

## XÂY DỰNG QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT VẮC XIN PHÒNG BỆNH TAY CHÂN MIỆNG EV71 TRÊN NUÔI CẤY TẾ BÀO VERO Ở QUY MÔ PHÒNG THÍ NGHIỆM

*Vũ Hồng Nga\**; *Lương Thùy Dương\**; *Nguyễn Bích Thủy\**  
*Đỗ Tuấn Đạt\**; *Nguyễn Thu Vân\**

### TÓM TẮT

Từng công đoạn trong quy trình sản xuất vắc xin phòng bệnh tay chân miệng EV71 trên nuôi cấy tế bào Vero đã được tối ưu hóa nhằm tìm thông số ổn định đảm bảo chất lượng sản phẩm tốt nhất. Một số nghiên cứu quan trọng đã được tiến hành để tìm quy trình sản xuất phù hợp nhất như nghiên cứu nuôi cấy virut; tinh sạch, cô đặc và bất hoạt virut. Siêu ly tâm trong gradient đường sucrose để thử các phân đoạn có kháng nguyên tinh khiết. Kết quả này sẽ là căn cứ để xây dựng một quy trình công nghệ sản xuất ổn định và tối ưu tại Công ty TNHH MTV Vắc xin và Sinh phẩm số 1.

\* Từ khóa: Vắc xin EV71; Quy trình công nghệ; Tế bào Vero.

## ESTABLISHMENT OF PROCEDURE FOR VERO CELL ENTEROVIRUS 71 VACCINE PRODUCTION IN LABORATORY SCALE

### SUMMARY

*Each step of the procedure for Vero cell Enterovirus 71 vaccine production has been optimized in order to find consistent parameter for best quality products. Several pivotal researches have been done for finding the most suitable production procedure such as a cell culture media was screened for virus propagation; research for finding of clarification, concentration and inactivation procedures, research for collecting purified virus by sucrose gradient ultracentrifugation. The results will be basics for establishment of the most consistent and optimal vaccine production procedure at the Company for Vaccine and Biological production No 1.*

\* Key words: *Technological process; EV71 vaccine; Vero cell.*

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Virut đường ruột týp 71 (EV71) là căn nguyên gây ra dịch tay chân miệng nghiêm trọng ở trẻ em tại châu Á trong những năm gần đây với bệnh cảnh về thần kinh cấp

tính bao gồm: liệt mềm giống bại liệt, viêm não, viêm màng não vô khuẩn, phù phổi. Các bệnh do EV71 gây ra thường để lại di chứng về thần kinh nghiêm trọng và có tỷ lệ tử vong cao. EV71 lần đầu tiên phân lập tại California (Mỹ) vào năm 1969, thuộc chi các

\* Công ty TNHH MTV Vắc xin và Sinh phẩm số 1, Hà Nội

Chịu trách nhiệm nội dung khoa học: PGS. TS. Đoàn Huy Hậu

virut đường ruột, họ *Picornaviridea*. Genom EV71 là ARN đơn dương gồm khoảng 7.500 nucleotit. Protein cấu trúc bao gồm VP<sub>1</sub>, VP<sub>2</sub>, VP<sub>3</sub> và VP<sub>4</sub>; ở hạt virut gây nhiễm VP<sub>0</sub> được tách thành VP<sub>4</sub> và VP<sub>2</sub>. Trong các nghiên cứu dịch tễ, phân tử hai protein cấu trúc VP<sub>1</sub> và VP<sub>4</sub> được dùng để xác định nhóm gen, EV71 được chia ra thành 3 nhóm gen (A, B và C) và phân chia nhỏ hơn với 11 nhóm gen (A, B<sub>1</sub>-B<sub>5</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>). Gần đây, các chủng lưu hành tại Malaysia, Singapore, Đài Loan, Thái Lan và Trung Quốc thuộc nhóm gen B<sub>5</sub>, C<sub>4</sub> và tại Việt Nam chủng EV71 thuộc nhóm gen C<sub>4</sub> và C<sub>5</sub>. Do đó, vắc xin EV71 hiệu quả phải tạo ra được kháng thể trung hòa bảo vệ chéo các nhóm gen khác nhau.

