

**NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT VẮXIN NHƯỢC ĐỘC ĐÔNG KHÔ
PHÒNG BỆNH ĐẬU GÀ BẰNG CÔNG NGHỆ NUÔI CẤY TẾ BÀO**

**Nguyễn Hồng Minh, Trần Thị Thanh Xuân,
Đoàn Trọng Vinh, Nguyễn Thị Nga**
Xí nghiệp thuốc thú y TW

TÓM TẮT

Vaccine nhược độc đông khô phòng bệnh đậu cho gà được nghiên cứu sản xuất bằng công nghệ nuôi cấy tế bào thay thế công nghệ sản xuất trên trứng. Vaccine được chế tạo bằng cách sử dụng virus đậu gà chủng C thích nghi trên môi trường nuôi cấy tế bào xơ phôi gà một lớp, thu hoạch huyền dịch virus tế bào khi đạt nồng độ virus, bổ xung chất bổ trợ, đông khô thành vaccine thành phẩm,... Các lô vaccine được nghiên cứu và sản xuất trong phòng thí nghiệm, kiểm nghiệm cấp cơ sở đều cho kết quả tốt.

Từ khóa: Vaccine đậu gà, Virus vaccine chủng C, Công nghệ nuôi cấy tế bào, Kiểm nghiệm.

**Researches on developing chicken pox attenuated virus vaccine
in cell cultures**

**Nguyễn Hồng Minh, Trần Thị Thanh Xuân,
Đoàn Trọng Vinh, Nguyễn Thị Nga**

Summary

A freeze dried attenuated vaccine for chicken pox was developed using cell culture technology to replace that one produced using the chicken embryonated eggs. The pox virus strain C was cultivated in chicken fibroblast monolayer cells, the cells were harvested when the required virus concentration was achieved; the harvest was supplemented with an adjuvant; the vaccine was then freeze dried... All the vaccine batches were developed and produced in the laboratory, the control of the vaccine indicated good results.

Key words: Chicken pox, Virus master seed, Vaccine, Cell culture technology, Control.

1. Đặt vấn đề.

Bệnh đậu gà là bệnh virus chung của gia cầm (gà, gà tây) và các loài chim (cả chim nuôi và chim hoang dã). Theo các tác giả Bolte, A. L., J. Meurer, E. F. và Kaleta, 1999 thì có khoảng 9.000 loài chim đã bị nhiễm bệnh tự nhiên với virus đậu. Bệnh gây ra bởi virus ADN thuộc nhóm Avipoxvirus, họ Poxviridae. Bệnh phân bố rộng khắp trên toàn thế giới, gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến kinh tế đối với các đàn gia cầm vì nó gây giảm sản lượng trứng đối với đàn gà đẻ, gây giảm sự tăng trưởng đối với gia cầm non và gây tỷ lệ chết đáng kể đối với tổng đàn.

Bệnh đậu gà là một bệnh lây lan chậm với những đặc trưng của bệnh là hình thành những nốt đậu hoặc vẩy ở những vùng da không có lông (gọi là thể ngoài da) hoặc hoại tử fibrin và các bệnh tích tăng sinh ở lớp màng nhầy của đường hô hấp trên, miệng, thực quản (gọi là thể thực quản). Gia cầm bị bệnh đậu có thể bị ở thể ngoài da hoặc thể bạch hầu hoặc có thể bị cả hai thể cùng lúc.

Để phòng bệnh đậu cho gà, biện pháp duy nhất và hiệu quả nhất là sử dụng vaccine phòng bệnh. Trên thế giới cũng như ở Việt Nam đang sử dụng hai chủng virus là chủng virus đậu gà và chủng virus đậu bồ câu dùng để chế vaccine phòng bệnh đậu cho gia cầm. Những vaccine này được sản xuất bằng cách gây nhiễm virus đậu gà hoặc virus đậu bồ câu vào màng CAM của phôi gà 9 – 11 ngày tuổi hoặc gây nhiễm vào môi trường nuôi cấy tế bào xơ phôi gà.

