

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.... giờ, ngày ... tháng ... năm 20...

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. GIỚI THIỆU VỀ BỆNH KHÔ THAI LỢN.....	3
1.1.1. Lịch sử hình thành bệnh.....	3
1.1.2. Cơ chế gây bệnh.....	3
1.1.3. Triệu chứng.....	3
1.2. TỔNG QUAN VỀ PARVOVIRUS.....	4
1.2.1. Phân loại	4
1.2.2. Cấu trúc virus.....	4
1.3. TỶ LỆ NHIỄM PPV	4
1.3.1. Tỷ lệ nhiễm PPV trên thế giới	4
1.3.2. Tỷ lệ nhiễm PPV tại Việt Nam.....	5
1.4. TÌNH HÌNH SẢN XUẤT VẮC XIN GÂY BỆNH KHÔ THAI LỢN DO PARVOVIRUS TRÊN THẾ GIỚI VÀ Ở VIỆT NAM.....	5
1.4.1. Tình hình sản xuất vắc xin Parvovirus gây bệnh khô thai lợn trên thế giới	5
1.4.2. Tình hình sản xuất vắc xin Parvovirus gây bệnh khô thai lợn tại Việt Nam	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 từ các mẫu bệnh phẩm điển hình ở các địa phương khác nhau.....	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 một số đặc tính virus	8
2.2.5. Xác định sự ổn định, độc lực và tính sinh miễn dịch	9
2.3. PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ SỐ LIỆU.....	9
2.5. Y ĐỨC ĐỘNG VẬT	9
Chương III – KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN	10
3.1. PHÂN LẬP PARVOVIRUS GÂY BỆNH KHÔ THAI TỪ CÁC MẪU BỆNH PHẨM ĐIỂN HÌNH Ở CÁC ĐỊA PHƯƠNG KHÁC KHAU	10

3.1.1. Kết quả xác định mẫu dương tính với Parvovirus	10
3.1.2. Kết quả phân lập parvovirus trên tế bào PK-15	10
3.1.2.1. Kết quả xác định mẫu đủ điều kiện phân lập	10
3.1.2.2. Kết quả quan sát bệnh tích tế bào	11
3.1.2.3. Kết quả khảo sát sự gia tăng số lượng virus trong quá trình nuôi cấy.....	12
3.2. XÁC ĐỊNH TYPE PARVOVIRUS	13
3.3. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH MỐI QUAN HỆ DI TRUYỀN PARVOVIRUS	14
3.3.1. Phân tích trình tự đoạn gen NS1	14
3.3.2. Phân tích gen VP2.....	15
3.4. XÁC ĐỊNH MỘT SỐ ĐẶC TÍNH CỦA CÁC CHỦNG PARVOVIRUS	16
3.4.1. Xác định biểu đồ sinh trưởng của PPV trên tế bào PK-15	16
3.4.2. Xác định hiệu giá TCID ₅₀	16
3.4.3. Xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp	17
3.5. ĐÁNH GIÁ SỰ ỔN ĐỊNH, ĐỘC LỰC VÀ TÍNH SINH MIỄN DỊCH CỦA PARVOVIRUS	18
3.5.1. Đánh giá sự ổn định của Parvovirus	18
3.5.1.1. Đánh giá sự ổn định về đặc tính sinh học	18
3.5.1.2. Đánh giá sự ổn định về đặc tính di truyền.....	19
3.5.2. Đánh giá độc lực của chủng parvovirus	19
3.5.3. Đánh giá khả năng sinh miễn dịch của chủng parvovirus	20
3.5.3.1. Đánh giá khả năng sinh miễn dịch của 02 chủng VC5 và TX7 trên động vật thay thế.....	20
3.5.3.2. Đánh giá khả năng sinh miễn dịch của 02 chủng VC5 và TX7 trên lợn	20
Chương IV – KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	23
4.1. Kết luận	23
4.2. Kiến nghị	23
TÓM TẮT NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN	25
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ.....	25

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. 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 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.

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 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.

