

NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM VÙNG GEN MÃ HÓA PROTEIN CỦA CHỦNG PORCINE PARVOVIRUS GÂY BỆNH KHÔ THAI Ở LỢN NUÔI TẠI VIỆT NAM

*Nguyễn Văn Giáp¹, Huỳnh Thị Mỹ Lệ¹, Đặng Hữu Anh¹,
Nguyễn Thành Trung¹, Vũ Thị Ngọc¹, Cao Thị Bích Phương¹, Lê Huỳnh Thanh Phương^{2*}*
**Tác giả liên hệ email: lhtphuong@vnua.edu.vn*

TÓM TẮT

Bệnh khô thai do porcine parvovirus (PPV) gây ra là một trong những bệnh rối loạn sinh sản ở lợn luôn được người chăn nuôi quan tâm. Mặc dù bệnh này đã xuất hiện ở Việt Nam từ lâu, nhưng cho tới nay có tương đối ít nghiên cứu về bệnh và lưu hành của virus này. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm góp phần làm rõ đặc điểm sinh học phân tử cơ bản của chủng virus phân lập PPV.DN.001. Trong 4.752 nucleotide được giải mã, chủng PPV.DN.001 mang đặc điểm của nhóm parvovirus; có khả năng tái bản độc lập với tỷ lệ %GC là 37,2%; không có vùng giàu CpG. Chủng virus mã hóa 4 protein phi cấu trúc và 2 protein cấu trúc với cách sắp xếp mang đặc điểm của virus thuộc giống protoparvovirus. Capsid protein VP1 của chủng PPV.DN.001 mang đầy đủ các vùng chức năng điển hình của PPV. Trong 6 nhóm di truyền của PPV, chủng PPV.DN.001 thuộc nhóm C và sai khác với chủng PPV nhược độc (NADL2) ở 7 vị trí trên capsid protein.

Từ khóa: virus gây bệnh khô thai, lợn, sinh học phân tử, đặc điểm trình tự gen.

Study on some characteristics of the protein coding gene region of porcine parvovirus causing fetal mummification in pigs in Viet Nam

*Nguyen Van Giap, Huynh Thi My Le, Dang Huu Anh,
Nguyen Thanh Trung, Vu Thi Ngoc, Cao Thi Bich Phuong, Le Huynh Thanh Phuong*

SUMMARY

Fetal mummification associated with porcine parvovirus (PPV) infection is one of the reproductive disorders in pigs that is always of interest to the pig farmers. Although, this disease has appeared in Viet Nam for a long time, to date there have been relatively few studies on the disease and circulation of this virus. This study was conducted to contribute to clarifying the basic molecular biology of the isolated virus strain PPV.DN.001. Of the 4,752 decoded nucleotides, strain PPV.DN.001 carried characteristics of the parvovirus group, had capability of independent replication with a %GC rate of 37.2%, and did not have a CpG-rich region. The virus encoding 4 non-structural proteins and 2 structural proteins, with typical arrangement carried the characteristics of viruses belonging to the protoparvovirus genus. The VP1 capsid protein of PPV.DN.001 carried all the typical functional domains of PPV. Among 6 genetic groups of PPV, strain PPV.DN.001 belonged to group C and differed with the attenuated PPV strain (NADL2) at 7 positions on the capsid protein.

Keywords: Porcine parvovirus, pig, molecular biology, genetic characterization.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Từ cuối thập niên 1960, Porcine parvovirus

(PPV) đã được xác định là căn nguyên gây ra hội chứng SMEDI (đẻ non, thai gổ, tiêu phôi và mất khả năng sinh sản) (Meszaros và cs., 2017). Với tiến bộ về kỹ thuật giải trình tự gen, đã xác định

