

Research Paper

Determination of materials genome in Varicella vaccine in Vietnam by PCR method

Le Thi Hai Yen*, Doan Huu Thien, Ngo Phi Phuong, Nguyen Kim Bach, Nguyen Viet Anh, Dao Thi Thuy, Nguyen Thi Ly, Nguyen Thi Thu Huong, Nguyen Thi Hong Anh

National Institute for Control of Vaccine and Biologicals, No 1 Nghiem Xuan Yem, Hoang Mai, Ha Noi

Received 3/2/2022

Accepted 3/3/2022

Abstract

Background/Purpose: National Institute for Control of Vaccines and Biologicals is responsible for its quality control. Identity test is compulsory in quality control tests. WHO currently recommends Plaque Forming Unit Test for identity test of varicella vaccine. The limitation is requirement of specific antibody and reference standard of manufacturer because International Reference vaccine and antibody are not available. At NICVB, the research has established an identity test protocol by PCR to minimize testing time and dependence to manufacturer's reagents

Methods: PCR methods, Validation identity methods.

Results: Primers are designed to target stable domain ORF-7, length of product is 280 nucleotide. PCR reaction contains: 12.5 µl master mix, 5.5 µl H₂O, 1 µl forward primer/reverse primer, 5 µl template and annealing temperature is 50°C, 30 cycles. The protocol is optimized, following validation of robustness and limit of detection. Identity test protocol is applied in vaccine quality control.

Conclusion: The study has designed primers targeting ORF-7 gene for identity test of varicella virus. The protocol for identity test is validated and meet the criteria of robustness, specificity and limit of detection.

Keywords: vaccine, varicella, PCR.

* Corresponding author.

E-mail address: haiyenleth@gmail.com

<https://doi.org/10.56086/jcvb.v2i1.19>

Xác định vật liệu di truyền trong mẫu vắc xin thủy đậu thương mại tại Việt Nam bằng kỹ thuật PCR

Lê Thị Hải Yên*, Đoàn Hữu Thiên, Ngô Phi Phương, Nguyễn Kim Bách,
Nguyễn Việt Anh, Đào Thị Thủy, Nguyễn Thị Lý, Nguyễn Thị Thu Hương,
Nguyễn Thị Hồng Ánh

Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế, số 1 Nghiêm Xuân Yên, Hoàng Mai, Hà Nội

Nhận ngày 3 tháng 2 năm 2022

Chấp nhận đăng ngày 3 tháng 3 năm 2022

Tóm tắt

Đặt vấn đề/ Mục tiêu: Viện kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế có nhiệm vụ kiểm soát chất lượng vắc xin và sinh phẩm y tế. Thử nghiệm nhận dạng vi rút thủy đậu là yêu cầu bắt buộc trong việc kiểm định đánh giá chất lượng vắc xin. Hiện nay, theo hướng dẫn của tổ chức y tế thế giới kỹ thuật trung hòa tạo đám hoại tử dùng trong thử nghiệm nhận dạng vắc xin thủy đậu. Nhưng hạn chế của phương pháp này là phải dùng đến kháng thể đặc hiệu và mẫu chuẩn của nhà sản xuất vì thế giới chưa thiết lập được mẫu chuẩn, kháng thể quốc tế. Tại NICVB nhóm nghiên cứu đã tiến hành thiết lập một qui trình nhận dạng vi rút thủy đậu bằng kỹ thuật PCR nhằm giảm phụ thuộc sinh phẩm của nhà sản xuất và giảm thời gian thực hiện thử nghiệm.

Phương pháp: phương pháp PCR, phương pháp thẩm định thử nghiệm nhận dạng.

Kết quả: Mỗi được thiết kế trên vùng gen ORF-7 ổn định, kích thước sản phẩm 280 nucleotit. Phản ứng PCR có thành phần như sau: 12,5 µl dung dịch đệm (master mix); 5,5 µl H₂O; 1 µl mỗi xuôi, ngược, 5 µl khuôn và nhiệt độ gắn mỗi của qui trình là 500C, 30 chu kỳ. Sau khi tối ưu qui trình tiến hành thẩm định độ mạnh và giới hạn phát hiện. Qui trình nhận dạng thủy đậu được ứng dụng trong kiểm định chất lượng vắc xin.

Kết luận: Nhóm nghiên cứu đã thiết kế được cặp mồi trên gen ORF-7 để nhận dạng vi rút thủy đậu. Qui trình nhận dạng này sau khi thẩm định đã đạt về các chỉ tiêu độ mạnh, độ đặc hiệu và giới hạn phát hiện.

Từ khóa: vắc xin, thủy đậu, kỹ thuật PCR

1. Đặt vấn đề

Vắc xin thủy đậu là hỗn dịch vi rút giảm độc lực nuôi cấy trên tế bào LuMA hoặc MRC-5, tinh sạch, tiếp theo thực hiện quá trình đông khô, thêm một số tá chất để tạo được phản ứng đáp ứng miễn dịch. Vi rút thủy đậu thuộc họ Herpesviridae, phân họ

Alpha Herpesvirinae thuộc chi Varicellavirus, loài Human alphaherpesvirus 3, lớp Herviviricetes, vật liệu di truyền là ADN sợi kép, có chiều dài khoảng 125.000bp có nhiều vùng gen lặp lại trình tự, những vùng gen lặp lại sẽ khác nhau giữa các chủng vắc xin và chủng hoang dại. Genome của vi rút thủy đậu có 67 gen và chia thành 5 vùng nhỏ có độ dài ngắn khác nhau bao gồm số lần lặp lại của các trình tự được qui định R1 đến R5, tạo ra các phân lập có cấu trúc riêng biệt. Các

*Tác giả liên hệ.

