

NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT VẮC XIN CÚM A/H5N1 CHO NGƯỜI TRÊN TRỨNG GÀ CÓ PHÔI, TỪ CHỦNG NIBRG-14 TẠI VIỆN VẮC XIN

Nguyễn Thị Minh Hiền, Lê Văn Hiệp, Lê Văn Bé, Nguyễn Thị Lan Phương,
Trần Ngọc Nhơn, Đặng Thị Hồng Vân

Viện Vắcxin và sinh phẩm Y tế, Nha Trang

TÓM TẮT

Đã sản xuất thử nghiệm thành công 5 loại vacxin phòng cúm A/H5N1 hấp phụ tá chất Al(OH)₃ (FLUVAC) cho người từ chủng NIBRG-14 trên phôi gà. Tất cả các loại vacxin đạt kết quả tốt và đáp ứng miễn dịch cao trên động vật thí nghiệm (chuột nhắt, chuột lang và gà), hiệu giá kháng thể kháng HA đạt mức bảo vệ (từ 40 đến > 320 HIU) chiếm tỷ lệ trung bình từ 76,6 – 100%. Bước đầu đã hình thành được qui trình sản xuất và kiểm định vacxin này tại Viện Vắcxin và Sinh phẩm Y tế.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dịch cúm gia cầm độc lực cao tít A/H5N1 xuất hiện từ giữa tháng 12/2003 tại Thái lan, Hàn quốc, Việt nam và lan rộng ra một số nước Châu Á, hiện nay đã xuất hiện ở các nước Châu Âu, đang là mối quan tâm lo ngại hàng đầu của cả thế giới.

Chủng virut cúm tít A/H5N1 được xác định có khả năng lan truyền trực tiếp từ gia cầm sang người và gây bệnh với tỷ lệ tử vong rất cao, Tổ chức Y tế Thế giới (TCYTTG) cũng đã cảnh báo chỉ cần 2 lần biến đổi gen nữa là virut cúm gia cầm A/H5N1 có thể lây từ người sang người (4), nguy cơ gây ra đại dịch cúm H5N1 là rất lớn. Tại Việt nam dịch cúm gia cầm A/H5N1 đã gây ra nhiều thiệt hại nặng nề, hàng triệu gia cầm bị tiêu hủy, hiện nay có 109 người bị mắc bệnh, trong đó có 53 người chết tính đến tháng 2/2009 [1,6].

Để phòng chống đại dịch thì việc sử dụng vacxin là phương thức hữu hiệu nhất bảo vệ cộng đồng. Tổ chức Y tế Thế giới khuyến cáo các nước nên tự nghiên cứu sản xuất vacxin cúm A/H5N1 cho đại dịch, với các công nghệ khác nhau nhưng phải đảm bảo

theo tiêu chuẩn qui định [8]. Các trung tâm nghiên cứu bệnh cúm Quốc tế đã tạo được các chủng sản xuất vacxin cúm A/H5N1 thích hợp bằng kỹ thuật di truyền ngược. Việc phát triển vacxin phòng cúm A/H5N1 cho người là một yêu cầu cấp bách đặt ra. Trên cơ sở đó, Viện vacxin và sinh phẩm Y tế đã nghiên cứu sản xuất vacxin cúm A/H5N1 trên trứng gà có phôi và sử dụng chủng NIBRG-14 từ Viện Quốc gia về tiêu chuẩn và kiểm định sinh học (NIBSC), Vương quốc Anh, với mục đích:

1. Sản xuất thử nghiệm vacxin cúm A/H5N1 phù hợp tiêu chuẩn khuyến cáo của TCYTTG dùng cho người.
2. Xây dựng qui trình khả thi sản xuất được vacxin cúm cho đại dịch, trên cơ sở đó đề xuất với nhà nước thiết lập cơ sở sản xuất vacxin cúm.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu:

- Trứng gà sạch có phôi 10 – 11 ngày nhận từ Phân Viện Thú y Miền trung và trứng sạch nhập từ CHLB Đức.
- Chủng sản xuất NIBRG-14 (Viện

