

XÁC ĐỊNH THỜI ĐIỂM THÍCH HỢP ĐỂ THU HOẠCH KHÁNG NGUYÊN LỞ MỖM LONG MÓNG TYPE A TRÊN HỆ THỐNG NỒI LÊN MEN

Nguyễn Hồng Thu¹, Đồng Thị Hồng Liên¹, Đồng Văn Trường¹, Cao Văn Hùng¹, Đào Thị Linh³, Vũ Đức Hạnh¹, Trịnh Đình Thâu², Dương Hồng Quảng², Lại Thị Lan Hương², Bùi Trần Anh Đào², Tô Long Thành²

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành tối ưu quy trình nuôi cấy tế bào BHK-21 dạng treo trong hệ thống nồi lên men, gây nhiễm virus lở mồm long móng (LMLM), type A và thu hoạch kháng nguyên đạt yêu cầu kỹ thuật phục vụ sản xuất vaccin vô hoạt nhũ dầu. Tế bào BHK-21 giống gốc đã nuôi, cấy chuyển liên tiếp qua nhiều đời, được chuyển vào hệ thống nồi nuôi. Tế bào phát triển nhanh về số lượng và đạt mật độ lớn nhất là $2,8 \times 10^6$ cell/ml tại thời điểm 36h sau nuôi cấy. Tiến hành gây nhiễm chủng virus LMLM A-AVAC 1, A-AVAC 2 với liều gây nhiễm được xác định tại giá trị 0,005 MOI để thu được kháng nguyên có hiệu giá virus lớn hơn $10^{7.5}$ TCID₅₀/ml. Chúng tôi đã chuẩn độ hiệu giá virus theo thời gian và đạt được kết quả hiệu giá virus cao nhất $10^{7.77}$ TCID₅₀/ml ở thời điểm từ 18h đến 24h. Thời gian này là mốc thích hợp nhất để thu hoạch kháng nguyên LMLM của 2 chủng, type A đạt yêu cầu chất lượng, là tiền đề sản xuất vaccin vô hoạt nhũ dầu phòng bệnh LMLM.

Từ khóa: LMLM, kháng nguyên, tế bào BHK-21 dạng treo, MOI (liều gây nhiễm), nồi lên men.

Determination of appropriate time to harvest FMD antigen, type A in fermentation pot system

Nguyen Hong Thu, Dong Thi Hong Lien, Dong Van Truong, Cao Van Hung, Dao Thi Linh, Vu Duc Hanh, Trinh Dinh Thau, Duong Hong Quang, Lai Thi Lan Huong, Bui Tran Anh Dao, To Long Thanh

SUMMARY

In this research, we conducted the experiments to optimize the process of culturing BHK-21 suspension cells in the fermentation pot system and then infected FMD virus, type A and harvested the antigens meeting the technical requirements to serve for the production of oil inactivated vaccines. The BHK-21 seed cells were cultured continuously through many generations, then transferred to the culture tank system. The maximum cell growth in number and density was 2.8×10^6 cells/ml after 36 hours. This was the time to infect FMD virus A-AVAC 1, A-AVAC 2 with the infectious dose was determined at 0.005 MOI to obtain antigens with virus titer greater than $10^{7.5}$ TCID₅₀/ml. We titrated the virus titer by time and achieved the highest viral titer of $10^{7.77}$ TCID₅₀/ml at the time from 18 hours to 24 hours. This time was the most appropriate milestone to harvest FMD antigens of 2 trains, type A meeting quality requirements, which is a prerequisite for production of FMD oil inactivated vaccine.

Keywords: FMD, antigen, BHK-21 suspension cells, MOI (multiplicity of infection), fermentation tank system.

