

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

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

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Nguyễn Thị Tường Vân

**NGHIÊN CỨU ĐÁNH GIÁ TIỀN LÂM SÀNG
VẮC XIN BẠCH HẦU – UỐN VÁN – HO GÀ VÔ BÀO (DTaP)**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Nha Trang – 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 Thị Tường Vân

**NGHIÊN CỨU ĐÁNH GIÁ TIỀN LÂM SÀNG
VẮC XIN BẠCH HẦU – UỐN VÁN – HO GÀ VÔ BÀO (DTaP)**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8420114

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

PGS.TS. Lê Văn Bé

Nha Trang – 2023

Lời cam đoan

Tôi xin cam đoan rằng tất cả các kết quả của đề tài: “***Nghiên cứu đánh giá tiền lâm sàng vắc xin Bạch hầu – Uốn ván – Ho gà vô bào (DTaP)***” là công trình nghiên cứu của bản thân tôi dưới sự hướng dẫn của PGS.TS Lê Văn Bé và tham khảo thêm các tài liệu đã được công bố trước đó. Các số liệu trong đề tài là kết quả làm việc của tôi trong suốt quá trình thực nghiệm tại Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế, thành phố Nha Trang, tỉnh Khánh Hòa.

Hà Nội, ngày 17 tháng 01 năm 2023

Tác giả luận văn

Nguyễn Thị Tường Vân

Lời cảm ơn

Đầu tiên, tôi xin gửi lời cảm ơn đến Ban lãnh đạo Học viện Khoa học và Công nghệ với niềm kính trọng và sự tự hào khi được học tập trong thời gian qua.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo Viện nghiên cứu và Ứng dụng công nghệ Nha Trang cùng quý Thầy Cô giáo đã trang bị cho tôi những kiến thức căn bản và quý giá để tôi hoàn thành luận văn này.

Tôi xin bày tỏ lời cảm ơn sâu sắc nhất đến Thầy PGS.TS. Lê Văn Bé – Nguyên Viện trưởng Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế đã tận tình hướng dẫn, chỉ dạy, giúp đỡ và động viên tôi trong suốt quá trình thực hiện luận văn tốt nghiệp.

Tôi xin chân thành cảm ơn TS. Dương Hữu Thái – Viện trưởng Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế đã tạo điều kiện, giúp đỡ và hỗ trợ để tôi có thể thực hiện và hoàn thành luận văn này.

Xin được ghi nhớ sự tận tâm giúp đỡ của các anh chị Phòng sản xuất vắc xin DPT, phòng Kiểm định và các anh chị em đồng nghiệp tại Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế đã nhiệt tình giúp đỡ và tạo mọi điều kiện hỗ trợ cho tôi trong suốt thời gian thực hiện luận văn tốt nghiệp này.

Xin chân thành cảm ơn đến các bạn học viên cao học lớp BIO.19 đã chia sẻ, trao đổi kiến thức và đóng góp ý kiến quý báu nhằm giúp đỡ, động viên tôi hoàn thành nghiên cứu.

Cuối cùng tôi xin bày tỏ lòng biết ơn gia đình, người thân và các bạn bè đã tạo điều kiện, động viên, chia sẻ kịp thời cùng tôi trong quá trình nghiên cứu.

Hà Nội, ngày 17 tháng 01 năm 2023

Tác giả luận văn

Nguyễn Thị Tường Vân

Danh mục các ký hiệu và chữ viết tắt

BTP	Bán thành phẩm
CoA	Certificate of Analysis (Chứng nhận phân tích chất lượng)
D	Diphtheria (Bạch hầu)
ĐĐVN	Dược điển Việt Nam
DT	Diphtheria – Tetanus Vaccine (Vắc xin bạch hầu – uốn ván)
DTaP	Diphtheria-Tetanus-Acellular Pertussis (vắc xin bạch hầu- uốn ván- ho gà vô bào)
DTwP	Diphtheria – Tetanus – whole cell Pertussis (Vắc xin bạch hầu – uốn ván – ho gà toàn tế bào)
ED50	Effective dose 50 (Liều hiệu lực ở 50%)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent assay (thử nghiệm miễn dịch gắn men)
GĐT	Giải độc tố
GMP	Good Manufacturing Practice (Thực hành sản xuất tốt)
GSK	GlaxoSmithKline (Doanh nghiệp phân phối các sản phẩm y dược)
IU	International unit (Đơn vị quốc tế)
IVAC	Institute of Vaccines and Medical Biologicals (Viện Vắc xin và Sinh phẩm y tế)

KĐ	Kiểm định
Lf	Limits of Flocculations (Giới hạn độ lên bông)
NICVB	National Institute for Control of Vaccine and Biologicals (Viện Kiểm định quốc gia vắc xin và sinh phẩm)
SBC	Streptavidin biotin Complex (Chất khuếch đại phản ứng)
T	Tetanus (Uốn ván)
TCCL	Tiêu chuẩn chất lượng
TCCS	Tiêu chuẩn cơ sở
TCMR	Tiêm chủng mở rộng
TLS	Tiền lâm sàng
ToBi	Toxin Biding Inhibition test (Phương pháp ức chế miễn dịch gắn men)
TSB	Tryp Soyabean Broth (môi trường nước đậu thủy phân)
WFI	Water for injection (Nước cất pha tiêm)

Danh mục các bảng

Bảng 1. 1. Chuỗi phát triển một vắc xin mới	12
Bảng 2.1 Thiết kế nghiên cứu	22
Bảng 2.2: Bảng điểm đánh giá phản ứng tại vị trí tiêm (Draize).....	23
Bảng 3.1: Kết quả chỉ số huyết học máu nền.....	39
Bảng 3.2: Kết quả chỉ số huyết học 2 ngày sau tiêm mũi 1	40
Bảng 3.3: Kết quả chỉ số huyết học 2 ngày sau tiêm mũi 3	41
Bảng 3.4: Kết quả chỉ số huyết học 14 ngày sau hồi phục	42
Bảng 3.5: Kết quả xét nghiệm sinh hóa máu nền	44
Bảng 3.6: Kết quả xét nghiệm sinh hóa 2 ngày sau tiêm mũi 1	44
Bảng 3. 7: Kết quả xét nghiệm sinh hóa 2 ngày sau tiêm mũi 3.....	45
Bảng 3. 8: Kết quả xét nghiệm sinh hóa 14 ngày sau hồi phục	45
Bảng 3. 9. Hiệu giá kháng thể kháng bạch hầu, uốn ván, ho gà thời điểm 2 ngày sau tiêm mũi 3	47
Bảng 3. 10. Hiệu giá kháng thể kháng bạch hầu, uốn ván, ho gà thời điểm 14 ngày sau tiêm mũi 3	47

Danh mục các hình vẽ, đồ thị

Hình 2. 1. Sơ đồ mũi tiêm miễn dịch, lấy máu và giải phẫu.....	21
Hình 3.1 Tỷ lệ tăng trọng lượng thỏ so với ngày trước tiêm	29
Hình 3.2 Nhiệt độ của thỏ trước và sau tiêm mũi 1	30
Hình 3.3 Nhiệt độ của thỏ trước và sau tiêm mũi 2	31
Hình 3.4 Nhiệt độ của thỏ trước và sau tiêm mũi 3	31
Hình 3.5: Hình ảnh giải phẫu mô não thỏ	32
Hình 3.6. Hình ảnh giải phẫu mô cơ tim thỏ.....	33
Hình 3.7. Hình ảnh giải phẫu mô gan thỏ	33
Hình 3.8. Hình ảnh giải phẫu mô thận trái thỏ.....	34
Hình 3.9. Hình ảnh giải phẫu mô thượng thận thỏ	34
Hình 3.10. Hình ảnh giải phẫu mô tủy xương thỏ	35
Hình 3. 11. Các hình ảnh tổn thương ở nhu mô phổi bên phải.....	35
Hình 3.12. Các hình ảnh tổn thương ở nhu mô phổi.....	36
Hình 3. 13. Các hình ảnh tổn thương ở mô cơ vùng tiêm bên trái	36
Hình 3.14. Các hình ảnh tổn thương ở mô cơ vùng tiêm.....	37
Hình 3. 15. Hiệu giá kháng thể kháng Bạch hầu	48
Hình 3.16. Hiệu giá kháng thể kháng Uốn ván.....	48
Hình 3. 17. Hiệu giá kháng thể kháng Ho gà.....	49

MỤC LỤC

	Trang
MỞ ĐẦU	3
ĐẶT VẤN ĐỀ	3
MỤC TIÊU ĐỀ TÀI	4
NỘI DUNG NGHIÊN CỨU	4
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	5
1.1. TỔNG QUAN VỀ CÁC BỆNH TRUYỀN NHIỄM	5
1.1.1. Bệnh Bạch hầu	5
1.1.2. Bệnh uốn ván.....	5
1.1.3. Bệnh ho gà.....	6
1.2. VẮC XIN PHÒNG BỆNH BẠCH HẦU – UỐN VÁN – HO GÀ	7
1.2.1. Lịch sử hình thành.....	7
1.2.2. Vắc xin DTaP.....	9
1.3. CÁC LUẬN CỨ VỀ TIỀN LÂM SÀNG	12
1.3.1. Vị trí của giai đoạn tiền lâm sàng trong chuỗi phát triển một vắc xin mới	12
1.3.2. Thử nghiệm tiền lâm sàng.....	13
1.3.3. Động vật thí nghiệm.....	14
1.3.4. Giải phẫu bệnh học	14
1.3.5. Phương pháp đánh giá tính sinh miễn dịch.....	15
CHƯƠNG 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	19
2.1. NGUYÊN LIỆU	19
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu	19
2.1.2. Vật liệu	19
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	21
2.2.1. Thiết kế nghiên cứu.....	21
2.2.2. Nghiên cứu độc tính (toxicology)	22

2.2.3. Nghiên cứu đánh giá tính sinh miễn dịch (immunogenicity).....	25
2.2.4. Phương pháp ELISA định lượng kháng thể kháng Bạch hầu, Uốn ván, Ho gà	26
2.2.5. Xử lý thống kê.....	26
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	28
3.1. NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH (TOXICOLOGY).....	28
3.1.1. Phản ứng tại chỗ sau tiêm (Phụ lục 1)	28
3.1.2. Quan sát sinh học lâm sàng.....	28
3.1.3. Theo dõi trọng lượng (Phụ lục 2).....	28
3.1.4. Mức độ tiêu thụ thức ăn	29
3.1.5. Phản ứng sốt (Phụ lục 3)	30
3.1.6. . Kết quả giải phẫu bệnh đại thể (Phụ lục 7)	31
3.1.7. Kết quả giải phẫu mô bệnh học vi thể.....	32
3.1.8. Xét nghiệm huyết học	39
3.1.9. Xét nghiệm sinh hóa (Phụ lục 5).....	43
3.2. NGHIÊN CỨU ĐÁNH GIÁ TÍNH SINH MIỄN DỊCH (IMMUNOGENICITY)	46
CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	51
4.1. KẾT LUẬN.....	51
4.2. KIẾN NGHỊ	51
TÀI LIỆU THAM KHẢO	52

MỞ ĐẦU

ĐẶT VẤN ĐỀ

Tại Việt Nam, Chương trình Tiêm chủng mở rộng (CTTCMR) đã được triển khai trên toàn quốc từ năm 1985 với 6 loại vắc xin phòng bệnh truyền nhiễm nguy hiểm là lao, bạch hầu, ho gà, uốn ván, sởi, bại liệt. Vắc xin kết hợp (DTwP) Bạch hầu, Ho gà, Uốn ván trong một mũi tiêm được áp dụng cho trẻ nhỏ dưới 1 năm tuổi với lịch tiêm 3 mũi vào tháng thứ 2,3,4 và sẽ được nhắc lại khi trẻ 16 tháng đến 6 năm tuổi. Tuy nhiên trong quá trình triển khai và sử dụng loại vắc xin phối hợp có thành phần Ho gà toàn tế bào đã xảy ra nhiều phản ứng phụ và một số phản ứng nặng sau tiêm, điều này ảnh hưởng rất lớn đến tâm lý sử dụng vắc xin của người dùng đặc biệt là khi sử dụng cho trẻ em.

Loại vắc xin phối hợp có chứa thành phần ho gà vô bào đã được phát triển từ những năm 1980 tại Nhật Bản được đánh giá là an toàn và rất ít gây phản ứng phụ nên đã khắc phục được nhược điểm trên. Do vậy loại vắc xin này đã nhanh chóng phát triển và hiện nay rất được tin dùng tại các nước phát triển. Tổ chức Y tế thế giới năm 1992 khuyến cáo sử dụng vắc xin DTaP cho các đối tượng là trẻ em dưới 7 tuổi. Từ năm 1997, tại Mỹ, việc chuyển đổi vắc xin DTwP sang DTaP đã được tiến hành đồng loạt trong những năm sau đó. Loại vắc xin này được tiến hành tiêm chủng 5 mũi cho các trẻ 2, 4, 6 tháng tuổi, từ 15 – 18 tháng tuổi và từ 4 – 6 tuổi.

Tuy nhiên vắc xin phối hợp có chứa thành phần ho gà vô bào đang sử dụng trên thị trường Việt Nam hiện nay hoàn toàn là vắc xin ngoại nhập với giá thành rất cao và số lượng hạn chế. Cùng với sự khan hiếm của loại vắc xin này thường xuyên xảy ra vì hoàn toàn phụ thuộc vào tình hình cung ứng trên thị trường quốc tế. Trước nhu cầu rất lớn về một loại vắc xin phối hợp dựa trên thành phần ho gà vô bào, giảm chi phí nhập khẩu, giảm sự phụ thuộc vào các nhà sản xuất bên ngoài thì việc nghiên cứu phát triển vắc xin DTaP với thành phần ho gà vô bào (aP) tại Việt Nam là việc làm hết sức cần thiết.

Việc nghiên cứu thành công vắc xin DTaP tại Việt Nam sẽ mở ra một triển vọng trong tương lai gần và sẽ thay thế hoàn toàn vắc xin DTwP với giá thành cạnh tranh so với sản phẩm nhập ngoại, tiến tới cung cấp cho Chương trình TCMR Việt Nam một loại vắc xin cho trẻ em ở độ tuổi từ 5-10 tuổi nhằm duy trì bền vững và ổn định miễn dịch cộng đồng bảo vệ trẻ chống lại 3 bệnh Bạch hầu – Uốn ván – Ho gà.

Đứng trước sự cấp thiết của việc phát triển một vắc xin mới, chúng tôi đề xuất thực hiện đề tài “*Nghiên cứu đánh giá tiền lâm sàng vắc xin Bạch hầu – Uốn ván – Ho gà vô bào (DTaP)*” để làm nền tảng cho việc nghiên cứu các giai đoạn tiếp theo.

MỤC TIÊU ĐỀ TÀI

1. Đánh giá độc tính liều lặp lại trên thỏ giống New Zealand.
2. Đánh giá khả năng sinh miễn dịch sau 3 liều tiêm trên thỏ giống New Zealand so với nhóm chứng.

NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

1. Đánh giá an toàn, khả năng dung nạp của thỏ với 3 liều tiêm vắc xin DTaP.
2. Đánh giá độc tính bằng xét nghiệm giải phẫu đại thể và vi thể ở nhóm thỏ chính (main group) và nhóm thỏ hồi phục (recovery group).
3. Đánh giá khả năng sinh miễn dịch của thỏ sau 3 liều tiêm vắc xin DTaP bằng xét nghiệm ELISA phát hiện kháng thể kháng bạch hầu, kháng uốn ván, kháng ho gà vô bào so với máu nền.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. TỔNG QUAN VỀ CÁC BỆNH TRUYỀN NHIỄM

1.1.1. Bệnh Bạch hầu

Bệnh Bạch hầu (Diphtheria) gây ra bởi vi khuẩn *Corynebacterium diphtheria* và lây truyền qua đường hô hấp. Bạch hầu là một bệnh nhiễm trùng, nhiễm độc biểu hiện rõ rệt ở nhiều bộ phận như họng, mũi, mắt, da... Đây là bệnh nhiễm khuẩn cấp tính có giả mạc ở tuyến hạnh nhân, hầu họng, thanh quản, mũi ngoài ra nó còn xuất hiện ở da, các màng niêm mạc khác như kết mạc hoặc bộ phận sinh dục. Bệnh lây lan trực tiếp từ người bị bệnh sang người bình thường qua đường hô hấp hoặc lây gián tiếp qua việc tiếp xúc với đồ vật hay các vật dụng có dính chất bài tiết của người nhiễm vi khuẩn Bạch hầu. Một số triệu chứng của bệnh Bạch hầu như đau bụng, ho, sốt kèm ớn lạnh và các triệu chứng này sẽ tăng dần khi người bệnh phơi nhiễm từ 2-5 ngày. Bởi vì các triệu chứng này khá phổ biến nên nhiều người thường nghĩ rằng trẻ đang bị cảm lạnh thông thường chứ không phải đang nhiễm vi khuẩn Bạch hầu, các trẻ từ 1 đến 7 tuổi thường có tỷ lệ mắc bệnh khá cao [1].

Tổ chức Y tế thế giới (WHO) khuyến khích trẻ em nên tiêm một liệu trình đủ 3 mũi vắc xin bạch hầu và nhắc lại 3 mũi sau đó. Trẻ sơ sinh được 6 tuần tuổi nên bắt đầu tiêm mũi vắc xin đầu tiên và các mũi tiếp theo tiêm cách nhau tối thiểu 4 tuần. Đối với 3 mũi tiêm nhắc lại nên tiêm lần lượt khi trẻ từ 18 – 23 tháng tuổi, 4 – 7 tuổi và 9 – 15 tuổi. Mỗi mũi tăng cường cách nhau 4 năm là hợp lý [2].

Vi khuẩn Bạch hầu là một ngoại độc tố có độc tính cao, có tính kháng nguyên đặc hiệu, không bền với nhiệt và formalin. Khi độc tố được xử lý bằng nhiệt hoặc formalin thì sẽ mất đi độc tính, hay còn gọi là giải độc tố và được sử dụng để ứng dụng vào việc sản xuất vắc xin phòng bệnh Bạch hầu [3].

1.1.2. Bệnh uốn ván

Bệnh uốn ván (Tetanus) là một bệnh cấp tính do ngoại độc tố tetanospasmin sinh ra từ trực khuẩn *Clostridium tetani* gây nên. Đây là một

nhiễm khuẩn rất nguy hiểm có tỷ lệ tử vong khá cao. Trước khi có chương trình TCMR, tỷ lệ tử vong bệnh Uốn ván cao từ 25-90%, nổi bật nhất là Uốn ván ở rốn trẻ sơ sinh, với tỷ lệ tử vong lên đến trên 95% [4, 5]. Ở các nước kém phát triển hay các nước chưa áp dụng chương trình TCMR thì tỷ lệ nhiễm bệnh ở trẻ sơ sinh và người trẻ tuổi khá cao.

Bệnh thường xảy ra khi có tổn thương cấp tính như rách da, trầy da, phẫu thuật hay bị bỏng... Thời gian ủ bệnh trong khoảng từ 4 – 21 ngày. Một số ca tử vong do bị suy hô hấp, rối loạn thần kinh thực vật và ngừng tim. Nhờ chương trình TCMR ngày càng được phát triển mà tỷ lệ mắc bệnh cũng như tử vong giảm đi đáng kể [5].

1.1.3. Bệnh ho gà

Bệnh ho gà (Whooping Cough) là một bệnh nhiễm trùng cấp tính đường hô hấp với đặc tính là các cơn ho đặc trưng và kéo dài trong thời gian rất lâu. Năm 1991, WHO đã đưa ra tiêu chuẩn chẩn đoán xác định bệnh ho gà: cơn ho kịch phát kéo dài 21 ngày hoặc hơn, nuôi cấy xác nhận có vi khuẩn ho gà, kháng thể kháng kháng nguyên ngưng kết hồng cầu dạng sợi (Filamentous hemagglutinin: FHA) hoặc kháng thể kháng độc tố ho gà (Pertussis toxin: PT) trong huyết thanh tăng, có tiền sử tiếp xúc trực tiếp hoặc có sự liên hệ chặt chẽ với bệnh nhân mắc bệnh ho gà [6].

Bệnh lây truyền qua đường hô hấp, bởi các cơn ho từ bệnh nhân và sự tiếp xúc thường xuyên của người mang mầm bệnh với các cá thể chưa có miễn dịch. Trong quá trình gây bệnh, vi khuẩn bám và định vị vào phần trên của đường hô hấp nhờ các diềm tua, nhanh chóng nhân lên trên bề mặt tế bào biểu mô hô hấp, không xâm nhập qua niêm mạc, mô hay vào máu [7].

Bệnh dễ diễn tiến nặng và dẫn đến tử vong, gây nhiều biến chứng ở phổi, phế quản, phần lớn là ở trẻ dưới 5 tuổi và trẻ suy dinh dưỡng. Trong chu kỳ khoảng từ 3 – 5 năm bệnh sẽ phát triển thành dịch. Ở Việt Nam, chương trình TCMR được phát triển rộng khắp cả nước từ năm 1986, khi đó trẻ em dưới 1 tuổi được gây miễn dịch cơ bản bằng 3 liều vắc xin Bạch hầu – Ho gà – Uốn ván (DTwP) [8, 9]. Nhờ vậy tỷ lệ mắc ho gà ở trẻ em giảm từ 84,4/100.000

trẻ em năm 1984 xuống chỉ còn 0,46/100.000 trẻ em vào năm 2004. Chương trình tiêm chủng mở rộng đã phòng được bệnh ho gà cho hàng triệu trẻ em và cứu được sinh mạng của hàng ngàn trẻ. Đặc biệt kể từ khi triển khai tiêm nhắc mũi 4 vắc xin ho gà thì số ca mắc hàng năm giai đoạn (1998-2012) ở mức thấp 0,1 - 0,32/100.000 dân [10].

