

Sự Tiến Hóa Gần Đây Của Virus Cúm Gia Cầm A/H5N1 Ở Gia Cầm Được Tiêm Vắc Xin và Không Tiêm Vắc Xin Từ Các Nông Trại Ở Miền Nam Việt Nam, Tháng 1 Đến Tháng 3 Năm 2010

N. T. Long¹, T. T. Thanh², H. R. van Doorn^{2,3,4}, P. P. Vu¹, P. T. Dung¹, T. T. K. Dung⁵, T. N. Tien⁵, D. T. T. Thao⁵, P. Hung⁶, N. V. Quang⁶, N. T. Hoa^{2,3}, J. E. Bryant^{2,3} and M. F. Boni^{2,3,7}

¹ Regional Animal Health Office No. 6, Ho Chi Minh City, Vietnam

² Oxford University Clinical Research Unit, Ho Chi Minh City, Vietnam

³ Nuffield Department of Medicine, Centre for Tropical Medicine, University of Oxford, Oxford, UK

⁴ Southeast Asian Infectious Diseases Clinical Research Network, Jakarta, Indonesia

⁵ Regional Animal Health Office No. 7, Can Tho, Vietnam

⁶ Central Viet Nam Veterinary Institute, Nha Trang, Vietnam

⁷ MRC Centre for Genomics and Global Health, University of Oxford, Oxford, UK

Keywords:

emerging diseases; vaccine; veterinary epidemiology; zoonosis/zoonotics; virus

Correspondence:

Maciej F. Boni. Oxford University Clinical Research Unit, Wellcome Trust Major Overseas Programme, Hospital for Tropical Diseases, 190 Ben Ham Tu, Quan 5, Ho Chi Minh City, Vietnam.
Tel.: +84839237954;
Fax: +84839238904;
E-mail: mboni@oucru.org

Received for publication January 13, 2011

doi:10.1111/j.1865-1682.2011.01229.x

Re-use of this article is permitted in accordance with the Terms and Conditions set out at http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms

Tóm tắt

Báo cáo này phân tích 15 dãy trình tự haemagglutinin (HA) mới của virus cúm gia cầm A/H5N1 được thu mẫu từ gia cầm bệnh ở miền Nam Việt Nam từ 01/01/2010 đến 06/03/2010. Những trình tự HA này tạo thành một nhánh phụ mới bắt nguồn từ phân nhóm 1 của virus H5N1 (đã lưu hành tại Việt Nam từ 2003/2004). Các virus này được đặc trưng bởi một thay đổi từ isoleucine thành valine ở vị trí 514 (I514V) và có 1.8% khác biệt ở cấp độ nucleotide so với các trình tự HA được thu ở Việt Nam trong năm 2007. Năm thay đổi trên amino acid mới được tìm thấy trong vùng kháng nguyên, và ba được xác định nằm trong vùng gắn kết thụ thể. Một đột biến mới có thể đã loại bỏ một vùng N-linked glycosylation trên bộ gen của các virus này. Ngoài ra, một phân tử methionine được chèn thêm vào vùng polybasic cleavage. Năm trong số những virus này được thu mẫu từ những nông trại có tiêm phòng H5N1, nhưng không có mối liên hệ giữa các đột biến tìm được với trạng thái tiêm chủng của đàn gia cầm. Mặc dù hiện tại chưa có đủ bằng chứng khẳng định khả năng biến đổi kháng nguyên hay thoát miễn dịch ở virus H5N1 Việt Nam, chúng tôi cho rằng việc giám sát liên tục vẫn là một ưu tiên cao.

Hơn 500 ca nhiễm cúm H5N1 đã được ghi nhận tính từ lúc chủng virus độc lực cao này bắt đầu xuất hiện trong năm 1996/1997 (Peiris et al., 2007; Tarantola et al., 2010). Trong thời gian gần đây, mặc dù tỷ lệ nhiễm H5N1 ở người đã giảm, việc giám sát và mô tả đặc điểm phân tử của virus cúm gia cầm độc lực cao (HPAI) vẫn là một ưu tiên cao. Tính đến nay, hầu hết các ca nhiễm bệnh ở người xảy ra ở 3 quốc gia: Indonesia (174), Ai Cập (130) và Việt Nam (119). Cả ba nước này đều có số lượng nông trại chăn nuôi gia cầm lớn đi kèm một mạng lưới rộng khắp các chợ buôn bán và tiêu thụ gia

cầm (Domenech et al., 2009). Tần suất bùng phát dịch ở các nước này khá thường xuyên với tỉ lệ cao của HPAI trong gia cầm. Việt Nam có tổng đàn gia cầm hơn 220 triệu con với hơn 40% hộ gia đình nuôi gà hoặc vịt. Cúm gia cầm H5N1, với khả năng lây nhiễm và gây tử vong trên người, đã trở thành mối đe dọa thường trực với các đợt dịch bùng phát thường xuyên từ tháng 12 đến tháng 2 hàng năm. Mặc dù hầu hết các ca nhiễm H5N1 trên người ở Việt Nam xảy ra trong các năm 2004 và 2005, hai năm vừa qua cũng có 12 trường hợp được ghi nhận, trong đó có 7 ca đã tử vong.

