

**BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**



**Nguyễn Ái Thương**

**NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT THỬ NGHIỆM HUYẾT THANH  
KHÁNG NỌC RẪN CẠP NIA BẮC (*BUNGARUS MULTICINCTUS*)  
TINH CHẾ**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ: CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

***Nha Trang – Năm 2023***

**BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**



**Nguyễn Ái Thương**

**NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT THỬ NGHIỆM HUYẾT THANH  
KHÁNG NỌC RẪN CẠP NIA BẮC (*BUNGARUS MULTICINCTUS*)  
TINH CHẾ**

Chuyên ngành: **Sinh học thực nghiệm**

Mã số: **8420114**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ:  
CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:**

1. PGS. TS. Lê Văn Bé
2. TS. Huỳnh Hoàng Như Khánh

***Nha Trang - Năm 2023***

## LỜI CAM ĐOAN

*Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.*

Tác giả luận văn ký và ghi rõ họ tên

Nguyễn Ái Thương

## LỜI CẢM ƠN

Trong suốt quá trình học tập và hoàn thành luận văn này, tôi đã nhận được sự hướng dẫn, giúp đỡ quý báu của các thầy cô, các anh chị, các em và các bạn. Với lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc tôi xin được bày tỏ lời cảm ơn chân thành tới:

Ban giám Đốc Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Nghiên Cứu và Ứng dụng công nghệ Nha Trang, Ban giám đốc Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế đã tạo mọi điều kiện thuận lợi giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và hoàn thành khóa luận.

Xin chân thành cảm ơn Phó giáo sư- Tiến sĩ Lê Văn Bé, Tiến sĩ Huỳnh Hoàng Như Khánh đã giúp đỡ, động viên, cũng như các thầy cô trong hội đồng chấm luận văn đã cho tôi những đóng góp quý báu để hoàn chỉnh luận văn này.

Xin gửi lời cảm ơn tới các đồng nghiệp, các anh chị em ở Trại Chăn nuôi Suối Dầu, Phòng Kiểm Định, Phòng Huyết thanh Tinh chế, Phòng Thành Phẩm Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế đã nhiệt tình giúp đỡ tôi trong quá trình hoàn thành luận văn.

Cuối cùng, tôi xin chân thành cảm ơn Bố Mẹ và gia đình đã luôn ở bên cạnh động viên và giúp đỡ tôi học tập làm việc và hoàn thành chương trình học.

## MỤC LỤC

MỞ ĐẦU .....	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....	4
1.1. TỔNG QUAN VỀ RẮN, TÌNH HÌNH RẮN CẢN TRÊN THẾ GIỚI.....	4
1.2. TỔNG QUAN VỀ RẮN VÀ TÌNH HÌNH RẮN CẢN Ở VIỆT NAM ....	7
1.3. THÀNH PHẦN ĐỘC TÍNH CỦA NỌC ĐỘC CẠP NIA BẮC .....	10
1.4. ĐẶC TÍNH MIỄN DỊCH CỦA PROTEIN NỌC RẮN CẠP NIA BẮC	17
1.5. ĐỘNG HỌC CỦA HUYẾT THANH KHÁNG NỌC RẮN CẠP NIA BẮC.....	18
1.6. TÁC ĐỘNG LÂM SÀNG CỦA NGỘ ĐỘC NỌC RẮN CẠP NIA BẮC .....	18
1.7. ĐIỀU TRỊ RẮN CẢN.....	19
1.8. HUYẾT THANH KHÁNG NỌC RẮN.....	20
1.9. SẢN XUẤT HUYẾT THANH KHÁNG NỌC RẮN .....	21
1.10. QUY TRÌNH LỖI TINH CHẾ HUYẾT THANH KHÁNG NỌC RẮN Ở IVAC.....	28
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	29
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU .....	29
2.2. NGUYÊN VẬT LIỆU.....	29
2.2.1. Động vật thí nghiệm.....	29
2.2.2. Nọc rắn .....	29
2.2.3. Hóa chất .....	29
2.2.4. Thiết bị và dụng cụ .....	30
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	30
2.3.1. Khảo sát nọc rắn Cạp nia Bắc ( <i>Bungarus multicinctus</i> ).....	30
2.3.2. Xây dựng phát đồ miễn dịch, gây miễn dịch trên ngựa, thu nhận huyết tương kháng nọc rắn Cạp nia Bắc .....	30

2.3.3. Ứng dụng quy trình tinh chế huyết thanh kháng nọc rắn của IVAC để tinh chế 3 lô thử nghiệm quy mô 10 lít/lô và 1 lô sản phẩm quy mô 60 lít /lô. Đóng 500 lọ IVACAV- <i>Bun</i> dạng thành phẩm (1000 LD <sub>50</sub> /lọ).....	34
2.3.4. Đề xuất tiêu chuẩn cơ sở cho huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc tinh chế phù hợp DDVN V, 2018 .....	39
2.3.5. Phương pháp kiểm định .....	40
<b>CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN</b> .....	<b>44</b>
<b>3.1. KHẢO SÁT KHÁNG NGUYÊN NỌC RẮN CẠP NIA BẮC</b> .....	<b>44</b>
3.1.1. Đánh giá cảm quan nọc rắn.....	44
3.1.2. Xác định Protein tổng số và LD <sub>50</sub> nọc rắn Cạp nia Bắc .....	44
<b>3.2. KẾT QUẢ THIẾT LẬP QUY TRÌNH MIỄN DỊCH TRÊN NGỰA, ĐÁNH GIÁ QUY TRÌNH SAU KHI GÂY MIỄN DỊCH</b> .....	<b>47</b>
3.2.1. Đánh giá tiêu chuẩn ngựa .....	47
3.2.2. Theo dõi sức khỏe ngựa sau các mũi tiêm miễn dịch.....	49
3.2.3. Kết quả đánh giá đáp ứng miễn dịch của 2 phác đồ miễn dịch trên ngựa trong giai đoạn miễn dịch cơ bản.....	51
3.2.4. Kết quả đánh giá hiệu giá kháng thể trung hòa của 2 phác đồ miễn dịch trên ngựa qua 4 chu kỳ khai thác .....	54
3.2.5. Kết quả đánh giá sức khỏe ngựa của 2 phác đồ miễn dịch trên ngựa qua 4 chu kỳ khai thác.....	59
3.2.6. Thu nhận huyết thanh thô kháng nọc rắn Cạp nia Bắc .....	61
<b>3.3. KẾT QUẢ TINH CHẾ HUYẾT THANH KHÁNG NỌC RẮN CẠP NIA BẮC</b> .....	<b>64</b>
3.3.1. Kết quả tinh chế 3 lô huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc quy mô 10 lít/lô, đánh giá tính phù hợp các thông số của quy trình.....	64
3.3.2. Kết quả tinh chế lô huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc bán thành phẩm.....	72
3.3.3. Kết quả huyết thanh tinh chế kháng nọc rắn Cạp nia Bắc thành phẩm.....	76

3.4. XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG VÀ ĐỀ XUẤT TIÊU CHUẨN CƠ SỞ CHO HUYẾT THANH KHÁNG NỌC RẮN TINH CHẾ PHÙ HỢP ĐCVN V, 2018.....	78
3.4.1. Xây dựng các phương pháp kiểm định huyết thanh tinh chế kháng nọc rắn Cạp nia Bắc.....	78
3.4.2. Đề xuất tiêu chuẩn chất lượng kiểm định huyết thanh tinh chế kháng nọc rắn Cạp nia Bắc bán thành phẩm và thành phẩm .....	80
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	82
KẾT LUẬN.....	82
KIẾN NGHỊ .....	82

## DANH MỤC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

3FTs	: Three-finger toxins (độc tố ba ngón tay)
CRISP	: Cysteine-rich secretory protein (protein bài tiết giàu cysteine)
ĐĐVN	: Dược điển Việt Nam
Htc	: Hematocrit (Dung tích hồng cầu)
IVAC	: Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế.
IVACAV- <i>Bun</i>	: IVAC Antivenom - Bugarus (tờ ghép đăng ký nhãn hiệu hàng hóa của huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc tinh chế do IVAC sản xuất).
LD <sub>50</sub>	: Lethal dose (Liều gây chết 50%)
LPA2	: Phospholipase A2
NP	: Natriuretic peptide
NGF	: Nerve growth factor (sự phát triển thần kinh yếu tố)
SDS -PAGE	: Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (Điện di trên gel polyacrylamide natri dodecyl sulfat)
TCCS	: Tiêu chuẩn cơ sở
WHO	: World Health Organization (Tổ chức Y tế Thế giới/TCYTTG)



## DANH MỤC BẢNG BIỂU

Bảng 2.1. Tiêu chuẩn chất lượng bán thành phẩm huyết thanh kháng nọc rắn tinh chế (theo tiêu chuẩn của IVAC đã đăng ký với 2 loại huyết thanh tinh kháng nọc Lục tre và Hồ đất).....	37
Bảng 2.2. Tiêu chuẩn chất lượng thành phẩm huyết thanh kháng nọc rắn tinh chế (theo tiêu chuẩn của IVAC đã đăng ký với 2 loại huyết thanh tinh kháng nọc Lục tre và Hồ đất).....	38
Bảng 2.3. Đánh giá các tiêu chí khai thác huyết thanh Cạp nia Bắc thô .....	40
Bảng 3.1. Kết quả đánh giá hàm lượng protein của 3 lô nọc rắn Cạp nia Bắc45	
Bảng 3.2. Kết quả đánh giá độc lực của 2 lô nọc rắn Cạp nia Bắc tươi .....	45
Bảng 3.3. Kết quả chỉ số sinh lý và sức khỏe 8 ngựa thí nghiệm trước khi đưa vào gây miễn dịch .....	48
Bảng 3.4. Kết quả sức khỏe 8 ngựa thí nghiệm sau các mũi tiêm miễn dịch cơ bản của 2 nhóm ngựa thí nghiệm .....	49
Bảng 3.5. Đáp ứng miễn dịch của 4 ngựa nhóm 1 sau khi tiêm nọc rắn Cạp nia Bắc bằng phương pháp ngưng kết trên thạch Agarose (Ouchterlony) .....	51
Bảng 3.6. Đáp ứng miễn dịch của 4 ngựa nhóm 2 sau khi tiêm nọc rắn Cạp nia Bắc.....	52
Bảng 3.7. Kết quả hiệu giá kháng thể kháng nọc rắn Cạp nia Bắc bằng thử nghiệm trung hòa trên chuột nhắt của 4 ngựa thí nghiệm nhóm 1 qua 4 chu kỳ khai thác huyết thanh thô .....	54
Bảng 3.8. Kết quả hiệu giá kháng thể kháng nọc rắn Cạp nia Bắc bằng thử nghiệm trung hòa trên chuột nhắt của 4 ngựa thí nghiệm nhóm 2 qua 4 chu kỳ khai thác huyết thanh thô .....	56
Bảng 3.9. Kết quả sức khỏe của 2 nhóm ngựa thí nghiệm qua 4 chu kỳ khai thác .....	60
Bảng 3.10. Số lượng huyết thanh thô khai thác của ngựa nhóm 1 sau 4 chu kỳ .....	61

Bảng 3.11. Số lượng huyết thanh thô khai thác của ngựa nhóm 2 sau 4 chu kỳ .....	62
Bảng 3.12. Tổng hợp đánh giá các chỉ số giữ 2 phác đồ miễn dịch trên ngựa	63
Bảng 3.13. Chất lượng các lô huyết thanh thô đưa vào tinh chế quy mô 10 lít/lô .....	64
Bảng 3.14. Các thông số quy trình tinh chế thử nghiệm 3 lô huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc giai đoạn pepsin hóa huyết thanh thô .....	65
Bảng 3.15. Các thông số quy trình tinh chế thử nghiệm 3 lô huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc giai đoạn tủa albumin và kháng thể .....	66
Bảng 3.16. Các thông số quy trình tinh chế thử nghiệm 3 lô huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc giai đoạn thẩm tích, hấp phụ và lọc vô trùng .....	67
Bảng 3.17. Kết quả đánh giá chất lượng của 3 lô huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc tinh chế thử nghiệm. ....	68
Bảng 3.18. Kết quả kiểm định huyết thanh bán thành phẩm kháng nọc rắn Cạp nia Bắc tinh chế lô IVACAV-Bun-001-B/S .....	73
Bảng 3.19. Kết quả đánh giá chỉ tiêu gây sốt đối với lô huyết thanh bán thành phẩm IVACAV-Bun-001-B/S tinh chế.....	75
Bảng 3.20. Số lượng thành phẩm huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc ...	76
Bảng 3.21. Kết quả kiểm định lô thành phẩm huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc IVACAV-Bun-001.....	77
Bảng 3.22. Danh mục các phương pháp kiểm định huyết thanh kháng nọc Cạp nia Bắc tinh chế.....	79
Bảng 3.23. Đề xuất tiêu chuẩn chất lượng cơ sở khai thác huyết thanh thô kháng nọc rắn Cạp nia Bắc trên ngựa. ....	80
Bảng 3.24. Đề xuất tiêu chuẩn chất lượng cơ sở huyết thanh tinh chế kháng nọc rắn Cạp nia Bắc bán thành phẩm và thành phẩm .....	81

## DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1. Rắn Cạp nia Bắc ( <i>Bungarus multicinctus</i> ) [14] .....	7
Hình 1.2. Phân bố bệnh nhân bị các loại rắn độc cắn tại Bệnh viện Chợ Rẫy từ năm 1990 – 1998 [19]. .....	10
Hình 1.3. Tỷ lệ % các thành phần nọc rắn Cạp nia Bắc [20].....	11
Hình 1.4. Tỷ lệ % các thành phần nọc rắn Cạp nia Bắc ở Việt Nam [22].....	12
Hình 1.5. Tỷ lệ % các thành phần nọc rắn Cạp nia Bắc (a) Trung Quốc và (b) Đài Loan [23] .....	13
Hình 1.6. Cấu trúc Immunoglobulin G [49].....	20
Hình 1.7. Các mảnh IgG khác nhau thu được từ quá trình tiêu hóa pepsin và papain [49].....	25
Hình 1.8. Hai loại huyết thanh kháng nọc rắn được IVAC sản xuất và lưu hành. ....	28
Hình 2.1. Phác đồ miễn dịch 1 .....	31
Hình 2.2. Phác đồ miễn dịch 2 .....	32
Hình 2.3. Quy trình khai thác huyết thanh thô kháng nọc rắn Cạp nia Bắc ...	34
Hình 2.4. Sơ đồ quy trình tinh chế huyết thanh kháng nọc rắn áp dụng tại IVAC .....	35
Hình 3.1. lô nọc rắn Cạp nia Bắc sử dụng cho nghiên cứu: (A) lô 01;.....	44
Hình 3.2. Triệu chứng chuột khi nhiễm độc nọc rắn Cạp nia Bắc.....	46
Hình 3.3. Kết quả ngưng kết trên thạch với mẫu huyết thanh thô được gây miễn dịch với nọc rắn Cạp nia Bắc của 4 ngựa thí nghiệm nhóm 1 ở các ngày (A: ngày D21; B: ngày D35 và C: ngày D49). ....	52
Hình 3.4. Kết quả ngưng kết mẫu huyết thanh thô được gây miễn dịch với nọc rắn Cạp nia Bắc của 4 ngựa nhóm 2 ở các ngày (A: ngày D21; B: ngày D35; C: ngày D49 và D: ngày D70). ....	53

Hình 3.5. Sự biến thiên của hiệu giá kháng thể kháng nọc rắn Cạp nia Bắc trên chuột nhất qua 4 chu kỳ khai thác huyết thanh thô của 4 ngựa được miễn dịch với phác đồ 1. ....	56
Hình 3.6. Sự biến thiên của hiệu giá kháng thể kháng nọc rắn Cạp nia Bắc trên chuột nhất qua 4 chu kỳ khai thác huyết thanh thô của 4 ngựa gây miễn dịch với phác đồ miễn dịch 2. ....	58
Hình 3.7. Hiệu giá kháng thể trung bình của 2 nhóm ngựa thí nghiệm (nhóm 1 miễn dịch 8 mũi, nhóm 2 miễn dịch 11 mũi) sau 4 chu kỳ khai thác huyết thanh thô. ....	59
Hình 3.8. Hình ảnh điện di SDS - PAGE 3 lô huyết thanh sau tinh chế thử nghiệm. ....	70
Hình 3.9. Quy trình tinh chế huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc .....	71
Hình 3.10. Kết quả điện di SDS -PAGE lô huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc tinh chế bán thành phẩm IVACAV-Bun – 001-B/S. ....	74
Hình 3.11. Lô huyết thanh bán thành phẩm IVACAV-Bun-001-B/S tinh chế .....	75
Hình 3.12. Huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc thành phẩm lô IVACAV-Bun 001 .....	78

## MỞ ĐẦU

Các loài rắn độc ở Việt Nam hiện nay chủ yếu thuộc về họ rắn Hồ (*Elapidae*, 36 loài) và họ rắn Lục (*Viperidae*, 19 loài), tuy nhiên có một số loài rắn độc thuộc họ rắn nước (*Colubridae*, 6 loài) đã và đang gây nên các trường hợp nhiễm độc rất nặng. Rắn độc cắn gây nên 3 tình trạng chính: (1) Tại vùng cắn gây sưng nề, chảy máu, hoại tử thường dẫn tới nhiễm trùng và dễ bị cắt cụt một phần hoặc di chứng sẹo, tàn phế; (2) Toàn thân bị liệt, thường phải hồi sức, thở máy, bệnh nhân nhanh chóng tử vong sớm do liệt cơ hô hấp nếu không được cấp cứu kịp thời; (3) Rối loạn đông máu, không cầm máu dẫn tới chảy máu ở nhiều vị trí và dễ tử vong.

Rắn Cạp nia Bắc thuộc chi (*Bungarus*) họ rắn Hồ (*Elapidae*), là một trong 5 loài rắn độc nhất trên thế giới và là loài rắn độc nhất ở Việt Nam. Theo các tài liệu công bố, độc tố của rắn Cạp nia Bắc có tác dụng gây liệt và không thể hồi phục nếu không có huyết thanh kháng nọc rắn đặc hiệu kịp thời. Các bệnh nhân bị rắn Cạp nia Bắc cắn sẽ bị liệt toàn thân, thường liệt mức độ hoàn toàn. Nếu không được cấp cứu kịp thời tại các cơ sở y tế, bệnh nhân sẽ tử vong nhanh chóng. Nếu không được dùng huyết thanh kháng nọc rắn đặc hiệu, bệnh nhân sẽ phải trải qua thời gian hồi sức và thở máy 2 - 4 tuần với nhiều biến chứng như nhiễm trùng, loét,... và vẫn có nguy cơ tử vong do suy hô hấp. Sau khi ra viện các bệnh nhân vẫn còn bị yếu cơ, giảm sức lao động nặng nề, đau mỏi cơ thể và thị lực bị ảnh hưởng trong nhiều tháng. Việc nằm viện hồi sức kéo dài của các bệnh nhân bị rắn Cạp nia Bắc cắn gây tốn kém, lãng phí rất lớn, làm tăng thêm quá tải bệnh viện. Hiện nay Việt Nam vẫn chưa sản xuất được huyết thanh loại này.

Tại Việt Nam, qua tổng hợp các nghiên cứu và tài liệu đã công bố cho tới nay, tại bệnh viện Chợ Rẫy với 67 ca rắn cắn năm 1990 đã tăng lên 648 ca năm 2000. Theo số liệu tại Trung tâm Chống độc bệnh viện Bạch Mai, từ 2000-2006 có 141 bệnh nhân rắn Cạp nia Bắc cắn nhập viện. Theo số liệu mới nhất năm 2015, trung tâm Chống độc bệnh viện Bạch Mai tiếp nhận 528 ca rắn cắn trong đó có 60 bệnh nhân bị rắn Cạp nia Bắc cắn.

Huyết thanh kháng nọc rắn là chế phẩm globulin miễn dịch đặc hiệu, khi sử dụng cho bệnh nhân bị rắn cắn sẽ trung hòa độc tố của nọc rắn, giúp nạn nhân thoát khỏi tình trạng nguy kịch, đe dọa tính mạng, hồi phục điều trị

nhanh. Đến nay, tinh chế huyết thanh kháng nọc rắn dạng F(ab')<sub>2</sub> được các đơn vị sản xuất huyết thanh ưu tiên lựa chọn. Dạng huyết thanh kháng nọc rắn này an toàn hơn cho người bệnh, có hiệu quả cao do sử dụng ammonium sulfate tủa protein nhưng không làm biến đổi tính chất của chúng, thời gian bán hủy tương đối chậm, đủ thời gian trung hòa độc tố nọc rắn, phản ứng phụ với huyết thanh thấp.

Với sự cần thiết cần có một sinh phẩm điều trị đặc hiệu, hướng đến đáp ứng nhu cầu cấp bách trong việc sử dụng huyết thanh điều trị nạn nhân bị rắn Cạp nia Bắc cắn, chúng tôi tiến hành đề tài: “Nghiên cứu sản xuất thử nghiệm huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc (*Bungarus multicinctus*) tinh chế”.

### **Mục tiêu của đề tài**

(1) Thiết lập quy trình gây miễn dịch ngựa, thu nhận huyết tương kháng nọc rắn Cạp nia Bắc.

(2) Ứng dụng quy trình tinh chế huyết thanh của Viện Vắc xin và sinh phẩm Y tế (IVAC), tinh chế 500 lọ (1000 LD<sub>50</sub>/lọ) huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc tinh chế (IVACAV-*Bun*) và đề xuất tiêu chuẩn cơ sở.

### **Nội dung nghiên cứu**

(1) Khảo sát nọc rắn Cạp nia Bắc (Protein tổng số và liều gây chết 50% - LD<sub>50</sub>).

(2) Xây dựng phát đồ miễn dịch, gây miễn dịch trên ngựa, thu nhận huyết tương kháng nọc rắn Cạp nia Bắc.

(3) Ứng dụng quy trình tinh chế huyết thanh kháng nọc rắn của IVAC để tinh chế 3 lô thử nghiệm quy mô 10 lít/lô và 1 lô sản phẩm quy mô 60 lít/lô. Đóng 500 lọ IVACAV-*Bun* dạng thành phẩm (1000 LD<sub>50</sub>/lọ).

(4) Đề xuất tiêu chuẩn cơ sở cho IVACAV-*Bun* phù hợp DĐVN V, 2018.

### **Ý nghĩa khoa học và thực tiễn**

- Ý nghĩa khoa học: Kết quả của đề tài cung cấp dữ liệu khoa học mới về quy trình gây miễn dịch ngựa sản xuất huyết thanh và ứng dụng quy trình tinh chế huyết thanh kháng nọc rắn có cùng công nghệ sản xuất tại đơn vị. Đồng thời, nâng cao được năng lực nghiên cứu khoa học cho đội ngũ cán bộ

của Viện trong việc tạo ra sản phẩm phẩm mới thiết yếu.

- Ý nghĩa thực tiễn: Thành công của đề tài cung cấp cơ sở khoa học tiên đề cho việc hoạch định sản xuất huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc ở quy mô lớn, đạt yêu cầu về chất lượng sản phẩm, mang tính an toàn cao và tiến tới tạo ra sản phẩm mới, đáp ứng nhu cầu điều trị cấp bách cho bệnh nhân bị rắn cạp nia Bắc cắn ở các bệnh viện và trung tâm chống độc trên toàn quốc.

## CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

### 1.1. TỔNG QUAN VỀ RẪN, TÌNH HÌNH RẪN CẢN TRÊN THẾ GIỚI

Rắn là tên gọi chung để chỉ một nhóm loài động vật bò sát có vảy (*Squamata*), không chân, toàn thân phủ một lớp vảy khô, không có mí mắt và tai ngoài, có màng ối, ngoại nhiệt, có thân hình tròn dài gồm 3 phần: Đầu, mình và đuôi, thuộc phân bộ (*Serpentes*) trong ngành động vật có xương sống (*Chordata*). Các loài rắn phân bố gần như khắp mọi châu lục (ngoại trừ châu Nam Cực), trong lòng các đại dương như Ấn Độ Dương và Thái Bình Dương, trên các vùng có độ cao độ 4.900 m trong khu vực dãy núi Himalaya ở châu Á và trên phần lớn các khối lục địa nhỏ hơn bao gồm một số đảo lớn như Ireland và New Zealand và nhiều đảo nhỏ trong Đại Tây Dương và Trung Thái Bình Dương.

Trong số gần 3.900 loài rắn được ghi nhận trên thế giới tập trung vào 20 họ với 2 cận bộ là *Alethinophidia* và *Scolecophidia* trong phân bộ *Serpentes*, trong đó có khoảng trên 650 loài là rắn độc chiếm khoảng 17%. Gần như tất cả các loài rắn này đều có răng độc mà qua đó nọc độc được đưa vào cơ thể con mồi hoặc kẻ thù. Các loài rắn có nọc độc về cơ bản được phân loại trong 2 họ: Họ *Elapidae*, là họ rắn Hổ, bao gồm rắn Hổ mang (*Naja*), rắn Hổ mang chúa (*Ophiophagus hannah*), Cạp nong (*Bungarus fasciatus*), Cạp nia (*Bungarus spp.*), rắn Mamba (*Dendroaspis spp.*), rắn Đầu đồng Úc (*Austrelaps*), rắn Biển (*Hydrophiinae*), rắn San hô (các chi *Leptomicrurus*, *Micruroides*, *Micrurus*), rắn Lá khô (*Calliophis*) và họ *Viperidae*, là họ Rắn Lục, bao gồm rắn Lục (*Trimeresurus spp.*), rắn Lục tre (*Trimeresurus albolabris*), rắn Lục đầu bạc (*Azemiops feae*), rắn Vipe (*Viperinae*), rắn Đuôi chuông (các chi *Crotalus*, *Sistrurus*), rắn Đầu đồng Mỹ (*Agkistrodon contortrix*), rắn Miệng bông (*Agkistrodon piscivorus*) và rắn Chúa bụi (*Lachesis spp.*) [1].

Rắn cắn là một trong những nguyên nhân gây ra các hậu quả nghiêm trọng nhất trong số tất cả các loại động vật gây độc và có nọc độc làm tổn thương với con người gây ảnh hưởng cho sức khỏe cộng đồng ở nhiều vùng miền trên khắp thế giới như Châu Phi, Châu Mỹ, Châu Á, bao gồm các nước Đông Nam Á, đặc biệt là ở những vùng nhiệt đới nơi mà ngành nông nghiệp vẫn còn đóng vai trò chính về kinh tế [2]. Trên thế giới, có khoảng 5,4 triệu



người bị rắn cắn xảy ra mỗi năm, dẫn đến 1,8 đến 2,7 triệu trường hợp ngộ độc do rắn cắn, có từ 81.410 đến 137.880 ca tử vong, số ca bị cắt cụt chi và các thương tật vĩnh viễn khác cao khoảng ba lần số lượng ca tử vong. Ở châu Á, có tới 2 triệu người bị rắn cắn mỗi năm, trong khi ở châu Phi ước tính có khoảng 435.000 đến 580.000 ca rắn cắn hàng năm cần được điều trị. Nọc độc của rắn ảnh hưởng trầm trọng đến phụ nữ, trẻ em và nông dân vùng nông thôn nghèo ở các nước có thu nhập thấp và trung bình. Gánh nặng cao nhất xảy ra ở các quốc gia có hệ thống y tế yếu kém và nguồn lực y tế hạn chế [2][3].

Loài rắn *Kraits* (chi *Bungarus*) thuộc họ rắn Hồ chỉ được tìm thấy ở Châu Á. Loài rắn này được con người đặc biệt quan tâm. Nó gây chết người, nguy cơ chết người gấp khoảng 15 lần so với rắn Hồ mang thông thường. Hiện nay người ta phát hiện được 15 loài rắn thuộc chi này trong đó có các loài như rắn Cạp nong (*Bungarus fasciatus*), rắn Cạp nia Nam (*Bungarus candidus*), rắn Cạp nia Bắc (*Bungarus multicinctus*), Cạp nia Ấn Độ (*Bungarus caeruleus*) là những loài có chất độc thần kinh cực mạnh gây suy hô hấp [4].

Rắn cắn là một tai họa đối với hầu hết người nghèo ở nông thôn của một số quốc gia kém phát triển. Trên thế giới, trong các loài rắn được biết đến có khoảng 15% được coi là nguy hiểm đối với con người. Rắn độc phân bố hầu hết các khu vực trên thế giới (trừ Nam Cực). Có 325 loài thuộc họ rắn Hồ và 224 loài thuộc họ rắn Lục. Số liệu thống kê của Tổ chức Y tế thế giới (WHO) cho thấy, số người chết do rắn độc cắn hàng năm ở các nước châu Á cao hơn các châu Lục khác (khoảng 100.000 người) và hơn 90% các trường hợp tử vong xảy ra ở châu Phi và châu Á [5][6]. Rắn cắn và tử vong do rắn cắn là một vấn đề sức khỏe cộng đồng rất quan trọng ở các vùng nông thôn nhiệt đới ở châu Phi, châu Á, châu Mỹ Latinh và châu Đại Dương [1]. Theo ước tính, mỗi năm trên thế giới có khoảng 5 triệu người bị ảnh hưởng bởi rắn cắn, trong số này có khoảng 100.000 người chết và khoảng gần gấp 3 lần số này bị cắt cụt chi hoặc các khuyết tật khác [7]. Tại Bangladesh, ước tính có 589.919 người bị rắn cắn và 6.041 người chết vào năm 2009. Tại Sri Lanka, từ năm 2012 - 2013, có khoảng 80.000 người bị rắn cắn, trong số đó có 30.000 người bị cắn bởi rắn độc và 400 người chết mỗi năm [6]. Ở Thái Lan trong một cuộc khảo sát quốc gia về những con rắn được đưa đến bệnh viện

bởi những người bị chúng cắn thì 70% số rắn là loài có nọc độc, thường là rắn Lục Mã Lai (*Calloselasma rhodostoma*) 38%, rắn Lục tre (*Trimeresurus albolabris*) 27%, rắn Hồ mang chúa (*Daboiarusselii siamensis*) 14%, rắn Hồ mang phun nọc Đông dương (*Naja siamensis*) 10% và rắn Hồ mang (*N. kaouthia*) 7% [8]. Ở Đài Loan tỷ lệ bị rắn Cạp nia Bắc (*Bungarus multicinctus*) chỉ chiếm 7,5% (khoảng 0 – 17,1%) tổng số nạn nhân bị rắn cắn. Tuy nhiên, vết cắn của rắn Cạp nia Bắc khả năng gây chết người rất cao theo trường hợp được báo cáo là 7 – 50%, với trường hợp tử vong xảy ra từ 6 – 30 giờ sau khi bị cắn nếu không có liệu pháp kháng nọc độc nào được cung cấp [9].

Rắn Cạp nia Bắc là loài sống trên cạn và phân bố chủ yếu ở Đài Loan, miền Nam Trung Quốc (gồm Hồng Kông, Hải Nam), Myanmar, Lào, miền Bắc Việt Nam, Thái Lan; là một trong sáu loài rắn độc nhất trên thế giới thuộc họ rắn Hồ và được mô tả lần đầu năm 1843 bởi Reinhardt [10][11]. Rắn có đầu lớn và ngắn, không có nhiều phân biệt với phần cổ, mắt tròn, nhỏ, đuôi ngắn, mút đuôi tròn, giữa sống lưng có một gờ dọc chạy từ cổ đến đuôi, vảy sống lưng có 6 cạnh lớn hơn vảy phía bên [12]. Thân có những khoang đen trắng xen kẽ nhau, có kích thước lớn, những con trưởng thành dài trung bình từ 1 mét đến 1,5 mét. Loài này thường được tìm thấy ở các khu vực thấp, đặc biệt là vùng cây bụi, rừng cây gỗ, các cánh đồng canh tác và rừng ngập mặn, ngoài ra chúng cũng được tìm thấy ở độ cao đến 1.300 mét. Ban ngày chúng ẩn nấp trong hang, dưới đồng cây gỗ hoặc cuộn tròn trong lá cây khô. Chúng hoạt động và săn mồi vào ban đêm. Bình thường chúng không tấn công con người, chỉ tấn công khi có mối đe dọa, vết cắn rất nguy hiểm đến tính mạng [10].

David Warrell năm 1983 khi thông báo kết quả nghiên cứu về các tai nạn do rắn Cạp nia Nam (*Bungarus candidus*) gây ra tại miền đông Thái Lan và tây bắc Malaysia. Tác giả đã trích dẫn nghiên cứu của Kuo T.p. và cộng sự trên tạp chí The Snake (1972) về 925 trường hợp bị rắn Cạp nia Bắc cắn tại Đài Loan với tỷ lệ tử vong tới 23%. Đây là những cảnh báo đầu tiên về sự nguy hiểm do rắn Cạp nia gây ra [13].



Hình 1.1. Rắn Cạp nia Bắc (*Bungarus multicinctus*) [14]

*Tổng quan trên cho thấy phần nào về sự đa dạng, khu vực phân bố các loài rắn độc và mức độ nghiêm trọng ảnh hưởng đến tính mạng khi bị các loài rắn độc cắn trên thế giới.*

## 1.2. TỔNG QUAN VỀ RẮN VÀ TÌNH HÌNH RẮN CẮN Ở VIỆT NAM

*Tổng quan về rắn ở Việt Nam:* Việt Nam là nước nhiệt đới, với  $\frac{3}{4}$  diện tích rừng núi và đất nông nghiệp, bờ biển dài hơn 3000 km, nắng ẩm, mưa nhiều kèm theo lượng thức ăn phong phú là môi trường rất thuận lợi cho các loài rắn sinh sống và phát triển. Nghiên cứu sinh thái học các loài rắn của Việt Nam đã được nhiều tác giả tiến hành và đã được tổng kết lại một cách hệ thống. Trong đó ghi nhận có trên 230 loài rắn sinh sống với 55 loài rắn độc gồm 35 loài (15 giống) thuộc họ rắn Hồ (*Elapidae*) và 20 loài (8 giống) thuộc họ rắn Lục (*Viperidae*) [15][16][17].

- Họ rắn Hồ (*Elapidae*): gồm bốn phân họ, phân họ rắn Cạp nia (*Bungarinae* Fitzinger, 1803); phân họ Rắn hổ (*Elapinae* Boie, 1827); phân họ rắn Biển (*Hydrophiinae* Boie, 1827) và phân họ rắn Biển sọc đuôi (*Laticaudinae* Cope, 1879). Một số loài rắn phổ biến thường gặp như rắn Hồ mang một mắt kính (*Naja kaouthia*); rắn Hồ mèo (*N.siamensis*); rắn Hồ mang bành (*N.atra*); rắn Hồ chúa (*Ophiophagus hannah*); rắn Cạp nia Nam (*Bungarus candidus*); rắn Cạp nia Bắc (*Bungarus multicinctus*); rắn Cạp nong (*Bungarus faciatus*).

- Họ rắn Lục (*Viperidae*): Gồm hai phân họ rắn Lục đầu bạc (*Azemiopinae* Liem, Marx & Rabb. 1971), phân họ rắn Lục (*Crotalinae* Opperl, 1811). Một số loài rắn lục thường gặp rắn Lục tre (*Trimeresurus albolabris*); rắn Lục xanh (*Trimeresurus stejnegeri*); rắn Lục núi (*Ovophis monticola*); rắn Lục cườm (*Protobothrops mucrosquamatus*); rắn Lục sừng (*P. cornutus*); rắn Choàm quạp (*Calloselasma rhodostoma*).

- Họ rắn Nước (*Colubridae*): Một phần nhỏ các loài rắn trong họ này là rắn độc, có cả tuyến nước bọt độc lẫn nọc độc thật sự trong tuyến nọc độc. Với loại có tuyến nọc độc, nọc được dẫn qua móc độc mọc ở phần sau và hướng về phía sau của miệng. Vị trí móc độc như vậy làm cho rắn cắn kém hiệu quả hơn với con người khi so với vị trí móc độc phía trước của hầu hết các loài rắn độc khác. Tuy nhiên một số ít giống, loài trong họ này rất độc và đã từng gây tử vong với người bị cắn bởi rắn Sài cổ đỏ (*Rhabdophis submirniata*).

Bên cạnh đó, sự phân bố theo vùng địa lý của các loài rắn độc cũng khác nhau: 12 loài chỉ ghi nhận ở miền Bắc, 19 loài chỉ ghi nhận ở miền Nam và 22 loài ghi nhận ở cả hai miền đất nước. Có 5 loài hiện được coi là đặc hữu của Việt Nam gồm: rắn Cạp nia Slowinski (*Bungarus slowinskii*), rắn Đèn xanh lợ (*Hydrophis parviceps*), rắn Lục hòn sơn (*Trimeresurus honsonensis*), rắn Lục trùng khánh (*Protobothrops trungkhanhensis*) và rắn Lục trường sơn (*Trimeresurus truongsonensis*) [15][16][17].

Ở Việt Nam, rắn Cạp nia Bắc phân bố chủ yếu từ Bắc miền Trung trở ra gồm Thừa Thiên Huế, Quảng Trị, Quảng Bình, Hà Tĩnh, Nghệ An, Vĩnh Phúc, Cao Bằng, Bắc Kạn, Lạng Sơn, Hòa Bình, Hà Nội ...[18].

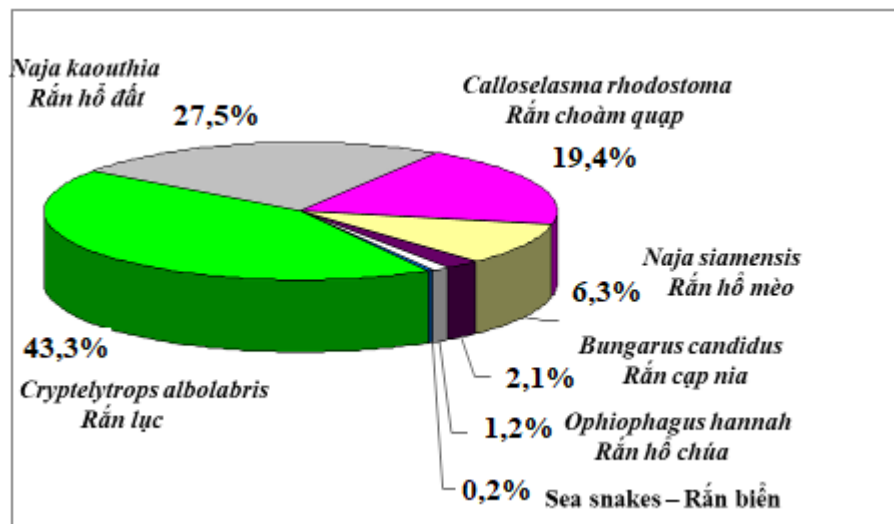
*Tình hình rắn độc cắn ở Việt Nam:* Ở Việt Nam phần lớn cư dân sinh sống, làm việc trong môi trường nông nghiệp, rừng núi, hải đảo... nguy cơ bị rắn độc cắn rất cao. Về mặt dịch tễ học, chưa có khảo sát ở cấp độ quốc gia nào được thực hiện để ước tính tỷ lệ bệnh nhân bị rắn cắn thực tế. Các chuyên gia ước tính mỗi năm nước ta có khoảng 30.000 trường hợp bị rắn cắn với tỷ lệ tử vong do rắn độc cắn là 80 người/1 triệu dân. Số liệu từ các bệnh viện đa khoa khu vực cho thấy số trường hợp rắn cắn điều trị tại các bệnh viện này là các con số đáng kể. Tại Bệnh viện Bạch Mai, từ năm 1994-1997, có 79 bệnh

nhân nhập khoa Săn sóc tăng cường A9, trong đó hầu hết là rắn Hổ và rắn Cạp nia. Năm 2001, có 155 trường hợp và năm 2002, có 129 trường hợp bị rắn cắn nhập viện. Từ năm 1990-1998, Khoa Hồi sức, Bệnh viện 103 điều trị cho 22 trường hợp rắn cắn nhiễm độc thần kinh, suy hô hấp. Từ năm 1992-1997, Trung tâm nuôi trồng nghiên cứu và chế biến dược liệu Quân khu 9 (Trại rắn Đồng Tâm) ghi nhận điều trị cho 3147 bệnh nhân, trong đó 57% (1636 bệnh nhân) do rắn Lục cắn và 8% (152 bệnh nhân) do rắn Hổ, rắn Cạp nong và rắn Cạp nia cắn. Từ năm 1993 - 1998, Bệnh viện Quân Y 175, có 137 nạn nhân rắn độc cắn trong tổng số 180 bệnh nhân rắn cắn, trong đó, 102 bệnh nhân do rắn Lục cắn và 8 bệnh nhân do rắn Hổ cắn. Tại Bệnh viện Chợ Rẫy, hàng năm có từ 600 đến 1000 bệnh nhân rắn cắn nhập viện. Tuy nhiên, những số liệu trên đây cũng chỉ phản ánh phần nổi của tảng băng [18].

