



BỘ Y TẾ
VIỆN QUỐC GIA SẢN XUẤT VACCIN
VÀ CÁC CHẾ PHẨM SINH HỌC

CHƯƠNG TRÌNH NGHIÊN CỨU KHOA HỌC
CẤP NHÀ NƯỚC - K.Y - 01

ĐỀ TÀI K.Y - 01 - 13

ỨNG DỤNG TIẾN BỘ KHOA HỌC KỸ THUẬT
XÂY DỰNG CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT HUYẾT THANH
KHÁNG ĐẠI TINH CHẾ

Nha Trang : 1994

CHỦ NHIỆM ĐỀ TÀI :
Nguyễn Thị Kê

NHỮNG NGƯỜI THỰC HIỆN :

Hoàng Thủy Nguyên ⁽¹⁾
Đặng Đức Trạch ⁽¹⁾
Đặng Đức Phú ⁽¹⁾
Doãn Thị Tâm ⁽²⁾
Hoàng Minh Hiền ⁽²⁾
Lê Văn Hiệp
Đặng Hồng Phong
Nguyễn Hữu Đôn
Nguyễn Chức
Nguyễn Thị Kim Loan
Hồ Thị Ánh
Cao Quang Minh
Nguyễn Minh Hiền
Bùi Văn Sơn
Lê Đình Bảy
Nguyễn Văn Bình
Trần Song Hào
Nguyễn Hoàng Oanh
Nguyễn Đức Thịnh

- (1) Viện Vệ sinh dịch tễ Hà Nội
(2) Trung tâm kiểm định quốc gia
Trung tâm y học dự phòng Tiền Giang
Trung tâm y học dự phòng Hà Tây
Trung tâm y học dự phòng Ninh Bình

Cơ quan thực hiện :

VIỆN QUỐC GIA SẢN XUẤT VACCIN

NHỮNG CHỮ VIẾT TẮT

1. CVS	:	Challenge Virus Strain
2. ĐV	:	Động vật
3. ED ₅₀	:	50% effective dose
4. ERIG	:	Equine Rabies Immuno Globuline
5. HDCV	:	Human Diploid Cell Vaccine
6. HRIG	:	Human Rabies Immuno Globuline
7. HIT	:	Huyết thanh
8. HIT-VR	:	Huyết thanh - Virút.
9. HTKD	:	Huyết thanh kháng đại
10. IITTC	:	Huyết thanh tinh chế
11. IU	:	International Unit
12. KN	:	Kháng nguyên
13. KT	:	Kháng thể
14. LD	:	Lethal Dose
15. MDCB	:	Miễn dịch cơ bản
16. MDCĐ	:	Miễn dịch cao độ
17. MDNL	:	Miễn dịch nhắc lại
18. n	:	Số chuột trong 1 độ pha
19. NHS	:	Normal horse serum
20. PBS	:	Phosphate buffered Saline
21. RIG	:	Rabies immunoglobuline
22. SAD	:	Sérum antidiphtherique
23. SAR	:	Sérum antirabique
24. SAT	:	Sérum antitétanique
25. SBH	:	Ammonium sulfat bão hòa
26. ST	:	Sau tiêm
27. SVTN	:	Súc vật thí nghiệm
28. TB	:	Tế bào
29. TLTV	:	Tỷ lệ tử vong
30. TN	:	Thí nghiệm
31. TSCĐ	:	Tài sản cố định
32. TT	:	Trước tiêm
33. TTKĐQG	:	Trung tâm kiểm định quốc gia
34. VP	:	Virus Pasteur
35. VSĐT	:	Vệ sinh dịch tễ
36. VT	:	Vô trùng
37. WHO	:	World Health Organization

