

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT HÓA MÔ MIỄN DỊCH ĐỂ CHẨN ĐOÁN CIRCOVIRUS TRÊN LỢN Ở VÙNG PHỤ CẬN HÀ NỘI

*Nguyễn Thị Lan, Lương Quốc Hưng, Bùi Trần Anh Đào,
Nguyễn Bá Hiên, Nguyễn Hữu Nam*

Khoa thú y - Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

TÓM TẮT

Nghiên cứu đã làm rõ thêm một số đặc điểm bệnh lý của lợn sau cai sữa bị mắc Circovirus type 2 (PCV2). Các triệu chứng đặc trưng của lợn sau cai sữa mắc PCV2 là: lợn còi cọc, gầy gò, lông thô và dài, da xanh xao, rối loạn hô hấp, tiêu chảy. Bệnh tích đại thể tập trung chủ yếu ở hạch bạch huyết, hạch bẹn nông thường sưng to nổi rõ nhất. Các bệnh tích khác bao gồm: Phổi căng phồng, đặc chắc, có lõm đốm nâu; ruột viêm hoại tử fibrin, điểm hoại tử trắng ở trên bề mặt vỏ thận; gan sưng và bề mặt gồ ghề. Bệnh tích vi thể chủ yếu là sự suy giảm tế bào lympho; xuất hiện thể hợp bào; thâm nhiễm tế bào viêm ở nhiều cơ quan; viêm phổi kẽ; viêm ruột u hạt; viêm thận kẽ; hoại tử và thoái hóa tế bào gan. Kết quả hóa mô miễn dịch đã xác định chắc chắn các lợn nghiên cứu có mắc PCV2 và xác định được sự phân bố của virus ở các cơ quan tổ chức của lợn nghiên cứu. Kết quả nghiên cứu giúp cho việc chẩn đoán chính xác, kịp thời góp phần phòng chống Circovirus type 2 nhanh, hiệu quả, giảm thiệt hại cho các trang trại quy mô công nghiệp và người chăn nuôi.

Từ khóa: Porcine Circovirus type 2, PCV2, Đặc điểm bệnh lý, Hóa mô miễn dịch

Application of immunohistochemistry technique in diagnosis of pigs infected with porcine circovirus (PCV) in the vicinity of Ha Noi, Viet Nam

*Nguyen Thi Lan, Luong Quoc Hung, Bui Tran Anh Dao,
Nguyen Ba Hien, Nguyen Huu Nam*

SUMMARY

In this study, some clinical symptoms and pathological signs of post-weaning pigs infected with porcine circovirus type 2 (PCV2) were found more clearly. The typical clinic symptoms of PCV2 infected post-weaning pigs were cachexy, raw-boned, long and rough hairs, paleness, respiratory disorder, diarrhea. Gross lesions of the infected post-weaning pigs were concentrated mainly in lymphoid node superficial inguinal node was enlarged. The other gross lesions included swollen lung with brown spots, fibrin necroinflamed intestine, white spots on kidney's cortices, inflamed liver and slightly rough hepatic surface. The main histopathological lesions were decline of lymphocytes occurrence of multinucleated giant cells, infiltrations of inflamed cells in many organs, interstitial pneumonia, granulomatous enteritis, interstitial nephritis, necrosis and degeneration of liver cells. The PCV2 infected pigs were surely detected by using immunohistochemistry (IHC) technique. IHC was also useful in identifying the distribution of PCV2 antigen in the organs of infected pigs. These results contributed to control the porcine circovirus disease, reduce the loss for farmers and pig industry...

Key words: Porcine Circovirus type 2, PCV2, Pathological findings, Immunohistochemistry

