

**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

Chuyên ngành: Sinh học

Mã số: 9420101

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS.TS. TRẦN QUỐC DUNG

2. TS. NGUYỄN THỊ DIỆU THUY

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

Khoa Sinh học

Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế

2. TS. Nguyễn Thị Diệu Thuý

Viện Công nghệ sinh học,

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ tại Hội đồng chấm luận án cấp Đại học Huế, họp tại cơ quan Đại học Huế, vào hồi.....giờ..... ngày..... tháng..... năm.....

Có thể tìm hiểu luận án tại thư viện:

1. Thư viện quốc gia Việt Nam.
2. Trung tâm học liệu Đại học Huế.
3. Thư viện 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 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. 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 các dẫn liệu khoa học cập nhật, phục vụ nghiên cứu và giảng dạy ở các trường Đại học, đào tạo chuyên ngành Sinh học, Công nghệ sinh học, Chăn nuôi và Thú y.

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 kẹp 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 hóa gỗ.

1.2.4. Dịch tễ học

Sự lưu hành của PPV trên toàn thế giới đã được xác nhận (Cadarr 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 khỏe 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 mồi 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

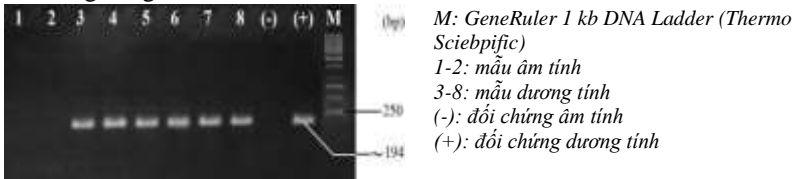
Tỷ lệ lưu hành các chủng nghiên cứu, tỷ lệ thành phần các loại nucleotide được xử lý thống kê bằng phần mềm Excel v2010.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

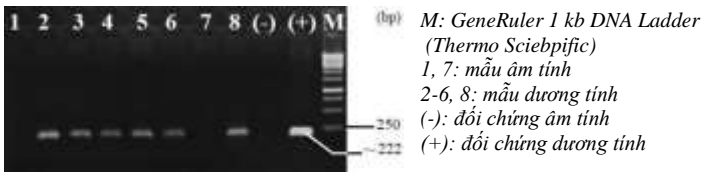
3.1. PHÁT HIỆN PPV (1-4) LƯU HÀNH TRÊN LỢN Ở BẢY TỈNH MIỀN TRUNG

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

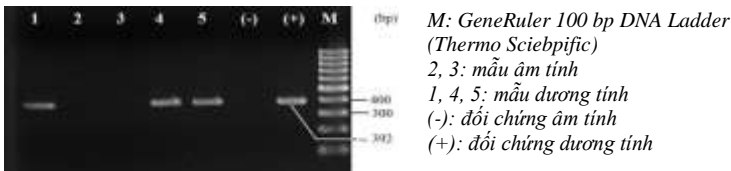
Sản phẩm PCR phát hiện PPV (1-4) được trình bày ở các Hình: 3.1; 3.2; 3.3 và 3.4. Kết quả giải trình tự các đoạn gen phát hiện PPV (1-4) được so sánh bằng công cụ BLAST.



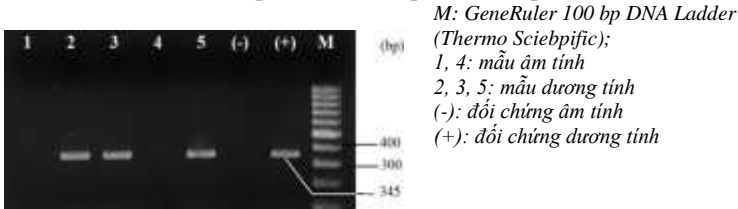
Hình 3.1. Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện PPV1



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 nhiễm PPV (1-4)

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

được trình bày trong Bảng 3.1.

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

Địa phương	n	Tỷ lệ nhiễm các chủng PPV (1-4) (%)				Tỷ lệ nhiễm 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 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

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

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	Trình	Kích	A	T	G	C	A+T	AT-	G+C	GC-
-------	-----	-------	------	---	---	---	---	-----	-----	-----	-----

	chủng	tự	thước (bp)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	skew	(%)	skew
PPV4	QT02	Gen VP	2187	34,3	24,7	20,3	20,7	59,0	0,163	41,0	0,162
	QT20			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		S	K	P	D	N	S	D	D	T	M	Q
	MK092408	2018	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
	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 (Cadaru 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

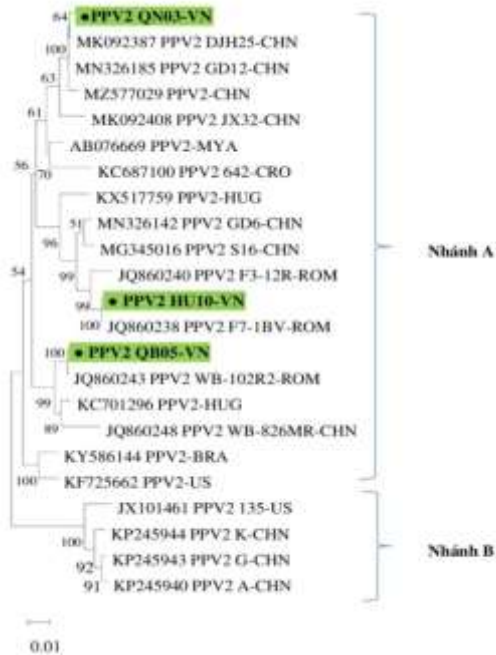
Mức độ tương đồng trong trình tự nucleotide/amino acid suy diễn từ trình tự gen VP của các chủng PPV2 phân lập tại miền Trung Việt Nam (2.493 bp và 831 aa) so với các chủng phân lập trong khu vực và trên thế giới được trình bày trong Bảng 3.9.

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.

```

110 120 130 140 150
GG327499 PPV4 17 TGGCCCTGATATATTT WPIIFRHHKWE
GG327500 PPV4 14 .....
NC014665 PPV4 .....
JQ668714 PPV4 WB-209CV .....A.....
JQ668716 PPV4 WB-549BH .....A.....
JQ668715 PPV4 WB-542BH .....A.....
JQ668713 PPV4 WB-195BH .....A.....
GU578967 PPV4 J30910-5644 .....
GU578965 PPV4 HEN0322-5645 .....
GU578968 PPV4 J30910-5400 .....
GU578964 PPV4 HEN0322-5400 .....
HM031135 PPV4 S0518b .....
HM031134 PPV4 J30918a .....
MG348527 PPV4-BEROM-SMU .....
MT434667 PPV4-QN17 .....
MT434668 PPV4-OT20 .....A.....
MT434669 PPV4-OT20 .....A.....

