

CHẨN ĐOÁN HỘI CHỨNG RỐI LOẠN HÔ HẤP VÀ SINH SẢN (PRRS) Ở LỢN CON CAI SỮA BẰNG KỸ THUẬT BỆNH LÝ VÀ KỸ THUẬT RT - PCR

Diagnosis of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) in Weaned Pigs by RT - PCR and Pathological Methods

Nguyễn Thị Lan, Nguyễn Thị Hoa

Khoa thú y, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

Địa chỉ tác giả liên hệ: lanjp2000@yahoo.com

Ngày gửi bài: 6.03.2012

Ngày chấp nhận: 17.04.2012

TÓM TẮT

Hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản (PRRS) gây thiệt hại lớn cho người chăn nuôi lợn. Đặc biệt lợn con sau cai sữa có tỷ lệ mắc bệnh cao vì đây là lứa tuổi lợn dễ mắc cảm, sức đề kháng yếu. Nghiên cứu này được tiến hành trên đàn lợn sau cai sữa từ 3-6 tuần tuổi. Các lợn sau cai sữa bị mắc PRRS có biểu hiện bỏ ăn, chán ăn, sốt cao, da mẩn đỏ, khó thở. Phổi lợn bệnh có hiện tượng sung huyết, xuất huyết, viêm phổi. Hạch lâm ba sưng to, tụ máu. Thận có xuất huyết lấm tẩm. Xoang bao tim tích nước. Các tổn thương vi thể bao gồm thâm nhiễm tế bào viêm, phế quản phế viêm hoặc viêm phổi thùy, xuất huyết cầu thận, bể thận. Kết quả phản ứng RT-PCR đã cho thấy các lợn có biểu hiện triệu chứng lâm sàng, bệnh tích như trên đều mắc PRRS.

Từ khóa: PRRS, lợn con cai sữa, RT-PCR.

SUMMARY

PRRS causes severe economic loss for the farmers. Post weaning piglets are highly infected with PRRS because of high sensitivity and low immunity with PRRS. The present research was carried out in post weaning piglets at age from 3 weeks to 6 weeks. The piglets showed depression, anorexia, fever, red skin, dyspnea. The piglets also showed congested and hemorrhage lung and pneumonia, and enlarged lymph nodes, hemorrhage kidney. The microscopic lesions consisted of inflammatory infiltration in lung, pneumonia or bronchopneumonia, hemorrhage in pelvis of kidney. The piglets with the above clinical signs and pathological findings were diagnosed to be infected with PRRS by RT-PCR.

Keywords: PRRS, weaned pigs, RT-PCR

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome - PRRS) là dịch bệnh truyền nhiễm nguy hiểm của loài lợn, gây thiệt hại kinh tế lớn cho ngành chăn nuôi lợn. PRRS lần đầu tiên được phát hiện ở Mỹ năm 1987 (Keffaber, 1989). Virus PRRS lần đầu tiên được phân lập từ một ổ dịch ở Hà Lan, được xác định là nguyên nhân chính gây ra hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn. Virus thuộc nhóm Arterivirus, thuộc họ Arteriviridae, bộ

Nidovirales, có cấu trúc hệ gen là RNA sợi đơn dương, gồm 7 khung đọc mở khác nhau mã hóa cho các protein của virus (Cavanaugh, 1997).

PRRS đặc biệt nguy hiểm ở lợn con sau cai sữa vì đây là một trong những nhóm lợn mắc cảm nhất với virus PRRS. Lợn con sau cai sữa thường có biểu hiện sốt, da mẩn đỏ, mệt mỏi, bỏ ăn, có biểu hiện khó thở (Chung và cs, 1997; Done và cs., 1996).

PRRS mới xuất hiện ở Việt Nam từ vài năm trở lại đây nhưng đã gây ra những thiệt hại vô cùng to lớn cho ngành chăn nuôi lợn

nói chung và khó khăn trong việc chẩn đoán phát hiện dịch bệnh PRRS nói riêng. Lợn mắc PRRS thường kể phát cùng nhiều bệnh nguy hiểm khác từ vi khuẩn cùng như virus gây bệnh khác làm cho công tác chẩn đoán gặp nhiều khó khăn.

