

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NHA TRANG



TRỊNH THỊ THU HẰNG

**PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN CHỦNG PARVOVIRUS
TIỀM NĂNG CHO SẢN XUẤT VẮC XIN PHÒNG
BỆNH KHÔ THAI TRÊN LỢN**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ

KHÁNH HÒA-2025

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NHA TRANG

TRỊNH THỊ THU HẰNG

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN CHỦNG PARVOVIRUS
TIỀM NĂNG CHO SẢN XUẤT VẮC XIN PHÒNG
BỆNH KHÔ THAI TRÊN LỢN

Ngành đào tạo: Công nghệ sinh học

Mã số: 9420201

LUẬN ÁN TIẾN SĨ

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

- 1. PGS.TS. VŨ KHẮC HÙNG**
- 2. PGS.TS. NGUYỄN VĂN DUY**

Phản biện 1: GS.TS Trần Văn Hiếu

Phản biện 2: PGS.TS Nguyễn Ngọc Đình

KHÁNH HÒA-2025

LỜI CAM ĐOAN

Kết quả của đề tài luận án tiến sĩ là một phần của đề tài cấp Bộ: “*Nghiên cứu chế tạo vắc-xin nhị giá vô hoạt phòng bệnh khô thai do Parvovirus và đóng dấu do vi khuẩn Erysipelothrix rhusiopathiae gây ra ở lợn*” thực hiện tại Phân viện Thú y miền Trung, do PGS.TS Vũ Khắc Hùng làm chủ trì đề tài. Tôi xin cam đoan phần kết quả của đề tài luận án tiến sĩ: “***Phân lập, tuyển chọn chủng Parvovirus tiềm năng cho sản xuất vắc xin phòng bệnh khô thai trên lợn***” là do cá nhân tôi thực hiện và chưa từng được công bố trong bất cứ công trình khoa học nào khác cho tới thời điểm này.

Khánh Hòa, ngày tháng năm

Tác giả luận án

Trịnh Thị Thu Hằng

LỜI CẢM ƠN

Trong suốt thời gian thực hiện đề tài, tôi đã nhận được sự giúp đỡ của Viện Công nghệ sinh học và môi trường, Phòng đào tạo sau đại học, Trường Đại học Nha Trang, Bộ môn Công nghệ sinh học và các đơn vị liên quan thuộc Phân viện Thú y miền Trung đã tạo điều kiện tốt nhất cho tôi được hoàn thành đề tài. Đặc biệt là sự hướng dẫn tận tình của PGS.TS. Vũ Khắc Hùng và PGS.TS. Nguyễn Văn Duy đã giúp tôi hoàn thành tốt đề tài. Qua đây, tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc đến sự giúp đỡ này.

Xin chân thành cảm ơn các thầy cô phản biện đã góp ý và cho tôi những lời khuyên quý báu để Luận án hoàn thành với chất lượng cao.

Xin cảm ơn Lãnh đạo Phân viện Thú y miền Trung đã giúp đỡ và tạo điều kiện cho tôi được đi học và hoàn thành Luận án này. Xin cảm ơn các thành viên đã nỗ lực cùng tôi thực hiện đề tài cấp Bộ Nông nghiệp và phát triển nông thôn để đề tài nghiên cứu khoa học và luận án hoàn thành với chất lượng và đúng thời gian.

Cuối cùng tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến gia đình và tất cả bạn bè đã giúp đỡ, động viên tôi trong suốt quá trình học tập và thực hiện đề tài.

Tôi xin chân thành cảm ơn!

Khánh Hòa, ngày tháng năm

Tác giả luận án

Trịnh Thị Thu Hằng

MỤC LỤC

	Trang
Danh mục chữ viết tắt.....	iv
Danh mục bảng.....	v
Danh mục hình	vi
Tóm tắt những đóng góp mới của luận án	vii
Mở đầu	1
Chương I – Tổng quan về vấn đề nghiên cứu.....	5
1.1. Tổng quan về đối tượng nghiên cứu	5
1.1.1. Tổng quan về bệnh khô thai lợn	5
1.1.1.1. Cơ chế gây bệnh.....	5
1.1.1.2. Triệu chứng.....	6
1.1.1.3. Hậu quả do nhiễm bệnh khô thai trên lợn	7
1.1.2. Tổng quan về Parvovirus.....	8
1.1.2.1. Phân loại	8
1.1.2.2. Đặc điểm sinh học và khả năng gây bệnh của các type PPV khác nhau	9
1.1.2.3. Cấu trúc PPV	12
1.1.2.4. Cơ chế xâm nhiễm của PPV vào tế bào vật chủ	13
1.2. Tổng quan về địa điểm nghiên cứu.....	14
1.3. Tổng quan về phương pháp nghiên cứu	15
1.3.1. Phương pháp phân lập PPV	15
1.3.1.1. Phương pháp thu mẫu	16
1.3.1.2. Phương pháp phát hiện mẫu dương tính PPV	16
1.3.1.3. Đồng nhiễm PPV với các virus khác	17
1.3.1.4. Kỹ thuật nuôi cấy PPV	17
1.3.2. Phương pháp xác định type PPV	18
1.3.3. Phân tích mối quan hệ di truyền dựa trên gen NS1 và VP2.....	19
1.3.3.1. Phân tích mối quan hệ di truyền dựa trên gen NS1	19
1.3.3.2. Phân tích mối quan hệ di truyền dựa trên gen VP2	19
1.3.4. Xác định đặc tính sinh học của PPV.....	20
1.3.4.1. Xác định biểu đồ sinh trưởng PPV	20
1.3.4.2. Xác định hiệu giá TCID ₅₀	21

1.3.4.3. Một số yếu tố ảnh hưởng đến nuôi cấy PPV	21
1.3.5. Xác định độ ổn định, độc lực, tính sinh miễn dịch PPV	22
1.3.5.1. Xác định độ ổn định của PPV	22
1.3.5.2. Xác định độc lực và tính sinh miễn dịch của PPV	23
1.4. Tổng quan về tình hình nghiên cứu	24
1.4.1. Sự lưu hành của PPV và tiềm năng ứng dụng vào nghiên cứu sản xuất vắc xin	24
1.4.1.1. Sự lưu hành của PPV trên thế giới và Việt Nam	24
1.4.1.2. Nghiên cứu ứng dụng các chủng phân lập vào phát triển vắc xin PPV	27
1.4.2. Tình hình sản xuất vắc xin PPV trên thế giới và ở Việt Nam	28
1.4.2.1. Tình hình sản xuất vắc xin PPV trên thế giới	28
1.4.2.2. Tình hình sản xuất vắc xin PPV tại Việt Nam	31
Chương II – Cơ sở lý thuyết và các phương pháp nghiên cứu	34
2.1. Đối tượng nghiên cứu	34
2.2. Phương pháp nghiên cứu	34
2.2.1. Cách tiếp cận các nội dung nghiên cứu	34
2.2.2. Phân lập Parvovirus gây bệnh khô thai trên lợn	36
2.2.2.1. Thu mẫu và xử lý mẫu	36
2.2.2.2. Xác định mẫu dương tính với Parvovirus	37
2.2.2.3. Xác định mẫu đủ điều kiện nuôi cấy	38
2.2.2.4. Nuôi cấy PPV trên tế bào PK-15	39
2.2.3. Xác định các type của Parvovirus	41
2.2.4. Xác định mối quan hệ di truyền của các chủng Parvovirus	42
2.2.5. Xác định đặc tính sinh học của PPV	43
2.2.6. Đánh giá tiềm năng sử dụng PPV vào nghiên cứu sản xuất vắc xin	45
2.2.6.1. Xác định sự ổn định về đặc tính sinh học và di truyền của PPV	45
2.2.6.2. Đánh giá độc lực	46
2.2.6.3. Đánh giá khả năng sinh miễn dịch	47
2.3. Phương pháp xử lý số liệu	51
2.4. Ý đức động vật	51
Chương III – Kết quả và thảo luận	52
3.1. Kết quả nghiên cứu	52

3.1.1. Phân lập Parvovirus	52
3.1.1.1. Xác định mẫu dương tính với Parvovirus	52
3.1.1.2. Kết quả xác định mẫu đủ điều kiện nuôi cấy	53
3.1.1.3. Kết quả nuôi cấy PPV	54
3.1.2. Xác định type Parvovirus	59
3.1.3. Phân tích mối quan hệ di truyền Parvovirus	60
3.1.3.1. Phân tích mối quan hệ di truyền dựa trên trình tự đoạn gen NS1.	60
3.1.3.2. Phân tích mối quan hệ di truyền dựa trên trình tự gen VP2.....	63
3.1.4. Xác định một số đặc tính sinh học của các chủng Parvovirus	66
3.1.4.1. Xác định biểu đồ sinh trưởng của PPV trên tế bào PK-15.....	66
3.1.4.2. Xác định hiệu giá TCID ₅₀	67
3.1.4.3. Xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp.....	69
3.1.5. Đánh giá sự ổn định, độc lực và tính sinh miễn dịch của hai chủng VC5 và TX7	71
3.1.5.1. Đánh giá sự ổn định của hai chủng VC5 và TX7.....	71
3.1.5.2. Đánh giá độc lực của hai chủng VC5 và TX7.....	78
3.1.5.3. Đánh giá khả năng sinh miễn dịch của hai chủng VC5 và TX7	81
3.2. Thảo luận.....	88
3.2.1. Mức độ lưu hành của PPV tại Việt Nam.....	88
3.2.2. Đặc tính sinh học và di truyền của các chủng phân lập.....	91
3.2.3. Tiềm năng ứng dụng hai chủng VC5 và TX7 vào nghiên cứu sản xuất vắc xin PPV	94
Kết luận và kiến nghị.....	101
Danh mục các công trình đã công bố liên quan đến luận án	104
Tài liệu tham khảo	105
Phụ lục	

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

ASF (African swine fever)	Virus dịch tả lợn Châu Phi
Bình T25:	Bình nuôi cấy có diện tích bề mặt 25 cm ²
CI (Confidence interval)	Khoảng tin cậy
CSFV(Classical swine fever virus):	Virus dịch tả lợn cổ điển
CPE (Cytopathic effects):	Bệnh tích tế bào
Ct (Cycle threshold):	Chu kỳ ngưỡng
DMSO:	Dimethylsulfoxide
DNA (Deoxyribonucleic acid):	Axit deoxyribonucleic
E-MEM (Eagle's Minimal Essential Medium):	Môi trường thiết yếu tối thiểu Eagle
ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent assay):	Xét nghiệm miễn dịch hấp thụ liên kết với Enzyme
FBS (Fetal Bovine Serum):	Huyết thanh bào thai bò
HI (Hemagglutination inhibition assay):	Phản ứng ngăn trở ngưng kết hồng cầu
MOI (Multiplicity of infection):	Số lượng virus gây nhiễm/số lượng tế bào
PBS (Phosphate Buffered Saline):	Đệm muối phosphate
PCR (Polymerase chain reaction):	Phản ứng chuỗi polymerase
PCV2 (Porcine circovirus 2):	Virus Circo type 2 trên lợn
PED (Porcine Epidemic Diarrhea):	Tiêu chảy cấp trên lợn
PI (Percent Inhibition):	Phần trăm ức chế
PK-15 (Porcine Kidney – 15):	Tế bào thận lợn
PRRSV (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus):	Virus gây Hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn
PPV (Porcine Parvovirus):	Virus Parvo trên lợn
Realtime - PCR (Realtime polymerase chain reaction):	Phản ứng chuỗi polymerase định lượng theo thời gian thực
RNA (Ribonucleic acid):	Axit ribonucleic
SD (Standard deviation)	Sai số chuẩn
SMEDI (Stillbirth, Mummification, Embryonic Death, and Infertility):	Chết non, thai gổ, chết phôi và vô sinh
TCID ₅₀ (Tissue Culture Infectious Dose 50):	Liều gây nhiễm nuôi cấy mô 50%

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Ảnh hưởng của việc nhiễm PPV ở các giai đoạn mang thai khác nhau.....	5
Bảng 1.2. Bảng so sánh thiệt hại do PPV mãn – cấp tính với lợn khỏe mạnh	8
Bảng 1.3. Bảng so sánh đặc điểm và khả năng gây bệnh của các type PPV	10
Bảng 1.4. Thống kê tổng đàn lợn theo địa phương	14
Bảng 1.5. Mức độ PPV lưu hành trên thế giới.....	25
Bảng 1.6. Một số loại vắc xin Parvovirus nhập khẩu lưu hành tại Việt Nam	32
Bảng 2.1. Trình tự các cặp môi định type Parvovirus	41
Bảng 2.2. Thiết kế thí nghiệm xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp với PPV.....	45
Bảng 2.3. Thiết kế thí nghiệm đánh giá khả năng sinh miễn dịch trên chuột lang.....	48
Bảng 2.4. Thiết kế thí nghiệm xác định tính sinh miễn dịch trên lợn nái bằng phương pháp huyết thanh học	49
Bảng 2.5. Thiết kế thí nghiệm xác định tính sinh miễn dịch trên lợn nái bằng phương pháp công cường độc trên lợn nái	50
Bảng 3.1. Kết quả xác định mẫu dương tính với PPV	52
Bảng 3.2. Kết quả xác định số lượng virus sau 3 đời cấy truyền.....	56
Bảng 3.3. Tỷ lệ tương đồng đoạn gen NS1 của chủng TX7, VC5 với một số chủng tham chiếu trên GenBank.....	60
Bảng 3.4. Kết quả xác định TCID ₅₀ của các chủng PPV.....	68
Bảng 3.5. Kết quả xác định TCID ₅₀ của hai chủng TX7 và VC5 qua các đời nuôi cấy.....	76
Bảng 3.6. Hiệu giá HI trên lợn nái mang thai sau khi gây nhiễm virus	79
Bảng 3.7. Khả năng sống và sự có mặt của PPV trong bào thai sau gây nhiễm virus.....	80
Bảng 3.8. Hiệu giá HI trên chuột lang sau tiêm vắc xin.....	82
Bảng 3.9. Kết quả đánh giá kháng thể kháng PPV trên lợn bằng HI.....	84
Bảng 3.10. Kết quả bảo hộ thai lợn sau công cường độc	85
Bảng 3.11. Kết quả ELISA đánh giá kháng thể kháng PPV trên lợn	87

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Hội chứng “thai gổ”	6
Hình 1.2. Sơ đồ phân loại Parvovirus	9
Hình 1.3. Cấu trúc hệ gen Parvovirus điển hình	12
Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu tổng quát	34
Hình 2.2. Sơ đồ nuôi cấy PPV trên tế bào PK-15	40
Hình 2.3. Quy trình xác định TCID ₅₀	43
Hình 3.1. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR phát hiện Parvovirus	53
Hình 3.2. Tế bào PK-15 sau 24 giờ gây nhiễm Parvovirus virus dưới kính hiển vi soi ngược độ phóng đại 100X	55
Hình 3.3. CPE trên tế bào PK-15 sau 5 ngày gây nhiễm Parvovirus virus dưới kính hiển vi soi ngược độ phóng đại 10X	55
Hình 3.4. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR xác định type chủng virus EK18	59
Hình 3.5. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen NS1	61
Hình 3.6. Kết quả BLAST trình tự nucleotide đoạn gen NS1 (330bp) của mẫu TX7 so với chủng tham chiếu PPV1-0225-L-SD (Mã số GenBank: OQ750579)	62
Hình 3.7. Cây phả hệ dựa trên trình tự đoạn gen NS1	62
Hình 3.8. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR khuếch đại gen VP2	64
Hình 3.9. Cây phả hệ dựa trên trình tự gen VP2	65
Hình 3.10. Biểu đồ sinh trưởng của một số chủng PPV phân lập được	67
Hình 3.11. Biểu đồ khảo sát điều kiện nuôi cấy thích hợp	70
Hình 3.12. CPE trên tế bào PK-15 sau 5 ngày gây nhiễm chủng TX7 dưới kính hiển vi soi ngược độ phóng đại 10X	72
Hình 3.13. CPE trên tế bào PK-15 sau 5 ngày gây nhiễm chủng VC5 dưới kính hiển vi soi ngược độ phóng đại 10X	73
Hình 3.14. Biểu đồ sinh trưởng PPV sau 15 đời nuôi cấy chủng TX7	75
Hình 3.15. Biểu đồ sinh trưởng PPV sau 15 đời nuôi cấy chủng VC5	75
Hình 3.16. Bệnh tích trên bào thai lợn sau gây nhiễm virus	81
Hình 3.17. Thai lợn sau công cường độc	86

TÓM TẮT NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

Đề tài luận án: Phân lập, tuyển chọn chủng Parvovirus tiềm năng cho sản xuất vắc xin phòng bệnh khô thai trên lợn
Ngành: Công nghệ sinh học
Mã số: 9420201
Nghiên cứu sinh: Trịnh Thị Thu Hằng
Khóa: 2021
Người hướng dẫn: 1. PGS.TS. Vũ Khắc Hùng
2. PGS.TS. Nguyễn Văn Duy
Cơ sở đào tạo: Trường Đại học Nha Trang

Nội dung:

Luận án đã thu được một số kết quả mới bổ sung vào lĩnh vực nghiên cứu về phân lập Parvovirus và tuyển chọn chủng Parvovirus tiềm năng cho sản xuất vắc xin như sau:

- 1) Nghiên cứu đã phân lập thành công Parvovirus lưu hành tại Việt Nam
- 2) Nghiên cứu xác định các đặc tính sinh học cũng như các đặc tính di truyền của các chủng phân lập tại Việt Nam. Từ đó giúp có cái nhìn toàn diện về các chủng Parvovirus đang lưu hành tại Việt Nam hiện nay.
- 3) Nghiên cứu tuyển chọn được 02 chủng Parvovirus có các đặc điểm sinh học và di truyền ổn định qua nhiều đời, có độc lực cao và tính sinh miễn dịch tốt. Hai chủng này sẽ là các chủng virus tiềm năng để nghiên cứu sản xuất vắc xin phòng bệnh khô thai trên lợn. Ở Việt Nam, hiện chưa có đơn vị nào sản xuất và thương mại hóa vắc xin phòng bệnh khô thai trên lợn, tất cả các loại vắc xin Parvovirus trên thị trường đều là vắc xin nhập khẩu. Những kết quả của nghiên cứu này đã đặt nền tảng cho việc phát triển vắc xin Parvovirus nội địa, giải quyết một lỗ hổng quan trọng trong phòng chống dịch bệnh thú y tại Việt Nam.

Đại diện cán bộ hướng dẫn

Nghiên cứu sinh

PGS.TS. Vũ Khắc Hùng

Trịnh Thị Thu Hằng

Key Findings

Thesis title: Isolation and Selection of Potential Parvovirus Strains for Vaccine Production against Porcine Mummification
Major: Biotechnology
Major code: 9420201
PhD student: Trinh Thi Thu Hang
Supervisor: 1. Assoc.Prof.Dr. Vu Khac Hung
2. Assoc.Prof.Dr. Nguyen Van Duy
Institution: Nha Trang University

Key Findings:

The dissertation provides several novel findings that contribute to the field of parvovirus isolation and the selection of potential strains for vaccine development, as follows:

1. The study successfully isolated Porcine Parvovirus strains currently circulating in Vietnam.
2. The research systematically identified both the biological and genetic characteristics of PPV strains isolated in Vietnam, thereby providing a comprehensive understanding of the currently circulating strains in the country.
3. Two PPV strains with stable biological and genetic characteristics over multiple passages, high virulence, and strong immunogenicity were successfully selected. These strains constitute promising candidates for the development of vaccines against porcine mummification. Importantly, no vaccine against porcine mummification is produced or commercialized domestically in Vietnam - all available porcine parvovirus vaccines are imported - the outcomes of this study establish a scientific foundation for the development of an indigenous PPV vaccine, addressing a critical gap in veterinary disease prevention and control in Vietnam.

Supervisor

PhD student

Assoc.Prof.Dr. Vu Khac Hung

Trinh Thi Thu Hang

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Theo các nhà dinh dưỡng Việt Nam, thịt lợn chiếm hơn 70% trong cơ cấu các loại thịt sử dụng trong bữa ăn của người Việt Nam. Do vậy, chăn nuôi lợn xếp vị trí hàng đầu trong các ngành chăn nuôi ở nước ta với giá trị tăng trưởng của ngành chăn nuôi năm 2023, ước đạt 5,72%, đóng góp 26% vào GDP nông nghiệp.

Theo số liệu của Tổng cục thống kê, năm 2023 Việt Nam có khoảng 25,5 triệu lợn, trong đó có khoảng 3,1 triệu lợn nái sinh sản (Tổng cục thống kê, tháng 4/2024). Tuy nhiên ngành chăn nuôi lợn cũng đối mặt với nhiều nguy cơ dịch bệnh gây thiệt hại đáng kể ảnh hưởng tới người dân và xã hội như dịch tả lợn châu Phi, lở mồm long móng, tai xanh, bệnh khô thai,... Nguyên nhân chính gây dịch bệnh khô thai ở lợn là do Parvovirus (PPV). Bệnh parvo là một bệnh truyền nhiễm, với các biểu hiện lâm sàng chỉ thấy ở lợn nái như chết lưu thai, thai gổ, thai thối hoặc lợn con đẻ ra có sức sống rất kém. Bệnh gây rất nhiều thiệt hại cho các trại giống lợn, làm giảm số đầu lợn con sơ sinh lên tới 50 - 60%, làm giảm khối lượng ở lợn con lúc cai sữa, làm tăng chi phí để khắc phục hậu quả do bệnh gây ra. Parvovirus là loại virus DNA có kích thước nhỏ, không có vỏ bọc và có genome dạng mạch đơn thẳng với chiều dài khoảng 5 kb (Xiao và cộng sự, 2013b). Hiện tại Parvovirus được phân loại gồm 7 type từ PPV1 đến PPV7. Để phòng chống bệnh khô thai do Parvovirus gây ra thì sử dụng vắc xin là biện pháp hiệu quả nhất.

Ở Việt Nam, hiện chưa có đơn vị nào sản xuất và thương mại hóa vắc xin phòng bệnh khô thai trên lợn. Các vắc xin được sử dụng để phòng bệnh khô thai do Parvovirus đang được lưu hành tại Việt Nam đều là vắc xin nhập khẩu. Các vắc xin nhập ngoại thường có chi phí cao và có thể không tương đồng với các chủng phân lập tại Việt Nam. Mặt khác, việc sử dụng vắc xin nhập khẩu dẫn đến tốn kém cho ngân sách nhà nước và quan trọng hơn là vắc xin chưa phù hợp với các chủng Parvovirus đang lưu hành tại Việt Nam. Vì vậy, để nâng cao hiệu quả phòng chống dịch bệnh do Parvovirus, Bộ Nông nghiệp và phát triển nông thôn (nay là Bộ Nông nghiệp và Môi trường) đã định hướng nghiên cứu sản xuất vắc xin 1 Parvovirus trên lợn – đây là một yêu cầu cấp thiết đối với ngành chăn nuôi lợn nước ta.

Để sản xuất vắc xin thì việc phân lập, tuyển chọn chủng Parvovirus đang lưu hành tại Việt Nam có đầy đủ đặc tính phù hợp cho việc nghiên cứu chế tạo vắc xin có tầm quan trọng đặc biệt. Vắc xin giúp ngăn ngừa các bệnh do Parvovirus gây ra, góp phần phát triển ngành chăn nuôi lợn bền vững, tạo sinh kế cho người nông dân Việt Nam, giúp xóa đói giảm nghèo, là một định hướng của Đảng và Nhà nước.

Vì những lý do trên, đề tài luận án tiến sĩ với tiêu đề: “Phân lập, tuyển chọn chủng Parvovirus tiềm năng cho sản xuất vắc xin phòng bệnh khô thai trên lợn” được thực hiện với mục tiêu phân lập được chủng Parvovirus có độc lực cao, ổn định và có tính sinh miễn dịch tốt làm cơ sở cho việc nghiên cứu, sản xuất vắc xin phòng bệnh khô thai trên lợn từ đó chủ động phòng chống dịch bệnh ở lợn theo định hướng của Chính phủ.

2. Mục tiêu nghiên cứu

2.1. Mục tiêu chung

Phân lập, tuyển chọn, tạo thư viện chủng Parvovirus tiềm năng sử dụng cho các nghiên cứu sản xuất vắc xin phòng bệnh khô thai trên lợn.

2.2. Mục tiêu cụ thể

- 1) Phân lập được các chủng Parvovirus từ thực địa
- 2) Xác định type và phân tích gen VP2 của các mẫu phân lập được
- 3) Xác định các đặc tính sinh học, độ ổn định và tính sinh miễn dịch của các chủng Parvovirus

3. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là Parvovirus phân lập từ 6 tỉnh Thái Bình, Thanh Hóa, Bình Định, Đắk Lắk, Đồng Nai, Bình Dương – Việt Nam.

4. Phạm vi nghiên cứu

- Phạm vi nghiên cứu: Phân lập, xác định một số đặc tính, xây dựng thư viện 2 chủng Parvovirus tiềm năng dùng cho sản xuất vắc xin phòng bệnh khô thai lợn

- Phạm vi không gian của nghiên cứu: Thực hiện phân lập các chủng đang lưu hành trên 6 tỉnh Thái Bình, Thanh Hóa, Bình Định, Đắk Lắk, Đồng Nai, Bình Dương – Việt Nam.

- Phạm vi thời gian của nghiên cứu: Từ năm 2022 đến năm 2024

5. Nội dung nghiên cứu

1) Phân lập Parvovirus gây bệnh khô thai từ các mẫu bệnh phẩm điển hình ở các địa phương khác nhau.

2) Xác định các type của chủng Parvovirus.

3) Xác định mối quan hệ di truyền của các chủng Parvovirus phân lập được

4) Xác định một số đặc tính của các chủng Parvovirus virus

5) Xác định độ ổn định, độc lực và tính sinh miễn dịch của các chủng virus được lựa chọn.

6. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

6.1. Ý nghĩa khoa học của đề tài

Nghiên cứu phân lập thành công các chủng Parvovirus đang lưu hành tại Việt Nam trên dòng tế bào PK-15.

Nghiên cứu xác định các đặc tính sinh học cũng như các đặc tính di truyền của các chủng phân lập tại Việt Nam. Từ đó giúp có cái nhìn toàn diện về các chủng Parvovirus đang lưu hành tại Việt Nam hiện nay.

Nghiên cứu tuyển chọn được 02 chủng Parvovirus có các đặc điểm sinh học và di truyền ổn định qua nhiều đời, có độc lực cao và tính sinh miễn dịch tốt. Hai chủng này sẽ là các chủng virus tiềm năng để nghiên cứu sản xuất vắc xin phòng bệnh khô thai trên lợn.

6.2. Ý nghĩa thực tiễn của đề tài

Bệnh thai gổ, bệnh khô thai do Parvovirus là bệnh truyền nhiễm nguy hiểm ở lợn nái. Đây là một bệnh gây rất nhiều thiệt hại cho các trại giống lợn sinh sản, làm giảm 3 số đầu lợn con sơ sinh lên tới 50 - 60%; làm giảm khối lượng ở lợn con lúc cai sữa; làm tăng chi phí để khắc phục hậu quả do bệnh gây ra. Bệnh này gây thiệt hại rất lớn cho người chăn nuôi. Tuy nhiên, hiện nay trên thị trường Việt Nam các loại vắc xin phòng bệnh parvo đều là vắc xin ngoại nhập giá thành cao và có thể không tương thích với các chủng đang lưu hành tại Việt Nam.

Việc phân lập và tuyển chọn được chủng PPV có độc lực cao, ổn định qua nhiều đời, có tính sinh miễn dịch tốt sẽ là cơ sở để nghiên cứu vắc xin phòng bệnh khô thai

trên lợn. Từ đó giúp chủ động nguồn cung vắc xin trong nước, nâng cao hiệu quả phòng bệnh, góp phần tích cực vào công tác phòng, chống dịch. Việc được sử dụng nguồn vắc xin nội địa với chi phí thấp hơn, nguồn cung ổn định hơn sẽ giúp người chăn nuôi chủ động trong công tác phòng bệnh, nâng cao năng suất, giúp người nông dân hạn chế rủi ro, tăng thu nhập.

CHƯƠNG I

TỔNG QUAN VỀ VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU

1.1. Tổng quan về đối tượng nghiên cứu

1.1.1. Tổng quan về bệnh khô thai lợn

1.1.1.1. Cơ chế gây bệnh

Lợn (*Sus scrofa domesticus*) là vật chủ cảm thụ chính của Porcine Parvovirus – tác nhân gây hội chứng rối loạn sinh sản đặc trưng, thường gọi là “bệnh khô thai”. Theo Tổng cục Thống kê (2024), Việt Nam hiện có khoảng 25,5 triệu con lợn, trong đó có 3,1 triệu lợn nái sinh sản. Chăn nuôi lợn xếp vị trí hàng đầu trong các ngành chăn nuôi ở nước ta. Các giống lợn lai đang được nuôi rộng rãi nhờ khả năng sinh trưởng nhanh, năng suất thịt cao và thích nghi tốt với điều kiện khí hậu nhiệt đới. Trong đó, hai giống lợn lai (Landrace x Yorkshire và Yorkshire x Landrace) được xem là có ưu thế lai cao về nhiều chỉ tiêu sinh sản và được chăn nuôi rộng rãi (Lê Thị Mến, 2015).

Thời gian mang thai của lợn trung bình khoảng 114 ngày. PPV có thể xâm nhập và nhân lên trong cơ thể nái mang thai, lây truyền qua nhau thai để gây nhiễm cho bào thai ở nhiều giai đoạn khác nhau. Nhiễm virus trong 10–30 ngày đầu làm bào thai chết hoặc bị hấp thu; trong giai đoạn 30–70 ngày gây hiện tượng mất nước, khô và hóa gỗ của thai; từ sau ngày thứ 70, bào thai đã có khả năng hình thành đáp ứng miễn dịch chống lại virus (Bảng 1.1).

Bảng 1.1. Ảnh hưởng của việc nhiễm PPV ở các giai đoạn mang thai khác nhau

Thời gian nhiễm (ngày)	Ảnh hưởng của nhiễm PPV
10-30	Chết và hấp thu lại
30-70	Chết và thai khô
70 - hết thai kỳ	Sinh đáp ứng miễn dịch, sống sót

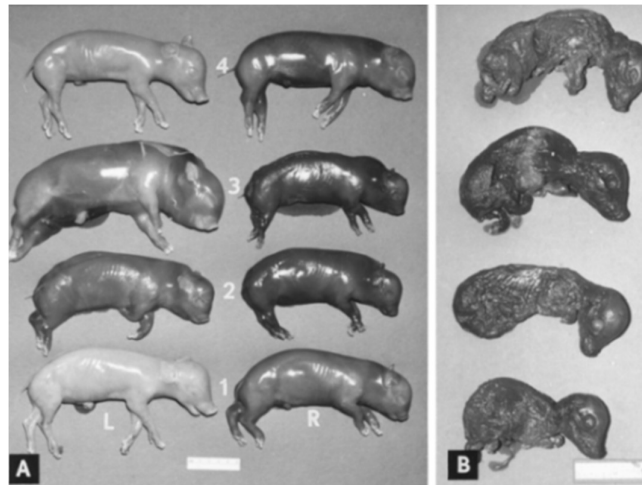
(Cartwright và Huck, 1967)

PPV xâm nhập vào các trang trại sạch bệnh thông qua nhiều con đường khác nhau như: nhiễm từ bên ngoài qua thức ăn, nước uống, phân; nhiễm qua quá trình phối giống: virus từ tinh dịch và dịch tiết từ cơ quan sinh dục cái. PPV xâm nhập vào lợn mẹ và từ đó xâm nhiễm vào bào thai qua nhau thai. Sau khi xâm nhập, PPV nhân lên trong các tế

bào nội mô và trung mô của màng niệu đệm, phá hủy mô liên kết nhau thai. Virus làm gián đoạn hệ tuần hoàn, dẫn đến hiện tượng phù nề, xuất huyết và tích tụ dịch chứa máu trong các khoang cơ thể. Những tổn thương nghiêm trọng này khiến toàn bộ hệ tuần hoàn của bào thai bị phá hủy hoàn toàn dẫn đến chết bào thai. (Cotmore và Tattersall, 2014).

1.1.1.2. Triệu chứng

Khi lợn nhiễm PPV, virus thường nhân lên rất nhanh trong các cơ quan, đặc biệt tập trung nhiều ở các mô lympho. Sau khi xâm nhiễm 5–10 ngày, lợn thường xuất hiện giảm bạch cầu tạm thời. Biểu hiện triệu chứng lâm sàng chính thường gặp là hội chứng rối loạn sinh sản. Lợn nái có thể không động dục, động dục lại, đẻ ít con, thai gổ, sảy thai, thai chết non, tỷ lệ sống sót của con non giảm (Liu, 2022).



Hình 1.1. Hội chứng “thai gổ”

(Mengeling và cộng sự, 1975)

Ghi chú: A: Thai của lợn nái được gây nhiễm thông qua đường mũi, miệng vào ngày 47 sau phối giống, thai được thu sau 34 ngày gây nhiễm. B: Thai mắc bệnh tự nhiên (thai khô)

Bệnh tích đại thể của thai bị nhiễm virus bao gồm thai còi cọc, sung huyết mạch máu trên phôi hoặc mất mạch máu ở các mô liên kết. Các xoang trong cơ thể bị sung huyết, phù thũng, xuất huyết và chứa đầy dịch thẩm xuất có lẫn máu và sợi tơ huyết. Khi thai chết các đám xuất huyết trở nên sẫm màu, mất nước khiến cho thai khô (Hình 1.1).

1.1.1.3. Hậu quả do nhiễm bệnh khô thai trên lợn

Theo thống kê, nhiều nước trên thế giới cũng chịu những thiệt hại kinh tế đáng kể do nhiễm Parvovirus. Một trang trại chăn nuôi lợn nái giống tại Anh đã có 500 con lợn nái bị nhiễm PPV cấp tính gây thiếu hụt 2.000 lợn con trong năm. Hậu quả này tương đương với khoản lỗ lên đến 70.000 bảng Anh (<https://www.nadis.org.uk>). Một trang trại quy mô 300 lợn nái tại Mỹ trong một đợt bùng phát dịch PPV đã gây thiếu hụt 678 lợn con gây thiệt hại lên tới 28.340 USD trong một năm (<https://www.msd-animal-health-swine.com>). Morrisson và Joo đã ước tính rằng trong một đợt bùng phát PPV tại một trang trại chăn nuôi quy mô 130 lợn nái, thiệt hại kinh tế lên đến 7.260 USD (Morrisson và Joo, 1984).

Tại Việt Nam, mặc dù chưa có số liệu thống kê đầy đủ về thiệt hại kinh tế do PPV gây ra, song các nghiên cứu đã khẳng định virus này là một trong những nguyên nhân chính gây suy giảm nghiêm trọng khả năng sinh sản của lợn nái. Các biểu hiện thường gặp bao gồm tỷ lệ phối giống thành công thấp, số con sơ sinh giảm (chỉ dưới 5 con/lứa), tỷ lệ thai chết lưu và thai khô cao, cùng với hiện tượng chậm động dục và mang thai giả (Bảng 1.2). Những yếu tố này dẫn đến giảm rõ rệt năng suất sinh sản của đàn nái, ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu quả tái đàn và lợi nhuận của trang trại (Võ Văn Ninh, 2003). Theo thống kê năm 2021, tỷ lệ lợn con chết lưu tại Việt Nam dao động từ 5–10%. Với khoảng 3–4 triệu lợn nái sinh sản được nuôi hàng năm, số lượng lợn con chết lưu có thể lên tới hàng triệu con (nhachannuoi.vn), trong đó *Parvovirus* được xác định là một trong những nguyên nhân quan trọng gây sảy thai ở lợn (Mengeling và cộng sự, 2000). Bệnh khô thai không chỉ làm giảm tỷ suất sinh và sức sống của con non mà còn gây thiệt hại kinh tế đáng kể do giảm khả năng sinh sản và kéo dài chu kỳ tái giống của đàn nái.

Trong bối cảnh ngành chăn nuôi lợn Việt Nam thường xuyên chịu ảnh hưởng của các dịch bệnh nguy hiểm như dịch tả lợn châu Phi, lở mồm long móng và tai xanh, việc khôi phục đàn giống và ổn định sản xuất sau dịch là một thách thức lớn. Đặc biệt, PPV có khả năng tồn tại lâu dài trong môi trường, lây lan mạnh, chưa có thuốc điều trị đặc hiệu và dễ phối hợp với các tác nhân khác làm trầm trọng thêm tình trạng bệnh. Do đó, nghiên cứu phân lập, tuyển chọn các chủng PPV có độc lực và khả năng sinh miễn dịch ổn định phục vụ sản xuất vắc xin phòng bệnh là yêu cầu cấp thiết nhằm kiểm soát hiệu

quả bệnh khô thai do PPV gây ra, góp phần nâng cao năng suất sinh sản, đảm bảo nguồn cung con giống. Từ đó giúp phát triển bền vững ngành chăn nuôi lợn trong nước.

Bảng 1.2. Bảng so sánh thiệt hại do PPV mãn – cấp tính với lợn khỏe mạnh

STT	Chỉ tiêu	Bình thường	PPV mãn tính	PPV cấp tính
1	Tổng số lợn con / lứa	11-12 con tùy trại	11-12 con	Giảm (<11 con)
2	Lợn sơ sinh còn sống/ổ	11-12 con	11.5 con/ổ	9.5 con/ổ
3	Tỷ lệ số lứa đẻ ít hơn 9 con	0%	Nái ra: <10% Nái hậu bị: <18%	20-40%
4	Tỷ lệ lợn con sơ sinh chết	0%	4-7%	7-12%
5	Tỷ lệ thai hóa gỗ	0%	0.6%	1-4%
6	Tỷ lệ lợn nái mang thai giả	0%	1%	2-6%
7	Tỷ lệ lợn nái chậm lên giống lại	0%	<3%	>4%
8	Các thiệt hại khác	Không có	Không có hoặc rất ít trên những hậu bị chưa tiêm vắc xin	Không có thiệt hại khác nhưng bệnh xuất hiện thường xuyên.

(Võ Văn Ninh, 2003)

1.1.2. Tổng quan về Parvovirus

1.1.2.1. Phân loại

PPV thuộc

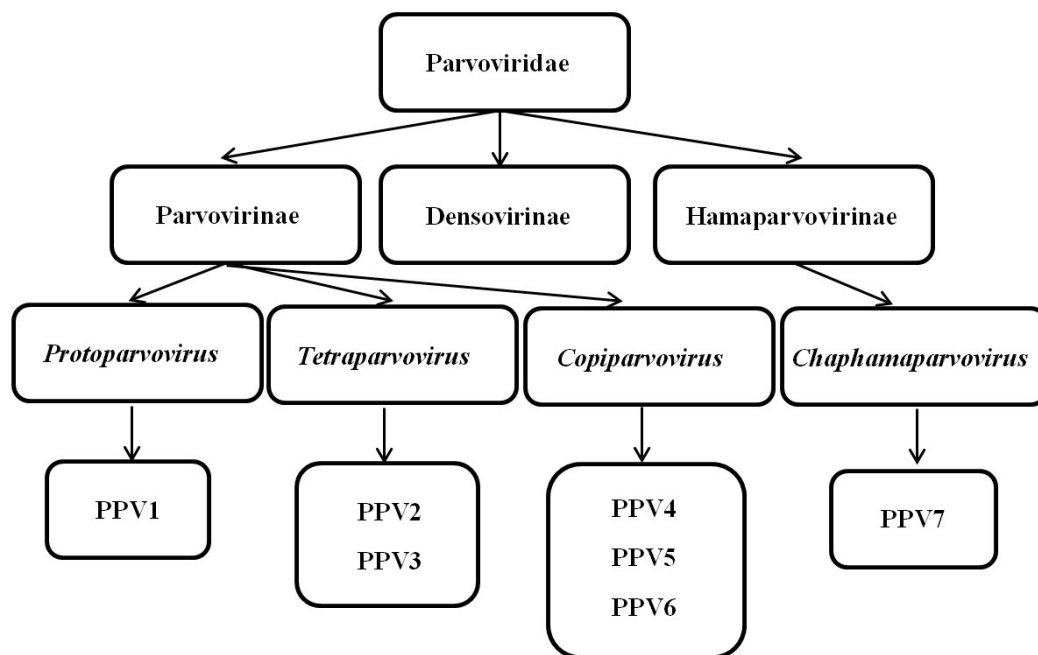
Họ: Parvoviridae

Phân họ: Parvovirinae

Chi: *Protoparvovirus*

Loài: *Ungulate protoparvovirus*

Phân loài: Porcine parvovirus



Hình 1.2. Sơ đồ phân loại Parvovirus

Hiện tại Parvovirus được phân loại gồm 7 type từ PPV1 đến PPV7 (Hình 1.2). Theo phân loại của Ủy ban Quốc tế về phân loại virus (International Committee on Taxonomy of Viruses-ICTV), PPV1 là một thành viên của họ Parvoviridae, phân họ Parvovirinae, chi *Protoparvovirus*, loài *U. protoparvovirus* 1; PPV2 (*U. tetraparvovirus* 3) và PPV3 (*U. Tetraparvovirus* 2) thuộc chi *Tetraparvovirus*; PPV4 (*U. copiparvovirus* 2), PPV5 (chưa có tên loài) và PPV6 (*U. copiparvovirus* 4) thuộc chi *Copiparvovirus*; PPV7 (*U. chaphamaparvovirus*) thuộc phân họ Hamaparvovirus, chi *Chaphamaparvovirus* (Streck và cộng sự, 2015).

1.1.2.2. Đặc điểm sinh học và khả năng gây bệnh của các type PPV khác nhau

Các type Porcine Parvovirus (PPV1–PPV7) thể hiện sự khác biệt rõ rệt về phân loại học, đặc điểm di truyền, khả năng gây bệnh và phạm vi phân bố (Bảng 1.3). Trong đó, PPV1 thuộc chi *Protoparvovirus* được xem là type cổ điển, có ý nghĩa bệnh học và dịch tễ học cao nhất. Virus này có cấu trúc gen điển hình gồm hai khung đọc mở (Open Reading Frame – ORF) ORF1 và ORF2 mã hóa cho protein không cấu trúc NS1 và protein capsid VP1/VP2. PPV1 là tác nhân chính gây hội chứng SMEDI (sảy thai, thai gổ, chết phôi và vô sinh) ở lợn nái dẫn đến suy giảm về sinh sản (Cartwright và Huck, 1967; Mengeling và cộng sự, 2000). Các nghiên cứu dịch tễ học trên toàn cầu cho thấy

tỷ lệ lưu hành của PPV1 thường rất cao, dao động từ 60–100% ở các quần thể lợn nái, phản ánh tính phổ biến rộng rãi và khả năng duy trì trong đàn nhờ cơ chế lây truyền dọc và ngang (Streck và cộng sự, 2015). Ngoài ra, PPV1 còn đồng nhiễm Virus dịch tả lợn (CSFV), Virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản trên lợn (PRRSV), Virus circo type 2 (PCV2), từ đó gây nên tình trạng suy giảm sinh sản nghiêm trọng hơn (Afolabi và cộng sự, 2019; Milek và cộng sự, 2020, Lyoo và cộng sự, 2001, Deka và cộng sự, 2021, Sun và cộng sự, 2015).

Các type mới phát hiện trong hai thập kỷ gần đây (PPV2–PPV7) thuộc các chi khác nhau trong họ Parvoviridae, bao gồm Tetraparvovirus, Copiparvovirus và Chaphama-parvovirus, phản ánh sự tiến hóa phân nhánh phức tạp của Parvovirus ở lợn (Streck và cộng sự, 2015). Trong đó, PPV2 và PPV3 thuộc chi Tetraparvovirus có quan hệ gần gũi với Parvovirus 4 gây bệnh ở người, gợi ý khả năng tiến hóa cùng nguồn gốc hoặc sự lan truyền chéo giữa các loài có vú (Hijikata và cộng sự, 2001; Lau và cộng sự, 2008). Ba type PPV4, PPV5 và PPV6 thuộc chi Copiparvovirus có sự khác biệt về cấu trúc gen, trong đó PPV4 chứa thêm khung ORF3 giữa ORF1 và ORF2 (Cheung và cộng sự, 2010), còn PPV5 và PPV6 có ORF2 dài hơn và mức tương đồng thấp so với PPV1, thể hiện sự phân nhánh tiến hóa độc lập (Xiao và cộng sự, 2013a; Ni và cộng sự, 2014; Schirtzinger và cộng sự, 2015). Đặc biệt, PPV7 thuộc chi Chaphama-parvovirus (phân họ Hamaparvovirinae), có khung ORF2 ngắn (~469 aa) và trình tự gen khác biệt hoàn toàn so với các type trước đó, phản ánh một hướng tiến hóa mới của Parvovirus trên lợn (Palinski và cộng sự, 2016; Xing và cộng sự, 2017). Tuy nhiên, ngoại trừ PPV1, vai trò gây bệnh của các type còn lại vẫn chưa được xác định rõ, chủ yếu được phát hiện ở lợn đồng nhiễm với các tác nhân virus khác như PCV2 và PRRSV (Streck và cộng sự, 2015; Wang và cộng sự, 2010). Sự khác biệt về cấu trúc gen, phân loại và khả năng gây bệnh giữa các type PPV cho thấy quá trình đa dạng hóa và thích nghi tiến hóa mạnh mẽ của Parvovirus ở lợn.

Bảng 1.3. Bảng so sánh đặc điểm và khả năng gây bệnh của các type PPV

Đặc điểm	PPV1	PPV2	PPV3	PPV4	PPV5	PPV6	PPV7
Chi	<i>Protoparvovirus</i>	<i>Tetraparvovirus</i>	<i>Tetraparvovirus</i>	<i>Copiparvovirus</i>	<i>Copiparvovirus</i>	<i>Copiparvovirus</i>	<i>Chaphama-parvovirus</i>
Phân họ	<i>Parvovirinae</i>	<i>Parvovirinae</i>	<i>Parvovirinae</i>	<i>Parvovirinae</i>	<i>Parvovirinae</i>	<i>Parvovirinae</i>	<i>Hamaparvovirinae</i>

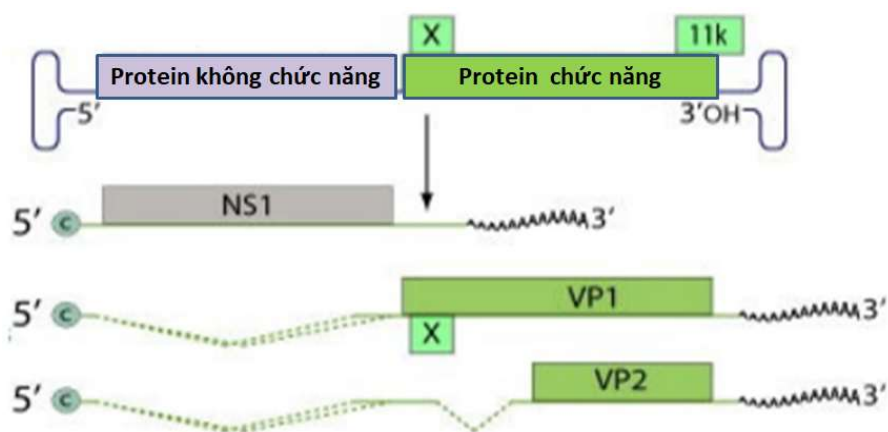
Đặc điểm	PPV1	PPV2	PPV3	PPV4	PPV5	PPV6	PPV7
Loài	<i>Ungulate protoparvovirus 1</i>	<i>U. tetraparvovirus 3</i>	<i>U. tetraparvovirus 2</i>	<i>U. copiparvovirus 2</i>	(Chưa có tên loài)	<i>U. copiparvovirus 4</i>	<i>U. chaphamaparvovirus</i>
Năm phát hiện	1965	2001	2008	2010	2013	2014	2016
Nơi đầu tiên phát hiện	Đức	Myanmar	Hồng Kông	Mỹ	Mỹ	Trung Quốc	Mỹ
Nguồn phát hiện ban đầu	Bào thai lợn chết	Huyết thanh lợn nhiễm bệnh viêm gan type E	Lợn nhiễm hokovirus	Lợn bội nhiễm PCV2	Lợn tại Bắc Mỹ	Lợn tại Trung Quốc	Lợn tại Mỹ
Đặc điểm gen nổi bật	Có 2 ORF chính: ORF1 (NS1), ORF2 (VP1/VP2)	Có 2 ORF chính: ORF1 (NS1), ORF2 (VP1/VP2)	Tương đồng với PARV4 người	Có ORF3 bổ sung giữa ORF1 và ORF2	Không có ORF3, ORF2 dài hơn PPV4	Gen VP1 dài hơn (mã hóa cho 1.189 aa)	Khung mở đọc ORF2 ngắn (~469aa), không có sự tương đồng so với các protein đã biết
Bộ gen	~5,0 kb	~5,2 kb	~5,1 kb	~5,3 - 5,9 kb	~5,0 – 5,8 kb	~6,0 kb	~3,4 – 4,1 kb
Mức độ phân bố	Toàn cầu, lưu hành phổ biến	Được ghi nhận ở nhiều quốc gia châu Á	Phát hiện ở châu Á, châu Âu, Bắc Mỹ	Bắc Mỹ, châu Âu, châu Á	Trung Quốc, Mỹ	Trung Quốc, Bắc Mỹ	Mỹ, Trung Quốc, châu Âu
Khả năng gây bệnh	Gây hội chứng SMEDI (sảy thai, thai gở, chết phôi)	Chưa rõ, có thể liên quan rối loạn sinh sản	Có thể liên quan nhiễm trùng đa virus	Phát hiện ở lợn bội nhiễm PCV2	Có thể góp phần vào bệnh đa nguyên nhân	Chưa rõ, thường phát hiện đồng nhiễm	Chưa rõ, thường xuất hiện cùng PCV2 và PRRSV
Tài liệu tham khảo	Cartwright và Huck (1967); Mengeling và cộng sự (2000), Streck và cộng sự (2013),	Hijikata và cộng sự (2001); Streck và cộng sự (2013), Wang và cộng sự (2010)	Lau và cộng sự (2008); Streck và cộng sự (2013),	Cheung và cộng sự (2010); Streck và cộng sự (2015), Ni và cộng sự, 2014; Schirtzinger và cộng sự, 2015	Xiao và cộng sự (2013a); Streck và cộng sự (2015), Xiao và cộng sự, 2013c; Ni và cộng sự, 2014; Wu và cộng sự, 2014; Schirtzinger và cộng sự, 2015	Ni và cộng sự (2014) Streck và cộng sự (2015), Xiao và cộng sự, 2013c; Ni và cộng sự, 2014; Wu và cộng sự, 2014; Schirtzinger và cộng sự, 2015	Palinski và cộng sự (2016); Xing và cộng sự, 2017

1.1.2.3. Cấu trúc PPV

Bộ gen của Parvovirus là một phân tử DNA sợi đơn, mạch thẳng, có kích thước xấp xỉ 5 kb, thuộc nhóm virus DNA có kích thước nhỏ nhất trong tự nhiên (Mészáros và cộng sự, 2017). PPV là virus không có vỏ bọc, có hình cầu, đường kính dao động từ 18–26 nm, với cấu trúc đối xứng hình khối 20 mặt điển hình của họ Parvoviridae (Parrish, 2010).

Ở hai đầu tận cùng của phân tử DNA tồn tại các cấu trúc kẹp tóc (hairpin structures) gồm khoảng 120–200 nucleotide, có vai trò quan trọng trong việc khởi đầu và điều hòa quá trình sao chép DNA của virus (Tattersall, 2006). Bộ gen của PPV được tổ chức thành hai khung đọc mở chính mã hóa cho hai nhóm protein chức năng khác nhau gồm: các protein phi cấu trúc (Non-Structural Proteins – NSPs) và các protein capsid (VPs), được thể hiện trong Hình 1.3.

ORF1 mã hóa cho các protein phi cấu trúc chủ yếu gồm NS1, NS2 và NS3, trong đó NS1 đóng vai trò trung tâm trong quá trình nhân đôi của virus nhờ hoạt tính enzym helicase và nickase. Các protein này có mức độ bảo tồn cao giữa các chủng Parvovirus khác nhau và được xem là yếu tố quan trọng trong cơ chế nhân lên và điều hòa phiên mã của virus. Ngược lại, ORF2 mã hóa cho các protein capsid VP1, VP2 và VP3, là các thành phần cấu trúc chủ yếu hình thành nên vỏ capsid của virus. Trong đó, VP1 và VP2 được dịch mã từ các mRNA khác nhau, còn VP3 được tạo ra thông qua quá trình cắt proteolytic từ VP2 (Streck và Truyen, 2020).



Hình 1.3. Cấu trúc hệ gen Parvovirus điển hình

(Streck và Truyen, 2020)

1.1.2.4. Cơ chế xâm nhiễm của PPV vào tế bào vật chủ

Quá trình sao chép sơ cấp của Parvovirus diễn ra chủ yếu trong các tế bào thuộc mô bạch huyết, sau đó virus được phân phối toàn thân thông qua hệ tuần hoàn. Kết quả phát hiện bằng PCR cho thấy PPV có khả năng lan truyền và tồn tại trong nhiều cơ quan khác nhau của cơ thể lợn như tim, phổi, thận, lách, nội mạc tử cung, ruột non và amidan (McKillen và cộng sự, 2007; Miao và cộng sự, 2009; Streck, 2013).

PPV sử dụng nhiều phân tử bề mặt tế bào, bao gồm glycoprotein, glycan và glycolipid, làm thụ thể gắn kết để khởi đầu quá trình xâm nhiễm. Trong đó, các gốc sialic acid (bao gồm cả O- và N-linked sialic acid) trên bề mặt glycoprotein đóng vai trò đặc biệt quan trọng trong sự nhận biết và gắn kết của virion (Harbinson và cộng sự, 2008; Ros và cộng sự, 2017). Sau khi gắn kết, virus có thể xâm nhập vào tế bào thông qua ba con đường chính: (i) nhập bào qua trung gian clathrin, (ii) đại ẩm bào (macropinocytosis) và (iii) một con đường xâm nhập chưa được xác định hoàn toàn. Việc sử dụng các chất ức chế đặc hiệu cho thấy, ngay cả khi hai con đường nhập bào và đại ẩm bào bị chặn, khả năng xâm nhập của PPV vẫn chỉ giảm khoảng 50–60%, cho thấy sự tồn tại của cơ chế thay thế thứ ba. Ngược lại, con đường qua caveolae đã được chứng minh không tham gia vào quá trình này (Boisvert và cộng sự, 2010). Những kết quả này gợi mở hướng nghiên cứu mới về cơ chế xâm nhập đa dạng và phức tạp của PPV vào tế bào vật chủ.

Sau khi xâm nhập, hệ thống vi ống và mạng lưới actin đóng vai trò vận chuyển virion đến vùng quanh nhân, giúp phân phối các virus mới được tổng hợp trong quá trình nhân lên. Quá trình này diễn ra có trình tự: virion tích tụ tại vùng ngoại vi nhân sau 4–8 giờ kể từ khi xâm nhiễm, và các hạt virus mới được tổng hợp xuất hiện trong nhân sau 16–20 giờ (Boisvert và cộng sự, 2010). Tại đây, bộ gen ssDNA của PPV cùng với protein cấu trúc được vận chuyển vào nhân, nơi chúng được bộ máy tế bào chủ sao chép thành DNA sợi kép (dsDNA). Trong mỗi chu kỳ phân chia của tế bào vật chủ, DNA virus được nhân đôi đồng thời, đảm bảo sự duy trì ổn định của bộ gen virus trong quá trình lây nhiễm.

PPV là nguyên nhân chính gây Hội chứng SMEDI ở lợn nái mang thai, biểu hiện qua hiện tượng chết phôi, tiêu thai, thai chết lưu và vô sinh (Díaz và cộng sự, 2021). Nhiễm PPV gây ra hiệu ứng bệnh tích tế bào (CPE) ở một số dòng tế bào lợn, tuy nhiên,

cơ chế phân tử gây nên CPE vẫn chưa được làm sáng tỏ hoàn toàn. Các nghiên cứu in vitro cho thấy sự sao chép của PPV có thể được thực hiện hiệu quả trên các dòng tế bào khác nhau như tế bào thận PK-15 (Zhang và cộng sự, 2015; Xu và cộng sự, 2022), tế bào tinh hoàn lợn (Swine testicular cells – ST) (Zhao và cộng sự, 2016) và tế bào thể vàng (Steroidogenic luteal cells – SLC) (Zhang và cộng sự, 2019).

Dù kết quả giữa các dòng tế bào có thể khác biệt, nhưng nhìn chung, quá trình nhân lên của PPV gây ra sự giảm điện thế màng ty thể, làm rò rỉ cytochrome C và kích hoạt các protein cảm ứng apoptosis như p53. Chuỗi phản ứng này khởi phát quá trình chết tế bào theo con đường ty thể, gây tổn thương mô và hiệu ứng bệnh lý tương tự các virus thuộc chi Protoparvovirus khác. Mức độ và kiểu hình tổn thương phụ thuộc vào chủng virus cũng như loại tế bào bị nhiễm; thậm chí, các đột biến đơn lẻ trong vùng capsid cũng có thể làm thay đổi đáng kể ái lực gắn kết và khả năng gây bệnh của virus (Zhang và cộng sự, 2015).

1.2. Tổng quan về địa điểm nghiên cứu

Trong những năm gần đây, ngành chăn nuôi lợn tại Việt Nam đã có những bước phát triển đáng kể, đóng vai trò quan trọng trong việc cung cấp nguồn thực phẩm thiết yếu và góp phần thúc đẩy tăng trưởng kinh tế nông nghiệp. Năm 2023, giá trị sản xuất ngành chăn nuôi tăng 5,72%, chiếm khoảng 26% GDP của toàn ngành nông nghiệp; trong đó, chăn nuôi lợn vẫn là lĩnh vực chủ lực, chiếm hơn 62% tổng sản lượng thịt hơi xuất chuồng của cả nước (Cục Chăn nuôi, 2024).

Bảng 1.4. Thống kê tổng đàn lợn theo địa phương

Tỉnh	Tổng đàn (con)
Thanh Hóa	1.147.068
Thái Bình	785.100
Bình Định	850.000
Đắk Lắk	820.000
Đồng Nai	2.035.633
Bình Dương	768.074

(Thống kê của Cục chăn nuôi tháng 4/2020)

Theo thống kê của Cục Chăn nuôi (2020), cả nước có tám tỉnh có tổng đàn lợn trên 750.000 con, bao gồm Hà Nội, Thanh Hóa, Thái Bình, Nghệ An, Bình Định, Đắk Lắk,

Đồng Nai và Bình Dương. Trong số đó, các tỉnh Thái Bình, Thanh Hóa, Bình Định, Đắk Lắk, Đồng Nai và Bình Dương được lựa chọn làm địa điểm nghiên cứu trong luận án này do có quy mô chăn nuôi phát triển mạnh, tổng đàn lớn (Bảng 1.4) và tập trung nhiều cơ sở sản xuất lợn giống quy mô công nghiệp.

Tại tỉnh Thái Bình, năm 2023 có ba cơ sở sản xuất lợn giống với quy mô khoảng 10.000 con mỗi năm, đáp ứng nhu cầu giống cho các huyện trọng điểm chăn nuôi (Chi cục Chăn nuôi và Thú y Thái Bình, 2023). Tỉnh Thanh Hóa có 582 trang trại lợn (trong đó 38 trang trại quy mô lớn) và 88.070 hộ chăn nuôi; riêng Tập đoàn Dabaco sản xuất 77.038 con giống trong 6 tháng đầu năm 2024, trung bình 15,21 con/ổ (Cổng thông tin điện tử Tỉnh ủy Thanh Hóa, 2024). Tỉnh Bình Định hiện có 14 cơ sở chuyên sản xuất con giống, nổi bật là trại lợn giống THACO với quy mô 13.000 nái sinh sản, góp phần hình thành vùng sản xuất giống tập trung của khu vực Nam Trung Bộ (Chi cục Chăn nuôi và Thú y Bình Định, 2023).

Ở khu vực Tây Nguyên, tỉnh Đắk Lắk đang triển khai Dự án Tổ hợp Nông nghiệp Ứng dụng Công nghệ cao DHN Đắk Lắk với quy mô 200 ha, trong đó khu chăn nuôi có khoảng 2.400 lợn giống, hướng tới phát triển giống chất lượng cao và an toàn dịch bệnh (Sở Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn Đắk Lắk, 2024). Tỉnh Đồng Nai được xem là trung tâm chăn nuôi lợn lớn nhất cả nước, với hơn 150 trang trại và 7 tổ hợp tác chăn nuôi đạt chứng nhận VietGAHP, cung cấp khoảng 110.000 tấn thịt lợn đạt tiêu chuẩn mỗi năm. Ngành chăn nuôi tại Đồng Nai đóng góp hơn 61,83% giá trị sản xuất nông nghiệp của tỉnh, đặc biệt nổi bật với chất lượng đàn nái và hệ thống lợn giống ba đời cao (Báo Khuyến nông Việt Nam, 2024). Tỉnh Bình Dương cũng ghi nhận 265 trang trại chăn nuôi lợn hoạt động trong 6 tháng đầu năm 2024, chủ yếu theo hướng công nghiệp và liên kết chuỗi (Tạp chí Chăn nuôi Việt Nam, 2024).

Các tỉnh được lựa chọn nghiên cứu nằm trải dài trên ba vùng địa lý Bắc – Trung – Nam, giúp đảm bảo tính đại diện cho các vùng sinh thái khác nhau. Việc thu mẫu tại các địa phương này không chỉ phản ánh sự lưu hành của Parvovirus ở lợn trên phạm vi rộng mà còn hỗ trợ tuyển chọn được các chủng virus có tiềm năng sinh miễn dịch cao và phù hợp với điều kiện dịch tễ của Việt Nam hiện nay.