¹ Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

² Ban Khoa học công nghệ, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

có nhiều loại parvovirus mới (không thuộc giống protoparvovirus), ký hiệu từ PPV2 đến PPV7. Ở Việt Nam, đến thời điểm hiện tại, bên cạnh một số loại parvovirus mới được phát hiện (ví dụ PPV2, PPV3 và PPV4) (Thuy và cs., 2021; Nguyen và cs., 2022), PPV vẫn đã và đang là mầm bệnh liên quan đến tình trạng rối loạn sinh sản ở lợn nái và hiện diện ở nhiều địa phương trong cả nước (Phạm Hùng, 1999; Nguyễn Văn Giáp và cs., 2020; Tran và cs., 2021; Nguyễn Ngọc Hải và Nguyễn Thị Thùy Trang, 2022; Trịnh Thị Thu Hằng và cs., 2023). Mặc dù vậy, hiện còn tương đối ít nghiên cứu giải mã và phân tích đặc điểm di truyền của PPV. Vì vậy, nghiên cứu này nhằm làm rõ một số đặc điểm sinh học phân tử chính của chủng PPV phân lập từ lợn mắc bệnh khô thai. Kết quả thu được không chỉ nhằm cập nhật thông tin về PPV tại Việt Nam, mà còn hướng tới ứng dụng trong chẩn đoán và sản xuất vaccin phòng bệnh.

II. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Trình tự gen gồm 4.752 nucleotide của chủng virus gây bệnh khô thai PPV.DN.001 được đăng ký trên GenBank với mã số truy cập PP316166.

Các trình tự gen mã hóa protein VP2 tham chiếu đã biết phân nhóm di truyền được lựa chọn theo nghiên cứu đã công bố (Deng và cs., 2024).

Sinh phẩm, hóa chất cho phản ứng PCR: kit tách ADN/ARN (Patho Gene-spin DNA/RNA Extraction Kit, 17154, iNtRON), kit PCR (Platinum Direct PCR Universal Master Mix, A44647500, Thermo Fisher Scientific).

Các cặp mồi nhân vùng gen mã hóa protein của PPV được chọn theo nghiên cứu trước đây (Oh và cs., 2017).

Bộ kit giải trình tự gen bằng công nghệ Nanopore DNA sequencing: Flongle Flow Cell (R10.4.1), Rapid Barcoding kit 24 V14 (SQK-RBK114.24).

2.2. Nội dung nghiên cứu

Phân tích đặc điểm về thành phần và cấu trúc vùng gen mã hóa protein

Phân tích đặc điểm các vùng chức năng của capsid protein.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Nhân bản vùng gen mã hóa protein

Tách ADN tổng số từ huyền dịch virus của chủng PPV.DN.001 bằng kit tách ADN/ARN, theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Nhân bản vùng gen mã hóa protein của chủng PPV.DN.001 sử dụng 7 cặp mồi đặc hiệu (Oh và cs., 2017) với thành phần và chu trình nhiệt theo khuyến cáo của kit PCR. Chú ý ở tất cả các phản ứng, bổ sung Platinum GC Enhancer với nồng độ cuối cùng 1X.

2.3.2. Giải trình tự gen

Tinh sạch sản phẩm PCR bằng AMPure XP beads (tỷ lệ 1:1)

Chuẩn bị thư viện giải trình tự theo hướng dẫn của bộ kit giải trình tự

Lắp ráp trình tự thu được bằng phần mềm tin sinh học theo quy trình đã công bố (Brancaccio và cs., 2021), sử dụng các trình tự tham chiếu: MZ577027, MZ677266, MZ706996, OR046035, OR046036, MZ577026.

2.3.3. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học phân tử của virus

Tính toán thành phần nucleotide A-T-G-C, %GC và các vị trí CpG bằng công cụ MethPrimer (Li và Dahiya, 2002).

Các vùng chức năng (trình tự riêng có của VP1_VP1up, motif phospholipase A2, epitop kháng nguyên, trình tự vận chuyển protein hướng nhân) của PPV được xác định theo những công bố trước đây (Kamstrup và cs., 1998; Zadori và cs., 2001; Xie và cs., 2010; Sun và cs., 2015;