Nghiên cứu phát triển vắc xin phòng bệnh tay chân miệng EV71 là cách hiệu quả nhất để phòng bệnh chủ động. Vì vậy, một loạt vắc xin phòng tay chân miệng EV71 đã được nghiên cứu như vắc xin hạt virut bất hoạt nhiệt hoặc formaldehyde; vắc xin tiểu thể dạng virut (virus-like particles-VLP), protein tái tổ hợp vùng VP<sub>1</sub>, vắc xin ADN vùng VP<sub>1</sub>, vắc xin peptide vùng tạo kháng thể trung hòa, vector vi khuẩn hay virut biểu hiện VP<sub>1</sub> và vắc xin EV71 sống giảm độc lực thích ứng trên tế bào Vero. Kết quả chung cho thấy: vắc xin bất hoạt toàn virut cho tính sinh miễn dịch cao hơn so với vắc xin VP<sub>1</sub> tái tổ hợp và vắc xin ADN.

Công nghệ sản xuất vắc xin phòng bệnh tay chân miệng EV71 được nghiên cứu tại Công ty Vắc xin và Sinh phẩm số 1, là công nghệ sử dụng dòng tế bào thường trực Vero để nhân nuôi virut, từ đó tinh chế kháng nguyên đặc hiệu. Nghiên cứu này nhằm mục tiêu: *Cung cấp các thông số về môi trường nuôi cấy virut, tinh sạch, bất hoạt virut sử dụng formaldehyde và tinh chế virut nhằm tìm ra quy trình sản xuất vắc xin EV71 có chất lượng, hiệu quả và mang tính thực tiễn.*

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Chủng virut.

Chủng virut đường ruột týp 71 0822 được phân lập từ bệnh nhi mắc tay chân miệng tại Việt Nam, tách dòng và cấy truyền chủng liên tiếp trên tế bào Vero. Hiệu giá chủng 10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub>/ml.

### 2. Tế bào.

Tế bào Vero (ATCC-CCL81) được Trung tâm Lưu trữ Ngân hàng Tế bào gốc châu Âu cung cấp. Kiểm tra chất lượng, an toàn dòng tế bào này đối với dòng tế bào thường trực.

### 3. Quy trình nuôi cấy và chuẩn bị tế bào Vero.

Tế bào Vero đời 139 từ điều kiện bảo quản của ngân hàng tế bào sản xuất được cấy chuyển đến đời 142 bằng môi trường MEM, bổ sung huyết thanh động vật. Xác định hình thái và số lượng tế bào trên bề mặt chai nuôi cấy bằng phương pháp quan sát dưới kính hiển vi đảo pha và đếm số lượng tế bào.

### 4. Quy trình gây nhiễm và nuôi cấy virut.

Chủng EV71 sản xuất gây nhiễm vào các chai tế bào Vero kín một lớp. Các điều kiện gây nhiễm khác bao gồm môi trường, nhiệt độ nuôi cấy virut và liều virut gây nhiễm.

### 5. Quy trình tinh sạch, bất hoạt và cô đặc virut.

Quy trình tinh sạch và cô đặc virut tìm hiểu về hiệu quả thu hoạch virut sau khi ly tâm và sử dụng các loại màng lọc, màng cô đặc khác nhau. Đánh giá quá trình bất hoạt sau khi sử dụng các loại hóa chất và điều kiện bất hoạt khác nhau. Đánh giá hiệu quả bất hoạt trên tế bào Vero.

### 6. Quy trình tinh chế virut.

Tinh chế virus EV71 bằng phương pháp siêu ly tâm trong gradient đường sucrose. Phương pháp định lượng kháng nguyên EV71 bằng thử nghiệm ELISA, định lượng protein bằng đo mật độ quang ở bước sóng 280 nm, điện di trên gel SDS-PAGE, phương pháp kính hiển vi điện tử được dùng để đánh giá hiệu quả của quy trình tinh chế.

### 7. Quy trình pha bán thành phẩm cuối cùng.

Công thức pha bán thành phẩm cuối cùng và chất lượng của vắc xin được đánh giá qua kết quả kiểm tra chất lượng và tính sinh miễn dịch của vắc xin thành phẩm.

## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

### 1. Quy trình nuôi cấy và chuẩn bị tế bào Vero.

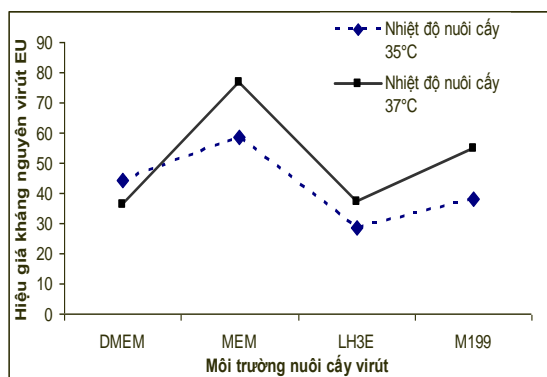
Quá trình nuôi cấy này phải tuân thủ theo đúng hướng dẫn về nuôi cấy tế bào cho sản xuất vắc xin. Tế bào Vero sẽ được cấy chuyển từ đời bảo quản trong ngân hàng tế bào sản xuất - đời 139 đến đời 142, đời cấy chuyển cuối cùng trước khi được gây nhiễm virus. Đếm số lượng tế bào trong chai nuôi cấy và quan sát tế bào kín một lớp dưới kính hiển vi đảo pha. Đây là cách thức để đánh giá chất lượng của tế bào sau nuôi cấy (dữ liệu không công bố). Xác định tỷ lệ tách tế bào qua các lần cấy chuyển, số ngày nuôi cấy cần thiết để đạt số lượng tế bào.

### 2. Quy trình nuôi cấy virus.

Điều kiện nuôi cấy virus tối ưu là những yếu tố quyết định đến hiệu giá thu hoạch virus sau gây nhiễm. Các tham số về điều kiện nuôi cấy virus bao gồm: môi trường, nhiệt độ nuôi cấy, liều virus gây nhiễm.

\* *Môi trường và nhiệt độ nuôi cấy virus:*

Môi trường nuôi cấy trong giai đoạn nuôi cấy virus trên tế bào là môi trường không có huyết thanh động vật nhằm đảm bảo sản phẩm cuối cùng không chứa protein huyết thanh động vật theo yêu cầu của Tổ chức Y tế Thế giới. Khảo sát tìm môi trường nuôi cấy virus không chứa huyết thanh động vật, nhưng vẫn đảm bảo virus hiệu giá virus cao.



Hình 1: Hiệu giá kháng nguyên virus thu được sau gây nhiễm trên môi trường nuôi cấy DMEM, MEM, LH3E, M199 và nhiệt độ nuôi cấy 35°C và 37°C.

Môi trường nuôi cấy MEM cho hiệu giá virus cao nhất ở cả 2 điều kiện nuôi cấy 35°C và 37°C. Nuôi cấy virus tại 37°C đều cho hiệu giá kháng nguyên virus cao hơn nhiệt độ nuôi cấy 35°C ở hầu hết môi trường nuôi cấy. Lựa chọn môi trường MEM là môi trường nuôi cấy virus và nhiệt độ nuôi cấy virus 37°C là những điều kiện giúp đạt được hiệu giá virus cao.

\* *Liều virus gây nhiễm và thời gian nuôi cấy:*

Mỗi loại tế bào có độ nhạy cảm với virus khác nhau. Nghiên cứu liều gây nhiễm khác nhau của EV71 trên tế bào vero là cần thiết nhằm mục đích tìm được liều gây nhiễm thích hợp cho hiệu giá tối đa trong sản xuất vắc xin. Khảo sát liều virus gây nhiễm nhằm tìm ra liều gây nhiễm tối ưu cho hiệu giá virus cao nhất. Trong nghiên cứu này, 4 liều gây nhiễm khác nhau được khảo sát là 1;

0,1; 0,01 và 0,001 TCID<sub>50</sub>/tế bào. Liều gây nhiễm này tính theo đơn vị hiệu giá TCID<sub>50</sub> của EV71.

