

**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**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Ngành: Sinh học

Mã số: 9420101

Người hướng dẫn khoa học:

- 1. PGS.TS. TRẦN QUỐC DUNG**
- 2. TS. NGUYỄN THỊ DIỆU THÚY**

HUẾ - 2024

Công trình được hoàn thành tại: Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Huế.

Người hướng dẫn khoa học:

- 1. PGS.TS. Trần Quốc Dung**, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế.
- 2. TS. Nguyễn Thị Diệu Thuý**, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam.

Phản biện 1: GS.TS. Hoàng Nghĩa Sơn, Viện Sinh học Nhiệt đới.

Phản biện 2: PGS.TS. Đồng Văn Quyền, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam.

Phản biện 3: PGS.TS. Nguyễn Văn Đức, Hội Chăn nuôi Việt Nam.

Luận án được bảo vệ tại Hội đồng chấm luận án cấp Đại học Huế, Hội trường I.01 - Đại học Huế, số 1, Điện Biên Phủ, thành phố Huế.

Vào lúc 8h ngày 31 tháng 5 năm 2024

Có thể tìm hiểu luận án tại thư viện:

1. Thư viện quốc gia Việt Nam.
2. Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Huế

MỞ ĐẦU

1. TÍNH CẤP THIẾT CỦA DỀ 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. Porcine Parvovirus (PPV) được xem là nguyên nhân gây nên Hội chứng suy giảm khả năng sinh sản ở lợn nái-SMEDI (Stillbirth, Mummification, Embryonic Death and Infertility-chết non, ướp xác, chết phôi và vô sinh).

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 virus 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). Tính đến tháng 9/2022, đã có 8 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 và là 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 3 thập kỷ nay, nhưng 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. Công bố gần đây xác nhận có 4 chủng PPV (1-4) lưu hành trên lợn nuôi tại nước ta. Hiện nay vẫn chưa có công trình khoa học nào nghiên cứu về đặc trưng di truyền, đặc điểm hệ gen PPV

phân lập trên lợn nuôi tại 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) tại một số tỉnh miền Trung Việt Nam”. Kết quả nghiên cứu của đề tài là cơ sở khoa học quan trọng để đánh giá mức độ tiến hóa phân tử của PPV, góp phần kiểm soát Hội chứng suy giảm khả năng sinh sản trên lợn do PPV gây ra.

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 PPV (1-4) 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 suy diễn của gen mã hóa protein cấu trúc của PPV phân lập được ở các tỉnh miền Trung Việt Nam.

3. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu này tập trung giải quyết các nội dung chính sau:

- Thu mẫu, tách chiết DNA tổng số
- Phân lập và sàng lọc các chủng PPV
- Khuếch đại và xác định trình tự nucleotide gen mã hóa protein cấu trúc của PPV
- Phân tích, đánh giá biến đổi trình tự nucleotide và amino acid suy diễn gen mã hóa protein cấu trúc và xây dựng cây phả hệ di truyền các chủng

PPV.

4. PHẠM VI NGHIÊN CỨU

- Địa điểm thu mẫu: 7 tỉnh khu vực miền Trung (Quảng Bình, Quảng Trị, Thừa Thiên Huế, Đà Nẵng, Quảng Nam, Quảng Ngãi, Bình Định).

- Địa điểm nghiên cứu: Phòng Công nghệ gen động vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

- 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 4 chủng PPV (1-4) trên lợn nuôi ở 7 tỉnh miền Trung.

- Giải và phân tích trình tự gen mã hoá protein cấu trúc của 03 chủng PPV2 (Mã số GenBank: OL913365-OL913367) và trình tự hệ gen của 02 chủng PPV4 (Mã số GenBank: MT434668-MT434669) phân lập ở miền Trung.

- Phân tích được mối quan hệ di truyền của các chủng PPV2 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 phân loại di truyền các chủng PPV phân lập được ở miền Trung Việt Nam 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 đối với Hội chứng suy giảm khả năng sinh sản ở lợn, 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 nguyên liệu di truyền làm cơ sở khoa học cho việc lựa chọn chủng virus để sản xuất và phát triển vaccine PPV tại các tỉnh miền Trung Việt Nam đồng thời 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. Tuy nhiên, khí hậu nhiệt đới gió mùa nóng ẩm mưa nhiều ở khu vực miền Trung đã khiến nhiều loại tác nhân gây bệnh trên lợn có điều kiện thuận lợi để tồn tại và gây thiệt hại đáng kể cho ngành chăn nuôi lợn, trong đó có PPV.

1.2. GIỚI THIỆU VỀ PPV VÀ BỆNH DO PPV TRÊN 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)

1.2.2. Đặc điểm sinh học

1.2.2.1. Hình thái

PPV là virus không vỏ, có kích thước nhỏ, hình dạng tròn, đường kính virion khoảng 18-26 nm, cấu trúc đối xứng 20 mặt.

