

ĐÁNH GIÁ TÍNH AN TOÀN VÀ MIỄN DỊCH CỦA VẮC-XIN VIÊM GAN A SẢN XUẤT TRÊN NUÔI CẤY TẾ BÀO MRC5 TẠI CÔNG TY VẮCXIN VÀ SINH PHẨM SỐ 1

**NGUYỄN THỊ VÂN QUỲNH, ĐỖ THỦY NGÂN,
NGUYỄN THU VÂN, ĐỖ TUẤN ĐẠT
Công ty Vắcxin và Sinh phẩm số 1, Bộ Y tế**

TÓM TẮT

Vắcxin viêm gan A được phát triển từ nuôi cấy vi rút viêm gan A chủng HM175 trên tế bào lưỡng bội người MRC5, sau đó được tinh sạch và bất hoạt bằng formaline. Tính an toàn của vắcxin được kiểm tra bằng cách tiêm vào chuột lang, chuột nhắt và thỏ. Tính sinh miễn dịch của vắcxin được xác định bằng cách tiêm vào chuột NMRI. Đáp ứng kháng thể được đo bằng xét nghiệm ELISA. Kết quả cho thấy vắcxin viêm gan A sản xuất bằng công nghệ này đảm bảo tính an toàn và tạo được miễn dịch đạt yêu cầu trên động vật thử nghiệm.

Từ khóa: Vắcxin viêm gan A, MRC5, miễn dịch.

SUMMARY

The MRC5 cell line derived hepatitis A vaccine using HM175 strain was purified and inactivated by formaline. The safety of the vaccine was examined by inoculation in guinea-pigs, swiss mice and rabbit. The immunogenicity was evaluated by vaccination NMRI mice with the vaccine. The antibody response was measured by ELISA test. These results show that the vaccine prepared by this technology is safe and immunogenic in animal models.

Keywords: MRC5, hepatitis A vaccine.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Viêm gan A (VGA) là 1 bệnh lây nhiễm thường gặp trên toàn thế giới, xảy ra với tỷ lệ cao ở những nước đang phát triển. Tiêm vắcxin viêm gan A (VXVGA) là biện pháp dự phòng có hiệu quả [1], [4], [5],[6].

Sản xuất VXVGA trên nuôi cấy tế bào MRC5 là xu hướng hiện nay trên thế giới. Sau khi thích ứng được chủng viêm gan A HM175 trên nuôi cấy tế bào MRC5 tại VABIOTECH [2], những loạt vắc xin thử nghiệm trên dòng tế bào MRC5 đã được tiến hành sản xuất ở quy mô phòng thí nghiệm với 3 loạt vắc-xin liên tiếp, từ đó đánh giá chất lượng của các loạt vắc-xin này trên động vật thực nghiệm. Nghiên cứu này tiến hành nhằm mục tiêu: “Đánh giá tính an toàn và sinh miễn dịch của vắc-xin viêm gan A trên động vật thực nghiệm”.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Vật liệu

* VXVGA được sản xuất bằng gây nhiễm chủng vi rút HAV HM175 (do Trung tâm kiểm soát bệnh tật và dự phòng Atlanta – CDC) trên tế bào MRC5 (do Ngân hàng tế bào châu Âu cung cấp ECACC – European Collection of Cell Cultures).

Vắc-xin viêm gan A thành phẩm được sản xuất theo quy trình thực hành chuẩn áp dụng tại VABIOTECH ở dạng lỏng, bất hoạt, hấp phụ nhôm và được sử dụng để đánh giá trên động vật thực nghiệm trong nghiên cứu này.

* VXVGA mẫu chuẩn quốc gia (iR/HA-02): do Viện Kiểm định Vắc-xin và sinh phẩm y học cung cấp.

* Chuột nhắt trắng (swiss), chuột lang, thỏ: do VABIOTECH cung cấp.

2. Phương pháp

* Tính an toàn

Để đánh giá tính an toàn của vắc-xin, mỗi loạt vắc-xin đều được kiểm tra trên chuột lang và chuột nhắt trắng như các loại vắc-xin thông thường khác.

- Trên chuột lang: sử dụng chuột lang cân nặng khoảng 250-350 gam, không có các biểu hiện bệnh lý, khỏe mạnh và tăng trọng bình thường trong thời gian cách ly là 3-7 ngày. Mỗi loạt vắc-xin dùng 2 chuột lang để kiểm tra. Tiêm 5 ml vắc-xin vào ổ bụng cho mỗi chuột và theo dõi trong thời gian 7 ngày sau tiêm để phát hiện dấu hiệu lâm sàng ốm do nhiễm độc. Thử nghiệm đạt yêu cầu nếu chuột khỏe mạnh, tăng trọng bình thường [3].