Tác giả: Lê Văn Hiệp

Địa chỉ: Viện Vắcxin và Sinh phẩm Y tế, Số 9 Pasteur, Nha Trang, Khánh Hòa

Điện thoại: 0903501638

Email: ivacdich@dng.vnn.vn

NIBSC-Anh), được tái tổ hợp từ 2 chủng virut cúm A/Viet Nam/1194/2004 (H5N1) và A/PR/ 8/34 (H1N1), trong đó gen mã hóa H5 và N1 lấy từ chủng của Việt nam. Vùng quyết định tính độc trên gen H5 gồm 4 axit amin mang tính kiềm bị cắt bỏ, 6 gen còn lại lấy từ chủng A/PR/ 8/34. Chủng NIBRG-14 có kháng nguyên bề mặt (H5 và N1) gần gũi với chủng virut cúm A/H5N1 đã phân lập được ở Việt nam [3] và được TCYTTG cho phép sử dụng làm vắc xin. Viện vắc xin đã phối hợp với Viện Công nghệ sinh học Hà nội để sản xuất các lô chủng sản xuất đạt các tiêu chuẩn kỹ thuật từ chủng gốc NIBRG-14.

- Labo an toàn sinh học cấp 2+, máy siêu ly tâm lạnh – Sorvall, Pro.80-Nhật bản, máy siêu âm đồng hóa mẫu – Labsonic, B.Braun-Đức, tủ ấp trứng v.v...
- Các hóa chất, chất chuẩn, dung dịch đệm, môi trường v.v.
- Các dụng cụ phòng thí nghiệm...
- Súc vật thí nghiệm: Chuột nhắt trắng, chuột lang (IVAC), gà trống (Phân Viện Thú y Miền trung).

2.2. Phương pháp:

- * Các công đoạn sản xuất :
 - Gây nhiễm chủng sản xuất vào trứng gà có phôi 10-11 ngày.
 - Nuôi cấy và thu hoạch dịch niệu nang.
 - Tinh sạch kháng nguyên trên máy ly

tâm siêu tốc (12.000 – 30.000 v/ph).

- Hoàn nguyên và bất hoạt.
- Hấp phụ Al(OH)₃ và cấu tạo thành vắc xin.
- * Các phương pháp kiểm định :
 - Phản ứng ngưng kết hồng cầu (HA), xác định kháng nguyên ngưng kết hồng cầu bề mặt, phương pháp khuyết tán miễn dịch vòng đơn (SRID) theo khuyến cáo của TCYTTG [8].
 - Phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu (HI), xác định kháng thể kháng HA, theo khuyến cáo của TCYTTG [8].
 - Phương pháp LAL (Được điển Anh 1998), xác định nội độc tố.
 - Phương pháp Kijehdal, xác định nitơ tổng số (Thường qui của Viện kiểm định Quốc gia).
 - Phương pháp kiểm tra an toàn đặc hiệu, kiểm tra khả năng bất hoạt, hồi độc, theo khuyến cáo của TCYTTG [8].
 - Kiểm tra an toàn chung (Thường qui của Viện kiểm định Quốc gia).
 - Phương pháp cấy trực tiếp kiểm tra vô trùng (Được điển Việt nam 3, 2002).
 - Kiểm tra các chỉ tiêu hóa-lý (Được điển Anh 1998).
 - Kiểm tra đáp ứng miễn dịch, theo khuyến cáo của TCYTTG [8].

III. KẾT QUẢ

3.1. Kết quả sản xuất :

Bảng 1. Hiệu suất tinh chế trong qui trình sản xuất (nhóm 1)

FLUVAC	GIẢI ĐOẠN	HIỆU GIÁ HA/ml	PROTEIN (mg/ml)	HIỆU SUẤT	ĐỘ SẠCH (HA/mg P)
01/05	THÔ	1/160	6,20	HA/T: 800	25,8
	TINH CHẾ	1/1280	0,40	HSTC: 66,6%	3200
02/05	THÔ	1/320	5,60	HA/T: 1340	57,1
	TINH CHẾ	1/1280	0,40	HSTC: 50%	3200
03/05	THÔ	1/160	3,68	HA/T: 808	43,5
	TINH CHẾ	1/1000	0,41	HSTC: 52%	2439
04/05	THÔ	1/160	7,02	HA/T: 609	22,8
	TINH CHẾ	1/1000	0,29	HSTC: 55,5%	3448,2
05/05	THÔ	1/320	4,43	HA/T: 1181	72,2
	TINH CHẾ	1/1280	0,39	HSTC: 48%	3282

Bảng 2. Hiệu suất tinh chế trong qui trình sản xuất (nhóm 2)

