

**NGHIÊN CỨU BIẾN ĐỔI THÀNH PHẦN GEN H5 CỦA VIRUS CÚM A/H5N1
PHÂN LẬP TỪ GÀ HẬU GIANG SO SÁNH VỚI CÁC CHỦNG CỦA VIỆT NAM
VÀ VÙNG ĐÔNG NAM CHÂU Á (2005 - 2008)**

**Genetic Analysis of HA (H5) of Influenza Virus A/H5N1 Isolated from Chicken
in Hau Giang in Comparison with the Strains Isolated in Vietnam and
Southeast Asian Region (2005 - 2008)**

Trần Quang Vui¹, Nguyễn Thị Bích Nga² và Lê Thanh Hoà²

¹*Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế*

²*Viện Công nghệ Sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

TÓM TẮT

Toàn bộ gen HA (H5) (gồm 1707 bp) của một chủng virus cúm A/H5N1 phân lập từ gà tại Hậu Giang năm 2005 (ký hiệu A/Ck/Vietnam/HG4/2005) đã được thu nhận, giải trình tự (đăng ký Ngân hàng gen số: EF051513). Thành phần nucleotide, amino acid gen H5 của A/Ck/Vietnam/HG4/2005(H5N1) được sử dụng để phân tích và xây dựng quan hệ phả hệ giữa chủng này với một số chủng của Trung Quốc, Việt Nam và Đông Nam Á phân lập trong các năm 2005 - 2008. Kết quả phân tích và so sánh cho thấy, thành phần nucleotide gen H5 của chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005 (Hậu Giang) có 9 vị trí sai khác hoàn toàn so với 19 chủng so sánh phân lập từ các vùng miền khác nhau của Việt Nam và châu Á. Tỷ lệ đồng nhất (identity) của gen H5 về nucleotide thấp nhất là 98% và tỷ lệ tương đồng (homology) về amino acid thấp nhất là 97% giữa chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005 so với các chủng virus cúm A/H5N1 từ miền Nam Việt Nam (Long An, Hậu Giang, Kiên Giang, Cà Mau và Bến Tre), Trung Quốc và Đông Nam Á, phân lập trong các năm 2005 - 2008. Chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005 được khẳng định cùng nguồn gốc dưới dòng Quảng Đông, nhưng có thành phần gen khác nhiều so với các chủng dưới dòng Phúc Kiến. Hỗn hợp virus cúm A/H5N1 gây bệnh tại Việt Nam có thể là vấn đề nên quan tâm để có phương hướng về chẩn đoán, dịch tễ và phòng chống.

Từ khoá: Cúm A/H5N1, dưới dòng, HA(H5), phả hệ, thành phần nucleotide/amino acid.

SUMMARY

The entire HA (H5) gene (1707 bp) of an avian influenza isolate collected from chicken in Hau Giang province (designated as A/Ck/Vietnam/HG4/2005) was obtained, completely sequenced (GenBank: EF051513). The nucleotide, amino acid of H5 sequence of A/Ck/Vietnam/HG4/2005(H5N1) was used to analyze for assessment of genetic variation and phylogenetic relationship with a number of strains isolated in China, Vietnam and Southeast Asia during 2005 - 2008. Results showed that the sequence of the A/Ck/Vietnam/HG4/2005 isolate (Hau Giang) had 9 nucleotides completely different from other 19 isolates of Vietnam and Asian countries compared. The identity incidence of the H5 gene of A/Ck/Vietnam/HG4/2005 was at least 98% for nucleotide and the homology incidence was at least 97% for amino acids compared with between this isolate and those strains isolated from South of Vietnam (ie. Long An, Hau Giang, Kien Giang, Ca Mau, Ben Tre provinces), China and Southeast Asia during 2005 - 2008. The A/Ck/Vietnam/HG4/2005 was confirmed to belong to the Guangdong sublineage; however, its nucleotide and amino acid composition differed from the isolates of the Fujian sublineage. The mix of A/H5N1 currently circulating in Vietnam and causing avian influenza should be an issue to be paid attention to in terms of diagnosis, epidemiology and control.

