

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	viii
MỞ ĐẦU.....	1
Chương I – TỔNG QUAN VỀ VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU	5
1.1. GIỚI THIỆU VỀ BỆNH KHÔ THAI LỢN.....	5
1.1.1. Lịch sử hình thành bệnh.....	5
1.1.2. Cơ chế gây bệnh.....	6
1.1.3. Triệu chứng.....	8
1.1.4. Hậu quả do nhiễm bệnh khô thai trên lợn.....	8
1.2. TỔNG QUAN VỀ PARVOVIRUS.....	10
1.2.1. Phân loại.....	10
1.2.2. Cấu trúc virus.....	11
1.2.3. Cơ chế xâm nhiễm của virus vào tế bào vật chủ	13
1.3. KỸ THUẬT PHÂN LẬP VÀ PHÂN TÍCH GEN PARVOVIRUS	14
1.3.1. Đối tượng thu mẫu sử dụng cho phân lập PPV	14
1.3.2. Kỹ thuật nuôi cấy virus	15
1.3.3. Phân tích gen PPV	18
1.4. TỶ LỆ NHIỄM PPV	21
1.4.1. Tỷ lệ nhiễm PPV trên thế giới.....	21
1.4.2. Tỷ lệ nhiễm PPV tại Việt Nam.....	26
1.5. TÌNH HÌNH SẢN XUẤT VẮC XIN GÂY BỆNH KHÔ THAI LỢN DO PARVOVIRUS TRÊN THẾ GIỚI VÀ Ở VIỆT NAM.....	28
1.5.1. Tình hình sản xuất vắc xin Parvovirus gây bệnh khô thai lợn trên thế giới	28
1.5.2. Tình hình sản xuất vắc xin Parvovirus gây bệnh khô thai lợn tại Việt Nam	31
Chương II – CƠ SỞ LÝ THUYẾT VÀ CÁC PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	33
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU.....	33
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	33
2.2.1. Cách tiếp cận các nội dung nghiên cứu.....	33

2.2.2. Phương pháp phân lập Parvovirus gây bệnh khô thai từ các mẫu bệnh phẩm điển hình ở các địa phương khác nhau	35
2.2.2.1. Phương pháp thu mẫu	35
2.2.2.2. Phương pháp xử lý mẫu	37
2.2.2.3. Xác định mẫu dương tính với Parvovirus	37
2.2.2.4. Xác định mẫu đủ điều kiện phân lập.....	38
2.2.2.5. Phương pháp phân lập PPV	38
2.2.3. Phương pháp xác định các type của Parvovirus	40
2.2.4. Phương pháp xác định mối quan hệ di truyền của các chủng Parvovirus	41
2.2.5. Phương pháp xác định một số đặc tính virus	42
2.2.6. Xác định sự ổn định, độc lực và tính sinh miễn dịch	44
2.2.6.1. Xác định sự ổn định về một số đặc tính sinh học và di truyền của PPV	44
2.2.6.2. Đánh giá độc lực	45
2.2.6.3. Đánh giá khả năng sinh miễn dịch.....	46
2.3. HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ CHỦ YẾU SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU ..	50
2.3.1. Hóa chất.....	50
2.3.2. Thiết bị chủ yếu	50
2.4. PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ SỐ LIỆU.....	50
2.5. Y ĐỨC ĐỘNG VẬT	51
Chương III – KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN	52
3.1. PHÂN LẬP PARVOVIRUS GÂY BỆNH KHÔ THAI TỪ CÁC MẪU BỆNH PHẨM ĐIỂN HÌNH Ở CÁC ĐỊA PHƯƠNG KHÁC KHAU	52
3.1.1. Kết quả xác định mẫu dương tính với Parvovirus	52
3.1.2. Kết quả phân lập parvovirus trên tế bào PK-15	57
3.1.2.1. Kết quả xác định mẫu đủ điều kiện phân lập	57
3.1.2.2. Kết quả quan sát bệnh tích tế bào	58
3.1.2.3. Kết quả khảo sát sự gia tăng số lượng virus trong quá trình nuôi cấy.....	60
3.2. XÁC ĐỊNH TYPE PARVOVIRUS	63
3.3. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH MỐI QUAN HỆ DI TRUYỀN PARVOVIRUS.....	66
3.3.1. Phân tích trình tự đoạn gen NS1.....	66
3.3.2. Phân tích gen VP2.....	70
3.4. XÁC ĐỊNH MỘT SỐ ĐẶC TÍNH CỦA CÁC CHỦNG PARVOVIRUS	72

3.4.1. Xác định biểu đồ sinh trưởng của PPV trên tế bào PK-15	72
3.4.2. Xác định hiệu giá TCID ₅₀	74
3.4.3. Xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp	76
3.5. ĐÁNH GIÁ SỰ ỔN ĐỊNH, ĐỘC LỰC VÀ TÍNH SINH MIỄN DỊCH CỦA PARVOVIRUS	79
3.5.1. Đánh giá sự ổn định của Parvovirus	79
3.5.1.1. Đánh giá sự ổn định về đặc tính sinh học	80
3.5.1.2. Đánh giá sự ổn định về đặc tính di truyền.....	85
3.5.2. Đánh giá độc lực của chủng parvovirus.....	91
3.5.3. Đánh giá khả năng sinh miễn dịch của chủng parvovirus	95
3.5.3.1. Đánh giá khả năng sinh miễn dịch của 02 chủng VC5 và TX7 trên động vật thay thế	95
3.5.3.2. Đánh giá khả năng sinh miễn dịch của 02 chủng VC5 và TX7 trên lợn	97
Chương IV – KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	108
4.1. Kết luận	108
4.2. Kiến nghị	109
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	110
TÀI LIỆU THAM KHẢO	111
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. Hậu quả của việc nhiễm PPV ở các giai đoạn mang thai khác nhau	7
Bảng 1.2. Bảng so sánh thiệt hại do PPV mãn – cấp tính với lợn khỏe mạnh	9
Bảng 1.3. Phân loại các chủng PPV lưu hành trên thế giới.....	23
Bảng 1.4. Mức độ PPV lưu hành trên thế giới.....	25
Bảng 1.5. Một số loại vắc xin Parvovirus nhập khẩu lưu hành tại Việt Nam	32
Bảng 2.1 Thống kê tổng đàn lợn theo địa phương thu mẫu	35
Bảng 2.2. Trình tự các cặp môi định type Parvovirus	40
Bảng 2.3. Thiết kế thí nghiệm xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp với PPV.....	44
Bảng 2.4. Thiết kế thí nghiệm đánh giá khả năng sinh miễn dịch trên chuột lang.....	47
Bảng 2.5. Thiết kế thí nghiệm xác định tính sinh miễn dịch trên lợn nái bằng phương pháp huyết thanh học	48
Bảng 2.6. Thiết kế thí nghiệm công cường độc trên lợn nái	49
Bảng 3.1. Kết quả thu mẫu.....	52
Bảng 3.2. Tỷ lệ nhiễm PPV theo địa phương	53
Bảng 3.3. Tỷ lệ nhiễm PPV theo loại mẫu bệnh phẩm	55
Bảng 3.4. Tỷ lệ nhiễm PPV theo đặc điểm lợn mẹ	56
Bảng 3.5. Kết quả quan sát bệnh tích tế bào.....	58
Bảng 3.6. Kết quả xác định số lượng virus sau 3 đời cấy truyền.....	61
Bảng 3.7. Tỷ lệ tương đồng đoạn gen NS1 của chủng TX7, VC5 với một số chủng tham chiếu trên Genbank	68
Bảng 3.8. Kết quả xác định TCID ₅₀ của các chủng PPV	74
Bảng 3.9. Kết quả xác định TCID ₅₀ của hai chủng TX7 và VC5 qua các đời nuôi cấy.....	84
Bảng 3.10. Hiệu giá HI trên lợn nái mang thai sau khi gây nhiễm virus	91
Bảng 3.11. Khả năng sống và sự có mặt của PPV trong bào thai sau gây nhiễm virus	93
Bảng 3.12. Hiệu giá HI trên chuột lang sau tiêm vắc xin.....	96
Bảng 3.13. Kết quả đánh giá kháng thể kháng PPV trên lợn bằng HI.....	98
Bảng 3.14. Kết quả bảo hộ thai lợn sau công cường độc	100
Bảng 3.15. Kết quả ELISA đánh giá kháng thể kháng PPV trên lợn	103

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Hội chứng “thai gổ”	5
Hình 1.2. Sơ đồ phân loại Parvovirus.....	11
Hình 1.3. Cấu trúc của Parvovirus.	12
Hình 1.4. Cấu trúc hệ gen Parvovirus điển hình	12
Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu tổng quát.....	33
Hình 2.2. Sơ đồ phân lập PPV trên tế bào PK-15	39
Hình 2.3. Quy trình xác định TCID ₅₀	42
Hình 3.1. Kết quả 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	59
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.....	59
Hình 3.4. Kết quả định type chủng virus EK18 bằng phản ứng PCR.....	63
Hình 3.5. Vị trí đoạn gen NS1 (330bp) trong bộ gen của Parvovirus.....	67
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)	69
Hình 3.7. Cây phân loại dựa trên trình tự đoạn gen NS1	69
Hình 3.8. Kết quả PCR nhân lên gen VP2.....	70
Hình 3.9. Cây phân loại dựa trên trình tự gen VP2.....	71
Hình 3.10. Biểu đồ sinh trưởng của một số chủng PPV phân lập được.....	73
Hình 3.11. Biểu đồ khảo sát điều kiện nuôi cấy thích hợp.....	78
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.....	81
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.....	82
Hình 3.14. Biểu đồ sinh trưởng PPV sau 15 đời nuôi cấy chủng TX7	83
Hình 3.15. Biểu đồ sinh trưởng PPV sau 15 đời nuôi cấy chủng VC5.....	83
Hình 3.16. So sánh trình tự gen NS1 của chủng TX7 qua các đời nuôi cấy	85
Hình 3.17. So sánh trình tự gen NS1 của chủng VC5 qua các đời nuôi cấy	86
Hình 3.18. Vị trí gen VP2 trong bộ gen của Parvovirus.....	87

Hình 3.19. So sánh trình tự gen VP2 của chủng TX7 qua các đời nuôi cấy	88
Hình 3.20. So sánh trình tự gen VP2 của chủng VC5 qua các đời nuôi cấy	90
Hình 3.21. Bệnh tích trên bào thai lợn sau gây nhiễm virus	94
Hình 3.22. Thai lợn sau công cường độc.....	101

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 này là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam phân lập thành công Parvovirus trên dòng tế bào liên tục PK-15.
- 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. This study represents the first successful isolation of porcine parvovirus in Vietnam using the continuous PK-15 cell line.
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. Bệnh Parvovirus 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 NN và PT Nông thôn đã định hướng nghiên cứu sản xuất vắc xin

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 chủng 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 huyết thanh, phôi thai lợn thu thập từ các đàn lợn sinh sản tại 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

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 đầu tiên tại Việt Nam phân lập thành công các chủng Parvovirus 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

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 Parvovirus 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. GIỚI THIỆU VỀ BỆNH KHÔ THAI LỢN

1.1.1. Lịch sử hình thành bệnh

Porcine Parvovirus đã được xác định là nguyên nhân gây ra suy giảm sinh sản ở lợn được biết đến rộng rãi với tên gọi là hội chứng SMEDI (Stillbirth, Mummification, Embryonic Death and Infertility: chết non, thai gổ, chết phôi và vô sinh) vào cuối những năm 1960. Vì vậy, bệnh lý này thường được gọi một cách phổ biến là "Bệnh thai gổ" (Hình 1.1).



Hình 1.1. Hội chứng “thai gổ”

(Mengeling, 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)

PPV được phát hiện lần đầu tiên trong quá trình nuôi cấy virus dịch tả lợn trên tế bào tinh hoàn lợn. PPV là một trong những tác nhân gây tạp nhiễm dai dẳng trong môi trường nuôi cấy tế bào để cấy chuyển virus dịch tả lợn. Sau khi được phát hiện, PPV được phân lập và mô tả chi tiết bởi Cartwright và Huck (1967). Trong những năm tiếp theo, PPV được xác định là nguyên nhân chính gây ra động dục tái phát, sảy thai, thai chết lưu.

Chủng PPV được phát hiện đầu tiên được đặt tên là PPV1 để phân biệt với các chủng PPV mới được phát hiện sau này. Trong nhiều nghiên cứu, PPV1 vẫn là chủng có tỷ lệ phân bố phổ biến nhất trên toàn cầu. PPV chỉ gây nên các biểu hiện trên lợn mà không tác động lên các loài động vật khác. Loại virus này chỉ tác động đến bào thai lợn, và mức độ ảnh hưởng khác nhau tùy thuộc vào thời điểm bào thai bị nhiễm virus. Ở các giai đoạn bào thai khác nhau, biểu hiện bệnh sẽ khác nhau. Hiện nay PPV được xác định gồm 7 type từ PPV1 đến PPV7 (Streck, 2013; Milek, 2020).

1.1.2. Cơ chế gây bệnh

Parvovirus xuất hiện khá phổ biến trên các đàn lợn trên toàn cầu, chúng thường xuyên gây ra các đợt dịch cục bộ. Virus này có khả năng lây lan nhanh chóng giữa các cá thể trong đàn. Chúng 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. Sự lan rộng của virus trong trang trại phụ thuộc nhiều vào hình thức chăn nuôi được áp dụng. Tại các trang trại nuôi theo hình thức tập trung, tình trạng rối loạn sinh sản thường bắt đầu xuất hiện sau khoảng hai tháng và kéo dài trong hai đến ba tháng liên tiếp, với tỷ lệ gần như 100% lợn trong trang trại đều bị nhiễm virus. Ở những khu vực chăn nuôi nhỏ lẻ, không tập trung, sự lây nhiễm virus diễn ra ít hơn, do các cá thể được hạn chế ở mức tối thiểu khả năng tiếp xúc với mầm bệnh (Streck, 2020).

Virus sẽ xâm nhiễm vào bào thai qua nhau thai. Ban đầu, virus sẽ chỉ gây bệnh cho một hoặc một vài bào thai. Nhưng sau đó, virus lây lan nhanh chóng sang các bào thai khác trong tử cung. Sự lây lan của virus trong tử cung có xu hướng ít lan rộng khi các phôi nhiễm virus chết sớm và bị tái hấp thu. Nguyên nhân là khi phôi chết, hoạt động phân chia tế bào dừng lại, không thuận lợi cho sự nhân lên của virus. Khi phôi bị tái hấp thu, nguồn bệnh trong tử cung cũng bị loại bỏ. Trong những trường hợp này, lứa đẻ có thể có ít con. Phôi, thai chết, có thể do virus xâm nhập và gây tổn thương lan rộng đến các mô và cơ quan, bao gồm cả nhau thai. Trong trường hợp bào thai chưa phát triển khả năng miễn dịch, chỉ cần virus tác động đến một số cơ quan quan trọng

cũng đủ để gây chết phôi 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. Cơ chế lây truyền virus qua nhau thai đã được làm sáng tỏ thông qua các phân tích miễn dịch huỳnh quang. Phân tích cho thấy rõ các tế bào nhiễm virus trong cơ thể lợn mẹ và trong mô bào thai ở các giai đoạn phát triển khác nhau. Các thí nghiệm gây nhiễm qua đường mũi, miệng cho lợn mẹ vào các thời điểm khác nhau trong quá trình mang thai và sau đó kiểm tra mô liên kết giữa mẹ và bào thai, đã phát hiện virus trong tế bào nội mô và trung mô của màng niệu đệp, cùng với sự tăng lên của thể bao hàm trong các mô này ở các giai đoạn mang thai khác nhau. Kết quả này chứng minh rằng virus từ lợn mẹ có thể truyền qua nhau thai để lây nhiễm trực tiếp cho bào thai. Điều này khẳng định rằng việc nhiễm virus ở lợn mẹ là điều kiện tiên quyết cho sự nhiễm virus của bào thai (Cotmore, 2014).

PPV xâm nhiễm vào bào thai lợn ở các giai đoạn khác nhau sẽ gây ra các biểu hiện bệnh khác nhau. Khi bào thai lợn nhiễm Parvovirus trong giai đoạn từ 10 đến 30 ngày, bào thai có kích thước nhỏ, hệ miễn dịch yếu nên thường chết hoặc bị tái hấp thu. Nếu nhiễm virus xảy ra trong giai đoạn từ 30 đến 70 ngày, bào thai có thể có các biểu hiện khô, mất nước dẫn đến hiện tượng thai hóa gỗ. Nếu virus nhiễm từ sau ngày thứ 70, bào thai bắt đầu có khả năng sản sinh miễn dịch đề kháng với PPV (Bảng 1.1).

Bảng 1.1. Hậu quả của việc nhiễm PPV ở các giai đoạn mang thai khác nhau

Thời gian nhiễm (ngày)	Mô tả hợp tử	Hậu quả của nhiễm PPV
10-30	Phôi	Chết và hấp thu lại
30-70	Thai	Chết và thai khô
70- hết thai kỳ	Thai	Sinh đáp ứng miễn dịch, sống sót

(Cartwright, 1967)

Đa số lợn nái hậu bị trước phối giống thường có nguy cơ cao nhiễm PPV, ngoại trừ những cá thể đã có miễn dịch tự nhiên. PPV chỉ gồm một serotyp kháng nguyên,

nên sau khi nhiễm, lợn sẽ phát triển miễn dịch mạnh mẽ và bền vững. Miễn dịch tự nhiên từ việc nhiễm PPV có thể kéo dài suốt đời đối với lợn nái. Tuy nhiên, những lợn nái hậu bị chưa có miễn dịch đối với PPV có nguy cơ nhiễm bệnh cao và dễ mắc các rối loạn sinh sản (Liu, 2022).

1.1.3. 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. Ở lợn, trong khoảng 5-10 ngày sau khi virus bắt đầu xâm nhập, không phụ thuộc vào lứa tuổi cũng như tính biệt, có chứng giảm bạch cầu trong thời gian ngắn, thường biểu hiện nhẹ.

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.

Bệnh tích đại thể của thai bị nhiễm virus bao gồm thai còi cọc ở các mức độ khác nhau; đôi khi có hiện tượng 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 thấm 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 (mummification). Một số bệnh tích còn quan sát được ở nhau thai, hoặc hiện tượng hoại tử ở nhiều cơ quan khác và hình thành thể bao hàm trong nhân (Liu, 2022).

1.1.4. 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 có 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 tuy chưa có số liệu thống kê chính xác về kinh tế do nhiễm PPV. Tuy nhiên, việc nhiễm Parvovirus đã được nghiên cứu gây suy giảm nghiêm trọng khả năng sinh sản của lợn mẹ. Tỷ lệ lợn đẻ thấp (36%), số con ít (chỉ dưới 5 con) và có nhiều con chết ngay, yếu, khô. Ngoài ra, các tác động lên lợn nái như chậm lên giống hay mang thai giả cũng góp phần làm giảm năng suất sinh sản của lợn nái, dẫn đến giảm năng suất sinh sản của toàn trại, từ đó giảm lợi nhuận chăn nuôi.

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 rạ: <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)

Qua số liệu về những thiệt hại mà PPV gây ra được trình bày trong bảng 1.2 cho thấy PPV làm giảm tỷ suất sinh, giảm sức sống con non và ảnh hưởng đến khả năng lên

giống của lợn nái. Từ đó bệnh khô thai gây hậu quả nghiêm trọng đối với việc tái đàn và cung cấp lợn giống. Theo số liệu thống kê năm 2021, tỷ lệ lợn con chết lưu biến động từ 5-10%. Với 3 – 4 triệu lợn nái được nuôi hàng năm tại Việt Nam, số lợn con chết lưu có thể lên tới hàng triệu con (nhachannuoi.vn). Một trong những nguyên nhân quan trọng gây chết lưu ở lợn con là do Parvovirus gây ra (Mengeling, 2000).

Tình hình chăn nuôi lợn của nước ta hiện nay vẫn luôn phải đối mặt với nhiều thách thức từ các dịch bệnh gây thiệt hại đáng kể như dịch tả lợn châu Phi, lở mồm long móng, tai xanh. Quá trình tái đàn và thiếu hụt con giống vẫn luôn là vấn đề cần giải quyết để khôi phục tình hình sản xuất sau dịch bệnh. Mặt khác, bệnh do Parvovirus gây ra không có thuốc điều trị, virus tồn tại dai dẳng trong trang trại trong nhiều tháng gây nên những thiệt hại nghiêm trọng về kinh tế cho người chăn nuôi.

Vì những lý do trên, việc phân lập và tuyển chọn các chủng Parvovirus để sản xuất vắc xin là hết sức cần thiết để kiểm soát bệnh tật trong trang trại, giúp ổn định nguồn cung lợn giống, tăng khả năng tái đàn, khôi phục và ổn định tình hình sản xuất sau dịch bệnh.

1.2. TỔNG QUAN VỀ PARVOVIRUS

1.2.1. Phân loại

PPV thuộc

Họ: Parvoviridae

Phân họ: Parvovirinae

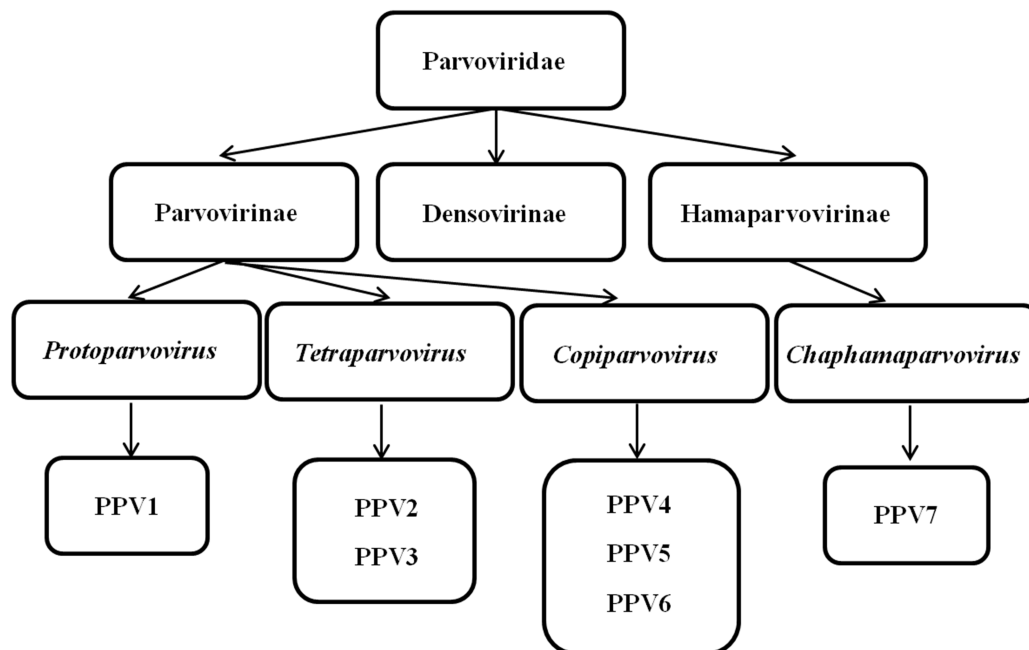
Chi: *Protoparvovirus*

Loài: *Ungulate protoparvovirus*

Phân loài: Porcine parvovirus

Họ Parvoviridae là họ duy nhất trong bộ Piccovirales và lớp Quintoviricetes, bao gồm ba phân họ: Densovirinae, Hamaparvovirinae và Parvovirinae; có tổng cộng 26 chi và 126 loài; được Ủy ban Quốc tế về phân loại virus (International Committee on Taxonomy of Viruses-ICTV) công nhận vào năm 2020. Phân họ Parvovirinae lây

nhằm trên động vật có xương sống bao gồm 10 chi, trong đó, bốn chi chứa các virus lây nhiễm ở lợn (Walker và cộng sự, 2020), bao gồm: *Bocaparvovirus*, *Copiparvovirus*, *Protoparvovirus*, *Tetraparvovirus*.

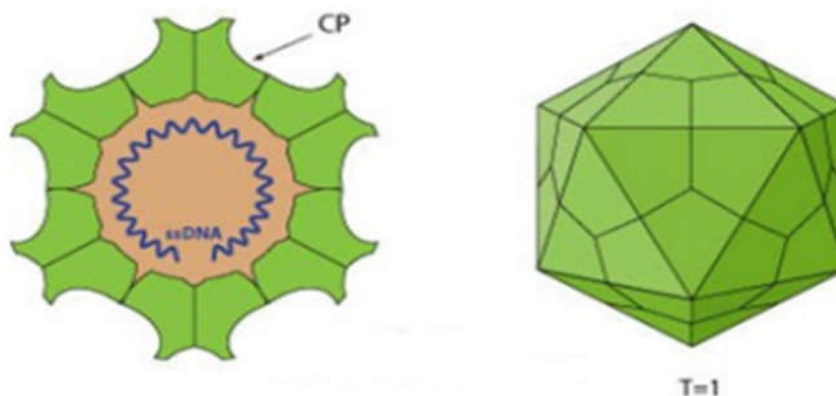


Hình 1.2. Sơ đồ phân loại Parvovirus

Hiện tại Parvovirus được phân loại gồm 7 type từ PPV1 đến PPV7. 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* (Strecker và cộng sự, 2015).

1.2.2. Cấu trúc virus

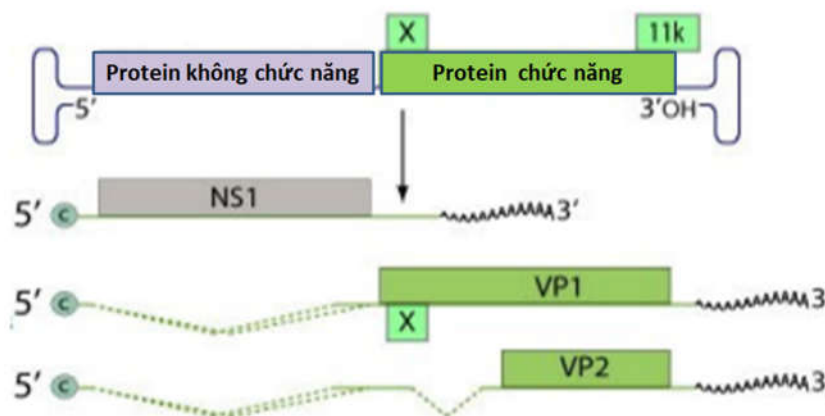
Bộ gen của Parvovirus là một phân tử DNA sợi đơn, mạch thẳng, có kích thước khoảng 5kb (Mészáros và cộng sự, 2017). PPV là một virus không có vỏ bọc, có kích thước nhỏ, hình cầu, đường kính dao động từ 18 đến 26 nm, mang cấu trúc đối xứng hình khối 20 mặt (Hình 1.3) (Parrish, 2010).



Hình 1.3. Cấu trúc của Parvovirus

(<https://viralzone.expasy.org>)

Tại hai đầu tận cùng trình tự DNA của Parvovirus có một cấu trúc kẹp tóc gồm 120-200 base có vai trò trong việc sao chép DNA (Tattersal, 2006). Bộ gen của PPV gồm hai khung đọc mở (Open reading frame – ORF) mã hóa cho protein phi cấu trúc (non-structural protein – NSP) và protein capsid (VP) (Hình 1.4). ORF1 mã hóa cho các protein không chức năng (NS1, NS2 và NS3) chịu trách nhiệm tổng hợp các enzym helicase và nickase, cần thiết cho quá trình sao chép và có tính bảo tồn cao. Ngược lại, ORF2 mã hóa cho các protein chức năng (VP1, VP2 và VP3), là các thành phần cấu trúc của capsid. VP1 và VP2 được dịch mã từ các ARN khác nhau, trong khi VP3 được hình thành thông qua quá trình phân cắt protein từ VP2 (Streck và Truyen, 2020).



Hình 1.4. Cấu trúc hệ gen Parvovirus điển hình

(<https://viralzone.expasy.org>)

1.2.3. Cơ chế xâm nhiễm của virus vào tế bào vật chủ

Quá trình sao chép sơ cấp của PPV diễn ra trong tế bào các mô bạch huyết, sau đó, chúng được phân phối một cách hệ thống qua tuần hoàn máu. Bằng phương pháp PCR, các nghiên cứu đã phát hiện PPV có thể lan truyền trong các tế bào tim, phổi, thận, lách, nội mạc tử cung, ruột non, amidan (Streck, 2013; Miao và cộng sự, 2009, McKillen và cộng sự, 2007).

PPV sử dụng nhiều glycoprotein, glycan và glycolipid để gắn vào tế bào (Ros và cộng sự, 2017; Harbinson và cộng sự, 2008). Đầu tiên, virion liên kết với các gốc sialic acid (O- and N- linked sialic acid) của glycoprotein trên bề mặt tế bào.

Sau đó, PPV xâm nhập vào tế bào bằng cả ba con đường, bao gồm:

- (i) Nhập bào (Endocytosis) qua trung gian clathrin
- (ii) Đại ẩm bào (Macropinocytosis)
- (iii) Con đường xâm nhập thứ ba (giả định)

Con đường xâm nhập thứ ba được giả định sau khi tiến hành thí nghiệm sử dụng các chất ức chế hai quá trình nhập bào và đại ẩm bào nhưng kết quả thu được cho thấy rằng sự xâm nhập của PPV vào tế bào chỉ giảm 50-60%. Ngoài ra, vai trò của con đường caveolae đã bị phủ nhận trong sự xâm nhập của PPV (Boisvert và cộng sự, 2010). Kết quả này gợi ý rằng việc nghiên cứu các con đường xâm nhiễm PPV vào tế bào cần được tiến hành trong tương lai.

Bước tiếp theo trong sự xâm nhập PPV vào tế bào, cả vi ống và mạng lưới actin đều đóng vai trò quan trọng trong việc vận chuyển các virion về phía nhân và phân phối các virus mới tổng hợp trong quá trình lây nhiễm (Boisvert và cộng sự, 2010). Sau khi xâm nhập vào tế bào, virion tích tụ ở một bên của nhân từ 4-8 giờ sau lây nhiễm. Các virion mới tổng hợp được tìm thấy trong nhân từ 16-20 giờ sau lây nhiễm. Khi đã có mặt trong nhân, đầu tiên, đoạn ssDNA cùng với protein của PPV sẽ thâm nhập vào hệ gen của vật chủ và được bộ máy di truyền của vật chủ chỉnh sửa thành DNA mạch kép. Sau mỗi lần tế bào vật chủ nhân đôi, DNA của virus cũng được nhân đôi.

PPV là nguyên nhân chính gây Hội chứng SMEDI ở lợn nái mang thai (Díaz và cộng sự, 2021). Nhiễm PPV gây ra hiệu ứng bệnh tích tế bào (Cytopathogenic effect CPE) ở một số dòng tế bào lợn, tuy nhiên, cơ chế phân tử cơ bản của CPE do PPV gây ra vẫn chưa được làm sáng tỏ hoàn toàn. Cho đến nay, các nghiên cứu tìm hiểu cơ chế gây bệnh của PPV ở lợn trên thế giới chỉ được thực hiện *in vitro* trên một số dòng tế bào khác nhau như tế bào thận PK-15 (Xu và cộng sự, 2022; Zhang và cộng sự, 2015), 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).

Mặc dù khó có thể so sánh kết quả của các thí nghiệm trên các dòng tế bào lợn khác nhau trong nghiên cứu cơ chế gây bệnh của PPV, nhưng nhìn chung, sự sao chép PPV làm giảm điện thế màng ty thể và dẫn đến việc giải phóng và tích lũy các protein độc hại đối với tế bào như cytochrome C và p53, kích hoạt quá trình apoptosis qua trung gian ty thể, gây chết tế bào và tổn thương mô giống như các Protoparvovirus khác. Kết quả thực tế của nhiễm PPV phần lớn phụ thuộc vào chủng virus và loại tế bào. Ngay cả những đột biến đơn lẻ trong capsid của PPV cũng có thể dẫn đến sự thay đổi trong tương tác virus-tế bào vật chủ và gây ra những tính chất bệnh khác nhau (Zhang và cộng sự, 2015).

1.3. KỸ THUẬT PHÂN LẬP VÀ PHÂN TÍCH GEN PARVOVIRUS

1.3.1 Đối tượng thu mẫu sử dụng cho phân lập PPV

PPV chủ yếu gây rối loạn sinh sản mà không làm ảnh hưởng đến sức khỏe của lợn mẹ. Virus này chủ yếu tác động lên bào thai lợn. Vì vậy, các đối tượng lấy mẫu thường là lợn có tiền sử sảy thai, giảm lứa đẻ hoặc gặp các vấn đề về sinh sản.

Các nghiên cứu cho thấy, khoảng 7 đến 8 ngày sau khi lợn nái mang thai bị nhiễm virus, virus có thể được phân lập từ máu cũng như các mô có khả năng sinh trưởng mạnh mẽ như phổi, gan, lách, thận, nhau thai và bào thai (Mengeling, 1975).

Một số tác giả như Eliaš, 2004 sử dụng mẫu phổi, gan, thận, lách của bào thai để phân lập Parvovirus. Johnson, 1973 sử dụng mẫu máu, thận, lách của bào thai để phân

lập Parvovirus. Kim, 2022 và Opriessnig, 2014 sử dụng mẫu huyết thanh và phổi để nghiên cứu PPV.

Vì 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. Phương pháp thích hợp nhất là thu thập mẫu huyết thanh của lợn mẹ và các cơ quan của bào thai nghi nhiễm PPV để sử dụng cho việc phân lập PPV.

1.3.2. Kỹ thuật nuôi cấy virus

Phương pháp nuôi cấy trên tế bào nguyên đại

Nuôi cấy tế bào nguyên đại là phương pháp lấy trực tiếp tế bào từ động vật mà không trải qua quá trình truyền thế hệ. Khi lấy mẫu từ động vật non, thời gian sống của tế bào nuôi cấy có thể kéo dài hơn. Tế bào nuôi cấy nguyên đại thường là sự kết hợp của nhiều loại tế bào khác nhau, ví dụ như tế bào cơ và tế bào thượng bì. Mặc dù số lần phân chia của các tế bào này không nhiều, nhưng chúng vẫn có khả năng hỗ trợ sự sinh trưởng của nhiều chủng virus.

Mô được xử lý bằng trypsin để tách tế bào, sau đó tế bào được nuôi trong các bình chứa môi trường nuôi cấy đặc biệt. Các tế bào phát triển và tạo thành một lớp đồng nhất bám vào thành trong của bình nuôi cấy, quá trình này được gọi là nuôi cấy tế bào một lớp (Phạm Văn Ty, 2013).

Phương pháp nuôi cấy trên dòng tế bào liên tục

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. Một trong những dòng tế bào liên tục nổi bật nhất là dòng tế bào HeLa. Dòng tế bào này, được phát hiện vào năm 1951, đã được nuôi cấy liên tục và sử dụng rộng rãi trong các nghiên cứu trên toàn thế giới. Dòng tế bào HeLa có nguồn gốc từ một phụ nữ mắc ung thư tử cung, và tên gọi HeLa được lấy từ các chữ cái đầu của tên người này. Thực tế, nhiều dòng tế bào liên tục ban đầu đều xuất phát từ các tế bào ung thư ác tính, do chúng có khả năng sinh trưởng nhanh chóng. Các dòng tế bào vĩnh sinh (immortal cell lines) 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. Chẳng hạn, dòng tế bào HeLa chứa hai gen virus cần thiết cho khả năng vĩnh sinh của chúng. Dòng tế bào này là dị bội thể (heteroploid), chứa số lượng nhiễm sắc thể không đồng nhất, dẫn đến tính đa dạng di truyền cao (Phạm Văn Ty, 2013).

Các dòng tế bào đơn hiện nay thường dùng như tế bào Hela, Hep-2, Vero, C6 / 36,...

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 được sử dụng phổ biến trên thế giới để phân lập virus là phương pháp nuôi trên tế bào liên tục.

Nuôi cấy, phân lập Parvovirus

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 (khỉ 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. Số lượng bản sao bộ gen cần thiết để khởi động quá trình lây nhiễm trong các tế bào này có thể dao động từ 500 đến 10.000 bản sao, tùy thuộc vào loại tế bào và chủng virus sử dụng (Mészáros và cộng sự, 2017).

Parvovirus được nhiều tác giả trên thế giới phân lập. Nhiều tác giả sử dụng dòng tế bào PK-15 để nuôi cấy chủng PPV (Lyoo và cộng sự, 2001; Serena và cộng sự, 2019; Soares và cộng sự, 2003; Streck, 2013; Zhang và cộng sự, 2015). Trong một nghiên cứu, tác giả đã sử dụng một số dòng tế bào PK-15, SK 6, IBRS-2, PS để nuôi cấy 4 chủng PPV phân lập tại Slovakia (Eliaš và cộng sự, 2004). Một nghiên cứu mới đây tại Trung Quốc 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).

Với những ưu điểm của dòng tế bào liên tục là sinh trưởng nhanh chóng, ổn định qua nhiều thế hệ. Trong nghiên cứu này, PPV được tiến hành nuôi cấy trên dòng tế bào liên tục phát triển từ tế bào thận lợn (PK-15).

❖ **Dòng tế bào sử dụng để phân lập PPV**

Dòng tế bào PK-15 là dòng tế bào biểu mô được phân lập từ thận lợn trưởng thành. Môi trường nuôi cấy được sử dụng là Eagle's Minimum Essential Medium (E-MEM), với sự bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò (FBS) (Theo hướng dẫn của Hãng ATCC-Mỹ).

Nhiều nghiên cứu đã thành công trong việc phân lập Parvovirus trên dòng tế bào PK-15, sử dụng môi trường E-MEM bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò (Lyoo và cộng sự, 2001; Serena và cộng sự, 2019; Soares và cộng sự, 2003; Streck, 2013, Eliaš và cộng sự, 2004; Gao và cộng sự, 2022).

❖ **Một số yếu tố ảnh hưởng đến nuôi cấy Parvovirus**

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

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 thích hợp 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).

pH, % CO₂:

pH môi trường 7,3-7,4 theo hướng dẫn của nhà sản xuất, trong môi trường 5% CO₂. Các nghiên cứu về Parvovirus của các tác giả không có tài liệu nào sử dụng điều kiện khác.