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngành chăn nuôi lợn của nước ta hiện nay đang phát triển rất mạnh mẽ, đến hết năm 2010 tổng đàn lợn của cả nước 2.737,1 nghìn con, sản lượng thịt hơi các loại năm 2011 ước tính đạt 4170 nghìn tấn, tăng 3,7% so với năm trước. Bên cạnh đó nhiều dịch bệnh ảnh hưởng tới năng suất chăn nuôi, hiệu quả sản xuất đang dần trở thành vấn đề được quan tâm. Porcine Circovirus (PCV) được phát hiện và phân lập lần đầu tiên khi gây bệnh liên tục trên dòng tế bào thận lợn PK-15 (Tischer và cs, 1974). Circovirus thuộc họ *Circoviridae*, kích thước rất nhỏ, không có vỏ bọc, sợi đơn DNA tròn (ssDNA) (Allan và Ellis, 2000). Porcine Circovirus (PCV) phân loại thành 2 serotype theo khả năng gây bệnh, kháng nguyên và cấu trúc di truyền, gồm PCV1 (không gây bệnh) và PCV2 (gây bệnh trên lợn). Trình tự nucleotide của PCV1 và PCV2 tương đồng nhỏ hơn 80% và trình tự aminoacid nhỏ hơn 70% (Olvera và cs, 2007). PCV2 là tác nhân gây suy giảm hệ thống miễn dịch (suy giảm tế bào lympho (Segales và Domingo, 2002)), cùng với các tác nhân gây bệnh khác gây nên hội chứng bệnh liên quan đến PCV2 (PCVAD) (Gagnon và cs, 2007) trên lợn gồm: Hội chứng suy mòn da hệ thống sau cai sữa (PMWS), hội chứng viêm da và sưng thận (PDNS), phức hợp bệnh hô hấp (PRDC), viêm phổi hoại tử tăng sinh và hoại tử (PNP). Năm 1991, hội chứng PMWS được báo cáo đầu tiên ở miền Tây Canada và được xác định ở Bắc Mỹ, châu Âu, châu Á (Harding và cs, 1998). PMWS đặc trưng bởi: giảm khối lượng cơ thể, còi cọc, chậm lớn, suy hô hấp, khó thở, ho, ho khan, hạch bạch huyết sưng to, tiêu chảy, thường ảnh hưởng ở độ tuổi 5 - 12 tuần tuổi và hay đi kèm với các tác nhân kể phát khác; gây hiện tượng rối loạn sinh sản (ở lợn nái đang mang thai) như sảy thai ở các giai đoạn mang thai khác nhau, vô sinh, thai gở, lợn con sinh ra yếu ớt. Hiện tại, PMWS rất phổ biến và gây thiệt hại lớn về kinh tế và ảnh hưởng xấu đến sức khỏe đàn lợn chăn nuôi quy mô công nghiệp của thế giới (PMWS từ nhiều nơi trên thế giới, bao gồm Bắc Mỹ, châu Âu và châu Á hầu như giống hệt nhau, có khoảng 96% trình tự

nucleotide tương đồng (Meehan và cs, 1998) ở các nước trên thế giới và bao gồm cả Việt Nam. Tồn thất lớn cho ngành chăn nuôi do tỷ lệ tử vong tăng lên, giảm khối lượng tăng trọng/ngày và hiệu quả chi phí thức ăn công nghiệp. Ở Việt Nam, trong những năm gần đây, tỷ lệ lợn mắc PCV2 khá cao (tăng từ 38,97% năm 2000 đến 90,26% năm 2005), xảy ra ở nhiều tỉnh, gây thiệt hại lớn cho ngành chăn nuôi lợn. Việc chẩn đoán bệnh chính xác, kịp thời để đưa ra được chiến lược phòng bệnh là việc làm rất cần thiết. Vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu một số triệu chứng lâm sàng, đặc điểm bệnh lý kết hợp với phương pháp chẩn đoán hóa mô miễn dịch (Immunohistochemistry - IHC) để xác định chính xác những con lợn bị nhiễm PCV2. Từ đó có thể đưa ra những thông tin có ích về tình hình nhiễm PCV2, góp phần khống chế dịch bệnh, giảm thiệt hại cho người chăn nuôi.

II. NGUYÊN LIỆU - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Mẫu bệnh phẩm được sử dụng trong nghiên cứu là: các hạch bạch huyết, phổi, tim, hạch amidan, màng payer, lá lách, hồi tràng, thận, ruột và gan của các lợn sau cai sữa nghi mắc Circovirus type 2 (PCV2) ở vùng phụ cận Hà Nội.

Hóa chất sử dụng trong phương pháp hóa mô miễn dịch như: dung dịch PBS, DAB, H_2O_2 ,...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Tiến hành quan sát, ghi chép, các biểu hiện của lợn từ khi xuất hiện những dấu hiệu bệnh lý đầu tiên để xác định các triệu chứng lâm sàng. Đồng thời dựa vào các đặc điểm dịch tễ học, những can thiệp trong quá trình bệnh xảy ra cũng như thu thập các thông tin liên quan từ cán bộ thú y cơ sở, chủ gia trại.

- Các biến đổi đại thể của lợn mắc Circovirus type 2 được xác định qua mổ khám ở những lợn có biểu hiện triệu chứng lâm sàng đặc trưng

của bệnh. Thu mẫu các cơ quan như: hạch bạch huyết, phổi, tim, gan, thận và ruột được cố định bằng cách ngâm trong dung dịch formol 10% để làm tiêu bản xác định các biến đổi vi thể.

