

**ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI**  
**TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN**

**ĐẶNG THỊ NGÂN HÀ**

**NGHIÊN CỨU TÍNH AN TOÀN VÀ KHẢ NĂNG  
GÂY ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH TRÊN KHỈ *Macaca  
mulatta* CỦA 3 CHỦNG VIRUT ROTA HỆ GIỐNG  
GỐC ĐỂ SẢN XUẤT VAC XIN ROTA**

**Chuyên ngành: Vi sinh vật học**

**Mã số: 62 42 40 01**

**TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC**

**Hà Nội - 2010**

**Công trình được hoàn thành tại: Khoa sinh học, trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội**

**Người hướng dẫn khoa học:**

1. PGS.TS. Lê Thị Luân
2. PGS.TS. Nguyễn Đăng Hiền

Phản biện 1: GS.TS Phạm Văn Ty

Phản biện 2: PGS.TS Lê Văn Phụng

Phản biện 3: PGS.TS Đặng Đức Anh

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng cấp nhà nước  
chấm luận án tiến sĩ họp tại: Trường Đại học Khoa học Tự nhiên,  
Đại học Quốc gia Hà Nội

Vào hồi 09 giờ 00 ngày 18 tháng 08 năm 2010

**Có thể tìm hiểu luận án tại:**

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Trung tâm Thông tin - Thư viện, Đại học Quốc gia Hà Nội

## **DANH MỤC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. Lê Thị Luân, Nguyễn Đăng Hiền, Đặng Ngân Hà, “Hiệu giá và tính an toàn của chủng virus Rota giống gốc G1P8 (KH0118)”, Tạp chí Y học dự phòng, Tập XVII, số 1 (86) 2007.

2. Nguyễn Đăng Hiền, Nguyễn Thị Mai Hương, Đặng Ngân Hà, Lê Trung Dũng, Phan Văn Tú, Nguyễn Văn Tùng, Lê Thị Luân, “Nghiên cứu dịch tễ học Bệnh tiêu chảy do virus Rota tại Việt nam từ tháng 9/2007 đến 8/2008”, Tạp chí Y học dự phòng, Tập XVIII, số 7 (99) 2008.

3. Luan Thi Le, Trang Van Nguyen, Phuong Minh Nguyen, Nguyen Thuy Huong, Ngo Thu Huong, Nguyen Thi Mai Huong, Tran Bich Hanh, Dang Ngan Ha, Dang Duc Anh, Jon R. Gentsch, Yuhuan Wang, Mathew D. Esona, Roger I. Glass, A. Duncan Steele, Paul E. Kilgore, Nguyen Van Man, Baoming Jiang, Hien Dang Nguyen, “Development and characterization of candidate rotavirus vaccine strains derived from children with diarrhoea in Vietnam”, Vaccine (2009), doi:10.1016/j.vaccine.2009.08.086

4. Nguyễn Đăng Hiền, Lê Thị Luân, Ngô Thu Hường, Nguyễn Văn Mẫn, Lê Trung Dũng, Đặng Thị Ngân Hà, Nguyễn Thị Mai Hương, Trần Bích Hạnh “Dịch tễ học Bệnh tiêu chảy do virus Rota tại Bệnh viện Nhi Trung ương”, Tạp chí Y học dự phòng, Tập XVIII, số 6 (98) 2008.

5. Nguyễn Đăng Hiền, Ngô Thu Hường, Lê Thị Luân, Nguyễn Văn Mẫn, Lê Trung Dũng, Đặng Thị Ngân Hà, Nguyễn Thị Mai Hương, Trần Bích Hạnh, Phan Văn Tú, Nguyễn Thị Thanh Thảo, Hoàng Lê Phúc “Dịch tễ học và virus học Bệnh tiêu chảy do virus Rota tại Thành phố Hồ Chí Minh từ tháng 12/2006 đến tháng 11/2007”, Tạp chí Y học dự phòng, Tập XVIII, số 6 (98) 2008.

# GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

## 1. Tính cấp thiết của luận án:

Bệnh viêm dạ dày ruột cấp tính gây ỉa chảy ở trẻ em do virus Rota gây nên rất phổ biến ở nước ta và nhiều nước trên Thế giới. Theo những tài liệu nghiên cứu dịch tễ học ở Việt Nam, tỷ lệ trẻ em dưới 5 tuổi bị ỉa chảy phải vào bệnh viện điều trị do virus Rota chiếm khoảng trên 50% trong tổng số các trẻ em bị tiêu chảy từ mọi nguyên nhân phải nhập viện. Trên Thế giới bệnh cũng phát triển mạnh kể cả những nước phát triển và đang phát triển. Bệnh tiêu chảy do virus Rota tỷ lệ tử vong khoảng 5% (600.000 trẻ em hàng năm).

Hiện nay 2 vaccin đã được phê chuẩn sử dụng ở các nước phát triển và đang phát triển. Vaccin RotaRix được sản xuất từ hệ thống chủng gốc giống G1P[8]. Vaccin RotaTeq được sản xuất phối hợp giữa chủng virus Rota bò và chủng virus Rota người G1, G2, G3, G4.

Tại Việt Nam, được sự giúp đỡ của Tổ chức Y tế Thế giới, Trung tâm Kiểm soát và Phòng chống bệnh tật CDC-Atlanta-Hoa Kỳ, Bộ Y tế và Bộ Khoa học Công nghệ. Trung tâm nghiên cứu sản xuất vaccin và sinh phẩm y tế đã nghiên cứu tạo chủng virus Rota làm ứng cử viên cho sản xuất vaccin Rota tại Việt Nam.

Hiện nay Việt Nam vẫn chưa tự chủ động sản xuất được vaccin mà phải nhập ngoại với giá thành rất cao. Đề tài: “Nghiên cứu tính an toàn và khả năng gây đáp ứng miễn dịch trên khi *Macaca mulatta* của 3 chủng virus Rota hệ giống gốc để sản xuất vaccin Rota”. Công trình được nghiên cứu một cách đầy đủ theo tiêu chuẩn của Tổ chức Y tế Thế giới.

## 2. Đối tượng nghiên cứu và nhiệm vụ của luận án

- 3 chủng virus Rota hệ giống gốc để nghiên cứu và sản xuất.
- Đánh giá tính an toàn của chủng virus Rota hệ giống gốc trong phòng thí nghiệm.
- Đánh giá đáp ứng miễn dịch của chủng virus Rota hệ giống gốc trên động vật linh trưởng - khỉ *Macaca mulatta*.
- Sử dụng phương pháp sinh học phân tử để xác định chủng virus Rota lưu hành tại Việt Nam.
- Nghiên cứu, đánh giá, lựa chọn, thích nghi và tạo chủng virus Rota hoàn thiện hồ sơ chủng giống gốc và chủng sản xuất

## 3. Những đóng góp mới của luận án

Đã hoàn thiện được hồ sơ chủng giống gốc và đưa vào sản xuất vaccin Rota. Kết quả lần đầu tiên được nghiên cứu tại Polyovac, sử dụng thí nghiệm trong luận án là phương pháp chuẩn của Tổ chức Y tế Thế giới.

Đây là luận án có một quá trình nghiên cứu rộng và nhiều phương pháp kỹ thuật mới, hiện đại, đem lại những kết quả khoa học tin cậy khẳng định 3 chủng có đầy đủ tiêu chuẩn để sản xuất vacxin rota trong tương lai gần.

#### **4. Bộ cục của luận án**

Phần nội dung của luận án dày 138 trang đánh máy bao gồm: Mở đầu (2 trang). Chương 1: Tổng quan (42 trang). Chương 2: Thí nghiệm (33 trang). Chương 3: Kết quả và bàn luận (59 trang). Kết luận và kiến nghị (2 trang). Các công trình liên quan đến luận án: (1 trang). Tài liệu tham khảo: (10 trang).

### **NỘI DUNG CỦA LUẬN ÁN**

#### **Chương 1. Tổng quan tài liệu.**

##### **1.1. Lịch sử phát hiện virus Rota**

Năm 1973, Bishop và cộng sự quan sát dưới kính hiển vi điện tử mảnh sinh thiết niêm mạc ruột của một em bé chết vì tiêu chảy cấp đã phát hiện ra một loại virus giống Reovirus có đường kính 70nm. Sau đó, virus này đã được đặt tên là virus Rota.

Ở Việt Nam năm 1980 mới nghiên cứu và xác định virus này là nguyên nhân chính gây nên bệnh tiêu chảy ở trẻ em. Việc nghiên cứu phát triển phòng bệnh tiêu chảy do virus Rota là một việc làm cấp thiết, góp phần phòng bệnh tiêu chảy cho trẻ em Việt Nam.

##### **1.2. Phân loại virus Rota**

Virus Rota thuộc họ Reoviridae. Họ này rất đa dạng gồm có các nhóm: *Aquareovirus*, *Coltivirus*, *Cypovirus*, *Fijivirus*, *Orbivirus*, *Phytoreovirus*, *Oryzavirus*, *Reovirus*, *Rotavirus* và *Cytoplasmic polyhedrosisvirus* gồm một số virus chưa đặt tên. Có 3 chi gây bệnh cho người và động vật có vú đó là: *Reovirus*, *Orbivirus*, *Rotavirus*. Các chi gây bệnh cho thực vật gồm: *Fijivirus*, *Phytoreovirus*. *Cytoplasmic polyhedrosisvirus* và *Cypovirus* là chi gây bệnh cho côn trùng.

