

ĐẠI HỌC HUẾ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

NGUYỄN TRẦN TRUNG

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 SINH HỌC

HUẾ - 2024

ĐẠI HỌC HUẾ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

NGUYỄN TRẦN TRUNG

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 SINH HỌC

CHUYÊN NGÀNH: SINH HỌC

MÃ SỐ: 9420101

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

PGS.TS. TRẦN QUỐC DUNG

TS. NGUYỄN THỊ DIỆU THÚY

HUẾ, 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi, các kết quả nghiên cứu được trình bày trong Luận án là trung thực, khách quan và chưa từng được sử dụng để bảo vệ lấy bất kỳ học vị nào.

Tôi xin cam đoan rằng mọi sự giúp đỡ cho việc thực hiện luận án đã được cảm ơn, các thông tin trích dẫn trong luận án này đều được chỉ rõ nguồn gốc.

Huế, ngày 01 tháng 8 năm 2023

Tác giả luận án

Nguyễn Trần Trung

LỜI CẢM ƠN

Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất đến Quý Lãnh đạo Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế cùng Quý cán bộ Phòng Khoa học, Đào tạo và Hợp tác quốc tế, Bộ môn Sinh học và Công nghệ sinh học ứng dụng, Phòng Tổ chức hành chính Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế đã hướng dẫn tận tình và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu tại Viện.

Đặc biệt, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất đến: PGS.TS. Trần Quốc Dung - Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế và TS. Nguyễn Thị Diệu Thúy - Phòng Công nghệ gen động vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tận tình dạy dỗ, hướng dẫn và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành đến PGS.TS. Trương Thị Hồng Hải, TS. Nguyễn Thị Kim Cúc, TS. Nguyễn Quang Cơ cùng quý Thầy Cô đã tận tình giảng dạy và hướng dẫn tôi trong quá trình học tập tại cơ sở đào tạo.

Tôi xin chân thành cảm ơn:

- *Quý cán bộ, nhân viên Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế*
- *Quý cán bộ, nghiên cứu viên Phòng Công nghệ gen động vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*
- *Sự hỗ trợ kinh phí thực nghiệm từ đề tài Nafosted mã số 106-NN.05-2015.62*
- *Sự tài trợ từ Học bổng đào tạo Tiến sĩ năm 2021 và 2022 của Quỹ VINIF.*

Cuối cùng, tôi xin kính dâng lòng biết ơn của tôi lên hai đấng sinh thành: Ba Nguyễn Trần Đường và Mẹ Nguyễn Thị Minh Thủy. Xin cảm ơn tất cả sự chia sẻ, động viên và hỗ trợ dành cho tôi từ những người thân trong gia đình, em trai Nguyễn Trần Thịnh và tất cả quý thiện hữu tri thức.

Xin chân thành cảm ơn!

Huế, ngày 01 tháng 8 năm 2023

Tác giả luận án

Nguyễn Trần Trung

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT-TIẾNG VIỆT	viii
DANH MỤC BẢNG	xi
DANH MỤC HÌNH ẢNH	xiii
MỞ ĐẦU	1
1. TÍNH CẤP THIẾT CỦA ĐỀ TÀI	1
2. MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU	2
2.1. Mục tiêu tổng quát	2
2.2. Mục tiêu cụ thể	2
3. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU	3
3.1. Thu mẫu, tách chiết DNA tổng số	3
3.2. Phân lập và sàng lọc các chủng PPV	3
3.3. Khuếch đại và xác định trình tự nucleotide gen mã hóa protein cấu trúc của PPV	3
3.4. Phân tích, đánh giá biến đổi trình tự nucleotide và amino acid dự đoán từ gen mã hóa protein cấu trúc và xây dựng cây phát sinh chủng loại các chủng PPV	3
4. PHẠM VI NGHIÊN CỨU	4
5. NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN	4
6. Ý NGHĨA KHOA HỌC VÀ THỰC TIỄN CỦA LUẬN ÁN	4
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	6
1.1. HIỆN TRẠNG CHĂN NUÔI VÀ DỊCH BỆNH TRÊN LỢN Ở CÁC TỈNH MIỀN TRUNG VIỆT NAM	6
1.2. GIỚI THIỆU VỀ PPV VÀ BỆNH DO PPV Ở LỢN	11

1.2.1. Phân loại PPV	11
1.2.2. Đặc điểm sinh học của PPV	13
1.2.2.1. Hình thái	13
1.2.2.2. Protein capsid	13
1.2.2.3. Hệ gen	14
1.2.3. Dịch thể học PPV	16
1.2.4. Tương tác giữa virus và tế bào	18
1.2.5. Cơ chế gây bệnh	19
1.2.6. Triệu chứng bệnh do PPV	20
1.2.7. Chẩn đoán PPV	21
1.2.8. Phòng ngừa PPV	23
1.3. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU PPV TRÊN THẾ GIỚI VÀ Ở VIỆT NAM	25
1.3.1. Tình hình nghiên cứu PPV trên thế giới	25
1.3.1.1. Sự lưu hành PPV	25
1.3.1.2. Biến đổi di truyền ở gen mã hóa protein cấu trúc	30
1.3.1.3. Tiến hóa của PPV	41
1.3.1.4. Phát hiện các chủng PPV khác	42
1.3.2. Tình hình nghiên cứu PPV ở Việt Nam	46
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	49
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	49
2.2. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU	49
2.2.1. Mẫu nghiên cứu	49
2.2.2. Trang thiết bị, dụng cụ, hóa chất	49
2.2.3. Môi	50
2.2.3.1. Môi phát hiện các chủng PPV	50
2.2.3.2. Môi khuếch đại gen mã hóa protein cấu trúc PPV	50

2.2.4. Trình tự các chủng PPV nghiên cứu	52
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	53
2.3.1. Phương pháp thu thập mẫu.....	54
2.3.2. Phương pháp tách chiết DNA	54
2.3.2.1. Quy trình tách chiết DNA từ máu chống đông	54
2.3.2.2. Quy trình tách chiết DNA từ mô phổi.....	55
2.3.3. Phương pháp điện di	56
2.3.4. Phương pháp thiết kế mồi và PCR.....	56
2.3.5. Phương pháp giải trình tự gen.....	57
2.3.6. Phương pháp xử lý và phân tích trình tự gen.....	58
2.3.7. Phương pháp xây dựng cây phát sinh chủng loại	59
2.3.8. Phương pháp xử lý số liệu.....	59
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	60
3.1. PHÁT HIỆN PPV1, PPV2, PPV3 VÀ PPV4 LƯU HÀNH TRÊN LỢN Ở BẢY TỈNH MIỀN TRUNG.....	60
3.1.1. Phát hiện PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 ở bảy tỉnh miền Trung	60
3.1.1.1. Kết quả phát hiện PPV1	60
3.1.1.2. Kết quả phát hiện PPV2	61
3.1.1.3. Kết quả phát hiện PPV3	63
3.1.1.4. Kết quả phát hiện PPV4	64
3.1.2. Tỷ lệ phát hiện PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 ở bảy tỉnh miền Trung .	66
3.1.2.1. Tỷ lệ phát hiện PPV1	70
3.1.2.2. Tỷ lệ phát hiện PPV2	74
3.1.2.3. Tỷ lệ phát hiện PPV3	75
3.1.2.4. Tỷ lệ phát hiện PPV4	76
3.1.3. Tỷ lệ đồng nhiễm các chủng PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4.....	78
3.1.3.1. Tỷ lệ đồng nhiễm hai chủng PPV	80
3.1.3.2. Tỷ lệ đồng nhiễm ba chủng PPV	82

3.1.3.3. Tỷ lệ đồng nhiễm bốn chủng PPV	83
3.2. TRÌNH TỰ GEN MÃ HÓA PROTEIN CẤU TRÚC CÁC CHỦNG PPV TRÊN LỢN Ở CÁC TỈNH MIỀN TRUNG.....	83
3.2.1. Trình tự gen mã hóa protein cấu trúc của các chủng PPV2.....	83
3.2.2. Trình tự hệ gen của các chủng PPV4.....	85
3.2.2.1. Trình tự hệ gen của các chủng PPV4 phân lập ở miền Trung Việt Nam.	85
3.2.2.2. Trình tự gen VP của các chủng PPV4 phân lập ở miền Trung Việt Nam	86
3.2.2.3. Trình tự khung đọc mở ORF3 của các chủng PPV4 phân lập ở miền Trung Việt Nam	87
3.2.3. Trình tự vùng gen <i>NSI/VP1</i> của các chủng PPV3.....	88
3.3. ĐẶC ĐIỂM PHÂN TỬ GEN MÃ HÓA PROTEIN CẤU TRÚC CỦA PPV PHÂN LẬP Ở CÁC TỈNH MIỀN TRUNG	88
3.3.1. Đặc điểm phân tử gen mã hóa protein cấu trúc các chủng PPV2 phân lập ở các tỉnh miền Trung	88
3.3.1.1. Đặc điểm trình tự nucleotide gen VP của PPV2.....	88
3.3.1.2. Đặc điểm trình tự amino acid dự đoán từ gen VP của PPV2	91
3.3.1.3. Mức độ tương đồng nucleotide/amino acid dự đoán từ gen VP của PPV2	99
3.3.1.4. Mối quan hệ di truyền các chủng PPV2 dựa vào gen VP.....	100
3.3.2. Đặc điểm phân tử hệ gen, gen mã hóa protein cấu trúc và ORF3 của các chủng PPV4 phân lập ở các tỉnh miền Trung	104
3.3.2.1. Đặc điểm phân tử hệ gen PPV4	104
3.3.2.2. Đặc điểm phân tử gen VP của PPV4	106
3.3.2.3. Đặc điểm phân tử ORF3 của PPV4	114
3.3.2.4. Mức độ tương đồng nucleotide/amino acid của các chủng PPV4 phân lập tại miền Trung Việt Nam	115
3.3.2.5. Mối quan hệ di truyền các chủng PPV4.....	118
3.3.3. Đặc điểm phân tử vùng gen <i>NSI/VP1</i> của các chủng PPV3 phân lập ở	

các tỉnh miền Trung	123
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	130
KẾT LUẬN	130
KIẾN NGHỊ.....	131
CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN.....	133
TÀI LIỆU THAM KHẢO	134
PHỤ LỤC	

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT-TIẾNG VIỆT

Từ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
bp	base pair	cặp bazơ nitơ
CP	Capsid protein	Protein capsid
CPE	Cytopathogenic effect	Hiệu ứng bệnh tích tế bào
cs	et al.	cộng sự
DNA	Deoxyribonucleic Acid	Axit deoxyribonucleic
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid	Axit etylenediaminetetraacetic
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	Xét nghiệm miễn dịch hấp thụ liên kết với enzyme
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations	Tổ chức Lương thực và Nông nghiệp Liên hiệp quốc
FMD	Foot-and-mouth disease	Bệnh Lở mồm long móng
HA	Haemagglutination test	Xét nghiệm đông máu
HI	Haemagglutination inhibition test	Xét nghiệm ức chế đông máu
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses	Ủy ban Quốc tế về phân loại virus
kb	kilobase	ki-lô-bazơ
MDCF	Modified direct complement-fixation (test)	Xét nghiệm cố định bổ thể trực tiếp

NCBI	National Center for Biotechnology Information	Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia (Mỹ)
NS	Non-structural protein	Protein không cấu trúc
ORF	Open Reading Frame	Khung đọc mở
PBS	Phosphate-buffered saline	Dung dịch muối đệm photphat
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
PCVAD	Porcine Circovirus Associated Diseases	Bệnh liên quan đến virus PCV ở lợn
PDNS	Porcine dermatitis and nephropathy syndrome	Hội chứng bệnh thận ở lợn
PhoV	Porcine Hokovirus	Virus Hoko lợn
PK15	Pig Kidney 15	Dòng tế bào thận lợn 15
PMWS	Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome	Hội chứng còi cọc sau cai sữa ở lợn
PPV	Porcine parvovirus	Virus parvo lợn
PPV1	Porcine parvovirus 1	Virus parvo lợn 1
PPV2	Porcine parvovirus 2	Virus parvo lợn 2
PPV3	Porcine parvovirus 3	Virus parvo lợn 3
PPV4	Porcine parvovirus 4	Virus parvo lợn 4
PPV5	Porcine parvovirus 5	Virus parvo lợn 5
PPV6	Porcine parvovirus 6	Virus parvo lợn 6
PPV7	Porcine parvovirus 7	Virus parvo lợn 7
PPV8	Porcine parvovirus 8	Virus parvo lợn 8
PRDC	Porcine Respiratory Disease Complex	Hội chứng suy hô hấp ở lợn
PRRS	Porcine reproductive and respiratory syndrome	Hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn

RNA	Ribonucleic Acid	Axit ribonucleic
ROS	Reactive oxygen species	Gốc tự do
SATp	Small alternatively translated protein	Protein nhỏ được dịch mã thay thế
SLC	Steroidogenic luteal cells	Tế bào thể vàng
SMEDI	Stillbirth Mummification Embryonic Death and Infertility	Hội chứng suy giảm khả năng sinh sản ở lợn
SN	Serum neutralization (test)	Xét nghiệm trung hoà huyết thanh
ssDNA	single-stranded DNA	ADN sợi đơn
ST	Swine testicular cells	Tế bào tinh hoàn lợn
TE	Tris EDTA	Đệm TE
TBE	Tris, borate and EDTA	Đệm TBE
VLP	Virus-like particle	Hạt giống virus
VP	Viral coat and capsid protein	Protein vỏ capsid của virus

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Kích thước hệ gen và gen <i>VP</i> của các chủng PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4.....	16
Bảng 1.2. Tỷ lệ lưu hành của PPV trên thế giới	26
Bảng 1.3. Các vị trí khác biệt trong trình tự amino acid VP2 giữa các chủng châu Âu và châu Á (Oh và cs, 2017)	34
Bảng 1.4. Phân loại các chủng PPV lưu hành trên thế giới	43
Bảng 2.1. Thông tin về các mẫu nghiên cứu được thu thập	49
Bảng 2.2. Các cặp mồi được sử dụng để phát hiện các chủng PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4	50
Bảng 2.3. Các cặp mồi được sử dụng để khuếch đại gen mã hóa protein cấu trúc của các chủng PPV	51
Bảng 2.4. Danh sách các trình tự PPV2 được sử dụng trong nghiên cứu này	52
Bảng 2.5. Danh sách các trình tự PPV3 và PPV4 sử dụng trong nghiên cứu	53
Bảng 2.6. Thành phần phản ứng PCR phát hiện PPV	57
Bảng 2.7. Chu trình nhiệt phản ứng PCR	57
Bảng 3.1. Tỷ lệ phát hiện PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 ở bảy tỉnh miền Trung..	67
Bảng 3.2. Tóm tắt tỷ lệ dương tính các chủng PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 từ các nghiên cứu trên thế giới	72
Bảng 3.3. Tỷ lệ đồng nhiễm các chủng PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 trên lợn ở bảy tỉnh miền Trung	79
Bảng 3.4. Tỷ lệ đồng nhiễm các chủng PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 ở lợn.	80
Bảng 3.5. Tỷ lệ thành phần nucleotide và giá trị độ lệch trong trình tự gen <i>VP</i> của các chủng PPV2 phân lập ở miền Trung	85
Bảng 3.6. Tỷ lệ thành phần nucleotide và giá trị độ lệch trong trình tự hệ gen của các chủng PPV4 phân lập tại miền Trung	86
Bảng 3.7. Tỷ lệ thành phần nucleotide và giá trị độ lệch trong trình tự gen <i>VP</i>	

của các chủng PPV4 phân lập tại miền Trung	87
Bảng 3.8. Tỷ lệ thành phần nucleotide và giá trị độ lệch trong trình tự ORF3 của các chủng PPV4 phân lập tại miền Trung	88
Bảng 3.9. Vị trí thay thế nucleotide và amino acid dự đoán từ trình tự gen <i>VP</i> của chủng PPV2-QN03 phân lập tại miền Trung so với các chủng tham chiếu.....	91
Bảng 3.10. Các vị trí thay thế quan trọng trong trình tự amino acid dự đoán từ gen <i>VP</i> của các chủng PPV2 phân lập tại miền Trung so với các chủng tham chiếu	93
Bảng 3.11. Kết quả phát hiện đột biến tại vị trí của các motif đặc trưng trong trình tự gen <i>VP</i> của PPV2	97
Bảng 3.12. Tỷ lệ tương đồng nucleotide và amino acid dự đoán (%) từ trình tự gen <i>VP</i> của các chủng PPV2 phân lập tại miền Trung Việt Nam và so sánh với các chủng tham chiếu	99
Bảng 3.13. Vị trí thay thế nucleotide và amino acid dự đoán từ trình tự gen <i>VP</i> của hai chủng PPV4 phân lập Quảng Trị so với các chủng tham chiếu	107
Bảng 3.14. Các vị trí thay thế quan trọng trong trình tự amino acid dự đoán từ gen <i>VP</i> của các chủng PPV4 phân lập so với các chủng tham chiếu	110
Bảng 3.15. Tỷ lệ tương đồng nucleotide và amino acid (%) của ORF1, ORF2, ORF3 và trình tự hệ gen giữa các chủng PPV4 phân lập tại miền Trung Việt Nam so với các chủng tham chiếu	116
Bảng 3.16. Vị trí thay thế nucleotide và amino acid dự đoán từ trình tự vùng gen <i>NS1/VP1</i> của hai chủng PPV3-QN16 và PPV3-QT4 khác biệt hoàn toàn so với các chủng tham chiếu.....	125
Bảng 3.17. Tỷ lệ tương đồng nucleotide và amino acid dự đoán (%) từ trình tự gen <i>NS1/VP1</i> của các chủng PPV3 phân lập tại miền Trung Việt Nam và so sánh với các chủng tham chiếu	126

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1. Bản đồ thống kê số lượng lợn nuôi ở một số tỉnh miền Trung.....	9
Hình 1.2. Sơ đồ mô tả phân loại hiện tại của PPV.....	12
Hình 1.3. Hình dạng của PPV (Kon, 2018)	13
Hình 1.4. Cấu trúc của PPV (Vereecke và cs, 2022). (A)Vỏ capsid và (B) Lõi ssDNA	14
Hình 1.5. Cấu trúc kẹp tóc ở hai đầu tận cùng của hệ gen PPV	14
Hình 1.6. Cấu trúc hệ gen PPV điển hình	15
Hình 1.7. Hậu quả lâm sàng khi nhiễm PPV được quan sát ở các thời điểm khác nhau của thai kỳ (Mengeling và cs, 2000)	18
Hình 1.8. Hiện tượng thai gở, chết non do lợn nái nhiễm PPV (Mengeling và cs, 2000).....	21
Hình 1.9. Mô hình 3D của protein VP2 của PPV (Streck và cs, 2015).....	32
Hình 1.10. Cây phát sinh chủng loại PPV1 được xây dựng dựa trên trình tự nucleotide gen mã hoá protein cấu trúc VP1 và VP2 thu nhận từ các chủng PPV1 phân lập ở châu Âu và châu Á bằng phần mềm FigTree 1.4.2. (Oh và cs, 2017).....	33
Hình 1.11. Cây phát sinh chủng loại PPV2 được xây dựng từ trình tự nucleotide (A) và amino acid dự đoán (B) của gen mã hóa NS1 của các chủng PPV2 phân lập tại Mỹ, Trung Quốc, Myanmar và các chủng virus trong phân họ Parvovirinae (Xiao và cs, 2012) bằng phần mềm MEGA 5.0, phương pháp Maximum Likelihood dựa trên mô hình Kimura 2-parameter	37
Hình 1.12. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng từ trình tự nucleotide hệ gen hoàn chỉnh của chủng PPV4 phân lập tại Trung Quốc và 1bốn chủng PPV4 tham chiếu (Qin và cs, 2018)	40
Hình 3.1. Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện PPV1. M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Mỹ).	60

Hình 3.2. Kết quả BLAST trình tự nucleotide của mẫu dương tính PPV1 so với chủng PPV1 tham chiếu	61
Hình 3.3. Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện PPV2. M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Mỹ)	62
Hình 3.4. Kết quả BLAST trình tự nucleotide của mẫu dương tính PPV2 so với chủng PPV2 tham chiếu	63
Hình 3.5. Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện PPV3.....	63
Hình 3.6. Kết quả BLAST trình tự nucleotide của mẫu dương tính PPV3 so với chủng PPV3 tham chiếu (Mã số GenBank: MG345026)	64
Hình 3.7. Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện PPV4. M: GeneRuler 100 bp DNA Ladder	65
Hình 3.8. Kết quả BLAST cho thấy tỷ lệ tương đồng của mẫu dương tính PPV4 so với chủng PPV4 tham chiếu	66
Hình 3.9. Tỷ lệ phát hiện PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 ở bảy tỉnh miền Trung	68
Hình 3.10. Tỷ lệ phát hiện PPV1 ở bảy tỉnh miền Trung	70
Hình 3.11. Tỷ lệ phát hiện PPV2 ở bảy tỉnh miền Trung	74
Hình 3.12. Tỷ lệ phát hiện PPV3 ở bảy tỉnh miền Trung	75
Hình 3.13. Tỷ lệ phát hiện PPV4 ở bảy tỉnh miền Trung	76
Hình 3.14. Tỷ lệ đồng nhiễm các chủng PPV PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 trên lợn ở bảy tỉnh miền Trung.....	78
Hình 3.15. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại gen <i>VP</i> của PPV2. M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Mỹ).....	84
Hình 3.16. Kết quả so sánh trình tự nucleotide gen <i>VP</i> của các chủng PPV2 phân lập tại miền Trung so với các chủng tham chiếu.....	90
Hình 3.17. Kết quả so sánh trình tự amino acid dự đoán gen <i>VP</i> của các chủng PPV2 phân lập tại miền Trung so với các trình tự tham chiếu	92

Hình 3.18. Các motifs đặc trưng trong trình tự nucleotide gen *VP* của PPV2 (Cadare và cs, 2013) 97

Hình 3.19. Cây phát sinh chủng loại PPV2 dựa trên trình tự nucleotide gen *VP* (2.493 bp) thu được từ một số tỉnh miền Trung Việt Nam và các trình tự gen tham chiếu. Chấm tròn màu đen biểu thị trình tự PPV2 Việt Nam 102

Hình 3.20. Vị trí đột biến thay thế nucleotide và amino acid trong khung đọc mở ORF1 của trình tự hệ gen PPV4 ở miền Trung 105

Hình 3.21. Kết quả so sánh trình tự nucleotide gen *VP* của các chủng PPV4 phân lập tại miền Trung so với các chủng tham chiếu..... 107

Hình 3.22. Kết quả so sánh trình tự amino acid dự đoán từ gen *VP* của các chủng PPV4 phân lập tại miền Trung Việt Nam so với các chủng tham chiếu108

Hình 3.23. Các motifs đặc trưng trong trình tự nucleotide của gen *VP* của PPV4 113

Hình 3.24. Cây phát sinh chủng loại PPV4 được xây dựng dựa trên trình tự hệ gen PPV4 (5.367 bp) ở miền Trung Việt Nam và các trình tự tham chiếu .. 119

Hình 3.25. Cây phát sinh chủng loại PPV4 được xây dựng dựa trên trình tự gen mã hóa protein capsid của các chủng PPV4 (2.187 bp) phân lập ở miền Trung Việt Nam và các trình tự tham chiếu 121

Hình 3.26. Các vị trí khác biệt nucleotide trong vùng gen *NS1/VP1* (995 bp) của hai chủng PPV3-QN16 và PPV3-QT4 so với các chủng tham chiếu 124

Hình 3.27. Kết quả so sánh trình tự amino acid dự đoán đoạn gen *VP1* của hai chủng PPV3-QN16 và PPV3-QT4 so với các trình tự tham chiếu..... 125

Hình 3.28. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên trình tự vùng gen *VP1* (305 bp) của 2 chủng PPV3-QN16 và PPV3-QT4 và các chủng PPV3 tham chiếu 128

MỞ ĐẦU

1. TÍNH CẤP THIẾT CỦA ĐỀ TÀI

Chất lượng sinh sản của con nái đóng góp vai trò quan trọng cung cấp nguồn giống tốt cho chăn nuôi lợn. Ở các nước có ngành chăn nuôi lợn phát triển, trong đó có Việt Nam, đàn lợn nái thường gặp các vấn đề liên quan đến suy giảm khả năng sinh sản. Virus Parvo trên lợn (Porcine Parvovirus-PPV) được xem là nguyên nhân gây nên Hội chứng suy giảm khả năng sinh sản ở lợn nái với các dấu hiệu đặc trưng là chết non, ướp xác, chết phôi và vô sinh (Stillbirth, Mummification, Embryonic Death and Infertility-SMEDI).

Về lý thuyết, PPV là virus DNA sợi đơn, quá trình sao chép vật liệu di truyền sử dụng bộ máy sao chép DNA của vật chủ, vì thế PPV được cho là có tỷ lệ biến đổi di truyền thấp. Tuy nhiên, các công trình nghiên cứu trong những năm gần đây cho thấy mức độ thay thế nucleotide của PPV là tương đương với virus RNA (khoảng 10^{-4} thay thế/vị trí/năm) (Streck và cs, 2011). Chủng PPV phân lập ở Đức năm 1964 có sự khác biệt di truyền lớn so với các chủng tham chiếu trên GenBank và chủng virus vaccine hiện đang sử dụng. Tính đến tháng 9/2022, đã có tám chủng PPV (1-8) được xác nhận. Những năm gần đây, ngành chăn nuôi lợn bị ảnh hưởng rất nhiều do xuất hiện nhiều dịch bệnh như bệnh tai xanh, lở mồm long móng, tiêu chảy cấp, vì thế nguy cơ nhiễm các loại tác nhân gây bệnh là rất cao. Khi con vật nhiễm bệnh, hệ miễn dịch suy giảm nhanh, tạo cơ hội tốt cho các tác nhân gây bệnh khác đang ở trạng thái tiềm ẩn có thể bùng phát. Điều này cũng đồng nghĩa với việc tăng nguy cơ tái tổ hợp di truyền giữa các chủng/phân nhóm virus. Mặc dù PPV đã xuất hiện và tồn tại với thời gian dài trên phạm vi toàn thế giới, các vaccine sử dụng hiệu quả trong ba thập kỷ nay, nhưng trước thực tế trên, việc kiểm soát, theo dõi, đánh giá biến đổi di truyền và dịch tễ học phân tử của virus này là thực sự cần thiết. Nghiên cứu phát hiện các chủng PPV lưu hành trên thực tế và tìm hiểu đặc điểm phân tử

gen mã hóa protein cấu trúc của chúng sẽ cung cấp những thông tin quan trọng cho công tác xây dựng chương trình vaccine đạt hiệu quả tối ưu trong phòng ngừa PPV trên lợn. Các công bố gần đây xác nhận có bốn chủng PPV (1- 4) lưu hành trên lợn nuôi tại nước ta (Nguyen và cs, 2022, Thuy và cs, 2021). Hiện nay vẫn chưa có công trình khoa học nào nghiên cứu về đặc trưng di truyền, đặc điểm hệ gen các PPV phân lập trên lợn nuôi ở miền Trung Việt Nam. Xuất phát từ cơ sở khoa học và thực tiễn trên, chúng tôi tiến hành đề tài: **“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”** nhằm cung cấp cơ sở khoa học quan trọng để đánh giá mức độ tiến hóa phân tử của PPV, góp phần kiểm soát Hội chứng SMEDI trên lợn do PPV gây ra ở khu vực miền Trung Việt Nam.

2. MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU

2.1. Mục tiêu tổng quát

Xác định các biến đổi trên trình tự nucleotide và amino acid dự đoán của các chủng PPV lưu hành ở lợn nuôi tại một số tỉnh miền Trung thông qua khảo sát đặc điểm di truyền của virus PPV.

2.2. Mục tiêu cụ thể

- Phát hiện được các chủng PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 lưu hành ở các tỉnh miền Trung.
- Xác định được trình tự nucleotide gen mã hóa protein cấu trúc của các chủng PPV phân lập được ở các tỉnh miền Trung Việt Nam.
- Phân tích, đánh giá được các biến đổi di truyền ở mức độ nucleotide và amino acid dự đoán của gen mã hóa protein cấu trúc của PPV phân lập được ở các tỉnh miền Trung Việt Nam.

3. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

3.1. Thu mẫu, tách chiết DNA tổng số

- Mẫu máu, mô phổi lợn ở độ tuổi giết thịt được thu tại các lò mổ thuộc bảy tỉnh miền Trung (Quảng Bình, Quảng Trị, Thừa Thiên Huế, Đà Nẵng, Quảng Nam, Quảng Ngãi và Bình Định).

- Tách chiết DNA tổng số từ các mẫu thu được.

3.2. Phân lập và sàng lọc các chủng PPV

Sử dụng các cặp mồi đặc hiệu với từng chủng PPV để khuếch đại đoạn gen tương ứng bằng phản ứng PCR, từ đó xác định tỷ lệ nhiễm các chủng PPV ở từng địa phương.

3.3. Khuếch đại và xác định trình tự nucleotide gen mã hóa protein cấu trúc của PPV

- Sử dụng các mồi đặc hiệu với từng đoạn gen nhằm khuếch đại gen mã hóa protein cấu trúc PPV.

- Kiểm tra chất lượng và kích thước phân tử đoạn gen khuếch đại bằng điện di gel agarose.

- Ghép nối và hiệu chỉnh trình tự gen dựa trên kết quả phân tích trình tự nucleotide.

3.4. Phân tích, đánh giá biến đổi trình tự nucleotide và amino acid dự đoán từ gen mã hóa protein cấu trúc và xây dựng cây phát sinh chủng loại các chủng PPV

- Phân tích đánh giá mức độ tương đồng trình tự nucleotide và amino acid tương ứng giữa các chủng PPV phân lập bằng phần mềm GenDoc 2.6; so sánh biến đổi di truyền với các chủng PPV đã phân lập trong khu vực và trên thế giới

- Xây dựng cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự hệ gen và gen mã hóa protein cấu trúc bằng phần mềm MEGA X để đánh giá xu hướng biến đổi di truyền, đồng thời xác định phân nhóm các chủng PPV đang lưu hành tại các

tỉnh khu vực miền Trung Việt Nam với các chủng PPV lưu hành trong khu vực và trên thế giới.

4. PHẠM VI NGHIÊN CỨU

- Các chủng PPV trên lợn thương phẩm ở độ tuổi giết mổ.
- Địa điểm thu mẫu: Bảy tỉnh khu vực miền Trung (Quảng Bình, Quảng Trị, Thừa Thiên Huế, Đà Nẵng, Quảng Nam, Quảng Ngãi và Bình Định).
- Địa điểm nghiên cứu: Phòng Công nghệ gen động vật (P601-602, nhà B4), Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, số 18, đường Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội.
- Thời gian nghiên cứu: 2019-2023.

5. NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

- Xác định được tỷ lệ lưu hành và tỷ lệ đồng nhiễm của bốn chủng PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 trên lợn nuôi ở bảy tỉnh miền Trung.
- Giải và phân tích được trình tự gen mã hóa protein cấu trúc của ba chủng PPV2 (Mã số GenBank: OL913365, OL913366 và OL913367) và trình tự hệ gen của hai chủng PPV4 (Mã số GenBank: MT434668 và MT434669) phân lập ở miền Trung.
- Phân tích được mối quan hệ di truyền của các chủng PPV2, PPV3 và PPV4 phân lập tại miền Trung với các chủng PPV lưu hành trong khu vực và trên thế giới.

6. Ý NGHĨA KHOA HỌC VÀ THỰC TIỄN CỦA LUẬN ÁN

- Kết quả phân tích trình tự, đánh giá mức độ biến đổi di truyền, cây phát sinh chủng loại các chủng PPV phân lập được ở miền Trung Việt Nam và so sánh với các chủng PPV lưu hành trong khu vực và trên thế giới sẽ là thông tin có giá trị trong các nghiên cứu về dịch tễ học phân tử các chủng PPV, hỗ trợ hiệu quả cho công tác quản lý, kiểm soát bệnh trên lợn, đặc biệt đối với Hội

chúng SMEDI, góp phần làm giảm thiểu những thiệt hại kinh tế cho ngành chăn nuôi lợn tại các tỉnh miền Trung nói riêng và Việt Nam nói chung.

- Cung cấp các dẫn liệu khoa học cập nhật, phục vụ nghiên cứu, giảng dạy và đào tạo các chuyên ngành Sinh học, Công nghệ sinh học, Chăn nuôi và Thú y ở các trường đại học.

CHƯƠNG 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. HIỆN TRẠNG CHĂN NUÔI VÀ DỊCH BỆNH TRÊN LỢN Ở CÁC TỈNH MIỀN TRUNG VIỆT NAM

Chăn nuôi lợn xếp vị trí hàng đầu trong các ngành chăn nuôi ở nước ta, cùng với canh tác lúa nước đã trở thành hai hợp phần quan trọng trong hệ thống sản xuất nông nghiệp ở Việt Nam. Thịt lợn chiếm đến hơn 70% trong cơ cấu các loại thịt sử dụng trong bữa ăn của người Việt. Theo số liệu của Tổng cục thống kê (2022), chăn nuôi lợn chiếm 60-64% trong cơ cấu đàn vật nuôi của Việt Nam ở giai đoạn 2020-2023.

Về quy mô, chăn nuôi lợn ở nước ta trước kia chủ yếu là chăn nuôi truyền thống theo nông hộ với một số lợi thế như tận dụng được nguồn lao động và thức ăn thừa, tạo nguồn phân bón hữu cơ cho canh tác nông nghiệp. Tuy nhiên, loại hình chăn nuôi này tồn tại nhiều nhược điểm như: Có mức đầu tư thấp, không gian chuồng trại đa phần nhỏ hẹp, mật độ nuôi cao, năng suất thấp, khó kiểm soát được chất lượng và dịch bệnh (Côi và cs, 2010). Hiện nay, xu hướng tất yếu của ngành chăn nuôi lợn ở nước ta là thực hiện chuyển đổi từ chăn nuôi theo quy mô nhỏ lẻ sang quy mô trang trại chuyên nghiệp. Thực tế cho thấy trong 5 năm vừa qua, tỷ lệ chăn nuôi nông hộ giảm từ 5-7%/năm, riêng năm 2019-2022, loại hình chăn nuôi theo nông hộ đã giảm 15-20%. Hiện nay sản lượng lợn sản xuất trong nông hộ nhỏ lẻ giảm còn 35-40%; sản lượng lợn sản xuất trong hộ chuyên nghiệp và trang trại đạt chiếm 60-65% (Cục Chăn nuôi, 2023). Đồng thời, việc ứng dụng khoa học công nghệ trong sản xuất đã hỗ trợ tích cực cho ngành chăn nuôi lợn ở nước ta phát triển theo hướng công nghiệp khép kín nhằm nâng cao sản lượng, rút ngắn thời gian và tiết kiệm chi phí sản xuất.

Về sản lượng, số liệu từ Tổng cục Thống kê (2023) cho thấy sản lượng thịt lợn hơi xuất chuồng năm 2019 của cả nước đạt ~4,1 triệu tấn và tiếp tục giảm trong năm 2020, xuống còn ~4,04 triệu tấn do ảnh hưởng của dịch Tả lợn

châu Phi. Sau đó, sản lượng thịt lợn hơi đã tăng trưởng trở lại trong năm 2021 và 2022 tương ứng đạt ~4,2 triệu tấn (tăng ~4,9 % so với năm 2020), đạt ~4,5 triệu tấn năm 2022 (tăng ~6,7% so với năm 2021). Trong 6 tháng đầu năm 2023, tổng đàn lợn cả nước ước tăng 2,5% so với cùng kỳ năm 2022, sản lượng thịt lợn hơi xuất chuồng ước đạt 2,3 triệu tấn, tăng 6,5% so với cùng kỳ năm 2022 (Tổng cục Thống kê, 2023).

Những thành tựu trên là kết quả của việc phát huy những ưu điểm của chăn nuôi lợn tại Việt Nam, bao gồm: Thời gian chăn nuôi ngắn, sức tăng trưởng nhanh, chu kỳ tái sản xuất ngắn, cùng với những lợi thế tự nhiên và tận dụng nguồn phụ phẩm nông nghiệp (Bé và cs, 2016). Tuy nhiên, khí hậu nhiệt đới gió mùa với đặc trưng nóng ẩm mưa đã khiến nhiều loại tác nhân gây bệnh trên lợn tồn tại và lưu hành trong thời gian dài trên đàn lợn nội địa. Trong đó, dịch Tả lợn châu Phi, dịch Lở mồm long móng và dịch Tai xanh là ba đại dịch đã gây thiệt hại đáng kể cho ngành chăn nuôi lợn ở nước ta trong thời gian gần đây.

Dịch Tả lợn châu Phi (African swine fever-ASF) xuất hiện ở Việt Nam vào năm 2019 và gây ra thiệt hại nặng nề cho ngành chăn nuôi lợn. Tính đến cuối năm 2019, dịch đã xảy ra tại 8.527 xã thuộc 667 huyện của tất cả các địa phương trên cả nước với tổng số lợn tiêu hủy gần 6 triệu con, tương đương với tổng trọng lượng 340,8 nghìn tấn (Tổng cục Thống kê, 2021). Nhìn chung, đợt dịch này đã gây ra thiệt hại đáng kể: Tổng đàn lợn sụt giảm mạnh; sản lượng thịt lợn hơi xuất chuồng trong năm 2019 giảm sâu so với năm 2018; tính đến cuối 2019, tổng đàn lợn cả nước giảm 25,5% so với cùng thời điểm năm 2018 (Tổng cục Thống kê, 2021).

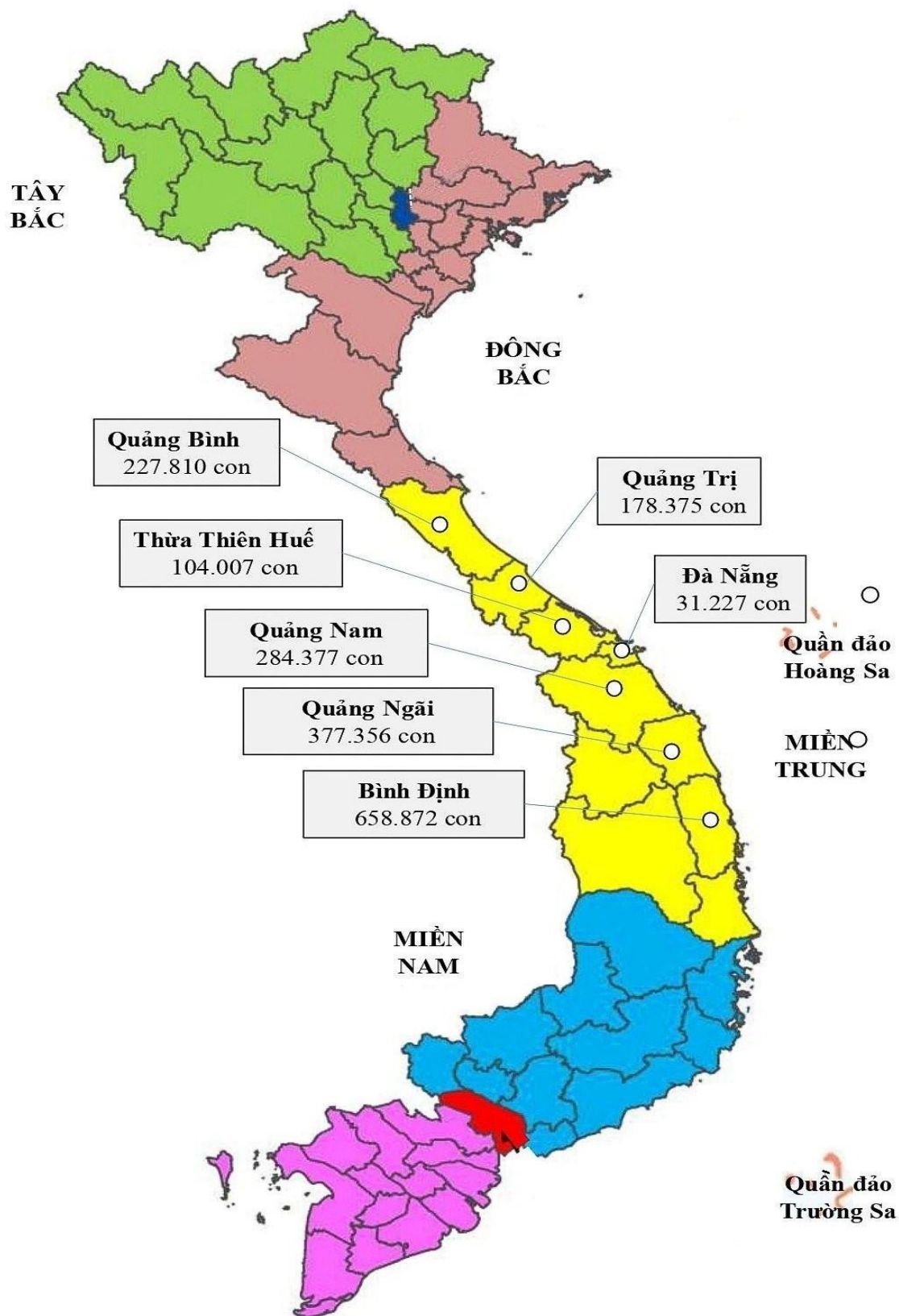
Sau dịch Tả lợn châu Phi, Lở mồm long móng (LMLM) (Foot-and-mouth disease-FMD) ở lợn là đại dịch thứ hai gây thiệt hại nặng nề cho ngành chăn nuôi lợn Việt Nam. Từ năm 2016 - 2020 (tháng 6/2020), Việt Nam đã xảy ra 1.760 ổ dịch LMLM tại 1.461 xã, phường, thị trấn tại 337 huyện, thị xã, thành phố của 57 tỉnh, thành phố; số gia súc mắc bệnh là 76.805 con, số gia súc bị chết và tiêu hủy là 36.428 con, trong đó, số lượng lợn bị tiêu hủy lên đến 34.275

con (chiếm tỷ lệ 94%). Dịch xảy ra trầm trọng nhất vào các năm 2018 và 2019, chủ yếu trên đàn lợn chưa được tiêm phòng vaccine LMLM. Mục tiêu của Chương trình quốc gia phòng chống dịch bệnh LMLM giai đoạn 2021-2025 bao gồm ngăn chặn sự xâm nhập của các chủng virus LMLM ngoại lai và xây dựng thành công các vùng an toàn dịch bệnh LMLM (Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2020).

Cùng với dịch LMLM, Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (Porcine reproductive and respiratory syndrome-PRRS), hay còn gọi là bệnh Tai xanh xuất hiện lần đầu tiên tại Việt Nam vào năm 2007, làm hàng chục nghìn con lợn mắc bệnh và bị tiêu hủy. Từ năm 2008, Việt Nam đã sử dụng vaccine và thực hiện có hiệu quả các biện pháp phòng, chống dịch tai xanh. Kết quả là từ năm 2014 đến nay, dịch Tai xanh vẫn xuất hiện, nhưng chỉ rải rác ở số ít hộ chăn nuôi lợn nhỏ lẻ tại một vài địa phương. So với dịch LMLM, bệnh Tai xanh có chiều hướng được kiểm soát tốt hơn nhiều do việc sử dụng vaccine có hiệu quả. Tuy nhiên, virus gây dịch bệnh Tai xanh vẫn tồn tại trong quần thể lợn (Thuy và cs, 2015). Do đó trong năm 2020 và giai đoạn tới, vẫn sẽ xuất hiện các ổ dịch nhỏ lẻ trên địa bàn có ổ dịch cũ và ở những khu vực có nguy cơ cao.

Bên cạnh đó, một số dịch bệnh như bệnh Phó thương hàn, bệnh Tụ huyết trùng, bệnh Đóng dấu, Hội chứng suy hô hấp ở lợn (Porcine Respiratory Disease Complex-PRDC), Hội chứng còi cọc sau cai sữa (Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome-PMWS), bệnh tiêu chảy ở lợn... vẫn thường xuyên xảy ra khiến ngành chăn nuôi gặp không ít khó khăn, thách thức.

Hiện tại, việc củng cố và tăng cường các biện pháp thú y phòng, chống dịch bệnh trong chăn nuôi lợn ở nước ta đã khiến tình hình dịch bệnh trên lợn đang từng bước được kiểm soát, đây cũng chính là thời điểm thuận lợi cho người chăn nuôi tái đàn, khôi phục sản xuất. Năm 2021, đàn lợn trong nước đã phục hồi trở lại, số lượng cá thể trong đàn lợn tại một số tỉnh khu vực miền Trung năm 2021 được trình bày ở Hình 1.1 theo số liệu của Tổng cục Thống kê (2022).



Hình 1.1. Bản đồ thống kê số lượng lợn nuôi ở một số tỉnh miền Trung (Tổng Cục thống kê, 2022)

Tuy nhiên, thực tế cho thấy việc tái đàn tại các địa phương nhìn chung vẫn còn chậm, đặc biệt trong những tháng đầu năm vì một số nguyên nhân như: Thiệt hại kinh tế nặng nề sau dịch, giá lợn giống luôn ở mức cao (từ 2,5-3,0 triệu đồng/con), tâm lý lo ngại dịch bùng phát khi chưa có vaccine phòng bệnh. Việc tái đàn chủ yếu diễn ra ở các cơ sở và doanh nghiệp chăn nuôi với quy mô lớn, đủ nguồn lực và chủ động được nguồn con giống (Tổng cục Thống kê, 2022).

Thiếu hụt con giống trong quá trình tái đàn, tăng đàn sau dịch bệnh là một thực trạng mà ngành chăn nuôi lợn tại nước ta thường xuyên phải đối mặt. Nguyên nhân chính của hiện tượng này là trong thời gian diễn ra dịch bệnh, số lượng lợn nái bị giảm, cơ sở sản xuất con giống không thực hiện phối giống và hạn chế cho lợn sinh sản, khiến giá lợn giống trên thị trường sau đó tăng cao (Tồn, 2020). Mặt khác, chất lượng sinh sản của đàn lợn nái vẫn bị ảnh hưởng bởi một số tác nhân gây suy giảm khả năng sinh sản. Trong đó, PPV đã được xác nhận là tác nhân chính gây Hội chứng SMEDI trên lợn ở khu vực miền Trung Việt Nam từ những năm 1990 (Hùng, 1999).

Nhiễm PPV gây hỏng thai, làm suy giảm chất lượng sinh sản ở đàn lợn nái và ảnh hưởng đến việc sản xuất lợn giống, gây thiệt hại đáng kể cho ngành chăn nuôi lợn (Streck và Truyen, 2020). Đối tượng lâm sàng chính của PPV là lợn nái mang thai, tuy nhiên, virus lưu hành trên lợn ở mọi lứa tuổi và không phân biệt giới tính (Thuy và cs, 2021). Do đó, việc chủng ngừa vaccine PPV cho lợn nái hậu bị chỉ có tác dụng giảm nhẹ các triệu chứng lâm sàng mà không thể loại bỏ hoàn toàn virus ra khỏi đàn lợn (Serena và cs, 2021). Đồng thời, nhằm hạn chế tối đa chi phí cho chăn nuôi, nhiều nông hộ có thể đã dừng tiêm phòng vaccine PPV, khiến cho Hội chứng SMEDI vẫn xuất hiện thường xuyên với tên gọi là “bệnh thai gổ”. Mặt khác, nghiên cứu của Quân và cs (2019) trên phạm vi toàn quốc đã xác nhận PPV là yếu tố kích hoạt cho Hội chứng còi cọc sau cai sữa.

Nhằm xây dựng ngành chăn nuôi lợn theo hướng công nghiệp hiện đại, tự chủ nguồn cung và tiến tới xuất khẩu, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn

đã tổ chức Hội nghị "Triển khai giải pháp thúc đẩy phát triển chăn nuôi lợn trong tình hình mới" vào ngày 27/7/2023. Hội nghị đã đưa ra chiến lược phát triển chăn nuôi đến năm 2030, phấn đấu sản lượng thịt xẻ khoảng 6 triệu tấn (thịt lợn chiếm khoảng 60%); xuất khẩu được từ 15-20% sản lượng thịt lợn. Để đạt được mục tiêu đề ra, Cục Thú y đã cam kết theo dõi sát tình hình dịch bệnh, tháo gỡ khó khăn cho các doanh nghiệp xuất khẩu, đồng thời xây dựng bản đồ dịch tễ của các bệnh trên lợn và tăng cường năng lực xét nghiệm bệnh trên lợn. Đồng thời, Hội nghị cũng yêu cầu đẩy mạnh các hoạt động khoa học công nghệ phục vụ cho chăn nuôi, đặc biệt là triển khai các nghiên cứu, ứng dụng kỹ thuật hiện đại trong công tác chẩn đoán, phòng và điều trị một số bệnh trên lợn. Trong đó, việc phát hiện mới và nghiên cứu đặc điểm phân tử của các virus gây bệnh trên lợn sẽ cung cấp cơ sở khoa học cho công tác xây dựng chương trình vaccine đạt hiệu quả cao trong phòng ngừa các bệnh truyền nhiễm ở lợn.

1.2. GIỚI THIỆU VỀ PPV VÀ BỆNH DO PPV Ở LỢN

1.2.1. Phân loại PPV

PPV (Porcine Parvovirus) thuộc:

Họ: Parvoviridae Phân họ: Parvovirinae Chi: *Protoparvovirus*

Loài: *Ungulate protoparvovirus*

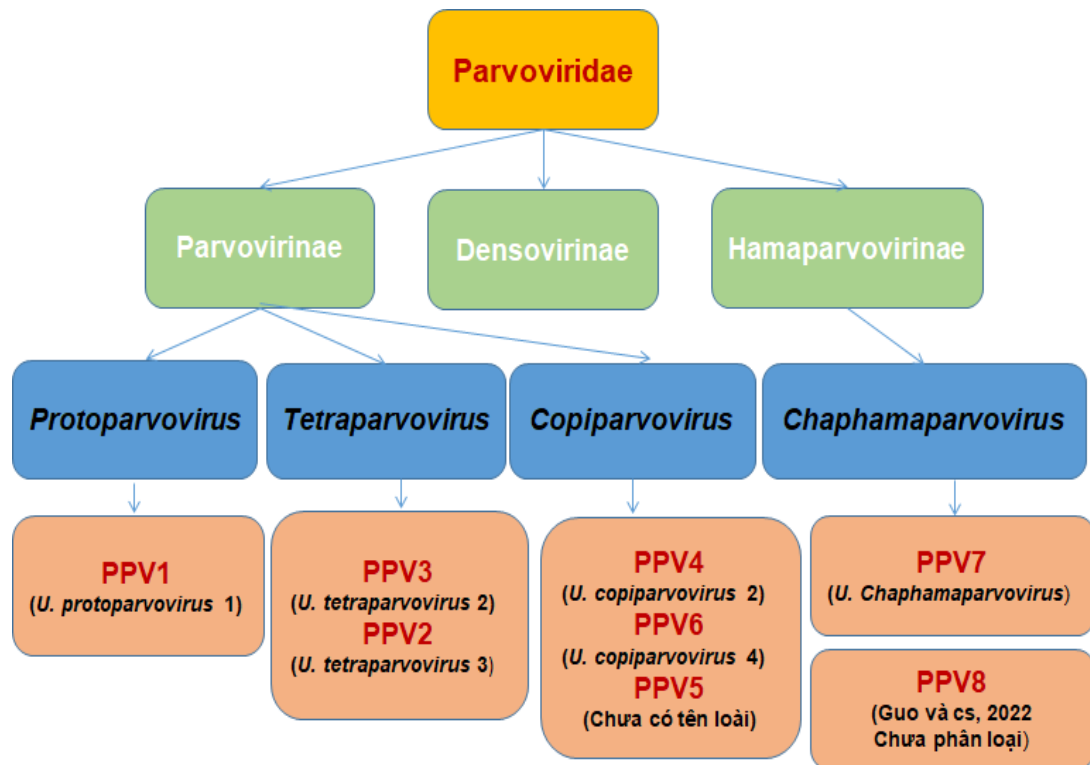
Phân loài: Porcine parvovirus (PPV)

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 nhiễm trên động vật có xương sống bao gồm 10 chi, trong đó, bốn chi chứa các virus lây nhiễm ở lợn (Walker và cs, 2020), bao gồm:

- *Bocaparvovirus* (loài *U. bocaparvovirus* 2, 3, 4 và 5)
- *Copiparvovirus* (loài *U. copiparvovirus* 2 và 4)

- *Protoparvovirus* (loài *U. protoparvovirus* 1 và 2)
- *Tetraparvovirus* (loài *U. tetraparvovirus* 2 và 3)

Tên gọi Porcine Parvovirus được đề xuất với tiền tố “parvo” bắt nguồn từ từ “parvum” trong tiếng Latin, có nghĩa là “nhỏ” và phù hợp với thành ngữ “*sed parva forti*” với ý nghĩa “nhỏ nhưng hùng mạnh” (Jager và cs, 2021). Thông tin phân loại các chủng PPV1-7 theo ICTV và chủng PPV8 được phát hiện gần đây ở Trung Quốc (Gou và cs, 2022) được trình bày ở Hình 1.2.



Hình 1.2. Sơ đồ mô tả phân loại hiện tại của PPV

Hiện tại, theo phân loại của 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* và PPV8 được đề xuất bởi Gou và cs (2022), hiện chưa được ICTV phân loại (Hình 1.2).

1.2.2. Đặc điểm sinh học của PPV

1.2.2.1. Hình thái



Hình 1.3. Hình dạng của PPV (Kon, 2018)

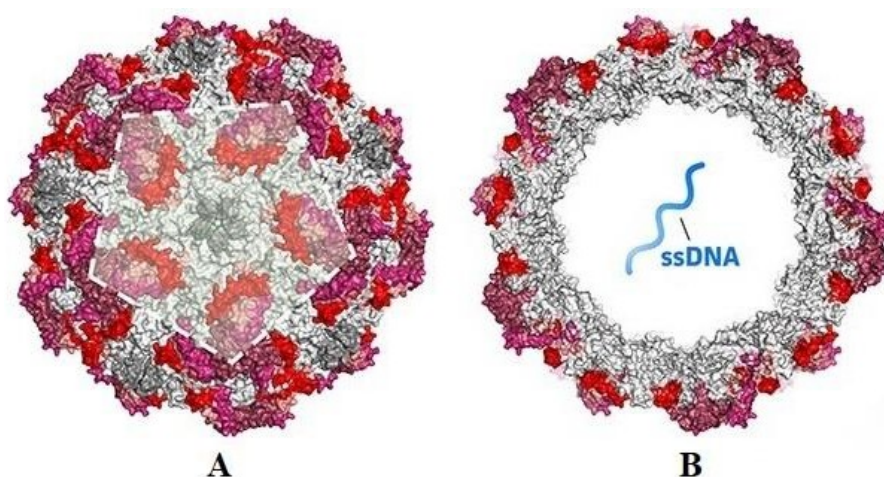
PPV là virus không vỏ, có kích thước nhỏ, tròn, đường kính virion khoảng 18-26 nm, cấu trúc đối xứng 20 mặt (Hình 1.3). Trọng lượng phân tử virion là $5,3 \times 10^6$ Dal. Lõi của PPV là một phân tử DNA sợi đơn có trọng lượng $1,4 \times 10^6$ Dal; chiếm 26,4% trọng lượng virion nguyên vẹn (Berns và Hauswirth 1983; Molitor và cs, 1983).

1.2.2.2. Protein capsid

Capsid là lớp vỏ protein có chức năng bảo vệ vật chất di truyền của virus, đóng vai trò quan trọng trong quá trình xâm nhập, quyết định tính kháng nguyên và phạm vi vật chủ của virus; đồng thời, capsid cũng là đối tượng của hệ miễn dịch vật chủ (Cadar và cs, 2013; Simpson và cs, 2002).

Capsid của PPV là vỏ protein hình cầu bao gồm 60 bản sao của VP1 hoặc VP2 sắp xếp theo cấu trúc đa diện đối xứng (Hình 1.4) (Chapman và Rossmann, 1993). Mỗi tiểu đơn vị capsid được tạo nên bởi tám chuỗi β đối song song, một cấu trúc phổ biến của capsid virus, cùng với một chuỗi xoắn α và bốn vòng loop. Các amino acid của vòng loop định vị theo trục 2- và 3- của cấu trúc đối xứng, chúng khác nhau tùy thuộc vào từng chủng PPV và được xem là quan trọng đối với khả năng miễn dịch và lây nhiễm (Simpson và cs, 2002). Một số

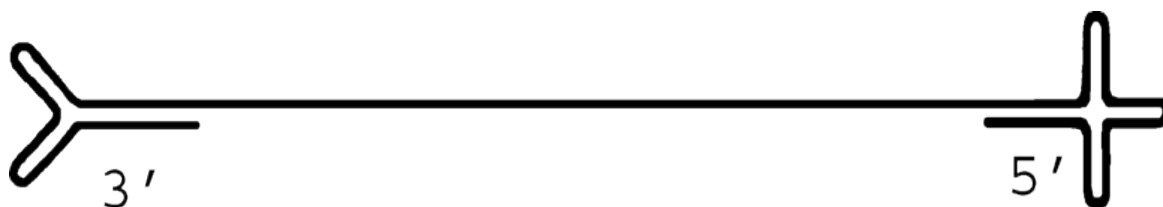
amino acid trung tính nằm ở bề mặt bên trong vỏ capsid của PPV. Đặc điểm này cho thấy sự bất thường, vì nằm ở mặt trong capsid của hầu hết các virus khác là các amino acid cơ bản, chúng đóng vai trò tương tác với các nhóm phosphat của phân tử DNA (Xie và Chapman, 1996) dẫn đến phản ứng entapy tĩnh điện cao với các phân tử DNA, đảm bảo quá trình lão hóa và ổn định của hệ gen virus.



Hình 1.4. Cấu trúc của PPV (Vereecke và cs, 2022). (A) Vỏ capsid và (B) Lõi ssDNA

1.2.2.3. Hệ gen

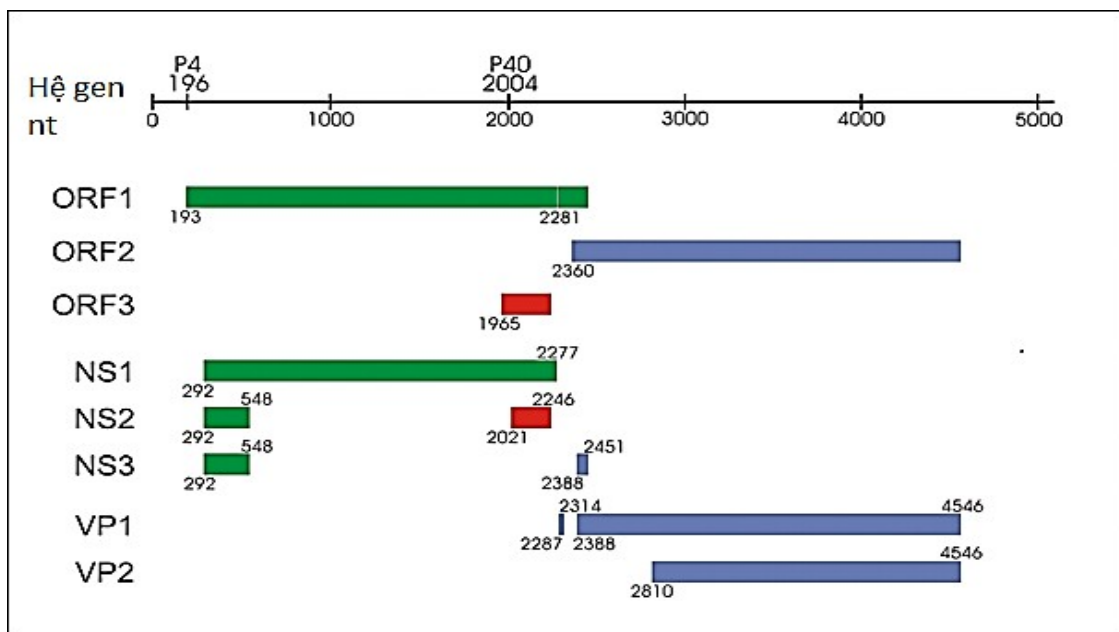
Vật liệu di truyền của PPV là ssDNA, mạch thẳng, với kích thước phân tử dao động trong khoảng 5-6 kb, tùy thuộc vào từng chủng PPV (Molitor và cs, 1983). Trình tự phía 2 đầu tận cùng của PPV tạo nên cấu trúc kẹp tóc (Palindromic hairpin structure) (Hình 1.5) dạng hình chữ “Y” hoặc chữ “T” với kích thước từ 120-200 bp (Bern và Hauswirth, 1983).



Hình 1.5. Cấu trúc kẹp tóc ở hai đầu tận cùng của hệ gen PPV (Zimmermann, 2006)

Mặc dù kích thước hệ gen nhỏ, nhưng cấu trúc hệ gen PPV khá phức tạp, gồm ba khung đọc mở (Open Reading Frame-ORF) mã hóa cho bảy protein.

Hiện tượng ghép nối xen kẽ (Alternative splicing) làm tăng khả năng mã hóa của hệ gen PPV, cho phép một gen có thể có nhiều hơn một khung đọc mở, vì thế có thể mã hóa cho nhiều protein khác nhau, thực hiện các chức năng sinh học khác nhau trong quá trình tồn tại và nhân lên của virus (Hình 1.6). ORF1 mã hóa cho các protein không cấu trúc (non-structural protein-NS) bao gồm NS1, NS2 (Bergeron và cs, 1993); ORF3 (chỉ có ở PPV4) là một khung đọc mở nhỏ, nằm ở giữa ORF1 và ORF2, mã hóa cho protein không cấu trúc NP1; cả ba protein này có tính bảo tồn cao, đóng vai trò tổng hợp các helicase và nickase cần thiết cho quá trình sao chép và biểu hiện gen của virus (Xie và cs, 2022). ORF2 mã hóa cho các protein vỏ capsid (Viral coat and capsid protein-VP) bao gồm VP1 và VP2 được phiên mã từ hai trình tự gen mã hóa trùm lên nhau. Protein cấu trúc thứ ba (VP3) tạo nên từ việc biến đổi sau dịch mã của VP2 (Tu và cs, 2015; Farr và cs, 2006; Simpson và cs, 2002). Ngoài ra, một protein không cấu trúc (SATp) được biểu hiện từ cùng mRNA của VP2, với điểm khởi đầu chậm hơn bảy nucleotide so với codon mở đầu của VP2 (Mietzsch và cs, 2019; Zadori và cs, 2005), đóng vai trò đẩy nhanh quá trình ly giải của tế bào và giải phóng virus (Mészáros và cs, 2017).



Hình 1.6. Cấu trúc hệ gen PPV điển hình (Zimmermann, 2006)

Như được thể hiện ở Hình 1.6, ORF1-3 là ba khung đọc mở khác nhau, mã hóa cho protein không cấu trúc (NS1-NS3) và protein cấu trúc (VP1, VP2). Các màu khác nhau biểu thị các protein được dịch mã từ các ORF tương ứng (Zimmermann, 2006).

Kích thước hệ gen và gen VP của PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 được trình bày ở Bảng 1.1.

Bảng 1.1. Kích thước hệ gen và gen VP của các chủng PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4

Chủng	Hệ gen (bp)	Gen VP (bp)	VP (aa)	Tác giả
PPV1	4.723	1.743	580	Li và cs (2021)
PPV2	5.426	3.099	1.032	
PPV3	5.179	2.778	925	
PPV4	5.368	2.187	728	Thuy và cs (2021)

1.2.3. Dịch tễ học PPV

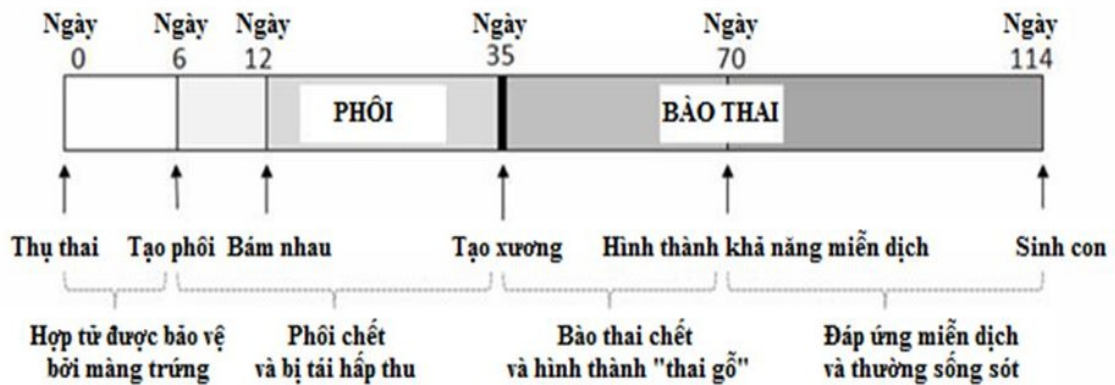
PPV được phát hiện lần đầu tiên vào năm 1964 (Mayr và Mahnel, 1964), sau đó, chúng được xác định có liên quan đến Hội chứng SMEDI và sự phân bố của chúng trên toàn thế giới cũng đã được xác nhận trên cả lợn nhà và lợn rừng không phân biệt giới tính, độ tuổi, tình trạng sức khỏe và tình trạng tiêm phòng vaccine (Cadar và cs, 2013; Truyen và Streck, 2012; Józwick cs, 2009; Dea và cs, 1985; Joo và cs, 1976; Mengeling và Cutlip, 1976; Cartwright và Huck, 1967).

Sự ổn định của PPV với điều kiện môi trường tự nhiên giúp chúng có khả năng tồn tại và truyền nhiễm trong thời gian dài thông qua chuồng trại, dụng cụ chăn nuôi, trang phục của người chăn nuôi... (Truyen và Streck, 2012). PPV bền với các yếu tố môi trường, có thể chịu được ngưỡng pH rộng từ 3,0-8,0; có khả năng chịu nhiệt hàng giờ ở 90°C và đề kháng tốt với nhiều chất sát trùng thông thường (Eterpi và cs, 2009).