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. 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 chết non, thai gổ, chết phôi và vô sinh. 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.

1.1.2. Cơ chế gây bệnh

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. 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. Virus từ lợn mẹ có thể truyền qua nhau thai để lây nhiễm trực tiếp cho bào thai. (Nguyễn Bá Hiên và cộng sự, 2010). 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 gổ. Nếu virus nhiễm từ sau ngày thứ 70, bào thai bắt đầu có khả năng sản sinh miễn dịch đề kháng với parvovirus và có thể có khả năng sống sót.

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.

1.2. TỔNG QUAN VỀ PARVOVIRUS

1.2.1. Phân loại

Họ: Parvoviridae

Phân họ: Parvovirinae

Chi: *Protoparvovirus*

Loài: *Ungulate protoparvovirus*

Phân loài: Porcine parvovirus

1.2.2. Cấu trúc virus

Bộ gen của Parvovirus là DNA sợi đơn, mạch thẳng, có kích thước khoảng 5kb. 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.

1.3. TỶ LỆ NHIỄM PPV

1.3.1. Tỷ lệ nhiễm PPV trên thế giới

Bảng 1.1. 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	Csagola và cộng sự, 2012;	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, 2013 và 2013b; Ni và cộng sự, 2014; Kim và cộng sự, 2022; Parthiban và cộng sự, 2022; Saekhow và cộng sự, 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	Milek và cộng sự, 2019;	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	Milek và cộng sự, 2020	7-32,4		2,6-14,3			
PPV6	37,1-38		74,7		21,5			
PPV7	18,2				14,2-18			

Kết quả tỷ lệ nhiễm PPV theo các type được tổng hợp như Bảng 1.1. 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.

1.3.2. Tỷ lệ nhiễm PPV tại Việt Nam

Tại Việt Nam, nghiên cứu của tác giả Hồ Đình Chúc điều tra huyết thanh học chỉ ra rằng từ 50% đến 60% lợn nái đã nhiễm PPV. (Hồ Đình Chúc, 1993). Trong một nghiên cứu khác, tác giả 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). 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 (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 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)

Từ những nghiên cứu trên cho thấy tỷ lệ nhiễm PPV tại Việt Nam được công bố dao động từ 10% đến 88%.

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

1.4.1. Tình hình sản xuất vắc xin parvovirus gây bệnh khô thai lợn trên thế giới

Trên thế giới đã có nhiều loại vắc xin được cấp phép lưu hành để phòng bệnh do parvovirus gây ra. 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. Một nghiên cứu của Serena đã phát hiện sự khác biệt về axit amin ở các vị trí 436 (S – P) và 565 (R – K) đối với các chủng PPV được nghiên cứu (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.

1.4.2. Tình hình sản xuất vắc xin parvovirus gây bệnh khô thai lợn tại Việt Nam

Hiện nay, tại Việt Nam chưa có nghiên cứu nào về phân lập và tuyển chọn các chủng parvovirus phục vụ cho việc nghiên cứu và phát triển vắc-xin. Các nghiên cứu hiện tại 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. 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 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 từ các mẫu bệnh phẩm điển hình ở các địa phương khác nhau.

* 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 một số đặc tính virus

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

*** 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 động vật thay thế

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

○ 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

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.

2.4. 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. 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

Đoạn gen NS1 330 bp có vị trí từ 1.453 đến 1.782 trên gen NS1 là vùng có độ bảo tồn cao giữa các chủng PPV và được sử dụng để xác định mẫu dương tính với PPV (Lyoo và cộng sự, 2001). Từ kết quả PCR, 32/392 mẫu được xác định là dương tính với PPV, chiếm tỷ lệ 8,2% (Bảng 3.1). Tỷ lệ nhiễm dao động trong khoảng hẹp, từ 4,8% tại Thanh Hóa đến 10,0% tại Đồng Nai và Bình Dương. 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 không có ý nghĩa thống kê.