Ở Việt Nam, tỉ lệ rắn cắn thay đổi theo từng vùng miền khác nhau trên cả nước. Hầu hết các trường hợp rắn độc cắn điều trị tại Trại rắn Đồng Tâm là do rắn Lục và rắn Hổ cắn; trong khi tại Bệnh viện Chợ Rẫy, tỉ lệ rắn độc thay đổi: Lục tre 43,3%, Hổ đất 27,5%, Choàm quạp 19,4%, Hổ mèo 6,3%, Hổ chúa 1,2%, Cạp nia Nam 2,1% và rắn Biên 0,2% [19]. Nhằm giảm thiểu tỷ lệ tử vong do rắn độc cắn, Bộ y tế đã quan tâm chỉ đạo việc nghiên cứu, ứng dụng sản xuất huyết thanh kháng nọc rắn. Đến nay, đã có một số nghiên cứu rất thành công, góp phần cứu sống hàng ngàn bệnh nhân. Tuy vậy, sau nhiều năm nỗ lực, đến nay chúng ta vẫn đang thiếu trầm trọng nhiều loại huyết thanh kháng nọc rắn, hầu như ta chỉ có duy nhất hai loại huyết thanh kháng nọc rắn cho rắn Hổ đất và rắn Lục tre.

Theo số liệu tại Trung tâm Chống độc bệnh viện Bạch Mai, từ 2000 - 2006 có 141 bệnh nhân rắn Cạp nia Bắc cắn nhập viện. Theo số liệu mới nhất năm 2015, trung tâm Chống độc bệnh viện Bạch Mai tiếp nhận 528 ca rắn cắn trong đó rắn Cạp nia Bắc cắn ở 60 bệnh nhân chiếm 11,36%.

Theo thống kê ghi nhận của bệnh viện Chợ Rẫy năm 1993 - 1998, có 430 trường hợp tử vong do rắn cắn ở rừng cao su, gây tử vong cao và thường gặp ở vùng trồng nhiều cây cao su và cây điều thuộc các tỉnh vùng Đông Nam Bộ, Nam Trung Bộ, Tây Nguyên, núi Cấm (An Giang) và khu vực núi đá vôi Nam bộ như Kiên Lương, Hà Tiên thuộc tỉnh Kiên Giang [19].



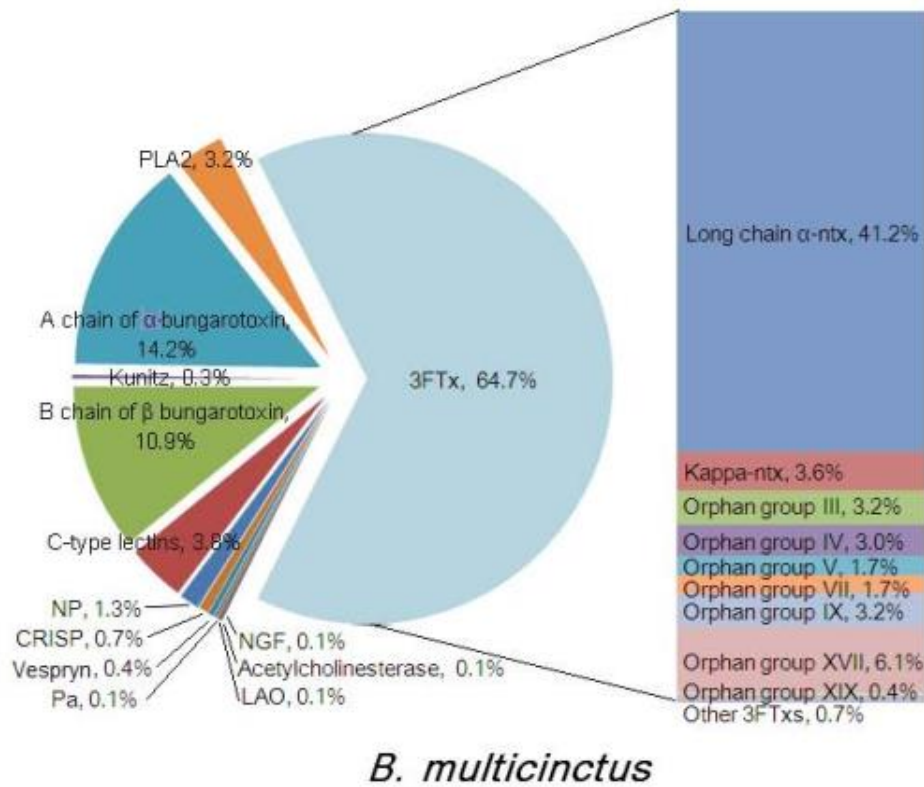
Hình 1.2. Phân bố bệnh nhân bị các loại rắn độc cắn tại Bệnh viện Chợ Rẫy từ năm 1990 – 1998 [19].

Tổng quan trên cho thấy phần nào về sự đa dạng, phân bố các loài rắn độc nói chung, rắn Cạp nia Bắc nói riêng và mức độ nghiêm trọng ảnh hưởng đến tính mạng khi bị các loài rắn độc cắn ở Việt Nam.

### 1.3. THÀNH PHẦN ĐỘC TÍNH CỦA NỌC ĐỘC CẠP NIA BẮC

Nọc độc rắn Cạp nia Bắc là hỗn hợp của các enzym và protein không phải enzym, hàm lượng nọc độc tiết ra sau một nhát cắn của rắn trưởng thành trung bình khoảng 4,6 mg - 18,4 mg [10][12]. Trong thành phần nọc rắn Cạp nia Bắc chủ yếu gồm 4 loại độc tố sau: Three-finger toxins (3FTs), Phospholipase A2 (PLA2), chất ức chế protease loại kunitz (Kunitz) và Lectin dạng C [4][20], nhóm độc tố này chiếm gần 97,1% hàm lượng nọc, phần còn lại chiếm 2,9% là nhóm độc tố L - Amino oxidase (LAO), yếu tố tăng trưởng thần kinh (Nerve growth factor, NGF), protein bài tiết giàu cysteine (Cysteine-rich secretory protein, CRISP) và vespryn. Tuy nhiên, Natriuretic peptide (NP), chất hoạt hóa Prothrombin (Pa) và Acetylcholinesterase [20][21]. Ba nhóm độc tố Three-finger toxins (3FTs), Phospholipase A2 (PLA2), chất ức chế protease loại kunitz (Kunitz) có chủ yếu trong nọc độc của loài rắn Cạp nia Bắc thuộc nhóm độc tố thần kinh là nguyên nhân chính gây ra các triệu chứng lâm sàng do nọc độc gây ra và dẫn đến tử vong. Các nọc độc khác nhau về hoạt tính của enzym, có thể là kết quả của sự biến đổi

giữa các thành phần nọc độc liên quan với nhau và độc lực thấp, ít có tác dụng với cơ thể sống [4][20].

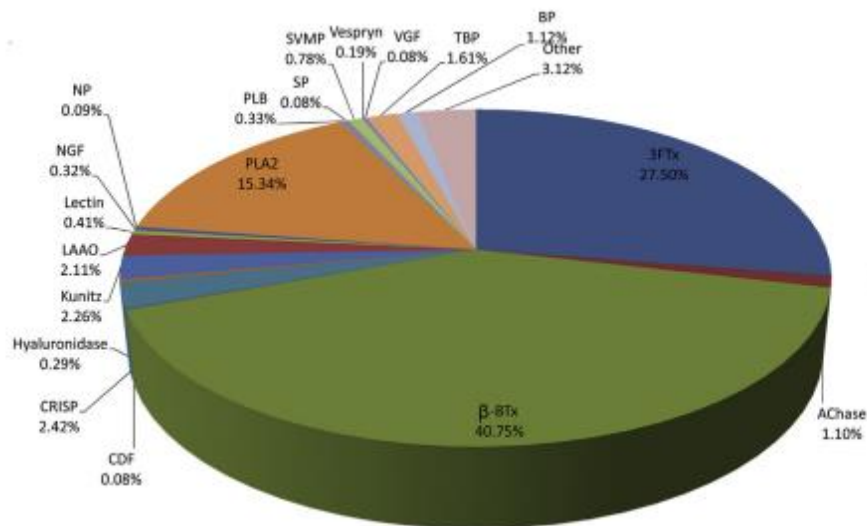


Hình 1.3. Tỷ lệ % các thành phần nọc rắn Cạp nia Bắc [20]

Tuy nhiên, sự phức tạp của thành phần nọc độc rắn Cạp nia Bắc chỉ được công bố gần đây với sự ra đời của công nghệ phân tích protein (Proteomics). Các phương pháp phân tích khác nhau đã được áp dụng và các phát hiện về protein của nọc rắn Cạp nia Bắc nói chung là khác nhau giữa các nghiên cứu, đặc biệt là về sự phong phú về các loại protein trong các mẫu nọc độc có nguồn gốc khác nhau. Do đó, việc so sánh và giải thích thêm về sự biến đổi nội tại cụ thể của nọc độc rắn Cạp nia Bắc là một thách thức. Có rất nhiều nguyên nhân gây ra sự biến đổi nọc độc trong từng loài, trong đó yếu tố địa lý đã và đang được nghiên cứu gần đây.

Độ đa dạng của protein nọc độc rắn cạp nia Bắc của Việt Nam được xác định gồm các thành phần sau: độc tố 3FTx (độc tố ba ngón tay); AChase và acetylcholinesterase;  $\beta$ -bungarotoxin; CDF (yếu tố suy giảm bỏ thể); CRISP (protein bài tiết giàu cysteine); Kunitz (chất ức chế protease serine loại Kunitz); LAAO (L-axit amin oxydaza); PLA2 (Phospholipase A2), PLB

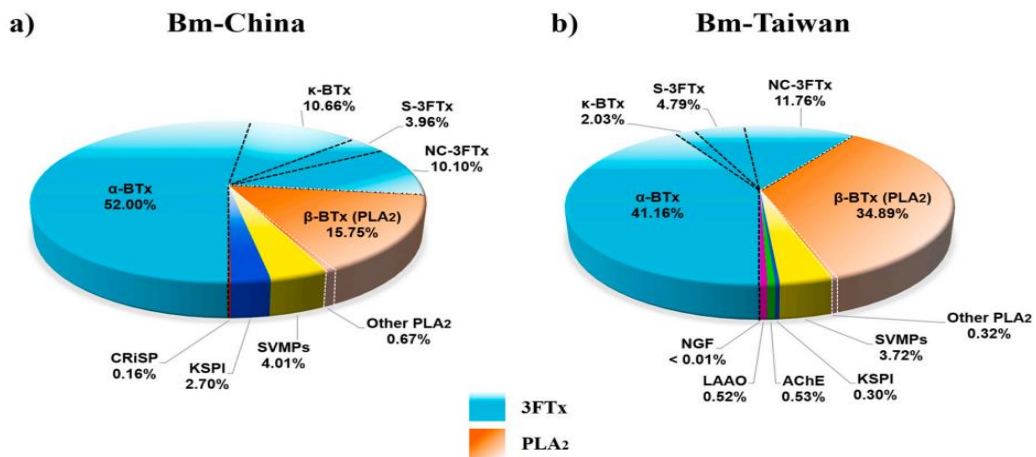
(phospholipase B); SP (serine protease); SVMP (metallicoproteinase nọc rắn); NGF (yếu tố tăng trưởng thần kinh nọc độc); VGF (yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu); NP (natriuretic peptide) ; BP (protein máu); TBP (protein tham gia sinh tổng hợp độc tố) (Hình 1.4). Trong đó 3 thành phần chính chiếm tỷ lệ cao trong tổng số protein của nọc độc là  $\beta$ -Bungarotoxin (40,75%), 3FTxs (27,5%), và PLA2 (15,34%) [22]



Hình 1.4. Tỷ lệ % các thành phần nọc rắn Cạp nia Bắc ở Việt Nam [22]

Các protein nọc độc rắn Cạp nia Bắc sống ở Trung Quốc được phân bố thành 5 nhóm: độc tố ba ngón tay (3FTx) chiếm tỷ lệ 76,72%; độc tố phospholipase A2 (PLA2) chiếm tỷ lệ 16,42%; SVMPs (metallicoproteinase nọc rắn) 4,01%; Kunitz (chất ức chế protease serine loại KSPI) 2,7% và CRISP (protein bài tiết giàu cysteine) 0,16%. Trong khi đó protein nọc độc rắn Cạp nia Bắc sống ở Đài Loan được phân thành 7 nhóm: độc tố ba ngón tay (3FTx) chiếm tỷ lệ 59,74%; độc tố phospholipase A2 (PLA2) chiếm tỷ lệ 35,21%; SVMPs (metallicoproteinase nọc rắn) 3,72%; AChE (Acetylcholinesterase) 0,53%; L-amino acid oxidase 0,5%; Kunitz (chất ức chế protease serine loại KSPI) 0,3% và CRISP (protein bài tiết giàu cysteine) 0,16%; NGF (sự phát triển thần kinh yếu tố) <0,01% (Hình 1.5) [23].





Hình 1.5. Tỷ lệ % các thành phần nọc rắn Cạp nia Bắc (a) Trung Quốc và (b) Đài Loan [23]

- **Three-finger toxins (3FTs)**: là các peptit không chứa enzym, các phân tử độc tố này thể hiện sự thích nghi cao đối với thụ thể Acetylcholine ở cơ bắp chúng được đặc trưng bởi sự gấp cụ thể của ba vòng beta kéo dài từ lõi trung tâm và được nối với nhau bằng cầu nối disulfua [24]. Tùy thuộc vào số lượng và vị trí của các liên kết disulfua mà Three-finger toxins (3FTs) được phân loại thành ba loại là chuỗi dài, chuỗi ngắn và không theo quy ước (long - chain, short-chain and non-conventional). [4][20].

+ Three-finger toxins long-chain ( $\kappa$  - 1- bungarotoxin): chứa 66-79 gốc axit amin có cầu nối rời với liên kết disulfua thứ 5 trong vòng lặp thứ hai và trong hầu hết các trường hợp, là phần mở rộng đầu Carbon [24][25]. Có hai phân nhân nhánh là Alpha-neurotoxin type II chiếm 41,2% và Kappa-neurotoxin 3,6% hàm lượng nọc độc của rắn Cạp nia Bắc. Là loại độc tố tác động sau synap gây ra liệt cơ [20][26].

+ Three-finger toxins short-chain: các protein chứa 57 - 66 gốc axit amin với bốn liên kết disulfua và thường chỉ có hai gốc dư trước cysteine đầu tiên và gốc dư sau cysteine cuối cùng [24][25]. Nhánh chuỗi ngắn được chia thành nhiều phân nhánh gồm Orphan group gồm Orphan group III (3,2%), Orphan group VII (1,7%), Orphan group IX (3,2%) và 3FTs khác chiếm 0,7%, phản ánh hoạt động hoặc sự tập hợp lại theo phân bố địa lý và môi trường sống của loài này [20][21].

+ **Three-finger toxins non-conventional**: là các protein chứa 62 - 77 gốc axit amin, nó bao gồm 3FT với liên kết disulfide thứ 5 trong vòng đầu tiên. Là nhóm "chất độc thần kinh yếu", được chia thành một số phân nhánh Orphan group IV (3,0%), Orphan group V (1,7%), Orphan group XVII (6,1%), Orphan group XIX (0,4%) và  $\gamma$ -bungarotoxin (< 0,7%).[20][21].

Độc tố nhóm Three-finger toxins của rắn Cạp nia Bắc tấn công lên các kênh canxi loại L, kênh natri, thụ thể tích phân, phospholipid màng tế bào, Acetylcholinesterase, Nicotinic Acetylcholine hoặc thụ thể Muscarinic, Adrenergic và Dopaminergic, trong đó có 5 phân nhóm độc tố tác động trước synap và 2 phân nhóm tác động sau Synap gây nên xơ hóa cơ, độc với tim, đặc tính chống đông máu, ức chế/kích hoạt kết tập tiểu cầu, xuất huyết, tan máu, hạ huyết áp [27][28].

- **Phospholipase A2 (PLA2)**: là nhóm độc tố lớn thứ 2 chiếm 15,34% đến 34,89% hàm lượng trong nọc rắn Cạp nia Bắc, tùy thuộc vào sự phân bố và môi trường sống [20][22][23]. Dựa vào cơ chế tác động của độc tố mà chia ra 2 phân nhóm là: phân nhóm độc tố loại Kunitz, khi vào cơ thể có thể xảy ra trong ba giai đoạn: độc tố một chức năng (với hoạt động ức chế serine protease), độc tố hai chức năng (với cả serine protease và hoạt động ức chế kênh kali) và độc tố chức năng mới (với hoạt động ức chế kênh kali). Các chất chẹn kênh kali gây độc thần kinh mạnh và cụ thể với mô típ kiểu Kunitz đặc biệt phát triển tốt ở rắn Cạp nia Bắc gồm 2 loại độc tố là  $\beta$ -bungarotoxin và  $\gamma$ -bungarotoxin. Và phân nhóm độc tố loại phospholipase A2 gồm LPA2 là các enzym nhỏ và  $\alpha$ -bungarotoxin. Dựa trên các nghiên cứu về nọc độc của loài rắn cạp nia Bắc, các thành phần gây chết người cao nhất là dạng phospholipase A2, trong đó nổi bật là độc tố  $\alpha$ -bungarotoxin và độc tố  $\beta$ -bungarotoxin [29].

+ **Độc tố  $\alpha$ -bungarotoxin**: có trọng lượng phân tử trung bình từ 7.000 – 8.500 dalton, điểm đẳng điện là 9,0 - 9,2 và isoleucine hoặc methionine ở đầu N [30][31]. Độc tố  $\alpha$ -bungarotoxin là một chất độc thần kinh tác động sau synap có khả năng ngăn chặn cạnh tranh các thụ thể Acetylcholine [32]. Trong nọc độc loài rắn Cạp nia Bắc thì  $\alpha$ -bungarotoxin chiếm 14,2% tổng hàm lượng nọc độc [20].

+ **Độc tố  $\beta$ -bungarotoxin**: Có trọng lượng phân tử khoảng 20 – 22.000 dalton, điểm đẳng điện 8,80 – 9,70, cấu trúc gồm 2 chuỗi gồm chuỗi nhẹ 6.000 – 7.000 dalton và chuỗi nặng 11.000 – 15.000 dalton được ổn định cộng hóa trị bởi các cầu nối disulfua giữa các chuỗi, đều có một Tryptophan và axit aspartic đầu N hoặc Asparagin [33][34]. Độc tố  $\beta$ -bungarotoxin là chất độc thần kinh trước synap, tác dụng trước và can thiệp đặc biệt vào việc giải phóng Acetylcholine từ tế bào thần kinh vận động và hoạt động của chúng là cần thiết cho sự phóng tỏa không thể đảo ngược truyền dẫn thần kinh cơ. Trong tế bào thần kinh, chúng có thể làm giảm chu kỳ của túi tiếp hợp bằng cách thủy phân phospholipid và bằng cách liên kết với các mục tiêu protein cụ thể như calmodulin và protein 14-3-3 trong tế bào [20][21].  $\beta$ -bungarotoxin là thành phần độc nhất trong nọc rắn Cạp nia Bắc với giá trị LD<sub>50</sub> là 0,004  $\mu$ g/g (i.p), 0,015  $\mu$ g /g (i.m) và 0,007  $\mu$ g/g (i.v.) [4]. Trong nọc độc loài rắn Cạp nia Bắc thì  $\beta$  – bungarotoxin chiếm 10,8% hàm lượng nọc độc [20].

+ **Độc tố LPA2** là các enzym nhỏ có trọng lượng phân tử trung bình khoảng 14 kDa, chiếm tỷ lệ 3,2% thành phần của nọc độc nọc rắn Cạp nia Bắc [20].

+ **Độc tố  $\gamma$ -bungarotoxin**: là một loại độc tố thần kinh mới của loài rắn Cạp nia Bắc chiếm tỷ lệ nhỏ 0,1% [20]. Cấu trúc chính của nó có chứa thêm một liên kết disulfua với vùng đầu cuối N và trình tự Arg – Gly - Asp (RGD) 5', là chất độc thần kinh trước synap, tác dụng trước và can thiệp đặc biệt vào việc giải phóng acetylcholine từ tế bào thần kinh vận động [35].

- **Lectin dạng C** (hoạt tính của lectin phụ thuộc vào sự có mặt của cation Ca<sup>2+</sup>): chứa các phân nhóm đa dạng khác nhau, bao gồm lectin thực sự, protein đông tụ, chất chủ vận kết tập tiểu cầu và chất đối kháng kết tập tiểu cầu. Các lectin thực sự gây ra sự kết tụ của hồng cầu theo cách phụ thuộc vào liều lượng, thường bao gồm hai tiểu đơn vị giống hệt nhau được liên kết cộng hóa trị, mỗi tiểu phần bao gồm 135 - 141 axit amin [35]. Trong thành phần nọc độc của loài rắn cạp nia Bắc độc tố Lectin dạng C chiếm 3,5% hàm lượng độc tố [20].

- **Natriuretic peptide (NP)**: là một pro-peptit CNP được tạo thành bởi một peptide tín hiệu, một trình liên kết, một phần mở rộng đầu N linh hoạt, có

cấu trúc vòng được bảo tồn, với vòng lõi 17 axit amin, với phần mở rộng của một vài axit amin trong hai phần cuối. Natriuretic peptide làm tăng thải natri qua thận dẫn tới hạ natri trong máu hạ huyết áp. Trong nọc độc rắn Cạp nia Bắc, Natriuretic peptide chiếm 1,3% [20].

- **L-amino acid oxidase:** chiếm tỷ lệ nhỏ 0,1% trọng lượng nọc. Enzyme này là một glycoprotein có tính axit (PI 4,4) với trọng lượng phân tử là 132.000 dalton và bao gồm hai tiểu đơn vị có trọng lượng phân tử bằng nhau. Các nghiên cứu sơ bộ cũng chỉ ra rằng enzym có trong nọc rắn Cạp nia Bắc không đủ gây chết người cũng như các biểu hiện về triệu chứng lâm sàng [36].

- **Acetylcholinesterase:** Cetylcholinesterase từ nọc độc rắn Cạp nia Bắc là một glycoprotein, trọng lượng phân tử  $140.000 \pm 5.000$  dalton. Gồm 2 chuỗi có kích thước bằng nhau ( $70.000 \pm 2.000$  dalton), phân tích axit amin đầu N cho glycine và serine. Giá trị pi của isozyme là  $5,98 + 0,05$  [37] chiếm tỷ lệ 0,1% thành phần của nọc độc [20].

Nọc độc rắn Cạp nia Bắc chứa một số độc tố thần kinh  $\alpha$ -neurotoxin và enzyme, bao gồm cả thụ thể Acetylcholine nicotinic ở cơ hoặc tế bào thần kinh (AChR) và các chất đối kháng với thụ thể muscarinic.  $\alpha$ -Bungarotoxin hoạt tính PLA2 hoạt động sau synap (tác động lên màng sau điểm tiếp hợp thần kinh nơi tiếp xúc giữa các neuron thần kinh qua khe synap), ngăn chặn cạnh tranh các thụ thể Acetylcholine trong điểm nối thần kinh cơ, liên kết với AChR nicotinic trong cơ của động vật có vú với ái lực cao, khóa các kênh  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  và  $\text{Cl}^-$ , gây ra một khối thần kinh cơ giống curare nhanh chóng, làm co đồng tử, co thắt phế quản, đau bụng, tiêu chảy, và hậu quả liệt giống nhược cơ. Trong khi  $\beta$ -bungarotoxin với hoạt tính PLA2 hoạt động trước synap trong điểm nối thần kinh cơ (tác động lên màng trước điểm tiếp hợp thần kinh nơi tiếp xúc giữa các neuron thần kinh qua khe synap), gây tổn thương kết thúc dây thần kinh và tiếp tục ức chế dẫn truyền xung động, khóa kênh  $\text{Ca}^{++}$ , can thiệp đặc biệt vào việc giải phóng Acetylcholine từ tế bào thần kinh vận động và hoạt động của chúng là cần thiết cho sự phong tỏa không thể đảo ngược truyền dẫn thần kinh cơ [30][38],  $\kappa$ -Bungarotoxin ( $\alpha$ -neurotoxin) ngăn chặn AChR nicotinic sau synap trong hạch tự trị, trong khi  $\gamma$ -bungarotoxin mới, có tác dụng lâm sàng ít đặc trưng hơn, ức chế các AChR

muscarinic, nicotinic và kết tập tiểu cầu [35]. Phần trăm trọng lượng của  $\alpha$ -neurotoxin,  $\alpha$ -bungarotoxin,  $\beta$ -bungarotoxin và  $\gamma$ -bungarotoxin trong nọc độc rắn Cạp nia Bắc lần lượt là 13 - 61%,  $\gamma$ -bungarotoxin có 0,1% [3], 22,0 - 26,4% (tổng của  $\alpha$ ,  $\beta$ 1-5) [39]. Liều gây chết trung bình ( $LD_{50}$ ) của độc tố  $\alpha$ -neurotoxin và  $\alpha$ , $\beta$ -bungarotoxin ở chuột lần lượt là 0,3mg/kg và 0,089mg/kg khi tiêm dưới da (s.c), liều gây chết trung bình của độc tố  $\gamma$ -bungarotoxin ở chuột là 0,15 mg/kg tiêm tĩnh mạch (i.v.) [40]. Đây là những ước tính sơ bộ vì nọc độc của từng con rắn có thể không bao gồm tất cả các đồng dạng độc tố. Các enzym hoặc peptid khác có ý nghĩa lâm sàng không được đánh giá cao cũng có trong nọc độc [41]. Rắn Cạp nia Bắc là loài rắn độc thứ 5 trên thế giới [42]. Nọc độc thô của rắn Cạp nia Bắc có độc tính rất cao với giá trị  $LD_{50}$  đạt 0,09 mg/kg – 0,108 mg/kg tiêm dưới da (s.c), 0,113 mg/kg tiêm tĩnh mạch (i.v) và 0,08 mg/kg tiêm phúc mạc (i.p) ở chuột nhắt [10][43].

*Phần tổng quan trên cho thấy nọc độc của rắn Cạp nia Bắc chứa đồng thời 2 nhóm độc tố thần kinh rất mạnh gồm nhóm tác động trước synap ( $\beta$ -bungarotoxin,  $\gamma$ -bungarotoxin) và sau synap ( $\alpha$ -bungarotoxin,  $\alpha$ -neurotoxin type II,  $\kappa$ -neurotoxin) gây ra liệt cơ, xơ hóa cơ, độc với tim, đặc tính chống đông máu, ức chế/kích hoạt kết tập tiểu cầu, xuất huyết, tan máu, hạ huyết áp gây tỷ lệ tử vong rất cao.*

#### 1.4. ĐẶC TÍNH MIỄN DỊCH CỦA PROTEIN NỌC RẮN CẠP NIA BẮC

Các đặc tính sinh miễn dịch của các protein không chứa enzyme và các enzyme của nọc rắn Cạp nia Bắc đã được nghiên cứu bằng cách sử dụng kỹ thuật lấy mẫu miễn dịch. Kết quả chỉ ra rằng nhóm enzyme gồm các độc tố thần kinh tác động sau synap ( $\alpha$ -bungarotoxin, PLA2) tạo thành một lớp kháng nguyên có hoạt tính sinh miễn dịch yếu với trọng lượng phân tử từ 7.000 -8.500 dalton [11].

Nhóm enzyme gồm các độc tố thần kinh tác động trước synap ( $\beta$ -bungarotoxin,  $\gamma$ -bungarotoxin) với trọng lượng phân tử 20.000 - 22.000 dalton tạo thành nhóm kháng nguyên thứ hai, có tính sinh miễn dịch mạnh trên động vật thử nghiệm [11].

Nhóm kháng nguyên nọc độc là protein không chứa enzyme (Three-finger toxins (3FTs)) gồm nhiều loại độc tố ( $\alpha$ -neurotoxin type II,  $\kappa$  -

*neurotoxin*, ...) có trọng lượng phân tử thấp, chứa 57-79 gốc amino acid có tính sinh miễn dịch yếu hơn nhóm kháng nguyên thứ hai [11].

### 1.5. ĐỘNG HỌC CỦA HUYẾT THANH KHÁNG NỌC RẮN CẠP NIA BẮC

Dấu hiệu nhận biết của nhiễm độc nọc rắn Cạp nia Bắc là liệt thần kinh cơ hô hấp tiến triển, đòi hỏi phải thông khí nhân tạo kéo dài, ít sung và đau cục bộ tại chỗ cắn. Những bệnh nhân bị rắn Cạp nia Bắc cắn sẽ dễ bị suy hô hấp mặc dù được sử dụng với số lượng khuyến cáo của huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc sớm (tức là trong vòng 4 giờ sau khi bị cắn). Người ta đã phát hiện ra rằng biểu hiện lâm sàng này của người bị nhiễm độc nọc rắn Cạp nia Bắc (tức là độc tố thần kinh kháng nọc rắn) chủ yếu là do sự cố định nhanh chóng và sự thoái hóa hoại tử không thể phục hồi của các đầu dây thần kinh bởi PLA<sub>2</sub>,  $\beta$ -bungarotoxins. Góp phần vào tác dụng này, các độc tố thần kinh sau synap từ nọc độc của rắn Cạp nia Bắc là các độc tố thần kinh chuỗi dài  $\alpha$  tương đối không thể đảo ngược [11][24].

### 1.6. TÁC ĐỘNG LÂM SÀNG CỦA NGỘ ĐỘC NỌC RẮN CẠP NIA BẮC

- Tác động lâm sàng của ngộ độc nọc rắn Cạp nia Bắc đã được nghiên cứu rộng rãi và chi tiết. Thường không có dấu hiệu gì khi mới bị cắn, đôi khi chỉ nhìn thấy 2 vết móc nhỏ như đầu kim hoặc không thấy móc độc vì móc độc của rắn Cạp nia rất nhỏ. Tại chỗ vết cắn không phù nề, không hoại tử. Thời gian ủ bệnh thường trong vòng một vài giờ sau khi bị cắn, bắt đầu từ biểu hiện sự bị liệt các cơ, theo thứ tự từ các cơ vùng đầu mặt cổ, đến cơ liên sườn, cơ hoành và cuối cùng là các chi [44].

- Sụp mí là một trong các dấu hiệu đầu tiên, bệnh nhân biểu hiện giống như buồn ngủ, sau đó từ từ sẽ tiến đến sụp mí hoàn toàn, không mở được mắt. Đồng tử giãn tối đa, không co và mất phản xạ ánh sáng, tồn tại lâu suốt quá trình sau đó. Đồng thời liệt vận nhãn, các cơ bị liệt, nhãn cầu hạn chế vận động hoặc bất động. Đây là một trong dấu hiệu đặc trưng chỉ gặp ở rắn Cạp nia Bắc cắn [44].

- Triệu chứng đau họng, nói khó, đờ miệng và khó nuốt dẫn tới ứ đọng đờm rãi cũng là một trong những dấu hiệu của liệt hầu họng, thường xuất hiện chủ yếu ở những người bệnh bị rắn Cạp nia Bắc cắn. Liệt cơ liên sườn, cơ

hoành, gây suy hô hấp. Suy hô hấp là nguyên nhân chính dẫn đến tử vong và thương tổn nặng lên do rắn Cạp nia Bắc cắn. Liệt chi, các chi liệt đối xứng hai bên, ngọn chi là nơi liệt cuối cùng và trong nhiều trường hợp có thể còn vận động nhẹ [44].

### 1.7. ĐIỀU TRỊ RẮN CẮN

Hầu hết các nạn nhân bị rắn cắn đều được điều trị bằng phương pháp truyền thống. Nhiều người bị rắn cắn vẫn sống sót nhưng lại bị tàn phế vĩnh viễn. Nhiều vùng thảo nguyên Châu Phi, Nam Phi, Ấn Độ, Đông Nam Á, Trung Quốc, New Guinea và Trung, Nam Mỹ bị ảnh hưởng lớn nhất về tình trạng bị rắn độc cắn. Tỷ lệ tử vong do rắn cắn đã được báo cáo là dao động từ 50.000 mỗi năm [45] đến 100.000 mỗi năm [46]. Tuy nhiên, những con số chủ yếu dựa trên bệnh viện này có thể bị đánh giá thấp, vì phần lớn nạn nhân bị rắn cắn tìm cách điều trị truyền thống và có thể chết tại nhà mà không được ghi nhận. Một vài nỗ lực để thực hiện các nghiên cứu dựa trên dân số được thiết kế phù hợp đã cho thấy tỷ lệ tử vong cao bất ngờ, từ 2 đến 16 trên 100.000 người mỗi năm ở Nigeria, Kenya, Senegal và Tây Bengal [5]. Không giống như hầu hết các bệnh nhiệt đới cổ điển khác, tình hình rắn cắn đang gia tăng, do con người thực hiện những thay đổi về môi trường, làm thay đổi các tập tính sinh sống và địa hình cư trú của các loài rắn độc [46].

Huyết thanh kháng nọc rắn được coi là chất điều trị hợp lý và hiệu quả duy nhất khi bị rắn cắn, được sản xuất lần đầu tiên bởi Albert Calmette vào năm 1894. Nhiều thập kỷ trôi qua, từ tác dụng thực tiễn của huyết thanh kháng nọc rắn đã được WHO khẳng định: “huyết thanh kháng nọc rắn là thuốc đặc trị rắn độc cắn duy nhất phổ biến khắp toàn cầu, giải quyết một trong những vấn đề Y tế còn tồn tại của thế giới” [5][6].

Một điểm nổi bật của huyết thanh kháng nọc rắn có thể trung hòa chéo giữa các loài rắn có chung một số thành phần nọc độc, Chen và cộng sự, 1995 đã công bố về hai trường hợp bị rắn Cạp nia Bắc (*Bungarus multicinctus*) cắn, với đầy đủ triệu chứng nhiễm độc nọc rắn Cạp nia như liệt cơ hô hấp, sụp mi,... sau khi được điều trị với huyết thanh đơn giá kháng nọc rắn Cạp nong (*Bungarus fasciatus*) và thở máy hỗ trợ, đã hồi phục sau tám ngày [47]. Thời

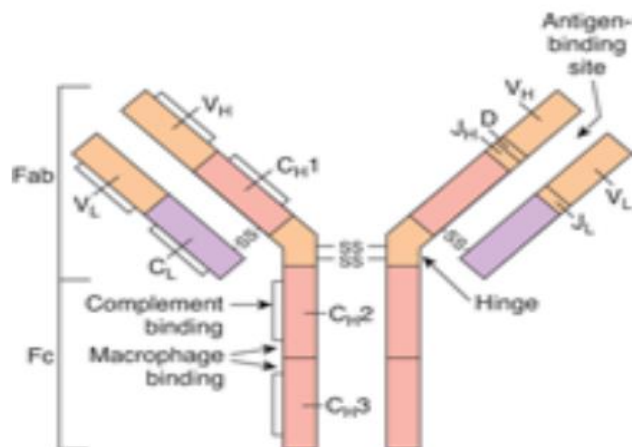
điểm này chưa có nước nào sản xuất được huyết thanh kháng nọc của hai loài rắn Cạp nia Bắc và rắn Cạp nia Nam (*Bungarus candidus*).

*Như vậy, huyết thanh kháng nọc rắn là một giải pháp điều trị đặc hiệu hợp lý nhất đã được khẳng định để cấp cứu nạn nhân bị rắn độc cắn, thoát khỏi sự đe dọa tử vong.*

## 1.8. HUYẾT THANH KHÁNG NỌC RẮN

Năm 1895, thuật ngữ “antivenin” tiếng Pháp bắt đầu được sử dụng, nghĩa là huyết thanh kháng nọc rắn, từ đó đến nay đã phổ biến khắp toàn cầu. Từ năm 2003, thuật ngữ “antivenin” đã được WHO chuyển sang tiếng Anh “antivenom”, do vậy cả hai thuật ngữ này đều được công nhận sử dụng trong Y văn của Thế giới với ý nghĩa giống nhau [1].

Huyết thanh kháng nọc rắn (antivenom) là sinh phẩm chứa các  $\gamma$ -globulin miễn dịch kháng nọc rắn trung hòa đặc hiệu nọc rắn tương ứng, thu được từ động vật hoặc từ người đã được miễn dịch, được tinh chế để lượng globulin đạt mức cần thiết theo quy định và để loại bỏ các protein không cần thiết [1]. Cho đến nay, sử dụng huyết thanh kháng nọc độc có nguồn gốc từ động vật là liệu pháp điều trị duy nhất đã được chứng thực về mặt khoa học để điều trị rắn cắn [48][48]. Có một số loại globulin miễn dịch, được gọi là IgG, IgM, IgD, IgA và IgE, trong đó IgG có nhiều nhất trong tuần hoàn máu. IgG tương ứng với phản ứng miễn dịch trưởng thành và do đó bao gồm phần lớn các kháng thể được sản xuất thương mại. Tất cả các IgG đều có cấu trúc chung giống nhau (Hình 1.4) [49]



Hình 1.6. Cấu trúc Immunoglobulin G [49]



Hầu hết huyết thanh kháng nọc độc của các loài rắn bao gồm toàn bộ IgGs (150 kDa), mảnh kháng thể kép F(ab')<sub>2</sub> (100 kDa) hoặc mảnh kháng thể Fab (50 kDa) được điều chế từ huyết tương của động vật đã chủng ngừa với nọc độc của một loại rắn tương ứng. Nguyên tắc của quy trình sản xuất huyết thanh kháng nọc rắn không có sự thay đổi, sự tiến bộ trong sản xuất sản phẩm huyết thanh kháng nọc độc chính là việc ứng dụng các kỹ thuật tiên tiến trong các công đoạn tinh chế [46][50].

