

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

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

KHÁNH HÒA-2025

Công trình được hoàn thành tại Trường Đại học Nha Trang

**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

Luận án được bảo vệ tại Hội đồng đánh giá luận án cấp trường họp tại Trường Đại học Nha Trang vào hồi 8 giờ, ngày 22 tháng 11 năm 2025

Có thể tìm hiểu luận án tại: Thư viện Quốc gia và Thư viện Trường Đại học Nha Trang

MỤC LỤC

	Trang
Mở đầu	1
Chương I – Tổng quan về vấn đề nghiên cứu.....	3
1.1. Tổng quan về đối tượng nghiên cứu	3
1.1.1. Tổng quan về bệnh khô thai lợn	3
1.1.2. Tổng quan về Parvovirus.....	3
1.2. Tổng quan về địa điểm nghiên cứu.....	4
1.3. Tổng quan về phương pháp nghiên cứu	4
1.4. Tổng quan về tình hình nghiên cứu	5
1.4.1. Sự lưu hành của PPV và tiềm năng ứng dụng vào nghiên cứu sản xuất vắc xin	5
1.4.1.1. Sự lưu hành của PPV trên thế giới và Việt Nam.....	5
1.4.1.2. Nghiên cứu ứng dụng các chủng phân lập vào phát triển vắc xin PPV.....	5
1.4.2. Tình hình sản xuất vắc xin PPV	6
Chương II – Cơ sở lý thuyết và các phương pháp nghiên cứu	7
2.1. Đối tượng nghiên cứu	7
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	7
2.2.1. Phân lập Parvovirus gây bệnh khô thai trên lợn.....	7
2.2.2. Xác định các type của Parvovirus.....	8
2.2.3. Xác định mối quan hệ di truyền của các chủng Parvovirus	8
2.2.4. Xác định đặc tính sinh học của PPV.....	8
2.2.5. Đánh giá tiềm năng sử dụng PPV vào nghiên cứu sản xuất vắc xin	9
2.3. Phương pháp xử lý số liệu.....	9
2.4. Y đức động vật.....	9
Chương III – Kết quả và thảo luận.....	10
3.1. Kết quả nghiên cứu	10
3.1.1. Phân lập Parvovirus	10
3.1.1.1. Xác định mẫu dương tính với Parvovirus	10
3.1.1.2. Kết quả xác định mẫu đủ điều kiện nuôi cấy	10
3.1.1.3. Kết quả nuôi cấy PPV	11
3.1.2. Xác định type Parvovirus	12

3.1.3. Phân tích mối quan hệ di truyền Parvovirus	13
3.1.3.1. Phân tích mối quan hệ di truyền dựa trên trình tự đoạn gen NS1.	13
3.1.3.2. Phân tích mối quan hệ di truyền dựa trên trình tự gen VP2.....	13
3.1.4. Xác định một số đặc tính sinh học của các chủng Parvovirus	15
3.1.4.1. Xác định biểu đồ sinh trưởng của PPV trên tế bào PK-15.....	15
3.1.4.2. Xác định hiệu giá TCID ₅₀	15
3.1.4.3. Xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp.....	16
3.1.5. Đánh giá sự ổn định, độc lực và tính sinh miễn dịch của hai chủng VC5 và TX7	17
3.1.5.1. Đánh giá sự ổn định của hai chủng VC5 và TX7.....	17
3.1.5.2. Đánh giá độc lực của hai chủng VC5 và TX7.....	18
3.1.5.3. Đánh giá khả năng sinh miễn dịch của hai chủng VC5 và TX7	18
3.2. Thảo luận.....	19
3.2.1. Mức độ lưu hành của PPV tại Việt Nam.....	19
3.2.2. Đặc tính sinh học và di truyền của các chủng phân lập.....	20
3.2.3. Tiềm năng ứng dụng hai chủng VC5 và TX7 vào nghiên cứu sản xuất vắc xin PPV	21
Kết luận và kiến nghị.....	22
Tóm tắt những đóng góp mới của luận án	24
Danh mục các công trình đã công bố	24

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Ở Việt Nam chưa có đơn vị nào sản xuất và thương mại vắc xin phòng bệnh khô thai do Parvovirus (PPV). 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 khá cao và có thể không tương đồng với các chủng phân lập ở Việt Nam. Mặt khác, việc sử dụng vắc xin nhập khẩu dẫn đến tốn kém cho ngân sách nhà nước. Vì vậy, Bộ Nông nghiệp và Môi trường 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.

Đề tài luận án “*Phân lập, tuyển chọn chủng Parvovirus tiềm năng cho sản xuất vắc xin phòng bệnh khô thai trên lợn*” 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. 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.

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

4.1. Ý nghĩa khoa học của đề tài

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

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

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

4.2. Ý nghĩa thực tiễn của đề tài

Việc phân lập và tuyển chọn được chủng PPV có độc lực cao, ổn định qua nhiều đời, có tính sinh miễn dịch tốt sẽ là cơ sở để nghiên cứu vắc xin phòng bệnh khô thai trên lợn. Từ đó giúp chủ động nguồn cung vắc xin trong nước, nâng cao hiệu quả phòng bệnh, góp phần tích cực vào công tác phòng, chống dịch. Việc được sử dụng nguồn vắc xin nội địa với chi phí thấp hơn, nguồn cung ổn định hơn sẽ giúp người chăn nuôi chủ động trong công tác phòng bệnh, nâng cao năng suất, giúp người nông dân hạn chế rủi ro, tăng thu nhập.

CHƯƠNG I

TỔNG QUAN VỀ VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU

1.1. Tổng quan về đối tượng nghiên cứu

1.1.1. Tổng quan về bệnh khô thai lợn

PPV là tác nhân chính gây hội chứng rối loạn sinh sản đặc trưng ở lợn, thường được gọi là “bệnh khô thai”. Lợn nái mang thai là vật chủ cảm thụ chính; virus xâm nhập và nhân lên trong cơ thể, sau đó lây truyền qua nhau thai đến bào thai. Thời điểm nhiễm PPV quyết định mức độ tổn thương: nhiễm trong 10–30 ngày đầu thai kỳ dẫn đến chết hoặc hấp thu bào thai; nhiễm trong 30–70 ngày thai kỳ gây hiện tượng khô và hóa gỗ của thai; nhiễm sau 70 ngày thai kỳ thường không gây chết bào thai do bào thai đã hình thành đáp ứng miễn dịch (Cartwright và Huck, 1967).

PPV xâm nhập vào trang trại qua nhiều con đường như thức ăn, nước uống, phân, tinh dịch hoặc dịch tiết sinh dục từ lợn nhiễm bệnh. Virus nhân lên chủ yếu trong tế bào nội mô và trung mô của màng niệu đệm, phá hủy mô liên kết nhau thai, gây gián đoạn hệ tuần hoàn, xuất huyết, phù nề và tích tụ dịch chứa máu, từ đó dẫn đến tổn thương tuần hoàn toàn bộ bào thai và gây chết bào thai (Cotmore và Tattersall, 2014).

Biểu hiện lâm sàng chủ yếu liên quan đến hội chứng rối loạn sinh sản, bao gồm chậm hoặc không động dục, tỷ lệ đẻ ít con, thai gỗ, sảy thai, thai chết non và giảm sức sống của lợn con sơ sinh. Bệnh tích đại thể của thai nhi bị nhiễm PPV gồm thai còi cọc, sung huyết mạch máu, phù thũng, xuất huyết và hóa gỗ (Mengeling và cộng sự, 1975; Liu, 2022).

