**TRANG THÔNG TIN LUẬN ÁN**

Tên đề tài luận án: ***Nghiên cứu tạo và phân tích biến đổi di truyền chủng vi-rút PRRS nhược độc làm vắc-xin***

Ngành: Di truyền học

Mã số ngành: 62420121

Họ tên nghiên cứu sinh: **BÙI ANH THY**

Khóa đào tạo: 2015

Người hướng dẫn khoa học: **GS. TS. Trần Linh Thước, TS. Trần Xuân Hạnh**

Cơ sở đào tạo: Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG.HCM

**1. TÓM TẮT NỘI DUNG LUẬN ÁN**:

Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở heo (Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS), còn được gọi là ''bệnh tai xanh'', là bệnh truyền nhiễm nguy hiểm, với các đặc điểm: rối loạn sinh sản như sảy thai ở heo nái; suy giảm đường hô hấp, đặc biệt ở heo bú sữa. Tác nhân gây bệnh PRRS là một loại RNA vi-rút (PRRSV) thuộc giống *Betaarterivirus* (*Arterivirus*). PRRSV luôn biến đổi về cấu trúc di truyền, đồng thời có khả năng tái tổ hợp di truyền để tăng khả năng gây bệnh. Sau hơn ba mươi năm tiến hóa, PRRSV đã hình thành vô số biến chủng theo các vùng địa lý khác nhau. Chính sự khác biệt về tính di truyền, đa dạng về tính kháng nguyên, và khả năng biến đổi cấu trúc kháng nguyên của vi-rút đã làm tăng thêm những khó khăn trong việc sản xuất vắc-xin. Trong khi đó, vắc-xin đang lưu hành trong nước, chủ yếu nhập khẩu nên giá thành cao, và không chủ động được nguồn cung; vì thế cần có thêm vắc-xin nội địa đáp ứng nhu cầu trong nước. Trong bối cảnh vắc-xin nội địa còn ít, việc thêm một ứng viên vắc-xin, đặc biệt là vắc-xin nhược độc có ý nghĩa thực tiễn lớn, giúp giảm giá thành, chủ động được nguồn cung, tăng hiệu quả bảo hộ trên heo...

Luận án “**Nghiên cứu tạo và phân tích biến đổi di truyền chủng vi-rút PRRS nhược độc làm vắc-xin**”được thực hiện với mục tiêu nghiên cứu tạo chủng vi-rút nhược độc bằng phương pháp nuôi cấy chuyền (tiếp truyền) dùng làm kháng nguyên để điều chế vắc-xin, đồng thời phân tích các biến đổi di truyền ở các chủng vi-rút được tạo ra trong quá trình nuôi cấy chuyền để củng cố và cung cấp thêm các dữ liệu khoa học về biến đổi di truyền ở các chủng vi-rút có tốc độ tiến hóa nhanh này. Để hiện thực hóa mục tiêu này, các nội dung sau đây được nghiên cứu: (i) Khảo sát đặc tính sinh học của chủng gốc PRRSV BG8 nhằm tạo chủng nhược độc bằng phương pháp tiếp truyền trên tế bào MARC-145; (ii) phân tích biến đổi di truyền chủng PRRSV qua các đời tiếp truyền trên tế bào; (iii) phân tích tính ổn định kháng nguyên của chủng nhược độc và độ tương đồng với các chủng PRRSV khác dựa trên trình tự ORF5 và protein GP5; (iv) đánh giá đặc tính sinh miễn dịch của chủng nhược độc BG8-P95 theo tiêu chuẩn giống làm vắc-xin.

Các kết quả thực nghiệm của luận án cho phép rút ra các kết luận sau đây:

(1) Phân tích cây phả hệ dựa theo trình tự amino acid của GP5, chủng PRRSV BG8 cùng thuộc phân dòng 8.7 với các chủng PRRSV đang lưu hành tại Việt Nam. Từ đó làm cơ sở tạo chủng nhược độc từ chủng cường độc BG8 bằng phương pháp nuôi cấy tiếp truyền 95 đời ở tế bào MARC-145. Sau quá trình nhược độc hóa, chủng BG8-P95 có tính sinh miễn dịch tốt, tạo đáp ứng kháng thể ở heo từ ngày thứ 14 sau tiêm BG8-P95 và ổn định sau 21 ngày tiêm. Sau khi được tiêm chủng BG8-P95 và công cường độc, heo thí nghiệm có đáp ứng kháng thể ổn định sau 21 ngày công cường độc, và bước đầu cho thấy có khả năng bảo hộ đối với chủng PRRSV cường độc.

