

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO**

**BỘ Y TẾ**

**VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG**

\*\*\*\*\*

**NGUYỄN THỊ KIỀU ANH**

**THÍCH NGHI CHỨNG SẢN XUẤT VẮC XIN ĐẠI VNUKOVO-32  
TRÊN TẾ BÀO VERO ĐỂ THỬ NGHIỆM SẢN XUẤT VẮC XIN**

**Chuyên ngành: Virút học**

**Mã số: 62 72 68 05**

**TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC**

**HÀ NỘI - 2010**

Công trình được hoàn thành tại:

## **VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG**

Người hướng dẫn khoa học:

**1. PGS.TS. NGUYỄN THỊ HỒNG HẠNH**

**2. PGS.TS. ĐINH KIM XUYẾN**

**Phản biện 1: GS.TSKH. Nguyễn Văn Dịp**

**Phản biện 2: GS.TSKH. Nguyễn Thu Vân**

**Phản biện 3: PGS.TS. Lê Văn Phủng**

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Nhà nước tổ chức tại:

## **VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG**

Vào hồi: 14 giờ 00 ngày 25 tháng 5 năm 2010

**Có thể tìm hiểu luận án tại:**

- Thư viện Quốc gia;
- Thư viện Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương.

## CÁC CHỮ VIẾT TẮT

CPE	Cytopathic Effect (huỷ hoại tế bào)
CTT	Chuột tăng trọng
ELISA	Emzym Linked Immuno-Sorbent Assay (kỹ thuật miễn dịch gắn men)
G protein	Glycoprotein
KD	Kilodalton
KV	1000 vòng/phút
MCB	Master Cell Bank (ngân hàng tế bào giống gốc)
MOI	Multiplicity of Infection (liều gây nhiễm)
MSV	Master Seed Virus (Chủng vi rút giống gốc)
MWCO	Molecular weight cut off (giới hạn trọng lượng phân tử)
N protein	Nucleoprotein
RFFIT	Rapid Fluorescence Focus Inhibition Test (thử nghiệm ức chế tạo đám huỳnh quang nhanh)
SLT	Siêu ly tâm
TB	Tế bào
TCYTTG	Tổ chức Y tế Thế giới
VR	Vi rút
WCB	Working Cell Bank (ngân hàng tế bào sản xuất)
WSV	Working Seed Virus (Chủng vi rút giống sản xuất)

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh dại hiện nay là vấn đề y tế cộng đồng khá nghiêm trọng ở một số nước châu Phi, châu Á. Đặc biệt trong những năm gần đây bệnh dại đã có xu hướng gia tăng và diễn biến phức tạp ở một số quốc gia châu Á như Trung Quốc, Hàn Quốc, Philippine và Việt Nam.

Bệnh dại lên cơn có tỷ lệ tử vong gần như là 100%, nhưng bệnh có thể phòng bằng vắc xin. Từ năm 1976, Việt Nam sử dụng vắc xin phòng dại được sản xuất trên não chuột ỏ theo phương pháp Fuenzalida. Do vắc xin Fuenzalida chưa được tinh khiết nên có thể gây phản ứng dị ứng, nặng có thể dẫn tới viêm não tuỷ do dị ứng với myeline. Tháng 8 năm 2007, Bộ Y tế đã chính thức ra quyết định ngừng sản xuất và sử dụng vắc xin dại Fuenzalida, thay thế bằng vắc xin dại sản xuất trên tế bào. Hiện tại Việt Nam vẫn chưa sản xuất vắc xin dại tế bào trong nước. Vì những lý do trên chúng tôi thực hiện đề tài ***“Thích nghi chủng sản xuất vắc xin dại Vnukovo-32 trên tế bào Vero để thử nghiệm sản xuất vắc xin”***.

## MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU

- 1. Thích nghi chủng sản xuất vắc xin dại Vnukovo-32 trên tế bào Vero.***
- 2. Điều chế chủng vi rút gốc và chủng sản xuất.***
- 3. Thử nghiệm sản xuất vắc xin.***

## CÁC ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

- Xây dựng được ngân hàng tế bào Vero - CCL81 WCB đạt tiêu chuẩn tế bào dùng cho sản xuất vắc xin và các chế phẩm sinh học;
- Thích nghi được chủng sản xuất dại Vnukovo-32 trên dòng tế bào Vero, chủng thích nghi được đặt tên là Vnukovo-V06;
- Xây dựng được ngân hàng chủng giống vi rút sản xuất vắc xin dại trên tế bào Vero Vnukovo-V06 đạt tiêu chuẩn chủng giống sản xuất vắc xin dại tế bào của TCYTTG;
- Nghiên cứu được quy trình sản xuất vắc xin dại tinh chế trên tế bào Vero đạt hiệu suất  $28,8 \pm 0,7\%$ ;

5. Sản xuất thử nghiệm được 03 loại vắc xin đại tinh chế trên tế bào Vero, đạt tiêu chuẩn vắc xin đại của TCYTTG về vô khuẩn, an toàn chung, an toàn đặc hiệu, pH, protein và công hiệu.

## CẤU TRÚC LUẬN ÁN

Luận án dày 138 trang không kể phụ lục, gồm 4 chương, 15 bảng, 9 biểu đồ, 20 hình, 195 tài liệu tham khảo trong, ngoài nước và phụ lục. Bố cục luận án gồm: đặt vấn đề 2 trang, tổng quan 35 trang, vật liệu và phương pháp nghiên cứu 20 trang, kết quả 28 trang, bàn luận 28 trang, kết luận 1 trang, kiến nghị 1 trang, 5 bài báo có nội dung liên quan với luận án đã được công bố.

## CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

### 1.1. Vi rút dại

❖ *Các đặc điểm sinh học của vi rút dại:* Vi rút dại thuộc nhóm *Lyssavirus*, họ *Rhabdoviridae*. *Lyssavirus* chia thành 10 kiểu gien, trong đó có 7 kiểu gien gây bệnh dại, duy nhất chỉ có kiểu gien 1 là có vắc xin phòng bệnh. Tuy nhiên, vắc xin có khả năng gây đáp ứng miễn dịch chéo với các vi rút gây bệnh dại thuộc kiểu gien khác. Vi rút dại có 5 protein cấu trúc, cả 5 protein đều có tính kháng nguyên, nhưng chỉ có G và N protein có vai trò trong đáp ứng miễn dịch bảo vệ và là thành phần không thể thiếu trong vắc xin.

❖ *Dịch tễ học vi rút dại:* Bệnh dại phổ biến trên toàn cầu, từ châu Âu đến châu Á, châu Phi, Mỹ La Tinh trừ một số vùng không có bệnh dại như Vương Quốc Anh, Nhật Bản, vùng Bắc cực và châu Đại Dương là những vùng đất “biệt lập”. Theo báo cáo của TCYTTG, trong 86 quốc gia và khu vực có giám sát bệnh dại thì có tới 68 quốc gia có ổ dịch dại trong tự nhiên, chủ yếu là ở các loài động vật hoang dã như chồn (59%), dơi (15%), cây (15%), cáo (3%). Hàng năm có khoảng 40.000 – 50.000 người chết vì bệnh dại, trong đó 99% số ca tử vong được thông báo từ các nước đang phát triển ở châu Phi, châu Á và vùng Nam Mỹ.

### 1.2. Các thế hệ vắc xin dại

❖ **Các vắc xin sản xuất trên mô thần kinh:** vắc xin Semple sản xuất trên mô não của động vật trưởng thành (thỏ, bê...); vắc xin Fuenzalida sản xuất trên mô thần kinh của động vật sơ sinh (chuột ỏ, thỏ dứt sữa...). Các vắc xin này có hạn sử dụng ngắn, thường dưới 6 tháng, công hiệu cũng là vấn đề đáng lo ngại và thường gây dị ứng, nặng có thể viêm não tuy dị ứng với Myelin dẫn tới tử vong.

❖ **Các vắc xin sản xuất trên mô không phải là mô thần kinh:** vắc xin sản xuất trên phôi vịt, phôi gà tinh chế. Vắc xin có hiệu lực bảo vệ tốt và độ an toàn cao. Tuy nhiên vẫn có thể gây dị ứng cho những người bị dị ứng với các thành phần của trứng.

❖ **Các vắc xin sản xuất trên tế bào:** các vắc xin sản xuất trên tế bào tiên phát (thận chuột đất vàng tiên phát, thận chó tiên phát, tế bào phôi gà tiên phát); các vắc xin sản xuất trên tế bào lưỡng bội (tế bào lưỡng bội phổi người WI-38, MRC5, tế bào lưỡng bội bào thai khỉ); vắc xin sản xuất trên tế bào thường trực (tế bào Vero). Các vắc xin sản xuất trên tế bào có độ an toàn và hiệu quả bảo vệ cao.

❖ **Các vắc xin sản xuất theo phương pháp tái tổ hợp:** chèn các gen N và G của vi rút dại vào genome của vi rút Adeno, Baculo, Orthopox và BCG để sản xuất các vắc xin vi rút tái tổ hợp. Các vắc xin này được trộn với thức ăn để gây miễn dịch cho động vật hoang dại, chưa sử dụng cho người.

