

NGHIÊN CỨU THÍCH ỨNG CHỦNG VIRUT VIÊM GAN A HAV HM175 TRÊN DÒNG TẾ BÀO MRC-5

NGUYỄN THỊ VÂN QUỲNH, NGUYỄN THU VÂN,
ĐỖ TUẤN ĐẠT, NGUYỄN KIM DUNG
Công ty Vắcxin và sinh phẩm số 1

TÓM TẮT

Nghiên cứu sản xuất vaccine viêm gan A từ nuôi cấy tế bào lưỡng bội trong nước là cần thiết và cũng là xu hướng hiện nay trên thế giới. **Mục tiêu:** Xác định khả năng thích ứng chủng virut viêm gan A HM175 trên tế bào MRC-5. **Phương pháp nghiên cứu:** nuôi cấy chủng HAV HM175 trên tế bào MRC-5 với các nồng độ gây nhiễm (MOI), môi trường nuôi cấy khác nhau để xác định khả năng nhân lên của virut viêm gan A trên tế bào MRC-5. Sử dụng các kỹ thuật hiển vi điện tử cắt lát, kỹ thuật PCR, kỹ thuật chuẩn độ hiệu giá virut trên tế bào để đánh giá kết quả nghiên cứu. **Kết quả:** virut viêm gan A chủng HM175 đã được thích ứng trên nuôi cấy tế bào MRC-5. Liều gây nhiễm tối ưu khi thích ứng chủng này ở môi trường MEM 1X 2% FBS với MOI là 0,005 và hiệu giá cao nhất đạt được là 10^7 PFU/ml. **Kết luận:** chủng virut viêm gan A HM175 có khả năng nhân lên trên tế bào MRC-5.

Từ khóa: viêm gan A, tế bào MRC-5.

SUMMARY

A study on development of a cell based hepatitis A vaccine is necessary and it is the worldwide trend. **Objectives:** to determine the adaptation ability of HAV HM175 strain in MRC-5 cell line. **Methods:**

propagation of HM175 in MRC-5 cell line under different conditions such as multiplicity of infection (MOI), different medium to find out whether virus propagate into MRC-5 cell or not. Electron microscope, PCR, plaque methods were used for analysis. **Results:** HAV HM175 strain was successfully adapted in MRC-5 cells. MOI 0.005 and MEM 2% FBS medium are the optimal condition for virus propagation. The highest titer has been achieved as 10^7 PFU/ml.

Conclusion: HAV HM 175 strain can multiplate in MRC-5 cells.

Keywords: Hepatitis A virus, HM175 strain, MRC-5 cell

ĐẶT VẤN ĐỀ

Viêm gan A là bệnh truyền nhiễm có thể dự phòng được bằng vaccine. Việt Nam là quốc gia có tỷ lệ nhiễm virut viêm gan A (VGA) cao vì vậy nhu cầu dùng vaccine viêm gan A rất lớn. Xu hướng hiện nay trên thế giới là sử dụng vaccine viêm gan A sản xuất trên tế bào thường trực MRC-5 vì hiệu quả bảo vệ và tính an toàn của vaccine này. Mặt khác sản xuất loại vaccine này đòi hỏi kỹ thuật cao, hiện chỉ có một số

hãng dược phẩm lớn GSK, MSD, Aventis Pasteur sản xuất thành công và giá thành của vaccine còn cao.

Tại Việt Nam, từ năm 2001 Công ty Vắcxin và sinh phẩm số 1 đã sản xuất thành công vaccine viêm gan A từ tế bào thận khỉ tiên phát [1] và đang tiến tới tự lực sản xuất vaccine viêm gan A trên tế bào lưỡng bội MRC-5. Để thực hiện chiến lược này, nhiệm vụ đầu tiên được đặt ra là phải thích ứng được chủng HAV HM175 trên tế bào MRC-5, trong đó, trước hết phải xác định được virus HAV HM175 có khả năng xâm nhập và nhân lên được trên tế bào này cùng các điều kiện nuôi cấy tối ưu. Chúng tôi tiến hành đề tài nghiên cứu này nhằm mục tiêu:

Xác định khả năng xâm nhập và nhân lên của HM175 trên tế bào MRC-5.

Xác định nồng độ gây nhiễm và môi trường nuôi cấy thích hợp của chủng HM175 trên tế bào MRC-5.