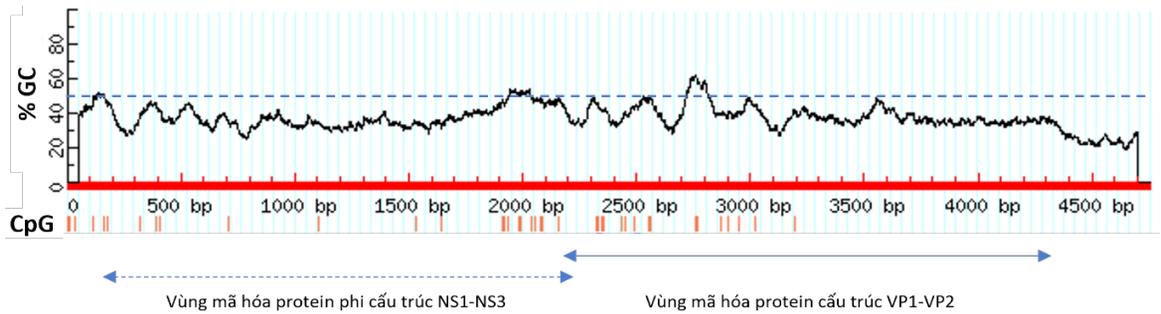
Meszaros và cs., 2017; Liu và cs., 2020; Streck và cs., 2022).

Phần mềm Fasttree (Price và cs., 2010) dùng xây dựng cây phát sinh chủng loại dựa vào trình tự amino acid của capsid protein VP2 hoàn chỉnh, tham khảo từ nghiên cứu trước đây (Deng và cs., 2024). Hiện thị cây phát sinh chủng loại bằng phần mềm FigTree v.1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc điểm trình tự gen của chủng PPV.DN.001

Về thành phần nucleotide (nu) trong 4.752 nu được giải mã, số lượng 4 loại nu xác định được gồm: 1.918 A (~40%), 1.067 T (~23%), 804 G (~17%) và 963 C (~20%). Chủng PPV.DN.001 có tỷ lệ %GC là 37,2% và phù hợp với đặc điểm của nhóm các parvovirus có khả năng tái bản độc lập, thường có %GC < 50% (Toth và cs., 2013).



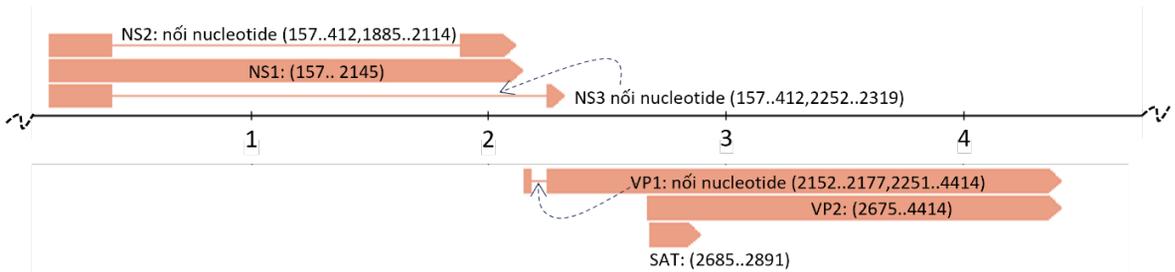
Hình 1. Thành phần nucleotide GC và CpG của chủng PPV.DN.001

Ghi chú: đường nét đứt biểu thị giới hạn 50% thành phần GC, đường kẻ dọc màu cam biểu thị các vị trí CpG trên vùng gen được giải mã

Về sự phân bố các vị trí CpG (đường kẻ dọc màu cam, hình 1), chủng PPV.DN.001 có 41 vị trí CpG, trong đó 38 vị trí thuộc vùng mã hóa protein. Dọc chiều dài bộ gen của chủng PPV.DN.001, không có vùng giàu CpG nào được xác định bằng phần mềm chuyên dụng. Đặc điểm đó là chung của parvovirus nhóm I, bao gồm PPV (Toth và cs., 2013).

Về cấu trúc, vùng gen mã hóa protein của chủng PPV.DN.001 bắt đầu từ nu thứ 157 đến 4.414. Hình

2 cho biết chủng PPV.DN.001 mã hóa 6 protein (Zadori và cs., 2005; Chen và cs., 2021): phía trái của bộ gen mã hóa protein phi cấu trúc NS1 (1.989 nu), NS2 (486 nu) và NS3 (306 nu); phía phải mã hóa 2 protein cấu trúc VP1 (2.190 nu), VP2 (1.740 nu) và 1 protein phi cấu trúc SAT (207 nu). Riêng đối với gen mã hóa protein NS3, chủng PPV.DN.001 có kích thước ngắn hơn 18 nu so với một số chủng PPV khác, ví dụ: EU790641, U44978.