1.3. Tổng quan về phương pháp nghiên cứu

1.3.1. Phương pháp phân lập PPV

1.3.1.1. Phương pháp thu mẫu

Cơ chế gây bệnh của PPV liên quan chủ yếu đến khả năng nhân lên mạnh trong các tế bào đang phân chia nhanh, đặc biệt ở bào thai. Do đó, virus tập trung chủ yếu trong các cơ quan như gan, phổi, nhau thai và lách của bào thai, và tồn tại tạm thời trong máu của lợn mẹ (McKillen và cộng sự, 2007; Miao và cộng sự, 2009; Streck, 2013).

Miao và cộng sự (2009) sử dụng kỹ thuật real-time PCR phát hiện PPV trong gan và phổi bào thai đạt lần lượt 87,5% và 81,2%, trong khi các mô khác của bào thai như thận, lách và nhau thai có tỷ lệ phát hiện thấp hơn, chỉ dao động từ 45–60%; 25–30% mẫu huyết thanh của lợn nái mang thai cho kết quả dương tính. Kết quả này cho thấy virus có xu hướng tập trung và nhân lên mạnh tại gan và phổi bào thai – hai cơ quan đóng vai trò chính trong chuyển hóa và trao đổi khí, có tốc độ phân chia tế bào cao.

Các nghiên cứu khác cũng khẳng định xu hướng tương tự. Eliaş và cộng sự (2004) đã phân lập được PPV chủ yếu từ phổi, gan và lách của bào thai; trong khi mẫu từ máu và các cơ quan khác của lợn mẹ thường âm tính hoặc chứa tải lượng virus rất thấp. Opriessnig và cộng sự (2014) cũng ghi nhận virus được phát hiện trong phổi bào thai với tần suất cao hơn gấp 2,3 lần so với lách và thận. Tương tự, Kim và cộng sự (2022) báo cáo tỷ lệ phát hiện PPV trong mô phổi và gan cao hơn khoảng 2–3 lần so với huyết thanh lợn mẹ.

Mặt khác PPV không gây chết đối với lợn nái mang thai nên việc thu thập các cơ quan của lợn nái nhiễm bệnh tương đối khó khăn. Vì vậy, phương pháp thu mẫu hợp lý nhất trong nghiên cứu này là kết hợp lấy huyết thanh lợn nái nghi nhiễm cùng mẫu gan và phổi của bào thai sảy hoặc chết lưu, nhằm tối đa hóa khả năng phát hiện Parvovirus.

1.3.1.2. Phương pháp phát hiện mẫu dương tính PPV

Phản ứng PCR là một trong những phương pháp được sử dụng rộng rãi để phát hiện mẫu dương tính với PPV nhờ vào tốc độ, độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Trong đó, gen NS1 được lựa chọn phổ biến vì tính bảo tồn cao giữa các chủng PPV, giúp phản ứng PCR đảm bảo khả năng phát hiện đa dạng chủng. Tại Hàn Quốc, Lyoo và cộng sự (2001) đã sử dụng PCR khuếch đại một đoạn gen dài 330 bp (vị trí từ 1.453 đến 1.782 bp) của gen NS1, để xác định các mẫu dương tính với PPV. Tương tự, Serena và cộng sự (2019) phát hiện 12,97% (17/131) mẫu dương tính với PPV trong các mẫu mô thai

từ lợn nái tại Argentina thông qua PCR nhằm vào gen NS1. Nghiên cứu tại miền Nam Ấn Độ của Parthiban và cộng sự (2022) cũng ghi nhận 14,3% (8/56) mẫu dương tính với PPV khi áp dụng phương pháp PCR khuếch đại đoạn gen NS1.

Như vậy, việc sử dụng PCR nhằm vào gen NS1 cung cấp một công cụ hiệu quả, phù hợp cho việc phát hiện PPV.

1.3.1.3. Đồng nhiễm PPV với các virus khác

Các nghiên cứu trước đây cho thấy PPV thường đồng nhiễm chủ yếu với các virus PCV2, PRRSV, CSFV và ASF. Tại Hàn Quốc, Lyoo và cộng sự (2001) phát hiện tỷ lệ đồng nhiễm PPV với PCV2 và PRRSV chiếm lần lượt 21,4% và 13,2%. Tại Nam Phi, Afolabi và cộng sự (2019) ghi nhận khoảng 62% mẫu dương tính với PPV đồng nhiễm với PCV2. Sun và cộng sự (2015) xác định tỷ lệ nhiễm PPV1–PPV7 ở Trung Quốc là 55,4%, với tỷ lệ đồng nhiễm PPV–PCV2 lên tới 38,6%. Deka và cộng sự (2021) tại Ấn Độ ghi nhận tỷ lệ huyết thanh dương tính với PPV, PCV2 và CSFV lần lượt là 52,7%, 58,3% và 36,1%, trong đó 28,4% mẫu có đồng nhiễm từ hai loại virus trở lên. Pegu và cộng sự (2023) bằng phương pháp Multiplex PCR đã xác định được tỷ lệ đồng nhiễm PCV2 và PPV là 2,80% (10/353); ASFV, PPV và PCV2 là 1,40% (5/353).

Do đó, việc lựa chọn và sàng lọc mẫu trước khi phân lập là yêu cầu bắt buộc, chỉ nên sử dụng các mẫu dương tính đơn với PPV, không đồng nhiễm với PCV2, PRRSV, CSFV, ASF để đảm bảo độ tinh khiết của nguồn virus trong phân lập PPV trên các dòng tế bào liên tục.

1.3.1.4. Kỹ thuật nuôi cấy PPV

Dòng tế bào liên tục, được sử dụng phổ biến trong nuôi cấy tế bào, là các tế bào có khả năng sinh sản qua nhiều thế hệ liên tiếp. Các dòng tế bào liên tục nuôi cấy trong phòng thí nghiệm không bị lão hóa, phân chia nhanh và yêu cầu dinh dưỡng đơn giản hơn so với tế bào thông thường. Tuy nhiên phương pháp này yêu cầu phòng thí nghiệm có đầy đủ thiết bị phục vụ nghiên cứu tế bào, yêu cầu cán bộ thí nghiệm có kỹ thuật cao. Hiện nay, phương pháp này được sử dụng phổ biến trên thế giới để phân lập virus.

Để phân lập Parvovirus, các dòng tế bào như tế bào tinh hoàn lợn (ST và PT), tế bào ống dẫn trứng lợn (PFT) và tế bào thận lợn (PK-13, PK-15) thường được sử dụng. Mặc dù một số chủng Parvovirus có thể nhân lên trong các tế bào Cos7 (khí xanh châu

Phi), KB (người) hoặc A72 (chó), nhưng tế bào thận lợn vẫn được xem là môi trường phù hợp hơn so với các tế bào lấy từ loài khác (Mészáros và cộng sự, 2017).

Trong số các dòng tế bào được nghiên cứu, PK-15, một dòng tế bào thận lợn, được đánh giá là phù hợp và hiệu quả nhất cho nuôi cấy PPV. So với các dòng tế bào khác, PK-15 có tính nhạy cảm cao với PPV, khả năng duy trì chủng virus qua nhiều thế hệ nuôi cấy tốt, và ít gặp các vấn đề về nhiễm độc tế bào hay suy giảm hiệu giá virus (Mészáros và cộng sự, 2017). Dòng tế bào PK-15 đã được nhiều tác giả sử dụng để nuôi cấy các chủng PPV đạt kết quả tốt. Eliaš và cộng sự (2004) đã sử dụng một số dòng tế bào PK-15 để nuôi cấy 4 chủng PPV phân lập tại Slovakia (Eliaš và cộng sự, 2004). Gao và cộng sự (2022) cũng nuôi cấy PPV trên dòng tế bào PK-15, 37°C and 5% CO₂ để thu được lượng virus cần thiết cho nghiên cứu (Gao và cộng sự, 2022). Mặt khác dòng tế bào PK-15 là dòng tế bào phổ biến, dễ mua. Tại Việt Nam đã có nghiên cứu sử dụng dòng tế bào này cho nuôi cấy Porcine circovirus (Huỳnh Thị Mỹ Lệ và cộng sự, 2015).

Nhờ những ưu điểm trên, trong nghiên cứu này, PPV được nuôi cấy trên dòng tế bào liên tục PK-15, một dòng tế bào biểu mô phân lập từ thận lợn trưởng thành. Môi trường nuôi cấy sử dụng là Eagle's Minimum Essential Medium (E-MEM), bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò (FBS), theo hướng dẫn của ATCC (Mỹ).

1.3.2. Phương pháp xác định type PPV

Với sự phát hiện và lưu hành rộng rãi của các type PPV, từ chủng cổ điển PPV1 đến các chủng mới PPV2 đến PPV7, việc chẩn đoán nhanh chóng, chính xác và định type virus là yêu cầu thiết yếu trong nghiên cứu và kiểm soát dịch bệnh. Phương pháp PCR là công cụ chủ yếu trong việc phát hiện và định type ban đầu các chủng PPV. Các nghiên cứu trên thế giới đã ứng dụng rộng rãi kỹ thuật PCR để khảo sát sự hiện diện của PPV1 đến PPV7 (Kim và cộng sự, 2022; Chung và cộng sự, 2020; Mišek và cộng sự, 2020). Tại Hàn Quốc, Kim và cộng sự (2022) đã phân tích hơn 1000 mẫu (huyết thanh, phổi, phân) bằng multiplex PCR để phát hiện PPV1-PPV7, cho thấy PPV lưu hành rộng rãi, với tỷ lệ phát hiện cao nhất trong mẫu phổi, dao động từ 7.9% (PPV1) đến 32.6% (PPV2). Tại Ba Lan, Mišek và cộng sự (2020) đã sử dụng real-time PCR để kiểm tra 519 mẫu huyết thanh từ tám trại lợn, xác định được sự hiện diện của nhiều type PPV với tỷ lệ phát hiện chung của các type PPV dao động rộng, từ 2.9% (PPV1) đến 26.6% (PPV2).

Chung và cộng sự, 2020 đã sử dụng PCR để phát hiện 7 chủng PPV1 và 2 chủng PPV7 từ 151 mẫu bệnh phẩm tại Hàn Quốc.

1.3.3. Phân tích mối quan hệ di truyền dựa trên gen NS1 và VP2

1.3.3.1. Phân tích mối quan hệ di truyền dựa trên gen NS1

Protein NS1 là protein không cấu trúc chính, có mức độ bảo tồn cao và đóng vai trò đa chức năng, bao gồm hoạt động endonuclease, DNA helicase, ATPase, và khả năng liên kết cộng hóa trị với đầu 5' của bộ gen virus (Ros và cộng sự, 2017). Nhiều nghiên cứu về PPV sử dụng việc phân tích trình tự gen NS1 để nghiên cứu về sự tiến hóa và phát sinh loài của PPV. Hao và cộng sự (2011) đã sử dụng trình tự gen NS1 của 23 chủng Parvovirus để tiến hành phân tích để phân nhóm và xây dựng dữ liệu phân tử về các chủng PPV phân lập tại Trung Quốc. Tại Trung Quốc, Deng và cộng sự (2024) sử dụng cây phả hệ dựa trên trình tự gen NS1 để phân loại và xác định mối quan hệ di truyền của 2 chủng PPV1 mới phân lập (chủng HLJ202108-Y và SDLC202109) (Deng và cộng sự, 2024). Lyu và cộng sự (2023) đã áp dụng trình tự gen NS1 để phân tích mối quan hệ tiến hóa di truyền của chủng PPV7 phân lập tại Phúc Kiến, Trung Quốc (Lyu và cộng sự, 2023).

1.3.3.2. Phân tích mối quan hệ di truyền dựa trên gen VP2

Protein VP2 là thành phần chủ yếu của vỏ capsid, chịu trách nhiệm về tính kháng nguyên và khả năng lây nhiễm của virus. Gen VP2 là mục tiêu quan trọng trong nghiên cứu di truyền vì nó chứa các vùng biến đổi liên quan đến độc lực, khả năng lây lan và tính sinh miễn dịch (Streck và cộng sự, 2015).

Gen VP2 thường được sử dụng trong phân tích phát sinh chủng loài và phân loại di truyền do có mức độ biến đổi cao, phản ánh sự đa dạng kháng nguyên và sự tiến hóa thích ứng của virus. Nhiều nghiên cứu cho thấy trình tự VP2 không chỉ cho phép phân nhóm các chủng PPV cổ điển và hiện đại, mà còn hỗ trợ xác định các genotype mới. Streck và cộng sự (2013) đã xây dựng cây phát sinh dựa trên VP2, qua đó xác định sự tồn tại của nhiều genotype khác nhau của PPV. Xiao và cộng sự (2013a) đã phát hiện các biến thể VP2 mới với khả năng thay đổi đặc tính kháng nguyên, cho thấy gen này đóng vai trò quan trọng trong việc theo dõi sự xuất hiện và lan truyền của các chủng virus mới. Xu và cộng sự (2013) phân tích mối quan hệ phát sinh gen của gen VP2 và

kết luận chủng PPV-NE/09 là một chủng PPV đột biến mới phổ biến ở Trung Quốc khi có 27 nucleotide mã hóa khu vực giàu glycine ở vùng đầu N của VP2 đã bị xóa ở chủng PPV-NE/09 (Xu và cộng sự, 2013). Deng và cộng sự (2024) đã phân tích 2 chủng PPV1 mới phân lập tại miền Bắc Trung Quốc cho thấy có 9 thay thế trong vị trí amino acid của protein VP2. Tác giả so sánh khả năng tăng sinh của các chủng phân lập được bằng cách phân tích các đường cong tăng trưởng nhiều bước. Mặt khác các biến đổi này cũng được chứng minh là có ảnh hưởng đến độc lực của virus (Deng và cộng sự, 2024).

Trong nghiên cứu này, gen NS1 và gen VP2 được lựa chọn để tiến hành phân tích. NS1 là gen có độ bảo tồn cao, việc phân tích trình tự gen này nhằm xác định nguồn gốc của các mẫu phân lập được. Gen VP2 là gen chịu trách nhiệm cho tính kháng nguyên và quá trình lây nhiễm của virus. Các biến đổi trong gen này có khả năng gây ảnh hưởng đến độc lực của virus. Việc khảo sát sự ổn định gen VP2 cũng liên quan đến tính ổn định về độc lực của virus.

1.3.4. Xác định đặc tính sinh học của PPV

1.3.4.1. Xác định biểu đồ sinh trưởng PPV

Việc xây dựng biểu đồ sinh trưởng là một phương pháp thường được sử dụng trong các nghiên cứu phân lập và đặc điểm sinh học của virus, nhằm xác định thời điểm thích hợp để thu nhận hàm lượng virus cao nhất phục vụ cho các mục tiêu nghiên cứu tiếp theo (Lê Thị Toan và cộng sự, 2016; Phạm Văn Sơn và cộng sự, 2017; Nguyễn Thị Lan và cộng sự, 2016; Nguyễn Thị Hoa và cộng sự, 2018). Để nghiên cứu đặc tính của Parvovirus, một nghiên cứu khác tại Trung Quốc cũng đã dùng phản ứng qPCR để định lượng số bản sao virus, từ đó xây dựng biểu đồ sinh trưởng của PPV (Wang và cộng sự, 2024). Biểu đồ sinh trưởng cũng được một nghiên cứu khác sử dụng để đánh giá khả năng sinh trưởng và phát triển của PPV trên 2 dòng tế bào PK-15 72 và ST (Cao và cộng sự, 2020).

Khi xây dựng biểu đồ sinh trưởng các chủng PPV được nhiều tác giả gây nhiễm lên dòng tế bào PK-15 với MOI bằng 0,01 (Cotmore và Tattersall, 2014; Qiu và cộng sự, 2017, Luo và cộng sự, 2015, Phạm Văn Sơn và cộng sự, 2017; Nguyễn Thị Hoa và cộng sự, 2018; Chung và cộng sự, 2020; Cságola và cộng sự, 2012).

Việc sử dụng $MOI = 0,01$ trong nuôi cấy trên dòng tế bào PK-15 đảm bảo lây nhiễm ban đầu thấp cho phép đánh giá rõ ràng hiệu suất nhân lên của virus, phản ánh chính xác khả năng sao chép của virus trong điều kiện nuôi cấy. Nếu MOI quá cao, số lượng virus ban đầu nhiều sẽ gây nhiễm đồng loạt, dẫn đến hủy hoại tế bào sớm, làm gián đoạn chu kỳ nhân lên và ảnh hưởng đến kết quả đánh giá độc lực hoặc hiệu quả nuôi cấy (Hematian và cộng sự, 2016).

1.3.4.2. Xác định hiệu giá $TCID_{50}$

Định lượng hiệu giá virus là một bước nền tảng và thiết yếu trong nghiên cứu virus học và phát triển vắc xin. Hiệu giá $TCID_{50}$ là đơn vị định lượng quan trọng, biểu thị nồng độ các hạt virus có khả năng gây nhiễm, được xác định là liều virus tối thiểu cần thiết để gây ra hiệu ứng bệnh lý tế bào hoặc một tiêu chí nhiễm trùng khác ở 50% số đơn vị nuôi cấy tế bào được gây nhiễm.

Việc xác định $TCID_{50}$ cho phép đánh giá chính xác khả năng xâm nhiễm và nhân lên của virus trong môi trường nuôi cấy tế bào, từ đó tiêu chuẩn hóa các điều kiện thử nghiệm. Phương pháp Reed-Muench (1938) là một kỹ thuật nội suy thống kê kinh điển và được áp dụng phổ biến nhất để tính toán $TCID_{50}$.

Sự tin cậy và tính ứng dụng rộng rãi của phương pháp Reed-Muench đã được khẳng định thông qua việc sử dụng nhất quán trong nhiều nghiên cứu trong nước và quốc tế về định lượng hiệu giá virus (Phạm Văn Sơn và cộng sự, 2017; Nguyễn Thị Hoa và cộng sự, 2018; Foerster và cộng sự, 2016; Józwik và cộng sự, 2009; Van den Born và cộng sự, 2020; Zeew và cộng sự, 2007).

1.3.4.3. Một số yếu tố ảnh hưởng đến nuôi cấy PPV

Nồng độ huyết thanh bào thai bò (Fetal bovine serum - FBS):

Huyết thanh chứa các protein, axit amin, vitamin và các yếu tố tăng trưởng khác giúp tế bào phát triển và nhân lên, tạo môi trường thuận lợi cho virus phát triển. Nhưng trong huyết thanh cũng có chứa kháng thể có thể làm ức chế hoạt động của virus. Vì vậy việc xác định nồng độ huyết thanh thích hợp có vai trò quan trọng trong việc lựa chọn môi trường nuôi cấy thích hợp với PPV. Lyoo sử dụng môi trường E-MEM với 3% FBS để nuôi cấy PPV trên dòng tế bào PK15 (Lyoo và cộng sự, 2001). Streck thực hiện nuôi cấy PPV trên môi trường E-MEM bổ sung 5% FBS (Streck, 2013). Trong khi đó, Kim

thử nghiệm với các nồng độ FBS 0%, 2%, 5%, và 10% trong nuôi cấy Parvovirus, và kết quả cho thấy nồng độ FBS tối ưu là 2% (Kim và cộng sự, 2019).

Nhiệt độ:

Choi đã thực hiện nuôi cấy Parvovirus ở hai nhiệt độ 37°C và 39°C đối với hai chủng KBSH và Kresse. Kết quả cho thấy chủng KBSH có khả năng thích nghi và sao chép hiệu quả ở 39°C sau các lần cấy truyền nối tiếp, dẫn đến sự gia tăng đáng kể về số lượng thể hệ virus, polypeptide virus và nồng độ DNA virus. Trong khi đó, chủng Kresse phát triển tốt và nhân lên liên tục ở nhiệt độ 37°C (Choi và cộng sự, 1990).

Bachmann đã thử nghiệm nuôi cấy Parvovirus tại các nhiệt độ 28°C, 33°C, 37°C và 40°C. Kết quả phản ứng HA sau 24 giờ nuôi cấy cho thấy mức độ kháng nguyên virus ở 40°C là 1/32, ở 28°C là 1/4, và ở 33°C và 37°C đạt 1/256 (Bachmann, 1972).

1.3.5. Xác định độ ổn định, độc lực, tính sinh miễn dịch PPV

1.3.5.1. Xác định độ ổn định của PPV

Một số nghiên cứu trên thế giới đánh giá sự ổn định của virus bằng cách kiểm tra các đặc tính sinh học và gen của virus sau 15 đời nuôi cấy liên tiếp. Zheng và cộng sự (2020) đánh giá sự ổn định về đặc tính di truyền và lý hóa của chủng Parvovirus tái tổ hợp bằng cách kiểm tra các đặc tính sinh học và gen của virus sau 15 đời nuôi cấy liên tiếp trên dòng tế bào đơn (Zheng và cộng sự, 2020). Lipkin cộng sự (2017) nghiên cứu các đột biến gen trong 15 thế hệ nuôi cấy trên dòng tế bào đơn để đánh giá bản đồ gen và các đột biến trên virus gây bệnh Marek trên gà (Lipkin và cộng sự, 2017). Mặt khác, với mục đích sử dụng chủng virus để nghiên cứu sản xuất vắc xin, các chủng virus cần được đánh giá độ ổn định qua nhiều đời. Tại Việt Nam, chưa có tiêu chuẩn kỹ thuật về độ ổn định của chủng virus nuôi cấy trên dòng tế bào liên tục dùng làm chủng giống vắc xin. Tuy nhiên, các công bố về vắc xin virus trên thế giới cũng yêu cầu về độ ổn định của virus trong 15 đời nuôi cấy liên tiếp. Trong đơn đăng ký số CN112501133A của Công ty dược phẩm Qingdao Sinder (Trung Quốc) đăng ký đặc tính cho chủng Pseudorabies virus (virus bệnh giả dại) thuộc độc thuộc lĩnh vực chế tạo vắc xin cũng xác định sự ổn định của chủng Pseudorabies virus QĐ gE-/gI-/11K bằng cách kiểm tra TCID₅₀ và sự ổn định của đoạn gen nhân lên bằng cặp mồi F2 sau 15 đời nuôi cấy virus trên dòng tế bào PK-15.

Dựa trên các cơ sở khoa học nêu trên, nghiên cứu này tiến hành đánh giá sự ổn định của hai chủng Parvovirus VC5 và TX7 thông qua việc theo dõi đặc tính sinh học và di truyền sau 15 đời cấy chuyển liên tiếp trên dòng tế bào PK-15. Kết quả thu được sẽ là cơ sở quan trọng cho việc lựa chọn chủng giống tiềm năng cho nghiên cứu sản xuất vắc xin phòng bệnh parvo gây ra trên lợn.

1.3.5.2. Xác định độc lực và tính sinh miễn dịch của PPV

Đánh giá độc lực và tính sinh miễn dịch là những bước quan trọng trong việc lựa chọn các chủng PPV tiềm năng phục vụ nghiên cứu và sản xuất vắc xin. Các nghiên cứu quốc tế cho thấy hai nhóm đối tượng thường được sử dụng trong đánh giá gồm lợn nái mang thai (vật chủ miễn cảm tự nhiên) và chuột lang (mô hình thí nghiệm quy mô nhỏ). Chuột lang (*Cavia porcellus*) là loài được sử dụng phổ biến trong nghiên cứu vắc xin do có kích thước cơ thể phù hợp, hệ miễn dịch phản ứng nhanh và dễ theo dõi đáp ứng huyết thanh học. Ngoài ra, mô hình này có ưu điểm về chi phí thấp, quy trình nuôi đơn giản và khả năng tái lập thí nghiệm cao. Nghiên cứu của Ma và cộng sự (2011) đã chứng minh rằng chuột lang có thể được sử dụng như mô hình thay thế đáng tin cậy để đánh giá khả năng sinh miễn dịch của PPV, trong đó hiệu giá kháng thể đặc hiệu được xác định bằng phản ứng ngăn trở ngưng kết hồng cầu (HI).

Zeeuw và cộng sự (2007) đã xác định độc lực của các chủng PPV phân lập từ thực địa thông qua thử nghiệm gây nhiễm thực nghiệm trên lợn nái mang thai. Các lợn nái mang thai được gây nhiễm virus ở ngày thứ 40 của thai kỳ. Giai đoạn giữa thai kỳ (khoảng ngày 40) là thời điểm bào thai bắt đầu hình thành cơ quan và hệ thống miễn dịch chưa hoàn thiện, dễ miễn cảm nhất với PPV (Cartwright và Huck, 1967). Vì vậy, việc gây nhiễm được tiến hành vào ngày thứ 40 của thai kỳ, nhằm bảo đảm khả năng virus xâm nhập, nhân lên và biểu hiện đầy đủ độc lực. Mổ khám và thu mẫu được thực hiện vào ngày thứ 90 của thai kỳ, tương ứng với giai đoạn cuối quá trình mang thai, khi các biểu hiện tổn thương, hấp thụ thai hoặc thai chết lưu có thể được quan sát và đánh giá một cách toàn diện. Virus được gây nhiễm qua đường tiêm tĩnh mạch hoặc đường mũi, với liều lượng tương đương 6,0 logTCID₅₀/1mL. Sau gây nhiễm, lợn nái được theo dõi lâm sàng và định kỳ lấy mẫu huyết thanh để xác định hiệu giá HI và khả năng trung hòa virus. Đến ngày thứ 90 của thai kỳ (tức khoảng 50 ngày sau khi gây nhiễm), tất cả lợn nái được giết mổ và mổ khám thai trong điều kiện vô trùng. Các phôi thai được phân

loại theo tình trạng sinh lý (bình thường, hấp thu, khô thai), đồng thời được kiểm tra sự hiện diện của DNA virus bằng PCR.

Foerster và cộng sự (2016) sử dụng mô hình gây nhiễm đồng chủng trên lợn nái đã được tiêm vắc xin vô hoạt để đánh giá hiệu quả bảo hộ và khả năng sinh miễn dịch. Lợn nái được tiêm vắc xin vào ngày 35 trước phối giống, sau đó tiêm nhắc lại sau 21 ngày. Khi thai được 40 ngày tuổi, lợn nái được công cường độc đồng chủng bằng chủng PPV-27a với liều 5mL dung dịch $6,0 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ qua đường nhỏ mũi và tiêm bắp. Mẫu huyết thanh được thu tại các mốc 3 tuần và 7 tuần sau tiêm để xác định hiệu giá HI và trung hòa. Đến ngày thứ 90 của thai kỳ (49 ngày sau công cường độc), lợn nái được giết mổ và đánh giá tình trạng phôi thai.

Bên cạnh đó, Ma và cộng sự (2011) đã sử dụng chuột lang để đánh giá hiệu quả tăng cường miễn dịch của tá dược propolis trong vắc xin PPV bất hoạt. Chuột lang được tiêm vắc xin kết hợp với các loại tá dược khác nhau, sau đó lấy mẫu huyết thanh định kỳ (7, 14 và 28 ngày sau tiêm) để đo hiệu giá HI nhằm xác định mức độ kích hoạt miễn dịch tế bào. Phương pháp này cho phép sàng lọc nhanh hiệu quả miễn dịch của các công thức vắc xin hoặc tá dược trước khi tiến hành thử nghiệm trên lợn, đồng thời giảm chi phí và thời gian nghiên cứu.

Việc xác định độc lực cung cấp thông tin trực tiếp về khả năng gây bệnh và ảnh hưởng đến thai, trong khi đánh giá tính sinh miễn dịch giúp xác định cường độ và thời gian đáp ứng miễn dịch. Kết hợp hai phương pháp này cho phép tuyển chọn chính xác các chủng PPV có độc lực và khả năng kích thích miễn dịch cao, từ đó làm cơ sở khoa học cho việc lựa chọn chủng gốc phục vụ nghiên cứu phát triển vắc xin PPV.

1.4. Tổng quan về tình hình nghiên cứu

1.4.1. Sự lưu hành của PPV và tiềm năng ứng dụng vào nghiên cứu sản xuất vắc xin

1.4.1.1. Sự lưu hành của PPV trên thế giới và Việt Nam

❖ Tình hình lưu hành PPV trên thế giới

Hiện nay có 7 type PPV được phát hiện trên thế giới (Bảng 1.5). Porcine Parvovirus type 1 (PPV1) thuộc chi ProtoParvovirus, được phân lập lần đầu tiên tại Đức vào năm 1965 như một tác nhân gây nhiễm tạp trong quá trình nuôi cấy tế bào. PPV1 được xác

định là một trong những tác nhân chính gây ra các bệnh lý liên quan đến sinh sản ở lợn (Mengeling và cộng sự, 2000). Trong suốt hai thập kỷ qua, một vài type Parvovirus mới (PPV2 – PPV7) đã được xác định trên lợn bằng phương pháp sinh học phân tử. Trong đó, PPV2 và PPV3 thuộc giống TetraParvovirus (Streck, 2013).

Bảng 1.5. Mức độ PPV lưu hành trên thế giới

Phân loại PPV	Châu Âu		Châu Mỹ		Châu Á		Châu Phi	
	Tỷ lệ nhiễm (%)	Tài liệu tham khảo	Tỷ lệ nhiễm (%)	Tài liệu tham khảo	Tỷ lệ nhiễm (%)	Tài liệu tham khảo	Tỷ lệ nhiễm (%)	Tài liệu tham khảo
PPV1	0,5-7,5	Cságola và cộng sự, 2012; Milek và cộng sự, 2019; Milek và cộng sự, 2020	14,7-25,9	Serena và cộng sự, 2019; Opriessnig và cộng sự, 2014; Garcia-Camacho và cộng sự, 2020	4,5-53	Zhang và cộng sự, 2011; Xiao và cộng sự, 2013a và 2013c; Ni và cộng sự, 2014; Kim và cộng sự, 2022; Parthiban và cộng sự, 2022; Saekhow và Ikeda, 2015	29,1	Afolabi và cộng sự, 2019; Bisimwa và cộng sự, 2021
PPV2	6,4-48,7		72-90		6,4-83		21,8	
PPV3	9,7-25,2		19,2-58,8		9,7-73		17,5	
PPV4	8,2-94		5,9-25,9		1,5-44		43,6	
PPV5	22,6-41,3		7-32,4		2,6-14,3			
PPV6	37,1-38		74,7		21,5			
PPV7	18,2				14,2-18			

Bảng 1.5 cho thấy các type PPV có sự phân bố rộng rãi trên toàn cầu, với mức độ lưu hành khác nhau giữa các quốc gia và vùng địa lý.

PPV1 là type được phát hiện sớm nhất và vẫn lưu hành ở hầu hết các quốc gia, tuy nhiên tỷ lệ nhiễm thường ở mức thấp hơn so với các type mới, dao động từ 0,5% đến khoảng 29% (Cságola và cộng sự, 2012; Afolabi và cộng sự, 2019). Tỷ lệ phát hiện PPV1 thấp có thể do việc sử dụng vắc xin thương mại. Tuy nhiên PPV1 vẫn có thể gây bệnh ở các đàn chưa được tiêm phòng hoặc tiêm phòng không đầy đủ.

Các type PPV2 và PPV3 có xu hướng lưu hành phổ biến hơn, được ghi nhận với

tỷ lệ nhiễm cao tại nhiều khu vực, đặc biệt ở châu Âu, châu Mỹ và châu Á, dao động trong khoảng 6,4–72% (Milek và cộng sự, 2019; Opriessnig và cộng sự, 2014; Kim và cộng sự, 2022). Kết quả này gợi ý rằng hai type này có khả năng thích nghi tốt với vật chủ và có thể đóng vai trò trong các trường hợp đồng nhiễm với các virus khác như PCV2 hoặc PRRSV.

PPV4 cũng được phát hiện ở nhiều quốc gia với tỷ lệ biến động đáng kể, từ 1,5% đến 43,6% (Xiao và cộng sự, 2013a; Afolabi và cộng sự, 2019), cho thấy khả năng lan truyền rộng và tiềm năng dịch tễ đáng chú ý.

Các type mới được phát hiện gần đây như PPV5, PPV6 và PPV7 đang ngày càng được ghi nhận với tần suất cao hơn, đặc biệt tại các quốc gia châu Á và châu Mỹ. PPV5 được phát hiện với tỷ lệ 2,6–32,4%, trong khi PPV6 có tỷ lệ nhiễm cao ở lợn con và bào thai sảy (50–75%) (Ni và cộng sự, 2014; Garcia Camacho và cộng sự, 2020). PPV7 được xác định với tỷ lệ khoảng 14–18% ở Hàn Quốc và Thái Lan (Kim và cộng sự, 2022; Saekhow và Ikeda, 2015).

❖ **Tình hình lưu hành PPV tại Việt Nam**

Tại Việt Nam, sự hiện diện của PPV lần đầu tiên được ghi nhận trong nghiên cứu của Hồ Đình Chúc (1993) khi khảo sát hội chứng rối loạn sinh sản ở lợn tại một số tỉnh miền Bắc và miền Nam, Việt Nam. Nghiên cứu này đã xác định được sự có mặt của PPV và kháng thể kháng PPV ở lợn nái và lợn đực giống. Phân tích huyết thanh học chỉ ra rằng khoảng 50–60% lợn nái đã từng nhiễm PPV. Bệnh gây ảnh hưởng đáng kể đến năng suất sinh sản của đàn lợn nái, đặc biệt là ở những lứa đẻ đầu tiên. Các yếu tố sinh thái khác nhau không cho thấy ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ rối loạn sinh sản (Hồ Đình Chúc, 1993).

Tại khu vực miền Trung, Phạm Hùng (1999) sử dụng phương pháp huyết thanh học để xác định tỷ lệ lưu hành PPV và ghi nhận tỷ lệ dương tính đạt khoảng 21,5%.

Một nghiên cứu tại tỉnh Long An cho thấy 69,5% mẫu huyết thanh dương tính với PPV trong tổng số 4.166 mẫu huyết thanh từ các trang trại lợn nái (Nguyễn Huỳnh và cộng sự, 2000).

Nghiên cứu gần đây của Huỳnh Thị Mỹ Lệ và cộng sự (2020) tại Hà Nội và các tỉnh lân cận (Hưng Yên, Hải Dương, Bắc Ninh, Hòa Bình, Vĩnh Phúc) đã phát hiện

88,2% (60/68) mẫu huyết thanh dương tính với kháng thể kháng PPV1, cho thấy virus này vẫn lưu hành mạnh trong đàn lợn nái.

Nguyen và cộng sự (2022) tiến hành khảo sát 174 mẫu dương tính với PCV2 được thu thập trong giai đoạn 2017–2021 nhằm xác định tỷ lệ đồng nhiễm với các type PPV. Kết quả ghi nhận tỷ lệ nhiễm PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 lần lượt là 24,1%; 32,2%; 36,8% và 32,2%, phản ánh tình trạng lưu hành nhiều type PPV trong quần thể lợn tại Việt Nam.

Gần đây nhất, Trần Văn Trung (2024) tiến hành khảo sát 146 mẫu thu thập tại các lò mổ thuộc bảy tỉnh miền Trung (Quảng Bình, Quảng Trị, Thừa Thiên Huế, Đà Nẵng, Quảng Nam, Quảng Ngãi và Bình Định), phát hiện 109 mẫu (74,7%) dương tính với PPV. Trong đó, tỷ lệ nhiễm các type PPV1 đến PPV4 lần lượt là 52,7%; 56,2%; 5,5% và 8,2%.

Nhìn chung, các kết quả nghiên cứu trong nước cho thấy PPV đã và đang lưu hành phổ biến ở nhiều vùng địa lý của Việt Nam với tỷ lệ nhiễm cao. PPV1 vẫn là type được phát hiện thường xuyên, song sự hiện diện đồng thời của các type mới (PPV2, PPV3 và PPV4) phản ánh xu hướng dịch tễ phức tạp tương tự như ở các quốc gia khác.

Bệnh do PPV gây ra là một trong những nguyên nhân quan trọng dẫn đến rối loạn sinh sản ở lợn nái, gây thiệt hại kinh tế đáng kể cho ngành chăn nuôi. Do đó, việc phân lập các chủng PPV đang lưu hành tại Việt Nam và nghiên cứu phát triển vắc xin phù hợp với điều kiện Việt Nam là hướng đi cần thiết nhằm nâng cao hiệu quả phòng bệnh trong thực tiễn sản xuất.

1.4.1.2. Nghiên cứu ứng dụng các chủng phân lập vào phát triển vắc xin PPV

Trong quá trình nghiên cứu về PPV, việc phân lập, nhận diện và tuyển chọn các chủng virus có đặc tính sinh học và kháng nguyên đặc trưng đóng vai trò then chốt trong phát triển vắc xin phòng bệnh khô thai ở lợn. Trên thế giới, nhiều chủng PPV đã được phân lập và đánh giá khả năng ứng dụng trong sản xuất vắc xin, trong đó phổ biến nhất là các chủng cổ điển PPV1.

Theo báo cáo tổng quan của Mesonero Escuredo và cộng sự (2011), hầu hết các vắc xin PPV hiện hành đều được phát triển dựa trên chủng PPV1 cổ điển (NADL-2) — một chủng virus có độc lực trung bình, dễ nuôi cấy trên dòng tế bào PK-15 và có khả

năng gây đáp ứng miễn dịch bảo hộ cao trên lợn nái. Tuy nhiên, các nghiên cứu dịch tễ học gần đây đã cho thấy sự xuất hiện của nhiều biến thể PPV khác biệt về mặt di truyền và kháng nguyên so với NADL-2, làm giảm hiệu quả bảo hộ chéo của vắc xin thương mại. Ví dụ, chủng PPV-27a được phân lập tại Đức thể hiện sự khác biệt đáng kể về vùng VP2, dẫn đến khả năng “lẩn tránh” miễn dịch khi sử dụng vắc xin dựa trên chủng NADL-2.

Tại Trung Quốc, nhiều công trình đã tập trung vào việc phân lập các chủng PPV bản địa và ứng dụng trong chế tạo vắc xin vô hoạt và tái tổ hợp. Các nghiên cứu của Gao và cộng sự (2022), Li và cộng sự (2024), và Zhou và cộng sự (2010) đã chứng minh rằng protein VP2 từ các chủng PPV phân lập nội địa có thể được biểu hiện trong các hệ thống khác nhau (như *Escherichia coli*, tế bào côn trùng và thực vật) để sản xuất vắc xin tiểu đơn vị hoặc vắc xin dạng hạt giống virus (virus-like particles, VLPs) với hiệu quả kích thích miễn dịch cao. Một số chủng phân lập tại Trung Quốc như PPV-SC3, PPV-HB và PPV-NJ đã được sử dụng làm nguyên liệu cho vắc xin vô hoạt, cho thấy khả năng sinh kháng thể trung hòa mạnh mẽ và bảo hộ hoàn toàn lợn nái khi thử nghiệm công cường độc. Tính đến năm 2025, Trung Quốc đã phê duyệt lưu hành 10 loại vắc xin PPV phát triển từ các chủng PPV nội địa, gồm 7 vắc xin vô hoạt (dựa trên các chủng như SC1, CG-05, NJ, BJ-2, YBF01, L, WH-1) và 3 vắc xin vô hoạt vectơ baculovirus (rPP03, HP-SC-VP2, PPV-VP2) (Liu và cộng sự, 2025)

Ngoài ra, việc phát triển vắc xin từ các chủng PPV bản địa còn giúp tăng cường hiệu quả bảo hộ đặc hiệu theo vùng dịch tễ. Các chủng PPV phân lập trong nước thường có khả năng thích nghi tốt với điều kiện sinh học địa phương, đồng thời phản ánh đặc điểm tiến hóa và biến dị kháng nguyên của virus đang lưu hành. Do đó, việc sử dụng chủng phân lập trong nước để phát triển vắc xin là hướng đi có ý nghĩa thực tiễn, giúp khắc phục hạn chế về tính tương thích kháng nguyên của các vắc xin nhập khẩu, đồng thời giảm chi phí sản xuất và chủ động nguồn cung trong nước. Điều này đặt nền tảng quan trọng cho việc nghiên cứu phân lập và tuyển chọn chủng PPV nội địa phục vụ sản xuất vắc xin phòng bệnh khô thai ở lợn tại Việt Nam trong giai đoạn tới.

1.4.2. Tình hình sản xuất vắc xin PPV trên thế giới và ở Việt Nam

1.4.2.1. Tình hình sản xuất vắc xin PPV trên thế giới

Hiện nay, các loại vắc xin phòng bệnh khô thai lợn do PPV chủ yếu được phát triển dựa trên hai hướng công nghệ chính, gồm vắc xin bất hoạt truyền thống và vắc xin tái tổ hợp

+ *Vắc xin Parvovirus bất hoạt truyền thống:*

Các vắc xin bất hoạt được nghiên cứu và sử dụng phổ biến trên thế giới chủ yếu dựa vào chủng PPV1, đặc biệt là chủng NADL-2. Zeeuw và cộng sự (2007) đã đánh giá khả năng trung hòa chéo của chủng NADL-2 so với các chủng PPV phân lập tại Đức thông qua thử nghiệm gây nhiễm thực nghiệm trên lợn nái mang thai. Kết quả cho thấy, ba trong số bốn chủng thử nghiệm có phản ứng ngưng kết chéo cao, trong khi chủng PPV-27a (type 2) thể hiện phản ứng chéo kém, đồng thời có hiệu giá ngưng kết thấp ngay cả với chính chủng này. Các tác giả nhận định PPV-27a có thể sở hữu cơ chế “lẩn tránh” miễn dịch.

Jóźwik và cộng sự (2009) cũng tiến hành nghiên cứu trên lợn nái được tiêm vắc xin chế tạo từ chủng NADL-2 type 1 trước phối giống 35 và 21 ngày. Lợn được công cường độc vào ngày thứ 41 của thai kỳ bằng PPV ($6,0 \log_{TCID_{50}}/1\text{mL}$) qua đường nhỏ mũi. Kết quả cho thấy 66/67 bào thai trong nhóm vắc xin sống sót và không phát hiện DNA của PPV trong mô bào thai, trong khi ở nhóm đối chứng, 39/50 bào thai chết, có hiện tượng khô thai và phát hiện DNA của PPV. Mặc dù vắc xin tạo được kháng thể bảo hộ (hiệu giá $1/32-1/512$ sau 21 ngày tiêm, $1/128-1/256$ sau 28 ngày), nhưng hiệu giá giảm dần theo thời gian, và cả nhóm được tiêm vắc xin lần đối chứng đều thải virus PPV-27a ít nhất 10 ngày sau công cường độc.

Tại Đức, Foerster và cộng sự (2016) sử dụng chủng PPV-27a để sản xuất vắc xin vô hoạt và tiến hành thử nghiệm công độc đồng chủng. Sau khi tiêm hai liều vắc xin tương ứng $5,0 \log_{TCID_{50}}/1\text{mL}$ và công cường độc ở ngày thứ 40 của thai kỳ bằng 5mL dung dịch $6,0 \log_{TCID_{50}}/1\text{mL}$, kết quả cho thấy nhóm vắc xin có tỷ lệ thai bị khô chỉ 4%, trong khi nhóm đối chứng đạt 51%. Hiệu giá kháng thể đo bằng phản ứng HI tăng cao sau tiêm ($1/40-1/640$) và giảm dần sau 54 ngày.

Một nghiên cứu so sánh hiệu quả ba loại vắc xin thương mại gồm ReproCyc ParvoFLEX (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH), ERYSENG PARVO (HIPRA) và Porcilis Ery+Parvo+Lepto (MSD Animal Health) được Noguera và cộng sự (2021)

thực hiện. Sau khi tiêm hai mũi vắc xin và công cường độc vào ngày thứ 40 thai kỳ bằng chủng PPV type 1 (401/09), kết quả cho thấy tỷ lệ thai khỏe mạnh đạt 96,5% (ReproCyc ParvoFLEX), 97,4% (ERYSENG PARVO) và 88,3% (Porcilis Ery+Parvo+Lepto), trong khi nhóm đối chứng có 0% thai khỏe mạnh.

Nhìn chung, các nghiên cứu này khẳng định phương pháp thử nghiệm công cường độc là tiêu chí đánh giá chính xác nhất khả năng bảo hộ của vắc xin. Trong khi đó, các chỉ số huyết thanh học (như hiệu giá kháng thể) có xu hướng giảm dần theo thời gian và không phản ánh hoàn toàn mức độ bảo vệ thực tế.

+ *Vắc xin Parvovirus tái tổ hợp:*

Trong những năm gần đây, nhiều nghiên cứu tập trung vào phát triển vắc xin tái tổ hợp với mục tiêu tạo ra sản phẩm an toàn, hiệu quả và có khả năng đáp ứng miễn dịch bền vững. Protein VP2 của PPV được xác định là kháng nguyên chính quyết định khả năng gây miễn dịch bảo hộ.

Các vắc xin dạng virus-like particles (VLPs) cấu tạo từ protein VP2 đã được chứng minh có khả năng tự lắp ráp, tạo đáp ứng miễn dịch mạnh và dễ sản xuất ở quy mô lớn bằng các hệ thống biểu hiện như *Saccharomyces cerevisiae* hoặc *Escherichia coli* (Tamošiūnas và cộng sự, 2014; Gao và cộng sự, 2022). Ngoài ra, biểu hiện VP2 trong hệ thống thực vật cũng cho thấy tiềm năng tạo ra vắc xin tiểu đơn vị an toàn, chi phí thấp và phù hợp với sản xuất công nghiệp (Ling và cộng sự, 2023; Zhou và cộng sự, 2010).

Một hướng nghiên cứu khác là vắc xin niêm mạc dựa trên vi sinh vật sống tái tổ hợp, điển hình là *Lactobacillus casei* mang gen VP2, giúp kích thích đồng thời miễn dịch niêm mạc và miễn dịch toàn thân (Xu và cộng sự, 2008). Ngoài ra, một số vector virus tái tổ hợp, như pseudorabies virus biểu hiện VP2, được phát triển với mục tiêu tạo vắc xin kép có khả năng bảo hộ đồng thời nhiều bệnh truyền nhiễm ở lợn (Li và cộng sự, 2024).

Hiện nay, nhiều loại vắc xin phòng PPV đã được thương mại hóa và lưu hành rộng rãi trên thế giới như Farrowsure Gold (Zoetis), Porcilis® Parvo (MSD Animal Health), Parvovax (CEVA), và PPV VAC (Hàn Quốc). Tuy nhiên, các sản phẩm này có chi phí cao và mức độ tương thích kháng nguyên với các chủng virus lưu hành tại Việt Nam

chưa được xác định rõ. Bên cạnh đó, sự xuất hiện của các type PPV mới (PPV2–PPV7) cùng với các biến thể di truyền và kháng nguyên của PPV1 có thể làm giảm hiệu quả bảo hộ của các vắc xin hiện có. Do đó, đặt ra yêu cầu cấp thiết cần phải phân lập và tuyển chọn các chủng Parvovirus tại Việt Nam, đáp ứng đủ các đặc tính phù hợp để nghiên cứu và chế tạo vắc xin phòng bệnh khô thai ở lợn sinh sản.

1.4.2.2. Tình hình sản xuất vắc xin PPV tại Việt Nam

Hiện nay, các loại vắc xin phòng bệnh khô thai do Parvovirus trên thị trường Việt Nam đều là vắc xin nhập khẩu (Bảng 1.6). Công tác phòng, chống bệnh vì vậy vẫn phụ thuộc chủ yếu vào nguồn cung vắc xin ngoại nhập. Tuy nhiên, các loại vắc xin này không chỉ có chi phí cao mà còn tiềm ẩn những hạn chế nhất định về tính tương thích với tình hình dịch tễ trong nước. Bên cạnh đó, việc phụ thuộc vào nguồn cung cấp bên ngoài cũng tiềm ẩn nguy cơ gián đoạn về khả năng tiếp cận và tính bền vững, đặc biệt trong bối cảnh biến động thị trường hoặc đứt gãy chuỗi cung ứng toàn cầu. Những hạn chế này cho thấy nhu cầu cấp thiết trong việc nghiên cứu và phát triển các loại vắc xin Parvovirus nội địa, vừa có chi phí hợp lý, vừa phù hợp với đặc điểm virus lưu hành tại Việt Nam, qua đó góp phần nâng cao hiệu quả phòng bệnh và cải thiện năng suất sinh sản của đàn lợn.

Các nghiên cứu hiện tại ở Việt Nam chủ yếu tập trung vào việc xác định tỷ lệ nhiễm qua phản ứng PCR. Trên thế giới cũng chưa có công trình nghiên cứu nào liên quan đến phân lập các chủng Parvovirus tại Việt Nam. Các nghiên cứu về phân lập và sản xuất vắc xin tại Việt Nam vẫn còn bỏ ngỏ. Vì vậy, cần thiết phải có những nghiên cứu về phân lập và tuyển chọn các chủng Parvovirus tại Việt Nam. Điều này sẽ góp phần cung cấp các chủng tiềm năng cho sản xuất vắc xin phòng bệnh parvo. Vắc xin vẫn luôn công cụ hữu hiệu nhất cho công tác phòng bệnh trên người và vật nuôi. Việc sản xuất vắc xin dựa trên các chủng lưu hành tại Việt Nam sẽ giúp nâng cao hiệu quả phòng bệnh. Nghiên cứu sản xuất vắc xin trong nước sẽ giúp chủ động nguồn cung vắc xin cũng như hạ giá thành so với vắc xin ngoại nhập giúp người nông dân dễ dàng tiếp cận với vắc xin phòng bệnh. Từ đó nâng cao hiệu quả phòng chống dịch, góp phần quan trọng vào sự phát triển bền vững của ngành chăn nuôi lợn trong nước.

Bảng 1.6. Một số loại vắc xin Parvovirus nhập khẩu lưu hành tại Việt Nam

Tên vắc xin	Hãng	Nước xuất sản	Đơn vị nhập khẩu và phân phối
ERYSENG® PARVO	HIPRA	Tây Nha Ban	HIPRA Việt Nam
PARVO – FARROWSURE®B	Zoetis	Mỹ	Zoetis Việt Nam
PARVOSIN OL	Bioveta	Cộng hòa Séc	Dược Phẩm Xanh – GreenPharma
PARVOERY SIN	Bioveta	Cộng hòa Séc	Dược Phẩm Xanh – GreenPharma
PORCILIS ERY+ PARVO	MSD	Hà Lan	MSD Việt Nam
SEPAR VAC	Green cross	Hàn Quốc	Tigervet
PPV-VAC	CAVAC (ChoongAng Vaccine)	Hàn Quốc	Công ty cổ phần thương mại Thuốc thú y Hoàng Kim

Từ tổng quan nghiên cứu trên, đề tài đã xác định được đối tượng nghiên cứu, địa điểm và phương pháp thực hiện như sau:

Bệnh khô thai do PPV gây ra trên lợn. Tác nhân gây bệnh có khả năng tồn tại lâu dài trong môi trường, lây truyền nhanh và gây ra các hậu quả nặng nề như chết phôi, sảy thai, thai gổ hoặc vô sinh ở lợn nái. Trong bối cảnh Việt Nam hiện chưa có vắc xin nội địa, việc phân lập và tuyển chọn các chủng PPV có độc lực cao, ổn định di truyền và khả năng sinh miễn dịch mạnh là cơ sở khoa học quan trọng cho nghiên cứu phát triển vắc xin phù hợp với điều kiện dịch tễ trong nước. Do đó, việc lựa chọn đối tượng nghiên cứu là các chủng PPV phân lập từ thực địa là hoàn toàn hợp lý, vừa đáp ứng nhu cầu thực tiễn vừa đảm bảo tính ứng dụng cao.

Các địa điểm nghiên cứu được lựa chọn gồm sáu tỉnh: Thái Bình, Thanh Hóa, Bình Định, Đắk Lắk, Đồng Nai và Bình Dương – đại diện cho ba vùng địa lý Bắc, Trung và Nam. Các địa phương này đều có quy mô chăn nuôi lợn lớn, tập trung nhiều trại giống và trang trại chăn nuôi công nghiệp, chiếm tỷ trọng cao trong tổng đàn lợn cả nước. Sự phân bố mẫu thu theo vùng sinh thái khác nhau giúp đảm bảo tính đại diện, phản ánh được sự lưu hành của PPV trong điều kiện tự nhiên đa dạng, qua đó nâng cao khả năng

tuyển chọn được các chủng virus có đặc tính sinh học và di truyền phù hợp cho nghiên cứu sản xuất vắc xin.

Phương pháp nghiên cứu được xây dựng trên cơ sở kế thừa các công trình trong và ngoài nước, đảm bảo tính hệ thống và khả năng ứng dụng thực tiễn. Cụ thể, nguồn gây bệnh được thu thập từ các mẫu gan, phổi của bào thai chết lưu hoặc huyết thanh lợn nái. Sau khi xác định mẫu dương tính bằng PCR, mẫu được loại bỏ khả năng đồng nhiễm với các virus CSFV, PRRSV, PCV2, ASF. Mẫu dương tính đơn với PPV được nuôi cấy trên dòng tế bào liên tục PK-15 – dòng tế bào cảm thụ cao và được khuyến nghị sử dụng trong phân lập PPV. Các mẫu phân lập tiếp tục được đánh giá đặc tính sinh học. Để đánh giá tiềm năng ứng dụng vào sản xuất vắc xin, các chủng tiếp tục đánh giá độ ổn định di truyền qua 15 đời cấy chuyển liên tiếp, độc lực và tính sinh miễn dịch. Độc lực và tính sinh miễn dịch của virus được xác định thông qua thí nghiệm gây nhiễm trên lợn nái mang thai và chuột lang. Các chỉ tiêu đánh giá gồm hiệu giá TCID₅₀, hiệu giá kháng thể HI và ELISA, khả năng bảo hộ phôi thai sau công cường độc, kết hợp với kiểm tra sự hiện diện DNA virus bằng PCR.

Như vậy, việc lựa chọn đối tượng nghiên cứu là Parvovirus phân lập tại Việt Nam, địa điểm lấy mẫu đại diện cho ba vùng sinh thái chính và phương pháp kết hợp giữa kỹ thuật nuôi cấy tế bào, sinh học phân tử và thử nghiệm thực địa trên vật chủ mẫn cảm là hoàn toàn có cơ sở khoa học. Cách tiếp cận này không chỉ đảm bảo độ tin cậy của kết quả mà còn giúp xác định được các chủng PPV có tiềm năng cao nhất cho sản xuất vắc xin phòng bệnh khô thai ở lợn, góp phần vào mục tiêu chủ động nguồn vắc xin trong nước và phát triển chăn nuôi bền vững.

CHƯƠNG II

CƠ SỞ LÝ THUYẾT VÀ CÁC PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

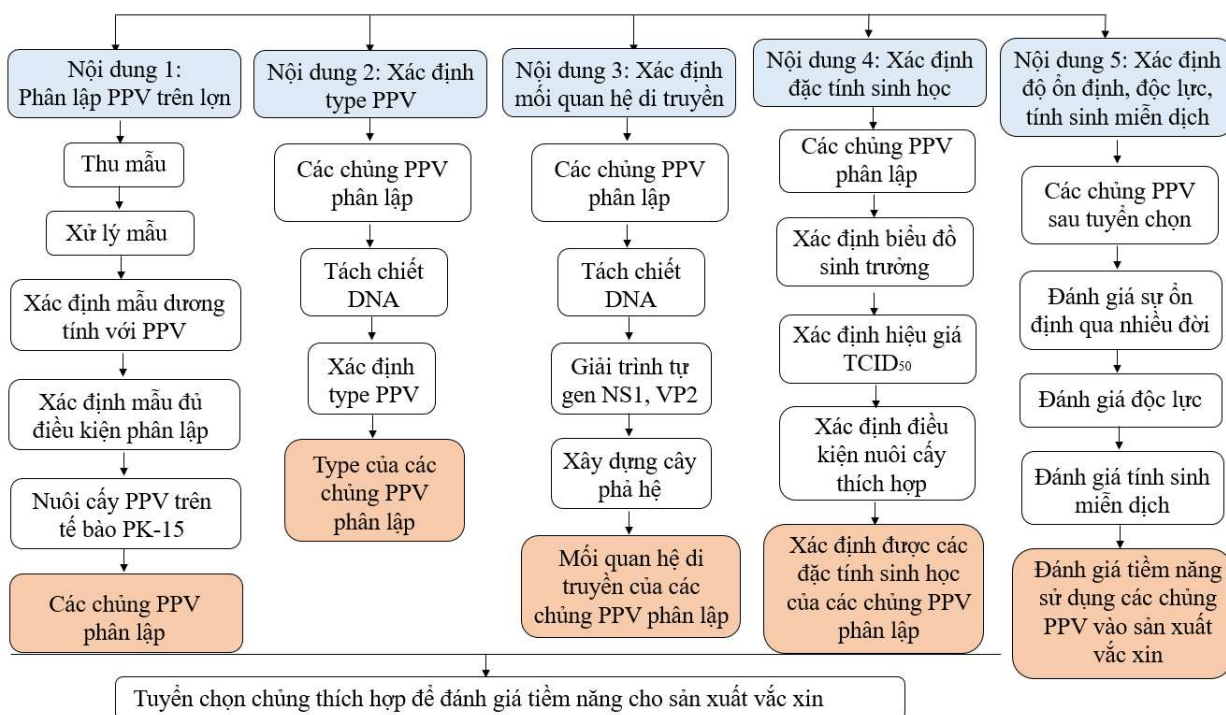
2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là Parvovirus phân lập từ 6 tỉnh Thái Bình, Thanh Hóa, Bình Định, Đắk Lắk, Đồng Nai, Bình Dương – Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Cách tiếp cận các nội dung nghiên cứu

Luận án được triển khai thực hiện theo sơ đồ nghiên cứu tổng quát thể hiện trên hình 2.1.



Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu tổng quát

Các nội dung chính của luận án được triển khai cụ thể như sau:

Nội dung 1: Để tiến hành phân lập PPV, các mẫu bệnh phẩm được thu thập từ các tỉnh Thái Bình, Thanh Hóa, Bình Định, Đắk Lắk, Đồng Nai, Bình Dương. Sau khi thu, các mẫu được tiếp tục xử lý để dùng làm nguyên liệu cho quá trình nuôi cấy virus hoặc tách chiết DNA. DNA của tất cả các mẫu được tiến hành phản ứng PCR để xác định

mẫu dương tính với PPV (Lyoo và cộng sự, 2001). Đồng thời, các mẫu dương tính với PPV được kiểm tra đồng nhiễm với các virus khác: Virus dịch tả lợn cổ điển (CSFV), Virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản trên lợn (PRRSV), Virus circo type 2 (PCV2), Virus dịch tả lợn Châu Phi (ASF). Những mẫu dương tính với PPV nhưng âm tính với các virus trên được sử dụng để tiến hành nuôi cấy PPV. Kết quả nuôi cấy PPV được đánh giá thông qua sự xuất hiện của bệnh tích tế bào và sự tăng sinh của virus trong môi trường nuôi cấy bằng phản ứng Realtime-PCR. Các chủng virus có khả năng phát triển trên tế bào PK-15 được thu nhận, bảo quản và xem như các chủng PPV phân lập thành công.

Nội dung 2: DNA của các chủng PPV phân lập được tách chiết và sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR nhằm xác định type của các chủng PPV theo mô tả của Kim và cộng sự (2022). Kết quả xác định được type của các chủng PPV phân lập.

Nội dung 3: Các chủng PPV phân lập được xác định mối quan hệ di truyền dựa trên trình tự gen NS1 và VP2. Gen NS1 và VP2 được khuếch đại bằng phản ứng PCR. Trình tự gen sau đó được phân tích và xây dựng cây phả hệ. Dữ liệu cây phả hệ giúp xác định mối quan hệ di truyền và mức độ tương đồng giữa các chủng PPV phân lập với các chủng tham chiếu trên thế giới.

Nội dung 4: Các chủng này PPV phân lập được đánh giá về các đặc tính sinh học bao gồm: biểu đồ sinh trưởng, hiệu giá TCID₅₀, điều kiện nuôi cấy thích hợp. Kết quả thu được cung cấp cơ sở dữ liệu quan trọng về khả năng nhân lên và đặc điểm sinh trưởng của từng chủng PPV.

Nội dung 5: Trên cơ sở kết quả của bốn nội dung nghiên cứu trước, các chủng PPV có hiệu giá TCID₅₀ cao, sinh trưởng ổn định và có mối quan hệ di truyền gần với các chủng đang được sử dụng trong nghiên cứu sản xuất vắc xin được lựa chọn để đánh giá tiềm năng ứng dụng trong sản xuất vắc xin PPV. Các chủng được đánh giá về độ ổn định di truyền và đặc tính sinh học qua nhiều đời, xác định độc lực và khả năng sinh miễn dịch. Những chủng đáp ứng đầy đủ các tiêu chí về tính ổn định, độc lực cao và khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch mạnh được xác định là các chủng PPV tiềm năng cho nghiên cứu phát triển vắc xin phòng bệnh do Parvovirus gây ra ở lợn.

Các kết quả này không chỉ tạo nền tảng khoa học cho việc hiểu rõ đặc điểm sinh học và di truyền của các chủng PPV lưu hành tại Việt Nam, mà còn là cơ sở dữ liệu quan trọng phục vụ cho việc tuyển chọn các chủng PPV tiềm năng cho nghiên cứu phát triển vắc xin PPV an toàn và hiệu quả.

