

Ứng dụng phương pháp RT-PCR để nhận dạng đặc hiệu chủng vi rút cúm A/H5N1 trong vắc xin

RT-PCR test for specific indentification of influenzavirus (A/H5N1) in vaccine

Luu Thi Dung*, Đoàn Hữu Thiên, Nguyễn Thị Lý,
Nguyễn Thị Hồng Định, Bé Thị Thắm,
Nguyễn Hoàng Tùng, Phạm Văn Hùng
Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế

Luu Thi Dung*, Doan Huu Thien, Nguyen Thi Ly,
Nguyen Thi Hong Dinh, Be Thi Tham,
Nguyen Hoang Tung, Pham Van Hung
National Institute for Control of Vaccines and Biologicals

TÓM TẮT

Nghiên cứu ứng dụng phương pháp RT-PCR (Reverse transcription - Polymerase Chain Reaction) để xác định sự có mặt của vi rút cúm A/H5N1 trong vắc xin, đồng thời xây dựng một quy trình nhận dạng đặc hiệu chủng vi rút A/H5N1 trong vắc xin cúm A/H5N1. Các mẫu được lựa chọn để tiến hành thử nghiệm gồm: Vắc xin cúm Ivacflu-A/H5N1 (Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế, vắc xin cúm mùa Vaxigrip (Sanofi Pasteur), chủng vi rút cúm A/Vietnam/1194/2004(A/H5N1) (Viện Quốc gia về sinh học tiêu chuẩn và kiểm soát - NIBSC) được sử dụng là mẫu chứng dương; mẫu vắc xin Varivax (MSD) và mẫu nước không chứa ADN, ARN là mẫu đối chứng âm. Kết quả cho thấy: Các chủng vi rút A/H5N1 được phát hiện thông qua sản phẩm phản ứng RT-PCR được tạo thành với cặp mồi để khuếch đại trên 02 đoạn gen đặc hiệu của gen HA kích thước lần lượt là 428 và 249 nucleotit đều cho kết quả dương tính. Tuy nhiên, sản phẩm khuếch đại có kích thước 428 cho kết quả tốt hơn. Trước khi tiến hành phản ứng RT-PCR, cần phải tiến hành loại bỏ nhôm và thành phần tham gia phản ứng RT-PCR như sau:

ABSTRACT

RT-PCR (Reverse transcription - Polymerase Chain Reaction) is applied to determine the presence of influenza virus A/H5N1 in vaccine, and to develop an identity process for specific virus strain A/H5N1 in influenza vaccine A/H5N1. Selected samples included: Ivacflu-A/H5N1 vaccine (Institute of Vaccines and Biologicals), Vaxigrip vaccine (Sanofi Pasteur), Influenza virus strain A/Vietnam/1194/2004(A/H5N1) (NIBSC) was used as positive control; vaccine Varivax (MSD) and DNA/RNA free water was used as negative controls. The results showed that virus strain A/H5N1 was identified as production of RT-PCR that were positive with amplified primer pairs of 2 specific gene sequences of HA whose length 428 and 249 bp. Before starting RT-PCR, it was necessary to eliminate aluminum and the components of RT-PCR reaction included: 5X QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer(5µl); dNTP (1µl); forward and reverse primers (1,5 µl); Enzyme

*Tác giả: Luu Thi Dung
Số 1 Nghiem Xuan Yem, Dai Kim, Hoang Mai, Ha Noi
ĐT: 0977522973
Email: dung.vr@nicvb.org.vn

*Coressponding Investigator: Luu Thi Dung
Address: No. 1 Nghiem Xuan Yem, Dai Kim,
Hoang Mai, Hanoi
Phone: 0977522973

5X QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer (5 μ l); dNTP (1 μ l); Mỗi xuôi/ngược (1,5 μ l); Enzyme (1 μ l), H₂O (10 μ l), ARN khuôn (5 μ l) và chu trình nhiệt cho phản ứng RT-PCR: 50°C (30 phút); 95°C (15 phút); 94°C (30 giây); 55°C (30 giây); 72°C (1 phút); 72°C (10 phút), 45 chu kỳ.

Từ khóa: *Cúm A/H5N1, phản ứng RT-PCR.*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vắc xin cúm A/H5N1 là hỗn dịch của chủng vi rút cúm A/H5N1 bất hoạt được bổ sung thêm một số tá chất để tạo được phản ứng đáp ứng sinh miễn dịch. Vi rút cúm A/H5N1 thuộc họ Orthomyxoviridae trong hệ thống phân loại chung. Các hạt vi rút cúm A/H5N1 (virion) có hình cầu hoặc hình khối đa diện, đường kính 80 -120 nm, đôi khi cũng có dạng hình sợi, trọng lượng phân tử khoảng 250 triệu Da. Phân tích thành phần hóa học một virion có chứa khoảng 0,8 - 1,1% ARN; 70 - 75% là protein; 20 - 24% lipid và 5 - 8% là carbohydrate [2, 3, 5].

Hạt vi rút có cấu tạo đơn giản gồm vỏ, vỏ bọc ngoài và lõi là ARN sợi đơn âm. Vỏ vi rút có chức năng bao bọc và bảo vệ vật chất di truyền ARN, bản chất cấu tạo là màng lipid kép, có nguồn gốc từ màng tế bào nhiễm được đặc hiệu hóa gắn các protein màng của vi rút. Trên bề mặt có khoảng 500 “gai mấu” nhô ra và phân bố dày đặc, mỗi gai mấu dài khoảng 10 - 14 nm có đường kính 4 - 6 nm, đó là những kháng nguyên bề mặt vỏ vi rút, bản chất cấu tạo là glycoprotein gồm: HA, NA, MA (matrix) và các dấu ấn khác của vi rút. Có sự phân bố không đồng đều giữa các phân tử NA và HA (tỉ lệ khoảng 1NA/4HA), đây là hai loại protein kháng nguyên có vai trò quan trọng trong quá trình xâm nhiễm của vi rút ở tế bào cảm nhiễm [2, 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. Theo khuyến cáo của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), phương pháp khuếch đại sử dụng enzyme phiên mã ngược RT-PCR, là phương pháp phát hiện nhanh, chính xác chủng vi rút cúm A/H5N1, sản phẩm của phản ứng RT-PCR

(1 μ l), H₂O (10 μ l), ARN template (5 μ l) and thermal cycle of RT-PCR reaction was: 50°C (30 minutes); 95°C (15 minutes); 94°C (30 seconds); 55°C (30 seconds); 72°C (1 minute); 72°C (10 minutes), 45 cycles.

