

---

## RESEARCH AND TRIAL PRODUCTION OF SNAKE ANTIVENOMS *CALLOSELASMA RHODOSTOMA*

Nguyen Van Duoc<sup>1\*</sup>, Lam Thi Hue<sup>1</sup>, Vu Thi Thu Huong<sup>1</sup>, Duong Huu Thai<sup>1</sup>, Le Van Be<sup>1</sup>,  
Nguyen Phuong Vu<sup>1</sup>, Tran Dai Quang<sup>1</sup>, Le Phuong Lien<sup>1</sup>, Ta Nguyen Tuong Van<sup>1</sup>, Nguyen  
Ai Thuong<sup>1</sup>, Tran Ngoc Quy<sup>1</sup>, Pham Duc Anh<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Vaccines and Medical biologicals*

<sup>2</sup>*National Institute for Control of Vaccines and Biologicals*

*Received 02 May 2024*

*Accepted 25 June 2024*

**Abstract:** *Calloselasma rhodostoma* is extremely venomous snake species commonly found in Vietnam, with high mortality rates. Nowadays, the use of antivenom serum derived from animals is the unique therapy that is proven significantly for snakebite treatment. Serum obtained from horses immunized with *Calloselasma rhodostoma* venom had an average crude potency of 32,6 LD50/ml. Purification process using the enhanced Pope method, with the utilization of pepsin for serum hydrolysis to be obtained F(ab')<sub>2</sub> antibody and fractionation by ammonium sulfate precipitation combined with octanoic acid good results. The average potency of refined *Calloselasma rhodostoma* snake antivenom serum reached 125,78 LD50/ml, with purification efficiency of 43%. Three lots of finished *Calloselasma rhodostoma* snake antivenom serum (IVACAV-Cal) met all manufacturer's standards.

**Keywords:** *Calloselasma rhodostoma*, snake antivenom serum, antibody, F(ab')<sub>2</sub>.

---

\* Corresponding author

E-mail address: duocivac@yahoo.com.vn

<https://doi.org/10.56086/jcvb.v4i2.155>

## NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT THỦ NGHIỆM HUYẾT THANH TINH CHẾ KHÁNG NỌC RẮN CHÀM QUẠP

Nguyễn Văn Đước<sup>1\*</sup>, Lâm Thị Huệ<sup>1</sup>, Vũ Thị Thu Hương<sup>1</sup>, Dương Hữu Thái<sup>1</sup>, Lê Văn Bé<sup>1</sup>,  
Nguyễn Phương Vũ<sup>1</sup>, Trần Đại Quang<sup>1</sup>, Lê Phương Liên<sup>1</sup>, Tạ Nguyễn Tường Vân<sup>1</sup>, Nguyễn  
Ái Thuởng<sup>1</sup>, Trần Ngọc Quy<sup>1</sup>, Phạm Đức Anh<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Viện Vắc xin và Sinh phẩm y tế

<sup>2</sup>Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế

Nhận ngày 02 tháng 05 năm 2024

Chấp nhận đăng ngày 25 tháng 06 năm 2024

**Tóm tắt:** Rắn Chàm quạp (*Calloselasma rhodostoma*) là loài rắn cực độc, thường gặp ở Việt Nam, khi bị cắn tỷ lệ gây tử vong cao. Cho đến nay, sử dụng huyết thanh kháng nọc độc có nguồn gốc từ động vật là liệu pháp điều trị duy nhất đã được chứng thực về mặt khoa học để điều trị rắn cắn. Dùng nọc rắn Chàm quạp để gây miễn dịch cho ngựa theo phác đồ tiêm miễn dịch cơ bản và tiêm nhắc lại với liều tăng dần. Huyết tương thu từ ngựa đã gây miễn dịch với nọc rắn Chàm quạp có hiệu giá trung bình 32,6 LD50/ml. Huyết tương được tinh chế theo phương pháp Pope cải tiến, sử dụng pepsin thủy phân huyết tương để thu nhận phân đoạn kháng thể  $F(ab')_2$  và tủa phân đoạn bằng muối amoni sulfat có kết hợp với axit octanoic cho kết quả tốt, hiệu giá trung bình của huyết thanh kháng nọc rắn Chàm quạp tinh chế đạt 125,78 LD50/ml, hiệu suất quy trình tinh chế đạt 43 %. Sản xuất 3 lô huyết thanh kháng nọc rắn Chàm quạp thành phẩm (IVACAV-Cal) đạt tất cả các chỉ tiêu theo tiêu chuẩn chất lượng cơ sở.

**Từ khoá:** rắn Chàm quạp, huyết thanh kháng nọc rắn, kháng thể, phân đoạn kháng thể  $F(ab')_2$ .

### 1. Đặt vấn đề

Rắn độc cắn được Tổ chức Y tế thế giới (WHO) đánh giá là một trong 20 bệnh nhiệt đới bị lãng quên (Neglected Tropical Diseases - NTDs). Trong số gần 3900 loài rắn ghi nhận trên thế giới, có khoảng trên 650 loài là rắn độc chiếm khoảng 17%. Theo WHO mỗi năm trên thế giới ước tính có khoảng 5,8 tỷ người có nguy cơ bị rắn cắn, 50% trong số đó là rắn độc. Thực tế ghi nhận có ít nhất 1,8 – 2,7 triệu trường hợp bị

rắn cắn mỗi năm trên toàn thế giới, trong đó khoảng 400.000 người bị tàn tật vĩnh viễn và có khoảng 81.000 – 138.000 người tử vong do rắn độc cắn [1-3].

