

## Nghiên cứu chế tạo kháng nguyên nọc rắn cạp nia dùng trong sản xuất Antivenom tại Việt Nam

*Thái Danh Tuyên\**; *Trịnh Xuân Kiềm\*\**; *Đỗ Trung Phấn\*\*\**

### TÓM TẮT

Huyết thanh kháng nọc rắn (HTKNR) - antivenom, là thuốc điều trị rắn độc cắn hiệu quả và phổ biến. Tuy nhiên, ở nước ta cũng như trên thế giới chưa có HTKNR rắn cạp nia (RCN) - loài rắn độc nguy hiểm nhất. Một trong những lý do chủ yếu là chưa chế tạo được kháng nguyên (KN) nọc RCN. Chúng tôi đã nghiên cứu, chế tạo thành công KN nọc RCN, đạt tiêu chuẩn: an toàn, vô khuẩn, không có chất gây sốt và có hiệu lực sinh kháng thể (KT) đặc hiệu tốt. Kết quả này là cơ sở đảm bảo cho thành công của quy trình sản xuất HTKNRCN.

\* Từ khoá: Kháng nguyên nọc rắn; Rắn Cạp nia; Antivenom.

## Research on developing bungarus candidus and bungarus multicinctus snake venom's antigens used for Antivenin production in Vietnam

### SUMMARY

*Antivenom has been the most popular and effective treatment for venomous snakebite victims. However, for the two species of Bungarus candidus (BC) and Bungarus multicinctus (BM) snakes, which are the most poisonous snakes, the specific antivenin is almost unavailable both in Vietnam and worldwide, due to the lack of good venom's antigen for immunization.*

*In this study, we have successfully produced the BC and BM originated venom's antigens that meet all criteria of such antigens, e.g safety, sterility, non-pyrogenicity, and most importantly, good immunogenicity. This success might be paving the way for the two snake's antivenin production.*

\* *Key words: Bungarus candidus; Antivenom.*

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Rắn Cạp nia, gồm 2 loài: RCN Bắc và RCN Nam [2], là loài rắn độc nguy hiểm nhất trong họ rắn Hổ (*Elapidae*). Mỗi năm có

hàng ngàn nạn nhân bị RCN cắn. Nạn nhân nếu không được sơ cứu, xử lý đúng; không được cấp cứu kịp thời, thường nhanh chóng tử vong. Giải pháp điều trị tốt nhất là sử dụng HTKNR đặc hiệu.

\* Bệnh viện 103

\*\* Bệnh viện Bạch Mai

\*\*\* Trường Đại học Y Hà Nội

Phản biện khoa học: TS. Nguyễn Đặng Dũng

Do tính đặc hiệu KN nọc rắn theo vùng địa lý và hiệu quả kinh tế thấp... khiến sản xuất HTKNR chưa được quan tâm đúng mức. Trên thị trường hiện chưa có HTKNRCN. Thực tế đòi hỏi phải nhanh chóng nghiên cứu, ứng dụng các kết quả nghiên cứu vào sản xuất HTKNRCN, thiết thực phục vụ đời sống nhân dân.

Trong các khâu của quy trình sản xuất HTKNR: chế tạo KN, gây miễn dịch và theo dõi sự hình thành KT đặc hiệu, thu huyết tương có KT, chế tạo HTKNR, tinh chế sản phẩm, kiểm định cơ sở và kiểm định quốc gia chất lượng sản phẩm, lưu trữ và bảo quản sản phẩm..., khâu chế tạo KN nọc rắn (lấy nọc rắn, khử độc, tinh lọc, kiểm tra tính an toàn và hiệu lực) là khâu đầu tiên, có ý nghĩa rất quan trọng.

Để sẵn sàng có HTKNR với cả 2 loài RCN Bắc và Nam, cần chế tạo KN nọc đa giá của cả 2 loài (*Polyspecific venom antigen*). Nọc RCN vốn rất ít và cực độc, lấy được nọc rắn rất nguy hiểm và khó khăn. Xử lý nọc tốt: bảo đảm tính KN của nọc, khử độc tính, đảm bảo an toàn cho ngựa gây miễn dịch là yêu cầu bắt buộc. Trên thế giới và trong nước chưa có nghiên cứu nào về sản xuất KN của loài rắn này. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu chế tạo KN nọc RCN Việt Nam dùng trong sản xuất HTKNR, với mục tiêu:

- Chế tạo KN nọc rắn đặc hiệu cho cả 2 loài RCN.
- Sản xuất KN an toàn với động vật được miễn dịch, kích thích sinh KT tốt.

