

NGHIÊN CỨU CẢI TIẾN NÂNG CAO HIỆU QUẢ SẢN XUẤT VACCIN BẠI LIỆT BÁN THÀNH PHẨM TRÊN CHAI NHỰA 10 TẦNG

Hoàng Trọng Thế^{1*}, Nguyễn Ánh Tuyết¹, Phạm Ích Tùng¹,
Nguyễn Đức Bách², Nguyễn Thuý Hường¹

¹*Trung tâm Nghiên cứu Sản xuất Vaccine và Sinh phẩm Y tế (POLYVAC)*

²*Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

*Tác giả liên hệ: hoangthetb@gmail.com

Ngày nhận bài: 31.04.2021

Ngày chấp nhận đăng: 07.06.2021

TÓM TẮT

Bại liệt là bệnh nhiễm virus cấp tính gây ra bởi poliovirus làm tổn thương thần kinh, não bộ và mất khả năng vận động. Ở Việt Nam, vaccin phòng bệnh bại liệt đang sử dụng phổ biến hiện nay được sản xuất từ chủng Sabin trên tế bào thận khỉ *Macaca mulatta*. Theo quy trình thông thường, tế bào được nuôi cấy một lớp trên các chai Roux bị giới hạn về bề mặt nuôi nên sản lượng vaccin bại liệt bán thành phẩm thu được thấp. Nghiên cứu này đã sử dụng phương pháp cải tiến nuôi tế bào trên bề mặt chai nhựa đa tầng, qua đó số lượng tế bào thu được khi nuôi cấy đã cao hơn nhiều so với quy trình sử dụng chai Roux trước đây. Kết quả đã cải tiến được quy trình sản xuất với mật độ tế bào nuôi cấy tối ưu là 156.000 tế bào/ml và thể tích môi trường bổ sung sau gây nhiễm virus là 150 ml/tầng. Quy trình sản xuất trên chai nhựa 10 tầng đã được thẩm định liên tục qua 3 lô với kích cỡ mỗi lô 20 chai với kết quả ổn định với hiệu giá vaccin đạt từ 7,73 đến 7,76 log₁₀ CCID₅₀/0,1ml, cao hơn so với tiêu chuẩn 5,5 log₁₀ CCID₅₀/0,1ml.

Từ khóa: Chai nhựa 10 tầng, chai Roux, hiệu giá vaccin, tế bào thận khỉ, vaccin bại liệt.

Improvement of Polio Bulk Production Technology by Cell Culture Application on 10 layer Cellstack

ABSTRACT

Poliomyelitis is an acute viral infectious disease caused by a poliovirus that damages the brainstem, spinal cord, and irreversible motor neuron damage. In Vietnam, the polio vaccine has been produced from the live attenuated poliovirus strain (the Sabin strain) inoculated on *Macaca mulatta* primary monkey kidney cells. In the conventional procedure, cells are cultured in a monolayer on Roux bottles with a limited surface, therefore, the yield is insufficient. This study applied a new approach to improve the production efficiency and higher yield of Polio vaccine by using 10-layer cellSTACK® instead of using glass Roux bottles. Culture conditions were optimized with the different cell densities and the volume of the culture medium. The results showed that the optimal density of cells for culture was 156.000 cells/ml and the optimal volume of medium for cell culture after virus inoculation was 150 ml/layer. The optimal parameters were applied to validate the trial production of 3 continuous batches by using 20 of 10-layer cellSTACK® per batch. The result was consistent for all 3 batches with high viral titers from 7.73 to 7.76 log₁₀ CCID₅₀/0.1ml, higher than the standard 5.5 log₁₀ CCID₅₀/0.1ml.

Keywords: 10-layer cellSTACK®, monkey kidney cells, polio vaccine, Roux bottle, viral titers.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh bại liệt là bệnh truyền nhiễm cấp tính lây truyền theo đường tiêu hóa gây ra bởi Poliovirus dẫn đến liệt mềm, không đối xứng

với tỉ lệ tử vong cao hoặc để lại di chứng suốt đời (Đoàn Xuân Mượu, 1977; Nguyễn Đình Bảng, 2016; Trịnh Quân Huấn, 2009; Bakker & cs., 2011). Từ năm 1962, Việt Nam đã sản xuất thành công vaccin bại liệt sống giảm độc

lực từ chủng Sabin trên tế bào thận khỉ *Macaca mulatta*, qua đó đã giảm đáng kể tỉ lệ mắc bệnh bại liệt ở miền bắc Việt Nam trong những năm 1960 và 1970 (Phạm Ngọc Thạch & cs., 1960; Hoàng Thuỷ Nguyên & cs., 1967) và góp phần giúp Việt Nam thanh toán thành công bệnh bại liệt vào năm 2000 (Nguyễn Thu Yến, 2002). Việc sử dụng vaccin bất hoạt của Salk và vaccin giảm độc lực của Sabin (OPV) đã đem lại hiệu quả phòng bệnh cao (Sabin, 1957; Dược điển Việt Nam IV, 2009). Đến năm 2018, quy trình sản xuất vaccin bại liệt bán thành phẩm vẫn được sử dụng chai Roux với diện tích bề mặt nuôi cấy tế bào 225cm² do đó mỗi lô sản xuất phải sử dụng từ 300 đến 350 chai Roux. Tuy nhiên, việc xử lý chai Roux bằng thuỷ tinh mất nhiều thời gian nên khó triển khai ở quy mô lớn và bệnh bại liệt hiện đang có xu hướng tăng lên ở nhiều nước trên thế giới với 34 ca nhiễm virus bại liệt ở Afghanistan năm 2020 (Attaullah & cs., 2020).

Chính vì vậy, việc nghiên cứu các giải pháp để tăng hiệu quả sản xuất vaccin có ý nghĩa quan trọng đối với nhiều quốc gia trên thế giới trong đó có Việt Nam (WHO, 2016). Ngoài việc kiểm soát các yếu tố môi trường dinh dưỡng, nhiệt độ để tế bào sinh trưởng nhanh và không bị nhiễm vi khuẩn, nấm hay Mycoplasma, cần tăng diện tích bề mặt nuôi cấy tế bào trong mỗi mẻ sẽ nâng cao được hiệu quả, năng suất và giảm giá thành vaccin (Freshney, 2000).