PPV lây nhiễm giữa các cá thể lợn qua ba con đường chính: Thức ăn, nước uống và phối giống. PPV xâm nhiễm vào cơ thể lợn qua mũi, miệng và đường sinh dục, sau đó lây lan qua hệ thống tuần hoàn máu đến các cơ quan khác như tim, phổi, thận, lá lách, nội mạc tử cung và ruột non của lợn (Streck, 2013; Paul và cs, 1979). Các cá thể lợn bị nhiễm PPV nặng sẽ thải virus thông qua phân, nước tiểu và các dịch bài tiết, khiến tốc độ lây nhiễm PPV trong đàn lợn trở nên nhanh chóng. Việc tách-nhập đàn từ những trang trại lợn khác nhau hay thậm chí sự di chuyển của một số loài gặm nhấm (Truyen và Streck, 2012) cũng có thể lây nhiễm PPV cho các đàn lợn sạch bệnh. PPV có thể truyền qua tinh dịch thông qua giao phối trực tiếp hoặc gieo tinh nhân tạo từ tinh dịch của lợn nọc mắc bệnh (Mészáros và cs, 2017).

Các nghiên cứu thực nghiệm và dịch tễ học đã chứng minh rằng nhiễm PPV trong khoảng thời gian nửa đầu thai kỳ có thể dẫn đến suy sinh sản ở lợn nái mang thai. Kết quả nhiễm trùng bào thai tùy thuộc vào thời điểm nhiễm

PPV ở lợn nái mang thai (Hình 1.7). Khi bắt đầu mang thai, hợp tử được bảo vệ bởi màng trứng (zona pellucida) có khả năng chống lại sự xâm nhập của virus. Trong giai đoạn phôi, nhiễm PPV dẫn đến chết phôi, phôi bị tái hấp thu bởi cơ thể mẹ và lợn nái có thể sẽ động dục trở lại. Từ ngày thứ 35 trở đi, nhiễm PPV khiến bào thai tử vong và xảy ra hiện tượng “thai gổ”. Từ sau ngày thứ 70 của thai kỳ, bào thai lợn có khả năng tự miễn dịch với PPV và lợn con thường có khả năng sống sót. Thời gian để PPV lây truyền dọc từ mẹ sang con thông qua nhau thai mất từ 12-18 ngày, do đó nếu lợn nái bị nhiễm PPV sau ngày thứ 56 của thai kỳ thường không gây tổn hại cho đàn con (Mészáros và cs, 2017) và lợn con được sinh ra với kháng thể kháng PPV.



Hình 1.7. Hậu quả lâm sàng khi nhiễm PPV được quan sát ở các thời điểm khác nhau của thai kỳ (Mengeling và cs, 2000)

Các chủng PPV có đặc điểm di truyền khác nhau gây ra những hậu quả lâm sàng khác nhau đối với bào thai lợn. Các chủng PPV vaccine và chủng PPV có độc lực thấp (Ví dụ: NADL-2 và MSV) không thể vượt qua hàng rào nhau thai một cách hiệu quả như các chủng gây bệnh cao (Ví dụ: Chủng Kresse và chủng 27a) (Zeeuw và cs, 2007; Kresse và cs, 1985;) vì vậy tác động có hại của chúng đối với thai kỳ không thể được phát hiện một cách rõ ràng như của các chủng độc lực cao. Tuy nhiên, việc tiêm trực tiếp chủng vaccine NADL-2 vào nước ối có thể dẫn đến thai chết lưu (Mészáros và cs, 2017).

1.2.4. Tương tác giữa virus và tế bào

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 (Paul và cs, 1979). 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 và cs, 2013; Miao và cs, 2009; McKillen và cs, 2007).

PPV sử dụng nhiều glycoprotein, glycan và glycolipid để gắn vào tế bào (Ros và cs, 2017; Harbinson và cs, 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 cs, 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 cs, 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.

1.2.5. Cơ chế gây bệnh

PPV là nguyên nhân chính gây Hội chứng SMEDI ở lợn nái mang thai (Díaz và cs, 2020). 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 cs, 2022; Zhang và cs, 2015), tế bào tinh hoàn lợn (Swine testicular cells-ST) (Zhao và cs, 2016) và tế bào thể vàng (Steroidogenic luteal cells-SLC) (Zhang và cs, 2019).

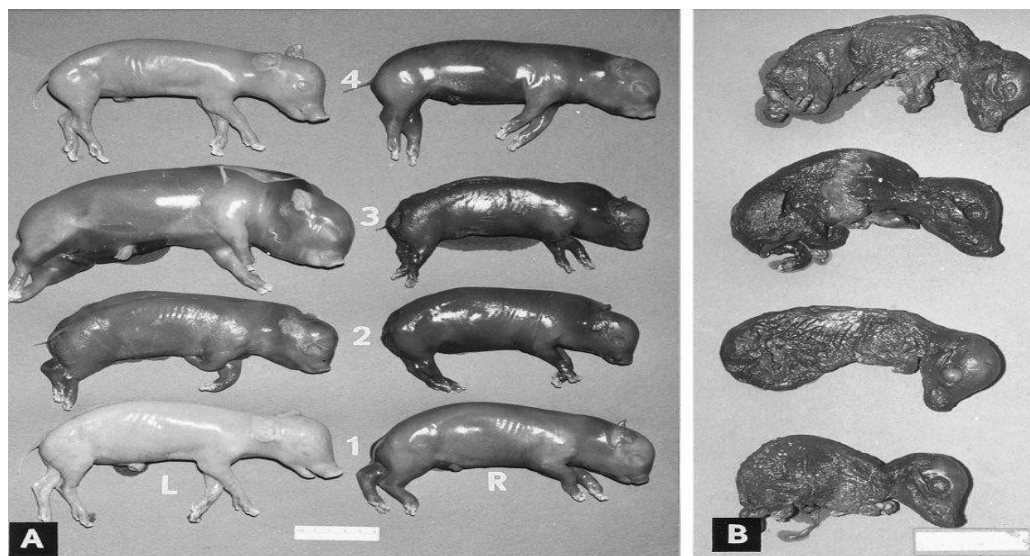
Mặc dù khó có thể so sánh kết quả của các thí nghiệm trên các dòng tế bào lợn khác nhau trong nghiên cứu cơ chế gây bệnh của PPV, nhưng nhìn chung, sự sao chép PPV làm giảm điện thế màng ty thể và dẫn đến việc giải phóng và tích lũy các protein độc hại đối với tế bào như cytochrome C và p53, kích hoạt 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 cs, 2015).

1.2.6. Triệu chứng bệnh do PPV

Mặc dù đối tượng lây nhiễm của PPV là lợn ở mọi lứa tuổi nhưng bệnh chủ yếu xảy ra trên lợn nái với dấu hiệu lâm sàng chính là suy giảm khả năng sinh sản, đặc trưng bởi hiện tượng sảy thai, đẻ non, chết phôi, thai hóa gỗ với nhiều kích thước khác nhau, giảm lứa đẻ và tái động dục. Ngoài ra, giảm kích thước vòng bụng ở lợn nái mang thai là triệu chứng duy nhất có thể đánh giá bằng trực quan ở giai đoạn sớm.

Lợn nhiễm PPV sau 7-8 ngày sẽ có biểu hiện sốt, giảm số lượng bạch cầu. Bất kể độ tuổi và giới tính của lợn, đây là kết quả của nhiễm trùng máu. Trong giai đoạn này, PPV có thể được phát hiện từ máu cũng như các mô và các tổ chức có khả năng sinh trưởng cao như tinh trùng, tế bào gan, thận, lá lách, niêm mạc phôi, nhau thai và bào thai (Mengeling và Cutlip, 1976).

Bệnh tích quan sát được là bào thai còi cọc không phát triển, phôi chết, các chất dịch lỏng và các mô mềm của phôi chết bị tái hấp thu, khiến phôi thai chết bị khô, nên thường gọi là “bệnh thai gỗ” (Hình 1.8). Một số ghi nhận về biến đổi đại thể trên bào thai bị nhiễm PPV khi chúng chưa có khả năng miễn dịch bao gồm: Sự phát triển của các mạch máu trên bề mặt bào thai gây xuất huyết vào các mô lân cận, hình thành cục máu đông trong các khoang cơ thể và thai bị khô. Ngược lại, không có biểu hiện bệnh tích trên thai bị nhiễm PPV sau khi thai đã hình thành miễn dịch chống lại PPV.



Hình 1.8. Hiện tượng thai gổ, chết non do lợn nái nhiễm PPV (Mengeling và cs, 2000). (A) Lợn mang thai được gây nhiễm với virus Parvo thông qua đường mũi miệng sau khi phối 47 ngày và giết sau 34 ngày gây nhiễm, thai lấy từ sừng tử cung trái (L) và sừng tử cung phải (R), thứ tự 1-4 tính từ cổ tử cung đến buồng trứng, thai L1 và L4 còi cọc và vẫn sống khi mổ khám, thai L3 chết ngay; (B) Thai của lợn nái bị mắc bệnh tự nhiên, sau 114 ngày phối giống, cuối giai đoạn hấp phụ nước (thai khô)

PPV được chứng minh có liên quan đến nhiều tình trạng bệnh khác nhau ở lợn, bao gồm viêm cơ tim không mũ ở lợn con đang bú, tiêu chảy, viêm thận kẽ ở lợn trong độ tuổi giết mổ và tổn thương da (Afolabi và cs, 2019; Yasuhara và cs, 1989; Dea và cs, 1985; Kresse và cs, 1985). Tuy nhiên, chưa có bằng chứng rõ ràng để khẳng định PPV là tác nhân chính của những bệnh này. Ngoài ra, đồng nhiễm PPV1/PCV2 làm trầm trọng thêm các triệu chứng của Hội chứng còi cọc sau cai sữa ở lợn (Molini và cs, 2022a; Bojan và cs, 2016).

1.2.7. Chẩn đoán PPV

Hầu hết các trường hợp nhiễm PPV đơn thuần không gây triệu chứng lâm sàng ở lợn trưởng thành hoặc lợn con. Sự có mặt của PPV có thể được dự đoán khi lợn nái xảy ra một trong các triệu chứng bất thường về sinh sản như tái động dục không theo chu kỳ, sảy thai, thai chết lưu, số lượng con sinh ra thấp bất thường...

Việc phát hiện PPV bằng các phương pháp huyết học bao gồm xét nghiệm trung hòa huyết thanh (Serum neutralization-SN), xét nghiệm cố định bổ thể trực tiếp (Modified direct complement-fixation-MDCF), xét nghiệm ức chế đông máu (Haemagglutination inhibition test-HI), kỹ thuật đông máu (Haemagglutination test-HA) đã được sử dụng phổ biến vào thập niên 80 của thế kỷ XX (Mengeling, 1972; Morimoto và cs, 1972; Joo và cs, 1976). Bên cạnh đó, phương pháp miễn dịch huỳnh quang cũng là một quy trình đáng tin cậy để phát hiện kháng nguyên PPV trong các mô của thai lợn bị chết lưu. Một kỹ thuật tiên tiến khác, xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzyme (Enzyme Linked Immunosorbent Assay-ELISA) có thể được chuẩn hóa dễ dàng hơn và phù hợp với quá trình tự động hóa, cho phép phát hiện kháng thể PPV trong huyết thanh và huyết tương ở lợn lâm sàng với độ đặc hiệu và độ nhạy cao, tiết kiệm chi phí (Gao và cs, 2022; Yan và cs, 2022; Deka và cs, 2021). Tuy nhiên, hạn chế của phương pháp này là có thể đưa ra kết quả dương tính giả. Trong nghiên cứu chẩn đoán PPV, phân lập virus là phương pháp ít được sử dụng nhất. Việc phân lập PPV từ “thai hóa gỗ” thường không thành công vì mất nhiều thời gian và thường bị nhiễm.

Gần đây hơn, PCR là kỹ thuật hữu ích nhất để phát hiện PPV trong gạc (mũi, trực tràng, đường sinh dục), máu, tinh dịch, thận, phổi, hạch bạch huyết và các mô từ thai hỏng, thai chết lưu. Kỹ thuật PCR đã được mô tả với độ nhạy, độ đặc hiệu và hiệu quả chẩn đoán cao hơn so với các phương pháp huyết học (Parthiban và cs, 2022; Li và cs, 2021; Bhattacharjee và cs, 2021; Streck và cs, 2015). Ngoài ra, Real-time PCR được xem là phương pháp chẩn đoán PPV hữu ích với ưu điểm có thể cung cấp thông tin chính xác về sự phát hiện PPV cũng như số lượng bản sao của virus được khuếch đại (Milek và cs, 2019). Bên cạnh đó, Multiplex PCR là phương pháp đã được sử dụng để phát hiện đồng thời các tác nhân virus gây bệnh trên lợn, trong đó có PPV (Chen và cs, 2023; Liu và cs, 2022; Shi và cs, 2022; Kim và cs, 2021).

1.2.8. Phòng ngừa PPV

Hiện tại chưa có biện pháp điều trị hiệu quả cho bệnh do tác nhân virus nói chung và PPV nói riêng. Các biện pháp quản lý chung đều nhắm đến mục tiêu duy trì tình trạng sức khỏe tốt, nâng cao khả năng miễn dịch và tiêm vaccine cho đàn lợn. Phương pháp cổ điển nhằm tạo miễn dịch đối với PPV là cho lợn nái hậu bị tiếp xúc với các mẫu bệnh phẩm trước khi phối giống. Cách tiếp cận này không đáng tin cậy và nguy hiểm vì chúng có thể dẫn đến việc phổ biến các mầm bệnh khác trong quần thể, ví dụ, virus gây bệnh sốt lợn cổ điển.

Vaccine bất hoạt ngừa PPV lần đầu tiên ra đời vào nửa cuối thập niên 1970 và nhanh chóng phát triển thành mũi tiêm thường quy cho lợn nái (Suzuki và Fujisaki, 1976). Cho đến nay, chủng PPV được sử dụng để sản xuất vaccine bất hoạt là chủng NADL-2 bị bất hoạt về mặt hóa học với tá dược là nhũ tương dầu hoặc aluminium hydroxide (Streck và cs, 2019). Mặc dù vaccine bất hoạt giúp kiểm soát PPV hiệu quả, nhưng mối lo ngại về tính an toàn của chúng vẫn thường được đặt ra do nguy cơ virus có thể không bị bất hoạt hoàn toàn và dẫn đến sự nhân lên của virus trong vật chủ (Wang và cs, 2020).

Vaccine nhược độc là một lựa chọn tốt trong việc kiểm soát PPV với ưu điểm gây ra phản ứng miễn dịch kéo dài giúp bảo vệ đàn lợn trong vài năm. Một số chủng PPV có độc lực thấp hoặc mang đặc điểm hỗn hợp của cả chủng PPV độc lực (Kresse) và chủng PPV ôn hòa (NADL-2) được đánh giá là có tiềm năng trở thành các chủng vaccine nhược độc mới, cung cấp hiệu quả miễn dịch mở rộng đối với các chủng PPV lưu hành trên thực địa (Vereecke và cs, 2022; Deng và cs, 2020; Cui và cs, 2012).

Hiện tại, trên thị trường có hơn 10 loại vaccine phòng ngừa PPV lưu hành với tên thương mại là: PARVOERY SIN, PARVOSIN-OL, BIOSUIS Parvo L, PARVOERY (Bioveta-Cộng hòa Séc); PARVOVAX (Merial, Pháp); PPV-VAC (Choongang, Hàn Quốc); Porcillis Parvo, Porcilis Ery+Parvo (Intervet,

Hà Lan); Parvosuin MR (Hipra, Tây Ban Nha); FarrowSure B, SUVAXYN PARVO/E (Zoetis, Mỹ) và PARVO Shield L5E (Novartis, Mỹ). Việc sử dụng đơn lẻ hoặc kết hợp của các loại vaccine thương mại phòng ngừa PPV1 ở châu Âu đã được khảo sát trong điều kiện thực tế (Garcia và cs, 2019c) và trong phòng thí nghiệm (Born và cs, 2020; Garcia và cs, 2020b, 2020c, 2019a; Sánchez và cs, 2019). Bên cạnh đó, hiệu quả bảo hộ của vaccine còn phụ thuộc vào các yếu tố như: Sự tương đồng về mặt di truyền giữa chủng vaccine và chủng thực địa (Noguera và cs, 2021, Kiss và cs, 2020); phương pháp sản xuất kháng nguyên và thành phần tá dục (Ma và cs, 2022; Kiss và cs, 2020).

Sự phát triển của cơ sở dữ liệu về trình tự gen kháng nguyên của các tác nhân gây bệnh ở lợn đã tạo điều kiện thuận lợi cho việc phát triển các loại vaccine tái tổ hợp đa giá, với mục đích tiết kiệm chi phí tiêm chủng và nâng cao hiệu quả phòng bệnh cho đàn lợn. Đối với PPV, gen mã hoá protein cấu trúc là nhân tố quyết định quá trình xâm nhập và gây bệnh trên lợn, vì thế nghiên cứu đặc điểm phân tử và biến đổi di truyền của vùng gen này có thể là cơ sở cho các nghiên cứu sản xuất vaccine phòng ngừa PPV. Gần đây, vaccine VLP (Virus-like particle) là vaccine tiểu đơn vị dựa trên trình tự gen VP2 của PPV1 đã được các nhà khoa học nghiên cứu phát triển và thử nghiệm để dần thay thế cho các vaccine truyền thống (Cho và cs, 2022; Wang và cs, 2020; Yang và cs, 2021; Zheng và cs, 2020; Tian và cs, 2019).

Tuy nhiên, việc chủng ngừa PPV chỉ có thể làm giảm những biểu hiện lâm sàng trên lợn nái sinh sản mà không thể ngăn ngừa sự lây nhiễm của PPV giữa các cá thể lợn, cũng như không thể loại bỏ hoàn toàn mầm bệnh ra khỏi đàn lợn (Serena và cs, 2021; Foerster và cs, 2016; Józwick và cs, 2009). Hiện tại, vaccine phòng ngừa PPV chỉ được sản xuất từ PPV1; chưa có công trình nào công bố về hiệu quả phòng ngừa của vaccine này đối với các chủng PPV khác, đặc biệt là các chủng mới phát hiện trong thời gian gần đây.

1.3. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU PPV TRÊN THẾ GIỚI VÀ Ở VIỆT NAM

1.3.1. Tình hình nghiên cứu PPV trên thế giới

1.3.1.1. Sự lưu hành PPV

Sự lưu hành của PPV nói chung và tỷ lệ lưu hành của từng chủng PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 trên thế giới được tổng hợp và trình bày ở Bảng 1.2.

Bảng 1.2. Tỷ lệ lưu hành của PPV trên thế giới

Châu lục	Quốc gia	Tỷ lệ nhiễm (%)				Tài liệu tham khảo
		PPV1	PPV2	PPV3	PPV4	
Châu Á	Myanmar	-	10,0	-	-	Hijikata và cs (2001)
	Trung Quốc	-	-	-	1,84	Huang và cs (2010)
		5,56	39,56	45,11	21,56	Sun và cs (2015)
	Thái Lan	53,0	83,0	73,0	44,0	Saekhow và Ikeda, (2015)
	Nhật Bản	-	58,0 - 100	-	-	Saekhow và cs, (2015)
		67,0	58,0	39,0	33,0	Saekhow và cs, (2015)
	Việt Nam	55,6	-	-	-	Giáp và cs (2020)
		53,7	28,0	17,7	7,8	Thuy và cs (2021)
		23,9 - 24,4	3,4 - 61,6	27,3 - 46,5	13,6 - 51,2	Nguyen và cs (2022)
	Ấn Độ	14,3	-	-	-	Parthiban và cs (2022)
Châu Mỹ	Mỹ	-	17,06	-	-	Xiao và cs (2012)
	Mỹ	-	-	-	1,9	Xiao và cs (2013)
	Bắc Mỹ	14,7	72,0	19,2	5,9	Opriessnig và cs (2014)
	Đông Nam Mexico	-	90,0	-	-	Garcia và cs (2020)

Châu lục	Quốc gia	Tỷ lệ nhiễm (%)				Tài liệu tham khảo
		PPV1	PPV2	PPV3	PPV4	
Châu Âu	Hungary	0,5	6,4	9,7	6,4	Csa'gola và cs (2012)
	Germany	60 - 61	55 - 78	20	7	Streck và cs (2013)
	Transylvania	-	10,3 - 25	17,5 - 35	0,95 - 10	Cadar và cs (2013)
	Miền Trung Slovakia	-	-	11,0	-	Sliz và cs (2015)
	Ba Lan	0	19,0	7,7	2,4	Cui và cs (2017)
	Hungary	-	51,06	-	-	Novosel và cs (2018)
	Ba Lan	8,6-10,7	48,7 - 49,1	-	-	Milek và cs (2019)
	Anh và một số nước châu Âu		17,3	5,8	3,5	Tregaskis và cs (2020)
Châu Phi	Nam Phi	29,1	21,8	5,5	43,6	Afolabi và cs (2019)
	Congo	-	-	17,5	-	Bisimwa và cs (2021)
	Namibia	37,0	-	-	-	Molini và cs (2022a)

Phân tích 80 mẫu amidan lợn thu được vào năm 2011 ở Chiangmai, Bắc Thái Lan đã khẳng định rằng tỷ lệ lưu hành các chủng PPV1, PPV2, PPV3, PPV4 và PPV5 là khá cao, từ 18 đến 83% (Bảng 1.2). Cụ thể, tỷ lệ nhiễm trên đàn lợn là 53% đối với PPV1, 83% đối với PPV2, 73% đối với PPV3, 44% đối với PPV4 và 18% đối với PPV5. Hơn 60% lợn đồng nhiễm từ ba chủng PPV trở lên và sự đồng nhiễm các cặp chủng PPV1/PPV3; PPV2/PPV5 cũng đã được phát hiện (Saekhow và Ikeda, 2015).

Năm 2013, Cadar và cs đã tiến hành xác định tỷ lệ lưu hành của các genotype PPV2-4 ở lợn nuôi (n=120) và lợn rừng (n=842) tại vùng Transylvania, phía Tây Romania bằng phương pháp PCR. Kết quả cho thấy tỷ lệ dương tính với PPV2 của lợn nhà là 25% (30/120) trong khi tỷ lệ dương tính với PPV2 của lợn rừng là 10,3% (87/842). Đối với PPV4, tỷ lệ lợn rừng mang virus là rất thấp 0,95% (8/842), ngược lại có đến 10% lợn nuôi phát hiện được virus (12/120). Tỷ lệ đồng nhiễm PPV2 và PPV3 là cao nhất, đạt 79% (31/39) ở lợn nuôi và 54,1% ở lợn rừng (213/390) (Cadar và cs, 2013). Đây là nghiên cứu khoa học đầu tiên báo cáo sự có mặt của PPV2 và PPV4 trong quần thể lợn rừng.

Streck và cs (2013) đã tiến hành xác định tỷ lệ nhiễm các chủng PPV trên 100 mẫu tim và 100 mẫu amidan thu thập từ lợn khỏe mạnh tại các lò mổ thuộc bảy bang ở nước Đức. Kết quả cho thấy 60% mẫu tim và 61% mẫu amidan nhiễm PPV1; tỷ lệ nhiễm PPV2 trên các mẫu tim và amidan lần lượt là 55% và 78%. Trong khi đó, PPV3 và PPV4 chỉ được tìm thấy ở các mẫu amidan với tỷ lệ lần lượt là 20% và 7%.

Nghiên cứu của Cui và cs (2017) ở sáu trang trại lợn tại Ba Lan đã cho thấy tỷ lệ nhiễm PPV ở lợn 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. PPV được phát hiện thường xuyên hơn ở lợn 9-18 tuần tuổi so với lợn 2-6 tuần tuổi.

Trong số 173 mẫu được thu thập từ lợn 9-18 tuần tuổi, 79 mẫu (64,2%) dương tính với ít nhất một chủng PPV. Tỷ lệ nhiễm PPV2 là cao nhất với

26,6%, tiếp theo là PPV3 ở mức 11%, trong khi tỷ lệ phổ biến của các subtype PPV khác là dưới 10%. Một điểm đáng lưu ý là PPV4 chỉ được phát hiện ở lợn 14-18 tuần tuổi và tất cả các mẫu dương tính với PPV6 chỉ được phát hiện ở lợn từ 13-18 tuần tuổi. Chỉ có duy nhất một cá thể lợn năm tuần tuổi được xác định dương tính với PPV2 và một cá thể lợn sáu tuần tuổi dương tính với PPV5, trong số 74 mẫu huyết thanh được thu nhận từ lợn con.

Với mục đích tìm hiểu về tỷ lệ nhiễm PPV trên đàn lợn ở các độ tuổi khác nhau (3-21 tuần tuổi) tại các trang trại ở Ba Lan, Milek và cs (2019) đã sử dụng phương pháp Real-time PCR để phát hiện sự hiện diện của các PPV (1-6) trên các mẫu dịch hầu họng (n=271), huyết thanh (n=1.244) và phân (n=1.238) thu ngẫu nhiên tại 19 trang trại lợn trong cả nước. Kết quả cho thấy PPV phổ biến rộng rãi ở Ba Lan và tỷ lệ phát hiện cao nhất thu được đối với dịch hầu họng (dao động từ 10,7% (PPV1) đến 48,7% (PPV2)). Lợn trưởng thành đang trong giai đoạn vỗ béo là nhóm tuổi có tỷ lệ phát hiện PPV cao nhất (từ 8,6% (PPV1) đến 49,1% (PPV2)). Việc phát hiện PPV ở lợn đang lớn cho đến giai đoạn trưởng thành cùng sự lây nhiễm kéo dài cho đến cuối giai đoạn vỗ béo có thể gợi ý tính chất mạn tính của nhiễm trùng PPV (đặc biệt đối với PPV2, được phát hiện thường xuyên nhất trên lợn ở mọi lứa tuổi).

Năm 2019, Serena và cs đã tiến hành khảo sát tỷ lệ nhiễm và mô tả đặc điểm các chủng PPV có trong 131 mẫu “thai ứ” hoặc thai chết lưu do sinh thường ở một trang trại lợn thuộc tỉnh Santa Fe, phía Đông Argentina. Kết quả PCR cho thấy 13% (17/131) mẫu dương tính với PPV. 10/17 mẫu dương tính đã được phân lập và giải trình tự, cho thấy chúng đều thuộc chủng PPV1 (NADL-2), có sự khác biệt về amino acid ở các vị trí 436 (S-P) và 565 (R-K). Đây là báo cáo đầu tiên phát hiện PPV ở Argentina, cho thấy PPV có thể truyền qua nhau thai ngay cả ở lợn nái đã được tiêm phòng bằng vaccine. Kết quả của nghiên cứu này cũng gợi ý rằng tiêm chủng chỉ làm giảm các dấu hiệu lâm sàng

và rối loạn sinh sản và vaccine có thể không phải là một công cụ hoàn hảo để kiểm soát nhiễm PPV (Serena và cs, 2019).

Cuộc khảo sát mức độ lưu hành của PPV và mối quan hệ của chúng với Hội chứng PMWS và Hội chứng SMEDI liên quan đến PCV2 trên đàn lợn ở 13 bang phía Đông Nam Mexico đã cho thấy tỷ lệ phổ biến PPV2 và PPV6 (lần lượt là 90,0% và 74,7%) tại Mexico cao hơn hẳn so với tỷ lệ nhiễm PPV2 và PPV6 ở các quốc gia khác (Garcia và cs, 2020a).

Ở châu Phi, nghiên cứu khảo sát tỷ lệ nhiễm của PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 chỉ mới được tiến hành bởi các nghiên cứu từ 2019 trở lại đây (Afolabi và cs, 2019; Bisimwa và cs, 2021; Molini và cs, 2022a). Theo Afolabi và cs (2019), tỷ lệ lưu hành các chủng PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 ở Nam Phi lần lượt là: 29,1%, 21,8%, 5,5% và 43,6%. Tại tỉnh Nam Kivu, miền Đông Congo, phân tích trên 80 mẫu bao gồm lá lách, gan và máu thu từ lợn bị dịch tả châu Phi và lợn khỏe mạnh ở độ tuổi trưởng thành chỉ phát hiện chủng PPV3 với tỷ lệ 17,5% (Bisimwa và cs, 2021). Phân tích phát sinh chủng loại cho thấy các chủng PPV3 phân lập trong nghiên cứu này có mối quan hệ di truyền gần gũi với các chủng PPV3 được công bố ở Đức, Trung Quốc và Slovakia (Bisimwa và cs, 2021). Gần đây nhất, nghiên cứu của Molini và cs (2022a) tại Namibia (Nam Phi) đã xác nhận PPV1 lưu hành trên đàn lợn nhà với tỷ lệ 37% và có đặc điểm di truyền tương đồng với các chủng PPV1 được phân lập từ lợn rừng.

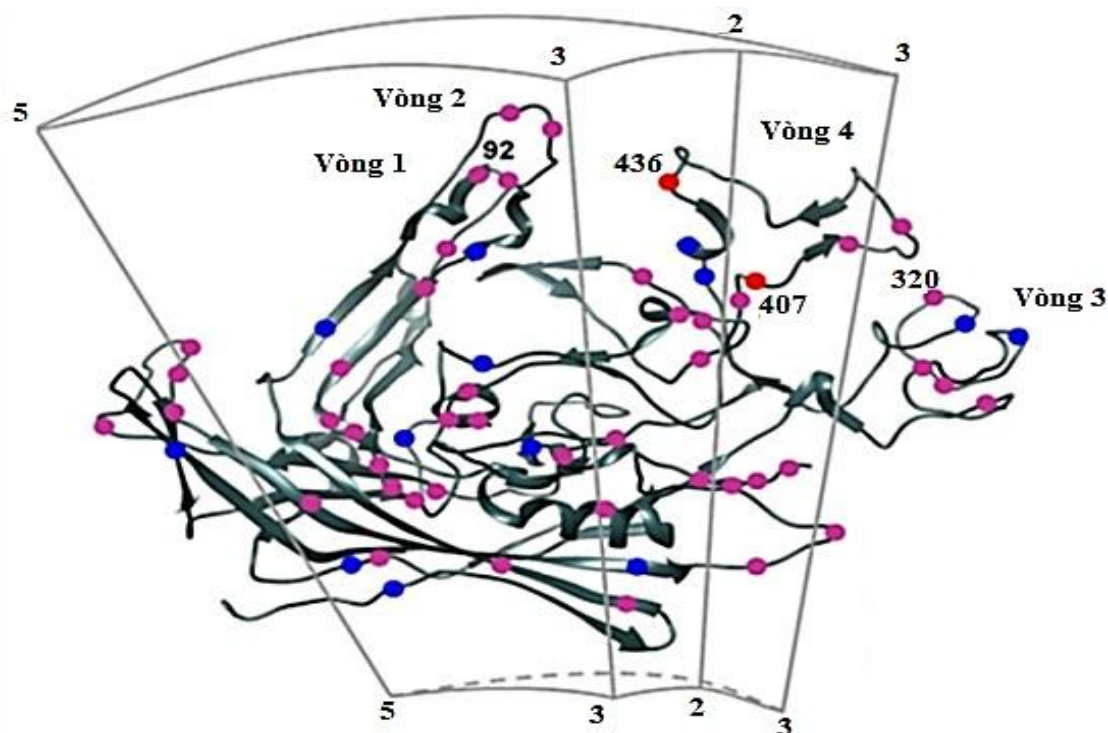
Hiện tại, các nghiên cứu về tỷ lệ nhiễm của PPV đã công nhận chúng là loài đặc hữu trên hầu hết các quốc gia và vùng lãnh thổ trên thế giới. Đồng thời, sự hiện diện của PPV được xác nhận ở đàn lợn mà không phụ thuộc vào giới tính, độ tuổi và tình trạng sức khỏe của lợn.

1.3.1.2. Biến đổi di truyền ở gen mã hóa protein cấu trúc

Nghiên cứu đầu tiên về biến đổi di truyền của PPV đã tiến hành phân tích đoạn gen mã hóa protein cấu trúc (gen VP2) của các chủng PPV phân lập từ năm 1994-2000 tại Brazil (Soare và cs, 2003). Kết quả cho thấy 22/26 vị trí

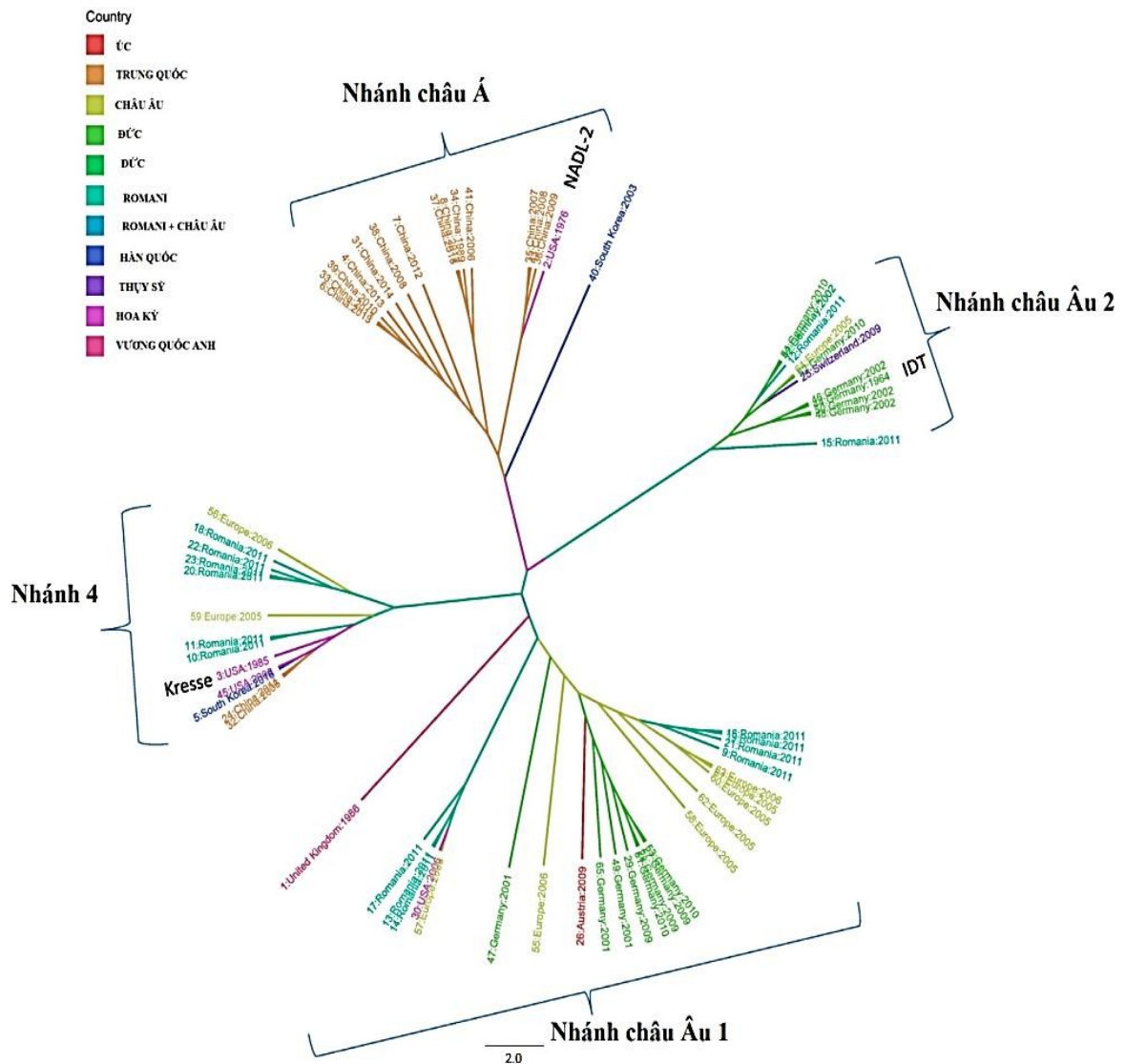
thay thế nucleotide dẫn đến thay thế amino acid dự đoán, trong đó có 8 vị trí thay thế nucleotide là đặc trưng phân biệt giữa hai phân nhánh di truyền là nhánh A (còn gọi là nhánh Kresse) và nhánh B (Soare và cs, 2003). Năm 2006, một nghiên cứu tương tự được tiến hành tại Đức trên các mẫu thu thập từ năm 2000-2002 đã phát hiện sáu kiểu hình PPV mới, nhóm thành hai nhánh khác nhau khi phân tích phát sinh chủng loại (Zimmermann và cs, 2006). Tiếp đó, các nghiên cứu trên các chủng PPV thực địa từ Trung Quốc và Romania phát hiện một số kiểu hình mới cũng đã được công bố (Cadaru và cs, 2013; Hao và cs, 2011; Shangjin và cs, 2009). Bên cạnh đó, các nghiên cứu cũng đã báo cáo rằng các kiểu hình mới với sự thay thế amino acid trong protein cấu trúc đã làm thay đổi các đặc tính kháng nguyên của virus. Những phát hiện này đã đặt ra giả thuyết: Sự xuất hiện của các đột biến mới có thể là sự thích nghi của virus đối với các loại vaccine được sử dụng rộng rãi, khiến PPV có thể vượt qua được “hàng rào tiêm chủng” (Zeeuw và cs, 2007).

Mặc dù cơ sở di truyền của việc gây bệnh do PPV chưa được xác định, nhưng các protein cấu trúc đóng vai trò quan trọng trong việc gây ra các tính chất bệnh khác nhau. Tất cả các vị trí thay thế nucleotide trong gen mã hóa protein không cấu trúc đều không có ý nghĩa; trong khi so sánh giữa chủng ôn hoà NADL-2 (Mã số GenBank: L23427) và chủng Kresse độc lực (Mã số GenBank: U44978) cho thấy 6/8 vị trí thay thế nucleotide ở gen mã hóa protein cấu trúc đã dẫn đến sự thay thế các amino acid được phiên mã. Đặc biệt, năm vị trí thay thế amino acid (I215T, D378G, H383Q, S436P và R565K) trong VP2 là phù hợp khi so sánh với các chủng phân lập trước đó. Các mức độ ái lực mô khác nhau được cho là do những biến đổi này (D378G, H383Q và S436P) gây ra (Saekhow và cs, 2022; Bergeron và cs, 1993).



Hình 1.9. Mô hình 3D của protein VP2 của PPV (Streck và cs, 2015). Các chấm tròn đại diện cho các vị trí thay thế amino acid: Bảo tồn (màu xanh), không bảo tồn (màu tím) và bán bảo tồn (màu đỏ) so với các chủng tham chiếu trên GenBank

Hình 1.9 cho thấy các vị trí được thể hiện bằng chấm tròn màu đỏ cho thấy sự khác biệt giữa các chủng NADL-2 và Kresse. Các chấm tròn màu tím đại diện cho các vị trí thay thế ở các chủng mới, thể hiện trên mô hình không gian ba chiều, được tạo ra bằng phần mềm Cn3D 4.1, các tọa độ này được lấy từ cơ sở dữ liệu NCBI, mã số 1K3V. Sự khác biệt amino acid ở các vị trí này có liên quan đến kiểu hình gây bệnh của chủng Kresse, và tất cả đều nằm trên bề mặt capsid của PPV (Simpson và cs, 2002). Có thể vị trí của các thay thế amino acid này nằm gần trung tâm của capsid PPV nên chúng có thể làm thay đổi quá trình tổng hợp protein và “đóng gói” virus DNA, dẫn đến sự sao chép virus hiệu quả hơn và có thể tăng cường độc lực của virus (Streck và cs, 2015).



Hình 1.10. Cây phát sinh chủng loại PPV1 được xây dựng dựa trên trình tự nucleotide gen mã hoá protein cấu trúc VP1 và VP2 thu nhận từ các chủng PPV1 phân lập ở châu Âu và châu Á bằng phần mềm FigTree 1.4.2. (Oh và cs, 2017)

Cây phát sinh chủng loại xây dựng dựa trên trình tự nucleotide gen mã hóa protein cấu trúc (gen VP2) trong nghiên cứu của Oh và cs (2017) đã chỉ ra rằng các chủng châu Á đã tách rời khỏi các chủng châu Âu và hình thành nên một nhánh mới (Hình 1.10). Trình tự amino acid dự đoán của VP2 đã được phân tích và so sánh giữa các chủng châu Âu và châu Á, kết quả bộc lộ khác biệt ở một số vị trí xác định (Bảng 1.3).

Bảng 1.3. Các vị trí khác biệt trong trình tự amino acid VP2 giữa các chủng châu Âu và châu Á (Oh và cs, 2017)

Vị trí amino acid	Chủng châu Âu (<i>n</i> = 42)	Chủng châu Á (<i>n</i> = 29)	
20	A (10) T (32)	T (29)	
82	K (10) R (32)	R (29)	
144	E (42)	A (6) E (23)	
215	I (1) T (41)	I (15) V (3) T (11)	
228	E (20) Q (22)	Q (29)	
304	T (10) P (32)	P (29)	
378	G (42)	D (9) G(20)	
383	H (1) Q (41)	H (16) Q (13)	
414	S (18) A(24)	S (1) A(28)	
419	Q (20) E(22)	E (29)	
436	T (23) A (4) P(15)	S (12) A(9)	H(1) P(7)
555	N (40) K (2)	N (21)	K (8)
565	K (41) E (1)	K (20)	R (9)

Mức độ thay thế nucleotide ở gen mã hóa protein cấu trúc của các chủng PPV lưu hành trên lợn nhà và lợn rừng ở Romania đã được Cadar và cs (2013) xác định bằng phương pháp Bayesian với tỷ lệ đột biến lần lượt là: $8,23 \times 10^{-4}$ thay thế/năm đối với PPV2; $3,86 \times 10^{-4}$ thay thế/năm đối với PPV3 và $4,53 \times 10^{-4}$ thay thế/năm đối với PPV4. Giá trị này tương đương với mức độ biến đổi di truyền được tìm thấy trong các virus RNA (Cadar cs, 2013). Điều này gợi ý rằng tốc độ tiến hóa cao của gen mã hóa protein cấu trúc ở PPV có thể ảnh hưởng bởi hiện tượng tái tổ hợp thường xuyên, một hiện tượng dễ tìm thấy ở các virus DNA sợi đơn khác. Bên cạnh đó, PPV1 và PPV2 cũng được xem là nhóm có tỷ lệ thay thế nucleotide cao nhất trong số các virus DNA sợi đơn (Streck và cs, 2011).

Trong bối cảnh sự biến đổi di truyền của gen mã hóa protein cấu trúc VP2 của PPV1 đã được ghi nhận trên toàn cầu, một nghiên cứu gần đây tại tám quốc gia châu Phi đã báo cáo rằng các chủng PPV1-27a được phát hiện thường xuyên hơn các chủng PPV1 NADL-8 ở các quốc gia có thu nhập cao. Trong đó, chủng 27a và NADL-8 là 2 chủng PPV1 được phân lập lần lượt tại Đức (2006) và Mỹ (2022), được các phòng thí nghiệm trên thế giới sử dụng như chủng tham chiếu cho các nghiên cứu trên chủng PPV1. Đồng thời, phân tích phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen VP2 của các chủng PPV1 phân lập từ lợn rừng Namibia cho thấy chúng có mối quan hệ di truyền gần gũi với chủng PPV1 phân lập ở lợn rừng Romania (Molini và cs, 2022a) và là nguồn lây nhiễm PPV1 cho đàn lợn nhà (Molini và cs, 2022b). Phân tích phát sinh chủng loại sâu hơn đã ủng hộ những phát hiện này, cho thấy các chủng PPV1 ở châu Phi có thể được du nhập thông qua đàn lợn di cư tự nhiên từ châu Âu và châu Á (Franzo và cs, 2023). Bên cạnh đó, sự khác biệt về mặt di truyền giữa các chủng PPV1 phân lập tại Nigeria với các chủng PPV1 đã công bố trên toàn thế giới (Luka và cs, 2022) là một minh chứng cho thấy sự đa dạng di truyền và tiến hóa của chúng cần được nghiên cứu nhiều hơn.

Sự tồn tại của các con đường du nhập PPV trên thế giới, sự biến đổi di truyền trong trình tự gen mã hóa protein cấu trúc của PPV đã cho thấy tầm quan trọng trong việc giám sát liên tục các chủng PPV lưu hành ở các quốc gia khác nhau trên thế giới. Trong đó, việc xác định đặc điểm phân tử, đa hình nucleotide, phân tích phát sinh chủng loại và ước lượng tỷ lệ tiến hóa phân tử của PPV dựa trên trình tự gen mã hóa protein cấu trúc là đặc biệt cần thiết trước khi đưa ra những chiến lược mới nhằm kiểm soát dịch bệnh do PPV gây ra.

Đặc điểm phân tử của PPV2

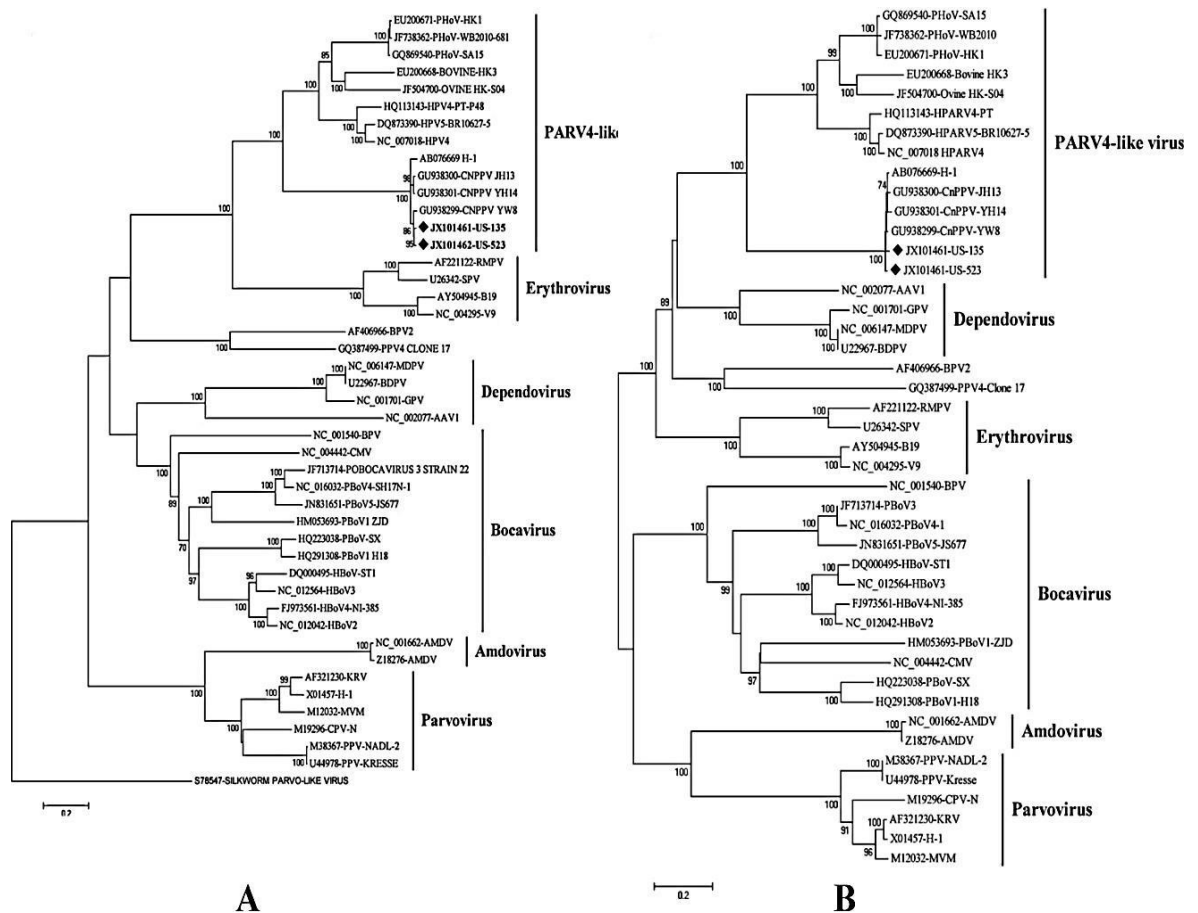
Những thay đổi nucleotide dẫn đến thay đổi amino acid tại một số vị trí tiềm năng trên gen VP2 (378, 383 và 436) được cho là chịu trách nhiệm về tính kháng nguyên đã được quan sát thấy trong nghiên cứu trước đây ở chủng PPV1

(Streck và cs, 2011; Soares và cs, 2003; Simpson và cs, 2002; Hao và cs, 2001). Tuy nhiên, đối với chủng PPV2, kể từ khi được phát hiện cho đến nay, việc nhân nuôi virus này trong ống nghiệm cho đến nay vẫn chưa thành

công, dẫn đến các nghiên cứu về khả năng gây bệnh của PPV2 vẫn chưa thể thực hiện được (Csagola và cs, 2012). Phân tích mối quan hệ di truyền giữa PPV1 và PPV2 cho thấy tỷ lệ tương đồng trong gen là 32,2-34,5% và tỷ lệ tương đồng amino acid là 20,2-21,5% đối với ORF1 và 16,5-16,9% đối với ORF2 (Opriessnig và cs, 2014).

Nhằm phân tích đặc điểm hệ gen và xác định phân nhóm di truyền của chủng PPV2 lưu hành tại Mỹ, hai chủng PPV2 đã được phân lập, giải trình tự gần như hoàn chỉnh (5.425-5.486 bp). Kết quả so sánh cho thấy mức độ tương đồng trong trình tự amino acid dự đoán từ ORF1 và ORF2 của hai chủng PPV2 phân lập tại Mỹ so với các chủng Trung Quốc trong giai đoạn 2006-2007 (Wang và cs, 2010) và chủng PPV2 phân lập tại Myanmar (Hijikata và cs, 2001) lần lượt là 95,6-98% và 95,3-98,9%. Tỷ lệ tương đồng nucleotide/ amino acid giữa các chủng PPV càng cao cho thấy chúng càng gần gũi nhau về mặt di truyền.

Phân tích phát sinh chủng loại dựa trên trình tự nucleotide hệ gen (Hình 1.11.A) và amino acid (Hình 1.11.B) của protein không cấu trúc NS1 đều cho thấy hai chủng PPV2 của Mỹ được nhóm lại cùng với các chủng PPV2 đã biết từ Trung Quốc và Myanmar, đồng thời chúng có mối quan hệ gần gũi với virus PARV4 ở lợn (Xiao và cs, 2012).



Hình 1.11. Cây phát sinh chủng loại PPV2 được xây dựng từ trình tự nucleotide (A) và amino acid dự đoán (B) của gen mã hóa NS1 của các chủng PPV2 phân lập tại Mỹ, Trung Quốc, Myanmar và các chủng virus trong phân họ Parvovirinae (Xiao và cs, 2012) bằng phần mềm MEGA 5.0, phương pháp Maximum Likelihood dựa trên mô hình Kimura 2-parameter (đối với trình tự nucleotide) và mô hình Poisson (đối với trình tự amino acid)

Nghiên cứu tương tự của Saekhow và cs ở Nhật Bản (2015) đã phân lập và giải trình tự hệ gen chủng PPV2 JPT68 với kích thước gần như hoàn chỉnh (5.233 bp) từ amidan của một cá thể lợn nhà khỏe mạnh. So sánh với sáu chủng PPV2 có độ dài trình tự đầy đủ được phân lập ở Myanmar, Trung Quốc và Mỹ cho thấy tỷ lệ tương đồng của chủng JPT68 so với các chủng tham chiếu là 95,5-97,7%. Trong hai ORF, mức độ tương đồng nucleotide và amino acid của JPT68 so với các chủng tham chiếu lần lượt là 94,3-97,5% và 94,3-97,5% đối với gen mã hóa protein không cấu trúc NS1 và 93,9-96,7% và 95,1-97,6% đối

với gen mã hóa protein cấu trúc *VP1*. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên đoạn gen *NS1* dài 330 bp cho thấy các chủng PPV2 được phân lập trong nghiên cứu này thuộc bảy phân nhóm di truyền khác nhau, đưa đến giả thuyết có nhiều chủng PPV2 khác nhau đã xâm nhập và lưu hành trên đàn lợn tại Nhật Bản (Saekhow và cs, 2015).

Nhìn chung, thông tin từ các nghiên cứu phân tích đặc điểm phân tử cũng như biến đổi di truyền của PPV2 còn hạn chế nên việc phân tích mối liên hệ giữa đột biến trong trình tự gen và sự thay đổi các đặc tính sinh học của PPV2 là cần thiết.

Đặc điểm phân tử của PPV4

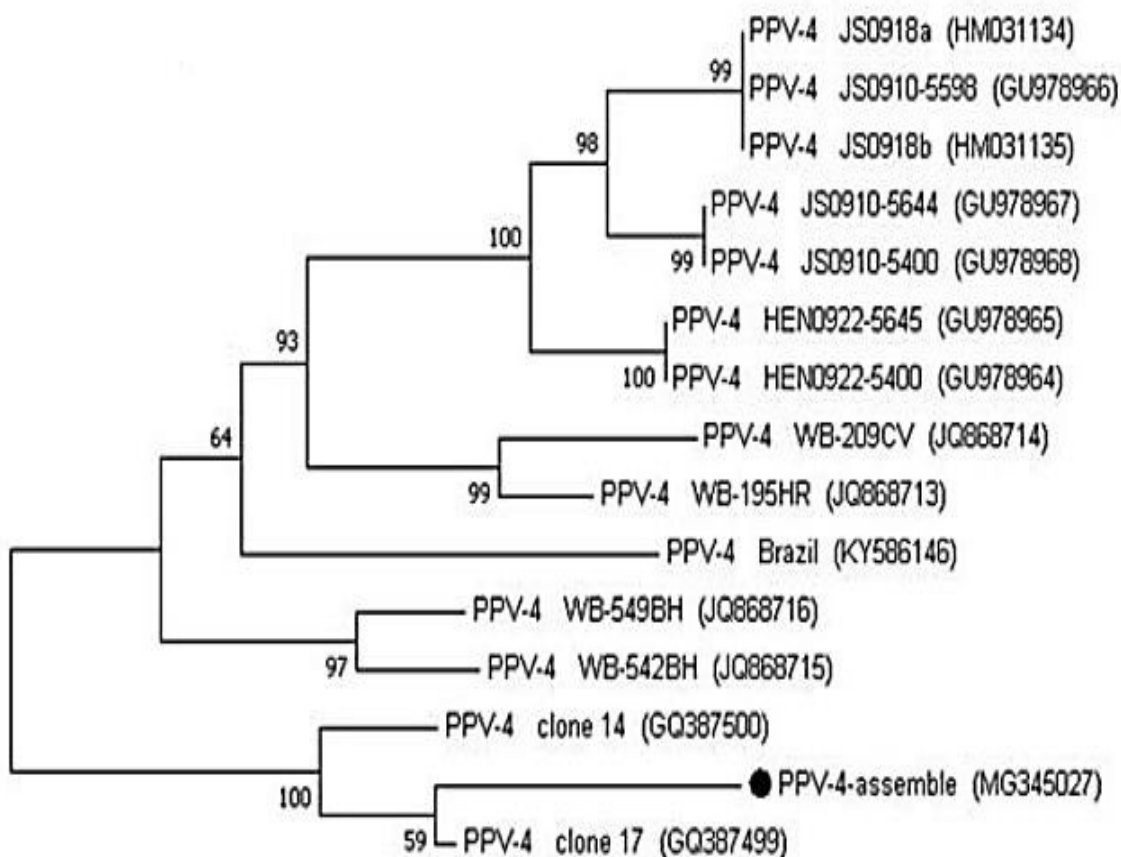
PPV4 được phát hiện lần đầu tiên tại Mỹ từ năm 2005 ở đàn lợn nhiễm bệnh liên quan đến Hội chứng PMWS (Cheung và cs, 2010), tuy nhiên, vai trò và khả năng gây bệnh của PPV4 vẫn chưa được xác định. Khác với các PPV khác, PPV4 tồn tại một khung đọc mở bổ sung ORF3, nằm ở giữa ORF1 và ORF2, mã hóa cho một nucleoprotein (NP1).

Hiện tại, các nghiên cứu phân tích ảnh hưởng của biến đổi di truyền liên quan đến khả năng lây nhiễm và độc lực của PPV4 còn hạn chế. Việc nghiên cứu đặc điểm phân tử, tìm kiếm các đột biến tiềm năng và xác định phân nhóm di truyền của các chủng PPV4 lưu hành trên thực địa đóng một vai trò quan trọng trong việc cung cấp thông tin dịch tễ quan trọng như: Nguồn gốc di truyền, xu hướng tiến hóa và dự đoán con đường biến đổi trong tương lai của các chủng PPV4 lưu hành trên thực địa. Những thông tin này cung cấp cơ sở khoa học cho việc đánh giá hiệu quả phòng ngừa của các loại vaccine thương mại đang lưu hành trên thị trường, đồng thời cung cấp dữ liệu cho các nghiên cứu điều chế vaccine phòng PPV4 trong tương lai.

Báo cáo đầu tiên về đặc điểm phân tử hệ gen PPV4 tại Trung Quốc được thực hiện bởi Huang và cs (2010) cho thấy độ tương đồng nucleotide và amino acid giữa các chủng Trung Quốc với nhau và với các chủng PPV4 phân lập tại

Mỹ lần lượt đều trên 99% và 98,5%. Phân tích cây phát sinh chủng loại cho thấy bảy chủng PPV4 của Trung Quốc và Mỹ có quan hệ di truyền gần gũi và tập hợp thành cụm trong cùng một nhánh. Ngoài ra, các chủng PPV4 của Trung Quốc và Mỹ xuất hiện đột biến mất nucleotide tương tự nhau ở vùng không mã hóa, gợi ý rằng các chủng PPV4 đã được đưa vào Trung Quốc thông qua việc nhập khẩu lợn nhiễm PPV4 từ Mỹ.

Trong công bố về sự tiến hóa protein cấu trúc vỏ capsid và so sánh phát sinh chủng loại các chủng PPV mới (PPV2, PPV3 và PPV4), Cadar và cs (2013) đã phân lập và giải trình tự gen mã hóa protein cấu trúc của các chủng PPV4 lưu hành trên lợn rừng và lợn nhà ở miền Tây Romania. Kết quả cho thấy các chủng PPV4 ở lợn rừng và lợn nhà có mức độ tương đồng khá cao so với các chủng tham chiếu trên thế giới, dao động trong khoảng 98,4-99,5%; 98,6-99,8% đối với trình tự nucleotide và 98,2-99,8%; 97,9-100% đối với trình tự amino acid. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng từ trình tự gen mã hóa protein cấu trúc cho thấy các chủng PPV4 phân lập trong nghiên cứu này tập hợp với nhau trong một phân nhánh và tách biệt so với nhánh được hình thành từ các chủng PPV4 có nguồn gốc từ Mỹ và Trung Quốc. Sự tập trung trong một phân nhánh của các chủng PPV4 phân lập tại Romania cho thấy không có sự khác biệt đáng kể trong trình tự gen PPV4 lây nhiễm trên lợn nhà và lợn rừng.



Hình 1.12. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng từ trình tự nucleotide hệ gen hoàn chỉnh của chủng PPV4 phân lập tại Trung Quốc và bốn chủng PPV4 tham chiếu (Qin và cs, 2018)

Gần đây, trong cuộc điều tra sự đồng nhiễm của các virus có liên quan đến Hội chứng PRDC trên đàn lợn tại Trung Quốc, Qin và cs (2018) đã phân lập và giải trình tự hoàn chỉnh một chủng PPV4 với kích thước hệ gen dài 5.908 bp. Các phân tích về đặc điểm hệ gen cho thấy hàm lượng GC là 42,5% và tỷ lệ tương đồng so với bốn chủng PPV4 tham chiếu trên GenBank dao động từ 98,1- 99,6%. Cây phát sinh chủng loại PPV4 dựa trên trình tự hệ gen đã được xây dựng bằng phần mềm MEGA 7.0 với phương pháp Maximum-likelihood và giá trị bootstrap với 1.000 lần lặp lại. Kết quả phân tích cho thấy chủng PPV4 phân lập có mối quan hệ di truyền gần gũi với chủng PPV4 14 và 17 có nguồn gốc từ Mỹ và tách biệt với các chủng có nguồn gốc từ Brazil, Romania và các chủng phân lập ở Trung Quốc trước năm 2010.

PPV4 là một trong các chủng PPV mới được phát hiện, mặc dù được cho là liên quan đến Hội chứng PMWS và Hội chứng PRDC với vai trò là tác nhân đồng nhiễm nhưng cho đến hiện tại, thông tin về cơ chế gây bệnh cũng như độc lực của PPV4 vẫn còn hạn chế. Do đó, việc xác định đặc điểm phân tử của PPV4, đặc biệt là gen mã hóa protein cấu trúc-đóng vai trò tương tác chủ đạo giữa virus và tế bào vật chủ-cùng với sự xuất hiện các đột biến trong gen này là quan trọng và cần thiết. Đồng thời, việc xác định mối quan hệ di truyền giữa các chủng PPV4 lưu hành tại các khu vực khác nhau trên thế giới cũng cung cấp thông tin quan trọng về dịch tễ học, giúp phòng ngừa và kiểm soát dịch bệnh có hiệu quả hơn.

1.3.1.3. Tiến hóa của PPV

Là một loại virus DNA, PPV sử dụng phức hợp polymerase tế bào của vật chủ trong quá trình sao chép vật liệu di truyền (với đơn vị sửa chữa hiệu quả), do đó, trong những thập niên 80-90 của thế kỷ XX, người ta cho rằng PPV có mức độ biến đổi di truyền thấp tương đương với vật chủ (Duffy và Holmes, 2008). Tuy nhiên, trong những năm gần đây, các nghiên cứu cho thấy tỷ lệ biến đổi nucleotide của PPV là tương đương với tỷ lệ biến đổi nucleotide của các virus RNA. Kết quả nghiên cứu của Streck và cs (2011) đã chứng minh rằng tỷ lệ thay thế nucleotide của PPV là khoảng 10^{-5} thay thế/vị trí/năm đối với gen *NS1* và $3-5 \times 10^{-4}$ thay thế/vị trí/năm đối với các gen *VP1* và *VP2*. Đồng thời, sự phát hiện tám chủng PPV (1965-2022) đã làm thay đổi hoàn toàn quan điểm về sự tiến hóa và miễn dịch học của PPV, cho thấy virus này đa dạng hơn nhiều so với các dự đoán trước đó. Bên cạnh đó, một số nghiên cứu về động lực học đột biến đã chỉ ra rằng các yếu tố bổ sung có thể ảnh hưởng mạnh đến tốc độ đột biến của virus (Duffy và Holmes, 2008; Xia và Yuen, 2005).

Việc xác định cơ chế tiến hóa của PPV cho đến thời điểm hiện tại vẫn chưa được thống nhất. Nhiều bằng chứng được đưa ra nhằm gợi ý các cơ chế tiến hóa khác nhau của PPV như đồng tiến hóa trong quan hệ virus-vật chủ, tái

tổ hợp và chọn lọc (Cadare và cs, 2013; Streck và cs, 2011; Shackelton và cs, 2005; Lukashov và Goudsmit, 2001). Các cuộc tranh luận vẫn tiếp tục diễn ra khi các đột biến đơn lẻ và các sự kiện tái tổ hợp đều đóng một vai trò nhất định. Bên cạnh đó, đột biến ngẫu nhiên cũng có thể dẫn đến tỷ lệ thay thế cao ở PPV, với các giả thiết về nguyên nhân được đưa ra là hệ gen của PPV không được sửa chữa bởi các exonuclease của vật chủ vì chúng không có các kiểu methyl hóa thích hợp (Duffy và Holmes, 2008); cũng có thể PPV đã sử dụng một loại polymerase dễ bị lỗi (ví dụ, một loại polymerase thiếu cơ chế sửa chữa cắt bỏ base) trong quá trình sao chép (Garcia và Bebenek, 2007).

Phân tích tiến hóa đầu tiên của PPV được thực hiện vào năm 2011 bằng cách nghiên cứu các chủng PPV nhiễm đàn lợn trong trang trại chăn nuôi chuyên nghiệp (Streck và cs, 2011) và PPV nhiễm ở lợn rừng (Cadare và cs, 2013). Tỷ lệ đột biến cao (khoảng $3-5 \times 10^{-4}$) trong các gen mã hóa protein cấu trúc (VP) đã được phát hiện từ cả hai loài vật chủ, cao hơn nhiều so với tốc độ tiến hóa của các gen mã hóa protein không cấu trúc (NS, khoảng 10^{-5}). Bằng cách áp dụng đồng hồ phân tử vào phân tích cây phát sinh chủng loại, người ta đã thấy rằng các phân kỳ chính đã thể hiện trong 10-30 năm qua. Lịch sử tiến hóa tích cực này đã cho thấy tỷ lệ đột biến cao có thể là đặc điểm điển hình của PPV.

1.3.1.4. Phát hiện các chủng PPV khác

Nhiều chủng PPV khác đã được xác định trong những năm gần đây nhờ đặc tính ưu việt của phương pháp PCR và sự ra đời của các công cụ giải trình tự gen thế hệ mới. So sánh trình tự gen mã hóa protein capsid của PPV cho thấy sự biến đổi di truyền của chúng dẫn đến sự hình thành các phân nhóm PPV khác nhau. Tám chủng PPV đã được xác nhận trong vòng 50 năm qua (1965-2016) bao gồm: PPV1, PPV2, PPV3, PPV4, PPV5, PPV6, PPV7 và PPV8 (Palinski và cs, 2016; Ni và cs, 2014; Xiao và cs, 2013; Cheung và cs, 2010; Huang và cs, 2010; Lau và cs, 2008) (Bảng 1.4).

