

KẾT QUẢ ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH Ở NGỰA VỚI KHÁNG NGUYÊN NỌC RẮN CẠP NIA TỰ CHẾ TẠO TRONG NƯỚC

Thái Danh Tuyên; Trịnh Xuân Kiếm***

TÓM TẮT

Ở Việt Nam, bệnh nhân (BN) do rắn Cạp nia (RCN) cắn nguy hiểm nhất, tỷ lệ tử vong cao > 20% [1]. Huyết thanh kháng nọc (HTKN) rắn là thuốc điều trị đặc hiệu cho BN bị nhiễm độc nọc rắn rất hiệu quả và phổ biến. Tuy nhiên, hiện vẫn chưa có HTKN RCN tại nước ta cũng như thế giới. Trên cơ sở chế tạo thành công kháng nguyên (KN) nọc RCN, chúng tôi đã miễn dịch cho 2 ngựa. Kết quả: đã xác lập được quy trình miễn dịch ngựa với liều KN nhỏ, tăng dần, phối hợp tá được Freund; ngựa khỏe mạnh, sinh kháng thể với hiệu giá cao và ổn định.

* Từ khóa: Rắn Cạp nia; Kháng nguyên nọc rắn; Đáp ứng miễn dịch; Ngựa.

VENOM SPECIFIC ANTIBODY RESPONSE IN HORSES IMMUNIZED WITH HOME PREPARED *B.CANDIDUS* AND *B.MULTICINCTUS* VENOM ANTIGENS

SUMMARY

In Vietnam, victims of Bungarus candidus (BC) and Bungarus multicinctus (BM) snake-bite are the most severe snake-bite patients, with mortality of more than 20%. Specific antivenom serum is widely and effectively in treatment of snake-bite patients. However, such antivenoms for BC and BM are not available in Vietnam at present. In this study, we had successfully immunized 2 horses with our home prepared BC's and BM's venom antigens, in combination with Freund's adjuvant, and according to small-dosed, repeatedly administered immunization protocol. The venom specific antibodies response in the horse gave reasonably high titer as well as stability after immunization.

* Key words: *Bungarus candidus*; *Bungarus multicinctus*; Antivenom; Horses.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Rắn Cạp nia là loài rắn độc nguy hiểm nhất Việt Nam, do độc tính nọc rất mạnh với hệ thần kinh cơ, gây liệt cơ vân, trong đó có cơ hô hấp, làm nạn nhân tử vong nếu không được cấp cứu kịp thời (> 20%) [1].

HTKN rắn là thuốc điều trị đặc hiệu tốt nhất những trường hợp này (WHO) [5]. Tuy nhiên, tại Việt Nam cũng như trên thế giới chưa có nơi nào sản xuất HTKN RCN để nhập về điều trị. BN vẫn phải điều trị không đặc hiệu và thở máy dài ngày, vất vả, tốn kém, hiệu quả điều trị thấp, tử vong cao.

* Bệnh viện 103

** Bệnh viện Bạch Mai

Phản biện khoa học: TS. Nguyễn Đặng Dũng

Trước thực trạng này, việc sản xuất đợc HTKN an toàn và hiệu lực cao, sẵn sàng phục vụ điều trị BN đang là nhu cầu hết sức cấp bách.

Trên cơ sở phát huy nội lực, chủ động nguồn HTKN điều trị cho BN, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài này nhằm:

- *Xác lập quy trình miễn dịch ngựa với KN nọc RCN tự chế tạo.*

- *Xác định khả năng đáp ứng miễn dịch của ngựa với KN nọc RCN.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

Nghiên cứu trên 2 ngựa đực 3 - 4 tuổi, khỏe mạnh, trọng lượng > 250 kg.

Chăm sóc, nuôi dưỡng trong trang trại riêng biệt, sạch sẽ, dinh dưỡng đầy đủ thức ăn thô và tinh, cỏ không phun thuốc bảo vệ thực vật, nước uống đảm bảo sạch.

2. Phương pháp nghiên cứu.

** Loại hình nghiên cứu:*

Nghiên cứu labo và thực nghiệm trên động vật.

** Nội dung nghiên cứu:*

- Xác lập lịch trình (thời gian) miễn dịch, liều KN và chất miễn dịch ngựa.

- Theo dõi sức khỏe ngựa sau miễn dịch.

- Xác định khả năng sinh kháng thể đặc hiệu với KN nọc.