Việt Nam nằm trong vùng nhiệt đới với địa hình và khí hậu khác nhau giữa các miền Bắc, Trung, Nam. Từ đặc điểm tự nhiên đó đã tạo nên sự đa dạng sinh học ở nước ta, trong đó có khoảng 60 loài rắn độc trong tổng số khoảng 230 loài rắn được ghi nhận. Tai nạn do rắn độc cắn ước tính có khoảng

30 nghìn ca/năm ở Việt Nam với tỷ lệ tử vong do rắn độc cắn ở mức tương đối cao [2,4]. Rắn Chàm quạp là loài rắn cực độc, thường gặp ở Việt Nam, khi bị cắn tỷ lệ gây tử vong cao. Loài rắn trên được WHO xếp vào danh mục rủi ro ở mức tầm y tế quan trọng cao nhất (Highest medical importance) [2,5].

Trên nền tảng dữ liệu và thông tin về rắn cắn của WHO công bố năm 2020, rắn Chàm quạp có tên khoa học là *Calloselasma rhodostoma*, thuộc phân họ rắn có hố má Crotalinae, họ rắn Lục (Viperidae), sống trên cạn và phân bố chủ yếu ở Thái Lan, phía tây Malasia, Campuchia, Lào, Việt Nam và Indonesia. Dân số loài người trong phạm vi của loài rắn Chàm quạp là 318.685.340 người dân, chiếm 3,98 % dân số thế giới [5]. Bản chất độc tố của nọc rắn Chàm quạp thuộc nhóm giàu độc tố enzyme, các loại enzyme nọc rắn tác động trực tiếp lên lớp nội mạc mạch máu gây các triệu chứng lâm sàng là rất đau, sưng nề, và lan nhanh sang hạch vùng. Sau đó gây chảy máu vết cắn và xuất hiện bóng nước đa dạng tụ máu, khi vỡ gây chảy máu liên tục. Việc chậm trễ điều trị vết cắn do rắn Chàm quạp có thể đe dọa đến tính mạng, nó có thể để lại những di chứng dẫn đến tổn thương vĩnh viễn do nọc độc gây phá hủy mô cục bộ trên diện rộng ở bệnh nhân còn sống

[6,7]. Hiện nay, Việt Nam vẫn chưa sản xuất được huyết thanh kháng nọc rắn Chàm quạp.

Huyết thanh kháng nọc rắn (antivenom) là sinh phẩm chứa các globulin miễn dịch kháng nọc rắn có khả năng trung hòa đặc hiệu nọc rắn tương ứng, thu được từ động vật được gây miễn dịch với nọc rắn hoặc từ người bị rắn độc cắn trước đó, được tinh chế để lượng globulin đạt mức tinh khiết cần thiết theo quy định và để loại bỏ các protein không cần thiết [8]. Cho đến nay, sử dụng huyết thanh kháng nọc độc có nguồn gốc từ động vật là liệu pháp điều trị duy nhất đã được chứng thực về mặt khoa học để điều trị rắn cắn [9]. Do tính đặc hiệu kháng nguyên nọc rắn theo vùng địa lý, WHO khuyến cáo: mỗi quốc gia phải tự chế tạo huyết thanh kháng nọc rắn cho chính quốc gia mình.

Viện Vắc xin và Sinh phẩm y tế (IVAC) là đơn vị trong nước đã nghiên cứu sản xuất thành công 2 loại huyết thanh tinh chế kháng nọc rắn Hồ đất và rắn Lục tre đầu giò đuôi đỏ, cung cấp cho các bệnh viện trên toàn quốc trong gần 20 năm nay. Huyết thanh kháng nọc rắn là chế phẩm globulin miễn dịch đặc hiệu, khi sử dụng cho bệnh nhân bị rắn cắn sẽ trung hòa độc tố của nọc rắn, giúp nạn nhân thoát khỏi tình trạng nguy kịch đe dọa tính mạng, hồi phục điều trị nhanh.

Nhằm phát triển chế phẩm điều trị đặc hiệu phục vụ nhu cầu cấp cứu, điều trị nạn nhân bị rắn Chàm quạp cắn, chúng tôi tiến hành: “Nghiên cứu sản xuất thử nghiệm huyết thanh tinh chế kháng nọc rắn Chàm quạp”.

## 2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Đối tượng, thời gian, địa điểm nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu: quy trình sản xuất kháng huyết thanh nọc rắn Chàm quạp.
- Địa điểm: Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế.
- Thời gian: từ tháng 08/2020 – tháng 11/2021.

### 2.2. Vật liệu, hoá chất

- Máy móc, thiết bị chính: tủ ấm, tủ mát, tank inox 2 vỏ, hệ thống lọc tiếp tuyến (TFF), máy ly tâm lạnh, máy khuấy từ, bơm chân không, máy lắc, hệ thống lọc, bộ điện di, máy quang phổ kế, .... Tất cả các máy móc, thiết bị còn hạn thẩm định, chuẩn định và bảo dưỡng.
- Động vật thí nghiệm: ngựa, thỏ, chuột lang, chuột nhắt trắng được cung cấp bởi Trại Chăn nuôi Suối Dầu, IVAC.
- Kháng nguyên (nọc rắn): nọc rắn Chàm quạp (nguồn từ Phan Thiết – Bình Thuận, IVAC).
- Hoá chất chính: pepsin, amonium sulfat, acid octanoic, sodium chloride, sodium hydroxide, aluminum chloride, acid hydrochloric, ...

