

STUDIES ON PREPARATION OF ANTICERA FOR TREATMENT OF ANIMAL LEPTOSPIROSIS

(Summary)

The polyvalent specific anticera against leptospirosis have been produced from horses and satisfy to standards for sterilization, safety and high effectivity.

The product has antibody titer from 1/75,000 to 1/80,000, it completely neutralizing respective leptospira strain on tested animals. The anticera have been tested for safety on regional scale in pig and used for treatment of 1,110 infeted pigs and realies 98.40% recovery rate.

Anticera can be kept at temperature 0-8°C for 36 months. At room temperature can be kept for 18 months.

CHUẨN ĐỘ VIRUS ĐẠI BẰNG PHƯƠNG PHÁP NGỪNG KẾT HỒNG CẦU

NGUYỄN THU HỒNG, NGUYỄN THÚY DUYÊN và CTV

BẢNG 1. Hiệu giá kháng nguyên đại được tinh chế bằng 2 phương pháp khác nhau.

Lần TN	Phương pháp	Hiệu giá NKHC (UHA*/0,05)	
		Protamin sulfat	Sacaro-axeton
1		64	16
2		256	32
3		128	128
4		256	64
5		512	256

* Unités hemagglutinantes

không có những "nhân tố ức chế", vì thế chiết suất kháng nguyên nhằm tách được phân virus mang hoạt tính NKHC. Kết quả tinh chế kháng nguyên được ghi trong bảng 1.

Qua bảng cho thấy, các lô kháng nguyên chế theo 2 phương pháp đều đạt tiêu chuẩn sử dụng theo quy định của OMS: Kháng nguyên ít nhất phải có hiệu giá 320UHA/1ml tức 1:16/0,05ml. Kháng nguyên chế theo phương pháp Protamin sulfat dễ thực hiện, cho hiệu giá cao hơn (64-512UHA) nhưng không chủ động về nguồn hoá chất ngoại nhập. Chế theo phương pháp Sacaro-axeton tuy hiệu giá kháng nguyên có thấp hơn (16-256UHA) nhưng có thể dùng tốt cho các loại phản ứng huyết thanh học Invitro khác. Hoá chất lại có sẵn, dễ tìm.

b) *Nghiên cứu dung dịch pha chế kháng nguyên do hiệu giá HA cao:* Dung dịch pha chế virus và độ pH ảnh hưởng rất lớn đến hiệu giá kháng nguyên. Chúng tôi đã dùng 1 số dung dịch pha chế như: Borat và PBS có độ pH khác nhau cuối cùng đã chọn được 2 loại dung dịch cho kết quả ổn định là Borat pH 9,0 và PBS pH 8,0 và dùng nó pha chế kháng nguyên. Kết quả dùng cho thấy, kháng nguyên được pha chế bằng dung dịch Borat pH 9,0 cho hiệu giá UHA cao hơn rõ rệt (64 - 512UHA) trong khi đó dung dịch PBS pH 8,0 (8-64) cao nhất cũng chỉ đạt được 64 UHA.

c) *Kháng nguyên chế từ các tổ chức nuôi cấy virus khác nhau:* Hiện nay, kháng nguyên có thể chế từ các tổ chức nuôi cấy virus khác nhau: Trên não chuột, trên các loại tế bào...

Trong thí nghiệm của chúng tôi, các tổ chức não chuột ố, phổi gà, tế bào phổi gà BHK được gây nhiễm virus F.HEP, sau đó tiến hành chuẩn độ hiệu giá kháng nguyên bằng phương pháp NKHC ngưng. Kết quả qua 3 thí nghiệm cho thấy, ở lần TN thứ nhất, hiệu giá NKHC (UHA/0,05ml) trên não chuột là 256, còn tế bào BHK và phổi gà đều là 8; lần TN2, hiệu giá NKHC (UHA/0,05ml) trên não chuột là 128, tế bào BHK là 16 và phổi gà là 4. Lần TN3, trên não chuột là 512, tế bào là 32 và phổi gà là 16.

