

KẾT QUẢ BƯỚC ĐẦU NHÂN CHỦNG VIRUS ĐẠI CVS IP-11 TRÊN TẾ BÀO VERO

**VÕ TẤN SƠN - Công ty Vắcxin và Sinh phẩm số II
LÊ VĂN HIỆP, TRẦN NGỌC NHƠN,
NGUYỄN THỊ LAN PHƯƠNG, NGUYỄN THỊ THÚY HẰNG
Viện Vắcxin và Sinh Phẩm Y tế**

TÓM TẮT

Các kết quả chuẩn độ hiệu giá chủng trên chuột và kết quả nhận dạng virus bằng kháng thể kháng ARN gắn huỳnh quang đã cho thấy chủng vắc xin đại CVS IP-11 đã được thích ứng trên tế bào Vero sau 5 lần cấy truyền liên tiếp. Bằng kỹ thuật xác định trình tự gen chưa thấy có sự thay đổi đặc tính di truyền khi nhân chủng này trên tế bào.

Từ khoá: *Challenger Virus Standard (CVS) , Rabies virus, Ethylaminoethyl Dextran*

SUMMARY

The results of virus titers and identity test by fluorescent conjugate shows that CVS IP -11 strain have adapted to Vero cell after 5 continuous

characteristics of the strain have not yet showed any changes during transfer from nervous tissue to vero cell.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Tại Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế trước đây sử dụng Chủng CVS IP- 11 (Challenger Virus Standard) có nguồn gốc từ Viện Bio Pharma (Indonesia) làm chủng giống kháng nguyên gây miễn dịch cho ngựa sản xuất huyết thanh kháng dại [1]. Từ chủng giống này đã tạo ra nguồn kháng nguyên có hiệu giá cao, ổn định và giá thành thấp mang lại hiệu quả kinh tế cao. Mặc dù có nhiều ưu điểm nhưng giống như vắc xin dại Fuenzalida, kháng nguyên sản xuất trên mô thần kinh không tinh khiết làm cho hiệu quả tinh chế và chất lượng huyết thanh còn thấp [2]. Sau sự cố vắc xin dại năm 2007, cùng với công nghệ sản xuất vắc xin Fuenzalida không còn tồn tại ở Việt Nam, sản xuất huyết thanh kháng dại gặp nhiều khó khăn do việc cung cấp kháng nguyên dại gây miễn dịch cho ngựa bị hạn chế. Nghiên cứu chuyển đổi chủng CVS IP-11 từ mô thần kinh sang tế bào Vero là yêu cầu cần thiết.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

1.1. Vật liệu sinh học

Tế bào Vero, chủng virus dại CVS IP-11
Cộng hợp kháng ARN virus dại gắn huỳnh quang
Primer 16S, Clean up PCR (Promega)

1.2. Súc vật thí nghiệm

Chuột nhắt trắng Swiss 11-13g,
Thỏ non dưới 1 tuần tuổi.
Chuột lang 250-350g/con.

1.3. Trang thiết bị, dụng cụ

Laminar, tủ ấm có CO₂ (37°C, 32°C), tủ lạnh (2-8°C, -70°C)

Kính hiển vi huỳnh quang, kính hiển vi soi ngược
Hệ thống giải trình tự gen, model ABI 3130
(Applied Biosystems – USA)

Chai nuôi tế bào và các dụng cụ cần thiết

1.4. Môi trường, hóa chất, dung dịch đệm

Dung dịch Phosphat-Buffer saline (PBS); pH = 7,2,

Dung dịch Trypsin 0,25%.

Môi trường M199, MEM

Huyết thanh bào thai bê, Huyết thanh ngựa thường 2%.

2. Phương pháp

Nhân giống chủng virus trên mô thần kinh: Chủng virus CVS-IP 11 dạng đông khô (thể tích 0,5ml) 20%, được tiêm truyền lần 1 (đậm độ 10⁻²) cho chuột lang (250-300g/con). Sau khi chuột liệt, mổ thu não và pha chế thành hỗn dịch virus 20% đời 1. Tiếp tục tiêm truyền đời 2 từ hỗn dịch não chuột lang 20% (đậm độ 10⁻³) cho thỏ non < 1 tuần tuổi. Thu hoạch não thỏ và pha chủng thành hỗn dịch 20% bảo quản -70°C.