- Dụng cụ: chai thuỷ tinh, tube nhựa, kẹp, pipet các loại, đầu côn các loại, bơm kim tiêm các loại, ....

### 2.3. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.3.1. Xác định độc lực của nọc rắn

Xác định độc lực (LD50) bằng phương pháp Spearman – Kärber trên chuột nhắt trắng.

#### 2.3.2. Gây miễn dịch trên ngựa

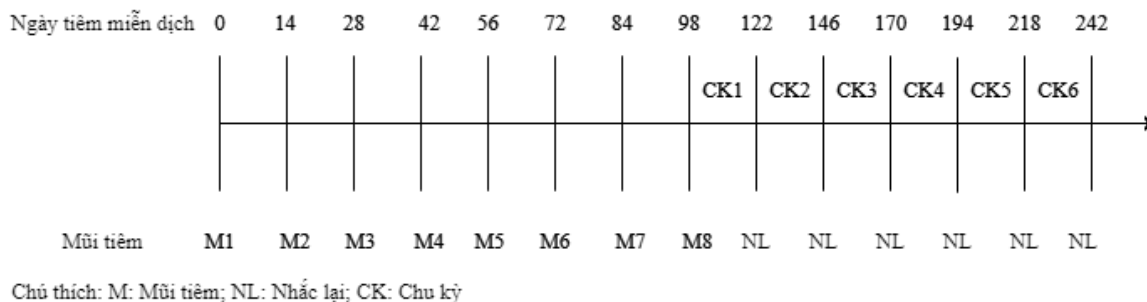
Dựa vào quy trình gây miễn dịch trên động vật thí nghiệm thỏ và các quy trình gây miễn dịch khai thác huyết tương kháng nọc rắn Hồ đất/Lục tre đang áp dụng tại IVAC để thiết kế phác đồ gây miễn dịch.

Ngựa sử dụng trong nghiên cứu: yêu cầu ngựa khi sử dụng để sản xuất huyết thanh thô phải có sức khỏe tốt, ngực rộng, mông nở, nhanh nhẹn, hoạt bát, màu lông bóng mượt, chiều cao  $\geq 1,2$  m; trọng lượng  $\geq 210$  kg; tuổi  $\geq 3$  tuổi; không bị dị tật; không bị bệnh ngoài da; hồng cầu từ  $6,0 \div 9,0$  triệu/  $\text{mm}^3$ ; bạch cầu từ  $6,0 \div 12,0$  ngàn/  $\text{mm}^3$ ; hematocrit trong khoảng  $25 \div 46\%$ ; ngựa đực được cắt bỏ tinh hoàn; ngựa cái không mang thai; ngựa trước khi đưa vào sản xuất huyết thanh thô đã được tiêm phòng 3 mũi vaccine uốn ván và nuôi hậu bị từ  $3 \div 6$  tháng.

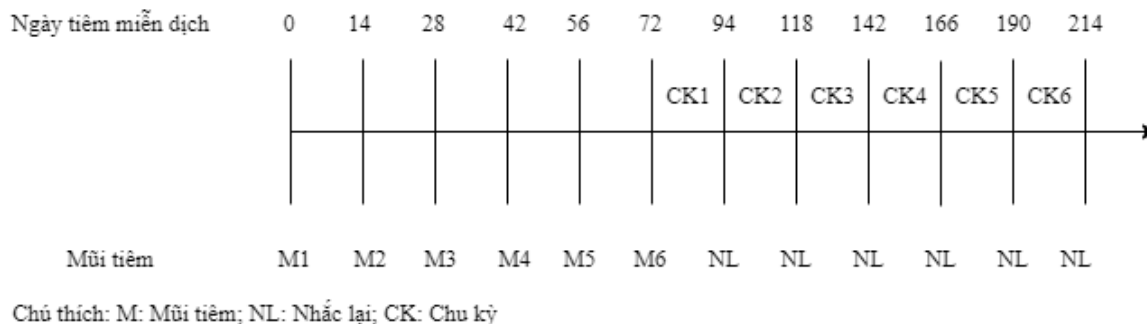
**Bảng 1. Thiết kế phác đồ gây miễn dịch**

Phác đồ gây miễn dịch	Số ngựa	Miễn dịch cơ bản			Miễn dịch nhắc lại		
		Số mũi tiêm	Liều tiêm (LD50/kg)	Khoảng cách (ngày)	Số mũi tiêm	Liều tiêm (LD50/kg)	Khoảng cách (ngày)
1	2	8	0,1;0,2;0,3;0,5;0,7;1,0;1,3;1,5	14	1	0,2	24
2	2	6	0,2;0,5;0,7;1,0;1,5;2,0	14	1	0,2	24
3	3	6	0,2;0,5;0,7;1,0;1,5;2,0	14	3	0,1;0,3;0,7	24/7

