

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**

—————*****—————

NGUYỄN MẠNH KHẢI

**ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG NGÂN HÀNG TẾ BÀO
VERO CHUẨN QUỐC GIA DÙNG TRONG KIỂM
ĐỊNH VẮC XIN VÀ SINH PHẨM Y TẾ**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2018

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

NGUYỄN MẠNH KHẢI

**ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG NGÂN HÀNG TẾ BÀO VERO
CHUẨN QUỐC GIA DÙNG TRONG KIỂM ĐỊNH VẮC XIN
VÀ SINH PHẨM Y TẾ**

Chuyên ngành: Động vật học (Vi sinh vật học)

Mã số : 8420103

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: TS. Phạm Văn Hùng

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận văn thạc sĩ này, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành và sâu sắc tới:

- Phòng Đào tạo sau đại học, Viện sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo mọi điều kiện cho tôi trong suốt quá trình học tập.

- TS. Phạm Văn Hùng, người thầy có nhiều kinh nghiệm đã trực tiếp giúp đỡ tôi từ lúc xây dựng đề cương cho đến khi hoàn thành luận văn.

- Các bạn đồng nghiệp tại Khoa Kiểm định vắc xin Vi khuẩn, Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế đã giúp đỡ, tạo điều kiện cho tôi trong quá trình học tập và hoàn thành khóa luận tốt nghiệp.

- Cuối cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn đến gia đình, các bạn cùng lớp và các đồng nghiệp trong các Khoa/ phòng của Viện đã động viên, khích lệ và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Hà Nội, tháng 11 năm 2018

Học viên

Nguyễn Mạnh Khải

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
ATCC	American Type Culture Collection	Chủng chuẩn
BSA	Bovine Serum Albumin	Huyết thanh bê
CV	Coeficient variation	Hệ số biến thiên
CBER	Center for Biologics Evaluation Research	Trung tâm đánh giá các nghiên cứu sinh học
COA	Certificate Of Analysis	Chứng nhận chất lượng
DNA	Acide Deoxyribonucleic	Acide Deoxyribonucleic
WHO	World Health Organization	Tổ chức Y tế Thế Giới
MCB	Master Cell Bank	Ngân hàng tế bào gốc giống
MCQG	National Reference Standard	Mẫu chuẩn quốc gia
MCQT	International Reference Standard	Mẫu chuẩn quốc tế
MDBK	Madin-Darby bovine kidney cell line	Tế bào tiên phát thận bò
MRC-5	human diploid cell strain	Tế bào lưỡng bội người
NIBSC	National Institute for Biological Standard and Control	Viện kiểm soát và thiết lập chất chuẩn quốc tế
NRA	National Regulatory Authority	Cơ quan quản lý quốc gia vắc xin
NICVB	National Institute for Control of Vaccine and Biological	Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm Y tế
NCL	National Laboratory Control	Phòng kiểm định quốc gia
FDA	Food and Drug Aministration	Cơ quan quản lý thuốc và thực phẩm Hoa Kỳ
WCB	Working Cell Bank	Ngân hàng tế bào làm việc
RNA	Acide Ribonucleic	Axit ribonucleic

JCM	Japan Collection of Microorganisms	Bộ sưu tập các chủng vi sinh vật Nhật Bản
SOP	Standard Operating Procedure	Quy trình thao tác chuẩn
GLP	Good Laboratory Practice	Thực hành phòng thí nghiệm tốt
GMP	Good Manufacturing Practice	Thực hành sản xuất tốt
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng khuếch đại chuỗi
SD	Standard Deviation	Độ lệch chuẩn
TRS	Technical Report Series	Báo cáo kỹ thuật
KĐQG		Kiểm định Quốc gia