1.3.3. Phân tích gen PPV

PPV là một virus ssDNA nhỏ, với bộ gen có khoảng 5000 nucleotide mã hóa cho bốn protein được phiên mã từ hai promoter. Hai protein không cấu trúc, NS1 và NS2 được mã hóa từ đầu 5' ORF đóng vai trò quan trọng trong việc sao chép DNA. Ngoài ra, còn có hai protein cấu trúc được mã hóa từ đầu 3' ORF là VP1 và VP2. Protein VP2 nhỏ được tạo ra bằng cách ghép nối từ cùng một khuôn ARN với protein lớn hơn VP1. Do đó, toàn bộ trình tự chuỗi VP2 có mặt trong chuỗi trình tự của VP1. Hai đoạn lặp lại 127 bp liên quan đến độc lực PPV (Zeeuw và cộng sự, 2007) bắt đầu ngay trước VP2 bộ ba phiên mã kết thúc của VP2. Gần đây, một protein thứ ba VP3 được phát hiện là một sản phẩm biến đổi sau khi phân cắt protein của VP2 (Simpson và cộng sự, 2002). Ba loại protein VP1, VP2 và VP3 tập hợp lại thành dạng icosahedral capsid (Parrish, 2010).

*** Phân tích gen NS1**

NS1 là protein không cấu trúc chính được bảo tồn cao và rất cần thiết cho quá trình sao chép DNA PPV. NS1 là một protein đa chức năng được đặc trưng bởi các hoạt động endonuclease, DNA helicase và ATPase và khả năng liên kết cộng hóa trị với đầu 5' của DNA virus bộ gen (Ros và cộng sự, 2017). Gen NS1 của porcine parvovirus (PPV) được xem là chỉ thị di truyền quan trọng trong nghiên cứu phân loại và phân tích tiến hóa do tính bảo tồn cao và khả năng phản ánh chính xác mối quan hệ phát sinh chủng loài. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh việc sử dụng NS1 giúp phân nhóm chính xác hơn so với các gen cấu trúc như VP1/VP2. Chẳng hạn, Shangjin và cộng sự (2009) đã cho thấy phân tích NS1 cung cấp sự phân tách rõ rệt các dòng PPV và có độ tin cậy cao hơn khi so sánh với VP1/VP2. Ren và cộng sự (2013) cũng khẳng định NS1 phản ánh tiến hóa lâu dài của virus, hỗ trợ nhận diện các nhánh chính trong

quá trình hình thành loài. Ngoài ra, Leal và cộng sự (2012) phát hiện hiện tượng tái tổ hợp giữa các clade, trong đó đoạn NS1 có thể bắt nguồn từ một clade khác với VP2, nhấn mạnh vai trò quan trọng của NS1 trong xác định chính xác quan hệ phát sinh. 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. Một nghiên cứu khác tại Trung Quốc năm 2024 cũng sử dụng cây phân loại 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). Để phân tích tiến hóa di truyền của chủng PPV7 phân lập tại Phúc Kiến, Trung Quốc, trình tự gen NS1 cũng được sử dụng để phân tích mối quan hệ tiến hóa (Lyu và cộng sự, 2023).

*** Phân tích gen VP2**

Protein VP2 là thành phần chủ yếu của vỏ capsid virus, chịu trách nhiệm cho tính kháng nguyên và quá trình lây nhiễm của virus. Gen VP2 mã hóa cho protein này, là mục tiêu quan trọng trong các nghiên cứu di truyền vì nó chứa các vùng gen biến đổi liên quan đến khả năng lây lan, độc lực, và tính sinh miễn dịch của virus (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 (2011) đã xây dựng cây phát sinh dựa trên VP2, qua đó xác định sự tồn tại của nhiều genotype khác nhau của PPV1. Tương tự, Oh và cộng sự (2009) báo cáo sự đa dạng di truyền đáng kể trong vùng VP2 của các chủng lưu hành tại Hàn Quốc, phản ánh sự tiến hóa liên tục của virus dưới áp lực miễn dịch. Yang và cộng sự (2012) khi phân tích các chủng PPV ở Trung Quốc cũng ghi nhận sự phân tách rõ ràng giữa các nhóm virus dựa trên VP2, qua đó nhấn mạnh giá trị của marker này trong phân loại và giám sát dịch tễ. Những nghiên cứu gần đây, như của Xiao và cộng sự (2013), 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.

Những nghiên cứu gần đây trên thế giới đã chứng minh rằng phân tích gen VP2 có thể xác định được sự khác biệt về mặt di truyền giữa các chủng Parvovirus. So sánh bộ gen giữa chủng nguyên thủy NADL-2 (GenBank L23427) và chủng độc lực Kresse (U44978) cho thấy rằng tất cả các vị trí nucleotit thay thế được tìm thấy trong protein không cấu trúc đều không có ý nghĩa, trong khi đó 6/8 sự thay thế nucleotit nằm trong các gen cấu trúc (VP1/VP2) đã dẫn 21 tới sự thay đổi của axit amin được phiên mã. Cụ thể, trong số các axit amin của gen VP2, có 5 sự thay đổi là phù hợp khi so sánh với các chủng đã được phân lập trước đây (I215T, D378G, H383Q, S436P và R565K) và ba trong số những thay đổi này (D378G, H383Q và S436P) được cho là chịu trách nhiệm cho những ái lực mô khác nhau (Bergeron và cộng sự, 1996). Những khác biệt về axit amin này có liên quan đến kiểu hình gây bệnh của chủng Kresse, và tất cả đều nằm trên bề mặt của capsid (Simpson và cộng sự, 2002).

Một nghiên cứu tại Trung Quốc dựa trên sự phân tích mối quan hệ phát sinh gen của gen VP2 đã kết luận chủng PPV-NE/09 là một chủng PPV đột biến mới phổ biến ở Trung Quốc. Phân tích gen VP2 cho thấy 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). Một nghiên cứu năm 2024 tại Trung Quốc 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).

Gần đây, các biến thể di truyền và sự xuất hiện của các loại kháng nguyên PPV mới đã được mô tả (Zimmermann và cộng sự, 2006), mặc dù tầm quan trọng trong lĩnh vực này vẫn chưa rõ ràng. Khi virus PPV tái tạo bằng cách sử dụng sự sao chép DNA của vật chủ, nó thường được giả định rằng virus có tỷ lệ thấp thay thế các nucleotit và đã được tìm thấy trong các loài động vật có vú. Tuy nhiên, trong những năm gần đây, các nghiên cứu đã chứng minh được rằng tỷ lệ thay thế nucleotit của PPV là khoảng

10^{-5} thay thế/ vị trí/ năm đối với gen NS1 và 10^{-4} thay thế/ vị trí/ năm đối với các gen VP1 và VP2, tỷ lệ này tương tự với tỷ lệ đã biết ở các chủng virus PPV (Streck và cộng sự, 2015).

Một số nghiên cứu gần đây đã phát hiện sự xuất hiện của các chủng PPV mới, có sự khác biệt về mặt di truyền cũng như đặc tính kháng nguyên so với những chủng đã được phân lập trước đó. Do đó, tác dụng bảo vệ của vắc xin bất hoạt thương mại không thể hoàn toàn đảm bảo phòng bệnh hiệu quả. Nghiên cứu của Serena phát hiện và xác định đặc điểm của các chủng PPV có trong 131 mẫu bệnh phẩm phôi thai chết lưu từ những lần đẻ thường ở lợn nái từ một trại lợn thương mại của Argentina đang sử dụng vắc xin thương mại. Kết quả PCR cho thấy 17/131 trường hợp dương tính với PPV. Mười trong số các loại virus này đã được phân lập và giải trình tự. Tất cả các virus đều liên quan đến trình tự PPV1 (NADL-2), duy trì sự khác biệt về axit amin ở các vị trí 436 (S – P) và 565 (R – K). Kết quả cho thấy PPV có thể đi qua nhau thai ngay cả ở lợn nái đã tiêm phòng (Serena và cộng sự, 2019). Gần đây Chung, 2020 cũng đã phát hiện những đột biến. Tác giả thu được 9 chủng Parvovirus. Các chủng PPV7 được thu thập trong nghiên cứu này có đột biến mất đoạn trong gen VP2 nhưng khác với các chủng PPV7 được thu thập vào năm 2017. Trong số các chủng PPV1, các biến thể axit amin trong các biểu mô tế bào B của protein VP2 đã được quan sát và 6 trong số 12 biểu mô được dự đoán có sự khác biệt đáng kể về chỉ số kháng nguyên so với các chủng PPV1 khác (Chung và cộng sự, 2020).

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 chủng 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.

1.4. TỶ LỆ NHIỄM PPV

1.4.1. Tỷ lệ nhiễm PPV trên thế giới

Porcine Parvovirus đã được xác định là nguyên nhân gây ra suy giảm sinh sản ở

lợn (hội chứng SMEDI) vào cuối những năm 1960. Vì vậy, bệnh lý này thường được gọi một cách phổ biến là "Bệnh thai gổ". Virus này lần đầu tiên được mô tả bởi Cartwright and Huck, 1967. Để phân biệt với các chủng PPV mới được phát hiện sau này, virus này được gọi là PPV1. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng PPV1 phân bố rộng rãi trong đàn lợn trên toàn cầu, và được coi là một bệnh có tính chất địa phương. Bệnh này là nguyên nhân chủ yếu dẫn đến hiện tượng nhiễm trùng phôi và chết thai. Không chỉ gây ra rối loạn sinh sản ở lợn, PPV1 còn có vai trò trong việc làm tăng nguy cơ lợn nhiễm Porcine Circovirus type 2 (PCV2) và mắc chứng còi cọc sau cai sữa (postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) (Mengeling, 1975).

Hiện nay có 7 type PPV được phát hiện trên thế giới (Bảng 1.3). 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).

Bệnh đã gây ra nhiều thiệt hại kinh tế đáng kể cho ngành chăn nuôi lợn trên toàn cầu (Mengeling và cộng sự, 2000). Tỷ lệ nhiễm PPV không có tính chất mùa vụ và không bị ảnh hưởng bởi tình trạng sức khỏe của lợn. (Streck và cộng sự, 2015).

PPV2 đã từng được phát hiện vào năm 2001 trong một nghiên cứu khảo sát điều tra huyết thanh của bệnh viêm gan type E ở Myanmar (Hijikata và cộng sự, 2001). Trong năm 2006 và 2007, một loại virus tương tự có tên là Cnvirus đã được xác định trên lợn bội nhiễm virus gây hội chứng hô hấp và sinh sản có độc tính cao ở Trung Quốc (Wang và cộng sự, 2010). Porcine Parvovirus type 3 (PPV3) (còn được gọi là PARV4 và hokovirus trên lợn) có liên quan chặt chẽ đến Parvovirus type 4 (PARV4) gây bệnh trên người và đã được xác định ở Hồng Kông năm 2008 (Lau, 2008). Ba genotypes còn lại của PPV là: PPV4, PPV5 và PPV6 đã được xác định trong những năm gần đây và thuộc giống CopiParvovirus (Streck và cộng sự, 2015).

Bảng 1.3. Phân loại các chủng PPV lưu hành trên thế giới

Phân loại PPV	Mã genbank/ Tác giả	Thông tin phát hiện
PPV1	Germany (Dunne và cộng sự, 1965)	Được phát hiện khi phân lập virus từ một bào thai lợn mới chết được thu thập tại lò giết mổ ở Đức
PPV2	Myanmar-AB076669 (Hijikata và cộng sự, 2001)	Được tìm ra ở huyết thanh lợn trong quá trình nghiên cứu Hepatitis E ở Myanmar
PPV3	Hong Kong-EU20667-EU200677 (Lau và cộng sự, 2008)	Mức độ tương đồng cao với Parvovirus 4 ở người và hokorirus bò (PARV4)
PPV4	US-GQ387499 (Cheung và cộng sự, 2010)	Phát hiện một ORF3 bổ sung định vị giữa ORF1 và ORF2
PPV5	US-JX896318-JX896322 (Xiao và cộng sự, 2013a)	Có sự tương đồng so với PPV4 là 64,1%-67,3%, không có ORF3 và ORF2 dài hơn nhiều
PPV6	China-KF999681-KF999685 (Ni và cộng sự, 2014)	PPV6 có mức tương đồng cao với trình tự protein không cấu trúc của PPV4 (49,8%) và với protein cấu trúc của PPV5 (29,8%)
PPV7	US-KU563733 (Palinski và cộng sự, 2016)	Khung mở đọc ORF2 ngắn, vị trí 469aa không có sự tương đồng so với các protein đã biết

(Milek và cộng sự, 2020)

PPV4, không giống với các Parvovirus lợn khác có chứa ORF3 bổ sung, được xác định trên lợn bội nhiễm Porcine circovirus type 2 (PCV2) năm 2010 (Cheung và cộng sự, 2010). Trong năm 2013 và 2014, PPV5 và PPV6 đã được ghi nhận tại Trung Quốc

và Bắc Mỹ (Xiao và cộng sự, 2013c; Ni và cộng sự, 2014; Wu và cộng sự, 2014; Schirtzinger và cộng sự, 2015). PPV4, PPV5 và PPV6 có mối quan hệ gần gũi và nằm trong cùng một nhánh trong các phân tích phả hệ (Ni và cộng sự, 2014; Schirtzinger và cộng sự, 2015). PPV7 được phát hiện lần đầu tiên ở Mỹ năm 2016 bởi Palinski (Palinski và cộng sự, 2016), trong khi genotype này được ghi nhận lần đầu tiên tại Trung Quốc bởi Xing vào năm 2017. Các chủng PPV7 ở Trung Quốc có sự tương đồng về trình tự nucleotide lên đến 98,7% - 99,7% so với các chủng PPV7 tại Mỹ (Xing và cộng sự, 2017).

Tại một số nước Châu Âu: Nghiên cứu tại Hungari đã phân tích 392 mẫu bệnh phẩm và ghi nhận tỷ lệ nhiễm PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 lần lượt là 0,5%, 6,4%, 9,7% và 94% (Cságola và cộng sự, 2012). Ở Ba Lan, nghiên cứu của Milek cho thấy sự hiện diện của sáu loại Parvovirus, từ PPV1 đến PPV6, với tỷ lệ nhiễm cụ thể như sau: PPV1 (10,7%); PPV2 (48,7%); PPV3 (26,7%); PPV4 (28,7%); PPV5 (41,3%); PPV6 (38%). Trong các nhóm lợn kiểm tra thì nhóm lợn vỗ béo có tỷ lệ nhiễm các type PPV là cao nhất (dao động từ 8,6% đối với PPV1 đến 49% đối với PPV2) (Milek và cộng sự, 2019). Một nghiên cứu khác tại Ba Lan của Milek đã chứng minh sự đồng nhiễm 2 loại virus PCV2 và Parvovirus, trong số 519 mẫu huyết thanh kiểm tra thì có tới 159 mẫu đồng nhiễm 2 loại virus PCV2 và PPV. Tỷ lệ nhiễm các type của parvovirus trong 159 mẫu là PPV1 7,5%, PPV2 30,2%, PPV3 25,2%, PPV4 8,2%, PPV5 22,6%, PPV6 37,1% và PPV7 18,2% (Milek và cộng sự, 2020).

Châu Mỹ: Serena, 2019 công bố kết quả xác định tỷ lệ nhiễm PPV trong 131 xác ướp hoặc thai chết lưu do sinh thường ở lợn nái từ một trang trại lợn thương mại của Argentina sử dụng vắc xin thương mại. Kết quả PCR cho thấy 17/131 ca dương tính với PPV (12,9%). Tất cả các loại virus đều liên quan đến trình tự PPV1 (NADL-2). (Serena và cộng sự, 2019). Opriessnig, 2014 nghiên cứu 586 mẫu huyết thanh và 164 mẫu phổi được thu thập từ năm 1996 đến 2013 tại Hoa Kỳ và Canada. Phát hiện PPV ở 48,8% (286/586) mẫu huyết thanh và 56,7% (93/164) dương tính với PPV trong mô phổi. PPV1 (14,7%), PPV2 (72%), PPV3 (19,2%), PPV4 (5,9%), PPV5 (7%) (Opriessnig và cộng sự, 2014). Tại Mexico, 170 mẫu mô nhúng paraffin cố định bằng

formalin được lưu trữ từ năm 2001 đến 2015, được gửi từ 13 bang của Mexico, đặc biệt là từ những bang có mật độ đàn lợn cao nhất và chiếm 80,9% tổng đàn lợn trong cả nước được sử dụng để nghiên cứu. Trong tất cả các trường hợp, tỷ lệ nhiễm PPV như sau: 25,9% đối với PPV1, 90% đối với PPV2, 58,8% đối với PPV3, 25,9% đối với PPV4, 32,4% cho PPV5 và 74,7% cho PPV6 (Garcia-Camacho và cộng sự, 2020).

Bảng 1.4. Mức độ PPV lưu hành trên thế giới

Phân loại PPV	Châu Âu		Châu Mỹ		Châu Á		Châu Phi	
	Tỷ lệ nhiễm (%)	Tác giả tham khảo	Tỷ lệ nhiễm (%)	Tác giả tham khảo	Tỷ lệ nhiễm (%)	Tác giả tham khảo	Tỷ lệ nhiễm (%)	Tác giả 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			

Tại châu Á: Tỷ lệ đồng nhiễm tổng thể nhiều loại PPV trên các đàn lợn được thông báo, gồm PPV2 (6,4 – 20 %), PPV3 (9,7 - 12,4 %), PPV4 (1,5 - 39,7 %) và PPV5 (2,6 - 6,6 %) (Zhang và cộng sự, 2011; Xiao và cộng sự, 2013a). 17,22 % và 2,09 % mẫu lâm sàng trong đàn lợn Trung Quốc nhiễm PPV1 và PPV4 (Huang và

cộng sự, 2010; Xu và cộng sự, 2012). Nghiên cứu gần đây trên đàn lợn ở Trung Quốc cho thấy tỉ lệ nhiễm PPV6 trên bào thai lợn bị sảy và lợn con khá cao (tương ứng là 50 % và 75 %) và cao hơn nhiều so với lợn nái và lợn hậu bị (tương ứng là 15,6 % và 3,8 %) (Ni và cộng sự, 2014). Tại Hàn Quốc, khảo sát trên tổng cộng có 286 mẫu huyết thanh, 481 phôi và 281 mẫu phân được thu thập từ năm 2018 đến 2020 cho thấy tỷ lệ nhiễm gồm: PPV1 (4,5%), PPV2 (22,1%), PPV3 (11,6%), PPV4 (8,2%), PPV5 (14,3%), PPV6 (21,5%), PPV7 (14,2%) (Kim và cộng sự, 2022). Tại Ấn Độ, Parthiban nghiên cứu 56 bào thai bị sảy và chết non từ các trang trại lợn có tổ chức ở Tamil Nadu và Kerala, các bang miền nam Ấn Độ, xác định tỷ lệ nhiễm là 14,3 % (Parthiban và cộng sự, 2022). Tất cả đều được xác định là PPV1. Tỷ lệ phổ biến của năm loại Parvovirus lợn ở khu vực Chiangmai của Thái Lan đã được nghiên cứu. Tỷ lệ nhiễm ở 80 con lợn là 53% đối với PPV1 (PPV-NADL2), 83% đối với PPV2 (CnP-PARV4), 73% đối với PPV3 (P-PARV4), 44% đối với PPV4 (PPV4) và 18% đối với PBo-likeV (PBoV7) (Saekhow và Ikeda, 2015)

Châu Phi: Tại Cộng hòa Dân chủ Congo, nghiên cứu sử dụng phương pháp PCR chỉ phát hiện PPV3 ở 14/80 con lợn (17,5%). (Bisimwa và cộng sự, 2021). Tại Nam Phi, khi nghiên cứu sự lưu hành của Parvovirus ở các trại nuôi lợn trước đó đã nhiễm PCV2, Afolabi cho thấy tỷ lệ nhiễm của các chủng PPV1, PPV2, PPV4 lần lượt là 29,1%, 21,8%, và 43,6%. (Afolabi và cộng sự, 2019).

Kết quả tỷ lệ nhiễm PPV theo các type được tổng hợp như Bảng 1.4. Tỷ lệ này dao động từ 0,5% đến 94%. Điều này cho thấy tỷ lệ nhiễm PPV không phụ thuộc vào vùng địa lý, cơ quan lấy mẫu và các loài lợn.

1.4.2. Tỷ lệ nhiễm PPV tại Việt Nam

Tại Việt Nam, nghiên cứu của tác giả Hồ Đình Chúc về hội chứng rối loạn sinh sản ở một số tỉnh đã xác định sự hiện diện của PPV và phát hiện kháng thể kháng PPV ở lợn nái và lợn đực giống. Nghiên cứu này đánh dấu lần đầu tiên PPV được ghi nhận tại Việt Nam. Kết quả điều tra ban đầu dựa trên phương pháp huyết thanh học cho thấy tỷ lệ lợn nái bị rối loạn sinh sản tại các tỉnh miền Bắc dao động từ 10,5% đến 26,7%,

trong khi miền Nam có tỷ lệ lên tới 30%. Bệnh gây ảnh hưởng đáng kể đến các đàn lợn nái sinh sản. Tần suất rối loạn sinh sản ở các lứa đầu thường cao hơn so với các lứa sau. Đặc biệt, nghiên cứu cũng cho thấy rằng các yếu tố sinh thái khác nhau dường như không có tác động đáng kể đến tỷ lệ rối loạn sinh sản ở lợn nái (Hồ Đình Chúc, 1993).

Trong một nghiên cứu khác, tác giả cũng đã sử dụng phương pháp huyết thanh học để xác định tỷ lệ lưu hành PPV ở khu vực miền Trung, kết quả cho thấy tỷ lệ này khoảng 21,5% (Phạm Hùng, 1999).

Cũng sử dụng phương pháp huyết thanh học, một nghiên cứu thực hiện tại tỉnh Long An ghi nhận 69,5% trong tổng số 4.166 mẫu huyết thanh từ các trang trại lợn nái cho kết quả dương tính với PPV. Phân tích trên 52 mẫu thai chết lưu ghi nhận sự hiện diện đồng thời của virus PPV và kháng thể PPV. Tỷ lệ suy giảm sinh sản ở lợn nái từ 21,7% - 26,1%, tỷ lệ suy giảm sinh sản ở lứa đẻ là 7,6% - 9%. Tần suất suy giảm sinh sản ở các lứa đầu cao hơn so với các lứa sau, và khác biệt về vùng sinh thái không có ảnh hưởng đáng kể đến tỷ lệ suy giảm sinh sản ở lợn nái (Nguyễn Huỳnh và cộng sự, 2000).

Một nghiên cứu mới đây về tình hình lưu hành của PPV1 tại Hà Nội và các khu vực lân cận đã phân tích 68 mẫu huyết thanh từ đàn lợn tại sáu địa phương gồm Hà Nội, Hưng Yên, Hải Dương, Bắc Ninh, Hòa Bình và Vĩnh Phúc. Kết quả thông qua phương pháp huyết thanh học cho thấy có 88,2% (60/68) số mẫu có sự hiện diện của kháng thể kháng PPV1 (Huỳnh Thị Mỹ Lệ và cộng sự, 2020).

Năm 2022, bằng phương pháp PCR, một nghiên cứu về tỷ lệ đồng nhiễm PPV trên 174 mẫu dương tính với PCV2 thu thập năm 2017 và 2021. Kết quả cho thấy 42/174 mẫu nhiễm PPV1, 56/174 mẫu nhiễm PPV2, 64/174 mẫu nhiễm PPV3, 56/174 mẫu nhiễm PPV4 (Nguyễn và cộng sự, 2022).

Nghiên cứu mới đây của Trần Văn Trung cũng sử dụng phương pháp PCR để phát hiện PPV. Trong 146 mẫu thu từ lò mổ trên địa bàn 7 tỉnh miền Trung (Quảng Bình, Quảng Trị, Thừa Thiên Huế, Đà Nẵng, Quảng Nam, Quảng Ngãi, Bình Định).

Kết quả 109/146 mẫu (74,7%) nhiễm PPV. Trong đó tỷ lệ nhiễm PPV1-PPV4 lần lượt là 52,7%; 56,2%; 5,5% và 8,2% (Trần Văn Trung, 2024).

Nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước đều cho thấy PPV phân bố rộng rãi trong đàn lợn trên toàn cầu. Bệnh do PPV gây ra đang là mối lo ngại đối với người chăn nuôi. Để đảm bảo công tác phòng chống dịch, việc phân lập, khảo sát các chủng đang lưu hành và nghiên cứu sản xuất vắc xin là những công việc được quan tâm hàng đầu. Những nghiên cứu này sẽ giúp đưa ra cái nhìn tổng quát về bệnh Parvovirus, theo dõi và có kế hoạch ứng phó kịp thời khi dịch bệnh nổ ra.

1.5. TÌNH HÌNH SẢN XUẤT VẮC XIN GÂY BỆNH KHÔ THAI LỢN DO PARVOVIRUS TRÊN THẾ GIỚI VÀ Ở VIỆT NAM

1.5.1. Tình hình sản xuất vắc xin Parvovirus gây bệnh khô thai lợn trên thế giới

Vắc xin Parvovirus chủ yếu được sản xuất bằng 2 phương pháp chính. Phương pháp bất hoạt truyền thống và phương pháp tái tổ hợp.

+ *Vắc xin Parvovirus bất hoạt truyền thống:*

Cho đến nay, việc nghiên cứu phát triển và sản xuất vắc xin chủ yếu dựa vào PPV type 1, chủng PPV-NADL-2. Zeeuw đã nghiên cứu về khả năng trung hòa chéo của chủng dùng sản xuất vắc xin (PPV-NADL-2) và các chủng phân lập trên thực địa tại Đức bằng cách gây nhiễm thực nghiệm trên lợn nái mang thai. Kết quả cho thấy, 3 trong số 4 chủng đều có phản ứng ngưng kết chéo cao, trong khi có phản ứng ngưng kết chéo kém với chủng PPV-27a thuộc type 2 (chủng phân lập ngoài thực địa) và một điều ngạc nhiên là chủng này có hiệu giá ngưng kết thấp với chính nó. Các tác giả cho rằng chủng này có cơ chế “lẩn trốn” miễn dịch (Zeeuw và cộng sự, 2007).

Trong một nghiên cứu khác cũng tại Đức, Józwik đã tiêm vắc xin sản xuất từ chủng PPV-NADL-2 type 1 vào ngày thứ 35 và 21 trước khi thụ tinh. Vào ngày thứ 41 của thai kỳ 4ml PPV (10^6 TCID₅₀) công cường độc bằng đường nhỏ mũi. Mẫu máu được lấy lúc 3 tuần (21 ngày) và lúc 7 tuần (28 ngày) sau tiêm để xét nghiệm kháng thể. Vào ngày thứ 90 của thai kỳ, khoảng 3 tuần trước khi sinh, tất cả lợn nái đã được giết nhân đạo và phôi thai được mổ lấy thai trong điều kiện vô trùng. Sau công cường

độc 66/67 thai của nhóm vắc xin sống sót, không phát hiện DNA của PPV trong bào thai; 39/50 thai của nhóm đối chứng chết và có các biểu hiện khô thai, mất nước và phát hiện DNA của PPV trong bào thai. Hiệu giá kháng thể sau 21 tiêm phòng nằm trong khoảng 1/32 đến 1/512, sau 28 ngày tiêm phòng nằm trong khoảng 1/128 đến 1/256 và đến ngày công cường độc thì giảm dần. Mặt khác nghiên cứu cho thấy, bào thai từ lợn nái mang thai đã được tiêm vắc xin (chế tạo từ chủng PPV-NADL-2 type 1) được bảo vệ khi thử nghiệm cường độc với chủng PPV-27a. Tuy nhiên, cả nhóm lợn nái tiêm vắc xin và nhóm đối chứng đều thải virus PPV-27a ít nhất 10 ngày sau khi thử nghiệm cường độc (Jóźwik và cộng sự, 2009).

Noguera thử nghiệm so sánh hiệu quả của 3 loại vắc xin ReproCyc ParvoFLEX (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH), ERYSENG PARVO (HIPRA), Porcilis Ery + Parvo + Lepto (MSD Animal Health). Mỗi vắc xin được tiêm 2 mũi theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau khi tiêm vắc xin, lợn được công cường độc vào ngày 40 thai kỳ bằng chủng 401/09 (198669) phân lập tại Đức 2004 (thuộc type 1). Phôi thai được thu hoạch vào ngày 90 của thai kỳ. Kết quả sau 35 ngày sau tiêm mũi 2, bằng ELISA xác định 69% huyết thanh dương tính với PPV ở nhóm 1 (vắc xin ReproCyc ParvoFLEX), 11% huyết thanh dương tính với PPV ở nhóm 2 (vắc xin ERYSENG PARVO), không có huyết thanh dương tính ở nhóm 3 (vắc xin Porcilis Ery + Parvo + Lepto). Sau khi công cường độc Nhóm 1 có 96,5% thai khỏe mạnh, Nhóm 2 có 97,4% thai khỏe mạnh, Nhóm 3 có 88,3% thai khỏe mạnh, Nhóm đối chứng 0% thai khỏe mạnh (Noguera và cộng sự, 2021).

Trong một nghiên cứu khác, Foerster đã dùng chủng PPV-27a để sản xuất vắc xin và dùng luôn chủng này (đồng chủng) để công cường độc. Tác giả sử dụng vắc xin vô hoạt với lượng virus tương ứng 10^5 TCID₅₀. Vắc xin được tiêm vào ngày 35 trước phối giống, mũi 2 tiêm nhắc lại sau 21 ngày. Ngày 40 của thai kỳ lợn được công cường độc với liều công 5×10^6 TCID₅₀ bằng đường nhỏ mũi và tiêm bắp. Kết quả đánh giá kháng thể bằng HI đối với nhóm vắc xin cho thấy sau 18 ngày tiêm mũi 2, lợn đạt hiệu giá từ 1/40 đến 1/640 và giảm xuống còn 1/10 đến 1/320 vào ngày 54 sau tiêm mũi 2 (ngày tiến hành công cường độc). Hiệu giá kháng thể nhỏ hơn 1/10 ở nhóm đối chứng cho

đến ngày tiến hành công cường độc. Vào ngày 90 của thai kỳ (49 ngày sau công), bào thai lợn được thu hoạch và đánh giá. Kết quả nhóm vắc xin có 4% thai bị thai gổ, nhóm đối chứng có 51% thai bị thai gổ (Foerster và cộng sự, 2016).

Các nghiên cứu trên cho thấy, phương pháp đánh giá khả năng bảo vệ của vắc xin chính xác nhất là phương pháp thử nghiệm cường độc. Các đánh giá về hiệu giá kháng thể sau tiêm thường cho kết quả không cao và giảm dần theo thời gian.

+ *Vắc xin Parvovirus tái tổ hợp*

Một số nghiên cứu gần đây đã tập trung vào việc phát triển vắc xin tái tổ hợp phòng bệnh Porcine parvovirus, trong đó protein VP2 được coi là kháng nguyên chủ yếu quyết định khả năng gây đáp ứng miễn dịch bảo hộ. Các vắc xin dạng hạt giống virus (virus-like particles, VLPs) được tạo thành từ VP2 đã chứng minh khả năng tự lắp ráp và gây miễn dịch mạnh, đồng thời có thể sản xuất ở quy mô lớn bằng nhiều hệ thống biểu hiện khác nhau, chẳng hạn như *Saccharomyces cerevisiae* và *Escherichia coli* (Tamošiūnas và cộng sự, 2014; Gao và cộng sự, 2022). Ngoài ra, biểu hiện VP2 trong hệ thống thực vật cũng được chứng minh có tiềm năng trong việc tạo ra vắc xin tiểu đơn vị an toàn, chi phí thấp, thích hợp cho sản xuất công nghiệp (Ling và cộng sự, 2023; Zhou và cộng sự, 2010). Một hướng đi khác là sử dụng các vi sinh vật sống tái tổ hợp, điển hình như *Lactobacillus casei* mang gen VP2, nhằm phát triển vắc xin niêm mạc với hiệu quả kích thích miễn dịch tại chỗ và toàn thân (Xu và cộng sự, 2008). Bên cạnh đó, vectơ virus tái tổ hợp, chẳng hạn pseudorabies virus biểu hiện VP2, được nghiên cứu như một chiến lược vắc xin kép, mang lại khả năng bảo hộ đồng thời với nhiều bệnh truyền nhiễm ở lợn (Li và cộng sự, 2024).

Trên thế giới đã có nhiều loại vắc xin được cấp phép lưu hành để phòng bệnh do Parvovirus gây ra như vắc xin Farrowsure Gold của hãng Zoetis, vắc xin Porcilis® Parvo của hãng MSD Animal Health, vắc xin Parvovax của hãng CEVA, vắc xin PPV-VAC của Hàn Quốc. Tuy nhiên các loại vắc xin nhập khẩu này không chỉ có chi phí cao mà còn có thể không hoàn toàn tương thích với các chủng virus tại Việt Nam. Hơn nữa, một số nghiên cứu đã ghi nhận sự xuất hiện của các chủng PPV mới, khác biệt về

mặt di truyền và kháng nguyên so với các chủng đã được phân lập trước đây. Do đó, tác dụng bảo vệ của vắc xin hiện tại không thể hoàn toàn đảm bảo phòng bệnh hiệu quả. Một nghiên cứu của Serena đã xác định đặc điểm của các chủng PPV có trong 131 mẫu bệnh phẩm phôi thai chết lưu từ những lần đẻ thường ở lợn nái từ một trại lợn thương mại của Argentina đang sử dụng vắc xin thương mại. Kết quả PCR cho thấy 17/131 trường hợp dương tính với PPV. Mười trong số các loại virus này đã được phân lập và giải trình tự. Tất cả các virus đều liên quan đến trình tự PPV1 (NADL-2), duy trì sự khác biệt về axit amin ở các vị trí 436 (S – P) và 565 (R – K) (Serena và cộng sự, 2019). Một nghiên cứu khác cũng đã phát hiện những đột biến của PPV từ các chủng PPV7 được thu thập, trong nghiên cứu này có đột biến mất đoạn trong gen VP2, các biến thể axit amin của protein VP2 đã được quan sát có trong 6 trên 12 chủng và được dự đoán có sự khác biệt đáng kể về chỉ số kháng nguyên so với các chủng PPV1 khác (Chung và cộng sự, 2020).

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.

1.5.2. Tình hình sản xuất vắc xin Parvovirus gây bệnh khô thai lợn 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 1.5). 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.

Bảng 1.5. Một số loại vắc xin Parvovirus nhập khẩu lưu hành tại Việt Nam

Tên vắc xin	Hãng	Nước sản xuất	Đơn vị nhập khẩu và phân phối
ERYSENG® PARVO	HIPRA	Tây Ban Nha	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

(<https://greenvet.com.vn>; <https://hoanto.com>; <https://tienphatvethcm.com.vn>;
<https://tigervet.com.vn>; <https://goldenvet.com.vn>)

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 Parvovirus. 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.

CHƯƠNG II

CƠ SỞ LÝ THUYẾT VÀ CÁC PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

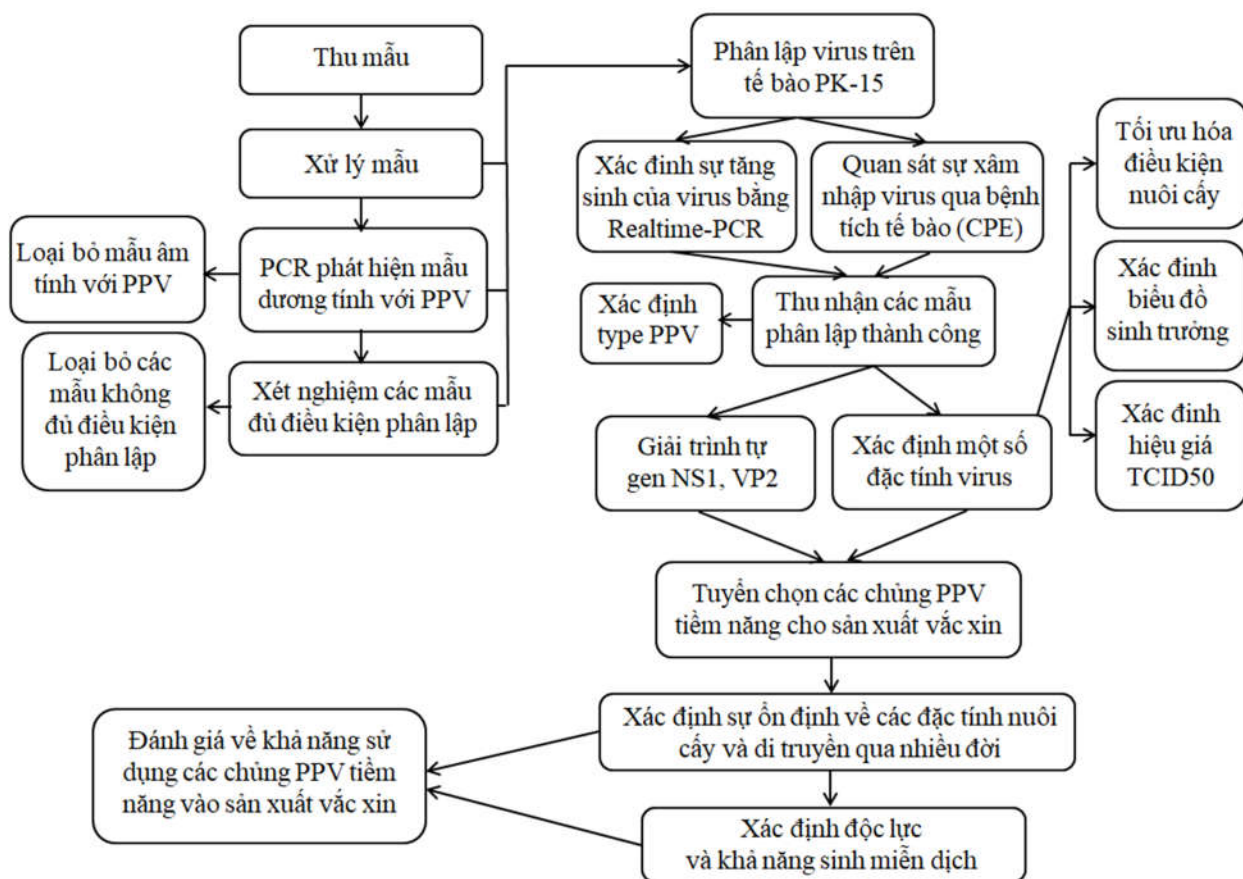
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu là Parvovirus phân lập từ huyết thanh, phôi thai lợn thu thập từ các đàn lợn sinh sản tại 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 thực hiện các nội dung nghiên cứu theo sơ đồ nghiên cứu tổng quát như sau:



Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu tổng quát

Để tiến hành phân lập PPV, mẫu được thu thập từ các trại lợn tại các tỉnh Thái Bình, Thanh Hóa, Bình Định, Đắk Lắk, Đồng Nai, Bình Dương. Mẫu sau khi thu thập sẽ được gửi về phòng thí nghiệm tại Bộ môn Công nghệ sinh học, Phân viện Thú y miền Trung để tiến hành nghiên cứu.

