

Nghiên cứu khoa học

NGHIÊN CỨU TẠO CHỦNG VIRUS TÁI TỔ HỢP LÀM GIỐNG GỐC CHO SẢN XUẤT VACCIN CÚM GIA CẦM A/H5N1 BẰNG KỸ THUẬT DI TRUYỀN NGƯỢC

Nguyễn Thị Thu Hằng¹, Nguyễn Hùng Chí^{1,2}, Chu Hoàng Hà^{3,1}, Nguyễn Trung Nam^{2,3,4}

TÓM TẮT

Kỹ thuật di truyền ngược được ứng dụng trong tạo virus cúm A/H5N1 clade 1.1 tái tổ hợp (rg-A/H5N1 clade 1.1) làm ứng viên cho sản xuất vaccin cúm gia cầm. Hiệu quả tái tạo virus đạt cao nhất khi chuyển nhiễm hệ thống 6 + 2 plasmid đơn gen mang 6 phân đoạn gen khung nguồn gốc từ virus A/PuertoRico/8/34(H1N1) và 2 phân đoạn gen kháng nguyên H5 HA (đã được loại bỏ vùng độc) và N1 NA từ virus A/duck/Vietnam/ST0970/2009(H5N1) (clade 1.1) vào tế bào 293T trong sự có mặt của Lipofectamine-2000 trong thời gian 30 phút. Chủng virus ứng viên vaccin đã được kiểm tra là chủng độc lực thấp, có tính ổn định di truyền gen kháng nguyên H5 và N1, có khả năng thích ứng nhân lên trong trứng gà có phôi với hiệu giá HA cao. Vaccin vô hoạt nhũ dầu được sản xuất từ chủng virus rg-A/H5N1 clade 1.1 đảm bảo tính an toàn và có khả năng kích thích sinh đáp ứng miễn dịch tạo kháng thể đặc hiệu ở gà sạch 3 ngày tuổi: 20/20 gà tiêm phòng vaccin (1024 HAU) có hiệu giá kháng thể HI $\geq 4 \log_2$ sau 2 tuần và 4 tuần tiêm phòng.

Từ khóa: 293T, di truyền ngược, tái tổ hợp, vaccin, virus cúm A/H5N1.

Generating recombinant virus as a seed strain for producing A/H5N1 Avian influenza vaccine by reverse genetics

Nguyen Thi Thu Hang, Nguyen Hung Chi, Chu Hoang Ha, Nguyen Trung Nam

SUMMARY

Reverse genetics was applied to generate recombinant A/H5N1, clade 1.1 avian influenza virus (rg-A/H5N1 clade 1.1) as a candidate virus for producing vaccine against avian influenza viruses. Recombinant viruses were recovered at the highest titer using 8-plasmid DNA transfection system (6:2 plasmids) containing six backborn gene segments from A/PuertoRico/8/34(H1N1) virus and two H5 (the multi-basic site was removed) and N1 antigen gene segments of A/duck/Vietnam/ST0970/2009(H5N1) (clade 1.1) virus into 293T cells under stimulation of lipofectamine-2000 reagents for 30 minutes. The vaccine candidate strain was confirmed as a low pathogenicity avian influenza virus (LPAIV), presented genetic stability of the H5 and N1 antigen genes and grew at high yields in embryonated chicken eggs. Inactivated oil-emulsion vaccine producing from rg-A/H5N1, clade 1.1 virus presented ability in inducing immunogenicity to produce specific antibodies in 3-days-old pathogen-free chickens. 100% of vaccinated chickens (1024 HAU) presented HI ($\log_2$) antibody titers ≥ 4.0 after 2 and 4 weeks of vaccination.

Keywords: 293T, reverse genetics, recombinant, vaccine, A/H5N1 Avian influenza virus.

¹ Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Trường Đại học Lâm nghiệp

² Phòng Công nghệ ADN ứng dụng, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam

³ Phòng Thí nghiệm trọng điểm công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam

⁴ Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh cúm do virus A/H5N1 thuộc họ *Orthomyxoviridae* gây ra là bệnh truyền nhiễm cấp tính ở người và gia cầm. Khả năng gây bệnh của virus cúm A/H5N1 phụ thuộc độc lực của virus và được phân thành hai nhóm là virus độc lực cao (HPAI - highly pathogenic avian influenza) và virus độc lực thấp (LPAI - low pathogenicity avian influenza). Sự khác biệt giữa các chủng virus thuộc nhóm HPAI và LPAI được xác định ở vị trí nhận biết của protease (do tế bào tiết ra) giữa hai tiểu đơn vị HA1 và HA2 trên protein HA: Virus HPAI có protein HA chứa một nhóm (một đoạn oligopeptide ngắn) giàu các amino acid kiềm arginine (R) và lysine (K) ở vị trí nhận biết của protease và liên quan trực tiếp đến tính độc của virus nên được gọi là vùng độc; virus LPAI có protein HA chỉ chứa 1 amino acid kiềm arginine hoặc lysine ở vị trí nhận biết của protease, do vậy không chứa vùng độc (Suzuki và cs, 2005).

Virus HPAI H5N1 luôn là mối nguy hiểm tiềm ẩn trong chăn nuôi gia cầm và sức khỏe cộng đồng, tuy nhiên, ở Việt Nam, công tác sản xuất vaccin phòng chống virus cho gia cầm từ năm 2003 đến nay vẫn chủ yếu sử dụng chủng virus gốc tái tổ hợp lắp ráp bằng di truyền ngược có nguồn gốc từ nước ngoài. Để chủ động trong việc tạo ra các chủng virus vaccin có hiệu quả bảo hộ cao với các clade virus lưu hành trong nước, Việt Nam cần xây dựng và làm chủ quy trình ứng dụng kỹ thuật di truyền ngược (Reverse Genetics) để chuẩn bị sẵn sàng cho việc tạo chủng ứng viên vaccin.