Chuẩn bị tế bào: Tế bào nuôi 1 lớp trên các chai nuôi tế bào, 4-5 ngày tuổi được trypsin hoá thành dung dịch tế bào có 10⁵ TB/ml.

- Xử lý tế bào với dung dịch Ethylaminoethyl Dextran với nồng độ 50#g/ml.

Cấy truyền virus trên tế bào

- Cấy hỗn dịch virus từ não thỏ vào các chai tế bào, nồng độ 1LD₅₀/100 tế bào.

- Ủ các chai tế bào đã gây nhiễm trong tủ ấm 32°C có 5% khí trường CO₂.

- Sau 3 ngày gây nhiễm thu hỗn dịch virus (mẫu sau 4 ngày). Sau khi gặt xong thêm môi trường giữ. Sau 3 ngày tiếp theo gặt virus (mẫu ngày thứ 7). Tiếp tục cho môi trường giữ vào chai tế bào cho đến lần gặt thứ 3 và thứ 4 (mẫu sau 10 ngày và sau 14 ngày). Bảo quản hỗn dịch virus gặt ở tủ lạnh -70°C.

- Chuẩn độ hiệu giá virus trên chuột, chọn hỗn dịch virus có hiệu giá cao nhất gây nhiễm lại đời 2 trên tế bào. Thu gặt virus vào các ngày thứ 4, 7, 9 và 12 sau gây nhiễm. Chuẩn độ hiệu giá virus và chọn hỗn dịch virus có hiệu giá cao nhất tiếp tục cấy truyền các đời sau theo qui trình gây nhiễm – thu gặt – chuẩn độ virus trong 5 đời liên tiếp.

Kiểm tra nhận dạng và đặc tính di truyền của virus dại trên tế bào: nhận dạng virus bằng cộng hợp kháng ARN gắn huỳnh quang. Kiểm tra đặc tính di truyền của virus bằng xác định trình tự gen và tra cứu trên BLAST SEACH (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>)

KẾT QUẢ

1. Nhân giống chủng virus trên mô thần kinh.

Chủng CVS IP-11 đông khô, được cấy truyền 2 đời liên tiếp trên não chuột lang và não thỏ để hồi phục độc lực và nhân chủng. Hiệu giá chủng được chỉ ra ở bảng 3.1

Bảng 1. Hiệu giá chủng CVS IP-11 cấy truyền trên mô thần kinh:

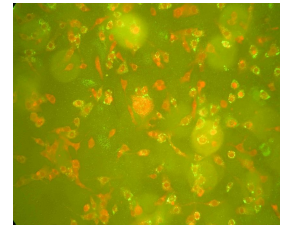
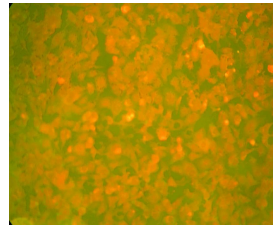
Chủng CVS IP -11	Hiệu giá chủng	
	LD ₅₀ /0,03ml	LD ₅₀ /ml
Chủng truyền đời 1 trên não chuột lang	10 ^{-5,75}	10 ^{-7,27}
Chủng truyền đời 2 trên não thỏ	10 ^{-6,6}	10 ^{-8,12}

2. Thích ứng và cấy truyền virus trên tế bào.

Hỗn dịch virus 20% từ não thỏ bảo quản -70°C được sử dụng để gây nhiễm đời 1 trên tế bào đã xử lý trước với Ethylaminoethyl Dextran. Sau khi thu gặt và chuẩn độ hiệu giá, hỗn dịch virus được tiếp tục nhân truyền liên tiếp trong 5 đời như được mô tả ở phần phương pháp. Các mẫu virus thu được trên nuôi cấy tế bào có hiệu giá tốt nhất ở ngày gặt thứ 7 và ngày gặt thứ 9, LD₅₀ đạt từ 10^{-4,6} đến 10^{-5,8} trong 0,03ml tương đương 10^{-6,2} và 10^{-7,3} trong 1ml. Hiệu giá virus được duy trì ở mức này đảm bảo yêu cầu làm chủng giống gây nhiễm cho đời sau. Các mẫu virus ở lần thu hoạch ngày thứ 12 vẫn cho hiệu giá tương đối tốt nhưng sau đó tế bào có hiện tượng thoái hoá nên không tiếp tục nuôi giữ. Các kết quả chuẩn độ hiệu giá virus được chỉ ra ở bảng 3.2