Virus Rota có những đặc điểm khác thường, chúng không có vỏ ngoài nhưng lại có đến 2 lớp vỏ capsit bao bọc hệ gen gồm 10 – 12 đoạn ARN kép.

Virus Rota có 7 loài: Ký hiệu A, B, C, D, E, F và G. Nhiễm ở người thường là các loài A, B, C, trong đó, loài A chiếm 90%.

##### **1.3. Hình thái và cấu trúc**

Hình thái: Hạt virus Rota có đường kính khoảng 75nm, giống hệt như một cái bánh xe có các gai ngắn và một cái vành rất nhọn.

Cấu trúc: Chuỗi nucleocapsit của virus Rota gồm 3 vòng xoắn đồng tâm chứa 11 đoạn ARN kép

Capsit của virus Rota có dạng đối xứng khối đa diện 20 mặt, gồm 132 capsomer. Cấu trúc capsit gồm 3 lớp:

Lớp ngoài chứa protein cấu trúc VP4 và VP7 .

Lớp trong chứa protein cấu trúc VP6 là kháng nguyên đặc hiệu nhóm, chiếm 50% hạt virut phát hiện trong kỹ thuật ELISA.

Lớp lõi chứa protein cấu trúc VP1, VP2 và VP3. 60 cái gai dài khoảng 120 Å<sup>0</sup> xuất phát từ bề mặt nhẵn của lớp ngoài.

#### 1.4. Phân nhóm và typ huyết thanh

Phân nhóm

- Lambert J.P, chia virut Rota thành 5 nhóm A, B, C, D và E.
- Isao, chia virut Rota gây bệnh cho người làm 3 nhóm A, B, C.
- Baoming chia virut Rota thành 7 nhóm A, B, C, D, E, F và G.

Typ huyết thanh

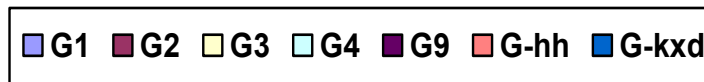
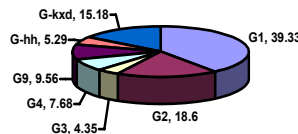
Trong mỗi nhóm, virut Rota được phân loại theo các typ huyết thanh, VP4 là một loại protein chống phân tách proteaza - protein P và VP7 một loại glycoprotein - protein G. 14 typ VP7 đã được phát hiện bằng phản ứng trung hoà giảm đám hoại tử, 10 trong 14 typ trên xuất hiện ở người và được xác định bởi phản ứng trung hoà chéo với các mẫu huyết thanh động vật đa dòng. Dựa vào phân tích gen người ta đã phát hiện ra ít nhất 19 typ huyết thanh VP4 và 20 kiểu gen VP7.

#### 1.5. Tính chất hoá lý

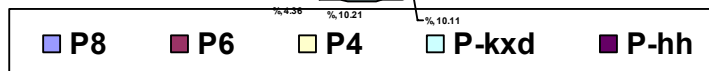
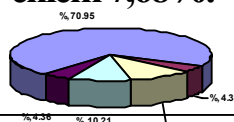
Sức đề kháng với nhiệt độ: Trong phân, ở nhiệt độ thường virut tồn tại nhiều ngày. Ở 4<sup>0</sup>C thậm chí ở 20<sup>0</sup>C với sự có mặt của 1,5 mM CaCl<sub>2</sub> virut Rota giữ được tính gây nhiễm trùng nhiều tháng. Ở - 20<sup>0</sup>C virut có thể tồn tại nhiều năm. Virut dễ bị bất hoạt ở nhiệt độ trên 45<sup>0</sup>C.

Tính bền vững với pH: Virut Rota bền vững với pH ở diện rộng từ pH: 3 đến pH: 10, nhờ đó mà virut Rota có thể tồn tại và phát triển tốt trong ruột người, virut chỉ bị bất hoạt ở pH < 3 và pH > 10 .

#### 1.6. Các chủng virut Rota lưu hành và gây bệnh tại Việt Nam từ 1998 đến 2008



Xác định typ G gây bệnh tiêu chảy trong đó G1 chiếm 39,33%, sau đó G4 chiếm 7,68%.



**Xác định typ P gây bệnh tiêu chảy trong đó P8 chiếm 70,95%, sau đó P4 chiếm 10,11% và P6 4,35%**

## **1.7 Hồ sơ hệ thống chủng giống sản xuất vacxin Rota tại Việt Nam**

### **1.7.1. Tóm tắt các bước cấy truyền tạo chủng giống gốc G1P[8]**

- Mẫu phân KH0118
- Định typ G1P[8]
- Phân lập trên tế bào Ma104
- Tách dòng một lần
- Cấy truyền 6 lần trên Ma104
- Cấy truyền 12 lần trên tế bào thận khỉ tiên phát *Macaca mulatta*
- Cấy truyền 17 lần trên tế bào Vero của Tổ chức Y tế Thế giới
- Tinh sạch dòng 2 lần trên tế bào Vero tại CDC Hoa Kỳ
- Cấy truyền 5 lần trên tế bào Vero tại CDC Hoa Kỳ (PL 5)

Tổng cộng 43 lần cấy truyền G1P[8] MS

- Cấy truyền 1 lần trên tế bào Vero tại Việt Nam (PL6)

Tổng cộng 44 lần cấy truyền G1P[8] WS

### **1.7.2. Tóm tắt các bước cấy truyền tạo chủng giống gốc G1P[4]**

- Mẫu phân 2000019210
- Định typ G1P[4]
- Phân loại trên tế bào Ma104
- Tách dòng 3 lần trên tế bào Ma104
- Cấy truyền 9 lần trên tế bào Ma104
- Cấy truyền 11 lần trên tế bào thận khỉ tiên phát *Macaca mulatta*
- Cấy truyền 10 lần trên tế bào Vero của Tổ chức Y tế Thế giới
- Tinh sạch dòng hai lần trên tế bào Vero CDC Hoa Kỳ
- Cấy truyền 5 lần trên tế bào Vero CDC Hoa Kỳ (PL5)

Tổng cộng cấy truyền 40 lần G1P[4]MS

- Cấy truyền 1 lần trên tế bào Vero tại Việt Nam (PL6)

Tổng cộng cấy truyền 41 lần G1P[4] WS

### **1.7.3. Tóm tắt các bước cấy truyền tạo chủng giống gốc G4P[6]**

- Mẫu phân 2001019203
- Định typ G4P[6]
- Phân lập trên tế bào Ma104
- Tách dòng 2 lần trên tế bào Ma104
- Cấy truyền 6 lần trên Ma104
- Cấy truyền 24 lần trên tế bào thận khỉ tiên phát *Macaca mulatta*
- Cấy truyền 12 lần trên tế bào Vero của Tổ chức Y tế thế giới
- Tinh sạch dòng 3 lần trên tế bào Vero tại CDC Hoa Kỳ
- Cấy truyền 5 lần trên tế bào Vero tại CDC Hoa Kỳ (PL5)

Tổng cộng 52 lần cấy truyền G4P[6]MS

- Cây truyền 1 lần trên tế bào Vero tại Việt Nam (PL6)  
Tổng cộng 53 lần cây truyền G4P[6] WS

## **Chương 2. Đối tượng, vật liệu và phương pháp nghiên cứu**

### **2.1 Đối tượng nghiên cứu**

#### **Chủng giống gốc (Master seed)**

- Chủng giống gốc G1P[8] (KH0118): Chủng có nguồn gốc từ mẫu phân của trẻ nữ 6 tháng tuổi vào Khoa nhi bệnh Viện Nhi Khánh Hòa-Nha Trang do tiêu chảy cấp tháng 12/2003.
- Chủng giống gốc G1P[4] (2000019210 ): Được phân lập từ mẫu phân của trẻ nam 6 tháng tuổi bị tiêu chảy cấp vào Bệnh viện Xanh Pon năm 2001 với mã số hồ sơ 399.
- Chủng giống gốc G4P[6] (2001019203): Được phân lập từ mẫu phân của trẻ nam 9 tháng tuổi bị tiêu chảy cấp vào Bệnh viện Xanh Pon năm 2000.

#### **Chủng sản xuất vacxin (Working seed)**

- Chủng sản xuất G1P[8] (KH0118) được sản xuất từ chủng giống gốc G1P[8] (KH0118)
- Chủng sản xuất G1P[4] (2000019210) được sản xuất từ chủng giống gốc G1P[4] (2000019210)
- Chủng sản xuất G4P[6](2001019203) được sản xuất từ chủng giống gốc G4P[6] (2001019203)
- Mẫu của chủng giống gốc, chủng sản xuất được kiểm tra theo qui định của Tổ chức Y tế Thế giới, đa số các thử nghiệm được kiểm tra tại Trung tâm nghiên cứu sản xuất vacxin và sinh phẩm y tế như kiểm tra vi khuẩn, nấm, *mycoplasma*, nhận dạng, an toàn ở trong phòng thí nghiệm và trên động vật thí nghiệm, gây đáp ứng miễn dịch trên khỉ,... một số thử nghiệm được kiểm tra tại phòng công nghệ cao Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương như: Thử nghiệm tác nhân ngoại lai về SV40, Retrovirrut, HBsAg,... Viện công nghệ Sinh học như trình tự gen 9(VP7)... Một số thử nghiệm được thực hiện tại Trung tâm Kiểm soát và phòng chống bệnh tật CDC-Hoa Kỳ: như trình tự gen, trình tự axit amin, *mycoplasma*.