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG I. TỔNG QUAN	3
1.1. Tế bào động vật và cơ sở của việc nuôi cấy tế bào động vật	3
1.1.1. Các tế bào dịch huyền phù	3
1.1.2. Các tế bào dính bám	3
1.2. Kỹ thuật nuôi cấy tế bào động vật	4
1.2.1. Môi trường nuôi cấy	5
1.2.2. Kỹ thuật nuôi cấy tế bào động vật	7
1.3. Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy tế bào động vật	10
1.3.1. Nuôi cấy và tạo tế bào lai soma động vật	10
1.3.2. Công nghệ nhân bản vô tính động vật	11
1.3.3. Ứng dụng trong lĩnh vực y tế	13
1.4. Lịch sử ứng dụng nuôi cấy tế bào trong sản xuất vắc xin và sinh phẩm y tế, khái niệm ngân hàng tế bào	14
1.5. Dòng tế bào Vero	16
1.6. Hướng dẫn WHO thiết lập mẫu chuẩn quốc gia dùng cho kiểm định	18
1.7. Hướng dẫn của WHO thiết lập và đánh giá chất lượng ngân hàng tế bào dùng cho sản xuất và kiểm định chất lượng vắc xin và sinh phẩm	19
1.7.1. Thử nghiệm nhận dạng	20
1.7.2. Thử nghiệm vô trùng	21
1.7.3. Kiểm tra độ sống	21
1.7.4. Tính đồng nhất giữa các ống tế bào	21
1.7.5. Thử nghiệm Mycoplasma	22
1.7.6. Thử nghiệm kiểm tra các tác nhân ngoại lai	22
1.7.7. Kiểm tra phát hiện vi khuẩn lao	23
1.7.8. Kiểm tra tính ổn định của ngân hàng tế bào MCB và WCB theo thời gian khi bảo quản ở điều kiện tối ưu -70 ⁰ C	23
CHƯƠNG II ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	24

2.1. Đối tượng, thời gian và địa điểm nghiên cứu.....	24
2.2. Nội dung nghiên cứu	24
2.3. Vật liệu nghiên cứu	25
2.3.1. Mẫu chuẩn và mẫu thử	25
2.3.2. Các sinh phẩm, hóa chất:.....	25
2.3.3. Các thiết bị chính	26
2.3.4. Các dụng cụ và nguyên vật liệu khác	26
2.4. Phương pháp nghiên cứu.....	27
2.4.1. Thiết kế mô hình nghiên cứu.....	27
2.4.2. Kỹ thuật nghiên cứu.....	29
CHƯƠNG III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	37
3.1. Quy trình sản xuất ngân hàng tế bào vero 76 NICVB-MCB01-18A và vero 76 NICVB-WCB01-18B chuẩn quốc gia.....	37
3.2. Quy trình chuẩn “Quy trình chuẩn đánh giá chất lượng tế bào vero dùng cho kiểm định vắc xin và sinh phẩm y tế” theo tiêu chuẩn WHO TRS No. 978, phần 3, 2013.	38
3.2. Kết quả kiểm tra chất lượng ngân hàng tế bào vero 76 NICVB-MCB01-18A và NICVB-MCB01-18B.....	38
3.2.1. Kết quả kiểm tra nhận dạng tế bào vero 76 MCB01-18A và WCB01-18B.	38
3.2.2. Kết quả kiểm tra vô trùng tế bào vero 76 MCB01-18A và WCB01-18B.....	39
3.2.3. Kết quả kiểm tra độ sống tế bào vero 76 NICVB-MCB01-18A và NICVB-WCB01-18B.....	40
3.2.4. Kết quả kiểm tra tính đồng nhất các ống tế bào vero 76 NICVB-MCB01-18A và NICVB-WCB01-18B.....	42
3.2.5. Kết quả kiểm tra Mycoplasma tế bào vero 76 NICVB-MCB01-18A và NICVB-WCB01-18B	44
3.2.6. Kết quả kiểm tra tác nhân ngoại lai tế bào vero 76 NICVB-MCB01-18A... ..	44
3.2.7. Kết quả kiểm tra vi khuẩn lao trong tế bào vero 76 NICVB-MCB01-18A và NICVB-WCB01-18B	45