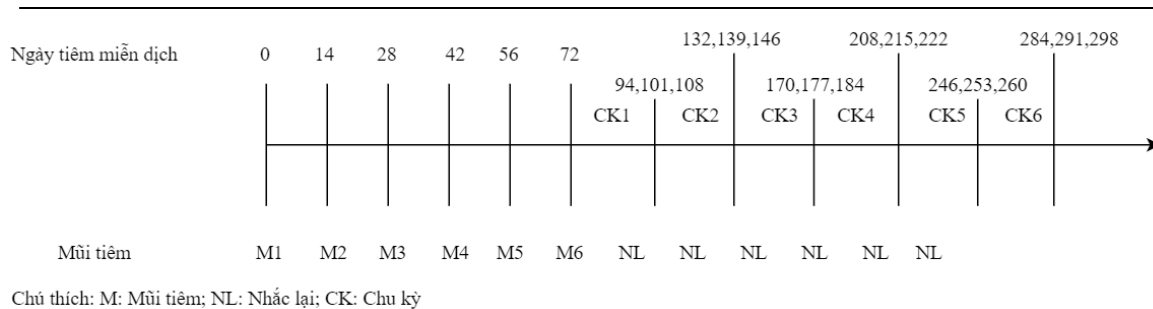
**Phác đồ gây miễn dịch:**



**Hình 1. Phác đồ gây miễn dịch 1**



**Hình 2. Phác đồ gây miễn dịch 2**



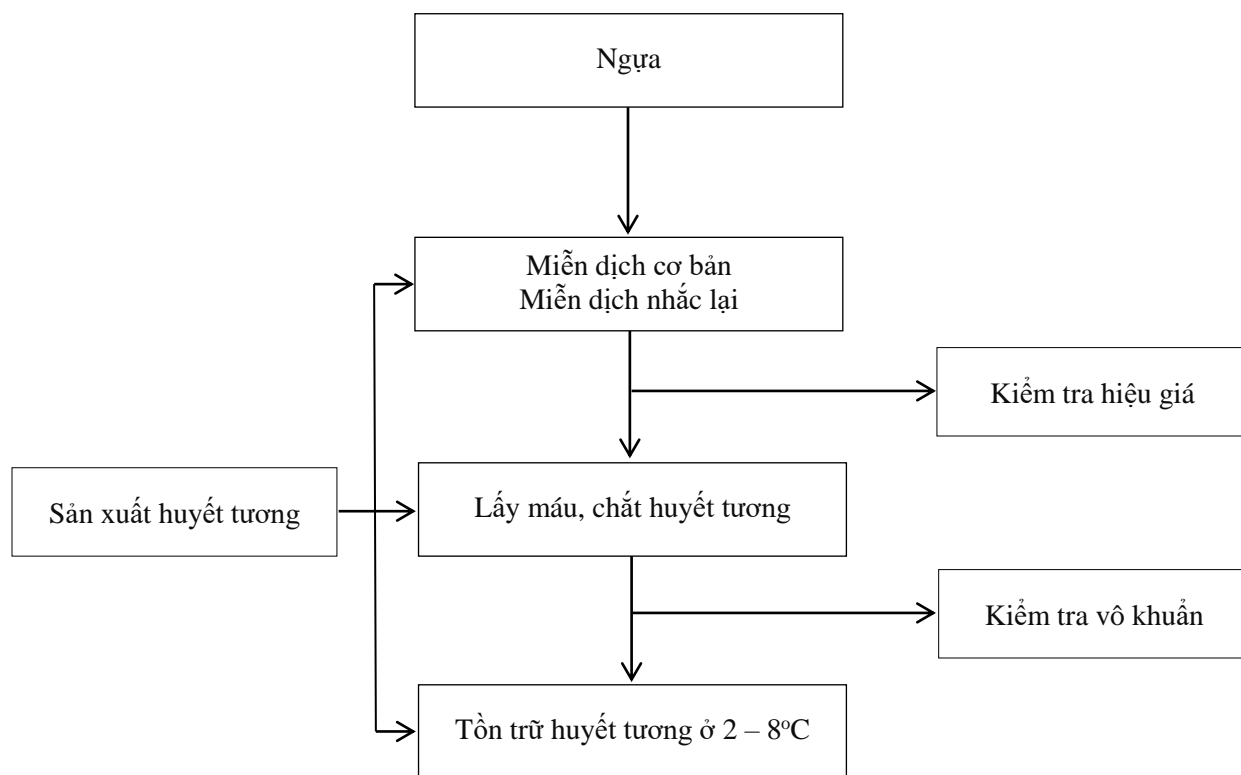
**Hình 3. Phác đồ gây miễn dịch 3**

Sau mỗi giai đoạn miễn dịch: đánh giá sức khỏe ngựa (quan sát tại chỗ tiêm, thể trạng ngựa, hematocrit), lấy máu kiểm tra hiệu giá để đánh giá khả năng đáp ứng miễn dịch của ngựa, so sánh giữa các nhóm và lựa chọn phác đồ miễn dịch hiệu quả nhất đưa vào quy trình khai thác huyết thanh thô.

**2.3.3. Khai thác huyết thanh thô**

Với quy trình khai thác huyết thanh thô, lượng máu lấy ra mỗi lần là 1,2% trọng lượng cơ thể ngựa. Lặp lại và khai thác các chu kỳ tiếp theo.