Hậu quả kinh tế của PPV là đáng kể. Trên thế giới, các đợt bùng phát dịch gây thiếu hụt hàng trăm đến hàng nghìn lợn con, tương ứng với thiệt hại hàng nghìn đến hàng chục nghìn USD/trang trại (Morrisson và Joo, 1984). Tại Việt Nam, PPV là nguyên nhân quan trọng dẫn đến giảm tỷ lệ phối giống thành công, số lợn con sơ sinh thấp, tỷ lệ thai chết, thai hóa gỗ, mang thai giả và chậm động dục, từ đó làm suy giảm năng suất sinh sản và lợi nhuận của trang trại. Ước tính, với khoảng 3–4 triệu lợn nái được nuôi, số lợn con chết lưu có thể lên tới hàng triệu con mỗi năm (Võ Văn Ninh, 2003).

1.1.2. Tổng quan về Parvovirus

PPV thuộc họ Parvoviridae, phân họ Parvovirinae, chi Protoparvovirus, loài

Ungulate protoparvovirus, với các phân loại gồm PPV1–PPV7 (Streck và cộng sự, 2015). Trong đó, PPV1 là type cổ điển, gây hội chứng SMEDI (sảy thai, thai gổ, chết phôi, vô sinh) ở lợn nái, có ý nghĩa dịch tễ và bệnh học cao nhất. Các type PPV2–PPV7 thuộc các chi Tetraparvovirus, Copiparvovirus và Chaphamaparvovirus, thể hiện sự đa dạng tiến hóa, với vai trò gây bệnh ở lợn còn chưa được xác định rõ, thường đồng nhiễm với các virus khác như PCV2 hay PRRSV (Streck và cộng sự, 2015; Wang và cộng sự, 2010).

Bộ gen PPV là DNA sợi đơn, mạch thẳng, dài khoảng 5 kb, không có vỏ bọc, hình cầu với cấu trúc khối 20 mặt. Bộ gen tổ chức thành hai khung đọc mở chính: ORF1 mã hóa protein phi cấu trúc NS1–NS3, chịu trách nhiệm sao chép và điều hòa phiên mã; ORF2 mã hóa các protein capsid VP1–VP3, hình thành vỏ virus (Streck và Truyen, 2020).

PPV xâm nhiễm tế bào vật chủ qua nhiều thụ thể bề mặt, bao gồm glycoprotein và sialic acid, thông qua các con đường nhập bào trung gian clathrin, macropinocytosis hoặc cơ chế chưa rõ hoàn toàn. Virus được vận chuyển đến nhân tế bào, nơi DNA ssDNA được sao chép thành dsDNA, đảm bảo duy trì bộ gen trong quá trình phân chia tế bào (Boisvert và cộng sự, 2010). PPV nhân lên hiệu quả trên các dòng tế bào lợn như PK-15, ST và SLC, gây tổn thương ty thể, rò rỉ cytochrome C, kích hoạt apoptotic theo con đường ty thể và dẫn tới bệnh tích mô điển hình, mức độ và kiểu hình tổn thương phụ thuộc vào chủng virus và loại tế bào bị nhiễm (Zhang và cộng sự, 2015; Xu và cộng sự, 2022).

1.2. Tổng quan về địa điểm nghiên cứu

Ngành chăn nuôi lợn tại Việt Nam chiếm vai trò chủ lực, đóng góp trên 60% sản lượng thịt hơi và khoảng 26% GDP nông nghiệp (Cục Chăn nuôi, 2024). Các tỉnh Thái Bình, Thanh Hóa, Bình Định, Đắk Lắk, Đồng Nai và Bình Dương được lựa chọn làm địa điểm nghiên cứu do có tổng đàn lớn, hệ thống trang trại và cơ sở sản xuất lợn giống công nghiệp phát triển, đáp ứng nhu cầu con giống chất lượng cao. Các tỉnh này trải dài ba vùng Bắc – Trung – Nam, phản ánh đại diện cho các điều kiện sinh thái khác nhau, cho phép khảo sát lưu hành Parvovirus trên phạm vi rộng và tuyển chọn các chủng virus tiềm năng phù hợp với điều kiện dịch tễ Việt Nam.

1.3. Tổng quan về phương pháp nghiên cứu

Phân lập PPV: Virus Parvovirus (PPV) tập trung chủ yếu ở gan và phôi bào thai do khả năng nhân lên mạnh ở tế bào phân chia nhanh, trong khi huyết thanh lợn mẹ chỉ chứa lượng virus thấp. Thu mẫu hiệu quả kết hợp huyết thanh lợn nái nghi nhiễm và cơ quan bào thai chết lưu. Phát hiện mẫu dương tính chủ yếu bằng PCR nhắm vào gen NS1 bảo tồn cao, đảm bảo độ nhạy và đặc hiệu. Trước khi phân lập, các mẫu cần được sàng lọc để tránh đồng nhiễm với PCV2, PRRSV, CSFV hoặc ASF.

Nuôi cấy PPV: Các dòng tế bào liên tục, đặc biệt PK-15, được sử dụng do nhạy cảm cao với PPV, khả năng duy trì virus qua nhiều thế hệ và dễ thao tác. Môi trường nuôi cấy thường là E-MEM bổ sung FBS, với các yếu tố như nồng độ FBS và nhiệt độ được tối ưu hóa để đảm bảo hiệu quả nhân lên. Biểu đồ sinh trưởng và hiệu giá TCID₅₀ được xây dựng để xác định thời điểm thu virus tối ưu và chuẩn hóa điều kiện nuôi cấy.

Xác định type PPV và phân tích di truyền: PCR đa môi được sử dụng để phát hiện các type PPV1–PPV7. Phân tích trình tự gen NS1 cung cấp thông tin về nguồn gốc và quan hệ tiến hóa, trong khi gen VP2 đánh giá tính kháng nguyên, khả năng lây lan và độc lực, đồng thời giúp theo dõi sự xuất hiện của các biến thể mới.

Đánh giá đặc tính sinh học, độc lực và tính sinh miễn dịch: Biểu đồ sinh trưởng và TCID₅₀ phản ánh khả năng nhân lên của virus. Độ ổn định được kiểm tra qua nhiều đời nuôi cấy liên tiếp, đảm bảo chủng virus thích hợp cho nghiên cứu vắc xin. Độc lực được đánh giá trên lợn nái mang thai ở ngày thứ 40 thai kỳ, với mổ khám vào ngày 90 để quan sát tổn thương phôi thai và xác định DNA virus bằng PCR. Tính sinh miễn dịch được đánh giá trên lợn và chuột lang bằng hiệu giá HI, cho phép sàng lọc các chủng có khả năng kích thích miễn dịch mạnh, làm cơ sở chọn chủng gốc cho nghiên cứu vắc xin PPV.

1.4. Tổng quan về tình hình nghiên cứu PPV và vắc xin

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

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

Trên thế giới: Hiện có 7 type Porcine Parvovirus (PPV1–PPV7). PPV1, được phân lập đầu tiên tại Đức năm 1965, là tác nhân chính gây bệnh sinh sản ở lợn. Các type mới (PPV2–PPV7) được xác định qua phương pháp sinh học phân tử, trong đó PPV2 và PPV3 thuộc giống TetraParvovirus. PPV1 phổ biến trên hầu hết các châu lục nhưng tỷ lệ nhiễm thấp (0,5–29%), có thể do sử dụng vắc xin. PPV2, PPV3, PPV4 và các type mới PPV5–

PPV7 lưu hành rộng rãi với tỷ lệ cao, đặc biệt ở châu Á, châu Mỹ và châu Âu, cho thấy khả năng thích nghi tốt và tiềm năng đồng nhiễm với các virus khác như PCV2 hay PRRSV.