Bảng 2. Hiệu giá chủng CVS IP-11 cấy truyền trên tế bào:

Đời cấy truyền	Nguồn chủng	Hiệu giá chủng chuẩn độ trên chuột nhắt			
		Mẫu ngày 4	Mẫu ngày 7	Mẫu ngày 9	Mẫu ngày 12
1	Não thỏ	(-)	Chuột liệt	Chuột liệt	(-)
2	Mẫu ngày 7 đời 1	$<10^{-2}$	$10^{-4,625}$	$10^{-4,834}$	$10^{-4,37}$
3	Mẫu ngày 7 đời 2	$10^{-3,37}$	$10^{-5,17}$	$10^{-5,25}$	$10^{-4,5}$
4	Mẫu ngày 9 đời 3	$10^{-3,17}$	$10^{-5,25}$	$10^{-5,8}$	$10^{-4,319}$
5	Mẫu ngày 9 đời 4	$10^{-3,69}$	$10^{-5,3}$	$10^{-5,5}$	$10^{-5,0}$



Tế bào bình thường (Âm tính)

Tế bào nhiễm virus dại (Dương tính)

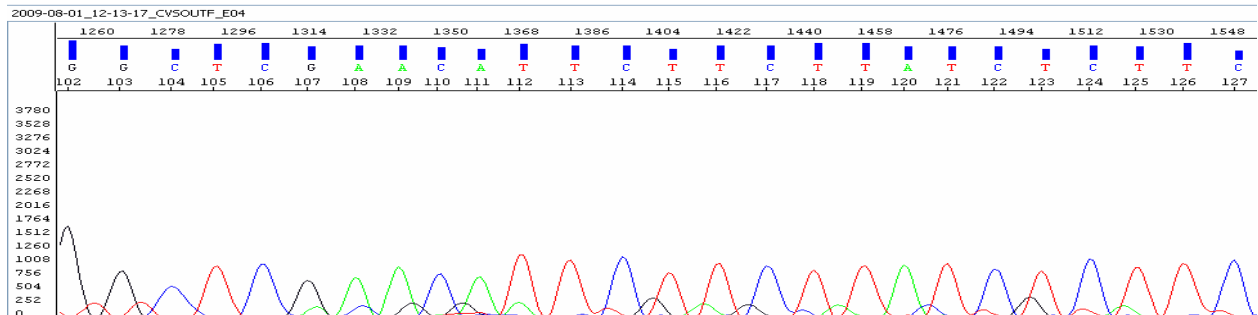
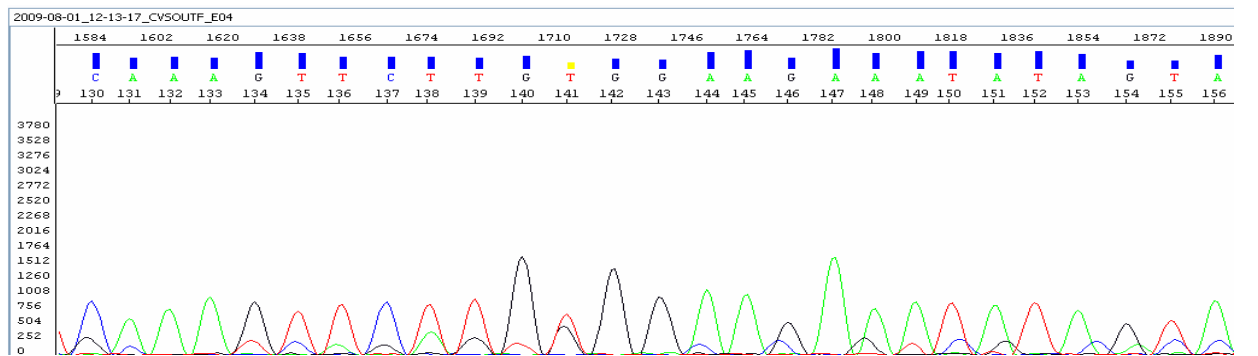
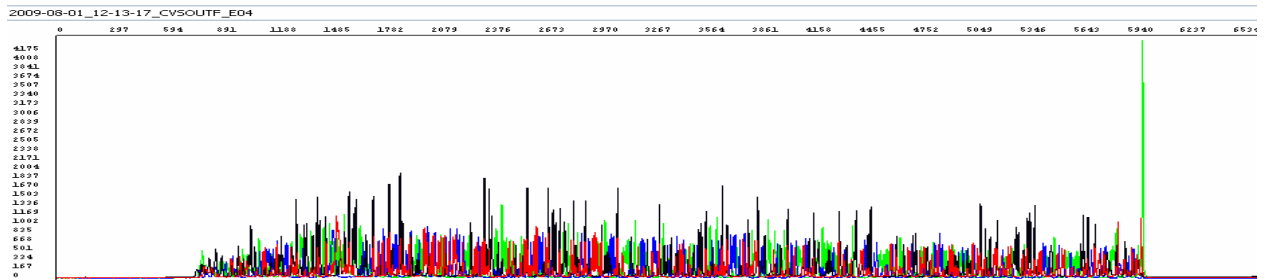
Hình 1. Nhận dạng virus CVS từ mẫu virus gặt ngày 9, đời thứ 5 trên tế bào Vero bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang. Kết quả cho thấy virus phản ứng đặc hiệu với kháng thể kháng ARN của virus dại gắn huỳnh quang