(2) Phân tích đặc điểm biến đổi di truyền trên toàn bộ gen ở các chủng PRRSV thu hoạch từ quá trình nuôi tiếp truyền cho thấy: (i) Không có sự thay đổi độ dài toàn bộ gen, (15321bp), nhưng xảy ra 38 đột biến nucleotide, dẫn đến thay đổi 14 amino acid, có một số đột biến làm thay đổi amino acid có khả năng ảnh hưởng đến đặc điểm sinh học và tính sinh miễn dịch, ví dụ như đột biến H79Y, F143L trên GP3; Y106C và Q196R trên GP5; (ii) Xu hướng hình thành đột biến ở chủng nhược độc BG8-P95 so với chủng cường độc BG8 là tương tự với 8 trường hợp chủng nhược độc so với chủng cường độc gốc ở Việt Nam, Trung Quốc và Mỹ: ít đột biến ở vùng ORF1ab, ORF6–7 so với ORF2a,b, ORF3, ORF4, ORF5; đột biến nhiều nhất trên các protein GP3 và GP5, ít nhất ở protein M và N.

(3) Kết quả phân tích trình tự amino acid trên protein GP5 và đánh giá mức độ tương đồng nucleotide trên ORF5 và amino acid trên GP5 của chủng BG8-P95 với các chủng PRRSV khác ghi nhận: Mặc dù chủng BG8-P95 có biến đổi so với chủng gốc BG8-P1 nhưng vùng epitope trung hòa vẫn được bảo tồn cao; đồng thời chủng BG8-P95 có mức độ tương đồng cao (97,1–99,1% về nucleotide và 96,0–99,0% về amino acid) với các chủng đang lưu hành tại Việt Nam. Như vậy, protein kháng nguyên GP5 vẫn ổn định qua các đời nuôi tiếp truyền.

(4) Vắc-xin thử nghiệm được chế tạo từ chủng nhược độc BG8-P95 đảm bảo tính an toàn trên heo thí nghiệm, gây được đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể, hiệu giá tạo kháng thể có tính ổn định sau khi tiêm và có khả năng bảo hộ 100% cho heo được công với chủng cường độc trong điều kiện nuôi thực nghiệm từ ngày 28 sau tiêm phòng. Các khảo nghiệm tại các trại nuôi thực địa với quy mô 2017 heo cai sữa, heo thịt, 9998 heo nái cho kết quả vắc-xin có độ an toàn hầu như tuyệt đối, đồng thời gây đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể sau khi tiêm phòng vắc-xin.

**2. NHỮNG KẾT QUẢ MỚI CỦA LUẬN ÁN**:

Tạo thành công chủng PRRSV BG8-P95 nhược độc từ chủng PRRSV BG8 cường độc tại Việt Nam bằng cách tiếp truyền 95 đời ở tế bào MARC-145, và đáp ứng các tiêu chuẩn làm giống để sản xuất vắc-xin.

Phân tích so sánh các biến đổi di truyền từ chủng PRRSV cường độc đến chủng PRRSV nhược độc với các chủng cường độc gốc và chủng nhược độc tương ứng được dùng làm vắc-xin trên thế giới, đặc biệt là các đột biến liên quan đến protein màng GP5 có vai trò quyết định tính kháng nguyên và khả năng gây đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể của PRRSV.

Kết quả nghiên cứu của luận án góp phần cho sự hiểu biết khá đầy đủ về đặc tính sinh học phân tử, tính sinh miễn dịch của chủng PRRSV lưu hành tại Việt Nam; bên cạnh đó, luận án cung cấp các dữ liệu về biến đổi gen liên quan đến tính sinh miễn dịch ở các chủng PRRSV trong quá trình nhược độc bằng phương pháp nuôi tiếp truyền có giá trị tham khảo cho các nghiên cứu về chế tạo vắc-xin nhược độc theo công nghệ mới.