Kỹ thuật di truyền ngược ứng dụng trong tái tạo chủng virus vaccin cúm từ quá trình chuyển nhiễm các plasmid mang 8 phân đoạn cDNA của virus cúm (gồm 6 phân đoạn mã hóa các protein tạo bộ khung - PB2, PB1, PA, NP, M và NS - từ virus A/PuertoRico/8/34 (PR8) và 2 phân đoạn mã hóa protein kháng nguyên - HA, NA - từ virus ứng viên đang lưu hành) vào tế bào động vật (WHO, 2018). Ưu điểm của di truyền ngược là cho phép thao tác với genome virus, tạo một hoặc một số biến đổi trong genome để loại bỏ

các yếu tố tạo nên độc lực của chủng virus, giúp tạo chủng virus vaccin an toàn (có độc lực thấp do phân đoạn gen kháng nguyên HA đã được chế biến loại bỏ vùng độc mã hóa một số các amino acid kiềm ở vị trí giữa HA1 và HA2 trong protein HA) và mang các đặc tính mong muốn (ví dụ có hiệu suất nhân giống cao trong trứng và tế bào quy định bởi các protein khung từ virus PR8) trong thời gian ngắn (Krammer và Palese, 2015).

Hướng tới mục tiêu hoàn toàn chủ động trong việc cung ứng nguồn giống virus vaccin cúm A/H5N1, nhóm nghiên cứu tiến hành tối ưu quy trình tái tạo chủng virus ứng viên vaccin phòng chống virus HPAI H5N1 clade 1.1 (có nguồn gốc phát sinh từ clade 1, xuất hiện ở Việt Nam năm 2007 và từ năm 2011 tiếp tục phân nhánh thành clade 1.1.1 và clade 1.1.2) cho gia cầm bằng di truyền ngược và đánh giá hiệu quả sinh đáp ứng miễn dịch của chủng virus ở gà sạch 3 ngày tuổi. Trong nghiên cứu, chủng virus nhược độc được lắp ráp nhân tạo bằng chuyển nhiễm hệ thống 6 + 2 plasmid pHW2000 tái tổ hợp (6 plasmid mang gen mã hóa các protein khung của virus PR8 + 2 plasmid mang gen mã hóa protein kháng nguyên vỏ HA (không chứa vùng độc) và NA của virus A/duck/Vietnam/ST0970/2009(H5N1) (clade 1.1); là bộ plasmid đã được nhóm nghiên cứu thiết kế và trình bày trong các công bố của Nguyễn Thị Thu Hằng và cs. (2017) và Nguyễn Thị Thu Hằng và cs. (2018) vào tế bào 293T).

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Các plasmid: Plasmid pBT; hệ thống 8 plasmid đơn gen gồm: 6 plasmid mang 6 phân đoạn gen khung của virus PR8 (pHW2000-PB2, pHW2000-PB1, pHW2000-PA, pHW2000-NP, pHW2000-M, pHW2000-NS) và 2 plasmid (pHW2000-HA, pHW2000-NA) mang phân đoạn gen kháng nguyên của virus A/duck/Vietnam/ST0970/2009(H5N1) (clade 1.1), trong đó gen H5 HA không chứa vùng độc.

Các cặp mồi: 8 cặp mồi nhân bản 8 phân đoạn gen của virus cúm A/H5N1 tái tổ hợp từ các mẫu RNA tổng số của

virus (vRNA) trong phản ứng RT-PCR một bước thiết kế theo Hoffmann và cs. (2001) (bảng 1).

Bảng 1. Các cặp mồi đặc hiệu để nhân bản phân đoạn gen của virus tái tổ hợp

Tên cặp mồi	Nhân gen	Trình tự nucleotide	Kích thước gen (bp)
Ba-PB2-F	PB2	TATTGGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGTC	2370
Ba-PB2-R		ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTCGTTT	
Bm-PB1-F	PB1	TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGCA	2370
Bm-PB1-R		ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGCATTT	
Bm-PA-F	PA	TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGCAGGTAC	2262
Bm-PA-R		ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTACTT	
Bm-HA-F	HA	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGG	1799
Bm-HA-R		ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT	
Bm-NP-F	NP	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGTA	1594
Bm-NP-R		ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTATTTTT	
Ba-NA-F	NA	TATTGGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGAGT	1434
Ba-NA-R		ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGAGTTTTTT	
Bm-M-F	M	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGTAG	1056
Bm-M-R		ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTAGTTTTT	
Bm-NS-F	NS	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGTG	919
Bm-NS-R		ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT	

Các nucleotide in nghiêng: Bắt cặp bổ sung với trình tự nucleotide bảo thủ của virus

Tế bào: Dòng tế bào 293T và MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) được cung cấp bởi ATCC (American Type Culture Collection, Mỹ).

Trứng gà sạch có phôi và gà sạch 3 ngày tuổi: Trứng gà sạch có phôi 9 - 11 ngày tuổi và gà sạch 3 ngày tuổi (huyết thanh không chứa kháng thể đặc hiệu với virus cúm A/H5N1) được cung cấp bởi Trung tâm Giống gia cầm Thụy Phương (Viện Chăn nuôi).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tái tạo virus cúm A/H5N1 clade 1.1 tái tổ hợp (rg-A/H5N1 clade 1.1) bằng kỹ thuật di truyền ngược

Hệ thống 6 + 2 plasmid đơn gen (nồng độ 1 µg/1 plasmid) được chuyển nhiễm vào tế bào

293T trong các đĩa 6 giếng (mật độ 1×10^6 tế bào/giếng) trong sự có mặt của hóa chất chuyển nhiễm. Thực hiện tối ưu hai yếu tố trong quá trình chuyển nhiễm là loại hóa chất chuyển nhiễm và thời gian chuyển nhiễm. Trong thí nghiệm xác định loại hóa chất chuyển nhiễm thích hợp cho quá trình tái tạo virus tái tổ hợp, sử dụng hai loại chất chuyển nhiễm là TransIT-LT (Mirus Bio LLC, Madison, USA) và Lipofectamine-2000 (Life Technologies, Darmstadt, Germany) với nồng độ và phương thức theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Trên cơ sở lựa chọn được loại hóa chất chuyển nhiễm thích hợp, tiến hành thí nghiệm tối ưu thời gian chuyển nhiễm tương ứng với loại hóa chất chuyển nhiễm đã được xác định.