MỤC LỤC

	<i>Trang</i>
1. Đặt vấn đề	1
2. Lịch sử bệnh chó dại	2
3. Virut dại	8
4. Dịch tễ học bệnh dại	10
5. Vaccin	11
6. Huyết thanh	11
7. Sản xuất huyết thanh kháng dại	13
8. Dự phòng và điều trị	14
9. Điều trị phối hợp vaccin và huyết thanh	15
10. Tinh chế huyết thanh kháng dại	16
11. Vật liệu	18
12. Điều chế kháng nguyên	21
13. Gây miễn dịch ngựa	22
14. Phương pháp tinh chế	23
15. Phương pháp kiểm tra chất lượng	33
16. Kết quả lựa chọn kháng nguyên và phát đồ gây miễn dịch	50
17. Kết quả nghiên cứu quy trình tinh chế và cô đặc Globulin miễn dịch	53
18. Huyết thanh tinh chế	56
19. Thực địa	56
20. Kết quả điều trị phối hợp vacxin và huyết thanh	60
21. Giá thành sinh phẩm	60
22. Kết luận và đề nghị	61
23. Tài liệu tham khảo	62

A. ĐẶT VẤN ĐỀ :

Bệnh chó dại cho đến nay vẫn còn là nỗi lo âu cho nhân dân trong cả nước và toàn thế giới. Riêng ở Châu Á mỗi năm đã có hàng ngàn người chết vì bệnh dại. Ở nước ta theo số liệu thống kê của 40 Tỉnh thành, số người bị chó nghi dại cắn ngày một tăng. Trong đó số người bị cắn ở những nơi nguy hiểm cần phải sử dụng huyết thanh kèm với vaccin cũng như số người tử vong do mắc bệnh dại cũng ngày một tăng. Ở 40 tỉnh thành trong 2 năm 1989 và 1990 (theo tài liệu thống kê dịch tễ học của Viện VSDT Hà Nội).

	1989	1990
Số bị chó nghi dại cắn phải dùng vaccin	217.684	284.546
Số bị chó nghi dại cắn phải dùng vaccin và huyết thanh	10.812	17.972
Số người chết vì bệnh dại	650	796

Cũng theo số liệu của Viện VSDT học Hà Nội số mắc và chết vì bệnh dại ở các tỉnh miền Bắc trong các năm 1992, 1993 và 6 tháng đầu năm 1994 :

	1992	1993	6 tháng 1994
Số bị chó nghi dại cắn tiêm vaccin	142.416	144.162	78.132
Số bị chó nghi dại cắn phải tiêm vaccin và huyết thanh	3.107	4.036	4.604
Số người chết vì bệnh dại	385	398	208

Cho đến nay chưa có thuốc đặc hiệu chữa bệnh dại lên cơn. Do đó tiêm vaccin kèm huyết thanh kháng dại là cách duy nhất cấp cứu có hiệu quả cho người bị súc vật nghi dại cắn.

Qua các số liệu trên cho thấy khoảng 5 - 6% trường hợp bị chó cắn là phải sử dụng huyết thanh điều trị. Đến nay mọi người đều công nhận việc dùng phối hợp huyết thanh và vaccin dại đã làm giảm TLTV rất lớn trong điều trị bệnh nhân bị chó dại cắn, đặc biệt là các trường hợp vết cắn ở những nơi gần trung khu thần kinh, bộ phận sinh dục. Để việc điều trị có hiệu quả người ta nghiên cứu sản xuất HTKD tinh chế có nguồn gốc súc vật hay người, cho hiệu giá cao và không gây phản ứng phụ.

Ở nước ta từ trước cho đến năm 1990 các trường hợp bị chó nghi dại cắn được điều trị dự phòng bằng vaccin sản xuất trong nước. Trong khi đó huyết thanh điều trị là do Liên Xô cung cấp bằng con đường viện trợ giữa 2 nhà nước. Sau 1990 do tình hình chính trị xã hội Liên Xô có thay đổi nguồn viện trợ này không còn. Để giải quyết nhu cầu sử dụng cho nhân dân trong cả nước, Bộ Y Tế phải nhập ngoại loại sinh phẩm này với giá thành 12 - 15 USD/1 ống (tương đương 130.000 - 160.000đ VN). Trước thực tế khó khăn trên Viện chúng tôi đặt vấn đề ứng dụng các tiến bộ khoa học kỹ thuật để xây dựng công nghệ sản xuất globulin kháng dại tinh chế nhằm phục vụ cho công tác điều trị dự phòng cho bệnh nhân bị chó dại cắn.