### **ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

#### **1. Nguyên liệu và động vật thí nghiệm.**

- Nọc RCN: khoảng 3 g nọc đã được làm đông khô và bảo quản lạnh -20°C.
- Chuột lang, thỏ khỏe (theo tiêu chuẩn động vật thí nghiệm của Viện Vệ sinh Dịch tễ TW).
- Ngựa đực 2 - 3 tuổi, khỏe, trọng lượng > 250 kg.

#### **2. Phương pháp nghiên cứu.**

- Lấy nọc của 2 loài RCN Bắc và RCN Nam.
- Chế tạo KN nọc RCN đa giá giảm độc lực.
- Thực nghiệm trên động vật, xác định tính an toàn và khả năng sinh KT đặc hiệu của KN.

#### *\* Kỹ thuật tiến hành:*

- Chọn rắn lấy nọc:

Xác định và tuyển chọn > 100 RCN Bắc và > 100 RCN Nam, nuôi cách ly khoảng 2 tháng, sau đó kiểm tra sức khỏe và lấy nọc.

- Khử độc nọc RCN, chế tạo KN để gây miễn dịch: theo phương pháp David Theakston và khuyến cáo của WHO [7]: 0,3 g nọc RCN đông lạnh, pha trong dung dịch PBS thành nồng độ

1%, trộn với 300 ml glutaraldehyde, ủ ở 37°C/72 giờ/pH = 7,3. Tiếp đó, ủ dung dịch nọc ở 56°C/24 giờ. Lọc vô trùng dung dịch nọc, thu được KN nọc RCN đã khử độc.

*\* Kiểm tra chất lượng KN nọc RCN được chế tạo:*

+ Mức độ vô khuẩn: dùng 1 ml KN nọc RCN cấy trong môi trường Thioglycolate, môi trường Sabouraud, theo dõi trong 7 ngày, xác định nhiễm khuẩn.

+ Tính an toàn: chọn 4 chuột lang khỏe mạnh, xác định trọng lượng mỗi chuột. Tiêm KN nọc RCN qua đường phúc mạc. Liều tiêm: theo trọng lượng chuột (1 ml/kg). Tiêm cho 3 chuột, chuột thứ tư không tiêm KN (chuột chứng). Theo dõi 4 chuột trong 21 ngày liên tiếp thấy: sốt, rụng lông, giảm trọng lượng.

+ Tìm chất gây sốt trong KN: chọn 3 thỏ khỏe mạnh, xác định trọng lượng và nhiệt độ hậu môn thỏ trước khi tiêm KN. Sau đó, tiêm KN nọc RCN qua đường tĩnh mạch tai tùy theo trọng lượng thỏ (1 ml/kg). Theo dõi nhiệt độ thỏ 3 giờ liên tiếp sau khi tiêm KN.

+ Xác định tính đặc hiệu của KN bằng kỹ thuật Ouchterlony:

Sử dụng KN được chế tạo, miễn dịch cho ngựa nghiên cứu theo lịch trình quy định.

Sau 4 lần miễn dịch, tiến hành lấy máu ngựa (khoảng 10 ml), tách huyết thanh làm xét nghiệm. KN sử dụng là KN nọc của 2 loài RCN lấy ngẫu nhiên từ môi trường tự nhiên được bảo quản đông lạnh -20°C.

*\* Dụng cụ, hóa chất nghiên cứu:*

- Môi trường nuôi cấy vi khuẩn (môi trường Sabouraud, Thioglycolate).
- Dung dịch PBS, glutaraldehyde, thuốc nhuộm màu...
- Dụng cụ phương tiện làm xét nghiệm miễn dịch, tủ lạnh âm, máy đo pH...
- Dụng cụ chuyên dùng bắt rắn, lấy nọc, bảo quản nọc. Các loại bơm tiêm thú y, dây garo lấy máu ngựa, khung ép ngựa.