1.2. VẮC XIN PHÒNG BỆNH BẠCH HẦU – UỐN VÁN – HO GÀ

1.2.1. Lịch sử hình thành

Từ những năm 1920, vắc xin Bạch hầu, Uốn ván ra đời; 5 năm sau là từ năm 1925 vắc xin Ho gà mới xuất hiện. Tuy nhiên đến năm 1933 Kendrick mới chứng minh được hiệu quả bảo vệ của 3 loại vắc xin này. Từ năm 1948, vắc xin phối hợp 3 thành phần Bạch hầu, Uốn ván, Ho gà được phát triển. Tổ chức Y tế thế giới bắt đầu khởi động Chương trình TCMR từ năm 1974, DTWP là một trong những vắc xin đi đầu cho công cuộc phòng 3 trong 6 bệnh cơ bản là Bạch hầu, Ho gà, Uốn ván, Lao, Sởi và Bại liệt. Năm 2015, có tới 85% trẻ em dưới 1 tuổi nhận đủ 3 liều vắc xin DTWP [1,11].

Từ những năm 1959, các nghiên cứu về sản xuất Vắc xin Ho gà tại Việt Nam bắt đầu phát triển, ở Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương, nuôi cấy tinh vi khuẩn trên môi trường Bordet – Gengou (BG). Tương tự vậy các vắc xin Uốn ván và Bạch hầu cũng được sản xuất rộng rãi trong thời kỳ đó, nhưng chỉ với số lượng nhỏ và vắc xin đơn giá [12].

Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế được tiếp nhận dây chuyền sản xuất vắc xin DTWP ở quy mô lớn từ nhà tài trợ UNICEF. Bắt đầu từ đó các vắc xin Bạch hầu, Uốn ván, Ho gà được sản xuất theo công nghệ lên men bán tự động trên nôi lên men 300 lít – 600 lít [13].

Vắc xin Ho gà được sản xuất trên 2 chủng Bp 134 (ngưng kết nguyên 1,3,7) và Bp 509 (ngưng kết nguyên 1,2,6,7) được cung cấp từ Viện Quốc gia sức khỏe cộng đồng Hà Lan (RIVM) năm 1989. Mỗi loại chủng được lên men riêng biệt trên nôi lên men 300 lít của hãng B.Braun (Đức) và được hỗn theo tỷ lệ sao cho đảm bảo nước cốt Ho gà hỗn hợp có đầy đủ các ngưng kết nguyên 1,2, 3 và đạt công hiệu bảo vệ trên chuột tối thiểu là 6 IU/ml [14].

Tương tự đối với hai thành phần Uốn ván và Bạch hầu cũng được lên men trên nồi lên men 300 lít đối với thành phần Bạch hầu và 600 lít đối với thành phần Uốn ván. Sau đó khi thu được sinh khối đem đi tách lọc và loại bỏ vi khuẩn bằng tổ hợp màng lọc chéo tiếp tuyến TFF (Tangential Flow Filtration). Vì cả hai thành phần Bạch hầu và Uốn ván là ngoại độc tố nên chúng được bất hoạt bởi nhiệt độ và formalin. Sử dụng formalin với tỷ lệ 0,4% - 0,6% v/v ở 37°C trong 6 tuần và tinh chế để thu được giải độc tố tinh sạch. Năm 1990, tại cơ sở 2 Đà Lạt, IVAC đã sản xuất thành công 2 loại vắc xin là vắc xin Bạch hầu – Ho gà – Uốn ván hấp phụ (DTwP) và vắc xin Uốn ván hấp phụ (TT) bằng dây chuyền lên men sinh học. Ngày 12/09/1990, Bộ Y tế cho phép hai loại vắc xin này được thử nghiệm lâm sàng trên người tại Khánh Hòa, Tiền Giang, Lâm Đồng và Buôn Mê Thuật – Đắk Lắk. Sau khi Hội đồng khoa học của Bộ Y tế đánh giá vắc xin DTwP và TT đạt tiêu chuẩn an toàn cho người sử dụng và có hiệu lực bảo vệ cao, tháng 03/1991 Bộ Y tế ra quyết định chuẩn hóa sử dụng vắc xin DTwP hấp phụ do IVAC sản xuất mang mã số TCVN 908 – 91[15].

Hiện nay trên thế giới đang nghiên cứu và phát triển vắc xin có chứa thành phần ho gà vô bào (acellular Pertussis: aP). Nhiều nghiên cứu đã chứng minh được vắc xin có chứa thành phần ho gà vô bào gây ít phản ứng phụ hơn so với vắc xin có chứa thành phần ho gà toàn tế bào. Nguyên nhân là do vắc xin DTaP là vắc xin chỉ chứa 2-5 kháng nguyên ho gà vô bào có chọn lọc và tinh chế, còn vắc xin ho gà toàn tế bào chứa toàn bộ khoảng 3.000 kháng nguyên của vi khuẩn ho gà.

Bên cạnh ưu điểm về tính an toàn, hiệu quả bảo vệ, nhược điểm lớn nhất của vắc xin chứa thành phần Ho gà vô bào này là đòi hỏi đầu tư lớn, công nghệ tiên tiến hơn khiến giá thành sản phẩm cao gấp hàng chục lần vắc xin thường. Đây là sản phẩm cũ và chỉ những nhà sản xuất lớn mới có tiềm năng phát triển để sử dụng trong vắc xin phối hợp 3,4,5 và 6 thành phần. Với nền tảng công nghệ và năng lực hiện có, hướng đi của IVAC là nghiên cứu phát triển vắc xin DTaP, 2 thành phần bạch hầu và uốn ván được sản xuất trong nước phối hợp với thành phần aP nhập khẩu từ Bionet (Thái Lan), sau

khi thiết lập quy trình sản xuất và sản xuất thành công vắc xin DTaP ở quy mô thí nghiệm đạt các tiêu chuẩn chất lượng.

1.2.2. Vắc xin DTaP

Vắc xin ho gà dạng vô bào chứa độc tố ho gà bất hoạt (Pertussis toxin: PT) và một hoặc nhiều thành phần vi khuẩn khác ví dụ như hemagglutinin dạng sợi (FHA), một protein màng ngoài 69 kilodalton - pertactin (Pn), và fimbriae (Fim) loại 2 và 3. PT được giải độc bằng cách dùng hóa chất, cụ thể là hydrogen peroxide, formalin và glutaraldehyde hoặc bằng cách sử dụng các kỹ thuật di truyền phân tử. Vắc xin ho gà dạng vô bào chứa nội độc tố ít hơn đáng kể so với vắc xin ho gà toàn tế bào.

Những lo ngại về tính an toàn của vắc xin ho gà toàn tế bào đã thúc đẩy sự phát triển của vắc xin vô bào ít gây ra các tác dụng phụ vì chúng chứa các thành phần kháng nguyên tinh khiết của *Bordetella pertussis*. Hai loại vắc xin bạch hầu, uốn ván và ho gà vô bào ACEL-IMUNE và Tripedia đã được cấp phép trong vài năm, nhưng chỉ được sử dụng cho liều thứ tư và thứ năm trong khoảng 15 tháng – 6 tuổi trước đó trẻ em đã tiêm ba liều vắc xin bạch hầu, uốn ván và ho gà toàn tế bào (DTwP) trở lên. Các báo cáo đã công bố chỉ ra rằng, khi được sử dụng cho trẻ em từ 2, 4 và 6 tháng tuổi, vắc xin ho gà vô bào có hiệu quả trong việc ngăn ngừa bệnh ho gà và có ít tác dụng phụ tại chỗ, toàn thân và một số tác dụng phụ nghiêm trọng hơn so với vắc xin ho gà toàn tế bào. Trên cơ sở những dữ liệu này, Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm (FDA) Mỹ đã cấp phép loại vắc xin DTaP để sử dụng cho trẻ em từ 6 tuần tuổi đến 6 tuổi. Tripedia hiện đã được cấp phép cho bốn liều ban đầu, và ACEL-IMUNE cho tất cả năm liều của phác đồ tiêm vắc xin phòng bệnh bạch hầu, uốn ván và ho gà. Vắc xin DTaP thứ ba (Infanrix) đã được cấp phép vào tháng 1 năm 1997, sử dụng bốn liều đầu tiên của phác đồ tiêm chủng cho trẻ em. Vắc xin Tripedia, ACELIMUNE và Infanrix hiện được khuyến dùng để tiêm chủng định kỳ cho trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ, mặc dù vắc xin ho gà toàn tế bào vẫn là lựa chọn thay thế được chấp nhận. Tripedia, ACEL-IMUNE và Infanrix được khuyến dùng cho tất cả các liều còn lại trong lịch trình cho trẻ đã bắt đầu đợt tiêm chủng với một, hai, ba hoặc bốn liều vắc xin ho gà toàn tế

bào. Vào tháng 9 năm 1996, FDA đã cấp phép sử dụng TriHIBit (ActHIB hoàn nguyên với Tripedia) cho liều thứ tư phòng bệnh bạch hầu, uốn ván, ho gà và bệnh *Haemophilus influenzae* type b [16]. Ngày nay, aP được phối trộn nhiều thành phần khác tạo ra vắc xin 3,4,5,6 thành phần trong 1 mũi tiêm, như Bạch hầu, Uốn ván, Viêm màng não Hib (*Haemophylus influenzae* type b: Hib), Viêm gan B (*Hepatitis* type B: HeB), bại liệt bất hoạt (Inactivated Polio Vaccin: IPV).

1.2.3. Tình hình nghiên cứu vắc xin DTaP trong và ngoài nước

1.2.3.1. Trên thế giới

Năm 1948, sự ra đời của vắc xin đa giá đầu tiên, liên kết các kháng nguyên bạch hầu và ho gà, bạch hầu và uốn ván, bạch hầu - uốn ván - ho gà, mà hiện nay vẫn còn được dùng ở nhiều nước trên thế giới trong đó có Việt Nam bởi hiệu quả bảo vệ tốt và giá thành hợp lý [19].

Kể từ năm 1991, bảy nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng đã được thực hiện ở châu Âu và châu Phi để đánh giá hiệu quả của tám loại vắc xin DTaP khác nhau ở trẻ em. Các loại vắc xin, được sản xuất bởi các nhà sản xuất khác nhau, có chứa một lượng kháng nguyên khác nhau.

Một số nghiên cứu đã nhận định rằng hiệu quả của ba liều vắc xin phối hợp có chứa thành phần ho gà vô bào trong việc ngăn ngừa bệnh ho gà tăng từ trung bình đến nặng nằm trong phạm vi dao động từ 59% đến 89%. Các phản ứng tại chỗ và toàn thân ít xảy ra hơn so với những trẻ được tiêm vắc xin có chứa thành phần ho gà toàn tế bào. Các phản ứng nghiêm trọng hơn như sốt khoảng 40,5°C, quấy khóc dai dẳng trong thời gian ≥ 3 giờ, các đợt giảm trương lực và co giật thường xảy ra ở trẻ sơ sinh được tiêm vắc xin có chứa thành phần ho gà toàn tế bào; ít xảy ra hơn so với trẻ được tiêm vắc xin chứa thành phần ho gà vô bào. Số lượng đối tượng trong các nghiên cứu này không đủ để ước tính nguy cơ mắc các phản ứng nghiêm trọng hiếm gặp (như là bệnh não hoặc sốc phản vệ) [16].

Hiện nay có nhiều sản phẩm vắc xin đa giá đang lưu hành trên thị trường trong và ngoài nước như: Daptacel (DTaP) hãng Sanofi Pasteur [20], Infanrix (DTaP) hãng GSK [21], Pentaxim (DTaP-Hib-IPV) hãng Sanofi Pasteur; Infanrix Hexa (DTaP-HeB-Hib-IPV) hãng GSK...với thành phần sử dụng là ho gà vô bào (aP).

1.2.3.2. Ở Việt Nam

Hiện nay, chưa có một cơ sở nào thành công trong việc nghiên cứu và phát triển thương mại vắc xin DTaP để có thể cung cấp cho thị trường trong nước. Bên cạnh đó Viện Vắc xin và Sinh phẩm y tế (IVAC) là nhà sản xuất vắc xin DTwP duy nhất tại Việt Nam với thành phần wP. Hàng năm IVAC vẫn sản xuất vắc xin DTwP cung cấp cho chương trình tiêm chủng mở rộng với chất lượng ổn định đạt tiêu chuẩn GMP.

IVAC đã có nhiều năm kinh nghiệm sản xuất và làm chủ các công nghệ tinh chế vắc xin dạng giải độc tố (uốn ván, bạch hầu, ho gà toàn tế bào), với một đội ngũ cán bộ kỹ thuật có kinh nghiệm nhiều năm trong lĩnh vực sản xuất, kiểm định, quản lý vắc xin.

Trong quá trình phát triển vắc xin DTwP, IVAC đã phát triển và làm chủ các công nghệ quan trọng: nuôi cấy và lên men vi sinh vật, kỹ thuật rửa cắt phân đoạn bằng amoni sunfate, lọc TFF, ly tâm liên tục và siêu ly tâm gradient cũng như các phương pháp kiểm định như đánh giá độc tính đặc hiệu của thành phần ho gà bằng thử nghiệm tăng trọng chuột, yếu tố kích hoạt bạch cầu, nội độc tố [17], xác định hoạt tính kháng nguyên độc tố ho gà (PT) trên tế bào CHO/K1 [18].

Vì những cơ sở và nền tảng sẵn có cùng với bề dày trong nghiên cứu sản xuất chuyên sâu, hiện nay IVAC đã và đang từng bước tiếp cận nghiên cứu thử nghiệm vắc xin ho gà từ các đề tài nghiên cứu cấp cơ sở và Quốc gia, đặc biệt là nắm bắt các kỹ thuật tiên tiến đánh giá chất lượng của vắc xin ho gà vô bào, cụ thể là đã cập nhật các phương pháp kiểm định như: thử nghiệm kiểm tra vô trùng, LAL (kiểm tra hàm lượng endotoxin), độ nhạy cảm

histamine, độc tố hoại tử da không bền nhiệt, hồi độc, phương pháp ELISA xác định hàm lượng kháng nguyên PT, FHA,...

1.3. CÁC LUẬN CỨ VỀ TIỀN LÂM SÀNG

1.3.1. Vị trí của giai đoạn tiền lâm sàng trong chuỗi phát triển một vắc xin mới

Bảng 1. 1. Chuỗi phát triển một vắc xin mới [22]

Giai đoạn	Nội dung phát triển sản phẩm	Luận cứ
1	Nghiên cứu và phát triển Quy mô Phòng thí nghiệm	<ul style="list-style-type: none"> - Xác định được cơ bản quy trình - Xác định được các tiêu chuẩn chất lượng chính và phương pháp kiểm định
2	Nghiên cứu và sản xuất quy mô nhỏ Pilot	<ul style="list-style-type: none"> - Thiết lập Quy trình công nghệ với các thông số tối ưu ở quy mô sản xuất nhỏ, theo tiêu chuẩn GMP. - Thẩm định và xây dựng tiêu chuẩn cơ sở, phương pháp kiểm định
3	Sản xuất quy mô lớn (công suất sản xuất lớn/thương mại)	<ul style="list-style-type: none"> - Thẩm định và hoàn thiện quy trình, nâng quy mô lớn theo công suất nhà máy đã thiết lập GMP. - Hoàn thiện tiêu chuẩn chất lượng phù hợp với các Y văn, Dược điển.
4	Thử nghiệm tiền lâm sàng (trên động vật TN)	<ul style="list-style-type: none"> - Xác định sự an toàn, dung nạp theo liều, đường dùng, thông qua quan sát và đo lường các biểu hiện tại chỗ và toàn thân của ĐVTN và các biến động các chỉ số huyết học và sinh hóa. - Độc tính tiềm ẩn ở các cơ quan đích.

		- Đánh giá dược lực học của sản phẩm (với vắc xin là khả năng đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể).
5	Thử nghiệm lâm sàng giai đoạn 1 (trên người)	Đánh giá an toàn và đáp ứng miễn dịch trên quần thể người khỏe mạnh với cỡ mẫu tối thiểu theo quy định (20-50 người)
6	Thử nghiệm lâm sàng giai đoạn 2 (trên người)	Chọn liều, đánh giá an toàn và đáp ứng miễn dịch trên quần thể đích người khỏe mạnh với cỡ mẫu đủ lớn theo giả thiết đưa ra (200-500 người)
7	Thử nghiệm lâm sàng giai đoạn 3 (trên người)	Đánh giá an toàn, miễn dịch, hiệu quả bảo vệ với cỡ mẫu lớn (1000-3000 người)
8	Cấp phép lưu hành	Giấy phép lưu hành sử dụng có thời hạn
9	Thử nghiệm lâm sàng giai đoạn 4 (trên người)	Đánh giá an toàn và hiệu quả trên thực địa khi sử dụng đại trà sản phẩm (>3000 – trên 10.000 người)

Một trong những phương pháp giúp phòng bệnh hiệu quả nhất đó là sử dụng vắc xin. Trước khi một vắc xin được đưa ra thị trường cho con người sử dụng thì nó phải được cơ quan có thẩm quyền cấp phép lưu hành và chứng thực được tính an toàn và hiệu quả trên động vật thí nghiệm cũng như trên con người qua các nghiên cứu thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng. Phạm vi nghiên cứu đề tài luận văn này là nghiên cứu tiền lâm sàng (trên động vật thí nghiệm).

1.3.2. Thử nghiệm tiền lâm sàng

Các nghiên cứu tiền lâm sàng được thực hiện để đánh giá tính an toàn, khả năng sinh miễn dịch cũng như hiệu lực của vắc xin trên các mô hình động vật khác nhau. Trong thử nghiệm tiền lâm sàng cần phải xem xét các yếu tố

sau: (a) lựa chọn các loài động vật phù hợp, (b) tuổi; (c) trạng thái sinh lý; (d) liều lượng, đường tiêm và phác đồ tiêm, (e) độ ổn định của sản phẩm nghiên cứu trong các điều kiện sử dụng [23].

Nghiên cứu độc tính tiền lâm sàng của vắc xin là một phần bắt buộc trong quá trình phát triển vắc xin để chứng minh tính an toàn của vắc xin mới trước khi chúng có thể được thử nghiệm trên người. Theo quy định của Cục Quản lý Dược, Bộ Y tế Việt nam cũng như các cơ quan đăng ký và quản lý dược phẩm của ASIAN - Đông Nam Á, FDA – Mỹ, CPMP/EMA – Châu Âu...thì hồ sơ về nghiên cứu tiền lâm sàng là một trong các nội dung bắt buộc trong hồ sơ đăng ký vắc xin mới [22].

1.3.3. Động vật thí nghiệm

Ngày nay mô hình động vật thí nghiệm được phép sử dụng rộng rãi như chuột nhắt, chuột lang, thỏ, khỉ, chim...Trong đó chuột, thỏ cũng như các loài gặm nhấm là những động vật được chọn làm vật thí nghiệm nhiều vì tính sẵn có, chi phí thấp, giá thành rẻ và có nhiều điểm khá tương đồng quá trình tiếp nhận vắc xin, biểu hiện phản ứng/độc tính, đáp ứng sinh miễn dịch với con người [24].

Các thí nghiệm trên động vật không được dùng để chứng minh rằng thuốc hay bất kỳ một sản phẩm sinh học nào là an toàn và hiệu quả đối với con người - chúng không thể thay thế cho thử nghiệm lâm sàng ở người. Thay vào đó, chúng được sử dụng để giúp quyết định xem có nên thử nghiệm một loại sản phẩm cụ thể trên người hay không. Các thí nghiệm trên động vật để chỉ điểm một số chỉ số có khả năng không hiệu quả hoặc quá nguy hiểm khi sử dụng cho con người. Nếu một loại sản phẩm vượt qua thử nghiệm trên động vật thì nó sẽ được xem xét cho thử nghiệm lâm sàng trên một nhóm nhỏ con người (giai đoạn 1) trước khi thử ở các giai đoạn tiếp theo với số người tham gia lớn hơn [22].

1.3.4. Giải phẫu bệnh học

Giải phẫu bệnh học là khoa học nghiên cứu các tổn thương ở các hệ, mô, tế bào hay cơ quan khác nhau nhằm đánh giá các mức độ tổn thương so

với các biểu hiện lâm sàng ở người nghĩa là tìm hiểu các mối liên quan mật thiết giữa những biến đổi hình thái và các rối loạn chức năng, trên cơ sở đó xác định việc chẩn đoán, điều trị và tiên lượng bệnh [25], trong thử nghiệm tiền lâm sàng là phát hiện độc tính cấp hoặc tiềm ẩn có thể có khi sử dụng vắc xin ở các cơ quan đích qua quan sát đại thể và vi thể.

Các tổn thương được đánh giá bằng phương pháp quan sát đại thể và vi thể. Quan sát đại thể là quan sát bằng mắt thường các đặc điểm về hình thái, kích thước, màu sắc của tổn thương ở các cơ quan. Quan sát vi thể là quan sát bằng kính hiển vi để xác định các tổn thương ở mức độ mô, tế bào...[25].

1.3.5. Phương pháp đánh giá tính sinh miễn dịch

Đánh giá tính sinh miễn dịch cho mỗi thành phần kháng nguyên trong vắc xin trên các mô hình động vật thí nghiệm thích hợp cần được thực hiện để đánh giá các đặc điểm miễn dịch của từng loại [22].

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA là dựa vào tính đặc hiệu kháng nguyên - kháng thể và được thực hiện bằng những bước cơ bản sau: Kháng nguyên - antigen (KN) hoặc Kháng thể (KT) đã biết được gắn trên một giá thể rắn, sau đó cho mẫu có chứa kháng thể (KT) hoặc kháng nguyên (KN) cần tìm vào giếng. Bổ sung thêm kháng thể có gắn với enzyme. Bước cuối cùng thêm cơ chất (substance), enzyme sẽ biến đổi cơ chất này và tạo tín hiệu màu có thể xác định được bằng máy đo huỳnh quang.

Có 4 loại phương pháp ELISA:

- ELISA trực tiếp (direct ELISA)
- ELISA gián tiếp (indirect ELISA)
- ELISA kẹp mồi (sandwich)
- ELISA cạnh tranh (competitive ELISA)

1.3.5.1. ELISA trực tiếp (direct ELISA)

Ưu điểm:

- Đơn giản và tiết kiệm thời gian vì chỉ sử dụng một kháng thể và ít bước tiến hành.
- Hạn chế được sai số và hầu như không xảy ra phản ứng chéo do chỉ sử dụng một loại kháng thể.