Về mặt thực tiễn, chủng PRRSV BG8-P95 nhược độc có đặc tính sinh miễn dịch theo tiêu chuẩn giống làm vắc-xin có thể được sử dụng để sản xuất vắc-xin phòng bệnh PRRS tại Việt Nam, thay thế vắc-xin ngoại nhập.

**3.** **CÁC ỨNG DỤNG/ KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG TRONG THỰC TIỄN HAY NHỮNG VẤN ĐỀ CÒN BỎ NGỎ CẦN TIẾP TỤC NGHIÊN CỨU**

Các kết quả nghiên cứu này là cơ sở cho việc dùng chủng PRRSV nhược độc BG8-P95 làm chủng giống để sản xuất vắc-xin phòng bệnh PRRS tại Việt Nam.

Thực hiện thí nghiệm gây nhiễm ngược nhiều đời trên heo thí nghiệm để đảm bảo không có hiện tượng độc lực trở lại. Tiến hành gây đột biến điểm định hướng và nghiên cứu ở mức protein nhằm xác định vị trí biến đổi giảm độc lực, từ đó làm cơ sở nghiên cứu vắc-xin theo công nghệ mới. Tiếp tục thu thập các chủng PRRSV lưu hành ở Việt Nam so với chủng BG8 để đánh giá biến đổi di truyền của PRRSV làm cơ sở đánh giá hiệu quả phòng bệnh của vắc-xin.

|  |  |
| --- | --- |
| **TẬP THỂ CÁN BỘ HƯỚNG DẪN**  (Ký tên, họ tên)  **GS.TS.TRẦN LINH THƯỚC TS. TRẦN XUÂN HẠNH** | **NGHIÊN CỨU SINH**  (Ký tên, họ tên)  **BÙI ANH THY** |

**XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO**

**HIỆU TRƯỞNG**

**THESIS INFORMATION**

Thesis title: ***Research on creating and analyzing genetic mutations of attenuated PRRSV strain to develop a vaccine***.

Speciality: Genetics

Code: 62420121

Name of PhD Student: **BÙI ANH THY**

Academic year: 2015

Supervisor: **Prof. PhD. Trần Linh Thước, PhD. Trần Xuân Hạnh**

At: VNUHCM - University of Science

**1. SUMMARY:**

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS), commonly known as ''blue ear disease,'' is a hazardous infectious disease characterized by reproductive failure, leading to miscarriages in pregnant sows, and respiratory distress in swine of all ages, especially in sucking piglets. The causative agent of PRRS is the PRRS virus, an RNA virus classified into the genus *Betaarterivirus* (*Arterivirus*). PRRSV exhibits a dynamic genetic structure and is capable of genetic recombination, enhancing its disease-causing ability. Over more than thirty years of evolution, PRRSV has given rise to numerous strains in different geographical regions. The complexities arising from genetic differences, antigenic diversity, and variability in antigenic structure pose challenges in vaccine production. Importantly, the predominant use of imported vaccines in the country, coupled with their high cost and limited supply, underscores the need for a domestic vaccine candidate. The thesis addresses this need by focusing on an attenuated vaccine, offering practical significance in cost reduction, proactive supply, and increased protective efficacy for pigs.

The thesis, "**Research on creating and analyzing genetic mutations of attenuated PRRSV strain to develop a vaccine**," aims to contribute to the development of attenuated virus strains by serial passaging for use as antigens in vaccine development. Additionally, the research analyzes genetic mutations in virus strains during cell culture passages, consolidating scientific data on genetic mutations in these rapidly evolving virus strains. The thesis includes research on (i) investigating the biological characteristics of the PRRSV parental strain, BG8, to create an attenuated strain via serial passaging in MARC-145 cells; (ii) analyzing genetic mutations in PRRSV strains through serial passaging in a cell line; (iii) assessing the antigenic stability of the attenuated strain and its similarity to other PRRSV strains based on the nucleotide sequence of ORF5 and amino acid sequence of GP5; and (iv) evaluating the immunogenic properties of the attenuated strain, BG8-P95, according to vaccine seed standards.