Ở nước ta hiện sử dụng virus nhược độc đậu gà chủng C để sản xuất vaccine. Đây là chủng virus đậu gà được giảm độc tự nhiên, được cấy chuyển trên màng CAM của phôi gà ấp 9 – 11 ngày tuổi. Vaccine có ưu điểm là an toàn cho gà ở mọi lứa tuổi, hiệu lực đạt từ 80 – 90% và thời gian duy trì miễn dịch kéo dài 9 – 12 tháng. Tuy nhiên, với công nghệ sản xuất vaccine trên trứng vẫn còn một số tồn tại mà thực tế trong sản xuất vẫn gặp phải. Đó là:

1. Vaccine được sản xuất bằng cách gây nhiễm trực tiếp trên trứng gà có phôi. Do đó để đảm bảo tính tinh khiết chúng ta phải sử dụng trứng gà SPF. Trong điều kiện của Việt Nam, vấn đề này vẫn chưa khắc phục được trong điều kiện sản xuất công nghiệp.

2. Trong quá trình sản xuất vaccin đậu gà, chúng ta phải tiến hành tạo buồng hơi giả để tạo ra vị trí gây nhiễm virus thích hợp trên màng CAM. Trong quá trình tạo buồng hơi giả rất dễ gây tập trùng cho trứng. Do vậy, trong quy mô sản xuất công nghiệp rất khó kiểm soát vấn đề vô trùng cho vaccin.

Để khắc phục những vấn đề tồn tại trên, trong đề tài này chúng tôi tiến hành nghiên cứu xây dựng quy trình sản xuất vaccin đậu gà bằng virus đậu gà chủng C gây nhiễm trên tế bào xơ phôi gà 1 lớp.

II. Nội dung nghiên cứu.

- Nuôi cấy virus Đậu gà chủng C trên môi trường tế bào xơ phôi gà một lớp
- Xây dựng quy trình sản xuất vaccin
- Đánh giá chất lượng vaccin Đậu gà được sản xuất trên môi trường tế bào xơ phôi gà một lớp : An toàn, hiệu lực, thuần khiết.

III. Nguyên liệu và phương pháp.

3.1. Nguyên liệu:

- Nguyên liệu: Trứng gà có phôi, gà, giống virus đậu gà nhược độc...
- Máy móc, thiết bị, hóa chất phòng thí nghiệm

3.2. Phương pháp.

- Phương pháp nuôi cấy tế bào xơ phôi gà 1 lớp
- Phương pháp sản xuất vaccin trên môi trường nuôi cấy tế bào xơ phôi gà 1 lớp.
- Phương pháp chuẩn độ hiệu giá virus trên môi trường tế bào xơ phôi gà 1 lớp (Reed & Muench)
- Phương pháp đông khô vaccin.
- Phương pháp kiểm tra độ ẩm, độ chân không của vaccin đông khô.
- Phương pháp kiểm tra chất lượng vaccin.
- Phương pháp xử lý số liệu

IV. Kết quả.

4.1 Khả năng thích nghi và ổn định của virus trên môi trường nuôi cấy tế bào.

Virus nhược độc đậu gà chủng C được thích nghi trên môi trường nuôi cấy tế bào xơ phôi gà một lớp. Sau khi virus thích nghi và ổn định trên môi trường nuôi cấy tế bào xơ phôi gà, tiến hành đánh giá một số chỉ tiêu của giống. Kết quả khảo sát thu được như sau:

- Giống virus đậu gà chủng C thích nghi và ổn định trên môi trường nuôi cấy tế bào xơ phôi gà một lớp sau 5 lần cấy chuyển.
- Nồng độ virus nuôi cấy thích hợp trên môi trường nuôi cấy tế bào xơ phôi gà là 1%
- Thời gian gây nhiễm virus thích hợp là sau khi nuôi cấy tế bào xơ phôi gà 1 lớp từ 24 – 48 giờ.
- Thời gian thu hoạch virus thích hợp là sau khi gây nhiễm virus từ 72 – 96 giờ.

Sau khi xác định được một số chỉ tiêu của giống, tiến hành xác định hiệu giá của giống trên môi trường nuôi cấy tế bào. Kết quả được trình bày trên bảng 1.