### 1.3. Tế bào dùng trong sản xuất vắc xin dại

Các tế bào sử dụng trong sản xuất vắc xin dại phải thoả mãn các yêu cầu chung của tế bào sử dụng cho sản xuất vắc xin và các chế phẩm sinh học như không nhiễm các yếu tố nhiễm trùng tiềm ẩn (vi khuẩn, nấm, *mycoplasma*, *mycobacteria*, *rickettsia*, *protozoa*, vi rút, các axit nucleic và các protein gây bệnh (bệnh bò điên), không gây ung thư, các đặc tính nuôi cấy, cấy truyền ổn định từ MCB cho đến tế bào ở giai đoạn cuối của quy trình sản xuất. Ngoài ra dòng tế bào đó phải nhạy cảm với vi rút dại. Tế bào sử dụng để sản xuất vắc xin trừ dòng tế bào tiên phát nên xây dựng ngân hàng tế bào bao gồm MCB và WCB. Các tế bào thuộc tầng MCB phải được kiểm tra đầy đủ các đặc tính theo yêu cầu, nhưng đối với tế bào

WCB chỉ cần kiểm tra các yếu tố nhiễm trùng tiềm ẩn mà tế bào WCB có thể bị phơi nhiễm khi cấy truyền từ MCB.

#### 1.4. **Chủng sản xuất vắc xin đại**

Ngân hàng chủng giống sản xuất vắc xin được xây dựng tương tự như ngân hàng chủng giống tế bào. Yêu cầu chủng sản xuất phải được lựa chọn một cách cẩn trọng và được kiểm tra các đặc tính như tính sinh miễn dịch, đảm bảo là chủng cố định, ổn định các đặc tính cấy truyền, di truyền, giảm độc lực, không nhiễm vi khuẩn, nấm, *mycoplasma*, các vi rút ngoại lai và phải gây được miễn dịch chống lại bệnh đại tại vùng đó. Thông thường kiểm tra chất lượng chủng giống được thực hiện đầy đủ ở tầng MSV, đối với vi rút WSV chỉ cần kiểm tra các yếu tố nhiễm khuẩn tiềm ẩn có thể xuất hiện trong quá trình nhân giống từ MSV đến WSV.

Hệ thống chủng sản xuất vắc xin đại Quốc tế bao gồm: chủng Pasteur Paris, chủng PV-12, chủng Pitman-Moore (PM), chủng CVS-27, chủng CVS-11, chủng LEP, chủng HEP, chủng Kelev, chủng ERA, chủng SAD, chủng Beijing và chủng Vnukovo-32.

#### 1.5. **Các phương pháp tinh chế vi rút đại ứng dụng trong sản xuất vắc xin**

❖ **Cô đặc và tinh chế vi rút đại bằng ly tâm phân vùng**: Có nhiều quy trình công nghệ sản xuất vắc xin đại ứng dụng ly tâm phân vùng để cô đặc, tinh chế vi rút đại như : vắc xin sản xuất trên tế bào sợi phôi gà tiên phát, tế bào lưỡng bội, vắc xin sản xuất trên tế bào Vero, sử dụng sử dụng ly tâm phân vùng hai lần đã loại bỏ tối đa ADN tế bào và thu hoạch hạt vi rút tinh khiết với sản lượng lớn.

❖ **Tinh chế bằng siêu ly tâm qua dung dịch đường nồng độ liên tục**: các vắc xin đại tế bào sử dụng quy trình cô đặc bằng siêu lọc và tinh chế bằng siêu ly tâm qua dung dịch đường nồng độ liên tục bao gồm: vắc xin sản xuất trên tế bào Vero; vắc xin sản xuất trên phôi gà tinh chế; vắc xin trên tế bào lưỡng bội người; vắc xin sản xuất trên tế bào phôi gà tiên phát. Phương pháp cô đặc bằng siêu lọc và tinh chế bằng siêu ly tâm là một trong những phương pháp có thể mở rộng quy mô sản xuất (scale up) và đạt hiệu quả cao.

❖ **Cô đặc vi rút bằng siêu lọc, tinh chế bằng sắc ký cột, hoặc cô đặc và tinh chế bằng sắc ký cột**: Hiện nay với sự phát triển của các phức hợp

gắn trong công nghệ sắc ký cột, rất nhiều nhà sản xuất vaccine đã sử dụng công nghệ cô đặc và tinh chế vi rút vắc xin bằng sắc ký cho hiệu suất cao, chất lượng tốt và giá thành giảm như lọc qua gel sepharose 6B sau đó chạy sắc ký cột DEAE sephadex A50; sử dụng cột DEAE sepharose CL 6B; sepharose CL 6B.... Hiệu quả tinh chế bằng sắc ký cột cao, kỹ thuật tinh chế cột đơn giản và giá thành thấp hơn so với siêu ly tâm. Đây là công nghệ hiện đại đã và đang được ứng dụng trong sản xuất vắc xin đại sử dụng cho người.

Có nhiều phương pháp cô đặc và tinh chế vi rút đại sử dụng trong sản xuất vắc xin như cô đặc bằng siêu lọc - tinh chế bằng sắc ký cột; cô đặc bằng siêu lọc - tinh chế bằng siêu ly tâm và cô đặc - tinh chế bằng ly tâm phân vùng. Mỗi một quy trình đều có những ưu nhược điểm và những yêu cầu kỹ thuật riêng, tùy theo điều kiện và thế mạnh kỹ thuật của từng nhà sản xuất để lựa chọn các quy trình sản xuất phù hợp.

## **CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Vật liệu**

- Chủng vi rút sản xuất vắc xin Vnukovo-32 đời 29 do Viện Bại liệt và Viêm não Mát xơ cơ và cung cấp; chủng vi rút thử thách CVS do Trung tâm nghiên cứu khoa học Quốc Gia Pháp cung cấp.
- Tế bào Vero CCL 81 của TCYTTG cung cấp cho các cơ sở sản xuất vắc xin; tế bào CER, MRC5, WI 38 do trường Đại học Y Oita, Nhật Bản cung cấp; tế bào NA2 do Viện Pasteur Paris cung cấp; tế bào BHK 21, BSR do Trung tâm nghiên cứu khoa học Quốc Gia Pháp cung cấp.
- Động vật thí nghiệm, môi trường, hoá chất, sinh phẩm và thiết bị cần thiết để nuôi cấy tế bào, cô đặc và tinh chế vi rút, kiểm định chất lượng chủng giống và vắc xin tinh chế.

### **2.2. Phương pháp nghiên cứu: thử nghiệm phòng thí nghiệm**

#### **2.2.1. Thí nghiệm và sản xuất chủng vi rút giống**

##### **2.2.1.1. Thí nghiệm chủng giống: bằng phương pháp cấy truyền liên tiếp**

Xác định khả năng xâm nhập của chủng gốc Vnukovo-32 trên tế bào Vero; MOI thích hợp (gây nhiễm với các MOI khác nhau từ 1VR/100TB cho đến 1VR/1TB, chuẩn độ hiệu giá vi rút trong cùng một điều kiện.



Chọn MOI thấp, đạt được hiệu giá cao) và xác định đường cong phát triển của chủng gốc Vnukovo-32 trên tế bào Vero (tất cả các thử nghiệm được tiến hành 03 lần để xác định độ lặp lại). Sử dụng vi rút ở pha phát triển hàm số mũ gây nhiễm cho tế bào ở các đời cấy truyền tiếp theo với MOI thích hợp đã được xác định. Khi hiệu giá của vi rút đạt trong khoảng  $10^7$  LD<sub>50</sub>/ml (đời cấy truyền thứ n) và ổn định qua ba đời cấy truyền (n+2) thì sử dụng đời n làm MSV và n+1 là WSV, n+2 làm vi rút sản xuất vắc xin.

**2.2.1.2. Điều chế chủng vi rút giống gốc và giống sản xuất:** theo hướng dẫn sản xuất chủng giống của TCYTTG

❖ **Điều chế MSV:** Sau khi vi rút đã thích nghi trên tế bào Vero, xác định lại MOI tối ưu của chủng đã thích nghi. Cấy truyền chủng thích nghi với MOI thích hợp, thu hoạch vi rút ở đỉnh cao pha sinh trưởng, ly tâm loại bỏ tế bào, chia 1,5ml/tuýp, bảo quản chủng giống gốc ở -80°C và nitrogen lỏng.

❖ **Điều chế WSV:** sử dụng 03 tuýp MSV trộn đều, gây nhiễm với MOI thích hợp trên tế bào Vero. Quy trình nhân giống WSV tương tự như nhân giống MSV.

**2.2.2. Kiểm tra chất lượng chủng giống:** theo hướng dẫn kiểm tra chất lượng chủng giống của TCYTTG

❖ **Kiểm tra vi khuẩn, nấm và mycoplasma:** sử dụng môi trường thioglycolate, soybean, thạch thường và salbouraud cấy 1ml vi rút/ tuýp. Tổng số 10 tuýp. Theo dõi 14 ngày.

Xác định *mycoplasma* bằng hai kỹ thuật lai ghép huỳnh quang và PCR.