### **2.2. Nguyên vật liệu**

- 3 chủng giống gốc và chủng sản xuất G1P[8], G1P[4], G4P[6]
- Nguyên vật liệu cho toàn bộ các phương pháp thử nghiệm
- Các động vật: thỏ, chuột nhắt, chuột lang, chuột ỏ và khỉ.

### **2.3. Phương pháp nghiên cứu**

- Phương pháp xét nghiệm vi khuẩn, nấm và vi khuẩn lao
- Phương pháp thử *Mycoplasma* bằng phương pháp PCR
- Phương pháp xác định virus gây hấp phụ hồng cầu
- Thử nghiệm tác nhân ngoại lai trên 4 loại tế bào
- Xác định nhận dạng virus Rota
- Xác định hình thể virus Rota bằng kính hiển vi điện tử
- Xác định an toàn và đáp ứng miễn dịch trên động vật thí nghiệm



- Xác định trình tự gen 4(VP4), 6(VP6), 9(VP7), 10(NSP4)
- Phương pháp thống kê xử lý số liệu

### Chương 3: Kết quả và bàn luận

#### 3.1. Kết quả kiểm định tính an toàn hệ thống chủng virus Rota

##### 3.1.1. Kiểm tra vô trùng

Thí nghiệm được tiến hành trong điều kiện phòng cấp độ B, hốt cấp độ A, nghiên cứu chủng phải vô trùng tuyệt đối từ dụng cụ đến trang thiết bị

Bảng 3.1. Kết quả vi khuẩn, nấm, và vi khuẩn lao vô trùng trong hỗn dịch virus chủng

Thử vô trùng	G1P[8]		G1P[4]		G4P[6]	
	MS	WS	MS	WS	MS	WS
Vi khuẩn	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Nấm	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Vi khuẩn lao	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Ghi chú:(-) kết quả âm tính. MS: chủng giống gốc. WS: chủng sản xuất.

Bảng 3.1: Ta thấy kết quả kiểm tra 3 chủng (MS, WS) trong hỗn dịch virus Rota đều không phát hiện được vi khuẩn, nấm và vi khuẩn lao. Chủng tổ chủng MS, WS đạt tiêu chuẩn vô trùng để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

##### 3.1.2. Kiểm tra tác nhân ngoại lai không gây hủy hoại tế bào trong hỗn dịch chủng bằng phương pháp PCR

Kiểm tra các tác nhân ngoại lai không gây hủy hoại tế bào trong hỗn dịch virus chủng, kiểm tra sự có mặt của *Mycoplasma*.

**Bảng 3.2. Kết quả tác nhân ngoại lai bằng phương pháp PCR**

Thử nghiệm tác nhân ngoại lai	G1P[8]		G1P[4]		G4P[6]	
	MS	WS	MS	WS	MS	WS
<i>Mycoplasma</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Bảng 3.2: Kết quả kiểm tra 3 chủng (MS, WS) trong hỗn dịch virus Rota đều không phát hiện được các virus ngoại lai theo phương pháp PCR, 3 chủng virus Rota không bị nhiễm *Mycoplasma*.

##### 3.1.3. Kiểm tra tác nhân ngoại lai gây hủy hoại tế bào trong hỗn dịch chủng virus Rota trên nuôi cấy tế bào, hấp phụ hồng cầu

Mỗi loạt chủng virus Rota phải thử nghiệm tìm tác nhân ngoại lai trên 4 loại tế bào: Vero, thận khỉ tiên phát, thận thỏ sơ sinh, Hep<sub>2</sub>C trong hỗn dịch virus Rota và hấp phụ hồng cầu trên 4 loại tế bào đó.

**Bảng 3.3 Kiểm tra tác nhân ngoại lai trong nước nổi tế bào nuôi cấy**

Thử nghiệm tác nhân ngoại lai	G1P[8]		G1P[4]		G4P[6]	
	MS	WS	MS	WS	MS	WS
Tế bào Vero	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Tế bào TKTP	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Thận thỏ sơ sinh	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Tế bào Hep <sub>2</sub> C	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Vi rút gây hấp phụ hồng cầu	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Bảng 3.3: Tế bào vero nhạy cảm với virus sởi, tế bào thận thỏ nhạy cảm với virus B, tế bào Hep2C nhạy cảm với virus đường ruột, nếu 1 lô tế bào mà có mặt của bất cứ 1 loại virus ngoại lai nào thì phải hủy bỏ kể cả khi tế bào đã nhiễm virus rồi. Kết quả 3 chủng virus Rota giống gốc và sản xuất đạt yêu cầu vì không phát hiện được sự có mặt của virus gây hấp phụ hồng cầu bằng phương pháp nuôi cấy trên 4 loại tế bào. Sau các thử nghiệm, quan sát dưới kính hiển vi, tế bào kín đẹp, mượt, không có dấu hiệu co, bong.

### 3.1.4. Kiểm tra an toàn trên động vật thí nghiệm

#### Kết quả an toàn trên thỏ tìm virus B (cercopithecoid herpes)

Hỗn dịch virus ro ta được tiến hành trên thỏ để xác định thỏ có bị nhiễm virus Heppet không.

**Bảng 3.4. Kết quả an toàn trên thỏ thí nghiệm chủng giống gốc**

Thỏ	G1P[8]MS	G1P[4]MS	G4P[6]MS	Đối chứng
Tổng số thỏ sử dụng	10	10	10	2
Tổng số thỏ sống sau thử nghiệm	10	10	10	2
Số thỏ chết trong 24 h thử nghiệm	0	0	0	0
Số thỏ chết sau 24 h thử nghiệm	0	0	0	0
Số lượng thỏ giảm cân	1	0	0	0
Trọng lượng trung bình trước thử nghiệm(kg)	2,37 ± 0,36	2,11 ± 0,17	2,03±0,19	2,50 ± 0,28
Trọng lượng trung bình sau thử nghiệm(kg)	2,40 ± 0,38	2,41 ± 0,09	2,41±0,21	2,54 ± 0,28
<b>Tăng trọng trung bình(%)</b>	<b>106,21±0,07</b>	<b>114,80±0,06</b>	<b>119,17±0,02</b>	<b>101,61±0,07</b>

Bảng 3.4: Kết quả kiểm tra an toàn 3 chủng giống gốc đạt yêu cầu khi thử hỗn dịch 3 chủng trên 30 thỏ, 100% thỏ sống khỏe mạnh, tăng trọng trung bình của mỗi thỏ cao hơn thỏ đối chứng (G1P[8]MS là 106,21%, G1P[4]MS là 114,80%, G4P[6]MS là 119,17%). Không thỏ

nào bị chết trong 24 giờ và sau 24 giờ. Với 2 thỏ đối chứng giá trị trung bình tăng trọng cả 2 đều thấp hơn lô thử nghiệm, chỉ đạt 101,61%.

**Bảng 3.5. Kết quả kiểm tra an toàn trên thỏ thí nghiệm chủng sản xuất**

<b>Thỏ</b>	<b>G1P 8 WS</b>	<b>G1P 4 WS</b>	<b>G4P 6 WS</b>	<b>Đối chứng</b>
Tổng số thỏ sử dụng	10	10	10	6
Tổng số thỏ sống sau thử nghiệm	10	10	10	6
Số thỏ chết trong 24 h thử nghiệm	0	0	0	0
Số thỏ chết sau 24 h thử nghiệm	0	0	0	0
Số lượng thỏ giảm cân	0	0	0	0
Trọng lượng trung bình trước thử nghiệm (kg)	1,58 ± 0,30	2,22±0,12	2,06±0,40	2,20 ± 0,10
Trọng lượng trung bình sau thử nghiệm (kg)	2,03 ± 0,17	2,63±0,12	2,54±0,32	2,80 ± 0,21
<b>Tăng trọng trung bình(%)</b>	<b>131,08 ± 18,05</b>	<b>118,58 ± 5,27</b>	<b>125,3 ± 14,89</b>	<b>125,76 ± 12,85</b>

Bảng 3.5: Kết quả kiểm tra an toàn 3 chủng sản xuất trên 36 thỏ, tất cả thỏ ở 3 chủng sản xuất cho kết quả tăng trọng với số liệu tương đương thỏ ở lô đối chứng. Tất cả thỏ đều sống khỏe mạnh sau thời gian theo dõi.

### **Kết quả thử nghiệm an toàn trên chuột lang tìm vi khuẩn lao**

Kết quả hỗn dịch chủng virus Rota tiến hành trên chuột lang để xác định sự có mặt của vi khuẩn lao (*Mycobacterium tuberculosis*). Nếu có vi khuẩn lao chuột sẽ ốm và chết trong thời gian theo dõi.