Cấu trúc phả hệ của virus cúm gia cầm H5N1 được WHO phân tích dựa trên trình tự haemagglutinin (HA) nhằm xác định nhóm và nhóm phụ của các dòng virus đã được phân lập (WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group, 2009). Các chủng H5N1 được tìm thấy ở Việt Nam nằm trong nhóm 1, nhóm 2.3.2 và nhóm 2.3.4 (Le et al., 2008; Nguyen et al., 2008). Năm 2008, một số virus thuộc nhóm 7 cũng được tìm thấy dọc biên giới Việt – Trung (Nguyen et al., 2009), tuy nhiên, các virus này vẫn chưa xâm nhập sâu vào Việt Nam. Hiện nay, chủng H5N1 chính (nhưng không phải duy nhất) gây bệnh ở miền Nam Việt Nam là các virus thuộc nhóm 1 (Wan et al., 2008). Nghiên cứu cấu trúc di truyền của các quần thể virus ở Việt Nam cho thấy cúm gia cầm H5N1 ở miền Bắc và miền Nam Việt Nam tiến hóa tương đối độc lập (Smith et al., 2006a).

Kể từ tháng 10 năm 2005, chính phủ Việt Nam đã theo đuổi các chiến dịch tiêm phòng định kỳ sáu tháng đầy tham vọng cho gia cầm (Hinrichs et al., 2010). Chiến lược tiêm phòng này là một trong những biến số quan trọng giải thích cho việc giảm đáng kể tần suất bùng phát dịch và tỉ lệ nhiễm trên tổng đàn (Domenech et al., 2009; Henning et al., 2009). Khoảng 250-350 triệu gia cầm được tiêm vaccin trong tháng 3-4 và tháng 8-9 mỗi năm, đây là vắc xin bất hoạt được tạo ra bởi kỹ thuật đảo ngược di truyền; công thức hiện tại (Re-1) chứa HA và neuraminidase của dòng virus A/Goose/Guangdong/1/96. Re-1 chỉ là họ hàng xa với dòng virus hiện đang lưu hành, mặc dù vậy, tác dụng bảo vệ của nó chống lại các virus hiện tại thuộc nhóm 1, 2.2 và 2.3.4 vẫn khá tốt (Tian et al., 2010). Trong năm 2011, Việt Nam có kế hoạch nâng cấp dòng vaccin lên Re-5 (A/duck/Anhui/1/2006), là nhánh virus 2.3.4 có họ hàng gần hơn với các dòng Trung Quốc đang lưu hành (Chen, 2009). Giám sát đa dạng di truyền và sự tiến hóa liên tục trong các quần thể được tiêm phòng là rất quan trọng để xác định những thay đổi trong độc lực cũng như sự thoát miễn dịch của virus. Tuy nhiên, việc giám sát này rất khó thực hiện thực tế là một số gà bị chuyển đổi huyết thanh nhưng hoàn toàn không có triệu chứng lâm sàng của bệnh (Henning et al., 2010). Một giả thuyết nhằm giải thích cho hiện tượng này là thừa nhận sự lưu hành của các biến thể H5N1 độc lực thấp ở gà; mặc dù vậy, chưa có bằng chứng virus học để xác nhận điều này.

Phương pháp

Chúng tôi giải trình tự HA của virus H5N1 được thu từ gia cầm bệnh trong suốt thời gian giám sát thụ động từ tháng 1 đến tháng 3 2010 tại bốn tỉnh của miền Nam Việt Nam: Khánh Hòa, Bến Tre, Sóc Trăng và Cà Mau.

Việc thu mẫu được tiến hành bởi các chi cục Thú y của các tỉnh dựa theo hướng dẫn quốc gia về việc xử lý