- Phương pháp làm tiêu bản vi thể theo quy trình tẩm đục bằng paraffin, nhuộm Haematoxinilin - Eosin gồm các bước sau: Cố định bệnh phẩm, khử formol, khử nước, khử cồn, khử Xylen - tẩm paraffin, đục block, cắt mảnh và dán mảnh, nhuộm tiêu bản (Haematoxinilin - Eosin), gắn baume canada, đánh giá kết quả tiêu bản.

- Chẩn đoán kháng định lợn mắc Circovirus type 2 bằng phương pháp nhuộm hoá mô miễn dịch (immunohistochemistry - IHC) gồm các bước cơ bản sau: làm sạch tiêu bản bằng cách khử paraffin, khử xylen, khử cồn giống phương pháp làm tiêu bản vi thể, cho chạy dưới vòi nước và rửa lại tiêu bản bằng nước cất. Hoạt hoá enzym bằng ngâm ngập tiêu bản trong dung dịch PBS 1X và hấp ướt ở 121°C/5 phút. Khử peroxidase nội sinh dùng H_2O_2 trong dung môi methanol, ngâm tiêu bản trong 10 phút. Gắn kháng thể (KT) kháng PCV2 chuẩn/1 tiêu bản

(Jeno comp, Korea). Để tủ ấm 37°C/1h hoặc 4°C/qua đêm. Rửa tiêu bản bằng dung dịch PBS 3 lần (5 phút/lần). Gắn kháng kháng thể (KKT) có gắn enzyme (Dako, Japan) lên tiêu bản. Để tủ ấm 37°C/1h. Rửa PBS 3 lần (5 phút/lần). Cho cơ chất ngâm tiêu bản trong dung dịch DAB khoảng 3-8 phút. Nhuộm nhân tế bào bằng Hematoxylin (30 giây). làm sạch, gắn baume canada và quan sát bằng kính hiển vi quang học.

III. KẾT QUẢ KHẢO NGHIỆM

3.1. Triệu chứng lâm sàng chủ yếu của lợn sau cai sữa nghi mắc PCV2

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành theo dõi các biểu hiện lâm sàng trên nhóm lợn sau cai sữa nghi mắc PCV2 ở một số trang trại, gia trại có dịch, đồng thời tiến hành thu thập các mẫu bệnh phẩm trên địa bàn ở khu vực phụ cận Hà Nội. Qua ghi chép các thông tin liên quan từ các cán bộ thú y cơ sở và các chủ gia trại có lợn mắc PCV2, thông tin của các nhóm lợn được sử dụng trong nghiên cứu này được trình bày ở bảng 1 và 2.

Bảng 1. Hồ sơ các lợn sau cai sữa trong nghiên cứu

STT	Lợn	Giống; lứa tuổi	Địa phương lấy mẫu (xã)	Quy mô chăn nuôi	Tiêm phòng vắc xin
1	CB1	Lai 2 máu Y, D; 4 tuần tuổi	Cổ Bi	Trang trại (205 con)	Dịch tả lợn
2	PT3	Lai 2 máu Y, L; 5 tuần tuổi	Phù Thủy	Hộ nông dân (18 con)	Không tiêm
3	KT5	Lai 3 máu Y, MC, D, 7 tuần tuổi	Kiên Thành	Hộ nông dân (14 con)	4 bệnh đỏ
4	DX7	Lai 4 máu Y, L, D, P; 9 tuần tuổi	Dương Xá	Trang trại (300 con)	Vaccin PRRS
5	BT4	Lai 3 máu Y, D, L; 6 tuần tuổi	Bát Tràng	Trang trại (250 con)	4 bệnh đỏ

Ghi chú: Y Yorkshire, D Đại bạch, L Landrace, MC Móng Cái, P Pietrin

Bảng 2. Một số triệu chứng lâm sàng chủ yếu của lợn sau cai sữa nghi mắc PCV2

STT	Lợn	Triệu chứng lâm sàng chủ yếu
1	CB1	Lợn còi cọc, gầy gò, giảm cân, biếng ăn, da xanh xao, ho, tiêu chảy mạnh, phân màu nâu.
2	PT3	Lợn còi cọc, hoàng đản, tiêu chảy, khó thở.
3	KT5	Lợn còi cọc, lười vận động, lông thô, da xanh xao, khó thở, hay dụi mõm.
4	DX7	Lợn còi cọc, khó thở, da nhợt nhạt, tiêu chảy, viêm da phía sau đuôi.
5	BT4	Lợn còi cọc, biếng ăn, lông xơ xác, da xanh xao, suy hô hấp, tiêu chảy mạnh.

