

THÍCH NGHI CÂY CHUYỀN CHŨNG VIRUT ĐẠI PV QUA TẾ BÀO

*Nguyễn Kim Dung, Trần Thị Mỹ Dung, Nguyễn Văn Thương, Mai Thu Thảo
Viện Pasteur tp. Hồ Chí Minh,*

Tóm tắt

Chủng virut đại PV14 có nguồn gốc từ chủng PV13 của Viện Pasteur Paris, vốn chỉ thích nghi tiêm truyền qua não động vật. Việc thích nghi chủng để có thể nhân lên trong tế bào là cần thiết khi nghiên cứu phát triển vaccin đại từ nuôi tế bào dùng cho người và động vật ở nước ta. Chủng PV14/não thỏ đã được tiến hành thích nghi cây chuyền qua tế bào BHK-21 và Vero (WHO). Sau 4 lần cây chuyền qua BHK-21, hiệu giá chủng đạt $10^{6,9}$ FFU/ml. Cây chuyền qua tế bào Vero 3 lần từ PV17/BHK-21, hiệu giá virut đạt $10^{6,3}$ FFU/ml. Kháng nguyên từ chủng PV/BHK-21 có tính sinh miễn dịch và hiệu quả bảo vệ chuột nhất trắng tốt. 80 – 100% chuột có mức kháng thể đủ bảo vệ ($> 0,5$ IU/ml) sau 2 và 4 tuần tiêm kháng nguyên. 70 – 90% chuột sống sót sau khi được tiêm 2 mũi kháng nguyên các liều 1/125 – 1/5 và thử thách vào não 68 LD₅₀ chủng CVS/não chuột.

Từ khóa: Chủng virut đại PV và CVS; Vaccin đại từ nuôi tế bào; Đáp ứng kháng thể; Hiệu quả bảo vệ.

ADAPTATION OF RABIES VIRUS PV STRAIN IN CELL CULTURE

Nguyễn Kim Dung, Trần Thị Mỹ Dung, Nguyễn Văn Thương, Mai Thu Thảo

Summary

Rabies virus PV14 strain is rabbit-brain fixed rabies virus originally from PV13 strain of Pasteur Institute in Paris since 1992. Adaptation of this strain for research and development of cell-culture rabies vaccines in Vietnam is necessary. Rabies virus PV14/rabbit-brain was adapted in BHK-21 and Vero (WHO) cell culture. Virus titre of PV/BHK-21 strain reached $10^{6,9}$ FFU/ml after 4 times passed in BHK-21. Following 3 times passed in Vero (WHO) cell, titre of PV/Vero was $10^{6,3}$ FFU/ml. Antigen from PV/BHK-21 induced a good antibody response and protective effect. 80 – 100% mice got protective antibody level ($>0,5$ IU/ml) in 2 and 4 weeks. 70 – 90% mice were survived after 2 injections of antigen at 1/125 – 1/5 dilution and challenged in cerebral inoculation by 68 LD₅₀ of rabies challenge virus train (CVS).

Key words: Rabies virus PV and CVS strain; Cell culture rabies vaccine; Antibody response; Protective effect.

1. Đặt vấn đề

Tất cả các chủng virut đại dùng làm vaccin cho người và động vật hiện nay đều là con cháu của một trong ba chủng bố mẹ duy nhất là chủng nguyên thủy Pasteur 1882, chủng Flury và SAD [1].

Trong đó, chủng PV13 (Viện Pasteur Tp. HCM nhận từ Viện Pasteur Paris năm 1991) có nguồn gốc từ chủng Pasteur 1882 [2]. Năm 1992, chủng này đã được tiêm truyền qua não thỏ con và đông khô thành chủng PV14. Từ đó được sử dụng để sản xuất vaccin đại dùng cho người cho đến năm 2006 tại Viện Pasteur Tp. HCM cũng như ở các Viện sản xuất vaccin của Việt Nam. Sau năm 2007, khi vaccin từ não chuột sơ sinh không còn được dùng để phòng bệnh đại cho người ở nước ta, đã có một số nghiên cứu phát triển vaccin đại dùng cho người và động vật bằng kỹ thuật nuôi tế bào nhằm chủ động nguồn vaccin đại trong nước. Do khó có thể có chủng virut đại đã thích nghi qua nuôi cấy tế bào từ các nhà sản xuất vaccin đại khác, Tổ chức Y tế thế giới cũng không có chính sách cung ứng chủng sản xuất vaccin đại, bên cạnh đó, kỹ thuật và điều kiện triển khai nuôi cấy tế bào rất thuận lợi tại Viện Pasteur Tp. HCM, nhóm nghiên cứu đã

