

P-ISSN 1859-4794 * E-ISSN 2615-9929

TẬP 65, SỐ 7, THÁNG 7 NĂM 2023
VOLUME 65, NUMBER 7, JULY 2023

TẠP CHÍ & KHOA HỌC CÔNG NGHỆ

Vietnam Journal of Science and Technology - MOST VIỆT NAM

TẠP CHÍ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

Tập 65 - Số 7 - Tháng 7 năm 2023



HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP

Chủ tịch

Châu Văn Minh - Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam, Việt Nam

Thành viên

Nguyễn Việt Anh - Trường Đại học Xây dựng, Việt Nam

Bùi Chí Bửu - Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam, Việt Nam

Vũ Dũng - Hội Tâm lý học Việt Nam, Việt Nam

Trần Thọ Đạt - Trường Đại học Kinh tế Quốc dân, Việt Nam

Nguyễn Đình Đức - Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Vũ Minh Giang - Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Trương Nam Hải - Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam, Việt Nam

Trần Thanh Hải - Trường Đại học Mở - Địa chất, Việt Nam

Phạm Huy Khang - Trường Đại học Giao thông Vận tải, Việt Nam

Phạm Gia Khánh - Hội Ghép tạng Việt Nam, Việt Nam

Hồ Đắc Lộc - Trường Đại học Công nghệ TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Nguyễn Thị Mỹ Lộc - Trường Đại học Giáo dục, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Bành Tiến Long - Đại học Bách khoa Hà Nội, Việt Nam

Lê Quan Nghiêm - Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Mai Trọng Nhuận - Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Trần Hữu Phúc - Hội đồng Giáo sư Nhà nước, Việt Nam

Nguyễn Thanh Phương - Trường Đại học Cần Thơ, Việt Nam

Nguyễn Thanh Thủy - Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Phạm Hùng Việt - Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Tổng biên tập

Nguyễn Thị Hương Giang - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Ban biên tập

Phạm Thị Minh Nguyệt - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Phí Công Thường - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Vũ Văn Hưng - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Ninh Văn Diện - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Lê Thị Bắc - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Tăng Xuân Bình - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Đoàn Đức Khải - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Trương Thị Thảo Dương - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

EDITORIAL BOARD

Chairman

Chau Van Minh - Vietnam Academy of Science and Technology, Vietnam

Members

Nguyen Viet Anh - National University of Civil Engineering, Vietnam

Bui Chi Bui - Institute of Agricultural Science for Southern Vietnam, Vietnam

Vu Dung - Vietnam Association of Social Psychology, Vietnam

Tran Tho Dat - National Economics University, Vietnam

Nguyen Dinh Duc - University of Engineering and Technology, VNU, Hanoi, Vietnam

Vu Minh Giang - VNU, Hanoi, Vietnam

Truong Nam Hai - Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology, Vietnam

Tran Thanh Hai - Hanoi University of Mining and Geology, Vietnam

Pham Huy Khang - University of Transport and Communications, Vietnam

Pham Gia Khanh - Vietnam Society of Organ Transplantation, Vietnam

Ho Duc Loc - Ho Chi Minh City University of Technology, Vietnam

Nguyen Thi My Loc - University of Education, VNU, Hanoi, Vietnam

Banh Tien Long - Hanoi University of Science and Technology, Vietnam

Le Quan Nghiem - University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City, Vietnam

Mai Trong Nham - VNU, Hanoi, Vietnam

Tran Huu Phuc - The State Council for Professorship, Vietnam

Nguyen Thanh Phuong - Can Tho University, Vietnam

Nguyen Thanh Thuy - University of Engineering and Technology, VNU, Hanoi, Vietnam

Pham Hung Viet - University of Science, VNU, Hanoi, Vietnam

Editor-in-Chief

Nguyen Thi Huong Giang - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Managing Editors

Pham Thi Minh Nguyet - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Phi Cong Thuong - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Vu Van Hung - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Ninh Van Dien - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Le Thi Bac - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Tang Xuan Binh - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Doan Duc Khai - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Truong Thi Thao Duong - Ministry of Science and Technology, Vietnam

TÒA SOẠN

113 Trần Duy Hưng - Cầu Giấy - Hà Nội - Việt Nam

Tel: (84.24) 39436793; Fax: (84.24) 39436794

Email: khoahocvacongnghevietnam@most.gov.vn

Tạp chí điện tử: b.vjst.vn

GIẤY PHÉP XUẤT BẢN

Số 459/GP-BTTTT ngày 20/7/2021

Số 50/GP-BTTTT ngày 01/02/2023

Giá: 18000^d

EDITORIAL OFFICE

113 Tran Duy Hung Str. - Cau Giay Dist. - Hanoi - Vietnam

Tel: (84.24) 39436793; Fax: (84.24) 39436794

Email: khoahocvacongnghevietnam@most.gov.vn

E-journal: b.vjst.vn

PUBLICATION LICENCE

No. 459/GP-BTTTT 20th July 2021

No. 50/GP-BTTTT 1st February 2023

Phát hiện đột biến mới trên gen *OCA2* và chẩn đoán di truyền tiền lâm tở bệnh bạch tạng tuýp 2 (oculocutaneous albinism 2 - *OCA2*)

Triệu Tiên Sang^{1*}, Trần Văn Khoa¹, Nguyễn Văn Phong¹, Lê Trọng Tuấn², Lê Văn Hải³, Nguyễn Thị Nhung^{4*}

¹Bộ môn Sinh học và Di truyền Y học, Học viện Quân y, 160 Phùng Hưng, phường Phúc La, quận Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

²Trung tâm Hỗ trợ Sinh sản, Bệnh viện An Thịnh, 496 Bạch Mai, phường Trương Định, quận Bạch Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam

³Trường Đại học Y Hà Nội (Phân hiệu Thanh Hoá), số 722 đường Quang Trung 3, phường Đông Vệ, TP Thanh Hóa, tỉnh Thanh Hóa, Việt Nam

⁴Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài 7/11/2022; ngày chuyển phân biên 10/11/2022; ngày nhận phân biên 28/11/2022; ngày chấp nhận đăng 1/12/2022

Tóm tắt:

Bệnh bạch tạng (oculocutaneous albinism - OCA) là một nhóm các rối loạn bẩm sinh di truyền gen lặn với đặc trưng là sự rối loạn tổng hợp sắc tố melanin. OCA hiện nay được phân loại thành 7 tuýp khác nhau, trong đó *OCA2* (OMIM 203200) được xếp hạng là tuýp bạch tạng phổ biến thứ hai trên thế giới và chiếm gần 30% các trường hợp OCA. Hiện nay, chưa có phương pháp nào để chữa bệnh triệt để. Chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi là phương pháp dự phòng bệnh hiệu quả nhất, giúp những gia đình mang gen bệnh có thể sinh được con khỏe mạnh và hoàn toàn không mang gen bệnh. Mục tiêu nghiên cứu: Xây dựng quy trình và tiến hành chẩn đoán trước chuyển phôi đột biến gen *OCA2* gây OCA2 cho các phôi của một gia đình mang gen bệnh. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Đối tượng nghiên cứu là mẫu máu của 4 thành viên thuộc một gia đình có thành viên mắc OCA gồm bố, mẹ và 2 người con gái; 6 mẫu sinh thiết phôi ngày 5 của cặp vợ chồng này. Các thành viên trong gia đình tham gia nghiên cứu được giải trình tự gen thế hệ mới (NGS) khảo sát đột biến nhóm gen gây OCA. Dựa trên kết quả xác định đột biến bằng giải trình tự NGS để thiết kế mồi cho phản ứng PCR khuếch đại đoạn trình tự chứa đột biến. Sau đó kết hợp phương pháp giải trình tự Sanger, phân tích di truyền liên kết để phát hiện đột biến gây bệnh trên các mẫu sinh thiết phôi sau nhân bản toàn bộ hệ gen (WGA). Kết quả nghiên cứu: Nhóm nghiên cứu đã phát hiện 1 đột biến mới là NM_000275.3:c.2323G>A (NP_000266.2: p.Gly775Ser) trên exon 22 của gen *OCA2* và tiến hành chẩn đoán trước chuyển phôi cho 6 phôi của một gia đình mang gen đột biến *OCA2* gây OCA2, kết quả có 3 phôi bệnh, 2 phôi bình thường và 1 phôi mang gen bệnh.

Từ khóa: bệnh bạch tạng, chẩn đoán di truyền tiền lâm tở, gen *OCA2*.

Chỉ số phân loại: 3.1

1. Đặt vấn đề

OCA là một nhóm các bệnh rối loạn bẩm sinh di truyền gen lặn với đặc trưng là sự rối loạn tổng hợp sắc tố melanin. Bệnh gây ra do đột biến các gen có vai trò trong quá trình tổng hợp melanin với đặc trưng lâm sàng là sự mất một phần hoặc hoàn toàn sắc tố của da, tóc và luôn đi kèm với các bất thường về mắt như: rung giật nhãn cầu, giảm thị lực, giảm sắc tố võng mạc... [1]. Tỷ lệ mắc OCA thay đổi giữa các dân tộc và quần thể, trên toàn thế giới tỷ lệ mắc là 1/17.000 [2]. Ở một số vùng quần thể người châu Phi, tỷ lệ này có thể lên tới 1/1.500 [3, 4].

OCA hiện nay được phân loại thành 7 tuýp khác nhau gồm: *OCA1A*, *OCA1B* (do đột biến gen *TYR*), *OCA2* (do đột biến gen *OCA2*), *OCA3* (do đột biến gen *TYRP1*), *OCA4* (do đột biến gen *SLC45A2*), *OCA6* (do đột biến gen *SLC24A5*) và *OCA7* liên quan đến các đột biến trên gen *LRMDA* [5]. Mỗi tuýp có đặc điểm đặc trưng lâm sàng khác nhau, trong đó *OCA2* (OMIM 203200) được xếp hạng là tuýp bạch tạng phổ biến thứ hai trên thế giới [6, 7] và chiếm gần 30% các trường hợp OCA [8]. Những người mắc *OCA2*

thường có nhiều sắc tố hơn những người mắc các tuýp OCA khác (làn da trắng nhưng không nhợt nhạt như mắc OCA tuýp 1, màu tóc từ vàng nhạt đến vàng hoặc thậm chí là nâu) và thị lực tốt hơn.

OCA2 gây ra bởi các đột biến trong gen *OCA2* (còn gọi là gen *P*) nằm trên nhiễm sắc thể 15 (15q11.2-15q12), dài khoảng 345 kb. Gen *OCA2* bao gồm 24 exon mã hóa một loại protein gồm 838 acid amin (protein P) có 12 miền xuyên màng. Protein này đóng một vai trò quan trọng trong quá trình hình thành tế bào hắc tố melanosome và kiểm soát hàm lượng sắc tố eumelanin trong tế bào hắc tố thông qua quá trình xử lý, vận chuyển tyrosinase. Hiện nay, chưa có phương pháp nào để chữa bệnh triệt để. Người mắc bệnh chỉ có thể sử dụng các biện pháp bảo vệ nhằm giảm những nguy cơ biến chứng và tổn hại do ánh nắng mặt trời gây ra.

Với sự tiến bộ của khoa học hiện nay, phương pháp chẩn đoán di truyền trước chuyển phôi được biết đến là phương pháp dự phòng bệnh hiệu quả nhất, bởi có thể chọn được phôi lành ngay từ trước khi cấy phôi vào tử cung của người mẹ. Điều này sẽ đem lại ý nghĩa rất lớn đối với những

*Tác giả liên hệ: Email: trieusangk83@yahoo.com.vn, nhungnguyen283@gmail.com

A novel mutation on *OCA2* gene detection and preimplantation genetic diagnosis for oculocutaneous albinism type 2 (OCA2)

Tien Sang Trieu^{1*}, Van Khoa Tran¹, Van Phong Nguyen¹, Trong Tuan Le², Van Hai Le³, Thi Nhung Nguyen^{4*}

¹160 Phung Hung Street, Phuc La Ward, Ha Dong District, Hanoi, Vietnam

²496 Bach Mai, Truong Dinh Ward, Hai Ba Trung District, Hanoi, Vietnam

³722 Quang Trung 3 Street, Dong Ve Ward, Thanh Hoa City, Thanh Hoa Province, Vietnam

⁴334 Nguyen Trai, Thanh Xuan Trung Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

Received 7 November 2022; revised 28 November 2022; accepted 1 December 2022

Abstract:

Oculocutaneous albinism (OCA) is a group of recessive genetic congenital disorders characterised by a disorder of melanin synthesis. OCA is currently classified into seven different types, of which OCA type 2 (OCA2 - OMIM 203200) ranks as the second most common type of albinism in the world and accounts for nearly 30% of albinism cases. Nowadays, there is currently no known way to treat OCA. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) is the most effective method of disease prevention, which helps families carrying gene mutations to have healthy children. Objectives: To develop a procedure and conduct PGD for embryos of a family carrying the *OCA2* mutation causing OCA2. Materials and methods: Research subjects are blood samples of four members of an OCA family, including father, mother, and two daughters; and 6 embryo biopsies on day 5 of this parents. Next-generation sequencing (NGS) was carried out on family members participating in the study. Based on the identified mutation results, primers for PCR amplification of the segments spanning the detected mutation were designed. Then, Sanger sequencing method is combined with linkage genetic analysis to detect pathogenic mutations on embryo biopsies after whole-genome amplification (WGA). Results: A novel mutation NM_000275.3:c.2323G>A (NP_000266.2:p.Gly775Ser) was detected on exon 22 of the *OCA2* gene. The outcomes of PGD for 6 embryos of a family carrying the *OCA2* mutant gene causing OCA2 were 3 affected embryos, 2 normal embryos, and 1 carriers.

Keywords: *OCA2* gene, oculocutaneous albinism, preimplantation genetic diagnosis.

Classification number: 3.1

gia đình mang gen gây bệnh đột biến như *OCA2*. Do vậy, nghiên cứu này được thực hiện trên một gia đình mang gen đột biến *OCA2* gây OCA tại Việt Nam, có nguyện vọng sinh con khỏe mạnh, không mang gen bệnh. Mục tiêu của nghiên cứu là thiết kế quy trình ứng dụng các kỹ thuật sinh học phân tử và tiến hành chẩn đoán trước chuyển phôi đột biến gen *OCA2* gây OCA2.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Đối tượng nghiên cứu là mẫu máu của một gia đình 4 thành viên gồm: bố I-1 (40 tuổi - kiểu hình bình thường, không có triệu chứng của OCA), mẹ I-2 (31 tuổi - kiểu hình bình thường, không có triệu chứng của OCA) và 2 người con gái, trong đó người con gái II-1 (7 tuổi) đã được chẩn đoán mắc OCA, người con gái II-2 (2 tuổi - kiểu hình bình thường, không có triệu chứng của OCA); 6 mẫu sinh thiết phôi ngày 5 (L1-L6) của cặp vợ chồng này sau khi làm thụ tinh trong ống nghiệm (IVF).

Nghiên cứu đã được phê duyệt bởi Hội đồng xét duyệt đạo đức Học viện Quân y (Số 1068/2019/VMMU-IRB) cùng sự đồng ý tham gia của tất cả các đối tượng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Mẫu ADN của cả gia đình đã được đem giải trình tự NGS khảo sát đột biến của nhóm gen gây OCA và xác định được I-1 mang đột biến *OCA2* c.2323G>A (p.Gly775Ser) - một đột biến mới, chưa từng được công bố; I-2 và II-2 mang đột biến *OCA2* c.2344G>A (p.Gly782Arg) - đột biến nghi ngờ gây bệnh (theo dữ liệu ngân hàng đột biến gen ClinVar-NCBI) và II-1 mang cả 2 đột biến trên. Tuy nhiên, biến thể *OCA2* c.2323 G>A nằm trong vùng gen tín hiệu kém, cần kiểm chứng bằng giải trình tự Sanger. Do đó, nhóm nghiên cứu đã tiến hành thiết kế mồi cho phản ứng khuếch đại đoạn gen chứa 2 đột biến trên và giải trình tự Sanger nhằm kiểm tra lại đột biến mới và chẩn đoán di truyền tiền lâm tở cho các mẫu phôi đã sinh thiết ngày 5 và đem nhân toàn bộ hệ gen của gia đình. Phân tích di truyền liên kết được thực hiện nhằm kiểm tra lại kết quả chẩn đoán và hiện tượng mất alen (Allele drop-out - ADO) của các mẫu phôi sau WGA.

Kỹ thuật tách chiết và bảo quản ADN từ mẫu máu ngoại vi: Các mẫu máu lấy từ các đối tượng được chống đông bằng EDTA trước khi tiến hành tách chiết ADN bằng bộ kit QIAamp DNA Blood mini-Kit (Đức). Quy trình tách chiết được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Độ tinh sạch và nồng độ ADN sau tách chiết được xác định bằng máy SpectraMax QuickDrop. ADN được pha loãng với nước deion để đạt nồng độ khoảng 20 ng/μl, độ tinh sạch A260/280 là 1,8-2,2, sau đó được bảo quản ở -20°C trước khi tiến hành chạy PCR và giải trình tự gen Sanger.

Kỹ thuật sinh thiết phôi: 6 phôi (L1-L6) của cặp vợ chồng được nuôi cấy đến ngày thứ 5 và tiến hành sinh

thiết ở giai đoạn phôi nang (ngày thứ 5-6 sau thụ tinh). Mỗi phôi sinh thiết 3-5 tế bào, đem rửa với dung dịch PBS 1X và 1% PVP trước khi đựng trong các ống PCR 0,2 ml và bảo quản ở -20°C.

Kỹ thuật nhân bản toàn bộ hệ gene (Whole genome amplification - WGA): ADN tách chiết từ các phôi đã sinh thiết được khuếch đại bằng bộ kit REPLI-g® Single Cell Kit (Lot.No. 166013027). Nồng độ và độ tinh sạch được đo bằng máy SpectraMax QuickDrop để đảm bảo ADN phôi sau khuếch đại của các tế bào phôi đủ tiêu chuẩn sử dụng. Các mẫu ADN sau WGA đem bảo quản ở -20°C.

Phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen chứa đột biến: Sử dụng phần mềm Primer-BLAST, nhóm nghiên cứu đã thiết kế được 2 cặp mồi để khuếch đại đoạn gen chứa đột biến *OCA2* c.2344G>A và *OCA2* c.2323G>A.

Cặp mồi *OCA2.1* khuếch đại đoạn gen chứa đột biến *OCA2* c.2344G>A như sau:

F: 5'-CACCACAGTCTCTCTACTTGCTAAAAA-3'

R: 5'-GAACAGAAGCTTACCACCAAGATGA-3'

Cặp mồi *OCA2.2* khuếch đại đoạn gen chứa đột biến *OCA2* c.2323G>A như sau:

F: 5'-ACTAACTGTTGCTTTGGGCTGA-3'

R: 5'-TGGATTTTCTAAATTGGTCACAGTATG-3'

Với nhiệt độ nóng chảy của các mồi trong khoảng 60,42-62,29°C, cặp mồi *OCA2.1* và *OCA2.2* khuếch đại cho toàn bộ exon 22 và exon 23 với kích thước lần lượt là 248 và 274 bp.

Mỗi ống phản ứng PCR để khuếch đại đoạn gen đột biến riêng có thể tích 12,5 µl, trong đó chứa 6,25 µl GoTaq Green Mastermix 2X, 2,75 µl nước, 0,5 µl mỗi mồi xuôi và ngược, 2,5 µl AND template. Dựa vào nhiệt độ nóng chảy của các cặp mồi, phản ứng PCR được thực hiện với dải gradient nhiệt độ gần mồi là 52-62°C. Dựa vào kết quả phản ứng này, nghiên cứu lựa chọn được 59°C làm nhiệt độ gần mồi tối ưu nhất. Chu trình nhiệt khuếch đại gen đột biến như sau: 95°C - 5 phút, 35 chu kỳ gồm 94°C - 30 giây, 59°C - 30 giây, 72°C - 45 giây và 72°C - 10 phút. Sau khi chạy phản ứng PCR, sản phẩm khuếch đại được điện di trên gel agarose 2% kiểm tra, trước khi tiến hành giải trình tự Sanger.

Giải trình tự Sanger: Sản phẩm PCR sau khi được kiểm tra bằng điện di sẽ được giải trình tự trên máy SeqStudio bằng bộ kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Hãng Thermo Fisher Scientific) theo nguyên lý Sanger để tìm đột biến *OCA2* c.2323G>A và *OCA2* c.2344G>A trên exon 22 và exon 23. Trình tự nucleotide của mỗi đoạn gen được xác định bằng phần mềm Bioedit Sequence Alignment Editor.

Phân tích di truyền liên kết: Dựa trên vị trí của gen *OCA2*, nhóm nghiên cứu lựa chọn 2 chỉ thị STR (Short

tandem repeats) liên kết với gen là D15S661 (nằm trong gen *OCA2*) và D15S1019 (cách gen *OCA2* khoảng 1,3 Mbps về phía telomere). Sau đó, tiến hành thiết kế mồi khuếch đại các STR này bằng phần mềm Primer-BLAST.

Cặp mồi khuếch đại STR D15S661 như sau:

F: 5'-/FAM/-TCACATTCTGGACCACGCATACTAG-3'

R: 5'-GTATGCTCTGTGTCCTTGCATTTCT-3'

Cặp mồi khuếch đại STR D15S1019 như sau:

F: 5'-/FAM/-GTGATAGGTGACAGACAGCTAGATG-3'

R: 5'-TGGTGTGTTGGATTAGTTGGTTTC-3'

Mỗi ống phản ứng PCR để khuếch đại đoạn STR riêng có thể tích 12,5 µl, trong đó chứa 6,25 µl GoTaq Green Mastermix 2X, 2,75 µl nước, 0,5 µl mỗi mồi xuôi và ngược, 2,5 µl AND mẫu. Chu trình nhiệt khuếch đại STR như sau: 95°C - 5 phút, 35 chu kỳ gồm 94°C - 30 giây, 56°C - 30 giây, 72°C - 45 giây và 72°C - 10 phút.

Hỗn hợp 1,0 µl sản phẩm PCR, 13,5 µl Hi-di và 0,5 µl Genscane LIZ 500 được trộn và đem biến tính ở 95°C trong vòng 5 phút. Tiến hành điện di mao quản các mẫu trên máy SeqStudio Genetic Analyzer, sau đó dùng phần mềm GeneMapper ID 6.0 để phân tích.

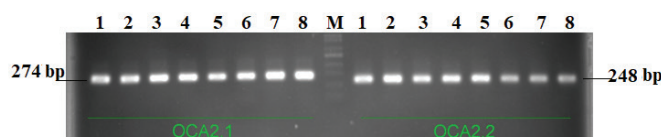
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Phản ứng khuếch đại PCR đoạn gen mang đột biến

Quy trình phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen đột biến đã được thực hiện 3 lần với thành phần phản ứng và chu trình nhiệt được mô tả như trên. Các kết quả thu được trong 3 lần là như nhau. Sau đó, sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 2%.

Kết quả kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di agarose 2% cho thấy nhóm nghiên cứu đã khuếch đại thành công các đoạn gen có kích thước như đã thiết kế (274 và 248 bp cho *OCA2.1* và *OCA2.2*) trên cả mẫu của các thành viên trên gia đình cũng như mẫu phôi.

Hình ảnh băng điện di các mẫu không có sản phẩm phụ, băng sáng, gọn và rõ nét (hình 1). Sản phẩm sau PCR này sẽ được tinh sạch bằng EXO-SAP IT và giải trình tự theo nguyên lý Sanger để phát hiện đột biến trên exon 22 và exon 23 của gen *OCA2*.

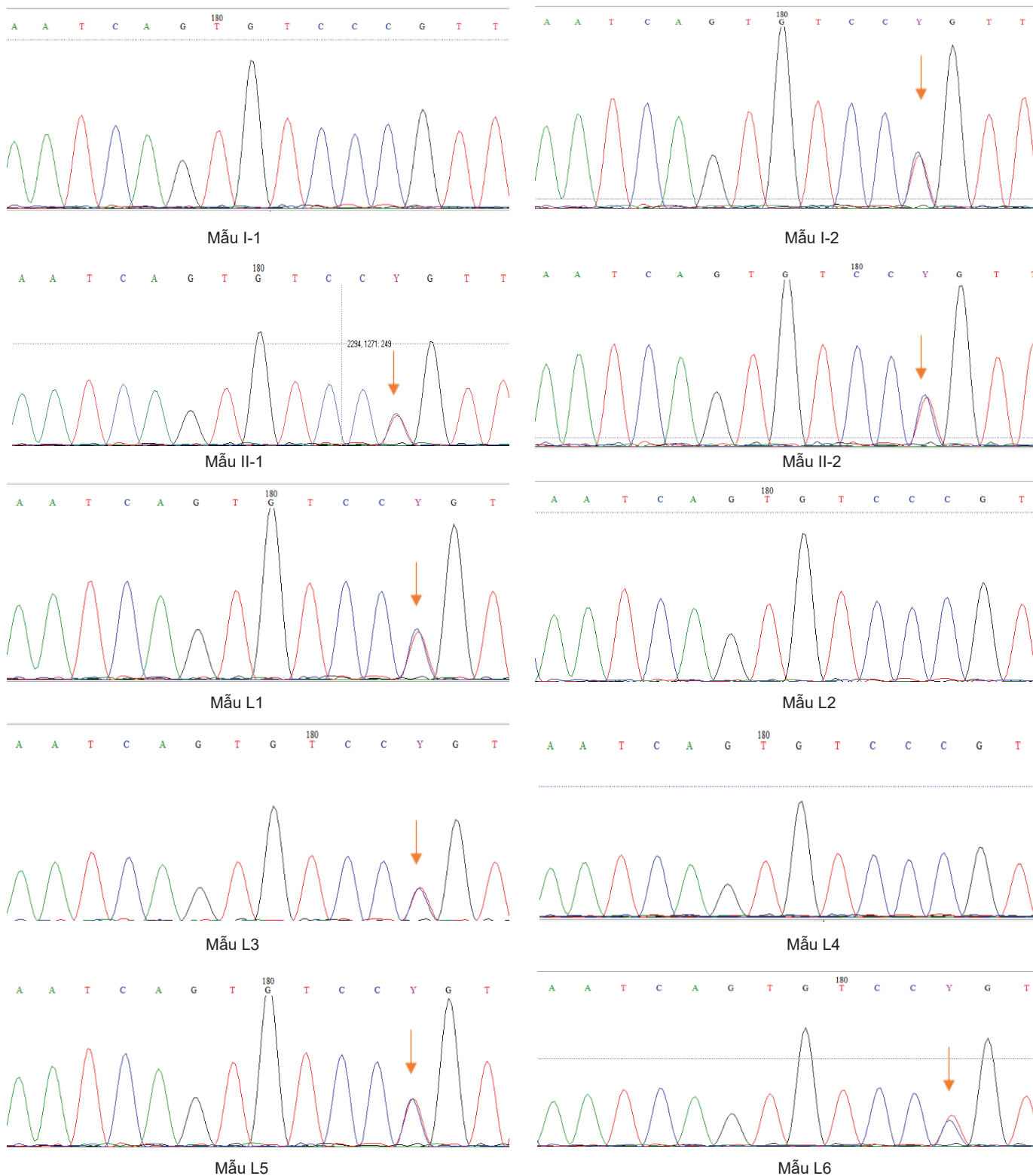


Hình 1. Kết quả khuếch đại đoạn gen chứa đột biến *OCA2.1* và *OCA2.2*. Giếng 1: mẫu M-1; giếng 2: mẫu M-2; giếng 3-8: mẫu L1-L6; M: marker 100 bp.

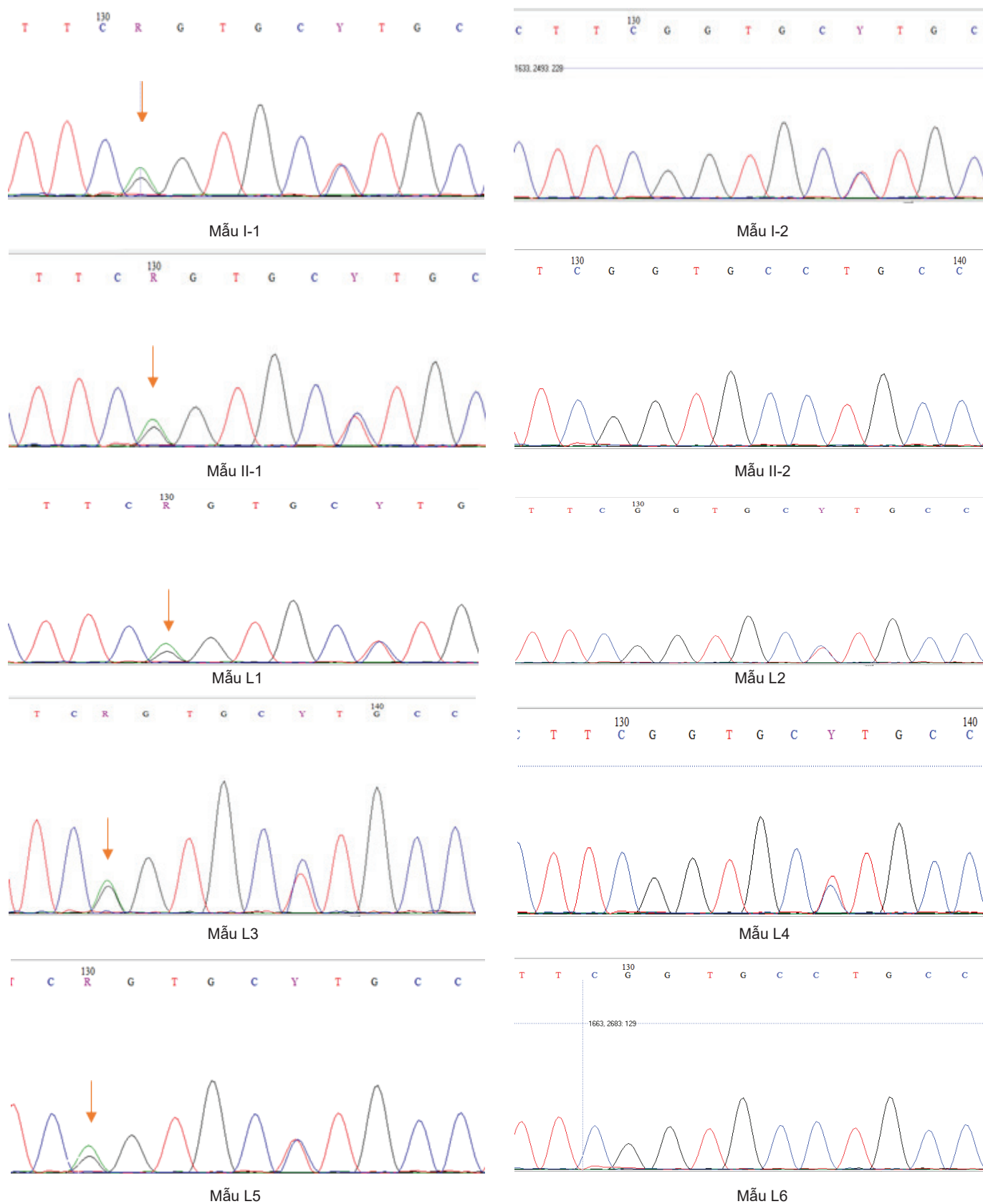
3.2. Kết quả giải trình tự Sanger

Thông qua giải trình tự Sanger (hình 2 và 3), nhóm nghiên cứu kết luận: Các mẫu chỉ mang đột biến *OCA2* c.2344G>A gồm:

I-2, II-2 và L6. Các mẫu chỉ mang đột biến *OCA2* c.2323G>A là I-1; mẫu II-1, L1, L3 và L5 mang cả 2 đột biến trên; chỉ có mẫu L2 và L4 là bình thường, không mang gen đột biến nào.



Hình 2. Kết quả giải trình tự Sanger xác định đột biến *OCA2* c.2344G>A.



Hình 3. Kết quả giải trình tự Sanger xác định đột biến OCA2 c.2323G>A.

Các đối tượng nghiên cứu được kết luận là bị bệnh khi mang cả hai đột biến (trạng thái dị hợp tử phức); người mang gen đột biến khi mang một trong hai đột biến trên và người bình thường khi chỉ mang alen WT, không mang alen đột biến (bảng 1).

Bảng 1. Kết quả chẩn đoán đột biến bằng giải trình tự Sanger.