Tế bào 293T sau chuyển nhiễm plasmid được nuôi cấy trong môi trường DMEM bổ sung 10% FBS và TPCK-trypsin (2 µg/ml), ở 37°C, 5%

CO₂ trong 48h. Dịch nuôi cấy tế bào sau chuyển nhiễm plasmid có khả năng chứa virus tái tổ hợp thể hệ P0 được cấy truyền vào trứng gà sạch có phôi để làm giàu virus. Xác định hiệu quả tái tạo virus trong từng công thức chuyển nhiễm thông qua hiệu giá HA (HA titer) của dịch niệu trứng đã cấy truyền virus (sau 36h làm gia tăng nồng độ virus trong trứng).

2.2.2. Chọn lọc chủng virus rg-A/H5N1 clade 1.1 có hiệu suất nhân giống cao trong trứng và kiểm tra tính ổn định di truyền của chủng virus

Nhân giống virus trong trứng gà sạch có phôi

Cấy truyền 100 µl dịch virus thể hệ P0 vào trứng gà sạch có phôi 9 - 11 ngày tuổi. Ủ trứng trong tủ ẩm ở 35°C, độ ẩm 60% trong thời gian 48h. Sau khi ủ, soi trứng để thu nhận quả có phôi sống đưa vào tủ lạnh 4°C trong 4 - 6h để giết phôi, làm co mạch máu và làm trong nước trứng. Thu nhận dịch niệu trứng (5 - 7 ml) chứa virus thể hệ P1 trong từng quả riêng rẽ vào các ống vô trùng. Ly tâm dịch niệu ở 2000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C để loại tạp chất, thu hồi dịch virus ở pha trên trong ống ly tâm.

Xác định độc lực của virus tái tổ hợp

Kiểm tra độc lực của virus tái tổ hợp bằng kỹ thuật RT-PCR nhân gen HA và phân tích trình tự gen HA. Gen HA được khuếch đại dưới dạng cDNA từ vRNA bằng kỹ thuật RT-PCR một bước (one step reverse transcriptase-polymerase chain reaction), sử dụng bộ hóa chất SuperScript™ IV One-step RT-PCR system (Invitrogen, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chu trình nhiệt của phản ứng RT-PCR: 50°C/60 phút, 94°C/10 phút, 35 chu kỳ (94°C/30 giây, 58°C/30 giây, 72°C/2 phút), 72°C/10 phút, 4°C/∞. Gen HA sau đó được tách dòng vào plasmid pBT, biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5α để khuếch đại gen và xác định trình tự nucleotide của gen trên máy đọc trình tự gen tự động ABI PRISM® 3100-Avant™ Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Mỹ). Thông tin về trình tự nucleotide của gen HA được xử lý

bằng phần mềm Bioedit (Mỹ) và chuyển sang trình tự amino acid để kiểm tra tính chính xác của gen và xác định sự có mặt của các amino acid kiểm ở vị trí giữa HA1 và HA2 (vùng độc) trong protein do gen HA mã hóa.

Xác định hiệu giá HA và hiệu giá virus

Hiệu giá HA thể hiện khả năng làm ngưng kết hồng cầu gà 0,5% và biểu thị nồng độ virus trong dịch niệu khi nhân giống virus trong trứng. Phương pháp xác định hiệu giá HA của virus được thực hiện theo hướng dẫn của WHO (2011).

Hiệu giá virus được xác định gián tiếp thông qua đếm số lượng đơn vị tạo thành plaque (plaque-forming unit, có thể quan sát và đếm sau khi nhuộm đĩa tế bào nhiễm virus với gentian violet) trên đĩa nuôi cấy tế bào MDCK lây nhiễm virus trong thí nghiệm plaque assay thực hiện theo hướng dẫn của Xue (2016).

Phân lập chủng virus có hiệu suất nhân giống cao trong trứng và kiểm tra tính ổn định di truyền của chủng virus

Chủng virus được phân lập từ các mẫu virus thể hệ P1 có hiệu giá HA và hiệu giá virus cao theo hướng dẫn của WHO (2011). Cấy truyền chủng virus vào trứng gà sạch có phôi thêm 4 lần tiếp theo (trứng của mỗi lần cấy truyền đều được ủ trong tủ ẩm ở 35°C, độ ẩm 60% trong 48h) để thu nhận chủng virus ở các thể hệ P2, P3, P4 và P5 trong dịch niệu trứng. Kiểm tra đặc điểm di truyền của virus thông qua các thí nghiệm: (1) xác định hiệu giá HA của virus thể hệ từ P2 đến P5; (2) xác định tính đầy đủ di truyền của chủng virus ở thể hệ P5 bằng phương pháp tách chiết RNA tổng số của virus trong dịch niệu trứng với kit Tripure Isolation Reagent (Invitrogen, Mỹ) và thực hiện phản ứng RT-PCR một bước nhân bản 8 phân đoạn gen trong genome virus sử dụng 8 cặp mồi đặc hiệu tương ứng với từng phân đoạn gen (bảng 1); (3) kiểm tra tính ổn định di truyền của gen kháng nguyên bằng giải trình tự nucleotide của gen H5 và N1 thể hệ P5.

2.2.3. Xác định khả năng sinh đáp ứng miễn dịch tạo kháng thể của vaccin sản xuất từ chủng virus rg-A/H5N1 clade 1.1 trên gà 3 ngày tuổi

Tạo vaccin vô hoạt nhũ dầu từ chủng virus rg-A/H5N1 clade 1.1

Chủng virus rg-A/H5N1 clade 1.1 trong dịch niêu trứng được vô hoạt bằng dung dịch formalin (37%) ở độ pha loãng 1: 2000 trong 7 ngày ở 4°C, xác định hiệu giá HA và hiệu giá virus (EID_{50}/ml) của dịch niêu trước và sau vô hoạt theo hướng dẫn của WHO (2011). Dịch niêu trứng chứa virus vô hoạt được phối trộn với dầu Montanide theo tỷ lệ 1: 1. Tính an toàn của vaccin được kiểm tra bằng tiêm 2 liều vaccin (0,5 ml/1 liều) vào da cổ gà 3 ngày tuổi. Gà ở công thức đối chứng tiêm 2 liều đệm PBS. Thống kê tình trạng bệnh tích và cân nặng của các lô gà thí nghiệm sau 4 tuần tiêm vaccin.