Nhằm tăng năng suất và giảm thời gian sản xuất vaccin bại liệt bán thành phẩm trên tế bào thận khỉ *Macaca mulatta*, chúng tôi đã tiến hành “Nghiên cứu cải tiến nâng cao hiệu quả sản xuất vaccin bại liệt bán thành phẩm trên chai nhựa 10 tầng” nhằm mục tiêu lựa chọn được các thông số sản xuất tối ưu để thiết lập được quy trình sản xuất vaccin bại liệt bán thành phẩm trên các chai nhựa polystyrene 10 tầng (10-layer cellSTACK®) với diện tích nuôi cấy mỗi tầng 636cm² (gấp 2,82 lần diện tích một chai Roux) giúp nâng cao hiệu quả sản xuất và chất lượng của vaccin bại liệt bán thành phẩm.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

2.1.1. Chủng virus bại liệt và tế bào thận khỉ

Chủng virus Bại liệt týp III Sabin (SO): WHO-IIIS-79A do Viện nghiên cứu Bại liệt Nhật Bản cung cấp. Chủng virus được cấy truyền 3 lần (SO+3) và 2 lần chọn lọc bằng cách tạo đám hoại tử (SO+3+2 plaque) hay còn gọi là chủng RSO+2 với hiệu giá 8,3log₁₀ CCID₅₀/ml.

Tế bào thận được tách từ thận khỉ *Macaca mulata* Polyvac (Trung tâm Nghiên cứu Sản xuất Vaccin và Sinh phẩm Y tế).

2.1.2. Vật tư và hoá chất môi trường nuôi cấy

Dụng cụ vật tư nghiên cứu chính bao gồm chai nuôi 1 tầng diện tích 225cm², chai nuôi 2 tầng mỗi tầng 636cm² và chai nuôi 10 tầng mỗi tầng 636cm² (cellSTACK® culture chamber) của hãng Corning.

Hoá chất bao gồm Bovine serum, các môi trường Trypsin 0,25%, Versen 0,025%, Trypsin - EDTA (0,1% Trypsin + 0,056% EDTA), Hanks (-) không có (đỏ phenol, Mg²⁺, Ca²⁺), Hanks (+) có đỏ phenol, LHE, MEM và LH₃E được cung cấp bởi Polyvac (Nguyễn Đăng Hiền & cs., 2014).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tách tế bào thận khỉ

Thận khỉ *Macaca mulata* được cân trọng lượng sau đó được đẩy toàn bộ máu động trong nhu mô thận ra ngoài bằng cách truyền dịch môi trường Versen 0,025% và môi trường Trypsin 0,25% đã ủ ấm ở 37°C. Sử dụng nút móc câu móc vào vỏ xơ thận đưa vào chai để lắc trong môi trường LHE. Thận được lắc đến khi các tế bào được tách ra (môi trường trong chai hóa đục) sau đó chất hỗn dịch tế bào vào chai và bổ sung môi trường LHE và lắc tiếp. Quá trình được lặp lại nhiều lần cho tới khi nhu mô thận tan hết chỉ còn xơ thì dừng lại (Nguyễn Văn Mẫn & Nguyễn Đăng Hiền, 2000). Kiểm tra lượng hỗn dịch tế bào đặc thu được, bổ sung môi trường LHE đến thể tích 2.000ml và đếm mật độ tế bào.

2.2.2. Nuôi cấy tế bào thận khỉ thể hệ P0

Tế bào sau khi đếm để kiểm tra mật độ thì hỗn dịch đó được pha và chia thành 03 nhóm 1, 2 và 3 với mật độ tế bào lần lượt là 108×10^3 , 132×10^3 và 156×10^3 tế bào/ml. Mỗi nhóm được nuôi trong 6 chai loại 2 tầng với thể tích mỗi tầng nuôi 200ml môi trường LHE. Các chai được nuôi tĩnh ở $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ và sau 4 ngày sẽ được thay môi trường LHE mới. Hàng ngày, khả năng phát triển của tế bào được đánh giá bằng cách quan sát dưới kính hiển vi, sau 7 ngày nếu tế bào phát triển kín 90% bề mặt chai là đạt. Tế bào thu được từ mỗi nhóm sau khi tách bằng môi trường trypsin - EDTA (0,5%) sẽ được đếm để đánh giá ảnh hưởng của mật độ cấy ban đầu đến hiệu quả nhân tế bào ở thể hệ P0, chuyển sang giai đoạn cấy truyền thể hệ P1.

2.2.3. Nuôi cấy thể hệ P1

Dựa vào kết quả đếm tế bào thu được sau 7 ngày ở thể hệ P0 ở các nhóm, mật độ tế bào cấy vào ban đầu cho kết quả nhất sẽ lựa chọn để nuôi cấy ở giai đoạn tiếp theo. Toàn bộ lượng hỗn dịch tế bào của 3 nhóm được gộp chung lại và được cấy truyền trong môi trường MEM. Thí nghiệm được bố trí trong chai 10 tầng (18 chai), chai nhựa 225cm^2 (10 chai) để làm đối chứng (K) và chai 2 tầng (3 chai) để kiểm tra sự phát triển của tế bào trong quá trình nuôi. Tế bào được nuôi cố định ở $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ trong 4 ngày và được kiểm tra bằng cách quan sát dưới kính hiển vi.

2.2.4. Phương pháp gây nhiễm

Khi tế bào phát triển bám trên 90% diện tích chai nuôi cấy sẽ được gây nhiễm virus. Môi trường Hanks (-) được sử dụng để rửa tế bào ở chai 2 tầng và dùng Trypsin-EDTA tách tế bào. Sau khi tách, số lượng tế bào được xác định để tính toán lượng virus gây nhiễm (chai 2 tầng được sử dụng để tính toán số lượng tế bào tương ứng ở các chai còn lại). Các chai còn lại được rửa bằng môi trường Hanks (+) với thể tích 100 ml/tầng.