Key words: Avian influenza A/H5N1, composition of nucleotide/amino acids, HA(H5), phylogeny, sublineage.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cúm gia cầm (avian influenza) là một bệnh truyền nhiễm nguy hiểm có tốc độ lây lan nhanh, với tỷ lệ chết cao trong đàn gia cầm nhiễm bệnh gây thiệt hại kinh tế lớn cho nhiều nước trên thế giới. Từ năm 2003, cúm gia cầm do phân tipo A/H5N1 xuất hiện tại Việt Nam và từ đó đến nay bệnh xảy ra liên tục và trở thành một vấn đề dịch tễ phức tạp cần giải quyết tại nước ta.

Phân tipo virus cúm A/H5N1 thuộc nhóm virus cúm A (Influenza virus A), họ *Orthomyxoviridae*, loại hình phân tipo kháng nguyên bề mặt HA là H5 và NA là N1, có độc lực cao gây nhiễm và gây bệnh nặng nề ở gia cầm và cả trên người (Murphy và Webster, 1996). Gen H5 (phân đoạn 4 trong hệ gen ARN sợi đơn âm của virus) là một gen kháng nguyên, có vai trò quan trọng quyết định khả năng xâm nhiễm và độc lực gây bệnh của virus trên vật chủ (Baigent, McCauley, 2001). Hệ gen của virus cúm A biến đổi nhanh ở tất cả các phân đoạn gen, nhưng thường xảy ra nhất là ở gen HA và NA (Skeik và Jabr, 2008). Đặc điểm biến đổi thành phần nucleotide và amino acid của gen H5 cho phép phân tích mối quan hệ tiến hoá, phân tipo và phân định nhóm kháng nguyên (clade) của virus cúm A/H5N1 (Lê Thanh Hoà và cs, 2008; Nguyen và cs, 2008). Virus cúm A/H5N1 phân lập từ cùng một địa điểm nhưng trong thời gian khác nhau hoặc từ các nước khác nhau trong cùng thời điểm, đều có thể có cấu trúc phân tử và đặc tính kháng nguyên khác nhau trong trình tự gen của chúng (Guan và cs, 2004; Li và cs, 2004). Vì vậy, việc nghiên cứu biến đổi thành phần nội gen của kháng nguyên H5 ở các chủng virus cường độc phân lập qua các năm ở các địa điểm khác nhau là yêu cầu cần thiết.

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả so sánh trình tự và phân tích sự biến đổi thành phần gen H5, tìm hiểu mối quan hệ phả hệ của một chủng virus cúm

A/H5N1 phân lập từ gà Hậu Giang năm 2005 với các chủng phân lập từ người và gia cầm trong các năm 2005 - 2008 từ các vùng miền khác nhau của Việt Nam và một số nước Đông Nam Á.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Bệnh phẩm

Bệnh phẩm là dịch khí quản-phế quản chứa virus cường độc cúm A/H5N1 thu thập từ gà tại Hậu Giang, cuối năm 2005 (ký hiệu chủng: A/Ck/Vietnam/HG4/2005) đã được vô hoạt bằng nhiệt độ, bảo quản ở -20°C.

2.2. Tách RNA hệ gen của virus, thiết kế mồi và thực hiện phản ứng RT-PCR

RNA hệ gen của virus được tách chiết bằng bộ kit QIAamp Viral Mini kit (QIAGEN Inc.) từ mẫu bệnh phẩm, theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Cặp mồi dùng cho phản ứng RT-PCR để thu nhận toàn bộ gen H5, bao gồm:

Mồi xuôi H5BAMF:

5'CGGGATCCTCTGTCAAAATGGAG
AAAATAGTGCTT3', tương ứng vị trí 19 - 34 trong phân đoạn 4, có bố trí điểm cắt của enzym giới hạn *BamHI* (gạch bên dưới) để thao tác tách dòng.