Qua bảng 1 và bảng 2, chúng tôi nhận thấy các lợn sau cai sữa nghi mắc PCV2 có các triệu chứng lâm sàng chủ yếu quan sát được như còi cọc, gầy gò, lông thô và dài, da xanh xao, suy hô hấp, tiêu chảy và có hiện tượng hoàng đản ở lợn PT3 hay viêm da vùng phía sau đuôi ở lợn DX7. Cả 5 lợn nghiên cứu đều không tiêm phòng với PCV2 nên khả năng mắc bệnh là rất cao tùy thuộc vào điều kiện chăm sóc nuôi dưỡng, trạng thái miễn dịch của cơ thể và các yếu tố kể phát (vi khuẩn, virus,...). Trong đó, triệu chứng rối loạn hô hấp biểu hiện ở nhiều mức độ khác nhau từ nhẹ đến nặng nên khó có thể phân biệt được với các bệnh ở đường hô hấp khác ở lợn. Ở đường tiêu hóa, hầu hết các lợn nghiên cứu đều thấy hiện tượng tiêu chảy mạnh, với phân màu nâu đông nhất. Điều này có thể giải thích khi PCV2 xâm nhập vào cơ thể, trong những ngày đầu thì virus có thể sinh sản không kiểm soát trong các tế bào có thẩm quyền miễn dịch, làm suy giảm hệ thống miễn dịch chưa được hoàn thiện ở lợn con nên lợn sau cai sữa trở nên nhạy cảm hơn với các tác nhân gây bệnh khác, điều này sẽ dẫn tới khó phân biệt trên lâm sàng

các lợn mắc PCV2 khi mắc các tác nhân kể phát khác. Ngoài ra, theo một số nghiên cứu thì lợn sau cai sữa mắc PCV2 còn có triệu chứng thần kinh như co giật, què quặt hoặc viêm khớp, đa số các lợn đều có biểu hiện dị mồm liên tục xuống nền chuồng. Kết quả nghiên cứu cũng phù hợp với kết quả của nhiều tác giả như Harding và cs (1998), John và cs (2003).

3.2. Biến đổi bệnh lý của lợn sau cai sữa nghi mắc PCV2

3.2.1. Bệnh tích đại thể của lợn sau cai sữa nghi mắc PCV2

Dựa vào các triệu chứng lâm sàng thu được, chúng tôi tiến hành mổ khám 5 lợn nghiên cứu để có được một cái nhìn toàn diện về các biến đổi đại thể của lợn sau cai sữa nghi mắc PCV2, kết quả được trình bày ở bảng 3. Đồng thời khi tiến hành mổ khám, chúng tôi chọn những vùng có tổn thương điển hình nhất ở từng cơ quan và được chia thành 2 loại mẫu gồm mẫu tươi bảo quản ở -80°C và trong dung dịch formol 10% để phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 3. Các tổn thương đại thể ở lợn sau cai sữa nghi mắc PCV2

Lợn	Cơ quan					
	Hạch bạch huyết	Phổi	Ruột	Thận	Gan	Cơ quan khác
CB1	Sưng to, xuất huyết	Cứng phồng, xuất huyết	Viêm cata, sung huyết	Hơi sưng, có đốm trắng	Teo, tụ máu	Loét dạ dày đoạn gần thực quản
PT3	Sưng to	Đặc chắc, lổm đốm nâu	Viêm hoại tử fibrin	Có các điểm hoại tử trắng	Có các điểm hoại tử	Lách hơi sưng, nhồi huyết
KT5	Sưng to, tụ máu	Viêm phổi hoại tử	Viêm, sung huyết	Hơi sưng	Sung huyết	Dạ dày viêm, viêm loét thực quản, phù nề xung quanh tuyến tụy
DX7	Sưng to	Cứng phồng, lổm đốm nâu	Viêm hoại tử fibrin	Hơi sưng, màng khô bóc	Sưng, gồ gề	Lách sưng to, rìa tù
BT4	Sưng to	Phù thũng, tiểu thùy có màu hồng nhạt	Viêm hoại tử fibrin	Có nhiều điểm trắng ở miễn vỏ	Sung huyết, tụ máu	Niêm mạc dạ dày xuất huyết từng phần thực quản Lách hơi sưng

Kết quả ở bảng 3 cho thấy các biến đổi đại thể quan sát thấy ở nhiều cơ quan nhưng chủ yếu tập trung ở các cơ quan như hạch bạch huyết, phổi, ruột, thận và ở gan.