E-mail address: haiyenleth@gmail.com

<https://doi.org/10.56086/jcvb.v2i1.19>

vùng R1 và R2 và R3 có nhiều nu GC nằm trong đoạn UL của bộ gen. Vùng R1 nằm trong ORF11 bao gồm các đoạn riêng biệt lặp lại với 15 đến 18 bp. Vùng R2 có gen glycoprotein C (GC), sự lặp lại của 42 cặp bp tạo nên sự khác biệt của các chủng. Vùng R3 có chiều dài khoảng 1000 bp nằm trong đoạn ORF22. Vùng R4 gồm đoạn IRS và TRS là vùng ORF 62 và ORF 63 bao gồm nhiều đoạn 27 bp. Vùng R5 nằm giữa ORF60 và ORF61 bao gồm cả đoạn 22 bp và 88 bp có chứa nhiều AT [5]. Vắc xin thủy đậu được sản xuất từ các chủng OKA hoặc MVA-06.

Đầu những năm 90, các kỹ thuật PCR được ứng dụng trong thiết lập qui trình xác định bệnh nhân nhiễm vi rút thủy đậu. Sau này các phương pháp được phát triển hiện đại hơn ứng dụng trong phân tích kiểu hình gen và vùng gen của vi rút thủy đậu. [5] Trong kiểm định chất lượng vắc xin, thử nghiệm nhận dạng là thử nghiệm bắt buộc phải được tiến hành đối với mỗi loại vắc xin. Tại Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế, phương pháp nhận dạng đang sử dụng thường qui[4]. Theo khuyến cáo của tổ chức y tế thế giới và dược điển Châu Âu phương pháp sử dụng để nhận dạng vắc xin thủy đậu là dùng kháng thể đặc hiệu trung hòa với vắc xin rồi gây nhiễm trên tế bào [3]. Tuy nhiên phương pháp này phụ thuộc vào kháng thể đặc hiệu và mẫu chuẩn của nhà sản xuất, hiện nay chưa có kháng thể chuẩn và vắc xin chuẩn thủy đậu thế giới vì vậy việc đánh giá chất lượng vắc xin gặp nhiều khó khăn trong quá trình xuất xưởng và giám sát hậu kiểm do không chủ động được vắc xin chuẩn và kháng thể. Phương pháp PCR sử dụng nhận dạng vật liệu di truyền trong vắc xin thủy đậu là phương pháp nhanh chóng có độ đặc hiệu cao dùng trong phòng thí nghiệm[4]. Xuất phát từ những lý do nêu trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu gen trên chủng MVA-06 và OKA, tìm đoạn ổn định thiết kế môi, "Xây

dựng qui trình nhận dạng vắc xin thủy đậu bằng phương pháp PCR áp dụng trong công tác kiểm định chất lượng vắc xin".

2. Đối tượng nghiên cứu

2.1. Đối tượng, thời gian, địa điểm nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu: Nghiên cứu qui trình nhận dạng vật liệu di truyền vi rút thủy đậu trên vắc xin thủy đậu.

- Thời gian nghiên cứu: Từ tháng 6/2016 đến tháng 9/2017.

- Địa điểm nghiên cứu: Phòng thí nghiệm khoa Kiểm định vắc xin Vi rút, Viện kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế, Bộ y tế.

2.2. Vật liệu, hóa chất

Mẫu chứng âm (Nước, vắc xin Priorix loạt A69CE248B. Hạn sử dụng: 1/2018), mẫu chứng dương (vắc xin mẫu chuẩn Varilrix-NSX GSK loạt AVARB346A), mẫu thử nghiệm (vắc xin Varivax- nhà sản xuất MSD, Varilrix - nhà sản xuất GSK, Varicella – nhà sản xuất Green Cross).

Kit tách chiết ADN (Exgene TM Blood SV mini, 100p hãng GeneAll), kit PCR (GeneAll), Maker, Safe view...

2.3. Thiết kế Primer

Truy cập dữ liệu của NCBI, tìm Nucleotide và download trình tự nucleotide chủng OKA và MAV-06. Sử dụng vùng gen ổn định là ORF-7 để thiết kế. Truy cập trang chủ phần mềm Primer-BLAST tại địa chỉ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Xem thông tin về đoạn môi và Tm. Trình tự đoạn môi trong khoảng 16-22 Nu, lớn nhất khoảng 25 Nu. Ký hiệu môi xuôi là ORF-7- FW, môi ngược là ORF-7- RV. Kiểm tra lại trình tự môi trên MEGA-X, đoạn môi thuộc trình tự ổn định của 2 chủng MVA-06 và OKA.

Gửi trình tự đoạn môi để đặt môi.

2.4. Qui trình thử nghiệm nhận dạng trên vắc xin mẫu chuẩn Varilrix.

Sử dụng vắc xin mẫu chuẩn Varilrix để xây dựng qui trình.