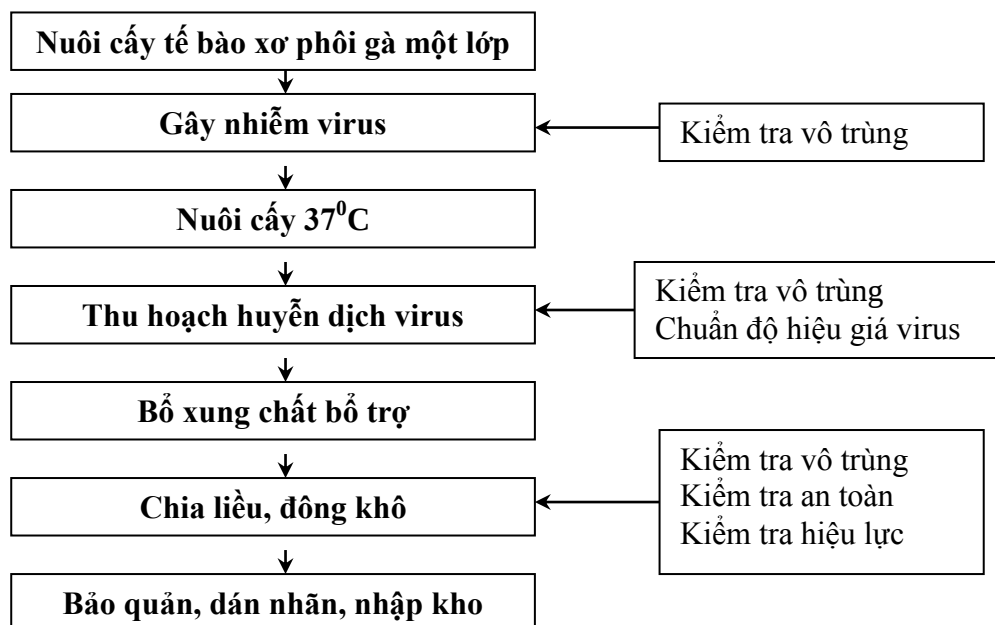
Bảng 1. Kết quả xác định hiệu giá virus của giống đậu gà chủng C trên môi trường nuôi cấy tế bào xơ phôi gà 1 lớp.

Lô TN	Độ pha loãng virus	Thời gian gây nhiễm (Giờ)	Nồng độ gây nhiễm (ml)	Số giếng tế bào TN/ nồng độ	TCID ₅₀	TCID ₅₀
I	10 ⁻² – 10 ⁻⁸	48	0,1	12	10 ^{-6,33}	10 ^{-6,36}
II	10 ⁻² – 10 ⁻⁸	48	0,1	12	10 ^{-6,75}	
III	10 ⁻² – 10 ⁻⁸	48	0,1	12	10 ^{-6,00}	

Qua bảng 1 cho thấy, hiệu giá virus của giống trên môi trường nuôi cấy tế bào xơ phôi gà 1 lớp biến động từ 10^{-6,00}/ 0,1 ml đến 10^{-6,75}/ 0,1 ml. Hiệu giá giống trung bình của virus đậu gà chủng C là 10^{-6,36}/ 0,1 ml.

4.2. Xây dựng quy trình sản xuất vaccin

Thông qua các kết quả nghiên cứu đã đạt được, kết hợp với các tiêu chuẩn của OIE chúng tôi đã xây dựng được các qui trình sau đây:



Sơ đồ 1. Quy trình sản xuất vaccin nhược đông khô Đậu gà bằng công nghệ nuôi cấy tế bào

Quy trình sản xuất vaccin đậu gà là một quy trình khép kín, toàn bộ quá trình được kiểm soát nghiêm ngặt, đặc biệt là chỉ tiêu vô trùng

4.3. Đánh giá chất lượng vaccin

Các lô vaccin thí nghiệm sau khi nghiên cứu được chúng tôi lấy mẫu theo TCN 160-92 "Vaccin thú y - Quy trình lấy mẫu và sử dụng mẫu trong kiểm nghiệm". Mẫu các lô vaccin thí nghiệm được tiến hành kiểm tra các chỉ tiêu chất lượng: thuần khiết, an toàn, hiệu lực theo TCN 196-94 «Vaccin thú y – Quy trình kiểm nghiệm vaccin đậu gà ».