Bảng 3.1. 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

Tỷ lệ dương tính với PPV trên mẫu huyết thanh là 9,1% và mẫu bệnh phẩm phôi thai là 9,4%. Tỷ lệ nhiễm của lợn đã sinh sản là 9,4% và lợn mang thai lần đầu là 4,6%. Với giá trị $p > 0,05$ cho thấy những khác biệt này không có ý nghĩa thống kê. Do trong nghiên cứu này, số mẫu khảo sát còn hạn chế so với yêu cầu cỡ mẫu tối thiểu để phát hiện chênh lệch nhỏ ở mức ý nghĩa thống kê. 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.

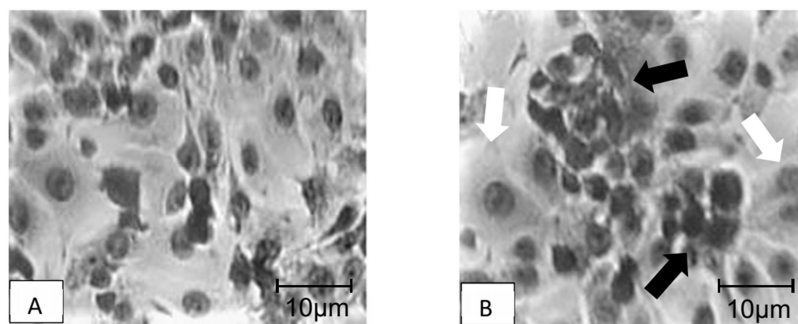
3.1.2. Kết quả phân lập parvovirus trên tế bào PK-15

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

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

3.1.2.2. Kết quả quan sát bệnh tích tế bào

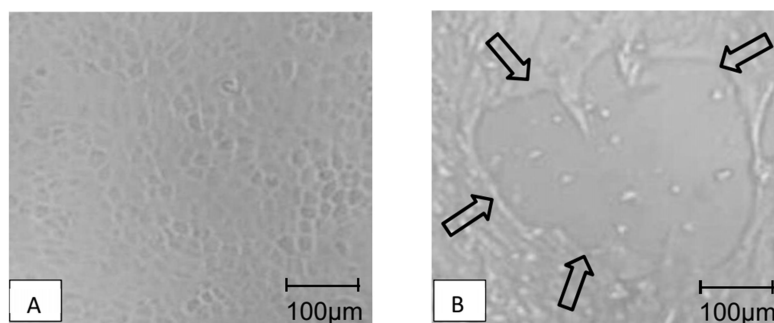
Kết quả CPE quan sát được cho thấy sau khi virus xâm nhập vào tế bào 24 giờ, chúng gây ra các biểu hiện trên tế bào như: hình dạng tế bào không đều, nhân vón cục, tạo hạt (Hình 3.1). Sau đó, virus nhân lên và phá hủy tế bào. Sau 5 ngày gây nhiễm virus đã gây phá hủy diện tích tế bào lớn, tạo ra những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

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

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

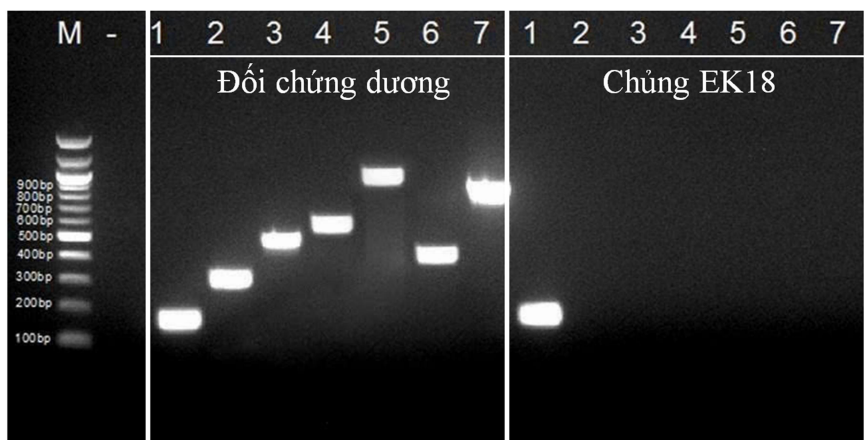
Tỉnh	Mẫu	Trung bình logarit số lượng bản sao virus $\pm$ SD (n = 3)			Nhóm so sánh trung bình Turkey (95% CI, n = 9)
		P1	P2	P3	
Thái Bình	ĐH2	3,36 $\pm$ 0,04	4,86 $\pm$ 0,05	5,16 $\pm$ 0,18	B, C, D
	ĐH4	2,82 $\pm$ 0,04	4,32 $\pm$ 0,03	4,62 $\pm$ 0,16	B, C, D
	ĐH11	3,78 $\pm$ 0,02	5,28 $\pm$ 0,13	5,58 $\pm$ 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
	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