**Bảng 3.6. Kết quả an toàn trên chuột lang thí nghiệm chủng giống gốc**

<b>Chuột lang</b>	<b>G1P 8 MS</b>	<b>G1P 4 MS</b>	<b>G4P 6 MS</b>	<b>Đối chứng</b>
Tổng số chuột lang sử dụng	5	5	5	2
Tổng số chuột lang sống sau thử nghiệm	5	5	5	2
Số chuột lang chết trong 24 h thử nghiệm	0	0	0	0
Số chuột lang chết sau 24 h thử nghiệm	0	0	0	0
Số lượng chuột lang giảm cân	0	0	0	0
Trọng lượng trung bình trước thử nghiệm (gam)	260 ± 70	264 ± 37	282 ± 25	530 ± 127
Trọng lượng trung bình sau thử nghiệm (gam)	402 ± 59	434 ± 47	434 ± 30	635 ± 106
<b>Tăng trọng trung bình sau thử nghiệm (%)</b>	<b>142 ± 19</b>	<b>170 ± 18</b>	<b>152 ± 27</b>	<b>105 ± 21</b>

Bảng 3.6: Kết quả kiểm tra an toàn 3 chủng giống gốc trên 15 chuột lang thí nghiệm. 100 % chuột lang đều sống, khỏe mạnh, tăng trọng, mức độ tăng trọng đều cao hơn (142%~170%) so với 2 chuột lang đối chứng (105%). Không phát hiện thấy vi khuẩn lao và những tác nhân khác.

**Bảng 3.7. Kết quả an toàn trên chuột lang thí nghiệm chủng sản xuất**

<b>Chuột lang</b>	<b>G1P[8]WS</b>	<b>G1P[4]WS</b>	<b>G4P[6]WS</b>	<b>Đối chứng</b>
Tổng số chuột lang sử dụng	5	5	5	2
Tổng số chuột lang sống sau thử nghiệm	5	5	5	2
Số chuột lang chết trong 24 h thử nghiệm	0	0	0	0
Số chuột lang chết sau 24 h thử nghiệm	0	0	0	0
Số lượng chuột lang giảm cân	0	0	0	0
Trọng lượng trung bình trước thử nghiệm (g)	424±5,74	400±14,14	420±46,90	475±7,07
Trọng lượng trung bình sau thử nghiệm (g)	564±61,88	614±62,28	588±38,98	730±127,27
<b>Tăng trọng trung bình(g)</b>	<b>140±65,19</b>	<b>214±62,28</b>	<b>168±30,33</b>	<b>255±134,3</b>

Bảng 3.7: Kết quả kiểm tra an toàn 3 chủng sản xuất trên 17 chuột lang thí nghiệm và đối chứng. Tất cả chuột lang khỏe mạnh tăng trọng trung bình tương đương với lô đối chứng. Kết quả không phát hiện thấy tác nhân gây bệnh cho chuột lang sau thời gian theo dõi.

**Kết quả thử nghiệm an toàn trên chuột nhắt thực nghiệm**

Hỗn dịch chủng virus Rota được thí nghiệm trên chuột nhắt trưởng thành, xác định virus gây viêm màng não đám rối màng mạch limpho bào (lymphocytic choriomeningitis virus).

**Bảng 3.8. Kết quả an toàn trên chuột nhắt thí nghiệm chủng giống gốc**

<b>Chuột nhắt</b>	<b>G1P[8] MS</b>	<b>G1P[4] MS</b>	<b>G4P[6] MS</b>	<b>Đối chứng</b>
Tổng số chuột nhắt sử dụng	20	20	20	6
Tổng số chuột nhắt sống sau thử nghiệm	20	20	20	6
Số chuột nhắt chết trong 24 h thử nghiệm	0	0	0	0
Số chuột nhắt chết sau 24 h thử nghiệm	0	0	0	0
Trọng lượng trung bình trước thử nghiệm(g)	20	17,5	17,5	20
Trọng lượng trung bình sau thử nghiệm(g)	38	34,5	41,0	35
<b>Tăng trọng trung bình(g)</b>	<b>18±12,7</b>	<b>17±12,0</b>	<b>23,5±16,6</b>	<b>15±10,6</b>

Bảng 3.8: Kết quả kiểm tra an toàn 3 chủng giống gốc được thí nghiệm trên 60 chuột nhắt, 100% chuột sống, khỏe mạnh, mức độ tăng trọng đều cao hơn 6 chuột đối chứng.

**Bảng 3.9. Kết quả an toàn trên chuột nhắt thí nghiệm chủng sản xuất**

<b>Chuột nhắt</b>	<b>G1P[8]WS</b>	<b>G1P[4]WS</b>	<b>G4P[6]WS</b>	<b>Đối chứng</b>
Tổng số chuột nhắt sử dụng	20	20	20	5
Tổng số chuột nhắt sống sau thử nghiệm	20	20	20	5
Số chuột nhắt chết trong 24 h thử nghiệm	0	0	0	0
Số chuột nhắt chết sau 24 h thử nghiệm	0	0	0	0
Trọng lượng trung bình trước thử nghiệm (g)	23,30±1,58	21,98±2,09	23,53±2,10	22,96±0,72
Trọng lượng trung bình sau thử nghiệm (g)	38,36±3,46	36,90±6,99	37,44±4,63	37,76±3,35
<b>Tăng trọng trung bình(g)</b>	<b>15,06±4,02</b>	<b>14,92±7,46</b>	<b>13,91±5,45</b>	<b>14,80±3,27</b>

Bảng 3.9: Kết quả kiểm tra an toàn 3 chủng sản xuất trên 60 chuột nhất, 5 chuột nhất đối chứng. Sau thử nghiệm, không có chuột bị chết, chuột đều khỏe mạnh và tăng trọng với số liệu tương đương lô đối chứng.

### **Kết quả thử nghiệm an toàn trên chuột ổ thực nghiệm**

Hỗn dịch virus giống gốc thử nghiệm trên chuột ổ xác định các tác nhân virus gây bệnh là virus coxsackie. Nếu hỗn dịch chủng có những tác nhân gây bệnh cho chuột ổ, chuột sẽ ốm, chết trong thời gian theo dõi.

**Bảng 3.10. Kết quả an toàn trên chuột ổ thí nghiệm chủng giống gốc**

<b>Chuột ổ</b>	<b>G1P[8] MS</b>	<b>G1P[4] MS</b>	<b>G4P[6] MS</b>	<b>Đối chứng</b>
Tổng số chuột ổ sử dụng	22	22	22	11
Tổng số chuột ổ sống sau thử nghiệm	20	18	18	10
Số chuột ổ chết trong 24 h thử nghiệm	0	0	0	0
Số chuột ổ chết sau 24 h thử nghiệm	0	0	0	0
Số chuột ổ chết do mẹ ăn (mất xác)	2	4	4	1

Bảng 3.10: Kết quả kiểm tra an toàn 3 chủng giống gốc trên 66 chuột ổ. Kết quả mẹ ăn con 10 chuột ổ loại khỏi thí nghiệm, các chuột khác đều sống, tăng trọng và khỏe mạnh, không có chuột ổ nào chết ở 24 giờ tiêm, đạt tiêu chuẩn.

**Bảng 3.11. Kết quả an toàn trên chuột ổ thí nghiệm chủng sản xuất**

<b>Chuột ổ</b>	<b>G1P[8] WS</b>	<b>G1P[4] WS</b>	<b>G4P[6] WS</b>	<b>Đối chứng</b>
Tổng số chuột ổ sử dụng	22	24	22	11
Tổng số chuột ổ sống sau thử nghiệm	22	24	21	10
Chuột ổ chết trong 24 h thử nghiệm	0	0	0	0
Chuột ổ chết sau 24 h thử nghiệm	0	0	0	0
Số chuột chết do mẹ ăn(mất xác)	0	0	1	1

Bảng 3.11: 3 chủng sản xuất trên 68 chuột ổ và 11 chuột ổ làm đối chứng. Sau thử nghiệm, 1 chuột ổ lô đối chứng và 1 chuột ổ kiểm tra chủng G4P[6] bị mẹ ăn, còn toàn bộ chuột khác đều khỏe mạnh, tăng trọng, đạt tiêu chuẩn qui định.

### **Kết quả thử nghiệm an toàn trên khỉ thực nghiệm**

Hỗn dịch virus Rota chủng giống gốc và chủng sản xuất phải kiểm tra và đạt tính an toàn trong phòng thí nghiệm và trên động vật thí nghiệm.

**Bảng 3.12. Kết quả an toàn trên khí thí nghiệm chủng giống gốc**

<b>Khí</b>	<b>G1P[8]MS</b>	<b>G1P[4]MS</b>	<b>G4P[6]MS</b>	<b>Đối chứng</b>
Tổng số khí sử dụng	5	5	5	2
Tổng số khí sống sau thử nghiệm	5	5	5	2
Số khí chết trong 24 h thử nghiệm	0	0	0	0
Số khí chết sau 24 h thử nghiệm	0	0	0	0
Số khí bị tiêu chảy	0	0	0	0
Số khí bị sốt	0	0	0	0
Số khí bị nôn	0	0	0	0
Số khí bỏ ăn	0	0	0	0
Các biểu hiện khác	0	0	0	0
Số lượng khí giảm cân	0	0	0	0
Trọng lượng trung bình khí trước thử nghiệm (kg)	1,12	1,27	1,28	1,4
Trọng lượng trung bình khí sau thử nghiệm (kg)	1,42	1,58	1,56	1,65
Tăng trọng trung bình (kg)	<b>0,30±0,21</b>	<b>0,31±0,22</b>	<b>0,28±0,20</b>	<b>0,25±0,18</b>

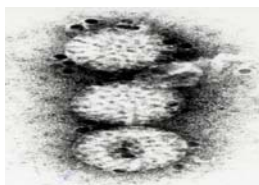
Bảng 3.12: Kiểm tra an toàn trên 15 khí uống 3 chủng virus Rota giống gốc 100% khí sống, khỏe mạnh, không khí nào bị tiêu chảy, không bị sốt, không bị nôn, không bị bỏ ăn và không có các biểu hiện bất thường khác, tất cả khí đều tăng trọng, đạt yêu cầu về an toàn trên khí non vừa tách mẹ.