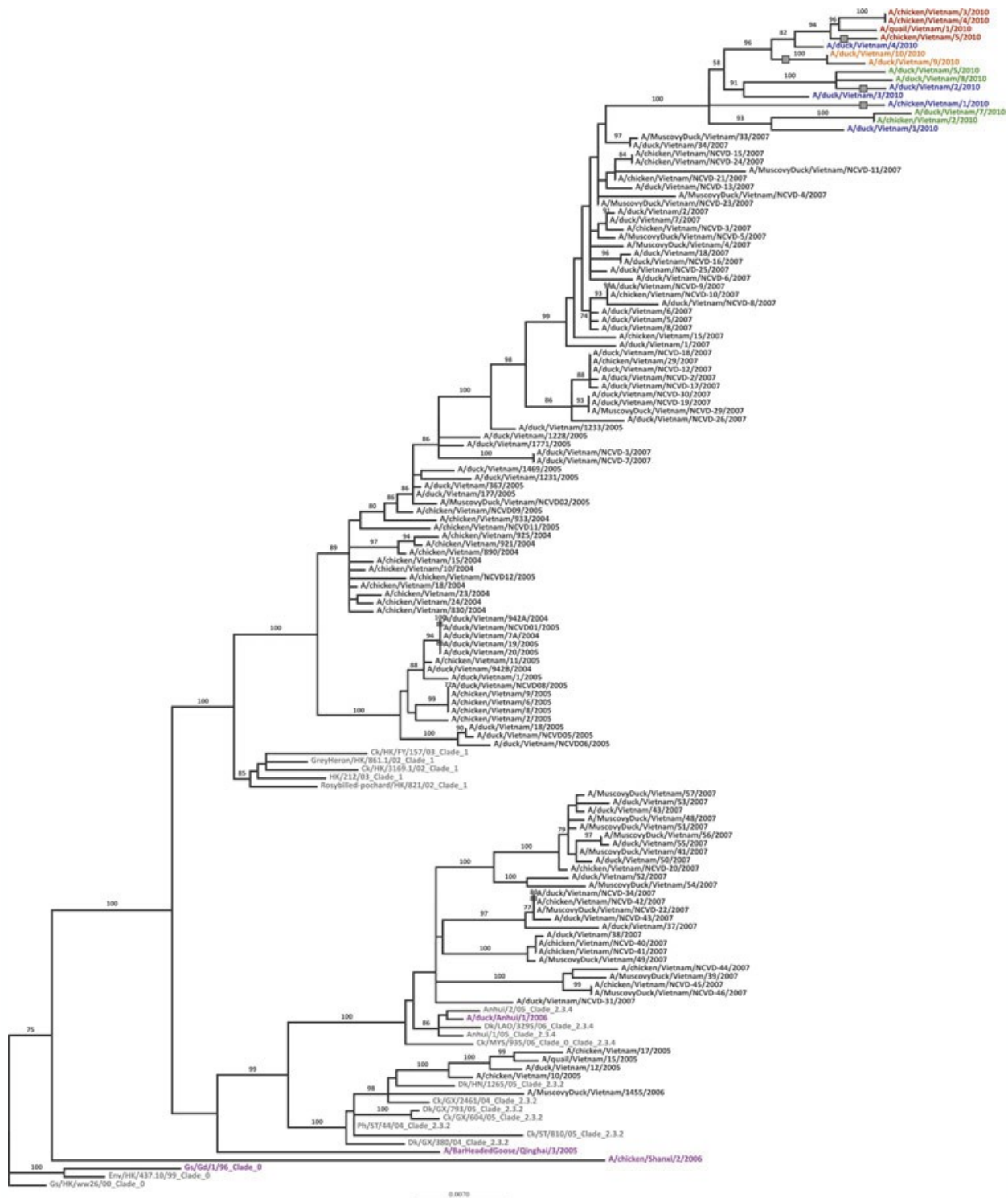
dịch bệnh có dấu hiệu của cúm độc lực cao. Mẫu phết hậu môn được thu từ một đến ba con gia cầm trên mỗi bãi nghi cúm và được kiểm tra bằng phương pháp RT-PCR sử dụng quy trình chuẩn OIE (OIE, 2008). Có 16 trang trại báo cáo gia cầm bệnh trong suốt 3 tháng nghiên cứu, và 17 mẫu được thu từ những nông trại này cho kết quả dương tính với H5. Bốn trang trại đã tiêm vắc xin trong vòng 3 tháng trước đó. Việc giải trình tự trực tiếp HA được thực hiện trên toàn bộ mẫu bằng phương pháp đã trình bày trước đây (Guan et al., 2002), 15 trình tự HA đã được tạo ra thành công (9 từ vịt thịt, 4 từ gà, một từ chim cút và một từ ngan; các số nhập vào Genbank CY081026 – CY081040).

Để đặt 15 trình tự HA mới trong bối cảnh khu vực, chúng tôi đã tải toàn bộ các trình tự HA (>1600 nt) của virus cúm gia cầm H5N1 thu ở Việt Nam từ Genbank (n=105; 33 gà, 71 vịt và 1 chim cút). Chúng tôi chỉ lấy các trình tự từ dự án *Influenza Genome Sequencing Project* (IGSP) (Ghedini et al., 2005) do quá trình thu mẫu cũng như giải trình tự của dự án này đã được kiểm soát chặt chẽ về chất lượng (Boni et al., 2010). Mười lăm trình tự HA thu được từ nghiên cứu này được phân tích cùng với 105 trình tự tải từ GenBank, 16 trình tự đặc trưng cho các phân nhóm (của H5N1), 3 trình tự thuộc phân nhóm 0 (dung làm nhóm ngoài), và 3 dòng virus được chọn làm vắc xin của Trung Quốc (Chen, 2009) (do các dòng này được cho là gần với dòng vắc xin sử dụng ở Việt Nam). Quá trình going trình tự được thực hiện bởi phần mềm MUSCLE v3.8 (Edgar, 2004); cây phát sinh loài được dựng bằng RAXML, sử dụng phương pháp tìm ước lượng hợp lý cực đại với 1000 vòng lặp bootstrap (Stamatakis, 2006; Stamatakis et al., 2008). Hình 1 biểu diễn cấu trúc phát sinh loài của toàn bộ 142 trình tự nói trên.

