



## **EVALUATE THE QUALITY OF BCG VACCINE PRODUCTION STRAINS BY GENE SEQUENCING METHOD**

**Tran Hong Tram<sup>1,2</sup>, Le Thi Hoang Yen<sup>1</sup>, Nguyen Phuong Lien<sup>1</sup>, Do Khanh Linh<sup>1</sup>, Do Linh Trang<sup>1</sup>, Vu Duy Dung<sup>1</sup>, Nguyen Manh Khai<sup>1</sup>, Nguyen Duy Thai<sup>1,21</sup>**

<sup>1</sup> *National Institute for Control of Vaccine and Biologicals*

<sup>2</sup> *Vietnam University of Traditional Medicine*

*Received 15 December 2023*

*Accepted 27 December 2023*

### **Abstract**

BCG is recognized as the most effective vaccine for preventing tuberculosis today. It is one of the six initial vaccines included in the nationwide expanded immunization program since 1986. Currently, the BCG vaccine is produced in Vietnam with strict requirements from strain selection to preservation. This study aims to investigate and assess the stability of the 16S rRNA gene of the production strain BCG lot 1173P2 Lot c/WS4 and the master strain BCG 1173P2 secondary seed-Lot C from the manufacturer IVAC at the National Institute for Control of Vaccine and Biologicals (NICVB). Using a cross-sectional research method, we determined the 16S rRNA gene sequences of the production strain BCG lot 1173P2 Lot c/WS4 and the master strain BCG 1173P2 secondary seed-Lot C, which were found to be 99% and 100% identical, respectively, to the gene sequence of the *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur 1173P2 strain in the International Genomic Data Bank. The results of this study demonstrate the stability of the 16S rRNA gene of the production strain BCG 1173P2 and provide a foundation for the application of gene sequencing methods for identification testing, serving the quality control of BCG vaccines in particular and other vaccines and biological products in general at NICVB.

*Keywords: BCG, identification, 16S rRNA gene sequencing, BCG 1173P2\_Pasteur Paris.*

<sup>1</sup> Corresponding author: Nguyen Duy Thai  
E-mail: [thainguyenduy@hotmail.com](mailto:thainguyenduy@hotmail.com)  
<https://doi.org/10.56086/jcvb.v3i4.119>

## ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG CHỦNG SẢN XUẤT VẮC XIN BCG BẰNG PHƯƠNG PHÁP GIẢI TRÌNH TỰ GEN

Trần Hồng Trâm<sup>1,2</sup>, Lê Thị Hoàng Yên<sup>1</sup>, Nguyễn Phương Liên<sup>1</sup>, Đỗ Khánh Linh<sup>1</sup>, Đỗ  
Linh Trang<sup>1</sup>, Vũ Duy Dũng<sup>1</sup>, Nguyễn Mạnh Khải<sup>1</sup>, Nguyễn Duy Thái<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế

<sup>2</sup> Học viện Y dược học Cổ truyền Việt Nam

Nhận ngày 15 tháng 12 năm 2023

Chấp nhận đăng ngày 27 tháng 12 năm 2023

### Tóm tắt

BCG được biết đến là vắc xin phòng ngừa bệnh lao hiệu quả nhất hiện nay, nó là 1 trong 6 loại vắc xin đầu tiên được đưa vào chương trình tiêm chủng mở rộng toàn quốc từ năm 1986. Hiện nay, vắc xin BCG đã được sản xuất tại Việt Nam theo yêu cầu nghiêm ngặt từ chọn chủng đến bảo quản. Nghiên cứu này của chúng tôi nhằm mục đích và đánh giá tính ổn định của gen 16S rRNA của chủng sản xuất (working seed) BCG lô số 1173P2 Lot c/WS4 và chủng gốc (master seed) BCG 1173P2 secondary seed-Lot C của nhà sản xuất IVAC tại Viện Kiểm định quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế (NICVB). Sử dụng phương pháp nghiên cứu cắt ngang, chúng tôi đã xác định trình tự gen 16S rRNA của chủng sản xuất BCG lô số 1173P2 Lot c/WS4 và chủng gốc BCG 1173P2 secondary seed-Lot C lần lượt tương đồng tới 99%, 100% với trình tự gen của chủng Mycobacterium bovis BCG Pasteur 1173P2 trong ngân hàng Dữ liệu gen Quốc tế. Kết quả nghiên cứu này cho thấy tính ổn định gen 16S rRNA của chủng sản xuất BCG 1173P2 và tiền đề cho việc ứng dụng phương pháp giải trình tự gen cho thử nghiệm nhận dạng phục vụ kiểm định vắc xin BCG nói riêng và các vắc xin, sinh phẩm khác nói chung tại NICVB.

*Từ khoá: BCG, nhận dạng, gen 16S rRNA, BCG 1173P2\_Pasteur Paris.*

## 1. Đặt vấn đề

Trực khuẩn lao (*Mycobacterium tuberculosis*, họ *Mycobacteriaceae*), gây ra bệnh lao, xuất hiện ở mọi lứa tuổi và giai đoạn của cuộc đời, với tần suất cao nhất tại lứa tuổi trẻ, phụ nữ mang thai và phụ nữ đang cho con bú [1,2].

Đối với trẻ sơ sinh, miễn dịch với trực khuẩn lao không được truyền từ mẹ sang con, vì vậy quá trình tiêm vắc xin BCG là rất quan trọng để tạo ra miễn dịch chống lại bệnh lao. Vắc xin BCG đông khô được sản xuất từ chủng vi khuẩn "Calmette" và "Guerin", sống, và được sử dụng để tiêm trong da để phòng ngừa bệnh lao. Quá trình sản xuất vắc xin này đặt ra những yêu cầu nghiêm ngặt, từ chọn chủng, nuôi cấy, đến đóng gói, và bảo quản. Vắc xin BCG được sản xuất tại Việt Nam từ chủng BCG 1173P2\_Pasteur Paris được thiết lập và duy trì để đảm bảo tính ổn định, có khả năng gây miễn cảm đối với tuberculin cho người và chuột lang, không gây bệnh cho người và động vật thí nghiệm, đồng thời toàn bộ quy trình sản xuất phải được thiết kế từ công đoạn nuôi cấy, sản xuất vắc xin đến kiểm định, bảo quản đều không tiếp xúc trực tiếp với ánh sáng mặt trời, tia cực tím [2].