Dung dịch chứa chủng virus để gây nhiễm được pha bằng môi trường LH_3E , với lượng virus được tính theo công thức sau:

$$V(\text{ml}) = \frac{95 \times 10^6 \times 10 \times N \times \text{Ipl}}{\text{MOI} \times \text{Ti}}$$

Trong đó: 95×10^6 là số tế bào trên 1 tầng;

10 là số tầng của chai;

N là số chai gây nhiễm + 1 (nhằm tránh hao hụt trong quá trình thao tác);

Ipl là hệ số pha loãng chủng virus (Ipl = 10);

MOI là tỉ lệ virus/tế bào (1 CCID_{50} /tế bào, CCID_{50} là Cell Culture Infective Dose 50 (liều gây hủy hoại 50% tế bào);

Ti là hiệu giá chủng/Ipl.

Chỉ số MOI (tỉ lệ virus/tế bào) đưa vào thử nghiệm cũng được chia thành 3 nhóm, mỗi nhóm gồm 6 chai 10 tầng và 3 chai 2 tầng trong đó nhóm 1 là 1 $\text{CCID}_{50}/150\text{tb}$, nhóm 2 là 1 $\text{CCID}_{50}/300\text{tb}$, nhóm 3 là 1 $\text{CCID}_{50}/600\text{tb}$. Gây nhiễm hỗn dịch chủng virus đã pha loãng theo chỉ số MOI của các nhóm với thể tích 100ml cho 1 chai tế bào 10 tầng và 20ml cho 1 chai 2 tầng. Các chai sau khi được gây nhiễm virus sẽ được hấp phụ ở tủ ấm $33 \pm 0,5^\circ\text{C}$ trong 60 phút và cứ mỗi 15 phút lại lắc 1 lần. Chai đối chứng (K) không gây nhiễm virus. Sau khi hấp phụ, bổ sung môi trường duy trì LH_3E ở các thể tích là 100 ml/tầng, 150 ml/tầng, 200 ml/tầng.

Các chai có diện tích 225cm^2 sử dụng làm đối chứng (K) được bổ sung 100ml môi trường duy trì. Tất cả các chai được nuôi trạng thái tĩnh ở $33 \pm 0,5^\circ\text{C}$ và kiểm tra sự hủy hoại tế bào của virus hàng ngày. Các thông số phù hợp nhất từ các kết quả nghiên cứu sẽ được áp dụng thiết lập qui trình và sản xuất thử nghiệm 3 lô liên tiếp với mỗi lô 20 chai 10 tầng.

2.3.5. Thu hoạch vacxin đơn typ

Được thực hiện sau khi gây nhiễm virus từ 68-72 giờ, khi số tế bào bị hủy hoại $\geq 90\%$ hỗn dịch virus sẽ được thu bằng cách ly tâm. Các chai được lựa chọn để thu virus phải đảm bảo không có hiện tượng nhiễm trùng, nhiễm nấm, các chai không nứt vỡ, lỏng nút. Các chai sau lắc từ buồng ấm được đưa vào phòng virus để xử lý lau sạch bên ngoài vỏ chai bằng ethanol 70% trước khi đưa vào tủ cấy vô trùng để thu vacxin. Các chai được lắc mạnh để các tế bào bong ra khỏi thành và đáy chai. Bình chứa vacxin được

gắn một đầu với dây hút và pipet, một đầu có lọc khí với máy millipore, sau đó đặt bình chứa lên cân điện tử. Dùng pipet kết nối với hệ thống xi phong để hút toàn bộ dịch virus ở tất cả các chai vào nhau, sau đó chia đều ra các chai chứa hoặc bình chứa và giữ ở nhiệt độ -20°C (Nguyễn Đăng Hiền & cs., 2014). Hỗn dịch chứa virus được kiểm tra hiệu giá vaccin đơn týp để đánh giá hiệu quả sản xuất vaccin.

2.3.6. Kiểm tra hiệu giá vaccin

Hiệu giá vaccin đơn týp được xác định bằng phương pháp trung hòa vi lượng, phương pháp được tóm tắt như sau: Mẫu cần xác định hiệu giá được pha loãng bằng môi trường duy trì MEM 2% FBS. Hút 100 μl mẫu pha loãng vào mỗi giếng trong khay 96 giếng, sau đó nhỏ 100 μl hỗn dịch tế bào Hep₂C được pha loãng bằng môi trường MEM 2% FBS (mật độ 10^5 tế bào/ml) và nuôi trong tủ ở điều kiện nhiệt độ 36°C , 5% CO_2 trong 7 ngày. Kết quả được đọc vào ngày thứ 5 và ngày thứ 7 bằng cách soi dưới kính hiển vi để phát hiện đám huỷ hoại tế bào do virus vaccin bại liệt. Giếng cho kết quả dương tính có sự huỷ hoại khi tế bào co tròn, giếng cho kết quả âm tính khi không có sự huỷ hoại tế bào (tế bào phát triển thành một lớp kín đáy giếng).

Hiệu giá vaccin bán thành phẩm (HGVX) được tính theo công thức của Kärber (1931):

$$\log \text{CCID}_{50} = L - D \left(\frac{S}{N} + 0,5 \right)$$

Trong đó:

L là log của độ pha loãng cao nhất có 100% có số giếng huỷ hoại;

D là sự chênh lệch log giữa các độ pha loãng mẫu ($D = 0,5$ với độ pha loãng bậc $10^{0,5}$);

S là tổng số giếng huỷ hoại ở các độ pha loãng không có 100% số giếng huỷ hoại;

N là số giếng gây nhiễm cho mỗi độ pha loãng.

Liều vaccin thành phẩm được xác định theo công thức:

Số liều = Thể tích vaccin bán thành phẩm $(\text{l}) \times 1.000 \times \text{hệ số pha loãng} \div 0,1$

Trong đó:

Hệ số pha loãng = $\log_{10}(\text{hiệu giá vaccin bán thành phẩm} - \text{hiệu giá pha vaccin thành phẩm})$;

0,1 là thể tích một liều vaccin thành phẩm (ml).

Hiệu giá vaccin bại liệt (týp 3) thành phẩm yêu cầu tiêu chuẩn tối thiểu đạt $5,5 \log_{10} \text{CCID}_{50}/0,1\text{ml}$, do hiệu giá vaccin bán thành phẩm tỉ lệ thuận với sản lượng vaccin thành phẩm thu được nên hiệu giá vaccin bán thành phẩm càng cao thì tỉ lệ pha loãng càng lớn và lượng vaccin thành phẩm được sản xuất ra trên 1 lô bán thành phẩm sẽ càng nhiều.

