

Nghiên cứu khoa học

ĐÁNH GIÁ ẢNH HƯỞNG TIỀM NĂNG CỦA INTERFERON ALPHA TRONG ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH CỦA LỢN ĐƯỢC TIÊM KHÁNG NGUYÊN GP5 TÁI TỔ HỢP CỦA VIRUS TAI XANH

Trần Thị Thanh Hà¹, Lý Đức Việt¹, Nguyễn Thị Huyền¹, Nguyễn Thị Lương¹, Đặng Thị Kiều Anh¹, Đặng Vũ Hoàng¹ và Takehiro KOKUHO²

TÓM TẮT

Hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRS, bệnh tai xanh) là một trong những bệnh quan trọng nhất, gây thiệt hại kinh tế cho ngành chăn nuôi lợn trên phạm vi toàn cầu. Mặc dù đã có nhiều loại vaccin được sản xuất và sử dụng ở nhiều quốc gia với hy vọng sẽ khống chế và ngăn chặn được dịch bệnh này, nhưng cho đến nay hiệu lực bảo hộ của các vaccin PRRS vẫn chưa đạt được kết quả như mong muốn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã ứng dụng hệ thống biểu hiện baculovirus để sản xuất protein GP5 của virus PRRS phân lập tại Việt Nam. Kết quả nghiên cứu cho thấy protein GP5 tái tổ hợp được sản xuất bằng hệ thống baculovirus mang hoạt tính sinh học và hoạt tính miễn dịch. Đồng thời việc kết hợp protein GP5 tái tổ hợp và interferon alpha đã làm tăng đáp ứng kháng thể đặc hiệu với virus PRRS, điều này được xác nhận bởi kết quả IDEXX ELISA và trung hòa virus. Kết quả nghiên cứu này cho thấy tiềm năng phát triển vaccin tái tổ hợp GP5 bằng hệ thống baculovirus tại Việt Nam

Từ khóa: Bệnh tai xanh, Khung đọc mở 5 (GP5), Protein tái tổ hợp, Hệ thống biểu hiện baculovirus

Evaluation on influence of interferon alpha in swine immune response induced by recombinant GP5 protein of PRRSV

Tran Thi Thanh Ha, Ly Duc Viet, Nguyen Thi Huyen, Nguyen Thi Luong, Dang Thi Kieu Anh, Dang Vu Hoang, Takehiro Kokuho

SUMMARY

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) is one of the most important diseases causing economic loss in the global pig raising industry. In spite of having many vaccine kinds were developed and used to prevent this disease in several countries, but up to date the protective efficacy of the current PRRS vaccines was limited. In this study, the baculovirus expression system was used to produce recombinant GP5 protein from PRRS strain which was isolated in Viet Nam. The studied results indicated that recombinant GP5 protein producing from Baculovirus system possessed both bioactive and immunity properties. Also, the combination of recombinant GP5 protein and interferon alpha enhanced the specific antibody response with PRRSV (this was determined by IDEXX ELISA and VN Test). The result of this study indicated the potential for development of GP5 recombinant vaccine by using baculovirus system in Viet Nam

Keywords: PRRS, Open reading frame 5 (GP5), Recombinant protein, Baculovirus expression system

¹ Bộ môn Hóa sinh Miễn dịch - Viện Thú y

² Viện Thú y Nhật Bản

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Virus PRRS là một virus RNA sợi đơn dương được xếp vào loài Nidovirales, họ Arteriviridae, giống Arterivirus, gần giống với virus gây viêm khớp ở ngựa (Equine arthritis virus - EAV), virus Lactic Dehydrogenase của chuột (LDV) và virus gây sốt xuất huyết trên khỉ (Simian Haemorrhagic Fever Virus- SHFV) (Thiel và cs., 1993). Đây là virus có vỏ bọc, hình cầu, đường kính từ 50-70 nm và chứa nhân nucleocapsid 25-35 nm. Trên bề mặt có những gai nhô ra rất rõ. Sự sinh sôi của virus bị dừng lại khi dùng chloroform hay ether, chúng tỏ vỏ có chứa lipid. Virus có khả năng sinh sản trên tế bào đơn nhân và tế bào đại thực bào, đồng thời nó có khả năng truyền qua nhau thai, gây bệnh cho bào thai. Virus có bộ gen dễ bị thay đổi dẫn đến những thay đổi về tính kháng nguyên và có khả năng trốn tránh hệ thống miễn dịch do con vật sinh ra nên nó có thể tồn tại rất lâu trong cơ thể vật bị nhiễm (P.L.Delputte và cs., 2004).

Virus PRRS có thể xâm nhập và nhân lên trong các đại thực bào (các tế bào có tác dụng bắt và tiêu diệt các tác nhân gây bệnh). Khi hình thành các virion, virus phá hủy các đại thực bào. Virus PRRS có 3 protein cấu trúc chính, đó là: (1) nucleocapsid protein (N, ORF 7), (2) protein xuyên màng (M, ORF 6) và (3) glycoprotein (E, ORF5). Chuỗi hệ gen đầy đủ của virus PRRS được xác lập vào năm 1993, có kích thước khoảng 15,1 đến 15,5 kb và chứa ít nhất 8 khung đọc mở (ORF) để mã hóa 20 protein đã định sẵn. Hệ gen cũng chứa 2 vùng không dịch mã (UTR) tại vị trí 5' và 3' (Meulenberg và cs., 1993).

ORF 1a và 1b là định vị xuôi dòng của 5'-UTR, nó chiếm giữ khoảng 80% hệ gen. ORF1a được dịch trực tiếp trong khi ORF1b được dịch bởi một khung dịch chuyển ribosomal, độ lún xuống của chuỗi Protein ORF1ab lớn là sự thủy phân protein thành các sản phẩm liên quan đến sự sao chép virus và bộ phận bản sao (Nelsen CJ và cs., 1999).

Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, protein GP5 là protein mang hoạt tính miễn dịch quan trọng nhất, kích thích sản sinh kháng thể trung hòa của lợn với virus PRRS. Đồng thời, ảnh hưởng của interferon alpha đến đáp ứng miễn dịch của lợn được tiêm vaccin PRRS đã được Du và cộng sự mô tả trong

nghiên cứu gần đây (Du Y và cs., 2012).

Với mục đích nghiên cứu ảnh hưởng của cytokine trong đáp ứng miễn dịch trung hòa của lợn đối với virus PRRS, chúng tôi thực hiện đề tài nghiên cứu "Đánh giá ảnh hưởng của interferon alpha đến đáp ứng miễn dịch của lợn được tiêm kháng nguyên GP5 tái tổ hợp của virus PRRS".