Tiến hành tách chiết thu ADN vi rút thủy đậu trong vắc xin theo hướng dẫn của bộ kit tách chiết Exgene Blood SV mini, 100p - GeneAll [14]. Thu được sản phẩm cuối cùng là 200µl ADN.

Phản ứng PCR thực hiện theo kit PCR - GeneAll: Nước PCR : 5,5 µl, One Taq: 12,5 µl, DNA: 5 µl, Mỗi xuôi, ngược: 1 µl/loại. Tổng phản ứng : 20 µl.

Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR : 94⁰C, 30 giây, 1 chu kỳ, giai đoạn biến tính: 94⁰C, 30 giây, 30 chu kỳ, giai đoạn gắn mồi (50⁰C 55⁰C, 60⁰C, 62⁰C, 65⁰C tiến hành tối ưu qui trình với các nhiệt độ gắn mồi trên) 30 chu kỳ, giai đoạn kéo dài 68⁰C, 60 giây, 30 chu kỳ, 68⁰C, 5 phút, 1 chu kỳ, 4⁰C, 30 giây.

Điện di sản phẩm với nồng độ Agarose là 1,5%.

2.5. Đánh giá khả năng phát hiện vật liệu di truyền trên các vắc xin thủy đậu lưu hành tại Việt Nam.

Sau khi đánh giá qui trình trên vắc xin mẫu chuẩn vắc xin thủy đậu chúng tôi tiếp tục đánh giá trên mẫu thử là 3 loại vắc xin thủy đậu thương mại là Varilrix, Varivax, Varicella, theo thử nghiệm qui trình đã được xây dựng từ phần 2.4.

Qui trình thực hiện

Tiến hành tách chiết thu ADN vi rút thủy đậu trong vắc xin theo hướng dẫn của bộ kit

tách chiết. Thu được sản phẩm cuối cùng là 200µl ADN.

Phản ứng PCR: Nước PCR : 5,5 µl, One Taq: 12,5 µl, DNA: 5 µl, Mỗi xuôi, ngược: 1 µl/loại. Tổng phản ứng : 20 µl.

Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR: 94⁰C, 30 giây, 1 chu kỳ, giai đoạn biến tính: 94⁰C, 30 giây, 30 chu kỳ, giai đoạn gắn mồi 50⁰C, 30 chu kỳ, giai đoạn kéo dài 68⁰C, 60 giây, 30 chu kỳ, 68⁰C, 5 phút, 1 chu kỳ, 4⁰C, 30 giây.

Điện di sản phẩm với nồng độ Agarose là 1,5%.

2.6. Xác định độ nhạy của qui trình PCR (độ nhạy hay còn gọi là giới hạn phát hiện)

Giới hạn phát hiện của phản ứng PCR được xác định là nồng độ vi rút thấp nhất được phát hiện cho kết quả PCR dương tính. Chúng tôi tiến hành pha loãng 3 loại vắc xin theo các độ pha 1/2 ; 1/32 ; 1/500 ; 1/1000 . Giới hạn phát hiện lý thuyết của qui trình được xác định là tỉ lệ 100% cả 3 loại vắc xin trên đều dương tính.

2.7. Xác định độ đặc hiệu của qui trình PCR

Sử dụng một loại vắc xin Priorix chứa 3 loại vi rút là sởi, quai bị, rubella để kiểm tra phản ứng chéo với cặp mồi đặc hiệu với vi rút thủy đậu trong nghiên cứu này. Độ đặc hiệu của qui trình được xác định là vắc xin Priorix có các thành phần vắc xin vi rút âm tính với cặp mồi của qui trình. Thực hiện trong 6 ngày khác nhau.

3. Kết quả

3.1. Đoạn mồi thiết kế

Cặp mồi thiết kế:

Cặp mồi thiết kế trên vùng gen ORF-7 A có kích thước 335 bp từ vị trí Nucleotide 8605-8940 và ORF-7 B có kích thước 309 bp từ vị trí Nucleotide 9078-9378.

ORF-7- RV: CGCTGCATGTTCTCGTAAC vị trí: 8838-8857 Nucleotide

ORF-7- FW GAGGTTTAGCAACGAC. vị trí : 9117-9094 Nucleotide

Nhiệt độ gắn mồi 50⁰C, 30 chu kỳ.

Kích thước sản phẩm 280 bp.

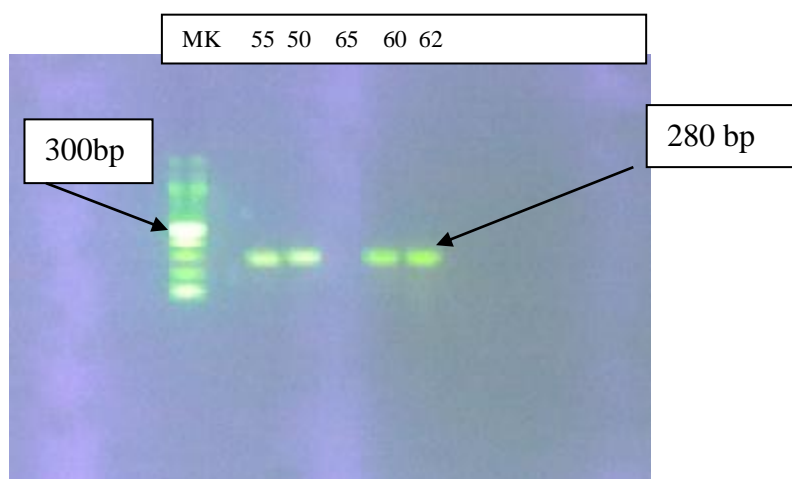
3.2. Qui trình thực hiện và kết quả

Phản ứng PCR: Nước PCR : 5,5 μ l, One Taq: 12,5 μ l, DNA: 5 μ l, Mỗi xuôi, ngược: 1 μ l/loại.
Tổng phản ứng : 20 μ l

Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR: 94⁰C, 30 giây, 1 chu kỳ, 94⁰C, 30 giây, 30 chu kỳ nhiệt độ gắn mồi 50⁰C, 30 chu kỳ, 68⁰C, 60 giây, 30 chu kỳ, 68⁰C, 5 phút, 1 chu kỳ, 4⁰C, 30 giây, 1 chu kỳ.

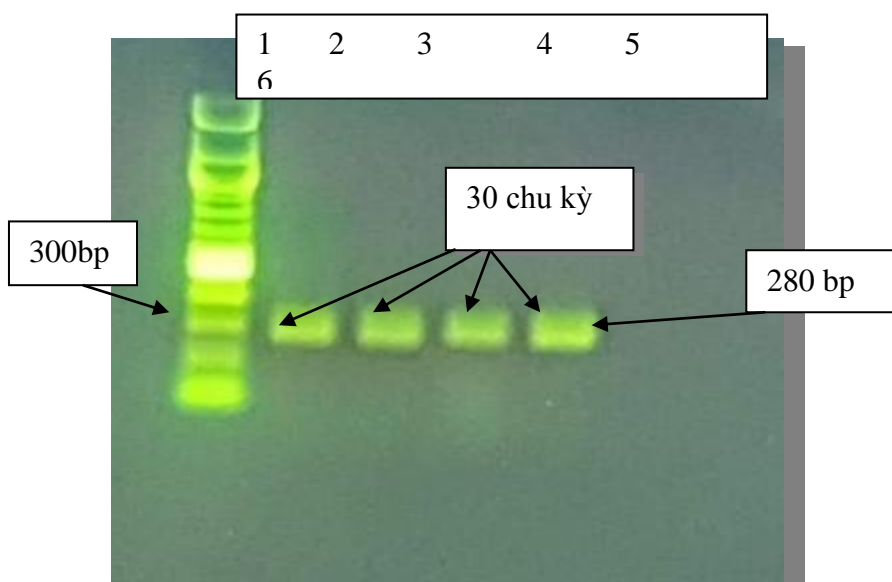
✓ Tiến hành soi bản thạch trên máy soi gel và chụp ảnh.

Hình 1: Hình ảnh sản phẩm điện di của phản ứng PCR của mẫu chuẩn



3.3. Đánh giá khả năng phát hiện vật liệu di truyền sử dụng primer bằng phương pháp PCR.

Hình 2: Hình ảnh sản phẩm điện vắc xin mẫu chuẩn, Varicella, Varilrix, Varivax khi thực hiện 30 chu kỳ trong phản ứng PCR.

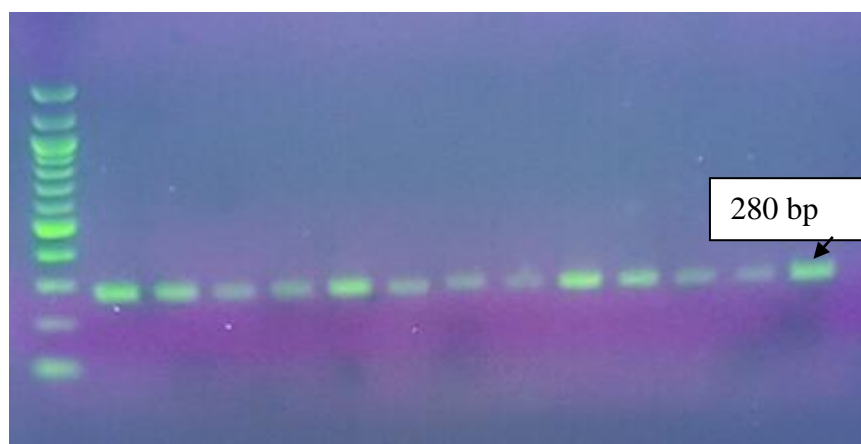


3.4. Giới hạn phát hiện (độ nhạy) và độ đặc hiệu của qui trình PCR.

Giới hạn phát hiện của qui trình PCR được xác định bằng cách pha loãng vắc xin từ các nồng độ 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} . Kết quả thu được ở độ pha loãng 10^{-3} phát hiện được cả 3 loại vắc xin trên dương tính với cặp mồi.

Giới hạn phát hiện:

Hình 3: Kết quả sản phẩm điện di giới hạn phát hiện.