**Bảng 3.13. Kết quả an toàn trên khi thí nghiệm chủng sản xuất**

Khí	G1P[8] WS	G1P[4] WS	G4P[6] WS	Hỗn hợp
Tổng số khí sử dụng	5	5	5	5
Tổng số khí sống sau thử nghiệm	5	5	5	5
Số khí chết trong 24 h thử nghiệm	0	0	0	0
Số khí chết sau 24 h thử nghiệm	0	0	0	0
Số khí bị tiêu chảy	0	0	0	0
Số khí bị sốt	0	0	0	0
Số khí bị nôn	0	0	0	0
Số khí bỏ ăn	0	0	0	0
Các biểu hiện khác	0	0	0	0
Số lượng khí giảm cân	0	0	0	0
Trọng lượng trung bình khí trước thử nghiệm (kg)	1,26	1,17	1,22	1,20
Trọng lượng trung bình khí sau thử nghiệm (kg)	1,64	1,50	1,52	1,60
Tăng trọng trung bình (kg)	0,38±0,27	0,33±0,23	0,30±0,21	0,40±0,28

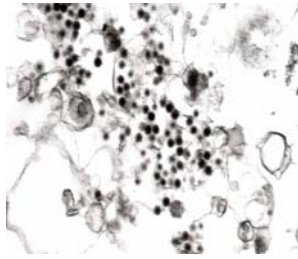
Bảng 3.13: Kiểm tra an toàn trên 20 khí được thử nghiệm, mỗi chủng thử trên 5 khí và hỗn hợp 03 chủng được thử trên 5 khí. Trọng lượng trung bình của khí trước khi thử nghiệm tương ứng với G1P[8], G1P[4], G4P[6], hỗn hợp là: 1,26 kg; 1,17 kg; 1,22 kg; 1,20 kg sau khi thử nghiệm tương ứng là: 1,64 kg; 1,50 kg; 1,52 kg; 1,6 kg, như vậy, khí tăng trọng trung bình tương ứng là: 0,38 kg; 0,33 kg; 0,30 kg; 0,4 kg.

### **3.1.5. Quan sát chủng virut Rota giống gốc trên kính hiển vi điện tử**

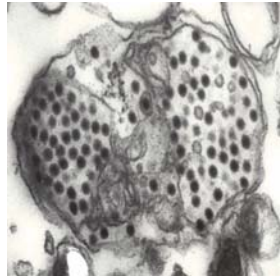


Hình 3.1 Hình ảnh chủng giống gốc vacxin G1P[8]





Hình 3.2. Hình ảnh chủng giống gốc vacxin G1P[4]

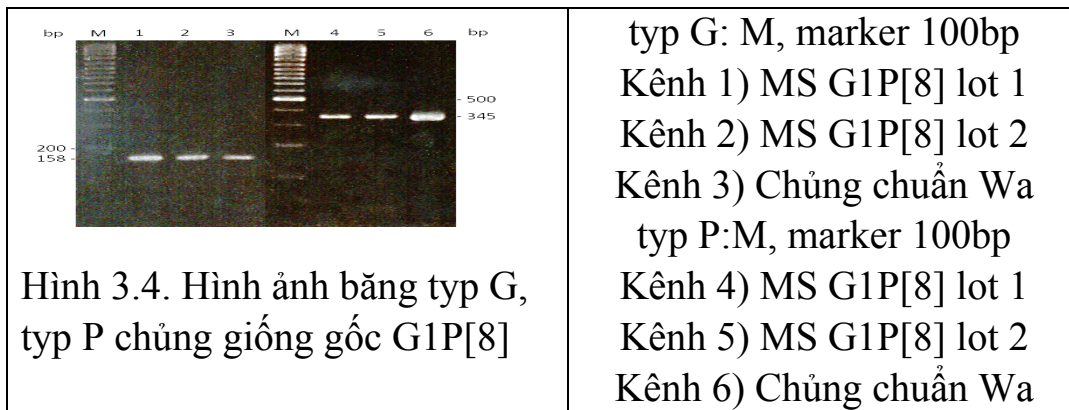


Hình 3.3. Hình ảnh chủng giống gốc vacxin G4P[6]

### 3.1.6. Kết quả nhận dạng chủng giống gốc và chủng sản xuất

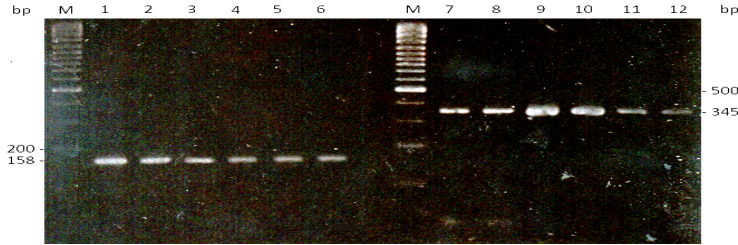
#### Kết quả nhận dạng chủng giống gốc G1P[8]

Từ các mẫu bệnh phẩm được chuẩn đoán dương tính với virus Rota bằng kỹ thuật gắn enzym EIA. Chúng tôi tiến hành tách chiết ARN, khuếch đại sao chép ngược các ARN này sử dụng các đoạn mồi được thiết kế tương ứng với các typ, tiến hành điện di trên gel agarose và đọc kết quả



Hình 3.4: Dựa vào vị trí băng trên gel. Băng chủng giống gốc G1P[8] lot1 (kênh 1) và lot2 (kênh 2) xác định typ G tại vị trí 158bp giống với băng mẫu chuẩn Wa (kênh 3). Tương tự xác định typ P của chủng này bằng (kênh 4, 5) xuất hiện tại vị trí 345bp như vị trí băng chủng chuẩn (kênh 6)

### Kết quả nhận dạng chủng sản xuất G1P[8]



**Hình 3.5. Hình ảnh băng typ G, typ P chủng sản xuất G1P[8]**

typ G: M, marker	typ P : M, marker 100bp
Kênh 1) WS G1P[8] lot 1	Kênh 7) WS G1P[8] lot 1
Kênh 2) WS G1P[8] lot 2	Kênh 8) WS G1P[8] lot 2
Kênh 3) WS G1P[8] lot 3	Kênh 9) WS G1P[8] lot 3
Kênh 4) WS G1P[8] lot 4	Kênh 10) WS G1P[8] lot 4
Kênh 5) WS G1P[8] lot 5	Kênh 11) WS G1P[8] lot 5
Kênh 6) Chủng chuẩn Wa	Kênh 12) Chủng chuẩn Wa

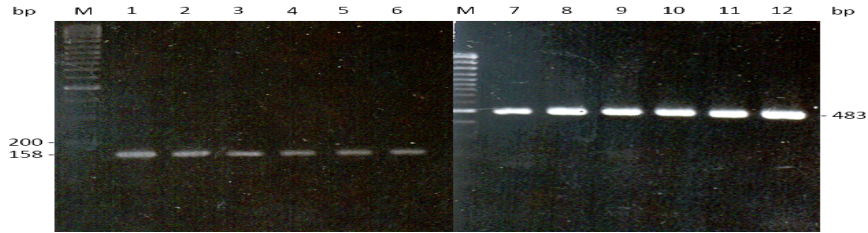
Hình 3.5: Cho hình ảnh kiểu gen của chủng G1P[8] trên gel, kết quả chạy RT-PCR cho thấy 5 loạt chủng G1P[8] đều có băng typ G (kênh 1, 2, 3, 4, 5) tại vị trí 158 bp giống băng chủng chuẩn WaG1P[8] (kênh 6). Tương tự, hình ảnh băng typ P của chủng chuẩn Wa (kênh 12)

### Kết quả nhận dạng chủng giống gốc G1P[4]

	typ G: M, marker 100bp Kênh 1) MS G1P[4] lot 1 Kênh 2) MS G1P[4] lot 2 Kênh 3) Chủng chuẩn Wa typ P: M, marker 100bp Kênh 4) MS G1P[4] lot 1 Kênh 5) MS G1P[4] lot 2 Kênh 6) Chủng chuẩn DS1
--	---

Dựa vào hình 3.6, hình băng trên gel ta thấy vị trí band xuất hiện, băng chủng giống gốc G1P[4] lot1 (kênh1) và lot2 (kênh 2) xác định typ G tại vị trí 158bp giống với băng mẫu chuẩn Wa (kênh 3). Xác định typ P của chủng này (kênh 4, 5) có băng xuất hiện tại vị trí 483bp như vị trí băng chủng chuẩn DS1 (kênh 6).

### Nhận dạng chủng sản xuất G1P[4]



**Hình 3.7. Hình ảnh băng typ G, P của chủng sản xuất G1P[4]**

typ G: M, marker 100bp Kênh 1, WS G1P[4] lot 1 Kênh 2, WS G1P[4] lot 2 Kênh 3, WS G1P[4] lot 3 Kênh 4, WS G1P[4] lot 4 Kênh 5, WS G1P[4] lot 5 Kênh 6, Chủng chuẩn Wa	typ P: M, marker 100bp Kênh 7, WS G1P[4] lot 1 Kênh 8, WS G1P[4] lot 2 Kênh 9, WS G1P[4] lot 3 Kênh 10, WS G1P[4] lot 4 Kênh 11, WS G1P[4] lot 5 Kênh 12, Chủng chuẩn DS1
---	---

Hình 3.7: Cho hình ảnh kiểu gen của chủng G1P[4] trên gel, kết quả chạy RT-PCR cho thấy 5 loạt chủng G1P[4] đều có băng typ G (kênh 1, 2, 3, 4, 5) tại vị trí 158 bp giống băng (typ G (kênh 6) chủng chuẩn Wa. Tương tự, hình ảnh băng typ P của 5 loạt chủng G1P[4] kênh 7, 8, 9, 10, 11 tại vị trí 483 bp giống như băng typ P của chủng chuẩn DS1 typ G (kênh 12).