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Tế bào côn trùng SF21AE và High Five từ Trung tâm Phòng và Kiểm soát dịch bệnh động vật, Viện thú y Nhật bản. Interferon alpha từ công ty Nanogen, Việt Nam.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

- **Biểu hiện protein tái tổ hợp bằng hệ thống baculovirus:** Bac-to-Bac baculovirus expression system của hãng invitrogen theo hướng dẫn của nhà sản xuất

- **Phát hiện nhanh baculovirus tái tổ hợp:** bằng phương pháp PCR theo công bố của Barbara Malitscheck và cs., 1999

- **Đánh giá hoạt tính sinh học của protein GP5 tái tổ hợp** bằng phương pháp IPMA sử dụng tế bào côn trùng theo Đặng Vũ Hoàng và cs., 2016

- **Bắt hoạt baculovirus mang protein GP5 tái tổ hợp:** theo phương pháp của Paloma Rueda và cs., 2001

- **Phương pháp ELISA:** sử dụng kit IDEXX theo hướng dẫn của nhà sản xuất

- **Phương pháp trung hòa virus:** (VN Test) theo công bố của Trần Thị Thanh Hà và cs., 2012.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sản xuất protein GP5 tái tổ hợp của virus PRRS bằng hệ thống Baculovirus

3.1.1. Thiết kế cặp mồi đặc hiệu và khuếch đại gen ORF5 của virus PRRS bằng kỹ thuật RT-PCR

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành sản xuất tái tổ hợp protein GP5 của virus PRRS bằng qui trình đã được thiết lập trước đây (Đặng Vũ Hoàng và

cs. 2016). Để thiết kế cặp mồi đặc hiệu gen ORF5 của virus PRRS, 20 trình tự gen ORF5 đã công bố trên ngân hàng dữ liệu NCBI được sử dụng để so sánh tìm ra trình tự đặc trưng. Phần mềm FastPCR

được sử dụng để tính toán các thông số của mồi, cho phép xác định được trình tự mồi phù hợp với các yêu cầu đặt ra. Trình tự mồi đặc hiệu cho gen ORF5 và các thông số của cặp mồi được trình bày ở bảng 1.

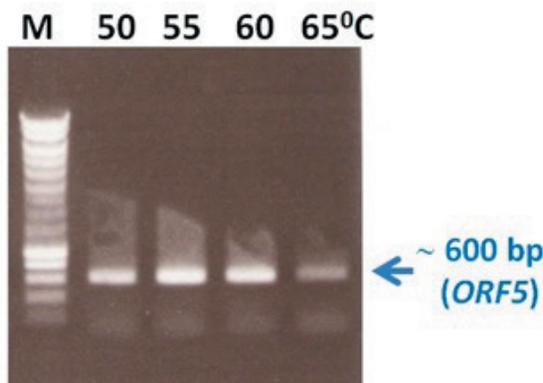
ORF5-R: ATG TTG GGG AAA TGC TTG ACC GC
 ORF5-F: CTA AGG ACG ACC CCA TTG TTC CGC

枝番	シケンス名	合成スケール	精製方法	塩基数	分子量 [MW]	A B S	O. D.	全量 [TW] (μg)	全モル数 (nmol)	溶解量* (μl)	T _m (°C)
1	15THPRF1	OLIGO KIDS	γ	23	7119.69	0.060	3.00	85.3	12.0	119.8	60.5
		ATG TTG GGG AAA TGC TTG ACC GC									
2	15BaTHPRF3	0.05 μmol	γ	32	9881.49	0.180	9.00	263.1	26.6	266.3	69.5
		GGC GGA TCC ATG TTG GGG AAA TGC TTG ACC GC									
3	15THPRR2	OLIGO KIDS	γ	24	7273.81	0.060	3.00	90.5	12.4	124.5	63.9
		CTA AGG ACG ACC CCA TTG TTC CGC									
4	15THPRR4	0.05 μmol	γ	33	10034.62	0.180	9.00	271.0	27.0	270.1	68.3
		CCG GAA TTC CTA AGG ACG ACC CCA TTG TTC CGC									

Bảng 1. Trình tự mồi dùng để khuếch đại nhân gen ORF5 của virus PRRS và các thông số mồi

Kết quả của phản ứng PCR kiểm tra nhiệt độ bắt cặp tối ưu của mồi (hình 1) cho thấy xuất hiện một băng DNA khoảng 600 bp trên cả bốn nhiệt độ bắt cặp khác nhau: 50, 55, 60 và 65°C. Kích thước này phù hợp với kích thước dự kiến của

gen ORF5 của virus PRRS theo thiết kế khi được khuếch đại với cặp mồi đặc hiệu (603 bp). Sản phẩm PCR của gen ORF5 thu được sẽ được sử dụng làm nguyên liệu để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.



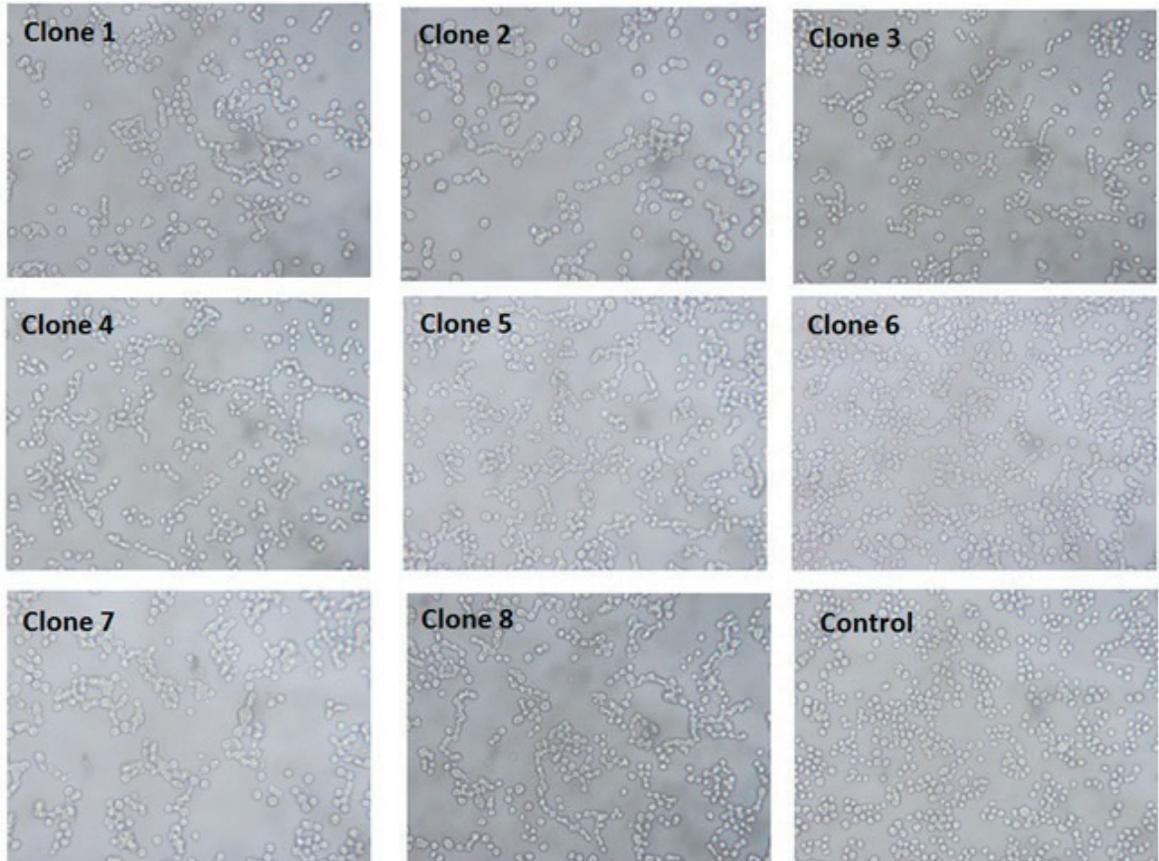
Hình 1. Phổ điện di sản phẩm phản ứng RT-PCR

M, thang DNA chuẩn; giếng 1-4: sản phẩm RT-PCR với nhiệt độ bắt cặp mồi là 50, 55, 60 và 65°C

3.1.2. Tạo baculovirus tái tổ hợp mang gen ORF5 sử dụng tế bào côn trùng SF21AE

Việc sản xuất protein GP5 tái tổ hợp của virus PRRS sử dụng hệ thống baculovirus được tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất và công bố trước đây của chúng tôi (Đăng Vũ Hoàng và cs., 2016).