Xác định trình tự gen của của mẫu virus gặt ngày 9, đời thứ 5 cho thấy chủng đã giữ được đặc tính di truyền sau khi được chuyển từ mô thần kinh sang tế bào.

Sự thích ứng của chủng virus CVS vào tế bào đã được nhận diện và chụp lại khi soi kính hiển vi huỳnh quang và được chỉ ra ở hình 3.1 dưới đây

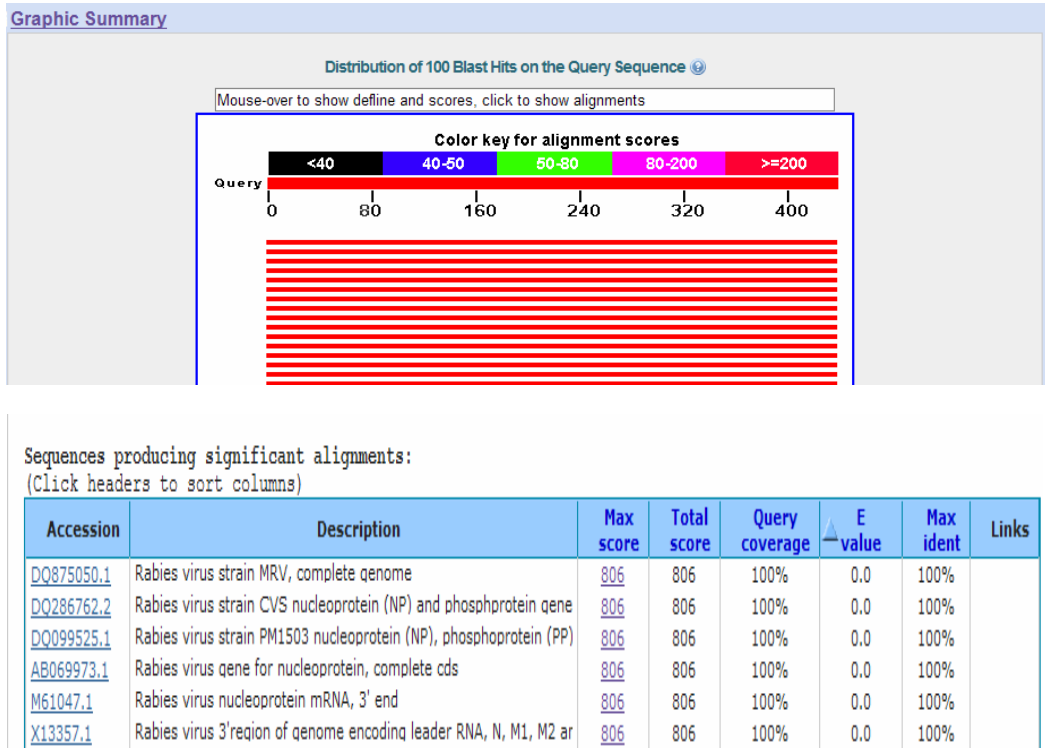
Kết quả

GCATCCAACAAAGTGAATGAGATTGAACACATGACCGACAGCATTTCGATGAATAAGGAGACTTCCCACTCAAGC
 CTAGTGAACGGAAGTGGATGAAATAAGAGTGAGGAACAGCTGTCTCTTGCCTGGCTCGAACATTCTTCTTATCT
 CTTCTCAAAGTTCTTGTGGAAGAAATATAGTATTGCTTCCCTTGCGGTGAGATTGATCTGCTTTATGAACCCTGT
 AAACGATACCAGTCTTGAGCAGTCTTCATAAGCGGTGACGACTGTGCCACTCTGATTGCCGAATACAGATGCT
 CAATCCGTGAGAAAAACATGTCGTAGGTTCCGGCCAAAAATCTGAAGTTCGGTATAGTACTCCAATTAGCACACA
 TCTTGTGAGTTGTCATTAGGGTATGGTGTCCACGATCTTAACAAAAGGTGCTGTCTCGAAA



Hình 2. Kết quả giải trình tự gen của chủng CVS IP-11 trên mẫu virus gặt ngày 7 đời thứ 5 trên tế bào Vero. Sử dụng chương trình NCBI-BLAST phân tích kết quả và tra cứu trên <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/> cho kết quả ở hình 2 dưới đây

Kết quả tra cứu trên BLAST SEARCH



```
> gb|DQ875050.1| D Rabies virus strain MRV, complete genome
Length=11869

Score = 806 bits (436), Expect = 0.0
Identities = 436/436 (100%), Gaps = 0/436 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 GCATCCAACAAAGTGAATGAGATTGAACACATGACCGACAGCATTTCGATGAATAAGGAGA 60
      |||
Sbjct 1021 GCATCCAACAAAGTGAATGAGATTGAACACATGACCGACAGCATTTCGATGAATAAGGAGA 962

Query 61 CTTCCCCTCAAGCCTAGTGAACGGAAGTGGATGAAATAAGAGTGAGGAACAGCTGTCTC 120
      |||
Sbjct 961 CTTCCCCTCAAGCCTAGTGAACGGAAGTGGATGAAATAAGAGTGAGGAACAGCTGTCTC 902

Query 121 TTGCCCTGGCTCGAACATTCTTCTTATCTCTTCCTCAAAGTTCTTGTGGAAGAAATATAG 180
      |||
Sbjct 901 TTGCCCTGGCTCGAACATTCTTCTTATCTCTTCCTCAAAGTTCTTGTGGAAGAAATATAG 842

Query 181 TATTGCTTCCCTTGCGGTGAGATTGATCTGCTTTATGAACCTGTAAACGATACCAGTCC 240
      |||
Sbjct 841 TATTGCTTCCCTTGCGGTGAGATTGATCTGCTTTATGAACCTGTAAACGATACCAGTCC 782