Keyword: *Influenza vaccine, RT-PCR reaction*

I. INTRODUCTION

Influenza vaccine A/H5N1 is a complex of inactivated influenza virus strain A/H5N1 with additional excipients to create adapted immune reaction. Influenza virus A/H5N1 belongs to Orthomyxoviridae in general classification system. Virus particles A/H5N1 (virion) has spherical or polyhedral shape or sometimes in fibre shape, 80 -120 nm diameters, molecular weight about 250 million Da. Chemical components of a virion includes 0,8 - 1,1% ARN; 70 - 75% protein; 20 - 24% lipid and 5 - 8% carbohydrate [2, 3, 5].

Virus particle has simple structure with capsid, envelope and core is negative RNA single strain. The function of viral envelope is to cover and protect ARN, with essence is bilipid layer from infectious cell membrane that contents specific viral protein called spike. There are about 500 spikes that distributed heavily on the surface, each spike length is about 10 - 14 nm with 4 - 6 nm diameters, they are surface antigens of viral envelop, which are glycoprotein including: HA, NA, MA (matrix) and other markers of the virus. There is no equal distribution between NA and HA (ratio of NA:HA is about 1:4), and NA and HA are 2 important antigenic proteins for infiltration into host cell [2,5].

In quality control of vaccine, identity test is needed for each vaccine. According to WHO, RT-PCR is a fast and accurate method to determine influenza viral strain A/H5N1, the production of RT-PCR can be used in gene sequencing, determination of gene mutants and limit the risk of cross contamination or spread influenza virus

có thể sử dụng cho quá trình giải trình tự gen và xác định các yếu tố đột biến xảy ra trên gen và hạn chế những nguy cơ nhiễm chéo hoặc lây lan chủng vi rút cúm A/H5N1 so với các phương pháp thông thường như SRD, phản ứng ngưng kết hồng cầu gà... [6, 7]

Bên cạnh đó, các phương pháp nêu trên còn phụ thuộc vào việc cung ứng các sinh phẩm chuẩn từ các phòng thí nghiệm với số lượng cung cấp bị giới hạn. Vì vậy, việc đánh giá chất lượng vắc xin gặp nhiều khó khăn trong quá trình kiểm định nghiên cứu, xuất xưởng và trong công tác giám sát hậu kiểm do không chủ động được thời gian, hóa chất và phương pháp triển khai phức tạp. Xuất phát từ những lý do nêu trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục tiêu thẩm định và áp dụng được quy trình nhận dạng đặc hiệu chủng vi rút cúm A/H5N1 trong vắc xin bằng phương pháp RT-PCR tại Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế (NICVB).

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

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

Đối tượng nghiên cứu: Chủng vi rút A/H5N1 được nhận dạng bằng phương pháp RT-PCR

Thời gian nghiên cứu: Từ tháng 08/2017 đến tháng 10/2018.

Địa điểm nghiên cứu: NICVB, Bộ Y tế.

2.2. Nguyên vật liệu

Mẫu thử nghiệm: Mẫu chứng âm (Nước không chứa ADN, ARN, vắc xin Varivax), mẫu chứng dương (Chủng vi rút cúm A/H5N1(A/Vietnam/1194/2004(A/H5N1), mẫu thử nghiệm (vắc xin IVACFLU-A/H5N1) và Vaxigrip - vắc xin có chứa 03 chủng cúm A/H1N1, A/H3N2 và B).

Sinh phẩm: Kít tách chiết ARN (Qiagen, 52904), kít RT-PCR (Qiagen, 210212), kít tinh sạch sản phẩm của phản ứng RT-PCR (Affymetrix, 78200).

Hệ thống môi: Cặp môi HA1: H5-248-270F (GTGACGAATTCATCAATGTRCCG) và H5-671-647R

(CTCTGGTTTGTAGTGTGATGTYCCAA).

Cặp môi HA2: H5-918F

(CCARTRGGKGCKATAAAYTC) và H5-1166R (GTCTGCAGCRTAYCCACTYC) [6].

strain A/H5N1 compared with common methods such as SRD method or chicken blood clotting reaction, etc.[6, 7]

Besides, these above methods also depend on the limitation of standard biological products from laboratories. Therefore, quality evaluation of vaccine has difficulties in research, lot release or post marketing surveillance because of inactive time and chemicals management and difficulty to carry out. Therefore, we started this research to assess and apply the specific identity procedure of influenza virus A/H5N1 in vaccines by RT-PCR method at National Institute for Control of Vaccines and biological (NICVB).

II. METHOD

2.1. Subject, research time and location

Research subject: Influenza virus strain A/H5N1 was identified by RT-PCR method

Research duration: 08/2017 to 10/2018.

Research location: National Institute for Control of Vaccines and Biologicals (NICVB), Ministry of Health (MoH).

2.2. Materials

Sample: Negative control (DNA/RNA free water, vaccine Varivax), positive control (Influenza virus strain A/H5N1 (A/Vietnam/1194/2004(A/H5N1)), testing sample (vaccine IVACFLU-A/H5N1 and Vaxigrip which contains 3 influenza virus strains A/H1N1, A/H3N2 and B).

Biological kit: ARN extraction kit (Qiagen, 52904), RT-PCR kit (Qiagen, 210212), RT-PCR production purification kit (Affymetrix, 78200).

Primer pairs: Primers for HA1:

H5-248-270F

(GTGACGAATTCATCAATGTRCCG) and

H5-671-647R

(CTCTGGTTTGTAGTGTGATGTYCCAA).

Primers for HA2:

H5-918F (CCARTRGGKGCKATAAAYTC) and

H5-1166R (GTCTGCAGCRTAYCCACTYC) [6].

Equipment: Realtime – PCR 7500, electrophoresis machine, electrophoresis reader.

Thiết bị: Máy Realtime – PCR 7500, máy điện di, máy đọc sản phẩm sau điện di

2.3. Thiết kế nghiên cứu: Mô tả thực nghiệm tại phòng thí nghiệm.

Các mẫu thử nghiệm được tiến hành tách chiết thu ARN, ADN sau đó được khuếch đại bằng các cặp mồi đặc hiệu và sản phẩm của phản ứng PCR sẽ được xác định qua kết quả điện di. Quy trình chuẩn sẽ được thiết lập và tiến hành thẩm định quy trình với chỉ số độ đặc hiệu và độ mạnh.

Tiêu chuẩn cần đạt: Mẫu âm tính không có sản phẩm được khuếch đại, mẫu dương tính có kết quả sản phẩm theo đúng kích thước băng điện di. Độ đặc hiệu và độ mạnh đạt 100% qua các lần làm thử nghiệm.

2.4. Phương pháp: Phương pháp loại bỏ nhôm thực hiện theo quy trình hiện hành của NICVB, quy trình RT-PCR thực hiện theo công bố của WHO, quy trình tinh sạch thực hiện theo hướng dẫn của bộ sinh phẩm. Thực hiện phản ứng RT-PCR với tất cả các mẫu, đưa ra điều kiện tối ưu nhất dựa trên quy trình gốc. Thẩm định độ đặc hiệu, độ mạnh của quy trình sử dụng trong nghiên cứu.