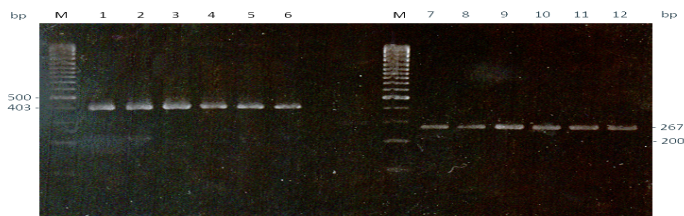
### Kết quả nhận dạng chủng giống gốc G4P[6]

	<p>G typ : M, marker 100bp Kênh 1) MS G4P6 lot 1 Kênh 2) MS G4P6 lot 2 Kênh 3) Chủng chuẩn ST3 P typ : M, marker 100bp Kênh 4) MS G4P6 lot 1 Kênh 5) MS G4P6 lot 2 Kênh 6) Chủng chuẩn ST3</p>
--	--

**Hình 3.8. Hình ảnh băng typ G, typ P chủng giống gốc G4P[6]**

Hình 3.8, Trên gel ta thấy sự nhận dạng chủng giống gốc dựa vào vị trí băng xuất hiện, băng chủng giống gốc G4P[6] lot1 (kênh 1) và lot2 (kênh 2) xác định typ G tại vị trí 403bp giống với băng mẫu chuẩn ST3 (kênh 3). Xác định typ P của chủng này băng (kênh 4, 5) xuất hiện tại vị trí 267bp như vị trí băng chủng chuẩn ST3 (kênh6).

## *Nhận dạng chủng sản xuất G4P[6]*



**Hình 3.9. Hình ảnh băng typ G, P của chủng sản xuất G4P[6]**

typ G: M, marker 100bp	typ P: M, marker 100bp
Kênh 1, WS G4P[6] lot 1	Kênh 7, WS G4P[6] lot 1
Kênh 2, WS G4P[6] lot 2	Kênh 8, WS G4P[6] lot 2
Kênh 3, WS G4P[6] lot 3	Kênh 9, WS G4P[6] lot 3
Kênh 4, WS G4P[6] lot 4	Kênh 10, WS G4P[6] lot 4
Kênh 5, WS G4P[6] lot 5	Kênh 11, WS G4P[6] lot 5
Kênh 6, Chủng chuẩn ST3	Kênh 12, Chủng chuẩn ST3

Hình 3.9: Hình ảnh kiểu gen của chủng G4P[6] trên gel, kết quả chạy RT-PCR cho thấy 5 loạt chủng G4P[6] đều có băng typ G (kênh 1, 2, 3, 4, 5) tại vị trí 403 bp giống băng chủng chuẩn ST3 (kênh 6). Tương tự, hình ảnh băng typ P của 5 loạt chủng G4P[6] kênh 7, 8, 9, 10, 11 tại vị trí 267 bp giống như băng typ P của chủng chuẩn ST3 (kênh 12).

### **3.2. Kết quả đáp ứng miễn dịch hệ thống chủng trên khỉ**

#### **3.2.1. Kết quả kháng thể trung hòa trên hệ thống 3 chủng**

Ở mỗi cơ thể động vật khác nhau thì có sức sinh miễn dịch khác nhau. Miễn dịch chủ động được tạo ra khi cơ thể bị nhiễm virus hoặc uống vắc xin sống giảm động lực...

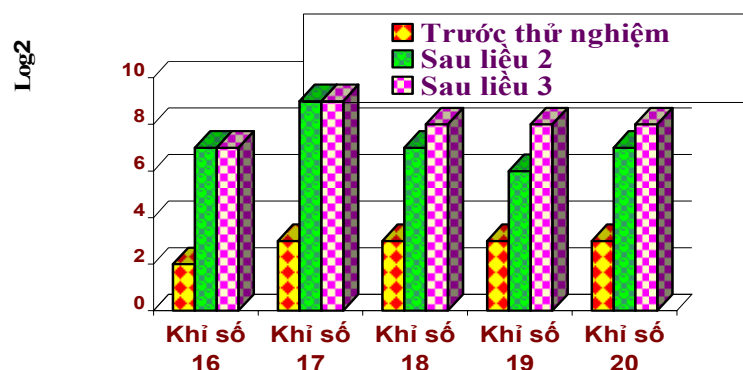
**Bảng 3.14. Hiệu giá kháng thể trung hoà trên khỉ chủng giống gốc G1P[8]MS**

Khỉ số	Hiệu giá kháng thể trung hoà		
	Trước TN	Sau liều 2	Sau liều 3
1	1:8	1:512	1:512
2	1:8	1:128	1:128
3	1:8	1:128	1:128
4	1:8	1:128	1:128
5	1:8	1:128	1:128

Bảng 3.14 cho kết quả đáp ứng miễn dịch chủng giống gốc G1P[8] trên 5 khỉ thử nghiệm. Tất cả các huyết thanh khỉ trước thử

nghiệm có hiệu giá 1:8 ( $2^3$ ). Toàn bộ huyết thanh khí sau thử nghiệm liều 2 và liều 3 tăng ít nhất 1:128 ( $2^7$ ). Huyết thanh khí cao nhất sau liều 2 và 3 tăng 1:512 ( $2^9$ ) khí số 1. Cả 5 khí đều tạo kháng thể sau khi sử dụng 3 liều, kết quả kháng thể sau liều 2 tương đương sau liều 3.

### Hiệu giá kháng thể trung hoà trên khí chủng sản xuất G1P[8]



**Hình: 3.10. Hiệu giá kháng thể trung hoà trên khí chủng sản xuất G1P[8]**

Hình 3.10: Cho kết quả hiệu giá kháng thể trung hòa của 5 khí trước khi thử nghiệm với chủng G1P[8] tương ứng là 1:4( $2^2$ ); 1:32( $2^5$ ); 1:8( $2^3$ ); 1:8( $2^3$ ); 1:8( $2^3$ ); sau khi gây đáp ứng miễn dịch trên khí thực nghiệm 5 trong 5 khí 1 lần thí nghiệm đều có đáp ứng miễn dịch sau liều 2 tăng cao từ 1:128( $2^7$ ); 1:512( $2^9$ ); 1:128( $2^7$ ); 1:64( $2^6$ ); 1:128( $2^7$ ). 1/5 khí kháng thể tăng cao nhất tại thời điểm sau liều 3 từ 1:512( $2^9$ ) đó là khí số 17. Hiệu giá sau liều 2 tương đương với hiệu giá sau liều 3.

**Bảng 3.15. Hiệu giá kháng thể trung hoà trên khí chủng giống gốc G1P[4]MS**

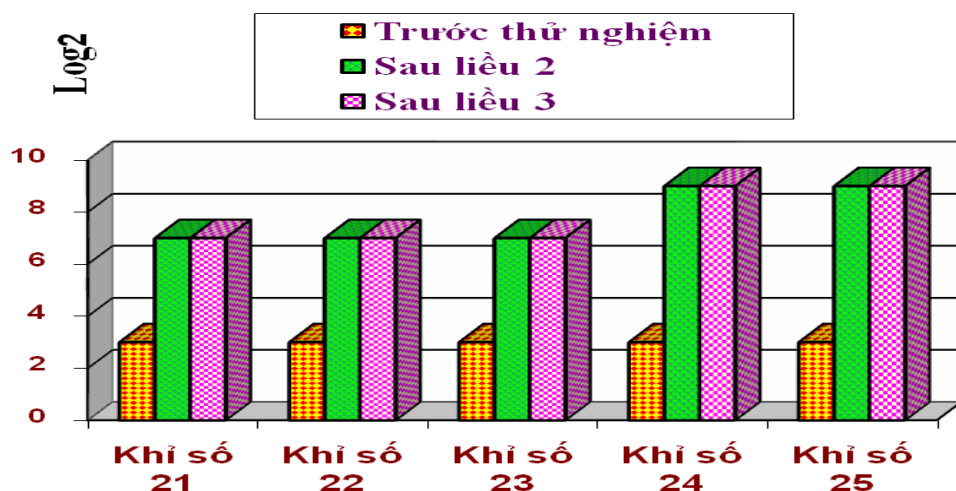
Khí số	Hiệu giá kháng thể trung hoà		
	Trước TN	Sau liều 2	Sau liều 3
6	1:8	1:128	1:128
7	1:8	1:64	1:64
8	1:8	1:128	1:256
9	1:8	1:256	1:512
10	1:8	1:128	1:128

Bảng 3.15 cho kết quả đáp ứng miễn dịch chủng giống gốc G1P[4] trên 5 khí thử nghiệm. Tất cả các huyết thanh khí trước thử nghiệm đều có hiệu giá 1:8 ( $2^3$ ). Toàn bộ huyết thanh khí sau thử nghiệm liều 2 và liều 3 tăng ít nhất 1:64 ( $2^6$ ). Huyết thanh cao nhất sau



liều 2 tăng 1:256 ( $2^8$ ) liều 3 tăng 1:512 ( $2^9$ ) khi số 9. 5 trong 5 khi đáp ứng miễn dịch, hiệu giá kháng thể sau liều 2 và 3 tương đương nhau.