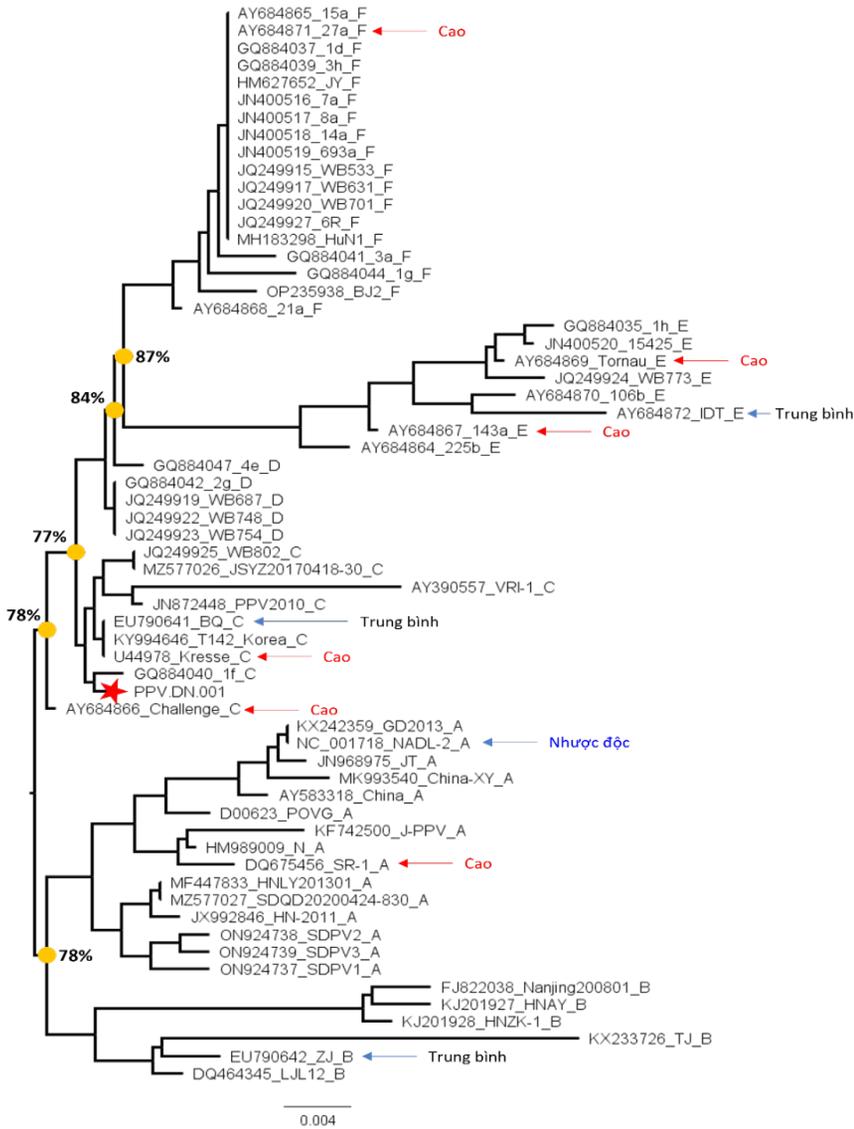


Hình 2. Sơ đồ cấu trúc vùng gen mã hóa protein của chủng PPV.DN.001

Về cách sắp xếp gen, chủng PPV.DN.001 mang đặc điểm của virus thuộc giống protoparvovirus (Cotmore và cs., 2019; Chen và cs., 2021) với các gen lồng nhau và 3 gen mã hóa protein NS2, NS3 và VP1 là sản phẩm của cơ chế cắt-nối chọn lọc (alternative splicing).

3.2. Mối liên hệ trình tự gen chủng PPV.DN.001 với các chủng tham chiếu

Mối liên hệ về mặt di truyền giữa chủng PPV.DN.001 với các chủng PPV trên thế giới được trình bày ở hình 3.