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

* p < 0,001

Từ kết quả Bảng 3.2 cho thấy tất cả 32 chủng PPV phân lập được đều có sự gia tăng số lượng bản sao trong quá trình nuôi cấy. Phân tích so sánh cặp Tukey chỉ ra rằng các mẫu VC5 và TX7 có số lượng bản sao cao nhất, khác biệt có ý nghĩa thống kê. Tổng hợp kết quả quan sát CPE và xác định sự gia tăng số lượng virus trong quá trình nuôi cấy cho thấy 32 mẫu dương tính PPV đều quan sát thấy CPE và có sự gia tăng số lượng virus trong quá trình nuôi cấy. Điều này chứng tỏ 32 chủng PPV đã được phân lập thành công.

3.2. XÁC ĐỊNH TYPE PARVOVIRUS



Hình 3.3. 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.

32 mẫu parvovirus phân lập được trong nghiên cứu này đều được xác định thuộc type 1 (Hình 3.3).

Tại Việt Nam, một nghiên cứu năm 2020 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, Bắc Ninh, Hưng Yên, Hòa Bình và Hải Dương, 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). Một số nghiên cứu tại Việt Nam gần đây ghi nhận sự lưu hành của các type PPV1-PPV4 (Nguyen và cộng sự, 2022; Trần Văn Trung, 2024). Tuy nhiên, tỷ lệ nhiễm này dựa trên các mẫu từ lò mổ (Trần Văn Trung, 2024) hoặc các mẫu có kết quả xét nghiệm dương tính với một loại virus khác (Nguyen và cộng sự, 2022). Do các lò giết mổ chủ yếu giết mổ lợn thịt hoặc lợn nái không còn khả năng sinh sản và điều kiện giết mổ cũng không đảm bảo vô trùng (Dang- Nguyen và cộng

sự, 2010) nên kết quả tỷ lệ nhiễm PPV cao hơn nhiều so với nghiên cứu này. Trong nghiên cứu này, các mẫu được thu thập tại các trang trại hoặc hộ nông dân đang được sử dụng để cung cấp lợn giống nên tỷ lệ nhiễm thấp hơn (8,2%) và tỷ lệ phát hiện các type cũng khác. Trong nghiên cứu này chúng tôi chỉ phát hiện type PPV1.