Để tạo baculovirus tái tổ hợp, 8 dòng bacmid tái tổ hợp được sử dụng để chuyển nạp vào tế bào côn trùng SF21AE theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Bac-to-Bac baculovirus expression System, invitrogen, Mỹ). Kết quả được thể hiện ở hình 2.



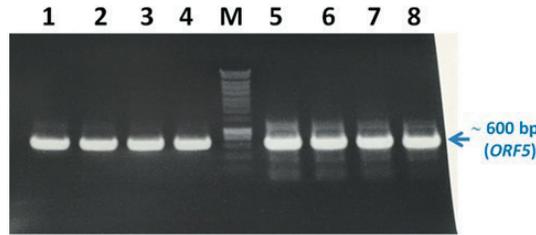
Hình 2. Hình ảnh tế bào côn trùng SF21AE sau gây nhiễm bởi Bacmid tái tổ hợp và nuôi ở nhiệt độ 27°C sau 72 giờ

Kết quả cho thấy xuất hiện các bệnh tích tế bào (CPE) sau 72 giờ nuôi cấy đối với các mẫu được gây nhiễm bởi bacmid tái tổ hợp (clone 1-8). Mẫu đối chứng không gây nhiễm với bacmid tái tổ hợp (control) phát triển bình thường và hoàn toàn không thấy xuất hiện CPE.

Để tạo baculovirus tái tổ hợp có mang gen ORF5 của virus PRRS, chúng tôi thực hiện phản ứng PCR phát hiện nhanh baculovirus tái tổ hợp với cặp môi đặc hiệu gen ORF5 theo phương

pháp đã được công bố của Barbara Malitscheck và cs., 1999. Kết quả được thể hiện trên hình 2 cho thấy cả 8 dòng baculovirus tái tổ hợp đều xuất hiện bằng DNA với kích thước mong đợi của gen ORF5. Từ các kết quả thu được, chúng tôi kết luận rằng đã tạo được 8 dòng baculovirus tái tổ hợp mang gen ORF5 của virus PRRS.

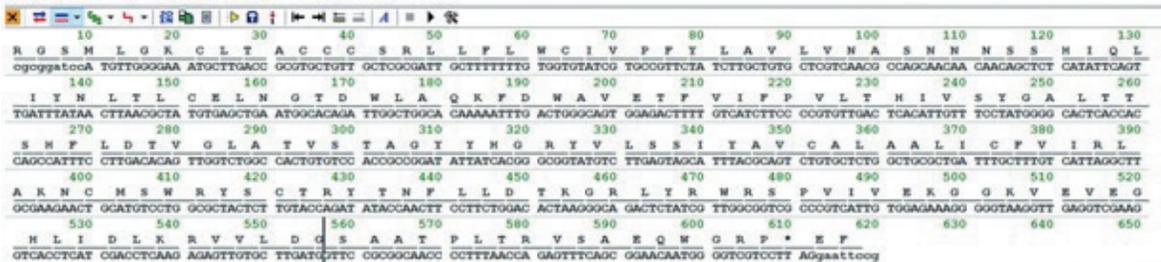
Đoạn gen ORF5 từ baculovirus tái tổ hợp được sử dụng để xác định trình tự nucleotide. Trình tự gen và khung đọc của đoạn gen ORF5 được trình bày ở hình 3.



Hình 3. Phổ điện di sản phẩm PCR

M, thang DNA chuẩn; 1-8, sản phẩm PCR sử dụng baculovirus tái tổ hợp mang gen ORF5 của virus PRRS

Kết quả cho thấy trình tự đoạn gen ORF5 của virus PRRS gồm 603 nucleotide từ mã đầu (mã ATG) và mã cuối (mã TAG) nằm ở gen ORF5.



Hình 4. Trình tự gen và khung đọc của gen ORF5 của virus PRRS

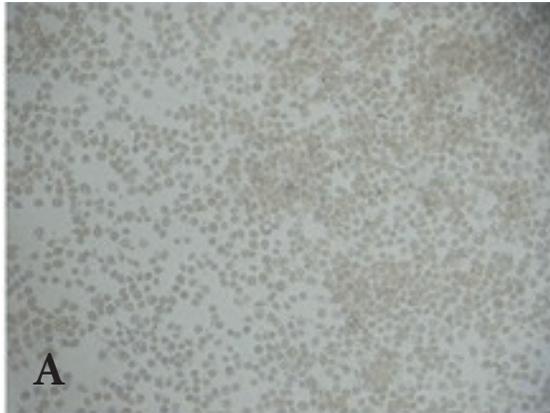
Đồng thời, trình tự gen thu được đã được sử dụng để blast lên ngân hàng dữ liệu NCBI. Kết quả được thể hiện ở hình 5 và cho thấy đoạn gen ORF5 trong nghiên cứu này có độ tương đồng 99% khi

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain SDXZ envelope glycoprotein GP5 mRNA, complete cds	1098	1098	100%	0.0	99%	HQ701731.1
Porcine respiratory and reproductive syndrome virus strain BJSD, complete genome	1098	1098	100%	0.0	99%	FJ950747.1
Porcine respiratory and reproductive syndrome virus strain HQ-5 glycosylated envelope protein GP5 gene, complete cds	1098	1098	100%	0.0	99%	EU439252.1
Porcine respiratory and reproductive syndrome virus strain HUN3 major envelope glycoprotein GP5 gene, complete cds	1098	1098	100%	0.0	99%	EU213122.1
Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain Hu5 envelope glycoprotein GP5 mRNA, complete cds	1092	1092	100%	0.0	99%	HQ701729.1
Porcine respiratory and reproductive syndrome virus strain AHXA GP5 envelope protein gene, complete cds	1092	1092	100%	0.0	99%	EU399864.1
Porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate SC07 GP5 envelope protein mRNA, complete cds	1092	1092	100%	0.0	99%	EU709834.1
Porcine respiratory and reproductive syndrome virus major envelope glycoprotein GP5 gene, complete cds	1092	1092	100%	0.0	99%	EU075303.1
Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain GX09-32, complete genome	1099	1099	99%	0.0	99%	HM214915.1
Porcine respiratory and reproductive syndrome virus strain 08HuN, complete genome	1099	1099	99%	0.0	99%	GU169411.1
Porcine respiratory and reproductive syndrome virus isolate CQ-L4 envelope glycoprotein GP5 gene, complete cds	1099	1099	99%	0.0	99%	FJ919338.1
Porcine respiratory and reproductive syndrome virus strain YN10 envelope glycoprotein GP5 gene, complete cds	1099	1099	99%	0.0	99%	FJ361891.1
Porcine respiratory and reproductive syndrome virus strain AHCFZC major envelope glycoprotein GP5 gene, complete cds	1099	1099	99%	0.0	99%	EU213094.1
Porcine reproductive and respiratory syndrome virus gene for glycosylated membrane protein 5, complete cds, strain_KTY_PRI	1094	1094	99%	0.0	99%	LC102500.1
Porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate NA/TH/NMA031/2008 envelope glycoprotein GP5 (GP5) gene, complete cds	1094	1094	99%	0.0	99%	KF688665.1
Porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate NJ-1106, complete genome	1094	1094	99%	0.0	99%	JX880029.1

