



NGHIÊN CỨU HIỆU QUẢ CHỐNG VIRUS TAI XANH ĐỘC LỰC CAO CỦA TILMICOSIN Ở ĐIỀU KIỆN IN VITRO

Hoàng Chung^{1*}, Porntrakulpipat Sarthorn²

¹ Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

² Đại học Khôn Kèn, Thái Lan

Tóm tắt: Hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn gây nhiều thiệt hại cho ngành sản xuất lợn trên thế giới, Trung Quốc và các nước Đông Nam Á. Việc khống chế và loại trừ nguyên nhân gây bệnh là hết sức cần thiết. Trên thực tế, an toàn sinh học và vaccine đã được áp dụng, nhưng giá thành khá cao, các quy trình an toàn sinh học đòi hỏi được thực hiện nghiêm ngặt, trong lúc hiệu quả của các loại vaccine sống vẫn còn nhiều hạn chế. Tilmicosin là một kháng sinh nhóm macrolide, đã được chứng minh có khả năng tích tụ nồng độ cao trong Đại thực bào phế nang phổi lợn (PAMs) cũng như ức chế virus bệnh tai xanh. Điều này là rất có lợi cho sự khống chế hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản lợn (PRRS). Trong nghiên cứu này, tilmicosin của bốn nhãn hiệu có sẵn trên thị trường đã được thử nghiệm trên hai chủng virus bệnh tai xanh độc lực cao (HP-PRRSV) và virus bệnh tai xanh độc lực thường (PRRSV). Kết quả cho thấy, tất cả bốn nhãn hiệu tilmicosin đều có khả năng ức chế cả hai chủng virus bệnh tai xanh trên. Kết quả này cũng xác nhận rằng, việc biến đổi gene của virus bệnh tai xanh không né tránh được hiệu quả của thuốc.

Từ khóa: HP-PRRSV, chống virus, tilmicosin

1 Đặt vấn đề

Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp lợn là một bệnh truyền nhiễm trên lợn gây ra thiệt hại kinh tế đáng kể cho ngành chăn nuôi lợn công nghiệp toàn cầu. Sự xuất hiện đầu tiên của bệnh được báo cáo ở Bắc Mỹ vào năm 1987 gây giảm năng suất sinh sản, gia tăng tử vong cho lợn một cách nghiêm trọng. Ở châu Âu, một đợt dịch bệnh có triệu chứng lâm sàng tương tự đã được tìm thấy ở Đức vào tháng 1 năm 1990 [8]. Tuy nhiên, đến năm 1991 tại Châu Âu mới phân lập được nguyên nhân gây bệnh và một thời gian ngắn sau đó ở Canada [6, 11]. Virus bệnh tai xanh phát triển trên tế bào đại thực bào phế nang ở phổi của lợn nhiễm bệnh, gây nhiễm trùng cấp tính có triệu chứng [3].

Sự xuất hiện của bệnh tai xanh độc lực cao đã được báo cáo ở Trung Quốc vào năm 2006 và được mô tả đặc điểm bởi sốt cao, tỉ lệ mắc bệnh và chết rất cao trên lợn ở tất cả các lứa tuổi. Virus tai xanh độc lực cao thuộc type 2 của virus bệnh tai xanh và hiện đang lan truyền rộng rãi ở Trung Quốc và các quốc gia Đông Nam Á [1]. Các nghiên cứu trước đây cho thấy, virus tai xanh độc lực cao gây triệu chứng lâm sàng và bệnh tích nghiêm trọng hơn virus tai xanh thường, thậm chí có khả năng gây bệnh nặng trong cả trường hợp không đồng nhiễm với các bệnh khác. Các nghiên cứu về bệnh học cũng cho thấy các virus bệnh tai xanh được phân lập từ 2006-2010 cho thấy virus vẫn duy trì một độc lực cao tương đương [7]. Ngoài ra, HP-PRRSV với trạng thái mất 30 axit amin trong chuỗi Nsp2 vẫn là chủng virus chiếm ưu thế hiện nay trong việc gây thiệt hại trên lợn [12].