Sau khi thu mẫu, các mẫu huyết thanh và mẫu mô được xử lý để dùng làm nguyên liệu cho quá trình phân lập virus hoặc tách chiết DNA. DNA của tất cả các mẫu thu được sẽ được tiến hành phản ứng PCR để xác định mẫu dương tính với PPV (Lyoo và cộng sự, 2001). Cùng với đó, các mẫu dương tính với PPV được xét nghiệm 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). Mẫu âm tính với các virus trên sẽ được xác định là đủ điều kiện để phân lập trên dòng tế bào liên tục PK-15. Kết quả phân lập được ghi nhận thông qua quan sát bệnh tích tế bào và xác định sự tăng sinh của virus bằng phản ứng Realtime-PCR. Các mẫu virus có khả năng phát triển trên tế bào PK-15 sẽ được thu nhận và bảo quản.

Các chủng virus đã phân lập thành công sau đó được tiếp tục xác định type PPV bằng phương pháp PCR theo mô tả của Kim và cộng sự, 2022. Các chủng này cũng được đánh giá về các đặc tính virus (điều kiện nuôi cấy, định hiệu giá TCID₅₀, biểu đồ sinh trưởng) và đặc tính di truyền (phân tích gen NS1 và VP2). Các chủng PPV có hiệu giá TCID₅₀ cao, sinh trưởng ổn định và có mối quan hệ di truyền gần với các chủng PPV đang được nghiên cứu sản xuất vắc xin sẽ được tuyển chọn làm chủng tiềm năng cho sản xuất vắc xin.

Để đánh giá khả năng sử dụng trong sản xuất vắc xin, các chủng virus tiềm năng sẽ được tiếp tục xác định sự ổn định về đặc điểm nuôi cấy và di truyền qua nhiều đời, xác định độc lực và khả năng sinh miễn dịch. Các chủng đủ điều kiện nghiên cứu sản xuất vắc xin phải đảm bảo đạt yêu cầu về sự ổn định đối với các đặc tính sinh học cũng như đặc tính di truyền, có độc lực cao và có khả năng đáp ứng miễn dịch tốt.

Các kết quả này là nguồn dữ liệu cần thiết để đánh giá khả năng sử dụng các chủng PPV tiềm năng trong nghiên cứu này nhằm phát triển vắc xin phòng bệnh do Parvovirus gây ra trên lợn.

2.2.2. Phương pháp phân lập Parvovirus gây bệnh khô thai từ các mẫu bệnh phẩm điển hình ở các địa phương khác nhau

2.2.2.1. Phương pháp thu mẫu

Theo thống kê về số lượng đàn lợn từ Cục Chăn nuôi (tháng 04/2020), cả nước có 8 tỉnh (Hà Nội, Thanh Hóa, Thái Bình, Đắk Lắk, Nghệ An, Bình Định, Đồng Nai, Bình Dương) có số lượng tổng đàn trên 750.000 con. Bên cạnh đó, nhằm đảm bảo thu thập được mẫu đại diện trên cả nước, các vùng lấy mẫu được lựa chọn phân bố trên cả ba miền Bắc, Trung, Nam. Vì vậy, các tỉnh được lựa chọn gồm: Thanh Hóa, Thái Bình, Đắk Lắk, Bình Định, Đồng Nai, Bình Dương. Các tỉnh được chọn đều có tổng đàn lợn lớn, vượt trên 750.000 con (Bảng 2.1)

Bảng 2.1. Thống kê tổng đàn lợn theo địa phương thu mẫu

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)

Đối với lợn mẹ: Tiến hành thu mẫu trên lợn mẹ từ những trại nuôi (hoặc hộ chăn nuôi) có các biểu hiện giảm tỷ suất sinh hoặc có tiền sử nhiễm Parvovirus. Mẫu máu được lấy từ tĩnh mạch cổ lợn bằng bơm tiêm vô trùng. Sau khi thu thập, mẫu máu được đánh dấu và huyết thanh sẽ được thu bằng cách để máu đông tự nhiên ở nhiệt độ thường trong khoảng thời gian từ 30 phút đến 1 giờ, tiến hành tách bỏ các phần máu đông, chỉ lấy phần dịch gọi là huyết thanh.

Đối với mẫu bệnh phẩm từ thai khô nghi nhiễm Parvovirus: mẫu thai khô sẽ được đặt trong túi hoặc lọ vô trùng.

Các mẫu sẽ được bảo quản lạnh và vận chuyển về Phân viện Thú y miền Trung trong vòng 24 giờ sau khi thu thập.

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

Để đảm bảo thu được mẫu dương tính, số lượng mẫu tối thiểu cần lấy được xác định theo Công thức về số lượng động vật cần phải lấy mẫu để phát hiện mầm bệnh do nhiễm bệnh tự nhiên hướng dẫn tại Thông tư 07/2016/TT-BNNPTNT (Quy định về phòng, chống dịch bệnh động vật trên cạn):

$n = \left[1 - (1 - p_1)^{\frac{1}{d}} \right] \times \left[N - \frac{d-1}{2} \right]$	n: Số mẫu cần lấy
	p1: Xác suất để phát hiện được bệnh (0,95)
	N: Tổng đàn vật nuôi
	d: Số động vật mắc bệnh (d=N x p2), p2: Tỷ lệ nhiễm bệnh dự đoán (%)

Từ những nghiên cứu trước đây cho thấy tỷ lệ nhiễm PPV tại Việt Nam thấp nhất là gần 10%. Áp dụng công thức trên ta có bảng tính như sau:

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

Với mỗi tỉnh, 2 huyện có số tổng đàn trên 1.000 con sẽ được lựa chọn để lấy mẫu, mỗi huyện tối thiểu 29 mẫu.

2.2.2.2. Phương pháp xử lý mẫu

Đối với mẫu huyết thanh: Huyết thanh sẽ được ly tâm 3000 vòng/phút trong vòng 10 phút để loại bỏ hồng cầu, phần dịch nổi lên phía trên được thu lại và bảo quản ở - 20°C. Huyết thanh sau đó sẽ được dùng để tách chiết DNA và phân lập PPV (Tuck và cộng sự, 2009).

Đối với mẫu bệnh phẩm phôi thai: Tiến hành mổ mẫu phôi thai trong môi trường vô trùng; thu mẫu gan, phổi. Mẫu mô gan, phổi sau đó được nghiền trong chày cối vô trùng, tạo huyền dịch 10% trong dung dịch PBS. Mẫu huyền dịch 10% được ly tâm 2.500 vòng/phút, 10 phút ở 4°C. Sau đó, dịch nổi thu được sẽ được dùng để tách chiết DNA và phân lập PPV (Nguyễn và cộng sự, 2022).

2.2.2.3. Xác định mẫu dương tính với Parvovirus

Mẫu dương tính được xác định thông qua kết quả phản ứng PCR nhân lên đoạn gen 330bp thuộc gen NS1. Đoạn gen NS1 330 bp được sử dụng để xác định mẫu dương tính với PPV trong nghiên cứu này là đoạn gen có vị trí từ 1.453 đến 1.782 trên gen NS1. Đoạn gen này là vùng có độ bảo tồn cao giữa các chủng PPV và được sử dụng để xác định mẫu dương tính với PPV (Lyo và cộng sự, 2001). Trước hết DNA virus được tách chiết từ các mẫu huyết thanh và mẫu mô đã thập được. Quá trình tách chiết DNA được sử dụng bộ kit MagMAX Viral Pathogen Kit (Thermo Fisher Scientific), các bước thực hiện được mô tả trong Phụ lục 1.

DNA sau tách chiết được sử dụng cho phản ứng PCR với cặp như sau:

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 2X Taq PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific); 0,5 µl mỗi môi và 2,5 µl DNA mẫu. Chương trình PCR được thiết lập như sau: Giai đoạn làm nóng với 1 chu kỳ 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 môi 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 PCR được điện di trên gel agarose 1% và đọc kết quả dưới tia UV.

2.2.2.4. Xác định mẫu đủ điều kiện phân lập

Trong một vài nghiên cứu trên thế giới, PPV có khả năng đồng nhiễm với PRRSV (Lyoo và cộng sự, 2001), CSFV (Deka và cộng sự, 2021), PCV2 (Lyoo và cộng sự, 2001; Deka và cộng sự, 2021; Sun và cộng sự, 2015). Vì vậy, để tránh đồng nhiễm 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 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, xét nghiệm PCV theo TCVN 8400-36:2015, xét nghiệm CSF theo TCVN 8400-47:2019, xét nghiệm ASF theo TCVN 8400-41:2019. 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 âm tính với tất cả các loại virus trên đủ điều kiện để phân lập PPV trên dòng tế bào PK-15.

2.2.2.5. Phương pháp phân lập PPV

Quá trình phân lập PPV được thực hiện bằng cách nuôi cấy trên tế bào PK-15 theo sơ đồ trình bày ở hình 2.2 theo mô tả của Kim và cộng sự, 2022.

Parvovirus được phân lập trên tế bào PK-15, sử dụng môi trường E-MEM có bổ sung 5% FBS và 1% Penicilin - Streptomycin ở 37°C, 5% CO₂ (Quy trình nuôi cấy chi tiết được trình bày tại Phụ lục 2). Hằng ngày, sự phát triển của tế bào được quan sát dưới kính hiển vi soi ngược với độ phóng đại 10X. Kết quả phân lập được xác định dựa trên kết quả quan sát bệnh tích tế bào và sự nhân lên của virus thông qua phản ứng Realtime PCR. Bệnh tích tế bào được quan sát hàng ngày dưới kính hiển vi soi ngược với độ phóng đại 10X với những biểu hiện bệnh tích tế bào như tạo hạt, thay đổi hình

dạng tế bào, tạo nên những thể vùi bên trong nhân, nhiễm sắc thể bị co cụm lại và phá vỡ thành tế bào. Sau đó, virus nhân lên và phá hủy tế bào, tạo ra những khoảng trống trên bề mặt bình nuôi cấy (Zhang và cộng sự, 2015).

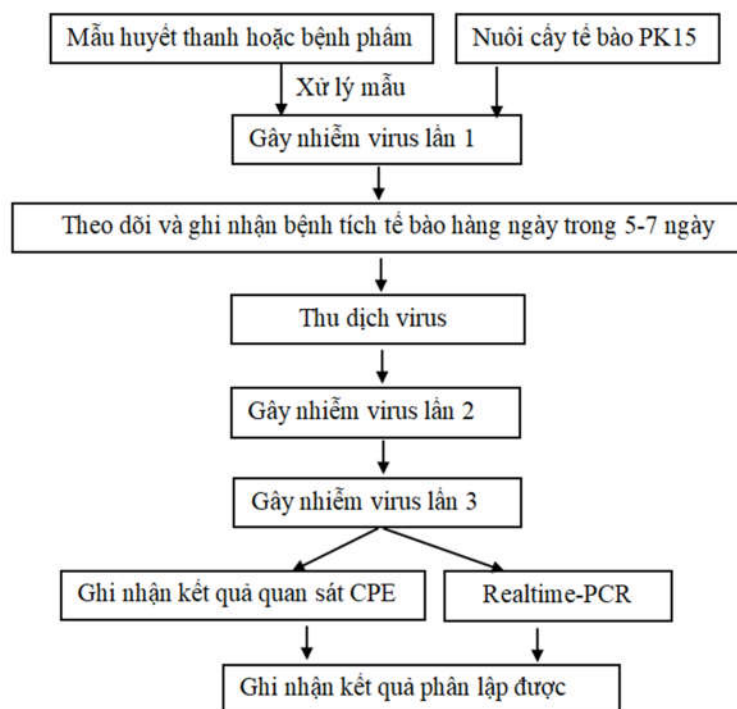
Sau 7 ngày nuôi cấy virus, 1ml dịch nuôi cấy được thu lại tách chiết DNA và tiến hành phản ứng Realtime-PCR sử dụng cặp mồi:

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

NS1-R: 5'-CTCCACGGCTCCAAGGCTAAAG-3'

Thành phần phản ứng bao gồm: 10 µl SYBR Green Mastermix, 8 µl nước không chứa nuclease, 0,5 µl mồi mỗi loại và 1 µl DNA. Quy trình PCR bắt đầu với bước biến tính ban đầu ở 95°C trong 10 giây, tiếp theo là 35 chu kỳ gồm 95°C trong 5 giây và 55°C trong 20 giây. Cuối cùng, đường cong nóng chảy được xác định bằng cách nâng nhiệt từ 70°C lên 95°C (Miao và cộng sự, 2009).

Số lượng bản sao virus sẽ được xác định thông qua 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 được trình bày chi tiết tại Phụ lục 3.



Hình 2.2. Sơ đồ phân lập PPV trên tế bào PK-15

Virus sẽ được ghi nhận là phân lập thành công khi quan sát thấy CPE đặc trưng của PPV trên tế bào PK-15. Virus sinh trưởng, phát triển tốt và gia tăng số lượng bản sao sau mỗi đời cấy chuyển.

2.2.3. Phương pháp xác định các type của Parvovirus

Các chủng virus đã phân lập thành công sẽ được định type bằng phương pháp PCR với các cặp mồi đặc hiệu được mô tả chi tiết trong Bảng 2.2 (Kim và cộng sự, 2022).

Bảng 2.2. Trình tự các cặp mồi định type Parvovirus

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

(Kim và cộng sự, 2022)

Mẫu phản ứng PCR (25 µl) được chuẩn bị bao gồm: 9 µl nước (không có nuclease) (Thermo Fisher Scientific); 12,5 µl 2X Taq PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific); 0,5 µl mỗi mồi và 2,5 µl DNA mẫu. 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 PCR được điện di trên gel agarose 1% và đọc kết quả dưới tia UV.

2.2.4. Phương pháp xác định mối quan hệ di truyền của các chủng Parvovirus

Trong nghiên cứu này, hai gen NS1 và 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 chủng 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.

*** Phân tích gen NS1**

Đoạn gen NS1 được nhân lên với cặp mồi PPVF, PPVR theo mô tả Lyoo và cộng sự, 2001 như sau:

PPVF: 5'-ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGC-3'

PPVR: 5'-TATGTTCTGTTTCCTCGCATC-3'

Sau đó sản phẩm PCR được gửi giải trình tự tại công ty Firstbase-Singapore. Trình tự được phân tích bằng BLAST trên ngân hàng gen NCBI. Cây phát sinh loài được xây dựng trên cơ sở trình tự nucleotide của đoạn gen NS1 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 gen VP2**

Đoạn gen VP2 được nhân lên bằng phản ứng PCR với cặp mồi (Xu và cộng sự, 2013)

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

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

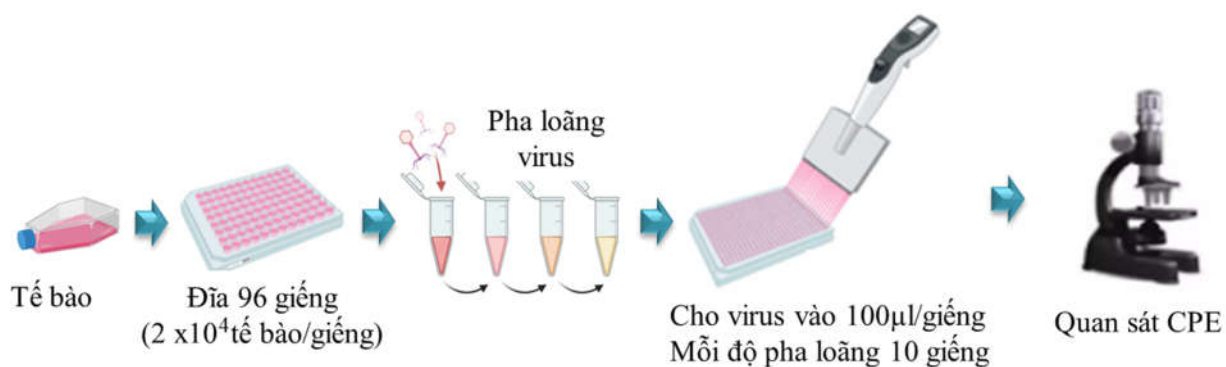
Mỗi được sử dụng có gắn thêm vị trí enzyme cắt hạn chế *BamHI*, *Sall*, dùng để cắt nối sản phẩm PCR vào vector tạo dòng pGEMT. Vector chứa đoạn gene VP2 được giải trình tự với môi T7, SP6 của vector. Gene VP2 được gửi đi giải trình tự tại công ty Firstbase – Singapore. Trình tự được phân tích bằng BLAST trên ngân hàng gen NCBI. Cây phát sinh loài được xây dựng trên cơ sở trình tự nucleotide của đoạn gen NS1 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).

2.2.5. Phương pháp xác định một số đặc tính virus

* Xác định biểu đồ sinh trưởng

Chủng virus được gây nhiễm lên tế bào PK-15 với $MOI = 0,01$. Virus phát triển trong môi trường E-MEM bổ sung 5% FBS và 1% Penicilin – Streptomycin tại nhiệt độ $37^{\circ}C$, 5% CO_2 . Sau mỗi 24 giờ trong vòng 7 ngày sau gây nhiễm, tiến hành thu mẫu virus. Số lượng virus tại mỗi thời điểm thu mẫu được xác định bằng phản ứng Realtime-PCR (Miao và cộng sự, 2009).

* Xác định hiệu giá $TCID_{50}$



Hình 2.3. Quy trình xác định $TCID_{50}$

Quy trình xác định $TCID_{50}$ được thực hiện như sơ đồ hình 2.3, các bước thực hiện chi tiết được mô tả 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: Tế bào PK-15 được chuẩn bị trên khay 96 giếng ($2,0 \times 10^4$ tế bào/giếng).

Bước 3: Virus được pha loãng theo cơ số 10.

Bước 4: Virus mỗi độ pha loãng được ủ trên bề mặt tế bào (100 μ l/giếng) 1 giờ ở nhiệt độ 37°C, mỗi độ pha loãng 10 giếng

Bước 5: Bổ sung môi trường E-MEM, 5% FBS và 1% Penicilin – Streptomycin (100 μ l/giếng). Môi trường được giữ ấm tại 37°C trong 30 phút trước khi sử dụng.

Bước 6: Virus được nuôi cấy trong điều kiện 37°C, 5% CO₂. CPE được quan sát hàng ngày cho đến ngày thứ 7 sau khi gây nhiễm. Kết quả gây nhiễm được ghi lại và tính TCID₅₀ được xác định theo phương pháp của Reed-Muench (1938):

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

Trong đó: $\text{PD} = (\text{Tỷ lệ nhiễm trên } 50\% - 50\%) / (\text{Tỷ lệ nhiễm trên } 50\%) - (\text{Tỷ lệ nhiễm dưới } 50\%).$

*** 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 tỷ lệ M.O.I (Multiplicity of Infection – số lượng virus gây nhiễm trên số lượng tế bào) là 0,01. Quá trình nuôi cấy được thực hiện trong 7 ngày liên tục. Mỗi 24 giờ, 200 μ l dịch nuôi cấy được thu thập để phân tích. Sau khi thu mẫu, DNA virus được tách chiết và xác định số lượng bản sao virus tại các thời điểm thu mẫu thông qua phản ứng Realtime-PCR. Số lượng bản sao virus sau mỗi 24 giờ được sử dụng làm tiêu chí đánh giá khả năng nhân lên của virus dưới các điều kiện nuôi cấy khác nhau.

Các điều kiện cố định trong thí nghiệm:

- Môi trường nuôi cấy: E-MEM
- Dòng tế bào: PK-15
- Tỷ lệ M.O.I = 0,01

- Kháng sinh: 1% Penicilin – Streptomycin
- Nồng độ CO₂: 5% CO₂
- Thời gian nuôi cấy: 7 ngày.
- Thể tích thu mẫu sau mỗi 24 giờ nuôi cấy: 200µl

Các điều kiện cần khảo sát:

- Nhiệt độ: 33°C, 37°C và 39°C
- Nồng độ FBS: 2%, 3% và 5%

Thiết kế thí nghiệm:

Bảng 2.3. 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	33°C	2% FBS
- Tỷ lệ gây nhiễm MOI (Multiplicity of infection – số lượng virus gây nhiễm/số lượng tế bào) = 0,01		3% FBS
		5% FBS
- 1% Penicilin – Streptomycin	37°C	2% FBS
- 5% CO ₂		3% FBS
		5% FBS
- Thời gian nuôi cấy 7 ngày. Sau mỗi 24 giờ nuôi cấy, 200µl dung dịch virus được thu mẫu.	39°C	2% FBS
		3% FBS
		5% FBS

2.2.6. Xác định sự ổn định, độc lực và tính sinh miễn dịch

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

* Xác định sự ổn định về một số đặc tính sinh học

Mẫu virus được cấy chuyển liên tục qua 15 đời. Tại các đời 1, 5, 10, 15, tiến hành đánh giá về biểu đồ sinh trưởng, hiệu giá TCID₅₀, bệnh tích tế bào.

Xác định biểu đồ sinh trưởng: Chủng virus được gây nhiễm lên tế bào PK-15 với $MOI = 0,01$. Virus được nuôi trong môi trường E-MEM có bổ sung 5% FBS và 1% Penicilin – Streptomycin tại nhiệt độ $37^{\circ}C$, 5% CO_2 . Sau mỗi 24 giờ trong vòng 7 ngày sau gây nhiễm, tiến hành thu mẫu virus. Tại mỗi thời điểm lấy mẫu, virus được định lượng bằng phản ứng Realtime-PCR (Miao và cộng sự, 2009)

Xác định hiệu giá $TCID_{50}$ theo mô tả của Phạm Văn Sơn và cộng sự, 2017

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% Penicilin – Streptomycin tại nhiệt độ $37^{\circ}C$, 5% CO_2 . Hàng ngày, bệnh tích tế bào được ghi nhận thông qua kết quả quan sát trên kính hiển vi soi ngược.

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

Mẫu virus được cấy chuyển liên tục qua 15 đời. Tại các đời 1, 5, 10, 15, tiến hành phân tích trình tự gen NS1, VP2 qua các đời nuôi cấy.

Gen NS1 được nhân bằng phản ứng theo mô tả của Lyoo và cộng sự, 2001. Gen VP2 được nhân lên theo mô tả của Xu và cộng sự, 2013.

Sản phẩm PCR được gửi giải trình tự tại công ty Firstbase-Singapore. Trình tự được phân tích so sánh để tìm ra sự biến đổi sau nhiều đời nuôi cấy.

2.2.6.2. Đánh giá độc lực

Độc lực của 02 chủng Parvovirus được xác định dựa trên mô tả sau đây (Zeeuw và cộng sự, 2007):

- 09 lợn nái hậu bị khỏe mạnh thuộc giống Landrace $\times$ Yorkshire (LY), độ tuổi 7–8 tháng, khối lượng trung bình 95–105 kg, được lựa chọn từ cơ sở chăn nuôi an toàn dịch bệnh. Tất cả lợn được kiểm tra huyết thanh học trước thí nghiệm, xác nhận âm tính với PPV và kháng thể kháng PPV. Lợn được chia thành 3 con/nhóm. Nhóm 1: Gây nhiễm với chủng TX7, nhóm 2: gây nhiễm với chủng VC5, nhóm 3 (nhóm đối chứng): tiêm với PBS. Lợn nái hậu bị được phối giống mang thai và ở ngày thứ 40 của thai kỳ, lợn trong nhóm thí nghiệm được gây nhiễm virus tương ứng với hiệu giá 10^6 $TCID_{50}/ml$

(2ml theo đường tiêm bắp cổ và 2ml theo đường nhỏ mũi); nhóm lợn đối chứng được tiêm PBS. Lợn được theo dõi hằng ngày sau khi gây nhiễm.

- Các mẫu huyết thanh được lấy vào các ngày 0, 7, 14, 21 và 49 sau khi gây nhiễm để xác định hiệu giá kháng thể bằng phản ứng HI (Ma và cộng sự, 2011) (Phương pháp HI được mô tả chi tiết trong Phụ lục 4).

- Ở ngày thứ 90 của thai kỳ, các lợn thí nghiệm được giết nhân đạo, thu dạ con để kiểm tra hình thái, bệnh tích trên thai. Sự có mặt của PPV trong mẫu phôi thai được xác định bằng phản ứng Reatime-PCR.

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% Penicilin - Streptomycin ở 37°C, 5% CO₂.

- *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.

- *Phôi trộn vắc xin*: Mỗi liều 2ml có chứa: 10⁶ TCID₅₀ 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 cấy 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**

Chuột lang khỏe mạnh, trọng lượng khoảng 300g, không có kháng thể PPV, được lựa chọn từ cơ sở chăn nuôi an toàn, đảm bảo yêu cầu thí nghiệm được lựa chọn để tiến hành thí nghiệm. Phương pháp xác định tính sinh miễn dịch trên chuột lang được thực hiện như mô tả của Ma và cộng sự, 2011 (Bảng 2.4).

Bảng 2.4. Thiết kế thí nghiệm đánh giá khả năng 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 theo dõi
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	Thể trạng, vận động, ăn uống, khối lượng, phản ứng tại chỗ tiêm, HI
	Nhóm 2	5	Vắc xin TX7 bất hoạt	0,5 mL (1/4 liều), tiêm bắp		1; 0, 7, 14, 21 ngày sau mũi	
	Nhóm 3	5	PBS đối chứng	0,5 mL, tiêm bắp		2	

*** 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:

09 lợn nái hậu bị khỏe mạnh thuộc giống Landrace $\times$ Yorkshire (LY), độ tuổi 7–8 tháng, khối lượng trung bình 95–105 kg, được lựa chọn từ cơ sở chăn nuôi an toàn dịch bệnh. Tất cả lợn được kiểm tra huyết thanh học trước thí nghiệm, xác nhận âm tính với PPV và kháng thể kháng PPV

Thí nghiệm được thực hiện bằng 2 phương pháp huyết thanh học và công cường độc.

Thiết kế thí nghiệm xác định tính sinh miễn dịch trên lợn nái bằng phương pháp huyết thanh học được thể hiện trong Bảng 2.5

Bảng 2.5. 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 theo dõi
Lợn nái hậu bị, khỏe mạnh, không có kháng thể PPV	Nhóm 1	3	Vắc xin VC5 bất hoạt	2mL/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	Thể trạng, vận động, ăn uống, khối lượng, nhiệt độ, phản ứng tại chỗ tiêm; HI, ELISA
	Nhóm 2	3	Vắc xin TX7 bất hoạt	2mL/liều, tiêm bắp	Mũi 2: 21 ngày sau tiêm mũi 1		
	Nhóm 3	3	PBS đối chứng	2mL, tiêm bắp			

Bên cạnh việc xác định khả năng sinh miễn dịch bằng phương pháp huyết thanh học, lợn nái thí nghiệm còn được xác định khả năng sinh miễn dịch bằng phương pháp công cường độc tại ngày 40 của thai kỳ. Thiết kế thí nghiệm chi tiết được thể hiện trong Bảng 2.6.

Bảng 2.6. Thiết kế thí nghiệm công cường độc trên lợn nái

Nhóm	Số lượng (con)	Xử lý trước công cường độc	Thời điểm công cường độc	Liều virus (TCID ₅₀)	Đường công cường độc	Thời điểm mổ khám	Chỉ tiêu theo dõi
Nhóm 1 (VC5)	3	Tiêm vắc xin VC5 bất hoạt (2 mL, tiêm bắp, 2 mũi: ngày -35 và -14 trước phối)	Ngày 40 thai kỳ	2×10^6 TCID ₅₀ chủng VC5 + 2×10^6 TCID ₅₀ chủng TX7	2 mL nhỏ mũi + 2 mL tiêm bắp cổ	Ngày 90 thai kỳ	Triệu chứng lâm sàng, thể trạng, ăn uống, bệnh tích trên thai, số lượng thai chết, 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)					
Nhóm 3 (Đối chứng)	3	Tiêm PBS vô trùng (2 mL, tiêm bắp, 2 lần: ngày -35 và -14 trước phối)					

2.3. HÓA CHẤT VÀ THIẾT BỊ CHỦ YẾU SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU

2.3.1. Hóa chất

Sử dụng các loại vật, tư và hóa chất được cung cấp bởi các hãng Gibco (Mỹ), Thermo Fisher Scientific (Mỹ), Promega (Mỹ).

Xuất xứ Gibco (Mỹ): Huyết thanh bào thai bò (FBS), môi trường Eagle's Minimum Essential Medium (E-MEM), HEPES, Trypsin EDTA, Kháng sinh Pen/strep.

Xuất xứ Thermo Fisher Scientific (Mỹ): Phosphate Buffered Saline (PBS), Kit tách chiết DNA MagMAX Viral Pathogen Kit, Kit ELISA PrioCHECK™ Porcine Parvovirus Ab Plate Kit, Master mix cho phản ứng PCR, Master mix cho phản ứng Realtime-PCR, Agarose, Ethidium bromide, Binary ethylenimine, Sodium thiosulphate

Xuất xứ Promega (Mỹ): Vector tạo dòng pGEMT.

Cặp mồi dùng trong phản ứng PCR được tổng hợp tại công ty IDT - Integrated DNA Technologies

2.3.2. Thiết bị chủ yếu

- Sử dụng các trang thiết bị tại phòng Công nghệ sinh học – Phân viện Thú y miền Trung như máy PCR, Realtime – PCR, tủ cấy an toàn sinh học cấp II, tủ ẩm CO₂, kính hiển vi, máy ly tâm lạnh dùng cho eppendorf 1,5ml, máy ly tâm lạnh dành cho falcon 15ml, bể ổn nhiệt, máy đọc ELISA, máy rửa ELISA....

- Khu vực nuôi động vật thí nghiệm đạt chuẩn GLP - Phân viện Thú y miền Trung.

2.4. PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ SỐ LIỆU

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Dữ liệu thu thập được trong thí nghiệm xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp, TCID₅₀, hiệu giá HI, hiệu giá ELISA được xử lý bằng phân tích mô hình tuyến tính tổng quát (General Linear Model – GLM) kết hợp

với kiểm định Turkey trên phần mềm Minitab18 nhằm đánh giá sự khác biệt có ý nghĩa. Tỷ lệ nhiễm PPV được phân tích thống kê bằng phương pháp kiểm định Chi-square.

2.5. 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 phát triển nông thôn). 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

CHƯƠNG III

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. PHÂN LẬP PARVOVIRUS GÂY BỆNH KHÔ THAI TỪ CÁC MẪU BỆNH PHẨM ĐIỂN HÌNH Ở CÁC ĐỊA PHƯƠNG KHÁC KHAU

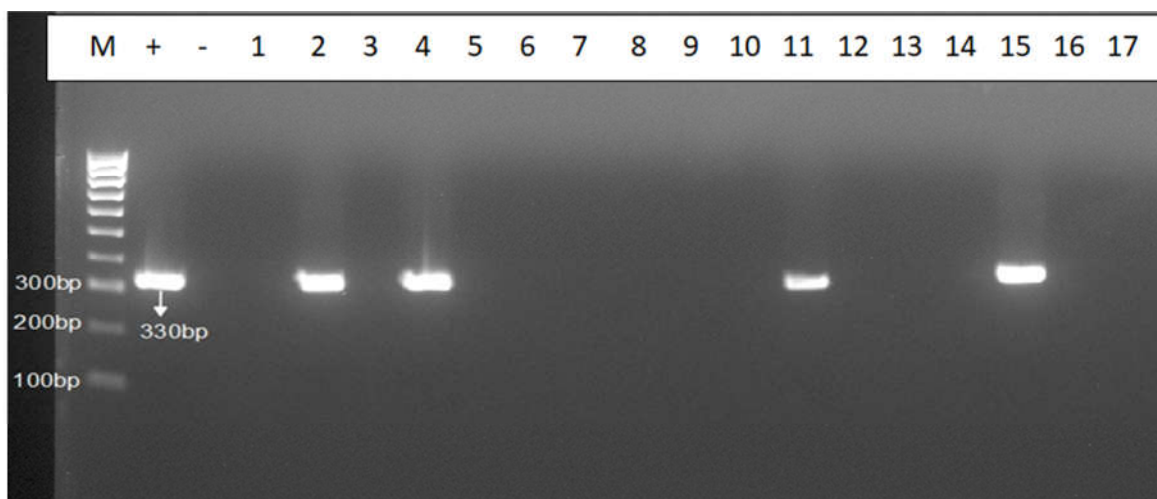
3.1.1. Kết quả xác định mẫu dương tính với Parvovirus

Trong nghiên cứu này, 392 mẫu bao gồm 360 mẫu huyết thanh và 32 mẫu bệnh phẩm phôi thai, được thu thập từ sáu tỉnh Thái Bình, Thanh Hóa, Bình Định, Đắk Lắk, Đồng Nai, Bình Dương (Bảng 3.1). Các địa phương được lựa chọn thu mẫu đều có quy mô chăn nuôi lợn cao trong cả nước (Bảng 2.1) và thuộc các vùng địa lý khác nhau của Việt Nam.

Bảng 3.1. Kết quả thu mẫu

Địa phương	Số lượng mẫu thu được
Thái Bình	60 (60 mẫu huyết thanh)
Thanh Hóa	63 (60 mẫu huyết thanh, 3 mẫu phôi thai)
Bình Định	60 (60 mẫu huyết thanh)
Đắk Lắk	69 (60 mẫu huyết thanh, 9 mẫu phôi thai)
Đồng Nai	70 (60 mẫu huyết thanh, 10 mẫu phôi thai)
Bình Dương	70 (60 mẫu huyết thanh, 10 mẫu phôi thai)
Tổng	392 (360 mẫu huyết thanh, 32 mẫu phôi thai)

Để phát hiện mẫu dương tính với PPV, phương pháp PCR nhân lên đoạn gen NS1 được sử dụng. Kết quả cho thấy sản phẩm PCR thu được có kích thước khoảng 300bp, phù hợp với kích thước công bố trong nghiên cứu của Lyoo và cộng sự (2001). Hình ảnh điện di sản phẩm PCR trên gel agarose cho thấy băng DNA rõ nét, không xuất hiện sản phẩm không đặc hiệu (Hình 3.1). Điều này cho thấy phương pháp khuếch đại đoạn gen NS1 được lựa chọn là hoàn toàn phù hợp, phản ứng có độ đặc hiệu cao và kết quả đáng tin cậy.



Hình 3.1. Kết quả 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 (Mẫu PCR không có DNA khuôn); 1-17: Mẫu PCR với DNA tách chiết từ huyết thanh hoặc bệnh phẩm thu được

Kết quả PCR cho thấy 32/392 mẫu dương tính với PPV, tương ứng với tỷ lệ 8,2%. Bảng kết quả chi tiết về các mẫu dương tính được trình bày tại Phụ lục 5.

Bảng 3.2. Tỷ lệ nhiễm PPV theo địa phương

Địa phương	Tổng số mẫu	Mẫu dương tính với PPV	Tỷ lệ (%)
Thái Bình	60	5	8,3
Thanh Hóa	63	3	4,8
Bình Định	60	4	6,7
Đắk Lắk	69	6	8,7
Đồng Nai	70	7	10
Bình Dương	70	7	10
Tổng	392	32	8,2

Từ kết quả Bảng 3.2 và phân tích thống kê bằng kiểm định Chi-square cho thấy sự khác biệt về tỷ lệ nhiễm PPV giữa các địa phương không có ý nghĩa thống kê ($\chi^2 = 1,81$; $df = 5$; $p = 0,875$). Cụ thể, tỷ lệ nhiễm dao động trong khoảng hẹp, từ 4,8% tại Thanh Hóa đến 10,0% tại Đồng Nai và Bình Dương, trong khi tỷ lệ trung bình toàn bộ mẫu khảo sát là 8,2%. Mặc dù có sự chênh lệch tuyệt đối về tỷ lệ giữa các địa phương, giá trị $p > 0,05$ cho thấy những khác biệt này có thể xuất hiện do yếu tố ngẫu nhiên hơn là do sự khác biệt thực sự về dịch tễ học. Kết quả này cho thấy rằng sự lưu hành của PPV ở các địa phương khảo sát mang tính phân bố tương đối đồng đều, chưa ghi nhận được ổ dịch đặc trưng hay sự tập trung bất thường theo vùng địa lý trong phạm vi nghiên cứu. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Streck và cộng sự (2011) tại Brazil, khi phân tích trên diện rộng cũng cho thấy PPV lưu hành phổ biến nhưng tỷ lệ nhiễm giữa các khu vực không có sự khác biệt rõ rệt. Một số khảo sát tại Trung Quốc (Yang và cộng sự, 2012) cũng ghi nhận tỷ lệ nhiễm dao động từ 5–12% giữa các tỉnh, nhưng sự khác biệt chưa đạt mức ý nghĩa thống kê. Ngược lại, nghiên cứu của Oh và cộng sự (2009) tại Hàn Quốc cho thấy sự khác biệt đáng kể về tỷ lệ lưu hành PPV giữa các vùng, được cho là liên quan đến sự khác biệt trong quy mô chăn nuôi và mức độ áp dụng biện pháp phòng bệnh.

Nhiều nghiên cứu trên thế giới cũng sử dụng phương pháp nhân lên đoạn gen NS1 để xác định tỷ lệ nhiễm PPV. Lyoo đã phát hiện Parvovirus trong 5/34 mẫu (14,7%) vào năm 1999 và 2/27 mẫu (7,4%) vào năm 2000 bằng phương pháp PCR nhân lên đoạn gen NS1 có kích thước 330bp (Lyoo và cộng sự, 2001). Tại Argentina, Serena cũng sử dụng PCR để khuếch đại đoạn gene NS1, phát hiện 17/131 mẫu dương tính với Parvovirus (12,97%) (Serena và cộng sự, 2019). Tương tự, nghiên cứu tại Nam Ấn Độ cũng xác định 8/56 mẫu lợn dương tính với Parvovirus (14,3%) bằng việc PCR sử dụng gene này (Parthiban và cộng sự, 2022). Nghiên cứu tại Canada trên 586 mẫu huyết thanh và 164 mẫu phổi được thu thập từ năm 1996 đến 2013 tại Hoa Kỳ và Canada. Phát hiện PPV ở 48,8% (286/586) mẫu huyết thanh và 56,7% (93/164) dương tính với PPV trong mô phổi qua kết quả PCR (Opriessnig và cộng sự, 2014).