Theo hướng dẫn của WHO [3], quá trình kiểm định chủng vắc xin BCG bao gồm nhiều thử nghiệm như độ nhạy kháng sinh, thử nghiệm quá miễn, thử nghiệm nhận dạng, kiểm tra lây nhiễm nấm và vi khuẩn, kiểm tra sự không xuất hiện của mycobacteria độc lực, kiểm tra phản ứng da quá mức... Trong việc nhận dạng chủng BCG, WHO đề xuất sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử, như xét nghiệm

PCR và giải trình tự gen, thay vì các phương pháp truyền thống như nuôi cấy tế bào [3]. Nhiều nghiên cứu trên thế giới cũng chứng minh hiệu quả của việc ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử trong việc nhận dạng chủng vắc xin BCG, điển hình như nghiên cứu của Levi D.T và cộng sự thực hiện vào năm 2016, tập trung vào đánh giá kỹ thuật nhận dạng và độ ổn định của vắc xin BCG bằng kỹ thuật multiplex PCR. Năm 2000, Jean Baldus Patel và cộng sự nghiên cứu việc nhận dạng các loài *Mycobacterium* trên đoạn gen 16S rDNA đã chứng minh sự nhanh chóng và chính xác hơn so với phương pháp truyền thống [4]. Điều này hỗ trợ việc đảm bảo chất lượng và an toàn của vắc xin BCG, là một phần quan trọng của chiến lược phòng ngừa bệnh lao trên toàn cầu [5].

Hiện nay, thử nghiệm nhận dạng trong kiểm định vắc xin BCG được tiến hành tại Viện Kiểm định Vắc xin và Sinh phẩm Y tế (NICVB) bằng kỹ thuật nuôi cấy tế bào trên môi trường Lowenstein - Jensen tại nhiệt độ 37°C/28 ngày, sau đó nhuộm Ziehl - Neelsen để quan sát khuẩn lạc theo tiêu chuẩn: trực khuẩn hình que, mảnh, kháng cồn- axit điển hình, bắt màu đỏ trên nền xanh [6]. Kỹ thuật này có ưu điểm là đơn giản, dễ làm, kinh tế nhưng thời gian trả kết quả lâu. Trong khi đó việc ứng dụng các kỹ thuật sinh học phân tử vào thử nghiệm nhận dạng cho kết quả nhanh và chính xác hơn, ngoài ra nó cung cấp thông tin liên quan để đảm bảo tính nhất quán di truyền trong sản xuất, từ lô chủng chính (master seed) thông qua lô chủng sản xuất và đến sản phẩm cuối cùng [3].

Mặc dù các vắc xin phòng lao ở Việt Nam, đặc biệt là loại vắc xin BCG sản xuất tại Viện vắc-xin và sinh phẩm Y tế (IVAC) từ chủng BCG 1173P2\_Pasteur Paris, được sử dụng phổ biến và có hiệu quả cao, nhưng để đảm bảo chất lượng chủng sản xuất, cần phải thực hiện những nghiên cứu và thử nghiệm chính xác. Điều này đã thúc đẩy sự hợp tác giữa nhà sản xuất IVAC và Viện Kiểm định quốc gia vắc xin và sinh phẩm y tế trong nghiên cứu " *Đánh giá chất lượng chủng sản xuất vắc xin BCG bằng phương pháp giải trình tự gen*", với mục tiêu kiểm tra tính ổn định gen 16S của chủng sản xuất (working seed) BCG lô số 1173P2 Lot c/WS4 và master seed BCG 1173P2 secondary seed-Lot C để đánh giá chất lượng chủng sản xuất vắc xin BCG của IVAC.

## **2. Phương pháp nghiên cứu**

Nghiên cứu được thực hiện bằng phương pháp nghiên cứu cắt ngang.

### **2.1. Đối tượng nghiên cứu**

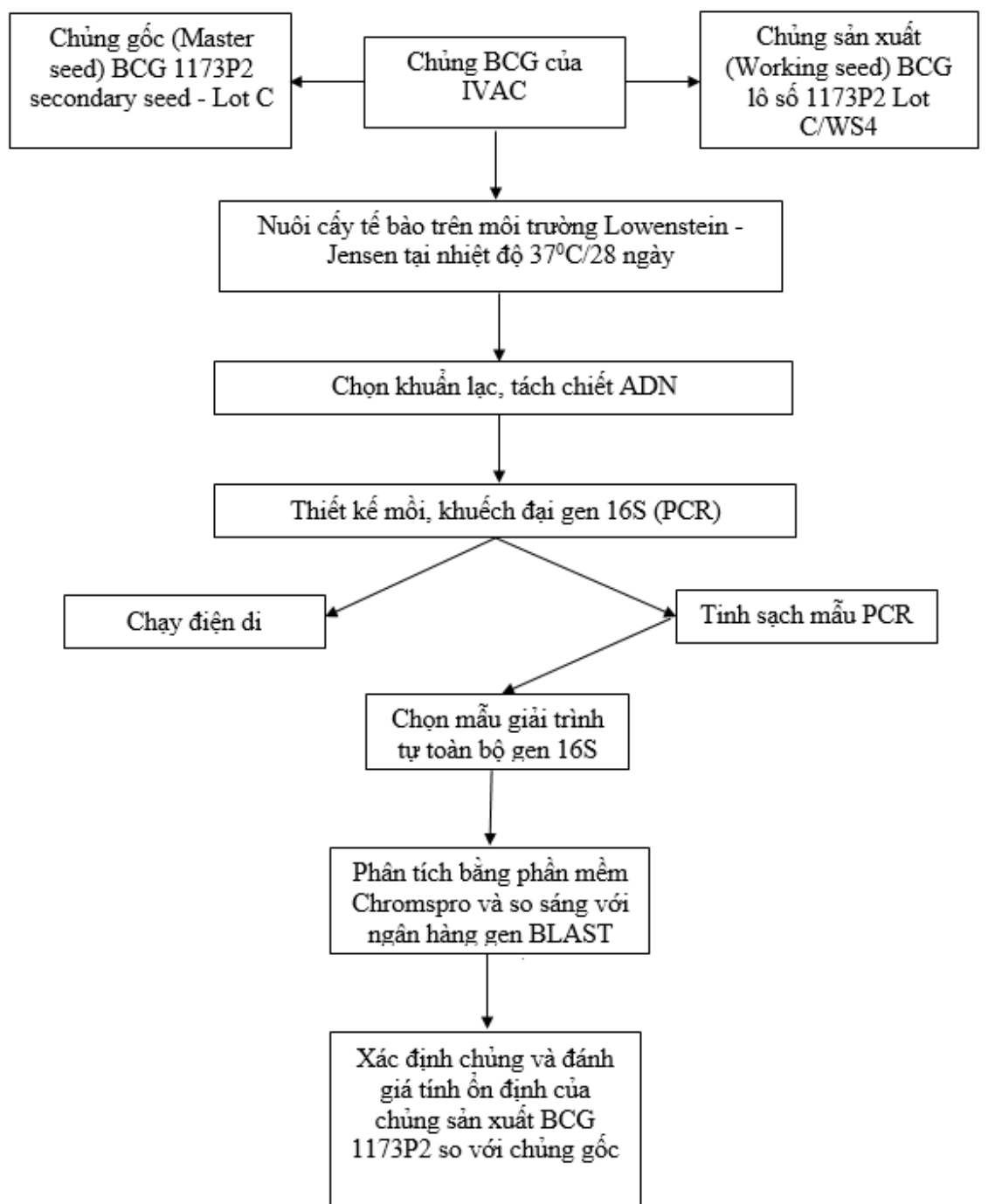
02 lọ đông khô chủng Master seed BCG 1173P2 secondary seed-Lot C và chủng sản xuất (Working seed) BCG lô số 1173P2 Lot C/WS4.