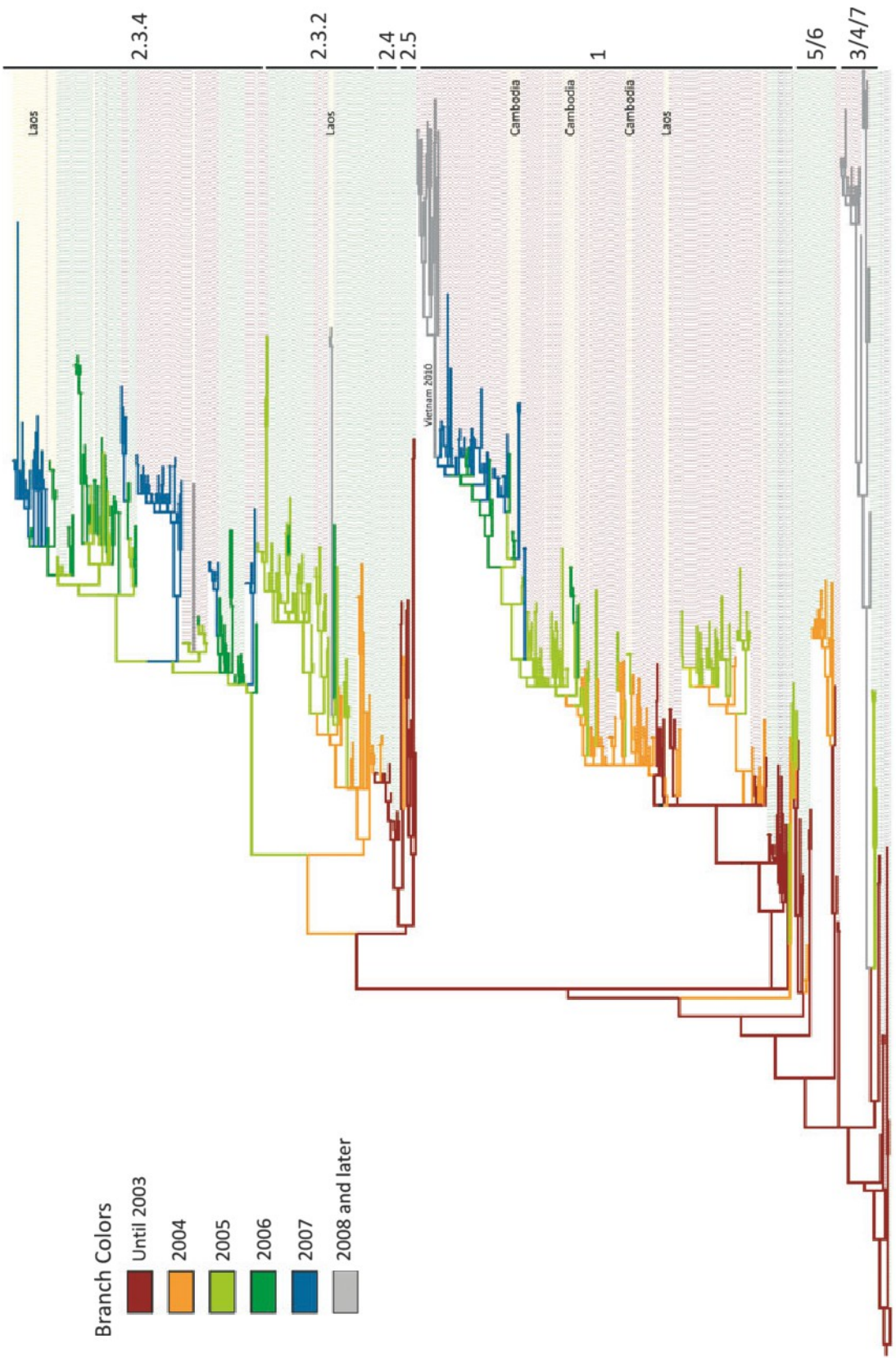
Để tìm hiểu mối quan hệ giữa những dòng virus Việt Nam thu được trong nghiên cứu này với virus ở các quốc gia lân cận, chúng tôi đã sử dụng một tập dữ liệu trình tự lớn hơn, sử dụng cả trình tự của IGSP và không phải IGSP, để dựng nên cây phát sinh loài thứ hai. Chúng tôi đã tải toàn bộ các trình tự HA của H5N1 (>1600 nt) từ Campuchia (n=25); Lào (n=36); Việt Nam (n=293); và 3 của tỉnh Trung Quốc là Vân Nam (n=68), Quảng Tây (n=78) (có đường biên giới chung với Việt Nam), và tỉnh Quảng Đông (n=37) (gần với Việt Nam và là một tâm điểm quan trọng của H5N1). Các trình tự Trung Quốc thu trước năm 2003 được loại bỏ để làm giảm kích thước của tập dữ liệu. Các trình tự này được sắp xếp với các trình tự đặc trưng nhóm, các dòng vắc xin và nhóm ngoài như ở trên. Hình 2 biểu diễn cây phát sinh loài hợp lý cực đại (RAXML, 100 vòng lặp bootstrap) của 574 trình tự này.