2.4.1. Các bước tiến hành

2.3. Research design: Description of experiment.

Samples were extracted to collect RNA and amplified by RT-PCR with specific primers then read the result after electrophoresis. Standard procedure would be established with specificity and robustness criteria.

Expected results: Negative control had no band, positive control had bands on the gel with correct length, specificity and robustness reached to 100% in each experiment.

2.4. Method: Aluminum elimination was current procedure of NICVB, RT-PCR procedure followed WHO recommendations, purification procedure as in the instruction of kit. RT-PCR was applied for all samples to find an optimal procedure based on the original procedure. After that, assessment of specificity and robustness would be done upon optimal procedure in this research.

2.4.1. Procedure

Aluminum elimination: eliminate aluminum out from samples.

BẢNG 1. THÀNH PHẦN CỦA PHẢN ỨNG RT-PCR
TABLE 1. COMPONENTS OF RT-PCR REACTION

Hóa chất Component	Thể tích/ống phản ứng (μl) Volume/reaction (μl)	
	Cặp mồi HA1 Primers HA1	Cặp mồi HA2 Primers HA2
5X QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer (μl)	5 (μl)	5 (μl)
H ₂ O	4,5 (μl)	10 (μl)
dNTP Mix 10 Mm (μl)	1 (μl)	1 (μl)
Mồi xuôi (μl)	1,5 (μl)	1,5 (μl)
Mồi ngược (μl)	1,5 (μl)	1,5 (μl)
Enzyme	1 (μl)	1 (μl)
ARN khuôn	2,5 (μl)	5 (μl)
Q	5 (μl)	0 (μl)
Tổng thể tích Total volume	25 (μl)	25 (μl)

BẢNG 2: CHU TRÌNH NHIỆT CHO PHẢN ỨNG TINH SẠCH SẢN PHẨM CỦA PHẢN ỨNG RT-PCR
TABLE 2: THERMAL CYCLE FOR PURIFICATION OF RT-PCR PRODUCTION

Nhiệt độ Temperature	Thời gian Time
37°C	15 phút 15 mins
80°C	15 phút 15 mins
4°C	∞

BẢNG 3. CHU TRÌNH NHIỆT CHO PHẢN ỨNG RT- PCR
TABLE 3. THERMAL CYCLE OF RT- PCR REACTION

Đoạn HA1: Cặp mồi (918F-1166R) Gene HA1: Primer (918F-1166R)			Đoạn HA2: Cặp mồi HA2 (248F-671R) Gene HA2: Primer HA2 (248F-671R)		
Nhiệt độ Temperature	Thời gian Time	Số chu kì Cycles	Nhiệt độ Temperature	Thời gian Time	Số chu kì Cycles
50°C	30 phút / mins	45 chu kì 45 cycles	50°C	30 phút	45 chu kì 45 cycles
95°C	15 phút / mins		95°C	15 phút	
94°C	30 giây / secs		94°C	1 phút	
55°C	30 giây / secs		55°C	1 phút	
72°C	30 giây / secs		72°C	2 phút	
72°C	7 phút / mins		72°C	10 phút	
4°C	∞		4°C	∞	

Tách nhôm: Tiến hành loại nhôm khỏi mẫu thử nghiệm

Tách chiết ARN: Theo hướng dẫn của bộ sinh phẩm. Sản phẩm cuối cùng thu được là 60 µl ARN.

Phương pháp RT-PCR (Bảng 1).

Điện di: Sản phẩm PCR sau khi khuếch đại được điện di trên thạch agarose 1% với chất nhuộm Safe view trong vòng 45 phút/80V. Tiến hành soi bản thạch trên máy soi gel và chụp ảnh.

Tinh sạch sản phẩm của phản ứng RT-PCR: Nhỏ 5 µl sản phẩm RT-PCR + 2 µl dung dịch ExoSAP- IT vào tuýp 0,2 ml.

2.4.2. Đánh giá thử nghiệm

a. Thử nghiệm có giá trị

Thang chuẩn 3kb = 3000 bp (Marker 3kb): Vạch chia kích thước các vạch bằng 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 bp chạy rõ nét và sáng.

Mẫu chứng âm: Điện di không có băng sản phẩm

Mẫu chứng dương: Sản phẩm khuếch đại đúng kích thước: đoạn gen HA1 có kích thước 249 nucleotit và HA2 có kích thước 424 nucleotit. Vạch băng điện di rõ nét: Vạch băng sáng, nét. Không có sản phẩm phụ: Chỉ có một vạch băng duy nhất

b. Tiêu chuẩn chấp thuận

Mẫu thử nghiệm (vắc xin cúm A/H5N1: Ivacflu – A/H5N1): Cho kết quả dương tính (tương tự mẫu chứng dương)

Mẫu thử nghiệm (vắc xin cúm Vaxigrip chứa 03 chủng cúm A/H1N1, A/H3N2 và B): Cho kết quả âm tính.

RNA extraction: Follow kit's instruction. Volume of final product is 60µl ARN.

RT-PCR method (Table 1).

Electrophoresis: PCR products after amplification were run electrophoresis on agarose gel 1% with Safe view as dyeing reagent in 45 mins/80V then put the gel in electrophoresis reader and capture the gel picture.

Purify RT-PCR product: Drop 5 µl RT-PCR product + 2 µl ExoSAP- IT into 0,2 ml tube.

2.4.2. Experiment evaluation

a. Valid experiment

Ladder 3kb = 3000 bp (Marker 3kb): Standard bands are seen in electrophoresis reader including 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 bp.

Negative control: No band in gel

Positive control: Band in a correct size (gene HA1 has 249 nucleotides and HA2 has 424 nucleotides). Electrophoresis band are clear and has only one band in each sample, no extra band.