Thế kỷ XXI là thế kỷ của công nghệ sinh học cùng với sự phát triển mạnh mẽ của kỹ thuật sinh học phân tử đã mở ra những triển vọng nghiên cứu vô cùng to lớn. Áp dụng kỹ thuật sinh học phân tử đặc biệt là kỹ thuật RT-PCR cho phép chẩn đoán nhanh, chính xác các bệnh do virus gây ra một cách đặc hiệu trong đó có hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản đồng thời góp phần xây dựng chiến lược kiểm soát dịch bệnh trên đàn lợn ở Việt Nam. Nghiên cứu này đã cho thấy các kết quả nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật RT-PCR để chẩn đoán PRRS ở lợn con cai sữa.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Nghiên cứu này được tiến hành trên các đàn lợn con cai sữa 3-6 tuần tuổi nghi mắc PRRS trên địa bàn một số tỉnh như Hưng Yên, Bắc Ninh, Hà Nội. Các lợn nghi mắc bệnh được quan sát, theo dõi tiểu sử, triệu chứng lâm sàng, và mổ khám thu thập các cơ quan bệnh phẩm của lợn như phổi, lách, hạch lâm ba, ruột.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- *Phương pháp quan sát các biến đổi bệnh lý:* Trực tiếp quan sát các triệu chứng lâm

sàng, mổ khám, quan sát các biến đổi bệnh lý đại thể của các lợn sau cai sữa. Tiêu bản vi thể được tiến hành theo phương pháp tẩm đục paraffin thường quy của phòng thí nghiệm Bộ môn Bệnh lý Thú y, Khoa Thú y, trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội. Mẫu bệnh phẩm của lợn như phổi, lách, hạch lâm ba, ruột được cố định trong formol trung tính 10%. Sau đó, được tẩm đục paraffin, cắt tiêu bản bằng máy cắt microtom và nhuộm tiêu bản bằng phương pháp Hematoxylin-Eosin (HE).

- *Phương pháp RT-PCR:* bao gồm các bước tách chiết RNA của virus và các bước thực hiện kỹ thuật RT-PCR. RNA của virus được tách chiết bằng kit QIAamp để tiến hành phản ứng RT-PCR. Quy trình tách chiết RNA của virus theo hướng dẫn của nhà sản xuất Kit. 5 ul RNA được tách chiết từ mẫu bệnh phẩm của lợn nghi mắc PRRS được trộn với 20 ul hỗn hợp RT-PCR của bộ kit One step RT-PCR kit (invitrogen). Cặp mồi được sử dụng cho phản ứng RT-PCR gồm mồi xuôi 5'-CAGCCAGTCAATCAGCTGTG - 3' và mồi ngược 5'-TCGCCCTAATTGAATAGGTG - 3' nhằm khuếch đại đoạn gen ORF7 dài 392 bp. Tiến hành phản ứng khuếch đại sản phẩm trong máy PCR với 35 chu kỳ. Điện di kiểm tra kết quả RT-PCR ở hiệu điện thế 100V trong 30 phút. Quan sát kết quả điện di sản phẩm RT-PCR trên máy chụp ảnh gel và chụp ảnh.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Triệu chứng lâm sàng chủ yếu của lợn con mắc PRRS

Bảng 1. Triệu chứng lâm sàng chủ yếu của lợn con mắc PRRS

STT	Kí hiệu	Triệu chứng lâm sàng								
		Sốt	Chán ăn, bỏ ăn	Phát ban	Mí mắt sưng	Khó thở	Tím tai	Chảy nước mũi	Tiêu chảy	Táo bón
1	L1	+++	+++	+	++	++	+++	+	+++	++
2	L2	++	++	-	+	++	++	-	++	+
3	L3	+++	++	-	+	-	+	+	+++	++
4	L4	+++	+++	+	-	+	++	+	+++	++
5	L5	++	++	-	-	+	-	-	++	+

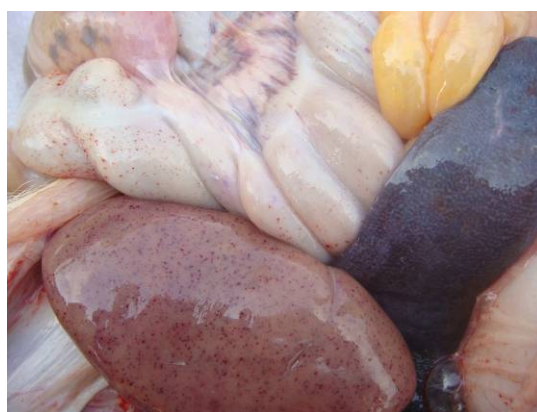
+++ Nặng; ++Trung bình ; + Nhẹ; - Không biểu hiện

