

# Đánh giá tính an toàn và hiệu lực bảo vệ của kháng huyết thanh kháng *Bacillus Anthracis* tinh chế trên động vật thực nghiệm

**Hoàng Thị Thu Hà<sup>\*</sup>; Tăng Thị Nga<sup>\*</sup>; Phạm Thanh Hải<sup>\*</sup>  
Nguyễn Thái Sơn<sup>\*\*</sup>; Phan Bốn<sup>\*\*\*</sup>; Phùng Đắc Cam<sup>\*</sup>**

## TÓM TẮT

Bệnh than là bệnh nhiễm khuẩn cấp tính, làm tổn thương da, đường hô hấp dưới, đường tiêu hóa và nhiều phủ tạng. Bệnh hay gặp ở động vật ăn cỏ, lây sang người do tiếp xúc. Bệnh xảy ra ở nhiều nơi trên thế giới, trong đó có Việt Nam. Tỷ lệ tử vong cao đối với cả người và động vật. Vắc xin và kháng huyết thanh (KHT) chống vi khuẩn (VK) than là chế phẩm có tác dụng để phòng ngừa và điều trị bệnh than. Hiện trên thị trường chưa có sẵn những sinh phẩm này để dùng cho nhân dân và quân đội khi có tình huống xảy ra. KHT chống VK than do Học viện Quân y phối hợp với Công ty Vắc xin Pasteur Đà Lạt sản xuất được thử nghiệm, đánh giá tính an toàn cũng như hiệu lực bảo vệ trên động vật thực nghiệm cho thấy đạt yêu cầu về tính an toàn và hiệu lực bảo vệ ở liều gây chết 10 x LD<sub>50</sub> của chủng VK độc lực *B. anthracis* 17JB.

\* Từ khóa: Kháng huyết thanh chống bệnh than; Tính an toàn; Hiệu lực bảo vệ.

## Evaluation of Safety and Potency of the *Bacillus anthracis* antisera in the experimental animals in Vietnam

### Summary

*Anthrax in nature is a usually fatal zoonotic disease and caused by Bacillus anthracis. Animals acquire the disease from consuming contaminated soil in which pre-existing anthrax spores are likely to have germinated, then repopulated under appropriate soil and weather conditions, increasing their concentration in soil to infectious levels. Human disease results from exposure to contaminated animal products. There is need to use the vaccine and/or anti-sera for prevention and treatment of the disease. The biological produces, however, need to evaluate their characteristics before using. The Bacillus anthracis anti-sera was produced in a rabies by injecting spores of the Sterne strain of Bacillus anthracis at in Dalat Vaccination Pasteur Institute and Military Medical University in Vietnam. The anti-sera was investigated for its safety and potency. The results showed that the anti-sera achieve the National Center for Control of Medical Biological Products and Vietnam pharmacopoeia-No.3 criteria for safety and potency with 10 x LD<sub>50</sub> of B. anthracis 17JB strain.*

\* Key words: Anthrax anti-sera; Safety, Potency.

---

\* Viện Vệ sinh Dịch tễ TW

\*\* Bệnh viện 103

\*\*\* Công ty Vắc xin Pasteur Đà Lạt

Phản biện khoa học: PGS. TS. Nguyễn Văn Minh

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh than là bệnh nhiễm khuẩn cấp tính, thường làm tổn thương da, đường hô hấp dưới và tiêu hóa. Bệnh hay gặp ở động

vật ăn cỏ, nhưng có thể gây bệnh cho người và động vật có vú khác qua tiếp xúc. Bệnh xảy ra rộng khắp trên thế giới, tỷ lệ tử vong có thể rất cao đối với cả người và

động vật [4, 5].

Tác nhân gây bệnh là trực khuẩn gram dương *Bacillus anthracis* (*B. anthracis*) có nha bào, có thể chịu được tác động của nhiệt độ, tia cực tím, bức xạ và một số hóa chất [6]. Vì vậy, VK có khả năng tồn tại nhiều năm ở môi trường và phát tán nhanh. Hơn nữa, *B. anthracis* có thể chế ở dạng bột, nên đã được sử dụng làm vũ khí sinh học gây nguy hiểm cho loài người. Gần đây nhất, năm 2001, vụ khủng bố sinh học bằng VK *B. anthracis* tại Mỹ làm 5 người chết trên tổng số 22 ca mắc bệnh [4].