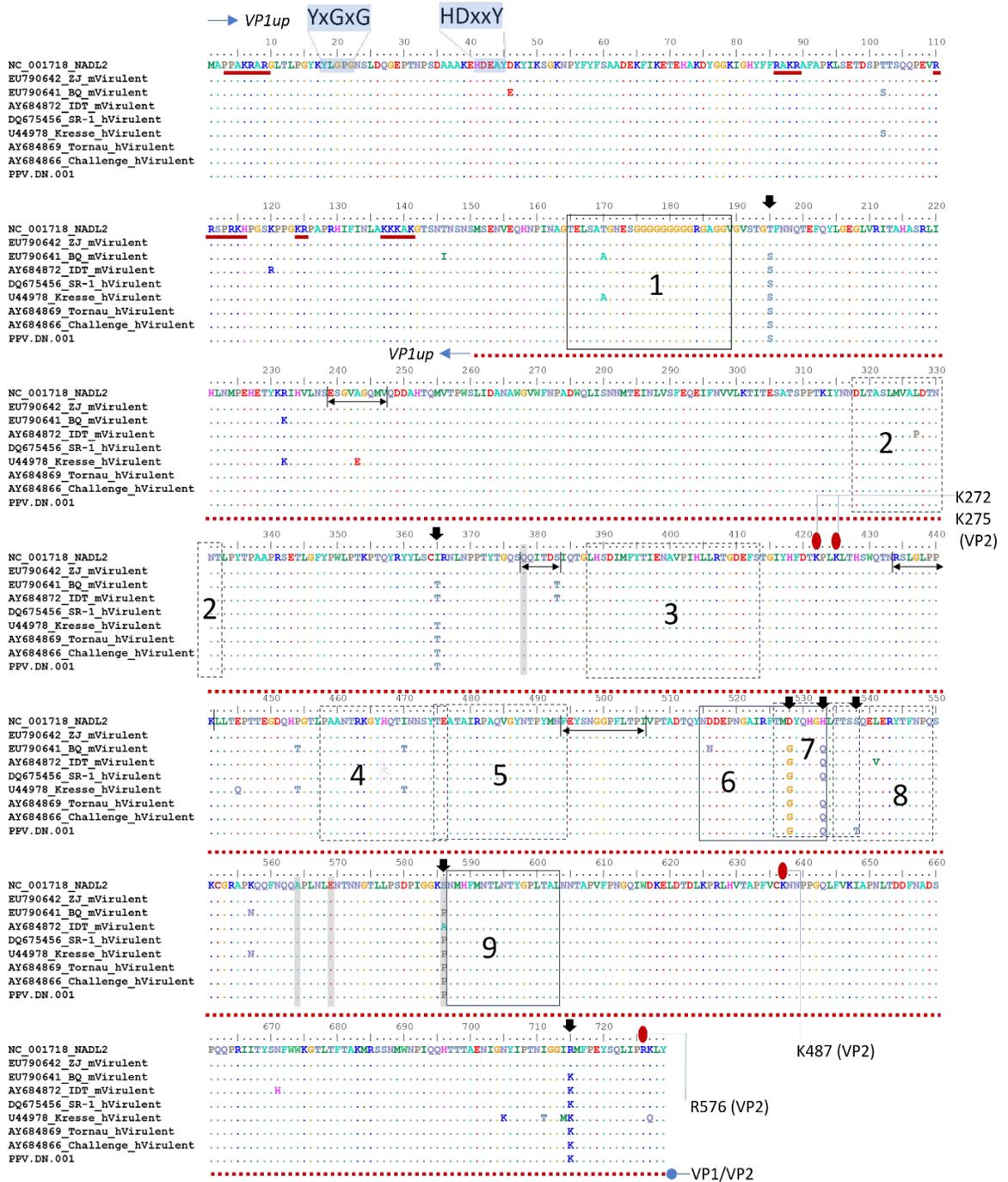
Hình 3. Cây phát sinh chủng loại dựa vào trình tự amino acid protein VP2

Ghi chú: chủng PPV.DN.001 được đánh dấu ngôi sao. Trình tự tham chiếu được đặt theo quy tắc GenBank_tên chủng_nhóm di truyền (A-F). Giá trị % biểu thị mức tin cậy được hiển thị cho 6 nhóm di truyền. Chủng đã biết độc lực (trung bình, cao và nhược độc) được chú thích.

Hình 3 cho biết PPV bao gồm 6 nhóm di truyền (A-F) và phù hợp với đặc điểm phân nhánh được công bố (Deng và cs., 2024), trong đó chủng PPV.DN.001 được xếp vào nhóm C. Về đặc điểm phân bố, có thể thấy các chủng độc

lực cao đã biết nằm phân tán ở nhiều nhóm di truyền. Trong một nhóm, cũng có thể bao gồm chủng có độc lực cao và trung bình (ví dụ nhóm C). Do đó, dựa vào đặc điểm phân nhánh không thể dự đoán độc lực chủng PPV.DN.001.