¹ Công ty RTD

² Học viện Nông nghiệp Việt Nam

³ Học viên cao học K28, khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh lở mồm long móng (LMLM) là một bệnh truyền nhiễm nguy hiểm do virus thuộc họ *Picornaviridae* gây ra (OIE, 2017). Bệnh lây lan nhanh, mạnh, thường xảy ra ở thể cấp tính, có thể lây lan trong phạm vi một nước hoặc nhiều nước, sự lây lan không chỉ do tiếp xúc mà còn qua nhiều đường lây nhiễm khác, kể cả qua không khí (Grubman và Baxt, 2004). Bệnh LMLM được OIE xếp đầu tiên trong danh mục bảng A các bệnh truyền nhiễm nguy hiểm của gia súc, gia cầm. Bệnh gây thiệt hại nghiêm trọng về kinh tế và ảnh hưởng đến thương mại, đặc biệt là việc buôn bán động vật và sản phẩm có nguồn gốc động vật (Rodriguez và Grubman, 2009). Việc phòng chống bệnh LMLM ở nhiều nước đã trở thành một chính sách rất quan trọng, nhất là trong thời đại của kinh tế thị trường.

Hiện nay, ở Việt Nam bệnh xảy ra quanh năm, việc phòng chống dịch bệnh còn gặp nhiều khó khăn do phụ thuộc rất lớn vào việc nhập khẩu vaccin. Chính vì những lý do cấp thiết trên, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu sản xuất vaccin nội địa để việc phòng chống dịch được hiệu quả. Xuyên suốt quá trình nghiên cứu và sản xuất thử nghiệm, chúng tôi đánh giá việc xác định thời điểm thích hợp để thu hoạch kháng nguyên LMLM là tiền đề chính, là khâu quan trọng nhất trong toàn bộ quy trình sản xuất vaccin vô hoạt nhũ dầu phòng bệnh LMLM.

II. NỘI DUNG, NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung

- Tối ưu quy trình nuôi cấy tế bào BHK-21 dạng treo trên hệ thống nồi lên men.

- Lựa chọn liều gây nhiễm (MOI) thích hợp virus LMLM type A trên tế bào BHK-21 dạng treo cho hiệu giá virus ($TCID_{50}$) cao nhất.

- Xác định thời điểm thích hợp để thu hoạch kháng nguyên LMLM type A trên hệ thống nồi lên men.

2.2. Nguyên liệu

- Giống virus LMLM: 2 chủng giống A/FMD/AVAC-1 (ký hiệu A1) và A/FMD/AVAC-2 (ký hiệu A2) do Công ty cổ phần phát triển công nghệ nông thôn (RTD) phân lập với hiệu giá đạt tối thiểu 10^7 $TCID_{50}$ /ml.

- Tế bào BHK-21 dạng treo

- Tế bào BHK-21 dạng một lớp.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp đếm tế bào

Sử dụng Trypan blue 1% pha trong PBS (không chứa Ca^{2+} , Mg^{2+}). Pha loãng 100μl huyền phù tế bào với 100μl trypan blue, trộn đều, làm khô buồng đếm Neubauer sau đó ép lamén dính vào buồng đếm. Chuyển 10μl dịch tế bào đã nhuộm vào buồng đếm. Đếm số tế bào sống trong 4 ô vuông lớn ở 4 góc và 1 ô trung tâm (hình 1). Tính toán số lượng tế bào sống theo công thức:

$$C = a \times m \times 1/5 \times 10^4$$

Trong đó:

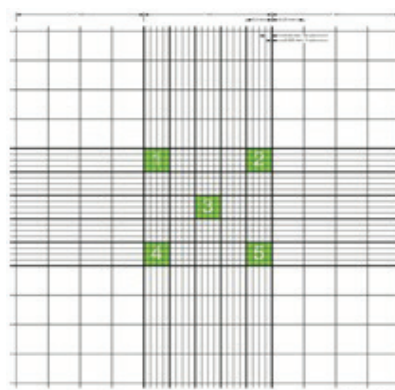
C: số lượng tế bào/ml

a: tổng số tế bào đếm được trong 5 ô vuông lớn

m: độ pha loãng giữa mẫu và trypan blue

1/5: giá trị trung bình tế bào ở mỗi ô vuông

10^4 : thể tích mỗi ô vuông.



Hình 1. Các ô đếm tế bào

2.3.2. Chuẩn độ virus

Virus LMLM được pha loãng theo cơ số 10 (từ 10^{-1} đến 10^{-8}) trong môi trường DMEM. Trên đĩa 96 giếng, cho 100 μ l huyền dịch virus vào các giếng tương ứng. Sau đó, cho tiếp mỗi giếng 100 μ l tế bào, lắc nhẹ, ủ đĩa và theo dõi trong 5 ngày. Đọc kết quả, ghi số giếng có CPE.