Mồi ngược H5NOTR:

5'ATAAGAATGCGGCCGCTCATTA
ATGCAAATTCTGCATTGTAACGA3',
tương ứng vị trí 1708 - 1735 trong phân đoạn 4, có bố trí điểm cắt của enzym giới hạn *NotI* (gạch bên dưới), để thao tác tách dòng.

Toàn bộ phân đoạn HA của chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005 có độ dài khoảng 1,7 kp được thu nhận bằng phản ứng RT - PCR một bước với cặp mồi H5BAMF - H5NOTR, theo chu trình nhiệt như sau: 50°C/60 phút, 95°C/15 phút, 35 chu kỳ [94°C/1 phút, 55°C/30 giây, 72°C/2 phút], 72°C/10 phút, sau chu kỳ cuối cùng bảo quản sản phẩm ở 4°C cho đến khi kiểm tra và tinh sạch sản phẩm.

2.3. Kiểm tra sản phẩm RT-PCR, tinh sạch và dòng hoá sản phẩm vào vector tách dòng

Sản phẩm RT - PCR được kiểm tra trên agarose 1%, tinh sạch bằng bộ kit QIAquick Purification kit (QIAGEN Inc.) và dòng hoá vào vector pCR2.1TOPO (Invitrogen).

2.4. Giải trình tự và phân tích số liệu

Trình tự nucleotide DNA của plasmid được giải trình trên máy tự động ABI-3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Chuỗi nucleotide được xử lý bằng chương trình SeqEd1.03, Assembly LIGN1.9 và hệ chương trình MacVector8.2 (Accelrys Inc.) trên máy tính Macintosh.

Thành phần amino acid được thu nhận bằng cách sử dụng bộ mã của vi sinh vật bậc thấp (vi khuẩn) trong ngân hàng gen. So sánh đối chiếu, xử lý số liệu các chuỗi bằng chương trình GENEDOC 2.5 và xây dựng phả hệ nguồn gốc bằng chương trình MEGA4.0 (Tamura và cs, 2007).

2.5. Chọn chuỗi so sánh mức độ tương đồng trình tự nucleotide

Các chủng của Việt Nam và thế giới đã công bố được thu thập từ ngân hàng gen (GenBank) bằng cách sử dụng chương trình BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) qua đối chiếu, so sánh với chuỗi nucleotide gen H5 của chủng virus cúm A/H5N1 từ gà Hậu Giang. Tất cả có 19 chủng được sử dụng để so sánh và phân tích (Bảng 1).

Bảng 1. Danh sách các chủng virus cúm A/H5N1 sử dụng để so sánh và phân tích gen H5