4.3.1. Kết quả kiểm tra thuần khiết.

Các lô vaccin thí nghiệm được kiểm tra thuần khiết theo 10 TCN 161 – 92. Kết quả kiểm tra được trình bày trên bảng 2

Bảng 2. Kết quả kiểm tra thuần khiết các lô vaccin đậu gà tế bào

Lô sản xuất	Ngày sản xuất	Loại môi trường kiểm tra			
		Thạch máu	Thạch nấm	Nước thịt	Yếm khí
1	8/07/2010	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
2	14/07/2010	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
3	28/07/2010	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
4	13/08/2010	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
5	26/08/2010	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt

Qua kết quả kiểm tra trên bảng 2 cho thấy, các lô vaccin Đậu gà tế bào được kiểm tra thuần khiết theo 10 TCN 161 – 92 đều cho kết quả kiểm tra đạt tiêu chuẩn theo tiêu chuẩn ngành.

4.3.2. Kết quả kiểm tra an toàn.

Các lô vaccin thí nghiệm được kiểm tra an toàn trực tiếp trên bản động vật và được tiến hành theo tiêu chuẩn ngành 196 – 94. Kết quả kiểm tra được trình bày trên bảng 3.

Bảng 3. Kết quả kiểm tra an toàn vaccin đậu gà tế bào nhược độc đông khô.

Lô TN	Ngày sản xuất	Số gà TN (con)	Liều sử dụng (liều)	Đường gây nhiễm	Thời gian theo dõi	Kết quả		Kết luận
						Sống	Chết	
1	8/7/10	10	10	Chủng dưới da	14 ngày	10/10	0/10	Đạt
2	14/7/10	10	10			10/10	0/10	Đạt
3	28/7/10	10	10			10/10	0/10	Đạt
4	13/8/10	10	10			10/10	0/10	Đạt
5	26/8/10	10	10			10/10	0/10	Đạt

Theo kết quả kiểm tra trên bảng 3 cho thấy: Vaccin đậu gà tế bào sau khi chủng dưới da cho 10 gà khỏe mạnh (1 – 2 tuần tuổi), mỗi con 10 liều quy định. Sau 14 ngày theo dõi, cho thấy: Tất cả số gà được chủng đều sống khỏe, phát triển bình thường, không có phản ứng cục bộ cũng như phản ứng toàn thân.

Như vậy, các lô vaccin đậu gà tế bào thí nghiệm đều đạt kết quả kiểm tra an toàn.

4.3.3. Kết quả kiểm tra hiệu lực.

Các lô vaccin đậu gà tế bào thử nghiệm được tiến hành kiểm tra hiệu lực theo hai phương pháp là phương pháp trọng tải và phương pháp thay thế. Kết quả kiểm tra được trình bày trên bảng 4 và bảng 5

Bảng 4. Kết quả kiểm tra hiệu lực các lô vaccin đậu gà bằng phương pháp trọng tải.

Nội dung	Lô 1	Lô 2	Lô 3	Lô 4	Lô 5	Đối chứng + (cường độc)	Đối chứng – (khỏe)
Số gà thí nghiệm (Con)	10	10	10	10	10	10	10
Tuổi dùng vacxin	2 – 6 tuần tuổi					Không chủng VX	2 – 6 tuần tuổi
Tuổi công cường độc	10 ngày						Không công cường độc
Triệu chứng lâm sàng	Không					Mụn đậu trên da	Không
Bệnh tích ở da	Không						Không
Số con có bệnh tích	0	0	0	0	0	10	0
Tỷ lệ bảo hộ (%)	100	100	100	100	100	0	100

Với 5 lô thí nghiệm được thể hiện trên bảng 4 cho thấy gà được chủng vaccin sống khỏe và không biểu hiện triệu chứng bệnh tích của bệnh đậu gà sau khi công cường độc. Gà chưa sử dụng vaccin biểu hiện triệu chứng lâm sàng và bệnh tích của bệnh Đậu gà rất điển hình 100%.