Xác định chỉ số $TCID_{50}$ (liều gây nhiễm 50% tế bào) bằng phương pháp chuẩn độ virus trên tế bào BHK-21 dạng treo theo công thức của Spearman và Karber (1908) như sau:

$$TCID_{50} = X_0 + d/2 - d \times \sum i/n$$

Trong đó:

X_0 : nồng độ pha loãng cao nhất mà tại đó tế bào có bệnh tích là 100%

d: khoảng cách pha loãng

i: giếng tế bào có bệnh tích từ nồng độ X_0

n: số giếng tế bào gây nhiễm ở mỗi nồng độ

2.3.3. Xác định liều gây nhiễm (Multiplicity of infection - MOI)

MOI = số PFU gây nhiễm/tổng số tế bào gây nhiễm

Hệ số tương quan $TCID_{50}$ và PFU được tính theo công thức (Cell Biology Protocol):

$$PFU/ml = 0,69 \times TCID_{50}$$

Tiến hành gây nhiễm virus lở mồm long móng ở các liều 0,1 MOI; 0,01 MOI; 0,005 MOI và 0,001 MOI lên tế bào BHK-21 dạng treo.

Quá trình này được thực hiện tối thiểu 3 lần,

thu nhận kết quả, tính toán và xử lý số liệu để xác định được liều gây nhiễm thích hợp nhất.

2.3.4. Xử lý số liệu

Toàn bộ số liệu được xử lý bằng các hàm của phần mềm Excel 2020 và đồ thị hàm số trên Excel 2020.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sau quá trình phục hồi tế bào và cấy chuyển đời, chúng tôi tiến hành tối ưu quy trình nuôi cấy tế bào BHK-21 dạng treo trên hệ thống nổi lên men. Theo Han và cs. (2016), tế bào BHK-21 và PK-15 là mô hình tế bào lý tưởng để nghiên cứu về bệnh LMLM và phát triển vacxin phòng bệnh.

3.1. Xác định mật độ tế bào và giá trị pH sau các thời điểm nuôi cấy

Để sản xuất kháng nguyên LMLM với số lượng lớn, chúng tôi tiến hành thí nghiệm nuôi cấy 30 lít tế bào BHK-21 dạng treo trên hệ thống nổi lên men 100 lít với lượng tế bào nuôi cấy ban đầu cố định là $5,0 \times 10^5$ tế bào/ml và sử dụng môi trường DMEM có bổ sung 5% FBS. Nồi được vận hành với tốc độ khuấy 90 vòng/phút; lưu lượng khí 0,5 lít/phút; pH ban đầu = 7,0 $\pm$ 0,1. Quá trình được thực hiện 5 lần ở cùng điều kiện nuôi.

Tại thời điểm 12 giờ, 24 giờ, 36 giờ, 48 giờ, 60 giờ và 72 giờ sau khi nuôi cấy, tiến hành lấy mẫu để kiểm tra mật độ tế bào BHK-21 dạng treo với kết quả thu được như ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả trung bình của mật độ tế bào và độ pH qua 5 lần thí nghiệm

Thời gian nuôi (h)	Mật độ ($\times 10^6$ TB/ml)	pH	Thông số kỹ thuật nổi lên men		
			Tốc độ khuấy (rpm)	CO ₂	O ₂
12	0,84	7,14	90	80	-
24	1,76	7,26	90	80	-
36	2,80	6,87	90	80	-
48	2,71	6,82	90	80	-
60	2,62	5,85	90	100	-
72	2,56	5,80	90	150	-

Bảng dữ liệu trên cho thấy ở giai đoạn 12-36 giờ sau nuôi, tế bào phát triển nhanh về số lượng và đạt mức lớn nhất tại thời điểm 36 giờ. Sau đó số lượng tế bào không tăng và bắt đầu có xu hướng giảm từ $2,80 \times 10^6$ TB/ml xuống còn $2,56 \times 10^6$ TB/ml tại thời điểm 72 giờ sau nuôi. Nghiên cứu sản xuất vắc xin LMLM type O của công ty RTD cũng cho các kết quả tương tự.