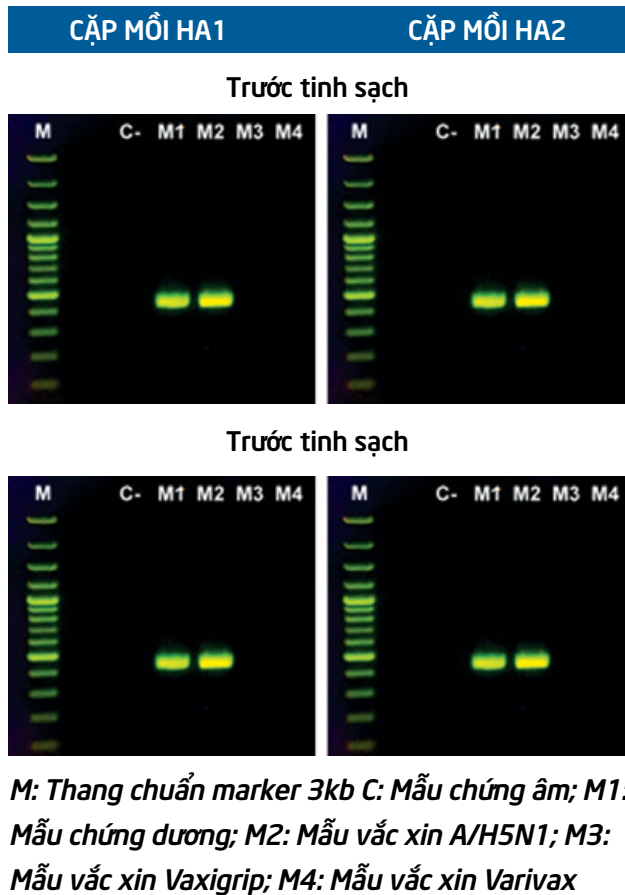
b. Criteria

Sample (Vaccine A/H5N1: Ivacflu – A/H5N1): Positive (same result as positive control)

Sample (Vaccine Vaxigrip contained 03 influenza virus strains A/H1N1, A/H3N2 and B): Negative

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả điện di sản phẩm của phản ứng RT-PCR với cặp mồi HA1 và HA2



Qua hình 3.1 cho thấy: Thang chuẩn 3kb = 3000 nucleotit (Marker 3kb): Vạch chia kích thước các vạch bằng 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 bp chạy rõ nét và sáng. Mẫu chứng âm: Không có băng sản phẩm điện di. Mẫu chứng dương: Sản phẩm khuếch đại đúng kích thước 249 bp và 424 bp tương ứng đoạn HA1 và HA2 trên gen HA, vạch băng điện di rõ nét: Vạch băng sáng, chưa được rõ nét, vẫn còn vết băng smear do chưa tiến hành tinh sạch sản phẩm và không có sản phẩm phụ, chỉ có một vạch băng duy nhất. Đối với mẫu thử nghiệm vắc xin cúm Ivacflu-A/H5N1 cho kết quả tương tự như mẫu chứng dương, còn đối với mẫu thử nghiệm vắc xin cúm Vaxigrip cho kết quả âm tính.

3.2. Kết quả thẩm định quy trình

3.2.1. Độ đặc hiệu

a. Độ đặc hiệu của quy trình với đoạn gen HA1

III. RESULTS

3.1. Electrophoresis result with primers for HA1 and HA2

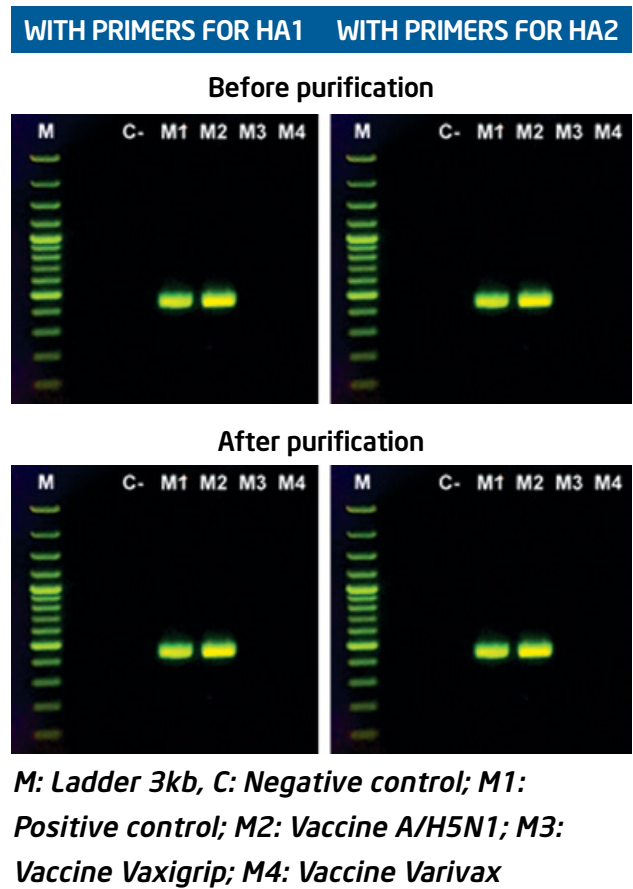
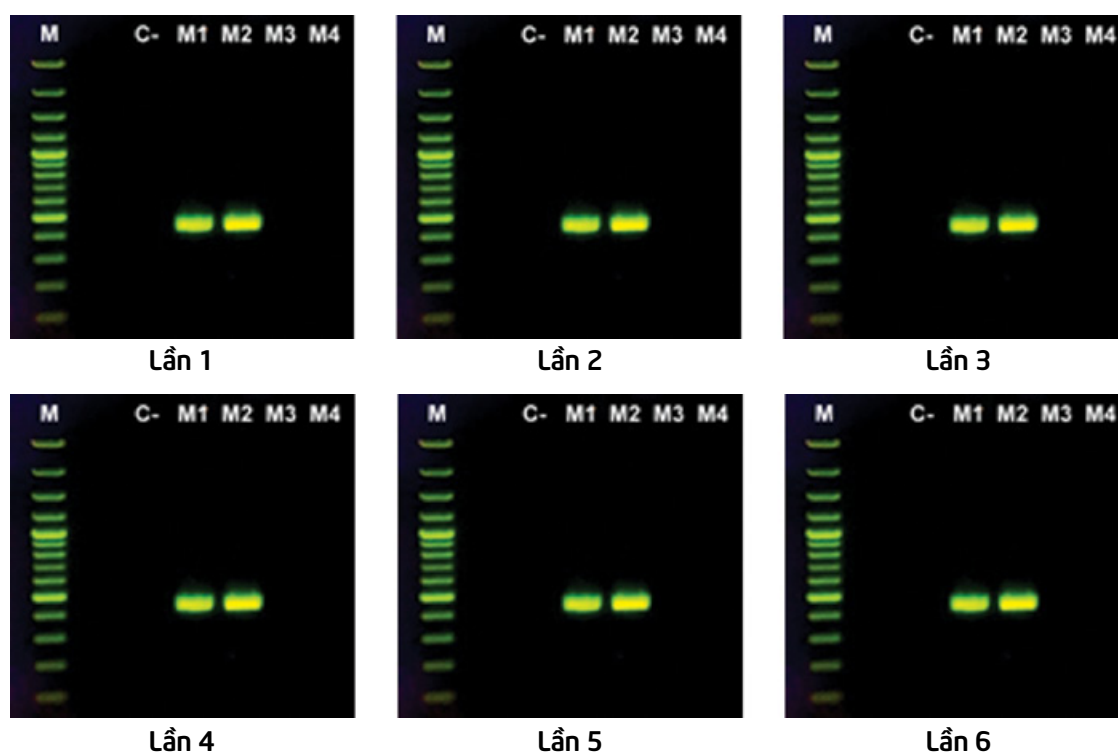


Figure 3.1 showed that ladder 3kb = 3000 nucleotides (Marker 3kb) had standard band sizes from 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, to 3000 bp were all clear. Negative control: no bands. Positive control: Amplified products were in correct sizes which were 249 bp and 424 bp corresponding with gene HA1 and HA2 of HA with only one clear band, however there were still smear because the gel was not purified. For vaccine Ivacflu-A/H5N1, the result was the same as positive control, for vaccine Vaxigrip, the result was negative.