MỤC ĐÍCH CỦA ĐỀ TÀI

Sản xuất được HTKD đạt tiêu chuẩn quốc tế (WHO) để phục vụ cho công tác điều trị dự phòng bệnh dại, không cần nhập ngoại.

Đề tài được tiến hành theo các bước sau :

1. Lựa chọn KN thích hợp để gây miễn dịch ngựa.
2. Nghiên cứu phát đồ tối ưu gây miễn dịch ngựa để có kháng huyết thanh đạt hiệu giá cao.
3. Nghiên cứu qui trình tinh chế và cô đặc globulin miễn dịch
4. Kiểm tra chất lượng : vô khuẩn, an toàn, độ sạch, công hiệu và các tiêu chuẩn lý hóa khác.
5. Thực địa các loại đạt tiêu chuẩn.

PHẦN THỨ NHẤT

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1. LỊCH SỬ BỆNH CHÓ DẠI :

Bệnh chó dại là một căn bệnh nguy hiểm có thể gây hại cho tất cả các động vật có vú. Căn nguyên do một loài virút thuộc họ Rhabdoviridae. Ở người : bệnh thường bắt đầu từ một vết cắn của động vật mang virút dại và sau đó phát bệnh, kết thúc bằng cái chết bi thảm. Bệnh được mô tả lần đầu tiên ở Antiquity, ở Á châu cũng như ở châu Phi và châu Âu. Vào thế kỷ XXIII trước công nguyên ở Mexotofamia lần đầu tiên người ta đã quan tâm đến bệnh này và đã ấn định một đạo luật phạt những người chủ có chó cắn người, trong trường hợp chó bị dại.

Ở Ai Cập, Hy Lạp và La Mã người ta xem bệnh chó dại là sự trừng phạt của thượng đế vì sự bí mật của bệnh lúc bấy giờ cũng như sự rùng rợn của các triệu chứng nó gây ra. Vào thế kỷ thứ V và thứ IV trước công nguyên Démocrite và Aristote đã mô tả kỹ lưỡng bệnh dại ở người. Một trăm năm sau Chúa giáng sinh, Selsius đã xác định được triệu chứng điển hình của bệnh : Chứng sợ nước; ông ta là người đầu tiên khuyến cáo phải cẩn thận với những vết do động vật cắn. Gaius là đồ đệ của Herophilus đã tìm ra sự tổn thương hệ thần kinh trung ương do bệnh này gây nên. Vì vậy lý thuyết liên quan đến thần kinh của bệnh này đã được biết từ lâu.

Những kiến thức liên quan đến bệnh được phong phú dần lên từ thế kỷ này sang thế kỷ khác. Ở thế kỷ XVI sự lan truyền tự nhiên của bệnh dại hầu như đã được công nhận. Thế kỷ XVII, XVIII những người nuôi chó săn đã mô tả một cách chi tiết triệu chứng của những động vật bị dại, cách lan truyền dại từ động vật này sang động vật khác và thời gian ủ bệnh. Vì vậy, ngay lúc bấy giờ rất nhiều phương pháp chữa trị thực nghiệm khác nhau được sử dụng để điều trị cho những con vật bị dại.

Những trường hợp đầu tiên người bị chó dại cắn ở tiểu bang Virginia (Mỹ) vào năm 1773. Năm 1803 ở miền Nam Peru và 1806 ở Argentina lần đầu tiên bệnh dại xuất hiện ở chó.