Bảng 2. Biến đổi đại thể của lợn con cai sữa mắc PRRS

Kí hiệu	Cơ quan				
	Phổi	Hạch lâm ba	Thận	Ruột	Cơ quan khác
L1	Sung huyết Xuất huyết Dịch viêm trong lòng phế quản.	Sung huyết Mặt cắt lõi chảy dịch màu hồng	Xuất huyết điểm	Loét ở niêm mạc ruột già	Lách nhồi huyết, Gan hơi sưng
L2	Viêm màu đỏ xám Có điểm hoại tử	Sưng to, thâm tím	Tụ máu	Xuất huyết trên bề mặt niêm mạc	Xoang bao tim tích nước Não xuất huyết
L3	Xuất huyết, viêm màu đỏ xám, dịch phù trong lòng phế quản	Xuất huyết, sưng to màu đỏ mọng	Xuất huyết điểm lan tràn	Thành ruột mỏng, niêm mạc bong tróc	Lách nhồi huyết Cơ tim nhão
L4	phổi căng phồng, rìa tù nhiều ổ viêm rải rác trên bề mặt, xuất huyết phổi	Thủy thũng, sưng to	Xuất huyết điểm	Xuất huyết	Cơ tim nhão
L5	Viêm màu đỏ xám, mặt cắt khô hơi lõi	Sưng to	Không có bệnh tích	Niêm mạc thủy thũng, có vết loét	Không có bệnh tích



Hình 1. Phổi viêm, xuất huyết



Hình 2. Thận xuất huyết điểm

Bảng 3. Bệnh tích vi thể của lợn con cai sữa mắc PRRS

Lợn	Cơ quan							
	Phổi		HLB	Lách	Thận	Ruột		
	Xuất huyết	Viêm kẽ phổi	Phế quản phế viêm	Xuất huyết	Nhồi huyết	Hoại tử	Viêm cầu thận	Thâm nhiễm tế bào viêm
L1	+	-	+	+	-	+	-	+
L2	+	+	+	+	-	-	+	+
L3	+	+	-	+	+	+	+	+
L4	-	+	+	+	+	-	+	+
L5	-	+	+	+	+	+	-	+

Ghi chú: HLB: Hạch lâm ba

+ : Có bệnh tích

- : Không có bệnh tích

Quan sát lợn con cai sữa trong độ tuổi từ 3 - 6 tuần nghi mắc PRRS ở một số gia trại tại Hưng Yên, Hải Dương, Bắc Ninh cho thấy lợn con cai sữa mắc PRRS có các triệu chứng lâm sàng chủ yếu là sốt, chán ăn, bỏ ăn, tím tai, khó thở, tiêu chảy, táo bón trong đó hiện tượng sốt, chán ăn, bỏ ăn có mức độ nặng ở tất cả các lợn theo dõi, đây là các dấu hiệu bệnh lý thường gặp trong các bệnh truyền nhiễm và không có tính đặc trưng (Bảng 1). Hiện tượng tím tai, thở khó, tiêu chảy, táo bón có biểu hiện ở mức độ từ trung bình đến nặng, đây có thể được coi là những dấu hiệu đầu tiên cho phép chúng ta nghĩ đến lợn mắc PRRS. Các biểu hiện khác như chảy nước mũi, mí mắt sưng, phát ban, xuất hiện rải rác ở các lợn khác nhau và có mức độ nhẹ đến trung bình.

3.2. Biến đổi bệnh lý của lợn con cai sữa mắc PRRS

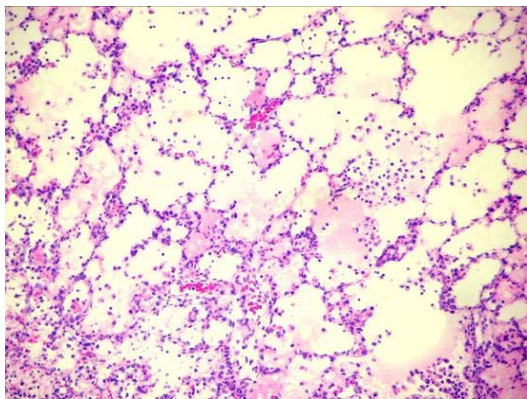
3.2.1. Biến đổi đại thể của lợn con cai sữa mắc PRRS

Bệnh tích đại thể của lợn mắc PRRS xuất hiện ở nhiều cơ quan khác nhau (Bảng 2). Trong đó, tất cả các trường hợp mổ khám đều có bệnh tích ở phổi. Phổi viêm với các mức độ khác nhau tùy thuộc vào từng lợn bệnh và mức độ tiến triển của bệnh cũng