Tại Việt Nam, một số báo cáo trước đây cũng ghi nhận tỷ lệ nhiễm PPV dao động theo tỉnh nhưng chưa chứng minh được sự phân bố dịch tễ đặc thù theo vùng. Bằng phương pháp PCR nhiều tác giả đã đưa ra tỷ lệ nhiễm PPV dao động từ 24,4%–61,6% vào năm 2017 và 3%–65% vào năm 2021 (Nguyen và cộng sự, 2022; Thuy và cộng sự, 2021). Tác giả Hồ Đình Chúc sử dụng phương pháp HI để phát hiện kháng thể PPV. Kết quả xác định tỷ lệ dương tính với kháng thể kháng PPV lần lượt là 10,5%-26,7% ở miền Bắc, 30% ở miền Nam (Hồ Đình Chúc, 1993). Một nghiên cứu khác cũng xác định tỷ lệ nhiễm PPV bằng phương pháp huyết thanh học và đưa ra kết quả 21,5% ở miền Trung (Phạm Hùng, 1999).

Trong phạm vi nghiên cứu này, tỷ lệ dương tính với PPV cũng được phân tích theo loại mẫu thu thập và tình trạng sinh sản của lợn. Kết quả được trình bày chi tiết trong Bảng 3.3, Bảng 3.4.

Bảng 3.3. Tỷ lệ nhiễm PPV theo loại mẫu bệnh phẩm

Địa phương	Mẫu huyết thanh		Mẫu bệnh phẩm phôi thai	
	Tổng số	Mẫu dương tính với PPV	Tổng số	Mẫu dương tính với PPV
Thái Bình	60	5/60 (8,33%)	0	0
Thanh Hóa	60	3/60 (5%)	3	0/3 (0%)
Bình Định	60	4/60 (6,67%)	0	0
Đắk Lắk	60	5/60 (8,33%)	9	1/9 (11,11%)
Đồng Nai	60	5/60 (8,33%)	10	2/10 (20%)
Bình Dương	60	7/60 (11,67%)	10	0/10 (0%)
Tổng	360	29/360 (8,06%)	32	3/32 (9,38%)

Bảng 3.4. Tỷ lệ nhiễm PPV theo đặc điểm lợn mẹ

Địa phương	Lợn mang thai lần đầu		Lợn đã sinh sản	
	Tổng số	Mẫu dương tính với PPV	Tổng số	Mẫu dương tính với PPV
Thái Bình	20	1/20 (5%)	40	4/40 (10%)
Thanh Hóa	18	0/18 (0%)	45	3/45 (6,67%)
Bình Định	15	0/15 (0%)	45	4/45 (8,89%)
Đắk Lắk	19	1/19 (5,26%)	50	5/50 (10%)
Đồng Nai	17	1/17 (5,88%)	53	6/53 (11,32%)
Bình Dương	20	2/20 (10%)	50	5/50 (10%)
Tổng	109	5/109 (4,59%)	283	27/283 (9,54%)

Phân tích số liệu ở Bảng 3.3 cho thấy tỷ lệ dương tính với PPV ở mẫu huyết thanh (8,06%) và bệnh phẩm phôi thai (9,38%) không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($\chi^2 = 0,00$; $df = 1$; $p = 1,000$; Fisher's exact test $p = 0,736$). Tương tự, ở Bảng 3.4, tỷ lệ nhiễm PPV ở lợn đã sinh sản (9,54%) cao hơn so với nhóm lợn mang thai lần đầu (4,59%), nhưng sự khác biệt này cũng không đạt mức ý nghĩa thống kê ($\chi^2 = 1,96$; $df = 1$; $p = 0,162$; Fisher's exact test $p = 0,148$). Kết quả này cho thấy rằng trong phạm vi cỡ mẫu khảo sát hiện tại, loại mẫu bệnh phẩm và đặc điểm sinh sản của lợn mẹ chưa chứng minh được vai trò rõ rệt trong việc làm thay đổi tỷ lệ nhiễm PPV, mặc dù có xu hướng tỷ lệ cao hơn ở nhóm lợn đã sinh sản.

Những kết quả này phù hợp với một số báo cáo quốc tế, trong đó PPV được ghi nhận lưu hành phổ biến nhưng sự khác biệt về tỷ lệ dương tính giữa các nhóm khảo sát hoặc giữa các địa phương không phải lúc nào cũng đạt ý nghĩa thống kê (Streck et al., 2011; Hao et al., 2011; Yang et al., 2012). Streck và cộng sự (2011) cho thấy PPV lưu hành rộng khắp, song mức độ khác biệt giữa các khu vực không phải lúc nào cũng rõ rệt. Hao và cộng sự (2011) khi khảo sát tại Trung Quốc cũng ghi nhận tỷ lệ dương tính dao động từ mức thấp tới trên 10% tùy tỉnh, nhưng nhiều so sánh cục bộ không đạt ý

nghĩa khi cỡ mẫu hạn chế. Yang và cộng sự (2012) cũng báo cáo kết quả tương tự với sự biến động về tỷ lệ dương tính song chưa xác định được mối liên hệ chắc chắn với yếu tố dịch tễ cụ thể. Ngược lại, một số nghiên cứu khác như của Oh và cộng sự (2009) ghi nhận sự khác biệt có ý nghĩa giữa các vùng, được giải thích do yếu tố đặc thù dịch tễ, quy mô đàn, lịch sử tiêm chủng và phương pháp lấy mẫu.

Trong nghiên cứu hiện tại, số lượng mẫu phôi thai còn hạn chế ($n = 32$) và số lượng lợn mang thai lần đầu ($n = 109$) cũng thấp so với yêu cầu cỡ mẫu tối thiểu để phát hiện chênh lệch nhỏ ở mức ý nghĩa thống kê. Phân tích ước tính cho thấy, để phát hiện chênh lệch tỷ lệ nhiễm khoảng 5% với độ tin cậy 95% và power 80%, cần tối thiểu trên 400 mẫu cho mỗi nhóm so sánh. Do đó, việc không tìm thấy sự khác biệt có ý nghĩa trong nghiên cứu này có thể liên quan đến hạn chế về cỡ mẫu hơn là phản ánh bản chất dịch tễ học của PPV. Tuy nhiên, xu hướng tỷ lệ cao hơn ở lợn đã sinh sản có thể là một chú ý quan trọng. Để nghiên cứu rõ hơn, những khác biệt trong nhóm lợn nái đã sinh sản và lợn nái mang thai lần đầu cần được khảo sát dịch tễ với cỡ mẫu đủ lớn và phương pháp phân tích đa biến nhằm kiểm soát tốt hơn các yếu tố gây nhiễu.

3.1.2. Kết quả phân lập parvovirus trên tế bào PK-15

3.1.2.1. Kết quả xác định mẫu đủ điều kiện phân lập

Tất cả 32 mẫu dương tính với PPV được xét nghiệm 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, xét nghiệm PCV theo TCVN 8400-36:2015, xét nghiệm CSF theo TCVN 8400-47:2019, xét nghiệm ASF theo TCVN 8400-41:2019. 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).

Kết quả thu được 32 mẫu dương tính với PPV đều cho âm tính với CSFV, PRRSV và PCV2, đáp ứng đủ yêu cầu để thực hiện các bước phân lập PPV tiếp theo.

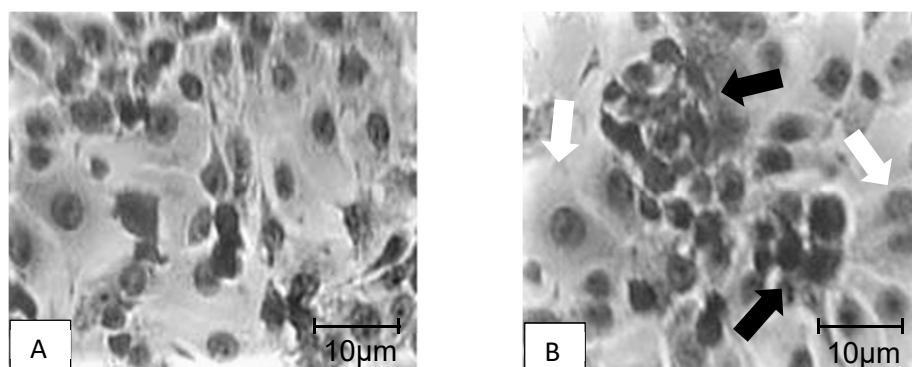
3.1.2.2. Kết quả quan sát bệnh tích tế bào

Kết quả quan sát CPE trong quá trình nuôi cấy 32 mẫu dương tính với PPV trên dòng tế bào PK-15 cho thấy tất cả các mẫu đều xuất hiện CPE trong vòng 7 ngày sau gây nhiễm (Bảng 3.5). Sau 24 giờ nuôi cấy, virus xâm nhập vào tế bào gây ra trên tế bào như: hình dạng tế bào không đều, nhân vón cục, tạo hạt (Hình 3.2). Trong những ngày tiếp theo, virus tiếp tục nhân lên và mức độ tổn thương tế bào tăng dần. Sau 5 ngày gây nhiễm, virus đã gây phá hủy diện tích tế bào lớn, tạo ra những khoảng trống rõ rệt trên bề mặt bình nuôi cấy (Hình 3.3).

Các đặc điểm bệnh tích tế bào quan sát được trong nghiên cứu này hoàn toàn phù hợp với những mô tả về bệnh tích tế bào do PPV gây ra trên tế bào PK15 trong nhiều nghiên cứu trước đó. Một nghiên cứu tại Trung Quốc cũng kết luận rằng tế bào PK-15 có thành tế bào trở nên mờ, tế bào co cụm và dần bong ra sau 48 giờ gây nhiễm với PPV (Wang và cộng sự, 2024). Một nghiên cứu khác về những thay đổi hình thái và phân tử của dòng tế bào thận lợn (PK-15) khi bị nhiễm PPV cho thấy PPV đã gây ra các đặc điểm bao gồm: ngưng tụ chất nhiễm sắc, hình thành thể vùi, tế bào bị phá hủy (Zhang và cộng sự, 2015). Như vậy, Parvovirus đã xâm nhập thành công và phát triển tốt trên tế bào PK-15.

Bảng 3.5. Kết quả quan sát bệnh tích tế bào

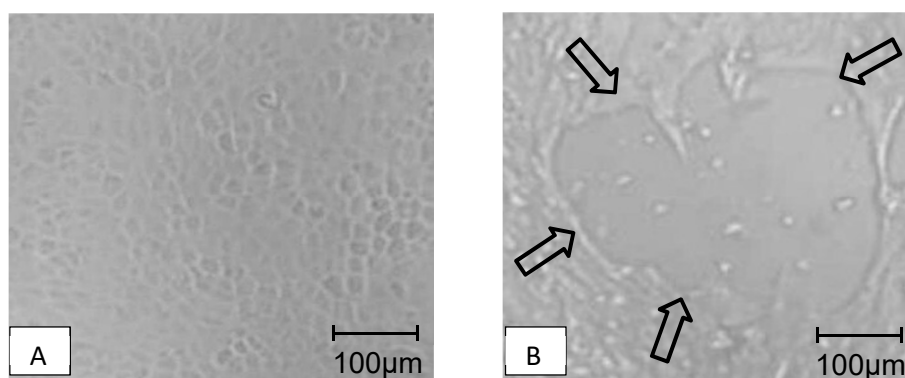
Tỉnh	Tổng số mẫu	Số mẫu dương tính với PPV	Số mẫu quan sát được CPE
Thái Bình	60	5	5
Thanh Hóa	63	3	3
Bình Định	60	4	4
Đắk Lắk	69	6	6
Đồng Nai	70	7	7
Bình Dương	70	7	7
Tổng số	392	32	32



**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 được 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 chai nuôi cấy

Tất cả 32 chủng PPV phân lập được trong nghiên cứu này đều ghi nhận những biểu hiện bệnh tích tế bào rõ rệt trên tế bào PK-15 sau khi gây nhiễm. Kết quả quan sát bệnh tích tế bào chi tiết cho từng chủng được trình bày đầy đủ tại Phụ lục 6. Kết quả này đã bước đầu xác nhận 32 chủng PPV đã xâm nhiễm và phát triển thành công trên tế bào PK-15. Tuy nhiên để khẳng định chính xác virus đã được phân lập thành công, số lượng virus cần được chứng minh tăng lên qua các đời nuôi cấy.

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

Phân tích định lượng bằng kỹ thuật Realtime PCR cho thấy số lượng virus trong các mẫu đều có xu hướng tăng lên rõ rệt sau mỗi lần cấy chuyển. Trong tất cả 32 mẫu nghiên cứu, số lượng bản sao virus đều tăng lên theo từng đời nuôi cấy (Bảng 3.6). Nhiều tác giả trên thế giới cũng dùng phương pháp tương tự để định lượng số bản sao virus trong mẫu. Miao đã xây dựng đường chuẩn với đoạn gen NS1 của PPV. Và từ kết quả Realtime-PCR, tác giả đã đánh giá số lượng virus có trong tim, gan, phổi, thận, lách của lợn mẹ nhiễm PPV (Miao và cộng sự, 2009). Song cũng phát triển phản ứng Realtime-PCR nhân lên đoạn gen NS1 để xác định số lượng PPV trong mẫu xét nghiệm (Song và cộng sự, 2010). Wang sử dụng phản ứng Realtime – PCR để khảo sát sự phát triển của PPV trên tế bào PK15 (Wang và cộng sự, 2024).

Tổng hợp kết quả quan sát bệnh tích tế bào và phân tích sự gia tăng số lượng virus trong quá trình nuôi cấy cho thấy toàn bộ 32 mẫu dương tính PPV đều gây nên những bệnh tích tế bào đặc trưng của Parvovirus trên dòng tế bào PK-15 và có sự gia tăng số lượng virus qua các đời nuôi cấy. Những kết quả này đã đồng thời khẳng định rằng tất cả 32 chủng PPV đã được phân lập thành công và có khả năng nhân lên trên dòng tế bào PK-15 trong điều kiện nuôi cấy in vitro.

Bảng 3.6. 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
	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

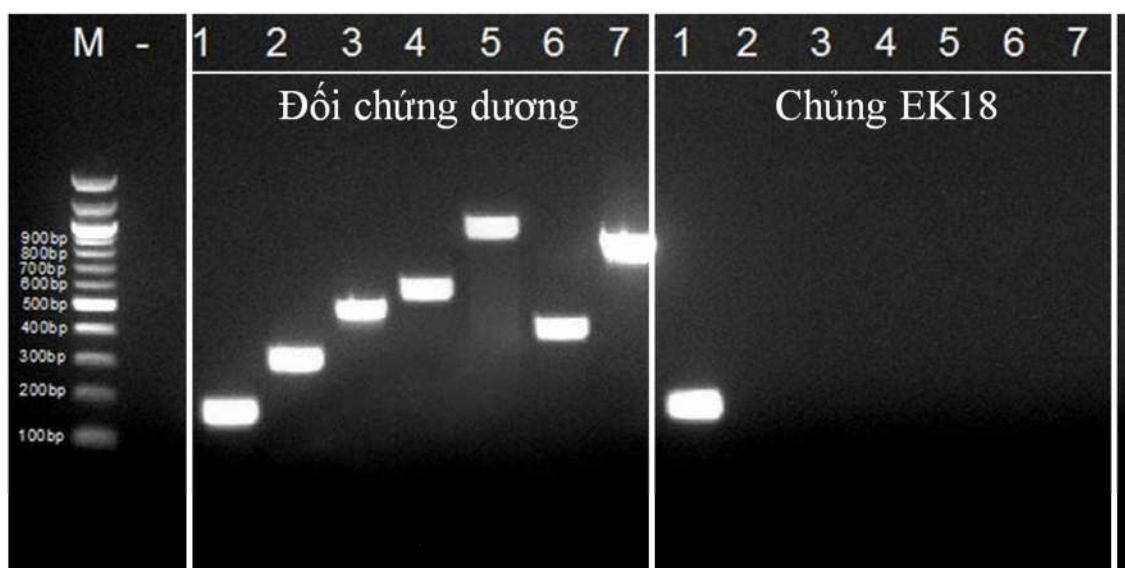
Tỉnh	Mẫu	Trung bình logarit số lượng bản sao virus $\pm$ SD			Nhóm so sánh trung bình Turkey (95% CI, n = 9)
		P1 (n = 3)	P2 (n = 3)	P3 (n = 3)	
Đắk Lắk	MD28	2,83 $\pm$ 0,04	4,33 $\pm$ 0,09	4,63 $\pm$ 0,08	B, C, D
Đồng Nai	VC5	5,02 $\pm$ 0,13	6,52 $\pm$ 0,04	6,92 $\pm$ 0,08	A
	VC10	4,23 $\pm$ 0,07	5,73 $\pm$ 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
	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

Kết quả phân tích phương sai (Phụ lục 11) cho thấy sự khác biệt về số lượng bản sao giữa các mẫu là có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$), chứng tỏ yếu tố nguồn gốc mẫu có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng nhân lên của virus trong điều kiện nuôi cấy. Phân tích so sánh cặp Tukey chỉ ra rằng các mẫu VC5 và TX7 có số lượng bản sao cao nhất, được xếp vào nhóm A, khác biệt rõ rệt so với nhiều mẫu khác thuộc nhóm C và D có mức nhân lên thấp hơn. Điều này chứng minh rằng VC5 và TX7 có khả năng nhân lên mạnh mẽ, thể hiện sự thích nghi tốt với môi trường nuôi cấy. Do đó, hai mẫu này có tiềm năng trở thành đối tượng nghiên cứu sâu hơn nhằm tìm hiểu đặc điểm di truyền, cơ chế sao chép, cũng như khả năng ứng dụng trong phát triển vắc xin phòng bệnh.

3.2. XÁC ĐỊNH TYPE PARVOVIRUS



Hình 3.4. Kết quả định type chủng virus EK18 bằng phản ứng PCR

M: 100bp plus DNA ladder (Gold Biotechnology, Mỹ); - : Đối chứng âm (Mẫu PCR không có DNA khuôn); Đối chứng dương 1-7 (Mẫu 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.

Các type của PPV được xác định thông qua kết quả của phản ứng PCR với 7 cặp mồi đặc hiệu cho 7 type (Bảng 2.2). Kết quả điện di sản phẩm PCR thu được như hình 3.4. Hình 3.4 cho thấy, đối với mẫu đối chứng dương sản phẩm PCR có băng rõ nét, không có băng phụ và đúng kích thước như mô tả của Kim và cộng sự, 2022 (Bảng

2.2). Mẫu phân lập được trong nghiên cứu này chỉ có băng DNA của sản phẩm PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu với PPV1, đối với các type khác không có băng DNA được phát hiện. Tất cả 32 mẫu Parvovirus phân lập được trong nghiên cứu này đều được xác định thuộc type 1 (Phụ lục 7).

Mặc dù PPV1 được nghiên cứu lần đầu tiên vào năm 1967 (Cartwright và Huck, 1967). Tuy nhiên, cho đến gần đây các chủng mới PPV1 vẫn được phân lập. Năm 2022, một nghiên cứu tại miền Nam Ấn Độ đã phân lập được các chủng PPV1 với các biến thể trên gen VP2: biến thể ở vị trí 215 (I đến T) ở cả hai phân lập, biến thể ở vị trí 228 (Q đến E) ở phân lập T5 và các biến thể ở vị trí 59 (L đến M) và 314 (K đến E) ở phân lập L17 (Parthiban và cộng sự, 2022). Gần đây, một nghiên cứu vào năm 2024 đã phát hiện hai chủng PPV1 mới (HLJ202108-Y và SDLC202109) từ miền bắc Trung Quốc, hai chủng này có ba vị trí axit amin thay đổi (K195R, K562R và S578P) trong protein NS1 (Deng và cộng sự, 2024). Vì vậy việc phân lập và nghiên cứu các chủng PPV1 vẫn rất cần thiết. Đặc biệt với mục đích phát triển vắc xin, việc phân lập được chủng PPV1 có tỷ lệ phổ biến cao sẽ đem lại hiệu quả phòng bệnh tốt hơn.

Trong những năm gần đây, một số nghiên cứu tại Việt Nam đã ghi nhận sự lưu hành của các type PPV1 đến PPV4. Nghiên cứu của Nguyen và cộng sự, 2022 thực hiện trên 174 mẫu dương tính với PCV2 thu thập trong giai đoạn 2017–2021 cho thấy tỷ lệ đồng nhiễm với các type PPV khá cao, với 24,1% mẫu nhiễm PPV1, 32,2% nhiễm PPV2, 36,8% nhiễm PPV3 và 32,2% nhiễm PPV4. Tuy nhiên, các mẫu trong nghiên cứu này được lựa chọn từ các ca đã xác định dương tính với PCV2. Một nghiên cứu khác của Trần Văn Trung, 2024 tiến hành tại khu vực miền Trung Việt Nam trên 146 mẫu thu thập từ lò mổ thuộc 7 tỉnh (Quảng Bình, Quảng Trị, Thừa Thiên Huế, Đà Nẵng, Quảng Nam, Quảng Ngãi và Bình Định) cho thấy tỷ lệ mẫu dương tính với PPV là 74,7%. Trong đó, tỷ lệ phát hiện PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 lần lượt là 52,7%; 56,2%; 5,5% và 8,2%. Tuy nhiên, các kết quả này chủ yếu được ghi nhận trên mẫu từ lò giết mổ – nơi chủ yếu xử lý lợn thịt hoặc lợn nái bị loại thải – trong điều kiện vệ sinh không đảm bảo vô trùng (Dang-Nguyen và cộng sự, 2010). Do vậy, tỷ lệ nhiễm PPV

cao được ghi nhận trong các nghiên cứu này có thể chịu ảnh hưởng bởi yếu tố lựa chọn mẫu và điều kiện thu thập.

Ngược lại, trong nghiên cứu này, các mẫu được thu thập tại các trang trại và hộ chăn nuôi có mục đích sản xuất giống, trong điều kiện kiểm soát tốt hơn về dịch bệnh và vệ sinh thú y. Kết quả cho thấy tỷ lệ nhiễm PPV thấp hơn đáng kể (8,2%), và chỉ phát hiện sự hiện diện của type PPV1. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Huỳnh Thị Mỹ Lệ và cộng sự (2020), khi phân tích 10 mẫu huyết thanh từ các trang trại chăn nuôi tại sáu tỉnh miền Bắc Việt Nam (Hà Nội, Vĩnh Phúc, Bắc Ninh, Hưng Yên, Hòa Bình và Hải Dương), tất cả các mẫu đều thuộc type PPV1 khi phân tích gen NS1. Tại Ấn Độ, Parthiban và cộng sự, 2022 cũng ghi nhận kết quả 8/56 mẫu phôi sảy thai và chết non thu thập từ các trang trại có tổ chức tại Tamil Nadu và Kerala đều dương tính với PPV1, không phát hiện sự hiện diện của các type khác. Một nghiên cứu tại Argentina công bố kết quả xác định tỷ lệ nhiễm PPV trong 131 xác ướp hoặc thai chết lưu do sinh thường ở lợn nái từ một trang trại lợn thương mại của Argentina sử dụng vắc xin thương mại. Kết quả PCR cho thấy 17/131 ca dương tính với PPV (12,9%). Tất cả các mẫu virus đều thuộc nhóm PPV1 (Serena và cộng sự, 2019).

Trên thế giới, tỷ lệ nhiễm PPV cho thấy sự khác biệt rõ rệt giữa các vùng địa lý, đối tượng khảo sát và phương pháp thu mẫu. Một nghiên cứu tại Hungary đã xác định tỷ lệ nhiễm các chủng PPV với kết quả là 0,5% cho PPV1, 6,4% cho PPV2, 9,7% cho PPV3, và 6,4% cho PPV4 (Cságola và cộng sự, 2012). Tại Tây Romania, một nghiên cứu khác đã xác định tỷ lệ nhiễm PPV2 ở lợn nhà là 25%; lợn rừng là 10,3%; tỷ lệ nhiễm với PPV4 ở lợn nhà là 10%, lợn rừng là 0,95% (Cadaru và cộng sự, 2013). Kết quả xác định tỷ lệ nhiễm PPV tại các lò mổ ở Đức, năm 2013 cho thấy 60% mẫu tim và 61% mẫu amidan nhiễm PPV1 (Streck và cộng sự, 2013). Một nghiên cứu tại Ba Lan cho tỷ lệ nhiễm là 0% đối với PPV1; 19% đối với PPV2; 7,7% đối với PPV3; 2,4% đối với PPV4; 4% đối với PPV5 và 6,1% đối với PPV6 (Cui và cộng sự, 2017). Tại Hàn Quốc, khảo sát trên tổng cộng có 286 mẫu huyết thanh, 481 phổi và 281 mẫu phân được thu thập từ năm 2018 đến 2020 cho thấy tỷ lệ nhiễm gồm: PPV1 (4,5%), PPV2

(22,1%), PPV3 (11,6%), PPV4 (8,2%), PPV5 (14,3%), PPV6 (21,5%), PPV7 (14,2%) (Kim và cộng sự, 2022).

Hiện nay, kiểu gen PPV1 là kiểu gen phổ biến nhất ở hầu hết các quốc gia trên thế giới (Streck và Truyen, 2020). PPV1 là mầm bệnh được chứng minh rõ ràng và được ghi nhận là có liên quan nhiều nhất đến tình hình suy giảm sinh sản ở lợn tại nhiều quốc gia (Zhang và cộng sự, 2010). PPV1 là loại virus được nghiên cứu nhiều nhất trên toàn cầu và là nguyên nhân quan trọng gây ra cái chết của phôi thai ở lợn (Parthiban và cộng sự, 2022).

Mặt khác các loại vắc xin trên thị trường hiện nay, chủ yếu phát triển dựa trên chủng PPV1. Vắc xin Porcilis© Parvo (Vắc xin vô hoạt - Hà Lan), Eryseng© Parvo (Vắc xin vô hoạt - Tây Ban Nha), ReproCyc© ParvoFLEX (Vắc xin tiểu phần - Đức) đều sử dụng kháng nguyên từ chủng PPV1 (Vereecke và cộng sự, 2022). Nhiều nghiên cứu về vắc xin PPV tiểu phần cũng được thực hiện trên chủng PPV1. Cho đã tiến hành nghiên cứu phát triển vắc xin tiểu phần phòng bệnh do Parvovirus gây ra trên lợn sử dụng protein VP2 của chủng PPV1-28 (Cho và cộng sự, 2023). Một nghiên cứu khác của Ling cũng phát triển vắc xin tiểu phần từ protein VP2 của chủng PPV1 (Ling và cộng sự, 2023).

Các chủng PPV1 được phân lập trong nghiên cứu này có thể là nguồn chủng hữu ích cho nghiên cứu sâu hơn về sản xuất vắc xin Parvovirus tại Việt Nam.

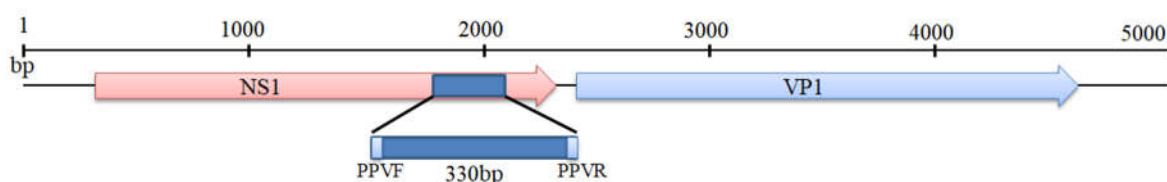
3.3. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH MỐI QUAN HỆ DI TRUYỀN PARVOVIRUS

3.3.1. Phân tích trình tự đoạn gen NS1

Sau khi đã phân lập thành công virus trên tế bào PK-15, những chủng phân lập được sẽ xác định mối quan hệ di truyền dựa trên trình tự đoạn gen NS1. Đoạn gen 330bp có vị trí từ 1.453 đến 1.782 trên gen NS1 (Hình 3.5), là vùng có độ bảo tồn cao giữa các chủng từ PPV1 – PPV6 và được dùng để ghi nhận tỷ lệ nhiễm PPV (Lyo và cộng sự, 2001). NS1 là protein không cấu trúc chính được bảo tồn cao và rất cần thiết cho quá trình sao chép DNA PPV. NS1 là một protein đa chức năng được đặc trưng bởi các hoạt động endonuclease, DNA helicase và ATPase và khả năng liên kết cộng

hóa trị với đầu 5' của DNA virus bộ gen (Xie và cộng sự, 2023). 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. Một nghiên cứu khác tại Trung Quốc năm 2024 cũng sử dụng cây phân loại 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 SDL202109) (Deng và cộng sự, 2024). Để phân tích tiến hóa di truyền của chủng PPV7 phân lập tại Phúc Kiến, Trung Quốc, trình tự gen NS1 cũng được sử dụng để phân tích mối quan hệ tiến hóa (Lyu và cộng sự, 2023)

Trong nghiên cứu này, trình tự gen NS1 cũng được sử dụng để phân tích mối quan hệ di truyền của các chủng phân lập được với các chủng tham chiếu trên Ngân hàng gen. Kết quả phân tích độ tương đồng trong trình tự nucleotide của đoạn gen NS1 từ 32 chủng phân lập cho thấy tỷ lệ tương đồng của các chủng với nhau là 100%. Trình tự đoạn gen NS1 của 32 chủng phân lập được trình bày tại Phụ lục 8. Vì tất cả trình tự đoạn gen NS1 của 32 chủng không có sự khác biệt nên trình tự gen của chủng VC5 và TX7 được lựa chọn để tiến hành phân tích.



Hình 3.5. Vị trí đoạn gen NS1 (330bp) trong bộ gen của Parvovirus
Chủng tham khảo: Chủng Kresse (Mã số GenBank: U44978)

Bảng 3.7. 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%

Trình tự đoạn gen NS1 của chủng VC5, TX7 tương đồng 99% với các chủng PPV1 từ Trung Quốc, Brasil. Trong đó, tương đồng cao nhất với chủng PPV1-0225-L-SD, phân lập tại Trung Quốc năm 2022 (Hình 3.6, Bảng 3.7).

Mặt khác, kết quả phân tích cây phân loại cũng cho thấy hai chủng VC5 và TX7 đều thuộc PPV1 (Hình 3.7). PPV1 là chủng có tỷ lệ phổ biến cao. 80% các chủng PPV trên thế giới đều thuộc PPV1 (Streck và cộng sự, 2011). Tại Việt Nam năm 2020, một nghiên cứu tại Việt Nam cho thấy 88,2% (60/68) mẫu huyết thanh thu thập từ các trang trại chăn nuôi ở sáu tỉnh, bao gồm Hà Nội, Vĩnh Phúc, Hưng Yên, Bắc Ninh, Hải Dương và Hòa Bình đều có chứa kháng thể kháng PPV1. Phân tích di truyền của 10 mẫu sử dụng gen mã hóa protein NS1, đã xác nhận các chủng này đều thuộc PPV1 (Huỳnh Thị Mỹ Lệ và cộng sự, 2020). Việc sử dụng chủng có tỷ lệ phổ biến cao để sản xuất vắc xin sẽ hứa hẹn đem lại hiệu quả phòng bệnh cao hơn. Như vậy các chủng PPV phân lập tại nghiên cứu này hoàn toàn phù hợp cho mục đích phát triển vắc xin và hứa hẹn sẽ đem lại hiệu quả phòng cao.

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

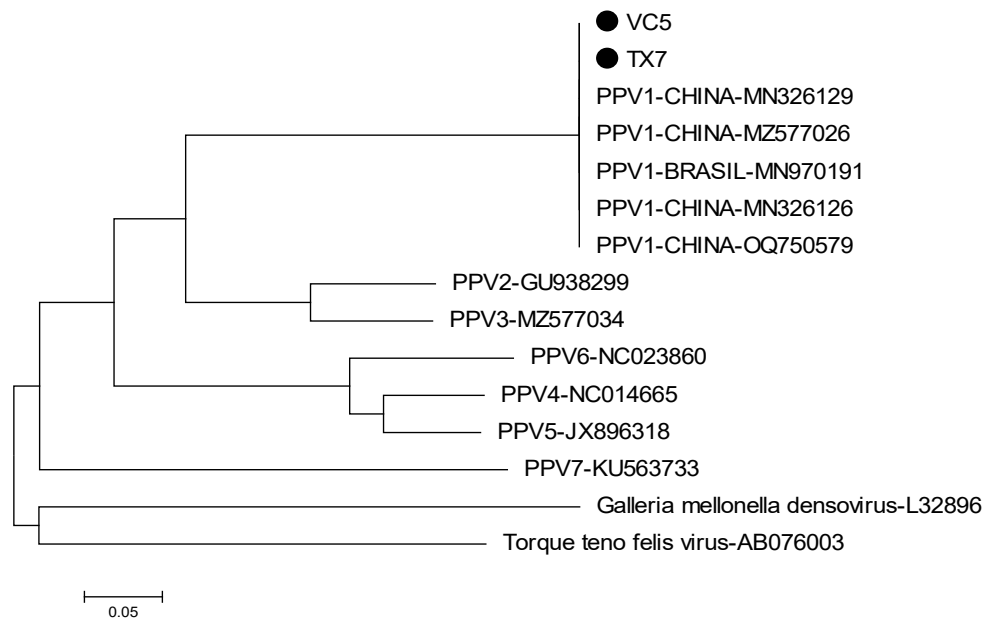
Sequence ID: [OQ750579.1](#) Length: 4248 Number of Matches: 1

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	CAAACCTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGTGAACCTTTCCATTTAATG	120		
Sbjct 1236	CAAACCTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGTGAACCTTTCCATTTAATG	1295		
Query 121	ACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGAAGCAGGAACTTTTCTAACCAAGTAA	180		
Sbjct 1296	ACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGAAGCAGGAACTTTTCTAACCAAGTAA	1355		
Query 181	ACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGGTCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAA	240		
Sbjct 1356	ACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGGTCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAA	1415		
Query 241	GCAAACAAATTGAACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTA	300		
Sbjct 1416	GCAAACAAATTGAACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTA	1475		
Query 301	GAATAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA	330		
Sbjct 1476	GAATAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA	1505		

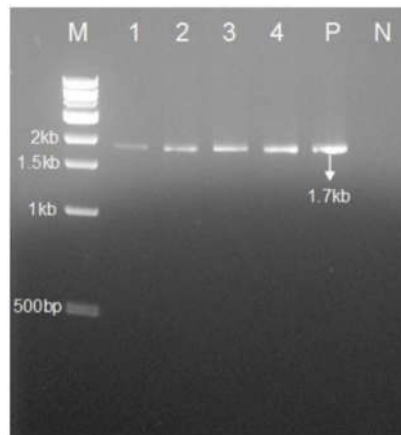
Hình 3.6. Kết quả BLAST trình tự nucleotide đoạn gen NS1 (330bp) của mẫu TX7 so với chủng tham chiếu PPV1-0225-L-SD (Mã số GenBank: OQ750579)



Hình 3.7. Cây phân loại dựa trên trình tự đoạn gen NS1

Cây phát sinh loài 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 liên kề (Neighbour-Joining) (Saitou và Nei, 1987), sử dụng độ tin cậy 1000 bootstrap (Felsenstein, 1985).

3.3.2. Phân tích gen VP2



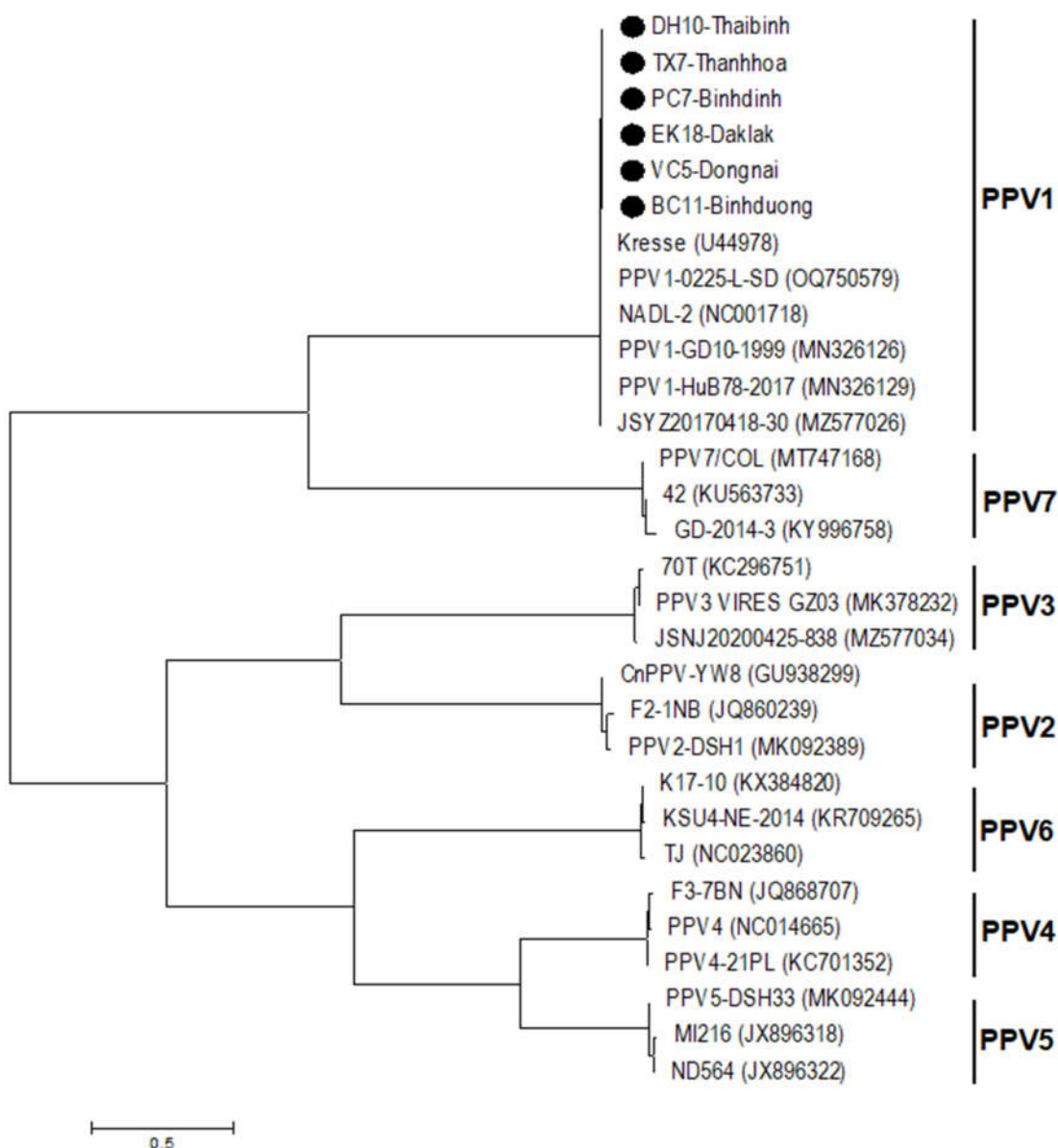
Hình 3.8. Kết quả PCR nhân lên gen VP2

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 (Mẫu PCR với DNA dương tính PPV - DNA Parvovirus từ Đại học Kangwon, Hàn Quốc), N: Đối chứng âm (Mẫu PCR không có DNA khuôn)

Gen VP2 được nhân lên với kích thước khoảng 1,7 kb , kết quả điện di sản phẩm PCR thu được như hình 3.8. Hình 3.8 cho thấy sản phẩm PCR có băng rõ nét, không có băng phụ và đúng kích thước như mô tả của Xu và cộng sự, 2013.