Mẫu	c.2323G>A	c.2344G>A	Kết luận
I-1	c.2323G>A/WT	WT/WT	Mang gen đột biến
I-2	WT/WT	c.2344G>A/WT	Mang gen đột biến
II-1	c.2323G>A/WT	c.2344G>A/WT	Bệnh
II-2	WT/WT	c.2344G>A/WT	Mang gen đột biến
L1	c.2323G>A/WT	c.2344G>A/WT	Bệnh
L2	WT/WT	WT/WT	Bình thường
L3	c.2323G>A/WT	c.2344G>A/WT	Bệnh
L4	WT/WT	WT/WT	Bình thường
L5	c.2323G>A/WT	c.2344G>A/WT	Bệnh
L6	WT/WT	c.2344G>A/WT	Mang gen đột biến

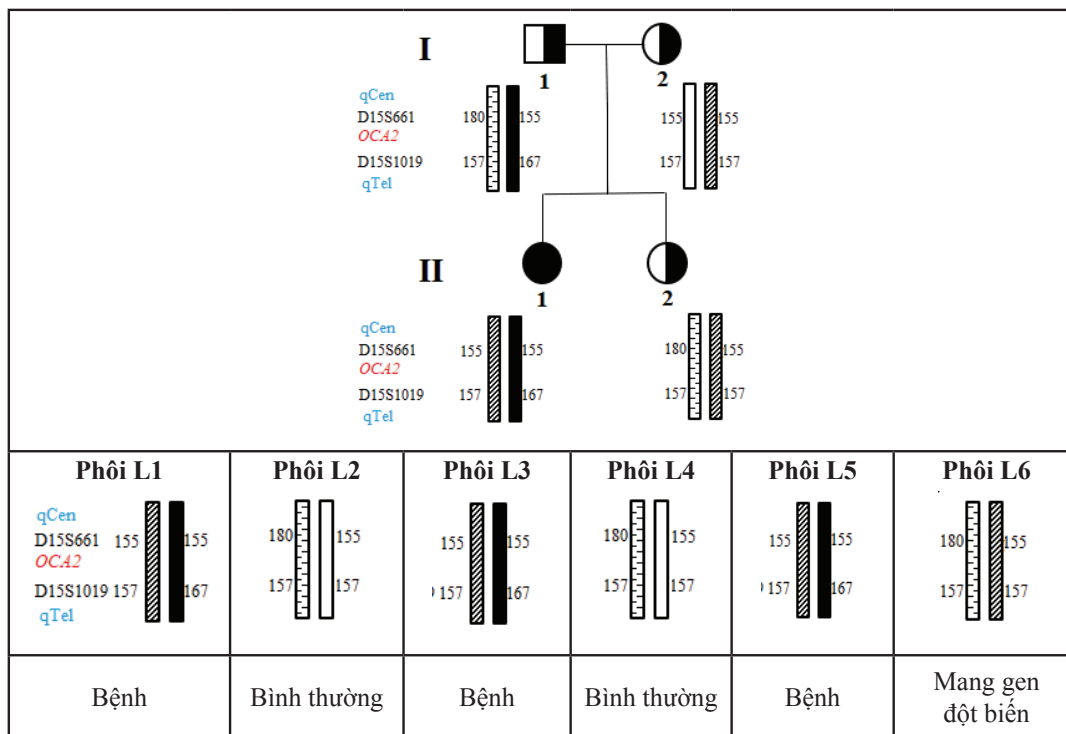
3.3. Kết quả phân tích di truyền liên kết

Nhằm kiểm tra lại kết quả chẩn đoán một lần nữa và hiện tượng ADO có xảy ra trên các mẫu phôi sau WGA không, nhóm nghiên cứu đã thiết kế và sử dụng thêm 2 chỉ thị STR liên kết gen *OCA2* là D15S661 và D15S1019. Kích thước các sản phẩm khuếch đại của chỉ thị này mang tính đặc trưng cao do số lần lặp trình tự khác nhau ở từng cá thể, nhờ đó dễ dàng tìm được các alen liên kết với gen đột biến (hình 4).

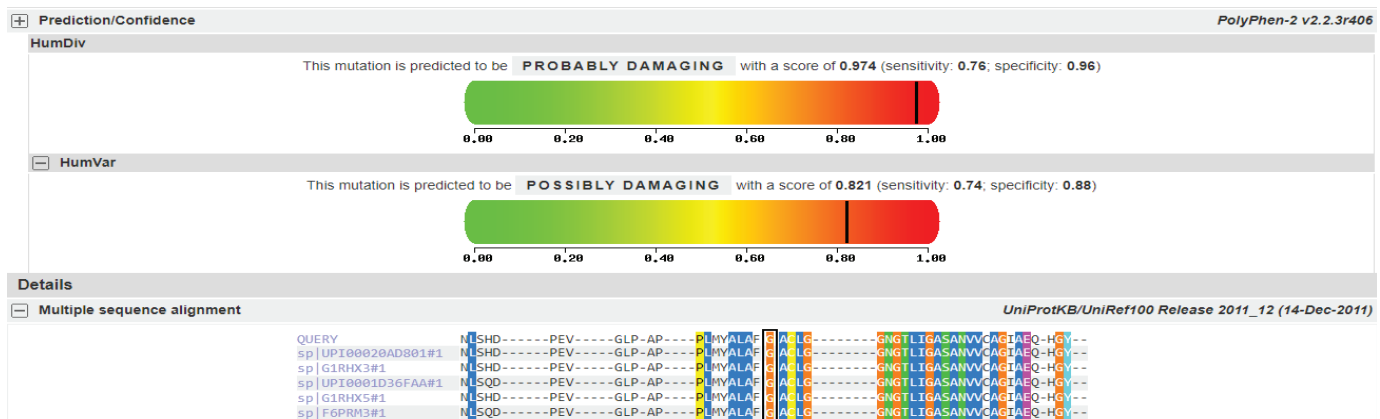
Qua kết quả điện di mao quản, nhóm nghiên cứu phân tích trên trường hợp bệnh nhân II-1 để suy luận ra các alen liên kết với đột biến gây bệnh. Nhận thấy, với locus D15S661, II-1 mang 2 alen có kích thước 155 bp, như vậy người bố I-1 mang 1 alen bệnh có kích thước 155 bp và người mẹ I-2 mang 1 alen bệnh có kích thước 155 bp. Tương tự, với locus D15S1019, người con II-1 mang 2 alen có kích thước 157 và 167 bp, do đó người bố I-1 sẽ mang 1 alen bệnh có kích thước 167 bp và người mẹ I-2 mang 1 alen bệnh có kích thước 157 bp. Căn cứ vào những dữ kiện này và kết quả giải trình tự Sanger đã nêu, nhóm nghiên cứu đã xác định được kết quả trên (hình 4). Trên mỗi phôi đều có hiện tượng dị hợp tử xảy ra trên ít nhất 1 locus STR, do vậy trên các phôi không xảy ra hiện tượng ADO. Ngoài ra, kết quả này cũng trùng khớp với kết quả giải trình tự Sanger mà nhóm nghiên cứu đã thực hiện. Như vậy, kết quả sàng lọc theo phương pháp mà nhóm nghiên cứu đã thiết kế là đáng tin cậy. Phôi L2 và L4 là bình thường, không mang gen bệnh và có thể sử dụng để tiến hành chuyển phôi.

3.4. Phát hiện đột biến mới trên gen *OCA2*

Theo kết quả nghiên cứu đột biến gen *OCA2* bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự gen theo nguyên lý Sanger, bố I-1 là người mang đột biến NM_000275.3:c.2323G>A (NP_000266.2: p.Gly775Ser) thuộc exon 22 của gen *OCA2*. Đây là đột biến sai nghĩa, dẫn đến sự thay thế amino acid thứ 775 từ Glycine thành Serine (p.Gly775Ser).



Hình 4. Kết quả phân tích di truyền liên kết gen *OCA2*.



Hình 5. Dữ liệu phân tích khả năng gây OCA của đột biến *OCA2* c.2323G>A sử dụng phần mềm PolyPhen-2.

Phần mềm PolyPhen-2 đã được sử dụng để đánh giá ảnh hưởng của đột biến này tới cấu trúc và chức năng của protein *OCA2*. Kết quả cho thấy, cấu trúc và chức năng protein *OCA2* bị ảnh hưởng cao với điểm tin cậy HumDiv và HumVar đạt giá trị lần lượt là 0,974 và 0,821 (hình 5). Công cụ phân tích đột biến Mutation Taster cũng cho kết quả dự đoán đột biến *OCA2* c.2323G>A là nguyên nhân gây bệnh.

Đối chiếu kết quả đột biến này với các ngân hàng đột biến gen quốc tế như Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>), ClinVar-NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) thì *OCA2* c.2323G>A là một đột biến mới, chưa từng được công bố. Như vậy, một đột biến điểm mới trên gen *OCA2* đã được phát hiện nhờ ứng dụng quy trình kết hợp giữa phương pháp PCR truyền thống và giải trình tự NGS, Sanger mà nhóm nghiên cứu thiết kế.

Nhìn chung, việc kết hợp sử dụng phương pháp giải trình tự NGS và Sanger giúp xác định đột biến chính xác và dễ dàng hơn, đồng thời tiết kiệm về thời gian lẫn chi phí thực hiện. Việc chẩn đoán trước chuyển phôi nhờ đó có thể giảm thiểu chi phí, giúp ngày càng có nhiều gia đình tiếp cận được với phương pháp này. Từ quy trình phát hiện đột biến *OCA2* này, nhóm nghiên cứu đã đưa ra cách thức tương tự có thể áp dụng cho các đột biến điểm khác trên gen *OCA2* và với các bệnh di truyền đơn gen khác nói chung.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã phát hiện 1 đột biến mới là NM_000275.3: c.2323G>A (NP_000266.2: p.Gly775Ser) trên exon 22 của gen *OCA2* (đột biến chưa từng được công bố trên ngân hàng cơ sở dữ liệu về đột biến gen *OCA2*) và tiến hành chẩn đoán trước chuyển phôi thành công cho 6 phôi của một gia đình mang gen đột biến *OCA2* gây OCA2. Kết quả có 3 phôi bệnh, 2 phôi bình thường và 1 phôi mang gen bệnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] F.K. Deilamani, M.T. Akbari, M. Karimipoor, et al. (2015), "Sequence analysis of tyrosinase gene in ocular and oculocutaneous albinism patients: Introducing three novel mutations", *Molecular Vision*, **21**, pp.730-735.
- [2] K. Gronskov, J. Ek, K.B. Nielsen (2007), "Oculocutaneous albinism", *Orphanet Journal of Rare Diseases*, **2**, DOI: 10.1186/17501172-2-43.
- [3] C.J. Witkop, J.D. Niswander, D.R. Bergsma, et al. (1972), "Tyrosinase positive oculocutaneous albinism among the Zuni and the Brandywine triracial isolate: Biochemical and clinical characteristics and fertility", *American Journal of Physical Anthropology*, **36(3)**, pp.397-405, DOI: 10.1002/ajpa.1330360311.
- [4] J.G. Kromberg, T. Jenkins (1982), "Prevalence of albinism in the South African negro", *South African Medical Journal*, **61(11)**, pp.383-386.
- [5] H. Gul, M.Z. Ali, E. Khan, et al. (2017), "Ophthalmogenetic analysis of Pakistani patients with nonsyndromic oculocutaneous albinism through whole exome sequencing", *J. Pak. Med. Assoc.*, **67(5)**, pp.790-792.
- [6] Z. Zhong, L. Gu, X. Zheng, et al. (2019), "Comprehensive analysis of spectral distribution of a large cohort of Chinese patients with non-syndromic oculocutaneous albinism facilitates genetic diagnosis", *Pigment Cell & Melanoma Research*, **32(5)**, pp.672-686, DOI: 10.1111/pcmr.12790.
- [7] E. Lasseaux, C. Plaisant, V. Michaud, et al. (2018), "Molecular characterization of a series of 990 index patients with albinism", *Pigment Cell and Melanoma Research*, **31(4)**, pp.466-474, DOI: 10.1111/pcmr.12688.
- [8] C. Rooryck, P.F. Morice, E. Lasseaux, et al. (2011), "High resolution mapping of *OCA2* intragenic rearrangements and identification of a founder effect associated with a deletion in Polish albino patients", *Human Genetics*, **129(2)**, pp.199-208.

Tỷ lệ mang liên cầu nhóm B và kết quả thai kỳ ở sản phụ sinh tại Bệnh viện Phụ sản Hà Nội

Phạm Thu Trang^{1*}, Phạm Thị Thanh Hiền¹, Đỗ Tuấn Đạt¹, Dương Thị Trà Giang²

¹ Tôn Thất Tùng, phường Trung Tự, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

² 929 đường La Thành, phường Ngọc Khánh, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 3/10/2022; ngày chuyển phản biện 6/10/2022; ngày nhận phản biện 31/10/2022; ngày chấp nhận đăng 4/11/2022

Tóm tắt:

Mục tiêu nghiên cứu: Xác định tỷ lệ sản phụ mang liên cầu nhóm B (GBS) và kết quả thai kỳ của những sản phụ này tại Bệnh viện Phụ sản Hà Nội. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu mô tả hồi cứu trên 537 sản phụ sinh tại Bệnh viện Phụ sản Hà Nội năm 2021 có kết quả xét nghiệm nuôi cấy phân lập định danh tìm GBS bằng mẫu dịch âm đạo - trực tràng ở thời điểm 36-37 tuần 6 ngày. **Kết quả nghiên cứu:** Tỷ lệ sản phụ mang GBS là 18,1%. 87,5% các thai kỳ mang GBS được điều trị kháng sinh dự phòng lây nhiễm trước sinh khi có chuyển dạ hoặc ối vỡ. Đái tháo đường làm tăng nguy cơ mang GBS trong thai kỳ (OR=2,3, 95%CI: 1,17-4,34). Thai kỳ mang GBS có liên quan đến nguy cơ vỡ ối (OR=3,09, 95%CI: 1,95-4,85) và nguy cơ phải điều trị kháng sinh cho trẻ sơ sinh (OR=3,39, 95%CI: 1,05-10,92). Tuy nhiên, GBS không làm tăng nguy cơ mô lấy thai, nhiễm trùng hậu sản ($p>0,05$). Thai kỳ mang GBS được dự phòng lây nhiễm trước sinh không tăng nguy cơ nhiễm trùng sơ sinh sớm (OR=0,55; 95%CI: 0,06-5,44). **Kết luận:** Tỷ lệ sản phụ mang GBS trong thai kỳ là 18,1%. Thai kỳ mang GBS được dự phòng lây nhiễm trước sinh không làm tăng nguy cơ kết quả thai kỳ bất lợi ở mẹ và nguy cơ nhiễm trùng sơ sinh.

Từ khóa: kháng sinh dự phòng trước sinh, liên cầu nhóm B, nhiễm trùng hậu sản, nhiễm trùng sơ sinh.

Chỉ số phân loại: 3.1

1. Đặt vấn đề

GBS là cầu khuẩn gram dương, có thể tìm thấy ở đường tiêu hóa, sinh dục và tiết niệu, hầu hết không có biểu hiện lâm sàng và không thuộc nhóm bệnh lây truyền qua đường tình dục. Phụ nữ có thai mang GBS là một trong số những nguyên nhân gây nhiễm khuẩn sơ sinh, làm gia tăng tỷ lệ tử vong thời kỳ chu sinh bởi sự lây truyền từ mẹ sang con, tuy nhiên, sự lây truyền gần như chỉ xảy ra khi chuyển dạ hoặc vỡ ối [1]. Tỷ lệ thai phụ mang GBS khoảng 10-30%, khác nhau tùy từng vị trí địa lý và cao hơn ở phụ nữ da màu [2]. Tại Việt Nam, tỷ lệ mang GBS ở 3 tháng cuối thai kỳ chiếm 13,2-19,1% [3, 4]. Từ năm 1996, Trung tâm Kiểm soát và Dự phòng bệnh tật Hoa Kỳ đã đưa ra khuyến cáo về chiến lược điều trị dự phòng GBS dựa vào các yếu tố nguy cơ của thai phụ. Từ năm 2002, những trường hợp điều trị dự phòng được dựa vào tầm soát nuôi cấy và được thực hiện ở tuổi thai 35-37 tuần. Điều trị dự phòng bằng kháng sinh trong khi chuyển dạ làm giảm tỷ lệ nhiễm trùng sơ sinh sớm từ 1,8/1.000 trẻ sinh sống vào những năm 1990 xuống còn 0,23/1.000 trẻ sinh sống vào năm 2015 [5]. Năm 2019, Hiệp hội Sản phụ khoa Hoa Kỳ (ACOG) khuyến cáo sàng lọc GBS cho các thai phụ 36-37 tuần 6 ngày và điều trị kháng sinh dự phòng cho tất cả các trường hợp xét nghiệm dương tính, trừ trường hợp mô chủ động có màng ối nguyên vẹn [2]. Tại Bệnh viện Phụ sản Hà Nội, việc sàng lọc GBS cho sản phụ tuổi thai 36-37 tuần 6 ngày bằng cách nuôi cấy dịch âm đạo - trực tràng với cách lấy mẫu như sau: Không mở mỏ vịt, không sát trùng, dùng 1 tăm bông của ống đưa vào 1/3

ngoài âm đạo, xoay tăm bông 5 vòng, dùng chính tăm bông đó đưa qua cơ thắt hậu môn vào sâu 2-3 cm, xoay 3-5 vòng và điều trị dự phòng lây nhiễm mẹ con đã được áp dụng thường quy trong quá trình quản lý thai từ năm 2019. Để tổng kết tỷ lệ mang GBS và tác động của can thiệp dự phòng đến kết quả thai kỳ, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục tiêu xác định tỷ lệ mang GBS và kết quả thai kỳ ở sản phụ mang GBS sinh tại Bệnh viện Phụ sản Hà Nội.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Các sản phụ sinh tại Bệnh viện Phụ sản Hà Nội đã được làm xét nghiệm GBS ở tuổi thai 36-37 tuần 6 ngày và có kết quả xét nghiệm nuôi cấy dịch âm đạo - trực tràng tìm GBS tại thời điểm sinh. Thông tin hồ sơ bệnh án đầy đủ.

Nghiên cứu được thực hiện từ ngày 1/1/2021 đến 31/12/2021 tại Bệnh viện Phụ sản Hà Nội.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả hồi cứu.

2.3. Cỡ mẫu

Mẫu được xác định dựa vào ước lượng tỷ lệ với sai số loại 1, $\alpha=0,05$, độ chính xác mong muốn $e=0,03$. Ước lượng tỷ lệ thai phụ mang GBS 34-36 tuần là 13,2% theo nghiên cứu của Phạm Thị Thanh Hiền và Lê Thị Mai Phương (2015) [3] tại

*Tác giả liên hệ: Email: trangyhn@gmail.com

Prevalence of group B streptococcus colonisation and pregnancy outcomes of pregnant women at Hanoi Obstetrics and Gynecology Hospital

Thu Trang Pham^{1*}, Thi Thanh Hien Pham¹,
Tuan Dat Do¹, Thi Tra Giang Duong²

¹No. 1 Ton That Tung, Trung Tu Ward, Dong Da District, Hanoi, Vietnam
²929 La Thanh Street, Ngoc Khanh Ward, Dong Da District, Hanoi, Vietnam

Received 3 October 2022; revised 31 October 2022; accepted 4 November 2022

Abstract:

Objectives: To determine the prevalence of maternal group B streptococcus (GBS) colonisation and pregnancy results of pregnant women at Hanoi Obstetrics and Gynecology Hospital. **Materials and methods:** Retrospective descriptive with 537 pregnant women delivered at the Hanoi Obstetrics and Gynecology Hospital in 2021, GBS was detected based on culture, isolation, and identification of bacteria from the vagina-rectum samples at 36-37⁺⁶ weeks gestation. **Results:** The prevalence of maternal GBS colonisation was 18.1%. 87.5% of GBS colonisations were applied to intrapartum antibiotic prophylaxis during labour or ruptured membranes. Diabetes increased the risk of carrying GBS (OR=2.3, 95%CI: 1.17-4.34). Maternal GBS colonisation increased the risk of rupture of membranes (OR 3.09, 95%CI: 1.95-4.85) and antibiotic treatment of newborns (OR=3.39, 95%CI: 1.05-10.92). However, there was no increased risk for cesarean section or postpartum infection (p>0.05). Maternal GBS colonisation with intrapartum antibiotic prophylaxis has not increased the risk for early neonatal (OR=0.55, 95%CI: 0.06-5.44). **Conclusion:** The prevalence of maternal GBS colonisation was 18.1%. Pregnant women carrying GBS treated with intrapartum antibiotic prophylaxis did not increase the risk of maternal adverse pregnancy outcomes and early neonatal infection.

Keywords: early neonatal infection, group B streptococcus, intrapartum antibiotic prophylaxis, postpartum infection.

Classification number: 3.1

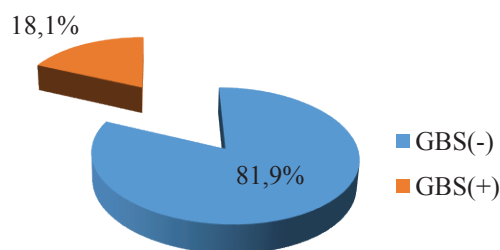
Bệnh viện Phụ sản Hà Nội năm 2014. Ước tính 10% mất dấu, mẫu tối thiểu đạt được 537 sản phụ sàng lọc GBS 36-37 tuần 6 ngày. Nghiên cứu chọn mẫu ngẫu nhiên hệ thống, khoảng cách mẫu bằng 9, danh sách bệnh nhân được lọc từ dữ liệu bệnh án điện tử do Phòng Kế hoạch Tổng hợp, Bệnh viện Phụ sản Hà Nội cung cấp.

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Tỷ lệ sản phụ mang GBS xác định dựa vào kết quả nuôi cấy, phân lập và định danh GBS dương tính từ mẫu dịch âm đạo - trực tràng so với tổng số thai phụ 36-37 tuần 6 ngày được sàng lọc. Điều trị dự phòng cho các trường hợp GBS dương tính khi có chuyển dạ hoặc ối vỡ. Sản phụ mang GBS sử dụng như nhóm bệnh, nhóm có kết quả sàng lọc GBS âm tính được sử dụng như nhóm chứng để đánh giá các yếu tố liên quan. Sử dụng tỷ suất chênh (OR) để đo lường mối liên quan giữa 2 biến nhị phân có cân nhắc đến mức độ mạnh - yếu. Mức ý nghĩa thống kê chọn p<0,05. Xử lý số liệu bằng phần mềm SPSS 20.0.

3. Kết quả

Trong thời gian từ ngày 1/1/2021 đến 31/12/2021 có 537 sản phụ được đưa vào nghiên cứu (hình 1). Kết quả cho thấy, tỷ lệ mang GBS là 18,1% (97/537).



Hình 1. Tỷ lệ mang GBS trong thai kỳ.

Nhận xét: Đái tháo đường làm tăng nguy cơ mang GBS thai kỳ, OR=2,3; 95%CI: 1,17-4,34 (bảng 1).

Bảng 1. Một số yếu tố nguy cơ mang GBS trong thai kỳ.

	GBS âm tính	GBS dương tính	OR	95%CI	p
Tiền sử đẻ non (n=537)					
Có	7 (77,8%)	2 (22,2%)	1,3	0,27-6,37	p>0,05
Không	433 (82%)	95 (18%)			
Tiền sử phá thai (n=537)					
Có	109 (87,2%)	16 (12,8%)	0,6	0,34-1,07	p>0,05
Không	331 (80,3%)	81 (19,7%)			
Tiền sử viêm đường sinh dục (n=537)					
Có	161 (81,7%)	36 (18,3%)	1,02	0,65-1,61	p>0,05
Không	279 (82,1%)	61 (17,9%)			
Đái tháo đường (n=537)					
Có	33 (68,8%)	15 (31,2%)	2,3	1,17-4,34	p<0,05
Không	407 (83,2%)	82 (16,8%)			

Bảng 2. Liên quan giữa tình trạng mang GBS và kết quả thai kỳ.

Kết quả thai kỳ	GBS âm tính	GBS dương tính	OR (95%CI)	p
Đặc điểm màng ối (n=537)				
Màng ối nguyên vẹn	334 (75,9%)	49 (50,5%)	3,09 (1,95-4,85)	p<0,001
Ối vỡ non	106 (24,1%)	48 (49,5%)		
Sốt đơn độc trong chuyển dạ (n=537)				
Có	5 (1,1%)	2 (2,1%)	1,18 (0,35-9,59)	p>0,05
Không	435 (98,9%)	95 (97,9%)		
Nhiễm khuẩn hậu sản (n=537)				
Có	3 (0,7%)	1 (1%)	1,51 (0,16-14,75)	p>0,05
Không	437 (99,3%)	96 (99%)		
Nguy cơ mổ lấy thai/nhóm không có chỉ định mổ tuyệt đối (n=453)				
Đề đường âm đạo	312 (83,6%)	61 (76,2%)	1,6 (0,89-2,86)	p>0,05
Mổ cấp cứu	61 (16,4%)	19 (23,8%)		
Điều trị kháng sinh con (n=538)				
Có	7 (1,6%)	5 (5,2%)	3,4 (1,05-10,92)	p<0,05
Không	434 (98,4%)	92 (94,8%)		

Nhận xét: Kết quả bảng 2 cho thấy, thai kỳ mang GBS làm tăng nguy cơ vỡ ối non với OR=3,09 (95%CI: 1,95-4,85), tăng nguy cơ phải điều trị kháng sinh cho trẻ sơ sinh với OR=3,4 (95%CI: 1,05-10,92).

Bảng 3. Hiệu quả của điều trị kháng sinh dự phòng với trẻ sơ sinh.

	Có điều trị dự phòng	Không điều trị dự phòng	OR (95%CI)	p
Nhiễm trùng sơ sinh sớm	4 (5,7%)	1 (10%)	0,55 (0,06-5,44)	p>0,05
Sơ sinh bình thường	66 (94,3%)	9 (90%)		
Tổng	70 (100%)	10 (100%)		

Mẫu gồm có 97 trường hợp GBS dương tính, trong đó có 17 trường hợp mổ lấy thai chủ động khi chưa có chuyển dạ hoặc ối vỡ không có chỉ định điều trị dự phòng. Trong số 80 trường hợp có chỉ định điều trị dự phòng, có 70 trường hợp được điều trị chiếm 87,5% (bảng 3). Thai kỳ mang GBS được điều trị kháng sinh dự phòng lây nhiễm trước sinh phù hợp không làm tăng nguy cơ nhiễm trùng sơ sinh sớm.

4. Bàn luận

Qua sàng lọc 537 sản phụ có làm xét nghiệm nuôi cấy dịch âm đạo - trực tràng tìm GBS, 97 sản phụ có kết quả sàng lọc GBS dương tính chiếm 18,1%. Tỷ lệ sản phụ mang GBS trong nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với tỷ lệ mang GBS trong các nghiên cứu trên thế giới và tại Việt Nam. Một nghiên cứu tổng hợp dựa trên dữ liệu của 85 quốc gia với 299.924 phụ nữ mang thai, tỷ lệ mang GBS là 18% [6]. Nhìn chung, các nghiên cứu tại Việt Nam thực hiện trong 3 tháng cuối thai kỳ, tỷ lệ mang GBS ở thời điểm này từ 13,2 đến 19,1% [3, 4].

Đối với nhóm có bệnh lý đái tháo đường, chúng tôi phân tích chung cả đối tượng đái tháo đường trước mang thai và nhóm đái tháo đường thai kỳ. Tỷ lệ mang GBS ở nhóm không có đái tháo đường và nhóm có đái tháo đường lần lượt là 16,8 và 31,2%, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p<0,05. Nguy cơ tương đối OR=2,3, 95%CI: 1,17-4,34. Nghiên cứu của J.M. Edwards và cs (2019) [7] tại Mỹ với cỡ mẫu trên 60.029 thai phụ cho thấy, tỷ lệ thai phụ mang GBS bị đái tháo đường cao hơn nhóm không mang GBS tương ứng 3,5 so với 2,8% (p<0,001) và tăng lên 15,6% ở nhóm nhiễm GBS xâm nhập (p<0,01). Hiệu chỉnh các yếu tố liên quan cho thấy đái tháo đường tăng nguy cơ mang GBS lên 1,12 lần (aRR 1,12, 95%CI: 1,01-1,23, p=0,03). Vì vậy, việc sàng lọc và kiểm soát đái tháo đường thai kỳ là cần thiết trong quản lý thai.

Mẫu nghiên cứu của chúng tôi có 97 trường hợp GBS dương tính, trong đó có 17 trường hợp (17,5%) mổ lấy thai chủ động khi chưa có chuyển dạ hoặc ối vỡ không có chỉ định điều trị dự phòng. Không có ghi nhận trường hợp nào có tiền sử dị ứng kháng sinh Penicillin. 87,5% (70/80) các trường hợp mang GBS có chỉ định điều trị dự phòng khi bắt đầu chuyển dạ và/hoặc có vỡ ối được điều trị bằng kháng sinh Ampicillin theo hướng dẫn của ACOG (2019) [2]. Tỷ lệ nhạy cảm kháng sinh Penicillin và Ampicillin của GBS tại Bệnh viện Đa khoa Quốc tế Vinmec theo nghiên cứu của tác giả P.T. Lý (2020) [8] là 100%. Trong một nghiên cứu tổng hợp của S. Li và cs (2017) [9] dựa trên 13 nghiên cứu trước đó cho thấy hiệu quả ngang nhau của Penicillin và Ampicillin trong điều trị dự phòng GBS. Do đó, sử dụng Ampicillin trong điều trị dự phòng GBS dương tính là hoàn toàn phù hợp.

Tỷ lệ ối vỡ ở nhóm thai phụ mang GBS và không mang GBS trong nghiên cứu của chúng tôi chiếm tỷ lệ tương ứng là 49,5 và 24,1%, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p<0,001. Sản phụ mang GBS làm tăng tỷ lệ ối vỡ trước và trong chuyển dạ (OR=3,09, 95%CI: 1,95-4,85). Trong nghiên cứu của T.Q. Hiệp (2011) [10], tỷ lệ nhiễm GBS cao hơn ở nhóm ối vỡ sớm, chiếm 9,1%. Thai kỳ mang GBS được điều trị dự phòng không làm tăng nguy cơ nhiễm khuẩn hậu sản (OR=1,5, 95%CI: 0,16-14,75), kết quả này cũng phù hợp khi GBS không phải là nguyên nhân hàng đầu gây ra các nhiễm trùng hậu sản. Các tác nhân như *E. coli*, *Staphylococcus Aureus* và *Streptococcus pyogenes* (liên cầu nhóm A) là những tác nhân thường gặp gây nhiễm trùng hậu sản, nhiễm trùng vết mổ. Thai kỳ mang GBS không làm tăng nguy cơ mổ lấy thai ở nhóm bệnh nhân không có chỉ định mổ tuyệt đối (OR=1,6, 95%CI: 0,89-2,86), tương đồng với kết quả nghiên cứu của P.T. Lý (2020) [8] tại Bệnh viện Đa khoa Quốc tế Vinmec.

Thai kỳ mang GBS dương tính làm tăng nguy cơ phải dùng kháng sinh điều trị trẻ sơ sinh (OR=3,4, 95%CI: 1,05-10,92). Tuy nhiên, chúng tôi phát hiện thai kỳ mang GBS được điều trị kháng sinh dự phòng lây nhiễm trước sinh phù hợp không làm tăng nguy cơ nhiễm trùng sơ sinh sớm (OR=0,55, 95%CI: 0,06-5,44). Mô hình nhiễm trùng sơ sinh sớm và tử vong do GBS hiện nay lại tập trung ở nhóm sơ sinh non tháng. Khoảng 50% trường hợp nhiễm trùng sơ sinh sớm do GBS xảy ra ở trẻ sơ sinh non tháng và liên quan đến nguy cơ tử vong cao hơn ở nhóm này, 20-30% ở nhóm sơ sinh dưới 33 tuần so với 1-3% ở nhóm sơ sinh đủ tháng [1]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, sản phụ được lấy mẫu xét nghiệm ở tuổi thai 36-37 tuần 6 ngày, kết quả cấy dịch âm đạo có sau 5 ngày, do đó có hạn chế trên nhóm sản phụ đẻ non tháng do cỡ mẫu nhỏ, chưa đủ để quan sát được trên nhóm sản phụ sinh khi thai <37 tuần.

5. Kết luận

Tỷ lệ sản phụ mang GBS là 18,1%. 87,5% các thai kỳ mang GBS được điều trị kháng sinh dự phòng lây nhiễm trước sinh. Đái tháo đường làm tăng nguy cơ mang GBS trong thai kỳ (OR=2,3, 95%CI: 1,17-4,34). Thai kỳ mang GBS có liên quan đến nguy cơ vỡ ối (OR=3,09, 95%CI: 1,95-4,85), nguy cơ phải điều trị kháng sinh cho trẻ sơ sinh (OR=3,4, 95%CI: 1,05-10,92). Kháng sinh dự phòng lây nhiễm trước sinh trong chuyển dạ không tăng nguy cơ nhiễm trùng sơ sinh sớm (OR=0,55, 95%CI: 0,06-5,44).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] S. Schrag, R. Gorwitz, K.F. Butts, et al. (2002), *Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease*, Revised Guidelines from CDC, <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5111a1.htm>, accessed July 26, 2021.

[2] The American College of Obstetricians and Gynecologists (2020), “ACOG committee opinion: Prevention of group B streptococcal early onset disease in newborns”, *Obstetrics & Gynecology*, **135**(2), pp.e51-e72.