**Hiệu giá kháng thể trung hoà trên khi thử nghiệm chủng sản xuất G1P[4]WS**



**Hình: 3.11. Hiệu giá kháng thể trung hoà trên khi chủng G1P[4]WS**

Hình 3.11 cho thấy hiệu giá kháng thể trung hòa của chủng sản xuất G1P[4] trên 5 khi thử nghiệm, cả 5 khi trước thử nghiệm đều có hiệu giá kháng thể trung hòa là 1:8 ( $2^3$ ). 2 khi có hiệu giá kháng thể trung hòa tăng cao sau liều 2 và liều 3: 1: 512 ( $2^9$ ) là khi 24 và 25. Hiệu giá giao động từ 1:128( $2^7$ ) đến 1:512( $2^9$ ). Hiệu giá kháng thể trung hòa sau liều 2 tương đương với hiệu giá kháng thể sau liều 3.

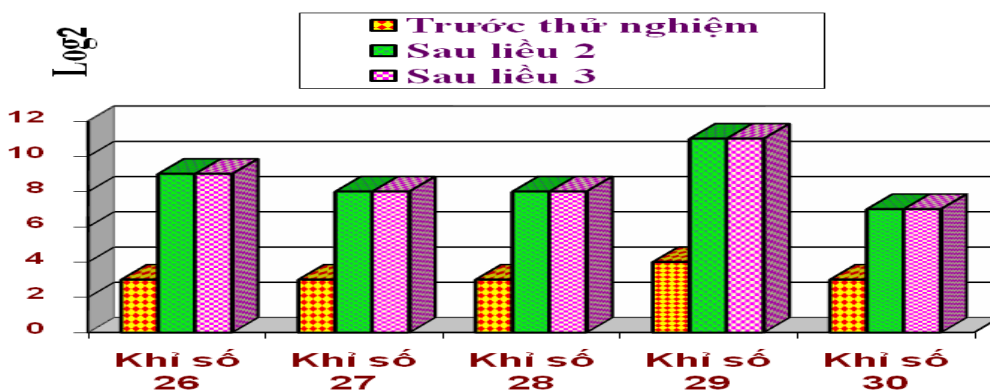
**Bảng 3.16. Hiệu giá kháng thể trung hoà trên khi chủng giống gốc G4P[6]MS**

Khi số	Hiệu giá kháng thể trung hoà		
	Trước TN	Sau liều 2	Sau liều 3
11	1:8	1:128	1:256
12	1:8	1:4096	1:4096
13	1:4	1:1024	1:1024
14	1:4	1:4096	1:4096
15	1:4	1:2048	1:2048

Bảng 3.16 cho kết quả đáp ứng miễn dịch trên 5 khi khi sử dụng chủng G4P[6] bằng đường uống. Tất cả các huyết thanh khi trước thử nghiệm đều có hiệu giá 1:8 ( $2^3$ ) ; 1:8 ( $2^3$ ) ; 1:4 ( $2^2$ ) ; 1:4 ( $2^2$ ) ; 1:4 ( $2^2$ ).

Toàn bộ huyết thanh khi sau thử nghiệm liều 2 và liều 3 tăng cao nhất 1:4096 ( $2^{12}$ ) khi số 12 và 14. 5 trong 5 khi đáp ứng miễn dịch tốt.

### Hiệu giá kháng thể trung hoà trên khi thử nghiệm chủng sản xuất G4P[6]WS



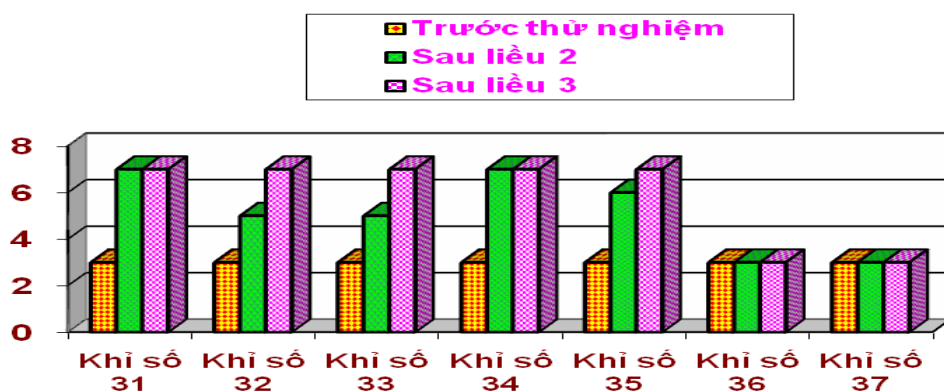
**Hình: 3.12. Hiệu giá kháng thể trung hoà trên khi chủng sản xuất G4P[6]WS**

Hình:3.12 cho kết quả hiệu giá kháng thể trung hòa chủng G4P[6] trên khi trước khi thử nghiệm là 1:8( $2^3$ ) ; 1:8 ( $2^3$ ) ; 1:8( $2^3$ ) ; 1:16( $2^4$ ) ; 1:8( $2^3$ ). Sau khi thử nghiệm gây đáp ứng miễn dịch trên khi thử nghiệm, 5 trong 5 khi 1 lần thí nghiệm đều có đáp ứng miễn dịch sau liều 2 tăng cao từ 1:32 ( $2^5$ ) khi số 30 đến 1:4096 ( $2^{12}$ ) khi số 29. Hiệu giá kháng thể trung hòa sau liều 2 tương đương với hiệu giá kháng thể sau liều 3 và ổn định tại liều 3. Có thể chỉ sử dụng vacxin với 2 liều.

### 3.2.2. Kết quả kháng thể trung hòa trên hệ thống chủng đối chứng

Hiệu giá kháng thể trung hoà trên khi thử nghiệm hỗn hợp 3 chủng:

G1P[8]WS; G1P[4]WS; G4P[6]WS



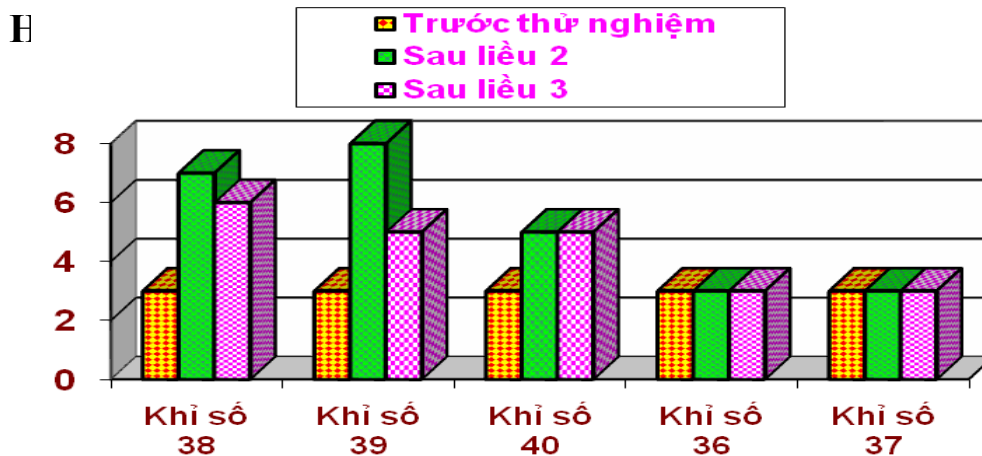
**Hình 3.13 Hiệu giá kháng thể trung hoà trên khi thử nghiệm hỗn hợp 3 chủng sản xuất G1P[8]WS; G1P[4]WS; G4P[6]WS và khi đối chứng.**

Hình.13. Cho kết quả hiệu giá kháng thể trung hòa của hỗn dịch 3 chủng trên khi thực nghiệm, hiệu giá kháng thể từng chủng sau khi thử nghiệm liều 2 là: 1:128( $2^7$ ); 1:32( $2^5$ ); 1:32( $2^5$ ); 1:128( $2^7$ ); 1:64( $2^6$ ) cao hơn trước khi thử nghiệm là: 1:8( $2^3$ ), hiệu giá kháng thể trung hòa sau liều 3 là cao nhất, 5 trong 5 khi có hiệu giá là: 1:128( $2^7$ ). Khi số 31 và 34 có hiệu giá kháng thể cao hơn tại liều 2 và ổn định tại liều 3. Vì vậy tỷ lệ khi đáp ứng miễn dịch sau khi uống vắc xin liều 2 là tăng cao và ổn định tại liều 3. Chỉ cần uống 2 liều vắc xin là đủ.

**Bảng 3.17. Hiệu giá kháng thể trung hoà trên khi đối chứng**

Khi số	Hiệu giá kháng thể trung hoà		
	Trước thí nghiệm	Sau liều 2	Sau liều 3
36	1:8	1:8	1:8
37	1:8	1:8	1:8

Bảng 3. 17: Cho thấy hiệu giá kháng thể trung hòa lô đối chứng tại trước và sau khi thử nghiệm đều giống nhau 1:8( $2^3$ ).