```

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.

```

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
GG327499 PPV4 17 CTACTTCAACTT GATTTA GCTTCCAGAGG ACCGCA ATTCATACGAC
GG327500 PPV4 14 .....
NC014665 PPV4 .....
JQ668714 PPV4 WB-209CV .....T.....
JQ668716 PPV4 WB-549BH .....T.....
JQ668715 PPV4 WB-542BH .....T.....
JQ668713 PPV4 WB-195BH .....T.....
GU578967 PPV4 J30910-5644 .....T.....
GU578965 PPV4 HEN0322-5645 .....T.....
GU578968 PPV4 J30910-5400 .....T.....
GU578964 PPV4 HEN0322-5400 .....T.....
HM031135 PPV4 S0518b .....T.....
HM031134 PPV4 J30918a .....T.....
MG348527 PPV4-BEROM-SMU .....T.....
MT434667 PPV4-QN17 .....T.....
MT434668 PPV4-OT20 .....T.....
MT434669 PPV4-OT20 .....T.....

1350 1360 1370 1380 1400 1420 1440 1460 1480
GG327499 PPV4 17 AATTCGTT TGGGAAAACAGTTCAGATG TGGATGAT TAAAG ACATGAG
GG327500 PPV4 14 .....
NC014665 PPV4 .....
JQ668714 PPV4 WB-209CV .....C.....
JQ668716 PPV4 WB-549BH .....C.....
JQ668715 PPV4 WB-542BH .....C.....
JQ668713 PPV4 WB-195BH .....C.....
GU578967 PPV4 J30910-5644 .....C.....
GU578965 PPV4 HEN0322-5645 .....C.....
GU578968 PPV4 J30910-5400 .....C.....
GU578964 PPV4 HEN0322-5400 .....C.....
HM031135 PPV4 S0518b .....C.....
HM031134 PPV4 J30918a .....C.....
MG348527 PPV4-BEROM-SMU .....C.....
MT434667 PPV4-QN17 .....C.....
MT434668 PPV4-OT20 .....C.....
MT434669 PPV4-OT20 .....C.....

1700 1720 1740 1760 1780 1800 1820 1840
GG327499 PPV4 17 TGGTATGATTAAG CAGAG ACCAAT TCTAGCCG AGTATTTTAA TCCCGG
GG327500 PPV4 14 .....
NC014665 PPV4 .....
JQ668714 PPV4 WB-209CV .....G.....
JQ668716 PPV4 WB-549BH .....G.....
JQ668715 PPV4 WB-542BH .....G.....
JQ668713 PPV4 WB-195BH .....G.....
GU578967 PPV4 J30910-5644 .....G.....
GU578965 PPV4 HEN0322-5645 .....G.....
GU578968 PPV4 J30910-5400 .....G.....
GU578964 PPV4 HEN0322-5400 .....G.....
HM031135 PPV4 S0518b .....G.....
HM031134 PPV4 J30918a .....G.....
MG348527 PPV4-BEROM-SMU .....G.....
MT434667 PPV4-QN17 .....G.....
MT434668 PPV4-OT20 .....G.....
MT434669 PPV4-OT20 .....G.....

```

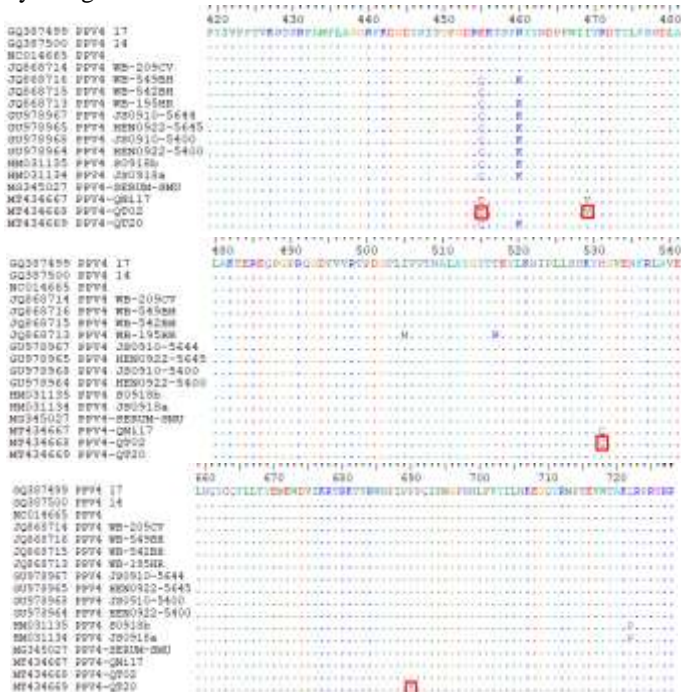
Hình 3.8. Kết quả so sánh trình tự nucleotide gen VP của các chủng PPV4 phân

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
Roma nia	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

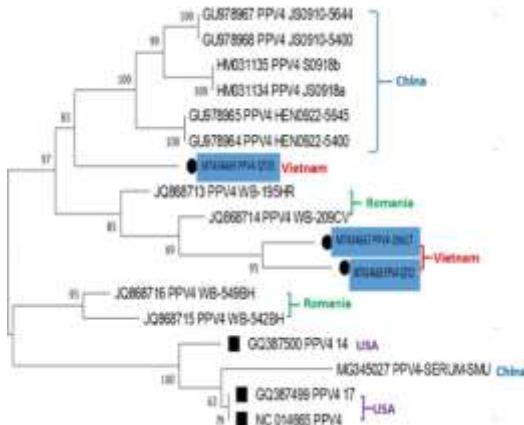
diễn của ORF1, ORF2, ORF3 và trình tự hệ gen giữa các chủng PPV4 phân lập tại miền Trung Việt Nam so với các chủng phân lập trong khu vực và trên thế giới được trình bày trong Bảng 3.12.

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.



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 nhiễm các 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.

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.

6.

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 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.