Là chủng PPV khác đầu tiên, PPV2 (*U. tetraparvovirus 3*) được phát hiện ở huyết thanh lợn trong quá trình điều tra Hepatitis E ở Myanmar (Hijikata và cs, 2001). Tiếp theo đó, PPV2 được phát hiện vào năm 2006-2007 ở Trung Quốc (Wang và cs, 2010) và năm 2012 tại Hungari (Csagola và cs, 2012). Kết quả phân tích của Xiao và cs (2013) tại 18 bang của Mỹ cho thấy, tỷ lệ lưu hành PPV2 ở lợn là khá cao trong các mẫu phổi, mẫu phân thu được từ lợn ở các nhóm tuổi khác nhau, và trong huyết thanh hoặc dịch lỏng ngực thu được từ lợn sơ sinh. Sự khác biệt di truyền lớn giữa PPV1 và PPV2 thể hiện ở tỷ lệ tương đồng trình tự nucleotide thấp 32,2-34,5% và tỷ lệ tương đồng amino acid của ORF1 và ORF2 lần lượt là 20,2-21,5% và 16,5-16,9% (Opriessnig và cs, 2014). Những nỗ lực để nuôi cấy PPV2 *in vitro* cho đến nay đã không thành công, vì vậy các nghiên cứu về khả năng gây bệnh của PPV2 đã không thể thực hiện được (Csagola và cs, 2012). Tuy nhiên, các nghiên cứu gần đây cho thấy PPV2 có thể là đồng yếu tố hoặc tác nhân khởi phát liên quan đến “bệnh sốt cao” (Wang và cs, 2010) hoặc bệnh liên quan đến virus PCV ở lợn (Porcine Circovirus Associated Diseases-PCVAD) (Csagola và cs, 2012). Gần đây, bằng phương pháp thống kê phân tích lớp tiềm ẩn (LCA) ở đàn lợn bị bệnh hô hấp, Tregaskis và cs (2020) đã chứng minh rằng PPV2 là một yếu tố đồng nhiễm với PCV2 trên nhóm đối tượng này và gợi ý rằng, PPV2 có thể liên quan về mặt thống kê với bệnh PCVAD và Hội chứng PRDC.

Bảng 1.4. Phân loại các chủng PPV lưu hành trên thế giới

Phân loại	Mã số GenBank/Tác giả	Đặc điểm
PPV1	Germany (Dunne và cs, 1965)	Được phát hiện khi phân lập virus từ một bào thai lợn mới chết được thu thập tại lò mổ ở Đức.
PPV2	AB076669 (Hijikata và cs, 2001)-Myanmar	Được tìm ra ở huyết thanh lợn trong quá trình điều tra <i>Hepatitis E</i> ở Myanmar.
PPV3	EU20667-EU200677 (Lau và cs, 2008)-Hong Kong	Mức độ tương đồng cao với Parvovirus 4 ở người và Hokovirus bò (PARV4).

Phân loại	Mã số GenBank/Tác giả	Đặc điểm
PPV4	GQ387499 (Cheung và cs, 2010)-Mỹ	Phát hiện một ORF3 bổ sung định vị giữa ORF1 và ORF2.
PPV5	JX896318-JX896322 (Xiao và cs, 2013)-Mỹ	Có sự tương đồng so với PPV4 là 64,1%-67,3%; không có ORF3 và ORF2 dài hơn nhiều.
PPV6	KF999681-KF999685 (Ni và cs, 2014)-Trung Quốc	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	KU563733 (Palinski và cs, 2016)-Mỹ	Khung đọc mở ORF2 ngắn, vị trí 469 aa không có sự tương đồng so với các protein đã biết.
PPV8	GDJM2021 (Guo và cs, 2022)-Trung Quốc	Hệ gen PPV8 kích thước phân tử 4.380 bp và có mức tương đồng với PPV1 là 44,18%

Chủng PPV mới tiếp theo được phân lập tại Hồng Kông với tên gọi là PhoV (*Porcine Hokovirus*) vào năm 2008. Kết quả phân tích trình tự hệ gen của PhoV thể hiện mức độ tương đồng cao với *Parvovirus 4* ở người và *Hokovirus* ở bò, tạo thành nhánh riêng trong họ Parvovirus (Lau và cs, 2008). Nghiên cứu gần đây của Chueng và cs (2010) đã xếp loại PhoV chính là PPV3 (*U. tetraparvovirus 2*). Mặc dù sự phân bố địa lý chính xác của phân nhóm này vẫn chưa được xác định, các nghiên cứu gần đây đã cho thấy tỷ lệ nhiễm PPV3 tương đối cao ở lợn nuôi ở Hungari (Csagola và cs, 2012), trên lợn rừng ở Đức (Adlhoch và cs, 2010), Romania (Cadaru và cs, 2011) và miền Nam nước Ý (Amoroso và cs, 2019).

PPV4 (*U. copiparvovirus 2*) được phát hiện lần đầu tiên vào 2005 từ đàn lợn nhiễm bệnh liên quan đến Hội chứng PMWS tại phía Bắc Carolina, Mỹ (Cheung và cs, 2010) và tiếp theo đó là ở Trung Quốc (Huang và cs, 2010; Zhang và cs, 2011). PPV4 có mức độ tương đồng cao nhất với *Parvovirus 2* ở bò, nhưng mức độ mã hóa và sắp xếp hệ gen lại tương tự với *Bocavirus* vì PPV4 mã hóa cho một ORF3 định vị giữa ORF1 và ORF2 giống như *Bocavirus*. Mặc

dù tỷ lệ đàn lợn dương tính nhiễm PPV4 trên thế giới nói chung còn thấp, dao động trong khoảng 2,09-6,6% (Csagola và cs, 2012 ; Zhang và cs, 2011; Huang và cs, 2010) nhưng tỷ lệ nhiễm PPV4 trong các đàn dương tính lại khá cao, chiếm đến 20-50%.

Vào đầu năm 2013, một chủng PPV mới được phát hiện ở Mỹ và được định danh là PPV5 (Xiao và cs, 2013). Khác với PPV4, PPV5 chỉ có hai ORF, tuy nhiên mức độ tương đồng nucleotide của PPV5 so với PPV4 là khá cao: 64,1%- 67,3%. Cho đến nay, PPV5 này đã được xác định trong mẫu phổi, mẫu huyết thanh và mẫu phân với tỷ lệ lưu hành chung ở Mỹ là 6,6%. Ngoài ra sự lưu hành PPV5 trên đàn lợn tại Ba Lan, Mexico, Hàn Quốc (Kim và cs, 2022; Park và cs, 2021; Milek và cs, 2019; Garcia và cs, 2019b; Cui và cs, 2017).

Một chủng PPV mới khác là PPV6 (*U. copiparvovirus 4*) được phát hiện trong các trang trại lợn ở Trung Quốc bởi nghiên cứu của Ni và cs (2014) với hệ gen có kích thước dài 6,1 kb và cấu trúc tương tự như các Parvovirus khác. Phân tích trình tự nucleotide của năm chủng PPV6 khác nhau ở Trung Quốc cho thấy mức độ tương đồng của chúng với các chủng Parvovirus khác nằm trong khoảng từ 20,5 đến 42,5%, trong đó PPV6 có mức độ tương đồng cao nhất với PPV4. Phân tích cây phát sinh chủng loại đã chứng minh rằng:

PPV6 cùng với PPV4 và PPV5 tạo nên một nhánh di truyền riêng biệt với nhóm xác định trước đây trong phân họ Parvovirinae và có thể xếp thành chi mới trong *Copiparvovirus* (Xiao và cs, 2013). Cho đến nay, sự hiện diện của PPV6 đã được báo cáo ở nhiều nước trên thế giới (Kim và cs, 2022; Park và cs, 2021; Milek và cs, 2019; Garcia và cs, 2019a; Cui và cs, 2017).

Năm 2016, PPV7 (*U. chaphamaparvovirus 1*) lần đầu tiên được phát hiện trong các mẫu phổi, huyết thanh và phân của lợn nái trưởng thành khỏe mạnh ở Mỹ (Palinski cs, 2016). Ở Trung Quốc, một nghiên cứu hồi cứu đã phát hiện sự có mặt của PPV7 trong các mẫu huyết thanh thu thập từ năm 2014 tại hai trang trại lợn thương phẩm (Xing cs, 2017). Các nghiên cứu tiếp theo cũng đã xác nhận sự lưu hành cũng như đặc điểm di truyền của PPV7 ở châu Âu, Hàn

Quốc, Colombia, Nam Mỹ, Úc và nhiều tỉnh thành khác tại Trung Quốc (Kim và cs, 2022; Wen và cs, 2022; Zhang và cs, 2022; Mai và cs, 2021; Vargas và cs, 2021; Bhatta và cs, 2021; Chung và cs, 2020; Wang và cs, 2020; Da Silva và cs, 2020; Wang và cs, 2019; Milek và cs, 2018).

Cho đến thời điểm hiện tại, PPV8 là chủng PPV mới nhất, được xác định vào năm 2021 thông qua giải trình tự thông lượng cao trong các mẫu dương tính với virus gây Hội chứng PRRS được thu thập từ các đàn lợn ở tỉnh Quảng Đông, Trung Quốc. Hệ gen gần như hoàn chỉnh của chủng PPV8 (GDJM2021) có chiều dài 4.380 bp với hai khung đọc mở chồng lên nhau, mã hóa cho NS1 và VP1. Phân tích trình tự đã cho thấy tỷ lệ tương đồng nucleotide của PPV8 với các chủng PPV1-PPV7 là 16,23-44,18% với mức độ tương đồng tương đối cao nhất với PPV1. PPV8 cùng với PPV1 và PbuV đã tập hợp thành một phân nhóm độc lập và có quan hệ gần gũi với các thành viên của chi *Protoparvovirus*. Đáng lưu ý, kết quả khảo sát hồi cứu (trên các mẫu thu thập từ 1990-2021) đã cho thấy PPV8 đã xuất hiện sớm nhất vào năm 1998 và lây nhiễm kéo dài cho đến thời điểm hiện tại (Guo và cs, 2022).

Việc phát hiện PPV8 đã cung cấp thêm thông tin về đa dạng di truyền của PPV. Điều này cũng cho thấy, việc nghiên cứu ở mức độ phân tử về từng chủng PPV là cần thiết, nhất là với các chủng được phát hiện trong những năm gần đây. Hơn nữa, các đặc tính sinh học của những chủng PPV này cũng như mối liên quan tới Hội chứng SMEDI ở lợn cũng cần được theo dõi chặt chẽ.

1.3.2. Tình hình nghiên cứu PPV ở Việt Nam

Ở Việt Nam, Hội chứng SMEDI ở lợn do PPV được quan tâm từ những năm đầu 1990. Bệnh xảy ra tương đối phổ biến ở các địa phương trong cả nước và gây tổn thất lớn trên các đàn lợn nái sinh sản. Các cuộc hội thảo với mục tiêu giảm thiểu thiệt hại do PPV gây ra ở đàn lợn đã được tổ chức, tuy nhiên chưa đạt được kết quả mong muốn.

Nghiên cứu đầu tiên về PPV tại Việt Nam được tiến hành bởi Chúc (1993), đã phát hiện kháng thể kháng PPV tồn tại ở lợn nái và lợn đực giống. Bằng phương pháp ngưng kết hồng cầu chuột lang để tìm kiếm kháng nguyên và phản ứng HI để tìm kiếm kháng thể, nghiên cứu này bước đầu cho thấy tỷ lệ lợn nái nhiễm PPV ở các tỉnh miền Bắc và miền Nam lần lượt là 10,5-26,7%, và 30% (Chúc và cs, 1993). Trong các nghiên cứu tiếp theo, phương pháp xét nghiệm huyết thanh học tương tự đã được sử dụng để xác nhận sự lưu hành và vai trò nguyên nhân của PPV đối với hiện tượng rối loạn sinh sản ở lợn nuôi tại tỉnh Thái Bình (50%) (Chúc và cs, 1995) và khu vực miền Trung (21,5%) (Hùng, 1999). Nghiên cứu trên đàn lợn nái tại tỉnh Long An của Huỳnh (2000) đã tiến hành xét nghiệm 4.166 mẫu huyết thanh bằng phương pháp HI nhằm phát hiện kháng thể, kết quả cho thấy tỷ lệ dương tính với kháng thể kháng PPV chiếm 69,5%. Nghiên cứu của Khanh (2004) đã xác nhận vai trò của PPV đối với Hội chứng SMEDI ở lợn, đồng thời tiến hành thử nghiệm vaccine và xây dựng biện pháp phòng bệnh do PPV gây ra trên đàn lợn ở tỉnh Thái Bình.

Năm 2007, Sở Khoa học và công nghệ Tiền Giang đã triển khai đề tài “Khảo sát tình hình rối loạn sinh sản ở heo nái và đề ra giải pháp khắc phục tình trạng chậm lên giống, phối giống không đậu, sẩy thai, đẻ non” nhằm tìm hiểu mối quan hệ giữa Hội chứng rối loạn sinh sản hô hấp, bệnh dịch tả, bệnh giả dại, bệnh sẩy thai truyền nhiễm, bệnh phó thương hàn và bệnh do Parvovirus với khả năng sinh sản của heo nái, từ đó đề xuất giải pháp khắc phục.

Trong nghiên cứu xác nhận sự hiện diện của PPV1 ở lợn nuôi tại Hà Nội và các vùng phụ cận, Giáp và cs (2020) đã tiến hành đồng thời phương pháp huyết thanh học phát hiện kháng thể đặc hiệu kháng PPV1 và phương pháp PCR phát hiện PPV1 trong các mẫu huyết thanh lợn thu tại sáu tỉnh phía Bắc Hà Nội, Hưng Yên, Hải Dương, Bắc Ninh, Hòa Bình và Vĩnh Phúc. Kết quả cho thấy phản ứng PCR đã xác nhận sự lưu hành của chủng PPV1 trong 10/18 mẫu dương tính với kháng thể kháng PPV1.

Gần đây, Thuy và cs (2021) đã tiến hành khảo sát tỷ lệ nhiễm các chủng PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 trên 231 mẫu phổi và mẫu máu thu tại các lò mổ thuộc 13 tỉnh thành thuộc ba miền Bắc, Trung và Nam Việt Nam. Kết quả cho thấy tỷ lệ lưu hành PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 lần lượt là 53,7%, 28,0%, 17,7% và 7,8%. PPV1 và PPV2 được phát hiện ở 11 tỉnh thành, trong khi PPV4 chỉ được phát hiện ở ba tỉnh. Phân tích phát sinh chủng loại đã xác nhận mối quan hệ di truyền chặt chẽ giữa các chủng PPV4 phân lập trong nghiên cứu này với các chủng có nguồn gốc từ Trung Quốc.

Cho đến thời điểm hiện tại, chưa có công trình khoa học nào công bố về đặc điểm phân tử gen mã hóa protein cấu trúc của các chủng PPV phân lập ở miền Trung Việt Nam.

CHƯƠNG 2

ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Virus PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 trên lợn ở độ tuổi giết mổ tại bảy tỉnh miền Trung.

2.2. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

2.2.1. Mẫu nghiên cứu

Tổng số 146 mẫu, trong đó 117 mẫu phổi và 29 mẫu máu được thu thập ở lợn thương phẩm nuôi trên địa bàn bảy tỉnh miền Trung từ tháng 5/2018 đến tháng 4/2019 ở các lò mổ. Số lượng lò mổ, số lượng mẫu và loại mẫu thu thập từ mỗi tỉnh được trình bày ở Bảng 2.1.

Bảng 2.1. Thông tin về các mẫu nghiên cứu được thu thập

Địa phương	Số lò mổ	Số lượng mẫu	Loại mẫu		Thời gian thu mẫu
			Phổi	Máu	
Quảng Bình	4	17	0	17	2019
Quảng Trị	5	22	22	0	2019
Thừa Thiên Huế	6	28	28	0	2019
Đà Nẵng	3	14	8	6	2018
Quảng Nam	4	16	10	6	2018-2019
Quảng Ngãi	5	24	24	0	2018-2019
Bình Định	5	25	25	0	2018
Tổng	32	146	117	29	

2.2.2. Trang thiết bị, dụng cụ, hóa chất

- Các hóa chất ở dạng tinh khiết dùng cho phân tích Sinh học phân tử được cung cấp bởi các hãng: Thermo Fisher Scientific (Mỹ), Invitrogen (Mỹ), Sigma (Mỹ)...

- Các trang thiết bị chính, dụng cụ, dung dịch đệm, gel và thuốc nhuộm sử dụng trong các thí nghiệm được trình bày ở Phụ lục 3.

2.2.3. Môi

2.2.3.1. Môi phát hiện các chủng PPV

Các môi đặc hiệu được sử dụng để phát hiện các chủng PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 được trình bày ở Bảng 2.2.

Bảng 2.2. Các cặp môi được sử dụng để phát hiện các chủng PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4

PPV	Trình tự môi (5'-3')	Ta (°C)	Kích thước sản phẩm (bp)	Tài liệu tham khảo
PPV1	F: GGGAGGGCTTGGTTAGAATCTC R: ACCACACCCCCCATGCGTTAGC	56	194	Streck và cs, 2013
PPV2	F: AGATTCTTGCAGGCCGTAGA R: CCAAGGGTCAGCACCTTTTA	60	222	Cadar và cs, 2013
PPV3	F: GCAGTCTGCGCTTAACTT R: CTGCTTCATCCACTGGTC	50	392	Csagola và cs, 2012
PPV4	F: GCATTGGTGTGTGTCTGTGTCC R: GTGGCACATTTGTACATGGGAG	54	345	Csagola và cs, 2012

2.2.3.2. Môi khuếch đại gen mã hóa protein cấu trúc PPV

Các môi được sử dụng để khuếch đại gen mã hóa protein cấu trúc của các PPV được trình bày ở Bảng 2.3.

Bảng 2.3. Các cặp mồi được sử dụng để khuếch đại gen mã hóa protein cấu trúc của các chủng PPV

PPV	Đoạn gen mục tiêu	Trình tự mồi (5'-3')	Ta (°C)	Kích thước sản phẩm (bp)	Tài liệu tham khảo
PPV2	PPV2-P4	F: CAGCTTCATGGCTTACGGGCA R: ATCCCTCTCCGCCC GCCAGA	50	721	Nghiên cứu này
	PPV2-P5	F: CATGAGCGCTGCCGACGCGT R: TCCATCAGACCCTGGGCCA	54	730	
	PPV2-P6	F: GACCCAGAGATAGATAGCGT R: CCACCAATGAGATCCGCTA	53	773	
	PPV2-P7	F: TGGACAAAGTCTTACCGCC R:AGGGTTGTACCACTGAATACT	50	743	
	PPV2-P8	F: CATTGGCGCGCAGGCACC R: ATAAACCCCTGAGGAAATA	50	746	
PPV3	NS1/VP1	F: TTGGAGGTACCGGCAGA R: TCATCGTACCGTTCATCG	58	995	Nghiên cứu này
PPV4	PPV4-1	F: TGACGCAGTACAGACCGACGAGA R: AATGCAAGTGCAAGCCACCTTTT	62	842	Csagola và cs, 2012
	PPV4-2	F: AGTAATCTGGTAATCGCTGTTCG R: ATGTTAGTCTTTCCTGTTGTGGC	62	893	
	PPV4-3	F: GCTGGTGGATAACAACATCTGCT R: GTTCTTCTTTCCTCGGTGCTTCT	60	986	
	PPV4-4	F: AAGAAGCACCGAGAAAGAAGAAA R: AAATCTAAGGGACAAGGCAAACG	60	884	
	PPV4-5	F: TACTAAGAAAGACAAGGTGGAG R: AATAATAGAAGGTATAGCGTC	60	898	
	PPV4-6	F: ACCTGCTCCTCCATCTTCTCCAC R: GGCCGTCATCATACTTCTGCTC	62	980	
	PPV4-7	F: ACTTACTGTTCTATGATGTCTGGAG R: ATATCATCTGCGGTGTCTGGG	62	1644	

2.2.4. Trình tự các chủng PPV nghiên cứu

Danh sách trình tự gen các chủng PPV phân lập ở Việt Nam và các chủng phân lập trên thế giới sử dụng để tham chiếu được trình bày ở Bảng 2.4 và 2.5.

Bảng 2.4. Danh sách các trình tự PPV2 được sử dụng trong nghiên cứu này

Mã số GenBank	Quốc gia	Năm phân lập	Kích thước (bp)	Tác giả
AB076669	Myamar	2001	5118	Hijikata và cs, 2001
KP245940	Trung Quốc	2014	3099	Sun và cs, 2015
KP245943		2014	3099	
KP245944		2014	3099	
MK092387		2018	5205	Ren và cs, 2020
MK092408		2018	3172	
MN326142		2019	5119	Sun và cs, 2021
MN326185		2019	5119	
MZ577029		2021	5426	Li và cs, 2021
MG345016		2017	5427	Qin và cs, 2018
OL913365		Việt Nam	2019	2493
OL913366	2019		2493	
OL913367	2019		2493	
KY586144	Brazil	2017	5316	Cerva và cs, 2017
KX517759	Hungary	2016	5533	Novosel và cs, 2017
KC701296		2013	3099	Cadar và cs, 2013
KC687100	Cromania	2013	3099	
JQ860238	Romania	2012	3096	
JQ860240		2012	3096	
JQ860243		2012	3099	
JQ860248		2012	3099	
JX101461	Mỹ	2012	5486	Xiao và cs, 2013
KF725662		2013	3259	Opriessnig và cs, 2014

Bảng 2.5. Danh sách các trình tự PPV3 và PPV4 sử dụng trong nghiên cứu

Chủng	Mã số GenBank	Quốc gia	Năm phân lập	Kích thước (bp)	Tác giả
PPV3	KJ842609	Trung Quốc	2013	390	He và cs, 2014
	MK378232		2017	4963	He và Tu, 2019
	MK378244			5133	
	MK378240			5052	
	KX827776		2017	4859	Sun và cs, 2017
	MG345026		2018	5081	Qin và cs, 2018
	JQ177085		2013	391	Pan và cs, 2011
	MW355754	Congo	2021	346	Bisimwa và cs, 2018
	EU200671	Hồng Kông	2008	5043	Lau và cs, 2008
	OP377042	Hàn Quốc	2023	4916	Park và cs, 2016
	OP377043			4147	
	KC296751	Đức	2013	4609	Streck và cs, 2010
	KC701326	Hungary	2013	2778	Cadar và cs, 2008
	KP768509	Slovakia	2015	356	Sliz và cs, 2012
	JQ700072	Brazil	2016	2696	Souza và cs, 2007
	KT726332	Bồ Đào Nha	2016	392	Miranda và cs, 2011
	JF738351	Romania	2011	5027	Cadar và cs, 2007
	JF738350			4048	
	KF561854	Mỹ	2014	3124	Opriessnig và cs, 1998
	QN16	Việt Nam	2018	995	Nghiên cứu này
QT4	2019		995		
PPV4	GU978964	Trung Quốc	2010	5400	Huang và cs, 2010
	GU978965			5645	
	GU978967			5644	
	GU978968			5400	
	HM031134			5400	
	HM031135			5552	
	MG345027		2018	5908	Qin và cs, 2018

Chủng	Mã số GenBank	Quốc gia	Năm phân lập	Kích thước (bp)	Tác giả
PPV4	JQ868713	Romania	2012	5454	Cadar và cs, 2012
	JQ868714			5454	
	JQ868715			5458	
	JQ868716			5456	
	GQ387499	Mỹ	2010	5905	Cheung và cs, 2010
	GQ387500		2010	5780	
	NC014665		2018	5905	Cheung và cs, 2018
	MT434668	Việt Nam	2020	5368	Nghiên cứu này
	MT434669			5368	

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.3.1. Phương pháp thu thập mẫu

- Mẫu được thu từ lợn ở độ tuổi giết mổ (4,5-5,5 tháng tuổi), được nuôi trên địa bàn bảy tỉnh khu vực miền Trung. Mỗi tỉnh thực hiện thu mẫu ở 3-5 lò mổ, mỗi lò mổ thu không quá năm mẫu.

- Mẫu máu (n=29): Được lấy từ lợn khi giết thịt, sau đó cho vào ống thu máu chống đông. Mẫu phổi (n=117): Được lấy khi lợn thịt được mổ bỏ nội tạng.

- Sau khi thu, mẫu được giữ ở 4°C và chuyển về phòng thí nghiệm Công nghệ gen động vật (Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam) bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng để tách chiết DNA tổng số.

2.3.2. Phương pháp tách chiết DNA

DNA tổng số được tách chiết theo phương pháp thường quy ở phòng thí nghiệm, sử dụng proteinase K; phenol/phloroform/isoamyl alcohol.

2.3.2.1. Quy trình tách chiết DNA từ máu chống đông

- Lấy 0,2 mL máu chống đông bằng EDTA, thêm vào 0,5 mL PBS.
- Lắc đều, ly tâm 12.000 vòng/10 phút/ 4°C.
- Loại bỏ dịch nổi, thu cặn tế bào.

- Lặp lại bước này cho đến khi loại được hoàn toàn huyết sắc tố, chỉ còn cặn tế bào bạch cầu máu màu trắng mờ.
- Sau khi thu cặn tế bào, bổ sung thêm 0,5 mL lysis buffer để phân huỷ tế bào, lắc đều, ủ ở 37°C trong vòng 60 phút.
- Bổ sung vào ống 5 µL proteinase K 20 mg/mL. Lắc đều, ủ 56°C trong bể ổn nhiệt qua đêm.
- Thêm 0,7 mL phenol bão hòa, lắc đều. Ly tâm 12000 vòng/20 phút/ 4°C. Thu dịch nổi phía trên
- Bổ sung 0,7 mL chloroform: isoamyl alcohol (24:1) vào, lắc đều. Ly tâm 12.000 vòng/20 phút/ 4°C, thu dịch phía trên.
- Thêm vào 2 lần thể tích cồn tuyệt đối, lắc nhẹ, ủ ở -20°C, 3 giờ. Ly tâm 12.000 vòng/20 phút/ 4°C thu tủa.
- Rửa tủa bằng cồn 70%, để khô, hoà tủa bằng 30 µL TE. Bảo quản ở 4°C.
- Sau đó, sản phẩm tách chiết DNA tổng số được tiến hành điện di kiểm tra trên gel agarose 1%.

2.3.2.2. Quy trình tách chiết DNA từ mô phổi

- Nghiền nhỏ 100 mg mẫu mô phổi trong ni tơ lỏng
- Thêm vào 0,5 mL lysis buffer để phân huỷ tế bào, lắc đều, ủ ở 37°C trong vòng 60 phút.
- Bổ sung vào ống 5 µL proteinase K 20 mg/mL. Lắc đều, ủ 56°C/qua đêm.
- Thêm 0,7 mL phenol bão hòa, lắc đều. Ly tâm 12.000 vòng/20 phút/4°C. Thu dịch phía trên
- Bổ sung 0,7 mL chloroform: isopropanol (24:1) vào, lắc đều. Ly tâm 12.000 vòng/20 phút/4°C, thu dịch phía trên.
- Thêm vào 2 lần thể tích cồn tuyệt đối, lắc nhẹ, ủ ở -20°C, 3 giờ. Ly tâm 12.000 vòng/20 phút/4°C thu tủa.
- Rửa tủa bằng cồn 70%, để khô, hoà tủa bằng 30 µL TE. Bảo quản ở 4°C.
- Sau đó, sản phẩm tách chiết DNA tổng số được tiến hành điện di kiểm tra trên gel agarose 1%.

Sau khi tách chiết, chất lượng và số lượng DNA tổng số được đánh giá bằng máy đo Nanodrop ND2000 (Thermo Scientific, Mỹ) và điện di trên gel agarose.

2.3.3. Phương pháp điện di

- **Bước 1:** Chuẩn bị gel agarose 1% hoặc 2% tùy vào kích thước đoạn DNA cần kiểm tra. Đổ gel vào khuôn đã gấn lược. Chờ gel đông đặc hoàn toàn, cẩn thận tháo lược ra khỏi gel. Đặt bản gel vào bể điện di, sau đó rót dung dịch đệm vào ngập bản gel.

- **Bước 2:** Mẫu DNA được trộn đều với loading dye 6× với tỷ lệ mẫu: loading dye là 5:1, sau đó tra mẫu điện di vào các giếng trên bản gel.

- **Bước 3:** Chạy điện di trong đệm TBE1× bằng dòng điện một chiều với hiệu điện thế 120V ở nhiệt độ phòng. Thời gian điện di thay đổi phụ thuộc vào kích thước của phân tử DNA, nồng độ agarose và cường độ dòng điện.

- **Bước 4:** Nhuộm bản gel bằng dung dịch ethidium bromide 0,1% trong khoảng 10 phút, sau đó lấy bản gel ra rửa lại bằng nước.

- **Bước 5:** Quan sát và chụp ảnh bằng hệ thống chụp ảnh gel (Biolads, Mỹ).

2.3.4. Phương pháp thiết kế môi và PCR

- Các môi đặc hiệu với các vùng sườn của gen *VP* của PPV2 được thiết kế bằng phần mềm Primer3 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>) và kiểm tra bằng Primer Checker. Các cặp môi phát hiện PPV1, PPV2, PPV3, PPV4 và khuếch đại hệ gen PPV4 được tham khảo từ các nghiên cứu trước đây.

Sử dụng DNA tổng số làm khuôn, tiến hành tối ưu hóa điều kiện PCR (thành phần phản ứng, nhiệt độ gấn môi) khuếch đại đặc hiệu các đoạn gen đặc trưng cho PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 bằng các cặp môi tương ứng. Thành phần phản ứng PCR và chu trình nhiệt phản ứng PCR phát hiện PPV được trình bày lần lượt ở Bảng 2.6 và Bảng 2.7.

Bảng 2.6. Thành phần phản ứng PCR phát hiện PPV

STT	Thành phần phản ứng	Thể tích (μL)
1	H ₂ O	13,94
2	Đệm phản ứng 10X	2,5
3	dNTPs 25 mM	0,16
4	Môi xuôi 10 pM	0,5
5	Môi ngược 10 pM	0,5
6	Dream <i>Taq</i> 2X	0,4
7	DNA khuôn	2
Tổng thể tích		20

Bảng 2.7. Chu trình nhiệt phản ứng PCR

Bước	Giai đoạn		Nhiệt độ ($^{\circ}\text{C}$)	Thời gian (phút)
1	Biến tính		94	3
2	Lặp lại 35 chu kỳ	Biến tính	94	1/2
		Gắn môi	Ta (*)	1/2
		Kéo dài	72	1/2
3	Hoàn tất kéo dài		72	7
4	Kết thúc phản ứng		8	∞

(*) Thông tin nhiệt độ gắn môi (Ta) được trình bày ở Bảng 2.3.

2.3.5. Phương pháp giải trình tự gen

Sản phẩm PCR được sử dụng để giải trình tự gen trực tiếp theo nguyên lý Sanger bằng thiết bị giải trình tự tự động ABI-3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Mỹ) tại công ty Macrogen, Hàn Quốc. Phương pháp giải trình tự gen do F.Sanger và cộng sự phát minh có độ chính xác tương đối cao, là cơ sở hoạt động của các máy giải trình tự gen tự động.

Nguyên lý

Dựa trên cơ chế tổng hợp DNA trong cơ thể sinh vật, Sanger đã giải trình tự hoàn chỉnh bộ gen của thực khuẩn thể X174 kí sinh vi khuẩn *E. coli*. Trong phương pháp này, tác giả sử dụng nhân tố kết thúc đặc hiệu quá trình kéo dài DNA khi tổng hợp là 2,3 dideoxynucleosid triphosphat (ddNTP). Các phân tử này (ddNTP) có thể kết hợp vào chuỗi DNA đang tổng hợp một cách bình thường qua nhóm 5 triphosphat nhưng lại không tiếp tục kết hợp được với phân tử deoxynucleosid triphosphat (dNTP) tiếp theo. Như vậy, khi trộn một lượng nhỏ ddNTP với 4 loại dNTP rồi tiến hành tổng hợp DNA nhờ enzym polymerase sẽ cho một loạt các đoạn DNA được kết thúc một cách đặc hiệu bởi gốc dideoxynucleotide và sẽ thu được các đoạn DNA có kích thước hơn kém nhau 1 nucleotide. Chạy điện di các đoạn có thể xác định được trình tự đoạn DNA nghiên cứu.

Các bước thực hiện

- **Bước 1:** Biến tính DNA khuôn, điện di trên gel polyacrylamid (có bổ sung ure) thu các mạch đơn DNA
- **Bước 2:** Chuẩn bị phản ứng tổng hợp DNA. Lấy bốn ống eppendorff, cho các thành phần cần thiết vào mỗi ống (DNA khuôn, môi có đánh dấu phóng xạ, enzym DNA polymerase và các dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) và dung dịch đệm thích hợp). Bổ sung vào mỗi ống tương ứng một lượng nhỏ (1%) các loại ddNTP nhất định (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP).
- **Bước 3:** Thực hiện phản ứng tổng hợp DNA với các thiết bị luân nhiệt.
- **Bước 4:** Điện di kết quả, so sánh các kết quả các chuỗi mạch đơn DNA được tổng hợp để xác định trình tự của mạch khuôn.

2.3.6. Phương pháp xử lý và phân tích trình tự gen

- Các trình tự gen được xử lý và xác định tỷ lệ từng loại nucleotide bằng phần mềm BioEdit v.7.0.9.0 (Hall, 1999) trên cơ sở đối chiếu so sánh các trình tự gen theo chiều xuôi và chiều ngược và với các trình tự tham chiếu công bố

trên GenBank. Trong trường hợp phát hiện trình tự bị lỗi ghi nhận sai hoặc thừa, thiếu nucleotide khi so sánh giữa file “*.ab1” (pic màu) và file “*.seq.File” (ký tự A, T, G, C), cần tiến hành chỉnh sửa dựa trên quan sát và phân tích đồ thị màu trong file “*.ab1”.

- Trình tự nucleotide của các chủng tham chiếu và các chủng nghiên cứu được căn chỉnh và sắp xếp bằng công cụ ClustalW Multiple alignment (Thompson và cs, 1994).

- Độ tương đồng của các trình tự gen thu được với trình tự gen của các chủng PPV tham chiếu công bố trên GenBank được xác định bằng phần mềm GenDoc 2.6.

- Giá trị độ lệch (skew/skewness value) được tính toán theo công thức: $AT\ skew = (A-T)/(A+T)$ và $GC\ skew = (G-C)/(G+C)$ (Perna và Kocher, 1995). Giá trị độ lệch dương biểu thị số lượng A>T và G>C và ngược lại.

2.3.7. Phương pháp xây dựng cây phát sinh chủng loại

Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên trình tự gen mã hóa protein cấu trúc của các chủng PPV2 và trình tự hệ gen/gen mã hóa protein cấu trúc của các chủng PPV4 bằng phần mềm MEGA X (Kumar và cs, 2018) với các tham số đầu vào bao gồm: Phương pháp dự đoán cây phát sinh chủng loại Maximum Likelihood; mô phỏng sự thay đổi nucleotide giữa các trình tự gen dựa vào mô hình Tajima-Nei và mức tin cậy ở các nhánh của cây phát sinh chủng loại được ước tính bằng phép thử bootstrap lặp lại 1.000 lần. Các trình tự gen tham chiếu lấy từ GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.3.8. Phương pháp xử lý số liệu

Tỷ lệ phát hiện PPV1/PPV2/PPV3/PPV4; tỷ lệ đồng nhiễm các chủng PPV1/PPV2/PPV3/PPV4; tỷ lệ AT skew và GC skew được tính toán bằng phần mềm Excel 2010.

CHƯƠNG 3

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

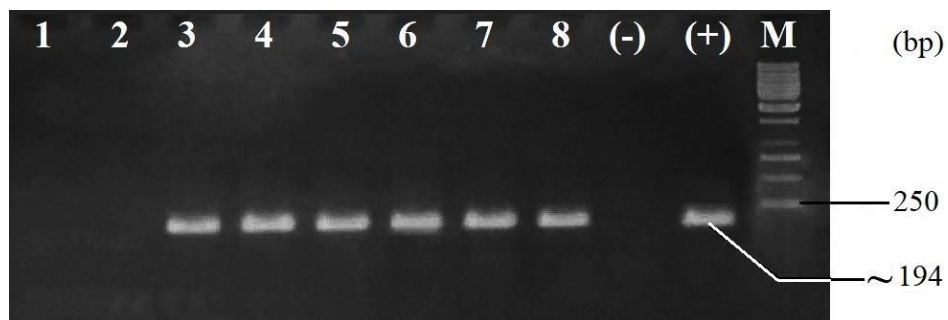
3.1. PHÁT HIỆN PPV1, PPV2, PPV3 VÀ PPV4 LƯU HÀNH TRÊN LỢN Ở BẢY TỈNH MIỀN TRUNG

3.1.1. Phát hiện PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 ở bảy tỉnh miền Trung

Nhằm xác định sự hiện diện của các chủng PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 ở bảy tỉnh miền Trung, trước tiên, chúng tôi tiến hành tách chiết DNA tổng số từ các mẫu đã thu thập được. DNA tổng số sau tách chiết được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% (Hình 2A, Phụ lục). Kết quả điện di cho thấy các băng DNA có kích thước lớn, sáng, rõ nét, không có hiện tượng đứt gãy. Tỷ số OD 260/280 của các mẫu DNA nằm trong khoảng 1,67-2,10 (Hình 2B, Phụ lục). Như vậy, DNA tổng số thu được từ các mẫu đảm bảo chất lượng và số lượng, được sử dụng làm khuôn cho các phản ứng PCR phát hiện PPV. Trong số 8 chủng PPV đã được phát hiện trên thế giới, nghiên cứu của chúng tôi tập trung phát hiện PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4.

3.1.1.1. Kết quả phát hiện PPV1

Để phát hiện PPV1, chúng tôi tiến hành phản ứng PCR sử dụng cặp môi với trình tự được tham khảo từ nghiên cứu của Streck và cs (2013) (Bảng 2.2). Thành phần phản ứng PCR (Bảng 2.6) và chu trình nhiệt phản ứng PCR (Bảng 2.7) đã được trình bày ở phần Phương pháp. Kết quả điện di sản phẩm phản ứng PCR phát hiện PPV1 được thể hiện ở Hình 3.1.



Hình 3.1. Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện PPV1. M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Mỹ); 1-2: mẫu âm tính; 3-8: mẫu dương tính; (-):

đối chứng âm tính (PCR không có DNA khuôn); (+): đối chứng dương tính (PCR với DNA tổng số của mẫu dương tính PPV1 làm khuôn).

Hình 3.1 cho thấy trong số tám giếng (1-8) chứa sản phẩm PCR của các mẫu thí nghiệm, các giếng 3-8 xuất hiện một băng DNA duy nhất, rõ nét, không có băng phụ, có kích thước khoảng 194 bp, tương ứng với sản phẩm PCR ở giếng (+). Kết quả này chứng tỏ sản phẩm PCR của các mẫu ở giếng 3-8 là dương tính với PPV1. Ngược lại, kết quả điện di sản phẩm PCR ở các giếng 1 và 2 không hiển thị băng DNA có kích thước tương ứng với băng DNA xuất hiện ở giếng (+), chứng tỏ các mẫu này là âm tính với PPV1.

Các sản phẩm PCR dương tính với PPV1 được tinh sạch và giải trình tự trực tiếp hai chiều. Kết quả giải trình tự thu được đoạn nucleotide có kích thước 194 bp, phù hợp với tính toán về mặt lý thuyết (Bảng 2.2), và tương đồng 99% với trình tự nucleotide của chủng PPV1 tham chiếu NADL2 (Mã số GenBank: KF049424) được phân lập ở Đức vào năm 2013 (Hình 3.2). Kết quả này chứng tỏ sự hiện diện của chủng PPV1 trong các mẫu 3-8.

Porcine parvovirus strain NADL2 capsid protein gene, complete cds

Sequence ID: [KF049424.1](#) Length: 2263 Number of Matches: 1

Range 1: 690 to 884 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

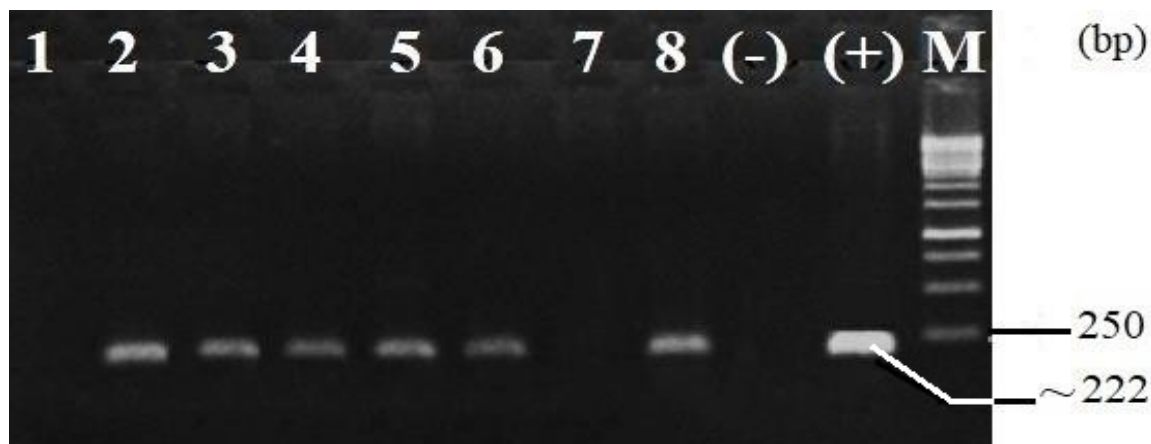
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
355 bits(192)	2e-93	194/195(99%)	0/195(0%)	Plus/Plus
Query 1	GGGAGGGCTTGGTTAGAATCACTGCACACGCATCAAGACTCATACATCTAAATATGCCAG	60		
Sbjct 690	GGGAGGGCTTGGTTAGAATCACTGCACACGCATCAAGACTCATACATCTAAATATGCCAG	749		
Query 61	AACACGAAACATACAAAAGAATACATGTAATAATTCAGAATCAGGGGTGGCGGGACAAA	120		
Sbjct 750	AACACGAAACATACAAAAGAATACATGTAATAATTCAGAATCAGGGGTGGCGGGACAAA	809		
Query 121	TGGTACAAGACGATGCACACACACAAATGGTAACACCTTGGTCACTAATAGATGCTAACG	180		
Sbjct 810	TGGTACAAGACGATGCACACACACAAATGGTAACACCTTGGTCACTAATAGATGCTAACG	869		
Query 181	CATGGGGGGTGTGGT	195		
Sbjct 870	CATGGGGAGTGTGGT	884		

Hình 3.2. Kết quả BLAST trình tự nucleotide của mẫu dương tính PPV1 so với chủng PPV1 tham chiếu (Mã số GenBank: KF049424)

3.1.1.2. Kết quả phát hiện PPV2

Nhằm phát hiện PPV2, chúng tôi tiến hành phản ứng PCR với cặp mồi với trình tự được tham khảo từ công bố của Cadar và cs (2013) (Bảng 2.2). Thành

phản ứng PCR (Bảng 2.6) và chu trình nhiệt phản ứng PCR (Bảng 2.7) được trình bày ở phần Phương pháp. Kết quả điện di sản phẩm phản ứng PCR phát hiện PPV2 được thể hiện ở Hình 3.3.



Hình 3.3. Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện PPV2. M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Mỹ); 1, 7: mẫu âm tính, 2-6, 8: mẫu dương tính; (-): đối chứng âm tính (PCR không có DNA khuôn); (+): đối chứng dương tính (PCR với DNA tổng số của mẫu dương tính PPV2 làm khuôn)

Kết quả ở Hình 3.3 cho thấy trong số tám giếng (1-8) chứa sản phẩm PCR của các mẫu thí nghiệm, các giếng 2-6 và giếng 8 xuất hiện băng DNA duy nhất, rõ nét, có kích thước khoảng 222 bp, tương ứng với sản phẩm PCR ở giếng (+). Kết quả này chứng tỏ sản phẩm PCR của các mẫu ở giếng 2-6 và 8 là dương tính với PPV2. Ngược lại, kết quả điện di sản phẩm PCR ở giếng 1 và giếng 7 không hiển thị băng DNA tương ứng với băng DNA xuất hiện ở giếng (+) chứng tỏ các mẫu này âm tính với PPV2. Sau khi được tinh sạch, các sản phẩm PCR dương tính với PPV2 được giải trình tự trực tiếp hai chiều. Trình tự nucleotide thu được có kích thước 222 bp, phù hợp với tính toán về mặt lý thuyết (Bảng 2.2) và tương đồng 98% trình tự nucleotide của chủng PPV2 tham chiếu được phân lập ở Trung Quốc năm 2018 (Mã số GenBank: MG345019) (Hình 3.4). Kết quả này đã xác nhận sự hiện diện của PPV2 trong các mẫu 2-6 và 8.

Porcine parvovirus 2 isolate SERUM-SMU non-structural protein and structural protein genes, complete cds
 Sequence ID: [MG345019.1](#) Length: 5438 Number of Matches: 1

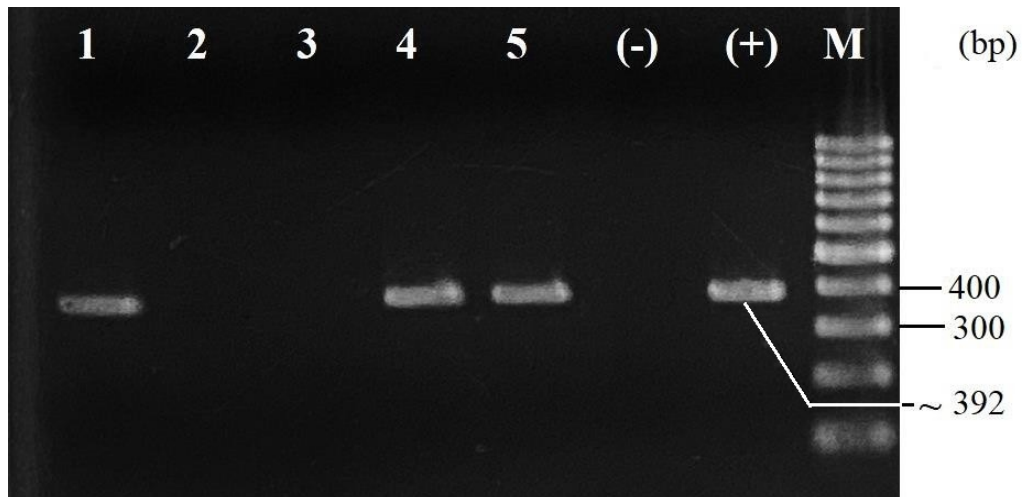
Range 1: 828 to 1035 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
357 bits(193)	5e-94	204/209(98%)	1/209(0%)	Plus/Plus
Query 1	TAGATTCTTGACAGGCCGTAGACTGGCTGGTAGACAATGGCTGCTGCACCGAGGCCAAGTG	60		
Sbjct 828	TAGATTCTTGACAGGCCGTAGACTGGCTGGTAGAGAATGGCTGCTGCACCGAGGCCAAGTG	887		
Query 61	GATCGAGATGGACAAGATGGGATATCGTTCTTTTCATGTCCACCATCTCAAGGGGTGCTGC	120		
Sbjct 888	GATCGAGATGGACAAGATGGGATATCGTTCTTTTCATGTCCACC-TCTCAAGGGGTGCTGC	946		
Query 121	AGGTGAAGAACGCTCTCAACCTTGACGACGAGGGAACCTCGTAGCAGGGAACAAACTGTTGG	180		
Sbjct 947	AAGTGAAGAACGCTCTTAACCTTGACGACGAGGGAACCTCGTAGCAGGGAACAAACTGTTGG	1006		
Query 181	AGAGCATAGTAAAAGGTGCTGACCCCTGG	209		
Sbjct 1007	AGAGCATAGTAAAAGGTGCTGACCCCTGG	1035		

Hình 3.4. Kết quả BLAST trình tự nucleotide của mẫu dương tính PPV2 so với chủng PPV2 tham chiếu (Mã số GenBank: MG345019)

3.1.1.3. Kết quả phát hiện PPV3

Phản ứng PCR phát hiện PPV3 sử dụng cặp mồi với trình tự được tham khảo từ nghiên cứu của Csagola và cs (2012) (Bảng 2.2). Thành phần phản ứng PCR và chu trình nhiệt phản ứng PCR được trình bày lần lượt ở Bảng 2.6 và Bảng 2.7 trong phần Phương pháp. Kết quả điện di sản phẩm phản ứng PCR phát hiện PPV3 được thể hiện ở Hình 3.5.



Hình 3.5. Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện PPV3. M: GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, Mỹ); 2, 3: mẫu âm tính; 1, 4, 5: mẫu dương tính; (-): đối chứng âm tính (PCR không có DNA khuôn); (+): đối chứng dương tính (PCR với DNA tổng số của mẫu dương tính PPV3 làm khuôn)

Nhìn vào Hình 3.5 có thể dễ dàng nhận thấy trong số năm giếng (1-5) chứa sản phẩm PCR của các mẫu thí nghiệm, băng DNA duy nhất, rõ nét chỉ xuất hiện trong các giếng 1, 4 và 5 với kích thước khoảng 392 bp, tương ứng với sản phẩm PCR ở giếng (+). Kết quả này cho thấy sản phẩm PCR ở các giếng 1, 4 và 5 dương tính với PPV3. Các sản phẩm PCR trong giếng 2 và giếng 3 không hiển thị băng DNA nào tương ứng với băng DNA ở giếng (+), do đó, chúng được xác định là âm tính với PPV3.

Các sản phẩm PCR dương tính với chủng PPV3 đã được tinh sạch và giải trình tự trực tiếp hai chiều. Kết quả thu được đoạn nucleotide có kích thước phân tử 392 bp, phù hợp với tính toán lý thuyết (Bảng 2.2) và tương đồng 98% trình tự nucleotide của chủng PPV3 được phân lập ở Trung Quốc vào năm 2018 (Mã số GenBank: MG345026) (Hình 3.6). Kết quả này chứng tỏ sự hiện diện của PPV3 trong các mẫu 1, 4 và 5.

Porcine parvovirus 3 isolate SERUM-SMU non-structural protein, minor structural protein, and major structural protein genes, complete cds
 Sequence ID: [MG345026.1](#) Length: 5081 Number of Matches: 1

Range 1: 2554 to 2945 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

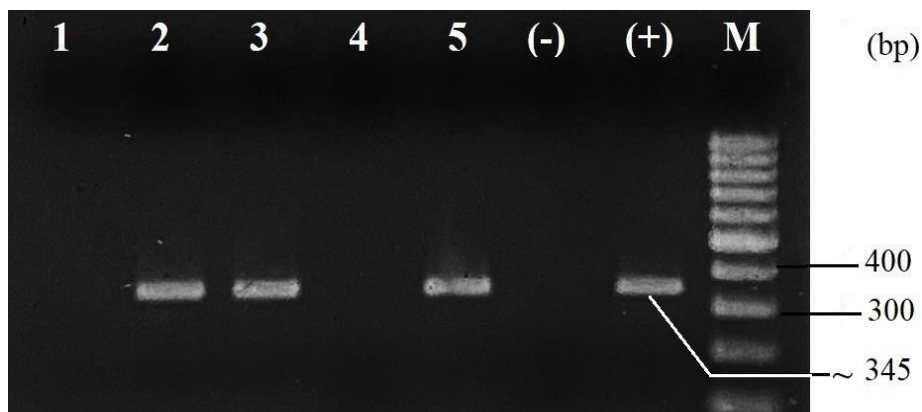
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
713 bits(386)	0.0	390/392(99%)	0/392(0%)	Plus/Plus
Query 1	GCAGTCTGCGCTTAACTTAGGTGATTTTCACCGGCCCTAACCCGGCCGTGTTGTTGGA	60		
Sbjct 2554	GCAGTCTGCGCTTAACTTAGGTGATTTTCACCGGCCCTAACCCGGCCGTGTTGTTGGA	2613		
Query 61	TTTACACAAATTTGCAAGGATGCCGTAGTACCTTCTGCGGAAGATAATAAGATTTTCTT	120		
Sbjct 2614	TTTACACAAATTTGCAAGGATGCCGTAGTACCTTCTGCGGAAGATAATAAGATTTTCTT	2673		
Query 121	TGAGGAGAGTGTCTCCTTGGTCTGAGGAAGACaaaaaaTTTGAACAGATTGAAGG	180		
Sbjct 2674	TGAGGAGAGTGTCTCCTTGGTCTGAGGAAGACAAAAAATTTGAACAGATTGAAGG	2733		
Query 181	GCAGTTCAGGAAATATTCATCCACCCACAGATACGGAGGATGGAGCCGATAGCTACGG	240		
Sbjct 2734	GCAGTTCAGGAAATATTCATCCACCCACAGATACGGAGGATGGAGCCGATAGCTACGG	2793		
Query 241	TGGCAACAGTGATCAAGGAACTGGTTCCTTAGTGAACAGACCTTGAACGGCCTCCCGA	300		
Sbjct 2794	TGGCAACAGTGATCAAGGAACTGGTTCCTTAGTGAACAGACCTTGAACGGCCTCCCGA	2853		
Query 301	GCGCCCCGGAATCTTGGTCCCCGGGTACAATTATGTTGGTCTGGTAATCCTTTGGATAA	360		
Sbjct 2854	GCGCCCCGGAATCTTGGTCCCCGGGTACAATTATGTTGGTCTGGTAATCCTTTGGATAA	2913		
Query 361	TGCTCCCGCTAAGGGACCAAGTGGATGAAGCAG	392		
Sbjct 2914	TGCTCCCGCTAAGGGACCAAGTGGATGAAGCAG	2945		

Hình 3.6. Kết quả BLAST trình tự nucleotide của mẫu dương tính PPV3 so với chủng PPV3 tham chiếu (Mã số GenBank: MG345026)

3.1.1.4. Kết quả phát hiện PPV4

Phản ứng PCR phát hiện PPV4 sử dụng cặp mồi với trình tự được tham khảo từ công bố của Csagola và cs (2012) (Bảng 2.2). Thành phần phản ứng

PCR và chu trình nhiệt phản ứng PCR được trình bày ở Bảng 2.6 và Bảng 2.7 phần Phương pháp. Kết quả điện di sản phẩm phản ứng PCR phát hiện PPV4 được thể hiện ở Hình 3.7.



Hình 3.7. Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện PPV4. M: GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, Mỹ); 1, 4: mẫu âm tính; 2, 3, 5: mẫu dương tính; (-): đối chứng âm tính (PCR không có DNA khuôn); (+): đối chứng dương tính (PCR với DNA tổng số của mẫu dương tính PPV4 làm khuôn)

Hình 3.7 cho thấy sản phẩm PCR ở các giếng 2, 3 và 5 là băng DNA duy nhất, không có băng phụ, rõ nét, có kích thước khoảng 345 bp, tương ứng với sản phẩm PCR ở giếng (+) trong số năm giếng (1-5) chứa sản phẩm PCR của các mẫu thí nghiệm. Kết quả này cho thấy sản phẩm PCR ở các giếng 2, 3 và 5 dương tính với PPV4. Ngược lại, sản phẩm PCR ở các giếng 1, 4 không xuất hiện băng DNA tương ứng sản phẩm PCR ở giếng (+), chứng tỏ các mẫu này âm tính với PPV4.

Sau khi tinh sạch, các sản phẩm PCR dương tính với PPV4 đã được giải trình tự hai chiều trực tiếp, kết quả thu được trình tự nucleotide có kích thước phân tử 345 bp, phù hợp với tính toán lý thuyết (Bảng 2.2) và tương đồng 99% trình tự nucleotide của chủng PPV4 tham chiếu được phân lập ở Trung Quốc vào năm 2020 (Mã số GenBank: MK092422) (Hình 3.8). Kết quả này chứng tỏ sự hiện diện của chủng PPV4 trong các mẫu 2, 3 và 5.

Porcine parvovirus 4 isolate PPV4-DJH12 replicase protein and ORF3 protein genes, complete cds
 Sequence ID: [MK092422.1](#) Length: 2769 Number of Matches: 1

Range 1: 367 to 711 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
621 bits(336)	3e-173	342/345(99%)	0/345(0%)	Plus/Plus
Query 1	GCATTGGTGTGTGTCTGTGTCGCTGGTACTCCGCGGGATGTGCTTACAATTTTCAAAAA	60		
Sbjct 367	GCATTGGTGTGTGTCTGTGTCGCTGGTACTCCGCGGGATGTGCTTACAATTTTCAAAAA	426		
Query 61	TACAGAGAAGAAGGTCTCTGTACTATTTTGGGGTGGAGGGCCTAAGCTTCTTTGTGCC	120		
Sbjct 427	TACAGAGAAGAAGGTCTCTGTACTATTTTGGGGTGGAGGGCCTAAGCTTCTTTGTGCC	486		
Query 121	CCATAAGAATAAACACGGGGCTGGAAGAGCACGGACGAGGGCTTTATCTACAACATATCT	180		
Sbjct 487	CCATAAGAATAAACACGGGGCTGGAAGAGCACAGACGAGGGCTTTATCTACAACATATCT	546		
Query 181	GCTTAAAAAACTGCCGCTAAAAGAGTGTATATGCTTGGACCACCATCGGTGGAGCCAT	240		
Sbjct 547	GCTTAAAAAACTGCCGCTGAAAGAGTGTATATGCTTGGACCACCATCGGTGGAGCCAT	606		
Query 241	CGGTGATGCTTGCCCTAAATACTGATAAGAGAAAGGAGTTGCTGGATAATAGACAGGACCC	300		
Sbjct 607	CGGTGATGCTTGCCCTAAATACTGATAAGAGAAAGGAGTTGCTGGATAATAGACAGGACCC	666		
Query 301	AGCAGTGATCGAAGAGCTCTCAGCTCCCATGTACAATGTGCCAC	345		
Sbjct 667	AGCAGTAATCGAAGAGCTCTCAGCTCCCATGTACAATGTGCCAC	711		

Hình 3.8. Kết quả BLAST cho thấy tỷ lệ tương đồng của mẫu dương tính PPV4 so với chủng PPV4 tham chiếu (Mã số GenBank: MK092422)

Bằng phản ứng PCR khuếch đại các đoạn gen đặc trưng của từng chủng PPV, giải trình tự và so sánh tỷ lệ tương đồng nucleotide, nghiên cứu của chúng tôi lần đầu tiên phát hiện PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 ở bảy tỉnh miền Trung. Kết quả này đồng thuận với các nghiên cứu gần đây khi nhận định: Việc chủng ngừa PPV chỉ có thể làm giảm những biểu hiện lâm sàng trên lợn nái sinh sản mà không thể ngăn ngừa sự lây nhiễm của PPV giữa các cá thể lợn, cũng như không thể loại bỏ hoàn toàn PPV ra khỏi đàn lợn (Serena và cs, 2021; Foerster và cs, 2016).

3.1.2. Tỷ lệ phát hiện PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 ở bảy tỉnh miền Trung

Sau khi xác nhận sự hiện diện của các chủng PPV trên các mẫu nghiên cứu, chúng tôi tính toán tỷ lệ phát hiện các chủng PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 ở từng địa phương. Tỷ lệ phát hiện PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 trên lợn nuôi ở bảy tỉnh miền Trung được trình bày ở Bảng 3.1 và Hình 3.9.

Bảng 3.1. Tỷ lệ phát hiện PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 ở bảy tỉnh miền Trung

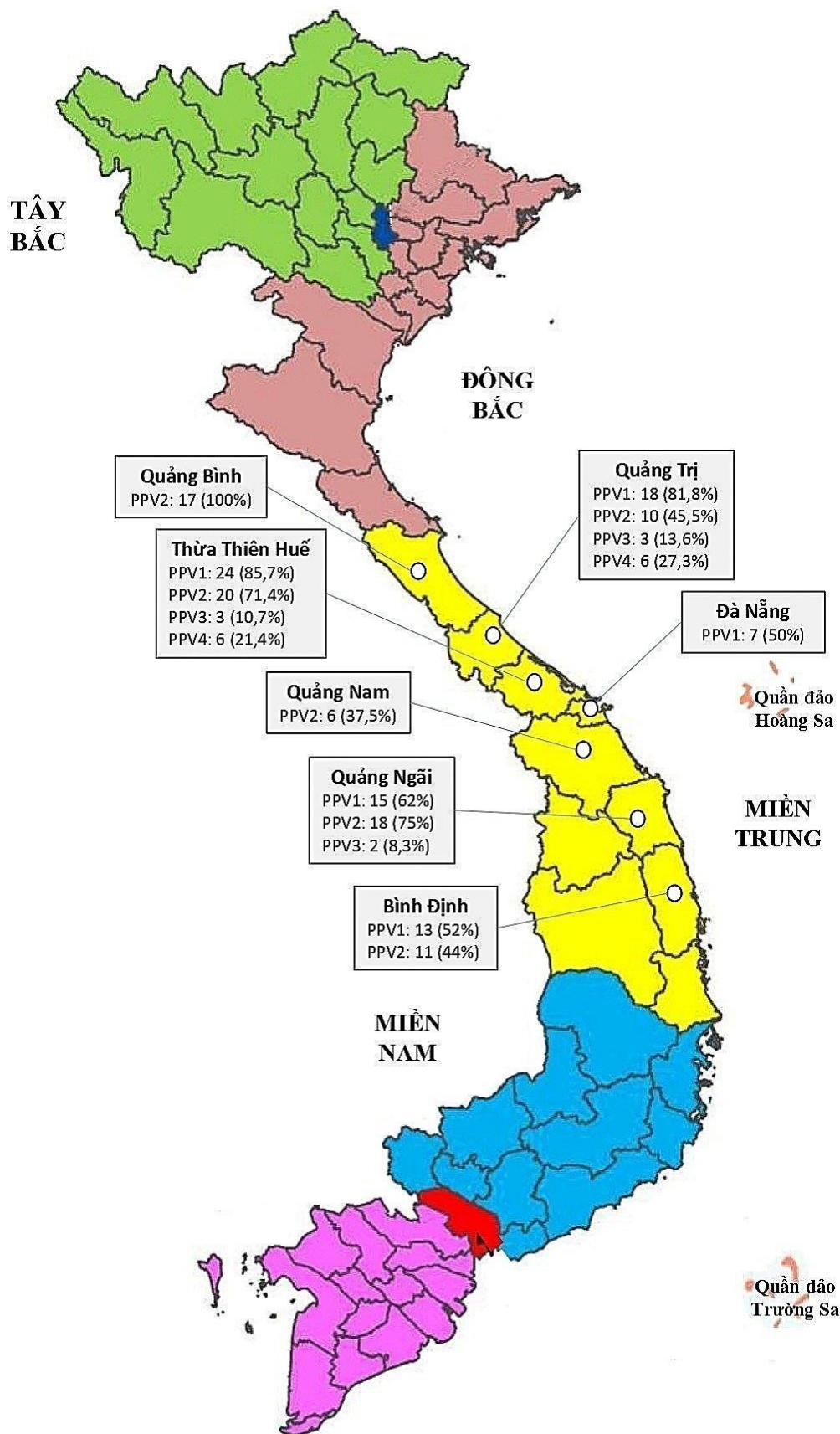
Tỉnh	n*	Tỷ lệ phát hiện các chủng PPV (1-4) (%)				Tỷ lệ phát hiện ít nhất một chủng PPV (%)
		PPV1	PPV2	PPV3	PPV4	
Quảng Bình	17	0	17 (100)	0 (0)	0 (0)	17 (100)
Quảng Trị	22	18 (81,8)	10 (45,5)	3 (13,6)	6 (27,3)	19 (86,4)
Thừa Thiên Huế	28	24 (85,7)	20 (71,4)	3 (10,7)	6 (21,4)	25 (89,3)
Đà Nẵng	14	7 (50,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	7 (50,0)
Quảng Nam	16	0	6 (37,5)	0 (0)	0 (0)	6 (37,5)
Quảng Ngãi	24	15 (62,0)	18 (75)	2 (8,3)	0 (0)	18 (75,0)
Bình Định	25	13 (52,0)	11 (44)	0 (0)	0 (0)	17 (68,0)
Tổng	146	77 (52,7)	82 (56,2)	8 (5,5)	12 (8,2)	109 (74,7)

*n: Số lượng mẫu thu ở mỗi tỉnh thành

Số liệu trình bày ở Bảng 3.1 và Hình 3.9 cho thấy sự hiện diện của PPV ở cả bảy tỉnh nghiên cứu: 109/146 mẫu dương tính, chiếm tỷ lệ 74,7%; trong đó, có một số mẫu dương tính với nhiều hơn một chủng PPV. Địa phương phát hiện tỷ lệ dương tính với PPV cao nhất là Quảng Bình (100%) và thấp nhất là Quảng Nam (37,5%). Tỷ lệ phát hiện PPV ở Thừa Thiên Huế là 89,3% (25/28); Quảng Trị là 86,4% (19/22); Quảng Ngãi là 75% (18/24); Bình Định là 68% (17/25) và Đà Nẵng là 50% (7/14).

Xét theo mức độ phổ biến thì PPV2 là chủng phổ biến nhất với tỷ lệ phát hiện là 56,2% (82/146), tiếp theo là PPV1 với 52,7% (77/146), PPV4 là 8,2% (12/146) và PPV3 có tỉ lệ thấp nhất là 5,5% (8/146).

Xét theo mức độ đa dạng thì Quảng Trị và Thừa Thiên Huế là hai tỉnh ghi nhận sự xuất hiện của cả bốn chủng PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4. Các mẫu có nguồn gốc từ Quảng Bình và Quảng Nam chỉ phát hiện chủng PPV2. Các mẫu tại Đà Nẵng chỉ dương tính với PPV1 (Hình 3.9).



Hình 3.9. Tỷ lệ phát hiện PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 ở bảy tỉnh miền Trung

Xét theo mức độ phân bố thì PPV2 hiện diện ở tất cả các tỉnh (trừ Đà Nẵng); ngược lại, PPV4 chỉ xuất hiện tại Quảng Trị và Thừa Thiên Huế. Hình 3.9 cũng cho thấy không phát hiện chủng PPV3 tại bốn tỉnh: Quảng Bình, Đà Nẵng, Quảng Nam và Bình Định. Đồng thời, PPV1 không được phát hiện ở Quảng Bình và Quảng Nam, mặc dù ở các tỉnh thành còn lại, tỷ lệ phát hiện PPV1 đều lớn hơn 50%.

Xét theo loại mẫu thì 60,7% (71/117) số mẫu phổi dương tính với PPV1; 50,4% (59/117) dương tính với PPV2; 6,8% (8/117) dương tính với PPV3 và 10,3% (12/117) dương tính với PPV4. Đối với mẫu máu thì 24,1% (7/29) số mẫu dương tính với PPV1; 79,3% (23/29) dương tính với PPV2; PPV3 và PPV4 không được phát hiện.