*\* Địa điểm và thời gian tiến hành:*

- Trung tâm Nghiên cứu sản xuất thuốc Học viện Quân y, Trung tâm Chống độc Quốc gia (Bệnh viện Bạch Mai), Trại rắn Vũng Tàu, làng nuôi rắn Lệ Mật (Gia Lâm) và một số địa điểm tại Hà Nội: xã Vạn Phúc (Ngọc Hồi), Thư Phú (Thường Tín), Bát Tràng (Gia Lâm).

- Thời gian nghiên cứu: 10 - 2007 đến 10 - 2010.

## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 1. Lấy nọc RCN, làm giảm độc lực, chế tạo KN.

- Lấy nọc của > 200 RCN, thu được 3 g nọc, sạch, không lẫn máu. Nọc được đông khô, lưu trữ ở -20°C cho đến khi sử dụng.

- Sau khi làm giảm độc lực theo quy trình kỹ thuật, tiến hành ly tâm, bỏ cặn, lọc vô trùng, thu được 285 ml dung dịch KN nọc RCN. Đóng lọ vô khuẩn, nắp cao su với thể tích 4 ml/lọ, dán nhãn ghi rõ ngày sản xuất, tên KN, điều kiện và thời gian bảo quản.

- Bảo quản ở tủ lạnh âm (-20°C).

## 2. Đánh giá chất lượng KN nọc RCN.

\* Vô khuẩn:

Kết quả cấy khuẩn trong môi trường Thioglycolate, môi trường Sabouraud, theo dõi trong 7 ngày không thấy mọc vi khuẩn, cho thấy KN nọc RCN đạt tiêu chuẩn vô khuẩn.

\* *Chất gây sốt* (chỉ nhiệt tố):

*Bảng 1:* Kết quả xác định KN nọc RCN không có chất gây sốt.

THỎ THÍ NGHIỆM	TRỌNG LƯỢNG (kg)	KN (ml)	NHIỆT ĐỘ TRƯỚC/SAU TIÊM KN (°C)				KẾT QUẢ
			Khởi đầu	Sau 1 giờ	Sau 2 giờ	Sau 3 giờ	
1	2,1	2,1	38,5	38,9	39,0	38,5	+ 0,5
2	2,3	2,3	39,1	39,8	39,2	39,1	+ 0,7
3	2,5	2,5	39,3	39,5	39,8	39,3	+ 0,5

Nhiệt độ ở cả 3 thử thay đổi < 1°C so với nhiệt độ thấp nhất. Như vậy, KN nọc RCN không có chất gây sốt.

\* *Độ an toàn trên động vật được miễn dịch:*

*Bảng 2:* Thử nghiệm xác định tính an toàn của KN nọc RCN.

CHUỘT LANG THÍ NGHIỆM	TRỌNG LƯỢNG (g)	KN TIÊM (ml)	THAY ĐỔI BẤT THƯỜNG			MỨC TĂNG TRỌNG LƯỢNG (g)
			Sốt	Rụng lông	Trọng lượng (g)	
1	230	2,30	0	0	240	+ 10
2	235	2,35	0	0	250	+ 15
3	250	2,50	0	0	260	+ 10
4 (chứng)	245	0,0	0	0	255	+ 10

Theo dõi trong 21 ngày liên tiếp thấy: không chuột nào sốt, rụng lông và tăng trọng lượng bình thường như chuột chứng, chứng tỏ KN nọc RCN đạt tiêu chuẩn an toàn khi miễn dịch cho động vật.

\* *Xác định KT đặc hiệu với KN nọc RCN:*



*Hình 1:* vết tua KN - KT RCN trên thạch (kỹ thuật Ouchterlony).

Vết tua KN - KT trên thạch trong xét nghiệm với KN nọc RCN cả 2 loài Bắc và Nam cho thấy: KN chế tạo đã kích thích cơ thể động vật được miễn dịch, sinh KT đặc hiệu với nọc RCN của cả 2 loài Bắc và Nam. Dựa trên kết quả này, chúng tôi có thể hiệu giá KT hình thành, theo dõi hiệu quả của quá trình sinh KT để lấy máu sản xuất HTKNR khi thấy đạt yêu cầu.

## BÀN LUẬN

### 1. Lấy nọc RCN, làm giảm độc lực, chế tạo KN.

Trước khi tiến hành lấy nọc rắn, chế tạo KN, miễn dịch cho động vật..., việc thiết kế ý tưởng nghiên cứu đóng vai trò hết sức quan trọng [7]: chế tạo, sản xuất HTKNR cho loài rắn nào và vì sao? Đó là loại HTKNR đơn giá hay đa giá? Dự định sản xuất HTKNR dạng IgG, F(ab) hay F(ab')? Động vật miễn dịch sử dụng là gì?... Chuẩn bị kỹ trước khi tiến hành, giúp tiết kiệm thời gian và chi phí sản xuất HTKNR.