Để góp phần ngăn ngừa dịch bệnh than trên cả người và động vật, nhiều nước trên thế giới đã nghiên cứu sản xuất KHT than tinh chế và vắc xin nhưng các chế phẩm này có giá thành khá cao. Trên thực tế nhu cầu sản xuất vắc xin hay KHT trong nước rất cần thiết. Tuy nhiên, các chế phẩm sinh học như KHT, vắc xin cần kiểm tra tính an toàn cũng như hiệu lực bảo vệ trên động vật thực nghiệm trước khi đưa vào sử dụng. Vì vậy, nghiên cứu này nhằm mục tiêu: *Đánh giá tính an toàn và hiệu lực bảo vệ của kháng huyết thanh bacillus anthracis tinh chế trên động vật thực nghiệm.*

## 42 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Vật liệu nghiên cứu.

\* Sinh phẩm:

- KHT than tinh chế, đóng lọ 1ml (hiệu giá 1/640) (do Học viện Quân y và Công ty Vắc xin Pasteur Đà Lạt phối hợp sản xuất), hạn sử dụng đến năm 2012.

- Chủng VK có độc lực *B. anthracis* 17JB dùng thử thách hiệu quả bảo vệ.

- Nước muối sinh lý 0,85% (NaCl 0,85%), pH từ 7,0 - 7,2.

- Môi trường thạch máu cừu 5%, thạch dinh dưỡng, thạch bán lỏng.

- Môi trường đường các loại: salicin, glucose, sacarose, manitol, arabinose.

- Dung dịch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NaClO 1%, 10%.

\* Động vật thí nghiệm:

- Chuột lang có trọng lượng từ 250 - 350g.

- Chuột nhắt (đồng giới) có trọng lượng từ 17 - 22g.

\* Dụng cụ thí nghiệm: bộ đo độ đục McFarland; tít nhựa 15 ml, vô trùng (Coming); micropipette loại 200 µl, 1000 µl; đầu côn 200 µl, 1000 µl; que cấy nhựa vô trùng 1 µl, 10 µl; bơm tiêm 1 ml; bông, cồn 70<sup>0</sup>; tủ ấm 37<sup>0</sup>C, đèn cồn, lam kính; kính hiển vi, cân điện tử hiện số.

### 2. Phương pháp nghiên cứu.

Đánh giá tính an toàn và hiệu lực KHT theo tiêu chuẩn Dược điển III [2], thực hiện tại phòng thí nghiệm an toàn sinh học cấp độ 3, Viện Vệ sinh Dịch tễ TW.

\* Đánh giá độ an toàn của KHT:

- Chọn chuột khỏe mạnh và nuôi cách ly 5 ngày trước thử nghiệm, cho ăn uống đầy đủ.

- Chuột chia làm 2 nhóm:

+ Chuột lang: trọng lượng chuột 250g/con (3 con).

+ Chuột nhắt: cân trọng lượng chuột 18g/con (3 con).

- Cách tiêm: tiêm dưới da vùng đùi bên (01 con tiêm KHT tinh chế, 01 con tiêm NaCl 0,85% và 01 con không tiêm).

- Liều tiêm: 5 ml/con đối với chuột lang và 1 ml/con đối với chuột nhắt.

- Thời gian theo dõi: chăm sóc và theo dõi chuột cho đến ngày thứ 14, theo dõi

sức khỏe và cân trọng lượng chuột.

\* *Tiêu chuẩn đánh giá*: tiêu chuẩn an toàn của KHT kháng *B. anthracis* tinh chế là chuột sống khỏe mạnh, không có dấu hiệu bệnh lý và trọng lượng giảm không quá 1/5 so với ban đầu [2, 4, 6].

## 2. Đánh giá hiệu lực bảo vệ của KHT than tinh chế.

\* *Cấy chủng VK và chuẩn bị liều tiêm chuột*:

+ Chủng VK 17JB cấy trong canh thang não tim bò, để ở nhiệt độ 37°C/24 giờ. Sau đó, lấy huyền dịch này cấy lên môi trường thạch máu cừu 5% và thạch dinh dưỡng, để ở nhiệt độ 37°C/24 giờ.

+ Lấy khuẩn lạc điển hình nhuộm soi dưới kính hiển vi để xác định hình thể và kiểm tra tính chất sinh vật hoá học, tính độc của VK bằng các môi trường thạch bán lỏng, catalase, đường (salicin, glucose, saccharose, manitol, arabinose).