2.2.2. Phân lập Parvovirus gây bệnh khô thai trên lợn

2.2.2.1. Thu mẫu và xử lý mẫu

Các mẫu bệnh phẩm được thu thập từ 6 tỉnh: Thanh Hóa, Thái Bình, Đắk Lắk, Bình Định, Đồng Nai, Bình Dương. Để đảm bảo thu được mẫu dương tính, số lượng mẫu tối thiểu cần lấy được xác định theo công thức tính số động vật cần lấy mẫu để phát hiện tác nhân gây bệnh trong điều kiện nhiễm tự nhiên, được hướng dẫn tại Thông tư số 07/2016/TT-BNNPTNT về “Quy định phòng, chống dịch bệnh động vật trên cạn”, cụ thể như sau:

$$n = \left[1 - (1 - p_1)^{\frac{1}{d}} \right] \times \left[N - \frac{d-1}{2} \right]$$

n: Số mẫu cần lấy
 p_1 : Xác suất để phát hiện được bệnh (0,95)
 N: Tổng đàn vật nuôi
 d: Số động vật mắc bệnh ($d=N \times p_2$), p_2 : Tỷ lệ nhiễm bệnh dự đoán (%)

Theo các nghiên cứu trước đây, tỷ lệ nhiễm Parvovirus lợn (PPV) tại Việt Nam được ghi nhận thấp nhất xấp xỉ 10%. Áp dụng công thức trên, số mẫu tối thiểu cần thu được tính như sau:

Tổng đàn	Số lượng mẫu cần lấy
10	10
100	25
1000	29
5000	29
10000	29
∞	29

Mẫu được thu tại các huyện có tổng đàn lợn trên 1.000 con, bao gồm:

- Tỉnh Bình Định: huyện Phù Mỹ, Phù Cát;
- Tỉnh Thái Bình: huyện Đông Hưng, Kiến Xương;
- Tỉnh Thanh Hóa: huyện Triệu Sơn, Thọ Xuân;

- Tỉnh Đắk Lắk: huyện Ea Kar, M'Đrăk;
- Tỉnh Đồng Nai: huyện Vĩnh Cửu, Long Thành;
- Tỉnh Bình Dương: huyện Dĩ An, Bến Cát.

Mỗi huyện thu tối thiểu 29 mẫu từ các trang trại hoặc hộ chăn nuôi có biểu hiện giảm tỷ lệ sinh sản hoặc có tiền sử nhiễm Parvovirus dựa trên thông tin thống kê từ các Chi cục Thú y địa phương.

Quy trình lấy mẫu tuân theo “Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia QCVN 01-83:2011/BNNPTNT: bệnh động vật – yêu cầu chung lấy mẫu bệnh phẩm, bảo quản và vận chuyển”.

Đối với lợn nái: Mẫu máu được lấy từ vịnh tĩnh mạch cổ lợn bằng bơm tiêm vô trùng, thể tích từ 2 - 3mL. Máu được để đông tự nhiên trong 30 phút – 1 giờ, tách bỏ phần máu đông, thu lại phần huyết thanh

Đối với bào thai: Bào thai sấy được thu trong túi sạch và bảo quản -20°C.

Các mẫu được vận chuyển trong thùng lạnh có đá khô về Phân viện Thú y miền Trung trong vòng 24 giờ sau khi thu thập. Tại Phân viện Thú y miền Trung, các mẫu được tiếp tục xử lý như sau:

Đối với mẫu huyết thanh: Huyết thanh được ly tâm 3000 vòng/phút trong vòng 10 phút để loại bỏ toàn bộ hồng cầu còn lẫn trong mẫu, phần dịch nổi được thu lại và bảo quản ở - 20°C (Tuck và cộng sự, 2009).

Đối với mẫu bào thai: Tiến hành mổ bào thai trong môi trường vô trùng; thu mẫu gan, phổi. Các mô này được nghiền trong chày cối vô trùng và pha thành huyền dịch 10% trong dung dịch PBS. Mẫu huyền dịch được ly tâm 2.500 vòng/phút, 10 phút ở 4°C. Sau đó, thu dịch nổi và bảo quản ở - 20°C (Nguyễn và cộng sự, 2022).

2.2.2.2. Xác định mẫu dương tính với Parvovirus

Các mẫu bệnh phẩm được xác định dương tính với PPV thông qua phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen có kích thước 330 bp thuộc vùng gen NS1. Đoạn gen này nằm trong khoảng từ vị trí 1.453 đến 1.782 bp trên gen NS1 của PPV, là vùng có độ bảo tồn cao giữa các chủng PPV và được sử dụng để xác định mẫu dương tính với PPV (Lyoo và cộng sự, 2001).

DNA virus được tách chiết từ các mẫu bệnh phẩm thông qua bộ kit MagMAX Viral Pathogen Kit (Thermo Fisher Scientific), các bước thực hiện được mô tả trong Phụ lục 1.

DNA sau đó được sử dụng cho phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen 330bp với cặp mồi như sau (Lyoo và cộng sự, 2001):

PPVF: 5'-ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGC-3'

PPVR: 5'-TATGTTCTGTTTCCTCGCATC-3'

Mẫu phản ứng PCR (25 µL) được chuẩn bị bao gồm: 9 µL nước (không có nuclease) (Thermo Fisher Scientific); 12,5 µL dung dịch 2X Taq PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific); 0,5 µL mỗi mồi đã được pha thành dung dịch làm việc với nồng độ 10µM và 2,5 µL DNA mẫu (nồng độ từ 10-30ng/µL). Chương trình PCR được thiết lập như sau: Giai đoạn khởi đầu với 1 bước ở 94°C trong thời gian 2 phút; sau đó là 30 chu kỳ bao gồm giai đoạn biến tính ở 94°C trong 45 giây, giai đoạn gắn mồi ở 55°C trong 60 giây, và giai đoạn kéo dài mạch ở 72°C trong 90 giây; kết thúc bằng 1 chu kỳ ở 72°C trong 10 phút (Lyoo và cộng sự, 2001).

Sản phẩm khuếch đại được điện di trên gel agarose 1% có bổ sung Ethidium bromide sao cho nồng độ cuối cùng đạt 0,5 µg/mL và được quan sát dưới tia UV bằng hệ thống Gel Doc XR (Bio-Rad, Mỹ). Mẫu được xác định là dương tính với PPV khi xuất hiện băng DNA đặc trưng có kích thước 330 bp so với thang chuẩn DNA.

2.2.2.3. Xác định mẫu đủ điều kiện nuôi cấy

Để tránh đồng nhiễm mẫu huyền dịch hoặc huyết thanh được chuẩn bị ở trên được xác định sự có mặt của các loại virus: Virus dịch tả lợn cổ điển (CSFV), Virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản trên lợn (PRRSV), Virus circo type 2 (PCV2), Virus dịch tả lợn Châu Phi (ASF).

Các xét nghiệm được thực hiện theo tiêu chuẩn Việt Nam:

- Xét nghiệm PRRS theo TCVN 8400-21:2014: Phát hiện PRRS bằng phản ứng realtime RT-PCR với mồi xuôi: 5'-CCCAAGCTGATGACACCTTTG-3'; mồi ngược: 5'-AATCCAGAGGCTCATCCTGGT-3', mẫu dò: HEX-CGCGTAGAACTG

TGACAACAACGCTGA-BHQ1. Chu trình: 50 °C, 30 min; 95 °C, 15 min; 40 chu kỳ (95 °C, 10 s và 60 °C, 50 s).

- Xét nghiệm PCV theo TCVN 8400-36:2015: Phát hiện PCV bằng phản ứng realtime RT-PCR với mỗi xuôi: 5'-TGGCCCGCAGTATTCTGATT-3'; mỗi ngược: 5'-CAGCTGGGACAGCAGTTGAG-3'; mẫu dò: FAM-CCAGCAATCAGACCCC GTTGAATG-BBHQ. Chu trình: 50 °C, 2 min; 95 °C, 2 min; 40 chu kỳ (95 °C, 10 s và 60 °C, 40 s).

- Xét nghiệm CSF theo TCVN 8400-47:2019: Phát hiện CSF bằng phản ứng realtime RT-PCR với mỗi xuôi: 5'-ATGCCCAAGTAGGACTAGCA-3'; mỗi ngược: 5'-CTACTGACGACTGTCCTGTAC-3'; mẫu dò: FAM-TGGCGAGCTC CCTGGGTGGTCTAAGT-TAMRA. Chu trình: 50 °C, 15 min; 95 °C, 2 min; 40 chu kỳ (95 °C, 45 s và 60 °C, 45 s).

- Xét nghiệm ASF theo TCVN 8400-41:2019: Phát hiện ASF bằng phản ứng realtime PCR với mỗi xuôi: 5'-CTGCTCATGGTATCAATCTTATCGA-3'; mỗi ngược: 5'-GATACCACAAGATCRGCCGT-3'; mẫu dò: FAM-CCACGGGAGG AATACCAACCCAGTG-TAMRA. Chu trình: 50 °C, 2 min; 95 °C, 2 min; 45 chu kỳ (95 °C, 15 s và 60 °C, 45 s).

Các xét nghiệm được thực hiện tại Phòng Chẩn đoán – Phân viện Thú y miền Trung (Phòng thử nghiệm ngành Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn đạt tiêu chuẩn ISO 17025).

Mẫu dương tính đơn với PPV và âm tính với tất cả các loại virus trên là mẫu đủ điều kiện để tiến hành nuôi cấy trên dòng tế bào PK-15.

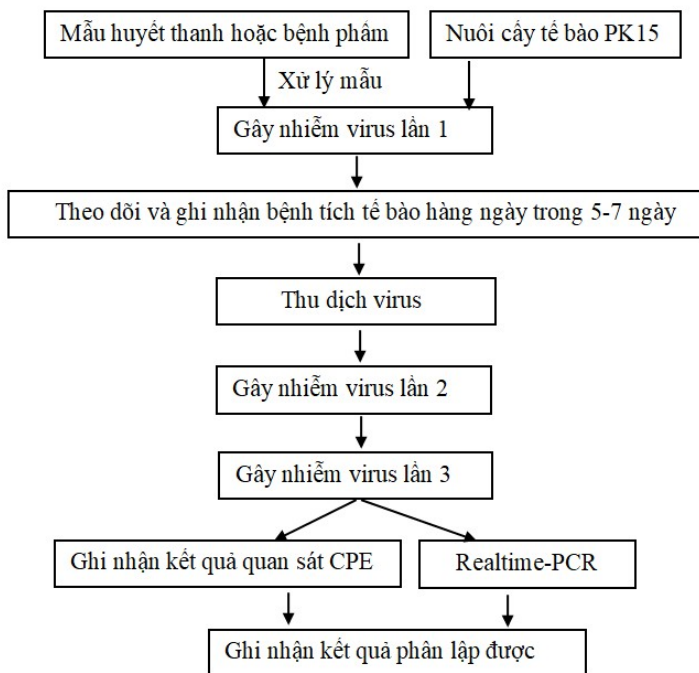
2.2.2.4. Nuôi cấy PPV trên tế bào PK-15

Việc nuôi cấy PPV được tiến hành trên tế bào PK-15 theo mô tả của Kim và cộng sự (2022), sơ đồ tóm tắt được trình bày ở hình 2.2

Parvovirus được nuôi cấy trên tế bào PK-15, sử dụng môi trường E-MEM có bổ sung 5% FBS và 1% Penicillin - Streptomycin ở 37°C, 5% CO₂ (Quy trình nuôi cấy chi tiết được trình bày tại Phụ lục 2). Sự phát triển của tế bào được quan sát hằng ngày dưới kính hiển vi soi ngược (Leica Dmi1) với độ phóng đại 10X. Sự nhân lên của PPV trong

tế bào PK-15 được xác định thông qua quan sát các biến đổi hình thái đặc trưng của bệnh tích tế bào và bằng phản ứng Realtime PCR.

Các đặc điểm bệnh tích tế bào điển hình bao gồm: sự tạo hạt và biến dạng tế bào, hình thành thể vùi trong nhân, sự cô đặc nhiễm sắc thể và phá vỡ màng tế bào, dẫn đến hình thành các khoảng trống rõ rệt trên bề mặt lớp tế bào (Zhang và cộng sự, 2015).



Hình 2.2. Sơ đồ nuôi cấy PPV trên tế bào PK-15

Sau 7 ngày nuôi cấy, 1 mL dịch nuôi cấy được thu để tách chiết DNA virus. Mẫu DNA được sử dụng cho phản ứng Realtime PCR theo mô tả của Miao và cộng sự (2009), với cặp mồi đặc hiệu cho gen NS1:

NS1-F: 5'-AGCCAAAAATGCAAACCCCAATA-3',

NS1-R: 5'-CTCCACGGCTCCAAGGCTAAAG-3'

Thành phần phản ứng bao gồm: 10 μ L SYBR Green Mastermix, 8 μ L nước không chứa nuclease, 0,5 μ L mỗi mồi đã được pha thành dung dịch làm việc với nồng độ 10 μ M và 1 μ L DNA mẫu (nồng độ từ 10-30ng/ μ L). Quy trình realtime-PCR bao gồm giai đoạn biến tính ở 95°C trong 10 giây; tiếp theo là 35 chu kỳ (95°C trong 5 giây, 55°C trong 20 giây), kết thúc bằng bước tăng nhiệt từ 70°C đến 95°C để ghi nhận tín hiệu huỳnh quang đặc trưng (Miao và cộng sự, 2009).

Số lượng bản sao virus được xác định dựa trên đường chuẩn xác định mối tương quan giữa giá trị Ct và số lượng bản sao DNA virus. Quy trình xây dựng đường chuẩn được trình bày chi tiết tại Phụ lục 3.

Kết quả phân lập PPV được đánh giá tổng hợp dựa trên biểu hiện bệnh tích tế bào đặc trưng và số lượng bản sao virus thu được qua phân tích Realtime PCR.

2.2.3. Xác định các type của Parvovirus

Các chủng PPV đã phân lập thành công được tiến hành định type bằng phản ứng PCR sử dụng các cặp mồi đặc hiệu riêng cho từng type, theo mô tả của Kim và cộng sự (2022). Trình tự mồi và kích thước sản phẩm khuếch đại được trình bày chi tiết trong Bảng 2.1.

Bảng 2.1. Trình tự các cặp mồi định type Parvovirus

Type PPV	Tên mồi	Trình tự (5'-3')	Kích thước sản phẩm (bp)	Gen đích	Chứng tham chiếu	Vị trí mồi trên gen đích
PPV1	PPV1-mF	AGTTAGAATAGGATGCGAGGAA	163	NS1	NC_001718	1761–1782
	PPV1-mR	TGCTTGGTAACCTTTCTTTACC				1923–1902
PPV2	PPV2-mF	GCGTGCTCAAGCTGTACC	286	NS1	NC_025965	195–212
	PPV2-mR	CTCACTGCGAGATGAAGG				480–463
PPV3	PPV3-mF	GCTGATAGGTTGATGAATAAGGAG	498	VP	KY586143	2990–3013
	PPV3-mR	CCGCATACCCATAACAGG				3487–3470
PPV4	PPV4-mF	CTGAGACTGAATTCATCCCTG	592	ORF3	GU938965	2347–2367
	PPV4-mR	ATCAGAATCATGTATGGTCTGC				2938–2917
PPV5	PPV5-mF	AACCGAGTTAAGAACTTTACCG	945	VP	JX896322	2773–2793
	PPV5-mR	ACCCAAGTCAGGAGTTTCG				3941–3924
PPV6	PPV6-mF	GTGATAATGATGTGACTACGGAG	396	NS1	MG345036	958–980
	PPV6-mR	CAGCAGTATGTGCAATAGCA				1353–1334
PPV7	PPV7-mF	AGGAAATGGAACATCCAGG	802	NS1	NC_040562	505–523
	PPV7-mR	TTATCTTTCGTGGCGTCC				1306–1289

(Kim và cộng sự, 2022)

Dung dịch phản ứng PCR (25 µL) được chuẩn bị riêng cho từng type bao gồm: 9µL nước (không có nuclease) (Thermo Fisher Scientific); 12,5 µL dung dịch 2X Taq PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific); 0,5 µL mồi xuôi và 0,5 µL mồi ngược (đã

được pha thành dung dịch làm việc với nồng độ 10 μ M) và 2,5 μ L DNA mẫu (nồng độ từ 10-30ng/ μ L). Chương trình PCR được thiết lập với các bước sau: 1 bước ở 94°C trong 1 phút để khởi động; sau đó là 35 vòng lặp bao gồm: 94°C trong 30 giây, 60°C trong 30 giây, và 72°C trong 60 giây; cuối cùng là 1 bước ở 72°C trong 10 phút để kết thúc phản ứng. Sản phẩm khuếch đại được điện di trên gel agarose 1% có bổ sung Ethidium bromide sao cho nồng độ cuối cùng đạt 0,5 μ g/mL và được quan sát dưới tia UV bằng hệ thống Gel Doc XR (Bio-Rad, Mỹ).

2.2.4. Xác định mối quan hệ di truyền của các chủng Parvovirus

Trong nghiên cứu này, hai gen NS1 và VP2 được lựa chọn làm cơ sở để phân tích mối quan hệ di truyền giữa các chủng Parvovirus lợn (PPV) phân lập được. Gen NS1 là vùng có mức độ bảo tồn cao, thường được sử dụng để xác định nguồn gốc và phân nhóm di truyền của virus. Trong khi đó, gen VP2 mã hóa cho protein vỏ capsid chính, đóng vai trò quan trọng trong tính kháng nguyên và khả năng xâm nhiễm tế bào vật chủ; các biến đổi trong vùng gen này có thể ảnh hưởng đáng kể đến độc lực và tính sinh miễn dịch của virus.

*** Phân tích gen NS1**

Đoạn gen NS1 có chiều dài 330 bp được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu theo mô tả của Lyoo và cộng sự (2001):

PPVF: 5'-ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGC-3'

PPVR: 5'-TATGTTCTGTTTCCTCGCATC-3'

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di gel agarose 1% và gửi giải trình tự tại Công ty First Base (Singapore). Trình tự nucleotide thu được được phân tích bằng công cụ Nucleotide BLAST trên cơ sở dữ liệu Ngân hàng gen (GenBank) NCBI. Hai trình tự của các mẫu PPV trong nghiên cứu này được so sánh với 12 trình tự gen các chủng PPV truy xuất từ GenBank, trong đó chủng Kresse-U44978 là chủng vắc xin tham chiếu. Các trình tự được căn chỉnh bằng ClustalW trong MEGA6, sau đó được kiểm tra và chỉnh sửa thủ công để loại bỏ vị trí căn chỉnh không tin cậy. Cây phả hệ được xây dựng theo phương pháp kết nối liền kề (Neighbour-Joining) (Saitou & Nei, 1987), sử dụng mô hình tiến hóa Kimura 2-parameter (K2P). Khoảng trống (gaps) được xử lý bằng phương

pháp pairwise deletion. Độ tin cậy của mối quan hệ phân nhánh được đánh giá bằng phân tích bootstrap với 1000 lần lặp (Felsenstein, 1985).

*** Phân tích gen VP2**

Đoạn gen VP2 có chiều dài khoảng 1,7 kb được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi theo mô tả của Xu và cộng sự (2013):

VP2F: 5'-CGAGGATCCATGAGTGAAAAT-3' (có gắn vị trí enzyme cắt hạn chế *BamHI*)

VP2R: 5'-GCTGTCGACCTAGTATAATTTTCTT-3' (có gắn vị trí enzyme cắt hạn chế *Sall*)

Sản phẩm PCR được tinh sạch và gắn vào vector tạo dòng pGEM-T tại vị trí enzyme cắt hạn chế *BamHI*, *Sall*. Vector chứa đoạn gene VP2 sau đó được giải trình tự bằng mồi T7, SP6 của vector tại Công ty First Base (Singapore). Các trình tự gen VP2 thu được được phân tích bằng Nucleotide BLAST trên cơ sở dữ liệu Ngân hàng gen (GenBank) NCBI. Sáu trình tự VP2 của các mẫu PPV trong nghiên cứu này được so sánh với 23 trình tự VP2 từ các chủng PPV đại diện cho bảy nhóm PPV (PPV1–PPV7) trên GenBank, trong đó chủng Kresse-U44978 là chủng vắc xin tham chiếu. Các trình tự được căn chỉnh bằng ClustalW trong MEGA6, sau đó được kiểm tra và chỉnh sửa thủ công để loại bỏ vị trí căn chỉnh không tin cậy. Cây phả hệ được xây dựng theo phương pháp kết nối liền kề (Neighbour-Joining) (Saitou & Nei, 1987), sử dụng mô hình tiến hóa Kimura 2-parameter (K2P). Khoảng trống (gaps) được xử lý bằng phương pháp pairwise deletion. Độ tin cậy của mối quan hệ phân nhánh được đánh giá bằng phân tích bootstrap với 1000 lần lặp (Felsenstein, 1985).

2.2.5. Xác định đặc tính sinh học của PPV

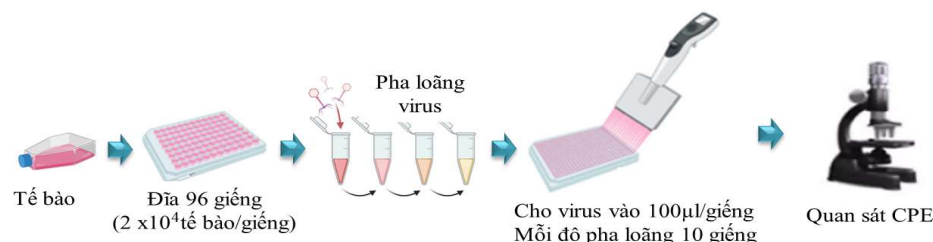
*** Xác định biểu đồ sinh trưởng**

Chủng virus được gây nhiễm lên tế bào PK-15 với $MOI = 0,01$. Quá trình nuôi cấy được tiến hành trong môi trường E-MEM bổ sung 5% FBS và 1% Penicillin – Streptomycin tại nhiệt độ 37°C, 5% CO₂.

Sau khi gây nhiễm, 200 µL dịch nuôi được thu thập định kỳ sau mỗi 24 giờ trong suốt 7 ngày. Ở mỗi thời điểm, mẫu được ly tâm loại bỏ mảnh tế bào và bảo quản ở – 80°C cho đến khi phân tích. Số lượng bản sao virus tại từng thời điểm được xác định

bằng phản ứng Real-time PCR theo mô tả của Miao và cộng sự (2009). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

*** Xác định hiệu giá TCID₅₀**



Hình 2.3. Quy trình xác định TCID₅₀

Quy trình xác định TCID₅₀ được thực hiện như sơ đồ hình 2.3, thí nghiệm được lặp lại 3 lần, các bước thực hiện chi tiết được mô tả như sau:

Bước 1. Chuẩn bị tế bào: Tế bào PK-15 được nuôi trong bình T25 cho đến khi đạt mật độ 80–90% diện tích bề mặt bình nuôi cấy.

Bước 2: Cấy tế bào: Chuyển tế bào sang đĩa 96 giếng với mật độ $2,0 \times 10^4$ tế bào/giếng, nuôi cấy tại 37°C, 5% CO₂ trong 24 giờ.

Bước 3: Pha loãng virus: Mẫu virus được pha loãng thập phân (theo cơ số 10) trong môi trường E-MEM.

Bước 4: Gây nhiễm: Mỗi nồng độ virus pha loãng được nhỏ 100 µL/giếng lên tế bào và ủ trong 1 giờ ở 37°C để virus bám dính. Mỗi độ pha loãng được bố trí 10 giếng lặp lại.

Bước 5: Bổ sung môi trường: Sau thời gian ủ, bổ sung 100 µL/giếng môi trường E-MEM có chứa 5% FBS và 1% Penicillin–Streptomycin (môi trường được làm ấm ở 37°C trước khi sử dụng).

Bước 6: Theo dõi và ghi nhận kết quả: Các đĩa nuôi được đặt trong tủ ủ 37°C, 5% CO₂ và được quan sát hàng ngày trong 7 ngày sau gây nhiễm để ghi nhận CPE.

Hiệu giá TCID₅₀ được tính toán theo công thức của Reed – Muench (1938):

$\text{Log}(\text{TCID}_{50}) = \log(\text{độ pha loãng thấp nhất mà quan sát được trên 50\% hiệu ứng tế bào}) + (-PD) \times \text{Log hệ số pha loãng}$

Trong đó:

$$PD = \frac{(\text{Tỷ lệ nhiễm trên 50\%} - 50)}{(\text{Tỷ lệ nhiễm trên 50\%} - \text{Tỷ lệ nhiễm dưới 50\%})}$$

* Xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp

Để xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp cho sự nhân lên của Parvovirus, virus được gây nhiễm lên dòng tế bào PK-15 với MOI là 0,01. Quá trình nuôi cấy được thực hiện liên tục trong 7 ngày dưới các tổ hợp điều kiện về nhiệt độ và tỷ lệ bổ sung FBS được trình bày trong Bảng 2.2. Mỗi 24 giờ sau gây nhiễm, 200 μ L dịch nuôi cấy được thu thập, ly tâm để loại bỏ mảnh tế bào, sau đó tách chiết DNA và xác định số lượng bản sao virus bằng phản ứng Real-time PCR (Miao và cộng sự, 2009). Kết quả được biểu diễn dưới dạng số lượng bản sao virus theo thời gian nhằm đánh giá khả năng nhân lên của virus trong từng điều kiện nuôi cấy khác nhau. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Bảng 2.2. Thiết kế thí nghiệm xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp với PPV

Điều kiện cố định	Điều kiện cần khảo sát	
	Nhiệt độ	% FBS
- Môi trường E-MEM, tế bào PK-15 - Tỷ lệ gây nhiễm MOI (Multiplicity of infection – số lượng virus gây nhiễm/số lượng tế bào) = 0,01 - 1% Penicillin – Streptomycin - 5% CO₂ - Thời gian nuôi cấy 7 ngày. Sau mỗi 24 giờ nuôi cấy, 200μL dung dịch virus được thu mẫu.	33°C	2% FBS
		3% FBS
		5% FBS
	37°C	2% FBS
		3% FBS
		5% FBS
	39°C	2% FBS
		3% FBS
		5% FBS

2.2.6. Đánh giá tiềm năng sử dụng PPV vào nghiên cứu sản xuất vắc xin

2.2.6.1. Xác định sự ổn định về đặc tính sinh học và di truyền của PPV

* Xác định sự ổn định về đặc tính sinh học

Để đánh giá khả năng duy trì đặc tính sinh học qua nhiều đời cấy chuyển, mẫu virus được cấy chuyển liên tục 15 đời trên dòng tế bào PK-15. Tại các đời P1, P5, P10 và P15, virus được thu thập và đánh giá các chỉ tiêu: biểu đồ sinh trưởng, hiệu giá TCID₅₀, và bệnh tích tế bào.

Xác định biểu đồ sinh trưởng: Chủng virus được gây nhiễm lên tế bào PK-15 với $MOI = 0,01$. Quá trình nuôi cấy được thực hiện trong môi trường E-MEM có bổ sung 5% FBS và 1% Penicillin–Streptomycin, duy trì ở $37^{\circ}C$, 5% CO_2 . Mẫu virus được thu thập sau mỗi 24 giờ trong 7 ngày liên tiếp. Tại mỗi thời điểm, số lượng bản sao virus được định lượng bằng phản ứng Real-time PCR theo mô tả của Miao và cộng sự (2009). Phản ứng Real-time PCR được lặp lại 3 lần. Dữ liệu thu được được sử dụng để xây dựng biểu đồ sinh trưởng của virus qua các đời cấy.

Xác định hiệu giá $TCID_{50}$ được xác định theo phương pháp của Reed – Muench (1938). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả được biểu diễn bằng $\log TCID_{50}/1mL$

Quan sát bệnh tích tế bào: Parvovirus được gây nhiễm lên tế bào PK-15 với $MOI = 0,01$. Virus được nuôi trong môi trường E-MEM bổ sung 5% FBS và 1% Penicillin – Streptomycin tại nhiệt độ $37^{\circ}C$, 5% CO_2 . Hàng ngày, hình thái tế bào được quan sát dưới kính hiển vi soi ngược (Leica Dmi1) với độ phóng đại 10X để ghi nhận các biến đổi đặc trưng cho hiệu ứng gây bệnh của virus, bao gồm: hiện tượng tạo hạt, biến dạng tế bào, hình thành thể vùi nhân, cô tụ nhiễm sắc thể và phá vỡ cấu trúc tế bào.

*** Xác định sự ổn định về di truyền**

Để đánh giá sự ổn định di truyền qua các đời nuôi cấy, mẫu virus được lấy tại các đời P1, P5, P10 và P15 tiến hành phân tích trình tự gen NS1 và VP2.

Gen NS1 kích thước 330bp được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng cặp môi theo mô tả của Lyoo và cộng sự (2001), trong khi gen VP2 kích thước 1,7kb được nhân lên với cặp môi của Xu và cộng sự (2013).

Sản phẩm PCR được tinh sạch và gửi giải trình tự tại Công ty First Base (Singapore). Trình tự nucleotide thu được được xử lý và phân tích bằng phần mềm BioEdit (phiên bản 7.2.5). Các trình tự gen NS1 và VP2 qua các đời nuôi cấy được so sánh bằng công cụ ClustalW để xác định các biến đổi có thể xảy ra trong quá trình nhân lên liên tiếp.

2.2.6.2. Đánh giá độc lực

Phương pháp xác định độc lực của virus Parvovirus được thực hiện dựa trên mô tả của Zeeuw và cộng sự, 2007:

Động vật thí nghiệm:

Loài: Lợn nái hậu bị (Landrace × Yorkshire)

Số lượng: 09 con

Tuổi: 7–8 tháng

Khối lượng: 95–105 kg

Tình trạng: Âm tính với kháng thể PPV xác định bằng ELISA (Phụ lục 4).

Điều kiện nuôi dưỡng: tại cơ sở chăn nuôi đạt tiêu chuẩn GLP thuộc Phân viện Thú y miền Trung.

Thiết kế thí nghiệm:

Lợn được chia thành 3 nhóm, 3 con/1 nhóm

Nhóm 1: Gây nhiễm chủng TX7 (4 mL, gồm 2 mL tiêm bắp + 2 mL nhỏ mũi, dung dịch virus sử dụng có hiệu giá 6,0 logTCID₅₀/mL.

Nhóm 2: Gây nhiễm chủng VC5 (4 mL, gồm 2 mL tiêm bắp + 2 mL nhỏ mũi, dung dịch virus sử dụng có hiệu giá 6,0 logTCID₅₀/mL.

Nhóm 3: Tiêm P_uBS (đối chứng).

Động vật được quan sát hằng ngày trong suốt thời gian thí nghiệm: thể trạng, ăn uống, vận động, thân nhiệt và khối lượng.

Đánh giá kết quả:

Các mẫu huyết thanh được thu vào ngày 0, 7, 14, 21 và 49 sau gây nhiễm để xác định hiệu giá kháng thể bằng phản ứng HI (Phụ lục 4). Phản ứng HI được lặp lại 3 lần.

Vào ngày thứ 90 của thai kỳ, lợn được giết mổ nhân đạo, thu dạ con để kiểm tra hình thái, bệnh tích thai và xác định sự có mặt của PPV trong mô bào thai bằng phản ứng Realtime-PCR (Miao và cộng sự, 2009).

2.2.6.3. Đánh giá khả năng sinh miễn dịch

*** Quy trình chuẩn bị vắc xin Parvovirus:**

- *Tăng sinh virus*: Parvovirus được nuôi cấy trên tế bào PK-15, E-MEM có bổ sung 10% FBS và 1% Penicillin - Streptomycin ở 37°C, 5% CO₂ cho đến khi đạt mật độ 80–90% diện tích bề mặt bình nuôi cấy.

- *Bất hoạt virus*: Parvovirus được bất hoạt bằng 5mM Binary ethylenimine, ở 37°C, trong 48 giờ, sau đó được trung hòa bằng 0,2mM sodium thiosulphate, ở 4°C qua đêm.

- *Phối trộn vắc xin*: Mỗi liều 2mL có chứa: 6,0 logTCID₅₀/1mL Parvovirus đã bất hoạt phối trộn với 20% chất bổ trợ Aluminum hydroxide. Vắc xin được kiểm tra vô trùng và xác nhận bất hoạt hoàn toàn trước khi sử dụng bằng cây kiểm tra trên PK-15, 7–10 ngày, không quan sát thấy CPE.

*** Đánh giá khả năng sinh miễn dịch trên động vật thay thế**

Phương pháp xác định tính sinh miễn dịch trên chuột lang được thực hiện như mô tả của Ma và cộng sự, 2011

Động vật thí nghiệm:

Loài: Chuột lang

Số lượng: 15 con

Khối lượng: 300g

Tình trạng: Âm tính với kháng thể PPV xác định bằng HI (Phụ lục 4).

Điều kiện nuôi dưỡng: tại cơ sở chăn nuôi đạt tiêu chuẩn GLP thuộc Phân viện Thú y miền Trung.

Thiết kế thí nghiệm:

Thiết kế thí nghiệm được mô tả chi tiết trong Bảng 2.3. Trong quá trình thí nghiệm, động vật được theo dõi thể trạng, vận động, ăn uống, khối lượng. Kết quả đánh giá bằng HI được lặp lại 3 lần.

Bảng 2.3. Thiết kế thí nghiệm xác định tính sinh miễn dịch trên chuột lang

Động vật	Nhóm	Số lượng (con)	Dung dịch tiêm	Liều lượng – đường tiêm	Lịch tiêm	Thời điểm lấy máu	Chỉ tiêu đánh giá
Chuột lang (≈300 g), khỏe mạnh, không có kháng thể PPV	Nhóm 1	5	Vắc xin VC5 bất hoạt	0,5 mL (1/4 liều), tiêm bắp	2 mũi cách nhau 21 ngày	0, 7, 14 ngày sau mũi 1; 0, 7, 14, 21 ngày sau mũi 2	HI
	Nhóm 2	5	Vắc xin TX7 bất hoạt	0,5 mL (1/4 liều), tiêm bắp			
	Nhóm 3	5	PBS đối chứng	0,5 mL, tiêm bắp			

* Đánh giá khả năng sinh miễn dịch trên lợn

Khả năng sinh miễn dịch của 02 chủng Parvovirus được đánh giá trên lợn nái được thực hiện như mô tả Foerster và cộng sự, 2016 và Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 8685-45:2024 về Quy trình kiểm nghiệm vắc xin - Phần 45: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh Parvo ở lợn nái.

Động vật thí nghiệm:

Loài: Lợn nái hậu bị (Landrace × Yorkshire)

Số lượng: 09 con

Tuổi: 7–8 tháng

Khối lượng: 95–105 kg

Tình trạng: Âm tính với kháng thể PPV xác định bằng ELISA (Phụ lục 4).

Điều kiện nuôi dưỡng: tại cơ sở chăn nuôi đạt tiêu chuẩn GLP thuộc Phân viện Thú y miền Trung.

Thiết kế thí nghiệm:

Thiết kế thí nghiệm xác định tính sinh miễn dịch trên lợn nái bằng phương pháp huyết thanh học được thể hiện trong Bảng 2.4.

Bảng 2.4. Thiết kế thí nghiệm xác định tính sinh miễn dịch trên lợn nái bằng phương pháp huyết thanh học

Động vật	Nhóm	Số lượng (con)	Dung dịch tiêm	Liều lượng – đường tiêm	Lịch tiêm	Thời điểm lấy máu	Chỉ tiêu đánh giá
Lợn nái hậu bị, khỏe mạnh, không có kháng thể PPV	Nhóm 1	3	Vắc xin VC5 bất hoạt	2 mL/liều, tiêm bắp	Mũi 1: ngày 35 trước phối giống;	0, 7, 14 ngày sau mũi 1; 0, 7, 14, 21 ngày sau mũi 2	HI, ELISA
	Nhóm 2	3	Vắc xin TX7 bất hoạt	2 mL/liều, tiêm bắp	Mũi 2: 21 ngày sau tiêm mũi 1		
	Nhóm 3	3	PBS đối chứng	2 mL, tiêm bắp			

Thiết kế thí nghiệm xác định khả năng sinh miễn dịch bằng phương pháp công cường độ được thể hiện chi tiết trong Bảng 2.5. Trong quá trình thí nghiệm, động vật được theo dõi thể trạng, vận động, ăn uống, khối lượng. Kết quả đánh giá bằng HI, ELISA được lặp lại 3 lần.

Bảng 2.5. Thiết kế thí nghiệm xác định tính sinh miễn dịch trên lợn nái bằng phương pháp công cường độ trên lợn nái

Nhóm	Số lượng (con)	Xử lý trước công cường độ	Thời điểm công cường độ	Liều virus (TCID ₅₀)	Đường công cường độ	Thời điểm mổ khám	Chỉ tiêu đánh giá
Nhóm 1 (VC5)	3	Tiêm vắc xin VC5 bất hoạt (2 mL, tiêm bắp, 2 mũi: ngày -35 và -14 trước phối giống)	Ngày 40 thai kỳ	2 × 6,0 logTCID ₅₀ /1mL chủng VC5 + 2 × 6,0 logTCID ₅₀ /1mL chủng TX7	2 mL nhỏ mũi + 2 mL tiêm bắp cổ	Ngày 90 thai kỳ	Số lượng bào thai chết, bệnh tích trên bào thai, sự xuất hiện PPV trong bào thai bằng phương pháp realtime-PCR
Nhóm 2 (TX7)	3	Tiêm vắc xin TX7 bất hoạt (2 mL, tiêm bắp, 2 mũi: ngày -35 và -14 trước phối giống)					
Nhóm 3 (Đối chứng)	3	Tiêm PBS vô trùng (2 mL, tiêm bắp, 2 lần: ngày -35 và -14 trước phối giống)					

2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Các dữ liệu thu được trong nghiên cứu được xử lý và phân tích thống kê bằng phần mềm Minitab 18:

- Tỷ lệ dương tính với Parvovirus giữa các nhóm hoặc các địa điểm được so sánh bằng kiểm định Chi-square (χ^2 test) nhằm xác định sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.
- Các dữ liệu định lượng bao gồm hiệu quả nuôi cấy, hiệu giá TCID₅₀, hiệu giá kháng thể HI và ELISA được phân tích bằng mô hình tuyến tính tổng quát (General Linear Model – GLM) để đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố thí nghiệm và xác định sự khác biệt giữa các nhóm.
- Khi phát hiện sự sai khác có ý nghĩa trong mô hình, kiểm định so sánh trung bình Tukey được sử dụng để phân biệt các nhóm có sai khác thống kê ở mức $p < 0,05$.
- Các giá trị được trình bày dưới dạng trung bình $\pm$ sai số chuẩn (Mean $\pm$ SD).

2.4. Y đức động vật

Nghiên cứu này là một phần của đề tài: “Nghiên cứu chế tạo vắc xin nhị giá vô hoạt phòng bệnh khô thai do Parvovirus và đóng dấu do vi khuẩn *Erysipelothrix rhusiopathiae* gây ra ở lợn” (Đề tài theo đặt hàng của Bộ Nông nghiệp và Môi trường). Các nghiên cứu trên động vật của đề tài đã được chấp thuận bởi hội đồng y đức động vật trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh theo giấy chứng nhận số NLU-230313 cấp ngày 24/05/2023 (Phụ lục 18)

CHƯƠNG III

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả nghiên cứu

3.1.1. Phân lập Parvovirus

3.1.1.1 Xác định mẫu dương tính với Parvovirus

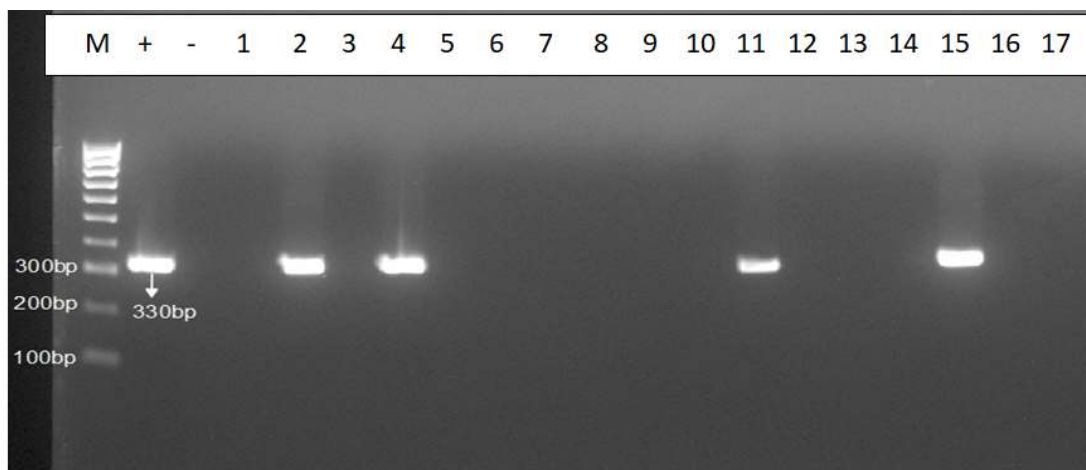
Trong nghiên cứu này, tổng số 392 mẫu bệnh phẩm được thu thập từ sáu tỉnh đại diện cho các vùng địa lý khác nhau của Việt Nam, bao gồm Thái Bình, Thanh Hóa, Bình Định, Đắk Lắk, Đồng Nai và Bình Dương. Tập mẫu gồm 360 mẫu huyết thanh và 32 mẫu bào thai (Bảng 3.1). Các địa phương được lựa chọn dựa trên quy mô chăn nuôi lợn lớn và tính đại diện cho các vùng sinh thái nông nghiệp đặc trưng của cả nước (theo Bảng 1.4)

Bảng 3.1. Kết quả xác định mẫu dương tính với PPV

Tỉnh	Mẫu thu được			Dương tính với PPV					
	Huyết thanh	Bào thai	Tổng số	Huyết thanh	Tỷ lệ (%)	Bào thai	Tỷ lệ (%)	Tổng số	Tỷ lệ (%)
Thái Bình	60	0	60	5/60	8,33	0		5/60	8,33
Thanh Hóa	60	3	63	3/60	5	0/3	0	3/63	4,76
Bình Định	60	0	60	4/60	6,67	0		4/60	6,67
Đắk Lắk	60	9	69	5/60	8,33	1/9	11,11	6/69	8,70
Đồng Nai	60	10	70	5/60	8,33	2/10	20	7/70	10
Bình Dương	60	10	70	7/60	11,67	0/10	0	7/70	10
Tổng	360	32	392	29/360	8,06	3/32	9,38	32/392	8,16

Kết quả PCR phát hiện Parvovirus lợn cho thấy sản phẩm khuếch đại có kích thước khoảng 330 bp, trùng khớp với kích thước công bố bởi Lyoo và cộng sự (2001). Ảnh điện di (Hình 3.1) thể hiện các băng DNA đặc trưng, rõ nét, không xuất hiện sản

phẩm không đặc hiệu, chứng tỏ phản ứng có độ đặc hiệu và độ tin cậy cao. Trong tổng số 392 mẫu, có 32 mẫu dương tính với PPV, tương ứng tỷ lệ lưu hành chung 8,16% (Phụ lục 2).



Hình 3.1. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR phát hiện Parvovirus

M: 100bp DNA ladder (Thermo scientific, Mỹ); + : Đối chứng dương (Mẫu PCR với DNA dương tính PPV - DNA Parvovirus từ Đại học Kangwon, Hàn Quốc); - : Đối chứng âm (Sản phẩm PCR không có DNA khuôn); 1-17: Sản phẩm PCR với DNA tách chiết từ bệnh phẩm thu được

Phân tích thống kê bằng kiểm định Chi-square cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ dương tính với PPV giữa các địa phương khảo sát ($\chi^2 = 1,81$; $df = 5$; $p = 0,875$). Tỷ lệ dương tính dao động từ 4,76% tại Thanh Hóa đến 10,0% tại Đồng Nai và Bình Dương, với trung bình toàn quốc 8,16%. Mặc dù có sự biến động nhẹ giữa các khu vực, giá trị $p > 0,05$ cho thấy sự khác biệt này không mang ý nghĩa dịch tễ học, phản ánh ảnh hưởng chủ yếu của yếu tố ngẫu nhiên trong lấy mẫu.

Kết quả cho thấy PPV đang lưu hành rộng rãi nhưng ở mức độ thấp tại các vùng khảo sát, chưa ghi nhận sự hình thành ổ dịch tập trung hay xu hướng phân bố theo vùng địa lý, phản ánh tình trạng lưu hành nền ổn định của virus trong quần thể lợn Việt Nam.

3.1.1.2. Kết quả xác định mẫu đủ điều kiện nuôi cấy

Kết quả sàng lọc các mẫu dương tính với Parvovirus lợn (PPV) cho thấy không phát hiện sự hiện diện của các tác nhân virus khác thường gặp ở lợn, bao gồm virus

dịch tả lợn cổ điển (CSFV), virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRSV), Circovirus type 2 (PCV2) và virus dịch tả lợn châu Phi (ASFV). Toàn bộ 32 mẫu dương tính với PPV đều âm tính hoàn toàn với các tác nhân trên.

Kết quả này khẳng định các mẫu nghiên cứu là nguồn nhiễm đơn PPV, không bị ảnh hưởng bởi hiện tượng đồng nhiễm virus, vốn có thể gây sai lệch trong quá trình phân lập, nuôi cấy và đánh giá đặc tính sinh học của virus. Sự thuần nhất về tác nhân gây nhiễm có ý nghĩa quan trọng, bởi trong điều kiện chăn nuôi thực tế, lợn thường bị nhiễm đồng thời nhiều loại virus thuộc nhóm gây rối loạn sinh sản và hô hấp, gây khó khăn cho việc xác định chính xác căn nguyên bệnh lý.

Việc toàn bộ các mẫu dương tính với PPV đều không chứa các virus khác chứng tỏ quá trình thu thập và bảo quản mẫu đạt độ chính xác cao. Điều này đảm bảo rằng các mẫu được lựa chọn là nguồn virus đặc trưng, thuần khiết và ổn định, đủ điều kiện sử dụng trong các nghiên cứu tiếp theo về phân lập, đánh giá đặc tính sinh học, di truyền và xác định độc lực của các chủng PPV.

Như vậy, 32 mẫu dương tính được xác định là đủ tiêu chuẩn cho bước nghiên cứu tiếp theo về đánh giá khả năng phát triển trên dòng tế bào thận lợn (PK-15).

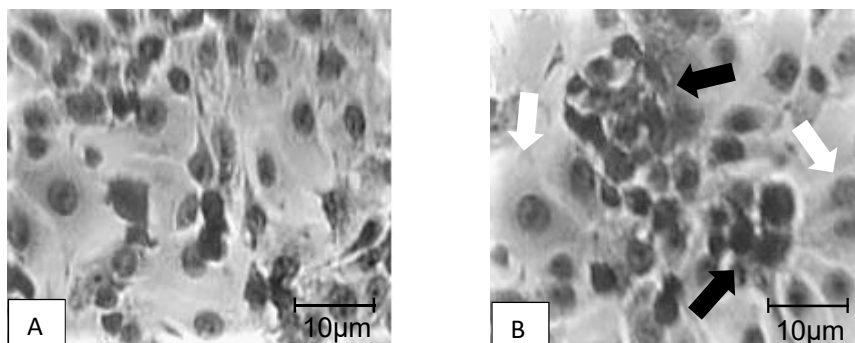
3.1.1.3. Kết quả nuôi cấy PPV

*** Khả năng xâm nhiễm và hình thành bệnh tích tế bào**

Kết quả nuôi cấy 32 mẫu dương tính với PPV trên dòng tế bào cảm thụ PK-15 cho thấy tất cả các mẫu đều xuất hiện hiệu ứng gây bệnh tế bào rõ rệt trong vòng 7 ngày sau gây nhiễm. Sau 24 giờ nuôi cấy, các dấu hiệu nhiễm virus ban đầu đã được ghi nhận, bao gồm thay đổi hình thái tế bào, hiện tượng nhân cô đặc, tạo hạt trong bào tương và mất tính đồng nhất của lớp tế bào đơn lớp (Hình 3.2).

Trong những ngày tiếp theo, virus tiếp tục nhân lên mạnh mẽ trong tế bào chủ, dẫn đến mức độ tổn thương gia tăng theo thời gian, biểu hiện bằng hiện tượng co cụm, bong tróc tế bào khỏi bề mặt nuôi, hình thành các khoảng trống đặc trưng trên bề mặt nuôi cấy (Hình 3.3).

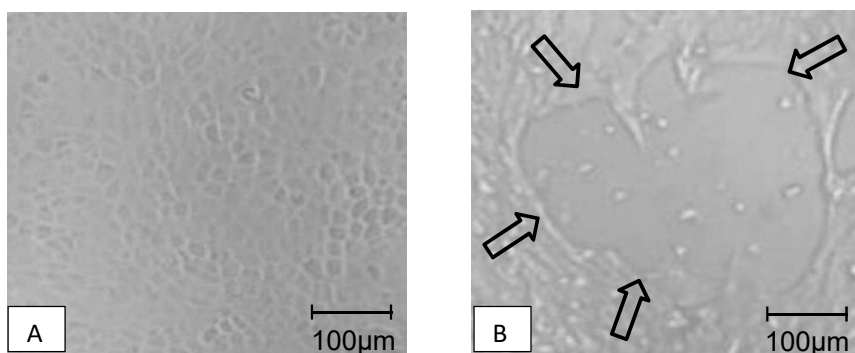
Các biểu hiện bệnh tích tế bào quan sát được hoàn toàn phù hợp với mô tả điển hình về CPE của PPV trên dòng tế bào PK-15 trong các công trình nghiên cứu trước đây (Wang và cộng sự, 2024; Zhang và cộng sự, 2015).



**Hình 3.2. Tế bào PK-15 sau 24 giờ gây nhiễm Parvovirus
dưới kính hiển vi soi ngược độ phóng đại 100X**

A: Tế bào PK-15 không gây nhiễm virus

B: Tế bào PK-15 khi được gây nhiễm virus sau 24 giờ, mũi tên trắng: tế bào bình thường, mũi tên đen: tế bào bị nhiễm virus gây ra hiện tượng nhân vón cục, thay đổi hình dạng tế bào.



**Hình 3.3. CPE trên tế bào PK-15 sau 5 ngày gây nhiễm Parvovirus
dưới kính hiển vi soi ngược độ phóng đại 10X**

A: Tế bào PK-15 không gây nhiễm virus sau 5 ngày

B: Bệnh tích trên tế bào PK-15 khi gây nhiễm virus sau 5 ngày. Mũi tên: Tế bào đã bị virus xâm nhiễm và gây phá hủy tế bào tạo nên những khoảng trống trên bề mặt nuôi cấy

Kết quả quan sát khi nuôi cấy PPV ghi nhận tất cả 32 chủng PPV phân lập được đều gây CPE điển hình trên dòng tế bào PK-15, khẳng định khả năng xâm nhập, nhân lên và gây hủy hoại tế bào chủ hiệu quả của virus. Hiện tượng này cho thấy dòng tế bào PK-15 có tính cảm thụ cao đối với PPV, đồng thời khẳng định rằng các chủng PPV trong

nghiên cứu đã được phân lập thành công và duy trì hoạt tính sinh học ổn định trong môi trường nuôi cấy tế bào.

*** Kết quả khảo sát sự gia tăng số lượng virus trong quá trình nuôi cấy**

Phân tích định lượng bằng kỹ thuật Real-time PCR cho thấy số lượng bản sao của PPV tăng lên rõ rệt sau mỗi đời cấy chuyển, phản ánh khả năng nhân lên ổn định và hiệu quả của virus trong môi trường tế bào PK-15. Kết quả theo dõi trên 32 mẫu dương tính cho thấy mức tăng đều đặn của tải lượng virus qua ba đời nuôi cấy, với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các đời cấy ($p < 0,001$).

Giá trị trung bình logarit số bản sao virus tăng đáng kể từ 2,73–5,13 log10 ở đời cấy thứ nhất (P1) lên 4,23–6,52 log10 ở đời thứ hai (P2) và đạt 4,53–7,00 log10 ở đời thứ ba (P3) (Bảng 3.2). Phân tích phương sai (Phụ lục 11) khẳng định rằng sự khác biệt giữa các mẫu là có ý nghĩa thống kê cao ($p < 0,001$), chứng tỏ nguồn gốc mẫu virus ảnh hưởng đáng kể đến khả năng nhân lên của chúng trong điều kiện nuôi cấy in vitro.

Phân tích so sánh cặp bằng phương pháp Tukey chỉ ra rằng các mẫu VC5 và TX7 đạt số lượng bản sao cao nhất, được xếp vào nhóm A, trong khi các mẫu khác có mức nhân lên thấp hơn thuộc các nhóm C và D. Kết quả này cho thấy VC5 và TX7 có tốc độ sao chép nhanh, khả năng thích nghi cao với môi trường tế bào PK-15 và hiệu suất nhân lên vượt trội so với các chủng còn lại.

Bảng 3.2. Kết quả xác định số lượng virus sau 3 đời cấy truyền

Tỉnh	Mẫu	Trung bình logarit số lượng bản sao virus $\pm$ SD			Nhóm so sánh trung bình Turkey* (95% CI, n = 9)
		P1 (n = 3)	P2 (n = 3)	P3 (n = 3)	
Thái Bình	ĐH2	3,36 $\pm$ 0,04	4,86 $\pm$ 0,05	5,16 $\pm$ 0,18	B, C, D
	ĐH4	2,82 $\pm$ 0,04	4,32 $\pm$ 0,03	4,62 $\pm$ 0,16	B, C, D
	ĐH11	3,78 $\pm$ 0,02	5,28 $\pm$ 0,13	5,58 $\pm$ 0,10	A, B, C, D
	ĐH15	2,81 $\pm$ 0,02	4,31 $\pm$ 0,11	4,61 $\pm$ 0,07	C, D
Thanh Hóa	KX24	4,23 $\pm$ 0,02	5,73 $\pm$ 0,12	6,03 $\pm$ 0,16	A, B, C, D

Tỉnh	Mẫu	Trung bình logarit số lượng bản sao virus $\pm$ SD			Nhóm so sánh trung bình Turkey* (95% CI, n = 9)
		P1 (n = 3)	P2 (n = 3)	P3 (n = 3)	
	TS8	2,79 $\pm$ 0,01	4,29 $\pm$ 0,09	4,59 $\pm$ 0,09	D
	TX7	5,13 $\pm$ 0,05	6,63 $\pm$ 0,12	7 $\pm$ 0,11	A
	TX13	2,78 $\pm$ 0,03	4,28 $\pm$ 0,09	4,58 $\pm$ 0,10	D
Bình Định	PM21	3,29 $\pm$ 0,04	4,79 $\pm$ 0,06	5,09 $\pm$ 0,18	B, C, D
	PM27	2,77 $\pm$ 0,20	4,27 $\pm$ 0,08	4,57 $\pm$ 0,10	D
	PC7	3,76 $\pm$ 0,12	5,26 $\pm$ 0,07	5,56 $\pm$ 0,14	A, B, C, D
	PC15	2,75 $\pm$ 0,15	4,25 $\pm$ 0,09	4,55 $\pm$ 0,07	D
Đắk Lắk	EK18	4,31 $\pm$ 0,07	5,81 $\pm$ 0,13	6,11 $\pm$ 0,09	A, B, C
	EK20	2,74 $\pm$ 0,12	4,24 $\pm$ 0,08	4,54 $\pm$ 0,09	D
	EK27	3,78 $\pm$ 0,11	5,28 $\pm$ 0,05	5,58 $\pm$ 0,10	A, B, C, D
	EK31	2,79 $\pm$ 0,12	4,29 $\pm$ 0,11	4,59 $\pm$ 0,16	B, C, D
	MD22	2,82 $\pm$ 0,06	4,32 $\pm$ 0,05	4,62 $\pm$ 0,10	B, C, D
Đắk Lắk	MD28	2,83 $\pm$ 0,04	4,33 $\pm$ 0,09	4,63 $\pm$ 0,08	B, C, D
Đồng Nai	VC5	5,02 $\pm$ 0,13	6,52 $\pm$ 0,04	6,92 $\pm$ 0,08	A
	VC10	4,23 $\pm$ 0,07	5,73 $\pm$ 0,06	6,03 $\pm$ 0,07	A, B, C, D
	VC15	2,82 $\pm$ 0,06	4,32 $\pm$ 0,04	4,62 $\pm$ 0,08	B, C, D
	VC32	3,33 $\pm$ 0,12	4,83 $\pm$ 0,06	5,13 $\pm$ 0,03	B, C, D
	LT23	2,79 $\pm$ 0,06	4,29 $\pm$ 0,05	4,59 $\pm$ 0,05	D
	LT32	2,73 $\pm$ 0,12	4,23 $\pm$ 0,07	4,53 $\pm$ 0,07	D
	LT36	3,21 $\pm$ 0,09	4,71 $\pm$ 0,05	5,01 $\pm$ 0,03	B, C, D
Bình Dương	DA6	2,86 $\pm$ 0,06	4,36 $\pm$ 0,10	4,66 $\pm$ 0,06	B, C, D

Tỉnh	Mẫu	Trung bình logarit số lượng bản sao virus $\pm$ SD			Nhóm so sánh trung bình Turkey* (95% CI, n = 9)
		P1 (n = 3)	P2 (n = 3)	P3 (n = 3)	
	DA12	3,73 $\pm$ 0,16	5,23 $\pm$ 0,10	5,53 $\pm$ 0,08	A, B, C, D
	DA27	2,82 $\pm$ 0,10	4,32 $\pm$ 0,08	4,62 $\pm$ 0,12	B, C, D
	BC2	3,37 $\pm$ 0,11	4,87 $\pm$ 0,10	5,17 $\pm$ 0,18	B, C, D
	BC4	2,76 $\pm$ 0,08	4,26 $\pm$ 0,07	4,56 $\pm$ 0,04	D
	BC11	4,32 $\pm$ 0,12	5,82 $\pm$ 0,07	6,12 $\pm$ 0,08	A, B
	BC15	2,87 $\pm$ 0,09	4,37 $\pm$ 0,07	4,67 $\pm$ 0,10	B, C, D

* $p < 0,001$

Ghi chú: P1 : Đồi nuôi cấy thứ nhất, P2: Đồi nuôi cấy thứ hai, P3: Đồi nuôi cấy thứ ba

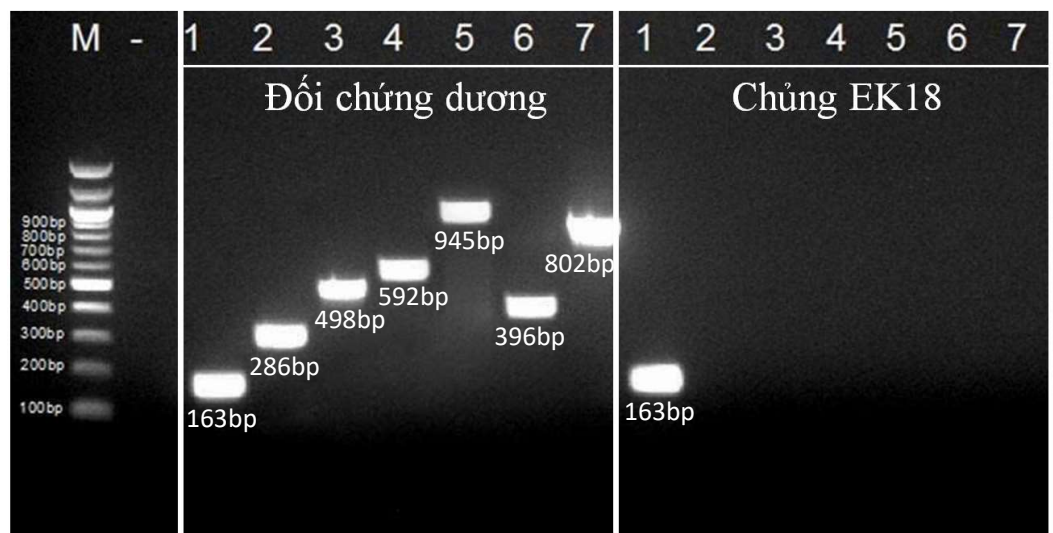
Tổng hợp kết quả phân tích định lượng bằng Real-time PCR và quan sát hình thái tế bào dưới kính hiển vi soi ngược cho thấy toàn bộ 32 chủng PPV phân lập được trong nghiên cứu đều có khả năng nhân lên hiệu quả trên dòng tế bào cảm thụ PK-15. Các chủng virus sau khi được gây nhiễm đều tạo ra hiệu ứng gây bệnh tế bào điển hình, đồng thời đi kèm với sự gia tăng rõ rệt về số lượng bản sao virus qua các đồi cấy chuyển, được thể hiện qua sự tăng số lượng virus từ P1 đến P3.

Kết quả định lượng cho thấy mức độ nhân lên của virus ổn định và bền vững qua nhiều chu kỳ nuôi cấy, chứng minh rằng các chủng PPV phân lập được thích nghi tốt với môi trường tế bào PK-15, một trong những dòng tế bào chuẩn được sử dụng phổ biến trong nghiên cứu virus Parvovirus ở lợn. Đáng chú ý, hai chủng VC5 và TX7 thể hiện khả năng tăng sinh virus vượt trội so với các chủng khác, thể hiện qua hiệu giá và số lượng bản sao đạt mức cao nhất trong toàn bộ tập mẫu.

Những kết quả này không chỉ khẳng định sự phân lập thành công và tính hoạt động sinh học mạnh mẽ của 32 chủng PPV, mà còn chỉ ra rằng VC5 và TX7 là hai chủng có đặc tính sinh học nổi trội, hội tụ đầy đủ các tiêu chí về tốc độ nhân lên, ổn định di truyền và khả năng gây bệnh tích tế bào rõ rệt. Các đặc điểm này cho thấy hai chủng trên có

tiềm năng cao trong việc lựa chọn làm chủng gốc phục vụ nghiên cứu chuyên sâu về độc lực, khả năng sinh miễn dịch và phát triển vắc xin phòng bệnh PPV.

3.1.2. Xác định type Parvovirus



Hình 3.4. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR xác định type chủng virus EK18

M: 100bp plus DNA ladder (Gold Biotechnology, Mỹ); - : Đôi chứng âm (Sản phẩm PCR không có DNA khuôn); Đôi chứng dương 1-7 (Sản phẩm PCR với DNA dương tính từ type 1 đến type 7- DNA Parvovirus từ Đại học Kangwon, Hàn Quốc); Chủng virus EK18 1-7: Mẫu PCR với DNA của chủng virus EK18 từ type 1 đến type 7.