**HUE UNIVERSITY
INSTITUTE OF BIOTECHNOLOGY**

NGUYỄN TRẦN TRUNG

**CHARACTERISTICS OF STRUCTURAL PROTEIN
ENCODING GENES OF PORCINE PARVOVIRUS (PPV)
IN CENTRAL PROVINCES OF VIETNAM.**

SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION

**Major: Biology
Code number: 9420101**

HUẾ - 2024

The study was conducted in: The institute of Biotechnology, Hue university

Supervisors:

1. ASSOC.PROF. PhD. Trần Quốc Dung

Department of Biology

University of Education, Hue University

2. PhD. Nguyễn Thị Diệu Thuý

Institute of Biotechnology,

Vietnam Academy of Science and Technology

Reviewer 1:

Reviewer 2:

Reviewre 3:

The dissertation will be defended at the Thesis Judging Committee at Hue University, at the Hue University office, athour..... on..... month..... year.....

The dissertation is available at:

1. Vietnam's National library
2. Hue University Learning resource center.
3. Library of Institute of Biotechnology, Hue University

INTRODUCTION

1. RATIONALE FOR THE STUDY

Reproductive quality of sows plays an important role in providing good breeding stock for pig production. In countries with a developed pig industry, including Vietnam, sows often have problems related to fertility decline. Porcine Parvovirus (PPV) is considered to be the cause of Sow Fertility Deficiency Syndrome (SMEDI) (Stillbirth, Mummification, Embryonic Death and Infertility).

In theory, PPV is a single-stranded DNA virus, which used the host's DNA replication machinery to replicate its genetic material, so the virus is thought to have a low rate of genetic variation. However, studies in recent years have shown that the level of nucleotide substitutions of PPV is comparable to that of RNA viruses (about 10⁻⁴ substitutions/site/year). As of September 2022, eight PPV genotypes (1-8) have been confirmed. In recent years, the pig industry has been greatly affected by the emergence of many diseases such as blue ear disease, foot-and-mouth disease, and acute diarrhea, so the risk of infection with pathogens is very high. When an animal is infected, the immune system rapidly declines and there is a good opportunity for other pathogens that are in a latent state to erupt. This also means an increased risk of genetic recombination between strains/subtypes of viruses. Although PPV has appeared and existed for a long time on a worldwide scale, and vaccines have been used effectively for 3 decades, but considering the current situation, it is absolutely essential to control, monitor and evaluate the genetic changes and molecular epidemiology of this virus. Recent publications have confirmed that there are 4 PPV genotypes (1-4) circulating in pigs raised in our country. Currently, there are no scientific studies on genetic characteristics, and genome's characteristics of PPV isolated on pigs

raised in central Vietnam. On the scientific and practical basis mentioned above, we conducted the project : "Characteristics of structural protein encoding genes of Porcine parvovirus (PPV) in Central provinces of Vietnam". The results of the study are an important scientific basis to evaluate the molecular evolution of PPV, contributing to the control of PPV-induced fertility decline syndrome in pigs.

2. OBJECTIVES OF THE STUDY

2.1. Overall objectives

Determining changes in the predicted nucleotide and amino acid sequences of PPV strains circulating in pigs in some Central provinces through surveying the genetic characteristics of PPV virus

2.2. Detailed objectives

- Isolation of PPV genotypes (1-4) circulating in the central provinces.
- Determination of nucleotide sequences of genes encoding structural proteins of PPV genotypes isolated in the central provinces of Vietnam.
- Analysis and evaluation of genetic changes at the nucleotide and inferred amino acid levels of genes encoding structural proteins of PPV isolated in the central provinces of Vietnam.

3. CONTENT OF THE STUDY

This study focuses on addressing the following main issues:

- Collecting samples, and extracting total DNA
- Isolating and screening PPV genotypes
- Amplifying and determining the nucleotide sequence of the gene encoding the structural protein of PPV
- Analyzing, evaluating changes in nucleotide and inferred amino acid sequences, inferring genes encoding structural proteins and building genetic genealogical trees of PPV strains

4. SCOPE OF THE STUDY

- Sampling locations: 7 central provinces (Quang Binh, Quang Tri, Thua Thien Hue, Da Nang, Quang Nam, Quang Ngai, Binh Dinh).

- Research location: Department of Animal Gene Technology, Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology.

- Research period: 2019-2023.

5. NEW FINDINGS OF THE DESSERTATION

- Determining the prevalence and co-infection rates of 4 PPV genotypes (1-4) in domestic pigs in 7 central provinces.

- Sequencing and analyzing gene sequences encoding structural proteins of 03 PPV2 strains (GenBank code: OL913365-OL913367) and genome sequences of 02 PPV4 strains (GenBank code: MT434668-MT434669) isolated in Central Vietnam.

- Analyzing the genetic relationship of PPV2 and PPV4 strains isolated in Central Vietnam with PPV strains circulating in the region and in the world.

6. SCIENTIFIC AND PRACTICAL IMPLICATIONS OF THE DESSERTATION

- Results of sequence analysis, evaluation of genetic variation, genetic taxonomy of PPV strains isolated in central Vietnam will be valuable information in molecular epidemiology studies on PPV strains, effectively supporting the management and control of Swine Fertility Reduction Syndrome, contributing to minimizing economic losses to the pig industry not only in the central provinces but in Vietnam as well.

- Providing updated scientific data to facilitate research and teaching students specialized in Biology, Biotechnology, Animal Husbandry and Veterinary Medicine at universities.

CHAPTER 1. OVERVIEW

1.1. CURRENT SITUATION OF PIG FARMING AND DISEASES IN CENTRAL PROVINCE OF VIETNAM

Pig farming ranks first in the livestock industry in our country. However, the tropical monsoon climate, which is hot and humid with a lot of rain in the Central region, has provided many types of pig pathogens, including PPV, with favorable conditions to survive and caused significant damage to the pig industry.

1.1. INTRODUCTION ABOUT PPV AND PPV-CAUSED DISEASES IN PIGS.

1.2.1. PPV Classification

PPV (Porcine Parvovirus) belongs to:

Family: Parvoviridae

Sub-family: Parvovirinae

Genus: *Protoparvovirus*

Species: *Ungulate protoparvovirus*

Sub-species: Porcine parvovirus (PPV)

1.2.2. Biological characteristics.

1.2.2.1. Morphology

PPV is a non-enveloped virus, with small size, round shape, virion diameter about 18-26 nm, 20-sided symmetry structure.

1.2.2.2. Capsid protein

The capsid of PPV is a spherical shell consisting of 60 copies of VP1 or VP2 arranged in a symmetric polyhedral structure (Chapman and Rossmann, 1993).