Hạch bạch huyết: trên cả 5 lợn đều thấy có bệnh tích. Các hạch (hạch amidan, hạch bẹn (hình 1) hạch dưới hàm, hạch màng treo ruột (hình 2) và hạch trung thất sưng to. Trong đó,

hạch bẹn nông thường sưng to và nổi rõ nhất, dấu hiệu hạch bẹn nông sưng to thường xuất hiện ở thời kỳ đầu của các lợn mắc PCV2. Ngoài ra ở lợn CB1 và KT5 còn thấy xuất hiện hiện tượng xuất huyết, tụ máu.

Phổi: bệnh tích chủ yếu là phổi căng phồng, đặc chắc (hình 3), có lõm dóm nâu ở lợn PT3 và DX7. Ngoài ra, có các bệnh tích khác như: phổi xuất huyết, cắt có nhiều dịch chảy ra, các tiểu thùy có màu hồng nhạt hoặc màu đỏ và viêm phổi hoại tử (lợn KT5). Các biến đổi này, khi biểu hiện trên triệu chứng lâm sàng thì quan sát thấy lợn có hiện tượng rối loạn hô hấp tương ứng trong bảng 2

Ruột: Các bệnh tích chủ yếu như ruột viêm hoại tử fibrin quan sát được trên 3/5 lợn (PT3, DX7, BT4), và còn thấy viêm ruột cata, sung

huyết, phù nề màng treo ruột. Niêm mạc ruột bong tróc. Trong ruột căng phồng các chất chứa là nguyên nhân khi quan sát triệu chứng lâm sàng thấy các lợn đều ỉa chảy mạnh.

Thận: có nhiều điểm hoại tử trắng ở trên bề mặt vỏ thận, hơi sưng.

Gan: bệnh tích chủ yếu là gan teo, màu nhợt nhạt, sưng và bề mặt gan gồ ghề, tụ máu.

Ngoài ra, ở 5 lợn nghiên cứu còn thấy các bệnh tích ở các cơ quan khác như: viêm dạ dày, xuất huyết niêm mạc dạ dày; viêm loét đoạn gần thực quản; lách hơi sưng thình thòang nhờ huyết. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi là hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu trước đây của Clark (1997), Rosell và cs (1999).



Hình 1. Hạch bẹn nông sưng to



Hình 2. Hạch màng treo ruột sưng to



Hình 3. Phổi viêm, đặc chắc



Hình 4. Lách lợn bị sưng

3.2.2. Bệnh tích vi thể của lợn sau cai sữa mắc PCV2

Dựa trên các mẫu bệnh phẩm của 5 lợn nghiên cứu ngâm trong dung dịch formol 10%, chúng tôi tiến hành làm tiêu bản bệnh lý và nhuộm HE

để quan sát các biến đổi vi thể chủ yếu của các lợn sau cai sữa nghi mắc PCV2 ở các cơ quan tương ứng. Những biến đổi bệnh lý vi thể được quan sát trên kính hiển vi quang học, chụp ảnh và tổng hợp ở bảng 4.

Bảng 4. Biến đổi vi thể ở một số cơ quan của lợn sau cai sữa nghi mắc PCV2

Lợn	Cơ quan					
	Hạch bạch huyết	Phổi	Ruột	Thận	Gan	Cơ quan khác
CB1	- Suy giảm tế bào lympho - Thâm nhiễm tế bào viêm - Nang lympho bị teo	- Viêm phổi kê - Hoại tử phế quản	- Viêm ruột u hạt - Viêm hoại tử fibrin kết trắng	Viêm thận kê	- Hoại tử - Tế bào gan thoái hóa	Viêm cơ tim
PT3	Thâm nhiễm tế bào viêm	- U hạt kê phổi - Thâm nhiễm tế bào viêm	- Nhiễm tế bào viêm - Lông nhung đứt nát	Thâm nhiễm tế bào viêm ở u nang thận	- Tổ chức bẹ gan bị phá vỡ - Hoại tử	Lách xuất huyết
KT5	- Thâm nhiễm tế bào viêm - Suy giảm tế bào lympho	- Viêm phổi kê - Thâm nhiễm tế bào viêm	- Xuất huyết - Thâm nhiễm tế bào viêm		Xơ hóa quanh thủy gan	Hoại tử tuyến tiêu hóa dạ dày
DX7	- Xuất huyết - Nang lâm ba teo - Xuất hiện thể hợp bào	- Dịch rỉ viêm - Lông phế nang chứa tế bào viêm	Viêm ruột u hạt, viêm kết trắng	Viêm mạch vùng vỏ thận	Thâm nhiễm tế bào viêm vào quang cửa	Viêm màng não
BT4	- Thâm nhiễm tế bào viêm - Xuất hiện thể vùi	- Dịch rỉ viêm - Thâm nhiễm tế bào viêm	- Thoái hóa tế bào biểu mô - Lông nhung đứt nát	Viêm thận kê	Xuất hiện thể hợp bào	Vách ngăn lách bị đứt nát