Kết quả xác định type của các chủng PPV được thể hiện qua kết quả điện di sản phẩm PCR. Trong Hình 3.4, các mẫu đối chứng dương tính cho bảy type virus xuất hiện các băng DNA rõ nét, không có sản phẩm không đặc hiệu, và kích thước băng hoàn toàn trùng khớp với mô tả của Kim và cộng sự (2022); mẫu EK18 chỉ ghi nhận băng DNA đặc trưng khi sử dụng cặp mồi đặc hiệu cho PPV1, trong khi không phát hiện sản phẩm khuếch đại với các cặp mồi đặc hiệu cho PPV2 đến PPV7. Kết quả xác định type ở toàn bộ 32 mẫu virus phân lập đều ghi nhận type PPV1. Kết quả chi tiết được trình bày trong Phụ lục 7.

Kết quả xác định type cho thấy PPV1 hiện là type virus lưu hành chủ yếu trong quần thể lợn nái tại các tỉnh khảo sát ở Việt Nam, tương đồng với nhiều nghiên cứu gần đây trong khu vực châu Á và trên thế giới (Serena và cộng sự, 2019; Parthiban và cộng sự, 2022; Kim và cộng sự, 2022).

Việc xác định tất cả các mẫu phân lập đều thuộc type PPV1 có ý nghĩa khoa học và thực tiễn quan trọng. Về mặt khoa học, kết quả này củng cố hiểu biết về đặc điểm dịch tễ học phân tử của PPV tại Việt Nam, làm rõ type virus chủ yếu đang lưu hành trên đàn lợn nái. Về mặt ứng dụng, các chủng PPV1 phân lập được – đặc biệt là những chủng có hiệu giá cao và ổn định di truyền như VC5 và TX7 – là nguồn vật liệu quý giá cho các nghiên cứu chuyên sâu về đặc tính sinh học, di truyền và phát triển vắc xin PPV nội địa nhằm phòng chống hiệu quả bệnh rối loạn sinh sản do Parvovirus gây ra ở lợn

3.1.3. Phân tích mối quan hệ di truyền Parvovirus

3.1.3.1. Phân tích mối quan hệ di truyền dựa trên trình tự đoạn gen NS1

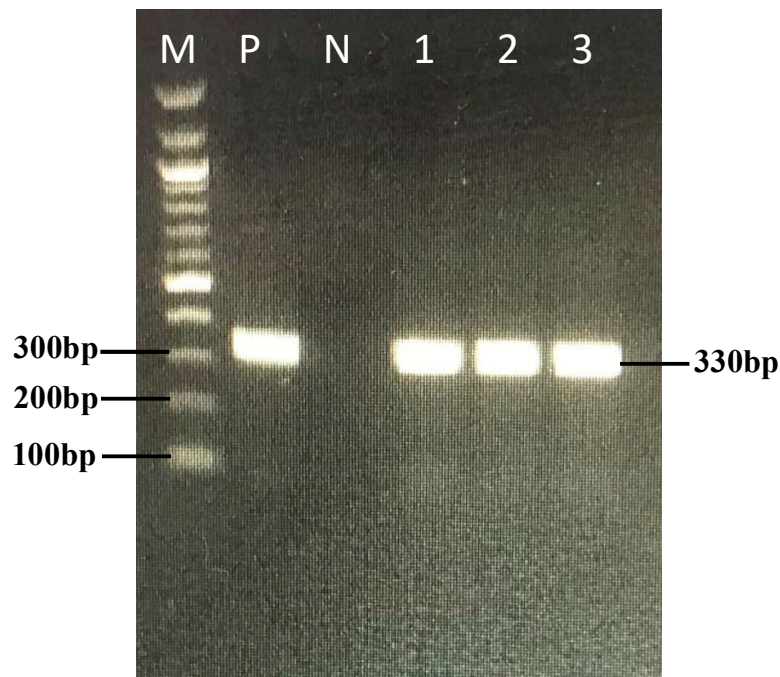
Sau khi phân lập thành công các chủng virus trên dòng tế bào PK-15, các chủng này được tiến hành phân tích mối quan hệ di truyền dựa trên trình tự gen NS1 – một trong những gen bảo tồn cao và có giá trị đặc trưng trong phân loại Parvovirus.

Trong nghiên cứu này, trình tự gen NS1 của các mẫu phân lập được so sánh với các chủng tham chiếu công bố trên Ngân hàng Gen nhằm xác định mức độ tương đồng và mối quan hệ phát sinh loài. Kết quả phân tích độ tương đồng nucleotide của đoạn gen NS1 bằng công cụ ClustalW trên phần mềm BioEdit cho thấy 32 mẫu phân lập có trình tự hoàn toàn đồng nhất, đạt 100% tương đồng với nhau. Trình tự gen NS1 của các chủng này được trình bày chi tiết tại Phụ lục 8. Do không phát hiện sự khác biệt trong trình tự giữa các chủng, hai chủng đại diện là VC5 và TX7 được lựa chọn để tiến hành phân tích so sánh với các chủng tham chiếu quốc tế (Bảng 3.3).

Bảng 3.3. Tỷ lệ tương đồng đoạn gen NS1 của chủng TX7, VC5 với một số chủng tham chiếu trên GenBank

TT	Chủng virus	Mã số GenBank	Tỷ lệ tương đồng (%)
1	TX7*		100
2	VC5		100
3	PPV1-HuB78-2017 (China)	MN326129	99,39
4	PPV1-GD10-1999 (China)	MN326126	99,39
5	PPV1-JSYZ20170418-30 (China)	MZ577026	99,39
6	PPV1/BRA-UEL/GO-1074/2018 (Brasil)	MN970191	99,39
7	PPV1-0225-L-SD (China)	OQ750579	99,70
8	Kresse	U44978	99,39

*Chủng tham chiếu



Hình 3.5. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen NS1

M: 100bp plus DNA ladder (Gold Biotechnology, Mỹ), 1-3: Mẫu PCR với DNA tách chiết từ huyết thanh hoặc bệnh phẩm thu được, P: Đối chứng dương (Sản phẩm PCR với DNA dương tính PPV - DNA Parvovirus từ Đại học Kangwon, Hàn Quốc), N: Đối chứng âm (Sản phẩm PCR không có DNA khuôn)

Kết quả khuếch đại đoạn gen NS1 bằng kỹ thuật PCR cho thấy sản phẩm có kích thước khoảng 330bp, phù hợp với mô tả của Lyoo và cộng sự (2001). Hình 3.5 minh họa kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose, trong đó các băng DNA thu được rõ nét, không xuất hiện băng phụ, và có kích thước đặc trưng tương ứng với đoạn gen NS1 mục tiêu. Trình tự gen sau khi được phân tích so sánh bằng công cụ BLAST cho thấy trình tự nucleotide của hai chủng VC5 và TX7 có mức độ tương đồng cao ($\geq 99\%$) so với các chủng PPV1 được công bố trên Ngân hàng gen. Trong đó, mức tương đồng cao nhất (99,70%) được ghi nhận với chủng PPV1-0225-L-SD, phân lập tại Trung Quốc năm 2022 (Bảng 3.3, Hình 3.6), tương đồng 99,39% với chủng Kresse (chủng được sử dụng để sản xuất vắc xin phòng bệnh Parvo trên lợn).

Porcine parvovirus 1 isolate PPV1-0225-L-SD, partial genome

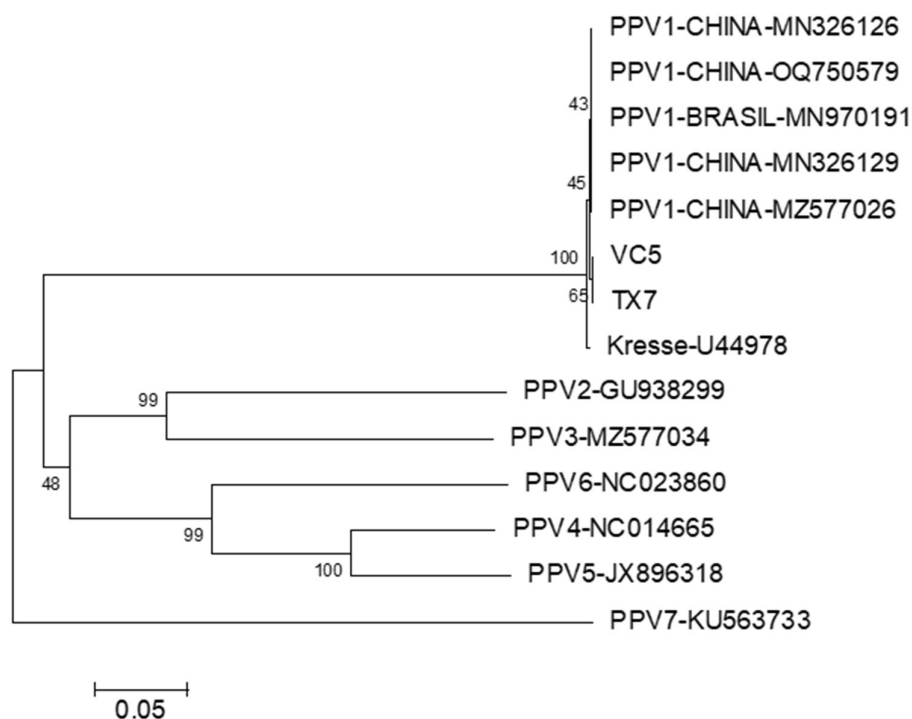
Sequence ID: [OQ750579.1](#) Length: 4248 Number of Matches: 1

Range 1: 1176 to 1505 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
604 bits(327)	2e-168	329/330(99%)	0/330(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTCAACACATTG	60		
Sbjct 1176	ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTCAACACATTG	1235		
Query 61	CAAAC TTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGTGAAC TTTCCATTTAATG	120		
Sbjct 1236	CAAAC TTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGTGAAC TTTCCATTTAATG	1295		
Query 121	ACTGTACAAATAAAAC TTAATATGGATTGAAGAAGCAGGAAACTTTTCTAACCAAGTAA	180		
Sbjct 1296	ACTGTACAAATAAAAC TTAATATGGATTGAAGAAGCAGGAAACTTTTCTAACCAAGTAA	1355		
Query 181	ACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGGTCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAGGAA	240		
Sbjct 1356	ACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGGTCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAGGAA	1415		
Query 241	GCAAACAAATTGAACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTA	300		
Sbjct 1416	GCAAACAAATTGAACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTA	1475		
Query 301	GAATAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA	330		
Sbjct 1476	GAATAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA	1505		

Hình 3.6. Kết quả BLAST trình tự nucleotide đoạn gen NS1 (330bp) của mẫu TX7 so với chủng tham chiếu PPV1-0225-L-SD (Mã số GenBank: OQ750579)



Hình 3.7. Cây phả hệ dựa trên trình tự đoạn gen NS1

Cây phả hệ được xây dựng trên cơ sở trình tự nucleotide của đoạn gen NS1 từ các chủng PPV TX7 và VC5 tham chiếu với một số chủng trên Ngân hàng gen bằng phần mềm MEGA6 theo phương pháp kết nối liền kề (Neighbour-Joining) (Saitou và Nei, 1987), sử dụng độ tin cậy 1000 bootstrap (Felsenstein, 1985).

Kết quả phân tích cây phả hệ dựa trên trình tự gen NS1 cho thấy hai chủng PPV phân lập trong nghiên cứu (VC5 và TX7) nằm trong cùng một cụm với các chủng PPV1 có nguồn gốc từ Trung Quốc và Brazil, với giá trị bootstrap rất cao (100). Điều này khẳng định mối quan hệ tiến hóa gần gũi giữa VC5, TX7 và các chủng PPV1 đang lưu hành trên thế giới, đồng thời cho thấy sự ổn định di truyền của nhóm virus này ở mức gen NS1 – gen mã hóa protein không cấu trúc đóng vai trò thiết yếu trong quá trình sao chép và điều hòa chu kỳ nhân lên của virus.

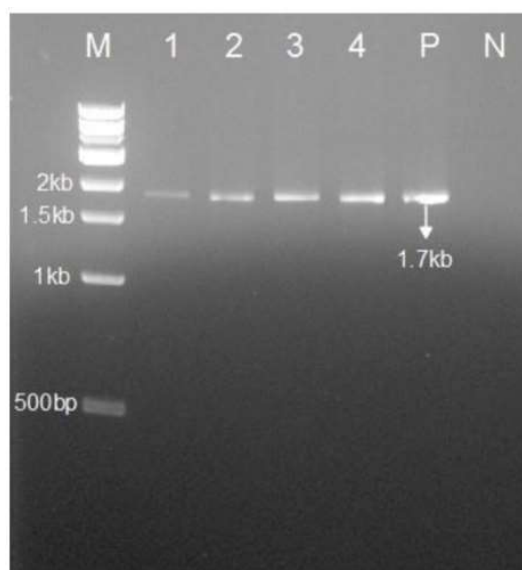
Trong khi đó, các type PPV khác (PPV2–PPV7) phân tách thành các nhánh riêng biệt với khoảng cách di truyền lớn, phản ánh sự khác biệt sâu sắc về cấu trúc bộ gen và đặc tính sinh học giữa các dòng PPV. Các giá trị bootstrap từ 61 đến 99 củng cố tính vững chắc của các cụm này, đồng thời cho thấy mức độ phân hóa tiến hóa rõ rệt giữa các typ PPV dựa trên gen NS1. Việc phân chia này phù hợp với phân loại của chi *Protoparvovirus*, trong đó PPV1 vẫn được coi là typ có ý nghĩa bệnh học quan trọng nhất trong gây hội chứng rối loạn sinh sản ở lợn.

Hai virus ngoài nhóm (*Galleria mellonella* densovirus và *Torque teno felis* virus) được sử dụng làm đối chứng xa giúp xác định ranh giới tiến hóa, qua đó hỗ trợ hiệu quả cho việc định vị chính xác các nhánh PPV trên cây phả hệ. Sự phân tách sâu của các đối chứng này với nhóm PPV tiếp tục xác nhận tính hợp lý của mô hình phân tích.

Mặt khác, việc VC5 và TX7 thuộc cụm PPV1 có ý nghĩa thực tiễn quan trọng trong nghiên cứu phát triển vắc xin, bởi PPV1 là typ được chứng minh có vai trò chính trong gây bệnh và là đối tượng trọng tâm của chương trình phòng chống hiện nay. Hơn nữa, sự tương đồng di truyền giữa hai chủng phân lập tại Việt Nam và các chủng quốc tế thuộc PPV1 cho thấy quần thể PPV1 trong nước không có sự phân kỳ mạnh, từ đó tạo điều kiện thuận lợi cho việc lựa chọn chủng làm ứng viên vắc xin.

3.1.3.2. Phân tích mối quan hệ di truyền dựa trên trình tự gen VP2

Gen VP2, mã hóa protein vỏ capsid chính của PPV, đóng vai trò quan trọng trong cấu trúc virus, tính kháng nguyên và xác định kiểu gen. Do đó, việc phân tích trình tự gen này có ý nghĩa đặc biệt trong phân loại di truyền và đánh giá mối quan hệ tiến hóa giữa các chủng PPV.

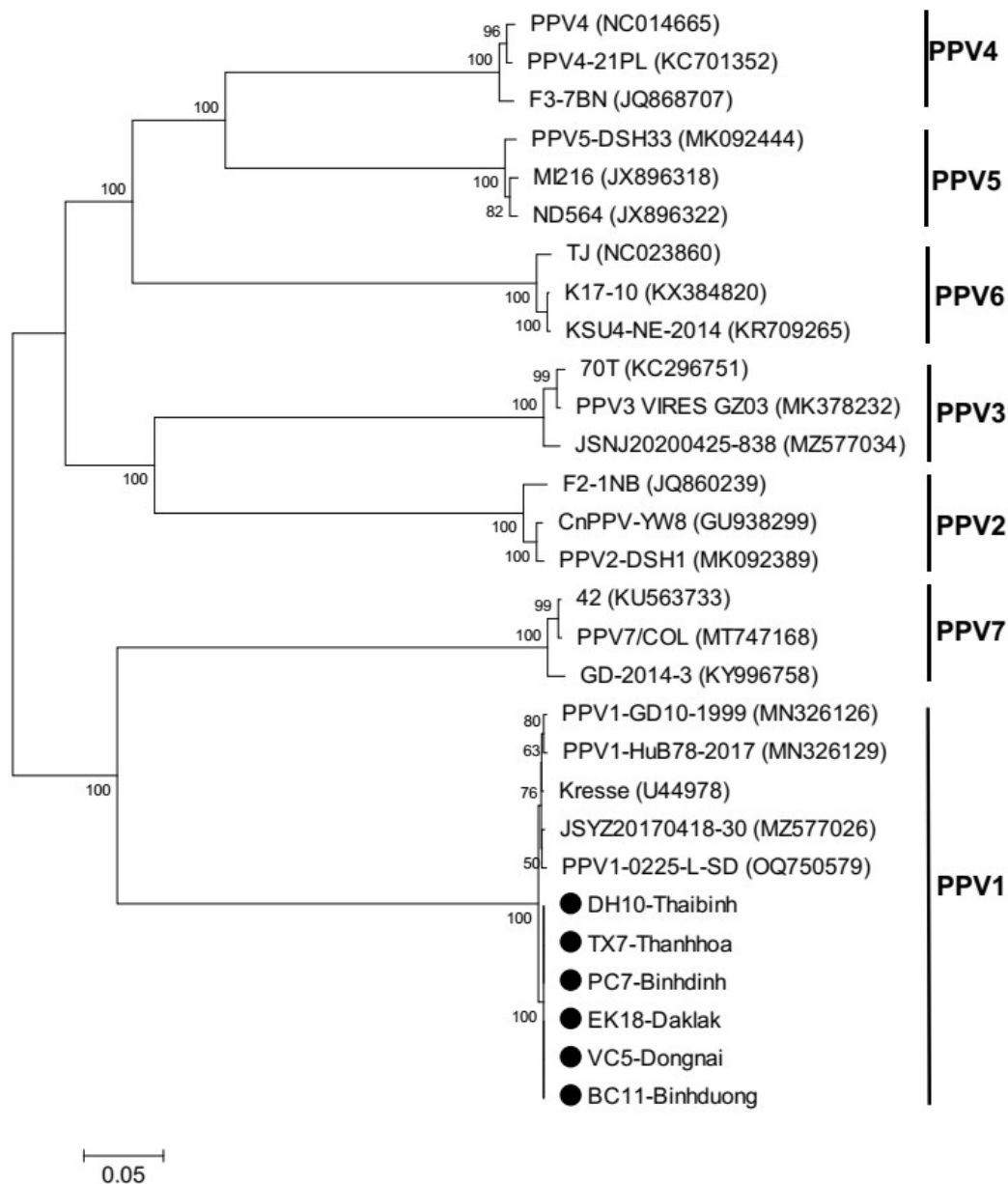


Hình 3.8. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR khuếch đại gen VP2

M: 1kb DNA Ladder (NEB, Anh), 1-4: Mẫu PCR với DNA tách chiết từ huyết thanh hoặc bệnh phẩm thu được, P: Đối chứng dương (Sản phẩm PCR với DNA dương tính PPV - DNA Parvovirus từ Đại học Kangwon, Hàn Quốc), N: Đối chứng âm (Sản phẩm PCR không có DNA khuôn)

Kết quả khuếch đại gen VP2 bằng kỹ thuật PCR cho thấy sản phẩm có kích thước khoảng 1,7 kb, phù hợp với mô tả của Xu và cộng sự (2013). Hình 3.8 minh họa kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose, trong đó các băng DNA thu được rõ nét, không xuất hiện băng phụ, và có kích thước đặc trưng tương ứng với đoạn gen VP2 mục tiêu.

Trình tự gen VP2 của 32 chủng PPV phân lập trong nghiên cứu này được phân tích và so sánh bằng công cụ ClustalW trên phần mềm BioEdit cho kết quả tương đồng 100%. Kết quả này cho thấy sự ổn định di truyền cao giữa các chủng thu được từ các địa phương khác nhau. Do không phát hiện sai khác trong trình tự nucleotide, sáu chủng đại diện (thuộc sáu tỉnh khác nhau) đã được lựa chọn và đăng ký trên cơ sở dữ liệu Ngân hàng Gen quốc tế (NCBI) với mã số từ OR263486 đến OR263491 (Phụ lục 9).



Hình 3.9. Cây phả hệ dựa trên trình tự gen VP2

Cây phả hệ được xây dựng trên cơ sở trình tự nucleotide gen VP2 từ các chủng PPV phân lập được tham chiếu với một số chủng trên Ngân hàng gen bằng phần mềm MEGA6 theo phương pháp kết nối liền kề (Neighbour-Joining) (Saitou và Nei, 1987), sử dụng độ tin cậy 1000 bootstrap (Felsenstein, 1985)

Phân tích cây phả hệ dựa trên trình tự gen VP2 cho thấy sự phân tách rõ ràng giữa các type PPV (PPV1–PPV7), phản ánh mức độ đa dạng di truyền đáng kể trong chi *Protoparvovirus*. Các nhánh trên cây đều đạt giá trị bootstrap cao (phần lớn đạt 100),

qua đó khẳng định độ tin cậy của phép phân nhóm và tính ổn định của mô hình tiến hóa được suy luận. Sự tách biệt đặc trưng của từng type phù hợp với hệ thống phân loại hiện hành dựa trên đặc điểm di truyền, cấu trúc capsid và đặc tính gây bệnh của virus.

Trong cấu trúc cây phả hệ, toàn bộ sáu chủng PPV phân lập trong nghiên cứu (DH10–Thaibinh, TX7–Thanhhoa, PC7–Binhding, EK18–Daklak, VC5–Dongnai, BC11–Binhduong) đều thuộc cụm PPV1 và được sắp xếp thành một nhánh con với giá trị bootstrap tuyệt đối (100). Các chủng này có quan hệ gần gũi với nhiều chủng PPV1 đại diện quốc tế, bao gồm Kresse (U44978), PPV1-HuB78-2017 (MN326129) và PPV1-0225-L-SD (OQ750579). Kết quả phân tích cây phả hệ cho thấy:

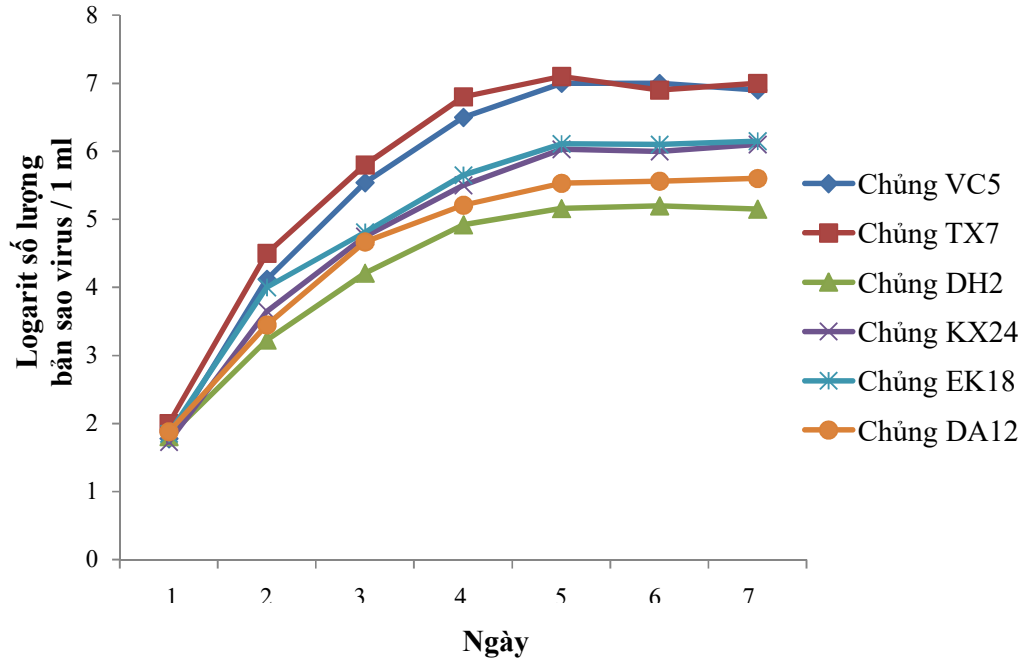
- Các chủng PPV phân lập tại Việt Nam có mức độ tương đồng di truyền cao, gợi ý khả năng các chủng này phát sinh từ một nguồn gốc chung hoặc cùng lưu hành trong một quần thể virus tương đối ổn định trong thời gian dài.
- Không ghi nhận sự phân ly đáng kể trong cấu trúc di truyền của gen VP2 giữa các chủng PPV1 Việt Nam. Điều này chỉ ra rằng áp lực chọn lọc lên VP2 có thể đang ở mức thấp, hoặc quần thể virus PPV1 lưu hành trong đàn lợn tại Việt Nam chưa chịu tác động mạnh từ miễn dịch quần thể, thực hành phòng bệnh, hoặc áp lực dịch tễ từ bên ngoài.
- Sự gần gũi về mặt di truyền giữa các chủng PPV1 Việt Nam và các chủng lưu hành tại Trung Quốc phản ánh khả năng tồn tại các mối liên hệ dịch tễ khu vực, phù hợp với xu hướng lan truyền PPV1 tại châu Á trong những năm gần đây.

Các kết quả trên cho thấy không có bằng chứng về sự phân tách thành nhiều dòng tiến hóa khác biệt trong quần thể PPV1 tại Việt Nam. Điều này góp phần củng cố nhận định rằng nguy cơ giảm hiệu quả vắc xin do biến dị kháng nguyên trên VP2 hiện đang ở mức thấp.

3.1.4. Xác định một số đặc tính sinh học của các chủng Parvovirus

3.1.4.1. Xác định biểu đồ sinh trưởng của PPV trên tế bào PK-15

Sau khi tiến hành khảo sát sự nhân lên của các chủng PPV phân lập được, biểu đồ sinh trưởng của 32 chủng virus đã được xác định trên dòng tế bào PK-15. Kết quả cho thấy virus bắt đầu nhân lên rõ rệt từ ngày 1 đến ngày 4 sau gây nhiễm, đạt đỉnh sinh trưởng vào ngày thứ 5, sau đó duy trì ổn định từ ngày 5 đến ngày 7 (Hình 3.10).



Hình 3.10. Biểu đồ sinh trưởng của một số chủng PPV phân lập được

Dựa trên kết quả biểu đồ sinh trưởng, thời điểm thu hoạch virus thích hợp nhất được xác định là ngày thứ 5 sau khi gây nhiễm trong điều kiện chuẩn hóa: gây nhiễm với tỷ lệ $MOI = 0,01$, sử dụng môi trường E-MEM bổ sung 5% huyết thanh bê thai (FBS) và 1% Penicillin–Streptomycin, ủ ở $37^{\circ}C$ trong điều kiện 5% CO_2 . Ở thời điểm này, hiệu giá virus đạt mức cao nhất và ổn định, đảm bảo thu được lượng virus tối đa với chất lượng sinh học tốt. Kết quả này là cơ sở quan trọng cho việc xác định thời điểm thu hoạch virus tối ưu, phục vụ cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.1.4.2. Xác định hiệu giá $TCID_{50}$

Toàn bộ 32 chủng PPV được phân lập thành công trong nghiên cứu này đã được tiến hành xác định hiệu giá $TCID_{50}$. Đây là bước quan trọng nhằm định lượng chính xác khả năng gây nhiễm của virus trên tế bào cảm thụ, đồng thời cung cấp dữ liệu cơ sở cho các thí nghiệm tiếp theo liên quan đến đánh giá độc lực và khả năng sinh miễn dịch của các chủng virus. Kết quả xác định hiệu giá $TCID_{50}$ của các chủng Parvovirus được trình bày chi tiết tại Bảng 3.4.

Bảng 3.4. Kết quả xác định TCID₅₀ của các chủng PPV

Tỉnh	Mẫu	Hiệu giá trung bình logTCID ₅₀ /1mL $\pm$ SD (n = 3)	Nhóm so sánh trung bình Turkey* (95% CI, n = 3)
Thái Bình	ĐH2	5.1 $\pm$ 0.1	D
	ĐH4	4.6 $\pm$ 0.1	E
	ĐH11	5.4 $\pm$ 0.1	C
	ĐH15	4.5 $\pm$ 0.0	E
Thanh Hóa	KX24	6.1 $\pm$ 0.1	A, B
	TS8	4.5 $\pm$ 0.0	E
Thanh Hóa	TX7	6.3 $\pm$ 0.0	A
	TX13	4.6 $\pm$ 0.1	E
Bình Định	PM21	5.1 $\pm$ 0.1	D
	PM27	4.5 $\pm$ 0.0	E
	PC7	5.5 $\pm$ 0.1	C
	PC15	4.5 $\pm$ 0.0	E
Đắk Lắk	EK18	4.5 $\pm$ 0.0	E
	EK20	4.5 $\pm$ 0.0	E
	EK27	5.5 $\pm$ 0.1	C
	EK31	4.6 $\pm$ 0.1	E
	MD22	4.6 $\pm$ 0.1	E
	MD28	4.6 $\pm$ 0.1	E
Đồng Nai	VC5	6.3 $\pm$ 0.0	A
	VC10	6 $\pm$ 0.1	B
	VC15	4.5 $\pm$ 0.0	E
	VC32	5.1 $\pm$ 0.1	D
	LT23	4.5 $\pm$ 0.0	E
	LT32	4.5 $\pm$ 0.0	E
	LT36	5 $\pm$ 0.0	D

Tỉnh	Mẫu	Hiệu giá trung bình logTCID ₅₀ /1mL ± SD (n = 3)	Nhóm so sánh trung bình Turkey* (95% CI, n = 3)
Bình Dương	DA6	4.6 ± 0.1	E
	DA12	5.5 ± 0.1	C
	DA27	4.5 ± 0.0	E
	BC2	5 ± 0.0	D
	BC4	4.5 ± 0.0	E
	BC11	6 ± 0.1	B
	BC15	4.5 ± 0.0	E

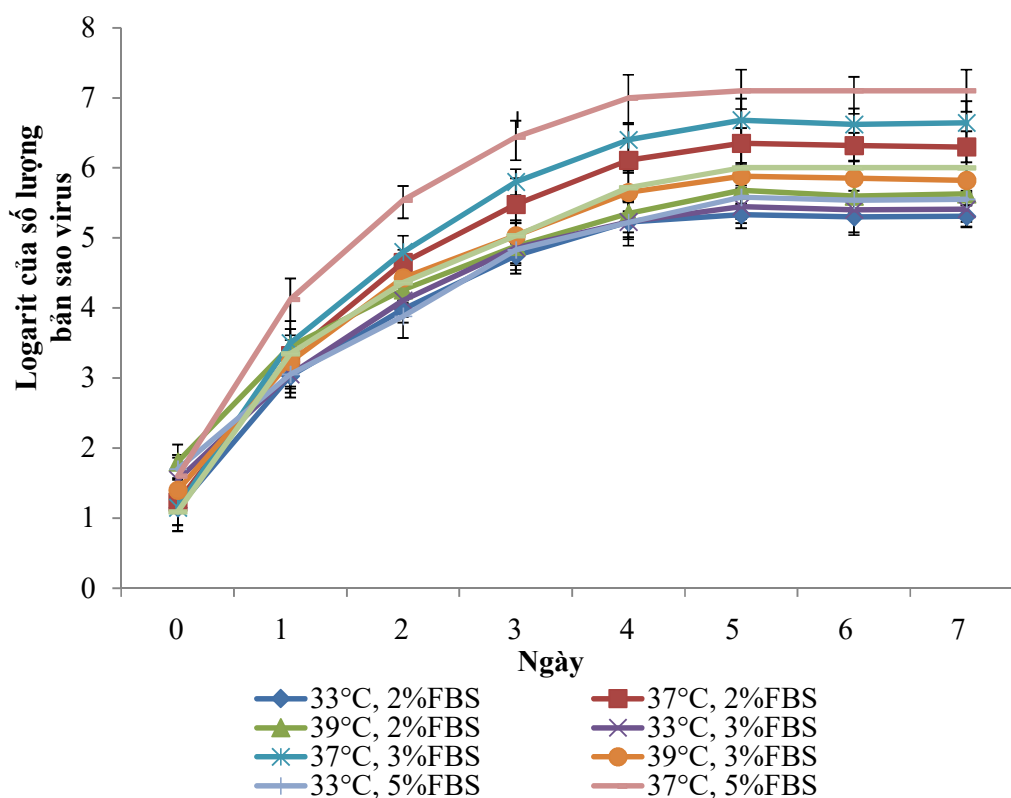
* p < 0,001

Hiệu giá logTCID₅₀/mL của các chủng dao động từ 4,5 đến 6,3. Kết quả phân tích thống kê (Phụ lục 12) cho thấy sự khác biệt về hiệu giá trung bình logTCID₅₀/1mL giữa các mẫu virus là có ý nghĩa thống kê rõ rệt (F = 222,24; p < 0,001). Phép so sánh cặp Tukey cũng cho thấy các mẫu được phân nhóm thành các mức hiệu giá khác nhau, phản ánh khả năng nhân lên không đồng đều trên tế bào cảm thụ. Đặc biệt, hai mẫu VC5 và TX7 đạt hiệu giá trung bình cao nhất (6,3 log TCID₅₀/1mL), được xếp riêng trong nhóm A và khác biệt có ý nghĩa so với phần lớn các mẫu còn lại. Điều này chứng tỏ rằng các chủng virus này có khả năng tăng sinh mạnh mẽ, vượt trội so với nhóm mẫu trung bình (5,0–5,5 logTCID₅₀/1mL) và đặc biệt là nhóm mẫu có hiệu giá thấp (4,5–4,6 logTCID₅₀/1mL). Giá trị này tương đương với hiệu giá của một số chủng PPV đã được sử dụng trong các nghiên cứu về vắc xin.

Như vậy, hai chủng VC5 và TX7 đạt được hiệu quả nuôi cấy tốt, có thể được lựa chọn để nghiên cứu độc lực và tính sinh miễn dịch trên lợn nái.

3.1.4.3. Xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp

Với kết quả Realtime-PCR và đường chuẩn (Phụ lục 3), số lượng bản sao virus mỗi thời điểm thu mẫu được xác định. Kết quả đó được ghi nhận và xây dựng biểu đồ như trong hình 3.11.



Hình 3.11. Biểu đồ khảo sát điều kiện nuôi cấy thích hợp

Từ biểu đồ (Hình 3.11) và kết quả phân tích mô hình tuyến tính tổng quát bằng phần mềm Minitab18 (Phụ lục 10) cho thấy cả hai yếu tố nhiệt độ và nồng độ huyết thanh FBS đều có ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê đến mức độ sao chép của virus ($P < 0,001$ đối với từng yếu tố). Đồng thời, mối tương quan giữa % FBS và nhiệt độ là tương tác có ý nghĩa ($P < 0,001$), phản ánh rõ ràng vai trò phối hợp của hai điều kiện này trong việc điều hòa quá trình nhân lên của virus.

Nhiệt độ nuôi cấy là yếu tố có tác động cao hơn ($F = 175,25$) so với % FBS ($F = 23,64$) đối với quá trình nhân lên của virus. Nhiệt độ 37°C được xác định là nhiệt độ thích hợp nhất cho điều kiện nuôi cấy virus. Kết quả so sánh trung bình theo phương pháp Tukey cho thấy nhóm nhiệt độ 37°C có giá trị logarit số lượng bản sao virus cao nhất (5,31500) so với các nhóm 39°C (4,65958) và 33°C (4,35153), khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Theo phân tích hồi quy với nhiệt độ mặc định 39°C làm mốc, hệ số hồi quy tại 37°C đạt + 0,5396, trong khi hệ số hồi quy tại 33°C là -0,4238.

Xét trên ảnh hưởng của nồng độ FBS, nồng độ FBS 5% là điều kiện thuận lợi nhất cho sự nhân lên của virus. Kết quả phân tích trung bình theo phương pháp Tukey cho

thấy cho thấy nồng độ 5% FBS mang lại hiệu quả sao chép cao nhất (trung bình 4,96597), cao hơn rõ rệt so với 3% (4,75361) và 2% (4,60653), với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Theo phân tích hồi quy với 5%FBS làm điều kiện mặc định, hệ số hồi quy tại 2%FBS và 3%FBS đều đạt hệ số âm, lần lượt là -0,1688 và -0,0218.

Mối tương quan giữa % FBS và nhiệt độ là tương tác có ý nghĩa với $F = 7,75$ và $P = 0,000$. Tương tác giữa nhiệt độ và nồng độ FBS cho thấy sự ảnh hưởng tổng hợp của hai yếu tố này đối với sự nhân lên của virus. Tổ hợp điều kiện 37°C và 5% FBS tạo ra mức độ sao chép cao nhất, với giá trị trung bình logarit đạt 5,73750, vượt trội so với các tổ hợp khác. Trong khi đó, tổ hợp 33°C và 2% FBS cho kết quả thấp nhất (4,26208). Các tổ hợp có điều kiện trung gian như 39°C – 3% FBS hoặc 33°C – 5% FBS cho thấy mức độ sao chép thấp hơn rõ rệt. Tại nhiệt độ 39°C và 33°C, 5% FBS, mặc dù sử dụng nồng độ FBS tối đa nhưng nhiệt độ không thích hợp vẫn làm giảm khả năng nhân lên của virus, giá trị trung bình logarit bản sao virus lần lượt là 4,74000 (thuộc nhóm C trong phân loại Turkey) và 4,42042 (thuộc nhóm E trong phân loại Turkey). Kết quả này cho thấy chỉ một yếu tố thuận lợi là chưa đủ để thích hợp nhất hóa quá trình nhân lên của virus. FBS chỉ phát huy tối đa hiệu quả khi ở mức nhiệt độ thích hợp.

Như vậy, điều kiện nuôi cấy thích hợp nhất cho sự nhân lên của PPV được xác định trong nghiên cứu này là 37°C, 5% FBS. Điều kiện nuôi cấy này cũng đã được nhiều nghiên cứu trên thế giới về PPV sử dụng (Streck và cộng sự, 2013; Zhang và cộng sự 2022; Zhang và cộng sự, 2015).

Dựa trên kết quả phân tích trình tự gen và đặc tính sinh học, hai chủng VC5 và TX7 cho thấy sự ổn định về mặt di truyền cũng như khả năng phát triển vượt trội hơn các chủng khác khi nuôi cấy trên dòng tế bào PK-15 (Bảng 3.2) và khả năng xâm nhiễm vào tế bào cảm thụ tốt thể hiện qua hiệu giá $TCID_{50}$ cao (Bảng 3.4). Do đó, hai chủng VC5 và TX7 được lựa chọn để tiếp tục đánh giá độ ổn định về đặc tính sinh học và đặc tính di truyền cũng như độc lực và khả năng đáp ứng miễn dịch.

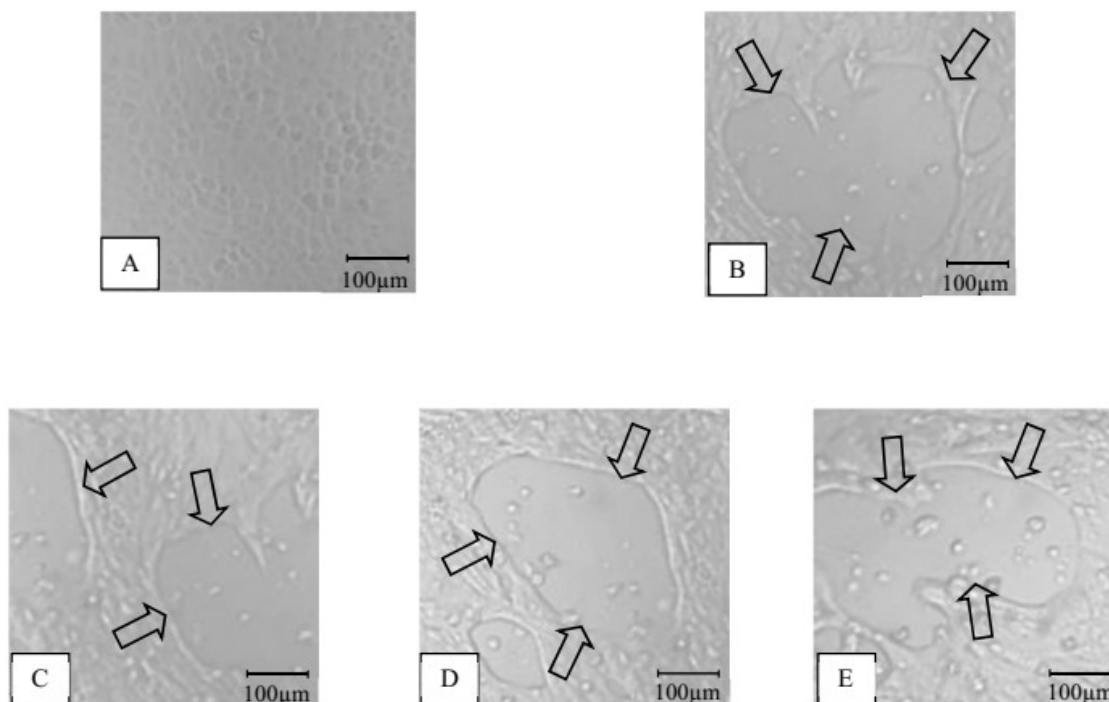
3.1.5. Đánh giá sự ổn định, độc lực và tính sinh miễn dịch của hai chủng VC5 và TX7

3.1.5.1. Đánh giá sự ổn định của hai chủng VC5 và TX7

a) Đánh giá sự ổn định về đặc tính sinh học

*** Đặc điểm nuôi cấy dựa trên quan sát bệnh tích tế bào**

Quá trình đánh giá sự ổn định về đặc tính sinh học của hai chủng virus VC5 và TX7 được tiến hành thông qua quan sát hình thái bệnh tích tế bào trên dòng tế bào PK-15 qua các đời cấy chuyển lần lượt là 1, 5, 10 và 15. Sau 5 ngày gây nhiễm, các bệnh tích tế bào điển hình được ghi nhận rõ rệt đối với cả hai chủng (Hình 3.12 và Hình 3.13).



**Hình 3.12. CPE trên tế bào PK-15 sau 5 ngày gây nhiễm chủng TX7
dưới kính hiển vi soi ngược độ phóng đại 10X**

A: Tế bào PK-15 không gây nhiễm virus sau 5 ngày

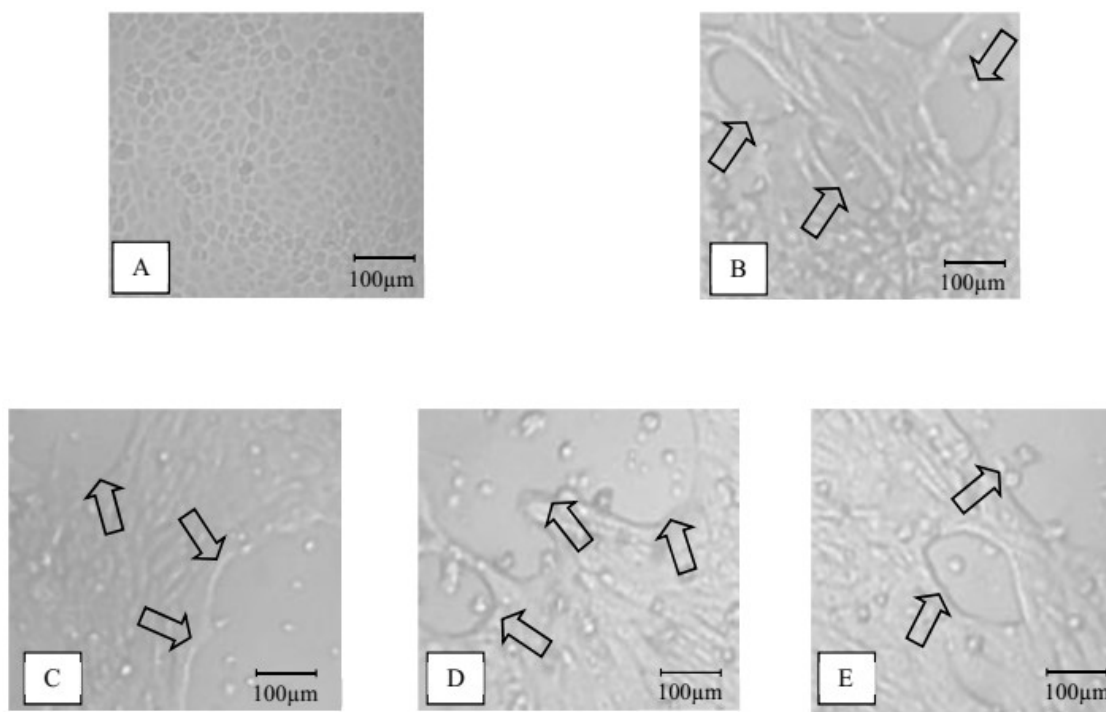
B: Bệnh tích trên tế bào PK-15 khi được gây nhiễm virus sau 5 ngày, đời nuôi cấy 01.

C: Bệnh tích trên tế bào PK-15 khi được gây nhiễm virus sau 5 ngày, đời nuôi cấy 05.

D: Bệnh tích trên tế bào PK-15 khi được gây nhiễm virus sau 5 ngày, đời nuôi cấy 10.

E: Bệnh tích trên tế bào PK-15 khi được gây nhiễm virus sau 5 ngày, đời nuôi cấy 15.

Mũi tên: Tế bào đã bị virus xâm nhiễm và gây phá hủy tế bào tạo nên những khoảng trống trên bề mặt nuôi cấy.



Hình 3.13. CPE trên tế bào PK-15 sau 5 ngày gây nhiễm chủng VC5 dưới kính hiển vi soi ngược độ phóng đại 10X

A: Tế bào PK-15 không gây nhiễm virus sau 5 ngày

B: Bệnh tích trên tế bào PK-15 khi được gây nhiễm virus sau 5 ngày, đời nuôi cấy 01.

C: Bệnh tích trên tế bào PK-15 khi được gây nhiễm virus sau 5 ngày, đời nuôi cấy 05.

D: Bệnh tích trên tế bào PK-15 khi được gây nhiễm virus sau 5 ngày, đời nuôi cấy 10.

E: Bệnh tích trên tế bào PK-15 khi được gây nhiễm virus sau 5 ngày, đời nuôi cấy 15.

Mũi tên: Tế bào đã bị virus xâm nhiễm và gây phá hủy tế bào tạo nên những khoảng trống trên bề mặt nuôi cấy

Kết quả cho thấy, hai chủng VC5 và TX7 đều duy trì ổn định khả năng xâm nhiễm, nhân lên và gây bệnh tích đặc trưng trên tế bào PK-15 qua 15 đời cấy chuyển liên tiếp. Sự bảo tồn các đặc điểm hình thái của CPE qua nhiều lần cấy chuyển phản ánh tính ổn định di truyền và khả năng thích ứng của virus trong điều kiện nuôi cấy in vitro.

Các biểu hiện CPE quan sát được bao gồm hiện tượng tạo hạt trong bào tương, biến dạng tế bào, co cụm và bóc tách khỏi bề mặt bình nuôi, dẫn đến hình thành các khoảng trống rõ rệt trong lớp tế bào đơn. Những đặc điểm này phù hợp với các mô tả

kinh điển về tác động gây bệnh tế bào của PPV trên dòng PK-15 (Wang và cộng sự, 2024; Zhang và cộng sự, 2015).

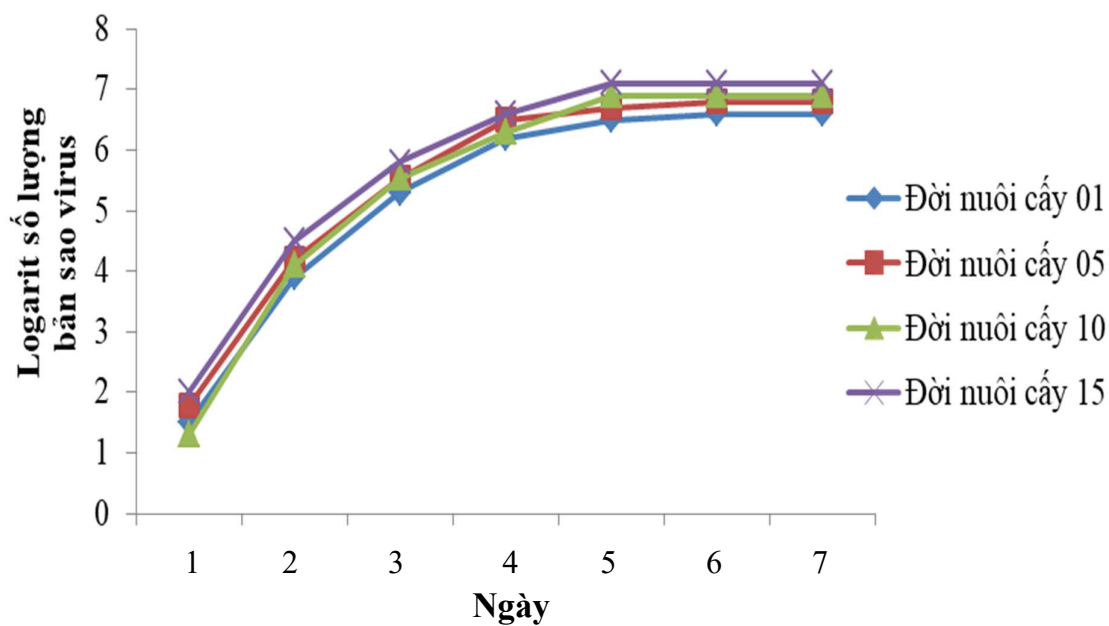
Như vậy, hai chủng VC5 và TX7 duy trì ổn định các đặc điểm CPE đặc trưng qua nhiều đời cấy chuyển. Điều này chứng minh khả năng nhân lên ổn định, tính di truyền bền vững và sự thích ứng tốt với dòng tế bào PK-15.

*** Biểu đồ sinh trưởng qua các đời nuôi cấy**

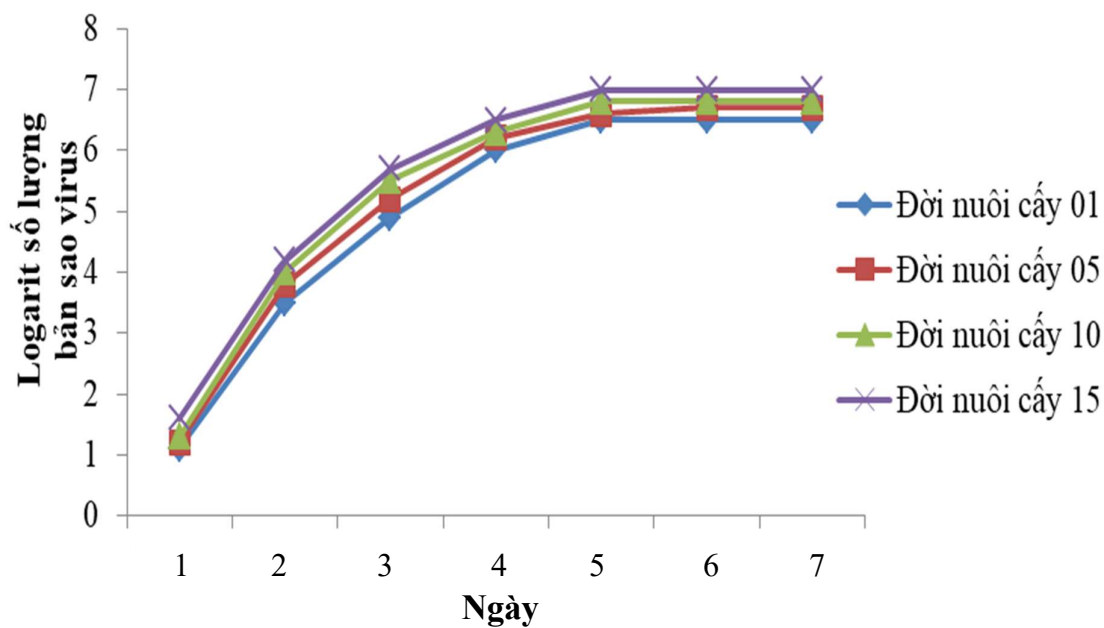
Biểu đồ sinh trưởng của hai chủng PPV TX7 và VC5 được xác định tại các đời cấy chuyển 1, 5, 10 và 15 (Hình 3.14 và Hình 3.15). Kết quả theo dõi khả năng nhân lên của virus cho thấy cả hai chủng đều tuân theo quy luật tăng trưởng đặc trưng của PPV trong điều kiện nuôi cấy in vitro. Cụ thể, virus bắt đầu nhân lên rõ rệt từ ngày thứ nhất sau gây nhiễm, tốc độ tăng nhanh trong giai đoạn từ ngày 1 đến ngày 4, đạt đỉnh sinh trưởng vào ngày thứ 5, sau đó duy trì trạng thái ổn định từ ngày 5 đến ngày 7.

Sự tương đồng về hình thái biểu đồ sinh trưởng giữa các đời cấy chuyển chứng tỏ rằng khả năng nhân lên của hai chủng TX7 và VC5 không bị ảnh hưởng qua quá trình cấy chuyển nối tiếp. Việc duy trì biểu đồ sinh trưởng ổn định qua 15 đời cấy chuyển cho thấy hai chủng virus có khả năng thích nghi tốt với dòng tế bào cảm thụ, đồng thời không xuất hiện dấu hiệu suy giảm khả năng nhân lên hoặc biến đổi trong đặc điểm tăng trưởng.

Tính ổn định về biểu đồ sinh trưởng của hai chủng VC5 và TX7 là một chỉ báo quan trọng phản ánh sự bền vững di truyền và sinh học của virus trong điều kiện nuôi cấy liên tục. Đây là tiêu chí cần thiết để xác định tính phù hợp của chủng làm nguyên liệu gốc trong các nghiên cứu về độc lực, tính sinh miễn dịch và ứng dụng trong sản xuất vắc xin PPV.



Hình 3.14. Biểu đồ sinh trưởng PPV sau 15 đời nuôi cấy chủng TX7



Hình 3.15. Biểu đồ sinh trưởng PPV sau 15 đời nuôi cấy chủng VC5

*** Hiệu giá TCID₅₀ qua các đời nuôi cấy**

Hiệu giá TCID₅₀ của hai chủng PPV TX7 và VC5 tại các đời cấy chuyển 1, 5, 10 và 15 được trình bày trong Bảng 3.5.

**Bảng 3.5. Kết quả xác định TCID₅₀ của hai chủng
TX7 và VC5 qua các đời nuôi cấy**

Chủng TX7		Chủng VC5	
Đời nuôi cấy	Hiệu giá trung bình (logTCID ₅₀ /1mL)	Đời nuôi cấy	Hiệu giá trung bình (logTCID ₅₀ /1mL)
01	6,3	01	6,3
05	6,4	05	6,4
10	6,5	10	6,5
15	6,5	15	6,5

Kết quả cho thấy hiệu giá trung bình của cả hai chủng VC5 và TX7 duy trì ổn định trong khoảng hẹp từ 6,3 đến 6,5 logTCID₅₀/mL qua 15 đời cấy chuyển liên tiếp. Kết quả này cho thấy khả năng nhân lên và gây nhiễm của hai chủng virus được duy trì bền vững trong điều kiện in vitro.

Sự ổn định của hiệu giá TCID₅₀ phản ánh năng lực xâm nhiễm ổn định của virus đối với tế bào cảm thụ PK-15, đồng thời chứng minh rằng quá trình cấy chuyển liên tục không làm suy giảm độc lực tế bào của virus.

Khi tổng hợp với các kết quả về biểu đồ sinh trưởng và đặc điểm CPE, hiệu giá TCID₅₀; có thể khẳng định rằng hai chủng VC5 và TX7 thể hiện tính ổn định sinh học vượt trội qua nhiều đời nuôi cấy. Hiệu giá TCID₅₀ ổn định, cùng với khả năng duy trì các bệnh tích tế bào đặc trưng đến đời thứ 15, là minh chứng cho sự thích nghi tốt của virus với dòng tế bào PK-15. Đây là tiêu chí quan trọng để đánh giá độ ổn định của chủng virus dùng làm giống gốc, góp phần khẳng định tính phù hợp của hai chủng VC5 và TX7 trong các nghiên cứu tiếp theo về độc lực, tính sinh miễn dịch và phát triển vắc xin phòng bệnh parvo ở lợn.

b) Đánh giá sự ổn định về đặc tính di truyền

❖ Đánh giá sự ổn định gen NS1

Để đánh giá mức độ ổn định di truyền của hai chủng PPV VC5 và TX7 qua các đời cây chuyển liên tiếp, một đoạn gen dài 330 bp nằm trong khoảng từ vị trí nucleotide 1.453 đến 1.782 trên gen NS1 đã được lựa chọn làm vùng khảo sát. Theo Lyoo và cộng sự (2001), đây là vùng gen có mức độ bảo tồn cao giữa các chủng PPV khác nhau, mã hóa cho protein phi cấu trúc NS1 – yếu tố trung tâm trong quá trình nhân lên, điều hòa biểu hiện gen và tái bản DNA của virus.

Kết quả phân tích trình tự gen NS1 sau 15 đời nuôi cấy liên tiếp cho thấy không phát hiện bất kỳ biến đổi nào về nucleotide hay axit amin trong vùng được khảo sát ở cả hai chủng VC5 và TX7 (Phụ lục 17). Sự duy trì hoàn toàn tính đồng nhất về trình tự qua nhiều thế hệ nuôi cấy phản ánh mức độ ổn định di truyền cao của hai chủng virus. Điều này đồng thời hàm ý rằng các cơ chế sao chép và sửa lỗi DNA của PPV được bảo toàn trong điều kiện nuôi cấy in vitro, không tạo ra áp lực chọn lọc đủ mạnh để thúc đẩy tích lũy đột biến.

Sự ổn định của vùng gen NS1 không chỉ có giá trị về mặt di truyền học, mà còn củng cố bằng chứng cho tính ổn định sinh học đã được ghi nhận ở phần trên, bởi gen này đóng vai trò thiết yếu trong việc điều hòa quá trình nhân lên của virus trong tế bào cảm thụ. Do đó, việc không xuất hiện đột biến trong NS1 có thể được xem là chỉ dấu quan trọng cho thấy khả năng sao chép và gây nhiễm của virus vẫn được duy trì ổn định qua 15 đời cây chuyển.

❖ Đánh giá sự ổn định gen VP2

Gen VP2 mã hóa protein cấu trúc chủ yếu của capsid PPV, chịu trách nhiệm hình thành khung bao virus, quyết định tính đặc hiệu kháng nguyên và là yếu tố trung tâm trong cơ chế gây miễn dịch bảo hộ (Simpson và cộng sự, 2002; Streck và cộng sự, 2011). Do đó, bất kỳ biến đổi nào trong trình tự gen này đều có thể ảnh hưởng đáng kể đến độc lực, khả năng nhân lên cũng như hiệu quả nhận diện kháng nguyên của virus. Việc xác định sự ổn định của gen VP2 vì vậy có ý nghĩa quan trọng trong đánh giá tiềm năng ứng dụng của chủng virus trong nghiên cứu và sản xuất vắc xin.

Kết quả phân tích trình tự gen VP2 của hai chủng VC5 và TX7 sau 15 đời cấy chuyển liên tiếp cho thấy không xuất hiện bất kỳ biến đổi nào về trình tự nucleotide hoặc axit amin trong vùng gen được khảo sát (Phụ lục 17). Dữ liệu này khẳng định hai chủng PPV phân lập tại Việt Nam duy trì sự ổn định di truyền cao của gen cấu trúc chủ chốt, ngay cả sau nhiều vòng nhân lên trong điều kiện in vitro.

Sự ổn định đồng thời của cả hai vùng gen – NS1 (phi cấu trúc) và VP2 (cấu trúc) – chứng minh rằng hai chủng VC5 và TX7 đáp ứng đầy đủ các tiêu chuẩn của một chủng virus ổn định về mặt di truyền.

Tổng hợp các kết quả phân tích về đặc tính sinh học và di truyền cho thấy hai chủng PPV VC5 và TX7 đều duy trì tính ổn định cao sau 15 đời nuôi cấy liên tiếp trên dòng tế bào PK-15. Cụ thể, các chỉ tiêu về hình thái tế bào cảm nhiễm, biểu đồ sinh trưởng, hiệu giá TCID₅₀ và trình tự gen ở hai vùng mã hóa NS1 và VP2 đều cho thấy sự nhất quán, không xuất hiện biến đổi về kiểu hình hay kiểu gen. Sự ổn định này phản ánh khả năng thích nghi bền vững của hai chủng virus trong điều kiện nuôi cấy in vitro, đồng thời đảm bảo duy trì các đặc tính quan trọng liên quan đến khả năng nhân lên, độc lực và sinh miễn dịch. Trên cơ sở đó, hai chủng VC5 và TX7 được xác định là các chủng ứng viên có giá trị khoa học và thực tiễn, cần được tiếp tục đánh giá chuyên sâu về độc lực trên động vật cảm thụ và khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch đặc hiệu, nhằm phục vụ định hướng ứng dụng trong nghiên cứu, sản xuất vắc xin phòng bệnh parvo ở lợn.