[3] P.T.T. Hien, L.T.M. Phuong (2015), “Love group B streptococcal infection in pregnant women from 34-36 weeks at Hanoi Obstetrics Hospital”, *Obstetrics and Gynecology Magazine*, **13**(2A), pp.92-94 (in Vietnamese).

[4] T.Q. Hanh (2019), *Research on The Current Situation of Intercurrent Infection Group B Coccidia in Pregnant Women and The Effectiveness of Prophylactic Treatment with Antibiotics During Labor to Prevent Transmission to The Baby at the Disease Nghe An Obstetrics and Pediatrics Hospital (2018-2019)*, Doctoral thesis in Medicine, Fever Institute cold - Parasites - Insect Central (in Vietnamese).

[5] S.A. Nanduri, S. Petit, C. Smelser, et al. (2019), “Epidemiology of invasive early-onset and late-onset group B streptococcal disease in the United States, 2006 to 2015: Multistate laboratory and populationbased surveillance”, *JAMA Pediatr.*, **173**(3), pp.224-233, DOI: 10.1001/jamapediatrics.2018.4826.

[6] N.J. Russell, A.C. Seale, M. O'Driscoll, et al. (2017), “Maternal colonization with group B streptococcus and serotype distribution worldwide: Systematic review and meta-analyses”, *Clin. Infect. Dis.*, **65** (suppl. 2), DOI: 10.1093/cid/cix658.

[7] J.M. Edwards, N. Watson, C. Focht, et al. (2019), “Group B streptococcus (GBS) colonization and disease among pregnant women: A historical cohort study”, *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.*, **2019**, DOI: 10.1155/2019/5430493.

[8] P.T. Ly (2020), *Research on some Clinical Characteristics, Paraclinical and Neonatal Status in Pregnant Women Carrying Streptococcus Group B Bacteria in The Vagina at Vinmec International General Hospital*, Specialist thesis II, Hanoi Medical University (in Vietnamese).

[9] S. Li, J. Huang, Z. Chen, et al. (2017), “Antibiotic prevention for maternal group B streptococcal colonization on neonatal GBSrelated adverse outcomes: A meta-analysis”, *Front Microbiol.*, **8**, DOI: 10.3389/fmicb.2017.00374.

[10] T.Q. Hiep (2011), *Research on some Characteristics of Vaginitis Caused by Streptococcus B Infection in Pregnant Women Examined and Treated at the Department of Obstetrics and Gynecology, Bach Mai Hospital*, Specialized thesis II, Hanoi Medical University (in Vietnamese).

Nghiên cứu sự kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn gram âm gây nhiễm khuẩn đường tiết niệu phân lập tại Bệnh viện Hữu nghị Đa khoa Nghệ An

Quế Anh Trâm*

Bệnh viện Hữu nghị Đa khoa Nghệ An, Km5, Đại lộ Lê Nin, phường Nghi Phú, TP Vinh, tỉnh Nghệ An, Việt Nam

Ngày nhận bài 12/9/2022; ngày chuyển phản biện 15/9/2022; ngày nhận phản biện 10/10/2022; ngày chấp nhận đăng 13/10/2022

Tóm tắt:

Nhiễm khuẩn đường tiết niệu (NKĐTN) là một trong những bệnh lý nhiễm trùng thường gặp, có thể tái diễn nhiều lần nếu không được chẩn đoán sớm và điều trị hiệu quả. Các vi khuẩn (VK) gram âm là những tác nhân thường gặp nhất. Trong nghiên cứu này, tác giả xác định các VK gram âm gây bệnh và mức độ kháng kháng sinh của chúng với mục đích giúp cho việc điều trị có hiệu quả, giảm chi phí điều trị, hạn chế sự gia tăng VK đề kháng kháng sinh. Nghiên cứu cắt ngang mô tả trên 400 chủng VK gram âm cho thấy, các VK thường gặp là *Escherichia coli* (38,48%), *Pseudomonas aeruginosa* (14,15%), *Klebsiella pneumoniae* (13,32%). *E. coli* kháng kháng sinh nhóm Cephalosporine, Quinolone 65,0-74,8%, Carbapenem 6,8-8,6%, sinh ESBL 58,4%. *K. pneumoniae* kháng nhóm Cephalosporine, Quinolone 66,7-76,9%, Carbapenem 29,7-35,9%. *P. Aeruginosa* kháng các kháng sinh thử nghiệm 58,7-77,5%. Kết quả nghiên cứu cho thấy, các VK phân lập được đã đề kháng với nhiều kháng sinh thường dùng với các mức độ khác nhau. Xuất hiện các chủng VK gram âm kháng Carbapenem với tỷ lệ cao.

Từ khóa: *E. coli*, *K. pneumoniae*, nhiễm khuẩn tiết niệu, *P. aeruginosa*.

Chỉ số phân loại: 3.1

1. Đặt vấn đề

NKĐTN là một trong những bệnh lý nhiễm trùng thường gặp. Bệnh có thể tái diễn nhiều lần nếu không được chẩn đoán sớm và điều trị hiệu quả. Các căn nguyên gây NKĐTN rất đa dạng, trong đó các vi khuẩn gram âm là những tác nhân thường gặp nhất [1-3].

Hiện trạng, sức đề kháng của VK gram âm là đáng báo động. Ở Việt Nam, đã có nhiều công trình nghiên cứu về vấn đề này [1], tuy nhiên tùy theo từng khu vực địa lý, từng bệnh viện, từng giai đoạn mà tỷ lệ và cơ cấu các loài VK gây NKĐTN có thể khác nhau. Vì vậy, việc xác định đúng căn nguyên gây NKĐTN và mức độ kháng kháng sinh của các VK sẽ giúp cho việc điều trị có hiệu quả, giảm chi phí điều trị và hạn chế sự gia tăng VK đề kháng kháng sinh [1].

Xuất phát từ các lý do trên, tác giả thực hiện nghiên cứu này với mục tiêu xác định mức độ kháng kháng sinh của những VK gram âm thường gặp tại Bệnh viện Hữu nghị Đa khoa Nghệ An.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Các chủng VK gram âm gây NKĐTN phân lập tại Bệnh viện Hữu nghị Đa khoa Nghệ An từ tháng 1/2021 đến tháng 12/2021.

Tiêu chuẩn chọn mẫu: Các chủng VK gram âm gây NKĐTN phân lập được từ mẫu nước tiểu của bệnh nhân nghi ngờ bị NKĐTN được điều trị tại bệnh viện.

*Email: tramlien@gmail.com

Tiêu chuẩn loại trừ: Các chủng VK ngoại nhiễm, VK phân lập được từ mẫu bệnh phẩm của bệnh nhân không khám và điều trị tại bệnh viện (ví dụ: mẫu các đơn vị khác gửi xét nghiệm); mẫu bệnh phẩm không đạt tiêu chuẩn lựa chọn.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: Hồi cứu, cắt ngang mô tả.

Phương pháp thu thập bệnh phẩm: Lấy nước tiểu giữa dòng đối với bệnh nhân tự lấy, lấy qua dẫn lưu đối với bệnh nhân đặt ống dẫn lưu nước tiểu theo quy định của bệnh viện.

Phương pháp nuôi cấy: Cấy định lượng VK theo Hướng dẫn thực hành kỹ thuật vi sinh lâm sàng của Bộ Y tế năm 2017 [4].

Phương pháp định danh: Bằng hệ thống Vitek 02 compact, Hãng BioMérieux.

Làm kháng sinh đồ: Theo phương pháp Kirby - Bauer (khoanh giấy khuếch tán). Kết quả phiên giải theo tiêu chuẩn Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [5] cập nhật hàng năm.

2.3. Xử lý số liệu

Dữ liệu liên quan được thu thập, quản lý và phân tích bằng phần mềm dành cho các thử nghiệm kháng sinh đồ Whonet 5.6 và SPSS 20.0. Giá trị p-value $\leq 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê.

Research of antibiotics resistance of gram-negative bacteria strains causing urinary tract infections isolated at Nghe An Friendship General Hospital

Anh Tram Que*

Nghe An Friendship General Hospital,

Km5, Lenin Avenue, Nghi Phu Ward, Vinh City, Nghe An Province, Vietnam

Received 12 September 2022; revised 10 October; accepted 13 October 2022

Abstract:

Urinary tract infection is one of the common infections, which can recur many times if not diagnosed early and treated effectively. Gram-negative bacteria are the most common pathogens. In this study, the author determined the pathogenic gram-negative bacteria and their level of antibiotic resistance with the aim of making the treatment effective, reducing the cost of treatment, and limiting the proliferation of antibiotic-resistant bacteria. A descriptive cross-sectional study on 400 strains of gram-negative bacteria showed that the most common bacteria were *Escherichia coli* 38.48%, *Pseudomonas aeruginosa* 14.15%, *Klebsiella pneumoniae* 13.32%. *E. coli* is resistant to Cephalosporine, Quinolone antibiotics from 65.0-74.8%, Carbapenem 6.8-8.6%, producing extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) 58.4%. *K. pneumoniae* is resistant to Cephalosporine, Quinolone 66.7-76.9%, Carbapenem 29.7-35.9%. *P. aeruginosa* was resistant to the tested antibiotics from 58.7 to 77.5%. The study results showed that the isolated bacteria were resistant to many commonly used antibiotics to varying degrees. Carbapenem-resistant gram-negative bacteria appeared at a high rate.

Keywords: *E. coli*, *Klebsiella*, *P. aeruginosa*, urinary tract infections.

Classification number: 3.1

2.4. Vấn đề y đức

Nghiên cứu này chỉ thu thập kết quả từ phần mềm lưu trữ, không can thiệp vào quá trình điều trị. Kết quả của nghiên cứu góp phần vào việc giám sát, quản lý và sử dụng kháng sinh hiệu quả hơn. Do đó, không cần phải thông qua hội đồng y đức bệnh viện.

3. Kết quả

3.1. Đặc điểm các VK gây NKĐTN phân lập được

Từ tháng 1/2021 đến 12/2021, tác giả đã phân lập được 669 chủng VK, vi nấm từ các mẫu nước tiểu nuôi cấy, thu được các kết quả sau:

Tỷ lệ các nhóm VK gram âm, gram dương, vi nấm phân lập được: Kết quả bảng 1 cho thấy, các VK gram âm chiếm đa số trong các vi sinh vật phân lập được với gần 60%. Các VK gram dương chiếm tỷ lệ nhỏ nhất với 13,6%.

Bảng 1. Tỷ lệ các nhóm VK, vi nấm phân lập được (n=669).

Nhóm VK/nấm	n	%
Gram âm	400	59,8
Gram dương	91	13,6
Vi nấm	178	26,6

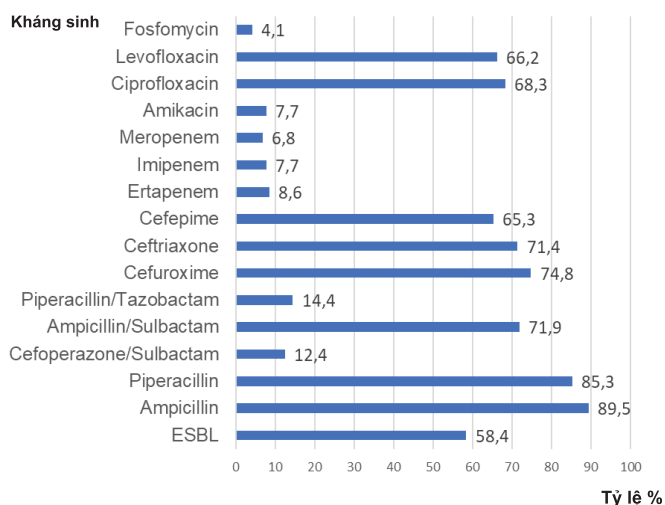
Tỷ lệ các loài VK gram âm: Kết quả bảng 2 cho thấy, *E. Coli* chiếm tỷ lệ cao nhất (56,5%), xếp thứ 2 là *P. Aeruginosa* chiếm 11,5%, kế tiếp là *K. pneumonia* chiếm 9,75%.

Bảng 2. Tỷ lệ các loài VK gram âm gây NKĐTN (n=400).

STT	VK	n	%
1	<i>E. coli</i>	226	56,5
2	<i>P. aeruginosa</i>	46	11,5
3	<i>K. pneumoniae</i>	39	9,75
4	<i>Enterobacter cloacae</i>	22	5,5
5	<i>Proteus mirabilis</i>	19	4,75
6	<i>Acinetobacter baumannii</i>	13	3,25
7	<i>Klebsiella aerogenes</i>	7	1,75
8	Khác	28	7,0
	Tổng	400	100

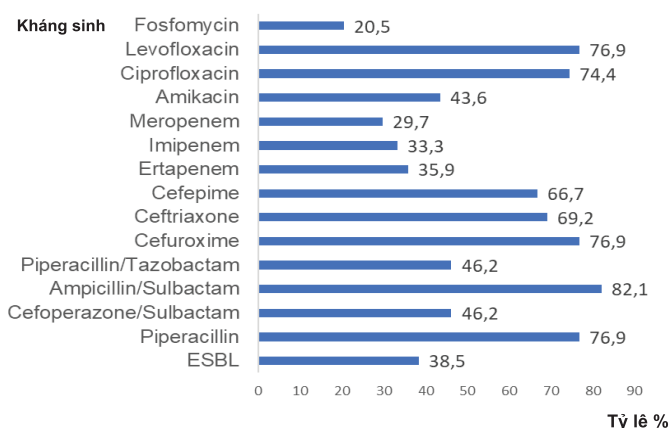
3.2. Đặc điểm đề kháng kháng sinh của một số vi khuẩn phân lập được

Tính đề kháng kháng sinh của *E. coli*: Tỷ lệ các chủng *E. coli* sinh ESBL (men betalactamase phổ rộng - Extended spectrum beta-lactamase) là 58,4%. Kháng với Cephalosporine, Quinolone 65,3-74,8%, Carbapenem 6,8-8,6% (hình 1).



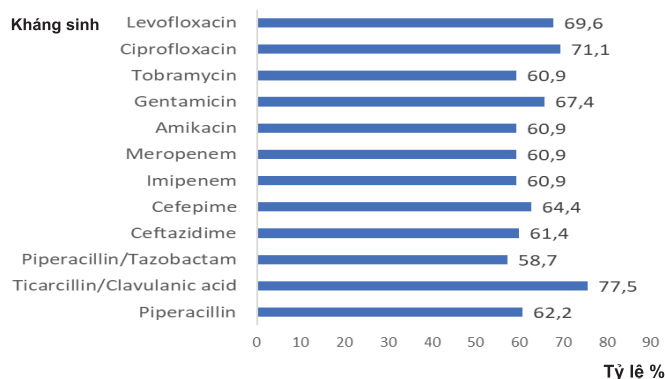
Hình 1. Tỷ lệ (%) kháng kháng sinh của *E. coli* (n=226).

Tính đề kháng kháng sinh của *K. pneumoniae*: *K. pneumoniae* đề kháng Cephalosporine, Quinolone 66,7-76,9%, kháng nhóm Carbapenem 29,7-35,9%. Tỷ lệ sinh ESBL 38,5% (hình 2).



Hình 2. Tỷ lệ (%) kháng kháng sinh của *K. pneumoniae* (n=39).

Tính đề kháng kháng sinh của *P. aeruginosa*: *P. aeruginosa* đề kháng trên 60% với hầu hết các kháng sinh thử nghiệm (hình 3).



Hình 3. Tỷ lệ (%) kháng kháng sinh của *P. aeruginosa* (n=46).

Bàn luận

Về tỷ lệ các VK gây NKĐTN phân lập được

VK gram âm là những tác nhân gây bệnh hàng đầu, với mức độ kháng kháng sinh cao trong hầu hết các nhiễm khuẩn. Nghiên cứu này cho thấy sự khác biệt rõ rệt giữa VK gram âm và VK gram dương, nắm, trong đó, VK gram âm chiếm ưu thế với tỷ lệ gần 60%. Nghiên cứu của Lâm Tú Hương và cs (2021) [6] cho thấy, các VK gram âm là những tác nhân gây bệnh chủ yếu với hơn 77% số VK phân lập được. Một số nghiên cứu nước ngoài cũng cho thấy, các VK gram âm là những tác nhân gây NKĐTN phổ biến nhất [7, 8].

Trong nghiên cứu này, họ VK đường ruột là căn nguyên chủ yếu, đặc biệt *E. coli* là tác nhân gây bệnh hàng đầu với 56,5%, xếp thứ hai là *P. aeruginosa* 11,5%, xếp thứ ba là *K. pneumoniae* với 9,75% trong tổng số VK gram âm phân lập được.

Về tính kháng kháng sinh của các chủng VK gây NKĐTN phân lập được

Tính kháng kháng sinh của *E. coli*: Kết quả cho thấy, *E. coli* đã đề kháng với tất cả kháng sinh thử nghiệm ở các mức độ khác nhau và xuất hiện nhiều chủng *E. coli* sinh ESBL. Tỷ lệ VK *E. coli* có khả năng sinh ESBL là 58,4%, tỷ lệ này tương đối cao. Kết quả này cao hơn kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Thanh Tâm và Trần Thị Bích Hương (2015) [3] là 39,1%. Một nghiên cứu tại Đan Mạch cho biết, tỷ lệ chủng sinh ESBL rất thấp (4%) [9], một nghiên cứu khác ở Southern Tunisia cũng cho kết quả *E. coli* sinh ESBL rất thấp (với 3,61%) [8].

Kháng sinh nhóm Quinolone là một trong những nhóm kháng sinh được sử dụng phổ biến nhất. *E. coli* đề kháng nhóm này 66,2-68,3%. Kết quả này thấp hơn so với nghiên cứu của Kiều Chí Thành và cs (2017) [2] với mức độ đề kháng Quinolone 70,6-75%. Một nghiên cứu tại Đan Mạch cho kết quả mức độ đề kháng rất thấp, chỉ là 8% [9].

Kết quả hình 1 cho thấy, mức độ đề kháng Cephalosporine 65,3-74,8%. Kết quả của nghiên cứu này cho mức độ kháng Ceftriaxone tương đồng nghiên cứu của Kiều Chí Thành và cs (2017) [2] (kháng gần 70%) và thấp hơn của Nguyễn Thị Thanh Tâm và Trần Thị Bích Hương (2015) [3] (84,6%). Tuy nhiên, tỷ lệ kháng kháng sinh Cephalosporine thế hệ 4 Cefepime lại cao hơn (65,3 so với 36,5%). Kết quả của nghiên cứu này cũng tương đồng với Trần Thị Thanh Nga (2013) [10] (kháng Ceftriaxone 62,3%). Một nghiên cứu khác tại Đan Mạch cho thấy, mức độ đề kháng Cephalosporine thế hệ 3 rất thấp, chỉ đạt 4% [9].

Kháng sinh nhóm Carbapenem là nhóm thường được sử dụng trong các nhiễm khuẩn nặng. Nghiên cứu này ghi nhận tỷ lệ đề kháng 6,8-8,6%. Theo Nguyễn Thị Thanh Tâm và Trần Thị Bích Hương (2015) [3], chưa ghi nhận chủng

E. coli nào kháng kháng sinh nhóm Carbapenem, nghiên cứu khác tại Đan Mạch cũng ghi nhận kết quả tương tự [9].

Có sự khác biệt đáng kể về mức độ kháng kháng sinh của nghiên cứu này, cũng như các nghiên cứu khác trong nước với nghiên cứu ở Đan Mạch. Điều này có thể do kiểm soát lưu hành các chủng VK đa kháng thuốc ở Đan Mạch (và các nước châu Âu) rất tốt, cũng như chính sách quản lý sử dụng kháng sinh nghiêm ngặt, giúp hạn chế sự kháng kháng sinh của các VK.

E. coli kháng với nhiều kháng sinh thông dụng, gây ra những khó khăn cho cả bác sỹ lâm sàng và người bệnh trong việc lựa chọn kháng sinh điều trị, đặc biệt VK này là căn nguyên gây bệnh phổ biến nhất và rất hạn chế về các lựa chọn kháng sinh đường uống.

Trong những trường hợp đa kháng, Amikacin, Fosfomycin, Piperacillin/tazobactam, Cefoperazone/Sulbactam là những lựa chọn cứu cánh. Những kháng sinh này đưa vào sử dụng tại Bệnh viện Hữu nghị Đa khoa Nghệ An chưa lâu, hơn nữa thuộc danh mục quản lý chặt chẽ nên vẫn duy trì được được lực tốt.

Trong nghiên cứu này, *E. coli* kháng với Amikacin 7,7%, Fosfomycin 4,1%, Piperacillin/tazobactam 14,4%, Cefoperazone/Sulbactam 12,4% (hình 1). Nghiên cứu của K.C. Thành và cs (2017) [2] cho thấy, VK này kháng Amikacin 15,9%, Fosfomycin 11,1%, gấp hơn 2 lần so với nghiên cứu này. Nghiên cứu của L.T. Hương và cs (2021) [6] cũng cho thấy *E. coli* đề kháng thấp với các kháng sinh trên với Amikacin chỉ 1,4%, Fosfomycin 7,9%, Piperacillin/tazobactam 12,2%, Cefoperazone/Sulbactam 4,7%. Nghiên cứu của K.U. Zubair và cs (2019) [11] chưa ghi nhận VK này kháng với Piperacillin/Tazobactam.

Tính kháng kháng sinh của *P. aeruginosa*: Mức độ đề kháng của *P. aeruginosa* với các kháng sinh thử nghiệm là rất cao, đề kháng trên 60% với tất cả các kháng sinh thử nghiệm (trừ Piperacillin/tazobactam kháng 58,7%) (hình 3). VK này là một trong những VK gây nhiễm trùng bệnh viện phổ biến, với sức đề kháng mạnh, gây ra rất nhiều khó khăn cho bác sỹ trong việc lựa chọn kháng sinh điều trị cho bệnh nhân.

Ceftazidime là kháng sinh thường được sử dụng điều trị nhiễm khuẩn do *P. aeruginosa*, tuy nhiên trong nghiên cứu này mức độ đề kháng đã lên tới 61,4%, cao hơn nghiên cứu của N.T.T. Tâm và cs (2015) [3] (hơn 50%). Trong nghiên cứu của T.T.T. Nga (2013) [10], VK này kháng Ceftazidime 70% (cao hơn nghiên cứu này); nghiên cứu của K.C. Thành và cs (2017) [2] cho thấy, mức độ đề kháng Ceftazidime là 38,9% (thấp hơn nghiên cứu này). Trong nghiên cứu của K.U. Zubair và cs (2019) [11], *P. aeruginosa* kháng với kháng sinh này 56,1%, ngưỡng tương đối cao. Một nghiên cứu khác tại Ả Rập cho thấy VK này cũng kháng Ceftazidime 50% [12].

Mức độ kháng Carbapenem trong nghiên cứu này 60,0%, cao hơn so với nghiên cứu của T.T.T. Nga (2013) [10] là 33-46%, K.C. Thành và cs (2017) [2] là 26-31,2% [2], N.T.T. Tâm và T.T.B. Hương (2015) [3] là 30-40%. Trong khi đó, nghiên cứu của M.A. Alzahrani và cs (2020) [12], mức độ kháng nhóm kháng sinh này đang khá thấp (26-28%), còn nghiên cứu khác tại Pakistan thì mức độ kháng với Imipenem chỉ 10,4%, rất thấp so với các nghiên cứu trên [13].

Trong nghiên cứu này, *P. aeruginosa* có mức độ đề kháng Levofloxacin 69,6%, kháng Ciprofloxacin 71,1%. So sánh với các nghiên cứu khác, kết quả này cao hơn Kiều Chí Thành và cs (2017) [2] kháng Ciprofloxacin, Levofloxacin 60%, nhưng thấp hơn nghiên cứu của Trần Thị Thanh Nga (2013) [10] kháng Ciprofloxacin 73,8%.

Tính kháng kháng sinh của *K. pneumoniae*: Tương tự *E. coli*, sự xuất hiện các chủng *K. pneumoniae* đa kháng thuốc đã gây không ít khó khăn trong điều trị, sự đề kháng các Cephalosporine, Quinolone với tỷ lệ cao làm cho việc lựa chọn kháng sinh điều trị trở nên khó khăn hơn, đặc biệt là sự xuất hiện nhiều chủng VK này kháng Carbapenem.

Nghiên cứu của N.T.T. Tâm và T.T.B. Hương (2015) [3] cho thấy, *K. pneumoniae* đã kháng Ciprofloxacin, Levofloxacin 100%, cao hơn nhiều so với nghiên cứu này (74,4-76,9%). Nghiên cứu của K.C. Thành và cs (2017) [2] cho thấy, mức độ đề kháng Quinolone 60-61,5%, thấp hơn so với nghiên cứu này. Trong nghiên cứu của M.A. Alzahrani và cs (2020) [12], mức độ kháng Ciprofloxacin ở mức 40%, thấp hơn các nghiên cứu nêu trên. Ngược lại, nghiên cứu của K.U. Zubair và cs (2019) [11] cho thấy VK này kháng Ciprofloxacin, Levofloxacin chỉ 25% (nhạy cảm 75%) [11].

Các kháng sinh nhóm Cephalosporine là những kháng sinh thông dụng, được sử dụng nhiều trên lâm sàng. Do đó, nguy cơ sự đề kháng của VK với nhóm kháng sinh này cũng lớn và thách thức cho bác sỹ điều trị. Trong nghiên cứu của Kiều Chí Thành và cs (2017) [2], mức độ đề kháng Cephalosporine thế hệ 3 là 62,5%, thấp hơn so với nghiên cứu này (kháng Cephalosporine thế hệ 3, 4 là 66,7-69,2%). Theo nghiên cứu của N.T.T. Tâm và T.T.B. Hương (2015) [3] tại Bệnh viện Chợ Rẫy, mức độ đề kháng Cephalosporine lên đến 90% [3], cao hơn nhiều so với nghiên cứu này. Trong nghiên cứu của M.A. Alzahrani và cs (2020) [12] thì VK này đã kháng với các Cephalosporine 33-69%.

Carbapenem là nhóm kháng sinh phổ rộng, có tác dụng mạnh lên các VK gram âm, thường được lựa chọn trong điều trị các nhiễm khuẩn nặng, các trường hợp đa kháng thuốc. Do đó, sự xuất hiện các chủng VK kháng với nhóm

kháng sinh này là thách thức lớn trong quản lý và sử dụng. Trong nghiên cứu này, *K. pneumoniae* có mức độ đề kháng Carbapenem lên tới 29,7-35,9%. Nghiên cứu của N.T.T. Tâm và T.T.B. Hương (2015) [3] cho kết quả kháng nhóm kháng sinh này khá cao như nghiên cứu này. Trong khi đó, nghiên cứu tại Pakistan (2019) chưa ghi nhận đề kháng Imipenem [11].

Kết luận

Các VK gram âm là những tác nhân gây NKĐTN chiếm tỷ lệ cao nhất với gần 60% tác nhân phân lập được. Các căn nguyên phổ biến là *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*. Các VK phân lập được đã đề kháng với nhiều kháng sinh thường dùng với các mức độ khác nhau. Đặc biệt, sự xuất hiện các chủng VK gram âm kháng Carbapenem.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Vietnam Association of Urology and Nephrology (2013), *Guidelines for The Treatment of Urinary Tract Infections in Vietnam*, 77pp (in Vietnamese).
- [2] K.C. Thanh, L.T. Hong, N.V. An, et al. (2017), "Research on the rate and antibiotic resistance of bacteria causing urinary tract infections at Military Hospital 103 (2014-2016)", *Medical News*, **12**, pp.20-25 (in Vietnamese).
- [3] N.T.T. Tam, T.T.B. Hương (2015), "Special clinical and microbiological scores of complicated urinary tract infections in adults at Cho Ray Hospital", *Ho Chi Minh City Medical Journal*, **19(4)**, pp.458-465 (in Vietnamese).
- [4] Ministry of Health (2017), *Guidelines for Practicing Forest Microbiology Techniques Clinical*, Medical Publishing House, 138pp (in Vietnamese).
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute (2019), *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 29th Ed, CLSI Supplement M100, 25pp.
- [6] L.T. Huong, H.M. Tuan, T.D. Khoa (2021), "Bacterial characteristics and antibiograms of infected patients urinary tract treated at the Department of Urology, Ho Chi Minh City University of Medicine and Pharmacy Hospital", *Ho Chi Minh City Medical Journal*, **25(1)**, pp.159-163 (in Vietnamese).
- [7] A. Mazzariol, A. Bazaj, G. Cornaglia (2017), "Multi-drug-resistant gram-negative bacteria causing urinary tract infections: A review", *Journal of Chemotherapy*, **29**, pp.2-9, DOI: 10.1080/1120009X.2017.1380395.
- [8] S.G. Toumi, S. Boujlel, M. Assoudi, et al. (2018), "Susceptibility profiles of bacteria causing urinary tract infections in Southern Tunisia", *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, **12**, pp.48-52, DOI: 10.1016/j.jgar.2017.09.004.
- [9] G. Córdoba, A. Holm, F. Hansen, et al. (2017), "Prevalence of antimicrobial resistant *Escherichia coli* from patients with suspected urinary tract infection in primary care, Denmark", *BMC Infectious Diseases*, **17(1)**, DOI: 10.1186/s12879-017-2785-y.
- [10] T.T.T. Nga (2013), "Infectious agents common urinary tract infections and antibiotic resistance in Hospitals Cho Ray in 2010-2011", *Ho Chi Minh City Medical Journal*, **17(1)**, pp.578-581 (in Vietnamese).
- [11] K.U. Zubair, A.H. Shah, A. Fawwad, et al. (2019), "Frequency of urinary tract infection and antibiotic sensitivity of uropathogens in patients with diabetes", *Pakistan Journal of Medical Sciences*, **35(6)**, pp.1664-1668, DOI: 10.12669/pjms.35.6.115.
- [12] M.A. Alzahrani, M.S. Ali, S. Anwar (2020), "Bacteria causing urinary tract infections and its antibiotic susceptibility pattern at tertiary hospital in Al-Baha region, Saudi Arabia: A retrospective study", *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, **12(4)**, pp.449-456, DOI: 10.4103/jpbs.JPBS_294_19.
- [13] D.A. Shah, S. Wasim, F.E. Abdullah (2015), "Antibiotic resistance pattern of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urine samples of Urinary Tract Infections patients in Karachi, Pakistan", *Pakistan Journal of Medical Sciences*, **31(2)**, pp.341-345, DOI: 10.12669/pjms.312.6839.

Đặc điểm các biến dạng ở mũi trên bệnh nhân khe hở môi một bên, ứng dụng trong phẫu thuật tạo hình mũi tại Bệnh viện Chợ Rẫy

Lê Hoàng Vĩnh^{1*}, Trần Viết Luân², Đỗ Quang Hùng³

¹Bộ môn Phẫu thuật Tạo hình Thẩm mỹ, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch, 2 Dương Quang Trung, phường 12, quận 10, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Bộ môn Tai Mũi Họng, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch, 2 Dương Quang Trung, phường 12, quận 10, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Khoa Tạo hình Thẩm mỹ, Bệnh viện Chợ Rẫy, 201B Nguyễn Chí Thanh, phường 12, quận 5, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 26/9/2022; ngày chuyển phản biện 30/9/2022; ngày nhận phản biện 24/10/2022; ngày chấp nhận đăng 28/10/2022

Tóm tắt:

Biến dạng mũi ở bệnh nhân khe hở môi một bên có nhiều dạng lâm sàng khác nhau, làm mất cân xứng trầm trọng 2 bên mũi. Việc điều trị tạo hình biến dạng mũi trên những trường hợp này rất phức tạp và là thách thức cho các phẫu thuật viên. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát đặc điểm các biến dạng mũi ở bệnh nhân khe hở môi một bên, từ đó giúp các phẫu thuật viên có sự chuẩn bị tốt hơn cho phẫu thuật. Phương pháp nghiên cứu là hồi cứu, mô tả hàng loạt ca được thực hiện trên 89 bệnh nhân khe hở môi một bên đã phẫu thuật môi nhưng còn biến dạng mũi đến khám và điều trị tại Khoa Tạo hình Thẩm mỹ, Bệnh viện Chợ Rẫy từ tháng 12/2013 đến tháng 10/2022. Kết quả nghiên cứu cho thấy, 64/89 bệnh nhân là nữ (71,9%), chỉ có 25 bệnh nhân nam (28,1%), tuổi thấp nhất là 16 và cao nhất là 64. 44 bệnh nhân có khe hở môi bên trái (49,44%) và 45 bên phải (50,56%), 100% bệnh nhân khe hở môi một bên có đặc điểm biến dạng mũi gồm: cánh mũi ngang, thấp và dài hơn bên lành, nền mũi khuyết, trụ mũi lệch, đỉnh mũi lệch, lỗ mũi rộng nằm ngang.

Từ khóa: biến dạng mũi, khe hở môi, khe hở môi một bên.