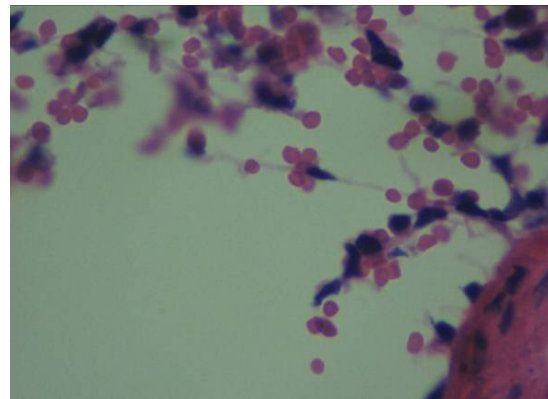
như sự kế phát các bệnh khác, viêm không mang tính chất đối xứng. Các thùy phổi bị viêm thường có màu đỏ xám, có trường hợp phổi bị nhục hóa, nhạt màu, xuất huyết trên bề mặt phổi. Phổi viêm và phù làm cho các thùy phổi cứng lại, mặt cắt hơi lồi (Hình 1). Các dấu hiệu này có thể được giải thích rằng lợn sau cai sữa nhu cầu trao đổi chất cao dẫn đến nhu cầu oxy tăng lên, trong khi đó virus PRRS lại xâm nhập và nhân lên trên các đại thực bào phổi dẫn đến phổi viêm và làm cho lợn càng khó thở hơn. Kết quả này là phù hợp với báo cáo của Phạm Ngọc Thạch, Đàm Văn Phải (2007).

Trong quá trình mổ khám quan sát bệnh tích đại thể, lợn con mắc PRRS thường thấy các hạch lâm ba tụ máu sưng to, tụ máu nhiều nhất là các hạch lâm ba vùng phổi. Quan sát các hạch này đều thấy hạch to hơn bình thường 3 - 5 lần, màu đỏ thẫm, có trường hợp xuất huyết, cắt đôi hạch có dịch màu hồng chảy ra.

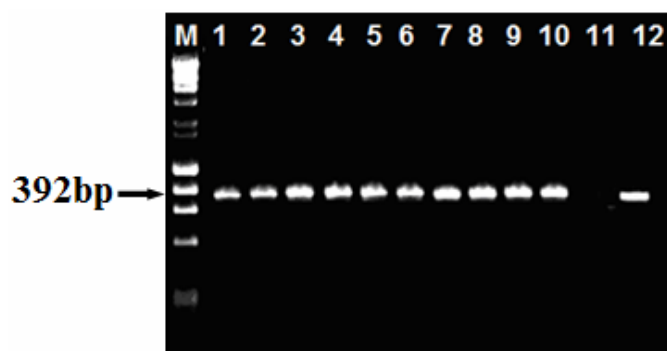
Thận xuất huyết điểm là bệnh tích hay gặp có nhiều điểm xuất huyết trên bề mặt thận và cả trong mô thận. Quan sát còn thấy hiện tượng tụ huyết ở thận, nhưng biến đổi này chỉ thấy xuất hiện trong một số ít trường hợp (Hình 2).



Hình 3. Dịch phù trong lòng phế nang



Hình 4. Lách xuất huyết



Hình 5. Kết quả phản ứng RT- PCR

[Virus PRRS được phát hiện bằng phản ứng RT- PCR với độ dài của gen là 392bp, thang chuẩn M 100bp; giếng từ 1-10 là mẫu từ 5 lợn bệnh theo thứ tự bảng 4; giếng 11 là đối chứng âm; giếng 12 là đối chứng dương]

Các bệnh tích đại thể khác thay đổi tùy thuộc vào diễn biến của bệnh cũng như sự kết phát các bệnh khác.

3.2.2. Bệnh tích vi thể của lợn con cai sữa mắc PRRS

Bệnh tích vi thể đáng chú ý nhất của cả 5 lợn được nghiên cứu ở trên là những biến đổi ở phổi. Phế nang chứa đầy dịch rỉ viêm và đại thực bào (ĐTĐB), quan sát thấy xuất hiện tế bào khổng lồ nhiều nhân. Các tiêu bản vi thể còn thấy một đặc trưng nữa là sự thâm nhiễm của tế bào phế nang loại II

(pneumocyte) làm cho vách phế nang nhăn lại, thường bắt gặp đại thực bào phân huỷ trong phế nang. Phổi xuất huyết rõ lòng phế quản và phế nang chứa đầy hồng cầu màu đỏ tươi. Nhiều tế bào phổi bị hoại tử và có huyết khối nhỏ trong lòng mạch quản do các thành phần máu tách ra và đông lại phế nang tràn ngập dịch phù (Hình 3).