### 1.9. SẢN XUẤT HUYẾT THANH KHÁNG NỌC RẮN

Năm 1894, Calmette, Phisalix và Bertrand đã báo cáo tại hội nghị khoa học ở Paris về kết quả xác định đặc tính kháng nọc rắn Hổ từ huyết thanh thỏ [1]. Năm 1896, Albert Calmette và Le'Pinay đã chế tạo thành công huyết thanh kháng nọc rắn Hổ đất Việt Nam bằng cách tiêm nọc rắn cho ngựa sau đó thu huyết tương ngựa và sử dụng huyết tương kháng nọc rắn điều trị cứu sống nạn nhân, lần đầu tiên trên thế giới, huyết thanh kháng nọc rắn được sử dụng hiệu quả trên người [1][51]. Việc gây miễn dịch cho động vật, lấy huyết thanh trị bệnh cứu người - kiểu miễn dịch thụ động (passive immunity), do Emil Adolf Von Behring và Shibasaburo Kitasato phát minh năm 1890 đã được A. Calmette ứng dụng trong thực tiễn, sản xuất thành công huyết thanh kháng nọc rắn [1][52].

Nghiên cứu, chế tạo thành công huyết thanh kháng nọc rắn đã mở ra một thời kỳ mới trong điều trị tai nạn rắn độc trên thế giới. Từ đó, các nghiên cứu về huyết thanh kháng nọc rắn ngày càng phát triển, ứng dụng điều trị ngày càng hiệu quả, an toàn. Huyết thanh kháng nọc rắn có thể ngăn chặn hoặc đảo ngược hầu hết các triệu chứng nhiễm độc của 20 loại nọc rắn và đóng vai trò quan trọng trong việc giảm thiểu tử vong và tàn phế của nạn nhân trên phạm vi toàn thế giới [53].

Ngựa vẫn là động vật chủ yếu được lựa chọn để sản xuất huyết thanh kháng nọc rắn, bởi vì ngựa có thể phát triển mạnh ở tất cả các vùng khí hậu, rất dễ xử lý, mang lại khối lượng lớn máu, ngoài ra huyết thanh kháng nọc rắn từ máu ngựa cho thấy an toàn trong thời gian thử nghiệm và cơ thể con người chấp nhận được kháng thể từ ngựa. Ngoài ra cừu và gà cũng đã được nghiên cứu sản xuất huyết thanh kháng nọc rắn. Kháng thể cừu là đặc biệt hữu ích ở những bệnh nhân quá mẫn cảm với kháng thể ngựa [46][50].

Kháng nguyên gây miễn dịch được sử dụng trong sản xuất huyết thanh kháng nọc độc là nọc độc không phân đoạn dạng thô bao gồm nhiều loại protein, chỉ có một số trong đó có bản chất là chất độc, việc sử dụng các thành phần nọc độc phân đoạn được cho là tạo ra phản ứng miễn dịch đáp ứng kháng thể trung hòa tốt hơn do có hiện tượng cạnh tranh kháng nguyên. Các nghiên cứu khác nhau đã chỉ ra rằng "sự cạnh tranh kháng nguyên" là một hiện tượng hiếm và đáp ứng kháng thể tốt hơn có thể đạt được so với nọc độc thô [46][50].

Gây miễn dịch cho động vật để sản xuất huyết thanh kháng nọc rắn được thực hiện bằng cách tiêm lặp đi lặp lại các liều lượng nọc độc khác nhau từ một hoặc nhiều loài có nọc rắn, tuân theo một phác đồ tiêm được xác định trước. Lượng nọc rắn được tiêm phải thấp để ngăn ngừa tổn thương mô hoặc các biểu hiện khác của nọc rắn, nhưng đủ cao để kích hoạt hệ thống miễn dịch tạo ra một lượng lớn kháng thể chống nọc rắn [54][55]. Đường tiêm gây miễn dịch ở ngựa, thường được áp dụng theo đường tiêm dưới da (s.c.) và hàm lượng thông thường chứa từ 0,5 đến 5,0 mg nọc độc mỗi lần tiêm, khoảng cách giữa các mũi tiêm và số lượng phụ thuộc vào nhà sản xuất [55]. Pratanaphon R. và cộng sự, 1997 đã sử dụng liều tiêm 0.5 đến 3mg nọc độc/ngựa mỗi lần tiêm, thực hiện 6 mũi tiêm với tổng lượng nọc độc là 8mg/ngựa trong thời gian 10 tuần để sản xuất kháng nọc độc loài rắn Thái cobra (*Naja kaouthia*) [56]. Wahby A.F. và cộng sự, 2007 đã sử dụng liều tiêm 0,5 đến 2,0 mg nọc độc/ngựa mỗi lần tiêm, thực hiện 7 mũi tiêm với tổng lượng nọc độc là 11,5mg/ngựa trong thời gian 29 tuần để sản xuất kháng nọc độc loài rắn *Egyptian cobra* [57].

Mục tiêu của các kế hoạch gây miễn dịch là tạo ra một lượng kháng thể trung hòa cao trong huyết thanh của động vật thí nghiệm, các huyết thanh kháng nọc độc có thể được tạo ra với hiệu lực cao và hàm lượng protein tổng số thấp, do đó làm cho sản phẩm hiệu quả hơn và an toàn hơn. Hơn nữa, với hiệu giá kháng thể kháng nọc độc cao, có thể tạo ra được nhiều lọ kháng nọc độc hơn trên mỗi thể tích huyết thanh, làm giảm chi phí cố định trong sản xuất, do đó làm cho quy trình trở nên năng suất và hiệu quả hơn [58].

Ngoài ra, trong quá trình tiêm miễn dịch, nọc độc được trộn với các tá dược giúp tăng cường phản ứng kháng thể của động vật. Một số nghiên cứu

đã đánh giá các phát đồ tiêm miễn dịch và chất bổ trợ khác nhau để sản xuất huyết thanh kháng nọc độc [56][59], nhưng cần có nhiều nghiên cứu hơn trong lĩnh vực này. Các tá dược thường được sử dụng trong sản xuất chất kháng nọc độc là muối khoáng, hợp chất cao phân tử hoặc nhũ tương [54][55]. Tá dược Complete Freund (CFA) là một chất bổ trợ rất mạnh trong việc gây miễn dịch sinh kháng thể nhưng có thể gây ra các tác dụng phụ nghiêm trọng như là áp xe và u hạt, đã được khuyến khích việc sử dụng nó trên ngựa. Để giảm thiểu các phản ứng cục bộ, một hình thức đa nhũ tương của CFA đã được sử dụng tại Brazil, tuy nhiên, áp xe và u hạt vẫn có thể được hình thành trong khoảng 25% của ngựa. Bên cạnh đó cũng có một số tá chất khác được sử dụng như Bentonite và nhôm Phosphate, Emulsigen-D.... Mặc dù nhiều nghiên cứu được thực hiện trên các loại động vật khác nhau với kháng nguyên là nọc độc của rắn được phụ trợ với các tá dược đều không thay đổi nhiều để tạo được huyết thanh kháng nọc độc [46][50].

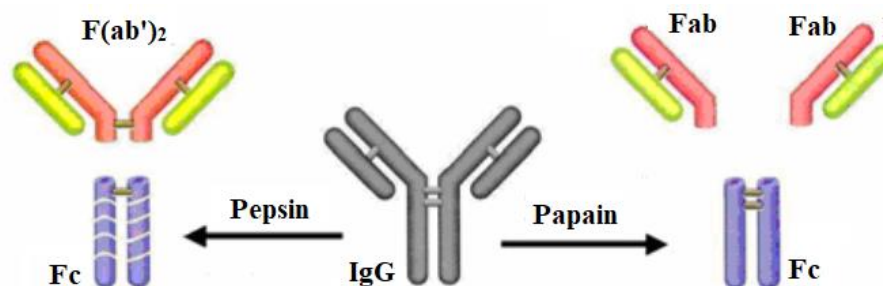
Việc tinh chế các globulin miễn dịch từ các thành phần khác của huyết thanh hoặc huyết tương của động vật bằng cách sử dụng các phản ứng hóa học đơn giản đã được ứng dụng từ những năm đầu của thế kỷ trước. Hơn nữa thế kỷ trước, các khám phá tiếp theo về cấu trúc của các kháng thể đã mở ra những cánh cửa mới đối với sự phân đoạn của các globulin miễn dịch [1]. Có nhiều phương pháp tinh chế huyết thanh khác nhau: Phương pháp đặc hiệu hay không đặc hiệu, phương pháp vật lý hay hóa học với nhiều quy trình khác nhau. Các phương pháp tinh chế dùng trong sản xuất được áp dụng nhiều trên thế giới là phương pháp dùng pepsin và ammoni sulfat (Pope, 1939), phương pháp dùng cồn lạnh (Cohn, 1973), phương pháp dùng ether (Anh), phương pháp dùng ammoni sulfate, phương pháp tinh chế globulin miễn dịch bằng acid caprylic (Rojas, 1994). Phương pháp Pope được ứng dụng ở nhiều nơi trên thế giới với các quy trình tinh chế khác nhau: quy trình Laverge của Pháp; quy trình Kasauli của Ấn Độ (1990); quy trình Harms-laboratory của Anh; quy trình Michigan sate laboratory of health [18].

Đến nay, công nghệ tinh chế huyết thanh kháng nọc rắn có thể thực hiện theo một trong ba kỹ thuật tinh chế tạo ra 3 dạng sản phẩm là IgG, F(ab')<sub>2</sub> và Fab. Tùy điều kiện và kinh nghiệm của nhà sản xuất, nhu cầu điều trị của từng quốc gia, từng địa phương và từng loại nọc rắn; có thể sản xuất

huyết thanh kháng nọc rắn ở một trong ba dạng sản phẩm nêu trên, sau đó tinh chế loại bỏ các thành phần khác, chỉ để lại phần đặc hiệu tác dụng với 27 độc tố nọc rắn là phần IgG, F(ab')<sub>2</sub> hoặc Fab, với mức độ cô đặc cao nhất. Quá trình dùng kỹ thuật không được làm suy giảm hoạt tính trung hòa của các kháng thể và tạo ra một sản phẩm có các đặc điểm hóa lý và độ tinh khiết với hàm lượng protein tổng số thấp, không gây sốt và khả năng thu hồi của các kháng thể tốt, nếu có thể, trong sản xuất lớn cần tính đến quy trình đơn giản và tiết kiệm để không làm tăng giá thành [2].

Việc có thể tạo ra các mảnh kháng thể F(ab')<sub>2</sub> hoặc Fab giúp làm giảm tần suất phản ứng phụ kháng nọc độc sớm và muộn bằng cách loại bỏ các đoạn Fc từ kháng thể IgG. Điều này được cho là giúp ngăn chặn sự kích hoạt của các bổ thể và làm giảm cường độ hình thành phức hệ miễn dịch gây ra các bệnh dị ứng huyết thanh muộn. Trong vòng 60-70 năm trở lại đây, các phân đoạn F(ab')<sub>2</sub> của các globulin miễn dịch đã được sử dụng rộng rãi [1].

Hiện nay, hầu hết các nhà sản xuất đều tuân theo quy trình cổ điển sản xuất kháng độc tố mảnh F(ab')<sub>2</sub> được phát triển bởi Pope, với một số điều chỉnh. Phương pháp sử dụng enzyme Pepsin cắt phân tử IgG tạo thành mảnh F(ab')<sub>2</sub> bằng cách loại bỏ và phân hủy mảnh Fc thành các peptide nhỏ, hai mảnh Fab vẫn còn liên kết với nhau 1 cầu nối disulfua [60]. Trong khi đó huyết thanh kháng nọc rắn dạng Fab được sản xuất bằng cách sử dụng enzyme Papain cắt phân đoạn ở vị trí làm rời 2 mảnh Fab (không còn cầu nối disulfua liên kết với nhau). Tiếp theo, dùng kỹ thuật hóa học với công nghệ tách lọc cở phân tử hoặc dùng sắc ký ái lực (affinity chromatography) hay sắc ký trao đổi ion (Ion-exchange chromatography) tập trung sản phẩm mong muốn có độ tinh sạch cao.



Hình 1.7. Các mảnh IgG khác nhau thu được từ quá trình tiêu hóa pepsin và papain [49]

Ở Tuy-ni-di, huyết thanh kháng nọc rắn đã được sản xuất tại Viện Pasteur từ những năm 1950. Tất cả các bước sản xuất, tinh chế và kiểm soát chất lượng huyết thanh kháng nọc rắn đã được cải tiến và tiêu chuẩn hóa để tạo ra sản phẩm F(ab')<sub>2</sub> tinh khiết, an toàn và hiệu quả, không chứa albumin, được đánh giá bởi SDS-PAGE 12,5% và điện di trên cellulose acetate [61].

Năm 1996, Lomonte và cộng sự đã so sánh khả năng kháng nọc độc của Fab và F(ab')<sub>2</sub> trên chuột, kết quả cho thấy việc trung hòa các yếu tố hoạt động xuất huyết cục bộ do nọc độc rắn Lục *Vipera berus* gây ra không được cải thiện khi sử dụng các mảnh Fab, so với F(ab')<sub>2</sub> [8].

Kết quả thử nghiệm lâm sàng so sánh hiệu quả kháng nọc độc của F(ab')<sub>2</sub> và Fab trên những người trưởng thành bị rắn đuôi chuông cắn ở Mỹ của Boyer và cộng sự (2013) cho thấy: sau điều trị, số lượng tiểu cầu và nồng độ fibrinogen ở nhóm được điều trị Fab thấp hơn so với nhóm được điều trị F(ab')<sub>2</sub>. Nồng độ nọc độc giảm xuống dưới giới hạn phát hiện ở tất cả bệnh nhân sau khi điều trị ban đầu nhưng sau đó tăng trở lại ở 4 trong số 6 trường hợp điều trị Fab. Mức độ kháng nọc độc của F(ab')<sub>2</sub> tồn tại lâu hơn trong huyết tương so với Fab. Ngoài ra, hai bệnh nhân trong nhóm Fab có các tác dụng phụ đáng kể liên quan đến các bất thường về đông máu sau thời gian điều trị ban đầu [62].

Tương tự, Bush và cộng sự (2015) đã so sánh hiệu quả của kháng nọc độc F(ab')<sub>2</sub> và Fab bằng thử nghiệm lâm sàng trên 121 bệnh nhân bị rắn Lục nửa cắn. Kết quả cho thấy, F(ab')<sub>2</sub> có hiệu quả vượt trội hơn trong việc ngăn ngừa rối loạn đông máu muộn sau điều trị, do F(ab')<sub>2</sub> có thời gian bán hủy dài hơn, làm giảm nguy cơ rối loạn đông máu và chảy máu bền vững hơn so với

kháng nọc độc Fab [63]. Tại Hội nghị độc học thế giới tại Mexico lần thứ 12 (1997), các nhà khoa học đã thống nhất quan điểm cho rằng hiệu quả điều trị của huyết thanh kháng nọc rắn F(ab')<sub>2</sub> phù hợp hơn F(ab) [64].

Do tính đặc hiệu kháng nguyên nọc rắn theo vùng địa lý, WHO khuyến cáo, mỗi quốc gia phải tự sản xuất huyết thanh kháng nọc rắn cho chính quốc gia mình. Để đáp ứng nhu cầu cấp cứu, điều trị rắn độc cắn, chúng ta rất cần đẩy mạnh nghiên cứu, sản xuất huyết thanh kháng nọc rắn, đặc biệt là các huyết thanh kháng nọc rắn cho các loài rắn độc nguy hiểm, thường gặp [1].

Cho đến nay, huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc đơn giá (*Bungarus multicinctus* monovalent antivenom) được sản xuất ở Đài Loan và Trung Quốc, sử dụng để điều trị nạn nhân bị rắn Cạp nia Bắc cắn ở Trung Quốc, Hồng Kong, Đài Loan. Huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc thương mại cho thấy phản ứng miễn dịch mạnh mẽ với các phân đoạn có trọng lượng phân tử cao của rắn Cạp nia Bắc như  $\alpha$ -neurotoxin,  $\beta$ -bungarotoxin, nhưng tác dụng yếu hơn được ghi nhận đối với các phân đoạn có trọng lượng phân tử thấp như  $\alpha$ -bungarotoxin và  $\gamma$ -bungarotoxin [9][11]

Ở Việt Nam trước 1990 vẫn chưa có một loại huyết thanh kháng nọc rắn. Việc điều trị rắn độc cắn, khi bị các loài rắn độc cắn thường được điều trị bằng các phương pháp không đặc hiệu, vì vậy rất nhiều bệnh nhân tử vong hoặc tàn phế.

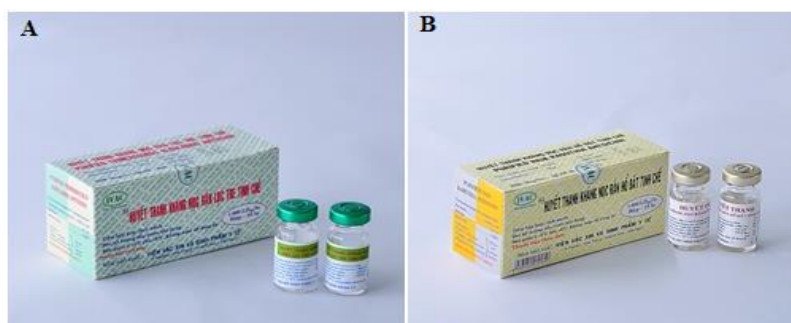
Mãi đến năm 1991, đơn vị nghiên cứu chế tạo huyết thanh được thành lập tại bệnh viện Chợ Rẫy, đã nghiên cứu chế tạo được huyết thanh Hồ mang (*Naja kaothia antivenom*) ứng dụng lâm sàng hiệu quả, làm giảm tỷ lệ tử vong từ 19,5% xuống 3,1%. BS. Trịnh Xuân Kiếm và cộng sự tiếp tục nghiên cứu 3 loại kháng huyết thanh là huyết thanh kháng nọc rắn Hồ đất, huyết thanh kháng nọc rắn Choàm quạp và huyết thanh kháng nọc rắn Hồ chúa nhưng chỉ dừng lại ở mức độ thí nghiệm ở labo. Từ tháng 12-2004 đến tháng 7-2007, TS-BS Trịnh Xuân Kiếm, TS-BS Trần Thúy Hạnh đã nghiên cứu sản xuất và ứng dụng thành công huyết thanh kháng nọc rắn Hồ chúa từ máu ngựa. Kết quả điều trị 40 bệnh nhân bị rắn Hồ chúa cắn, nhiễm độc nặng, sau khi sử dụng huyết thanh kháng nọc rắn Hồ chúa đã hồi phục hoàn toàn trong 24 giờ đầu. Phản ứng không mong muốn trong giới hạn cho phép 10 - 18% [18].

Năm 2013, ở Việt Nam đã nghiên cứu sản xuất thành công huyết thanh kháng nọc rắn đa giá F(ab')<sub>2</sub> của rắn Cạp nia Bắc (*Bungarus multicinctus*) và rắn Cạp nia Nam (*Bungarus candidus*) và đề tài: “nghiên cứu sản xuất huyết thanh kháng nọc rắn Chòam quạp đa giá F(ab')<sub>2</sub> từ huyết tương ngựa; đánh giá chất lượng chế phẩm trong phòng thí nghiệm”, đạt yêu cầu với 8/8 chỉ tiêu của Tiêu chuẩn Quốc gia (Dược điển Việt Nam IV, 2009), đạt 9/10 chỉ tiêu của WHO về huyết thanh kháng nọc rắn dùng cho người [64]. Tuy nhiên, các nghiên cứu trên đến nay vẫn không phát triển được thương mại hóa sản phẩm để sử dụng rộng rãi.

Từ năm 1996 đến năm 2000, IVAC đã nghiên cứu thành công quy trình sản xuất 2 loại kháng huyết thanh đơn giá từ máu ngựa: Huyết thanh kháng nọc rắn Hổ mang đất (*Naja kaouthia*) và huyết thanh kháng nọc rắn Lục tre (*Trimeresurus albolabris*). Từ năm 2005 - 2007, Viện tiếp tục nghiên cứu thành công quy trình sản xuất huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nong (*Bungarus fasciatus*) từ máu ngựa. Tháng 4/2004, IVAC được sự cho phép của Bộ Y Tế đã sản xuất đại trà và thương mại hóa hai loại huyết thanh kháng nọc rắn Hổ đất (*Naja kaouthia*) và rắn Lục tre (*Trimeresurus albolabris*), đáp ứng nhu cầu điều trị bệnh nhân bị 2 loại rắn độc cắn trên phạm vi toàn quốc [65].

Năm 2012, IVAC đã ứng dụng tá chất Montanide ISA 50V2 vào quy trình miễn dịch ngựa sản xuất huyết thanh kháng nọc rắn Hổ đất đã mang lại hiệu quả đáp ứng dịch và cho hiệu giá kháng thể cao [66].

IVAC có cơ sở chăn nuôi ngựa rộng lớn, làm chủ quy trình công nghệ sản xuất huyết thanh kháng nọc rắn ở quy mô công nghiệp, thương mại hóa sản phẩm, từ việc nuôi ngựa, gây miễn dịch thu nhận huyết tương thô, đến công nghệ tinh huyết thanh, công nghệ đóng ống liên hoàn tự động. Từ những điều kiện hiện có về cơ sở hậu cần, làm chủ công nghệ cũng như có đội ngũ cán bộ chuyên môn cao trong lĩnh vực sản xuất các loại huyết thanh kháng độc tố uốn ván, kháng dại, kháng nọc rắn là hội tụ các yếu tố cần và đủ để IVAC tiếp tục nghiên cứu sản xuất các loại huyết thanh kháng nọc rắn khác mà Việt Nam cần, trong đó có huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc.



**Hình 1.8.** Hai loại huyết thanh kháng nọc rắn được IVAC sản xuất và lưu hành. (A) Huyết thanh kháng nọc rắn Lục tre tinh chế ; (B) Huyết thanh kháng nọc rắn Hồ đất tinh chế [67]

*Tổng quan trên cho thấy phần nào về sự phát triển của các dạng huyết thanh kháng nọc rắn (kháng nọc rắn dạng nguyên bản IgG, F(ab')<sub>2</sub> và Fab của các nhà sản xuất huyết thanh. Dựa trên tính hiệu quả thử nghiệm lâm sàng và điều trị trên bệnh nhân của huyết thanh kháng nọc rắn dạng F(ab')<sub>2</sub> vượt trội hơn và có thời gian bán hủy dài hơn so với huyết thanh kháng nọc rắn dạng Fab. Vì vậy nhiều nhà sản xuất chọn quy trình sản xuất kháng độc tố dạng mảnh F(ab')<sub>2</sub> để sử dụng trong điều trị.*

#### 1.10. QUY TRÌNH LỖI TINH CHẾ HUYẾT THANH KHÁNG NỌC RẮN Ở IVAC.

IVAC đã nghiên cứu và xây dựng quy trình lõi sản xuất huyết thanh kháng nọc rắn tinh chế trên 2 sản phẩm huyết thanh kháng nọc rắn Lục tre tinh chế và huyết thanh kháng nọc rắn Hồ đất tinh chế (Hình 1.8) đã được Bộ Y tế cho phép sản xuất sản phẩm và đang lưu hành trên thị trường trong nước.

Huyết thanh ngựa có chứa kháng thể kháng nọc rắn được pepsin hóa loại bỏ fibrin, sau đó rửa ammonium sulfate 14% đã loại bỏ rửa albumin và protein không cần thiết. Tiến hành rửa thu kháng thể bằng cách thêm vào 16% nồng độ ammonium sulfate (tổng 2 lần rửa ammonium sulfate là 30%), hoàn nguyên rửa kháng thể và thẩm tích loại muối ammonium sulfate trong nước cất, sau đó tẩy màu bằng Al(OH)<sub>3</sub>. Huyết thanh kháng nọc rắn tinh chế thu được sau khi làm đẳng trương trong dung dịch nước muối sinh lý và lọc vô trùng. Với dây chuyền công nghệ tinh huyết thanh kháng nọc rắn được thiết lập, những năm gần đây IVAC đã chủ động nghiên cứu để phát triển các loại huyết thanh kháng nọc rắn khác trong đó có huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc.



## CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

- Đối tượng nghiên cứu của chúng tôi là huyết thanh thô được lấy từ ngựa có chứa kháng thể kháng nọc rắn Cạp nia Bắc.

- Phạm vi nghiên cứu: trên quy mô phòng thí nghiệm.

- Thời gian nghiên cứu: Từ tháng 8 năm 2022 đến tháng 3 năm 2023

### 2.2. NGUYÊN VẬT LIỆU

#### 2.2.1. Động vật thí nghiệm

- Ngựa: Được IVAC nhập từ các trang trại nuôi ngựa trong nhân dân ở Việt Nam, với trọng lượng  $\geq 210$  kg và độ tuổi  $\geq 3$  tuổi.

- Chuột nhắt ICR: Từ 4 đến 5 tuần tuổi, trọng lượng 18g đến 20g, IVAC.

- Thỏ: Từ 4 đến 5 tháng tuổi, trọng lượng 2.0 kg đến 2.4 kg, IVAC.

- Chuột lang: Từ 6 đến 7 tuần tuổi, trọng lượng 250 g đến 350 g, IVAC

#### 2.2.2. Nọc rắn

Nọc rắn Cạp nia Bắc được tiếp nhận từ Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam, Viện Hàn Lâm Khoa Học Công Nghệ Việt Nam, có nguồn gốc từ Trang trại rắn gia truyền Nguyễn Văn Quyết - Thôn 4 - Vĩnh Sơn - Vĩnh Tường - Vĩnh Phúc.

#### 2.2.3. Hóa chất

Hóa chất sử dụng trong nghiên cứu gồm: Sodium chloride (Merck), Ammonium Acetate (Merck), Acid Acetide (Merck), Coomassieblue R250 (Merck), Dung dịch Tri-sodium citrate dihydrate 4% (Merck), Dung dịch Merthiolate ( $C_9H_9HgNaO_2S$ ), 1% (Merck), Sodium hydroxide (Merck), Acid Octanoic (Merck), Sodium chloride (Merck), Sodium aluminum chloride (Merck), Pepsin (Sigma Aldrich), Cồn 70° (Công ty Hải Dương), Cồn Iốt, 3% (Xilong Trung Quốc), Dung dịch nước muối 0,9% (Đức Giang), Nước cất pha tiêm (IVAC), Tá chất Montanide ISA 50V2 (Seppic, Pháp).

## 2.2.4. Thiết bị và dụng cụ

### 2.2.4.1. Thiết bị, máy móc

Thiết bị máy móc sử dụng trong nghiên cứu gồm: Laminar flow (Pháp), Máy khuấy từ (Biotech), Tủ lạnh 4°C (Panasonic Nhật Bản), Máy lắc (IKA, Đức), Tủ lạnh âm 40°C (SANYO, Nhật Bản), Kho lạnh 2 ÷ 8°C (Copeland, Thái Lan), Máy lắc vortex (IKAv- Đức), Bơm chân không (KNF - Đức), Máy đo hematocrit (Hettich - Đức), Máy ly tâm Sorval (Mỹ), Máy TFF KvicK Lab (GE – Mỹ), Hệ thống lọc tiếp tuyến TFF Beta (Santoflow Beta, Đức), Tank inox 65 lít (Het-Noorden, Hà Lan), Bộ điện di BIORAD (Themo, Mỹ), Hệ thống lọc-cột lọc 0,45/0,22 m; 0,8-3µm; 20m (Satorius, Đức).

### 2.2.4.2. Dụng cụ

Các dụng cụ sử dụng trong nghiên cứu gồm: Bơm tiêm 1 mL, 5ml (Vinahankook), Thùng giữ nhiệt (Việt Nam), Kim lấy máu (Việt Nam), Nhiệt kế thủy ngân (Gold Star), Tube thủy tinh Φ 12, 18 và 20 (PYREX), Chai thủy tinh 5 lít, 10 lít (Duran).

## 2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.3.1. Khảo sát nọc rắn Cạp nia Bắc (*Bungarus multicinctus*)

Nọc rắn Cạp nia Bắc được ly tâm 4.000 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ tạp chất thu dung dịch nọc rắn, tiến hành đánh giá hàm lượng protein và độc lực.

- Xác định hàm lượng protein: Sử dụng phương pháp Lowry để xác định hàm lượng protein có trong nọc rắn Cạp nia Bắc (Phụ lục 9).

- Xác định độc lực (LD<sub>50</sub>): Sử dụng phương pháp Spearman – Kärber để xác định độc lực LD<sub>50</sub> có trong nọc rắn Cạp nia Bắc (Phụ lục 4).

### 2.3.2. Xây dựng phát đồ miễn dịch, gây miễn dịch trên ngựa, thu nhận huyết tương kháng nọc rắn Cạp nia Bắc

#### 2.3.2.1. Tiêu chuẩn ngựa sử dụng trong nghiên cứu

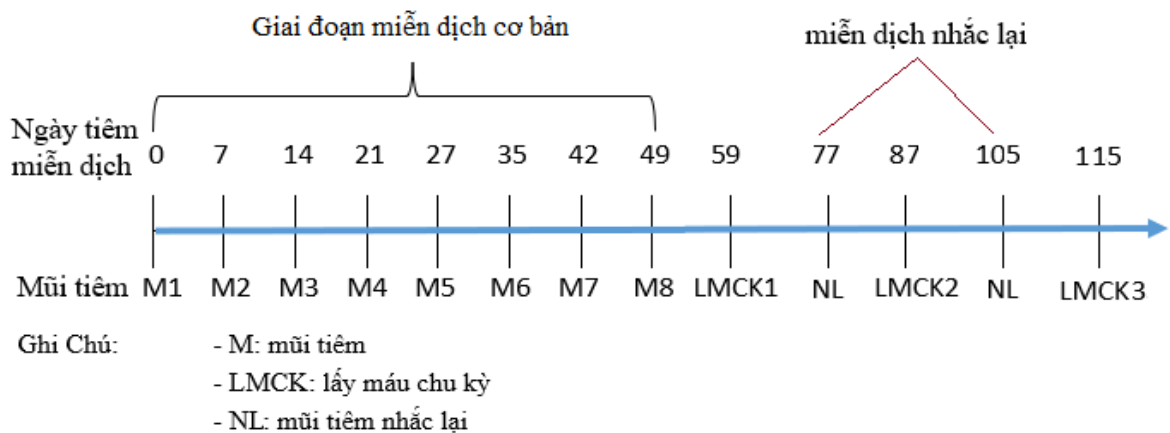
Yêu cầu ngựa khi sử dụng để sản xuất huyết thanh thô phải có sức khỏe tốt, ngực rộng, mông nở, nhanh nhẹn, hoạt bát, màu lông bóng mượt, chiều cao ≥ 1,2 m; trọng lượng ≥ 210 kg; tuổi ≥ 3 tuổi; không bị dị tật; không bị bệnh ngoài da; số lượng hồng cầu từ 6,0 ÷ 9,0 triệu/mm<sup>3</sup>; số lượng bạch cầu

từ  $6,0 \div 12,0$  ngàn/  $\text{mm}^3$ ; hematocrit trong khoảng  $25 \div 46\%$ ; ngựa đực được cắt bỏ tinh hoàn; ngựa cái không mang thai; ngựa trước khi đưa vào sản xuất huyết thanh thô đã được tiêm phòng 3 mũi vaccine uốn ván và nuôi hậu bị từ  $3 \div 6$  tháng.

### 2.3.2.2. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được thực hiện trên 2 nhóm ngựa với 2 phác đồ miễn dịch được thiết kế như sau

- **Nhóm 1:** Gồm 4 con ngựa được đánh số ngựa số 1, ngựa số 2, ngựa số 3 và ngựa số 4. Được gây miễn dịch với phác đồ miễn dịch số 1:



Hình 2.1. Phác đồ miễn dịch 1

#### Liều gây miễn dịch cơ bản:

+ Gây miễn dịch cơ bản với phác đồ 8 mũi tiêm, với liều tiêm được tính từ liều gây chết 50% số chuột nhất thí nghiệm ( $1\text{LD}_{50}$  được tính theo  $\mu\text{g}$  protein nọc rắn đã xác định từ trước) từ mũi 1 đến mũi 8 tương ứng là: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 và 4,0  $\text{LD}_{50}/\text{kg}$  trọng lượng ngựa.

+ Sử dụng nọc rắn Cạp nia Bắc phối hợp với tá chất ISA 50V2.

+ Đường tiêm: tiêm dưới da lưng.

+ Khoảng cách giữa các mũi tiêm miễn dịch cơ bản là 7 ngày.

+ Tiến hành lấy mẫu kiểm tra đáp ứng kháng thể ở ngày 21, 35, 49, (bằng phương pháp Ouchterlony) và mẫu ngày 59 (bằng phương pháp trung hòa trên chuột).

+ Khai thác huyết thanh thô: Sau khi tiêm mũi cuối cùng (mũi 8), cho ngựa nghỉ 10 ngày rồi tiến hành lấy máu khai thác huyết thanh thô chu kỳ 1,

lượng máu lấy ra bằng 1% trọng lượng cơ thể ngựa. Sau đó cho ngựa nghỉ 18 ngày và tiến hành gây miễn dịch nhắc lại cho chu kỳ mới.

### Miễn dịch nhắc lại:

+ Tiêm nhắc lại 1 mũi với liều tiêm với liều tiêm được tính từ liều gây chết 50% số chuột nhất thí nghiệm ( $1LD_{50}$  được tính theo  $\mu\text{g}$  protein nọc rắn đã xác định từ trước) là  $3,0 LD_{50}/\text{kg}$  trọng lượng.

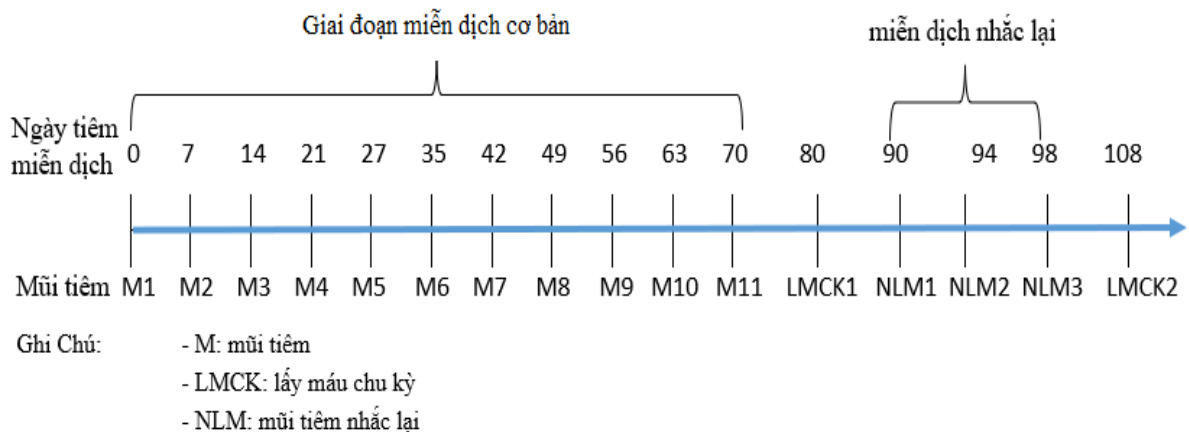
+ Sử dụng nọc rắn Cạp nia Bắc phối hợp với tá chất ISA 50V2.

+ Đường tiêm: Tiêm dưới da lưng.

+ Lấy mẫu kiểm tra đáp ứng kháng thể sau 10 ngày tiêm nhắc lại.

+ Khai thác huyết thanh thô: Sau khi tiêm mũi nhắc lại, cho ngựa nghỉ 10 ngày rồi tiến hành lấy máu khai thác huyết thanh thô, từ chu kỳ khai thác thứ 2 tiến hành lấy máu 2 lần, mỗi lần cách nhau 4 ngày, lượng máu lấy ra lần 1 là 1,5% và lần 2 là 1,2% trọng lượng cơ thể ngựa. Sau đó cho ngựa nghỉ 18 ngày rồi tiến hành gây miễn dịch nhắc lại cho chu kỳ khai thác tiếp theo.

- **Nhóm 2:** Gồm 4 ngựa được đánh số ngựa số 5, ngựa số 6, ngựa số 7 và ngựa số 8. Được gây miễn dịch với phác đồ miễn dịch 2:



Hình 2.2. Phác đồ miễn dịch 2

### Liều gây miễn dịch cơ bản:

+ Gây miễn dịch cơ bản với phác đồ 11 mũi tiêm, với liều tiêm được tính từ liều gây chết 50% số chuột nhất thí nghiệm ( $1LD_{50}$  được tính theo  $\mu\text{g}$  protein nọc rắn đã xác định từ trước) từ mũi 1 đến mũi 11 tương ứng là: 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,7; 1,0; 1,3; 1,5; 2,0; 2,5;  $3,0 LD_{50}/1\text{kg}$  trọng lượng ngựa.

+ Sử dụng nọc rắn Cạp nia Bắc phối hợp với tá chất ISA 50V2.

- + Đường tiêm dưới da
- + Khoảng cách giữa các mũi tiêm miễn dịch cơ bản là 7 ngày.
- + Tiến hành lấy mẫu kiểm tra đáp ứng kháng thể của ngựa thí nghiệm ở ngày 21, 35, 49, 70 (bằng phương pháp Ouchterlony) và ngày 80 (bằng phương pháp trung hòa trên chuột)
- + Khai thác huyết thanh thô: Sau khi tiêm mũi cuối cùng (mũi 11), cho ngựa nghỉ 10 ngày rồi tiến hành lấy máu khai thác huyết thanh thô chu kỳ 1, lượng máu lấy ra bằng 1% trọng lượng cơ thể ngựa. Sau đó cho ngựa nghỉ 10 ngày và tiến hành gây miễn dịch nhắc lại cho chu kỳ tiếp theo.

#### **Miễn dịch nhắc lại:**

- + Miễn dịch nhắc lại gồm 3 mũi với liều tiêm được tính từ liều gây chết 50% số chuột nhất thí nghiệm (1LD<sub>50</sub> được tính theo  $\mu\text{g}$  protein nọc rắn đã xác định từ trước) lần lượt là: 0,5; 1,0; 2,0 LD<sub>50</sub>/kg trọng lượng ngựa.
- + Sử dụng nọc rắn Cạp nia Bắc phối hợp với tá chất ISA 50V2.
- + Đường tiêm: Tiêm dưới da lưng.
- + Khoảng cách giữa các mũi tiêm miễn dịch nhắc lại là 4 ngày.
- + Lấy mẫu kiểm tra đáp ứng kháng thể sau mũi tiêm thứ 3 là 10 ngày (bằng phương pháp trung hòa trên chuột).
- + Khai thác huyết thanh thô: Sau khi tiêm mũi nhắc lại cuối cùng (mũi 3), cho ngựa nghỉ 10 ngày rồi tiến hành lấy máu khai thác huyết thanh thô, từ chu kỳ khai thác thứ 2 tiến hành lấy máu 2 lần, mỗi lần cách nhau 4 ngày, lượng máu lấy ra lần 1 là 1,5% và lần 2 là 1,2% trọng lượng cơ thể ngựa. Sau đó cho ngựa nghỉ 10 ngày rồi tiến hành gây miễn dịch nhắc lại 3 mũi cho chu kỳ khai thác mới.