3.3. Trình tự amino acid các vùng chức năng trên protein VP1 của chủng PPV.DN.001



Hình 4. Sơ đồ vị trí và trình tự amino acid các vùng chức năng thuộc protein VP1
 Ghi chú: từ vị trí 1- 150 là trình tự riêng của VP1, vùng dấu chấm màu đỏ là trình tự chung của VP1 và VP2 (VP1/VP2). Đánh dấu màu xám là trình tự đặc trưng motif phospholipase A2, với x biểu thị amino acid bất kỳ. Gạch chân màu đỏ và hình bầu dục đỏ là các trình tự vận chuyển protein vào nhân tế bào. Vùng quyết định kháng nguyên được ký hiệu 1-9 và giới hạn bởi mũi tên 2 đầu.

Là một ADN virus, PPV nhân lên ở trong nhân tế bào, do đó việc đưa được vào nhân tế bào bộ gen cũng như enzyme sao chép của virus là vô cùng cần thiết. Vùng trình tự riêng của protein VP1 (VP1up) có 5 chuỗi amino acid kiềm tính dạng thẳng (gạch chân màu đỏ, hình 4) là các trình tự vận chuyển protein virus vào nhân tế bào (nuclear localization signal, NLS). Ngoài ra, trong quá trình hình thành cấu trúc không gian, có 4 amino acid kiềm tính khác (K272, K275, K487 và R576) cũng hình thành trình tự hướng nhân (non-linear nuclear localization motif, NLM). Ngoài ra, ở vùng VP1up còn có amino acid hình thành cấu trúc vòng bám Ca^{2+} (YxGxG) và mang motif đặc trưng HDxxY của phospholipase A2 (PLA2). Trong đó trình tự mang hoạt tính của PLA2 đóng vai trò không thể thiếu trong quá trình xâm nhiễm của virus (Zadori và cs., 2001; Meszaros và cs., 2017). Hai vùng chức năng kể trên (vận chuyển hướng nhân, hoạt tính phospholipase) đều thấy ở capsid protein VP1 của chủng PPV.DN.001. Kết quả so sánh với một số chủng PPV tham chiếu cho thấy trình tự amino acid ở các vùng đó là bảo thủ (hình 4).

Capsid protein của virus được xác định đóng vai trò quan trọng trong kích thích tạo kháng thể trung hòa và đáp ứng miễn dịch bảo hộ. Trên protein này, đã xác định được 9 chuỗi peptid dạng thẳng (1-9, hình 4) đóng vai trò epitope kháng nguyên, trong đó các peptide 1, 6 và 9 có khả năng kích thích tạo kháng thể trung hòa (Kamstrup và cs., 1998). Những công bố gần đây còn xác định thêm 1 epitop mạch thẳng ESGVAGQMV (Liu và cs., 2020) và 3 epitope mạch thẳng tương tác với tế bào lympho B (linear B cell epitope): QQITDA, RSLGLPPK và FEYSNGGPFLTPI (Sun và cs., 2015) (giới hạn bởi mũi tên 2 đầu, hình 4). Ngoài trừ vùng kháng nguyên 6, 7 (hình 4), các vùng quyết định kháng nguyên khác đều có ít thay đổi. Gần đây, có 4 vị trí amino acid (vị trí tương đối ở protein VP1/VP2: 378/228, 564/414, 569/419 và 586/436) được chứng minh ảnh hưởng tới khả năng trung hòa của kháng thể (Streck và cs., 2022). Trong số đó, chỉ có vị trí 586/436 nằm sát vùng kháng nguyên số 9 và đa dạng kiểu amino acid (S, P, A). So với chủng nhược độc NADL2, chủng PPV.DN.001 sai khác ở

7 vị trí (mũi tên dày, hình 4), trong đó 3 vị trí thuộc vùng quyết định kháng nguyên 6-7-8 và 1 vị trí có ảnh hưởng đến tính kháng nguyên (vị trí 586/436). Tựu chung lại, kết quả phân tích ở hình 4 cho thấy chủng PPV.DN.001 mang đầy đủ các vùng chức năng đã biết của PPV và sai khác đáng kể so với chủng nhược độc NADL2.