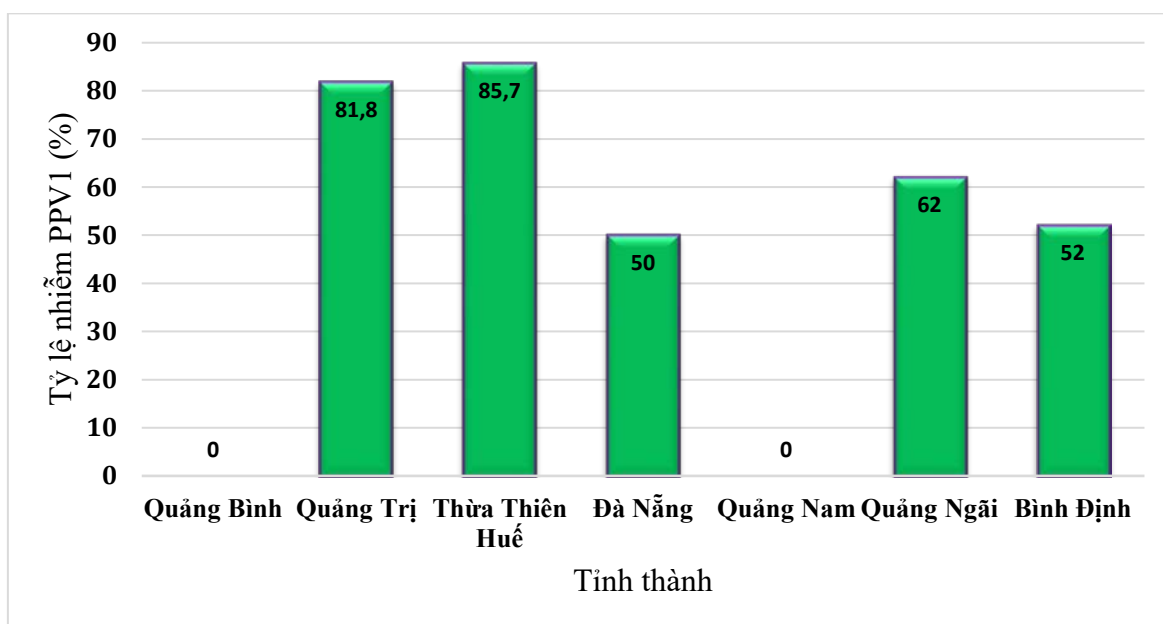
Các nghiên cứu phát hiện PPV ở lợn trước đây trên thế giới và Việt Nam chủ yếu sử dụng các phương pháp phát hiện kháng thể kháng PPV từ máu lợn như xét nghiệm huyết thanh học (HI) hoặc ELISA. Bằng những phương pháp này, PPV đã được phát hiện ở lợn rừng tại Croatia và lợn nhà tại CuBa với tỷ lệ lần lượt là 41,6% và 35,3% (Roic' và cs, 2005; Arce và cs, 2009). Gần đây, kết quả xét nghiệm ELISA trên các mẫu huyết thanh lợn ở Tây Tạng (Yan và cs, 2022) đã phát hiện PPV với tỷ lệ 91,01%. Hai nghiên cứu sớm nhất về PPV ở Việt Nam đã sử dụng phương pháp xét nghiệm huyết thanh (HI) để phát hiện sự hiện diện của chúng ở đàn lợn nái tại Thái Bình và Long An với tỷ lệ lần lượt là 50% và 69,5% (Chúc và cs, 1995; Huỳnh, 2000). Bằng phương pháp PCR khuếch đại đoạn gen đặc trưng của từng PPV, trong nghiên cứu này chúng tôi đã phát hiện sự hiện diện của PPV ở 109/146 mẫu (74,7%).

Sau một thời gian xâm nhiễm, PPV có thể không còn tồn tại trong cơ thể lợn nhưng kháng thể kháng PPV vẫn tồn tại trong huyết thanh lợn. Ở trường hợp này, mặc dù xét nghiệm ELISA cho thấy dương tính với kháng thể kháng PPV, nhưng vì PPV không còn tồn tại trong cơ thể lợn nên phản ứng PCR phát hiện PPV sẽ cho kết quả âm tính. Cùng với kết quả của các nghiên cứu trên, kết

quả của chúng tôi một lần nữa khẳng định PPV là loại virus lưu hành phổ biến trên lợn ở các nước trên thế giới và Việt Nam nói riêng, đặc biệt ở bảy tỉnh miền Trung với tỷ lệ khá cao (74,7%).

3.1.2.1. Tỷ lệ phát hiện PPV1

PPV1 là chủng PPV được phát hiện sớm nhất trong số các PPV, và trong nhiều nghiên cứu thường được gọi chung là PPV. Ngay cả các vaccine đang sử dụng cũng gọi là vaccine Parvo. Tỷ lệ lợn dương tính với chủng PPV1 nói riêng và các chủng PPV nói chung là các thông tin dịch tễ quan trọng, đóng góp cho chương trình vaccine và các phương pháp phòng chống dịch bệnh do PPV gây ra. Tỷ lệ phát hiện PPV1 ở bảy tỉnh miền Trung được trình bày ở Bảng 3.1 và Hình 3.10.



Hình 3.10. Tỷ lệ phát hiện PPV1 ở bảy tỉnh miền Trung

Số liệu trình bày ở Bảng 3.1 và Hình 3.10 cho thấy PPV1 được phát hiện ở 5/7 tỉnh nghiên cứu với tỷ lệ 52,7% (77/146). Thừa Thiên Huế và Quảng Trị là hai tỉnh có tỷ lệ phát hiện PPV1 cao nhất (lần lượt là 85,7% và 81,8%), trong khi đó, tỷ lệ phát hiện PPV1 thấp hơn được ghi nhận ở Quảng Ngãi (62%), Bình Định (52%) và Đà Nẵng (50%). So sánh với các nghiên cứu ở vùng miền cho thấy tỷ lệ phát hiện PPV1 ở miền Trung (52,7%) cao hơn so với ở miền Nam

(33,3% (Thuy và cs, 2021)) nhưng thấp hơn so với miền Bắc (55,6% (Giáp và cs, 2020) và 60,3% (Thuy và cs, 2021)); so sánh với các nghiên cứu trên phạm vi cả nước, tỷ lệ phát hiện PPV1 trong nghiên cứu này cao hơn đáng kể so với nghiên cứu của Nguyen và cs (2022) (23,9-24,4%) nhưng lại tương đương với kết quả của Thuy và cs (2021) (53,7%).

Trên thế giới, PPV1 đã được phát hiện ở hầu hết các châu lục, không phụ thuộc vào giới tính, độ tuổi, tình trạng sức khỏe và tình trạng tiêm phòng của đàn lợn. Ở châu Á, trong khi tỷ lệ lưu hành PPV1 tại Thái Lan và Nhật Bản lần lượt là 53% (Saekhow và Ikeda, 2015) và 67% (Saekhow và cs, 2015) thì tại Trung Quốc và Ấn Độ, tỷ lệ lưu hành PPV1 được ghi nhận với kết quả thấp hơn đáng kể, lần lượt là 5,56% và 14,3% (Parthiban và cs, 2022; Sun và cs, 2015). Tại châu Âu, sự khác biệt trong tỷ lệ phát hiện PPV1 đã được ghi nhận tại các quốc gia như Hungary với 0,5% (Csa'gola và cs, 2012), tại Đức với 60-61% (Streck và cs, 2013) và tại Ba Lan dao động trong khoảng 8,6-10,7% (Milek và cs, 2019). Bên cạnh đó, tỷ lệ lưu hành PPV1 tại Bắc Mỹ và Nam Phi với tỷ lệ lần lượt là 14,7% (Opriessnig và cs, 2014) và 29,1-37% (Molini và cs, 2022a; Afolabi và cs, 2019). Như vậy, tỷ lệ phát hiện PPV1 ở bảy tỉnh miền Trung Việt Nam cao hơn so với nhiều nước trên thế giới, ngoại trừ Đức và Nhật Bản (Saekhow và cs, 2015; Streck và cs, 2013) (Bảng 3.2).

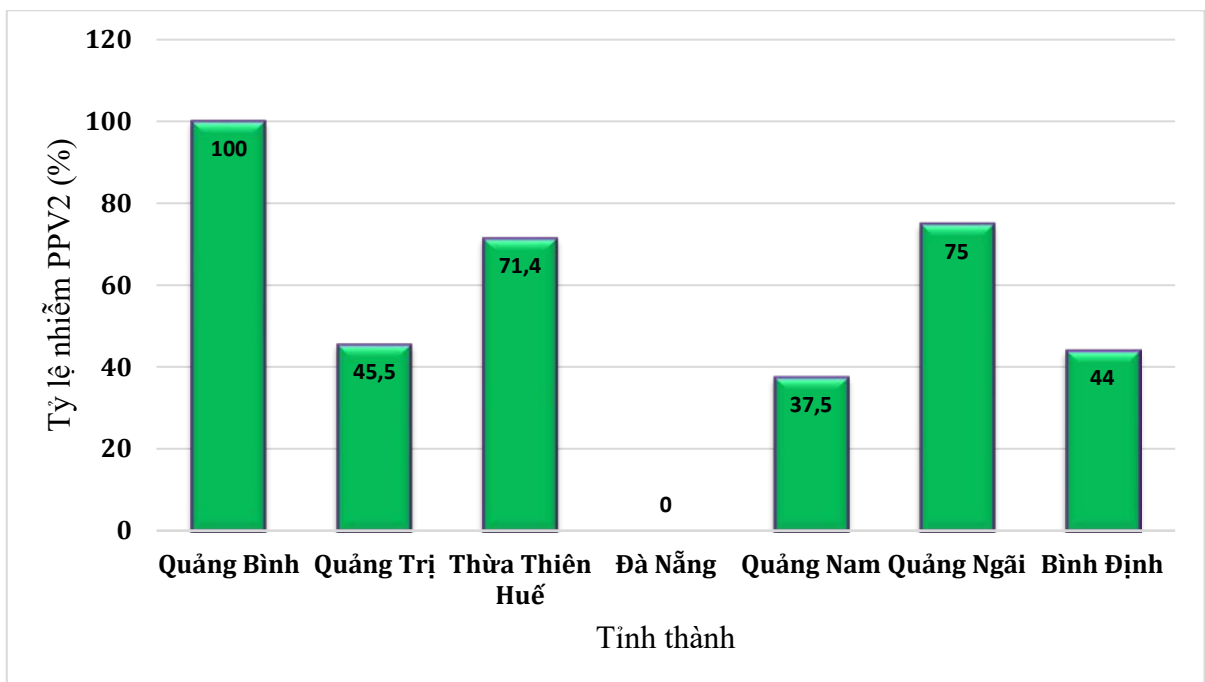
Bảng 3.2. Tóm tắt tỷ lệ dương tính các chủng PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 từ các nghiên cứu trên thế giới

Châu lục	Quốc gia	Tỷ lệ phát hiện (%)				Tài liệu tham khảo
		PPV1	PPV2	PPV3	PPV4	
Châu Á	Myanmar	-	10,0	-	-	Hijikata và cs (2001)
	Trung Quốc	-	-	-	1,84	Huang và cs (2010)
		5,56	39,56	45,11	21,56	Sun và cs (2015)
	Thái Lan	53,0	83,0	73,0	44,0	Saekhow và Ikeda, (2015)
	Nhật Bản	-	58,0 - 100	-	-	Saekhow và cs, (2015)
		67,0	58,0	39,0	33,0	Saekhow và cs, (2015)
	Việt Nam	55,6	-	-	-	Nguyễn Văn Giáp và cs (2020)
		53,7	28,0	17,7	7,8	Thuy và cs (2021)
		23,9-24,4	3,4-61,6	27,3-46,5	13,6-51,2	Nguyen và cs (2022)
Ấn Độ	14,3	-	-	-	Parthiban và cs (2022)	
Châu Âu	Hungary	0,5	6,4	9,7	6,4	Csa'gola và cs (2012)
	Đức	60-61	55	20	7	Streck và cs (2013)
	Transylvania	-	10,3 - 25	17,5 - 35	0,95 -10	Cadar và cs (2011, 2013)
	Slovakia	-	-	11,0	-	Sliz và cs (2015)
	Ba Lan	0	19,0	7,7	2,4	Cui và cs (2017)
	Hungary	-	51,06	-	-	Novosel và cs (2018)
	Ba Lan	8,6-10,7	48,7-49,1	-	-	Milek và cs (2019)
	Anh và một số nước châu Âu		17,3	5,8	3,5	Tregsakis và cs (2020)

Châu lục	Quốc gia	Tỷ lệ phát hiện (%)				Tài liệu tham khảo
		PPV1	PPV2	PPV3	PPV4	
Châu Mỹ	Mỹ	-	17,06	-	-	Xiao và cs (2012)
	Mỹ	-	-	-	1,9	Xiao và cs (2013)
	Bắc Mỹ	14,7	72,0	19,2	5,9	Opriessnig và cs (2014)
	Đông Nam Mexico	-	90,0	-	-	Garcia và cs (2020a)
Châu Phi	Nam Phi	29,1	21,8	5,5	43,6	Afolabi và cs (2019)
	Congo	-	-	17,5	-	Bisimwa và cs (2021)
	Namibia	37,0	-	-	-	Molini và cs (2022)

3.1.2.2. Tỷ lệ phát hiện PPV2

Kể từ khi được phát hiện lần đầu tiên tại Myanmar từ hai thập kỷ trước (Hijikata và cs, 2001), PPV2 đã được xác nhận là đồng tác nhân trong Hội chứng PRDC và bệnh PCVAD trên lợn. Tỷ lệ phát hiện PPV2 trên lợn nuôi ở bảy tỉnh miền Trung trong nghiên cứu của chúng tôi được trình bày ở Bảng 3.1 và Hình 3.11.



Hình 3.11. Tỷ lệ phát hiện PPV2 ở bảy tỉnh miền Trung

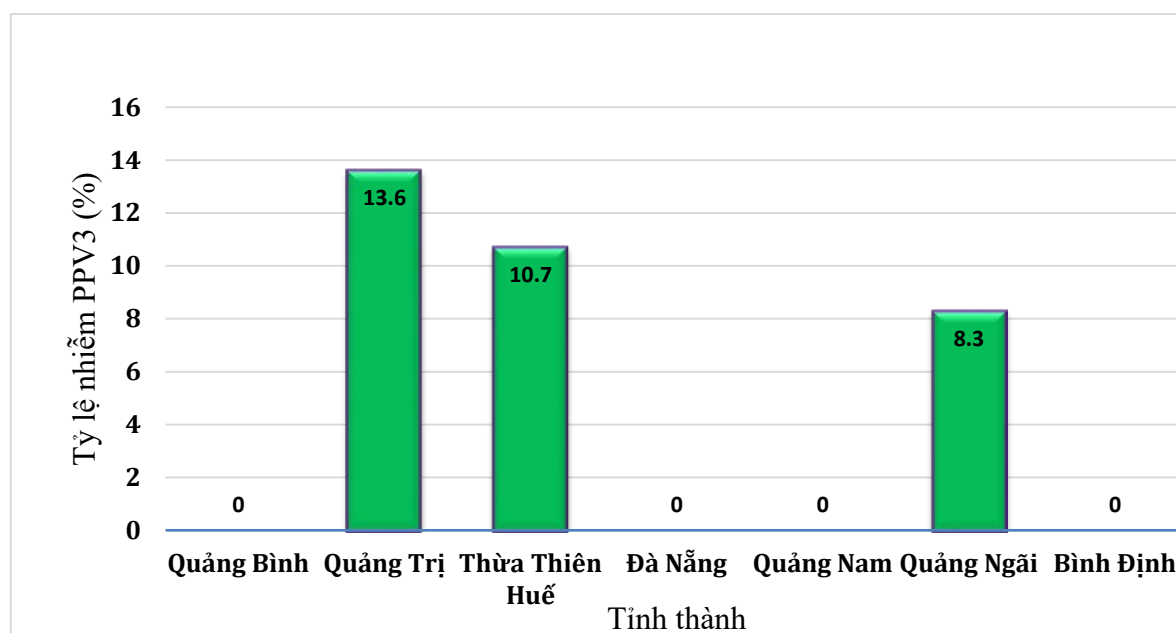
Số liệu ở Bảng 3.1 cho thấy PPV2 được phát hiện ở 6/7 tỉnh nghiên cứu với tỷ lệ là 56,2% (82/146) và PPV2 là chủng có tỷ lệ hiện diện cao nhất trong bốn chủng PPV được nghiên cứu. PPV2 được phát hiện với tỷ lệ cao nhất ở Quảng Bình (100%) và thấp nhất tại Quảng Nam (37,5%); không phát hiện PPV2 ở Đà Nẵng.

So với các nghiên cứu đã được tiến hành ở Việt Nam (Bảng 3.2), tỷ lệ phát hiện PPV2 ở miền Trung cao hơn so với kết quả nghiên cứu của Thuy và cs (2021) (Miền Bắc: 24,7%; miền Nam 11%; cả nước: 28%) và kết quả của Nguyen và cs (2022) trên các mẫu thu thập năm 2021 (3,4%) và thấp hơn kết quả phát hiện PPV2 từ các mẫu thu thập năm 2017 (61,6%) (Nguyen và cs, 2022).

Các nghiên cứu dịch tễ học về PPV2 đã báo cáo sự lưu hành của chúng trên toàn thế giới (Nelsen và cs, 2021), tuy nhiên, tỷ lệ phát hiện PPV2 là khác biệt giữa các quốc gia (Bảng 3.2). Tỷ lệ phát hiện PPV2 trong nghiên cứu của chúng tôi (56,2%) cao hơn so với kết quả nghiên cứu ở Myanmar (10% (Hijikata và cs, 2001)), Trung Quốc (39,6% (Sun và cs, 2015)), Nam Phi (21,8% (Afolabi và cs, 2019)) và một số nước châu Âu (6,4%-55% (Milek và cs, 2019; Novosel và cs, 2018; Streck và cs, 2013; Cadar và cs, 2013)) nhưng thấp hơn so với kết quả nghiên cứu ở Nhật Bản (58% -100% (Saekhow và cs, 2015)), Thái Lan (83% (Saekhow và Ikeda, 2015)) và một số nước châu Mỹ (90% (Garcia và cs, 2020a); 72% (Opriessnig và cs, 2014)).

3.1.2.3. Tỷ lệ phát hiện PPV3

PPV3 làm suy giảm khả năng miễn dịch (Amoroso và ctv, 2019), và đóng vai trò là yếu tố kích hoạt liên quan đến bệnh do PCV2 trên lợn (Patrick và ctv, 2014). Tỷ lệ phát hiện PPV3 trong bảy tỉnh nghiên cứu được trình bày ở Bảng 3.1 và Hình 3.12.



Hình 3.12. Tỷ lệ phát hiện PPV3 ở bảy tỉnh miền Trung

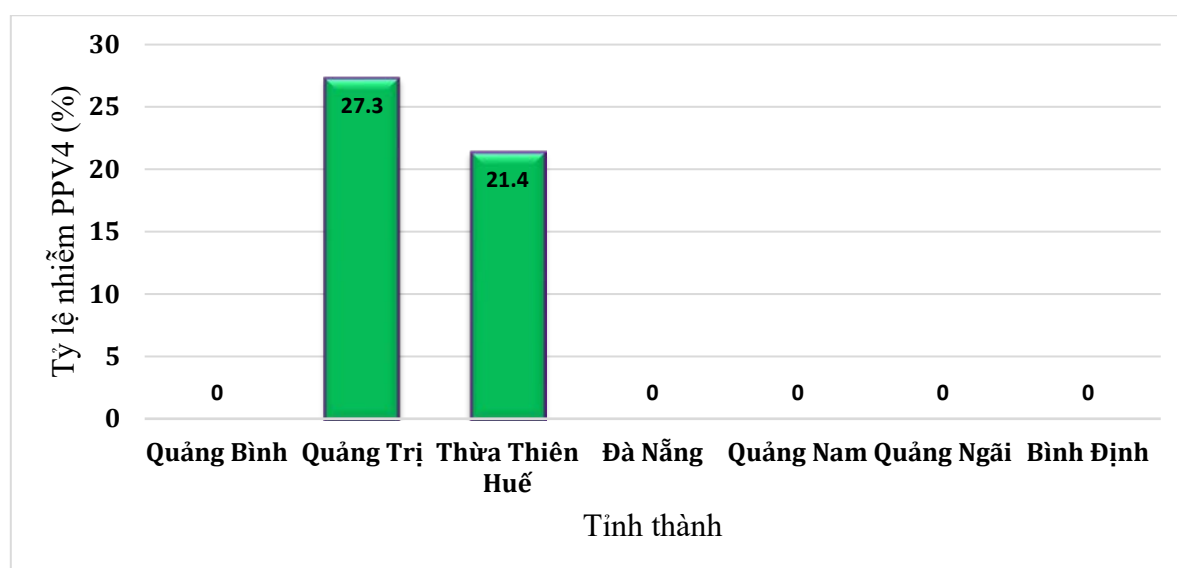
Số liệu ở Bảng 3.1 cho thấy sự hiện diện của PPV3 trên đàn lợn ở 3/7 tỉnh miền Trung đã được phát hiện với tỷ lệ 5,5% (8/146), thấp nhất trong số bốn

chủng PPV được khảo sát. Cụ thể, PPV3 lưu hành trên đàn lợn tại các tỉnh Quảng Trị, Thừa Thiên Huế và Quảng Ngãi với tỷ lệ dao động từ 8,3%-13,6%. Không phát hiện PPV3 trong các mẫu thu thập tại Quảng Bình, Quảng Nam, Đà Nẵng và Bình Định.

Tỷ lệ phát hiện PPV3 ở bảy tỉnh miền Trung (5,5%) thấp hơn so với các kết quả nghiên cứu trước đây ở Việt Nam (Miền Bắc: 43,2%; miền Nam: 6,9%; cả nước: 17,7% (Thuy và cs, 2021); 27,3%-46,5% (Nguyen và cs, 2022)). So với các kết quả nghiên cứu trên thế giới, tỷ lệ phát hiện PPV3 trong nghiên cứu của chúng tôi tương đương với kết quả của Afolabi và cs (2019) ở Nam Phi (5,5%) và thấp hơn so với kết quả nghiên cứu ở các quốc gia khác (Cui và cs, 2017; Sliz và cs, 2015; Saekhow và cs, 2015; Sun và cs, 2015; Saekhow và Ikeda, 2014; Streck và cs, 2013; Cadar và cs, 2013; Csa'gola và cs, 2012; Cadar và cs, 2011) (Bảng 3.2).

3.1.2.4. Tỷ lệ phát hiện PPV4

PPV4 là một trong các chủng PPV mới được phát hiện, được cho là liên quan đến Hội chứng PMWS và Hội chứng PRDC với vai trò là tác nhân đồng nhiễm. Tỷ lệ lưu hành của PPV4 trên lợn bảy tỉnh miền Trung được trình bày trong Bảng 3.1 và Hình 3.12.



Hình 3.13. Tỷ lệ phát hiện PPV4 ở bảy tỉnh miền Trung

Kết quả nghiên cứu đã phát hiện PPV4 lưu hành ở 2/7 tỉnh nghiên cứu (Hình 3.13) với tỷ lệ 8,2% (12/146) (Bảng 3.1), cho thấy chúng là chủng có mức độ phân bố địa lý hẹp nhất. Cụ thể, PPV4 chỉ được phát hiện tại Quảng Trị và Thừa Thiên Huế (trong các mẫu phổi) với tỷ lệ lần lượt là 27,3% và 21,4%; không phát hiện PPV4 trong các mẫu máu.

Tỷ lệ phát hiện PPV4 trên lợn tại các tỉnh miền Trung cao hơn so với kết quả nghiên cứu của Thụy và cs (2021) ở một số tỉnh miền Bắc (6,5%) và cả nước (7,8%), nhưng thấp hơn so với kết quả nghiên cứu trên phạm vi cả nước của Nguyen và cs (2022) (13,6%-51,2%). So với các công bố trên thế giới, tỷ lệ phát hiện PPV4 ở bảy tỉnh miền Trung cao hơn so với các kết quả nghiên cứu ở Mỹ (1,9%-5,9% (Opriessnig và cs, 2014; Xiao và cs, 2013)), Ba Lan (2,4% (Cui và cs, 2017)), nhưng lại thấp hơn so với tỷ lệ nhiễm PPV4 ở Nhật Bản (33% (Saekhow và cs, 2015)), Thái Lan (44% (Saekhow và Ikeda, 2014)), Trung Quốc (21,56% (Sun và cs, 2015)) và một số nước châu Âu như Hungary (21%) (Cságola và cs, 2012) và Đức (21,6%) (Streck và cs, 2013).

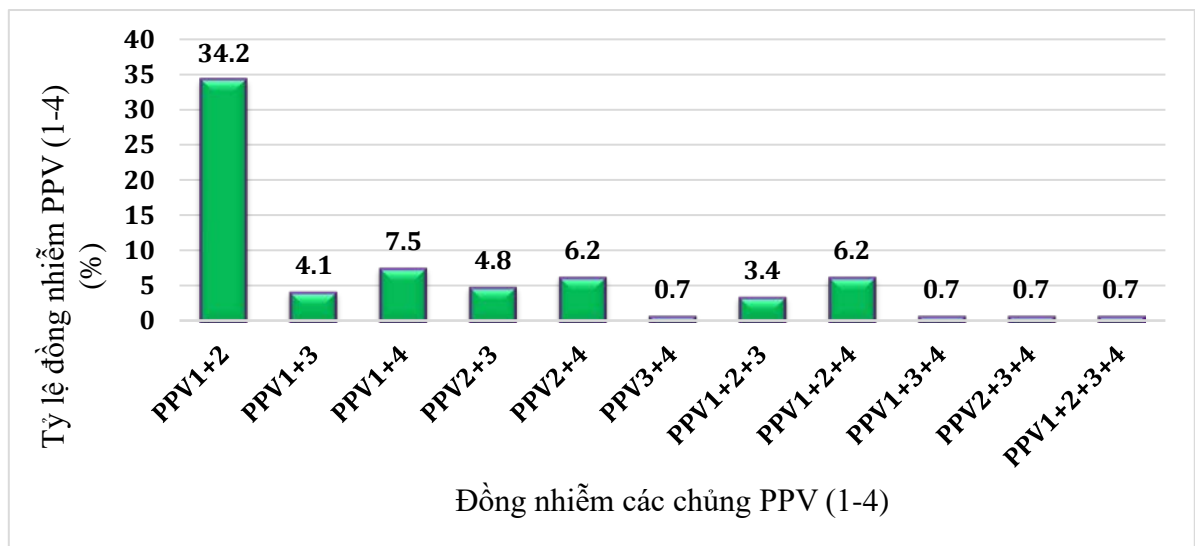
Tỷ lệ phát hiện PPV ở bảy tỉnh miền Trung tương đối cao (74,7%) có thể là do nguồn mẫu thu thập, loại mẫu. Bên cạnh đó, sự khác biệt về kết quả phát hiện PPV ở mỗi địa phương có thể được lý giải bởi sự khác biệt trong quản lý vệ sinh dịch tễ thú y ở địa phương đó. Một số dịch bệnh lưu hành ở lợn làm suy giảm sức đề kháng của lợn, tạo điều kiện cho sự nhân lên của PPV. Đồng thời, quy mô chăn nuôi ở các địa phương là một yếu tố quan trọng quyết định cho công tác chủ động phòng ngừa bệnh do PPV gây ra.

Kết quả phát hiện PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 với các mức độ khác nhau trong nghiên cứu của chúng tôi là báo cáo đầu tiên về sự lưu hành của PPV trên lợn nuôi ở bảy tỉnh miền Trung. Hiện tại, các loại vaccine phòng ngừa PPV lưu hành trên thị trường đều chỉ sử dụng chủng PPV1. Do đó, việc phát hiện bốn chủng PPV lưu hành ngoài thực địa sẽ là thông tin hỗ trợ cho việc đánh giá mức độ bảo hộ của các vaccine đang sử dụng, đồng thời cung cấp thông tin dịch tễ học hữu ích cho các nghiên cứu sản xuất vaccine phòng ngừa PPV trong tương lai.

3.1.3. Tỷ lệ đồng nhiễm các chủng PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4

Thông thường, lợn thường được phát hiện dương tính với nhiều hơn một chủng PPV (Thuy và cs, 2021). Đồng nhiễm các chủng PPV ở lợn có thể làm cho tình trạng bệnh trầm trọng hơn hoặc làm suy giảm hệ miễn dịch của lợn, tạo điều kiện thuận lợi cho nhiều loại mầm bệnh khác xâm nhập và gây bệnh (Qin và cs, 2018). Nghiên cứu mức độ đồng nhiễm các chủng PPV trên đàn lợn có thể cung cấp thông tin dịch tễ học quan trọng về mối quan hệ giữa mức độ đồng nhiễm và tình trạng bệnh diễn ra trên lợn. Bên cạnh đó, tỷ lệ đồng nhiễm các chủng PPV là thông tin có ý nghĩa cho việc lựa chọn kháng nguyên trong nghiên cứu sản xuất vaccine đa giá phòng ngừa PPV.

Nhằm đánh giá mức độ đồng nhiễm các chủng PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 trên lợn nuôi ở bảy tỉnh miền Trung Việt Nam, chúng tôi đã tiến hành thống kê kết quả phát hiện PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 trên từng mẫu dương tính. Kết quả đồng nhiễm các chủng PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 trên lợn ở các tỉnh miền Trung được trình bày ở Bảng 3.3 và Hình 3.14.



Hình 3.14. Tỷ lệ đồng nhiễm các chủng PPV PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 trên lợn ở bảy tỉnh miền Trung

Bảng 3.3. Tỷ lệ đồng nhiễm các chủng PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 trên lợn ở bảy tỉnh miền Trung

Địa phương	n	Tỷ lệ đồng nhiễm các chủng PPV (%)											
		PPV1+2	PPV1+3	PPV1+4	PPV2+3	PPV2+4	PPV3+4	PPV1+2+3	PPV1+2+4	PPV1+3+4	PPV2+3+4	PPV1+2+3+4	
Quảng Bình	17	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Quảng Trị	22	9 (40,9)	3 (13,6)	5 (22,8)	2 (9,1)	3 (13,6)	0 (0)	2 (9,1)	3 (13,6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
TT Huế	28	19 (67,9)	2 (7,1)	6 (21,4)	3 (10,7)	6 (21,4)	1 (3,6)	2 (7,1)	6 (21,4)	1 (3,6)	1 (3,6)	1 (3,6)	1 (3,6)
Đà Nẵng	14	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Quảng Nam	16	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Quảng Ngãi	24	15 (62,5)	1 (4,2)	0 (0)	2 (8,3)	0 (0)	0 (0)	1 (4,2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Bình Định	25	7 (28)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Tổng số	146	50 (34,2)	6 (4,1)	11 (7,5)	7 (4,8)	9 (6,2)	1 (0,7)	5 (3,4)	9 (6,2)	1 (0,7)	1 (0,7)	1 (0,7)	1 (0,7)

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi không phát hiện đồng nhiễm bất cứ chủng PPV nào ở ba tỉnh Quảng Bình, Đà Nẵng và Quảng Nam. Thừa Thiên Huế là địa phương phát hiện tất cả các đồng nhiễm 2/3/bốn chủng PPV, trong khi ở Bình Định, duy nhất đồng nhiễm PPV1/PPV2 được ghi nhận.

Bảng 3.4. Tỷ lệ đồng nhiễm các chủng PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 ở lợn

Quốc gia/Địa phương	Tỷ lệ đồng nhiễm PPV (%)								Tác giả
	PPV1 +2	PPV1 +3	PPV1 +4	PPV2 +3	PPV2 +4	PPV3 +4	PPV1 +2+3	PPV2 +3+4	
Hungari	0	0	0	1,27	1,0	1	-	-	Csagola và cs (2012)
Đức	32,0- 46,0	15,0	4,0	15	5,0	2,0	-	-	Streck và cs (2013)
Nam Phi	2,7	1,8	17,3	1,8	18,2	1,8	-	-	Afolabi và cs (2019)
Việt Nam	20,8	10,0	6,9	4,3	4,3	0,4	2,6	-	Thuy và cs (2021)
	0	1,1	1,1	1,1	-	0,5	-	2,3	Nguyen và cs (2022)
Miền Bắc Việt Nam	17,8	20,5	6,8	6,8	1,4	0	2,7	-	Thuy và cs (2021)
Miền Nam Việt Nam	5,6	1,4	0	0	0	0	0	-	

3.1.3.1. Tỷ lệ đồng nhiễm hai chủng PPV

Tỷ lệ đồng nhiễm PPV1/PPV2

Số liệu ở Bảng 3.3 cho thấy đồng nhiễm PPV1/PPV2 được phát hiện ở 4/7 tỉnh thành nghiên cứu và chiếm tỷ lệ cao nhất trong các loại đồng nhiễm với 34,2% (50/146). Xét theo địa phương, Thừa Thiên Huế là tỉnh có tỷ lệ đồng nhiễm PPV1/PPV2 cao nhất với 67,9% (19/28). Kết quả phát hiện đồng nhiễm

PPV1/PPV2 trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn so với các nghiên cứu được tiến hành tại Việt Nam và Nam Phi (Thuy và cs, 2021; Afolabi và cs, 2019) và thấp hơn so với kết quả nghiên cứu tại Đức của Streck và cs (2013).

Tỷ lệ đồng nhiễm PPV1/PPV3

Kết quả từ Bảng 3.3 cho thấy đồng nhiễm PPV1/PPV3 đã được phát hiện ở 3/7 tỉnh nghiên cứu với tỷ lệ là 4,1% (6/146). Quảng Trị là tỉnh được ghi nhận có tỷ lệ đồng nhiễm PPV1/PPV3 cao nhất (13,6%). Tỷ lệ đồng nhiễm PPV1/PPV3 trong nghiên cứu này (4,1%) cao hơn so với kết quả nghiên cứu tại miền Nam (1,4%) và thấp hơn so với kết quả nghiên cứu ở miền Bắc (Thuy và cs, 2021) (Bảng 3.4).

Tỷ lệ đồng nhiễm PPV1/PPV4

Hầu hết các mẫu dương tính với PPV4 trong nghiên cứu của chúng tôi đều đồng nhiễm với PPV1, chiếm tỷ lệ 7,5% (11/146) (Bảng 3.3). Mặc dù chỉ xuất hiện tại 2/7 tỉnh nghiên cứu nhưng tỷ lệ đồng nhiễm là khá cao ở mỗi tỉnh: 22,8% ở Quảng Trị và 21,4% ở Thừa Thiên Huế. Số liệu ở Bảng 3.4 cho thấy tỷ lệ đồng nhiễm PPV1/PPV4 ở các tỉnh miền Trung cao hơn so với kết quả của Thuy và cs (2021) ở các tỉnh miền Bắc (6,8%) và trên phạm vi cả nước (6,9%). Trên thế giới, đồng nhiễm PPV1/PPV4 chỉ được ghi nhận tại Đức và Nam Phi với tỷ lệ lần lượt là 4% và 17,3% (Streck và cs, 2013; Afolabi và cs, 2019).

Tỷ lệ đồng nhiễm PPV2/PPV3

Số liệu ở Bảng 3.3 cho thấy đồng nhiễm PPV2/PPV3 được phát hiện tại 3/7 tỉnh nghiên cứu với tỷ lệ 4,8% (7/146). Kết quả này thấp hơn so với nghiên cứu của Thuy và cs (2021) ở miền Bắc (6,8%) nhưng cao hơn so với các nghiên cứu trên phạm vi cả nước 1,1-4,3% (Thuy và cs, 2021; Nguyen và cs, 2022). Trên thế giới, đồng nhiễm PPV2/PPV3 cũng đã được phát hiện ở Hungari, Nam Phi và Đức với tỷ lệ lần lượt là 1,27%, 1,8% và 15% (Afolabi và cs, 2019; Streck và cs, 2013; Csagola và cs, 2012, Cadar và cs, 2013) (Bảng 3.4).

Tỷ lệ đồng nhiễm PPV2/PPV4

Đồng nhiễm PPV2/PPV4 đã được phát hiện ở 2/7 tỉnh miền Trung với tỷ lệ 6,2% (9/146) (Bảng 3.3). Cụ thể, đồng nhiễm PPV2/PPV4 được phát hiện tại Quảng Trị và Thừa Thiên Huế với tỷ lệ lần lượt là 13,6% (3/22) và 21,4% (6/28). Kết quả này cao hơn so với nghiên cứu của Thuy và cs (2021) ở các tỉnh miền Bắc (1,4%) và trên phạm vi cả nước 4,3%. Trên thế giới, đồng nhiễm PPV2/PPV4 đã được báo cáo tại Romania, Đức và Nam Phi với tỷ lệ lần lượt là 1%, 5% và 18,2%, (Afolabi và cs, 2019; Streck và cs, 2013; Csagola và cs, 2012) (Bảng 3.4).

Tỷ lệ đồng nhiễm PPV3/PPV4

Đồng nhiễm PPV3/PPV4 chỉ được phát hiện trong một mẫu duy nhất tại tỉnh Thừa Thiên Huế với tỷ lệ 0,7% (1/146) (Bảng 3.3). Nghiên cứu trên phạm vi toàn quốc của Thuy và cs (2021) và Nguyen và cs (2022) đã phát hiện đồng nhiễm PPV3/PPV4 với tỷ lệ lần lượt là 0,4% (1/231) và 0,5% (1/174). Trên thế giới, đồng nhiễm PPV3/PPV4 cũng được xác định ở mức độ khá thấp tại Hungari, Nam Phi và Đức với tỷ lệ lần lượt là 1% (4/392); 1,8% (2/110) và 2% (2/100) (Afolabi và cs, 2019; Streck và cs, 2013; Csagola và cs, 2012) (Bảng 3.4).

3.1.3.2. Tỷ lệ đồng nhiễm ba chủng PPV

Tỷ lệ đồng nhiễm PPV1/PPV2/PPV3

Đồng nhiễm PPV1/PPV2/PPV3 được phát hiện ở 3/7 tỉnh nghiên cứu (Bảng 3.3) với tỷ lệ 3,4% (5/146). Kết quả này cho thấy tỷ lệ đồng nhiễm PPV1/PPV2/PPV3 ở các tỉnh miền Trung cao hơn so với các tỉnh miền Bắc (2,7%) và phạm vi cả nước (2,6%) (Thuy và cs, 2021).

Tỷ lệ đồng nhiễm PPV1/PPV2/PPV4

Đồng nhiễm PPV1/PPV2/PPV4 được phát hiện với tỷ lệ 6,2% (9/146) (Bảng 3.3). Cụ thể, có ba trường hợp đồng nhiễm PPV1/PPV2/PPV4 được phát hiện tại Quảng Trị và sáu trường hợp được phát hiện tại Thừa Thiên Huế, tỷ lệ ở mỗi tỉnh lần lượt là 13,6% và 21,4%.

Tỷ lệ đồng nhiễm PPV1/PPV3/PPV4 và PPV2/PPV3/PPV4

Đồng nhiễm PPV1/PPV3/PPV4 và đồng nhiễm PPV2/PPV3/PPV4 được phát hiện trong nghiên cứu của chúng tôi với tỷ lệ 0,7% (1/146) (Bảng 3.3).

Nguyen và cs (2022) đã phát hiện đồng nhiễm PPV2/PPV3/PPV4 với tỷ lệ 2,3% trong các mẫu thu thập năm 2017 trên phạm vi toàn quốc.

3.1.3.3. Tỷ lệ đồng nhiễm bốn chủng PPV

Một mẫu thu được tại Thừa Thiên Huế dương tính với cả bốn chủng PPV1/PPV2/PPV3/PPV4, chiếm tỷ lệ 0,7% (1/146) (Bảng 3.3). Đây là lần đầu tiên đồng nhiễm bốn chủng PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 được ghi nhận tại Việt Nam. Theo hiểu biết của chúng tôi, chưa có trường hợp nào đồng nhiễm bốn chủng PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 được công bố trên thế giới.

Đồng nhiễm các chủng PPV hoặc đồng nhiễm PPV với các virus khác (PCV, PhoV...) lây nhiễm trên lợn đã được công bố bởi các nghiên cứu trước đây (Nguyen và cs, 2022; Afolabi và cs, 2019; Cadar và cs, 2013). Thông tin về mối liên quan giữa mức độ đồng nhiễm các chủng PPV và tình trạng bệnh do PPV gây ra trên lợn cho đến nay vẫn còn hạn chế, tuy nhiên đồng nhiễm các virus trên lợn có thể làm tình trạng bệnh trầm trọng hơn, hoặc gây nên các bệnh/hội chứng liên quan ở lợn (Qin và cs, 2018).

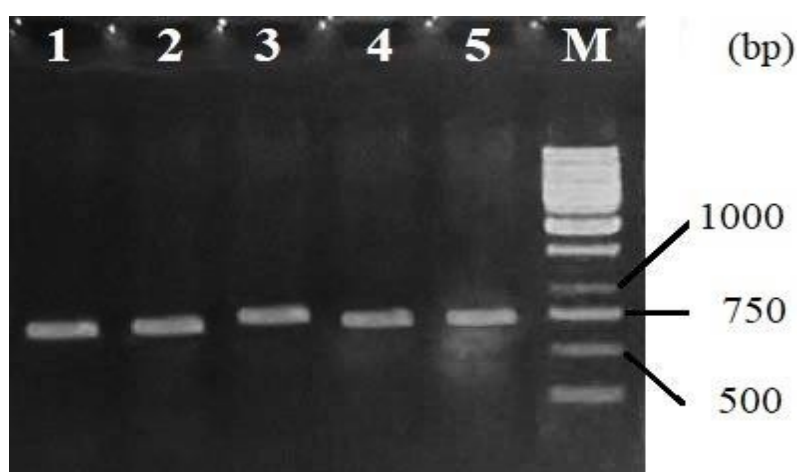
3.2. TRÌNH TỰ GEN MÃ HÓA PROTEIN CẤU TRÚC CÁC CHỦNG PPV TRÊN LỢN Ở CÁC TỈNH MIỀN TRUNG

Trong bốn chủng PPV nghiên cứu thì PPV1 là chủng đã được nhiều tác giả nghiên cứu và công bố ở Việt Nam (Giáp và cs, 2020; Cường, 2018). Mặc khác, kết quả nghiên cứu của chúng tôi về chủng PPV1 không khác biệt đáng kể so với các công bố trên và so với các chủng tham chiếu. Do đó, chúng tôi chọn PPV2, PPV3 và PPV4 để giải trình tự và phân tích đặc điểm phân tử gen mã hoá protein cấu trúc/hệ gen của chúng.

3.2.1. Trình tự gen mã hóa protein cấu trúc của các chủng PPV2

Gen *VP* (bao gồm gen *VP1* và gen *VP2*, với trình tự gen *VP1* bao trùm lên toàn bộ trình tự gen *VP2*) mã hóa cho protein capsid của PPV, đóng vai trò

quan trọng trong quá trình xâm nhập, quyết định tính kháng nguyên và phạm vi vật chủ của virus. Với tỷ lệ phát hiện cao nhất trong số bốn chủng PPV được khảo sát, PPV2 được lựa chọn để phân tích trình tự gen *VP* của chúng. Năm cặp mồi được thiết kế dựa trên trình tự PPV2 tham chiếu trên GenBank đã được sử dụng để khuếch đại gen *VP* của ba chủng PPV2 (PPV2-QN03, PPV2-HU10 và PPV2-QB05) phân lập được (Bảng 2.3). Sản phẩm PCR khuếch đại các đoạn gen *VP* của PPV2 được kiểm tra trên gel agarose 1% và kết quả được thể hiện ở Hình 3.15.



Hình 3.15. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại gen *VP* của PPV2. M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Mỹ); 1-5: Sản phẩm PCR khuếch đại gen mã hóa gen *VP* của PPV2 với các cặp mồi: (1) PPV2-P4 (721 bp); (2) PPV2-P5 (730 bp); (3) PPV2-P6 (773 bp); (4) PPV2-P7 (743 bp) và (5) PPV2-P8 (746 bp).

Sau khi được tinh sạch, sản phẩm PCR được giải trình tự trực tiếp bằng máy giải trình tự tự động ABI-3100 Avant Genetic Analyzer tại công ty MacroGen (Hàn Quốc) theo nguyên lý của Sanger, với mục đích thu nhận trình tự nucleotide gen *VP* của PPV2.

Kết quả cho thấy kích thước phân tử đoạn gen *VP* của ba chủng PPV2 phân lập được là 2.493 bp (2.493/3.099 bp), không có các đột biến thêm/mất nucleotide trong vùng mã hóa. Trình tự đoạn gen *VP* của ba chủng PPV2-QN03, PPV2-HU10 và PPV2-QB05 được đăng ký ở Cơ sở dữ liệu GenBank với mã số truy cập lần lượt là OL913365, OL913366 và OL913367. Tỷ lệ thành

phần nucleotide và giá trị độ lệch AT và GC trong trình tự gen VP của các chủng PPV2 ở các tỉnh miền Trung được trình bày ở Bảng 3.5.

Bảng 3.5. Tỷ lệ thành phần nucleotide và giá trị độ lệch trong trình tự gen VP của các chủng PPV2 phân lập ở miền Trung

Chủng	Tên chủng	Trình tự	Kích thước (bp)	A (%)	T (%)	G (%)	C (%)	A+T (%)	AT-skew	G+C (%)	GC-skew
PPV2	QN03	Gen VP	2.493	25,3	20,8	29,6	24,2	46,1	0,097	53,9	0,1
	HU10			25,3	20,8	29,6	24,3	46,1	0,098	53,9	0,1
	QB05			25,3	20,4	29,9	24,4	45,7	0,108	54,3	0,099

Bảng 3.5 cho thấy tỷ lệ các loại nucleotide A, T, G, C, (A+T) và (G+C) của gen VP ở các chủng PPV2 không sai khác lớn: A=25,3%; T=20,4-20,8%; G=29,6%; C=24,2-24,4% và thành phần (A+T)=45,7- 46,1% và (G+C)=53,9-54,3%. Giá trị độ lệch AT-skew và GC-skew đều mang giá trị dương, nên tỷ lệ thành phần bốn loại nucleotide trong trình tự gen VP của các chủng PPV2 phân lập tại miền Trung có mô hình tương tự nhau: G>A>C>T.

3.2.2. Trình tự hệ gen của các chủng PPV4

3.2.2.1. Trình tự hệ gen của các chủng PPV4 phân lập ở miền Trung Việt Nam

Nghiên cứu của chúng tôi lần đầu tiên phát hiện sự lưu hành của PPV4 ở khu vực miền Trung Việt Nam. Nhằm tìm hiểu đặc điểm phân tử và khảo sát tính đa dạng của chúng, các mẫu dương tính với chủng PPV4 được chọn để phân tích trình tự hệ gen. Bảy cặp mồi sử dụng để khuếch đại hệ gen của các chủng PPV4 được tham khảo từ nghiên cứu trước đây của Csagola và cs (2012) (Bảng 2.5). Sản phẩm PCR khuếch đại các đoạn gen cấu thành hệ gen hoàn chỉnh của PPV4 được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%, sau đó được tinh sạch và giải trình tự trực tiếp bằng máy giải trình tự tự động ABI-3100 Avant Genetic Analyzer theo nguyên lý của Sanger tại công ty Macrogen (Hàn Quốc). Kết quả giải trình tự cho thấy kích thước phân tử hệ gen của hai chủng PPV4 phân lập trong nghiên cứu này là 5.367 bp; bao gồm ba khung đọc mở ORF1,

ORF2 và ORF3; không có các đột biến thêm/mất nucleotide trong vùng mã hóa. Trình tự hệ gen PPV4 của hai chủng PPV4-QT02 và PPV4-QT20 đã được gửi vào Cơ sở dữ liệu GenBank với mã số truy cập MT434668 và MT434669. Tỷ lệ thành phần nucleotide và giá trị độ lệch AT và GC trong trình tự hệ gen của các chủng PPV4 phân lập các tỉnh miền Trung được trình bày ở Bảng 3.6.

Bảng 3.6. Tỷ lệ thành phần nucleotide và giá trị độ lệch trong trình tự hệ gen của các chủng PPV4 phân lập tại miền Trung

Chủng	Tên chủng	Trình tự	Kích thước (bp)	A (%)	T (%)	G (%)	C (%)	A+T (%)	AT-skew	G+C (%)	GC-skew
PPV4	QT02	Hệ gen	5.387	33,0	25,2	22,5	19,3	58,2	0,135	41,8	0,078
	QT20			33,0	25,2	22,5	19,3	58,2	0,135	41,8	0,075

Số liệu ở Bảng 3.6 cho thấy tỷ lệ thành phần nucleotide trong trình tự hệ gen các chủng PPV4 phân lập ở miền Trung có một sự tương đồng gần như tuyệt đối, cụ thể tỷ lệ thành phần A=33%; T=25,2%; G=22,5%; C=19,3% và tỷ lệ tổng thể là A+T=58,2% và G+C=48,1%. Giá trị độ lệch AT-skew và GC-skew đều mang giá trị dương nên tỷ lệ thành phần nucleotide của các chủng PPV4 phân lập trong nghiên cứu này là A>T>G>C.

3.2.2.2. Trình tự gen VP của các chủng PPV4 phân lập ở miền Trung Việt Nam

Trình tự gen VP của hai chủng PPV4 được phân lập tại miền Trung Việt Nam (PPV4-QT02 và PPV4-QT20) đã được xác định và phân tích thông qua giải trình tự toàn bộ hệ gen PPV4 như được trình bày ở Mục 3.4.1.1. Kích thước phân tử gen VP của hai chủng PPV4 phân lập trong nghiên cứu này là 2.187 bp, nằm trong khung đọc mở ORF2, không có các đột biến thêm/mất nucleotide trong vùng mã hóa. Tỷ lệ thành phần nucleotide và giá trị độ lệch AT và GC trong trình tự gen VP của các chủng PPV4 phân lập các tỉnh miền Trung được trình bày ở Bảng 3.7.

Bảng 3.7. Tỷ lệ thành phần nucleotide và giá trị độ lệch trong trình tự gen VP của các chủng PPV4 phân lập tại miền Trung

Chủng	Tên chủng	Trình tự	Kích thước (bp)	A (%)	T (%)	G (%)	C (%)	A+T (%)	AT-skew	G+C (%)	GC-skew
PPV4	QT02	Gen	2187	34,3	24,7	20,3	20,7	59,0	0,163	41,0	-0,001
	QT20	VP		34,3	24,8	20,2	20,7	59,1	0,162	40,9	-0,001

Như được thể hiện trong Bảng 3.7, tỷ lệ thành phần nucleotide của hai chủng PPV4 phân lập tại miền Trung không có sự chênh lệch đáng kể (A=34,3%; T=24,7-24,8%; G=20,2-20,3%; C=20,7%), tỷ lệ tổng thể A+T và G+C lần lượt ở mức 59% và 41%. Khác với PPV2, giá trị độ lệch GC-skew trong gen VP của PPV4 mang giá trị âm, thể hiện nucleotide loại C chiếm số lượng nhiều hơn loại G. Tỷ lệ thành phần nucleotide trong gen VP của PPV4 phân lập trong nghiên cứu này là $A > T > C > G$.

3.2.2.3. Trình tự khung đọc mở ORF3 của các chủng PPV4 phân lập ở miền Trung Việt Nam

Cho đến hiện tại, PPV4 là chủng PPV duy nhất có khung đọc mở ORF3 trong cấu trúc hệ gen. ORF3 nằm giữa ORF1 và ORF2, không trùng lặp với hai khung đọc mở chính này và mã hóa cho protein nhân (NP1) (Cheung và cs, 2010; Huang và cs, 2010). Trình tự khung đọc mở ORF3 của hai chủng PPV4 phân lập tại Quảng Trị lần đầu tiên được xác định và phân tích thông qua giải trình tự toàn bộ hệ gen PPV4. Độ dài trình tự khung đọc mở ORF3 của hai chủng PPV4 phân lập trong nghiên cứu này là 615 bp, không có các đột biến thêm/mất nucleotide trong vùng mã hóa. Tỷ lệ thành phần nucleotide và giá trị độ lệch AT và GC trong trình tự ORF3 của các chủng PPV4 phân lập các tỉnh miền Trung được trình bày trong Bảng 3.8.

Bảng 3.8. Tỷ lệ thành phần nucleotide và giá trị độ lệch trong trình tự ORF3 của các chủng PPV4 phân lập tại miền Trung

Chủng	Tên chủng	Trình tự	Kích thước (bp)	A (%)	T (%)	G (%)	C (%)	A+T (%)	AT-skew	G+C (%)	GC-skew
PPV4	QT02	ORF3	615	34,6	26,2	21,0	18,2	60,8	0,139	39,2	0,141
	QT20			34,8	26,2	20,8	18,2	61,0	0,071	39,0	0,067

Số liệu ở Bảng 3.8 cho thấy tỷ lệ từng loại nucleotide trong trình tự ORF3 của các chủng PPV4 phân lập trong nghiên cứu này là A=34,6-34,8%; T=26,2%; G=20,8-21%; C=18,2%; tỷ lệ A+T chiếm xấp xỉ 61% và G+C chiếm khoảng 39%. Độ lệch AT-skew và GC-skew đều đạt giá trị dương nên tỷ lệ thành phần nucleotide trong trình tự ORF3 tương tự như trình tự hệ gen PPV4 với công thức: A>T>G>C.

3.2.3. Trình tự vùng gen *NSI/VPI* của các chủng PPV3

Trình tự vùng gen *NSI/VPI* của hai chủng PPV3-QN16 và PPV3-QT4 đã được khuếch đại với cặp mồi đặc hiệu (Bảng 2.3). Kết quả giải trình tự sản phẩm PCR theo nguyên lý Sanger đã thu được trình tự nucleotide có kích thước 995 bp (trong đó, 229 bp thuộc gen *NSI* và 766 bp thuộc gen *VPI*). Kết quả phân tích trình tự đoạn gen kích thước 995 bp không phát hiện các đột biến thêm/mất nucleotide. Đây là những thông tin ban đầu và là dữ liệu phân tử đầu tiên của các chủng PPV3 phân lập tại miền Trung.

3.3. ĐẶC ĐIỂM PHÂN TỬ GEN MÃ HÓA PROTEIN CẤU TRÚC CỦA PPV PHÂN LẬP Ở CÁC TỈNH MIỀN TRUNG

3.3.1. Đặc điểm phân tử gen mã hóa protein cấu trúc các chủng PPV2 phân lập ở các tỉnh miền Trung

3.3.1.1. Đặc điểm trình tự nucleotide gen *VP* của PPV2

Nhằm phân tích và đánh giá sự biến đổi di truyền trong trình tự nucleotide gen *VP* của ba chủng PPV2 phân lập tại miền Trung (PPV2- QN03, PPV2-

HU10 và PPV2-QB05), các chủng PPV2 tham chiếu bao gồm chủng PPV2 “nguyên thủy” phân lập tại Myanmar (AB076669), các chủng PPV2 được phân lập tại Trung Quốc (KP245940, KP245943, KP245944, MK092387, MK092408, MN326142, MN326185, MZ577029, MG345016), các chủng có nguồn gốc từ các nước châu Âu (KY586144, KX517759, KC701296, KC687100, JQ860238, JQ860240, JQ860243, JQ860248) và châu Mỹ (JX101461, KF725662) đã được lựa chọn (Bảng 2.4). Kết quả so sánh trình tự nucleotide gen *VP* của các chủng PPV2 phân lập tại miền Trung và các chủng tham chiếu được trình bày ở Hình 3.16.

AB076669	PPV2-MYA	370	400	410	430	440	450	460
OL913365	PPV2 QN03-VN	AGGCG	GGATA	GCCACGA	TGGTTTA	TTCGCTGACAAGGTCCGTTTACCTGA	A	C
OL913366	PPV2 HU10-VN
OL913367	PPV2 QB05-VN
KY586144	PPV2-BRA
KP245944	PPV2 K-CHN
KP245943	PPV2 G-CHN
KP245940	PPV2 A-CHN
MG345016	PPV2 S16-CHN
MN326142	PPV2 GD6-CHN
MK092387	PPV2 DJH25-CHN
MN326185	PPV2 GD12-CHN
MZ577029	PPV2-CHN
MK092408	PPV2 JX32-CHN
KX517759	PPV2-HUG
KC701296	PPV2-HUG
JQ860238	PPV2 F7-1BV-ROM
JQ860240	PPV2 F3-12R-ROM
JQ860243	PPV2 WB-102R2-ROM
JQ860248	PPV2 WB-826MR-ROM
KC687100	PPV2 642-CRO
JX101461	PPV2 135-US
KF725662	PPV2-US
AB076669	PPV2-MYA	660	670	740	760	770	780	
OL913365	PPV2 QN03-VN	AGCAACCTCAGCC	TCTGGACGGGCT	CCGGACGGGAAGGAGATTCCCCCTCTA	A	C	A	
OL913366	PPV2 HU10-VN	
OL913367	PPV2 QB05-VN	
KY586144	PPV2-BRA	
KP245944	PPV2 K-CHN	
KP245943	PPV2 G-CHN	
KP245940	PPV2 A-CHN	
MG345016	PPV2 S16-CHN	
MN326142	PPV2 GD6-CHN	
MK092387	PPV2 DJH25-CHN	
MN326185	PPV2 GD12-CHN	
MZ577029	PPV2-CHN	
MK092408	PPV2 JX32-CHN	
KX517759	PPV2-HUG	
KC701296	PPV2-HUG	
JQ860238	PPV2 F7-1BV-ROM	
JQ860240	PPV2 F3-12R-ROM	
JQ860243	PPV2 WB-102R2-ROM	
JQ860248	PPV2 WB-826MR-ROM	
KC687100	PPV2 642-CRO	
JX101461	PPV2 135-US	
KF725662	PPV2-US	
AB076669	PPV2-MYA	800	820	870	960	990	1000	1090
OL913365	PPV2 QN03-VN	ATGGACC	GAAAA	ATC	CATACCGT	CGGACACTATGATGGGAA	AGAGCT	
OL913366	PPV2 HU10-VN
OL913367	PPV2 QB05-VN
KY586144	PPV2-BRA
KP245944	PPV2 K-CHN
KP245943	PPV2 G-CHN
KP245940	PPV2 A-CHN
MG345016	PPV2 S16-CHN
MN326142	PPV2 GD6-CHN
MK092387	PPV2 DJH25-CHN
MN326185	PPV2 GD12-CHN
MZ577029	PPV2-CHN
MK092408	PPV2 JX32-CHN
KX517759	PPV2-HUG
KC701296	PPV2-HUG
JQ860238	PPV2 F7-1BV-ROM
JQ860240	PPV2 F3-12R-ROM
JQ860243	PPV2 WB-102R2-ROM
JQ860248	PPV2 WB-826MR-ROM
KC687100	PPV2 642-CRO
JX101461	PPV2 135-US
KF725662	PPV2-US
AB076669	PPV2-MYA	1790	1800	1810	1870	1920	1930	1950
OL913365	PPV2 QN03-VN	TCAGATTATACGGTTC	TGTC	TCCGCAGT	TGTATCCGGTACTACTA	CCAGTG		
OL913366	PPV2 HU10-VN
OL913367	PPV2 QB05-VN
KY586144	PPV2-BRA
KP245944	PPV2 K-CHN
KP245943	PPV2 G-CHN
KP245940	PPV2 A-CHN
MG345016	PPV2 S16-CHN
MN326142	PPV2 GD6-CHN
MK092387	PPV2 DJH25-CHN
MN326185	PPV2 GD12-CHN
MZ577029	PPV2-CHN
MK092408	PPV2 JX32-CHN
KX517759	PPV2-HUG
KC701296	PPV2-HUG
JQ860238	PPV2 F7-1BV-ROM
JQ860240	PPV2 F3-12R-ROM
JQ860243	PPV2 WB-102R2-ROM
JQ860248	PPV2 WB-826MR-ROM
KC687100	PPV2 642-CRO
JX101461	PPV2 135-US
KF725662	PPV2-US

Hình 3.16. Kết quả so sánh trình tự nucleotide gen VP của các chủng PPV2 phân lập tại miền Trung so với các chủng tham chiếu

Hình 3.16 cho thấy các điểm biến đổi nucleotide trên trình tự gen *VP* của 3 chủng PPV2 phân lập tại miền Trung (PPV2-QN03, PPV2-HU10 và PPV2-QB05), trong đó có 4 vị trí thay thế nucleotide chỉ phát hiện ở chủng PPV2-QN03 khác biệt hoàn toàn so với các chủng tham chiếu có trên cơ sở dữ liệu GenBank ở thời điểm nghiên cứu. Các vị trí đột biến thay thế nucleotide và amino acid dự đoán từ trình tự gen *VP* của ba chủng PPV2 phân lập tại miền Trung khác biệt so với các chủng tham chiếu được trình bày trong Bảng 3.9.

Bảng 3.9. Vị trí thay thế nucleotide và amino acid dự đoán từ trình tự gen *VP* của chủng PPV2-QN03 phân lập tại miền Trung so với các chủng tham chiếu

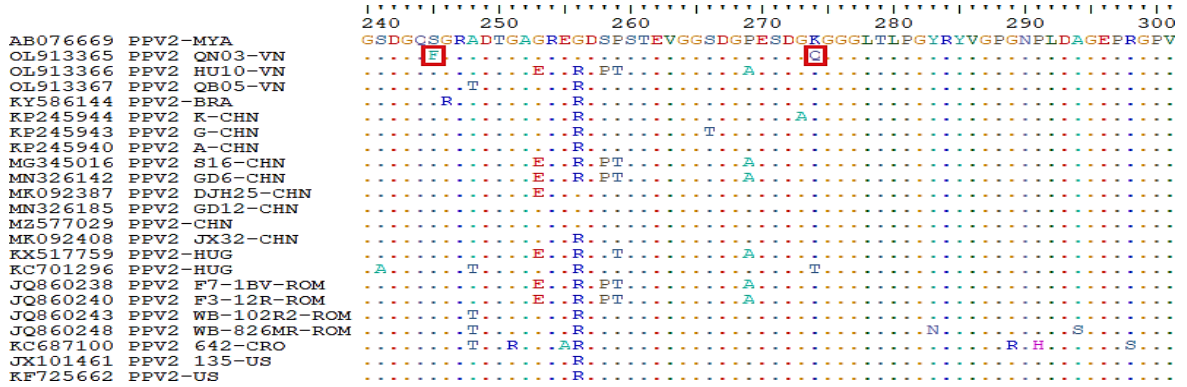
Chủng	Vị trí thay thế nucleotide	Vị trí thay thế amino acid
PPV2-QN03 (OL913365)	444: T→A	-
	734: C→T	245: S→F
	820: A→C	274: K→Q
	1794: T→A	-

Số liệu ở Bảng 3.9 cho thấy trong số 3 chủng PPV2 phân tích trình tự gen (PPV2-QN03, PPV2-HU10 và PPV2-QB05), 4 vị trí thay thế nucleotide khác biệt hoàn toàn so với các chủng tham chiếu chỉ phát hiện ở chủng PPV2-QN03 (Mã số GenBank: OL913365), bao gồm: 444: T→A, 734: C→T, 820: A→C, 1794: T→A (Hình 7E, Phụ lục 7). Đây là các biến đổi mới xuất hiện trong trình tự gen *VP* của các chủng PPV2 phân lập tại miền Trung Việt Nam và chưa thấy được ghi nhận ở các chủng PPV2 đã công bố trên thế giới, do đó, cần giám sát nguồn lan truyền của các đột biến này hoặc có thể chúng là những đột biến nội tại của các chủng PPV2 nghiên cứu.

3.3.1.2. Đặc điểm trình tự amino acid dự đoán từ gen *VP* của PPV2

Trong nghiên cứu đặc điểm phân tử các gen mã hóa protein, việc xác định vị trí codon/amino acid tiềm năng đóng vai trò quan trọng. Các vị trí này vừa xác định xu hướng đột biến ở cấp độ nucleotide, vừa kiểm tra áp lực chọn lọc đối với các vị trí codon/amino acid để suy luận quá trình tiến hóa phân tử (Gupta và Vadde, 2023). Gen *VP* của các chủng PPV2 phân lập trong nghiên cứu của

chúng tôi có kích thước phân tử 2.493 nucleotide và mã hóa cho 831 amino acid. Một số vị trí thay thế trong trình tự nucleotide đã dẫn đến sự khác biệt trong trình tự amino acid dự đoán. Kết quả so sánh trình tự amino acid dự đoán của ba chủng PPV2 phân lập trong nghiên cứu này với các chủng PPV2 tham chiếu trên GenBank được trình bày ở Hình 3.17.



Hình 3.17. Kết quả so sánh trình tự amino acid dự đoán gen VP của các chủng PPV2 phân lập tại miền Trung so với các trình tự tham chiếu

Hình 3.17 cho thấy hai vị trí thay thế trong trình tự amino acid dự đoán của chủng PPV2-QN03 (245: S → F, 274: K → Q). Không có vị trí đột biến thay thế nào được quan sát trong trình tự amino acid dự đoán của hai chủng PPV2-HU10 và PPV2-QB05 (Bảng 3.9, Hình 3.17).

Cơ sở di truyền của việc gây bệnh do PPV chưa được xác định, nhưng các protein cấu trúc đóng một vai trò quan trọng trong việc gây ra các tính chất bệnh khác nhau. Thay thế amino acid ở một số vị trí quan trọng trên bề mặt vỏ capsid của PPV nói chung và PPV2 nói riêng được cho là chịu trách nhiệm đối với sự thay đổi các đặc tính sinh học của virus và là yếu tố quyết định trong việc hình thành các phân nhóm di truyền (Sun và cs, 2015; Streck và cs, 2011; Soares và cs, 2003; Simpson và cs, 2002; Hao và cs, 2001).

Kết quả so sánh đột biến thay thế amino acid ở các vị trí quan trọng trong trình tự amino acid dự đoán của các chủng PPV2 phân lập tại Việt Nam với kết quả của các nghiên cứu trước đây (Sun và cs, 2015; Cadar và cs, 2013) được trình bày ở Bảng 3.10.