tiến hành thích nghi cấy chuyền chủng PV14 qua nuôi cấy 2 dòng tế bào Vero và BHK-21. Virut đại chủng PV cấy chuyền qua nuôi cấy tế bào BHK-21 (PV/BHK) sau khi bắt hoạt đã được kiểm tra tính sinh miễn dịch và hiệu quả bảo vệ chuột nhất trắng, so sánh với chủng CVS cấy chuyền qua tế bào BHK-21 (CVS/BHK).

II Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Vật liệu

- **Chủng PV14/não thỏ** nhận được từ tiêm truyền chủng PV13 qua não thỏ con năm 1992. Chủng được bảo quản ở -73°C dưới dạng huyền dịch não 10% đông khô. Hiệu giá của chủng đạt $10^{6,52}$ LD50/ml khi chuẩn độ trên chuột.
- **Chủng CVS/BHK-21** nhận từ Viện Pasteur Paris năm 1992. Chủng này đã được thích nghi cấy chuyền qua tế bào BHK-21 355 lần. Sau 6 lần cấy chuyền thêm ở Viện Pasteur Tp. HCM., chủng được bảo quản ở đời cấy 361. Hiện là chủng dùng cho thử nghiệm kiểm tra hiệu giá kháng thể trung hòa virut đại trên tế bào. Chủng này cũng được nghiên cứu dùng sản xuất vacxin đại từ nuôi tế bào dùng cho thú y.
- **Tế bào BHK-21** nhận từ Trung tâm kiểm soát bệnh CDC Atlanta năm 1998. Sau khi cấy chuyền thêm 4 lần, ngân hàng tế bào BHK-21 làm việc được bảo quản ở -73°C . Các tế bào lấy ra sử dụng được cấy chuyền thêm 2 – 3 lần trước khi thích nghi cấy chuyền chủng PV14/ não thỏ.
- **Tế bào Vero (WHO) ECACC 88020401** nhận được từ Ngân hàng chủng giống châu Âu (ECACC) năm 2005. Ngân hàng tế bào gốc (MCB) Vero ở đời cấy 137P và Ngân hàng tế bào làm việc (WCB) Vero ở đời cấy 139P được bảo quản – 196°C . Tế bào Vero ở đời cấy 140P và 141P được dùng để cấy chuyền từ chủng PV/BHK-21.
- **Chuột nhất trắng Swiss** 14 – 16g của Viện Pasteur Tp. HCM được dùng để kiểm tra tính sinh miễn dịch và hiệu quả bảo vệ của các kháng nguyên từ chủng PV/BHK-21 và CVS/BHK-21.

2.2 Phương pháp

-Thích nghi cấy chuyền chủng PV14 qua nuôi cấy tế bào BHK-21 và Vero:

2 ống chủng PV14/não thỏ 10% đông khô được pha trong 2ml môi trường M199 1% huyết thanh bào thai bò (M199/1%FBS). Sau khi lắc bằng máy trộn Vortex 600rpm/2 phút, huyền dịch được ly tâm 6000 vòng/phút trong 2 phút. Pha 1ml dịch nổi và 10 ml M199/1%FBS, lọc 0,45 μm . Cấy 0,2 ml dịch qua lọc vào mỗi giếng của phiến 12 giếng đã có thảm tế bào BHK-21 2 ngày. Láng đều và ủ $36,5^{\circ}\text{C}$ trong 1 giờ. Cho vào mỗi giếng 1 ml M199/1%FBS. Ủ phiến trong tủ ẩm $36,5^{\circ}\text{C}$ có 5%CO₂. Thay môi trường M199/1%FBS cho tất cả các giếng vào ngày thứ 7. Ngày thứ 11, gạt dịch nổi trong từng giếng vào 1 ống Cryo đáy nhọn. Kiểm tra sự hiện diện của virut đại trong dịch gạt bằng cách cấy 0,1 ml lên thảm tế bào BHK-21 trong phiến 96 giếng, thêm 0,1 ml M199/1%FBS và ủ trong tủ ẩm $36,5^{\circ}\text{C}$ có 5%CO₂, sau 48 và 72 giờ cố định và nhuộm phiến bằng thuốc thử miễn dịch huỳnh quang phát hiện virut đại (Biorad Code 357-2114). Trộn chung các dịch gạt có virut, chia 0,5 ml/ống và bảo quản ở -73°C . Lô virut này được đặt tên là PV15/BHK-21. Tiến hành cấy chuyền chủng PV15/BHK-21 qua tế bào BHK-21 nuôi trong các chai 75cm² và chai Roux 150 cm². Gạt virut cách 2 – 3 ngày từ ngày 2 đến 14 và lấy mẫu bảo quản -20°C cho đến khi chuẩn độ. Cấy chuyền qua BHK-21 3 lần để có các chủng PV16/BHK-21; PV17/BHK-21 và PV18/BHK-21. Từ chủng PV17/BHK-21, cấy chuyền qua tế bào Vero để có các lô chủng PV18/Vero; PV19/Vero và PV20/Vero. Các chủng virut sau khi chuẩn độ được bảo quản ở -73°C . Chuẩn độ virut các lô chủng trên tế bào BHK-21 và phát hiện virut đại bằng thuốc thử miễn dịch huỳnh quang như đã nêu trên. Hiệu giá virut được tính bằng

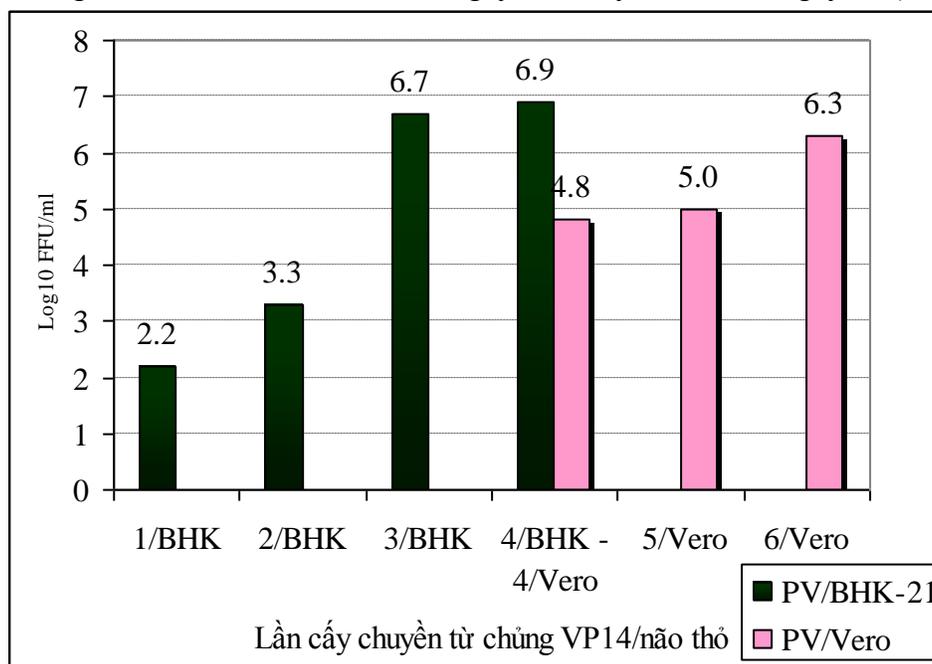
FFU/ml (Focus Fluorescent Unit). Chụp ảnh quan sát hình ảnh tế bào BHK-21 nhiễm virut đại các chủng VP/BHK-21 và PV/Vero. So sánh với hình ảnh của virut đại chủng CVS/BHK-21.