Nhược điểm:

- Độ nhạy thấp do không có sự khuếch đại tín hiệu.
- Tính linh hoạt thấp do việc đánh dấu cho từng loại kháng thể sử dụng cho mỗi loại kháng nguyên khá tốn kém, nhất là khi cần chẩn đoán cho nhiều loại kháng nguyên khác nhau.
- Nhiều nền cao do các protein trong mẫu liên kết với các bề mặt rắn.

1.3.5.2. ELISA gián tiếp (indirect ELISA)

Ưu điểm:

- Tính linh hoạt cao do chỉ cần sử dụng một kháng thể để nhận biết cho nhiều loại kháng nguyên khác nhau.
- Độ nhạy cao - nhiều hơn một kháng thể được đánh dấu có thể liên kết với kháng thể chính.
- Phản ứng miễn dịch chọn lọc cao - không có nhiều can thiệp vào các vị trí trên kháng thể chính.
- Kinh tế - yêu cầu ít loại kháng thể đánh dấu (gắn enzyme)

Nhược điểm:

- Cần tiến hành nhiều bước hơn.
- Khả năng xảy ra phản ứng chéo do các tín hiệu không đặc hiệu.

1.3.5.3. ELISA kẹp môi (sandwich)

Ưu điểm:

- Giảm được nhiều nền và các phản ứng không đặc hiệu do đã loại bỏ được các thành phần tạp.
- Độ đặc hiệu cao - hai kháng thể được sử dụng để phát hiện kháng nguyên.
- Thích hợp cho các mẫu phức tạp - không yêu cầu phải tinh sạch kháng nguyên trước khi đo.

Nhược điểm:

- Nhiều bước tiến hành hơn.
- Khả năng xảy ra phản ứng chéo cao do sử dụng nhiều loại kháng thể khác nhau.

1.3.5.4. ELISA cạnh tranh (competitive ELISA)

Ưu điểm:

- Tính linh hoạt cao nhất - có thể dựa trên định dạng ELISA trực tiếp, gián tiếp hoặc sandwich.
- Độ đặc hiệu cao nhất - kháng nguyên được bắt và phát hiện cụ thể.
- Khuếch đại tín hiệu mạnh - giảm thiểu ảnh hưởng của việc pha loãng mẫu và hiệu ứng nền mẫu.

Nhược điểm:

- Khá tốn thời gian – quy trình phức tạp.
- Phụ thuộc nhược điểm của định dạng phát hiện đã chọn.

Phương pháp ELISA được sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực như nông nghiệp, công nghiệp hay trong các quy trình kiểm tra chất lượng các sản phẩm sinh học và đặc biệt là trong lĩnh vực y học như phục vụ cho các nghiên cứu về sản xuất và kiểm định vắc xin.

Nghiên cứu này, chúng tôi ứng dụng phương pháp ELISA định lượng kháng thể kháng độc tố ho gà PT.

- Phương pháp định lượng kháng thể kháng độc tố ho gà PT bằng phương pháp ELISA đã được mô tả trong Dược điển Châu Âu [26], nguyên tắc của phương pháp là dựa trên sự kết hợp đặc hiệu giữa kháng nguyên PT với kháng thể đặc hiệu kháng PT. Sau đó cho cộng hợp kháng thể gắn biotin bất đặc hiệu với kháng thể kháng PT. Dùng Streptavidin khuếch đại phản ứng màu và hiện màu bằng cơ chất TMB/H₂O₂. Dùng phản ứng bằng axit sunfuric và đọc phản ứng ở bước sóng 450 nm trên máy ELISA Biotek.

CHƯƠNG 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. NGUYÊN LIỆU

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Vắc xin Bạch hầu – Uốn ván – Ho gà vô bào (DTaP) do Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế sản xuất.

2.1.2. Vật liệu

2.1.2.1. Vắc xin và sinh phẩm

- Vắc xin DTaP, lô số: 03-21, IVAC và 1 lô đối chứng (Nước muối sinh lý làm giả dược (placebo): 007-20)
- Huyết thanh chuẩn Uốn ván, MC in-house TerVn10 – (IVAC).
- Huyết thanh chuẩn Bạch hầu, MC in-house DirVn 8 – (IVAC)
- Kháng nguyên chuẩn ho gà FHA (JNIH-4, Nhật Bản).
- Kháng nguyên chuẩn ho gà PT (JNIH-5, Nhật Bản).
- Kháng thể kháng PT (JNIH-12, Nhật Bản)
- Kháng thể kháng FHA (JNIH-11, Nhật Bản)
- Độc tố uốn ván, MC in-house TetoxVn1117 - (IVAC).
- Độc tố bạch hầu, MC in-house Ditox Vn02

2.1.2.2. Động vật thí nghiệm

- Loài/giống: Thỏ giống New Zealand của Trại chăn nuôi động vật thí nghiệm Suối dầu, IVAC.
- Tuổi và trọng lượng: Thỏ 4 – 6 tháng tuổi, trọng lượng 1,7 – 2,3 kg/con.
- Số lượng: 16 thỏ gồm 8 thỏ đực và 8 thỏ cái.

2.1.2.3. Hóa chất – Máy móc thiết bị

➤ Hóa chất:

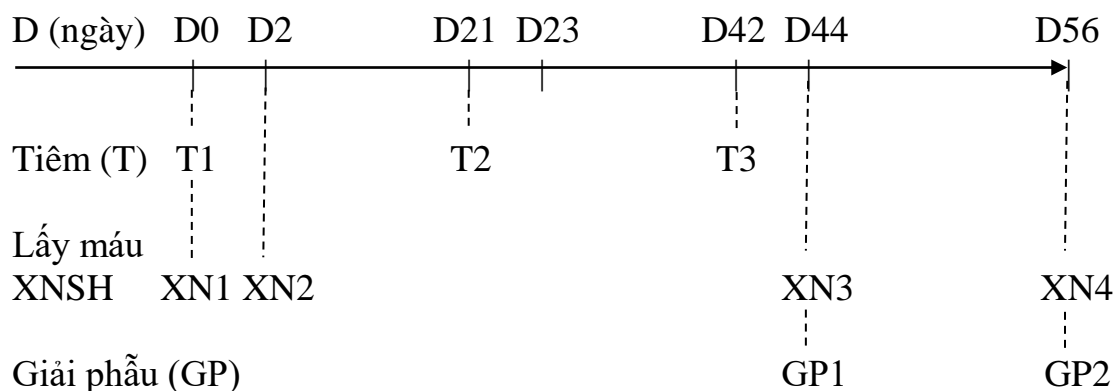
- Cộng hợp dê kháng chuột (AP124P), hãng Merck.
- Cộng hợp dê kháng thỏ (AP132P), hãng Merck.
- Streptavidin-Biotinylated HRP, Sigma .
- 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine GR for analysis, Merck.
- Iodine, hãng Merck.
- Axit sunfuric, hãng Merck.
- Nước cất (WFI) – (IVAC)
- Nước muối sinh lý – (IVAC)

➤ Dụng cụ thí nghiệm:

- Laminar, ESCO.
- Lò hấp FOF5/9, hãng Fedegari, Ý.
- Máy đo pH điện cực thủy tinh, WTW, Đức.
- Máy đo pH 7310, hãng Inolab, Đức.
- Máy đo ELISA Bioteck , Mỹ.
- Máy quang phổ, Genesys 10S, ThermoScientific, Mỹ.
- Máy lắc, IKA, Đức.
- Máy khuấy từ, Stuart, Anh.
- Máy khuấy từ, hãng IKA, Đức.
- Tủ ấm 37⁰C – Memmert, Đức.
- Tủ mát, Haier, Trung Quốc.
- Tủ lạnh âm, Sanyo, Nhật Bản.
- Tủ sấy UF 750 TS, hãng Memmert, Đức.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu



Hình 2. 1. Sơ đồ mũi tiêm miễn dịch, lấy máu và giải phẫu

Ghi chú:

- Tiêm (T) 3 mũi T1, T2 và T3 vào các ngày D0, D21 và D42; mỗi mũi 0,5 ml/con.

- Lấy 4 mẫu máu làm xét nghiệm (XN) huyết học toàn phần và 6 chỉ số sinh hóa chọn lọc (Ure, Creatinin, Enzyme Glutamic – Oxaloacetic Transaminase, Enzyme Alanine Aminotransferase, men gamma Glutamyl Transferase và C reactive protein); **XN1**: máu nền; **XN2**: sau tiêm mũi T1: 2 ngày (D2); **XN3**: sau tiêm mũi T3: 2 ngày, ngày thứ 44 (D44); **XN4**: lấy vào ngày giải phẫu nhóm hồi phục ngày thứ 56 (D56).

- 2 lần Giải phẫu (GP): **GP1**: đại thể và vi thể vào ngày D44 cho giai đoạn chính. **GP2**: đại thể và vi thể vào ngày D56 cho nhóm thở ở giai đoạn hồi phục.

Bảng 2.1 Thiết kế nghiên cứu

STT	Phân nhóm		Số lượng thỏ	Ngày tiêm	Ngày lấy máu	Số thỏ Giải phẫu (con)	
						Lần 1 (D44)	Lần 2 (D56)
1	Nhóm chính	Vắc xin	5	D0, D21, D42	D0, D2, D23, D44	5	\
		Giả dược	3	D0, D21, D42	D0, D2, D23, D44	3	\
2	Nhóm hồi phục	Vắc xin	5	D0, D21, D42	D0, D2, D23, D44, D56	\	5
		Giả dược	3	D0, D21, D42	D0, D2, D23, D44, D56	\	3

2.2.2. Nghiên cứu độc tính (toxicology)**Bảng 2. 2.** Thiết kế nghiên cứu độc tính

Nhóm nghiên cứu	Số lượng thỏ	Liều tiêm	Thời gian
Nhóm tiêm DTaP	10	3 liều (0,5 ml/con/liều)	21 ± 2 ngày
Nhóm tiêm giả dược	6		

Mỗi thỏ nhận 3 liều mỗi liều 0,5 ml/con, tiêm cách nhau 21 ± 2 ngày, tiêm vào bắp đùi của một trong hai chân sau, thời kỳ hồi phục 14 ngày sau tiêm mũi 3.

2.2.2.1. Theo dõi phản ứng tại chỗ

- Theo dõi và ghi nhận lại các phản ứng tại vị trí tiêm của mỗi thỏ trước và sau tiêm 24 giờ, 48 giờ các biểu hiện sưng, phù nề, đỏ, xuất huyết, loét, nốt cứng.

- Một số các biểu hiện trên da sau mỗi mũi tiêm như phù nề, ban đỏ, tụ máu, nốt chai cứng, xuất huyết... tại vị trí tiêm phải được ghi nhận lại hàng ngày đến khi nào trên da không còn các dấu hiệu đó nữa.

- Các triệu chứng hay dấu hiệu phản ứng trên da được đánh giá và chấm điểm theo thang điểm chuẩn Draize (Draize Scoring System), như mô tả trong bảng 2.2.

Bảng 2.3: Bảng điểm đánh giá phản ứng tại vị trí tiêm (Draize)

Điểm	Mức độ	Phù nề (Edema)	Ban đỏ (Erythema)
0	Không có	Không sưng	Màu da bình thường
1	Rất nhẹ	Sưng nhẹ, không có gờ	Da màu hồng nhẹ, lan tỏa
2	Nhẹ	Sưng nhẹ, có gờ	Da màu hồng đậm, đỏ nhẹ, phân biệt được với vùng da xung quanh
3	Trung bình	Có sưng rõ, gờ nhô lên	Da màu đỏ, phân biệt được với vùng da xung quanh
4	Nặng	Sưng rất rõ, gờ nhô cao (> 1 mm, ước lượng)	Da màu đỏ đậm, thấy rõ ràng.

2.2.2.2. Theo dõi lâm sàng

Thỏ được chăm sóc và theo dõi hàng ngày trong suốt quá trình thử nghiệm. Khi có các biểu hiện lâm sàng bất thường cần phải ghi nhận và đánh giá tổng thể. Cụ thể là:

- Quan sát các biểu hiện bên ngoài như lông, mắt, mũi, các cơ quan hay bộ phận ngoài của thỏ.

- Quan sát hệ hô hấp, hệ tuần hoàn và hệ tiêu hóa, có các dấu hiệu bất thường như khó thở hay biếng ăn, tiêu chảy...

- Quan sát các dấu hiệu về hệ thần kinh và các hoạt động bình thường của thỏ.

- Và một số các biểu hiện bất thường khác.

2.2.2.3. Theo dõi trọng lượng

Cân thỏ vào ngày nhận, cân từng con trước khi tiêm T1, 24 giờ sau khi tiêm T1, T2 và T3, cân hàng tuần vào giờ cố định trước khi cho ăn trong suốt thời gian thí nghiệm. Đơn vị tính là kilogram, số lẻ sau dấu phẩy là 2 con số.

2.2.2.4. Theo dõi mức độ tiêu thụ thức ăn

Định suất ăn của thỏ là 120 g/ngày trong tháng đầu tiên. Sau đó định suất thức ăn tăng lên 150 g/ngày cho đến hết thời gian nghiên cứu. Mức tiêu thụ thức ăn của mỗi thỏ hàng ngày trong suốt thời gian nghiên cứu được xác định bằng cách cân lượng thức ăn thừa vào trước mỗi lần cho ăn. Lượng tiêu thụ thức ăn là định suất ăn hàng ngày trừ lượng thức ăn thừa trong ngày, đơn vị tính là gram.

2.2.2.5. Theo dõi nhiệt độ

Theo dõi nhiệt độ hậu môn thỏ trước khi tiêm và sau tiêm trong vòng 6 giờ và 24 giờ. Ở các thời điểm nhiệt độ bất thường cũng phải được ghi nhận lại và quan sát đến khi nhiệt độ trở về mức bình thường hoặc thấp hơn T0.

Thỏ trước khi được đo nhiệt độ phải ở trong không gian kín, yên tĩnh, không bị ảnh hưởng bởi bất kỳ tiếng ồn nào, nhiệt độ phòng khoảng 22⁰C – 25⁰C và độ ẩm từ 60% - 70% trong vòng 15 phút. Mỗi thỏ đều phải được cố định trong một ô riêng, trên bàn đo.

2.2.2.6. Giải phẫu bệnh học

Phối hợp với Khoa Giải phẫu Bệnh học, trường Đại học Y Huế.

- Trên mỗi con thỏ sẽ tiến hành khảo sát và nhận xét đại thể ở các cơ quan như: não, tim, gan, mật, 2 phổi, 2 thận, 2 tuyến thượng thận, tuỷ xương ức và ghi nhận các bất thường ở mô cơ tại 2 vùng tiêm. Quan sát đại thể từng cơ quan này và ghi nhận màu sắc, trọng lượng (gam), kích thước (cm), mô tả các bất thường khác (nếu có) theo thứ tự.

- Vi thể: giải phẫu bệnh lý học tế bào, cắt lát và nhuộm soi các tế bào ở não, tim, gan, thận 2 bên, phổi 2 bên, tủy xương và mô cơ vùng tiêm.

2.2.2.7. Xét nghiệm huyết học toàn phần và sinh hóa chọn lọc

Thực hiện tại Trung tâm xét nghiệm lâm sàng, Viện Pasteur Nha Trang.

Thỏ lấy máu xét nghiệm 4 lần như sơ đồ thiết kế ở Hình 2.1 với chỉ số huyết học toàn phần (số lượng bạch cầu (WBC), tỷ lệ bạch cầu lympho (L), chỉ số tỷ lệ bạch cầu trung tính (N), tỷ lệ bạch cầu đơn nhân (M), tỷ lệ bạch cầu ưa axit (E), tỷ lệ bạch cầu ưa kiềm (B), chỉ số hồng cầu (RCB), lượng huyết sắc tố (Hb), tỷ lệ thể tích hồng cầu trong thể tích máu toàn phần (HCT), thể tích trung bình của hồng cầu trong máu (MCV), số lượng huyết sắc tố trung bình có trong một tế bào hồng cầu (MCH), nồng độ huyết sắc tố trung bình trong một tế bào hồng cầu (MCHC), số lượng tiểu cầu (PLT), thể tích trung bình tiểu cầu (MPV), số lượng hồng cầu lưới) và 6 chỉ số sinh hóa chọn lọc: Ure, Creatinin, GOT (Enzyme Glutamic – Oxaloacetic Transaminase), GPT (Enzyme Alanine Aminotransferase), GGT (men gamma Glutamyl Transferase) và CRP (C reactive protein).

Đánh giá biến động các chỉ số huyết học, sinh hóa sau tiêm mũi 1, mũi 3 và thời điểm hồi phục (D56) so với máu nền, giả dược và so sánh với chuẩn bình thường.

2.2.3. Nghiên cứu đánh giá tính sinh miễn dịch (immunogenicity)

Có 2 nhóm thỏ, nhóm tiêm vắc xin 10 con và nhóm tiêm giả dược 6 con. Tất cả thỏ được lấy máu để kiểm tra kháng thể nền kháng Bạch hầu (Diphtheria antibodies), kháng thể kháng Uốn ván (Tetanus antibodies), kháng thể kháng Ho gà (PT antibodies) trước khi tiêm miễn dịch.

Mỗi thỏ được tiêm theo sơ đồ mũi tiêm ở Hình 2.1.

Sau tiêm thỏ được theo dõi tình trạng sức khỏe và lấy máu thêm 3 lần vào các ngày D2, D44 và D56. Máu được lấy ở tĩnh mạch rìa tai, mỗi lần lấy khoảng 2-3ml cho 1 thỏ.

Các mẫu máu được tách huyết thanh, bất hoạt bổ thể và giữ ở nhiệt độ

lạnh sâu dưới -20°C cho đến khi chuẩn độ kháng thể.

Mỗi mẫu huyết thanh thử được xác định kháng thể kháng 3 thành phần kháng nguyên của vắc xin DTaP gồm anti – D (Bạch hầu), anti -T (Uốn ván), anti – PT (Ho gà). Việc định lượng kháng thể kháng Uốn ván và Bạch hầu bằng kỹ thuật ức chế miễn dịch gắn men (ToBi – Toxin Binding Inhibition test), định lượng kháng thể kháng Ho gà PT bằng phản ứng ELISA.

2.2.4. Phương pháp ELISA định lượng kháng thể kháng Bạch hầu, Uốn ván, Ho gà

2.2.4.1. Phương pháp ức chế miễn dịch gắn men (ToBI - Toxin binding inHibition test) xác định kháng thể kháng Uốn ván và Bạch hầu (anti-D và anti-T)

Nguyên tắc: Kháng thể cần định lượng có trong huyết thanh được ủ với một lượng độc tố ức chế xác định (37°C , qua đêm), lượng độc tố thừa không bị trung hòa bởi kháng thể, được định lượng trên một phiên ELISA khác, đã gắn sẵn kháng thể kháng uốn ván hoặc bạch hầu. Dùng cộng hợp thử kháng thể kháng uốn ván hoặc bạch hầu gắn biotin để phát hiện lượng độc tố thừa.

Phiên kết quả được đo độ hấp phụ ở bước sóng 450 nm bằng máy ELISA Biotek và tính toán bằng phần mềm Gen 5 V2.03.Bio-Tek.

2.2.4.2. Phương pháp định lượng kháng thể kháng độc tố Ho gà (anti-PT)

Nguyên tắc: Phương pháp dựa trên sự kết hợp đặc hiệu của kháng thể thử kháng PT với kháng nguyên PT chuẩn được giữ bởi fetuin gắn vào giá thể rắn của phiên ELISA. Sau đó dùng cộng hợp IgG chuột kháng thử gắn biotin để phát hiện kháng thể kháng PT.

Phiên kết quả được đo OD ở bước sóng 450 nm bằng máy ELISA Biotek và tính toán bằng phần mềm Gen 5 V2.03.Bio-Tek.

2.2.5. Xử lý thông kê

Sử dụng kiểm định phi tham số Mann – Whiney để so sánh các chỉ số huyết học toàn phần và sinh hóa với nhóm máu nền.

Sử dụng phương pháp ước lượng khoảng tin cậy 95%, theo Clopper – Pearson và kiểm định Wilcoxon-Mann-Whitney để phân tích khả năng đáp ứng miễn dịch trước và sau tiêm vắc xin DTaP.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. NGHIÊN CỨU ĐỘC TÍNH (TOXICOLOGY)

3.1.1. Phản ứng tại chỗ sau tiêm (Phụ lục 1)

Sau tiêm mũi 1: tại vị trí tiêm không có bất kỳ phản ứng nào ở cả hai nhóm thỏ trong thử nghiệm.

Sau tiêm mũi 2: có 1/10 thỏ (chiếm 10%) của nhóm tiêm vắc xin có phản ứng hồng loét, kích thước 5 x 6 mm, mức độ rất nhẹ (mức 1 theo thang điểm Draze) tồn tại đến 48h sau tiêm và biến mất hoàn toàn sau 72h. Nhóm tiêm giả dược có 1/6 thỏ (chiếm 17%) có phản ứng hồng loét, kích thước 3 x 3 mm, mức độ rất nhẹ (mức 1 theo thang điểm Draze) tồn tại đến 24h sau tiêm và biến mất hoàn toàn sau 48h.

Sau tiêm mũi 3: có 1/10 thỏ (chiếm 10%) của nhóm tiêm vắc xin có phản ứng đỏ nhẹ kích thước 3 x 4 mm, mức độ nhẹ (mức 2 theo thang điểm Draze) tồn tại đến 48h sau tiêm và biến mất hoàn toàn sau 72h. Nhóm tiêm giả dược không có thỏ nào có phản ứng tại chỗ tiêm.

3.1.2. Quan sát sinh học lâm sàng

- 16/16 thỏ sống khỏe mạnh và bình thường trong suốt thời gian nghiên cứu.
- Không có các biểu hiện bất thường trên da, lông, móng, mắt, các chi hay các bộ phận bên ngoài.
- Không có các biểu hiện bất thường như co giật, liệt chi, xù lông hay khó thở, tím tái... Các cơ quan về hệ thần kinh, hệ hô hấp và hệ tuần hoàn đều hoạt động bình thường.
- Không có các biểu hiện bất thường về hệ tiêu hóa, thỏ ăn uống và đại tiện bình thường.