* Liên hệ: hoangchung@huaf.edu.vn

Hiện tại phương thức quản lý và chương trình khống chế và loại trừ PRRS như an toàn sinh học, vệ sinh môi trường, giảm quy mô đàn... để giảm thiểu và loại bỏ các nguy cơ gây hại của HP-PRRS. Tuy nhiên, không phải tất cả các trang trại chăn nuôi lợn đều có thể áp dụng biện pháp có giá trị này do chi phí đầu tư khá cao. Các chương trình vaccine cho đến nay chưa thể được sử dụng như một biện pháp hiệu quả vì các loại vaccine sống (ML-vaccine) tỏ ra ít hiệu quả khi ngăn chặn các biến thể di truyền liên tục của các chủng virus tai xanh này [5].

Do các nhược điểm của ML-vaccine và chi phí cao của các phương pháp trên, một cách tiếp cận khác là cần thiết để kiểm soát hay ngăn chặn lây nhiễm virus PRRS trong các trang trại. Cách lựa chọn tốt nhất để kiểm soát PRRS là để loại bỏ virus PRRS lây lan từ các trang trại lợn. Theo kịch bản này, hóa trị liệu kháng virus mới là lựa chọn kịp thời để điền vào lỗ hổng đang tồn tại dai dẳng trong các chương trình phòng chống và kiểm soát PRRS. Một trong số đó sẽ được sử dụng các loại thuốc chống virus PRRS như tilmicosin, là một kháng sinh nhóm macrolide. Một vài nghiên cứu đã chỉ ra rằng tilmicosin bổ sung vào thức ăn có thể làm giảm những thiệt hại gây ra bởi PRRS ở lợn [2]. Hơn thế nữa, tilmicosin còn có khả năng tích lũy với nồng độ cao trong các đại thực bào phế nang lợn (PAMs) và dòng tế bào thận khỉ xanh châu Phi (MARC-145), được biết đến như một dòng tế bào giúp hỗ trợ nhân lên của PRRSV [4, 10].

Do thiếu thông tin về hiệu quả của tilmicosin trên HP-PRRSV, nghiên cứu này nhằm mục đích đánh giá khả năng kháng virus của bốn thương hiệu của tilmicosin đang được bán trên thị trường đối với chủng HP-PRRSV được phân lập từ vùng Đông Bắc của Thái Lan năm 2010.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Tế bào, virus và tilmicosin

Đại thực bào được thu thập bằng phương pháp rửa phế nang từ phổi lợn con 6 tuần tuổi không nhiễm PRRSV và được nuôi trong môi trường RPMI-1640 chứa 10 % huyết thanh thai bò bất hoạt bởi nhiệt (FBS) và thuốc kháng sinh. Dòng tế bào MARC-145 được nuôi trong môi trường D-MEM có bổ sung FBS 10 %. Trong tất cả các thí nghiệm, các tế bào được ủ trong một lồng ấp ẩm tại 37 °C và 5 % CO₂. Sau 24 h ủ, các tế bào không dính được chiết hoặc rửa sạch bằng dung dịch PBS hoặc dung dịch HBSS. Các tế bào còn lại được nuôi trong môi trường có bổ sung FBS và kháng sinh. Các virus được sử dụng trong nghiên cứu này là chủng của HP-PRRSV được phân lập từ những con lợn bị nhiễm bệnh ở Đông Bắc Thái Lan năm 2010 và PRRSV đã được điều chỉnh để phát triển trong dòng tế bào MARC-145. Bốn thương hiệu khác nhau của tilmicosin thu thập từ thị trường được bán ở dạng bột sau đó được hòa tan trong môi trường RPMI-1640 và D-MEM trước khi được thử nghiệm trên PAMs và tế bào MARC-145. Các loại thuốc hòa tan được lọc qua màng lọc 0,2 µm (Minisart®).

2.2 Xác định khả năng gây độc của tilmicosin trên dòng tế bào MARC-145 và PAMs

2×10^4 tế bào MARC-145 và 10^5 PAMs được gieo vào khay 96 giếng (96-well microtiter plate), sau đó được ủ ở 37 °C, 5 % CO₂ trong 24 giờ. Dãy pha loãng hai lần của tilmicosin bắt đầu với nồng độ 1000 mg/ml được thực hiện và trộn với tế bào để tìm nồng độ tối đa của

tilmicosin không gây hại cho chúng. Mỗi pha loãng được thực hiện ba hàng trước khi được chuyển sang các khay vi chuẩn 96 giếng có chứa tế bào tương ứng. Bệnh lý tế bào (CPE) được quan sát hàng ngày thông qua việc quan sát đánh giá tổn thương tế bào thông qua kính hiển vi. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