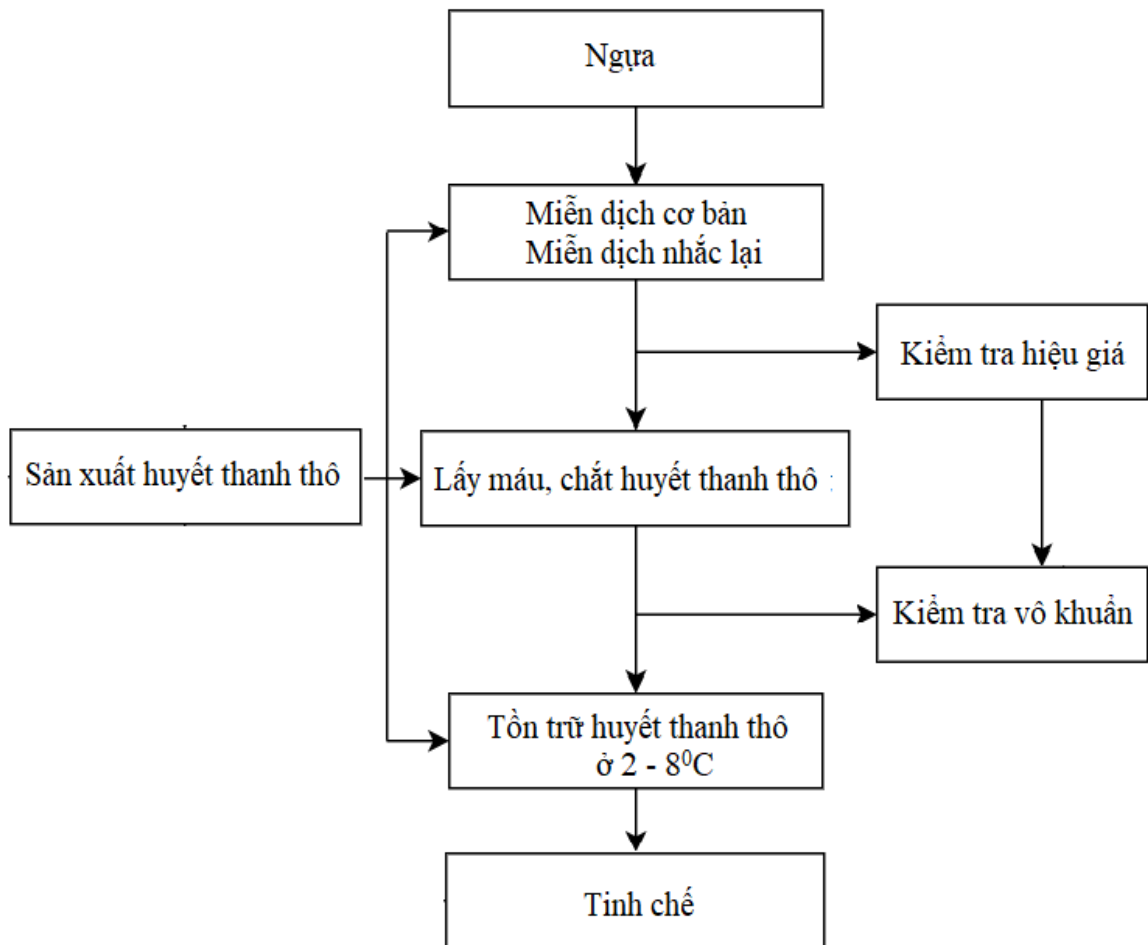
#### **2.3.2.3. Tiêu chí đánh giá**

- Đánh giá đáp ứng kháng thể của ngựa ở giai đoạn gây miễn dịch cơ bản bằng phương pháp ngưng kết kháng nguyên - kháng thể (Ouchterlony) của các mẫu lấy ở thời điểm sau 7 ngày tiêm các mũi thứ 3, 5, 7 và 10 (D21, D35, D49 và D70).
- Đánh giá hiệu giá kháng thể bằng phương pháp trung hòa trên chuột mẫu ở các thời điểm lấy máu lần 1 của tất cả các chu kỳ khai thác huyết thanh thô.

- Đánh giá sức khỏe ngựa bằng cách quan sát tại chỗ tiêm, theo dõi thể trạng ngựa như ăn uống hoạt động, xét nghiệm chỉ số hematocrit và đo nhiệt độ trước khi lấy máu.

#### 2.3.2.4. Sơ đồ quy trình khai thác huyết thanh thô

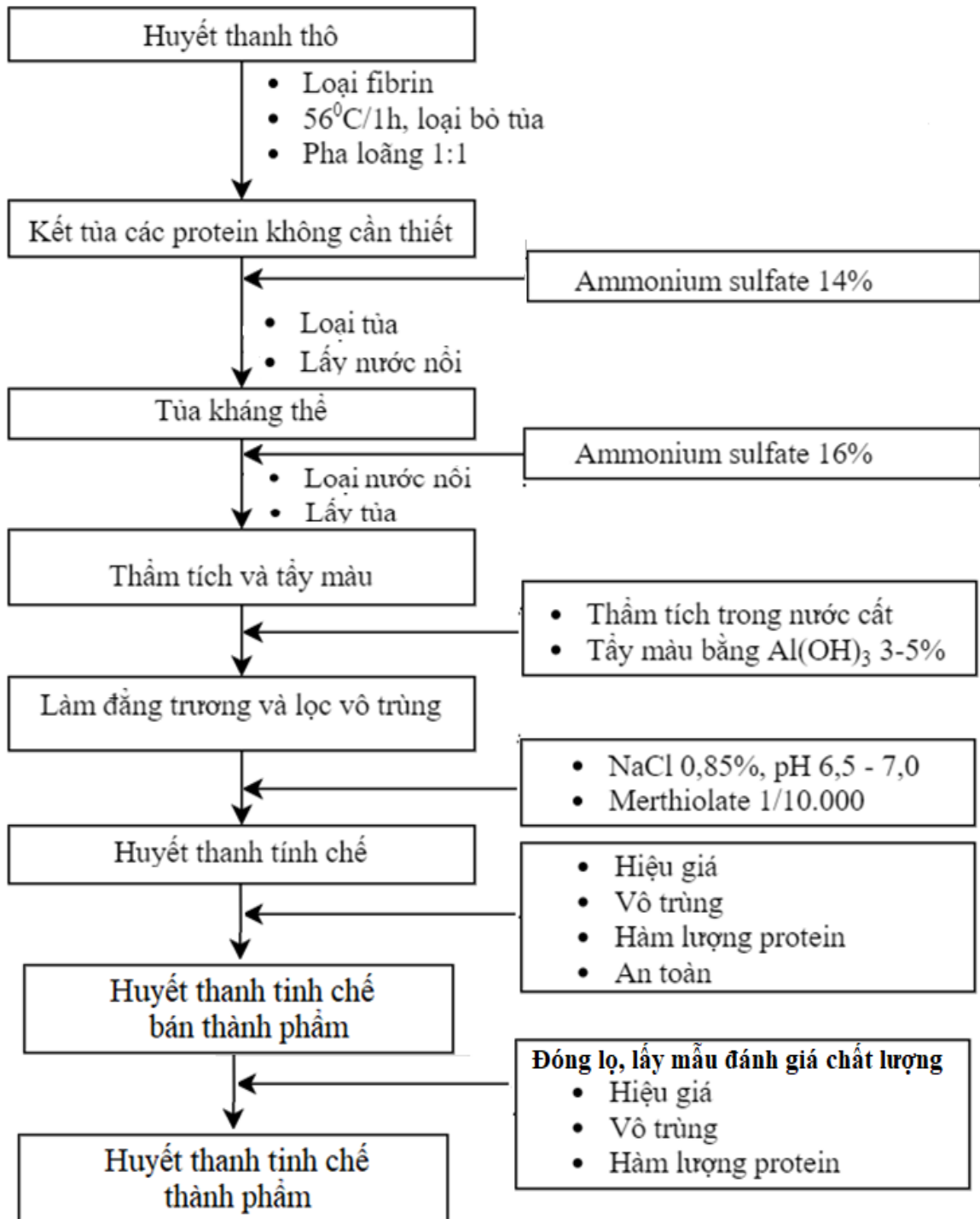
Sơ đồ khai thác huyết thanh thô chung cho cả 2 phác đồ miễn dịch, chỉ khác nhau về số lần tiêm miễn dịch nhắc lại và thời điểm lấy máu khai thác huyết thanh.



Hình 2.3. Quy trình khai thác huyết thanh thô kháng nọc rắn Cạp nia Bắc

**2.3.3. Ứng dụng quy trình tinh chế huyết thanh kháng nọc rắn của IVAC để tinh chế 3 lô thử nghiệm quy mô 10 lít/lô và 1 lô sản phẩm quy mô 60 lít /lô. Đóng 500 lọ IVACAV-Bun dạng thành phẩm (1000 LD<sub>50</sub>/lọ).**

**2.3.3.1. Quy trình tinh chế huyết thanh kháng nọc rắn của Viện Vắc xin và sinh phẩm Y tế**



**Hình 2. 4.** Sơ đồ quy trình tinh chế huyết thanh kháng nọc rắn áp dụng tại IVAC

- Tủa phân đoạn huyết thanh thô: Nồng độ pepsin, pH, nhiệt độ, thời gian ủ đã được xác định.

- Loại bỏ albumin và những protein không cần thiết: Nồng độ acid octanoic, nồng độ muối ammonium sulfate 14%, pH, nhiệt độ và thời gian ủ đã được xác định.

- Kết tủa kháng thể: Thêm vào 16% muối ammonium sulfate (để được nồng độ cuối cùng 30%) và pH đã được xác định. Xác định khối lượng tủa kháng thể thu được.

- Thẩm tích: Xác định các thông số kỹ thuật như áp lực đầu vào, đầu ra, thời gian 1 chu trình, thể tích nước cất và nước muối dùng để trao đổi. Thể tích cô đặc.

- Hấp phụ và ly tâm: với nồng độ  $Al(OH)_3$  và thời gian trong giai đoạn hấp phụ đã được xác định. Xác định các thông số kỹ thuật trong giai đoạn ly tâm gồm thời gian, tốc độ, ...

- Lọc vô trùng: Xác định các thông số quy trình lọc.

- Lấy mẫu và đánh giá chất lượng huyết thanh theo các tiêu chí sau: hiệu suất, độ tinh sạch, hiệu giá, Protein, an toàn...

### **2.3.3.2. Thiết kế thử nghiệm**

- Cỡ mẫu thử nghiệm: Thực hiện tinh chế thử nghiệm trên 03 lô (IVACAV-Bun- 01/TN, IVACAV-Bun -02/TN và IVACAV-Bun -03/TN) mỗi lô đưa vào tinh chế 10 lít huyết thanh ngựa có chứa kháng thể kháng nọc độc nọc rắn Cạp nia Bắc với các thông số đã được xác định theo quy trình tinh chế huyết thanh kháng nọc rắn của Viện Vắc xin và sinh phẩm Y tế.

- Tiêu chí đánh giá: Đánh giá tính phù hợp các thông số quy trình hiện tại theo sơ đồ trên, đánh giá chất lượng sản phẩm sau tinh chế.

- Sản xuất thử nghiệm 01 lô bán thành phẩm: IVACAV-Bun-001-B/S: quy mô 60 lít.

+ Đánh giá chất lượng sản phẩm sau tinh chế.

+ Đánh giá giá tính ổn định của quy trình.

+ Tiêu chí đánh giá: Theo tiêu chuẩn tham chiếu huyết thanh kháng nọc rắn Hổ đất và Lục tre bán thành phẩm (Bảng 2.1) và thành phẩm (Bảng 3.2) hiện tại của IVAC.



Bảng 2.1. Tiêu chuẩn chất lượng bán thành phẩm huyết thanh kháng nọc rắn tinh chế (theo tiêu chuẩn của IVAC đã đăng ký với 2 loại huyết thanh tinh kháng nọc Lục tre và Hổ đất)

STT	Chỉ tiêu	Phương pháp	Tiêu chuẩn	Tài liệu tham khảo
1	pH	Đo điện thế - điện cực	6,0 – 7,0	Dược điển Việt Nam V, 2018
2	Cảm quan	Kiểm tra bằng mắt thường	Dung dịch trong suốt không màu hoặc màu vàng nhạt, hơi nhớt	Dược điển Việt Nam V, 2018
3	Hiệu giá	Trung hòa trên chuột nhắt trắng	$\geq 200$ LD50/lọ (*)	Dược điển Việt Nam V, 2018
4	Protein tổng số (mg/ml)	Lowry	$\leq 150$ mg/ml	Dược điển Việt Nam V, 2018
5	Độ tinh sạch	Điện di SDS-PAGE	Không có vết albumin	Dược điển Việt Nam V, 2018
6	Vô khuẩn	Cấy trực tiếp	Không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm sau 14 ngày theo dõi	Dược điển Việt Nam V, 2018
7	Chất gây sốt	Đánh giá tính chất gây sốt dựa trên sự tăng thân nhiệt của thỏ trước và sau tiêm mẫu vào tĩnh mạch tai	Không có chất gây sốt	Dược điển Việt Nam V, 2018

(\*): theo thực tế

Bảng 2.2. Tiêu chuẩn chất lượng thành phẩm huyết thanh kháng nọc rắn tinh chế (theo tiêu chuẩn của IVAC đã đăng ký với 2 loại huyết thanh tinh kháng nọc Lục tre và Hồ đất)

<b>TT</b>	<b>Chỉ tiêu</b>	<b>Phương pháp</b>	<b>Tiêu chuẩn</b>	<b>Tài liệu tham khảo</b>
1	Cảm quan	Kiểm tra bằng mắt thường	Dung dịch trong suốt không màu hoặc màu vàng nhạt, hơi nhớt	Dược điển Việt Nam V, 2018
2	Vô khuẩn	Cấy trực tiếp	Không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm sau 14 ngày theo dõi	Dược điển Việt Nam V, 2018
3	pH	Đo điện thế - điện cực	6,0 – 7,0	Dược điển Việt Nam V, 2018
4	Nhận dạng	Thông qua thử nghiệm xác định hiệu giá	Phản ứng đặc hiệu giữa nọc rắn tinh chế với HT kháng nọc tương ứng	Dược điển Việt Nam V, 2018
5	Hiệu giá	Trung hòa trên chuột nhắt trắng	$\geq 1000$ LD <sub>50</sub> /lọ (*)	Dược điển Việt Nam V, 2018
6	Protein tổng số	Lowry	$\leq 150$ mg/ml	Dược điển Việt Nam V, 2018
7	Hàm lượng chất bảo quản Merthiolate	Đo quang với thuốc thử Diphenylthiocacbazon (dithizon)	$\leq 0,01\%$	Dược điển Việt Nam V, 2018

TT	Chỉ tiêu	Phương pháp	Tiêu chuẩn	Tài liệu tham khảo
8	Hàm lượng Natri clorid	Morh	Từ 0,85% đến 0,9%	Dược điển Việt Nam V, 2018
9	An toàn chung	Thử trên chuột nhắt trắng và chuột lang	Sau ít nhất 7 ngày theo dõi, toàn bộ chuột khỏe mạnh, tăng trọng và không có biểu hiện bệnh lý hoặc nhiễm độc	Dược điển Việt Nam V, 2018
10	Chất gây sốt	Đánh giá tính chất gây sốt dựa trên sự tăng thân nhiệt của thỏ trước và sau tiêm mẫu vào tĩnh mạch tai	Không có chất gây sốt	Dược điển Việt Nam V, 2018

(\*): theo thực tế

#### **2.3.4. Đề xuất tiêu chuẩn cơ sở cho huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc tinh chế phù hợp ĐĐVN V, 2018**

##### ***2.3.4.1. Tiêu chuẩn khai thác huyết thanh thô kháng nọc rắn Cạp nia Bắc thô từ máu ngựa***

Dựa trên tiêu chuẩn tham chiếu ngựa khai thác huyết thanh của 2 sản phẩm khai thác huyết thanh kháng nọc rắn Hổ đất và huyết thanh kháng nọc rắn Lục tre hiện tại đang được sản xuất tại Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế và kết quả miễn dịch thu được sau thử nghiệm 2 phác đồ miễn dịch sản xuất huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia để đề xuất tiêu chuẩn cơ sở khai thác huyết thanh thô trên ngựa cho ngựa sản xuất huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc (Bảng 2.3)

Bảng 2.3. Đánh giá các tiêu chí khai thác huyết thanh Cạp nia Bắc thô

STT	Chỉ tiêu	Phương pháp	Tiêu chí
1	Hiệu giá	Trung hòa trên chuột nhắt trắng	Ghi nhận sau thử nghiệm
2	Cảm quan	Kiểm tra bằng mắt thường	Dung dịch trong suốt màu vàng nhạt, sánh keo, không có vật lạ.
3	Vô khuẩn	Cấy trực tiếp	Không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm sau 14 ngày theo dõi

#### ***2.3.4.2. Tiêu chuẩn chất lượng huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc tinh chế bán thành phẩm***

Dựa trên tiêu chuẩn tham chiếu của 2 sản phẩm huyết thanh kháng nọc rắn Hồ đất tinh chế và huyết thanh kháng nọc rắn Lục tre tinh chế bán thành phẩm (Bảng 2.1) đã được đăng ký, hiện tại đang được sản xuất tại Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế và kết quả sau tinh chế 3 lô thử nghiệm 10 lít/lô và 1 lô bán thành phẩm để đề xuất tiêu chuẩn cơ sở cho huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc tinh chế bán thành phẩm phù hợp DĐVN V, 2018.

#### ***2.3.4.3. Tiêu chuẩn chất lượng huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc tinh chế thành phẩm***

Dựa trên tiêu chuẩn tham chiếu của 2 sản phẩm huyết thanh kháng nọc rắn Hồ đất và Lục tre tinh chế thành phẩm (Bảng 2.2) hiện tại đang được sản xuất tại Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế để đề xuất tiêu chuẩn cơ sở cho huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc tinh chế thành phẩm phù hợp DĐVN V, 2018.

### **2.3.5. Phương pháp kiểm định**

#### ***2.3.5.1. Đánh giá định tính đáp ứng miễn dịch của huyết thanh ngựa thô***

- Phương pháp: Khuếch tán miễn dịch Ouchterlony (Phụ Lục 1)
- Nguyên lý: Phương pháp này dựa trên hiện tượng khuếch tán và ngưng kết giữa kháng nguyên (nọc rắn Cạp nia Bắc) và kháng thể (huyết

thanh sau khi được gây miễn dịch nọc rắn Cạp nia Bắc) trên thạch agarose 1%, ở nhiệt độ 2 - 8°C trong 48h. Tạo ra các cung ngưng kết khi nhuộm coomassie blue 0,025%.

#### **2.3.5.2. Kiểm tra độ tinh khiết huyết thanh**

- Phương pháp: Điện di SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) (Phụ Lục 2).

- Nguyên lý: Phương pháp điện di trên gel polyacrylamide sử dụng các lỗ siêu nhỏ của gel và dòng điện chạy qua nhằm kéo theo và phân tách các chuỗi polypeptide có khối lượng, độ phức tạp khác nhau. Protein có kích thước càng lớn di chuyển càng chậm trên gel và ngược lại. SDS dùng trong phương pháp này giúp tích điện âm cho các gốc amino acid của protein. Nhờ vậy, protein không còn ở trạng thái gấp cuộn và duỗi dài thành chuỗi polypeptide và di chuyển về cực dương của dòng điện. Khi qua các lỗ gel, các protein phân tách nhau chỉ bởi khối lượng (chiều dài, thành phần của chuỗi polypeptide). Có hai điều kiện xử lý protein trước khi chạy điện di là không khử và khử. Đối với điều kiện không khử, protein nguyên vẹn và xác định được khối lượng tương ứng với dạng tự nhiên. Đối với điều kiện khử,  $\beta$ -mercaptoethanol được thêm vào nhằm phá vỡ các liên kết disulfide. Trong trường hợp khử hoàn toàn, chuỗi nặng được phân cắt hoàn toàn với chuỗi nhẹ và trên gel nhận được hai vạch chính.

#### **2.3.5.3. Cảm quan**

- Phương pháp: Kiểm tra vật lý (bằng mắt thường) (Phụ Lục 3)

- Tiêu chuẩn: Dung dịch trong suốt không màu hoặc có màu vàng nhạt, hơi nhớt.

#### **2.3.5.4. Nhận dạng**

- Phương pháp: Bằng thử nghiệm xác định hiệu giá trung hòa trên chuột (Phụ Lục 4).

- Tiêu chuẩn: Huyết thanh thử nghiệm có khả năng trung hòa đặc hiệu nọc độc rắn tương ứng.

#### **2.3.5.5. Xác định $LD_{50}$ nọc rắn.**

- **Phương pháp:** phương pháp của Spearman – Karber (phụ lục 4)
- **Nguyên tắc:** Xác định liều LD50 độc tố nọc rắn là xác định liều gây chết 50% súc vật thí nghiệm được diễn tả bằng  $\mu\text{g}$  protein nọc rắn

#### **2.3.5.6. Hiệu giá**

- Phương pháp: Dựa vào khả năng trung hòa nọc rắn với huyết thanh kháng nọc rắn tương ứng (Phụ Lục 4).

- Nguyên lý: Thử nghiệm xác định hiệu giá của huyết thanh kháng nọc rắn được thực hiện trên nguyên lý trung hòa nọc rắn với huyết thanh kháng nọc rắn tương ứng. Thử nghiệm được thực hiện trên chuột nhắt trắng ICR để xác định số LD<sub>50</sub> có trong 1 ml huyết thanh (theo công thức Spearman và Kärber).

- Hiệu giá/ lọ = Hiệu giá (LD<sub>50</sub>/ml) x thể tích (ml).

#### **2.3.5.7. Đo thể tích**

Phương pháp: Cân và xác định khối lượng chia cho tỷ trọng (Phụ Lục 5)

#### **2.3.5.8. An toàn chung**

- Phương pháp: Thử trên 5 chuột nhắt trắng và 2 chuột lang (Phụ Lục 6)
- Nguyên lý: Thử nghiệm xác định hiệu giá của huyết thanh kháng nọc rắn được thực hiện trên nguyên lý trung hòa nọc rắn với huyết thanh kháng nọc rắn tương ứng. Thử nghiệm được thực hiện trên chuột nhắt trắng Swiss để xác định số LD<sub>50</sub> có trong 1 ml huyết thanh.

#### **2.3.5.9. Chất gây sốt**

- Phương pháp: Đánh giá tính chất gây sốt dựa trên sự tăng thân nhiệt của thỏ trước và sau khi tiêm vào tĩnh mạch tai dung dịch mẫu thử (Phụ Lục 7).

- Nguyên lý: Thử nghiệm chất gây sốt là phương pháp sinh học dùng đánh giá tính chất gây sốt của sinh phẩm dựa trên sự tăng thân nhiệt của thỏ trước và sau khi tiêm vào tĩnh mạch tai dung dịch của sinh phẩm đem thử.

#### **2.3.5.10. Vô khuẩn**

- Phương pháp: Cây trực tiếp (Phụ Lục 8)

- Nguyên lý: Độ vô khuẩn là một trong những yêu cầu về độ tinh sạch trong quá trình thẩm định sản phẩm. Phương pháp này nhằm chứng minh sự vắng mặt của những vi sinh vật sống ngoại sinh trong dược phẩm. Nếu mẫu thành phẩm có hiện diện vi sinh vật thì khi được thêm vào môi trường giàu dinh dưỡng và nhiệt độ ủ thích hợp, chúng sẽ tăng sinh nhanh chóng và phát hiện được dựa trên độ đục.

#### **2.3.5.11. Protein tổng số**

- Phương pháp: Lowry (Phụ Lục 9)

- Nguyên tắc: Protein có trong mẫu thử bị rửa với acid tricloacetic nóng. Xác định lượng rửa để tính ra lượng protein trong mẫu bằng cách hòa tan rửa, cho phản ứng với đồng tatrata và thuốc thử Folin trong môi trường kiềm để tạo phức màu xanh da trời, đo quang ở bước sóng 750 nm.

#### **2.3.5.12. Xác định chất bảo quản Merthiolate**

- Phương pháp hóa lý (Phụ Lục 10)

- Nguyên tắc: Dựa vào phản ứng giải phóng ion thủy ngân ( $Hg^{2+}$ ) tự do từ merthiolate, kết hợp với dithizon thành dithizonat thủy ngân, xác định bằng cách đo quang ở bước sóng 620 nm...

#### **2.3.5.13. Xác định pH**

- Phương pháp: Máy đo pH (đo điện thế - điện cực) (Phụ Lục 11)

- Nguyên lý: pH của một dung dịch được xác định bằng cách đo thế hiệu giữa điện cực chỉ thị nhạy cảm với ion hydrogen (điện cực thủy tinh) và một điện cực so sánh (điện cực calomen bão hòa).

#### **2.3.5.14. Định lượng Natri clorid**

- Phương pháp Morh (Phụ Lục 12)

- Nguyên tắc: Dựa trên phản ứng xác định ion  $Cl^-$  bằng Bạc nitrat ( $AgNO_3$ ) 0,1N với chỉ thị màu Kali cromat  $K_2CrO_4$  10%; từ lượng  $AgNO_3$  dùng chuẩn độ tính ra hàm lượng NaCl.

#### **2.3.5.15. Phương pháp xử lý số liệu**

- Xử lý số liệu bằng excel.

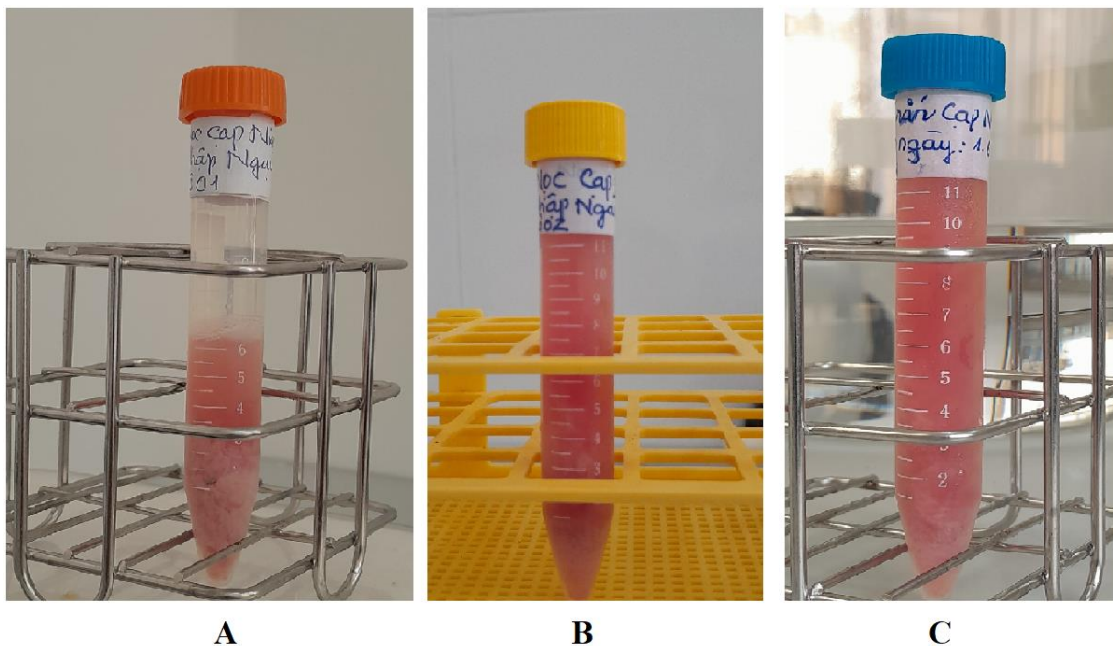
### CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. KHẢO SÁT KHÁNG NGUYÊN NỌC RẮN CẠP NIA BẮC

##### 3.1.1. Đánh giá cảm quan nọc rắn

- 3 lô nọc rắn Cạp nia Bắc 01, 02 và 03 được tiếp nhận từ Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam, Viện Hàn Lâm Khoa Học Công Nghệ Việt Nam (Hình 3.1).

- + Ở dạng dung dịch
- + Có màu hồng nhạt
- + Có mùi tanh
- Bảo quản ở nhiệt độ dưới  $-25^{\circ}\text{C}$ .



Hình 3.1. 3 lô nọc rắn Cạp nia Bắc sử dụng cho nghiên cứu: (A) lô 01; (B) lô 02; (C) lô 03.

##### 3.1.2. Xác định Protein tổng số và $LD_{50}$ nọc rắn Cạp nia Bắc

Kết quả xác định hàm lượng protein của 3 lô nọc rắn Cạp nia Bắc được trình bày ở trong Bảng 3.1.

Hàm lượng protein có trong nọc rắn Cạp nia Bắc (dạng dung dịch) của 3 lô nọc đưa vào thử nghiệm lần lượt là 92,8 mg/ml (lô 01); 25,0 mg/ml (lô 02) và 35,4 mg/ml (lô 03). Trung bình 51,07 mg/ml. Kết quả này cho thấy



hàm lượng protein có trong nọc rắn Cạp nia Bắc ở Việt Nam thấp hơn so với các loài rắn độc khác được khảo sát ở IVAC như Nọc rắn Hồ Chúa (dạng dung dịch) hàm lượng protein trung bình 100,2 mg/ml, nọc rắn Cạp Nong miền nam (dạng dung dịch) hàm lượng protein trung bình 134,3 mg/ml, nọc rắn Lục tre (dạng dung dịch) hàm lượng protein trung bình 101,5 mg/ml và nọc rắn Choàm quạp (dạng dung dịch) trung bình 259,6 mg/ml.

Bảng 3.1. Kết quả đánh giá hàm lượng protein của 3 lô nọc rắn Cạp nia Bắc

Lô nọc rắn	Thể tích (ml)	Hàm lượng Protein (mg/ml)
01	6	92,8
02	12	25,0
03	12	35,4
Trung bình		51,07

Lô 01 có hàm lượng protein cao hơn nhiều so với lô 02 và 03 điều này cho thấy thời gian lấy mẫu ảnh hưởng rất lớn đến hàm lượng protein nọc. Lô nọc 01 được lấy cuối tháng 02, thời gian rắn Cạp nia Bắc trải qua quá trình ngủ đông nên hàm lượng protein được tích lũy trong nọc cao hơn 2 lô nọc 02 được lấy cuối tháng 5 và lô nọc 03 lấy giữa tháng 8.

Bảng 3.2. Kết quả đánh giá độc lực của 2 lô nọc rắn Cạp nia Bắc tươi

Lô	Thể tích (ml)	Độc lực ( $\mu\text{g protein}/1\text{LD}_{50}$ )
01	6	2,26
02	12	2,85
03	12	2,78
Trung bình		2,63

Độc lực tính theo hàm lượng protein của 3 lô nọc rắn Cạp nia Bắc lần lượt là 2,26  $\mu\text{g}/1\text{LD}_{50}$  (lô 01), 2,85  $\mu\text{g}/1\text{LD}_{50}$  (lô 02) và 2,78  $1\text{LD}_{50}$  (lô 03). Sự chênh lệch này không quá lớn, có thể do điều kiện khai thác nọc như: khai

thác nọc sau khi cho rắn ăn, mùa lấy nọc, cũng như số lượng cá thể đực cái trong quá trình lấy nọc... Tính trung bình độc lực của 3 lô nọc đạt  $2,63\mu\text{g}/1\text{LD}_{50}$  tương đương  $0,131\text{ mg/kg}$  chuột. Với cỡ mẫu  $n = 3$  thì kết quả chúng tôi chưa có nhiều ý nghĩa về mặt thống kê. Kết quả này cho thấy độc lực nọc rắn Cạp nia Bắc của chúng tôi thu được thấp hơn so với độc lực được công bố  $0,113\text{ mg/kg}$  [43]. So sánh với các loài rắn độc cùng họ (*Elapidae*) khác chứa nọc độc thần kinh như rắn Hồ mang  $0,373\text{ mg/kg}$ , rắn Hồ mang chúa  $1,314\text{ mg/kg}$ , loài rắn độc thuộc họ rắn Lục (*Viperidae*) như rắn Lục tre  $0,370\text{ mg/kg}$ , rắn Choàm Quạp  $5,2\text{ mg/kg}$ . Từ đó cho thấy nọc độc Rắn Cạp nia Bắc được đánh giá là một loài rắn độc đứng thứ 4 trên thế giới và là loài độc nhất ở khu vực Trung Quốc và Việt Nam [9][41].

Trong quá trình đánh giá độc lực của nọc rắn, chúng tôi cũng tiến hành theo dõi các triệu chứng nhiễm độc của nọc rắn Cạp nia Bắc trên chuột. Hình 3.2 cho thấy độc tố của nọc rắn Cạp nia Bắc đã gây tác dụng lên chuột nhất trắng sau khi tiêm vào tĩnh mạch đuôi với liều lượng lớn, gây ra hiện tượng liệt cơ nhanh, suy hô hấp dẫn đến cơ thể tím tái và tử vong. Ở liều tiêm với hàm lượng độc tố thấp hơn thì xảy ra hiện tượng liệt cơ từ từ, chuột di chuyển khó khăn, mắt ướt giảm thị lực, bỏ ăn sau đó tùy vào liều lượng mà chuột có thể sống trở lại hoặc tử vong sau 48 giờ. Các triệu chứng này cũng phù hợp với công bố của Mao và cộng sự [9] và Lin và cộng sự [11].



Hình 3.2. Triệu chứng chuột khi nhiễm độc nọc rắn Cạp nia Bắc

Dựa trên kết quả độc lực của nọc rắn Cạp nia Bắc sau khi được đánh giá, chúng tôi xây dựng 2 phát đồ gây miễn dịch khác nhau trên ngựa. Sau đó tiến hành gây miễn dịch, đánh giá khả năng đáp ứng kháng thể trên ngựa và lấy máu sản xuất huyết thanh thô.

## 3.2. KẾT QUẢ THIẾT LẬP QUY TRÌNH MIỄN DỊCH TRÊN NGỰA, ĐÁNH GIÁ QUY TRÌNH SAU KHI GÂY MIỄN DỊCH

### 3.2.1. Đánh giá tiêu chuẩn ngựa

So với tiêu chuẩn ngựa đưa vào sản xuất huyết thanh của Viện Vắc Xin và Sinh phẩm Y tế (IVAC), cả 8 ngựa được chọn làm thí nghiệm đều đạt tiêu chuẩn theo quy định bao gồm các tiêu chí sau: Sức khỏe tốt; ngoại hình (ngực rộng, mông nở, nhanh nhẹn, hoạt bát, lông bóng mượt) đạt yêu cầu; chiều cao, cân nặng và độ tuổi đạt tiêu chuẩn quy định; ngựa không có dị tật; không có các bệnh ngoài da; ngựa đực đã được cắt bỏ tinh hoàn và ngựa cái không mang thai; các chỉ số sinh lý như hồng cầu, bạch cầu và chỉ số hematocrit đều nằm trong tiêu chuẩn cho phép; ngựa đã được tiêm phòng đủ 3 mũi vắc xin uốn ván và có thời gian nuôi hậu bị từ 3 đến 4 tháng (Bảng 3.3)

**Bảng 3.3 Kết quả các chỉ số sinh lý và sức khỏe của 8 ngựa thí nghiệm trước khi đưa vào gây miễn dịch**

Thông số	Sức khỏe, ngoại hình	Chiều cao (m)	Trọng lượng (kg)	Tuổi	Dị tật	Bệnh ngoài da	Cắt bỏ tinh hoàn	Yếu tố mang thai	Hồng cầu (triệu/mm <sup>3</sup> )	Bạch cầu (ngàn/mm <sup>3</sup> )	Chỉ số Htc (%)	Tiêm vắc xin uốn ván	Nuôi hậu bị (tháng)
Sức khỏe tốt,													
Ngoại hình đạt													
Tiêu chuẩn	(ngực rộng, mỏng nở, nhanh nhẹn, hoạt bát, lông bóng mượt)	≥1,2	≥210	≥3	không	Không	Có	Không	6,0 ÷ 9,0	6,0 ÷ 12,0	25 ÷ 46	Đủ 3 mũi	3 ÷ 6
Ngựa số 1	Đạt	1,5	242	6	không	không	không	không	7,1	8,95	31	Đủ	3
Ngựa số 2	Đạt	1,6	315	6	không	không	Có	không	8,75	11,15	46	Đủ	3
Ngựa số 3	Đạt	1,3	232	6	không	không	không	không	6,73	7,65	27	Đủ	3
Ngựa số 4	Đạt	1,5	261	4	không	không	Có	không	8,1	10,25	40	Đủ	4
Ngựa số 5	Đạt	1,5	261	4	không	không	Có	không	6,84	7,85	28	Đủ	4
Ngựa số 6	Đạt	1,3	244	4	không	không	không	không	7,92	10,45	40	Đủ	3
Ngựa số 7	Đạt	1,5	294	5	không	không	không	không	8,32	11,05	43	Đủ	4
Ngựa số 8	Đạt	1,4	286	6	không	không	không	không	7,05	8,85	30	Đủ	4

## 3.2.2. Theo dõi sức khỏe ngựa sau các mũi tiêm miễn dịch

Bảng 3.4 Kết quả sức khỏe 8 ngựa thí nghiệm sau các mũi tiêm miễn dịch cơ bản của 2 nhóm ngựa thí nghiệm.

Theo dõi sau tiêm	Nhóm 1				Nhóm 2			
	Ngựa số 1	Ngựa số 2	Ngựa số 3	Ngựa số 4	Ngựa số 5	Ngựa số 6	Ngựa số 7	Ngựa số 8
Mũi 1	Áp xe nặng SC+AI	Áp xe nặng SC+AI	Áp xe nặng SN+BT	Áp xe nặng SC+AI	Áp xe nặng SN+BT	Áp xe nặng SN+BT	Áp xe nặng KS+BT	Áp xe nặng SN+BT
Mũi 2	Áp xe nặng SC+AI	Áp xe nặng SC+AI	Áp xe nặng SC+AI	Áp xe nặng SN+BT	Áp xe nặng SN+BT	Áp xe nặng SN+BT	Áp xe nặng KS+BT	Áp xe nặng KS+BT
Mũi 3	Áp xe nặng SN+BT	Áp xe nặng SC+AI	Áp xe nặng SC+AI	Áp xe nặng SN+BT	Áp xe nặng KS+BT	Áp xe nặng KS+BT	Áp xe nặng KS+BT	Áp xe nặng KS+BT
Mũi 4	Áp xe nặng SN+BT	Áp xe nặng SC+AI	Áp xe nặng SN+AI	Áp xe nặng KS+BT	Áp xe nặng SN+BT	Áp xe nặng KS+BT	Áp xe nặng KS+BT	Áp xe nặng KS+BT
Mũi 5	Áp xe nặng KS+BT	Áp xe nặng KS+BT	Áp xe nặng SN+BT	Áp xe nặng KS+BT	Áp xe nặng KS+BT	Áp xe nặng KS+BT	Áp xe nặng SN+BT	Áp xe nặng KS+BT
Mũi 6	Áp xe nặng SN+BT	Áp xe nặng KS+BT	Áp xe nặng KS+BT	Áp xe nặng KS+BT	Áp xe nặng KS+BT	Áp xe nặng SN+AI	Áp xe nặng KS+BT	Áp xe nặng KS+BT
Mũi 7	Áp xe nặng KS+BT	Áp xe nặng KS+BT	Áp xe nặng SN+BT	Áp xe nặng KS+BT	Áp xe nặng KS+BT	Áp xe nặng SN+BT	Áp xe nặng KS+BT	Áp xe nặng KS+BT
Mũi 8	Áp xe nặng KS+BT	Áp xe nặng KS+BT	Áp xe nặng SN+BT	Áp xe nặng KS+BT	Áp xe nặng KS+BT	Áp xe nặng SN+BT	Áp xe nặng KS+BT	Áp xe nặng KS+BT
Mũi 9	Áp xe - Thẻ trạng -	Áp xe - Thẻ trạng -	Áp xe - Thẻ trạng -	Áp xe - Thẻ trạng -	Áp xe nặng KS+BT	Áp xe nặng KS+BT	Áp xe nặng KS+BT	Áp xe nặng KS+BT
Mũi 10	Áp xe - Thẻ trạng -	Áp xe - Thẻ trạng -	Áp xe - Thẻ trạng -	Áp xe - Thẻ trạng -	Áp xe nặng KS+BT	Áp xe nặng KS+BT	Áp xe nặng SN+BT	Áp xe nặng KS+BT
Mũi 11	Áp xe - Thẻ trạng -	Áp xe - Thẻ trạng -	Áp xe - Thẻ trạng -	Áp xe - Thẻ trạng -	Áp xe nặng KS+BT	Áp xe nặng KS+BT	Áp xe nặng KS+BT	Áp xe nặng KS+BT

Ghi Chú: KS không sốt; SN: sốt nhẹ (38,5 – 39,0°C); SC: Sốt cao (>39,0°C); BT: bình thường; AI: ấn ít; áp xe nặng là sưng to, tạo mủ.