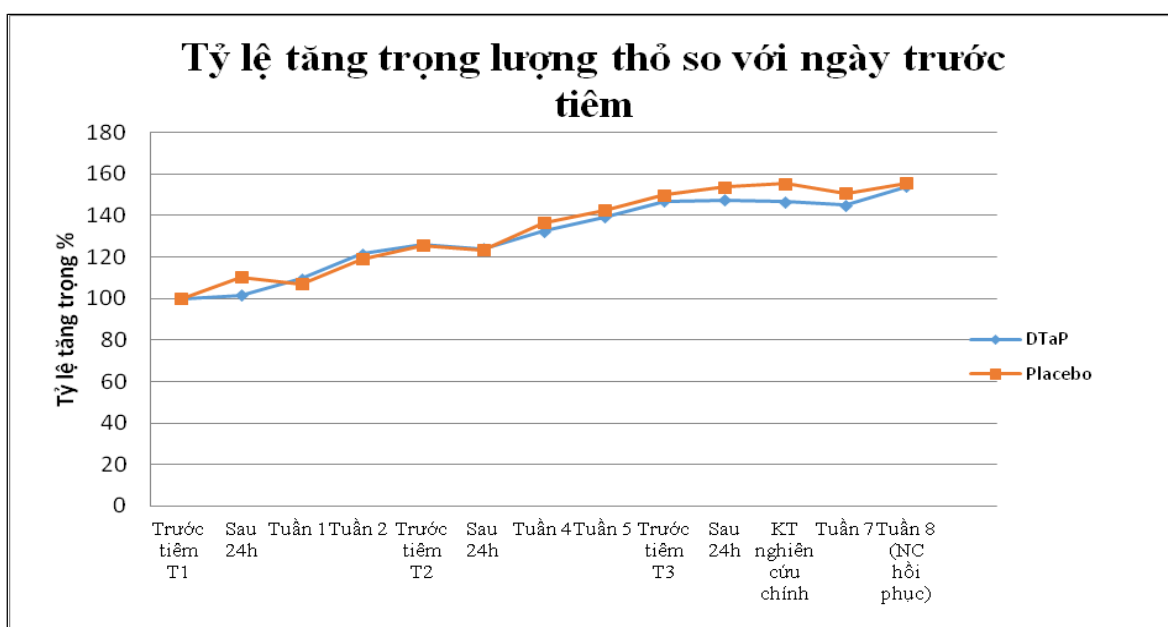
3.1.3. Theo dõi trọng lượng (Phụ lục 2)

Thỏ tăng cân vào hầu hết các thời điểm cân trọng lượng. Trọng lượng trung bình của mỗi thỏ lúc bắt đầu nghiên cứu là $2,26 \pm 0,09$ kg, đến hết giai

đoạn nghiên cứu chính đạt $2,76 \pm 0,26$ kg. Trong đó nhóm thỏ tiêm vắc xin tăng trọng trung bình $0,47$ kg, nhóm thỏ tiêm giả dược tăng trọng trung bình $0,55$ kg, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Có một vài thời điểm thỏ giảm cân như sau:

- Ở nhóm tiêm giả dược, thỏ giảm cân tại thời điểm 1 tuần sau tiêm mũi 1 và 24h sau tiêm mũi 2 với tỷ lệ giảm lần lượt là 3,3% và 2,4%.
- Ở nhóm tiêm vắc xin, thỏ giảm cân sau tiêm mũi hai 24h (giảm 1,8%) và sau tiêm mũi ba 2 ngày (giảm 0,8%).



Hình 3.1 Tỷ lệ tăng trọng lượng thỏ so với ngày trước tiêm

3.1.4. Mức độ tiêu thụ thức ăn

Trong một ngày, lượng thức ăn trung bình của một thỏ tiêm vắc xin là $86,52 \pm 21,01$ g, ở nhóm tiêm giả dược là $89,34 \pm 20,35$ g.

Có 1/10 thỏ ở nhóm tiêm vắc xin và 1/6 thỏ ở nhóm tiêm giả dược có mức tiêu thụ thức ăn trung bình lần lượt là $66,79 \pm 12,03$ g và $67,65 \pm 17,51$ g, thấp hơn so với khẩu phần ăn tiêu chuẩn hàng ngày của một thỏ trưởng thành (70 - 90g/ngày), tuy nhiên sự chênh lệch này là không đáng kể nên nhận định rằng việc tiêm vắc xin không gây ảnh hưởng đến việc tiêu thụ thức ăn

của thỏ.

3.1.5. Phản ứng sốt (Phụ lục 3)

– Tất cả thỏ đều có nhiệt độ bình thường trước khi tiêm (từ 38,4 đến 39,6°C).

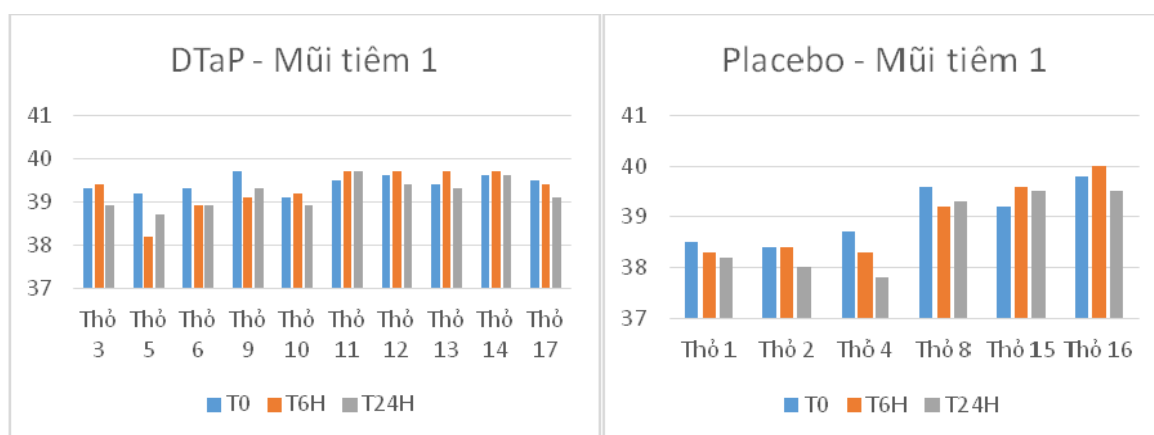
– Sau tiêm mũi 1, 16,7% thỏ thân nhiệt (40°C) ở nhóm tiêm giả dược. Thời điểm sốt là 6h sau tiêm đến 24h sau đó thì thỏ này hết sốt hoàn toàn, nhóm tiêm vắc xin không có thỏ nào sốt.

– Sau mũi tiêm 2, 16,7% thỏ sốt ở nhóm tiêm giả dược. Thời điểm sốt là 6h và 24h sau tiêm với nhiệt độ đo được lần lượt là 40°C và 39,9°C, 48h sau đó thỏ hết sốt hoàn toàn. Nhóm tiêm vắc xin có 40% thỏ sốt tại thời điểm sau tiêm 6h, với nhiệt độ sốt từ 39,9-40°C. Sau 24h, tất cả thỏ đều đã quay về nhiệt độ bình thường. Như vậy tỷ lệ thỏ sốt sau mũi tiêm 2 ở nhóm tiêm vắc xin (40%) cao hơn so với nhóm tiêm giả dược (16,7%), tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($P=0,867$).

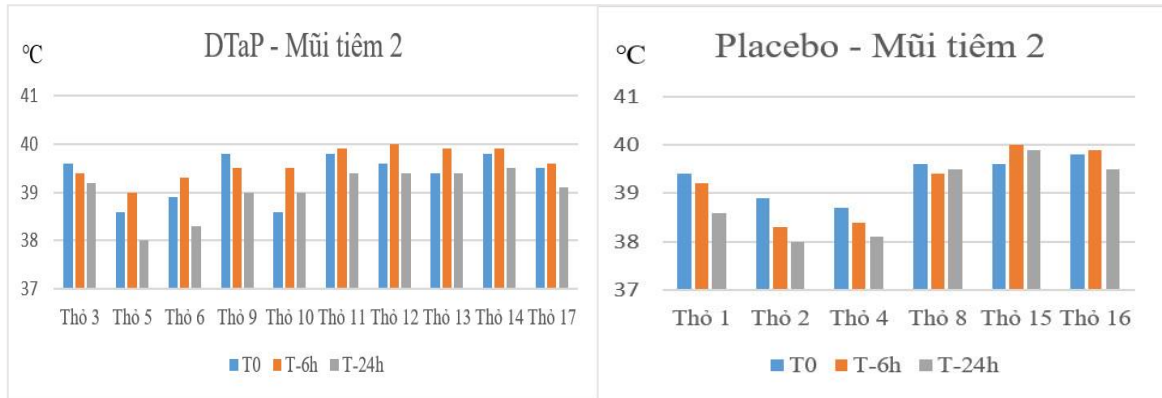
– Sau mũi tiêm 3, không có thỏ nào sốt.

Như vậy tỷ lệ thỏ sốt cao nhất thuộc nhóm tiêm vắc xin và sau mũi tiêm 2, tất cả thỏ có đỉnh sốt nằm ở thời điểm 6h sau tiêm, 5/16 thỏ trở về thân nhiệt bình thường sau 24h, 1/16 thỏ bình thường sau 48h.

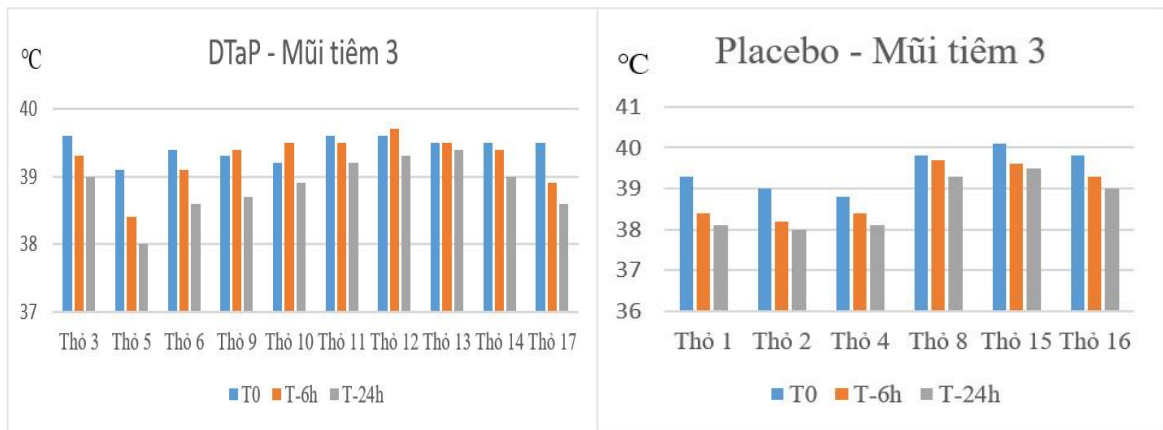
Kết quả đo nhiệt độ của thỏ ở tất cả các lần tiêm được thể hiện ở các Hình 3.2, 3.3, 3.4.



Hình 3.2 Nhiệt độ của thỏ trước và sau tiêm mũi 1



Hình 3.3 Nhiệt độ của thỏ trước và sau tiêm mũi 2



Hình 3.4 Nhiệt độ của thỏ trước và sau tiêm mũi 3

3.1.6. . Kết quả giải phẫu bệnh đại thể (Phụ lục 7)

Hình ảnh đại thể nhìn chung (quan sát và nhận định bằng mắt thường) các cơ quan và mô đều có kích thước bình thường, không có hiện tượng nhiễm mỡ hay các dấu hiệu thay đổi về cấu trúc của các mô và cơ quan nội tạng. Không ghi nhận tổn thương trên đại thể ở não, tim, gan, mật, thận, thượng thận và tủy xương của xương ức.

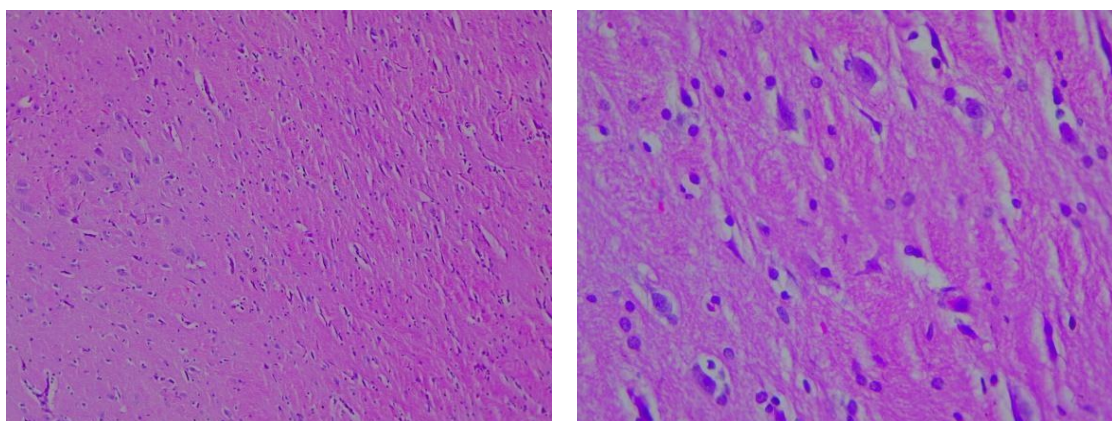
- Thỏ số 4 (tiêm giả dược), thỏ số 13 (tiêm DTaP): có tổn thương ở nhu mô phổi dưới dạng các chấm, nốt xuất huyết đường kính vài milimet, rải rác hoặc từng ổ nhỏ trên bề mặt nhu mô phổi.
- Thỏ số 10 (tiêm DTaP) có vài chấm xuất huyết ở phổi trái và thỏ số 15 (tiêm giả dược) có nhiều chấm xuất huyết ở thùy trên của 2 phổi.

- Cơ vùng tiêm bên trái của thỏ số 9 (tiêm DTaP) có một chấm đỏ nhỏ. Trong khi đó, mô cơ vùng tiêm bên trái của thỏ số 13 (tiêm DTaP) có vùng với các chấm đỏ xen kẽ đục khoảng 2mm.
- Các tổn thương đại thể này sẽ được phân tích và lý giải trong phần vi thể.

Nhìn chung, không thấy tổn thương trên đại thể ở não, tim, gan, mật, thận, thượng thận và tủy xương của xương ức ở toàn bộ các con thỏ trong nghiên cứu này; hình ảnh vi thể không phát hiện có dấu hiệu bệnh lý cụ thể nào tác động lên các cơ quan não, tim, gan, mật, 2 phổi, 2 thận, 2 tuyến thượng thận và tủy xương ức.

3.1.7. Kết quả giải phẫu mô bệnh học vi thể

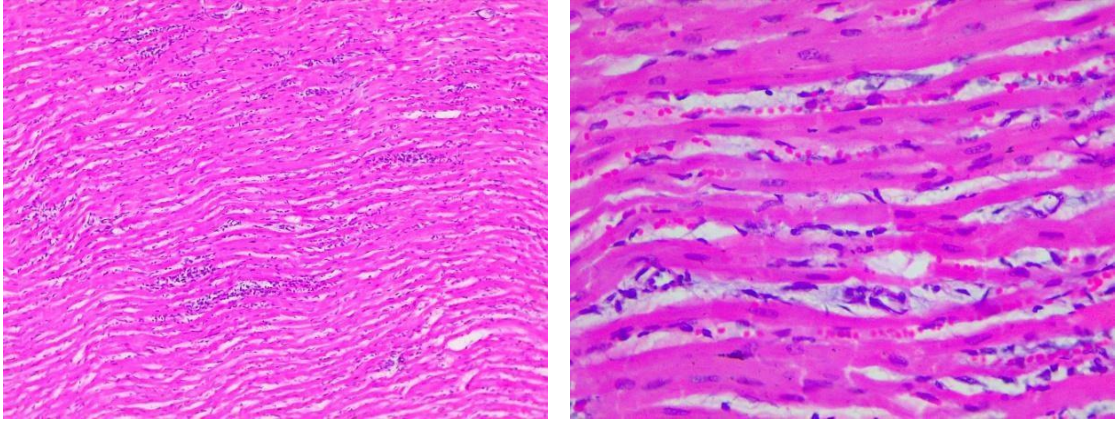
Mô não, tim, gan, thận, thượng thận và tủy xương: không thấy tổn thương vi thể trên tất cả các mẫu bệnh phẩm.



Hình 3.5. Hình ảnh giải phẫu mô não thỏ

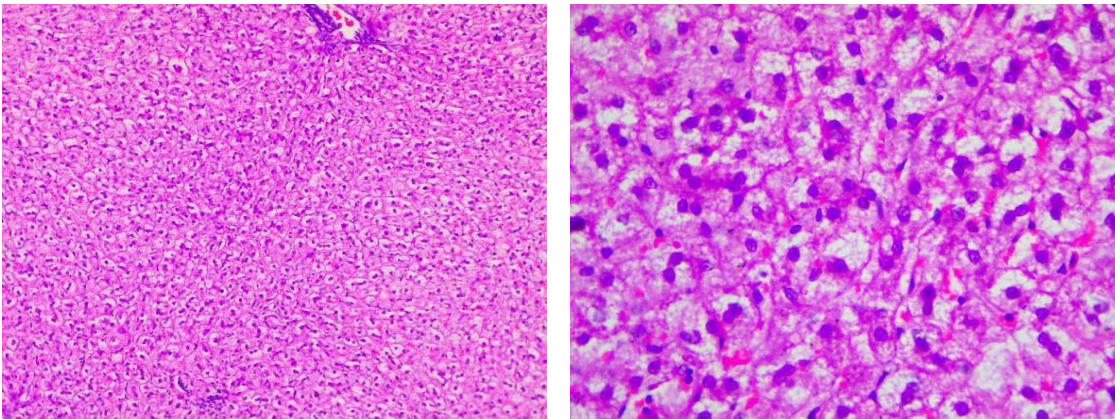
Thấy rõ cấu trúc chất trắng và chất xám với các nơ-ron, các tế bào thần kinh đệm...

Không thấy hình ảnh thoái hóa hoặc hoại tử mô não



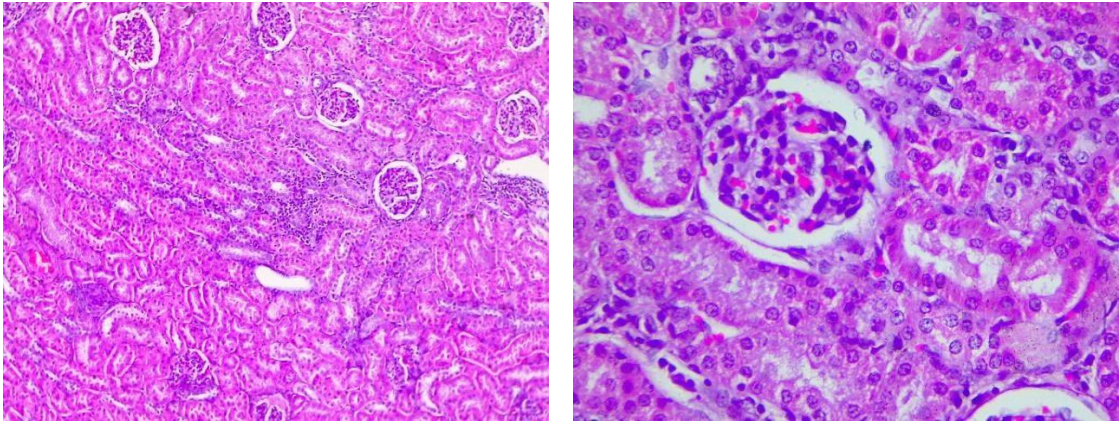
Hình 3.6. Hình ảnh giải phẫu mô cơ tim thỏ

Các tế bào cơ tim nguyên vẹn, sắp xếp thành bó, nhân nằm giữa tế bào, cắt ngang qua các bó cơ có các vân ngang. Không thấy hình ảnh tế bào cơ tim phì đại, thoái hóa.



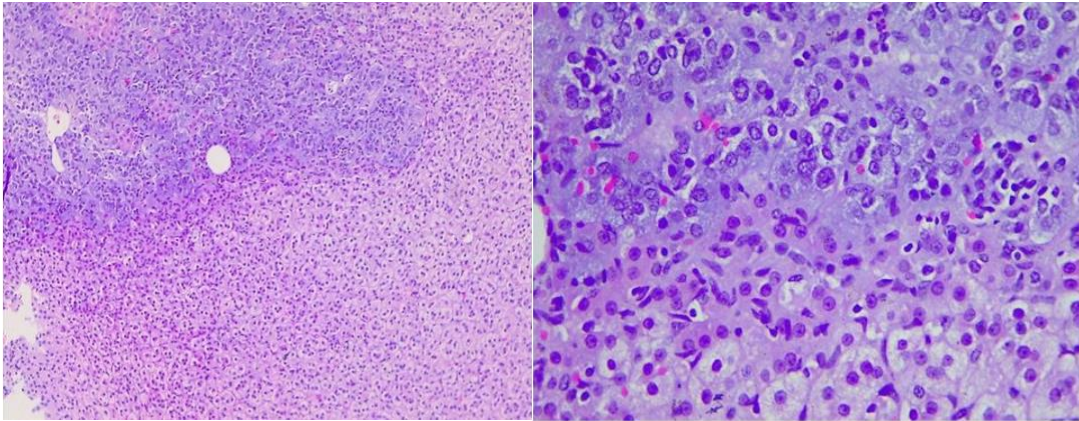
Hình 3.7. Hình ảnh giải phẫu mô gan thỏ

Mô gan bình thường với hình ảnh các khoang cửa và các bè gan xếp đều nhau.