** Kỹ thuật:*

Theo khuyến cáo của WHO [4] và phương pháp của Trịnh Xuân Kiếm [1], bao gồm:

- Miễn dịch ngựa: cố định ngựa, sát trùng vùng tiêm, xác định liều lượng cho mỗi vị trí

tiêm, trộn KN và tá chất freund, lắckỹ, tiêm dưới da. Vị trí tiêm KN: vùng cổ và mông ngựa (theo WHO). Chia nhỏ nhiều mũi tiêm, mỗi lần 2 - 8 mũi ở các vị trí khác nhau.

- Theo dõi sức khỏe ngựa sau tiêm KN:

+ Toàn thân, với các biểu hiện và chia các mức độ sau:

. Vận động: bình thường, mệt mỏi, uể oải, yếu (bại hoặc liệt).

. Hô hấp: bình thường, thở nhanh, khó thở.

. Tiêu hóa: ăn bình thường, ăn ít, bỏ ăn.

+ Tại chỗ tiêm: bình thường, viêm (sưng nóng đỏ đau), loét.

- Theo dõi khả năng đáp ứng miễn dịch:

Lấy máu ngựa xét nghiệm trước khi tiêm KN gây miễn dịch, xác định mức độ đáp ứng miễn dịch, tính đặc hiệu của kháng thể với KN bằng các kỹ thuật tủa trên thạch (Ouchterlony), miễn dịch men và điện di miễn dịch.

** Dụng cụ, phương tiện, hóa chất:*

- Chuồng trại, khung sắt giữ ngựa, dây trói ngựa, garo tĩnh mạch cổ ngựa...

- Dụng cụ sát trùng, bơm kim tiêm miễn dịch, bơm tiêm lấy máu ngựa.

- Hóa chất và máy chuyên dùng cho các kỹ thuật xét nghiệm miễn dịch.

- KN nọc RCN của đề tài nghiên cứu tự chế tạo.

- Tá chất freund hoàn chỉnh (freund's complete adjuvant - FCA) và tá chất không hoàn chỉnh (Freund's incomplete adjuvant - FIA) phối hợp KN.

** Địa điểm và thời gian tiến hành:*

Từ 10 - 2008 đến 6 - 2010 tại Trung tâm Nghiên cứu Sản xuất thuốc (Học viện Quân y) (Hòa Lạc) và đơn vị nghiên cứu HTKN (Trung tâm Chống độc Quốc gia, Bệnh viện Bạch Mai).

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Lịch trình miễn dịch, liều lượng KN và tá dược đã dùng miễn dịch ngựa.

Bảng 1:

LẦN MIỄN DỊCH	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Liều KN (ml)	0,1	0,3	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0
FCA (ml)	0,1	0,3	0,5	0	0	0	0	0	0
FIA (ml)	0	0	0	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0
Tổng số dung dịch KN	0,2	0,6	1	2	4	6	8	10	12

- Đã tiêm dưới da gây miễn dịch cho ngựa trong 9 lần, mỗi lần cách nhau 1 tháng, với liều lượng KN tăng dần từ 0,1 ml đến 6 ml. Phối hợp KN với FCA trong 3 tháng đầu với tỷ lệ 1/1 và phối hợp với FIA trong các tháng tiếp theo (tỷ lệ 1/1).

- Số lượng KN + tá dược FCA, FIA được sử dụng tiêm dưới da nhắc lại ngày càng tăng, vì vậy, số điểm tiêm càng nhiều và ngựa đau hơn.

2. Biểu hiện toàn thân và tại chỗ sau tiêm miễn dịch ngựa.

Bảng 2: Tình trạng sức khỏe của ngựa nghiên cứu sau khi tiêm KN và FCA, FIA.

LẦN GÂY MIỄN DỊCH	NGỰA 1				NGỰA 2			
	Toàn thân			Tại chỗ	Toàn thân			Tại chỗ
	Vận động	Hô hấp	Tiêu hóa		Vận động	Hô hấp	Tiêu hóa	
1	Yếu	Bình thường	Bỏ ăn	Bình thường	Yếu	Bình thường	Bỏ ăn	Bình thường
2	Yếu	Bình thường	Bỏ ăn	Loét	Yếu	Bình thường	Bỏ ăn	Loét
3	Yếu	Bình thường	Ăn kém	Loét	Yếu	Bình thường	Ăn kém	Loét
4	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường
5	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường
6	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường
7	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường
8	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường
9	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường

- Sau khi tiêm KN + CFA với tỷ lệ 1/1, lần 1 đến lần 3, cả 2 ngựa nghiên cứu đều mệt mỏi, yếu bại, nằm tại chỗ, bỏ ăn. Tại chỗ có biểu hiện viêm. Tiêm lần 2, 3, tại chỗ xuất hiện vết loét. Đã nấu cháo cho ngựa ăn trong 4 - 10 ngày, sức khỏe ngựa hồi phục. Tiến hành rửa vết thương, sau vài tuần mới liền sẹo.