1: Varivax: n/2 5: Varicella: n/2 9: Varilrix n/2 13: chứng dương

2: Varivax: n/32 6: Varicella: n/32 10: Varilrix n/32

3: Varivax: n/500 7: Varicella: n/500 11: Varilrix n/500

4: Varivax: n/1000 8: Varicella: n/1000 12: Varilrix: n/1000.

Bảng 1: Bảng nồng độ pha loãng phát hiện vi rút thủy đậu trong mẫu vắc xin.

Vắc xin	Liều đăng ký	Nồng độ pha loãng	Hàm lượng phát hiện
Varicella	3990 PFU/liều	n/1000	≥ 4 PFU
Varilrix	4110 PFU/ liều	n/1000	≥ 4 PFU
Varivax	13225 PFU/liều	n/1000	≥ 13 PFU

Khảo sát số lần xuất hiện dương tính của giới hạn phát hiện.

Bảng 2: Bảng khảo sát số lần xuất hiện dương tính của giới hạn phát hiện.

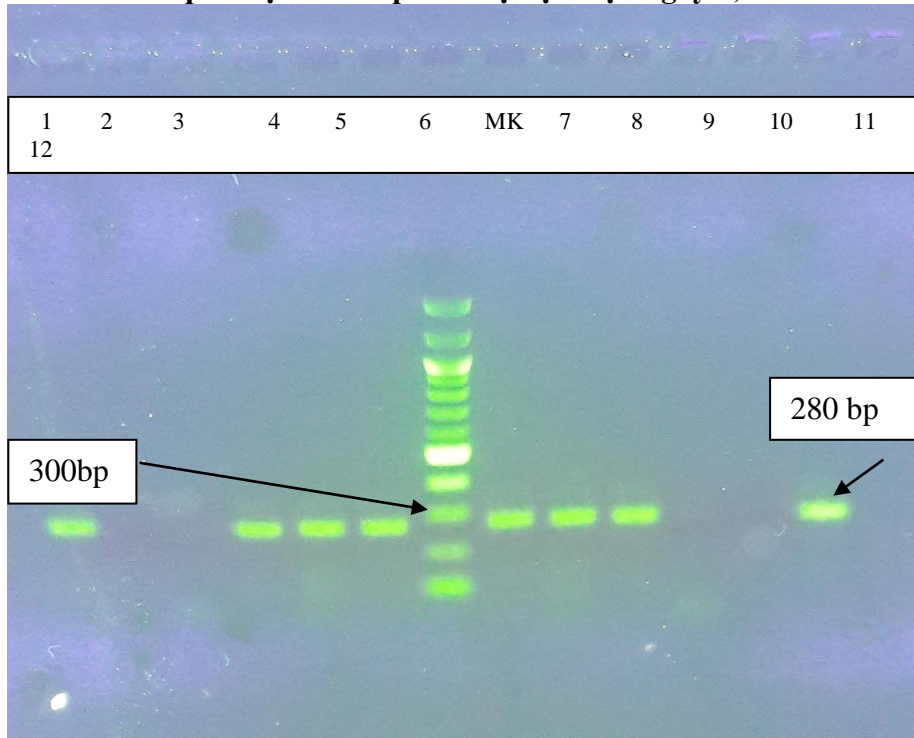
Số lần	Nồng độ pha loãng	Varicella	Varilrix	Varivax
1	n/2	+	+	+
2	n/32	+	+	+

3	n/500	+	+	+
4	n/1000	+	+	+
Độ nhạy của phép thử		100% (4/4)	100% (4/4)	100% (4/4)

Qui ước: + dương tính.