3.1.5.2. Đánh giá độc lực của hai chủng VC5 và TX7

Hiệu giá HI được xác định ở các thời điểm 0, 7, 14, 21 và 49 ngày sau gây nhiễm, với kết quả được trình bày tại Bảng 3.6. Phân tích dữ liệu (Phụ lục 13) cho thấy hiệu giá HI trên lợn nái mang thai sau gây nhiễm biến động rõ rệt theo thời gian và khác biệt đáng kể giữa các nhóm thí nghiệm. Cả ba yếu tố “nhóm”, “thời gian” và tương tác “nhóm × thời gian” đều đạt ý nghĩa thống kê cao ($p < 0,001$). Hệ số xác định $R^2 = 98,73\%$ cho thấy mô hình thống kê được sử dụng có khả năng giải thích phần lớn biến thiên dữ liệu, phản ánh mức độ tin cậy cao của kết quả đo lường

Bảng 3.6. Hiệu giá HI trên lợn nái mang thai sau khi gây nhiễm virus

Nhóm	Hiệu giá trung bình HI trong huyết thanh lợn mẹ ($\log_2$) $\pm$ SD				
	Ngày 0 (n = 9)	Ngày 7 (n = 9)	Ngày 14 (n = 9)	Ngày 21 (n = 9)	Ngày 49 (n = 9)
TX7	0 $\pm$ 0,00	5,33 $\pm$ 0,87	8,33 $\pm$ 0,87	11,33 $\pm$ 0,71	10 $\pm$ 0,71
VC5	0 $\pm$ 0,00	4,67 $\pm$ 0,71	7,67 $\pm$ 0,71	10,67 $\pm$ 0,71	9,67 $\pm$ 0,71
Đối chứng	0 $\pm$ 0,00	0 $\pm$ 0,00	0 $\pm$ 0,00	0 $\pm$ 0,00	0 $\pm$ 0,00

Ở thời điểm ngày 7 sau gây nhiễm, kháng thể đặc hiệu đã được ghi nhận với hiệu giá trung bình 4,67 $\log_2$ ở nhóm VC5 và 5,33 $\log_2$ ở nhóm TX7, trong khi nhóm đối chứng vẫn ở mức 0. Sự tăng mạnh ở tuần thứ nhất cho thấy cả hai chủng virus đều có khả năng nhân lên hiệu quả và kích thích đáp ứng miễn dịch dịch thể sớm. Hiệu giá tiếp tục tăng và đạt đỉnh vào ngày 21, với 10,67 $\log_2$ ở nhóm VC5 và 11,33 $\log_2$ ở nhóm TX7; đây là những giá trị cao nhất trong toàn bộ thí nghiệm. Phân tích Tukey pairwise chỉ ra rằng tại ngày 21, TX7 có hiệu giá trung bình cao nhất (11,33 $\log_2$, nhóm A), kế đến là VC5 (10,67 $\log_2$, nhóm A–B), trong khi nhóm đối chứng hoàn toàn không có đáp ứng kháng thể (0 $\log_2$, nhóm F).

Đến ngày 49, hiệu giá HI ở cả hai nhóm thí nghiệm giảm nhẹ nhưng vẫn duy trì ở mức cao (9,67 $\log_2$ ở VC5 và 10,0 $\log_2$ ở TX7), cao hơn rõ rệt so với các thời điểm trước ($p < 0,001$). Điều này cho thấy đáp ứng miễn dịch không chỉ được hình thành nhanh chóng mà còn bền vững trong thời gian dài. Kết quả phân tích Tukey đối với yếu tố “thời gian” khẳng định ngày 21 có hiệu giá trung bình cao nhất (7,33 $\log_2$, nhóm A), kế đến là ngày 49 (6,56 $\log_2$, nhóm B), trong khi ngày 0 hoàn toàn âm tính (0 $\log_2$, nhóm E). Kết quả cho thấy, kháng thể hình thành nhanh chóng từ ngày thứ 7, đạt đỉnh vào ngày 21 và kéo dài đến ngày thứ 49.

Bảng 3.7. Khả năng sống và sự có mặt của PPV trong bào thai sau gây nhiễm virus

Khả năng sống của thai lợn sau công cường độc							
Nhóm thí nghiệm	Chủng virus	Thứ tự lợn	Tổng số	Sống	Chết		Số bào thai dương tính với PPV
					Không có biểu hiện khô thai	Có biểu hiện khô thai	
1	TX7	1	5	0	1	4	5
		2	6	0	2	4	5
		3	6	0	2	4	5
		Tổng số	17	0	5	12	15
		Tỷ lệ (%)	100	0	29	71	88
2	VC5	4	7	0	1	6	7
		5	5	0	1	4	5
		6	8	0	2	6	6
		Tổng số	20	0	4	16	18
		Tỷ lệ (%)	100	0	20	80	90
3	Không gây nhiễm virus	7	8	8	0	0	0
		8	6	6	0	0	0
		9	5	5	0	0	0
		Tổng số	19	19	0	0	0
		Tỷ lệ (%)	100	100	0	0	0

Kết quả đánh giá khả năng sống của thai lợn sau khi gây nhiễm thực nghiệm với hai chủng Parvovirus VC5 và TX7 được trình bày trong Bảng 3.7. Kết quả cho thấy nhóm đối chứng (tiêm PBS) có 100% thai phát triển bình thường, bề ngoài hồng hào, đồng đều về kích thước, không ghi nhận bất kỳ bất thường đại thể nào. Ngược lại, ở hai nhóm gây nhiễm virus, toàn bộ số thai đều chết, phản ánh độc lực cao của cả hai chủng PPV. Đáng chú ý, 71% số thai ở nhóm TX7 và 80% số thai ở nhóm VC5 biểu hiện bệnh tích điển hình, bao gồm: biến đổi màu sắc thành nâu sẫm hoặc đen, hiện tượng mất nước

khíến bào thai khô, nhăn nheo (Hình 3.16). Các đặc điểm bệnh tích này tương đồng với mô tả kinh điển về tổn thương bào thai trong nhiễm PPV cấp tính, phản ánh rõ rệt khả năng xâm nhập và nhân lên mạnh mẽ của virus trong mô thai.



Hình 3.16. Bệnh tích trên bào thai lợn sau gây nhiễm virus

Kết quả xét nghiệm sinh học phân tử khẳng định sự hiện diện của PPV trong 88–90% mẫu thai thuộc hai nhóm gây nhiễm, trong khi toàn bộ mẫu thuộc nhóm đối chứng âm tính tuyệt đối. Sự trùng khớp giữa kết quả bệnh tích và phát hiện gen virus chứng minh tính đặc hiệu của quá trình gây nhiễm, đồng thời khẳng định độc lực cao của hai chủng VC5 và TX7 trên đối tượng lợn nái mang thai.

Những kết quả này cung cấp bằng chứng xác thực cho thấy cả hai chủng PPV không chỉ duy trì ổn định về đặc tính sinh học và di truyền mà còn thể hiện khả năng gây bệnh mạnh trên vật chủ là lợn nái mang thai.

3.1.5.3. Đánh giá khả năng sinh miễn dịch của hai chủng VC5 và TX7

a) Đánh giá khả năng sinh miễn dịch của hai chủng VC5 và TX7 trên chuột lang

Kết quả đánh giá khả năng sinh miễn dịch của hai chủng PPV VC5 và TX7 được thể hiện trong Bảng 3.8 và Phụ lục 14 cho thấy cả hai chủng đều kích thích đáp ứng

miễn dịch dịch thể mạnh mẽ và ổn định trên động vật thí nghiệm. Hiệu giá HI tăng rõ rệt sau khi tiêm, phản ánh khả năng nhân lên và cảm ứng miễn dịch hiệu quả của virus.

Hiệu giá HI trung bình có sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm thí nghiệm, số mũi tiêm và thời điểm lấy mẫu, với mức ý nghĩa thống kê cao ($p < 0,001$). Mô hình tuyến tính cho thấy hệ số xác định $R^2 = 96,21\%$, chứng minh tính nhất quán và độ phù hợp cao giữa các giá trị đo được. Sau mũi tiêm đầu tiên, kháng thể đặc hiệu đã được hình thành, và đạt đỉnh sau mũi tiêm thứ hai. Hiệu giá HI duy trì ở mức cao trong suốt thời gian theo dõi, cho thấy đáp ứng miễn dịch bền vững và lâu dài.

Bảng 3.8. Hiệu giá HI trên chuột lang sau tiêm vắc xin

Nhóm thí nghiệm	Hiệu giá HI trung bình ($\log_2$) $\pm$ SD						
	Sau tiêm mũi 1			Sau tiêm mũi 2			
	Ngày 0 (n = 15)	Ngày 7 (n = 15)	Ngày 14 (n = 15)	Ngày 0 (n = 15)	Ngày 7 (n = 15)	Ngày 14 (n = 15)	Ngày 21 (n = 15)
TX7	$0 \pm 0,00$	$0,47 \pm 0,52$	$1,47 \pm 0,52$	$3,60 \pm 0,83$	$4,60 \pm 0,74$	$6,20 \pm 0,77$	$7,60 \pm 0,74$
VC5	$0 \pm 0,00$	$0,47 \pm 0,52$	$1,40 \pm 0,51$	$3,20 \pm 0,68$	$4,20 \pm 0,77$	$5,60 \pm 0,74$	$7,40 \pm 0,74$
Đối chứng	$0 \pm 0,00$	$0 \pm 0,00$	$0 \pm 0,00$	$0 \pm 0,00$	$0 \pm 0,00$	$0 \pm 0,00$	$0 \pm 0,00$

Sau mũi tiêm thứ nhất, hiệu giá HI chỉ tăng nhẹ, trung bình dao động từ 0,47–1,47 $\log_2$ ở cả hai chủng TX7 và VC5 trong khoảng thời gian 7–14 ngày sau tiêm. Đây là phản ứng miễn dịch nguyên phát điển hình, thường khởi phát chậm và đạt mức hiệu giá thấp do hệ thống miễn dịch chưa được hoạt hóa hoàn toàn. Phân tích thống kê bằng phép thử Tukey pairwise cho thấy nhóm tiêm một mũi chỉ đạt hiệu giá trung bình 0,91 $\log_2$ (nhóm B), thấp hơn rõ rệt so với nhóm tiêm hai mũi (3,53 $\log_2$, nhóm A), khẳng định vai trò hạn chế của đáp ứng nguyên phát trong việc hình thành miễn dịch bảo hộ.

Sau khi tiêm nhắc, hiệu giá HI tăng mạnh mẽ, thể hiện đặc trưng rõ nét của đáp ứng miễn dịch thứ cấp. Tại thời điểm ngày 0 trước khi tiêm nhắc, hiệu giá đã đạt 3,6 $\log_2$ đối với chủng TX7 và 3,2 $\log_2$ đối với VC5, phản ánh sự hình thành trí nhớ miễn

dịch sau liều đầu tiên. Trong giai đoạn 14–21 ngày sau mũi tiêm thứ hai, hiệu giá HI tiếp tục tăng nhanh, đạt mức cao nhất 6,2–7,6 log₂ (TX7) và 5,6–7,4 log₂ (VC5). Phân tích Tukey chỉ ra rằng nhóm TX7 tiêm hai mũi đạt hiệu giá trung bình cao nhất (5,5 log₂, nhóm A), tiếp đến là nhóm VC5 tiêm hai mũi (5,1 log₂, nhóm B), trong khi các nhóm tiêm một mũi chỉ đạt 1,3–1,4 log₂ (nhóm C). Nhóm đối chứng hoàn toàn âm tính trong suốt thời gian theo dõi (0 log₂, nhóm D). Sự khác biệt giữa nhóm tiêm hai mũi và nhóm tiêm một mũi có ý nghĩa thống kê rất cao ($p < 0,001$), chứng minh rõ ràng vai trò tăng cường miễn dịch của liều nhắc.

Xét theo yếu tố thời gian, hiệu giá HI đạt đỉnh tại ngày 21 (3,69 log₂, nhóm A), cao hơn đáng kể so với các thời điểm ngày 14 (2,44 log₂, nhóm B), ngày 7 (1,62 log₂, nhóm C) và ngày 0 (1,13 log₂, nhóm D). Kết quả này khẳng định rằng nồng độ kháng thể đạt mức tối đa vào khoảng ba tuần sau mũi tiêm nhắc lại – thời điểm phản ánh sự hoạt hóa mạnh mẽ của tế bào nhớ và quá trình biệt hóa tương bào sản xuất kháng thể đặc hiệu.

Đáng chú ý, trong suốt thời gian thí nghiệm, không ghi nhận bất kỳ biểu hiện lâm sàng bất thường hay phản ứng viêm tại vị trí tiêm trên chuột lang. Điều này chứng minh hai chủng virus TX7 và VC5 có tính an toàn sinh học cao, không gây độc tính hay phản ứng bất lợi trên động vật thay thế. Kết quả này cung cấp cơ sở khoa học vững chắc cho việc tiếp tục đánh giá tính sinh miễn dịch và hiệu lực bảo hộ của các chủng virus này trên đối tượng đích là lợn. Việc sàng lọc ban đầu bằng mô hình chuột lang không chỉ đảm bảo an toàn trong nghiên cứu mà còn góp phần tối ưu hóa quy trình phát triển vắc xin PPV, rút ngắn thời gian và giảm chi phí thử nghiệm trên quy mô lớn.

b) Đánh giá khả năng sinh miễn dịch của hai chủng VC5 và TX7 trên lợn

Để đánh giá khả năng sinh miễn dịch của hai chủng PPV (VC5 và TX7) trên động vật đích, thí nghiệm được tiến hành trên lợn với tiêm hai mũi vắc xin bất hoạt. Kháng thể kháng PPV trong huyết thanh được xác định bằng phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu tại các thời điểm ngày 0, 7, 14 ngày sau tiêm mũi thứ nhất và 0, 7, 14, 21 sau mũi tiêm thứ hai. Hiệu giá HI của các nhóm lợn thí nghiệm được thể hiện ở bảng 3.13. Kết quả HI (Bảng 3.9) cho thấy lợn miễn dịch có hiệu giá HI trung bình tăng dần. Sau mũi tiêm thứ nhất, hiệu giá HI trung bình chỉ đạt 1,56 log₂ và 1,44 log₂ với hai nhóm TX7 và VC5. Hiệu giá HI tăng nhanh sau khi tiêm mũi nhắc lại. Tại ngày thứ 21 sau mũi 2, hiệu giá HI trung bình đạt 7,33 log₂ với nhóm VC5; 7,67 log₂ với nhóm TX7. Trong

khi đó, suốt quá trình thí nghiệm, không phát hiện được kháng thể kháng PPV (HI=0) ở nhóm đối chứng PBS.

Bảng 3.9. Kết quả đánh giá kháng thể kháng PPV trên lợn bằng HI

Nhóm thí nghiệm	Hiệu giá HI trung bình ($\log_2$) $\pm$ SD						
	Sau tiêm mũi 1			Sau tiêm mũi 2			
	Ngày 0 (n = 9)	Ngày 7 (n = 9)	Ngày 14 (n = 9)	Ngày 0 (n = 9)	Ngày 7 (n = 9)	Ngày 14 (n = 9)	Ngày 21 (n = 9)
TX7	0 $\pm$ 0,00	0,56 $\pm$ 0,53	1,56 $\pm$ 0,53	3,67 $\pm$ 0,87	4,67 $\pm$ 0,87	6,33 $\pm$ 0,71	7,67 $\pm$ 0,87
VC5	0 $\pm$ 0,00	0,56 $\pm$ 0,53	1,44 $\pm$ 0,53	3,33 $\pm$ 0,71	4,33 $\pm$ 0,87	5,67 $\pm$ 0,87	7,33 $\pm$ 0,71
Đối chứng	0 $\pm$ 0,00	0 $\pm$ 0,00	0 $\pm$ 0,00	0 $\pm$ 0,00	0 $\pm$ 0,00	0 $\pm$ 0,00	0 $\pm$ 0,00

Kết quả phân tích cho thấy hiệu giá HI trên lợn sau tiêm vắc xin có sự khác biệt rõ rệt giữa các nhóm, số mũi tiêm và thời điểm theo dõi. Phân tích thống kê (Phụ lục 15) xác nhận rằng các yếu tố nhóm thí nghiệm, số mũi tiêm và thời gian đều ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê đến hiệu giá HI ($p < 0,001$). Đồng thời, các tương tác giữa nhóm với số mũi tiêm và nhóm với thời gian cũng có ý nghĩa ($p < 0,001$), phản ánh sự khác biệt trong động thái đáp ứng miễn dịch của từng nhóm theo mũi tiêm và thời gian.

Kết quả so sánh bằng phương pháp Tukey khẳng định rằng hai nhóm được tiêm vắc xin (TX7 và VC5) có hiệu giá HI trung bình cao hơn có ý nghĩa so với nhóm đối chứng ($p < 0,001$), trong khi không có sự khác biệt đáng kể giữa TX7 và VC5 ($p > 0,05$). Tuy nhiên, xét trên từng thời điểm, nhóm TX7 thường duy trì hiệu giá cao hơn VC5, đặc biệt tại ngày 21 sau tiêm, với giá trị trung bình lần lượt là 5,57 $\log_2$ và 5,44 $\log_2$. Điều này phù hợp với quan sát trong bảng dữ liệu, khi TX7 liên tục đạt hiệu giá cao hơn VC5 từ sau mũi 2.

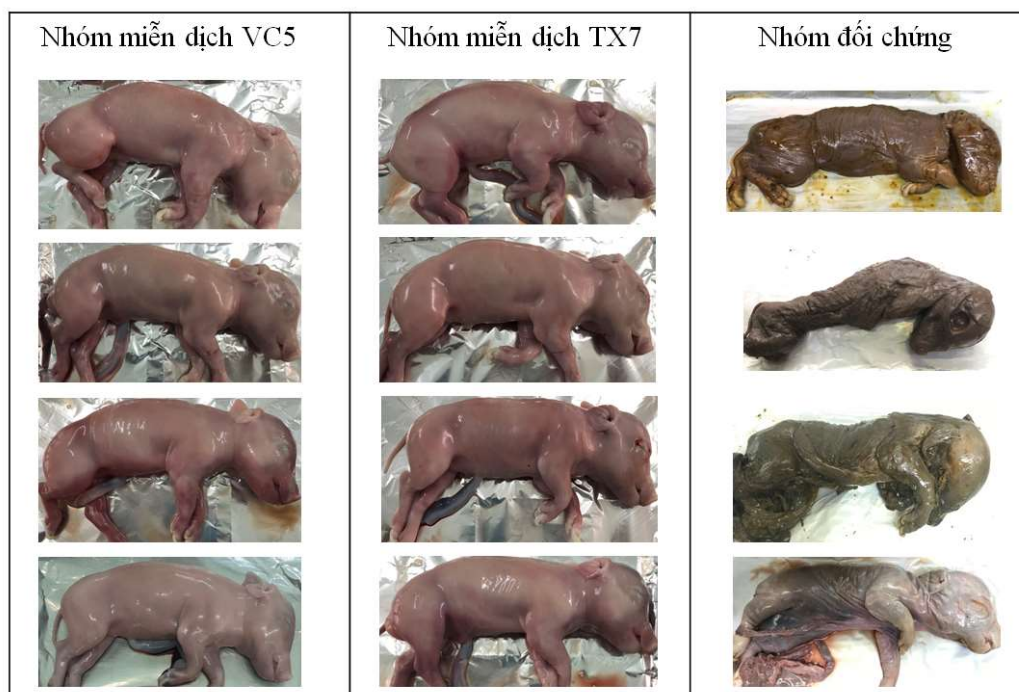
Bảng 3.10. Kết quả bảo hộ thai lợn sau công cường độc

Nhóm thí nghiệm	Thứ tự lợn	Tổng số thai lợn	Khả năng sống của thai lợn sau công cường độc			Thai lợn dương tính với PPV sau công cường độc
			Sống	Chết		
				Không có biểu hiện khô thai	Có biểu hiện khô thai	
Nhóm miễn dịch VC5	Lợn số 1	8	6	2	0	1
	Lợn số 2	7	5	2	0	1
	Lợn số 3	7	7	0	0	0
Tỷ lệ (%)		100	81,82	18,18 18,18	0	9,09
Nhóm miễn dịch TX7	Lợn số 4	6	6	0	0	0
	Lợn số 5	8	6	2	0	1
	Lợn số 6	7	6	1	0	1
Tỷ lệ (%)		100	85,71	14,29 14,29	0	9,52
Nhóm đối chứng	Lợn số 7	7	0	2	5	6
	Lợn số 8	7	0	1	6	6
	Lợn số 9	6	0	2	4	6
Tỷ lệ (%)		100	0	25 100	75	90

Ảnh hưởng của số mũi tiêm cũng thể hiện rất rõ, khi hiệu giá HI trung bình tiêm 2 mũi đạt 3,58 log₂, cao hơn có ý nghĩa so với khi tiêm 1 mũi (0,93 log₂). Kết quả này

khẳng định vai trò cần thiết của mũi tiêm nhắc lại trong việc kích thích đáp ứng miễn dịch mạnh mẽ và bền vững. Phân tích theo thời gian cũng cho thấy hiệu giá HI tăng dần sau tiêm, với mức cao nhất tại ngày 21 ($3,67 \log_2$), cao hơn có ý nghĩa so với các thời điểm khác ($p < 0,05$).

Mặt khác, kết quả hiệu giá HI trên lợn sau tiêm hai mũi (Bảng 3.9) tương đương với kết quả thu được trên mô hình chuột lang sử dụng liều 1/4 (Bảng 3.8). Điều này cho thấy mô hình chuột lang có thể được áp dụng là động vật thay thế cho lợn trong đánh giá khả năng sinh miễn dịch của các chủng PPV.



Hình 3.17. Thai lợn sau công cường độc

Kết quả thí nghiệm công cường độc trên lợn nái mang thai (Bảng 3.10) cho thấy cả hai nhóm tiêm vắc xin TX7 và VC5 đều đạt hiệu quả bảo hộ rõ rệt so với nhóm đối chứng. Ở nhóm được tiêm vắc xin, tỷ lệ thai sống đạt lần lượt 81,82% (VC5) và 85,71% (TX7), trong khi nhóm đối chứng hoàn toàn không có thai sống sau công cường độc. Điều này chứng minh rằng việc tiêm vắc xin đã tạo được đáp ứng miễn dịch có khả năng bảo vệ bào thai trước sự xâm nhập của virus.

Mặt khác, cả hai nhóm TX7 và VC5 đều không ghi nhận hiện tượng khô thai, trong khi ở nhóm đối chứng. Trong khi, 75% thai lợn có các biểu hiện như thai bị hấp thu

nước, khô, cứng lại và chuyển màu thành màu đen, kích thước nhỏ hơn so với các thai bình thường ở nhóm đối chứng (Hình 3.17). Đây là bằng chứng cho thấy vắc xin đã ngăn chặn được đặc trưng gây bệnh điển hình của PPV, vốn thường dẫn đến hiện tượng khô thai và sảy thai hàng loạt.

PPV được phát hiện có mặt ở 90% thai lợn của nhóm đối chứng, trong khi chỉ 2/22 (9,09%) và 2/21 thai lợn (9,52%) thai lợn được phát hiện PPV ở nhóm miễn dịch VC5 và nhóm miễn dịch TX7, theo thứ tự (Bảng 3.10).

Bảng 3.11. Kết quả ELISA đánh giá kháng thể kháng PPV trên lợn

Nhóm thí nghiệm	Trung bình PI (%) $\pm$ SD						
	Sau tiêm mũi 1			Sau tiêm mũi 2			
	Ngày 0 (n = 9)	Ngày 7 (n = 9)	Ngày 14 (n = 9)	Ngày 0 (n = 9)	Ngày 7 (n = 9)	Ngày 14 (n = 9)	Ngày 21 (n = 9)
TX7	10,10 $\pm$ 0,62	13,23 $\pm$ 1,22	18,47 $\pm$ 1,06	30,79 $\pm$ 1,46	42,90 $\pm$ 0,56	54,11 $\pm$ 1,52	72,48 $\pm$ 0,96
VC5	10,03 $\pm$ 0,47	13,15 $\pm$ 0,70	18,30 $\pm$ 0,88	30,36 $\pm$ 1,04	42,90 $\pm$ 1,53	54,09 $\pm$ 1,04	71,51 $\pm$ 0,86
Đối chứng	10,08 $\pm$ 0,57	10,61 $\pm$ 0,52	10,36 $\pm$ 0,60	10,09 $\pm$ 0,60	10,72 $\pm$ 0,46	10,45 $\pm$ 0,71	10,53 $\pm$ 0,46

Ghi chú: PI (Percent Inhibition – Phần trăm ức chế), $PI \geq 50\%$: Mẫu dương tính với kháng thể PPV, $PI < 50\%$: Mẫu âm tính với kháng thể PPV

Kết quả ELISA (Bảng 3.11) đánh giá đáp ứng kháng thể kháng PPV trên lợn cho thấy cả hai nhóm thí nghiệm (TX7 và VC5) đều ghi nhận sự gia tăng rõ rệt giá trị PI sau tiêm vắc xin, trong khi nhóm đối chứng duy trì mức PI ổn định ở ngưỡng nền ($\approx 10\%$), không vượt ngưỡng dương tính (50%). Trước tiêm (ngày 0), tất cả các nhóm đều âm tính với kháng thể kháng PPV, chứng minh tính đồng nhất của đàn lợn nái được sử dụng trong thí nghiệm. Sau tiêm mũi thứ nhất, chỉ số PI tăng nhưng chưa đạt ngưỡng dương tính, phản ánh đáp ứng miễn dịch sơ cấp. Sau mũi tiêm thứ hai, giá trị PI ở cả hai nhóm vắc xin tăng nhanh, vượt ngưỡng 50% và đạt đỉnh vào ngày 21 (TX7: 72,48%; VC5: 71,51%). Điều này cho thấy vai trò quyết định của mũi tiêm nhắc lại trong việc kích hoạt đáp ứng miễn dịch dịch thể thứ cấp và tạo miễn dịch bảo hộ bền vững.

Phân tích thống kê (Phụ lục 16) khẳng định các yếu tố nhóm thí nghiệm, số mũi tiêm và thời gian đều ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê đến hiệu giá ELISA ($p < 0,001$). Giá trị R^2 hiệu chỉnh của mô hình đạt 98,42%, chứng minh mức độ phù hợp rất cao của mô hình với dữ liệu thực nghiệm. Phân tích phương sai cho thấy cả yếu tố chính và tương tác (nhóm*số mũi tiêm, nhóm*thời gian) đều có ảnh hưởng đáng kể đến chỉ số PI, phản ánh sự khác biệt rõ rệt về khả năng sinh miễn dịch giữa các nhóm.

Kết quả so sánh Tukey cho thấy nhóm TX7 và VC5 đều đạt chỉ số PI trung bình cao và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng ($p < 0,05$), trong khi không có sự khác biệt đáng kể giữa TX7 và VC5. Ở yếu tố số mũi tiêm, mũi tiêm thứ hai tạo ra chỉ số PI cao hơn rõ rệt so với mũi tiêm thứ nhất (36,74 so với 17,62; $p < 0,05$). Xét theo yếu tố thời gian, giá trị PI tăng theo tiến trình sau tiêm, đạt mức cao nhất ở ngày 21 (41,94), khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các thời điểm khác. Đặc biệt, phân tích tương tác nhóm*thời gian cho thấy TX7 và VC5 tại ngày 21 đạt PI trung bình lần lượt 58,14 và 57,20, nằm trong nhóm cao nhất (A), trong khi nhóm đối chứng ở tất cả các thời điểm đều duy trì PI dưới 11 và nằm trong nhóm thấp nhất (E).

Những kết quả này chứng minh rằng cả hai chủng vắc xin TX7 và VC5 đều có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch dịch thể mạnh mẽ, vượt trội so với nhóm đối chứng. Dữ liệu ELISA có sự thống nhất với kết quả HI (Bảng 3.9) và kết quả thử thách trên lợn nái mang thai (Bảng 3.10).

Kết quả trên cho thấy, hai chủng VC5 và TX7 có khả năng gây đáp ứng miễn dịch tốt trên lợn và có khả năng bảo hộ 81,82% (chủng VC5) và 85,71% (chủng TX7) thai sống, trong khi 100% thai lợn chết ở nhóm đối chứng PBS và có biểu hiện đặc trưng của bệnh. Tại ngày thứ 21 sau mũi 2, hiệu giá HI trung bình đạt $7,33\log_2$ với nhóm VC5; $7,66\log_2$ với nhóm TX7. 100% lợn dương tính với kháng thể PPV (theo kết quả ELISA) sau 21 ngày tiêm 2 mũi vắc xin. Kết quả này tương đương với nhiều nghiên cứu về Parvovirus vắc xin trên thế giới. Như vậy, hai chủng VC5 và TX7 là những chủng có độc lực cao và đáp ứng miễn dịch tốt. Hai chủng VC5 và TX7 và sẽ là những chủng tiềm năng cho các nghiên cứu sản xuất vắc xin trong thời gian tới.

3.2. Thảo luận

3.2.1. Mức độ lưu hành của PPV tại Việt Nam

Kết quả khảo sát trong nghiên cứu này xác định tỷ lệ dương tính với Porcine Parvovirus tại Việt Nam đạt 8,16%. Sự phân bố tỷ lệ dương tính giữa các tỉnh dao động trong khoảng từ 4,76% đến 10%, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các địa phương ($p > 0,05$). Điều này cho thấy PPV đang lưu hành tương đối đồng đều trên phạm vi quốc gia, phản ánh đặc điểm dịch tễ học ổn định và không phụ thuộc vào yếu tố địa lý. Kết quả này tương đồng với các ghi nhận quốc tế của Streck và cộng sự (2011) tại Brazil và Yang và cộng sự (2012) tại Trung Quốc, khi cả hai nhóm tác giả đều nhận định rằng tỷ lệ dương tính với PPV giữa các vùng địa lý khác nhau không có sự khác biệt thống kê rõ rệt.

Opriessnig và cộng sự (2014) báo cáo tỷ lệ phát hiện PPV (bao gồm các type PPV1–PPV5) lần lượt là 48,8% trong mẫu huyết thanh và 56,7% trong mô phổi thu thập tại Mỹ và Canada trong giai đoạn 1996–2013, trong đó PPV2 chiếm ưu thế với tỷ lệ 35,2%. Sự khác biệt đáng kể giữa kết quả này và nghiên cứu hiện tại có thể được lý giải bởi đặc điểm của đối tượng lấy mẫu và thời gian khảo sát. Cụ thể, nghiên cứu của Opriessnig và cộng sự bao gồm lợn ở nhiều giai đoạn sinh trưởng (từ 3 đến trên 25 tuần tuổi, $n = 586$) và các mẫu được thu trong thời gian dài (2006–2013). Trong khi đó, nghiên cứu tại Việt Nam tập trung trên đàn lợn nái trong hệ thống chăn nuôi thương mại, với thời gian lấy mẫu giới hạn trong năm 2022, nên tỷ lệ dương tính thấp hơn có thể phản ánh đặc điểm sinh học quần thể khác biệt cũng như tính ngắn hạn của giai đoạn khảo sát.

Tại Ấn Độ, Parthiban và cộng sự (2022) ghi nhận tỷ lệ dương tính với PPV1 đạt 14,3% trên 56 mẫu thai chết lưu tại các bang Tamil Nadu và Kerala. Tương tự, Serena và cộng sự (2019) phát hiện tỷ lệ dương tính với PPV1 là 13% (17/131) trên các mẫu thai chết lưu ở Argentina. Hai kết quả này cao hơn nhẹ so với Việt Nam (8,2%), có thể do sự tương đồng trong đối tượng thu mẫu (đều từ đàn lợn nái gặp vấn đề sinh sản - thai chết lưu). Tuy nhiên, khác biệt về loại mẫu xét nghiệm cũng có thể ảnh hưởng đến tỷ lệ phát hiện virus, do các nghiên cứu ở Ấn Độ và Argentina chỉ sử dụng mẫu thai chết lưu, trong khi nghiên cứu hiện tại bao gồm cả mẫu huyết thanh và mẫu thai chết lưu. Nhiều tác giả đã chỉ ra rằng tỷ lệ phát hiện PPV trên mẫu bào thai thường cao gấp 2–3 lần so với mẫu huyết thanh hoặc cơ quan của lợn mẹ (Miao và cộng sự, 2009; Eliaš và cộng sự, 2004).

Tỷ lệ dương tính với PPV trong nghiên cứu này nhìn chung thấp hơn so với các khảo sát trước đó tại Việt Nam. Nguyen và cộng sự (2022) báo cáo tỷ lệ dương tính với PPV dao động từ 24,4% đến 61,6%, trong khi Thuy và cộng sự (2021) ghi nhận mức từ 3% đến 65% tùy khu vực và thời điểm lấy mẫu. Sự khác biệt có thể xuất phát từ nguồn gốc và tính chất của mẫu khảo sát. Cụ thể, Nguyen và cộng sự thu mẫu tại các cơ sở giết mổ, nơi điều kiện vệ sinh khó được đảm bảo, còn Thuy và cộng sự sử dụng các mẫu đã dương tính với PCV2 – một yếu tố được chứng minh có liên quan chặt chẽ đến hiện tượng đồng nhiễm với PPV (Afolabi và cộng sự, 2019; Sun và cộng sự, 2015; Deka và cộng sự, 2021; Pegu và cộng sự, 2023). Do đó, các yếu tố về môi trường lấy mẫu và tình trạng bệnh lý nền của đàn lợn có thể đã làm gia tăng tỷ lệ dương tính trong các nghiên cứu trước.

Kết quả phân tích type virus trong nghiên cứu này cho thấy toàn bộ các mẫu dương tính đều thuộc type PPV1, không phát hiện sự hiện diện của các type khác (PPV2–PPV7). Phát hiện này tương đồng với nghiên cứu của Huỳnh Thị Mỹ Lệ và cộng sự (2020), trong đó 100% mẫu PPV phân lập từ sáu tỉnh miền Bắc Việt Nam cũng được xác định là PPV1. Trái lại, Thuy và cộng sự (2021) và Trần Văn Trung (2024) đã ghi nhận sự xuất hiện đồng thời của nhiều type PPV (PPV1–PPV4). Tuy nhiên, các nghiên cứu này chủ yếu thu mẫu tại cơ sở giết mổ hoặc từ các đàn lợn đã dương tính với PCV2, do đó khả năng đồng nhiễm hoặc tạp nhiễm trong quá trình lấy mẫu là yếu tố khó loại trừ, làm giảm độ tin cậy trong xác định type PPV gây bệnh thực sự.

Các kết quả tương tự cũng được ghi nhận trong nhiều nghiên cứu quốc tế: Serena và cộng sự (2019) và Parthiban và cộng sự (2022) đều xác định 100% mẫu dương tính thuộc type PPV1 khi thu mẫu từ đàn lợn nái gặp rối loạn sinh sản – thai chết lưu. Trong khi Opriessnig và cộng sự (2014) và Milek và cộng sự (2020) ghi nhận sự hiện diện của nhiều type PPV (PPV1–PPV7) trên đối tượng lợn ở nhiều giai đoạn sinh trưởng (từ 3 đến trên 25 tuần tuổi) và trong các trường hợp đồng nhiễm với PCV2 hoặc các tác nhân virus khác. Mặc dù sự lưu hành của các type mới (PPV2–PPV7) đã được ghi nhận ở nhiều khu vực trên thế giới, song PPV1 vẫn được xem là kiểu gen chiếm ưu thế toàn cầu và là nguyên nhân chính gây hội chứng SMEDI (Stillbirth, Mummification, Embryonic Death, and Infertility) ở lợn (Mengeling và cộng sự, 2000).

Như vậy, kết quả nghiên cứu này – chỉ phát hiện sự hiện diện của type PPV1 – không những phản ánh tính chính xác trong việc lựa chọn đối tượng thu mẫu (lợn nái gặp vấn đề rối loạn sinh sản) cũng như độ tin cậy cao của quy trình lấy mẫu và xét nghiệm (được thực hiện trong điều kiện vô trùng nghiêm ngặt, hạn chế tối đa nguy cơ tạp nhiễm hoặc đồng nhiễm), mà còn cho thấy sự ổn định về mặt di truyền và dịch tễ của PPV tại Việt Nam. Việc phân lập thành công các chủng PPV1 từ đàn lợn nái gặp rối loạn sinh sản và bào thai chết lưu là cơ sở quan trọng cho các nghiên cứu tiếp theo về đặc tính sinh học, di truyền và khả năng sinh miễn dịch của virus, đồng thời góp phần cung cấp dữ liệu khoa học phục vụ công tác giám sát và định hướng phát triển vắc xin phòng bệnh PPV trong nước.

Kết quả nghiên cứu cho thấy PPV đang lưu hành ở mức độ thấp (8,16%) trong quần thể lợn nái tại Việt Nam, với kiểu gen PPV1 chiếm ưu thế (100%), chưa ghi nhận sự xuất hiện của các kiểu gen mới (PPV2-PPV7). Mức độ nhiễm tương đối ổn định, phân bố đồng đều giữa các khu vực và không bị chi phối đáng kể bởi yếu tố địa lý.

3.2.2. Đặc tính sinh học và di truyền của các mẫu phân lập

Phân tích trình tự đoạn gen NS1 cho thấy các chủng PPV1 phân lập trong nghiên cứu này có mức độ tương đồng di truyền cao (99,3–99,7%) so với các chủng PPV1-0225-L-SD và PPV1-GD10-1999 được ghi nhận tại Trung Quốc. Sự tương đồng đáng kể này phản ánh mối quan hệ phát sinh chủng loài gần gũi giữa các chủng PPV1 lưu hành tại Việt Nam và các biến chủng phổ biến trong khu vực Đông Á, đồng thời cho thấy tính bảo tồn di truyền cao của virus trong phạm vi địa lý hẹp. Hiện tượng này có thể bắt nguồn từ nguồn gốc dịch tễ chung hoặc từ sự lan truyền xuyên biên giới thông qua hoạt động vận chuyển, trao đổi lợn giống và sản phẩm chăn nuôi trong khu vực.

Kết quả phân tích đoạn gen VP2 cho thấy các mẫu phân lập thuộc nhóm di truyền gần với chủng Kresse (phân lập tại Canada, 1996), đại diện điển hình của nhóm PPV “Kresse-like”. Đây là nhóm có ý nghĩa sinh học và ứng dụng đặc biệt, do các chủng thuộc nhóm này thường biểu hiện tính sinh miễn dịch mạnh và khả năng trung hòa chéo cao. Theo Kiss và cộng sự (2020), các vắc xin phát triển từ chủng PPV K22 mang kiểu di truyền “Kresse-like” thể hiện mức độ bảo hộ vượt trội khi công cường độc với chủng PPV-27a, so với các vắc xin thương mại cổ điển dựa trên chủng NADL hoặc NADL-2. Do đó, sự tương đồng di truyền giữa các chủng PPV1 phân lập tại Việt Nam với chủng

Kresse gợi mở tiềm năng ứng dụng thực tiễn to lớn trong phát triển vắc xin PPV thể hệ mới, có khả năng bảo hộ hiệu quả hơn đối với các chủng lưu hành hiện nay. Ngoài ra, mức độ bảo tồn cao của cả hai gen NS1 và VP2 củng cố bằng chứng về sự ổn định di truyền của PPV1 tại Việt Nam, khẳng định khả năng thích nghi của virus trong quần thể lợn bản địa và giá trị của các chủng này làm nguồn nguyên liệu gốc cho nghiên cứu vắc xin.

Trên phương diện sinh học tế bào, các chủng PPV1 phân lập đều gây ra bệnh tích tế bào điển hình trên dòng tế bào PK-15, bao gồm biến dạng hình thái, hiện tượng nhân co đặc và sự hình thành thể vùi trong bào tương. Các biến đổi này hoàn toàn phù hợp với những mô tả kinh điển của PPV trên tế bào cảm thụ (Zhang và cộng sự, 2015; Wang và cộng sự, 2024), qua đó khẳng định khả năng xâm nhập, nhân lên và biểu hiện kháng nguyên mạnh mẽ của virus. Đặc tính này không chỉ phản ánh tính thích nghi của virus đối với tế bào vật chủ, mà còn là chỉ dấu quan trọng trong việc lựa chọn chủng virus gốc phục vụ nghiên cứu độc lực, đánh giá tính sinh miễn dịch và sản xuất vắc xin vô hoạt hoặc tái tổ hợp.

Kết quả nghiên cứu động học nhân lên của virus cho thấy 32 chủng PPV phân lập có cùng xu hướng phát triển như sau: giai đoạn nhân lên nhanh từ ngày 1 đến ngày 4, đạt đỉnh sinh trưởng vào ngày thứ 5, sau đó duy trì ổn định đến ngày thứ 7 sau khi gây nhiễm. Diễn biến này tương đồng với kết quả của Serena và cộng sự (2019) và Deng và cộng sự (2024), các tác giả này đều ghi nhận đỉnh tăng sinh của PPV đạt cực đại sau 5 ngày nuôi trên các dòng tế bào thận lợn và tinh hoàn lợn. Ngược lại, Wang và cộng sự (2024) khi sử dụng tỷ lệ gây nhiễm cao ($MOI = 0,1$) ghi nhận đỉnh sinh trưởng sớm hơn (36 giờ sau nhiễm), do hiện tượng xâm nhiễm đồng loạt và tiêu hủy tế bào nhanh. Theo Hematian và cộng sự (2016), việc sử dụng MOI cao có thể làm rút ngắn chu kỳ nhân lên nhưng đồng thời làm giảm hiệu suất nuôi cấy và gây sai lệch khi đánh giá độc lực. Do đó, lựa chọn $MOI = 0,01$ như trong nghiên cứu này được xem là tối ưu hơn cho các thí nghiệm nhằm đánh giá đặc tính nhân lên tự nhiên của virus.

Giá trị $TCID_{50}$ của các chủng PPV phân lập dao động trong khoảng 4,5–6,3 $\log TCID_{50}/mL$, phản ánh hiệu quả nhân lên tốt trong điều kiện in vitro. Đáng chú ý, hai chủng VC5 và TX7 đạt hiệu giá cao nhất (6,3 $\log TCID_{50}/mL$), tương đương hoặc vượt so với các chủng PPV được sử dụng trong các nghiên cứu vắc xin quốc tế. Van den Born

và cộng sự (2020) sử dụng chủng PPV-27a có hiệu giá 6,0 logTCID₅₀/mL để đánh giá hiệu quả bảo hộ vắc xin thương mại; Zeew và cộng sự (2007) sử dụng chủng PPV-IDT với hiệu giá 6,5 logTCID₅₀/mL; còn Foerster và cộng sự (2016) ghi nhận hiệu giá 5,0–6,0 logTCID₅₀/mL khi sử dụng PPV-27a trong sản xuất vắc xin vô hoạt. Sự tương đồng về khả năng nhân lên này cho thấy VC5 và TX7 là những chủng có đặc tính sinh học ưu việt, đáp ứng tiêu chuẩn lựa chọn cho nghiên cứu phát triển vắc xin PPV trong nước.

Điều kiện nuôi cấy tối ưu được xác định là 37°C với 5% FBS, phù hợp với xu hướng chung của các nghiên cứu gần đây (Zhang và cộng sự, 2015; Wang và cộng sự, 2024). Kết quả này tương tự với quan sát của Bachmann (1972), khi chủng PPV G10/1 nhân lên tốt nhất ở 33–37°C và bị ức chế ở 40°C. Choi và cộng sự (1990) cũng khẳng định sự khác biệt về đáp ứng nhiệt độ giữa các chủng là yếu tố phản ánh tính đa dạng di truyền và mức độ thích nghi sinh học của virus. Trên dòng tế bào tinh hoàn lợn (ST), chủng KBSH nhân lên tối ưu ở 37°C nhưng bị hạn chế ở 39°C, trong khi chủng Kresse lại thể hiện khuynh hướng ngược lại. Trong bối cảnh hiện nay, dòng tế bào PK-15 được xem là hệ thống chuẩn mực trong nuôi cấy và nghiên cứu PPV, nhờ tính cảm nhiễm cao, độ ổn định di truyền và khả năng duy trì lâu dài trong điều kiện in vitro. Mặt khác, tổng hợp các kết quả nghiên cứu cũng cho thấy điều kiện nuôi cấy của PPV phụ thuộc đồng thời vào đặc điểm sinh học của từng chủng và tính chất của tế bào vật chủ. Việc xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp cho từng chủng cụ thể là yếu tố cốt lõi để tối ưu hóa hiệu suất nhân lên, đồng thời nâng cao độ tin cậy trong đánh giá độc lực, tính sinh miễn dịch và hiệu quả vắc xin.

Tổng hợp các kết quả cho thấy các chủng PPV1 phân lập tại Việt Nam thể hiện sự ổn định di truyền cao, khả năng sinh trưởng tốt trên tế bào PK-15, và thích nghi tối ưu ở 37°C với 5% FBS. Các chủng đều đạt đỉnh sinh trưởng vào ngày thứ 5 khi sử dụng MOI = 0,01. Đặc biệt, hai chủng VC5 và TX7 nổi bật với hiệu quả nhân lên vượt trội, đặc tính sinh học ổn định và mối tương đồng di truyền với các chủng vắc xin quốc tế. Những phát hiện này khẳng định tiềm năng ứng dụng của hai chủng VC5 và TX7 như ứng viên chủng gốc cho các nghiên cứu chuyên sâu về độc lực, tính sinh miễn dịch và phát triển vắc xin PPV thế hệ mới, góp phần chủ động trong công tác phòng bệnh sinh sản do Parvovirus ở lợn tại Việt Nam.

3.2.3. Tiềm năng ứng dụng hai chủng VC5 và TX7 vào nghiên cứu sản xuất vắc xin PPV

Hai chủng virus VC5 và TX7 biểu hiện rõ khả năng gây bệnh tích đặc trưng trên dòng tế bào PK-15, với các biến đổi hình thái điển hình bao gồm hiện tượng biến dạng tế bào, nhân cô đặc và sự hình thành các hạt vùi trong bào tương – những đặc điểm kinh điển của nhiễm PPV. Biểu đồ sinh trưởng của hai chủng duy trì ổn định qua 15 đời cấy chuyển liên tiếp, với hiệu giá trung bình đạt 6,3–6,5 log TCID₅₀/mL. Không ghi nhận bất kỳ dấu hiệu suy giảm khả năng nhân lên hoặc thay đổi về hình thái bệnh tích tế bào trong suốt quá trình cấy chuyển. Kết quả này cho thấy hai chủng VC5 và TX7 có tính ổn định sinh học cao và thích nghi tốt trong môi trường nuôi cấy in vitro.

Phân tích trình tự gen NS1 và VP2 sau 15 đời cấy chuyển liên tục không phát hiện biến đổi về nucleotide hoặc axit amin so với chủng gốc, phản ánh mức độ ổn định di truyền đáng tin cậy của hai chủng virus trong điều kiện nuôi cấy. Sự ổn định di truyền này đóng vai trò quyết định đối với việc bảo đảm tính đồng nhất, an toàn và khả năng biến chủng trong các nghiên cứu tiếp theo về độc lực, sinh miễn dịch và sản xuất vắc xin.

Nhiều công trình quốc tế đã sử dụng tiêu chí ổn định di truyền qua nhiều thế hệ cấy chuyển để đánh giá độ thích hợp của chủng virus trong sản xuất vắc xin. Zheng và cộng sự (2020) chứng minh tính ổn định di truyền và lý – hóa của một chủng Parvovirus tái tổ hợp sau 15 đời nuôi cấy liên tục trên dòng tế bào đơn, thông qua đánh giá đặc tính sinh học và trình tự gen. Tương tự, Lipkin và cộng sự (2017) phân tích sự xuất hiện của các đột biến gen trong 15 thế hệ cấy chuyển để xây dựng bản đồ di truyền và đánh giá các biến đổi phân tử của virus gây bệnh Marek ở gà. Các kết quả này củng cố cơ sở khoa học cho việc sử dụng 15 đời cấy chuyển như một ngưỡng chuẩn đánh giá độ ổn định di truyền trong sản xuất vắc xin virus.

Về mặt tiêu chuẩn kỹ thuật, các chủng virus dùng làm giống gốc cho sản xuất vắc xin cần duy trì tính ổn định sinh học và di truyền qua nhiều thế hệ nuôi cấy nhằm bảo đảm chất lượng của sản phẩm. Mặc dù tại Việt Nam hiện chưa có quy định cụ thể về số đời cấy yêu cầu đối với chủng virus gốc, song theo thông lệ quốc tế, mức đánh giá tối thiểu thường là 15 đời cấy chuyển. Ví dụ, trong bằng sáng chế CN112501133A của Công ty Dược phẩm Qingdao Sinder (Trung Quốc), chủng Pseudorabies virus nhược

độc QĐ gE⁻/gI⁻/11K dùng cho sản xuất vắc xin được chứng nhận ổn định dựa trên hiệu giá TCID₅₀ và trình tự gen kiểm định sau 15 đời nuôi cấy trên tế bào PK-15.

Kết quả của nghiên cứu hiện tại khẳng định hai chủng PPV VC5 và TX7 đáp ứng đầy đủ các tiêu chí kỹ thuật này, với độ ổn định cao cả về đặc tính sinh học lẫn di truyền, đủ điều kiện được xem là các chủng ứng viên làm giống gốc trong nghiên cứu phát triển vắc xin PPV.

Thí nghiệm gây nhiễm thực nghiệm cho thấy cả hai chủng PPV VC5 và TX7 đều biểu hiện độc lực cao trên lợn nái mang thai. PPV được biết là nguyên nhân chủ yếu gây hội chứng rối loạn sinh sản ở lợn, trong đó tổn thương chủ yếu xảy ra ở bào thai, với mức độ nghiêm trọng phụ thuộc vào giai đoạn phát triển khi nhiễm virus. Giai đoạn giữa thai kỳ (khoảng ngày thứ 40) được xác định là thời điểm bào thai có độ miễn cảm cao nhất do hệ miễn dịch chưa hoàn thiện (Cartwright và Huck, 1967). Vì vậy, trong nghiên cứu này, lợn nái được gây nhiễm ở ngày thứ 40 và mổ khám vào ngày thứ 90 của thai kỳ nhằm đánh giá toàn diện các biểu hiện bệnh lý, bao gồm hấp thụ thai, chết lưu và khô thai.

Kết quả cho thấy toàn bộ bào thai trong nhóm gây nhiễm đều chết (100%), trong đó 71% (TX7) và 80% (VC5) thai biểu hiện bệnh tích đặc trưng của nhiễm PPV, như mất nước, teo mô và biến đổi màu sắc mô bào. Virus được phát hiện trong 88–90% mẫu bào thai bằng phản ứng sinh học, trong khi nhóm đối chứng hoàn toàn âm tính. So sánh với các dữ liệu quốc tế, độc lực của hai chủng này được xếp vào nhóm cao, vượt trội so với các chủng chuẩn PPV-27a (van den Born và cộng sự, 2020) có tỷ lệ thai sống 41% và khô thai 39%, cũng như các chủng PPV-143a, PPV-IDT và PPV-NADL-2 với tỷ lệ khô thai chỉ đạt 5–18% (Zeeuw và cộng sự, 2007). Kết quả này khẳng định các chủng PPV phân lập tại Việt Nam (VC5 và TX7) có khả năng gây bệnh tích điển hình, đặc biệt phù hợp cho các nghiên cứu phát triển vắc xin bất hoạt có hiệu lực cao.

Về khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch, cả hai chủng VC5 và TX7 đều tạo ra đáp ứng kháng thể mạnh mẽ trên lợn nái sau khi công cường độc. Hiệu giá kháng thể HI bắt đầu tăng từ ngày thứ 7 sau nhiễm, đạt đỉnh vào ngày 21 với giá trị trung bình 11,33 log₂ (TX7) và 10,67 log₂ (VC5), sau đó giảm nhẹ nhưng vẫn duy trì ở mức ≥9,67 log₂ đến ngày 49. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các thời điểm và giữa nhóm gây nhiễm với nhóm đối chứng ($p < 0,001$) chứng tỏ hai chủng PPV này có khả năng nhân

lên hiệu quả trong cơ thể vật chủ và kích thích đáp ứng miễn dịch mạnh, đáp ứng tiêu chuẩn lựa chọn chủng ứng viên trong sản xuất vắc xin phòng bệnh PPV.

Thí nghiệm đánh giá tính sinh miễn dịch cho thấy việc áp dụng hai mũi tiêm vắc xin bất hoạt mang lại đáp ứng kháng thể tối ưu trên cả hai mô hình thử nghiệm – chuột lang và lợn nái. Hiệu giá HI trung bình có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các số lần tiêm ($p < 0,001$). Trên chuột lang, hiệu giá HI sau một mũi tiêm chỉ đạt trung bình $0,93 \log_2$, trong khi nhóm tiêm hai mũi đạt $3,58 \log_2$, phản ánh rõ vai trò tăng cường của liều nhắc lại. Kết quả tương tự được ghi nhận trên lợn nái: sau mũi tiêm thứ nhất, hiệu giá HI trung bình chỉ đạt $1,44 \log_2$ (VC5) và $1,56 \log_2$ (TX7), nhưng tăng mạnh vào ngày thứ 21 sau mũi tiêm thứ hai, đạt $7,33 \log_2$ (VC5) và $7,67 \log_2$ (TX7). Các giá trị này đều vượt ngưỡng bảo hộ miễn dịch, cho thấy hai chủng VC5 và TX7 có khả năng kích thích đáp ứng dịch thể mạnh mẽ khi được sử dụng trong công thức vắc xin bất hoạt.

Kết quả này hoàn toàn phù hợp với các ghi nhận trước đó. Paul và Mengeling (1986) đã chứng minh rằng liều tiêm đầu tiên của vắc xin PPV bất hoạt chỉ kích thích đáp ứng kháng thể ở mức thấp, trong khi liều nhắc lại tạo ra miễn dịch mạnh hơn và bền vững hơn. Nghiên cứu của van den Born và cộng sự (2020) với vắc xin tam giá Ery+Parvo+Lepto cũng cho thấy kháng thể xuất hiện từ ngày thứ 6 và đạt đỉnh vào ngày thứ 21 sau khi tiêm hai mũi. Tương tự, Sørensen và Askaa (1981) ghi nhận hiệu giá HI đạt $7-9 \log_2$ trong vòng 2-3 tuần sau liều nhắc lại khi sử dụng vắc xin PPV vô hoạt.

Sự gia tăng mạnh mẽ của hiệu giá HI sau mũi tiêm thứ hai phản ánh cơ chế củng cố trí nhớ miễn dịch – yếu tố then chốt của đáp ứng miễn dịch thứ cấp, được mô tả rõ trong các nguyên lý miễn dịch học cơ bản (Plotkin, 2010; Siegrist, 2018). Như vậy, việc tiêm hai mũi vắc xin bất hoạt chứa chủng VC5 hoặc TX7 không chỉ đảm bảo khả năng kích thích miễn dịch mạnh và kéo dài, mà còn phù hợp với các quy chuẩn quốc tế về quy trình tạo miễn dịch chủ động phòng bệnh do PPV gây ra.

Kết quả đánh giá đáp ứng miễn dịch bằng phản ứng huyết thanh học cho thấy cả hai chủng VC5 và TX7 đều có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch dịch thể mạnh mẽ trên cả mô hình thay thế (chuột lang) và động vật đích (lợn nái).

Trên chuột lang, hiệu giá HI trung bình đạt $7,4-7,6 \log_2$ vào ngày 21 sau mũi tiêm thứ hai, phản ánh rõ khả năng kích thích trí nhớ miễn dịch của hai chủng virus. Sự tương

đồng về động học hình thành kháng thể giữa chuột lang và lợn nái chứng minh chuột lang là mô hình thay thế thích hợp trong giai đoạn sàng lọc chủng vắc xin PPV, giúp giảm chi phí và hạn chế việc sử dụng động vật đích trong nghiên cứu tiền lâm sàng.

Trên lợn nái, cả hai chủng đều kích thích đáp ứng miễn dịch mạnh mẽ sau mũi tiêm nhắc lại. Hiệu giá HI trung bình đạt $7,33-7,67 \log_2$ vào ngày 21 sau tiêm, và 100% cá thể chuyển đổi huyết thanh dương tính với chỉ số ức chế (PI) > 70% theo ELISA. Những kết quả này vượt ngưỡng bảo hộ miễn dịch, khẳng định tính sinh miễn dịch cao và ổn định của hai chủng VC5 và TX7 khi được sử dụng trong công thức vắc xin bất hoạt.

Kết quả thu được nhất quán với các báo cáo trước đây về cơ chế đáp ứng miễn dịch của vắc xin PPV vô hoạt. Paul và Mengeling (1986) đã chứng minh rằng liều tiêm đầu tiên chỉ tạo đáp ứng kháng thể ở mức thấp, trong khi liều nhắc lại giúp tăng cường đáng kể hiệu giá và kéo dài thời gian bảo hộ. Nghiên cứu của van den Born và cộng sự (2020) với vắc xin tam giá Ery+Parvo+Lepto cũng ghi nhận kháng thể xuất hiện sớm từ ngày thứ 6 và đạt đỉnh vào ngày thứ 21 sau hai mũi tiêm, tương tự xu hướng được ghi nhận trong nghiên cứu này. Sørensen và Askaa (1981) khi đánh giá vắc xin PPV vô hoạt cũng báo cáo hiệu giá HI đạt $7-9 \log_2$ trong vòng 2-3 tuần sau mũi nhắc lại, cho thấy đáp ứng miễn dịch thứ cấp đóng vai trò quyết định hiệu quả bảo hộ.

Mức độ sinh miễn dịch ghi nhận ở hai chủng VC5 và TX7 tương đương hoặc vượt trội so với nhiều chế phẩm vắc xin PPV thương mại hiện nay. Kiss và cộng sự (2020) cho thấy chỉ khoảng 15% cá thể tiêm các vắc xin PPV thương mại (Parvoruvax, NADL-2, 014-“NADL-2-like”) đạt hiệu giá ELISA dương tính. Trong khi đó, Noguera và cộng sự (2021) khi so sánh ba vắc xin thương mại (ReproCyc ParvoFLEX, ERYSENG PARVO, Porcilis Ery+Parvo+Lepto) nhận thấy tỷ lệ huyết thanh dương tính dao động từ 0% đến 69% sau tiêm mũi thứ hai, thấp hơn đáng kể so với kết quả trong nghiên cứu này. Các khảo sát diện rộng gần đây của Renzhammer và cộng sự (2024) cũng ghi nhận tỷ lệ huyết thanh dương tính PPV từ 73,7% đến 100% tùy loại vắc xin được sử dụng, trong khi Garcia-Morante và cộng sự (2020) báo cáo vắc xin tiểu phần ReproCyc® ParvoFLEX đạt 100% huyết thanh dương tính từ ngày thứ 28 sau tiêm.

Kết quả công cường độ cho thấy cả hai chủng VC5 và TX7 đều tạo được hiệu quả bảo hộ cao trên lợn nái mang thai, với tỷ lệ thai sống đạt tương ứng 81,82% và 85,71%.

Trong khi đó, ở nhóm đối chứng không tiêm vắc xin, toàn bộ thai chết, 90% mẫu thai dương tính với PPV, thể hiện độc lực điển hình của virus. Hiệu quả bảo hộ thu được tương đồng với nhiều nghiên cứu quốc tế về vắc xin PPV bất hoạt, củng cố tiềm năng ứng dụng của hai chủng trong sản xuất chế phẩm phòng bệnh.

Sørensen và Askaa (1981) ghi nhận tỷ lệ thai sống đạt 100% ở nhóm được tiêm vắc xin PPV vô hoạt, trong khi nhóm đối chứng có 66,15% thai chết và 76,92% thai nhiễm virus. Kết quả tương tự được báo cáo bởi van den Born và cộng sự (2020), khi 100% thai của nhóm tiêm vắc xin sống khỏe mạnh và chỉ 10% mẫu phát hiện PPV, trong khi nhóm đối chứng có 69% thai chết và 90% mẫu dương tính với PPV. Kiss và cộng sự (2020) khi so sánh hiệu quả của bốn loại vắc xin thương mại (Parvoruvax®, Vaccine B, C, D) cho thấy tỷ lệ thai sống đạt lần lượt 100%, 89%, 92% và 64%, trong khi nhóm đối chứng chỉ đạt 40%, khẳng định sự khác biệt rõ rệt giữa nhóm có miễn dịch và nhóm không được bảo hộ.

Nghiên cứu của Józwik và cộng sự (2009) tại Đức tiếp tục chứng minh hiệu quả bảo hộ của vắc xin PPV sản xuất từ chủng NADL-2 type 1. Sau khi công cường độc bằng chủng PPV với liều 6,0 logTCID₅₀/1mL vào ngày thứ 41 của thai kỳ, 66/67 thai của nhóm vắc xin sống sót và không phát hiện DNA của PPV, trong khi nhóm đối chứng có 39/50 thai chết, xuất hiện tổn thương khô thai và dương tính với PPV. Mặc dù virus công cường độc (PPV-27a) vẫn được thải ra ở cả nhóm vắc xin và nhóm đối chứng trong vòng 10 ngày đầu, song kết quả này khẳng định vắc xin PPV-NADL-2 có khả năng bảo hộ chéo hiệu quả đối với các chủng khác cùng type.

Trong nghiên cứu của Noguera và cộng sự (2021), ba loại vắc xin thương mại (ReproCyc ParvoFLEX, ERYSENG PARVO, Porcilis Ery + Parvo + Lepto) được tiêm hai liều theo hướng dẫn của nhà sản xuất, sau đó lợn nái được công cường độc vào ngày thứ 40 của thai kỳ bằng chủng PPV-401/09 (type 1). Kết quả cho thấy tỷ lệ thai khỏe mạnh đạt 96,5% ở nhóm 1, 97,4% ở nhóm 2 và 88,3% ở nhóm 3, trong khi nhóm đối chứng không có thai sống, khẳng định tác dụng bảo hộ ổn định của các vắc xin đa giá trên nền PPV vô hoạt.