Đánh giá kết quả cấy truyền thích ứng chủng HM175 trên nuôi cấy tế bào MRC-5.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng, vật liệu nghiên cứu

Chủng virus viêm gan A HM 175 (HAV HM175) dùng làm chủng thích ứng trên MRC-5 cho nghiên cứu này được Công ty Vắcxin và Sinh phẩm số 1 nhận từ Trung tâm kiểm soát bệnh tật và dự phòng Atlanta, Georgia Mỹ (CDC –USA) tháng 8.1997. Chủng HAV HM175 được cấy truyền duy trì 10 lần trên tế bào thận khỉ Rhesus bào thai thường trực (Frkh-4).

Tế bào nguyên bào sợi phổi người lưỡng bội MRC-5

Tế bào MRC-5 đời cấy truyền P19 nhận từ ngân hàng tế bào châu Âu (ECACC), nồng độ tách 1:3 đến 1:6 hoặc 2-4 x10.000 cells/cm², tách bằng trypsin/EDTA.

Tế bào thận khỉ thường trực Frkh-4 (CDC) để chuẩn độ hiệu giá virus viêm gan A

Môi trường, hóa chất, sinh phẩm và các trang thiết bị cần thiết.

2. Phương pháp nghiên cứu: Nghiên cứu thử nghiệm tại phòng thí nghiệm

2.1. Xác định khả năng xâm nhập và nhân lên của virus HAV HM 175 trên tế bào MRC-5.

Gây nhiễm HAV HM175 trên tế bào MRC-5 một lớp và cấy treo. Xác định sự xâm nhập và nhân lên trong tế bào MRC-5 của chủng virus HM175 bằng các kỹ thuật hiển vi điện tử cắt lát và kỹ thuật chuẩn độ hiệu giá virus trên tế bào, kỹ thuật PCR.

2.2. Xác định nồng độ gây nhiễm và môi trường nuôi cấy thích hợp của chủng HAV HM175 trên tế bào MRC-5.

Gây nhiễm chủng HM175 với các nồng độ gây nhiễm khác nhau (0,005; 0,05; 0,5; 5 pfu/tế bào) trên 3 môi trường nuôi cấy khác nhau và thực hiện trong cùng một điều kiện nhiệt độ nuôi cấy cũng như trong một thử nghiệm. Chuẩn độ hiệu giá virus trong cùng một điều kiện và lấy hiệu giá virus làm thước đo đánh giá và lựa chọn nồng độ gây nhiễm, môi trường nuôi cấy virus thích hợp.

2.3. Cấy truyền thích ứng

- Cấy truyền thích ứng chủng HAV HM 175 trên tế bào MRC-5 và đánh giá hiệu giá virus qua các lần cấy truyền.

2.4. Kỹ thuật chuẩn độ hiệu giá virus

- Xác định hiệu giá virus bằng thử nghiệm plaque – Kỹ thuật tạo đám hoại tử (pfu) để xác định hiệu giá virus HAV trong nuôi cấy tế bào.

Hiệu giá (pfu/ml) = số lượng pfu/giống x độ pha loãng x10

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

1. Xác định khả năng xâm nhập và nhân lên của virus HAV HM 175 trên tế bào MRC-5

Chúng tôi tiến hành gây nhiễm virus HAV HM 175 trên MRC-5 ở các nuôi cấy trong các điều kiện khác nhau và xác định sự xâm nhập, nhân lên của virus viêm gan A bên trong tế bào bằng kỹ thuật hiển vi điện tử, PCR và chuẩn độ hiệu giá bằng thử nghiệm plaque.

Virus có khả năng xâm nhập và nhân lên trên tế bào MRC-5 ở cả phương thức gây nhiễm cấy treo cũng như cấy trên tế bào 1 lớp.