3.2.8. Kết quả kiểm tra tính ổn định ngân hàng tế bào vero 76 NICVB-MCB01-18A và NICVB-WCB01-18B khi bảo quản điều kiện -70°C theo thời gian.....	46
CHƯƠNG IV. BÀN LUẬN	50
4.1. Tính cấp thiết của việc thiết lập và đánh giá chất lượng ngân hàng tế bào vero đạt tiêu chuẩn WHO TRS No. 978, 2013.....	50
4.2. Xây dựng qui trình chuẩn “Quy trình chuẩn đánh giá chất lượng tế bào vero dùng cho kiểm định vắc xin và sinh phẩm y tế” đạt tiêu chuẩn WHO	51
4.3. Đánh giá chất lượng ngân hàng tế bào vero 76 NICVB-MCB01-18A và NICVB-WCB01-18B	52
4.4. Tính ổn định của ngân hàng tế bào vero 76 NICVB-MCB01-18A và NICVB-WCB01-18B khi bảo quản theo thời gian tại nhiệt độ tối ưu -70°C	53
KẾT LUẬN	55
KIẾN NGHỊ	56
TÀI LIỆU THAM KHẢO	57
PHỤ LỤC	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Thành phần môi trường Eagle (1959)	7
Bảng 2.1 Thành phần phản ứng PCR nhận dạng tế bào vero	31
Bảng 2.2 Điều kiện phản ứng chu kỳ nhiệt PCR nhận dạng tế bào vero.....	31
Bảng 2.3 Thành phần phản ứng PCR phát hiện Mycoplasma	34
Bảng 2.4 Điều kiện phản ứng chu kỳ nhiệt PCR phát hiện Mycoplasma.....	34
Bảng 3.1 Kết quả kiểm tra vô trùng	40
Bảng 3.2 kết quả kiểm tra độ sống tế bào vero 76 NICVB-MCB01-18A và NICVB-MCB01-18B	41
Bảng 3.3 Kết quả tính đồng nhất các ống tế bào vero 76 NICVB-MCB01-18A	42
Bảng 3.4 Kết quả tính đồng nhất các ống tế bào vero 76 NICVB-WCB01-18B	43
Bảng 3.5 Kết quả kiểm tra tác nhân ngoại lai của ngân hàng tế bào vero 76 NICVB-MCB01-18A.....	45
Bảng 3.6 Kết quả kiểm tra phát hiện trực khuẩn lao trong tế bào vero 76 NICVB-MCB01-18A và NICVB-WCB01-18B	46
Bảng 3.7 Kết quả đánh giá tính ổn định ngân hàng tế bào vero 76 NICVB-MCB01-18A khi bảo quản ở nhiệt độ tối ưu theo thời gian	47
Bảng 3.8 Kết quả đánh giá tính ổn định ngân hàng tế bào vero 76 NICVB-WCB01-18B khi bảo quản ở nhiệt độ tối ưu theo thời gian.....	48

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1: Các tế bào động vật thường được sử dụng trong nuôi cấy.....	4
Hình 1.2. Hình ảnh tế bào vero trong môi trường nuôi cấy MEM 10%FBS.....	17
Hình 2.1 Mô hình nghiên cứu	29
Hình 3.1 Sơ đồ sản xuất ngân hàng tế bào vero 76 NICVB-MCB01-18A và vero 76 NICVB-WCB01-18B chuẩn quốc gia.....	37
Hình 3.2 Tế bào vero 76 NICVB-MCB01-18A và NICVB-WCB01-18B.....	38
Hình 3.3 Kết quả nhận dạng MCB01 và WCB01.....	39
Hình 3.4 Kết quả hình thái đặc trưng vero 76 trên môi trường nuôi cấy.....	41
Hình 3.5 Kết quả xác định Mycoplasma trong mẫu tế bào ngân hàng vero 76 NICVB-MCB01-18A và NICVB-WCB01-18B.....	44
Hình 3.6 Kết quả tính ổn định độ sống tế bào vero 76 NICVB-MCB01-18A	48
Hình 3.7 Kết quả tính ổn định độ sống tế bào vero 76 NICVB-WCB01-18B	49