FLUVAC	GIẢI ĐOẠN	HIỆU GIÁ HA/ml	PROTEIN (mg/ml)	HIỆU SUẤT	ĐỘ SẠCH (HA/mgP)
01/07	THÔ	1/320	4,5	HA/T: 1280	71.1
	TINH CHẾ	1/1280	0,1	HSTC: 56,3%	12800
02/07	THÔ	1/320	3,38	HA/T: 1748	94.6
	TINH CHẾ	1/1280	0,09	HSTC: 54%	14222
03/07	THÔ	1/320	8.87	HA/T: 1762	36
	TINH CHẾ	1/1000	0,11	HSTC: 63,6%	9090
04/07	THÔ	1/320	5,08	HA/T: 2044	63
	TINH CHẾ	1/1280	0,11	HSTC: 4,05%	11636

Bảng 3. Hiệu suất tinh chế trung bình trong quy trình sản xuất

Nhóm VX	HA thô/trứng	HA tinh chế/trứng	HSTC (%)	Độ sạch thô (HA/mgP)	Độ sạch tinh chế (HA/mgP)	Số lần tinh sạch
01	1833,2	976,6	54,42	44,28	3113,8	70
02	3031	1714	56,57	66,17	11937	180

Qua các số liệu trên bảng 1, bảng 2 và 3 cho thấy 2 nhóm vắc xin được sản xuất độc lập, nhưng cho kết quả tương đối đồng nhất. Hiệu giá kháng nguyên HA tính trên một trứng khá cao, hiệu suất tinh chế (HSTC) kháng nguyên HA của 2 nhóm gần

tương đương nhau (nhóm 1: 54,42%; nhóm 2: 56,57%), kết quả này cũng phù hợp với các báo cáo của nhiều công ty sản xuất vắc xin cúm trên thế giới (HA trong sản phẩm có 30-50%) [5], đồng thời giá trị tỷ lệ kháng nguyên HA tính trên mg protein

(HA/mgP) trong ml càng lớn thì mức độ tinh sạch của vắc xin càng cao (Hàm lượng protein không đặc hiệu giảm 70 lần ở nhóm vắc xin 1 và 180 lần ở nhóm 2).

Bảng 4. Kết quả kiểm định sau hoàn nguyên và bất hoạt 5 lô FLUVAC (nhóm 1)

Chỉ tiêu \ Fluvac	01/05	02/05	03/05	04/05	05/05	Yêu cầu của TCYT TG
1.Vô trùng	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Không có vi sinh vật phát triển
2.Hiệu lực bất hoạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Không ngưng kết hồng cầu/2 lần cấy trên trứng
3.Hồi độc	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Không ngưng kết hồng cầu/2 lần cấy trên trứng
4.HA/ml	1280	1280	1000	1000	1280	-
5.Nội độc tố EU/ml	32	30	25	25	20	-
6.Protein tổng số mg/ml	0,40	0,40	0,41	0,29	0,39	-

Bảng 5. Kết quả kiểm định sau hoàn nguyên và bất hoạt 4 lô FLUVAC (nhóm 2)

Chỉ tiêu \ Fluvac	01/05	02/05	03/05	04/05	Yêu cầu của TCYT TG
1.Vô trùng	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Không có vi sinh vật phát triển
2.Hiệu lực bất hoạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Không ngưng kết hồng cầu/2 lần cấy trên trứng
3.Hồi độc	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Không ngưng kết hồng cầu/2 lần cấy trên trứng
4.HA/ml	44,36	30,35	30,35	44,36	-
5.Nội độc tố EU/ml	25	25	25	50	-
6.Protein tổng số mg/ml	0,10	0,09	0,11	0,11	-

Các chỉ tiêu giám sát sau hoàn nguyên và bất hoạt kháng nguyên của cả 9 lô đều cho kết quả tốt.

3.2. Kết quả kiểm tra thành phẩm:

Đối với vắc xin cúm thông thường (thường bao gồm 3 chủng) TCYT TG khuyến cáo trong 1 liều vắc xin tiêm cho người có 15 µg kháng nguyên HA trên 1 chủng và phải đảm bảo nồng độ protein không vượt quá 100 µg trên 1 chủng, nội độc tố không vượt quá 100