Trên thế giới có nhiều chủng sản xuất vaccine viêm gan A. Mỗi chủng giống sản xuất vaccine trên tế bào đều đã qua thích ứng trên một hoặc vài dòng tế bào thích hợp như chủng CR236, GBM, HM175... thích ứng trên MRC-5. Trong nghiên cứu này, chúng tôi chọn chủng HM175 vì đây là chủng sản xuất vaccine viêm gan A do trung tâm Kiểm soát bệnh tật và Dự phòng Hoa Kỳ (CDC) cung cấp là chủng có chất lượng tốt, ổn định, hơn thế nữa chủng này có cùng nguồn gốc với chủng virus HM175 hiện đang được sử dụng nhiều năm nay tại Việt Nam để sản xuất vaccine viêm gan A (HAVAX) của công ty Vắcxin và Sinh phẩm số 1 và đây cũng là chủng có cùng nguồn gốc với HAV HM175 để sản xuất vaccine HAVRIX của Glaxo Smith Kline. Tế bào MRC-5 sử dụng trong nghiên cứu này được mua từ ngân hàng tế bào Châu Âu là loạt tế bào đảm bảo chất lượng của Tổ chức Y tế thế giới. Dòng tế bào lưỡng bội MRC-5 được coi là tiêu chuẩn vàng để sản xuất vaccine do những ưu điểm như: đặc tính nuôi cấy ổn định, qui trình nuôi cấy và cấy truyền dễ dàng. Hơn nữa tế bào MRC-5 có nguồn gốc từ người nên sản phẩm cuối cùng thường ít có khả năng gây dị ứng cho người so với các dòng tế bào có nguồn gốc từ các động vật khác; Dòng tế bào này không có đặc tính sinh khối u và đã được tạo ngân hàng tế bào với sự kiểm tra đầy đủ các đặc tính đảm bảo chất lượng tốt của một dòng tế bào dùng trong sản xuất vaccine. Đặc biệt tế bào MRC-5 nhạy cảm với rất nhiều chủng viêm gan A ví dụ như chủng CR236, GBM, CR-336, HM175 [2], [3], [4], [5], [6].

Các kết quả chụp ảnh hiển vi điện tử, PCR, chuẩn độ hiệu giá đều chứng minh virus viêm gan A từ chủng chúng tôi lựa chọn có thể xâm nhập và nhân lên trên tế bào MRC-5 ở cả phương thức gây nhiễm treo cũng như cấy trên tế bào một lớp. Kết quả này bước đầu cho thấy thích ứng HM175 trên MRC-5 là khả thi. Vấn đề tiếp theo của việc thích ứng là xác định các điều kiện nuôi cấy tối ưu, nhất là liều gây nhiễm, môi trường nuôi cấy.

2. Nồng độ và môi trường gây nhiễm thích hợp

Chúng tôi sử dụng các môi trường LH₂E, MEM1X+2%FBS, DMEM1X +2%FBS và gây nhiễm với các nồng độ 0,005; 0,05; 0,5; 5 pfu/tế bào. Kết quả thu được:

Nồng độ	LH ₃ E	MEM 1X +2%FBS	DMEM 1X +2%FBS
5	6,0 x 10 ⁵	4 x 10 ⁶	3,5 x 10 ⁵
0,5	2,0 x 10 ⁶	2,0 x 10 ⁶	6,5 x 10 ⁵
0,05	2,0 x 10 ⁶	3,5 x 10 ⁶	0,5 x 10 ⁶
0,005	1,0 x 10 ⁵	0,5 x 10 ⁷	1,5 x 10 ⁵

Nồng độ gây nhiễm thích hợp của chủng HM175 trên tế bào MRC-5 ở môi trường MEM 1X 2%FBS là 0,005 MOI.

Môi trường MEM 1X 2%FBS cho hiệu giá virus cao hơn 2 môi trường LH₃E, DMEM1X 2%FBS.

*** Nồng độ gây nhiễm:** Việc xác định nồng độ gây nhiễm tối ưu của chủng HM175 trên tế bào MRC-5 là cần thiết khi thích ứng chủng trên tế bào. Các chủng khác nhau có nồng độ gây nhiễm tối ưu khác nhau trên tế bào, ngay cả khi cùng một chủng cũng có nồng độ gây nhiễm tối ưu khác nhau trên các dòng tế bào khác nhau. Kết quả bảng trên cho thấy: ở nồng độ gây nhiễm là 0,005 pfu/tế bào cho kết quả hiệu giá HAV là 0,5 x 10⁷ pfu/ml cao hơn khi gây nhiễm với các nồng độ khác. Nồng độ gây nhiễm tối ưu của chủng HM175 trên tế bào MRC-5 ở môi trường MEM 1X 2%FBS là 0,005 MOI.

*** Môi trường nuôi cấy thích hợp:** Sau khi gây nhiễm virus HAV HM 175 trên tế bào MRC-5 chúng tôi dùng các loại môi trường khác nhau để nuôi tế bào như LH₃E, MEM1X 2%FBS, DMEM1X 2%FBS. Kết quả bảng trên cho thấy môi trường MEM 1X 2%FBS cho hiệu giá cao hơn so với hai môi trường còn lại khi gây nhiễm cùng liều và nuôi cấy, chuẩn độ trong cùng một điều kiện.