Kết quả kiểm tra sự phát triển và đếm số lượng tại các thời điểm, tế bào BHK-21 dạng treo phát triển tốt và đạt mật độ yêu cầu sau 36 giờ nuôi cấy ($2,8 \times 10^6$ TB/ml). Trong cùng điều kiện về nhiệt độ, môi trường nuôi cấy, nồng độ,

pH, tế bào BHK-21 phát triển tốt, không bị tạp nhiễm và kích thước tế bào đồng đều nhau.

3.2. Xác định liều gây nhiễm (MOI) virus LMLM type A trên tế bào BHK-21 dạng treo cho TCID₅₀ cao nhất

Tại thời điểm nuôi cấy tế bào đạt mật độ cao nhất, tiến hành gây nhiễm hai chủng A1 và A2 với các giá trị MOI khác nhau, ta có kết quả chuẩn độ tính hiệu giá TCID₅₀.

Kết quả tính TCID₅₀ sau 72h chuẩn độ được thể hiện qua bảng 2.

Bảng 2. Kết quả chuẩn độ hiệu giá TCID₅₀

Liều gây nhiễm	Chủng gây nhiễm	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 4	Lần 5	Trung bình
0,1 MOI	A1	$10^{6,421}$	$10^{6,3}$	$10^{6,425}$	$10^{6,325}$	$10^{6,4}$	$10^{6,37}$
	A2	$10^{6,345}$	$10^{6,4}$	$10^{6,425}$	$10^{6,375}$	$10^{6,445}$	$10^{6,34}$
0,01 MOI	A1	$10^{7,28}$	$10^{7,3}$	$10^{7,25}$	$10^{7,345}$	$10^{7,445}$	$10^{7,32}$
	A2	$10^{7,3}$	$10^{7,33}$	$10^{7,28}$	$10^{7,28}$	$10^{7,34}$	$10^{7,31}$
0,005 MOI	A1	$10^{7,66}$	$10^{7,68}$	$10^{7,7}$	$10^{7,75}$	$10^{7,65}$	$10^{7,69}$
	A2	$10^{7,73}$	$10^{7,75}$	$10^{7,64}$	$10^{7,71}$	$10^{7,76}$	$10^{7,72}$
0,001 MOI	A1	$10^{7,15}$	$10^{7,25}$	$10^{7,18}$	$10^{7,09}$	$10^{7,12}$	$10^{7,32}$
	A2	$10^{7,2}$	$10^{7,22}$	$10^{7,16}$	$10^{7,19}$	$10^{7,17}$	$10^{7,19}$

Qua số liệu trên, huyền dịch kháng nguyên LMLM có hiệu giá virus lớn hơn $10^{7,5}$ TCID₅₀/ml khi lựa chọn liều gây nhiễm ban đầu là 0,005 MOI; cụ thể là khi lựa chọn liều gây nhiễm ban đầu là 0,005 MOI; hiệu giá virus chủng A1 đạt mức $10^{7,75}$ TCID₅₀/ml và hiệu giá virus chủng A2 đạt mức $10^{7,76}$ TCID₅₀/ml. Ở những nồng độ MOI khác trên cả 2 chủng, hiệu giá virus đạt được dưới giá trị $10^{7,5}$ TCID₅₀/ml; do vậy ở những nồng độ gây nhiễm này không đáp ứng được hiệu giá virus cho sản xuất vắc xin.

3.3. Xác định thời điểm thích hợp để thu hoạch kháng nguyên LMLM type A trên hệ thống nổi lên men

Tế bào BHK-21 dạng treo được gây nhiễm từng chủng giống riêng biệt với giá trị MOI đã được xác định ở trên. Thí nghiệm được lặp lại 5 lần.

3.3.1. Kết quả xác định mật độ tế bào BHK-21 dạng treo sau gây nhiễm virus

Sau khi gây nhiễm lần lượt 2 chủng virus vào hệ thống nổi nuôi tế bào, tiến hành theo dõi, quan sát và lấy mẫu đếm tế bào. Kết quả đếm tế bào được thể hiện ở bảng 3.