Xác định hiệu giá kháng thể

Gà sạch 3 ngày tuổi được tiêm phòng vaccin sản xuất từ chủng virus rg-A/H5N1 clade 1.1 theo 2 công thức: Tiêm 1 liều 0,5 ml vaccin lúc gà 3 ngày tuổi; tiêm 2 liều: Liều 1 tiêm 0,2 ml vaccin lúc gà 3 ngày tuổi và tiêm nhắc lại liều 0,5 ml vaccin sau 10 ngày. Mỗi công thức thí nghiệm tiêm 20 gà. Công thức đối chứng tiêm đệm PBS. Xác định hiệu quả sinh đáp ứng miễn dịch tạo kháng thể đặc hiệu của từng loại vaccin bằng phương pháp xác định hiệu giá HI (Haemagglutination Inhibition) được thực hiện theo hướng dẫn của WHO (2011). Từ kết quả về

hiệu giá HI, tính hiệu giá kháng thể trung bình hình học GMT (geometric mean titer) của các mẫu có hiệu giá HI $\geq 4 \log_2$.

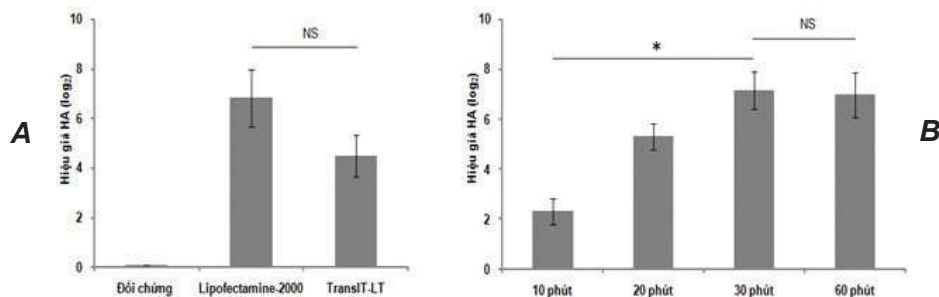
2.2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả xác định trình tự nucleotide của gen được phân tích bằng các phần mềm tin-sinh như Bioedit (Mỹ), chương trình BLAST (NCBI). Các số liệu thực nghiệm được xử lý thống kê bằng chương trình Excel để tính toán giá trị trung bình mẫu, độ lệch chuẩn (SD), kiểm tra sự khác biệt giữa các giá trị trung bình ($P < 0,05$).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tối ưu điều kiện chuyển nhiễm hệ thống 6 + 2 plasmid đơn gen vào tế bào 293T cho tái tạo virus rg-A/H5N1 clade 1.1

Lipofectamine-2000 và TransIT-LT là hai loại hóa chất thường được sử dụng trong chuyển nhiễm các plasmid mang DNA ngoại lai vào tế bào 293T (Avci-Adali và cs., 2014). Kết quả xác định ảnh hưởng của Lipofectamine-2000 và TransIT-LT đến hiệu quả tái tạo virus rg-A/H5N1 clade 1.1 thông qua giá trị hiệu giá HA ($\log_2$) (hình 1A) cho thấy: Hiệu giá HA ($\log_2$) trung bình của virus ở công thức bổ sung chất chuyển nhiễm Lipofectamine-2000 là 6,83 - đạt cao hơn và có sự khác biệt thống kê so với công thức bổ sung TransIT-LT (4,5). Do vậy, Lipofectamine-2000 là chất kích thích chuyển nhiễm được lựa chọn để nghiên cứu nâng cao hiệu quả chuyển nhiễm bằng tối ưu thời gian chuyển nhiễm.



Hình 1. Ảnh hưởng của loại hóa chất chuyển nhiễm và thời gian chuyển nhiễm đến hiệu quả tái tạo virus rg-A/H5N1 clade 1.1

A. Ảnh hưởng của loại hóa chất chuyển nhiễm,

B. Ảnh hưởng của thời gian chuyển nhiễm bằng Lipofectamine-2000. NS (not significant): Khác biệt không có ý nghĩa thống kê;

Kết quả (hình 1B) cho thấy tương ứng với các thời gian chuyển nhiễm khác nhau, đã nhận được hiệu quả tái tạo virus tái tổ hợp khác nhau. Thời gian chuyển nhiễm 10 phút và 20 phút là chưa đủ để đạt hiệu quả chuyển nhiễm cao của plasmid vào tế bào - hiệu giá HA ($\log_2$) của virus là 2,33 và 5,33 tương ứng. Công thức có thời gian chuyển nhiễm 30 phút và 60 phút cho hiệu giá HA ($\log_2$) của virus là cao (đạt 7,17 và 7,0 tương ứng), và số liệu thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với các công thức khác. Trong hai khoảng thời gian chuyển nhiễm là 30 phút và 60 phút, hiệu quả chuyển nhiễm ở công thức 30 phút cao hơn và không thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với công thức 60 phút. Số liệu nhận được cho phép lựa chọn thời gian chuyển nhiễm bằng Lipofectamine-2000 thích hợp cho tái tạo virus rg-A/H5N1 clade 1.1 là 30 phút.