❖ **Kiểm tra chủng cố định:**

- Trên hệ thống tế bào: cấy truyền mù 3 lần chủng đã thích nghi và chủng Vnukovo-32 gốc trên các dòng tế bào có nguồn gốc từ người (WI-38; MRC5); từ khỉ (Vero B19, Vero 1009, CCL81 và BHK); từ gà (CER); từ chuột (NA2). Xác định hiện tượng CPE, so sánh với chủng gốc Vnukovo-32. Chủng Vnukovo-32 là chủng không gây CPE trên tế bào.
- Trên động vật: tiêm đường não chủng thích nghi và chủng Vnukovo-32 cho chuột Swiss ở 3 ngày tuổi và chuột 11 – 13g. Theo dõi chuột trong 21 ngày, so sánh biểu hiện bệnh lý trên chuột của chủng thích nghi với chủng gốc Vnukovo-32. Chủng gốc Vnukovo-32 gây liệt chuột ở từ

ngày thứ 3, gây liệt chuột trưởng thành từ ngày thứ 5 sau khi tiêm đường não và hiện tượng gây liệt chuột cố định trong vòng 21 ngày.

❖ *Kiểm tra độc lực*: sử dụng các kỹ thuật *invivo*, *invitro* và di truyền học để xác định chủng cố định

- Thông qua kiểm tra chủng cố định (trên hệ thống tế bào và trên động vật)
- Cloning gen P (gen độc lực của vi rút) và giải trình tự gen. So sánh trình tự nucleotide gen P của hai chủng thích nghi và chủng Vnukovo-32

❖ *Kiểm tra vi rút ngoại lai*: Chủng vi rút đã thích nghi được trung hoà với kháng thể kháng dại trước khi tiến hành các thử nghiệm xác định vi rút ngoại lai

- Xác định các vi rút gây huỷ hoại tế bào: cấy truyền mù 03 lần hỗn dịch vi rút sau khi trung hoà với huyết thanh lên các dòng tế bào NA, CER, BSR, Vero, WI38, MRC5. Song song cấy lô đối chứng vi rút và huyết thanh. Theo dõi hiện tượng huỷ hoại tế bào.
- Xác định các vi rút gây bệnh trên động vật: Tiêm ổ bụng và tiêm não cho chuột Swiss ổ 1 ngày tuổi và chuột 11 – 13g, song song tiêm lô đối chứng vi rút và chứng huyết thanh. Theo dõi hiện tượng bệnh lý của chuột.
- Xác định vi rút ngoại lai bằng phương pháp hiển vi điện tử: nhuộm âm bản hỗn dịch vi rút và lát cắt mỏng tế bào gây nhiễm vi rút.

❖ *Kiểm tra khả năng sinh miễn dịch*: Bất hoạt vi rút bằng  $\beta$  propiolactone nồng độ cuối cùng là 1/4.000, nhiệt độ 4<sup>0</sup>C trong 24 giờ, tiếp đó 37<sup>0</sup>C trong 2 giờ. Tiêm 0,5 ml hỗn dịch vi rút đã bất hoạt vào ổ bụng chuột 11 – 13g, sau 7 ngày tiêm mũi thứ hai. Lấy máu chuột sau 7 ngày tiêm mũi thứ hai, xác định hiệu giá kháng thể trung hoà kháng dại trong huyết thanh chuột bằng thử nghiệm RFFIT và ELISA.

Cloning gen G và N, giải trình tự gen, so sánh với trình tự nucleotide gen G và N của chủng gốc Vnukovo-32

### **2.2.3. Sản xuất thử nghiệm vắc xin:**

2.2.3.1. *Nghiên cứu quy trình sản xuất*: toàn bộ các giai đoạn đều được thực hiện 03 lần để xác định tính lặp lại của thử nghiệm. Kết quả được tính là giá trị trung bình của các thử nghiệm.

❖ *Nuôi cấy tế bào, gây nhiễm vi rút:* Nuôi cấy tế bào theo thường quy của ngân hàng tế bào ECACC từ đời 137 đến đời 141 và hoặc 142. Gây nhiễm vi rút với điều kiện nuôi cấy tối ưu.

❖ *Nuôi cấy vi rút:* Sau khi gây nhiễm vi rút, rửa tế bào bằng PBS (-) 3 lần, thay môi trường Parker không có huyết thanh bê bào thai. Gặt vi rút 2-3 ngày một lần cho đến khi tế bào bắt đầu thoái hoá. Ly tâm hỗn dịch vi rút 3.500 vòng/phút/ 30 phút loại bỏ tế bào và hoặc lọc qua màng lọc 0,45µm.

❖ *Bất hoạt và cô đặc vi rút:* Bất hoạt vi rút bằng  $\beta$  propiolatone 1/4.000 ở nhiệt độ 4<sup>0</sup>C trong 24 giờ, tiếp đó 37<sup>0</sup>C trong 2 giờ. Kiểm tra bất hoạt bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang (FA) và tiêm truyền trên chuột. Cô đặc vi rút bằng hệ thống siêu lọc millipore với các màng lọc có giới hạn trọng lượng phân tử khác nhau 10KD, 100KD, 300KD để lựa chọn điều kiện tối ưu.

❖ *Tinh chế vi rút:* Tinh chế vi rút bằng các phương pháp khác nhau như tinh chế qua sắc ký cột ái lực cellulose fine sulfate, tinh chế bằng lọc tiếp tuyến và tinh chế bằng lọc qua gel sepharose CL 6B ; tinh chế vi rút bằng siêu ly tâm qua một nồng độ đường hoặc qua dung dịch đường có nồng độ liên tục 10 – 60%, tốc độ và thời gian khác nhau để tìm được quy trình có hiệu suất và độ tinh khiết phù hợp nhất. Trong quá trình cô đặc và tinh chế vi rút, sử dụng phương pháp ELISA định lượng G protein của vi rút đại, so sánh với mẫu chuẩn do phòng thí nghiệm sản xuất tính theo đơn vị ELISA để xác định hiệu suất của các phương pháp thử nghiệm. Xác định độ tinh sạch bằng định lượng protein theo phương pháp Lowry, sử dụng kit DC protein assay của Biorad. Các thử nghiệm đều được lặp lại 3 lần. Lựa chọn phương pháp tinh chế tối ưu có hiệu suất và độ tinh sạch cao.

2.2.3.2. *Sản xuất thử nghiệm 03 loạt vắc xin: theo quy trình lựa chọn*

2.2.3.3. *Kiểm tra chất lượng vắc xin sản xuất thử nghiệm: theo tiêu chuẩn và kỹ thuật của TCYTTG, bao gồm:*

Kiểm tra vô khuẩn, an toàn chung, an toàn đặc hiệu, công hiệu (NIH), protein (Lowry), pH (đo trực tiếp), ADN tồn dư (đo bằng microtrip).

## CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ

### 3.1. Kết quả thích nghi chủng sản xuất vắc xin đại Vnukovo-32 trên tế bào Vero

#### 3.1.1. Kết quả xác định MOI và biểu đồ phát triển của chủng Vnukovo-32 trên TB Vero.

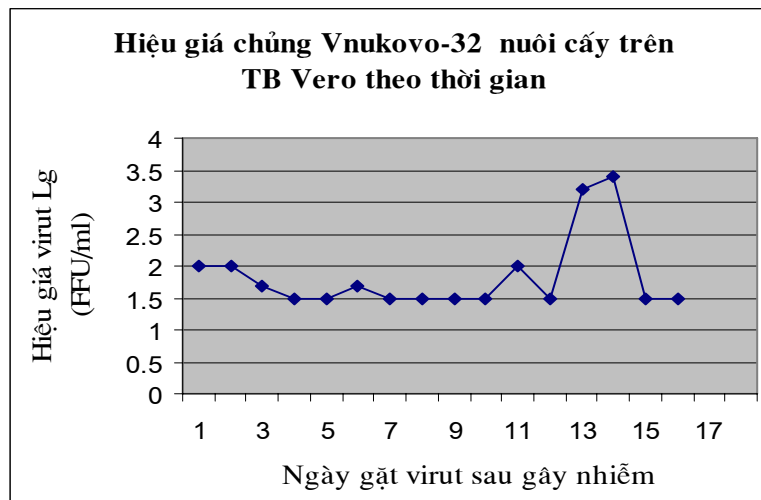
❖ Kết quả xác định MOI tối ưu của chủng gốc Vnukovo-32 trên tế bào Vero

**Bảng 3.1: Hiệu giá trung bình của vi rút đại nuôi cấy trên tế bào Vero với MOI khác nhau**

Liều gây nhiễm	0,01 MOI	0,05 MOI	0,1 MOI	0,3 MOI	0,5 MOI	1 MOI
Hiệu giá Vi rút (FFU/ml)	Không có	Không có	$10^{2,0 \pm 0,1}$	$10^{3,4 \pm 0,1}$	$10^{3,5 \pm 0,1}$	$10^{3,0 \pm 0,15}$

Từ kết quả trên lựa chọn MOI tối ưu của chủng gốc Vnukovo-32 gây nhiễm trên tế bào Vero là 0,3 (3VR/10TB)