TT	Ký hiệu chủng so sánh	Loài mắc	Sub-type	Năm phân lập	Nguồn gốc	Số đăng ký trong Ngân hàng gen	*Tỷ lệ (%) đồng nhất nucleotide
1	A-Ck-VN-HG4-05	Gà	H5N1	2005	Hậu Giang, Việt Nam	EF051513	-
2	A-Ck-VN-LA-636-05	Gà	H5N1	2005	Long An, Việt Nam	ISDN230180	98
3	A-Dk-VN-CM498-06	Vịt	H5N1	2006	Cà Mau, Việt Nam	EU124165	97
4	A-Ck-VN-NCVD09-05	Gà	H5N1	2005	Việt Nam	EF566200	97
5	A-HN-3040-05	Người	H5N1	2005	Việt Nam	AB239125	97
6	A-Ck-TL-Nontaburi-05	Gà	H5N1	2005	Thái Lan	DQ334776	98
7	A-mDk-VN-BT342-06	Ngan	H5N1	2006	Bến Tre, Việt Nam	ISDN230179	97
8	A-Dk-VN-18-07	Vịt	H5N1	2007	Kiên Giang, Việt Nam	CY029623	97
9	A-Ck-VN-29-07	Gà	H5N1	2006	Hậu Giang, Việt Nam	CY029631	97
10	A-Ck-Indo-Soppeng-07	Gà	H5N1	2007	Indonesia	ISDN242846	95
11	A-Ck-Thailand-08	Gà	H5N1	2008	Thái Lan	EU497919	98
12	A-Ck-Fujian-584-06	Gà	H5N1	2006	Phúc Kiến, Trung Quốc	DQ992831	94
13	A-Dk-VN-NA72-07	Vịt	H5N1	2007	Nghệ An, Việt Nam	Đang đăng ký	94
14	A-Dk-VN-53-07	Ngan	H5N1	2007	Nghệ An, Việt Nam	CY029735	93
15	A-Ck-Laos- 36-06	Gà	H5N1	2006	Lào	ISDN239006	96
16	A-Ck-Laos-1-08	Gà	H5N1	2008	Lào	AB435522	95
17	A-mDk-VN-1455-06	Ngan	H5N1	2006	Hà Tây, Việt Nam	CY029535	93
18	A-Dk-VN-50-07	Vịt	H5N1	2007	Hà Nội, Việt Nam	CY029711	95
19	A-Dk-VN-43-07	Vịt	H5N1	2007	Hà Tây, Việt Nam	CY029687	94
20	A-VN-HN31242-07	Người	H5N1	2007	Hà Nội, Việt Nam	EU294370	95

*Tỷ lệ đồng nhất (%) về nucleotide (identity) giữa chủng A-Ck-VN-HG4-05 với các chủng khác.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân tích biến đổi thành phần gen H5 của chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005 và so sánh với các chủng của Việt Nam và vùng Đông Nam Á phân lập trong các năm 2005 - 2008

Bằng các phương pháp sinh học phân tử, bao gồm RT-PCR, tách dòng, giải trình tự và phân tích chuỗi gen, chúng tôi thu nhận được toàn bộ chuỗi gen H5 của chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005 có độ dài 1707 nucleotide và đăng ký Ngân hàng gen số: EF051513. Chúng tôi truy cập

ngân hàng gen và thu thập chuỗi gen H5 của các chủng cường độc dương nhiễm (2005-2008) thuộc các vùng miền khác nhau của Việt Nam và Đông Nam Á. Chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005 có mức độ tương đồng cao với các chủng A/H5N1 đã công bố trong ngân hàng gen, chứng tỏ gen HA thu nhận được chính xác là gen H5 của virus cúm A phântyp H5N1, thuộc dưới dòng Quảng Đông (Guangdong sublineage). Như vậy có thể khẳng định kết quả của quá trình tách dòng đã lưu giữ được gen H5 của chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005 và có cơ sở để phân tích biến đổi thành phần gen.