- **Kiểm tra tính sinh miễn dịch và hiệu quả bảo vệ chuột nhắt trắng** của kháng nguyên từ chủng PV/BHK-21, so sánh với kháng nguyên từ chủng CVS/BHK-21: Hiệu giá virut trước bất hoạt của kháng nguyên PV/BHK-21 là $10^{6.3}$ FFU/ml và kháng nguyên CVS/BHK-21 là $10^{6.4}$ FFU/ml. Bất hoạt các huyền dịch virut bằng Betapropiolactone 1/4000, pha chế trong chất ổn định và 10% chất bổ trợ miễn dịch Pet gel A (Seppic). Kiểm tra tính sinh miễn dịch bằng cách tiêm dưới da mỗi chuột 0,5 ml kháng nguyên. Mỗi lô tiêm cho 15 chuột. Các chuột này được lấy máu sau 1, 2 và 4 tuần. Lấy máu tim, tách, bất hoạt huyết thanh $56^{\circ}\text{C}/30$ phút và bảo quản -20°C cho đến khi chuẩn độ. Kháng thể trung hòa được xác định bằng phương pháp FAVN. Kiểm tra hiệu quả bảo vệ được xác định bằng phương pháp NIH: kháng nguyên pha 1/5; 1/25 và 1/125, mỗi độ pha tiêm 0,5ml/chuột/ổ bụng, 2 mũi cách nhau 1 tuần. Tuần thứ 3 tiêm vào não chuột liều thử thách 10 – 100LD50/0,03ml chủng CVS (Challenge virut strain). Theo dõi chuột 14 ngày và ghi nhận số lượng chuột chết do bệnh đại.

III. Kết quả và thảo luận

3.1 Chủng PV thích nghi cấy chuyền qua tế bào Vero và BHK-21:

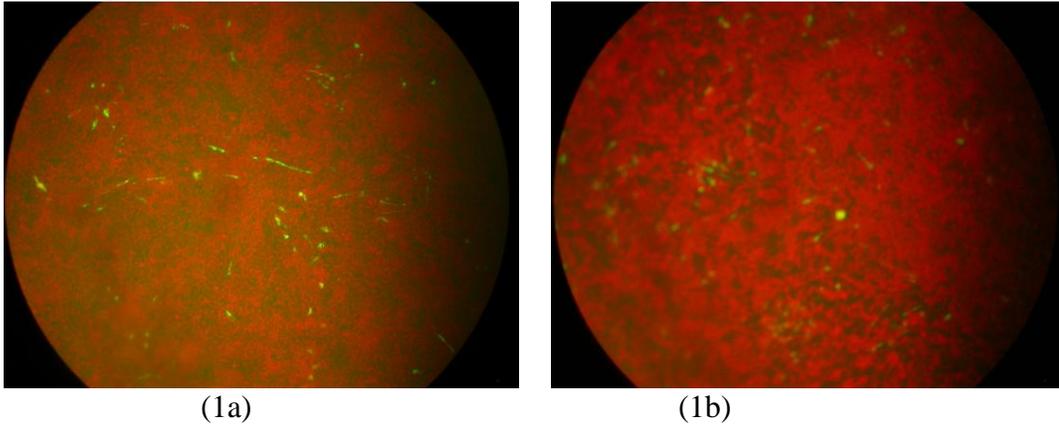
Sau 4 lần cấy chuyền qua tế bào BHK-21, hiệu giá virut của chủng PV đã tăng từ $10^{2.2}$ FFU/ml lên $10^{6.9}$ FFU/ml trong dịch gặt nuôi tế bào (Đồ thị 1). Thời điểm số lượng virut giải phóng vào môi trường cũng nhanh hơn. Từ lần thích nghi 1/BHK-21 đến lần 3/BHK-21, số lượng virut cao nhất vào ngày thứ 11- 12, đến lần cấy thứ 4/BHK-21, ngày thứ 10, hiệu giá virut đã đạt $10^{6.9}$ FFU/ml. Ở tế bào Vero, sau 3 lần cấy chuyền từ chủng PV17/BHK-21, đến đời cấy 6/Vero, lượng virut đạt được cao nhất vào ngày 8 và duy trì cao đến ngày 12 (đồ thị 1).