**Địa điểm nghiên cứu:** Viện Kiểm định quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế

**Tiêu chuẩn chấp nhận:** Chủng đông khô; Lọ chủng nguyên vẹn không nứt vỡ, nhãn rõ ràng.

**Tiêu chuẩn loại trừ:** Lọ chủng không nguyên vẹn, nứt vỡ; Không có nhãn mác trên lọ chủng hoặc nhãn mác không rõ ràng.

### **2.2. Thiết kế nghiên cứu**



### 2.3. Quy trình nghiên cứu

Mồi (Primer): Thiết kế trên phần mềm BLAST [7] dựa trên các trình tự mồi có trong các nghiên cứu của Lê Huyền Ái Thuý và cộng sự [8]; Yasuhiko Suzuki và cộng sự “Trình tự nucleotide hoàn chỉnh của gen 16S rRNA của *Mycobacterium bovis* BCG” [9].

Các bước tiến hành:

-Bước 1: Nuôi cấy chủng trên môi trường Lowenstein – Jensen [6].

Chọn 5 khuẩn lạc/ống chủng để tách chiết ADN, tổng số 10 khuẩn lạc cho 2 ống chủng: 1173P2 Lot c/WS4 và master seed BCG 1173P2 secondary seed-Lot C được tách chiết (bảng 1). Sau đó chọn 8 mẫu ADN: S1, S2, S3, S4, G1, G2, G3, G4 để khuếch đại gen và chạy điện di. Các mẫu ADN còn lại được lưu

giữ ở tủ (-70°C), sử dụng thay thế trong trường hợp 1 trong 8 mẫu không khuếch đại được.

**Bảng 1:** Danh sách 10 mẫu khuẩn lạc được tách tiết ADN.

| <b>STT</b> | <b>Danh sách mẫu tách chiết</b>                | <b>Mã hóa</b> |
|------------|--|---------------|
| 1          | Ống 1:1173P2 secondary seed-Lot C              | S1            |
| 2          | Ống 1:1173P2 secondary seed-Lot C              | S2            |
| 3          | Ống 1:1173P2 secondary seed-Lot C              | S3            |
| 4          | Ống 1:1173P2 secondary seed-Lot C              | S4            |
| 5          | Ống 1:1173P2 secondary seed-Lot C              | S5            |
| 6          | Ống 2: 1173P <sub>2</sub> LotC/WS <sub>3</sub> | G1            |
| 7          | Ống 2: 1173P <sub>2</sub> LotC/WS <sub>3</sub> | G2            |
| 8          | Ống 2: 1173P <sub>2</sub> LotC/WS <sub>3</sub> | G3            |
| 9          | Ống 2: 1173P <sub>2</sub> LotC/WS <sub>3</sub> | G4            |
| 10         | Ống 2: 1173P <sub>2</sub> LotC/WS <sub>3</sub> | G5            |

- Bước 2: Tách chiết DNA tổng số (sử dụng kit QIAGEN) [10]

- Bước 3: Tiến hành khuếch đại gen (PCR, sử dụng kit Promega)

- Bước 4: Điện di sản phẩm PCR

- Bước 5: Tinh sạch sản phẩm PCR (Sử dụng kit EXO-SAPII)

- Bước 6: Thực hiện giải trình tự gen 16S (thực hiện BigDye và giải trình tự Sanger trên hệ thống máy ABI 3130).

- Bước 7: Làm sạch số liệu và phân tích số liệu bằng phần mềm Chromas Pro và so sánh 16S của chủng BCG lô số 1173P2 với ngân hàng gen trên BLAST.

Mỗi mẫu ADN được chạy với 3 mỗi khác nhau: 27F, 533F, 1495R. Mỗi mỗi được chạy lặp lại ở 3 giếng khác nhau để chọn ra đoạn giải trình tự đẹp nhất. Như vậy 1 mẫu ADN được làm ở 9 giếng khác

nhau. Tổng số có 8 mẫu ADN được giải trình tự trên 72 giếng (test).