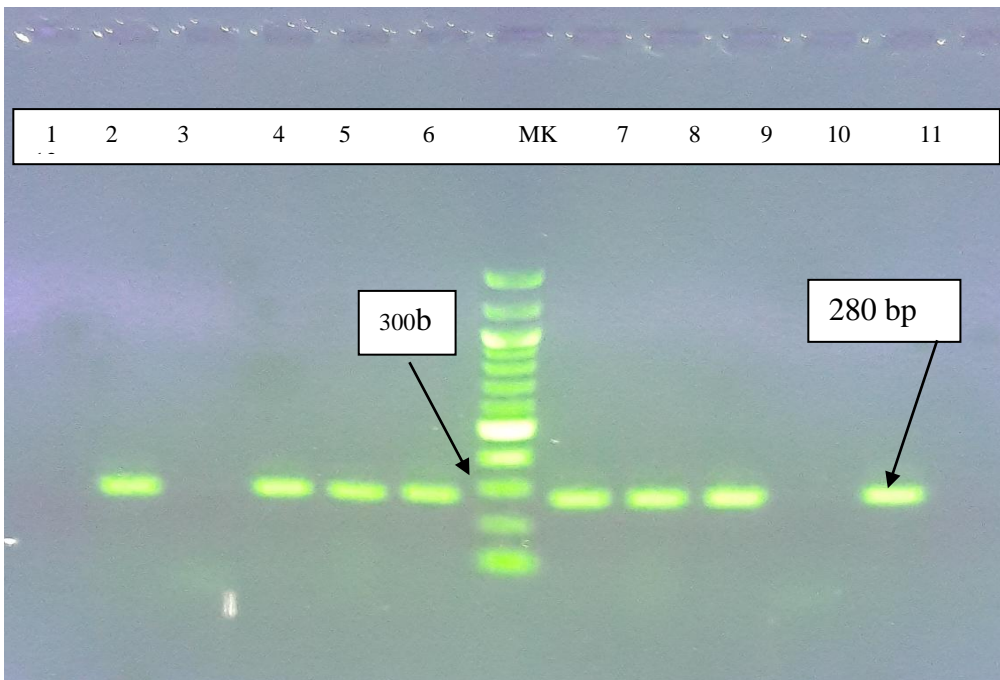
Độ đặc hiệu

Hình 4: Kết quả điện di sản phẩm độ đặc hiệu ngày 1,2



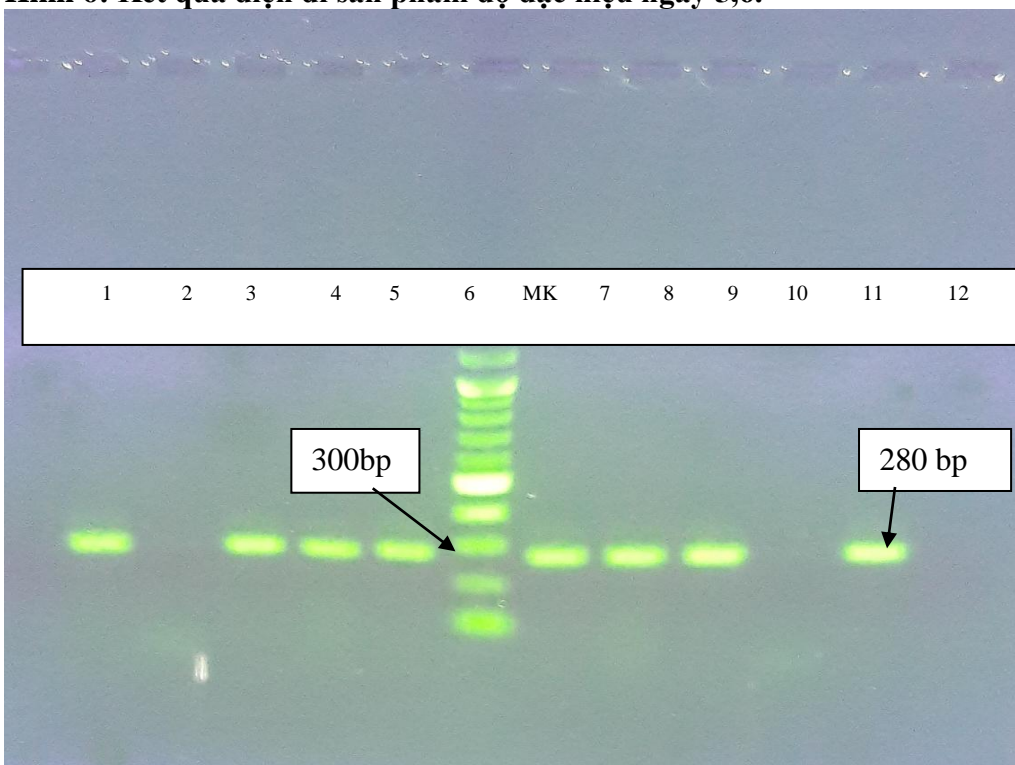
1: Chứng dương; 2: Chứng âm, 3: Priorix, 4: Varivax, 5: Varicella, 6: Varilrix. (Ngày 1)
 12: Chứng dương; 11: Chứng âm, 10: Priorix, 7: Varivax, 8: Varicella, 9: Varilrix. (Ngày 2)
 MK: marker.

Hình 5: Kết quả điện di sản phẩm độ đặc hiệu ngày 3,4.



1: Chứng âm; 2: Chứng dương, 3: Priorix, 4: Varivax, 5: Varicella, 6: Varilrix. (Ngày 3)
12: Chứng âm; 11: Chứng dương, 10: Priorix, 7: Varivax, 8: Varicella, 9: Varilrix. (Ngày 4)
MK: marker.

Hình 6: Kết quả điện di sản phẩm độ đặc hiệu ngày 5,6.



1: Chứng dương; 2: Chứng âm, 3: Priorix, 4: Varivax, 5: Varicella, 6: Varilrix. (Ngày 5)

12: Chứng dương; 11: Chứng âm, 10: Priorix, 7: Varivax, 8: Varicella, 9: Varilrix. (Ngày 6)
MK: marker.

Bảng 3: Bảng thống kê tần xuất dương tính của độ đặc hiệu.

Ngày thực hiện	Mẫu vắc xin (+)	Mẫu đối chứng(-)
Ngày 1	100%	0%
Ngày 2	100%	0%
Ngày 3	100%	0%
Ngày 4	100%	0%
Ngày 5	100%	0%
Ngày 6	100%	0%

Độ đặc hiệu được thực hiện đồng thời vắc xin Priorix là vắc xin có chứa vi rút sởi, quai bị, rubella. Sử dụng khuôn là sản phẩm tách chiết từ vắc xin priorix thực hiện phản ứng điện di không có băng nào, chứng âm cũng không có sản phẩm. Chứng dương và vắc xin Varilrix, Vairicella, Varivax cho sản phẩm có kích thước 280bp. 100% mẫu vắc xin thủy đậu dương tính với qui trình này, mẫu đối chứng dương tính 0 % với qui trình này.