IV. KẾT LUẬN

Kết quả giải mã và phân tích vùng gen mã hóa protein cho thấy chủng PPV.DN.001 gồm 4.752 nucleotide, thuộc nhóm di truyền C, mang đặc điểm điển hình của PPV về thành phần nucleotide, cấu trúc 6 gen mã hóa protein và các vùng chức năng của capsid protein.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được thực hiện bởi kinh phí của đề tài khoa học và công nghệ Nhà nước “ Khai thác và phát triển nguồn gen một số chủng virus gây bệnh (porcine parvovirus - PPV, porcine pseudorabies virus - PRV, goatpox virus - GTPV) phục vụ chẩn đoán và sản xuất vắc-xin phòng chống bệnh ”, mã số ĐT.02/2020-HĐ-NVQG.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Boisvert M., Bouchard-Levesque, V., Fernandes, S. và Tijssen, P., 2014. Classic nuclear localization signals and a novel nuclear localization motif are required for nuclear transport of porcine parvovirus capsid proteins. *J Virol*, 88(20): 11748-59.
2. Brancaccio R. N., Robitaille, A., Dutta, S., Rollison, D. E., Tommasino, M. và Gheit, T., 2021. MinION nanopore sequencing and assembly of a complete human papillomavirus genome, *J Virol Methods*, 294: 114180.
3. Chen S., Miao, B., Chen, N., Chen, C., Shao, T., Zhang, X., Chang, L., Zhang, X., Du, Q., Huang, Y. và Tong, D., 2021. SYNCRIP facilitates porcine parvovirus viral DNA replication through the alternative splicing of NS1 mRNA to promote NS2 mRNA formation. *Vet Res*, 52(1): 73.
4. Cotmore S. F., Agbandje-Mckenna, M., Canuti, M., Chiorini, J.A., Eis-Hubinger, A. M., Hughes, J., Mietzsch, M., Modha, S., Ogliastro, M., Penzes, J. J., Pintel, D. J., Qiu, J., Soderlund-Venermo, M., Tattersall, P., Tijssen, P. và Ictv Report, C., 2019. ICTV Virus Taxonomy Profile: Parvoviridae. *J Gen Virol*, 100(3): 367-368.