**Bảng 1:** Kết quả gây nhiễm EV71 ở nồng độ virus 1; 0,1; 0,01; 0,001 MOI tại các thời điểm gặt 24; 36; 48; 60 giờ.

(TCID <sub>50</sub> /tế bào)	(TCID <sub>50</sub> /ml)			
	24 giờ	36 giờ	48 giờ	60 giờ
1	10 <sup>6,25</sup>	10 <sup>5,75</sup>	-	-
0.1	10 <sup>6,5</sup>	10 <sup>5,75</sup>	-	-
0.01	10 <sup>5,75</sup>	10 <sup>6,25</sup>	10 <sup>6,75</sup>	-
0.001	10 <sup>4,75</sup>	10 <sup>5,75</sup>	10 <sup>6,5</sup>	10 <sup>6</sup>

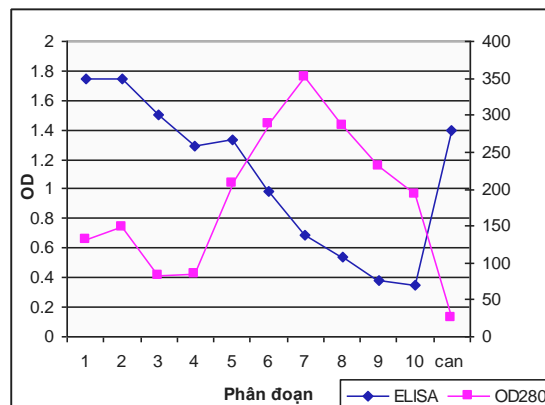
Liều gây nhiễm 1 và 0,1: lượng virus gây nhiễm cao gây hiện tượng tế bào bị hủy hoại nhanh nên virus đạt hiệu giá khá cao ngay sau 24 giờ gây nhiễm, đến thời điểm 36 giờ sau gây nhiễm, hiệu giá virus giảm do tế bào bị hủy hoại hoàn toàn, không còn cơ chất cho virus nhân lên. Liều gây nhiễm 0,01 và 0,001: lượng virus gây nhiễm thấp nên hiệu giá virus thu được sau 24 giờ gây nhiễm không cao, tuy nhiên, hiệu giá virus tăng dần theo thời gian sau gây nhiễm và đạt đỉnh vào thời điểm 48 giờ sau gây nhiễm. Kết quả trên cho thấy: liều gây nhiễm 0,01 sau 48 giờ cho kết quả khả quan nhất. Vậy trong quy trình gây nhiễm EV71 vào tế bào Vero sử dụng liều gây nhiễm 0,01 TCID<sub>50</sub>/tế bào thích hợp nhất, hiệu giá virus đạt cao và không lãng phí chủng.

### 3. Quy trình tinh sạch, bất hoạt và cô đặc virus.

Hỗn dịch virus sau khi thu hoạch được ly tâm để loại xác tế bào và được lọc để loại bỏ các tạp chất. Sau quá trình tinh sạch, cô đặc và bất hoạt hỗn dịch virus (dữ liệu không công bố). Kết quả cho thấy: màng lọc 0,8 μm và màng siêu lọc 50K phù hợp để tinh sạch và cô đặc EV71. Virus được bất

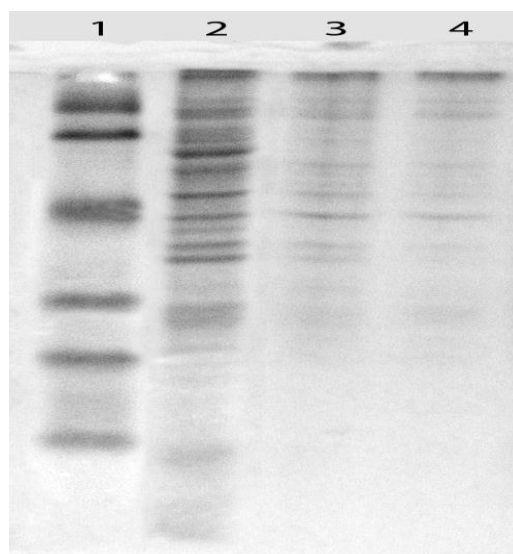
hoạt hoàn toàn khi sử dụng formaldehyde với nồng độ 1/2000 ở 37°C sau 7 ngày.