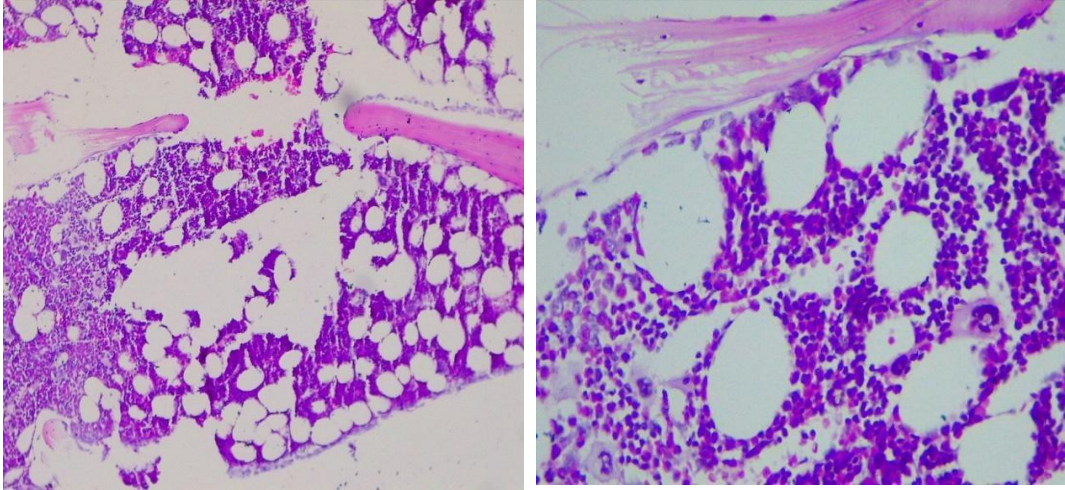
Hình 3.8. Hình ảnh giải phẫu mô thận trái thỏ

Mô thận bình thường với các tiểu cầu thận và các ống thận.



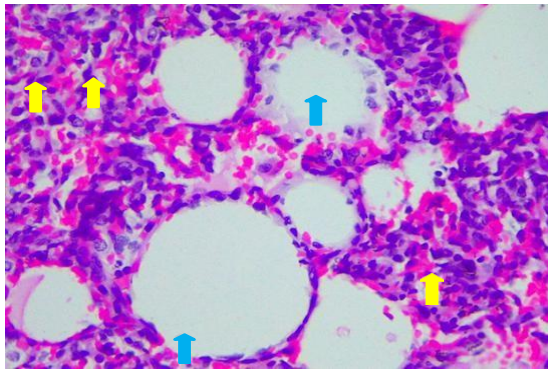
Hình 3.9. Hình ảnh giải phẫu mô thượng thận thỏ

Mô thượng thận bình thường với các mao mạch máu lớn xen kẽ với nhau.

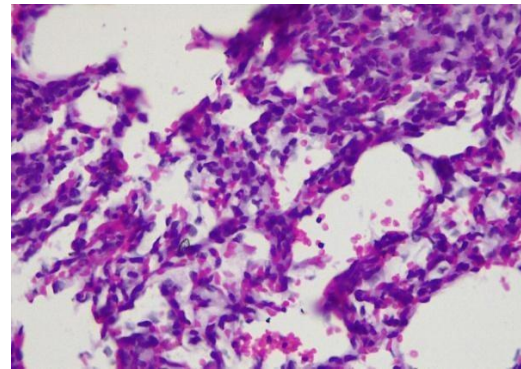


Hình 3.10. Hình ảnh giải phẫu mô tủy xương thỏ

Mô tủy xương nằm trong các bè xương với các tế bào đơn nhân, bào tương hẹp, kích thước nhỏ, khá đều. Không thấy hình ảnh tăng sinh tế bào, xâm lấn, phá hủy lớp vỏ.

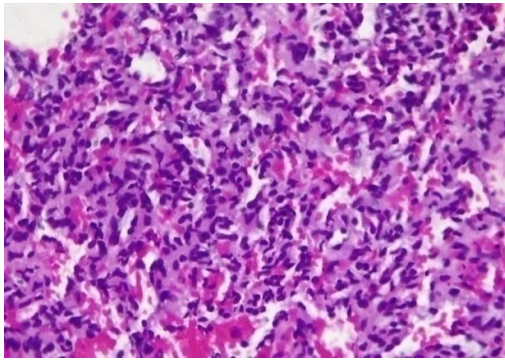


Hồng cầu hiện diện ở mô kẽ là chủ yếu (mũi tên vàng) ít thấy ở lòng phế nang (mũi tên xanh)

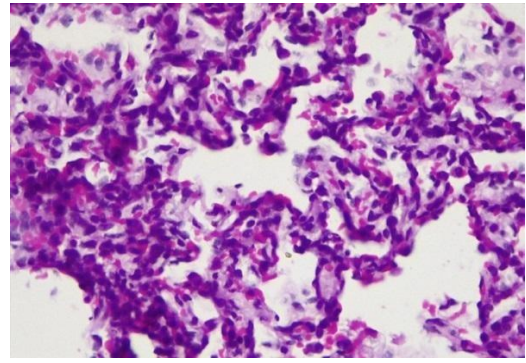


Hình ảnh hồng cầu hiện diện ở mô kẽ là chủ yếu, ít thấy ở lòng phế nang

Hình 3. 11. Các hình ảnh tổn thương ở nhu mô phổi bên phải

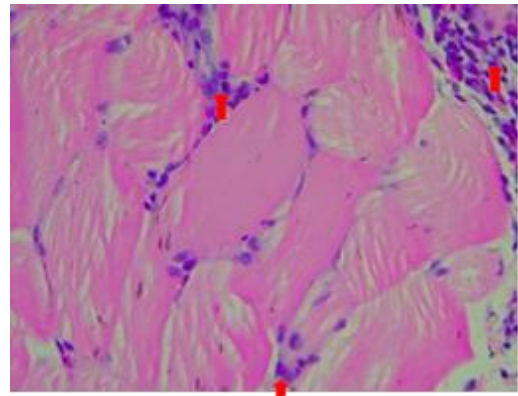
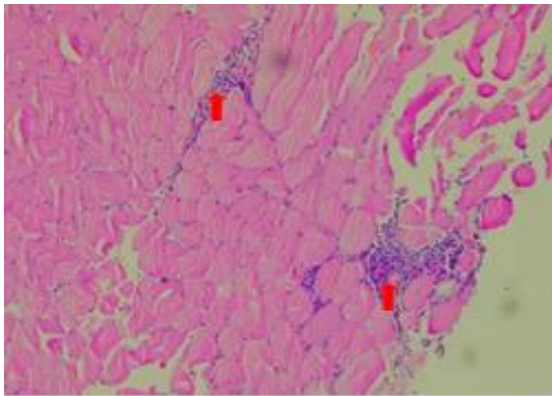


Hình ảnh các hồng cầu trong mô kẽ, hiếm thấy trong lòng phế nang hay tiểu phế quản



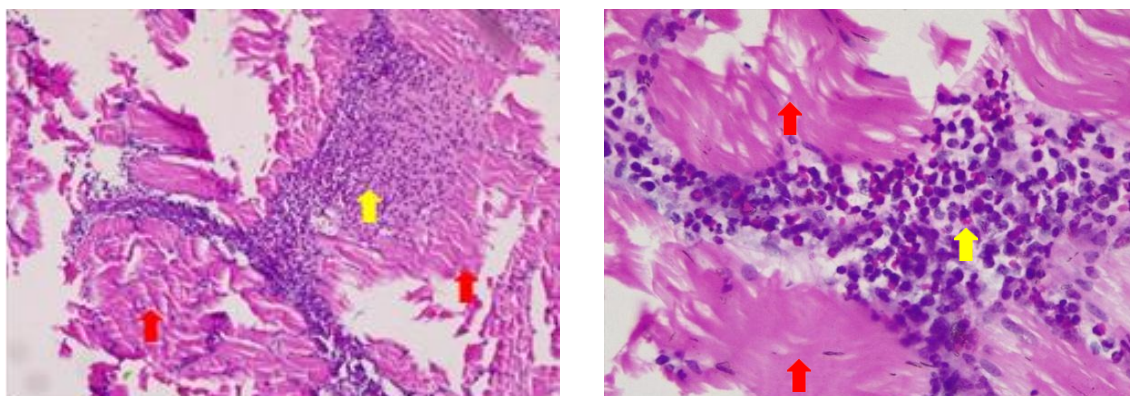
Hình ảnh các hồng cầu trong mô kẽ, hiếm thấy trong lòng phế nang hay tiểu phế quản.

Hình 3.12. Các hình ảnh tổn thương ở nhu mô phổi



Hình 3.13. Các hình ảnh tổn thương ở mô cơ vùng tim bên trái

Mô cơ vân bị chia cắt bởi các ổ xâm nhập viêm nhỏ, chủ yếu là lympho (mũi tên đỏ)



Mô cơ vân bị chia cắt (mũi tên đỏ) bởi các vùng viêm cấp kèm hoại tử rộng lớn (mũi tên vàng)

Hình 3.14. Các hình ảnh tổn thương ở mô cơ vùng tiêm

Kết quả giải phẫu mô bệnh học đại thể và vi thể cho thấy:

- Mô phổi:

- Các con số 4 và 13 có hình ảnh chảy máu nhẹ ở quanh các phế nang của phổi bên phải, với hình ảnh các hồng cầu thoát mạch nằm trong mô kẽ là chủ yếu, ít thấy hồng cầu trong lòng phế nang hay tiểu phế quản. Không thấy ổ xuất huyết, nhồi máu hay hoại tử.

- Hình ảnh hồng cầu ở mô đệm của phổi ít nhiều cũng thấy ở các con thỏ khác ở mức độ rất nhẹ.

- Phổi bên trái con thỏ số 10 và phổi 2 bên của thỏ số 15 có chảy máu từ nhẹ đến vừa với hình ảnh các hồng cầu trong mô kẽ, hiếm thấy trong lòng phế nang hay tiểu phế quản, hình ảnh xuất huyết này không nhiều hơn đáng kể so với các con thỏ khác không có các chấm xuất huyết trên đại thể.

- Mô cơ vùng tiêm:

- Con số 9: mô cơ vùng tiêm bên trái có các ổ xâm nhập lympho bào vào giữa các bó cơ vân, không thấy hoại tử hay xâm nhập bạch cầu đa nhân.

- Con số 13: tổn thương cơ vùng tiêm khá nặng với hình ảnh xâm nhập bạch cầu rộng lớn, chủ yếu là bạch cầu đa nhân của phản ứng viêm cấp, ít hồng cầu và 1 vài ổ hoại tử nhỏ.

Các tổn thương ở nhu mô phổi dưới dạng các chấm, nốt xuất huyết có đường kính nhỏ vài milimet rải rác hoặc tập trung ở nhiều vị trí khác nhau: đỉnh phổi, ngoại vi hoặc gần rốn phổi trên các con thỏ số: 4, 10, 13, 15. Các tổn thương này không có điểm chung về vị trí, hình ảnh đại thể và loại xuất huyết. Khi so sánh, đối chiếu với tổn thương trên vi thể thì chỉ có xuất huyết nhẹ ở quanh phế nang, không có con nào bị xuất huyết trầm trọng, trong phế nang hay trong lòng phế quản. Các con thỏ khác không có tổn thương xuất huyết trên đại thể cũng ít nhiều có xuất huyết trong mô kẽ trên vi thể như các con thỏ này.

Từ các nhận định trên, có thể cho rằng các tổn thương xuất huyết quan sát được ở đại thể và vi thể là do các tác động bên ngoài hoặc do thỏ vùng vẫy (khi giết chết) mà không cho thấy bằng chứng có liên quan đến liều tiêm hay tá chất của vắc xin.

Trong đợt phẫu tích mẫu, có 2 con thỏ (số 9 và 13) có hình ảnh chấm đỏ hoặc đỏ - đục khi quan sát đại thể và hình ảnh vi thể có xâm nhập lympho bào từng ổ ở con số 9, xâm nhập bạch cầu đa nhân và cả ổ hoại tử nhỏ ở con số 13. Các tổn thương này là phản ứng mạn tính (con số 9) và phản ứng viêm cấp tính (con số 13). Dựa trên các quan sát và phân tích vi thể, nhận định rằng tổn thương ở mô cơ vùng tiêm này có thể liên quan đến phản ứng tại chỗ của mô cơ với tá chất trong vắc xin.

3.1.8. Xét nghiệm huyết học

Các kết quả về chỉ số huyết học toàn phần được nêu ở Phụ lục 4.

Bảng 3.1: Kết quả chỉ số huyết học máu nền

Đặc điểm	Nhóm DTaP (n=10) Trung vị-Khoảng tứ phân vị	Nhóm Placebo (n=6) Trung vị-Khoảng tứ phân vị	P^a
WBC	6,71 (4,80-9,05)	5,63 (5,09-6,73)	0,448
N	25,45 (15,50-32,20)	36,90 (23,50 – 39,00)	0,065
L	54,5 (53,4-63,4)	47,30 (45,30-50,30)	0,013
M	6,95 (5,4-9,5)	9,50 (8,00-12,50)	0,065
E	0,10 (0-6,70)	0 (0-8,30)	0,636
B	5,40 (4,30-6,80)	3,85 (3,50- 4,80)	0,193
RCB	5,99 (5,66-6,12)	5,81 (5,38-6,24)	1,000
Hb	12,60 (11,5 – 13,00)	11,95 (11,10-12,70)	0,549
HCT	39,6 (35,9-40,4)	38,40 (35,70-40,90)	1,000
MCV	66,75 (64,70-68,70)	65,90 (65,30-67,30)	0,957
MCH	21,30 (20,70-21,50)	20,85 (20,40-21,20)	0,384
MCHC	32,00 (31,10-32,30)	31,2 (30,8-31,9)	0,173
RDW-CV	14,50 (12,80-15,20)	15,80 (14,50- 17,10)	0,114
PLT	315,00 (273,00- 352,00)	301 (271-408)	0,914
MPV	6,3 (6,2 -6,5)	6,45 (6,30-6,60)	0,510
HC LƯỚI	2,15 (2-2,2)	2,25 (2,10-2,40)	0,222

Bảng 3.2: Kết quả chỉ số huyết học 2 ngày sau tiêm mũi 1

Đặc điểm	Nhóm DTaP (n=10) Trung vị-Khoảng tứ phân vị	Nhóm Placebo (n=6) Trung vị-Khoảng tứ phân vị	P^a
WBC	7,65 (6,79-9,59)	7,03 (6,88-8,21)	0,356
N	27,15 (20,80-32,20)	36,50 (29,90-38,10)	0,030
L	56,25 (53,80-64,70)	42,9 (42-49,7)	0,001
M	9,20 (8,60-9,60)	13,20 (11,20-15,40)	0,003
E	0 (0-3,6)	0 (0-4,4)	0,895
B	3,65 (2,10-4,70)	3,65 (2,30-3,90)	0,871
RCB	5,26 (5,16-5,35)	5,22 (4,83-5,37)	0,914
Hb	10,85 (10,60-11,60)	10,70 (10,30-11,50)	0,587
HCT	34,55 (33,30-37,00)	34,15 (31,70-36,60)	0,356
MCV	68,25 (64,50-69,70)	65,55 (65,40-70,30)	1,000
MCH	21,00 (20,70-21,70)	21,15 (20,70-21,50)	0,744
MCHC	31,25 (30,5-31,8)	31,30 (30,70-32,20)	0,550
RDW-CV	14,50 (12,60-15,30)	15,90 (14,00-17,20)	0,115
PLT	266,00 (209,00- 312,00)	323,00 (305,00- 376,00)	0,083
MPV	6,35 (6,20-6,50)	6,55 (6,50-6,60)	0,028
HC LƯỚI	2,10 (2,10-2,30)	2,25 (2,20-2,40)	0,164

Bảng 3.3: Kết quả chỉ số huyết học 2 ngày sau tiêm mũi 3

Đặc điểm	Nhóm DTaP (n=10) Trung vị-Khoảng tứ phân vị	Nhóm Placebo (n=6) Trung vị-Khoảng tứ phân vị	P^a
WBC	7,31 (6,18-8,09)	6,58 (5,35-8,18)	0,515
N	22,95 (18,00-32,40)	32,35 (26,60-35,60)	0,175
L	60,40 (49,00-63,90)	55,75 (49,20-61,00)	0,515
M	8,00 (6,20-8,50)	9,90 (7,80 -10,70)	0,175
E	4,10 (0-13,20)	0 (0-0)	0,119
B	2,65 (2,20 - 3,10)	1,75 (1,70-2,10)	0,104
RCB	5,20 (4,62-5,46)	5,09 (4,89-5,32)	0,957
Hb	11,60 (10,60-11,60)	11,55 (11,20-11,80)	0,663
HCT	35,85 (33,40-36,60)	35,80 (34,80- 37,10)	0,704
MCV	69,25 (67,40-71,10)	69,70 (68,30- 71,20)	0,515
MCH	22,10 (21,70-22,50)	22,30 (22,00-23,10)	0,446
MCHC	31,85 (31,3-32,3)	32,10 (31,70-32,50)	0,276
RDW-CV	13,70 (12,60 -14,70)	14,1 (13,7-14,3)	0,913
PLT	297,50 (239,00 – 310,00)	296,50 (281,00 – 309,00)	0,704
MPV	6,45 (6,30-6,60)	6,55 (6,4-6,7)	0,322
HC LƯỚI	2,10 (2,00-2,30)	2,15 (2,10-2,20)	0,617

Bảng 3.4: Kết quả chỉ số huyết học 14 ngày sau hồi phục

Đặc điểm	Nhóm DTaP (n=4)	Nhóm Placebo (n=2)	P^a
WBC	6,59 (4,91-8,53)	4,18 (4,17-4,18)	0,064
N	28,90 (20,05-39,80)	33,80 (31,90-35,70)	0,643
L	59,65 (47,05-69,10)	55,10 (53,60-56,60)	0,643
M	9,50 (8,50 – 12,00)	9,95 (9,40-10,50)	0,643
E	0 (0 – 0,05)	0,10 (0-0,20)	0,411
B	1,55 (1,15-2,30)	1,05 (0,20-1,90)	
RCB	5,36 (4,92-5,76)	5,29 (4,86-5,72)	1,000
Hb	11,9 (11,1-12,35)	11,55 (10,70-12,40)	1,000
HCT	38,65 (36,45-39,50)	38,45 (36,50-40,40)	0,638
MCV	71,40 (68,65-74,15)	72,85 (70,60-75,10)	0,354
MCH	21,80 (21,45-22,55)	21,85 (21,70-22,00)	1,000
MCHC	30,80 (30,45-31,25)	30,00 (29,30-30,70)	0,240
RDW-CV	15,75 (14,80-17,40)	16,95 (16,00-17,90)	0,643
PLT	343,00 (264,00-404,50)	292,50 (200,00-385,00)	0,355
MPV	6,45 (6,40 – 6,50)	6,50 (6,40-6,60)	0,617
HC LƯỚI	2,15 (2,10-2,25)	2,25 (2,10-2,40)	0,623

* *Kiểm định Wilcoxon-Mann-Whitney*

Kết quả phân tích ghi nhận có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các chỉ số Lympho ở hai nhóm thử tiêm DTaP và tiêm giả dược ở thời điểm trước tiêm với giá trị P là 0,013. Ở thời điểm 2 ngày sau tiêm mũi 1, chỉ số Bạch cầu trung tính, Bạch cầu đơn nhân và Lympho có sự khác biệt giữa hai nhóm thử tiêm DTaP và tiêm giả dược, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với giá trị P lần lượt là P=0,030; P=0,001 và P=0,003. Kết quả nghiên cứu không ghi

nhận sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của chỉ số lâm sàng nào giữa hai nhóm tiêm ở 2 mốc thời điểm sau tiêm mũi ba 2 ngày và 14 ngày sau hồi phục (với tất cả giá trị P từ 0,064 – 1,000).

Hầu hết các chỉ số xét nghiệm huyết học đều có giá trị trung bình nằm trong dải giới hạn bình thường ở cả 4 lần xét nghiệm gồm: số lượng bạch cầu (WBC), tỷ lệ bạch cầu lympho (L), chỉ số hồng cầu (RCB), lượng huyết sắc tố (Hb), tỷ lệ thể tích hồng cầu trong thể tích máu toàn phần (HCT), thể tích trung bình của hồng cầu trong máu (MCV), số lượng huyết sắc tố trung bình có trong một tế bào hồng cầu (MCH), nồng độ huyết sắc tố trung bình trong một tế bào hồng cầu (MCHC), số lượng tiểu cầu (PLT), thể tích trung bình tiểu cầu (MPV) và số lượng hồng cầu lưới.

Một số chỉ số có sự biến động như sau: chỉ số tỷ lệ bạch cầu trung tính (N) có giá trị trung bình thấp hơn bình thường, các chỉ số gồm tỷ lệ bạch cầu đơn nhân (M), tỷ lệ bạch cầu ưa axit (E), tỷ lệ bạch cầu ưa kiềm (B) có giá trị trung bình cao hơn bình thường. Tuy nhiên các giá trị bất thường này xảy ra ngay ở lần xét nghiệm đầu tiên khi thở chưa tiêm bất cứ liều vắc xin nào vì vậy dải giới hạn bình thường chỉ mang tính chất tham khảo đối với các chỉ số này, không liên quan với vắc xin.

3.1.9. Xét nghiệm sinh hóa (Phụ lục 5)

Xét nghiệm 6 chỉ số sinh hóa chọn lọc gồm Ure, Creatinin, GOT (Enzyme Glutamic – Oxaloacetic Transaminase), GPT (Enzyme Alanine Aminotransferase), GGT (men gamma Glutamyl Transferase) và CRP (C reactive protein).