- Lần gây miễn dịch thứ 4 - 9: cả 2 ngựa đều vận động và ăn uống bình thường, tại chỗ không có viêm, loét.

- Trong tất cả các lần miễn dịch, không thấy ngựa có biểu hiện rối loạn hô hấp, thở nhanh, thở khó.

3. Hiệu giá kháng thể đặc hiệu với KN nọc RCN theo lịch trình miễn dịch.

Bảng 3:

NGỰA GÂY MÃN CẢM	HIỆU GIÁ KHÁNG THỂ SAU TỪNG LẦN MIỄN DỊCH								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ngựa 1	8	16	32	64	128	256	512	1.024	2.048
Ngựa 2	8	32	64	128	256	512	1.024	2.048	2.048

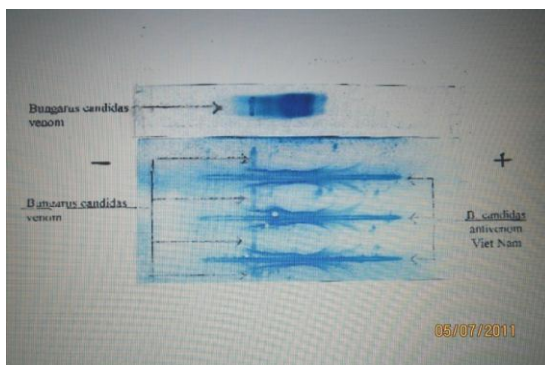
Với liều lượng KN và tá dược như nhau cho cả 2 ngựa cân nặng tương đương, hiệu giá kháng thể đặc hiệu không đồng đều nhau. Đến lần miễn dịch thứ 8, hiệu giá kháng thể cao nhất, không tăng thêm ở ngựa thứ nhất. Đến lần thứ miễn dịch thứ 9, hiệu giá kháng thể cao tương đương ở ngựa thứ 2.

4. Kết quả xác định kháng thể đặc hiệu với KN nọc RCN.

Trong quá trình gây miễn dịch (theo lịch trình), theo dõi khả năng sinh kháng thể đặc hiệu với KN nọc RCN bằng kỹ thuật Ouchterlony và điện di miễn dịch cho thấy đáp ứng miễn dịch đặc hiệu với KN nọc rắn rất khả quan.



Hình 1: Vết tua KN nọc RCN và kháng thể đặc hiệu trên thạch (kỹ thuật Ouchterlony).



Hình 2: Xác định kháng thể đặc hiệu với KN nọc RCN bằng kỹ thuật điện di miễn dịch.

1. Lịch trình miễn dịch, liều lượng KN + tá dược.

Cùng với việc chế tạo KN, việc gây miễn dịch cho ngựa, thu huyết tương giàu kháng thể sản xuất HTKN là khâu rất quan trọng. Để an toàn cho ngựa, đáp ứng sinh kháng thể tốt, hiệu quả kinh tế cao... đòi hỏi việc tính toán liều lượng KN, tá dược và khoảng cách giữa 2 lần tiêm KN sao cho hợp lý, không gần quá, dễ nguy hiểm cho ngựa, không xa quá gây tốn kém thời gian và chi phí không cần thiết.

Đây là lần đầu tiên nghiên cứu cơ bản về sản xuất HTKN RCN tại Việt Nam nên chưa có một quy trình miễn dịch ngựa cụ thể. Sau khi chế tạo thử nghiệm loại HTKN này trong một nghiên cứu thăm dò trước đây, cùng với nghiên cứu một số tài liệu chúng tôi đề ra quy trình miễn dịch ngựa lần này, đem áp dụng thử. Kết quả nghiên cứu khẳng định lịch trình miễn dịch, liều lượng KN và tá dược dự kiến ban đầu là phù hợp, ngựa đáp ứng tốt và an toàn.

Kết quả thực hiện lịch trình miễn dịch ngựa cho thấy:

- + Thời gian miễn dịch: cần 8 - 9 tháng, để có đáp ứng sinh kháng thể tốt, hiệu giá cao.
- + Thời gian xen kẽ giữa 2 lần miễn dịch là một tháng, là lúc KN tại nơi tiêm vừa phân tán hết, ngựa khỏe trở lại. Đây là thời điểm nên tiêm nhắc lại với liều KN cao hơn.
- + Liều KN từ 0,1 ml tăng dần tới 5 ml là liều KN vừa đủ, giúp cường độ kích thích hệ miễn dịch ngựa tăng dần.
- + FCA: sử dụng trong 3 tháng đầu, góp phần tăng cường khả năng đáp ứng miễn dịch. FCA có paraffin cùng lanoline tạo huyền dịch với các tiểu phân cực nhỏ chứa KN để tế bào miễn dịch xử lý, đồng thời làm chậm quá trình phân tán, tiêu hủy KN, kéo dài thời gian tiếp xúc của tế bào miễn dịch với KN. Mycobacterium butyricum (BCG) hình thành phản ứng viêm, kêu gọi các tế bào có thẩm quyền miễn dịch tập trung về ổ viêm, nhận diện và xử lý KN, thông tin cho các tế bào của toàn hệ miễn dịch [3, 4].
- + FIA: sử dụng cho tất cả những lần miễn dịch tiếp theo, vì thời gian huy động mọi tế bào viêm đã đủ, song vẫn rất cần phân nhỏ KN thành tiểu phần và kéo dài thời gian tồn tại của KN để mọi tế bào miễn dịch đều được tiếp xúc, xử lý và nhận diện KN [3].

3. Theo dõi phản ứng toàn thân, tại chỗ của ngựa trong quá trình miễn dịch.

Kết quả theo dõi sức khỏe, tình trạng toàn thân, tại chỗ của ngựa được miễn dịch với KN nọc RCN tự chế tạo thấy: 2 ngựa đều không khỏe trong 3 tháng đầu của quá trình miễn dịch. Vận động bị ảnh hưởng nhất, thậm chí ngựa bị bại yếu, không đi lại được. Thông thường, sau miễn dịch, ngựa đều ăn ít hoặc bỏ ăn. Sau khi được chăm sóc tốt, ngựa không chết, hồi phục trở lại. Đặc biệt, không có rối loạn hô hấp, chứng tỏ việc khử độc của nọc rất tốt, không gây liệt cơ hô hấp, ảnh hưởng đến vận động và kém ăn của ngựa, chủ yếu do đau tại vết tiêm vùng mông và cổ ngựa.

Phản ứng viêm loét tại chỗ tiêm xuất hiện sau khi tiêm KN + FCA. Những lần tiêm KN + FIA không thấy viêm loét tại chỗ tiêm. Việc xử lý tại chỗ vết thương không có gì đặc biệt so với các loại vết thương khác, sẹo liền tốt. Ngựa bỏ ăn và vận động kém do đau chỗ tiêm và do vết loét trong những lần tiêm KN + CFA. Kết quả này khẳng định tính an toàn của KN, đặc biệt khi phối hợp CFA, IFA, ngựa vẫn khỏe mạnh.

4. Kết quả đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể đặc hiệu.

Vết tủa KN - kháng thể trên thạch và trên hình ảnh điện di khẳng định rõ việc hình thành kháng thể tương ứng đặc hiệu với KN nọc RCN trong máu ngựa.

Hiệu giá kháng thể của 2 ngựa đều tăng tối đa vào tháng thứ 8, 9. Kết quả này tạo thuận lợi cho lấy máu, sản xuất HTKN ngay từ tháng thứ 8 của lịch trình miễn dịch và những tháng tiếp theo. Quá trình miễn dịch cho thấy lượng kháng thể đặc hiệu với KN nọc RCN tăng tỷ lệ thuận với tăng liều KN trong các lần miễn dịch và không tăng khi đạt hiệu giá cao nhất ở lần miễn dịch thứ 8, 9.

KẾT LUẬN

Đã xác lập được lịch trình miễn dịch ngựa với liều KN nọc RCN nhỏ, tăng dần, phối hợp tá dược freund (CFA, IFA), an toàn cho ngựa, kích thích sinh kháng thể với hiệu giá cao và ổn định.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế, Cục Quản lý Dược. Công văn số 3633/QLD-KD, ngày 28/4/2008, về việc: nguồn cung cấp huyết thanh kháng nọc rắn.
2. Kiem X.T, Tuyen D.T, Long X.T. The production of Bungarus candidus & Bungarus multicinctus antivenom from horses immunized with venom & its application for the treatment of snake bite patients in Vietnam. OP.0016. The XVIth world congress of international society on toxinology. Brazil. 2009.
3. Abul Abbas, Andrew H. Lichtman. Basic immunology. Functions and disorders of the immune system. Third edition, Saunders, Elsevier. 2009, pp.67-189.
4. Ruey J, Huang S, Whei C, Tsun K, Ming-Yi L. The detoxification of Naja atra venom and preparation of potent antivenom. National institute of preventive medicine, Department of health, Taipei, R.O.C. The Chinese journal of microbiology and immunology. 1985, Vol 18, N^o3, pp.21-27.
5. WHO. Proposed WHO Guidelines for the production, control and regulation of antivenom immunoglobulines. 2008, pp.17-40.