Bệnh tích vi thể đáng chú ý nhất ở cả 5 lợn là sự thay đổi trong các hạch bạch huyết bao gồm sự suy giảm số lượng tế bào lympho. Bệnh tích này thường thấy rõ ở các hạch bạch huyết sưng to. Bên cạnh sự suy giảm còn xuất hiện sự thâm nhiễm tế bào viêm, tế bào đại thực bào, đặc biệt là trong các xoang miễn vỏ hạch bạch huyết. Trong nguyên sinh chất của tế bào chứa các hạt ái kiềm (thể vùi hình chùm nho). Thể hợp bào thấy ở các hạch bạch huyết (hình 7), đặc biệt trong các hạch bạch huyết như hạch màng treo ruột, lách.

Phổi chủ yếu có hiện tượng viêm phổi kê ở 2/5 lợn (CB1, KT5) (hình 6), có sự thâm nhiễm tế bào viêm ở 3/5 lợn (PT3, KT5, BT4) đặc biệt là thâm nhiễm các bạch cầu đa nhân trung tính. Lông phế nang có chứa tế bào viêm, tế bào biểu mô bong tróc của vách phế nang. Viêm phổi kê là một bệnh tích thường được quan sát thấy phổ biến ở lợn mắc PCV2 với các biến đổi đại thể tương ứng là phổi căng phồng, đặc chắc, có lốm đốm nâu đã chỉ ra mối tương quan giữa bệnh tích

vi thể và bệnh tích đại thể được thể hiện ở bảng 3 và 4.

Ruột ở 5 lợn đều quan sát thấy bệnh tích chủ yếu là viêm ruột u hạt, viêm hoại tử fibrin ở kết tràng ở hầu hết các lợn. Ngoài ra, còn thấy hiện tượng thâm nhiễm tế bào viêm, thoái hóa tế bào biểu mô, lông nhung đứt nát.

Ở thận, xuất hiện nhiều ổ viêm thận kê, xâm nhiễm các tế bào lympho trong tế bào tổ chức u nang thận và viêm mạch vùng vỏ và tủy thận, rải rác hoặc một vùng rộng. Kết quả của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu của Kwang (2009).

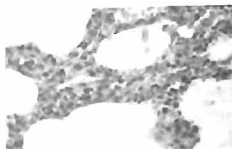
Các biến đổi ở gan là sự thâm nhiễm tế bào lympho vào quang cửa, các tế bào gan hoại tử đơn lẻ và thoái hóa (hình 8), các bẹ gan bị phá vỡ, xuất hiện thể hợp bào (tế bào không lồ đa nhân) đôi khi xuất hiện xơ hóa quanh thủy gan ở lợn KT5. Các biến đổi ở gan dẫn tới các tổn thương tương ứng về đại thể đồng thời làm suy giảm chức năng của các tế bào gan cũng là nguyên nhân dẫn tới hiện tượng hoàng đản quan sát thấy ở lợn PT3.

Ngoài ra, chúng tôi còn quan sát thấy một số biến đổi vi thể ở một số cơ quan khác như: lách xuất huyết, vách ngăn đứt nát; hoại tử tuyến tiêu

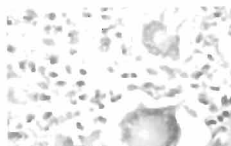
hóa ở dạ dày; viêm màng não, viêm cơ tim; thâm nhiễm tế bào lympho ở nhiều cơ quan.