❖ Kết quả xác định biểu đồ phát triển của vi rút đại với MOI là 3VR/10TB



**Biểu 3.1: Biểu đồ phát triển của chủng Vnukovo-32 nuôi cấy trên TB Vero với MOI là 3VR/10TB**

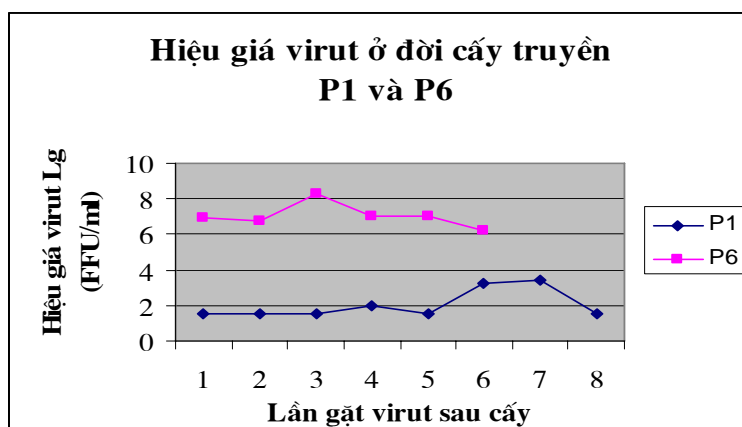
Thời gian thu hoạch vi rút tối ưu (pha phát triển hàm số mũ) dùng cho thích nghi chủng giống vào ngày thứ 12-13 sau gây nhiễm vi rút, hiệu giá đạt đỉnh cao là  $10^{3,4}$  FFU/ml ở đời cấy truyền đầu tiên (P1)

### 3.1.2. Kết quả các đời cấy truyền chủng Vnukovo-32 trên tế bào Vero

**Bảng 3.2. Hiệu giá vi rút ở đời cấy truyền P1 và P6**

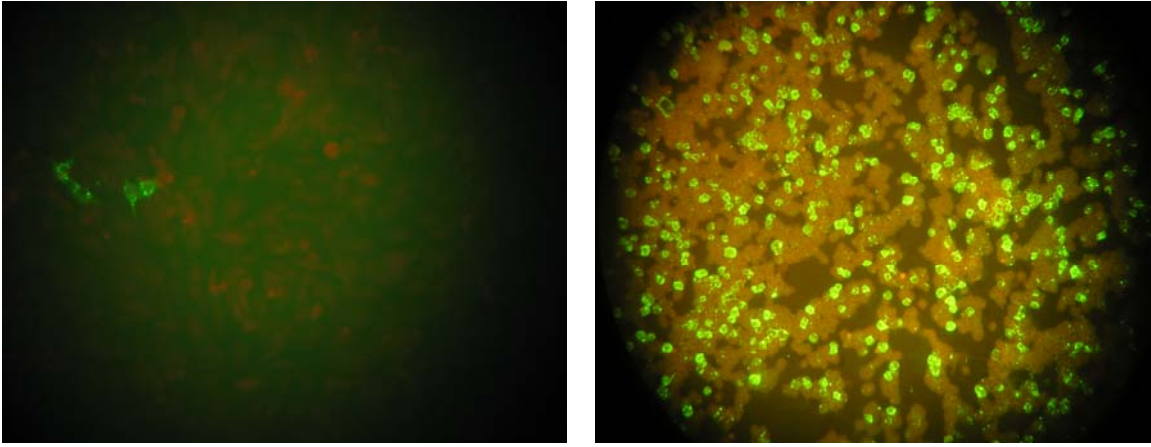
Ngày gặt sau cấy	7 ngày	9 ngày	11 ngày	13 ngày	15 ngày	17 ngày
Hiệu giá P1 (FFU/ml)	$10^{1,5}$	$10^{2,0}$	$10^{3,2}$	$10^{3,4}$	$10^{1,5}$	$10^{1,5}$
Hiệu giá P6 (FFU/ml)	$10^{6,9}$	$10^{6,8}$	$10^{8,2}$	$10^{7,0}$	$10^{7,0}$	$10^{6,2}$

Hiệu giá vi rút gặt ở đời cấy truyền P1 và P6 đạt đỉnh cao vào các ngày 9 –11. Hiệu giá P6 đạt  $> 10^6$ FFU/ml kể từ ngày thứ 7 sau gây nhiễm



**Biểu 3.2. So sánh hiệu giá của vi rút Vnukovo-32 trên tế bào Vero ở đời cấy truyền P1 và P6 với MOI 3VR/100TB.**

Ở đời cấy truyền thứ 6 hiệu giá của vi rút cao gấp 4,8  $\text{Log}_{10}$  so với hiệu giá cao nhất của lần cấy truyền đầu tiên ( $10^{3,4}$  FFU/ml) và đạt  $10^{8,2}$  FFU/ml.



**Hình 3.1. Hình ảnh tế bào sau 9 ngày gây nhiễm vi rút ở P1 (trái) và P6 (phải)**

Hình 3.1. cho thấy ở đời P6 có rất nhiều tế bào nhiễm huỳnh quang, trong khi đó ở đời P1 có rất ít tế bào nhiễm huỳnh quang. Điều này càng khẳng định chủng Vnukovo-32 đã thích nghi trên tế bào Vero.

### 3.1.3. Kết quả xác định các đặc tính của chủng thích nghi trên tế bào Vero

❖ *Kết quả xác định đặc tính ổn định hiệu giá của chủng thích nghi*

**Bảng 3. 3. Hiệu giá trung bình của vi rút ở đời cấy truyền P6, P7, P8**

Đời cấy truyền	P6	P7	P8
Hiệu giá vi rút FFU/ml	$10^{8,2 \pm 0,1}$	$10^{8,1 \pm 0,03}$	$10^{8,1 \pm 0,1}$
Hiệu giá vi rút LD <sub>50</sub> /ml	$10^{-7,1 \pm 0,02}$	$10^{-7,1 \pm 0,1}$	$10^{-7,0 \pm 0,08}$

Từ đời P6 và qua 2 đời cấy truyền liên tiếp P7, P8 hiệu giá của vi rút đã ổn định trong khoảng  $10^{-7}LD_{50}/ml$ . Do vậy lựa chọn đời P6 làm MSV, P7 làm WSV và P8 làm vi rút vắc xin là phù hợp, đời P5 sẽ được giữ lại làm Parent Seed Virus (vi rút cha mẹ). Chủng vi rút đại thích nghi trên tế bào Vero sau 6 đời cấy truyền được đặt tên là Vnukovo-V06.

❖ *Kết quả xác định MOI tối ưu của chủng thích nghi Vnukovo-V06 trên Vero*

**Bảng 3.4. Hiệu giá trung bình của chủng đã thích nghi Vnukovo-V06 với liều gây nhiễm khác nhau**

Liều gây nhiễm	0,01 MOI	0,05 MOI	0,1 MOI	0,3 MOI	0,6 MOI
Hiệu giá LD <sub>50</sub> /ml	$10^{-6,33 \pm 0,05}$	$10^{-7,33 \pm 0,1}$	$10^{-7,12 \pm 0,1}$	$10^{-7,0 \pm 0,02}$	$10^{-7,28 \pm 0,1}$

Kết quả cho thấy liều gây nhiễm tối ưu của chủng giống gốc Vnukovo - V06 là 0,05 MOI (5VR/100TB).

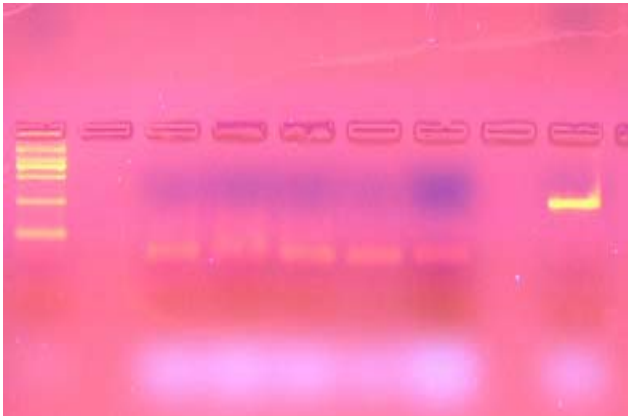
### 3.2. Kết quả điều chế chủng giống và kiểm tra chất lượng chủng giống

#### 3.2.1. Kết quả điều chế chủng giống gốc và giống sản xuất

Tạo được ngân hàng chủng vi rút sản xuất vắc xin trên tế bào Vero Vnukovo-V06. Tổng số đã nhân giống được 318 tuýp giống gốc MSV có hiệu giá  $10^{-7,12}LD_{50}/ml$  và 2000 tuýp WSV có hiệu giá  $10^{-7,1}LD_{50}/ml$  WSV.

#### 3.2.2. Kết quả kiểm tra chất lượng chủng giống

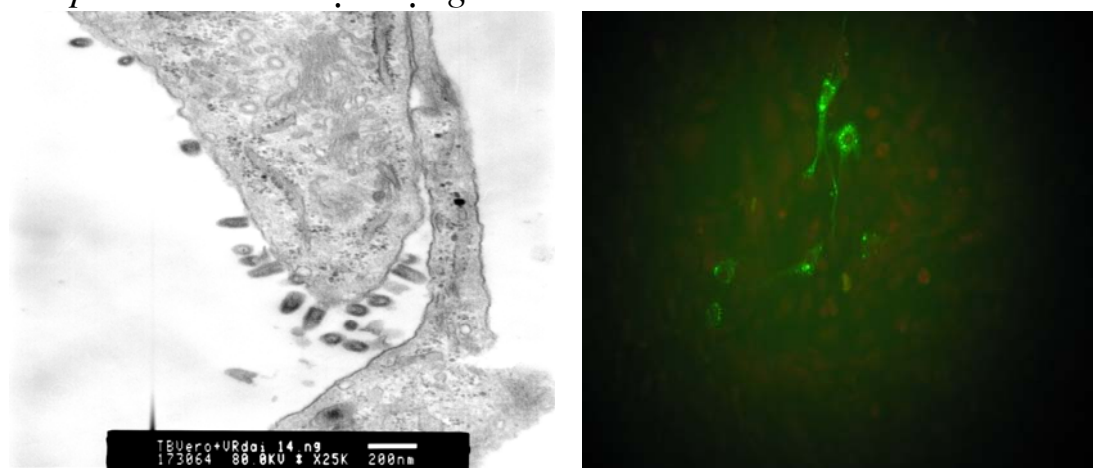
❖ *Kết quả kiểm tra vi khuẩn, nấm và mycoplasma*: chủng giống gốc MSV và WSV Vnukovo-V06 không nhiễm vi khuẩn, nấm và *mycoplasma*.