Protein VP2 là thành phần chủ yếu của vỏ capsid virus, chịu trách nhiệm cho tính kháng nguyên và quá trình lây nhiễm của virus. Gen VP2 mã hóa cho protein này, là mục tiêu quan trọng trong các nghiên cứu di truyền vì nó chứa các vùng gen biến đổi liên quan đến khả năng lây lan, độc lực, và tính sinh miễn dịch của virus (Strecker và cộng sự, 2015). Những nghiên cứu gần đây trên thế giới đã chứng minh rằng phân tích gen VP2 có thể xác định được sự khác biệt về mặt di truyền giữa các chủng Parvovirus và những thay đổi trên gen VP2 có thể ảnh hưởng đến độc lực của virus. Một nghiên cứu tại Trung Quốc dựa trên sự phân tích mối quan hệ phát sinh gen của gen VP2 đã kết luận chủng PPV-NE/09 là một chủng PPV đột biến mới phổ biến ở Trung Quốc. Phân tích gen VP2 cho thấy 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). Một nghiên cứu năm 2024 tại Trung Quốc 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. Kết quả cho thấy những biến đổi này có ảnh hưởng đến khả năng tăng sinh của PPV. Mặt khác các biến đổi này cũng được chứng minh là có ảnh hưởng đến độc lực của virus (Deng và cộng sự, 2024).



Hình 3.9. Cây phân loại dựa trên trình tự gen VP2

Cây phát sinh loài 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)

Trình tự gen VP2 của 32 chủng PPV phân lập trong nghiên cứu này sau khi phân tích cho kết quả tương đồng 100%. Vì không có sai khác trong trình tự gen VP2 của các chủng phân lập được, 6 trình tự từ 6 chủng thuộc 6 tỉnh khác nhau được lựa chọn để đăng ký trên ngân hàng gen NCBI với mã số từ OR263486 - OR263491 (Phụ lục 9). Cây phân loại cho thấy các chủng PPV có mối quan hệ gần nhất với chủng Kresse (phân lập từ Canada năm 1996) và chủng PPV1-0225-L-SD (phân lập từ Trung Quốc năm 2022) (Hình 3.9). Trong một nghiên cứu gần đây về so sánh khả năng bảo hộ của một số loại vắc xin thương mại phòng bệnh PPV. Vắc xin dựa trên chủng K22 PPV “Kresse - like” mang lại khả năng bảo vệ vượt trội khi công với chủng PPV-27a so với vắc xin thương mại dựa trên chủng giống NADL-2 và NADL (Kiss và cộng sự, 2020). Từ kết quả cây phân loại, ta thấy các chủng phân lập có mối quan gần nhất với chủng Kresse. Đây cũng có thể là một yếu tố để lựa chọn các chủng này cho mục đích phát triển vắc xin.

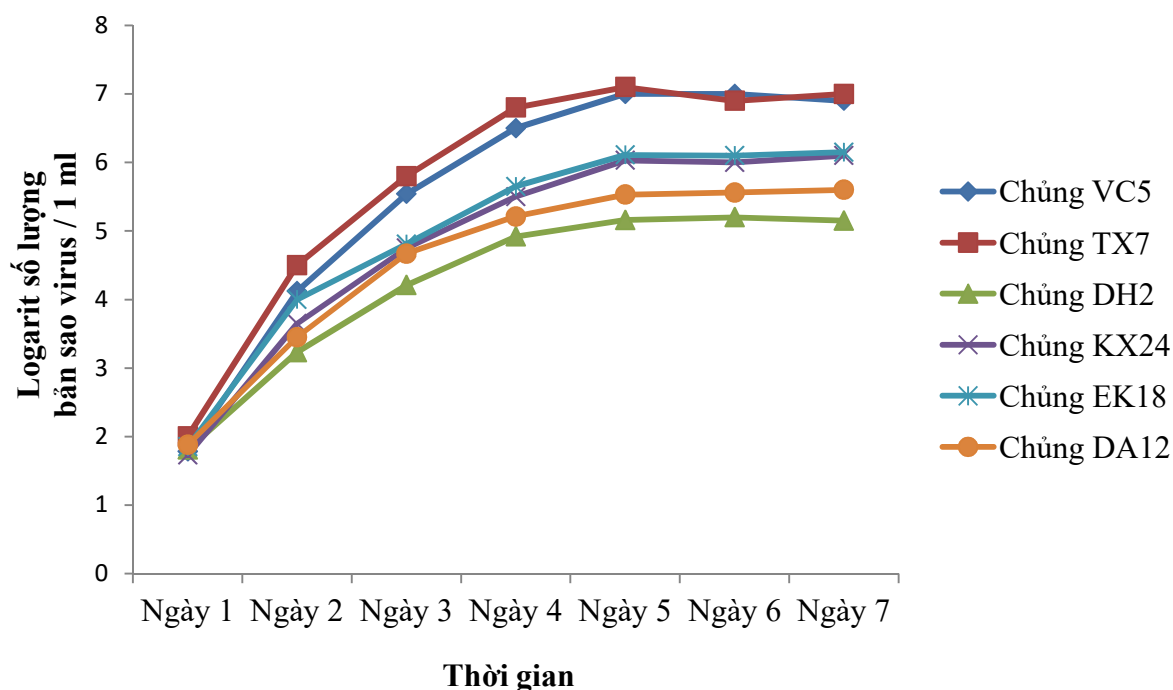
3.4. XÁC ĐỊNH MỘT SỐ ĐẶC TÍNH CỦA CÁC CHỦNG PARVOVIRUS

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

Sau khi tiến hành khảo sát, biểu đồ sinh trưởng của 32 chủng Parvovirus phân lập được trong nghiên cứu này được xác định như sau: Virus phát triển nhanh từ ngày 1 đến ngày 4, đạt đỉnh sinh trưởng tại ngày thứ 5, ổn định từ ngày 5 đến ngày 7 (Hình 3.10)

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

và ST (Cao và cộng sự, 2020). Trong nghiên cứu này, biểu đồ sinh trưởng cũng được xây dựng để đánh giá đặc tính sinh học của chủng Parvovirus phân lập được.



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

Trong nghiên cứu này, các chủng PPV được gây nhiễm lên dòng tế bào PK-15 với hệ số nhân (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). Quá trình nuôi cấy được thực hiện trong môi trường E-MEM bổ sung 5% FBS và 1% Penicillin – Streptomycin, duy trì ở 37°C và 5% CO₂.

Kết quả biểu đồ sinh trưởng của các chủng trong nghiên cứu này tương tự với các nghiên cứu trước đó. Trong nghiên cứu của Serena, để thu được lượng virus tối đa thực hiện nghiên cứu, PPV được nuôi cấy trên tế bào thận lợn trong 5 ngày (Serena và cộng sự 2019). Một nghiên cứu khác tại Trung Quốc đã xây dựng đường cong sinh trưởng của PPV trên tế bào ST. Kết quả số lượng virus đạt đỉnh sau 5 ngày (Deng và cộng sự, 2024). Một số nghiên cứu sử dụng tỷ lệ gây nhiễm cao hơn (MOI = 0,1) thì đạt được đỉnh sinh trưởng sớm hơn. Nghiên cứu của Wang xây dựng đường cong sinh trưởng

của PPV sử dụng tỷ lệ gây nhiễm $MOI = 0,1$, vì vậy đường cong sinh trưởng PPV đạt sớm hơn: PPV được nhân rộng nhanh chóng từ 6 giờ đến 24 giờ, đạt cực đại ở mức 36 giờ, ổn định ở mức 48–72 giờ (Wang và cộng sự, 2024). Một nghiên cứu khác cũng khảo sát biểu đồ sinh trưởng PPV trên tế bào ST và PK-15, PPV được gây nhiễm với $MOI = 0,1$. Kết quả không có sự khác biệt khi nuôi cấy giữa tế bào ST và PK-15 và đỉnh sinh trưởng đạt sau 60 giờ (Cao và cộng sự, 2020).

Kết quả biểu đồ sinh trưởng của các chủng PPV trong nghiên cứu này đã xác định được thời điểm thích hợp để thu nhận virus khi gây nhiễm với $MOI = 0,01$ trong môi trường E-MEM bổ sung 5% FBS và 1% Penicillin – Streptomycin, duy trì ở 37°C và 5% CO_2 . là vào ngày thứ năm sau gây nhiễm. Đây là cơ sở quan trọng cho việc lựa chọn thời điểm thu hoạch virus trong các thí nghiệm tiếp theo.

3.4.2. Xác định hiệu giá $TCID_{50}$

Tất cả 32 chủng PPV đã được phân lập thành công đều 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 cơ sở dữ liệu cho các nghiên cứu tiếp theo về khảo sát độc lực hoặc đánh giá đáp ứng miễn dịch. Kết quả xác định hiệu giá $TCID_{50}$ của các chủng Parvovirus phân lập được trong nghiên cứu này được trình bày chi tiết tại Bảng 3.8.

Bảng 3.8. Kết quả xác định $TCID_{50}$ của các chủng PPV

Tỉnh	Mẫu	Hiệu giá trung bình $TCID_{50}/1\text{ml} (\log_{10}) \pm \text{SD}$ (n = 3)	Nhóm so sánh trung bình Turkey (95% CI, n = 3)
Thái Bình	ĐH2	5.1 ± 0.1	D
	ĐH4	4.6 ± 0.1	E
	ĐH11	5.4 ± 0.1	C
	ĐH15	4.5 ± 0.0	E
Thanh Hóa	KX24	6.1 ± 0.1	A, B
	TS8	4.5 ± 0.0	E

Tỉnh	Mẫu	Hiệu giá trung bình TCID ₅₀ /1ml (log ₁₀) ± SD (n = 3)	Nhóm so sánh trung bình Turkey (95% CI, n = 3)
Thanh Hóa	TX7	6.3 ± 0.0	A
	TX13	4.6 ± 0.1	E
Bình Định	PM21	5.1 ± 0.1	D
	PM27	4.5 ± 0.0	E
	PC7	5.5 ± 0.1	C
	PC15	4.5 ± 0.0	E
Đắk Lắk	EK18	4.5 ± 0.0	E
	EK20	4.5 ± 0.0	E
	EK27	5.5 ± 0.1	C
	EK31	4.6 ± 0.1	E
	MD22	4.6 ± 0.1	E
	MD28	4.6 ± 0.1	E
Đồng Nai	VC5	6.3 ± 0.0	A
	VC10	6 ± 0.1	B
	VC15	4.5 ± 0.0	E
	VC32	5.1 ± 0.1	D
	LT23	4.5 ± 0.0	E
	LT32	4.5 ± 0.0	E
	LT36	5 ± 0.0	D
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 $\log_{10}$ TCID₅₀/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 TCID₅₀/1ml 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 $\log$ TCID₅₀/1ml) và đặc biệt là nhóm mẫu có hiệu giá thấp (4,5–4,6 $\log$ TCID₅₀/1ml). Giá trị này tương đương với hiệu giá của một số chủng PPV đã được sử dụng trong các nghiên cứu về vắc xin. Trong một nghiên cứu về vắc xin PPV, Van den Born đã sử dụng PPV chủng 27a với hiệu giá $\log_{10}$ TCID₅₀/1ml là 6,0 để công cường độc đánh giá độ bảo hộ của vắc xin PPV thương mại (Van den Born và cộng sự, 2020). Một nghiên cứu khác của Zeew sử dụng chủng PPV-IDT có hiệu giá $\log_{10}$ TCID₅₀/mL là 6,5 để gây nhiễm trên lợn (Zeew và cộng sự, 2007). Foerster sử dụng PPV chủng 27a với hiệu giá 105 TCID₅₀/1ml 5,0 để bất hoạt tạo vắc xin vô hoạt và virus với hiệu giá $\log_{10}$ TCID₅₀/mL là 6,0 để công cường độc (Foerster và cộng sự, 2016).

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.

3.4.3. Xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp

Nhiều tác giả đã phân lập PPV trên dòng tế bào PK-15. Môi trường nuôi phù hợp bao gồm E-MEM bổ sung FBS và 1% kháng sinh, trong điều kiện 5% CO₂ (Lyoo và cộng sự, 2001; Streck và cộng sự, 2013; Kim và cộng sự, 2019). Tuy nhiên, các điều kiện khác như nhiệt độ và tỷ lệ FBS đã được nhiều tác giả trên thế giới nghiên cứu để xác định điều kiện nuôi cấy phù hợp với nhiều chủng PPV khác nhau. Lyoo đã sử dụng E-MEM (3% FBS) để nuôi cấy PPV trên tế bào PK-15 (Lyoo và cộng sự, 2001). Streck nuôi cấy PPV trong E-MEM với 5% FBS (Streck và cộng sự, 2013). Kim đã thực hiện

các thí nghiệm với các nồng độ FBS là 0%, 2%, 5% và 10%, và đề xuất rằng nồng độ FBS thích hợp là 2% (Kim và cộng sự, 2019). Choi đã tiến hành nghiên cứu về việc nuôi cấy Parvovirus ở hai nhiệt độ là 37°C và 39°C, sử dụng hai chủng KBSH và Kresse. Kết quả cho thấy chủng KBSH phát triển tốt hơn và sao chép hiệu quả hơn ở 39°C sau nhiều đời cấy truyền liên tiếp. Có sự gia tăng về số lượng virus ở thể hệ sau, cũng như polypeptide và nồng độ DNA của virus. Ngược lại, chủng Kresse cho thấy sự phát triển thích hợp hơn ở nhiệt độ 37°C (Choi và cộng sự, 1990). Bachmann nghiên cứu nuôi cấy Parvovirus ở các nhiệt độ khác nhau: 28°C, 33°C, 37°C, và 40°C. Kết quả kiểm tra bằng phản ứng HA sau 24 giờ nuôi cấy cho thấy, tại 40°C, tỉ lệ đạt được là 1/32; tại 28°C, tỉ lệ đạt được là 1/4; còn ở 33°C và 37°C, tỉ lệ đạt được là 1/256 (Bachmann, 1972).

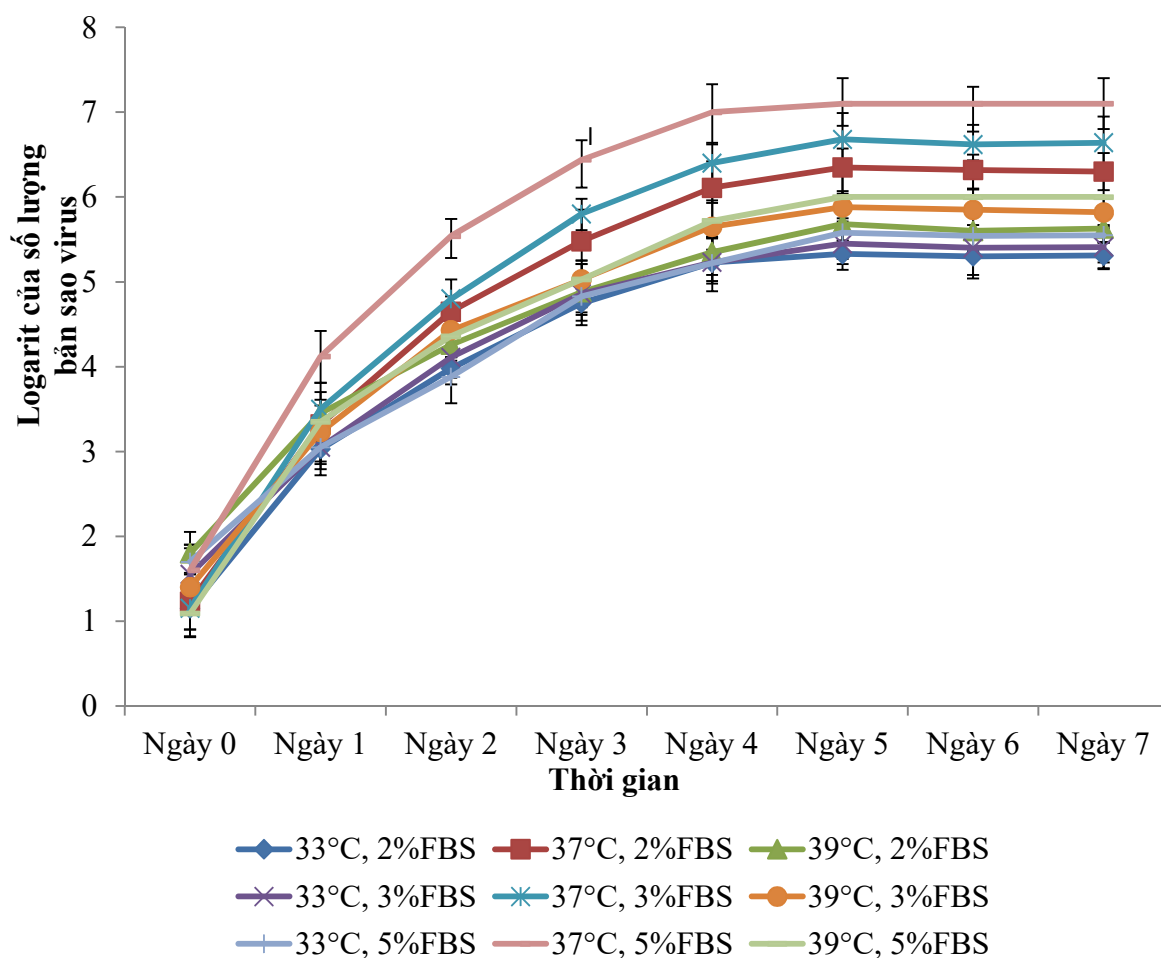
Dựa trên các kết quả nghiên cứu trước đây, các điều kiện nuôi cấy được khảo sát bao gồm nhiệt độ 33°C, 37°C và 39°C, kết hợp với các tỷ lệ FBS là 2%, 3% và 5%, được bổ sung vào môi trường E-MEM. Trong các nghiên cứu về nuôi cấy Parvovirus, tỷ lệ % kháng sinh và % CO₂ luôn được sử dụng là 1% kháng sinh và 5% CO₂. Vì vậy, các chỉ tiêu về tỷ lệ kháng sinh và % CO₂ được giữ cố định trong quá trình khảo sát.

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

Từ biểu đồ (Hình 3.11) và kết quả phân tích mô hình tuyến tính tổng quát (General Linear Model – GLM) 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.



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

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 $39^{\circ}\text{C} - 3\%$ FBS hoặc $33^{\circ}\text{C} - 5\%$ 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).

3.5. ĐÁNH GIÁ SỰ ỔN ĐỊNH, ĐỘC LỰC VÀ TÍNH SINH MIỄN DỊCH CỦA PARVOVIRUS

3.5.1. Đánh giá sự ổn định của Parvovirus

Dựa trên kết quả phân tích trình tự gen, các chủng Parvovirus thu nhận trong nghiên cứu này không ghi nhận sai khác về kiểu gen. Mặt khác, hai chủng VC5 và TX7 cho thấy khả năng phát triển vượt trội hơn các chủng khác khi nuôi cấy trên dòng tế bào PK-15 (Bảng 3.6) và khả năng gây nhiễm của virus trên tế bào cảm thụ tốt thể hiện qua hiệu giá TCID_{50} cao (Bảng 3.8). 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.

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 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 cũng 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) nhược 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.

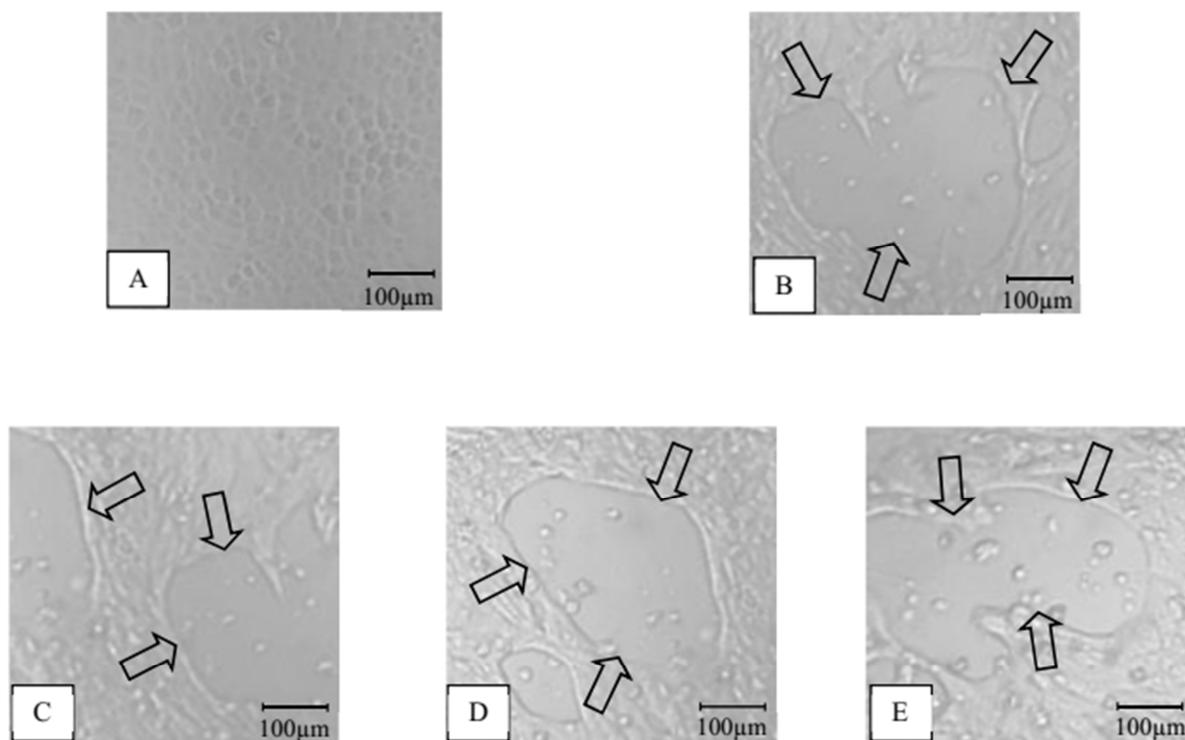
Dựa trên các cơ sở khoa học nêu trên, nghiên cứu này tiến hành đánh giá sự ổn định của hai chủng Parvovirus VC5 và TX7 thông qua việc theo dõi đặc tính sinh học và di truyền sau 15 đời cấy chuyển liên tiếp trên dòng tế bào PK-15. Kết quả thu được sẽ là cơ sở quan trọng cho việc lựa chọn chủng giống tiềm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

3.5.1.1 Đánh giá sự ổn định về đặc tính sinh học

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

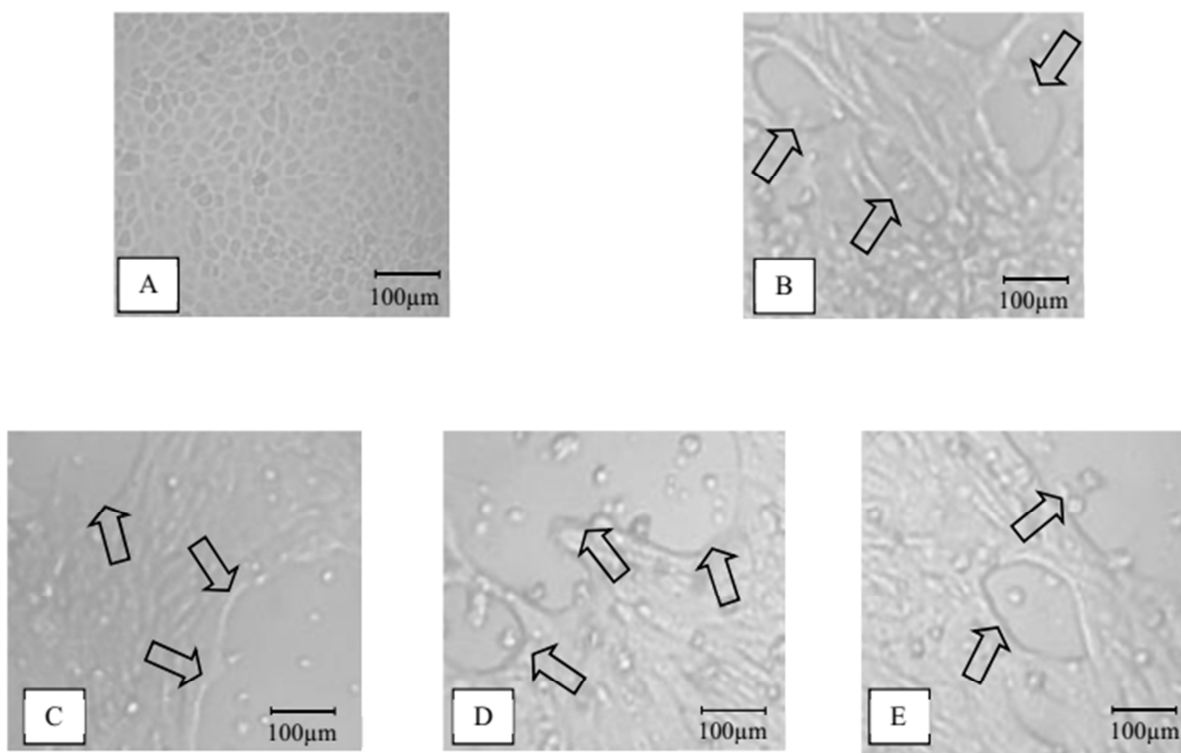
Tại các đời cấy chuyển lần lượt là 01, 05, 10, 15, bệnh tích tế bào được ghi nhận sau 5 ngày gây nhiễm với chủng TX7 (Hình 3.12), chủng VC5 (Hình 3.13). Kết quả quan sát cho thấy hai chủng VC5 và TX7 duy trì khả năng xâm nhiễm và gây các bệnh tích điển hình trên tế bào qua 15 đời cấy chuyển. Việc duy trì các đặc điểm CPE điển hình sau nhiều đời cấy chuyển phản ánh tính ổn định của chủng virus trong môi trường nuôi cấy.

CPE bao gồm tạo hạt, thay đổi về hình dạng tế bào và phá hủy tế bào tạo nên những khoảng trống lớn trên bề mặt bình nuôi cấy (Hình 3.12, 3.13). Bệnh tích tế bào này hoàn toàn phù hợp với những nghiên cứu trước đó về bệnh tích tế bào do PPV gây ra trên tế bào PK15. Một nghiên cứu tại Trung Quốc đã quan sát thấy tế bào PK-15 tế bào có thành tế bào trở nên mờ, tế bào co cụm và dần bong ra sau 48 giờ gây nhiễm với PPV (Wang và cộng sự, 2024). Một nghiên cứu về những thay đổi trong hình thái và phân tử của dòng tế bào thân lợn (PK-15) khi bị nhiễm PPV cho thấy PPV đã gây ra các đặc điểm bao gồm: ngưng tụ chất nhiễm sắc, hình thành thể vùi, tế bào bị phá hủy (Zhang và cộng sự 2015).



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 chai 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.

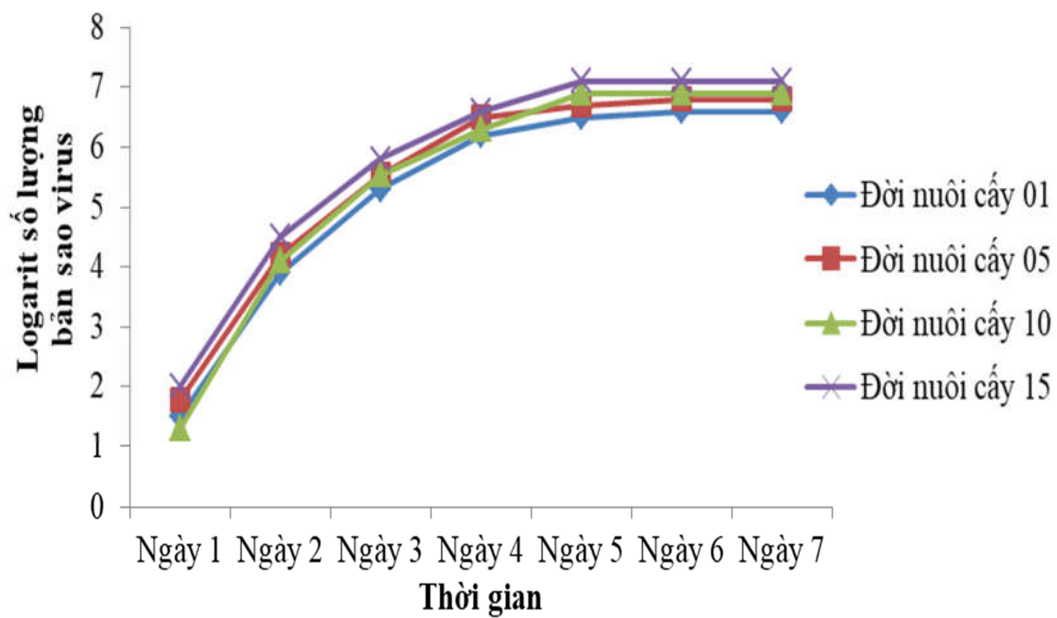
E: Bệnh tích trên tế bào PK-15 khi được gây nhiễm virus sau 5 ngày, đời nuôi cấy 15.

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

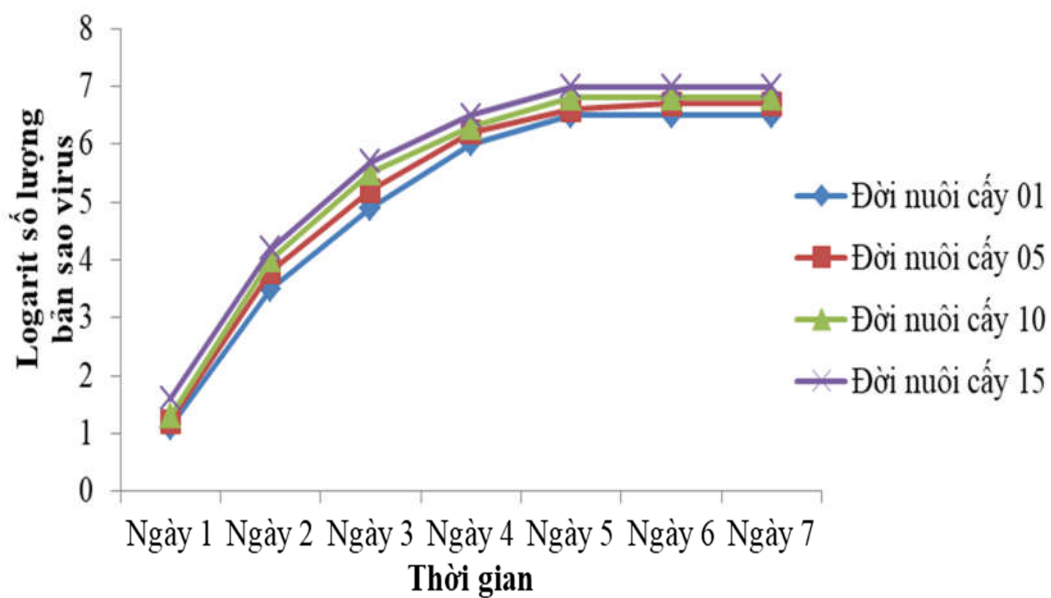
*** Biểu đồ sinh trưởng qua các đời nuôi cấy**

Biểu đồ sinh trưởng của hai chủng PPV là TX7 và VC5 qua các đời cấy chuyển 01, 05, 10 và 15 được thể hiện lần lượt tại Hình 3.14 và Hình 3.15.

Kết quả theo dõi cho thấy cả hai chủng đều có quy luật sinh trưởng tương tự nhau tại tất cả các đời cấy chuyển: Virus phát triển nhanh từ ngày 1 đến ngày 4, đạt đỉnh sinh trưởng tại ngày thứ 5, ổn định từ ngày 5 đến ngày 7. Số lượng bản sao virus qua các đời nuôi cấy không khác biệt. Điều này cho thấy chủng TX7 và VC5 phát triển ổn định sau 15 đời nuôi cấy.



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**

Kết quả xác định hiệu giá TCID₅₀ của 2 chủng TX7 và VC5 tại các đời cấy chuyên 01, 05, 10, 15 được trình bày trong Bảng 3.9.

**Bảng 3.9. 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 TCID ₅₀ /1ml (log ₁₀)	Đời nuôi cấy	Hiệu giá trung bình TCID ₅₀ /1ml (log ₁₀)
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 xác định hiệu giá log₁₀ TCID₅₀/1ml của hai chủng VC5 và TX7 dao động trong khoảng hẹp từ 6,3 - 6,5. Kết quả này cho thấy sự ổn định cao về khả năng gây nhiễm của hai chủng virus này qua nhiều đời nuôi cấy liên tiếp. Việc không ghi nhận sự suy giảm về hiệu giá virus cho thấy hai chủng VC5 và TX7 duy trì tốt khả năng nhân lên và độc lực tế bào sau 15 đời cấy chuyên.

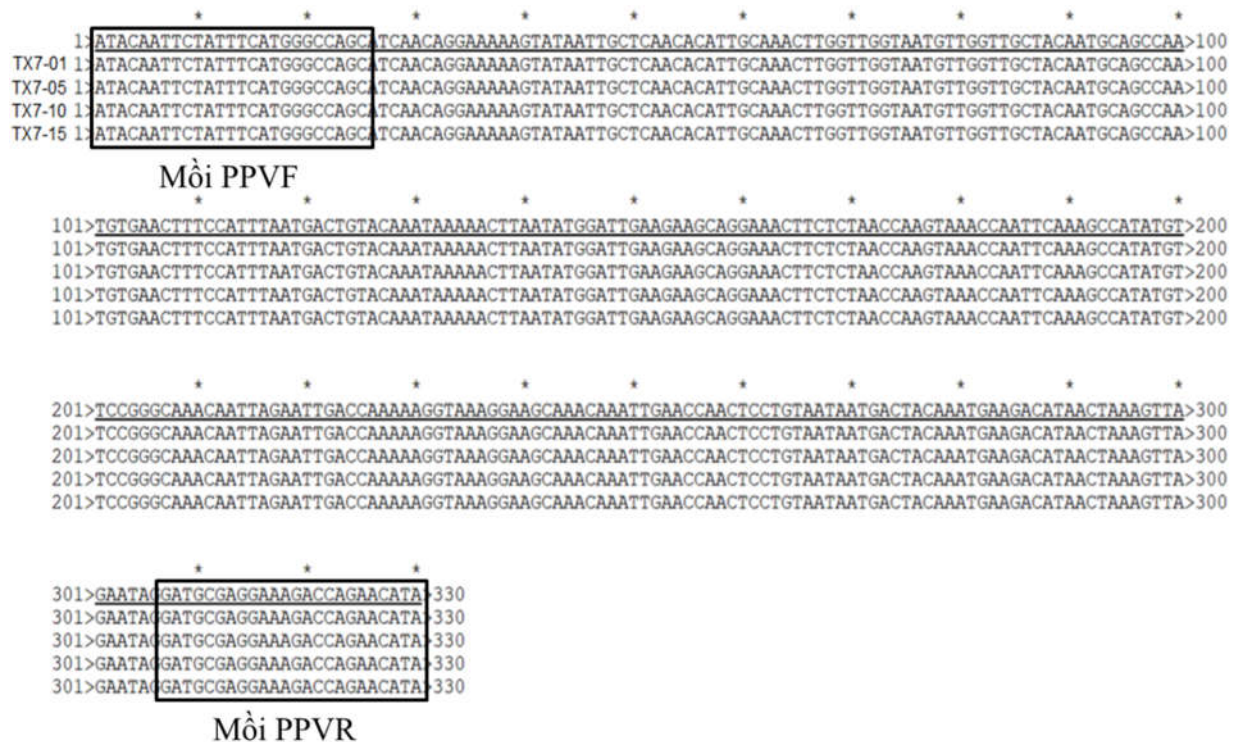
Từ những kết quả trên cho thấy hai chủng VC5 và TX7 có khả năng thích nghi tốt với môi trường nuôi cấy trên tế bào PK-15. CPE được ghi nhận rõ nét và ổn định đến đời nuôi cấy thứ 15. Biểu đồ sinh trưởng ổn định và hiệu giá log₁₀ TCID₅₀ luôn duy trì trong khoảng 6,3-6,5. Các kết quả này khẳng định hai chủng VC5 và TX7 ổn định về đặc tính sinh học qua các đời cấy chuyên. Đây là tiêu chí quan trọng, góp phần xác lập cơ sở khoa học cho việc tuyển chọn hai chủng này làm ứng viên tiềm năng trong nghiên cứu phát triển vắc xin phòng bệnh Parvovirus ở lợn.

3.5.1.2. Đánh giá sự ổn định về đặc tính di truyền

* Đánh giá sự ổn định gen NS1

Đoạn gen có chiều dài 330 bp, nằm trong khoảng từ vị trí 1.453 đến 1.782 trên gen NS1 (Hình 3.5), được lựa chọn để đánh giá sự ổn định di truyền của virus qua các đời cấy truyền. Đây là vùng gen được xác định có mức độ bảo tồn cao giữa các chủng Parvovirus, theo báo cáo của Lyoo và cộng sự, 2001.