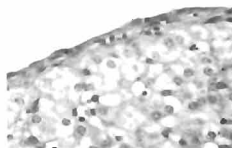
Hình 5. Suy giảm tế bào lympho ở hạch bạch huyết (H.E x 400)



Hình 6. Viêm phổi kẽ (H.E x 400)



Hình 7. Xuất hiện thể hợp bào ở hạch bạch huyết (H.E x 400)



Hình 8: Tế bào gan bị thoái hóa và hoại tử (H.E x 400)

3.3. Kết quả nhuộm hoá mô miễn dịch

Nhuộm hóa mô miễn dịch không chỉ nhằm chẩn đoán trên lát cắt tổ chức bệnh phẩm của lợn nghi mắc PCV2 có mặt virus hay không, mà kết quả còn chỉ ra chính xác vị trí phân bố của PCV2 ở tổ chức của lợn mắc bệnh. Kết quả nhuộm hóa mô miễn dịch cũng giúp cho việc lựa chọn cơ

quan tổ chức để phân lập virus ở các nghiên cứu tiếp theo liên quan tới PCV2. Ở mỗi lợn nghiên cứu, 4 cơ quan được chọn là: phổi, hạch bạch huyết, lách, gan. Mỗi cơ quan của mỗi lợn, 2 block ở vùng có tổn thương đại thể được chọn để làm hóa mô miễn dịch với kháng thể đơn dòng đặc hiệu chống lại PCV2. Kết quả được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Kết quả nhuộm hoá mô miễn dịch xác định sự có mặt của PCV2

Lợn	Phổi		Hạch bạch huyết		Lách		Gan	
	Block 1	Block 2	Block 1	Block 2	Block 1	Block 2	Block 1	Block 2
CB1	++	++	+++	+++	++	++	++	+++
PT3	++	++	+++	++	-	+	++	++
KT5	+++	+	++	++	++	++	+++	++
DX7	-	+	++	++	-	+	++	+
BT4	+	++	+++	++	+	++	+++	++

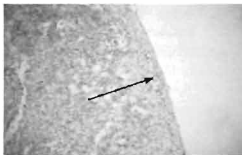
Ghi chú: +++ Đám, hạt bắt màu nâu vàng nhiều ++ Đám, hạt bắt màu nâu vàng TB
+ Đám, hạt bắt màu nâu vàng ít Không có đám, hạt bắt màu nâu vàng

Qua bảng 4 cho thấy trong số 40 block của 5 lợn được chọn làm thí nghiệm, có 37 block cho kết quả dương tính với PCV2 với biểu hiện là những đám bắt màu vàng nâu trên tiêu bản vi thể của tổ chức, 3 block âm tính với PCV2. Như vậy, 5 lợn được lựa chọn trong nghiên cứu này được chẩn đoán là dương tính với PCV2.

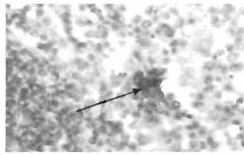
Kết quả nhuộm hóa mô miễn dịch với từng cơ quan tương ứng ở 5 lợn là không giống nhau, điều này có thể do sự khác nhau về điều kiện chăm sóc, tình trạng miễn dịch, hay là độc lực và đường xâm nhập của chủng PCV2 vào từng con lợn là khác nhau. Tương tự khi xem xét kết quả nhuộm hóa mô miễn dịch trên 2 block khác nhau trên cùng một cơ quan thì cơ block cho kết quả dương tính với hóa miễn dịch, nhưng lại có block cho kết quả âm tính với hóa miễn dịch như phổi ở lợn DX7 và lách ở lợn PT3 và DX7. Điều này có thể được lý giải là do trong quá trình làm tiêu bản nhuộm hóa mô miễn dịch, phần tổ chức có virus tấn công đã không được lấy; tổ chức

đó đã bị hoại tử không còn virus hay do virus phân bố không đồng đều trong cùng một tổ chức cơ quan nên không có sự kết hợp đặc hiệu giữa kháng nguyên và kháng thể, tiêu bản không xuất hiện màu đặc trưng.

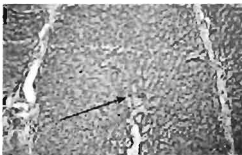
Quan sát tiêu bản nhuộm hóa mô miễn dịch bằng kính hiển vi quang học thông thường có thể nhận biết được vị trí phân bố của virus qua các đám bắt màu vàng nâu trên vi trường. Ở phổi, virus thường được phát hiện bên trong phế quản, cuống phổi, các tế bào biểu mô phế nang và trong các đại thực bào phế nang (đây là tế bào đích của PCV2). Tại hạch bạch huyết, sự hiện diện của virus rất rõ ràng. Ở đây, virus tấn công vào các tế bào miễn dịch trong các nang lympho (hình 9, 10). Ở gan: virus cư trú và nhân lên trong các tế bào gan, tế bào biểu mô ống mật và tế bào kuffer (hình 11, 12). Không giống như ở các cơ quan khác, ở lách PCV2 phân bố rải rác và không tập trung. Nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với kết quả nghiên cứu của Opriessnig và cs (2009).