1	Thang chuẩn	1	2	3	4	5	6	7	8	9
3,4	Chủng Vnukovo-V06 MSV									
5,6	Chủng Vnukovo-V06 WSV									
7	Chứng âm									
8	Không có mẫu									
9	Chứng dương									

Đoạn ADN khuếch đại đặc hiệu:  
270bp

**Hình 3.2 : Hình ảnh điện di sản phẩm PCR xác định mycoplasma trong Vnukovo-V06 MSV và WSV**

❖ *Kết quả kiểm tra nhận dạng*



**Hình 3.3: Hình ảnh vi rút đại trong tế bào Vero quan sát KHVĐT độ phóng đại 25.000 lần (trái) và nhuộm Mab kháng N – FITC (phải)**

❖ *Kết quả kiểm tra vi rút ngoại lai*

Các dòng tế bào NA, CER, BSR, Vero (CCL81, B19 và 1009), WI38 và MRC5 sau 3 lần cấy truyền mù hỗn dịch vi rút MSV trung hoà với 8250IU kháng thể kháng dại không xuất hiện huỷ hoại tế bào.

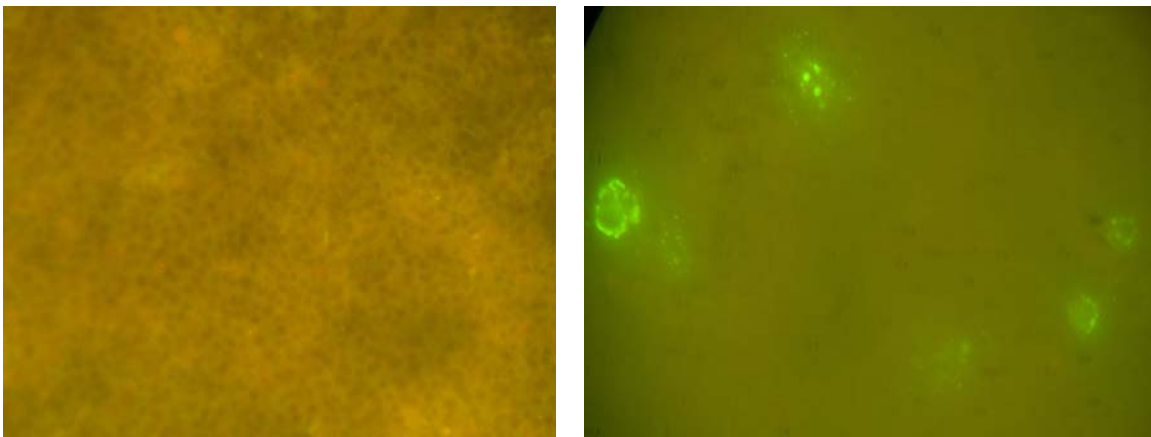
Chuột nhất trắng 11 – 13g và chuột ỏ tiêm MSV sau khi trung hoà với 8250IU kháng thể kháng dại hoàn toàn khoẻ mạnh sau 21 ngày theo dõi. Lô chuột tiêm vi rút không trung hoà chuột liệt điển hình.

Kiểm tra vi rút ngoại lai bằng phương pháp HVĐT không thấy hình ảnh vi rút ngoại lai trong hỗn dịch vi rút cũng như trong tế bào gây nhiễm vi rút.

❖ *Kiểm tra chủng cố định*

Chủng Vnukovo-V06 gây liệt chuột ỏ khi tiêm đường não vào ngày thứ 3, gây liệt chuột 3 tuần tuổi vào ngày thứ 5 và ổn định trong 21 ngày. Chuột liệt điển hình giống về thời gian và bệnh học như lô chuột tiêm chủng Vnukovo-32. Lô chuột được tiêm hỗn dịch vi rút sau khi trung hoà với 8250IU kháng thể hoàn toàn khoẻ mạnh sau 21 ngày theo dõi.

Các dòng tế bào Vero, BHK, WI38, MRC5, NA2 và CER đều không có hiện tượng huỷ hoại tế bào khi gây nhiễm chủng Vnukovo-V06 cũng như lô tế bào gây nhiễm chủng Vnukovo-32 đối chứng. Nhuộm các tế bào này với Mab kháng N gắn FITC thấy có hình ảnh phát quang đặc hiệu ở bào tương của tất cả các dòng tế bào gây nhiễm vi rút Vnukovo-V06.



**Hình 3.4: Hình ảnh tế bào Vero sau 14 ngày gây nhiễm Vnukovo-V06 quan sát kính hiển vi soi ngược (trái) và nhuộm huỳnh quang bằng kháng thể đơn dòng kháng N vi rút dại gắn FITC (phải)**



❖ *Kết quả kiểm tra đặc tính sinh miễn dịch*

Hiệu giá kháng thể kháng đại của chuột trước khi tiêm miễn dịch là 0 đơn vị ELISA và RFFIT, hiệu giá kháng thể trung hoà sau 2 mũi tiêm cơ bản chủng Vnukovo-V06 ( $10^{-7,14}$ LD<sub>50</sub>/ml) cô đặc 10 lần, bất hoạt đạt 0,97IU/ml (RFFIT) và 1,2 IU/ml (ELISA).

❖ *Kết quả kiểm tra trình tự nucleotide của các gen mã hoá cho G, P và N protein của chủng đã thích nghi, so sánh với chủng gốc*

Trình tự các nucleotide các gen N, P và G của chủng đã thích nghi Vnukovo- V06 trùng khớp 100% với trình tự nucleotide các gen này của chủng gốc Vnukovo-32.

### 3.3. Kết quả sản xuất thử nghiệm vắc xin

#### 3.3.1. Kết quả nghiên cứu quy trình sản xuất thử nghiệm vắc xin đại trên tế bào Vero

##### 3.3.1.1. Quy trình gây nhiễm và thu hoạch vi rút

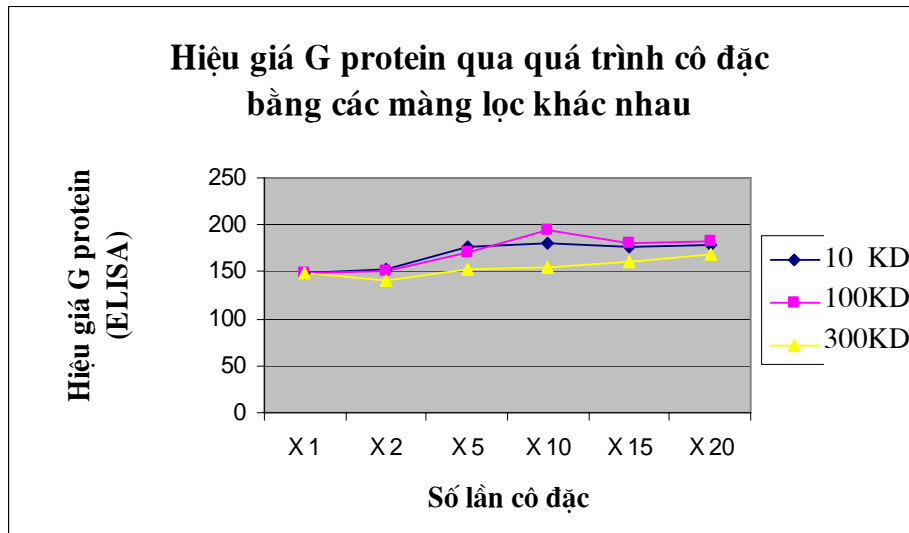
Nuôi cấy tế bào một lớp kín 80%, cấy vi rút với MOI 0,05 (5VR/100TB); môi trường MEM có 2%FCS. Sau 3 ngày gây nhiễm lấy mẫu kiểm tra hiệu giá, rửa tế bào bằng PBS (-), nuôi cấy vi rút bằng parker pH 7,4.

**Bảng 3.5: Hiệu giá trung bình của vi rút ở các lần gặt khác nhau**

Ngày gặt	3 ngày	7 ngày	10 ngày	13 ngày	16 ngày
<b>Hiệu giá VR (LD<sub>50</sub>/ml)</b>	$10^{-5,9 \pm 0,1}$	$10^{-7,0 \pm 0,05}$	$10^{-7,1 \pm 0,1}$	$10^{-6,9 \pm 0,1}$	$10^{-5,8 \pm 0,15}$

Thu hoạch các loạt gặt ở ngày thứ 7, 10 và 13 vi rút có hiệu giá  $>10^{6,0}$  LD<sub>50</sub>/ml, ly tâm 3.500 vòng/ phút trong 30 phút lấy nước nổi lọc qua màng lọc 0,45µm, bất hoạt bằng β propiolacton 1/4.000 trong 24 giờ ở 4°C, sau đó 37°C trong 2 giờ.