Sau mỗi lần tiêm nọc rắn Cạp nia Bắc gây miễn dịch trên ngựa, quan sát thấy các tổn thương cục bộ phát triển tại vị trí tiêm trên tất cả các ngựa ở cả 2 nhóm thí nghiệm (Bảng 3.4). Các tổn thương cục bộ có kích thước khác nhau (đường kính từ 10 đến 20 cm), các tổn thương có giới hạn rõ và lan tỏa với đặc trưng bởi sự phát triển của mô xơ (rắn khi sờ thấy). Những tổn thương này tạo thành các ổ áp xe lớn và tạo mủ dẫn đến sự hình thành lỗ rò trước khi xơ hóa và thường được chữa lành và tái hấp thu trong 4–7 tuần. Tổn thương mô tại vị trí tiêm kháng nguyên miễn dịch nọc rắn có thể là do sự kết hợp của kích ứng mô xung quanh do tá chất Montanide (ISA 50V2) tạo ra hoặc do tác dụng của nọc rắn được giải phóng từ từ khỏi nhũ tương, hoặc do các hoạt động được kích hoạt bởi các tế bào viêm được kích thích bởi nọc rắn Cạp nia Bắc và tá dược. Theo nghiên cứu của Arguedas và cộng sự, việc hình thành các tổn thương cục bộ tại vị trí tiêm miễn dịch phần lớn là do các tá chất sử dụng trong miễn dịch (Montanide và Freund) gây ra [68].

Theo dõi thể trạng ngựa sau tiêm cho thấy nhóm ngựa được tiêm với phác đồ miễn dịch 1 (nhóm 1) có biểu hiện mệt mỏi, sốt cao và sức ăn giảm trong 1 đến 2 ngày sau tiêm mũi 1 và mũi 2, thể trạng ngựa được phục hồi và trở lại bình thường sau 3 đến 4 ngày tiêm. Các triệu chứng này được giảm dần từ mũi tiêm thứ 3 đến mũi tiêm thứ 4 và trở lại bình thường sau mũi tiêm thứ 5. Trong khi đó nhóm ngựa được tiêm với phác đồ miễn dịch 2 (nhóm 2) ngựa chỉ sốt nhẹ, không có biểu hiện mệt mỏi và ăn uống bình thường sau tiêm mũi 1. Triệu chứng sốt nhẹ giảm từ mũi 2 và bình thường sau tiêm mũi 3 (Bảng 3.4). Ở phác đồ miễn dịch 1, liều miễn dịch mũi 1, 2 và 3 (0,5; 1,0 và 1,5 LD<sub>50</sub>/kg) lớn gấp 5 lần liều miễn dịch mũi 1, 2 và 3 (0,1; 0,2 và 0,3LD<sub>50</sub>/ml) ở phác đồ miễn dịch 2 nên mức độ tác động lên thể trạng và sức khỏe của ngựa nhóm 1 lớn hơn ở ngựa nhóm 2. Kết quả này cho thấy rằng liều kháng nguyên miễn dịch đã có tác động không nhỏ lên sức khỏe của động vật thí nghiệm trong giai đoạn đầu của quá trình miễn dịch. Miễn dịch liều cao khả năng đáp ứng miễn dịch nhanh hơn nhưng tác động rất lớn đến sức khỏe của động vật thí nghiệm, động vật thí nghiệm có thể tử vong khi sức khỏe giảm sút [57][67]. Trong khi miễn dịch liều thấp khả năng đáp ứng miễn dịch chậm hơn nhưng đảm bảo được sức khỏe cho động vật thí nghiệm [59][69]. Do đó việc nghiên cứu thiết lập một quy trình miễn dịch phù hợp đối với chủng loại

kháng nguyên nọc rắn độc tạo được hiệu giá kháng thể cao đồng thời đảm bảo được sức khỏe của động vật thí nghiệm là một sự cân nhắc quan trọng cho nhà sản xuất đối với sản xuất kháng huyết thanh kháng nọc rắn trên động vật.

### 3.2.3. Kết quả đánh giá đáp ứng miễn dịch của 2 phác đồ miễn dịch trên ngựa trong giai đoạn miễn dịch cơ bản

#### 3.2.3.1. Phác đồ miễn dịch 1

Ứng dụng phương pháp khuếch tán miễn dịch Ouchterlony để đánh giá khả năng đáp ứng kháng thể sau khi miễn dịch ở các ngày D21, D35 và D49. Kết quả đáp ứng miễn dịch được trình bày ở Bảng 3.5.

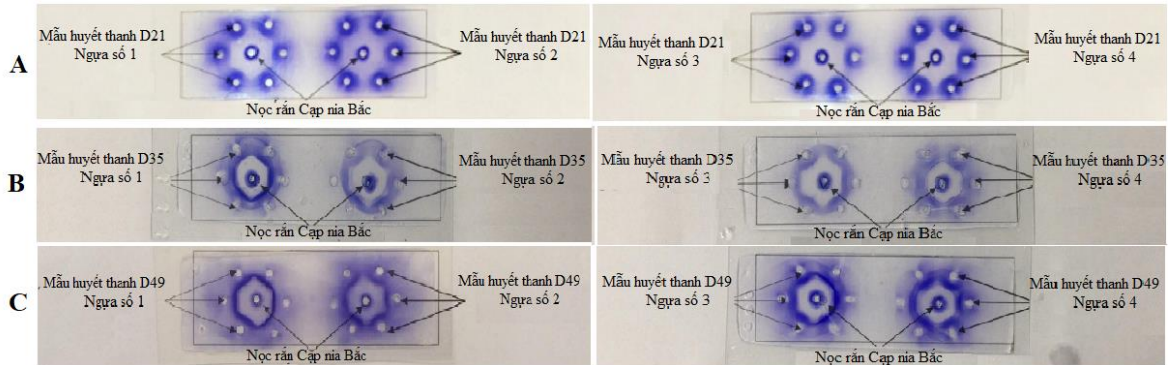
Bảng 3.5. Đáp ứng miễn dịch của 4 ngựa nhóm 1 sau khi tiêm nọc rắn Cạp nia Bắc bằng phương pháp ngưng kết trên thạch Agarose (Ouchterlony)

Ngựa thí nghiệm số	Kết quả ngưng kết		
	D21	D35	D49
1	±	++	+++
2	±	+	++
3	±	+	+++
4	±	++	+++

*Ghi chú: - : âm tính; ±: có thể dương tính hoặc âm tính; +: dương tính; + < ++ < +++ < ++++: mức độ dương tính*

Tại thời điểm D21 sau 7 ngày tiêm mũi thứ 3, huyết thanh của cả 4 ngựa đều đã có đáp ứng kháng thể trong huyết thanh nhưng hàm lượng còn thấp. Hình 3.3A cho thấy đã có kháng thể ngưng kết với kháng nguyên nọc rắn nhưng chỉ ngưng kết yếu và vết ngưng kết chỉ (+). Đến D35 sau 7 ngày tiêm mũi thứ 5 thì hàm lượng kháng thể cả 4 ngựa thí nghiệm đều tăng lên, 2 ngựa số 2 và số 3 xuất hiện ngưng kết (+), 2 ngựa số 1 và số 4 mức độ ngưng kết tăng lên (++), kết quả thể hiện rõ khi vết ngưng kết rõ ràng và đậm dần (Hình 3.3B). Ở D49 tức sau tiêm mũi 7 thì chỉ có ngựa số 2 ngưng kết (++)

còn 3 ngựa số 1, 3 và 4 đều có ngưng kết tương đối đậm (+++), vết ngưng kết đậm nét và dày lên (Hình 3.3C).



Hình 3.3. Kết quả ngưng kết trên thạch với mẫu huyết thanh thô được gây miễn dịch với nọc rắn Cạp nia Bắc của 4 ngựa thí nghiệm nhóm 1 ở các ngày (A: ngày D21; B: ngày D35 và C: ngày D49).

### 3.2.3.2. Phác đồ miễn dịch 2

Kết quả đánh giá khả năng đáp ứng kháng thể của 4 ngựa sau khi gây miễn dịch tại các ngày D21, D35, D49 và D70 ở phác đồ miễn dịch 2 được trình bày ở Bảng 3.6.

Bảng 3.6. Đáp ứng miễn dịch của 4 ngựa nhóm 2 sau khi tiêm nọc rắn Cạp nia Bắc

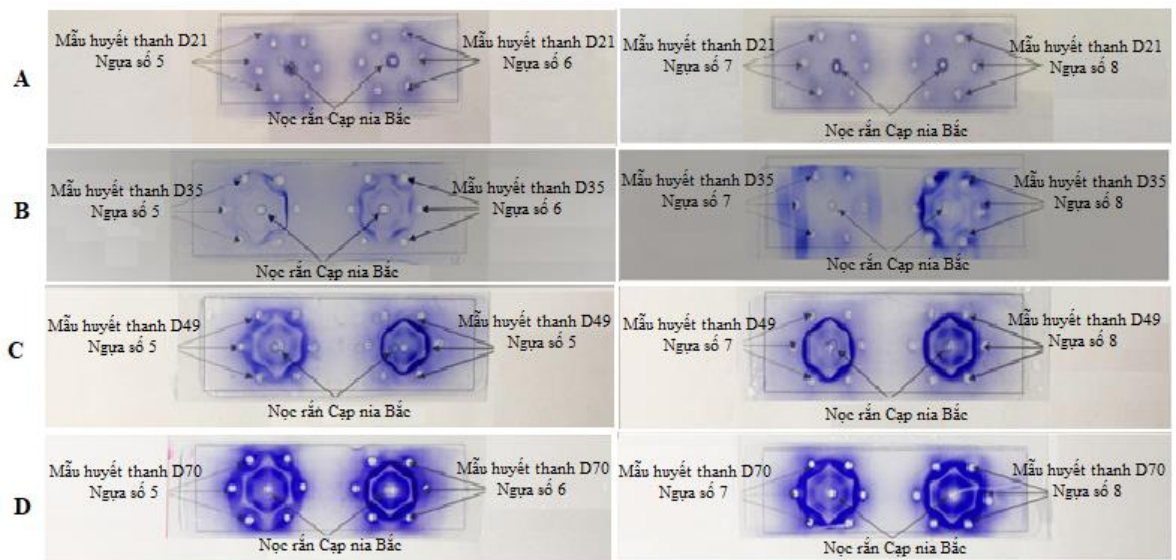
Ngựa thí nghiệm số	Kết quả ngưng kết			
	D21	D35	D49	D70
5	-	±	+	++++
6	-	+	++	++++
7	-	-	++	++++
8	-	+	+++	++++

Ghi chú: - : âm tính; ±: có thể dương tính hoặc âm tính; +: dương tính;

+ < ++ < +++ < ++++ < +++++: mức độ dương tính



Ở phác đồ miễn dịch 2, tại thời điểm D21 sau 7 ngày tiêm mũi thứ 3, kết quả đánh giá cho thấy huyết thanh thô của cả 4 ngựa đều không có kháng thể để ngưng kết với nọc rắn Cạp nia Bắc (Hình 3.4A), như vậy sau 21 ngày tiêm cả 4 ngựa chưa có đáp ứng kháng thể (âm tính). Đến D35 sau 7 ngày tiêm mũi thứ 5, có 2 ngựa số 6 và số 8 đã có kháng thể trong huyết thanh thô cho ngưng kết với nọc rắn Cạp nia Bắc (+), ngựa số 5 có kháng thể thấp hơn cho ngưng kết yếu với nọc rắn Cạp nia Bắc ( $\pm$ ). Trong khi đó ngựa số 7 vẫn âm tính (-) chưa có kháng thể (Hình 3.4B). Ở D49 tức sau tiêm mũi 7 thì huyết thanh của cả 4 ngựa đều đã có kháng thể cho phản ứng dương tính với nọc rắn, trong đó ngựa số 8 có mức độ ngưng kết (+++), đến ngựa số 6 và 7 có mức độ ngưng kết (++) và ngựa số 5 có mức độ ngưng kết (+) yếu nhất trong 4 ngựa thử nghiệm (Hình 3.4C). So sánh với phác đồ miễn dịch 1, mẫu D49 của phác đồ 2 có đáp ứng miễn dịch thấp hơn, nhưng sau 7 ngày tiêm mũi 10 (D70) tất cả 4 ngựa đều có ngưng kết rất đậm (++++) , vết ngưng kết rất đậm nét và dày lên (Hình 3.4D).



Hình 3.4. Kết quả ngưng kết mẫu huyết thanh thô được gây miễn dịch với nọc rắn Cạp nia Bắc của 4 ngựa nhóm 2 ở các ngày (A: ngày D21; B: ngày D35; C: ngày D49 và D: ngày D70).

Các kết quả trên cho thấy cả 2 phác đồ miễn dịch được thí nghiệm trên 2 lô ngựa đều cho đáp ứng miễn dịch và có khả năng sinh kháng thể. Huyết thanh thô thu được đã ngưng kết với nọc rắn Cạp nia Bắc. Có sự khác biệt về

thời gian đáp ứng (nhANH, chậm) và mức độ đáp ứng miễn dịch (mẠnh, yếu) giữa các ngựa trên cùng 1 lô ngựa thí nghiệm, điều này cho thấy rằng đáp ứng miễn dịch trên động vật phụ thuộc vào thể chất và cơ địa của từng cá thể. Từ kết quả đánh giá cho thấy: 4 ngựa nhóm 1 được gây miễn dịch với phác đồ miễn dịch 1, tiêm với liều cao kháng nguyên nọc rắn Cạp nia Bắc đã cho kết quả là thời gian đáp ứng miễn dịch nhanh hơn và mức độ đáp ứng miễn dịch mạnh hơn (Hình 3.3) so với 4 ngựa nhóm 2 được gây miễn dịch với phác đồ miễn dịch 2, với liều tiêm miễn dịch kháng nguyên nọc rắn Cạp nia Bắc thấp thì thời gian đáp ứng chậm và có mức độ đáp ứng miễn dịch yếu hơn ở các ngày D21, D35 và D49 nhưng sang ngày D70 đáp ứng miễn dịch rất mạnh (Hình 3.4). Điều này cho thấy hàm lượng nọc rắn đưa vào gây miễn dịch cũng là yếu tố đáng xem xét trên 2 khía cạnh là đáp ứng miễn dịch và sức khỏe ngựa thí nghiệm.

### 3.2.4. Kết quả đánh giá hiệu giá kháng thể trung hòa của 2 phác đồ miễn dịch trên ngựa qua 4 chu kỳ khai thác

#### 3.2.4.1. Kết quả đánh giá hiệu giá kháng thể trung hòa của phác đồ miễn dịch 1

Bảng 3.7. Kết quả hiệu giá kháng thể kháng nọc rắn Cạp nia Bắc bằng thử nghiệm trung hòa trên chuột nhắt của 4 ngựa thí nghiệm nhóm 1 qua 4 chu kỳ khai thác huyết thanh thô

Chu kỳ khai thác	Hiệu giá kháng thể kháng nọc rắn Cạp nia Bắc (LD <sub>50</sub> /ml)			
	Ngựa 1	Ngựa 2	Ngựa 3	Ngựa 4
Chu kỳ 1	145,1	49,8	78,2	122,7
Chu kỳ 2	↓ 87,0	↓ 28,1	↓ 63,1	↓ 60,2
Chu kỳ 3	↓ 75,2	↑ 37,6	↓ 61,7	↑ 85,1
Chu kỳ 4	↑ 82,9	↑ 38,1	↓ 52,8	↑ 96,6

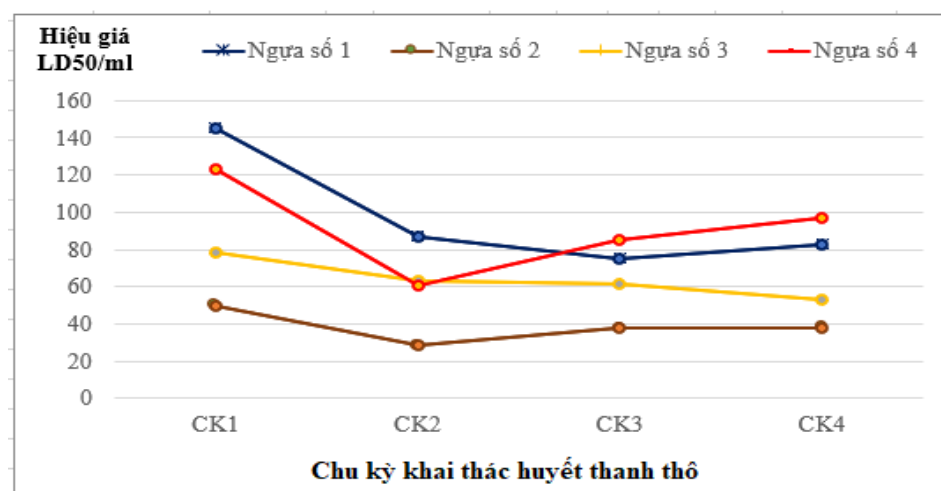
Ghi chú: ↓: giảm so với chu kỳ trước đó; ↑: tăng so với chu kỳ trước đó

Kết quả ở bảng 3.7 cho thấy hiệu giá kháng thể kháng nọc rắn Cạp nia Bắc của huyết thanh ngựa sau 10 ngày tiêm miễn dịch mũi 8 (chu kỳ 1 lấy máu) với nọc rắn Cạp nia Bắc trên chuột của 4 ngựa thí nghiệm từ thấp đến cao lần lượt là 49,8 LD<sub>50</sub>/ml ngựa số 2; 78,2 LD<sub>50</sub>/ml ngựa số 3; 122,7 LD<sub>50</sub>/ml ngựa số 4 và 145,1 LD<sub>50</sub>/ml ngựa số 1. Hiệu giá kháng thể kháng nọc rắn Cạp nia Bắc của cả 4 ngựa thử nghiệm giảm mạnh sau khi tiêm miễn dịch nhắc lại và lấy máu chu kỳ 2, trong đó ngựa số 4 giảm hơn 50,9% từ 122,7 LD<sub>50</sub>/ml xuống còn 60,2 LD<sub>50</sub>/ml, tiếp theo là ngựa số 2 giảm 43,6% từ 49,8 LD<sub>50</sub>/ml xuống còn 28,1 LD<sub>50</sub>/ml, ngựa số 1 giảm 40% từ 145,1 LD<sub>50</sub> xuống còn 87,0 LD<sub>50</sub>/ml, cuối cùng ngựa số 3 giảm nhẹ 19,3% từ 78,2 LD<sub>50</sub>/ml xuống 63,1 LD<sub>50</sub>/ml.

Ở chu kỳ khai thác thứ 3 sau khi miễn dịch nhắc lại có 2 ngựa hiệu giá kháng thể kháng nọc rắn Cạp nia Bắc tăng lên so với chu kỳ khai thác thứ 2: ngựa số 2 tăng 33,8% từ 28,1 LD<sub>50</sub>/ml lên 37,6 LD<sub>50</sub>/ml và ngựa số 4 tăng lên 41,4% từ 60,2 LD<sub>50</sub>/ml lên 85,1 LD<sub>50</sub>/ml. Trong khi đó ngựa số 1 tiếp giảm thêm 13,6% từ 87,0 LD<sub>50</sub>/ml xuống 75,2 LD<sub>50</sub>/ml và ngựa số 3 tiếp tục giảm nhẹ 2,2% từ 63,1 LD<sub>50</sub>/ml xuống 61,7 LD<sub>50</sub>/ml.

Ở chu kỳ khai thác thứ 4 có 3 ngựa có hiệu giá kháng thể tăng so với chu kỳ trước đó, cao nhất là ngựa số 4 tăng 13,5% từ 85,1 LD<sub>50</sub>/ml lên 96,6 LD<sub>50</sub>/ml, đến ngựa số 1 tăng 10,2% từ 75,2 LD<sub>50</sub>/ml lên 82,9 LD<sub>50</sub>/ml và ngựa số 2 tăng nhẹ 1,3% từ 37,6 LD<sub>50</sub>/ml lên 38,1 LD<sub>50</sub>/ml. Ở chu kỳ này chỉ có ngựa số 3 tiếp tục giảm thêm 14,4% từ 61,7 LD<sub>50</sub>/ml xuống còn 52,8 LD<sub>50</sub>/ml. Biểu đồ theo dõi sự biến thiên của hiệu giá kháng thể trên chuột qua 4 chu kỳ khai thác huyết thanh thô của 4 ngựa gây miễn dịch với phác đồ miễn dịch 1 được trình bày ở Hình 3.5.

Như vậy, nhóm ngựa gây miễn dịch với phác đồ miễn dịch 1 cho thấy tất cả 4 ngựa đều có hiệu giá kháng thể giảm (từ 19,3% đến 50,9%) ở chu kỳ khai thác thứ 2, hiệu giá kháng thể của ngựa được tiêm miễn dịch nhắc lại có tăng nhưng không cao (từ 1,3% đến 41,4%) và duy trì ở mức thấp (từ 37,6 LD<sub>50</sub>/ml đến 96,6 LD<sub>50</sub>/ml) từ chu kỳ 3 trở đi.



Hình 3.5. Sự biến thiên của hiệu giá kháng thể kháng nọc rắn Cạp nia Bắc trên chuột nhắt qua 4 chu kỳ khai thác huyết thanh thô của 4 ngựa được miễn dịch với phác đồ 1.

#### 3.2.4.2. Kết quả đánh giá hiệu giá kháng thể trung hòa của phác đồ miễn dịch 2 (nhóm 2)

Kết quả ở bảng 3.8 cho thấy 4 ngựa nhóm 2 được gây miễn dịch với phác đồ 2 sau mũi tiêm thứ 11 cho hiệu giá trung hòa trên chuột tương đối cao ở chu kỳ 1 khai thác huyết thanh thô, trong đó ngựa số 6 có hiệu giá kháng thể cao nhất là 251,8 LD<sub>50</sub>/ml, tiếp đến ngựa số 8 hiệu giá 203,6 LD<sub>50</sub>/ml, ngựa số 7 là 187,2 LD<sub>50</sub>/ml và thấp nhất ngựa số 5 hiệu giá 147,6 LD<sub>50</sub>/ml.

Bảng 3.8. Kết quả hiệu giá kháng thể kháng nọc rắn Cạp nia Bắc bằng thử nghiệm trung hòa trên chuột nhắt của 4 ngựa thí nghiệm nhóm 2 qua 4 chu kỳ khai thác huyết thanh thô

Chu kỳ khai thác	Hiệu giá kháng thể kháng nọc rắn Cạp nia Bắc (LD <sub>50</sub> /ml)			
	Ngựa 5	Ngựa 6	Ngựa 7	Ngựa 8
Chu kỳ 1	147,6	251,8	187,2	203,6
Chu kỳ 2	↓ 46,5	↓ 165,2	↓ 146,3	↓ 165,2
Chu kỳ 3	↓ 36,9	↑ 209,1	↑ 273,0	↓ 92,3
Chu kỳ 4	↑ 99,0	↓ 206,0	↑ 337,6	↑ 106,7

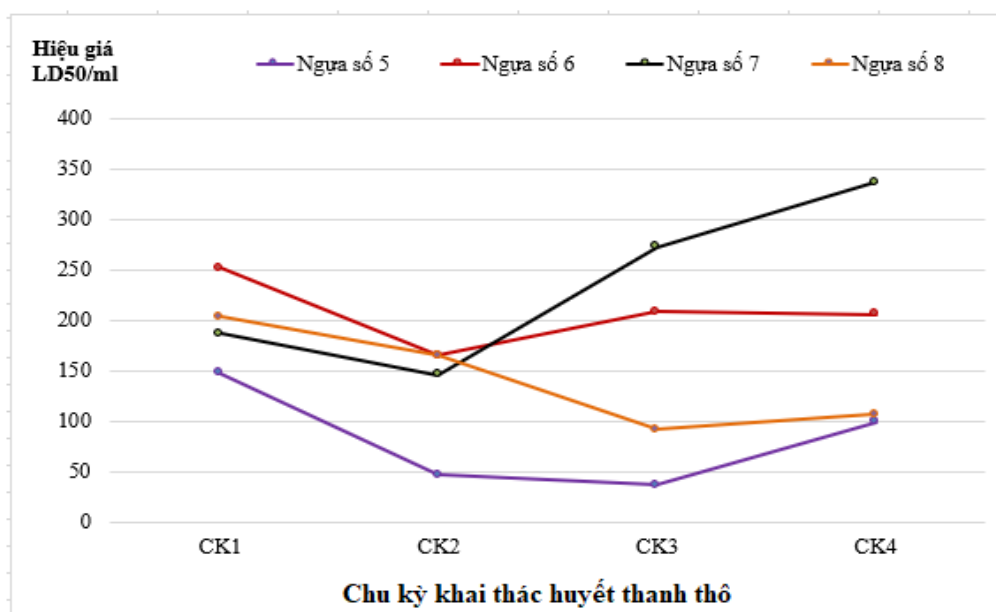
Ghi chú: ↓: giảm so với chu kỳ trước đó; ↑: tăng so với chu kỳ trước đó

Sau 3 mũi miễn dịch nhắc lại, hiệu giá kháng thể kháng nọc rắn Cạp nia Bắc của chu kỳ khai thác thứ 2 cả 4 ngựa thí nghiệm đều giảm trong đó ngựa số 5 giảm mạnh nhất 68,5% từ 147,6 LD<sub>50</sub>/ml xuống 46,5 LD<sub>50</sub>/ml, ngựa số 6 giảm 34,4% từ 251,8 LD<sub>50</sub>/ml xuống 165,2 LD<sub>50</sub>/ml, ngựa số 7 giảm 21,8% từ 187,2 LD<sub>50</sub>/ml xuống 146,3 LD<sub>50</sub>/ml và ngựa số 8 giảm 18,9% từ 203,6 LD<sub>50</sub>/ml xuống còn 165,2 LD<sub>50</sub>/ml.

Ở chu kỳ khai thác thứ 3 có 2 ngựa hiệu giá kháng thể tiếp tục giảm so với chu kỳ trước đó là ngựa số 8 giảm 44,3% từ 165,2 LD<sub>50</sub>/ml xuống 92,3 LD<sub>50</sub>/ml và ngựa số 5 giảm 20,4% từ 46,5 LD<sub>50</sub>/ml xuống 36,9 LD<sub>50</sub>/ml. Trong khi đó 2 ngựa còn lại có hiệu giá kháng thể tăng, ngựa số 7 có hiệu giá tăng cao nhất 86,6% từ 146,3 LD<sub>50</sub>/ml lên 273,0 LD<sub>50</sub>/ml, ngựa số 6 tăng 26,5% từ 165,2 LD<sub>50</sub>/ml lên 209,1 LD<sub>50</sub>/ml.

Đến chu kỳ khai thác thứ 4 hiệu giá kháng thể ngựa số 5 tăng cao nhất 167,6% so với chu kỳ trước đó từ 36,9 LD<sub>50</sub>/ml lên 99,0 LD<sub>50</sub>/ml, tiếp đến là ngựa số 7 tăng 23,7% từ 273,0 LD<sub>50</sub>/ml lên 337,6 LD<sub>50</sub>/ml và ngựa số 8 tăng ít nhất 16,0% từ 92,3 LD<sub>50</sub>/ml lên 106,7 LD<sub>50</sub>/ml. Trong khi đó ngựa số 6 giảm không đáng kể từ 209,1 LD<sub>50</sub>/ml xuống 206,0 LD<sub>50</sub>/ml. Biểu đồ theo dõi sự biến thiên của hiệu giá kháng thể trên chuột qua 4 chu kỳ khai thác huyết thanh thô của 4 ngựa gây miễn dịch với phác đồ miễn dịch 2 được trình bày ở Hình 3.6.

Như vậy, ở nhóm ngựa gây miễn dịch với phác đồ miễn dịch 2 cho thấy tất cả 4 ngựa đều có hiệu giá kháng thể giảm ở chu kỳ khai thác thứ 2 (từ 18,9% đến 68,5%). Sang chu kỳ khai thác thứ 3 có sự biến động hiệu giá kháng thể: 50% ngựa có hiệu giá kháng thể tăng lên (từ 26,6% đến 86,6%) và 50% số ngựa còn lại hiệu giá kháng thể tiếp tục giảm (từ 20,6% đến 44,1%). Đến chu kỳ khai thác thứ 4 hiệu giá kháng thể của cả 4 ngựa tăng (từ 16,0% đến 167,6%) và duy trì ở mức khá cao (từ 99,0 LD<sub>50</sub>/ml đến 337,6 LD<sub>50</sub>/ml).

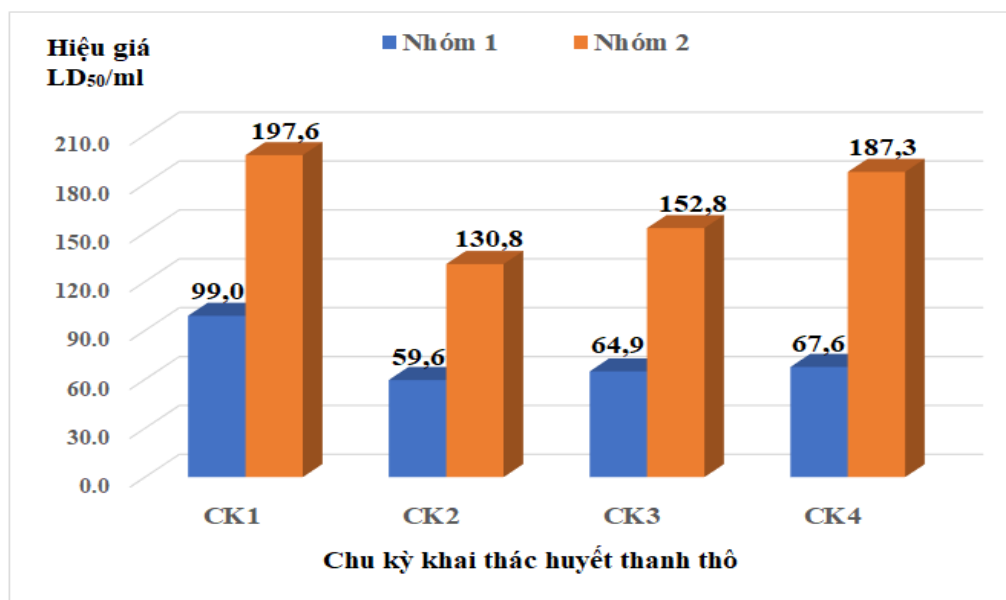


Hình 3.6. Sự biến thiên của hiệu giá kháng thể kháng nọc rắn Cạp nia Bắc trên chuột nhắt qua 4 chu kỳ khai thác huyết thanh thô của 4 ngựa gây miễn dịch với phác đồ miễn dịch 2.

Ở cả 2 phác đồ miễn dịch tất cả các ngựa có hiệu giá kháng thể kháng nọc rắn Cạp nia Bắc giảm mạnh sau khi tiêm miễn dịch nhắc lại để lấy máu khai thác ở chu kỳ 2, sang chu kỳ khai thác thứ 3 có ngựa tiếp tục giảm nhưng một số ngựa tăng trở lại (Hình 3.5 và 3.6). Kết quả này cho thấy sự ảnh hưởng của việc khai thác huyết thanh thô khi ngựa mới đưa vào sản xuất đã tác động lên sức khỏe và thể chất của ngựa sau chu kỳ lấy máu thứ nhất, do đó đã ảnh hưởng đến đáp ứng miễn dịch của ngựa sau khi tiêm miễn dịch nhắc lại, làm giảm hàm lượng kháng thể trong huyết thanh thô ở chu kỳ lấy máu thứ 2. Sang chu kỳ 3 ngựa dần thích nghi và cho đáp ứng miễn dịch tốt hơn, dẫn đến hiệu giá kháng thể dần tăng trở lại sau chu kỳ khai thác thứ 3 và thứ 4.

Đánh giá hiệu quả đáp ứng miễn dịch của phác đồ miễn dịch 1 và phác đồ miễn dịch 2 trên 2 nhóm ngựa thí nghiệm qua 4 chu kỳ khai thác được thể hiện ở Hình 3.7. Hiệu giá trung bình  $LD_{50}/ml$  của 4 ngựa ở 4 chu kỳ khai thác huyết thanh thô của nhóm ngựa thí nghiệm 2 cao hơn nhiều so với nhóm ngựa thí nghiệm 1 lần lượt từ chu kỳ 1 đến chu kỳ 4 là 197,6/99,0; 130,8/59,6; 152,8/64,9 và 189,3/67,6. Kết quả này cho thấy với phác đồ miễn dịch 2 với 11 mũi tiêm miễn dịch với liều kháng nguyên thấp cho kết quả đáp ứng miễn dịch tốt hơn, có hiệu giá kháng thể kháng nọc rắn Cạp nia Bắc cao hơn phác

đồ miễn dịch 1 được gây miễn dịch 8 mũi tiêm với liều gây miễn dịch cao hơn. So sánh với kết quả nghiên cứu sản xuất huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nong (*Bungarus faciatus*) cùng nhóm đối tượng nọc độc thần kinh với phác đồ 4 mũi tiêm liều cao [70], thì kết quả chúng tôi thu được có hiệu giá kháng thể tốt hơn.



Hình 3. 7. Hiệu giá kháng thể trung bình của 2 nhóm ngựa thí nghiệm (nhóm 1 miễn dịch 8 mũi, nhóm 2 miễn dịch 11 mũi) sau 4 chu kỳ khai thác huyết thanh thô.

### 3.2.5. Kết quả đánh giá sức khỏe ngựa của 2 phác đồ miễn dịch trên ngựa qua 4 chu kỳ khai thác

#### 3.2.5.1. Phản ứng phụ tại vị trí tiêm

Kết quả ở bảng 3.9 cho thấy tất cả các ngựa thí nghiệm được gây miễn dịch với phác đồ miễn dịch 1 đều bị áp xe nặng với vết tiêm sưng to, tạo mủ tại chu kỳ lấy máu thứ 1. Sang chu kỳ lấy máu thứ 2 có 3 ngựa vẫn còn áp xe nặng (ngựa số 1, 3 và 4), ngựa số 2 vết áp xe đã giảm chỉ còn bị sưng nhỏ tại vị trí tiêm. Ở chu kỳ lấy máu thứ 3 chỉ một ngựa số 4 vị trí tiêm bị áp xe nặng, còn ngựa số 1, 2 và 3 chỉ còn áp xe nhẹ. Đến chu kỳ khai thác thứ 4 không có ngựa nào bị áp xe nặng, chỉ còn áp xe nhẹ ở vị trí tiêm. Trong khi đó tất cả các ngựa được tiêm miễn dịch với phác đồ miễn dịch 2 đều bị áp xe nặng với vết tiêm sưng to, tạo mủ tại các chu kỳ lấy máu 1, 2 và 3; sang chu kỳ 4 có ngựa số 8 tình trạng áp xe nhẹ hơn, tại vị trí tiêm bị sưng nhỏ không có mủ, 3

ngựa còn lại vẫn tình trạng áp xe nặng. Điều này cho thấy ở phác đồ miễn dịch 2 với 3 mũi tiêm miễn dịch nhắc lại và thời gian nghỉ giữa 2 mũi tiêm ngắn (4 ngày) đã ảnh hưởng đến phản ứng tại vị trí tiêm và gây ra hiện tượng áp xe kéo dài.

Bảng 3.9 Kết quả sức khỏe của 2 nhóm ngựa thí nghiệm qua 4 chu kỳ khai thác.

Ngựa số	Chu kỳ 1			Chu kỳ 2			Chu kỳ 3			Chu kỳ 4		
	Vị trí tiêm (áp xe)	Htc (%)	Thế trạng	Vị trí tiêm (áp xe)	Htc (%)	Thế trạng	Vị trí tiêm (áp xe)	Htc (%)	Thế trạng	Vị trí tiêm (áp xe)	Htc (%)	Thế trạng
1	nặng	31	BT	nặng	27	BT	nhẹ	35	BT	nhẹ	39	SN
2	nặng	28	BT	nhẹ	35	BT	nhẹ	32	BT	nhẹ	34	BT
3	nặng	25	BT	nặng	28	BT	nhẹ	32	BT	nhẹ	38	BT
4	nặng	36	BT	nặng	35	BT	nặng	30	SN	nhẹ	41	BT
5	nặng	33	BT	nặng	30	BT	nặng	30	BT	nặng	36	BT
6	nặng	28	BT	nặng	25	BT	nặng	31	BT	nặng	28	BT
7	nặng	27	BT	nặng	30	BT	nặng	33	BT	nặng	32	SN
8	nặng	25	BT	nặng	29	BT	nặng	30	BT	nhẹ	26	BT

Ghi chú: BT: bình thường; áp xe nặng là sưng to, tạo mủ; áp xe nhẹ là tại vị trí tiêm bị sưng nhỏ hoặc viêm không đáng kể; SN: sốt nhẹ (38,5 – 39,0 °C).



### 3.2.5.2. Thể trạng ngựa

Cả 2 nhóm ngựa thí nghiệm 1 và 2 ở các chu kỳ lấy máu thứ 1, 2, 3 và 4 không có hiện tượng bất thường xảy ra như sốt cao ( $> 39^{\circ}\text{C}$ ), ngựa bỏ ăn, hoạt động kém linh hoạt. Đủ điều kiện để lấy máu khai thác huyết thanh thô.

### 3.5.2.3. Chỉ số hematocrit

Chỉ số hematocrit của 4 ngựa thí nghiệm nhóm 1 và 4 ngựa thí nghiệm nhóm 2 tại các chu kỳ lấy máu 1, 2, 3 và 4 không có sự biến động lớn và nằm trong tiêu chuẩn cho phép ( $25\% \div 46\%$ ) của quy trình chuẩn khai thác huyết thanh thô trên ngựa ở Viện Vắc xin và sinh phẩm Y tế đủ điều kiện để lấy máu sản xuất.