### 4. Quy trình tinh chế virus.



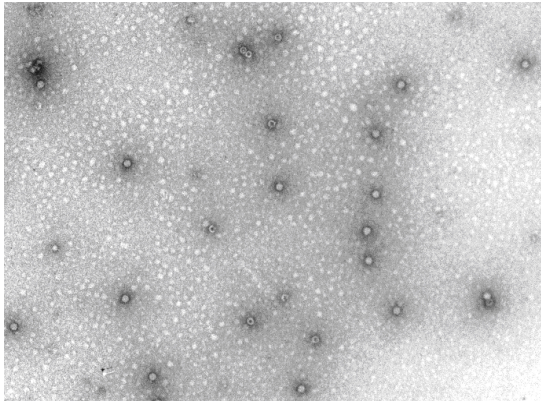
Hình 2: Kết quả siêu ly tâm tinh chế virus.

Ở các phân đoạn 1, 2, 3 và 4, xác định hiệu giá kháng nguyên bằng phương pháp ELISA có giá trị cao nhất, đồng thời ít lẫn các protein tạp khác (giá trị OD280 thấp).



Hình 3: Hình ảnh điện di trên gel SDS-PAGE. 1- Chuẩn trọng lượng phân tử; 2- Mẫu trước siêu ly tâm; 3,4- Mẫu sau siêu ly tâm.

Kết quả chạy điện di SDS-PAGE cũng khẳng định, sản phẩm sau quá trình siêu ly tâm có độ tinh khiết cao, chứa ít protein tạp.



Hình 4: Hình ảnh virut đường ruột týp 71 sau tinh chế.

Cùng với kết quả xác định hàm lượng ADN tế bào tồn dư và hình ảnh virut sau tinh chế dưới kính hiển vi điện tử cho thấy: siêu ly tâm trong gradient đường sucrose cho kháng nguyên virut có độ tinh khiết cao, thích hợp để pha chế vắc xin.

#### 5. Quy trình pha bán thành phẩm cuối cùng.

Sau khi tinh chế, pha kháng nguyên virut với các công thức khác nhau. Kết quả kiểm tra chất lượng và tính sinh miễn dịch của vắc xin thành phẩm sẽ quyết định công thức pha bán thành phẩm cuối cùng nào là tối ưu nhất (dữ liệu không công bố). Công thức pha bán thành phẩm cuối cùng được lựa chọn sẽ tiếp tục áp dụng trong quy trình sản xuất vắc xin EV71 trên nuôi cấy tế bào Vero.

#### KẾT LUẬN

Khảo sát từng công đoạn của quy trình sản xuất vắc xin EV71 trên nuôi cấy tế bào Vero để tìm ra các thông số tối ưu và ổn định, đảm bảo chất lượng sản phẩm. Đây là cơ sở để xây dựng quy trình công nghệ sản xuất vắc xin phòng bệnh tay chân miệng EV71 tại Công ty TNHH MTV Vắc xin và Sinh phẩm số 1.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chang JY, Chang CP, Tsai HHP, Lee CD, Lian WC, et al. Selection and characterization of vaccine strain for Enterovirus 71 vaccine development. *Vaccine*. 2012, 30, pp.703-711.
2. Lee MS, Chang LY. Development of enterovirus 71 vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2010, 9, pp.149-156.
3. Liu CC, Guo MS, Lin FHY, Hsiao KN, Chang KHW, et al. Purification and characterization of EV71 viral particles produced from Vero cell grown in a serum-free microcarrier bioreactor system. *PLoS ONE*. 2011, 10.1371/Journal-pone.0020005.
4. Huang ML, Ho MS, Lee MS. Enterovirus 71 vaccine: when will it be available?. *J Formos Med Assoc*. 2011, 110, pp.425-427.
5. Solomon T, Lewthwaite P, Perera D, Cordosa MJ, McMinn P, et al. Virology, epidemiology, pathogenesis and control of enterovirus 71. *Lancet Infect Dis*. 2010, 10, pp.778-790.

Ngày nhận bài: 30/10/2012

Ngày giao phôi biên: 15/11/2012

Ngày giao bản thảo in: 6/12/2012