##### 3.3.1.2. Quy trình cô đặc và bất hoạt vi rút



***Biểu 3.3. Hiệu giá G protein trung bình qua quá trình cô đặc  
bằng các màng lọc 10KD, 100KD và 300KD***

Cô đặc vi rút bằng các màng lọc có giới hạn trọng lượng phân tử khác nhau 10KD, 100KD và 300KD trong cùng một điều kiện: thể tích lọc là 300ml, màng lọc 50cm<sup>2</sup>, áp lực dòng chảy 1 Bar, áp lực nén trên màng 0,3 Bar. Kết quả cho thấy hiệu giá vi rút đạt cao nhất đối với màng lọc 100KD, tiếp đó đến màng lọc 10KD và sau cùng là màng lọc 300KD. Đối với màng lọc 100KD hiệu giá vi rút đạt cao nhất ở mức độ cô đặc 10 lần.

### *3.3.1.3. Quy trình tinh chế vi rút*

Thử nghiệm tinh chế bằng sắc ký cột cellulose fine sulfate cho thấy hiệu suất tinh chế đạt  $14,9 \pm 0,25\%$  (CV: 1,6) và protein toàn phần dao động trong khoảng  $0,22 \pm 0,01$  mg/ml (CV: 9,3).

Thử nghiệm tinh chế bằng màng vi lọc tiếp tuyến khác nhau 0,45; 0,22; 0,1  $\mu$ m và màng siêu lọc có giới hạn trọng lượng phân tử 100KD, 300KD để tinh chế vi rút. Kết quả loại bỏ được  $91,7 \pm 2,2\%$  protein toàn phần (protein TP), nhưng G protein mất tới  $89 \pm 5\%$ ; hàm lượng protein TP trong sản phẩm cuối cùng đạt  $0,5 \pm 0,1$  mg/ml.

Thử nghiệm tinh chế bằng siêu ly tâm qua dung dịch đường có nồng độ liên tục 10 – 40% kết quả cho thấy:

**Bảng 3.6. Kết quả tinh chế vi rút đại bằng siêu ly tâm qua dung dịch đường 10 – 40% với tốc độ và thời gian khác nhau**

Tốc độ và thời gian SLT	Hiệu giá vi rút (Đơn vị ELISA)			Protein (mg/ml)		
	Trước SLT	Sau SLT	Hiệu suất (%)	Trước SLT	Sau SLT	Protein thải (%)
<b>35KV/17giờ</b>	6156 ± 5,8	4106 ± 5,1	66,7 ± 0,01	57 ± 0,8	5,4 ± 0,2	90,4 ± 0,3
<b>38KV/18giờ</b>	6004 ± 15	4012 ± 6,8	66,8 ± 0,05	53 ± 2,1	5,16 ± 0,1	90,3 ± 0,1
<b>40KV/15giờ</b>	6118 ± 15	4100 ± 11,5	67,01 ± 0,3	55 ± 1,2	5,52 ± 0,06	90 ± 0,3

Bảng 3.6 cho thấy siêu ly tâm tốc độ từ 35KV đến 40KV trong 15 - 18 giờ hiệu suất đạt được 66,7 ± 0,01% đến 67,01 ± 0,3% và hàm lượng protein loại bỏ từ 90 ± 0,3% đến 90,4 ± 0,3%. Tất cả các giá trị  $X \in \bar{X} \pm 2SD$ ; CV từ 0,1 đến 4. So sánh hiệu suất vi rút đạt được khi ly tâm 35KV/17 giờ; 38KV/ 18 giờ và 40KV/15 giờ bằng test Anova cho thấy không có sự khác biệt với  $P = 0,192 (> 0,05)$ .

*Qua các thử nghiệm tinh chế vi rút bằng sắc ký cột CS, lọc tiếp tuyến và siêu ly tâm. Chúng tôi lựa chọn quy trình tinh chế vi rút bằng siêu ly tâm qua dung dịch đường nồng độ liên tục 10 – 40%.*

### **3.3.2. Quy trình sản xuất vắc xin đại thử nghiệm trên tế bào Vero được lựa chọn**

- Nuôi cấy tế bào Vero 1 lớp (đời 142), tế bào kín 80%. Cấy vi rút Vnukovo-V06 WSV với MOI là 5VR/100TB. Thêm môi trường MEM 2% FCS, ủ trong 3 ngày.
- Rửa tế bào bằng PBS 3 lần. Cho môi trường Parker không serum pH 7,4.
- Thu hoạch vi rút ở ngày thứ 7, 10 và 13 sau khi gây nhiễm. Kiểm tra hiệu giá vi rút, chọn các lô gặt có hiệu giá  $>10^{-6,0}$  LD<sub>50</sub>/ml. Ly tâm 3.500 vòng/ phút/ 30 phút. Loại bỏ cặn; nước nổi được lọc qua màng lọc 0,45 µm.

- Bất hoạt bằng  $\beta$  propiolactone nồng độ cuối cùng là 1/4000 trong 24 giờ, tiếp đó ủ 37°C/ 2 giờ.
- Cô đặc 10 lần bằng màng 100KD, áp lực dòng chảy 1 Bar, nén 0,3 Bar.
- Siêu ly tâm 35.000 vòng/ phút x 17 giờ qua nồng độ đường liên tục 10 – 40%.
- Thu hoạch các phân đoạn chứa pick G protein. Chạy trao đổi ion 3 lần với PBS pH 7,4 bằng máy siêu lọc màng 10KD để loại bỏ đường.
- Bán thành phẩm cất -30°C. Kiểm tra bán thành phẩm về vô khuẩn, bất hoạt, protein và công hiệu (ELISA).
- Pha vắc xin trong PBS (-) theo hiệu giá vắc xin bán thành phẩm, kiểm tra chất lượng vắc xin thử nghiệm.

### 3.3.3. Kết quả sản xuất thử nghiệm 03 loạt vắc xin đại tinh chế trên quy trình được xây dựng

**Bảng 3.7. Kết quả kiểm định tại nơi sản xuất 03 loạt vắc xin**

KQ kiểm định	Vô khuẩn	An toàn chung (CTT)	An toàn đặc hiệu (CTT)	Protein TP ( $\mu\text{g/ml}$ )	Công hiệu (IU/ml)	pH	ADN tồn dư
010808	Đạt	118%	155%	108	2,95	7,13	Không đo được
020908	Đạt	125%	162%	102	2,7	7,2	Không đo được
031008	Đạt	130%	173%	113	2,65	7,19	Không đo được
$\bar{X}$		124,3 $\pm$ 6	163,3 $\pm$ 9	107,6 $\pm$ 5,5	2,77 $\pm$ 0,16	7,17 $\pm$ 0,03	
CV		4,8	5,5	5,1	5,8	0,5	
<b>Tiêu chuẩn vắc xin đại tế bào Vero của TCYTTG</b>							
<b>Yêu cầu</b>	Đạt	Chuột khoẻ mạnh, tăng cân	Chuột khoẻ mạnh, tăng cân	$\leq 180 \mu\text{g/ml}$	$\geq 2,5 \text{ IU/ liều}$	7,0 – 7,4	$\leq 10\text{ng/ liều}$

**Bảng 3.8. Kết quả kiểm định 03 loại vắc xin sản xuất thử nghiệm tại công ty vắc xin và sinh phẩm số 1**

KQ kiểm định	Vô khuẩn	An toàn chung (CTT)	An toàn đặc hiệu (CTT)	Protein TP	Công hiệu (IU/ml)	pH
010808	Đạt	140%	207%	109 µg/ml	2,6	7,23
020908	Đạt	147,5%	181,9%	37 µg/ml	2,7	7,3
031008	Đạt	110,6%	191,9%	110 µg/ml	2,5	7,25

Kết quả kiểm định 03 loại vắc xin đại tinh chế trên tế bào Vero sản xuất thử nghiệm đạt tiêu chuẩn của TCYTTG về vô khuẩn, an toàn, bất hoạt, pH, protein và công hiệu.

## CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

### 4.1. Thích nghi chủng sản xuất vắc xin đại Vnukovo-32 trên tế bào Vero

❖ *Nguồn gốc, chất lượng tế bào, chủng vi rút dùng thích nghi chủng và sản xuất thử nghiệm vắc xin:* Tế bào Vero CCL 81, đời 134 được mua theo vận đơn số 163983. Dòng tế bào này do TCYTTG lựa chọn và cất giữ tại ngân hàng tế bào châu Âu (ECACC) để cung cấp cho các nhà sản xuất vắc xin trên tế bào Vero sử dụng cho người. Tế bào được nhân giống tạo WCB (đời 137) và được kiểm tra các yếu tố nhiễm trùng tiềm ẩn như vi khuẩn, nấm, *mycoplasma*, vi rút ngoại lai theo hướng dẫn tạo ngân hàng tế bào dùng trong sản xuất vắc xin và các chế phẩm sinh học của TCYTTG và Hoa Kỳ. Chủng Vnukovo- 32 do viện Bại liệt và viêm não Mát xơ cơ và cung cấp có đầy đủ hồ sơ và họ chiếu của chủng. Chủng đã được kiểm tra đảm bảo chất lượng của chủng giống sản xuất vắc xin đại. Chủng Vnukovo-32 nằm trong hệ thống chủng Quốc tế dùng để sản xuất vắc xin đại. Như vậy các nguyên liệu

nguồn sử dụng để thích nghi chủng giống đều là nguyên liệu cho phép sử dụng để sản xuất vắc xin và chế phẩm sinh học sử dụng cho người.