2.3 Xác định hiệu quả chống virus tai xanh của tilmicosin trên tế bào MARC-145 và PAMs

Trước khi gây nhiễm, 2×10^4 tế bào MARC-145 và 10^5 PAMs được gieo vào các khay vi chuẩn 96 giếng, sau đó được trộn với các dãy pha loãng hai lần của tilmicosin của bốn nhãn hiệu trong 24 giờ. Nồng độ của các pha loãng đầu tiên của tilmicosin là 80 mg/ml. Sau đó, các tế bào đã bị nhiễm bệnh với 100 ml TCID₅₀ của PRRSV cho tế bào MARC-145 và 100 ml TCID₅₀ của HP- PRRSV cho PAMs trong sự hiện diện của các loại thuốc tilmicosin. Các CPE được quan sát đánh giá hàng ngày bằng kính hiển vi quang học đảo ngược. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Thí nghiệm được thực hiện tại Phòng thí nghiệm virus, Khoa thú y, Trường Đại học Khôn Kèn, Thái Lan từ tháng 4 năm 2013 đến tháng 2 năm 2014.

2.4 Phương pháp xử lý số liệu

Nồng độ tối đa của các mẫu tilmicosin không có khả năng gây độc trên 50 % PAMs cũng như tế bào MARC-145 và nồng độ tối thiểu tilmicosin bảo vệ các tế bào chống lại sự biểu hiện 50 % của CPE đã được ghi lại và được tính bằng công thức Reech và Muech [9]. Kết quả thí nghiệm được trình bày trong các bảng biểu bằng giá trị trung bình \pm độ lệch tiêu chuẩn (SD).

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Gây độc tế bào

Hình thái học của các tế bào đã được quan sát qua kính hiển vi để xác nhận sự biến dạng về hình thái và sự phá hủy tế bào sau khi được điều trị bằng các dãy pha loãng 2 lần liên tục của tilmosin từ bốn thương hiệu.

Bảng 1. Nồng độ tối đa của các mẫu tilmicosin không có khả năng gây độc trên 50 % PAMs và tế bào MARC-145

Tế bào	Mẫu A ($\mu\text{g/ml}$)	Mẫu B ($\mu\text{g/ml}$)	Mẫu C ($\mu\text{g/ml}$)	Mẫu D ($\mu\text{g/ml}$)
Tế bào MARC-145	345,39 \pm 33,3	219,30 \pm 38,29	132,40 \pm 63,94	295,03 \pm 25,18
PAMs	311,8 \pm 39,01	199,8 \pm 3,11	139,14 \pm 66,45	272,16 \pm 35,45

Kết quả trên cho thấy, tilmicosin bốn nhãn hiệu của trên thị trường đều có khả năng gây độc tế bào khác nhau. Mẫu C là mẫu có khả năng gây độc cao nhất cả hai loại tế bào PAMs và tế bào MARC-145 (132,40 \pm 63,94 $\mu\text{g/ml}$ và 139,14 \pm 66,45 $\mu\text{g/ml}$) trong sự so sánh với các mẫu khác. Trong khi, mẫu A lại ít gây hại cho tế bào nhất, cao đến 345,39 \pm 33,3 $\mu\text{g/ml}$ đối với tế bào

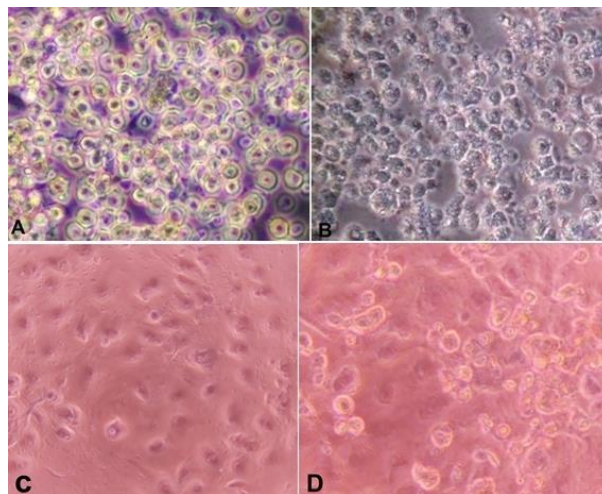
MARC-145 và $311,8 \pm 39,01$ $\mu\text{g/ml}$ đối với PAMs. Chính nhờ kết quả này, chúng tôi có thể lựa chọn các nồng độ ban đầu của tilimicosin trong thí nghiệm kháng virus tiếp theo, nhằm bảo vệ các tế bào khỏi bị gây hại bởi virus PRRS, đồng thời không gây độc tế bào và không ảnh hưởng đến kết quả nghiên cứu.