1.2.2.2. Capsid protein

Capsid của PPV là vỏ hình cầu bao gồm 60 bản sao của VP1 hoặc VP2 sắp xếp theo cấu trúc đa diện đối xứng (Chapman và Rossmann, 1993).

1.2.2.3. Hệ gen

Vật liệu di truyền của PPV là ssDNA với kích thước phân tử dao động trong khoảng 5-6 kb. Trình tự phía 2 đầu tận cùng của PPV tạo nên cấu trúc

kép tóc (Bern và Hauswirth, 1983). Hệ gen của PPV bao gồm 2 khung đọc mở chính: ORF1 mã hóa cho các protein không cấu trúc NS1, NS2 (Bergeron và cs, 1993) và ORF2 mã hóa cho các protein vỏ capsid. ORF3 (chỉ có ở PPV4) là một khung đọc mở nhỏ, nằm ở giữa ORF1 và ORF2, mã hóa cho protein không cấu trúc NS3.

1.2.3. 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 gổ.

1.2.4. Dịch tễ học

Sự lưu hành của PPV trên toàn thế giới đã được xác nhận (Cadare và cs, 2012; Truyen và Streck, 2012). PPV bền với các yếu tố môi trường và đề kháng tốt với nhiều chất sát trùng thông thường (Brown, 1981). PPV lây nhiễm ở lợn qua ba con đường chính: Thức ăn, nước uống và phôi giống.

1.2.5. Tương tác giữa virus và tế bào

PPV xâm nhập vào tế bào bằng cả ba con đường: (i) Nhập bào, (ii) Đại ẩm bào (Macropinocytosis) và (iii) Con đường xâm nhập thứ ba (giả định). DNA 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.

1.2.6. Cơ chế gây bệnh

Nhiễm PPV gây ra hiệu ứng tế bào (Cytopathogenic effect-CPE) hoặc kích hoạt apoptosis qua trung gian ty thể (Zhang và cs, 2019). Kết quả thực tế của nhiễm PPV phần lớn phụ thuộc vào chủng virus và loại tế bào (Zhang và cs, 2015).

1.2.7. Chẩn đoán PPV

PPV có thể được phát hiện bằng các phương pháp huyết học bao gồm xét nghiệm SN, MDCF, HI, HA (Mengeling, 1972; Morimoto và cs, 1972;

Joo và cs, 1976) hoặc xét nghiệm miễn dịch huỳnh quang và xét nghiệm ELISA. Hiện tại, PCR và Real-time PCR là kỹ thuật hữu ích nhất để phát hiện PPV trong nhiều loại mẫu (Milek và cs, 2019).

1.2.8. Phòng ngừa PPV

Vaccine bất hoạt và vaccine nhược độc là những vaccine truyền thống, đã phát triển thành mũi tiêm thường quy, tạo phản ứng miễn dịch kéo dài giúp bảo vệ đàn lợn. Hiện nay, vaccine VLP (VLP-virus-like particle) và vaccine tái tổ hợp dựa trên trình tự gen VP2 của PPV hiện đang được nghiên cứu phát triển để dần thay thế cho các vaccine truyền thống.

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 đã được phát hiện trên đàn lợn ở hầu hết các quốc gia mà không phụ thuộc vào giới tính, độ tuổi và tình trạng sức khoẻ của lợn. Tỷ lệ lưu hành của PPV có thể phụ thuộc vào loại mẫu thu thập ở từng nghiên cứu Streck và cs (2013).

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

Protein cấu trúc của PPV đóng vai trò quan trọng trong việc gây ra các tính chất bệnh khác nhau. So sánh trình tự hệ gen giữa chủng ôn hoà NADL-2 được sử dụng làm vaccine và chủng độc lực Kresse cho thấy chúng chỉ khác nhau ở 8 vị trí nucleotide và 6/8 vị trí này dẫn đến thay đổi các amino acid được dịch mã. 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. Việc xác định đặc điểm phân tử, đa hình nucleotide, phân tích phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen mã hoá protein cấu trúc là cần thiết cho những chiến lược mới nhằm kiểm soát dịch bệnh do PPV gây ra.

1.3.1.3. Tiến hoá của PPV

Những thập niên 80-90 của thế kỷ trước, người ta cho rằng PPV có mức độ biến đổi di truyền thấp tương đương với vật chủ. Tuy nhiên, các nghiên cứu gần đây cho thấy tỷ lệ biến đổi nucleotide của PPV là tương đương với tỷ lệ biến đổi nucleotide của các virus RNA. Đồng thời, sự phát hiện 8 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.

1.3.1.4. Phát hiện các chủng PPV khác

So sánh trình tự gen mã hóa protein cấu trúc của PPV cho thấy sự biến đổi di truyền ở phân tử VP dẫn đến sự hình thành các phân nhóm PPV khác nhau. Tám chủng PPV đã được xác nhận (1965-2022) 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).