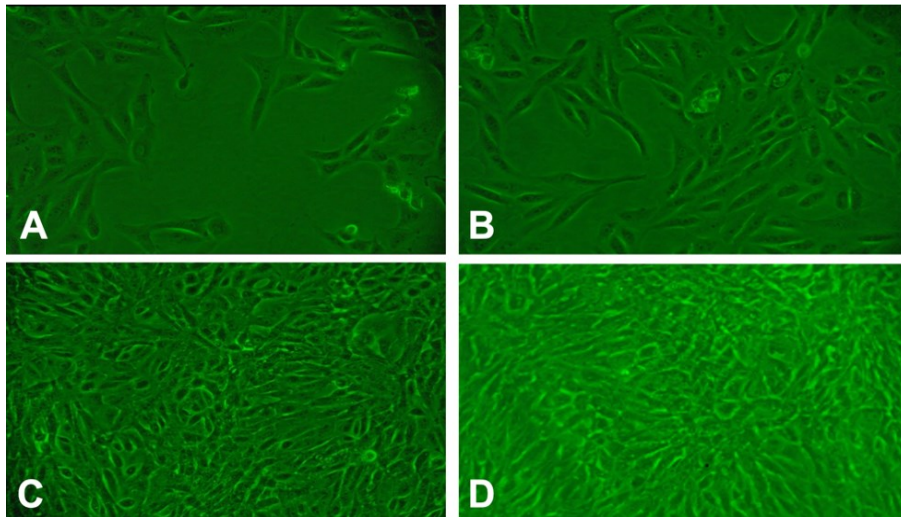
2.3.7. Đánh giá hiệu quả sản xuất vaccin bán thành phẩm đơn týp

Hiệu quả sản xuất giữa 2 phương pháp sử dụng chai Roux và chai nhựa nhiều tầng được xác định dựa vào lượng vaccin bán thành phẩm thu được. Hiệu quả được đánh giá theo những tiêu chí bao gồm (i) thời gian sản xuất, (ii) thể tích vaccin bán thành phẩm thu được trên mỗi lô sản phẩm, (iii) hiệu giá vaccin bán thành phẩm thu được của 3 lô sản xuất theo mỗi quy trình, trên chai Roux và trên chai 10 tầng và (iv) số liều vaccin thành phẩm tương ứng thu được ở mỗi lô.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của mật độ tế bào nuôi ban đầu tới lượng tế bào thu được ở giai đoạn P0

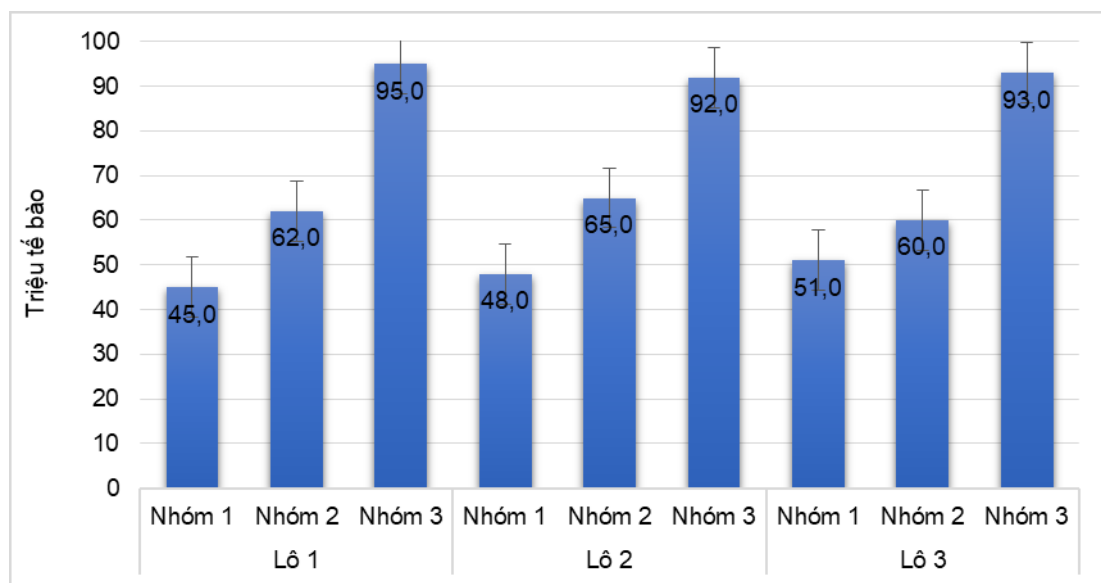
Tế bào thận khỉ sau khi tách được nuôi cấy trong chai nhựa 2 tầng ở 37°C và theo dõi sự phát triển hàng ngày dưới kính hiển vi (Hình 1). Kết quả cho thấy sau 7 ngày nuôi cấy, mật độ đưa vào ở nhóm 1 (108×10^3 tế bào/ml), tế bào bám trên bề mặt chai đạt khoảng 50%, nhóm 2 (132×10^3 tế bào/ml), mật độ tế bào bám chỉ đạt 70% và còn nhiều khoảng trống trên mặt chai, nhóm 3 (156×10^3 tb/ml) tế bào đã bám kín đều hơn 95% bề mặt chai và khả năng bám của tế bào trên bề mặt chai nhựa cũng tương đương với bề mặt chai Roux bằng thủy tinh (Hình 1).



Ghi chú: (A): Nhóm 1 mức độ bám khoảng 50%, (B): Nhóm 2 mức độ bám khoảng 70%, (C): Nhóm 3 mức độ bám tốt nhất khoảng trên 95%, (D): Chai Roux với mật độ tế bào đưa vào 70.000 tế bào/ml, độ bám khoảng trên 95%.

Ở chai Roux 225cm² mật độ đưa vào nuôi là 70.000 tế bào/ml là tỉ lệ với mật độ nuôi và diện tích nuôi cấy trên chai (tăng 636cm²).