1.2.2.3. Genome

The genetic material of PPV is ssDNA with a molecular size ranging from 5-6 kb. The sequence on the two-terminal ends of the PPV gives rise to a

hairpin structure (Bern and Hauswirth, 1983). The PPV genome consists of two main open reading frames: ORF1 encoding the nonstructural proteins NS1, NS2 (Bergeron et al., 1993) and ORF2 encoding the capsid proteins. ORF3 (PPV4) is a small open reading frame, located between ORF1 and ORF2, encoding the nonstructural protein NS3.

1.2.3. PPV Symptoms of PPV-caused diseases

Although PPV infects pigs of all ages, the disease mainly occurs in sows with the main clinical symptoms of impaired fertility, characterized by miscarriage, premature birth, embryonic death, and mummification.

1.2.4. Epidemiology

The worldwide circulation of PPV has been confirmed (Cadar et al., 2012; Truyen and Streck, 2012). PPV is resistant to environmental factors and immune to many common disinfectants (Brown, 1981). PPV infects pigs through three main routes: food, water and insemination.

1.2.5. Interactions between viruses and cells

PPV enters cells by all three pathways: (i) endocytosis, (ii) macrocytosis, and (iii) a third pathway of entry (presumptive). PPV DNA and proteins enter the host genome and are edited by the host's genetic machinery into double-stranded DNA. After each time the host cell duplicates, the viral DNA is also duplicated.

1.2.6. Disease mechanisms

PPV infection induces cytopathogenic effect (CPE) or mitochondrial-mediated apoptosis (Zhang et al., 2019). The actual outcome of PPV infection largely depends on the virus strain and cell type (Zhang et al., 2015).

1.2.7. Diagnosis of PPV

PPV can be detected by hematologic methods including SN, MDCCF, HI, HA (Mengeling, 1972; Morimoto et al., 1972; Joo et al., 1976) or immunofluorescence assays and ELISA assays. Currently, PCR and Real-

time PCR are the most useful techniques for detecting PPV in a variety of samples (Milek et al., 2019).

1.2.8. Prevention of PPV

Inactivated vaccines and attenuated vaccines are traditional vaccines, which have evolved into routine injections, creating a long-lasting immune response that helps protect the pig herd. Currently, VLP vaccine (VLP-virus-like particle) and recombinant vaccine based on VP2 gene sequence of PPV are currently under research and development to gradually replace traditional vaccines.

1.2. CURRENT SITUATION OF PPV RESEARCH IN THE WORLD AND IN VIETNAM

1.3.1. The current situation of PPV research in the world

1.3.1.1. Circulation

PPV has been detected in pig herds in most countries regardless of the sex, age and health status of pigs. The prevalence of PPV may depend on the type of sample collected in each study (Streck et al., 2013).

1.3.1.2. Genetic variation in genes encoding structural proteins

The structural protein of PPV plays an important role in the induction of various disease properties. Comparing the genome sequences between the mild strain NADL-2 used as a vaccine and the virulent strain Kresse showed that they differ only at 8 nucleotide positions and 6/8 of these positions lead to changes in amino acids. New phenotypes with amino acid substitutions in structural proteins have altered the antigenic properties of the virus. The characterization of molecular characteristics and nucleotide polymorphisms, and phylogenetic analysis based on gene sequences encoding structural proteins are needed for new strategies to control diseases caused by PPV.

1.3.1.3. PPV evolution

In the 80s and 90s of the last century, it was assumed that PPV had a low level of genetic variation comparable to that of the host. However, recent studies have shown that the nucleotide variation rate of PPV is comparable to that of RNA viruses. Besides, the discovery of eight PPV genotypes (1965-2022) completely changed the view of the evolution and immunology of PPV, showing that the virus is much more diverse than previously predicted.

1.3.1.4. Detection of other PPV genotypes

Sequence comparison of genes encoding structural proteins of PPV showed that genetic variation in the VP molecule leads to the formation of different PPV subtypes. Eight PPV genotypes have been confirmed (1965-2022) including: PPV1, PPV2, PPV3, PPV4, PPV5, PPV6, PPV7 and PPV8 (Palinski et al., 2016; Ni et al., 2014; Xiao et al., 2013); Cheung et al., 2010; Huang et al., 2010; Lau et al., 2008).

1.3.2. Current situation of PPV research in Vietnam

In Vietnam, SMEDI Syndrome has been of concern since the 1990s, there is no specific treatment and vaccination can be ignored, so in reality, the disease still occurs continuously and is common in most localities in the country. There are still no specific statistics on the harmful effects of SMEDI in Vietnam in general and the Central provinces in particular. Serological testing has been used to confirm the prevalence of PPV in pigs (Pham Hung, 1999; Ho Dinh Chuc, 1995). Recent studies have used PCR to detect the prevalence of PPVs in pig herds in some provinces in the country, mainly in the North and the South (Giap et al., 2020; Thuy et al., 2021). Up to now, there have been no published scientific works on infection rate and molecular characteristics of genes encoding structural proteins of PPVs isolated in Central Vietnam.

Chapter 2. SUBJECTS, MATERIALS AND METHODS

2.1. Subjects

PPV strains (1-4) circulated in pigs of slaughter age in seven central provinces.

2.2. Materials

A total of 146 samples (117 lung samples and 29 blood samples) were collected from commercial pigs raised in seven central provinces at slaughterhouses. Each province collects an average of 5 slaughterhouses, each slaughterhouse collects no more than 5 samples; equipment, tools, chemicals, primers to detect PPV genotypes, primers to amplify genes encoding PPV genotypes and reference sequences.

2.3. Research Methods

2.3.1. Sampling method

A total of 146 samples including blood and lungs were collected at slaughterhouses (4 slaughterhouses/province, no more than 5 samples/slaughterhouse). After collection, samples were kept at 4°C and transferred to the laboratory for storage at -20°C prior to total DNA extraction.

2.2.2. Total DNA extraction

DNA extraction method: According to routine laboratory method, using Proteinase K; Phenol/Chloroform.

2.2.3. PCR

The PCR method uses total DNA as a template, and requires the optimization of PCR conditions to specifically amplify DNA fragments with the corresponding primer pairs for each DNA fragment.

2.2.4. Electrophoresis

Prepare the agarose gel, apply the electrophoresis sample, stain the gel with Ethidium Bromide, then observe and capture the electrophoresis image.

2.2.5. DNA sequencing

DNA sequences were determined using an automatic sequence analyzer ABI-3100 Avabp Genetic Analyzer of Macrogen company, Korea according to Sanger's principle.