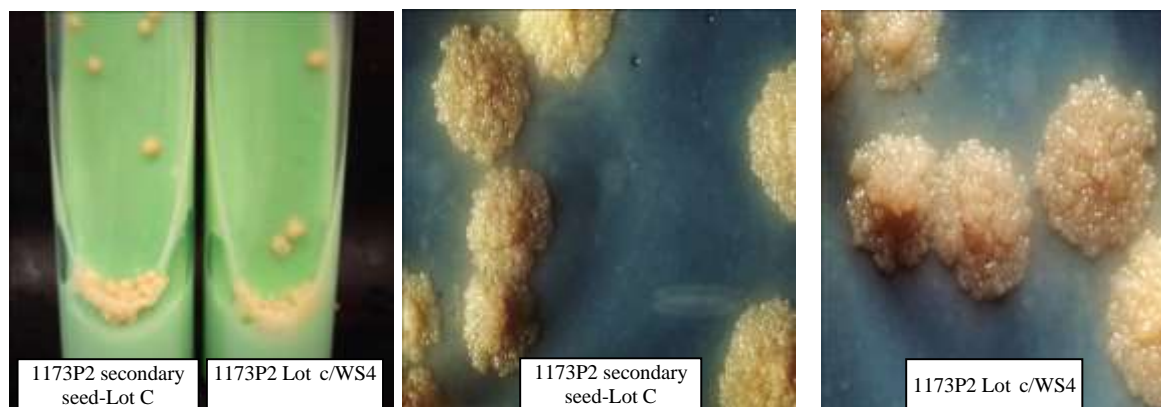
### 3. Kết quả

#### 3.1. Nuôi cấy, tách chiết và khuếch đại ADN chủng sản xuất vắc xin BCG

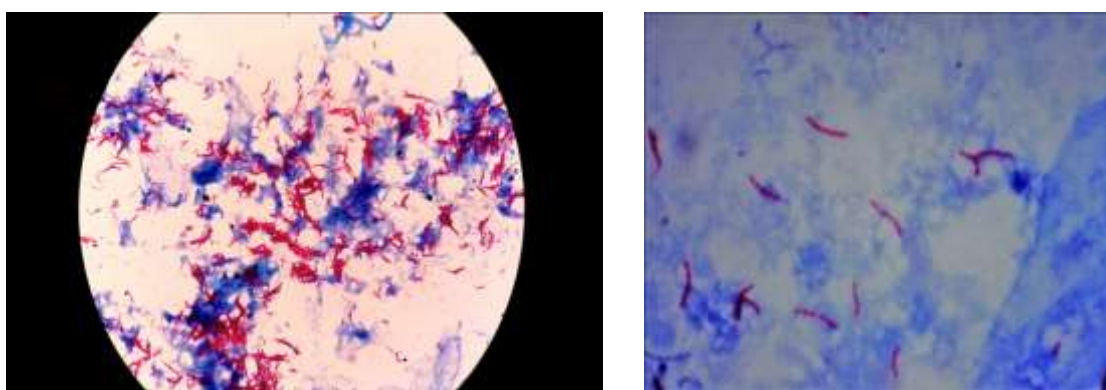
Khuẩn lạc BCG mọc trên môi trường Lowenstein khô, có màu trắng ngà, xù xì như súp lơ, mọc riêng rẽ hoặc thành cụm trên bề mặt môi trường (hình 1).

Trên kính hiển vi trực khuẩn hình que, mảnh, kháng còn-axít điển hình, bắt màu đỏ trên nền xanh (hình 2).

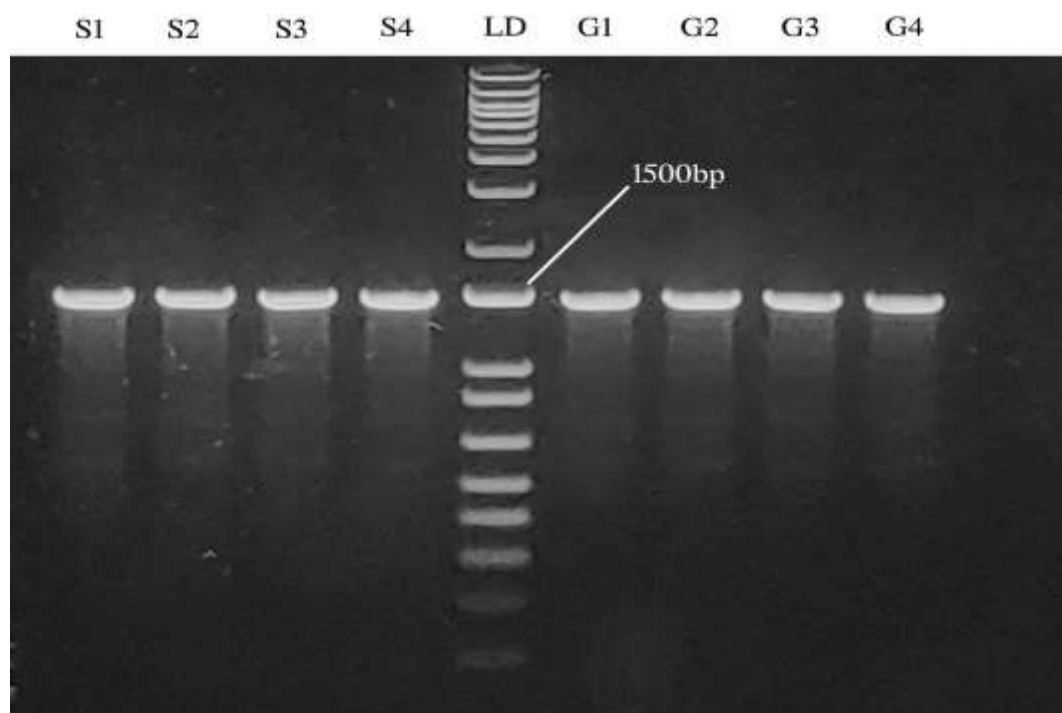
Kết quả điện di sản phẩm ADN khuếch đại của các mẫu khuẩn lạc được lựa chọn để tách chiết đều lên vạch rõ ràng, có kích thước bằng nhau là 1500bp (hình 3), phù hợp với kích thước của gen 16S. Điều này cho thấy quá trình tách chiết và khuếch đại gen đảm bảo yêu cầu.



