gao R, Cao B, Hu Y, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9)virus. *N Engl J Med* **2013**, published online April 14.
2. Liu D, Shi W, Shi Y, et al. Origin and diversity of novel influenza A/H7N9 viruses causing human infection: phylogenetic, structural, and coalescent analyses. *Lancet* **2013**;published online May 1.
3. Baas DC, Koopmans MP, de Bruin E, et al. Detection of influenza A virus homo- and heterosubtype-specific memory B-cells using a novel protein microarray-based analysis tool. *J Med Virol* **2013**; 85:899–909.
4. Huijskens EGW, Reimerink J, Mulder PGH, et al. Profiling of humoral response to influenza A (H1N1) pdm09 infection and vaccination measured by a protein microarray in persons with and without history of seasonal vaccination. *PLoS One* **2013**; 8:e54890.
5. Koopmans M, de Bruin E, Godeke G-J, et al. Profiling of humoral immune responses to influenza viruses by using protein microarray. *Clin Microbiol Infect* **2012**; 18:797–807.
6. Wang M, Fu C-X. Antibodies against H5 and H9 avian influenza among poultry workers in China. *N Engl J Med* **2009**; 360:2583–4.
7. Trani L Di, Porru S, Bonfanti L. Serosurvey against H5 and H7 avian influenza viruses in Italian poultry workers. *Avian Dis* **2012**; 56:1068–71.
8. Kayali G, Ortiz EJ, Chorazy ML, Gray GC. Evidence of previous avian influenza infection among US turkey workers. *Zoonoses and Public Health* **2010**; 57:265–72.
9. Gray GC, McCarthy T, Capuano AW, Setterquist SF, Alavanja MC, Lynch CF. Evidence for avian influenza A infections among Iowa’s agricultural workers. *Influenza and Other Respiratory Viruses* **2008**; 2:61–9.
10. Lynch GW, Selleck P, Church WB, Sullivan JS. Seasoned adaptive antibody immunity for highly pathogenic pandemic influenza in humans. *Immunol Cell Biol* **2012**; 90:149–58.
11. Garcia J-M, Pepin S, Lagarde N, et al. Heterosubtype neutralizing responses to influenza A (H5N1) viruses are mediated by antibodies to virus haemagglutinin. *PLoS One* **2009**; 4:e7918.

12. Khuntirat BP, Yoon I-K, Blair PJ, et al. Evidence for subclinical avian influenza virus infections among rural Thai villagers. *Clin Infect Dis* **2011**; 53:e107–16.
13. Katz J, Hancock K, Veguilla V, et al. Serum cross-reactive antibody response to a novel influenza A (H1N1) virus after vaccination with seasonal influenza vaccine. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **2009**; 58:521–24.
14. Bahl J, Nelson MI, Chan KH, et al. Temporally structured metapopulation dynamics and persistence of influenza A H3N2 virus in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* **2011**; 108:19359–64.
15. Gioia C, Castilletti C, Tempestilli M, et al. Cross-subtype immunity against avian influenza in persons recently vaccinated for influenza. *Emerg Infect Dis* **2008**; 14: 121–8.



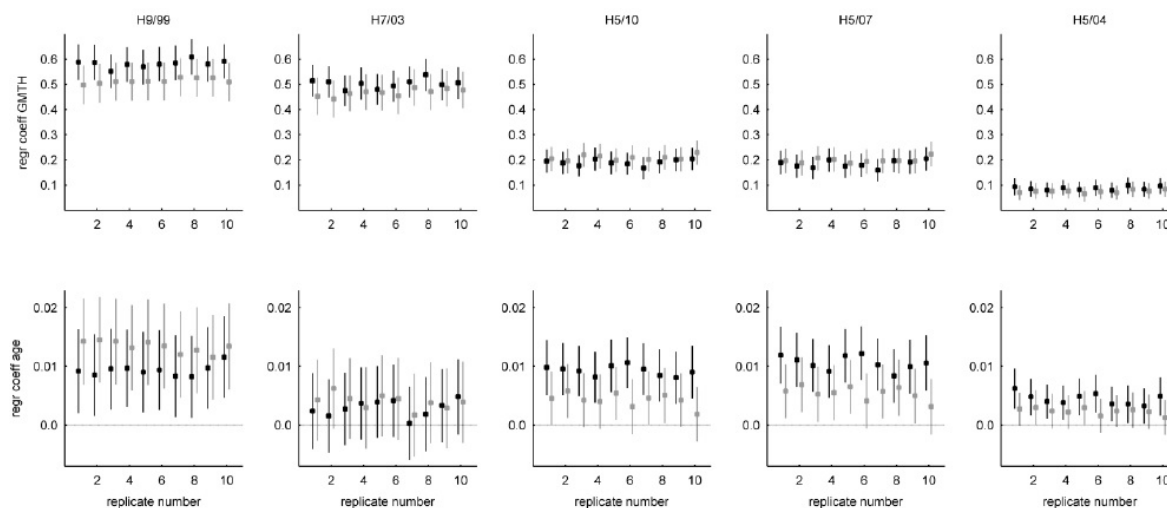
Hình 1: Các điểm phân vị chỉ ra những so sánh của sự phân phối hàm lượng giữa 5 kháng nguyên