Chỉ số phân loại: 3.2

1. Đặt vấn đề

Khe hở môi - hàm ếch là một trong những dị tật bẩm sinh thường gặp ở vùng hàm mặt. Theo Tổ chức Y tế Thế giới, tỷ lệ bệnh nhân trên thế giới bị khe hở môi - hàm ếch ước tính khoảng 1/500. Tại Việt Nam, tỷ lệ trẻ dị tật bẩm sinh khe hở môi - hàm ếch là 0,141% [1]. Các dị dạng khe hở không trực tiếp đe dọa đến tính mạng nhưng ảnh hưởng rất lớn đến thẩm mỹ của khuôn mặt, tác động mạnh đến tâm lý của người bệnh. Đã có nhiều công trình nghiên cứu đóng kín các khe hở, tuy nhiên, biến dạng mũi trên bệnh nhân khe hở môi ít được chú ý hơn cho đến thế kỷ XX [2]. Khi xã hội ngày một phát triển, chất lượng cuộc sống ngày càng được nâng cao, nhu cầu chỉnh hình các biến dạng mũi sau phẫu thuật khe hở môi nhằm cải thiện chức năng và thẩm mỹ cũng ngày càng gia tăng. Đây là một thách thức cho các phẫu thuật viên vì biến dạng mũi ở bệnh nhân khe hở môi có nhiều dạng lâm sàng khác nhau. Biến dạng có thể làm mất cân xứng trầm trọng 2 bên mũi nên việc tạo hình rất phức tạp, đòi hỏi sự phối hợp của nhiều kỹ thuật và sử dụng nhiều nguyên liệu. Do đó, cần hiểu rõ những đặc điểm biến dạng mũi trên bệnh nhân khe hở môi một bên trước khi tiến hành phẫu thuật tạo hình mũi. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát các đặc điểm biến dạng mũi ở bệnh nhân khe hở môi một bên, từ đó giúp các phẫu thuật viên đánh giá được tình hình và chuẩn bị tốt hơn cho phẫu thuật.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

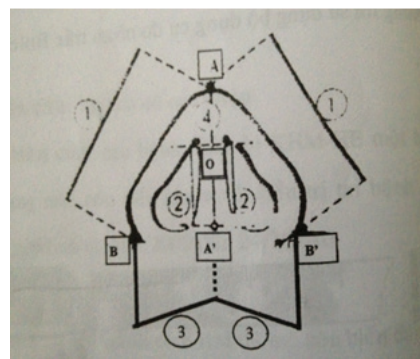
2.1. Đối tượng

Bệnh nhân khe hở môi một bên đã phẫu thuật vá môi, đến khám và điều trị tại Khoa Tạo hình Thẩm mỹ, Bệnh viện Chợ Rẫy từ tháng 12/2013 đến tháng 10/2022.

Cỡ mẫu: Chọn mẫu thuận tiện, trong thời gian trên các tác giả ghi nhận 89 bệnh nhân.

Dụng cụ và phương tiện đo đạc: Thước đo nhân trắc Boley và thước dây.

Các kích thước mũi cần khảo sát: Chiều dài cánh mũi (AB, AB'), chiều cao trụ mũi (OA'), chiều cao mũi (AA') và chiều rộng nền mũi (A'B, A'B') (hình 1).



Hình 1. Các kích thước mũi cần khảo sát [3].

*Tác giả liên hệ: Email: vinhhlh@pnt.edu.vn

Unilateral cleft lip anatomy combined with nasal deformities for clinical application in rhinoplasty at Cho Ray Hospital

Hoang Vinh Le^{1*}, Viet Luan Tran², Quang Hung Do³

¹Department of Plastic and Reconstructive Surgery,
Pham Ngoc Thach University of Medicine,

2 Duong Quang Trung, Ward 12, District 10, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Department of Ear, Nose and Throat, Pham Ngoc Thach University of Medicine,
2 Duong Quang Trung, Ward 12, District 10, Ho Chi Minh City, Vietnam

³Department of Plastic Surgery, Cho Ray Hospital,

³201B Nguyen Chi Thanh, Ward 12, District 5, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 26 September 2022; revised 24 October 2022; accepted 28 October 2022

Abstract:

Nasal deformity in unilateral cleft lip patients has many different clinical forms, causing severe disproportion on both sides of the nose. The treatment of rhinoplasty in these cases is very complex and always a challenge for the surgeon. This study aims to investigate the characteristics of nasal deformities in unilateral cleft lip patients, thereby helping clinical surgeons better prepare for rhinoplasty in these patients. A retrospective method describes a series of cases performed on 89 unilateral cleft lip patients who had lip surgery but still deformed the nose and came for examination and treatment at the Department of Plastic Surgery, Cho Ray Hospital, from December 2013 until October 2022. The study results showed that, 64/89 patients were female (71.9%), only 25 male patients (28.1%), the lowest age was 16 and the highest was 64 years old. 44 patients had a lateral cleft lip on the left side (49.44%) and 45 patients on the right side (50.56%), 100% of the patients had features of nasal deformities: the nasal tip is horizontal, lower and longer than the normal side, nasal base defect, deviated nasal columella, deviated nasal tip, and the nostrils are wide and flat.

Keywords: cleft lip, nasal deformities, unilateral cleft lip.

Classification number: 3.2

2.2. Phương pháp

Thiết kế nghiên cứu: Hồi cứu, mô tả hàng loạt ca.

3. Kết quả

Từ tháng 12/2013 đến tháng 10/2022 có 89 bệnh nhân khe hở môi một bên thỏa mãn yêu cầu nghiên cứu. Kết quả nghiên cứu cho thấy, đa phần bệnh nhân là nữ giới (71,9%), nam giới chỉ chiếm 28,1% (bảng 1). Về độ tuổi, bệnh nhân có tuổi cao nhất là 64, thấp nhất là 16 (trung bình là 40).

Bảng 1. Phân bố theo giới tính.

Giới tính	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Nam	25	28,1
Nữ	64	71,9

Bảng 2. Vị trí khe hở môi.

Vị trí khe hở môi	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Bên trái	44	49,44
Bên phải	45	50,56

Kết quả bảng 2 cho thấy, 44 bệnh nhân có khe hở môi bên trái (chiếm 49,44%), 45 bệnh nhân hở môi bên phải (chiếm 50,56%).

Các biến dạng mũi trên bệnh nhân khe hở môi một bên bao gồm: cánh mũi ngang, thấp và dài hơn bên lành, nền mũi khuyết, trụ mũi lệch, đỉnh mũi lệch, lỗ mũi rộng nằm ngang. Tình trạng thông khí ở mũi: có 6/89 bệnh nhân (6,74%) nghẹt một bên mũi. Các kích thước mũi trước phẫu thuật được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Các kích thước mũi trước phẫu thuật.

	Trung bình (mm)	Lớn nhất (mm)	Nhỏ nhất (mm)
Chiều dài cánh mũi bên lành	26,5	35	22
Chiều dài cánh mũi bên khe hở	29,2	32	23
Chiều cao trụ mũi	7,4	10	5
Chiều cao mũi	14,6	19	9
Chiều rộng nền mũi bên lành	16,5	22	13
Chiều rộng nền mũi bên khe hở	19,4	25	14

Kết quả bảng 3 cho thấy, trước phẫu thuật, chiều dài cánh mũi và chiều rộng nền mũi bên khe hở đều cao hơn so với bên lành.

Biến dạng mũi trên bệnh nhân khe hở môi một bên trước khi phẫu thuật vá môi và sau phẫu thuật vá môi trước khi tạo hình mũi được thể hiện ở hình 2-4.



Hình 2. Biến dạng mũi trên bệnh nhân khe hở môi một bên trước khi phẫu thuật vá môi [4].



Hình 3. Biến dạng của mũi trên bệnh nhân đã phẫu thuật vá môi trước khi tạo hình mũi.



Hình 4. Biến dạng của bệnh nhân được cải thiện sau phẫu thuật.

4. Bàn luận

Số bệnh nhân nữ trong nghiên cứu này là 64 (chiếm 71,9%), gấp 2,5 lần số bệnh nhân nam, kết quả này tương đồng với nghiên cứu của N.T. Châu (2010) [3]. Trong nghiên cứu của C. Wong (2018) [5], F.V.W.J.V. Zijl và cs (2018) [6] có tỷ lệ nam và nữ tương đương nhau. Trong khi đó, nghiên cứu của L.F. Insalaco và cs (2020) [7] lại cho thấy tỷ lệ nam gấp đôi nữ. Việc chỉnh sửa biến dạng mũi có thể ít liên quan

đến giới tính, nhưng có thể thấy ở các nước phương đông, nữ giới có nhu cầu thẩm mỹ mũi cao hơn nam giới.

Theo S.G. Melgar và cs (2013) [8], việc chỉnh sửa mũi thường trong khoảng 16-18 tuổi, lúc này sụn mũi đã phát triển đầy đủ, không còn biến dạng thứ phát sau sửa chữa kỳ 2 trở đi sẽ mang lại hiệu quả cao hơn. Trong nghiên cứu của chúng tôi, bệnh nhân nhỏ tuổi nhất là 16 và lớn tuổi nhất là 64, nhóm tuổi nhiều nhất là 18-20 (28 bệnh nhân, chiếm 31,46%), nhóm tuổi này tương đồng với nghiên cứu của C. Wong (2018) [5] (19 tuổi) và H.J. Seo (2020) [9] (19±1 tuổi). Đây là lứa tuổi vừa mới kết thúc chương trình học phổ thông bắt đầu học đại học hoặc đi làm, quá trình giao tiếp xã hội nhiều và có ý thức về hình dáng bên ngoài, đặc biệt là trên gương mặt.

Cơ chế hình thành khe hở môi thường được giải thích qua thuyết “nụ mầm” và quá trình trung bì hóa, sự bất thường trong quá trình kết dính các nụ sẽ tạo thành các khe hở [10]. Khi có khe hở, hai phần cơ của cơ vòng môi trên cách nhau bởi khe hở có xu hướng kéo theo hướng ngược lại, một phần kéo nền cánh mũi ra bên ngoài, phần còn lại kéo trụ mũi theo hướng ngược lại. Điều đó gây ra biến dạng của đầu mũi, lỗ mũi, trụ mũi, vách ngăn, cánh mũi nhiều hoặc ít trong quá trình phát triển của cơ thể [11, 12].

Theo thống kê, có khoảng 80% số bệnh nhân có biến dạng mũi sau tạo hình khe hở môi kỳ đầu. Nguyên nhân là do chỉ khép kín khe hở, chưa can thiệp vào mũi ở phẫu thuật kỳ đầu, các biến dạng nguyên phát của mũi vẫn còn tồn tại, hoặc sau phẫu thuật mũi kỳ đầu, mũi bị biến dạng dần trong quá trình phát triển của cơ thể [2].

Trong nghiên cứu này, 100% bệnh nhân có mũi biến dạng với các đặc điểm: cánh mũi ngang, thấp và dài hơn bên lành, lỗ mũi rộng nằm ngang, nền mũi khuyết, trụ mũi lệch, đỉnh mũi lệch. Nguyên nhân có thể do trước đây tại Việt Nam chưa áp dụng các biện pháp hỗ trợ điều trị toàn diện khe hở môi từ lúc mới sinh đến trưởng thành. Theo N.T. Châu (2010) [3], bệnh nhân bị biến dạng mũi sẽ có những đặc điểm lâm sàng như: đầu mũi lệch (73,3%), cánh mũi xẹp (100%), lỗ mũi rộng (96,7%), nền lỗ mũi khuyết (73,3). Còn theo L.Đ. Tuấn (2004) [2], cánh mũi bên khe hở môi bị xẹp chiếm tỷ lệ cao nhất (92,13%), tiếp đến là đầu mũi và trụ mũi lệch (66,92%), cuối cùng là lỗ mũi bên khe hở môi rộng (43,38%).

Nắm rõ cơ chế gây ra biến dạng và đặc điểm các biến dạng mũi trên bệnh nhân đã phẫu thuật khe hở môi một bên có thể giúp các phẫu thuật viên chủ động định hướng cho cuộc phẫu thuật, chuẩn bị các phương pháp và lựa chọn vật liệu tạo hình mũi phù hợp cho từng trường hợp cụ thể. Trong nghiên cứu này, những biến dạng của trụ mũi và cánh

mũi được cải thiện bởi mảnh ghép mở rộng vách ngăn bằng sụn sườn tự thân, biến dạng của cánh mũi được cải thiện bởi mảnh ghép Alar bằng sụn sườn, biến dạng của nền mũi được cải thiện bằng sụn sườn đập mềm một phần độn vào tạo hình nâng cao nền mũi, từ đó cải thiện sự bất cân xứng của 2 lỗ mũi.

Trong nghiên cứu này, chiều cao mũi trước phẫu thuật lớn nhất là 19 mm, nhỏ nhất là 9 mm, trung bình 14 mm. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của N.T. Châu (2010) [3] (18,8 mm).

Có sự không cân xứng 2 bên của nền mũi, cánh mũi. Chiều rộng nền mũi bên lành trước phẫu thuật trong nghiên cứu này trung bình là 16,5 mm, bên khe hở là 19,4 mm. Chiều dài cánh mũi bên lành trung bình là 26,5 mm, bên lành là 29,2 mm. Có thể thấy, chiều dài cánh mũi trung bình bên khe hở luôn lớn hơn chiều dài cánh mũi trung bình bên lành trước phẫu thuật.

5. Kết luận

Các đặc điểm biến dạng của mũi thường gặp trên bệnh nhân khe hở môi một bên bao gồm: cánh mũi ngang, thấp và dài hơn bên lành, lỗ mũi rộng nằm ngang, nền mũi khuyết, trụ mũi lệch, đỉnh mũi lệch. Những biến dạng của trụ mũi và cánh mũi được cải thiện bởi mảnh ghép mở rộng vách ngăn bằng sụn sườn tự thân, biến dạng của cánh mũi được cải thiện bởi mảnh ghép Alar bằng sụn sườn, biến dạng của nền mũi được cải thiện bằng sụn sườn đập mềm một phần độn vào tạo hình nâng cao nền mũi, từ đó cải thiện sự bất cân xứng của 2 lỗ mũi. Cùng với việc thiếu thẩm mỹ do biến dạng mũi gây ra, quy trình phẫu thuật tạo hình cho bệnh nhân khe hở môi một bên cũng còn nhiều thách thức, chính vì vậy, các phẫu thuật viên cần hiểu rõ những đặc điểm biến dạng mũi để có thể lựa chọn phương pháp và nguyên liệu hiệu quả nhất trước khi tiến hành phẫu thuật.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] P.Q. Dung (2006), *Situation of Birth Defects of Cleft Lip - Cleft Palate at Tu Du and Hung Vuong Hospital*, Master's Thesis in Medicine, University of Medicine and Pharmacy, Ho Chi Minh City (in Vietnamese).
- [2] L.D. Tuan (2004), *Research on Repairing Deformations Lip - Nose After Surgery for Congenital Unilateral Upper Lip Cleft*, Essay Doctoral Thesis in Medicine, Institute of Clinical Medical and Pharmaceutical Sciences Research 108 (in Vietnamese).
- [3] N.T. Chau (2010), *Evaluation of Treatment Results of Tajima Method on Patients with Nose Deformities after Surgery unilateral Cleft Lip*, Thesis of Specialist Doctor II, University of Medicine and Pharmacy Ho Chi Minh City (in Vietnamese).
- [4] S.G. Hoshal (2020), "Controversies in cleft rhinoplasty", *Facial Plastic Surgery*, **36**(1), pp.102-111, DOI: 10.1055/s-0040-1701477.
- [5] C. Wong (2018), "Asian cleft rhinoplasty: The open structural approach", *Aesthetic Surgery Journal*, **38**(1), pp.28-37, DOI: 10.1093/asj/sjx197.
- [6] F.V.W.J.V. Zijl, S. Versnel, E.F.V.D. Poel, et al. (2018), "Use of routine prospective functional and aesthetic patient satisfaction measurements in secondary cleft lip rhinoplasty", *JAMA Facial Plast Surg.*, **20**(6), pp.488-494, DOI: 10.1001/jamafacial.2018.0876.
- [7] L.F. Insalaco, E. Karp, H. Zavala, et al. (2020), "Comparing autologous versus allogenic rib grafting in pediatric cleft rhinoplasty", *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, **138**, DOI: 10.1016/j.ijporl.2020.110264.
- [8] S.G. Melgar, C.M. Martin (2013), "Analysis and treatment of cleft lip nasal and palate deformity", *Acta Otorrinolaringol. Esp.*, **64**(5), pp.323-330, DOI: 10.1016/j.otoeng.2013.10.003.
- [9] H.J. Seo (2020), "Primary rhinoplasty does not interfere with nasal growth: A long-term three-dimensional morphometric outcome study in patients with unilateral cleft", *Plast. Reconstr. Surg.*, **145**(5), pp.1223-1236, DOI: 10.1097/PRS.00000000000006744.
- [10] N.C. Phuong (2017), "Cleft lip and palate", *Maxillofacial Pathology and Surgery*, **1**, pp.115-139 (in Vietnamese).
- [11] S.A. Wolfe, N.R. Nathan (2016), "The cleft lip nose: Primary and secondary treatment", *Clin. Plastic Surg.*, **43**(1), pp.213-221, DOI: 10.1016/j.cps.2015.09.008.
- [12] D.J. Zajac, L.D. Vallino (2017), *Evaluation and Management of Cleft Lip and Palate a Developmental Perspective*, Plural Publishing, 418pp.

Đánh giá kết quả sớm điều trị nang tuyến vú bằng vi sóng tại Bệnh viện Chợ Rẫy

Huỳnh Quang Khánh^{1*}, Nguyễn Thành Phát²

¹Đơn vị Tuyến vú, Bệnh viện Chợ Rẫy

²Bộ môn Phẫu thuật Lồng ngực - Tim mạch, Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 26/2/2022; ngày chuyển phản biện 28/2/2022; ngày nhận phản biện 25/3/2022; ngày chấp nhận đăng 28/3/2022

Tóm tắt:

Nang tuyến vú thường gặp ở phụ nữ tiền mãn kinh (65,1%) so với phụ nữ mãn kinh (39,4%) với độ tuổi thường gặp nhất là từ 35 đến 50. Can thiệp điều trị nang tuyến vú có triệu chứng bằng vi sóng là một phương pháp điều trị đáng quan tâm với nhiều ưu điểm. Nghiên cứu nhằm đánh giá kết quả sớm của phương pháp điều trị nang lành tính tuyến vú bằng vi sóng dưới hướng dẫn của siêu âm. Nghiên cứu sử dụng phương pháp mô tả loạt ca hồi cứu bệnh nhân nang tuyến vú có triệu chứng không đáp ứng điều trị nội khoa và chọc hút bằng kim nhỏ được can thiệp điều trị bằng vi sóng tại Đơn vị Tuyến vú, Bệnh viện Chợ Rẫy từ tháng 8/2018 đến tháng 3/2020. Kết quả cho thấy, 58 bệnh nhân được điều trị bằng vi sóng, tuổi trung bình 45,3. Tỷ lệ các loại nang đơn giản, phức hợp, phức tạp lần lượt là 80,0, 16,93 và 3,07%. Kích thước trung bình nang được can thiệp là 23,86 mm. Tất cả bệnh nhân đều có đáp ứng hoàn toàn sau khi thực hiện đốt vi sóng, tỷ lệ giảm kích thước sau 6 tháng đạt trên 90%. Hoàn toàn không xuất hiện các biến chứng liên quan tới can thiệp trong suốt quá trình theo dõi. Có một trường hợp nang bọc sữa có vôi hóa thành nang không đáp ứng điều trị. Tóm lại, can thiệp bằng vi sóng là một phương pháp điều trị hứa hẹn cho các nang tuyến vú có triệu chứng với tỷ lệ thành công thủ thuật cao, tỷ lệ biến chứng sau thủ thuật thấp. Nang có thành nang vôi hóa cần được đánh giá kỹ trước khi thực hiện điều trị bằng vi sóng.

Từ khóa: Bệnh viện Chợ Rẫy, can thiệp bằng vi sóng, nang tuyến vú.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

Bệnh lý tuyến vú được chia thành 2 nhóm chính: bệnh lý lành tính chiếm khoảng 87,7% và ung thư vú chiếm khoảng 12,3%, tỷ lệ này thay đổi tùy theo nhóm tuổi [1]. Trong nhóm bệnh lành tính tuyến vú, nang và thay đổi sợi bọc tuyến vú là 2 nhóm chiếm đa số.

Nang tuyến vú được định nghĩa là những cấu trúc dạng túi hoặc khối chứa dịch hình tròn hoặc ô van xuất phát từ phần tận cùng của đơn vị ống tiểu thùy tuyến vú do sự dẫn và tắc nghẽn ở phần xa của ống tuyến vú. Những nang này xuất hiện ở nửa trên của tuyến vú, thường gặp ở phụ nữ tiền mãn kinh (65,1%) so với phụ nữ mãn kinh (39,4%), độ tuổi thường gặp nhất là từ 35 đến 50 [2]. Trong trường hợp sử dụng liệu pháp hormone thay thế, nang tuyến vú có thể xuất hiện nhiều nhất vào giai đoạn hậu mãn kinh [3]. Nang tuyến vú gồm 3 loại: đơn giản, phức tạp và phức hợp.

Nang tuyến vú nếu không có triệu chứng sẽ được theo dõi. Tuy nhiên, bên cạnh những nang thương kích thước nhỏ, không gây triệu chứng thì cũng có những nang thương kích thước lớn, gây triệu chứng chủ quan là cảm giác đau,

căng tức tuyến vú, đỏ da, đặc biệt có trường hợp nếu nhiễm trùng sẽ gây nên áp xe tuyến vú. Những nang thương này cần phải điều trị để loại bỏ các triệu chứng cho bệnh nhân.

Các hướng điều trị với nang tuyến vú gồm:

- Theo dõi: Áp dụng cho nang đơn giản và phức tạp được đánh giá BIRADs 3 trên siêu âm và không có triệu chứng lâm sàng.

- Hút nang tuyến vú bằng kim nhỏ: Là tiếp cận ban đầu đối với nang tuyến vú có triệu chứng. Nang phức tạp không triệu chứng mà bệnh nhân có nguy cơ cao ung thư tuyến vú (bất kể trên bảng đánh giá nào).

- Phẫu thuật cắt bỏ nang: Phương pháp này dùng để điều trị nang kích thước lớn, tái phát nhiều lần sau chọc hút, hoặc những nang nghi ngờ nhưng kết quả sinh thiết lõi là lành tính. Nhược điểm của phương pháp này là gây đau và mang lại sự kém hài lòng về mặt thẩm mỹ.

Trong khi đó, phương pháp điều trị bằng vi sóng có nhiều ưu điểm hơn các phương pháp kể trên như giảm thời gian và chi phí điều trị, giảm độc hại, ít hiệu ứng lan nhiệt và vùng đốt mô rộng hơn [4]. Về điều trị bệnh lý tuyến vú,

*Tác giả liên hệ: Email: huynhquangkhanhbvcr@gmail.com

Breast cyst microwave ablation: Early treatment result assessment at Cho Ray Hospital

Quang Khanh Huynh^{1*}, Thanh Phat Nguyen²

¹Unit of Breast, Cho Ray Hospital

²Thoracic and Cardiovascular Surgery Department, University of
Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City

Received 26 February 2022; accepted 28 March 2022

Abstract:

A breast cyst is common in premenopausal women (61.5%) in comparison with the menopause population (39.4%) and the most common age is 35 to 50. The treatment of breast cyst using a microwave with a lot of advantages should be a considered method. This study aims to evaluate the early result of breast cyst treatment with microwave in ultrasound guidance in breast unit of Cho Ray hospital. The authors prospectively reviewed patients who underwent breast cyst treatment using microwave ablation at the Unit of Breast, Cho Ray Hospital from August 2018 to March 2020. Results showed that 58 patients are reviewed. The average age is 45.3. The proportion of simple breast cyst, complicated breast cyst and complex breast cyst are 80.0, 16.93, and 3.07%, prospectively. The average diameter of ablated cysts is 23.86 mm. All of the patients have complete response after treatment, the decrease in size ratio has reach more than 90% after 6 months. No complication is recorded in treatment process. There is one case, with calcification of cyst wall, do not respond with microwave ablation. Microwave ablation procedure is the promising method for symptom breast cyst with high rate of success and low rate of complication. Breast cyst with calcified wall should have careful assessment before the procedure.

Keywords: breast cyst, Cho Ray Hospital, microwave ablation.

Classification number: 3.2

trên thế giới cũng đã áp dụng vi sóng trong điều trị các nang thương ác tính [5], kết quả cho thấy được sự an toàn và hiệu quả trong điều trị nang thương lành tính tuyến vú mà chủ yếu là u sợi tuyến vú.

Bệnh lý nang lành tính tuyến vú là một bệnh lý chưa được quan tâm nhiều, gây lo lắng cho bệnh nhân do các triệu chứng và tính tái phát. Điều trị bằng chọc hút nang đơn thuần không giải quyết được nguyên nhân hình thành nang dẫn tới tỷ lệ tái phát cao. Trong các phương pháp điều trị ít xâm lấn, điều trị bằng vi sóng đã cho thấy sự hiệu quả trong điều trị các cơ quan khác nhau. Chúng tôi đã hồi cứu các trường hợp can thiệp điều trị bệnh lý nang tuyến vú tại Đơn vị Tuyến vú, Bệnh viện Chợ Rẫy nhằm đánh giá các kết quả đạt được qua các chỉ định, kỹ thuật và kết quả bước đầu theo dõi điều trị bệnh lý này bằng vi sóng dưới hướng dẫn siêu âm.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Phương pháp

Thiết kế nghiên cứu: Hồi cứu mô tả hàng loạt ca.

Đối tượng nghiên cứu

Trích lục dữ liệu 58 hồ sơ bệnh án tại Đơn vị Tuyến vú của Bệnh viện Chợ Rẫy. Các bệnh nhân được can thiệp vi sóng điều trị bệnh lý nang tuyến vú trong thời gian từ tháng 8/2018 đến tháng 3/2020.

Tiêu chuẩn chọn mẫu: Chọn mẫu khi bệnh nhân thỏa mãn các điều kiện sau: bệnh nhân được chẩn đoán nang tuyến vú; nang tuyến vú có triệu chứng điều trị nội khoa không đáp ứng và nang tuyến vú tái phát sau chọc hút bằng kim nhỏ; có kết quả tế bào học lành tính hoặc kết quả giải phẫu bệnh lành tính; được điều trị nang tuyến vú bằng vi sóng.

Tiêu chuẩn loại trừ: Bệnh nhân có các sang thương khác kèm theo, cần làm sinh thiết chẩn đoán.

Các biến số nghiên cứu: Biến số đặc điểm mẫu nghiên cứu gồm có: tuổi, giới tính, hút thuốc lá, tăng huyết áp, bệnh mạch vành, đái tháo đường, bệnh phổi, bệnh thận, bệnh mạch máu não, tiền căn sử dụng nội tiết.

Biến số liên quan đến can thiệp: chỉ định can thiệp, loại nang can thiệp, thời gian can thiệp.

Biến số liên quan đến kết quả: thành công của kỹ thuật ngay sau điều trị, mức độ giảm kích thước trong quá trình theo dõi, biến chứng đau, chảy máu, nhiễm trùng, bóng da.

Phương pháp thống kê: Thu thập và xử lý số liệu bằng phần mềm SPSS 25. Biến số định tính được trình bày dưới dạng tần số, tỷ lệ %. Biến số định lượng được trình bày dưới dạng giá trị trung bình và độ lệch chuẩn.

Các biến định tính được kiểm tra sự tương quan bằng phép kiểm Chi bình phương và phép kiểm chính xác Fisher, các biến định lượng được kiểm tra sự tương quan bằng phép kiểm T-student, ANOVA. Giá trị $p \leq 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê.

Y đức: Kỹ thuật này đã được Hội đồng đạo đức của Bệnh viện Chợ Rẫy thông qua.

Kết quả

Từ tháng 8/2018 đến tháng 3/2020, có 58 bệnh nhân với 65 nang tuyến vú được can thiệp bằng vi sóng tại Đơn vị Tuyến vú, Bệnh viện Chợ Rẫy. Nhóm nang đơn giản, phức hợp và phức tạp chiếm tỷ lệ lần lượt là 80,0, 16,93 và 3,07%.

Đặc điểm của mẫu nghiên cứu có độ tuổi trung bình là 45,3. Tất cả các bệnh nhân đều được điều trị bằng chọc hút kim nhỏ và không đáp ứng. Có 32,7% bệnh nhân được điều trị nội khoa trước điều trị bằng vi sóng. Tỷ lệ bệnh nhân có sử dụng nội tiết tố là 10,34%. Tỷ lệ nhóm kích thước nang được can thiệp trong nghiên cứu được thể hiện ở bảng 1 cho thấy, đa số các trường hợp nang tuyến vú có kích thước 20-30 mm.

Bảng 1. Nhóm kích thước nang được can thiệp bằng vi sóng (n=65).

Nhóm kích thước nang	<20 mm	20-30 mm	>30 mm
Số lượng	24	29	12
Tỷ lệ %	36,9	44,6	18,5

Nang vú được thực hiện đốt vi sóng có kích thước lớn nhất là 56 mm, nhỏ nhất là 10 mm, trung bình là $23,86 \pm 11,43$ mm.

Bảng 2. Tỷ lệ sờ thấy tổn thương trước và sau can thiệp (n=58).

Đặc điểm tổn thương	Trước can thiệp	Sau can thiệp
Sờ thấy (%)	53 (91,38)	3 (5,17)
Không sờ thấy (%)	5 (8,62)	55 (94,83)

Kết quả bảng 2 cho thấy, có 91,38% các tổn thương sờ thấy trước can thiệp. Sau can thiệp chỉ còn 5,17% tổn thương còn sờ thấy trên lâm sàng.

Bảng 3. Tỷ lệ đáp ứng điều trị của từng loại nang trong quá trình theo dõi.

	1 tháng	3 tháng	6 tháng
Tỷ lệ giảm kích thước trung bình so với nang ban đầu			
Nang đơn giản	96,40 $\pm$ 1,45	98,09 $\pm$ 0,9	99,51 $\pm$ 0,47
Nang phức tạp	85,90 $\pm$ 4,25	88,90 $\pm$ 4,40	92,18 $\pm$ 4,82
Nang phức hợp	81,00 $\pm$ 1,41	86,00 $\pm$ 1,41	91,50 $\pm$ 2,15

Kết quả bảng 3 cho thấy, tỷ lệ giảm kích thước nang sau can thiệp tăng dần sau thời gian theo dõi, trong đó nang đơn giản có tỷ lệ giảm kích thước nhiều nhất.

Các bệnh nhân đều có thời gian bệnh kéo dài, trung bình là 19,7 tháng. Đặc điểm của nang tuyến vú là lành tính và chủ yếu là đa nang tuyến vú với tỷ lệ 84,49%. Triệu chứng sờ thấy nang vú chiếm tỷ lệ cao nhất với 89,8% các trường hợp, sau đó là triệu chứng đau vú với tỷ lệ là 42,4%. Tỷ lệ tái phát khi chọc hút đơn thuần nang tuyến vú đơn giản trong nghiên cứu này là 57,46% sau 6 tháng theo dõi.

Siêu âm tuyến vú giúp xác định chẩn đoán các loại nang trong nghiên cứu của chúng tôi với tỷ lệ 80% nang đơn giản, 16,93% nang phức hợp, 3,07% nang phức tạp. Ngoài ra siêu âm tuyến vú còn giúp xác định các tính chất nang. Cụ thể, siêu âm giúp phát hiện 209 nang tuyến vú, vị trí chủ yếu ở 1/4 trên ngoài, kích thước trung bình của nang vú được phát hiện qua siêu âm là 14,2 mm và kích thước nang vú trung bình được điều trị vi sóng là $23,86 \pm 11,43$ mm. Siêu âm tuyến vú còn có vai trò hỗ trợ hướng dẫn hình ảnh học trong quá trình điều trị và giúp đánh giá, theo dõi sau điều trị.

X-quang tuyến vú có vai trò hỗ trợ siêu âm trong chẩn đoán nang tuyến vú. Nhũ ảnh không phát hiện được nang tuyến vú trong hầu hết các trường hợp. Tuy nhiên, X-quang tuyến vú vẫn có giá trị khi thành nang có vôi hóa, từ đó giúp đánh giá khả năng thành công trong điều trị nang tuyến vú bằng vi sóng.

Với nhiệt độ được thiết lập ở 70°C, gây tê tại chỗ, thời gian điều trị trung bình ngắn (khoảng 2,5 phút cho nang đơn giản và phức tạp, 3,25 phút cho nang phức hợp). Với mức nhiệt độ và thời gian nêu trên, phương pháp điều trị nang tuyến vú bằng vi sóng trong nghiên cứu này là an toàn, không có biến chứng lớn và hiệu quả với 100% các tổn thương được đốt trọn hoàn toàn ngay sau khi thủ thuật.