3. Kết quả cấy truyền thích ứng chủng HAV HM 175 trên tế bào MRC-5

Lần đầu tiên nghiên cứu gây nhiễm tế bào MRC-5 với virus viêm gan A HM175 với mong muốn có được một chủng virus viêm gan A thích ứng trên nuôi tế bào MRC-5 đạt được hiệu giá tối đa cho việc sản xuất vaccine viêm gan A bất hoạt, chúng tôi đã tiến hành thích ứng chủng này trên tế bào MRC-5 sau 5 lần cấy truyền liên tục.

Đời cấy truyền	Nồng độ GN	
	0,005	
P1	Lần 1	Lần 2
	0,5x10 ⁷	1,0x10 ⁷
P2	1,0x10 ⁷	2,0x10 ⁷
P3	0,5x10 ⁶	2,0x10 ⁶
P4	0,5x10 ⁶	0,5x10 ⁶
P5	ND (<10 ⁴)	2x10 ⁶

Kết quả cho thấy là hiệu giá virus ở P1, P2 là 10⁷ PFU/ml, từ P3 hiệu giá giảm 1 log. Do đó chúng tôi

tiến hành tạo chủng sản xuất trên MRC-5 tại P1 và sản xuất vaccine ở P2.

Để có thể thích ứng được một chủng virus trên tế bào thì điều kiện trước tiên là chủng virus đó phải có khả năng xâm nhập và nhân lên trên dòng tế bào được lựa chọn, đồng thời phối hợp với các đặc tính virus học của chủng mới có thể lựa chọn các phương pháp thích hợp cho việc thích ứng chủng. Hai phương pháp hay được sử dụng là phương pháp tạo dòng thuần chủng từ plaque (được áp dụng đối với các virus gây hủy hoại tế bào để tách dòng tạo nên các chủng virus có nguồn gốc đơn clone) và phương pháp cấy truyền liên tiếp lên dòng tế bào để thích nghi chủng virus. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng phương pháp cấy truyền liên tiếp lên dòng tế bào để thích ứng chủng HAV HM175 vì đây là chủng virus không gây hủy hoại tế bào [7] và hơn nữa là chủng này có thể xâm nhập và nhân lên trên dòng tế bào MRC-5 với hiệu giá lần cấy truyền đầu tiên là 0,5x10⁷ PFU/ml.

KẾT LUẬN

Kết quả bước đầu thích ứng chủng HM175 trên tế bào sợi phổi người lưỡng bội MRC-5 cho thấy: Chủng HAV HM175 được lựa chọn có khả năng xâm nhập và nhân lên trên tế bào MRC-5. Chủng nêu trên có khả năng phát triển tốt trên môi trường MEM 1X 2%FBS với nồng độ 0,005 MOI cho hiệu giá đạt 0,5 x 10⁷ PFU/ml. Cấy truyền đời P1, P2 đạt hiệu giá 10⁷ PFU/ml, hiệu giá này giảm 1log ở các đời P3, P4 và giảm 2log ở đời P5.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Thu Vân, Nguyễn Tuyết Nga, Vũ Hồng Nga, Đỗ Tuấn Đạt và cộng sự: *Hoàn thiện qui trình công nghệ sản xuất vaccine viêm gan A bất hoạt qui mô 100.000 liều/năm*. Dự án khoa học và công nghệ cấp nhà nước KC.10-DA12, Hà Nội.
- Gunter siegl, Jose de Chastonay, Getrud Kronauer (1984): *Propagation and Asssay of Hepatitis A Virus in vitro*; Journal of Virological Methods, 9: 53 – 67.
- <http://www.Wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?WO=199406446&IA=US1993008610&DISPLAY=DOCS>
- <http://www.medscape.com/druginfo/monograph?cid=med&drugid>
- Rene Leiva, M.D (2006): *A Brief History of Human Diploid Cell Strains*; The National Catholic Bioethics Center.
- Ann W.Funkhouser, Robert H.Purcell, Erik D'hondt and Suzanne U.Emerson: *Attenuated Hepatitis A Virus: Genetic Determinants of Adaptation to Growth in MRC-5 Cells*; Journal of Virology, Jan.1994, p.148 -157.