❖ **Phương pháp thích nghi chủng giống:** sử dụng phương pháp cấy truyền liên tiếp, là phương pháp đã được ứng dụng để tạo rất nhiều chủng sản xuất vắc xin đại. Việc xác định MOI tối ưu và đường cong phát triển của chủng gốc Vnukovo-32 trên tế bào Vero để lựa chọn điều kiện tối ưu cho cấy truyền liên tiếp trong việc thích nghi chủng giống là điều kiện tiên quyết, quyết định sự thành công của quá trình thích nghi.

Đối với các chủng vi rút đại cố định thì liều gây nhiễm thường trong khoảng 0,01 - 0,3 MOI. Khi sử dụng liều gây nhiễm quá cao sẽ gây nên hiện tượng ức chế cạnh tranh hoặc tạo ra các hạt vi rút không hoàn chỉnh. Các hạt vi rút không hoàn chỉnh không có khả năng gây nhiễm và nhân lên, nhưng nó lại cạnh tranh với các hạt vi rút hoàn chỉnh làm giảm khả năng xâm nhập của các hạt vi rút hoàn chỉnh vào tế bào.

Song song với việc lựa chọn điều kiện nuôi cấy thích hợp của chủng gốc Vnukovo-32 trên tế bào Vero thì việc xác định biểu đồ phát triển của vi rút trên dòng tế bào này cũng đóng vai trò quan trọng vào quá trình thích nghi và thành công của sự thích nghi. Lựa chọn vi rút ở pha phát triển hàm số mũ để cấy truyền liên tiếp theo, mặc dù hiệu giá vi rút ở giai đoạn này thấp hơn hiệu giá vi rút ở đỉnh pha sinh trưởng nhưng ở đó có nhiều hạt vi rút hoàn chỉnh hơn do vậy khả năng xâm nhập vào tế bào tốt hơn so với vi rút thu hoạch ở đỉnh pha sinh trưởng hoặc ở các pha khác.

Việc xác định mức độ thích nghi của chủng vi rút qua các đời cấy truyền không những được thể hiện bằng hiệu giá của vi rút đạt được qua mỗi đời cấy truyền mà còn được chứng minh bằng sự xâm nhập, nhân lên của vi rút trong tế bào Vero thông qua nhuộm tế bào gây nhiễm với kháng thể đơn dòng kháng N protein của vi rút đại gần huỳnh quang và mức độ ổn định hiệu giá của vi rút qua 3 đời P6, P7, P8.

Lựa chọn đời cấy truyền P6 làm MSV, P7 làm WSV và P8 làm vi rút sản xuất vắc xin là phù hợp do chủng Vnukovo-32 đã hoàn toàn thích nghi trên tế bào Vero ở đời cấy truyền thứ 6, ổn định về hiệu giá và biểu đồ phát triển qua ba đời cấy truyền (đỉnh cao hiệu giá đạt được ở ngày thứ 9 – 11 sau gây nhiễm). Hơn thế nữa, chủng Vnukovo- 32 gốc cho phép cấy truyền sau đời 35 (WSV) là 10 đời để sản xuất vắc xin. Chủng giống gốc Vnukovo-32 mà chúng tôi sử dụng để thích nghi trên tế bào Vero là đời 29, tổng số đời cấy truyền cho phép sẽ là 16 đời. Qua sáu đời cấy truyền liên tiếp trên tế bào Vero để tạo Vnukovo-V06 MSV sẽ còn 10 đời cấy truyền để làm WSV và sản xuất vắc xin. Như vậy, ngân hàng chủng giống vi rút Vnukovo-V06 đạt tiêu chuẩn đảm bảo cung cấp đủ số lượng chủng giống cho sản xuất vắc xin.

#### **4.2. Điều chế chủng giống và chất lượng chủng giống**

❖ **Phương pháp tạo ngân hàng vi rút giống:** được tuân thủ nghiêm ngặt theo hướng dẫn tạo ngân hàng chủng giống dùng cho sản xuất vắc xin và chế phẩm sinh học của TCYTTG và Hoa Kỳ. Chủng vi rút thích nghi Vnukovo-V06 đã được xây dựng hệ thống ngân hàng chủng giống 3 tầng bao gồm vi rút giống cha mẹ, MSV và WSV.

❖ **Chất lượng chủng giống:** Ngân hàng chủng giống sản xuất vắc xin đại trên tế bào Vero Vnukovo-32 được kiểm tra đầy đủ các đặc tính về vi khuẩn, nấm, *mycoplasma*, độc lực, cố định, khả năng sinh miễn dịch và vi rút ngoại lai theo hướng dẫn tạo ngân hàng chủng giống sản xuất vắc xin của TCYTTG và của Hoa Kỳ.

*Kiểm tra chủng giảm độc lực và cố định:* chủng Vnukovo-V06 được thích nghi bằng cấy truyền 06 lần liên tiếp chủng Vnukovo-32 trên tế bào Vero. Việc cấy truyền liên tiếp có thể tạo nên các chủng vi rút tăng độc lực, chính vì vậy việc kiểm tra chủng cố định và giảm độc lực là điều vô cùng quan trọng, nó quyết định là chủng sau thích nghi có thể sử dụng để sản xuất vắc xin hay không. Việc kiểm tra chủng giảm độc lực và “cố định” được thực hiện phối hợp nhiều thử nghiệm bao gồm thử nghiệm trên động vật, trên hệ thống tế bào và các phương pháp di

truyền học (giải trình tự gien độc lực – gien P, so sánh với chủng gốc Vnukovo-32) đã chứng minh chủng Vnukovo-V06 là chủng cố định và giảm độc lực.

*Kiểm tra các yếu tố nhiễm trùng tiềm ẩn:* việc kiểm tra các yếu tố nhiễm trùng tiềm ẩn (NTTA) và xác định khả năng chủng giống vi rút bị nhiễm các yếu tố NTTA phụ thuộc vào nguồn gốc của chủng vi rút cũng như nguồn gốc của tế bào và các nguyên liệu nguồn (môi trường, trypsin, huyết thanh sử dụng...) sử dụng trong quá trình thích nghi, nhân giống chủng giống vi rút.

Chủng giống gốc Vnukovo-32 là chủng đã được kiểm tra và thoả mãn đầy đủ các đặc tính của một chủng sản xuất vắc xin, chủng đã được chứng minh không nhiễm các yếu tố nhiễm trùng tiềm ẩn và TCYTTG công nhận chủng Vnukovo-32 thuộc hệ thống chủng giống vi rút đại dùng trong sản xuất vắc xin sử dụng cho người .

Tế bào Vero sử dụng để thích nghi và nhân giống chủng Vnukovo-V06 có mã số Vero - WHO CCL 81 được TCYTTG công nhận là dòng tế bào đủ tiêu chuẩn dùng trong sản xuất vắc xin và các chế phẩm sinh học sử dụng cho người. Tế bào Vero được nhập khẩu ở đời cấy truyền 134, chúng tôi sử dụng toàn bộ nguyên liệu nguồn (môi trường nuôi cấy tế bào, huyết thanh, trypsin và môi trường cấy tế bào) là các sản phẩm thương mại hoá được cấp phép cho sản xuất vắc xin và các chế phẩm sinh học để nhân giống WCB (đời 137). Tế bào WCB đã được kiểm tra xác định là vô trùng, không nhiễm vi rút ngoại lai, kiểm tra nhận dạng ... theo hướng dẫn cách xây dựng và kiểm tra ngân hàng tế bào sử dụng cho sản xuất vắc xin và các chế phẩm sinh học sử dụng cho người của TCYTTG.

Các nguyên liệu nguồn dùng trong quá trình thích nghi và nhân giống chủng giống Vnukovo-V06 như môi trường nuôi cấy tế bào, huyết thanh bê bào thai, trypsin... đều là các sản phẩm thương mại dùng cho sản xuất vắc xin và các chế phẩm sinh học. Chính vì vậy, các yếu tố nhiễm trùng tiềm ẩn mà chủng Vnukovo-V06 có thể phơi nhiễm



trong quá trình thích nghi và tạo ngân hàng chủng vi rút giống gốc chỉ có thể là vi khuẩn, nấm và *mycoplasma*. Vấn đề chủng bị phơi nhiễm với các vi rút ngoại lai là rất khó có thể xảy ra. Việc kiểm tra vi khuẩn, nấm và *mycoplasma* đã được thực hiện nghiêm ngặt ở từng giai đoạn thích nghi chủng cũng như tạo ngân hàng chủng vi rút giống, các kỹ thuật sử dụng để kiểm tra vi khuẩn, nấm và *mycoplasma* có độ nhạy và độ đặc hiệu cao (môi trường thioglycolate, soybean và PCR phát hiện *mycoplasma*) đã đảm bảo chủng hoàn toàn không nhiễm vi khuẩn, nấm và *mycoplasma*.