Kết quả phân tích trình tự gen NS1 sau 15 đời cấy chuyển cho thấy không có sự sai khác nào trong đoạn trình tự được khảo sát đối với cả hai chủng TX7 và VC5. Điều này chứng tỏ trình tự gen NS1 được duy trì ổn định qua các lần cấy truyền liên tiếp trên tế bào PK-15 (Hình 3.16, Hình 3.17).



Hình 3.16. So sánh trình tự gen NS1 của chủng TX7 qua các đời nuôi cấy

```

      *      *      *      *      *      *      *      *
1> ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTCAACACATTGCAAACTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAA>100
VC5-01 1> ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTCAACACATTGCAAACTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAA>100
VC5-05 1> ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTCAACACATTGCAAACTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAA>100
VC5-10 1> ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTCAACACATTGCAAACTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAA>100
VC5-15 1> ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTCAACACATTGCAAACTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAA>100

```

Môi PPVF

```

      *      *      *      *      *      *      *      *
101> TGTGAACCTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGAAGCAGGAAACTTCTTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGT>200
101> TGTGAACCTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGAAGCAGGAAACTTCTTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGT>200
101> TGTGAACCTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGAAGCAGGAAACTTCTTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGT>200
101> TGTGAACCTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGAAGCAGGAAACTTCTTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGT>200
101> TGTGAACCTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGAAGCAGGAAACTTCTTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGT>200

```

```

      *      *      *      *      *      *      *      *
201> TCCGGGCAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAACAAATTGAACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTA>300
201> TCCGGGCAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAACAAATTGAACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTA>300
201> TCCGGGCAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAACAAATTGAACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTA>300
201> TCCGGGCAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAACAAATTGAACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTA>300
201> TCCGGGCAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAACAAATTGAACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTA>300

```

```

      *      *      *
301> GAATAAGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA>330
301> GAATAAGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA>330
301> GAATAAGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA>330
301> GAATAAGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA>330
301> GAATAAGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA>330

```

Môi PPVR

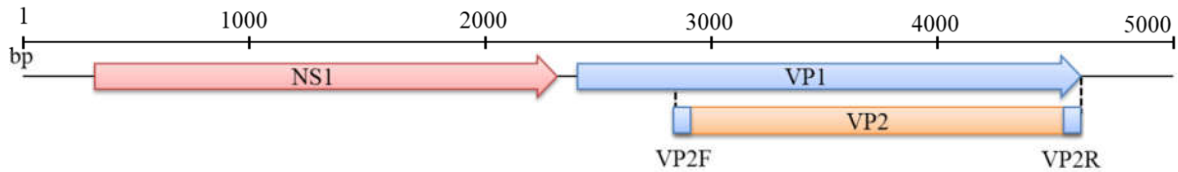
Hình 3.17. So sánh trình tự gen NS1 của chủng VC5 qua các đời nuôi cấy

Sự ổn định về mặt di truyền của vùng gen NS1 – gen có vai trò quan trọng trong quá trình nhân lên của virus, ngoài việc khẳng định tính ổn định về di truyền còn góp phần khẳng định thêm sự ổn định về khả năng nhân lên của virus qua các đời nuôi cấy. Kết quả này là một tiêu chí quan trọng để lựa chọn hai chủng VC5 và TX7 cho các nghiên cứu tiếp theo.

• Đánh giá sự ổn định gen VP2

VP2 là protein cấu trúc chính của Parvovirus lợn (PPV), đóng vai trò quan trọng trong việc hình thành capsid virus và liên quan trực tiếp đến tính sinh miễn dịch cũng như khả năng gây bệnh. Nhiều nghiên cứu trước đây đã ghi nhận sự biến đổi trên gen VP2 có thể làm thay đổi kiểu hình gây bệnh hoặc ảnh hưởng đến hiệu quả nhận diện kháng nguyên (Streck và cộng sự, 2011; Simpson và cộng sự, 2002). Do đó, việc phân tích sự ổn định của gen VP2 trong quá trình cấy truyền liên tiếp có ý nghĩa quan trọng trong đánh giá tính ổn định di truyền của các chủng PPV sử dụng trong nghiên cứu vắc xin.

Vị trí của gen VP2 trên bộ gen của PPV được thể hiện tại Hình 3.18, dựa trên trình tự chuẩn của chủng tham khảo Kresse (GenBank accession number: U44978)



Hình 3.18. Vị trí gen VP2 trong bộ gen của Parvovirus
Chủng tham khảo: Chủng Kresse (Mã số GenBank: U44978)

```

1>ATGAGTGAAAAATGTGGAACAACACAAACCTATTAATGCAGGCAGTGAATTGTCTGCAACAGGAAATGAATCTGGGGGTGGGGGCGGCGGTGGCGGGGGTA>100
TX7-01 1>ATGAGTGAAAAATGTGGAACAACACAAACCTATTAATGCAGGCAGTGAATTGTCTGCAACAGGAAATGAATCTGGGGGTGGGGGCGGCGGTGGCGGGGGTA>100
TX7-05 1>ATGAGTGAAAAATGTGGAACAACACAAACCTATTAATGCAGGCAGTGAATTGTCTGCAACAGGAAATGAATCTGGGGGTGGGGGCGGCGGTGGCGGGGGTA>100
TX7-10 1>ATGAGTGAAAAATGTGGAACAACACAAACCTATTAATGCAGGCAGTGAATTGTCTGCAACAGGAAATGAATCTGGGGGTGGGGGCGGCGGTGGCGGGGGTA>100
TX7-15 1>ATGAGTGAAAAATGTGGAACAACACAAACCTATTAATGCAGGCAGTGAATTGTCTGCAACAGGAAATGAATCTGGGGGTGGGGGCGGCGGTGGCGGGGGTA>100

```

Môi VP2F

```

101>GGGGTGTCTGGGGGGGTGGTATGTCTACATGCAGATTCCAAAATCAACAATAATTTCACTTCTTGGGATATGACTTGAATACAATCACTGCACACCTCC>200
101>GGGGTGTCTGGGGGGGTGGTATGTCTACATGCAGATTCCAAAATCAACAATAATTTCACTTCTTGGGATATGACTTGAATACAATCACTGCACACCTCC>200
101>GGGGTGTCTGGGGGGGTGGTATGTCTACATGCAGATTCCAAAATCAACAATAATTTCACTTCTTGGGATATGACTTGAATACAATCACTGCACACCTCC>200
101>GGGGTGTCTGGGGGGGTGGTATGTCTACATGCAGATTCCAAAATCAACAATAATTTCACTTCTTGGGATATGACTTGAATACAATCACTGCACACCTCC>200

```

```

201>TCATTGACTCGTACATCCTAAATATGCACAGAACACTATTTATACAAAAACAACATGTCCAAAATACAAAATCAAGGCTGACTCTACAAATGAAACAAG>300
201>TCATTGACTCGTACATCCTAAATATGCACAGAACACTATTTATACAAAAACAACATGTCCAAAATACAAAATCAAGGCTGACTCTACAAATGAAACAAG>300
201>TCATTGACTCGTACATCCTAAATATGCACAGAACACTATTTATACAAAAACAACATGTCCAAAATACAAAATCAAGGCTGACTCTACAAATGAAACAAG>300
201>TCATTGACTCGTACATCCTAAATATGCACAGAACACTATTTATACAAAAACAACATGTCCAAAATACAAAATCAAGGCTGACTCTACAAATGAAACAAG>300

```

```

301>AATATTACCCCACTCAAAATTTAACTCCTTAGTCACCTTACATGCTCACCACAAAATGAGAGTTGGATTAAATACCANGCGAAACTTATTCTTAATATCC>400
301>AATATTACCCCACTCAAAATTTAACTCCTTAGTCACCTTACATGCTCACCACAAAATGAGAGTTGGATTAAATACCANGCGAAACTTATTCTTAATATCC>400
301>AATATTACCCCACTCAAAATTTAACTCCTTAGTCACCTTACATGCTCACCACAAAATGAGAGTTGGATTAAATACCANGCGAAACTTATTCTTAATATCC>400
301>AATATTACCCCACTCAAAATTTAACTCCTTAGTCACCTTACATGCTCACCACAAAATGAGAGTTGGATTAAATACCANGCGAAACTTATTCTTAATATCC>400

```

```

401>CACACACATGACAGAAAATATATCTTAAATTAGATTTTCATACAAAAAATATTCGACGTAATAACTGTATTACAAATTTCAATCACTTATACTCACCAC>500
401>CACACACATGACAGAAAATATATCTTAAATTAGATTTTCATACAAAAAATATTCGACGTAATAACTGTATTACAAATTTCAATCACTTATACTCACCAC>500
401>CACACACATGACAGAAAATATATCTTAAATTAGATTTTCATACAAAAAATATTCGACGTAATAACTGTATTACAAATTTCAATCACTTATACTCACCAC>500
401>CACACACATGACAGAAAATATATCTTAAATTAGATTTTCATACAAAAAATATTCGACGTAATAACTGTATTACAAATTTCAATCACTTATACTCACCAC>500

```

```

501>CATTACACAATATACACAACAATCTAACTGCAAGCTTAATGGTGCAGTACAGACCAATAACACACTTCCATACACACCAGCAGCACCTATAAGTGAAA>600
501>CATTACACAATATACACAACAATCTAACTGCAAGCTTAATGGTGCAGTACAGACCAATAACACACTTCCATACACACCAGCAGCACCTATAAGTGAAA>600
501>CATTACACAATATACACAACAATCTAACTGCAAGCTTAATGGTGCAGTACAGACCAATAACACACTTCCATACACACCAGCAGCACCTATAAGTGAAA>600
501>CATTACACAATATACACAACAATCTAACTGCAAGCTTAATGGTGCAGTACAGACCAATAACACACTTCCATACACACCAGCAGCACCTATAAGTGAAA>600

```

```

601>CACTTGGTTTTTTATCCATGGTTACCTACAAAACCAACTCAATACAGATATTACCTATCATGCACCAGAAACCTAAATCCACCAACATACACTGGACAATC>700
601>CACTTGGTTTTTTATCCATGGTTACCTACAAAACCAACTCAATACAGATATTACCTATCATGCACCAGAAACCTAAATCCACCAACATACACTGGACAATC>700
601>CACTTGGTTTTTTATCCATGGTTACCTACAAAACCAACTCAATACAGATATTACCTATCATGCACCAGAAACCTAAATCCACCAACATACACTGGACAATC>700
601>CACTTGGTTTTTTATCCATGGTTACCTACAAAACCAACTCAATACAGATATTACCTATCATGCACCAGAAACCTAAATCCACCAACATACACTGGACAATC>700

```

```

701>ACAACAAATAACAGACTCAATACAAACAGGACTACACAGTGACATTATGTTCTACACAATAGAAAATGCAGTACCAATTCATCTTCTAAGAACAGGAGAT>800
701>ACAACAAATAACAGACTCAATACAAACAGGACTACACAGTGACATTATGTTCTACACAATAGAAAATGCAGTACCAATTCATCTTCTAAGAACAGGAGAT>800
701>ACAACAAATAACAGACTCAATACAAACAGGACTACACAGTGACATTATGTTCTACACAATAGAAAATGCAGTACCAATTCATCTTCTAAGAACAGGAGAT>800
701>ACAACAAATAACAGACTCAATACAAACAGGACTACACAGTGACATTATGTTCTACACAATAGAAAATGCAGTACCAATTCATCTTCTAAGAACAGGAGAT>800

```



```

*      *      *      *      *      *      *      *
801>GAATTCTCCACAGGAATATATCACTTTGACACAAAACCACTAAAATTAACCTACTCATGGCAAAACAAACAGATCTCTAGGACTGCCTCCAAAACCTACTAA>900
801>GAATTCTCCACAGGAATATATCACTTTGACACAAAACCACTAAAATTAACCTACTCATGGCAAAACAAACAGATCTCTAGGACTGCCTCCAAAACCTACTAA>900
801>GAATTCTCCACAGGAATATATCACTTTGACACAAAACCACTAAAATTAACCTACTCATGGCAAAACAAACAGATCTCTAGGACTGCCTCCAAAACCTACTAA>900
801>GAATTCTCCACAGGAATATATCACTTTGACACAAAACCACTAAAATTAACCTACTCATGGCAAAACAAACAGATCTCTAGGACTGCCTCCAAAACCTACTAA>900

*      *      *      *      *      *      *      *
901>CTGAACCTACCACAGAAGGAGACCAACACCCAGGAACACTACCAGCAGCTAACACAAGAAAAGGTTATCACCACAAACATTAATAATAGCTACACAGAAGC>1000
901>CTGAACCTACCACAGAAGGAGACCAACACCCAGGAACACTACCAGCAGCTAACACAAGAAAAGGTTATCACCACAAACATTAATAATAGCTACACAGAAGC>1000
901>CTGAACCTACCACAGAAGGAGACCAACACCCAGGAACACTACCAGCAGCTAACACAAGAAAAGGTTATCACCACAAACATTAATAATAGCTACACAGAAGC>1000
901>CTGAACCTACCACAGAAGGAGACCAACACCCAGGAACACTACCAGCAGCTAACACAAGAAAAGGTTATCACCACAAACATTAATAATAGCTACACAGAAGC>1000
901>CTGAACCTACCACAGAAGGAGACCAACACCCAGGAACACTACCAGCAGCTAACACAAGAAAAGGTTATCACCACAAACATTAATAATAGCTACACAGAAGC>1000

*      *      *      *      *      *      *      *
1001>AACAGCAATTAGGCCAGCTCAGGTAGGATATAATACACAATACATGAATTTTGGATACCTCAATGGTGGACCATTTCTAACTCCTATAGTACCAACAGCA>1100
1001>AACAGCAATTAGGCCAGCTCAGGTAGGATATAATACACAATACATGAATTTTGGATACCTCAATGGTGGACCATTTCTAACTCCTATAGTACCAACAGCA>1100
1001>AACAGCAATTAGGCCAGCTCAGGTAGGATATAATACACAATACATGAATTTTGGATACCTCAATGGTGGACCATTTCTAACTCCTATAGTACCAACAGCA>1100
1001>AACAGCAATTAGGCCAGCTCAGGTAGGATATAATACACAATACATGAATTTTGGATACCTCAATGGTGGACCATTTCTAACTCCTATAGTACCAACAGCA>1100
1001>AACAGCAATTAGGCCAGCTCAGGTAGGATATAATACACAATACATGAATTTTGGATACCTCAATGGTGGACCATTTCTAACTCCTATAGTACCAACAGCA>1100

*      *      *      *      *      *      *      *
1101>GACACACAATATAATGATGATGAACCAAAATGGTGTCTATAAGATTTACAATGGGTTACCAACATGGACAATTAACCACATCTACACAAGAACTAGAAAAGT>1200
1101>GACACACAATATAATGATGATGAACCAAAATGGTGTCTATAAGATTTACAATGGGTTACCAACATGGACAATTAACCACATCTACACAAGAACTAGAAAAGT>1200
1101>GACACACAATATAATGATGATGAACCAAAATGGTGTCTATAAGATTTACAATGGGTTACCAACATGGACAATTAACCACATCTACACAAGAACTAGAAAAGT>1200
1101>GACACACAATATAATGATGATGAACCAAAATGGTGTCTATAAGATTTACAATGGGTTACCAACATGGACAATTAACCACATCTACACAAGAACTAGAAAAGT>1200
1101>GACACACAATATAATGATGATGAACCAAAATGGTGTCTATAAGATTTACAATGGGTTACCAACATGGACAATTAACCACATCTACACAAGAACTAGAAAAGT>1200

*      *      *      *      *      *      *      *
1201>ACACATTCAATCCACAAAGTAAATGTGGAAGAGCTCCAAAACAACAAATTTAATCAACAGGCACCCTAAACCTAGAAAATACAAATAATGGAACACTTTT>1300
1201>ACACATTCAATCCACAAAGTAAATGTGGAAGAGCTCCAAAACAACAAATTTAATCAACAGGCACCCTAAACCTAGAAAATACAAATAATGGAACACTTTT>1300
1201>ACACATTCAATCCACAAAGTAAATGTGGAAGAGCTCCAAAACAACAAATTTAATCAACAGGCACCCTAAACCTAGAAAATACAAATAATGGAACACTTTT>1300
1201>ACACATTCAATCCACAAAGTAAATGTGGAAGAGCTCCAAAACAACAAATTTAATCAACAGGCACCCTAAACCTAGAAAATACAAATAATGGAACACTTTT>1300
1201>ACACATTCAATCCACAAAGTAAATGTGGAAGAGCTCCAAAACAACAAATTTAATCAACAGGCACCCTAAACCTAGAAAATACAAATAATGGAACACTTTT>1300

*      *      *      *      *      *      *      *
1301>ACCTTCAGATCCAATAGGAGGGAACCTAACATGCATTTTCATGAATACACTCAATACATATGGACCATTAAACAGCACTAAACAACTACTGCACCTGTATTT>1400
1301>ACCTTCAGATCCAATAGGAGGGAACCTAACATGCATTTTCATGAATACACTCAATACATATGGACCATTAAACAGCACTAAACAACTACTGCACCTGTATTT>1400
1301>ACCTTCAGATCCAATAGGAGGGAACCTAACATGCATTTTCATGAATACACTCAATACATATGGACCATTAAACAGCACTAAACAACTACTGCACCTGTATTT>1400
1301>ACCTTCAGATCCAATAGGAGGGAACCTAACATGCATTTTCATGAATACACTCAATACATATGGACCATTAAACAGCACTAAACAACTACTGCACCTGTATTT>1400
1301>ACCTTCAGATCCAATAGGAGGGAACCTAACATGCATTTTCATGAATACACTCAATACATATGGACCATTAAACAGCACTAAACAACTACTGCACCTGTATTT>1400

*      *      *      *      *      *      *      *
1401>CCAAATGGTCAAATATGGGATAAAGAACTTGATACAGATCTAAAACCTAGACTACATGTTACAGCTCCATTGTTTGTAAAAACAATCCACCAGGACAAC>1500
1401>CCAAATGGTCAAATATGGGATAAAGAACTTGATACAGATCTAAAACCTAGACTACATGTTACAGCTCCATTGTTTGTAAAAACAATCCACCAGGACAAC>1500
1401>CCAAATGGTCAAATATGGGATAAAGAACTTGATACAGATCTAAAACCTAGACTACATGTTACAGCTCCATTGTTTGTAAAAACAATCCACCAGGACAAC>1500
1401>CCAAATGGTCAAATATGGGATAAAGAACTTGATACAGATCTAAAACCTAGACTACATGTTACAGCTCCATTGTTTGTAAAAACAATCCACCAGGACAAC>1500
1401>CCAAATGGTCAAATATGGGATAAAGAACTTGATACAGATCTAAAACCTAGACTACATGTTACAGCTCCATTGTTTGTAAAAACAATCCACCAGGACAAC>1500

*      *      *      *      *      *      *      *
1501>TATTTGTAAAAATAGCACCACAACTAACAGATGATTTCAATGCTGACTCTCCTCAACAACCTAGAATAATAACCTATTCAAACCTTTTGGTGAAAGGAAC>1600
1501>TATTTGTAAAAATAGCACCACAACTAACAGATGATTTCAATGCTGACTCTCCTCAACAACCTAGAATAATAACCTATTCAAACCTTTTGGTGAAAGGAAC>1600
1501>TATTTGTAAAAATAGCACCACAACTAACAGATGATTTCAATGCTGACTCTCCTCAACAACCTAGAATAATAACCTATTCAAACCTTTTGGTGAAAGGAAC>1600
1501>TATTTGTAAAAATAGCACCACAACTAACAGATGATTTCAATGCTGACTCTCCTCAACAACCTAGAATAATAACCTATTCAAACCTTTTGGTGAAAGGAAC>1600
1501>TATTTGTAAAAATAGCACCACAACTAACAGATGATTTCAATGCTGACTCTCCTCAACAACCTAGAATAATAACCTATTCAAACCTTTTGGTGAAAGGAAC>1600

*      *      *      *      *      *      *      *
1601>ACTAACATTACAGCAAAAAATGAGATCCAGTAATATGTGGAACCTATTCAACAACACACAACAACAGCAGAAAAACATTGGTAACATATATTCTACAAAT>1700
1601>ACTAACATTACAGCAAAAAATGAGATCCAGTAATATGTGGAACCTATTCAACAACACACAACAACAGCAGAAAAACATTGGTAACATATATTCTACAAAT>1700
1601>ACTAACATTACAGCAAAAAATGAGATCCAGTAATATGTGGAACCTATTCAACAACACACAACAACAGCAGAAAAACATTGGTAACATATATTCTACAAAT>1700
1601>ACTAACATTACAGCAAAAAATGAGATCCAGTAATATGTGGAACCTATTCAACAACACACAACAACAGCAGAAAAACATTGGTAACATATATTCTACAAAT>1700
1601>ACTAACATTACAGCAAAAAATGAGATCCAGTAATATGTGGAACCTATTCAACAACACACAACAACAGCAGAAAAACATTGGTAACATATATTCTACAAAT>1700

*      *      *      *      *      *      *      *
1701>ATTGGTGGCATAAAAAATGTTTCCAGAATATTCACAACTTATACCGATCATATTAAAAAGAA>1760
1701>ATTGGTGGCATAAAAAATGTTTCCAGAATATTCACAACTTATACCGATCATATTAAAAAGAA>1760
1701>ATTGGTGGCATAAAAAATGTTTCCAGAATATTCACAACTTATACCGATCATATTAAAAAGAA>1760
1701>ATTGGTGGCATAAAAAATGTTTCCAGAATATTCACAACTTATACCGATCATATTAAAAAGAA>1760
1701>ATTGGTGGCATAAAAAATGTTTCCAGAATATTCACAACTTATACCGATCATATTAAAAAGAA>1760

```

Mỗi VP2R

Hình 3.19. So sánh trình tự gen VP2 của chủng TX7 qua các đời nuôi cấy


```

      *      *      *      *      *      *      *      *
VC5-01 1>ATGAGTGAAAATBTGGAAACAACAACCTATTAAATGCAGGCCTGAATTGTCTGCAACAGGAAATGAATCTGGGGGTGGGGGCGGCGGTGGCGGGGGTA>100
VC5-05 1>ATGAGTGAAAATBTGGAAACAACAACCTATTAAATGCAGGCCTGAATTGTCTGCAACAGGAAATGAATCTGGGGGTGGGGGCGGCGGTGGCGGGGGTA>100
VC5-10 1>ATGAGTGAAAATBTGGAAACAACAACCTATTAAATGCAGGCCTGAATTGTCTGCAACAGGAAATGAATCTGGGGGTGGGGGCGGCGGTGGCGGGGGTA>100
VC5-15 1>ATGAGTGAAAATBTGGAAACAACAACCTATTAAATGCAGGCCTGAATTGTCTGCAACAGGAAATGAATCTGGGGGTGGGGGCGGCGGTGGCGGGGGTA>100

```

Môi VP2F

```

      *      *      *      *      *      *      *      *
101>GGGGTGTCTGGGGGGTTGGTATGTCTACATGCAGATTCCAAAAACAACAATAATTTCACTTCTTGGGATATGACTTGAATACAATCACTGCACACCTCC>200
101>GGGGTGTCTGGGGGGTTGGTATGTCTACATGCAGATTCCAAAAACAACAATAATTTCACTTCTTGGGATATGACTTGAATACAATCACTGCACACCTCC>200
101>GGGGTGTCTGGGGGGTTGGTATGTCTACATGCAGATTCCAAAAACAACAATAATTTCACTTCTTGGGATATGACTTGAATACAATCACTGCACACCTCC>200
101>GGGGTGTCTGGGGGGTTGGTATGTCTACATGCAGATTCCAAAAACAACAATAATTTCACTTCTTGGGATATGACTTGAATACAATCACTGCACACCTCC>200

```

```

      *      *      *      *      *      *      *      *
201>TCATTGACTCGTACATCCTAAATATGCACAGAACACTATTTATACAAAAACAACATGTCCAAAAACAACCAAGGCTGACTCTACAAATGAAACAAG>300
201>TCATTGACTCGTACATCCTAAATATGCACAGAACACTATTTATACAAAAACAACATGTCCAAAAACAACCAAGGCTGACTCTACAAATGAAACAAG>300
201>TCATTGACTCGTACATCCTAAATATGCACAGAACACTATTTATACAAAAACAACATGTCCAAAAACAACCAAGGCTGACTCTACAAATGAAACAAG>300
201>TCATTGACTCGTACATCCTAAATATGCACAGAACACTATTTATACAAAAACAACATGTCCAAAAACAACCAAGGCTGACTCTACAAATGAAACAAG>300

```

```

      *      *      *      *      *      *      *      *
301>AATATTCACCCACTCAAATTTAACTCCTTAGTCACCTTACATGCTCACCCAAAATGAGAGTTGGATTAAATACCANGCGAAACTTATTCTTAATATCC>400
301>AATATTCACCCACTCAAATTTAACTCCTTAGTCACCTTACATGCTCACCCAAAATGAGAGTTGGATTAAATACCANGCGAAACTTATTCTTAATATCC>400
301>AATATTCACCCACTCAAATTTAACTCCTTAGTCACCTTACATGCTCACCCAAAATGAGAGTTGGATTAAATACCANGCGAAACTTATTCTTAATATCC>400
301>AATATTCACCCACTCAAATTTAACTCCTTAGTCACCTTACATGCTCACCCAAAATGAGAGTTGGATTAAATACCANGCGAAACTTATTCTTAATATCC>400

```

```

      *      *      *      *      *      *      *      *
401>CACAACATGACAGAAAATATATCTTAAATTAGATTTATACAAAAAATATTGCGAGTAAATAACTGTATTACAAATATTCAATCACTTATACTCACCAC>500
401>CACAACATGACAGAAAATATATCTTAAATTAGATTTATACAAAAAATATTGCGAGTAAATAACTGTATTACAAATATTCAATCACTTATACTCACCAC>500
401>CACAACATGACAGAAAATATATCTTAAATTAGATTTATACAAAAAATATTGCGAGTAAATAACTGTATTACAAATATTCAATCACTTATACTCACCAC>500
401>CACAACATGACAGAAAATATATCTTAAATTAGATTTATACAAAAAATATTGCGAGTAAATAACTGTATTACAAATATTCAATCACTTATACTCACCAC>500

```

```

      *      *      *      *      *      *      *      *
501>CATTACAAATATACAACAACAACTTAACTGCAAGCTTAATGGTCGCACTAGACACCAATAACACACTTCCATACACACCCAGCAGCACCTATAAGTGAA>600
501>CATTACAAATATACAACAACAACTTAACTGCAAGCTTAATGGTCGCACTAGACACCAATAACACACTTCCATACACACCCAGCAGCACCTATAAGTGAA>600
501>CATTACAAATATACAACAACAACTTAACTGCAAGCTTAATGGTCGCACTAGACACCAATAACACACTTCCATACACACCCAGCAGCACCTATAAGTGAA>600
501>CATTACAAATATACAACAACAACTTAACTGCAAGCTTAATGGTCGCACTAGACACCAATAACACACTTCCATACACACCCAGCAGCACCTATAAGTGAA>600

```

```

      *      *      *      *      *      *      *      *
601>CACTTGGTTTTTATCCATGGTTACCTACAAACCAACTCAATACAGATATTACCTATCATGCACAGAAACCTAAATCCACCAACATACACTGGACAATC>700
601>CACTTGGTTTTTATCCATGGTTACCTACAAACCAACTCAATACAGATATTACCTATCATGCACAGAAACCTAAATCCACCAACATACACTGGACAATC>700
601>CACTTGGTTTTTATCCATGGTTACCTACAAACCAACTCAATACAGATATTACCTATCATGCACAGAAACCTAAATCCACCAACATACACTGGACAATC>700
601>CACTTGGTTTTTATCCATGGTTACCTACAAACCAACTCAATACAGATATTACCTATCATGCACAGAAACCTAAATCCACCAACATACACTGGACAATC>700

```

```

      *      *      *      *      *      *      *      *
701>ACAACAAATAACAGACTCAATACAAACAGGACTACACAGTGACATTATGTTCTACACAATAGAAAATGCAGTACCAATTCATCTTCTAAGAACAGGAGAT>800
701>ACAACAAATAACAGACTCAATACAAACAGGACTACACAGTGACATTATGTTCTACACAATAGAAAATGCAGTACCAATTCATCTTCTAAGAACAGGAGAT>800
701>ACAACAAATAACAGACTCAATACAAACAGGACTACACAGTGACATTATGTTCTACACAATAGAAAATGCAGTACCAATTCATCTTCTAAGAACAGGAGAT>800
701>ACAACAAATAACAGACTCAATACAAACAGGACTACACAGTGACATTATGTTCTACACAATAGAAAATGCAGTACCAATTCATCTTCTAAGAACAGGAGAT>800

```

```

      *      *      *      *      *      *      *      *
801>GAATTCTCCACAGGAATATATCACTTTGACACAAAACCACTAAATTAACTCACTCATGGCAAACAAACAGATCTCTAGGACTGCCTCCAAAACTACTAA>900
801>GAATTCTCCACAGGAATATATCACTTTGACACAAAACCACTAAATTAACTCACTCATGGCAAACAAACAGATCTCTAGGACTGCCTCCAAAACTACTAA>900
801>GAATTCTCCACAGGAATATATCACTTTGACACAAAACCACTAAATTAACTCACTCATGGCAAACAAACAGATCTCTAGGACTGCCTCCAAAACTACTAA>900
801>GAATTCTCCACAGGAATATATCACTTTGACACAAAACCACTAAATTAACTCACTCATGGCAAACAAACAGATCTCTAGGACTGCCTCCAAAACTACTAA>900

```

```

      *      *      *      *      *      *      *      *
901>CTGAACCTACCAAGAAGGAGACCAACCCAGGAACACTACCAGCAGCTAACACAAGAAAAGGTTATCACCAAACAATTAATAATAGCTACACAGAAGC>1000
901>CTGAACCTACCAAGAAGGAGACCAACCCAGGAACACTACCAGCAGCTAACACAAGAAAAGGTTATCACCAAACAATTAATAATAGCTACACAGAAGC>1000
901>CTGAACCTACCAAGAAGGAGACCAACCCAGGAACACTACCAGCAGCTAACACAAGAAAAGGTTATCACCAAACAATTAATAATAGCTACACAGAAGC>1000
901>CTGAACCTACCAAGAAGGAGACCAACCCAGGAACACTACCAGCAGCTAACACAAGAAAAGGTTATCACCAAACAATTAATAATAGCTACACAGAAGC>1000

```

```

      *      *      *      *      *      *      *      *
1001>AACAGCAATTAGGCCAGCTCAGGTAGGATATAATACACAATACATGAATTTGGATACTCCAATGGTGGACCATTTCTAACTCCTATAGTACCAACAGCA>1100
1001>AACAGCAATTAGGCCAGCTCAGGTAGGATATAATACACAATACATGAATTTGGATACTCCAATGGTGGACCATTTCTAACTCCTATAGTACCAACAGCA>1100
1001>AACAGCAATTAGGCCAGCTCAGGTAGGATATAATACACAATACATGAATTTGGATACTCCAATGGTGGACCATTTCTAACTCCTATAGTACCAACAGCA>1100
1001>AACAGCAATTAGGCCAGCTCAGGTAGGATATAATACACAATACATGAATTTGGATACTCCAATGGTGGACCATTTCTAACTCCTATAGTACCAACAGCA>1100

```



```

* * * * *
1101>GACACACAATATAATGATGATGAACCAAAATGGTGTCTATAAGATTTCACATGGGTTACCAACATGGACAATTAACCACATCTACACAAGAACTAGAAAGAT>1200
1101>GACACACAATATAATGATGATGAACCAAAATGGTGTCTATAAGATTTCACATGGGTTACCAACATGGACAATTAACCACATCTACACAAGAACTAGAAAGAT>1200
1101>GACACACAATATAATGATGATGAACCAAAATGGTGTCTATAAGATTTCACATGGGTTACCAACATGGACAATTAACCACATCTACACAAGAACTAGAAAGAT>1200
1101>GACACACAATATAATGATGATGAACCAAAATGGTGTCTATAAGATTTCACATGGGTTACCAACATGGACAATTAACCACATCTACACAAGAACTAGAAAGAT>1200
1101>GACACACAATATAATGATGATGAACCAAAATGGTGTCTATAAGATTTCACATGGGTTACCAACATGGACAATTAACCACATCTACACAAGAACTAGAAAGAT>1200

* * * * *
1201>ACACATTCAATCCACAAAGTAAATGTGGAAGAGCTCCAAAACAACAATTTAATCAACAGGCACCCTAAACCTAGAAAATACAAATAATGGAACACTTTT>1300
1201>ACACATTCAATCCACAAAGTAAATGTGGAAGAGCTCCAAAACAACAATTTAATCAACAGGCACCCTAAACCTAGAAAATACAAATAATGGAACACTTTT>1300
1201>ACACATTCAATCCACAAAGTAAATGTGGAAGAGCTCCAAAACAACAATTTAATCAACAGGCACCCTAAACCTAGAAAATACAAATAATGGAACACTTTT>1300
1201>ACACATTCAATCCACAAAGTAAATGTGGAAGAGCTCCAAAACAACAATTTAATCAACAGGCACCCTAAACCTAGAAAATACAAATAATGGAACACTTTT>1300
1201>ACACATTCAATCCACAAAGTAAATGTGGAAGAGCTCCAAAACAACAATTTAATCAACAGGCACCCTAAACCTAGAAAATACAAATAATGGAACACTTTT>1300

* * * * *
1301>ACCTTCAGATCCAATAGGAGGGAACCTAACATGCAATTCATGAATACACTCAATACATATGGACCATTAAACAGCACTAAACAACTACTGCACCTGTATTT>1400
1301>ACCTTCAGATCCAATAGGAGGGAACCTAACATGCAATTCATGAATACACTCAATACATATGGACCATTAAACAGCACTAAACAACTACTGCACCTGTATTT>1400
1301>ACCTTCAGATCCAATAGGAGGGAACCTAACATGCAATTCATGAATACACTCAATACATATGGACCATTAAACAGCACTAAACAACTACTGCACCTGTATTT>1400
1301>ACCTTCAGATCCAATAGGAGGGAACCTAACATGCAATTCATGAATACACTCAATACATATGGACCATTAAACAGCACTAAACAACTACTGCACCTGTATTT>1400
1301>ACCTTCAGATCCAATAGGAGGGAACCTAACATGCAATTCATGAATACACTCAATACATATGGACCATTAAACAGCACTAAACAACTACTGCACCTGTATTT>1400

* * * * *
1401>CCAAATGGTCAAATATGGGATAAAGAACTTGATACAGATCTAAAACCTAGACTACATGTTACAGCTCCATTGTGTTGTAACAACTCCACCAGGACAAAC>1500
1401>CCAAATGGTCAAATATGGGATAAAGAACTTGATACAGATCTAAAACCTAGACTACATGTTACAGCTCCATTGTGTTGTAACAACTCCACCAGGACAAAC>1500
1401>CCAAATGGTCAAATATGGGATAAAGAACTTGATACAGATCTAAAACCTAGACTACATGTTACAGCTCCATTGTGTTGTAACAACTCCACCAGGACAAAC>1500
1401>CCAAATGGTCAAATATGGGATAAAGAACTTGATACAGATCTAAAACCTAGACTACATGTTACAGCTCCATTGTGTTGTAACAACTCCACCAGGACAAAC>1500
1401>CCAAATGGTCAAATATGGGATAAAGAACTTGATACAGATCTAAAACCTAGACTACATGTTACAGCTCCATTGTGTTGTAACAACTCCACCAGGACAAAC>1500

* * * * *
1501>TATTTGTAATAATAGCACCACCAACCTAACAGATGATTTCAATGCTGACTCTCCTCAACAACCTAGAATAATAACCTATTCAAACCTTTGGTGGAAGGAAC>1600
1501>TATTTGTAATAATAGCACCACCAACCTAACAGATGATTTCAATGCTGACTCTCCTCAACAACCTAGAATAATAACCTATTCAAACCTTTGGTGGAAGGAAC>1600
1501>TATTTGTAATAATAGCACCACCAACCTAACAGATGATTTCAATGCTGACTCTCCTCAACAACCTAGAATAATAACCTATTCAAACCTTTGGTGGAAGGAAC>1600
1501>TATTTGTAATAATAGCACCACCAACCTAACAGATGATTTCAATGCTGACTCTCCTCAACAACCTAGAATAATAACCTATTCAAACCTTTGGTGGAAGGAAC>1600
1501>TATTTGTAATAATAGCACCACCAACCTAACAGATGATTTCAATGCTGACTCTCCTCAACAACCTAGAATAATAACCTATTCAAACCTTTGGTGGAAGGAAC>1600

* * * * *
1601>ACTAACATTCACAGCAAAATGAGATCCAGTAATATGTGGAACCTATTCAACAACACACAACAACAGCAGAAAAACATTGGTAACATATATCTTACAAAT>1700
1601>ACTAACATTCACAGCAAAATGAGATCCAGTAATATGTGGAACCTATTCAACAACACACAACAACAGCAGAAAAACATTGGTAACATATATCTTACAAAT>1700
1601>ACTAACATTCACAGCAAAATGAGATCCAGTAATATGTGGAACCTATTCAACAACACACAACAACAGCAGAAAAACATTGGTAACATATATCTTACAAAT>1700
1601>ACTAACATTCACAGCAAAATGAGATCCAGTAATATGTGGAACCTATTCAACAACACACAACAACAGCAGAAAAACATTGGTAACATATATCTTACAAAT>1700
1601>ACTAACATTCACAGCAAAATGAGATCCAGTAATATGTGGAACCTATTCAACAACACACAACAACAGCAGAAAAACATTGGTAACATATATCTTACAAAT>1700

* * * * *
1701>ATTGGTGGCATAAAAAATGTTTCCAGAATATTCAAACTTATACCGATCATATTTAAAGAA>1760
1701>ATTGGTGGCATAAAAAATGTTTCCAGAATATTCAAACTTATACCGATCATATTTAAAGAA>1760
1701>ATTGGTGGCATAAAAAATGTTTCCAGAATATTCAAACTTATACCGATCATATTTAAAGAA>1760
1701>ATTGGTGGCATAAAAAATGTTTCCAGAATATTCAAACTTATACCGATCATATTTAAAGAA>1760
1701>ATTGGTGGCATAAAAAATGTTTCCAGAATATTCAAACTTATACCGATCATATTTAAAGAA>1760

```

Môi VP2R

Hình 3.20. So sánh trình tự gen VP2 của chủng VC5 qua các đời nuôi cấy

Kết quả phân tích trình tự gen VP2 sau 15 đời cấy truyền cho thấy không xuất hiện bất kỳ đột biến nào trong vùng gen khảo sát đối với cả hai chủng TX7 và VC5 (Hình 3.19, 3.20). Điều này chứng minh rằng hai chủng virus duy trì sự ổn định di truyền cao về vùng gen mã hóa VP2 trong suốt quá trình cấy truyền nhiều đời liên tiếp trên dòng tế bào PK-15.