Foerster và cộng sự (2016) sử dụng chủng PPV-27a để sản xuất vắc xin vô hoạt và công cường độc bằng chính chủng này. Sau khi tiêm hai mũi vắc xin (liều 5,0 logTCID₅₀/1mL) trước khi phối giống và công cường độc bằng liều 5×6,0

logTCID₅₀/1mL vào ngày 40 của thai kỳ, hiệu giá HI ở nhóm vắc xin đạt 1/40–1/640 sau 18 ngày tiêm nhắc, giảm dần xuống 1/10–1/320 vào ngày 54. Kết quả mô khám ở ngày 90 thai kỳ cho thấy chỉ 4% thai bị khô ở nhóm tiêm vắc xin so với 51% ở nhóm đối chứng.

❖ *Đánh giá về khả năng sử dụng các chủng PPV VC5 và TX7 vào sản xuất vắc xin*

Tổng hợp các kết quả về đặc tính dịch tễ, sinh học, di truyền, độc lực và tính sinh miễn dịch cho thấy hai chủng PPV VC5 và TX7 là ứng viên nổi bật cho phát triển vắc xin PPV thế hệ mới tại Việt Nam. Cả hai được phân lập từ lợn nái mắc hội chứng rối loạn sinh sản, đại diện cho type PPV1 – kiểu gen duy nhất hiện lưu hành trong quần thể lợn Việt Nam, có quan hệ di truyền gần với nhóm “Kresse-like” của các chủng vắc xin quốc tế.

Về đặc tính sinh học, VC5 và TX7 gây bệnh tích tế bào điển hình trên dòng PK-15, đạt hiệu giá cao (6,3–6,5 logTCID₅₀/mL) và duy trì ổn định qua ≥15 đời cấy mà không thay đổi về hình thái hay trình tự gen, đáp ứng tiêu chuẩn ổn định di truyền của chủng giống vắc xin. Trên phương diện phân tử, hai chủng có độ tương đồng gen NS1 đạt 99,3–99,7% với các chủng PPV1 Đông Á, thuộc nhóm “Kresse-like” có khả năng kích thích miễn dịch mạnh và bảo hộ chéo hiệu quả.

Thử nghiệm gây nhiễm trên lợn nái mang thai cho thấy VC5 và TX7 có độc lực cao, gây chết thai 100%, với 71–80% thai biểu hiện bệnh tích đặc trưng, vượt trội so với các chủng đối chứng quốc tế (Zeeuw và cộng sự, 2007; van den Born và cộng sự, 2020). Hai chủng tái tạo được hội chứng SMEDI điển hình, khẳng định giá trị mô hình thực nghiệm cho nghiên cứu vắc xin.

Về khả năng sinh miễn dịch, vắc xin bất hoạt từ VC5 và TX7 kích thích đáp ứng dịch thể mạnh trên cả lợn và chuột lang, với hiệu giá HI 7,33–7,67 log₂, vượt ngưỡng bảo hộ và tương đương hoặc cao hơn nhiều chế phẩm thương mại (Noguera và cộng sự, 2021; Kiss và cộng sự, 2020). Sự tăng mạnh hiệu giá sau mũi nhắc lại phản ánh khả năng hoạt hóa trí nhớ miễn dịch và đáp ứng thứ cấp hiệu quả (Plotkin, 2010; Siegrist, 2018).

Thử thách công cường độc cho thấy tỷ lệ thai sống ở nhóm tiêm vắc xin đạt 81,82–85,71%, trong khi nhóm đối chứng chết thai hoàn toàn. Virus không được phát hiện trong mẫu thai của nhóm được bảo hộ, chứng minh hiệu quả ngăn chặn nhân lên của PPV. Hiệu quả này tương đương với các vắc xin châu Âu hiện hành (Sørensen & Askaa, 1981; Jóźwik và cộng sự, 2009).

Tổng thể, hai chủng VC5 và TX7 đáp ứng đầy đủ tiêu chí lựa chọn chủng giống gốc cho sản xuất vắc xin PPV:

- (1) nguồn gốc phân lập từ ổ dịch tự nhiên;
- (2) ổn định sinh học qua ≥ 15 đời cấy;
- (3) bảo tồn di truyền cao;
- (4) độc lực rõ ràng, gây bệnh tích đặc trưng;
- (5) kích thích đáp ứng miễn dịch mạnh và bảo hộ hiệu quả;

Hai chủng này không chỉ đại diện cho PPV1 lưu hành tại Việt Nam mà còn là ứng viên tiềm năng hàng đầu cho phát triển vắc xin PPV nội địa, góp phần chủ động nguồn chế phẩm sinh học, giảm phụ thuộc nhập khẩu và nâng cao năng lực phòng bệnh sinh sản ở lợn theo hướng an toàn sinh học và bền vững. Tuy nhiên, nghiên cứu này chỉ là nghiên cứu bước đầu về tiềm năng ứng dụng các chủng PPV đang lưu hành tại Việt Nam. Để phát triển vắc xin, nghiên cứu cần được tiếp tục đánh giá, so sánh hiệu quả bảo hộ với các sản phẩm vắc xin thương mại.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. Kết luận

Nghiên cứu đã cung cấp dữ liệu toàn diện về đặc điểm dịch tễ, di truyền và sinh học của PPV đang lưu hành tại Việt Nam, đồng thời tuyển chọn được hai chủng virus nội địa có tiềm năng cao phục vụ phát triển vắc xin phòng bệnh. Các kết quả chính được tóm tắt theo năm nội dung nghiên cứu như sau:

(1) Phân lập virus:

Từ các mẫu bệnh phẩm điển hình thu thập tại sáu tỉnh đại diện cho các vùng chăn nuôi trọng điểm (Thái Bình, Thanh Hóa, Bình Định, Đắk Lắk, Đồng Nai và Bình Dương), đã phân lập thành công 32 chủng PPV trên dòng tế bào liên tục PK-15. Các chủng đều gây CPE đặc trưng của PPV và được xác nhận bằng PCR đặc hiệu.

(2) Xác định type virus:

Phân tích đặc hiệu bằng phản ứng PCR và giải trình tự gen cho thấy toàn bộ 32 mẫu phân lập đều thuộc type PPV1, chưa phát hiện sự hiện diện của các type mới (PPV2–PPV7) trong các mẫu khảo sát. Kết quả này khẳng định PPV1 vẫn là kiểu gen lưu hành chủ yếu trong quần thể lợn tại Việt Nam.

(3) Mối quan hệ di truyền:

Trình tự gen NS1 và VP2 của 32 mẫu phân lập có mức độ bảo tồn cao (100% tương đồng với nhau). Cây phát sinh chủng được xây dựng trên cơ sở trình tự gen VP2 cho thấy các chủng này có quan hệ di truyền gần gũi với chủng Kresse (phân lập tại Canada) và PPV1-0225-L-SD (phân lập tại Trung Quốc năm 2022), phản ánh nguồn gốc tiến hóa ổn định của PPV1 lưu hành trong khu vực châu Á – Thái Bình Dương.

(4) Đặc tính sinh học:

Điều kiện tối ưu cho nuôi cấy và nhân lên của PPV trên dòng PK-15 được xác định là môi trường E-MEM bổ sung 5% FBS, 1% kháng sinh, ở 37°C và 5% CO₂. Virus phát triển mạnh từ ngày 1–4, đạt đỉnh hiệu giá vào ngày thứ 5 (4,5–6,3 logTCID₅₀/mL) và duy trì ổn định đến ngày 7. Hai chủng VC5 và TX7 có tốc độ nhân lên nhanh, hiệu giá cao và đặc tính sinh học ổn định nhất, được lựa chọn cho các nghiên cứu chuyên sâu.

(5) Độ ổn định, độc lực và tính sinh miễn dịch:

Hai chủng VC5 và TX7 giữ ổn định di truyền qua ít nhất 15 đời cấy, không ghi nhận biến dị gen NS1 và VP2. Khi gây nhiễm thực nghiệm trên lợn nái mang thai, cả hai chủng đều biểu hiện độc lực cao, gây chết toàn bộ thai, trong đó 71–80% có tổn thương điển hình của hội chứng SMEDI. Trong các thí nghiệm miễn dịch, cả hai chủng kích thích đáp ứng kháng thể mạnh trên cả mô hình chuột lang và lợn, với hiệu giá HI đạt 7,3–7,6 log₂ sau mũi tiêm thứ hai. Thử nghiệm công cường độc cho thấy tỷ lệ thai sống đạt 81,82% (VC5) và 85,71% (TX7), trong khi nhóm đối chứng không có thai sống và 90% thai dương tính với PPV.

Tổng hợp các kết quả trên cho thấy VC5 và TX7 là hai chủng PPV nội địa có đặc tính di truyền ổn định, độc lực điển hình và khả năng sinh miễn dịch mạnh, đáp ứng các tiêu chí của chủng gốc cho phát triển vắc xin PPV bất hoạt trong nước. Những dữ liệu thu được góp phần hoàn thiện cơ sở khoa học cho việc chủ động nghiên cứu, sản xuất và ứng dụng vắc xin phòng bệnh parvo trên lợn tại Việt Nam.

2. Kiến nghị

Hai chủng Parvovirus VC5 và TX7 được tuyển chọn trong nghiên cứu này đã được chứng minh có các đặc điểm sinh học và di truyền ổn định qua nhiều đời cấy chuyển, có hiệu giá virus cao, độc lực mạnh, đồng thời kích thích được đáp ứng miễn dịch đặc hiệu ở cả mô hình chuột lang và lợn. Những kết quả này cho thấy tiềm năng lớn của hai chủng virus trong ứng dụng phát triển vắc xin phòng bệnh parvo ở lợn. Để tiến tới hoàn thiện quy trình nghiên cứu và ứng dụng hai chủng này vào phát triển vắc xin phòng bệnh parvo ở lợn, kiến nghị cần tiếp tục triển khai các nội dung sau:

1. Thực hiện các nghiên cứu sâu hơn nhằm hoàn thiện cơ sở dữ liệu về đặc điểm của virus: Nghiên cứu sâu hơn về hình thái virus qua kỹ thuật kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM). Giải trình tự toàn bộ hệ gen và phân tích chuyên sâu về đặc điểm di truyền và cấu trúc phân tử của gen VP2 (dựa trên mô hình 3D capsid hoặc docking kháng thể), phân tích các đột biến trên gen VP2 và ảnh hưởng tiềm năng của các đột biến này đến cấu trúc protein và khả năng sinh miễn dịch.
2. Thực hiện các nghiên cứu tiếp theo nhằm hoàn thiện quy trình đánh giá chủng giống vắc xin để sản xuất thử nghiệm vắc xin bất hoạt phòng bệnh PPV ở lợn: Xác định điều kiện bảo quản và đánh giá tính ổn định của virus theo thời gian

bảo quản. Đánh giá tính ổn định của kháng thể theo thời gian. Xác định chu kỳ tiêm nhắc. Lựa chọn chất bổ trợ phù hợp nhằm nâng cao hiệu quả kích thích miễn dịch. So sánh hiệu quả bảo hộ và đáp ứng miễn dịch của vắc xin thử nghiệm từ hai chủng VC5 và TX7 với các vắc xin thương mại hiện có trên thị trường.

Việc triển khai các nội dung trên sẽ góp phần hoàn thiện cơ sở dữ liệu cũng như đánh giá toàn diện chủng giống vắc xin để sản xuất thử nghiệm, hướng tới ứng dụng trong thực tiễn nghiên cứu chế tạo và sản xuất vắc xin phòng bệnh PPV hiệu quả cho ngành chăn nuôi lợn trong nước.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1) T. T. Hang Trinh, V. Tan Do, V. Khien Do, and Hung Vu-Khac,(2024), “Isolation and characterization of porcine parvovirus in Vietnam”, *Veterinary World*, 17(7), pp. 1530–1537.

2) Trịnh Thị Thu Hằng, Vũ Khắc Minh Dương, Đỗ Văn Tấn, Phạm Trung Hiếu và Vũ Khắc Hùng, “Xác định một số đặc tính sinh học và đánh giá khả năng sinh miễn dịch của 02 chủng parvovirus phân lập tại Việt Nam”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, bản B (Giấy chấp nhận đăng)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng việt

1. Bộ Nông nghiệp và Môi trường, (2014), Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 8400-21:2014 về Bệnh động vật - Quy trình chẩn đoán - Phần 21: Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRS).
2. Bộ Nông nghiệp và Môi trường, (2015), Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 8400-36:2015 về Bệnh động vật - Quy trình chẩn đoán - Phần 36: Hội chứng suy mòn ở lợn sau cai sữa do circovirus typ 2.
3. Bộ Nông nghiệp và Môi trường, (2019), Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 8400-47:2019 về Bệnh động vật - Quy trình chuẩn đoán - Phần 47: Bệnh dịch tả lợn cổ điển.
4. Bộ Nông nghiệp và Môi trường, (2019), Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 8400-41:2019 về Bệnh động vật - Quy trình chuẩn đoán - Phần 41: Bệnh dịch tả lợn Châu Phi.
5. Bộ Nông nghiệp và Môi trường, (2024), Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 8685-45:2024 về Quy trình kiểm nghiệm vắc xin - Phần 45: Vắc xin vô hoạt phòng bệnh Parvo ở lợn nái
6. Hồ Đình Chúc, (1993), “Kết quả điều tra và phân lập virus từ lợn bị rối loạn sinh sản ở một số tỉnh phía Bắc”. Báo cáo khoa học Hội nghị Chăn nuôi Thú y toàn quốc 6/1993.
7. Huỳnh Thị Mỹ Lệ, Nguyễn Văn Giáp, Mai Thị Ngân, Lê Văn Trường, Vũ Thị Ngọc, Võ Văn Hiếu, Tạ Thị Kim Chung và Vũ Đức Hạnh, (2020), “Sự hiện diện của porcine Parvovirus 1 (PPV) ở lợn nuôi tại Hà Nội và vùng phụ cận”, *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 18(7), tr. 495-503.
8. Huỳnh Thị Mỹ Lệ, Lê Văn Phan, Nguyễn Văn Giáp và Trịnh Đình Thâu, (2015), “Lựa chọn chủng giống porcine circovirus type 2 (pcv2) để sản xuất vắc xin phòng hội chứng còi cọc ở lợn con”. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 13(3), tr. 406-415.
9. Lê Thị Mến, (2015), “Khảo sát năng suất sinh sản của heo nái lai (Landrace x Yorkshire, Yorkshire x Landrace) và sự sinh trưởng của heo con đến 60 ngày tuổi thuộc hai nhóm giống Duroc x (Landrace x Yorkshire) và Duroc x (Yorkshire x Landrace) ở trang trại”, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, Phần B: Nông nghiệp, Thủy sản và Công nghệ Sinh học*: 40(2): 15-22.
10. Lê Thị Toan, Nguyễn Thị Lan, Nguyễn Hữu Nam, Phạm Hồng Ngân và Lê Văn Hùng, (2016), “Đặc tính sinh học của chủng virus PRRS (KTY-PRRS-05) phân lập tại Việt Nam qua các đời cấy truyền”, *Tạp chí Khoa học nông nghiệp Việt Nam*, 14(4), tr. 605-612.
11. Nguyễn Thị Hoa, Nguyễn Thị Lan, Trương Quang Lâm, Trịnh Đình Thâu và Ngô Thị Hạnh, (2018), “Nghiên cứu phân lập và xác định một số đặc điểm sinh học của virus PED (porcine epidemic diarrhea virus)”, *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 16(3), tr. 257-267.

12. Nguyễn Thị Lan, Nguyễn Bá Hiên, Trịnh Đình Châu, Cao Thị Bích Phượng và Lê Văn Hùng, (2016), “So sánh một số đặc tính sinh học của chủng virus PRRS phân lập tại Việt Nam (KTY-PRRS-04) qua các đời cấy truyền”. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y*, 23(6), tr. 5-13.
13. Nguyễn Huỳnh, Trần Đình Từ, Lê văn Hùng, (2000). *Khảo sát một số yếu tố liên quan đến rối loạn sinh sản trên heo nái tỉnh Long An*, Luận văn thạc sĩ, Trường đại học Nông lâm Tp.HCM.
14. Phạm Hùng (1999), *Vai trò của Porcine Parvovirus trong hội chứng rối loạn sinh sản của lợn ở một số tỉnh miền Trung và nghiên cứu chế vaccin phòng bệnh*, Luận án Tiến sĩ Nông nghiệp, Viện Thú Y Quốc gia.
15. Phạm Văn Sơn, Nguyễn Thị Lan, Nguyễn Văn Cẩm và Nguyễn Bá Hiên (2017), “Nghiên cứu sự ổn định về một số đặc tính sinh học và sinh học phân tử của chủng virus KTY-PRRS-01 phân lập tại Việt Nam”, *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 15(2), tr. 188-197.
16. Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia QCVN 01- 83:2011/BNNPTNT: bệnh động vật – yêu cầu chung lấy mẫu bệnh phẩm, bảo quản và vận chuyển.
17. Thông tư 07/2016/TT-BNNPTNT ngày 31/5/2016, Thông tư quy định về phòng, chống dịch bệnh động vật trên cạn.
18. Trần Văn Trung (2024), *Nghiên cứu đặc điểm phân tử gen mã hóa protein cấu trúc của virus parvo trên lợn (Porcine Parvovirus – PPV) ở một số tỉnh miền Trung Việt Nam*, Luận án tiến sĩ, Trường Đại học Huế.
19. Võ Văn Ninh (2003) “*Những bệnh truyền lan giữa người và gia súc*”, Nhà xuất bản trẻ.

Tiếng Anh

20. Afolabi K. O. , Iweriebor B.C. , Obi L. C. , and Okoh A. I. , (2019), “Prevalence of porcine parvoviruses in some South African swine herds with background of porcine circovirus type 2 infection”, *Acta Tropica*, 190, pp. 37-44.
21. Bachmann P. A., (1972), “Porcine Parvovirus Infection In Vitro: A Study Model for the Replication of Parvoviruses I. Replication at Different Temperatures”, *Experimental Biology and Medicine*, 140(4), pp. 1369–1374.
22. Bisimwa P. N., Wasso D. Bantuzeko S., F., Aksanti C. B., Tonui R., Birindwa A. B., and Bisimwa E. B., (2021), “First investigation on the presence of porcine parvovirus type 3 in domestic pig farms without reproductive failure in the Democratic Republic of Congo”, *Veterinary and Animal Science*, 13, pp. 100-187.
23. Boisvert M., Fernandes S., and Tijssen P., (2010), “Multiple pathways involved in porcine parvovirus cellular entry and trafficking toward the nucleus”, *Virology Journal*, 84, pp. 82-92.
24. Cao L., Xue M., Chen J., Shi H., Zhang X., Shi D., Liu J., Huang L., Wei Y., Liu C., and Feng L., (2020), “Porcine parvovirus replication is suppressed by

- activation of the PERK signaling pathway and endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis”, *Virology*, 539, pp. 1-10.
25. Cartwright S.F., and Huck R.A., (1967), “Viruses isolated in association with herd infertility, abortions and stillbirths in pigs”, *Veterinary Record*, 81, pp. 196–197
 26. Cheung A.K., Wu G., Wang D., Bayles D.O., Lager K.M., and Vincent A.L., (2010), “Identification and molecular cloning of a novel porcine Parvovirus”, *Archives of Virology*, 155, pp. 801–806.
 27. Choi C. S., Joo H. S., and Molitor T. W., (1990), “Replication of two porcine parvovirus isolates at non-permissive temperatures”. *Archives Virology*, 113(3), pp. 235–244.
 28. Chung H-C , Nguyen V-G , Huynh T-M-L , Park Y-H , Park K-T , and Park B-K, (2020), “PCR-based detection and genetic characterization of porcine parvoviruses in South Korea in 2018”, *BMC Veterinary Research*, 16(1), pp. 113-120.
 29. Cotmore S. F., and Tattersall P. (2014). “Parvoviruses: Small does not mean simple”. *Annual Review of Virology*, pp.1517–1537.
 30. Cságola A., Lőrincz M. , Cadar D. , Tombácz K. , Biksi I. , and Tuboly T., (2012), “Detection, prevalence and analysis of emerging porcine Parvovirus infections”. *Archives of Virology*, 157(6).
 31. Díaz C., Celer V., and Frébort I., (2021), “The main DNA viruses significantly affecting pig livestock”, *Journal of Veterinary Research*, 65, pp. 15-25.
 32. Deka D., Barman N.N., Deka N., Batth B.K., Singh G., Singh S., Agrawal R.K., Mukhopadhyay C.S, and Ramneek, (2021), “Sero-epidemiology of porcine parvovirus, circovirus, and classical swine fever virus infections in India”. *Tropical Animal Health and Production*. 53(1):180.
 33. Deng H., Cong G., Wang H., Hu Z., Shi D., Shi H., Xia C., Fu F., and Feng L. (2024), “Isolation, characterization, and phylogenetic analysis of two new porcine parvovirus 1 isolates from Northern China”, *Virus Research*, 339.
 34. Eliaš D., Eliašová E., Paulík Š., and Pistl J., (2004), “Isolation of four strains of porcine parvovirus in slovak republic”, *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 48, pp. 85-88.
 35. Felsenstein (1985), Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, pp. 783–791.
 36. Foerster T., Streck A.F., Speck S., Selbitz H.J., Lindner T., and Truyen U. (2016), “An inactivated whole-virus porcine parvovirus vaccine protects pigs against disease but does not prevent virus shedding even after homologous virus challenge”, *Journal of General Virology*, 97(6), pp. 1408-1413.
 37. Gao Y. , Wang H. , Wang S. , Sun M. , Fang Z. , Liu X. , Cai X. , and Tu Y., (2022), “Self-Assembly of Porcine Parvovirus Virus-like Particles and Their Application in Serological Assay”, *Viruses*,14(8).
 38. Garcia-Camacho L. A., Vargas-Ruiz A., Marin-Flamand E., Ramírez-Álvarez H., and Brown C., (2020), “A retrospective study of DNA prevalence of porcine

- parvoviruses in Mexico and its relationship with porcine circovirus associated disease". *Microbiology and Immunology*, 64(5), pp. 366–376.
39. Garcia-Morante B., Noguera M., Klocke S., Sommer K., and Bridger P. (2020), "Duration of immunity against heterologous porcine parvovirus 1 challenge in gilts immunized with a novel subunit vaccine based on the viral protein 2". *BMC Veterinary Research*, 16(1):184
 40. Hao X., Lu Z., Sun P., Fu Y., Cao Y., Li P., Bai X., Bao H., Xie B., Chen Y., Li D., and Liu Z., (2011), "Phylogenetic analysis of porcine parvoviruses from swine samples in China", *Virology Journal*, 8.
 41. Harbinson C. E., Chiorini J. A., and Parrish C., (2008), "The parvovirus capsid odyssey: from the cell surface to the nucleus", *Trends in Microbiology*, 16, pp. 208-214.
 42. Hematian A, Sadeghifard N, Mohebi R, Taherikalani M, Nasrolahi A, Amraei M, and Ghafourian S., (2016), "Traditional and Modern Cell Culture in Virus Diagnosis". *Osong Public Health and Research Perspectives*. 7(2):77-82
 43. Hijikata M., Abe K., Win K. M., Shimizu Y. K., Keicho N., and Yoshikura. H. (2001). "Identification of new Parvovirus DNA sequence in swine sera from Myanmar", *Japan Journal of Infectious Diseases*, 54, pp. 244-245.
 44. Jóźwik A., Manteufel J., Selbitz H-J., and Truyen U., (2009), "Vaccination against porcine Parvovirus protects against disease, but does not prevent infection and virus shedding after challenge infection with a heterologous virus strain", *Journal of General Virology*, 90(10), pp. 2437-2441.
 45. Kim H. J., Kwon S. R., and Yuasa K., (2019), "Establishing the optimal fetal bovine serum concentration to support replication of cyprinid herpesvirus 3 in CCB and KF-1 cell lines", *Journal of Virological Methods*, 276.
 46. Kim S-C, Kim J-H, Kim J-Y, Park G-S, Jeong C-G, and Kim W-I., (2022), "Prevalence of porcine parvovirus 1 through 7 (PPV1-PPV7) and co-factor association with PCV2 and PRRSV in Korea". *BMC Veterinary Research*, 18(1):133.
 47. Kiss I., Kovács E., Zádori Z., Mészáros I., Cságola A., Bajnóczi P., Mortensen P., and Palya V., (2020), "Vaccine Protection Against Experimental Challenge Infection with a PPV-27a Genotype Virus in Pregnant Gilts". *Veterinary Medicine (Auckland, N.Z.)*. 11, pp. 17-24.
 48. Lau S. K., Woo P. C., Tse H., Fu C. T., Au W. K., Chen X. C., Tsoi H. W., Tsang T. H., Chan J. S., Tsang D. N., Li K. S., Tse C.W., Ngo T. K., Tsang O. T., Zheng B. J., Tam S., Chan K. H., Zhou B., and Yuen K. Y., (2008), "Identification of novel porcine and bovine Parvoviruses closely related to human Parvovirus 4", *Journal of General Virology*, 89, pp. 1840–1848.
 49. Li X., Xu H., Zhao Y., Liu Y., Chen J., Wang J., Zhang H., Wu Q., Gao F., Sun J., and Jiang P. (2024). "Chimeric porcine parvovirus VP2 virus-like particles with inserted epitopes: potential as multivalent vaccines". *Vaccines*, 12(5):654.
 50. Ling H., Wang X., Wang C., Zhang Z., Wu Y., Zhang X., Zhai Y., Zhang J., Jiang P., Chen Y., Li J., and Chen H. (2023). "A subunit vaccine based on the VP2 protein of porcine parvovirus (PPV1)". *Frontiers in Immunology*, 14:1148532

51. Lipkin E., Smith J., Burt D., Soller M., and Fulton J. (2017), "Mapping QTLs affecting Marek's disease by selective DNA pooling in eight lines across 15 generations". ISAG 2017, 36th International Society for Animal Genetics Conference
52. Liu Y, Chen Y, Shang Y, Deng X, and Hao H. (2025), "Porcine Parvovirus in China: Recent Advances, Epidemiology, and Vaccine Strategies". *Viruses*. 17(9):1262.
53. Liu D. (2022). "*Molecular Detection of Animal Viral Pathogens*". 1st Edition. Taylor and Francis Group. Chapter 80: Porcine Parvovirus, pp.713-716.
54. Luo Y., and Qiu J. (2015). "Parvovirus infection-induced cell death and cell cycle arrest". *Future Virology*, 10(4), 371–390.
55. Lyu Z., Zhang X., Xue S., Yang X., Liu J., Fan K., and Dai A., (2023), "Detection and genetic evolution analysis of porcine parvovirus type 7 (PPV7) in Fujian Province". *Infection, Genetics and Evolution*, 115:105515.
56. Lyoo K.S., Park Y.H. and Park B.K., (2001), "Prevalence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2 and Porcine parvovirus from aborted fetuses and pigs with respiratory problems in Korea", *Journal of Veterinary Science*, 2(3), pp. 201–207.
57. Ma X., Guo Z., Shen Z., Wang J., Hu Y., and Wang D., (2011), "The immune enhancement of propolis adjuvant on inactivated porcine parvovirus vaccine in guinea pig", *Cellular Immunology*, 270(1), pp. 13-18.
58. McKillen J., Hjertner B., Millar A., McNeilly F., Beldak S., Adair B., and Allan G., (2007). "Molecular beacon real-time PCR detection of swine viruses". *Journal of Virological Methods*, 140, pp. 155-165
59. Mengeling W. L., Cutlip R. C., Wilson R. A., Parks J. B. and Marshall R. F. (1975). "Fetal mummification associated with porcine parvovirus infection". *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 166 (10): 993–995. PMID 1126862
60. Mengeling W. L., Lager K. M., and Vorwald A. C., (2000), "The effect of porcine Parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine reproductive performance", *Animal Reproduction Science*, 60, pp. 199–210.
61. Mészáros I., Olasz F., Cságola A., Tijssen P., and Zádori Z., (2017). "Review Biology of Porcine Parvovirus (Ungulate Parvovirus 1)", *Viruses*, 9(12): 393.
62. Miao L-F., Zhang C-F., Chen C-M., and Cui S-J., (2009), "Real-time PCR to detect and analyze virulent PPV loads in artificially challenged sows and their fetuses", *Veterinary Microbiology*, 138, pp. 145–149.
63. Milek D., Woźniak A., Guzowska M., and Stadejek T., (2019), "Detection Patterns of Porcine Parvovirus (PPV) and Novel Porcine Parvoviruses 2 through 6 (PPV2–PPV6) in Polish Swine Farms", *Viruses*, 11(5): 474.
64. Milek D., Woźniak A., Podgórska K., and Stadejek T., (2020), "Do porcine parvoviruses 1 through 7 (PPV1-PPV7) have an impact on porcine circovirus type 2 (PCV2) viremia in pigs ?". *Veterinary Microbiology*, 242:108613
65. Morrisson R.B. and Joo H.S., (1984). "Acute reproductive losses due to Porcine Parvovirus infection in a swine herd; herd observations and economic analysis of the losses". *Preventive Veterinary Medicine*; 2: 699.

66. Ni J., Qiao C., Han X., Han T., Kang W., Zi Z., Cao Z., Zhai X., and Cai X., (2014), "Identification and genomic characterization of a novel porcine Parvovirus (PPV6) in China", *Virology Journal*, 11, pp. 203-211.
67. Noguera M., Vela A., Kraft C., Chevalier M., Goutebroze S., Paz X. D., Kunze M., Rathkjen P., Schacht E., and Garcia-Morante B., (2021), "Effects of three commercial vaccines against porcine parvovirus 1 in pregnant gilts", *Vaccine*, 39 (29), pp. 3997-4005
68. Nguyen V.G., Dang H. A., Nguyen T. T., Huynh T. M. L., Nguyen B., H., Pham L. A. M, and Le H. T. P., (2022), "Polymerase chain reaction-based detection of coinfecting DNA viruses in Vietnamese pigs in 2017 and 2021". *Veterinary World*, 15(10), pp. 2491-2498
69. Opriessnig T. , Xiao C-T , Gerber P. F. , and Halbur P. G., (2014). "Identification of recently described porcine parvoviruses in archived North American samples from 1996 and association with porcine circovirus associated disease", *Veterinary Microbiology*, 173(1), pp. 9-16.
70. Palinski R.M., Mitra N., and Hause B.M., (2016), "Discovery of a novel Parvovirinae virus, porcine Parvovirus 7, by metagenomic sequencing of porcine rectal swabs", *Virus Genes*, 52, pp. 564–567
71. Parrish C. R., (2010), "Structures and functions of Parvovirus capsids and the process of cell infection", *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 343, pp. 149–176.
72. Parthiban S., Sowndharya R.K.V., Raja P., Parthiban M., Ramesh A., Dhinakar Raj G., Senthilkumar K., Balasubramanyam D., Hemalatha S., Bharathi R., Ravishankar C., and Thahira Parveen, S., (2022), "Molecular detection of porcine Parvovirus 1–associated reproductive failure in southern India". *Tropical Animal Health and Production*, 54(195).
73. Paul P.S., and Mengeling W.L.,(1986), "Vaccination of swine with an inactivated porcine parvovirus vaccine in the presence of passive immunity", *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 188(4), 410-3. PMID: 3949618.
74. Pegu S.R., Deb R., Das P.J., Sengar G.S., Yadav A.K., Rajkhowa S., Paul S., and Gupta V.K.,(2023), "Development of multiplex PCR assay for simultaneous detection of African swine fever, porcine circo and porcine parvo viral infection from clinical samples". *Animal Biotechnology*. 34(6):1883-1890.
75. Plotkin, S. A. (2010). "Correlates of protection induced by vaccination". *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(7), 1055–1065
76. Qiu, J., Cheng, F., Burger, L. R., and Pintel, D. (2017). "The transcription profile of the bocavirus bovine parvovirus type 1 in nonpermissive cells". *Journal of Virology*, 91(2), e01741-16.
77. Reed L. J., and Muench H. (1938), "A simple method of estimating fifty per cent endpoints". *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 27: 493-497
78. Renzhammer R., Truyen U., Buchebner B., G. Baumgartner, Kobialka R. M. , Wahed A. A. E. , Koch M. , Ladinig A. , and Unterweger C. , (2024), "Duration of maternally derived antibodies of porcine parvovirus in growing pigs and

- presence of antibodies in gilts and sows vaccinated with three different parvovirus vaccines”, *Porcine Health Management*, 15.
79. Ros C., Bayat N., Wolfisberg R., and Almendral J.M., (2017). “Protoparvovirus Cell Entry”. *Viruses*, 9(11): 313
 80. Saekhow P. , and Ikeda H., (2015), “Prevalence and genomic characterization of porcine parvoviruses detected in Chiangmai area of Thailand in 2011”, *Microbiology and Immunology*, 59(2), pp. 82-88.
 81. Saitou N., and Nei M., (1987), “The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees”. *Molecular Biology and Evolution*, 4, pp. 406–425.
 82. Schirtzinger E. E., Suddith A. W., Hause B. M., and Hesse and R. A., (2015), “First identification of porcine Parvovirus 6 in North America by viral metagenomic sequencing of serum from pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus”, *Virology Journal*, 12, pp. 170-179.
 83. Siegrist C.-A. (2018). “Vaccine immunology”. In S. A. Plotkin, W. A. Orenstein, & P. A. Offit (Eds.), *Plotkin’s vaccines* (7th ed., pp. 16–34). Elsevier
 84. Simpson A.A., Hébert. B., Sullivan G.S., Parrish C.R., Zadori Z., Tijssen P., and Rossmann M.G., (2002), “The structure of porcine Parvovirus: comparison with related viruses”, *Journal of Molecular Biology*, 315, pp. 1189–1198.
 85. Sørensen K. J., and Askaa J., (1981), “Vaccination against porcine parvovirus infection”, *Acta Veterinaria Scandinavica*, 22(2), pp. 171-179.
 86. Serena M.S., Cappuccio J.A., Metz G.E, Aspitia C.G., Dibárbora M., GalloCalderón M., and Echeverría M.G., (2019), “Detection and molecular characterization of porcine Parvovirus in fetal tissues from sows without reproductive failure in Argentina”, *Heliyon*, 5(11).
 87. Sun J., Huang L., Wei Y., Wang Y., Chen D., Du W., Wu H., and Liu C.,(2015), “Prevalence of emerging porcine parvoviruses and their co-infections with porcine circovirus type 2 in China”, *Archives of Virology*, 160(5):1339-44.
 88. Streck A.F., Bonatto S.L., Homeier T., Souza C.K., Goncalves K.R., Gava D., Canal C.W., and Truyen U., (2011), “High rate of viral evolution in the capsid protein of porcine Parvovirus”, *Journal of General Virology*, 92, pp. 2628–2636.
 89. Streck A. F. (2013), *Studies on genetic properties of porcine parvoviruses*, Faculty of Veterinary Medicine of the University of Leipzig.
 90. Streck A. F., Canal C. W., and Truyen U., (2015), “Molecular epidemiology and evolution of porcine Parvoviruses”, *Infection, Genetics and Evolution*, 36, pp. 300–306.
 91. Streck A.F., and Truyen U., (2020)., “Porcine Parvovirus”, *Current Issues in Molecular Biology*, 37(1), pp. 33-46.
 92. Tamošiūnas P., Michailova M., Petraitytė-Burneikienė R., Lasickienė R., Valiūnienė J., and Sasnauskas K. (2014). “Generation of recombinant porcine parvovirus virus-like particles”. *PLoS ONE*, 9(9):e107176.

93. Tattersall. P., (2006), *The evolution of Parvovirus taxonomy*, In Parvoviruses. J. R. Kerr, S. F. Cotmore, M. E. Bloom, R. M. Linden, and C. R. Parrish (ed.), p.5-14.
94. Thuy N.T.D, Trung N.T., Dung T.Q., Khoa D.V.A., Thuy D.T.N., and Opriessnig T. (2021), “First investigation of the prevalence of parvoviruses in slaughterhouse pigs and genomic characterization of ungulate copiparvovirus 2 in Vietnam”, *Archives of Virology*, 166(3), pp. 779-788
95. Tuck M.K., Chan D.W., Chia D., Godwin A.K., Grizzle W.E., Krueger K.E., Rom W., Sanda M., Sorbara L., Stass S., Wang W., and Brenner D.E., (2009), “Standard operating procedures for serum and plasma collection: early detection research network consensus statement standard operating procedure integration working group”, *Journal of Proteome Research*, 8(1), pp.113-117.
96. Wang F., Wei Y., Zhu C., Huang X., Xu Y., Yu L. and Yu X., (2010), “Novel Parvovirus sublineage in the family of Parvoviridae”, *Virus Genes*, 41, pp. 305-308
97. Wang L., Song Y., Xu M., Zhang C., Zhang L., Xia L., and Wei Z., (2024), “Proteomics analysis of PK-15 cells infected with porcine parvovirus and the effect of PCBP1 on PPV replication”, *Microbiology Spectrum*, 12(6).
98. Wu R., Wen Y., Huang X., Wen X., Yan Q., Huang Y., Ma X.,and Cao S., (2014), “First complete genomic characterization of a porcine Parvovirus 5 isolate from China”, *Archives of Virology*, 159, pp. 1533–1536.
99. van den Born E., van den Elzen P.P.M., van Kilsdonk E., Hoeijmakers M.J.H., and Segers R.P.A.M., (2020), “An octavalent vaccine provides pregnant gilts protection against a highly virulent porcine parvovirus strain. *BMC Veterinary Research*, 16(1), 55.
100. Xiao C. T., Gerber P. F., Giménez-Lirola L. G., Halbur P. G., and Opriessnig T., (2013a), “Characterization of porcine Parvovirus type 2 (PPV2) which is highly prevalent in the USA”, *Veterinary Microbiology*, 161, pp. 325–330.
101. Xiao C. T., Gimenez-Lirola L. G., Jiang Y. H., Halbur P. G., and Opriessnig T., (2013b), “Characterization of a novel porcine Parvovirus tentatively designated 55 PPV5”, *PLOS One*, 8, e65312.
102. Xiao C.T., Halbur P.G., and Opriessnig T., (2013c), “Complete genome sequence of a novel porcine Parvovirus (PPV) provisionally designated PPV5”, *Genome Announcements*, 1, e00021–00012.
103. Xing X., Zhou H., Tong L., Chen Y., Sun Y., Wang H., and Zhang G., (2017), “First identification of porcine Parvovirus 7 in China”, *Archives of Virology*, 163, pp. 209–213.
104. Xu M., Jin X., Zhang C., Liao H., Wang P., Zhou Y., Song Y., Xia L., and Wang L., (2022), “TLR2-Mediated NF-KB Signaling Pathway Is Involved in PPV1-Induced Apoptosis in PK-15 Cells”, *Veterinary Research Communications*, 1, pp. 1-11.
105. Xu Y. G., Cui L. C., Wang H. W., Huo G. C., and Li S. L., (2013), “Characterization of the capsid protein VP2 gene of a virulent strain NE/09 of

- porcine Parvovirus isolated in China”. *Research in Veterinary Science*, 94, pp. 219–224.
106. Xu Y.G., Cui B.A., Liu X.J., Cui Z.W., Liu T., Yin Y.L., Pan Q.Y., Guo Y., and Gao Y.W. (2008). “Construction of recombinant *Lactobacillus casei* expressing VP2 protein of porcine parvovirus as a mucosal vaccine”. *Vaccine*, 26(23):2735–2742.
 107. Zeeuw E. J. L., Leinecker N., Herwig V., Selbitz H-J., and Truyen U., (2007), “Study of the virulence and cross-neutralization capability of recent porcine Parvovirus field isolates and vaccine viruses in experimentally infected pregnant gilts”. *Journal of General Virology*, 88(2), pp. 420-427.
 108. Zhang J., Fan J., Li Y., Liang S., Huo S., Wang X., Zuo Y., Cui D., Li W., Zhong Z., and Zhong F., (2019), “Porcine parvovirus infection causes pig placenta tissue damage involving nonstructural protein 1 (NS1)-induced intrinsic ROS/mitochondria-mediated apoptosis”. *Viruses*, 11(4), pp. 389-398.
 109. Zhang H. B., Huang L., Liu Y. J., Lin T., Sun C. Q., Deng Y., Wei Z. Z., Cheung A. K., Long J. X., and Yuan S. S., (2011), “Porcine bocaviruses: genetic analysis and prevalence in Chinese swine population”, *Epidemiology and Infection*, 139, pp. 1581- 1586.
 110. Zhang H., Huang Y., Du Q., Luo X., Zhang L., Zhao X., and Tong D., (2015), “Porcine parvovirus infection induces apoptosis in PK-15 cells through activation of p53 and mitochondria-mediated pathway”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 456(2), pp. 649-655.
 111. Zhang X., Ma P., Shao T., Xiong Y., Du Q., Chen S., Miao B., Zhang X., Wang X., Huang Y., Tong D. (2022). “Porcine parvovirus triggers autophagy through the AMPK/Raptor/mTOR pathway to promote viral replication in porcine placental trophoblasts”. *Veterinary Research*. 3;53(1):33.
 112. Zhao X., Xiang H., Bai X., Fei N., Huang Y., Song X., Zhang H., Zhang L., and Tong D., (2016), “Porcine parvovirus infection activates mitochondria-mediated apoptotic signaling pathway by inducing ROS accumulation”, *Virology Journal*, 13, pp. 26-34.
 113. Zheng H-H , Wang L-Q , Fu P-F , Zheng L-L , Chen H-Y , and Liu F., (2020), “Characterization of a recombinant pseudorabies virus expressing porcine parvovirus VP2 protein and porcine IL-6”. *Virology Journal*, 17(1).
 114. Zhou Y., Jiang L., Li X., Zhang H., Tong W., Yu H., Liu C., Zheng H., Li Y., Wang J., Wu D., and Zhou E.M. (2010). “Production and purification of VP2 protein of porcine parvovirus”. *Virology Journal*, 7:129

Các trang web

115. <https://www.msd-animal-health-swine.com/diseases-solutions/sowcare/parvovirosis>
116. <https://www.nadis.org.uk/disease-a-z/pigs/porcine-parvovirus>
117. Trang web Cơ quan thống kê quốc gia: <https://www.nso.gov.vn/>
118. <https://viralzone.expasy.org>
119. <https://greenvet.com.vn>

- 120. <https://hoanto.com>
- 121. <https://tienphatvethcm.com.vn>
- 122. <https://tigervet.com.vn>
- 123. <https://goldenvet.com.vn>
- 124. Trang thông tin điện tử Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn Tỉnh Đắk Lắk:
<https://nnptnt.daklak.gov.vn/>
- 125. Cổng thông tin điện tử Tỉnh ủy Thanh Hóa :<https://thanhhoa.dcs.vn/tinhuy>
- 126. Trang thông tin điện tử Chi cục Chăn nuôi Thú y Bình Định :
<http://cccnty.snnptnt.binhdingh.gov.vn>
- 127. Cổng thông tin điện tử Tỉnh Đồng Nai: <https://www.dongnai.gov.vn/>
- 128. Báo điện tử Khuyến nông Việt Nam: <https://khuyennongvn.gov.vn/>

PHỤ LỤC

	Trang
Phụ lục 1 Quy trình tách chiết DNA	-2-
Phụ lục 2 Quy trình chi tiết nuôi cấy tế bào và virus	-3-
Phụ lục 3 Đường chuẩn xác định mối tương quan giữa giá trị Ct của phản ứng Realtime-PCR và số lượng bản sao virus	-6-
Phụ lục 4 Quy trình HI và ELISA	-8-
Phụ lục 5 Kết quả xác định mẫu dương tính PPV	-13-
Phụ lục 6 Kết quả quan sát bệnh tích tế bào của 32 chủng phân lập	-14-
Phụ lục 7 Kết quả PCR định type của 32 chủng phân lập	-17-
Phụ lục 8 Trình tự đoạn gen NS1 (330bp) của 32 chủng phân lập	-20-
Phụ lục 9 Trình tự gen VP2 trên ngân hàng gen NCBI	-26-
Phụ lục 10 Kết quả xử lý thống kê đa biến xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp bằng phần mềm Minitab18	-33-
Phụ lục 11 Kết quả xử lý thống kê số lượng bản sao virus sau 3 đời cấy truyền của 32 chủng phân lập	-36-
Phụ lục 12 Kết quả xử lý thống kê Hiệu giá TCID ₅₀ của 32 chủng phân lập	-39-
Phụ lục 13 Kết quả xử lý thống kê Hiệu giá HI sau công cường độ	-42-
Phụ lục 14 Kết quả xử lý thống kê Hiệu giá HI miễn dịch chuột lang	-45-
Phụ lục 15 Kết quả xử lý thống kê Hiệu giá HI miễn dịch trên lợn	-49-
Phụ lục 16 Kết quả xử lý thống kê Hiệu giá ELISA miễn dịch trên lợn	-53-
Phụ lục 17 Kết quả so sánh trình tự gen NS1, VP2 của chủng VV5, TX7 qua các đời nuôi cấy 01, 05, 10, 15	-57-
Phụ lục 18 Giấy chứng nhận y đức động vật	-62-

Phụ lục 1. Quy trình tách chiết DNA

Sử dụng kit MagMAX Viral Pathogen Kit (Thermo Fisher Scientific) và tiến hành theo các bước trong hướng dẫn của nhà sản xuất, cụ thể như sau:

Bước 1: Chuẩn bị dung dịch gồm 265 μ l Binding Solution, 10 μ l Mag Max DNA/RNA Binding Beads, 5 μ l Proteinase K. Thêm 200 μ l mẫu và vortex 2 phút.

Bước 2: Ủ mẫu đã chuẩn bị ở bước 1 với nhiệt độ 65°C trong 5 phút. Sau khi ủ, mẫu được vortex trong 3 phút.

Bước 3: Để mẫu vào giá từ chờ 5 phút cho đến khi hạt từ bám hết, sau đó hút bỏ nước.

Bước 4: Thêm 500 μ l Wash buffer vào và vortex 1 phút. Để mẫu vào giá từ chờ 2 phút, sau đó hút bỏ nước.

Bước 5: Thêm 500 μ l Ethanol 80 % vào và vortex 1 phút. Để mẫu vào giá từ chờ 2 phút, sau đó hút bỏ nước.

Bước 6: Thêm 250 μ l Ethanol 80 % vào và vortex 1 phút. Để mẫu vào giá từ chờ 2 phút, sau đó hút bỏ nước.

Bước 7: Để khô mẫu trong 2 - 5 phút.

Bước 8: Thêm 50 μ l Elution Solution vào và vortex 3 phút.

Bước 9: Ủ dung dịch với nhiệt độ 65°C trong 10 phút. Sau khi ủ, mẫu được vortex trong 3 phút.

Bước 10: Để mẫu vào giá từ chờ 2 phút sau đó hút dung dịch DNA qua eppendorf 1,5ml mới.

DNA sau khi thu được sẽ được bảo quản ở điều kiện - 20°C.

Phụ lục 2. Quy trình chi tiết nuôi cấy tế bào và virus

*** Nuôi cấy tế bào PK-15**

PK-15 là dòng tế bào thương mại có nguồn gốc từ tế bào thận lợn trưởng thành. Các dòng tế bào này phát triển trong môi trường dinh dưỡng E-MEM có bổ sung 10% FBS và 1% Penicilin - Streptomycin ở 37°C, 5% CO₂ (theo hướng dẫn của hãng ATCC, Mỹ).

Môi trường E-MEM được bổ sung với 10% FBS và 1% dung dịch Penicillin-Streptomycin được giữ ấm trong tủ ấm 37°C, 30 phút trước khi sử dụng. Tế bào PK-15 sau khi được lấy ra từ bình nitơ lỏng sẽ được rã đông nhanh ở 37°C. Sau khi rã đông, tế bào được chuyển vào ống falcon 15ml có chứa sẵn 5 ml E-MEM. Tiếp đó, dung dịch được ly tâm ở 1.500 vòng/phút, 5 phút, 4°C. Dịch nổi được loại bỏ và phần cặn có chứa tế bào được thu lại. Cặn tế bào được hòa tan trong 1 ml E-MEM và chuyển vào bình nuôi cấy có diện tích bề mặt 25 cm² (bình T25) chứa 6 ml E-MEM. Sử dụng pipet vô trùng đảo nhẹ hỗn hợp để tế bào hòa tan đều. Sau đó, bình nuôi cấy được chuyển vào tủ ấm ở 37°C và 5% CO₂. Hằng ngày, sự phát triển của tế bào được quan sát dưới kính hiển vi soi ngược với độ phóng đại 10X. Khi mật độ tế bào đạt từ 80 – 90% bề mặt bình nuôi cấy, tế bào có thể được sử dụng để tiếp tục cấy chuyển hoặc gây nhiễm virus (Nguyễn Thị Hoa và cộng sự, 2018).

*** Cấy chuyển tế bào PK-15**

Khi mật độ tế bào đạt từ 80 – 90% bề mặt bình nuôi cấy, tiến hành cấy chuyển tế bào theo phương pháp thực hiện như sau:

Bước 1: Hút bỏ môi trường từ bình nuôi cấy và rửa lớp tế bào bằng 10 ml dung dịch PBS.

Bước 2: Thêm 1ml Trypsin-EDTA vào bình nuôi cấy và ủ ở 37°C trong 10 phút. Sau đó, quan sát tế bào dưới kính hiển vi soi ngược với độ phóng đại 10X và gõ nhẹ bình cho đến khi tế bào tách rời thành tế bào đơn. Hút dung dịch chứa tế bào vào ống falcon 15 ml có chứa 7 ml môi trường E-MEM bổ sung với 10% FBS và 1% dung dịch Penicillin-Streptomycin. Tiếp theo, dung dịch Trypsin được loại bỏ bằng cách ly tâm ở 1.500 vòng/phút, 5 phút, 4°C.

Bước 3: Cặn tế bào sau đó được hòa tan trong 5 ml môi trường và thực hiện đếm số tế bào.

Bước 4: Tế bào được pha loãng đến 2×10^5 tế bào/ml và chia đều vào các bình nuôi cấy mới có chứa sẵn môi trường nuôi cấy. Quan sát tế bào dưới kính hiển vi soi ngược với độ phóng đại 10X, lắc nhẹ bình để tế bào tách rời nhau, không bám thành cụm.

Bước 5: Chuyển bình tế bào vào tủ ấm 37°C , 5 % CO_2 . Sự phát triển của tế bào được quan sát hàng ngày dưới kính hiển vi soi ngược với độ phóng đại 10X (Phạm Văn Sơn và cộng sự, 2017).

*** Giữ giống tế bào**

Các bước thu nhận tế bào để giữ giống được thực hiện giống bước 1 đến bước 3 trong phương pháp cấy chuyển tế bào, bước 4 được thực tiếp như sau:

Bước 4: Pha loãng tế bào đạt nồng độ 5×10^6 tế bào/ml trong môi trường E-MEM với 10% FBS, 1% dung dịch Penicillin-Streptomycin và 10% Dimethylsulfoxide (DMSO). Huyền dịch tế bào sau đó được chia vào các ống chịu nhiệt, mỗi ống 1ml.

Bước 5: Tế bào giữ giống được bảo quản như sau: đầu tiên tế bào được bảo quản ở -20°C trong vòng 2 – 3 giờ, sau đó chuyển sang bảo quản ở -80°C qua đêm. Cuối cùng, tế bào được chuyển vào lưu trữ trong nitơ lỏng (Phạm Văn Sơn và cộng sự, 2017).

*** Gây nhiễm virus**

Mẫu huyền dịch hoặc huyết thanh được chuẩn bị ở trên sẽ được xét nghiệm sự có mặt của các loại virus: Virus dịch tả lợn (CSFV), Virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản trên lợn (PRRSV), Virus circo type 2 (PCV2). Các xét nghiệm được thực hiện theo tiêu chuẩn Việt Nam: Xét nghiệm PRRS theo TCVN 8400-21:2014, xét nghiệm PCV theo TCVN 8400-36:2015, và xét nghiệm CSF theo TCVN 8400-47:2019. Tất cả các mẫu âm tính với tất cả các loại virus trên sẽ được sử dụng để phân lập PPV trên dòng tế bào PK-15.

Các bước gây nhiễm parvovirus được tiến hành như sau:

Bước 1: Tế bào PK-15 được nuôi cấy trong bình T25 đến khi mật độ tế bào đạt từ 80 – 90% bề mặt bình nuôi cấy.

Bước 2: Mẫu huyết thanh hoặc huyền dịch sẽ được lọc bằng màng lọc vô trùng có kích thước lỗ lọc $0,2\mu\text{m}$.

Bước 3: Tế bào PK-15 đã được chuẩn bị trong bước 1. Tiếp theo, môi trường nuôi cấy được loại bỏ. Tế bào được ủ với 1ml dung dịch sau lọc trong 60 phút ở nhiệt độ 37°C . Sau đó 6 ml môi trường E-MEM bổ sung 5% FBS và 1% Penicilin – Streptomycin

được bổ sung vào bình nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy được giữ ấm ở 37°C, 30 phút trước khi sử dụng.

Bước 4: Chuyển bình tế bào vào tủ ấm 37°C, 5% CO₂ . Hàng ngày, quan sát sự phát triển của tế bào dưới kính hiển vi soi ngược với độ phóng đại 10X. Quan sát tế bào trong vòng 7 ngày.

Bước 5: Virus được thu lại khi diện tích tế bào bị phá hủy đạt 80 – 90% diện tích đáy bình nuôi. Tiến hành đông tan 03 lần để virus thoát hoàn toàn ra khỏi tế bào. Sau đó bảo quản virus ở nhiệt độ -30°C. Tiếp tục sử dụng 10% dung dịch ở đời nuôi cấy thứ nhất để gây nhiễm đời thứ hai theo phương pháp như trên. Kết quả phân lập cuối cùng được ghi nhận sau khi virus được cấy chuyển 3 đời liên tiếp (Nguyễn Thị Hoa và cộng sự, 2018).

Phụ lục 3. Đường chuẩn xác định mối tương quan giữa giá trị Ct của phản ứng Realtime-PCR và số lượng bản sao virus

- *Quy trình xây dựng đường chuẩn xác định mối tương quan giữa giá trị Ct của phản ứng Realtime-PCR và số lượng bản sao virus*

Đoạn gen NS1 của Parvovirus được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu đã được công bố bởi Miao và cộng sự (2009):

NS1-F: 5'-AGCCAAAAATGCAAACCCCAATA-3'

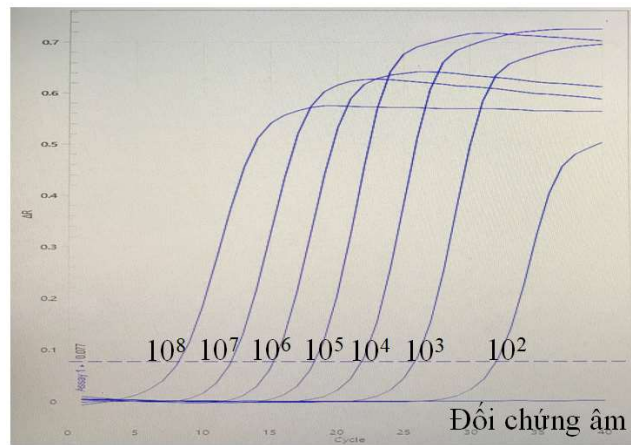
NS1-R: 5'-CTCCACGGCTCCAAGGCTAAAG-3'

Sản phẩm PCR thu được được chèn vào vector pGEM-T (Promega) và biến nạp vào chủng E. coli DH5 α để nhân dòng. Plasmid tái tổ hợp được tách chiết bằng bộ QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN), sau đó đo nồng độ bằng quang phổ kế UV/Vis (BioPhotometer plus, Eppendorf). Số bản sao plasmid được tính toán bằng công cụ DNA Copy Number Calculator (Thermo Scientific Web Tools) dựa trên khối lượng DNA thu được. Dung dịch plasmid gốc sau đó được pha loãng theo cấp số nhân 10, tạo thành dãy chuẩn cho phản ứng Real-time PCR. Các giá trị Ct thu được từ phản ứng được sử dụng để xây dựng đường chuẩn định lượng (Miao et al., 2009).

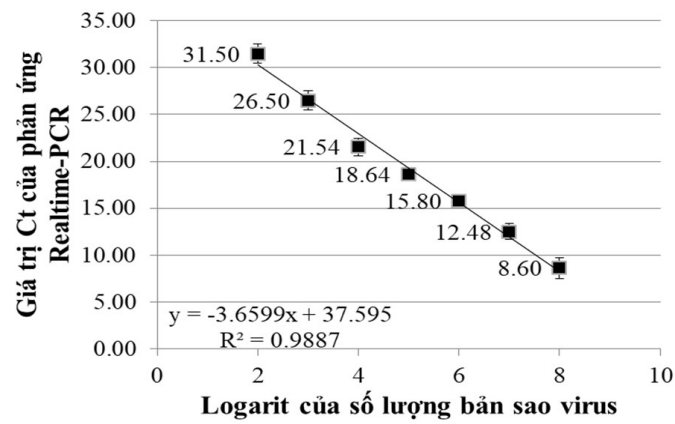
Kết quả xây dựng đường chuẩn:

Đoạn gen NS1 có kích thước 142 bp được khuếch đại thành công bằng cặp mồi NS1-F và NS1-R (Miao et al., 2009) và được chèn ổn định vào vector pGEM-T (kích thước 3 kb). Nồng độ plasmid tái tổ hợp ban đầu đạt 0,034 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, tương ứng với $1,008 \times 10^{10}$ bản sao/ μl , được xác định bằng công cụ tính toán của Thermo Scientific. Mẫu plasmid được pha loãng theo cấp số 10, và các phản ứng Real-time PCR được thực hiện ba lần lặp kỹ thuật để đảm bảo độ chính xác.

Kết quả phân tích (Hình 1) cho thấy các giá trị Ct có mối tương quan tuyến tính cao với số lượng bản sao plasmid trong dãy pha loãng, qua đó đường chuẩn định lượng được xây dựng với độ tin cậy cao (Hình 2). Dựa trên đường chuẩn này, số lượng bản sao virus trong các mẫu DNA có thể được tính toán chính xác từ giá trị Ct thu được trong các phản ứng Real-time PCR sử dụng cặp mồi NS1-F và NS1-R.



Hình 1. Kết quả Realtime-PCR các nồng độ pha loãng



Hình 2. Đường chuẩn định lượng số bản sao virus

Phụ lục 4. Quy trình HI và ELISA

I - QUY TRÌNH PHẢN ỨNG NGĂN TRỞ NGỪNG KẾT HỒNG CẦU (HI)

1.1. Phản ứng ngưng kết hồng cầu (HA)

Cách tiến hành

- Dùng pipet nhỏ 50 µl PBS vào các giếng của đĩa nhựa 96 giếng đáy chữ V từ cột thứ 1 đến cột thứ 12
- Dùng pipet nhỏ 50 µl PPV vào giếng 1 của đĩa phản ứng.
- Pha loãng kháng nguyên: sử dụng pipet trộn đều virus với PBS ở giếng 1, hút 50 µl chuyển sang giếng 2, trộn đều, hút 50 µl chuyển sang giếng 3, trộn đều, tiếp tục làm như vậy đến giếng 11 rồi hút bỏ đi 50 µl
- Dùng pipet nhỏ tiếp 50 µl PBS vào tất cả các giếng của đĩa phản ứng
- Dùng pipet nhỏ 50 µl hồng cầu chuột lang 0,8 % vào các giếng của đĩa phản ứng. Lắc nhẹ đĩa phản ứng và ủ đĩa ở nhiệt độ 37 °C trong thời gian 1 h, sau đó đọc kết quả

Đọc kết quả

- Phản ứng âm tính: hồng cầu lắng xuống đáy tạo thành chấm tròn.
- Phản ứng dương tính: xảy ra hiện tượng ngưng kết, hồng cầu ngưng kết thành cụm lấm tấm xung quanh giếng.
- Đọc hiệu giá ngưng kết: hiệu giá ngưng kết kháng nguyên được đánh giá ở độ pha loãng cao nhất còn có phản ứng ngưng kết xảy ra.

1.2. Phản ứng ngăn trở ngưng kết hồng cầu (HI)

Xử lý huyết thanh cần kiểm tra: Vô hoạt huyết thanh cần kiểm tra bằng bể ổn nhiệt (ở nhiệt độ 56 °C trong 30 phút. Cho huyết thanh đã được vô hoạt vào các tuýp eppendorf, mỗi tuýp 50 µl huyết thanh. Thêm 150µl dung dịch Kaolin 25% và để yên ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Ly tâm dung dịch với tốc độ 2500 vòng/ phút trong 10 phút, sau đó thêm 25 µl hồng cầu chuột lang 0,8 %, lắc nhẹ và để yên ở nhiệt độ phòng trong 1 h. Tiếp tục ly tâm dung dịch với tốc độ 2500 vòng/ phút trong 10 min, thu huyết thanh nổi ở trên.

Cách tiến hành

- Dùng pipet nhỏ 50 µl PBS vào đĩa nhựa 96 giếng đáy chữ U từ cột thứ 1 đến cột thứ 12.

- Dùng pipet nhỏ 50 µl huyết thanh đối chứng dương vào giếng A1 và B1, nhỏ 50 µl huyết thanh đối chứng âm vào giếng C1 và D1, nhỏ 50 µl huyết thanh đã xử lý vào giếng E1 và G1 của đĩa phản ứng.
- Pha loãng huyết thanh: sử dụng pipet trộn đều huyết thanh với PBS ở cột 1, rồi hút 50 µl chuyển sang cột 2, trộn đều, hút 50 µl chuyển sang cột 3, trộn đều, tiếp tục làm như vậy đến cột 11 rồi bỏ đi 50 µl.
- Dùng pipet nhỏ 50 µl dung dịch kháng nguyên 4 đơn vị HA vào các giếng từ cột thứ 1 đến cột 11. Lắc nhẹ đĩa, ủ đĩa ở nhiệt độ 37 °C trong thời gian 1 h
- Dùng pipet nhỏ 50 µl PBS (B.1.7) vào cột 12 làm đối chứng hồng cầu.
- Dùng pipet nhỏ 50 µl hồng cầu chuột lang 0,8 % vào các giếng của đĩa phản ứng.
- Lắc nhẹ đĩa phản ứng và để ở nhiệt độ phòng trong 45 phút đến 60 phút, sau đó đọc kết quả.