Bảng 3.5: Kết quả xét nghiệm sinh hóa máu nền

Đặc điểm	Nhóm DTaP (n=10) Trung vị-Khoảng tứ phân vị	Nhóm Placebo (n=6) Trung vị-Khoảng tứ phân vị	P^a
URE	6,05 (4,9-6,8)	5,00 (4,30-5,60)	0,174
Creatinin	106,50 (93,00 – 136,00)	91,50 (84,00 -107,00)	0,102
GOT	38,60 (29,50 – 43,00)	68,90 (41,80-146,90)	0,017
GPT	40,50 (34,10-49,90)	55,8 (44,3- 58)	0,193
GGT	13,50 (12,00 – 15,00)	15,00 (12,00 – 18,00)	0,383
CRP	0,25 (0,22-0,26)	0,19 (0,17-0,22)	0,016

Bảng 3.6: Kết quả xét nghiệm sinh hóa 2 ngày sau tiêm mũi 1

Đặc điểm	Nhóm DTaP (n=10) Trung vị-Khoảng tứ phân vị	Nhóm Placebo (n=6) Trung vị-Khoảng tứ phân vị	P^a
URE	4 (3,2-4,3)	3,30 (3,10-3,80)	0,232
Creatinin	96,50 (87,0-111,00)	85,00 (79,00-87,00)	0,044
GOT	29,75 (20,90-47,70)	25,80 (23,70-54,30)	0,828
GPT	48,25 (40,50-64,20)	53,30 (45,60-60,90)	0,704
GGT	11,50 (10,00-14,00)	13,50 (11,00-17,00)	0,353
CRP	0,25 (0,23-0,25)	0,25 (0,24-0,25)	0,532

Bảng 3. 7: Kết quả xét nghiệm sinh hóa 2 ngày sau tiêm mũi 3

Đặc điểm	Nhóm DTaP (n=10) Trung vị-Khoảng tứ phân vị	Nhóm Placebo (n=6) Trung vị-Khoảng tứ phân vị	P^a
URE	5,40 (5,10-7,20)	4,75 (4,10-5,50)	0,232
Creatinin	109,50 (86,00 – 116,00)	92,50 (85,00 – 97,00)	0,212
GOT	30,25 (26,00 – 38,30)	25,80 (22,60-31,60)	0,515
GPT	47,85 (39,50-61,80)	50,15 (30,10-61,00)	0,914
GGT	9,00 (7,00-12,00)	9,00 (9,00 – 10,00)	0,821
CRP	0,19 (0,14-0,20)	0,24 (0,15 -0,25)	0,480

Bảng 3. 8: Kết quả xét nghiệm sinh hóa 14 ngày sau hồi phục

Đặc điểm	Nhóm DTaP (n=4)	Nhóm Placebo (n=2)	P^a
URE	6,65 (6,25-7,60)	7,55 (5,20-9,90)	1,000
Creatinin	110,00 (88,50- 126,00)	89,50 (87,00-92,00)	0,355
GOT	33,50 (28,90-40,20)	29,20 (26,50-31,90)	0,355
GPT	56,30 (37,80-60,10)	56,95 (47,10-66,80)	0,643
GGT	8,00 (5,50-12,50)	6,00 (5,00-7,00)	0,481
CRP	0,19 (0,15-0,21)	0,20 (0,18-0,21)	0,623

^a Kiểm định Wilcoxon-Mann-Whitney

Kết quả phân tích ghi nhận có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các chỉ số GOT, CRP ở hai nhóm thử tiêm DTaP và giả dược ở thời điểm trước tiêm với giá trị P lần lượt là $P = 0,017$ và $P = 0,016$. Kết quả nghiên cứu không ghi nhận sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của chỉ số lâm sàng nào giữa

hai nhóm thử ở 2 mốc thời điểm sau tiêm mũi 1, 2 ngày sau tiêm mũi 3 và 14 ngày sau hồi phục (với tất cả giá trị $P > 0,05$).

- Chỉ số Protein phản ứng C (CRP) âm tính ở tất cả các thử và tất cả các lần xét nghiệm.

- Các chỉ số GGT, GPT và Urea có sự biến động ở cả 4 lần xét nghiệm: GGT luôn cao hơn gấp đôi giới hạn bình thường hoặc nằm ở ngưỡng trên, trong khi đó GPT và Urea luôn thấp hơn giới hạn bình thường hoặc nằm ở giới hạn dưới. Sự biến động này quan sát thấy ở cả nhóm tiêm vắc xin lẫn nhóm tiêm giả dược. Do đó giới hạn bình thường có lẽ chỉ mang tính chất tham khảo, không quy kết là do vắc xin.

- Chỉ số GOT: 3/16 thử có giá trị cao hơn từ 1,2-2,4 lần so với giới hạn trên ở lần xét nghiệm đầu tiên (nhóm máu nền), các lần xét nghiệm sau đó chỉ số này đều nằm trong giới hạn bình thường. Do đó có thể nhận định chỉ số GOT tăng ngoài dải bình thường ở 3 thử này có thể là do ngẫu nhiên.

- Chỉ số Creatinin: 4/16 thử có giá trị cao hơn giới hạn bình thường ở lần xét nghiệm đầu tiên (nhóm máu nền), sang lần xét nghiệm ở thời điểm D2 thì 3 thử giảm xuống đạt mức bình thường, thử còn lại vẫn cao (hơn 1,1 lần so với giới hạn trên). Đến các lần xét nghiệm sau thì chỉ số này bình thường ở tất cả các thử. Vì vậy chỉ số Creatinin tăng ngoài dải bình thường ở các thử này có thể là do biến động trong quá trình sinh trưởng.

3.2. NGHIÊN CỨU ĐÁNH GIÁ TÍNH SINH MIỄN DỊCH (IMMUNOGENICITY)

Kết quả hiệu giá kháng thể kháng Bạch hầu, kháng Ho gà, kháng Uốn ván của 2 nhóm nghiên cứu (Phụ lục 6).

Sau 14 ngày hồi phục, trung bình hiệu giá kháng thể kháng bạch hầu, ho gà, uốn ván tăng hơn gấp đôi so với thời điểm 2 ngày sau tiêm mũi 3 (anti-D: 14,62 gấp 3,3 lần so với 4,48; anti-T: 11,43 gấp 3,9 lần so với 2,94, anti-PT: 37,41 gấp 2,4 lần so với 15,87) cho thấy được giữa 2 nhóm tiêm có sự khác biệt rõ rệt.

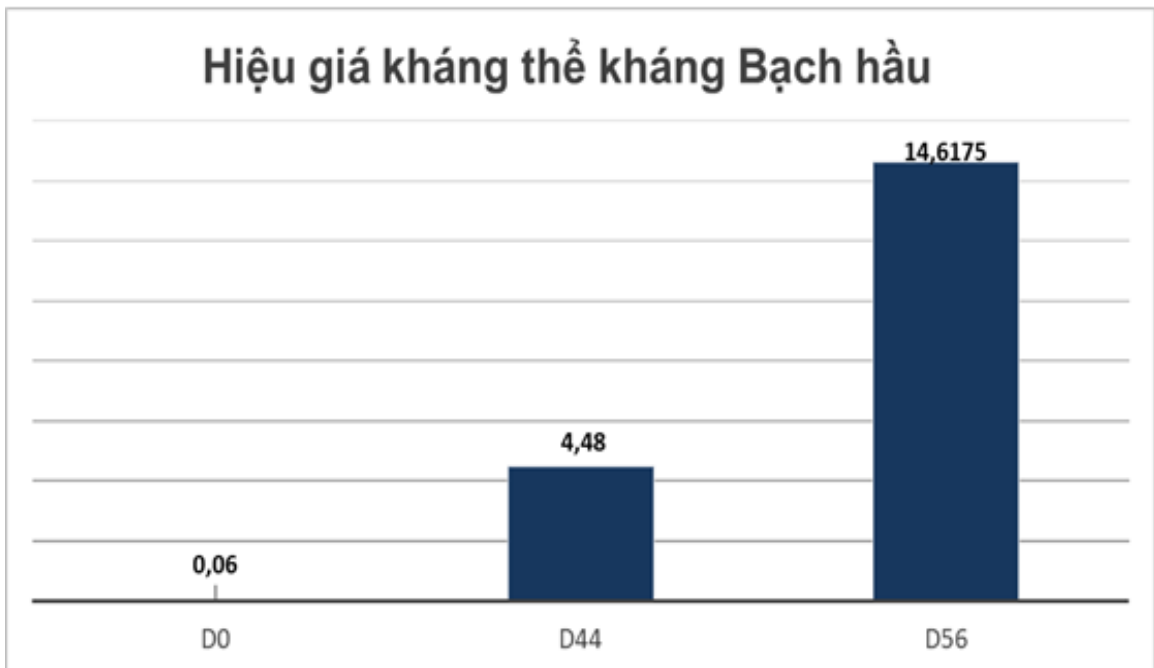
Bảng 3. 9. Hiệu giá kháng thể kháng bạch hầu, uốn ván, ho gà thời điểm 2 ngày sau tiêm mũi 3

Hiệu giá kháng thể kháng	Nhóm tiêm DTaP			Nhóm tiêm placebo			p ^a
	Trung bình ± Độ lệch chuẩn	Trung vị - Khoảng tứ phân vị	CI 95%	Trung bình ± Độ lệch chuẩn	Trung vị - Khoảng tứ phân vị	CI 95%	
	(n=10)			(n=6)			
Bạch hầu (anti-D)	4,48±2,54	3,09 (2,55-6,47)	2,66- 6,30	0,06±0	0,06 (0,06-0,06)	0,06-0,06	<0,001
Uốn ván (anti-T)	2,94±0,73	2,75 (2,63-3,70)	2,42- 3,46	0,06±0	0,06 (0,06-0,06)	0,06-0,06	<0,001
Ho gà (anti-PT)	15,87±5,28	14,22 (11,86-22,32)	12,09-19,64	0,03±0	0,03 (0,03-0,03)	0,03-0,03	<0,001

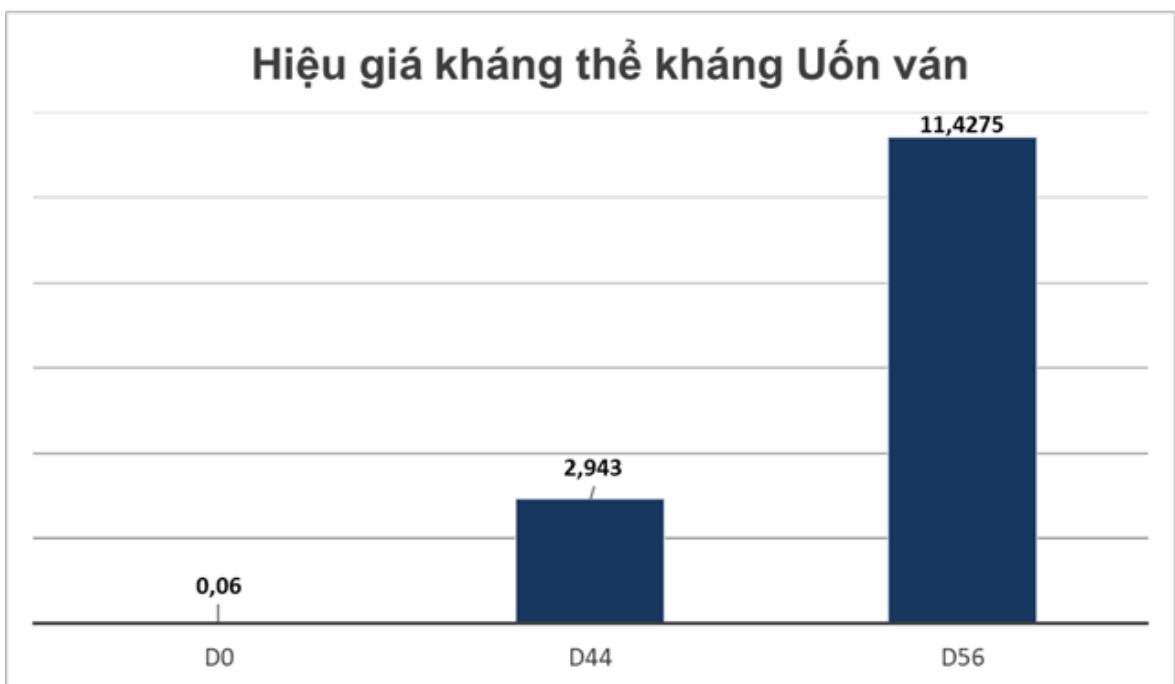
Bảng 3. 10. Hiệu giá kháng thể kháng bạch hầu, uốn ván, ho gà thời điểm 14 ngày sau tiêm mũi 3

Hiệu giá kháng thể kháng	Nhóm tiêm DTaP			Nhóm tiêm placebo			p ^a
	Trung bình ± Độ lệch chuẩn	Trung vị - Khoảng tứ phân vị	CI 95%	Trung bình ± Độ lệch chuẩn	Trung vị - Khoảng tứ phân vị	CI 95%	
	(n=4)			(n=2)			
Bạch hầu (anti-D)	14,62±5,36	13,83 (11,00-18,24)	6,10-23,14	0,06±0	0,06 (0,06-0,06)	0,06-0,06	0,060
Uốn ván (anti-T)	11,43±8,15	8,76 (5,64-17,22)	-1,55-24,40	0,06±0	0,06 (0,06-0,06)	0,06-0,06	0,060
Ho gà (anti-PT)	37,41±7,94	37,22 (30,67-44,15)	24,78-50,04	0,03±0	0,03 (0,03-0,03)	0,03-0,03	0,050

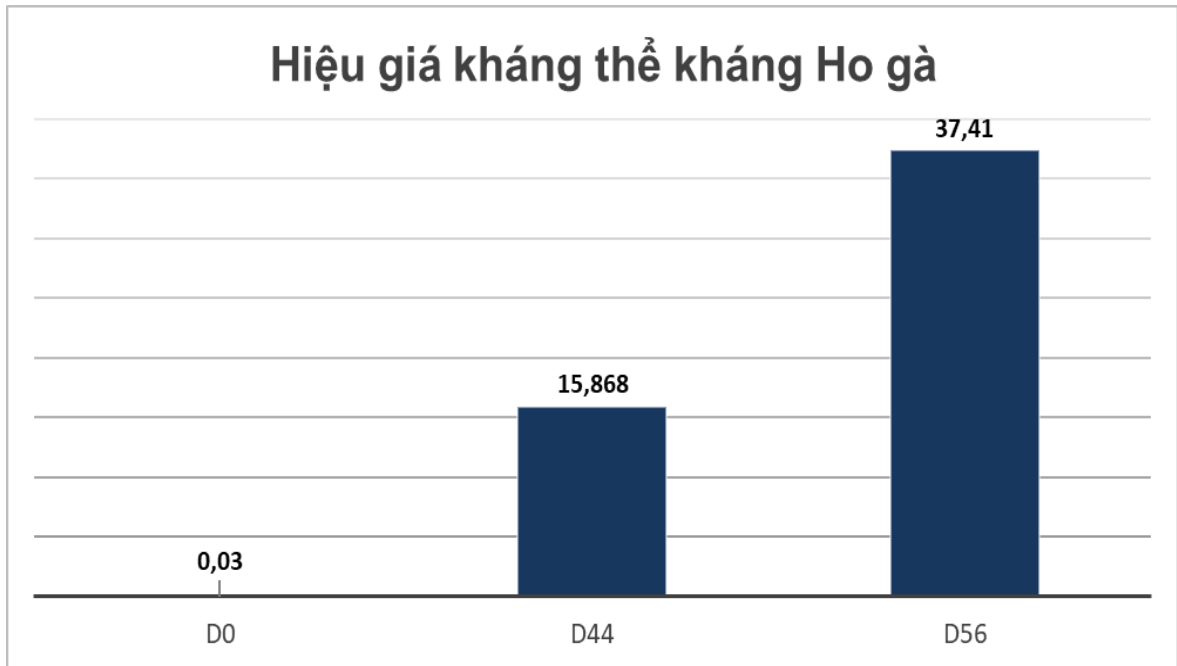
*Kiểm định Wilcoxon-Mann-Whitney



Hình 3.15. Hiệu giá kháng thể kháng Bạch hầu



Hình 3.16. Hiệu giá kháng thể kháng Uốn ván



Hình 3. 17. Hiệu giá kháng thể kháng Ho gà

Kết quả cho thấy hiệu giá kháng thể bạch hầu, uốn ván, ho gà ở nhóm thỏ được tiêm DTaP vào thời điểm 2 ngày sau tiêm mũi 3 lần lượt là 4,48 IU/ml (CI 95%: 2,66-6,30), 2,94 IU/ml (CI 95%: 2,42-3,46), 15,87 IU/ml (CI 95%: 12,09-19,64).

Ghi nhận thời điểm 14 ngày sau tiêm mũi 3 hiệu giá kháng thể kháng bạch hầu, uốn ván, ho gà với các giá trị lần lượt là 14,62 IU/ml (CI 95%: 6,10-23,14), 11,43 IU/ml (CI 95%: -1,55-24,40), 37,41 IU/ml (CI 95%: 24,78-50,04).

Kết quả phân tích thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê hiệu giá kháng thể kháng bạch hầu, uốn ván, ho gà ở hai nhóm tiêm DTaP và giả dược tại thời điểm 2 ngày sau tiêm mũi 3 (tất cả giá trị $P < 0,001$).

Đối với nhóm thỏ tiêm giả dược thì nồng độ kháng thể trước tiêm và sau tiêm không có sự thay đổi (dưới ngưỡng phát hiện, đối với anti-D và anti-T là $< 0,06$ IU/ml, anti-PT là $< 0,03$ IU/ml).

Hiệu giá kháng thể kháng bạch hầu, ho gà, uốn ván ở thời điểm 2 ngày sau tiêm mũi 3 có sự khác biệt rõ rệt với nhóm tiêm giả dược chứng tỏ nhóm

thở được tiêm vắc xin DTaP tạo được đáp ứng miễn dịch tốt đối với các thành phần bạch hầu, ho gà, uốn ván có trong vắc xin.

Thời điểm kết thúc nghiên cứu, các kháng thể này tăng cao gấp rất nhiều lần. Trên người, nồng độ kháng thể kháng bạch hầu, uốn ván đạt ≥ 0.01 IU/ml là có khả năng bảo vệ.

Từ các chỉ số hiệu giá kháng thể trước và sau tiêm chủng tỏ vắc xin DTaP có đáp ứng miễn dịch tốt đối với các thành phần bạch hầu, uốn ván và ho gà.

CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. KẾT LUẬN

Vắc xin DTaP ghi nhận là an toàn và dung nạp tốt với 3 liều (0,5 ml/liều tiêm) lặp lại, đường tiêm bắp trên động vật thí nghiệm. Tất cả 16 con thỏ thử độc tính đều sống khỏe mạnh, tăng cân đến hết thời kỳ thử nghiệm, không phát hiện các biểu hiện bất thường về sinh học – lâm sàng tại chỗ và toàn thân. Xét nghiệm huyết học toàn phần và sinh hóa chọn lọc, hầu hết các chỉ số bình thường, một số thỏ có biến động nhẹ nhưng không liên quan vắc xin.

Giải phẫu mô bệnh học không ghi nhận tổn thương trên đại thể và hình ảnh vi thể không phát hiện có dấu hiệu bệnh lý cụ thể nào ở não, tim, gan, mật, thận, thượng thận và tủy xương của xương ức ở toàn bộ các con thỏ trong nghiên cứu này.

Vắc xin DTaP tạo được 100% số thỏ đáp ứng miễn dịch với các thành phần bạch hầu, uốn ván, ho gà bằng đường tiêm bắp với 3 liều lặp lại, cách nhau 21 ± 2 ngày.

4.2. KIẾN NGHỊ

Tiếp tục nghiên cứu và đánh giá tính ổn định vắc xin DTaP để cập nhật kết quả cho thử nghiệm lâm sàng khi có thể.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. World Health Organization, 2009, The Immunological Basis for Immunization Series,2, pp. 1-11.
2. Bệnh Viện Nhiệt đới Trung ương, 2012, Các loại vắc xin dùng trong Chương trình Tiêm chủng mở rộng Quốc gia, Available at <http://benhnhietdoi.vn/tin-tuc/chi-tiet/cac-loai-vac-xin-dung-trong-chuong-trinh-tiem-chung-mo-rong-quoc-gia/884>.
3. Bệnh viện Vinmec, Đặc điểm vi khuẩn Bạch hầu, Available at <https://www.vinmec.com/vi/tin-tuc/thong-tin-suc-khoe/suc-khoe-tong-quat/dac-diem-vi-khuan-bach-hau>.
4. World Health Organization, 2007, The Immunological Basis for Immunization Series,3, pp. 1-3.
5. World Health Organization, 2018, The Immunological Basis for Immunization Series,3, pp. 1-29.
6. Brennan J.M., Burns L.D., Meade D.B., Shahin D.R., Manclark C.R., 1995, Recent advanced in the development of Pertussis vaccines, *Vaccines: New approaches to Immunological problem*, pp. 4-22.
7. Lê Văn Hiệp, 1998, Góp phần tìm hiểu các yếu tố liên quan đến độc tính và công hiệu của vắc xin ho gà sản xuất bằng nổi lên men, *Tạp chí Y học dự phòng*, VIII, tr. 13-22.
8. Bisgard K.M., Rhodes P., Connelly B,L., Bi D., Hahn C., Patrick S. et al, 2005, Pertussis vaccine effectiveness among children 6 to 59 months of age in the United States, 116(2), pp. 94-285.
9. UNICEF Supply Division, 2015, Pentavalent vaccine (DTwP-HepB-Hib): Market & Supply Update.
10. Đỗ Thiện Hải, 2021, Tổng quan chẩn đoán và điều trị bệnh ho gà, *Tạp chí Nhi khoa*, 14(1), tr. 1-3.
11. World Health Organization, 2016, Immunization, vaccines and Biologicals Global immunization coverage sustained in the past five years.
12. Viện Vệ sinh Dịch Tễ Trung ương và Cục Y Tế Dự phòng, 2018, *Niên giám thống kê bệnh truyền nhiễm*.

13. Lê Văn Bé, 2013, Nhìn lại chặng đường cung cấp vắc xin cho chương trình Tiêm chủng mở rộng của Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế, *Tạp chí Y học dự phòng*, XXIII(9), tr. 86.
14. Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế, 2016, *Hồ sơ tái đăng ký vắc xin Bạch hầu - Ho gà - Uốn ván (DPT)*.
15. Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế, Lịch sử hình thành và phát triển, Available at http://www.ivac.com.vn/gioi_thieu/9/lich-su-hinh-thanh-va-phat-trien/vien-vac-xin.html.
16. United States Department of Health and Human Services, 1997, *Pertussis Vaccination: Use of Acellular Pertussis Vaccines Among Infants and Young Children*.
17. Nguyễn Thị Lan Phương, Trần Ngọc Nhơn, Lê Thị Bích Thủy, 2002, Đánh giá độc tính đặc hiệu của thành phần ho gà trong vắc xin DPT bằng các thử nghiệm tăng trọng chuột (MWG test), yếu tố kích hoạt bạch cầu (LPF test) và nội độc tố (LAL test), *Tạp chí Y học dự phòng*, XII(5), tr. 6-11.
18. Nguyễn Thị Lan Phương, Lê Văn Hiệp, Trần Ngọc Nhơn, Lê Thị Bích Thủy, 2005, Xác định hoạt tính kháng nguyên độc tố ho gà (PT) trên tế bào CHO/K1 (Chinese Hamster Ovary Cell), *Tạp chí Y học Thực Hành*, (523), tr. 7-14.
19. Wikipedia, Vắc xin DPT, Available at https://vi.wikipedia.org/wiki/V%E1%BA%AFc-xin_DPT.
20. Sanofi Pasteur Ltd., 2002, *Diphtheria and Tetanus Toxoids and Acellular Pertussis Vaccine Adsorbed*.
21. INFANRIX, 1997, *Diphtheria and Tetanus Toxoids and Acellular Pertussis Vaccine Adsorbed - Suspension for Intramuscular Injection*.
22. World Health Organization, 2005, WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines, (927), pp. 32-54.
23. EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 1997, *Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals*.

