

CÔNG NGHỆ TẠO VACCINE CÚM GIA CẦM NGUỒN GỐC THỰC VẬT: TỪ NGHIÊN CỨU ĐẾN ĐỊNH HƯỚNG ỨNG DỤNG TẠI VIỆT NAM

PGS.TS Phạm Bích Ngọc, ThS Phạm Thị Vân

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

Cúm gia cầm thể độc lực cao (Highly pathogenic avian influenza - HPAI) do virus cúm type A (như A/H5N1, A/H5N6, A/H7N9...) gây ra là bệnh truyền nhiễm cấp tính có tốc độ lây lan nhanh, với tỷ lệ gây chết cao trong đàn gia cầm bị bệnh. Dịch cúm gia cầm liên tục tái phát hàng năm với tốc độ lây lan nhanh và diễn biến phức tạp. Hàng chục triệu gia cầm và thủy cầm đã bị chết hoặc bị tiêu hủy, gây thiệt hại nặng nề cho ngành chăn nuôi trong nước. Tiêm phòng luôn được xem là biện pháp khả thi nhất về mặt kinh tế để bảo vệ gia cầm khỏi bệnh cúm. Hiện nay, Viện Công nghệ sinh học (IBT), Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ (KH&CN) Việt Nam đã nghiên cứu vaccine cúm gia cầm nguồn gốc từ thực vật có khả năng bảo hộ gia cầm lên tới trên 90%. Kết quả này đã mở ra triển vọng mới trong việc phát triển vaccine có nguồn gốc từ thực vật phòng bệnh cúm gia cầm ở Việt Nam.

Virus cúm gia cầm và sự biến đổi nhanh của nó

Virus cúm gia cầm thuộc họ *Orthomyxoviridae*, chi *Alphainfluenzavirus*, loài virus cúm A. Virus cúm A được phân loại thành các phân nhóm dựa theo sự kết hợp của hai protein bề mặt virus khác nhau giữa hemagglutinin (HA) và neuraminidase (NA). Cho đến nay có 18 phân nhóm HA khác nhau và 11 phân nhóm NA khác nhau. Trong tự nhiên các phân nhóm HA và NA có thể tái tổ hợp luân chuyển (reassortment) tạo nên các dòng HxNy mới có khả năng thích ứng xâm nhiễm ở loài vật chủ mới và có khả năng gây ra đại dịch cúm toàn cầu [1]. Tùy thuộc vào vật chủ gốc, virus cúm A có thể được phân loại là cúm

gia cầm (A/H5N1, A/H9N2, A/H5N6...), cúm lợn (A/H1N1, A/H3N2...) hoặc các loại virus cúm động vật khác. Trong đó, virus cúm A/H5N1 được coi là loại biến chủng có mức độ độc lực cao nhất cho các loài động vật và người.

Sự tiến hoá của virus cúm gia cầm có thể làm thay đổi tính kháng nguyên, dẫn đến ảnh hưởng đáp ứng miễn dịch của gia cầm khi được tiêm phòng vaccine. Tính đến nay, virus cúm A/H5N1 đã tiến hoá tạo thành 10 nhánh (clade) khác nhau, được đánh số từ 0-9 và nhiều phân nhánh (subclade) khác nhau để mô tả tính chất độc lực của HA. Virus cúm A/H5N1 bùng nổ và lưu hành tại Việt Nam từ năm 2003 đến nay rất đa dạng về kiểu hình HA liên quan nhiều đến đặc tính kháng nguyên, trong đó

clade 1 và clade 2 lưu hành phổ biến, có thể gây bệnh cho người và đã phát triển thành nhiều subclade khác nhau trên cơ sở thay đổi một số amino acid [2]. Đến năm 2014, các ổ dịch cúm gia cầm do biến thể virus cúm A/H5N6 lần đầu được phát hiện ở nước ta, sau đó tiếp tục lan rộng và chiếm ưu thế trong những năm gần đây. Các nghiên cứu cho thấy, các chủng virus HPAI A/H5N6 này có chứa gen HA của H5 thuộc subclade 2.3.4.4 và gen NA từ virus A/H6N6 hoặc A/H5N6 nằm trong cùng dòng Á - Âu (Eurasian lineage) [3, 4].