2.2.6. DNA sequence processing and analysis

DNA sequences of isolated PPV strains were processed with BioEdit software v.7.0.9.0 (Hall, 1999); and compared using GenDoc 2.6 software and BLAST tool. Skew value was calculated according to the formula $AT\ skew = (A-T)/(A+T)$ and $GC\ skew = (G-C)/(G+C)$ (Perna and Kocher, 1995). Nucleotide sequences of reference strains and study strains were aligned and arranged using the ClustalW Multiple alignment tool (Thompson et al., 1994).

2.2.7. Phylogenetic tree construction

Phylogenetic tree was built using MEGA X software (Kumar et al., 2018) with Maximum Likelihood inference method, Tajima-Nei model and bootstrap test repeated 1000 times.

2.2.8. Data analysis

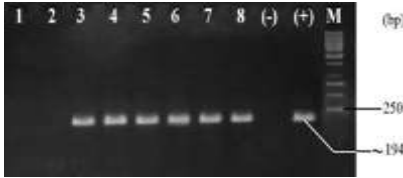
The prevalence rates of the studied genotypes and the composition rates of nucleotides were statistically processed using Excel v2010 software.

CHAPTER 3. STUDY RESULTS

3.1. DISCOVERY OF PPV (1-4) CIRCULATING ON PIGS IN SEVEN CENTRAL PROVINCES

3.1.1. Discovery of PPV (1-4) circulating on pigs in 7 central provinces.

PPV detection PCR products (1-4) are presented in Figures: 3.1; 3.2; 3.3 and 3.4. Sequencing results of gene fragments detecting PPV (1-4) were compared by BLAST tool.



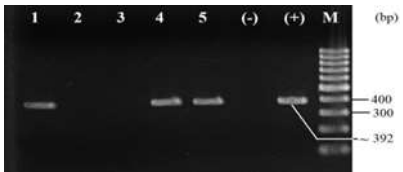
M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Sciebpific)
1-2: Negative samples
3-8: Positive samples
(-): Negative control
(+): Positive control

Figure 3.1. Electrophoresis results of PCR product to detect PPV1



M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Sciebpific)
1, 7: Negative samples
2-6, 8: Positive samples
(-): Negative control
(+): Positive control

Figure 3.2. Electrophoresis results of PCR product to detect PPV2



M: GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Sciebpific)
2, 3: Negative samples
1, 4, 5: Positive samples
(-): Negative control
(+): Positive control

Figure 3.3. Electrophoresis results of PCR product to detect PPV3



M: GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Sciebpific);
1, 4: Negative samples
2, 3, 5: Positive samples
(-): Negative control
(+): Positive control

Figure 3.4. Electrophoresis results of PCR product to detect PPV4 (345 bp)

3.1.2. PPV (1-4) infection rate results

The results of infection rates of PPV (1-4) in pigs raised in seven central provinces are presented in Table 3.1.

Table 3.1. PPV (1-4) infection rates in pigs in 7 central provinces

Provinces	n	Infection rate of PPV genotypes (1-4) (%)				Infection rate of at least one 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)

Data from Table 3.1 show that PPV is present in pigs raised in the seven provinces in the study (7/7). PPV was detected in a total of 109/146 samples studied, accounting for 74.7%; specifically, the rate of PPV infection (1-4) being: 52.7%; 56.2%; 5.5% and 8.2% respectively.

3.1.2. PPV genotypes (1-4) co-infection rate results

Results of co-infection with PPV genotypes (1-4) in pigs in the Central provinces showed that PPV1/PPV2 co-infection accounted for the highest rate (34.2%) and only one sample was co-infection with 4 PPV genotypes. (1-4). In terms of locality, Thua Thien Hue is the province where all types of co-infection with 2/3/4 PPV strains were detected.

3.2. DNA SEQUENCES ENCODING STRUCTURAL PROTEIN OF PPV2 AND PPV4 STRAINS CIRCULATING ON PIGS IN CENTRAL PROVINCES

3.2.1. DNA Sequences encoding structural proteins of PPV2 strains

The VP DNA sequences of three PPV2 strains isolated in this study with molecular size 2,493 bp were submitted to the GenBank database with access codes OL913365-OL913367, respectively. Nucleotide composition of VP gene sequences of PPV2 strains isolated from central provinces is presented in Table 3.2.

Table 3.2. Nucleotide composition and skew value in VP DNA sequences of PPV2 strains isolated in Central Vietnam

Genotype	Strain	Sequence	Size (bp)	A (%)	T (%)	G (%)	C (%)	A+T (%)	AT-skew	G+C (%)	GC-skew
PPV2	QN03	<i>VP gene</i>	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. Genome sequences of PPV4 strains

3.2.2.1. Genome sequences of PPV4 strains isolated from Central Vietnam

The genome molecular size of two PPV4 strains isolated in this study is 5,367 bp, including 3 open reading frames ORF1, ORF2 and ORF3 and was submitted to GenBank database with access codes MT434668 and MT434669. The nucleotide composition of genome sequence of PPV4 strains isolated from central provinces is presented in Table 3.3.

Table 3.3. The nucleotide composition and skew value in genome sequence of PPV4 strains isolated in Central Vietnam.

Genotype	Strain	Sequence	Size (bp)	A (%)	T (%)	G (%)	C (%)	A+T (%)	AT-skew	G+C (%)	GC-skew
PPV4	QT02	Genome	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. VP gene sequences of PPV4 strains isolated from Central Vietnam

The molecular size of the VP gene of the two PPV4 strains isolated in this study is 2,187 bp; located in the open reading frame ORF2. The nucleotide composition and the AT and GC skew values in the VP gene sequences of PPV4 strains isolated from the central provinces are presented in Table 3.4.

Table 3.4. Nucleotide composition và skew values in VP gene sequences of PPV4 strains isolated in Central Vietnam.

Genotype	Strain	Sequence	Size (Sbp)	A (%)	T (%)	G (%)	C (%)	A+T (%)	AT-skew	G+C (%)	GC-skew
PPV4	QT02	Gen VP	2187	34,3	24,7	20,3	20,7	59,0	0,163	41,0	0,162
	QT20			34,3	24,8	20,2	20,7	59,1	-0,001	40,9	-0,001

3.2.2.3. DNA sequences of PPV4 strains isolated from Central Vietnam

ORF3 open reading frame sequence length of the two PPV4 strains isolated in this study was 615 bp, without insertion/deletion mutations in the coding region. The nucleotide composition and AT and GC skew values in ORF3 sequences of PPV4 strains isolated from central provinces are

presented in Table 3.5.