Đọc kết quả

- Phản ứng âm tính: có hạt ngưng kết lắng chầm.
- Phản ứng dương tính: hồng cầu lắng xuống đáy tạo chấm tròn.
- Hiệu giá của huyết thanh là nghịch đảo của giá trị pha loãng lớn nhất mà ức chế 50 % 4 HA vi rút

II - QUY TRÌNH ELISA (PrioCHECK™ Porcine Parvovirus Ab Plate Kit – ThermoFisher Scientific)

2.1. Chuẩn bị dung dịch trước khi thực hiện

- **Dilution buffer 5X** (Thành phần 3) phải được pha loãng theo tỷ lệ 1:5 trong nước khử khoáng. Độ ổn định của Dilution buffer working solution: 5 giờ ở 22 ± 3°C.
- **Horse Serum** Hoàn nguyên huyết thanh ngựa (Thành phần 6) với 3,5 ml nước khử khoáng (Thành phần 5). Sau khi pha, bảo quản ở -20°C cho đến ngày hết hạn.
- Việc hoàn nguyên **thuốc thử đông khô** phải được thực hiện như sau:
 1. Cân bằng các lọ ở nhiệt độ 22 ± 3°C.
 2. Để lọ thuốc ở vị trí thẳng đứng, gõ nhẹ lọ thuốc vào mặt bàn để đảm bảo rằng chất bên trong nằm ở đáy lọ.
 3. Mở lọ.
 4. Thêm lượng nước khử khoáng cần thiết.

5. Đẩy nút trên lọ và xoay nhẹ lọ để vật liệu khô còn lại sẽ được hòa tan.
6. Để yên vật liệu đông khô trong 15 phút ở $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$.
7. Thỉnh thoảng đảo ngược lọ nhẹ nhàng (nên tránh tạo bọt tránh).

- Conjugate buffer

Để thực hiện xét nghiệm với hai dải, hãy thêm vào 1,9 mL dung dịch Dilution buffer working, 0,1 mL huyết thanh ngựa đã hoàn nguyên (nồng độ cuối cùng của ngựa huyết thanh là 5% (v/v)). Dung dịch Conjugate buffer chưa sử dụng có thể được bảo quản ở nhiệt độ $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ trong thời gian tối đa đến 24 giờ.

- Conjugate dilution

Pha loãng Conjugate (30x) (Thành phần 2) 1:30 bằng Conjugate buffer. Chuẩn bị 1,8 mL để thực hiện xét nghiệm với hai dải.

Lưu ý: Conjugate phải được pha loãng ngay trước khi sử dụng.

- Kháng nguyên (Antigen)

Hoàn nguyên Antigen (Thành phần 7) với 6 mL Dilution buffer working. Để sử dụng một phần bộ xét nghiệm, kháng nguyên hoàn nguyên trong lọ phải được chia thành các phần 1,0 mL (tối đa 6 lần chạy thử trên mỗi đĩa). Tránh rã đông nhiều lần và bảo quản các phần dịch trong lọ nhỏ ở -20°C .

- Washing solution

Washing Fluid (200x) (Thành phần 4) phải được pha loãng theo tỷ lệ 1:200 trong nước khử khoáng và đủ cho thể tích cuối cùng là 12 lít dung dịch rửa. Độ ổn định của dung dịch rửa: 1 tuần bảo quản ở $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Lưu ý: Có thể sử dụng máy rửa ELISA có bán trên thị trường. Nếu không có sẵn, Việc rửa các đĩa có thể được thực hiện bằng tay bằng cách phân phối 200 – 300 μl dung dịch rửa vào tất cả các giếng của đĩa. Sau đó, làm trống đĩa và lặp lại nhiều lần theo quy định. Không cần thiết phải ngâm đĩa. Gõ nhẹ vào đĩa sau lần rửa cuối cùng.

2.2. Quá trình thực hiện

❖ Ủ trước mẫu xét nghiệm và kháng nguyên

1. Trộn 96 μl dung dịch Dilution buffer working solution với 24 μl Huyết thanh tham chiếu 1 (Thành phần 8) và 120 μl kháng nguyên hoàn nguyên.

2. Trộn 96µl dung dịch Dilution buffer working solution với 24µl Huyết thanh tham chiếu 2 (Thành phần 9) và 120µl kháng nguyên hoàn nguyên.
3. Trộn 12µl mỗi mẫu huyết thanh với 48µl Dilution buffer working solution và 60µl kháng nguyên hoàn nguyên.
4. Ủ trong 60 ± 5 phút ở $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

❖ Ủ trong đĩa thử nghiệm

1. Dán nhãn từng dải của Tấm thử (Thành phần 1) bằng bút đánh dấu.
2. Phân phối 100 µL Dilution buffer working solution vào giếng A1 và B1.
3. Phân phối 50 µL Dilution buffer working solution vào giếng C1 và D1.
4. Thêm 50 µL kháng nguyên hoàn nguyên vào giếng C1 và D1 và trộn.
5. Phân phối 100 µL Huyết thanh Tham chiếu 1 - hỗn hợp kháng nguyên vào giếng E1 và F1.
6. Phân phối 100 µL Huyết thanh Tham chiếu 2 - hỗn hợp kháng nguyên vào các giếng G1 và H1.
7. Phân phối 100 µL mẫu xét nghiệm - hỗn hợp kháng nguyên vào các giếng còn lại.
8. Đậy đĩa thử lại và ủ trong 120 ± 5 phút ở $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

❖ Ủ với Conjugate

1. Đổ tấm thử ra và rửa tấm 6 lần với 200 đến 300 µL dung dịch rửa. Gõ nhẹ vào đĩa sau lần giặt cuối cùng.
2. Phân phối 100 µL Dilution conjugate vào tất cả các giếng.
3. Đậy đĩa thử lại và ủ trong 60 ± 5 phút ở $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

❖ Ủ với chất nền tạo màu (TMB)

1. Đổ đĩa thử nghiệm ra sau thời gian ủ và rửa đĩa 6 lần với 200 đến 300 µL dung dịch rửa. Gõ nhẹ vào đĩa sau chu trình giặt cuối cùng.
2. Phân phối 100 µL Chất tạo màu (TMB) (Thành phần 10) vào tất cả các giếng.
3. Ủ đĩa trong 15 phút ở $22 \pm 3^\circ\text{C}$.
4. Thêm 100 µL Stop solution (Thành phần 11) vào tất cả các giếng.
5. Trộn hàm lượng trong giếng trước khi đo.

2.3. Đọc kết quả và tính kết quả

1. Đo mật độ quang (OD) của giếng ở bước sóng 450 nm trong phạm vi 15 phút sau khi ngừng phản ứng tạo màu.
2. Tính giá trị trung bình OD 450 của giếng A1 và B1 (= OD 450 blank).
3. Tính giá trị OD 450 đã hiệu chỉnh của huyết thanh tham chiếu 1, 2 và của mẫu huyết thanh bằng cách trừ đi giá trị trung bình của OD 450 blank.
4. Tính giá trị trung bình OD 450 đã hiệu chỉnh của giếng C1 và D1 (= OD 450 tối đa).
5. Phần trăm ức chế (PI) được tính theo công thức sau:

$$PI = 100 - (OD\ 450\ \text{đã hiệu chỉnh của mẫu thử} / OD\ 450\ \text{đã hiệu chỉnh tối đa}) \times 100$$

$PI \geq 50\%$: Mẫu dương tính với kháng thể PPV

$PI < 50\%$: Mẫu âm tính với kháng thể PPV

Tiêu chí xác thực

1. Giá trị OD 450 blank trung bình (giếng A1 và B1) phải $< 0,300$.
2. OD 450 tối đa đã hiệu chỉnh (giếng C1 và D1) phải $> 1,000$.
3. PI của Huyết thanh tham chiếu 1 (đối chứng dương tính) phải $> 50\%$.
4. PI của Huyết thanh tham chiếu 2 (đối chứng âm tính) phải $< 50\%$.

Không đáp ứng bất kỳ tiêu chí nào trong số này là lý do để loại bỏ kết quả của tiêu chí đó tầm thử nghiệm cụ thể.

Lưu ý: Nếu OD 450 max đã hiệu chỉnh dưới 1.000 thì có thể là (TMB) quá lạnh. Trong trường hợp đó, làm ấm dung dịch đến $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ hoặc ủ tối đa 30 phút. Nếu OD 450 max trung bình đã hiệu chỉnh là trên 2.000 thì nên ủ TMB với thời gian ngắn hơn.

Phụ lục 5. Kết quả xác định mẫu dương tính PPV

Tỉnh	Thời gian thu mẫu	Số lượng mẫu	Mẫu dương tính PPV	
			Bệnh phẩm phôi thai	Huyết thanh
Bình Định	13/04/2022 đến 18/04/2022	60 huyết thanh		PM21, PM27, PC7, PC15
Thái Bình	24/05/2022 đến 31/05/2022	60 huyết thanh		ĐH2, ĐH4, ĐH11, ĐH15, KX24
Thanh Hóa	07/06/2022 đến 15/06/2022	60 huyết thanh, 3 bào thai		TS8, TX7, TX13
Đắk Lắk	15/08/2022 đến 22/08/2022	60 huyết thanh, 9 bào thai	EK31	EK18, EK20, EK27, MD22, MD28
Đồng Nai	26/09/2022 đến 02/10/2022	60 huyết thanh, 10 bào thai	VC32, LT36	VC5, VC10, VC15, LT23, LT32
Bình Dương	04/11/2022 đến 11/11/2022	60 huyết thanh, 10 bào thai		DA6, DA12, DA27, BC2, BC4, BC11, BC15
Tổng:		360 huyết thanh, 32 bào thai		

Phụ lục 6. Kết quả quan sát bệnh tích tế bào của 32 chủng phân lập

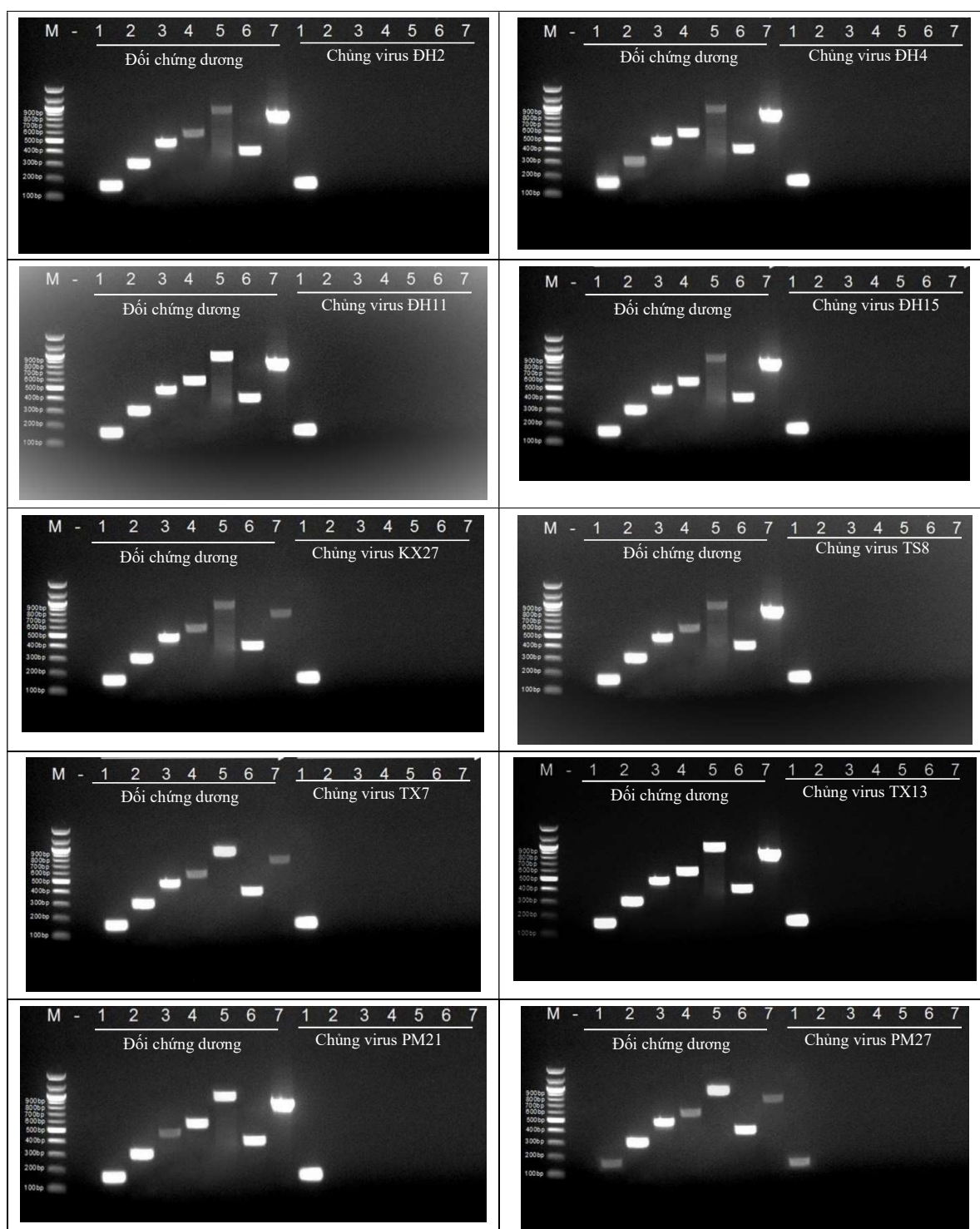
Tỉnh	Mẫu	Đời nuôi cấy	Bệnh tích tế bào* (%)						
			Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5	Ngày 6	Ngày 7
Thái Bình	ĐH2	P1	0	0	10	30	40	50	65
		P2	0	10	30	40	55	75	75
		P3	0	20	30	50	60	70	80
	ĐH4	P1	0	0	5	10	20	30	40
		P2	0	5	10	20	30	45	55
		P3	0	10	30	40	50	60	70
	ĐH11	P1	0	10	25	45	55	60	70
		P2	0	20	35	55	65	75	80
		P3	0	35	50	60	70	80	90
	ĐH15	P1	0	0	5	10	25	35	45
		P2	0	5	10	25	30	40	60
		P3	0	10	20	30	40	55	75
	KX24	P1	0	10	25	40	55	70	85
		P2	0	30	40	60	70	80	90
		P3	0	35	55	60	75	85	90
Thanh Hóa	TS8	P1	0	0	5	10	15	25	35
		P2	0	5	15	25	30	40	50
		P3	0	10	25	40	50	60	70
	TX7	P1	0	10	25	40	60	70	80
		P2	0	30	55	60	70	80	90
		P3	0	30	45	60	75	85	90
	TX13	P1	0	0	0	0	10	20	30
		P2	0	0	15	25	35	50	65
		P3	0	10	15	35	50	60	75
Bình Định	PM21	P1	0	0	10	25	35	45	60
		P2	0	10	20	30	40	55	70
		P3	0	20	35	50	60	70	80
	PM27	P1	0	0	0	0	10	20	30
		P2	0	0	10	20	35	50	60
		P3	0	10	20	35	50	60	70
	PC7	P1	0	10	25	40	50	65	70
		P2	0	20	35	55	60	70	80
		P3	0	35	50	65	75	85	90
	PC15	P1	0	0	0	0	10	20	30
		P2	0	0	10	20	35	45	60
		P3	0	10	15	30	45	60	75
Đắk Lắk	EK18	P1	0	0	5	10	15	25	35
		P2	0	5	15	25	30	40	50

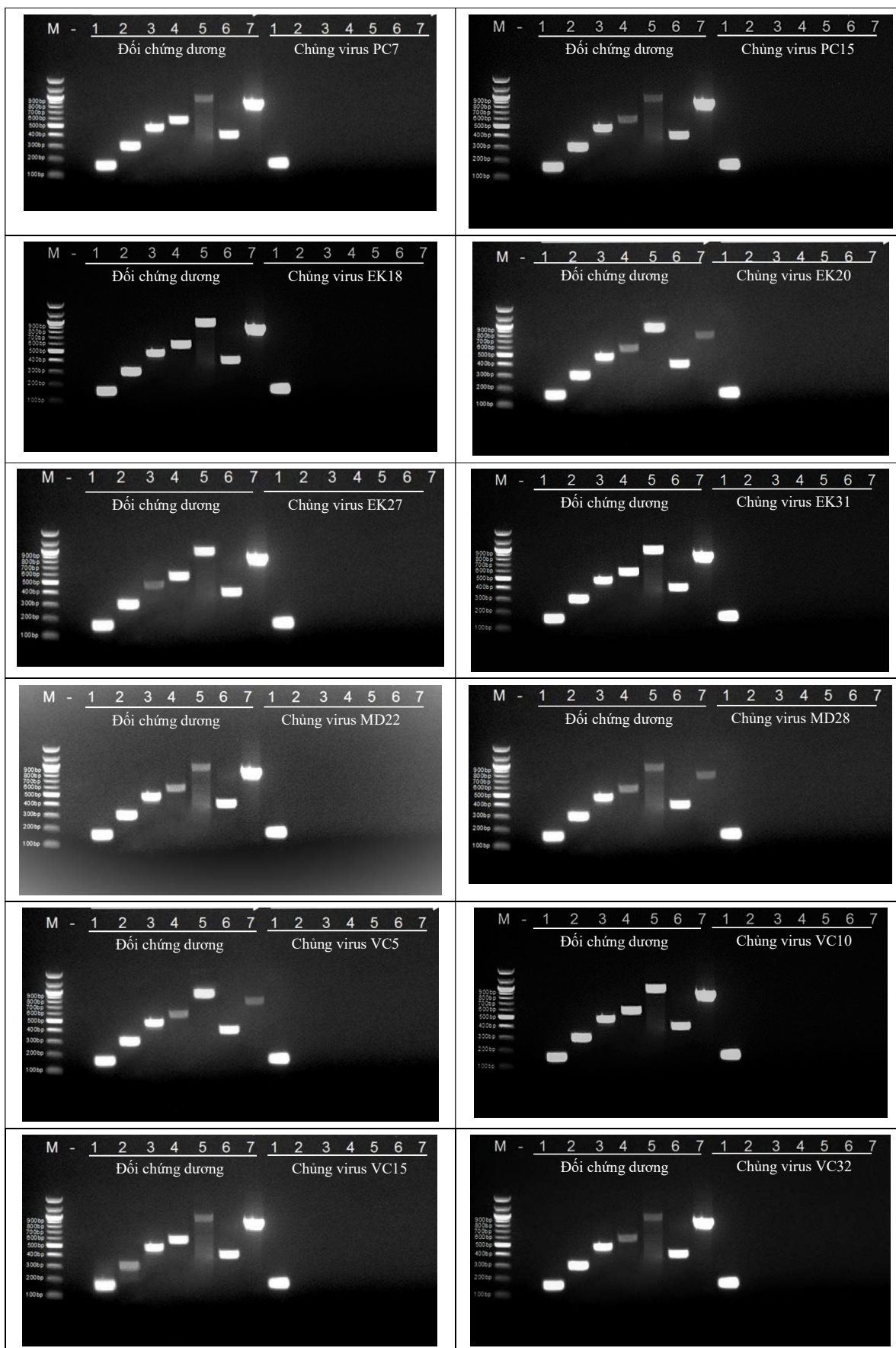
		P3	0	10	25	40	50	60	70	
		EK20	P1	0	0	5	10	25	35	45
			P2	0	5	10	25	30	40	60
			P3	0	10	25	35	45	65	75
		EK27	P1	0	10	25	40	50	60	75
			P2	0	20	35	45	55	65	85
			P3	0	35	50	60	70	80	90
		EK31	P1	0	0	0	0	10	20	35
			P2	0	5	10	20	30	40	55
			P3	0	10	15	25	40	65	75
		MD22	P1	0	0	0	0	10	20	30
			P2	0	0	10	20	35	50	60
	P3		0	15	30	45	55	65	75	
	MD28	P1	0	0	5	10	15	25	35	
		P2	0	5	15	25	30	40	50	
		P3	0	10	25	40	50	60	70	
	Đồng Nai	VC5	P1	0	15	20	35	55	70	80
			P2	0	30	50	60	70	80	90
P3			0	30	50	65	75	85	90	
VC10		P1	0	10	25	40	55	70	85	
		P2	0	30	45	60	70	80	90	
		P3	0	35	50	60	75	85	90	
VC15		P1	0	0	0	0	10	20	30	
		P2	0	0	10	25	35	40	55	
		P3	0	15	25	35	45	60	70	
VC32		P1	0	0	10	30	40	50	65	
		P2	0	10	30	40	55	75	75	
		P3	0	20	30	50	60	70	80	
LT23		P1	0	0	0	0	10	20	30	
		P2	0	0	10	20	35	50	60	
		P3	0	20	30	40	55	65	75	
LT32		P1	0	0	0	0	10	20	30	
		P2	0	0	10	20	30	40	50	
		P3	0	10	15	25	40	60	70	
LT36		P1	0	0	10	30	45	60	70	
		P2	0	10	25	35	55	70	80	
		P3	0	20	35	50	65	75	85	
Bình Dương	DA6	P1	0	0	0	0	10	20	30	
		P2	0	0	10	25	35	40	55	
		P3	0	15	25	35	45	60	70	
	DA12	P1	0	10	25	45	55	65	75	
		P2	0	20	35	50	60	70	80	

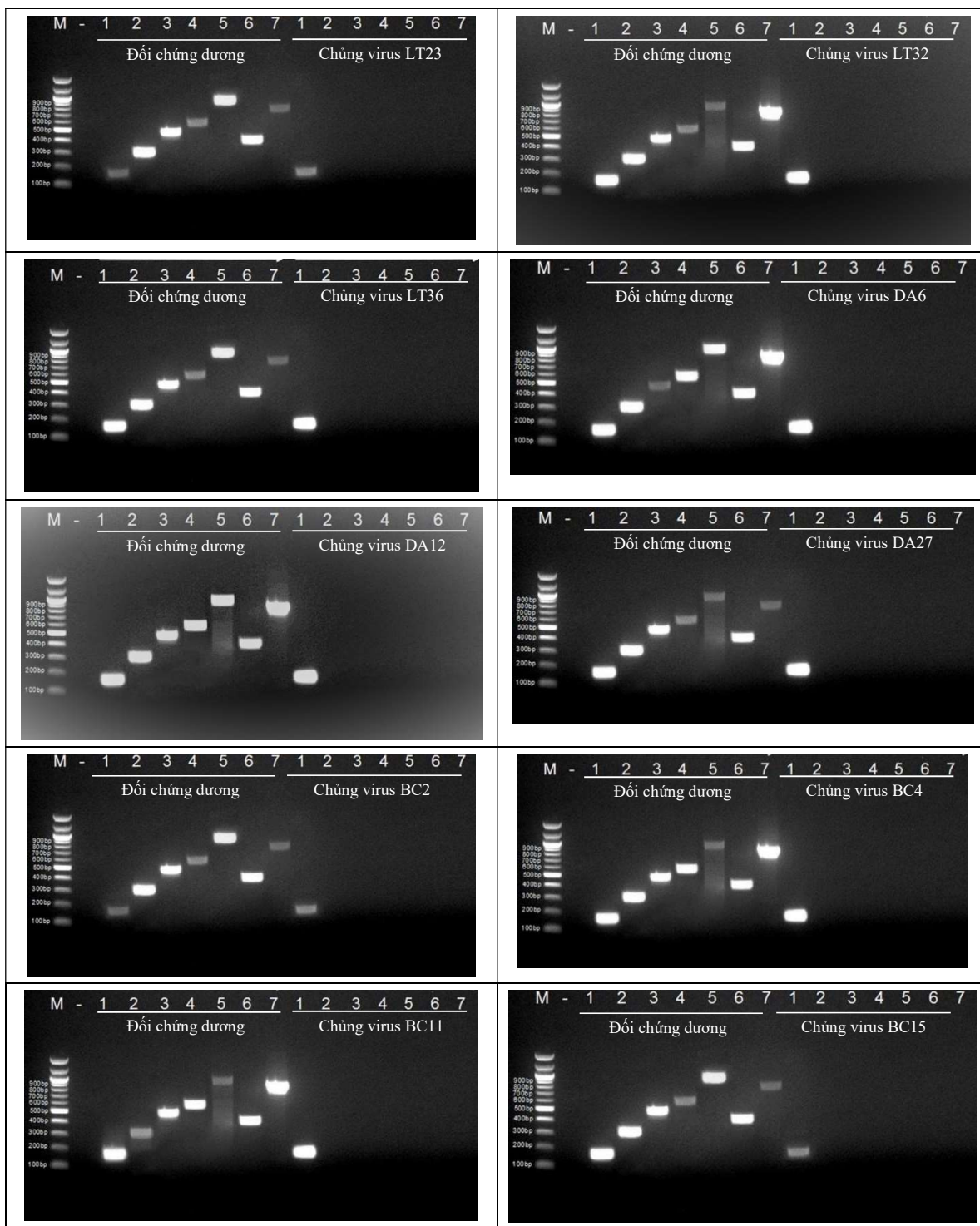
	DA27	P3	0	35	50	65	75	80	90
		P1	0	0	5	10	20	30	40
		P2	0	5	10	20	30	45	55
		P3	0	10	30	40	50	65	75
	BC2	P1	0	0	10	30	40	50	65
		P2	0	10	20	30	50	60	70
		P3	0	15	35	45	55	70	80
	BC4	P1	0	0	0	0	10	20	35
		P2	0	5	10	20	30	40	55
		P3	0	10	15	25	40	65	75
	BC11	P1	0	10	25	40	50	75	85
		P2	0	30	45	55	70	80	90
		P3	0	35	55	60	75	85	90
	BC15	P1	0	0	5	10	15	25	35
		P2	0	5	15	25	30	40	50
		P3	0	10	25	40	50	60	70

*Ghi chú: * là khoảng ước lượng bằng mắt thường tỉ lệ tế bào có CPE so với toàn bộ tế bào trên vi trường kính hiển vi soi ngược; P1: Đờn nuôi cấy thứ nhất; P2: Đờn nuôi cấy thứ hai; P3: Đờn nuôi cấy thứ ba*

Phụ lục 7. Kết quả PCR định type của 32 chủng phân lập







Phụ lục 8. Trình tự đoạn gen NS1 (330bp) của 32 chủng phân lập

Trình tự đoạn gen NS1 (330bp) của chủng ĐH2:

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGT
GAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGA
AGCAGGAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGG
GCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGAAC
CAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAATAG
GATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

Trình tự đoạn gen NS1 (330bp) của chủng ĐH4:

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGT
GAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGA
AGCAGGAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGG
GCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGAAC
CAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAATAG
GATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

Trình tự đoạn gen NS1 (330bp) của chủng ĐH11:

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGT
GAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGA
AGCAGGAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGG
GCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGAAC
CAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAATAG
GATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

Trình tự đoạn gen NS1 (330bp) của chủng ĐH15:

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGT
GAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGA
AGCAGGAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGG
GCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGAAC
CAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAATAG
GATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

Trình tự đoạn gen NS1 (330bp) của chủng KX24:

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGT
GAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGA
AGCAGGAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGG
GCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGAAC
CAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAATAG
GATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

Trình tự đoạn gen NS1 (330bp) của chủng TS8:

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGT
GAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGA
AGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGG
GCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGAAC
CAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAATAG
GATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

Trình tự đoạn gen NS1 (330bp) của chủng TX7:

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGT
GAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGA
AGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGG
GCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGAAC
CAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAATAG
GATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

Trình tự đoạn gen NS1 (330bp) của chủng TX13:

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGT
GAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGA
AGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGG
GCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGAAC
CAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAATAG
GATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

Trình tự đoạn gen NS1 (330bp) của chủng PM21:

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGT
GAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGA
AGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGG
GCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGAAC
CAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAATAG
GATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

Trình tự đoạn gen NS1 (330bp) của chủng PM27:

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGT
GAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGA
AGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGG
GCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGAAC
CAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAATAG
GATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

Trình tự đoạn gen NS1 (330bp) của chủng PC7:

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGT
GAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGA
AGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGG

GCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAATTGAAC
CAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAATAG
GATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

Trình tự đoạn gen NS1 (330bp) của chủng PC15:

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGT
GAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGA
AGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGG
GCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAATTGAAC
CAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAATAG
GATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

Trình tự đoạn gen NS1 (330bp) của chủng EK18:

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGT
GAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGA
AGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGG
GCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAATTGAAC
CAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAATAG
GATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

Trình tự đoạn gen NS1 (330bp) của chủng EK20:

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGT
GAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGA
AGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGG
GCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAATTGAAC
CAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAATAG
GATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

Trình tự đoạn gen NS1 (330bp) của chủng EK27:

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGT
GAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGA
AGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGG
GCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAATTGAAC
CAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAATAG
GATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

Trình tự đoạn gen NS1 (330bp) của chủng EK31:

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGT
GAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGA
AGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGG
GCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAATTGAAC
CAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAATAG
GATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

Trình tự đoạn gen NS1 (330bp) của chủng MD22:

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGT
GAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGA
AGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGG
GCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGAAC
CAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAATAG
GATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

Trình tự đoạn gen NS1 (330bp) của chủng MD28:

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGT
GAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGA
AGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGG
GCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGAAC
CAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAATAG
GATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

Trình tự đoạn gen NS1 (330bp) của chủng VC5:

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGT
GAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGA
AGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGG
GCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGAAC
CAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAATAG
GATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

Trình tự đoạn gen NS1 (330bp) của chủng VC10:

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGT
GAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGA
AGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGG
GCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGAAC
CAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAATAG
GATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

Trình tự đoạn gen NS1 (330bp) của chủng VC15:

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGT
GAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGA
AGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGG
GCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGAAC
CAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAATAG
GATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

Trình tự đoạn gen NS1 (330bp) của chủng VC32:

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGT
GAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGA
AGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGG

GCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAATTGAAC
CAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAATAG
GATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

Trình tự đoạn gen NS1 (330bp) của chủng LT23

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGT
GAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGA
AGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGG
GCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAATTGAAC
CAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAATAG
GATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

Trình tự đoạn gen NS1 (330bp) của chủng LT32

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGT
GAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGA
AGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGG
GCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAATTGAAC
CAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAATAG
GATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

Trình tự đoạn gen NS1 (330bp) của chủng LT36:

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGT
GAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGA
AGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGG
GCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAATTGAAC
CAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAATAG
GATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

Trình tự đoạn gen NS1 (330bp) của chủng DA6:

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGT
GAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGA
AGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGG
GCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAATTGAAC
CAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAATAG
GATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

Trình tự đoạn gen NS1 (330bp) của chủng DA12:

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGT
GAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGA
AGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGG
GCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAATTGAAC
CAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAATAG
GATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

Trình tự đoạn gen NS1 (330bp) của chủng DA27:

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGT
GAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGA
AGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGG
GCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGAAC
CAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAATAG
GATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

Trình tự đoạn gen NS1 (330bp) của chủng BC2:

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGT
GAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGA
AGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGG
GCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGAAC
CAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAATAG
GATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

Trình tự đoạn gen NS1 (330bp) của chủng BC4:

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGT
GAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGA
AGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGG
GCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGAAC
CAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAATAG
GATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

Trình tự đoạn gen NS1 (330bp) của chủng BC11:

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGT
GAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGA
AGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGG
GCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGAAC
CAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAATAG
GATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

Trình tự đoạn gen NS1 (330bp) của chủng BC15:

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGT
GAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGA
AGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGG
GCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGAAC
CAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAATAG
GATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

Phụ lục 9. Trình tự gen VP2 trên ngân hàng gen NCBI

LOCUS OR263486 1760 bp DNA linear VRL 24-SEP-2024

DEFINITION UNVERIFIED: Porcine parvovirus isolate PPV-Thaibinh VP2-like gene,
complete sequence.

ACCESSION OR263486

VERSION OR263486.1

KEYWORDS UNVERIFIED.

SOURCE Porcine parvovirus

ORGANISM [Porcine parvovirus](#)
Viruses; Monodnaviria; Shotokuvirae; Cossaviricota;
Quintoviricetes; Piccovirales; Parvoviridae; Parvovirinae;
Protoparvovirus; Protoparvovirus unguiculat1.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1760)
AUTHORS Trinh,T.T.H., Do,V.T., Do,V.K. and Vu-Khac,H.
TITLE Isolation and characterization of porcine parvovirus in Vietnam
JOURNAL Vet World, 1530-1537 (2024)

REFERENCE 2 (bases 1 to 1760)
AUTHORS Trinh,H.T.T., Vu-Khac,H., Do,K.V. and Do,T.V.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (13-JUL-2023) Biotechnology department, Institute of
Veterinary Research and Development of central Vietnam, No 227,
2/4
Street, Nha Trang, Khanh Hoa 57111, Vietnam

COMMENT GenBank staff is unable to verify sequence and/or annotation
provided by the submitter.

##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1760
/organism="Porcine parvovirus"
/mol_type="genomic DNA"
/isolate="PPV-Thaibinh"
/host="pig"
/db_xref="taxon:10796"
/geo_loc_name="Viet Nam"
/collection_date="11-Oct-2022"
misc_feature 1..1760
/note="similar to VP2"

ORIGIN
1 atgagtgaat atgtggaaca acacaaccct attaatgcag gcactgaatt gtctgcaaca
61 ggaaatgaat ctgggggttg ggcggcggtt ggcgggggta ggggtgctgg ggggggttgg
121 atgtctacat gcagattcca aaatcaaaca ataatttcac ttcttgggat atgacttgaa
181 tacaatcact gcacacctcc tcattgactc gtacatccta aatatgcaca gaacactatt
241 tatacaaaaa acaacatgtc caaaatacaa aatcaaggct gactctacaa atgaaacaag
301 aatattcacc cactcaaatt ttaactcctt agtcactctt acatgctcac ccaaaatgag
361 agttggatta aataccangc gaaacttatt cttaatatcc cacaacatga cagaaaatat
421 atcttaaatt agatttcata caaaaaatat tgcacgtaaa taactgtatt acaaattatt
481 caatcactta tactcaccac cattacacaa tatacaacaa caatctaact gcaagcttaa
541 tggctgcact agacaccaat aacacacttc catacacacc agcagcacct ataagtgaat
601 cacttggttt ttatccatgg ttacctacaa aaccaactca atacagatat tacctatcat
661 gcaccagaaa cctaaatcca ccaacatata ctggacaatc acaacaaata acagactcaa
721 tacaacacag actacacagt gacattatgt tctacacaat agaaaatgca gtaccaattc
781 atcttctaag aacaggagat gaattctoca caggaatata tcactttgac acaaaaaccac
841 taaaattaac tcaactcatg caaacaacaa gatctctagg actgcctcca aaactactaa
901 ctgaacctac cacagaagga gaccaacacc caggaacact accagcagct aacacaagaa
961 aaggttatca ccaacaatt aataatagct acacagaagc aacagcaatt aggccagctc
1021 aggtaggata taatacacia tacatgaatt ttggatactc caatggtgga ccatttctaa
1081 ctcttatagt accaacagca gacacacaat ataattgatga tgaaccaaatt ggtgctataa

```

1141 gatttacaat gggttaccaa catggacaat taaccacatc tacacaagaa ctagaagaat
1201 acacattcaa tccacaaaagt aaatgtggaa gagctccaaa acaacaattht aatcaacagg
1261 caccactaaa cctagaaaaat acaaaataatg gaacacttht accttcagat ccaataggag
1321 ggaaacctaa catgcatttc atgaatacac tcaatacata tggaccatta acagcactaa
1381 acaatactgc acctgtattt ccaaatgggtc aaatatggga taaagaactt gatacagatc
1441 taaaacctag actacatggt acagctccat ttgtttgtaa aaacaatcca ccaggacaac
1501 tatttgtaaa aatagcacca aacctaacag atgatttcaa tgctgactct cctcaacaac
1561 ctagaataat aacctattca aacttttgggt ggaaaggaac actaacattc acagcaaaaa
1621 tgagatccag taatatgtgg aaccctattc aacaacacac aacaacagca gaaaacattg
1681 gtaactatat tctacaaat attggtggca taaaaatgtt tccagaatat tcacaactta
1741 taccaagaaa attatactag

//
LOCUS      OR263487              1760 bp    DNA        linear    VRL 24-SEP-
2024
DEFINITION UNVERIFIED: Porcine parvovirus isolate PPV-Thanhhoa VP2-like
gene,
            complete sequence.
ACCESSION  OR263487
VERSION    OR263487.1
KEYWORDS   UNVERIFIED.
SOURCE     Porcine parvovirus
ORGANISM   Porcine parvovirus
            Viruses; Monodnaviria; Shotokuvirae; Cossaviricota;
            Quintoviricetes; Piccovirales; Parvoviridae; Parvovirinae;
            Protoparvovirus; Protoparvovirus unguis-like.
REFERENCE  1 (bases 1 to 1760)
AUTHORS    Trinh,T.T.H., Do,V.T., Do,V.K. and Vu-Khac,H.
TITLE      Isolation and characterization of porcine parvovirus in Vietnam
JOURNAL    Vet World, 1530-1537 (2024)
REFERENCE  2 (bases 1 to 1760)
AUTHORS    Trinh,H.T.T., Vu-Khac,H., Do,K.V. and Do,T.V.
TITLE      Direct Submission
JOURNAL    Submitted (13-JUL-2023) Biotechnology department, Institute of
            Veterinary Research and Development of central Vietnam, No 227,
2/4
            Street, Nha Trang, Khanh Hoa 57111, Vietnam
COMMENT    GenBank staff is unable to verify sequence and/or annotation
            provided by the submitter.

            ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..1760
                        /organism="Porcine parvovirus"
                        /mol_type="genomic DNA"
                        /isolate="PPV-Thanhhoa"
                        /host="pig"
                        /db_xref="taxon:10796"
                        /geo_loc_name="Viet Nam"
                        /collection_date="11-Oct-2022"
     misc_feature       1..1760
                        /note="similar to VP2"
ORIGIN
1 atgagtgaat atgtggaaca acacaacctt attaatgcag gcactgaatt gtctgcaaca
61 ggaaatgaat ctgggggtgg ggcggcggtt ggcgggggta ggggtgctgg gggggttggg
121 atgtctacat gcagattcca aaatcaaaca ataatttcac ttcttgggat atgacttgaa
181 tacaatcact gcacacctcc tcattgactc gtacatccta aatatgcaca gaacactatt
241 tatacaaaaa acaacatgtc caaaatacaa aatcaaggct gactctacaa atgaaacaag
301 aatattcacc cactcaaatt ttaactcctt agtcactctt acatgctcac ccaaaatgag
361 agttggatta aataccangc gaaacttatt cttaatatcc cacaacatga cagaaaatat
421 atcttaaatt agatttcata caaaaaatat tcgacgtaaa taactgtatt acaaaattatt
481 caatcactta tactcaccac cattacacaa tatacaacaa caatctaact gcaagcttaa

```

```

541  tggctgcact  agacaccaat  aacacacttc  catacacacc  agcagcacct  ataagtgaaa
601  cacttggttt  ttatccatgg  ttacctacaa  aaccaactca  atacagatat  tacctatcat
661  gcaccagaaa  cctaaatcca  ccaacataca  ctggacaatc  acaacaaata  acagactcaa
721  tacaacacag  actacacagt  gacattatgt  tctacacaat  agaaaatgca  gtaccaattc
781  atcttctaag  aacaggagat  gaattctcca  caggaatata  tcactttgac  acaaaaccac
841  taaaattaac  tcactcatgg  caaacaacaa  gatctctagg  actgcctcca  aaactactaa
901  ctgaacctac  cacagaagga  gaccaacacc  caggaacact  accagcagct  aacacaagaa
961  aaggttatca  ccaaacaatt  aataatagct  acacagaagc  aacagcaatt  aggccagctc
1021 aggtaggata  taatacacaa  tacatgaatt  ttggatactc  caatggtgga  ccattttctaa
1081 ctctatagt  accaacagca  gacacacaat  ataatgatga  tgaaccaaata  ggtgctataa
1141 gatttacaat  gggttacca  catggacaat  taaccacatc  tacacaagaa  ctagaagat
1201 acacattcaa  tccacaaagt  aaatgtggaa  gagctccaaa  acaacaattt  aatcaacagg
1261 caccactaaa  cctagaaaat  acaataatg  gaacactttt  accttcagat  ccaataggag
1321 ggaaacctaa  catgcatttc  atgaatacac  tcaatacata  tggaccatta  acagcactaa
1381 acaatactgc  acctgtattt  ccaaatgggtc  aaatatggga  taaagaactt  gatacagatc
1441 taaaacctag  actacatgtt  acagctccat  ttgtttgtaa  aaacaatcca  ccaggacaac
1501 tattttgtaa  aatagcacca  aacctaacag  atgatttcaa  tgctgactct  cctcaacaac
1561 ctagaataat  aacctattca  aacttttggg  ggaaaggaa  actaacattc  acagcaaaaa
1621 tgagatccag  taatatgtgg  aacctattc  aacaacacac  aacaacagca  gaaaacattg
1681 gtaactatat  tctacaaat  attggtggca  taaaaatgtt  tccagaatat  tcacaactta
1741 taccaagaaa  attatactag

//
LOCUS      OR263488                      1760 bp    DNA        linear    VRL 24-SEP-
2024
DEFINITION UNVERIFIED: Porcine parvovirus isolate PPV-Binhdin VP2-like
gene,
           complete sequence.
ACCESSION  OR263488
VERSION    OR263488.1
KEYWORDS   UNVERIFIED.
SOURCE     Porcine parvovirus
  ORGANISM Porcine parvovirus
            Viruses; Monodnaviria; Shotokuvirae; Cossaviricota;
            Quintoviricetes; Piccovirales; Parvoviridae; Parvovirinae;
            Protoparvovirus; Protoparvovirus unguis.
REFERENCE  1 (bases 1 to 1760)
  AUTHORS  Trinh,T.T.H., Do,V.T., Do,V.K. and Vu-Khac,H.
  TITLE    Isolation and characterization of porcine parvovirus in Vietnam
  JOURNAL  Vet World, 1530-1537 (2024)
REFERENCE  2 (bases 1 to 1760)
  AUTHORS  Trinh,H.T.T., Vu-Khac,H., Do,K.V. and Do,T.V.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL  Submitted (13-JUL-2023) Biotechnology department, Institute of
            Veterinary Research and Development of central Vietnam, No 227,
2/4
            Street, Nha Trang, Khanh Hoa 57111, Vietnam
COMMENT    GenBank staff is unable to verify sequence and/or annotation
            provided by the submitter.

##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..1760
                       /organism="Porcine parvovirus"
                       /mol_type="genomic DNA"
                       /isolate="PPV-Binhdin"
                       /host="pig"
                       /db_xref="taxon:10796"
                       /geo_loc_name="Viet Nam"
                       /collection_date="11-Oct-2022"
     misc_feature       1..1760
                       /note="similar to VP2"

```

```

ORIGIN
    1 atgagtgaat atgtggaaca acacaaccct attaatgcag gcactgaatt gtctgcaaca
    61 ggaaatgaat ctgggggtgg ggcggggcgt ggcgggggta ggggtgctgg gggggttggg
   121 atgtctacat gcagattcca aaatcaaaca ataatttcac ttcttgggat atgacttgaa
   181 tacaatcact gcacacctcc tcattgactc gtacatccta aatatgcaca gaacactatt
   241 tatacaaaaa acaacatgtc caaaatacaa aatcaaggct gactctacaa atgaaacaag
   301 aatattcacc cactcaaatt ttaactcctt agtcactctt acatgctcac ccaaaatgag
   361 agttggatta aataccangc gaaacttatt cttaatatcc cacaacatga cagaaaaatat
   421 atcttaaatt agatttcata caaaaaatat tcgacgtaaa taactgtatt acaaattatt
   481 caatcactta tactcaccac cattacacaa tatacaacaa caatctaact gcaagcttaa
   541 tggtcgcact agacaccaat aacacacttc catacacacc agcagcacct ataagtgaag
   601 cacttggttt ttatccatgg ttacctacaa aaccaactca atacagatat tacctatcat
   661 gcaccagaaa cctaaatcca ccaacataca ctggacaatc acaacaaata acagactcaa
   721 tacaacacag actacacagt gacattatgt tctacacaat agaaaatgca gtaccaattc
   781 atcttctaag aacaggagat gaattctcca caggaatata tcactttgac acaaaaccac
   841 taaaattaac tcactcatgg caaacaacaa gatctctagg actgcctcca aaactactaa
   901 ctgaacctac cacagaagga gaccaacacc caggaacact accagcagct aacacaagaa
   961 aaggttatca ccaaacaatt aataatagct acacagaagc aacagcaatt aggccagctc
  1021 aggtaggata taatacacia tacatgaatt ttggatactc caatgggtga ccatttctaa
  1081 ctcctatagt accaacagca gacacacaat ataatgatga tgaaccaaat ggtgctataa
  1141 gatttacaat gggttacca catggacaat taaccacatc tacacaagaa ctagaaagat
  1201 acacattcaa tccacaaagt aaatgtggaa gagctccaaa acaacaattt aatcaacagg
  1261 caccactaaa cctagaaaat acaataaatg gaacactttt accttcagat ccaataggag
  1321 ggaaacctaa catgcatttc atgaatacac tcaatacata tggaccatta acagcactaa
  1381 acaatactgc acctgtattt ccaaatgggc aaatatggga taaagaactt gatcacagatc
  1441 taaaacctag actacatgtt acagctccat ttgtttgtaa aaacaatcca ccaggacaac
  1501 tatttgtaaa aatagcacca aacctaacag atgatttcaa tgctgactct cctcaacaac
  1561 ctagaataat aacctattca aacttttggg ggaaaggaa actaacattc acagcaaaaa
  1621 tgagatccag taatatgtgg aacctattc aacaacacac aacaacagca gaaaacattg
  1681 gtaactatat tcctacaaat attggtggca taaaaatgtt tccagaatat tcacaactta
  1741 taccaagaaa attatactag

//
LOCUS       OR263489                      1760 bp    DNA        linear    VRL 24-SEP-
2024
DEFINITION  UNVERIFIED: Porcine parvovirus isolate PPV-DakLak VP2-like gene,
complete sequence.
ACCESSION   OR263489
VERSION     OR263489.1
KEYWORDS    UNVERIFIED.
SOURCE      Porcine parvovirus
  ORGANISM   Porcine parvovirus
              Viruses; Monodnaviria; Shotokuvirae; Cossaviricota;
              Quintoviricetes; Piccovirales; Parvoviridae; Parvovirinae;
              Protoparvovirus; Protoparvovirus unguis.
REFERENCE   1 (bases 1 to 1760)
  AUTHORS   Trinh,T.T.H., Do,V.T., Do,V.K. and Vu-Khac,H.
  TITLE     Isolation and characterization of porcine parvovirus in Vietnam
  JOURNAL   Vet World, 1530-1537 (2024)
REFERENCE   2 (bases 1 to 1760)
  AUTHORS   Trinh,H.T.T., Vu-Khac,H., Do,K.V. and Do,T.V.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (13-JUL-2023) Biotechnology department, Institute of
              Veterinary Research and Development of central Vietnam, No 227,
2/4
              Street, Nha Trang, Khanh Hoa 57111, Vietnam
COMMENT     GenBank staff is unable to verify sequence and/or annotation
              provided by the submitter.

              ##Assembly-Data-START##
              Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
              ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..1760

```

```

/organism="Porcine parvovirus"
/mol_type="genomic DNA"
/isolate="PPV-DakLak"
/host="pig"
/db_xref="taxon:10796"
/geo_loc_name="Viet Nam"
/collection_date="11-Oct-2022"
misc feature 1..1760
              /note="similar to VP2"
ORIGIN
1 atgagtgaat atgtggaaca acacaacct attaatgcag gcactgaatt gtctgcaaca
61 ggaaatgaat ctgggggtgg ggcggcggtt ggcgggggta ggggtgctgg gggggttggg
121 atgtctacat gcagattcca aaatcaaaca ataatttcac ttcttgggat atgacttgaa
181 tacaatcact gcacacctcc tcattgactc gtacatccta aatatgcaca gaacactatt
241 tatacaaaaa acaacatgtc caaaatacaa aatcaaggct gactctacaa atgaaacaag
301 aatattcacc cactcaaatt ttaactcctt agtcactctt acatgctcac ccaaaatgag
361 agttggatta aataccangc gaaacttatt cttaatatcc cacaacatga cagaaaaatat
421 atcttaaatt agatttcata caaaaaatat tcgacgtaaa taactgtatt acaaattatt
481 caatcactta tactcaccac cattacacaa tatacaacaa caatctaact gcaagcttaa
541 tggtcgcact agacaccaat aacacacttc catacacacc agcagcacct ataagtgaag
601 cacttggttt ttatccatgg ttacctacaa aaccaactca atacagatat tacctatcat
661 gcaccagaaa cctaaatcca ccaacataca ctggacaatc acaacaaata acagactcaa
721 tacaacacag actacacagt gacattatgt tctacacaat agaaaatgca gtaccaattc
781 atcttctaag aacaggagat gaattctcca caggaatata tcactttgac aaaaaccac
841 taaaattaac tcatcatggg caaacaacaa gatctctagg actgcctcca aaactactaa
901 ctgaacctac cacagaagga gaccaacacc caggaacact accagcagct aacacaagaa
961 aaggttatca ccaaacaatt aataatagct acacagaagc aacagcaatt aggccagctc
1021 aggtaggata taatacacia tacatgaatt ttggatactc caatgggtga ccatttctaa
1081 ctcctatagt accaacagca gacacacaat ataatgatga tgaaccaaat ggtgctataa
1141 gatttacaat gggttacca catggacaat taaccacatc tacacaagaa ctagaaagat
1201 acacattcaa tccacaaagt aaatgtggaa gagctccaaa acaacaattt aatcaacagg
1261 caccactaaa cctagaaaat acaataatg gaacactttt accttcagat ccaataggag
1321 ggaaacctaa catgcatttc atgaatacac tcaatacata tggaccatta acagcactaa
1381 acaatactgc acctgtatth ccaaatgggtc aaatatggga taaagaactt gatcacagatc
1441 taaaacctag actacatgth acagctccat ttgtttgtaa aaacaatcca ccaggacaac
1501 tatttgtaaa aatagcacca aacctaacag atgatttcaa tgctgactct cctcaacaac
1561 ctagaataat aacctattca aacttttggg ggaaaggaa actaacattc acagcaaaaa
1621 tgagatccag taatatgtgg aacctatttc aacaacacac aacaacagca gaaaacattg
1681 gtaactatat tcctacaaat attggtggca taaaaatgtt tccagaatat tcacaactta
1741 taccaagaaa attatactag
//
LOCUS OR263490 1760 bp DNA linear VRL 24-SEP-2024
DEFINITION UNVERIFIED: Porcine parvovirus isolate PPV-Dongnai VP2-like gene,
complete sequence.
ACCESSION OR263490
VERSION OR263490.1
KEYWORDS UNVERIFIED.
SOURCE Porcine parvovirus
ORGANISM Porcine parvovirus
Viruses; Monodnaviria; Shotokuvirae; Cossaviricota;
Quintoviricetes; Piccovirales; Parvoviridae; Parvovirinae;
Protoparvovirus; Protoparvovirus unguis.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1760)
AUTHORS Trinh,T.T.H., Do,V.T., Do,V.K. and Vu-Khac,H.
TITLE Isolation and characterization of porcine parvovirus in Vietnam
JOURNAL Vet World, 1530-1537 (2024)
REFERENCE 2 (bases 1 to 1760)
AUTHORS Trinh,H.T.T., Vu-Khac,H., Do,K.V. and Do,T.V.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (13-JUL-2023) Biotechnology department, Institute of

```

Veterinary Research and Development of central Vietnam, No 227,
2/4
Street, Nha Trang, Khanh Hoa 57111, Vietnam
COMMENT GenBank staff is unable to verify sequence and/or annotation
provided by the submitter.

##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##

FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..1760
 /organism="Porcine parvovirus"
 /mol_type="genomic DNA"
 /isolate="PPV-Dongnai"
 /host="pig"
 /db_xref="taxon:10796"
 /geo_loc_name="Viet Nam"
 /collection_date="11-Oct-2022"
 misc_feature 1..1760
 /note="similar to VP2"

ORIGIN
1 atgagtgaac atgtggaaca acacaaccct attaatgcag gcactgaatt gtctgcaaca
61 ggaaatgaat ctgggggtgg gggcgggcgg ggcgggggta ggggtgctgg gggggttggt
121 atgtctacat gcagattcca aaatcaaaca ataatttcac ttcttgggat atgacttgaa
181 tacaatcact gcacacctcc tcattgactc gtacatccta aatatgcaca gaacactatt
241 tatacaaaaa acaacatgct caaaatacaa aatcaaggct gactctacaa atgaaacaag
301 aatattcacc cactcaaatt ttaactcctt agtcactctt acatgctcac ccaaaatgag
361 agttggatta aataccangc gaaacttatt cttaatatcc cacaacatga cagaaaatat
421 atcttaaatt agatttcata caaaaaatat tcgacgtaaa taactgtatt acaaattatt
481 caatcactta tactcaccac cattacacaa tatacaacaa caatctaact gcaagcttaa
541 tggctgcact agacaccaat aacacacttc catacacacc agcagcacct ataagtgaac
601 cacttggttt ttatccatgg ttacctacaa aaccaactca atacagatat tacctatcat
661 gcaccagaaa cctaaatcca ccaacatata ctggacaatc acaacaaata acagactcaa
721 tacaacacag actacacagt gacattatgt tctacacaat agaaaatgca gtaccaattc
781 atcttctaag aacaggagat gaattctcca caggaatata tcactttgac acaaaaccac
841 taaaattaac tcactcatgg caaacaacaa gatctctagg actgcctcca aaactactaa
901 ctgaacctac cacagaagga gaccaacacc caggaacact accagcagct aacacaagaa
961 aagggttatca ccaacaattt aataatagct acacagaagc aacagcaatt aggccagctc
1021 aggtaggata taatacacia tacatgaatt ttggatactc caatggtgga ccattttctaa
1081 ctcttatagt accaacagca gacacacaat ataattgatg tgaaccaaat ggtgctataa
1141 gattttacaat gggttaccaa catggacaat taaccacatc tacacaagaa ctagaaagat
1201 acacattcaa tccacaaagt aaatgtggaa gagctccaaa acaacaattt aatcaacagg
1261 caccactaaa cctagaaaat acaataatg gaacactttt accttcagat ccaataggag
1321 ggaaacctaa catgcatttc atgaatacac tcaatacata tggaccatta acagcactaa
1381 acaatactgc acctgtattt ccaaatgggtc aaatatggga taaagaactt gatacagatc
1441 taaaacctag actacatggt acagctccat ttgtttgtaa aaacaatcca ccaggacaac
1501 tatttgtaaa aatagcacca aacctaacag atgatttcaa tgctgactct cctcaacaac
1561 ctagaataat aacctattca aacttttggg ggaaaggaa actaacattc acagcaaaaa
1621 tgagatccag taatatgtgg aaccctattc aacaacacac aacaacagca gaaaacattg
1681 gtaactatat tctacaaat attggtggca taaaaatgtt tccagaatat tcacaactta
1741 taccaagaaa attatactag

//
LOCUS OR263491 1760 bp DNA linear VRL 24-SEP-2024
DEFINITION UNVERIFIED: Porcine parvovirus isolate PPV-Binhduong VP2-like gene,
complete sequence.
ACCESSION OR263491
VERSION OR263491.1
KEYWORDS UNVERIFIED.
SOURCE Porcine parvovirus
ORGANISM Porcine parvovirus
Viruses; Monodnaviria; Shotokuvirae; Cossaviricota;

Quintoviricetes; Piccovirales; Parvoviridae; Parvovirinae;
 Protoparvovirus; Protoparvovirus unguis1.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1760)
 AUTHORS Trinh,T.T.H., Do,V.T., Do,V.K. and Vu-Khac,H.
 TITLE Isolation and characterization of porcine parvovirus in Vietnam
 JOURNAL Vet World, 1530-1537 (2024)

REFERENCE 2 (bases 1 to 1760)
 AUTHORS Trinh,H.T.T., Vu-Khac,H., Do,K.V. and Do,T.V.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (13-JUL-2023) Biotechnology department, Institute of
 Veterinary Research and Development of central Vietnam, No 227,

2/4

Street, Nha Trang, Khanh Hoa 57111, Vietnam

COMMENT GenBank staff is unable to verify sequence and/or annotation
 provided by the submitter.

##Assembly-Data-START##
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
 ##Assembly-Data-END##

FEATURES
 Location/Qualifiers
 source 1..1760
 /organism="Porcine parvovirus"
 /mol_type="genomic DNA"
 /isolate="PPV-Binhduong"
 /host="pig"
 /db_xref="taxon:10796"
 /geo_loc_name="Viet Nam"
 /collection_date="11-Oct-2022"
 misc_feature 1..1760
 /note="similar to VP2"

ORIGIN
 1 atgagtgaat atgtggaaca acacaaccct attaatgcag gcactgaatt gtctgcaaca
 61 ggaaatgaat ctgggggtgg gggcgggcgt ggcgggggta ggggtgctgg gggggttggg
 121 atgtctacat gcagattcca aaatcaaaca ataatttcac ttcttgggat atgacttgaa
 181 tacaatcact gcacacctcc tcattgactc gtacatccta aatatgcaca gaacactatt
 241 tatacaaaaa acaacatgtc caaaatacaa aatcaaggct gactctacaa atgaaacaag
 301 aatattcacc cactcaaatt ttaactcctt agtcactctt acatgctcac ccaaatgag
 361 agttggatta aataccangc gaaacttatt cttaatatcc cacaacatga cagaaaatat
 421 atcttaaatt agatttcata caaaaaatat tgcacgtaaa taactgtatt acaaattatt
 481 caatcactta tactcaccac cattacacaa tatacaacaa caatctaact gcaagcttaa
 541 tggctgcact agacaccaat aacacacttc catacacacc agcagcacct ataagtgaat
 601 cacttggttt ttatccatgg ttacctacaa aaccaactca atacagatat tacctatcat
 661 gcaccagaaa cctaaatcca ccaacataca ctggacaatc acaacaaata acagactcaa
 721 tacaacacag actacacagt gacattatgt tctacacaat agaaaatgca gtaccaattc
 781 atcttctaag aacaggagat gaattctcca caggaatata tcaacttgac acaaaaccac
 841 taaaattaac tcaactatgg caaacaacaa gatctctagg actgcctcca aaactactaa
 901 ctgaacctac cacagaagga gaccaacacc caggaacact accagcagct aacacaagaa
 961 aaggttatca ccaacaatt aataatagct acacagaagc aacagcaatt aggccagctc
 1021 aggtaggata taatacacia tacatgaatt ttggatactc caatggtgga ccatttctaa
 1081 ctcttatagt accaacagca gacacacaat ataattgatg tgaaccaaat ggtgctataa
 1141 gatttacaat gggttaccaa catggacaat taaccacatc tacacaagaa ctagaagat
 1201 acacattcaa tccacaaagt aaatgtggaa gagctccaaa acaacaattt aatcaacagg
 1261 caccactaaa cctagaaaat acaataatg gaacactttt accttcagat ccaataggag
 1321 ggaaccta catgcatttc atgaatacac tcaatacata tggaccatta acagcactaa
 1381 acaatactgc acctgtattt ccaaatgggc aaatatggga taaagaactt gatacagatc
 1441 taaaacctag actacatgtt acagctccat ttgtttgtaa aaacaatcca ccaggacaac
 1501 tatttgtaaa aatagcacca aaactaacag atgatttcaa tgctgactct cctcaacaac
 1561 ctagaataat aacctattca aacttttggg ggaaagggaac actaacattc acagcaaaaa
 1621 tgagatccag taatatgtgg aacctattc aacaacacac aacaacagca gaaaacattg
 1681 gtaactatat tctacaaat attggtggca taaaaatgtt tccagaatat tcacaactta
 1741 taccaagaaa attatactag

Phụ lục 10. Kết quả xử lý thống kê đa biến xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp bằng phần mềm Minitab18

General Linear Model: Logarit số lượng bản sao virus ... FBS, Thời gian Method

Factor coding (-1, 0, +1)

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
Nhiệt độ	Fixed	3	33°C, 37°C, 39°C
% FBS	Fixed	3	2%FBS, 3%FBS, 5%FBS
Thời gian	Fixed	8	Ngày 0, Ngày 1, Ngày 2, Ngày 3, Ngày 4, Ngày 5, Ngày 6, Ngày 7

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Nhiệt độ	2	34.866	17.4330	175.25	0.000
% FBS	2	4.702	2.3512	23.64	0.000
Thời gian	7	500.709	71.5298	719.09	0.000
Nhiệt độ*% FBS	4	3.082	0.7706	7.75	0.000
Error	200	19.894	0.0995		

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.315392	96.47%	96.20%	95.88%

Coefficients

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	4.7754	0.0215	222.53	0.000	
Nhiệt độ					
33°C	-0.4238	0.0303	-13.97	0.000	1.33
37°C	0.5396	0.0303	17.78	0.000	1.33
% FBS					
2%FBS	-0.1688	0.0303	-5.56	0.000	1.33
3%FBS	-0.0218	0.0303	-0.72	0.474	1.33
Thời gian					
Ngày 0	-3.2843	0.0568	-57.84	0.000	1.75
Ngày 1	-1.4446	0.0568	-25.44	0.000	1.75
Ngày 2	-0.3365	0.0568	-5.93	0.000	1.75
Ngày 3	0.4513	0.0568	7.95	0.000	1.75
Ngày 4	1.0017	0.0568	17.64	0.000	1.75

Ngày 5	1.2331	0.0568	21.72	0.000	1.75
Ngày 6	1.1813	0.0568	20.81	0.000	1.75
Nhiệt độ*% FBS					
33°C 2%FBS	0.0794	0.0429	1.85	0.066	1.78
33°C 3%FBS	0.0423	0.0429	0.99	0.325	1.78
37°C 2%FBS	-0.1649	0.0429	-3.84	0.000	1.78
37°C 3%FBS	-0.0670	0.0429	-1.56	0.120	1.78

Regression Equation

Logarit số lượng bản sao virus	=	4.7754 - 0.4238 Nhiệt độ_33°C + 0.5396 Nhiệt độ_37°C - 0.1158 Nhiệt độ_39°C - 0.1688 % FBS_2%FBS - 0.0218 % FBS_3%FBS + 0.1906 % FBS_5%FBS - 3.2843 Thời gian_Ngày 0 - 1.4446 Thời gian_Ngày 1 - 0.3365 Thời gian_Ngày 2 + 0.4513 Thời gian_Ngày 3 + 1.0017 Thời gian_Ngày 4 + 1.2331 Thời gian_Ngày 5 + 1.1813 Thời gian_Ngày 6 + 1.1980 Thời gian_Ngày 7 + 0.0794 Nhiệt độ*% FBS_33°C 2%FBS + 0.0423 Nhiệt độ* % FBS_33°C 3%FBS - 0.1217 Nhiệt độ*% FBS_33°C 5%FBS - 0.1649 Nhiệt độ*% FBS_37°C 2%FBS - 0.0670 Nhiệt độ* % FBS_37°C 3%FBS + 0.2319 Nhiệt độ*% FBS_37°C 5%FBS + 0.0855 Nhiệt độ*% FBS_39°C 2%FBS + 0.0247 Nhiệt độ* % FBS_39°C 3%FBS - 0.1102 Nhiệt độ*% FBS_39°C 5%FBS
--------------------------------	---	--

Fits and Diagnostics for Unusual Observations

Obs	Logarit số lượng bản sao virus	Fit	Resid	Std Resid	
26	1.9000	1.0878	0.8122	2.68	R
50	1.9000	1.1362	0.7638	2.52	R
75	1.0000	1.6970	-0.6970	-2.30	R
99	1.0200	1.9420	-0.9220	-3.04	R
121	1.6000	2.4532	-0.8532	-2.81	R
123	1.3500	2.4532	-1.1032	-3.64	R
146	2.0500	1.2920	0.7580	2.50	R

R Large residual

Comparisons for Logarit số lượng bản sao virus

Tukey Pairwise Comparisons: Nhiệt độ

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Nhiệt độ	N	Mean	Grouping		
37°C	72	5.31500	A		
39°C	72	4.65958		B	
33°C	72	4.35153			C

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: % FBS

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

% FBS	N	Mean	Grouping		
5%FBS	72	4.96597	A		
3%FBS	72	4.75361		B	
2%FBS	72	4.60653			C

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: Nhiệt độ*% FBS

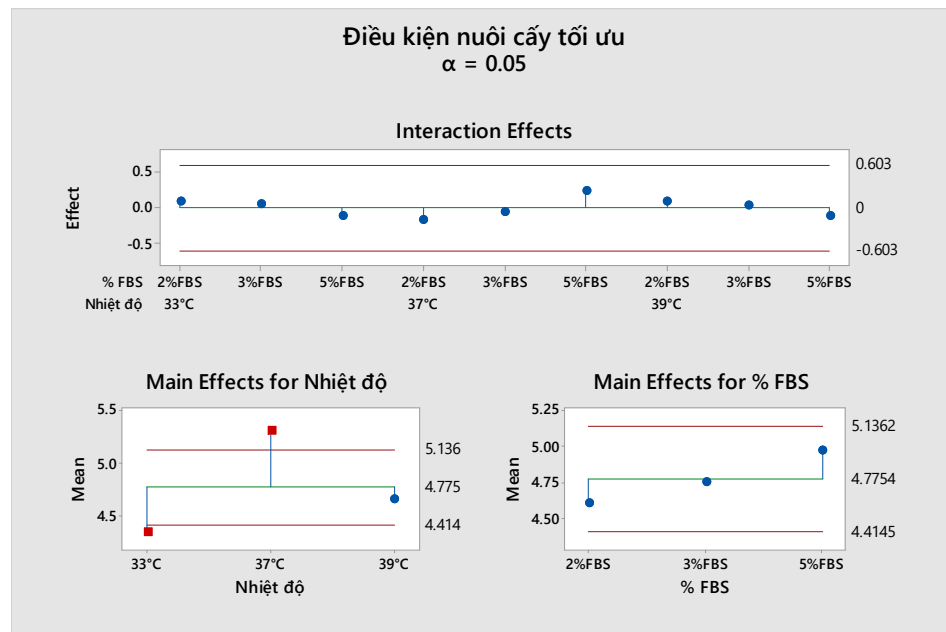
Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Nhiệt độ*% FBS	N	Mean	Grouping						
37°C 5%FBS	24	5.73750	A						
37°C 3%FBS	24	5.22625		B					
37°C 2%FBS	24	4.98125		B	C				
39°C 5%FBS	24	4.74000			C	D			
39°C 3%FBS	24	4.66250				D	E		
39°C 2%FBS	24	4.57625				D	E	F	
33°C 5%FBS	24	4.42042					E	F	G
33°C 3%FBS	24	4.37208						F	G
33°C 2%FBS	24	4.26208							G

Means that do not share a letter are significantly different.