Hình 1. Tế bào ở các nhóm được nuôi sau 7 ngày trên chai nhựa 2 tầng và chai Roux



Ghi chú: Tổng số tế bào thu được sau 7 ngày nuôi. Đối với chai nhựa 2 tầng, mật độ tế bào ban đầu ở nhóm 1, 2 và 3 tương ứng là 108×10^3 , 132×10^3 và 156×10^3 tế bào/ml. Thể tích hỗn dịch tế bào chai nhựa 2 tầng là 200 ml/tầng.

Hình 2. Ảnh hưởng của mật độ tế bào nuôi cấy ban đầu tới lượng tế bào thu được ở thế hệ P0 trên chai nhựa 2 tầng

Sau 7 ngày nuôi, tế bào phát triển lan kín lớp đáy chai nuôi, khi đó tế bào được tách để đếm theo từng nhóm. Kết quả cho thấy, sau 7 ngày nuôi, số lượng tế bào thu được ở nhóm 1 và nhóm 2 tương đối thấp, chỉ đạt khoảng 45×10^6 tế bào

và 62×10^6 tế bào cho mỗi tầng tương ứng đạt $7,08 \times 10^4$ tế bào/cm² và $9,75 \times 10^4$ tế bào/cm². Đối với nhóm 3, số lượng tế bào thu được ở cả 3 lô nghiên cứu đạt trung bình 93×10^6 tế bào/tầng tương ứng $14,6 \times 10^4$ tế bào/cm² (Hình 2).

Do lượng tế bào thu được ổn định giữa các lô thí nghiệm, nên nhóm 3 sẽ được chọn để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

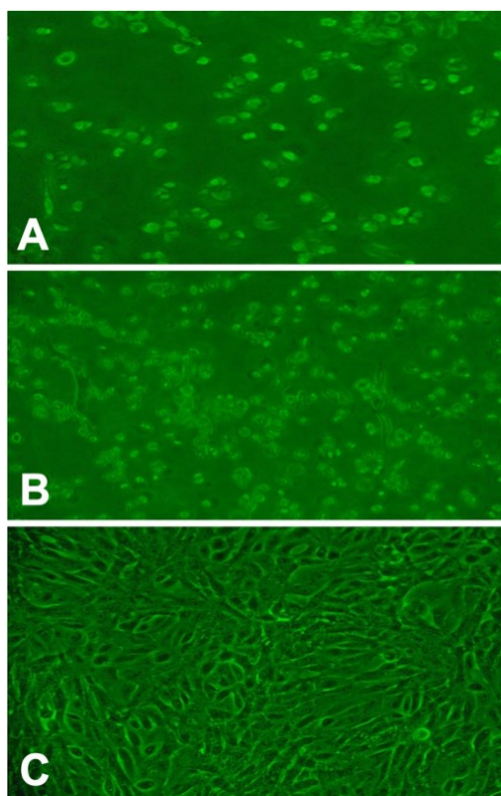
3.2. Kết quả cấy truyền thế hệ P1

Đối với chai nhựa 10 tầng mỗi tầng được cấy truyền 200ml hỗn dịch tế bào (mật độ 156×10^3 tế bào/ml) tương đương với $31,2 \times 10^6$ tế bào/tầng, chai Roux thể tích cấy truyền là 170ml hỗn dịch tế bào (mật độ 70.000 tế bào/ml) tương đương $11,9 \times 10^6$ tế bào/chai, kết quả sau 4 ngày cấy truyền tế bào ở P1 được trình bày ở bảng 1.

Kết quả sau 4 ngày nuôi cấy ở chai nhựa 10 tầng tế bào phát triển đều, kín đẹp lượng tế bào thu được từ 93×10^6 đến 97×10^6 tế bào/tầng. Mật độ tế bào đạt từ $14,62 \times 10^4$ đến $15,25 \times 10^4$ tế bào/cm². Mật độ này cũng tương đương với việc nuôi trên chai Roux (Bảng 1) với mật độ tế bào đưa vào $5,28 \times 10^4$ thì kết quả thu được $33,6 \times 10^6$ đến 34×10^6 tế bào/chai (tương đương $14,96 \times 10^4$ đến $15,26 \times 10^4$). Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu đã công bố của nhóm nghiên cứu trên chai Roux của Lê Thị Luân & Nguyễn Đăng Hiền (2007).

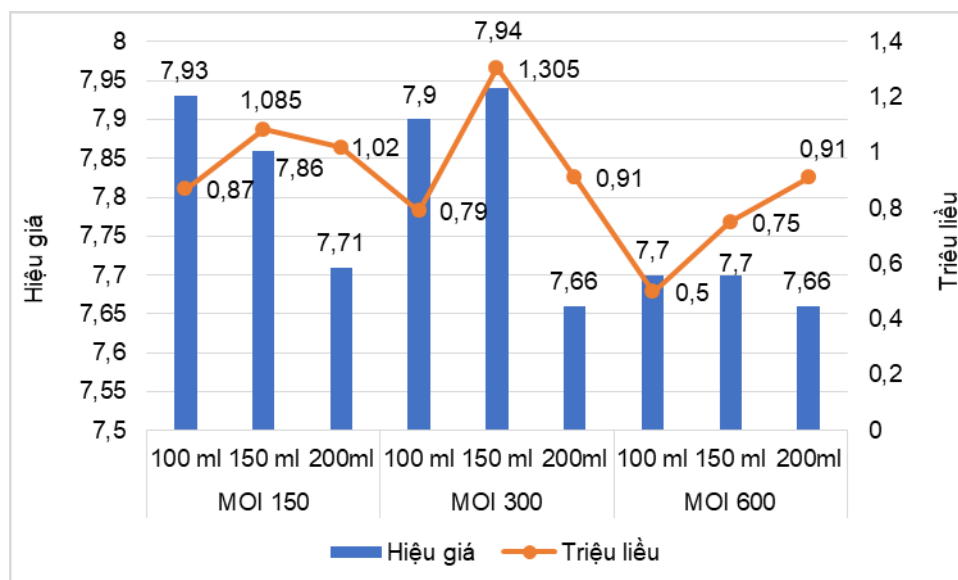
Bảng 1. Kết quả nuôi cấy tế bào P1 trên chai nhựa 10 tầng và chai Roux

Lô	Chai nhựa 10 tầng			Chai Roux		
	Số tế bào đưa vào 1 tầng (10^3)	Số tế bào sau 4 ngày nuôi/1 tầng (10^3)	Mật độ tế bào/cm ² (10^4)	Số tế bào đưa vào/1 chai (10^3)	Số tế bào sau 4 ngày nuôi/1 chai (10^3)	Mật độ tế bào/cm ² (10^4)
I	31,200	93,000	14,62	11,900	34,000	15,11
II	31,200	97,000	15,25	11,900	33,660	14,96
III	31,200	95,000	14,93	11,900	34,340	15,26



Ghi chú: A: Tế bào nuôi trên chai Roux; B: Tế bào nuôi trên chai nhiều tầng; C: Tế bào nguyên vẹn (Đối chứng/Không gây nhiễm virus).