3.2. Results of assessment procedure

3.2.1. Specificity

a. Specificity in gene HA1



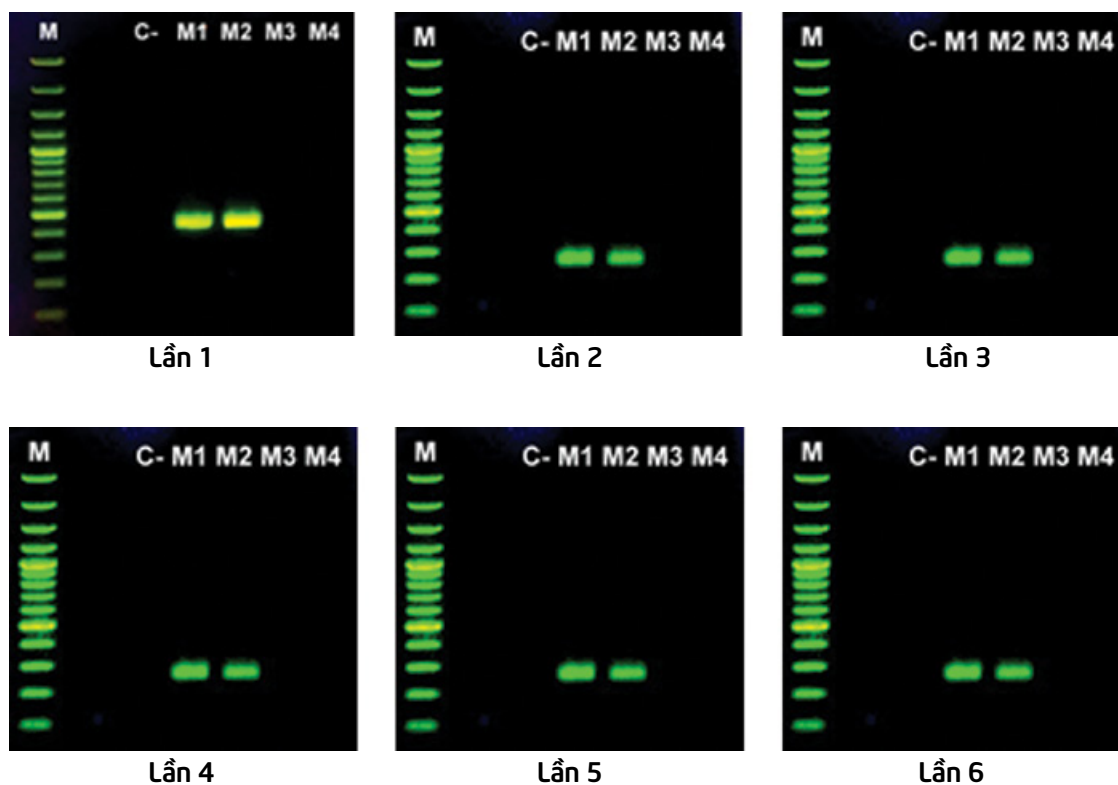
Hình 3.2.1. a. Ảnh sản phẩm điện di của phản ứng RT-PCR 06 lần thẩm định độ đặc hiệu với cặp mồi 248F-671R. M: Thang chuẩn marker 3kb; C-: Mẫu chứng âm; M1: Mẫu chứng dương; M2: Mẫu vắc xin A/H5N1; M3: Mẫu vắc xin Vaxigrip; M4: Mẫu vắc xin Varivax

Figure 3.2.1. a. 6 times assessment of RT-PCR electrophoresis products with primers 248F-671R.

M: Ladder 3kb; C-: Negative control; M1: Positive control; M2: Vaccine A/H5N1; M3: Vaccine Vaxigrip; M4: Vaccine Varivax

b. Độ đặc hiệu của quy trình với đoạn gen HA2

b. Specificity in gene HA2



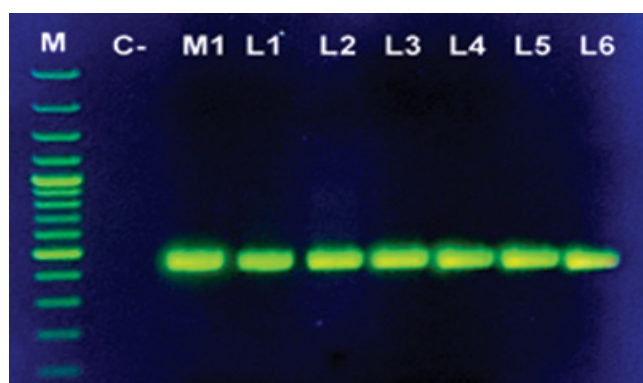
Hình 3.2.1.b. Ảnh sản phẩm điện di của phản ứng RT-PCR 06 lần thẩm định độ đặc hiệu với cặp mồi 918F-1166R. M: Thang chuẩn marker 3kb; C: Mẫu chứng âm; M1: Mẫu chứng dương, M2: Mẫu vắc xin cúm A/H5N1; M3: Mẫu vắc xin Vaxigrip; M4: Mẫu vắc xin Varivax

Figure 3.2.1.b. 6 times of specificity assessment of RT-PCR electrophoresis products with primers 918F-1166R. M: Ladder 3kb; C: Negative control; M1: Positive control; M2: Vaccine A/H5N1; M3: Vaccine Vaxigrip; M4: Vaccine Varivax

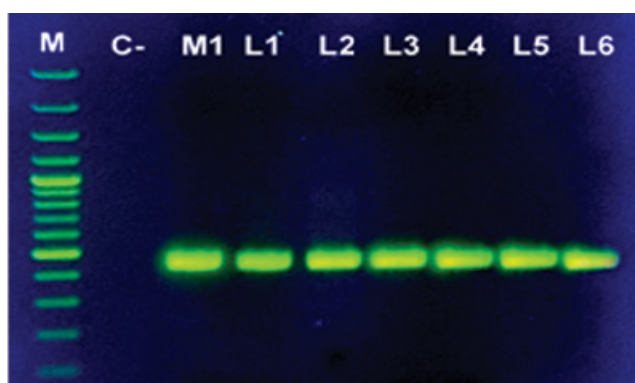
Kết quả ở hình 3.2.1.a và 3.2.1.b đều cho thấy quy trình đạt được yêu cầu về độ đặc hiệu 100% khi tiến hành thực hiện 06 lần thử nghiệm độc lập.