1.3.2. Tình hình nghiên cứu PPV ở Việt Nam

Ở Việt Nam, Hội chứng SMEDI đã được quan tâm từ những năm 1990, không có thuốc đặc trị và tiêm phòng vaccine có thể bị bỏ qua nên trong thực tế, bệnh vẫn xảy ra liên tục và phổ biến ở hầu hết các địa phương trong cả nước. Hiện vẫn chưa có số liệu thống kê cụ thể về tác hại của SMEDI ở Việt Nam nói chung và các tỉnh miền Trung nói riêng. Phương pháp xét nghiệm huyết thanh học đã được sử dụng để xác nhận sự lưu hành của PPV trên đàn lợn (Phạm Hùng, 1999; Hồ Đình Chúc, 1995). Các nghiên cứu gần đây đã sử dụng phương pháp PCR để phát hiện sự lưu hành của các PPV trên đàn lợn ở một số tỉnh trong nước, chủ yếu tập trung ở miền Bắc và miền Nam (Giáp và cs, 2020; Thuy và cs, 2021). Cho đến thời điểm hiện tại, chưa có công trình khoa học nào công bố về tỷ lệ nhiễm và đặc điểm phân tử gen mã hoá protein cấu trúc của các 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

Các chủng PPV (1-4) lưu hành trên lợn ở độ tuổi giết mổ tại bảy tỉnh miền Trung.

2.2. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

Tổng số 146 mẫu (117 mẫu phổi và 29 mẫu máu) được thu thập từ lợn thương phẩm nuôi trên địa bàn bảy tỉnh miền Trung tại các lò mổ. Mỗi tỉnh thu trung bình 5 lò mổ, mỗi lò mổ thu không quá 5 mẫu; các trang thiết bị, dụng cụ, hoá chất, môi phát hiện các chủng PPV, môi khuếch đại hệ gen/gen mã hoá các chủng PPV và các trình tự tham chiếu.

2.3. CÁC PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.3.1. Phương pháp thu thập mẫu

Mẫu máu và mẫu phổi được thu nhận từ lợn nuôi tại địa phương từ các lò mổ (4 lò mổ/tỉnh, không quá 5 mẫu/lò mổ). Sau khi thu, mẫu được giữ ở 4°C và chuyển về phòng thí nghiệm bảo quản ở -20°C trước khi tách chiết DNA tổng số.

2.2.2. Phương pháp tách chiết DNA tổng số

Tách chiết DNA theo phương pháp thường quy ở phòng thí nghiệm, sử dụng Proteinase K; Phenol/Chloroform.

2.2.3. Phương pháp PCR

Phương pháp PCR sử dụng DNA tổng số làm khuôn, tiến hành tối ưu điều kiện PCR để khuếch đại đặc hiệu các đoạn gen bằng cặp môi tương ứng cho từng đoạn gen.

2.2.4. Phương pháp điện di

Chuẩn bị gel agarose, tra mẫu điện di, nhuộm bản gel bằng Ethidium Bromie, sau đó quan sát và chụp ảnh điện di.

2.2.5. Phương pháp giải trình tự gen

Trình tự DNA được xác định bằng máy phân tích trình tự tự động ABI-3100 Avabp Genetic Analyzer của công ty Macrogen, Hàn Quốc theo nguyên lý của Sanger.

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

Trình tự gen các chủng PPV phân lập được: Xử lý bằng phần mềm BioEdit v.7.0.9.0 (Hall, 1999); so sánh, đối chiếu bằng phần mềm GenDoc 2.6 và công cụ BLAST. 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). 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).

2.2.7. Phương pháp xây dựng cây phát sinh chủng loại

Cây phát sinh chủng loại được xây dựng bằng phần mềm MEGA X (Kumar và cs, 2018) với phương pháp dự đoán Maximum Likelihood; mô hình Tajima-Nei và phép thử bootstrap lặp lại 1000 lần.

2.2.8. Phương pháp xử lý số liệu

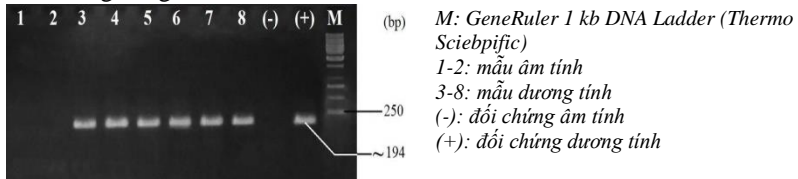
Tỷ lệ phát hiện các chủng PPV nghiên cứu, tỷ lệ thành phần các loại nucleotide được xử lý thống kê bằng phần mềm Excel v2010.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

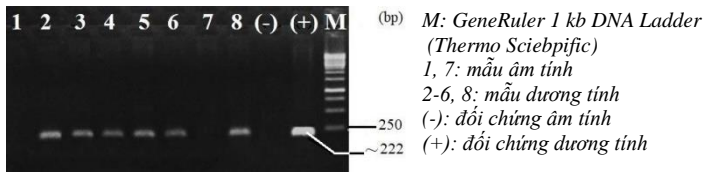
3.1. PHÁT HIỆN PPV (1-4) LƯU HÀNH TRÊN LỢN Ở BẢY TỈNH MIỀN TRUNG