4. Bàn luận

Vắc xin thủy đậu là vắc xin sống giảm độc lực. Chúng phổ biến dùng để sản xuất là OKA (vắc xin Varilrix, Varivax, Okavac), vắc xin Varicella nhà sản xuất Green Cross sử dụng chủng MAV-06. Chủng này cũng có nguồn gốc từ chủng OKA. MAV-06 là chủng của nhà sản xuất nên không có nhiều các công trình công bố trên tạp chí. Từ giai đoạn sản xuất đến giai đoạn thành phẩm các thử nghiệm nhận dạng chủng đều thực hiện bằng phương pháp trung hòa sử dụng kháng thể đặc hiệu. [2,3,11] Hiện nay vẫn chưa có mẫu chuẩn và kháng thể chuẩn quốc tế cho vắc xin thủy đậu. Vì vậy việc thực hiện kiểm tra thử nghiệm và nhận dạng vắc xin luôn phụ thuộc vào nhà sản xuất cung cấp kháng thể và mẫu chuẩn. Việc này cũng gây khó khăn cho quá trình giám sát, hậu kiểm tại Viện kiểm định quốc gia vắc xin và Sinh phẩm y tế.

Nhóm nghiên cứu đã phân tích các vùng gen của vi rút thủy đậu. Bộ gen của vi rút thủy đậu có tính ổn định cao [4]. Sau khi tìm hiểu thông tin các bài báo thì kỹ thuật PCR trong các nghiên cứu công bố trong nước và ngoài nước chỉ dùng để chẩn đoán lâm sàng hoặc phân tích kiểu hình, kiểu gen, sự đột

biến của vi rút thủy đậu [1,6,7,9,10]. Chưa có công trình khoa học nào công bố môi nhận dạng vi rút thủy đậu trên 2 chủng OKA và MAV-06 hay trên duy nhất chủng MAV-06 nên chúng tôi tiến hành tự thiết kế môi. Dùng phần mềm MEGA-X để phân tích sự giống và khác nhau nucleotide các chủng OKA và MAV-06 nhận thấy 2 chủng tương đối tương đồng. Lựa chọn vùng gen ổn định ORF-7 để thiết kế môi. Môi thiết kế tuân thủ theo các nguyên tắc như tỉ lệ GC khoảng 50-60%, đầu 3' không chứa 3G hoặc 3 C...Sử dụng phần mềm thiết kế môi Prime 3, phân tích các cặp môi nhóm nghiên cứu đã lựa chọn cặp môi đáp ứng được các yêu cầu.

Sau khi lựa chọn cặp môi nhóm nghiên cứu đã xây dựng qui trình nhận dạng vi rút thủy đậu bằng phương pháp PCR và tối ưu qui trình. Qui trình được thực hiện nhiều lần với các thử nghiệm dò nhiệt độ gắn môi, số chu kỳ, nồng độ, thể tích phản ứng PCR nhằm mục đích đưa ra được qui trình tối ưu nhất. Sản phẩm cho một băng rõ nét có kích thước 280bp, không có sản phẩm phụ. Qui trình tách chiết DNA theo bộ kit của hãng GeneAll lần đầu được thực hiện cho vắc xin thủy đậu của khoa kiểm định vắc xin Vi rút cho kết quả tốt. Trong

khảo sát nhiệt độ gắn môi và số chu trình, tại nhiệt độ 50 độ C, sản phẩm cho kích thước 280 có băng sáng, và nét hơn các nhiệt độ khác, không có băng phụ trong sản phẩm. Quy trình đã được tối ưu và nhiệt độ gắn môi phù hợp là 50⁰C, số chu kỳ là 30 chu kỳ. Sau khi quy trình chuẩn được thiết lập chúng tôi đã thử nghiệm thăm định trên 3 loại vắc xin thủy đậu đang lưu hành ở Việt nam là Varilrix, Varivax, Varicella. Quy trình sử dụng cho cả 3 loại vắc xin trên.

Thực hiện thăm định phản ứng PCR trên đoạn môi nhóm thiết kế đã thu được độ đặc hiệu 100 % đối với vi rút thủy đậu, giới hạn phát hiện từ 4 vi rút trở lên. Như vậy với hàm lượng rất ít của vắc xin cũng có thể kiểm tra sự có mặt của vi rút thủy đậu. Kỹ thuật PCR phục vụ tốt cho việc giám sát, hậu kiểm mà không cần phụ thuộc vào việc khuyến cáo pha loãng của nhà sản xuất mới thực hiện được kiểm tra như thử nghiệm trung hòa kháng nguyên kháng thể thông thường.