Hình 3. Hình thái tế bào khi gây nhiễm virus



Hình 4. Ảnh hưởng của liều gây nhiễm và thể tích môi trường duy trì bổ sung tới số liều vaccin/lô

3.3. Ảnh hưởng của liều gây nhiễm và thể tích môi trường duy trì bổ sung tới hiệu giá virus

Phương pháp này được thực hiện sau khi nuôi 68-72 giờ gây nhiễm. Đối với chai đối chứng (K), môi trường trong suốt, không có hiện tượng nhiễm trùng, nhiễm nấm, chai tế bào không nứt vỡ, lỏng nứt. Soi trên kính hiển vi phản pha thấy một lớp tế bào kín, không có hiện tượng huỷ hoại (Hình 3C). Đối với các chai đã gây nhiễm virus, môi trường có màu vàng sẫm, trong suốt, không có hiện tượng nhiễm trùng hay nhiễm nấm.

Quá trình phát triển của poliovirus cũng được đánh giá thông qua sự huỷ hoại tế bào bằng cách quan sát trên kính hiển vi phản pha độ phóng đại 10x. Kết quả cho thấy tế bào bị huỷ hoại được thể hiện qua sự co tròn và bong khỏi bề mặt nuôi cấy giống với hình ảnh trên chai Roux và đạt > 90% sau 72 giờ gây nhiễm (Hình 3A, B).

Sau khi thu hoạch hỗn dịch virus bằng cách gộp theo từng nhóm, mẫu được lấy để kiểm tra hiệu giá theo từng nhóm ở cả 3 lô nghiên cứu, kết quả được trình bày ở (Hình 4).

Theo kết quả trung bình (Hình 4) ở nhóm 1 với MOI 1CCID₅₀/150 tế bào, khi bổ sung môi trường duy trì 100 ml/tầng cho hiệu giá là 7,93

log₁₀ CCID₅₀/0,1ml, tương đương với 0,87 triệu liều/1 chai 10 tầng. Khi bổ sung môi trường duy trì 150 ml/tầng cho kết quả hiệu giá 7,86 log₁₀ CCID₅₀/0,1ml tương đương 1,085 triệu liều/1 chai 10 tầng. Với thể tích môi trường duy trì bổ sung 200 ml/tầng cho hiệu giá 7,71 log₁₀ CCID₅₀/0,1ml, tương đương 1,02 triệu liều/chai 10 tầng. Ở nhóm 2 với MOI 1CCID₅₀/300 tế bào, thể tích môi trường duy trì bổ sung lần lượt 100 ml/tầng, 150 ml/tầng và 200 ml/tầng cho kết quả hiệu giá tương ứng 7,9 log₁₀ CCID₅₀/0,1ml, 7,94 log₁₀ CCID₅₀/0,1ml và 7,66 log₁₀ CCID₅₀/0,1ml tương đương thu được 0,79 triệu liều, 1,305 triệu liều và 0,91 triệu liều vaccin/1 chai 10 tầng. Đối với nhóm 3 với MOI là 1CCID₅₀/600tb, hiệu giá trung bình của 3 nhóm bổ sung môi trường với thể tích 100 ml/tầng, 150 ml/tầng và 200 ml/tầng là 7,7 là log₁₀ CCID₅₀/0,1ml, 7,7 log₁₀ CCID₅₀/0,1ml và 7,66 log₁₀ CCID₅₀/0,1ml tương đương với 0,5 triệu liều, 0,75 triệu liều và 0,91 triệu liều. Như vậy nhóm 2 với MOI 1CCID₅₀/300 tế bào, thể tích môi trường duy trì bổ sung là 150 ml/tầng đạt được hiệu quả tốt nhất.

3.4. Kết quả sản xuất 3 lô trên chai nhựa 10 tầng

Dựa vào các kết quả nghiên cứu thu được gồm nồng độ nuôi cấy tế bào ở thể hệ P0 và

P1 (156.000 tế bào/ml), lượng MOI là ($1\text{CCID}_{50}/15 = 300\text{tb}$) thể tích môi trường duy trì được bổ sung cho mỗi tầng 636cm^2 là 150ml, Quy trình sản xuất vaccin bại liệt bán thành phẩm đã được thiết lập và tiến hành sản xuất thử nghiệm 3 lô liên tiếp trên chai nhựa 10 tầng với kích cỡ mỗi lô 20 chai. Kết quả về thể tích và số liệu thu được thể hiện ở bảng 2.

Theo kết quả ở bảng 2 thu được sau 3 lô sản xuất cho thấy hiệu giá, thể tích và số liệu thu được ở 3 lô là tương đương nhau. Trung bình mỗi lô sản xuất sẽ thu được 30 lít vaccin đơn typ với hiệu giá trung bình $7,74 \log_{10} \text{CCID}_{50}/0,1\text{ml}$, tương đương khoảng 16,7 triệu liều vaccin

thành phẩm. Điều này cho thấy quy trình sản xuất vaccin bại liệt bán thành phẩm trên chai 10 tầng với các thông số đã thiết lập cho kết quả ổn định.

3.5. Đánh giá chất lượng vaccin bại liệt bán thành phẩm đơn typ trên chai nhựa 10 tầng

Kết quả bảng 3 cho thấy vaccin sản xuất theo quy trình sử dụng chai nhựa nhiều tầng đáp ứng được tất cả các tiêu chuẩn về chất lượng đối với vaccin bại liệt bán thành phẩm theo tiêu chuẩn của dược điển Việt Nam IV (2009) và WHO TRS 980 (2014).