Tuy việc thích nghi và nhân giống tạo ngân hàng chủng giống Vnukovo-V06 được thực hiện nghiêm ngặt ngay từ khâu lựa chọn nguyên liệu nguồn để hạn chế tối đa nhiễm vi rút ngoại lai, nhưng chủng Vnukovo-V06 đã được kiểm tra nhiễm các vi rút ngoại lai bằng cách cấy truyền mù liên tiếp 3 lần chủng MSV sau khi đã trung hoà với huyết thanh kháng đại lên nhiều dòng tế bào khác nhau để xác định các vi rút ngoại lai gây huỷ hoại tế bào. Đối với các vi rút không gây huỷ hoại tế bào được xác định thông qua việc kiểm tra hình ảnh bằng phương pháp hiển vi điện tử (nhuộm âm bản và lát cắt mỏng) và tiêm truyền cho động vật bao gồm chuột ổ và chuột swiss 11 – 13 gam.

*Kiểm tra khả năng sinh miễn dịch:* Khả năng sinh miễn dịch của chủng sản xuất cũng là một yếu tố vô cùng quan trọng của chủng sản xuất vắc xin, chủng Vnukovo-V06 gây đáp ứng miễn dịch cho chuột khi tiêm 2 mũi miễn dịch cơ bản là 0,97IU/ml (RFFIT). Theo TCYTTC ngưỡng kháng thể trung hoà có khả năng bảo vệ là 0,5IU/ml. Để khẳng định chủng giống sản xuất vắc xin Vnukovo- V06 và Vnukovo- 32 có khả năng gây miễn dịch chống lại vi rút đại lưu hành ở Việt Nam. Hai chủng này đã được giải trình tự gen N, so sánh với các chủng vi rút đại hoang đại đang lưu hành ở Việt Nam trong vài năm qua. Kết quả cho thấy chủng vi rút đại sản xuất vắc xin Vnukovo-32, Vnukovo-V06 và các chủng vi rút đại hoang đại lưu hành ở người và động vật gần người (chó) tại Việt Nam đều thuộc kiểu gen 1, phân bố thành 2 dưới nhóm,

chúng tỏ chủng Vnukovo-V06 là chủng vi rút thích hợp dùng để sản xuất vắc xin phòng bệnh dại ở Việt Nam.

### **4.3. Sản xuất thử nghiệm vắc xin**

Việc nghiên cứu quy trình sản xuất vắc xin dại trên tế bào Vero được thực hiện qua từng giai đoạn từ nuôi cấy tế bào, nuôi cấy vi rút, bất hoạt, cô đặc và tinh chế vi rút. Mỗi giai đoạn được thực hiện với nhiều phương pháp khác nhau để xác định phương pháp, kỹ thuật tối ưu nhất. Riêng quy trình tinh chế vi rút đã được thử nghiệm với nhiều phương pháp tinh chế tiên tiến nhất trên thế giới hiện nay đang sử dụng để tinh chế vi rút dại như tinh chế bằng sắc ký cột ái lực (cellulose fine sulfate); tinh chế bằng lọc qua gel sepharose CL6B; tinh chế bằng siêu lọc và vi lọc sử dụng các màng lọc tiếp tuyến có MWCO và kích thước khác nhau; tinh chế bằng siêu ly tâm qua dung dịch đường có nồng độ liên tục 10 – 40%. Các thử nghiệm tinh chế vi rút đều được thực hiện ít nhất 03 lần xác định tính lặp lại của thử nghiệm, đánh giá hiệu suất tinh chế và hiệu quả tinh sạch của từng phương pháp, từ đó lựa chọn quy trình sản xuất tối ưu trong điều kiện cơ sở vật chất và trang thiết bị hiện có.

Quy trình sản xuất thử nghiệm vắc xin của chúng tôi sử dụng phương pháp cô đặc bằng siêu lọc và tinh chế vi rút bằng siêu ly tâm qua dung dịch đường nồng độ 10 – 40% là một trong những quy trình được nhiều nhà sản xuất vắc xin dại trên thế giới sử dụng. 03 loạt vắc xin sản xuất thử nghiệm theo quy trình tìm được đã đạt tiêu chuẩn vắc xin dại của TCYTTG về vô khuẩn, an toàn, bất hoạt, pH, protein và công hiệu. Tuy nhiên quy trình sản xuất thử nghiệm vắc xin dại tinh chế chúng tôi chưa đạt hiệu suất cao ( $28,8 \pm 0,7\%$ ), vì vậy cần phải có những nghiên cứu tiếp theo để hoàn thiện quy trình sản xuất vắc xin và nâng cao hiệu suất.

## KẾT LUẬN

1. **Chủng Vnukovo-V06 là chủng sản xuất vắc xin đại Vnukovo-32 đã thích nghi trên tế bào Vero đạt yêu cầu của chủng giống sản xuất vắc xin**
  - Hiệu giá  $10^{-7,12}LD_{50}/ml$ , ổn định qua 3 đời cấy truyền; MOI là 5VR/100TB
  - Chủng cố định, giảm độc lực; đạt yêu cầu vô trùng (không bị nhiễm khuẩn, nấm và *mycoplasma*); không nhiễm vi rút ngoại lai
  - Khả năng sinh miễn dịch là 0,94IU/ml (RFFIT)
2. **Tạo được ngân hàng chủng giống MSV và WSV đạt tiêu chuẩn của chủng giống sản xuất vắc xin đại tế bào**
3. **Sản xuất vắc xin thử nghiệm**
  - 3.1. ***Xây dựng được quy trình sản vắc xin đại tế bào có hiệu suất  $28,8 \pm 0,7\%$***
  - 3.2. ***Sản xuất được 03 loạt vắc xin đại tế bào Vero đạt tiêu chuẩn của TCYTTG về***
    - Vô khuẩn: đạt yêu cầu 03/03 loạt
    - Bất hoạt: đạt yêu cầu 03/03 loạt
    - An toàn chung: đạt yêu cầu, chuột tăng trọng  $124,3 \pm 6 \%$
    - An toàn đặc hiệu: đạt yêu cầu, chuột tăng trọng  $163,3 \pm 9 \%$
    - Protein: đạt yêu cầu, protein trung bình  $107,6 \pm 5,5 \mu g/ml$
    - pH : đạt yêu cầu, pH trung bình  $7,17 \pm 0,03$
    - Công hiệu: đạt yêu cầu  $\geq 2,5IU/ml$ .

## KIẾN NGHỊ

1. Hoàn thiện quy trình sản xuất vắc xin đại tế bào Vero có hiệu suất cao, đạt tiêu chuẩn chất lượng của TCYTTG sử dụng cho người;
2. Xin được đào tạo kỹ thuật và trang bị thiết bị cần thiết để hoàn thiện các kỹ thuật kiểm định ADN tồn dư trong vắc xin đại tế bào sản xuất trên tế bào Vero;
3. Sử dụng kháng nguyên tinh chế để sản xuất các bộ sinh phẩm dùng trong chẩn đoán và nghiên cứu vi rút đại.

## DANH MỤC CÁC BÀI BÁO LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN ĐÃ CÔNG BỐ

1. Nguyễn Thị Kiều Anh, Nguyễn Thị Hồng Hạnh, Nguyễn Thị Quý, Hoàng Minh Hiền (2006) “Xây dựng tiêu chuẩn của hiệu giá virus dại trong sản xuất vắc xin dại tế bào theo FFU dựa trên tiêu chuẩn LD<sub>50</sub>”, *tạp chí Y học dự phòng* XVI, 2(80), tr 16-20.
2. Nguyễn Thị Kiều Anh, Ngô Châu Giang, Nguyễn Vĩnh Đông, Manen Kuazaki, Akira Nishizono, Nguyễn Thị Hồng Hạnh (2008) “Bước đầu thử nghiệm thích nghi chủng sản xuất vaccine dại Vnukovo-32 trên tế bào Vero”, *tạp chí nghiên cứu y học*, tập 53, số 2, tr. 62 – 67.
3. Nguyễn thị Kiều Anh, Ngô Châu Giang, Nguyễn Vĩnh Đông, Nguyễn thị Hồng Hạnh (2009) ‘Thử nghiệm tinh chế virus dại bằng siêu ly tâm qua dung dịch đường nồng độ 10% - 40%’, *tạp chí Y học dự phòng*, tập XIX, số 7 (106), tr 88 – 94.
4. Nguyễn thị Kiều Anh, Nguyễn thị Hồng Hạnh, Đinh Kim Xuyên, Ngô Châu Giang, Nguyễn Vĩnh Đông (2009) “Thử nghiệm sản xuất kháng nguyên virus dại tế bào cô đặc bằng phương pháp siêu lọc, *tạp chí Y học dự phòng*, tập XIX, số 7 (106), tr 95 – 101.
5. Nguyễn Thị Kiều Anh, Ngô Châu Giang, Nguyễn Vĩnh Đông, Nguyễn Thị Hồng Hạnh (2009) “Thích nghi chủng sản xuất vaccine dại Vnukovo-32 trên tế bào Vero”, *tạp chí nghiên cứu Y học*, tập 65 số 6, tr 16-25.