Tại Việt Nam: PPV được phát hiện từ năm 1993, gây rối loạn sinh sản ở lợn nái, với tỷ lệ nhiễm cao (21–88%) tùy khu vực. Nhiều type PPV (PPV1–PPV4) lưu hành đồng thời, phản ánh tình hình dịch tễ phức tạp, tương tự các quốc gia khác. Việc phân lập các chủng PPV nội địa là cần thiết để phát triển vắc xin phù hợp, nâng cao hiệu quả phòng bệnh.

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

Việc phân lập, nhận diện và chọn lọc chủng PPV có đặc tính sinh học và kháng nguyên đặc trưng là cơ sở để phát triển vắc xin. Trên thế giới, vắc xin PPV phổ biến dựa trên chủng PPV1 cổ điển (NADL-2), nhưng sự xuất hiện các biến thể như PPV-27a làm giảm hiệu quả bảo hộ chéo. Ở Trung Quốc, nhiều chủng nội địa đã được dùng để sản xuất vắc xin vô hoạt hoặc vắc xin tiểu đơn vị/virus-like particles (VLPs), cho hiệu quả miễn dịch cao và bảo hộ lợn nái. Việc sử dụng chủng phân lập nội địa giúp tăng tính tương thích kháng nguyên, chủ động nguồn cung, giảm chi phí và nâng cao hiệu quả bảo hộ theo vùng.

1.4.2. Tình hình sản xuất vắc xin PPV

Trên thế giới: Vắc xin bất hoạt truyền thống chủ yếu dựa trên PPV1 (NADL-2), tạo hiệu giá kháng thể bảo hộ nhưng giảm dần theo thời gian; phương pháp công cường độc là tiêu chí đánh giá bảo hộ chính xác. Vắc xin tái tổ hợp tập trung vào protein VP2, dưới dạng VLPs hoặc vectơ tái tổ hợp, mang lại đáp ứng miễn dịch mạnh, an toàn và dễ sản xuất. Nhiều vắc xin thương mại (FarrowSure Gold, Porcilis® Parvo, Parvovax, PPV VAC) đã lưu hành, nhưng chi phí cao và chưa chắc tương thích với các chủng lưu hành tại Việt Nam.

Tại Việt Nam: Các vắc xin PPV hiện chỉ là sản phẩm nhập khẩu, chi phí cao và hạn chế về tương thích kháng nguyên. Nghiên cứu phân lập và sản xuất vắc xin nội địa còn bỏ ngỏ, nhưng cần thiết để đảm bảo chủ động nguồn cung, giảm chi phí và nâng cao hiệu quả phòng bệnh, góp phần phát triển bền vững ngành chăn nuôi lợn.

CHƯƠNG II

CƠ SỞ LÝ THUYẾT VÀ CÁC PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

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

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập Parvovirus gây bệnh khô thai trên lợn

* Phương pháp thu mẫu

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.

* Phương pháp xử lý mẫu

Đối với mẫu huyết thanh: Huyết thanh sẽ được ly tâm 3000 vòng/phút, 10 phút thu dịch nổi và bảo quản ở - 20°C (Tuck và cộng sự, 2009)

Đối với mẫu bệnh phẩm phôi thai: Mẫu mô gan, phổi của phôi thai được thu lại và tạo huyền dịch 10% trong dung dịch PBS (Nguyễn và cộng sự, 2022)

* Xác định mẫu dương tính với Parvovirus

Mẫu được xác định dương tính với PPV bằng phản ứng PCR theo mô tả bởi Lyoo và cộng sự, 2001.

* Xác định mẫu đủ điều kiện phân lập

Mẫu sẽ được xét nghiệm sự có mặt của các loại virus: 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. Mẫu âm tính với tất cả các loại virus trên đủ điều kiện để phân lập PPV trên dòng tế bào PK-15.

* Phương pháp phân lập PPV

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

2.2.2. Xác định các type của Parvovirus

Các chủng virus phân lập được sẽ được định type bằng phương pháp PCR của Kim Seung-Chai và cộng sự, 2022.

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

Đoạn gen NS1 được nhân lên với cặp mồi PPVF, PPVR theo mô tả Lyoo và cộng sự, 2001. Đoạn gen VP2 được nhân lên bằng phản ứng PCR (Xu và cộng sự, 2013). DNA 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).

2.2.4. Xác định đặc tính sinh học của PPV

*** Xác định hiệu giá TCID₅₀:** TCID₅₀ được thực hiện theo phương pháp của Reed-Muench (1938)

*** Xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp**

Các điều kiện nuôi cấy được khảo sát bao gồm: nhiệt độ 33°C, 37°C và 39°C; các nồng độ FBS 2%, 3% và 5%. Parvovirus được gây nhiễm lên tế bào PK-15 với MOI (Multiplicity of infection - số lượng virus gây nhiễm/số lượng tế bào) = 0,01. Sau đó virus được nuôi trong các điều kiện khác nhau trong 7 ngày. Sau mỗi 24 giờ nuôi cấy, 200µl dung dịch virus được thu lại, tách chiết DNA và thực hiện phản ứng Realtime-PCR để xác định số lượng virus.

*** Xác định biểu đồ sinh trưởng**

Chủng virus được gây nhiễm lên tế bào PK-15 với MOI (Multiplicity of infection - Tỷ lệ gây nhiễm) = 0,01. Virus phát triển trong môi trường E-MEM bổ sung 5% FBS và 1% Penicilin – Streptomycin tại nhiệt độ 37°C, 5% CO₂. Sau mỗi 24 giờ trong vòng 7 ngày sau gây nhiễm, tiến hành thu mẫu virus. Hàm lượng virus tại mỗi thời điểm thu mẫu được xác định bằng phản ứng Realtime-PCR (Miao và cộng sự, 2009).

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

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

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 và phân tích trình tự gen NS1, VP2.

*** Đánh giá độc lực**

Độc lực của chủng parvovirus được xác định dựa trên mô tả của Zeeuw và cộng sự, 2007.

*** Đánh giá khả năng sinh miễn dịch**

○ Đánh giá khả năng sinh miễn dịch trên chuột lang

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

○ Đánh giá khả năng sinh miễn dịch trên lợn

Khả năng sinh miễn dịch của chủng parvovirus được đánh giá trên lợn mang thai theo phương pháp của Foerster Tessa và cộng sự, 2016

2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Dữ liệu nghiên cứu được phân tích bằng Minitab 18. Tỷ lệ dương tính với Parvovirus giữa các nhóm hoặc địa điểm được so sánh bằng kiểm định Chi-square (χ^2). Dữ liệu định lượng như hiệu quả nuôi cấy, TCID₅₀, hiệu giá kháng thể HI và ELISA được phân tích bằng mô hình tuyến tính tổng quát (GLM) để đánh giá ảnh hưởng các yếu tố thí nghiệm. Khi phát hiện khác biệt có ý nghĩa, kiểm định Tukey được sử dụng để phân biệt các nhóm ở mức $p < 0,05$. Kết quả được trình bày dưới dạng trung bình $\pm$ sai số chuẩn (Mean $\pm$ SD).