Nghiên cứu của nhóm đã đưa ra được đoạn môi sử dụng nhận dạng cho 2 loại nguồn chủng OKA và MVA-06 của vi rút thủy đậu. Quy trình này đã giải quyết được một số vấn đề tồn đọng trong công tác kiểm định chất lượng vắc xin. Kiểm soát được một phần chất lượng vắc xin mà không phụ thuộc vào hóa chất, sinh phẩm của nhà sản xuất. Thêm nữa thực hiện quy trình PCR đã rút gọn được thời gian tiến hành thử nghiệm. Nếu như thực hiện thử nghiệm trung hòa hay miễn dịch huỳnh quang thời gian thử nghiệm thường kéo dài 30-45 ngày vì thời gian nuôi cấy tế bào kéo dài ít nhất 2 tuần. Điều kiện thử nghiệm yêu cầu cao như phải tiến hành trong phòng sạch có áp lực dương, hoặc phải sử dụng thiết bị đắt tiền như kính hiển vi huỳnh quang... công lao động cũng tốn hơn. Trong khi thực hiện quy trình nhận dạng bằng phương pháp PCR thời gian chỉ kéo dài 1-2 ngày, quá trình thực hiện không yêu cầu điều kiện phòng thí nghiệm cao như phòng áp lực dương, luôn

phải theo dõi kiểm tra theo dõi vi khuẩn và nấm trong phòng như thử nghiệm trên tế bào.

Quy trình PCR đã tránh được việc dùng hóa chất độc như (Folmaldehyde) trong quá trình thử nghiệm, loại bỏ được các nguy cơ ảnh hưởng đến sức khỏe người lao động. Thử nghiệm PCR ứng dụng trong nhận dạng vắc xin thủy đậu cho kết quả trong thời gian nhanh, độ nhạy của thử nghiệm cao, có thể phát hiện ra vi rút thủy đậu ở lượng rất nhỏ.

Quy trình này sau khi nghiên cứu sẽ được ứng dụng thực tiễn trong kiểm định chất lượng vắc xin thủy đậu hằng năm. Việc áp dụng quy trình không những làm giảm thời gian thực hiện mà còn làm tăng số loạt vắc xin cần kiểm định trong 1 lần thử nghiệm. Ngoài các yếu tố ưu việt về thời gian, nhân công thực hiện, phòng thử nghiệm, trang thiết bị so với quy trình trung hòa thì một yếu tố vô cùng quan trọng là lượng mẫu chuẩn sử dụng giảm hơn. Mẫu chuẩn có thể tách chiết cất giữ ADN trong thời gian dài. Những yếu tố trên cho thấy quy trình nhận dạng vật liệu di truyền trên vắc xin thủy đậu có thể thực hiện tại NICVB bất cứ thời gian nào cho việc hậu kiểm kiểm tra chất lượng vắc xin mà không phụ thuộc vào kháng thể và mẫu chuẩn.

Khi thực hiện đánh giá độ đặc hiệu và giới hạn phát hiện của quy trình kết quả thu được độ đặc hiệu đạt 100% , giới hạn phát hiện nhỏ nhất là 4 PFU.

5. Kết luận

Nhóm nghiên cứu đã thiết kế cặp môi trên gen ORF-7 đạt yêu cầu về giới hạn phát hiện và thiết lập được quy trình nhận dạng vi rút thủy đậu ứng dụng trong kiểm tra chất lượng các vắc xin Varivax, Varilrix, Varicella.

References

- [1] Allison Abendroth, Ann M.Avin, Jenifer F.Mofat, Editors (2010), Varicella-zoster, Current topic in microbiology and immunology.
- [2] Dược điển Việt Nam 5 bổ sung, vắc xin thủy đậu, 2017.
- [3] European pharmacopoeia, seventh edition volume I, 2010, p839.
- [4] Geoffrey A Petters, Shaun D.Tyler, Charles Grose và cộng sự A full-genome Phylogentic analysis of varicella-Zoster virus reveals a novel origin of replication-based genotyping scheme and evidence of recombination between major circulating clades, American society for microbiology, tháng 7, 2006.
- [5] Knipe, David M, Howley, Peter M, Fields Virology, 5 th Ed, 2007, chuyên mục 70
- [6] Oasem JA, MA Al-Fadhli, MA Saraya, J Thomas, Analysis of enzymatic digestion pattern of two open reading frames of varicella-Zoster genome from Kuwaiti patients using the RFLP technique. Iranian journal of Microbiology, 2012. 10
- [7] Vladimir N. Loparev, Takele Argaw, Philip R. Krause, Michiko Takayama, D. Scott Schmid, Improved Identification and Differentiation of Varicella-Zoster Virus (VZV) Wild- type Strain and attenuaed varicella vaccine strain using a VZV open reading frame 62-based PCR, Journal of clinical Microbiology, tháng 9, 2000, p 3156-3160.
- [8] [Sueli L. Tillieux](#), [Wendy S. Halsey](#), [Elizabeth S. Thomas](#), [John J. Voycik](#), [Ganesh M. Sathe](#), and [Ventzislav Vassilev](#), (2008) Complete DNA Sequences of Two Oka Strain
- [9] Ruth Harbecke, Michael N. Oxman, Beth A. Arnold... và cộng sự. A Real- Time PCR assay to identify and discriminate among wild-type and vaccine strain of varicella-zoster virus and herpes simplex virus in clinical specimens, and comparison with the clinical diagnoses. HHS Public access, 2014.
- [10] WHO-TRS, 848, Annex 1.
- [11] <https://www.sinhhoc.edu.vn/biology/phan-mem/PCR/primer3-de-thiet-ke-moi-cho-phan-ung-pcr-14.html> 20
- [12] Phần mềm MEGA-X.
- [13] Qui trình tách chiết AND của bộ kit GeneAll hoặc kit QIAGEN.