5. Deng H., Cong, G., Wang, H., Hu, Z., Shi, D., Shi, H., Xia, C., Fu, F. và Feng, L., 2024. Isolation, characterization, and phylogenetic analysis of two new porcine parvovirus 1 isolates from Northern China. *Virus Res*, 339: 199247.
6. Kamstrup S., Langeveld, J., Botner, A., Nielsen, J., Schaaper, W. M., Boshuizen, R. S., Casal, J. I., Hojrup, P., Vela, C., Meloen, R. và Dalsgaard, K., 1998. Mapping the antigenic structure of porcine parvovirus at the level of peptides. *Virus Res*, 53(2): 163-73.
7. Li L. C. và Dahiya, R., 2002. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*, 18(11): 1427-31.
8. Liu Y., Wang, J., Chen, Y., Wang, A., Wei, Q., Yang, S., Feng, H., Chai, S., Liu, D. và Zhang, G., 2020. Identification of a dominant linear epitope on the VP2 capsid protein of porcine parvovirus and characterization of two monoclonal antibodies with neutralizing abilities. *Int J Biol Macromol*, 163: 2013-2022.
9. Meszaros I., Olasz, F., Csagola, A., Tijssen, P. và Zadori, Z., 2017. Biology of Porcine Parvovirus (Ungulate parvovirus 1). *Viruses*, 9(12).
10. Nguyễn Ngọc Hải và Nguyễn Thị Thùy Trang, 2022. PCV3 và sự đồng nhiễm với PCV2, PRRSV và PPV (porcine parvovirus) trên thai heo sây. *Khoa học kỹ thuật Thú y*, 29(3): 13-19.
11. Nguyễn Văn Giáp, Mai Thị Ngân, Lê Văn Trường, Vũ Thị Ngọc, Võ Văn Hiểu, Tạ Thị Kim Chung, Vũ Đức Hạnh và Huỳnh Thị Mỹ Lệ, 2020. Sự hiện diện của porcine parvovirus 1 (PPV1) ở lợn nuôi tại Hà Nội và vùng phụ cận. *Khoa học nông nghiệp Việt Nam*, 18(7): 495-503.
12. Nguyen V. G., Dang, H. A., Nguyen, T. T., Huynh, T. M. L., Nguyen, B. H., Pham, L. a. M. và Le, H. T. P., 2022. Polymerase chain reaction-based detection of coinfecting DNA viruses in Vietnamese pigs in 2017 and 2021. *Vet World*, 15(10): 2491-2498.
13. Oh W. T., Kim, R. Y., Nguyen, V. G., Chung, H. C. và Park, B. K., 2017. Perspectives on the evolution of porcine parvovirus. *Viruses*, 9(8).
14. Phạm Hùng, 1999. *Vai trò của porcine parvovirus trong hội chứng rối loạn sinh sản của lợn ở một số tỉnh miền Trung, nghiên cứu chế vaccin phòng bệnh*. Luận án tiến sĩ Nông nghiệp: 1-147.
15. Price M. N., Dehal, P. S. và Arkin, A. P., 2010. FastTree 2 – approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLOS ONE*, 5(3): e9490.
16. Ranz A. I., Manclus, J. J., Diaz-Aroca, E. và Casal, J. I., 1989. Porcine parvovirus: DNA sequence and genome organization. *J Gen Virol*, 70 (Pt 10)(10): 2541-53.
17. Sedlik C., Sarraseca, J., Rueda, P., Leclerc, C. và Casal, I., 1995. Immunogenicity of poliovirus B and T cell epitopes presented by hybrid porcine parvovirus particles. *J Gen Virol*, 76 (Pt 9)(9): 2361-8.
18. Streck A. F., Canal, C. W. và Truyen, U., 2022. Viral fitness and antigenic determinants of porcine parvovirus at the amino acid level of the capsid protein. *J Virol*, 96(2): e0119821.
19. Sun J., Huang, L., Wei, Y., Wang, Y., Chen, D., Du, W., Wu, H., Feng, L. và Liu, C., 2015. Identification of three PPV1 VP2 protein-specific B cell linear epitopes using monoclonal antibodies against baculovirus-expressed recombinant VP2 protein. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99(21): 9025-36.
20. Thuy N. T. D., Trung, N. T., Dung, T. Q., Khoa, D. V. A., Thuy, D. T. N. và Opriessnig, T., 2021. First investigation of the prevalence of parvoviruses in slaughterhouse pigs and genomic characterization of ungulate copiparvovirus 2 in Vietnam. *Arch Virol*, 166(3): 779-788.
21. Toth R., Meszaros, I., Stefancsik, R., Bartha, D., Balint, A. và Zadori, Z., 2013. CpG distribution and methylation pattern in porcine parvovirus. *PLoS One*, 8(12): e85986.
22. Tran K. T., Nguyen, T. T. T., Vu, L. X. và Dinh, X. P., 2021. Identification of porcine circovirus type 2 (PCV2), type 3 (PCV3) and porcine parvovirus (PPV) in swine by multiplex PCR test. *The Journal of Agriculture and Development*, 20(3): 11-17.
23. Trịnh Thị Thu Hằng, Vũ Khắc Hùng, Đỗ Văn Tấn và Đỗ Văn Khiên, 2023. Phân lập, định type và phân tích gen VP2 của các chủng parvovirus. *Khoa học kỹ thuật Thú y*, 30(5): 37-46.
24. Xie H. L., Wang, Z., Cui, S. J., Zhang, C. F. và Cui, Y. D., 2010. The epitope of the VP1 protein of porcine parvovirus. *Virol J*, 7(1): 161.
25. Zadori Z., Szelei, J., Lacoste, M. C., Li, Y., Garipey, S., Raymond, P., Allaire, M., Nabi, I. R. và Tijssen, P., 2001. A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity. *Dev Cell*, 1(2): 291-302.
26. Zadori Z., Szelei, J. và Tijssen, P., 2005. SAT: a late NS protein of porcine parvovirus. *J Virol*, 79(20): 13129-38.

Ngày nhận: 16-2-2024

Ngày phản biện: 17-2-2024

Ngày đăng: 1-7-2024