- Trên chuột nhắt: chuột nhắt dùng để kiểm tra là 3-4 tuần tuổi, trọng lượng từ 17-22 gram, khỏe mạnh, tăng trọng bình thường trong thời gian cách ly 3-5 ngày. Mỗi thử nghiệm dùng 5 chuột để kiểm tra. Tiêm 0,5 ml vắc-xin vào ổ bụng cho mỗi chuột và theo dõi trong thời gian 7 ngày sau tiêm để phát hiện dấu hiệu lâm sàng ốm do nhiễm độc. Thử nghiệm đạt yêu cầu nếu chuột khỏe mạnh và tăng trọng bình thường [3].

- Kiểm tra chất gây sốt trên thỏ: mỗi loạt vắc-xin thành phẩm được kiểm tra chất gây sốt trên 3 thỏ. Dùng thỏ có cân nặng ít nhất 1,5kg và có thân nhiệt $\leq 39,8^{\circ}\text{C}$, được cách ly 2 ngày trước khi thử nghiệm (chỉ cho thỏ uống nước, không cho ăn). Nhiệt độ “ban đầu” của thỏ đo khoảng 30 phút trước khi tiêm mẫu. Mẫu vắc-xin thử nghiệm phải được làm ấm lên 37°C và tiêm vào tĩnh mạch tại 1ml/kg trọng lượng. Ghi và đọc nhiệt độ 3 lần trong vòng 3 giờ sau tiêm với khoảng cách giữa 2 lần đo không quá 60 phút. Nhiệt độ cao nhất

của thỏ được ghi nhận trong 3 giờ sau khi tiêm được coi là nhiệt độ “tối đa”. Hiệu số giữa nhiệt độ tối đa và nhiệt độ ban đầu được coi là nhiệt độ của phản ứng. Thử nghiệm đạt yêu cầu khi tổng nhiệt độ tăng của 3 thỏ $\leq 1,3^{\circ}\text{C}$ [3].

* Tính sinh miễn dịch

- Tính sinh miễn dịch được đánh giá qua thử nghiệm kiểm tra công hiệu của vắc-xin viêm gan A theo thường quy của Tổ chức Y tế thế giới.

Công hiệu của vắc-xin viêm gan A được kiểm tra song song và được xác định bằng việc so sánh liều hữu hiệu bảo vệ 50% (ED_{50}) giữa vắc-xin thử và vắc-xin viêm gan A mẫu chuẩn quốc gia (iR/HA-02).

- Gây miễn dịch trên chuột: chuột thuần chủng NMRI 5 tuần tuổi, chuột được chia làm 5 nhóm, mỗi nhóm 12 chuột. Vắc-xin cần kiểm tra và vắc-xin mẫu chuẩn được pha loãng ở các độ pha A, B, C, D, E tương ứng với 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 trong nước muối sinh lý. Mỗi một độ pha loãng tiêm màng bụng 1ml/1 chuột. 5 tuần sau khi gây miễn dịch tiến hành lấy máu chuột và chất huyết thanh. Để riêng từng mẫu huyết thanh chuột.

- Kiểm tra hiệu giá kháng thể: xác định hàm lượng Anti-HAV có trong huyết thanh chuột bằng thử nghiệm ELISA, sử dụng bộ sinh phẩm chẩn đoán anti-HAV của hãng DIAPRO (ý). Xử lý kết quả theo chương trình START PROBIT. Công hiệu của vắc-xin tính theo ED_{50} .

- Tiêu chuẩn chấp thuận: ED_{50} của vắc-xin kiểm tra phải không được nhỏ hơn ED_{50} của vắc-xin chuẩn. Công hiệu của vắc-xin thử so với vắc-xin mẫu chuẩn phải ≥ 1 .

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

1. Tính an toàn.

Các loạt vắc-xin phải đảm bảo về tính an toàn khi sử dụng. Do đó chúng tôi tiến hành kiểm tra tính an toàn của vắc-xin viêm gan A sản xuất trên nuôi cấy tế bào MRC5 trên các động vật thí nghiệm như chuột nhắt trắng, chuột lang và thỏ.

* **An toàn chung trên chuột:** sau khi tiêm vắc-xin VGA vào chuột và theo dõi sức khỏe, tình trạng trọng lượng chuột hàng ngày trong 7 ngày, chúng tôi thu được kết quả như sau:

Bảng 1: Kết quả kiểm tra tính an toàn của vắc-xin VGA trên chuột nhắt.

Loạt vắc-xin	Tình trạng chuột Swiss	% tăng trọng lượng	Kết luận
0110	Toàn bộ chuột khỏe mạnh	151,70	Đạt
0210	lên cân, không có dấu hiệu bệnh lý	110,60	Đạt
0310		110,52	Đạt

Để kiểm tra chất lượng của vắc-xin, chúng tôi đã thử nghiệm trên chuột lang. Kết quả được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2: Kết quả kiểm tra tính an toàn của vắc-xin VGA trên chuột lang.