Bảng 3.10. Các vị trí thay thế quan trọng trong trình tự amino acid dự đoán từ gen VP của các chủng PPV2 phân lập tại miền Trung so với các chủng tham chiếu

Quốc gia	Vị trí Chủng	Năm phân lập	A		B			C					
			245	274	269	442	714	349	437	598	689	784	796
Myamar	AB076669	2001	S	K	P	D	Q	S	D	D	T	M	Q
Việt Nam	OL913365 QN03	2019	F	Q	P	D	S	S	D	E	T	M	Q
	OL913366 HU10		S	K	A	K	N	S	D	D	T	I	E
	OL913367 QB05		S	K	P	H	N	S	Y	E	S	M	Q
Brazil	KY586144	2017	S	K	P	D	Q	S	D	D	S	M	Q
Trung Quốc	KP245944	2014	S	K	P	D	G	R	E	E	S	I	E
	KP245943		S	K	P	D	G	R	E	E	S	I	E
	KP245940		S	K	P	D	G	R	E	E	S	I	E
	MK092387	2018	S	K	P	D	N	S	D	D	T	M	Q
	MK092408		S	K	P	D	N	S	D	D	T	M	Q
	MN326142	2019	S	K	A	D	S	S	D	D	T	M	Q
	MN326185		S	K	P	D	S	S	D	D	T	M	Q
	MG345016	2017	S	K	A	D	S	S	D	D	T	I	E
MZ577029	2021	S	K	P	D	S	S	D	D	T	M	Q	

Quốc gia	Vị trí Chủng	Năm phân lập	A		B			C					
			245	274	269	442	714	349	437	598	689	784	796
Hungary	KX517759	2016	S	K	A	D	S	S	D	D	T	M	Q
	KC701296	2013	S	T	P	D	N	S	D	D	S	M	Q
Romania	JQ860238	2012	S	K	A	K	N	S	D	D	T	I	E
	JQ860240		S	K	A	D	N	S	D	D	T	I	E
	JQ860243		S	K	P	H	N	S	Y	E	S	M	Q
	JQ860248		S	K	P	D	N	S	Y	D	S	M	Q
Cromania	KC687100	2013	S	K	P	D	Q	S	D	D	T	M	Q
Mỹ	JX101461	2012	S	K	P	D	G	R	E	E	S	I	E
	KF725662	2013	S	K	P	N	S	S	D	D	S	M	Q

A: Vị trí đột biến ở các chủng Việt Nam khác biệt so với các chủng tham chiếu

B: Vị trí đột biến chịu áp lực chọn lọc tích cực (Cadar và cs, 2013)

C: Vị trí đột biến quan trọng xác định phân nhóm di truyền (Sun và cs, 2015).

Số liệu trình bày ở Bảng 3.10 cho thấy hai vị trí thay thế amino acid (245: S→F và 274: K→Q) phát hiện ở chủng PPV2-QN03 hoàn toàn khác biệt so với các chủng PPV2 tham chiếu.

Vị trí của các biến thể di truyền chịu áp lực chọn lọc là một thông tin quan trọng trong nghiên cứu tiến hóa phân tử của các gen mã hóa protein (Gupta and Vadde, 2023). Bên cạnh đó, quá trình tiến hóa thích nghi thường xảy ra theo từng đợt, tập trung ở một vài vị trí trong trình tự nucleotide và ở một số phân nhóm di truyền trong cây phát sinh chủng loại (Pond và cs, 2011). Trong trình tự amino acid dự đoán gen *VP* của PPV2, hai vị trí amino acid 269 và 1010 được xác định là đối tượng chịu áp lực chọn lọc tích cực (Cadar và cs, 2013). Hai vị trí này chỉ được phát hiện ở các chủng PPV2 có nguồn gốc từ lợn nhà mà không xuất hiện ở các chủng có nguồn gốc từ lợn rừng hoang dã. Dữ kiện này đã chứng minh vai trò quan trọng của hai vị trí thay thế amino acid 269 và 1010 trong quá trình tiến hóa thích ứng của PPV2. Hơn nữa, đột biến thay thế amino acid ở vị trí 269: P→A nằm trong vùng tương ứng với gai ba lớp (three-fold spike) của tiểu đơn vị capsid - được xem là vùng bề mặt kháng nguyên phổ biến của Parvovirus (Cadar và cs, 2013; Chapman và Rossmann, 1993). Ngoài ra, hai vị trí amino acid 442 và 714 được xác định là vị trí chịu áp lực chọn lọc theo từng đợt trong quá trình tiến hóa của PPV2 (Cadar và cs, 2013).

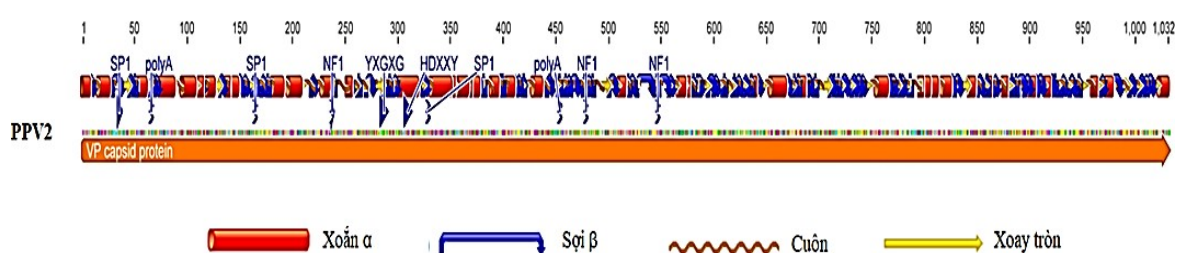
Kết quả nghiên cứu của chúng tôi đã phát hiện đột biến ở vị trí 269: P→A trong trình tự amino acid dự đoán của chủng PPV2-HU10. Đột biến ở vị trí 269: P→A cũng được phát hiện ở một số chủng PPV2 châu Âu được phân lập trong giai đoạn 2012-2016 và các chủng Trung Quốc phân lập vào năm 2017 và 2019 (Bảng 3.10). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi đã phát hiện đột biến thay thế amino acid ở các vị trí chịu áp lực chọn lọc theo từng đợt trong quá trình tiến hóa phân tử của gen *VP* ở PPV2. Đột biến thay thế amino acid 442: D→K được phát hiện ở chủng PPV2-HU10 và thay thế amino acid 442: D→H được phát hiện ở chủng PPV2-QB05. Các đột biến tương tự ở vị trí 442 cũng được phát hiện ở các

chủng PPV2 có nguồn gốc từ Romania. Đối với vị trí 714, đột biến thay thế amino acid được phát hiện ở cả ba chủng PPV2 phân lập trong nghiên cứu này. Thay thế amino acid ở vị trí 714: Q→S được phát hiện ở chủng PPV2-QN03 và các chủng có nguồn gốc từ: Trung Quốc (2017- 2021), Hungari (2016) và Mỹ (2013). Thay thế 714: Q→N được phát hiện ở chủng PPV2-HU10, chủng PPV2-QB05, các chủng có nguồn gốc từ Trung Quốc được phân lập năm 2018, chủng Hungari (2013) và các chủng Romania (2012) (Bảng 3.10).

Theo Sun và cs (2015), thay thế amino acid ở một số vị trí: 349, 437, 598, 689, 784 và 796 đóng vai trò quan trọng trong việc hình thành các phân nhóm di truyền khác nhau của PPV2 (Sun và cs, 2015). Phân tích trình tự amino acid dự đoán của các chủng PPV2 phân lập tại miền Trung Việt Nam đã phát hiện một số thay thế amino acid tại một số vị trí quan trọng (Bảng 3.10). Cụ thể, thay thế amino acid tại vị trí 437: D→Y đã được phát hiện ở chủng PPV2-HU10; đột biến thay thế amino acid ở vị trí 589: D→E được tìm thấy ở chủng PPV2-QN03 và chủng PPV2-QB05. Đột biến thay thế ở vị trí 689 (T→S) được phát hiện trong trình tự amino acid dự đoán của chủng PPV2-QB05 và các chủng có nguồn gốc từ châu Âu, Mỹ và Trung Quốc (phân lập năm 2014). Mặt khác, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng đã phát hiện đột biến thay thế amino acid ở hai vị trí 784: M→I và 796: Q→E ở chủng PPV2-HU10 và các chủng có nguồn gốc từ Romania (phân lập năm 2012) và Trung Quốc (phân lập năm 2014 và 2017). Những phát hiện này cho thấy các chủng PPV2 lưu hành tại miền Trung bộc lộ những đặc điểm di truyền khác biệt so với chủng tham chiếu được phân lập ở Myanmar và thể hiện sự tương đồng với các chủng có nguồn gốc từ châu Âu và Trung Quốc.

Các motif đặc trưng trong trình tự gen mã hóa protein cấu trúc của PPV2 được phát hiện bởi Cadar và cs (2013) (Hình 3.18) bao gồm: Hai motif được bảo tồn (YXGXG và HDXXY) liên kết với enzyme phospholipase A2 (sPLA2) liên quan đến khả năng lây nhiễm và tích hợp hệ gen virus vào hệ gen vật chủ

với vị trí lần lượt là 285 và 308 (Cadaru và cs, 2013; Zádori và cs, 2001; Girod và cs, 2002); tín hiệu polyadenyl hóa (Polyadenylation Signal- PAS) (AATAAA) có vai trò quan trọng trong quá trình biến đổi mRNA sau phiên mã (Fang và cs, 2022; Zhang và cs, 2022); vị trí liên kết yếu tố phiên mã SP1 (GGGCGG) và vị trí liên kết yếu tố phiên mã và sao chép NF1 (TTGGC). Bên cạnh đó, Hình 3.18 cũng thể hiện vị trí của các vùng cuộn xoắn α và chuỗi β trong mô hình cấu trúc bậc hai của protein VP ở PPV2.



Hình 3.18. Các motifs đặc trưng trong trình tự nucleotide gen VP của PPV2 (Cadaru và cs, 2013)

Kết quả phát hiện đột biến tại vị trí của các motif đặc trưng trong trình tự gen VP của PPV2 phân lập ở miền Trung Việt Nam được trình bày trong Bảng 3.11.

Bảng 3.11. Kết quả phát hiện đột biến tại vị trí của các motif đặc trưng trong trình tự gen VP của PPV2

Motifs đặc trưng	Vị trí codon khởi đầu motif	Vị trí codon xuất hiện đột biến	Chủng PPV2 xuất hiện đột biến
Tín hiệu Polyadenyl hóa (PAS) (AATAAA)	66	66 (AAG <u>A</u> AAA)	PPV2-HU10
	454	454 (A <u>C</u> TAAA)	PPV2-QB05
Vị trí liên kết SP1 (GGGCGG)	329	329 (GGGC <u>A</u> G)	PPV2-QN03

Một bước quan trọng trong quá trình biến đổi sau phiên mã của mRNA, qua đó ảnh hưởng đến quá trình biểu hiện gen của sinh vật. Ở lợn, vai trò của các motif PAS trong hệ gen đã được xác nhận có liên quan đến ba nhóm chức năng chính của tế bào, bao gồm: quá trình sinh học, thành phần tế bào và chức năng phân tử (Zhang và cs, 2022). Thông thường, trình tự của motif PAS làm

tín hiệu cho quá trình polyadenyl hóa ở đầu 3' của phân tử RNA được bảo tồn cao (Fang và cs, 2022; Zhang và cs, 2022). Bảng 3.11 cho thấy đột biến thay thế nucleotide trong motifs đặc trưng cho tín hiệu PAS đã được tìm thấy ở vị trí codon 66 và codon 454 trong trình tự gen *VP* của các chủng PPV2 phân lập ở miền Trung Việt Nam. Cụ thể, đột biến tại vị trí codon 66: T→G (AATAAA→AAGAAA) được phát hiện ở chủng PPV2-HU10 và đột biến tại vị trí codon 454: A→C (AATAAA→AACTAAA) được phát hiện ở chủng PPV2-QB05. Kết quả này gợi ý rằng: những đột biến này có khả năng làm gián đoạn quá trình nhận dạng tín hiệu PAS và có thể dẫn đến những thay đổi trong quá trình biểu hiện gen *VP* của PPV2.

Yếu tố phiên mã SP1 được xem là cầu nối giữa virus và vật chủ, kích hoạt quá trình phiên mã của nhiều gen liên quan đến sự phát triển, biệt hóa và chết theo chương trình của tế bào (Safe, 2023). Ở virus gây Hội chứng PRRS, SP1 điều chỉnh hoạt động biểu hiện gen của tế bào vật chủ theo hướng có lợi cho sự lây nhiễm của virus (You và cs, 2022). Số liệu ở Bảng 3.12 cho thấy đột biến thay thế nucleotide (G→A) được phát hiện trong motif liên kết với yếu tố phiên mã SP1 (Specific protein 1-SP1) ở vị trí codon 329 trong trình tự của chủng PPV2-QN03 (GGGCAG). Mặc dù ảnh hưởng của các đột biến trong motif liên kết SP1 đối với hoạt động của PPV chưa được báo cáo, nhưng kết quả phát hiện đột biến này là thông tin hữu ích cho các nghiên cứu sâu hơn về ảnh hưởng của SP1 trong sự tương tác giữa PPV và vật chủ. Ngoài ra, không phát hiện đột biến ở vị trí của hai motifs được bảo tồn liên quan đến hoạt động của sPLA2 và motif liên kết NF1 trong trình tự gen *VP* của các chủng PPV2 ở miền Trung Việt Nam.

So sánh với kết quả nghiên cứu của Cadar và cs (2013) (Hình 3.18), đột biến thay thế amino acid nằm ở các vùng cuộn xoắn α , chuỗi β trong trình tự amino acid dự đoán của gen *VP* ở các chủng PPV2 phân lập tại miền Trung Việt Nam đã được phát hiện. Ảnh hưởng cụ thể của các đột biến amino acid trong vùng cuộn xoắn α và chuỗi β đối với hoạt động của PPV2 vẫn chưa được

báo cáo, tuy nhiên, không loại trừ khả năng chúng sẽ làm biến đổi cấu trúc của tiểu đơn vị capsid của PPV2 (Cadare và cs, 2013).

Đối với PPV2, các nghiên cứu phân tích sự ảnh hưởng của biến đổi di truyền liên quan đến các đặc tính sinh học như: tính kháng nguyên, khả năng lây nhiễm và độc lực vẫn còn hạn chế. Phân tích trình tự amino acid dự đoán của ba chủng PPV2 phân lập tại miền Trung Việt Nam đã phát hiện các đột biến thay thế nucleotide/amino acid khác biệt so với các chủng tham chiếu. Đồng thời, kết quả phân tích cũng bộc lộ các đột biến ở một số vị trí motif quan trọng trong gen VP của PPV2. Chức năng chính xác của các đột biến này vẫn chưa được giải thích rõ ràng, tuy nhiên, chúng có thể ảnh hưởng đến cấu trúc kháng nguyên và mang lại lợi thế tiến hóa cho virus (Cadare và cs, 2013).

3.3.1.3. Mức độ tương đồng nucleotide/amino acid dự đoán từ gen VP của PPV2

Mức độ tương đồng trong trình tự nucleotide và amino acid dự đoán từ trình tự gen VP của các chủng PPV2 phân lập tại miền Trung Việt Nam (2.493 nucleotide và 831 amino acid) so với các chủng phân lập trong khu vực và trên thế giới được trình bày trong Bảng 3.12.

Bảng 3.12. Tỷ lệ tương đồng nucleotide và amino acid dự đoán (%) từ trình tự gen VP của các chủng PPV2 phân lập tại miền Trung Việt Nam và so sánh với các chủng tham chiếu

Kích thước		Nucleotide (2.493 bp)	Amino acid (831 aa)
Chủng			
Việt Nam		95,8-97,0	95,3-97,5
Myama		96,1-98,1	95,4-98,7
Trung Quốc	Nhóm A	95,2-99,7	94,5-99,6
	Nhóm B	93,7-94,6	93,2-95,5
Châu Âu		94,9-100	93,3-100
Mỹ		93,7-96,7	93,8-97,4

Số liệu trình bày ở Bảng 3.12 cho thấy tỷ lệ tương đồng nucleotide và amino acid dự đoán của ba chủng PPV2 phân lập ở miền Trung Việt Nam khá cao, lần lượt là 95,8-97% và 95,3-97,5%. So với chủng PPV2 “nguyên thủy” được xác định ở Myanmar năm 2001, các chủng PPV2 phân lập tại Việt Nam có độ tương đồng về nucleotide và amino acid lần lượt là 96,1-98,1% và 95,4-98,7%. Tỷ lệ tương đồng nucleotide và amino acid ở mức độ cao đã được quan sát thấy giữa các chủng PPV2 của Việt Nam và các chủng châu Âu, lần lượt là 94,9-100% và 93,3-100%. Đặc biệt, mức độ tương đồng tuyệt đối (100%) đã được phát hiện giữa chủng các chủng PPV2 phân lập trong nghiên cứu này với các chủng có nguồn gốc từ Romania, lần lượt là PPV2-HU10 và PPV2 F7-1BV (Mã số GenBank: JQ860238); PPV2-QB05 và PPV2 WB-102R2 (Mã số GenBank: JQ860243).

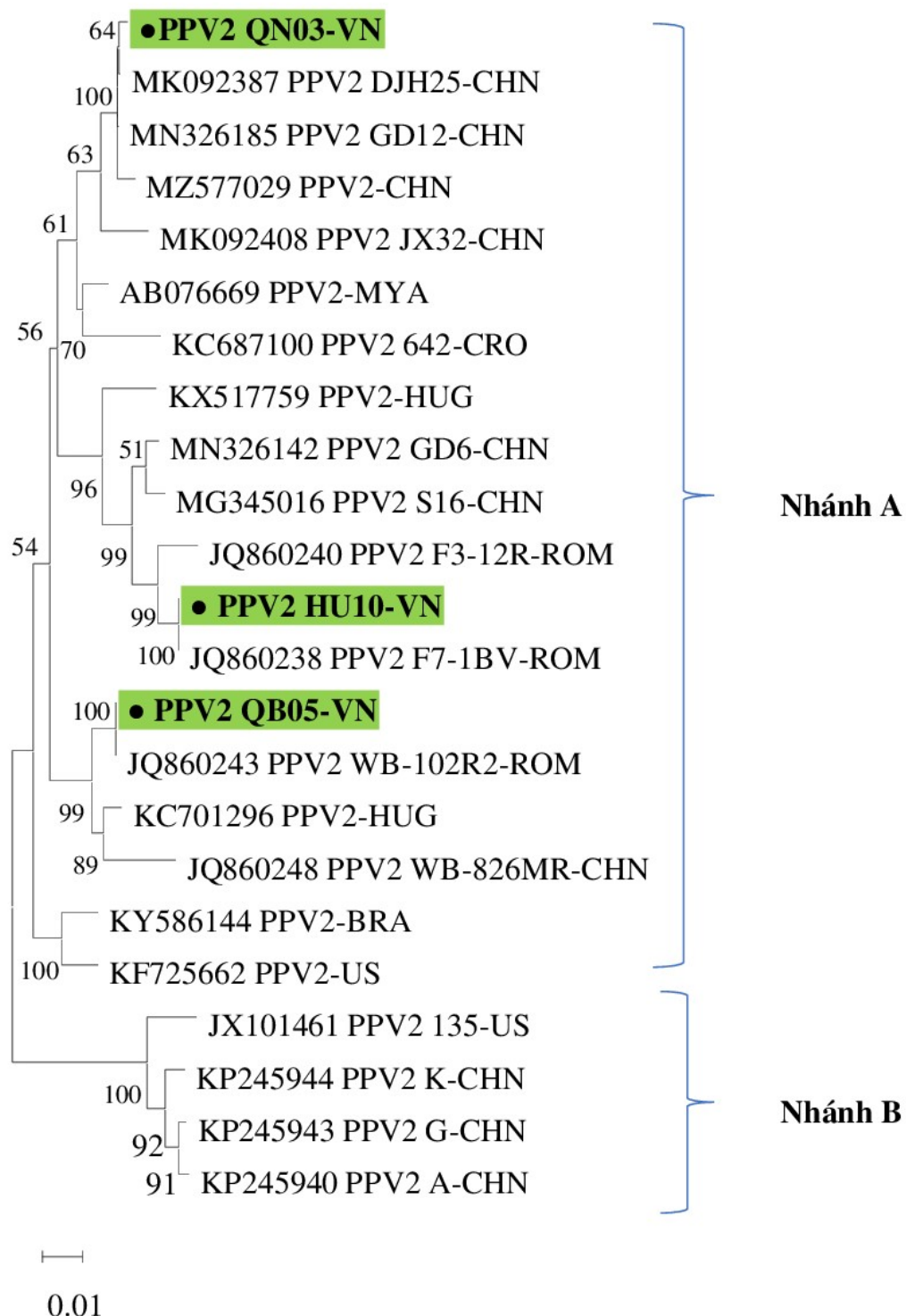
So sánh trình tự nucleotide và amino acid giữa các chủng PPV2 nghiên cứu với các chủng có nguồn gốc từ Trung Quốc được phân lập trong giai đoạn 2018-2021 (Nhóm A) và các chủng được phân lập năm 2014 (Nhóm B) đã cho thấy kết quả khác biệt (Bảng 3.12). Tỷ lệ tương đồng nucleotide và amino acid giữa các chủng PPV2 ở miền Trung Việt Nam và các chủng Trung Quốc nhóm A (2018-2021) là cao hơn so với các chủng Trung Quốc nhóm B. Kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu của Xiao và cs (2013) khi so sánh tỷ lệ tương đồng giữa các chủng PPV2 được phân lập tại Mỹ vào năm 2012 với chủng PPV2 “nguyên thủy” và với các chủng phân lập ở Trung Quốc vào năm 2010. Sự khác biệt về mức độ tương đồng giữa các chủng PPV2 trong nghiên cứu của chúng tôi so với các chủng tham chiếu phân lập vào các thời điểm khác nhau tại các quốc gia trên thế giới có thể là bằng chứng chứng minh cho sự tiến hóa liên tục của PPV2.

3.3.1.4. *Mối quan hệ di truyền các chủng PPV2 dựa vào gen VP*

Nghiên cứu dịch tễ học phân tử dựa trên việc phân tích cây phát sinh chủng loại là một vấn đề quan trọng nhằm đánh giá sự biến đổi di truyền của các chủng

virus ngoài thực địa, từ đó đánh giá sự biến chủng của virus theo thời gian (Thuy và cs, 2013).

Cây phát sinh chủng loại PPV2 dựa trên trình tự đoạn gen *VP* với kích thước phân tử 2.493 bp được xây dựng bằng chương trình MEGA X, sử dụng phương pháp thay thế Maximum Composite Likelihood dựa trên mô hình Tamura-Nei. Độ tin cậy ở các nhánh của cây phát sinh chủng loại được ước tính bằng phép thử bootstrap lặp lại 1.000 lần. Mối quan hệ của các chủng PPV2 phân lập trong nghiên cứu này và các chủng tham chiếu có nguồn gốc từ ba trung tâm chăn nuôi lợn lớn trên thế giới là châu Âu, châu Mỹ và châu Á được thể hiện trong Hình 3.19.



Hình 3.19. Cây phát sinh chủng loại PPV2 dựa trên trình tự nucleotide gen *VP* (2.493 bp) thu được từ một số tỉnh miền Trung Việt Nam và các trình tự gen tham chiếu. Chấm tròn màu đen biểu thị trình tự PPV2 Việt Nam. Các chữ số trên các nhánh là giá trị bootstrap với 1.000 lần lặp lại.

Hình 3.19 cho thấy cây phát sinh chủng loại PPV2 dựa trên trình tự đoạn gen *VP* (2.493 bp) chia thành hai nhánh chính (nhánh A và nhánh B) với giá trị bootstrap cho mỗi nhánh đạt 99%.

Nhánh A bao gồm các chủng PPV2 phân lập tại miền Trung Việt Nam (Chấm đen; Mã số GenBank: OL913365-OL913367), chủng PPV2 “nguyên thủy” lần đầu tiên phát hiện tại Myanmar (Mã số GenBank: AB076669), các chủng phân lập tại Trung Quốc trong thời gian 2018-2021 (Mã số GenBank: MK092387, MK092408, MN326142, MN326185 và MZ577029) cùng với các chủng phân lập tại châu Âu (Mã số GenBank: KY586144, KX517759, KC701296, KC687100, JQ860238, JQ860240, JQ860243 và JQ860248).

Nhánh B gồm các chủng PPV2 phân lập tại Trung Quốc năm 2014 (Mã số GenBank: KP245940, KP245943 và KP245944) và chủng PPV2 có nguồn gốc từ Mỹ (Mã số GenBank: JX101461). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi đã phát hiện các thành viên trong nhánh B được đặc trưng bởi chín vị trí thay thế trong trình tự amino acid dự đoán từ gen *VP* (237: V→A; 349: S→R; 401: A→E; 437: D→E; 457: E→Q; 784: M→I; 788: S→N; 796: Q→E và 822: D→E), trong đó có ba vị trí (784: M→I; 788: S→N; 796: Q→E) đã được công bố bởi Cadar và cs (2013).

Phân tích mối quan hệ di truyền giữa các chủng PPV2 phân lập tại miền Trung cho thấy mặc dù chúng tập hợp cùng nhau trong nhánh A của cây phát sinh chủng loại nhưng chủng PPV2-QB05 được định vị trong phân nhánh di truyền chứa các chủng châu Âu và tách biệt hoàn toàn với phân nhánh chứa hai chủng còn lại.

Hình 3.19 cũng cho thấy các chủng PPV2 phân lập tại miền Trung Việt Nam có quan hệ di truyền gần gũi với các chủng PPV2 phân lập tại Trung Quốc (2018-2021) và với các chủng phân lập tại châu Âu. Cụ thể, chủng PPV2-QN03 phân lập tại Quảng Ngãi có mối quan hệ di truyền gần gũi với các chủng Trung Quốc phân lập trong giai đoạn 2018-2021. Mặt khác, hai chủng PPV2-HU10

và PPV2-QB05 phân lập tại Thừa Thiên Huế và Quảng Bình thể hiện mối quan hệ di truyền gần gũi hơn với các chủng phân lập tại châu Âu.

Đối với chủng PPV2 “nguyên thủy” được phân lập tại Myanmar, các chủng PPV2 phân lập tại miền Trung Việt Nam thể hiện mối quan hệ di truyền khác biệt. Mức độ gần gũi trong quan hệ di truyền giữa các chủng phân lập trong nghiên cứu này với chủng Myanmar được thể hiện từ cao xuống thấp theo thứ tự: Chủng PPV2-QN03 > chủng PPV2-HU10 > chủng PPV2-QB05.

Các nghiên cứu phát sinh chủng loại dựa trên trình tự hệ gen/gen VP của PPV2 trước đây cho thấy các chủng PPV2 lưu hành ở các quốc gia tập trung trong hai phân nhóm di truyền chính. Phân nhóm thứ nhất (A) bao gồm các chủng có mối quan hệ di truyền gần gũi với chủng PPV2 “nguyên thủy” phân lập ở Myanmar trong khi phân nhóm thứ hai (B) bao gồm các chủng phát sinh từ Trung Quốc. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với các phân tích phát sinh chủng loại PPV2 được thực hiện bởi các nghiên cứu trước đây (Sun và cs 2015; Streck và cs, 2013; Cadar và cs, 2013). Cây phát sinh chủng loại này đã cho thấy mối quan hệ di truyền giữa các chủng PPV2 phân lập và các chủng tham chiếu cũng như sự đa dạng của các chủng PPV2 lưu hành tại miền Trung Việt Nam.

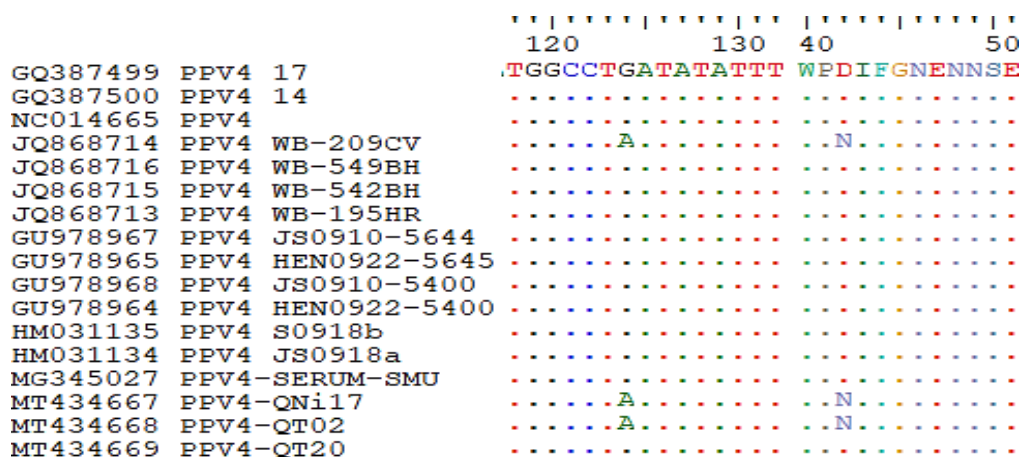
3.3.2. Đặc điểm phân tử hệ gen, gen mã hóa protein cấu trúc và ORF3 của các chủng PPV4 phân lập ở các tỉnh miền Trung

3.3.2.1. Đặc điểm phân tử hệ gen PPV4

Nhằm đánh giá sự biến đổi trong trình tự hệ gen của hai chủng PPV4 phân lập tại miền Trung, chúng tôi lựa chọn các chủng PPV4 tham chiếu được phân lập tại một số nước thuộc khu vực châu Á, châu Âu và châu Mỹ. Danh sách các chủng PPV4 tham chiếu được trình bày ở Bảng 2.5. Hệ gen PPV4 khác biệt với các chủng PPV còn lại với đặc điểm chúng sở hữu ba khung đọc mở, bao gồm ORF1, ORF2 và ORF3. Khung đọc mở ORF1 (1.797 bp) mã hóa cho chuỗi 598 amino acid, bao gồm các protein không cấu trúc NS1 và NS2, chịu trách nhiệm

cho việc sao chép của virus. Khung đọc mở ORF2 (2.187 bp) mã hóa cho chuỗi 728 amino acid, bao gồm các protein cấu trúc: VP1 và VP2, đóng vai trò là đơn phân cấu tạo nên vỏ capsid của virus, quyết định tính kháng nguyên và là đối tượng của hệ miễn dịch vật chủ. Một ORF nhỏ (ORF3) nằm ở giữa ORF1 và ORF2, có kích thước phân tử 615 bp, mã hóa cho chuỗi 204 amino acid của protein nhân NP1.

Các vị trí đột biến thay thế nucleotide dẫn đến thay thế trong trình tự amino acid dự đoán từ trình tự ORF1 của các chủng PPV4 phân lập tại miền Trung được thể hiện trong Hình 3.20.



Hình 3.20. Vị trí đột biến thay thế nucleotide và amino acid trong khung đọc mở ORF1 của trình tự hệ gen PPV4 ở miền Trung

Phân tích trình tự ORF1 (Hình 3.20) cho thấy một đột biến thay thế nucleotide ở vị trí 124: G→A dẫn đến thay thế tại vị trí (42: D→N) trong trình tự amino acid dự đoán của chủng PPV4-QT02. Đột biến này cũng xuất hiện ở chủng PPV4-QNi17 phân lập tại tỉnh Quảng Ninh, và chủng PPV4-WB-209CV có nguồn gốc từ Romania.

Phân tích trình tự ORF2 (mã hóa protein cấu trúc VP) phát hiện đột biến nucleotide dẫn đến thay đổi ở ba vị trí trong trình tự amino acid dự đoán của chủng PPV4-QT02 (455: E→D; 469: I→V và 531: H→Q) và thay đổi ở một vị trí (690: P→S) đối với chủng PPV4-QT20. Các kết quả này được trình bày và phân tích chi tiết trong phần tiếp theo (Mục 3.3.2.2). So sánh với các chủng

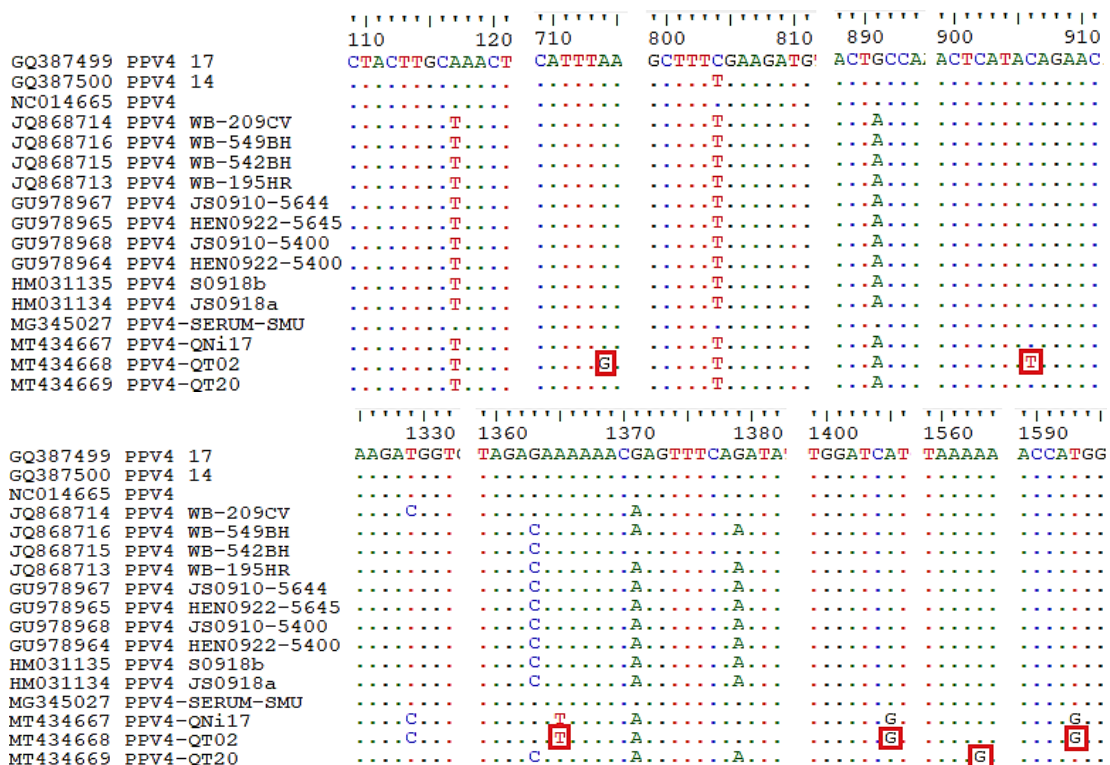
tham chiếu không phát hiện đột biến thay thế trong trình tự amino acid dự đoán từ ORF3 của các chủng PPV4 phân lập ở miền Trung.

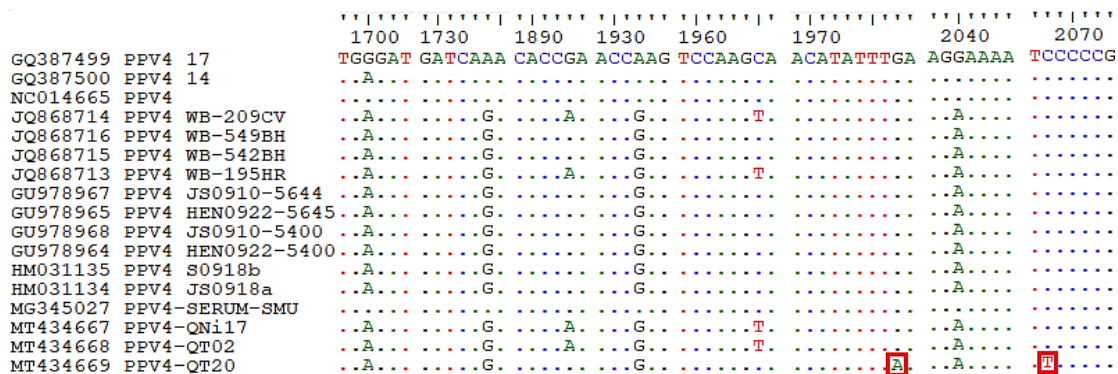
Kết quả phân tích và so sánh trình tự amino acid dự đoán từ hệ gen PPV4 phân lập trong nghiên cứu này đã phát hiện số lượng đột biến thay thế amino acid dự đoán từ ORF2 lớn hơn so với OFR1 và ORF3. Kết quả này gợi ý rằng ORF2 chứa trình tự gen mã hóa protein cấu trúc của PPV4 là đối tượng chịu áp lực chọn lọc từ hệ thống miễn dịch vật chủ cao hơn so với trình tự ORF1 và ORF3.

3.3.2.2. Đặc điểm phân tử gen VP của PPV4

Đặc điểm trình tự nucleotide gen VP của PPV4

Danh sách các chủng PPV4 tham chiếu được sử dụng trong so sánh và phân tích đặc điểm phân tử gen VP của các chủng PPV4 phân lập tại miền Trung Việt Nam được trình bày ở Bảng 2.5. Kết quả so sánh trình tự nucleotide gen VP của các chủng PPV4 phân lập tại miền Trung và các chủng tham chiếu được trình bày ở Hình 3.21.





Hình 3.21. Kết quả so sánh trình tự nucleotide gen VP của các chủng PPV4 phân lập tại miền Trung so với các chủng tham chiếu

Hình 3.21 cho thấy trình tự gen VP của hai chủng PPV4 phân lập tại miền Trung có tám vị trí khác biệt hoàn toàn với các chủng tham chiếu (Hình 3.21). Vị trí của các đột biến nucleotide trong trình tự gen VP của các chủng PPV4 phân lập tại miền Trung được trình bày ở Bảng 3.13.

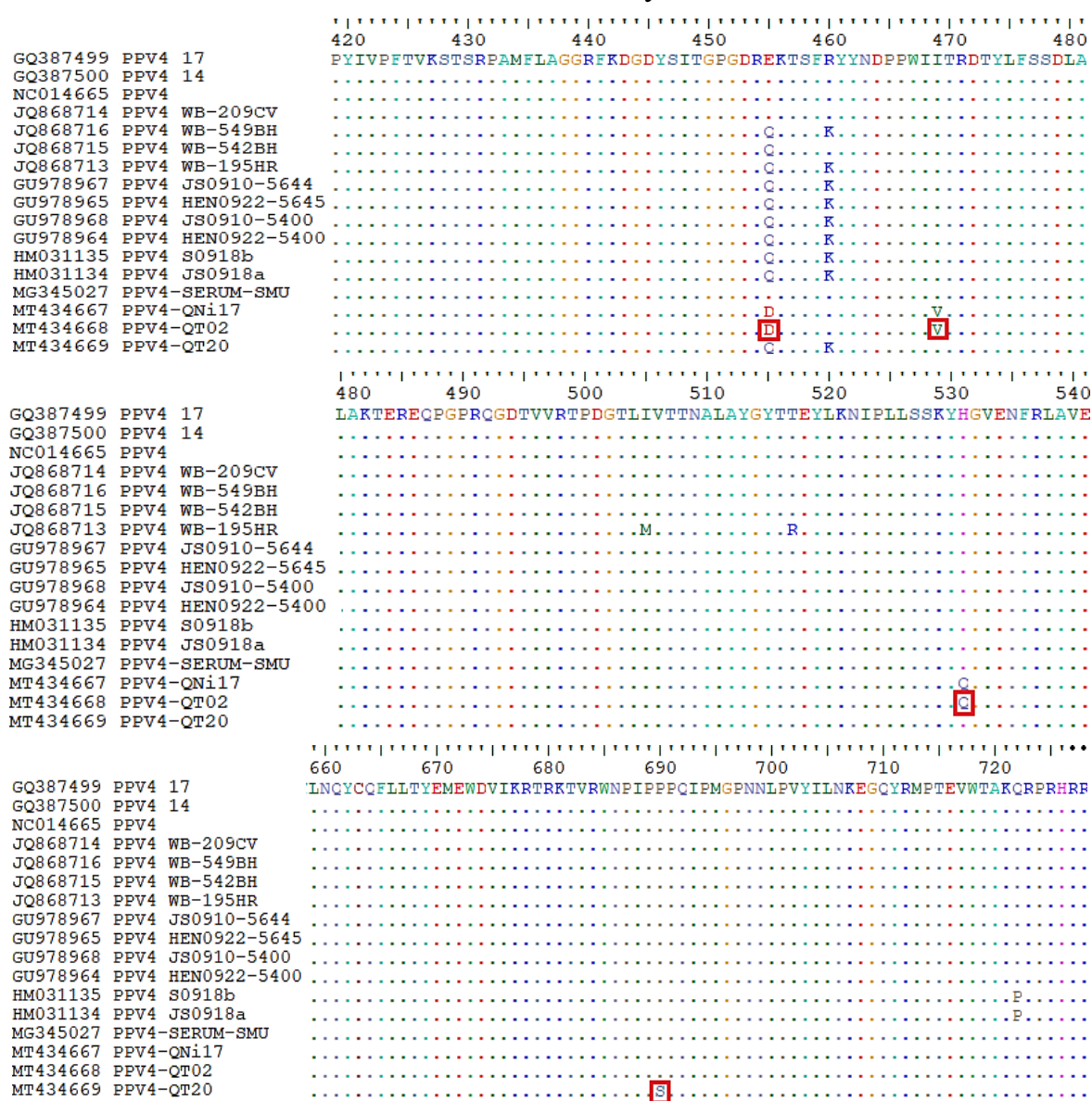
Bảng 3.13. Vị trí thay thế nucleotide và amino acid dự đoán từ trình tự gen VP của hai chủng PPV4 phân lập Quảng Trị so với các chủng tham chiếu

Chủng	Vị trí thay thế nucleotide	Vị trí thay thế amino acid
PPV4-QT02	714: A→G	-
	906: C→T	-
	1365: A→T	455: E→D
	1405: C→G	469: I→V
	1593: A→G	531: H→Q
PPV4-QT20	1563: A→G	-
	1977: G→A	-
	2068: C→T	690: P→S

Như được thể hiện trong Bảng 3.13, chủng PPV4-QT02 xuất hiện năm vị trí đột biến thay thế nucleotide (714: A→G; 906: C→T; 1365: A→T; 1405: C→G; 1593: A→G) và chủng PPV4-QT20 xuất hiện ba vị trí đột biến thay thế nucleotide (1563: A→G; 1977: G→A; 2068: C→T) hoàn toàn khác biệt so với các chủng tham chiếu.

Đặc điểm trình tự amino acid dự đoán từ gen VP của PPV4

Việc cập nhật liên tục các trình tự PPV4 tham chiếu đã cung cấp dữ liệu cho các nghiên cứu đặc tính hóa phân tử, xác định các vùng chức năng trong trình tự gen VP của PPV4 (Gupta và Vadde, 2019; Sun và cs, 2015; Cadar và cs, 2013); từ đó xây dựng cơ sở dữ liệu làm nền tảng để xác định đặc điểm phân tử của các chủng PPV4 phân lập ngoài thực địa. Kết quả so sánh trình tự amino acid dự đoán của hai chủng PPV4 phân lập trong nghiên cứu này với các chủng PPV4 tham chiếu trên GenBank được trình bày ở Hình 3.22.



Hình 3.22. Kết quả so sánh trình tự amino acid dự đoán từ gen VP của các chủng PPV4 phân lập tại miền Trung Việt Nam so với các chủng tham chiếu

Hình 3.22 cho thấy bảy vị trí đa hình đã được quan sát trong trình tự amino acid dự đoán của các chủng PPV4 phân lập trong nghiên cứu này, trong đó có bốn vị trí thay thế amino acid là khác biệt hoàn toàn so với các chủng tham chiếu. Cụ thể, ở chủng PPV4-QT02 xuất hiện ba vị trí thay đổi trong trình tự amino acid dự đoán (455: E→D; 469: I→V; 531: H→Q) và một vị trí thay thế amino acid được phát hiện ở chủng PPV4-QT20 (690: P→S) (Bảng 3.14, Hình 3.22).

Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng thay thế amino acid ở một số vị trí trên bề mặt vỏ capsid của PPV chịu trách nhiệm cho sự thay đổi các đặc tính sinh học của virus và là yếu tố quyết định trong việc hình thành các phân nhóm di truyền khác nhau (Sun và cs, 2015; Streck và cs, 2011; Soares và cs, 2003; Simpson và cs, 2002; Hao và cs, 2001). Kết quả so sánh thay thế amino acid tại các vị trí tiềm năng trong trình tự amino acid dự đoán từ gen *VP* của các chủng PPV4 phân lập tại Quảng Trị với kết quả của các nghiên cứu trước đây (Sun và cs, 2015; Cadar và cs, 2013) được trình bày trong Bảng 3.14.

Bảng 3.14. Các vị trí thay thế quan trọng trong trình tự amino acid dự đoán từ gen VP của các chủng PPV4 phân lập so với các chủng tham chiếu

Quốc gia	Vị trí Chủng	Năm phân lập	A		B							
			531	690	178	416	455	460	469	567	583	722
Mỹ	GQ387499	2010	H	P	S	E	E	R	I	G	T	Q
	GQ387500	2010	H	P	S	K	E	R	I	E	A	Q
	NC014665	2018	H	P	S	E	E	R	I	G	T	Q
Việt Nam	MT434667 QNi17	2020	Q	P	S	K	D	R	V	E	T	Q
	MT434668 QT02		Q	P	S	K	D	R	V	E	T	Q
	MT434669 QT20		H	S	S	K	Q	K	I	E	T	Q
Romania	JQ868713	2012	H	P	S	K	E	R	I	E	T	Q
	JQ868714		H	P	S	K	Q	K	I	E	T	Q
	JQ868715		H	P	S	K	Q	R	I	E	T	Q
	JQ868716		H	P	S	K	Q	K	I	E	T	Q

Quốc gia	Vị trí Chủng	Năm phân lập	A		B							
			531	690	178	416	455	460	469	567	583	722
Trung Quốc	GU978964	2010	H	P	P	K	Q	K	I	E	T	Q
	GU978965		H	P	S	K	Q	K	I	E	T	Q
	GU978967		H	P	P	K	Q	K	I	E	T	Q
	GU978968		H	P	S	K	Q	K	I	E	T	Q
	HM031134		H	P	S	K	Q	K	I	E	T	P
	HM031135		H	P	S	K	Q	K	I	E	T	P
	MG345027	2018	H	P	S	E	E	R	I	G	T	Q

A: Vị trí đột biến ở các chủng Việt Nam khác biệt so với các chủng tham chiếu

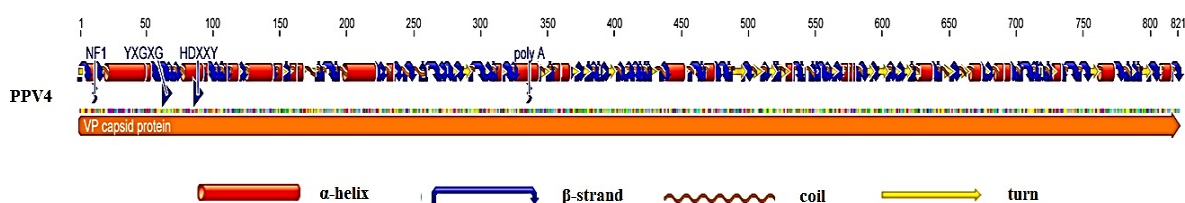
B: Vị trí đột biến quan trọng (Sun và cs, 2015; Cadar và cs, 2013).

Kết quả ở Bảng 3.14 cho thấy hai vị trí đột biến thay thế amino acid khác biệt hoàn toàn so với các chủng tham chiếu đã được phát hiện ở chủng PPV4-QT02 (531: H→Q) và chủng PPV4-QT20 (690: P→S).

Theo Gupta và Vadde (2023), việc xác định vị trí của các biến thể di truyền chịu áp lực chọn lọc sẽ cung cấp các thông tin quan trọng cho nghiên cứu dịch tễ học và tiến hóa phân tử của các gen mã hóa protein. Cadar và cs (2013) đã báo cáo hai amino acid chịu áp lực chọn lọc trong trình tự gen *VP* của PPV4 nằm ở vị trí 455 và vị trí 722. Nghiên cứu của chúng tôi phát hiện đột biến thay thế amino acid tại vị trí 455 (E→D) ở chủng PPV4-QN02 phân lập tại Quảng Trị, không phát hiện đột biến tương tự ở các chủng PPV4 tham chiếu. Kết quả này cho thấy các chủng PPV4 Việt Nam xuất hiện một đột biến quan trọng đối với quá trình tiến hóa phân tử của gen *VP* và khác biệt hoàn toàn so với các chủng PPV4 tham chiếu.

Thay thế amino acid ở các vị trí: 178, 416, 455, 460, 469, 567, 583 và 722 đóng vai trò quan trọng trong việc hình thành các phân nhóm di truyền khác nhau của PPV4 (Sun và cs, 2015). Kết quả phân tích trình tự amino acid dự đoán từ gen *VP* của các chủng PPV4 phân lập tại miền Trung Việt Nam và các chủng tham chiếu đã phát hiện một số đột biến thay thế amino acid ở các vị trí quan trọng kể trên. Bảng 3.14 cho thấy thay thế amino acid tại hai vị trí 416 (E→K) và 567 (G→E) đã được phát hiện ở hai chủng PPV4 phân lập tại miền Trung Việt Nam và hầu hết các chủng PPV4 tham chiếu, ngoại trừ hai chủng PPV4 được phân lập tại Mỹ (2010 và 2018) và một chủng có nguồn gốc từ Trung Quốc (2018). Thay thế amino acid ở vị trí 455 (E→D) và 469 (I→V) chỉ được phát hiện ở chủng PPV4-QT02 Quảng Trị. Ngoài ra, thay thế amino acid ở vị trí 455 (E→Q) và 460 (R→K) được phát hiện đồng thời ở chủng PPV4-QT20 Quảng Trị và hầu hết các chủng PPV4 có nguồn gốc từ Romania và Trung Quốc. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi đã phát hiện sự thay thế amino acid giống nhau giữa các chủng PPV4 phân lập tại miền Trung và các chủng có

nguồn gốc từ Trung Quốc và Romania tại các vị trí: 416 (E→K); 455 (E→Q); 460 (R→K) và 567 (G→E).



Hình 3.23. Các motifs đặc trưng trong trình tự nucleotide của gen VP của PPV4 (Cadaru và cs, 2013)

Trong trình tự gen VP của PPV4, số lượng các motif đặc trưng xuất hiện ít hơn so với ở PPV2 và vị trí của chúng thường tập trung ở đầu 5' hơn là phân bố theo chiều dọc của gen như ở PPV2. Kết quả nghiên cứu của Cadaru và cs (2013) cho thấy các motif đặc trưng trong trình tự gen mã hóa protein cấu trúc của PPV4 bao gồm: Hai motif được bảo tồn liên kết với enzyme phospholipase A2 (YXCXG và HDXXY) có vị trí lần lượt là codon 64 và codon 87; tín hiệu polyadenyl hóa (AATAAA) và vị trí liên kết yếu tố phiên mã và sao chép NF1 (TTGGC) (Hình 3.23). Khác với PPV2, trình tự gen VP của PPV4 không tồn tại vị trí liên kết với yếu tố phiên mã SP1. Bên cạnh đó, Hình 3.13 cũng thể hiện vị trí của các vùng cuộn xoắn α và chuỗi β trong mô hình cấu trúc bậc hai của protein VP ở PPV4. Nghiên cứu của chúng tôi không phát hiện ở các motif đặc trưng trong trình tự gen VP của các chủng PPV4 ở miền Trung Việt Nam. Kết quả này tương tự với các nghiên cứu trước đây khi cho rằng các motif đặc trưng này thường được bảo tồn ở mức độ cao (Safe, 2023; You và cs, 2022; Fang và cs, 2022; Zhang và cs, 2022; Cadaru và cs, 2013; Wang và cs, 2010; Zádori và cs, 2001).

So sánh trình tự amino acid dự đoán từ gen VP của các chủng PPV4 ở miền Trung Việt Nam với kết quả nghiên cứu của Cadaru và cs (2013) đã phát hiện các đột biến thay thế amino acid ở các vùng cuộn xoắn α và chuỗi β của protein VP. Mặc dù thông tin về sự ảnh hưởng của các đột biến amino acid trong vùng cuộn xoắn α và chuỗi β đối với hoạt động của PPV4 vẫn còn hạn

ché, nhưng không loại trừ khả năng những đột biến này sẽ làm biến đổi cấu trúc của tiểu đơn vị capsid ở PPV4 và đưa đến sự biến đổi cấu trúc kháng nguyên (Hình 3.23). Kết quả phân tích trình tự nucleotide/amino acid dự đoán của các chủng PPV4 ở miền Trung Việt Nam đã phát hiện những đột biến thay thế ở một số vị trí quan trọng đối với quá trình tiến hóa phân tử của gen *VP*. Đồng thời, sự bảo tồn ở mức độ cao của các motif đặc trưng cho các chức năng liên quan đến hoạt động lây nhiễm và gây bệnh của virus trong gen *VP* cũng được phát hiện ở các chủng PPV4 nghiên cứu.

Đối với PPV4, các nghiên cứu phân tích ảnh hưởng của biến đổi di truyền liên quan đến các đặc tính sinh học như: tính kháng nguyên, khả năng lây nhiễm và độc lực vẫn còn hạn chế. Vai trò của các đột biến được phát hiện trong nghiên cứu này vẫn chưa được xác định rõ ràng, tuy nhiên, không loại trừ khả năng chúng có thể ảnh hưởng đến cấu trúc kháng nguyên và mang lại lợi thế tiến hóa cho virus. Đặc điểm phân tử gen *VP* của PPV4 được báo cáo trong nghiên cứu của chúng tôi sẽ là cơ sở để đánh giá hiệu quả bảo hộ của vaccine hiện tại và cung cấp thông tin dịch tễ học phân tử hữu ích cho các nghiên cứu sản xuất vaccine phòng ngừa PPV trong tương lai.

3.3.2.3. Đặc điểm phân tử ORF3 của PPV4

Ở PPV, ORF1 mã hóa cho các protein có vai trò chức năng, ORF2 mã hóa cho protein cấu trúc. Duy nhất hệ gen của chủng PPV4 xuất hiện khung đọc mở ORF3, đây là điểm khác biệt lớn trong hệ gen của PPV4 và các chủng PPV khác. Trình tự nucleotide và amino acid dự đoán khung đọc mở ORF3 của các chủng PPV4 phân lập từ Quảng Trị kích thước phân tử 615 bp, mã hóa cho chuỗi 204 amino acid đã được so sánh với các chủng tham chiếu. Kết quả cho thấy chỉ có một vị trí đột biến thay thế duy nhất trong trình tự nucleotide của chủng PPV4-QT02 (240: A→G) và không có đột biến thay thế nào được phát hiện trong trình tự amino acid dự đoán từ khung đọc mở ORF3 của các chủng PPV4 phân lập tại miền Trung Việt Nam.

3.3.2.4. Mức độ tương đồng nucleotide/amino acid của các chủng PPV4 phân lập tại miền Trung Việt Nam

Kết quả so sánh mức độ tương đồng trình tự nucleotide và amino acid dự đoán của ORF1, ORF2, ORF3 và hệ gen giữa các chủng PPV4 phân lập tại miền Trung Việt Nam so với các chủng phân lập trong khu vực và trên thế giới được trình bày ở Bảng 3.15.

Bảng 3.15. Tỷ lệ tương đồng nucleotide và amino acid (%) của ORF1, ORF2, ORF3 và trình tự hệ gen giữa các chủng PPV4 phân lập tại miền Trung Việt Nam so với các chủng tham chiếu

Trình tự	Kích thước phân tử	Nguồn gốc các chủng PPV4				
		Miền Trung Việt Nam	Miền Bắc Việt Nam	Trung Quốc	Mỹ	Romania
ORF1	1797 bp	99,6	99,7-99,8	99,1-99,6	99,1-99,2	99,1-99,8
	598 aa	99,4	99,6-99,8	98,6-99,6	98,4-98,9	99,1-100
ORF2	2.187 bp	99,1	99,3-99,7	98,9-99,6	98,9-99,3	99,2-99,7
	728 aa	99,3	99,3-100	99,3-99,8	99,3-99,4	99,1-99,8
ORF3	615 bp	99,8	99,6-99,8	99,1-100	99,6-99,8	99,8-100
	204 aa	100	100	99,0-100	100	100
Hệ gen	5.367 bp	99,3	99,4-99,6	98,7-99,4	98,8-99,0	99,0-99,5
	1500 aa	98,7	98,8-99,3	98,0-98,9	98,0	98,2-99,0

Kết quả so sánh trình tự của ba khung đọc mở giữa hai chủng PPV4 ở miền Trung Việt Nam đã cho thấy mức độ tương đồng nucleotide và amino acid cao, tương ứng lần lượt là: 99,6% và 99,4% ở ORF1; 99,1% và 99,3% ở ORF2; 99,8% và 100% ở ORF3, gợi ý rằng hai chủng virus này có chung nguồn gốc (Bảng 3.15). Kết quả này cũng cho thấy sự khác biệt về đặc điểm phân tử của chúng chủ yếu là ở trình tự gen *VP*.

So sánh trình tự của ba khung đọc mở giữa hai chủng PPV4 miền Trung với chủng PPV4-QNi17 (miền Bắc) cho thấy tỷ lệ tương đồng nucleotide/amino acid cao: 99,7-99,8% và 99,6-99,8% đối với ORF1; 99,3-99,7% và 99,3-100% đối với ORF2; 99,6-99,8% và 100% đối với ORF3. Kết quả so sánh cho thấy mức độ tương đồng giữa chủng PPV4-QT02 và chủng PPV4-QNi17 cao hơn tỷ lệ tương đồng giữa chủng PPV4-QT02 và chủng PPV4-QT20 (Bảng 8B, Phụ lục), gợi ý rằng chủng PPV4-QT02 có mối quan hệ di truyền gần gũi với chủng PPV4-QNi17.

Số liệu ở Bảng 3.15 cho thấy trình tự nucleotide và amino acid ORF1 của các chủng PPV4 phân lập tại miền Trung Việt Nam có sự tương đồng cao nhất với các chủng Romania (99,1-99,8% và 99,1-100%), kế tiếp là các chủng Trung Quốc (99,1-99,6% và 98,6-99,6%) và thấp nhất là các chủng Mỹ (99,1-99,2% và 98,4-98,9%). Trình tự nucleotide và amino acid dự đoán của ORF2 các chủng PPV4 nghiên cứu có tỷ lệ tương đồng cao nhất với các chủng Romania (lần lượt là 99,2-99,7% và 99,1-99,8%), tiếp đến là các chủng Trung Quốc (lần lượt là 98,9-99,6% và 99,3-99,8%) và thấp nhất là các chủng Mỹ (98,9-99,3% và 99,3-99,4%). Trình tự ORF3 của hai chủng PPV4 nghiên cứu có tỷ lệ tương đồng nucleotide cao nhất với các chủng Romania (99,8-100%) và thấp nhất với các chủng phân lập ở Mỹ (99,6-99,8%); tỷ lệ tương đồng nucleotide của ORF3 giữa các chủng Việt Nam và Trung Quốc là 99,1-100%. Độ tương đồng amino acid dự đoán của hai chủng phân lập với các chủng tham chiếu là 99,0-100%, cho thấy chúng không có nhiều sự khác biệt.

Kết quả so sánh trình tự ba khung đọc mở giữa các chủng PPV4 nghiên cứu với các chủng PPV4 tham chiếu cho thấy các chủng PPV4 có nguồn gốc từ Trung Quốc và Romani có thể là nguồn gốc phát sinh của các chủng PPV4 ở miền Trung Việt Nam. Để kiểm tra giả thuyết này, chúng tôi tiến hành xây dựng cây phát sinh chủng loại nhằm phân tích mối quan hệ di truyền giữa các chủng PPV4 ở miền Trung Việt Nam và các chủng PPV4 trên thế giới.

3.3.2.5. Mối quan hệ di truyền các chủng PPV4

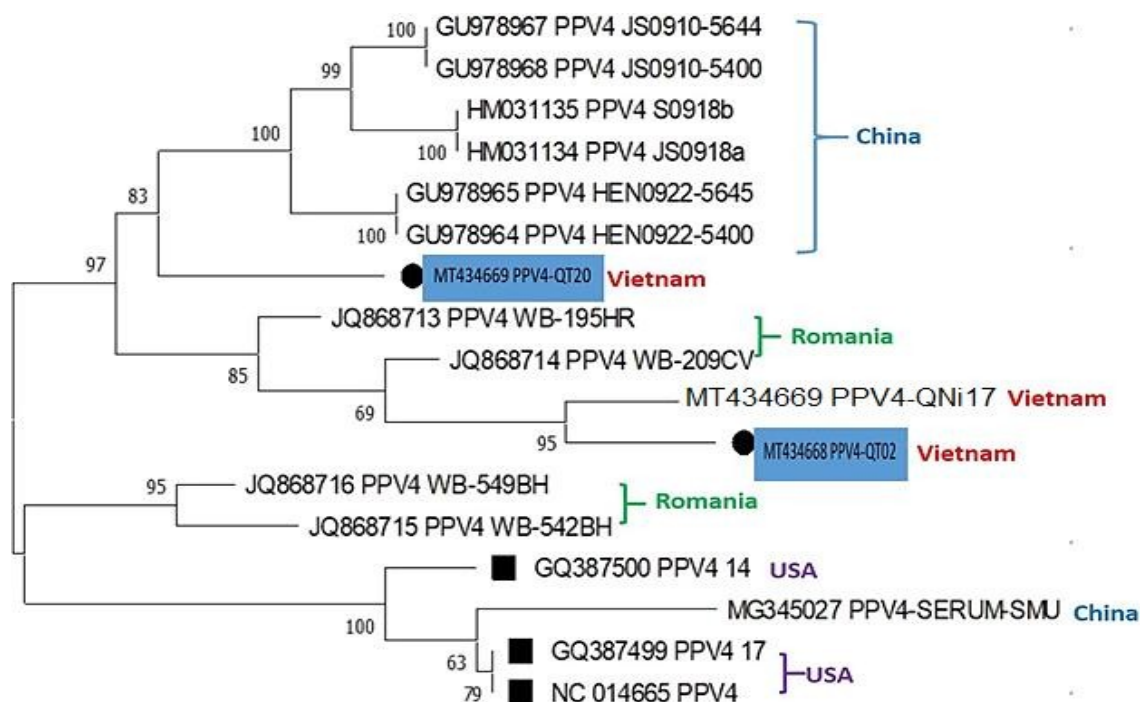
Sau khi nghiên cứu mối quan hệ di truyền của các chủng PPV2, chúng tôi tiếp tục tìm hiểu mối quan hệ di truyền giữa các chủng PPV4 ở miền Trung Việt Nam dựa vào phân tích cây phát sinh chủng loại được xây dựng từ hệ gen và gen VP của PPV4. Thông qua phân tích cây phát sinh chủng loại, các thông tin quan trọng như: Nguồn gốc phát sinh, phân nhóm di truyền và xu hướng biến đổi di truyền của các chủng PPV4 lưu hành ở miền Trung đã được làm sáng tỏ.

Mối quan hệ di truyền của các chủng PPV4 dựa vào hệ gen

Cây phát sinh chủng loại PPV4 dựa vào hệ gen (5.367 bp) được xây dựng bằng chương trình MEGA X, sử dụng phương pháp thay thế Maximum Composite Likelihood dựa trên mô hình Tamura-Nei. Mức tin cậy ở các nhánh của cây phát sinh chủng loại được ước tính bằng phép thử bootstrap lặp lại 1.000 lần. Mối quan hệ di truyền giữa hai chủng PPV4 phân lập và các chủng tham chiếu được thể hiện ở Hình 3.24.

Hình 3.24 cho thấy hai chủng PPV4-QT02 (Mã số GenBank: MT434668) và PPV4-QT20 (Mã số GenBank: MT434669) phân lập ở miền Trung trong nghiên cứu của chúng tôi và chủng PPV4-QNi17 (Mã số GenBank: MT434667) được phân lập tại miền Bắc tập hợp thành một nhánh di truyền cùng với các trình tự có nguồn gốc từ Romania (Mã số GenBank: JQ868713-JQ868714) và Trung Quốc (Mã số GenBank: GU978964-GU978968 và HM031134-HM031135). Nhánh còn lại bao gồm các trình tự PPV4 của Mỹ (Mã số

GenBank: GQ387499, GQ387500 và BC014665), Romania (Mã số GenBank: JQ868715 và RJQ868716) và một trình tự từ Trung Quốc (Mã số GenBank: MG345027). Giá trị bootstrap của tất cả các nhánh đều cao hơn 63%, cho thấy độ tin cậy của cây phát sinh chủng loại đã xây dựng.



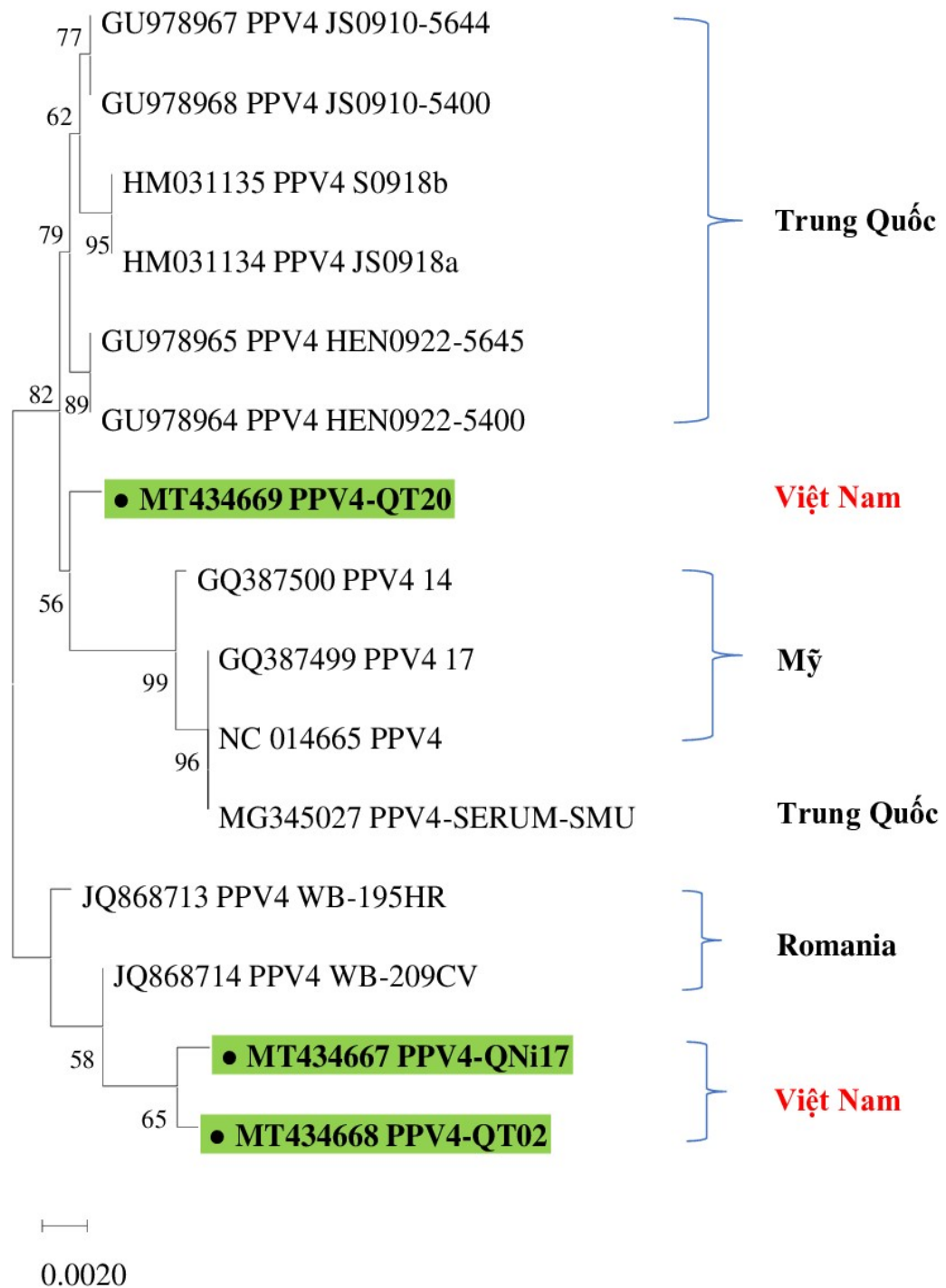
Hình 3.24. Cây phát sinh chủng loại PPV4 được xây dựng dựa trên trình tự hệ gen PPV4 (5.367 bp) ở miền Trung Việt Nam và các trình tự tham chiếu. Các chữ số trên các nhánh là giá trị bootstrap với 1.000 lần lặp lại.