EU trên 1 chủng. Đối với vắc xin cho đại dịch, chủng virut sản xuất thường được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền ngược, vắc xin có thể sản xuất từ 1 chủng và được hấp phụ tá chất, nhằm tăng hiệu lực của kháng nguyên [2, 7]. Việc pha vắc xin được dựa trên hàm lượng kháng nguyên HA có trong 1 ml sản phẩm được tính theo đơn vị của kháng nguyên chuẩn, bằng phương pháp khuếch tán miễn dịch vòng đơn (SRID) và phương pháp ngưng

kết hồng cầu gà. Căn cứ theo tiêu chuẩn dành cho vắc xin cúm thông thường, vắc xin FLUVAC do Viện sản xuất có thành phần trong 1 liều (0,5ml) tiêm cho người như sau : Hiệu giá kháng nguyên ngưng kết hồng cầu

HA từ 1/100 đến 1/160 và 15 µg/ml, nồng độ chất hấp phụ Al(OH)₃ là 0,5 mg ± 10%, đồng thời việc pha vắc xin cũng phải đáp ứng đúng yêu cầu cho phép về nồng độ nội độc tố và protein trên 1 liều, trên 1 chủng.

Bảng 6. Kết quả kiểm định 5 lô FLUVAC thành phẩm

FLUVAC Tiêu chuẩn chất lượng	01/05	02/05	03/05	04/05	05/05
1. Vô trùng	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
2. An toàn chung	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
3. pH (7,2 ± 0,3)	7,45	7,22	7,38	7,40	7,14
4. Nội độc tố (≤ 100 EU/ chủng/liều)	8,0	7,5	12,5	12,5	10,0
5. Protein tổng số (≤ 100µg/ chủng/liều)	100,0	100,0	50,6	36,8	79,6
6. Chất hấp phụ Al(OH) ₃ (0.5 mg/liều ± 10%)	0,51	0,46	0,47	0,47	0,47
7. Chất bảo quản Merthiolat (≤ 0,01%)	0,0053	0,0074	0,0092	0,0095	0,0090
8. Formalin tồn dư (≤ 0,02%)	0,0051	0,0045	0,0024	0,0023	0,0023
9. NaCl (0,7-1,0%)	0,84	0,85	0,83	0,84	0,88

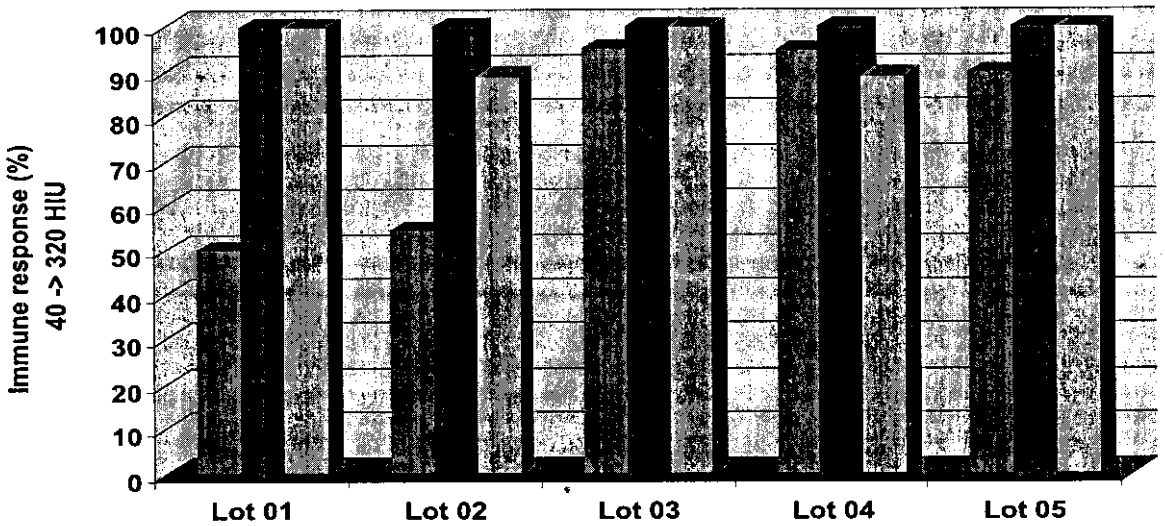
Kết quả cho thấy 5 lô vắc xin thành phẩm (nhóm 1) được kiểm tra chất lượng theo qui định của TCYTTG, đạt kết quả tốt theo tiêu chuẩn cơ sở.

Để đánh giá đáp ứng miễn dịch của vắc xin FLUVAC, mỗi đối tượng súc vật thí nghiệm được tiêm 2 liều vắc xin gây miễn dịch, liều thứ nhất cách liều thứ hai 20

ngày. Mỗi lô vắc xin tiêm 20 chuột nhắt, 08 chuột lang và 10 con gà. Lô chứng không tiêm vắc xin. Sau liều tiêm thứ 2, 10 ngày lấy máu của tất cả súc vật miễn dịch xác định kháng thể kháng HA bằng phương pháp ức chế ngưng kết hồng cầu (HIU). Kết quả được thể hiện ở bảng 7 và hình 1 dưới đây.