3.2. Kiểm tra tính an toàn và xác định khả năng thích ứng nhân lên trong trứng của virus tái tổ hợp

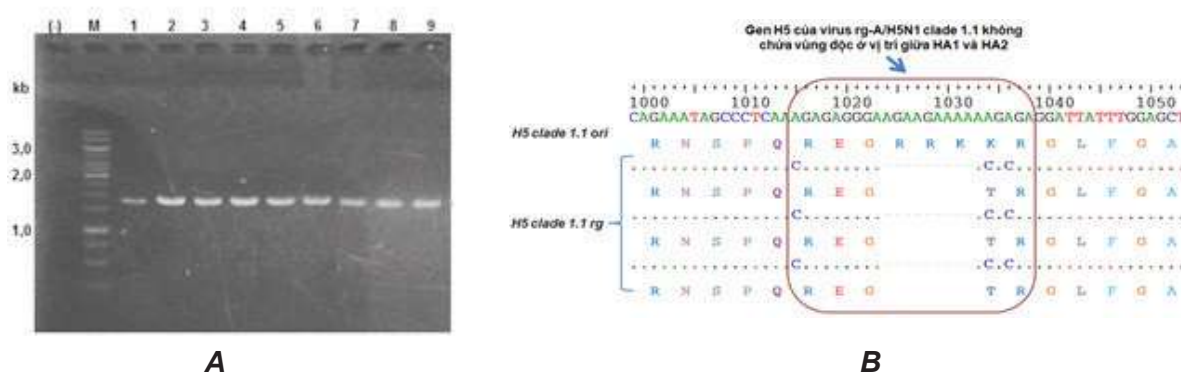
Các thí nghiệm chuyển nhiễm hệ thống

plasmid mang các phân đoạn cDNA cho phép tái tạo virus rg-A/H5N1 clade 1.1 thể hệ P0 (genome gồm 6 phân đoạn gen khung nguồn gốc từ virus PR8 (H1N1) và 2 phân đoạn gen kháng nguyên nguồn gốc từ virus A/H5N1 clade 1.1) trong tế bào 293T dưới sự có mặt của chất chuyển nhiễm Lipofectamine 2000 trong thời gian 30 phút đã được thực hiện. Thu nhận các mẫu virus rg-A/H5N1 clade 1.1 thể hệ P0 (9 mẫu, lựa chọn ngẫu nhiên từ các đĩa 6 giếng nuôi cấy tế bào 293T sau chuyển nhiễm plasmid) để kiểm tra độc lực của virus ở mức độ phân tử. Do độc lực của virus quy định bởi protein HA, nên các thí nghiệm tách chiết RNA tổng số của virus, thực hiện phản ứng RT-PCR nhân gen HA từ RNA và xác định trình tự nucleotide của gen HA đã được thực hiện. Bên cạnh đó, virus rg-A/H5N1 clade 1.1 thể hệ P0 được cấy truyền vào trứng gà sạch có phôi, ủ ở 35°C, độ ẩm 60% trong 48h và thu hoạch mẫu dịch niệu trứng chứa virus thể hệ P1 để xác định hiệu giá HA và hiệu giá virus của từng mẫu virus. Kết quả nhận được trình bày ở bảng 2 và hình 2.

Bảng 2. Kiểm tra tính an toàn và hiệu suất nhân giống trong trứng của virus rg-A/H5N1 clade 1.1

Ký hiệu mẫu virus	Kiểm tra tính an toàn của virus ở mức độ phân tử quy định bởi gen HA			Xác định hiệu suất nhân giống virus trong trứng	
	Sản phẩm RT-PCR nhân bản gen HA	Xác định trình tự gen HA	Sự có mặt của vùng độc trong gen HA	Hiệu giá HA trung bình ($\log_2$)	Hiệu giá virus trung bình ($\log_{10}$ PFU/ml)
rg1.1	+	KTĐ	-	10,67 ± 0,60	8,92 ± 0,44
rg1.2	+	KTĐ	-	9,33 ± 0,60	8,52 ± 0,46
rg1.3	+	KTĐ	-	7,00 ± 0,00	7,54 ± 0,47
rg2.1	+	KTĐ	-	11,33 ± 0,60	9,16 ± 0,09
rg2.2	+	KTĐ	-	8,67 ± 0,60	7,86 ± 0,59
rg2.3	+	KTĐ	-	8,33 ± 0,60	7,83 ± 0,57
rg3.1	+	KTĐ	-	5,33 ± 1,20	6,88 ± 0,64
rg3.2	+	KTĐ	-	5,33 ± 0,60	6,49 ± 0,59
rg3.3	+	KTĐ	-	10,00 ± 0,00	8,63 ± 0,50

(+): Sản phẩm RT-PCR dương tính với băng đặc hiệu kích thước khoảng 1,8 kb; KTĐ: Trình tự nucleotide của phân đoạn gen (gen HA) được nhân bản trong phản ứng RT-PCR không thay đổi so với trình tự gen HA clade 1.1 trong plasmid pHW2000; (-): Không có các amino acid kiểm ở vị trí vùng độc của gen HA.



Hình 2. Điện di kiểm tra sản phẩm phản ứng RT-PCR nhân bản gen HA và phân tích trình tự gen HA

A. Điện di kiểm tra sản phẩm phản ứng RT-PCR nhân gen HA. (-): Mẫu đối chứng; M: Marker 1kb; 1 - 9: Sản phẩm RT-PCR nhân gen HA của 9/9 mẫu virus rg-A/H5N1 clade 1.1

B. Trình tự nucleotide của gen HA H5 trong genome virus rg-A/H5N1 clade 1.1 không chứa vùng độc và không bị lại độc. H5 clade 1.1 ori: Gen HA của virus A/duck/Vietnam/ST0970/2009(H5N1) (clade 1.1) trên ngân hàng NCBI chứa vùng độc; H5 clade 1.1 rg: Gen HA của virus rg-A/H5N1 clade 1.1 không chứa vùng độc

Kết quả kiểm tra cho thấy 9/9 mẫu dịch nuôi cấy tế bào 293T sau biến nạp plasmid đều dương tính với phản ứng RT-PCR nhân gen HA (hình 2A): Sản phẩm phản ứng RT-PCR khi điện di kiểm tra trên gel agarose 1,5% xuất hiện một băng đặc hiệu kích thước khoảng 1,8 kb, phù hợp với kích thước lý thuyết của gen HA.

Kết quả kiểm tra trình tự nucleotide của sản phẩm phản ứng RT-PCR cho thấy phân đoạn gen HA đã được nhân bản thành công và có trình tự nucleotide không thay đổi (không bị đột biến) so với trình tự gen HA clade 1.1 trong plasmid pHW2000 và không chứa vùng độc. Cụ thể, gen H5 clade 1.1 có kích thước 1799 bp, mã hóa 565 amino acid không chứa một nhóm các amino acid kiềm (không chứa vùng độc) ở vị trí giữa HA1 và HA2 (hình 2B): Vị trí amino acid 338 - 344 của gen HA ở virus rg-A/H5N1 clade 1.1 là QREGT-RG, trong khi ở chủng gốc A/duck/Vietnam/ST0970/2009(H5N1) (clade 1.1), vị trí 338 - 347 là QREGRRKK-RG (chứa 4 amino acid kiềm -RRKK- ở vị trí nhận biết của protease). Đặc điểm không chứa vùng độc trong gen HA quy định tính độc lực thấp của virus tái tổ hợp, bên cạnh đó, trình tự amino acid của protein do gen HA mã hóa cũng thể hiện sự không thể bị

lại độc của virus tái tổ hợp do amino acid lysine (K, vị trí 345) được thay thế bằng threonine (T, vị trí 342).