3.2 Hiệu quả chống virus của tilimicosin đối với HP-PRRS và PRRSV trên PAMs và tế bào MARC-145

Trong thí nghiệm này, các tế bào được trộn qua đêm với tilimicosin trước khi gây nhiễm với virus. Kết quả trên PAMs cho thấy nồng độ ức chế của mẫu A, B, C và D chống lại HP-PRRSV lần lượt là $31,43 \pm 4,26$ mg/ml, $28,97 \pm 0$ mg/ml, $42,02 \pm 9,80$ mg/ml và $33,89 \pm 4,26$ mg/ml. Trong khi kết quả trên tế bào MARC-145 cho thấy khả năng ức chế PRRSV thường của mẫu A, B, C và D là tương đương nhau và ở nồng độ $30,1 \pm 5,31$ mg/ml.

Bảng 2. Nồng độ tối thiểu của các mẫu tilimicosin có khả năng bảo vệ tế bào PAMs và tế bào MARC-145 trước hai chủng virus tai xanh

Tế bào	Mẫu A ($\mu\text{g/ml}$)	Mẫu B ($\mu\text{g/ml}$)	Mẫu C ($\mu\text{g/ml}$)	Mẫu D ($\mu\text{g/ml}$)
Tế bào MARC-145 nhiễm PRRSV	$30,1 \pm 5,31$	$30,1 \pm 5,31$	$30,1 \pm 5,31$	$30,1 \pm 5,31$
PAMs nhiễm HP-PRRSV	$31,43 \pm 4,26$	$28,97 \pm 0$	$42,02 \pm 9,80$	$33,89 \pm 4,26$



Hình 1. Hiệu ứng bệnh lý tế bào của HP-PRRSV trên PAMs và của PRRSV trên tế bào MARC-145 (A: tế bào PAMs bình thường; B: tế bào PAMs bị nhiễm). (C: tế bào MARC-145 bình thường; D: tế bào MARC-145 bị nhiễm)

Nghiên cứu này cho thấy tilmicosin sẵn trên thị trường có hiệu quả khác nhau để ngăn chặn sự lây nhiễm của virus PRRS (Hình 1). Mẫu A và B đại diện cho 2 nhãn hiệu tilmicosin hiệu quả hơn tilmicosin trong mẫu C và D khi bảo vệ hai loại tế bào khỏi sự gây hại của HP-PRRSV và PRRSV. Ngược lại, mẫu C cần nồng độ cao hơn để ngăn chặn sự nhân lên của HP-PRRSV ($42,02 \pm 9,80$ mg/ml). Những kết quả này chứng minh rằng, tất cả 4 nhãn hiệu tilmicosin trên thị trường đều có khả năng ức chế sự lây nhiễm của cả hai loại virus tai xanh độc lực cao và độc lực thường trên môi trường tế bào, nhưng với các nồng độ hiệu quả khác nhau.

Để giải thích cho khả năng của tilmicosin trong việc ức chế sự nhân lên của virus bệnh tai xanh, chúng tôi dựa vào những luận cứ khoa học [16, 27] về hóa học, dược lý học và đưa ra giả thiết tóm gọn như sau: sự tích tụ của tilmicosin trong lysosome làm tăng giá trị pH của lysosome, dẫn đến sự bất hoạt các enzym phân giải protein và như một hệ quả, quá trình cởi áo của virus sẽ bị ức chế, do đó có thể ngăn chặn sự sao chép của virus bệnh tai xanh diễn ra trong tế bào.

4 Kết luận và kiến nghị

Cả bốn nhãn hiệu tilmicosin sử dụng trong thí nghiệm đều có tác dụng ức chế sự nhân lên của virus bệnh tai xanh trong điều kiện in vitro. Chúng tôi cũng xác nhận rằng, biến thể di truyền của virus PRRS không thể thoát khỏi sự hiệu quả của tilmicosin. Có thể thấy rằng, tilmicosin là một loại hóa dược tiềm năng trong phòng và điều trị sớm cho lợn ở vùng có dịch đang xảy ra với chi phí không cao và dễ sử dụng. Đồng thời, với khả năng ngăn chặn sự nhân lên của virus bệnh tai xanh trong cơ thể lợn, điều này tương ứng với việc hạn chế rất hiệu quả các mầm bệnh virus tai xanh thải ra môi trường, giúp hạn chế lây lan dịch bệnh trong lúc chờ đợi một giải pháp vaccine hiệu quả hơn hiện tại. Vì vậy, chúng tôi kiến nghị loại hóa dược tiềm năng này nên được phép ứng dụng trong điều kiện in vivo như là một giải pháp điều trị sớm, góp phần cùng các giải pháp khác khống chế và loại trừ dịch bệnh tai xanh.