3.1.1. Phát hiện PPV (1-4) lưu hành trên lợn ở bảy tỉnh miền Trung

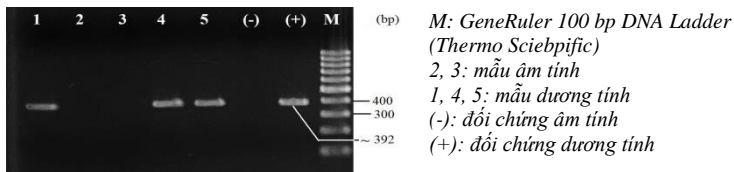
Sản phẩm PCR phát hiện PPV (1-4) được trình bày ở các Hình: 3.1; 3.2; 3.3 và 3.4. Kết quả giải trình tự các đoạn gen phát hiện PPV (1-4) được so sánh bằng công cụ BLAST.



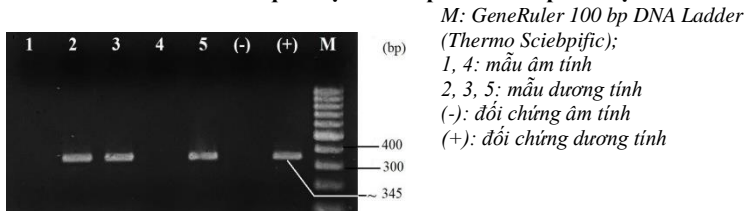
Hình 3.1. Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện PPV1



Hình 3.2. Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện PPV2



Hình 3.3. Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện PPV3



Hình 3.4. Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện PPV4 (345 bp)

3.1.2. Kết quả tỷ lệ phát hiện PPV (1-4)

Kết quả tỷ lệ phát hiện của PPV (1-4) trên lợn nuôi ở bảy tỉnh miền

Trung được trình bày trong Bảng 3.1.

Bảng 3.1. Tỷ lệ phát hiện PPV (1-4) trên lợn ở bảy tỉnh miền Trung

Địa phương	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 (100,0)
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)

Dữ liệu từ Bảng 3.1 cho thấy PPV hiện diện ở lợn nuôi trên địa bàn bảy tỉnh trong nghiên cứu (7/7). PPV đã được phát hiện trong tổng số 109/146 mẫu nghiên cứu, chiếm tỷ lệ 74,7%; cụ thể, tỷ lệ mẫu bị nhiễm PPV (1-4) lần lượt là: 52,7%; 56,2%; 5,5% và 8,2%

3.1.3. Kết quả tỷ lệ đồng nhiễm các chủng PPV (1-4)

Kết quả đồng nhiễm các chủng PPV (1-4) trên lợn ở các tỉnh miền Trung cho thấy đồng nhiễm PPV1/PPV2 chiếm tỷ lệ cao nhất (34,2%) và duy nhất một mẫu đồng nhiễm với 4 chủng PPV (1-4), chiếm tỷ lệ 0,7%. Xét theo địa phương, Thừa Thiên Huế là tỉnh phát hiện tất cả các kiểu đồng nhiễm 2/3/4 chủng PPV.

3.2. TRÌNH TỰ GEN MÃ HOÁ PROTEIN CẤU TRÚC CÁC CHỦNG PPV2 VÀ PPV4 LƯU HÀNH TRÊN LỢN Ở CÁC TỈNH MIỀN TRUNG

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

Trình tự gen VP của ba chủng PPV2 phân lập được trong nghiên cứu này có kích thước phân tử 2.493 bp, được gửi vào cơ sở dữ liệu GenBank với mã số truy cập lần lượt là OL913365-OL913367. Thành phần nucleotide trong trình tự gen VP của các chủng PPV2 phân lập các tỉnh

miền Trung được trình bày trong Bảng 3.2.

Bảng 3.2. Tỷ lệ thành phần nucleotide và giá trị độ lệch (skew/skewness) trong trình tự gen VP của các chủng PPV2 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
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

3.2.2. Trình tự hệ gen các chủng PPV4

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

Kích thước phân tử hệ gen của hai chủng PPV4 phân lập trong nghiên cứu này là 5.367 bp, bao gồm 3 khung đọc mở ORF1, ORF2 và ORF3 và được gửi vào cơ sở dữ liệu GenBank với mã số truy cập là MT434668 và MT434669. Tỷ lệ thành phần nucleotide trình tự hệ gen của các chủng PPV4 phân lập các tỉnh miền Trung được trình bày trong Bảng 3.3.

Bảng 3.3. 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

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

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. Bảng 3.4 thống kê 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.

Bảng 3.4. 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	0,162
	QT20	VP		34,3	24,8	20,2	20,7	59,1	-0,001	40,9	-0,001

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

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 chèn/xoá 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 3.5.