3.2.2. Độ mạnh

a. Độ mạnh của quy trình với đoạn gen HA1



Nhóm 1

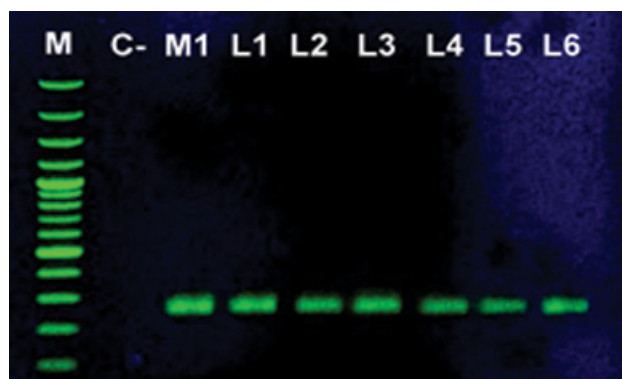


Nhóm 2

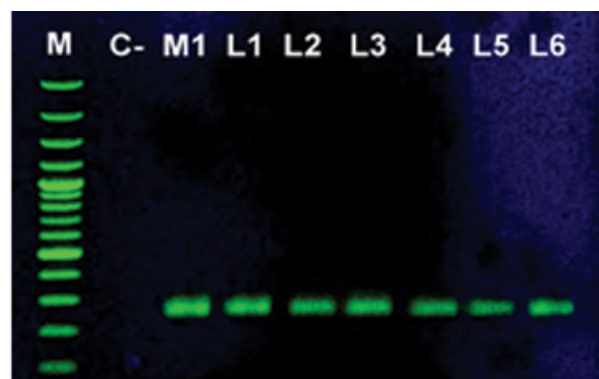
Hình 3.2.2.a: Ảnh sản phẩm điện di của phản ứng RT-PCR 06 lần thử nghiệm thẩm định độ mạnh của nhóm 1 và nhóm 2 với cặp mồi 918F-1166R. M: Thang chuẩn marker 3kb, C-: Mẫu chứng âm; M1: Mẫu chứng dương; L1, L2, L3, L4, L5, L6: 06 lần lặp lại của mẫu vắc xin A/H5N1

Figure 3.2.2.a. 6 times of specificity assessment of RT-PCR electrophoresis products with primers 918F-1166R of group 1 and group 2. M: Ladder 3kb, C-: Negative control; M1: Positive control; L1, L2, L3, L4, L5, L6: 06 repeatable times of vaccine A/H5N1

b. Độ mạnh của quy trình với đoạn gen HA2



Nhóm 1



Nhóm 2

Hình 3.2.2.b: Ảnh sản phẩm điện di của phản ứng RT-PCR 06 lần thử nghiệm thẩm định độ mạnh của nhóm 1 và nhóm 2 với cặp mồi 248F-671R. M: Thang chuẩn marker 3kb; C-: Mẫu chứng âm; M1: Mẫu chứng dương; L1, L2, L3, L4, L5, L6: 06 lần lặp lại của mẫu vắc xin A/H5N1.

Figure 3.2.2.b: 6 times of robustness assessment of RT-PCR electrophoresis products with primers 248F-671R of group 1 and group 2. M: Ladder 3kb, C-: Negative control; M1: Positive control; L1, L2, L3, L4, L5, L6: 06 repeatable times of vaccine A/H5N1

Kết quả ở hình 3.2.1.a và 3.2.1.b đều cho thấy quy trình đạt được yêu cầu về độ mạnh 100% khi tiến hành thực hiện 06 lần thử nghiệm độc lập.

IV. BÀN LUẬN

Trong nghiên cứu này trước hết chúng tôi tiến hành loại bỏ nhôm trong mẫu vắc xin cúm A/H5N1 trước khi tách chiết axit nucleic [1].

Sản phẩm RT-PCR hai đoạn của gen HA của chủng vi rút cúm A/H5N1 với hai cặp mồi đặc hiệu 918F-1166R và 248F-671R. Kết quả sau khi điện di sản phẩm của phản ứng RT-PCR cho thấy quy trình nhận dạng đặc hiệu chủng vi rút cúm A/H5N1 trong vắc xin bằng phương pháp RT-PCR đã bước đầu cho kết quả dương tính trên những mẫu đích được xác định có sự có mặt của vi rút cúm A/H5N1 và cho kết quả âm tính trên mẫu chứng âm và mẫu thử nghiệm đối chứng. Sản phẩm của phản ứng RT-PCR được khuếch đại 02 gen có kích lần lượt là 249 nucleotit và 424 nucleotit trên gen HA của chủng vi rút cúm A/H5N1. Đồng thời, trình tự nucleotit này là đặc hiệu chủng khi không có hiện tượng dương tính xảy ra đối với những mẫu thử nghiệm đối chứng có chứa các chủng vi rút cúm khác bao gồm A/H1N1, A/H3N2, chủng cúm B và cả với chủng vi rút thủy đậu.

Khi đọc kết quả sản phẩm của phản ứng RT-PCR trên hình ảnh điện di chúng ta có thể thấy hình ảnh băng sản phẩm có chứa vạch mờ và kết quả này là do trong sản phẩm của quá trình phản ứng RT-PCR có thể có chứa những thành phần không mong muốn hoặc vật liệu, hóa chất của phản ứng RT-PCR tồn dư sẽ ảnh hưởng đến kết quả của băng điện di trong quá trình chạy trên gel thạch agarose. Chính vì vậy, sản phẩm của phản ứng RT-PCR được tiến hành tinh sạch để loại bỏ các thành phần không mong muốn làm ảnh hưởng đến băng sản phẩm điện di.

Kết quả sau khi tiến hành tinh sạch sản phẩm của phản ứng RT-PCR trên 02 đoạn gen của gen

The results in figure 3.2.1.a and 3.2.1.b showed that the procedure was valid for robustness with productivity was 100% in 06 independent times of testing.

IV. DISCUSSION

In this research, we started with elimination of aluminum in influenza A/H5N1 before acid nucleic extraction [1].