**Hình 1:** Khuẩn lạc BCG trên ống môi trường Lowenstein-Jensen



**Hình 2.** Trực khuẩn nhuộm Ziehl-Nelsen kháng cồn-axít dưới kính hiển vi

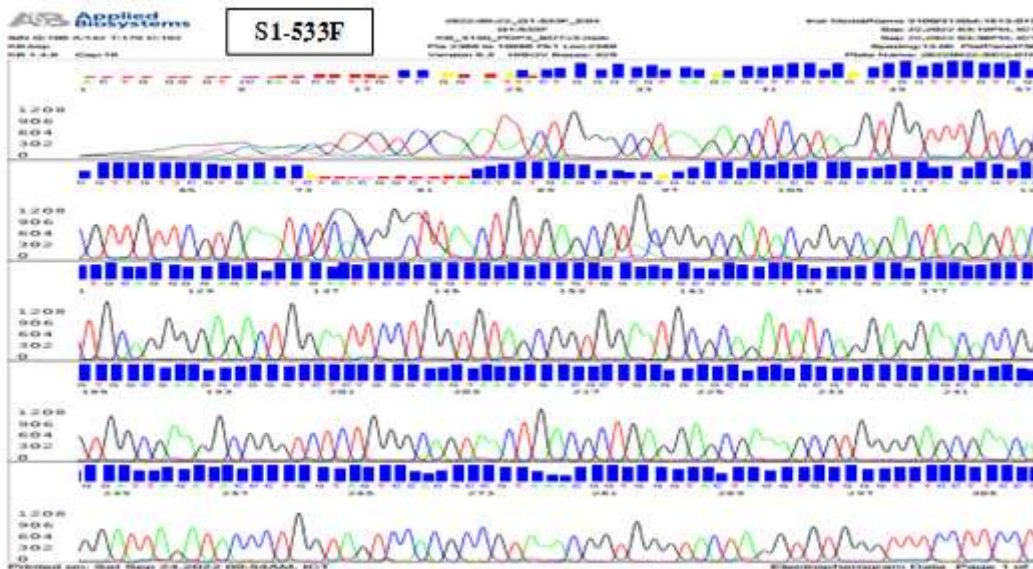
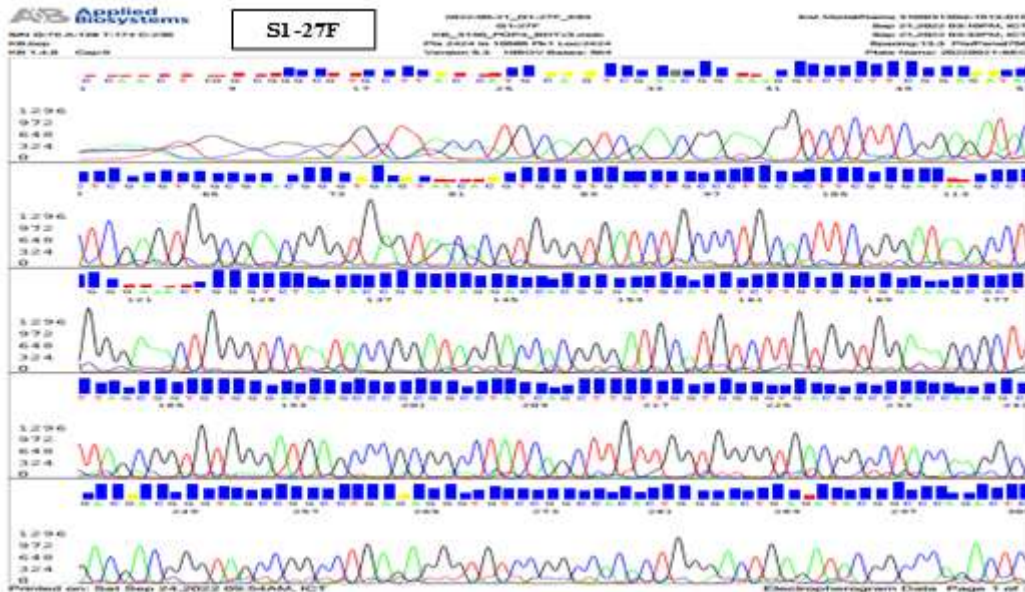


**Hình 3:** Kết quả điện di ADN của 8 mẫu khuẩn lạc nuôi cấy chủng sản xuất BCG (S: chủng gốc master seed, G: chủng sản xuất working seed).

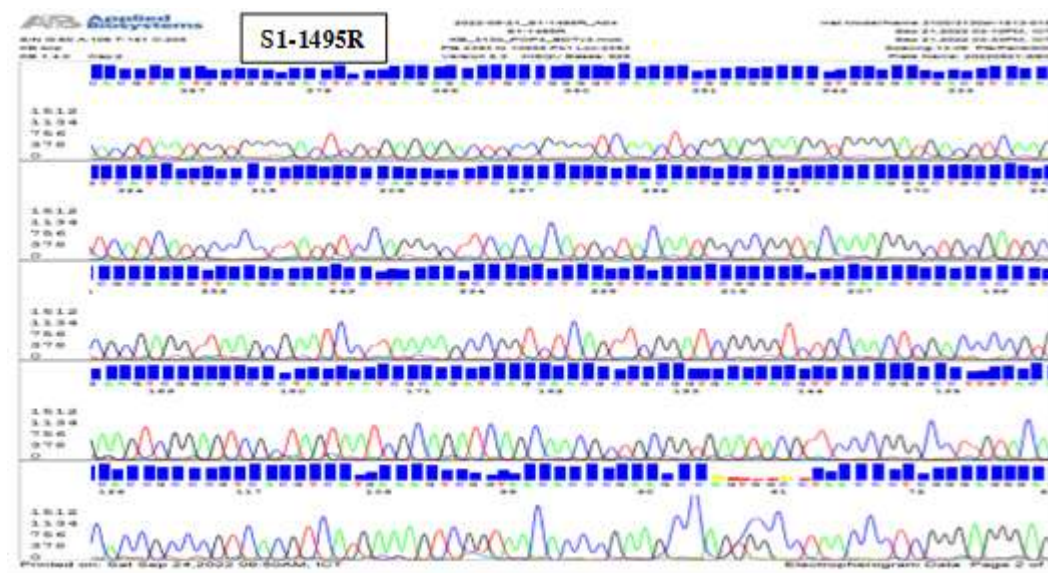
### 3.2. Trình tự của gen 16S rRNA chủng sản xuất BCG

Trong nghiên cứu của chúng tôi, 8 mẫu ADN (G1-27F, G1-533F, G1-1495R; G2-27F, G2-533F, G2-1495R; G3-27F, G3-533F, G3-1495R; G4-27F, G4-533F, G4-1495R; S1-27F, S1-533F, S1-1495R;

S2-27F, S2-533F, S2-1495R; S3-27F, S3-533F, S3-1495R; S4-27F, S4-533F, S4-1495R) đều cho thấy dữ liệu trình tự có độ dài đầy đủ và chất lượng tốt trên phần mềm đánh giá chất lượng trình tự Phred, FastQ.







**Hình 4:** Trình tự gen 16S rRNA mẫu S1-1173P2 secondary seed-Lot C (3 môi 27F, 533F, 1495R)

Kết quả giải trình tự của 8 mẫu được đưa lên phần mềm Chromas Pro để phân tích, Sau khi thu được trình tự các nucleotide của các môi, chúng tôi nhóm thành 1 mẫu gồm trình tự của 3 môi và đưa vào phần mềm BLAST để so sánh với ngân hàng gen gốc. Kết quả cho thấy trình

tự gen 16S rRNA của chủng gốc (Master seed) BCG 1173P2 secondary seed - Lot C của IVAC, thu được độ tương đồng là 100% so với trình tự gen của chủng *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur 1173P2 complete genome trên ngân hàng gen quốc tế (genbank).

```
TCGAACGGAAAGGTCTCTTCGGAGATACTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACA  
CGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATA  
CCGGATAGGACCACGGGATGCATGTCTTGTGGTGGAAAGCGCTTTAGCGGTGT  
GGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGACGGCCTACCAAGGC  
GACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTCCGGCCACACTGGGACTGAGATA  
CGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGC  
AAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACC  
TCTTTCACCATCGACGAAGGTCCGGGTTCTCTCGGATTGACGGTAGGTGGAGA  
AGAAGCACCGGCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGA  
GCGTTGTCCGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTTGTTCGCGTTGT  
TCGTGAAATCTCACGGCTTAAGTGTGAGCGTGCGGGCGATACGGGCAGACTAG  
AGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATAT  
CAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGA  
GGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC  
GTAAACGGTGGGTACTAGGTGTGGGTTTCCTTCCTTGGGATCCGTGCCGTAGCT  
AACGCATTAAGTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAA
```

GGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGC  
AACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGCACAGGACGCGTCTAGAGATAG  
GCGTTCCTTGTGGCCTGTGTGCAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTC  
GTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTCATGTTGCC  
AGCACGTAATGGTGGGGACTCGTGAGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAA  
GGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATG  
CTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCGATGCCGCGAGGTAAAGCGAATCCTTA  
AAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGA  
GTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT  
GTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCAGTGGCC  
TAACCCTCGGGAGGGAGCTGTCGAAGGTGGGATCGGCG

Link blast: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Get&RID=K9WU3BJ0013>

**Hình 5:** Trình tự đã ghép nối S1 (mẫu chủng 1173P2 secondary seed-Lot C).

**Mycobacterium bovis BCG Pasteur 1173P2, complete genome**  
**Sequence ID: [AM408590.1](#) Length: 4374522 Number of Matches: 1**

Range 1: 1498424 to 1499834 [GenBankGraphics](#)

| Score           | Expect   | Identities      | Gaps       | Strand    |
|-----------------|--|-----------------|------------|-----------|
| 2606 bits(1411) | 0.0  | 1411/1411(100%) | 0/1411(0%) | Plus/Plus |
| Query 1         | TCGAACGGAAAGGTCTCTTCGGAGATACTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGT   |                 |            |           |
| 60              |  |                 |            |           |
| Sbjct           |  |                 |            | 1498424   |
|                 | TCGAACGGAAAGGTCTCTTCGGAGATACTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGT   |                 |            | 1498483   |
| Query 61        | GATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCAC   |                 |            |           |
| 120             |  |                 |            |           |
| Sbjct           |  |                 |            | 1498484   |
|                 | GATCTGCCCTGCACTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCAC   |                 |            | 1498543   |
| Query           | GGGATGCATGTCTTGTGGTGGAAAGCGCTTTAGCGGTGTGGGATGAGCCCGCGGCCTATC   |                 |            | 181       |
| 180             |  |                 |            |           |
| Sbjct           |  |                 |            | 1498544   |
|                 | GGGATGCATGTCTTGTGGTGGAAAGCGCTTTAGCGGTGTGGGATGAGCCCGCGGCCTATC   |                 |            | 1498603   |
| Query           | AGCTTGTGGTGGGGTGACGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTG    |                 |            | 240       |
| 240             |  |                 |            |           |
| Sbjct           |  |                 |            | 1498604   |
|                 | AGCTTGTGGTGGGGTGACGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTG    |                 |            | 1498663   |
| Query           | TCCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT   |                 |            | 300       |
| 300             |  |                 |            |           |
| Sbjct           |  |                 |            | 1498664   |
|                 | TCCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT   |                 |            | 1498723   |
| Query           | ATTGCACAATGGGGCCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGG   |                 |            | 360       |
| 360             |  |                 |            |           |
| Sbjct           |  |                 |            | 1498724   |
|                 | ATTGCACAATGGGGCCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGG   |                 |            | 1498783   |
| Query 361       | TTGTAAACCTCTTTCACCATCGACGAAGGTCCGGGTTCTCTCGGATTGACGGTAGGTGGA   |                 |            |           |
| 420             |  |                 |            |           |
| Sbjct           |  |                 |            | 1498784   |
|                 | TTGTAAACCTCTTTCACCATCGACGAAGGTCCGGGTTCTCTCGGATTGACGGTAGGTGGA   |                 |            | 1498843   |
| Query           | GAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTG    |                 |            | 480       |
| 480             |  |                 |            |           |
| Sbjct           |  |                 |            | 1498844   |
|                 | GAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTG    |                 |            | 1498903   |
| Query 481       | TCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTTGTTCGCGTTGTTTCGTGAAATCTC |                 |            |           |
| 540             |  |                 |            |           |
| Sbjct           |  |                 |            | 1498904   |
|                 | TCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTTGTTCGCGTTGTTTCGTGAAATCTC |                 |            | 1498963   |
| Query           | ACGGCTTAACTGTGAGCGTGCGGGCGATACGGGCAGACTAGAGTACTGCAGGGGAGACTG   |                 |            | 600       |
| 600             |  |                 |            |           |
| Sbjct           |  |                 |            | 1498964   |
|                 | ACGGCTTAACTGTGAGCGTGCGGGCGATACGGGCAGACTAGAGTACTGCAGGGGAGACTG   |                 |            | 1499023   |
| Query           | GAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCG   |                 |            | 660       |
| 660             |  |                 |            |           |
| Sbjct           |  |                 |            | 1499024   |
|                 | GAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCG   |                 |            | 1499083   |

```
|||||
Sbjct 1499084
GGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGAT 1499143

Query 721 ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGTACTAGGTGTGGGTTTCCTTCCTTGGGATC
780
|||||
Sbjct 1499144
ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGTACTAGGTGTGGGTTTCCTTCCTTGGGATC 1499203

Query 781
CGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC 840
|||||
Sbjct 1499204
CGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC 1499263

Query 841
CAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACG 900
|||||
Sbjct 1499264
CAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACG 1499323

Query 901
CGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGCACAGGACGCGTCTAGAGATAGGCGTTCCTTG 960
|||||
Sbjct 1499324
CGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGCACAGGACGCGTCTAGAGATAGGCGTTCCTTG 1499383

Query 961 TGGCCTGTGTGCAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAA
1020
|||||
Sbjct 1499384
TGGCCTGTGTGCAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAA 1499443

Query 1021
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGCTCATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCGTG 1080
|||||
Sbjct 1499444
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGCTCATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCGTG 1499503

Query 1081
AGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTT 1140
|||||
Sbjct 1499504
AGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTT 1499563

Query 1141
ATGTCCAGGGCTTACACATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCGATGCCGCGAGGT 1200
|||||
Sbjct 1499564
ATGTCCAGGGCTTACACATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCGATGCCGCGAGGT 1499623

Query 1201
TAAGCGAATCCTTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGA 1260
|||||
Sbjct 1499624
TAAGCGAATCCTTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGA 1499683

Query 1261
AGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT 1320
|||||
Sbjct 1499684
AGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT 1499743

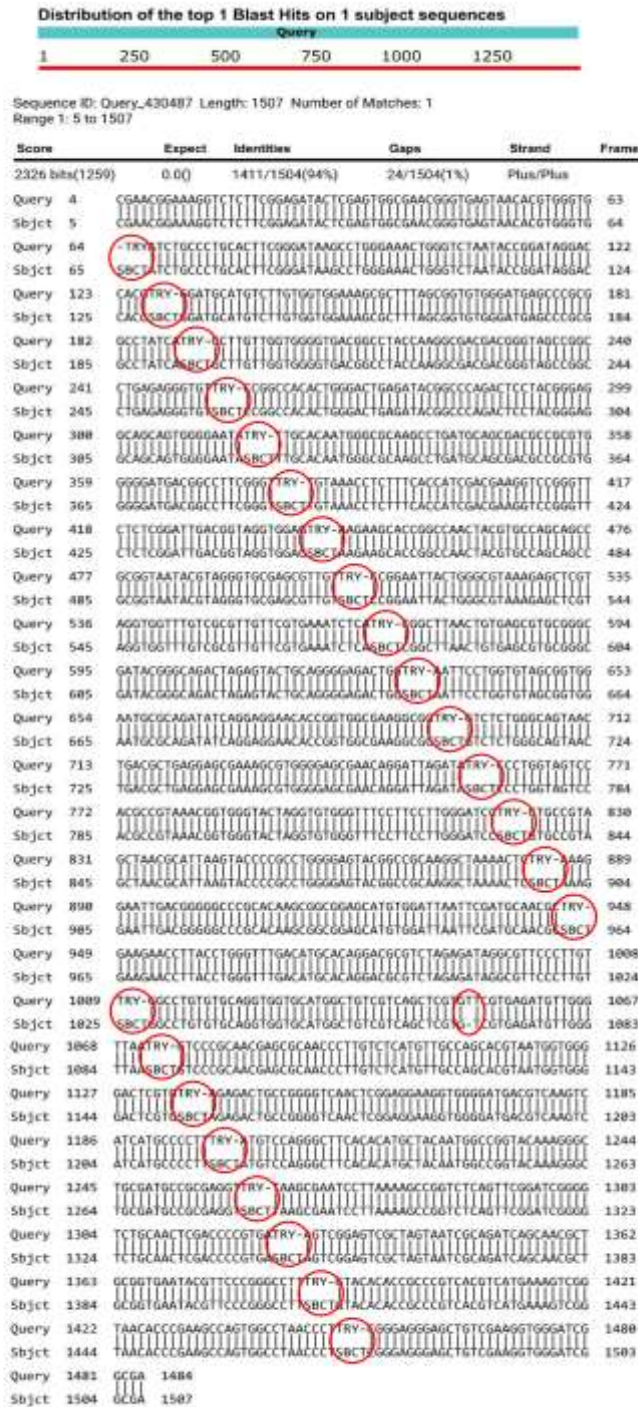
Query 1321
GTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCAGTGGCCTAACCCCT 1380
|||||
Sbjct 1499744
GTACACACCGCCCGTCACGTCATGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCAGTGGCCTAACCCCT 1499803

Query 1381 CGGGAGGGAGCTGTGCAAGGTGGGATCGGCG 1411
|||||
Sbjct 1499804 CGGGAGGGAGCTGTGCAAGGTGGGATCGGCG 1499834
```