Bảng 3.5. 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

3.2.1. Trình tự vùng gen NSI/VP1 của các chủng PPV3

Trình tự vùng gen NSI/VP1 của hai chủng PPV3 phân lập trong nghiên cứu này có kích thước 995 bp (Bao gồm: đoạn gen NSI có kích thước 229 bp và đoạn gen VP1 có kích thước 766 bp, mã hoá cho protein cấu trúc VP1). Không phát hiện các đột biến thêm/mất nucleotide trong vùng gen mã hóa.

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 hoá 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

Các vị trí đột biến thay thế nucleotide và amino acid suy diễn 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 3.6.

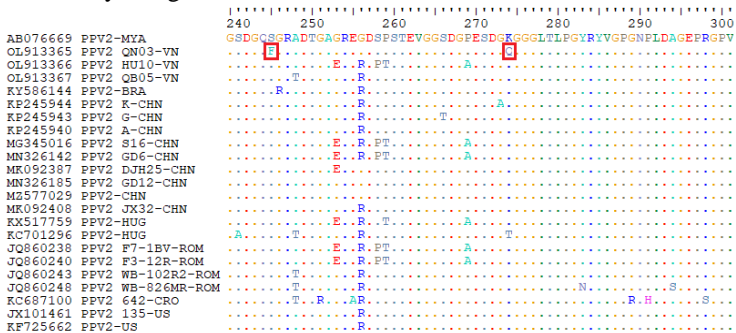
Bảng 3.6. Vị trí thay thế nucleotide và amino acid suy diễn từ trình tự gen VP của ba chủng PPV2 phân lập tại miền Trung so với các chủng tham chiếu

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

Dữ liệu từ Bảng 3.6 đã 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 (OL913365) khác biệt hoàn toàn so với các chủng tham chiếu có trên cơ sở dữ liệu GenBank ở thời điểm nghiên cứu.

3.3.1.2. Đặc điểm trình tự amino acid suy diễn từ gen VP của PPV2

Kết quả so sánh trình tự amino acid suy diễn của hai chủng PPV2 phân lập trong nghiên cứu này với các chủng PPV2 tham chiếu trên GenBank được trình bày trong Hình 3.5.



Hình 3.5. Kết quả so sánh trình tự amino acid suy diễn từ gen VP của các chủng PPV2 phân lập tại miền Trung Việt Nam so với các chủng tham chiếu

Như được thể hiện trong Hình 3.5, so sánh trình tự amino acid suy diễn đã phát hiện hai vị trí thay thế (245: S→F, 274: K→Q) trong trình tự amino acid suy diễn của chủng PPV2-QN03.

Kết quả so sánh đột biến thay thế amino acid ở các vị trí quan trọng trong trình tự amino acid suy diễn 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 trong Bảng 3.7.

Bảng 3.7. Các vị trí thay thế quan trọng trong trình tự amino acid suy diễn 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	2019	F	Q	P	D	S	S	D	E	T	M	Q
	QN03												
	OL913366												
	HU10												
	OL913367		S	K	A	K	N	S	D	D	T	I	E
	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
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).

Kết quả phát hiện đột biến tại vị trí các motif đặc trưng trong trình tự gen VP của PPV2 theo nghiên cứu của Cadar trên các chủng PPV2 phân lập ở miền Trung Việt Nam được trình bày trong Bảng 3.8.

Bảng 3.8. Kết quả phát hiện đột biến tại vị trí của các motif đặc trưng trong trình tự gen VP của PPV2 (Cadare và cs, 2013)

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 hoá (PAS) (AATAAA)	66	66 (AAGAAA)	PPV2-HU10
	454	454 (ACTAAA)	PPV2-QB05
Vị trí liên kết SP1 (GGGCGG)	36, 165, 329	329 (GGGCAG)	PPV2-QN03

3.3.1.3. *Mức độ tương đồng nucleotide/amino acid suy diễn từ gen VP của PPV2*

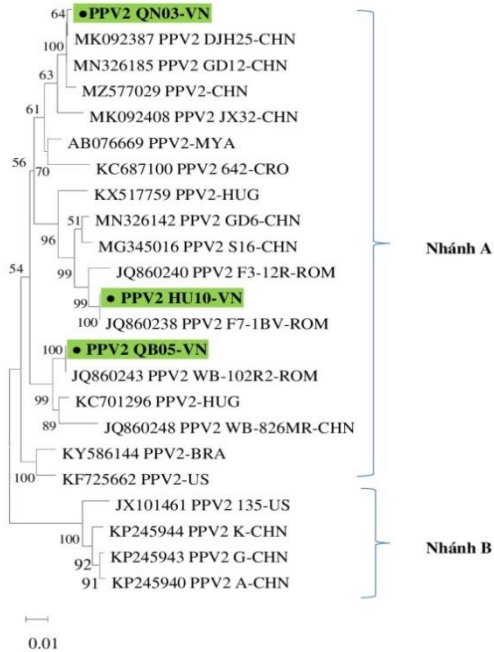
Mức độ tương đồng trong trình tự nucleotide/amino acid suy diễn từ trình tự gen VP của các chủng PPV2 phân lập tại miền Trung Việt Nam (2.493 bp và 831 aa) so với các chủng phân lập trong khu vực và trên thế giới được trình bày trong Bảng 3.9.