Kết quả và thảo luận

Mười lăm trình tự Việt Nam năm 2010 hình thành một phân nhánh phụ (có giá trị bootstrap cao) trong nhóm 1,



Hình 1. Cây phát sinh loài hợp lý cụ đại của 142 trình tự HA virus cúm gia cầm H5N1 Việt Nam. Xuất phát từ Gs/Gd/1/96. Chỉ những trình tự có trên Dự Án Trình Tự Gen Cúm (National Institutes of Health, USA) là được tính trong phân tích này. Giá trị bootstrap $\geq 70\%$ được chỉ ra trên các nhánh. Các trình tự từ 2010 được tô màu theo mã vị trí: Khanh Hoa (đỏ), Ben Tre (cam), Soc Trang (xanh lá) and Ca Mau (xanh da trời). Các hộp xám trên nhánh biểu thị năm trình tự được thu mẫu từ những nông trại đã tiêm chủng. Các dòng vaccine đã sử dụng ở Trung Quốc (Chen, 2009) được biểu diễn bằng màu đỏ sẫm. Mô hình tiến hóa sử dụng bởi RAXML: GTR-C, $\alpha = 0.422679$, $AC = 1.149255$, $AG = 5.429345$, $AT = 0.628623$, $CG = 0.232736$, $CT = 7.840430$, $GT = 1.0$.



Hình 2. Cây phát sinh loài hợp lý cực đại của 574 trình tự HA của virus H5N1 từ khu vực Đông Nam Á: Việt Nam, Lào, Campuchia (toàn bộ các năm) và and Vân Nam, Quảng Tây và Quảng Đông Trung Quốc (2003) và sau đó). Xuất phát từ Gs/Gd/1/96. Màu sắc các nhánh xác định năm thu mẫu. Các vùng bóng ở bên phải của nhánh tương ứng với đất nước mà virus đó được thu mẫu: Việt Nam

(đỏ), Trung Quốc (Xanh lá), Lào (vàng) và Cam pu chia (cam). Các số ở bên lề phải của xác định các nhánh theo định nghĩa của WHO. Mô hình tiến hóa bởi RAXML: GTR-C, a = 0.

477645, AC = 0.878452, AG = 5.045729, AT = 0.606001, CG = 0.176209, CT = 7.067432, GT = 1.0.

Bảng 1. 15 trình tự HA được thu từ 01/2010 đến 03/2010 ở miền Nam Việt Nam

Tên trình tự	Ngày thu mẫu	Địa điểm (Tỉnh)	Các amino acid mới thay đổi từ nhánh 1 trình tự 2007
A/Chicken/Vietnam/1/2010*	Jan 1	Ca Mau	I514V , A214S
A/Duck/Vietnam/1/2010	Jan 7	Ca Mau	I514V , A185E , N309T , D45G, R458K
A/Duck/Vietnam/2/2010*	Jan 10	Ca Mau	I514V
A/Duck/Vietnam/3/2010#	Jan 17	Ca Mau	I514V , S155G, N236S; insertion (-)326M
A/Duck/Vietnam/4/2010#	Jan 24	Ca Mau	T204M
A/Duck/Vietnam/5/2010	Jan 25	Soc Trang	S155N
A/Chicken/Vietnam/2/2010	Feb 2	Soc Trang	I514V , N309T
A/Duck/Vietnam/8/2010	Feb 12	Soc Trang	I514V , A185E , V200I
A/Duck/Vietnam/7/2010	Feb 17	Soc Trang	I514V , N309T , A184G
A/Chicken/Vietnam/4/2010	Feb 23	Khanh Hoa	I514V
A/Quail/Vietnam/1/2010	Feb 23	Khanh Hoa	I514V , C42W, K161R
A/Chicken/Vietnam/3/2010	Feb 25	Khanh Hoa	I514V
A/Chicken/Vietnam/5/2010*	Feb 25	Khanh Hoa	I514V , I71T
A/Duck/Vietnam/9/2010*+	Mar 6	Ben Tre	I514V , T36A , P136S , L41H, C42R
A/Duck/Vietnam/10/2010*+	Mar 6	Ben Tre	I514V , T36A , P136S

*Trang trại đã tiêm chủng

Không có trình tự qua vị trí 514.

+ Mẫu cùng một trang trại.