**Hình 6:** Trình tự gen chủng *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur 1173P2

Trình tự gen 16S rRNA của chủng sản xuất BCG loạt số: 1173P2LotC/WS4 do IVAC sản xuất trong ngân hàng Dữ liệu gen Quốc tế, ta thu được độ tương đồng đạt 99% so với trình tự gen của chủng *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur 1173P2 complete genome. So sánh trình

tự gen của 1% khác biệt (24 vị trí đánh dấu trên hình) chúng tôi không phát hiện có sự trùng khớp với bất kỳ vị trí nào với tổng số 37 đột biến (30 SNP và 7 Indels) đã được xác định trên chủng *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur 1173P2 (hình 7).



**Hình 7:** Trình tự gen khác biệt của chủng sản xuất BCG loạt số 1173P2LotC/WS4 (1%).

#### **4. Bàn luận**

Theo sơ đồ lịch sử và phả hệ của chủng sản xuất BCG và tài liệu “Đánh giá lịch sử vắc xin BCG tại Nhật Bản” đã chỉ ra rằng chủng BCG 1173P2 - Pasteur Paris được xếp vào loại “chủng muộn” tức là loại chủng sử dụng để sản xuất vắc xin BCG phổ biến gần đây nhất đối với toàn cầu [3, 10].

Trình tự gen của các chủng sản xuất vắc xin BCG, bao gồm chủng BCG 1173P2 - Pasteur Paris được nhiều nhà khoa học tập trung nghiên cứu. Năm 2022, Mahla Asadian và cộng sự đã báo cáo đặc điểm gen của hai chủng phổ biến nhất: Danish 1331 và Pasteur 1173P2 [12, 13]. BCG World Atlas (2020) cho biết Danish 1331 được sử dụng rộng rãi nhất (16,6%), và Pasteur 1173P2 đứng thứ hai (9,2%). Kỹ thuật giải trình tự gen cũng được áp dụng trong một số nghiên cứu về miễn dịch, tác động không đặc hiệu, và độ ổn định gen.

Theo kết quả nghiên cứu của chúng tôi, các mẫu khuẩn lạc của 2 lọ chủng sản xuất BCG lô số 1173P2 Lot c/WS4 và master seed BCG 1173P2 secondary seed-Lot C đã được tách chiết, khuếch đại thành công. Do đó trình tự gen chủng sản xuất BCG lô số 1173P2 Lot c/WS4 khi phân tích và so sánh với ngân hàng gen gốc cho kết quả tương đồng 99%. Mặt khác ông chủng gốc master

seed BCG 1173P2 secondary seed-Lot C cũng được giải trình tự để so sánh cũng như để chứng minh một cách khách quan coi 2 mẫu của IVAC gửi đến là mẫu mù không biết nguồn gốc xuất xứ có đúng là chủng gốc thực sự hay là chủng đã pha loãng hoặc chủng loại khác (VD: Danish 1331 hoặc M. bovis BCG-1 (Nga)...). Kết quả của chủng gốc master seed BCG 1173P2 secondary seed-Lot C so với ngân hàng gen gốc trên BLAST tương đồng 100%. Kết quả này cho thấy việc nhận dạng chủng sản xuất vắc xin BCG bằng phương pháp giải trình tự gen có thể được nghiên cứu để thay thế phương pháp nuôi cấy tế bào truyền thống tại NICVB, đồng thời có thể mở rộng áp dụng cho các thử nghiệm kiểm định vắc xin vi rút, sinh phẩm, dịch vụ khác..