Phân tích phát sinh chủng loại của PPV4 dựa trên trình tự hệ gen cho thấy các chủng của miền Trung Việt Nam có quan hệ di truyền gần với các chủng PPV4 được phân lập ở miền Bắc Việt Nam, Romania và Trung Quốc (Hình 3.24). Các chủng PPV4 phân lập từ miền Trung, miền Bắc Việt Nam, Trung Quốc và Romania tập hợp cùng nhau trong một phân nhánh di truyền, tách biệt với nhánh được hình thành bởi các trình tự PPV4 phân lập ở Mỹ và ở Trung Quốc (Hình 3.24). Những kết quả này hoàn toàn phù hợp với phân tích phát sinh chủng loại đã công bố trước đó dựa trên trình tự hệ gen PPV4 (Huang và cs, 2010) và xác nhận thêm mối quan hệ di truyền giữa các chủng PPV4 phân lập tại Việt Nam so với các chủng tham chiếu trên thế giới.

Tỷ lệ tương đồng cao trong trình tự nucleotide và amino acid giữa các chủng PPV4 phân lập tại miền Trung Việt Nam, miền Bắc Việt Nam và Trung Quốc; kết quả phân tích mối quan hệ di truyền dựa trên trình tự hệ gen; cùng với các công bố không phát hiện sự lưu hành của PPV4 tại các tỉnh khu vực phía Nam (Thuy và cs, 2021) đã cho thấy khả năng du nhập PPV4 từ Trung Quốc vào Việt Nam thông qua biên giới phía Bắc. Tuy nhiên, cần tiến hành các nghiên cứu với cỡ mẫu lớn hơn để xác nhận giả thuyết này.

Mối quan hệ di truyền các chủng PPV4 dựa vào gen VP

Cây phát sinh chủng loại PPV4 dựa vào gen *VP* (2.187 bp) được xây dựng bằng chương trình MEGA X, sử dụng phương pháp Maximum Composite Likelihood dựa trên mô hình Tamura-Nei. Độ tin cậy ở các nhánh của cây phát sinh chủng loại được ước tính bằng phép thử bootstrap lặp lại 1.000 lần. Mối quan hệ di truyền dựa trên trình tự gen *VP* của các chủng PPV4 phân lập tại miền Trung Việt Nam so với các chủng tham chiếu trong khu vực và trên thế giới đã công bố trên GenBank (Bảng 2.5) được thể hiện trong cây phát sinh chủng loại ở Hình 3.25.



Hình 3.25. Cây phát sinh chủng loại PPV4 được xây dựng dựa trên trình tự gen mã hóa protein capsid của các chủng PPV4 (2.187 bp) phân lập ở miền Trung Việt Nam và các trình tự tham chiếu. Các chữ số trên các nhánh là giá trị bootstrap với 1.000 lần lặp lại.

Kết quả ở Hình 3.25 cho thấy cây phát sinh chủng loại được chia làm hai nhánh chính và giá trị bootstrap của tất cả các nhánh đều cao hơn 55%, cho thấy độ tin cậy của cây phát sinh chủng loại. Nhánh thứ nhất bao gồm: Chủng PPV4-QT20 (Mã số GenBank: MT434669) phân lập ở miền Trung Việt Nam, các chủng có nguồn gốc từ Trung Quốc (Mã số GenBank: GU978964-GU978968, HM031134-HM031135 và MG345027) và các chủng phân lập tại Mỹ (Mã số GenBank: GQ387499, GQ387500 và BC014665). Nhánh còn lại bao gồm chủng PPV4- QT02 (Mã số GenBank: MT434668) phân lập ở miền Trung Việt Nam, chủng PPV4-QNi17 (Mã số GenBank: MT434667) phân lập ở miền Bắc Việt Nam và các chủng có nguồn gốc từ Romania (Mã số GenBank: JQ868713-JQ868714).

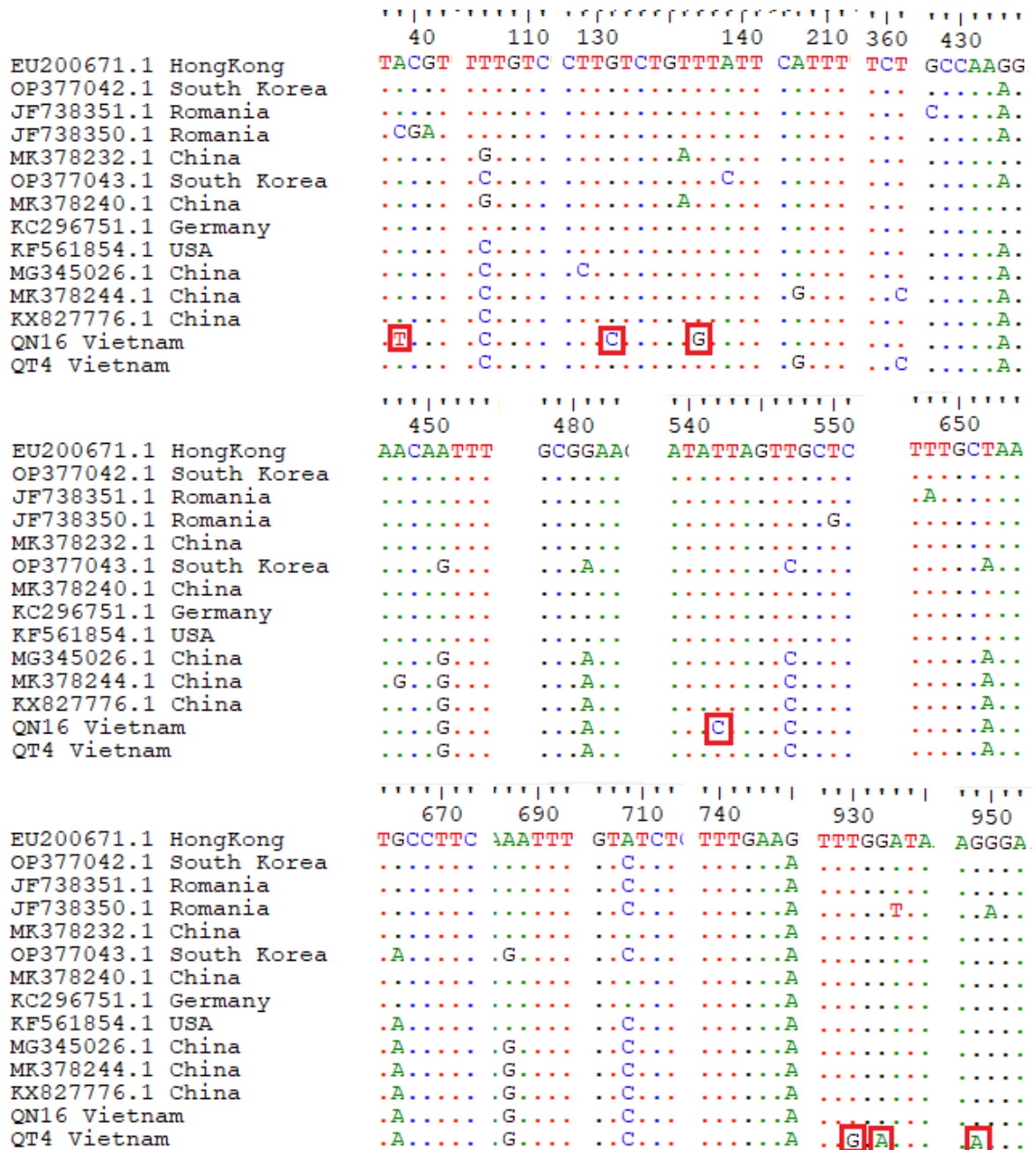
Kết quả phân tích cây phát sinh chủng loại đã gợi ý rằng các chủng PPV4 phân lập tại miền Trung Việt Nam có quan hệ di truyền gần gũi hơn với các chủng có nguồn gốc từ Trung Quốc và Romania so với các chủng phân lập ở Mỹ. Hình 3.25 cho thấy chủng PPV4-QT02 ở miền Trung Việt Nam cùng với chủng PPV4-QNi17 phân lập ở miền Bắc Việt Nam và các chủng Romania tạo thành một phân nhóm di truyền độc lập, tách biệt với các chủng PPV4 có nguồn gốc từ Trung Quốc và Mỹ. Trong khi đó, chủng PPV4-QT20 tập hợp với các chủng PPV4 được phân lập từ Trung Quốc và Mỹ trong một phân nhánh di truyền khác, tách biệt với nhánh Romania. Sự phân nhánh di truyền của cây phát sinh chủng loại trong nghiên cứu này thể hiện sự tương đồng với kết quả của các nghiên cứu trước đây (Qin và cs, 2018; Cadar và cs, 2013). Cùng với việc xác định mối quan hệ di truyền giữa các chủng PPV4 phân lập tại miền Trung Việt Nam với các chủng tham chiếu, kết quả nghiên cứu của chúng tôi đã cho thấy sự đa dạng di truyền của các chủng PPV4 phân lập tại miền Trung Việt Nam và cho thấy chúng thuộc các nhánh di truyền riêng biệt. Cho đến thời điểm hiện tại, nghiên cứu của chúng tôi lần đầu tiên phát hiện sự lưu hành của PPV4 trên lợn nuôi miền Trung Việt Nam và tiến hành phân tích đặc điểm phân

từ hệ gen/gen mã hóa protein cấu trúc của chúng. Kết quả này cũng cho thấy các chủng PPV4 phân lập có cấu trúc hệ gen điển hình với ba khung đọc mở. Tỷ lệ tương đồng cao giữa các chủng PPV4 phân lập ở các tỉnh miền Trung với các chủng PPV4 có nguồn gốc từ Trung Quốc gợi ý rằng các chủng virus này có thể được du nhập từ Trung Quốc sang Việt Nam thông qua biên giới phía Bắc. Bên cạnh đó, các chủng PPV4 nghiên cứu còn có mức độ tương đồng rất cao với các chủng phân lập từ Romania, chứng tỏ chúng có cùng một xu hướng tiến hóa riêng biệt. Đồng thời, sự xuất hiện các đột biến mới cung cấp thông tin dịch tễ quan trọng để kiểm soát tình hình lây lan của các chủng PPV4 cũng như đưa ra những dự đoán về quá trình tiến hóa của virus trong tương lai.

3.3.3. Đặc điểm phân tử vùng gen *NS1/VPI* của các chủng PPV3 phân lập ở các tỉnh miền Trung

PPV3 là chủng virus được phát hiện với tỷ lệ thấp nhất (5,5%) trong nghiên cứu này. Cho đến nay, thông tin về mối quan hệ giữa PPV3 và các bệnh ở lợn vẫn còn hạn chế, tuy nhiên, đã có minh chứng cho thấy PPV3 đóng vai trò là yếu tố kích hoạt liên quan đến bệnh do PCV2 trên lợn (Patrick và cs, 2014), làm suy giảm khả năng miễn dịch ở lợn (Amoroso và cs, 2019). Ngoài ra, Tregakis và cs (2020) đã xác nhận PPV3 có liên quan đáng kể đến hiện tượng viêm phúc mạc, viêm loét dạ dày, đại tràng và manh tràng, bệnh viêm da và hội chứng bệnh thận ở lợn (Porcine dermatitis and nephropathy syndrome-PDNS).

Kết quả so sánh trình tự nucleotide vùng gen *NS1/VPI* của hai chủng PPV3-QN16 và PPV3-QT4 phân lập ở miền Trung với các chủng tham chiếu (Bảng 2.5) được trình bày ở Hình 3.26.



Hình 3.26. Các vị trí khác biệt nucleotide trong vùng gen NS1/VP1 (995 bp) của hai chủng PPV3-QN16 và PPV3-QT4 so với các chủng tham chiếu

Các vị trí đột biến thay thế nucleotide và amino acid dự đoán từ trình tự vùng gen NS1/VP1 của hai chủng PPV3-QN16 và PPV3-QT4 phân lập tại miền Trung khác biệt so với các chủng tham chiếu được trình bày trong Bảng 3.16 và Hình 3.27.

Bảng 3.16. Vị trí thay thế nucleotide và amino acid dự đoán từ trình tự vùng gen NS1/VP1 của hai chủng PPV3-QN16 và PPV3-QT4 khác biệt hoàn toàn so với các chủng tham chiếu

Chủng	Vị trí thay thế nucleotide *	Vị trí thay thế amino acid**
PPV3-QN16	39: A→T	-
	131: G→C	-
	137: T→G	-
	542: T→C	-
PPV3-QT4	930: T→G	234: L→W
	932: G→A	235: D→N
	949: G→A	-

(*) Vị trí nucleotide trong trình tự đoạn gen NS1/VP1 (995 bp)

(**) Khung đọc mở ORF2 mã hoá cho protein VP1 khởi đầu từ nucleotide 230



Hình 3.27. Kết quả so sánh trình tự amino acid dự đoán đoạn gen VP1 của hai chủng PPV3-QN16 và PPV3-QT4 so với các trình tự tham chiếu

Số liệu ở Bảng 3.16 cho thấy trình tự vùng gen 995 bp của hai chủng PPV3-QN16 và PPV3-QT4 có bảy vị trí nucleotide khác biệt so với các chủng tham chiếu. Cụ thể, chủng PPV3-QN16 xuất hiện bốn vị trí khác biệt (39: A→T; 131: G→C; 137: T→G và 542: T→C) và chủng PPV3-QT4 có ba vị trí khác biệt (930: T→G; 932: G→A và 949: G→A). Trong số bảy vị trí thay thế

nucleotide kể trên, có bốn vị trí (542: T→C; 930: T→G; 932: G→A và 949: G→A) thuộc trình tự gen *VP1*. Hai vị trí thay thế nucleotide 930: T→G và 932: G→A dẫn đến thay thế amino acid dự đoán tại 234: L→W và 235: D→N của chủng PPV3-QT4 (Hình 3.26-3.27, Bảng 3.16). Hai biến đổi này nằm sát cạnh amino acid 233: P (Hình 3.27), là vị trí chịu áp lực chọn lọc tích cực trong quá trình tiến hoá phân tử gen mã hoá protein cấu trúc của PPV3 (Cadare và cs, 2013). Bên cạnh đó, so sánh các vị trí thay thế nucleotide tương tự với các chủng tham chiếu cũng cho thấy hai chủng PPV3 phân lập tại miền Trung có một số thay thế nucleotide tương đồng với chủng PPV3 phân lập tại Trung Quốc (2017-2019), Hàn Quốc và Mỹ (107: T→C; 433: G→A; 667: G→A và 709: A→C) (Hình 3.26).

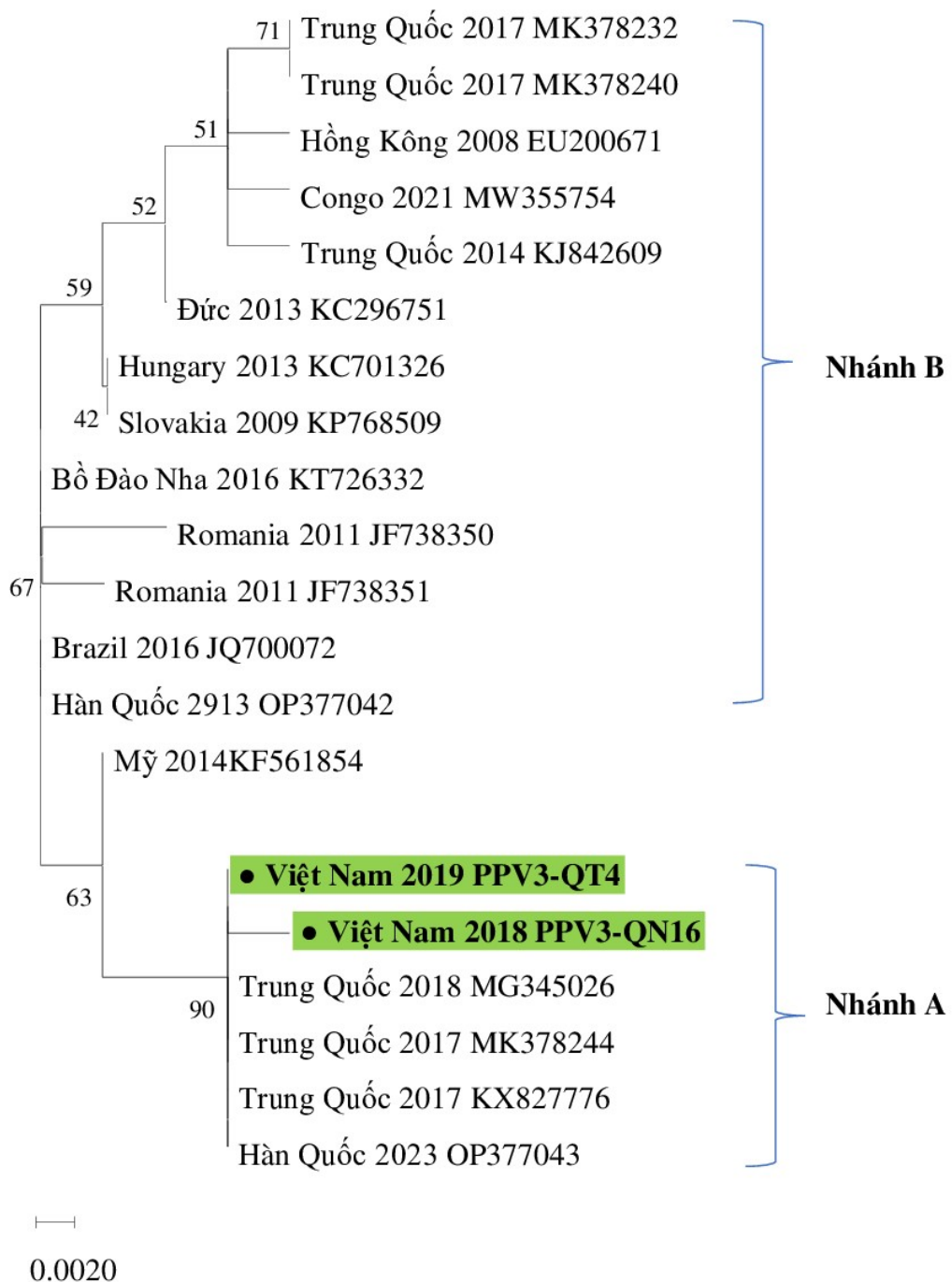
Mức độ tương đồng trình tự nucleotide vùng gen *NS1/VP1* của các chủng PPV3 phân lập ở miền Trung Việt Nam so với các chủng tham chiếu được trình bày trong Bảng 3.17.

Bảng 3.17. Tỷ lệ tương đồng nucleotide và amino acid dự đoán (%) từ trình tự gen *NS1/VP1* của các chủng PPV3 phân lập tại miền Trung Việt Nam và so sánh với các chủng tham chiếu

Kích thước		Nucleotide (995 bp)
Chủng		
Việt Nam		99,1
Hong Kông		98,4-98,5
Trung Quốc	Nhóm A	99,2-99,5
	Nhóm B	97,8-97,9
Mỹ		98,3-98,4
Châu Âu		97-98,4

Tỷ lệ tương đồng của hai chủng PPV3 trong nghiên cứu của chúng tôi với các chủng Trung Quốc được phân lập trong giai đoạn 2017-2018 dao động từ 99,2-99,5%; cao hơn hẳn khi so sánh với các chủng Trung Quốc được phân lập trước đó (2014-2017) với tỷ lệ 97,8-97,9%. So với chủng PPV3 có nguồn gốc từ Mỹ, các chủng PPV3 phân lập tại Quảng Ngãi và Quảng Trị có mức tương đồng nucleotide 98,3-98,4%. Tỷ lệ này thấp hơn khi so sánh với các chủng PPV3 có nguồn gốc từ châu Âu (97-98,4%).

Cây phát sinh chủng loại của các chủng PPV3 nghiên cứu và các chủng tham chiếu đại diện có nguồn gốc từ Châu Âu, châu Mỹ và châu Á (Bảng 2.5) được xây dựng dựa trên trình tự vùng gen mã hoá protein cấu trúc *VPI* của PPV3 (305 bp) (Hình 3.28).



Hình 3.28. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên trình tự vùng gen *VPI* (305 bp) của 2 chủng PPV3-QN16 và PPV3-QT4 và các chủng PPV3 tham chiếu. Chấm tròn màu đen biểu thị trình tự PPV3 Việt Nam. Các chữ số trên các nhánh là giá trị bootstrap với 1.000 lần lặp lại.

Hình 3.28 cho thấy cây phát sinh chủng loại PPV3 dựa trên trình tự vùng gen mã hoá protein cấu trúc *VP1* (305 bp) phân chia các chủng PPV3 phân tích thành hai nhánh chính. Hai chủng PPV3-QN16 và PPV3-QT4 được phân lập vào năm 2018-2019 ở miền Trung Việt Nam tập hợp cùng với các chủng PPV3 được phân lập tại Trung Quốc (2017-2018) và Mỹ trong một phân nhánh. Nhánh thứ hai bao gồm các chủng PPV3 có nguồn gốc từ Trung Quốc (2014-2017), Hàn Quốc, châu Âu, Congo và Brazil. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với các phân tích phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen *VP* của PPV3 được thực hiện bởi các nghiên cứu trước đây (Sun và cs, 2015; Bisimwa và cs, 2021).

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Đã phát hiện sự lưu hành của PPV1, PPV2, PPV3 và PPV4 trên đàn lợn ở bảy tỉnh miền Trung Việt Nam bằng phương pháp PCR khuếch đại đoạn nucleotide đặc trưng của từng chủng. Tỷ lệ phát hiện PPV (1-4) ở bảy tỉnh miền Trung lần lượt là: 52,7% đối với PPV1; 56,2% đối với PPV2; 5,5% đối với PPV3 và 8,2% đối với PPV4. Đồng nhiễm các chủng PPV (1-4) cũng đã được phát hiện ở 4/7 tỉnh nghiên cứu (Quảng Trị, Thừa Thiên Huế, Quảng Ngãi và Bình Định); trong đó đồng nhiễm hai chủng PPV1/PPV2 ở lợn nuôi tại Thừa Thiên Huế chiếm tỷ lệ cao nhất với 67,9 %.

2. Đã giải hai trình tự hệ gen của hai chủng PPV4 phân lập tại Quảng Trị có kích thước 5.367 bp (Đã đăng ký GenBank với các mã số MT434668 và MT434669), bao gồm ba khung đọc mở: ORF1, ORF2 và ORF3 với kích thước tương ứng lần lượt là 1.797 bp, 2.187 bp và 615 bp; ba trình tự gen mã hóa protein cấu trúc của ba chủng PPV2 phân lập ở các tỉnh Quảng Ngãi, Thừa Thiên Huế và Quảng Bình với kích thước 2.493 bp (Đã đăng ký GenBank với các mã số OL913365, OL913366 và OL913367) và hai trình tự vùng gen *NS1/VP1* của hai chủng PPV3 phân lập ở Quảng Trị và Quảng Ngãi với kích thước 995 bp.

3. Kết quả phân tích trình tự gen mã hóa protein cấu trúc của ba chủng PPV2 đã phát hiện bốn vị trí đột biến thay thế nucleotide (444: T→A, 734: C→T, 820: A→C và 1794: T→A), trong đó có hai đột biến dẫn đến thay thế amino acid dự đoán ở hai vị trí: 245 (S→F) và 274 (K→Q) khác biệt hoàn toàn so với các chủng tham chiếu. Kết quả phân tích trình tự hệ gen của hai chủng PPV4 đã phát hiện một đột biến thay thế nucleotide (124: G→A) dẫn đến thay thế amino acid (42: D→N) trong khung đọc mở ORF1 và tám vị trí thay thế trong trình tự nucleotide của gen mã hóa protein cấu trúc (ORF2) (714: A→G,

906: C→T, 1365: A→T, 1405: C→G, 1593: A→G, 1563: A→G, 1977: G→A, và 2068: C→T) dẫn đến bốn thay thế trong trình tự amino acid dự đoán ở các vị trí 455 (E→D), 469 (I→V), 531 (H→Q) và 690 (P→S) khác biệt hoàn toàn so với các chủng tham chiếu. Các đột biến thay thế nucleotide/amino acid dự đoán chủ yếu tập trung ở trình tự gen mã hóa protein cấu trúc (ORF2) của các chủng PPV4. Kết quả phân tích trình tự đoạn gen *VPI* của hai chủng PPV3 cho thấy bốn vị trí thay thế nucleotide (542: T→C; 930: T→G; 932: G→A và 949: G→A) dẫn đến thay thế trong trình tự amino acid dự đoán ở hai vị trí 234 (L→W) và 235 (D→N) khác biệt hoàn toàn so với các chủng tham chiếu.

4. Hai cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên trình tự hệ gen (5.387 bp) và gen mã hóa protein cấu trúc (2.187 bp) của PPV4 cho thấy các chủng PPV4 Quảng Trị có quan hệ gần gũi với các chủng PPV4 Romania và Trung Quốc. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên trình tự gen mã hóa protein cấu trúc của PPV2 (2.493 bp) cho thấy các chủng PPV2 có nguồn gốc từ Quảng Bình, Thừa Thiên Huế và Quảng Ngãi có quan hệ gần gũi với các chủng PPV2 có nguồn gốc từ châu Âu và Trung Quốc. Cây phát sinh chủng loại xây dựng dựa trên trình tự đoạn gen mã hoá protein cấu trúc *VPI* của PPV3 (305 bp) cho thấy các chủng PPV3 phân lập từ Quảng Ngãi và Quảng Trị có mối quan hệ gần gũi với các chủng PPV3 có nguồn gốc từ Trung Quốc và Mỹ.

5. Các dịch bệnh xảy ra trên lợn trong thời gian gần đây khá phức tạp, trong đó có phức hợp bệnh liên quan sinh sản và hô hấp, thường có sự đồng nhiễm của nhiều loại virus: PCV, PRRSV, PPV... vì thế các thông tin cập nhật về biến đổi di truyền, đặc biệt ở các vùng gen liên quan đến các tính kháng nguyên, đáp ứng miễn dịch... của virus là rất cần thiết, đặc biệt trong mục đích xây dựng phương pháp phát hiện các tác nhân gây bệnh đồng nhiễm trên lợn.

KIẾN NGHỊ

Mặc dù PPV lưu hành trên lợn ở mọi lứa tuổi nhưng nghiên cứu này chỉ được thực hiện trên các mẫu thu thập từ lợn nuôi thương phẩm, độ tuổi giết mổ,

thu ở các lò mổ. Bên cạnh đó, đề tài được thực hiện từ tháng 9/2019-8/2023, nằm toàn bộ trong thời gian đại dịch COVID-19, trong đó giai đoạn thu mẫu bị ảnh hưởng nên có những hạn chế nhất định, đặc biệt là không thể thực hiện được việc thu mẫu với lợn nái từ các trang trại giống. Do đó, tác giả luận án xin đề xuất một số kiến nghị sau:

1. Cần sàng lọc thêm nhiều chủng PPV phân lập tại Việt Nam, để tìm hiểu có hay không sự lưu hành của các chủng PPV khác (PPV5-8), nhằm bổ sung dữ liệu về PPV trên đàn lợn nuôi tại Việt Nam.

2. Tiến hành giám định sự có mặt của PPV ở các loại lợn (nái, sau cai sữa, choai), và tinh trùng của chúng nhằm kiểm soát các nguồn lan truyền virus.

3. Giải mã toàn bộ hệ gen/ gen mã hóa protein cấu trúc của các chủng PPV trên lợn đang lưu hành để so sánh với các chủng hiện có ở các vùng địa lý khác nhau nhằm đánh giá đặc điểm dịch tễ học phân tử của chúng

CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Nguyen Thi Dieu Thuy, **Nguyen Tran Trung**, Tran Quoc Dung, Do Vo Anh Khoa, Dinh Thi Ngoc Thuy, Tanja Opriessnig (2021). First investigation of the prevalence of parvoviruses in slaughterhouse pigs and genomic characterization of ungulate copiparvovirus 2 in Vietnam. *Archives of Virology*, 166: 779-788. (SCIE/Q2)
2. **Nguyen Tran Trung**, Tran Quoc Dung, Nguyen Thi Dieu Thuy (2023). Prevalence and structural protein encoding gene sequence (VP) of porcine parvovirus 2 (PPV2) in slaughtered pigs in central provinces of Vietnam. *Hue University Journal of Science: Natural Science*, 132 (1D): 5-14.
3. **Nguyễn Trần Trung**, Trần Quốc Dung, Đinh Thị Ngọc Thuý, Nguyễn Thị Diệu Thuý (2023). Phân tích trình tự vùng gen NS1/VP1 của virus Parvo (PPV3) trên lợn nuôi tại Quảng Trị và Quảng Ngãi. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Chăn nuôi*, 293: 59-65.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TIẾNG VIỆT

1. Bé, Đ.T. (2016). *Phát triển chăn nuôi lợn thịt theo tiêu chuẩn thực hành chăn nuôi tốt (VietGAHP) trên địa bàn huyện Diễn Châu, tỉnh Nghệ An*. Luận văn Thạc sĩ Kinh tế nông nghiệp, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.
2. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2020). *Chương trình quốc gia phòng chống dịch bệnh LMLM giai đoạn 2021-2025*.
3. Chúc, H.Đ. (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*.
4. Chúc, H.Đ., Đông, N.T.P., Khanh, T.D. (1995). Tình hình Hội chứng rối loạn sinh sản của lợn nái ở Thái Bình. *Tạp chí Thú y*, 1: 1-4.
5. Nguyễn Hùng Cường (2018). *Đặc điểm phân tử gen VP2 của virut Parvo trên lợn*. Luận văn Thạc sĩ Sinh học, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật.
6. Giáp, N.V., Ngân, M.T., Trường, L.V., Ngọc, V.T., Hiếu, V.V., Chung, T.T.K., Hạnh, V.Đ., Lê H.T.M. (2020). Sự hiện diện của Porcine Parvovirus 1 (PPV1) ở lợn nuôi tại Hà Nội và vùng phụ cận. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 18(7): 495-503.
7. Hùng, P. (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 vacxin phòng bệnh*. Luận án Tiến sĩ Nông nghiệp. Viện Thú Y Quốc gia.
8. Huỳnh, N., Từ, T.Đ., Hùng, L.V. (2000). *Khảo sát một số yếu tố liên quan đến rối loạn sinh sản trên heo nái tỉnh Long An*. Luận văn Thạc sĩ Thú y, Trường Đại học Nông lâm Thành phố Hồ Chí Minh.
9. Khanh, T.D., (2004). *Hội chứng rối loạn sinh sản ở lợn tại Thái Bình và vai trò của Porcine parvovirus*. Luận án Tiến sĩ Nông nghiệp, Viện Thú Y Quốc gia.

10. Quân, P.H. (2019). *Nghiên cứu sự lưu hành và đặc điểm dịch tễ học phân tử của porcine circovirus type 2 (PCV2) ở lợn nuôi tại Việt Nam*. Luận án Tiến sĩ Dịch tễ học Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

TIẾNG ANH

11. Adlhoch, C., Kaiser, M., Ellerbrok, H., Pauli, G. (2010). High prevalence of porcine Hokovirus in German wild boar populations. *Virol. J.*, 7(171): 1-4.
12. Afolabi, K.O., Iweriebor, B.C., Obi, L.C., Okoh, A.I. (2018a). Prevalence of porcine parvoviruses in some south African swine herds with confirmed high farm level occurrence of porcine circovirus type 2. *Acta. Trop.*, 119: 37-44.
13. Afolabi, K.O., Iweriebor, B.C., Okoh, A.I., Obi, L.C. (2019). Increasing diversity of swine parvoviruses and their epidemiology in African pigs. *Infect. Genet. Evol.*, 73: 175-183.
14. Amoroso, M.G., Cerutti, F., D'alessio, N., Lucibelli, M.G., Cerrone, A., Acutis, P.L., Galiero, G., Fusco, G., Peletto, S. (2019). First Identification Of Porcine Parvovirus 3 In A Wild Boar In Italy By Viral Metagenomics- Short Communication. *Acta Veterinaria Hungarica*, 67(1): 135-139.
15. Bergeron, J., Menezes, J., Tijssen, P. (1993). Genomic organization and mapping of transcription and translation products of the NADL-2 strain of porcine parvovirus. *Virol. J.*, 197(1): 86-98.
16. Berns, K.I., Hauswirth, W.W. (1983). Adeno-associated virus DNA structure and replication. In Berns KI, *The Parvoviruses*, New York, Plenum Press: 1-31.
17. Bhatta, T.R., Chamings, A., Alexandersen, S. (2021). Exploring the Cause of Diarrhoea and Poor Growth in 8-11-Week-Old Pigs from an Australian Pig Herd Using Metagenomic Sequencing. *Viruses*, 13(8): 1608.

18. Bhattacharjee, U., Sen, A., Sharma, I. (2021). Development of cost effective quantitative PCR method for parallel detection of porcine circovirus2 and porcine parvovirus in perspective of North-eastern India. *Trop. Anim. Health. Prod.*, 53: 177.
19. Bisimwa, P., Wasso, D., Bantuzeko, F., Aksanti, C., Tonui, R., Birindwa. A., Bisimwa, E. (2021). First investigation on the presence of porcine parvovirus type 3 in domestic pig farms without reproductive failure in the Democratic Republic of Congo. *Vet. Anim. Sci.*, 13(1): 100187.
20. Boisvert, M., Fernandes, S., Tijssen, P. (2010). Multiple pathways involved in porcine parvovirus cellular entry and trafficking toward the nucleus. *Viol. J.*,84: 82-92.
21. Bojan, L., Aleksandra, K., Nenad, M., Dejan, K., Ljubisa, V., Vesna, M., Andrea, Z., Spomenka, D., Maja, S. and Jakov, N. (2016). Molecular Detection of PCV2 And PPV in Pigs in Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina. *Acta Veterinaria-Beograd*, 66 (1): 51-60.
22. Born, E.V.D., Elzen, P.P.M.V.D, Kilsdonk, E.V, Hoeijmakers, M.J.H, Segers, R.P.A.M. (2020). An octavalent vaccine provides pregnant gilts protection against a highly virulent porcine parvovirus strain. *BMC. Vet. Res.*, 16(55): 1-6.
23. Cadar, D., Cságola, A., Kiss, T., Tuboly, T. (2013). Capsid protein evolution and comparative phylogeny of novel porcine parvoviruses. *Mol. Phylogenet.*, 66: 243-253.
24. Cartwright, S.F., and Huck, R.A. (1967). Viruses isolated in association with herd infertility, abortions and stillbirths in pigs. *Vet. Rec.*, 81: 196- 197.
25. Cartwright, S.F., Lucas, M., Huck, R. (1971). A small haemagglutinating porcine DNA virus: II. Biological and serological studies. *J. Comp. Pathol.*, 81: 145-155.

26. Chapman, M.S., Rossmann, M.G. (1993). Structure, sequence, and function correlations among parvoviruses. *Viol. J.*, 194: 491-508.
27. Chen, Y., Luo, S., Tan, J., Zhang, L., Qiu, S., Hao, Z., Wang, N., Deng, Z., Wang, A., Yang, Q., Yang, Y., Wang, C. and Zhan, Y. (2023). Establishment and application of multiplex real-time PCR for simultaneous detection of four viruses associated with porcine reproductive failure. *Front. Microbiol.*, 14: 1092273.
28. Cheung, A.K., Wu, G., Wang, D., Bayles, D.O., Lager, K.M., Vincent, A.L. (2010). Identification and molecular cloning of a novel porcine parvovirus. *Arch. Virol.*, 155: 801-806.
29. 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., Park, C.K., Choi, B.H., Lee, Y.H. (2022). A Plant-Produced Porcine Parvovirus 1-82 VP2 Subunit Vaccine Protects Pregnant Sows against Challenge with a Genetically Heterologous PPV1 Strain. *Vaccines* 2023, 11(1): 54.
30. Chung, H.C., Nguyen, V.G., Huynh, T.M, Park, Y.H., Park, K.T., Park, B.K. (2020). PCR-based detection and genetic characterization of porcine parvoviruses in South Korea in 2018. *BMC. Vet. Res.*, 16(113): 1-10.
31. Csagola, A., Lorincz, M., Cadar, D., Tombacz, K., Biksi, I., Tuboly, T. (2012). Detection, prevalence and analysis of emerging porcine parvovirus infections. *Arch. Virol.*, 157: 1003-1010.
32. Cui, J., Biernacka, K., Fan, J., Gerber, P.F, Stadejek, T., Opriessnig, T.. Circulation of Porcine Parvovirus Types 1 through 6 in Serum Samples Obtained from Six Commercial Polish Pig Farms (2017). *Transbound. Emerg. Dis.*, 64: 1945-1952.
33. Cui, J., Wang, X., Ren, Y., Cui, S., Li, G., Ren, X. (2012). Genome sequence of Chinese porcine parvovirus strain PPV2010. *J. Virol.*, 86(4): 2379.

34. Da Silva, M.S., Budaszewski, R.R., Weber, M.N., Cibulski, S.P., Paim, W.P., Mósená, A.C.S., Canova, R., Varela, A.P.M., Mayer, F.Q., Pereira, C.W., Canal, C.W. (2020). Liver virome of healthy pigs reveals diverse small ssDNA viral genomes. *Infect. Genet. Evol.*, 81: 104203
35. Dea, S., Elazhary, M.A.S.Y., Martineau, G.P., Vaillancourt, J. (1985). Parvovirus-like particles associated with diarrhea in unweaned piglets. *Can. J. Comp. Med.*, 49: 343-345.
36. Deka, D., Barman, N.N., Deka, N., Bath, B.K., Singh, G., Singh, S., Agrawal, R.K., Mukhopadhyay, C.S. (2021). Sero-epidemiology of porcine parvovirus, circovirus, and classical swine fever virus infections in India. *Trop. Anim. Health Prod.*, 53: 180.
37. Deng, S., Zhiyong, H., Mengjiao, Z., Shuangqi, F., Jingyuan, Z., Yunzhen, H., Hailuan, X., Jinding, C. (2020). Isolation and phylogenetic analysis of a new Porcine parvovirus strain GD2013 in China. *J. Virol. Methods.*, 275: 113748.
38. Díaz, C., Celer, V., Frébort, I. (2021). The main DNA viruses significantly affecting pig livestock. *J. Vet. Res.*, 65: 15-25.
39. Duffy, S., Holmes, E.C. (2008). Phylogenetic evidence for rapid rates of molecular evolution in the single-stranded DNA begomovirus tomato yellow leaf curl virus. *Virol. J.*, 82: 957-965.
40. Eterpi, M., McDonnell, G., Thomas, V. (2009). Disinfection efficacy against parvoviruses compared with reference viruses. *J. Hosp. Infect.*, 7364-7370.
41. Fang, L., Guo, L., Zhang, M., Li, X., Deng, Z. (2022). Analysis of Polyadenylation Signal Usage with Full-Length Transcriptome in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insects*, 13: 803
42. Farr, G.A., Cotmore, S.F., Tattersall, P. (2006). VP2 Cleavage and the Leucine Ring at the Base of the Fivefold Cylinder Control pH-Dependent

- Externalization of both the VP1 N Terminus and the Genome of Minute Virus of Mice. *Viol. J.*, 80(1): 161-171.
43. Franzo, G., Zerbo, H.L., Ouoba, B.L., Dji-Tombo, A.D., Kindo, M.G., Sawadogo, R., Chang'a, J., Bitanyi, S., Kamigwe, A., Mayenga, C., et al (2023). A Phylogeographic Analysis of Porcine Parvovirus 1 in Africa. *Viruses*, 15: 207.
 44. Gao, Y., Wang, H., Wang, S., Sun, M., Fang, Z., Liu, X., Cai, X., Tu, Y. (2022). Self-Assembly of Porcine Parvovirus Virus-like Particles and Their Application in Serological Assay. *Viruses*, 14(8): 1828.
 45. Garcia-Camacho, L.A., Vargas-Ruiz, A., Marin-Flamand, E., Ramírez-Álvarez, H., Brown, C. (2020a). A retrospective study of DNA prevalence of porcine parvoviruses in Mexico and its relationship with porcine circovirus associated disease. *Microbiol. Immunol.*, 64(5): 366-376.
 46. Garcia-Morante, B., Friedrich, R., Kaiser, T., Kraft, C., Bridger, P., Noguera, M. (2020c). Gilt vaccination with a mixed administration of a PRRS MLV and a PPV1 subunit vaccine protects against heterologous PRRSV1 infection and prevents detrimental effects on piglet performance. *Viruses*, 12: 789.
 47. Garcia-Morante, B., Noguera, M., Klocke, S., Sommer, K., Bridger, P. (2020b). Duration of immunity against heterologous porcine parvovirus 1 challenge in gilts immunized with a novel subunit vaccine based on the viral protein 2. *BMC. Vet. Res.*, 16: 184.
 48. Garcia-Morante, B., Noguera, M., Klocke, S., Sommer, K., Kaiser, T., Haist, V., et al (2019a). A novel subunit vaccine based on the viral protein 2 of porcine parvovirus: safety profile in bred pigs at different stages of the reproduction cycle and in offspring. *Heliyon* 5(11): e02593.
 49. Garcia-Morante, B., Noguera, M., Kraft, C., Bridger, P. (2019b). Field evaluation of the safety and compatibility of a combined vaccine against

- porcine parvovirus 1 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in breeding animals. *Porc. Heal. Manag.* 5: 28.
50. Girod, A., Wobus, C.E., Zádori, Z., Ried, M., Leike, K., Tijssen, P., Kleinschmidt, J.A., Hallek, M. (2002). The VP1 capsid protein of adeno-associated virus type 2 is carrying a phospholipase A2 domain required for virus infectivity. *J. Gen. Virol.*, 83: 973-978.
 51. Guo, Y., Yan, G., Chen, S., Han, H., Li, J., Zhang, H., Luo, S., Liu, M., Wu, Q., Li, Q., Tu, C., Huang, L. Gong, W. (2022). Identification and genomic characterization of a novel porcine parvovirus in China. *Front. Vet. Sci.*, 9: 1009103.
 52. Gupta, M.K, and Vadde, R. (2019). Genetic basis of adaptation and maladaptation via balancing selection. *Zoology*, 136: 125693.
 53. Gupta, M.K., and Vadde, R. (2023). Nextgeneration development and application of codon model in evolution. *Front. Genet.*, 14: 1091575.
 54. Hao, X., Lu, Z., Sun, P., Fu, Y., Cao, Y., Li, P., Bai, X., Bao, H., Xie, B., Chen, Y., Li, D., Liu, Z. (2011). Phylogenetic analysis of porcine parvoviruses from swine samples in China. *Virol. J.*, 8: 320.
 55. Harbinson, C.E., Chiorini, J.A., Parrish, C. (2008). The parvovirus capsid odyssey: from the cell surface to the nucleus. *Trends in Microbiol*, 16: 208-214.
 56. Haubold, B. (2014). Alignment-free phylogenetics and population genetics. *Brief. Bioinform.*, 15: 407-418.
 57. Hijikata, M., Abe, K., Win, K.M., Shimizu, Y.K., Keicho, N., Yoshikura, H. (2001). Identification of new parvovirus DNA sequence in swine sera from Myanmar. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 54: 244-245.
 58. Huang, L., Zhai, S.L., Cheung, A.K., Zhang, H.B., Long, J.X., Yuan, S.S. (2010). “Detection of a novel porcine parvovirus, PPV4, in Chinese swine herds. *Virol. J.*, 7(1): 1-4.

59. Jager, M.C., Tomlinson, J.E., Lopez-Astacio, R.A., Parrish, C.R., Van de Walle, G.R. (2021). Small but mighty: old and new parvoviruses of veterinary significance. *Viol. J.*, 18: 210.
60. Joo, H.S., Donaldson-Wood, C.R., and Johnson, R.H. (1976). Letter: Rapid diagnostic techniques for detection of porcine parvovirus infection in mummified foetuses. *Aust. Vet. J.*, 52: 51-52.
61. Jóźwik, A., Manteufel, J., Selbitz, H.J., 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. *J. Gen. Virol.*, 90: 2437-2441.
62. Kim, S.C., Jeong, C.G., Nazki, S., Lee, S.I., Baek, Y.C., Jung, Y.J., Kim, W.I. (2021). Evaluation of a multiplex PCR method for the detection of porcine parvovirus types 1 through 7 using various field samples. *PLoS One*, 16(1): e0245699.
63. Kiss, I., Kovács, E., Zádori, Z., Mészáros, I., Cságola, A., Bajnóczi, P., et al (2020). Vaccine protection against experimental challenge infection with a PPV-27a genotype virus in pregnant gilts. *Vet. Med. Res. Reports*, 11: 17-24.
64. Kresse, J.I., Taylor, W.D., Stewart, W.W., Emission, K.A. (1985). Parvovirus infection in pigs with necrotic and vesicle-like lesions. *Vet. Microbiol.*, 10: 525-531.
65. Kumar, S., Stecher, G., Li M., Knyaz, C., Tamura, K. (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.*, 35: 1547-1549.
66. 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., Ng, T.K., Tsang, O.T., Zheng, B.J., Tam, S., Chan, K.H., Zhou, B., Yuen, K.Y. (2008). Identification of novel porcine and bovine parvoviruses closely related to human parvovirus 4. *J. Gen. Virol.*, 89: 1840-1848.

67. Li, J., Xiao, Y., Qiu, M, Li, X., Li, S., Lin, H., et al (2021). A systematic investigation unveils high coinfection status of porcine parvovirus types 1 through 7 in China from 2016 to 2020. *Microbiol. Spectr.*, 9: e0129421.
68. Liu, H., Shi, K., Zhao, J., Yin, Y., Chen, Y., Si, H., et al (2022). Development of a one-step multiplex qRT-PCR assay for the detection of African swine fever virus, classical swine fever virus and atypical porcine pestivirus. *BMC Vet. Res.*, 18: 43.
69. Liu, Y., Wang, J., Chen, Y., Wang, A., Wei, Q., Yang, S., Feng, H., Chai, S., Liu, D., Zhang, G. (2020). Identification of a dominant linear epitope on the VP2 capsid protein of porcine parvovirus and characterization of two monoclonal antibodies with neutralizing abilities. *Int. J. Biol. Macromol.*, 163: 2013-2022.
70. Luka, P.D., Adedeji, A.J., Jambol, A.R., Ifende, I.V., Luka, H.G., Choji, N.D., Weka, R., Settypalli, T.B.K., Achenbach, J.E., Cattoli, G., et al (2022). Coinfections of African Swine Fever Virus, Porcine Circovirus 2 and 3, and Porcine Parvovirus 1 in Swine in Nigeria. *Arch. Virol.*, 167: 2715-2722.
71. Lukashov, V.V., Goudsmit, J. (2001). Evolutionary relationships among parvoviruses: virus-host coevolution among autonomous primate parvoviruses and links between adeno-associated and avian parvoviruses. *Virol. J.*, 75: 2729-2740.
72. Ma, X., Guo, Z., Li, Y., Yang, K., Li, X., Liu, Y., Shen, Z., Zhao, L. and Zhang, Z. (2022) Phytochemical Constituents of Propolis Flavonoid, Immunological Enhancement, and Anti-porcine Parvovirus Activities Isolated From Propolis. *Front. Vet. Sci.*, 9: 857183.
73. Mai, J., Wang, D., Zou, Y., Zhang, S., Meng, C., Wang, A., Wang, N. (2021). High Co-infection Status of Novel Porcine Parvovirus 7 With Porcine Circovirus 3 in Sows That Experienced Reproductive Failure. *Front. Vet. Sci.*, 8: 695553

74. Mayr, A. and Mahnel, H. (1964). Cultivation of hog cholera virus in pig kidney cultures with cytopathogenic effect. *Zentralbl Bakteriol Orig.*, 195: 157-166.
75. McKillen, J., Hjertner, B., Millar, A., McNeilly, F., Beldak, S., Adair, B., Allan, G. (2007). Molecular beacon real-time PCR detection of swine viruses. *Viol. J. Methods*, 140: 155-165.
76. Mengeling, W.L. (1972). Porcine parvovirus: Properties and prevalence of a strain isolated in the United States. *Am. J. Vet. Res.* 33: 2239-2248.
77. Mengeling, W.L., Cutlip RC (1976). Reproductive disease experimentally induced by exposing pregnant gilts to porcine parvovirus. *Am. J. Vet. Res.*, 37: 1393-1400.
78. Mengeling, W.L., Lager, K.M., Vorwald, A.C. (2000). The effect of porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine reproductive performance. *Anim. Reprod. Sci.*, 60(61): 199-210.
79. Mészáros, I., Toth, R., Olasz, F., Tijssen, P., Zadori, Z. (2017). The SAT Protein of Porcine Parvovirus Accelerates Viral Spreading through Induction of Irreversible Endoplasmic Reticulum Stress. *Viol. J.*, 91(16): 1-16.
80. Miao, L.F., Zhang, C.F., Chen, C.M., Cui, S.J. (2009). Real-time PCR to detect and analyze virulent PPV loads in artificially challenged sows and their fetuses. *Vet. Microbiol.*, 138: 145-149.
81. Mietzsch, M., Péntzes, J.J., Agbandje-McKenna, M. (2019). Twenty-Five Years of Structural Parvovirology. *Viruses*, 11: 362
82. Milek, D., Wozniak, A., Guzowska, M., 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.

83. Molini, U., Coetzee, L.M., Hemberger, M.Y., Khaiseb, S., Cattoli, G., Dundon, W.G. (2022b). Evidence Indicating Transmission of Porcine Parvovirus 1 between Warthogs and Domestic Pigs in Namibia. *Vet. Res. Commun.*, 2022.
84. Molini, U., Franzo, G., Gous, M., Moller, S., Hemberger, Y.M., Chiwome, B., Marruchella, G., Khaiseb, S., Cattoli, G., Dundon, W.G. (2021). Three Different Genotypes of Porcine Circovirus 2 (PCV-2) Identified in Pigs and Warthogs in Namibia. *Arch. Virol.*, 166: 1723-1728.
85. Molini, U., Franzo, G., Settypalli, T.B.K., Hemberger, M.Y., Khaiseb, S., Cattoli, G., Dundon, W.G., Lamien, C.E. (2022a). Viral Co-Infections of Warthogs in Namibia with African Swine Fever Virus and Porcine Parvovirus 1. *Animals*, 12: 1697.
86. Molitor, T.W., Joo, H.S., Collet, M.S. (1983). Porcine parvovirus purification and structural and antigenic properties of viron polypeptides. *Viol. J.*, 45: 842-854.
87. Morimoto, T., Fujisaki, Y., Ito, Y., and Tanaka, Y. (1972). Biological and physicochemical properties of porcine parvovirus recovered from stillborn piglets. *Natl. Inst. Anim. Health Q.*, 12: 137-144.
88. Nelsen, A., Lin, C.M., Hause, B.M. (2021). Porcine Parvovirus 2 Is Predominantly Associated With Macrophages in Porcine Respiratory Disease Complex. *Front. Vet. Sci.*, 8(726884): 1-10.
89. Nguyen, V.G., Dang, H.A., Nguyen, T.T., Huynh, T.M.L., Nguyen, B.H., Pham, L.A.M., 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): 2491-2498.
90. Ni, J., Qiao, C., Han, X., Han, T., Kang, W., Zi, Z., Cao, Z., Zhai, X., Cai, X. (2014). Identification and genomic characterization of a novel porcine parvovirus (PPV6) in China. *Viol. J.*, 11(203): 1-8.

91. Noguera, M., Vela, A., Kraft, C., Chevalier, M., Goutebroze, S., de Paz, X., Kunze, M., Rathkjen, P., Schacht, E., Garcia-Morante, B. (2021). Effects of three commercial vaccines against porcine parvovirus 1 in pregnant gilts. *Vaccine*, 39: 3997-4005.
92. Opriessnig, T., Xiao, C.T., Gerber, P.F., Halbur, P.G. (2014). Identification of recently described porcine parvoviruses in archived North American samples from 1996 and association with porcine circovirus associated disease. *Vet. Microbiol.*, 173(1-2): 9-16.
93. Palinski, R.M., Mitra, N., Hause, B.M. (2016). Discovery of a novel Parvovirinae virus, porcine parvovirus 7, by metagenomic sequencing of porcine rectal swabs. *Virus Genes*, 52: 564-567.
94. Park, G.N., Song, S., Cha, R.M. et al. (2021). Genetic analysis of porcine parvoviruses detected in South Korean wild boars. *Arch. Virol.*, 166: 2249-2254.
95. 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., Parveen, S.T. (2022). Molecular detection of porcine parvovirus 1-associated reproductive failure in southern India. *Tropical Animal Health and Production*, 54: 195.
96. Paul, P.S., Mengeling, W.L., Brown, T.T. (1979). Replication of Porcine Parvovirus in Peripheral-Blood Lymphocytes, Monocytes, and Peritoneal-Macrophages. *Infect. Immun.*, 25: 1003-1007.
97. Perna, N.T. and Kocher, T.D. (1995). Patterns of nucleotide composition at fourfold degenerate sites of animal mitochondrial genomes. *J. Mol. Evol.*, 41: 353-358.
98. Qin, S., Ruan, W., Yue, H., Tang, C., Zhou, K., Zhang, B. (2018). Viral communities associated with porcine respiratory disease complex in intensive commercial farms in Sichuan province, China. *Sci. Rep.*, 8: 13341.

99. Ren, X., Tao, Y., Cui J., Suo, S., Cong, Y., Tijssen, P. (2013). Phylogeny and evolution of porcine parvovirus. *Virus research*, 178(2): 392-397.
100. Ros, C., Bayat, N., Wolfisberg, R., and Almendral, J.M. (2017). Protoparvovirus Cell Entry. *Viruses*, 9(11): 313.
101. Saekhow, P. and Ikeda, H. (2015). Prevalence and genomic characterization of porcine parvoviruses detected in Chiangmai area of Thailand in 2011. *Microbiol. Immunol.*, 59: 82-88.
102. Saekhow, P., Kishizuka, S., Sano, N., Mitsui, H., Akasaki, H., Mawatari, T., and Ikeda, H. (2015). Coincidental detection of genomes of porcine parvoviruses and porcine circovirus type 2 infecting pigs in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 77(12): 1581-1586.
103. Saekhow, P., Sriphanam, C. and Yamsakul, P. (2022). Molecular characterization of porcine parvovirus 1 based on partial VP2 gene in the ovaries of Thai pigs. *Veterinary Integrative Sciences*, 20(2): 475-488.
104. Safe, S. (2023). Specificity Proteins (Sp) and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, 24 (5164): 1-22.
105. Sánchez-Matamoro,s A., Camprodon, A., Maldonado, J., Pedrazuela, R., Miranda, J. (2019). Safety and long-lasting immunity of the combined administration of a modified-live virus vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 and an inactivated vaccine against porcine parvovirus and *Erysipelothrix rhusiopathiae* in breeding pigs. *Porc. Heal. Manag.*, 5(11).
106. Serena, M.S., Cappuccio, J.A., Metz, G.E., Aspitia, C.G., Dibarbora, M., Calderon, M.G., Echeverria, M.G. (2019). Detection and molecular characterization of porcine parvovirus in fetal tissues from sows without reproductive failure in Argentina. *Heliyon*, 5(e02874): 1-6.
107. Serena, M.S., Dibárborá, M., Olivera, V., Metz, G.E., Aspitia, C.G., Pereda, A., et al (2021). Evidence of porcine circovirus type 2 and co-

- infection with ungulate protoparvovirus 1 (porcine parvovirus) in mummies and stillborn piglets in subclinically infected farm. *Infect. Genet. Evol.*, 89: 104735.
108. Shackelton, L.A., Parrish, C.R., Truyen, U., Holmes, E.C. (2005). High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 102: 379-384.
 109. Shangjin, C., Cortey, M., Segalés, J. (2009). Phylogeny and evolution of the NS1 and VP1/VP2 gene sequences from porcine parvovirus. *Virus Res.*, 140: 209-215.
 110. Shi, K., Chen, Y., Yin, Y., Long, F., Feng, S., Liu, H, Qu, S., Si, H. (2022). A Multiplex Crystal Digital PCR for Detection of African Swine Fever Virus, Classical Swine Fever Virus, and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Front. Vet. Sci.*, 9: 926881.
 111. Simpson, A.A., Hébert, B., Sullivan, G.S., Parrish, C.R., Zadori, Z., Tijssen, P., Rossmann, M.G. (2002). The structure of porcine parvovirus: comparison with related viruses. *J. Mol. Biol.*, 315: 1189-1198.
 112. Sliz, I., Vlasakova, M., Jackova, A., Vilcek, S. (2015). Characterization of Porcine Parvovirus Type 3 and Porcine Circovirus Type 2 in Wild Boars (*Sus Scrofa*) in Slovakia. *J. Wildl. Dis.*, 51: 703-711.
 113. Soares, R.M., Cortez, A., Heinemann, M.B., Sakamoto, S.M., Martins, V.G., Bacci, M., De Campos, F.M., Richtzenhain, L.J. (2003). Genetic variability of porcine parvovirus isolates revealed by analysis of partial sequences of the structural coding gene VP2. *J. Gen. Virol.*, 84: 1505- 1515.
 114. Streck, A.F., Bonatto, S.L., Homeier, T., Souza, C.K., Goncalves, K.R., Gava, D., Canal, C.W., Truyen, U. (2011). High rate of viral evolution in the capsid protein of porcine parvovirus. *Gen. Virol. J.*, 92: 2628-2636.
 115. Streck, A.F., Canal, C.W., Truyen, U. (2015). Molecular epidemiology evolution of porcine parvoviruses. *Infect. Genet. Evol.*, 36: 300-306.

116. Streck, A.F., Homeier, T., Foerster, T., Fischer, S., Truyen, U. (2013). Analysis of porcine parvoviruses in tonsils and hearts from healthy pigs reveals high prevalence and genetic diversity in Germany. *Arch. Virol.*, 158: 1173-1780.
117. Streck, A.F., Truyen, U. (2020). Porcine Parvovirus. *Curr. Issues. Mol. Biol.*, 37: 33-46.
118. Sun, J., Huang, L., Wei, Y., Wang, Y., Chen, D., Du, W., Wu, H., Liu, H. (2015). Prevalence of emerging porcine parvoviruses and their co-infections with porcine circovirus type 2 in China. *J. Gen. Virol.*, 160(5): 1339-1344.
119. Suzuki, H., and Fujisaki, Y. (1976). Immunizing effects of inactivated porcine parvovirus vaccine on piglets.
120. Thompson, J., Higgins, D., Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weight-ing, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673-4680.
121. Thuy, N.T.D., Thu, N.T., Son, N.G., Ha, L.T.T., Khoa, D.V.A. (2015). Genetic Analysis of the ORF7 Gene in Vietnamese Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV). *Kafkas. Univ. Vet. Fak. Derg.*, 21(5): 745-751.
122. Thuy, N.T.D., Trung N.T., Dung T.Q., Khoa, D.V.A., Thuy D.T.N., 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: 779- 788.
123. Tian, W., Qiu, Z., Cui, Y.C., Zhang, J., Ma, X.J., Cui, S.J., Zheng, S.M. (2019). Comparison of immune responses induced by porcine parvovirus virus-like particles and inactivated vaccine. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 32: 377- 382.

124. Tregaskis, P., Staines, A., Gordon, A., Sheridan, P., McMenemy, M., Duffy, C. (2020). Co-infection status of novel parvovirus's (PPV2 to 4) with porcine circovirus 2 in porcine respiratory disease complex and porcine circovirus-associated disease from 1997 to 2012. *Transbound. Emerg. Dis.*, 68: 1979-1994.
125. Truyen, U., Streck, A.F, (2012). Porcine parvovirus. In: Zimmerman J, Karriker L, Ramirez A, Schwartz K, Stevenson G (Eds.) *Diseases of Swine 10*. John Wiley & Sons Inc., Oxford: 447-455.
126. Tu, M., Liu, F., Chen, S., Wang, M., Cheng, A. et al (2015). Role of Capsid Proteins in Parvoviruses Infection. *Virology Journal*, 12: 114-121.
127. Vargas-Bermudez, D.S., Rendon-Marin, S., Ruiz-Saenz, J., Mogollon, D., Jaime, J. (2021). The first report of porcine parvovirus 7 (PPV7) in Colombia demonstrates the presence of variants associated with modifications at the level of the VP2-capsid protein. *PLoS ONE.*, 16: e258311.
128. Vereecke, N., Kvisgaard, L.K., Baele, G., Boone, C., Kunze, M., Larsen, L.E., Theuns, S., 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 Evol.*, 8(1): 1-12.
129. 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., Davison, A.J. (2020). Changes to virus taxonomy and the Statutes ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.*, 165(11): 2737-2748.

130. Wang, F., Wei, Y., Zhu, C., Huang, X., Xu, Y., Yu, L., Yu, X. (2010). Novel parvovirus sublineage in the family of Parvoviridae. *Virus Genes*, 41: 305-308.
131. Wang, J., Liu, Y., Chen, Y., Wang, A., Wei, Q., Liu, D. et al (2020). Large-scale manufacture of VP2 VLP vaccine against porcine parvovirus in *Escherichia coli* with highdensity fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 104: 3847-3857.
132. Wang, J., Liu, Y., Chen, Y., Zhang, T., Wang, A., Wei, Q., Liu, D., Wang, F., Zhang, G. (2021). Capsid assembly is regulated by amino acid residues asparagine 47 and 48 in the VP2 protein of porcine parvovirus. *Vet. Microbiol.*, 253: 108974.
133. Wang, W., Cao, L., Sun, W., Xin, J., Zheng, M., Tian, M., Lu, H., Jin, N. (2019). Sequence and phylogenetic analysis of novel porcine parvovirus 7 isolates from pigs in Guangxi, China. *PLoS ONE.*, 14: e0219560.
134. Wang, Y., Yang, K., Wang, J., Wang, X., Zhao, L., Sun, P., Li, Y. (2019). Detection and molecular characterization of novel porcine parvovirus 7 in Anhui province from Central-Eastern China. Infection, genetics and evolution. *J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.*, 71: 31-35
135. Wang, Z., Bai, L., Hsieh, Y.J., Roeder, R.G. (2000). Nuclear factor 1 (NF1) affects accurate termination and multiple-round transcription by human RNA polymerase III. *EMBO J.*, 19: 6823-6832.
136. Wen, S., Song, Y., Lv, X., Meng, X., Liu, K., Yang, J., Diao, F., He, J., Huo, X., Chen, Z., Zhai, J. (2022). Detection and Molecular Characterization of Porcine Parvovirus 7 in Eastern Inner Mongolia Autonomous Region, China. *Front. Vet. Sci.*, 9: 930123.
137. Xia, X., and Yuen, K.Y. (2005). Differential selection and mutation between dsDNA and ssDNA phages shape the evolution of their genomic AT percentage. *BMC. Genet.*, 6(20): 1-8.

138. Xiao, C.T., Genber, P.F., Gimenez-Lirola, L.G., Halbur, P.G. and Opriessnig, T. (2012). Characterization of porcine parvovirus type 2 (PPV2) which is highly prevalent in the USA. *Vet. Microbiol.*, 161: 325-330.
139. Xiao, C.T., Halbur, P.G., Opriessnig, T. (2013). Complete genome sequence of a novel porcine parvovirus (PPV) provisionally designated PPV5. *Genome Announcements*, 1: 00021-00012.
140. Xie, Q., Chapman, M.S. (1996). Canine parvovirus capsid structure, analyzed at 2.9 Å resolution. *Mol. Biol. J.*, 264: 497-520.
141. Xie, Q., Wang, J., Gu, C., Wu, J., Liu, W. (2022). Structure and function of the parvoviral NS1 protein: a review. *Virus genes*, 226(1).
142. Xu, M., Jin, X., Zhang, C., Liao, H., Wang, P., Zhou, Y., Song, Y., Xia, L., Wang, L. (2022). TLR2-Mediated NF-KB Signaling Pathway Is Involved in PPV1-Induced Apoptosis in PK-15 Cells. *Vet. Res. Commun.*, 1-11.
143. Yan, F., Xu, S., Chang, Z., Nazar, M., Chamba, Y., Shang, P. (2022). Seroprevalence and risk factors investigations of parvovirus disease in tibetan pigs: first report from tibet. *Vet. Sci.*, 9: 576.
144. Yang, D., Chen, L., Duan, J., Yu, Y., Zhou, J., Lu, H. (2021). Investigation of Kluyveromyces marxianus as a novel host for large-scale production of porcine parvovirus virus-like particles. *Microb. Cell. Fact.*, 20(24).
145. Yasuhara, H., Matsui, O., Hirahara, T., Ohgtani, T., Tanaka, M.L., Kodama, K., Nakai, M., Sasaki, N. (1989). Characterization of parvovirus isolated from diarrheic feces of a pig. *Jpn. Vet. Sci. J.*, 51: 337-344.
146. You, X., Lei, Y., Zhang, P., Xu, D., Ahmed, Z., Yang, Y. (2022). Role of transcription factors in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection: A review. *Front. Microbiol.*, 13: 924004.