Các thay đổi của Amino acid được tô đậm quan sát trong nhiều hơn một virus.

với một khoảng cách di truyền trung bình là 31 nt (1.8%) so với các virus tổ tiên năm 2007 (Hình 1). Nhánh 2010 được đặc trưng bởi một đột biến tại vị trí 514 – isoleucine biến đổi thành valine (I514V; vị trí trên gen H5 được đánh số dựa theo Chương trình Cúm toàn cầu của WHO (2005) và Smith et al. (2006a)). Ngoài ra, có 4 đột biến amino acid mới được tìm thấy trong ít nhất 2 trình tự (Bảng 1). So với các virus của năm 2007, các virus 2010 có tần số đột biến K48R và N168D cao vượt trội. Trên các virus này, chúng tôi cũng tìm thấy 5 biến đổi amino acid mới trong vùng kháng nguyên (T36A, D45G, P136S, S155N/G và A185E) (Chương trình Cúm toàn cầu của WHO, 2005; Steven et al., 2006). Ba thay đổi amino acid (A184G, A185E và A214S) xảy ra trong khu vực gen được dự đoán là cấu trúc vòng của vùng gắn kết thụ thể (Stevens et al., 2006). Các đột biến S155N/G cũng được ghi nhận; một vị trí N-glycosylation có thể đã bị loại bỏ bởi các đột biến này (Smith et al., 2006a; Yen et al., 2009). Một virus mang thêm một methionine được chèn vào vùng polybasic cleavage. Các hiệu ứng kiểu hình của những thay đổi này sẽ được mô tả trong ở những phân tích trong tương lai.

Khi xem xét trong bối cảnh phát sinh loài rộng hơn – bao gồm các trình tự IGSP và không-IGSP từ Việt Nam, Cam Pu Chia, Lao và miền Nam Trung Quốc – các trình tự HA của Việt Nam vẫn hình thành một nhánh phụ (bootstrap=99%) trong nhóm virus 1. Mặc dù virus nhánh 1 lưu hành trong năm 2008 và 2009 có đặc tính di truyền học là gần giống với virus 2010 được miêu tả ở đây, nhưng không có bất kỳ trình tự H5N1 nào của Việt Nam trong năm 2008 hoặc 2009 có trên GenBank.

Các virus 2010 được thu mẫu trong báo cáo này có nguồn gốc từ các trang trại gà và vịt có kích thước bầy đàn động từ 4 đến trên 8000 cá thể. Các trang trại bùng phát dịch đã trải qua những thiệt hại đáng kể, với hầu hết các trang trại bị thiệt hại từ 10% đến 45% tổng đàn. Bốn trong số 15 trang trại báo cáo rằng đã tiêm phòng cho đàn gia cầm trong 3 tháng trước đó; mặc dù vậy chúng tôi không có thông tin chi tiết về lịch sử tiêm phòng để xác định tỉ lệ cá thể được chủng ngừa so với tổng đàn cũng như không thể khẳng định rằng toàn bộ vịt đã được tiêm hai mũi như khuyến cáo. Cần lưu ý rằng ngay cả khi sử dụng huyết thanh, tình trạng miễn dịch của gia cầm ở các trang trại này cũng không thể được xác định bởi công

thức vac xin hiện tại ở Việt Nam (bất hoạt Re-1) tạo ra phản ứng miễn dịch hoàn toàn giống với phản ứng gây ra do lây nhiễm tự nhiên. Chúng tôi khuyến cáo rằng lịch sử tiêm phòng tại các trang trại nuôi gia cầm nên được ghi lại chi tiết hơn nhằm phục vụ cho các hoạt động chống dịch trong tương lai.

Nhiều nhân tố ở cả 2 cấp độ – cá thể và đàn – có thể ảnh hưởng đến hiệu quả của vắc xin, điển hình là các vấn đề về quy trình làm lạnh hay chất lượng vắc xin thấp, liều không đúng (không đúng cho độ tuổi, thất bại trong việc tăng cường) hoặc là sự thay đổi số lượng cá thể trong đàn. Các nghiên cứu trước đây xác nhận rằng việc tiêm vắc xin ở thực địa có thể thất bại trong việc đạt được cùng một mức độ của miễn dịch như đã quan sát thấy trong kiểm chứng thực nghiệm (Henning et al., 2010). Đặc biệt, chuyển đổi huyết thanh được biết là đặc biệt ít ở vịt và yêu cầu tối thiểu là 2 liều, khuyến cáo ở ngày thứ 7 và 21, cho việc bảo vệ hoàn toàn (Henning et al., 2010). Vì thế, có sự khó khăn để xác định trạng thái miễn dịch chính xác và khả năng nhạy cảm với việc nhiễm bệnh hay các bùng phát dịch của bất cứ bầy cụ thể nào.