Table 3.5. Nucleotide composition and skew values in ORF3 sequences of PPV4 strains isolated in Central Vietnam

Genotype	Strain	Sequence	Size (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

3.2.3. Sequence of the NS1/VP1 gene region of PPV3 strains

The sequence of the NS1/VP1 gene region of the two PPV3 strains isolated in this study is 995 bp in size (Including: *NS1* gene segment of 229 bp and *VP1* gene segment of 766 bp, coding for structural proteins VP1). No nucleotide addition/loss mutations were detected in the coding gene region.

3.3. CHARACTERIZATION OF GENES ENCODING STRUCTURAL PROTEINS OF PPV ISOLATED IN CENTRAL PROVINCES

3.3.1. Characterization of genes encoding structural proteins of PPV2 strains isolated in central provinces

3.3.1.1. Characterization of the VP gene nucleotide sequence of PPV2

The sites of nucleotide substitution mutations and amino acid inferred from the VP gene sequences of three PPV2 strains isolated in Central Vietnam are different from those of the reference strains shown in Table 3.6.

Table 3.6. The sites of nucleotide substitution mutations and amino acid inferred from the VP gene sequences of three PPV2 strains isolated in Central Vietnam compared to reference strains.

Strain	Sites of bp substitution	Sites of aa substitution
PPV2-QN03 (OL913365)	444: T→A	-
	734: C→T	245: S→F
	820: A→C	274: K→Q
	1794: T→A	-

Data from Table 3.6 shows nucleotide variation points on the VP gene sequence of 3 PPV2 strains isolated in the Central region (PPV2 QN03, PPV2-HU10 and PPV2- QB05), including 4 nucleotide substitution positions

only detected in strain PPV2-QN03 (OL913365) was completely different from the reference strains.

3.3.1.2. Characterization of amino acid sequences inferred from the VP gene of PPV2

The results of comparing the inferred amino acid sequences of the two PPV2 strains isolated in this study with the referenced PPV2 strains on GenBank are presented in Figure 3.5.



Figure 3.5. Comparison of amino acid sequences inferred from the VP gene of PPV2 strains isolated in Central Vietnam compared with reference strains

As shown in Figure 3.17, according to the inferred amino acid sequence comparison, two substitution sites were detected (245: S→F, 274: K→Q) in the inferred amino acid sequence of strain PPV2-QN03.

Results of comparing amino acid substitution mutations at important sites in the inferred amino acid sequence of PPV2 strains isolated in Vietnam with the results of previous studies (Sun et al., 2015; Cadar et al. cs, 2013) are presented in Table 3.7.

Table 3.7. Important sites of substitution in the amino acid sequence inferred from the VP gene of PPV2 strains isolated in Central Vietnam compared with reference strains

Country	Site Strain	Year of isolation	A		B			C					
			245	274	269	442	714	349	437	598	689	784	796
Myanmar	AB076669	2001	S	K	P	D	Q	S	D	D	T	M	Q
Vietnam	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
China	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
U.S.A	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: Mutation positions in Vietnamese strains different from reference strains; B: The mutation site under positive selection pressure (Cadaru et al., 2013; C: Important mutation sites determining genetic subtypes (Sun et al., 2015).

The results of mutations detected at the sites of the specific motifs in the VP gene sequence of PPV2 according to Cadaru's research on PPV2 strains isolated in central Vietnam are presented in Table 3.8.

Table 3.8. Results of mutations at the sites of the characteristic sequence motifs in the VP gene sequence of PPV2 (Cadaru et al., 2013)

Characteristic sequence motifs	Site of codon khởi đầu motif	Vị trí codon xuất hiện đột biến	Chủng PPV2 xuất hiện đột biến
Polyadenylation signal (PAS) (AATAAA)	66	66 (AAGAAA)	PPV2-HU10
	454	454 (ACTAAA)	PPV2-QB05
SP1 binding site (GGGCGG)	36, 165, 329	329 (GGGCA G)	PPV2-QN03

3.3.1.3. Level of nucleotide/amino acid similarity inferred from the VP gene of PPV2

The level of similarity in nucleotide/amino acid sequences inferred from VP gene sequences of PPV2 strains isolated in Central Vietnam (2,493 bp and 831 aa) compared with strains isolated in the region and the world is presented in Table 3.9

Table 3.9. The ratio of nucleotide and amino acid homology inferred (%) from VP gene sequences of PPV2 strains isolated in Central Vietnam compared with reference strains

Strain	Size	Nucleotide (2.493 bp)	Amino acid (831 aa)
Vietnam		95,8-97,0	95,3-97,5
Myamar		96,1-98,1	95,4-98,7
China	Group A	95,2-99,7	94,5-99,6
	Group B	93,7-94,6	93,2-95,5
Europe		94,9-100	93,3-100
U.S.A		93,7-96,7	93,8-97,4

3.3.1.4. PPV2 phylogenetic relationships based on VP gene sequences

The phylogenetic tree of the PPV2 strains isolated in this study and the reference strains was built based on the VP gene sequence of PPV2 with a molecular size of 2,493 bp (Figure 3.6).

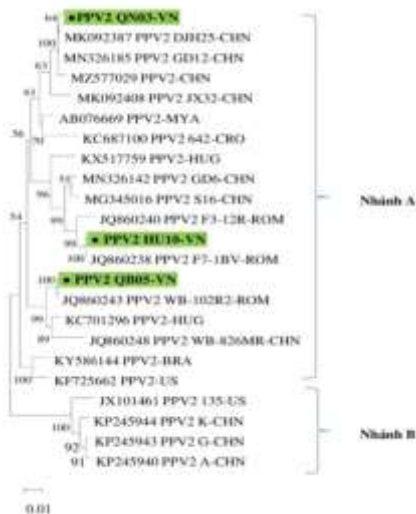


Figure 3.6. Phylogenetic tree PPV2 based on VP gene nucleotide sequences (2,493 bp) obtained from some central provinces of Vietnam and reference gene sequences.

3.3.2. Characterization of genes encoding structural proteins of PPV4 strains isolated in central provinces

3.3.2.1. Characterization of the PPV4 genome

The sites of nucleotide substitution mutations leading to substitutions in amino acid sequences inferred from ORF1 sequences of PPV4 strains isolated in the Central region are shown in Figure 3.7.