147. Zádori, Z., Szelei, J., Lacoste, M.C., Li, Y., Gariépy, S., Raymond, P., Allaire, M., Nabi, I.R., Tijssen, P. (2001). A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity. *Dev. Cell*, 1: 291-302.
148. Zádori, Z., Szelei, J., Tijssen, P. (2005). SAT: a late NS protein of porcine parvovirus. *Viol. J.*, 79: 13129-13138.
149. Zeeuw, E.J.L., Leinecker, N., Herwig, V., Selbitz, H.J., Truyen, U. (2007). Study of the virulence and crossneutralization capability of recent porcine parvovirus field isolates and vaccine viruses in experimentally infected pregnant gilts. *J. Gen. Virol.*, 88: 420-427.
150. Zhang, H., Huang, Y., Du, Q., Luo, X., Zhang, L., Zhao, X., Tong, D. (2015). Porcine parvovirus infection induces apoptosis in PK-15 cells through activation of p53 and mitochondria-mediated pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 456: 649-655.
151. Zhang, H.B., Huang, L., Liu, Y.J., Lin, T., Sun, C.Q., Deng, Y., Wei, Z.Z., Cheung, A.K., Long, J.X., Yuan, S.S. (2011). Porcine bocaviruses: genetic analysis and prevalence in Chinese swine population. *Epidemiol. Infect.*, 139: 1581-1586.
152. Zhang, J., Fan, J., Li, Y., Liang, S., Huo, S., Wang, X., Zuo, Y., Cui, D., Li, W., Zhong, Z., 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): 389.
153. Zhang, X., Zheng, C., Lv, Z., Xue, S., Chen, Y., Liu, Y. et al (2022). Genetic and epidemic characteristics of porcine parvovirus 7 in the Fujian and Guangdong regions of southern China. *Front. Vet. Sci.*, 9: 949764.
154. Zhang, Y., Song, J., Zhang, M., Deng, Z. (2022). Analysis Polyadenylation Signal Usage in *Sus scrofa*. *Animals*, 12(2): 194.

155. Zhao, X., Xiang, H., Bai, X., Fei, N., Huang, Y., Song, X., Zhang, H., Zhang, L., Tong, D. (2016). Porcine parvovirus infection activates mitochondria-mediated apoptotic signaling pathway by inducing ROS accumulation. *Viol. J.*, 13: 26.
156. Zheng, H.H., Wang, L.Q., Fu, P.F., Zheng, L.L., Chen, H.Y., Liu, F. (2020). Characterization of a recombinant pseudorabies virus expressing porcine parvovirus VP2 protein and porcine IL-6. *Viol. J.*, 17: 19.
157. Zimmermann, P., Ritzmann, M., Selbitz, H.J., Heinritzi, K., Truyen, U. (2006). VP1 sequences of German porcine parvovirus isolates define two genetic lineages. *Gen. Virol. J.*, 87: 295-301.

TRANG WEB

158. Côi, NQ. (2010). Phát triển chăn nuôi lợn bền vững quy mô nông hộ tại một số tỉnh miền Trung Việt Nam. *Báo cáo tiến độ dự án CARD*. Truy cập ngày 9/10/2023, từ <https://thuvienluanvan.info/luan-van/bao-cao-phat-trien-chan-nuoi-lon-ben-vung-quy-mo-nong-ho-tai-mot-so-tinh-mien-trung-viet-nam-112905.html>
159. Cục chăn nuôi (2023). *Tổng quan về ngành chăn nuôi lợn của Việt Nam giai đoạn 2019-2023*. Truy cập ngày 9/11/2023 từ <https://nhachannuoi.vn/tong-quan-ve-nganh-chan-nuoi-lon-cua-viet-nam-giai-doan-2019-2023-p4-su-chuyen-dich-co-cau/>
160. Kon, K. (2018). *Porcine Parvovirus*. Truy cập ngày 19/8/2019, từ <https://sciencephotogallery.com/featured/1-porcine-parvovirus-kateryna-konscience-photo-library.html>
161. Tôn, NV. (2020). Ổn định và phát triển ngành chăn nuôi, chăn nuôi lợn bền vững trong bối cảnh ở nước ta hiện nay. *Tạp chí Công sản*. Truy cập ngày 11/10/2023, <https://www.tapchiconsan.org.vn/web/guest/kinh-te//2018/819602/on-dinh-va-phat-trien-nganh-chan-nuoi%2C-chan-nuoi-lon-ben-vung-trong-boi-can-h-o-nuoc-ta-hien-nay.aspx#>

162. Tổng cục Thống kê (2021). *Chăn nuôi lợn đang đà hồi phục*. Truy cập ngày 12 tháng 5 năm 2021 từ <https://www.gso.gov.vn/du-lieu-va-so-lieu-thong-ke/2021/04/chan-nuoi-lon-dang-da-hoi-phuc/>
163. Tổng cục Thống kê (2022). *Thống kê chăn nuôi năm 2021*. Truy cập ngày 8 tháng 8 năm 2022, từ <https://channuoivietnam.com/thong-ke-chan-nuoi/>
164. Tổng cục Thống kê (2023). *Thông cáo báo chí về tình hình kinh tế-xã hội quý II và 6 tháng đầu năm 2023*. Truy cập ngày 10/10/2023, từ <https://www.gso.gov.vn/du-lieu-va-so-lieu-thong-ke/2023/06/thong-cao-bao-chi-ve-tinh-hinh-kinh-te-xa-hoi-quy-ii-va-6-thang-dau-nam-2023/>

DANH MỤC PHỤ LỤC

Phụ lục 1: Thông tin thu mẫu ở bảy tỉnh miền Trung Phụ lục 2: Kết quả tách chiết DNA tổng số

Phụ lục 3: Trang thiết bị, dụng cụ, hóa chất, trình tự tham chiếu sử dụng trong nghiên cứu

Phụ lục 4: Các marker sử dụng trong nghiên cứu

Phụ lục 5: Kết quả đăng ký trình tự nucleotide của các chủng PPV2 phân lập tại miền Trung Việt Nam.

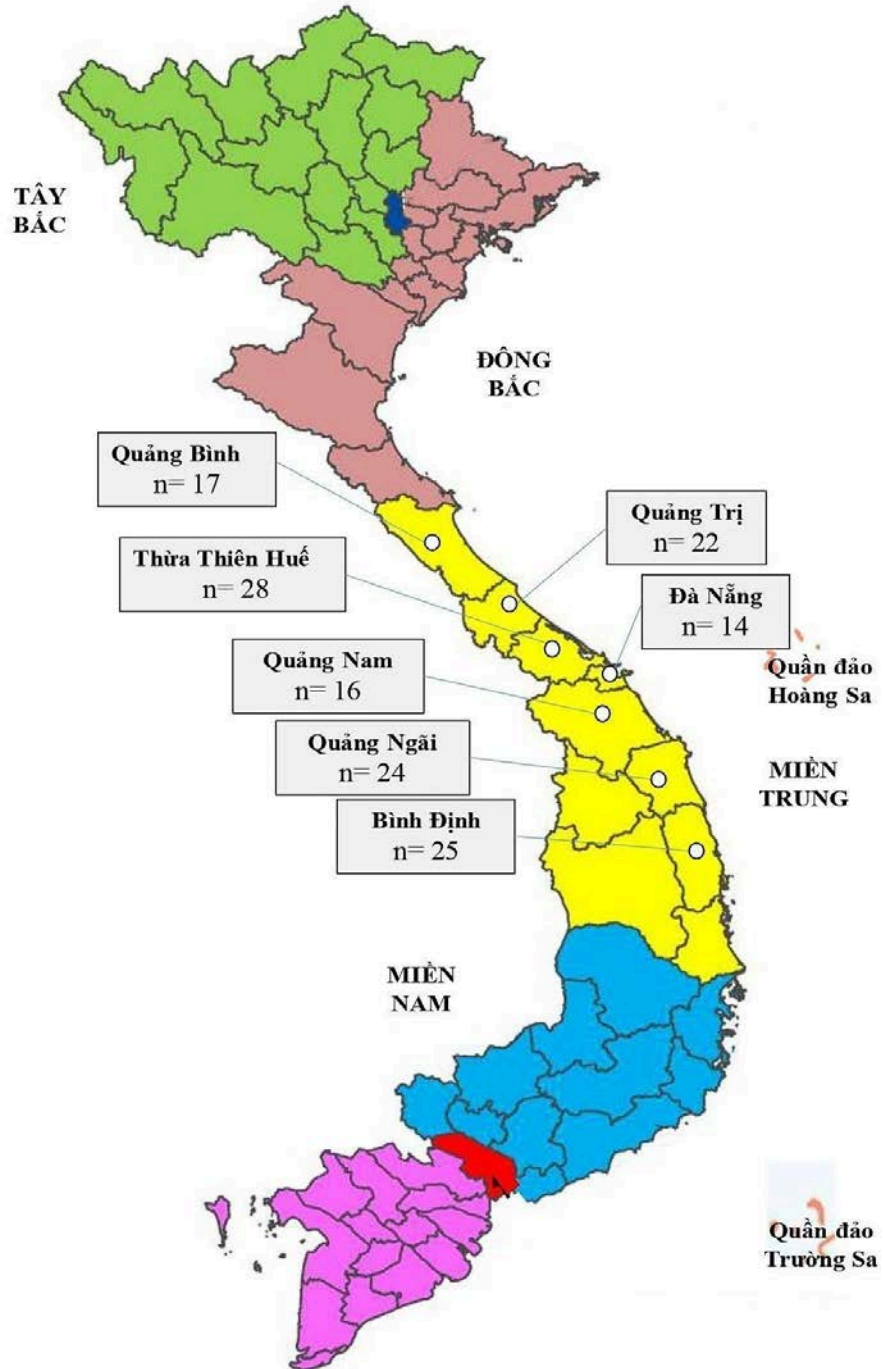
Phụ lục 6: Kết quả đăng ký trình tự nucleotide của các chủng PPV4 phân lập tại miền Trung Việt Nam.

Phụ lục 7: Kết quả so sánh trình tự nucleotide và amino acid giữa các chủng PPV phân lập so với chủng tham chiếu

Phụ lục 8: Kết quả so sánh tỷ lệ tương đồng

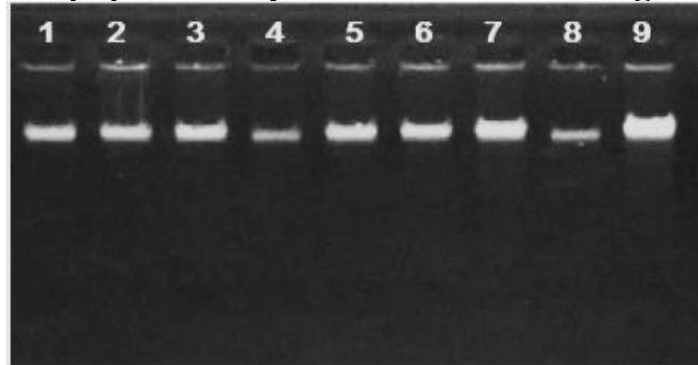
PHỤ LỤC

Phụ lục 1: Thông tin thu mẫu ở bảy tỉnh miền Trung

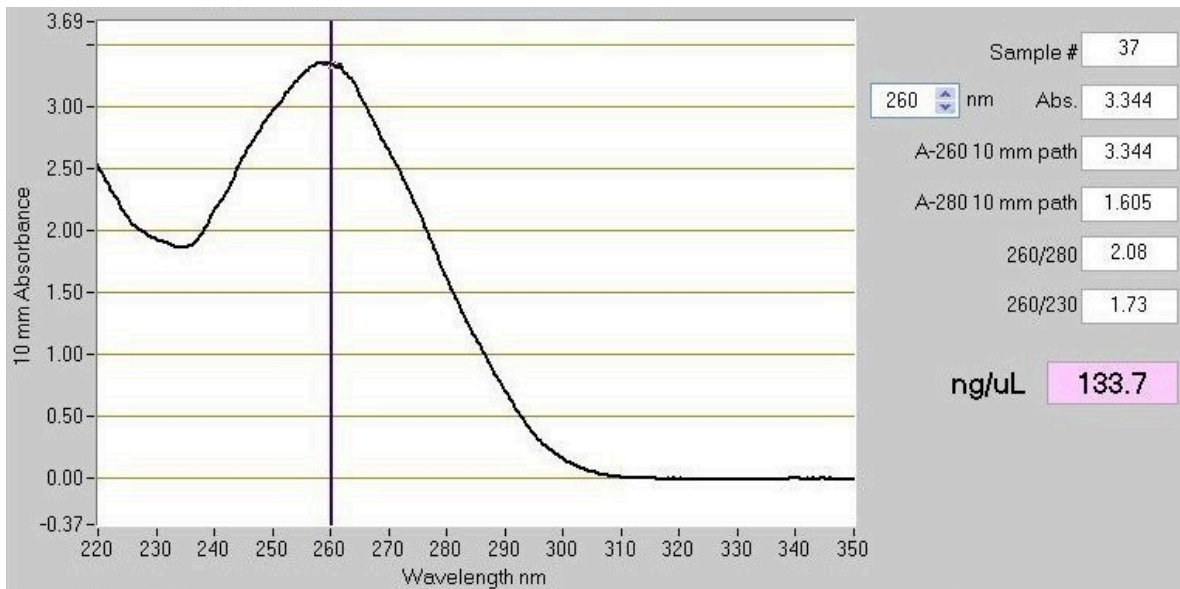


Hình PL1. Thông tin thu thập mẫu thí nghiệm ở bảy tỉnh miền Trung

Phụ lục 2: Kết quả tách chiết DNA tổng số



Hình 2A. Kết quả điện di DNA tổng số tách chiết từ mẫu nghiên cứu



Hình 2B. Kết quả đánh giá chất lượng và số lượng DNA tổng số bằng máy đo Nanodrop

Phụ lục 3: Trang thiết bị, dụng cụ, hóa chất sử dụng trong nghiên cứu
Bảng 3A. Trang thiết bị sử dụng trong nghiên cứu

STT	Trang thiết bị	Hãng sản xuất (Nước)
1	Bộ cối chày sứ	Việt Nam
2	Cân phân tích	Mettler (Đức)
3	Đèn chiếu tia UV	Probe Shimadzu (Nhật Bản)
4	Hệ thống chụp ảnh gel	Biolabs (Mỹ)
5	Hệ thống điện di DNA	Mupid-ex (Nhật)
6	Lò vi sóng	Samsung (Hàn Quốc)
7	Máy chu trình nhiệt PCR	Applied Biosystems (Mỹ)
8	Máy PCR -96	Mastercycler-ependorf (Mỹ)
9	Bể điện di	Mupid-2 plus (Nhật Bản)
10	Nồi khử trùng và tủ sấy	Nhật Bản
11	Pipettman, đầu côn các loại	Eppendorf (Đức)
12	Tủ cấy vô trùng	Sanyo (Nhật Bản)
13	Tủ lạnh sâu -20°C, tủ lạnh 4°C	Sanyo (Nhật Bản)
14	Tủ ôn nhiệt	OSI (Pháp)
15	Máy đo Nanodrop ND2000	Thermo Scientific (Mỹ)

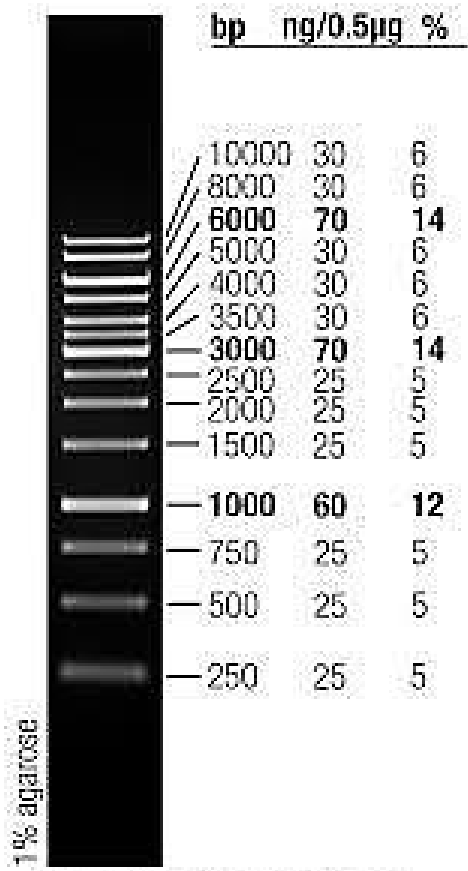
Bảng 3B. Các đệm, gel và thuốc nhuộm sử dụng trong nghiên cứu

STT	Thiết bị	Thành phần
1	Đệm TBE 10x	1M Tris HCl; 830 mM boric acid; 1 mM EDTA; pH = 8,0
2	Đệm TE 10x	10 mM Tris HCl; 1 mM EDTA; pH = 8,0
3	Agarose 0,5%	Cân 0,5 g agarose hòa tan vào trong 100 mL dung dịch đệm TBE
4	Agarose 1 %	Cân 1 g agarose hòa tan vào trong 100 mL dung dịch đệm TBE
5	Ethidium bromide 1%	Hoà tan 1 g Ethidium bromide trong 100 mL H ₂ O

Bảng 3C. Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu

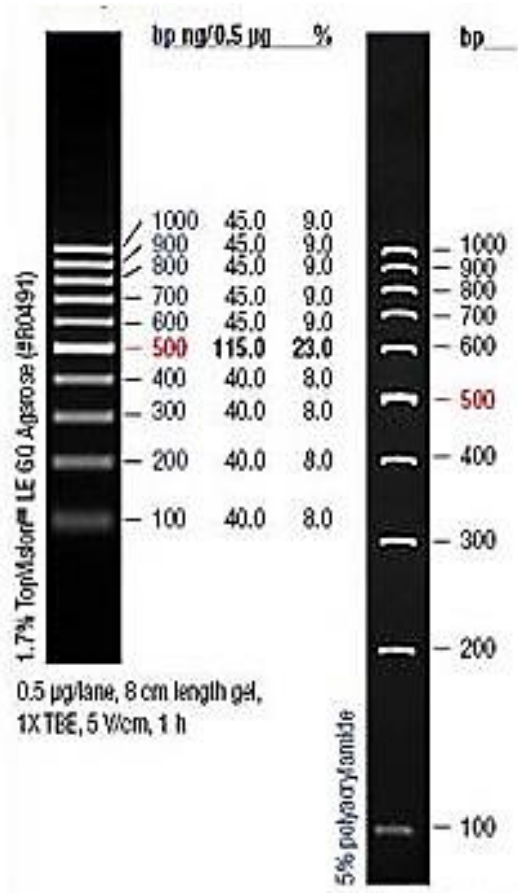
STT	Thiết bị, dụng cụ	Hãng sản xuất (Nước)
1	Nitơ lỏng	Việt Nam
2	Bộ hóa chất tách mRNA	Invitrogen (Mỹ)
3	Bộ hóa chất chạy PCR	Fermentas (Mỹ)
4	Cồn 70% và 100%	Merch (Đức)
5	Hóa chất điện di DNA	Biolabs (Mỹ)

Phụ lục 4: Các marker sử dụng trong nghiên cứu



0.5 µg/lane, 8 cm length gel,
1X TAE, 7 V/cm, 45 min

GeneRuler 1 kb DNA Ladder
(Thermo Scientific, Mỹ)



0.5 µg/lane, 8 cm length gel,
1X TBE, 5 V/cm, 1 h

GeneRuler 100 bp DNA Ladder
(Thermo Scientific, Mỹ)

Phụ lục 5: Kết quả đăng ký trình tự nucleotide của các chủng PPV2 phân lập tại miền Trung Việt Nam

Porcine parvovirus isolate QN03 sequence

GenBank: OL913365.1

LOCUS OL913365 2493 bp DNA linear VRL 04-OCT-2022

DEFINITION : Porcine parvovirus isolate QN03 sequence.

ACCESSION OL913365

VERSION OL913365.1

KEYWORDS .

SOURCE Porcine parvovirus

ORGANISM Porcine parvovirus

Viruses; Monodnaviria; Shotokuvirae; Cossaviricota; Quintoviricetes; Piccovirales; Parvoviridae; Parvovirinae; Protoparvovirus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 2493)

AUTHORS Nguyen,T.T., Dinh,T.T.N. and Nguyen,T.T.D.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (16-DEC-2021) Animal Gene Biotechnology, Institute of

Biotechnology, VAST, 18 Hoang Quoc Viet Rd, Ha Noi 10600, Viet Nam

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..2493

/organism="Porcine parvovirus"

/mol_type="genomic DNA"

/isolate="QN03"

/isolation_source="lung"

/host="pig"

/db_xref="taxon:10796"

/country="Viet Nam"

/collection_date="2021"

ORIGIN

```
1   tgagcgctgc cgacgcgtgg aagccgggtg accggccccc gctggagaac ctcatggatg
61  ccatggacag atccatttgg ggcaatagaa gaaacaactc tggcggggcg agagggatca
121 atgcccttct gaggcctggc tatgatccgc gcatgcgcca ggctctctta cagctttaca
181 agttttttat ctcaataaag aaacacggtg gtttctggga taaaattaag gaggtggcga
241 agcaatggtg gatggcggga caccagacct ccaagggaga cgagctagcg cgaacagtgc
301 tegatctggg aaggctcttt atggcctggt tagatgacta tagggaggac ccagagatag
361 atagcgtcag gaggagcatg atagattttc tttacgggga caatgatgcc actagggcct
421 tctttggatt acagcggttc gcagacaagg tccgtctacc tcagagagac gtgatgaggg
```

481 tgtggatcac gggcgggtat agaccgcagc ccccgaaagg gagtccttgg ggtacctggg
541 cggaacttga cctagacatt cgtaattcct tagatgcctc ctataaggca gaagaggaag
601 accgttcgaa agcgattcag gtcctcctg gtcgaccatcc tgggcctgaa tccggagagc
661 aacctcagcc ggcacctgaa gagaggcctg ctgagagtgc tgaggctggt ggcccagggt
721 ctgatggaca gtttggacgg gctgatacgg gggccggacg ggaaggagat tccccctcta
781 ccgaagtggg aggatcagat ggaccagagt cagatggaca agggggagga ctcaccctgc
841 ctggatatag gtatgtaggg cccggcaatc ccttggatgc gggggagccg aggggaccg
901 tagatgccat agctaagaaa cacgatgagc ggtacgacga gctcatcaag catggccaca
961 taccgtatat tcacgggagg ggggcagaca ctatgatggg aaaagagctt gcagatgccg
1021 aggaagcggg gaagatcctc gatagttatg atcagttagt ggcgaatgcc gctagggggc
1081 tgtggagagc taaggacacg ttagcggatc tcattggtgg ggagctggac aaagtcttac
1141 cgcccgatcc tcccgtacag agcgaggggg aggagtccca gaagagacct cgtgaggagg
1201 cggatcctcc ggagagcgcc gactccgcc ccaaagcccc gcccgcccaa aaaccaagac
1261 tagacgttcc ggagtacttc tggacggagg aggaagaggg cgccggagac gggtcgggag
1321 acgacgaggg tgggtgggatt gtgcgcatca atataccaat aaaaatggag agcgcctgaca
1381 gcaccaaca tcaacctcaa ggtcatgggg gggggccgag agcatccggc cattggcgcg
1441 caggcaccat gtttgggact cacggggtga cgactactca gacgcgaatg gttatactga
1501 gccctaagac tgactacaag cctctgttcc tggacgctga caccagtaaa tttgactctg
1561 aaccaggcat ggggttccctg acaccgtggc agtactttga tttcaactgc tacatgaacc
1621 actttacccc ctctgattgg caagagttag ggagggcata cgattccatt aggcccaagt
1681 cctgactat atcagtcgag aacgtagtga ttaaggacgt tcatcagacg aacaacgaga
1741 caaacgtgca tgactccggt acaggtggca tcatgatatt cgaggactca gaatatacgt
1801 tcccgtatgt cattgggcat gctcaagagg gaaaccggg tgcactgagt attcagtggt
1861 acaaccctcc gcagtacgcc tatttcacag gttttaatcc aattgcttgg gatcatgcaa
1921 ccggtactac taagtatcgg gtacatccca gtgcgacac tgaattcttt gttctanagg
1981 aacacgctgc ccaaatactg cgcagcggng atgctacttc ctttgcttac nagtttccca
2041 gtctcgagcc taagcgactg ggtaccgta tgggcacgtt gaatctccgt cataaccctg
2101 tactgcctag tanactggct atttatttgg gagaggattc aagtaatgga ccaacatttt
2161 atcagcctca ggggactgat ctggacatat ttctcaggg gtttataacc gggcccanac
2221 cctgtcttcc ggtttccaca caactaagag ctagtagcga tttcgatgag atgtcggcaa
2281 ttgcctacgg tgatcccaca agtaacaaca ggcactctct catgccattt accgacaggg
2341 cgacaacaat gtccactcaa agctataatc gccaggggga ggtacagaga aatgtgact
2401 tccaattggg tgacatggcc tttgcgcggt cctctgctga agattctttt tatgaaagat
2461 ttgacgagga caagactac cgcaatcctg gtg

//

Porcine parvovirus strain HU10 sequence

GenBank: OL913366.1

LOCUS OL913366 2493 bp DNA linear VRL 04-OCT-2022

DEFINITION : Porcine parvovirus strain HU10 sequence.

ACCESSION OL913366

VERSION OL913366.1

KEYWORDS .

SOURCE Porcine parvovirus

ORGANISM Porcine parvovirus

Viruses; Monodnaviria; Shotokuvirae; Cossaviricota; Quintoviricetes; Piccovirales; Parvoviridae; Parvovirinae; Protoparvovirus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 2493)

AUTHORS Nguyen,T.T., Dinh,T.T.N. and Nguyen,T.T.D.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (16-DEC-2021) Animal Gene Biotechnology, Institute of

Biotechnology, VAST, 18 Hoang Quoc Viet Rd, Ha Noi 10600, Viet Nam

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..2493
/organism="Porcine parvovirus"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="HU10"
/isolation_source="lung"
/host="pig"
/db_xref="taxon:10796"
/country="Viet Nam"
/collection_date="2021"

ORIGIN

```
1   tgagcgctgc cgacgcgtgg aagccgggtg accggccccc gctggagaac ctcatggatg
61  ccatggacag atccatttgg ggcaatagaa gaaacaactc tggcgggicgg agagggatca
121 atgcccttct gaggcctggc tatgaccgcg gcatgcgcca ggctctctta cagctttaca
181 agttttttat ctcaataaac aaacacgggtg gtttctggga taaaattaag gaggtggcga
241 agcaatggtg gatggcggga caccagacct ccaagggaga cgagctagcg cgaacagtgc
301 tcgatctggg aaggctcttt atggccgtcg tagatgacta tagggaggac ccagagatag
361 atagcgtcag gcggagcatg atagattttc tttacgggga caatgatgcc actagggcct
421 tctttggact acagcggttc gctgacaagg tccgtttacc tcagagagac gtgatgaggg
481 tgtggattac gggcgggtat agacctcaac cccaaaagg aagtccttgg ggtacctggg
541 cagagcttga ctagacatt cgtaattcct tagatgcctc ctacaaggca gaagaggaag
601 accgtccgaa agagattcag gtcgctcgta tcgacaatcc tgggtctgca gccggagagc
```

661 gatctcggcc ggcacctgaa gagaggcctg ctgagagtgc tgaggctggt ggcccaggg
721 ctgatggaca gtctggacgg gctgatacgg gggccgaacg ggaacgagat cccacgtcta
781 ccgaagtggg aggatcagat ggagcagagt cagatggaaa agggggagga ctcaccctgc
841 ctggatatag gtatgtaggg cccggcaatc ccttgatgc gggggagccg aggggacccg
901 tagatgccat agctaagaaa cacgatgagc ggtacgacga gctcatcaag catggccaca
961 taccctatat tcacgggagg ggggcgata ctttgatggg gaaagagctt gcagatgccg
1021 aggaagcggg gaagatcctc gatagttatg atcagttagt ggcgaatgcc gctagggggc
1081 tgtggacagc taaggacacg ttagcggatc tcattggtgg ggagctggac aaagtcttac
1141 cggccgatcc tcccgtacag agcagggggg aggagtccca gaagagacct cgtgaggagg
1201 cggatcctcc ggagagcggc gactccggcc ccaaagcccc gcccgcccaa aaacaaaaac
1261 tagacgttcc ggagtacttc tggacggagg aggaagaggg cgccggagac gggctcgggag
1321 acaaagacgg tgggtgggatt gtgggcatta atataccaat aaaaatggag agtgctgaca
1381 gcaccaaca tcaacctcaa ggtcatgggg gggggccgag agcatccggg cattggcggc
1441 caggcaccgt gtttgggact catgggggtga cgactactca gacgcgaatg gttatactga
1501 gccctaagac tgactacaag cctctgttcc tggacgctga caccagtaaa tttgactctg
1561 aaccaggcat ggggttcctg acaccgtggc agtactttga tttcaactgc tacatgaacc
1621 actttacccc ctctgattgg caagagttag ggagggcata cgactccatt agggccaagt
1681 ccttgactat atcagtagaa aatgtggtga ttaaggacgt gcatcagacg aacaacgaga
1741 caaacgtgca tgactccggt acaggtggca tcatgatatt cgaggactca gattatacgt
1801 ttccgtatgt cattgggcat gctcaagagg gaaaccggg tgcactgagt attcagtgg
1861 acaacctcc acagtacgcc tatttcacag gttttaatcc aattgcttgg gatcatgcat
1921 ccggtaccac caagtatcgg gtacatccca gcgcggacac ggagttcttt gttctagagg
1981 aacacgctgc ccaataactg cgcagcggtg atggtacctc ctttgcttac gagtttcca
2041 gtctcgagcc taagcgactg ggtaccgta tgggcacgtt gaacctacgt cataacctg
2101 tactgcctag tagactggcc atttatgtg gagaggataa caccaagggg ccaacatttt
2161 atcagcctca ggggactgat ctggacatat ttctcaggg gtttataccg gggccaagac
2221 cgtgtcttcc ggtgtccaca cagctaagta ctagcagcga tttctatgag atgtctgcga
2281 tcgcctacgg tgatcgcact agtaataatc ggcactctct catgccgttt accagacagg
2341 ctacaacat ctccactcaa aactataatc gccaggggga ggtagagaga aatgtacact
2401 tccaactggg tgatatggcc tttgccggg cctctgctga agattctttt tatgaaagat
2461 ttgacgagga caaagactac cgcaatcctg gtg

//

Porcine parvovirus isolate QB05 sequence

GenBank: OL913367.1

LOCUS OL913367 2493 bp DNA linear VRL 04-OCT-2022

DEFINITION : Porcine parvovirus isolate QB05 sequence.

ACCESSION OL913367

VERSION OL913367.1

KEYWORDS .

SOURCE Porcine parvovirus

ORGANISM Porcine parvovirus

Viruses; Monodnaviria; Shotokuvirae; Cossaviricota; Quintoviricetes; Piccovirales; Parvoviridae; Parvovirinae; Protoparvovirus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 2493)

AUTHORS Nguyen,T.T., Dinh,T.T.N. and Nguyen,T.T.D.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (16-DEC-2021) Animal Gene Biotechnology, Institute of

Biotechnology, VAST, 18 Hoang Quoc Viet Rd, Ha Noi 10600, Viet Nam

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..2493

/organism="Porcine parvovirus"

/mol_type="genomic DNA"

/isolate="QB05"

/isolation_source="lung"

/host="pig"

/db_xref="taxon:10796"

/country="Viet Nam"

/collection_date="2021"

ORIGIN

```
1   tgagcgctgc cgacgcgtgg aagccgggtg accggccccc gctggagaac ctcatggatg
61  cgatggacag atccatttgg ggcaatagaa gaaacaactc tggcgggcgg agagggatca
121 atgcccttct gaggcctggc tatgatccgc gcatgcgcca ggctctctta cagctttaca
181 agttttttat ctcaataaag aaacacggtg gtttctggga taaaattaag gaggtggcca
241 agcagtgggtg gatggcggga caccagacct ccaagggaga cgagctagcg cgaacagtgc
301 tcgatctggg aaggctcttt atggccgtcg tagatgacta tagggaggac ccagagatag
361 atagcgtcag gaggagcatg atagattttc tttacgggga caatgatgcc actagggcct
421 tctttggatt acagcggttc gctgacaagg tccgtttacc tcagagagac gtgatgaggg
481 tgtggatcac gggcgggtat agaccgaagc ccccgaaagg gagtccttgg ggtacctggg
541 eggagcttga cctagacatt cgtaattcct tagatgcctc ctacaaggca gaagaggaag
601 accgttcgaa agcgattcag gtcctctgta tcgaccatcc tgggcctgaa tcaggagagc
```

661 aacctcagcc ggcacctgaa gagaggcctg ctgagagtgc tgaggctggt ggcccaggg
721 ctgatggaca gtctggacgg actgatacgg gggccggacg ggaacgagat tccccctcta
781 ccgaagtggg aggatcagat ggaccagagt cagatggaaa agggggagga ctcaccctgc
841 ctggatatag gtatgtaggg cccggcaacc ccttggatgc gggggagccg aggggaccg
901 tagatgccat agctaagaaa cacgatgagc ggtacgacga gctcatcaag catggccaca
961 taccctatat tcacgggagg ggggaggaca ctttgatggg gaaagagctt gcagatgccg
1021 aggaagcggg gaagatcctc gatagttatg atcagttagt ggcgaatgcc gctagggggc
1081 tgtggagagc taaggacacg ttagcggatc tcattggtgg ggagctggac aaagtcttac
1141 cgcccgatcc tcccgtacag agcagggggg aggagtccca gaagagacct cgtgaggagg
1201 cggatcctcc ggagagcggc gactccggcc ccaaagcccc gcccgcccaa aaaccaagac
1261 tagacgttcc ggagtacttc tggacggagg aggaagaggg cgccggatac gggctcgggag
1321 accacaaggg tgggtgggatt gtgcgcatat atataccact aaaaatggag agtgctgaca
1381 gcaccaaca tcaacctcaa ggtcatgggg gggggccgag agcatccggg cattggcggc
1441 caggcaccgt gtttgggact catgggggtga cgactactca gacgagaatg gttatactga
1501 gccctaaaac tgactacaag ccgctgttcc tggacgctga caccagtaaa tttgactctg
1561 aaccaggcat ggggttcctg acaccgtggc agtactttga tttcaactgc tccatgaacc
1621 actttacccc ctctgattgg caagagctag ggagacgata cgactccatt aggcccaaat
1681 ccctgagtat atcagtggag aacgtgggtga tcaaagacgt acatcagacg aacaacgaga
1741 caaacgtgca tgactccgga acaggtggca tcatgatatt cgaggactca gagtatacgt
1801 tcccgtatgt gattgggcat gctcaagagg gaaaccggg tgcactgagt attcagtgg
1861 acaacctcc acagtacgcc tatttcacag gttttaatcc aattgcttgg gatcatgcat
1921 cgggtactac caagtatcgg gtacatccca gcgaggacac ggagttcttt gttctagagg
1981 aacacgctgc ccaatactg cgcagcggtg atggtacctc ctttgcttac gagtttcca
2041 gtctcgagcc taaacgcctg ggcagccgta tgggcacgtt gaatctcctg cataacctg
2101 tgctgcctag tagactggct atttatttgg gagaggataa caacaatggg ccaacatttt
2161 atcagcctca ggggactgat ctggacatat ttcctcaggg gtttataccg gggcccagac
2221 cgtgtcttcc ggtttccaca cagctaagag ctagcagcga tttcgatgag atgtcggcga
2281 tcgcctacgg tgatcccaca agtaacaaca ggcactctct catgccattt accagacaag
2341 cgacaacaat gtccactgaa agctataatc gccaggggga ggtgcagaga aatgtacact
2401 tccaattggg tgacatggcc tttgcgagg cctctgctga agattctttt tatgaaagat
2461 ttgacgagga caaagactac cgcaatcctg gtg

//

Phụ lục 6: Kết quả đăng ký trình tự nucleotide của các chủng PPV4 phân lập tại miền Trung Việt Nam

Chú thích: Ký tự **màu nâu** chỉ cho trình tự: *ORF1*; **màu xanh**: *ORF2*; **màu xanh**: *ORF3*.

Porcine parvovirus 4 strain QT02 replicase, ORF3, and capsid genes, complete cds

GenBank: MT434668.1

LOCUS MT434668 5368 bp DNA linear VRL 07-NOV-2020
DEFINITION Porcine parvovirus 4 strain QT02 replicase, ORF3, and capsid genes, complete cds.
ACCESSION MT434668
VERSION MT434668.1
KEYWORDS .
SOURCE Porcine parvovirus 4
ORGANISM Porcine parvovirus 4
Viruses; Monodnaviria; Shotokuvirae; Cossaviricota; Quintoviricetes; Piccovirales; Parvoviridae; Parvovirinae; Copiparvovirus.
REFERENCE 1 (bases 1 to 5368)
AUTHORS Nguyen,T.T.D., Nguyen,T.T., Tran,D.Q., Do,K.V.A., Oppriessnig,T.
and Dinh,T.T.N.
TITLE Prevalence of porcine parvoviruses (PPVs) and genomic characterization of PPV4 isolated in Vietnam
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 5368)
AUTHORS Nguyen,T.T.D., Nguyen,T.T., Tran,D.Q., Do,K.V.A., Oppriessnig,T. and Dinh,T.T.N.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (05-MAY-2020) Animal Gene Biotechnology, Institute of Biotechnology, VAST, 18 Hoang Quoc Viet, Ha Noi, Ha Noi 10600, Vietnam
COMMENT ##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..5368
/organism="Porcine parvovirus 4"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="QT02"
/host="domestic pig"
/db_xref="taxon:707546"

```

/country="Viet Nam: Quang Tri province"
/collection_date="2019"
CDS 357..2153
/note="ORF1"
/codon_start=1
/product="replicase"
/protein_id="QOW02514.1"
/translation="METYWTGICRLFPDVLKIPGVYEGRYIFEVPISTRDCMKWPNIF
GNENNSENQQSGAAPAPRENLNSNLVIAVRQAEALFRELQKELRKSCRLGVDPGIFM
QLEEVDSKGGHLHLHWCVSVSAGTPRDVLTIFKNTEKKVSLYYFGVEGLSFFVPHKNKH
GAWKSTDEGFIYNYLLKKLPLKECLYAWTTIGGAIGDACLNTDKRKELLDNRQDPAVI
EELSAPMYKCATGKMLDIVQWLVDNNICSESRWENKNALSLYSFLATQAGGYMAKQC
LRIAQQKLLKEKPLGLTLMDFKDMNALRRFQQDEGEMTFDNNRMHYIFAINNYDPKIA
SVIMYFWSMKQTGKRNCVWFYGPATTGKTNMAQAICHSSANYGNVNWNNANFPFQDIV
GAQVGWVEEGKMTGDMVEAAKALLGGTALRIDRCKMQSIEVNSPPFLITSNVDMTIVQ
EGSFVSEFHQQPLEDRMIKFSFNMTLPGNFGFLITSEEVKSFRRMGAKLAAQPDIMNCP
IFKKGPASIRHLVPVGEI PPPKEMKHKRQPLYMRAEPDEIQDNPEELDHWFEEEAPKK
KKQTKNTATKNPAETVEIITETEFIPAPGKR"
CDS 2303..2917
/codon_start=1
/product="ORF3"
/protein_id="QOW02515.1"
/translation="MFGGQGIIPILTWEQLEAFMWAGQGMSIDYYRSCLSDCMLFGEK
FNIHMPKTKNLLLEAEYLYRLFHSGFANSAQGFRRERWRWRTESKLRCPQFDRPMDAS
QRHAYLGFFYQALSCLPENASEEDILQTIHSDSDTSKEKFYAFMEKIQQEPEYVFKEP
DSIPQPEAPVTVAVPVETSPTENRYLLLHIKILRKTRWRNVCLVP"
CDS 3181..5367
/note="ORF2"
/codon_start=1
/product="capsid"
/protein_id="QOW02516.1"
/translation="MQKHGHWPHLWAPFVDRQMSQEIQQVLKLGSTKLSQKLLANFIIA
LWRAKEKIGAPIYEIVKGVFSPVDKKTVESLLPHDPPIAPPSSPQRGSKRASPPQSP
NAHDEDTMSGHKRQKTMEVESECDKSLLCPTQONAGADFELCGTGGGATNEKGTWVGGT
QFTDTSIRTFGTRRCVLSAFPDTYCSMMSGDAIPSIIFNTPWYYYDLNIMSCHFSPSA
FQTLIEDYDAFRPRSLTVHLKELVIKDVCQQQLQAEQVSDNNSATLLAFEDVNYELP
YVLGGQVSVPGHLPQPYQLPKYSYRTVGKPDNSGFVPGRNTHPDQGPGHPKASKT
IWYSQYLETQDTEFYILENHKATILHSGNTFSQNYNFPDLPFELTQYMWDARRQDNP
LIDQRIQVMSRMYDDGPQKTFAIKVNPIYVFTVKSTSRPAMFLAGGRFKDGDYSITG
PGDRDKTSFRYNDPPWIVTRDITYLSSDLAKTEREQPGPRQGDVVRTPDGTLIVTT
NALAYGYTTEYLKNIPLLSKYQGVENFR LAVENERGYSMPGHPSHIRETLFRGKLP
EIRESTIKSEDQRKEITFPDYMGVNEKTTANLESQIWSQIPNTDITEKCTTPPLSIW
GMKNPPPMVFLRLLAQMGPPRRSACSGSIPSNTYLNQYCQFLTYEMEWVVIKTRKTR
VRWNPIPPQIPMGPNLNPVYIILNKEGQYRMPTEVWTAKQRPRHRR"

```

ORIGIN

1 gtaaattaat ttatgtaaag tgggaggagc ttattggctc ctcctacttt gcataaatta

61 tgtaa atgat atgtaa atta atttatgcaa agtaggagga gctttttttg attggacggg
121 gtttcaagtc catttatttg cataat tttat gcaaagagga agttaacctg attggtcagt
181 ttttttggcg ggaagcaatt tgattggacg ggaactcaag tcctaatttg cattgacgtg
241 gaccaatcag aatcgagtac atattatata aggaggctga aaaagaggaa gtttgtcatt
301 tgcgttttg agaccgtcgc gagcagaact ccgtcgtttt cggcctgtat ttgaag atgg
361 aaac t actg gacaggtatt tgcagacttt ttctgatgt tttaaaaata cctgggtgtt
421 atgaaggacg ctatattttt gaagttccta tttctacgcy tgattgcatg aaatggccta
481 atatatttg caacgagaat aatagt gaaa atcaacagtc tggcgcggcg cctgcggcgc
541 cgcgcgaaaa tcttaatagt aatctggtaa tcgctgttcg gcaggcggag gctttgttta
601 gagagctgca gaaagagctt agaaaatcat gtcgtttagg ggtagatcct ggcattttta
661 tgcagttaga agaagtagac tcaaaaggty gcttgcactt gcattggtgt gtgtctgtgt
721 ccgctggtag tccgcgggat gtgcttacia ttttcaaaaa tacagagaag aaggtctctc
781 tgtactattt tggggtggag ggcctgagct tctttgtgcc ccataagaat aaacacgggg
841 cctggaagag cacggacgag ggctttatct acaactatct gcttaaaaaa ctgccgctga
901 aagagtgttt atatgcttgg accaccatcg gtggagccat cgggtgatgct tgctaaata
961 ctgataagag aaaggagtty ctggataata gacaggaccc agcgggtgatc gaagagctct
1021 cagctcccat gtacaaatgt gccaccgggg agaaaatgct tgatatcgtg cagtggctgg
1081 tggataacia catctgctct gagagcagat gggaaaaata gaatgctcta agtctatact
1141 cgtttctggc caccaggca ggtggataca tggctaaaca gtgtctgaga atcgtcagc
1201 aaaagttatt gaaagagaaa cctctgggggt tgactctgat ggatttcaag gatatgaatg
1261 ctctgcggcg ctttcagcag gatgaggggg aaatgacttt tgacaataac agaatgcatt
1321 atatctttgc cattaaciac tatgatccta aaattgcttc ggtgataatg tacttttggg
1381 gcatgaaaca aacgggaaag aggaactgtg tgtggtttta cgggcctgcc acaacaggaa
1441 agactaacat ggctcaagcc atctgccaca gttctgcaaa ctatggcaat gtgaactgga
1501 ataatgcaaa tttcccgttt caagatatcg tgggggctca ggtagggtgg tgggaagagg
1561 gaaagatgac tggatgatg gtcgaagctg ctaaagcact actgggggga actgctttgc
1621 gaatcgaccg caagtgcag caatctattg aggttaacag tccaccttcc ctcataacct
1681 caaatgtgga catgactatt gtacaagagg gaagttttgt aagctttgaa catcagcaac
1741 cattagagga caggatgata aagtttagct tcaatatgac cctgccgggc aattttgggt
1801 tgattaccag tgaggaagtg aaatcttttt ttcgaatggg agctaaactt gctgcgcaac
1861 cggacattat gaactgccct atatttaaaa aaggacctgc cagtattaga catttagtcc
1921 ctgttggaga gatcccacc ccaaaagaaa tgaagcataa aaggcagcca ctctacatga
1981 gagcggaaac agatgaaatt caagacaatc cagaagaact ggaccactgg tttgaagaag
2041 aagcaccgaa aaagaagaaa cagaaaacia aaaatactgc aactaagaac cctgctgaga
2101 cgggtggagat tataactgag actgaattca tcctgcacc aggtaagaga tgagtactta
2161 tttactatca gaataaagga taaactgtac ccagcagtag ttgataagtg cccctctctt
2221 acagatacac agccacaact ggtgtttgac atccagttag aagaggaagc agaaatttca
2281 gatatcatcg gagaaciaa aaatgttcgg cggacaagggt attataccga tactaacatg
2341 ggagcaatta gaagctttta tgtgggctgg gcaaggaatg tcaattgact attacagaag
2401 ctgtttaagc gattgtatgc tttttgggga aaaatttaac attcatatgc caaaaaciaa
2461 aaatttatta ttagaagctg aatacctata tagacttttt cacagtgggt ttgccaatag
2521 tgcacaagggt ttcagagaaa gggtagaaaag atggagaaca gaaagcaaac tgagatgtcc
2581 ccaatttgat agaccatgg atgcctcaca aaggcatgca tacttaggat ttttctatca
2641 agccctcagt aaattgccgg aaaatgcctc tgaggaagat attctgcaga ccatacatga
2701 ttctgatgac accagtaaag aaaaattcta tgcatttatg gaaaaaattc agcaagaacc
2761 agaatatgtg tttaaagagc ctgatagcat tccgcaacca gaagctcctg ttacagcagt
2821 tccggttag acatcaccaa ctgaaaacag gtaccttctc ttacacatca agatactaag

2881 aaagacaagg tggaggaacg tttgccttgt cccttagatt tttgtgatga acattggcag
2941 ggcagacacc cgctaggatt caaggaagaa gaagaagaaa ttcaaaaaga aatagaggaa
3001 gacagaagag aagaaacaga aacaatcgaa aaagcgaaac aggggtgaagg agaacatgaa
3061 aagggaggac tcacctggcc cggtcacatcgc tacacaggtc cattcaatcc tctccctcat
3121 ggaaaaccta ctgatcaact tgacgaagca gctcttcgac atgatacaag gtacaaaaca
3181 atgcagaaac acggctcactg gcctcattta tgggcacat ttgttgacag acagatgagc
3241 caagaaattc aacaggtttt aaaaggttct acaaaaactga gccaaaaact acttgctaac
3301 ttcacatag cactatggcg agcaaaaagaa aaaataggag ctctatata tgagattgta
3361 aaaggggttt ttccaagtgt tgataaaaaa actggtgaaa gccttttacc gcacctgac
3421 cctatacctg ctctccatc ttctccacag cgaggatcca aacgtgcac tctctctcag
3481 agtcctaatag cacatgatga agatacaatg agcgggcaca agcgtcagaa aactatggaa
3541 gtggaatctg aatgtgataa gtctttgctt tgtccaacgc agaatgctgg agctgatttt
3601 gagctttgcg ggacgggagg gggggcaaca aatgagaaaag ggacatgggt gggagggaca
3661 caatttaccg atacatctat taggacattt ggtactagaa gatgtgttct ctacgcgttt
3721 cctgacactt actgttctat gatgtctgga gacgctatac ctctctattat ttttaataca
3781 ccatggactt attatgatct aacattatg tctgccatt tctctccaag tgcttttcaa
3841 actttaattg aagattatga tgcatttaga cctagatcgc taacagttca tttgaaagag
3901 cttgtaataa aagatgatg tcagcaaca ggtttacaag ctgagcaggt atctgacaat
3961 aactctgcta cactgcttgc ttttgaagat gttaattatg aacttcata tgttttaggt
4021 ggtggtcaag tatctgtgcc aggacatcta ccgggacaac catatcaact accaaaatac
4081 tcatatagaa ctggttgaaa accagacca aacagcggct tcgtgcccggg aaggaacaca
4141 catccagatc aaggaccagg acatccaaaa gcaagtaaaa caatttggta ctcaaatat
4201 ttagaaaacc aagacaccga attctacata ttagaaaacc acaaagcaac aattttacac
4261 tctggaaata cattttccca aaattacaat tttctgac taccctttga gcagttgaca
4321 cagtatatgt gggatgcacg gaggcaggac aatccattga tagatcagag gatacaagtg
4381 atgagcagaa tgtatgatga cggcccacag aaaacatttg ctatcaaagt gaaccatac
4441 attgtgccat tcacagtaaa aagcaccagc agaccagcta tgttcttagc gggaggaaga
4501 tttaaagacg gtgattattc aataacaggt ccaggagata gagataaaac aagtttcaga
4561 tattacaatg atcctccatg gatcgtcacc agagatacct atctctctc cagcgattta
4621 gctaaaactg aaagagaaca gccaggacc agacagggag acacagtagt taggaccct
4681 gatggaacac tgatagtac tactaatgca ttagcttatg ggtacacaac agaatatcta
4741 aaaaacattc cgcttttgag ttccaatac cagggggttg aaaacttcag actagctgtt
4801 gaaaatgaaa gaggatattc aatgccaggt caccgcac atatcagaga aacattattc
4861 agaggtaaac tgccaagtga gataagggaa tcaactatta aatcagagga tcagagaaaa
4921 gaaataacat ttccagatta catgggttct gtaaatgaaa aaacaacagc aaatttagaa
4981 tcgcagatat ggtctcagat accgaacact gatatcactg aaaaatgtac aacaccacca
5041 ctatccattt ggggtatgaa aaaccacca ccaatggttt tctgagact cctggcacag
5101 atgggaccac cgagaagaag cgctgcagc ggatccattc caagtaatac atatttgaac
5161 caatattgcc aatttttgct tacatatgaa atggaatggg atgttattaa aagaaccaga
5221 aaaacgggta ggtggaatcc aattcctccc ccgcaaattc cgatgggacc taacaatctt
5281 cctgtttata ttttgaacaa agagggacaa tacagaatgc cgacggaagt ttggaccgca
5341 aaacagagac ccagacaccg cagatgat

//

Porcine parvovirus 4 strain QT20 replicase, ORF3, and capsid genes, complete cds

GenBank: MT434669.1

LOCUS MT434669 5368 bp DNA linear VRL 07-

NOV-2020

DEFINITION Porcine parvovirus 4 strain QT20 replicase, ORF3, and capsid genes,

complete cds.

ACCESSION MT434669

VERSION MT434669.1

KEYWORDS .

SOURCE Porcine parvovirus 4

ORGANISM Porcine parvovirus 4

Viruses; Monodnaviria; Shotokuvirae; Cossaviricota; Quintoviricetes; Piccovirales; Parvoviridae; Parvovirinae; Copiparvovirus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 5368)

AUTHORS Nguyen,T.T.D., Nguyen,T.T., Tran,D.Q., Do,K.V.A., Oppriessnig,T.

and Dinh,T.T.N.

TITLE Prevalence of porcine parvoviruses (PPVs) and genomic characterization of PPV4 isolated in Vietnam

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 5368)

AUTHORS Nguyen,T.T.D., Nguyen,T.T., Tran,D.Q., Do,K.V.A., Opriessnig,T. and

Dinh,T.T.N.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (05-MAY-2020) Animal Gene Biotechnology, Institute of

Biotechnology, VAST, 18 Hoang Quoc Viet, Ha Noi, Ha Noi 10600,

Vietnam

COMMENT ##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source

1..5368

/organism="Porcine parvovirus 4"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="QT20"

/host="domestic pig"

/db_xref="taxon:707546"

/country="Viet Nam: Quang Tri province"

```

                /collection_date="2019"
CDS                357..2153
                    /note="ORF1"
                    /codon_start=1
                    /product="replicase"
                    /protein_id="QOW02517.1"
/translation="METYWTGICRLFPDVLKIPGVYEGRYIFEVPISTRDCMKWPDIF
GNENNSENQQSGAAPAPRENLNSNLVIAVRQAEALFRELQKELRKSCRLGVDPGIFM
QLEEVDKSGGLHLHWCVSVSAGTPRDVLTIFKNTEKKVSLYYFGVEGLSFFVPHKNKH
GAWKSTDEGFIYNYLLKKLPLKECLYAWTTIGGAIGDACLNTDKRKELLDNRQDPAVI
EELSAPMYKCATGEKMLDIVQWLVDNNICSESRWENKNALSLYSFLATQAGGYMAKQC
LRIAQQKLLKEKPLGLTLMFEFKDMNALRRFQQDEGEMTFDNNRMHYIFAINNYDPKIA
SVIMYFWSMKQTGKRNCVWFYGPATTGKTNMAQAICHSSANYGNVNWNNANFPQDIV
GAQVGWWEEGKMTGDMVEAAKALLGGTALRIDRKCMQSI EVNSPPFLITSNVDMTIVQ
EGSFVSEFHQQPLEDRMIKFSFNMTLPGNFGFLITSEEVKSF FRMGAKLAAQPDIMNCP
IFKKGPASIRHLVPVGEIPPPKEMKHKRQPLYMRAEPDEIQDYPEELDHWFEFEEAPKK
                KKQKTKNTATKNPAETVEIITETEFIPAPGKR "
CDS                2303..2917
                    /codon_start=1
                    /product="ORF3"
                    /protein_id="QOW02518.1"
/translation="MFGGQGIIPILTWEQLEAFMWAGQGMSIDYRSCLSDCMLFGEK
FNIHMPKTKNLLLEAEYLYRLFHSGFANSAQGFREVERWRTE SKLRCPQFDRPMDAS
QRHAYLGFFYQALS KLPENASEEDILQTIHSDSDTSKEKFYAFMEKIQQEPEYVFKEP
                DSIPQPEAPVTVAVPVETSPTENRYLLLHIKILRKTRWRNVCLVP "
CDS                3181..5367
                    /note="ORF2"
                    /codon_start=1
                    /product="capsid"
                    /protein_id="QOW02519.1"
/translation="MQKHGHWPHLWAPFVDRQMSQEIQQVLKGSTKLSQKLLANFIIA
LWRAKEKIGAPIYEIVKGVFPSVDKKTVESELLPHDPPI PAPPSSPQRGSKRASPPQSP
NAHDEDTMSGHKRQKTMEVESECDKSLLCPTQAGADFE LCGTGGGATNEKGTWVGGT
QFTDTSIRTFGTRRCVLSAFPDTYCSMMSGDAIPSIIFNTPWYYYDLNIMSCHFSPSA
FQTLIEDYDAFRP RSLTVHLKELVIKDVCQQQLQAEQVSDNNSATLLAFEDVNYELP
YVLGGQVSVPGHLP GPYQLPKYSYRTVGKPD PNSGFVPGRNTHPDQGP GHPKASKT
IWYSQYLETQDTEFYILENHKATILHSGNTFSQNYNFPDLPFEQLTQYMW DARRQDNP
LIDQRIQVMSRMYDDGPQKTF AIKVNPIYIVPFTVKSTSRPAMFLAGGRFKDGDYSITG
PGDRQKTSFKYYNDPPWII TRDTYLFSSDLAKTEREQPGPRQGD TVVRTPDGTLIVTT
NALAYGYTTEYLKNIPL LSSKYHGVENFR LAVENERGY SMPGHPSHIRETLFRGK LPS
EIRESTIKSEDQRKEITFPDYMG SVNEKTTANLESQIWSQIPNTDITEKCTTPPLSIW
GMKNPPPMVFLRLLAQMGPPRRSACSGSIPSNTYLNQYCQFL LTYEMEWDVIKRTRKT
VRWNP I P SPQIPMGPNL PVYILNKEGQYRMPTEVWTAKQRPRHRR "

```

ORIGIN

1 gtaaattaat ttatgcaaag taggaggagc tttttgactc ctctactttt gcataaatta
61 tgtaaatagat atgtaaatta atttatgcaa agtaggaggg gctttttttt attggacggg
121 gtttcaagtc cattaatttg cataatztat gcaaagagga agttaacctg attggtcagt
181 ttttttggcg ggaagcaatt tgattggacg ggaactcaag tcctaatttg cattgacgtg
241 gaccaatcag aatcgagtat atattatata aggagaccga aaaagaggaa gtttgtcatt
301 tgcgttttgg agaccgtcgc gagcagaact ccgtcgtttt cggcctgtat ttgcagatgg
361 aaacctactg gacaggtatt tgcagacttt ttctgatgt tttaaaaata cctgggtgtt
421 atgaaggacg ctatattttt gaagttccta tttctacgcy tgattgcatg aaatggcctg
481 atatatttgg caacgagaat aatagtgaat atcaacagtc tggcgcgggc cctgcgggcg
541 cgcgcgaaaa tcttaatagt aatctggtaa tcgctgttcg gcaggcggag gctttgttta
601 gagagctgca gaaagagctt agaaaatcat gtcgttttagg ggtagatcct ggcattttta
661 tgcagttaga agaagtagac tcaaaaggtg gcttgcaact gcattgggtg gtgtctgtgt
721 ccgctggtag tccgcgggat gtgcttacia ttttcaaaaa tacagagaag aaggtctctc
781 tgtactatth tggggtggag ggcctgagct tctttgtgcc ccataagaat aaacacgggg
841 cctggaagag cacggacgag ggctttatct acaactatct gcttaaaaaa ctgccgctga
901 aagagtgttt atatgcttgg accaccatcg gtggagccat cggatgatgct tgctaaata
961 ctgataagag aaaggagtgg ctggataata gacaggacce agcgggtgatc gaagagctct
1021 cagctcccat gtacaaatgt gccaccgggg agaaaatgct tgatatcgtg cagtggctgg
1081 tggataacia catctgctct gagagcagat gggaaaaata gaatgctcta agtctatact
1141 cgtttctggc caccaggca ggtggataca tggctaaaca gtgtctgaga atcgtcagc
1201 aaaagttatt gaaagagaaa cctctggggg tgaactctgat ggaattcaag gatatgaatg
1261 ctctgcgggc ctttcagcag gatgaggggg aaatgacttt tgacaataac agaatgcatt
1321 atatctttgc cattaaciac tatgatccta aaattgcttc ggtgataatg tacttttggg
1381 gcatgaaaca aacgggaaa aggaactgtg tgtggtttta cgggcctgcc acaacaggaa
1441 agactaacat ggctcaagcc atctgccaca gttctgcaaa ctatggcaat gtgaactgga
1501 ataatgcaaa cttcccgttt caagatatcg tgggggctca ggtgggggtg tgggaagagg
1561 gaaagatgac tggatgatg gtcgaagctg ctaaagcact actgggggga actgctttgc
1621 gaatcgaccg caagtgcag caatctattg aggttaacag tccacctttc ctcataacct
1681 caaatgtgga catgactatt gtacaagagg gaagttttgt aagctttgaa catcagcaac
1741 cattagagga caggatgata aagtttagct ttaatatgac cctgccgggc aattttgggt
1801 tgattaccag tgaggaagtg aaatcttttt ttcgaatggg agctaaactt gctgcgcaac
1861 cggacattat gaactgccct atatttaaaa aaggacctgc cagtattaga catttagttc
1921 ctgttggaga gatccacccc ccaaaagaaa tgaagcataa aaggcagcca ctctacatga
1981 gagcggaaac agatgaaatt caagactatc cagaagaact ggaccactgg ttcgaagaag
2041 aagcaccgaa aaagaagaaa cagaaaacia aaaatactgc aactaagaac cctgctgaga
2101 cgggtggagat tataactgag actgaattca tcctgcacc aggtaagaga tgagtactta
2161 tttactatca gaataaagga taaactgtac ccagcagtag ttgataagtg ccctctctt
2221 acagatacac agccacaact ggtgtttgac atccagttag aagaggaagc agaaatttca
2281 gatatcatcg gagaaciaa aaatgttccg cggacaagggt attataccga tactaacatg
2341 ggagcaatta gaagctttta tgtgggctgg gcaaggaatg tcaattgact attacagaag
2401 ctgttttaagc gattgtatgc tatttggggg aaaaatttaac attcatatgc caaaaaacia
2461 aaatttatta ttagaagctg aatacctata tagacttttt cacagtgggt ttgccaatag
2521 tgcacaagggt ttcagagaaa gagtagaaag atggagaaca gaaagcaaac tgagatgtcc
2581 ccaatttgat agaccatgg atgcctcaca aaggcatgca tacttaggat ttttctatca
2641 agccctcagt aaattgccgg aaaatgcctc tgaggaagat attctgcaga ccatacatga

2701 ttctgatgac accagtaaag aaaaattcta tgcatttatg gaaaaaatc agcaagaacc
2761 agaatatgtg tttaaagagc ctgatagcat tccgcaacca gaagctcctg ttacagcagt
2821 tccggttgag acatcaccaa ctgaaaacag gtaccttctc ttacacatca agatactaag
2881 aaagacaagg tggaggaacg tttgccttgt cccttagatt tttgtgatga acattggcag
2941 ggcagacacc cgctaggatt caaggaagaa gaagaagaaa ttcaaaaaga aatagaggaa
3001 gacagaagag aagaaacaga aacaatcgaa aaagcgcaac aggggtgaagg agaacatgaa
3061 aagggaggac tcacctggcc cggctatcgc tacacaggtc cattcaatcc tctccctcat
3121 ggaaaacctt ctgatcaact tgacgaagca gctcttcgac atgatacaag gtacaaaaca
3181 atgcagaaac acggctactg gcctcattta tgggcacat ttgttgacag acagatgagc
3241 caagaaattc aacaggtttt aaaaggttct acaaaaactga gccaaaaact acttgctaac
3301 ttcatcatag cactatggcg agcaaaaagaa aaaataggag ctctatata tgagattgta
3361 aaaggggttt ttccaagtgt tgataaaaaa actgttgaaa gccttttacc gcacctgac
3421 cctatacctg ctctccatc ttctccacag cgaggatcca aacgtgcac tctcctcag
3481 agtcctaata cacatgatga agatacaatg agcgggcaca agcgtcagaa aactatggaa
3541 gtggaatctg aatgtgataa gtctttgctt tgtccaacgc agaatgctgg agctgatttt
3601 gagctttgcg ggacgggagg gggggcaact aatgagaaag ggacatgggt gggagggaca
3661 caatttaccg atacatctat taggacattt ggtactagaa gatgtgttct ctacgcgttt
3721 cctgacactt actgttctat gatgtctgga gacgtatac ctctattat ttttaataca
3781 ccatggtaact attatgatct aacattatg tctgccatt tctctccaag tgcttttcaa
3841 actttaattg aagattatga tgcatttaga cctagatcgc taacagttca tttaaaagag
3901 cttgtaataa aagatgtatg tcagcaaca ggtttacaag ctgagcaggt atctgacaat
3961 aactctgcta cactgcttgc ttttgaagat gttaattatg aacttccata tgttttagggt
4021 ggtggtcaag tatctgtgcc aggacatcta ccgggacaac catatcaact accaaaatac
4081 tcatacagaa ctgttgaaa accagacca aacagcggct tcgtgccggg aaggaacaca
4141 catccagatc aaggaccagg acatccaaaa gcaagtaaaa caatttggtt ctcgcaatat
4201 ttagaaaacc aagacaccga attctatata ttagaaaacc acaaagcaac aattttacac
4261 tctggaaata cattttccca aaattacaat tttcctgatc taccttttga gcagttgaca
4321 cagtatatgt gggatgcacg gaggcaggac aatccattga tagatcagag gatacaggtg
4381 atgagcagaa tgtatgatga cggcccacag aaaacatttg ctatcaaagt gaaccatac
4441 attgtacatc tcacagtaaa aagcaccagc agaccagcta tgttcttagc gggaggaaga
4501 tttaaagatg gtgattattc aataacaggt ccaggagata gacaaaaaac aagtttcaaa
4561 tattacaatg atcctccatg gatcatcacc agagatacct atctcttctc cagcgattta
4621 gctaaaactg aaagagaaca gccaggacc cagacaggag acacagtagt taggaccocct
4681 gatggaacac tgatagtgac tactaatgca ttagcttatg ggtacacaac agaatatcta
4741 aagaacattc cgcttttgag ttccaaatac catgggggtg aaaacttcag actagctggt
4801 gaaaatgaaa gaggatattc aatgccaggt caccgcac atatcagaga aacattattc
4861 agaggtaaac tgccaagtga gataagggaa tcaactatta aatcagagga tcagagaaaa
4921 gaaataacat ttccagatta catgggttct gtaaatgaaa aaacaacagc aaatttagaa
4981 tcgagatat ggtctcagat accgaacact gatatcactg aaaaatgtac aacaccacca
5041 ctatccattt ggggtatgaa aaaccacca ccgatgggtt tcttgagact cctggcacag
5101 atgggaccac cgagaagaag cgctgcagc ggatccattc caagcaatac atattttaaac
5161 caatattgcc aatttttgct tacatatgaa atggaatggg atgttattaa aagaaccaga
5221 aaaacggatg ggtggaatcc aattccttcc ccgcaaattc cgatgggacc taacaatctt
5281 cctgtttata ttttgaacaa agagggacaa tacagaatgc cgacggaagt ttggaccgca
5341 aaacagagac ccagacaccg cagatgat

//

Phụ lục 7: Kết quả so sánh trình tự nucleotide và amino acid giữa các chủng PPV phân lập so với chủng tham chiếu