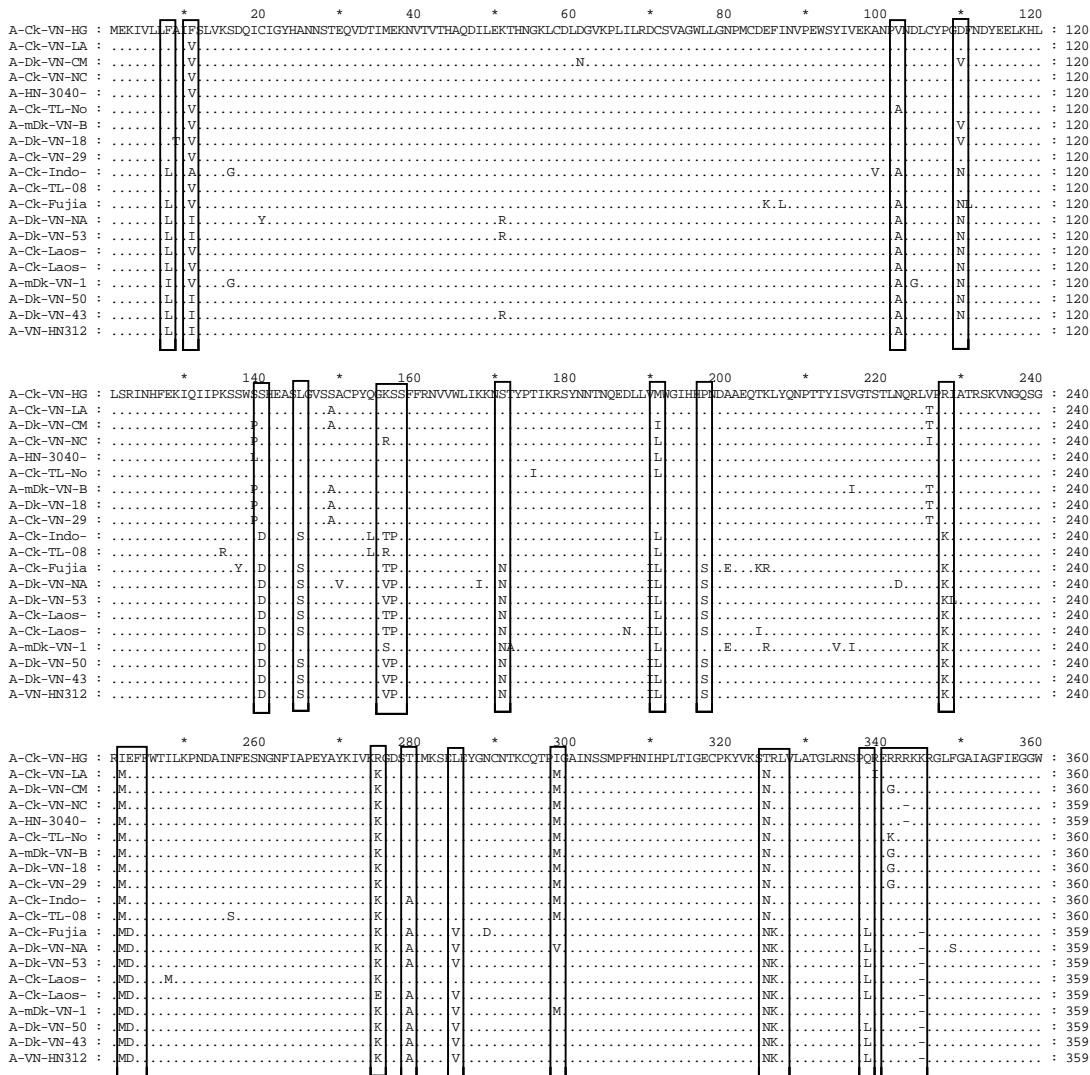
Hai mươi chung liệt kê ở bảng 1 được sắp xếp so sánh đối chiếu sử dụng chương trình GENEDOC2.5. Các chung số 2 đến 11 thuộc dưới dòng Quảng Đông; các chung số

A. H5 NUCLEOTIDE

12 đến 20 thuộc dòng Phúc Kiến (Bảng 1). Chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005 có tỷ lệ đồng nhất nucleotide (identity) thấp nhất là 95% (Bảng 1) và tỷ lệ tương đồng amino acid (homology) thấp nhất là 97% với các chủng có nguồn gốc Quảng Đông (từ số 2 đến 11). Trong khi đó, với các chủng có nguồn gốc Phúc Kiến (từ số 12 đến 20), tỷ lệ đồng nhất nucleotide thấp nhất của chủng này là 93% (Bảng 1) và tỷ lệ tương đồng amino acid thấp nhất là 92% (số liệu không trình bày ở đây).

Kết quả so sánh đối chiếu trình tự nucleotide và amino acid của toàn bộ chuỗi gen H5 (1707 bp mã hoá cho 568 amino acid) của chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005(H5N1) với các chủng A/H5N1 khác của Việt Nam và vùng Đông Nam Á được trình bày ở hình 1.