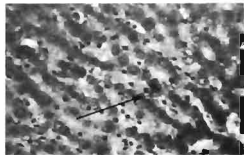
Hình 9. Virus phân bố ở hạch (IHC 100X)



Hình 10. Virus phân bố ở hạch bạch huyết (IHC 400X)



Hình 11. Virus tập trung ở gan (IHC x 100)



Hình 12. Virus tập trung ở gan (IHC x 400)

Kết quả cho thấy hạch bạch huyết và gan của lợn mắc PCV2 cho kết quả dương tính rõ nét với nhiều đám bắt màu vàng nâu; phổi và lách cũng cho kết quả dương tính nhưng số lượng các đám bắt màu vàng nâu là không nhiều. Kết quả này cũng cho thấy để có sự chính xác cao trong chẩn đoán PCV2 bằng phương pháp IHC thì mẫu bệnh phẩm nên lấy ở lợn bệnh là gan và hạch bạch huyết.

IV. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi góp phần khẳng định và làm rõ thêm các đặc điểm bệnh lý của lợn sau cai sữa bị nhiễm Circovirus type 2 (PCV2). Các triệu chứng đặc trưng của lợn sau cai sữa mắc PCV2 là: còi cọc, gầy gò, lông thô và dài, da xanh xao, rối loạn hô hấp, tiêu chảy. Bệnh tích đại thể chủ yếu là sưng ở hạch bạch huyết, đặc biệt là hạch bẹn nông. Các bệnh tích khác bao gồm: Phổi căng phồng, đặc chắc, có lõm đỏ nâu; ruột viêm hoại tử fibrin; điểm hoại tử trắng ở trên bề mặt vô thận, gan sưng và bề mặt gồ ghề, tụ máu. Bệnh tích vi thể chủ yếu là sự suy giảm tế bào lympho, xuất hiện thể hợp bào, thâm nhiễm tế bào viêm ở nhiều cơ quan; viêm phổi kẽ; viêm ruột u hạt hay hoại tử fibrin; viêm thận kẽ; hoại tử và thoái hóa tế bào gan.

Kỹ thuật IHC đã xác định chắc chắn được sự có mặt và vị trí phân bố của PCV2 trên lát cắt tổ chức bệnh phẩm của lợn sau cai sữa bị nhiễm bệnh. Trong đó, PCV2 tập trung chủ yếu ở các hạch bạch huyết và gan.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Allan GM, Ellis JA. (2000) Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest*, 12:3-14.
2. Gagnon CA, Tremblay D, Tijssen P, Venne MH, Houde A, Elahi SM: (2007) The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada. *Can Vet J*, 48, 811-819.

3. Harding, J. C. S, E. G. Clark, J. H. Strokappe, P. I. Willson, and J. A. Ellis (1998). Postweaning multisystemic wasting syndrome: epidemiology and clinical presentation. *Swine Health Prod.* 6:249-254.
4. John A. Ellis DVM, PhD(, 2003). Porcine circovirus: An old virus in a new guise causes an emerging disease through a novel pathogenesis. Large Animal veterinary rounds, Volume 3, Issue 4.
5. Meehan, B. M., F. McNeilly, D. Todd, S. Kennedy, V. A. Jewhurst, J.A. Ellis, L. E. Hassard, E. G. Clark and G. M. Allan (1998): Characterization of circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J Gen Virol* 79, 2171-2179.
6. Olvera A, Cortey M, Segales J: (2007) Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virology* 357: 175-185.
7. Rosell, C., Segales, J., Plana-Duran, J., Balasch, M., Rodriguez-Arriola, G.M., Kennedy, S., Allan, G.M., McNeilly, F., Latimer, K.S., Domingo, M (1999). Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J. Comp. Pathol.* 120, 59-78.
8. Segales J, Domingo M (2002): Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Vet Q* 24: 109-124.
9. Tanja Opricssnig, Abby R. Patterson, Xiang-Jin Meng, Patrick G. Halbur: (2009). Porcine circovirus type 2 in muscle and bone marrow is infectious and transmissible to naive pigs by oral consumption. *Veterinary Microbiology* 133: 54-64.

Nhận ngày: 21.1.2013

Phản biện ngày: 24.1.2013