Query 241 TGAGCAGTCTTCATAAGCGGTGACGACTGTGCCCACTCTGATTGCCGAATACAGATGCTC 300
      |||
Sbjct 781 TGAGCAGTCTTCATAAGCGGTGACGACTGTGCCCACTCTGATTGCCGAATACAGATGCTC 722

Query 301 AATCCGTGAGAAAAACATGTCGTAGGTCCCGCCAAAAATCTGAAGTTCGGTATAGTACT 360
      |||
```

```

Sbjct 721 AATCCGTGAGAAAAACATGTCGTAGGTTCCGGCCAAAAATCTGAAGTTCGGTATAGTACT 662
Query 361 CCAATTAGCACACATCTTGTGAGTTGTCATTAGGGTATGGTGTCCACGATCTTAACAAA 420
|||||
Sbjct 661 CCAATTAGCACACATCTTGTGAGTTGTCATTAGGGTATGGTGTCCACGATCTTAACAAA 602
Query 421 AGGTGCTGTCTCGAAA 436
|||||
Sbjct 601 AGGTGCTGTCTCGAAA 586

> gb|DQ286762.2 Rabies virus strain CVS nucleoprotein (NP) and
phosphoprotein
genes, complete cds
Length=2416

Score = 806 bits (436), Expect = 0.0
Identities = 436/436 (100%), Gaps = 0/436 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 GCATCCAACAAAGTGAATGAGATTGAACACATGACCGACAGCATTTCGATGAATAAGGAGA 60
|||||
Sbjct 1021 GCATCCAACAAAGTGAATGAGATTGAACACATGACCGACAGCATTTCGATGAATAAGGAGA 962

Query 61 CTTCCCACTCAAGCCTAGTGAACGGAAGTGGATGAAATAAGAGTGAGGAACAGCTGTCTC 120
|||||
Sbjct 961 CTTCCCACTCAAGCCTAGTGAACGGAAGTGGATGAAATAAGAGTGAGGAACAGCTGTCTC 902

Query 121 TTGCCCTGGCTCGAACATTCTTCTTATCTCTTCTCAAAGTTCTTGTGGAAGAAATATAG 180
|||||
Sbjct 901 TTGCCCTGGCTCGAACATTCTTCTTATCTCTTCTCAAAGTTCTTGTGGAAGAAATATAG 842

Query 181 TATTGCTTCCCTTGCAGTGAATGATCTGCTTTATGAACCCGTGTAACGATAACAGTCC 240
|||||
Sbjct 841 TATTGCTTCCCTTGCAGTGAATGATCTGCTTTATGAACCCGTGTAACGATAACAGTCC 782

Query 241 TGAGCAGTCTTCATAAGCGGTGACGACTGTGCCCACTCTGATTGCCGAATACAGATGCTC 300
|||||
Sbjct 781 TGAGCAGTCTTCATAAGCGGTGACGACTGTGCCCACTCTGATTGCCGAATACAGATGCTC 722

Query 301 AATCCGTGAGAAAAACATGTCGTAGGTTCCGGCCAAAAATCTGAAGTTCGGTATAGTACT 360
|||||
Sbjct 721 AATCCGTGAGAAAAACATGTCGTAGGTTCCGGCCAAAAATCTGAAGTTCGGTATAGTACT 662

Query 361 CCAATTAGCACACATCTTGTGAGTTGTCATTAGGGTATGGTGTCCACGATCTTAACAAA 420
|||||
Sbjct 661 CCAATTAGCACACATCTTGTGAGTTGTCATTAGGGTATGGTGTCCACGATCTTAACAAA 602

Query 421 AGGTGCTGTCTCGAAA 436
|||||
Sbjct 601 AGGTGCTGTCTCGAAA 586