2.4. Y đức động vật

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. Kết quả nghiên cứu

3.1.1. Phân lập Parvovirus

3.1.1.1 Xác định mẫu dương tính với Parvovirus

Trong nghiên cứu, 392 mẫu bệnh phẩm (360 huyết thanh, 32 bào thai) từ sáu tỉnh đại diện các vùng sinh thái Việt Nam được xét nghiệm bằng PCR. Kết quả phát hiện 32 mẫu dương tính với PPV (8,16%), với sản phẩm PCR khoảng 330 bp, đặc hiệu và tin cậy. Tỷ lệ dương tính giữa các địa phương dao động 4,76–10,0% (Bảng 3.1), nhưng không có khác biệt thống kê ($\chi^2 = 1,81$; $p = 0,875$). Kết quả cho thấy PPV lưu hành rộng nhưng ở mức thấp, không hình thành ổ dịch tập trung, phản ánh tình trạng lưu hành nền ổn định trong quần thể lợn Việt Nam.

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

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

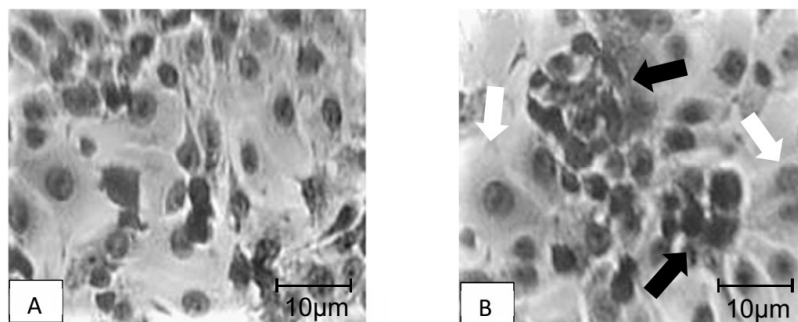
3.1.1.2. Kết quả xác định mẫu đủ điều kiện nuôi cấy

Tất cả 32 mẫu dương tính với PPV đều cho âm tính với CSFV, PRRSV, PCV2, ASF đáp ứng đủ yêu cầu để thực hiện các bước phân lập PPV tiếp theo.

3.1.1.3. Kết quả nuôi cấy PPV

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

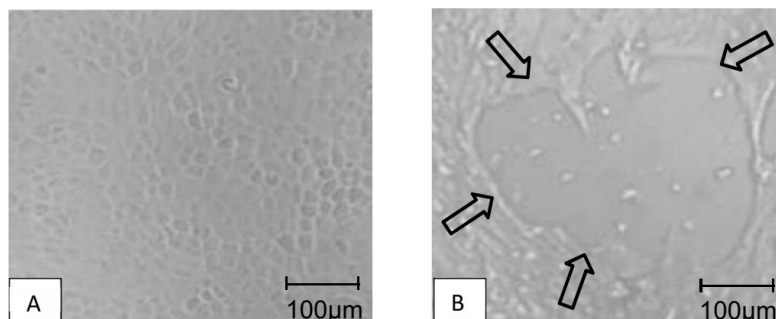
Kết quả CPE quan sát được cho thấy sau khi virus xâm nhập vào tế bào 24 giờ, chúng gây ra các biểu hiện trên tế bào như: hình dạng tế bào không đều, nhân vón cục, tạo hạt (Hình 3.1). Sau đó, virus nhân lên và phá hủy tế bào. Sau 5 ngày gây nhiễm virus đã gây phá hủy diện tích tế bào lớn, tạo ra những khoảng trống trên bề mặt bình nuôi cấy (Hình 3.2)



Hình 3.1. 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 3.2. 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

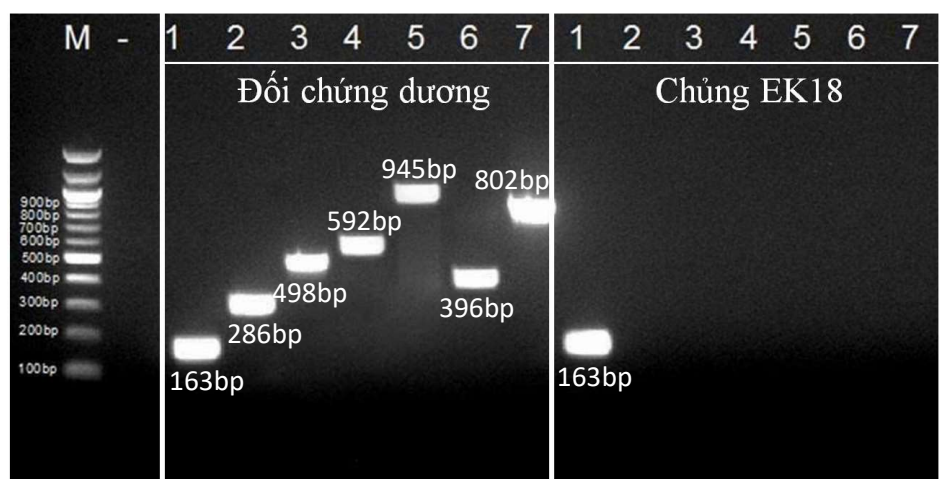
B: Bệnh tích trên tế bào PK-15 khi được gây nhiễm virus sau 5 ngày. Mũi tên: Tế bào đã bị virus xâm nhiễm và gây phá hủy tế bào tạo nên những khoảng trống trên bề mặt chai nuôi cấy

Tất cả 32 chủng PPV trong nghiên cứu này đều đã ghi nhận được CPE trên tế bào PK-15 sau khi gây nhiễm.

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

Phân tích Real-time PCR cho thấy 32 chủng PPV phân lập từ các mẫu bệnh phẩm đều nhân lên hiệu quả và ổn định trên dòng tế bào PK-15, với sự gia tăng đáng kể về số lượng bản sao virus qua ba đời cấy (P1–P3, $p < 0,001$). Giá trị $\log_{10}$ số bản sao tăng từ 2,73–5,13 ở P1 lên 4,53–7,00 ở P3, phản ánh khả năng thích nghi và nhân lên bền vững của virus. Phân tích Tukey chỉ ra hai chủng VC5 và TX7 đạt số lượng bản sao cao nhất, đi kèm với hiệu ứng gây bệnh tế bào rõ rệt, cho thấy tốc độ sao chép nhanh, ổn định di truyền và tiềm năng cao để sử dụng làm chủng gốc nghiên cứu độc lực, khả năng sinh miễn dịch và phát triển vắc xin PPV.

3.1.2. Xác định type Parvovirus



Hình 3.3. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR xác định type chủng virus EK18

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.

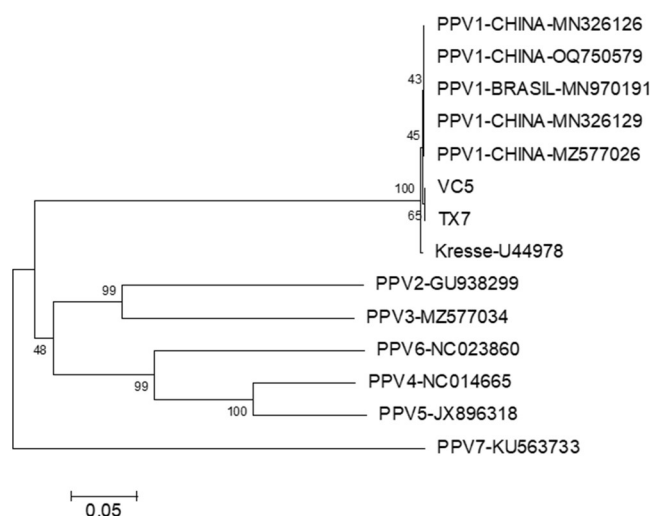
Kết quả xác định type của các chủng PPV được tiến hành thông qua phân tích sản phẩm PCR trên gel điện di. Hình 3.3 minh họa rằng các mẫu đối chứng dương tính cho bảy type virus đều xuất hiện các băng DNA đặc trưng, rõ nét, không có sản phẩm không đặc hiệu, với kích thước băng hoàn toàn phù hợp với mô tả của Kim và cộng sự (2022). Mẫu EK18 chỉ ghi nhận băng DNA đặc trưng khi sử dụng cặp mồi đặc hiệu cho PPV1, trong khi không phát hiện sản phẩm khuếch đại với các cặp mồi đặc hiệu cho PPV2 đến

PPV7. Toàn bộ 32 mẫu virus phân lập trong nghiên cứu đều được xác định thuộc type PPV1, chi tiết được trình bày trong Phụ lục 7.