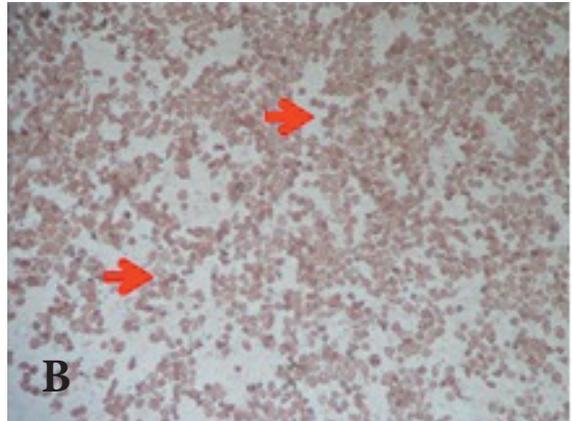
Hình 5. Kết quả so sánh trình tự gen và nhận diện loài sử dụng công cụ Blast giữa trình tự gen ORF5 của virus PRRS và ngân hàng NCBI

so sánh với gen ORF5 của virus PRRS được phân lập bởi Học viện Nông nghiệp Việt Nam, chủng KTY-PRRS-02 (Accession No. LC102500.1).

3.1.3. Kiểm tra hoạt tính sinh học của protein GP5 tái tổ hợp bằng phương pháp Immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) trên tế bào côn trùng High FIVE



Để kiểm tra hoạt tính sinh học của protein GP5 tái tổ hợp, chúng tôi tiến hành phương pháp IPMA sử dụng tế bào côn trùng dòng High FIVE nhằm phát hiện sự có mặt của protein GP5 tái tổ hợp. Các bước tiến hành theo phương pháp đã công bố trước đây (Đặng Vũ Hoàng và cs., 2016). Kết quả được trình bày ở hình 6.



Hình 6. Kết quả IPMA sử dụng tế bào côn trùng High FIVE gây nhiễm với baculovirus tái tổ hợp sau 72 giờ

A. Huyết thanh chuẩn âm: Huyết thanh lợn sạch SPF âm tính với PRRSV;

B. Huyết thanh chuẩn dương: Huyết thanh lợn sạch SPF gây tối miễn dịch với PRRSV cường độ

Kết quả ở hình 6 cho thấy giếng sử dụng huyết thanh lợn sạch SPF âm tính với virus PRRS khi nhuộm thấy tế bào không bắt màu, nhưng ở giếng sử dụng huyết thanh gây tối miễn dịch với virus PRRS thì ngược lại, các tế bào bắt màu nâu đỏ trong nguyên sinh chất khi nhuộm. Chứng tỏ rằng protein GP5 tái tổ hợp phản ứng mạnh và được nhận diện bởi kháng thể tự nhiên kháng virus PRRS. Điều này chứng tỏ, protein GP5 tái tổ hợp bằng hệ thống biểu hiện baculovirus mang đặc tính sinh học tự nhiên.

3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của interferon alpha đến đáp ứng miễn dịch trung hòa với virus PRRS của lợn được tiêm kháng nguyên GP5 tái tổ hợp

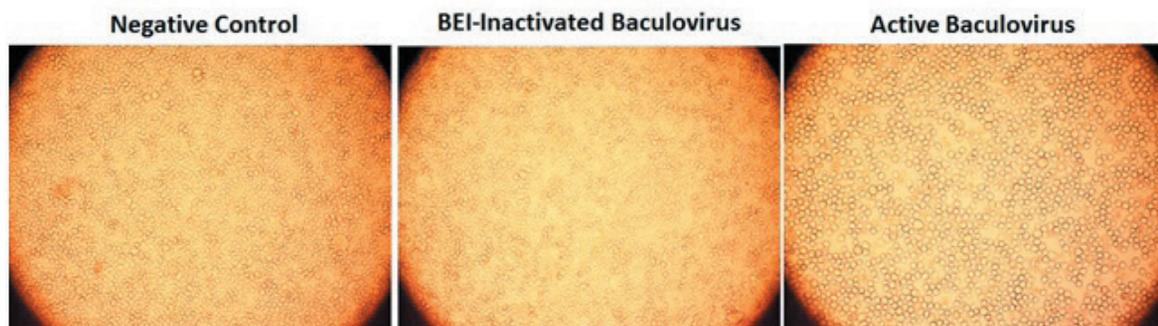
3.2.1. Bất hoạt baculovirus mang protein GP5 tái tổ hợp bằng BEI

Baculovirus mang protein GP5 tái tổ hợp được xử lý với 10mM BEI trong 48h theo phương pháp

đã được công bố bởi Paloma Rueda và cs., 2001. Để khẳng định baculovirus đã được bất hoạt, chúng tôi sử dụng tế bào côn trùng High FIVE gây nhiễm với baculovirus đã bất hoạt bằng BEI. Đối chứng dương sử dụng baculovirus không bất hoạt (active baculovirus). Sau 72 giờ gây nhiễm, chúng tôi quan sát bệnh tích tế bào (CPE), kết quả được trình bày ở hình 7.

Kết quả hình 7 cho thấy: xuất hiện các bệnh tích tế bào (CPE) sau 72 giờ nuôi cấy đối với giếng được gây nhiễm với baculovirus không bất hoạt (active baculovirus). Giếng đối chứng không gây nhiễm với baculovirus (Negative Control) và giếng gây nhiễm với virus baculo bất hoạt bằng BEI (BEI-inactivated baculovirus), tế bào phát triển bình thường và hoàn toàn không thấy xuất hiện CPE, kết quả này cho thấy baculovirus mang protein GP5 tái tổ hợp đã được bất hoạt hoàn toàn được sử dụng trong thí nghiệm kế tiếp trên lợn nhằm đánh giá tính sinh miễn dịch của GP5 tái tổ hợp và vai trò của

interferon alpha trong đáp ứng miễn dịch trung hòa gây ra bởi kháng nguyên GP5 ở lợn



Hình 7. Tế bào côn trùng High FIVE gây nhiễm với baculovirus tái tổ hợp được bất hoạt bằng 10mM BEI trong 48 giờ

3.2.2. Nghiên cứu ảnh hưởng tiềm năng của Interferon alpha trong đáp ứng miễn dịch của lợn được tiêm kháng nguyên GP5 tái tổ hợp của virus PRRS

Nhằm đánh giá hoạt tính miễn dịch của protein

GP5 tái tổ hợp và vai trò của interferon alpha trong đáp ứng miễn dịch trung hòa với virus PRRS của lợn được tiêm kháng nguyên GP5 tái tổ hợp, chọn lợn 35 ngày tuổi không có kháng thể kháng virus PRRS, dịch tả lợn và PCV2. Bố trí thí nghiệm được trình bày ở bảng 2.