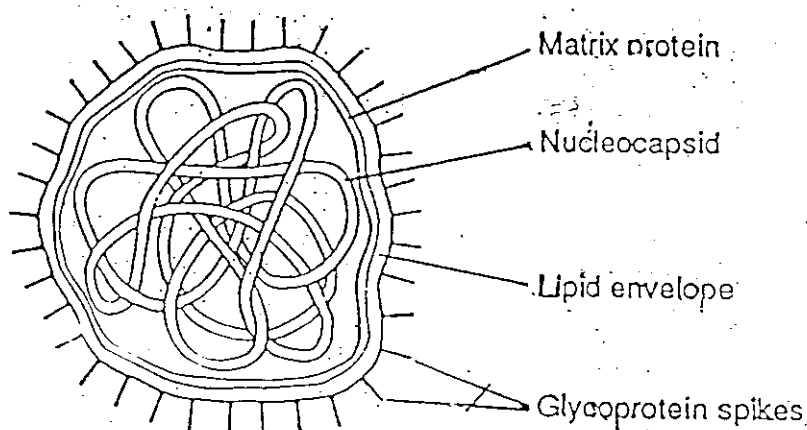
Vào thế kỷ XIV những phát minh có liên quan đến bệnh dại bắt đầu nở rộ. Năm 1885 lần đầu tiên trong lịch sử L. Pasteur đã cứu mạng sống của một bé trai bị chó dại cắn bằng phương pháp chủng ngừa. Và từ đó vaccin ngày càng được ứng dụng rộng rãi. Lúc bấy giờ việc chủng ngừa vẫn còn ở giai đoạn ngăn ngừa bệnh cho những đối tượng có nguy cơ. Tên tuổi của Pasteur đã gắn liền với những thành tựu chống lại bệnh dại và kết thúc ở việc tìm ra vaccin. Đây là một sự kiện cực kỳ quan trọng vì nó không chỉ là một vaccin cho phép gây miễn dịch trên súc vật hoặc trên

người mà đến hôm nay nó còn là một phương pháp điều trị hữu hiệu (thường có phối hợp với kháng huyết thanh đặc hiệu được sản xuất từ việc gây miễn dịch cho người hay súc vật).

2. VIRÚT DẠI :

2.1 . Phân loại :

Virút dại thuộc họ Rhabdoviridae, phân bố rộng trong thiên nhiên gồm trên 80 chủng loài có khả năng gây bệnh cho động vật có xương sống hoặc không xương sống và thực vật. Virút dại trực thuộc giống Lysavirus. Họ Rhabdoviridae được phân loại dựa theo hình thái viên đạn dẹt có vỏ bọc và có gai. Nhân là ARN sợi đơn (Hình vẽ 1A, 1B).



1A



Rhabdoviridae

1B

HÌNH 1A, 1B : Hình thái và cấu trúc của virút dại

2.2. Hình thái :

Virút đại một đầu tròn, một đầu dẹt, dẹp. Đường kính 75nm, dài 180nm. Dưới kính hiển vi điện tử : Vỏ bao gồm 2 màng Phospholipid xen kẽ với những gai glucoprotein. Nucleocapsid có cấu trúc đối xứng hình trụ. Nhân là ARN một sợi âm. Sợi này được bảo vệ bằng những đơn vị Nucleoprotein, có thể được thấy xuyên qua vỏ ngoài và mang tính đặc trưng của họ Rhabdo .

2.3. Acid nhân (Nucleo Acide) :

Genom (ARN) của virút bao gồm 1 sợi đơn âm không phân nhánh với trọng lượng phân tử $4,6 \times 10^6$ Dalton, tốc độ lắng 45S.

Bản thân Genom không gây bệnh. Sự nhân lên của virút đòi hỏi có hoạt động của enzym theo 2 hướng phiên âm và sao chép. Tổng hợp ARN (+) cùng lúc với ARN thông tin. Hạt virút được hình thành bằng cách nảy chồi từ tế bào túc chủ.

2.4. Cấu trúc Protein :

Hạt virút chứa trung bình 74% protein, 22% lipid; 3 carbon và 1 Nucleic acid.

Có 5 loại protein căn bản :

- Glycoprotein G có vỏ gai, mang tính kháng nguyên. Chính nó gây đáp ứng miễn dịch bảo vệ chống lại bệnh đại.
- Polypeptid N gắn liền vỏ Nucleocapsid.
- Hai protein M_1 và L có liên quan đến Nucleocapsid.
- Protein M_2 nằm ở vỏ ngoài bao bọc Glycoprotein G.