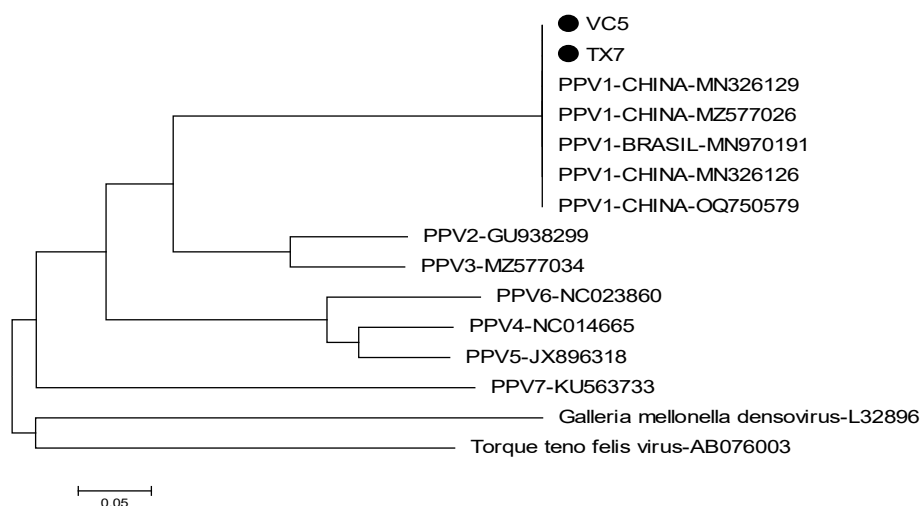
Kết quả này cũng hoàn toàn phù hợp với tỷ lệ phổ biến của chủng PPV1. Hiện nay, kiểu gen PPV1 là kiểu gen phổ biến nhất ở hầu hết các quốc gia trên thế giới (Streck và Truyen, 2020). Mặt khác các loại vắc xin trên thị trường hiện nay, chủ yếu phát triển dựa trên chủng PPV1. Vắc xin Porcilis© Parvo (Vắc 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.

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

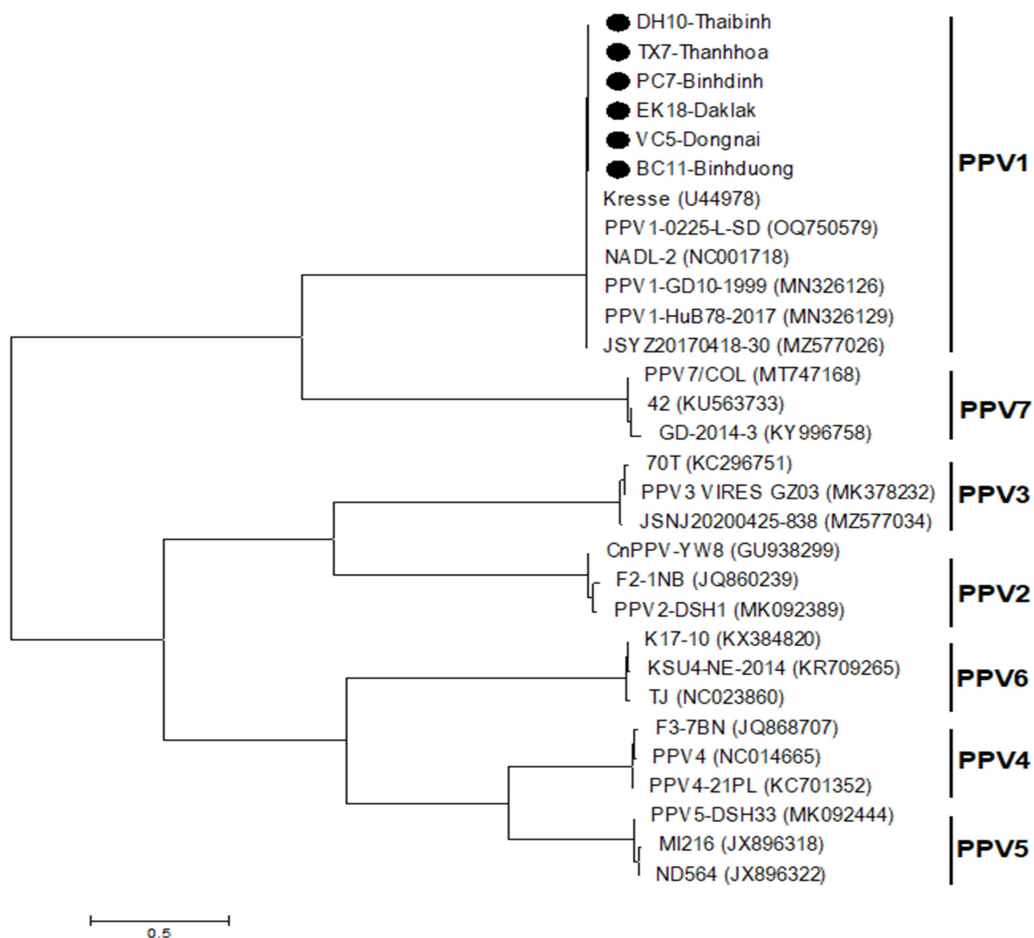
Kết quả phân tích cây phân loại cho thấy hai chủng VC5 và TX7 đều thuộc PPV1 (Hình 3.4). PPV1 là chủng có tỷ lệ phổ biến cao. 80% các chủng PPV trên thế giới đều thuộc PPV1 (Streck và cộng sự, 2015). Việc sử dụng chủng có tỷ lệ phổ biến cao để sản xuất vắc xin sẽ hứa hẹn đem lại hiệu quả phòng bệnh cao 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 bệnh cao.