Bảng 3.9. Tỷ lệ tương đồng nucleotide và amino acid suy diễn (%) từ trình tự gen VP của các chủng PPV2 phân lập tại miền Trung Việt Nam và so sánh với các chủng tham chiếu

Chủng		Kích thước	Nucleotide (2.493 bp)	Amino acid (831 aa)
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

3.3.1.4. *Mối quan hệ di truyền PPV2 dựa trên trình tự gen VP*

Cây phát sinh chủng loại của các chủng PPV2 phân lập trong nghiên cứu này và các chủng tham chiếu được xây dựng dựa trên trình tự gen VP của PPV2 với kích thước phân tử 2.493 bp (Hình 3.6).



Hình 3.6. 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.

3.3.2. Đặc điểm phân tử gen mã hoá protein cấu trúc các chủng PPV4 phân lập ở các tỉnh miền Trung

3.3.2.1. Đặc điểm phân tử hệ gen PPV4

Vị trí đột biến thay thế nucleotide dẫn đến thay thế trong trình tự amino acid suy diễn từ trình tự ORF1 của các chủng PPV4 phân lập tại miền Trung được thể hiện trong Hình 3.7.

```

      |120|130|40|50|
GQ387499 PPV4 17      TGGCCTGATATATTT WFDIFGNENNSE
GQ387500 PPV4 14      .....
NC014665 PPV4       .....
JQ868714 PPV4 WB-209CV .....A.....N.....
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-QN117 .....A.....N.....
MT434668 PPV4-QT02 .....A.....N.....
MT434669 PPV4-QT20 .....

```

Hình 3.7. Vị trí đột biến thay thế nucleotide và amino acid trong khung đọc mở ORF1 của trình tự hệ gen PPV4.

3.3.2.2. Đặc điểm phân tử gen VP của PPV4

Đặc điểm trình tự nucleotide gen VP của PPV4

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 trong Hình 3.8.

```

      |110|120|710|800|810|890|900|910|
GQ387499 PPV4 17      CTACTTCGAAACT CATTAA GCTTTCGAAGATG ACTGCGCA ACTCATACAGAAC
GQ387500 PPV4 14      .....T.....
NC014665 PPV4       .....
JQ868714 PPV4 WB-209CV .....T.....A.....
JQ868716 PPV4 WB-549BH .....T.....A.....
JQ868715 PPV4 WB-542BH .....T.....A.....
JQ868713 PPV4 WB-195HR .....T.....A.....
GU978967 PPV4 JS0910-5644 .....T.....A.....
GU978965 PPV4 HEN0922-5645 .....T.....A.....
GU978968 PPV4 JS0910-5400 .....T.....A.....
GU978964 PPV4 HEN0922-5400 .....T.....A.....
HM031135 PPV4 S0918b .....T.....A.....
HM031134 PPV4 JS0918a .....T.....A.....
MG345027 PPV4-SERUM-SMU .....T.....A.....
MT434667 PPV4-QN117 .....T.....A.....
MT434668 PPV4-QT02 .....T.....A.....
MT434669 PPV4-QT20 .....T.....A.....

      |1330|1360|1370|1380|1400|1560|1590|
GQ387499 PPV4 17      AAGATGGT TAGAGAAAAAACGATTCAGATA TGGATCAT TAAAA ACCATGG
GQ387500 PPV4 14      .....
NC014665 PPV4       .....
JQ868714 PPV4 WB-209CV .....C.....A.....
JQ868716 PPV4 WB-549BH .....C.....A.....
JQ868715 PPV4 WB-542BH .....C.....A.....
JQ868713 PPV4 WB-195HR .....C.....A.....
GU978967 PPV4 JS0910-5644 .....C.....A.....
GU978965 PPV4 HEN0922-5645 .....C.....A.....
GU978968 PPV4 JS0910-5400 .....C.....A.....
GU978964 PPV4 HEN0922-5400 .....C.....A.....
HM031135 PPV4 S0918b .....C.....A.....
HM031134 PPV4 JS0918a .....C.....A.....
MG345027 PPV4-SERUM-SMU .....C.....A.....
MT434667 PPV4-QN117 .....C.....A.....G.....G.....
MT434668 PPV4-QT02 .....C.....A.....G.....G.....
MT434669 PPV4-QT20 .....C.....A.....G.....G.....

      |1700|1730|1890|1930|1960|1970|2040|2070|
GQ387499 PPV4 17      TGGGAT GATCAAA CACCGA ACCCAG TCCAGCA ACATATTTGA AGSAAA TCCCCGG
GQ387500 PPV4 14      .....
NC014665 PPV4       .....
JQ868714 PPV4 WB-209CV .....A.....G.....T.....A.....
JQ868716 PPV4 WB-549BH .....A.....G.....A.....A.....
JQ868715 PPV4 WB-542BH .....A.....G.....A.....A.....
JQ868713 PPV4 WB-195HR .....A.....G.....A.....T.....A.....
GU978967 PPV4 JS0910-5644 .....A.....G.....G.....A.....
GU978965 PPV4 HEN0922-5645 .....A.....G.....G.....A.....
GU978968 PPV4 JS0910-5400 .....A.....G.....G.....A.....
GU978964 PPV4 HEN0922-5400 .....A.....G.....G.....A.....
HM031135 PPV4 S0918b .....A.....G.....G.....A.....
HM031134 PPV4 JS0918a .....A.....G.....G.....A.....
MG345027 PPV4-SERUM-SMU .....A.....G.....G.....A.....
MT434667 PPV4-QN117 .....A.....G.....A.....G.....T.....A.....
MT434668 PPV4-QT02 .....A.....G.....A.....G.....T.....A.....
MT434669 PPV4-QT20 .....A.....G.....G.....G.....A.....