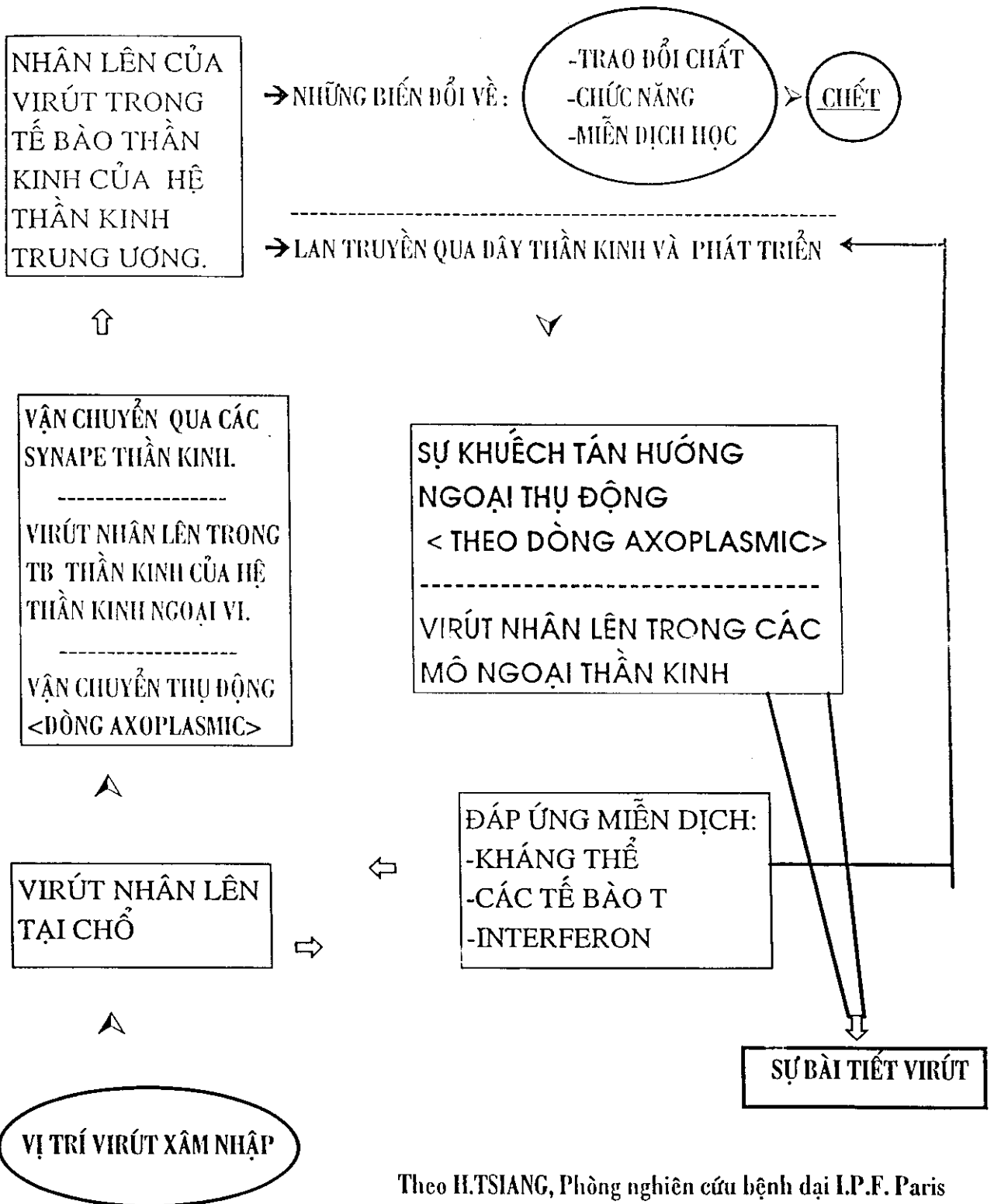
2.5. Các typ huyết thanh học :

Những virút thuộc giống Lysa từ lâu được xem như nhóm đồng dạng. Do đó có 4 nhóm huyết thanh được phát hiện :