B. H5 AMINO ACID



Hình 1. So sánh trình tự nucleotide (rút gọn) (Hình 1A) và toàn bộ trình tự amino acid (Hình 1B) của gen H5 giữa chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005 với các chủng A/H5N1 của Việt Nam, Trung Quốc và vùng Đông Nam Á. Phần đóng khung biểu thị sai khác của chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005 với các chủng khác

Có 9 vị trí mà ở đó thành phần nucleotide gen H5 của chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005 có sai khác hoàn toàn so với 19 chủng chủng phân lập ở Việt Nam và vùng Đông Nam Á trong các

năm 2005 - 2008 và 2 vị trí sai khác với 18 chủng (chỉ tương đồng với 1 chủng). Hầu hết các sai khác này là đột biến thay thế Adenin ↔ Guanin (A<->G). Ngoài những sai khác trên và những sai khác có

tính chất đơn lẻ khác, trình tự gen H5 của chủng A/ Ck/ Vietnam/ HG4/ 2005 còn có 1 vị trí sai khác với tất cả các chủng thuộc dưới dòng Quảng Đông và 43 vị trí sai khác với các chủng dưới dòng Phúc Kiến. Sự thay đổi này đã làm sai khác 5 amino acid (ở các vị trí: 11, 242, 275, 325, 512) so với tất cả các chủng so sánh, 1 amino acid (298) so với các chủng dưới dòng Quảng Đông và 17 amino acid (8, 102, 110, 140, 145, 156, 157, 171, 191, 197, 228, 243, 279, 285, 326, 338, và 529) so với các chủng dưới dòng Phúc Kiến. Kết quả này cho thấy virus A/H5N1 có khả năng biến đổi nội gen kháng nguyên tương đối cao.

Chuỗi gen H5 của chủng A/ Ck/ Vietnam/ HG4/ 2005 và các chủng dưới dòng Quảng Đông phân lập tại Việt Nam cũng như ở một số nước Đông Nam Á đều có kích thước chính xác là 1707 nucleotide, trong khi đó các chủng thuộc dưới dòng Phúc Kiến thiếu hụt 3 nucleotide (Hình 1A) (Lê Thanh Hòa và cs, 2008). Do đó, vùng amino acid tạo nên điểm cắt của protease ở chủng A/ Ck/ Vietnam/ HG4/ 2005 và các chủng dưới dòng Quảng Đông có đầy đủ thành phần - RRRKK-, một đặc tính quan trọng quyết định độc lực của virus cúm A/H5N1, trong khi đó các chủng dưới dòng Phúc Kiến thiếu hụt 1 amino acid Lysine (K) (Hình 1B). Điều này có thể là nguyên nhân chính làm gia tăng độc lực gây bệnh của virus A/H5N1 thuộc dưới dòng Phúc Kiến hay không còn là vấn đề cần xác định.