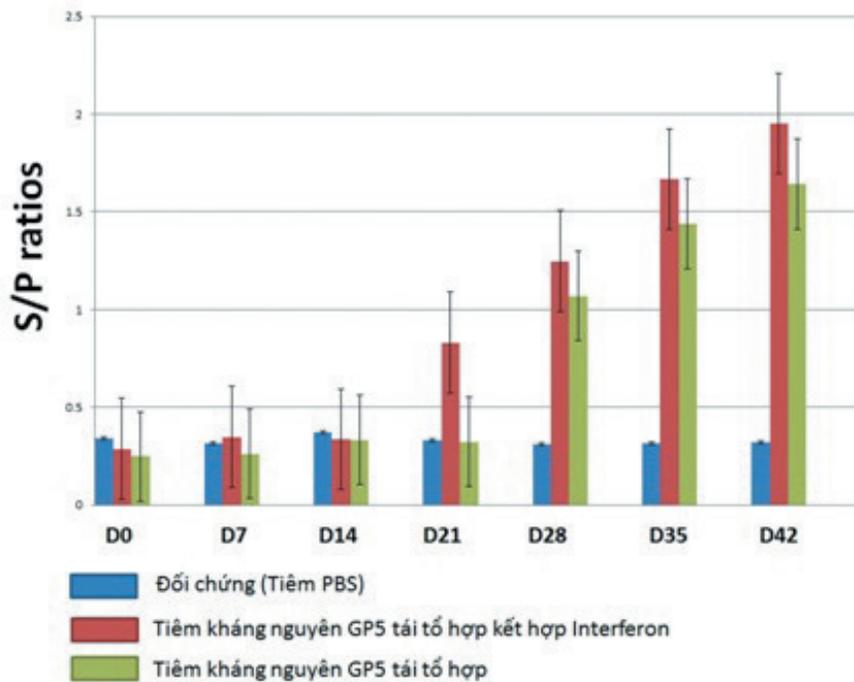
Bảng 2. Bố trí thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của interferon alpha đến đáp ứng miễn dịch trung hòa với virus PRRS của lợn được tiêm kháng nguyên GP5 tái tổ hợp

Ngày tiêm	Đối chứng (n=3)	Tiêm kháng nguyên GP5 tái tổ hợp (n=3)	Tiêm kháng nguyên GP5 kết hợp Interferon alpha (n=3)
Ngày 0	Tiêm PBS	GP5 kết hợp bổ trợ Freund hoàn toàn (Freund's complete adjuvant) (Liều: 5.0×10^7 pfu)	- GP5 kết hợp bổ trợ Freund hoàn toàn - Interferon alpha với liều 5000 UI/lợn (Nanogen Co. Vietnam)
Ngày 7	Tiêm PBS	GP5 kết hợp bổ trợ Freund không hoàn toàn (Freund's Incomplete Adjuvant)	GP5 kết hợp bổ trợ Freund không hoàn toàn
Ngày 21	Tiêm PBS	GP5 kết hợp bổ trợ Freund không hoàn toàn	GP5 kết hợp bổ trợ Freund không hoàn toàn

Mẫu huyết thanh lợn được thu thập ở các ngày 0, 7, 14, 21, 28, 35 và 42 sau khi tiêm và được đánh giá bằng kit ELISA thương mại (IDEXX laboratories, inc) theo hướng dẫn của nhà sản xuất và phương pháp trung hòa virus (VN Test) theo công bố của Trần Thị Thanh Hà và cs., 2012. Kết quả được trình bày ở hình 8.

Kết quả hình 8 cho thấy, nhóm tiêm kháng nguyên GP5 tái tổ hợp kết hợp interferon alpha phát hiện kháng thể kháng virus PRRS sau khi

tiêm 21 ngày, trong khi ở nhóm lợn chỉ tiêm kháng nguyên GP5 tái tổ hợp, kháng thể kháng virus PRRS xuất hiện muộn hơn 7 ngày so với nhóm tiêm kháng nguyên GP5 kết hợp với interferon. Cả hai nhóm thí nghiệm cho kết quả dương tính mạnh (căn cứ vào S/P ratio) từ ngày 35 đến ngày 42 sau khi tiêm, so sánh với nhóm đối chứng (tiêm PBS). Kết quả này hoàn toàn phù hợp với công bố trước đây, trong đó lợn được tiêm vaccin PRRS kết hợp với Interferon alpha làm tăng đáp



Hình 8. Kết quả ELISA phát hiện kháng thể kháng virus PRRS trong huyết thanh lợn được tiêm kháng nguyên GP5 tái tổ hợp và Interferon alpha

ứng kháng thể đặc hiệu với virus PRRS (Wasin Charerntantanakul, 2009). Đồng thời, kết quả này cũng cho thấy vai trò tiềm năng của interferon alpha như chất bổ trợ vaccin nhằm nâng cao hiệu lực miễn dịch của vaccin phòng bệnh tai xanh ở lợn, đặc biệt với vaccin tái tổ hợp.

Nhằm khẳng định vai trò của interferon alpha trong đáp ứng miễn dịch trung hòa với virus PRRS ở lợn được tiêm kháng nguyên GP5 tái tổ hợp, chúng tôi tiến hành phản ứng trung hòa virus (VN Test) với mẫu huyết thanh thu thập ở ngày 42 sau khi tiêm. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả phản ứng trung hòa virus với huyết thanh lợn được tiêm kháng nguyên GP5 tái tổ hợp kết hợp với Interferon alpha

Nhóm thí nghiệm	Kết quả ELISA (S/P ratios)	Kết quả VNT (Log ₂)
Nhóm đối chứng (tiêm PBS)	0.319	0
Tiêm protein GP5 kết hợp Interferon alpha	1.952	6.00
Tiêm protein GP5	1.642	5.00
Mẫu đối chứng âm chuẩn	0.162	0
Mẫu đối chứng dương	3.803	8.00

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, mức độ trung hòa kháng thể ở cả hai nhóm thí nghiệm đều cao, ở ngày 42, nhóm tiêm GP5 kết hợp với Interferon alpha cao hơn nhóm chỉ tiêm kháng nguyên GP5.

Không có hiện tượng trung hòa kháng thể quan sát được ở nhóm đối chứng (tiêm PBS). Kết quả này cho thấy kháng nguyên GP5 có khả năng tạo đáp ứng miễn dịch trung hòa với virus PRRS và

Interferon alpha làm tăng đáp ứng miễn dịch của lợn được tiêm protein tái tổ hợp GP5.

IV. KẾT LUẬN

Ứng dụng thành công hệ thống biểu hiện Baculovirus trong việc sản xuất protein GP5 tái tổ hợp của virus PRRS phân lập tại Việt Nam, protein GP5 tái tổ hợp bằng hệ thống baculovirus mang hoạt tính sinh học và tính sinh miễn dịch tự nhiên, là ứng cử viên tiềm năng để sản xuất vắc xin tái tổ hợp phòng bệnh Tai xanh ở Việt nam. Đồng thời Interferon alpha hoàn toàn phù hợp trong vai trò là chất bổ trợ vắc xin tái tổ hợp nhằm nâng cao tính sinh miễn dịch của kháng nguyên tái tổ hợp GP5 của virus PRRS.

Kiến nghị

Tiếp tục nghiên cứu phát triển và hoàn thiện vắc xin tái tổ hợp GP5 dùng trong phòng bệnh tai xanh tại Việt Nam. Đồng thời phát triển hướng nghiên cứu xây dựng ngân hàng cytokine tái tổ hợp của lợn (porcine cytokine bank) để phục vụ công tác nghiên cứu cũng như phát triển hệ thống cytokine bổ trợ vắc xin thế hệ mới, phục vụ công tác phòng chống dịch bệnh cho vật nuôi tại Việt Nam.