**Hình 3.14 Hiệu giá kháng thể trung hoà trên khi thử nghiệm Rotarix (GSK)**

Hình 3.14: Hiệu giá kháng thể trung hòa của vắc xin Rota Rix trên 3 khi thử nghiệm, cả 3 khi trước thử nghiệm đều có hiệu giá kháng thể trung hòa là 1:8 ( $2^3$ ). 2 khi có hiệu giá kháng thể trung hòa tăng cao sau liều 2, từ 1: 128 ( $2^7$ ) đến 1: 256 ( $2^8$ ) và 1:32( $2^5$ ) khi 40 giữ nguyên hiệu giá 1:32 ( $2^5$ ). 02 khi hiệu giá kháng thể trung hòa giảm 2 tháng sau liều 3 còn từ 1:32 ( $2^5$ ) đến 1:64 ( $2^6$ ) và khi số 40 vẫn giữ nguyên hiệu giá 1:32 ( $2^5$ ).



Kết quả các nghiên cứu trên chứng minh được chủng giống gốc và chủng sản xuất của Việt Nam đạt được tính sinh miễn dịch ở khi.

### **3.3. Kết quả giải trình tự gen hệ thống chủng virus Rota**

Thử nghiệm so sánh virus Rota với chủng giống gốc hoặc chủng sản xuất thích hợp để đảm bảo rằng virus Rota không bị thay đổi trong quá trình nhân lên khi cấy chuyền. Đặc tính kiểu hình và đặc tính kiểu gen (phân tích trình tự gen) phải tương đồng. Xác định tính ổn định của virus bao gồm đặc tính phát triển trong phòng thí nghiệm. Kết quả đặc tính hóa gen của virus đóng một vai trò quan trọng. Tính nguyên vẹn và ổn định của hệ gen virus đã được nghiên cứu.

Sử dụng phương pháp RT-PCR, phản ứng chuỗi polymeraza khuếch đại sao chép ngược nhằm xác định các gen mã hóa cho protein capsit lớp ngoài VP4 (gen 4, typ P) và VP7 (gen 9, typ G) mang tính kháng nguyên đặc hiệu typ của virus Rota có trong mẫu phân.

Chuỗi ADN được giải trình tự trên máy giải trình tự động ABI-3100 (Perkin-ELmer) từ sản phẩm dòng hóa là ADN của plasmid tái tổ hợp. Giải trình tự được thực hiện nhiều lần với số lượng nhiều plasmid tái tổ hợp nhằm thu được kết quả chính xác. Xử lý chuỗi nucleotide bằng chương trình Sequancher 4.7; sắp xếp, đối chiếu trình tự tương ứng của đoạn gen bằng chương trình máy tính GENDOC2.5 (Karl Nicholas, 1997). Giám định các chủng được thực hiện bằng phương pháp truy cập Ngân hàng Gen thông qua chương trình BLAST có tại (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Nhìn vào kết quả cho thấy: Trình tự nucleotide đoạn gen số 4 (VP4) của các chủng giống gốc và sản xuất G1P[4], G1P[8] và G4P[6] sau khi giải mã đem so sánh hoàn toàn giống nhau 100%. Điều này cũng có thể khẳng định hệ gen chủng G1P[4], G1P[8] và G4P[6] chủng giống gốc và chủng sản xuất ổn định.

So sánh tính tương đồng đoạn gen số 4 (VP4) các chủng của Việt Nam với trình tự nucleotide của chủng chuẩn Quốc tế có sự tương đồng, trong đó, G1P[8] với chủng chuẩn KU trong Ngân hàng gen Quốc tế với mã số

AB222787, G1P[4] với chủng DS1 có mã số AB118025 và G4P[6] với chủng ST3 có mã số L33895. Có tính tương đồng trong khoảng: 93%, 93% và 90%.

Nhìn vào kết quả cho thấy: Trình tự nucleotide đoạn gen số 6 (VP6) của các chủng giống gốc và sản xuất G1P[4], G1P[8] và G4P[6] sau khi giải mã đem so sánh hoàn toàn giống nhau 100%. Điều này cũng có thể khẳng định hệ gen chủng G1P[4], G1P[8] và G4P[6] giống gốc và sản xuất ổn định.

So sánh tính tương đồng đoạn gen số 6 (VP6) các chủng của Việt Nam với trình tự nucleotide của chủng chuẩn Quốc tế có sự tương đồng, trong đó, G1P[8] với chủng chuẩn KU trong Ngân hàng gen Quốc tế với mã số AB222787, G1P[4] với chủng DS1 có mã số AB118025 và G4P[6] với chủng ST3 có mã số L33895. Có tính tương đồng trong khoảng: 91%, 86% và 89%.

Nhìn vào kết quả trên cho thấy: Trình tự nucleotide đoạn gen số 9 (VP7) của các chủng giống gốc và sản xuất G1P[4], G1P[8] và G4P[6] sau khi giải mã đem so sánh hoàn toàn giống nhau 100%. Điều này khẳng định hệ gen chủng G1P[4], G1P[8] và G4P[6] giống gốc và sản xuất ổn định.

So sánh tính tương đồng đoạn gen số 9 (VP7) các chủng của Việt Nam với trình tự nucleotide của chủng chuẩn Quốc tế có sự tương đồng lớn, trong đó, G1P[4], G1P[8] với chủng chuẩn KU trong Ngân hàng gen Quốc tế với mã số AB222787 và G4P[6] với chủng Hochi có mã số AB039035. Có tính tương đồng trong khoảng: 92%, 91% và 85%.

Nhìn vào kết quả trên cho thấy: Trình tự nucleotide đoạn gen số 10 (NSP4) của các chủng giống gốc và sản xuất G1P[4], G1P[8] và G4P[6] sau khi giải mã đem so sánh hoàn toàn giống nhau 100%. Điều này cũng có thể khẳng định hệ gen chủng G1P[4], G1P[8], G4P[6] giống gốc và sản xuất ổn định.

So sánh tính tương đồng đoạn gen số 10 (NSP4) các chủng của Việt Nam với trình tự nucleotide của chủng chuẩn Quốc tế có sự tương đồng, trong đó: G1P[8], G1P[4] với chủng chuẩn KU trong Ngân hàng gen Quốc tế với mã số AB022772, và G4P[6] với chủng Hochi có mã số AB008251. Có tính tương đồng trong khoảng: 92%, 81% và 93%.

## KẾT LUẬN

**I. Hệ thống các chủng giống gốc virus rota gồm: G1P[8], G1P[4] và G4P[6] đạt tiêu chuẩn an toàn trong phòng thí nghiệm và trên động vật thí nghiệm theo tiêu chuẩn của Tổ chức Y tế Thế giới:**

- Cả 03 chủng không bị nhiễm tác nhân ngoại lai gây huỷ hoại tế bào, gây hấp phụ hồng cầu và đạt các chỉ tiêu về tính vô trùng, không bị nhiễm vi khuẩn, nấm, lao và *Mycoplasma*.

- So sánh tính tương đồng về genom giữa chủng giống gốc và chủng sản xuất của cả 3 chủng đều có genom ổn định và tương đồng 100%.

- Cả 03 chủng có tính an toàn cao trên động vật thí nghiệm: thỏ, chuột lang, chuột nhắt, chuột ỏ và khi.

**II. Hệ thống chủng giống gốc và chủng sản xuất virus rota tạo đáp ứng miễn dịch trên thí nghiệm tương đương với vaccin Rotarix của Bỉ:**

- Với chủng G1P[8]: Hiệu giá kháng thể trung hoà của khi trước khi thử nghiệm chỉ có hiệu giá 8, sau thử nghiệm hiệu giá đạt được từ 128 – 256 (tăng 16 đến 32 lần so với trước khi thử nghiệm) trên cả 5 khi thử nghiệm.

- Với chủng G1P[4]: Hiệu giá kháng thể trung hoà của khi trước khi thử nghiệm chỉ có hiệu giá 8, sau thử nghiệm hiệu giá đạt được từ 128 – 256 (tăng từ 8 đến 32 lần) trên cả 5 khi thử nghiệm.

- Với chủng G4P[6]: Hiệu giá kháng thể trung hoà của khi trước khi thử nghiệm chỉ có hiệu giá 4 và 8, sau thử nghiệm hiệu giá đạt được rất cao từ 128 – 4026 (tăng từ 16 đến 1024 lần) trên cả 5 khi thử nghiệm.

- Hệ thống chủng đã tạo đáp ứng miễn dịch tốt trên khi tương đương với vaccin Rotarix của Bỉ. 2 khi đối chứng dùng Placebo hiệu giá kháng thể không thay đổi.

- Tỷ lệ khi đáp ứng miễn dịch sau khi uống liều 2 tăng cao và ổn định tại liều 3. Do đó chỉ cần uống 2 liều vaccin có khả năng gây đáp ứng miễn dịch tốt.

## KIẾN NGHỊ

- Tiếp tục nghiên cứu tính ổn định gen của hệ thống chủng trong quá trình sản xuất vaccin và sau khi trẻ sử dụng vaccin.

- Mở rộng đầu tư nghiên cứu sâu hơn về trình tự gen mã hóa gây độc lực của virus Rota nhằm có một kết luận chính xác và khoa học về sự giảm độc lực của virus Rota hệ giống gốc.

- Sớm sản xuất vaccin Rota từ hệ thống chủng nghiên cứu để phòng bệnh tiêu chảy do virus Rota ở trẻ em.