Kết quả phân tích trình tự gen HA khẳng định sự an toàn ở mức độ phân tử (là virus độc lực thấp) của các mẫu virus rg-A/H5N1 clade 1.1.

Tiêu chí để lựa chọn chủng virus ứng viên vaccin cúm A/H5N1 ở gia cầm không chỉ căn cứ vào đặc điểm di truyền và tính kháng nguyên, mà còn xét đến khả năng thích ứng nhân lên trong trứng, vì phương pháp nhân giống virus cho sản xuất vaccin cúm gia cầm hiện nay vẫn chủ yếu là nhân trong trứng. Khả năng thích ứng nhân lên của virus rg-A/H5N1 clade 1.1 trong trứng gà sạch có phôi được đánh giá thông qua hiệu giá HA và hiệu giá virus. Hiệu giá HA ($\log_2$) của các mẫu virus thế hệ P1 là 5,33 - 11,33. Hiệu giá virus của từng mẫu được tính toán dựa vào số lượng plaque (vết tan tế bào) tạo thành trên các đĩa tế bào MDCK và có giá trị 6,49 - 9,16 $\log_{10}$ PFU/ml. Trong số các mẫu virus tái tổ hợp, có 3/9 mẫu - rg1.1, rg2.1 và rg3.3 - có giá trị về hiệu giá HA và hiệu giá virus cao hơn cả: Hiệu giá HA ($\log_2$) là 10,67; 11,33 và 10,00 tương ứng, hiệu giá virus ($\log_{10}$ PFU/ml) là 8,92; 9,16

và 8,63 tương ứng. Do vậy, chủng virus ứng viên vaccin đã được tiến hành phân lập từ các mẫu rg1.1, rg2.1 và rg3.3.

3.3. Phân lập và kiểm tra tính ổn định di truyền của chủng virus ứng viên vaccin

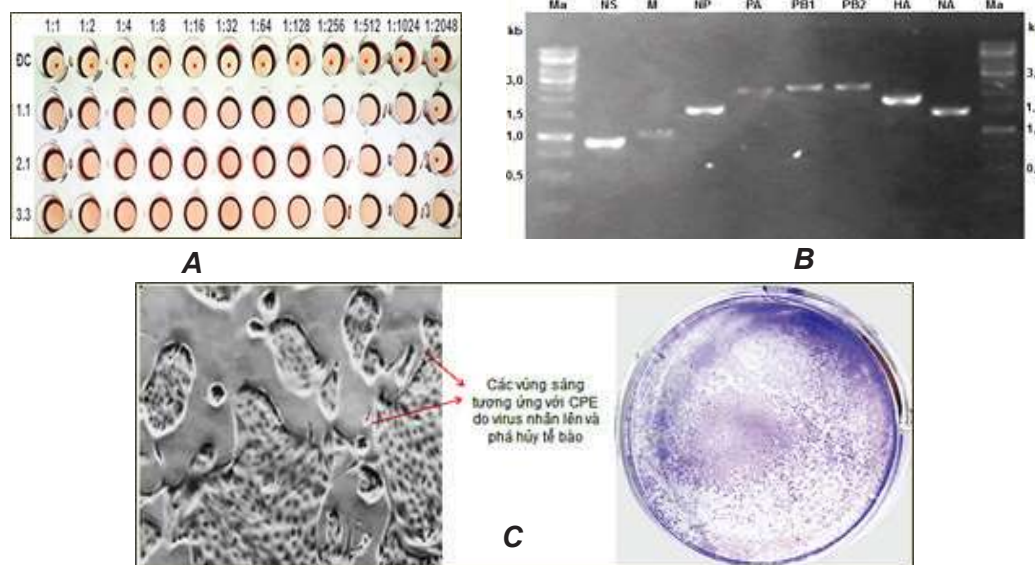
Các chủng virus ứng viên đã phân lập được cấy truyền và nhân giống 4 thế hệ tiếp theo trong trứng gà sạch có phôi và thu nhận được chủng virus thế hệ P2, P3, P4 và P5. Hiệu suất nhân giống trong trứng và tính ổn định di truyền

của từng chủng virus được xác định thông qua: Hiệu giá HA của thế hệ P2 - P5; tính đầy đủ di truyền bằng thực hiện kỹ thuật RT-PCR nhân bản 8 phân đoạn gen (PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M và NS) của virus thế hệ P5 với mỗi đặc hiệu của từng gen; xác định trình tự nucleotide của hai gen kháng nguyên (HA, NA) của virus thế hệ P5. Bên cạnh đó, sự thích ứng nhân lên của chủng virus thế hệ P5 trên tế bào MDCK cũng được kiểm tra. Kết quả nhận được thống kê ở bảng 3 và một phần kết quả thể hiện ở hình 3.

Bảng 3. Kiểm tra tính ổn định di truyền của chủng virus rg-A/H5N1 clade 1.1

Ký hiệu chủng virus	Tỷ lệ trứng có hiệu giá HA $\geq 1: 1024$ ở các thế hệ (%)				Phản ứng RT-PCR nhân 8 phân đoạn gen	Trình tự gen HA	Trình tự gen NA	Khả năng tạo CPE trên tế bào MDCK
	P2	P3	P4	P5				
1.1	100	100	100	100	+	KTĐ	KTĐ	+
2.1	100	100	100	100	+	KTĐ	KTĐ	+
3.3	100	100	100	100	+	KTĐ	KTĐ	+

(+): Sản phẩm RT-PCR dương tính với 8 phân đoạn gen có kích thước đúng theo lý thuyết/ Có khả năng tạo plaque trên tế bào MDCK; KTĐ: Không thay đổi



Hình 3. Kiểm tra đặc tính của chủng virus ứng viên vaccin phòng chống cúm A/H5N1 clade 1.1 ở gia cầm

A. Xác định hiệu giá HA của chủng virus. ĐC: Đối chứng; 1.1, 2.1, 3.3: Ký hiệu chủng virus; 1: 1 - 1: 2048: Nồng độ pha loãng virus; B. Nhân bản 8 phân đoạn gen của chủng virus thế hệ P5 bằng kỹ thuật RT-PCR. Ma: Marker 1 kb; NS, M, NP, PA, PB1, PB2, HA, NA: Sản phẩm RT-PCR của 8 phân đoạn gen (tương ứng) trong genome của chủng virus; C. Chủng virus thế hệ P5 có khả năng thích ứng nhân lên trên tế bào MDCK và tạo thành các CPE có thể quan sát dưới kính hiển vi (hình bên trái, độ phóng đại x100) và sau khi nhuộm đĩa tế bào nhiễm virus với gentian violet (hình bên phải).