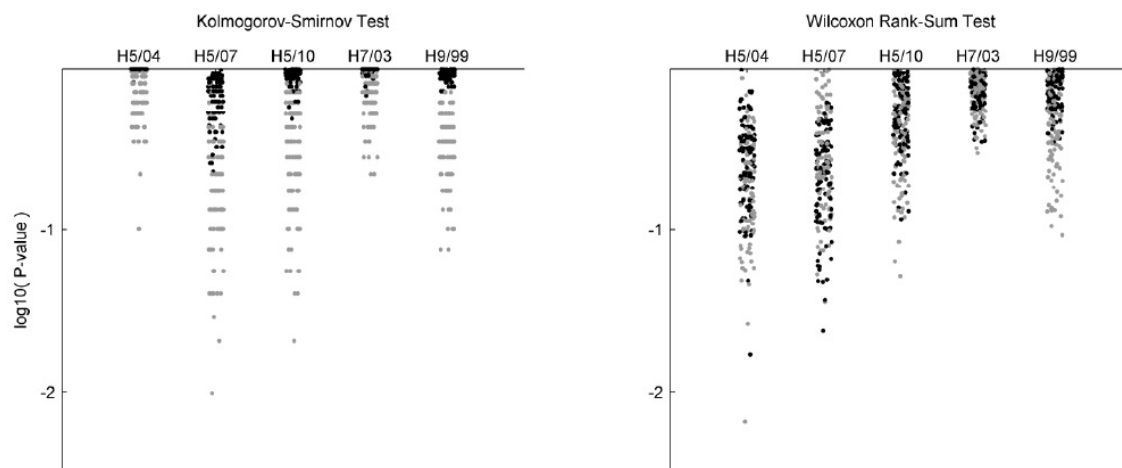
Hình 2: Biểu đồ phân tán của hàm lượng

Bảng S1 – Những kháng nguyên được gắn lên đĩa protein microarray. Các dòng trong ngoặc. Viết tắt được bôi đen.

Các Kháng Nguyên Cúm Gia Cầm	Các Kháng Nguyên Cúm Người
A/Guinea Fowl/Hong Kong/WF10/1999 (H9N2)	A/South Carolina/1/1918 (H1N1)
H9/99	
A/Chicken/Netherlands/1/2003 (H7N7)	A/USSR/92/1977 (H1N1)
H7/03	
A/Hubei/1/2010 (H5N1)	A/New Caledonia/20/1999 (H1N1)
H5/10	
A/Cambodia/R0405050/2007 (H5N1)	A/Brisbane/59/2007 (H1N1)
H5/07	
A/Vietnam/1194/2004 (H5N1)	A/California/6/2009 (H1N1)
H5/04	
	A/Aichi/2/1968 (H3N2)
	A/Wyoming/3/2003 (H3N2)
	A/Wiscosin/67/2006(H3N2)
	A/Brisbane/10/2007 (H3N2)
	A/Victoria/210/2009 (H3N2)
	A/Victoria/361/2011 (H3N2)

Biểu đồ S1

Biểu đồ S1: Hệ số hồi quy (hộp) với 95% khoảng tin cậy (đường), khi hồi quy log2 hàm lượng một kháng thể cúm gia cầm trên độ tuổi và trung bình nhân hàm lượng của chín kháng thể cúm người (GMTH). Hàng trên cùng chỉ ra hệ số hồi quy tương ứng với GMTH, và dòng cuối chỉ ra hệ số hồi quy tương ứng với độ tuổi. Hồi quy được thực hiện riêng rẽ cho từng khu vực nghiên cứu (Thành phố Hồ Chí Minh màu đen, Khánh Hòa màu nâu). Mười mẫu ngẫu nhiên từ dữ liệu được sử dụng ($n=609$ cho mỗi khu vực nghiên cứu) để phù hợp với sự phân phối độ tuổi giữa Hồ Chí Minh và Khánh Hòa, và chỉ số mẫu được chỉ ra trên trục x của biểu đồ. Hai kháng thể cúm người được loại trừ khỏi phân tích: A/Victoria/261/2011 bởi vì gần một nửa số mẫu được thu thập trước khi loại virus này bắt đầu lưu hành, và A/South Carolina/1/1918 khi không có mẫu nào có kháng thể của virus này.

Biểu đồ S2

Biểu đồ S2: Giá trị-P chỉ ra sự khác biệt trong phân phối hàm lượng giữa thành phố Hồ Chí Minh và Khánh Hòa. Những phân phối hàm lượng được mẫu con 100 lần vì vậy phân phối tuổi phù hợp chính xác giữa các vùng nghiên cứu ($n=609$ cho mỗi khu vực nghiên cứu), và giá trị P liên quan đến những mẫu con được hiển thị thành những chấm đen. Đối với mỗi mẫu con, tứ phân vị cao nhất ($n=152$ cho mỗi khu vực nghiên cứu) của phân phối được kiểm tra cho mẫu khác, và những giá trị P này được trình bày bởi chấm nâu.