Two-Way Normal ANOM for Logarit số lượng bản sao virus

Two-Way Normal ANOM for Logarit số lượng bản sao virus



Phụ lục 11. Kết quả xử lý thống kê số lượng bản sao virus sau 3 đời cấy truyền của 32 chủng phân lập

General Linear Model: Số lượng bản sao versus Mẫu

Method

Factor coding (-1, 0, +1)

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
Mẫu	Fixed	32	BC11, BC15, BC2, BC4, DA12, DA27, DA6, ĐH11, ĐH15, ĐH2, ĐH4, EK18, EK20, EK27, EK31, KX24, LT23, LT32, LT36, MD22, MD28, PC15, PC7, PM21, PM27, TS8, TX13, TX7, VC10, VC15, VC32, VC5

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Mẫu	31	138.323	4.46204	6.25	0.000
Error	256	182.790	0.71402		

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.845000	43.08%	36.18%	27.96%

Coefficients

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	4.4302	0.0498	88.97	0.000	
Mẫu					
BC11	0.990	0.277	3.57	0.000	1.94
BC15	-0.460	0.277	-1.66	0.098	1.94
BC2	0.040	0.277	0.14	0.886	1.94
BC4	-0.570	0.277	-2.06	0.041	1.94
DA12	0.400	0.277	1.44	0.151	1.94
DA27	-0.510	0.277	-1.84	0.067	1.94
DA6	-0.470	0.277	-1.70	0.091	1.94
ĐH11	0.450	0.277	1.62	0.106	1.94
ĐH15	-0.520	0.277	-1.88	0.062	1.94
ĐH2	0.030	0.277	0.11	0.915	1.94
ĐH4	-0.510	0.277	-1.84	0.067	1.94
EK18	0.980	0.277	3.53	0.000	1.94
EK20	-0.590	0.277	-2.13	0.034	1.94
EK27	0.450	0.277	1.62	0.106	1.94

EK31	-0.429	0.277	-1.55	0.123	1.94
KX24	0.900	0.277	3.25	0.001	1.94
LT23	-0.540	0.277	-1.95	0.052	1.94
LT32	-0.600	0.277	-2.17	0.031	1.94
LT36	-0.120	0.277	-0.43	0.665	1.94
MD22	-0.510	0.277	-1.84	0.067	1.94
MD28	-0.500	0.277	-1.80	0.072	1.94
PC15	-0.580	0.277	-2.09	0.037	1.94
PC7	0.430	0.277	1.55	0.122	1.94
PM21	-0.040	0.277	-0.15	0.885	1.94
PM27	-0.560	0.277	-2.02	0.044	1.94
TS8	-0.540	0.277	-1.95	0.052	1.94
TX13	-0.550	0.277	-1.98	0.048	1.94
TX7	1.823	0.277	6.58	0.000	1.94
VC10	0.900	0.277	3.25	0.001	1.94
VC15	-0.510	0.277	-1.84	0.067	1.94
VC32	-0.000	0.277	-0.00	0.999	1.94

Regression Equation

Số lượng bản sao = 4.4302 + 0.990 Mẫu_BC11 - 0.460 Mẫu_BC15 + 0.040 Mẫu_BC2 - 0.570 Mẫu_BC4 + 0.400 Mẫu_DA12 - 0.510 Mẫu_DA27 - 0.470 Mẫu_DA6 + 0.450 Mẫu_ĐH11 - 0.520 Mẫu_ĐH15 + 0.030 Mẫu_ĐH2 - 0.510 Mẫu_ĐH4 + 0.980 Mẫu_EK18 - 0.590 Mẫu_EK20 + 0.450 Mẫu_EK27 - 0.429 Mẫu_EK31 + 0.900 Mẫu_KX24 - 0.540 Mẫu_LT23 - 0.600 Mẫu_LT32 - 0.120 Mẫu_LT36 - 0.510 Mẫu_MD22 - 0.500 Mẫu_MD28 - 0.580 Mẫu_PC15 + 0.430 Mẫu_PC7 - 0.040 Mẫu_PM21 - 0.560 Mẫu_PM27 - 0.540 Mẫu_TS8 - 0.550 Mẫu_TX13 + 1.823 Mẫu_TX7 + 0.900 Mẫu_VC10 - 0.510 Mẫu_VC15 - 0.000 Mẫu_VC32 + 1.723 Mẫu_VC5

Comparisons for Số lượng bản sao

Tukey Pairwise Comparisons: Mẫu

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Mẫu	N	Mean	Grouping
TX7	9	6.25333	A
VC5	9	6.15333	A
BC11	9	5.42000	A B
EK18	9	5.41000	A B C
KX24	9	5.33000	A B C D
VC10	9	5.33000	A B C D
EK27	9	4.88000	A B C D

ÐH11	9	4.88000	A	B	C	D
PC7	9	4.86000	A	B	C	D
DA12	9	4.83000	A	B	C	D
BC2	9	4.47000		B	C	D
ÐH2	9	4.46000		B	C	D
VC32	9	4.43000		B	C	D
PM21	9	4.39000		B	C	D
LT36	9	4.31000		B	C	D
EK31	9	4.00111		B	C	D
BC15	9	3.97000		B	C	D
DA6	9	3.96000		B	C	D
MD28	9	3.93000		B	C	D
DA27	9	3.92000		B	C	D
ÐH4	9	3.92000		B	C	D
MD22	9	3.92000		B	C	D
VC15	9	3.92000		B	C	D
ÐH15	9	3.91000			C	D
LT23	9	3.89000				D
TS8	9	3.89000				D
TX13	9	3.88000				D
PM27	9	3.87000				D
BC4	9	3.86000				D
PC15	9	3.85000				D
EK20	9	3.84000				D
LT32	9	3.83000				D

Means that do not share a letter are significantly different.

Phụ lục 12. Kết quả xử lý thống kê Hiệu giá TCID₅₀ của 32 chủng phân lập

General Linear Model: Hiệu giá trung bình TCID₅₀/1ml versus Mẫu

Method

Factor coding (-1, 0, +1)

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
Mẫu	Fixed	32	BC11, BC15, BC2, BC4, DA12, DA27, DA6, ĐH11, ĐH15, ĐH2, ĐH4, EK18, EK20, EK27, EK31, KX24, LT23, LT32, LT36, MD22, MD28, PC15, PC7, PM21, PM27, TS8, TX13, TX7, VC10, VC15, VC32, VC5

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Mẫu	31	34.4466	1.11118	222.24	0.000
Error	64	0.3200	0.00500		
Total	95	34.7666			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0707107	99.08%	98.63%	97.93%

Coefficients

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	4.98438	0.00722	690.66	0.000	
Mẫu					
BC11	1.0156	0.0402	25.28	0.000	1.94
BC15	-0.4844	0.0402	-12.05	0.000	1.94
BC2	0.0156	0.0402	0.39	0.699	1.94
BC4	-0.4844	0.0402	-12.05	0.000	1.94
DA12	0.5156	0.0402	12.83	0.000	1.94
DA27	-0.4844	0.0402	-12.05	0.000	1.94
DA6	-0.3844	0.0402	-9.57	0.000	1.94
ĐH11	0.4156	0.0402	10.34	0.000	1.94
ĐH15	-0.4844	0.0402	-12.05	0.000	1.94
ĐH2	0.1156	0.0402	2.88	0.005	1.94
ĐH4	-0.3844	0.0402	-9.57	0.000	1.94
EK18	-0.4844	0.0402	-12.05	0.000	1.94
EK20	-0.4844	0.0402	-12.05	0.000	1.94
EK27	0.5156	0.0402	12.83	0.000	1.94
EK31	-0.3844	0.0402	-9.57	0.000	1.94

KX24	1.1156	0.0402	27.76	0.000	1.94
LT23	-0.4844	0.0402	-12.05	0.000	1.94
LT32	-0.4844	0.0402	-12.05	0.000	1.94
LT36	0.0156	0.0402	0.39	0.699	1.94
MD22	-0.3844	0.0402	-9.57	0.000	1.94
MD28	-0.3844	0.0402	-9.57	0.000	1.94
PC15	-0.4844	0.0402	-12.05	0.000	1.94
PC7	0.5156	0.0402	12.83	0.000	1.94
PM21	0.1156	0.0402	2.88	0.005	1.94
PM27	-0.4844	0.0402	-12.05	0.000	1.94
TS8	-0.4844	0.0402	-12.05	0.000	1.94
TX13	-0.3844	0.0402	-9.57	0.000	1.94
TX7	1.3156	0.0402	32.74	0.000	1.94
VC10	1.0156	0.0402	25.28	0.000	1.94
VC15	-0.4844	0.0402	-12.05	0.000	1.94
VC32	0.1156	0.0402	2.88	0.005	1.94

Regression Equation

Hiệu giá trung bình
 TCID50/1ml

$$\begin{aligned}
 = & 4.98438 + 1.0156 \text{ Mẫu_BC11} - 0.4844 \text{ Mẫu_BC15} \\
 & + 0.0156 \text{ Mẫu_BC2} \\
 & - 0.4844 \text{ Mẫu_BC4} + 0.5156 \text{ Mẫu_DA12} - 0.4844 \text{ Mẫu_DA27} \\
 & - 0.3844 \text{ Mẫu_DA6} + 0.4156 \text{ Mẫu_ĐH11} - 0.4844 \text{ Mẫu_ĐH15} \\
 & + 0.1156 \text{ Mẫu_ĐH2} - 0.3844 \text{ Mẫu_ĐH4} - 0.4844 \text{ Mẫu_EK18} \\
 & - 0.4844 \text{ Mẫu_EK20} + 0.5156 \text{ Mẫu_EK27} - 0.3844 \text{ Mẫu_EK31} \\
 & + 1.1156 \text{ Mẫu_KX24} - 0.4844 \text{ Mẫu_LT23} - 0.4844 \text{ Mẫu_LT32} \\
 & + 0.0156 \text{ Mẫu_LT36} - 0.3844 \text{ Mẫu_MD22} - 0.3844 \text{ Mẫu_MD28} \\
 & - 0.4844 \text{ Mẫu_PC15} + 0.5156 \text{ Mẫu_PC7} + 0.1156 \text{ Mẫu_PM21} \\
 & - 0.4844 \text{ Mẫu_PM27} - 0.4844 \text{ Mẫu_TS8} - 0.3844 \text{ Mẫu_TX13} \\
 & + 1.3156 \text{ Mẫu_TX7} + 1.0156 \text{ Mẫu_VC10} - 0.4844 \text{ Mẫu_VC15} \\
 & + 0.1156 \text{ Mẫu_VC32} + 1.3156 \text{ Mẫu_VC5}
 \end{aligned}$$

Comparisons for Hiệu giá trung bình TCID50/1ml

Tukey Pairwise Comparisons: Mẫu

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Mẫu	N	Mean	Grouping
VC5	3	6.3	A
TX7	3	6.3	A
KX24	3	6.1	A B
BC11	3	6.0	B
VC10	3	6.0	B
DA12	3	5.5	C
EK27	3	5.5	C

PC7	3	5.5	C
ÐH11	3	5.4	C
ÐH2	3	5.1	D
PM21	3	5.1	D
VC32	3	5.1	D
BC2	3	5.0	D
LT36	3	5.0	D
ÐH4	3	4.6	E
DA6	3	4.6	E
EK31	3	4.6	E
MD22	3	4.6	E
MD28	3	4.6	E
TX13	3	4.6	E
BC15	3	4.5	E
BC4	3	4.5	E
DA27	3	4.5	E
ÐH15	3	4.5	E
EK18	3	4.5	E
EK20	3	4.5	E
LT23	3	4.5	E
LT32	3	4.5	E
PC15	3	4.5	E
PM27	3	4.5	E
TS8	3	4.5	E
VC15	3	4.5	E

Means that do not share a letter are significantly different.

Phụ lục 13. Kết quả xử lý thống kê Hiệu giá HI sau công cường độ

General Linear Model: Hiệu giá HI (log2) versus Nhóm, Thời gian

Method

Factor coding (-1, 0, +1)

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
Nhóm	Fixed	3	Đối chứng, TX7, VC5
Thời gian	Fixed	5	Ngày 0, Ngày 14, Ngày 21, Ngày 49, Ngày 7

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Nhóm	2	1397.10	698.548	2347.90	0.000
Thời gian	4	933.69	233.423	784.56	0.000
Nhóm*Thời gian	8	468.78	58.597	196.95	0.000
Error	121	36.00	0.298		
Total	135	2835.93			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.545455	98.73%	98.58%	98.39%

Coefficients

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	4.5111	0.0468	96.41	0.000	
Nhóm					
Đối chứng	-4.5111	0.0659	-68.41	0.000	1.33
TX7	2.4889	0.0663	37.55	0.000	1.33
Thời gian					
Ngày 0	-4.5111	0.0938	-48.09	0.000	1.60
Ngày 14	0.8222	0.0926	8.88	0.000	1.59
Ngày 21	2.8222	0.0938	30.08	0.000	1.60
Ngày 49	2.0444	0.0938	21.79	0.000	1.60
Nhóm*Thời gian					
Đối chứng Ngày 0	4.511	0.133	34.03	0.000	2.13
Đối chứng Ngày 14	-0.822	0.129	-6.36	0.000	2.08
Đối chứng Ngày 21	-2.822	0.133	-21.29	0.000	2.13
Đối chứng Ngày 49	-2.044	0.133	-15.42	0.000	2.13
TX7 Ngày 0	-2.489	0.133	-18.75	0.000	2.13

TX7 Ngày 14	0.511	0.132	3.88	0.000	2.10
TX7 Ngày 21	1.511	0.133	11.39	0.000	2.13
TX7 Ngày 49	0.956	0.133	7.20	0.000	2.13

Regression Equation

Hiệu giá HI (log2) = 4.5111 - 4.5111 Nhóm_Đối chứng + 2.4889 Nhóm_TX7 + 2.0222 Nhóm_VC5
 - 4.5111 Thời gian_Ngày 0 + 0.8222 Thời gian_Ngày 14
 + 2.8222 Thời gian_Ngày 21 + 2.0444 Thời gian_Ngày 49
 - 1.1778 Thời gian_Ngày 7 + 4.511 Nhóm*Thời gian_Đối chứng Ngày 0
 - 0.822 Nhóm*Thời gian_Đối chứng Ngày 14 - 2.822 Nhóm*Thời gian_Đối
 chứng Ngày 21 - 2.044 Nhóm*Thời gian_Đối chứng Ngày 49
 + 1.178 Nhóm*Thời gian_Đối chứng Ngày 7 - 2.489 Nhóm*Thời gian_TX7 Ngày
 0 + 0.511 Nhóm*Thời gian_TX7 Ngày 14 + 1.511 Nhóm*Thời gian_TX7 Ngày 21
 + 0.956 Nhóm*Thời gian_TX7 Ngày 49 - 0.489 Nhóm*Thời gian_TX7 Ngày 7
 - 2.022 Nhóm*Thời gian_VC5 Ngày 0 + 0.311 Nhóm*Thời gian_VC5 Ngày 14
 + 1.311 Nhóm*Thời gian_VC5 Ngày 21 + 1.089 Nhóm*Thời gian_VC5 Ngày 49
 - 0.689 Nhóm*Thời gian_VC5 Ngày 7

Fits and Diagnostics for Unusual Observations

Obs	Hiệu giá HI (log2)	Fit	Resid	Std Resid	
15	7.000	5.333	1.667	3.24	R
18	4.000	5.333	-1.333	-2.59	R
21	7.000	8.333	-1.333	-2.59	R
27	7.000	8.333	-1.333	-2.59	R
30	10.000	11.333	-1.333	-2.59	R
56	6.000	4.667	1.333	2.59	R
65	9.000	7.667	1.333	2.59	R
74	12.000	10.667	1.333	2.59	R
84	11.000	9.667	1.333	2.59	R

R Large residual

Comparisons for Hiệu giá HI (log2)

Tukey Pairwise Comparisons: Nhóm

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Nhóm	N	Mean	Grouping
TX7	45	7.00000	A
VC5	45	6.53333	B
Đối chứng	46	-0.00000	C

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: Thời gian

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Thời gian	N	Mean	Grouping
Ngày 21	27	7.33333	A

Ngày 49	27	6.55556	B
Ngày 14	28	5.33333	C
Ngày 7	27	3.33333	D
Ngày 0	27	0.00000	E

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: Nhóm*Thời gian

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Nhóm*Thời gian	N	Mean	Grouping
TX7 Ngày 21	9	11.3333	A
VC5 Ngày 21	9	10.6667	A B
TX7 Ngày 49	9	10.0000	B C
VC5 Ngày 49	9	9.6667	C
TX7 Ngày 14	9	8.3333	D
VC5 Ngày 14	9	7.6667	D
TX7 Ngày 7	9	5.3333	E
VC5 Ngày 7	9	4.6667	E
TX7 Ngày 0	9	0.0000	F
VC5 Ngày 0	9	-0.0000	F
Đối chứng Ngày 49	9	-0.0000	F
Đối chứng Ngày 0	9	-0.0000	F
Đối chứng Ngày 21	9	-0.0000	F
Đối chứng Ngày 7	9	-0.0000	F
Đối chứng Ngày 14	10	-0.0000	F

Means that do not share a letter are significantly different.

Phụ lục 14. Kết quả xử lý thống kê Hiệu giá HI miễn dịch chuột lang

General Linear Model: Hiệu giá HI (log2) versus Nhóm, ... m, Thời gian

Method

Factor coding (-1, 0, +1)

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
Nhóm	Fixed	3	Đối chứng, TX7, VC5
Số mũi tiêm	Fixed	2	1, 2
Thời gian	Fixed	4	Ngày 0, Ngày 14, Ngày 21, Ngày 7

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Nhóm	2	668.09	334.044	1157.49	0.000
Số mũi tiêm	1	464.13	464.133	1608.26	0.000
Thời gian	3	208.09	69.363	240.35	0.000
Nhóm*Số mũi tiêm	2	234.29	117.144	405.92	0.000
Nhóm*Thời gian	6	104.62	17.437	60.42	0.000
Error	300	86.58	0.289		
Total	314	2286.40			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.537208	96.21%	96.04%	95.82%

Coefficients

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	2.2222	0.0327	67.97	0.000	
Nhóm					
Đối chứng	-2.2222	0.0462	-48.06	0.000	1.56
TX7	1.2000	0.0462	25.95	0.000	1.56
Số mũi tiêm					
1	-1.3111	0.0327	-40.10	0.000	1.14
Thời gian					
Ngày 0	-1.0889	0.0517	-21.06	0.000	1.67
Ngày 14	0.2222	0.0517	4.30	0.000	1.67
Ngày 21	1.4667	0.0694	21.15	0.000	2.14
Nhóm*Số mũi tiêm					
Đối chứng 1	1.3111	0.0462	28.36	0.000	1.56

TX7 1	-0.7667	0.0462	-16.58	0.000	1.56
-------	---------	--------	--------	-------	------

Nhóm*Thời gian

Đối chứng Ngày 0	1.0889	0.0731	14.89	0.000	2.22
Đối chứng Ngày 14	-0.2222	0.0731	-3.04	0.003	2.22
Đối chứng Ngày 21	-1.4667	0.0981	-14.95	0.000	3.00
TX7 Ngày 0	-0.5333	0.0731	-7.30	0.000	2.22
TX7 Ngày 14	0.1889	0.0731	2.58	0.010	2.22
TX7 Ngày 21	0.6333	0.0981	6.46	0.000	3.00

Regression Equation

Hiệu giá HI (log2) = 2.2222 - 2.2222 Nhóm_Đối chứng + 1.2000 Nhóm_TX7 + 1.0222 Nhóm_VC5 - 1.3111 Số mũi tiêm_1 + 1.3111 Số mũi tiêm_2 - 1.0889 Thời gian_Ngày 0 + 0.2222 Thời gian_Ngày 14 + 1.4667 Thời gian_Ngày 21 - 0.6000 Thời gian_Ngày 7 + 1.3111 Nhóm*Số mũi tiêm_Đối chứng 1 - 1.3111 Nhóm*Số mũi tiêm_Đối chứng 2 - 0.7667 Nhóm*Số mũi tiêm_TX7 1 + 0.7667 Nhóm*Số mũi tiêm_TX7 2 - 0.5444 Nhóm*Số mũi tiêm_VC5 1 + 0.5444 Nhóm*Số mũi tiêm_VC5 2 + 1.0889 Nhóm*Thời gian_Đối chứng Ngày 0 - 0.2222 Nhóm*Thời gian_Đối chứng Ngày 14 - 1.4667 Nhóm*Thời gian_Đối chứng Ngày 21 + 0.6000 Nhóm*Thời gian_Đối chứng Ngày 7 - 0.5333 Nhóm*Thời gian_TX7 Ngày 0 + 0.1889 Nhóm*Thời gian_TX7 Ngày 14 + 0.6333 Nhóm*Thời gian_TX7 Ngày 21 - 0.2889 Nhóm*Thời gian_TX7 Ngày 7 - 0.5556 Nhóm*Thời gian_VC5 Ngày 0 + 0.0333 Nhóm*Thời gian_VC5 Ngày 14 + 0.8333 Nhóm*Thời gian_VC5 Ngày 21 - 0.3111 Nhóm*Thời gian_VC5 Ngày 7

Fits and Diagnostics for Unusual Observations

Obs	Hiệu giá HI (log2)	Fit	Resid	Std Resid	
47	2.000	3.878	-1.878	-3.58	R
53	5.000	3.878	1.122	2.14	R
59	5.000	3.878	1.122	2.14	R
66	3.000	4.611	-1.611	-3.07	R
71	6.000	4.611	1.389	2.64	R
81	7.000	5.911	1.089	2.07	R
84	7.000	5.911	1.089	2.07	R
88	7.000	5.911	1.089	2.07	R
90	8.000	5.911	2.089	3.98	R
92	6.000	7.600	-1.600	-3.08	R
101	9.000	7.600	1.400	2.70	R
155	2.000	3.456	-1.456	-2.77	R
161	2.000	3.456	-1.456	-2.77	R
170	3.000	4.189	-1.189	-2.26	R
176	3.000	4.189	-1.189	-2.26	R

180	6.000	4.189	1.811	3.45	R
185	4.000	5.356	-1.356	-2.58	R
192	7.000	5.356	1.644	3.13	R
201	6.000	7.400	-1.400	-2.70	R
209	9.000	7.400	1.600	3.08	R

R Large residual

Comparisons for Hiệu giá HI (log2)

Tukey Pairwise Comparisons: Nhóm

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Nhóm	N	Mean	Grouping
TX7	105	3.42222	A
VC5	105	3.24444	A
Đối chứng	105	-0.00000	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: Số mũi tiêm

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Số mũi tiêm	N	Mean	Grouping
2	180	3.53333	A
1	135	0.91111	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: Thời gian

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Thời gian	N	Mean	Grouping
Ngày 21	45	3.68889	A
Ngày 14	90	2.44444	B
Ngày 7	90	1.62222	C
Ngày 0	90	1.13333	D

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: Nhóm*Số mũi tiêm

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Nhóm*Số mũi tiêm	N	Mean	Grouping
TX7 2	60	5.50000	A
VC5 2	60	5.10000	B
VC5 1	45	1.38889	C
TX7 1	45	1.34444	C
Đối chứng 1	45	-0.00000	D

Đối chứng 2 60 -0.00000 D
Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: Nhóm*Thời gian

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Nhóm*Thời gian	N	Mean	Grouping
VC5 Ngày 21	15	5.54444	A
TX7 Ngày 21	15	5.52222	A
TX7 Ngày 14	30	3.83333	B
VC5 Ngày 14	30	3.50000	B
TX7 Ngày 7	30	2.53333	C
VC5 Ngày 7	30	2.33333	C
TX7 Ngày 0	30	1.80000	D
VC5 Ngày 0	30	1.60000	D
Đối chứng Ngày 0	30	-0.00000	E
Đối chứng Ngày 21	15	-0.00000	E
Đối chứng Ngày 14	30	-0.00000	E
Đối chứng Ngày 7	30	-0.00000	E

Means that do not share a letter are significantly different.

Phụ lục 15. Kết quả xử lý thống kê Hiệu giá HI miễn dịch trên lợn

General Linear Model: Hiệu giá HI (log2) versus Nhóm, ... m, Thời gian

Method

Factor coding (-1, 0, +1)

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
Nhóm	Fixed	3	Đối chứng, TX7, VC5
Số mũi tiêm	Fixed	2	1, 2
Thời gian	Fixed	4	Ngày 0, Ngày 14, Ngày 21, Ngày 7

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Nhóm	2	413.54	206.770	648.47	0.000
Số mũi tiêm	1	285.34	285.340	894.88	0.000
Thời gian	3	121.04	40.347	126.53	0.000
Nhóm*Số mũi tiêm	2	143.79	71.895	225.48	0.000
Nhóm*Thời gian	6	60.86	10.143	31.81	0.000
Error	174	55.48	0.319		
Total	188	1394.80			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.564676	96.02%	95.70%	95.29%

Coefficients

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	2.2562	0.0444	50.85	0.000	
Nhóm					
Đối chứng	-2.2562	0.0627	-35.96	0.000	1.56
TX7	1.2346	0.0627	19.68	0.000	1.56
Số mũi tiêm					
1	-1.3272	0.0444	-29.91	0.000	1.14
Thời gian					
Ngày 0	-1.0895	0.0701	-15.53	0.000	1.67
Ngày 14	0.2438	0.0701	3.48	0.001	1.67
Ngày 21	1.4167	0.0941	15.05	0.000	2.14
Nhóm*Số mũi tiêm					
Đối chứng 1	1.3272	0.0627	21.15	0.000	1.56

TX7 1	-0.7654	0.0627	-12.20	0.000	1.56
Nhóm*Thời gian					
Đối chứng Ngày 0	1.0895	0.0992	10.98	0.000	2.22
Đối chứng Ngày 14	-0.2438	0.0992	-2.46	0.015	2.22
Đối chứng Ngày 21	-1.417	0.133	-10.64	0.000	3.00
TX7 Ngày 0	-0.5679	0.0992	-5.72	0.000	2.22
TX7 Ngày 14	0.2099	0.0992	2.12	0.036	2.22
TX7 Ngày 21	0.667	0.133	5.01	0.000	3.00

Regression Equation

Hiệu giá HI (log2) = 2.2562 - 2.2562 Nhóm_Đối chứng + 1.2346 Nhóm_TX7 + 1.0216 Nhóm_VC5
 - 1.3272 Số mũi tiêm_1 + 1.3272 Số mũi tiêm_2 - 1.0895 Thời gian_Ngày 0
 + 0.2438 Thời gian_Ngày 14 + 1.4167 Thời gian_Ngày 21
 - 0.5710 Thời gian_Ngày 7 + 1.3272 Nhóm*Số mũi tiêm_Đối chứng 1
 - 1.3272 Nhóm*Số mũi tiêm_Đối chứng 2 - 0.7654 Nhóm*Số mũi tiêm_TX7 1
 + 0.7654 Nhóm*Số mũi tiêm_TX7 2 - 0.5617 Nhóm*Số mũi tiêm_VC5 1
 + 0.5617 Nhóm*Số mũi tiêm_VC5 2 + 1.0895 Nhóm*Thời gian_Đối chứng Ngày 0
 - 0.2438 Nhóm*Thời gian_Đối chứng Ngày 14 - 1.417 Nhóm*Thời gian_Đối chứng Ngày 21
 + 0.5710 Nhóm*Thời gian_Đối chứng Ngày 7
 - 0.5679 Nhóm*Thời gian_TX7 Ngày 0 + 0.2099 Nhóm*Thời gian_TX7 Ngày 14
 + 0.667 Nhóm*Thời gian_TX7 Ngày 21 - 0.3086 Nhóm*Thời gian_TX7 Ngày 7
 - 0.5216 Nhóm*Thời gian_VC5 Ngày 0 + 0.0340 Nhóm*Thời gian_VC5 Ngày 14
 + 0.750 Nhóm*Thời gian_VC5 Ngày 21 - 0.2623 Nhóm*Thời gian_VC5 Ngày 7

Fits and Diagnostics for Unusual Observations

Obs	Hiệu giá HI (log2)	Fit	Resid	Std Resid	
29	2.000	3.926	-1.926	-3.54	R
38	6.000	4.704	1.296	2.39	R
42	3.000	4.704	-1.704	-3.14	R
56	6.000	7.667	-1.667	-3.13	R
59	9.000	7.667	1.333	2.50	R
95	2.000	3.556	-1.556	-2.86	R
104	3.000	4.333	-1.333	-2.45	R
108	6.000	4.333	1.667	3.07	R
113	7.000	5.444	1.556	2.86	R
115	7.000	5.444	1.556	2.86	R
123	9.000	7.333	1.667	3.13	R

R Large residual

Comparisons for Hiệu giá HI (log2)

Tukey Pairwise Comparisons: Nhóm

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Nhóm	N	Mean	Grouping
TX7	63	3.49074	A
VC5	63	3.27778	A
Đối chứng	63	0.00000	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: Số mũi tiêm

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Số mũi tiêm	N	Mean	Grouping
2	108	3.58333	A
1	81	0.92901	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: Thời gian

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Thời gian	N	Mean	Grouping
Ngày 21	27	3.67284	A
Ngày 14	54	2.50000	B
Ngày 7	54	1.68519	C
Ngày 0	54	1.16667	D

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: Nhóm*Số mũi tiêm

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Nhóm*Số mũi tiêm	N	Mean	Grouping
TX7 2	36	5.58333	A
VC5 2	36	5.16667	B
TX7 1	27	1.39815	C
VC5 1	27	1.38889	C
Đối chứng 1	27	0.00000	D
Đối chứng 2	36	-0.00000	D

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: Nhóm*Thời gian

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Nhóm*Thời gian	N	Mean	Grouping
TX7 Ngày 21	9	5.57407	A
VC5 Ngày 21	9	5.44444	A
TX7 Ngày 14	18	3.94444	B
VC5 Ngày 14	18	3.55556	B

TX7 Ngày 7	18	2.61111	C	
VC5 Ngày 7	18	2.44444	C	D
TX7 Ngày 0	18	1.83333		D E
VC5 Ngày 0	18	1.66667		E
Đối chứng Ngày 0	18	0.00000		F
Đối chứng Ngày 21	9	0.00000		F
Đối chứng Ngày 14	18	-0.00000		F
Đối chứng Ngày 7	18	-0.00000		F

Means that do not share a letter are significantly different.

Phụ lục 16. Kết quả xử lý thống kê Hiệu giá ELISA miễn dịch trên lợn

General Linear Model: Hiệu giá ELISA (PI) versus Nhóm, ... , Thời gian

Method

Factor coding (-1, 0, +1)

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
Nhóm	Fixed	3	Đối chứng, TX7, VC5
Số mũi tiêm	Fixed	2	1, 2
Thời gian	Fixed	4	Ngày 0, Ngày 14, Ngày 21, Ngày 7

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Nhóm	2	22789.3	11394.6	1655.28	0.000
Số mũi tiêm	1	14803.9	14803.9	2150.53	0.000
Thời gian	3	10947.4	3649.1	530.10	0.000
Nhóm*Số mũi tiêm	2	7346.7	3673.3	533.62	0.000
Nhóm*Thời gian	6	5346.0	891.0	129.43	0.000
Error	174	1197.8	6.9		
Total	188	81805.6			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
2.62370	98.54%	98.42%	98.29%

Coefficients

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	27.184	0.206	131.87	0.000	
Nhóm					
Đối chứng	-16.772	0.292	-57.53	0.000	1.56
TX7	8.552	0.292	29.34	0.000	1.56
Số mũi tiêm					
1	-9.559	0.206	-46.37	0.000	1.14
Thời gian					
Ngày 0	-10.275	0.326	-31.53	0.000	1.67
Ngày 14	0.446	0.326	1.37	0.173	1.67
Ngày 21	14.761	0.437	33.76	0.000	2.14
Nhóm*Số mũi tiêm					
Đối chứng 1	9.524	0.292	32.67	0.000	1.56

TX7 1	-4.773	0.292	-16.37	0.000	1.56
Nhóm*Thời gian					
Đối chứng Ngày 0	9.947	0.461	21.58	0.000	2.22
Đối chứng Ngày 14	-0.452	0.461	-0.98	0.329	2.22
Đối chứng Ngày 21	-14.682	0.618	-23.74	0.000	3.00
TX7 Ngày 0	-5.014	0.461	-10.88	0.000	2.22
TX7 Ngày 14	0.106	0.461	0.23	0.818	2.22
TX7 Ngày 21	7.647	0.618	12.37	0.000	3.00

Regression Equation

Hiệu giá ELISA (PI) = 27.184 - 16.772 Nhóm_Đối chứng + 8.552 Nhóm_TX7 + 8.220 Nhóm_VC5
 - 9.559 Số mũi tiêm_1 + 9.559 Số mũi tiêm_2 - 10.275 Thời gian_Ngày 0
 + 0.446 Thời gian_Ngày 14 + 14.761 Thời gian_Ngày 21
 - 4.932 Thời gian_Ngày 7 + 9.524 Nhóm*Số mũi tiêm_Đối chứng 1
 - 9.524 Nhóm*Số mũi tiêm_Đối chứng 2 - 4.773 Nhóm*Số mũi tiêm_TX7 1
 + 4.773 Nhóm*Số mũi tiêm_TX7 2 - 4.750 Nhóm*Số mũi tiêm_VC5 1
 + 4.750 Nhóm*Số mũi tiêm_VC5 2 + 9.947 Nhóm*Thời gian_Đối chứng Ngày 0
 - 0.452 Nhóm*Thời gian_Đối chứng Ngày 14 - 14.682 Nhóm*Thời gian_Đối
 chứng Ngày 21 + 5.187 Nhóm*Thời gian_Đối chứng Ngày 7
 - 5.014 Nhóm*Thời gian_TX7 Ngày 0 + 0.106 Nhóm*Thời gian_TX7 Ngày 14
 + 7.647 Nhóm*Thời gian_TX7 Ngày 21 - 2.740 Nhóm*Thời gian_TX7 Ngày 7
 - 4.933 Nhóm*Thời gian_VC5 Ngày 0 + 0.345 Nhóm*Thời gian_VC5 Ngày 14
 + 7.035 Nhóm*Thời gian_VC5 Ngày 21 - 2.448 Nhóm*Thời gian_VC5 Ngày 7

Fits and Diagnostics for Unusual Observations

Obs	Hiệu giá ELISA (PI)	Fit	Resid	Std Resid	
1	11.560	6.114	5.446	2.16	R
27	16.850	21.955	-5.105	-2.02	R
34	29.560	34.779	-5.219	-2.07	R
35	29.010	34.779	-5.769	-2.29	R
36	29.510	34.779	-5.269	-2.09	R
51	56.270	50.621	5.649	2.24	R
64	11.030	5.886	5.144	2.04	R
95	28.670	34.506	-5.836	-2.31	R
116	56.300	50.505	5.795	2.30	R

R Large residual

Comparisons for Hiệu giá ELISA (PI)

Tukey Pairwise Comparisons: Nhóm

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Nhóm	N	Mean	Grouping
TX7	63	35.7356	A
VC5	63	35.4040	A

Đối chứng 63 10.4112 B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: Số mũi tiêm

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Số mũi tiêm	N	Mean	Grouping
2	108	36.7430	A
1	81	17.6242	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: Thời gian

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Thời gian	N	Mean	Grouping
Ngày 21	27	41.9447	A
Ngày 14	54	27.6294	B
Ngày 7	54	22.2517	C
Ngày 0	54	16.9085	D

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: Nhóm*Số mũi tiêm

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Nhóm*Số mũi tiêm	N	Mean	Grouping
TX7 2	36	50.0683	A
VC5 2	36	49.7136	A
TX7 1	27	21.4028	B
VC5 1	27	21.0944	B
Đối chứng 2	36	10.4469	C
Đối chứng 1	27	10.3755	C

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: Nhóm*Thời gian

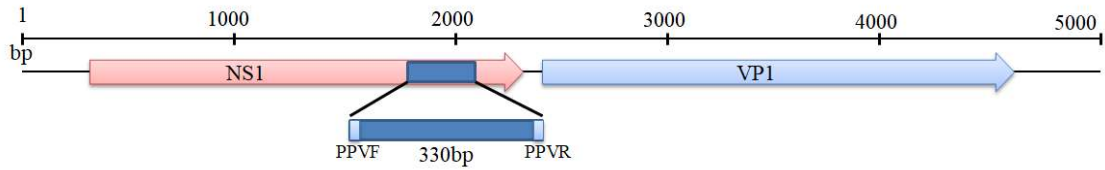
Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Nhóm*Thời gian	N	Mean	Grouping
TX7 Ngày 21	9	58.1439	A
VC5 Ngày 21	9	57.2004	A
TX7 Ngày 14	18	36.2878	B
VC5 Ngày 14	18	36.1950	B
TX7 Ngày 7	18	28.0639	C
VC5 Ngày 7	18	28.0244	C
TX7 Ngày 0	18	20.4467	D

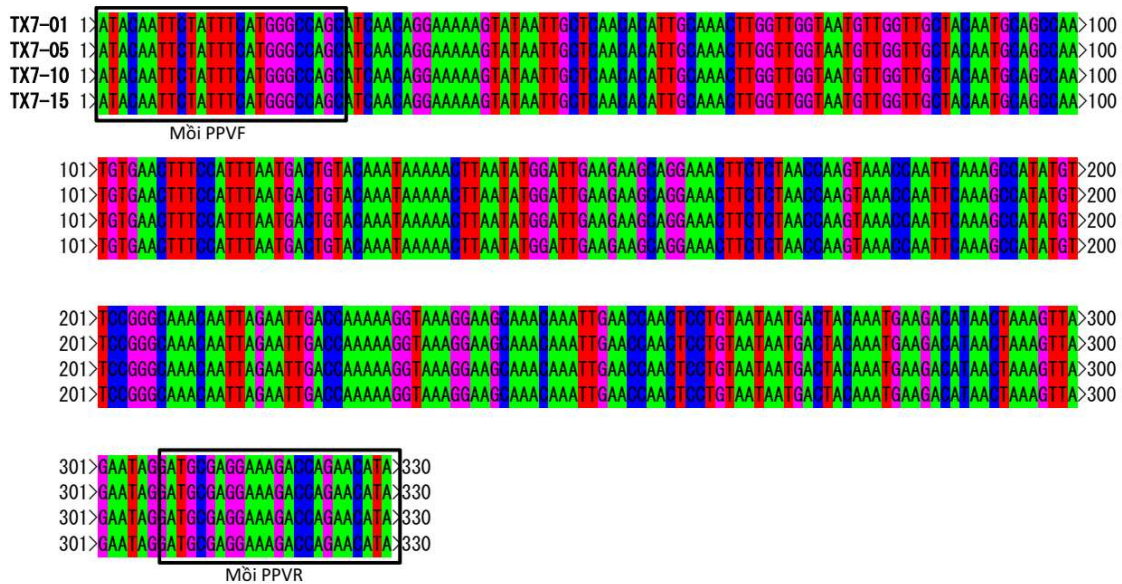
VC5 Ngày 0	18	20.1961	D
Đối chứng Ngày 7	18	10.6667	E
Đối chứng Ngày 21	9	10.4898	E
Đối chứng Ngày 14	18	10.4056	E
Đối chứng Ngày 0	18	10.0828	E

Means that do not share a letter are significantly different.

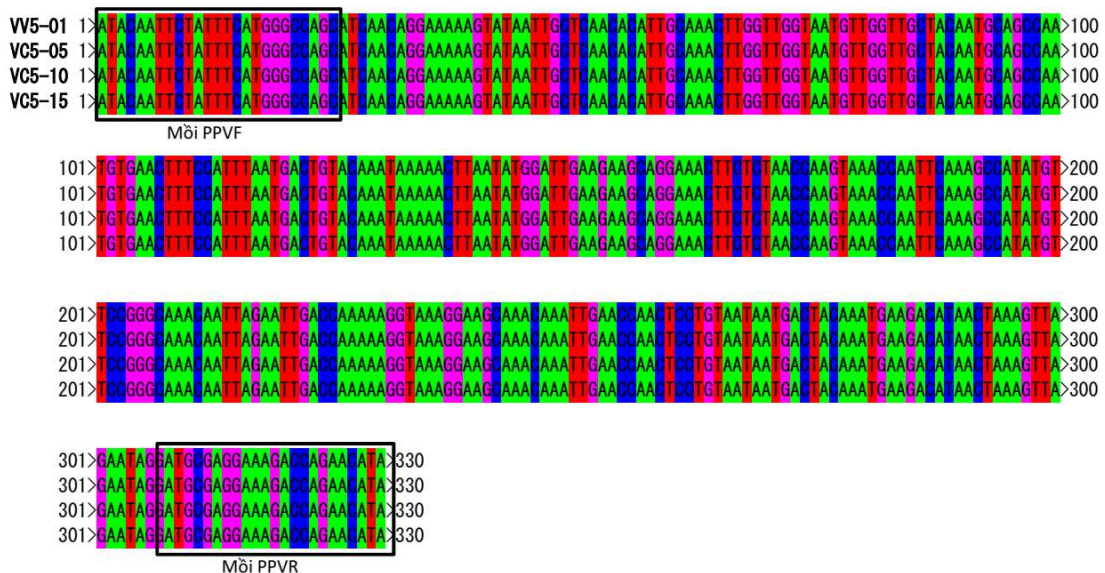
**Phụ lục 17. Kết quả so sánh trình tự gen NS1, VP2
của chủng VC5, TX7 qua các đời nuôi cấy 01, 05, 10, 15**



Hình 1. Vị trí đoạn gen NS1 (330bp) trong bộ gen của Parvovirus
Chủng tham khảo: Chủng Kresse (Mã số GenBank: U44978)



Hình 2. So sánh trình tự gen NS1 của chủng TX7 qua các đời nuôi cấy 1, 5, 10, 15



Hình 3. So sánh trình tự gen NS1 của chủng VC5 qua các đời nuôi cấy 1, 5, 10, 15

201> TATTGACTGGTAAATCTAAATATGAAAGAAATATTATTATAAAAAAATAATGTCAAAAATAAAAAAAGGTTGACTTTAAAAAGAAAG>300
 201> TATTGACTGGTAAATCTAAATATGAAAGAAATATTATTATAAAAAAATAATGTCAAAAATAAAAAAAGGTTGACTTTAAAAAGAAAG>300
 201> TATTGACTGGTAAATCTAAATATGAAAGAAATATTATTATAAAAAAATAATGTCAAAAATAAAAAAAGGTTGACTTTAAAAAGAAAG>300
 201> TATTGACTGGTAAATCTAAATATGAAAGAAATATTATTATAAAAAAATAATGTCAAAAATAAAAAAAGGTTGACTTTAAAAAGAAAG>300

301> AATATTAAAGCACTAAAATTTTAAATCGTTAGTAACTTTATATATGTTACCAAAAAAGAGAGTTGGATTAAATACAAAGGAAATTTATTCTTAATATCC>400
 301> AATATTAAAGCACTAAAATTTTAAATCGTTAGTAACTTTATATATGTTACCAAAAAAGAGAGTTGGATTAAATACAAAGGAAATTTATTCTTAATATCC>400
 301> AATATTAAAGCACTAAAATTTTAAATCGTTAGTAACTTTATATATGTTACCAAAAAAGAGAGTTGGATTAAATACAAAGGAAATTTATTCTTAATATCC>400
 301> AATATTAAAGCACTAAAATTTTAAATCGTTAGTAACTTTATATATGTTACCAAAAAAGAGAGTTGGATTAAATACAAAGGAAATTTATTCTTAATATCC>400

401> AAAAAATGAAAGAAAAATATCTTAAATAGATTTTATAAAAAAATTTGAGTAAATAATGTATTAAAAATTATTAATTAATTATATCTACCAAG>500
 401> AAAAAATGAAAGAAAAATATCTTAAATAGATTTTATAAAAAAATTTGAGTAAATAATGTATTAAAAATTATTAATTAATTATATCTACCAAG>500
 401> AAAAAATGAAAGAAAAATATCTTAAATAGATTTTATAAAAAAATTTGAGTAAATAATGTATTAAAAATTATTAATTAATTATATCTACCAAG>500
 401> AAAAAATGAAAGAAAAATATCTTAAATAGATTTTATAAAAAAATTTGAGTAAATAATGTATTAAAAATTATTAATTAATTATATCTACCAAG>500

501> TATTAAATAATATACAAATAAATCTAAATGCAAGCTTAATGGTGGCACTAGACAAATAAATAATTTGATACAAACAGCAGACATATAAGTGAAAG>600
 501> TATTAAATAATATACAAATAAATCTAAATGCAAGCTTAATGGTGGCACTAGACAAATAAATAATTTGATACAAACAGCAGACATATAAGTGAAAG>600
 501> TATTAAATAATATACAAATAAATCTAAATGCAAGCTTAATGGTGGCACTAGACAAATAAATAATTTGATACAAACAGCAGACATATAAGTGAAAG>600
 501> TATTAAATAATATACAAATAAATCTAAATGCAAGCTTAATGGTGGCACTAGACAAATAAATAATTTGATACAAACAGCAGACATATAAGTGAAAG>600

601> AACTTGGTTTTATCTATGGTTACCTAAGAAAAAATCAATCAATACAGATATTACCTATCATGCAACAGAAACCTAAATCCACCAACATAAATCGGAAT>700
 601> AACTTGGTTTTATCTATGGTTACCTAAGAAAAAATCAATCAATACAGATATTACCTATCATGCAACAGAAACCTAAATCCACCAACATAAATCGGAAT>700
 601> AACTTGGTTTTATCTATGGTTACCTAAGAAAAAATCAATCAATACAGATATTACCTATCATGCAACAGAAACCTAAATCCACCAACATAAATCGGAAT>700
 601> AACTTGGTTTTATCTATGGTTACCTAAGAAAAAATCAATCAATACAGATATTACCTATCATGCAACAGAAACCTAAATCCACCAACATAAATCGGAAT>700

701> AAAAAATAAGAGTTAAATAAAAAGGATTAATAAGTGAATTAATGTTCTAATAAAGAAAAAGTATACCAATTAATTTCTAAGAAAGGAGA>800
 701> AAAAAATAAGAGTTAAATAAAAAGGATTAATAAGTGAATTAATGTTCTAATAAAGAAAAAGTATACCAATTAATTTCTAAGAAAGGAGA>800
 701> AAAAAATAAGAGTTAAATAAAAAGGATTAATAAGTGAATTAATGTTCTAATAAAGAAAAAGTATACCAATTAATTTCTAAGAAAGGAGA>800
 701> AAAAAATAAGAGTTAAATAAAAAGGATTAATAAGTGAATTAATGTTCTAATAAAGAAAAAGTATACCAATTAATTTCTAAGAAAGGAGA>800

801> GAATTTCTGAGAGGAATATATCAATTTGATAAAAAATCAATAAATTAATTAATGCTATGGCAAAAAAGATCTTAGGATGGCTCAAAAAATATAA>900
 801> GAATTTCTGAGAGGAATATATCAATTTGATAAAAAATCAATAAATTAATTAATGCTATGGCAAAAAAGATCTTAGGATGGCTCAAAAAATATAA>900
 801> GAATTTCTGAGAGGAATATATCAATTTGATAAAAAATCAATAAATTAATTAATGCTATGGCAAAAAAGATCTTAGGATGGCTCAAAAAATATAA>900
 801> GAATTTCTGAGAGGAATATATCAATTTGATAAAAAATCAATAAATTAATTAATGCTATGGCAAAAAAGATCTTAGGATGGCTCAAAAAATATAA>900

901> GTGAACCTACCAAGAAGGAGACAAATCCAGGAAACTATCAGAGGTAAATCAAGAAAAAGGTTATCAACAAAATTAATAATAGTATACAGAAG>1000
 901> GTGAACCTACCAAGAAGGAGACAAATCCAGGAAACTATCAGAGGTAAATCAAGAAAAAGGTTATCAACAAAATTAATAATAGTATACAGAAG>1000
 901> GTGAACCTACCAAGAAGGAGACAAATCCAGGAAACTATCAGAGGTAAATCAAGAAAAAGGTTATCAACAAAATTAATAATAGTATACAGAAG>1000
 901> GTGAACCTACCAAGAAGGAGACAAATCCAGGAAACTATCAGAGGTAAATCAAGAAAAAGGTTATCAACAAAATTAATAATAGTATACAGAAG>1000

1001> AAAGTAATTAGGCAAGCTTAGGTAGGATATAATATAAATAATGAATTTTGGATATCTCAATGGTGGACGATTTTAAATCTATAGTACCAAGAA>1100
 1001> AAAGTAATTAGGCAAGCTTAGGTAGGATATAATATAAATAATGAATTTTGGATATCTCAATGGTGGACGATTTTAAATCTATAGTACCAAGAA>1100
 1001> AAAGTAATTAGGCAAGCTTAGGTAGGATATAATATAAATAATGAATTTTGGATATCTCAATGGTGGACGATTTTAAATCTATAGTACCAAGAA>1100
 1001> AAAGTAATTAGGCAAGCTTAGGTAGGATATAATATAAATAATGAATTTTGGATATCTCAATGGTGGACGATTTTAAATCTATAGTACCAAGAA>1100

1101> GAAATAAATAAATGATGATGAACAAATGGTGTATAAGATTTAATGGGTTAAATAATGGAAATTAACCAATTAATAAAGAAATAGAAAAG>1200
 1101> GAAATAAATAAATGATGATGAACAAATGGTGTATAAGATTTAATGGGTTAAATAATGGAAATTAACCAATTAATAAAGAAATAGAAAAG>1200
 1101> GAAATAAATAAATGATGATGAACAAATGGTGTATAAGATTTAATGGGTTAAATAATGGAAATTAACCAATTAATAAAGAAATAGAAAAG>1200
 1101> GAAATAAATAAATGATGATGAACAAATGGTGTATAAGATTTAATGGGTTAAATAATGGAAATTAACCAATTAATAAAGAAATAGAAAAG>1200

1201> AATAATTAAATCAAAAAGTAAATGTGGAAGAGCTTCAAAAATAAATTTAAATAAGGACCAATAAACCTAGAAAAATAAATAATGGAAATTTT>1300
 1201> AATAATTAAATCAAAAAGTAAATGTGGAAGAGCTTCAAAAATAAATTTAAATAAGGACCAATAAACCTAGAAAAATAAATAATGGAAATTTT>1300
 1201> AATAATTAAATCAAAAAGTAAATGTGGAAGAGCTTCAAAAATAAATTTAAATAAGGACCAATAAACCTAGAAAAATAAATAATGGAAATTTT>1300
 1201> AATAATTAAATCAAAAAGTAAATGTGGAAGAGCTTCAAAAATAAATTTAAATAAGGACCAATAAACCTAGAAAAATAAATAATGGAAATTTT>1300

1301>ACCTTGAGATCAATAGGAGGGAAAAGTAAATGATTTAATGAATAAATTAATAATATGGACATTAAAGAAATAAAATATGAACTGTATT>1400
 1301>ACCTTGAGATCAATAGGAGGGAAAAGTAAATGATTTAATGAATAAATTAATAATATGGACATTAAAGAAATAAAATATGAACTGTATT>1400
 1301>ACCTTGAGATCAATAGGAGGGAAAAGTAAATGATTTAATGAATAAATTAATAATATGGACATTAAAGAAATAAAATATGAACTGTATT>1400
 1301>ACCTTGAGATCAATAGGAGGGAAAAGTAAATGATTTAATGAATAAATTAATAATATGGACATTAAAGAAATAAAATATGAACTGTATT>1400

 1401>CAAAATGGTCAAAATATGGGATAAAGAAATTGATACAGATCTAAAACTAGACTAATGTTTACAGTCCATTGTTGTAAAAAATCCACGAGGAAAC>1500
 1401>CAAAATGGTCAAAATATGGGATAAAGAAATTGATACAGATCTAAAACTAGACTAATGTTTACAGTCCATTGTTGTAAAAAATCCACGAGGAAAC>1500
 1401>CAAAATGGTCAAAATATGGGATAAAGAAATTGATACAGATCTAAAACTAGACTAATGTTTACAGTCCATTGTTGTAAAAAATCCACGAGGAAAC>1500
 1401>CAAAATGGTCAAAATATGGGATAAAGAAATTGATACAGATCTAAAACTAGACTAATGTTTACAGTCCATTGTTGTAAAAAATCCACGAGGAAAC>1500

 1501>AATTTGTAAGAAATAGCACTAAACCTAAACAGATGATTTAAATGATGATTTCTTAAACCTAGAAATAAATCTATTAAATTTTGGTGGAAAGGAAAC>1600
 1501>AATTTGTAAGAAATAGCACTAAACCTAAACAGATGATTTAAATGATGATTTCTTAAACCTAGAAATAAATCTATTAAATTTTGGTGGAAAGGAAAC>1600
 1501>AATTTGTAAGAAATAGCACTAAACCTAAACAGATGATTTAAATGATGATTTCTTAAACCTAGAAATAAATCTATTAAATTTTGGTGGAAAGGAAAC>1600
 1501>AATTTGTAAGAAATAGCACTAAACCTAAACAGATGATTTAAATGATGATTTCTTAAACCTAGAAATAAATCTATTAAATTTTGGTGGAAAGGAAAC>1600

 1601>ACTAAATTTAAGAAAAATGAGATCAGTAATATGTGGAACCTATTAAACAAATAAATAAAGAGAGAAAAATTGGTAATATATTATTAATAAAT>1700
 1601>ACTAAATTTAAGAAAAATGAGATCAGTAATATGTGGAACCTATTAAACAAATAAATAAAGAGAGAAAAATTGGTAATATATTATTAATAAAT>1700
 1601>ACTAAATTTAAGAAAAATGAGATCAGTAATATGTGGAACCTATTAAACAAATAAATAAAGAGAGAAAAATTGGTAATATATTATTAATAAAT>1700
 1601>ACTAAATTTAAGAAAAATGAGATCAGTAATATGTGGAACCTATTAAACAAATAAATAAAGAGAGAAAAATTGGTAATATATTATTAATAAAT>1700

 1701>ATTGGTGGATAAAAAATGTTTACAGAAATTAATAAATTAATACGATATATTAATAAAGAAAT>1760
 1701>ATTGGTGGATAAAAAATGTTTACAGAAATTAATAAATTAATACGATATATTAATAAAGAAAT>1760
 1701>ATTGGTGGATAAAAAATGTTTACAGAAATTAATAAATTAATACGATATATTAATAAAGAAAT>1760
 1701>ATTGGTGGATAAAAAATGTTTACAGAAATTAATAAATTAATACGATATATTAATAAAGAAAT>1760

Mũi VP2R

Hình 6. So sánh trình tự gen VP2 của chủng VC5 qua các đời nuôi cấy 1, 5, 10, 15

Phụ lục 18. Giấy chứng nhận y đức động vật



MINISTRY OF EDUCATION AND TRAINING
NONG LAM UNIVERSITY - HO CHI MINH CITY
Linh Trung Ward – Thu Duc – Ho Chi Minh City
Tel: 84 8 38966946 Fax: 84 8 38960713

Animal Ethics Committee
Pursuant to Article 2962/QĐ-ĐHNL-TCCB on 27/10/2021
Nong Lam University HCMC
<https://aec.hcmuaf.edu.vn/>
Email: aec@hcmuaf.edu.vn



Date_24th May 2023

Dear (Dr.) **Trinh Thi Thu Hang**

Animal Ethics Committees in Nong Lam University (AEC – NLU) have recently reviewed your application for the animal ethical approval of the project mentioned below. Your proposal fully meets the requirement of using animals in research that are in accordance with accepted international assessment standards adopted by the committee and Vietnam legislation. AECs is honor to grant the ethical approval.

Approval No.:	NLU-230313
Project title:	Producing bivalent inactivated vaccine against Parvovirus and <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> in swine
Funding source:	Ministry of Agriculture and Rural Development
Principle investigator:	Vu Khac Hung
Research Institution:	Institute of Veterinary Research and Development of Central Vietnam.
Site for research:	Institute of Veterinary Research and Development of Central Vietnam.
Approval date:	May 24, 2023
Expiry date:	May 24, 2025
AEC's decision:	<u>APPROVED</u>

The standard conditions of this approval are (i) perform the protocol to use animal strictly as described in the application, any changes should be requested and approved by AEC-NLU; (ii) provide related adverse event reports immediately to have the appropriate advice, (iv) provide a satisfactory final report on project completion.

Please note that failure to follow the above conditions may result in withdrawal of this approval.

Best regards,



Assoc. Prof. Dr. Nguyen Tat Toan

Vice President - Nong Lam University - Ho Chi Minh city

Assoc. Prof. Le Thanh Hien

Chair, Animal Ethics Committees