Figure 3.7. Nucleotide and amino acid substitution mutation positions in the ORF1 open reading frame of the PPV4 genome sequence.

3.3.2.2. Characterization of the VP gene of PPV4

Characterization of the VP gene nucleotide sequence of PPV4

The results of comparing VP gene nucleotide sequences of PPV4 strains isolated in Central Vietnam and reference strains are presented in Figure 3.8.

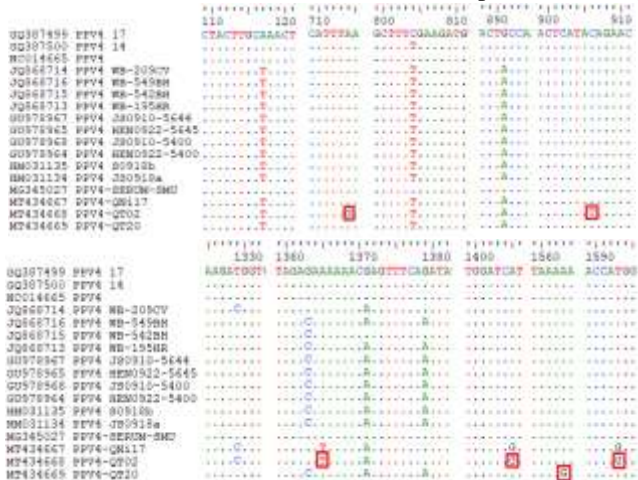




Figure 3.8. The results of comparing VP gene nucleotide sequences of PPV4 strains isolated in Central Vietnam and reference strains

Table 3.10. Sites of substitution in the amino acid sequence inferred from the VP gene of PPV2 strains isolated in Quang Tri compared with reference strains

Strain	Sites of bp substitution	Sites of aa substitution
PPV4-QT02	714: A→G	-
	906: C→T	-
	1365: A→T	455: E→D
	1405: C→G	469: I→V
PPV4-QT20	1593: A→G	531: H→Q
	1563: A→G	-
	1977: G→A	-
	2068: C→T	690: P→S

The results of comparing inferred amino acid sequences of two PPV4 strains isolated in this study with referenced PPV4 strains on GenBank are presented in Figure 3.9.

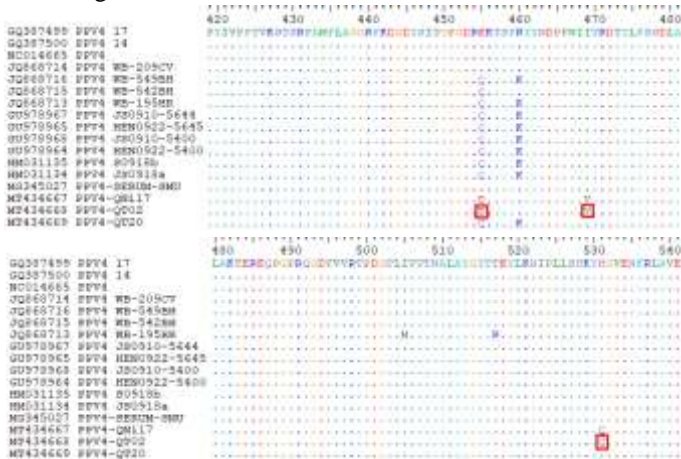




Figure 3.9. Results of comparison of amino acid sequences inferred from the VP gene of PPV4 strains isolated in central Vietnam compared with reference strains.

Results of comparing amino acid substitutions at potential sites in amino acid sequences inferred from the VP gene of PPV4 strains isolated in Quang Tri province with the results of previous studies (Sun et al., 2015; Cadar, 2015 et al., 2013) are presented in Table 3.11.

Table 3.11. Important sites of substitutions in amino acid sequences inferred from the VP gene of PPV4 strains isolated compared with reference strains

Country	Strain	Year of isolation	A		B							
			531	690	178	416	455	460	469	567	583	722
U.S.A	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
Vietnam	MT434667	2020	Q	P	S	K	D	R	V	E	T	Q
	QNi17		Q	P	S	K	D	R	V	E	T	Q
	MT434668		Q	P	S	K	D	R	V	E	T	Q
	QT02		Q	P	S	K	D	R	V	E	T	Q
Romania	MT434669	2012	H	S	S	K	Q	K	I	E	T	Q
	QT20		H	S	S	K	Q	K	I	E	T	Q
	JQ868713		H	P	S	K	E	R	I	E	T	Q
	JQ868714		H	P	S	K	Q	K	I	E	T	Q
China	JQ868715	2012	H	P	S	K	Q	R	I	E	T	Q
	JQ868716		H	P	S	K	Q	K	I	E	T	Q
	GU978964		H	P	P	K	Q	K	I	E	T	Q
	GU978965		H	P	S	K	Q	K	I	E	T	Q
	GU978966	2010	H	P	P	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	2018	H	P	S	K	Q	K	I	E	T	P	
MG345027		H	P	S	E	E	R	I	G	T	Q	

A: Mutation sites in Vietnamese strains are different from reference strains; B: Important mutation sites (Sun et al., 2015; Cadar et al., 2013).

3.3.2.3. Characterization of ORF3 of PPV4

The results of comparing the nucleotide and amino acid sequences inferred from the ORF3 open reading frame of the PPV4 strains isolated in Quang Tri province with the reference strains showed that only a single substitution mutation was detected in the nucleotide sequence in Quang Tri. strain PPV4-QT02 (240: A→G).

3.3.2.4. Level of nucleotide/amino acid similarity of PPV4 isolated in central Vietnam

The results of comparing the similarity of nucleotide and inferred amino acid sequences of ORF1, ORF2, ORF3 and genome sequences between PPV4 strains isolated in Central Vietnam compared with strains in the region and the world is presented in Table 3.12.

Table 3.12. The percentage of nucleotide and amino acid similarity (%) of ORF1, ORF2, ORF3 and genomic sequences between PPV4 strains isolated in Central Vietnam compared with reference strains

Sequence	Molecular size	Sources of PPV4 strains				
		Cetral Vietnam	Northern Vietnam	China	U.S.A	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
Genome	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. Phylogenetic relationship of PPV4 strains

The phylogenetic tree built based on genomic sequences (5,367 bp) and genes encoding structural protein (2,187 bp) are presented in Figure 3.24 and Figure 3.25.