```

Hình 2. Kết quả tra cứu trên <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>

BÀN LUẬN

Sự thành công trong việc chuyển đổi chủng virus dại từ mô thần kinh sang mô không có nguồn gốc thần kinh lần đầu tiên được Kissling báo cáo năm 1958 trên thận chuột đất vàng [2]. Sau đó một loạt các tế bào nuôi đã được áp dụng để nuôi cấy, phân lập virus dại hoặc sản xuất kháng nguyên, vắc xin dại dùng cho các mục đích khác nhau. CVS -11 là chủng

virus cố định đã được dùng để sản xuất vắc xin dại cho thú y trên tế bào BHK21. Hiện nay WHO khuyến cáo nên sản xuất vắc xin trên tế bào vero để đảm bảo tính an toàn cho người sử dụng [3]. Sự chuyển đổi từ mô thần kinh sang tế bào không có nguồn gốc thần kinh và ngược lại của các chủng virus dại được cho là có vai trò của các thụ thể acetylcholin ở tế bào thần kinh và thụ thể gangliosid ở các tế bào khác [4]. Quá

trình tương tác của chủng CVS IP-11 và tế bào vero cũng tuân theo qui luật này.

KẾT LUẬN

Các kết quả chuẩn độ hiệu giá chủng trên chuột và kết quả nhận diện virus bằng kháng thể kháng ARN gắn huỳnh quang đã cho thấy chủng vắc xin đại CVS IP-11 từ mô thần kinh đã thích nghi trên tế bào Vero sau 5 lần cấy truyền liên tiếp. Kết quả xác định trình tự gen của virus chưa thấy có sự thay đổi đặc tính di truyền của chủng khi chuyển sang tế bào. Tuy nhiên cũng cần có sự nghiên cứu thêm về tính ổn định của chủng này

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Viện Vắc xin, "Hồ sơ đăng ký huyết thanh kháng dại", 2000, Bộ Y tế.
2. Klaus Hummeler at all, "Structure and Development of Rabies Virus in Tissue Culture", J Virol., 1967, Vol. 1(1), p. 152-170.
3. WHO, "Laboratory Techniques in Rabies", 1996, Geneva: 28-50, 114-122.
4. K.J. reagan and W.H.Wunner, "Rabies Virus Interaction with Various Cell Lines is Independent of Acetylcholine Receptor", Archieves of Virology, 1985, Vol. 84: 277-282.