Quy trình khai thác huyết thanh thô:



**Hình 4. Sơ đồ khai thác huyết thanh thô (huyết tương)**

### 2.3.4. Quy trình tinh chế huyết thanh kháng nọc rắn

Áp dụng quy trình tinh chế huyết thanh kháng nọc rắn theo phương pháp Pope cải tiến gồm: pha loãng huyết tương, thủy phân huyết tương bằng pepsin, tủa phân đoạn bằng muối amonium sulfat để loại bỏ albumin và protein tạp, thẩm tích trao đổi loại bỏ  $SO_4^{2-}$  và cô đặc, hấp phụ và ly tâm, làm đẳng trương, lọc vô trùng. Kiểm soát các thông số quy trình ở mỗi công đoạn: nồng độ, pH, nhiệt độ, thời gian. Lấy mẫu kiểm tra chất lượng.

#### **Khảo sát quy trình tinh chế:**

Cỡ mẫu: 3 lô, 10 lít huyết thanh thô/lô.

Tiêu chí đánh giá: tính phù hợp các thông số quy trình hiện tại và chất lượng sản phẩm, sơ bộ tính hiệu suất.

**Quy trình tinh chế:** là quy trình rút ra được sau khi áp dụng quy trình tinh chế huyết thanh kháng nọc rắn hiện áp dụng tại IVAC trên 3 lô huyết thanh với quy mô 10 lít/ lô ở trên.

Cỡ mẫu: 3 lô, 100 lít huyết thanh thô/lô.

Đánh giá: đánh giá chất lượng sản phẩm (vô trùng, an toàn, hiệu giá, protein, độ sạch), hiệu suất tinh chế để đánh giá tính ổn định của quy trình.

### 2.3.5. Phương pháp đánh giá chất lượng

Thực hiện các phương pháp kiểm tra chất lượng theo Dược điển Việt Nam V (2018) về các chỉ tiêu vô trùng, an toàn, chỉ nhiệt tố, hiệu giá, nhận dạng, độ tinh sạch và hoá học (pH, protein, muối, merthiolate, thể tích,...).

Tiêu chuẩn chất lượng: được xây dựng tiêu chuẩn chất lượng cơ sở phù hợp với tiêu chuẩn ĐDVN V (2018).

### 2.3.6. Phương pháp xử lý số liệu

Xử lý số liệu bằng excel.

Sử dụng phân tích phương sai một yếu tố (ANOVA – single factor) để đánh giá sự khác biệt hiệu giá kháng thể đặc hiệu giữa các nhóm ngựa.

## 3. Kết quả

### 3.1. Kết quả xác định độc lực của nọc rắn

**Bảng 2. Kết quả đánh giá độc lực của 8 lô nọc rắn Chàm quạp tươi**

Lô số	Thể tích (ml)	Hàm lượng protein (mg/ml)	Độc lực ( $\mu\text{g protein}/1\text{LD}_{50}$ )
0120	9,0	227,6	77,10
0220	11,5	289,0	106,44
0320	12,0	293,0	97,08
0420	14,0	232,7	86,52

0121	14	294,4	101,65
0221	12	244,5	86,52
0321	12	235,9	84,55
0421	12	260,0	88,54
Trung bình	12	259,6	91,10



Hình 5. Triệu chứng chuột chết khi nhiễm độc nọc rắn Chàm quạp

### 3.2. Kết quả gây miễn dịch trên ngựa

Bảng 3. Đánh giá tình trạng sức khỏe ngựa sau 6 chu kỳ gây miễn dịch

Phác đồ gây miễn dịch		1		2		3		
Ngựa số		926	930	925	934	989	990	994
Trọng lượng (kg)		242	232	250	256	242	212	229
Chu kỳ 1	Thể trạng	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT
	Vị trí tiêm (áp xe)	nặng	nặng	nặng	nặng	nặng	nặng	nặng
	Htc (%)	31	27	21	22	28	29	32
Chu kỳ 2	Thể trạng	BT	BT	SN	SN	BT	BT	BT
	Vị trí tiêm (áp xe)	nặng	nhẹ	nhẹ	nhẹ	nhẹ	nặng	nặng
	Htc (%)	30	32	28	27	26	26	22
Chu kỳ 3	Thể trạng	BT	BT	BT	BT	SN	BT	SN
	Vị trí tiêm (áp xe)	nhẹ	nhẹ	nhẹ	nhẹ	nhẹ	nặng	nặng
	Htc (%)	36	37	30	25	26	30	29
Chu kỳ 4	Thể trạng	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT
	Vị trí tiêm (áp xe)	nhẹ	nhẹ	nhẹ	nặng	nặng	nặng	nhẹ
	Htc (%)	35	40	33	25	27	32	28



Chu kỳ 5	Thể trạng	BT	BT	BT	BT	BT	SN	BT
	Vị trí tiêm (áp xe)	nặng	nhẹ	nhẹ	nhẹ	nặng	nặng	nhẹ
	Htc (%)	36	34	31	29	30	29	28
Chu kỳ 6	Thể trạng	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT
	Vị trí tiêm (áp xe)	nhẹ	nhẹ	nặng	nhẹ	nhẹ	nặng	nặng
	Htc (%)	39	40	34	34	29	27	29

Ghi chú: Htc – chỉ số các tế bào hồng cầu trong máu; BT: bình thường; SN: sốt nhẹ (38,5 – 39,0); Áp xe nặng: sưng to, tạo mủ; áp xe nhẹ: sưng nhỏ hoặc viêm không đáng kể.