Hiệu quả về mặt lâm sàng cao với tỷ lệ không sờ thấy nang sau điều trị là 94,83% và tỷ lệ giảm triệu chứng đau sau điều trị đạt hơn 50%.

Về mặt hình ảnh học, kích thước của nang vú trong thời gian theo dõi sau 6 tháng giảm đáng kể với tỷ lệ trung bình là $99,51 \pm 0,47$, $92,18 \pm 4,82$ và $91,50 \pm 2,15\%$, lần lượt tương ứng với nang tuyến vú đơn giản, phức tạp và phức hợp. Trong 6 tháng theo dõi, nghiên cứu của chúng tôi không ghi nhận trường hợp tái phát nang tuyến vú sau khi được điều trị bằng vi sóng.

Bàn luận

Tỷ lệ đau vú trong nghiên cứu này chiếm 44,1% và không có sự khác biệt giữa triệu chứng đau vú ở phụ nữ còn kinh và đã mãn kinh ($p=0,301 > 0,05$). Theo M. Morrow (2000) [6], đau vú là triệu chứng chủ yếu làm bệnh nhân tìm tới bác sỹ, tác giả nhận thấy rằng đau vú thường xảy ra ở phụ nữ tiền mãn kinh.

Về kích thước nang tuyến vú, các tác giả ghi nhận kích thước nhỏ nhất là 10 mm, lớn nhất là 56 mm, trung bình là $23,86 \pm 11,43$ mm. So sánh với nghiên cứu của F. Taskin và cs (2010) [7] trên các bệnh nhân có nang phức hợp ghi nhận đường kính nhỏ nhất của loại nang này là 4 mm, lớn nhất là 42 mm và trung bình là 16 mm. Trong khi đó, nghiên cứu trên 246 nang phức tạp không sờ thấy trên lâm sàng lại ghi nhận kích thước nang nhỏ nhất là 4 mm, lớn nhất là 41 mm, trung bình là 15 mm [8].

Tỷ lệ nang đơn giản và phức tạp trong nghiên cứu của chúng tôi cũng khá tương đồng với nghiên cứu của W.A. Berg và cs (2010) [2] khi tầm soát 2809 phụ nữ có nguy cơ về ung thư vú. Tỷ lệ nang phức hợp trong nghiên cứu của chúng tôi gấp đôi nghiên cứu này, sự khác biệt có thể do số lượng mẫu của hai nghiên cứu không tương đồng và sự khác biệt về chủng tộc.

Các tác giả lựa chọn kích thước ăng-ten đốt tùy theo kích thước khối u, ăng-ten nhỏ (kim nhỏ) để đốt các tổn thương có kích thước lớn hơn 2 cm và kim rất nhỏ (kim mini) cho tổn thương nhỏ hơn 2 cm. J. Yu và cs (2017) [9] thực hiện nghiên cứu điều trị MWA trên các tổn thương vú lành tính sử dụng ăng-ten kim có đường kính 1,6 mm (16G) và chiều dài 10 cm, chiều dài đầu hoạt động là 3 và 5 mm. Sau khi gây tê cục bộ bằng hỗn hợp 2% lidocain và 1% ropivacain (1:1) tiêm dưới da và xung quanh khối u, ăng-ten được đưa qua da vào tổn thương vú và đặt ở vị trí mong muốn. Khi tổn thương nhỏ hơn 2,0 cm, công suất đầu ra 20 W và sử dụng ăng-ten có đầu hoạt động 3 mm, tổn thương có kích thước từ 2,0 cm trở lên, công suất đầu ra là 30 W và ăng-ten có đầu hoạt động 5 mm được sử dụng. Tại mỗi vị trí, thời gian phát ra vi sóng là 10-30 giây. Ngoài ra, tác giả còn áp dụng kỹ thuật bóc tách bằng nước để tách tổn thương với da, bầu ngực và quầng vú.

Trong nghiên cứu của J. Yu và cs (2017) [9], 198 tổn thương trên 122 bệnh nhân đã được cắt đốt bằng vi sóng với năng lượng trung bình $28,3 \pm 6,2$ W, thời gian đốt trung bình trong khoảng 3,2 phút. 99,5% trường hợp các tổn thương đã được loại bỏ hoàn toàn, chỉ có một tổn thương lớn (3,6 cm) được cắt bỏ một phần. W. Zhang và cs (2019) [10] cũng đã sử dụng để cắt đốt cho 205 tổn thương vú lành tính trên 182 bệnh nhân. Mức năng lượng được cài ở 40 W cho tất cả các ca trong nghiên cứu. Kết quả kiểm tra bằng siêu âm có tăng cường tương phản cho thấy, 97,8% trường hợp tổn thương được cắt bỏ hoàn toàn. Chúng tôi không ghi nhận có trường hợp nào bóng da trong suốt quá trình can thiệp. Có 2 nguyên nhân dẫn đến bóng da. Đầu tiên là do sự truyền nhiệt trên ăng-ten. Nhiệt độ được tạo ra ở đầu kim đốt được truyền đi lên toàn bộ thân kim, khiến vùng da ở vị trí đâm kim dễ bị

bóng. Như đã đề cập bên trên, để tránh hiện tượng bóng gây ra do dẫn nhiệt, nhiệt độ đốt cần được để ở mức 70°C. Thứ hai là vị trí của tổn thương. Đối với các tổn thương nằm sát bề mặt da, nhiệt độ cắt đốt cũng đồng thời làm nóng vùng da lẫn các mô lân cận, dễ dẫn đến bóng da. Khi đó, cần phải tiêm thuốc tê hoặc tiêm nước tách rời tổn thương ra khỏi bề mặt da. Cách xử trí này cũng đã được chứng minh hiệu quả trong nghiên cứu của J. Xu và cs (2018) [11] khi thực hiện kỹ thuật bóc tách bằng cách bơm nước xung quanh nang thương và đạt được kết quả tương tự như nghiên cứu này. Tham khảo thêm nghiên cứu khác về đốt vi sóng của W. Zhang và cs (2019) [10] thì tỷ lệ bóng da cũng chiếm rất nhỏ (0,1%). Tuy nhiên, tỷ lệ này đạt tới lần lượt là 10 và 26,7% khi thực hiện đốt u sợi tuyến vú bằng laser [12].

Sau can thiệp, ghi nhận tỷ lệ bệnh nhân còn đau vú là 20,69%. Chúng tôi đánh giá, đa số bệnh nhân còn đau do ảnh hưởng của đốt vi sóng hơn là triệu chứng đau còn lại do nang vú. Sự khác biệt về tỷ lệ đau trước và sau can thiệp là có ý nghĩa thống kê với $p=0,000125$. Như vậy có thể thấy rằng, can thiệp đối với các nang vú có triệu chứng đau vú đem lại hiệu quả giảm đau tốt cho bệnh nhân. Ngoài ra, can thiệp là phương pháp ít xâm lấn, bệnh nhân không cần trải qua phẫu thuật hay tiểu phẫu để lấy nang.

Các tác giả ghi nhận số tổn thương sờ thấy sau can thiệp giảm từ 53 xuống còn 4 tổn thương, tỷ lệ tổn thương không sờ thấy tăng từ 10,2 lên đến 93,3%, sự khác biệt này có ý nghĩa với $p<0,05$. Như vậy, có thể thấy kích thước nang giảm đáng kể khi đánh giá trên lâm sàng.

Kết quả nghiên cứu này ghi nhận, đối với các nang đơn giản, tỷ lệ giảm kích thước trung bình sau 1, 3 và 6 tháng là $96,40 \pm 1,45$, $98,09 \pm 0,9$ và $95,51 \pm 0,47\%$; nang phức tạp lần lượt là $85,90 \pm 4,25$, $88,90 \pm 4,4$ và $92,18 \pm 4,82\%$; nang phức hợp lần lượt là $81,00 \pm 1,41$, $86,00 \pm 1,41$ và $91,05 \pm 2,15\%$. Kích thước nang giảm trung bình trong toàn bộ nghiên cứu là $89,3 \pm 12,7\%$. Như vậy, kích thước nang giảm đáng kể sau can thiệp bằng vi sóng so với can thiệp trên nhóm u vú lành tính, can thiệp trên nang vú có mức giảm thể tích lớn hơn so với các u đặc ở vú.

Trong nghiên cứu này, tỷ lệ can thiệp lại bằng vi sóng là 0%, tuy nhiên có 6 nang cần chọc hút dịch để tăng hiệu quả điều trị (9,23%). Các trường hợp này đều thuộc loại nang phức tạp và phức hợp.

Các nang thương sau can thiệp đều được theo dõi bằng siêu âm và không ảnh hưởng tới chương trình tầm soát ung thư vú. Khó khăn của việc theo dõi là sau can thiệp, các nang lành tính có thể được ghi nhận dưới siêu âm là một nang thương cao và từ đó dẫn tới can thiệp không cần thiết.

Bệnh nhân sau thủ thuật được theo dõi định kỳ trong khoảng từ 3 đến 12 tháng, tùy vào tính đáp ứng của tổn thương sau thủ thuật. Thời gian theo dõi trung bình là 8 tháng. Trong nghiên cứu này, số tổn thương sờ thấy giảm từ 53 (91,38%) xuống còn 3 (5,17%) sau điều trị và theo dõi. Sau 14 tháng theo dõi, tỷ lệ tổn thương sờ thấy trong nghiên cứu của J. Yu và cs (2017) [9] cũng đã giảm tuy còn khá cao (từ 90,2 xuống 45,9%). Kết quả kiểm tra bằng siêu âm cho thấy, 100% tổn thương dạng nang và 85% tổn thương dạng u đáp ứng hoàn toàn, 15% tổn thương dạng u đáp ứng một phần trong thời gian theo dõi, cao hơn so với nghiên cứu của W. Zhang và cs (2019) [10]. Về vấn đề thẩm mỹ, sau thủ thuật 100% bệnh nhân đều cảm thấy hài lòng. Bên cạnh đó, không xảy ra bất kỳ phản ứng phụ, tái phát hay dấu hiệu ác tính trong nghiên cứu này.

Kết luận

Can thiệp bằng vi sóng là phương pháp điều trị khả thi và an toàn với thành công kỹ thuật và tính thẩm mỹ cao, tỷ lệ biến chứng sau thủ thuật thấp. Can thiệp vi sóng cho nang tuyến vú là một lựa chọn điều trị tốt nên được xem xét để điều trị cho các bệnh nhân nang tuyến vú không đáp ứng điều trị nội khoa và chọc hút bằng kim nhỏ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] H.S. Kiran, U. Koirala, R. Khatri, et al. (2016), "Histomorphological spectrum of breast lesions", *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*, **5**(54), pp.3577-3581.

[2] W.A. Berg, A.G. Sechtin, H. Marques, et al. (2010), "Cystic breast masses and the ACRIN 6666 experience", *Radiol. Clin. North Am.*, **48**(5), pp.931-987.

[3] A. Ozdemir, O. Konuş, T. Nas, et al. (1999), "Mammographic and ultrasonographic study of changes in the breast related to HRT", *Int. J. Gynaecol. Obstet.*, **67**(1), pp.23-32.

[4] A.S. Wright, L.A. Sampson, T.F. Warner, et al. (2005), "Radiofrequency versus microwave ablation in a hepatic porcine model", *Radiology*, **236**(1), DOI: 10.1148/radiol.2361031249.

[5] J. Yu, Z.Y. Han, T. Li, et al. (2020), "Microwave ablation versus nipple sparing mastectomy for breast cancer ≤ 5 cm: A pilot cohort study", *Front. Oncol.*, **10**, DOI: 10.3389/fonc.2020.546883.

[6] M. Morrow (2000), "The evaluation of common breast problems", *Am. Fam. Physician*, **61**(8), pp.2371-2378.

[7] F. Taşkın, K. Köseoğlu, S. Özbaş, et al. (2010), "Complex breast cysts: Sonographic findings and histopathologic results", *The Journal of Breast Health*, **6**(4), pp.135-140.

[8] S. Tez, C. Dener, A. Köktener, et al. (2008), "The value of fine needle aspiration and cytologic examination of impalpable complicated breast cysts", *Bratisl Lek. Listy*, **109**(9), pp.387-390.

[9] J. Yu, J.Min. Li, W. He, et al. (2017), "Ultrasound-guided percutaneous microwave ablation of benign breast lesions", *Oncotarget*, **8**(45), pp.79376-79386.

[10] W. Zhang, Z.Q. Jin, M. Baikpour, et al. (2019), "Clinical application of ultrasound-guided percutaneous microwave ablation for benign breast lesions: A prospective study", *BMC Cancer*, **19**, DOI: 10.1186/s12885-019-5523-6.

[11] J. Xu, H. Wu, Z. Han, et al. (2018), "Microwave ablation of benign breast tumors: A prospective study with minimum 12 months follow-up", *Int. J. Hyperthermia*, **35**(1), pp.253-261.

[12] S. Basu, B. Ravi, R. Kant (1999), "Interstitial laser hyperthermia, a new method in the management of fibroadenoma of the breast: A pilot study", *Lasers Surg. Med.*, **25**(2), pp.148-152.

Đánh giá ban đầu một số kết quả sau phục hình cầu - chụp - pivot cố định tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 từ tháng 4/2020 đến tháng 10/2021

Đinh Xuân Thụ*, Nguyễn Thị Tuyết, Nguyễn Điện Biên

Khoa Răng miệng, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

Ngày nhận bài 30/1/2023; ngày chuyển phản biện 2/2/2023; ngày nhận phản biện 6/2/2023; ngày chấp nhận đăng 9/2/2023

Tóm tắt:

Nghiên cứu nhằm đánh giá tình trạng phục hình cố định trên bệnh nhân làm phục hình răng giả cố định tại Khoa Răng miệng, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 (Bệnh viện 108) từ tháng 4/2020 đến tháng 10/2021. Nghiên cứu được thiết kế mô tả cắt ngang trên 33 người bệnh đến khám và làm phục hình cầu - chụp - pivot cố định tại Khoa Răng miệng, Bệnh viện 108. Kết quả cho thấy, có 45,5% bệnh nhân nam và 54,5% bệnh nhân nữ; loại vật liệu phục hình: kim loại là 13,3%, kim loại phủ sứ 73,4%, sứ toàn phần 8,3% và kim loại cấy nhựa 5,0%. Thời điểm 3 tháng, chức năng ăn nhai 91,7% tốt, phát âm 100% tốt, sự hài lòng của bệnh nhân 91,7% tốt. Ở các thời điểm 6 và 12 tháng, các chức năng đều duy trì tốt. Chỉ số viêm lợi (GI) không khác biệt theo thời gian và không phụ thuộc vật liệu phục hình. Độ bám dính giảm dần theo thời gian và không phụ thuộc vật liệu. Kết quả nghiên cứu cho thấy, chất lượng phục hình cầu - chụp - pivot cố định được tiến hành khép kín tại Khoa Răng miệng, Bệnh viện 108 có kết quả tốt, đáp ứng nhu cầu về thẩm mỹ và chức năng.

Từ khóa: cầu - chụp - pivot, chỉ số viêm lợi, phục hình cố định.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

Sức khỏe răng miệng đặc biệt quan trọng, vì ngoài các bệnh hệ thống rất dễ mắc phải thì các tổn thương vùng miệng cũng có ảnh hưởng trực tiếp hoặc gián tiếp đến dinh dưỡng, thể chất, tâm lý, giao tiếp và làm giảm chất lượng cuộc sống. Bệnh răng miệng là các bệnh rất phổ biến với khoảng gần 3,5 tỷ người trên toàn thế giới mắc bệnh, ở mọi lứa tuổi, mọi tầng lớp xã hội [1]. Bệnh này gây tổn thương cả phần tổ chức cứng và các tổ chức quanh răng [2]. Trong đó, mất răng là một tình trạng thường thấy ở người trưởng thành tại Việt Nam. Khi một răng mất thì các răng đối diện sẽ trôi, răng kế bên sẽ di lệch, xô lệch, xương ổ răng sẽ bị tiêu đi, làm mất sức nhai. Bệnh sâu răng, nha chu, chấn thương khớp cắn phát sinh đưa đến mất thêm những răng khác. Từ đó ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe răng miệng, thẩm mỹ của nụ cười, khuôn mặt và sức khỏe chung. Phục hình răng mất là một việc quan trọng, giúp cải thiện chất lượng sống.

Phục hình cố định là các phương pháp phục hồi cấu trúc của một hay nhiều răng đã mất nhằm duy trì về mặt thẩm mỹ cũng như phục hồi các chức năng ăn nhai được gần như răng thật. Các phương pháp phục hình này được gắn cố định trên hàm và người bệnh không thể tự tháo ra được. Ngày nay, với sự phát triển của khoa học và công nghệ trong nha khoa, phục hình cố định bao gồm 8 loại chính từ những kỹ thuật kinh điển như inlay, onlay, chụp răng... đến kỹ thuật mới nhất, không xâm lấn đến răng thật như implant nha khoa. Trong khuôn khổ bài báo này, chúng tôi đề cập đến 3

kỹ thuật được sử dụng rộng rãi nhất là chụp răng, cầu răng và răng chốt pivot. Mất răng khi có chỉ định làm phục hình cầu - chụp - pivot cố định phải căn cứ vào nhiều tiêu chí, trong đó liên quan cả răng làm trụ và tổ chức xung quanh răng. Các răng tham gia phải đảm bảo không lung lay, mô cứng của răng còn đủ, đối với răng pivot phải được điều trị tủy răng ổn định... Tổ chức quanh răng không có viêm, xương không tiêu, huyết răng sau nhổ nếu có phải lành lặn, không còn viêm nhiễm... Vật liệu sử dụng trong phục hình cố định cầu - chụp - pivot có nhiều loại với những ưu nhược điểm khác nhau do người bệnh lựa chọn nhằm phù hợp với điều kiện tài chính.

Phục hình nói chung sau khi được lắp phải bảo đảm đầy đủ các yếu tố về chức năng ăn nhai, phát âm cũng như thẩm mỹ cho bệnh nhân, tạo cho bệnh nhân sự hài lòng thoải mái khi sử dụng. Bệnh nhân sau lắp hàm cũng cần được hướng dẫn sử dụng và vệ sinh đúng cách để đạt được hiệu quả cao nhất. Việc đánh giá hiệu quả sau điều trị ngoài việc nhân viên y tế lắp hàm đúng chỉ định, đúng kỹ thuật còn phụ thuộc vào việc tuân thủ đúng lời dặn của bác sĩ với bệnh nhân. Khoa Răng miệng, Bệnh viện 108 là một trong số ít các cơ sở y tế có labo răng giả tại khoa để đảm bảo tiến hành trọn vẹn một quy trình làm và lắp cầu - chụp - pivot khép kín tại khoa. Lượng bệnh nhân đến lắp phục hình cố định tại khoa hàng năm là rất lớn. Tuy nhiên, vẫn chưa có nghiên cứu nào đánh giá kết quả sau phục hình cầu - chụp - pivot tại Khoa. Do đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm mục tiêu đánh giá ban đầu kết quả sau phục hình cầu - chụp - pivot cố định trên bệnh nhân được làm phục hình

*Tác giả liên hệ: Email: thudelta@gmail.com

Initial evaluation of some results after fixed spherical-capture-pivot restorations at the 108 Military Central Hospital from April 2020 to October 2021

Xuan Thu Dinh*, Thi Tuyet Nguyen, Dien Bien Nguyen

Dental Department, 108 Military Central Hospital

Received 30 January 2023; accepted 9 February 2023

Abstract:

The study aimed to evaluate the status of fixed spherical-capture-pivot restorations on patients who came for denture prosthetics at the Dental Department, 108 Military Central Hospital, from April 2020 to October 2021. A cross-sectional descriptive study was conducted on 33 patients who came to examine and do fixed prosthetics at the Dental Department. Results showed that proportion by age and sex: male 45.5%, female 54.5%, type of prosthetic material: metal 13.3%, metal coated with porcelain 73.4%, full porcelain 8.3%, metal with acrylic resin 5.0%. After 3 months, chewing function was good 91.7%, pronunciation (rounded letters, no slurs) was 100% good, and patient satisfaction was 91.7% good. At the time of 6 and 12 months, the functions were well maintained. The gingivitis index did not differ over time and was independent of prosthetic material. Adhesion decreased over time and was independent of the material. Results exhibited that the quality of fixed bridge-crown-pivot dentures carried out in a closed manner at the Dental Department, 108 Military Central Hospital has good results, meeting the aesthetic and functional needs.

Keywords: fixed prosthetics, fixed spherical-capture-pivot restorations, gingivitis index.

Classification number: 3.2

tại Khoa Răng miệng, Bệnh viện 108 từ tháng 4/2020 đến tháng 10/2021.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng

Các bệnh nhân được chẩn đoán mất răng có chỉ định làm phục hình chụp, cầu răng hoặc pivot cố định tại Khoa Răng miệng, Bệnh viện 108. Thời điểm đánh giá là 3, 6 và 12 tháng sau phục hình.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp nghiên cứu là phương pháp mô tả cắt ngang.

Cỡ mẫu là 60 đơn vị răng phục hình chụp - cầu - pivot trên 33 bệnh nhân bao gồm: chụp răng 36, cầu răng 22 và pivot 2. Nghiên cứu bao gồm phần khám đánh giá của nhân viên y tế kết hợp khảo sát bệnh nhân. Bảng khảo sát của bệnh nhân gồm 3 mức độ: tốt, khá, kém (bảng 1) tại các thời điểm 3, 6 và 12 tháng.

Bảng 1. Bảng các tiêu chí khảo sát bệnh nhân.

STT	Tiêu chí đánh giá	Tốt	Khá	Kém
1	Hình thái kích thước	Hài hòa, tương xứng với cùng nhóm răng	Tương đối phù hợp	To hơn hoặc nhỏ hơn
2	Màu sắc	Giống màu răng thật	Màu sắc tương đối giống	Màu khác màu răng
3	Đường viền lợi	Tương xứng với răng bên, màu hồng nhạt tự nhiên	Màu lợi thay đổi ít, không chảy máu khi thăm khám	Đường viền lợi cao, to hơn, lợi sưng lồi màu đỏ, chảy máu khi khám
4	Ăn nhai	Nhai bình thường gần như răng thật	Ăn được thức ăn cứng, mềm, dính	Không nhai được vùng răng mang phục hình
5	Phát âm	Phát âm bình thường	Phát âm gần như bình thường	Vướng khi phát âm, nói không rõ tiếng
6	Độ bền	Răng giả ổn định vững chắc trên cung, không lung lay	Phục hình lung lay	Lung lay, sưng đau
7	Điểm tiếp giáp	Không rất thức ăn	Có rất thức ăn	Rất nhiều thức ăn gây khó chịu
8	Cổ răng giả liên tục với cùi răng	Cổ răng giả ôm khít liên tục với cùi răng	Cổ răng giả ôm sát cùi răng	Cổ răng giả không liên tục với cùi răng
9	Khớp cắn	Không chạm sớm, không cản trở cắn khi hàm dưới thực hiện chức năng	Có chạm, cản trở khi nhai	Có chạm, gây đau nhức vùng đối diện phục hình
10	Độ bám dính lợi	Không mất bám dính		Có mất bám dính
11	Độ lung lay trụ răng	Không lung lay	Có lung lay	Lung lay nhiều
12	Gây vỡ trụ răng	Không gây vỡ		Gây vỡ, bong cầu chụp

Các chỉ số được dùng trong nghiên cứu bao gồm: tuổi, giới tính, lý do làm phục hình; vật liệu làm phục hình; chỉ số lợi GI với 4 mức độ (lợi khỏe mạnh; lợi viêm nhẹ, thay đổi về màu sắc, hơi phù nề, không chảy máu khi thăm dò; lợi viêm trung bình, đỏ phù nề, chảy máu khi thăm dò; lợi viêm

nặng, nướu đỏ phù nề nhiều, lở loét chảy máu tự phát); độ mất bám dính lâm sàng (CAL) (mức độ nhẹ: mất bám dính 1-2 mm; mức độ trung bình: mất bám dính 3-4 mm; mức độ nặng: mất bám dính ≥ 5 mm).

Xử lý số liệu

Các số liệu thu thập được xử lý bằng phương pháp thống kê y học theo SPSS phiên bản 16.0, kiểm định Fisher và thuật toán χ^2 .

Kết quả

Kết quả bảng 2 cho thấy, sự chênh lệch giữa bệnh nhân nam và nữ là không đáng kể. Lý do ăn nhai kết hợp thẩm mỹ chiếm tỷ lệ cao nhất với 66,7%, còn vấn đề ăn nhai đơn thuần chiếm 33,3%. Không bệnh nhân nào làm phục hình do thẩm mỹ đơn thuần.

Bảng 2. Phân bố bệnh nhân theo giới tính liên quan đến lý do phục hình ăn nhai và thẩm mỹ.

Giới tính	Ăn nhai		Thẩm mỹ		Ăn nhai và thẩm mỹ		Tổng	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Nam	5	15,1	0	0,0	10	30,3	15	45,4
Nữ	6	18,2	0	0,0	12	36,4	18	54,6
Tổng	11	33,3	0	0,0	22	66,7	33	100

Kết quả bảng 3 cho thấy, trong số 60 phục hình cố định thì có 36 chụp răng đơn lẻ, cầu răng là 22 và có 2 pivot. Chiếm tỷ lệ cao nhất là làm kim loại phủ sứ (70,0%). Kim loại cấy nhựa chiếm tỷ lệ thấp nhất với 5,0%.

Bảng 3. Vật liệu làm phục hình.

Vật liệu	Phục hình					
	Chụp răng		Cầu răng		Pivot	
	n	%	n	%	n	%
Kim loại thường	6	10,0	2	3,3	0	0,0
Kim loại cấy nhựa	0	0,0	3	5,0	0	0,0
Kim loại phủ sứ	27	45,0	15	25,0	2	3,4
Sứ toàn phần	3	5,0	2	3,3	0	0,0
Tổng	36	60,0	22	36,6	2	3,4

Kết quả nghiên cứu cho thấy, không có đánh giá kém được ghi nhận nên loại khỏi phép tính thống kê. Các chức năng đều không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê tại các mốc thời gian 3, 6 và 12 tháng. Tiêu chí màu sắc có xu hướng kém ở tháng thứ 6. 100% bệnh nhân phát âm bình thường sau lắp răng. Sự hài lòng của bệnh nhân được cải thiện sau 6 tháng, tuy nhiên khi so sánh với thời điểm 3 tháng, sự khác biệt là không đáng kể (bảng 4).

Bảng 4. Đánh giá chức năng chung cho các loại phục hình cố định.

Tiêu chí	3 tháng			6 tháng			12 tháng			Chỉ số p
	Tốt	Khá	Kém	Tốt	Khá	Kém	Tốt	Khá	Kém	
Hình thái, kích thước	55	5	0	56	4	0	56	4	0	>0,05
Màu sắc	58	2		58	2	0	55	5	0	>0,05
Ăn nhai	55	5	0	57	3	0	59	1	0	>0,05
Phát âm	60	0	0	60	0	0	60	0	0	
Sự hài lòng của bệnh nhân	55	5	0	58	2	0	58	2	0	>0,05

Kết quả bảng 5 cho thấy, không có bệnh nhân nào viêm mức độ nặng tại cả 3 thời điểm. Mức độ viêm nhẹ và vừa không có sự khác biệt ở cả 3 thời điểm. Sứ toàn phần không xuất hiện tình trạng viêm ở cả 5 phục hình. So sánh các vật liệu còn lại với nhau, sự khác biệt về mức độ viêm là không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

Bảng 5. Đánh giá chỉ số lợi theo chỉ số GI.

Vật liệu	3 tháng				6 tháng				12 tháng			
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Kim loại thường	5	3	0	0	5	3	0	0	4	3	1	0
Kim loại cấy nhựa	3	0	0	0	3	0	0	0	2	1	0	0
Kim loại phủ sứ	38	6	0	0	40	2	2	0	41	3	0	0
Sứ toàn phần	5	0	0	0	5	0	0	0	5	0	0	0
Tổng	51	9	0	0	53	5	2	0	52	7	1	0

Ghi chú: 0: không viêm; 1: viêm nhẹ; 2: viêm bình thường; 3: viêm nặng.

Kết quả bảng 6 cho thấy, 100% không có trường hợp mất bám dính mức độ nặng. Độ bám dính ở tất cả các vật liệu bị mất dần theo thời gian. Sự khác biệt tại các thời điểm là có ý nghĩa thống kê với $p<0,05$. So sánh giữa các vật liệu, sự khác biệt về giảm độ bám dính là không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

Bảng 6. Đánh giá độ bám dính.

Chất liệu	3 tháng			6 tháng			12 tháng		
	Nhẹ	Trung bình	Nặng	Nhẹ	Trung bình	Nặng	Nhẹ	Trung bình	Nặng
Kim loại thường	8	0	0	5	3	0	4	4	0
Kim loại cấy nhựa	3	0	0	3	0	0	3	0	0
Kim loại phủ sứ	43	1	0	42	2	0	40	4	0
Sứ toàn phần	5	0	0	5	0	0	4	1	0
Tổng	59	1	0	55	5	0	51	9	0

Bàn luận

Lý do làm phục hình cố định

Bảng 2 cho thấy lý do làm phục hình cố định là để đạt được cả ăn nhai và thẩm mỹ 66,7% và để ăn nhai 33,3%. Không có bệnh nhân nào làm phục hình với lý do thẩm mỹ đơn thuần. Lý giải tỷ lệ này là do phần lớn bệnh nhân đến điều trị vì mất răng hoặc răng bị sâu, vỡ, không còn chức năng ăn nhai. Bên cạnh đó, đối tượng cao tuổi chiếm phần lớn. Đây là nhóm đối tượng không đặt nặng vấn đề thẩm mỹ.

Vật liệu làm phục hình cố định

Sự lựa chọn vật liệu làm phục hình cũng rất quan trọng vì nó liên quan đến độ bền vững và sự thẩm mỹ của phục hình. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ bệnh nhân sử dụng vật liệu bằng kim loại phủ sứ là cao hơn hẳn (73,4%) so với những loại vật liệu khác. Điều này là hợp lý bởi kim loại phủ sứ có những ưu điểm nổi trội, như vừa đạt được độ bền vững, vừa đạt được sự thẩm mỹ, có thể phục hình được cho tất cả các nhóm răng mà giá thành vừa phải so với mức sống trung bình của người Việt Nam. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Lê Thùy Linh (2010) [3] và J. Schmitt và cs (2009) [4].

Về chức năng chung do bệnh nhân tự đánh giá

Bệnh nhân hầu như không thay đổi đánh giá về hình dạng, kích thước phát âm trong suốt 12 tháng. Sự ăn nhai được cải thiện theo thời gian nhưng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi so sánh giữa các mốc thời gian. Màu sắc của răng có xu hướng kém đi do đây là yếu tố liên quan đến chế độ ăn, vệ sinh của từng bệnh nhân (phát phiếu và hỏi đáp khi tái khám).

Sự hài lòng của bệnh nhân

Qua phỏng vấn 33 bệnh nhân trong nghiên cứu cho thấy, số lượng bệnh nhân rất hài lòng với phục hình đang dùng chiếm 91,7%, còn lại 8,3% số bệnh nhân cho là chấp nhận được (hoặc là về chức năng hoặc là về thẩm mỹ). Không có bệnh nhân nào không hài lòng và muốn tháo bỏ phục hình ngay. Sự hài lòng được cải thiện dần theo thời gian. Sự khác biệt theo mốc thời gian là không có ý nghĩa thống kê (phát phiếu và hỏi đáp khi tái khám).

Nhận xét chỉ số viêm lợi GI

Ở thời điểm 3 tháng, trong tổng số 60 phục hình cố định thì có 51 trường hợp phân lợi bình thường (chiếm 85%), tình trạng viêm lợi độ 1 có 9 trường hợp (chiếm 15%) do nhiều nguyên nhân như: bệnh nhân chưa vệ sinh răng miệng đúng cách... Không bệnh nhân nào bị viêm lợi mức độ trung bình hay nặng. Tuy nhiên, ở các mốc thời gian tiếp theo đã xuất hiện các trường hợp viêm lợi mức độ trung bình cần phải xử

lý. Đây là những bệnh nhân vệ sinh răng miệng kém hoặc có bệnh lý toàn thân kèm theo như đái tháo đường. Viêm lợi cũng thường xuất hiện ở các phục hình có vật liệu kim loại. 100% phục hình sứ toàn phần không xuất hiện viêm lợi. Tình trạng viêm lợi ở nam 24%, nhiều hơn so với ở nữ 8,6%. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của H. Loe (1967) [5].

Nhận xét độ bám dính

Độ bám dính ở tất cả các vật liệu bị mất dần theo thời gian. Sự khác biệt tại các thời điểm là có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. So sánh giữa các vật liệu, sự khác biệt về giảm độ bám dính là không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Không có trường hợp nào bị mất bám dính lợi mức độ nặng. Kết quả này không chênh lệch nhiều so với nghiên cứu của Trần Thiên Lộc và cs (2009) [6].