Các kết quả của chúng tôi đồng tình với các báo cáo khác cho rằng những chiến dịch tiêm vắc xin hiện tại đang thất bại trong việc cung cấp sự bảo vệ chống lại khả năng nhiễm và phát bệnh. Các đàn gia cầm được tiêm vắc xin có thể tạo ra các quần thể miễn dịch một phần, và trở thành môi trường thích hợp để các biến thể kháng nguyên mới của H5N1 phát sinh (Smith et al., 2006b; Domenech et al., 2009; Henning et al., 2010). Mặc dù vậy, đến nay không có bằng chứng nào cho thấy sự thất bại của vắc xin là kết quả của việc thoát miễn dịch ở cúm. Đặc điểm kháng nguyên của các virus được tìm thấy trong nghiên cứu này cần được phân tích kĩ hơn nhằm đánh giá đầy đủ những tác động của các đột biến mới lên kiểu hình virus. Cần phải nhấn mạnh rằng sự hiện diện của các đột biến này trong H5N1 2010 ở Việt Nam không liên quan tới trạng thái tiêm phòng; hai virus trong số mẫu thu được từ các trang trại đã tiêm vắc xin không cho thấy đột biến trên các vị trí kháng nguyên.

Sự kết hợp của các chiến dịch tiêm phòng vắc xin tích cực và các biện pháp kiểm soát sự bùng phát của HPAI đã

giảm đáng kể sự lây truyền của virus H5N1 tại Việt Nam từ đợt dịch đầu tiên 2003-2005. Mặc dù vậy, HPAI tiếp tục phát tán ở những đàn gia cầm ít được tiêm phòng. Với việc virus cúm gia cầm H5 đã được xác định là có khả năng tiến hóa thoát miễn dịch (Lee et al., 2004; Domenech et al., 2009), chúng tôi nhấn mạnh rằng việc giám sát kéo dài và thận trọng đối với virus tại thực địa là vô cùng quan trọng.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi: quỹ Wellcome Trust UK 089276/B/09/Z, quỹ UK Medical Research Council G0600718 và quỹ Li Ka Shing Foundation – Chương trình Y tế toàn cầu – Đại học Oxford.

Nguồn tham khảo

- Boni, M.F., M.D. de Jong, H.R. van Doorn, and E.C. Holmes, 2010: Guidelines for identifying homologous recombination events in influenza A virus. *PLoS ONE* 5, e10434.
- Chen, H., 2009: Avian influenza vaccination: the experience in China. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 28, 267-274.
- Domenech, J., G. Dauphin, J. Rushton, J. McGrane, J. Lubroth, A. Tripodi, J. Gilbert, and L. D. Sims, 2009: Experiences with vaccination in countries endemically infected with highly pathogenic avian influenza: the Food and Agriculture Organization perspective. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 28, 293-305.
- Edgar, R.C., 2004: MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792-1797.
- Ghedini, E., N. A. Sengamalai, M. Shumway, J. Zaborsky, T. Feldblyum, V. Subbu, D. J. Spiro, J. Sitz, H. Koo, P. Bolotov, D. Dernovoy, T. Tatusova, Y. Bao, K. St George, J. Taylor, D. J. Lipman, C. M. Fraser, J. K. Taubenberger, and S. L. Salzberg, 2005: Large-scale sequencing of human influenza reveals the dynamic nature of viral genome evolution. *Nature* 437, 1162-1166.
- Guan, Y., J. S. M. Peiris, A. S. Lipatov, T. M. Ellis, K. C. Dyrting, S. Krauss, L. J. Zhang, R. G. Webster, and K. F. Shortridge, 2002: Emergence of multiple genotypes of H5N1 avian influenza viruses in Hong Kong SAR. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 8950-8955.
- Henning, K. A., J. Henning, J. Morton, N. T. Long, N. T. Ha, and J. Meers, 2009: Farm- and flock-level risk factors associated with Highly Pathogenic Avian Influenza outbreaks on small holder duck and chicken farms in the Mekong Delta of Viet Nam. *Prev. Vet. Med.* 91, 179-188.
- Henning, J., K. A. Henning, J. M. Morton, N. T. Long, N. T. Ha, L. T. Vu, P. P. Vu, D. M. Hoa, and J. Meers, 2010: Highly pathogenic avian influenza (H5N1) in ducks and in-contact chickens in backyard and smallholder commercial duck farms in Viet Nam. *Prev. Vet. Med.*, in press.
- Hinrichs, J., J. Otte, and J. Rushton, 2010: Technical, epidemiological, and financial implications of large-scale national vaccination campaigns to control HPAI H5N1. *CAB Reviews* 5, 021.
- Le, M. T. Q., H. F. L. Wertheim, H. D. Nguyen, W. Taylor, P. V. M. Hoang, C. D. Vuong, H. L. K. Nguyen, H. H. Nguyen, T. Q. Nguyen, T. V. Nguyen, T. D. Van, B. T. Ngoc, T. N. Bui, B. G. Nguyen, L. T. Nguyen, S. T. Luong, P. H. Phan, H. V. Pham, T. Nguyen, A. Fox, C. V. Nguyen, H. Q. Do, M. Crusat, J. Farrar, H. T. Nguyen, M. D. de Jong, and P. Horby, 2008: Influenza A H5N1 clade 2.3.4 virus with a different antiviral susceptibility profile replaced clade 1 virus in humans in northern Vietnam. *PLoS ONE* 3, e3339.
- Lee, C.-W., D. A. Senne, and D. L. Suarez, 2004: Effect of Vaccine Use in the Evolution of Mexican Lineage H5N2 Avian Influenza Virus. *J. Virol.* 78, 8372-8381.
- Nguyen, T. D., T. V. Nguyen, D. Vijaykrishna, R. G. Webster, Y. Guan, J. S. M. Peiris, and G. J. D. Smith, 2008: Multiple Sublineages of Influenza A Virus (H5N1), Vietnam, 2005-2007. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 632-636.
- Nguyen, T., C. T. Davis, W. Stembridge, B. Shu, A. Balish, K. Inui, H. T. Do, H. T. Ngo, X.-F. Wan, M. McCarron, S. E. Lindstrom, N. J. Cox, C. V. Nguyen, A. I. Klimov, and R. O. Donis, 2009: Characterization of a highly pathogenic avian influenza H5N1 virus sublineage in poultry seized at ports of entry into Vietnam. *Virology* 387, 250-256.
- OIE, 2008: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. OIE, Paris. Chapter 2.3.4. Avian influenza
- Peiris, J. S. M., M. D. de Jong, and Y. Guan, 2007: Avian Influenza Virus (H5N1): a Threat to Human Health. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 243-267.
- Smith, G. J. D., T. S. P. Naipospos, T. D. Nguyen, M. D. de Jong, D. Vijaykrishna, T. B. Usman, S. S. Hassan, T. V. Nguyen, T. V. Dao, N. A. Bui, Y. H. C. Leung, C. L. Cheung, J. M. Rayner, J. X. Zhang, L. J. Zhang, L. L. M. Poon, K. S. Li, V. C. Nguyen, T. T. Hien, J. Farrar, R. G. Webster, H. Chen, J. S. M. Peiris, and Y. Guan, 2006a: Evolution and