d) *Chủng virus được sử dụng để chế kháng nguyên:* Theo tài liệu, tất cả các chủng virus đại đều có thể sử dụng để chế kháng nguyên NKHC (chủng CVS, HEP, Pitman Moore, v.v.) nhưng vì lý do an toàn người ta thường khuyên dùng chủng virus

Virus đại có khả năng gây ngưng kết hồng cầu (NKHC) ngưng trong điều kiện virus được tách ra khỏi những "nhân tố ức chế" và chỉ xảy ra ở nhiệt độ, pH nhất định. Trên cơ sở đó, phản ứng NKHC được xây dựng để phát hiện và chuẩn độ virus trong hỗn dịch chứa virus. Virus NKHC còn được dùng làm kháng nguyên trong phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu (UCNKHC) vì lượng nhằm phát hiện kháng thể của quần thể động vật sau khi tiêm phòng đại, hoặc bị nhiễm virus đại.

Dựa vào nguyên lý trên, chúng tôi tiến hành đề tài này nhằm tìm được một phương pháp đơn giản có thể phát hiện và chuẩn độ virus trong các sản phẩm nghiên cứu và sản xuất.

I. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu: Chủng virus: Flury HEP và Flury LEP do Viện Pasteur - Paris cung cấp được giữ tại Trung tâm nghiên cứu bệnh đại và ĐVND. Trứng gà có phôi, chuột bạch ố, chuột lang, chuột bạch chồi, ngỗng, gà con mới nở... các loại tế bào phổi gà, tế bào BHK. Các dung dịch chống đông và bảo quản hồng cầu, dung dịch pha kháng nguyên và dung dịch pha hồng cầu với các pH khác nhau.

Phương pháp: Tinh thể kháng nguyên bằng phương pháp chiết suất bằng Sacaro-axeton: Nghiền não chuột đã gây nhiễm virus đại chủng F.HEP và pha thành hỗn dịch 20% trong dung dịch sacaro 8,5%. Xử lý axeton 2 lần (theo tỷ lệ 1:20). Mỗi lần khuấy đều để lắng 10 phút, bỏ nước nổi, thu hoạch cặn. Làm khô cặn thành dạng bột bằng máy hút chân không. Hoà tan trong đệm Borat pH 9,0. Lắc đều, để ở lạnh 4°C 18-24 giờ. Ly tâm lạnh 10.000 vòng/phút trong 1 giờ. Thu hoạch nước trong ở trên là kháng nguyên.

Tinh chế kháng nguyên bằng phương pháp xử lý Protamin sulfat: Virus đại được chế tạo thành hỗn dịch 20% trong dung dịch Borat pH 9,0. Ly tâm 5000 vòng/30 phút/4°C. Thu hoạch nước nổi xử lý Protamin sulfat. Lắc đều để ở 4°C, 3 giờ. Ly tâm 10.000 vòng/30 phút/4°C. Thu hoạch nước nổi. Kiểm tra hiệu giá (HA, LD50). Chuẩn độ kháng nguyên phản ứng NKHC theo phương pháp vi chuẩn độ trên giá nhựa 96 giếng. Hiệu giá kháng nguyên là độ pha loãng kháng nguyên cuối cùng còn khả năng gây ngưng kết hồng cầu hoàn toàn gọi là "1 đơn vị kháng nguyên".

Phương pháp chuẩn độ hiệu giá virus trên chuột bạch ố xác định giá trị LD₅₀: Theo Reed-Muench, 1938.

Phương pháp tạo điểm trống hoại tử tế bào xác định giá trị UFP (theo quy trình kỹ thuật của Viện Pasteur Paris).

Phương pháp tiếp đời giống trên chuột ố, trên phổi gà, trên tế bào phổi gà v.v...