Bảng 2. Kết quả vaccin bại liệt bán thành phẩm đơn typ

Lô sản xuất	Hiệu giá $\log_{10} \text{CCID}_{50}/0,1\text{ml}$	Thể tích (lít)	Số liều vaccin thành phẩm (triệu liều)
I	7,73	30	16,1
II	7,76	30	17,2
III	7,75	30	16,8
Trung bình	7,74	30	16,7

Bảng 3. Kết quả kiểm định mẫu vaccin bán thành phẩm đơn typ

Tên thử nghiệm	Tiêu chuẩn	Kết quả			Đánh giá
		Lô I	Lô II	Lô III	
Vô trùng	-	-	-	-	Đạt
Phát hiện trực khuẩn lao	-	-	-	-	Đạt
Mycoplasma	-	-	-	-	Đạt
Hiệu giá	$>10^{5,5} \text{CCID}_{50}/0,1\text{ml}$	$10^{7,73}$	$10^{7,76}$	$10^{7,75}$	Đạt
Nhận dạng virus bại liệt	Typ III	Typ III	Typ III	Typ III	Đạt

Ghi chú: (-): Âm tính.



Ghi chú: A: Nuôi cấy trên chai 10 tầng; B: Nuôi cấy trên chai Roux.

Hình 5. Nuôi tế bào trong chai nhựa 10 tầng và nuôi trong chai Roux

3.6. Đánh giá hiệu quả sản xuất vaccin trên chai nhựa 10 tầng

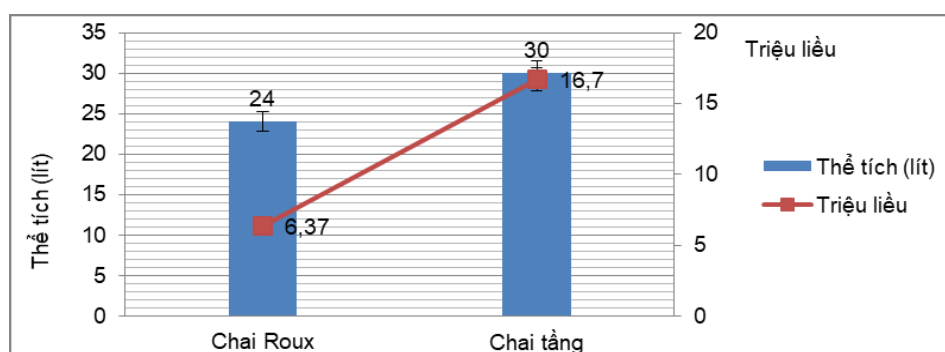
Trong cùng quy trình sản xuất, trên chai Roux và chai nhựa 10 tầng hiệu quả mang lại khác nhau rõ rệt. Đối với chai nhựa 10 tầng, chỉ cần 1 giá để nuôi, tuy nhiên đối với chai Roux cần sử dụng nhiều giá nuôi và tốn nhiều diện tích nuôi hơn (Hình 5). Khả năng bị lây nhiễm cũng cao hơn khi thao tác với nhiều chai.

Nếu so sánh giữa 2 quy trình nuôi bằng chai Roux và chai nhựa 10 tầng cho thấy diện tích và số lượng chai Roux cần sử dụng sẽ rất lớn. Nếu tính ở quy mô lớn, quy trình sản xuất sử dụng chai nhựa nhiều tầng tiết kiệm thời gian sản xuất do không phải làm nhiều lô, tiết kiệm được số lượng khí, chi phí nhân công và nguyên vật liệu, môi trường và không phải xử lý, rửa và sấy chai Roux nhờ đó giảm thiểu được các tác nhân ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm. Hiệu quả của 2 quy trình sản xuất, các thông số bao gồm số cặp thận khí sử dụng, thời gian sản xuất, thể tích, hiệu giá và số liệu vaccin được so sánh sau 3 lô sản xuất (Hình 6; Bảng 4).

Đối với 1 lô sản xuất trên chai Roux hay chai nhựa 10 tầng đều chỉ sử dụng 1 cặp thận khí để tách tế bào. Tuy nhiên, trong cùng khoảng thời gian sản xuất 14 ngày, khi dùng chai Roux mỗi lô chỉ thu được 24 lít, trong khi chai nhựa 10 tầng thu được 30 lít vaccin bán thành phẩm đơn tấp.

Hiệu giá thu được trung bình khi sản xuất trên chai Roux là $7,4 \log_{10} \text{CCID}_{50}/0,1\text{ml}$ và ở chai nhựa 10 tầng là $7,74 \log_{10} \text{CCID}_{50}/0,1\text{ml}$. Do đó số liệu vaccin thành phẩm thu được trung bình trên chai Roux là 6,37 triệu liều và trên chai nhựa 10 tầng là 16,7 triệu liều (gấp 2,62 lần). Như vậy, việc sử dụng chai nhựa 10 tầng vào sản xuất có hiệu quả cao hơn nhiều so với sản xuất theo quy trình truyền thống sử dụng chai Roux bằng thủy tinh (Hình 6).

Như vậy, với cùng 1 cặp thận khí và thời gian sản xuất 14 ngày, khi sản xuất trên chai Roux phải sử dụng rất nhiều chai cho 1 lô. Dù chai Roux rẻ hơn chai nhựa 10 tầng và có thể tái sử dụng được nhiều lần nhưng chi phí và nhân công để xử lý chai (ngâm, rửa, sấy tiệt trùng) lại cao hơn. Ngoài ra, nguy cơ nhiễm trùng sau khi xử lý cao hơn so với chai nhựa 10 tầng dẫn đến có thể ảnh hưởng đến hiệu quả sản xuất và chất lượng sản phẩm. Số lượng lao động cho sản xuất trên chai Roux cũng nhiều hơn so với chai tầng (Bảng 4). Giá trị kinh tế ở số liệu thành phẩm thu được trên chai nhựa 10 tầng là 16,7 triệu liều, tương đương khoảng 33,4 tỉ trong khi đó, 1 lô sản xuất sử dụng chai Roux thu được 6,37 triệu liều, tương đương khoảng 12,7 tỉ. Như vậy, nếu so sánh hiệu quả sản xuất vaccin thì sử dụng chai nhựa 10 tầng sẽ cao hơn nhiều so với chai Roux.