3.1.3. Phân tích mối quan hệ di truyền Parvovirus

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

Sau khi phân lập các chủng PPV trên dòng tế bào PK-15, mối quan hệ di truyền của chúng được phân tích dựa trên trình tự gen NS1, một gen bảo tồn cao có giá trị đặc trưng trong phân loại Parvovirus. Kết quả phân tích cho thấy 32 mẫu phân lập có trình tự NS1 đồng nhất 100%, trong đó hai chủng đại diện VC5 và TX7 được so sánh với các chủng tham chiếu quốc tế. Sản phẩm PCR có kích thước ~330 bp, rõ nét, không có băng phụ, và trình tự nucleotide của VC5, TX7 tương đồng cao ($\geq 99\%$) với các chủng PPV1 từ Trung Quốc và Brazil, đặc biệt đạt 99,70% với PPV1-0225-L-SD (Trung Quốc, 2022).



Hình 3.4. Cây phả hệ dựa trên trình tự đoạn gen NS1

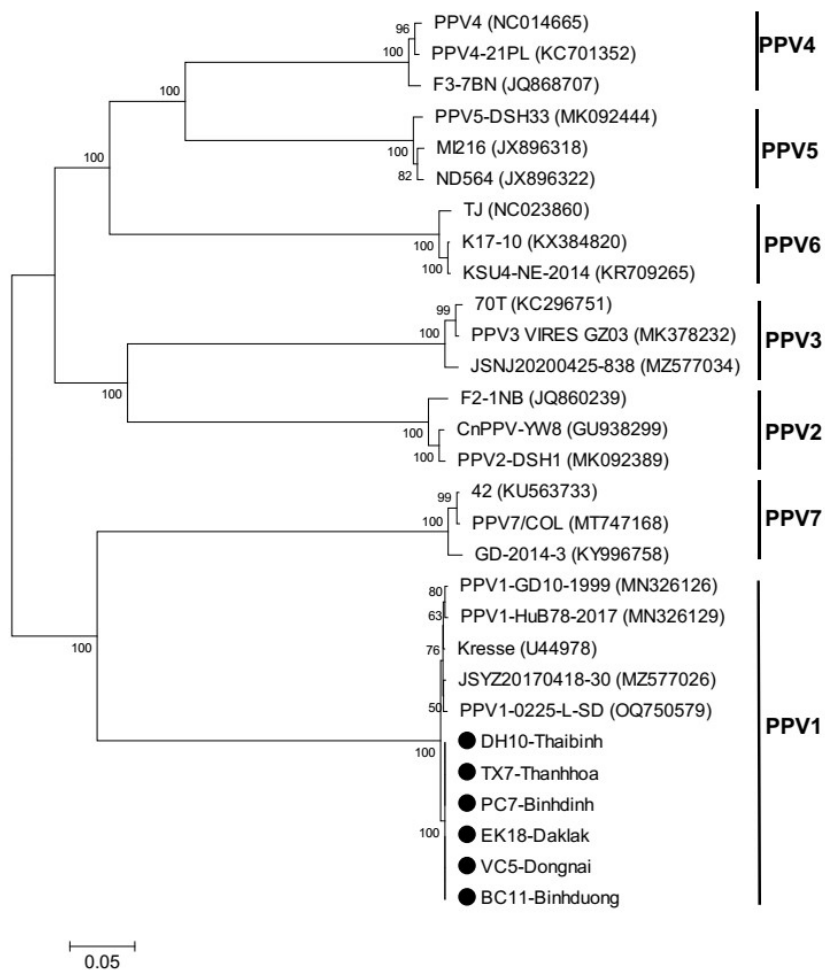
Cây phả hệ dựa trên gen NS1 cho thấy VC5 và TX7 nằm trong cùng cụm với các chủng PPV1 quốc tế, với giá trị bootstrap 100, khẳng định mối quan hệ tiến hóa gần gũi và sự ổn định di truyền của nhóm PPV1. Các type PPV khác (PPV2–PPV7) phân tách thành các nhánh riêng với khoảng cách di truyền lớn, phản ánh sự khác biệt về cấu trúc bộ gen và đặc tính sinh học. Hai virus ngoài nhóm được dùng làm đối chứng xa nhằm xác định ranh giới tiến hóa, củng cố độ tin cậy của phân tích.

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

Gen VP2, mã hóa protein capsid chính của PPV, có giá trị đặc biệt quan trọng trong phân loại di truyền và đánh giá quan hệ tiến hóa. Kỹ thuật PCR đã khuếch đại thành công

đoạn gen khoảng 1,7 kb, cho sản phẩm đặc hiệu và không xuất hiện băng phụ. Trình tự VP2 của 32 chủng PPV phân lập cho thấy mức độ tương đồng hoàn toàn (100%), phản ánh sự ổn định di truyền cao giữa các chủng từ nhiều địa phương. Sáu chủng đại diện cho sáu tỉnh được lựa chọn và đăng ký trên NCBI (OR263486–OR263491).

Cây phả hệ dựa trên trình tự VP2 thể hiện sự phân tách rõ giữa các type PPV (PPV1–PPV7) với giá trị bootstrap cao, khẳng định độ tin cậy của mô hình phân nhóm. Sáu chủng phân lập tại Việt Nam đều thuộc cụm PPV1, tạo thành một nhánh riêng biệt và có quan hệ gần với các chủng PPV1 quốc tế. Kết quả phân tích chỉ ra: PPV1 lưu hành tại Việt Nam có tính đồng nhất di truyền cao; không ghi nhận sự phân ly đáng kể trong VP2; các chủng Việt Nam có quan hệ gần gũi với chủng lưu hành tại Trung Quốc, phù hợp xu hướng dịch tễ khu vực. Việc không có bằng chứng về sự hình thành nhiều dòng tiến hóa khác biệt trong quần thể PPV1 tại Việt Nam, cho thấy nguy cơ biến dị ảnh hưởng đến hiệu lực vắc xin hiện ở mức thấp.