Kết luận

Chất lượng phục hình cầu - chụp - pivot cố định tại Khoa Răng miệng, Bệnh viện 108 là hoàn toàn đáp ứng được nhu cầu của bệnh nhân. Thời điểm 3 tháng, chức năng ăn nhai 91,7% tốt, phát âm 100% tốt, sự hài lòng của bệnh nhân 91,7% tốt. Ở các thời điểm 6 và 12 tháng, các chức năng đều duy trì tốt. Chỉ số viêm lợi GI không khác biệt theo thời gian và không phụ thuộc vật liệu phục hình. Độ bám dính giảm dần theo thời gian và không phụ thuộc vật liệu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Đỗ Sơn Tùng, Lê Văn Anh, Phùng Lâm Tới, Khúc Thị Hồng Hạnh, Ong Thế Duệ, Trần Thị Lan Anh, Hoàng Bảo Duy (2022), “Thực hành chăm sóc sức khỏe răng miệng và một số yếu tố liên quan ở học sinh 12-15 tuổi khu vực thành thị và nông thôn tỉnh Bình Định”, *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, **160(12V2)**, tr.309-317.
- [2] Nguyễn Hữu Bản, Đào Anh Sơn, Vũ Mạnh Tuấn, Nguyễn Thị Thúy Hạnh (2021), “Thực trạng bệnh răng miệng và một số yếu tố liên quan ở cán bộ chiến sỹ Công an tỉnh Nam Định năm 2019-2020”, *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, **139(3)**, tr.126-135.
- [3] Lê Thị Thùy Linh (2010), *Nhận xét hiệu quả phục hình răng bằng vật liệu sứ cercon tại Bệnh viện Răng hàm mặt Trung ương*, Luận văn thạc sỹ, Trường Đại học Y Hà Nội, tr.44.
- [4] J. Schmitt, H. Stefan, W. Manfred, et al. (2009), “Zirconia posterior fixed partial dentures: prospective clinical 3-year follow up”, *International Journal of Prosthodontics*, **22(6)**, pp.597-603.
- [5] H. Loe (1967), “The gingival index, the plaque index and the retention index systems”, *The Journal of Periodontology*, **38(6)**, DOI: 10.1902/jop.1967.38.6.610.
- [6] Trần Thiên Lộc, Nguyễn Thị Bích Thủy, Nguyễn Kim Dung (2009), *Phục hình răng cố định*, Nhà xuất bản Y học Chi nhánh TP Hồ Chí Minh, tr.11-139.

Nghiên cứu bào chế viên ngậm chứa cao Đảng sâm (*Codonopsis javanica* (Blume) Hook. f. & Thomson)

Phạm Thị Diệu Như, Đỗ Quang Dương, Nguyễn Đức Hạnh*

Khoa Dược, Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 26/8/2022; ngày chuyển phản biện 29/8/2022; ngày nhận phản biện 26/9/2022; ngày chấp nhận đăng 29/9/2022

Tóm tắt:

Đảng sâm (ĐS) - *Codonopsis javanica* (Blume) Hook. f. & Thomson là dược liệu quý, có tác dụng điều hòa hệ miễn dịch, chữa ho, tiêu đờm, chống tăng đường huyết, bảo vệ niêm mạc dạ dày... Viên ngậm cứng (lozenges) chứa cao khô ĐS được nghiên cứu bào chế hướng tới mục tiêu cải thiện tính chất của viên ngậm cứng thông thường như dễ hút ẩm, kết tinh lại trong quá trình bảo quản và hạn chế năng lượng tiêu thụ trên người sử dụng. Các công thức viên ngậm cứng với tỷ lệ tá dược khác nhau và thông số quy trình điều chế viên ngậm placebo đã được nghiên cứu và đánh giá. Các tính chất của viên ngậm như độ ẩm, nhiệt độ chuyển dịch kính (Tg) và mức độ hút ẩm của các công thức được so sánh. Sử dụng phần mềm BCPharsoft OPT, các tác giả đã xây dựng mối liên quan nhân quả giữa các thành phần công thức, thông số quy trình điều chế và tính chất của viên ngậm. Công thức viên ngậm placebo tối ưu chứa 50% isomalt (ISO) (kl/kl), 15% maltodextrin DE 12 (MAL) (kl/kl) và nhiệt độ đổ khuôn tối ưu là 155°C. Tỷ lệ cao khô ĐS tối ưu của viên ngậm cứng là 15% (kl/kl). Viên ngậm ĐS được chọn có độ ẩm dưới 0,5%, mức độ hút ẩm dưới 6% (trong điều kiện thí nghiệm ở nhiệt độ 30±2°C, độ ẩm 75±5%) và Tg là 45,8°C. Kết quả nghiên cứu cung cấp dữ liệu quan trọng cho việc nghiên cứu phát triển sản phẩm viên ngậm ĐS.

Từ khóa: Đảng sâm, isomalt, maltodextrin DE 12, sucrose, viên ngậm.

Chỉ số phân loại: 3.4

Đặt vấn đề

ĐS là dược liệu quý, đã được chứng minh có tác dụng chống tăng đường huyết, điều hòa hệ miễn dịch, bảo vệ niêm mạc dạ dày [1]... Hiện nay, bên cạnh dạng sử dụng phổ biến là dược liệu tươi và khô, nhiều dạng bào chế tiện lợi hơn chứa cao ĐS đang được quan tâm nghiên cứu, phát triển như: viên nén, trà hòa tan, viên ngậm... Dược liệu ĐS có vị ngọt [2], vì vậy, việc nghiên cứu phát triển dạng bào chế viên ngậm cứng chứa cao ĐS dự kiến dễ được người sử dụng chấp nhận, giúp tăng cường hấp thu các hoạt chất qua niêm mạc dưới lưỡi và tăng sinh khả dụng của các hoạt chất trong cao chiết từ dược liệu ĐS.

Viên ngậm cứng chứa chiết xuất từ dược liệu là một trong những dạng bào chế mang lại nhiều ưu điểm như đơn giản, tiện lợi khi sử dụng, mùi vị dễ chịu, áp dụng được cho nhiều đối tượng, quy trình sản xuất đơn giản và chi phí sản xuất thấp [3]. Tuy nhiên, nhược điểm của viên ngậm cứng là chứa nhiều năng lượng, dễ hút ẩm, biến dạng, kết tinh lại đường, tạo cảm giác nhám, mất hương vị sau một thời gian bảo quản. Nguyên nhân của các hiện tượng trên có thể do viên ngậm cứng có Tg thấp hơn nhiệt độ bảo quản, độ ẩm và mức độ hút ẩm của viên ngậm cứng cao [4]... Để khắc phục các vấn đề này, cần có sự lựa chọn hợp lý các loại tá dược và thông số quy trình điều chế viên ngậm [4, 5]. Bên cạnh đó, việc nghiên cứu xây dựng công thức viên ngậm ít năng lượng cũng là một mục tiêu quan trọng phù hợp với xu

hướng sử dụng và đảm bảo sức khỏe người dùng. Vì vậy, nghiên cứu được thực hiện nhằm mục tiêu điều chế viên ngậm cứng chứa cao khô ĐS (viên ngậm ĐS) có các tính chất như Tg cao, độ ẩm và mức độ hút ẩm thấp, giúp tăng tính ổn định của viên ngậm.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Cao khô ĐS đạt tiêu chuẩn cơ sở (hàm lượng lobetyolin và polysaccharid lần lượt không ít hơn 0,05 và 15%) do Khoa Dược, Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh cung cấp. Sucrose (SUC), maltodextrin DE 12 (MAL) và isomalt (ISO) được cung cấp bởi Công ty Roquette (Pháp).

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp điều chế viên ngậm cứng placebo: Hòa tan tất cả các tá dược SUC, ISO và MAL (ứng với từng công thức khảo sát) với nước cất (lượng nước chiếm khoảng 30% tổng khối lượng hỗn hợp [4]). Quy mô mỗi thí nghiệm là 200 g hỗn hợp tá dược. Gia nhiệt hỗn hợp đến nhiệt độ phù hợp bằng máy khuấy từ có gia nhiệt (tùy theo từng thử nghiệm). Đổ khuôn và làm nguội ở nhiệt độ 10-25°C [6], độ ẩm tương đối trong khoảng 35-40% [7].

Thiết kế thí nghiệm và tối ưu hóa công thức, thông số quy trình điều chế viên ngậm cứng placebo: 10 thí nghiệm được thiết kế bằng phần mềm Design-Expert 6.0.6 (Stat-Ease Inc.,

*Tác giả liên hệ: Email: duchanh@ump.edu.vn

Development of lozenges containing extract of *Codonopsis javanica* (Blume) Hook. f. & Thomson

Thi Dieu Nhu Pham, Quang Duong Do,
Duc Hanh Nguyen*

Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City

Received 26 August 2022; accepted 29 September 2022

Abstract:

Codonopsis javanica (Blume) Hook. f. & Thomson, a precious medicinal herb, has demonstrated its therapeutic effects on regulating the immune system, treating cough, dissipating phlegm, lowering blood sugar and protecting the gastric mucosa... This study aimed to develop lozenges containing dry extract of *C. javanica* (Blume) Hook. f. & Thomson and overcome the disadvantages of ordinary lozenges such as moisture sensitivity, recrystallisation during storage and reducing the consumed energy of users. Several formulations with different excipient ratios and process parameters had been studied. The properties of the lozenges such as moisture content, glass transition temperature (Tg) and hygroscopicity were evaluated. The cause-effect relations between formulation ingredients, process parameters and properties of lozenges were developed, using BCPharSoft OPT software. The optimal placebo formulation consisted of 50% isomalt (w/w) and 15% maltodextrin DE 12 (w/w), and the optimal moulding temperature was 155°C. The optimum percentage of *C. javanica* (Blume) Hook. f. & Thomson dry extract in the *C. javanica* (Blume) Hook. f. & Thomson lozenges was 15% (w/w). The chosen lozenges had a moisture content of less than 0.5%, a hygroscopicity level of less than 6% (under experimental conditions at a temperature of 30±2°C, a humidity of 75±5%), and a Tg of 45.8°C. This study could provide useful data for further study on the production of lozenges containing dry extract of *C. javanica* (Blume) Hook. f. & Thomson.

Keywords: *Codonopsis javanica* (Blume) Hook. f. & Thomson, isomalt, lozenges, maltodextrin DE 12, sucrose.

Classification number: 3.4

Mỹ) theo mô hình D-optimal với 3 biến độc lập và 3 biến phụ thuộc với các mức thử nghiệm được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Ý nghĩa và các mức của biến.

Biến độc lập	Mức 1	Mức 2	Mức 3
X ₁ : tỷ lệ ISO/tổng khối lượng tá dược (%; kl/kl)	20	50	-
X ₂ : tỷ lệ MAL/tổng khối lượng tá dược (%; kl/kl)	5	12	20
X ₃ : nhiệt độ kết thúc giai đoạn cô đặc (°C)	145	155	-
Biến phụ thuộc	Điều kiện ràng buộc		
Y ₁ : độ ẩm (%)	Tối thiểu		
Y ₂ : mức độ hút ẩm (%)	Tối thiểu		
Y ₃ : Tg (°C)	Tối đa		

Tổng khối lượng tá dược = khối lượng ISO + khối lượng MAL + khối lượng SUC.

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần và lấy kết quả trung bình của 3 lần thử nghiệm. Sử dụng phần mềm BCPharSoft OPT để nghiên cứu mối liên quan nhân quả và tối ưu hóa công thức, thông số quy trình điều chế viên ngậm cứng placebo. Kết quả dự đoán tối ưu được thực nghiệm kiểm chứng lặp lại 3 lần. Áp dụng trắc nghiệm t (One-sample t test) để so sánh kết quả thực nghiệm với kết quả dự đoán (khác nhau không có ý nghĩa thống kê khi p>0,05).

Xây dựng công thức viên ngậm DS: Phối hợp cao khô DS vào công thức viên ngậm placebo tối ưu với quy trình điều chế viên ngậm placebo được chọn. Cao khô DS được phối hợp vào hỗn hợp với các tỷ lệ khảo sát khác nhau là 15 và 20% (so với tổng khối lượng tá dược). Đánh giá thể chất, khả năng đổ khuôn của các mẫu khảo sát và lựa chọn tỷ lệ cao khô DS phù hợp cho công thức viên ngậm DS.

Đánh giá tính chất viên ngậm DS: Viên ngậm DS được đánh giá một số tính chất như: hình thức, độ ẩm, mức độ hút ẩm và Tg.

Phương pháp xác định độ ẩm viên ngậm cứng: Độ ẩm của viên ngậm cứng được xác định theo Gaithersburg (2000) [8]. Cân chính xác khoảng 3 g mẫu viên ngậm (m) đã được nghiền nhỏ. Đặt mẫu vào tủ sấy ở nhiệt độ 105±2°C, tiến hành sấy đến khối lượng không đổi. Ghi nhận khối lượng mẫu sau khi sấy (m'). Độ ẩm (M) được tính theo công thức sau:

$$M (\%) = \frac{m'}{m} \times 100$$

Phương pháp xác định mức độ hút ẩm viên ngậm cứng: Cân chính xác khoảng 9 g mỗi mẫu viên ngậm (h). Khảo sát tính hút ẩm của mẫu ở độ ẩm 75±5%, nhiệt độ 30±2°C và ghi nhận khối lượng mẫu sau 48 giờ hút ẩm (h'). Môi trường vi khí hậu được tạo bởi dung dịch muối NaCl bão hòa trong bình kín. Độ hút ẩm (H) được tính theo công thức sau:

$$H (\%) = \frac{h' - h}{h} \times 100$$

Phương pháp xác định Tg: Tg của các mẫu được xác định bằng phương pháp phân tích nhiệt vi sai (Differential scanning calorimetry - DSC) [9]. Cân chính xác khoảng 5 mg mẫu cho vào đĩa nhôm và đặt nắp. Sau đó, đặt đĩa nhôm vào bên trong buồng đo của máy DSC 204 F1 Phoenix (Netzsch, Đức). Khoảng nhiệt độ khảo sát từ 0 đến 100°C, tốc độ gia nhiệt là 10°C/phút và dòng khí nitơ vào 40-60 ml/phút. Tg được xác định từ biểu đồ nhiệt bằng phần mềm Proteus thermal analysis.

Kết quả và bàn luận

Mô hình thực nghiệm, tương quan hồi quy của biến độc lập và biến phụ thuộc

Dữ liệu 10 thực nghiệm (bảng 2) được dùng làm dữ liệu đầu vào cho phần mềm BCPHARsoft OPT để khảo sát mối liên quan nhân quả và tối ưu hóa công thức, thông số quy trình điều chế viên ngậm cứng.

Bảng 2. Tổng hợp kết quả 10 thực nghiệm (n=3).

Thí nghiệm	Biến độc lập			Biến phụ thuộc		
	X_1	X_2	X_3	Y_1 (%)	Y_2 (%)	Y_3 (°C)
1	20	12	155	0,502±0,014	7,594±0,134	44,57±0,12
2	50	20	145	0,646±0,028	6,877±0,171	39,43±0,12
3	50	20	155	0,439±0,028	6,497±0,185	46,63±0,12
4	20	5	155	0,451±0,012	7,071±0,042	41,17±0,15
5	50	12	145	0,733±0,035	6,866±0,011	37,43±0,15
6	20	20	155	0,579±0,015	6,882±0,104	45,03±0,12
7	50	5	145	1,137±0,039	7,223±0,067	35,43±0,15
8	20	5	145	0,849±0,025	7,369±0,026	36,97±0,12
9	50	5	155	0,790±0,012	6,816±0,191	35,87±0,12
10	20	12	145	0,672±0,033	8,012±0,096	38,87±0,12

Mô hình hóa

Điều kiện:

- Nhóm thử ($Y_1^{(4,8)}$, $Y_2^{(1,9)}$, $Y_3^{(6,9)}$);
- Thuật toán: Back propagation learning.

Kết quả tương quan hồi quy của phương pháp tối ưu hóa thể hiện mức độ liên quan nhân quả được trình bày ở bảng 3.

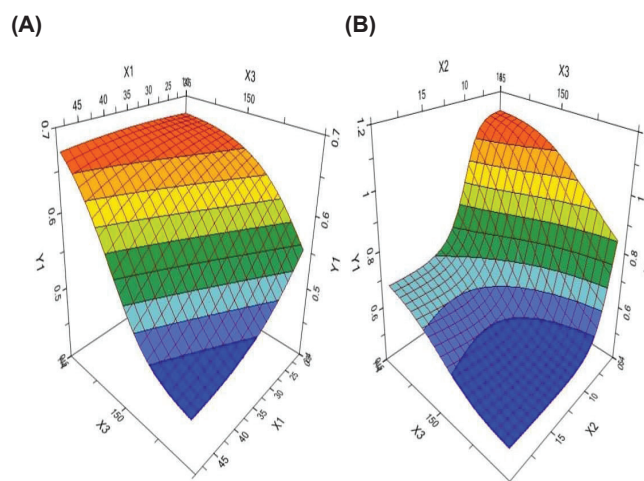
Bảng 3. Tương quan hồi quy phương pháp tối ưu hóa.

Biến phụ thuộc	R ² thử	R ² luyện
Y_1	0,98	1,00
Y_2	0,99	0,99
Y_3	0,99	1,00

R là hệ số tương quan hồi quy.

Các giá trị R² luyện và R² thử trong khoảng 0,98-1,00 nên mô hình dự đoán được xây dựng từ phần mềm BCPHARsoft OPT rất tốt. Mô hình này có thể được sử dụng làm cơ sở để khảo sát liên quan nhân quả, tối ưu hóa và dự đoán các biến phụ thuộc.

Quy luật nhân quả liên quan đến độ ẩm viên ngậm cứng placebo



Hình 1. Ảnh hưởng của tỷ lệ ISO/tổng khối lượng tá dược (X_1) và nhiệt độ kết thúc giai đoạn cô đặc (X_3) khi $X_2=15\%$ (A); tỷ lệ MAL/tổng khối lượng tá dược (X_2) và nhiệt độ kết thúc giai đoạn cô đặc (X_3) trên độ ẩm của viên ngậm (Y_1) khi $X_1=50\%$ (B).

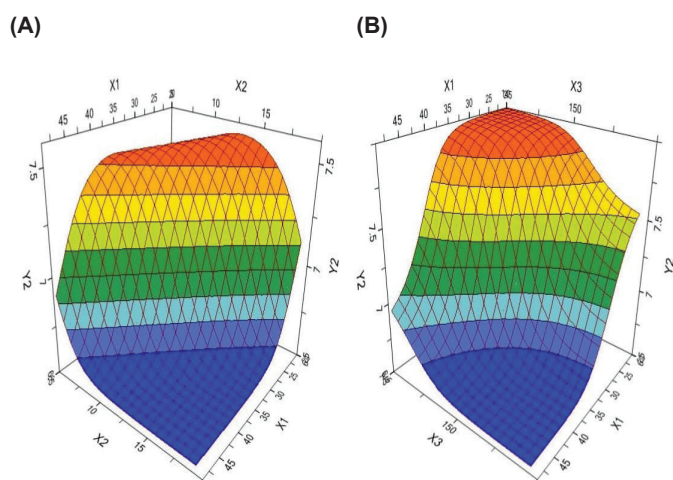
Hình 1A cho thấy, khi tăng tỷ lệ ISO/tổng khối lượng tá dược (X_1) thì độ ẩm viên ngậm (Y_1) giảm. Điều này có thể được lý giải là do dung dịch ISO có độ nhớt thấp [10], nên khi tăng tỷ lệ ISO/tổng khối lượng tá dược (X_1) sẽ làm giảm độ nhớt của hỗn hợp. Trong giai đoạn cô đặc hỗn hợp, khi độ nhớt của hỗn hợp giảm có thể làm cho các phân tử nước linh động hơn, dễ dàng khuếch tán và bay hơi khi hỗn hợp được gia nhiệt, dẫn đến hàm lượng nước trong hỗn hợp giảm, độ ẩm của viên ngậm giảm.

Khi tăng nhiệt độ kết thúc giai đoạn cô đặc (X_3) thì độ ẩm viên ngậm (Y_1) giảm (hình 1A). Trong giai đoạn cô đặc, nước bốc hơi dần, dẫn đến nồng độ chất khô trong hỗn hợp tăng. Khi nồng độ chất khô càng lớn thì nhiệt độ sôi càng cao [5]. Vì vậy, khi tăng nhiệt độ kết thúc giai đoạn cô đặc (X_3) sẽ làm tăng nồng độ chất khô và giảm lượng nước trong hỗn hợp, dẫn đến độ ẩm viên ngậm placebo (Y_1) giảm.

Hình 1B cho thấy, khi tăng tỷ lệ MAL/tổng khối lượng tá dược (X_2) thì độ ẩm viên ngậm (Y_1) giảm. Nghiên cứu của H. Price và cs (2014) [11] cho thấy, hệ số khuếch tán của hỗn hợp MAL - nước lớn hơn hệ số khuếch tán của hỗn hợp SUC - nước. Do đó, khi tăng tỷ lệ MAL/tổng khối lượng tá dược, các phân tử nước trong hỗn hợp được khuếch tán và bay hơi dễ dàng khi tăng nhiệt độ trong giai đoạn cô đặc, dẫn đến độ ẩm viên ngậm (Y_1) giảm.

Quy luật nhân quả liên quan đến mức độ hút ẩm viên ngậm cứng placebo

Khi tăng tỷ lệ ISO/tổng khối lượng tá dược (X_1) và/hoặc tăng tỷ lệ MAL/tổng khối lượng tá dược (X_2) thì mức độ hút ẩm của viên ngậm (Y_2) giảm (hình 2A). Viên ngậm được điều chế từ nhiều thành phần khác nhau, nên tính hút ẩm của viên ngậm bị ảnh hưởng bởi các thành phần tạo nên viên ngậm placebo. ISO là tá dược rất ít hút ẩm [10], do đó khi tăng tỷ lệ ISO/tổng khối lượng tá dược (X_1) thì độ hút ẩm của viên ngậm (Y_2) giảm. Tương tự, MAL cũng được sử dụng để làm giảm tính hút ẩm của viên ngậm. Nghiên cứu của B. Santhanam và cs (2020) [12] ghi nhận các polysaccharid chuỗi dài như MAL làm giảm tính hút ẩm của viên ngậm. Vì vậy, khi tăng tỷ lệ MAL/tổng khối lượng tá dược (X_2) thì mức độ hút ẩm của viên ngậm (Y_2) giảm.

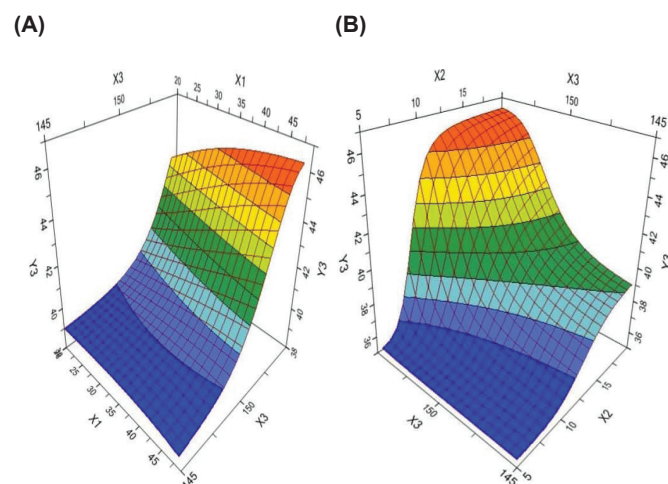


Hình 2. Ảnh hưởng của tỷ lệ ISO/tổng khối lượng tá dược (X_1) và tỷ lệ MAL/tổng khối lượng tá dược (X_2) khi $X_3=155^\circ\text{C}$ (A); tỷ lệ ISO/tổng khối lượng tá dược (X_1) và nhiệt độ kết thúc giai đoạn cô đặc (X_3) trên mức độ hút ẩm của viên ngậm (Y_2) khi $X_2=15\%$ (B).

Khi tăng nhiệt độ kết thúc giai đoạn cô đặc (X_3) thì độ hút ẩm viên ngậm (Y_2) giảm (hình 2B). Điều này có thể được giải thích là do khi tăng nhiệt độ kết thúc giai đoạn cô đặc (X_3) làm hàm lượng nước trong viên ngậm giảm, dẫn đến độ nhớt của viên ngậm tăng. Quá trình hút ẩm của viên ngậm cứng xảy ra qua hai bước. Đầu tiên các phân tử nước từ không khí hấp phụ ở bề mặt viên ngậm thông qua tương tác liên kết hydro với các phân tử đường. Một khi các phân tử nước đã được hấp phụ ở bề mặt thì sẽ từ từ khuếch tán vào các lớp bên trong do sự khác biệt lượng nước ở bề mặt và bên trong viên ngậm [4]. Tốc độ khuếch tán của nước giảm khi độ nhớt viên ngậm tăng, dẫn đến viên ngậm ít hút ẩm hơn [5]. Vì vậy, khi tăng nhiệt độ kết thúc giai đoạn cô đặc (X_3) thì độ nhớt viên ngậm tăng làm độ hút ẩm viên ngậm (Y_2) giảm.

Quy luật nhân quả liên quan đến Tg viên ngậm cứng placebo

Trường hợp nhiệt độ kết thúc giai đoạn cô đặc (X_3) trong khoảng 150-155°C, khi tăng tỷ lệ ISO/tổng khối lượng tá dược (X_1) thì Tg của viên ngậm (Y_3) tăng (hình 3A). Giá trị Tg phụ thuộc vào thành phần của viên ngậm. Tá dược SUC và ISO có Tg lần lượt khoảng 60 và 63°C [13]. ISO có giá trị Tg cao hơn SUC nên khi tăng tỷ lệ ISO/tổng khối lượng tá dược (X_1), Tg của viên ngậm placebo (Y_3) tăng.



Hình 3. Ảnh hưởng của tỷ lệ ISO/tổng khối lượng tá dược (X_1) và nhiệt độ kết thúc giai đoạn cô đặc (X_3) khi $X_2=15\%$ (A); tỷ lệ MAL/tổng khối lượng tá dược (X_2) và nhiệt độ kết thúc giai đoạn cô đặc (X_3) trên Tg của viên ngậm (Y_3) khi $X_1=50\%$ (B).

Bên cạnh đó, khi tăng nhiệt độ kết thúc giai đoạn cô đặc (X_3) thì Tg của viên ngậm (Y_3) tăng (hình 3A). Điều này có thể giải thích do khi tăng nhiệt độ kết thúc giai đoạn cô đặc làm giảm hàm lượng nước trong viên ngậm. Nghiên cứu của J. Raudonus và cs (2000) [14] ghi nhận khi hàm lượng nước trong viên ngậm càng thấp thì giá trị Tg của viên ngậm càng cao. Do vậy, khi tăng nhiệt độ kết thúc giai đoạn cô đặc (X_3) sẽ làm tăng Tg của viên ngậm (Y_3).

Khi tăng tỷ lệ MAL/tổng khối lượng tá dược (X_2) thì Tg của viên ngậm (Y_3) tăng (hình 3B). Tương tự như ISO, tá dược MAL có Tg khoảng 159,60°C [15]. Tg của tá dược MAL cao hơn Tg của SUC (60°C). Theo nghiên cứu của P. Gabarra và R. Hartel (1998) [16], các hợp chất có trọng lượng phân tử cao hơn đáng kể so với thành phần cơ bản của viên ngậm là SUC (ví dụ như MAL, tinh bột và các sản phẩm thủy phân khác) có thể được thêm vào để nâng cao Tg của viên ngậm. Do đó, khi tăng tỷ lệ MAL/tổng khối lượng tá dược (X_2) thì Tg của hỗn hợp tăng đáng kể.

Tối ưu hóa công thức, thông số quy trình điều chế viên ngậm cứng placebo

Công thức và thông số quy trình điều chế viên ngậm placebo tối ưu và giá trị dự đoán các biến Y bởi phần mềm BCPharSoft OPT được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Công thức và thông số quy trình điều chế viên ngậm placebo tối ưu và giá trị dự đoán các biến Y.

Biến số	Kết quả tối ưu			Giá trị dự đoán		
	X_1	X_2	X_3	$Y_1(\%)$	$Y_2(\%)$	$Y_3(^{\circ}C)$
Giá trị	50	15	155	0,456	6,524	46,55

Thực hiện lặp lại 3 lần công thức và thông số quy trình điều chế viên ngậm placebo tối ưu. Dùng phần mềm thống kê SPSS 20.0 so sánh kết quả thực nghiệm và kết quả dự đoán. Kết quả thống kê được trình bày ở bảng 5.

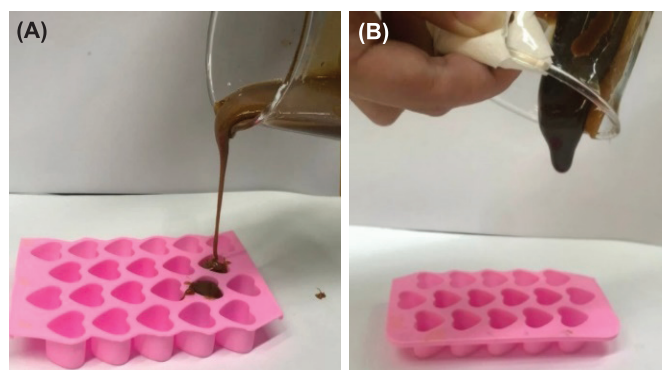
Bảng 5. So sánh kết quả dự đoán và thực nghiệm kiểm chứng (n=3).

	$Y_1(\%)$	$Y_2(\%)$	$Y_3(^{\circ}C)$
Dự đoán	0,456	6,524	46,55
Thực nghiệm	$0,450 \pm 0,012$	$6,499 \pm 0,184$	$46,23 \pm 0,21$
Giá trị p	0,48	0,84	0,12

Trắc nghiệm t trong bảng 5 cho thấy, kết quả dự đoán và kết quả kiểm chứng khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Như vậy, kết quả thực nghiệm kiểm chứng công thức và thông số quy trình điều chế viên ngậm tối ưu phù hợp với kết quả dự đoán bởi phần mềm BCPharsoft OPT.

Khảo sát lựa chọn tỷ lệ cao DS và xây dựng công thức viên ngậm DS

Hình 4B cho thấy, khi phối hợp cao DS với tỷ lệ 20% trong công thức viên ngậm DS, thể chất của hỗn hợp ở giai đoạn đổ khuôn rất nhớt, không thể đổ khuôn để tạo hình

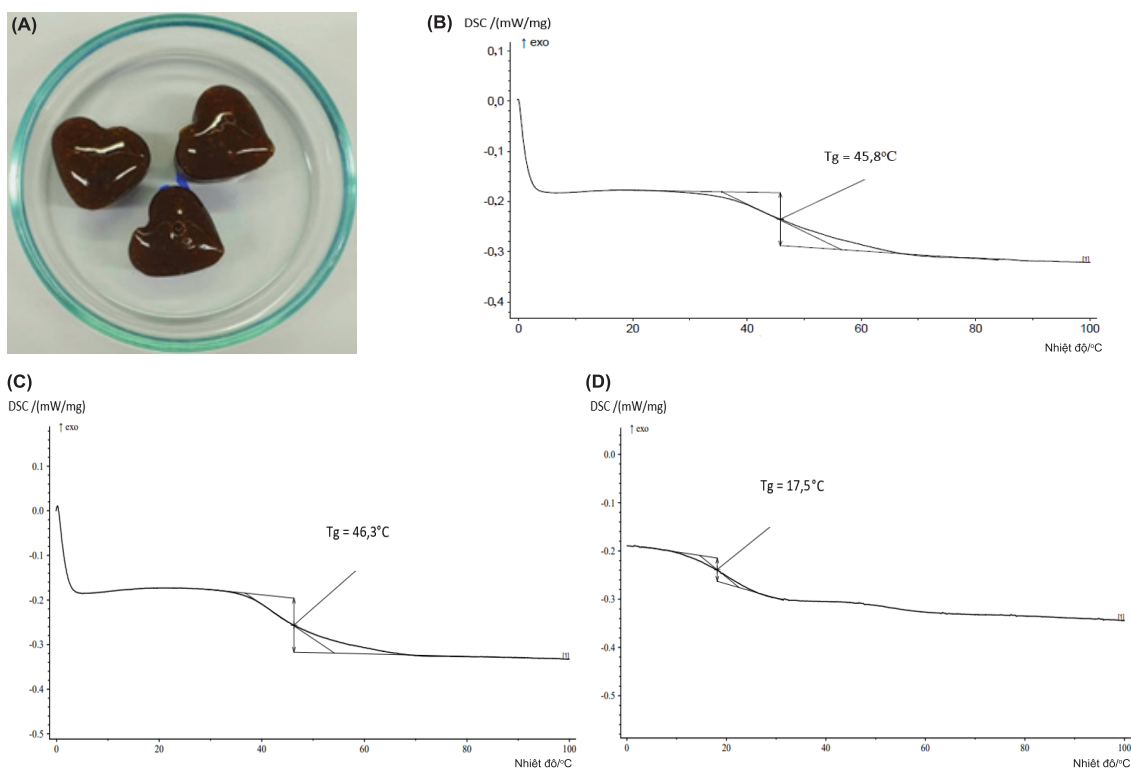


Hình 4. Thể chất hỗn hợp đổ khuôn ở tỷ lệ cao DS 15% (A) và 20% (B).

viên ngậm. Điều này có thể được giải thích là trong cao DS chứa nhiều polysaccharid [17] có khối lượng phân tử lớn, các polysaccharid này gây tăng độ nhớt của hỗn hợp. Khi phối hợp cao DS với tỷ lệ 20% trong công thức viên ngậm DS, hỗn hợp ở giai đoạn đổ khuôn có độ nhớt cao, không thể thực hiện đổ khuôn. Do đó, tỷ lệ cao khô DS trong công thức viên ngậm DS được chọn là 15%.