+ Lấy 01 khuẩn lạc hòa vào tít 10 ml dung dịch NaCl 0,85% đạt nồng độ McFarland 0,5 (tương đương 1 - 1,5 x 10<sup>8</sup> VK/ml) được coi là huyền dịch ban đầu cho thử nghiệm. Huyền dịch này tiếp tục pha loãng bậc 10 để được các nồng độ 10<sup>0</sup>, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>.

- Tiến hành thử nghiệm trên động vật.

- Chọn chuột nhất khỏe mạnh, trọng lượng chuột 18 - 20g/con và nuôi cách ly 5 ngày trước thử nghiệm và cho ăn uống đầy đủ, đặc biệt chế độ vitamin.

- Số lượng chuột sử dụng: 100 con.

+ Chuột tính liều gây độc (LD<sub>50</sub>): 40 con,

chia 5 nhóm, tiêm các liều gây độc sau: 10<sup>1</sup>, 10<sup>0</sup>, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>.

+ Nhóm chuột đánh giá hiệu lực KHT: 60 con, chia thành 4 nhóm:

Nhóm 1: tiêm liều 2 x LD<sub>50</sub>.

Nhóm 2: tiêm liều 4 x LD<sub>50</sub>.

Nhóm 3: tiêm liều 8 x LD<sub>50</sub>.

Nhóm 4: tiêm liều 10 x LD<sub>50</sub>.

+ Cách tiêm: tiêm dưới da vùng đùi bẹn.

+ Liều tiêm: nhóm tiêm tính liều gây độc: 1 ml/con.

+ Nhóm đánh giá hiệu lực bảo vệ của KHT:

05 con tiêm 1 ml liều độc + 1 ml KHT nồng độ đặc.

05 con tiêm 1 ml liều độc + 1 ml KHT nồng độ pha loãng 1/2

05 con tiêm 1 ml liều gây độc + 1 ml NaCl 0,85%.

- Thời gian theo dõi:

. Nhóm tính liều gây độc: ngày thứ 3 đến ngày thứ 14.

. Nhóm đánh giá hiệu lực: chăm sóc và theo dõi chuột cho đến ngày thứ 10, theo dõi tình trạng sức khỏe.

\* *Tiêu chuẩn đánh giá*: theo tiêu chuẩn của Dược điển Việt Nam III và Tổ chức Y tế Thế giới [1, 3]. Đánh giá hiệu lực bảo vệ của KHT kháng *B. anthracis* tinh chế dựa trên nguyên lý phản ứng trung hoà in vivo của liều VK với các độ pha loãng KHT than và kết quả chuột sống sau khi thử nghiệm.

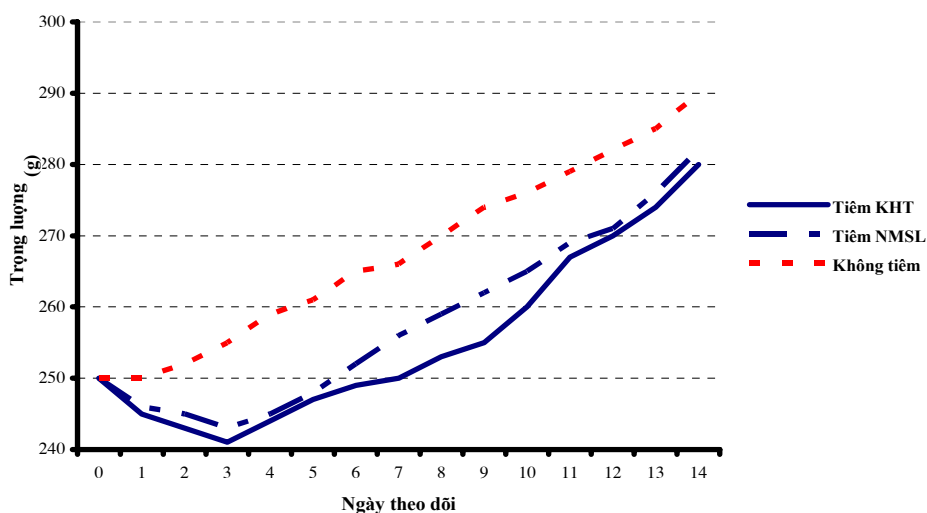
## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