Lời cảm ơn: Tác giả xin chân thành cảm ơn Tiến sỹ Michihiro Takagi, Viện Thú y Quốc gia Nhật Bản đã tặng mẫu huyết thanh lợn sạch SPF âm tính và mẫu huyết thanh gây tối miễn dịch với virus PRRS cường độc dùng làm mẫu đối chứng trong nghiên cứu này. Tác giả cũng xin bày tỏ sự cảm ơn đến PGS.TS Tô Long Thành và các cán bộ thuộc phòng virus, Trung tâm chẩn đoán Thú y Trung ương đã hỗ trợ để hoàn thành công trình này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Thiel HJ, Meyers G, Stark R, Tautz N, Rumenapf T, et al. (1993), "Molecular characterization of positive strand RNA viruses: pestiviruses and the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)". *Arch Virol Suppl*, 7, pp. 41-52
2. Du Y1, Qi J, Lu Y, Wu J, Yoo D, Liu X, Zhang X, Li J, Sun W, Cong X, Shi J, Wang J. (2012). Evaluation of a DNA vaccine candidate co-expressing GP3 and GP5 of porcine

reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) with interferon α/γ in immediate and long-lasting protection against HP-PRRSV challenge. *Virus Genes. Dec;45(3):474-87*

3. Meulenbergh JJ, Hulst MM, de Meijer EJ, Moonen PL, den Besten A, et al. (1993), "Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV". *Virology*, 192, pp. 62-72.
4. Barbara Malitschek and Manfred Scharlt (1991) Rapid identification of recombinant baculovirus using PCR, *Biotechnology*, vol. 11, No 2
5. Nelsen CJ, Murtaugh MP, Faberg KS. (1999) "Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents". *J Virol*, 73, pp. 270-280
6. Rueda P, Fominaya J, Langeveld JP, Brusckhe C, Vela C, Casal JJ. Effect of different baculovirus inactivation procedures on the integrity and immunogenicity of porcine parvovirus-like particles. *Vaccine* 2000;19(7-8):726-34.
7. Đặng Vũ Hoàng, Trương Quốc Phong, Trần Thị Thanh Hà, Nguyễn Thị Huyền, Takehiro Kokuho và cs. (2016). Ứng dụng hệ thống biểu hiện baculovirus nhằm sản xuất protein ORF2 tái tổ hợp của virus PCV2. *Tạp chí KHKT Thú y Tập XXIII, Số 2*, 14-21
8. Trần Thị Thanh Hà, Ken Inui, Phạm Thị Nga, Đặng Xuân Sinh, Trịnh Quang Đại, Trương Anh Đức và Nguyễn Việt Không, 2012, Phản ứng trung hòa virus PRRS nuôi cấy trên tế bào và ứng dụng. *Tạp chí KHKT Thú y Tập XVIII, Số 2*
9. Charerntantanakul W. (2009), Adjuvants for porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines. *Vet Immunol Immunopathol*. 15;129 (1-2):1-13

Nhận ngày 8-8-2016

Phản biện ngày 5-9-2016

NGHIÊN CỨU MỘT SỐ YẾU TỐ NGUY CƠ ẢNH HƯỞNG ĐẾN QUÁ TRÌNH PHÁT SINH VÀ LÂY LAN HỘI CHỨNG RỐI LOẠN HÔ HẤP VÀ SINH SẢN Ở LỢN (PRRS) TRÊN ĐỊA BÀN TỈNH THÁI BÌNH

Trịnh Đình Thâu¹, Phạm Văn Lý²

TÓM TẮT

Tình hình dịch bệnh PRRS ở tỉnh Thái Bình đã được khảo sát tại một số xã thuộc các huyện: (Vũ Thư, Kiến Xương và TP Thái Bình, tỉnh Thái Bình) bằng phương pháp xử lý số liệu lưu trữ và điều tra, phỏng vấn các chủ hộ chăn nuôi. Kết quả khảo sát cho thấy trong năm 2013, tỉnh Thái Bình có 528 lợn mắc PRRS, chiếm 0,05% tổng đàn lợn của tỉnh, trong đó số lợn chết là 104 con, chiếm 19,70% số lợn bệnh. Nghiên cứu đã xác định được 7 yếu tố nguy cơ làm phát sinh và lây lan PRRS với các giá trị OR từ 2,10 đến 3,05, bao gồm: Trang trại nuôi lợn có đường giao thông chính đi qua hay gần khu vực chợ buôn bán gia súc, gia cầm sống; lợn nuôi không được tiêm phòng các bệnh truyền nhiễm nguy hiểm khác; nguồn gốc con giống không rõ ràng; chuồng trại nuôi không sử dụng thuốc sát trùng, vệ sinh tiêu độc định kỳ; sử dụng nước ao hồ công cộng để chăn nuôi trong thời gian có dịch; người nuôi bán chạy lợn trong thời gian có dịch.

Từ khóa: Lợn, PRRS, Tình hình dịch bệnh, Yếu tố nguy cơ, Tỉnh Thái Bình

Study on some risky factors affecting the spread of PRRS epidemic in Thai Binh province

Trinh Dinh Thau, Pham Van Ly

SUMMARY

Situation of PRRS epidemic in Thai Binh province was surveyed at some representative communes of Vu Thu and Kien Xuong districts, Thai Binh province. The study was carried out by analyzing the secondary data and conducting the survey through interviewing the pig raising farmers. The surveyed results showed that in 2013, there were 528 PRRS infection pigs accounting for 0.05% of total pig number in the province. Of which, the number of dead pigs were 104, accounting for 19.70% of the infection pigs. There were 7 risky factors associating with the spread of PRRS epidemic with OR value from 2.10 to 3.05 identified. These factors including: The farms had the main roads passing or located closely to the alive poultry/animal markets; The pigs were not vaccinated for other dangerous diseases; The piglet origin was not clear; The disinfectants were not used for routine disinfection in the farms; The water from community ponds/reservoirs was used in the farms during PRRS outbreak period; The farmers sold the pigs illegally in the areas and periods that PRRS was being outbroken.

Keywords: Pig, PRRS, Infection rate, Risky factor, Thai Binh province.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRS), hay còn gọi là bệnh tai xanh, là một bệnh truyền nhiễm nguy hiểm, lây lan nhanh và

làm chết nhiều lợn. Nguyên nhân gây bệnh do virus PRRS, làm thiệt hại kinh tế lớn cho ngành chăn nuôi. Ở Việt Nam từ tháng 3/2007 đến nay, bệnh đã trở thành đại dịch tại nhiều địa phương và làm tổn thất lớn về kinh tế cho người chăn nuôi, trong đó phải kể đến tỉnh Thái Bình (Cục Thú y, 2008, 2009, 2010, 2011).

¹ Học viện Nông nghiệp Việt Nam

² Chi cục Thú y tỉnh Thái Bình

Trong những năm gần đây, đàn lợn của tỉnh Thái Bình phát triển khá mạnh cả về tốc độ và giá trị sản xuất. Tuy nhiên, dịch bệnh đã làm nhiều lợn ốm, chết. Do vậy việc nghiên cứu, tìm hiểu về hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn có ý nghĩa quan trọng và cấp thiết trong quá trình phòng chống dịch bệnh đạt hiệu quả, giảm thiệt hại do dịch bệnh gây ra.