Với đặc điểm địa lý Việt Nam hẹp và dài, từ vùng cận ôn đới tới vùng nhiệt đới, nên RCN cũng khác nhau về hình thái và phân bố. RCN Nam phổ biến ở cả 2 miền Đông và Tây Nam Bộ, tập trung nhiều ở các tỉnh miền Đông đến cực Nam Trung Bộ và chưa bao giờ thấy ở miền Bắc Việt Nam. Trong khi, RCN Bắc có rải rác từ đèo Hải Vân đến biên giới Lào - Việt - Trung, nhiều nhất ở các tỉnh Đồng bằng Bắc Bộ. Hình thái 2 loài này nhìn thoáng qua rất khó phân biệt, dân gian thường gọi "rắn khúc đen khúc trắng". Trên thực tế lâm sàng, nạn nhân nhiễm độc nọc RCN Nam nặng hơn nhiều so với nhiễm độc nọc RCN Bắc [2, 5]. Cho đến nay, chưa có thông báo về sự khác biệt bản chất sinh - hóa học của nọc độc giữa 2 loài này [1]. Với những khác biệt về lâm sàng, khả năng đã có khác biệt về độc tính nọc, vì vậy cần có nghiên cứu sâu thêm đặc điểm này. Trước mắt, cần tạo HTKNR cho cả 2 loài để tiện việc cấp cứu, điều trị.

Về vấn đề lấy nọc RCN, cần chuẩn bị hết sức cẩn thận về mọi mặt: từ việc cố định đầu rắn, xác định răng độc, cố định đuôi rắn và thao tác lấy nọc hết sức khéo léo, cẩn thận bởi đây là loài rắn cực độc. Đã rất nhiều người bắt rắn tử vong khi bắt loài rắn này. Điều cần chú ý là khi lấy nọc xong, cho đuôi rắn vào trước và thả đầu rắn sau cùng, thao tác cần dứt khoát và nhanh. Tránh để đuôi rắn quấn vào tay, rắn sẽ cắn lại, hết sức nguy hiểm, nhất là khi chúng ta chưa có HTKNR đặc hiệu để cấp cứu.

Với kết quả thu được 03 g nọc từ > 200 RCN, an toàn, tương đối tinh khiết là một thành công ban đầu của nghiên cứu (vì nọc RCN rất ít, khó lấy và cực kỳ nguy hiểm).

Nọc được để khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng, làm khô nhanh bằng quạt gió, sau đó cho vào tủ lạnh -20°C bảo quản theo phương pháp của D. Theakston và khuyến cáo của WHO [2, 7]. Sau khi chế tạo KN và miễn dịch cho kết quả tốt, cho thấy việc để khô tự nhiên và bảo quản ở nhiệt độ âm sâu đã bảo đảm không thay đổi đặc tính KN của nọc rắn.

Khử độc bằng glutaraldehyde là kỹ thuật thường dùng hiện nay. Các phương pháp khác được WHO khuyến cáo có thể sử dụng như dùng formaldehyde, tia xạ... [7], tuy nhiên chúng tôi lựa chọn glutaraldehyde do đã có kinh nghiệm về sử dụng phương pháp này trong khử độc nọc rắn Hồ mang, Hồ đất, Hồ chúa, Choàm quạp.

### 2. Đánh giá mức độ an toàn và hiệu lực sinh KT của KN nọc RCN.

Để chế tạo HTKNR thành công, KN sử dụng gây miễn dịch động vật phải rất an toàn, không gây chết động vật, đồng thời phải giữ được tính KN nọc rắn, nhằm giúp HTKNR được sản xuất, chế tạo có thể trung hòa hiệu quả, nhanh chóng nọc độc chứa các độc tố nguy hiểm trong cơ thể nạn nhân. Với loại độc tố nọc rắn có độc lực rất mạnh như nọc RCN, chế

tạo KN để gây miễn dịch nếu không hiệu quả, có thể gây chết động vật ngay từ những lần miễn dịch đầu tiên.