Từ bảng 3, chúng tôi thấy sau 18h gây nhiễm, mật độ tế bào bằng 0, chứng tỏ trong nồi nuôi cấy không còn tế bào phát triển; hay nói cách khác sau 18h virus đã xâm nhiễm và phá hủy hoàn toàn tế bào BHK-21.

Bảng 3. Kết quả xác định mật độ tế bào BHK-21 dạng treo sau gây nhiễm

Thời gian (h)	Mật độ ($\times 10^6$ tế bào/ml)		Thông số kỹ thuật nuôi		
	A1	A2	Tốc độ khuấy (rpm)	CO ₂	O ₂
12h	1,52	1,51	90	1200	-
18h	0	0	90	1000	-
24h	0	0	90	900	-
36h	0	0	90	900	-
48h	0	0	90	900	-

3.3.2. Xác định hiệu giá virus sau gây nhiễm

Tiến hành lấy mẫu huyền dịch từng thời

điểm sau gây nhiễm để chuẩn độ hiệu giá virus, kết quả được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả chuẩn độ virus sau gây nhiễm (TCID₅₀/ml)

Thời gian	Lần 1		Lần 2		Lần 3		Lần 4		Lần 5	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
12h	10 ^{4,26}	10 ^{4,18}	10 ^{4,21}	10 ^{4,19}	10 ^{4,30}	10 ^{4,13}	10 ^{4,55}	10 ^{4,68}	10 ^{4,21}	10 ^{4,11}
18h	10 ^{7,78}	10 ^{7,76}	10 ^{7,78}	10 ^{7,77}	10 ^{7,76}	10 ^{7,72}	10 ^{7,77}	10 ^{7,78}	10 ^{7,76}	10 ^{7,77}
24h	10 ^{7,65}	10 ^{7,69}	10 ^{7,68}	10 ^{7,73}	10 ^{7,71}	10 ^{7,69}	10 ^{7,76}	10 ^{7,69}	10 ^{7,74}	10 ^{7,74}
36h	10 ^{6,78}	10 ^{6,88}	10 ^{6,70}	10 ^{6,84}	10 ^{6,67}	10 ^{6,84}	10 ^{6,85}	10 ^{6,88}	10 ^{6,81}	10 ^{6,94}
48h	10 ^{5,64}	10 ^{5,94}	10 ^{5,68}	10 ^{5,91}	10 ^{5,54}	10 ^{5,77}	10 ^{5,78}	10 ^{5,77}	10 ^{5,62}	10 ^{5,95}

Giá trị trung bình hiệu giá virus 2 chủng được thể hiện ở bảng 5.

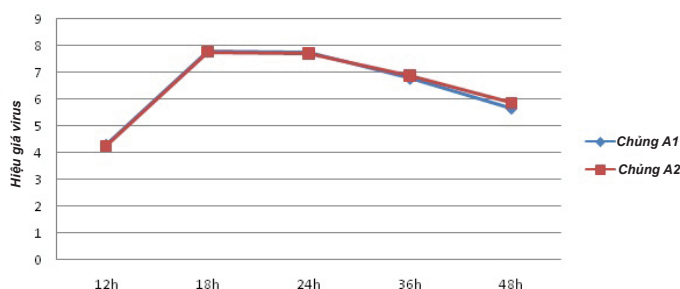
Bảng 5. Hiệu giá virus trung bình của 2 chủng theo thời gian

Thời gian (h)	A1	A2
12	10 ^{4,31}	10 ^{4,26}
18	10 ^{7,77}	10 ^{7,76}
24	10 ^{7,71}	10 ^{7,71}
36	10 ^{6,76}	10 ^{6,88}
48	10 ^{5,65}	10 ^{5,87}

Từ bảng 4 và 5, chúng tôi xây dựng đường cong sinh trưởng của 2 chủng LMLM type A (hình 2).

Tốc độ sinh trưởng virus ở từng thời điểm của 2 chủng là như nhau. Sau khi gây nhiễm 2 chủng virus, chúng tôi đã lấy mẫu theo thời gian và chuẩn độ hiệu giá virus, từ kết quả thu nhận được và hiển thị trên biểu đồ cho thấy hiệu giá chủng A1 và A2 đạt cao nhất tại thời điểm 18h với hiệu giá lần lượt là 10^{7,77} và 10^{7,76}, sau 18h hiệu giá virus cả 2 chủng giảm dần theo thời gian.