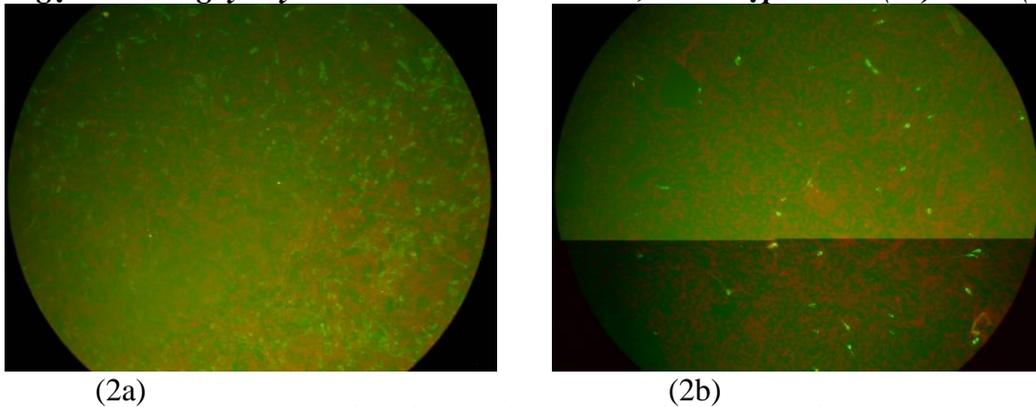
Đồ thị 1. Hiệu giá virut chủng PV cấy chuyền qua tế bào Vero và BHK-21

Quan sát dưới kính hiển vi, các tế bào có virut bắt huỳnh quang nằm rải rác, tách rời nhau đối với cả PV/BHK-21 (hình 1a, 1b) và PV/Vero (hình 2a, 2b). Điều đó cho thấy tính lây truyền thấp của chủng PV giữa các tế bào so với chủng CVS/BHK-21 (hình 3) vốn là chủng đã được thích nghi cấy chuyền nhiều lần qua tế bào. Ngay cả ở mật độ cao (hình 2a) chủng PV cũng ít tạo các đám

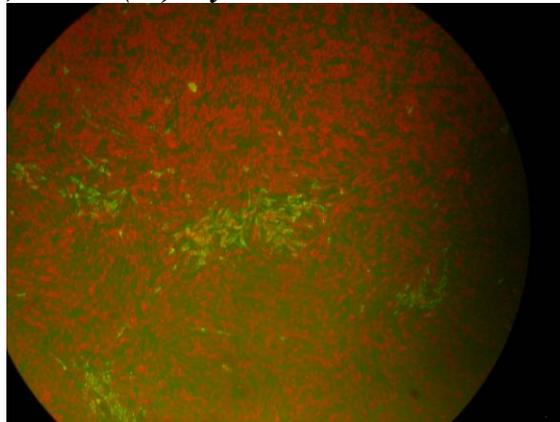
cụm tế bào nhiễm virus bắt huỳnh quang như các đám cụm huỳnh quang lớn của chủng CVS/BHK-21 (hình 3).



Hình 1. Chủng PV/BHK-21 sau 1 lần (1a) và 3 lần (1b) cấy chuyển từ PV14/não thỏ. Huyền dịch virus gặt sau 12 ngày cấy trên thảm tế bào BHK-21; ảnh chụp sau 72 (1a) và 48 (1b) giờ



Hình 2. Chủng PV/Vero sau 3 lần cấy chuyển từ PV/BHK-21. Huyền dịch virus gặt sau 12 ngày - độ pha 10^{-1} (2a) và 10^{-2} (2b) cấy trên thảm tế bào BHK-21; ảnh chụp sau 48 giờ