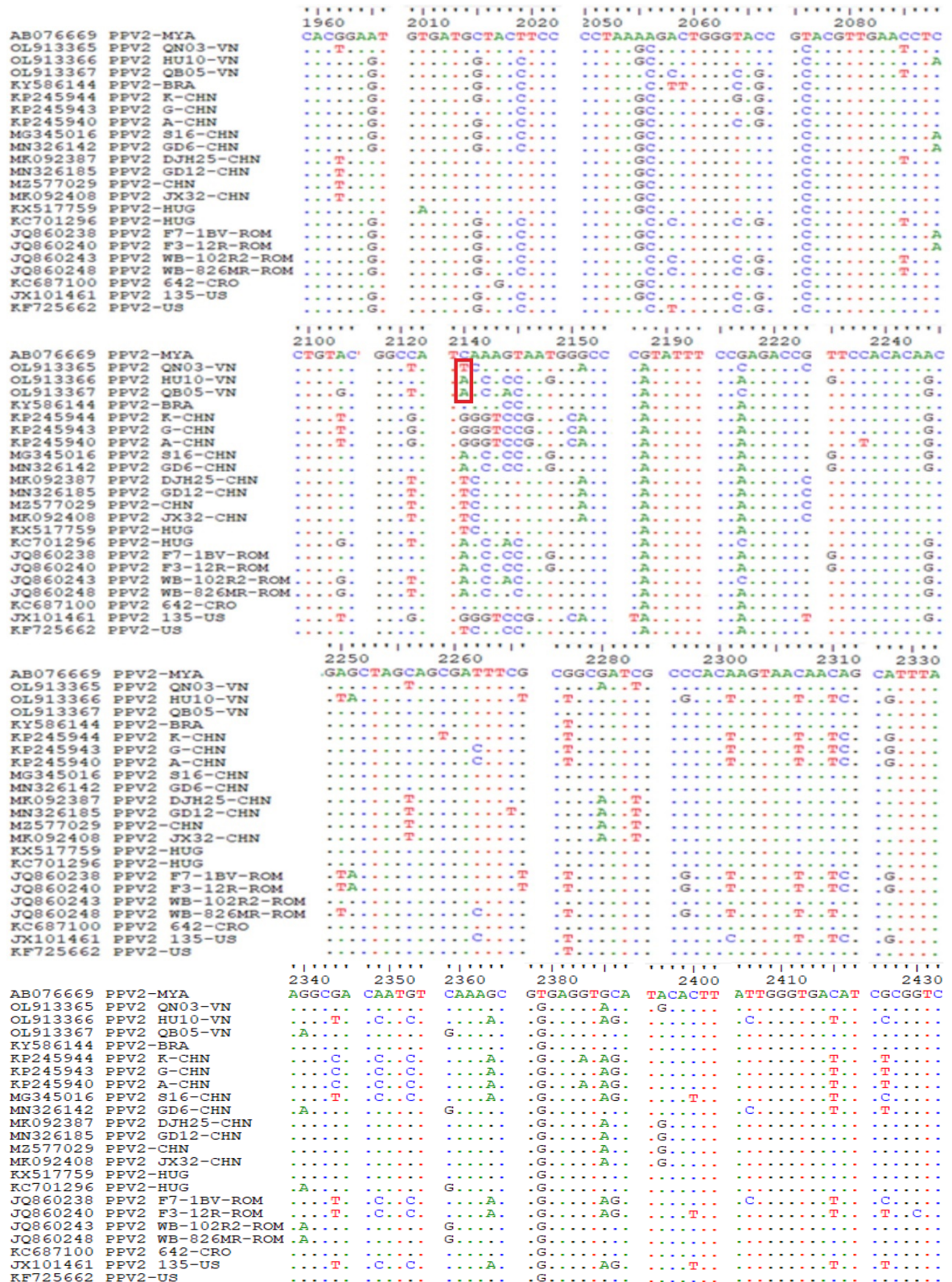
		----- -----	----- -----	-----	----- -----	-----
		60 70 140 150 200 240 250 330				
AB076669	PPV2-MYA	TGCCATGGACAG	G-CTATGACCOGC	AAAGAAA	CCAAGCAGTGGTG	TCGT
OL913365	PPV2 QN03-VNG.....T...C.....	..G.....A.....	..G..
OL913366	PPV2 HU10-VNG.....T...C.....	..G.....A.....
OL913367	PPV2 QB05-VN	..G.....	..G.....T...C.....	..G.....A.....
KY586144	PPV2-BRAGT.....T.....	..T.....A.....
KP245944	PPV2 K-CHNG.....A.....A.....
KP245943	PPV2 G-CHNG.....A.....A.....
KP245940	PPV2 A-CHNG.....A.....A.....
MG345016	PPV2 S16-CHNG.....C.....	..G.....A.....
MN326142	PPV2 GD6-CHNG.....C.....	..G.....A.....
MK092387	PPV2 DJH25-CHNG.....T...C.....	..G.....A.....	..G..
MN326185	PPV2 GD12-CHNG.....T...C.....	..G.....A.....	..G..
MZ577029	PPV2-CHNG.....T...C.....	..G.....A.....	..G..
MK092408	PPV2 JX32-CHNG.....C.....	..G.....A.....
KX517759	PPV2-HUGG.....T...C.....	..G.....A.....
KC701296	PPV2-HUGG.....T...C.....	..G.....A.....
JQ860238	PPV2 F7-1BV-ROMG.....C.....	..G.....A.....
JQ860240	PPV2 F3-12R-ROMG.....C.....	..G.....A.....
JQ860243	PPV2 WB-102R2-ROM	..G.....	..G.....T...C.....	..G.....A.....
JQ860248	PPV2 WB-826MR-ROMG.....T...C.....	..G.....A.....
KC687100	PPV2 642-CROA.....	..G.....A.....	..A.....
JX101461	PPV2 135-USG.....A.....	..A.....
KF725662	PPV2-USG.....C.....	..A.....A.....
		----- -----	----- -----	-----	----- -----	-----
		490 500 510 520 530 540 550				
AB076669	PPV2-MYA	TCACGGGCGGATATAGACCCGCAGC	GAAAGGGAGTCCTTGG	GGGCGGAGCTTGA		
OL913365	PPV2 QN03-VNG.....A.....A.....A.....
OL913366	PPV2 HU10-VN	..T.....G.....T..A..	A.....A.....C...A.....A.....
OL913367	PPV2 QB05-VNG.....A.....A.....A.....A.....
KY586144	PPV2-BRAG.....A.....A.....A.....
KP245944	PPV2 K-CHNG.....A.....A.....A.....
KP245943	PPV2 G-CHNG.....A.....A.....A.....
KP245940	PPV2 A-CHNG.....A.....A.....A.....
MG345016	PPV2 S16-CHN	..T.....G.....TA..A.....C...A.....A.....
MN326142	PPV2 GD6-CHN	..T.....G.....TA..A.....C...A.....A.....
MK092387	PPV2 DJH25-CHNG.....A.....A.....A.....
MN326185	PPV2 GD12-CHNG.....A.....A.....A.....
MZ577029	PPV2-CHNG.....A.....A.....A.....
MK092408	PPV2 JX32-CHNG.....A..C..A.....A.....A.....
KX517759	PPV2-HUG	..A.....G.....T...A.....C...A.....A.....
KC701296	PPV2-HUGG.....A.....A.....A.....
JQ860238	PPV2 F7-1BV-ROM	..T.....G.....T..A..	A.....A.....C...A.....A.....
JQ860240	PPV2 F3-12R-ROM	..T.....G.....T..A..	A.....A.....C...A.....A.....
JQ860243	PPV2 WB-102R2-ROMG.....A.....A.....A.....A.....
JQ860248	PPV2 WB-826MR-ROMG.....A.....A.....A.....A.....
KC687100	PPV2 642-CROA.....G.....A.....C.....A.....A.....
JX101461	PPV2 135-USG.....A.....A.....A.....
KF725662	PPV2-USG.....A.....A.....A.....
		----- -----	----- -----	-----	----- -----	-----
		370 400 410 430 440 450 460				
AB076669	PPV2-MYA	AGGC G GATA GCCACGA TGGTTTA TTCGCTGACAAGGTC CGTTTACCTGA				
OL913365	PPV2 QN03-VN	..A.....C.....T...	..A.....A.....C.....C.....
OL913366	PPV2 HU10-VNC.....T...	..AC.....A.....C.....C.....
OL913367	PPV2 QB05-VN	..A.....C.....T...	..A.....A.....C.....C.....
KY586144	PPV2-BRA	..A.....T.....A.....C.....C.....
KP245944	PPV2 K-CHN	..AA.....C.....T...	..AC.....	..T.....	..G..A.....C.....
KP245943	PPV2 G-CHN	..AA.....C.....T...	..AC.....	..T.....	..G..A.....C.....
KP245940	PPV2 A-CHN	..AA.....C.....T...	..AC.....	..T.....	..G..A.....C.....
MG345016	PPV2 S16-CHNC.....T...	..AC.....A.....C.....C.....
MN326142	PPV2 GD6-CHNC.....T...	..AC.....A.....C.....C.....
MK092387	PPV2 DJH25-CHNA.....C.....T...	..A.....A.....C.....C.....
MN326185	PPV2 GD12-CHNA.....C.....T...	..A.....A.....C.....C.....
MZ577029	PPV2-CHNA.....C.....T...	..A.....A.....C.....C.....
MK092408	PPV2 JX32-CHNA.....C.....T...	..AC.....G.....	..G..A.....C.....
KX517759	PPV2-HUGC.....T...	..AC..GC.....C.....C.....
KC701296	PPV2-HUG	..A.....C.....T...	..A.....A.....C.....C.....
JQ860238	PPV2 F7-1BV-ROMC.....T...	..AC.....A.....C.....C.....
JQ860240	PPV2 F3-12R-ROMC.....T...	..AC.....A.....C.....C.....
JQ860243	PPV2 WB-102R2-ROM	..A.....C.....T...	..A.....A.....C.....C.....
JQ860248	PPV2 WB-826MR-ROM	..A.....C.....T...	..A.....A.....C.....C.....
KC687100	PPV2 642-CROA.....C.....T...	..A.....GG.....	..A.....C.....C.....
JX101461	PPV2 135-US	..AA.....C.....T...	..AC.....	..T.....	..G..A.....C.....
KF725662	PPV2-US	..A.....C.....T...	..A.....A.....	..G..A.....C.....

		580	610	620	630	640	650	
AB076669	PPV2-MYA	CTCCTAC	GTTTCGAAAGCGATT	CAGGTC	CCCTCGTATCG	ACCATCCTGGG	CCTGAGTCAG	
OL913365	PPV2 QN03-VNTGGAAC	
OL913366	PPV2 HU10-VNCAGGAT..CAG.C	
OL913367	PPV2 QB05-VNA	
KY586144	PPV2-BRAA	
KP245944	PPV2 K-CHNA.GA	
KP245943	PPV2 G-CHNA.GA	
KP245940	PPV2 A-CHNA.GA	
MG345016	PPV2 S16-CHNCAGAT..CAG.C	
MN326142	PPV2 GD6-CHNCAGAT..CAG.C	
MK092387	PPV2 DJH25-CHNGA.C	
MN326185	PPV2 GD12-CHNTGA.C	
MZ577029	PPV2-CHNTGA.C	
MK092408	PPV2 JX32-CHNA.GA	
KX517759	PPV2-HUGCCAGAT..CAG.C	
KC701296	PPV2-HUGA	
JQ860238	PPV2 F7-1BV-ROMCAGAT..CAG.C	
JQ860240	PPV2 F3-12R-ROMCAGGA	
JQ860243	PPV2 WB-102R2-ROMT..CAG.C	
JQ860248	PPV2 WB-826MR-ROMA	
KC687100	PPV2 642-CROGA	
JX101461	PPV2 135-USTAA.GT..A	
KF725662	PPV2-USA	
		660	670	740	760	770	780	
AB076669	PPV2-MYA	AGCAACCTCAGCC	TCTGGACGGGCT	CCGGACGGGAAGGAGATT	CCCCCTCTA			
OL913365	PPV2 QN03-VNG.TGACC.A.G	
OL913366	PPV2 HU10-VNC	
OL913367	PPV2 QB05-VNC	
KY586144	PPV2-BRATC	
KP245944	PPV2 K-CHNC	
KP245943	PPV2 G-CHNC	
KP245940	PPV2 A-CHNC	
MG345016	PPV2 S16-CHNG.TGA	
MN326142	PPV2 GD6-CHNG.TGA	
MK092387	PPV2 DJH25-CHNA	
MN326185	PPV2 GD12-CHNA	
MZ577029	PPV2-CHNC	
MK092408	PPV2 JX32-CHNC	
KX517759	PPV2-HUGG.TGA	
KC701296	PPV2-HUGC	
JQ860238	PPV2 F7-1BV-ROMG.TGA	
JQ860240	PPV2 F3-12R-ROMG.TGA	
JQ860243	PPV2 WB-102R2-ROMA	
JQ860248	PPV2 WB-826MR-ROMA	
KC687100	PPV2 642-CROA	
JX101461	PPV2 135-USA	
KF725662	PPV2-USTC	
		800	820	870	960	990	1000	1090
AB076669	PPV2-MYA	ATGGACC	GAAA	ATC	CATACCGT	CGGACACTATGATGGGAA	AGAGCT	
OL913365	PPV2 QN03-VNGA	
OL913366	PPV2 HU10-VNT..T..G	
OL913367	PPV2 QB05-VNT..T..G	
KY586144	PPV2-BRAG.C..G	
KP245944	PPV2 K-CHNG.C..G	
KP245943	PPV2 G-CHNG.C..G	
KP245940	PPV2 A-CHNG.C..G	
MG345016	PPV2 S16-CHNGGG.C..G	
MN326142	PPV2 GD6-CHNGG.C..G	
MK092387	PPV2 DJH25-CHNA	
MN326185	PPV2 GD12-CHNA	
MZ577029	PPV2-CHNA	
MK092408	PPV2 JX32-CHNA	
KX517759	PPV2-HUGGG	
KC701296	PPV2-HUGG	
JQ860238	PPV2 F7-1BV-ROMGG	
JQ860240	PPV2 F3-12R-ROMGG	
JQ860243	PPV2 WB-102R2-ROMT..T..G	
JQ860248	PPV2 WB-826MR-ROMT..T..G	
KC687100	PPV2 642-CROG	
JX101461	PPV2 135-USG	
KF725662	PPV2-USG	

		1260	1310	1330	1340	1360	1370	1430	1450
AB076669	PPV2-MYA	AAGACT	AGACG	CGACGAGGGT	ATTGTGCG	AATA	GAGAGT	GCCA'	CATGT
OL913365	PPV2 QN03-VN
OL913366	PPV2 HU10-VN	..A..	A..A..C..G.G..	..G..
OL913367	PPV2 QB05-VNT..	..A..C..G..	..G..
KY586144	PPV2-BRAG..	..G..
KP245944	PPV2 K-CHNG.G.C..	..G..	..G..
KP245943	PPV2 G-CHNG.G.C..	..G..	..A..
KP245940	PPV2 A-CHNG.G.C..	..G..	..A..
MG345016	PPV2 S16-CHNG..	..G..
MN326142	PPV2 GD6-CHNG..	..G..
MK092387	PPV2 DJH25-CHN
MN326185	PPV2 GD12-CHN
MZ577029	PPV2-CHN
MK092408	PPV2 JX32-CHN
KX517759	PPV2-HUGG..	..G..
KC701296	PPV2-HUGG..	..G..
JQ860238	PPV2 F7-1BV-ROM	..A..A..A..C..G.G..	..G..
JQ860240	PPV2 F3-12R-ROMG..	..G..
JQ860243	PPV2 WB-102R2-ROMT..	..C..A..C..G..	..G..
JQ860248	PPV2 WB-826MR-ROMT..G..	..G..
KC687100	PPV2 642-CRO
JX101461	PPV2 135-USG.G.G..	..G..
KF725662	PPV2-USA..G..	..G..

		1460	1480	1510	1520	1610	1650	1660
AB076669	PPV2-MYA	ACTCACG	TCAGACGCG	AGACT	AAGCCTC	GCTAC	GTTAGGGAGGCGATACGATT	
OL913365	PPV2 QN03-VN
OL913366	PPV2 HU10-VNT.C.
OL913367	PPV2 QB05-VNT.A..A..C..C.
KY586144	PPV2-BRAT.C.
KP245944	PPV2 K-CHNT.C.
KP245943	PPV2 G-CHNT.C.
KP245940	PPV2 A-CHNT.C.
MG345016	PPV2 S16-CHNT.C.
MN326142	PPV2 GD6-CHNT.C.
MK092387	PPV2 DJH25-CHN
MN326185	PPV2 GD12-CHN
MZ577029	PPV2-CHN
MK092408	PPV2 JX32-CHN
KX517759	PPV2-HUGT.A..G.C.
KC701296	PPV2-HUGT.A..G.C.
JQ860238	PPV2 F7-1BV-ROMT.C.
JQ860240	PPV2 F3-12R-ROMC..A..G.C.
JQ860243	PPV2 WB-102R2-ROMT.A..A..G.C.
JQ860248	PPV2 WB-826MR-ROMT.G.A..C.
KC687100	PPV2 642-CROA..CT.C.
JX101461	PPV2 135-USC.
KF725662	PPV2-UST.C.

		1790	1800	1810	1870	1920	1930	1950
AB076669	PPV2-MYA	TCAGATTATACGTTT		TGTC	TCCGCAGT	TGTATCCGGTACTACTA		CCAGTG
OL913365	PPV2 QN03-VN
OL913366	PPV2 HU10-VNT.C.
OL913367	PPV2 QB05-VNG.C.
KY586144	PPV2-BRAC.
KP245944	PPV2 K-CHNC..G..C..A..TT.
KP245943	PPV2 G-CHNC..G..C..A..TT.
KP245940	PPV2 A-CHNC..G..C..A..TT.
MG345016	PPV2 S16-CHNC.
MN326142	PPV2 GD6-CHNC.
MK092387	PPV2 DJH25-CHNC.
MN326185	PPV2 GD12-CHNC.
MZ577029	PPV2-CHNC.C.
MK092408	PPV2 JX32-CHNC.
KX517759	PPV2-HUGC.
KC701296	PPV2-HUGG.C.
JQ860238	PPV2 F7-1BV-ROMT.C.
JQ860240	PPV2 F3-12R-ROMG.C.
JQ860243	PPV2 WB-102R2-ROMG.C.
JQ860248	PPV2 WB-826MR-ROMG.C.
KC687100	PPV2 642-CROC.
JX101461	PPV2 135-USC..G..C..C..TT.
KF725662	PPV2-USC.



Hình 7A. Kết quả so sánh trình tự nucleotide gen VP của các chủng PPV2 phân lập tại miền Trung so với các chủng tham chiếu.

		10	20	30	40	50	60
AB076669	PPV2-MYA	SAADAWKPGDRPPELENLMDAMDRSIWGNRRNNSGGRRGINALLRXPYDPRMRQALLQLYK					
OL913365	PPV2 QN03-VN					.G.	
OL913366	PPV2 HU10-VN					.G.	
OL913367	PPV2 QB05-VN					.G.	
KY586144	PPV2-BRA					.G.	
KP245944	PPV2 K-CHN			D.		.G.	
KP245943	PPV2 G-CHN			D.		.G.	
KP245940	PPV2 A-CHN			D.		.G.	
MG345016	PPV2 S16-CHN			D.		.G.	
MN326142	PPV2 GD6-CHN					.G.	
MK092387	PPV2 DJH25-CHN					.G.	
MN326185	PPV2 GD12-CHN					.G.	
MZ577029	PPV2-CHN					.G.	
MK092408	PPV2 JX32-CHN			D.		.G.	
KX517759	PPV2-HUG					.G.	
KC701296	PPV2-HUG	E.				.G.	
JQ860238	PPV2 F7-1BV-ROM					.G.	
JQ860240	PPV2 F3-12R-ROM					.G.	
JQ860243	PPV2 WB-102R2-ROM					.G.	
JQ860248	PPV2 WB-826MR-ROM					.G.	
KC687100	PPV2 642-CRO				K.	.G.	
JX101461	PPV2 135-US		D.		D.	.AG.	N
KF725662	PPV2-US					F.	G.

		60	70	80	90	100	110	120
AB076669	PPV2-MYA	YKFFISIKKHGGFWDKIKEVAKQWWMAGHQTSKGDDELARTVLDLGRLFMAVVDDYREDPEID						
OL913365	PPV2 QN03-VN							
OL913366	PPV2 HU10-VN		N.					
OL913367	PPV2 QB05-VN							
KY586144	PPV2-BRA		N.					
KP245944	PPV2 K-CHN						V.	
KP245943	PPV2 G-CHN						V.	
KP245940	PPV2 A-CHN						V.	
MG345016	PPV2 S16-CHN		N.					
MN326142	PPV2 GD6-CHN		N.					
MK092387	PPV2 DJH25-CHN							
MN326185	PPV2 GD12-CHN							
MZ577029	PPV2-CHN							
MK092408	PPV2 JX32-CHN						V.	
KX517759	PPV2-HUG		N.					
KC701296	PPV2-HUG							
JQ860238	PPV2 F7-1BV-ROM		N.					
JQ860240	PPV2 F3-12R-ROM		N.					
JQ860243	PPV2 WB-102R2-ROM							
JQ860248	PPV2 WB-826MR-ROM							
KC687100	PPV2 642-CRO							R.
JX101461	PPV2 135-US	N.						
KF725662	PPV2-US		N.					

		120	130	140	150	160	170	180
AB076669	PPV2-MYA	IDSVRRSMIDFLYGDNDAITRAFFGLQRFADKVRLEPERDVMRVVITGGYRPQPPKGSFPGTWA						
OL913365	PPV2 QN03-VN					Q.		
OL913366	PPV2 HU10-VN					Q.		
OL913367	PPV2 QB05-VN					Q.		K.
KY586144	PPV2-BRA					Q.		
KP245944	PPV2 K-CHN				H.	Q.		
KP245943	PPV2 G-CHN				H.	Q.	V.	K.
KP245940	PPV2 A-CHN				H.	Q.	V.	K.
MG345016	PPV2 S16-CHN					Q.		K.
MN326142	PPV2 GD6-CHN					Q.		K.
MK092387	PPV2 DJH25-CHN					Q.		
MN326185	PPV2 GD12-CHN					Q.		
MZ577029	PPV2-CHN					Q.		
MK092408	PPV2 JX32-CHN				H.	Q.	V.	N.
KX517759	PPV2-HUG				T.	Q.		
KC701296	PPV2-HUG					Q.		K.
JQ860238	PPV2 F7-1BV-ROM					Q.		
JQ860240	PPV2 F3-12R-ROM					Q.		
JQ860243	PPV2 WB-102R2-ROM					Q.		K.
JQ860248	PPV2 WB-826MR-ROM					Q.		K.
KC687100	PPV2 642-CRO				V.	H.	L.S.	K.Q.S.
JX101461	PPV2 135-US					H.		Q.
KF725662	PPV2-US					Q.		

		180	190	200	210	220	230	240
AB076669	PPV2-MYA	IWAELDLDIRNSLDASYKAEEDRSKAIQVPRIDHHPGESGEQCPAPEERPAESAEAVGPGS						
OL913365	PPV2 QN03-VNV.....						
OL913366	PPV2 HU10-VNP.E..A..N..SAA..RSR.....						
OL913367	PPV2 QB05-VNS.....G.....						
KY586144	PPV2-BRAND.....G..A..						
KP245944	PPV2 K-CHNND.....G..A..						
KP245943	PPV2 G-CHNND.....G..A..						
KP245940	PPV2 A-CHNND.....G..A..						
MG345016	PPV2 S16-CHNP.E..A..N..SAA..RSR.....						
MN326142	PPV2 GD6-CHNP.E..A..N..SAA..RSR.....						
MK092387	PPV2 DJH25-CHNV.....						
MN326185	PPV2 GD12-CHNV.....						
MZ577029	PPV2-CHNV.....						
MK092408	PPV2 JX32-CHNND.....G..A..						
KX517759	PPV2-HUGP.E..A..N..SAA..RSR.....						
KC701296	PPV2-HUGT.....						
JQ860238	PPV2 F7-1BV-ROMP.E..A..N..SAA..RSR.....						
JQ860240	PPV2 F3-12R-ROMP.E..AG..N..SAA..RSR.....						
JQ860243	PPV2 WB-102R2-ROM						
JQ860248	PPV2 WB-826MR-ROMI.....T..K..S..G.....						
KC687100	PPV2 642-CROD..ND..S.....						
JX101461	PPV2 135-USS.....G.....						
KF725662	PPV2-US						

		240	250	260	270	280	290	300
AB076669	PPV2-MYA	GSDGSGRADITGAGREGDSPSTEVEGSDGPESDGKGGGLTLPGYRYVGPNGPLDAGEPRGPV						
OL913365	PPV2 QN03-VNE.....C.....						
OL913366	PPV2 HU10-VNT.....R..PT.....A.....						
OL913367	PPV2 QB05-VNR.....R.....A.....						
KY586144	PPV2-BRAR.....T.....A.....						
KP245944	PPV2 K-CHNR.....R.....A.....						
KP245943	PPV2 G-CHNR.....R.....A.....						
KP245940	PPV2 A-CHNR.....R.....A.....						
MG345016	PPV2 S16-CHNE..R..PT.....A.....						
MN326142	PPV2 GD6-CHNE..R..PT.....A.....						
MK092387	PPV2 DJH25-CHNE.....						
MN326185	PPV2 GD12-CHNR.....R.....T.....A.....						
MZ577029	PPV2-CHNA.....T.....T.....						
MK092408	PPV2 JX32-CHNE..R..PT.....A.....						
KX517759	PPV2-HUGE..R..PT.....A.....						
KC701296	PPV2-HUGT.....R.....R.....A.....						
JQ860238	PPV2 F7-1BV-ROME..R..PT.....A.....						
JQ860240	PPV2 F3-12R-ROME..R..PT.....A.....						
JQ860243	PPV2 WB-102R2-ROMT.....R.....R.....A.....						
JQ860248	PPV2 WB-826MR-ROMT.....R.....R.....N.....S.....						
KC687100	PPV2 642-CROT..R..AR.....R..H..S.....						
JX101461	PPV2 135-USR.....R.....						
KF725662	PPV2-USR.....						

		300	310	320	330	340	350	360
AB076669	PPV2-MYA	GPVDAIAKKHDERYDELIKHGHIPYIHGRGADTMMGKELADAEAGKILDSYDQLVANAARGL						
OL913365	PPV2 QN03-VNL.....						
OL913366	PPV2 HU10-VNL.....						
OL913367	PPV2 QB05-VNSL.....						
KY586144	PPV2-BRASL.....R.....						
KP245944	PPV2 K-CHNSL.....R.....						
KP245943	PPV2 G-CHNSL.....R.....						
KP245940	PPV2 A-CHNSL.....R.....						
MG345016	PPV2 S16-CHNSL.....X..X.....						
MN326142	PPV2 GD6-CHNSL.....						
MK092387	PPV2 DJH25-CHNV.....						
MN326185	PPV2 GD12-CHN						
MZ577029	PPV2-CHN						
MK092408	PPV2 JX32-CHN						
KX517759	PPV2-HUGR.....L..E.....						
KC701296	PPV2-HUGL.....						
JQ860238	PPV2 F7-1BV-ROMSL.....						
JQ860240	PPV2 F3-12R-ROML.....						
JQ860243	PPV2 WB-102R2-ROML.....						
JQ860248	PPV2 WB-826MR-ROMN.....P.....						
KC687100	PPV2 642-CROS.....						
JX101461	PPV2 135-USSL.....R.....						
KF725662	PPV2-USSL.....						

		360	370	380	390	400	410	420
AB076669	PPV2-MYA	GIWRAKDTLADLIGGELDKVLPPDPPVQSEGEESQKRPREEDAPFESADSAKAPPAQKPRI						
OL913365	PPV2 QN03-VN						
OL913366	PPV2 HU10-VNT.....					K.....
OL913367	PPV2 QB05-VN						
KY586144	PPV2-BRAR.....		S.....
KP245944	PPV2 K-CHNE.....N.T.QV.....	
KP245943	PPV2 G-CHNE.....C.N.QV.....	
KP245940	PPV2 A-CHNE.....C.N.QV.....	
MG345016	PPV2 S16-CHN						
MN326142	PPV2 GD6-CHN						
MK092387	PPV2 DJH25-CHN						
MN326185	PPV2 GD12-CHN						
MZ577029	PPV2-CHN						
MK092408	PPV2 JX32-CHNN.....				
KX517759	PPV2-HUG						
KC701296	PPV2-HUG						
JQ860238	PPV2 F7-1BV-ROMT.....					K.....
JQ860240	PPV2 F3-12R-ROM						
JQ860243	PPV2 WB-102R2-ROM						
JQ860248	PPV2 WB-826MR-ROM						
KC687100	PPV2 642-CROM.....					
JX101461	PPV2 135-USE.....N.QV.....	
KF725662	PPV2-US						

		420	430	440	450	460	470	480
AB076669	PPV2-MYA	PRLDVPEYFWTEEEEGAGDGGSDDEGGGIVRINIPKIMESADSTQHQPQGGGGPRASGHWRA						
OL913365	PPV2 QN03-VNKD.....G.....		
OL913366	PPV2 HU10-VNK.....		Y.....HK.....L.....	
OL913367	PPV2 QB05-VN						
KY586144	PPV2-BRAD.....					
KP245944	PPV2 K-CHND.....E.....	C.....		
KP245943	PPV2 G-CHND.....E.....	C.....		
KP245940	PPV2 A-CHND.....E.....	C.....		
MG345016	PPV2 S16-CHN						
MN326142	PPV2 GD6-CHN						
MK092387	PPV2 DJH25-CHN						
MN326185	PPV2 GD12-CHN						
MZ577029	PPV2-CHN						
MK092408	PPV2 JX32-CHN						
KX517759	PPV2-HUG						
KC701296	PPV2-HUG						
JQ860238	PPV2 F7-1BV-ROMK.....		KD.....G.....		
JQ860240	PPV2 F3-12R-ROM						
JQ860243	PPV2 WB-102R2-ROMY.....HK.....	L.....		
JQ860248	PPV2 WB-826MR-ROMY.....HK.....	T.....L.L.L.....	
KC687100	PPV2 642-CRO						
JX101461	PPV2 135-USD.....E.....	Q.....		
KF725662	PPV2-USD.G.....N.....				

		480	490	500	510	520	530	540
AB076669	PPV2-MYA	RAGTMFGTHGVTTTQTRMVILSPKTDYKPLFLDADTSKFDSEPGMGFLTPWQYFDNFCYMNH						
OL913365	PPV2 QN03-VN						
OL913366	PPV2 HU10-VNV.....						
OL913367	PPV2 QB05-VNV.....					S.....
KY586144	PPV2-BRAV.....E.....					
KP245944	PPV2 K-CHNV.....						
KP245943	PPV2 G-CHNI.....						
KP245940	PPV2 A-CHNI.....						
MG345016	PPV2 S16-CHNV.....E.....					
MN326142	PPV2 GD6-CHNV.....E.....					
MK092387	PPV2 DJH25-CHN						
MN326185	PPV2 GD12-CHN						
MZ577029	PPV2-CHN						
MK092408	PPV2 JX32-CHN						
KX517759	PPV2-HUGV.....						
KC701296	PPV2-HUGV.....						
JQ860238	PPV2 F7-1BV-ROMV.....						
JQ860240	PPV2 F3-12R-ROMV.....H.C.....					
JQ860243	PPV2 WB-102R2-ROMV.....					S.....
JQ860248	PPV2 WB-826MR-ROMV.....					R.S.....
KC687100	PPV2 642-CRO						
JX101461	PPV2 135-USV.....						
KF725662	PPV2-USV.....E.....					

		720	730	740	750	760	770	780
AB076669	PPV2-MYA	FYQPQGGTDL	VFPQGFIPGPR	CLPVSTQLR	ASSDFED	MSAIAYGD	PTSNNRH	SMLPFTRQA
OL913365	PPV2 QN03-VNI.....
OL913366	PPV2 HU10-VNI.....ST.....Y.....R.....
OL913367	PPV2 QB05-VNI.....
KY586144	PPV2-BRAI.....
KP245944	PPV2 K-CHNI.....
KP245943	PPV2 G-CHNI.....
KP245940	PPV2 A-CHNI.....
MG345016	PPV2 S16-CHNI.....A.....
MN326142	PPV2 GD6-CHNI.....A.....
MK092387	PPV2 DJH25-CHNI.....
MN326185	PPV2 GD12-CHNI.....
MZ577029	PPV2-CHNI.....
MK092408	PPV2 JX32-CHNI.....
KX517759	PPV2-HUGI.....
KC701296	PPV2-HUGI.....
JQ860238	PPV2 F7-1BV-ROMI.....ST.....Y.....R.....
JQ860240	PPV2 F3-12R-ROMI.....ST.....Y.....R.....
JQ860243	PPV2 WB-102R2-ROMI.....
JQ860248	PPV2 WB-826MR-ROMH.....I.....S.....S.....R.....
KC687100	PPV2 642-CROI.....
JX101461	PPV2 135-USI.....
KF725662	PPV2-USI.....V.....

		780	790	800	810	820	830	
AB076669	PPV2-MYA	RQATTMSTQ	SYNRQGEV	QCRNVH	FLGLDM	AFARSSA	EDSFYERF	DEDDKDYRNPG
OL913365	PPV2 QN03-VN
OL913366	PPV2 HU10-VNI.....N.....E.....
OL913367	PPV2 QB05-VNE.....
KY586144	PPV2-BRAE.....
KP245944	PPV2 K-CHNI.....N.....IE.....E.....
KP245943	PPV2 G-CHNI.....N.....E.....E.....
KP245940	PPV2 A-CHNI.....N.....IE.....E.....
MG345016	PPV2 S16-CHNI.....N.....E.....
MN326142	PPV2 GD6-CHNE.....
MK092387	PPV2 DJH25-CHN
MN326185	PPV2 GD12-CHN
MZ577029	PPV2-CHN
MK092408	PPV2 JX32-CHN
KX517759	PPV2-HUG
KC701296	PPV2-HUGE.....
JQ860238	PPV2 F7-1BV-ROMI.....N.....E.....
JQ860240	PPV2 F3-12R-ROMI.....N.....E.....
JQ860243	PPV2 WB-102R2-ROME.....
JQ860248	PPV2 WB-826MR-ROME.....
KC687100	PPV2 642-CRO
JX101461	PPV2 135-USI.....N.....E.....E.....
KF725662	PPV2-US

Hình 7B. Kết quả so sánh trình tự amino acid dự đoán từ gen VP của các chủng PPV2 phân lập tại miền Trung Việt Nam so với các chủng tham chiếu

		110	120	710	800	810	890	900	910
GQ387499	PPV4 17	CTACTTGCAA	AACT	CATTAA	GCTTTCGAAG	ATG	ACTGCCA	ACTCATA	CAGAAC
GQ387500	PPV4 14
NC014665	PPV4T.....
JQ868714	PPV4 WB-209CVT.....T.....A.....
JQ868716	PPV4 WB-549BHT.....T.....A.....
JQ868715	PPV4 WB-542BHT.....T.....A.....
JQ868713	PPV4 WB-195HRT.....T.....A.....
GU978967	PPV4 JS0910-5644T.....T.....A.....
GU978965	PPV4 HEN0922-5645T.....T.....A.....
GU978968	PPV4 JS0910-5400T.....T.....A.....
GU978964	PPV4 HEN0922-5400T.....T.....A.....
HMO31135	PPV4 S0918bT.....T.....A.....
HMO31134	PPV4 JS0918aT.....T.....A.....
MG345027	PPV4-SERUM-SMU
MT434667	PPV4-QN117T.....T.....A.....
MT434668	PPV4-QT02T.....S.....T.....A.....T.....
MT434669	PPV4-QT20T.....T.....A.....

			1010	1040	1120	1190	1200	1240	1260
GQ387499	PPV4	17	TACTCGCA	GAATTCTATA	TCTGCCT	AGAATACAGGTGAT	TGCTATCGA	ACATTGTAC	
GQ387500	PPV4	14
NC014665	PPV4	
JQ868714	PPV4	WB-209CVA.....C.....A.....G.....A.....A.....G.....
JQ868716	PPV4	WB-549BHA.....G.....A.....
JQ868715	PPV4	WB-542BHA.....G.....A.....
JQ868713	PPV4	WB-195HRA.....C.....A.....G.....A.....
GU978967	PPV4	JS0910-5644A.....G.....A.....
GU978965	PPV4	HEN0922-5645A.....G.....A.....
GU978968	PPV4	JS0910-5400A.....G.....A.....
GU978964	PPV4	HEN0922-5400A.....G.....A.....
HM031135	PPV4	S0918bG.....A.....
HM031134	PPV4	JS0918aG.....A.....
MG345027	PPV4	SERUM-SMU
MT434667	PPV4	QNi17A.....G.....A.....A.....G.....
MT434668	PPV4	QT02A.....C.....A.....G.....A.....A.....G.....
MT434669	PPV4	QT20A.....G.....A.....

			1330	1360	1370	1380	1400	1560	1590
GQ387499	PPV4	17	AAGATGGT	TAGAGAAAAAC	CGAGTTTCAGATA		TGGATCAT	TAAAAA	ACCATGG
GQ387500	PPV4	14
NC014665	PPV4	
JQ868714	PPV4	WB-209CVC.....A.....
JQ868716	PPV4	WB-549BHC.....A.....A.....
JQ868715	PPV4	WB-542BHC.....
JQ868713	PPV4	WB-195HRC.....A.....A.....
GU978967	PPV4	JS0910-5644C.....A.....A.....
GU978965	PPV4	HEN0922-5645C.....A.....A.....
GU978968	PPV4	JS0910-5400C.....A.....A.....
GU978964	PPV4	HEN0922-5400C.....A.....A.....
HM031135	PPV4	S0918bC.....A.....A.....
HM031134	PPV4	JS0918aC.....A.....A.....
MG345027	PPV4	SERUM-SMU
MT434667	PPV4	QNi17C.....T.....A.....G.....G.....
MT434668	PPV4	QT02C.....T.....A.....G.....G.....
MT434669	PPV4	QT20C.....A.....G.....

			1700	1730	1890	1930	1960	1970	2040	2070
GQ387499	PPV4	17	TGGGAT	GATCAAAA	CACCGA	ACCAAG	TCCAAGCA	ACATATTTGA	AGGAAAA	TCCCCCG
GQ387500	PPV4	14
NC014665	PPV4	
JQ868714	PPV4	WB-209CVA.....G.....A.....G.....T.....A.....
JQ868716	PPV4	WB-549BHG.....G.....T.....A.....
JQ868715	PPV4	WB-542BHG.....G.....T.....A.....
JQ868713	PPV4	WB-195HRG.....G.....T.....A.....
GU978967	PPV4	JS0910-5644G.....G.....A.....
GU978965	PPV4	HEN0922-5645A.....G.....A.....
GU978968	PPV4	JS0910-5400A.....G.....A.....
GU978964	PPV4	HEN0922-5400A.....G.....A.....
HM031135	PPV4	S0918bA.....G.....A.....
HM031134	PPV4	JS0918aA.....G.....A.....
MG345027	PPV4	SERUM-SMU
MT434667	PPV4	QNi17G.....A.....G.....T.....A.....
MT434668	PPV4	QT02G.....A.....G.....T.....A.....
MT434669	PPV4	QT20G.....A.....T.....

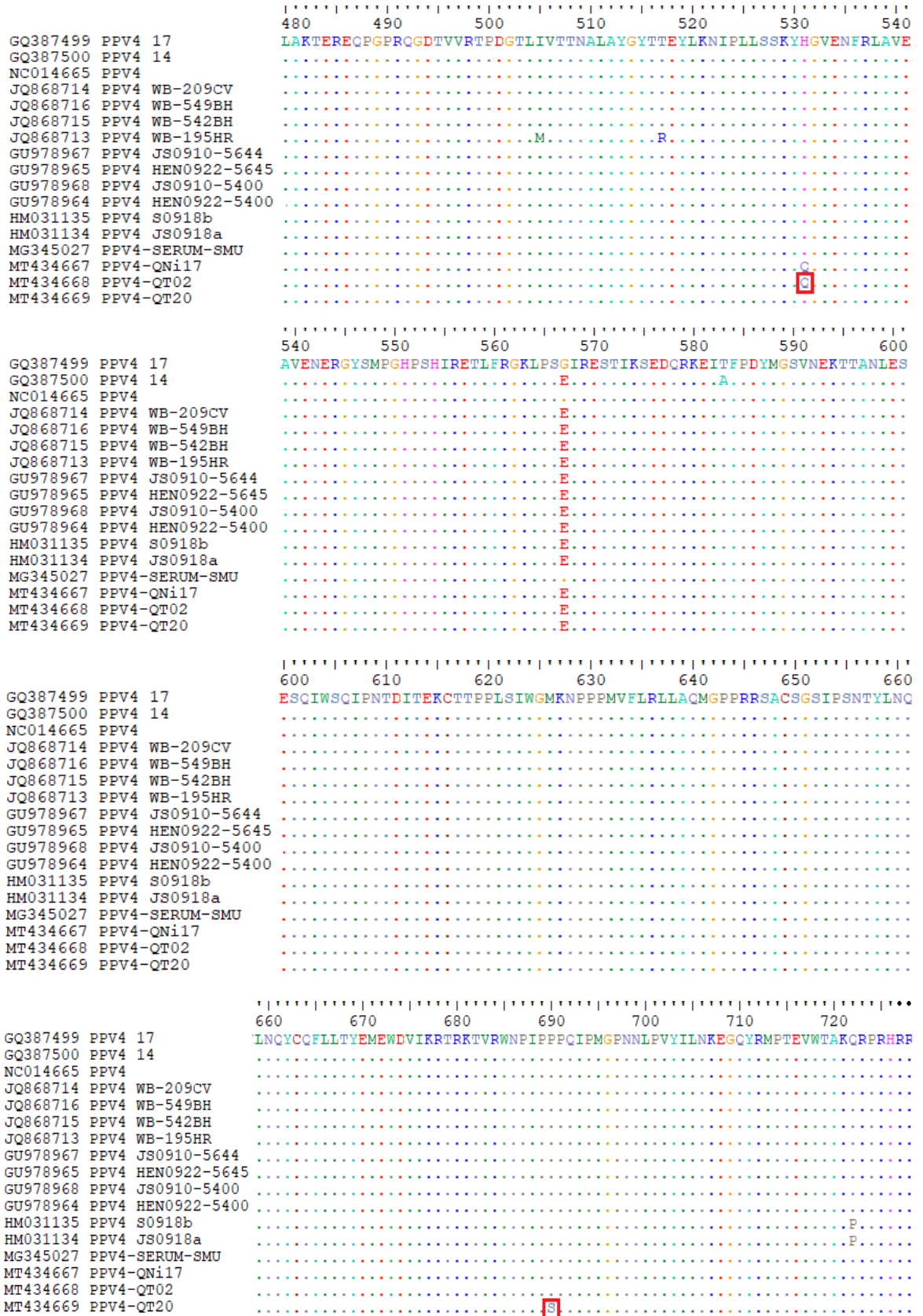
Hình 7C. Kết quả so sánh trình tự nucleotide gen VP của các chủng PPV4 phân lập tại miền Trung so với các chủng tham chiếu.

			240	250	260	270	280	290	300
GQ387499	PPV4	17	ELVIKDV	CQQCGLQAEQVSDNNSATLLAFEDVNYELPYVLGGGQVSVPGHLPGQPYQLPKYS					
GQ387500	PPV4	14
NC014665	PPV4	
JQ868714	PPV4	WB-209CV
JQ868716	PPV4	WB-549BH
JQ868715	PPV4	WB-542BH
JQ868713	PPV4	WB-195HR
GU978967	PPV4	JS0910-5644
GU978965	PPV4	HEN0922-5645
GU978968	PPV4	JS0910-5400
GU978964	PPV4	HEN0922-5400
HM031135	PPV4	S0918b
HM031134	PPV4	JS0918a
MG345027	PPV4	SERUM-SMU
MT434667	PPV4	QNi17
MT434668	PPV4	QT02
MT434669	PPV4	QT20

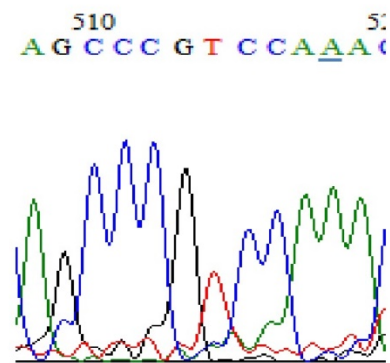
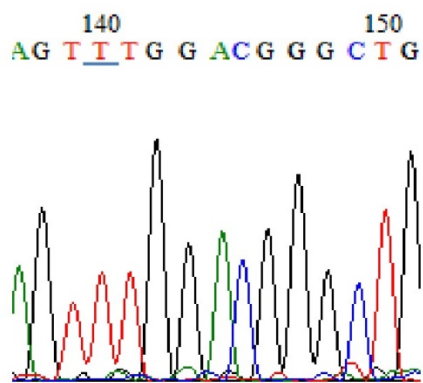
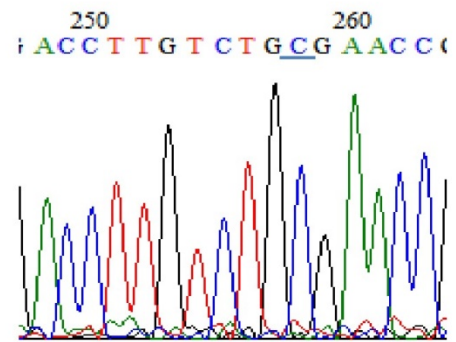
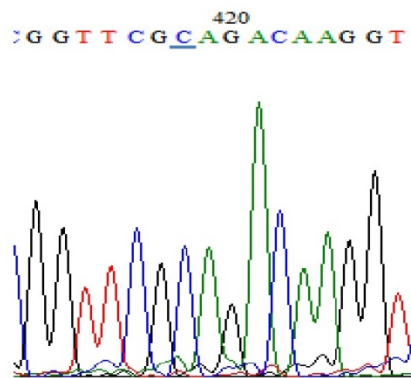
			300	310	320	330	340	350	360
GQ387499	PPV4	17	KYSYRTV	GKPDPNSSGFVPGRNTHFDQGGPGHPKASKTIWYSCYLETQDTEFYILENHKATILHS					
GQ387500	PPV4	14
NC014665	PPV4	
JQ868714	PPV4	WB-209CV
JQ868716	PPV4	WB-549BH
JQ868715	PPV4	WB-542BH
JQ868713	PPV4	WB-195HR
GU978967	PPV4	JS0910-5644
GU978965	PPV4	HEN0922-5645
GU978968	PPV4	JS0910-5400
GU978964	PPV4	HEN0922-5400
HM031135	PPV4	S0918b
HM031134	PPV4	JS0918a
MG345027	PPV4	SERUM-SMU
MT434667	PPV4	QNi17
MT434668	PPV4	QT02
MT434669	PPV4	QT20

			360	370	380	390	400	410	420
GQ387499	PPV4	17	HSGNTFSQNYNFPDLPEEQILTQYMWDDARRQDNPLIDQRIQVMSRMYDDGPKQKFAIEVNPYI						
GQ387500	PPV4	14	K.
NC014665	PPV4		K.
JQ868714	PPV4	WB-209CV	K.
JQ868716	PPV4	WB-549BH	K.
JQ868715	PPV4	WB-542BH	K.
JQ868713	PPV4	WB-195HR	K.
GU978967	PPV4	JS0910-5644	K.
GU978965	PPV4	HEN0922-5645	K.
GU978968	PPV4	JS0910-5400	K.
GU978964	PPV4	HEN0922-5400	K.
HM031135	PPV4	S0918b	K.
HM031134	PPV4	JS0918a	K.
MG345027	PPV4	SERUM-SMU	K.
MT434667	PPV4	QNi17	K.
MT434668	PPV4	QT02	K.
MT434669	PPV4	QT20	K.

			420	430	440	450	460	470	480
GQ387499	PPV4	17	PYIVPFTVKSTSRPAMFLAGGRFKDGDYSITGPGDREKTSFRYYNDPPWIIITRDTYLFSDDL						
GQ387500	PPV4	14
NC014665	PPV4	
JQ868714	PPV4	WB-209CV
JQ868716	PPV4	WB-549BH	Q.	K.	.
JQ868715	PPV4	WB-542BH	Q.	K.	.
JQ868713	PPV4	WB-195HR	Q.	K.	.
GU978967	PPV4	JS0910-5644	Q.	K.	.
GU978965	PPV4	HEN0922-5645	Q.	K.	.
GU978968	PPV4	JS0910-5400	Q.	K.	.
GU978964	PPV4	HEN0922-5400	Q.	K.	.
HM031135	PPV4	S0918b	Q.	K.	.
HM031134	PPV4	JS0918a	Q.	K.	.
MG345027	PPV4	SERUM-SMU	Q.	K.	.
MT434667	PPV4	QNi17	D.	.	V.
MT434668	PPV4	QT02	D.	.	V.
MT434669	PPV4	QT20	Q.	.	K.



Hình 7D. Kết quả so sánh trình tự amino acid dự đoán từ gen VP của các chủng PPV4 phân lập tại miền Trung Việt Nam so với các chủng tham chiếu



Trình tự gen theo môi xuôi

Trình tự gen theo môi ngược

Hình 7E. Vị trí thay thế nucleotide trong trình tự gen VP của chủng PPV2-QN03 khác biệt hoàn toàn so với các chủng tham chiếu

Phụ lục 8: Kết quả so sánh tỷ lệ tương đồng

Bảng 8A. Tỷ lệ tương đồng nucleotide (phía dưới đường chéo) và amino acid dự đoán (phía trên đường chéo) của trình tự gen mã hóa protein cấu trúc PPV2

STT	Chủng	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1	AB076669		98.7	95.4	97.4	97.5	95.3	95.1	95.1	95.6	96.2	99	99.1	99.1	97.7	97.1	97.7	95.4	95.4	97.4	95.9	96.7	95.1	97.4
2	OL913365	98.1		95.3	97.5	97.3	95.5	95.4	95.4	95.5	96.1	99.5	99.6	99.6	97.9	97.2	97.7	95.3	95.3	97.5	95.7	96.3	95.4	97.4
3	OL913366	96.1	95.8		95.4	95.6	93.7	93.2	93.5	98	97.9	95.7	95.6	95.6	94.5	97.4	95.4	100	98.7	95.4	93.9	93.3	93.8	95.7
4	OL913367	97.2	97	96.1		97.3	95.4	95.1	95.4	95.6	96.5	97.5	97.7	97.7	96.6	96.1	98.5	95.4	95.1	100	96.9	95.7	95.3	97.4
5	KY586144	97.1	96.5	95.5	96.6		95.7	95.3	95.5	96.3	96.9	97.5	97.7	97.7	96.7	96.6	97.5	95.6	95.9	97.3	95.6	95.6	95.4	98.9
6	KP245944	93.9	93.9	94	94.6	94.1		98.7	99.2	94.4	94.1	95.5	95.6	95.6	96.3	94.3	95.3	93.7	93.9	95.4	93.6	93.3	98.6	95.7
7	KP245943	94.1	94	94	94.5	94.1	99		99.5	94.2	93.8	95.4	95.5	95.5	96.6	94.1	95	93.2	93.5	95.1	93.3	93.5	98.1	95.3
8	KP245940	93.8	93.7	93.8	94.4	94	99	99.5		94.4	94.1	95.4	95.5	95.5	96.6	94.1	95.3	93.5	93.7	95.4	93.6	93.5	98.4	95.5
9	MG34501	96.3	96	98.1	96.2	96	94.1	94.2	94		99.1	96	95.9	95.9	95.1	97.7	95.9	98	98.3	95.6	93.9	94.1	94.5	96.3
10	MN32614	96.8	96.4	98.3	96.8	96.5	93.8	93.9	93.7	99		96.6	96.5	96.5	95.5	98.3	96.7	97.9	98.1	96.5	94.8	94.7	94.2	96.9
11	MK09238	98.2	99.7	96	97.1	96.6	94	94.1	93.9	96.2	96.6		99.8	99.8	98.1	97.7	97.8	95.7	95.7	97.5	96	96.6	95.4	97.7
12	MN32618	98.2	99.7	96	97	96.7	94	94.2	93.9	96.2	96.6	99.8		100	98.3	97.5	97.9	95.6	95.6	97.7	96.1	96.7	95.5	97.8
13	MZ57702	97.8	99.3	95.7	97	96.3	94.3	94.4	94.1	95.9	96.3	99.4	99.5		98.3	97.5	97.9	95.6	95.6	97.7	96.1	96.7	95.5	97.8
14	MK09240	97.4	98.2	95.2	96.3	95.9	95	95.3	95.1	95.5	95.8	98.3	98.3	97.9		96.5	96.8	94.5	94.5	96.6	95	95.6	95.7	96.8
15	KX517759	96.9	96.7	96.9	96.3	95.9	93.4	93.5	93.3	97.1	97.6	97	96.9	96.7	96.1		96.3	97.4	97.4	96.1	94.5	95	94.4	96.7
16	KC701296	97.1	96.8	96.1	98.7	96.5	94.1	94.1	94	96.2	96.8	96.9	96.9	96.7	96.1	97.1		95.4	95.4	98.5	96.7	96	95.1	97.5
17	JQ860238	96.1	95.8	100	96.1	95.5	94	94	93.8	98.1	98.3	96	96	95.7	95.2	96.9	96.1		98.7	95.4	93.9	93.3	93.8	95.7
18	JQ860240	95.7	95.4	98.5	96	95.3	94	94	93.8	97.9	97.7	95.7	95.6	95.4	94.9	97	96.2	98.5		95.1	93.9	93.6	94.1	95.9
19	JQ860243	97.2	97	96.1	100	96.6	94.6	94.5	94.4	96.2	96.8	97.1	97	97	96.3	96.3	98.7	96.1	96		96.9	95.7	95.3	97.4
10	JQ860248	95.9	95.6	95.4	97.5	95.5	93.4	93.5	93.4	95	95.7	95.8	95.7	95.5	95	95.6	97.8	95.4	95.5	97.5		94.2	93.5	95.6
21	KC687100	97.4	96.7	94.9	96.2	95.9	92.9	93.1	92.9	95.3	95.7	96.9	96.9	96.5	96.3	95.8	96	94.9	94.7	96.2	94.9		93.2	95.5
22	JX101461	93.7	93.7	93.7	94.3	93.8	97.9	97.9	97.8	93.9	93.5	93.9	93.9	94.2	94.5	93.2	93.8	93.7	93.7	94.3	93.1	92.6		95.4
23	KF725662	96.9	96.6	95.7	96.7	98.2	94.2	94.2	94.1	96.1	96.6	96.7	96.8	96.5	96	96.1	96.5	95.7	95.3	96.7	95.5	95.9	93.9	

Bảng 8B. Tỷ lệ tương đồng nucleotide (phía dưới đường chéo) và amino acid dự đoán (phía trên đường chéo) của trình tự hệ gen PPV4

STT	Chủng	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	GQ387499		99.3	100	98.6	98.5	98.1	98.5	98	98.2	98	98.2	98	98	99.3	98.2	98	98
2	GQ387500	99.7		99.3	98.6	98.4	98.1	98.4	98	98.2	98	98.2	98	98	98.7	98.2	98	98
3	NC 014665	100	99.7		98.6	98.5	98.1	98.5	98	98.2	98	98.2	98	98	99.3	98.2	98	98
4	JQ868714	98.9	99	98.9		98.7	98.8	99.5	98.9	99	98.9	99	98.8	98.8	98.6	99.2	99	98.9
5	JQ868716	99.2	99.2	99.2	99.2		99.3	98.9	98.3	98.4	98.3	98.4	98.3	98.3	98.2	98.3	98.2	98.4
6	JQ868715	99.1	99.1	99.1	99.2	99.7		98.7	98.3	98.4	98.3	98.4	98.2	98.2	98.1	98.7	98.5	98.4
7	JQ868713	99	99	99	99.7	99.4	99.3		98.9	99	98.9	99	98.8	98.8	98.4	98.9	98.7	99
8	GU978967	98.9	98.9	98.9	99.2	99.2	99.1	99.3		99.4	100	99.4	99.4	99.4	98	98.6	98.2	98.8
9	GU978965	98.9	98.9	98.9	99.3	99.2	99.2	99.4	99.7		99.4	100	99.3	99.3	98.2	98.7	98.3	98.9
10	GU978968	98.9	98.9	98.9	99.2	99.2	99.1	99.3	100	99.7		99.4	99.4	99.4	98	98.6	98.2	98.8
11	GU978964	98.9	98.9	98.9	99.3	99.2	99.2	99.4	99.7	100	99.7		99.3	99.3	98.2	98.7	98.3	98.9
12	HM031135	98.9	98.9	98.9	99.2	99.1	99.1	99.3	99.7	99.6	99.7	99.6		100	98	98.5	98.1	98.7
13	HM031134	98.9	98.9	98.9	99.2	99.1	99.1	99.3	99.7	99.6	99.7	99.6	100		98	98.5	98.1	98.7
14	MG345027	99.6	99.4	99.6	98.9	99	99	98.9	98.8	98.9	98.8	98.9	98.9	98.9		98.2	98	98
15	MT434667	98.9	98.9	98.9	99.5	99.1	99.2	99.3	99.2	99.2	99.2	99.2	99.1	99.1	98.9		99.3	98.8
16	MT434668	98.8	98.8	98.8	99.5	99	99.1	99.3	99	99	99	99	98.9	98.9	98.7	99.6		98.7
17	MT434669	98.9	99	98.9	99.2	99.2	99.2	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.3	99.3	98.9	99.4	99.3	

Bảng 8C. Tỷ lệ tương đồng nucleotide (phía dưới đường chéo) và amino acid dự đoán (phía trên đường chéo) của trình tự ORF1 của PPV4

STT	Chủng	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	GQ387499		99.3	100	98.9	99.6	99.4	99.1	99.1	98.9	99.1	98.9	99.1	99.1	99.8	98.8	98.9	98.8
2	GQ387500	99.7		99.3	98.6	99.3	99.1	98.8	98.8	98.6	98.8	98.6	98.8	98.8	99.1	98.4	98.6	98.4
3	NC 014665	100	99.7		98.9	99.6	99.4	99.1	99.1	98.9	99.1	98.9	99.1	99.1	99.8	98.8	98.9	98.8
4	JQ868714	99.2	99.1	99.2		99.3	99.4	99.8	99.4	99.3	99.4	99.3	99.4	99.4	98.8	99.8	100	99.4
5	JQ868716	99.2	99.1	99.2	99.1		99.8	99.4	99.1	98.9	99.1	98.9	99.1	99.1	99.4	99.1	99.3	99.1
6	JQ868715	99.1	99.1	99.1	99.1	99.9		99.6	99.3	99.1	99.3	99.1	99.3	99.3	99.3	99.3	99.4	99.3
7	JQ868713	99.2	99.2	99.2	99.9	99.1	99.2		99.6	99.4	99.6	99.4	99.6	99.6	98.9	99.6	99.8	99.6
8	GU978967	99.2	99.1	99.2	99.5	98.9	99	99.6		99.8	100	99.8	100	100	98.9	99.6	99.4	99.6
9	GU978965	99.1	99	99.1	99.4	98.8	98.9	99.4	99.7		99.8	100	99.8	99.8	98.8	99.4	99.3	99.4
10	GU978968	99.2	99.1	99.2	99.5	98.9	99	99.6	100	99.7		99.8	100	100	98.9	99.6	99.4	99.6
11	GU978964	99.1	99	99.1	99.4	98.8	98.9	99.4	99.7	100	99.7		99.8	99.8	98.8	99.4	99.3	99.4
12	HM031135	99.1	99.1	99.1	99.4	98.9	98.9	99.5	99.9	99.7	99.9	99.7		100	98.9	99.6	99.4	99.6
13	HM031134	99.1	99.1	99.1	99.4	98.9	98.9	99.5	99.9	99.7	99.9	99.7	100		98.9	99.6	99.4	99.6
14	MG345027	99.7	99.4	99.7	99.1	99.1	99	99.1	99.1	98.9	99.1	98.9	99.1	99.1		98.6	98.8	98.6
15	MT434667	99.2	99.1	99.2	99.7	99.1	99.1	99.7	99.6	99.5	99.6	99.5	99.6	99.6	99.1		99.8	99.6
16	MT434668	99.2	99.2	99.2	99.8	99.1	99.2	99.7	99.4	99.3	99.4	99.3	99.4	99.4	99.1	99.7		99.4
17	MT434669	99.2	99.1	99.2	99.6	99.1	99.1	99.7	99.6	99.5	99.6	99.5	99.6	99.6	99.1	99.8	99.6	

Bảng 8D. Tỷ lệ tương đồng nucleotide (phía dưới đường chéo) và amino acid dự đoán (phía trên đường chéo) của trình tự gen mã hóa protein cấu trúc (OFR2) PPV4

STT	Chủng	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	GQ387499		99.5	100	99.7	99.4	99.5	99.1	99.3	99.4	99.3	99.4	99.3	99.3	100	99.3	99.3	99.3
2	GQ387500	99.8		99.5	99.8	99.5	99.7	99.3	99.4	99.5	99.4	99.5	99.4	99.4	99.5	99.4	99.4	99.4
3	NC 014665	100	99.8		99.7	99.4	99.5	99.1	99.3	99.4	99.3	99.4	99.3	99.3	100	99.3	99.3	99.3
4	JQ868714	98.9	99	98.9		99.7	99.8	99.4	99.5	99.7	99.5	99.7	99.5	99.5	99.7	99.5	99.5	99.5
5	JQ868716	99.3	99.4	99.3	99.3		99.8	99.7	99.8	100	99.8	100	99.8	99.8	99.4	99.4	99.4	99.8
6	JQ868715	99.4	99.4	99.4	99.3	99.9		99.5	99.7	99.8	99.7	99.8	99.7	99.7	99.5	99.5	99.5	99.7
7	JQ868713	98.9	98.9	98.9	99.6	99.4	99.4		99.5	99.7	99.5	99.7	99.5	99.5	99.1	99.1	99.1	99.5
8	GU978967	99.2	99.3	99.2	99.2	99.8	99.7	99.4		99.8	100	99.8	99.7	99.7	99.3	99.3	99.3	99.7
9	GU978965	99.2	99.3	99.2	99.2	99.8	99.7	99.4	99.8		99.8	100	99.8	99.8	99.4	99.4	99.4	99.8
10	GU978968	99.2	99.3	99.2	99.2	99.8	99.7	99.4	100	99.8		99.8	99.7	99.7	99.3	99.3	99.3	99.7
11	GU978964	99.2	99.3	99.2	99.2	99.8	99.7	99.4	99.8	100	99.8		99.8	99.8	99.4	99.4	99.4	99.8
12	HM031135	99.2	99.3	99.2	99.1	99.7	99.6	99.3	99.8	99.7	99.8	99.7		100	99.3	99.3	99.3	99.7
13	HM031134	99.2	99.3	99.2	99.1	99.7	99.6	99.3	99.8	99.7	99.8	99.7	100		99.3	99.3	99.3	99.7
14	MG345027	100	99.8	100	98.9	99.3	99.4	98.9	99.2	99.2	99.2	99.2	99.2	99.2		99.3	99.3	99.3
15	MT434667	99	99.1	99	99.4	99.4	99.4	99.1	99.3	99.3	99.3	99.3	99.2	99.2	99		100	99.3
16	MT434668	98.9	98.9	98.9	99.5	99.2	99.2	99.2	99.1	99.1	99.1	99.1	99	99	98.9	99.7		99.3
17	MT434669	99.2	99.3	99.2	99.2	99.7	99.6	99.3	99.6	99.6	99.6	99.6	99.5	99.5	99.2	99.3	99.1	

Bảng 8E. Tỷ lệ tương đồng nucleotide (phía dưới đường chéo) và amino acid dự đoán (phía trên đường chéo) của trình tự khung đọc mở ORF3 của PPV4

STT	Chủng	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	GQ387499		100	100	100	100	100	100	99	99.5	99	99.5	100	100	100	100	100	100
2	GQ387500	99.6		100	100	100	100	100	99	99.5	99	99.5	100	100	100	100	100	100
3	NC 014665	100	99.6		100	100	100	100	99	99.5	99	99.5	100	100	100	100	100	100
4	JQ868714	99.8	99.8	99.8		100	100	100	99	99.5	99	99.5	100	100	100	100	100	100
5	JQ868716	99.8	99.8	99.8	100		100	100	99	99.5	99	99.5	100	100	100	100	100	100
6	JQ868715	99.8	99.8	99.8	100	100		100	99	99.5	99	99.5	100	100	100	100	100	100
7	JQ868713	99.8	99.8	99.8	100	100	100		99	99.5	99	99.5	100	100	100	100	100	100
8	GU978967	99.1	99.1	99.1	99.3	99.3	99.3	99.3		98.5	100	98.5	99	99	99	99	99	99
9	GU978965	99.6	99.6	99.6	99.8	99.8	99.8	99.8	99.1		98.5	100	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5
10	GU978968	99.1	99.1	99.1	99.3	99.3	99.3	99.3	100	99.1		98.5	99	99	99	99	99	99
11	GU978964	99.6	99.6	99.6	99.8	99.8	99.8	99.8	99.1	100	99.1		99.5	99.5	99.5	99.5	99.5	99.5
12	HM031135	99.8	99.8	99.8	100	100	100	100	99.3	99.8	99.3	99.8		100	100	100	100	100
13	HM031134	99.8	99.8	99.8	100	100	100	100	99.3	99.8	99.3	99.8	100		100	100	100	100
14	MG345027	100	99.6	100	99.8	99.8	99.8	99.8	99.1	99.6	99.1	99.6	99.8	99.8		100	100	100
15	MT434667	99.6	99.6	99.6	99.8	99.8	99.8	99.8	99.1	99.6	99.1	99.6	99.8	99.8	99.6		100	100
16	MT434668	99.6	99.6	99.6	99.8	99.8	99.8	99.8	99.1	99.6	99.1	99.6	99.8	99.8	99.6	99.6		100
17	MT434669	99.8	99.8	99.8	100	100	100	100	99.3	99.8	99.3	99.8	100	100	99.8	99.8	99.8	