```

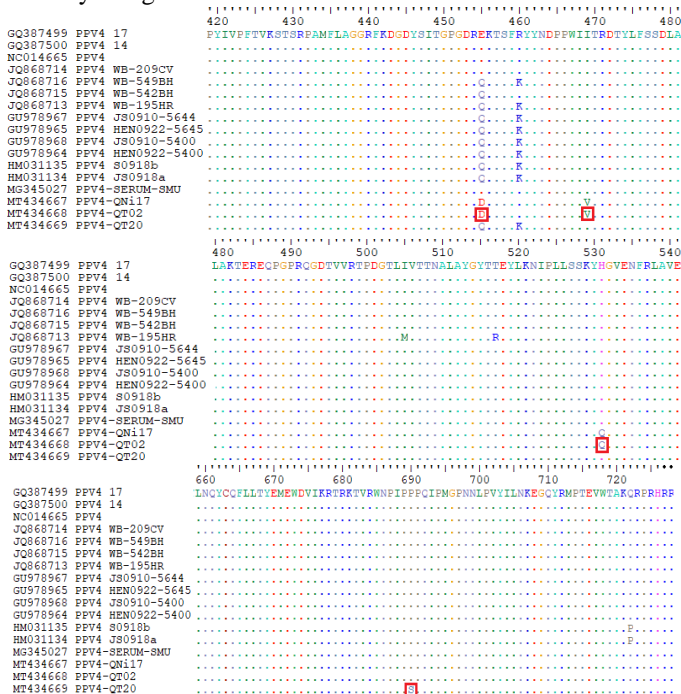
Hình 3.8. Kết quả so sánh trình tự nucleotide gen VP của các chủng PPV4 phân

lập tại miền Trung so với các chủng tham chiếu.

Bảng 3.10. Vị trí thay thế nucleotide và amino acid suy diễn từ trình tự gen VP của hai chủng PPV4 phân lập Quảng Trị so với các chủng tham chiếu.

Chủng	Vị trí thay thế bp	Vị trí thay thế aa
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

Kết quả so sánh trình tự amino acid suy diễn của hai chủng PPV4 phân lập trong nghiên cứu này với các chủng PPV4 tham chiếu trên GenBank được trình bày trong Hình 3.9.



Hình 3.9. Kết quả so sánh trình tự amino acid suy diễn từ gen VP của các chủng PPV4 phân lập tại miền Trung Việt Nam so với các chủng tham chiếu.

Kết quả so sánh thay thế amino acid tại các vị trí tiềm năng trong trình

tự amino acid suy diễn 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 3.11.

Bảng 3.11. Các vị trí thay thế quan trọng trong trình tự amino acid suy diễn 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						
			53 1	69 0	17 8	41 6	45 5	46 0	46 9	56 7	58 3	72 2
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
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).

3.3.2.3. Đặc điểm phân tử ORF3 của PPV4

Kết quả so sánh trình tự nucleotide và amino acid suy diễn từ khung đọc mở ORF3 của các chủng PPV4 phân lập tại Quảng Trị với các chủng tham chiếu cho thấy chỉ phát hiện một vị trí đột biến thay thế duy nhất trong trình tự nucleotide ở chủng PPV4-QT02 (240: A→G).

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

Kết quả so sánh mức độ tương đồng trình tự nucleotide và amino acid

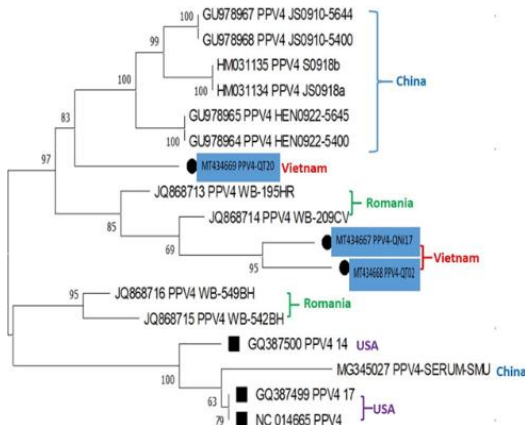
suy diễn của ORF1, ORF2, ORF3 và trình tự hệ gen giữa các chủng PPV4 phân lập tại miền Trung Việt Nam so với các chủng phân lập trong khu vực và trên thế giới được trình bày trong Bảng 3.12.