**Bảng 4. Kết quả hiệu giá kháng thể kháng nọc rắn Chàm quạp qua 6 chu kỳ**

Phác đồ gây miễn dịch	Ngựa số	Hiệu giá kháng thể (LD50/ml)						Trung bình (LD50/ml)
		CK1	CK2	CK3	CK4	CK5	CK6	
1	926	16,0	14,6	16,2	17,3	28,7	29,0	19,8
	930	30,3	14,6	16,2	14,6	15,9	23,8	
2	925	15,9	16,0	17,3	17,6	29,6	38,1	21,8
	934	17,3	16,0	20,5	22,7	26,4	24,3	
3	989	18,7	28,0	35,0	22,9	25,8	34,6	28,7
	990	16,6	18,4	26,4	38,1	31,6	48,4	
	994	16,6	25,7	24,2	22,9	41,8	40,9	

### 3.3. Kết quả khai thác huyết tương

**Bảng 5. Kết quả khai thác huyết tương kháng nọc rắn Chàm quạp từ chu kỳ 7 đến chu kỳ 14 (8 chu kỳ)**

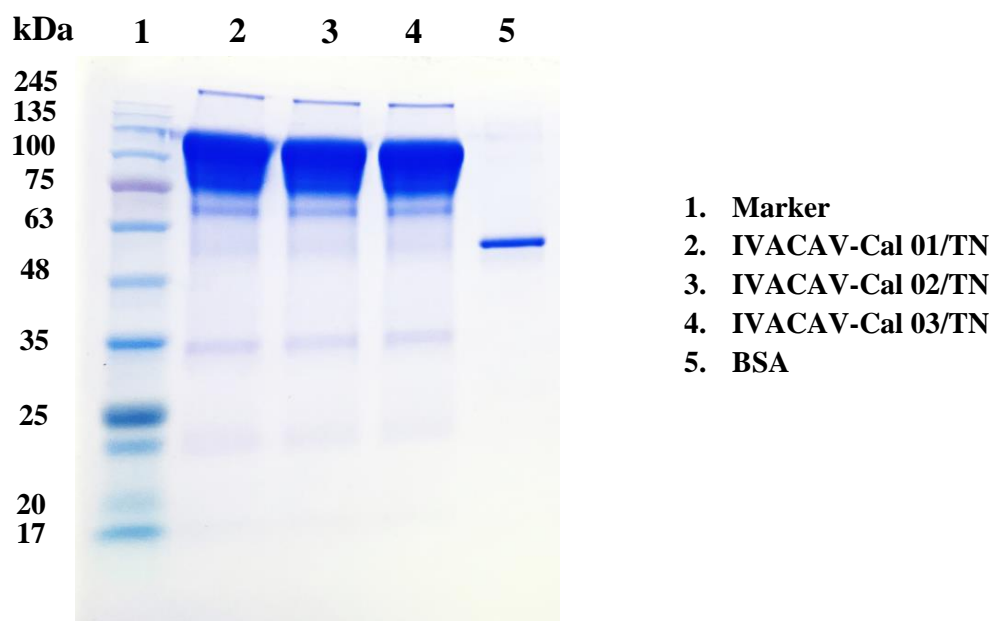
Nhóm ngựa	Số lượng huyết tương (lít)	Hiệu giá trung bình (LD50/ml)	Kết quả kiểm tra vô khuẩn
1	98,4	29,3	Đạt
2	97,4	35,4	Đạt
3	125,7	33,1	Đạt
Kết quả	Tổng: 321,5	Trung bình: 32,6	Đạt

### 3.4. Kết quả tinh chế huyết thanh

**Bảng 6. Kết quả kiểm tra một số chỉ tiêu chất lượng huyết thanh sau tinh chế thử nghiệm**

TT	Chỉ tiêu	Kết quả		
		SAV-Cal-01/TN	SAV-Cal-02/TN	SAV-Cal-03/TN

1	Cảm quan	Có màu vàng nhạt, trong suốt	Có màu vàng nhạt, trong suốt	Có màu vàng nhạt, trong suốt
2	Protein (mg/ml)	96,42	103,47	110,85
3	Hiệu giá tinh chế (LD50/ml)	120,22	137,25	119,87
4	Hiệu suất tinh chế (%)	42,83	43,35	44,58
5	Độ tinh sạch	Không phát hiện có band albumin hình ảnh điện di SDS-PAGE		



Hình 6. Hình ảnh điện di SDS PAGE các lô huyết thanh kháng nọc rắn Chàm quạp

### 3.5. Kết quả huyết thanh tinh chế kháng nọc rắn thành phẩm

Bảng 7. Kết quả kiểm định 3 lô thành phẩm huyết thanh kháng nọc rắn Chàm quạp

TT	Chỉ tiêu	Kết quả		
		IVACAV-Cal 001-00-21	IVACAV-Cal 002-00-21	IVACAV-Cal 003-00-21
1	Cảm quan	Đạt	Đạt	Đạt
2	Vô khuẩn	Đạt	Đạt	Đạt
3	pH	6,56	6,54	6,58
4	Nhận dạng	Đạt	Đạt	Đạt
5	Hiệu giá (LD50/lọ)	620,59	616,23	617,58

6	Protein tổng số (mg/ml)	110,91	109,30	129,48
7	Merthiolate	0,0090%	0,0091%	0,0088%
8	Hàm lượng Natri clorid	0,85%	0,87%	0,86%
9	An toàn chung	Đạt	Đạt	Đạt
10	Chất gây sốt	Đạt	Đạt	Đạt