Hình 3.4. Cây phân loại dựa trên trình tự đoạn gen NS1

3.3.2. Phân tích gen VP2

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. 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 3.5). 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.



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

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 khảo sát, biểu đồ sinh trưởng của các chủng PPV 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

Từ kết quả xây dựng biểu đồ sinh trưởng cho thấy khi gây nhiễm PPV với MOI = 0,01, lượng virus sẽ đạt cực đại sau 5 ngày nuôi cấy. Đây sẽ là thời điểm tối ưu để thu nhận virus.

3.4.2. Xác định hiệu giá TCID₅₀

Tất cả 32 mẫu PPV phân lập thành công đều được tiến hành xác định hiệu giá TCID₅₀. Kết quả xác định TCID₅₀ của 32 chủng như bảng 3.3.

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

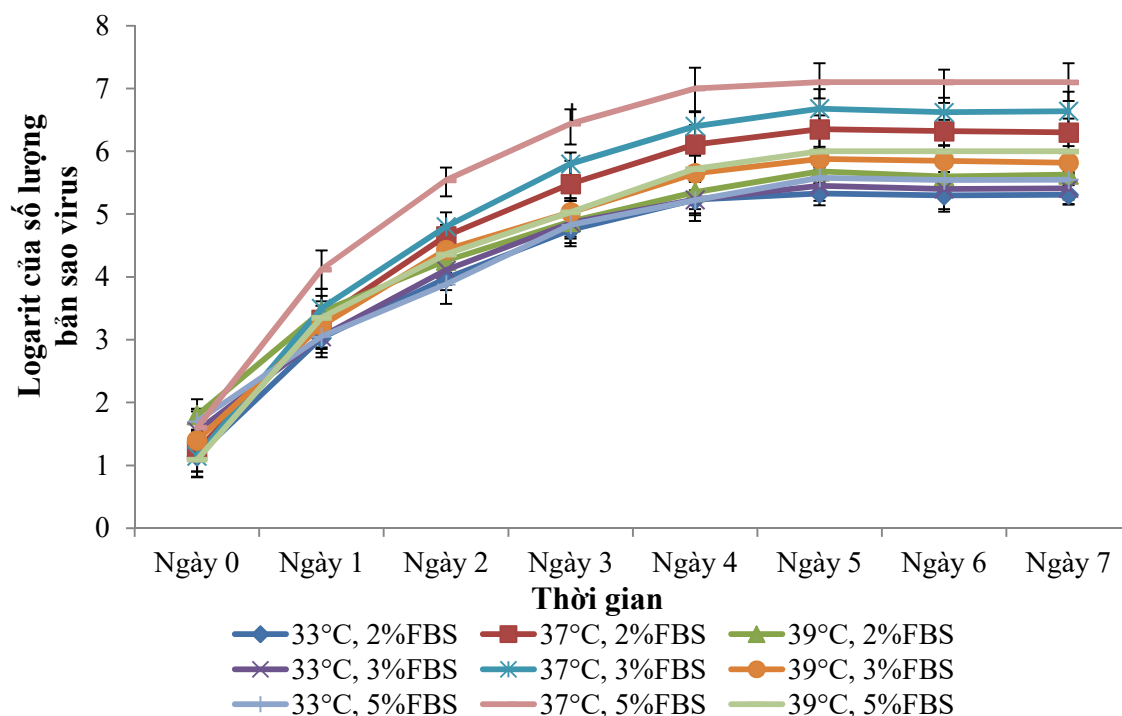
Tỉnh	Mẫu	Hiệu giá trung bình TCID ₅₀ /1ml (log ₁₀) ± SD (n = 3)	Nhóm so sánh trung bình Turkey (95% CI, n = 3)
	VC15	4.5 ± 0.0	E
	VC32	5.1 ± 0.1	D
	LT23	4.5 ± 0.0	E
	LT32	4.5 ± 0.0	E
	LT36	5 ± 0.0	D
Bình Dương	DA6	4.6 ± 0.1	E
	DA12	5.5 ± 0.1	C
	DA27	4.5 ± 0.0	E
	BC2	5 ± 0.0	D
	BC4	4.5 ± 0.0	E
	BC11	6 ± 0.1	B
	BC15	4.5 ± 0.0	E