Kết quả cấy khuẩn cho thấy KN đạt tiêu chuẩn vô khuẩn. Điều hiển nhiên, nọc rắn lấy được không thể bảo đảm vô khuẩn. Song trong quá trình khử độc, các vi khuẩn đã bị tiêu diệt một phần. Những vi khuẩn còn lại được loại bỏ bằng quá trình lọc vô khuẩn qua màng lọc. Trong suốt quá trình chế tạo KN, dụng cụ lấy nọc và chế tạo KN phải sấy hấp tiệt trùng. Chúng tôi tuân thủ nghiêm túc khuyến cáo của WHO, như khi làm trong các la vô khuẩn khác. Sau khi khử độc nọc, tiến hành ly tâm, bỏ cặn, thu dung dịch KN, chiết vào các lọ nhỏ 4 ml/lọ; khử trùng kỹ nút lọ bằng nhiệt đèn cồn, đóng nắp lọ và ghi đầy đủ thông tin trên nhãn lọ KN; bảo quản lọ ở -20°C cho đến khi lấy KN ra sử dụng. Lấy ngẫu nhiên 1 lọ KN để cấy khuẩn cho thấy kết quả chế tạo KN đạt yêu cầu vô khuẩn.

Qua kết quả nghiên cứu trên thỏ (*bảng 1*), chuột Lang (*bảng 2*) cho thấy: KN nọc RCN đảm bảo không có chất gây sốt và an toàn cho động vật thí nghiệm. Điều này tránh được nhiều khó khăn khi miễn dịch cho động vật; đảm bảo hiệu quả nghiên cứu. Kết quả này gián tiếp đánh giá hiệu quả toàn bộ các khâu kỹ thuật trong quá trình chế tạo KN. Ly tâm và lọc kỹ dung dịch KN đã giúp loại bỏ hầu hết các chất có hại cho động vật, như: chất gây sốt và hóa chất đã sử dụng trong quá trình khử độc nọc rắn.

Kết quả lấy máu ngựa sau miễn dịch 4 lần cách nhau 4 tuần/lần để tách huyết thanh, làm xét nghiệm phản ứng KN - KT với KN nọc RCN lấy ngẫu nhiên từ tự nhiên, với cả 2 loài Bắc và Nam cho thấy xuất hiện rất rõ vết tủa KN - KT trên thạch. Điều này khẳng định tính hiệu lực sinh KT của KN rất tốt. KN đã khử độc, bảo đảm an toàn, nhưng vẫn đủ mạnh để kích thích cơ thể động vật sinh KT. Như vậy, các chuỗi peptides độc tố vẫn giữ được cấu trúc, tuy mất đi hoạt tính sinh học của độc tố nhưng vẫn giữ được tính sinh miễn dịch.

## KẾT LUẬN

KN nọc RCN được nghiên cứu chế tạo, qua kiểm tra chất lượng, đã đạt tiêu chuẩn an toàn (vô trùng, không có chất gây sốt, an toàn trên động vật thí nghiệm) và có hiệu lực kích thích sinh KT tốt.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hoàng Ngọc Anh, Nguyễn Hồng Thanh. Nghiên cứu các thành phần của nọc rắn hổ đất (N. kaouthia). Tạp chí Sinh học. 2009, tr.89-94.

2. Trịnh Xuân Kiếm, Thái Danh Tuyên. Nghiên cứu chế tạo HTKNRCN, ứng dụng điều trị lâm sàng tại Việt Nam. Tạp chí Y học Việt Nam. 2009, tr.15-19.

3. Trịnh Xuân Kiếm, Thái Danh Tuyên. Nghiên cứu chế tạo HTKNR hổ chúa (King cobra antivenom), ứng dụng điều trị lâm sàng thành công tại Việt Nam. Tạp chí Y học quân sự. 2007, 244, tr.35-37.

4. *Trịnh Xuân Kiếm, Thái Danh Tuyên*. Xu hướng phát triển gần đây trong sản xuất HTKNR, ứng dụng điều trị lâm sàng. Tạp chí Y học quân sự. 2006, tr.52-55.

5. *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 XVI<sup>th</sup> World Congress of International Society on Toxinology. Brazil. 2009.

6. *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, 18 (3), pp.21-27.

7. *WHO*. Proposed WHO Guidelines for the production, control and regulation of antivenom immunoglobulines. 2008, pp.17-40.