Hình 7. Thành phẩm IVACAV-Cal 001-00-21

#### 4. Bàn luận

Độc lực tính theo hàm lượng protein của 8 lô nọc rắn Chàm quạp dao động từ 77,1  $\mu\text{g}/1\text{LD}_{50}$  đến 106,4  $\mu\text{g}/1\text{LD}_{50}$  (bảng 2). Sự biến động độc lực giữa các lô nọc có thể do điều kiện khai thác nọc như: khai thác nọc sau khi cho rắn ăn, mùa lấy nọc, cũng như số lượng cá thể đực cái trong quá trình lấy nọc,... Tính trung bình độc lực của 8 lô nọc đạt 91,10  $\mu\text{g}/1\text{LD}_{50}$  tương đương 4,56 mg/kg. Kết quả phù hợp với công bố của Reid và cộng sự (1968), liều gây chết trung bình của nọc rắn Chàm quạp qua đường tĩnh mạch ( $\text{LD}_{50}$ ) của nọc độc là 4,6 mg/kg ở chuột nhắt trắng [10]. Điều này cho thấy

chất lượng nọc rắn Chàm quạp chúng tôi thu được không có sự khác biệt so với nọc rắn cùng chủng loại thu được ở Malaysia được công bố.

Trong quá trình đánh giá độc lực của nọc rắn, chúng tôi cũng tiến hành theo dõi các triệu chứng nhiễm độc của nọc rắn Chàm quạp trên chuột. Hình 5 cho thấy độc tố của nọc rắn đã gây tác dụng tại chỗ sau khi tiêm vào tĩnh mạch đuôi với liều lượng lớn, gây hiện tượng sưng cục bộ, xung huyết và chảy máu ở vị trí tiêm, tiếp theo gây chảy máu mũi, miệng và hốc mắt, sau đó xảy ra hiện tượng xuất huyết toàn thân và tử vong. Ở liều tiêm với hàm lượng độc tố thấp hơn

thì xảy ra hiện tượng sốc toàn thân và co giật sau đó tùy vào liều lượng mà chuột có thể sống trở lại hoặc tử vong sau 48 giờ. Các triệu chứng này cũng phù hợp với công bố của Tan và cộng sự (1996) [11].

Dựa trên cơ sở độc lực của nọc rắn sau khi được đánh giá, chúng tôi xây dựng các liều tiêm miễn dịch khác nhau trên thỏ để đánh giá khả năng dung nạp nọc rắn và đáp ứng miễn dịch của thỏ với nọc rắn Chàm quạp. Và dựa vào các quy trình gây miễn dịch khai thác huyết tương kháng nọc rắn Hồ đất/Lục tre đang áp dụng tại IVAC thiết kế phác đồ gây miễn dịch nọc rắn Chàm quạp trên ngựa để sản xuất huyết thanh kháng nọc rắn Chàm quạp.

Kết quả gây miễn dịch trên ngựa cho thấy: sau khi kết thúc chu kỳ 1 tất cả ngựa được gây miễn dịch với kháng nguyên nọc rắn Chàm quạp đều xuất hiện áp xe nặng do phải tiêm liên tục nhiều mũi tiêm, mặt khác do ngựa chưa thích ứng với việc tiêm kháng nguyên, cơ thể chưa có kháng thể bảo vệ. Ngoài ra, nhóm ngựa gây miễn dịch theo phác đồ 3 sử dụng nhiều mũi tiêm hơn, liều tiêm cao hơn, do đó áp xe trên ngựa ở nhiều vị trí hơn, và mức độ nặng hơn so với các nhóm ngựa khác. Chỉ số Htc có giảm sau khi tiêm kháng nguyên ở một số chu kỳ đầu là do nọc rắn Chàm quạp chứa các enzym gây tan máu, nên làm cho số lượng hồng cầu trong

máu bị giảm. Tuy nhiên sức khỏe của tất cả ngựa đều ổn định, có một số con sốt nhẹ sau khi tiêm kháng nguyên nhưng nhanh chóng hồi phục, đặc biệt là không có ngựa chết trong 6 chu kỳ gây miễn dịch (bảng 3). Kết quả hiệu giá kháng thể (bảng 4) qua 6 chu kỳ gây miễn dịch, tại chu kỳ 1 hiệu giá kháng thể trung bình của phác đồ 1 cao hơn phác đồ 2 và phác đồ 3, từ chu kỳ 2 đến chu kỳ 6, phác đồ 2 có hiệu giá kháng thể trung bình luôn cao hơn phác đồ 1 và thấp hơn so với phác đồ 3. Phân tích ANOVA 1 yếu tố cho thấy, không có sự khác biệt hiệu giá kháng thể trung bình giữa phác đồ 2 so với phác đồ 1 ( $p = 0,541522$ ) và phác đồ 2 so với phác đồ 3 ( $p = 0,131709$ ); tuy nhiên hiệu giá kháng thể trung bình của phác đồ 3 cao hơn phác đồ 1 có ý nghĩa thống kê ( $p = 0,042884$ ). Từ các kết quả thu nhận được ở trên, ta thấy cả 3 phác đồ gây miễn dịch đều không gây ảnh hưởng lớn đến sức khỏe của ngựa, bằng chứng là tình trạng sức khỏe của cả 7 ngựa gây miễn dịch đều ổn định qua 6 chu kỳ gây miễn dịch. Tuy nhiên, việc kiểm tra hiệu giá kháng thể và qua so sánh giữa các phác đồ gây miễn dịch cho thấy phác đồ 3 cho kết quả cao nhất. Do đó, lựa chọn phác đồ 3 để gây miễn dịch, khai thác huyết thanh kháng nọc rắn Chàm quạp.