* p < 0,001

Hiệu giá TCID₅₀/1ml của các chủng PPV phân lập dao động trong khoảng từ 4,5 đến 6,3 log TCID₅₀/1ml. Trong đó, hai chủng 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 thống kê so với phần lớn các chủng còn lại. Kết quả này cho thấy hai chủng VC5 và TX7 có khả năng nhân lên mạnh mẽ trên tế bào PK-15, tương đương với hiệu giá của một số chủng PPV đã và đang được sử dụng trong các nghiên cứu phát triển vắc xin (Zeew và cộng sự, 2007, Van den Born và cộng sự, 2020). Như vậy, VC5 và TX7 có thể được coi là những ứng viên tiềm năng cho các nghiên cứu tiếp theo về độc lực và khả năng sinh miễn dịch trên lợn nái, qua đó phục vụ định hướng phát triển vắc xin phòng bệnh PPV tại Việt Nam.

3.4.3. Xác định môi trường nuôi cấy thích hợp

Từ những phân tích thống kê và biểu đồ (Hình 3.6) điều kiện tối ưu để tiến hành nuôi cấy virus là 37°C, 5% FBS, virus phát triển ổn định theo thời gian, tăng trưởng mạnh từ sau ngày thứ 3, đạt đỉnh sinh trưởng vào ngày 5 và duy trì ổn định vào ngày 6-7. Tương tác Nhiệt độ - Thời gian, %FBS - Nhiệt độ có ý nghĩa thống kê (P < 0,05). Tương tác %FBS - thời gian, Nhiệt độ – %FBS – Thời gian không có ý nghĩa thống kê (P > 0,05).



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

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

Từ những kết quả về phân tích gen cho thấy các chủng trong nghiên cứu này không có sai khác về kiểu gen. Kết quả nuôi cấy và xác định hiệu giá TCID₅₀ cho thấy 02 chủng VC5 và TX7 có khả năng phát triển và nhân lên tốt, có hiệu giá virus cao. Vì vậy, 02 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.

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

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.

3.5.1.2. 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.

3.5.2. Đánh giá độc lực của chủng parvovirus

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 ($p < 0,001$). Ở thời điểm ngày 7 sau gây nhiễm, kháng thể đặc hiệu đã được ghi nhận với hiệu giá trung bình 4,67 log₂ ở nhóm VC5 và 5,33 log₂ 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 log₂ ở nhóm VC5 và 11,33 log₂ 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 log₂, nhóm A), kế đến là VC5 (10,67 log₂, nhóm A–B), trong khi nhóm đối chứng hoàn toàn không có đáp ứng kháng thể (0 log₂, 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 log₂ ở VC5 và 10,0 log₂ ở TX7).

Kết quả mổ khám ở ngày 90 của thai kỳ cho thấy ở nhóm đối chứng, 100% thai lợn khỏe mạnh. Trong khi đó 100% thai lợn ở nhóm gây nhiễm virus chết. 71% thai lợn ở nhóm gây nhiễm với chủng TX7 có biểu hiện khô thai và 80% thai lợn ở nhóm gây nhiễm

với chủng VC5 có biểu hiện khô thai. Thai lợn có các biểu hiện khô thai đặc trưng như: có màu nâu đen, thai khô, mất nước. 88%-90% thai lợn dương tính với PPV ở nhóm gây nhiễm virus. Nhóm đối chứng không phát hiện thấy sự có mặt của PPV trên thai lợn.