RT-PCR products were 2 genes of HA of influenza virus strain A/H5N1 with 2 specific primer pairs which were 918F-1166R và 248F-671R. The results after electrophoresis showed that identity procedure was specific for influenza virus strain A/H5N1 in vaccine by RT-PCR method and gave a positive result for samples contained influenza virus strain A/H5N1 and a negative result for negative control and negative samples. Products of RT-PCR reaction were 2 amplified genes which were 249 nucleotides and 424 nucleotides on gene HA of influenza virus strain A/H5N1. Simultaneously, this nucleotide sequence was specific for strain A/H5N1 because there was no positive result in negative samples which contained other influenza virus strains such as A/H1N1, A/H3N2, B and even varicella virus strain.

When electrophoresis images of RT-PCR products were read on the screen, we could see that product bands contained smears. The reason for this symbol was the presence of unexpected components or residual materials of RT-PCR reaction that affected bands in agarose gel. Therefore, the products were purified to eliminate unexpected components that affected the electrophoresis results.

The result of RT-PCR products after purification showed that specific identity procedure for influenza virus strain A/H5N1 in

HA cho thấy quy trình nhận dạng đặc hiệu chủng vi rút cúm A/H5N1 trong vắc xin bằng phương pháp RT-PCR đã cho kết quả rất tốt về việc khuếch đại thành công đoạn gen có kích thước 249 nucleotit và 424 nucleotit của chủng vi rút cúm A/H5N1. Trong đó, sản phẩm của phản ứng RT-PCR sau khi tinh sạch đã cho ra băng của sản phẩm điện di và đặc hiệu về kích thước cũng như vạch băng sáng rõ, nét và chỉ có một băng duy nhất [6, 7].

Quy trình đã được thực hiện trên điều kiện thực tế với hóa chất, vật liệu, trang thiết bị tại phòng thí nghiệm của NICVB. Chúng tôi đã chủ động thay đổi thành phần của phản ứng và một số điều kiện của phản ứng và hóa chất đi kèm của quy trình gốc và quy trình tham khảo quy trình lỗi được công bố trong tài liệu của Tổ chức Y tế Thế giới, căn cứ theo điều kiện thực tế và chi phí thực hiện của đề tài. Cụ thể như việc sử dụng ARNase inhibitor (20U/ μ l) có vai trò ngăn chặn sự lây nhiễm ARN, tăng cường tính an toàn cho mẫu được giảm thiểu nhưng giá thành rất cao. Tuy nhiên với kết quả thu được từ nghiên cứu này chúng tôi nhận thấy rằng sự vắng mặt của ARNase inhibitor (20U/ μ l) không làm thay đổi kết quả và hiệu quả của phản ứng RT-PCR. Thêm vào đó, các thành phần và chu kỳ của phản ứng cũng được điều chỉnh và thay đổi để kết quả của phản ứng RT-PCR đạt được tối ưu nhất để đưa ra được quy trình chuẩn với nhiệt độ chạy qua các chu kỳ chạy. Với kết quả này chúng ta có thể khẳng định rằng quy trình nhận dạng đặc hiệu chủng vi rút cúm A/H5N1 trong vắc xin bằng phương pháp RT-PCR đã được nghiên cứu áp dụng thành công trên mẫu vắc xin cúm A/H5N1 với hai cặp mồi đặc hiệu của gen HA. Tuy nhiên nghiên cứu cho thấy quy trình nhận dạng đặc hiệu với việc sử dụng cặp mồi 248F-671R cho kết quả tốt hơn [6].

Sau khi đã thiết lập được quy trình nhận dạng đặc hiệu chủng vi rút cúm A/H5N1 trong vắc xin bằng phương pháp RT-PCR tại NICVB, do RT-PCR là phương pháp tiêu chuẩn theo tài liệu khuyến cáo của WHO vì vậy thử nghiệm được thẩm định một phần cho thử nghiệm nhận dạng

vaccine by RT-PCR method gave a good result in successful amplification of genes which had size 249 nucleotides 424 nucleotides of influenza virus strain A/H5N1. RT-PCR products then were purified and the images of electrophoresis were clear, clean, specific and there was only one band without smear [6, 7].

The procedure was operated under real condition of chemicals, materials and equipment in laboratory of NICVB. We decided to change components, some conditions and chemicals of the original procedure or approval core procedure that was published in WHO's recommendation based on real condition and expense of the research, such as: using RNase inhibitor (20U/ μ l) to prevent from RNA contamination, sample safety was improved but high cost. However, with our result in this research, we found out that the absence of RNase inhibitor (20U/ μ l) did not change the result or productivity of RT-PCR reaction. Additionally, components and cycles of RT-PCR were also changed for optimal procedure and running temperature of RT-PCR reaction. With this result, we confirmed that specific identity procedure of influenza virus strain A/H5N1 in vaccine by RT-PCR was successfully applied in influenza vaccine A/H5N1 with 2 specific primer pairs in gene HA. The research also showed that specific identity procedure by primers 248F-671R gave better results [6].

After specific identity procedure of influenza virus strain A/H5N1 in vaccine by RT-PCR method was established at NICVB, and due to RT-PCR was a standard method according to WHO's recommendation, therefore identity test needed to be assessed in specificity. However, we also determined robustness to confirm the reliability of the method.

In research samples, positive results were detected in RT-PCR reaction for positive control and testing sample which contained influenza virus strain A/H5N1. Conversely,

cần xác định độ đặc hiệu. Tuy nhiên nhóm nghiên cứu xác định thêm độ mạnh của phương pháp này đồng thời khẳng định độ tin cậy của phương pháp.

Trong các mẫu nghiên cứu, đối với mẫu chứng dương và mẫu thử nghiệm danh định có mặt của vi rút cúm A/H5N1, kết quả đều cho thấy phản ứng RT-PCR cho kết quả dương tính trong các mẫu này khi tiến hành thử nghiệm. Và ngược lại, đối với các mẫu chứng âm và mẫu trắng cùng loài có chứa các chủng vi rút cúm khác: A/H1N1, H3N2, B và mẫu trắng khác loài chứa chủng vi rút thủy đậu thì cho kết quả âm tính tức là không có sản phẩm của phản ứng RT-PCR. Căn cứ vào đặc điểm cấu trúc gen của các chủng vi rút cúm cho thấy mức độ giống nhau có thể đến 99%. Những nghiên cứu về sinh học phân tử của các chủng vi rút cúm cho thấy rằng sự sai khác giữa các chủng cúm có tỉ lệ rất thấp, có những chủng chỉ khác nhau vài nucleotit, sự thay đổi một vài nucleotit trên gen HA cũng đã có thể gây ra biến đổi di truyền lớn tạo thành chủng vi rút mới và chính vì sự biến đổi về cấu trúc di truyền thường xuyên nên chủng vi rút cúm thường dễ gây ra dịch và đặc biệt là chủng cúm A/H5N1 đã được coi như chủng vi rút cúm đại dịch trên toàn cầu. Chính vì vậy chúng tôi thiết lập bố trí thí nghiệm để kiểm chứng độ đặc hiệu của phản ứng RT-PCR và căn cứ vào kết quả thực hiện 06 lần thử nghiệm độc lập trên, chúng ta có thể thấy rằng quy trình nhận dạng đặc hiệu chủng vi rút cúm A/H5N1 trong vắc xin bằng phương pháp RT-PCR tại NICVB đạt yêu cầu về độ đặc hiệu. Bên cạnh đó thiết kế thử nghiệm của độ mạnh được tiến hành độc lập song song giữa hai nhóm thực hiện trên hai máy PCR khác nhau. Kết quả thực hiện 06 lần thử nghiệm giữa hai nhóm đều đạt 100% theo độ đặc hiệu và độ mạnh giữa các lần làm thử nghiệm.