Loạt vắc-xin	Tình trạng Chuột lang	% tăng trọng lượng	Kết luận
0110	Toàn bộ chuột khỏe	118,80	Đạt

0210	manh lên cân, không có	117,00	Đạt
0310	dấu hiệu bệnh lý	119,50	Đạt

Vì khi tiêm bất kỳ một loại vắc-xin nào cho người đều có khả năng gây ra những phản ứng không mong muốn ở các mức độ khác nhau, vì đây là các prôtêin lạ. So sánh với sự xuất hiện các kháng thể bảo vệ thì kiểu và cơ chế xuất hiện phản ứng không mong muốn là phức tạp và đa dạng, do đó việc kiểm tra an toàn là một yêu cầu bắt buộc trong qui trình kiểm tra chất lượng của vắc xin.

Kết quả bảng 1 và 2 cho thấy: tất cả chuột dùng trong thử nghiệm 3 loại vắc-xin đều đạt tiêu chuẩn chấp thuận (100% sống khỏe mạnh, không có dấu hiệu bệnh lý và tăng cân).

* **Chất gây sốt:** để kiểm tra các chất gây sốt chúng tôi tiến hành thử nghiệm trên thỏ trưởng thành bằng cách tiêm vắc xin vào tĩnh mạch tai thỏ và theo dõi thân nhiệt thỏ trong vòng 3 giờ sau tiêm.

Bảng 3: Kết quả theo dõi thân nhiệt thỏ của 3 loại vắc-xin VGA.

Loại vắc xin	Tổng nhiệt độ tăng của thỏ (°C)	Kết luận
0110	0,1	Đạt
0210	0,2	Đạt
0310	0	Đạt

Thử nghiệm chất gây sốt được thực hiện để phát hiện các thành phần gây sốt có trong vắc-xin thành phẩm. Chất gây sốt của vắc xin được xác định gián tiếp qua thí nghiệm đo thân nhiệt của thỏ thí nghiệm trước và sau khi tiêm vắc xin. Các kết quả bảng 3 cho thấy cả 3 loại vắc-xin VGA 0110, 0210, 0310 đều đạt yêu cầu về chất gây sốt.

Tính sinh miễn dịch

Tính sinh miễn dịch được đánh giá qua thử nghiệm kiểm tra công hiệu và kết quả đạt được trong thử nghiệm công hiệu sẽ phản ánh sơ bộ về tính sinh miễn dịch ở người. Tùy theo từng loại vắc xin mà phương pháp xác định công hiệu khác nhau. Theo quy định, một vắc xin được tiêm cho mô hình động vật thí nghiệm phù hợp và sau một lịch tiêm cơ bản sẽ lấy

máu để chuẩn độ hiệu giá kháng thể hoặc được xác định mức độ bảo vệ bằng việc thử thách trực tiếp với chủng thử thách.

Bảng 4: Kết quả công hiệu của 3 loại vắc-xin VGA trên nuôi cấy MRC5.

Loại	ED50		Công hiệu tương quan	Kết luận
	Vắc xin mẫu chuẩn	Vắc xin thử		
0110	1,64	0,75	2,20	Đạt
0210	1,64	0,73	2,24	Đạt
0310	1,64	1,24	1,33	Đạt

Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành tiêm vắc-xin cho chuột NMRI và sau 5 tuần tiêm vắc-xin, chuột được lấy máu để xác định hiệu giá kháng thể. Các kết quả bảng 4 cho thấy cả 3 loại VXVGA đều có công hiệu (ED50) tương đương với vắc-xin chuẩn quốc gia (iR/HA-02).

KẾT LUẬN

Vắc-xin viêm gan A được sản xuất bằng chủng HAV HM175 nuôi cấy trên tế bào MRC5 là an toàn và sinh miễn dịch trên động vật thí nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thu Vân (2002). *Dịch tễ học và dự phòng các bệnh viêm gan virut từ A đến E*. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội 2002.
2. Nguyễn Thị Vân Quỳnh, Nguyễn Thu Vân, Đỗ Tuấn Đạt, Nguyễn Kim Dung. *Nghiên cứu thích ứng chủng vi rút viêm gan A HAV HM175 trên dòng tế bào MRC5*. Tạp chí Y học Thực hành, số 3 (2011), tr.121-124.
3. Dược điển Việt Nam (lần xuất bản thứ tư). Hà Nội 2009.
4. Craig A.S., Sockwell D.C., et al. (1998). *Use of hepatitis A vaccine in a community-wide outbreak of hepatitis A*. J-Clin-infect – Dis, 27(3): 531- 535.
5. Montplaisir S., Delage G. (1989). *Vaccination as a means of prevention*. J-Med-Virol, 26: 425 – 428.
6. Pellegrini.V., Fineschi.N., Matteucci.G., Marsili.I., et al (1993). *Preparation and immunogenicity of an inactivated hepatitis A vaccine*. In: Vaccine, Vol.11.Issue 3,1993.