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 lựa chọn các chủng PPV tiềm năng cho sản xuất vắc xin, việc đánh giá khả năng sinh miễn dịch trên động vật thay thế là hết sức cần thiết để thiết lập quy trình kiểm nghiệm sử dụng động vật thay thế. Với nhiều ưu điểm như tiết kiệm chi phí, dễ dàng tìm mua, quy trình nuôi đơn giản, việc đánh giá khả năng đáp ứng miễn dịch trên động vật thay thế đã được sử dụng trong kiểm nghiệm nhiều loại vắc xin.

Ma và cộng sự, 2011 đã tiến hành đánh giá khả năng sinh miễn dịch của PPV trên đối tượng chuột lang, hiệu giá kháng thể được ghi nhận thông qua kết quả của phản ứng HI. Vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành đánh giá khả năng sinh miễn dịch của các chủng PPV trên đối tượng chuột lang.

5 chuột lang mỗi nhóm thí nghiệm được tiêm với 1/4 liều trên lợn. Kết quả 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 ($p < 0,001$). 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. Kết quả Tukey pairwise 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. Ở thời điểm ngày 0 trước mũi 2, hiệu giá đã đạt 3,6 $\log_2$ (TX7) và 3,2 $\log_2$ (VC5), 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. Kết quả cho thấy thời điểm đạt kháng thể cao nhất được ghi nhận ở ngày 21 sau tiêm nhắc.

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.

3.5.3.2. Đánh giá khả năng sinh miễn dịch của 02 chủng VC5 và TX7 trên lợn

Kết quả HI 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 và 1,44 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 $7,33\log_2$ với nhóm VC5; $7,67\log_2$ 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. Phân tích thống kê 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 ($p < 0,001$).

Sau khi công cường độc, nhóm được tiêm miễn dịch VC5 có 18/22 (81,82%) thai sống, nhóm được tiêm miễn dịch TX7 có 18/21 (82,35%) thai sống; trong khi 100% thai lợn của nhóm đối chứng chết và có bệnh tích điển hình của bệnh. 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.

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. Kết quả này cũng tương đương với kết quả của một số nghiên cứu khác về vắc-xin PPV vô hoạt.

Kết quả ELISA 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. Sau tiêm mũi thứ nhất, chỉ số PI tăng nhưng chưa đạt ngưỡng dương tính. 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%). Phân tích thống kê 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 ($p < 0,001$).

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.

Kết quả này tương đương với một số nghiên cứu về PPV vắc xin trên thỏ 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).

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 (Strecker và Truyen, 2020). 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 TCID₅₀/1ml 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 TCID₅₀/1ml trên 5,0 và công cường độc với TCID₅₀/1ml trên 6,0 (Van den Born và cộng sự, 2020; Zeew và cộng sự, 2007; Foerster và cộng sự, 2016).

Hai chủng này có tính ổn định cao cả về các đặc tính sinh học cũng như các đặc tính di truyền. Các chủng 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; Jóźwik 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 hoàn toàn đáp ứng các yêu cầu để tiếp tục nghiên cứu phát triển vắc xin phòng bệnh do Parvovirus gây ra trên lợn.

CHƯƠNG IV

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. KẾT LUẬN

- 1) Nghiên cứu đã phân lập thành công 32 chủng PPV 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. Trình tự gen NS1 không có sự sai khác 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 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 VC5 và TX7 có hiệu giá TCID₅₀ cao và ổn định về đặc tính sinh học cũng như đặc tính di truyền qua 15 đời nuôi cấy, có độc lực cao và khả năng sinh miễn dịch tốt. Đề nghị tiếp tục nghiên cứu thêm 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.

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 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.

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)