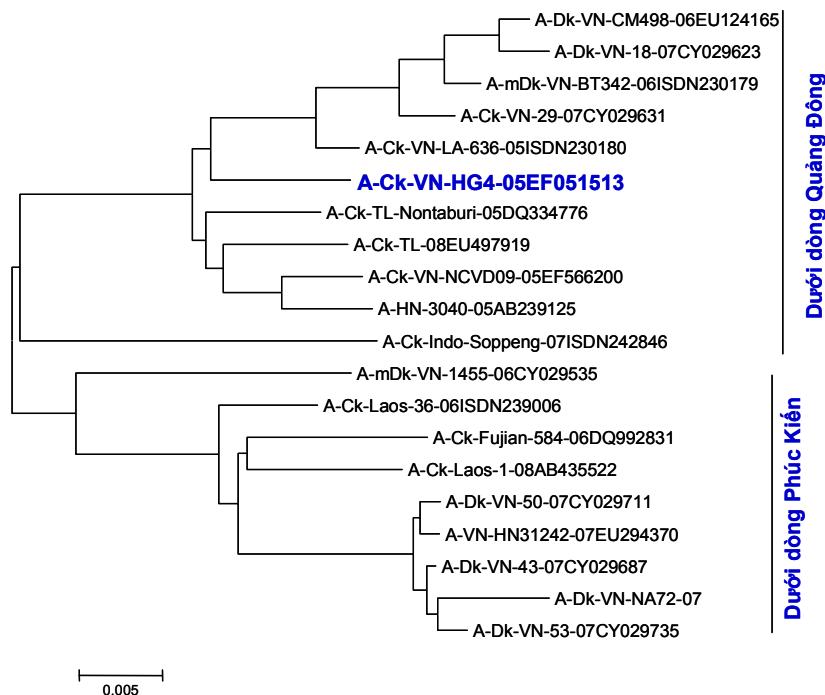
3.2. Phân tích mối quan hệ phả hệ của chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005(H5N1)

Quan hệ phả hệ của chủng cúm A/H5N1 phân lập từ gà Hậu Giang (chủng A/ Ck/ Vietnam/ HG4/ 2005 (H5N1)) của chúng tôi nghiên cứu, được phân tích so

sánh với các chủng khác của Việt Nam, Trung Quốc và Đông Nam Á, kết quả trình bày ở hình 2. Các chủng phân lập ở miền nam Việt Nam trong các năm 2005 - 2007: A-Ck-VN-LA-636-05 (ISDN230180), A-Dk-VN - CM498-06 (EU124165), A - mDk - VN - BT342 - 06 (ISDN230179), A - Dk - VN - 18 - 07 (CY029623), A - Ck - VN - 29 - 07 (CY02963) tập hợp trong cùng một nhóm với chủng A/ Ck/ Vietnam/ HG4/ 2005 (H5N1) (EF051513) phân lập từ gà tại Hậu Giang (Hình 2). Điều này cho phép nhận xét, có thể các chủng cúm A/H5N1 từ gia cầm Hậu Giang, Long An, Kiên Giang, Cà Mau, Bến Tre là có cùng nguồn gốc và thuộc nhóm di truyền 1 (clade 1) (Nguyen và cs, 2008). Đây là các chủng cúm A/H5N1 thuộc dưới dòng Quảng Đông.

Trong khi đó, cây phả hệ (Hình 2) cho thấy, các chủng phân lập từ người và gia cầm ở miền Bắc và miền Trung năm 2007, bao gồm: A - Dk - VN - 50 - 07 (H5N1) (CY029711), A - Dk - VN - 43 - 07 (H5N1) (CY029687), A - VN - HN31242 - 07 (H5N1) (EU294370), A - Dk - VN - NA72 - 07 (H5N1), A - Dk - VN - 53 - 07 (H5N1) (CY029735) và chủng A - Ck - Laos - 1 - 08 (H5N1) (AB435522) tập hợp trong cùng một nhóm, với chủng chính gốc Phúc Kiến phân lập năm 2006 và thuộc nhóm di truyền 2.3.4 (clade 2.3.4) (Nguyen và cs, 2008). Đây là các chủng thuộc dưới dòng Phúc Kiến.

Như vậy, trong các năm giai đoạn 2005-2008, ngoài các chủng thuộc dưới dòng Quảng Đông (trong đó có chủng A/ Ck/ Vietnam/ HG4/ 2005 (H5N1)), ở nhiều nước châu Á (Trung Quốc, Việt Nam, Lào) còn xuất hiện các chủng thuộc dưới dòng Phúc Kiến gây bệnh cúm gia cầm.