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

1. Sản xuất kháng nguyên

a) *Tinh chế kháng nguyên:* Virus đại chỉ có khả năng gây ngưng kết hồng cầu ngưng trong điều kiện

nhược độc, phổ biến nhất là dùng chủng Flury HEP. Trong thí nghiệm của chúng tôi đã chế 1 số kháng nguyên bằng chủng F.HEP và F. LEP theo phương pháp Protamin sulfat. Hiệu giá kháng nguyên được chuẩn độ bằng phương pháp NKHC ngồng. Kết quả hiệu giá kháng nguyên chế từ các chủng virus F.HEP và F.LEP là: Lần TN1, hiệu giá NKHC (UHA/0,05ml) của chủng virus F.HEP và F.LEP đều là 256; TN2 hiệu giá của chủng F.HEP và của chủng F.LEP đều là 64; và ở lần TN3 hiệu giá của chủng F. HEP là 512, của chủng F.LEP là 256.

Qua 2 lần thí nghiệm cho thấy các lô kháng nguyên chế từ 2 chủng F.HEP, F. LEP đều cho hiệu giá tương tự.

2. Chuẩn độ virus đại bằng phương pháp NKHC

a) **Nghiên cứu chọn loại hồng cầu mẫn cảm:** Khả năng NKHC ở virus đại chỉ xảy ra trong những điều kiện nhất định. Vì thế, song song với các việc chiết

BẢNG 2. Hiệu giá NKHC chế từ các loại động vật khác nhau.

Loại hồng cầu Lô KN	Hiệu giá UHA (log ₂)				
	Ngồng	Gà con 1 ngày	Gà lớn	Chuột lang	Cừu
151	7	6	4	3	2
169	9	8	6	4	3
1511	6	5	3	2	2
2812	9	7	5	3	3

suất kháng nguyên, cần thiết phải tạo ra những nhân tố phù hợp như hồng cầu mẫn cảm, nhiệt độ, pH cũng như các nguyên liệu khác... Trong thí nghiệm đã dùng 1 số hồng cầu ngồng, gà con 1 ngày tuổi, gà lớn, chuột lang, cừu v.v... để tiến hành phản ứng NKHC với kháng nguyên virus đại chuẩn đã được tinh chế. Qua nhiều lần thí nghiệm cho thấy hồng cầu ngồng mẫn cảm nhất cho hiệu giá HA cao hơn hồng cầu chế từ các loại động vật khác. Bảng 2 ghi lại kết quả của những lần làm thí nghiệm.

Để thuận tiện cho việc sử dụng lâu dài và thường xuyên, đã thí nghiệm chế hồng cầu ngồng Formalin theo phương pháp mô tả ở kỹ thuật xét nghiệm vi sinh vật y học (1991). Kết quả cho thấy, so với hồng cầu tươi, hồng cầu Formalin giảm từ 1-2 UHA (đơn vị ngưng kết).

b) **Dùng dịch pha hồng cầu ở các độ pH khác nhau:** Độ pH sử dụng trong phản ứng NKHC ảnh hưởng rất lớn đến kết quả thí nghiệm. pH không phù hợp có thể làm giảm hiệu giá HA từ 3-4 UHA đến 5 - 7 UHA thậm chí có thể ức chế hoàn toàn.

Thí nghiệm đã tiến hành dùng các loại dung dịch đệm photphat có độ pH khác nhau: 6, 6,2, 6,4, 6,8, 7,

để pha hồng cầu rồi tiến hành phản ứng với 1 số lô kháng nguyên virus đại chuẩn đã được tinh chế hiệu giá cao. Kết quả cho thấy, hiệu giá HA giảm dần khi độ pH tăng lên. Độ pH thích hợp để pha hồng cầu là 6,2.

c) **Tương quan giữa hiệu giá virus xác định bằng phương pháp NKHC với phương pháp khác:** Bảng 3 phản ánh nội dung này.

BẢNG 3. Hiệu giá virus xác định bằng UHA, LD₅₀, UFP.