Mục đích của nghiên cứu này, nhằm xác định được tình hình dịch bệnh PRRS ở lợn tại Thái Bình năm 2013 và đánh giá các yếu tố nguy cơ gây bùng phát bệnh tai xanh trên đàn lợn tại địa bàn nghiên cứu.

II. NỘI DUNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nội dung nghiên cứu

Tình hình dịch bệnh PRRS ở lợn tại tỉnh Thái Bình năm 2013.

Đánh giá các yếu tố nguy cơ ảnh hưởng đến quá trình phát sinh và lây lan bệnh PRRS ở lợn trên địa bàn tỉnh Thái Bình năm 2013.

Đề tài được tiến hành từ tháng 8/2013 đến tháng 7/2014 tại xã Vũ Vân, Vũ Đoài (huyện Vũ Thư), xã Phú Xuân (thành phố Thái Bình), xã Vũ Hòa (huyện Kiến Xương).

2.2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Vật liệu

- Số liệu điều tra về tình hình chăn nuôi lợn và tình hình dịch bệnh PRRS ở lợn, được thu thập thông qua các tài liệu lưu trữ của Cục thống

kê, Chi cục thú y, Trạm thú y (số liệu thứ cấp) về các chỉ tiêu: tổng số lợn, số lợn ốm, số lợn chết và tiêu hủy do PRRS.

2.2.2 Phương pháp nghiên cứu

- Dùng bảng hỏi (phiếu điều tra) để điều tra các hộ chăn nuôi; kết hợp phỏng vấn cán bộ thú y cơ sở để thu thập thêm thông tin.

- Đánh giá các yếu tố nguy cơ có ảnh hưởng đến quá trình phát sinh và lây lan bệnh PRRS ở lợn trên địa bàn tỉnh Thái Bình năm 2013:

+ Gần đường giao thông chính.

+ Gần chợ buôn bán giết mổ động vật và sản phẩm động vật.

+ Không tiêm phòng các bệnh truyền nhiễm nguy hiểm.

+ Nguồn gốc con giống không rõ ràng.

+ Không sử dụng thuốc sát trùng để vệ sinh tiêu độc định kỳ.

+ Sử dụng nước ao hồ công cộng để chăn nuôi lợn.

+ Bán chạy lợn.

- Xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2007 các dữ liệu để biết được số hộ chăn nuôi lợn mắc bệnh và không mắc bệnh PRRS.

- Sử dụng phần mềm Epicalc 2000 để xác định yếu tố nguy cơ có liên quan hay không liên quan đến việc phát sinh và lây lan dịch bệnh PRRS theo phương pháp nghiên cứu bệnh chứng hay hồi cứu (*case-control studies*),

Nhân tố	Bệnh		Tổng số
	Có mắc	Không mắc	
Có yếu tố nguy cơ	a	b	a+b
Không có yếu tố nguy cơ	c	d	c+d
Tổng số	a+c	b+d	a+b+c+d = N

Sử dụng phép thử χ^2 (khi bình phương) (Chi-square) để có kết luận về mối liên quan

giữa yếu tố nguy cơ và số hộ có lợn mắc bệnh.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**Thái Bình năm 2013.****3.1 Tình hình dịch bệnh PRRS ở lợn tại**

Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Tình hình dịch bệnh PRRS ở lợn tại Thái Bình năm 2013

TT	Huyện/Thành	Tổng số lợn (con)	Số lợn ốm (con)	Tỷ lệ (%)	Số chết, xử lý (con)	Tỷ lệ (%)
1	Đông Hưng	180.253	0	0,00	0	0,00
2	Hưng Hà	164.628	0	0,00	0	0,00
3	Kiến Xương	151.596	129	0,09	22	17,05
4	Quỳnh Phụ	156.911	0	0,00	0	0,00
5	Thái Thụy	107.789	0	0,00	0	0,00
6	TP Thái Bình	40.503	138	0,34	19	13,77
7	Tiền Hải	92.045	0	0,00	0	0,00
8	Vũ Thư	167.796	261	0,16	63	24,14
Tổng số		1.061.521	528	0,05	104	19,70

Từ đầu tháng 4/2013, qua triển khai công tác hoạt động kiểm dịch lưu động, kết hợp với giám sát thường xuyên, đã phát hiện dịch bệnh tai xanh trên đàn lợn của 117 hộ chăn nuôi ở 23 thôn thuộc 4 xã: Vũ Hoà (huyện Kiến Xương), Vũ Vân, Vũ Đoài (huyện Vũ Thư) và xã Phú Xuân (thành phố Thái Bình) với tổng số lợn mắc bệnh là 528 con (128 lợn nái, 313 lợn thịt, 87 lợn sữa) trong tổng đàn 1.283 con, số lợn được điều trị khỏi bệnh là 424 con (108 lợn nái, 280 lợn thịt, 36 lợn sữa); số lợn chết và bị tiêu huỷ là 104 con (20 lợn nái, 33 lợn thịt, 51 lợn sữa), chiếm 19,69 % số lợn ốm.

Số lợn ốm do mắc bệnh PRRS năm 2012 là 81 con, số lợn chết và xử lý là 25 con (Chi cục thú y Thái Bình, 2012). Như vậy, so với năm 2012, số lợn ốm do mắc bệnh tai xanh tăng 6,52 lần, số lợn chết và phải xử lý tăng 4,16 lần. Nguyên nhân cơ bản do tỷ lệ tiêm phòng vacxin PRRS trên đàn lợn đạt thấp và do hệ thống giám sát, phát hiện dịch tại cơ sở còn nhiều hạn chế, phát hiện chậm, báo cáo chậm.

3.2 Yếu tố nguy cơ làm ảnh hưởng đến quá**trình phát sinh và lây lan dịch bệnh PRRS ở lợn tại Thái Bình năm 2013**

Việc kiểm soát các yếu tố nguy cơ ở các hộ chăn nuôi rất quan trọng và cần phải được triển khai thường xuyên, nhằm kiểm soát có hiệu quả dịch bệnh. Mặt khác, công tác kiểm dịch, vận chuyển cần được chú trọng hơn và khắc phục những tồn tại, bất cập hiện nay để ngăn chặn virus PRRS lây lan và gây bệnh do vận chuyển gia súc mang trùng.

Chúng tôi tiến hành thu thập thông tin điều tra theo biểu mẫu, sau khi có thống kê số liệu theo các yếu tố phân tích, kết quả về ảnh hưởng của các yếu tố nguy cơ đến việc làm phát tán và lây lan dịch bệnh PRRS tại Thái Bình năm 2013 được phân tích như sau:

3.2.1 Gần đường giao thông chính

Chúng tôi điều tra 120 hộ chăn nuôi lợn, trong đó mỗi liên hệ giữa số hộ chăn nuôi lợn có dịch PRRS và không có dịch PRRS với yếu tố có khu vực chăn nuôi gần đường giao thông chính được thể hiện qua bảng 2.