Tài liệu tham khảo

1. An, TQ., Tian, ZJ., Xiao, Y., Li, R., Peng, JM., Wei, TC., Zhang, Y., Zhou, YJ., and Tong, GZ. (2010), Origin of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus, China, *Emerg Infect Dis.* 16: 365-7.
2. Benfield, DA., C. C., Moore G, Wagner JR, Zeman DH and et. al. (2002), An evaluation of the effects of tilmicosin in feed on nursery pigs inoculated with porcine reproductive and respiratory syndrome virus, *Proceedings American Association of Swine Veterinarians*, 87-91.
3. Beyer, J., Fichtner, D., Schirmeier, H., Polster, U., Weiland, E., and Wege, H. (2000), Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): kinetics of infection in lymphatic organs and lung, *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 47, 9-25.
4. Blais, J., et. al. (1994), Intracellular accumulation of tilmicosin in primary swine alveolar macrophages, *Proc 13th IPVS Congr* p331.
5. Charentantanakul, W. (2012), Porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines: Immunogenicity, efficacy and safety aspects, *World J Virol*, 1: 23-30.

6. Collins, JE., Benfield, DA., Christianson, WT., Harris, L., Hennings, JC., Shaw, DP., Goyal, SM., McCullough, S., Morrison, RB., Joo, HS., and et. al. (1992), Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs, *J Vet Diagn Invest*, 4: 117-26.
7. Lager, KM., Faaberg, KS., Brockmeier, SL., Miller, LC., Kappes, MA., Spear, A., Kehrli, Jr., ME. 2012, Pathogenesis of HP-PRRSV in gnotobiotic pigs, *International PRRS Symposium*, 92.
8. OIE. (1992), World Animal Health 1991. Volume VII. Number 2, *Animal Health Status and Disease Control Methods (Part One: Reports)*, 126.
9. Reed, LJM., H. (1938), A simple method of estimating fifty percent endpoints, *The American Journal of Hygiene*, 27: 493-497.
10. Therrien, D., St-Pierre, Y., and Dea, S. (2000), Preliminary characterization of protein binding factor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus on the surface of permissive and non-permissive cells, *Arch Virol*, 145: 1099-116.
11. Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol, JM., ter Laak, EA., Bloemraad, M., de Kluyver, EP., Kragten, C., van Buiten, L., den Besten, A., Wagenaar, F., và Cs. (1991), Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus, *Vet Q.*, 13: 121-30.
12. Yu, X., Chen, N., Deng, X., Cao, Z., Han, W., Hu, D., Wu, J., Zhang, S., Wang, B., Gu, X., and Tian, K. (2013), Genomic sequencing reveals mutations potentially related to the overattenuation of a highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus, *Clin Vaccine Immunol*, 20: 613-9.

ANTIVIRAL ACTIVITY OF TILMICOSIN ON HIGHLY PATHOGENIC PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS IN VITRO

Hoang Chung^{1*}, Porntrakulpipat Sarthorn²

¹College of Agriculture and Forestry, Hue University

²Khon Kaen University, Thailand

Abstract: The Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (HP-PRRS) has caused economic losses to the pig production in China, south-east Asian countries and other nations in the world. Consequently, immense challenge to control and eliminate the causes could not be avoided. For this purpose, bio-security and vaccine have been used; however, the expense is high, the bio-security procedure is strict, and the the survival rate of the vaccines is relatively limited. Meanwhile, tilmicosin, a macrolide antibiotic, was found to accumulate in high concentrations in Porcine Alveolar Macrophages (PAMs) and could inhibit PRRS virus (PRRSV), and it could be benefited for PRRS control. In this study, HP-PRRSV and PRRSV were tested with four brands of tilmicosin in the market. The results demonstrated that all four brands of tilmicosin could inhibit the infection of both HP-PRRSV and PRRSV in cell culture. Furthermore, the results also confirmed that genetic variation of PRRSV could not escape from the efficacy of tilmicosin.

Keywords: HP-PRRSV, antivirus, tilmicosin