Ngoài ra, chủng sản xuất vắc xin Pasteur 1173P2 được báo cáo rất ổn định qua thời gian và được dùng phổ biến trên thế giới. Điều này phù hợp với kết quả nghiên cứu của chúng tôi và các nghiên cứu khác tại Việt Nam, đại diện là Viện vắc xin và sinh phẩm y tế (IVAC) đã lưu giữ chủng này hàng chục năm để sản xuất vắc xin BCG và vẫn ổn định về mặt di truyền: 98-99% so với chủng gốc trên ngân hàng gen. Kết quả này được xác nhận trong nghiên cứu của Stefanova T vào năm 2015 cho thấy tính ổn định di truyền của quá trình sản xuất vắc xin qua

hơn 30 năm ở Bulgaria, sử dụng lai tạo microarray VNTR và DNA [14]. Năm 2018, Otrasheskaya E.V và cộng sự đã chứng minh tính ổn định của bộ gen của chủng phụ M. bovis BCG-1 (Nga) trong toàn bộ quy trình sản xuất, bằng cách giải trình tự toàn bộ bộ gen và phân tích so sánh RD và SNP [15]. Tương tự, vào năm 2016, Levi D.T và cộng sự đã sử dụng phương pháp multiplex PCR để đánh giá tính ổn định của chủng M. bovis BCG-1 (Nga) trong hơn 60 năm sản xuất vắc xin BCG, và kết quả xác nhận tính nhất quán của hệ thống ổn định duy trì chủng [5]. Nghiên cứu của Yasuhiko Suzuki và cộng sự vào năm 1998 cũng làm rõ về cấu trúc và tính ổn định của gen 16S rRNA của Mycobacterium bovis BCG [9]. Các nghiên cứu này chứng tỏ rằng nếu bảo quản chủng ở điều kiện thích hợp, tính di truyền của chủng duy trì ổn định, đảm bảo chất lượng sản xuất vắc xin BCG qua thời gian.

## 5. Kết luận

Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy chủng sản xuất (working seed) BCG lô số 1173P2 Lot c/WS4 và master seed BCG 1173P2 secondary seed-Lot C của Viện vắc xin và sinh phẩm y tế (IVAC) đảm bảo chất lượng và trình tự gen 16S của chủng sản xuất ổn định qua thời gian giữa khoảng cách ít nhất là 8 năm (2015 – 2023) khi so sánh với trình tự trên ngân hàng gen gốc lần lượt là: 98%, 99%. Bên

cạnh đó, nghiên cứu này cũng chứng minh quy trình nhận dạng chủng sản xuất vắc xin BCG bằng phương pháp giải trình tự gen có thể được triển khai ứng dụng tại Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế (NICVB) trong thời gian tới.

## Tài liệu tham khảo

- [1] World Health Organization (WHO): Global Tuberculosis Report 2022.
- [2] Dược điển V, 2017.
- [3] WHO TRS No 979. 2013 (BCG)
- [4] Jean Baldus Patel, Debra G. B. Leonard, Xai Pan, James M. Musser, Richard E. Berman and Irving Nachamkin (2000). *Sequence Based Identification of Mycobacterium Species Using the MicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Identification System*. J Clin Microbiol. 2000 Jan; 38(1): 246–251. doi: 10.1128/jcm.38.1.246-251.2000.
- [5] Levi D.T, Obukhov Y.I, Aleksandrova N.V, Volkova R.A, Elbert E.V, Alvarez Figueroa M.V, Prokopenko A.V, Ludanniy R.I. (2016). *Identity and stability assessment of BCG vaccine by multiplex PCR*. BIO preparations Prev. Diagn. Treat. 2016, 16, 49–54
- [6] SOP VK08-05 - Nhận dạng vắc xin BCG, Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế.
- [7] Giáo trình “Thực tập Bioinformatic” của Trần Linh Thước 10/2003

- [8] Lê Huyền Ái Thuý, Trương Kim Phượng, Hồ Thị thanh Thuý (2011). *Xây dựng quy trình Real Time – PCR trên 16S rRNA gen của Vi khuẩn lao Mycobacterium Tuberculosis*. Tạp chí khoa học trường Đại học mở TP. Hồ Chí Minh- số 6 (1) 2011.
- [9] Yasuhiko Suzuki, Akihisa Nagata, Yasuko Ono and Takeshi Yamada (1998) *Complete Nucleotide Sequence of the 16S rRNA Gene of Mycobacterium bovis BCG*. Journal of Bacteriology, June 1988, p. 2886-2889.
- [10] Hướng dẫn sử dụng QIAamp® DNA Mini Kit.
- [11] Yamamoto S, Yamamoto T (2007). Historical review of BCG vaccine in Japan. Japanese Journal of Infectious Disease, 2007, 60:331–336.
- [12] Mahla Asadian, Seyed Mehdi Hassanzadeh, Azadeh Safarchi and Masoumeh Douraghi (2022). *Genomic characteristics of two most widely used BCG vaccine strains: Danish 1331 and Pasteur 1173P2*. BMC Genomics 2022; 23:609.
- [13] Stefan Panaiotov, Yordan Hodzhev, Vladimir Tolchkov, Borislava Tsafarova, Alexander Mihailov and Tzvetelina Stefanova (2021). *Complete Genome Sequence, Genome Stability and Phylogeny of the Vaccine Strain Mycobacterium bovis BCG SL222 Sofia*. Vaccines 2021, 9(3), 237.
- [14] Stefanova T. (2015). *Genetic stability of BCG production in Bulgaria*. Probl. Infect. Parasit. Dis. 2015, 43, 30–35
- [15] Otrashesvskaya E.V.; Vinokurova V.N, Shitikov E.A. Sotnikova, E.A. Perevyshina, T.A. Kolchenko, S.A. Butusova, T.B. Kostryukova, E.S. Iina, E.N. Ignalev, G.M (2018). *M. bovis BCG-1 (Russia) sub-strain genome stability investigation within the entire production process*. J. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2018, 2, 58–67.