Tổng hợp kết quả phân tích di truyền cho cả hai vùng gen NS1 và VP2 cho thấy không ghi nhận sự biến đổi nào qua 15 đời nuôi cấy liên tiếp. Điều này chứng minh tính ổn định về di truyền của hai chủng VC5 và TX7.

3.5.2. Đánh giá độc lực của chủng parvovirus

Dựa trên các kết quả khảo sát đặc tính sinh học và di truyền ở trên, hai chủng VC5 và TX7 được xác định có hiệu giá TCID₅₀ cao, có đặc tính sinh học cũng như đặc tính di truyền ổn định qua 15 đời nuôi cấy. Vì vậy, hai chủng VC5 và TX7 được lựa chọn để tiếp tục đánh giá độc lực trên lợn. Parvovirus được là nguyên nhân chính gây ra các rối loạn sinh sản ở lợn nhưng chúng chỉ gây nên các biểu hiện trên lợn mà không tác động lên các loài động vật khác. Loại virus này chỉ tác động đến bào thai lợn, và mức độ ảnh hưởng khác nhau tùy thuộc vào thời điểm bào thai bị nhiễm virus. Vì vậy, thí nghiệm xác định độc lực chỉ tiến hành trên đối tượng lợn nái mang thai.

Lợn được gây nhiễm với 4ml virus (10⁶ TCID₅₀/ml) của chủng Parvovirus tương ứng (2ml theo đường tiêm bắp cổ và 2ml theo đường nhỏ mũi) vào ngày 40 của thai kỳ. Nhóm 1: được gây nhiễm với chủng TX7, nhóm 2: được gây nhiễm với chủng VC5, nhóm 3 (nhóm đối chứng): được tiêm với PBS.

Kết quả hiệu giá HI thu được vào ngày 0, 7, 14, 21, 49 sau gây nhiễm được mô tả trong Bảng 3.10.

Bảng 3.10. Hiệu giá HI trên lợn nái mang thai sau khi gây nhiễm virus

Hiệu giá trung bình HI trong huyết thanh lợn mẹ (log ₂) ± SD					
	Ngày 0	Ngày 7	Ngày 14	Ngày 21	Ngày 49
Nhóm	(n = 9)	(n = 9)	(n = 9)	(n = 9)	(n = 9)
TX7	0 ± 0,00	5,33 ± 0,87	8,33 ± 0,87	11, 33 ± 0,71	10 ± 0,71
VC5	0 ± 0,00	4,67 ± 0,71	7,67 ± 0,71	10,67 ± 0,71	9,67 ± 0,71
Đối chứng	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00

* p < 0,001

Kết quả trình bày ở Bảng 3.10 và phân tích thống kê (Phụ lục 13) cho thấy hiệu giá HI trên lợn nái mang thai sau gây nhiễm có sự biến động rõ rệt theo thời gian và khác biệt giữa các nhóm thí nghiệm. Hiệu ứng của cả ba yếu tố “nhóm”, “thời gian” và tương tác “nhóm * thời gian” đều có ý nghĩa thống kê cao (p < 0,001), với hệ số xác định R² = 98,73% chứng tỏ mô hình giải thích hầu hết biến thiên dữ liệu.

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. Những kết quả này phù hợp với nhận định trước đây rằng sau khi gây nhiễm, hiệu giá HI thường bắt đầu tăng từ tuần thứ nhất, đạt đỉnh vào tuần 3–4 và sau đó duy trì ổn định (Mengeling và cộng sự, 2000). Nghiên cứu của Mészáros cũng cho thấy kháng thể đặc hiệu PPV có thể được phát hiện sớm nhất là vào ngày thứ 6 sau gây nhiễm và đạt cao nhất sau 21 ngày gây nhiễm (Mészáros và cộng sự, 2017). Một nghiên cứu khác trên chủng PPV-27a cũng quan sát thấy hiệu giá HI chống lại PPV dao động từ $11 \log_2$ đến $13 \log_2$ trong khoảng thời gian từ ngày 8 đến ngày 50 sau khi nhiễm virus (van den Born và cộng sự, 2020).

Khả năng sống của thai lợn sau khi công cường độc với chủng VC5 và TX7 được trình bày trong Bảng 3.11.

Bảng 3.11. 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 ngiệm	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%

Việc mổ khám tử cung lợn nái được thực hiện vào ngày thứ 90 của thai kỳ nhằm đánh giá mức độ ảnh hưởng của virus đến sự phát triển và sống sót của thai. Kết quả cho thấy, ở nhóm đối chứng, 100% thai lợn khỏe mạnh, không ghi nhận dấu hiệu bất thường. Ngược lại, ở hai nhóm gây nhiễm virus, 100% số thai đều chết. Trong đó, 71% số thai ở nhóm TX7 và 80% số thai ở nhóm VC5 có biểu hiện bệnh tích điển hình bao gồm: màu nâu đen, hiện tượng mất nước và cấu trúc mô bào khô teo (Hình 3.21). Kết quả xét nghiệm cho thấy 88–90% thai lợn ở nhóm gây nhiễm dương tính với PPV, trong khi đó không phát hiện virus PPV ở bất kỳ mẫu thai nào thuộc nhóm đối chứng. So sánh với các nghiên cứu trước cho thấy độc lực của hai chủng TX7 và VC5 ở mức cao. Nghiên cứu của van den Born và cộng sự, 2020 với chủng PPV-27a ghi nhận tỷ lệ 41% thai còn sống và 39% có biểu hiện khô thai sau công cường độc. Nghiên cứu của Zeeuw về độc lực của các chủng PPV-143a, PPV-IDT, PPV-NALD-2 cho kết quả tỷ lệ thai lợn có biểu hiện khô thai từ 5% đến 18% (Zeeuw và cộng sự, 2017).



Hình 3.21. Bệnh tích trên bào thai lợn sau gây nhiễm virus

Như vậy, kết quả thí nghiệm khẳng định rằng hai chủng VC5 và TX7 có khả năng gây bệnh tích điển hình trên bào thai lợn, độc lực được đánh giá ở mức cao khi so sánh với các nghiên cứu trước đây.

3.5.3. Đánh giá khả năng sinh miễn dịch của chủng parvovirus

3.5.3.1. Đánh giá khả năng sinh miễn dịch của 02 chủng VC5 và TX7 trên động vật thay thế

Với mục tiêu tuyển chọn các chủng PPV tiềm năng phục vụ nghiên cứu phát triển vắc xin, việc đánh giá khả năng sinh miễn dịch trên động vật thay thế đóng vai trò quan trọng trong việc thiết lập quy trình kiểm nghiệm hiệu quả, giảm thiểu sử dụng động vật đích ở giai đoạn sàng lọc ban đầu. So với động vật đích, mô hình thay thế như chuột lang có ưu điểm về chi phí, khả năng tiếp cận, quy trình nuôi đơn giản và được ứng dụng rộng rãi trong kiểm nghiệm nhiều loại vắc xin.

Theo nghiên cứu của Ma và cộng sự (2011), chuột lang có thể sử dụng làm mô hình đánh giá miễn dịch với virus Parvovirus lợn, trong đó hiệu giá kháng thể được xác định thông qua phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu. Dựa trên cơ sở đó, nghiên cứu này tiến hành đánh giá đáp ứng sinh miễn dịch của hai chủng PPV (VC5 và TX7) trên động vật thay thế là chuột lang.

Trong nghiên cứu này, khả năng sinh miễn dịch của hai chủng PPV (VC5 và TX7) được đánh giá trên chuột lang với liều tương đương 1/4 liều sử dụng trên lợn. Kết quả trình bày ở Bảng 3.12 và phân tích thống kê (Phụ lục 14) cho thấy hiệu giá HI trên chuột lang thay đổi rõ rệt theo nhóm, số mũi tiêm và thời gian lấy mẫu, với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê rất cao ($p < 0,001$). Mô hình tuyến tính giải thích đến 96,21% biến thiên dữ liệu ($R^2 = 96,21\%$), chứng minh tính tin cậy và độ phù hợp cao của kết quả thí nghiệm. Kết quả thí nghiệm cho thấy cả hai chủng VC5 và TX7 đều kích thích đáp ứng miễn dịch dịch thể tốt trên chuột lang, với hiệu giá HI cao và tăng dần sau mỗi mũi tiêm.

Bảng 3.12. 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

* $p < 0,001$

Sau tiêm mũi thứ nhất, hiệu giá HI chỉ tăng nhẹ, trung bình dao động 0,47–1,47 $\log_2$ ở cả hai chủng TX7 và VC5 trong khoảng 7–14 ngày. Đây là đáp ứng miễn dịch nguyên phát, thường khởi phát chậm và hiệu giá thấp. Kết quả Tukey pairwise cũng cho thấy nhóm tiêm 1 mũi có hiệu giá trung bình chỉ đạt 0,91 $\log_2$ (nhóm B), thấp hơn rõ rệt so với nhóm tiêm 2 mũi (3,53 $\log_2$, nhóm A).

Sau khi tiêm nhắc (mũi 2), hiệu giá HI tăng mạnh mẽ, phản ánh đặc trưng của đáp ứng miễn dịch thứ cấp. Ở thời điểm ngày 0 trước mũi 2, hiệu giá đã đạt 3,6 $\log_2$ (TX7) và 3,2 $\log_2$ (VC5), chứng minh khả năng hình thành trí nhớ miễn dịch từ mũi tiêm đầu tiên. Sau đó, hiệu giá tiếp tục tăng nhanh, đạt 6,2–7,6 $\log_2$ (TX7) và 5,6–7,4 $\log_2$ (VC5) vào ngày 14–21. Phân tích Tukey cho thấy nhóm TX7 tiêm 2 mũi đạt hiệu giá trung bình cao nhất (5,5 $\log_2$, nhóm A), kế đến là VC5 tiêm 2 mũi (5,1 $\log_2$, nhóm B), trong khi các nhóm tiêm 1 mũi chỉ đạt 1,3–1,4 $\log_2$ (nhóm C). Nhóm đối chứng hoàn toàn âm tính trong suốt thời gian theo dõi (0 $\log_2$, nhóm D). Kết quả so sánh cặp Tukey chỉ ra rằng sự khác biệt giữa nhóm tiêm 2 mũi và nhóm tiêm 1 mũi là hoàn toàn có ý nghĩa thống kê, chứng minh vai trò tăng cường miễn dịch của mũi tiêm nhắc lại.

Đối chiếu theo thời gian, hiệu giá HI đạt đỉnh tại ngày 21 (3,69 $\log_2$, nhóm A), cao hơn so với ngày 14 (2,44 $\log_2$, nhóm B), ngày 7 (1,62 $\log_2$, nhóm C) và ngày 0

(1,13 log₂, nhóm D). Kết quả này cho thấy thời điểm đạt kháng thể cao nhất được ghi nhận ở ngày 21 sau tiêm nhắc.

Kết quả này phù hợp với đặc điểm miễn dịch học đã được công bố, khi mũi tiêm nhắc thường làm tăng nhanh nồng độ kháng thể nhờ kích hoạt tế bào B nhớ và thúc đẩy quá trình biệt hóa tế bào plasma (Plotkin, 2010; Siegrist, 2018). Mức hiệu giá HI trong nghiên cứu này tương đương với nghiên cứu về vắc xin vô hoạt Parvovirus trên chuột lang của Ma và cộng sự, 2011. Điều này chứng minh tiềm năng ứng dụng của hai chủng VC5 và TX7 trong phát triển vắc xin phòng bệnh.

Đặc biệt, trong suốt quá trình thí nghiệm, chuột không ghi nhận biểu hiện lâm sàng bất thường, không có phản ứng phụ tại vị trí tiêm, cho thấy hai chủng virus sử dụng là an toàn trên động vật thử nghiệm. Tính an toàn được khẳng định trên mô hình chuột lang là cơ sở khoa học và thực tiễn quan trọng để tiếp tục triển khai các bước đánh giá khả năng sinh miễn dịch trên động vật đích là lợn. Việc này vừa đảm bảo an toàn sinh học trong nghiên cứu, vừa giúp sàng lọc bước đầu các chủng virus có tiềm năng, từ đó tiết kiệm thời gian và chi phí trong quá trình phát triển vắc xin.

3.5.3.2. Đánh giá khả năng sinh miễn dịch của 02 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 3.13) 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 3.13. 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

* $p < 0,001$

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.

Ảnh hưởng của số mũi tiêm cũng thể hiện rất rõ, khi nhóm được tiêm 2 mũi đạt hiệu giá HI trung bình 3,58 $\log_2$, cao hơn có ý nghĩa so với nhóm tiêm 1 mũi (0,93 $\log_2$). 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 3.13) tương đương với kết quả thu được trên mô hình chuột lang sử dụng liều 1/4 (Bảng 3.12). 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.

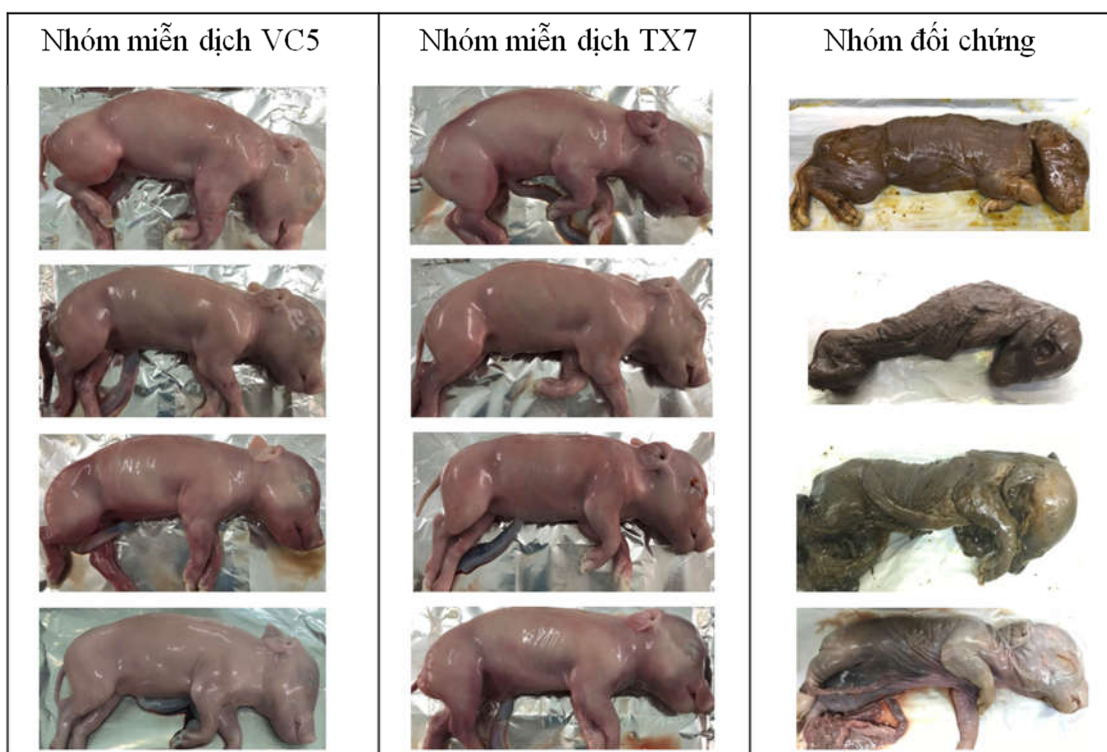
Các kết quả trên phù hợp với các nghiên cứu trước đó về khả năng sinh miễn dịch của vắc xin PPV vô hoạt. Paul và Mengeling, tác giả đã khẳng định sau liều tiêm thứ nhất hiệu giá HI tăng lên không đáng kể. Hai liều vắc-xin mang lại hiệu quả miễn dịch tốt hơn và lâu dài hơn đối với vắc-xin PPV bất hoạt (Paul và Mengeling, 1986). Nghiên cứu của van den Born và cộng sự khảo sát tính sinh miễn dịch của vắc-xin tam giá Ery + Parvo + Lepto cũng sử dụng 02 mũi tiêm và chỉ ra rằng, kháng thể xuất hiện sớm từ ngày thứ 6 và đạt đỉnh vào ngày 21 sau tiêm 2 mũi vắc xin (van den Born và cộng sự, 2020). Một nghiên cứu khác của Sørensen và cộng sự cũng sử dụng vắc-xin PPV vô hoạt với 02 mũi tiêm để gây đáp ứng miễn dịch và cho kết quả HI từ $7 \log_2$ đến $9 \log_2$ sau 2-3 tuần tiêm mũi 2 (Sørensen và Askaa, 1981).

Kết quả thí nghiệm công cường độc trên lợn nái mang thai (Bảng 3.14) cho thấy cả hai nhóm miễn dịch bằng vắc xin TX7 và VC5 đều đạt hiệu quả bảo hộ rõ rệt so với nhóm đối chứng. Ở nhóm được miễn dịch, tỷ lệ thai sống đạt lần lượt 81,82% (VC5) và 82,35% (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 3.22). 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.

Bảng 3.14. 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 %	0 %	9,09 %
				18,18 %		
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 %	82,35 %	17,65 %	0 %	9,52 %
				17,65 %		
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 %	75 %	90 %
				100 %		



Hình 3.22. Thai lợn sau công cường độc

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 3.14).

Các kết quả này tương đương với kết quả của một số nghiên cứu khác về vắc-xin PPV vô hoạt. Nghiên cứu của Sørensen và cộng sự cho kết quả 50/65 (76,92 %) thai nhiễm vi rút và 43/65 (66,15%) thai chết ở nhóm không tiêm vắc-xin, 100% thai sống ở nhóm tiêm vắc-xin (Sørensen và Askaa, 1981). Van den Born và cộng sự cũng cho thấy 69% thai lợn chết, 90% phát hiện PPV ở nhóm không tiêm vắc-xin; 100% lợn sống và 10% phát hiện PPV ở nhóm tiêm vắc-xin (Van den Born và cộng sự, 2020). Kiss và cộng sự nghiên cứu khả năng bảo hộ của Vắc-xin Parvoruvax® và 3 loại vắc-xin PPV thương mại (Vắc-xin B, Vắc-xin C, Vắc-xin D). Kết quả cho thấy sau công cường độc, 100% thai lợn sống với nhóm tiêm vắc-xin Parvoruvax® ; 89%, 92%, 64% lần lượt là tỷ lệ thai lợn sống với nhóm Vắc-xin B, Vắc-xin C, Vắc-xin D. 40% thai lợn sống sau công cường độc ở nhóm đối chứng (Kiss và cộng sự, 2020).

Trong một nghiên cứu tại Đức, Jóźwik đã tiêm vắc xin sản xuất từ chủng PPV-NADL-2 type 1 vào ngày thứ 35 và 21 trước khi thụ tinh. Vào ngày thứ 41 của thai kỳ 4ml PPV (10^6 TCID₅₀) công cường độ bằng đường nhỏ mũi. Mẫu máu được lấy lúc 3 tuần (21 ngày) và lúc 7 tuần (28 ngày) sau tiêm để xét nghiệm kháng thể. Vào ngày thứ 90 của thai kỳ, khoảng 3 tuần trước khi sinh, tất cả lợn nái đã được giết nhân đạo và phôi thai được mổ lấy thai trong điều kiện vô trùng. Sau công cường độ 66/67 thai của nhóm vắc xin sống sót, không phát hiện DNA của PPV trong bào thai; 39/50 thai của nhóm đối chứng chết và có các biểu hiện khô thai, mất nước và phát hiện DNA của PPV trong bào thai. Hiệu giá kháng thể sau 21 tiêm phòng nằm trong khoảng 1/32 đến 1/512, sau 28 ngày tiêm phòng nằm trong khoảng 1/128 đến 1/256 và đến ngày công cường độ thì giảm dần. Mặt khác nghiên cứu cho thấy bào thai từ lợn nái mang thai được tiêm vắc xin (sản xuất từ chủng PPV-NADL-2 type 1) được bảo hộ khi công cường độ với chủng PPV-27a. Tuy nhiên, ở cả nhóm lợn nái được tiêm vắc xin và nhóm đối chứng đều thải virus (PPV-27a) công cường độ ít nhất 10 ngày sau khi công (Jóźwik và cộng sự, 2009).

Noguera thử nghiệm so sánh hiệu quả của 3 loại vắc xin ReproCyc ParvoFLEX (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH), ERYSENG PARVO (HIPRA), Porcilis Ery + Parvo + Lepto (MSD Animal Health). Mỗi vắc xin được tiêm 2 mũi theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau khi tiêm vắc xin, lợn được công cường độ vào ngày 40 thai kỳ bằng chủng 401/09 (198669) phân lập tại Đức 2004 (thuộc type 1). Phôi thai được thu hoạch vào ngày 90 của thai kỳ. Kết quả sau 35 ngày sau tiêm mũi 2, bằng ELISA xác định 69% huyết thanh dương tính với PPV ở nhóm 1 (vắc xin ReproCyc ParvoFLEX), 11% huyết thanh dương tính với PPV ở nhóm 2 (vắc xin ERYSENG PARVO), không có huyết thanh dương tính ở nhóm 3 (vắc xin Porcilis Ery + Parvo + Lepto). Sau khi công cường độ Nhóm 1 có 96,5% thai khỏe mạnh, Nhóm 2 có 97,4% thai khỏe mạnh, Nhóm 3 có 88,3% thai khỏe mạnh, Nhóm đối chứng 0% thai khỏe mạnh (Noguera và cộng sự, 2021).

Trong một nghiên cứu khác, Foerster đã dùng chủng PPV-27a để sản xuất vắc xin và dùng luôn chủng này (đồng chủng) để công cường độc. Tác giả sử dụng vắc xin vô hoạt với lượng virus tương ứng 10^5 TCID₅₀. Vắc xin được tiêm vào ngày 35 trước phối giống, mũi 2 tiêm nhắc lại sau 21 ngày. Ngày 40 của thai kỳ lợn được công cường độc với liều công 5×10^6 TCID₅₀ bằng đường nhỏ mũi và tiêm bắp. Kết quả đánh giá kháng thể bằng HI đối với nhóm vắc xin cho thấy sau 18 ngày tiêm mũi 2, lợn đạt hiệu giá từ 1/40 đến 1/640 và giảm xuống còn 1/10 đến 1/320 vào ngày 54 sau tiêm mũi 2 (ngày tiến hành công cường độc). Hiệu giá kháng thể nhỏ hơn 1/10 ở nhóm đối chứng cho đến ngày tiến hành công cường độc. Vào ngày 90 của thai kỳ (49 ngày sau công), bào thai lợn được thu hoạch và đánh giá. Kết quả nhóm vắc xin có 4% thai bị thai gổ, nhóm đối chứng có 51% thai bị thai gổ (Foerster và cộng sự, 2016).

Bảng 3.15. 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

* $p < 0,001$

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 3.15) 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 hiệu giá 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 hiệu giá 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 3.13) và kết quả thử thách trên lợn nái mang thai (Bảng 3.14).

Kết quả này tương đương với một số nghiên cứu về vắc xin PPV trên thế giới. Một nghiên cứu đánh giá hiệu quả Vắc xin Parvoruvax (dựa trên chủng K22-“Kresse-like”), Vắc xin B (dựa trên chủng NADL-2), Vắc xin C,D (dựa trên chủng 014-“NADL-2-like”) cho kết quả hiệu giá kháng thể đo bằng ELISA sau tiêm chủng ở mức thấp, chỉ có 15% tổng số động vật được tiêm phòng có hiệu giá vượt quá giới hạn dương tính của bộ xét nghiệm (Kiss và cộng sự, 2020). Noguera thử nghiệm so sánh hiệu quả của 3 loại vắc xin ReproCyc ParvoFLEX (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH), ERYSENG PARVO (HIPRA), Porcilis Ery + Parvo + Lepto (MSD Animal Health). Mỗi vắc xin được tiêm 2 mũi theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tất cả lợn nái được tiêm phòng đều cho thấy chuyển đổi huyết thanh bắt đầu ở ngày 62 sau lần tiêm phòng đầu tiên. Kết quả sau 35 ngày sau tiêm mũi 2, bằng ELISA xác định 69% huyết thanh dương tính với PPV ở nhóm 1 (vắc xin ReproCyc ParvoFLEX), 11% huyết thanh dương tính với PPV ở nhóm 2 (vắc xin ERYSENG PARVO), không có huyết thanh dương tính ở nhóm 3 (vắc xin Porcilis Ery + Parvo + Lepto) (Noguera và cộng sự, 2021).

Ở một số nghiên cứu khác, kết quả đánh giá hiệu giá kháng thể PPV tương đương với nghiên cứu này. Renzhammer thu mẫu từ 12 trang trại, mẫu huyết thanh được lấy từ 180 lợn nái hậu bị và được tiêm phòng ít nhất hai lần bằng một trong ba loại vắc xin PPV thương mại khác nhau. Tất cả mẫu được kiểm tra kháng thể PPV bằng xét nghiệm ELISA. Nhóm vắc xin 1: 73,68% mẫu dương tính với kháng thể PPV, Nhóm vắc xin 2: 98,33% mẫu dương tính với kháng thể PPV, Nhóm vắc xin 3: 100% mẫu dương tính với kháng thể PPV (Renzhammer và cộng sự, 2024). Garcia-Morante đánh giá miễn dịch vắc xin tiểu phần dựa trên protein VP2 của PPV1 có tên là ReproCyc® ParvoFLEX. Vắc xin được tiêm 2 mũi cách nhau 21 ngày. Hiệu giá kháng thể trên mẫu huyết thanh lợn sau tiêm chủng được đánh giá bằng phản ứng ELISA. Kết quả 100% lợn nái tiêm vắc xin đều có xét nghiệm huyết thanh dương tính bắt đầu từ ngày 28 ngày sau tiêm mũi 1 (Garcia-Morante và cộng sự, 2020).

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 82,35% (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.

• ĐÁNH GIÁ VỀ KHẢ NĂNG SỬ DỤNG CÁC CHỦNG PPV TIỀM NĂNG VÀO SẢN XUẤT VẮC XIN

Hai chủng VC5 và TX7 được lựa chọn trong nghiên cứu này thuộc PPV1. PPV1 là nhóm có tỷ lệ phân bố cao nhất trên toàn thế giới (Streck và Truyen, 2020). PPV1 là loại virus được nghiên cứu nhiều nhất trên toàn cầu và là nguyên nhân quan trọng gây ra cái chết của phôi thai ở lợn (Parthiban và cộng sự, 2022). Theo phân tích mối quan hệ di truyền dựa trên trình tự gen NS1, hai chủng này tương đồng cao nhất với chủng PPV1-0225-L-SD, phân lập tại Trung Quốc năm 2022. Theo phân tích gen VP2, hai chủng này mối quan hệ gần nhất với chủng Kresse (phân lập từ Canada năm 1996). Theo một số nghiên cứu gần đây, vắc xin dựa trên chủng Kresse mang lại khả năng bảo vệ vượt trội hơn so với vắc xin thương mại dựa trên chủng giống NADL (Kiss và cộng sự, 2020).

Mặt khác hai chủng VC5 và TX7 có khả năng sinh trưởng phát triển tốt trên tế bào PK-15, hiệu giá $TCID_{50}/1ml$ trong các lần nuôi cấy đều cao trên 6,0. Trong các nghiên cứu về vắc xin, các chủng PPV thường được sử dụng để sản xuất vắc xin với $TCID_{50}/1ml$ trên 5,0 và công cường độc với $TCID_{50}/1ml$ trên 6,0 (Van den Born và cộng sự, 2020; Zeew và cộng sự, 2007; Foerster và cộng sự, 2016). Như vậy hai chủng này có hiệu giá hoàn toàn đáp ứng được các yêu cầu cho nghiên cứu sản xuất vắc xin PPV.

Hai chủng này có khả năng gây bệnh tích trên tế bào PK-15 và biểu đồ sinh trưởng ổn định qua 15 đời nuôi cấy trên tế bào PK-15, hiệu giá TCID₅₀/1ml qua 15 đời nuôi cấy ổn định ở mức 6,3 - 6,5. Về mặt di truyền, trình tự gen NS1 và VP2 của hai chủng này không phát hiện có sự biến đổi sau 15 đời nuôi cấy. Như vậy hai chủng này có tính ổn định cao cả về các đặc tính sinh học cũng như các đặc tính di truyền.

Hai chủng này có độc lực và khả năng sinh miễn dịch tương đương với các nghiên cứu trên một số sản phẩm vắc xin PPV thương mại (van den Born và cộng sự, 2020; Zeeuw và cộng sự, 2017; Foerster và cộng sự, 2016; Kiss và cộng sự, 2020; Józwik và cộng sự, 2009; Noguera và cộng sự, 2021; Garcia-Morante và cộng sự, 2020; Ma và cộng sự, 2011)

Những kết quả trên cho thấy hai chủng VC5 và TX7 có độc lực cao, ổn định qua nhiều đời và sinh đáp ứng miễn dịch tốt. Hai chủng này có thể trở thành các chủng tiềm năng cho các nghiên cứu tiếp theo về phát triển vắc xin phòng bệnh khô thai trên lợn.

CHƯƠNG IV

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. KẾT LUẬN

- 1) Nghiên cứu đã phân lập thành công 32 chủng Porcine Parvovirus trên dòng tế bào liên tục PK-15 từ các mẫu bệnh phẩm thu thập tại sáu tỉnh: Thái Bình, Thanh Hóa, Bình Định, Đắk Lắk, Đồng Nai và Bình Dương.
- 2) Tất cả 32 chủng PPV phân lập được đều thuộc type PPV1. Phân tích trình tự gen cho thấy không có sai khác về trình tự gen NS1 giữa các chủng, và các chủng này có mối quan hệ di truyền gần với các chủng PPV1 được phân lập tại Trung Quốc. Trình tự gen VP2 của 32 chủng PPV phân lập trong nghiên cứu này tương đồng 100%, không có sự sai khác trong trình tự. Cây phân loại cho thấy các chủng PPV trong nghiên cứu này có mối quan hệ gần nhất với chủng Kresse (phân lập từ Canada năm 1996) và chủng PPV1-0225-L-SD (phân lập từ Trung Quốc năm 2022).
- 3) Điều kiện nuôi cấy thích hợp cho chủng Parvovirus trong nghiên cứu này được xác định là: sử dụng môi trường E-MEM bổ sung 5% FBS, 1% kháng sinh, tại nhiệt độ 37°C và 5% CO₂. Virus phát triển nhanh từ ngày 1 đến ngày 4, đạt đỉnh sinh trưởng tại ngày thứ 5, ổn định từ ngày 5 đến ngày 7. Hiệu giá virus của các chủng PPV dao động từ 4,5 đến 6,3 log₁₀ TCID₅₀/1ml. Trong đó, hai chủng VC5 và TX7 có hiệu giá cao nhất và được tuyển chọn để đánh giá về độ ổn định, độc lực và tính sinh miễn dịch.
- 4) Hai chủng VC5 và TX7 có đặc tính sinh và đặc tính di truyền ổn định qua 15 đời nuôi cấy. Hai chủng này có độc lực cao, gây chết 100% thai lợn, trong đó 71% (TX7) đến 80% (VC5) thai lợn có biểu hiện bệnh tích điển hình. Hai chủng này có khả năng sinh đáp ứng miễn dịch tốt trên lợn và trên chuột lang với hiệu giá HI tăng dần sau tiêm, đạt mức cao vào ngày 21 sau mũi vắc xin thứ hai. Đặc biệt, hai chủng VC5 và TX7 có khả năng bảo hộ tốt trên lợn với tỷ lệ 81,82% - 82,35% thai sống sau công cường độc.

4.2. 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 Parvovirus ở lợn. Để tiến tới hoàn thiện quy trình nghiên cứu và ứng dụng hai chủng này vào phát triển vắc xin phòng bệnh Parvovirus 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).
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. 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 Phát triển Nông thôn, (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 Phát triển Nông thôn, (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 type 2.
3. Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, (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 Phát triển Nông thôn, (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. 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.
6. 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.
7. 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 vaccin phòng hội chứng còi cọc ở lợn con”. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 13(3), tr. 406-415.
8. 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.
9. 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.
10. 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 cây truyền”. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y*, 23(6), tr. 5-13.
11. 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.
 12. 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.
 13. 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.
 14. Phạm Văn Ty (2013) “*Virut học*”, Nhà xuất bản giáo dục Việt Nam.
 15. 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.
 16. Thông tư 07/2016/TT-BNNPTNT ngày 31/5/2016, Thông tư quy định về phòng, chống dịch bệnh động vật trên cạn.
 17. 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.
 18. Võ Văn Ninh (2003) “*Những bệnh truyền lan giữa người và gia súc*”, Nhà xuất bản trẻ.

Tiếng Anh

19. 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.
20. 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.
21. Bergeron J., Hébert B., and Tijssen P., (1996), “Genome organization of the Kresse strain of porcine Parvovirus: identification of the allotropic determinant and comparison with those of NADL-2 and field isolates”, *Journal of Virology*, 70, pp. 2508–2515.
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. Cadar D., Cságola A., Kiss T., and Tuboly T., (2013), "Capsid protein evolution and comparative phylogeny of novel porcine parvoviruses". *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66, pp. 243-253.
25. 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.
26. 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
27. 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.
28. Cho K-N., Ouh I-O., Park Y-M., Park M-H., Min K-M., Kang H-J., Yun S-Y., Song J-Y., Hyun B-H., and Park C-K., (2023), "A Plant-Produced Porcine Parvovirus 1-82 VP2 Subunit Vaccine Protects Pregnant Sows against Challenge with a Genetically Heterologous PPV1 Strain", *Vaccines*, 11(54).
29. 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.
30. 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.
31. Cotmore, S. F., & Tattersall, P. (2014). "Parvoviruses: Small does not mean simple". *Annual Review of Virology*, pp.1517–1537.
32. 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).
33. Cui J., Biernacka K., Fan J., Gerber P. F, Stadejek T., and Opriessnig T., (2017), "Circulation of Porcine Parvovirus Types 1 through 6 in Serum Samples Obtained from Six Commercial Polish Pig Farms", *Transboundary and Emerging Diseases*, 64, pp. 1945-1952
34. Díaz C., Celer V., and Frébort I., (2021), "The main DNA viruses significantly affecting pig livestock", *Journal of Veterinary Research*, 65, pp. 15-25.

35. Dang- Nguyen T. Q., Tich N. K., Nguyen B. X., Ozawa M., Kikuchi K., Manabe N., Ratky J., Kanai Y., and Nagai T., (2010), "Introduction of various vietnamese indigenous pig breeds and their conservation by using assisted reproductive techniques". *Journal of Reproduction and Development*. 56(1).
36. Deka D., Barman N.N., Deka N., Batth B.K., Singh G., Singh S., Agrawal R.K., Mukhopadhyay C.S, Ramneek, (2021), "Sero-epidemiology of porcine parvovirus, circovirus, and classical swine fever virus infections in India". *Tropical Animal Health and Production*. 53(1):180.
37. 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.
38. 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.
39. Felsenstein (1985), Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, pp. 783–791.
40. 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.
41. Gao F., Zhang J., Xu H., Xie Y., Wang Y., Sun J., Liu X., Wu D., Chen Y., Wang Y., and Jiang P. (2022). "Self-assembly of porcine parvovirus virus-like particles for large-scale manufacture in *Escherichia coli*". *Viruses*, 14(8):1711.
42. 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).
43. 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.
44. Garcia-Morante B., Noguera M., Klocke S., Sommer K., 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
45. 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.
46. Harbinson C. E., Chiorini J. A., Parrish C., (2008), "The parvovirus capsid odyssey: from the cell surface to the nucleus", *Trends in Microbiology*, 16, pp. 208-214.

47. 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.
48. Huang L., Zhai S. L., Cheung A. K., Zhang H. B., Long J.X., and Yuan S. S., (2010), "Detection of a novel porcine Parvovirus, PPV4, in Chinese swine herds", *Virology Journal*, 7.
49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. 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.
54. Leal É., Villanova F., Richtzenhain L., and Brandão P. (2012). "Interclade recombination in porcine parvovirus strains". *Journal of General Virology*, 93(Pt 2), 269–276
55. 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.
56. 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
57. Ling Z., Zhang H., Chen Y., Sun L., and Zhao J., (2023), "A Subunit Vaccine Based on the VP2 Protein of Porcine Parvovirus 1 Induces a Strong Protective Effect in Pregnant Gilts". *Vaccines (Basel)*, 11(11):1692.
58. 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
59. Liu D. (2022). “*Molecular Detection of Animal Viral Pathogens*”. 1st Edition. Taylor and Francis Group. Chapter 80: Porcine Parvovirus, pp.713-716.
 60. Luo, Y., Qiu, J. (2015). “Parvovirus infection-induced cell death and cell cycle arrest”. *Future Virology*, 10(4), 371–390.
 61. 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.
 62. 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.
 63. 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.
 64. 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
 65. Mengeling, W. L.; Cutlip, R. C.; Wilson, R. A.; Parks, J. B. & Marshall, R. F. (1975). "Fetal mummification associated with porcine parvovirus infection". *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 166 (10): 993–995. PMID 1126862
 66. 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.
 67. Mészáros I., Olasz F., Cságola A., Tijssen P., and Zádori Z., (2017). “Review Biology of Porcine Parvovirus (Ungulate Parvovirus 1)”, *Viruses*, 9(12): 393.
 68. 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.
 69. 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.
 70. 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

71. 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.
72. 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.
73. 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
74. 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
75. Oh W.T., Kim J., Kim H.Y., Cho S.H., Kim H.J., Kim D., Lee K.K., and Lee C. (2009). "Genetic diversity of porcine parvovirus isolates based on analysis of the VP2 gene". *Journal of Veterinary Medical Science*, 71(7), 923–927
76. 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.
77. 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
78. 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.
79. Parthiban S., Sowndhraya 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).
80. 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.
81. Plotkin, S. A. (2010). "Correlates of protection induced by vaccination". *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(7), 1055–1065
82. 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.