24. Miller W. Rosenbloom K., Hardison R.C., Hou M., Taylor J., Raney B. et al, 2007, 28-way vertebrate alignment and conservation track in UCSC Genome Browser, *Genome Research*,(17), pp. 808-1797.
25. Trần Phương Hạnh, Nguyễn Sào Trung, 2013, *Giải phẫu bệnh học*.
26. European Pharmacopoeia 8.0, Assay of pertussis vaccine, pp. 252.

PHỤ LỤC 2
BẢNG THEO DÕI TRỌNG LƯỢNG THỎ
(Đơn vị: kg)

Sản phẩm NC	Giới	Dấu thỏ	Ngày theo dõi												
			Trước tiêm T1	Sau 24h	Tuần 1	Tuần 2	Trước tiêm T2	Sau 24h	Tuần 4	Tuần 5	Trước tiêm T3	Sau 24h	Kết thúc NC	Tuần 7	Tuần 8
DTaP	Đực	3	2,34	2,36	2,4	2,48	2,5	2,48	2,51	2,52	2,6	2,62	2,6		
		5	2,1	2,1	2,14	2,21	2,32	2,32	2,34	2,37	2,5	2,48	2,5	2,52	2,66
		6	2,34	2,36	2,3	2,4	2,4	2,38	2,5	2,48	2,6	2,62	2,6		
		9	2,12	2,12	2,2	2,28	2,32	2,32	2,4	2,38	2,4	2,42	2,4		
		10	2,24	2,24	2,3	2,48	2,46	2,44	2,5	2,6	2,46	2,48	2,52	2,58	2,62
	Cái	11	2,34	2,46	2,6	2,74	2,76	2,72	2,83	2,98	3,06	3,1	3,04		
		12	2,32	2,33	2,41	2,5	2,68	2,66	2,9	2,96	3	3	3,02	3,12	3,22
		13	2,2	2,16	2,3	2,4	2,46	2,44	2,52	2,64	2,8	2,74	2,72		
		14	2,34	2,36	2,56	2,78	2,82	2,78	2,79	3	3,2	3,22	3,2		
		17	2,2	2,2	2,28	2,43	2,4	2,4	2,5	2,54	2,62	2,6	2,6	2,6	2,68

Sản phẩm NC	Giới	Dấu thỏ	Ngày theo dõi												
			Trước tiêm T1	Sau 24h	Tuần 1	Tuần 2	Trước tiêm T2	Sau 24h	Tuần 4	Tuần 5	Trước tiêm T3	Sau 24h	Kết thúc NC	Tuần 7	Tuần 8
Placebo	Đực	1	2,3	2,34	2,44	2,56	2,66	2,68	2,8	2,88	2,94	2,98	3,06		
		2	2,14	2,12	2,2	2,26	2,26	2,28	2,39	2,34	2,4	2,4	2,42	2,4	2,5
		4	2,3	2,34	2,42	2,48	2,54	2,52	2,61	2,64	2,7	2,8	2,78		
	Cái	8	2,44	2,44	2,46	2,62	2,7	2,7	2,81	2,9	2,98	3	3		
		15	2,2	2,8	2,28	2,46	2,56	2,4	2,64	2,84	2,92	3	3	3,14	3,14
		16	2,2	2,16	2,2	2,34	2,4	2,4	2,52	2,54	2,64	2,62	2,64		

PHỤ LỤC 3

BẢNG THEO DÕI NHIỆT ĐỘ THỞ

Đơn vị: °C

Sản phẩm NC	GIỚI		Mũi tiêm 1			Mũi tiêm 2				Mũi tiêm 3		
		THỞ	T0	T-6h	T-24h	T0	T-6h	T-24h	T-48h	T0	T-6h	T-24h
DTaP	Đực	Thở 3	39,3	39,4	38,9	39,6	39,4	39,2		39,6	39,3	39
		Thở 5	39,2	38,2	38,7	38,6	39	38		39,1	38,4	38
		Thở 6	39,3	38,9	38,9	38,9	39,3	38,3		39,4	39,1	38,6
		Thở 9	39,7	39,1	39,3	39,8	39,5	39		39,3	39,4	38,7
		Thở 10	39,1	39,2	38,9	38,6	39,5	39		39,2	39,5	38,9
	Cái	Thở 11	39,5	39,7	39,7	39,8	39,9	39,4		39,6	39,5	39,2
		Thở 12	39,6	39,7	39,4	39,6	40	39,4		39,6	39,7	39,3
		Thở 13	39,4	39,7	39,3	39,4	39,9	39,4		39,5	39,5	39,4
		Thở 14	39,6	39,7	39,6	39,8	39,9	39,5		39,5	39,4	39
		Thở 17	39,5	39,4	39,1	39,5	39,6	39,1		39,5	38,9	38,6
Placebo	Đực	Thở 1	38,5	38,3	38,2	39,4	39,2	38,6		39,3	38,4	38,1
		Thở 2	38,4	38,4	38	38,9	38,3	38		39	38,2	38
		Thở 4	38,7	38,3	37,8	38,7	38,4	38,1		38,8	38,4	38,1
	Cái	Thở 8	39,6	39,2	39,3	39,6	39,4	39,5		39,8	39,7	39,3
		Thở 15	39,2	39,6	39,5	39,6	40	39,9	39,5	40,1	39,6	39,5
		Thở 16	39,8	40	39,5	39,8	39,9	39,5		39,8	39,3	39

PHỤ LỤC 4

BẢNG KẾT QUẢ XÉT NGHIỆM HUYẾT HỌC

XN	DẤU THỎ	WBC	N	L	M	E	B	RBC	Hb	HCT	MCV	MCH	MCHC
XN1 (D0)	1	6,73	21	56,3	8	11,1	3,6	5,38	11,4	35,7	66,4	21,2	31,9
	2	5,09	36,4	50,3	9,8	0	3,5	6,24	12,7	40,8	65,4	20,4	31,1
	3	6,72	23,2	53,6	7	12,8	3,4	5,84	12,1	37,8	64,7	20,7	32
	4	6,06	50,9	38,8	7,3	0	3	4,5	10,5	33,5	74,4	23,3	31,3
	5	4,7	23	63,4	4	0	9,6	6,17	12,8	39,2	63,5	20,7	32,7
	6	9,11	36,9	50,2	6,9	0,2	5,8	5,66	11,5	35,9	63,4	20,3	32
	8	5,19	37,4	45,3	12,5	0	4,8	5,53	11,1	36	65,1	20,1	30,8
	9	4,87	11	59,8	6	18,3	4,9	6,01	13,4	41,3	68,7	22,3	32,4
	10	6,87	32,2	53,4	12,2	0	2,2	6,12	12,5	40,2	65,7	20,4	31,1
	11	4,63	15,5	70,4	3,5	6,3	4,3	4,9	10,5	33,8	69	21,4	31,1
	12	9,05	28,6	51,6	9,5	0	10	6	13	40,4	67,3	21,7	32,2
	13	5,73	32,2	53,6	8,6	0	5,6	6,37	13,7	42,4	66,6	21,5	32,3
	14	6,69	14,8	67,9	5,4	6,7	5,2	4,8	10,3	34,5	71,9	21,5	29,9
	15	4,11	39	47,7	9,2	0	4,1	6,08	12,5	40,9	67,3	20,6	30,6
	16	7,46	23,5	46,9	14,2	8,3	7,1	6,46	13,6	42,2	65,3	21,1	32,2
	17	9,57	27,7	55,4	10,1	0	6,8	5,98	12,7	40	66,9	21,2	31,8

XN	DẤU THỎ	WBC	N	L	M	E	B	RBC	Hb	HCT	MCV	MCH	MCHC
XN2 (D2)	1	7,02	35,6	49,7	11,3	0	3,4	4,83	10,3	31,7	65,6	21,3	32,5
	2	7,04	38,1	51,1	9,7	0	1,1	5,37	11,1	35,1	65,4	20,7	31,6
	3	10,4	31,5	55,7	9,6	0	3,2	5,16	10,7	33,3	64,5	20,7	32,1
	4	8,67	49,8	36,7	11,2	0	2,3	3,82	8,9	29	75,9	23,3	30,7
	5	7,04	20,8	67,9	9,2	0	2,1	5,22	10,8	33,4	64	20,7	32,3
	6	9,59	32,2	54,3	8	0	5,5	5,29	10,6	33,3	62,9	20	31,8
	8	6,88	29,9	42,2	15,4	8,6	3,9	5,07	10,3	33,2	65,5	20,3	31
	9	5,42	21,5	59,6	9,2	7,9	1,8	5,22	11,6	37	70,9	22,2	31,4
	10	7,89	30,9	51,7	13,6	0	3,8	5,35	10,9	35,7	66,7	20,4	30,5
	11	6,49	19,6	67,3	9,6	0	3,5	4,59	9,6	32	69,7	20,9	30
	12	9,02	23,4	51,2	8,8	9	7,6	5,3	11,5	36,6	69,1	21,7	31,4
	13	6,79	34,1	53,8	7,4	0	4,7	5,69	12	39	68,5	21,1	30,8
	14	7,4	17,9	64,7	9,2	3,6	4,6	4,51	9,9	33	73,2	22	30
	15	4,89	37,4	43,6	15,1	0	3,9	5,36	11,5	37,7	70,3	21,5	30,5
	16	8,21	28,7	42	18,9	4,4	6	5,61	11,8	36,6	65,2	21	32,2
	17	9,68	33,5	56,8	8,6	0	1,1	5,57	11,8	37,9	68	21,2	31,1

XN	DẤU THỎ	WBC	N	L	M	E	B	RBC	Hb	HCT	MCV	MCH	MCHC
XN3 (D44)	1	8,18	26,6	64,9	6,7	0	1,8	4,89	11,3	34,8	71,2	23,1	32,5
	2	5,35	32,9	55,3	10,1	0	1,7	5,32	11,8	37,2	69,9	22,2	31,7
	3	7,5	18	62,4	8,3	10,1	1,2	5,52	12	37,2	67,4	21,7	32,3
	4	9,28	21,3	61	12,2	0	5,5	5,04	11,8	36,5	72,4	23,4	32,3
	5	6,18	19,7	49	10,4	14,9	6	5,25	11,6	35,6	67,8	22,1	32,6
	6	13,39	44,3	44,4	8,2	0	3,1	5,87	11,9	38,1	64,9	20,3	31,2
	8	6,05	49,6	40,5	7,8	0	2,1	5,14	11,2	35,1	68,3	21,8	31,9
	9	4,26	10,6	68,3	4,7	13,8	2,6	5,15	11,9	36,6	71,1	23,1	32,5
	10	7,49	61,4	25,5	11,2	0	1,9	4,4	10,6	33,9	77	24,1	31,3
	11	7,12	32,4	58,1	7	0	2,5	5,46	11,6	36,1	66,1	21,2	32,1
	12	10,11	25,3	63,9	7,8	0	3	4,54	10,2	32,7	72	22,5	31,2
	13	5,38	31,8	60,8	5,2	0	2,2	4,72	10,6	33,4	70,8	22,5	31,7
	14	6,95	10,7	66,3	6,2	13,2	3,6	4,62	10,2	32,5	70,3	22,1	31,4
	15	4,77	31,8	56,2	10,7	0	1,3	4,72	10,4	32,8	69,5	22	31,7
	16	7,11	35,6	49,2	9,7	3,8	1,7	5,45	12,2	37,1	68,1	22,4	32,9
	17	8,09	20,6	60	8,5	8,2	2,7	5,31	11,6	36,2	68,2	21,8	32

XN	DẤU THỎ	WBC	N	L	M	E	B	RBC	Hb	HCT	MCV	MCH	MCHC
XN4 (D56)	2	4,17	31,9	56,6	9,4	0,2	1,9	5,72	12,4	40,4	70,6	21,7	30,7
	5	4,2	16,9	73,1	8,3	0	1,7	5,68	12,2	39,5	69,5	21,5	30,9
	10	5,61	45	39,9	13,7	0	1,4	5,04	11,6	37,8	75	23	30,7
	12	9,5	34,6	54,2	10,3	0	0,9	4,79	10,6	35,1	73,3	22,1	30,2
	15	4,18	35,7	53,6	10,5	0	0,2	4,86	10,7	36,5	75,1	22	29,3
	17	7,56	23,2	65,1	8,7	0,1	2,9	5,83	12,5	39,5	67,8	21,4	31,6

Nguồn: Trung tâm xét nghiệm lâm sàng, Viện Pasteur Nha Trang .

PHỤ LỤC 5

BẢNG KẾT QUẢ XÉT NGHIỆM SINH HÓA

XN	DẤU THỎ	RDW-CV	PLT	MPV	HC LU'ỚI	URE	CREA	GOT	GPT	GGT	CRP
XN1 (D0)	1	17,2	305	6,5	2,2	4,3	81	40,5	53,6	11	Negative <0.12
	2	17,1	191	6,1	2	3,3	99	147	58	16	Negative 0.20
	3	14,5	315	6,7	2,2	4,7	84	37,3	37,9	15	Negative 0.25
	4	16,9	408	6,6	2,4	5,3	84	232	67	12	Negative 0.17
	5	14,5	298	6,7	2	6,4	104	39,9	33,3	14	Negative 0.25
	6	15,1	371	6,3	2,2	5,4	93	29,5	33,4	12	Negative 0.22
	8	14,7	411	6,7	2,4	4,7	84	56,3	58	23	Negative 0.18
	9	12,4	273	6,1	2,2	4,9	130	120	49,4	15	Negative 0.26
	10	15,2	316	6,2	2,5	5,7	109	31,7	49,9	19	Negative 0.25
	11	16,2	212	6,5	2,1	7,7	90	49,5	43,1	10	Negative 0.21
	12	12,1	315	6,3	1,9	6,8	170	27,3	57,2	12	Negative 0.19
	13	12,8	354	6,2	2	8,3	170	43	60,5	13	Negative 0.27
	14	16,5	352	6,4	2,2	6,5	104	40,1	34,1	7	Negative 0.22
	15	13,8	271	6,3	2,3	8,3	116	41,8	44,3	14	Negative 0.24
	16	14,5	297	6,4	2,1	5,6	107	81,5	27,9	18	Negative 0.22
	17	13,8	264	6,3	2	4,7	136	28,9	35,8	16	Negative 0.26

XN	DẤU THỎ	RDW-CV	PLT	MPV	HC LUỖI	URE	CREA	GOT	GPT	GGT	CRP
XN2 (D2)	1	17,7	376	6,6	2,2	3,1	79	24,6	54,6	10	Negative 0.24
	2	17,2	216	6,4	2,1	2,7	84	23,7	60,9	13	Negative 0.25
	3	14,3	335	6,7	2,4	3	75	37,1	46	14	Negative 0.26
	4	16,7	461	6,8	2,4	3,1	75	27	45,6	11	Negative 0.26
	5	14,7	285	6,3	2,2	3,9	93	68,5	64,2	11	Negative 0.24
	6	15,3	312	6,2	2,1	4,3	95	26,8	31,9	10	Negative 0.23
	8	15,1	320	6,5	2,3	3,5	87	72,6	64,4	23	Negative 0.20
	9	12,4	206	6,2	2	3,2	111	20,9	40,5	13	Negative 0.25
	10	15,1	261	6,1	2,4	3,6	87	14,2	52,6	18	Negative 0.25
	11	15,9	195	6,4	2,3	5,1	83	20,7	45,6	10	Negative 0.23
	12	12,1	271	6,5	2,1	4,1	142	61,3	74,4	11	Negative 0.24
	13	12,6	209	6,3	1,9	5,4	112	47,7	74,1	12	Negative 0.25
	14	16	374	6,5	2,1	4,3	98	26,3	33,1	7	Negative 0.13
	15	13,8	305	6,6	2,4	5	93	21,7	52	14	Negative 0.25
	16	14	326	6,5	2,2	3,8	86	54,3	39,1	17	Negative 0.25
	17	13,5	227	6,4	2,1	2,9	101	32,7	50,5	17	Negative 0.25

XN	DẤU THỎ	RDW-CV	PLT	MPV	HC LUỖI	URE	CREA	GOT	GPT	GGT	CRP
XN3 (D44)	1	13,9	303	6,7	2,1	3,6	68	25,1	55	10	Negative <0.10
	2	14,3	218	6,5	2,1	4,7	90	26,5	61	9	Negative 0.22
	3	12,6	298	6,8	2,3	5,1	86	44	51,4	13	Negative 0.26
	4	11,6	466	6,7	2,2	4,1	85	22,6	26	9	Negative 0.25
	5	13,2	239	6,6	2	5,1	89	17,7	27,9	10	Negative 0.20
	6	14,7	297	6,5	2,3	4,2	85	26	39,5	12	Negative <0.11
	8	15,9	281	6,6	2,2	5,5	95	79	77,2	12	Negative <0.15
	9	12,2	199	6,3	2	5,5	116	30,8	39,5	9	Negative 0.20
	10	17,4	433	6,3	2,4	4,1	73	37,8	68,9	21	Negative 0.29
	11	11,6	192	6,1	2	7,3	127	38,3	44,3	7	Negative <0.11
	12	14,2	310	6,5	2,1	6,6	116	27,8	53,7	9	Negative 0.15
	13	15,9	338	6,6	2,1	7,2	104	67,8	61,8	6	Negative <0.14
	14	13,2	303	6,3	2	8,1	120	21,2	26,3	4	Negative 0.19
	15	13,7	290	6,4	2,4	7,4	97	20,6	45,3	9	Negative 0.27
	16	14,3	309	6,3	1,9	4,8	107	31,6	30,1	9	Negative 0.25
	17	14,6	260	6,4	2,1	5,3	115	29,7	70,2	9	Negative 0.18

XN	DẤU THỎ	RDW-CV	PLT	MPV	HC LƯỚI	URE	CREA	GOT	GPT	GGT	CRP
XN4 (D56)	2	16	200	6,4	2,1	5,2	92	26,5	66,8	7	Negative 0.21
	5	15,1	295	6,5	2,2	6,4	96	28,6	22,7	5	Negative 0.21
	10	18,4	391	6,4	2,3	6,1	81	37,8	59,7	15	Negative 0.17
	12	14,5	418	6,5	2,1	8,3	124	29,2	52,9	6	Negative 0.21
	15	17,9	385	6,6	2,4	9,9	87	31,9	47,1	5	Negative 0.18
	17	16,4	233	6,4	2,1	6,9	128	42,6	60,5	10	Negative 0.12

Nguồn: Trung tâm xét nghiệm lâm sàng, Viện Pasteur Nha Trang .