Kết quả nhận được cho thấy: Cả ba chủng virus đã phân lập có hiệu giá HA luôn ổn định ở mức $HA \geq 1: 1024$ ở các thế hệ P2 đến P5 (Hình 3A); virus thế hệ P5 có kết quả RT-PCR dương tính với cả 8 phân đoạn vRNA là PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M và NS (hình 3B) với kích thước đúng theo tính toán lý thuyết; có trình tự gen kháng nguyên H5 HA và N1 NA không thay đổi (không bị đột biến) so với các trình tự gen tương ứng đã được tách dòng vào plasmid pHW2000 và trình tự gen HA không chứa vùng độc; chủng virus thế hệ P5 có khả năng thích ứng nhân lên trên tế bào MDCK thể hiện ở việc xuất hiện các CPE (cytopathic effect) tương ứng với các vùng sáng do tế bào MDCK bị hủy hoại bởi sự lây nhiễm và nhân lên của virus (hình 3C). Kết quả nhận được chứng tỏ cả ba chủng virus rg-A/H5N1 clade 1.1 đã phân lập đều đáp ứng tiêu chí của chủng virus ứng viên cho sản xuất vaccin cúm A sử dụng cho gia cầm.

3.4. Xác định khả năng kích thích sinh đáp ứng miễn dịch của virus rg-A/H5N1 clade 1.1 ở gà sạch 3 ngày tuổi

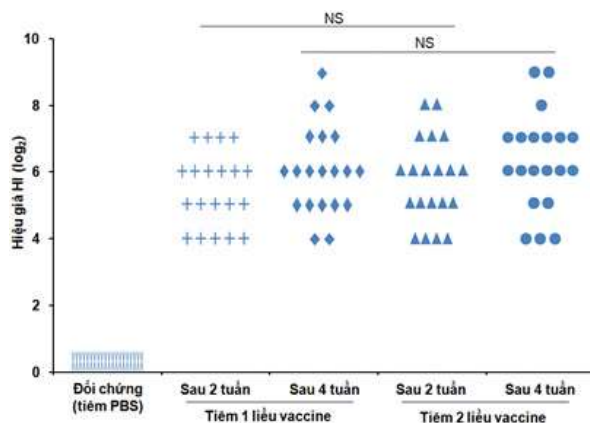
Vaccin vô hoạt nhũ dầu được sản xuất từ chủng virus rg-A/H5N1 clade 1.1 với liều lượng kháng nguyên (HAU - Haemagglutination Unit) trước vô hoạt đạt $1: 1024$, có màu trắng đục, đồng nhất, không phân lớp. Tính an toàn của vaccin được xác định thông qua khảo sát tình trạng cân nặng, bệnh tích của gà 3 ngày tuổi tiêm 2 liều vaccin (0,5 ml/1 liều) sau 4 tuần theo dõi. Kết quả (bảng 4) chỉ ra gà ở lô tiêm vaccin và gà ở lô đối chứng (tiêm đệm PBS) đều khỏe mạnh, không biểu hiện tình trạng viêm ở vị trí tiêm, không biểu hiện bệnh cúm và tăng trọng bình thường, không có sự khác biệt về cân nặng. Do vậy, vaccin là an toàn đối với gà 3 ngày tuổi khi tiêm 2 liều vaccin (0,5 ml vaccin/liều) chứa HAU $1: 1024$.

Bảng 4. Ảnh hưởng của chế phẩm vaccin rg-A/H5N1 clade 1.1 đến sức sống và khả năng kích thích sinh kháng thể đặc hiệu của gà 3 ngày tuổi

Chỉ tiêu theo dõi	Đối chứng (tiêm PBS)		Vaccin từ virus rg-A/H5N1 clade 1.1	
	Tiêm 1 liều	Tiêm 2 liều	Tiêm 1 liều	Tiêm 2 liều
Số gà thí nghiệm	20	20	20	20
Số gà sống sau tiêm	20/20	20/20	20/20	20/20
Số gà biểu hiện viêm/ bệnh tích sau tiêm	0/20	0/20	0/20	0/20
GMT ($\log_2$) trước tiêm	<1/2	<1/2	<1/2	<1/2
GMT ($\log_2$) sau tiêm 2 tuần	<1/2	<1/2	5,45	5,70
GMT ($\log_2$) sau tiêm 4 tuần	<1/2	<1/2	6,05	6,30

Gà 3 ngày tuổi ở tất cả các lô trong thí nghiệm trước tiêm phòng đều không có miễn dịch (huyết thanh không chứa kháng thể thụ động) với virus cúm A/H5N1, thể hiện ở hiệu giá kháng thể trung bình hình học (GMT) < $1/2 \log_2$. Sau 2 và 4 tuần tiêm phòng, hiệu giá kháng thể (hiệu giá HI) của 100% cá thể gà (20/20) ở các lô tiêm vaccin (tiêm 1 liều hoặc tiêm 2 liều) đều đạt $\geq 4 \log_2$, trong khi tất cả gà ở lô chứng âm không có đáp ứng tạo kháng thể với hiệu giá HI < $1/2 \log_2$ (hình 4). Cụ thể, giá trị GMT

của gà tiêm vaccin ở công thức tiêm 1 liều là $5,45 \log_2$ (tuần 2) và $6,05 \log_2$ (tuần 4), giá trị GMT của công thức tiêm 2 liều đạt cao hơn - $6,05 \log_2$ (tuần 2) và $6,30 \log_2$ (tuần 4) - nhưng không thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với công thức tiêm 1 liều. Kết quả nhận được thể hiện vaccin từ virus rg-A/H5N1 clade 1.1 có khả năng kích thích sinh đáp ứng miễn dịch tạo kháng thể đặc hiệu ở gà sạch 3 ngày tuổi tiêm phòng 1 liều hoặc 2 liều vaccin có HAU $1: 1024$ với hiệu giá HI $\geq 4 \log_2$.