Hình 3.5. Cây phân loại dựa trên trình tự gen VP2

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

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

Biểu đồ sinh trưởng của 32 chủng PPV phân lập trên dòng tế bào PK-15 cho thấy quá trình nhân lên của virus bắt đầu tăng mạnh từ ngày 1 đến ngày 4 sau gây nhiễm, đạt mức tối đa vào ngày thứ 5 và duy trì ở trạng thái ổn định đến ngày thứ 7. Trên cơ sở đó, ngày thứ 5 được xác định là thời điểm thu hoạch tối ưu trong điều kiện nuôi cấy chuẩn hóa (MOI = 0,01; môi trường E-MEM bổ sung 5% FBS và 1% Penicillin–Streptomycin; ủ ở 37°C với 5% CO₂)

3.1.4.2. Xác định hiệu giá TCID₅₀

Bảng 3.3. Kết quả xác định TCID₅₀ của các chủng PPV

Tỉnh	Mẫu	Hiệu giá trung bình TCID ₅₀ /1ml (log ₁₀) ± 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
	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

Tỉnh	Mẫu	Hiệu giá trung bình TCID ₅₀ /1ml (log ₁₀) ± SD (n = 3)	Nhóm so sánh trung bình Turkey* (95% CI, n = 3)
	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

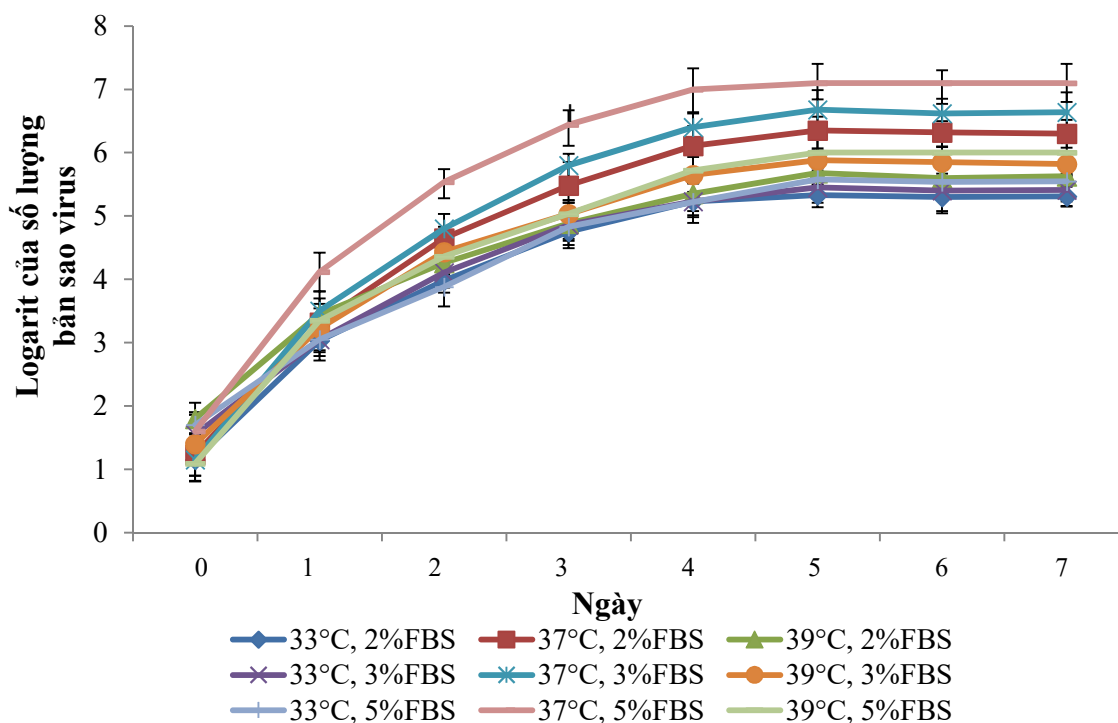
* p < 0,001

Kết quả xác định hiệu giá TCID₅₀ cho thấy các chủng PPV có mức độ tăng sinh khác nhau, với giá trị logTCID₅₀/mL dao động từ 4,5 đến 6,3. Phân tích thống kê chứng minh sự khác biệt có ý nghĩa giữa các mẫu (F = 222,24; p < 0,001), đồng thời phép so sánh Tukey phân nhóm các chủng theo mức hiệu giá tương ứng. Đáng chú ý, hai chủng VC5 và TX7 đạt hiệu giá cao nhất (6,3 logTCID₅₀/mL), vượt trội so với nhóm trung bình (5,0–5,5 logTCID₅₀/mL) cũng như nhóm có hiệu giá thấp (4,5–4,6 logTCID₅₀/mL).

3.1.4.3. Xác định môi trường nuôi cấy thích hợp

Kết quả định lượng số bản sao virus bằng Realtime-PCR kết hợp với phân tích mô hình tuyến tính tổng quát cho thấy cả hai yếu tố nhiệt độ và nồng độ FBS đều ảnh hưởng có ý nghĩa đến khả năng nhân lên của PPV trên tế bào PK-15, đồng thời tồn tại tương tác đáng kể giữa hai yếu tố này (P < 0,001). Trong đó, nhiệt độ là yếu tố tác động mạnh hơn. Nhiệt độ 37°C cho hiệu quả sao chép cao nhất, vượt trội so với 33°C và 39°C; tương tự, nồng độ FBS 5% cho mức độ tăng sinh virus cao hơn đáng kể so với 2% và 3%.

Tổ hợp điều kiện tối ưu là 37°C và 5% FBS, tạo ra số bản sao virus cao nhất, trong khi các tổ hợp khác, đặc biệt 33°C–2% FBS, ghi nhận mức sao chép thấp nhất.



Hình 3.6. Biểu đồ khảo sát điều kiện nuôi cấy thích hợp

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

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

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

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

Kết quả quan sát CPE trên tế bào cho thấy sau 15 đời cấy chuyển, hai chủng VC5 và TX7 vẫn gây bệnh tích tế bào ổn định. 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.

* Biểu đồ sinh trưởng qua các đời nuôi cấy

Quy luật sinh trưởng của 02 chủng TX7 và VC5 tương đồng rõ rệt ở các đời nuôi cấy: 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.

* Hiệu giá TCID₅₀ qua các đời nuôi cấy

Kết quả xác định hiệu giá TCID₅₀ cho thấy nồng độ virus qua 15 đời cấy truyền là ổn định. Giá trị TCID₅₀/1ml ổn định ở mức 6,3 - 6,5 sau 15 đời cấy truyền.

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

* Đánh giá sự ổn định gen NS1

Kết quả so sánh độ tương đồng trong trình tự gen NS1 qua 15 đời nuôi cấy cho thấy không có sự biến đổi về trình tự gen NS1.

*** Đánh giá sự ổn định gen VP2**

Hai chủng VC5 và TX7 không có những thay đổi về trình tự gen VP2 qua 15 đời nuôi cấy.

Từ những kết quả trên cho thấy hai chủng VC5 và TX7 ổn định về đặc tính sinh học cũng như đặc tính di truyền qua nhiều đời. Hai chủng này có thể được lựa chọn cho các nghiên cứu sản xuất vắc xin phòng bệnh.

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

Hiệu giá HI trên lợn nái mang thai biến động đáng kể theo thời gian và khác biệt rõ rệt giữa các nhóm, với hiệu ứng của “nhóm”, “thời gian” và “nhóm × thời gian” đều có ý nghĩa thống kê cao ($p < 0,001$). Kháng thể đặc hiệu xuất hiện từ ngày 7 sau gây nhiễm với hiệu giá trung bình $4,67 \log_2$ (VC5) và $5,33 \log_2$ (TX7), trong khi nhóm đối chứng duy trì ở mức 0, phản ánh khả năng nhân lên sớm và kích thích đáp ứng miễn dịch mạnh mẽ của cả hai chủng virus.

Hiệu giá đạt đỉnh vào ngày 21 với $10,67 \log_2$ (VC5) và $11,33 \log_2$ (TX7). Phân tích Tukey cho thấy TX7 có mức đáp ứng cao nhất, tiếp theo là VC5, trong khi nhóm đối chứng hoàn toàn không tạo kháng thể. Đến ngày 49, hiệu giá giảm nhẹ nhưng vẫn duy trì ở mức cao (VC5: $9,67 \log_2$; TX7: $10,0 \log_2$).