Chính sự biến chủng diễn ra nhanh chóng của virus cúm A đã làm công tác tiêm phòng vaccine cho gia cầm ở nước ta trở nên kém hiệu quả. Đồng thời, đặt ra nhiệm vụ cấp bách về tăng cường

công tác giám sát virus cúm ở gia cầm, chủ động áp dụng các biện pháp phòng chống dịch thích hợp, nghiên cứu phát triển các loại vaccine và công nghệ sản xuất theo kịp biến đổi clade của virus H5Ny, nhằm nhanh chóng giảm thiểu khả năng lây nhiễm virus ở gia cầm và ngăn chặn lây truyền từ gia cầm sang người.

Vaccine phòng bệnh cúm gia cầm

Tiêm phòng luôn được xem là phương pháp khả thi nhất về mặt kinh tế và hiệu quả nhất để bảo vệ động vật và con người khỏi nhiều bệnh truyền nhiễm. Hiện nay, có 38 loại vaccine nhược độc virus cúm nhân tạo đã được WHO công nhận về độ an toàn và khuyến cáo đưa vào chương trình sản xuất vaccine phòng chống virus cúm gia cầm A(H5) trên thế giới, trong đó virus cúm A/H5N1 có 35 chủng.

Ở Việt Nam, công nghệ di truyền ngược đã được nghiên cứu và ứng dụng để tạo ra những vaccine thương mại phòng bệnh cúm gia cầm. Năm 2012, với sự chuyển giao công nghệ của IBT cho Công ty CP thuốc thú y Trung ương NAVETCO, vaccine nội địa đầu tiên đã được thương mại hoá là Navet-Viflucac. Đây là vaccine vô hoạt được sản xuất từ virus A/H5N1 chủng NIBRG-14, có hệ gen tái tổ hợp từ hai chủng A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) và chủng A/PR/8/34 (H1N1), được nuôi cấy trên phôi gà và vô hoạt bằng Formalin. Vaccine

này rất an toàn, tạo tính sinh miễn dịch nhanh, mạnh và kéo dài. Tuy nhiên do sự biến đổi liên tục tạo nên các chủng virus mới mà hiệu quả phòng bệnh của vaccine Navet-Viflucac hay các vaccine ngoại nhập khác không cao. Để giải quyết vấn đề này, năm 2020 vaccine Navet-Fluvac 2 chứa 2 chủng NIBRG - 14 và A/Hubei/1/2010 (H5N1)-PR8-IDCDC-RG30 đã được NAVETCO nghiên cứu, sản xuất và lưu hành. Vaccine này có hiệu quả trong việc phòng các chủng virus cúm thuộc các biến chủng clade 1, 1.1, 2.3.2.1a, b, c và có bảo hộ chéo với cúm A(H5N6) cho gà, vịt, ngan, chim cút và vịt trời với hiệu lực ít nhất sáu tháng. Gần đây, nhóm nghiên cứu của TS Nguyễn Trung Nam và cộng sự tại IBT đã tạo ra được giống virus vaccine cúm gia cầm A/H5N1 (được ký hiệu là IBT-RG02) bằng công nghệ di truyền ngược trên cơ sở các gen HA và NA phân lập từ biến chủng virus mới HPAI H5N1 (A/duck/Vietnam/HT2/2014(H5N1)) của clade 2.3.2.1c chiếm ưu thế ở Việt Nam trong giai đoạn 2012-2014. Kết quả thu được chủng virus cúm A/H5N1 tái tổ hợp đảm bảo tính ổn định về mặt di truyền và nhân lên trong trứng gà SPF với hiệu giá HA tương đối cao (khoảng 9 log₂). Điều quan trọng, ứng cử viên vaccine IBT-RG02 đã tạo ra hiệu giá kháng thể cao và gà được tiêm vaccine có tỷ lệ bảo hộ cao tới 91,6% đối với chủng virus cường độc A/DK/VN/Bacninh/

NCVD-17A384/2017 [5].

Bên cạnh hệ thống sản xuất vaccine cúm gia cầm trên hệ thống nuôi cấy phôi trứng gà nêu trên, nhiều hướng nghiên cứu phát triển vaccine cúm A/H5N1 trên các hệ thống biểu hiện khác như nấm men, thực vật... cũng đã và đang thực hiện tại IBT. Trong đó, hệ thống thực vật đang thu nhận được nhiều kết quả khả quan khi tạo ra được ứng viên vaccine tiềm năng phòng bệnh cúm gia cầm A/H5N1 với tỷ lệ bảo hộ gà lên tới trên 90%.