Với kết quả thành phần phản ứng được đưa ra là 5X QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer (5 μ l); dNTP (1 μ l); Mồi xuôi/ngược (1,5 μ l); Enzyme (1 μ l), H₂O (10 μ l), ARN khuôn (5 μ l) và chu trình nhiệt cho phản ứng RT-PCR: 50° C (30 phút); 95° C (15 phút); 94° C (30 giây); 55° C (30 giây); 72° C (1 phút); 72° C (10 phút), 45 chu kỳ. Quy trình đã

negative control and other blank samples contained other influenza virus strains such as A/H1N1, H3N2, B and sample contained varicella virus strain did not have any RT-PCR products on gel which meant they were all negative. Based on gene structure of influenza virus strains, they can be 99% homogeneous. Previous molecular biological research of influenza virus showed that the difference between different strains was very low, there may be only different from few nucleotides and the different positions of some nucleotides in gene HA can cause huge changes in genetics to create new variants. Because of the rapid genetic changes, influenza virus can cause pandemic easily, especially influenza virus A/H5N1 which is known as global pandemic influenza virus. Therefore, we established an experiment to verify specificity of RT-PCR method and based on the result of 6 times of independent experiment, we confirmed that specific identity procedure of influenza virus strain A/H5N1 in vaccine by RT-PCR method at NICVB is valid in specificity. Besides, robustness indicator was also carried out by two groups and two different PCR devices. The results of 2 groups reached 100% of productivity in 6 repeat tests.

The components of RT-PCR reactions were 5X QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer(5 μ l); dNTP (1 μ l); Forward/ Reverse primers (1,5 μ l); Enzyme (1 μ l), H₂O (10 μ l), ARN template (5 μ l) and the RT-PCR thermal cycle: 50°C (30 mins); 95°C (15 mins); 94°C(30 secs); 55°C (30 secs); 72°C (1 min); 72°C(10 mins), 45 cycles. The productivity of specificity and robustness assessment were 100% so we can conclude that the specific identity procedure for influenza virus strain A/H5N1 in vaccine by RT-PCR method was valid to evaluate specific identification of influenza virus strain A/H5N1 with 2 specific primer pairs 918F-1166R and 248F-671R.

được thẩm định độ đặc hiệu và độ mạnh là 100% vì vậy có thể khẳng định rằng quy trình nhận dạng đặc hiệu chủng vi rút cúm A/H5N1 trong vắc xin bằng phương pháp RT-PCR được đánh giá là đạt yêu cầu để đánh giá nhận dạng đặc hiệu chủng vi rút cúm A/H5N1 với hai cặp mồi nghiên cứu và có thể sử dụng một trong cặp mồi đặc hiệu 918F-1166R và 248F-671R khi tiến hành thử nghiệm.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã đưa ra được quy trình nhận dạng đặc hiệu chủng vi rút cúm A/H5N1 trong vắc xin bằng phương pháp RT-PCR tại Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế.

Việc khuếch đại đoạn gen HA1 với cặp mồi 918F-1166R cho kết quả tốt hơn đoạn gen HA2 với cặp mồi 248F-671R thể hiện qua độ sáng của các băng màu và tối ưu hơn cả về thời gian và không cần hóa chất mẫu chuẩn như phương pháp nhận dạng protein bằng phương pháp khuếch tán miễn dịch thường vẫn đang thực hiện để nhận dạng vắc xin cúm hiện nay.

V. CONCLUSION

This research is implemented as a procedure of specific identity of influenza virus strain A/H5N1 used in vaccine by RT-PCR method at National Institute for Control of Vaccine and Biologicals.

The better amplification of gene HA1 with primers 918F-1166R than gene HA2 with primers 248F-671R was shown by clearer bands, optimal run time, omit the need for standard samples such as in protein identity method or immune diffusion method used as influenza vaccine identification.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lưu Thị Dung (2017) Ứng dụng phương pháp RT-PCR để nhận dạng vi rút viêm gan A trong các loại vắc xin viêm gan A. Tạp chí Y học dự phòng 27(11):259-267
2. Lê Thanh Hòa (2006b) Y sinh học phân tử. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
3. Claas EC, Osterhaus AD, van Beek R, De Jong JC, Rimmelzwaan GF, Senne DA, Krauss S, Shortridge KF, Webster RG (1998) Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza vi rút. Lancet 351:472-477
4. Horimoto T, Kawaoka Y (2006) Strategies for developing vaccines against H5N1 influenza A vi rút. Trends Mol Med 12(11): 506-514. Review.
5. Korteweg C, Gu J (2008) Pathology, molecular biology, and pathogenesis of avian influenza A (H5N1) infection in humans. Am J Pathol 172(5): 1155-1170. Review.
6. http://www.who.int/influenza/resources/documents/molecular_diagnosis_influenza_virus_humans_update_201707.pdf
7. http://www.wpro.who.int/vietnam/topics/avian_influenza/factsheet/vi/

REFERENCE

1. Lưu Thị Dung (2017) Apply RT-PCR for identity test of Hepatitis A virus in vaccine. Journal of Preventive Medicine 27(11):259-267
2. Lê Thanh Hoa (2006) Micromedical Biology. Medical Publishing House, Hanoi.
3. Claas EC, Osterhaus AD, van Beek R, De Jong JC, Rimmelzwaan GF, Senne DA, Krauss S, Shortridge KF, Webster RG (1998) Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza vi rút. Lancet 351:472-477
4. Horimoto T, Kawaoka Y (2006) Strategies for developing vaccines against H5N1 influenza A vi rút. Trends Mol Med 12(11): 506-514. Review.
5. Korteweg C, Gu J (2008) Pathology, molecular biology, and pathogenesis of avian influenza A (H5N1) infection in humans. Am J Pathol 172(5): 1155-1170. Review.
6. http://www.who.int/influenza/resources/documents/molecular_diagnosis_influenza_virus_humans_update_201707.pdf
7. http://www.wpro.who.int/vietnam/topics/avian_influenza/factsheet/vi/