Kết quả mổ khám ngày 90 cho thấy sự khác biệt rõ rệt về độc lực: ở nhóm đối chứng, 100% thai lợn khỏe mạnh; trong khi ở hai nhóm gây nhiễm, 100% thai chết. Tỷ lệ khô thai đạt 80% ở nhóm VC5 và 71% ở nhóm TX7, với các đặc điểm điển hình như thai khô, biến màu nâu đen và mất nước. Tỷ lệ thai dương tính PPV đạt 88–90% ở các nhóm virus, trong khi nhóm đối chứng hoàn toàn âm tính.

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

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

Nghiên cứu đánh giá khả năng sinh miễn dịch của hai chủng PPV VC5 và TX7 trên chuột lang (5 con/nhóm, liều tiêm bằng 1/4 liều trên lợn) nhằm lựa chọn chủng virus tiềm năng phục vụ sản xuất vắc xin. Hiệu giá HI khác biệt có ý nghĩa thống kê theo nhóm, số liều tiêm và thời điểm thu mẫu ($p < 0,001$). Sau mũi tiêm thứ nhất, đáp ứng kháng thể chỉ tăng nhẹ, đạt $0,47$ – $1,47 \log_2$; trung bình nhóm tiêm 1 mũi đạt $0,91 \log_2$ (nhóm B) và thấp hơn rõ rệt so với nhóm tiêm 2 mũi ($3,53 \log_2$, nhóm A).

Sau tiêm nhắc, hiệu giá HI tăng mạnh: tại thời điểm trước mũi 2, hiệu giá đạt 3,6 log₂ (TX7) và 3,2 log₂ (VC5), sau đó tăng lên 6,2–7,6 log₂ (TX7) và 5,6–7,4 log₂ (VC5) vào ngày 14–21, thời điểm đạt đỉnh đáp ứng miễn dịch. Trong toàn bộ thí nghiệm, chuột không xuất hiện bất kỳ biểu hiện lâm sàng hay phản ứng phụ tại vị trí tiêm, khẳng định tính an toàn của hai chủng virus trên mô hình động vật thay thế.

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

Kết quả đánh giá hiệu giá HI trên lợn cho thấy đáp ứng miễn dịch tăng dần theo số mũi tiêm và thời gian. Sau mũi tiêm đầu tiên, HI trung bình đạt 1,44 log₂ (VC5) và 1,56 log₂ (TX7), tăng nhanh sau mũi nhắc lại và đạt đỉnh vào ngày 21 với 7,33 log₂ (VC5) và 7,67 log₂ (TX7), trong khi nhóm đối chứng duy trì HI = 0. Phân tích thống kê xác nhận nhóm thí nghiệm, số mũi tiêm và thời gian đều có ảnh hưởng có ý nghĩa ($p < 0,001$).

Sau công cường độc, 18/22 (81,82%) thai lợn ở nhóm VC5 và 18/21 (82,35%) ở nhóm TX7 sống, trong khi 100% thai ở nhóm đối chứng chết với bệnh tích điển hình: 75% thai lợn có biểu hiện khô, cứng, chuyển màu nâu-đen và kích thước nhỏ. PPV được phát hiện ở 90% thai lợn nhóm đối chứng, nhưng chỉ 2/22 (9,09%) và 2/21 (9,52%) ở nhóm VC5 và TX7, tương ứng.

Kết quả ELISA cũng ghi nhận đáp ứng kháng thể rõ rệt. Sau mũi 1, chỉ số PI tăng nhưng chưa vượt ngưỡng dương tính; sau mũi 2, PI vượt 50% và đạt đỉnh ngày 21 (TX7: 72,48%; VC5: 71,51%). Phân tích thống kê cho thấy các yếu tố nhóm, số mũi tiêm và thời gian ảnh hưởng có ý nghĩa ($p < 0,001$), với mũi nhắc tạo hiệu giá PI cao hơn mũi đầu (36,74 so với 17,62; $p < 0,05$) và thời điểm ngày 21 đạt giá trị cao nhất (41,94; $p < 0,05$). Không có khác biệt đáng kể giữa hai chủng TX7 và VC5

Như vậy, hai chủng VC5 và TX7 là những chủng có độc lực cao và đáp ứng miễn dịch tốt. Hai chủng VC5 và TX7 và sẽ là những chủng tiềm năng cho các nghiên cứu sản xuất vắc xin trong thời gian tới.

3.2. Thảo luận

3.2.1. Mức độ lưu hành của PPV tại Việt Nam

Nghiên cứu xác định tỷ lệ lưu hành PPV trong đàn lợn nái tại Việt Nam đạt 8,16%, phân bố tương đối đồng đều giữa các địa phương và không bị chi phối bởi yếu tố địa lý. Tỷ lệ này thấp hơn đáng kể so với các báo cáo tại Mỹ, Canada, Ấn Độ và Argentina, cũng như một số nghiên cứu trước đây tại Việt Nam. Sự khác biệt chủ yếu xuất phát từ đặc

điểm đối tượng lấy mẫu, điều kiện chăn nuôi và loại mẫu phân tích; cụ thể, nghiên cứu hiện tại chỉ khảo sát trên lợn nái thương mại và bao gồm cả mẫu huyết thanh, trong khi các nghiên cứu quốc tế và trong nước thường tập trung vào mẫu thai chết lưu hoặc các đàn có đồng nhiễm PCV2 – yếu tố làm tăng tần suất phát hiện PPV.

Toàn bộ các mẫu dương tính đều xác định thuộc kiểu gen PPV1, phù hợp với kết quả tại nhiều quốc gia và các báo cáo trong nước trên đàn lợn gặp rối loạn sinh sản. Việc không phát hiện các kiểu gen mới (PPV2–PPV7), trái ngược với một số nghiên cứu tại cơ sở giết mổ hoặc trên đàn lợn đồng nhiễm, cho thấy nghiên cứu đã xác định được chính xác đối tượng thu mẫu (lợn nái gặp vấn đề rối loạn sinh sản) cũng như độ tin cậy cao của quy trình lấy mẫu và xét nghiệm (được thực hiện trong điều kiện vô trùng nghiêm ngặt, hạn chế tối đa nguy cơ tạp nhiễm hoặc đồng nhiễm).

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

Phân tích gen NS1 cho thấy các chủng PPV1 phân lập tại Việt Nam có độ tương đồng cao 99,3–99,7% so với PPV1-0225-L-SD và PPV1-GD10-1999 từ Trung Quốc, phản ánh mối quan hệ phát sinh chủng gần gũi và tính bảo tồn di truyền cao trong phạm vi Đông Á. Gen VP2 của các mẫu phân lập thuộc nhóm “Kresse-like”, tương đồng với chủng Kresse (Canada, 1996), nhóm này có khả năng sinh miễn dịch mạnh và trung hòa chéo hiệu quả, mở ra tiềm năng ứng dụng trong phát triển vắc xin thế hệ mới.

Trên dòng tế bào PK-15, các chủng PPV1 gây bệnh tích điển hình: biến dạng hình thái, nhân cô đặc và thể vùi trong bào tương, khẳng định khả năng xâm nhập và nhân lên mạnh mẽ. Động học nhân lên cho thấy 32 chủng phân lập có xu hướng tăng nhanh từ ngày 1–4, đạt đỉnh ngày 5 và duy trì đến ngày 7 khi sử dụng MOI = 0,01. Giá trị TCID₅₀ dao động 4,5–6,3 logTCID₅₀/mL, trong đó VC5 và TX7 đạt 6,3 logTCID₅₀/mL, tương đương hoặc vượt các chủng PPV dùng trong nghiên cứu vắc xin quốc tế (Van den Born và cộng sự, 2020; Zeew và cộng sự, 2007; Foerster và cộng sự, 2016).