Bảng 3.12. 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

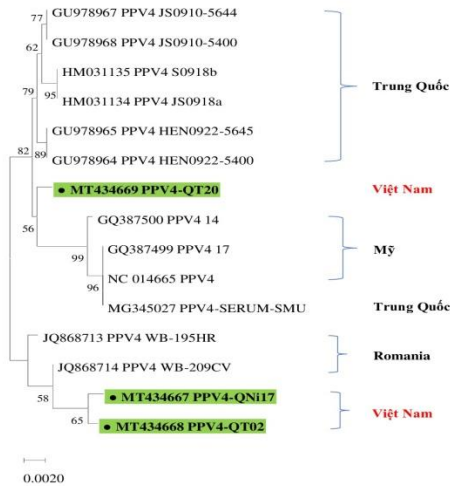
Trình tự	Kích thước phân tử	Nguồn gốc các chủng PPV4				
		Miền Trung Việt Nam	Miền Bắc Việt Nam	Trung Quốc	Mỹ	Romania
ORF1	1797 bp	99,6	99,7-99,8	99,1-99,6	99,1-99,2	99,1-99,8
	598 aa	99,4	99,6-99,8	98,6-99,6	98,4-98,9	99,1-100
ORF2	2.187 bp	99,1	99,3-99,7	98,9-99,6	98,9-99,3	99,2-99,7
	728 aa	99,3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

3.3.2.5. Môi quan hệ di truyền các chủng PPV4

Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên các trình tự hệ gen (5.367 bp) và gen mã hoá protein cấu trúc (2.187 bp) được trình bày trong Hình 3.10 và Hình 3.11.



Hình 3.10. Cây phát sinh chủng loại PPV4 được xây dựng dựa trên trình tự hệ gen gần như hoàn chỉnh của PPV4 (5.367 bp) thu được từ Việt Nam và các trình tự tham chiếu.



Hình 3.11. Cây phát sinh chủng loại PPV4 được xây dựng dựa trên trình tự gen mã hoá protein capsid hoàn chỉnh của các chủng PPV4 (2.187 bp) phân lập ở miền Trung Việt Nam và trình tự tham chiếu.

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

Trình tự vùng gen *NSI/VPI* (995 bp) của hai chủng PPV3-QN16 và PPV3-QT4 có bảy vị trí nucleotide khác biệt hoàn toàn so với các chủng tham chiếu (39: A→T; 131: G→C; 137: T→G và 542: T→C; 930: T→G; 932: G→A và 949: G→A), dẫn đến thay thế amino acid suy diễn ở hai vị trí 234 (L→W) và 235 (D→N). 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.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Đã phát hiện sự lưu hành của PPV (1-4) 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 7 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 4/7 tỉnh nghiên cứu (Quảng Trị, Thừa Thiên Huế, Quảng Ngãi và Bình Định); trong đó đồng nhiễm 2 chủng PPV1/PPV2 ở lợn nuôi tại Thừa Thiên Huế chiếm tỷ lệ cao nhất với 67,9 %.

2. Đã giải trình tự gen mã hoá protein cấu trúc của 3 chủng PPV2 phân lập từ lợn nuôi ở các tỉnh Quảng Ngãi, Thừa Thiên Huế và Quảng Bình với kích thước 2.493 bp (mã số GenBank: OL913365-OL913367); trình tự toàn bộ hệ gen của 2 chủng PPV4 phân lập tại Quảng Trị có kích thước 5.367 bp (mã số GenBank: MT434668 và MT434669), bao gồm 3 khung đọc mở: ORF1, ORF2 và ORF3 với kích thước tương ứng lần lượt là 1.797 bp, 2.187 bp và 615 bp).

3. Kết quả phân tích trình tự gen mã hoá 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 suy diễn 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 hoá 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 suy diễn 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 suy diễn chủ yếu tập trung trong trình tự gen mã hoá protein cấu trúc (ORF2) của các chủng PPV4 phân lập.

4. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên trình tự gen mã hoá protein cấu trúc của PPV2 (2.493 bp) và hệ gen của PPV4 (5.387 bp). Ba chủng PPV2 phân lập tại 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. Các chủng PPV4 phân lập tại Quảng Trị có quan hệ gần gũi với các chủng PPV4 Romania và Trung Quốc.

KIẾN NGHỊ

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 tình trạng 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 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.

**NHỮNG CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ CÔNG BỐ
CÓ 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.

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 cebpral 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.