Sau khi lựa chọn được phác đồ gây miễn dịch, tiếp tục gây miễn dịch theo chu kỳ và

khai thác huyết tương. Bảng 5 thể hiện lượng huyết tương khai thác được trong 8 chu kỳ (từ chu kỳ 7 đến chu kỳ 14), huyết tương có màu vàng rom; không bị vẩn đục; không vật lạ; sánh keo; có một lớp mỏng dưới đáy bình. Huyết tương đạt tiêu chuẩn vô trùng (không có sự phát triển của vi khuẩn/nấm sau 14 ngày theo dõi). Hiệu giá kháng thể của các nhóm ngựa đều giữ ở mức ổn định, hiệu giá trung bình 32,6 LD50/ml. Tất cả lượng huyết tương thu được đạt tiêu chuẩn để đưa vào tinh chế.

Chúng tôi áp dụng quy trình tinh chế hiện tại (quy trình tinh chế Lục tre/Hổ đất) theo phương pháp Pope cải tiến với 7 công đoạn và 25 thông số kỹ thuật kiểm soát quy trình trong quá trình sản xuất. Huyết thanh kháng nọc rắn Chàm quạp có hiệu giá tinh chế trung bình đạt 125,78 LD50/ml; hiệu suất đạt khoảng 43 %. Tất cả các lô đều đạt yêu cầu độ tinh sạch. Như vậy, kết quả kiểm tra chất lượng sản phẩm của 3 lô huyết thanh tinh chế thử nghiệm mỗi loại cho thấy sự tương đồng về chất lượng giữa các lô; trên cơ sở tham khảo tiêu chuẩn chấp nhận của huyết thanh kháng nọc rắn Lục tre/ Hổ đất, chúng tôi nhận thấy cả 5 chỉ tiêu về cảm quan, protein, hiệu giá, hiệu suất và độ tinh sạch của quy trình có tính ổn định và phù hợp để tinh chế huyết thanh kháng nọc rắn Chàm quạp.

Từ các loạt huyết thanh kháng nọc rắn tinh chế, sản xuất 3 lô huyết thanh kháng nọc rắn Chàm quạp thành phẩm (IVACAV-Cal), hiệu giá > 500 LD50/lọ; đạt tất cả các chỉ tiêu kiểm tra theo tiêu chuẩn cơ sở và đã nhận chứng nhận chất lượng của Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế.

## 5. Kết luận

Chúng tôi đã nghiên cứu, sản xuất thử nghiệm thành công huyết thanh tinh chế kháng nọc rắn Chàm quạp; đạt tất cả các chỉ tiêu kiểm tra theo tiêu chuẩn cơ sở và được Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế cấp Chứng nhận chất lượng sản phẩm. Đây là tiền đề để Viện Vắc xin và Sinh phẩm y tế thiết lập sản xuất trên quy mô công nghiệp, hướng tới thương mại hóa sản phẩm.

## Tài liệu tham khảo

- [1] WHO (2019), “Snakebite envenoming: a strategy for prevention and control”.
- [2] Kasturiratne A. et al. (2008), “The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths”, PLoS Med 5(11): e218.doi10.1371/journal.pmed.0050218

- [3] WHO, "Snakebite Information and Data Platform",  
<https://www.who.int/teams/control-of-neglected-tropical-diseases/snakebite-envenoming/snakebite-information-and-data-platform> (Accessed: 03 April 2024)
- [4] "Rắn độc Việt Nam: Đa dạng loài, tầm quan trọng trong nghiên cứu và quản lý tai nạn rắn độc cắn ở Việt Nam",  
<https://vast.gov.vn/tin-chi-tiet/-/chi-tiet/lop-hoc-cong-chung-ran-%C4%91oc-viet-nam-%C4%91a-dang-loai-tam-quan-trong-trong-nghien-cuu-va-quan-ly-tai-nan-ran-%C4%91oc-can-o-viet-nam--111816-463.html>  
(Accessed: 03 April 2024)
- [5] WHO, "Expert Derived Snake Distributions",  
[https://snbdatainfo.who.int/?data\\_id=dataSource10-187d5a34599-layer-4%3A105](https://snbdatainfo.who.int/?data_id=dataSource10-187d5a34599-layer-4%3A105) (Accessed: 03 April 2024)
- [6] Ho M. et al. (1986), "Clinical significance of venom antigen levels in patients envenomed by the Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*)", *Am J Trop Med Hyg.* 35 (3), pp. 579-587.
- [7] Wongtongkam N. et al. (2005), "A study of 225 Malayan pit viper bites in Thailand", *Mil Med.* 170 (4), pp. 342-348.
- [8] WHO (2010), "Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins".
- [9] Gutiérrez J. M. et al. (2017), "Preclinical Evaluation of the Efficacy of Antivenoms for Snakebite Envenoming: State-of-the-Art and Challenges Ahead", *Toxins (Basel)*. 9 (5).
- [10] Reid H. A. (1968), "Symptomatology, pathology, and treatment of land snake bite in India and Southeast Asia", *Venomous animals and their venoms*, Elsevier, pp. 611-642.
- [11] Tan N. H. et al. (1996), "The Toxinology of *Calloselasma Rhodostoma* (Malayan Pit Viper) Venom", *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*. 15 (1), pp. 1-17.