Điều kiện nuôi cấy tối ưu là 37°C với 5% FBS, phù hợp với quan sát trước đây (Zhang và cộng sự, 2015; Wang và cộng sự, 2024), đảm bảo hiệu quả nhân lên, ổn định sinh học và độ tin cậy cao trong đánh giá độc lực và sinh miễn dịch.

Tổng hợp các kết quả cho thấy các chủng PPV1 tại Việt Nam ổn định về di truyền, sinh trưởng tốt trên tế bào PK-15, đạt đỉnh nhân lên ngày 5 và thích nghi tối ưu ở 37°C, 5% FBS. Đặc biệt, VC5 và TX7 nổi bật với hiệu giá TCID₅₀ cao, đặc tính sinh học ổn

định và mối tương đồng di truyền với các chủng vắc xin quốc tế, khẳng định tiềm năng làm chủng gốc cho nghiên cứu phát triển vắc xin PPV tại Việt Nam.

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

Hai chủng PPV VC5 và TX7 thể hiện đặc tính sinh học ổn định trên dòng tế bào PK-15, với bệnh tích điển hình (biến dạng tế bào, nhân cô đặc, thể vùi) duy trì qua 15 đời cấy, hiệu giá TCID₅₀ đạt 6,3–6,5 log/mL. Phân tích gen NS1 và VP2 không phát hiện đột biến sau 15 đời cấy, khẳng định tính ổn định di truyền, đáp ứng các tiêu chí quốc tế về chủng gốc sản xuất vắc xin.

Thí nghiệm công cường độc trên lợn nái mang thai ngày thứ 40 cho thấy toàn bộ bào thai trong nhóm gây nhiễm đều chết, trong đó 71% (TX7) và 80% (VC5) thai có biểu hiện khô thai, virus phát hiện ở 88–90% mẫu. So sánh với các chủng chuẩn quốc tế (PPV-27a, PPV-IDT, PPV-NADL-2), VC5 và TX7 có độc lực cao, biểu hiện bệnh tích điển hình, phù hợp cho nghiên cứu vắc xin bất hoạt hiệu lực cao.

Cả hai chủng kích thích đáp ứng miễn dịch mạnh trên chuột lang và lợn nái. Trên lợn, sau hai mũi tiêm, hiệu giá HI đạt đỉnh ngày 21 với 7,33 log₂ (VC5) và 7,67 log₂ (TX7); chỉ số ELISA PI >70%, vượt ngưỡng bảo hộ. Trên chuột lang, hiệu giá HI đạt 7,4–7,6 log₂ sau mũi nhắc, chứng minh khả năng tạo đáp ứng miễn dịch thứ cấp và phù hợp làm mô hình thay thế trong sàng lọc chủng vắc xin.

Hiệu quả bảo hộ sau công cường độc cao: tỷ lệ thai sống đạt 81,82% (VC5) và 85,71% (TX7), trong khi nhóm đối chứng toàn bộ thai chết, 90% mẫu dương tính với PPV. Kết quả này tương đương hoặc vượt nhiều vắc xin PPV thương mại và các nghiên cứu quốc tế (van den Born và cộng sự, 2020; Kiss và cộng sự, 2020; Noguera và cộng sự, 2021), khẳng định tiềm năng của VC5 và TX7 làm chủng gốc cho vắc xin PPV bất hoạt tại Việt Nam.

Hai chủng VC5 và TX7 đáp ứng đầy đủ các tiêu chí về ổn định sinh học, di truyền, độc lực và khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch mạnh, trở thành ứng viên lý tưởng cho phát triển vắc xin PPV phòng bệnh sinh sản do Parvovirus ở lợn.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. Kết luận

Nghiên cứu cung cấp dữ liệu toàn diện về dịch tễ, di truyền và sinh học của PPV lưu hành tại Việt Nam, đồng thời tuyển chọn hai chủng nội địa tiềm năng cho phát triển vắc xin. Các kết quả chính gồm:

- Phân lập virus: 32 chủng PPV thành công từ các mẫu bệnh phẩm tại sáu tỉnh trọng điểm, gây CPE đặc trưng trên dòng tế bào PK-15 và xác nhận bằng PCR.
- Xác định type virus: Tất cả 32 mẫu phân lập thuộc PPV1; không phát hiện type mới (PPV2–PPV7), khẳng định PPV1 là kiểu gen lưu hành chủ yếu.
- Mối quan hệ di truyền: Trình tự NS1 và VP2 bảo tồn cao (100% tương đồng giữa các mẫu). Cây phát sinh chủng VP2 cho thấy gần gũi với Kresse (Canada) và PPV1-0225-L-SD (Trung Quốc), phản ánh nguồn gốc tiến hóa ổn định trong khu vực châu Á – Thái Bình Dương.
- Đặc tính sinh học: Điều kiện nuôi cấy tối ưu: E-MEM + 5% FBS, 37°C, 5% CO₂. Virus phát triển mạnh từ ngày 1–4, đạt đỉnh hiệu giá 4,5–6,3 logTCID₅₀/mL vào ngày thứ 5. Hai chủng VC5 và TX7 có tốc độ nhân lên nhanh, hiệu giá cao và ổn định, được lựa chọn cho nghiên cứu chuyên sâu.
- Độ ổn định, độc lực và sinh miễn dịch: VC5 và TX7 ổn định di truyền qua ≥15 đời cấy, không ghi nhận biến dị NS1 và VP2. Gây nhiễm trên lợn nái mang thai: 100% thai chết, 71–80% thai có tổn thương SMEDI điển hình. Sau hai mũi tiêm vắc xin bất hoạt, hiệu giá HI đạt 7,3–7,6 log₂ trên cả chuột lang và lợn, công cường độc cho hiệu quả bảo hộ cao (thai sống 81,82–85,71%), nhóm đối chứng không có thai sống và 90% thai dương tính với PPV.

Tổng hợp cho thấy VC5 và TX7 là chủng nội địa ổn định về di truyền, độc lực điển hình, kích thích đáp ứng miễn dịch mạnh, đáp ứng tiêu chuẩn chủng gốc cho phát triển vắc xin PPV bất hoạt tại Việt Nam.

2. Kiến nghị

Để hoàn thiện quy trình nghiên cứu và ứng dụng hai chủng VC5 và TX7:

- Nghiên cứu sâu hơn về đặc tính virus: Quan sát hình thái bằng TEM, giải trình tự toàn bộ hệ gen, phân tích cấu trúc 3D của VP2, đánh giá tác động các đột biến đến cấu trúc protein và khả năng sinh miễn dịch.

- Hoàn thiện quy trình đánh giá chủng giống vắc xin: Xác định điều kiện bảo quản, tính ổn định virus và kháng thể theo thời gian, chu kỳ tiêm nhắc, lựa chọn chất bổ trợ, so sánh hiệu quả bảo hộ và đáp ứng miễn dịch với vắc xin thương mại.

Triển khai các nội dung này sẽ củng cố cơ sở dữ liệu, đánh giá toàn diện chủng giống, hướng tới phát triển vắc xin PPV hiệu quả, an toàn, đáp ứng yêu cầu thực tiễn ngành chăn nuôi lợn trong nước

TÓM TẮT NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

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

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

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

- 1) T. T. Hang Trinh, V. Tan Do, V. Khiem 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)