So sánh một số tính chất viên ngậm placebo và viên ngậm DS

Hình 5A cho thấy, viên ngậm DS có màu nâu đen, nhẵn bóng, cứng. Viên ngậm DS có độ ngọt vừa phải, có mùi vị đặc trưng của dược liệu DS. Tg của mẫu viên ngậm chứa cao DS là 45,8°C. Tg của viên ngậm DS giảm nhẹ so với Tg của



Hình 5. Viên ngậm DS (A) và kết quả DSC của viên ngậm DS (B), viên ngậm cứng placebo (C), cao khô DS (D).

viên ngậm cứng placebo (46,3°C). Điều này có thể được giải thích là do Tg của mẫu cao ĐS là 17,5°C (hình 5D) nên khi phối hợp cao ĐS vào hỗn hợp viên ngậm cứng placebo (Tg là 46,3°C) làm cho Tg của viên ngậm ĐS giảm nhẹ hoặc do sự tăng nhẹ của độ ẩm viên ngậm ĐS (bảng 6).

Bảng 6. So sánh một số tính chất viên ngậm placebo và viên ngậm ĐS (n=3).

Tính chất	Độ ẩm (%)	Tính hút ẩm (%)	Tg (°C)
Viên ngậm placebo	0,450±0,012	6,499±0,184	46,3±0,21
Viên ngậm ĐS	0,465±0,014	5,831±0,089	45,8±0,15

Kết quả bảng 6 cho thấy, độ ẩm của viên ngậm ĐS nhỏ hơn 0,5%. Độ ẩm của viên ngậm ĐS cao hơn viên ngậm cứng placebo (0,45%). Tuy nhiên, chênh lệch là không đáng kể.

Mức độ hút ẩm của viên ngậm ĐS của 3 lô ở nhiệt độ 30±2°C và độ ẩm 75±5% trong thời gian 48 giờ tăng dưới 6% (kl/kl). Mức độ hút ẩm này có sự giảm nhẹ so với mức độ hút ẩm của viên ngậm placebo (mức độ hút ẩm là 6,5%), có thể là do trong cao ĐS chứa nhiều thành phần có khối lượng phân tử lớn (polysaccharid), ít hút ẩm, dẫn đến giảm nhẹ mức độ hút ẩm của viên ngậm ĐS [17].

Kết luận

Nghiên cứu đã nghiên cứu xây dựng thành công mối liên quan nhân quả giữa 3 biến độc lập (tỷ lệ ISO/tổng khối lượng tá dược, tỷ lệ MAL/tổng khối lượng tá dược và nhiệt độ kết thúc giai đoạn cô đặc) và 3 biến phụ thuộc (độ ẩm, mức độ hút ẩm và Tg) của công thức và quy trình điều chế viên ngậm cứng placebo. Công thức và quy trình điều chế viên ngậm cứng placebo đã được tối ưu hóa và được kiểm chứng thành công. Viên ngậm cứng chứa cao ĐS được chọn (chứa 15% cao khô ĐS) có độ ẩm dưới 0,5%, mức độ hút ẩm dưới 6% (trong điều kiện thí nghiệm) và Tg là 45,8°C phù hợp để tiếp tục nghiên cứu nâng cỡ lô sản xuất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] L. Wu, M. Peng, Y. Jing, et al. (2020), "Immunomodulatory effect of polysaccharides from the extraction of *Codonopsis javanica* (Blume) Hook. f. et Thomson (*Campanulaceae*) roots in female rats", *Natural Product Research*, **35**(24), pp.5883-5887.

[2] Đỗ Tất Lợi (2001), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, 1295tr.

[3] R. Pothu, M.R. Yamsani (2014), "Lozenges formulation and evaluation: A review", *International Journal of Advances in Pharmaceutical Research*, **5**(5), pp.290-298.

[4] R.W. Hartel, H. Joachim, R. Hofberger (2018), "Hard candy", *Confectionery Science and Technology*, Springer, DOI: 10.1007/978-3-319-61742-8_8.

[5] R.W. Hartel, J.H. Von Elbe, R. Hofberger (2017), "Water", *Confectionery Science and Technology*, Springer, DOI: 10.1007/978-3-319-61742-8_3.

[6] Lê Văn Việt Mẫn, Lại Quốc Đạt, Nguyễn Thị Hiền và cs (2010), *Công nghệ chế biến thực phẩm*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, 1019tr.

[7] D. Peters, H. Lieberman, L. Lachman, J. Schwartz (1989), "Medicated lozenges", *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, Marcel Dekker, pp.419-463.

[8] Gaithersburg (2000), *Association of Official Agricultural Chemists*, 17th Edition, Official Methods of Analysis of AOAC international.

[9] F.M. Yilmaz, E. Yildirim, M. Karakuş (2019), "Production of natural colorant fortified hard candy: Effects of different carbohydrate formulations on colour, glass transition, hygroscopicity, carbohydrate composition and sensory properties", *GIDA - Journal of Food*, **44**(2), pp.357-368.

[10] A. Sentko, I.W. Ettle (2012), "Isomalt", *Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology*, **11**, pp.243-274.

[11] H. Price, B. Murray, J. Mattsson (2014), "Quantifying water diffusion in high-viscosity and glassy aqueous solutions using a Raman isotope tracer method", *Atmospheric Chemistry and Physics*, **14**(8), pp.3817-3830.

[12] B. Santhanam, J. Hickey, B.D. Brown, M. Venkatachalam (2020), *Hard Candy Confections With Low Hygroscopicity*, US Patent 10820608B1.

[13] P.J. Sheskey, B.C. Hancock, G.P. Moss, D.J. Goldfarb (2017), *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 9th Edition, Pharmaceutical Press, 1296pp.

[14] J. Raudonus, J. Bernard, H. Janßen, et al. (2000), "Effect of oligomeric or polymeric additives on glass transition, viscosity and crystallization of amorphous isomalt", *Food Research International*, **33**(1), pp.41-51.

[15] S.E. Papadakis, C. Gardeli, C. Tzia (2006), "Spray drying of raisin juice concentrate", *Drying Technology*, **24**(2), pp.173-180.

[16] P. Gabarra, R. Hartel (1998), "Corn syrup solids and their saccharide fractions affect crystallization of amorphous sucrose", *Journal of Food Science*, **63**(3), pp.523-528.

[17] J.Y. He, N. Ma, S. Zhu, et al. (2015), "The genus *Codonopsis* (*Campanulaceae*): A review of phytochemistry, bioactivity and quality control", *Journal of Natural Medicines*, **69**(1), pp.1-21.

Nghiên cứu bào chế hydrogel chứa vi nhũ tương ibuprofen dùng trên da

Hồ Hoàng Nhân*, Hoàng Thị Ngọc Duyên

Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế

Ngày nhận bài 24/3/2023; ngày chuyển phản biện 27/3/2023; ngày nhận phản biện 24/4/2023; ngày chấp nhận đăng 27/4/2023

Tóm tắt:

Đặt vấn đề: Ibuprofen (IBU) là dược chất thuộc nhóm giảm đau, kháng viêm không steroid (NSAIDs) với dạng bào chế tại chỗ dùng trên da sẽ giúp giảm tác dụng không mong muốn và chuyển hóa qua gan lần đầu. Để đảm bảo nồng độ hiệu quả của thuốc qua đường dùng trên da, nghiên cứu này được tiến hành nhằm mục đích xây dựng công thức hydrogel chứa vi nhũ tương (VNT) IBU dùng trên da và đánh giá chất lượng sản phẩm. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu khảo sát độ tan của IBU, xây dựng giản đồ pha, khảo sát tỷ lệ các tá dược trong công thức và đánh giá các đặc tính của VNT như kích thước giọt, hàm lượng dược chất bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao, khả năng giải phóng hoạt chất *ex vivo* qua da tai lợn bằng thiết bị Hanson Research. **Kết quả nghiên cứu:** Công thức hydrogel gồm xanthan 1% chứa VNT IBU 5% (kl/kl) dùng trên da gồm capryol 90 12,5%, acrysol K140 33,33%, propylen glycol 16,67% và nước vừa đủ 100% (kl/kl) với kích thước giọt bằng $25,69 \pm 2,12$ nm, phân bố kích thước bằng $0,226 \pm 0,095$. Công thức hydrogel gồm xanthan 1% chứa VNT IBU 5% (kl/kl) có khả năng thấm qua màng da tai lợn gấp 45 lần so với công thức hydrogel chứa IBU nguyên liệu. **Kết luận:** Đây là dạng bào chế đầy tiềm năng, có khả năng cải thiện sinh khả dụng của IBU với đường dùng trên da.

Từ khóa: hydrogel, ibuprofen, vi nhũ tương.

Chỉ số phân loại: 3.4

Đặt vấn đề

IBU (dẫn xuất của acid phenyl propionic) là một trong những NSAIDs được sử dụng trong điều trị viêm khớp dạng thấp, viêm cơ xương khớp và đau từ nhẹ đến trung bình. Nồng độ IBU trong huyết thanh và tác dụng giảm đau có mối tương quan với nhau. Do đó, nếu IBU hấp thu nhanh thì sẽ gây tác dụng giảm đau nhanh [1]. Tuy nhiên, vì tính thấm qua da kém nên rất khó để bào chế dạng dùng tại chỗ với nồng độ hiệu quả [2]. Để tăng khả năng thấm qua da của IBU, các dung dịch quá bão hòa, hệ eutecti và các dạng khác chứa chất diện hoạt không ion hóa hoặc acid béo đã và đang được nghiên cứu [3].

Nhằm mục tiêu cải thiện khả năng thấm qua da cũng như độ tan của IBU, VNT đã được nghiên cứu với thành phần bao gồm pha dầu, chất diện hoạt, chất đồng diện hoạt và pha nước. Dạng bào chế này trong suốt và bền vững với kích thước giọt 10-100 nm và có nhiều ưu điểm như làm tăng độ tan của dược chất, có độ bền nhiệt động cao, cải thiện khả năng thấm qua da so với dạng nhũ tương truyền thống [4].

Trên thế giới, H. Chen và cs (2006) [3] đã xây dựng công thức hydrogel chứa VNT IBU dùng trên da. Công thức VNT chứa IBU 3% sử dụng ethyl oleat làm pha dầu có tốc độ thấm tăng gấp 5,72-30,0 lần so với công thức chứa IBU bão hòa. Gôm xanthan 1,5% chứa VNT cho thấy sự ổn định không tách pha sau 3 tháng. B. Hajjar và cs (2017) [5] đã bào chế gel chứa VNT natri diclofenac 3% dùng trên da với caprylocaproyl polyoxyl-8 glycerid làm chất diện hoạt, diethylen glycol monoethyl ether làm chất đồng diện

hoạt và propylen glycol monolaurat làm pha dầu. Kích thước giọt của VNT và gel carbopol chứa VNT lần lượt là $114,4 \pm 0,472$ nm và $178 \pm 2,46$ nm; thế zeta lần lượt là $-33,3 \pm 0,64$ mV và $-33,0 \pm 0,40$ mV. Tỷ lệ giải phóng của VNT natri diclofenac và gel chứa VNT lần lượt là $76,67 \pm 8,63\%$ và $69,28 \pm 7,14\%$ sau 6 giờ, tốt hơn so với các mẫu chứng. A. Sharma và cs (2020) [6] đã tối ưu hóa công thức gel chứa VNT của nitrendipin dùng trên da với pha dầu kết hợp capmul và triacetin, chất diện hoạt là kolliphor ELP và chất đồng diện hoạt là transcutool HP. Công thức tối ưu có kích thước giọt $20,43 \pm 1,50$ nm, hàm lượng dược chất là $97,05 \pm 1,77\%$ và thế zeta là $-15,45 \pm 0,35$ mV. Gel chứa VNT nitrendipin hấp thu qua da tốt hơn so với dung dịch thuốc nhờ khả năng thấm và hòa tan tốt hơn.

Ở trong nước, Vũ Văn Duy và cs (2017) [7] đã bào chế hydrogel chứa VNT betamethason dipropionat dùng trên da. Công thức tối ưu chứa 0,064% betamethason dipropionat, 5% acid oleic, 11,6% cremophor RH40, 23,2% transcutool P và nước cất vừa đủ có kích thước giọt là 121,3 nm, tốc độ giải phóng $2,097 \pm 0,131$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{giờ}$ và lượng betamethason dipropionat lưu giữ trên da sau 24 giờ là $26,334 \pm 1,543$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Nguyễn Thị Kim Liên và cs (2018) [8] đã bào chế gel VNT chứa cao khô rau đắng đất với thành phần tạo VNT gồm isopropyl myristat, tween 20, span 80 và nước. VNT rau đắng đất có pH 4,527, kích thước giọt 14 nm và bền sau 6 chu kỳ sốc nhiệt. Gel VNT rau đắng đất đạt các chỉ tiêu vật lý và thể hiện khả năng kháng khuẩn *in vitro* trên chủng *P. aeruginosa*. Huỳnh Trúc Thanh Ngọc và cs (2019) [9] đã bào chế VNT chứa 2% diclofenac dùng trên da với pha dầu là capryol 90, chất diện hoạt là tween 20, đồng dung môi là PEG 400 với tỷ lệ tương ứng là 2:1.

*Tác giả liên hệ: Email: hhnhan@huamed-univ.edu.vn

Formulation of ibuprofen-loaded microemulsion-based hydrogel for topical administration

Hoang Nhan Ho*, Thi Ngoc Duyen Hoang

Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy, Hue University

Received 24 March 2023; accepted 27 April 2023

Abstract:

Background: Ibuprofen (IBU) is a nonsteroidal anti-inflammatory drug used to relieve pain and inflammation. Topical formulations of IBU can reduce unwanted side effects and first-pass metabolism in the liver. To enhance its water-poor solubility and permeability for topical administration, this study aimed to develop and characterise hydrogels containing IBU microemulsion. **Materials and methods:** Pseudo-ternary phase diagrams were constructed based on the evaluation of IBU solubility and the ratio of different excipients in the microemulsion formula. IBU microemulsion and IBU microemulsion-loaded hydrogels were characterised in terms of particle size and drug content by the high-performance liquid chromatography method. *Ex vivo* drug release through pig ear skin was evaluated using Hanson Research equipment. **Results:** The 1% xanthan gum hydrogel formula containing 5% (w/w) IBU microemulsion included 12.5% capryol 90, 33.33% acrysol K140, 16.67% propylene glycol and water (up to 100%, w/w) had a particle size of 25.69 ± 2.12 nm and a polydispersity index of 0.226 ± 0.095 . The permeated drug percentage through the pig ear skin of the 1% xanthan gum hydrogel formula containing 5% (w/w) IBU microemulsion was 45-fold greater than that containing IBU material. **Conclusion:** These results showed that IBU-loaded microemulsion-based hydrogel would be a promising drug delivery system for topical administration.

Keywords: hydrogel, ibuprofen, microemulsion.

Classification number: 3.4

VNT có kích thước giọt trung bình $216,80 \pm 0,28$ nm, pH 7,26, độ thấm qua màng là $41,72$ mg/cm² sau 180 phút.

Do đó, việc khảo sát các yếu tố thuộc công thức như loại và tỷ lệ pha dầu, loại và tỷ lệ chất diện hoạt, chất đồng diện hoạt là rất cần thiết. Thêm vào đó, VNT là dạng bào chế có độ nhớt thấp nên cần phải phối hợp với các tá dược tạo gel khác nhau để phù hợp cho việc dùng trên da. Nhằm góp phần nâng cao độ tan của IBU cũng như tăng cường khả năng thấm của dược chất qua da, nghiên cứu được thực hiện nhằm xây dựng được công thức hydrogel chứa VNT với nồng độ IBU 5% và đánh giá một số đặc tính lý hóa của sản phẩm bào chế được.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng

Nguyên liệu: IBU [2-(4-isobutylphenyl)-propionic acid] xuất xứ Trung Quốc, hàm lượng 99,5%. IBU chuẩn của Viện Kiểm nghiệm thuốc TP Hồ Chí Minh, hàm lượng 99,67%, số lô QT026 100715. Labrafac CC, peceol, capryol 90, labrafil M1944CS, labrasol, lauroglycol 90 do Công ty Gattefossé (Pháp) sản xuất được tài trợ từ Công ty Sapharchem ở TP Hồ Chí Minh. Acrysol K140, acrysol EL 135 từ Công ty Corel Pharma Chem (Ấn Độ). PEG 400, acid oleic, isopropanol, propylen glycol từ Xilong (Trung Quốc). Acetonitril, methanol, natri acetat, acid acetic băng đạt tiêu chuẩn HPLC (High performance liquid chromatography - sắc ký lỏng hiệu năng cao). Các hóa chất khác đều đạt tiêu chuẩn phân tích.

Thiết bị: Máy lắc xoay Vortex Labnet (Mỹ), bể lắc điều nhiệt Julabo SW22 (Đức), thiết bị ly tâm Hermle Labortechnik GmbH (Đức), máy khuấy từ IKA C-MAG HS-7, máy đo quang phổ UV-Vis JASCO V-630, thiết bị HPLC Shimadzu (CAT.NO 228) (Nhật Bản), thiết bị đánh giá khả năng phóng thích qua màng Hanson Research (Teledyne Technologies Incorporated, Mỹ), cân phân tích HR-250 AZ (Nhật Bản), màng lọc nylon 0,45 μ m.

Phương pháp nghiên cứu

Đánh giá độ tan của IBU: Thử độ tan của IBU trong các tá dược khác nhau, bao gồm acid oleic, labrafac CC, peceol, capryol 90, labrafil M1944CS, labrasol, acrysol K140, acrysol EL 135, PEG 400, lauroglycol 90, propylen glycol. Thử nghiệm được tiến hành bằng cách cho lượng dư IBU vào 1 ml mỗi tá dược trong ống ly tâm. Sau đó, hỗn hợp được trộn lắc xoay và giữ trong 7 ngày tại nhiệt độ 25°C trong bể lắc để đạt cân bằng. Sau đó, mẫu được ly tâm tại 10.000 vòng/phút trong 30 phút để loại IBU dư [10]. Hút phần dịch trong phía trên và tiến hành pha loãng mẫu bằng cách sử dụng dung môi isopropanol với tỷ lệ thích hợp rồi định lượng bằng phương pháp quang phổ UV-Vis, sử dụng máy Spectrophotometer JASCO V-630 (Nhật Bản), mẫu trắng là isopropanol cùng tá dược tương ứng. Mẫu được định lượng ở bước sóng 264 nm, sử dụng phương pháp so chuẩn để tính toán độ tan bão hòa của IBU [11].

Đánh giá về khả năng nhũ hóa: Các chỉ tiêu đánh giá bao gồm: % độ truyền qua và khả năng dễ nhũ hóa. Đối với chất diện hoạt, có thể tiến hành như sau: lấy 0,5 ml chất diện hoạt (acrysol K140, acrysol EL135, labrafil M1944CS) thêm vào 0,5 ml dầu. Trộn hỗn hợp đồng nhất rồi lấy 0,1 ml hỗn hợp trên pha loãng với 50 ml nước cất để tạo thành nhũ tương [12]. Quan sát độ đục của nhũ tương tạo thành. Nhũ tương trên được để trong 2 giờ rồi đo độ truyền qua bằng máy đo quang phổ UV-Vis Spectrophotometer JASCO V-630 (Nhật Bản) tại bước sóng 638 nm, mẫu trắng là nước cất [12].

Các chất đồng diện hoạt (propylen glycol, lauroglycol 90) được sàng lọc để xây dựng công thức VNT. Chuẩn bị hỗn hợp chất đồng diện hoạt (0,1 g), chất diện hoạt (0,2 g) và dầu đã lựa chọn (0,3 g) để thực hiện đánh giá khả năng nhũ hóa theo như cách được mô tả trên rồi chọn ra chất đồng diện hoạt thích hợp [13].

Tiếp theo, thực hiện đánh giá tỷ lệ chất diện hoạt và chất đồng diện hoạt để xây dựng giản đồ pha. Chuẩn bị 0,3 g các tỷ lệ khác nhau (1:1, 1:2, 1:3, 2:1, 3:1, 4:1) của hỗn hợp chất diện hoạt và chất đồng diện hoạt (Smix) và 0,3 g dầu rồi thực hiện đánh giá như trên.

Xây dựng giản đồ pha: Để tìm ra khoảng nồng độ của các thành phần trong công thức VNT, tiến hành xây dựng giản đồ pha bằng cách sử dụng phương pháp chuẩn độ nước tại nhiệt độ phòng (25°C). Tỷ lệ Smix được lựa chọn là 1:1, 2:1, 3:1, 4:1. Sau đó, Smix được trộn với pha dầu với tỷ lệ tương ứng là 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 và 9:1 [5, 13, 14] tạo thành các hỗn hợp khác nhau. Tiếp theo, pha loãng hỗn hợp trên bằng cách nhỏ từ từ từng giọt nước kết hợp với khuấy từ với tốc độ 50 vòng/phút. Điểm cuối chuẩn độ là khi tạo thành nhũ tương đục hay mờ [5].

Giản đồ pha được xây dựng trên ternaryplot.com và tính diện tích phần VNT bằng công cụ WebPlotDigitizer. Tỷ lệ Smix được lựa chọn tương ứng với vùng VNT lớn nhất trên giản đồ pha [15].

Bào chế VNT và hydrogel VNT

Bào chế VNT IBU: IBU được hòa tan vào hỗn hợp dầu, chất diện hoạt và chất đồng diện hoạt với các tỷ lệ khác nhau, sau đó cho từ từ từng giọt nước. Trong khi thêm nước, sử dụng khuấy từ với tốc độ 50 vòng/phút trong 5 phút để tạo thành VNT. Tất cả VNT được bảo quản ở nhiệt độ phòng [3].

Bào chế hydrogel VNT IBU: Lựa chọn gồm xanthan là tá dược tạo gel để phối hợp với VNT [3, 16]. Phối hợp từ từ gồm xanthan vào VNT hoàn chỉnh kết hợp với khuấy trộn [3]. Các nồng độ chất tạo gel 1, 1,5 và 2% (kl/kl) được khảo sát [3].

Đánh giá đặc tính lý hóa của VNT chứa IBU

Tính chất: Đánh giá cảm quan VNT được tạo thành bằng cách quan sát các tính chất như trạng thái đồng nhất, trong suốt, khả năng tách pha.

Kích thước giọt và phân bố kích thước giọt (PDI): Các mẫu được đo bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động học (DLS - Dynamic light scattering), sử dụng thiết bị Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Anh). Pha loãng mẫu VNT thu được bằng nước cất 2 lần với tỷ lệ thích hợp sao cho tốc độ đếm nằm trong khoảng 200-400 kcps, sử dụng cuvet nhựa để đo mẫu ở 25°C và ở góc tán xạ 90° [5, 6].

Đánh giá đặc tính lý hóa của hydrogel chứa VNT của IBU

pH: Cân chính xác khoảng 1 g gel, pha loãng 10 lần bằng nước cất, sau đó tiến hành xác định pH bằng máy đo pH (Mettler Toledo, Thụy Sĩ).

Hàm lượng IBU trong hydrogel: Định lượng IBU trong gel bằng phương pháp HPLC như sau:

- Chuẩn bị mẫu thử bằng cách lấy khoảng 0,1 g hydrogel chứa VNT pha loãng thành 10 ml dung dịch bằng isopropanol.
- Sử dụng hệ thống HPLC pha đảo, HPLC Shimadzu (CAT.

NO 228, Nhật Bản). Hệ thống HPLC sử dụng cột Thermo Fisher Scientific C18 (5 μ m x 4,6 mm x 25 cm, Mỹ), hệ tiêm mẫu tự động, dùng detector DAD. Pha động là hỗn hợp acetonitril - đệm natri acetat (pH 2,5) (70:30). Tốc độ dòng cố định 0,8 ml/phút và bước sóng xác định đặt ở 264 nm [3].

Khả năng giải phóng dược chất ex vivo của hydrogel chứa VNT của IBU:

Chuẩn bị da tai lợn: Sử dụng màng da tai lợn nguyên vẹn được lấy trong vòng 2 giờ sau khi mổ và tách khỏi lớp sụn, loại bỏ lớp mỡ, lông bằng các dụng cụ phẫu thuật như dao mổ, panh, kéo phẫu thuật. Rửa sạch da với nước muối sinh lý, sau đó rửa với đệm muối phosphat (PBS) pH 7,4. Da có thể được sử dụng ngay hoặc bảo quản ở nhiệt độ -20°C và sử dụng trong vòng 1 tuần [17, 18]. Màng da tai lợn được kiểm tra mô học bằng cách nhuộm H&E (Hematoxylin & Eosin) để kiểm tra tính toàn vẹn trước khi tiến hành thử nghiệm [19].

Tiến hành đánh giá: Các hydrogel chứa VNT của IBU 5% và mẫu chứng chứa IBU được thử nghiệm (mẫu chứa hỗn dịch IBU 5% (kl/kl) được bào chế cụ thể như sau: phân tán 0,15 g IBU vào lượng nước vừa đủ thu được hỗn dịch IBU 5%, sau đó, cho từ từ gồm xanthan vào hỗn dịch trên và khuấy đều đến đồng nhất để thu được hydrogel gồm xanthan 1% chứa IBU 5%). Da được đặt ở giữa buồng cho và buồng nhận, với diện tích bề mặt khuếch tán là 1,77 cm², thể tích môi trường khuếch tán PBS là 7 ml. Giữ nhiệt độ 37±5°C trong suốt quá trình thử nghiệm với bề điều nhiệt. Dung dịch trong buồng nhận được khuấy từ với tốc độ 350 vòng/phút [3]. Cân 0,3 g mẫu thử để thử nghiệm. Tiến hành lấy mẫu trong 8 giờ tại các thời điểm nhất định. Mỗi lần lấy 1 ml đồng thời bổ sung ngay 1 ml môi trường khuếch tán mới. Sau đó, dung dịch thu được được định lượng bằng phương pháp HPLC.

Lượng IBU thấm qua màng da tai lợn được biểu diễn theo thời gian. Tốc độ thấm qua da của hoạt chất tại trạng thái dừng (J, μ g/cm²/giờ) và thời gian tiềm tàng được tính toán từ đồ thị biểu diễn khả năng giải phóng hoạt chất ex vivo. Hệ số thấm qua da (P) được tính bằng cách lấy tốc độ thấm qua da (J_{ss}) chia cho nồng độ IBU tại buồng cho (C_o): $P = J_{ss}/C_o$ [3, 20, 21].

Phương pháp xử lý thống kê: Xử lý thống kê với Microsoft excel 2010.

Kết quả

Độ tan của IBU

Kết quả độ tan được thể hiện ở bảng 1 cho thấy, trong số các tá dược dầu, độ tan của IBU trong capryol 90 là cao nhất (268±0,011 mg/ml), tiếp theo là peceol, acid oleic và labrafac CC. Trong các chất diện hoạt, IBU tan nhiều nhất trong acrysol K140 (374±0,042 mg/ml), tiếp theo là labrasol, acrysol EL135 và labrafil M1944CS. Trong các chất đồng diện hoạt, IBU tan nhiều nhất trong propylen glycol (201±0,007 mg/ml). Dựa trên kết quả thu được, lựa chọn pha dầu là capryol 90 để tiếp tục thử nghiệm tiếp theo.

Bảng 1. Kết quả độ tan của IBU trong các tá dược.

Loại tá dược	Tá dược	Độ tan (trung bình±SD, n=3) (mg/ml)
Tá dược dầu	Acid oleic	123±0,040
	Labrafac CC	113±0,028
	Peceol	235±0,036
	Capryol 90	268±0,011
Chất điện hoạt	Labrafil M1944CS	108±0,191
	Labrasol	295±0,147
	Acrysol EL135	285±0,118
	Acrysol K140	374±0,042
Chất đồng điện hoạt	Lauroglycol 90	113±0,041
	Propylene glycol	201±0,007

Đánh giá về khả năng nhũ hóa

Kết quả độ truyền qua của hỗn hợp sau khi được pha loãng với nước được thể hiện ở bảng 2. Acrysol K140 và acrysol EL135 nhũ hóa hoàn toàn capryol 90, trong khi labrafil M1944CS và labrasol nhũ hóa một phần và tạo váng dầu. Tuy acrysol K140 và acrysol EL135 có độ truyền qua gần như nhau (tương ứng là 100,13±0,43% và 99,55±2,81%), nhưng do IBU tan trong acrysol K140 nhiều hơn acrysol EL135 nên lựa chọn acrysol K140 làm chất điện hoạt để thực hiện thử nghiệm tiếp theo.

Bảng 2. Độ truyền qua của hỗn hợp capryol 90/chất điện hoạt sau khi pha loãng.

Pha dầu	Chất điện hoạt	Độ truyền qua T% (trung bình±SD, n=3)
Capryol 90	Acrysol K140	100,13±0,43
	Acrysol EL135	99,55±2,81
	Labrafil M1944CS	23,32±10,09
	Labrasol	8,45±4,80

Kết quả bảng 3 cho thấy, capryol 90 kết hợp với acrysol K140 và propylen glycol cho độ truyền qua lớn nhất (99,89±1,08%), có nghĩa là tổ hợp này cho mức độ nhũ hóa lớn nhất. Do đó lựa chọn 3 thành phần trên để bào chế VNT.

Bảng 3. Độ truyền qua của hỗn hợp capryol 90/acrysol K140/chất đồng điện hoạt sau khi pha loãng.

Pha dầu	Chất điện hoạt	Chất đồng điện hoạt	Độ truyền qua T% (trung bình±SD, n=3)
Capryol 90	Acrysol K140	Propylen glycol	99,89±1,08
		Lauroglycol 90	80,75±8,10

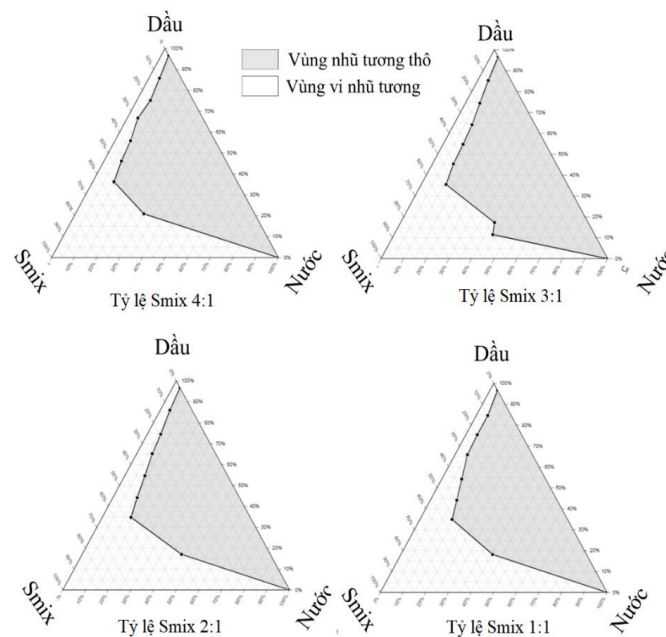
Kết quả bảng 4 cho thấy, trong số các tỷ lệ acrysol K140/propylen glycol, tỷ lệ 1:1, 2:1, 3:1 và 4:1 có độ truyền qua lớn hơn so với các tỷ lệ còn lại. Nhận thấy, khi lượng propylene glycol (chất đồng điện hoạt) lớn hơn lượng acrysol K140 (chất điện hoạt) (tỷ lệ khối lượng/khối lượng) thì tác dụng nhũ hóa sẽ kém đi. Do đó, tiến hành xây dựng các giản đồ pha với tỷ lệ 1:1, 2:1, 3:1 và 4:1.

Bảng 4. Độ truyền qua của hỗn hợp capryol 90/acrysol K140/propylen glycol sau khi pha loãng.