PHỤ LỤC 6

BẢNG KẾT QUẢ HIỆU GIÁ KHÁNG THỂ KHÁNG BẠCH HẦU – UỐN VÁN – HO GÀ

Đơn vị: IU/ml

Sản phẩm NC	Thỏ	D0			D44			D56		
		Anti-D	Anti-T	Anti-PT	Anti-D	Anti-T	Anti-PT	Anti-D	Anti-T	Anti-PT
DTaP	3	< 0,06		< 0,03	2,55	2,77	10,25			
	5				6,47	2,63	11,86	13	6	42,62
	6				8,91	4,16	14,32			
	9				2,88	2,2	12,65			
	10				1,86	3	22,32	21,82	22,92	45,68
	11				6,18	2,73	24,35			
	12				3,3	2,72	10,24	9	5,27	29,52
	13				2,61	3,73	22,32			
	14				7,58	1,79	14,12			
	17				2,46	3,7	16,25	14,65	11,52	31,82
Placebo	1	< 0,06		< 0,03	\			\		
	2									
	4									
	8									
	15									
	16									

PHỤ LỤC 7

BẢNG MÔ TẢ GIẢI PHẪU BỆNH ĐẠI THỂ

❖ **GP1**

T H Ồ	Đặc điểm	NÃO	TIM	PHỔI T	PHỔI P	GAN	THẬN T	THẬN P	THƯỢNG THẬN T	THƯỢNG THẬN P	CƠ TIÊM T	CƠ TIÊM P	TỦY XƯƠNG
13	TL tươi (g)	8.8	6.4	7.6		96.6	5.6	5.9	0.1	0.1			
	KT (mm)	45x35x1 0	35x24x 15	46x60x18		95x105 x25	32x20x 12	32x24x 10	9x6x4	10x6x3			
	Màu sắc	trắng hồng	đỏ sẫm	hồng nhạt	hồng nhạt	nâu sẫm	nâu nhạt	nâu nhạt	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng
	Mô tả	mềm, trắng đục, đồng nhạt	chắc, đỏ sẫm, đồng nhạt	mềm, hồng sẫm	mềm, hồng sẫm, vài chấm xuất huyết nhỏ	mềm, nâu sẫm, đồng nhạt	chắc, nâu nhạt, đồng nhạt	chắc, nâu nhạt, đồng nhạt	mềm, trắng đục, đồng nhạt	mềm, trắng đục, đồng nhạt	Có chấm đỏ, trắng đục trong cơ	chắc, trắng hồng, đồng nhạt	Trung tâm đỏ sẫm
11	TL tươi (g)	8.8	7.1	13.4		73.8	6.7	7.3	0.3	0.2			
	KT (mm)	45x30x1 3	35x22x 14	65x64x12		85x98x 20	34x22x 10	35x25x 12	11x10x 5	12x8x6			

T H Ổ	Đặc điểm	NÃO	TIM	PHỔI T	PHỔI P	GAN	THẬN T	THẬN P	THƯỢNG THẬN T	THƯỢNG THẬN P	CƠ TIÊM T	CƠ TIÊM P	TỦY XƯƠNG
	Màu sắc	trắng hồng	đỏ sẫm	hồng nhạt	hồng nhạt	nâu sẫm	nâu nhạt	nâu nhạt	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng
	Mô tả	mềm, trắng đục, đồng nhạt	chắc, đỏ sẫm, đồng nhạt	mềm, hồng sẫm, đồng nhạt	mềm, hồng sẫm, đồng nhạt	mềm, nâu sẫm, đồng nhạt	chắc, nâu nhạt, đồng nhạt	chắc, nâu nhạt, đồng nhạt	mềm, trắng đục, đồng nhạt	mềm, trắng đục, đồng nhạt	chắc, trắng hồng, đồng nhạt	chắc, trắng hồng, đồng nhạt	Trung tâm đỏ sẫm
14	TL tươi (g)	8.8	6.1	10.7		126.5	6.3	6.4	0.2	0.2			
	KT (mm)	45x32x1 2	35x28x 12	60x55x13		105x10 0x25	32x25x 12	32x25x 11	10x7x4	13x6x4			
	Màu sắc	trắng hồng	đỏ sẫm	hồng nhạt	hồng nhạt	nâu sẫm	nâu nhạt	nâu nhạt	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng
	Mô tả	mềm, trắng đục, đồng nhạt	chắc, đỏ sẫm, đồng nhạt	mềm, hồng sẫm, đồng nhạt	mềm, hồng sẫm, đồng nhạt	mềm, nâu sẫm, đồng nhạt	chắc, nâu nhạt, đồng nhạt	chắc, nâu nhạt, đồng nhạt	mềm, trắng đục, đồng nhạt	mềm, trắng đục, đồng nhạt	chắc, trắng hồng, đồng nhạt	chắc, trắng hồng, đồng nhạt	Trung tâm đỏ sẫm
3	TL tươi (g)	8.1	4.5	12.8		57.5	6.8	6.7	0.1	0.1			
	KT (mm)	45x30x1 5	35x22x 10	62x50x16		90x95x 20	32x25x 13	34x24x 13	8x8x4	11x6x4			

T H Ổ	Đặc điểm	NÃO	TIM	PHỔI T	PHỔI P	GAN	THẬN T	THẬN P	THƯỢNG THẬN T	THƯỢNG THẬN P	CƠ TIÊM T	CƠ TIÊM P	TỦY XƯƠNG
	Màu sắc	trắng hồng	đỏ sẫm	mềm, hồng sẫm, đồng nhất	mềm, hồng sẫm, đồng nhất	nâu sẫm	nâu nhạt	nâu nhạt	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng
	Mô tả	mềm, trắng đục, đồng nhất	chắc, đỏ sẫm, đồng nhất	mềm, hồng sẫm, đồng nhất	mềm, hồng sẫm, đồng nhất	mềm, nâu sẫm, đồng nhất	chắc, nâu nhạt, đồng nhất	chắc, nâu nhạt, đồng nhất	mềm, trắng đục, đồng nhất	mềm, trắng đục, đồng nhất	chắc, trắng hồng, đồng nhất	chắc, trắng hồng, đồng nhất	Trung tâm đỏ sẫm
16	TL tươi (g)	8.6	5.4	8.1		78.3	5.7	5.5	0.4	0.3			
	KT (mm)	40x35x1 3	34x24x 12	55x40x12		105x10 5x21	30x20x 14	32x22x 10	10x6x4	14x4x4			
	Màu sắc	trắng hồng	đỏ sẫm	hồng nhạt	hồng nhạt	nâu sẫm	nâu nhạt	nâu nhạt	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng
	Mô tả	mềm, trắng đục, đồng nhất	chắc, đỏ sẫm, đồng nhất	mềm, hồng sẫm, đồng nhất	mềm, hồng sẫm, đồng nhất	mềm, nâu sẫm, đồng nhất	chắc, nâu nhạt, đồng nhất	chắc, nâu nhạt, đồng nhất	mềm, trắng đục, đồng nhất	mềm, trắng đục, đồng nhất	chắc, trắng hồng, đồng nhất	chắc, trắng hồng, đồng nhất	Trung tâm đỏ sẫm
9	TL tươi (g)	9.1	4.4	11		65.3	5.6	5.1	0.2	0.1			
	KT (mm)	40x35x1 2	33x25x 11	60x55x15		110x80 x20	33x22x 13	32x25x 9	9x11x4	11x5x5			

T H Ò	Đặc điểm	NĂO	TIM	PHỔI T	PHỔI P	GAN	THẬN T	THẬN P	THƯỢNG THẬN T	THƯỢNG THẬN P	CƠ TIÊM T	CƠ TIÊM P	TỦY XƯƠNG
	Màu sắc	trắng hồng	đỏ sẫm	hồng nhạt	hồng nhạt	nâu sẫm	nâu nhạt	nâu nhạt	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng
	Mô tả	mềm, trắng đục, đồng nhất	chắc, đỏ sẫm, đồng nhất	mềm, hồng sẫm, đồng nhất	mềm, hồng sẫm, đồng nhất	mềm, nâu sẫm, đồng nhất	chắc, nâu nhạt, đồng nhất	chắc, nâu nhạt, đồng nhất	mềm, trắng đục, đồng nhất	mềm, trắng đục, đồng nhất	Có chấm đỏ nhỏ trong cơ	chắc, trắng hồng, đồng nhất	Trung tâm đỏ sẫm
4	TL tươi (g)	8.9	5.7	11.7		86.7	7.4	7.0	0.2	0.1			
	KT (mm)	46x32x10	34x20x13	68x62x20		100x110x18	35x25x12	34x24x13	11x7x3	9x7x3			
	Màu sắc	trắng hồng	đỏ sẫm	hồng nhạt	hồng nhạt	nâu sẫm	nâu nhạt	nâu nhạt	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng
	Mô tả	mềm, trắng đục, đồng nhất	chắc, đỏ sẫm, đồng nhất	mềm, hồng sẫm, đồng nhất	mềm, hồng sẫm, diện cắt có các chấm đỏ sẫm	mềm, nâu sẫm, đồng nhất	chắc, nâu nhạt, đồng nhất	chắc, nâu nhạt, đồng nhất	mềm, trắng đục, đồng nhất	mềm, trắng đục, đồng nhất	chắc, trắng hồng, đồng nhất	chắc, trắng hồng, đồng nhất	Trung tâm đỏ sẫm
1	KL tươi (g)	7.6	5.2	8.1		73.4	7,9	7.7	0.3	0.1			
	KT (mm)	42x32x12	32x22x10	60x50x14		100x100x25	33x28x15	35x26x12	12x9x4	12x6x4			

T H Ổ	Đặc điểm	NĂO	TIM	PHỔI T	PHỔI P	GAN	THẬN T	THẬN P	THƯỢNG THẬN T	THƯỢNG THẬN P	CƠ TIÊM T	CƠ TIÊM P	TỦY XƯƠNG
	Màu sắc	trắng hồng	đỏ sẫm	hồng nhạt	hồng nhạt	nâu sẫm	nâu nhạt	nâu nhạt	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng
	Mô tả	mềm, trắng đục, đồng nhất	chắc, đỏ sẫm, đồng nhất	mềm, hồng sẫm, đồng nhất	mềm, hồng sẫm, đồng nhất	mềm, nâu sẫm, đồng nhất	chắc, nâu nhạt, đồng nhất	chắc, nâu nhạt, đồng nhất	mềm, trắng đục, đồng nhất	mềm, trắng đục, đồng nhất	chắc, trắng hồng, đồng nhất	chắc, trắng hồng, đồng nhất	Trung tâm đỏ sẫm
8	TL tươi (g)	8.5	5.6	9.4		98.8	6.9	6.8	0.3	0.3			
	KT (mm)	45x32x1 2	36x20x 12	55x55x12		120x10 0x22	34x29x 13	32x26x 13	12x8x4	14x8x5			
	Màu sắc	trắng hồng	đỏ sẫm	hồng nhạt	hồng nhạt	nâu sẫm	nâu nhạt	nâu nhạt	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng
	Mô tả	mềm, trắng đục, đồng nhất	chắc, đỏ sẫm, đồng nhất	mềm, hồng sẫm, đồng nhất	mềm, hồng sẫm, đồng nhất	mềm, nâu sẫm, đồng nhất	chắc, nâu nhạt, đồng nhất	chắc, nâu nhạt, đồng nhất	mềm, trắng đục, đồng nhất	mềm, trắng đục, đồng nhất	chắc, trắng hồng, đồng nhất	chắc, trắng hồng, đồng nhất	Trung tâm đỏ sẫm
6	TL tươi (g)	8.4	6.0	9.3		66.9	6.0	5.6	0.2	0.1			
	KT (mm)	46x32x1 4	38x22x 14	55x65x15		110x95 x20	33x24x 13	32x25x 12	9x9x4	11x5x4			
	Màu sắc	trắng hồng	đỏ sẫm	hồng nhạt	hồng nhạt	nâu sẫm	nâu nhạt	nâu nhạt	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng

T H O	Đặc điểm	NĂO	TIM	PHỔI T	PHỔI P	GAN	THẬN T	THẬN P	THƯỢNG THẬN T	THƯỢNG THẬN P	CƠ TIÊM T	CƠ TIÊM P	TỦY XƯƠNG
	Mô tả	mềm, trắng đục, đồng nhất	chắc, đỏ sẫm, đồng nhất	mềm, hồng sẫm, đồng nhất	mềm, hồng sẫm, đồng nhất	mềm, nâu sẫm, đồng nhất	chắc, nâu nhạt, đồng nhất	chắc, nâu nhạt, đồng nhất	mềm, trắng đục, đồng nhất	mềm, trắng đục, đồng nhất	chắc, trắng hồng, đồng nhất	chắc, trắng hồng, đồng nhất	Trung tâm đỏ sẫm

❖ GP2

T H O	Đặc điểm	NĂO	TIM	PHỔI T		PHỔI P	GAN	THẬN T	THẬN P	THƯỢNG THẬN T	THƯỢNG THẬN P	CƠ TIÊM T	CƠ TIÊM P
2	TL tươi (g)	8.8	5.2	8.9		70.1	5.6	5.1	0.3	0.2			
	KT (mm)	45x29x13	35x25x10	55x46x14		90x95x18	30x24x13	31x25x9	14x9x4	13x7x4			
	Màu sắc	trắng hồng	đỏ sẫm	hồng nhạt	hồng nhạt	nâu sẫm	nâu nhạt	nâu nhạt	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng
	Mô tả	mềm, trắng đục, đồng nhất	chắc, đỏ sẫm, đồng nhất	mềm, hồng sẫm, đồng nhất	mềm, hồng sẫm, đồng nhất	mềm, nâu sẫm, đồng nhất	chắc, nâu nhạt, đồng nhất	chắc, nâu nhạt, đồng nhất	mềm, trắng đục, đồng nhất	mềm, trắng đục, đồng nhất	chắc, trắng hồng, đồng nhất	chắc, trắng hồng, đồng nhất	Trung tâm đỏ sẫm
5	TL tươi (g)	8.5	5.2	9.9		75.3	5.1	5.3	0.3	0.2			
	KT (mm)	51x33x12	34x20x15	48x49x16		110x102x17	28x23x10	34x21x12	12x9x5	13x7x4			

T H Ổ	Đặc điểm	NÃO	TIM	PHỔI T		PHỔI P	GAN	THẬN T	THẬN P	THƯỢNG THẬN T	THƯỢNG THẬN P	CƠ TIÊM T	CƠ TIÊM P
				hồng nhạt	hồng nhạt								
	Màu sắc	trắng hồng	đỏ sẫm	hồng nhạt	hồng nhạt	nâu sẫm	nâu nhạt	nâu nhạt	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng
	Mô tả	mềm, trắng đục, đồng nhất	chắc, đỏ sẫm, đồng nhất	mềm, hồng sẫm, đồng nhất	mềm, hồng sẫm, đồng nhất	mềm, nâu sẫm, đồng nhất	chắc, nâu nhạt, đồng nhất	chắc, nâu nhạt, đồng nhất	mềm, trắng đục, đồng nhất	mềm, trắng đục, đồng nhất	chắc, trắng hồng, đồng nhất	chắc, trắng hồng, đồng nhất	Trung tâm đỏ sẫm
10	KL tươi (g)	8.6	5.6	9.8		71.0	6.5	7.0	0.3	0.1			
	KT (mm)	50x30x1 4	33x22x 11	61x55x10		100x90 x18	31x24x 13	34x23x 13	11x9x4	13x7x3			
	Màu sắc	trắng hồng	đỏ sẫm	hồng nhạt, có các chấm xuất huyết	hồng nhạt	nâu sẫm	nâu nhạt	nâu nhạt	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng
	Mô tả	mềm, trắng đục, đồng nhất	chắc, đỏ sẫm, đồng nhất	mềm, hồng sẫm, đồng nhất	mềm, hồng sẫm, đồng nhất	mềm, nâu sẫm, đồng nhất	chắc, nâu nhạt, đồng nhất	chắc, nâu nhạt, đồng nhất	mềm, trắng đục, đồng nhất	mềm, trắng đục, đồng nhất	chắc, trắng hồng, đồng nhất	chắc, trắng hồng, đồng nhất	Trung tâm đỏ sẫm
17	TL tươi (g)	7.6	4.8	10.0		59.9	6.2	6.0	0.4	0.3			

T H Ổ	Đặc điểm	NÃO	TIM	PHỔI T		PHỔI P	GAN	THẬN T	THẬN P	THƯỢNG THẬN T	THƯỢNG THẬN P	CƠ TIÊM T	CƠ TIÊM P
	KT (mm)	12x29x1 1	29x24x 10	59x50x15		100x10 0x18	33x22x 10	32x23x 10	14x11x 4	12x10x 4			
	Màu sắc	trắng hồng	đỏ sẫm	hồng nhạt	hồng nhạt	nâu sẫm	nâu nhạt	nâu nhạt	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng
	Mô tả	mềm, trắng đục, đồng nhạt	chắc, đỏ sẫm, đồng nhạt	mềm, hồng sẫm, đồng nhạt	mềm, hồng sẫm, đồng nhạt	mềm, nâu sẫm, đồng nhạt	chắc, nâu nhạt, đồng nhạt	chắc, nâu nhạt, đồng nhạt	mềm, trắng đục, đồng nhạt	mềm, trắng đục, đồng nhạt	chắc, trắng hồng, đồng nhạt	chắc, trắng hồng, đồng nhạt	Trung tâm đỏ sẫm
12	TL tươi (g)	8.2	6.0	9.9		105.9	6.6	6.5	0.2	0.1			
	KT (mm)	50x32x1 1	34x21x 12	65x60x15		105x11 0x17	33x26x 10	33x25x 10	13x7x5	11x7x3			
	Màu sắc	trắng hồng	đỏ sẫm	hồng nhạt	hồng nhạt	nâu sẫm	nâu nhạt	nâu nhạt	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng
	Mô tả	mềm, trắng đục, đồng nhạt	chắc, đỏ sẫm, đồng nhạt	mềm, hồng sẫm, đồng nhạt	mềm, hồng sẫm, đồng nhạt	mềm, nâu sẫm, đồng nhạt	chắc, nâu nhạt, đồng nhạt	chắc, nâu nhạt, đồng nhạt	mềm, trắng đục, đồng nhạt	mềm, trắng đục, đồng nhạt	chắc, trắng hồng, đồng nhạt	chắc, trắng hồng, đồng nhạt	Trung tâm đỏ sẫm
15	TL tươi (g)	9.0	6.8	15.3		85.4	8.1	8.7	0.3	0.3			

T H Ổ	Đặc điểm	NÃO	TIM	PHỔI T		PHỔI P	GAN	THẬN T	THẬN P	THƯỢNG THẬN T	THƯỢNG THẬN P	CƠ TIÊM T	CƠ TIÊM P
	KT (mm)	45x33x1 2	38x22x 15	66x62x13		105x10 5x18	36x22x 11	40x27x 12	10x8x4	12x8x3			
	Màu sắc	trắng hồng	đỏ sẫm	hồng nhạt, có chấm xuất huyết thùy trên	hồng nhạt, có chấm xuất huyết thùy trên	nâu sẫm	nâu nhạt	nâu nhạt	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng	trắng hồng
	Mô tả	mềm, trắng đục, đồng nhất	chắc, đỏ sẫm, đồng nhất	mềm, hồng sẫm, có ổ chảy máu	mềm, hồng sẫm, có ổ chảy máu	mềm, nâu sẫm, đồng nhất	chắc, nâu nhạt, đồng nhất	chắc, nâu nhạt, đồng nhất	mềm, trắng đục, đồng nhất	mềm, trắng đục, đồng nhất	chắc, trắng hồng, đồng nhất	chắc, trắng hồng, đồng nhất	Trung tâm đỏ sẫm

Nguồn: Khoa Giải phẫu Bệnh học, trường Đại học Y Huế.

PHỤ LỤC 8

Phương pháp ức chế miễn dịch gắn men (ToBI – Toxin binding Inhibition Test) xác định kháng thể kháng uốn ván – bạch hầu (anti – T và anti – D)

❖ Nguyên tắc:

Kháng thể trong huyết thanh được ủ với một lượng độc tố ức chế xác định ở 37°C qua đêm. Lượng độc tố thừa không bị trung hòa được định lượng trên một phiến ELISA khác đã gắn sẵn kháng thể kháng uốn ván hoặc bạch hầu. Dùng kháng thể kháng uốn ván hoặc bạch hầu có gắn biotin để phát hiện lượng độc tố thừa.

❖ Các bước thực hiện:

- Huyết thanh chuẩn và huyết thanh mẫu thử được pha loãng bậc 2 bằng dung dịch pha loãng chứa PBS + 0,5% BSA (100µl/giếng).

- Thêm 100 µl độc tố (uốn ván hoặc bạch hầu) có nồng độ 0,01 Lf/ml vào mỗi giếng và ủ qua đêm ở 37°C.

- Phủ kháng độc tố uốn ván hoặc bạch hầu lên phiến ELISA khác với nồng độ 0,1 IU/ml (100µl/giếng) và ủ qua đêm ở 37°C.

Ngày tiếp theo:

- Rửa phiến ELISA bằng dung dịch rửa có chứa PBS + 0,05% Tween 80.

- Khóa phiến bằng dung dịch PBS + 0,5% BSA (125 µl/giếng) và ủ ở 37°C trong 1 giờ.

- Rửa phiến bằng dung dịch rửa.

- Chuyển 100 µl hỗn hợp huyết thanh và độc tố từ phiến PS sang phiến ELISA theo các giếng tương ứng, ủ ở 37°C trong 2 giờ.

- Rửa phiến bằng dung dịch rửa.

- Thêm 100 µl cộng hợp gắn biotin kháng uốn ván hoặc bạch hầu đã

được pha loãng 1/2000 vào tất cả các giếng và ủ ở 37°C trong 1 giờ 30 phút.

- Rửa phiên bằng dung dịch rửa.

- Thêm 100 µl dung dịch SBC vào tất cả các giếng và ủ ở 37°C trong 30 phút.

- Rửa phiên bằng dung dịch rửa.

- Thêm 100 µl cơ chất TMB (Tetramethylbenzidine) vào tất cả các giếng và ủ ở 37°C trong 30 phút.

- Thêm 100 µl dung dịch H₂SO₄ 2M vào tất cả các giếng để dừng phản ứng.

- Đo độ hấp phụ ở bước sóng 450 nm bằng máy ELISA Biotek.

- Tính kết quả bằng chương trình Gen 5 V2.03.Bio-Tek.

PHỤ LỤC 9

Phương pháp định lượng kháng thể kháng độc tố ho gà (anti-PT)

❖ *Nguyên tắc:*

Dựa trên sự kết hợp đặc hiệu của kháng nguyên PT trong huyết thanh với kháng thể kháng PT đặc hiệu. Dùng cộng hợp kháng thể gắn biotin bắt đặc hiệu với kháng thể kháng PT. Khuếch đại phản ứng màu bằng Streptavidin và hiện màu bằng có chất TMB/H₂O₂. Ngưng phản ứng bằng dung dịch H₂SO₄ và đọc phản ứng bằng máy ELISA Biotek 450 nm.

❖ *Các bước thực hiện*

- Phủ 100 µl kháng nguyên PT vào tất cả các giếng, kháng nguyên được pha loãng trong đệm carbonat và ủ ở nhiệt độ phòng qua đêm.

Ngày tiếp theo:

- Rửa phiến 3 lần bằng dung dịch rửa có chứa PBS + 0,05% Tween 20.

- Khóa phiến bằng dung dịch PBS + 0,5% BSA (120 µl/giếng) và ủ ở 37°C trong 1 giờ.

- Rửa phiến 3 lần bằng dung dịch rửa có chứa PBS + 0,05% Tween 20.

- Thêm 100 µl dung dịch pha loãng có chứa PBS + 0,5% BSA + 0,05% Tween 20 vào tất cả các giếng (trừ cột đầu tiên).

- Thêm 200 µl huyết thanh thử kháng PT và mẫu thử huyết thanh thử vào cột 1.

- Pha loãng bậc 2 mẫu chuẩn và mẫu thử, ủ ở 37°C trong 1 giờ.

- Rửa phiến 3 lần bằng dung dịch rửa có chứa PBS + 0,05% Tween 20.

- Thêm 100 µl cộng hợp dê kháng thể gắn biotin và ủ ở 37°C trong 1 giờ.

- Rửa phiến 3 lần bằng dung dịch rửa có chứa PBS + 0,05% Tween 20.

- Thêm 100 μ l dung dịch SBC vào tất cả các giếng và ủ ở 37°C trong 1 giờ.
- Rửa phiên 3 lần bằng dung dịch rửa có chứa PBS + 0,05% Tween 20.
- Thêm 100 μ l cơ chất TMB (Tetramethylbenzidine) vào tất cả các giếng.
- Sau khoảng 10 phút thêm 100 μ l dung dịch H₂SO₄ 2M vào tất cả các giếng để dừng phản ứng.
- Đo OD ở bước sóng 450 nm bằng máy ELISA Biotek và tính kết quả bằng chương trình Gen 5 V2.03.Bio-Tek.