Hình 6. Hiệu quả sản xuất vaccin trên chai Roux và chai nhựa 10 tầng

Bảng 4. So sánh hiệu quả kinh tế của sản xuất trên chai Roux và trên chai nhựa 10 tầng

Lô sản xuất	Thể tích vaccin (lít)	Chi phí xử lý/chai (triệu)	Giá thành/chai (triệu)	Công lao động/lô (triệu)	Số liệu vaccin thành phẩm (triệu liều)	Doanh số/lô (tỉ đồng)
300 chai Roux	24	0,2	1	180	6,37	12,7
20 chai 10 tầng	30	0	4	120	16,7	33,4

4. KẾT LUẬN

Vaccin bOPV là dạng vaccin an toàn được sử dụng rộng rãi trong chương trình tiêm chủng mở rộng hiện nay. Cải tiến thành công quy trình công nghệ sản xuất vaccin bán thành phẩm đơn tít trên chai nhựa 10 tầng trong nghiên cứu này đóng góp rất to lớn cho việc phát triển sản xuất vaccin đạt chất lượng sau này. Việc sản xuất trên chai nhựa 10 tầng ở mỗi lô theo quy trình cải tiến thu được 30 lít vaccin bán thành phẩm, hiệu giá trung bình là $7,74\log_{10}$ CCID₅₀/0,1ml, số liệu thu được 16,7 triệu liều, hiệu quả hơn so với quy trình trên chai Roux thu được là 24 lít vaccin bán thành phẩm, hiệu giá trung bình $7,4\log_{10}$ CCID₅₀/0,1ml, số liệu thu được 6,37 triệu liều. Các thông số tối ưu cho quy trình sản xuất vaccin bại liệt bán thành phẩm trên chai nhựa 10 tầng với mật độ tế bào nuôi đưa vào ở giai đoạn P0 và P1 là 156.000 tế bào/ml. Thể tích hỗn dịch nuôi tế bào tối ưu trên 1 tầng chai là 200ml đối với chai nhựa 10 tầng, mỗi tầng 636cm². Lượng MOI cho gây nhiễm là (1CCID₅₀/15 = 300tb), thể tích môi trường duy trì bổ sung sau gây nhiễm là 150 ml/tầng cho hiệu quả sản xuất vaccin cao nhất.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện từ nguồn kinh phí đề tài của Trung tâm Nghiên cứu Sản xuất Vaccin và Sinh phẩm Y tế (POLYVAC).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Attaullah Ahmadi, Mohammad Yasir Essar, Xu Lin, Yusuff Adebayo Adebisi & Don Eliseo Lucero-Prisno (2020). Polio in Afghanistan: The Current Situation amid COVID-19. *American Journal of Hygiene and Tropical Medicine*. 103(4): 1367-1369.

Bakker W.A., Thomassn Y.E. & Van't Oever A.G. (2011). Inactivated polio vaccine development for technology transfer using attenuated Sabin poliovirus strains to shift from Salk-IPV to Sabin-IPV. *Vaccine*. 29(41): 7188-96.

Đoàn Xuân Mượu (1977). *Virus học* (Tập 2). Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.

Dược điển Việt Nam IV (2009). Chuyên đề vaccin huyết thanh và sinh phẩm. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.

Freshney R.I. (2000). *Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique*. 4th edition. Wiley-Liss. New York. pp. 413-414.

Hoàng Thuý Nguyên, Nguyễn Trung Thành & Huỳnh Ngọc Tính (1967). Tình hình bệnh bại liệt ở miền bắc Việt Nam sau 6 năm gây miễn dịch rộng rãi bằng vaccin sống giảm độc lực (Sabin). *Tạp chí Y học Việt Nam*. 4: 8-11.

Kärber G. (1931). Beitrag zur kollektiven behandlung pharmakologischer reihenversuche. *Archive für Experimentelle Pathologie Pharmakologie*. 162: 480-483.

Lê Thị Luân & Nguyễn Đăng Hiền (2007). Vaccin bại liệt sống uống công nghệ sản xuất và qui trình kiểm tra chất lượng. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.

Nguyễn Đăng Hiền, Lê Thị Luân & Nguyễn Thị Quý (2014). Môi trường sử dụng cho nghiên cứu và sản xuất vaccin. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.

Nguyễn Đăng Hiền, Nguyễn Thuý Hương & Lê Thị Luân (2014). Thường quy kiểm định vaccin OPV. Nhà xuất bản y học, Hà Nội.

Nguyễn Đình Bảng (2016). *Vaccin học*. Nhà xuất bản Đại học quốc gia Hà Nội, Hà Nội.

Nguyễn Thu Yên (2002). Thành quả thanh toán bệnh bại liệt ở Việt Nam. *Tạp chí Y học thực hành*. 6 : 17-18.

Nguyễn Văn Mẫn & Nguyễn Đăng Hiền (2000). Hiệu quả quy trình tách tế bào thận khi bằng phương pháp truyền dịch Trypsin. *Tạp chí Y học thực hành*. 8: 40-42.

Phạm Ngọc Thạch, Võ Tổ & Hoàng Thuý Nguyên (1960). Việc gây miễn dịch rộng rãi chống bệnh bại liệt cho các trẻ em ở nước Việt Nam Dân chủ Cộng hoà bằng vaccin làm với các giống siêu vi trùng giảm độc lực của Sabin. *Tạp chí Y học Việt Nam*. 5: 10-16.

Sabin A.B. (1957). Properties and behavior of orally administered attenuated poliovirus vaccine. *Jama*. 164: 1216-1223.

Trịnh Quân Huân (2009). Cẩm nang phòng chống bệnh truyền nhiễm. Bộ Y tế. Cục Y tế Dự phòng và Môi trường. Hà Nội.

WHO (2016). Polio vaccines. WHO position paper, *Weekly epidemiological record*. 91(12): 145-168.

WHO TRS 980 (2014). Annex2. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of poliomyelitis vaccines. pp. 66-77.