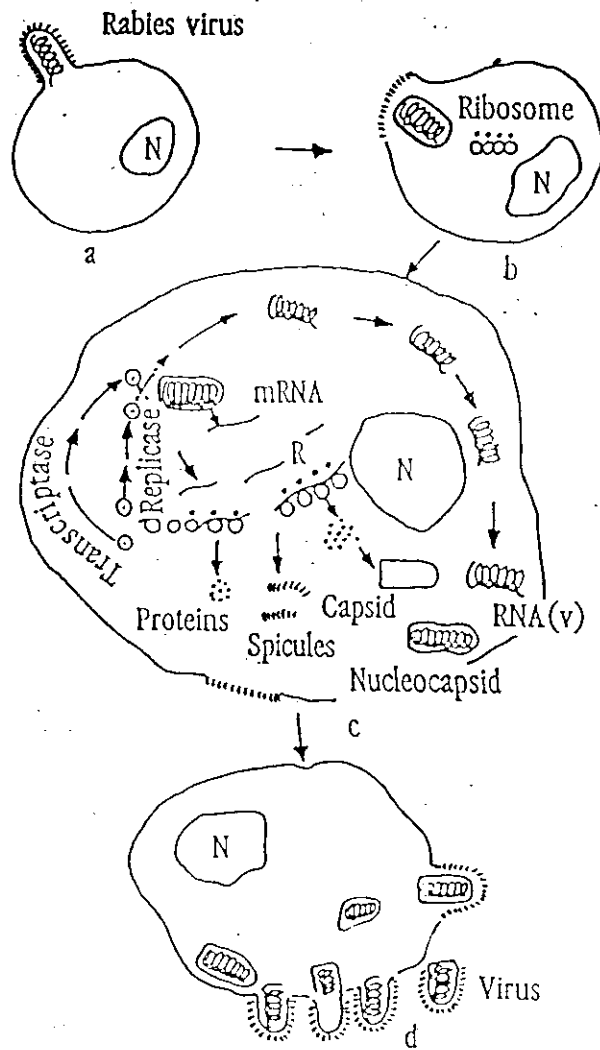
- Nhóm huyết thanh I : Có liên quan đến chủng CVS và khối lượng lớn chủng hoang dại tồn tại ở nhiều vùng trên thế giới.
- Nhóm huyết thanh II : Prototyp của nhóm huyết thanh II là virút Lagos. Nhóm huyết thanh này được phân lập từ não dơi ở Lagos.
- Nhóm huyết thanh III : Prototyp của nhóm huyết thanh III là Mokola virút. Virút này được phân lập ở phủ tạng người và chuột trù.
- Nhóm huyết thanh IV : Gồm nhiều chủng khác nhau được phân lập từ muỗi, ruồi và một số động vật có vú. Tại miền Nam Châu Phi chủng này được phân lập lần đầu tiên ở người và sau đấy tìm thấy ở dơi. Gần đây phân lập được ở châu Âu. Có mối quan hệ giữa bệnh đại với virút Lagos và virút Mokola.

2.6. Con đường lan truyền của virút trong cơ thể người :

Hình 2: CÁC GIAI ĐOẠN LAN TRUYỀN BỆNH ĐẠI



Theo H.TSIANG, Phòng nghiên cứu bệnh đại I.P.F. Paris



HÌNH 3 : Quá trình nhân lên của virút dại

Trong tự nhiên virút dại có ảnh hưởng lớn đến những động vật máu nóng. Hiện nay những hiểu biết về sinh bệnh học của dại rất rộng rãi nhờ các công trình nghiên cứu của Pasteur. Sau khi đưa virút dại vào máu, người ta đã phát hiện nó ở hệ thần kinh trung ương cũng như ở tủy sống. Khi động vật bị nhiễm, trước tiên virút nhân lên tại chỗ sau đó vào trong tế bào thần kinh ngoại vi, từ từ phát tán qua các synap rồi hướng về thần kinh trung ương. Mô thần kinh lúc này trở nên bị nhiễm virút. Từ đó hình thành quá trình phân bố virút trong não, tủy sống và các hạch. Virút đồng thời cũng xâm nhập vào các mô khác theo đường hướng ngoại, khống chế quá trình tiết dịch. Vì vậy có thể tìm thấy virút dại ở các tuyến nước bọt và trong nước bọt. Những triệu chứng nặng của bệnh này là do rối loạn chức năng của cơ chế hoạt động thần kinh. (Hình 2, 3).