Bảng 2. Kết quả điều tra về mối liên hệ giữa yếu tố đường giao thông chính và số hộ chăn nuôi có dịch PRRS ở lợn tại Thái Bình năm 2013

		Có dịch PRRS	Không có dịch PRRS	Tổng hàng	P	OR
Khu vực chăn nuôi gần đường giao thông chính	Hộ có	27	15	42	0,021637<0,05	2,45
	Hộ không	33	45	78		
	Tổng cột	60	60	120		

Bảng 2 cho thấy $p = 0,021637 < 0,05$, bác bỏ H_0 . Các hộ chăn nuôi lợn gần đường giao thông chính có liên quan và làm tăng nguy cơ mắc bệnh PRRS ở lợn tại Thái Bình gấp 2,45 lần (95% CI 1,13-5,33) so với những hộ không có đường giao thông đi qua.

3.2.2 Chăn nuôi gần chợ buôn bán gia súc,

gia cầm sống

Qua điều tra trực tiếp, chúng tôi đã thống kê được mối liên quan giữa các hộ chăn nuôi gần chợ buôn bán gia súc, gia cầm sống với việc lợn mắc bệnh PRRS tại các hộ chăn nuôi tỉnh Thái Bình năm 2013, kết quả thể hiện qua bảng 3.

Bảng 3. Kết quả điều tra về mối liên hệ giữa yếu tố gần chợ buôn bán gia súc, gia cầm sống và số hộ chăn nuôi có dịch PRRS ở lợn tại Thái Bình năm 2013

		Có dịch PRRS	Không có dịch PRRS	Tổng hàng	P	OR
Khu vực chăn nuôi gần chợ buôn bán gia súc, gia cầm sống	Hộ có	33	21	53	0,043164<0,05	2,12
	Hộ không	28	39	67		
	Tổng cột	60	60	120		

Bảng 3 cho thấy $p = 0,043871 < 0,05$, vì vậy bác bỏ H_0 . Việc các hộ chăn nuôi gần khu vực chợ buôn bán gia súc, gia cầm sống có liên quan và làm tăng nguy cơ mắc bệnh PRRS ở lợn tại Thái Bình năm 2013 lên gấp 2,12 lần (CI: 1,02 - 4,42) so với các hộ chăn nuôi cách xa khu vực buôn bán gia súc gia cầm sống.

3.2.3 Không tiêm phòng các bệnh truyền nhiễm nguy hiểm khác

PRRS là một trong những bệnh truyền nhiễm nguy hiểm và lây lan nhanh ở lợn mọi lứa tuổi. Để khẳng định việc tiêm phòng các bệnh truyền nhiễm khác (như dịch tả lợn, phó thương hàn, tụ huyết trùng, đốm máu...) có liên quan đến việc làm phát sinh và lây lan bệnh PRRS ở lợn tại Thái Bình năm 2013, chúng tôi tiến hành điều tra và phân tích mối liên quan này. Kết quả được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả điều tra về mối liên hệ giữa việc không tiêm phòng các bệnh truyền nhiễm nguy hiểm khác và số hộ chăn nuôi có dịch PRRS ở lợn tại Thái Bình năm 2013

		Có dịch PRRS	Không có dịch PRRS	Tổng hàng	P	OR
Tiêm phòng các bệnh truyền nhiễm nguy hiểm khác	Hộ có	34	19	45	0,005826<0,05	2,82
	Hộ không	26	41	75		
	Tổng cột	60	60	120		

Kết quả bảng 4 cho biết $p = 0,005826 < 0,05$, bác bỏ H_0 . Như vậy, việc các hộ chăn nuôi lợn không tiêm phòng các bệnh truyền nhiễm nguy hiểm khác có liên quan và làm tăng nguy cơ lây lan và phát sinh dịch PRRS ở lợn tại Thái Bình lên 2,82 lần so với các hộ tiêm phòng đầy đủ (95% CI 1,34-5,95).

Đợt dịch này của Thái Bình xảy ra vào tháng 4 năm 2013. Do điều kiện thời tiết bất lợi (thời tiết lúc chuyển mùa) kết hợp với việc không tiêm phòng đầy đủ vacxin các bệnh truyền nhiễm làm tăng nguy cơ mắc bệnh PRRS khi gia súc tiếp xúc với mầm bệnh.

3.2.4 Nguồn gốc con giống không rõ ràng

Nguyên nhân do giá con giống cao và chưa chủ động được con giống, nên hầu hết các hộ chăn nuôi quy mô nhỏ đều mua con giống có xuất xứ không rõ ràng. Một số ít hộ chăn nuôi có lợn nái sinh sản đã tự chủ động được con giống để chăn nuôi.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi quy định gia súc có nguồn gốc rõ ràng là những gia súc: đã nuôi tại hộ gia đình trên 2 tháng, giống của gia đình có lợn nái sinh ra, giống mua trong địa phương (cùng xã) hoặc gia súc được mua có nguồn gốc rõ ràng (có chứng nhận kiểm dịch của cơ quan thú y). Kết quả được thể hiện ở bảng 5.

Bảng 5. Kết quả điều tra về mối liên hệ giữa việc sử dụng nguồn gốc con giống không rõ ràng và số hộ chăn nuôi có dịch PRRS ở lợn tại Thái Bình năm 2013

		Có dịch PRRS	Không có dịch PRRS	Tổng hàng	P	OR
Nguồn gốc con giống không rõ ràng	Hộ có	35	19	54	0,003326<0,05	3,02
	Hộ không	25	41	66		
	Tổng cột	60	60	120		

Kết quả bảng 5 cho biết $p = 0,003326 < 0,05$, bác bỏ H_0 . Như vậy, việc sử dụng con giống có nguồn gốc không rõ ràng có liên quan và làm tăng nguy cơ lây lan và phát sinh dịch bệnh PRRS ở lợn tại Thái Bình lên 3,02 lần (95% CI 1,43-6,38).

3.2.5 Không sử dụng thuốc sát trùng vệ sinh tiêu độc định kỳ

Việc sử dụng thuốc sát trùng để VSTD định kỳ ngày càng được người chăn nuôi quan tâm sử dụng và coi đó là một việc không thể thiếu trong nghề chăn nuôi của mình. Tuy nhiên, việc sử dụng thuốc sát trùng định kỳ lại chưa được các hộ chăn nuôi có quy mô nhỏ lễ quan tâm, chỉ có các trang trại, gia trại quy mô lớn mới chú trọng công tác này. Nguyên nhân một phần do tâm lý chủ quan của người chăn nuôi nhỏ lẻ. Chúng tôi quy ước, hộ chăn nuôi sử dụng thuốc khử trùng để vệ sinh tiêu độc trong và ngoài chuồng trại

định kỳ một tuần/lần được coi là hộ có sử dụng, còn lại là hộ không sử dụng.

Khi điều tra, chúng tôi nhận thấy đa số các hộ có dịch chỉ vệ sinh cơ giới chuồng nuôi, không sử dụng hóa chất để vệ sinh tiêu độc định kỳ. Phân và chất thải chăn nuôi không được xử lý. Đối với các hộ không có dịch, việc vệ sinh tiêu độc được rất nhiều hộ thực hiện theo quy trình (định kỳ một tuần phun hóa chất từ 1-2 lần, vệ sinh cơ giới trước khi phun khử trùng tiêu độc).

Số liệu điều tra được thu thập và thống kê theo bảng 6.

Kết quả cho thấy $p = 0,003204 < 0,05$, không chấp nhận H_0 . Như vậy, việc các hộ chăn nuôi lợn không sử dụng thuốc sát trùng để VSTD định kỳ có liên quan và làm tăng nguy cơ phát sinh và lây lan dịch PRRS ở lợn gấp 3,05 lần (95% CI 1,44-6,47).