### 1. Kết quả đánh giá độ an toàn.

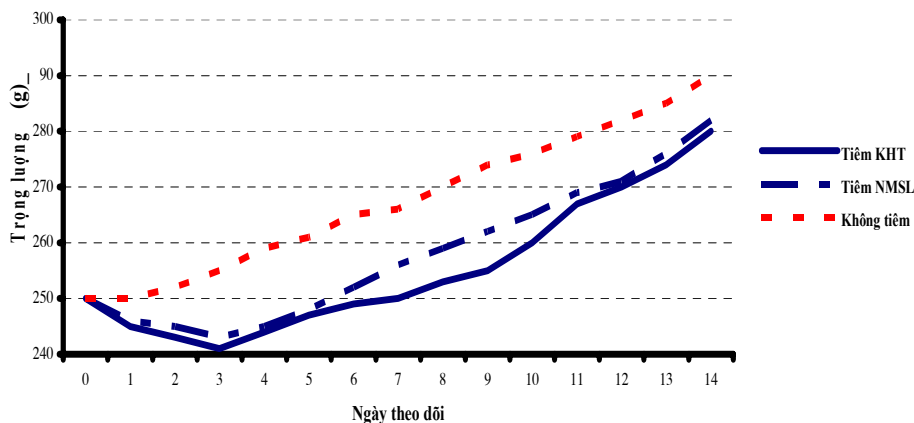
Thực tế không có KHT nào được coi là tuyệt đối an toàn. Các phản ứng phụ có thể xảy ra với một tỷ lệ nhất định trong số những cá thể dùng KHT. Vì thế, tính an toàn của KHT cần được kiểm tra bằng thử nghiệm *in vivo*. Ở đây, chúng tôi đã áp dụng thử nghiệm tăng

trọng của chuột [2, 4]. Thử nghiệm này có thể bị ảnh hưởng bởi các yếu tố không liên quan đến KHT như chủng loại chuột sử dụng, điều kiện nuôi dưỡng chăm sóc. Vì thế, đã sử dụng 02 nhóm chứng và 02 chủng loại chuột khác nhau. Sau khi tiêm KHT kháng *B. anthracis* tinh chế vào chuột lang và chuột nhắt, theo dõi trong 14 ngày tại phòng nuôi động vật thí nghiệm, kết quả cho thấy: chuột sống khỏe mạnh và không có dấu hiệu bệnh lý (100%)

- Trọng lượng chuột tăng so với trọng lượng ban đầu (hình 1 và 2):



Hình 1: Theo dõi chuột lang thử tính an toàn của kháng huyết thanh tinh chế.



Hình 2: Theo dõi chuột nhắt thử tính an toàn của kháng huyết thanh tinh chế.

So với nhóm chuột không tiêm, nhóm tiêm nước muối sinh lý và KHT đều giảm trọng lượng sau khi tiêm thử nghiệm. Đây là phản ứng thông thường của động vật thử nghiệm sau khi tiêm. Ở nhóm tiêm KHT, trọng lượng chuột giảm nhiều hơn. Hiện tượng này có thể do ảnh hưởng của các thành phần trong KHT. Tuy nhiên, sang ngày thứ 4, trọng lượng của chuột ở cả 2 nhóm tiêm đều tăng trở lại, điều này chứng tỏ quá trình tiêm thử nghiệm đạt hiệu quả.

Với kết quả thu được và theo tiêu chuẩn đánh giá của Dược điển Việt Nam [2] và Tổ chức Y tế Thế giới [4], KHT kháng *B. anthracis* tinh chế này đảm bảo tính an toàn trên động vật thực nghiệm.

## 2. Kết quả đánh giá hiệu lực bảo vệ của KHT tinh chế.

\* *Liều gây độc* (LD<sub>50</sub>): tiêm các liều gây độc với những nồng độ khác nhau, thu được kết quả:

*Bảng 1:* Tiêm chuột để tính liều gây độc LD<sub>50</sub>.

NỒNG ĐỘ LIỀU GÂY ĐỘC	SỐ CHUỘT SỐNG	SỐ CHUỘT CHẾT	TỶ LỆ CHẾT	
			Tỷ số	Phần trăm (%)
10 <sup>1</sup>	0	8	8/8	100
10 <sup>0</sup>	3	5	5/8	62,5
10 <sup>-1</sup>	7	1	7/8	12,5
10 <sup>-2</sup>	8	0	0/8	0
10 <sup>-3</sup>	8	0	0/8	0

LD<sub>50</sub> vào khoảng giữa nồng độ pha loãng 10<sup>0</sup> và 10<sup>-1</sup> VK, phần trăm chết tương ứng với liều sát trên 50% là 62,5%, phần trăm tương ứng liều sát dưới 50% là 12,5%. Tính toán bằng Spearman - Kärber [8] thì LD<sub>50</sub> titer = 10<sup>-1,33</sup>.