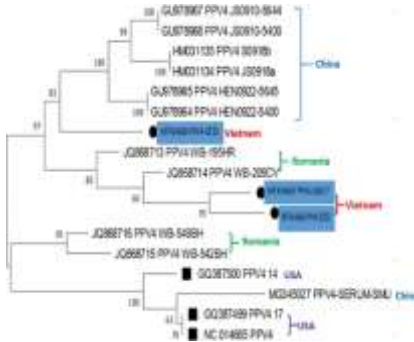


Figure 3.10. Phylogenetic tree PPV4 was built based on the almost complete genome sequence of PPV4 (5,367 bp) obtained from Vietnam and reference sequences.

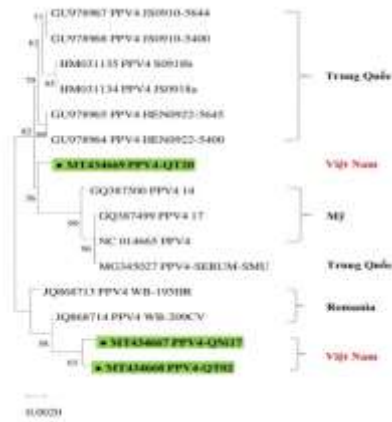


Figure 3.11. The PPV4 phylogenetic tree was built based on the complete capsid protein-coding gene sequences of PPV4 strains (2,187 bp) isolated in Central Vietnam and reference sequences.

3.3.3. Characterization of genes NS1/VP1 gene region of PPV3 strains isolated in central provinces

The sequence of the NS1/VP1 gene region (995 bp) of the two strains PPV3-QN16 and PPV3-QT4 has seven nucleotide positions that are completely different from the reference strains (39: A→T; 131: G→C; 137: T→G and 542: T→C; 930: T→G; 932: G→A and 949: G→A), leading

to deduced amino acid substitutions at positions 234 (L→W) and 235 (D→N). The phylogenetic tree built based on the sequence of the gene encoding the VP1 structural protein of PPV3 (305 bp) shows that PPV3 strains isolated from Quang Ngai and Quang Tri have a close relationship with PPV3 strains from China and USA.

CONCLUSION AND RECOMMENDATIONS

CONCLUSION

7. The circulation of PPV (1-4) was detected in pig herds in seven central provinces of Vietnam using PCR to amplify the specific nucleotide fragment of each genotype. The infection rates of PPVs (1-4) in 7 central provinces were: 52.7% for PPV1 ; 56.2% for PPV2; 5.5% for PPV3 and 8.2% for PPV4. Co-infection with PPV genotypes (1-4) was also detected in 4/7 studied provinces (Quang Tri, Thua Thien Hue, Quang Ngai and Binh Dinh); in which co-infection with 2 genotypes PPV1/PPV2 in pigs raised in Thua Thien Hue accounted for the highest rate with 67.9%.

8. We have sequenced the genes encoding structural proteins of 3 strains of PPV2 isolated from pigs raised in Quang Ngai, Thua Thien Hue and Quang Binh provinces with the size of 2,493 bp (GenBank code: OL913365, OL913366 and OL913367); The whole genome sequence of two PPV4 strains isolated in Quang Tri has the size of 5,367 bp (GenBank codes: MT434668 and MT434669), including 3 open reading frames: ORF1, ORF2 and ORF3 with corresponding sizes of 1,797 bp, 2,187 bp and 615 bp.

9. The results of analyzing the gene sequences encoding structural proteins of three strains of PPV2 have shown the detection of four nucleotide substitution mutations (444: T→A, 734: C→T, 820: A→C and 1794: T→A),

in which there are two mutations leading to inferred amino acid substitution at two positions: 245 (S→F) and 274 (K→Q) which are completely different from the reference strains. The results of genomic sequence analysis of two PPV4 strains revealed a nucleotide substitution mutation (124: G → A) leading to amino acid substitution (42: D → N) in the ORF1 open reading frame and eight sites of substitutions in the nucleotide sequence of genes encoding structural proteins (ORF2) (714: A→G, 906: C→T, 1365: A→T, 1405: C→G, 1593: A→G, 1563: A →G, 1977: G→A, and 2068: C→T) leading to four substitutions in the inferred amino acid sequence at positions 455 (E→D), 469 (I→V), 531 (H→ Q) and 690 (P→S), which were completely different from the reference strains. The inferred nucleotide/amino acid substitution mutations mainly concentrated in the structural protein (ORF2) gene sequences of PPV4 strains isolated.

10. The phylogenetic tree was built based on genes encoding structural protein of PPV2 (2,493 bp) and genome of PPV4 (5,387 bp). Three PPV2 strains isolated in Quang Binh, Thua Thien Hue and Quang Ngai are closely related to PPV2 strains originating from Europe and China. PPV4 strains isolated in Quang Tri are closely related to Romanian and Chinese PPV4 strains.

11. Diseases that have occurred in pigs recently are quite complicated, including a complex of reproductive and respiratory diseases, often with co-infection of many viruses: PCV, PRRSV, PPV... Therefore, updated information on genetic changes, especially in gene regions related to antigenic properties, immune response... of the virus, is very necessary,

especially for the purpose of developing methods detect pathogens that cause co-infection in pigs.

RECOMMENDATIONS

Although PPV circulates in pigs of all ages, this study was only performed on samples collected from commercially raised pigs, of slaughter age, collected at slaughterhouses. In addition, the project was carried out from September 2019 to August 2023, entirely during the COVID-19 pandemic, in which the sample collection period was affected, so there were certain limitations, especially It is not possible to collect samples with sows from breeding farms. Therefore, the author of the thesis would like to propose the following recommendations:

4. More PPV isolates in Vietnam need to be screened, to find out whether or not there is circulation of other PPV genotypes (PPV5-8), in order to provide data on PPV in pigs raised in Vietnam.

5. Conduct testing for the presence of PPV in pigs (sows, post-weaning, growing) and their sperm in order to control the sources of virus transmission.

6. Decode the entire genome/structural protein-encoding genes of circulating pig PPVs to compare with existing genotypes in different geographical regions to evaluate the molecular epidemiological characteristics of the pigs.

AUTHOR'S PUBLICATIONS RELATED TO THE THESIS

4. 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)
5. **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.
6. **Nguyen Tran Trung**, Tran Quoc Dung, Dinh Thi Ngoc Thuy, and Nguyen Thi Dieu Thuy (2023). The nucleotide sequence of NS1/VP1 gene of Porcine Parvovirus 3 (PPV3) in finishing pigs raised in Quang Ngai and Quang Tri provinces. *Journal of Animal Husbandry Sciences and Technics*, 293: 59-65.