Hình 3. Chủng CVS361/BHK-21 cấy chuyển từ chủng CVS355/BHK-21. Huyền dịch virus gặt sau 4 ngày độ pha 10^{-3} cấy trên thảm tế bào BHK-21; ảnh chụp sau 48 giờ

3.2 Tính sinh miễn dịch và hiệu quả bảo vệ chuột nhất trắng của chủng PV qua nuôi cấy tế bào BHK-21

Hiệu giá kháng thể trung hòa (HGKTTH) ở nhóm chuột tiêm kháng nguyên PV/BHK-21 xuất hiện sớm ở 4/5 chuột sau 2 tuần. HGKTTH đạt trung bình 4,7 IU/ml. Đến tuần thứ 4, HGKTTH trung bình đạt 15,4 IU/ml, 5/5 chuột đều có mức kháng thể bảo vệ > 0,5 IU/ml. Nhóm chuột tiêm kháng nguyên CVS/BHK-21, HGKTTH xuất hiện muộn hơn trong thí nghiệm này. Sau 2 tuần chưa có kháng thể ở 5/5 chuột. Đến tuần thứ 4, mới có 3/5 chuột có kháng thể > 0,5 IU/ml. Do một chuột có mức kháng thể rất cao lên tới 81,3 IU/ml nên HGKTTH trung bình cả nhóm đạt 17,5 IU/ml (Bảng 1).

Bảng 1. Tính sinh miễn dịch của kháng nguyên từ chủng VP/BHK-21 so với từ chủng CVS/BHK-21

Kháng nguyên	Tỷ lệ chuột có kháng thể bảo vệ > 0,5 IU/ml & Hiệu giá kháng thể trung bình (IU/ml)					
	1 tuần		2 tuần		4 tuần	
	Tỷ lệ	Hiệu giá IU/ml	Tỷ lệ	Hiệu giá IU/ml	Tỷ lệ	Hiệu giá IU/ml
PV/BHK-21	0/5 (0%)	0,2 ± 0.1	4/5 (80%)	4,7 ± 6.1	5/5 (100%)	15,4 ± 11.8
CVS/BHK-21	0/5 (0%)	0	0/5 (0%)	0	3/5 (60%)	17,5 ± 35,7

Khi thử thách với chủng thử thách CVS/não chuột liều 68 LD₅₀/0,03ml, chuột tiêm kháng nguyên PV/BHK-21 bảo vệ 70 – 90% chuột ở các độ pha kháng nguyên 1/125 – 1/5. Tỷ lệ này ở chuột tiêm kháng nguyên CVS/BHK-21 là 10 – 100% (Bảng 2).

Bảng 2. Hiệu quả bảo vệ chuột nhắt trắng của kháng nguyên từ chủng PV/BHK-21 so với từ chủng CVS/BHK-21

Kháng nguyên	Tỷ lệ chuột sống/ độ pha kháng nguyên			Liều bảo vệ 50% chuột
	1/5	1/25	1/125	Log ₁₀ ED ₅₀
PV/BHK-21	9/10 (90%)	9/10 (90%)	7/10 (70%)	-2.7
CVS/BHK-21	9/9 (100%)	7/10 (70%)	1/10 (10%)	-1.65