Hình 2. Phân tích phả hệ của các chủng cúm A/H5N1 của Việt Nam và vùng Đông Nam Á dựa trên thành phần nucleotide của gen H5 sử dụng bootstraps 1000 replicate, Neighbor-Joining, Kimura 2-parameter (Tamura và cs, 2007).
Có hai nhóm chính (Quảng Đông và Phúc Kiến), trong đó chủng A/Ck/Vietnam/HG4/2005(H5N1) thuộc dưới dòng Quảng Đông

4. KẾT LUẬN

Toàn bộ chuỗi gen HA của chủng cúm A/H5N1 phân lập từ gà Hậu Giang (A/ Ck/ Vietnam/ HG4/ 2005 (H5N1)) có độ dài 1707 bp đã được giải trình tự, được xác định là gen H5 của virus cúm A/H5N1, có 9 vị trí sai khác hoàn toàn so với 19 chủng phân lập trong các năm 2005 - 2008 từ người và gia cầm của Việt Nam, Trung Quốc và vùng Đông Nam Á; trong cấu trúc có đầy đủ các amino acid (-RRKK-) tại vị trí cắt của protease. Chủng A/ Ck/ Vietnam/ HG4/ 2005 (H5N1) có cùng nguồn gốc thuộc dưới dòng Quảng Đông cùng với một số chủng cúm A/H5N1 từ gia cầm ở Hậu Giang, Long An, Kiên Giang, Cà Mau, Bến

Tre (Việt Nam) và một số chủng trong vùng Đông Nam Á phân lập trong các năm 2005 - 2008.

LỜI CẢM ƠN

Cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ về Nhiệm vụ Nghị định thư Việt Nam - Thái Lan và Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen (Viện Công nghệ sinh học) hỗ trợ kinh phí và trang thiết bị để chúng tôi thực hiện đề tài này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Baigent SJ and McCauley JW (2001). Glycosylation of hemagglutinin and stalk-length of neuraminidase combine

- to regulate the growth of avian influenza viruses in tissue culture. *Virus Res.* 79 (1-2): 177-185.
- Guan Y, Poon LL, Cheung CY, Ellis TM, Lim W, Lipatov AS, Chan KH, Sturm-Ramirez KM, Cheung CL, Leung YH, Yuen KY, Webster RG, Peiris JS (2004). H5N1 influenza: a protean pandemic threat. *PNAS USA* 101: 8156-8161.
- Lê Thanh Hoà, Nguyễn Thị Bích Nga, Trần Quang Vui, Nguyễn Mạnh Kiên, Nguyễn Xuân Vũ, Lê Trần Bình (2008). Phát hiện biến chủng virus cúm A/H5N1 dòng Phúc Kiến gây bệnh trên gia cầm/người tại Việt Nam (pp 699-702). Tập san Hội nghị khoa học toàn quốc lần thứ tư: Hóa sinh và Sinh học phân tử phục vụ nông, sinh, y học và công nghiệp thực phẩm (Hà Nội, 16 - 17/10/2008). NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội (924 trang).
- Li KS, Guan Y, Wang J, Smith GJ, Xu KM, Duan L, Rahardjo AP, Puthavathana P, Buranathai C, Nguyen TD, Estoepangestie AT, Chaisingham A, Auewarakul P, Long HT, Hanh NT, Webby R, Poon LL, Chen H, Shortridge KF, Yuen KY, Webster RG, Peiris JS (2004). Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature* 430: 209-213.
- Murphy BR and Webster RG (1996). Orthomyxoviruses. In Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds.). *Fields Virology* 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia: 1397-1445.
- Nguyen TD, Nguyen TV, Vijaykrishna D, Webster RG, Guan Y, Peiris MJS, Smith GJD (2008). Multiple Sublineages of Influenza A Virus (H5N1), Vietnam, 2005-2007. *Emerging Infectious Diseases* 14(4): 632-636.
- Skeik N, Jabr FI (2008). Influenza viruses and the evolution of avian influenza virus H5N1. *Int J Infect Dis* 12(3): 233-8. Review.
- Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599.