Vaccine nguồn gốc thực vật - từ định hướng nghiên cứu đến ứng dụng

Việc tìm kiếm hệ thống biểu hiện protein tái tổ hợp giá thành thấp và hiệu quả đã dẫn các nhà nghiên cứu và sản xuất tìm đến thực vật. Bởi thực vật được xem là một nhà máy sinh học có thể điều khiển tổng hợp protein tái tổ hợp vào trong các mô đã biệt hoá hoàn toàn như lá, hạt... vì thế protein không dễ bị phân huỷ, mà dễ dàng bảo quản. Sản phẩm protein tái tổ hợp từ thực vật rất an toàn vì không chứa nguồn bệnh hay độc tố có hại đối với sức khoẻ con người. Đặc biệt gần đây công nghệ biểu hiện tạm thời protein tái tổ hợp ở thực vật thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* có sử dụng lực thấm hút chân không (gọi tắt là agroinfiltration) đã thu hút được nhiều nhà khoa học và các công ty sản xuất vaccine quan tâm. Vì công nghệ này có những ưu điểm

■ Khoa học - Công nghệ và Đổi mới sáng tạo

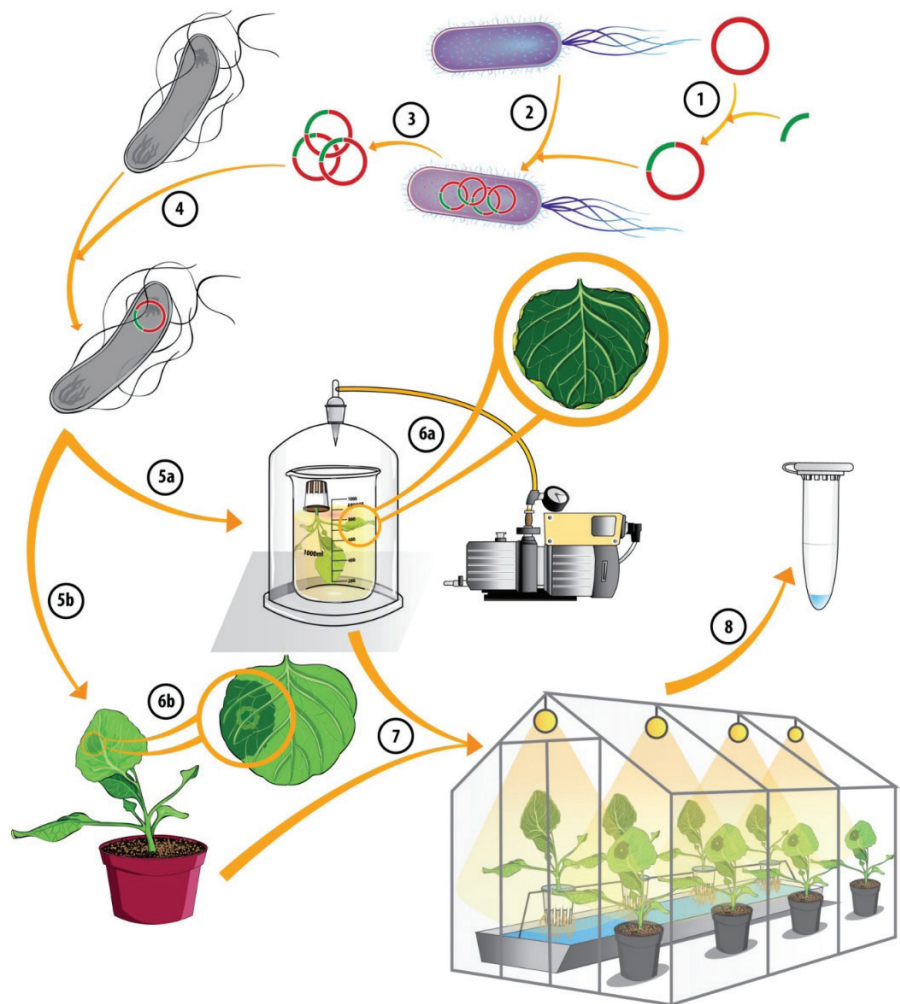
như: linh hoạt, an toàn và đơn giản, chi phí thấp trong nghiên cứu và sản xuất, cho phép trong thời gian ngắn có thể biểu hiện được lượng lớn protein kháng nguyên, từ đó có thể đáp ứng kịp thời với đại dịch.