### 3.2.6. Thu nhận huyết thanh thô kháng nọc rắn Cạp nia Bắc

#### 3.2.6.1. Với phác đồ miễn dịch 1

Bảng 3.10. Số lượng huyết thanh thô khai thác của ngựa nhóm 1 sau 4 chu kỳ

Chu kỳ	Số lượng huyết tương (lít)	Hiệu giá kháng thể trung bình, n = 4 ( $\text{LD}_{50}/\text{ml}$ )	Đánh giá cảm quan	Kết quả kiểm tra vô trùng (KPH)
CK1	5,0	99,0	Đạt	KPH
CK2	15,5	59,6	Đạt	KPH
CK3	16,8	64,9	Đạt	KPH
CK4	16,6	67,6	Đạt	KPH
	53,9 (Tổng)	$71,3 \pm 17,8$ (trung bình)	Đạt	KPH

*Ghi chú: KPH - không phát hiện Vi sinh vật*

Kết quả khai thác huyết thanh thô kháng nọc rắn Cạp nia Bắc của 4 ngựa nhóm 1 gây miễn dịch theo phác đồ miễn dịch 1 được trình bày ở Bảng 3.10. Ở chu kỳ khai thác thứ 1 với tỷ lệ lấy máu 1% theo trọng lượng cơ thể và lấy 1 lần nên thể tích huyết thanh thô thu được 5,0 lít. Từ chu kỳ lấy máu thứ 2 trở đi mỗi chu kỳ lấy 2 lần với tỷ lệ lần 1 bằng 1,5% và lần 2 bằng 1,2%

theo trọng lượng cơ thể ngựa, thể tích huyết thanh thô thu được ổn định từ chu kỳ 2 đến chu kỳ 4 (từ 15,5 lít đến 16,8 lít). Tổng thể tích huyết thanh thô sau 4 chu kỳ khai thác đạt 53,9 lít và hiệu giá trung bình đạt  $71,3 \pm 17,8$  LD<sub>50</sub>/ml. Huyết thanh thô thu được đạt tiêu chuẩn về cảm quan là có màu vàng rom; trong suốt, không bị vẩn đục; không vật lạ; sánh keo; có một lớp mỏng dưới đáy bình. Huyết thanh thô đạt tiêu chuẩn vô trùng (không có sự phát triển của vi khuẩn/nấm sau 14 ngày theo dõi).

### 3.2.6.2. Với phác đồ miễn dịch 2

Kết quả khai thác huyết thanh thô kháng nọc rắn Cạp nia Bắc của 4 ngựa nhóm 2 gây miễn dịch theo phác đồ miễn dịch 2 được trình bày ở Bảng 3.11. Ở chu kỳ khai thác thứ 1 thể tích huyết thanh thô thu được 5,5 lít. Thể tích huyết thanh thô thu được ổn định từ chu kỳ 2 đến chu kỳ 4 (từ 14,5 lít đến 16,5 lít). Tổng thể tích huyết thanh thô sau 4 chu kỳ khai thác đạt 52,5 lít và hiệu giá trung bình đạt  $164,9 \pm 30,9$  LD<sub>50</sub>/ml. Huyết thanh thô thu được đạt tiêu chuẩn về cảm quan là có màu vàng rom; trong suốt, không bị vẩn đục; không vật lạ; sánh keo; có một lớp mỏng dưới đáy bình. Huyết thanh thô đạt tiêu chuẩn vô trùng (không có sự phát triển của vi khuẩn/nấm sau 14 ngày theo dõi).

Bảng 3.11. Số lượng huyết thanh thô khai thác của ngựa nhóm 2 sau 4 chu kỳ

Chu kỳ	Số lượng huyết tương (lít)	Hiệu giá kháng thể trung bình, n = 4 (LD <sub>50</sub> /ml)	Đánh giá cảm quan	Kết quả kiểm tra vô trùng (KPH)
CK1	5,5	197,6	Đạt	KPH
CK2	14,5	130,8	Đạt	KPH
CK3	16,0	152,8	Đạt	KPH
CK4	16,5	187,3	Đạt	KPH
Tổng	52,3 (tổng)	$164,9 \pm 30,9$ (trung bình)	Đạt	KPH

*Ghi chú: KPH - không phát hiện Vi sinh vật*

Số lượng huyết thanh thô thu được của nhóm 1 và nhóm 2 với thể tích gần bằng nhau, nhưng hiệu giá trung bình huyết thanh thu được của nhóm 2 cao hơn hiệu giá trung bình huyết thanh thu được của nhóm 1 là 2,3 lần. Kết quả này cho thấy phác đồ miễn dịch 2 cho đáp ứng miễn dịch tốt và hiệu quả hơn phác đồ miễn dịch 1.

Bảng 3. 12. Tổng hợp đánh giá các chỉ số giữ 2 phác đồ miễn dịch trên ngựa

Các chỉ số	Phác đồ miễn dịch 1, n = 4	Phác đồ miễn dịch 2, n = 4	Đánh giá (PD1/PD2)
Phản ứng phụ tại vị trí tiêm (số ngựa áp xe nặng/ số ngựa áp xe nhẹ)	- CK1: 4/0 - CK2: 3/1 - CK3: 1/3 - CK4: 0/4	- CK1: 4/0 - CK2: 4/0 - CK3: 4/0 - CK4: 3/1	Phản ứng tại vị trí tiêm ở phác đồ miễn dịch 1 nhẹ hơn phác đồ miễn dịch 2
Thể trạng ngựa (sốt, bỏ ăn, hoạt động)	Không sốt, không bỏ ăn, hoạt động bình thường	Không sốt, không bỏ ăn, hoạt động bình thường	Giống nhau
Hematocrit (%)	25% ÷ 41%	25% ÷ 36%	Không có khác biệt, ở trong tiêu chuẩn cho phép (25% ÷ 46%)
Hiệu giá kháng thể trung bình 4 chù kỳ khai thác (LD <sub>50</sub> /ml)	71,3 ± 17,8	164,9 ± 30,9	PD2 > PD1 (164,9/71,3=2,3 lần)
Tổng thể tích huyết thanh thô khai thác 4 chù kỳ (lít)	53,9	52,5	Xấp xỉ ngang nhau

Đánh giá chung: Có 2 chỉ số khác biệt giữa phác đồ miễn dịch 1 và 2: thứ nhất là chỉ số phản ứng phụ tại vị trí tiêm của ngựa được gây miễn dịch bởi phác đồ miễn dịch 1 nhẹ hơn so với ngựa được gây miễn dịch bởi phác đồ miễn dịch 2 qua 4 chu kỳ khai thác; thứ 2 là hiệu giá kháng thể kháng nọc rắn Cạp nia Bắc ( $LD_{50}/ml$ ) của phác đồ miễn dịch 2 cao hơn phác đồ miễn dịch 1: 2,3 lần, đạt giá trị trung bình  $164,9 \pm 30,9 LD_{50}/ml$ . Trong khi đó chỉ số về thể trạng ngựa, hematocrit và thể tích huyết thanh thô khai thác không có sự khác biệt giữa 2 phác đồ miễn dịch. Kết quả này cho thấy phác đồ miễn dịch 2 hiệu quả hơn phác đồ miễn dịch 1, cần nhắc áp dụng phác đồ gây miễn dịch 2.

### 3.3. KẾT QUẢ TINH CHẾ HUYẾT THANH KHÁNG NỌC RẮN CẠP NIA BẮC

#### 3.3.1. Kết quả tinh chế 3 lô huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc quy mô 10 lít/lô, đánh giá tính phù hợp các thông số của quy trình

Ứng dụng quy trình tinh chế huyết thanh kháng nọc rắn đang áp dụng tại Viện Vắc xin và sinh phẩm Y tế, chúng tôi tiến hành tinh chế thử nghiệm 3 lô được đánh số Lô IVACAV-*Bun* -01/TN, Lô IVACAV-*Bun* -02/TN và Lô IVACAV-*Bun* -03/TN (IVACAV-*Bun* là bản quyền đăng ký nhãn hiệu hàng hóa) để đánh giá các thông số của quy trình tinh chế. Chất lượng huyết thanh thô sử dụng để đưa vào tinh chế 3 lô thử nghiệm được trình bày tại Bảng 3.13. Hiệu giá huyết thanh thô ban đầu đưa vào tinh chế từ 91,45  $LD_{50}/ml$  đến 96,89  $LD_{50}/ml$ .

Bảng 3.13. Chất lượng các lô huyết thanh thô đưa vào tinh chế quy mô 10 lít/lô

Tiêu chí	Lô IVACAV- <i>Bun</i> -01/TN	Lô IVACAV- <i>Bun</i> -02/TN	Lô IVACAV- <i>Bun</i> -03/TN
Hiệu giá huyết thanh thô ( $LD_{50}/ml$ )	96,89	91,45	93,40
Thể tích (lít)	10	10	10

Các bước tiến hành 3 lô tinh chế thử nghiệm ở quy mô 10 lít/lô với các thông số cụ thể của quy trình tinh chế được trình bày ở Bảng 3.14, Bảng 3.15

và Bảng 3.16. Nhóm nghiên cứu sử dụng hệ thống KvicK Lab dùng trong giai đoạn thẩm tích cho thí nghiệm này. Dựa trên kết quả đánh giá sản phẩm cuối cùng sau tinh chế của 3 lô thử nghiệm chúng tôi đánh giá tính phù hợp và hiệu quả của quy trình tinh chế đối với sản phẩm huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc.

Bảng 3.14. Các thông số quy trình tinh chế thử nghiệm 3 lô huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc giai đoạn pepsin hóa huyết thanh thô

Giai đoạn	Thông số quy trình	Tiêu chí kiểm soát quy trình lỗi của IVAC	Lô huyết thanh thô		
			IVACAV-Bun - 01/TN	IVACAV-Bun - 02/TN	IVACAV-Bun - 03/TN
Huyết thanh thô	Thể tích huyết thanh thô (lít)	NA	10	10	10
	Thể tích nước cất (lít)	NA	10	10	10
Pepsin hóa huyết thanh thô	Nhiệt độ dung dịch trong tank (°C)	30 – 32	32	32	32
	Khối lượng pepsin để đạt nồng độ 0,7 g/lít huyết thanh (g)	NA	7	7	7
	pH	3,2 – 3,3	3,24	3,21	3,24
	Thời gian pepsin hóa huyết thanh (phút)	30 ± 1	30	30	30

Ghi chú: NA: không áp dụng; IVACAV-Bun: là nhãn hiệu hàng hóa do Cục sở hữu trí tuệ cấp

Bảng 3.15. Các thông số quy trình tinh chế thử nghiệm 3 lô huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc giai đoạn tủa albumin và kháng thể

Giai đoạn	Thông số quy trình	Tiêu chí kiểm soát quy trình lõi của IVAC	Lô huyết thanh thô		
			IVACAV- <i>Bun</i> - 01/TN	IVACAV- <i>Bun</i> - 02/TN	IVACAV- <i>Bun</i> - 03/TN
Tủa albumin và những protein không cần thiết	Khối lượng ammonium sulfate (%)	14	14	14	14
	Nhiệt độ (°C)	56 ± 1	56,5	55,8	56,2
	pH	4,2 – 4,3	4,23	4,22	4,25
	Thể tích acid octanoic (ml)	0,1 – 0,2%	0,15	0,15	0,15
	Thời gian ủ (phút)	60 ± 1	60	60	60
Kết tủa kháng thể	Khối lượng ammonium sulfate (%)	16	16	16	16
	pH	6,5 – 6,6	6,57	6,53	6,59
	Nhiệt độ dung dịch	22 ± 2°C	23°C	22,5°C	22,8°C
	Thời gian tủa kháng thể (giờ)	10 – 12	11 giờ phút	10 giờ 55 phút	11 giờ 10 phút

Bảng 3.16. Các thông số quy trình tinh chế thử nghiệm 3 lô huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc giai đoạn thẩm tích, hấp phụ và lọc vô trùng

Giai đoạn	Thông số quy trình	Tiêu chí kiểm soát quy trình lõi của IVAC	Lô huyết thanh thô		
			IVACAV-Bun - 01/TN	IVACAV-Bun - 02/TN	IVACAV-Bun - 03/TN
Thẩm Tích	Dạng kháng thể	Kết tủa	Kết tủa	Kết tủa	Kết tủa
	Hoàn nguyên kháng thể (kháng thể: nước cất)	1:6 đến 1:8	1:7	1:7	1:7
	Nước cất (lít)	NA	30	30	30
	Dung dịch NaCl 0,2 – 0,3% (lít)	NA	40	40	40
	Thời gian chạy mỗi chu trình (phút)	20 – 60	25	25	25
	Nhiệt độ °C	22 – 30	28	28	28
Hấp phụ	Al(OH) <sub>3</sub> (%)	3 – 5	3	3	3
	Nhiệt độ °C	56 ± 1	56	56	56
	Thời gian (phút)	60	60	60	60
	Ly tâm (vòng/ phút)	4000	4000	4000	4000
Làm đẳng trương và lọc vô trùng	Dung dịch NaCl (%)	0,85– 0,9	0,85	0,85	0,86
	pH	6,5 ± 0,5	6,54	6,6	6,56
	Lọc vô trùng bằng cột lọc có kích thước lỗ lọc (µm)	0,22	0,22	0,22	0,22

Kết quả kiểm tra chất lượng của các lô huyết thanh sau tinh chế thử nghiệm quy mô nhỏ được thể hiện tại bảng 3.17.

Bảng 3.17. Kết quả đánh giá chất lượng của 3 lô huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc tinh chế thử nghiệm.

TT	Chi tiêu	Tiêu chuẩn huyết thanh kháng nọc rắn IVAC đăng ký với Bộ Y tế	Kết quả 3 lô huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc tinh chế thử nghiệm		
			IVACAV-Bun-01/TN	IVACAV-Bun-02/TN	IVACAV-Bun-03/TN
1	Cảm quan	Dung dịch trong suốt, có màu vàng nhạt,	Có màu vàng nhạt, trong suốt	Có màu vàng nhạt, trong suốt	Có màu vàng nhạt, trong suốt
2	Vô khuẩn	Không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm sau 14 ngày theo dõi	Không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm sau 14 ngày theo dõi	Không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm sau 14 ngày theo dõi	Không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm sau 14 ngày theo dõi
3	Protein (mg/ml)	$\leq 150$	100,34	96,72	98,54
4	Hiệu giá (LD <sub>50</sub> /ml)	$\geq 200$	458,78	427,45	443,82
5	An toàn chung	Sau ít nhất 7 ngày theo dõi, toàn bộ chuột khỏe mạnh, tăng trọng và không có biểu hiện bệnh lý hoặc nhiễm độc	Toàn bộ chuột thí nghiệm đều khỏe mạnh, tăng trọng lượng và không có biểu hiện bệnh lý hoặc nhiễm độc sau 7 ngày theo dõi	Toàn bộ chuột thí nghiệm đều khỏe mạnh, tăng trọng lượng và không có biểu hiện bệnh lý hoặc nhiễm độc sau 7 ngày theo dõi	Toàn bộ chuột thí nghiệm đều khỏe mạnh, tăng trọng lượng và không có biểu hiện bệnh lý hoặc nhiễm độc sau 7 ngày theo dõi
6	Chất gây sốt	Không có chất gây sốt	Không có chất gây sốt	Không có chất gây sốt	Không có chất gây sốt
7	Độ tinh sạch	Không phát hiện có Albumin trên điện di SDS-PAGE	Không phát hiện có band albumin trên hình ảnh điện di SDS-PAGE	Không phát hiện có band albumin trên hình ảnh điện di SDS-PAGE	Không phát hiện có band albumin trên hình ảnh điện di SDS-PAGE



Kết quả tại bảng 3.17 cho thấy: 7 chỉ tiêu đánh giá chất lượng của 03 lô huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc được tinh chế thử nghiệm theo quy trình tinh chế huyết thanh kháng nọc rắn Lục tre/Hổ đất đạt yêu cầu theo tiêu chuẩn huyết thanh tinh chế, cụ thể:

- Chỉ tiêu cảm quan: dung dịch mẫu huyết thanh sau tinh chế của 3 lô IVACAV-*Bun-01/TN*, IVACAV-*Bun-02/TN*, IVACAV-*Bun-03/TN* có màu vàng nhạt, không xuất hiện cặn, tủa, đạt yêu cầu về tiêu chuẩn chất lượng theo Dược điển Việt Nam V, 2018.

- Vô trùng: Cả 3 lô thí nghiệm không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm sau 14 ngày theo dõi. Đạt về tiêu chuẩn vô trùng.

- Chỉ tiêu hàm lượng protein: Hàm lượng protein của 3 lô huyết thanh IVACAV-*Bun-01/TN*, IVACAV-*Bun-02/TN*, IVACAV-*Bun-03/TN* lần lượt là 100,34 mg/ml; 96,72 mg/ml và 98,54 mg/ml (đạt theo yêu cầu của tiêu chuẩn cơ sở: hàm lượng protein  $\leq 150$  mg/ml). Kết quả này cho thấy không có sự khác biệt giữa các lô, thể hiện tính ổn định của quy trình tinh chế đang áp dụng.

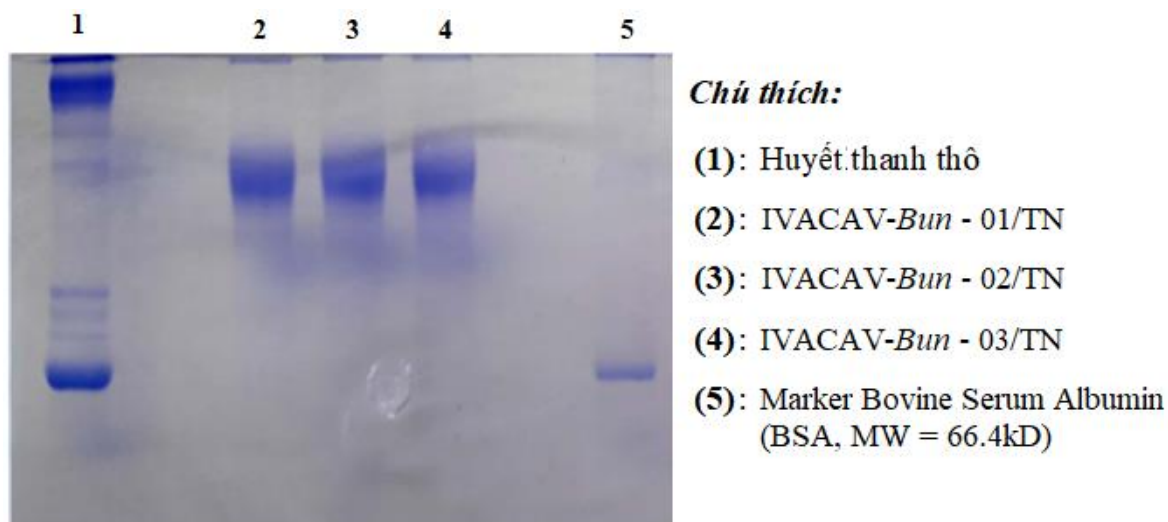
+ Hiệu giá tinh chế: 3 lô huyết thanh IVACAV-*Bun-01/TN*, IVACAV-*Bun-02/TN* và IVACAV-*Bun-03/TN* sau tinh chế thử nghiệm có hiệu giá lần lượt: 458,78 LD<sub>50</sub>/ml; 427,45 LD<sub>50</sub>/ml; 443,82 LD<sub>50</sub>/ml. Cả 3 lô tinh chế thử nghiệm đều có hiệu giá cao gấp 2 lần so với quy định tối thiểu về hiệu giá theo tiêu chuẩn cơ sở của huyết thanh kháng nọc rắn hiện tại ( $\geq 200$  LD<sub>50</sub>/ml). Đây là tín hiệu rất tốt để có thể sản xuất được loại huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc tinh chế có chất lượng cao.

+ An toàn chung: Cả 3 lô huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc tinh chế IVACAV-*Bun-01/TN*, IVACAV-*Bun-02/TN* và IVACAV-*Bun-03/TN* sau khi thử nghiệm an toàn chung đều có kết quả là toàn bộ chuột thí nghiệm đều khỏe mạnh, tăng trọng lượng và không có các biểu hiện bệnh lý hoặc bị nhiễm độc sau 7 ngày theo dõi, đạt yêu cầu về tiêu chuẩn chất lượng theo Dược điển Việt Nam V, 2018.

+ Chất gây sốt: Cả 3 lô huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc tinh chế IVACAV-*Bun-01/TN*, IVACAV-*Bun-02/TN* và IVACAV-*Bun-03/TN* sau thử nghiệm, các thử nghiệm cứu không tăng nhiệt độ và không xuất hiện các

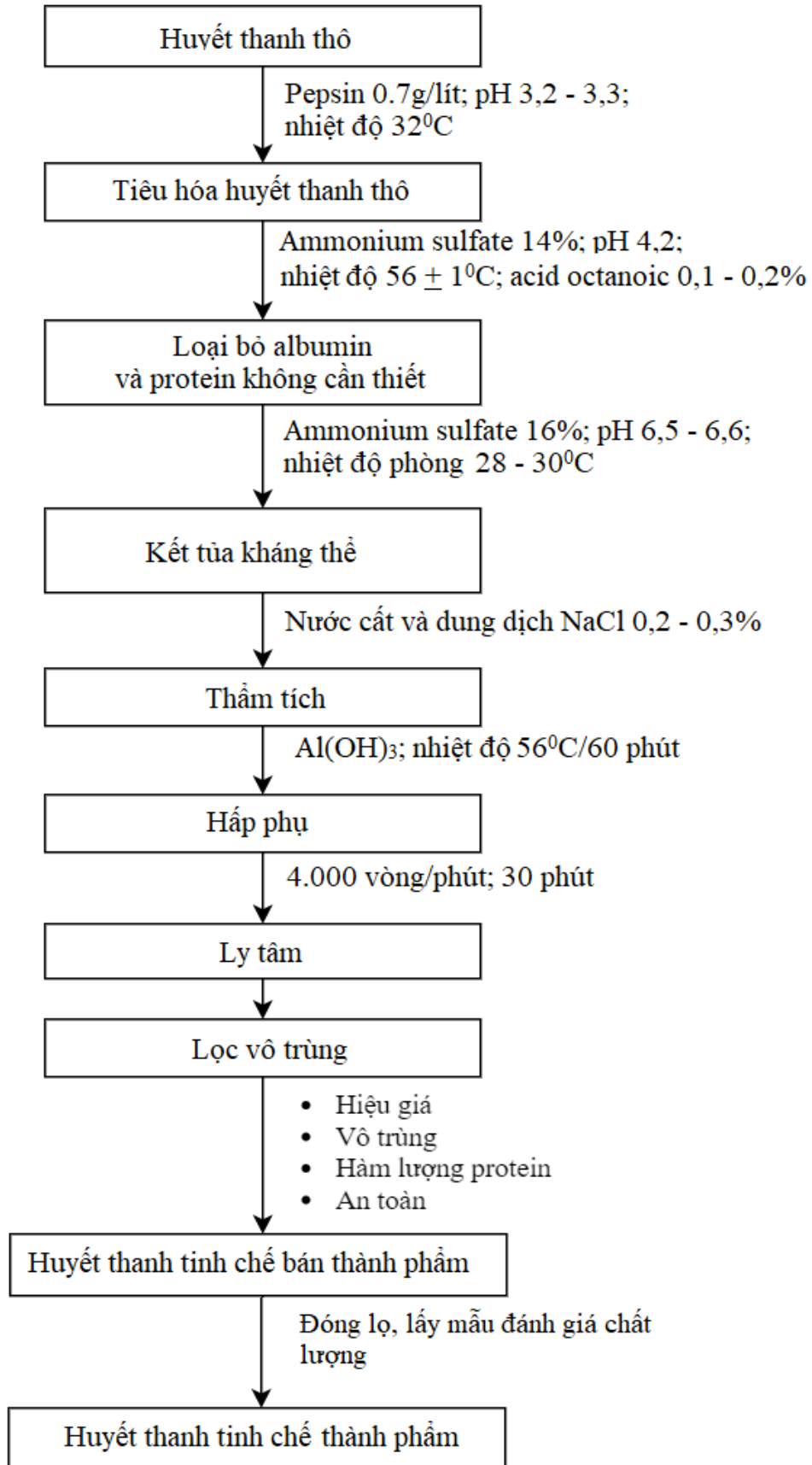
dấu hiệu bất thường (phụ lục 13). Đạt yêu cầu về tiêu chuẩn chất lượng là không phát hiện có chất gây sốt.

+ Về độ tinh sạch: Hình ảnh điện di SDS-PAGE sản phẩm sau tinh chế thử nghiệm của 3 lô huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc IVACAV-*Bun*-01/TN, IVACAV-*Bun*-02/TN và IVACAV-*Bun*-03/TN cho thấy không phát hiện thấy band albumin (Hình 3.8). Kết quả này cho thấy quy trình tinh chế cho độ sạch đạt yêu cầu.



Hình 3.8. Hình ảnh điện di SDS - PAGE 3 lô huyết thanh sau tinh chế thử nghiệm.

Kết quả kiểm tra chất lượng sản phẩm của 3 lô huyết thanh tinh chế thử nghiệm cho thấy sự tương đồng về chất lượng giữa các lô; trên cơ sở tiêu chuẩn cho phép của huyết thanh kháng nọc rắn Lục tre/Hổ đất, chúng tôi nhận thấy cả 7 chỉ tiêu chất lượng về cảm quan, vô khuẩn, protein, hiệu giá, an toàn chung, chất gây sốt và độ tinh sạch đều nằm trong quy định của tiêu chuẩn cơ sở huyết thanh kháng nọc rắn mà IVAC đăng ký với Bộ Y tế. Đồng thời, kiểm soát các thông số trong quy trình tinh chế (Bảng 3.14, Bảng 3.15 và Bảng 3.16) đều ổn định. Do vậy, chúng tôi nhận thấy quy trình tinh chế hiện tại của IVAC phù hợp để áp dụng cho tinh chế huyết kháng nọc rắn Cạp nia Bắc (Hình 3.9).



Hình 3.9. Quy trình tinh chế huyết thanh kháng nọc rắn Cap nia Bắc

### 3.3.2. Kết quả tinh chế lô huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc bán thành phẩm

Chúng tôi áp dụng quy trình đã thử nghiệm để tinh chế lô huyết thanh bán thành phẩm kháng nọc rắn Cạp nia Bắc được ký hiệu: IVACAV-Bun-001-B/S với quy mô 60 lít huyết thanh thô, hiệu giá huyết thanh thô trước tinh chế 124.68LD<sub>50</sub>/ml, các bước thực hiện bao gồm:

- Thể tích huyết thanh thô được tinh chế V = 60 lít. Huyết thanh thô được pha loãng với nước cất theo tỷ lệ pha loãng 1:1. Dem tiêu hóa huyết thanh thô bằng pepsin (0,7g/lít) ở nhiệt độ 32 – 33°C, đạt pH 3,2 – 3,3; tiêu hóa huyết thanh thô trong thời gian 30 phút.

- Loại bỏ albumin và những protein không cần thiết bằng tua ammonium sulfate ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) lần 1 với tỉ lệ 14% w/v và acid octanoic có nồng độ (0,1 – 0,2%) ở nhiệt độ 56°C, giữ trong 1 giờ với pH 4,2 – 4,3. Tiến hành hạ nhiệt độ xuống 28-30°C.

- Lọc qua lọc giấy Simoneton (khung lọc Simoneton 18×20cm) loại bỏ tua thu được sau tua lần 1, tiến hành tua lần 2 với tỉ lệ ammonium sulfate 16% w/v (nồng độ cuối cùng của 2 lần tua là 30%). Để qua đêm với pH 6,5 – 6,6.

- Cho dung dịch tua lần 2 lọc qua giấy lọc Simoneton (khung lọc Simoneton 18×20cm) loại phần nước nổi trên, thu lấy phần tua chứa kháng thể, ép khô kháng thể bằng khí nén.

- Thu kháng thể, cân trọng lượng kháng thể thu được và bảo quản ở kho lạnh với nhiệt độ 2-8°C.

- Kháng thể thu được hoàn nguyên bằng dung dịch NaCl 0,2% sau đó tiến hành loại SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> bằng hệ thống TFF. Dung dịch loại hết ion SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> được bảo quản trong dung dịch merthiolate 1%.

- Dung dịch được hấp phụ Al(OH)<sub>3</sub> theo tỉ lệ 3 – 5% ở nhiệt độ 56°C/1h. Sau đó ly tâm 4.000 vòng/phút trong 30 phút, sau quá trình ly tâm thu nước nổi và loại bỏ cặn.

- Tính NaCl để dung dịch có nồng độ 0,85 – 0,90%, chuẩn pH sau cùng để dung dịch có pH đạt 6 – 7.

- Lọc vô trùng bằng hệ thống Sartorius 0,45/0,22 $\mu$ m, thu được huyết thanh tinh chế bán thành phẩm. Lấy mẫu kiểm tra đánh giá chất lượng huyết thanh sau tinh chế.

Kết quả kiểm tra chất lượng lô huyết thanh bán thành phẩm kháng nọc rắn Cạp nia Bắc tinh chế IVACAV-Bun-001-B/S được đánh giá theo tiêu chuẩn cơ sở của 2 loại huyết thanh tinh chế kháng nọc rắn Lục và Hồ đã được cấp phép sản xuất được trình bày ở Bảng 3.18.

Bảng 3.18. Kết quả kiểm định huyết thanh bán thành phẩm kháng nọc rắn Cạp nia Bắc tinh chế lô IVACAV-Bun-001-B/S

STT	Chi tiêu	Tiêu chuẩn huyết thanh kháng nọc rắn IVAC đăng ký với Bộ Y tế	Kết quả kiểm định lô IVACAV-Bun-001-B/S
1	pH	6 - 7	6,58
2	Vô khuẩn	Không quan sát thấy sự phát triển của nấm và vi khuẩn sau 14 ngày nuôi cấy	Không quan sát thấy sự phát triển của nấm và vi khuẩn sau 14 ngày nuôi cấy
3	Protein (mg/ml)	$\leq 150$	42,41
4	Hiệu giá (LD <sub>50</sub> /ml)	$\geq 200$	312,43
5	Độ tinh sạch	Không phát hiện band của albumin trên điện di SDS-PAGE	Không phát hiện thấy band của albumin trên hình ảnh điện di SDS-PAGE
6	Chất gây sốt ( $^{\circ}$ C)	Không có chất gây sốt	Không có chất gây sốt
7	Cảm quan	Dung dịch trong suốt, có màu vàng nhạt	Dung dịch trong suốt, có màu vàng nhạt

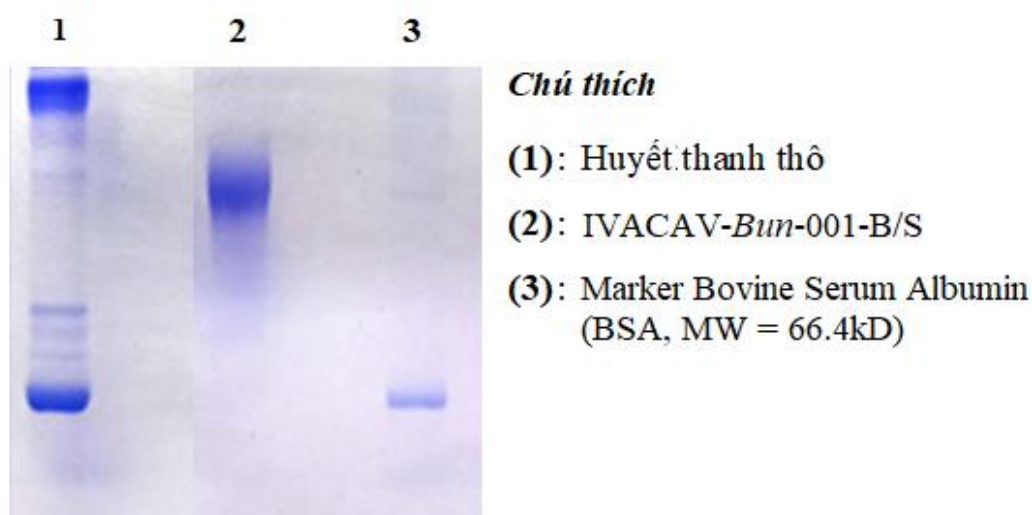
Cụ thể như sau:

+ Chỉ tiêu vô khuẩn: Không quan sát thấy sự phát triển của nấm và vi khuẩn sau 14 ngày nuôi cấy, đạt yêu cầu về vô khuẩn.

+ Chỉ tiêu protein: Hàm lượng protein lô tinh chế IVACAV-*Bun*-001-B/S có kết quả là 42,41 mg/ml (Bảng 3.18), đạt yêu cầu theo tiêu chuẩn cơ sở (protein  $\leq$  150 mg/ml).

+ Chỉ tiêu hiệu giá: Lô tinh chế IVACAV-*Bun*-001-B/S có kết quả hiệu giá là 312,43 LD<sub>50</sub>/ml (Bảng 3.18), đạt yêu cầu theo tiêu chuẩn cơ sở ( $\geq$  200 LD<sub>50</sub>/ml).

+ Chỉ tiêu độ tinh sạch: Hình ảnh điện di SDS-PAGE sản phẩm lô huyết thanh bán thành phẩm IVACAV-*Bun*-001-B/S kháng nọc rắn Cạp nia Bắc tinh chế không phát hiện thấy band albumin (Hình 3.10), đạt theo tiêu chuẩn chấp nhận.



Hình 3. 10. Kết quả điện di SDS -PAGE lô huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc tinh chế bán thành phẩm IVACAV-*Bun* – 001-B/S.

+ Chỉ tiêu pH: Dung dịch huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc tinh chế bán thành phẩm có pH bằng 6,58 nằm trong tiêu chuẩn cho phép pH 6 – 7.

+ Về chỉ tiêu cảm quan: Sản phẩm lô tinh chế IVACAV-*Bun*-001-B/S có màu vàng nhạt, trong suốt, không có xuất hiện cặn tủa trong dung dịch (Hình 3.11)



IVACAV-Bun-001B/S

Hình 3.11. Lô huyết thanh bán thành phẩm IVACAV-Bun-001-B/S tinh chế

Bảng 3.19. Kết quả đánh giá chỉ tiêu gây sốt đối với lô huyết thanh bán thành phẩm IVACAV-Bun-001-B/S tinh chế

Chỉ số	Thỏ số		
	1	2	4
Cân nặng (kg)	1,9	1,9	2,0
Nhiệt độ thỏ trước khi tiêm (°C)	39,0	39,2	39,05
Nhiệt độ thỏ tối đa đo được sau khi tiêm (nhiệt độ cao nhất đo được trong 3 lần đo sau khi tiêm mẫu, mỗi lần đo cách nhau 1 giờ) (°C)	39,4	39,2	39,2
Hiệu số nhiệt độ tối đa sau khi tiêm và nhiệt độ ban đầu của mỗi thỏ (°C)	0,4	0	0,15
Tổng nhiệt độ chênh lệch 3 thỏ (°C)	0,55		

+ Chỉ tiêu chất gây sốt: Sau tiêm thử nghiệm sản phẩm lô huyết thanh bán thành phẩm IVACAV-*Bun*-001-B/S tinh chế, các thử nghiệm cứu không tăng nhiệt độ và không xuất hiện các dấu hiệu bất thường, kết quả kiểm tra chỉ tiêu gây sốt được thể hiện tại Bảng 3.19.

Kết quả này cho thấy lô huyết thanh bán thành phẩm kháng nọc rắn Cạp nia Bắc tinh chế IVACAV-*Bun*-001-B/S đạt 10 chỉ tiêu cơ sở giống như hai loại kháng huyết thanh nọc rắn Lục tre và Hồ đất đã được cấp phép lưu hành. Chúng tôi tiến hành sản xuất thử nghiệm 1 lô huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc thành phẩm.

### 3.3.3. Kết quả huyết thanh tinh chế kháng nọc rắn Cạp nia Bắc thành phẩm

Từ lô huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc tinh chế bán thành phẩm IVACAV-*Bun*-001-B/S chúng tôi sản xuất lô huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc thành phẩm IVACAV-*Bun*-001. Số lượng lọ đã đóng được là 1.128 lọ huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc (Bảng 3.20) đạt yêu cầu theo tiêu chuẩn chất lượng cơ sở của hai loại kháng huyết thanh nọc rắn Lục tre và Hồ đất đã được cấp phép lưu hành của Bộ Y tế (Bảng 3.21).

Bảng 3.20. Số lượng thành phẩm huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc

Lô bán thành phẩm	Số lượng bán thành phẩm đóng (lít)	Lô thành phẩm	Số lượng thành phẩm (lọ)
IVACAV- <i>Bun</i> -001-B/S	5,0	001	1128



Bảng 3.21. Kết quả kiểm định lô thành phẩm huyết thanh kháng nọc rắn Cap nia Bắc IVACAV-Bun-001.

<b>TT</b>	<b>Chỉ tiêu</b>	<b>Tiêu chuẩn cơ sở của IVAC đã được Bộ Y tế cấp phép lưu hành với huyết thanh kháng nọc rắn Hồ đất và Lục tre</b>	<b>Kết quả IVACAV-Bun-001</b>
1	Cảm quan	Dung dịch trong suốt không màu hoặc màu vàng nhạt, hơi nhớt	Đạt
2	Vô khuẩn	Không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm sau 14 ngày theo dõi	Không phát hiện
3	pH	6,0 – 7,0	6,58
4	Nhận dạng	Phản ứng đặc hiệu giữa nọc rắn với huyết thanh kháng nọc tương ứng	Đạt
5	Hiệu giá	$\geq 1000 \text{ LD}_{50}/\text{lọ}$	1276 $\text{LD}_{50}/\text{lọ}$
6	Protein tổng số	$\leq 150 \text{ mg/ml}$	42,41 mg/ml
7	Hàm lượng chất bảo quản Merthiolate	$\leq 0,01\%$	0,0093%
8	Hàm lượng Natri clorid	Từ 0,85% đến 0,9%	0,85%
9	An toàn chung	Sau ít nhất 7 ngày theo dõi, toàn bộ chuột khỏe mạnh, tăng trọng và không có biểu hiện bệnh lý hoặc nhiễm độc	Đạt
10	Chất gây sốt	Không có chất gây sốt	Đạt



Hình 3.12. Huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc thành phẩm lô IVACAV-Bun 001

Dựa trên kết quả thu được chúng tôi tiến hành xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cho sản phẩm huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc tinh chế.

### 3.4. XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG VÀ ĐỀ XUẤT TIÊU CHUẨN CƠ SỞ CHO HUYẾT THANH KHÁNG NỌC RẮN TINH CHẾ PHÙ HỢP ĐVN V, 2018

#### 3.4.1. Xây dựng các phương pháp kiểm định huyết thanh tinh chế kháng nọc rắn Cạp nia Bắc

Áp dụng các phương pháp kiểm định 2 loại huyết thanh tinh chế kháng nọc rắn Lục tre và Hồ đất đã được cấp phép tại IVAC chúng tôi tiến hành xây dựng các phương pháp kiểm định huyết thanh tinh chế kháng nọc rắn Cạp nia Bắc. Danh mục phương pháp được trình bày ở bảng 3.22.

Bảng 3.22. Danh mục các phương pháp kiểm định huyết thanh kháng nọc Cap nia Bắc tinh chế.