Như vậy qua kiểm tra hiệu lực bằng thử thách cường độc cho thấy: Vaccin đạt tiêu chuẩn về hiệu lực, tỷ lệ bảo hộ cao.

+ Kết quả kiểm tra hiệu lực các lô vaccin đậu gà thí nghiệm bằng phương pháp thay thế.

Vaccin đông khô được pha trở lại bằng dung dịch PBS vô trùng, mỗi lô vaccin thí nghiệm được pha loãng ở 5 nồng độ từ 10^{-1} - 10^{-5} , mỗi nồng độ gây nhiễm 0,1 ml vào màng nhung niệu của trứng gà có phôi ấp 10 ngày tuổi. ấp tiếp 37°C , theo dõi trong 7 ngày. Kết quả được tính toán theo công thức Reed and Muench.

Kết quả được trình bày trên bảng 5.

Bảng 5. Kết quả kiểm tra hiệu lực các lô vaccin đậu gà bằng phương pháp thay thế

Lô TN	Ngày sản xuất	Số trứng gây nhiễm (quả)	Liều gây nhiễm (ml /quả)	Hiệu giá virus trung bình
Lô 1	8/07/2010	25	0,1	$10^{2.5}\text{EID}_{50}/\text{liều}$
Lô 2	14/07/2010	25	0,1	$10^{2.6}\text{EID}_{50}/\text{liều}$
Lô 3	28/07/2010	25	0,1	$10^{2.6}\text{EID}_{50}/\text{liều}$
Lô 4	13/08/2010	25	0,1	$10^{2.5}\text{EID}_{50}/\text{liều}$
Lô 5	26/08/2010	25	0,1	$10^{2.4}\text{EID}_{50}/\text{liều}$

Như vậy, theo kết quả kiểm tra trên bảng 5 cho thấy cả 5 lô vaccin thí nghiệm đều cho kết quả chuẩn độ hiệu giá virus $\geq 10^{2,0}$ EID₅₀/ liều. Áp dụng theo 10 TCN 196-94, cả 5 lô vaccin đậu gà tế bào thí nghiệm đều đạt kết quả kiểm tra.

V. Kết luận

- Giống gốc dùng để sản xuất vaccin đậu gà nhược độc đông khô có nguồn gốc từ Trung Quốc, giống ổn định, thích nghi trên môi trường tế bào xơ phôi gà một lớp, giống hoàn toàn vô trùng. Hiệu giá virus giống là $10^{6,36}$ TCID₅₀/ 0,1 ml
- Nồng độ 10^{-2} là nồng độ thích hợp nhất để gây nhiễm virus trên môi trường tế bào xơ phôi gà một lớp. Thời gian thu hoạch virus thích hợp nhất từ 72 – 96 giờ sau gây nhiễm
- Vaccin an toàn, được sử dụng cho gà mọi lứa tuổi.
- Vaccin đạt hiệu lực, hiệu giá 1 liều vaccin ít nhất là 10^2 EID₅₀ sẽ bảo hộ đối với gà được chủng vaccin.
- Vaccin đậu gà tế bào nhược độc đông khô do Xí nghiệp thuốc thú y TƯ nghiên cứu sản xuất đã được đánh giá chất lượng tại Xí nghiệp đạt yêu cầu theo tiêu chuẩn ngành.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Như Thanh, Trần Khâm, Nguyễn Văn Thanh. 1997. Kết quả bước đầu nghiên cứu vắc xin nhược độc đậu gà chủng C.III. Bảo quản và thực nghiệm trong sản xuất. *Khoa học kỹ thuật Nông nghiệp* số 197 tháng 11 năm 1978. Tr. 840- 843
2. Bolte, A. L., J. Meurer, E. F. and Kaleta. 1999. Avian host spectrum of avipox viruses. *Avian Pathol* 28:415—432
3. OIE, 2008. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animal