\* *Đánh giá hiệu lực bảo vệ:* xác định số chuột tiêm liều gây chết + KHT tinh chế còn sống để đánh giá hiệu lực bảo vệ của KHT.

*Bảng 2:* Theo dõi chuột sau tiêm liều gây độc LD<sub>50</sub> và 1 ml KHT pha loãng nồng độ 1/2 .

LIỀU TIÊM	SỐ LƯỢNG CHUỘT	SỐ CHUỘT SỐNG	TỶ LỆ CHUỘT SỐNG/SỐ CHUỘT THÍ NGHIỆM
2 x LD <sub>50</sub>	5	2	2/5
4 x LD <sub>50</sub>	5	0	0
8 x LD <sub>50</sub>	5	0	0
10 x LD <sub>50</sub>	5	0	0

Từ hiệu giá của KHT sử dụng là 1/640, tiến hành tiêm liều KHT pha loãng 1/2 với các liều gây độc đã định trước. Kết quả bảng 2 cho thấy, chỉ duy nhất nhóm tiêm liều gây độc 2 x LD<sub>50</sub> có chuột còn sống. Tuy nhiên, số chuột sống sót ở nhóm này chỉ đạt 40%. Do vậy, sử dụng liều tiêm KHT pha loãng 1/2 là không có tác dụng bảo vệ.

**Bảng 3:** Theo dõi chuột sau tiêm liều gây độc và 1 ml KHT tinh chế hiệu giá 1/640.

LIỀU TIÊM	SỐ CHUỘT THỬ NGHIỆM	SỐ CHUỘT SỐNG SÓT
2 x LD <sub>50</sub>	5	5 (100%)
4 x LD <sub>50</sub>	5	5 (100%)
8 x LD <sub>50</sub>	5	5 (100%)
10 x LD <sub>50</sub>	5	5 (100%)

100% số chuột tiêm KHT không pha loãng với các liều gây độc khác nhau đều sống, không có biểu hiện bệnh lý đến ngày thứ 10 của thử nghiệm. Điều đó chứng tỏ KHT hiệu giá 1/640 có tác dụng bảo vệ với các liều gây độc đã tiến hành trong thử nghiệm.

## KẾT LUẬN

KHT chống VK than tinh chế hiệu giá 1/640 do Học viện Quân y và Công ty Vắcxin Pasteur Đà Lạt sản xuất đảm bảo tính an toàn trên động vật thực nghiệm và có hiệu lực bảo vệ ở liều gây chết 10 x LD<sub>50</sub> của chủng VK độc lực *B. anthracis* 17JB.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Dược điển học Việt Nam*. Xuất bản lần 3. 2003.
2. Nguyễn Thị Lan Phương. Thảm định thử nghiệm sinh học áp dụng trong kiểm định vắcxin và huyết thanh. Tạp chí Y học Dự phòng. 2003. Tập XIII, số 6 (63), tr.108-112.
3. General requirements for the sterility of biological substances (Requirements for Biological substances No.6, revised 1973). In: WHO. Expert Committee on Biological Standardization. Twenty-fifth report. Geneva, World Health Organization, 1973 (WHO Technical Report Series, No. 530); and Amendment 1995 in WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty-sixth report. Geneva, World Health Organization, 1998 (WHO Technical Report Series, No 872).
4. Shirin S, Ramona D., Stephen R and et al. Inhalation anthrax: Epidemiology, diagnosis, and management. *CHEST*. 1999.
5. Friedlander A.M, and Parker G.W.. Anthrax vaccine: evidence for safety and efficacy against inhalational anthrax. *JAMA*. 1999. 282: 2104-2106.
6. World Health Organization (WHO). Emerging and other communicable diseases, surveillance and control. Guidelines for the surveillance and control of anthrax in humans and animals. WHO Doc. No. WHO/EMC/ZDI/98.6. Geneva: WHO; 1998. Available at: <http://www.who.int/emc-documents/>

zoonoses/docs/whoemczdi986.html. Accessed October 11, 2001.

7. *F. X Mesline, M.M. Kaplan, H.Koprowski*. Laboratory techniques in rabies. 4th edition. WHO Geneva. 1996. Testing the safety and potency of vaccines.