<b>TT</b>	<b>Chỉ tiêu</b>	<b>Phương pháp</b>	<b>SOP</b>	<b>Ngày có hiệu lực</b>
1	Vô khuẩn	Cấy trực tiếp	KĐ/089 18/08	10/05/18
2	pH	Đo điện thế - điện cực	KĐ/124 21/06	13/10/21
3	Merthiolate (%)	Đo quang với thuốc thử Diphenilthiocacbazon (dithizon)	KĐ/131 18/03	23/07/18
4	NaCl (%)	Morh	KĐ/125 21/06	13/10/21
5	Protein (mg/ml)	Lowry	KĐ/136 18/02	02/07/18
6	Hiệu giá tinh chế (LD <sub>50</sub> /ml)	Trung hòa trên chuột nhắt trắng	KĐ/029 19/03	03/07/19
7	Độ tinh sạch	Điện di SDS-PAGE	KĐ/073 19/03	03/07/19
8	Chất gây sốt (°C)	Đánh giá tính chất gây sốt dựa trên sự tăng thân nhiệt của thỏ trước và sau tiêm mẫu vào tĩnh mạch tai	KĐ/138 17/03	28/07/17
9	An toàn chung	Thử trên chuột nhắt trắng và chuột lang	KĐ/052 19/08	02/07/19
10	Cảm quan	Kiểm tra bằng mắt thường	KĐ/143 18/02	20/07/18
11	Đo thể tích	Cân	KĐ/129 19/04	10/07/19

### 3.4.2. Đề xuất tiêu chuẩn chất lượng kiểm định huyết thanh tinh chế kháng nọc rắn Cạp nia Bắc bán thành phẩm và thành phẩm

Dựa vào kết quả miễn dịch khai thác huyết thanh Cạp nia Bắc trên ngựa, kết quả 3 lô tinh chế quy mô nhỏ (10 lít/ lô) và kết quả tinh chế lô quy mô lớn (60 lít/lô) với sự tham chiếu tiêu chuẩn của 2 loại huyết thanh tinh chế do IVAC sản xuất đã được đăng ký lưu hành, cũng như các tiêu chuẩn của ĐDVN V – 2018, chúng tôi đề xuất tiêu chuẩn cơ sở (TCCS) dây chuyền sản xuất huyết thanh kháng nọc rắn cạp nia Bắc như sau:

- Đề xuất tiêu chuẩn chất lượng cơ sở khai thác huyết thanh thô kháng nọc rắn Cạp nia Bắc trên ngựa.

Bảng 3.23. Đề xuất tiêu chuẩn chất lượng cơ sở khai thác huyết thanh thô kháng nọc rắn Cạp nia Bắc trên ngựa.

STT	Chỉ tiêu	Phương pháp	Tiêu chuẩn cơ sở
1	Hiệu giá	Trung hòa trên chuột nhắt trắng	$\geq 20 \text{ LD}_{50}/\text{ml}$
2	Cảm quan	Kiểm tra bằng mắt thường	Dung dịch trong suốt màu vàng nhạt, sánh keo, không có vật lạ.
3	Vô khuẩn	Cấy trực tiếp	Không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm sau 14 ngày theo dõi

- Đề xuất tiêu chuẩn chất lượng cơ sở huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc tinh chế bán thành phẩm và thành phẩm.

Bảng 3.24. Đề xuất tiêu chuẩn chất lượng cơ sở huyết thanh tinh chế kháng nọc rắn Cạp nia Bắc bán thành phẩm và thành phẩm

<b>TT</b>	<b>Chỉ tiêu</b>	<b>Tiêu chuẩn cơ sở</b>	<b>Tài liệu tham khảo</b>
1	Vô khuẩn (*)	Không có sự phát triển của vi khuẩn và nấm sau 14 ngày theo dõi	Dược điển Việt Nam V, 2018 [71]
2	pH (**)	6 – 7	Dược điển Việt Nam V, 2018 [71]
3	Merthiolate (%) (**)	≤ 0,01	Dược điển Việt Nam V, 2018 [71]
4	NaCl (%) (**)	0,85 – 0,90	Dược điển Việt Nam V, 2018 [71]
5	Protein (mg/ml) (**)	≤ 150	Dược điển Việt Nam V, 2018 [71]
6	Hiệu giá tinh chế (LD <sub>50</sub> /ml) (**)	≥ 200	Dược điển Việt Nam V, 2018 [71]
7	Độ tinh sạch (**)	Không phát hiện có Albumin trên điện di SDS-PAGE	Dược điển Việt Nam V, 2018 [71]
8	Chất gây sốt (°C) (**)	Không có chất gây sốt	Dược điển Việt Nam V, 2018 [71]
9	An toàn chung (**)	Sau ít nhất 7 ngày theo dõi, toàn bộ chuột khỏe mạnh, tăng trọng và không có biểu hiện bệnh lý hoặc nhiễm độc	Dược điển Việt Nam V, 2018 [71]
10	Cảm quan (**)	Dung dịch trong suốt, có màu vàng nhạt	Dược điển Việt Nam V, 2018 [71]
<p>(*): thực hiện trên bán thành phẩm và thành phẩm (**): chỉ thực hiện trên bán thành phẩm hoặc thành phẩm</p>			

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### KẾT LUẬN

- Đã thiết lập được quy trình gây miễn dịch trên ngựa và khai thác huyết thanh thô kháng nọc rắn Cạp nia Bắc đạt yêu cầu chất lượng cao với phác đồ gây miễn dịch 11 mũi cơ bản, liều kháng nguyên tăng dần từ 0,1 LD<sub>50</sub> đến 3,0 LD<sub>50</sub>/kg trọng lượng ngựa; tiêm nhắc lại giữa 2 chu kỳ khai thác huyết thanh thô 3 mũi với liều 0,5; 1,0; 2,0 LD<sub>50</sub>/kg trọng lượng ngựa; đường tiêm dưới da, cách nhau 7 ngày. Khai thác huyết thanh thô chu kỳ đầu tiên vào ngày thứ 80, tạo được hiệu giá trung bình qua 4 chu kỳ khai thác là  $164,9 \pm 30,9$  LD<sub>50</sub>/ml.

- Đã ứng dụng quy trình lõi tinh chế huyết thanh kháng nọc rắn của IVAC, tinh chế thành công 3 lô thử nghiệm với quy mô 10 lít/lô và 1 lô sản phẩm với quy mô 60 lít, phù hợp để tinh chế huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc. Đã đóng 1128 lọ IVACAV-Bun thành phẩm, hiệu giá 1276 LD<sub>50</sub>/lọ, đạt tất cả tiêu chuẩn cơ sở chất lượng giống tiêu chuẩn của hai loại huyết thanh kháng nọc rắn Lục tre tinh chế và rắn Hồ đất tinh chế mà Viện đã được cấp phép, phù hợp với Dược điển VN V, 2018. Đã đề xuất xây dựng 3 tiêu chuẩn cơ sở cho khai thác huyết thanh thô kháng nọc rắn Cạp nia Bắc, 7 tiêu chuẩn chất lượng huyết thanh kháng nọc Cạp nia Bắc tinh chế dạng bán thành phẩm và 10 tiêu chuẩn chất lượng dạng thành phẩm với phù hợp với ĐĐVN V, 2018. Đã xác định danh mục 11 quy trình chuẩn, phương pháp kiểm định huyết thanh kháng nọc rắn hiện hành tại IVAC áp dụng cho kiểm định chất lượng huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc tinh chế.

### KIẾN NGHỊ

Nghiên cứu dược lực/động học huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc trên động vật thí nghiệm để cung cấp dữ liệu thử lâm sàng trên bệnh nhân bị loại rắn này cắn, hướng đến đăng ký lưu hành sản phẩm (huyết thanh kháng nọc rắn Cạp nia Bắc tinh chế với bản quyền đăng ký nhãn hiệu hành hóa: "IVACAV-Bun").

## DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] World Health Organization (WHO), 2010, Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins, *Biology Aujourd'hui*, 204(1), pp. 87–91, [Online]. Available: <http://www.biologie-journal.org/10.1051/jbio/2009043%5n> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20950580>.
- [2] World Health Organization (WHO), 2016, Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins, *expert committee on biological standardization*.
- [3] Chiappinelli V., 1991,  $\kappa$ -Neurotoxins and  $\alpha$ -neurotoxins: effects on neuronal nicotinic acetylcholine receptors, *Snake toxins, New York, Pergamon Press*, pp. 223–258.
- [4] Qing Liang, Tam Minh Huynh, Yen Zhi Ng, Geoffrey K. Isbister and Wayne C. Hodgson, 2021, In Vitro Neurotoxicity of Chinese Krait (*Bungarus multicinctus*) Venom and Neutralization by Antivenoms, *Toxins (Basel)*, 13 (1), pp. 1–10, doi: 10.3390/TOXINS 13010049.
- [5] World Health Organization (WHO), 2005, Guidelines for the Clinical Management of Snake Bite in the South-East Asia Region, *Tropical Medicine*, 30.
- [6] World Health Organization Regional Office for Africa, 2010, Guidelines for the prevention and clinical management of snake bite in Africa, pp. 1–145, [Online]. Available: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/204458>.
- [7] Camila Nunes Faioli, Thaisa Francielle Souza Domingos, Eduardo Coriolano de Oliveira, Eládio Flores Sanchez, Suzi Ribeiro, Guilherme Muricy and Andre Lopes Ful, 2013, Appraisal of antiophidic potential of marine sponges against Bothrops jararaca and Lachesis muta venom, *Toxins (Basel)*, 5(10), pp. 1799–1813, doi: 10.3390/toxins 5101799.
- [8] Bruno Lomonte, Guillermo Legn And Lars A. Hanson, 1996, Similar effectiveness of Fab and F(ab')<sub>2</sub> antivenoms in the neutralization of hemorrhagic activity of viperid snake venom in mice, *Toxicon*,

- 34( 10), pp. 1197–1202, doi: 10.1016/0041-0101(96)00079-7.
- [9] Yan-Chiao Mao, Po-Yu Liu, Liao-Chun Chiang, Shu-Chen Liao, Hung-Yuan Su, Szu-Yin Hsieh, and Chen-Chang Yang, 2017, Bungarus multicinctus multicinctus Snakebite in Taiwan, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(6), pp. 1497–1504, doi: 10.4269/ajtmh.17-0005.
- [10] Gopalakrishnakone P and Chou L.M, 1990, Snakes of medical importance (Asia-Pacific region), *Venom and Toxin Group, National University of Singapore & International Society on Toxinology*.
- [11] Bo Lin, Jia-Rui Zhang, Hui-Juan Lu, Lin Zhao, Jing Chen, Hong-Fei Zhang, Xue-Song Wei, Liang-Yu Zhang, Xiao-Bing Wu, Wen-Hui Le, 2020, Immunoreactivity and neutralization study of chinese bungarus multicinctus antivenin and lab-prepared anti-bungarotoxin antisera towards purified bungarotoxins and snake venoms, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(11), pp. 1–19, doi: 10.1371/journal.pntd.0008873.
- [12] Dr.Willott, *Venomous Land Snakes*. Cosmos Books Ltd. ISBN 9882113265.
- [13] David A Warrell, Sornchai Looareesuwan, Nicholas J White, R David G Theakston, M J Warrell, Wyphot Kosakarn, H Alistair Reid, 1983, Severe neurotoxic envenoming by the Malayan krait Bungarus candidus (Linnaeus): Response to antivenom and anticholinesterase, *British Medical Journal*, 286(6366), pp. 678–680, doi: 10.1136/bmj.286.6366.678.
- [14] <http://www.vncreatures.net/chitiet.php?page=1&loai=1&ID=6058> (Cập nhật ngày 25.9.2022).
- [15] Nguyễn Quang Trường, Nguyễn Văn Khôi, Nguyễn Văn Sáng. Hồ Thu Cúc, 2005, *Nhận dạng một số loài bò sát - ếch nhái ở Việt Nam*. NXB Nông Nghiệp, Chi Cục Kiểm Lâm TP. HCM, Tò Chức Wildlife At Risk Việt Nam. Viện sinh thái và Tài Nguyên Sinh Vật, TP Hồ Chí Minh.
- [16] Nguyễn Văn Sáng, 2007, *Động vật chí Việt Nam: Phân bộ rắn*. NXB



Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

- [17] Nguyen Q.T., Nguyen V.S., Dang T.T., and Nguyen T.T., 2009, *Diversity of venomous snakes in Vietnam*. Proceedings of the first National Scientific Workshop on Amphibian and Reptiles in Vietnam. Hue University Press, Hue, pp. 159-167.
- [18] Trịnh Xuân Kiêm, Trần Thị Ngân, Lê Khắc Quyên, 2014, Rắn độc và độc tố các loài rắn độc tại Việt Nam, *Tạp chí Y học Việt Nam*, 415(2), pp. 72–76.
- [19] Trinh Xuan Kiem, 2000, Snake bites in Vietnam: The initial results of research and production of Naja Kouthia and Calloselasma rhodostoma antivenoms, clinical application in patients at Cho Ray hospital since 1990, *Symp. Emerg. Treat. snakebite patients, Univeristy of Medicine Pharmacy Ho Chi Minh City*, pp. 65 – 67.
- [20] Yu Jiang, Yan Li, Wenhui Lee, Xun Xu, Yue Zhang, Ruoping Zhao, Yun Zhang, Wen Wang, 2011, Venom gland transcriptomes of two elapid snakes (*Bungarus multicinctus* and *Naja atra*) and evolution of toxin genes, *BMC Genomics*, 12, pp. 1–13, doi: 10.1186/1471-2164-12-1.
- [21] Lin-Lin Shan, Jian-Fang Gao, Yan-Xia Zhang, Shan-Shan Shen, Ying He, Jin Wang, Xiao-Mei Ma, Xiang Ji, 2016, Proteomic characterization and comparison of venoms from two elapid snakes (*Bungarus multicinctus* and *Naja atra*) from China, *Journal of Proteomics*, 138, pp. 83–94, doi: 10.1016/j.jprot.2016.02.028.
- [22] Rustam H. Ziganshin, Sergey I. Kovalchuk, Georgij P. Arapidi, Vladislav G. Starkov, Anh Ngoc Hoang, Thao Thanh Thi Nguyen, Khoa Cuu Nguyen, Batozhab B. Shoibonov, Victor I. Tsetlin, Yuri N. Utkin, 2015, Quantitative proteomic analysis of Vietnamese krait venoms: Neurotoxins are the major components in *Bungarus multicinctus* and phospholipases A2 in *Bungarus fasciatus*, *Toxicon*, 107, pp. 197–209, doi: 10.1016/j.toxicon.2015.08.026.
- [23] Angeline Mei Feng Oh, Kae Yi Tan, Nget Hong Tan, Choo Hock Tan,

- 2021, Proteomics and neutralization of *Bungarus multicinctus* (Many-banded Krait) venom: Intra-specific comparisons between specimens from China and Taiwan, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology Pharmacology*, doi: 10.1016/j.cbpc.2021.109063.
- [24] Tsetlin V., 1999, Snake venom  $\alpha$ -neurotoxins and other 'three-finger' proteins, *European journal of biochemistry*, 264(2), pp. 281–286, doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00623.x. PMID: 10491072.
- [25] Endo T., & Tamiya N., 1991, Structure-function relationship of postsynaptic neurotoxins from snake venoms. In A. L. Harvey (Ed.), *Snake toxins*, pp. 165–222, New York: Pergamon Press.
- [26] Chiappinelli V., 1983, Kappa-Bungarotoxin: a probe for the neuronal nicotinic receptor in the avian ciliary ganglion, *Brain Research*, 277(1), pp. 9–22, doi: 10.1016/0006-8993(83)90902-2.
- [27] Kini R., 2003, Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes, *Toxicon*, 42(8), pp. 827–840, doi: doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.002.
- [28] Michael R. Hanley, Vesna A. Eterovic, Susan P. Hawkes, Alvin J. Hebert, and Edward L. Bennett, 1997, Neurotoxins of *Bungarus multicinctus* venom. Purification and partial characterization, *Biochemistry*, 16(26), pp. 5840–5849, doi: 10.1021/bi00645a031.
- [29] Pei-Fung Wu and Long-Sen Chang, 2000, Genetic organization of A chain and B chain of  $\beta$ -bungarotoxin from taiwan banded krait (*Bungarus multicinctus*): A chain genes and B chain genes do not share a common origin, *European journal of biochemistry*, 267(15), pp. 4668–4675, doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01518.x.
- [30] Selvanayagam Nirthanan and Matthew C.E. Gwee, 2004, Three-Finger  $\alpha$ -Neurotoxins and the Nicotinic Acetylcholine Receptor, Forty Years On, *Journal of Pharmacological Sciences*, 94(1), pp. 1–17, doi: 10.1254/jphs.94.1.
- [31] Ulrich Kucha, Brian E. Mollesb, Tamotsu Omori-Satoh, Lawan Chanhome, Yuji Samejima, Dietrich Mebs, 2003, Identification of

alpha-bungarotoxin (A31) as the major postsynaptic neurotoxin, and complete nucleotide identity of a genomic DNA of *Bungarus candidus* from Java with exons of the *Bungarus multicinctus* alpha-bungarotoxin (A31) gene, *Toxicon*, 24(4), pp. 381–390, doi: 10.1016/s0041-0101(03)00168-5.

- [32] Catherine A. Vulfius, Elena V. Gorbacheva, Vladislav G. Starkov, Alexey V. Osipov, Igor E. Kasheverov, Tatyana V. Andreeva, Maxim E. Astashev, Victor I. Tsetlin, Yuri N. Utkin, 2011, An unusual phospholipase A<sub>2</sub> from puff adder *Bitis arietans* venom—a novel blocker of nicotinic acetylcholine receptors, *Toxicon*, 57, (5), pp. 787–793, doi: 10.1016/j.toxicon.2011.02.013.
- [33] Michael R. Hanley, Vesna A. Eterovic, Susan P. Hawkes, Alvin J. Hebert and Edward L. Bennett, 1977, Neurotoxins of *Bungarus multicinctus* venom. Purification and partial characterization, *Biochemistry*, 16(26), pp. 5840–5849, doi: 10.1021/bi00645a031.
- [34] James Halpert And David Eaker, 1976, Isolation and amino acid sequence of a neurotoxic phospholipase A from the venom of the australian tiger snake *Notechis scutatus scutatus*, *Journal of Biological Chemistry*, 251(23), pp. 7343–7347, doi: 10.1016/s0021-9258(17)32855-7.
- [35] Long-sen Chang, Charling Chung, Jordge Lin and Enjong Hong, 2002, Organization and phylogenetic analysis of kappa-bungarotoxin genes from *Bungarus multicinctus* (Taiwan banded krait), *Genetica*, 115,(2), pp. 212–221, doi: 10.1023/a:1020139728292.
- [36] Gnanajothy Ponnudurai, Maxey C.M. Chung, Nget-Hong Tan, 1993, Isolation and characterization of a hemorrhagin from the venom of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper),” *Toxicon*, 31(8), pp. 997–1005, Aug. doi: 10.1016/0041-0101(93)90259-L.
- [37] H. Großmann, M. Weinert and M. Liefländer, 1979, The acetylcholinesterase of *Bungarus multicinctus* venom. Purification and properties (author’s transl), *Z Naturforsch C Biosciences*, 34(1–2), pp. 27–32.

- [38] Rowan E.G, 2001, What does beta-bungarotoxin do at the neuromuscular junction?, *Toxicon*, 39(1), pp. 107–118, doi: 10.1016/S0041-0101(00)00159-8
- [39] Kiyoshi Kondo, Hiroko Toda, Kozo Narita, Chen-Yuan Lee, 1982, Amino acid sequences of three beta-bungarotoxins (beta 3-, beta 4-, and beta 5- bungarotoxins) from Bungarus multicinctus venom. Amino acid substitutions in the A chains, *Journal of Biochemistry*, 91(5), pp. 1531–1548, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a133844.
- [40] Chang C.C and Lee C.Y., 1963, Isolation of neurotoxins from the venom of Bungarus multicinctus and their modes of neuromuscular blocking action, *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 144, pp. 241–257, 1963.
- [41] Lee C.V., Chang S.L., Kau S.T., Shing-Hui Luh, 1972, Chromatographic separation of the venom of Bungarus multicinctus and characterization of its components, *Journal of Chromatography*, 72(1), pp. 71–82, doi: 10.1016/0021-9673(72)80009-8.
- [42] Carl H. Ernst, George R. Zug, 1996, *Snakes in question : the Smithsonian answer book*.
- [43] Thomas. S., 1999, *Scores for various snakes*. (Data was obtained from a number of sources most notably the Australian venom and toxin database and dangerous snakes of Africa by Stephen Spawls and Bill Branch).
- [44] Rắn Cạp nia cắn. <http://benhviendktingquangninh.vn/phac-do-dieu-tri-hoi-suc-tich-cuc/ran-cap-nia-can.918.html>. truy cập ngày 25.9.2022 .
- [45] Swaroop S. and Grab B., 1954, Snakebite mortality in the world., *Bull. World Health Organization*, 10(1), pp. 35–76.
- [46] Chippaux J.P., 1998, Snake-bites: Appraisal of the global situation, *Bull. World Health Organization*, 76(5), pp. 515–524.
- [47] Chang K.P., Lai C. S. and Lin S. D., 2007, Management of poisonous snake bites in southern Taiwan, *Kaohsiung Journal of Medicine Sciences*, 23(10), pp. 511–518, doi: 10.1016/S1607-551X(08)70009-3.
- [48] José María Gutiérrez, Gabriela Solano, Davinia Pla, María Herrera,

- Álvaro Segura, Mariángela Vargas, Mauren Villalta, Andrés Sánchez, Libia Sanz, Bruno Lomonte, Guillermo León and Juan J. Calvete, 2017, Preclinical evaluation of the efficacy of antivenoms for snakebite envenoming: State-of-the-art and challenges ahead, *Toxins (Basel)*, 9(5), doi: 10.3390/toxins9050163.
- [49] Zolfagharina H. and N. Mohammadpour Dounighi, 2013, Progress and improvement of the manufacturing process of snake antivenom, *Archives of Razi Institute*, 68(1), pp. 1–10.
- [50] Christensen P.A, 1979, Production and Standardization of Antivenin, *Snake Venoms*, pp. 825–846, doi: 10.1007/978-3-642-66913-2\_20.
- [51] Lê Văn Hiệp, 2006, *Vacxin học những vấn đề cơ bản*, Nhà xuất bản Y học Hà Nội.
- [52] Chippaux J.P., Williams V. and White J., 1991, Snake venom variability: methods of study, results and interpretation, *Toxicon*, 29(11), pp. 1279–1303, doi: 10.1016/0041-0101(91)90116-9.
- [53] Irma aguilar, elda e. Sánchez, maría e. Girón, amalid estrella, bely guerrero and f. Alexis rodriguez-acosta, 2014, Coral snake antivenom produced in chickens (*Gallus domesticus*), *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 56, pp. 61–66.
- [54] Wilmar Dias da Silva and Denise V. Tambourgi, 2011, The humoral immune response induced by snake venom toxins, *Inflamm. Allergy - Drug Targets*, 10(5), pp. 343–357, doi: 10.2174/187152811797200623.
- [55] León Guillermo Sánchez, Laura Hernández, Andrés Villalta, Mauren Herrera, María Segura, Álvaro Estrada, Ricardo Gutiérrez, José María, 2011, Immune response towards snake venoms,” *Inflamm. Allergy - Drug Targets*, 10(5), pp. 381–398, doi: 10.2174/187152811797200605.
- [56] Pratanaphon R., Akesowan S., Khaw O., Sriprapat S. and Ratanabanangkoon K., 1997, Production of highly potent horse antivenom against the Thai cobra (*Naja kaouthia*), *Vaccine*, 15(14), pp. 1523–1528, doi: 10.1016/S0264-410X(97)00098-4.
- [57] Wahby A.F., El-aziz D.A.A., Bashandy A.H, Ibrahim N.M. and Mahdy

- E.M., 2007, A Low Dose Multi-Site Immunization Schedule for Raising Therapeutic Antivenom To the Egyptian Cobra *Naja Haje* Venom, *Egyptian Journal of Natural Toxins* 4(2), pp. 1–11.
- [58] León, Guillermo Vargas, Mariángela Segura, Álvaro Herrera, María Villalta, Mauren Sánchez, Andrés Solano, Gabriela Gómez, Aarón Sánchez, Melvin Estrada, Ricardo Gutiérrez, José María, 2018, Current technology for the industrial manufacture of snake antivenoms, *Toxicon*, 151, pp. 63–73, doi: 10.1016/J.TOXICON.2018.06.084.
- [59] Chotwiwatthanakun C., Pratanaphon R., Akesowan S., Sriprapat S. and Ratanabanangkoon K., 2001, Production of potent polyvalent antivenom against three elapid venoms using a low dose, low volume, multi-site immunization protocol, *Toxicon*, 39(10), pp. 1487–1494, doi: 10.1016/S0041-0101(01)00108-8.
- [60] Pope C.G., 1939, The Action of Proteolytic Enzymes on the Antitoxins and Proteins in Immune Sera: I. True Digestion of the Proteins, *British Journal of Experimental Pathology*, 20(2), pp. 132.
- [61] Krifi Mn K.D., Ayeb M., 1999, The improvement and standardization of antivenom production in developing countries: comparing antivenom quality, therepeutical efficiency and cost, *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 5(2), pp. 128–142, doi: doi.org/10.1590/S0104-79301999000200002.
- [62] Leslie V. Boyer, Peter B. Chase, Janice A. Degan, Gary Figge, Alma Buelna-Romero, Cynthia Luchetti, Alejandro Alagón, 2013, Subacute coagulopathy in a randomized, comparative trial of Fab and F(ab')<sub>2</sub> antivenoms, *Toxicon*, 74, pp. 101-108.
- [63] Bush, Sean P, Ruha, Anne Michelle Seifert, Steven A. Morgan, David L. Lewis, Brandon J.Arnold, Thomas C.Clark, Richard F.Meggs, William J.Toschlog, Eric A.Borron, Stephen W. Figge, Gary R.Sollee, Dawn R.Shirazi, Farshad M.Wolk, Robert De Chazal, Ives Quan, Dan García-Ubbelohde, Walter Alagón, Alejandro Gerkin, Richard D. Boyer, Leslie V., 2015, Comparison of F(ab')<sub>2</sub> versus Fab antivenom for pit viper envenomation: A prospective, blinded, multicenter,

- randomized clinical trial, *Clinical Toxicology*, 53(1), pp. 37–45, doi: 10.3109/15563650.2014.974263.
- [64] Thái Danh Tuyên, 2013, Nghiên cứu sản xuất huyết thanh kháng nọc rắn cạp nia đa giá F(ab')<sub>2</sub> từ huyết tương ngựa; đánh giá chất lượng chế phẩm trong phòng thí nghiệm, *Đại học Y Hà Nội*.
- [65] Vũ Văn Đỉnh và cộng sự, 2004, *Rắn độc, Hồi sức cấp cứu toàn tập*.
- [66] Lê Văn Bé, Lê Bá Bút, Bùi Văn Sơn, 2013, Hiệu quả sử dụng tá chất Montanide ISA 50V2 trong sản xuất huyết thanh kháng nọc rắn hổ đất (*Naja kaouthia*), *Tạp chí Y học dự phòng*, XXIII(9), p. 145.
- [67] <https://ivac.com.vn/san-pham/vien-vac-xin.html> (cập nhật 25.9.202).
- [68] Mauricio Arguedas, Deivid Umaña, Edwin Moscoso, Armando García, Carolina Pereira, Andrés Sánchez, Gina Durán, Daniel Cordero, Adriana Sánchez, Álvaro Segura, Mariángela Vargas, María Herrera, Mauren Villalta, Aarón Gómez, Catalina Salas, Cecilia Díaz, José María Gutiérrez, Guillermo León., 2022, Comparison of adjuvant emulsions for their safety and ability to enhance the antibody response in horses immunized with African snake venoms, *Vaccine X*, 12, 100233, doi: 10.1016/j.jvacx.2022.100233.
- [69] Supod Sriprapat, Surasak Aeksowan, Sompong Sapsutthipas, Charoonroj Chotwiwatthanakun, Porntip Suttijitpaisal, Ronachai Pratanaphon, Orawan Khaw, Visith Sitprija, Kavi Ratanabanangkoon, 2003, The impact of a low dose, low volume, multi-site immunization on the production of therapeutic antivenoms in Thailand, *Toxicon*, 41(1), pp. 57–64.
- [70] Lê Văn Bé, Nguyễn Ái Thương, 2013, Kết quả bước đầu sản xuất huyết thanh kháng nọc rắn cạp nong (*Bungarus fasciatus*) trên ngựa, *Tạp chí Y học dự phòng*., vol. Tập XXIII, (145), pp. 65.
- [71] ĐIỀN VIỆT NAM V Tập 2, 2018.

## PHỤ LỤC

### **Phụ lục 1: Thử nghiệm nhận dạng huyết thanh bằng kỹ thuật khuếch tán miễn dịch (Ouchterlony)**

(Tham khảo Phụ lục 15.34 – trang PL-371 – ĐĐVN V – 2018)

#### **1. Nguyên tắc:**

Kỹ thuật này dựa trên nguyên lý khuếch tán kép tự do của kháng nguyên và kháng thể từ các giếng riêng biệt được tạo trong gel agarose 1% vào môi trường và tạo thành vòng cung tủa do phản ứng đặc hiệu của chúng.

#### **2. Nguyên vật liệu và thiết bị:**

- Phiến kính
- Agarose 1% trong đệm phosphate pH 7,4
- Hộp ẩm
- Huyết thanh thử nghiệm miễn dịch
- Nọc rắn Cạp nia Bắc
- Dung dịch nhuộm: coomasie blue 0,025%
- Dung dịch tẩy màu: methanol – acid acetic – nước cất (4 : 1 : 5)

#### **3. Thực hiện:**

- Đổ gel agarose 1% lên phiến kính.
- Dùng dụng cụ đục giếng loại có đường kính 3 mm tạo 7 giếng trên phiến kính (1 giếng ở giữa, 6 giếng cách đều xung quanh). Nhỏ huyết thanh cần thử nghiệm vào các giếng xung quanh và nọc rắn Choàm quạp vào giếng ở giữa.
- Đặt phiến kính vào hộp ẩm từ 12 đến 48 giờ.
- Nhộm gel với dung dịch nhuộm coomasie blue 0,025%.
- Tẩy màu bằng dung dịch tẩy màu, sau đó rửa bằng nước cất.
- Để khô phiến kính ở nhiệt độ phòng.

#### **4. Tiêu chuẩn đánh giá:**

Dương tính: xuất hiện cung ngưng kết đặc hiệu.



## **Phụ lục 2: Kiểm tra độ tinh khiết huyết thanh bằng phương pháp điện di SDS-PAGE**

**(Tham khảo phụ lục 5.6 – trang PL-154 – ĐĐVN V – 2018)**

### **1. Nguyên tắc:**

Phương pháp điện di trên gel polyacrylamide sử dụng các lỗ siêu nhỏ của gel và dòng điện chạy qua nhằm kéo theo và phân tách các chuỗi polypeptide có khối lượng, độ phức tạp khác nhau. Protein có kích thước càng lớn di chuyển càng chậm trên gel và ngược lại. SDS dùng trong phương pháp này giúp tích điện âm cho các gốc amino acid của protein. Nhờ vậy, protein không còn ở trạng thái gấp cuộn và duỗi dài thành chuỗi polypeptide và di chuyển về cực dương của dòng điện. Khi qua các lỗ gel, các protein phân tách nhau chỉ bởi khối lượng (chiều dài, thành phần của chuỗi polypeptide). Có hai điều kiện xử lý protein trước khi chạy điện di là không khử và khử. Đối với điều kiện không khử, protein nguyên vẹn và xác định được khối lượng tương ứng với dạng tự nhiên. Đối với điều kiện khử,  $\beta$ -mercaptoethanol được thêm vào nhằm phá vỡ các liên kết disulfide. Trong trường hợp khử hoàn toàn, chuỗi nặng được phân cắt hoàn toàn với chuỗi nhẹ và trên gel nhận được hai vạch chính.

### **2. Nguyên vật liệu và thiết bị:**

- Bộ điện di Mini protean
- Máy sốc nhiệt
- SDS gel preparation kit
- Protein Albumin chuẩn
- Nước muối sinh lý
- Dung dịch nhuộm: coomasie blue 0,025%
- Dung dịch tẩy màu: methanol – acid acetic – nước cất (4 : 1 : 5)

### **3. Thực hiện:**

#### **3.1. Chuẩn bị mẫu thử:**

- Pha loãng mẫu thử về ~ 1 mg/ml.
- Trộn mẫu thử với đệm ủ mẫu theo tỉ lệ 1:1.
- Ủ mẫu ở 100°C trong 2 phút.

### 3.2. Chuẩn bị gel:

- Pha running gel theo bảng:

Thành phần (ml)	Nồng độ (%)				
	5	7,5	10	12,5	15
PAA Stock solution (30:0 ~ 8%)	2,50	3,75	5,00	6,25	7,50
Separation gel buffer	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Nước cất	7,25	6,00	4,75	3,50	2,25
TEMED 10%	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
APS 10%	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10

- Pha stacking gel theo bảng:

Thành phần (ml)	Nồng độ (%)		
	3	6	9
PAA Stock solution (30:0 ~ 8%)	0,50	1,00	1,50
Stacking gel buffer	1,00	1,00	1,00
Nước cất	3,40	2,90	2,40
TEMED 10%	0,10	0,10	0,10
APS 10%	0,03	0,03	0,03

- Pha running bufer:
- Pha loãng running buffer 10X với nước cất.

### **3.3. Các bước tiến hành**

- Bước 1: Đổ running gel

Hút 4,5ml running gel vào khuôn kính. Để trong thời gian 30 phút đến khi gel đông hoàn toàn.

- Bước 2: Đổ 1,5ml stacking gel

Hút 1,5ml stacking gel vào khuôn kính. Gắn lược để trong thời gian 60 phút đến khi gel đông hoàn toàn.

- Bước 3: Cho mẫu:

Tháo lược, gắn băng gel vào buồng điện di. Đổ running buffer vào buồng điện di, phía bên trong ngập hết tiêu bản, bên ngoài khoảng 1/2 dung dịch bên trong.

Dùng micropipette hút mẫu/ mẫu chuẩn cho vào mỗi giếng 10 $\mu$ l.

- Bước 4: Chạy điện di:

Đậy nắp buồng điện di, cắm điện, chỉnh hiệu điện thế 110V. Chỉnh ở chế độ hiệu điện thế ổn định. Thời gian chạy điện di từ 60-80 phút cho đến khi vạch màu chạy đến cuối băng gel. Tắt máy lấy gel cho vào hộp nhuộm có chứa dung dịch nhuộm xanh coomassie nhuộm 30 phút. Lấy gel cho vào dung dịch rửa tẩy màu, thay dung dịch tẩy màu vài lần cho đến khi sạch.

### **4. Tiêu chuẩn đánh giá:**

Không có band tương ứng band albumin.

### **Phụ lục 3: Phương pháp kiểm tra cảm quan**

**(Tham khảo Phụ lục 11.8.B – trang PL-265 – DDVN V – 2018)**

**1. Nguyên tắc:** Kiểm tra vật lý tính chất bên ngoài của các vắc xin sinh phẩm bằng cảm quan (**bằng mắt thường**) bao gồm:

- Kiểm tra nhãn mác, quy cách đóng gói, sự nguyên vẹn của bao bì.
- Kiểm tra trạng thái của mẫu: rắn, lỏng.
- Kiểm soát sự hàn kín của chai lọ, ampoule đựng sinh phẩm.
- Kiểm soát mùi vị, màu sắc, tính đồng nhất, độ đồng đều, độ trong, độ đục của dung dịch và vật thể lạ của mẫu dưới đèn soi.

**2. Điều kiện phương tiện kiểm tra:**

**Nhân viên kiểm tra:**

- Phải có thị lực tốt (do chuyên khoa mắt xác định) đảm bảo ít nhất là 9/10 (khi cần phải dùng kính đúng số để điều tiết thị lực tốt).
- Phải được huấn luyện quen nhận dạng các tạp chất, qua nhiều lần hướng dẫn thực tế để không bị nhầm lẫn, không bỏ sót để có thể độc lập đảm nhận công việc.

**Cơ sở:**

Phải có khu vực riêng để kiểm tra vật lý. Phòng kiểm tra là phòng tối, tương đối yên tĩnh, tạo điều kiện cho người kiểm tra làm việc thuận tiện, không gần những nơi có ánh sáng và đèn chói mắt.

**Phương tiện kiểm tra:**

- Nguồn sáng: Dùng bóng đèn huỳnh quang 20W, dài 60 cm hoặc dùng bóng đèn tungsten 40W, nguồn sáng nên chiếu từ dưới lên.
- Hộp đen: Có thể soi được cả hai phía, làm bằng gỗ sơn trắng mờ, bên trong nền soi sơn màu đen mờ.

### 3. Thực hiện:

Mẫu thử: Lấy ngẫu nhiên 20 đơn vị mẫu. Loại bỏ mọi nhãn mác, rửa sạch và làm khô bên ngoài.

- Cách cầm và lắc ống mẫu: Xoay đáy ống mẫu về phía có nguồn sáng chiếu tới. Lắc nhẹ nhàng 180°, không lắc, vẩy mạnh làm dung dịch nổi bọt khó nhìn, thường quay 3 vòng, nhìn 3 lần sẽ phân biệt rõ.

- Lóc thủy tinh: là các mảnh hoặc các vảy mỏng thủy tinh lóc có phát quang óng ánh, kích thước to hoặc nhỏ đủ phân biệt với tạp chất không màu khác.

- Sợi cơ học: là tất cả các loại sợi được nhìn thấy bằng mắt thường chuyển động trong dung dịch khi lắc ống mẫu và lơ lửng trong dung dịch.

- Vẩn màu: là các hạt nhỏ màu đen, đỏ, trắng, đục... lẫn vào trong dung dịch.

- Tủa thuốc: là các tinh thể hoặc vô định hình làm cho dung dịch vẩn đục.

- Vật lạ bất thường: là bất cứ tạp chất lạ ngoài các dạng phổ biến đã nêu ở trên bị lẫn vào ống mẫu.

- Các tạp chất khác: Bao gồm các phần tử nhỏ lơ lửng trong dung dịch

### 4. Tiêu chuẩn đánh giá

Là dung dịch trong suốt, không màu hoặc có màu vàng nhạt. Dung dịch hơi nhớt. Tuyệt đối không có xơ bông, vật lạ, cặn, bụi.

## **Phụ lục 4: Phương pháp kiểm tra hiệu giá**

**(Huyết thanh kháng nọc rắn – trang 992 – DDVN V – 2018)**

### **1. Nguyên tắc:**

Dựa vào khả năng trung hòa đặc hiệu của nọc rắn bằng kháng thể kháng nọc rắn khi một loạt các độ pha loãng khác nhau của huyết thanh kháng nọc rắn được trung hòa với một lượng nọc rắn đặc hiệu nhất định, sau đó đem tiêm cho chuột nhắt. Hiệu giá được xác định bằng cách so sánh sự chênh lệch giữa LD<sub>50</sub> độc lực của nọc rắn với nọc rắn đã được trung hòa bằng huyết thanh tương ứng.

### **2. Nguyên vật liệu:**

#### **Thiết bị – dụng cụ:**

- Máy khuấy từ; Máy lắc (Retch)
- Cân phân tích (Sartorius)
- Tủ ấm 37°C
- Tube thủy tinh ĐK 18 mm
- Pipet man 50-200 µl và 200-1000 µl
- Đầu côn 200 µl ; 1000 µl ( Greiner)
- Pipet thủy tinh 1, 2, 5, 10 ml
- Syringe nhựa 0.5 ml

#### **Hóa chất và chế phẩm:**

- Nước muối sinh lý 0,9%
- Nọc rắn Cạp nia Bắc

#### **Động vật thí nghiệm:**

- Chuột nhắt trắng 18-20 gram

### 3. Tiến hành thí nghiệm:

#### 3.1. Xác định LD<sub>50</sub> nọc rắn

- Pha dung dịch: Pha dung dịch nọc rắn gốc 1000 µg/ml trong NaCl 0,9%.

- Pha dung dịch nọc rắn thử nghiệm: 250 µg/ml từ dung dịch mẹ NaCl 0,9%.