83. Reed L. J., Muench H. (1938), "A simple method of estimating fifty per cent endpoints". *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 27: 493-497
84. Renzhammer R., Truyen U., Buchebner B., G. Baumgartner, Kobialka R. M. , Wahed A. A. E. , Koch M. , Ladinig A. , 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.
85. Ren X., Tao Y., Cui J., Suo S., Cong Y., and Tijssen P. (2013). "Phylogeny and evolution of porcine parvovirus". *Virus Research*, 178(2), 392–397
86. Ros C., Bayat N., Wolfisberg R., and Almendral, J.M. (2017). "Protoparvovirus Cell Entry". *Viruses*, 9(11): 313
87. 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.
88. 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.
89. Schirtzinger, E. E., Suddith A. W., Hause B. M., 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.
90. Shangjin C., Xiaohong W., Yanming Z., Xin Z., Xiaobo W., Xintian W., and Ling L. (2009). "Phylogeny and evolution of the NS1 and VP1/VP2 gene sequences from porcine parvovirus". *Virus Research*, 140(1–2), 1–7
91. 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
92. 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.
93. Soares M.R., Cortez A., Heinemann M.B., Sakamoto S.M., Martins V.G., Bacci Jr., M., De Campos Fernandes F.M., and Richtzenhain L.J., (2003), "Genetic variability of porcine Parvovirus isolates revealed by analysis of partial sequences of the structural coding gene VP2", *Journal of General Virology*, 84, pp. 1505–1515
94. Song C., Zhu C., Zhang C., and Cui S. (2010), "Detection of porcine parvovirus using a taqman-based real-time pcr with primers and probe designed for the NS1 gene", *Virology Journal*, 7(353).
95. Sørensen K. J., and Askaa J., (1981), "Vaccination against porcine parvovirus infection", *Acta Veterinaria Scandinavica*, 22(2), pp. 171-179.

96. 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).
97. Sun J., Huang L., Wei Y., Wang Y., Chen D., Du W., Wu H., 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.
98. Streck A.F., Canal C.W., Truyen U. (2011). “Molecular epidemiology and evolution of porcine parvoviruses”. *Journal of General Virology*, 92(Pt 5), 965–973
99. 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.
100. Streck A. F. (2013), *Studies on genetic properties of porcine parvoviruses*, Faculty of Veterinary Medicine of the University of Leipzig.
101. 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.
102. Streck A.F., and Truyen U., (2020)., “Porcine Parvovirus”, *Current Issues in Molecular Biology*, 37(1), pp. 33-46.
103. 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.
104. 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.
105. 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
106. 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.
107. Walker, P.J., Siddell, S.G., Lefkowitz, E.J., Mushegian, A.R., Adriaenssens, E.M., Dempsey, D.M., Dutilh, B.E., Harrach, B., Harrison, R.L., Hendrickson, R.C., Junglen, S., Knowles, N.J., Kropinski, A.M., Krupovic, M., Kuhn, J.H., Nibert, M., Orton, R.J., Rubino, L., Sabanadzovic, S., Simmonds, P., Smith, D.B., Varsani, A., Zerbini, F.M., and Davison, A.J. (2020). “Changes to virus taxonomy and the Statutes ratified

- by the International Committee on Taxonomy of Viruses”, *Archives of Virology*, 165(11), pp. 2737-2748.
108. 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
 109. 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).
 110. 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.
 111. 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.
 112. Vereecke N., Kvisgaard L.K., Baele G., Boone C., Kunze M., Larsen L.E., Theuns S., and Nauwynck H., (2022), “Molecular epidemiology of Porcine Parvovirus Type 1 (PPV1) and the reactivity of vaccine-induced antisera against historical and current PPV1 strains”, *Virus Evolution*, 8(1):veac053.
 113. 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.
 114. 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.
 115. 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.
 116. Xie Q., Wang J., Gu C., Wu J., and Liu W., (2023), “Structure and function of the parvoviral NS1 protein: a review”. *Virus Genes*, 59(2), pp. 195-203.
 117. 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.
 118. Xu X. G., Chen G. D., Huang Y., Ding L., Li Z. C., Chang C. D., Wang C. Y., Tong D. W., and Liu H. J., (2012), “Development of multiplex PCR for simultaneous detection of six swine DNA and RNA viruses”, *Journal of Virological Methods*, 183, pp. 69-74
 119. 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.

120. 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.
121. 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.
122. Yang S., Wang J., Shan T., Zhao W., Deng X., Wen X., Zhang W., Hua X., and Delwart E. (2012). "Isolation and characterization of porcine parvovirus 5 from healthy pigs in China". *PLoS ONE*, 7(6), e41546
123. 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.
124. Zimmermann P., Ritzmann M., Selbitz H. J., Heinritzi K., and Truyen U., (2006), "VP1 sequences of German porcine Parvovirus isolates define two genetic lineages", *Journal of General Virology*, 87, pp. 295–301.
125. Zhang C. F., Song C. P., Chen C. M., Cui S. J., and Miao L. F., (2010), "Reproductive failure in wild boars associated to porcine parvovirus infection and in vivo and in vitro characterization of the causal isolate", *Tropical Animal Health and Production*, 42, pp. 1611–1613.
126. 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.
127. 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.
128. 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.
129. 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.
130. 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.
131. 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).
132. 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

133. <https://www.msd-animal-health-swine.com/diseases-solutions/sowcare/parvoviro-sis>
134. <https://www.nadis.org.uk/disease-a-z/pigs/porcine-parvovirus>
135. Trang web Cơ quan thống kê quốc gia: <https://www.nso.gov.vn/>
136. <https://viralzone.expasy.org>
137. <https://greenvet.com.vn>
138. <https://hoanto.com>
139. <https://tienphatvethcm.com.vn>
140. <https://tigervet.com.vn>
141. <https://goldenvet.com.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 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 được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi như sau (Miao và cộng sự, 2009):

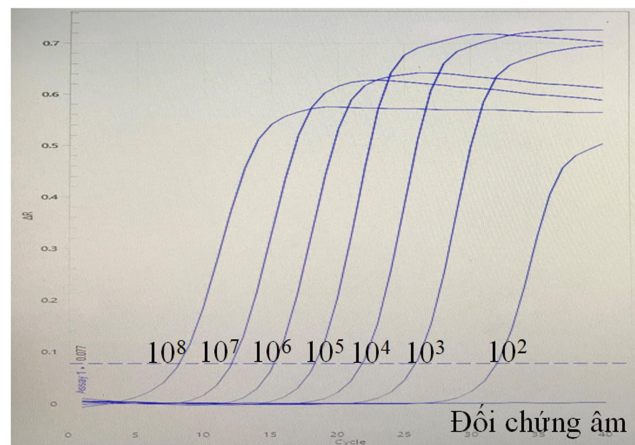
NS1-F: 5'-AGCCAAAAATGCAAACCCCAATA-3',

NS1-R: 5'-CTCCACGGCTCCAAGGCTAAAG-3'

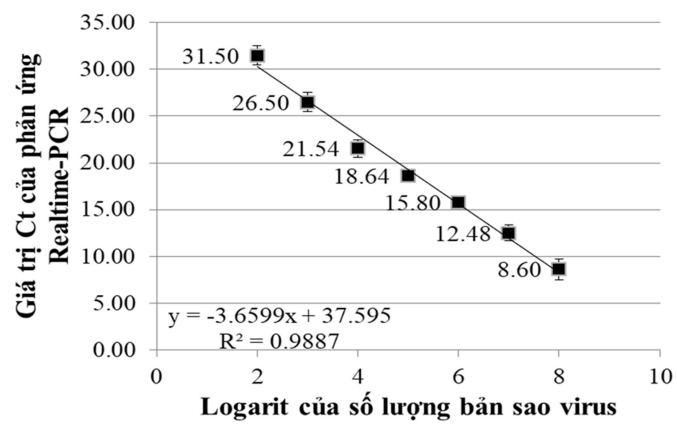
Sản phẩm PCR được chèn vào vector pGEM-T (Promega). Sau đó plasmid tái tổ hợp được biến nạp vào chủng *E.coli* DH5 α . Plasmid được tách chiết bằng kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN). Nồng độ của plasmid tái tổ hợp được đo bằng máy quang kế UV/Vis (BioPhotometer plus - Eppendorf). Bằng cách sử dụng công cụ DNA Copy Number Calculator trên Thermo Scientific Web Tools, số lượng bản sao được tính toán dựa trên nồng độ của plasmid. Sản phẩm plasmid thu được sẽ được pha loãng cấp số 10. Các nồng độ pha loãng này sẽ được sử dụng để tiến hành phản ứng Realtime-PCR. Kết quả Ct thu được từ phản ứng Realtime-PCR sẽ được ghi nhận để xây dựng đường chuẩn (Miao và cộng sự, 2009).

- *Kết quả xây dựng đường chuẩn*

Đoạn gen NS1 có kích thước 142bp được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi NS1-F, NS1-R (Miao và cộng sự, 2009) và được chèn thành công vào vector pGEM-T (3kb). Plasmid ban đầu có nồng độ là 0,034 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Sử dụng công cụ DNA Copy Number Calculator trên Thermo Scientific Web Tools, số lượng bản sao xác định được là $1,008 \times 10^{10}$ bản sao/ μl . Plasmid sau đó được pha loãng theo tỷ lệ 10 lần. Các phản ứng Realtime-PCR được lặp lại 3 lần. Kết quả Ct từ các phản ứng Realtime-PCR như Hình 1, và đường chuẩn định lượng số bản sao được xây dựng như Hình 2. Dựa trên đường chuẩn này, với mỗi giá trị Ct của phản ứng Realtime-PCR sử dụng cặp mồi NS1-F và NS1-R (Miao và cộng sự, 2009), số lượng bản sao virus có trong mẫu DNA có thể tính toán được.



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 lấm chấm.
- 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 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$.
- **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 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$.
 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 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

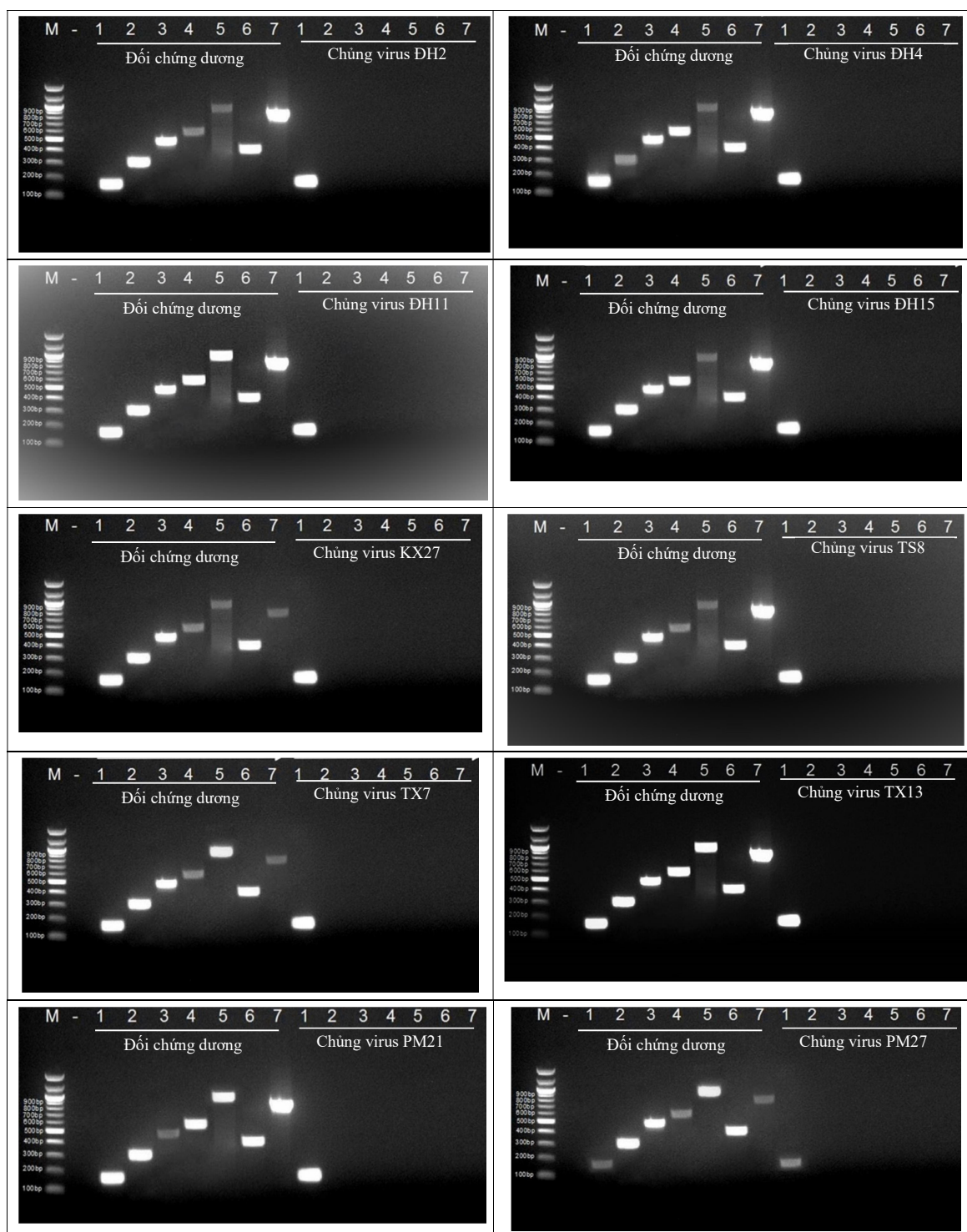
Tỉnh	Mẫu	Đời nuôi cấy	Bệnh tích tế bào* (%)						
			Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5	Ngày 6	Ngày 7
Thái Bình	ĐH2	P1	0	0	10	30	40	50	65
		P2	0	10	30	40	55	75	75
		P3	0	20	30	50	60	70	80
	ĐH4	P1	0	0	5	10	20	30	40
		P2	0	5	10	20	30	45	55
		P3	0	10	30	40	50	60	70
	ĐH11	P1	0	10	25	45	55	60	70
		P2	0	20	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

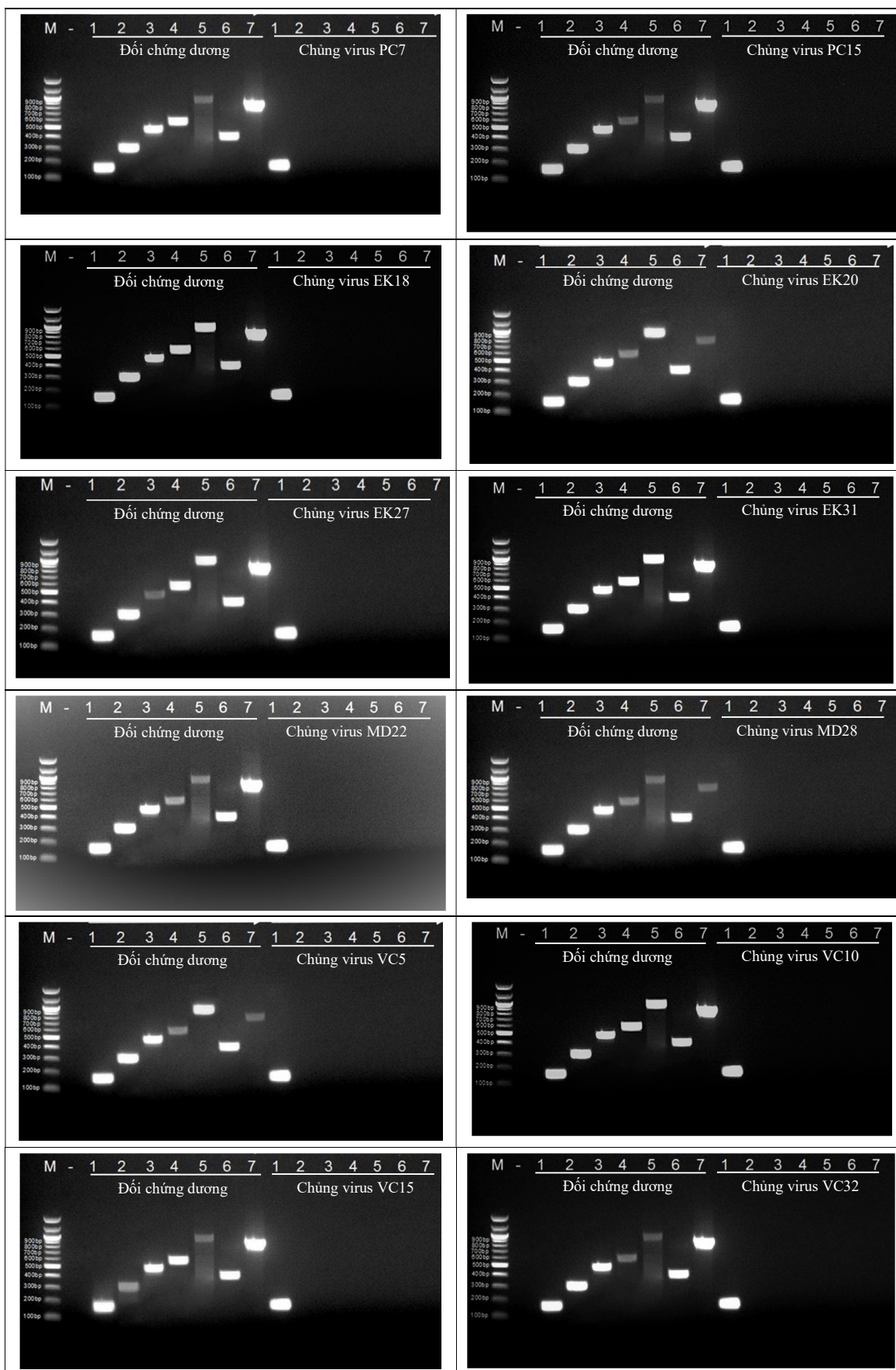
		P3	0	10	25	40	50	60	70
	EK20	P1	0	0	5	10	25	35	45
		P2	0	5	10	25	30	40	60
		P3	0	10	25	35	45	65	75
	EK27	P1	0	10	25	40	50	60	75
		P2	0	20	35	45	55	65	85
		P3	0	35	50	60	70	80	90
	EK31	P1	0	0	0	0	10	20	35
		P2	0	5	10	20	30	40	55
		P3	0	10	15	25	40	65	75
	MD22	P1	0	0	0	0	10	20	30
		P2	0	0	10	20	35	50	60
		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

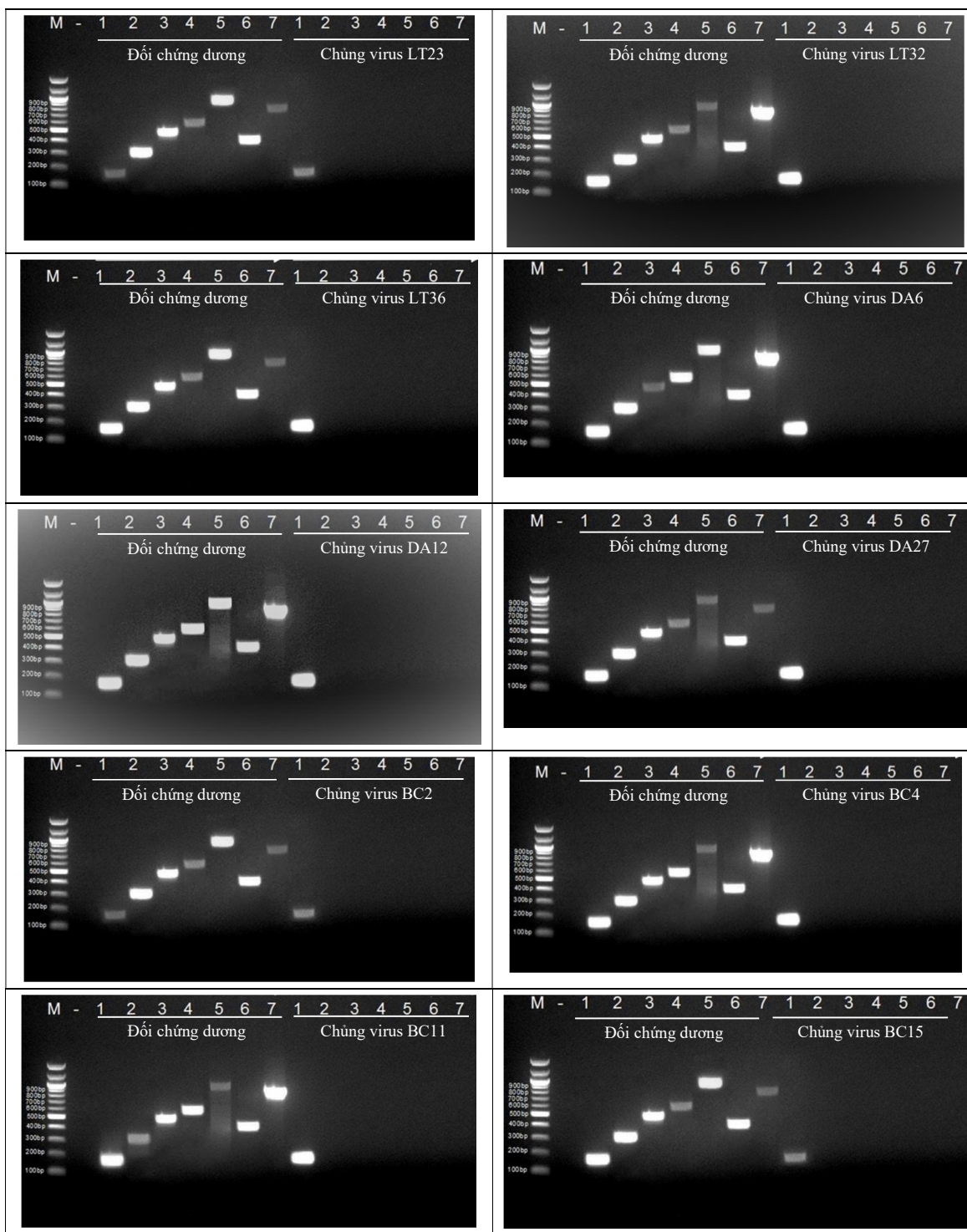
	DA27	P3	0	35	50	65	75	80	90
		P1	0	0	5	10	20	30	40
		P2	0	5	10	20	30	45	55
		P3	0	10	30	40	50	65	75
	BC2	P1	0	0	10	30	40	50	65
		P2	0	10	20	30	50	60	70
		P3	0	15	35	45	55	70	80
	BC4	P1	0	0	0	0	10	20	35
		P2	0	5	10	20	30	40	55
		P3	0	10	15	25	40	65	75
	BC11	P1	0	10	25	40	50	75	85
		P2	0	30	45	55	70	80	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: Đồi nuôi cấy thứ nhất; P2: Đồi nuôi cấy thứ hai; P3: Đồi 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
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATG
TGAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAG
AAGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCG
GGCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGA
ACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAA
TAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

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

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATG
TGAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAG
AAGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCG
GGCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGA
ACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAA
TAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

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

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATG
TGAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAG
AAGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCG
GGCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGA
ACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAA
TAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

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

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATG
TGAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAG
AAGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCG
GGCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGA
ACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAA
TAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

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

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATG
TGAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAG
AAGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCG
GGCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGA
ACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAA
TAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

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

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATG
TGAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAG
AAGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCG
GGCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGA
ACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAA
TAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

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

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATG
TGAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAG
AAGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCG
GGCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGA
ACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAA
TAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

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

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATG
TGAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAG
AAGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCG
GGCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGA
ACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAA
TAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

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

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATG
TGAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAG
AAGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCG
GGCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGA
ACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAA
TAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

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

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATG
TGAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAG
AAGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCG
GGCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGA
ACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAA
TAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

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

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATG
TGAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAG
AAGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCG

GGCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGA
ACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAA
TAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

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

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATG
TGAACCTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAG
AAGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCG
GGCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGA
ACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAA
TAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

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

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATG
TGAACCTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAG
AAGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCG
GGCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGA
ACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAA
TAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

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

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATG
TGAACCTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAG
AAGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCG
GGCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGA
ACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAA
TAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

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

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATG
TGAACCTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAG
AAGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCG
GGCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGA
ACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAA
TAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

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

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATG
TGAACCTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAG
AAGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCG
GGCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGA
ACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAA
TAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

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

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATG
TGAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAG
AAGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCG
GGCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGA
ACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAA
TAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

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

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATG
TGAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAG
AAGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCG
GGCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGA
ACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAA
TAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

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

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATG
TGAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAG
AAGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCG
GGCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGA
ACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAA
TAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

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

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATG
TGAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAG
AAGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCG
GGCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGA
ACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAA
TAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

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

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATG
TGAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAG
AAGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCG
GGCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGA
ACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAA
TAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

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

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATG
TGAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAG
AAGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCG

GGCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGA
ACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAA
TAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

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

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATG
TGAACCTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAG
AAGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCG
GGCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGA
ACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAA
TAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

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

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATG
TGAACCTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAG
AAGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCG
GGCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGA
ACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAA
TAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

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

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATG
TGAACCTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAG
AAGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCG
GGCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGA
ACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAA
TAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

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

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATG
TGAACCTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAG
AAGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCG
GGCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGA
ACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAA
TAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

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

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATG
TGAACCTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAG
AAGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCG
GGCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGA
ACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAA
TAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

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

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATG
TGAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAG
AAGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCG
GGCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGA
ACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAA
TAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

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

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATG
TGAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAG
AAGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCG
GGCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGA
ACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAA
TAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

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

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATG
TGAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAG
AAGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCG
GGCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGA
ACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAA
TAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

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

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATG
TGAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAG
AAGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCG
GGCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGA
ACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAA
TAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

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

ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTC
AACACATTGCAAACCTTGGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATG
TGAACTTTCCATTTAATGACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAG
AAGCAGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCG
GGCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAGCAAACAAATTGA
ACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAA
TAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA

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 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-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 tcgacgtaaa 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 caaaaaccac
841 taaaattaac tcatcatgg 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 ctcctatagt accaacagca gacacacaat ataattgatga tgaaccaaatt ggtgctataa

```

1141 gatttacaat gggttaccaa catggacaat taaccacatc tacacaagaa ctagaagat
1201 acacattcaa tccacaaagt aaatgtggaa gagctccaaa acaacaattht aatcaacagg
1261 caccactaaa cctagaaaaat acaataaatg 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 aacttttggg ggaaaggaa actaacattc acagcaaaaa
1621 tgagatccag taatatgtgg aacctattc 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 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 atgaacaag
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  taatacacia  tacatgaatt  ttggatactc  caatggtgga  ccattttctaa
1081 ctctatagt  accaacagca  gacacacaat  ataatgatga  tgaaccaaat  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  ccaaatgggt  aaatatggga  taaagaactt  gatacagatc
1441 taaaacctag  actacatggt  acagctccat  ttgtttgtaa  aaacaatcca  ccaggacaac
1501 tattttgtaa  aatagcacca  aacctaacag  atgatttcaa  tgctgactct  cctcaacaac
1561 ctagaataat  aacctattca  aacttttggg  ggaaaggaac  actaacattc  acagcaaaaa
1621 tgagatccag  taatatgtgg  aacctatttc  aacaacacac  aacaacagca  gaaaacattg
1681 gtaactatat  tcctacaaat  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 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 acaaattatt
481 caatcactta tactcaccac cattacacaa tatacaacaa caatctaact gcaagcttaa
541 tggctgcact 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 taatacaca tacatgaatt ttggatactc caatggtgga ccatttctaa
1081 ctccctatagt accaacagca gacacacaat ataatgatga tgaaccaaat ggtgctataa
1141 gattttacaat 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 acctgtattt ccaaatgggc aaatatggga taaagaactt gatcacagatc
1441 taaaacctag actacatgtt acagctccat ttgtttgtaa aaacaatcca ccaggacaac
1501 tattttgtaa aatagcacca aacctaacag atgatttcaa tgctgactct cctcaacaac
1561 ctagaataat aacctattca aacttttggg ggaaaggaa actaacattc acagcaaaaa
1621 tgagatccag taatatgtgg aaccctattc 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 acacaaccct attaatgcag gcactgaatt gtctgcaaca
61 ggaaatgaat ctgggggtgg gggcggcggt ggcgggggta ggggtgctgg gggggttggt
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 caaaaatgag
361 agttggatta aataccangc gaaacttatt cttaatatcc cacaacatga cagaaaatat
421 atcttaaatt agatttcata caaaaaatat tcgacgtaaa taactgtatt acaaatattt
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 acaacaataa acagactcaa
721 tacaacagag actacacagt gacattatgt tctacacaat agaaaatgca gtaccaattc
781 atcttctaag aacaggagat gaattctcca caggaatata tcactttgac acaaaaccac
841 taaaattaac tcaatcatgg caaacaacaa gatctctagg actgcctcca aaactactaa
901 ctgaacctac cacagaagga gaccaacacc caggaaactc accagcagct aacacaagaa
961 aaggttatca ccaacaatt aataatagct acacagaagc aacagcaatt aggccagctc
1021 aggtaggata taatacacia tacatgaatt ttggatactc caatggtgga ccatttctaa
1081 ctctatagt accaacagca gacacacaat ataatgatga tgaaccaaat ggtgctataa
1141 gattttacaat gggttaccaa 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 acctgtatth ccaaatgggc aaatatggga taaagaactt gatacagatc
1441 taaaacctag actacatgth acagctccat ttgtttgtaa aaacaatcca ccaggacaac
1501 tatttgtaaa aatagcacca aacctaacag atgatttcaa tgctgactct cctcaacaac
1561 ctagaataat aacctattca aacttttggt ggaaagggaac actaacattc acagcaaaaa
1621 tgagatccag taatatgtgg aaccttatth aacaacacac aacaacagca gaaaacattg
1681 gtaactatat tcctacaaat attggtggga taaaaatgth 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;
               Protoperovirus; Protoperovirus unguatell.
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 gggcgggcgt ggcgggggta ggggtgctgg gggggttggt
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 atcttaaaatt agatttcata caaaaaatat tgcagctaaa taactgtatt acaaaattatt
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 aaggttatca ccaacaattt aataatagct acacagaagc aacagcaatt aggccagctc
1021 aggtaggata taatacacaa tacatgaatt ttggatactc caatggtgga ccattttctaa
1081 ctcttatagt accaacagca gacacacaat ataattgatg tgaaccaaatt ggtgctataa
1141 gattttacaat gggttaccaa catggacaat taaccacatc tacacaagaa ctagaaagat
1201 acacattcaa tccacaaaag aaatgtggaa gagctccaaa acaacaattt aatcaacagg
1261 caccactaaa cctagaaaat acaataaatg gaacactttt accttcagat ccaataggag
1321 ggaaacctaa catgcatttc atgaatacac tcaatacata tggaccatta acagactaaa
1381 acaatactgc acctgtattt ccaaatgggtc aaatatggga taaagaactt gatacagatc
1441 taaaacctag actacatggt acagctccat ttgtttgtaa aaacaatcca ccaggacaac
1501 tatttgaata aatagcacca aacctaacag atgatttcaa tgctgactct cctcaacaac
1561 ctagaataat aacctattca aacttttggg ggaaagggaac 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 ungulatel.

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	atgagtga	aatgga	acacaac	cctatta	atgcag	gcactga	attgtct	gcaaca
61	ggaaatg	aactgg	ggcggg	gcgggt	ggcggg	ggtgct	gggggt	gttgg
121	atgtctac	atgcag	attcca	aaatcaa	acataa	ttcttgg	gatgat	tgaa
181	tacaatc	actgcac	actctc	gtacatc	ctataa	aatatgc	acaga	actatt
241	tatacaaaa	acaacat	gtcctc	aaaatac	aaatcaa	gactcta	caaa	caag
301	aatattc	accactc	ctcaaat	ttaactc	cttactc	atgctca	cacaa	atgag
361	agttggat	taaccan	gcgactt	attctta	cttaata	tccaca	acatga	caaaaat
421	atcttaa	attcata	caaaaaa	ataatc	gcagtaa	taactgt	attata	attatt
481	caatcact	ttaacc	acacata	caataa	caatcta	actgaa	gcttaa	aa
541	tggtcgc	actacaa	aatcact	ttcac	agcagc	acacta	ataagt	gaaa
601	cacttggt	ttatcca	tgtgg	ttacct	acaa	atacaga	tattac	tcat
661	gcaccaga	aaatcca	ccaacata	cataca	ctggaca	atcaaa	ataact	caa
721	tacaaac	agactac	agattat	gttaca	aataga	aaaaat	gcaact	ttc
781	atcttcta	agaggat	gaattct	ccaaga	aatata	ttctttg	acaaa	accac
841	taaaatta	acatcat	ggcaaaa	acagat	gatctct	agctcca	aaacta	ctaa
901	ctgaacct	acagaag	gaacca	accac	caggaa	accagc	aacaca	agaa
961	aaggttat	caaaaca	attatag	ctacaga	agcaag	aacagca	attagg	cctc
1021	aggtagg	ataacaa	tacatga	atttgg	atactc	caatgg	tggata	ctaa
1081	ctcctat	agacaga	caacaca	aatatga	tgaacaa	aatggt	gtatata	aa
1141	gatttaca	atggtac	caatgga	gagctcc	aaaaca	aatcaa	acagg	g
1201	acacatt	caaaagt	aatgtgg	aaatgga	gaacttt	accttc	agag	g
1261	caccact	aaaact	aaataat	gaacact	ttcag	ccaat	aggag	g
1321	gaaaccta	atgcat	ttcaca	taataca	tggacc	ataac	agact	aa
1381	aaaactgc	actgtatt	ccaaatg	gtcaca	aatatgg	aaagaac	ctgac	atc
1441	taaaacct	agcatgt	ttccat	ttgttt	gttaa	aaacaat	ccagg	aac
1501	tatttgt	aaagacca	aaactaac	agatttc	aaatg	tgctgac	ctca	aac
1561	ctagaata	aatattca	aactttt	ggaaagg	aaacatt	acagcaa	aaaaa	g
1621	tgagatcc	aatatgtg	aacctatt	caaacac	aaacag	caaat	gattg	g
1681	gtaactata	ttacaaa	attggtg	gcaaaa	aatgtt	tcagaat	ataact	ta
1741	taccaagaa	attatact	ag					

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

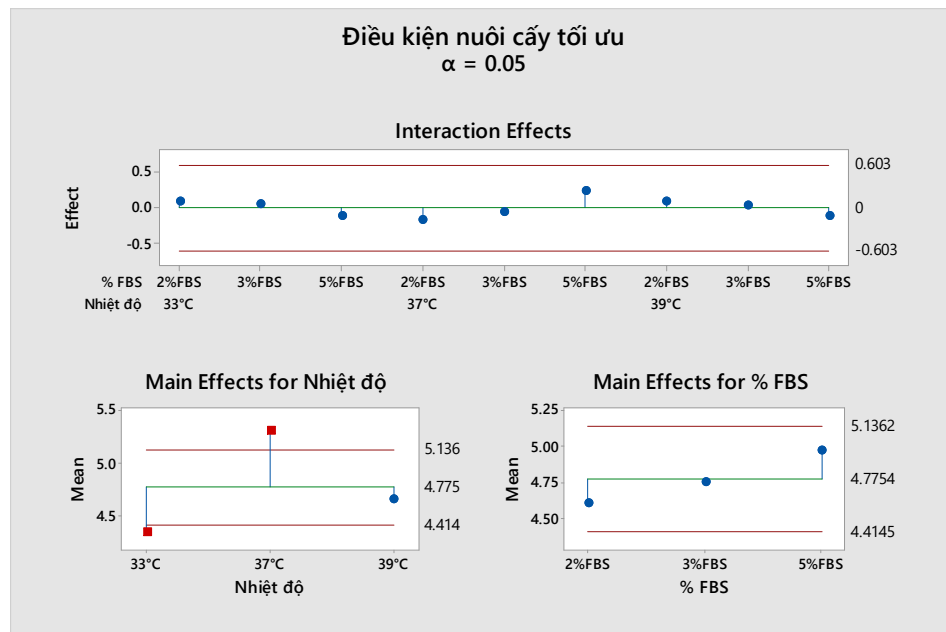
Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

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

$$\begin{aligned}
 \text{Hiệu giá trung bình TCID50/1ml} = & 4.98438 + 1.0156 \text{ Mẫu_BC11} - 0.4844 \text{ Mẫu_BC15} \\
 & + 0.0156 \text{ Mẫu_BC2} \\
 & - 0.4844 \text{ Mẫu_BC4} + 0.5156 \text{ Mẫu_DA12} - 0.4844 \text{ Mẫu_DA27} \\
 & - 0.3844 \text{ Mẫu_DA6} + 0.4156 \text{ Mẫu_ĐH11} - 0.4844 \text{ Mẫu_ĐH15} \\
 & + 0.1156 \text{ Mẫu_ĐH2} - 0.3844 \text{ Mẫu_ĐH4} - 0.4844 \text{ Mẫu_EK18} \\
 & - 0.4844 \text{ Mẫu_EK20} + 0.5156 \text{ Mẫu_EK27} - 0.3844 \text{ Mẫu_EK31} \\
 & + 1.1156 \text{ Mẫu_KX24} - 0.4844 \text{ Mẫu_LT23} - 0.4844 \text{ Mẫu_LT32} \\
 & + 0.0156 \text{ Mẫu_LT36} - 0.3844 \text{ Mẫu_MD22} - 0.3844 \text{ Mẫu_MD28} \\
 & - 0.4844 \text{ Mẫu_PC15} + 0.5156 \text{ Mẫu_PC7} + 0.1156 \text{ Mẫu_PM21} \\
 & - 0.4844 \text{ Mẫu_PM27} - 0.4844 \text{ Mẫu_TS8} - 0.3844 \text{ Mẫu_TX13} \\
 & + 1.3156 \text{ Mẫu_TX7} + 1.0156 \text{ Mẫu_VC10} - 0.4844 \text{ Mẫu_VC15} \\
 & + 0.1156 \text{ Mẫu_VC32} + 1.3156 \text{ Mẫu_VC5}
 \end{aligned}$$

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 mũ tiêu

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Số mũ tiêu	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 mũ tiêu

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Nhóm*Số mũ tiêu	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.