Tính đến nay, đã có khoảng 12 loại vaccine, 7 loại kháng thể và 5 loại protein ăn uống/điều trị được sản xuất từ một số loại thực vật (như thuốc lá, ngô, khoai, rau bina, xà lách, bèo tấm, huyền phù tế bào cà rốt...) đang trong giai đoạn thử nghiệm lâm sàng hoặc đã có mặt trên thị trường [6, 7]. Trong đó, thành công đáng ghi nhận nhất có thể kể đến là Công ty Medicago (Canada) đã sản xuất và thử nghiệm lâm sàng thành công vaccine-VLP từ thực vật phòng bệnh cúm trên người bằng công nghệ agroinfiltration. Và gần đây, khi đại dịch viêm đường hô hấp cấp lan rộng trên toàn cầu, Medicago đã có cả một chương trình cho phát triển vaccine và kháng thể COVID-19 nguồn gốc thực vật để phòng và chữa cho các bệnh nhân nhiễm virus SARS-CoV-2. Hiện nay, công ty này đã sản xuất và thử nghiệm thành công vaccine-VLP từ thực vật phòng chống bệnh Covid-19. Vaccine này đang được thử nghiệm lâm sàng giai đoạn 3 tại Mỹ và Canada [8, 9].

Trải qua quá trình lịch sử với hơn 15 năm nghiên cứu về cúm gia cầm và vaccine phòng chống cúm gia cầm, ngay từ đầu IBT đã đề xuất và tiến hành nhiều hướng

nghiên cứu sản xuất vaccine cúm gia cầm. Bên cạnh hướng sản xuất vaccine cúm gia cầm theo công nghệ truyền thống hoặc di truyền ngược, hướng nghiên cứu sản xuất vaccine cúm gia cầm từ thực vật dựa vào công nghệ biểu hiện tạm thời đang được xem là có tiềm năng thay thế [10]. Bởi vì,

trước sự biến chủng liên tục của virus cúm thì việc rút ngắn được quá trình nghiên cứu, sản xuất vaccine cập nhật và chủ động được nguồn vaccine sẽ giúp giảm chi phí cho nền kinh tế và đáp ứng kịp thời nhu cầu khi có các biến chủng virus mới xuất hiện tại Việt Nam.



Hình 1. Sơ đồ mô tả phương pháp biểu hiện tạm thời thông qua *Agrobacterium tumefaciens*: 1-Gắn gen quan tâm vào vector biểu hiện ở thực vật; 2-Nhân dòng plasmid tái tổ hợp trong *E. coli*; 3-Biến nạp plasmid tái tổ hợp vào *A. tumefaciens*; 4-Chọn dòng khuẩn *A. tumefaciens* chứa plasmid tái tổ hợp; 5-Đưa dung dịch chứa *A. tumefaciens* mang plasmid tái tổ hợp vào lá thuốc lá *N. benthamiana* bằng hút chân không (5a) và bơm kim tiêm (5b); 6-Hình ảnh lá thuốc lá sau khi đưa dịch khuẩn vào lá bằng hút chân không (6a) và bơm tiêm (6b); 7-Đưa cây trở lại nuôi ở nhà kính từ 2-7 ngày sau khi biến nạp. Toàn bộ lá được thu và bảo quản ở tủ -80°C; 8-Tách chiết, thu hồi protein tinh sạch từ lá [10].

Tại IBT, mô hình sản xuất kháng nguyên HA tái tổ hợp của các chủng cúm A/H5N1 lưu hành ở Việt Nam bằng phương pháp agroinfiltration hiện đã được nghiên cứu từ những năm 2008 và đến nay đã ghi nhận nhiều thành công mang hướng ứng dụng cao (hình 1) [10]. Đây là kết quả của sự hợp tác nhiều năm với Viện Nghiên cứu cây trồng và di truyền thực vật (IPK), CHLB Đức. Nhóm nghiên cứu của IBT đã có nhiều thử nghiệm khác nhau để tạo ra được kháng nguyên HA với các dạng monomer, dimer, dạng nguyên bản trimer trong tự nhiên hoặc nhân tạo và các dạng HA oligomer khác nhau với mục đích tìm kiếm những ứng viên có hoạt tính miễn dịch cao, trung hoà được virus đang gây bệnh phổ biến ở Việt Nam hoặc các ứng viên làm vaccine phổ rộng có khả năng bảo hộ chéo, giúp gà chống được nhiều chủng virus cúm A/H5N1 cùng lúc [10]. Kết quả nổi bật nhất được kể đến là đề tài Nghị định thư Việt - Đức “Nghiên cứu sản xuất kháng nguyên HA của virus cúm A/H5N1 có tính sinh miễn dịch cao bằng phương pháp biểu hiện trên cây thuốc lá” mã số NĐT.07.GER.15 được tài trợ bởi Bộ KH&CN Việt Nam. Nghiên cứu cho thấy, bằng phương pháp agroinfiltration, chỉ sau 1-2 tháng kể từ khi biết được trình tự kháng nguyên thì có thể tạo ra được một lượng lớn kháng nguyên HA từ thực vật, do đó có thể đáp ứng được kịp thời khi có đại dịch cúm xảy ra. Kết quả