- Chọn từ 5-8 điểm nồng độ nọc rắn liên tục trên bảng 1 và bảng 2 để tiêm chuột sao cho trong các độ pha chứa 2 điểm 0% và 100% số chuột chết. Tiêm tĩnh mạch đuôi chuột nhất trắng có trọng lượng 18 - 20 gram với liều 0,5 ml/con, mỗi độ pha 6 chuột.

- Đọc kết quả sau 48 giờ, theo dõi số chuột sống – chết trong mỗi độ pha.

- Tính kết quả theo phương pháp của Spearman – Karber:

$$\text{Log LD}_{50} = X_0 + d/2 - d\sum R_i/n$$

$$T = \text{LD}_{50} = \text{antilog} (X_0 + d/2 - d\sum R_i/n)$$

T : được tính từ LD<sub>50</sub> của 0,5 ml dung dịch độc tố trung hòa

X<sub>0</sub> : log của độ pha loãng cao nhất của nọc rắn tại đó gây ra 100% số chuột chết.

d : log của tác nhân độ pha loãng

n : số chuột tại mỗi độ pha

∑R<sub>i</sub> : tổng số chuột chết trong mỗi độ pha

#### 3.2. Phản ứng trung hòa xác định hiệu giá huyết thanh kháng nọc rắn:

- Chọn các độ pha của huyết thanh sao cho chứa tối thiểu hai điểm 0 % và 100 % số chuột chết.

- Chuẩn bị dung dịch nọc rắn 20 LD<sub>50</sub> bằng cách cân 10 ml nọc rắn pha thành dung dịch 1000 µl/ml, từ dung dịch này sẽ pha thành dung dịch 20

LD<sub>50</sub>.

- Nhóm đối chứng: gồm các độ pha dùng chuẩn dung dịch nọc rắn 1/20, 1/14, 1/10, 1/7, 1/5 ( $d=\log_{10}1,4$ ) hoặc 1/12.1, 1/11, 1/10, 1/9.1, 1/8.3 ( $d=\log_{10}1,1$ ).

- Phản ứng trung hòa giữa kháng huyết thanh và nọc rắn: cho lần lượt vào mỗi ống nghiệm 2,5 ml huyết thanh kháng nọc rắn của các độ pha loãng của huyết thanh, thêm vào tất cả các độ pha 2,5 ml dung dịch nọc rắn 20 LD<sub>50</sub>/ml. Sau đó cho vào tủ ấm ở 37 °C trong 30 phút.

- Tiêm tĩnh mạch đuôi chuột nhắt trắng có trọng lượng 18-20 gr với liều 0,5 ml/con, mỗi độ pha 6 chuột.

- Đọc kết quả sau 48 giờ, theo dõi số chuột sống – chết trong mỗi độ pha.

**- Cách tính kết quả:**

**Liều bảo vệ 50 % (PD<sub>50</sub>)**

Theo phương pháp của Spearman – Karber:

$$\log LD_{50} = X_0 + d/2 - d\sum Ri/n$$

$$PD_{50} = \text{antilog} (X_0 + d/2 - d\sum Ri/n)$$

X<sub>0</sub> : log của độ pha loãng cao nhất của huyết thanh tại đó 100% số chuột sống.

D : log của tác nhân độ pha loãng giữa 2 độ pha.

n : số chuột tại mỗi độ pha.

$\sum Ri$  : tổng số chuột sống trong mỗi độ pha

**Hiệu giá huyết thanh: LD<sub>50</sub>/ml = (T-1)/PD<sub>50</sub>**

T : được tính từ LD<sub>50</sub> của 0,5 ml dung dịch độc tổ trung hòa.

**- Đánh giá kết quả:**

Giá trị T của LD<sub>50</sub> chứng nọc rắn phải nằm trong khoảng từ 4 - 6 thì



không lặp lại thí nghiệm (thử nghiệm có giá trị).

Nếu giá trị T của LD<sub>50</sub> chứng nằm ngoài khoảng 4 - 6 thì lặp lại thí nghiệm với số chuột như ban đầu.

#### **4. Tiêu chuẩn chất lượng:**

Nhận dạng: Huyết thanh có khả năng trung hòa đặc hiệu nọc rắn tương ứng

Hiệu giá/ lọ = Hiệu giá (LD<sub>50</sub>/ml) x thể tích (ml)

Tiêu chuẩn:  $\geq 1000$  LD<sub>50</sub>/lọ.

## **Phụ lục 5: Phương pháp kiểm tra thể tích**

(Tham khảo Phụ lục 11.1 – trang PL-248 – DDVN V – 2018)

**1. Nguyên tắc:** Cân và tính toán thể tích dựa vào khối lượng riêng của mẫu.

**Mẫu đơn liều:** tính thể tích thu hồi.

**2. Nguyên vật liệu và thiết bị:**

- Bơm tiêm 1ml
- Cân phân tích
- Ống đựng mẫu

**3. Thực hiện:**

- Tiến hành trên 6 lọ (1 lọ trắng bơm tiêm, 5 lọ thử)
  - Dùng bơm tiêm sạch có dung tích 1ml hút một lượng mẫu từ lọ thứ 1 để rửa bơm tiêm, xả hết lượng mẫu trong bơm tiêm.
  - Cân ống đựng mẫu và đưa cân về trạng thái cân bằng
  - Dùng bơm tiêm hút hết lượng mẫu trong ống thứ 2, xả hết mẫu vào ống falcon đựng mẫu. Cân lượng mẫu đã thu hồi được.
  - Làm như vậy đối với các đơn vị mẫu còn lại.
  - Đối với các mẫu đựng trong bơm tiêm không cần dùng bơm tiêm hút mà xả trực tiếp vào ống đựng mẫu.
  - Cân 1ml mẫu để tính trọng lượng riêng.
  - Thể tích thu hồi của mẫu được tính như sau:  $X = A/B$
- Trong đó: A: khối lượng cân được của mẫu trong 1 đơn vị đóng ống  
B: Khối lượng cân được của 1 ml mẫu

**4. Tiêu chuẩn đánh giá:**

Hiệu giá/ lọ = Hiệu giá (LD<sub>50</sub>/ml) x thể tích (ml)

Tiêu chuẩn:  $\geq 1000 \text{ LD}_{50}/\text{lọ}$ .

## **Phụ lục 6: Phương pháp kiểm tra an toàn chung**

**(Phụ lục 15.11 – trang PL-372 – DDVN V – 2018)**

### **1. Nguyên tắc:**

- Thử nghiệm an toàn không đặc hiệu nhằm xác định độc tính bất thường trong huyết thanh kháng nọc rắn, được tiến hành trên chuột nhắt và chuột lang. Triệu chứng nhiễm độc trên chuột có thể biểu hiện như sau:

- Thay đổi diện mạo bên ngoài, xù lông.
- Trạng thái bất thường, giảm hoạt động.
- Chuột giảm cân.
- Chuột chết do nhiễm độc.

### **2. Nguyên vật liệu:**

- ĐVTN: 05 chuột nhắt 17 – 22g, 02 chuột lang 250 – 350g
- Bơm tiêm nhựa 1 ml, 5ml.
- Máy lắc

### **3. Tiến hành:**

#### **Chuẩn bị chuột**

- Chuột khỏe mạnh không được dùng cho bất cứ thí nghiệm nào trước đó.

- Kiểm tra loại bỏ những chuột không đạt yêu cầu: Bướu, ỉa chảy, xù lông, ghê...

- Để chuột lang thích nghi với điều kiện môi trường ít nhất 3 ngày trước khi thực hiện thí nghiệm 2 chuột lang/mẫu được nhốt cùng một lồng. Đánh dấu từng chuột một khác nhau và theo dõi cân nặng, chỉ chọn những chuột tăng cân.

- 5 chuột nhắt trắng/mẫu được nhốt chung một lồng. Cân trọng lượng

và đánh dấu từng chuột.

- Gắn nhãn vào lồng chuột vừa chọn.

### **Chuẩn bị mẫu thử**

- Để ấm mẫu ở nhiệt độ phòng.
- Lắc kỹ các lọ vắc xin trước khi hút mẫu.
- Dùng pipet hoặc bơm tiêm hút mẫu thử đều ở mỗi lọ vào chai thủy tinh sạch vô trùng, lắc đều.

### **Tiêm chuột**

#### **\* *Tiêm chuột nhắt trắng***

- Lắc kỹ vắc xin trước khi hút vào bơm kim tiêm, mỗi chuột sử dụng 1 bơm kim tiêm riêng.
- Tiêm ổ bụng cho mỗi chuột 1 liều tiêm cho người nhưng không quá 1ml. Liều tiêm cho người được trình bày trên nhãn sản phẩm

#### **\* *Tiêm chuột lang***

- Lắc kỹ vắc xin trước khi hút vào bơm tiêm, mỗi chuột dùng 1 bơm kim tiêm
- Tiêm vào ổ bụng cho mỗi chuột 1 liều tiêm cho người nhưng không quá 5 ml. Liều tiêm cho người được trình bày trên nhãn sản phẩm

#### **\* *Theo dõi chuột***

- Chuột phải được quán sát kỹ 2 giờ đầu sau tiêm và hàng ngày trong suốt 7 ngày để phát hiện chuột ốm do nhiễm độc
- Ghi những triệu chứng bất thường vào bảng theo dõi.
- Cân trọng lượng chuột trước khi tiêm, ngày thứ 3 và thứ 7 sau khi tiêm.

### **4. Tiêu chuẩn chất lượng**

- Kết quả là “***DAT***” nếu trong suốt thời gian theo dõi 7 ngày:

- Tất cả chuột phải sống khỏe mạnh lên cân so với ngày đầu.
- Không có chuột nào có biểu hiện bệnh lý hoặc nhiễm độc.
- Nếu có hơn 1 chuột chết thì thử nghiệm không đạt yêu cầu (nếu thử nghiệm là có giá trị)

## **5. Lặp lại thí nghiệm**

- Trong quá trình thực hiện nếu xác định được thí nghiệm bị ảnh hưởng bởi các yếu tố không đặc hiệu như: kỹ thuật, chất lượng chuột, môi trường hay sự nhiễm trùng, kết quả của thử nghiệm này không được coi là tin cậy và phải loại bỏ. Lần thử nghiệm tiếp theo sẽ được tính là làm lần đầu.

- Nếu có 1 chuột chết hoặc có dấu hiệu ốm do nhiễm độc trong lần thử nghiệm thứ nhất, cần làm lại thử nghiệm với số lượng chuột gấp đôi, thử nghiệm lần thứ 2 đạt yêu cầu nếu như không có chuột nào chết hoặc ốm do nhiễm độc.

## **6. Giải phẫu chuột**

- Nếu có chuột ốm hoặc có dấu hiệu bất thường trong quá trình theo dõi, cần mổ chuột để xem xét và xác định nguyên nhân gây bệnh.

- Ghi chép vào biên bản giải phẫu chuột.

## **Phụ lục 7: Phương pháp thử chất gây sốt**

**(Phụ lục 15.12 – trang PL-372 – DDVN V – 2018)**

### **1. Nguyên tắc:**

Thử nghiệm chất gây sốt là phương pháp sinh học dùng để đánh giá tính chất gây sốt của vắc xin, sinh phẩm dựa trên sự tăng thân nhiệt của thỏ trước và sau khi tiêm vào tĩnh mạch rìa tai thỏ dung dịch mẫu thử.

### **2. Nguyên vật liệu:**

**Động vật thí nghiệm:** Thỏ khỏe mạnh, trưởng thành, đực hoặc cái không mang thai, cân nặng từ 1,5 kg trở lên được nuôi dưỡng bằng thức ăn không chứa chất kháng sinh và không bị sụt cân trong suốt 1 tuần trước thử nghiệm. Trong thời gian 3 ngày trước khi thí nghiệm, không dùng thỏ này vào những thí nghiệm tương tự khác. Để thỏ nhịn đói qua đêm có thể cho uống nước. Không cho uống nước trong khi đang thí nghiệm.

#### **Thiết bị – dụng cụ:**

- Cân thông dụng (cân thỏ).
- Nhiệt kế điện tử (OMRON) hoặc Máy đo chất gây sốt (Pyrogen Test Processor).
- Syringe nhựa 3 ml, 5 ml
- Đèn cồn.
- Bông thấm nước, Giấy vệ sinh, Vaseline.

### **3. Tiến hành:**

#### **Thử nghiệm thăm dò (preliminary test):**

Từ 1 đến 3 ngày trước khi tiến hành tiêm vắc xin, sinh phẩm cần kiểm tra sơ bộ về tính nhạy cảm của thỏ thí nghiệm bằng cách tiêm vào tĩnh mạch rìa tai thỏ 10 ml/kg trọng lượng dung dịch nước muối sinh lý 0,9% không chứa chất gây sốt đã được làm ấm lên ~ 38,5°C. Đo nhiệt độ trước và sau khi tiêm tiến hành đo 3 lần mỗi lần đo cách nhau 1 giờ. Thỏ nào có dao động so với nhiệt độ ban đầu > 0,6°C sẽ bị loại, không dùng cho thử nghiệm chính.

**Thử nghiệm chính (main test):** Đối với mẫu vắc xin, sinh phẩm.

Trong ngày tiêm, thỏ đạt tiêu chuẩn trên được ổn định ở vị trí thí nghiệm ít nhất 60 phút, sau đó tiến hành đo nhiệt độ thỏ 2 lần, mỗi lần cách nhau 30 phút (nếu đo tay) hoặc theo chương trình cài đặt (nếu đo bằng thiết bị). Nhiệt độ ban đầu của thỏ là giá trị trung bình của 2 lần đo trên. Chỉ dùng những thỏ có 2 lần đo chênh lệch nhau không quá  $0,2^{\circ}\text{C}$  và có nhiệt độ ban đầu nằm trong khoảng  $38,0 - 39,8^{\circ}\text{C}$  để tiêm. Mỗi mẫu thử được tiêm tĩnh mạch rìa tai cho nhóm 3 con thỏ có nhiệt độ ban đầu chênh lệch nhau không quá  $1^{\circ}\text{C}$ . Tốc độ tiêm tĩnh mạch 4 - 6 ml/phút. Thời gian tiêm không kéo dài quá 4 phút.

Liều lượng: 1ml huyết thanh/ 1kg cân nặng.

Nhiệt độ tối đa sau khi tiêm là nhiệt độ cao nhất đo được trong 3 lần đo sau khi tiêm mẫu, mỗi lần đo cách nhau 1 giờ.

#### **4. Đánh giá kết quả:**

- Đáp ứng của mỗi thỏ là hiệu số của nhiệt độ tối đa sau khi tiêm mẫu thử và nhiệt độ ban đầu.

- Đáp ứng của mỗi thỏ bằng 0 nếu nhiệt độ tối đa sau khi tiêm bằng hoặc thấp hơn nhiệt độ ban đầu.

- Nếu không có thỏ nào có đáp ứng lớn hơn  $0,6^{\circ}\text{C}$  và nếu tổng số đáp ứng của 3 thỏ  $\leq 1,3^{\circ}\text{C}$  thì mẫu thử đạt yêu cầu về tiêu chuẩn chất gây sốt. Nếu  $> 2,4^{\circ}\text{C}$  thì không đạt yêu cầu. Nếu 1 thỏ trở lên có đáp ứng  $> 0,6^{\circ}\text{C}$  và/hoặc nếu tổng số đáp ứng của 3 thỏ  $> 1,3^{\circ}\text{C}$  đến  $2,4^{\circ}\text{C}$  thì thử nghiệm cần phải tiến hành thêm trên 3 thỏ khác.

- Nếu tổng số đáp ứng của 6 thỏ (cộng dồn)  $\leq 3^{\circ}\text{C}$  thì mẫu thử đạt yêu cầu về tiêu chuẩn chất gây sốt. Nếu  $> 4,1^{\circ}\text{C}$  thì không đạt yêu cầu. Nếu nằm trong khoảng  $> 3^{\circ}\text{C}$  đến  $4,1^{\circ}\text{C}$  thì cần làm thêm lần cuối trên 3 thỏ khác.

- Nếu tổng số đáp ứng của 9 thỏ (cộng dồn)  $\leq 4,9^{\circ}\text{C}$  thì mẫu thử đạt yêu cầu về tiêu chuẩn chất gây sốt. Nếu  $> 4,9^{\circ}\text{C}$  thì không đạt yêu cầu và phải hủy vắc xin hay sinh phẩm thử nghiệm.

## **Phụ lục 8: Phương pháp kiểm tra vô khuẩn**

**(Phụ lục 15.7 – trang PL-368 – DDVN V – 2018)**

### **1. Nguyên tắc**

- Cây trực tiếp vào môi trường Thioglycolate và TSB (Tryp Soyabean Broth).

### **2. Quy định chung**

- Thử nghiệm vô trùng phải thực hiện dưới điều kiện tủ ATSH (Biosafety Cabinet) class II đạt cấp độ A, trong phòng sạch cấp độ B, được kiểm soát áp suất, nhiệt độ, độ ẩm, tốc độ trao đổi khí và giám sát vi sinh. Nhân viên thực hiện thử nghiệm vô khuẩn phải là người được đào tạo, có hiểu biết và kinh nghiệm về thực hành, được trang bị phương tiện bảo hộ vô trùng và tuân thủ mọi quy trình ra vào khu vực sạch.

### **3. Thiết bị, nguyên vật liệu chính, mẫu**

#### **3.1.Thiết bị, nguyên vật liệu**

- Phòng vô trùng cấp độ B
- Tủ cấy vô trùng
- Tủ ấm 30-35°C
- Tủ mát 20-25°C
- Pipet Aid, Pipét Pasteur vô trùng
- Môi trường Thioglycolate và TSB
- Cồn 70°
- Quần áo, mũ, khẩu trang, tất vải, găng tay, bông gạc vô trùng

#### **3.2.Mẫu thử**

Số lượng thành	Số lượng mẫu thử (lọ/ống)
----------------	---------------------------



phẩm (lọ/ống)	Thể tích trong mỗi lọ $\geq 2$ ml	Thể tích trong mỗi lọ $< 2$ ml
$< 100$	10% nhưng không ít hơn 4	20% nhưng không ít hơn 8
101 - 500	10	20
501 - 1000	2%	4%
$>1000$	20	40

#### 4. Các bước thực hiện

- Mẫu thử cần được khử trùng sơ bộ bên ngoài bằng ethanol 70°C đã được lọc vô trùng, trước khi chuyển vào phòng sạch.

- Ngay trước khi thực hiện thao tác cấy vô trùng, các mẫu thử cần được khử trùng lại.

- Với vắc xin sinh phẩm đóng trong ống, phải dùng cưa, gạc vô trùng để cưa và bẻ ống mẫu thử.

- Với vắc xin, sinh phẩm là vắc xin đông khô phải hồi chỉnh với dung dịch đi kèm trước khi cấy vào môi trường.

- Riêng đối với mẫu vắc xin vắc xin phòng lao (BCG), bột đông khô (dạng ampoule) trước khi khử trùng sơ bộ, cần kiểm tra độ chân không để loại bỏ những ống không đạt tiêu chuẩn.

- Với sinh phẩm là vắc xin phối hợp gồm nhiều thành phần (ví dụ: DTP- HB- IPV hoặc DTP- HB- IPV – Hib) để kiểm tra tính vô khuẩn của sinh phẩm phải hỗn hợp các thành phần vắc xin lại với nhau ngay trước khi cấy vào môi trường.

- Sau khi cấy, cần kiểm chứng lại dung dịch nước muối sinh lý hoặc nước cất bằng cách lấy 4 ml, cấy 1 ml vào mỗi trong 2 ống thioglycolate và 2 ống TSB. Các ống Thioglycolate kiểm chứng được ủ ở nhiệt độ 30 – 35°C, còn các ống TSB ủ ở nhiệt độ 20 – 25°C như với môi trường đã cấy mẫu kiểm tra.

- **Cách cấy:** Lắc kỹ mẫu thử trước khi cấy vào môi trường, dùng quả bóp cao su hoặc pipét air có cắm pipét Pasteur vô trùng để hút mẫu thử. Đẩy hết khí thừa ở đầu pipét. Đưa pipét xuống tận đáy ống môi trường, vừa phối hợp động tác bơm mẫu thử vừa kéo pipét ra khỏi môi trường thử.

- Mỗi loại môi trường được pha chế dùng trong thử nghiệm vô khuẩn đều phải kiểm tra chất lượng môi trường về tính vô trùng, tính tăng sinh, khả năng trung hòa chất ức chế.

**Lượng mẫu cấy vào môi trường:**

Lượng VX-SP có trong 1 lọ	Lượng VX- SP được lấy để cấy	Lượng VX- SP cấy vào mỗi ống MT
Ít hơn 1 ml	Toàn bộ	Toàn bộ
Từ 1 ml đến < 2 ml	1 ml	1 ml
Từ 2 ml đến < 4 ml	½ thể tích	1 ml
Từ ≥ 4 ml đến < 20 ml	2 ml	1 ml

*Lưu ý:* Thể tích môi trường phải phù hợp để đảm bảo khi có mặt mẫu thử không ảnh hưởng đến dinh dưỡng của môi trường.

**Cấy chuyển:**

- Đối với các sản phẩm không làm đục môi trường (globulin miễn dịch, dị nguyên gây bệnh và không gây bệnh, các kháng nguyên, các dung dịch hồi chính v.v.), các ống môi trường sẽ được theo dõi hàng ngày trong vòng 14 ngày.

- Đối với các sản phẩm làm đục môi trường nuôi cấy (những sản phẩm có chất hấp phụ, sinh khối hoặc chứa tế bào não) sau khi cấy 3 – 7 ngày phải cấy chuyển ít nhất 1 ml sang ống môi trường mới tương ứng theo thứ tự và ủ tiếp ở nhiệt độ như quy định. Hàng ngày theo dõi và ghi chép. Đọc kết quả cuối cùng vào ngày thứ 14.

**Ủ mẫu:** các ống Thio ủ ở nhiệt độ 30 – 35°C ít nhất 14 ngày, các ống TSB (hoặc Thio khi dùng thay thế) ủ ở nhiệt độ 20 – 25°C ít nhất 14 ngày. Các ống môi trường cấy chuyên ủ trong thời gian ít nhất là 7 ngày.

## **5. Theo dõi và đọc kết quả**

- Theo dõi các ống môi trường vào những khoảng thời gian thích hợp. Đọc kết quả cuối cùng vào ngày thứ 14 kể từ ngày kiểm tra.

- Lấy các giá nhựa đựng mẫu, nhắc lần lượt các ống môi trường lên để quan sát các dấu hiệu tạp nhiễm sau:

✓ Làm đục môi trường, mất chỉ thị màu, nổi váng. Nổi bọt khí, có mùi hôi của vi khuẩn kỵ khí. Lắng cặn.

✓ Quan sát thật kỹ các dấu hiệu bất thường trên các ống nhiễm (nứt, bể).

### **Đánh giá kết quả**

- **Lô sinh phẩm đạt yêu cầu vô khuẩn khi:** không có sự phát triển của vi khuẩn/nấm sau 14 ngày theo dõi

- **Lô sinh phẩm không đạt yêu cầu vô khuẩn khi:** có sự phát triển của vi khuẩn/ nấm trong các ống môi trường nuôi cấy

- **Thử nghiệm không có giá trị khi gặp một trong các trường hợp sau:**

✓ Môi trường nuôi cấy không đạt vô trùng, độ nhạy

✓ Nhiệt độ ủ mẫu không đạt yêu cầu

✓ Chứng âm không đạt

✓ Phòng sạch không đạt tiêu chuẩn

✓ Phát hiện có sai sót kỹ thuật trong quá trình thao tác

## **6. Tiêu chuẩn chất lượng**

Mẫu kiểm tra đạt yêu cầu về vô khuẩn khi không có sự phát triển của vi sinh vật ở các ống môi trường sau 14 ngày theo dõi.

## **Phụ lục 9: Phương pháp xác định protein tổng số**

**(Phụ lục 15.34 – trang PL-392 – DDVN V – 2018)**

### **1. Nguyên tắc**

Protein có trong mẫu thử bị tủa với acid tricloacetic nóng. Xác định lượng tủa để tính ra lượng protein trong mẫu bằng cách hòa tan tủa, cho phản ứng với đồng tactrate và thuốc thử Folin trong môi trường kiềm để tạo phức màu xanh da trời, đo quang ở bước sóng 750 nm.

### **2. Nguyên vật liệu**

#### **Dụng cụ:**

- Tube  $\phi$  13 x 100 mm - Pyrex®
- Pipet 5 ml -  $1/20 \pm 0,03$  ml và 10 ml -  $1/10 \pm 0,05$  ml
- Bình định mức  $100 \pm 0,4$  ml.

#### **Thiết bị :**

- Cân phân tích.
- Máy ly tâm ~ 10.000 vòng/ phút
- Máy quang phổ, Cồng đo bằng thạch anh dày 1cm.
- Micro pipette 20 – 200  $\mu$ l và 100 – 1000  $\mu$ l (+ đầu côn)
- Máy lắc ống nghiệm IKA.

#### **Hóa chất:**

Có thể sử dụng bộ Kit Protein Assay của Bio-Rad DC hoặc Sigma

- Protein Assay Standard II-Bovine Serum Albumin – Catalog 500-0007. Hoặc:

Albumin Bovine – Initial fractionation by heat shock – Fraction V, minimum 98% - Sigma A – 7906. Hoặc: Ampoul Protein Standards 1mg BSA/ml – Sigma – P0914.

- Trichloroacetic Acid (TCA) – p.a
- Sodium Hydroxide NaOH – p.a
- Sodium Carbonate Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – p.a
- Copper (II) Sulphate CuSO<sub>4</sub> – p.a
- Potassium Sodium Tartrate – p.a
- Folin Ciocalteu's Phenol Reagent

Hóa chất của các nhà sản xuất khác nhau có cùng chất lượng (p.a.) có thể được dùng.

### **Thuốc thử:**

- Dung dịch TCA 10%: Cân 10 g TCA, thêm nước cất vừa đủ 100 ml. Khuấy đều. Bảo quản ở nhiệt độ phòng tối đa 1 năm.

- Dung dịch Alkaline: Chuẩn bị 2 dung dịch:

\* Dung dịch CuSO<sub>4</sub> 2%: Cân 2g CuSO<sub>4</sub>, hòa tan trong vừa đủ 100 ml nước cất.

\* Natri tartrate 4%: Cân 4g Na tartrate, hòa tan trong vừa đủ 100 ml nước cất.

Trộn đều 2 dung dịch trên được dung dịch A. Bảo quản ở nhiệt độ phòng tối đa 2 tháng.

\* Cân 0,8g NaOH và 4g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, thêm nước cất vừa đủ 100ml được dung dịch B. Khuấy đều. Bảo quản ở nhiệt độ phòng tối đa 1 năm.

Khi dùng trộn 50 ml dung dịch B với 1 ml dung dịch A được dung dịch Alkaline.

- Pha loãng thuốc thử Folin Ciocalteu's Phenol với nước cất tỷ lệ 1:2. Chỉ pha khi dùng. Bảo quản tối đa 1 ngày.

### **Dung dịch chuẩn:**

- Bovine Serum Albumin 2 mg/ml (BSA 2 mg/ml):

+ Từ chai chuẩn thêm nước cất như hướng dẫn để được dung dịch 2 mg/ml.

+ Từ Albumin, Bovine: Cân 0,1 g trong bình định mức 100 ml, thêm từ từ nước cất vừa đủ. Đậy nút, lắc kỹ cho đều (BSA 1 mg/ml).

- Albumin Standard 0,25 mg/ml: pha loãng 4 lần dung dịch BSA 1 mg/ml hoặc 8 lần dung dịch BSA 2 mg/ml.

### **3. Thực hiện**

Pha loãng mẫu thử bằng nước cất, ước lượng nồng độ protein của mẫu trong khoảng 20 – 120 mg/ml. Thêm 1ml dung dịch TCA 10% vào 1 ml mẫu thử. Đặt trong nồi cách thủy 80°C/15 phút. Để nguội đến nhiệt độ phòng. Ly tâm ở tốc độ 3500 vòng/phút trong 30 phút, loại bỏ phần dung dịch nước. Rửa tủa bằng 2ml dung dịch TCA 5%, lắc kỹ và ly tâm lại. Thêm 2,5 ml dung dịch Alkaline, ủ ở nhiệt độ phòng để hòa tan tủa. Thêm 2,5 ml nước cất và 0,5 ml thuốc thử Folin (pha loãng 1/2), để ở 37°C/30 phút. Đo OD trên máy quang phổ ở bước sóng 750 nm.

Đường chuẩn: Dụng đường chuẩn với dung dịch protein chuẩn có các nồng độ 0, 20, 40, 60, 80, 100 mg/ml. Dựa vào hàm lượng protein tìm được trên đường chuẩn tính ra hàm lượng protein trong mẫu.

### **4. Tiêu chuẩn chất lượng:**

Hàm lượng protein tổng số  $\leq 150$  mg/ml.

## **Phụ lục 10: Xác định hàm lượng chất bảo quản merthiolate**

**(Phụ lục 15.29 – trang PL-389 – DDVN V – 2018)**

### **1. Nguyên tắc:**

Phương pháp dựa trên phản ứng tách thủy ngân từ Merthiolate dưới dạng ion tự do  $Hg^{2+}$  và ion thủy ngân sẽ kết hợp với Diphenilthiocacbazon (dithizon) thành dithizonat thủy ngân.

### **2. Nguyên vật liệu:**

#### **Dụng cụ thủy tinh:**

- Phễu chiết 60 ml - Pyrex
- Pipet 1 ml -  $1/10 \pm 0,01$  ml và 10 ml -  $1/10 \pm 0,05$  ml
- Bình định mức 100 ml  $\pm 0,10$  ml
- Ống đong 100, 250 ml.
- Bình nón nút mài 100 ml – Duran – Đức

#### **Thiết bị:**

- Máy quang phổ kế
- Cồng đo bằng thạch anh dày 1 cm

#### **Hóa chất:**

- Dung dịch thủy ngân chuẩn 1000 mg/l - 1.19795 - Merck - Đức
- Chloroform  $CHCl_3$  - p.a.
- Dithizone p.a.
- Hydroxylamin sunphat  $H_8N_2O_6S$  p.a.
- Axit sunfuric  $H_2SO_4$  95 – 97 % p.a.
- Kalipermanganat  $KMnO_4$  – TQ.
- Axit acetic  $CH_3COOH$  - p.a.

#### **Thuốc thử - Dung dịch chuẩn:**

- Dung dịch dithizone pha trong chloroform 0,01%: Cân chính xác 0,1

g dithizone hòa tan bằng Chloroform trong bình định mức 100 ml. Thêm chloroform đến vạch. Khi dùng pha loãng 10 lần.

- Dung dịch Hydroxylamin sunphat 20%: Cân 20 g Hydroxylamin sunphat hòa tan trong 100 ml nước cất.

- Dung dịch Kalipermanganat 5%: Cân 5 g Kalipermanganat hòa tan trong 100 ml nước cất.

- Dung dịch Axit sunfuric v/v: 1 thể tích Axit sunfuric + 1 thể tích nước cất.

- Dung dịch Axit acetic 6 M: 150 ml Axit acetic hòa tan trong 500 ml nước cất.

- Dung dịch NaCl 0,9%.

#### **Dung dịch chuẩn:**

- Thủy ngân  $Hg^{2+}$  0,01%: Pha loãng dung dịch thủy ngân chuẩn 1000 mg/l 100 lần (1 ml/BĐM 100 ml).

### **3. Tiến hành:**

Vô cơ hóa mẫu: Hút chính xác 0,2 ml mẫu vào bình tam giác 100 ml có nút mài, thêm 1,2 ml  $H_2SO_4$  v/v, thêm 5 ml dung dịch  $KMnO_4$  5%, lắc đều và để yên 1 giờ. Loại  $KMnO_4$  thừa bằng cách thêm 1,5 ml dung dịch Hydroxylamin sunphat 20%, thêm 35 ml nước cất 2 lần, 5 ml Axit acetic 6M lắc đều. Thêm 10 ml dithizone 0,01% trong chloroforme và lắc trong 30 giây. Chuyển toàn bộ dung dịch thử vào phễu chiết, tách lớp Chloroforme qua 1 lớp bông vào các ống đo. Đo màu bằng quang phổ kế ở bước sóng 620 nm.

### **4. Tính kết quả:**

- Hàm lượng Merthiolate trong mẫu tính theo công thức:

$$X\% = \frac{V \times 10 \times 100 \times 100}{0,2 \times 49,55 \times 1.000.000} = \frac{V}{99,1}$$

Trong đó:



100	:	Tính ra %
49,55	:	Lượng Hg có trong 100 phần merthiolate
V	:	Số ml Hg tính theo đường chuẩn
10	:	Lượng Hg (10 $\mu\text{g}$ ) chứa trong 1 ml chuẩn
0,2	:	Thể tích mẫu đem thử nghiệm.
1.00.0	:	Chuyển $\mu\text{g}$ thành g

### **5. Tiêu chuẩn:**

Hàm lượng chất bảo quản merthiolate  $\leq 0,01\%$ .

## **Phụ lục 11: Xác định pH**

(Phụ lục 15.33 – trang PL-392 – DDVN V – 2018)

### **1. Nguyên tắc:**

pH của một dung dịch là logarit của nghịch đảo hoạt độ ion hydro tính bằng ion gam/lít. Đối với dung dịch loãng, hoạt độ xấp xỉ bằng nồng độ, ta có:

$$\text{pH} = -\lg C_{\text{H}^+}$$

Trị số pH cho ta biết tính chất axit hay kiềm của một dung dịch. pH = 7 biểu thị môi trường trung tính. pH > 7 biểu thị môi trường kiềm. pH < 7 biểu thị môi trường axit.

pH của một dung dịch được xác định bằng máy đo pH với điện cực chỉ thị (điện cực thủy tinh).

Để kiểm tra phép đo nói trên, người ta thường dùng các dung dịch đệm chuẩn có pH xác định, thỏa mãn các điều kiện sau:

- + Hóa chất dùng phải bền vững và điều chế thành tinh khiết.
- + Dung dịch phải có năng suất đệm cao.
- + pH hầu như không thay đổi theo thời gian và ít thay đổi theo nhiệt độ.

### **2. Nguyên vật liệu**

#### **Dụng cụ - thiết bị:**

- Máy đo pH điện cực thủy tinh
- Cốc đựng mẫu 50 ml
- Bình tia nước cất nhựa

#### **Dung dịch chuẩn:**

- Buffer Solution pH 4,0
- Buffer Solution pH 7,0
- Dung dịch ngâm điện cực 3M KCl Elektrolyt

### 3. Tiến hành:

#### 3.1. Chuẩn hóa máy:

Dùng 2 dung dịch đệm chuẩn (có trị số pH khác nhau không quá 4 đơn vị và trị số pH của dung dịch cần đo phải nằm giữa 2 trị số pH này) để chuẩn hóa bằng cách chỉnh máy để đọc được trị số pH phù hợp với nhiệt độ của dung dịch đệm chuẩn khi đo.

\* Đo pH dung dịch chuẩn:

(pH : 7,0)            pH =                            nhiệt độ:

(pH : 4,0)            pH =                            nhiệt độ:

#### 3.2. Đo pH dung dịch thử nghiệm:

Trước mỗi lần đo, các điện cực phải rửa bằng nước cất nhiều lần và làm khô bằng giấy lọc mềm, nhúng chìm điện cực trong dung dịch cần khảo sát và đo trị số pH ở chính nhiệt độ đo của các dung dịch đệm chuẩn. Sau cùng đo lại trị số pH của dung dịch đệm chuẩn dùng để chuẩn hóa máy. Nếu sự khác nhau giữa lần đọc này và trị số gốc của dung dịch đệm chuẩn ấy > 0,05 thì các phép đo phải làm lại.

**Ghi kết quả:**                            pH =                            nhiệt độ:

### 4. Tiêu chuẩn chất lượng.

pH từ 6,0 – 7,0

## **Phụ lục 12: Phương pháp xác định hàm lượng natri clorid**

**(Phụ lục 15.26 – trang PL-388 – DDVN V – 2018)**

### **1. Nguyên tắc:**

Dựa trên phản ứng xác định ion  $\text{Cl}^-$  bằng Bạc nitrat ( $\text{AgNO}_3$ ) 0,1N với chỉ thị màu Kali cromat  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  10%; từ lượng  $\text{AgNO}_3$  chuẩn độ suy ra hàm lượng NaCl.

### **2. Nguyên vật liệu:**

#### **Dụng cụ thủy tinh:**

- Buret tự động 10 ml -  $1/50 \pm 0,02$  ml
- Pipet 1 ml -  $1/10 \pm 0,01$  ml
- Bình tam giác 100 ml

#### **Hóa chất:**

- Bạc nitrat  $\text{AgNO}_3$  0,1N ống chuẩn
- Kali cromat  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  – p.a.

#### **Thuốc thử - Dung dịch chuẩn:**

- Dung dịch kali cromat  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  10%: Hòa tan 10g kali cromat trong 100 ml nước cất.

- Dung dịch chuẩn: Pha  $\text{AgNO}_3$  0,1N từ ống chuẩn, 1 ống/ 1000 ml nước cất.

- Dung dịch  $\text{AgNO}_3$  0,1N được đựng trong bình thủy tinh nút mài màu nâu 1lít, bảo quản mát, tránh ánh sáng.

### **3. Tiến hành:**

- Hút chính xác 1 ml mẫu vào bình tam giác dung tích 100 ml.
- Thêm 3 giọt  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  10 %, lắc đều.
- Chuẩn độ bằng dung dịch  $\text{AgNO}_3$  0,1N cho đến khi xuất hiện màu đỏ

gạch.

- Ghi số N ml AgNO<sub>3</sub> đã dùng.

#### **4. Tính kết quả:**

1ml dung dịch AgNO<sub>3</sub> 0,1N tương ứng với 5,85 mg NaCl.

$$\% NaCl = \frac{N * 5,85 * 100}{1 * 1000}$$

N = số ml AgNO<sub>3</sub> 0,1N dùng để chuẩn độ mẫu thử nghiệm

100: tính theo %

1000: đổi mg ra g

#### **5. Tiêu chuẩn chất lượng.**

Hàm lượng NaCl cho phép từ 0,85 – 0,90%

**Phụ lục 13: Kết quả đánh giá chỉ tiêu gây sốt đối với 3 lô huyết thanh tinh chế thử nghiệm IVACAV-Bun-01/TN, IVACAV-Bun-02/TN và IVACAV-Bun-03/TN.**

	IVACAV-Bun-01/TN			IVACAV-Bun-02/TN			IVACAV-Bun-03/TN		
	1	2	5	2	3	4	1	2	4
Số thỏ	1	2	5	2	3	4	1	2	4
Cân nặng (kg)	2,0	1,9	2,0	1,9	2,0	2,0	1,9	2,0	1,9
Nhiệt độ thỏ trước khi tiêm (°C)	39,1	39,05	39,15	39,25	39,1	39,0	39,3	39,2	39,3
Nhiệt độ thỏ tối đa đo được sau khi tiêm (°C)	39,15	39,2	39,4	39,3	39,3	39,3	39,3	39,35	39,4
Hiệu số nhiệt độ tối đa sau khi tiêm và nhiệt độ ban đầu của mỗi thỏ (°C)	0,05	0,15	0,25	0,05	0,2	0,3	0	0,15	0,1
Tổng nhiệt độ chênh lệch 3 thỏ (°C)	0,45			0,55			0,25		