Hình 4. Hiệu giá HI trong huyết thanh của các lô gà thí nghiệm sau 2 và 4 tuần tiêm phòng vaccin chứa kháng nguyên virus rg-A/H5N1 clade 1.1

NS: Khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$

Hiệu quả sinh đáp ứng tạo kháng thể của vaccin sản xuất từ chủng virus rg-A/H5N1 clade 1.1 ở gia cầm là tương đương khi so sánh với hiệu giá kháng thể tạo ra khi tiêm phòng vaccin cúm A/H5N1 nguồn gốc di truyền ngược cho gia cầm trong công bố của Lee và cs (2013): Gà 6 tuần tuổi tiêm vaccin sản xuất từ chủng virus A/Chicken/Korea/ES/2003(H5N1) nguồn gốc di truyền ngược đạt hiệu giá kháng thể trung bình là 7,5 log₂ sau 3 tuần tiêm 1 liều vaccin (10⁷ - 10⁸ EID₅₀/liều); Jang và cs (2017): Gà 3 tuần tuổi tiêm phòng 1 ml vaccin (10⁷ EID₅₀/ml) sản xuất từ chủng virus cúm A/H5N1 nguồn gốc di truyền ngược (chủng K10-483), sau 4 tuần sinh đáp ứng miễn dịch tạo kháng thể với hiệu giá HI trung bình là 6,0 log₂.

IV. KẾT LUẬN

- Virus cúm A/H5N1 tái tổ hợp (rg-A/H5N1 clade 1.1) đã được lắp ráp nhân tạo thành công bằng kỹ thuật di truyền ngược sau khi chuyển nhiễm hệ thống 6 + 2 plasmid (6 plasmid mang các phân đoạn gen khung của virus PR8 (H1N1) và 2 plasmid mang gen kháng nguyên HA và NA của virus A/H5N1 clade 1.1) vào tế bào 293T. Điều kiện chuyển nhiễm thích hợp

cho tái tạo virus là sử dụng chất chuyển nhiễm Lipofectamine-2000 trong thời gian 30 phút. Virus rg-A/H5N1 clade 1.1 là an toàn ở mức độ phân tử do gen HA đã được loại bỏ vùng độc và tránh lại độc.

- Đã phân lập được chủng virus rg-A/H5N1 clade 1.1 đáp ứng yêu cầu của chủng ứng viên vaccin: Có hiệu suất nhân giống cao trong trứng gà sạch có phôi với hiệu giá HA $\geq 1: 1024$, có sự ổn định di truyền gen kháng nguyên (gen HA và NA của chủng virus không thay đổi khi nhân trong trứng đến thế hệ P5).

- Vaccin sản xuất từ chủng virus rg-A/H5N1 clade 1.1 đảm bảo tính an toàn, có khả năng kích thích sinh đáp ứng miễn dịch tạo kháng thể đặc hiệu khi tiêm phòng cho gà sạch 3 ngày tuổi: Ở thời điểm tuần 2 và tuần 4 sau tiêm phòng vaccin (HAU 1: 1024), 100% gà có hiệu giá HI ≥ 4 log₂.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện trong khuôn khổ đề tài cấp Nhà nước “Nghiên cứu tạo giống gốc để sản xuất vaccin cúm A/H5N1” 2016-2018 (Mã số SPQG.05b.03), tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG, Perez DR (2001). Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol* 146: 2275–2289.
- Jang JW, Lee CY, Kim IH, Choi JG, Lee YJ, Yuk SS, Lee JH, Song CS, Kim JH, Kwon HJ (2017). Optimized clade 2.3.2.1C H5N1 recombinant-vaccine strains against highly pathogenic avian influenza. *J Vet Sci* 18(S1): 299–306.
- Krammer F, Palese P (2015). Advances in the development of influenza virus vaccines. *Nat Rev Drug Discov* 14(3): 167–182.
- Lee DH, Park JK, Kwon JH, Yuk SS,

- Erdene-Ochir TO, Jang YH, Seong BL, Lee JB, Park SY, Choi IS, Song CS (2013). Efficacy of single dose of a bivalent vaccine containing inactivated Newcastle disease virus and reassortant highly pathogenic avian influenza H5N1 virus against lethal HPAI and NDV infection in chickens. *PLoS ONE* 8(3): e58186.
5. Nguyễn Thị Thu Hằng, Hoàng Thị Thu Hằng, Nguyễn Hùng Chí, Chu Hoàng Hà, Nguyễn Trung Nam (2017). Nhân dòng vector pHW2000 tái tổ hợp mang gen HA làm nguyên liệu tạo chủng gốc ứng dụng sản xuất vaccine cúm A/H5N1. *Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội* 33(1S): 159–167.
 6. Nguyễn Thị Thu Hằng, Nguyễn Hùng Chí, Hoàng Thị Thu Hằng, Vũ Huyền Trang, Chu Hoàng Hà, Nguyễn Trung Nam (2017). Tách dòng sáu gen khung virus cúm vào vector pHW2000 phục vụ tạo chủng gốc vaccine cúm A/H5N1 bằng kỹ thuật di truyền ngược. *Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội* 33(2): 9–16.
 7. Suzuki T, Takahashi T, Guo CT, Hidari KI, Miyamoto D, Goto H, Kawaoka Y, Suzuki Y (2005). Sialidase activity of influenza A virus in an endocytic pathway enhances viral replication. *J Virol* 79 (18): 11705–11715.
 8. WHO (2018). Guidelines for the safe development and production of vaccines 6 to human pandemic influenza viruses and viruses with 7 pandemic potential: 3–45.
 9. WHO (2011). Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza: 35–114.
 10. Xue J, Chambers BS, Hensley SE, López CB (2016). Propagation and characterization of influenza virus stocks that lack high levels of defective viral genomes and hemagglutinin mutations. *Front Microbiol* 7: 326.

Ngày nhận 24-10-2019

Ngày phản biện 3-12-2019

Ngày đăng 1-1-2020