Thảo luận

Mặc dù có rất nhiều loại vaccin đại dùng cho người và động vật nhưng tất cả các chủng sản xuất vaccin đều có nguồn gốc từ 3 chủng chính Pasteur (PV), Flury và SAD [1]. Thí dụ các chủng virut đại PM (Pittman Moore) và Kissling có nguồn gốc từ não của 1 bò điên ở Pháp năm 1882 (chủng PV). Chủng virut đại PM được dùng để sản xuất vaccin từ tế bào lưỡng bội người (HDCV), vaccin từ tế bào Vero tinh chế (PVRV) và vaccin phôi vịt tinh chế (PDEV) [3]. Chủng Pitman-Moore (PM) cũng được xem như chủng virut đại Pasteur cố định cây chuyên qua não thỏ PV -11 [2]. Chủng virut đại cố định CVS cũng có nguồn gốc từ chủng PV nhưng được cố định cây chuyên qua não chuột rồi sau đó thích nghi cây chuyên qua BHK-21. Có một số khác biệt về các quyết định kháng nguyên trên protein G của 2 chủng PV và CVS khi nhận diện bằng kháng thể đơn dòng Mabs-G [4]. Trong nghiên cứu [4], chủng PV có 23 quyết định kháng nguyên được Mabs-G nhận ra trong khi chủng CVS chỉ có 17 vị trí. So sánh đoạn ngoài màng (1-439) của protein G, chủng PV có 4 vị trí (37, 158, 247, 319) được glycosyl hóa trong khi chủng CVS chỉ có 3 (37, 204 và 319). Tuy nhiên cả 2 chủng đều giống nhau là có Arginine ở vị trí 333 (vị trí gây độc thần kinh). Protein G của virut đại là kháng nguyên kích thích tạo kháng thể trung hòa virut và bảo vệ động vật khi thử thách bằng đường tiêm não và ngoại vi. Trong nghiên cứu này, chủng PV dù mới được thích nghi cây chuyên qua tế bào BHK-21 nhưng đã cho thấy những ưu điểm về tính sinh miễn dịch và hiệu quả bảo vệ động vật so với chủng CVS/BHK-21. Theo [5] các chủng

virut dại thích nghi cấy chuyền qua tế bào thường nhân rất nhanh và gây đáp ứng miễn dịch mạnh cho cơ thể. Kết quả quan sát chủng CVS/BHK-21 cho thấy virut lây nhiễm nhanh từ tế bào này sang tế bào khác, tạo các đám cụm tế bào chứa virut bắt màu huỳnh quang lớn sau 48 giờ. Mỗi đám cụm có thể lên tới 30 – 40 tế bào trong khi chủng PV/BHK-21 chỉ tạo những đám cụm huỳnh quang nhỏ khoảng 5 – 10 tế bào.

Kết luận

Chủng virut dại PV cố định, tiêm truyền qua não thỏ đã được thích nghi cấy chuyền thành công qua tế bào BHK-21 và Vero. Hiệu giá virut của PV/BHK-21 đạt cao nhất $10^{6,9}$ FFU/ml ở đời cấy 4, lô PV18/BHK-21. Hiệu giá virut của PV/Vero cũng đạt tới $10^{6,3}$ FFU/ml sau 3 lần cấy chuyền từ PV17/BHK-21. Kháng nguyên PV/BHK-21 gây đáp ứng miễn dịch nhanh sau 2 tuần và 80 -100% chuột có đáp ứng kháng thể đủ bảo vệ sau 2 và 4 tuần. Kháng nguyên VP/BHK-21 cũng bảo vệ tốt 70 – 90% chuột tiêm các liều 1/125 – 1/5 khi thử thách vào não chủng virut dại có độc lực với 68 LD₅₀. Chủng PV/BHK-21 và PV/Vero đã được thích ứng qua tế bào nuôi có thể chọn làm chủng sản xuất vaccin dại từ nuôi tế bào cho người và động vật.

Tài liệu tham khảo:

1. Rhodes A. J.: Strains of rabies virus available for preparation of Sylvatic rabies vaccines with special reference to vaccines prepared in cell culture. *Can. Vet. J.* 2 (August 1981): 262 – 266
2. WHO: Report of German Green Cross/ WHO workshop on monoclonal antibody in rabies diagnosis and research. *WHO/Rab. Res./84.20*
3. Moore SM, Ricke TA, Davis RD, Briggs DJ. The influence of homologous vs. heterologous challenge virus strains on the serological test results of rabies virus neutralizing assays. *Biologicals.* 2005; 33(4): 269 - 276. [PubMed: [16168666](#)].
4. Smith J.S., King A.A: Monoclonal antibodies for the identification of rabies and non-rabies lyssaviruses”. World Health Organization, Geneva, Laboratory techniques in rabies 4th edition, 145 -155
5. Dietzschold B, Li J, Faber M, Schnell M.: Concepts in the pathogenesis of rabies. *Future Virol.* 2008 Sep;3(5):481-490