The experimental results of the thesis allow the following conclusions:

1. Analyzing the phylogenetic tree based on the amino acid sequence of GP5 indicates that PRRSV strain BG8 belongs to sublineage 8.7, similar to other PRRSV strains circulating in Vietnam. This forms the basis for creating an attenuated virus strain from the virulent strain BG8 through continuous passaging (95 times) in MARC-145 cells. Post-attenuation, the BG8-P95 strain demonstrates good immunogenicity, inducing antibody responses in pigs from the 14th day post-injection and remaining stable from the 21st day post-injection. After inoculation with BG8-P95 and challenge with the virulent PRRSV strain, experimental pigs maintain stable antibody responses from the 21st day post-challenge, providing sufficient protective efficacy against the virulent strain.
2. Analyzing genetic variation characteristics across the whole genome in PRRSV strains obtained by serial passaging reveals 38 nucleotide substitutions resulting in 14 amino acid changes. While these point mutations do not affect the length of the entire genome (15321bp), they have the potential to influence biological characteristics and immunogenicity. Notable mutations include H79Y and F143L on GP3, and Y106C and Q196R on GP5. The trend of forming mutations in the attenuated strain, BG8-P95, compared with the virulent strain, BG8, mirrors 8 cases of attenuated strains compared with parental virulent strains in Vietnam, China, and the US. Few mutations occur in ORF1ab, ORF6, and ORF7, less than in ORF2a, b, ORF3, ORF4, and ORF5; most mutations are in GP3 and GP5 proteins, with the least in M and N proteins.
3. Results of analyzing the amino acid sequence on the GP5 protein and evaluating the similarity of nucleotides on ORF5 and amino acids on GP5 of the attenuated strain, BG8-P95, with other PRRSV strains show that, despite genetic changes compared with the original strain, BG8-P1, the neutralizing epitope region remains highly conserved. Simultaneously, BG8-P95 has a high genetic identity (97.1–99.1% in nucleotides and 96.0–99.0% in amino acids) with PRRSV strains circulating in Vietnam, indicating stability of the GP5 antigenic protein through serial passages.
4. The experimental vaccine developed from the attenuated strain, BG8-P95, ensures safety in experimental pigs, stimulates an immune response, and maintains stable antibody titers post-vaccination. It provides optimal protection (up to 100%) for pigs challenged with virulent strains under experimental farming conditions from the 28th day post-vaccination. The experiment on field farms, involving 2017 weaning pigs, growing pigs, and 9998 sows, demonstrates the vaccine's almost absolute safety and its ability to stimulate an immune response post-vaccination.

**2. NOVELTY OF THESIS:**

The thesis's novelty lies in successfully creating the attenuated PRRSV strain, BG8-P95, from the virulent PRRSV strain, BG8, in Vietnam through 95 passages in MARC-145 cells.

It further contributes to the field through a comparative analysis of genetic changes in the attenuated PRRSV strain compared with the virulent strains worldwide, emphasizing mutations related to the GP5 membrane protein's crucial role in PRRSV's antigenicity and its ability to induce antibody-producing immune responses.

The research results provide a comprehensive understanding of the molecular biology and immunogenicity of PRRSV strains circulating in Vietnam. Additionally, the thesis offers valuable data on genetic changes related to immunogenicity in PRRSV strains during the attenuation process by serial passages in cell lines, serving as a reference for developing the next generation of PRRS vaccines.

In practical terms, the attenuated PRRSV strain, BG8-P95, with immunogenic properties meeting vaccine seed standards, can be employed to develop PRRSV vaccines in Vietnam, replacing imported foreign vaccines.

**3**. **APPLICATIONS/ APPLICABILITY/ PERSPECTIVE:**

The research results form the foundation for using the attenuated PRRSV strain BG8-P95 as the seed strain to produce PRRSV vaccines in Vietnam.

Carrying out multi-generation infection experiments on experimental pigs ensures the absence of reversion to virulence. Conducting directed point mutagenesis and proteomic research to determine mutative locations related to virulence serves as a basis for developing the next generation of PRRS vaccines. Continuing to collect PRRSV strains circulating in Vietnam compared to the PRRSV strain, BG8, contributes to evaluating the genetic variation of PRRSV, providing a basis for assessing the vaccine's protective efficacies.

|  |  |
| --- | --- |
| **SUPERVISOR**  **Prof.PhD. TRẦN LINH THƯỚC PhD. TRẦN XUÂN HẠNH** | **PhD STUDENT**  **BÙI ANH THY** |

**CERTIFICATION**

**UNIVERSITY OF SCIENCE**

**PRESIDENT**