Lách sung huyết, thoái hoá và hoại tử. Trên tiêu bản lách vách đứt nát, các tế bào thoái hoá xen kẽ với các tế bào lành, thâm nhiễm hồng cầu lan tràn trong nhu mô lách (Hình 4).

Bảng 4. Kết quả phản ứng RT- PCR xác định virus PRRS

Lợn	Loại bệnh phẩm	Kết quả RT- PCR
L1	Phổi	+
	Rử mắt	+
L2	Hạch phổi	+
	Phổi	+
L3	Phổi	+
	Nước mũi	+
L4	Thận	+
	Nước mũi	+
L5	Phổi	+
	Ruột	+
Đối chứng âm	Mẫu nước cát	-
Đối chứng dương	Mẫu RNA của PRRSV	+

Thận ngoài những biến đổi bệnh lý như thâm nhiễm tế bào viêm, tế bào thận bị thoái hoá, hoại tử thì còn có những biến đổi ở kẽ thận như xuất huyết, tập trung nhiều hồng cầu và các lymphocyte, monocyte...nếu quá trình viêm kéo dài thì tăng sinh nhiều fibroblast. Cầu thận viêm có chứa dịch rỉ viêm, tế bào ống thận teo nhỏ, lòng ống rộng, có trụ trong. Ở các vùng lành có hoạt động bù, mạch quản giãn rộng, phân nhiều nhánh.

3.3. Kết quả phản ứng RT- PCR

Từ các mẫu bệnh phẩm, RNA của virus được tách chiết bằng kit tách chiết QIAamp. Sản phẩm thu được sau khi tách chiết được khuếch đại bằng kỹ thuật RT-PCR với sự tham gia của enzym sao chép ngược (Reverse Transcrip) và sử dụng cặp mồi ORF7 có khả năng phát hiện virus PRRS thuộc cả chủng bắc Mỹ và chủng châu Âu (cặp mồi này cho phép xác định đoạn gen của virus PRRS có kích thước 392bp). Sản phẩm sau khi khuếch đại được điện di và chụp ảnh. Kết quả của phản ứng RT- PCR xác định PRRSV được trình bày ở bảng 4 và hình 5.

Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm cho thấy tất cả 10 mẫu được chọn làm thí nghiệm đều cho kết quả dương tính với PRRSV. Sản phẩm điện di cho vạch DNA tương ứng 392bp đúng theo thiết kế mồi. Các mẫu bệnh phẩm bao gồm: phổi, hạch phổi, nước mũi, rử mắt đều có thể sử dụng làm mẫu để chẩn đoán PRRSV.

4. KẾT LUẬN

Chẩn đoán bằng kỹ thuật bệnh lý cho thấy các triệu chứng lâm sàng chủ yếu của lợn sau cai sữa mắc PRRS bao gồm: sốt, bỏ ăn, khó thở, tím tai. Bệnh tích đại thể tập trung chủ yếu ở phổi và hạch lâm ba với hiện tượng viêm là phổ biến. Các biến đổi vi thể phổ biến ở phổi với hiện tượng thâm nhiễm tế bào viêm, các cơ quan khác như hạch, lách, thận cũng xuất hiện các tổn thương vi thể. Bằng kỹ thuật RT-PCR, đã xác định được chính xác được lợn sau cai sữa mắc PRRS.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Phạm Ngọc Thạch, Đàm Văn Phái (2007). “Một số chỉ tiêu lâm sàng, chỉ tiêu máu ở lợn mắc hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp (bệnh tai xanh) trên một số đàn lợn tại tỉnh Hải Dương và Hưng Yên”, Hội thảo Hội chứng rối loạn hô hấp - sinh sản và bệnh liên cầu khuẩn ở lợn, ngày 11/10/2007, ĐH Nông Nghiệp Hà Nội
- Cavanaugh, D. (1997). Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. Arch. Virol. 142:629-633).
- Chung, W. B., W. F. Chang, M. Hsu, and P. C. Yang. (1997). Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in intensive farrow-to-finish pig herds. Can. J. Vet. Res. 61:292-298.
- Done, S. H., D. J. Paton, and M. E. C. White. (1996). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): a review with emphasis on pathological, vi-rological and diagnostic aspects. Br. Vet. J. 152:153-174.
- Keffaber, K. (1989). Reproductive failure of unknown aetiology. Am. Assoc. Swine Pract. Newsl. 1:1-10.