Hiệu giá KN (UHA/0,05ml)	Hiệu giá LD ₅₀ (Log ₁₀)	Hiệu giá (UFP/0,1ml)
8	3,83	2.10 ⁴
16	4,16	
32	4,50	2.10 ⁵
64	5,00	
128	5,50	2.10 ⁶
256	6,37	1.10 ⁷

Kết quả bảng 3 cho thấy, các lô kháng nguyên ở nhóm có hiệu giá UHA trung bình (8-16) tương đương với liều LD₅₀ 3,83-4log₁₀LD₅₀. Cũng đánh giá như vậy đối với các lô có hiệu giá UHA khá (5log₁₀LD₅₀); UHA cao (6log₁₀LD₅₀).

Phương pháp chuẩn độ virus trên động vật xác định liều gây nhiễm LD₅₀ và trên tế bào xác định hiệu giá UFP là hai phương pháp đã được chọn để xác định virus đại, nhưng cả hai phương pháp đều đòi hỏi thời gian dài ngày, tốn công và đắt tiền. Thí nghiệm đã nghiên cứu sự tương quan giữa các đơn vị xác định hiệu giá trên đây cho phép có thể gián tiếp sử dụng phương pháp NKHC để chuẩn độ virus cho kết quả nhanh hơn.

III. KẾT LUẬN

(1) Đã nghiên cứu tìm ra được 2 phương pháp sản xuất kháng nguyên đại bằng Protamin sulfat và Saccaro-axeton dùng trong phản ứng NKHC (HA). Kháng nguyên được chế từ chủng nhược độc F.HEP nuôi trên não chuột bạch ở cho hiệu giá cao đạt tiêu chuẩn quy định của OMS. (2) Đã nghiên cứu tìm ra được những điều kiện thích hợp để tiến hành phản ứng NKHC: Nghiên cứu chọn được loại hồng cầu ngồng mẫn cảm, chọn được dung dịch pha loãng kháng nguyên, pha loãng hồng cầu để có độ pH của phản ứng là 6,3±0,05. (3) Đã nghiên cứu ứng dụng phương pháp NKHC để chuẩn độ virus đại thông qua kết quả nghiên cứu tương quan tỉ lệ thuận giữa đơn vị NKHC (UHA) với liều gây nhiễm (LD₅₀) trên chuột bạch ở và hiệu giá (Unités Formatrices de plaques) trên tế bào BHK.

RABID VIRUS TITRATION BY HAEMAGGLUTINATION METHOD

(Summary)

Haemagglutination Test is an invitro and traditional method. It has widely been using in developed countries for the different purposes: Virus titration diagnosis, serological survey, etc. Rabid antigens have been successfully produced in suckling mouse brain with Flury HEP strain. Two methods of the Antigen chemical treatment such as: Protamin Sulfate, Saccarose-Acetone have been reported. The different components which influence to the results of the reaction such as: the quality of goose erythrocytes, the suitability of the temperature, pH were researched. The comparison of the three units: HAU (Haemagglutination unit), LD₅₀, (Lethal dose), PFU (Plaque forming unit) demonstraed that Haemagglutination Test may be quite used in rabid virus titration.

SỬ DỤNG KHÁNG SINH NEOMYCIN, COLISTIN, ANFLOX KHỐNG CHẾ VI KHUẨN SALMONELLA GÂY BỆNH Ở GÀ CÔNG NGHIỆP

TRẦN THỊ HẠNH, KIỀU THỊ DUNG, LƯU QUỲNH HUƠNG,
PHAN VĂN LỤC, NGUYỄN THÀNH ĐỒNG, LÊ THANH AN, ĐẶNG THỊ TÂM

Bệnh Salmonella ở gà công nghiệp gây thiệt hại đáng kể cho đàn gà và nó có khả năng lây nhiễm cho

người qua trứng. Ở nước ta, bệnh do Salmonella gây ra ở gà đã được tiến hành điều tra nghiên cứu từ