mang đến nhiều triển vọng ứng dụng hơn cả là dịch chiết thô thực vật chứa HA oligomer được tạo thành dựa vào sự dung hợp của HA với TP (tail piece) của IgMFC có khả năng bảo hộ gà lên đến trên 90% sau thí nghiệm công cường độc với chủng virus hoang dại gây bệnh mạnh ở Việt Nam [11]. Thành công này đã mở ra nhiều hướng nghiên cứu và sản xuất vaccine có nguồn gốc thực vật phòng bệnh cúm A/H5N1 nói riêng cũng như phòng các bệnh truyền nhiễm khác trên động vật và cả con người ở Việt Nam ✍

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] WHO (2020), *Antigenic and genetic characteristics of zoonotic influenza A viruses and development of candidate vaccine viruses for pandemic preparedness*, 11pp.

[2] T.H Le, N.T Nguyen (2014), “Evolutionary dynamics of highly pathogenic avian influenza A/H5N1 HA clades and vaccine implementation in Vietnam” *Clin. Exp. Vaccine Res.*, **3(2)**, pp.117-127.

[3] Lê Thanh Hòa, Nguyễn Thị Bích Nga, Đoàn Thị Thanh Hương, Đỗ Thị Roan, Lê Thị Kim Xuyên, Nguyễn Thị Khuê, Nguyễn Trung Nam, Chu Hoàng Hà (2019), “Đặc điểm phân tử của virus cúm A/H5N6 lưu hành ở Việt Nam giai đoạn 2014-2017”, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, **17(1)**, tr.147-156.

[4] Phạm Ngọc Thạch, Nguyễn Thị Lan, Đào Lê Anh (2018), “Sự lưu hành và đặc tính di truyền của virus cúm gia cầm A/H5N6 tại một số tỉnh biên giới phía Bắc Việt Nam”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, **60(2)**, tr. 43-48.

[5] H.T.T. Hoang, C.H. Nguyen, N.T.T. Nguyen, P.D. An, N.T.T. Hang, L.T. Hoa, T.X. Hang, C.H. Ha, N.T. Nam (2020), “Immunization with the H5N1 recombinant vaccine candidate

induces high protection in chickens against Vietnamese highly pathogenic avian influenza virus strains”, *Vaccines*, **8(2)**, pp.159.

[6] T.Q. Nguyen, T.T.H. Van, Y.C. Lin, T.N.N. Van, K.C. Bui, Q.G. Le, T.H. Do, V.C. Vo, V.D. Truong, P.M. Smooker, P.J. Coloe, N.H. Truong (2014), “A potential protein-based vaccine for influenza H5N1 from the recombinant HA₁ domain of avian influenza A/H5N1 expressed in *Pichia pastoris*”, *Future Virology*, **9**, pp.1019-1031.

[7] S. Singhabahu, K. Hefferon, A. Makhzoum (2016), “Transgenesis and plant molecular pharming”, in: *Jha S.(eds) Transgenesis and Secondary Metabolism*, pp.1-26.

[8] <https://www.nature.com/articles/d43747-020-00537-y>.

[9] <https://www.medicago.com/en/covid-19-programs/>.

[10] Chu Hoàng Hà (chủ biên), Phạm Bích Ngọc, Phan Trọng Hoàng, Udo Conrad, Hồ Thị Thương, Phạm Thị Vân, Vũ Huyền Trang (2021), *Công nghệ tạo vaccine cúm gia cầm từ thực vật: từ nghiên cứu đến định hướng ứng dụng tại Việt Nam*, NXB Khoa học tự nhiên và Công nghệ.

[11] Vũ Huyền Trang và nhóm nghiên cứu (2019), *Báo cáo tổng kết đề tài Nghị định thư Việt - Đức “Nghiên cứu sản xuất kháng nguyên HA của virus cúm A/H5N1 có tính sinh miễn dịch cao bằng phương pháp biểu hiện trên cây thuốc lá”*, mã số: NĐT.07.GER.15.