Như vậy, tốc độ sinh trưởng của 2 chủng virus LMLM type A trong nghiên cứu tương đối đồng đều. Thời điểm thu hoạch kháng nguyên tối ưu đối với các chủng virus LMLM type A là từ 18h đến 24h sau khi gây nhiễm. Mật độ tế bào cũng giảm dần và tỷ lệ nghịch với hiệu giá virus của huyền dịch kháng nguyên.



Hình 2. Đường cong sinh trưởng của 2 chủng virus LMLM A1 và A2 (trung bình 5 lần)

IV. KẾT LUẬN

Tế bào BHK-21 phát triển nhanh về số lượng từ giai đoạn 12-36h nuôi cấy với mật độ lớn nhất ở thời điểm 36h đạt $2,8 \times 10^6$ tế bào/ml.

Liều gây nhiễm thích hợp của chủng virus LMLM type A là 0,005 MOI để thu được kháng nguyên có hiệu giá virus lớn hơn $10^{7.5}$ TCID₅₀/ml.

Thời điểm thu hoạch tối ưu trên hệ thống nuôi lên men đối với chủng virus LMLM type A là từ 18h đến 24h sau khi gây nhiễm.

Lời cảm ơn: Kinh phí thực hiện nghiên cứu này dựa trên đề tài: “Nghiên cứu, sản xuất vaccin vô hoạt nhũ dầu phòng bệnh lở mồm long móng type A cho gia súc” do Bộ Khoa học và Công nghệ Việt Nam cấp. Chúng tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến Công ty cổ phần và phát triển công nghệ nông thôn (RTD) và các tổ chức cá nhân đã tận tình giúp đỡ thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Domingo, E., Escarmail, C., Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C.M., Carrillo, E., Nájera, J.I. and Sobrino, F., 2003. Evolution of foot-and-mouth disease virus. *Virus research* 91, 47-63.
- Grubman, M. J. and B. Baxt, 2004. Foot-and-mouth disease. *Clinical microbiology reviews* 17(2): 465-493.
- Han, S.-C., H.-C. Guo, S.-Q. Sun, Y. Jin, Y.-Q. Wei, X. Feng, X.-P. Yao, S.-Z. Cao, D. X. Liu and X.-T. Liu, 2016. Productive entry of foot-and-mouth disease virus via macropinocytosis independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *Scientific reports* 6: 19294.
- Hoang, V.N., 2009. Meeting of the OIE Sub-Commission for foot-and-mouth disease in South-East Asia. In: 15th (Ed), Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia
- Kärber, G., 1931. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Naunyn-Schmiedeberg's Archiv für experimentelle pathologie und pharmacologie* 162(4): 480-483.
- Kitching, R.P., Barnett, P.V., Mackay, D.K.J., Donaldson, A.I., 2004. Foot-and-mouth disease. In: Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, Office International des Epizooties, Paris
- OIE, 2019. Foot and Mouth Disease,” In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 2.1.5.
- OIE, 2017. Foot and mouth disease (infection with foot and mouth disease virus). Chapter 3.1.8: 32.
- Rodriguez, L. L. and M. J. Grubman, 2009. Foot and mouth disease virus vaccines. *Vaccine* 27: D90-D94.
- Spearman, C., 1908. The method of right and wrong cases (constant stimuli) without Gauss's formulae. *British Journal of Psychology* 2(3): 227.
- Van Phan Le, T.N., Kwang-Nyeong Lee, Young-Joon Ko, Hyang-Sim Lee, Van Cam Nguyen, Thuy Duong Mai, Thi Hoa Do, Su-Mi Kim, In-Soo Cho, Jong-Hyeon Park, 2010. Molecular characterization of serotype A foot-and-mouth disease virus circulating in Viet Nam in 2009. *Veterinary Microbiology* Vol. 144, 58 - 66.

Ngày nhận 9-3-2021

Ngày phản biện 31-3-2021

Ngày đăng 1-5-2021