- adaptation of H5N1 influenza virus in avian and human hosts in Indonesia and Vietnam. *Virology* 350, 258-268.
- Smith, G. J. D., X. H. Fan, J. Wang, K. S. Li, K. Qin, J. X. Zhang, D. Vijaykrishna, C. L. Cheung, K. Huang, J. M. Rayner, J. S. M. Peiris, H. Chen, R. G. Webster, and Y. Guan, 2006b: Emergence and predominance of an H5N1 influenza variant in China. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103, 16936-16941.
- Stamatakis, A., 2006: RAXML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22, 2688-2690.
- Stamatakis, A., P. Hoover, and J. Rougemont, 2008: A rapid bootstrap algorithm for the RAXML Web servers. *Syst. Biol.* 57, 758-771.
- Stevens, J., O. Blixt, T. M. Tumpey, J. K. Taubenberger, J. C. Paulson, and I. A. Wilson, 2006: Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science* 312, 404-410.
- Tarantola, A., P. Barboza, V. Gauthier, S. Ioos, N. E. Omeiri, and M. Gastellu-Etchegorry, 2010: The influenza A(H5N1) epidemic at six and a half years: 500 notified human cases and more to come. *Euro. Surv.* 15, 1-5.
- Tian, G., X. Zeng, Y. Li, J. Shi, and H. Chen, 2010: Protective Efficacy of the H5 Inactivated Vaccine Against Different Highly Pathogenic H5N1 Avian Influenza Viruses Isolated in China and Vietnam. *Avian Dis.* 54, 287-289.
- Wan, X-F., T. Nguyen, C. T. Davis, C. B. Smith, Z-M. Zhao, M. Carrel, K. Inui, H. T. Do, D. T. Mai, S. Jadhao, A. Balish, B. Shu, F. Luo, M. Emch, Y. Matsuoka, S. E. Lindstrom, N. J. Cox, C. V. Nguyen, A. Klimov, and R. Donis, 2008: Evolution of highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses in Vietnam between 2001 and 2007. *PLoS ONE* 3, e3462.
- WHO Global Influenza Program, 2005: Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1515-1521.
- WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group, 2009: Continuing progress towards a unified nomenclature for the highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses: divergence of clade 2.2 viruses. *Influenza Other Respi. Viruses* 3, 59-62.
- Yen, H-L, J. R. Aldridge, A. C. M. Boon, N. A. Ilyushina, R. Salomon, D. J. Hulse-Post, H. Marjuki, J. Franks, D. A. Boltz, D. Bush, A. S. Lipatov, R. J. Webby, J. E. Rehg, and R. G. Webster, 2009: Changes in H5N1 influenza virus hemagglutinin receptor binding domain affect systemic spread. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106, 286-291.