Bảng 7. Kết quả đáp ứng miễn dịch của 5 lô FLUVAC trên súc vật thí nghiệm

FLUVAC	Chuột nhắt (%) 40 - (> 320)HIU	Chuột lang (%) 40 - (> 320) HIU	Gà (%) 40 - (> 320) HIU
01/05	50,0	100	100
02/05	54,3	100	88,9
03/05	95,0	100	100
04/05	94,4	100	88,9
05/05	89,5	100	100
Trung bình	76,6	100	95,6
Chứng	(-)	(-)	(-)



Hình 1. Đáp ứng miễn dịch của 5 lô FLUVAC trên súc vật thí nghiệm

Kết quả trên bảng 7 cho thấy vắc xin cúm A/H5N1 (FLUVAC) hấp phụ, sản xuất bằng phương pháp nuôi cấy trên trứng gà sạch có phôi cho đáp ứng miễn dịch rất cao trên súc vật thí nghiệm so với tiêu chuẩn tối thiểu 40 HIU [5]. Đáp ứng kháng thể ở mức 40 đến (>320) HIU trên chuột nhất trung bình 76,6%, ở chuột lang là 100% và gà là 95,6%.

VI. KẾT LUẬN

1. Áp dụng khuyến cáo của TCYTGT đã xây dựng được qui trình sản xuất vắc xin cúm khả thi tại Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế.
2. Viện đã sản xuất được 5 loạt vắc xin cúm FLUVAC hấp phụ Al(OH)₃ và 4lô bán thành phẩm với chủng NIBRG – 14 trên trứng gà có phôi. Kết quả kiểm tra cho thấy chất lượng của vắc xin đạt tốt và có đáp ứng miễn dịch cao trên súc vật thí nghiệm (chuột nhất, chuột lang và gà), hiệu giá kháng thể kháng HA đạt mức bảo vệ (từ 40 đến (>320) HIU) chiếm tỷ lệ trung bình từ 76,6 – 100%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thu Vân, Hoàng Thủy Nguyên, Đỗ Thủy Ngân, Nguyễn Tuyết Nga và c.s. *Đánh giá tính an toàn và đáp ứng miễn dịch của vắc xin cúm A/H5N1*

(FLUVAX) trên động vật thực nghiệm. Công ty Vắc xin và sinh phẩm số 1, Viện Vệ sinh dịch tễ trung ương. Y học thực hành, số 7(2006) tr. 2.

2. Canadian intellectual Property office. *Adjuvanted influenza vaccine* (CA 2514667) Ottawa (2004), p 5-19.
3. NIBSC. *NIBSC influenza reference virus NIBRG-14*. 03/246 (version 4: 4 April 2005)
4. OIE, Avian influenza. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 5th, 2004*. Version adopted May 2005.
5. WHO, *Consulation for the development of a global action plan to increase the supply of pandemic influenza vaccines*. 2-3 May 2006.
6. WHO, *Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO*. 2 February 2009.
7. WHO, *Recommendations for production and control of influenza vaccine (inactivated)*. Adopted by the 54th meeting of the WHO expert Committee on Biological Standardization, November (2003), p 17-21
8. WHO/ TRS/ 927. *WHO expert committee on Biological Standardization (Fifty-fourth report)*, Geneva 2005, p 99-134.

STUDY OF PRODUCTION OF INACTIVATED INFLUENZA VACCINE FOR HUMAN ON EGG - GROWN FROM REASSORTANTS NIBRG-14 AT VACCINE INSTITUTE

**Le Van Hiep, Nguyen Thi Minh Hien, Le Van Be, Nguyen Thi Lan Phuong,
Tran Ngoc Nhon, Dang Thi Hong Van. Nha Trang**

Institute of Vaccines and Medicine Biologicals, Nha Trang

IVAC has successfully produced 5 lots of absorbed vaccine A/H5N1 (FLUVAC) using NIBRG -14 strain and embryonated eggs. The immunological response in animals (mice, guinea pigs and chicken) has evolved

high titer of anti- hæmagglutinin (40 - >320 HIU) and reached average ratio from 76,6% -100%. Initially, production and quality control processes have been set up at IVAC.