Pha dầu	Chất điện hoạt	Chất đồng điện hoạt	Tỷ lệ Smix	Độ truyền qua T% (trung bình±SD, n=3)
Capryol 90	Acrysol K140	Propylen glycol	4:1	100,00±2,03
			3:1	99,94±1,45
			2:1	99,19±1,94
			1:1	95,21±4,77
			1:2	52,06±10,87
			1:3	39,36±12,35

Xây dựng giản đồ pha

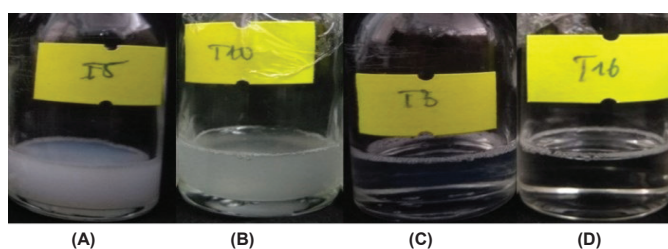
Hình ảnh giản đồ pha của capryol 90 (pha dầu)/acrysol K140-propylen glycol (Smix)/nước được thể hiện ở hình 1. Diện tích vùng VNT tương ứng với tỷ lệ Smix 2:1 bằng 30179,87 px² (pixel) lớn nhất, tiếp theo là tỷ lệ 1:1 (29808,54 px²), 4:1 (27760,88 px²) và 3:1 (27265,27 px²). Do đó lựa chọn tỷ lệ Smix là 2:1 cho công thức VNT.

**Hình 1. Giản đồ pha xác định vùng hình thành VNT của capryol 90 (dầu)/acrysol K140-propylen glycol (Smix)/nước.****Bào chế VNT IBU**

Tiến hành bào chế VNT với tỷ lệ các thành phần công thức và tính chất thu được kết quả ở bảng 5 và hình 2. Có thể thấy, các mẫu T16 đến T20 trong suốt và bền vững, do đó lựa chọn các mẫu này để đo kích thước giọt.

Bảng 5. Tính chất của các công thức VNT IBU.

Công thức	% O	% Smix	% nước	% IBU	Tính chất
T1	5	25	65	5	Trong mờ, 1 ngày sau đục
T2	7,5	25	62,5	5	Đục
T3	5	30	60	5	Trong, hơi mờ
T4	7,5	30	57,5	5	Trong, hơi mờ đục, 1 ngày sau chuyển đục
T5	10	30	55	5	Đục
T6	5	35	55	5	Trong, hơi mờ, sau 1 tuần thấy tách pha ít
T7	7,5	35	52,5	5	Trong, hơi mờ, sau 1 tuần thấy tách pha ít
T8	10	35	50	5	Trong, hơi mờ, sau 1 tuần thấy tách pha ít
T9	5	40	50	5	Đục, tách pha sau 2-3 ngày
T10	7,5	40	47,5	5	Đục, tách pha sau 2-3 ngày
T11	10	40	45	5	Đục, tách pha sau 2-3 ngày
T12	5	45	45	5	Đục, tách pha sau 2-3 ngày
T13	8,75	45	41,25	5	Hơi đục, tách pha sau 2-3 ngày
T14	12,5	45	37,5	5	Hơi đục, tách pha sau 2-3 ngày
T15	5	50	40	5	Hơi đục, tách pha sau 2-3 ngày
T16	8,75	50	36,25	5	Trong suốt
T17	12,5	50	32,5	5	Trong suốt
T18	5	55	35	5	Trong suốt
T19	8,75	55	31,25	5	Trong suốt
T20	5	60	30	5	Trong suốt



Hình 2. Hình ảnh một số mẫu VNT. (A) Đục do kích thước giọt lớn dẫn đến kết tụ; **(B)** Đục do không nhũ hóa hết 2 pha; **(C)** VNT trong mờ; **(D)** VNT trong.

Kết quả bảng 6 cho thấy, T18 có kích thước giọt nhỏ nhất là 22,38 nm với PDI 0,211 còn T19 có kích thước giọt lớn nhất là 29,08 và PDI 0,307.

Bảng 6. Kích thước giọt và PDI của các công thức VNT.

Công thức	Kích thước giọt (nm)	PDI
T16	23,78±1,53	0,247±0,071
T17	25,69±2,12	0,226±0,095
T18	22,38±1,97	0,211±0,068
T19	29,08±3,51	0,307±0,083
T20	22,99±1,18	0,226±0,069

Bào chế và đánh giá tính chất lý hóa của hydrogel chứa VNT IBU

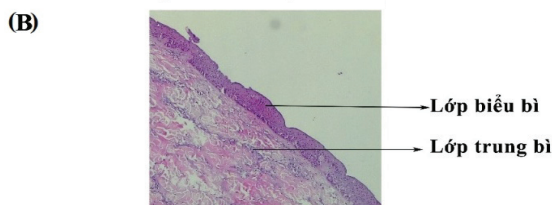
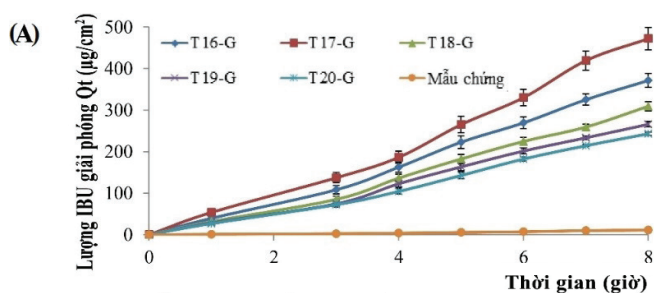
Sau khi khảo sát các nồng độ tá dược tạo gel gồm xanthan (1-2%), hydrogel sử dụng gồm xanthan 1% có thể chất đặc, đồng nhất, mịn, thích hợp cho dạng dùng trên da được sử dụng để phối vào các công thức VNT chứa IBU đã được lựa chọn. Kết quả bảng 7 cho thấy, các công thức gel đều đạt yêu cầu trong suốt, đặc, đồng nhất, mịn, pH đo được có giá trị 4,52 đến 4,93 đạt yêu cầu phù hợp với khoảng pH của da 4,1-5,8, hàm lượng trong khoảng 4,87-5,00%.

Bảng 7. Tính chất, pH và hàm lượng của các gel chứa VNT IBU 5%.

Mẫu gel	Tính chất	pH	Hàm lượng (%)
T16-G	Trong suốt, đặc, đồng nhất, mịn	4,52±0,12	4,87±0,07
T17-G	Trong suốt, đặc, đồng nhất, mịn	4,86±0,19	5,00±0,07
T18-G	Trong suốt, đặc, đồng nhất, mịn	4,68±0,10	4,94±0,08
T19-G	Trong suốt, đặc, đồng nhất, mịn	4,79±0,07	4,92±0,06
T20-G	Trong suốt, đặc, đồng nhất, mịn	4,93±0,06	4,88±0,06

Đánh giá khả năng giải phóng dược chất qua màng da tai lợn

Kết quả đánh giá khả năng giải phóng dược chất được thể hiện ở hình 3 cho thấy, kết quả tốc độ thẩm qua da của hoạt chất tại trạng thái dừng (J) lần lượt là 52,86, 72,55, 43,80, 35,65 và 34,96 µg/cm²/giờ; thời gian tiềm tàng t_{lag} lần lượt là 0,52, 0,66, 0,57, 0,54 và 0,53 giờ, tương ứng với các công thức T16-G, T17-G, T18-G, T19-G và T20-G. So với mẫu chứng có J là 1,61 µg/cm²/giờ, các công thức đều có tốc độ thẩm cao hơn, với công thức T17-G có khả năng giải phóng dược chất tốt nhất với tốc độ thẩm gấp 45 lần nên lựa chọn T17-G là công thức tối ưu. Dựa vào hình ảnh nhuộm H&E của màng da tai lợn, lớp màu tím phía ngoài là lớp biểu bì, ngăn cách bên dưới qua lớp trung bì, chứng tỏ sự nguyên vẹn của màng trước khi thử giải phóng.



Hình 3. (A) Đồ thị biểu diễn khả năng giải phóng IBU từ hydrogel chứa VNT qua màng da tai lợn (n=6); **(B)** Hình ảnh tiêu bản da tai lợn sau khi nhuộm H&E.

Bàn luận

VNT gồm có pha dầu, pha nước, chất diện hoạt và chất đồng diện hoạt. Qua khảo sát, IBU tan nhiều nhất trong pha dầu là capryol 90, nên lựa chọn capryol là pha dầu. Qua kết quả khảo sát, acrysol K140 là chất diện hoạt có khả năng hòa tan IBU cao nhất và propylen glycol là chất đồng diện hoạt có khả năng hòa tan IBU cao nhất. Tuy nhiên, để xây dựng được công thức VNT tối ưu, không chỉ dựa vào độ tan của IBU trong các tá dược mà còn cần phải dựa vào khả năng nhũ hóa của các tá dược đó. Do đó, cần phải xem xét kết quả đánh giá khả năng nhũ hóa của tá dược để lựa chọn công thức tốt nhất. Dựa vào khả năng nhũ hóa của các tá dược, lần lượt lựa chọn acrysol K140 và propylen glycol là chất diện hoạt và chất đồng diện hoạt trong công thức VNT. Điều này có thể là do trong các tá dược chất diện hoạt khảo sát, giá trị HLB (hệ số phân bố dầu nước) nếu sắp xếp theo thứ tự tăng dần thì có thứ tự như sau: labrafil M1944CS (9), labrasol (12), acrysol K140 (14-16), acrysol EL135 (15,4), đồng thời số lượng nhóm oxyethylen tương ứng của chúng cũng tăng dần nên khả năng nhũ hóa tạo thành VNT ở trường hợp sử dụng acrysol, ngược lại tạo nhũ tương thô khi sử dụng labrafil, labrasol [22, 23]. Xây dựng giản đồ pha để xác định vùng VNT và tìm ra tỷ lệ acrysol K140, propylen glycol. Tỷ lệ Smix 2:1 là tối ưu nhất với vùng hình thành VNT lớn nhất.

Theo nghiên cứu của H. Chen và cs (2006) [3], việc bào chế VNT khá đơn giản và dễ thực hiện. Mặc dù tăng tỷ lệ pha dầu sẽ làm cho kích thước giọt càng lớn nhưng do IBU tan trong pha dầu nên nồng độ pha dầu được lựa chọn là 5-12,5%. Theo các nghiên cứu khác về VNT [3, 5, 16] và đồng thời cần đảm bảo nồng độ nước vừa đủ để tạo gel, nồng độ Smix được lựa chọn là 25-60%, còn lại là nước. Sau khi khảo sát các công thức, nhận thấy vùng VNT tối ưu khi ở vùng nồng độ Smix 50-60%, do đó vùng này sẽ được lựa chọn nhằm tối ưu hóa cho nghiên cứu sau.

Các công thức T16 đến T20 được pha loãng và đánh giá kích thước giọt bằng phương pháp DLS. Kết quả công thức T18 và T20 có kích thước giọt thấp nhất, còn T19 có kích thước giọt cao nhất. PDI của các công thức đều dưới 0,3 (trừ T19 có PDI 0,307). Nhìn chung, khi tăng tỷ lệ dầu và giảm tỷ lệ Smix thì kích thước giọt sẽ tăng. Các công thức được phối gel và thử giải phóng dược chất qua màng.

Tá dược tạo gel có ảnh hưởng rõ ràng đến đặc tính của VNT. Qua tham khảo các tài liệu [3, 16, 24] lựa chọn gồm xanthan với các nồng độ 1, 1,5 và 2% để làm tá dược tạo gel. Sau khi khảo sát, gồm xanthan với nồng độ 1% được lựa chọn do công thức với hàm lượng gồm xanthan 1,5 và 2% tạo thành gel rất đặc, nhớt dính, lợn cợn, không mịn. Điều này được giải

thích do công thức có hàm lượng nước thấp, gồm xanthan 1,5 và 2% tương tự không đồng đều tạo thành gel không đồng nhất.

Khi phối vào gel, theo nghiên cứu của B. Hajjar và cs (2017) [5], cấu trúc của VNT vẫn giữ nguyên, không bị tách pha sau 5 chu kỳ nóng - lạnh, mặc dù kích thước giọt có tăng từ 114,4 lên 178,8 nm so với công thức VNT. Do đó, trong các nghiên cứu tiếp theo, nhằm đánh giá độ ổn định của hydrogel chứa VNT IBU, các chỉ tiêu như tính chất, độ nhớt, pH, hàm lượng dược chất, kích thước giọt, PDI, khả năng tách pha, tính chất cơ học của gel... sau quá trình bảo quản mẫu nhũ tương ở các điều kiện khác nhau sẽ được tiếp tục khảo sát.

Kết quả nhuộm H&E ở hình 3B cho thấy, mặt ngoài của da là lớp mỏng toàn vẹn màu xanh đậm, còn mặt trong tương ứng là lớp dày màu đỏ hồng. Ở lớp biểu bì, đi từ trong ra ngoài là các lớp tế bào đáy, lớp tế bào gai, lớp tế bào hạt, lớp bóng và lớp sừng. Lớp trung bì ở phía dưới với các sợi collagen và elastin [25]. Hình ảnh của da tai lợn đã nhuộm H&E chứng tỏ da tai lợn toàn vẹn và có thể áp dụng để đánh giá nghiên cứu qua màng *ex vivo*.

Sau khi đánh giá giải phóng dược chất qua màng da tai lợn bằng thiết bị Hanson Research cho thấy, nhìn chung việc tăng hàm lượng dầu và giảm hàm lượng chất diện hoạt sẽ giúp giải phóng dược chất tốt hơn. So sánh với kết quả của mẫu chứng, hydrogel chứa VNT thu được có tốc độ thấm cao hơn nhiều (tốc độ thấm của T17 cao gấp 45 lần so với mẫu chứng). Điều này chứng tỏ đây là dạng bào chế dùng trên da đầy tiềm năng, có khả năng cải thiện sinh khả dụng của IBU với đường dùng trên da. So với sản phẩm Deep Relief của Công ty TNHH Rohto - Mentholatum Việt Nam chứa IBU 5%, hoặc Boots IBU 5%, 10% của Công ty The Mentholatum Company Limited (Anh) có sử dụng ethanol/isopropanol có thể kết hợp thêm với kiềm hóa để làm tăng độ tan của IBU, công thức kem IBU Fiterman 5% của Công ty Fiterman Pharma (Romani) thì công thức VNT ở dạng gel không chứa ethanol/isopropanol sẽ phù hợp đối với các trường hợp quá mẫn hoặc kích ứng với các dung môi này. Đồng thời, giá trị pH thu được là $4,86 \pm 0,19$, nằm trong khoảng pH sinh lý da nên hạn chế được việc gây kích ứng.

Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được công thức bào chế tối ưu của hydrogel gồm xanthan 1% chứa VNT IBU 5% dùng trên da gồm capryol 90 12,5%, acrysol K140 33,33%, propylen glycol 16,67% và nước vừa đủ 100%, với kích thước giọt bằng $25,69 \pm 2,12$ nm và PDI bằng $0,226 \pm 0,095$. Đây là cơ sở để phát triển các nghiên cứu tiếp theo nhằm ứng dụng dạng bào chế hydrogel chứa VNT IBU trong sản xuất dược phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] M. Klueglic, A. Ring, S. Scheuerer, et al. (2005), "Ibuprofen extrudate, a novel, rapidly dissolving ibuprofen formulation: Relative bioavailability compared to ibuprofen lysinate and regular ibuprofen, and food effect on all formulations", *J. Clin. Pharmacol.*, **45**(9), pp.1055-1061.
- [2] T. Yano, A. Nakagawa, M. Tsuji, et al. (1986), "Skin permeability of various non-steroidal anti-inflammatory drugs in man", *Life Sci.*, **39**(12), pp.1043-1050.
- [3] H. Chen, X. Chang, D. Du, et al. (2006), "Microemulsion-based hydrogel formulation of ibuprofen for topical delivery", *Int. J. Pharm.*, **315**(1-2), pp.52-58.
- [4] M.J. Lawrence, G.D. Rees (2000), "Microemulsion-based media as novel drug delivery systems", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **45**(1), pp.89-121.
- [5] B. Hajjar, K.I. Zier, N. Khalid, et al. (2017), "Evaluation of a microemulsion-based gel formulation for topical drug delivery of diclofenac sodium", *J. Pharm. Invest.*, **48**(7), pp.351-362.
- [6] A. Sharma, A.P. Singh, S.L. Harikumar (2020), "Development and optimization of nanoemulsion based gel for enhanced transdermal delivery of nitrendipine using Box-Behnken statistical design", *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **46**(2), pp.329-342.
- [7] Vũ Văn Duy, Nguyễn Thị Hương, Nguyễn Thạch Tùng (2017), "Nghiên cứu xây dựng công thức bào chế vi nhũ tương betamethason dipropionat", *Tạp chí Dược học*, **57**(7), tr.17-20.
- [8] Nguyễn Thị Kim Liên, Lê Xuân Trường, Trần Văn Thành (2018), "Bào chế gel vi nhũ tương từ cao khô Rau đắng đất [*Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC., Molluginaceae]", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, **61**(5), tr.11-15.
- [9] Huỳnh Trúc Thanh Ngọc, Trương Đình Quỳnh Ngân, Bùi Nguyễn Huyền Linh (2019), "Nghiên cứu điều chế vi nhũ tương chứa 2% diclofenac", *Tạp chí Y Dược học Cần Thơ*, **22-25**, tr.1-7.
- [10] L. Hu, J. Yang, W. Liu, et al. (2011), "Preparation and evaluation of ibuprofen loaded microemulsion for improvement of oral bioavailability", *Drug Deliv.*, **18**(1), pp.90-95.
- [11] M. Górecki, M. Sosada, B. Pasker, et al. (2016), "Preparation of ibuprofen emulsions with rapeseed phospholipids and vegetable oils", *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, **50**(2), pp.271-276.
- [12] M. Aqil, M. Kamran, A. Ahad, et al. (2016), "Development of clove oil based nanoemulsion of olmesartan for transdermal delivery: Box-Behnken design optimization and pharmacokinetic evaluation", *Journal of Molecular Liquids*, **214**, pp.238-248.
- [13] B. Dhawan, G. Aggarwal, S.L. Harikumar (2014), "Enhanced transdermal permeability of piroxicam through novel nanoemulgel formulation", *Int. J. Pharm. Invest.*, **4**(2), pp.65-76.
- [14] S. Das, S.H. Lee, P.S. Chow, et al. (2020), "Microemulsion composed of combination of skin beneficial oils as vehicle: Development of resveratrol-loaded microemulsion based formulations for skin care applications", *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, **194**, DOI: 10.1016/j.colsurfb.2020.111161.
- [15] S. Kotta, A.W. Khan, S. H. Ansari, et al. (2015), "Formulation of nanoemulsion: A comparison between phase inversion composition method and high-pressure homogenization method", *Drug Deliv.*, **22**(4), pp.455-466.
- [16] P. Spiclin, M. Homar, A.Z. Valant, et al. (2003), "Sodium ascorbyl phosphate in topical microemulsions", *Int. J. Pharm.*, **256**(1-2), pp.65-73.
- [17] A. Abruzzo, N. Armenise, F. Bigucci, et al. (2017), "Surfactants from itaconic acid: Toxicity to HaCaT keratinocytes *in vitro*, micellar solubilization, and skin permeation enhancement of hydrocortisone", *Int. J. Pharm.*, **524**(1-2), pp.9-15.
- [18] F. Bigucci, A. Abruzzo, B. Saladini, et al. (2015), "Development and characterization of chitosan/hyaluronan film for transdermal delivery of thiocolchicoside", *Carbohydr. Polym.*, **130**, pp.32-40.
- [19] A.H. Fischer, K.A. Jacobson, J. Rose, et al. (2008), "Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections", *CSH Protoc.*, **2008**, DOI: 10.1101/pdb.prot4986.
- [20] M. Alberti, Y. Dancik, G. Sriram, et al. (2017), "Multi-chamber microfluidic platform for high-precision skin permeation testing", *Lab Chip*, **17**(9), pp.1625-1634.
- [21] P.A. Lehman (2014), "A simplified approach for estimating skin permeation parameters from *in vitro* finite dose absorption studies", *J. Pharm. Sci.*, **103**(12), pp.4048-4057.
- [22] Gattefossé (2023), *Lipid Excipients for Topical Drug Delivery*, <https://www.pharmaexcipients.com/excipient-suppliers-list/gattefossé-lipid-excipients/>, accessed March 1, 2023.
- [23] Corel Pharma Chem (2023), *ACRYSOL® Castor Oil Derivatives*, <https://www.corelpharmachem.com/products/acrysol/>, accessed March 2, 2023.
- [24] E.A. Lee, P. Balakrishnan, C.K. Song, et al. (2010), "Microemulsion-based hydrogel formulation of itraconazole for topical deliver", *J. Pharm. Invest.*, **40**(5), pp.305-311.
- [25] M.K. In, K.C. Richardson, A. Loewa, et al. (2019), "Histological and functional comparisons of four anatomical regions of porcine skin with human abdominal skin", *Anat. Histol. Embryol.*, **48**(3), pp.207-217.

Áp dụng hướng dẫn EP15A3 của CLSI trong xác nhận phương pháp định lượng glucose máu bằng máy Accu-check Inform II

Lê Hoàng Bích Nga^{1,2}, Trần Thị Thuý Quỳnh¹, Lê Lâm Kiều Oanh¹, Nguyễn Thị Ngọc Lan^{1,2*}

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Bệnh viện Đại học Y Hà Nội

Ngày nhận bài 5/10/2022; ngày chuyển phản biện 8/10/2022; ngày nhận phản biện 19/10/2022; ngày chấp nhận đăng 24/10/2022

Tóm tắt:

Xác nhận đặc tính hiệu năng kỹ thuật của phương pháp xét nghiệm là một yêu cầu thiết yếu trong phòng xét nghiệm nhằm đảm bảo cung cấp kết quả xét nghiệm đáng tin cậy cho chẩn đoán và điều trị. Mục tiêu của nghiên cứu nhằm đánh giá kết quả xác nhận phương pháp định lượng glucose máu bằng máy Accu-check Inform II tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội. Phương pháp và vật liệu nghiên cứu: Vật liệu nội kiểm do nhà sản xuất cung cấp để tiến hành thực nghiệm đánh giá độ chụm, độ đúng xét nghiệm glucose máu trên máy Accu-check Inform II theo hướng dẫn EP15A3 của CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute - Viện Tiêu chuẩn về xét nghiệm lâm sàng). Kết quả của độ lệch chuẩn (SD) trong một lần chạy và SD giữa các lần chạy của 2 mức nội kiểm (QC - Quality control) trong thực nghiệm nhỏ hơn công bố của nhà sản xuất, giá trị trung bình quan sát không nằm trong khoảng xác minh nhưng độ lệch Bias nhỏ hơn mức độ cho phép. Độ đúng và độ chụm của xét nghiệm glucose máu được thực hiện trên máy Accu-check Inform II tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội được xác nhận phù hợp với công bố của nhà sản xuất.

Từ khóa: Accu-check Inform II, EP15A3, nồng độ glucose máu, xác nhận phương pháp.

Chỉ số phân loại: 3.5

Application of CLSI's EP15A3 guideline in Accu-check Inform II method verification

Hoang Bich Nga Le^{1,2}, Thi Thuy Quynh Tran¹, Lam Kieu Oanh Le¹, Thi Ngoc Lan Nguyen^{1,2*}

¹Hanoi Medical University

²Hanoi Medical University Hospital

Received 5 October 2022, accepted 24 October 2022

Abstract:

Method validation is an essential laboratory requirement to ensure reliable test results for diagnosis and treatment. This study aims to evaluate the determination of blood glucose level method by the Accu-check Inform II analyzer at Hanoi Medical University Hospital. Method and materials: Internal control materials were provided by the manufacturer to conduct experiments to evaluate the precision, accuracy and linearity of blood glucose testing on the Accu-check Inform II analyzer according to the guideline EP15A3 of the Clinical and Laboratory Standards Institute. Results: The within-run precision and within-laboratory precision of two experimental quality control levels are less than the manufacturer's claim, the observed mean is not within the verification interval, but the Bias is less than the allowable Bias. The accuracy and precision of the blood glucose test performed on the Accu-check Inform II analyzer used at the Hanoi Medical University Hospital were confirmed in accordance with the manufacturer's claims.

Keywords: Accu-check Inform II, blood glucose level, EP15A3, method validation.

Classification number: 3.5

Đặt vấn đề

Xác nhận phương pháp là khẳng định bằng kiểm tra các bằng chứng khách quan cho thấy các yêu cầu cụ thể của một phương pháp định sử dụng có thể đáp ứng được. Việc xác nhận phương pháp phân tích cần được tiến hành trước khi đưa thiết bị mới, kỹ thuật xét nghiệm mới vào sử dụng nhằm xác nhận các tiêu chuẩn kỹ thuật mà nhà sản xuất đã công bố là đúng trong điều kiện của phòng xét nghiệm [1].

Máy Accu-check Inform II được thiết kế để định lượng đường huyết bằng máu tĩnh mạch, máu mao mạch, máu động mạch và máu trẻ sơ sinh giúp hỗ trợ theo dõi kiểm soát đường huyết. Hệ thống này thiết kế dành cho nhân viên y tế đo lượng nồng độ glucose máu và tự động ghi lại kết quả, bao gồm cả kết quả QC tại giường nhằm hỗ trợ nâng cao chất lượng chăm sóc bệnh nhân [2]. Để khẳng định kết quả xét nghiệm trên hệ thống phân tích này là chính xác, đáng tin cậy như nhà sản xuất công bố, cần phải xác nhận phương pháp trước khi đưa vào sử dụng tại phòng xét nghiệm.

EP15A3 của CLSI hướng dẫn xác nhận độ chụm và độ đúng của phương pháp. Độ chụm được sử dụng để mô tả mức độ gần nhau giữa các kết quả của những lần thực hiện độc lập trên cùng một mẫu và cùng một điều kiện được biểu thị định lượng thông qua SD và hệ số biến thiên (CV) [3]. Độ đúng chỉ mức độ gần nhau giữa kết quả đo và giá trị thực của phép đo, một phương pháp xét nghiệm thu được kết quả đúng khi kết quả xấp xỉ bằng trị số thực của nó. Hướng dẫn EP15A3 của CLSI được áp dụng rộng rãi vì quy trình kỹ thuật đơn giản nhằm tiết kiệm tối đa các nguồn lực nhưng vẫn đảm bảo tính nghiêm ngặt, đánh giá được đồng thời độ đúng và độ chụm, có thể áp dụng trong các phòng xét nghiệm khác nhau về trang thiết bị, kỹ thuật, nhân lực [4].

*Tác giả liên hệ: Email: ngoclannguyen@hmu.edu.vn

Vì vậy, nghiên cứu được tiến hành nhằm đánh giá kết quả xác nhận phương pháp định lượng glucose máu bằng máy Accu-check Inform II tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội theo hướng dẫn EP15A3 của CLSI.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng

Chất liệu nghiên cứu: 2 mẫu QC với 2 mức nồng độ, que test máy Accu-check do nhà sản xuất cung cấp (Hãng Roche).

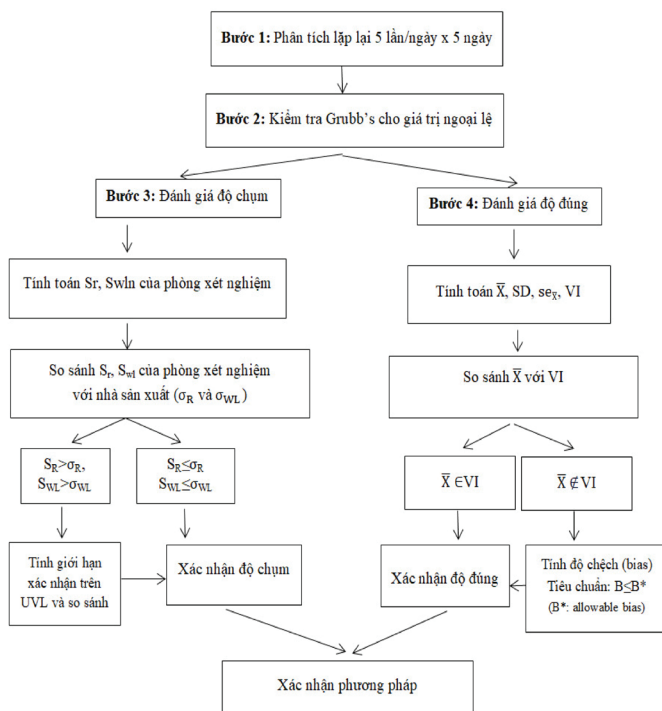
Địa điểm và thời gian nghiên cứu: Khoa Xét nghiệm, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội, từ ngày 28/6/2022 đến 10/8/2022.

Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu thực nghiệm trong phòng xét nghiệm.

Nguyên lý xét nghiệm đường máu mao mạch trên máy là nguyên lý điện hoá.

Enzyme Mut-QGH có trên que thử sẽ chuyển glucose trong mẫu máu thành gluconolactone. Phản ứng tạo ra dòng điện một chiều, máy đo sẽ định lượng được nồng độ glucose. Sơ đồ nghiên cứu được thể hiện ở hình 1.



Hình 1. Sơ đồ nghiên cứu xác nhận phương pháp máy Accu-check Inform II. S_R , S_{WL} : độ lệch chuẩn trong một lần chạy và giữa các lần chạy 2 mức QC của phòng xét nghiệm; σ_R , σ_{WL} : độ lệch chuẩn trong một lần chạy và giữa các lần chạy của nhà sản xuất; $\bar{X}$: giá trị trung bình quan sát; UVL: giới hạn xác nhận trên; $se_{\bar{X}}$: Sai số chuẩn hệ thống; VI: Khoảng xác nhận.

Nghiên cứu sử dụng cùng một thực nghiệm để đánh giá đồng thời độ chụm và độ đúng của phương pháp xét nghiệm theo hướng dẫn EP15A3 của CLSI. Cụ thể:

Bước 1: Phân tích lặp lại mỗi ngày 5 lần mỗi mẫu kiểm tra chất lượng ở hai mức nồng độ kiểm tra chất lượng, tiến hành trong 5 ngày liên tiếp.

Bước 2: Kiểm tra Grubb's cho các số liệu ngoại lệ. Một kết quả được coi là giá trị ngoại lệ nếu nó nằm ngoài khoảng giới hạn Grubb's.

$$\text{Grubb's limits} = \text{Mean} \pm G \times \text{SD}$$

trong đó: Mean: giá trị trung bình của số liệu thu được; G: hệ số của Grubb's được tra từ bảng Grubb's ($G=3,135$).

Bước 3: Đánh giá độ chụm.

So sánh SD của phòng xét nghiệm với độ chụm của nhà sản xuất hoặc khoảng chấp nhận tính toán được của độ chụm.

- Tính toán phương sai. Sử dụng công cụ phân tích ANOVA một chiều trên Excel để tính toán phương sai giữa các lần chạy lặp lại (V_w và V_B).

$$V_w = MS2, \text{ nếu } MS1 < MS2 \text{ thì } V_B = 0; \text{ ngược lại } V_B = (MS1 - MS2)/n_0$$

trong đó: V_w : phương sai lặp lại (trong ngày); V_B : phương sai giữa các ngày; $MS1$: bình phương trung bình giữa các ngày; $MS2$: bình phương trung bình trong ngày; n_0 là số lần chạy/ngày (thực nghiệm này là 5).

- So sánh độ chụm ước tính với công bố của nhà sản xuất. So sánh độ chụm ước tính của phòng xét nghiệm ở cả 2 mức QC với công bố của nhà sản xuất. Nếu độ chụm của phòng xét nghiệm vượt quá công bố nhà sản xuất, cần tính UVL (Upper verification limit - giới hạn xác nhận) để so sánh. Tính giới hạn xác nhận cho độ chụm (UVL_R) như sau:

$$df_R = N - k = 25 - 5 = 20, \text{ với } N \text{ là tổng số kết quả; } k = n_0 \text{ là số lần chạy.}$$

$$UVL_R = F \times \sigma_R$$

Tính giới hạn xác nhận cho độ chụm (UVL_{WL}) như sau:

$$df_{WL} \text{ tra cứu dựa trên tỷ lệ } p = \frac{\sigma_{WL}}{\sigma_R} \text{ theo bảng giá trị } p \text{ và số lần chạy.}$$

$$UVL_{WL} = F \times \sigma_{WL}$$

Bước 4: Đánh giá độ đúng.

- Tính toán sai số chuẩn của giá trị trung bình ($se_{\bar{X}}$).

$$se_{\bar{X}} = \sqrt{\frac{1}{n_{Run}} \times (S_{WL}^2 - (\frac{n_{Rep} - 1}{n_{Rep}}) \times S_R^2)}$$

trong đó: $n_{Run} = 5$, $n_{Rep} = 5$.

- Sai số chuẩn của giá trị đích (se_{RM}) giả định là 0 khi sử dụng mẫu QC.

- Tính sai số chuẩn kết hợp (se_c).

- Tính bậc tự do kết hợp (df_c).

- Xác định m theo hàm t student có độ chính xác 95% cho 2 mức QC.

- Tính khoảng xác nhận (VI - Verification interval).

Tính toán thống kê để đưa ra khoảng giá trị xác nhận của phương pháp. Nếu giá trị trung bình của vật liệu kiểm tra nằm trong khoảng xác nhận thì độ đúng của phòng xét nghiệm được xác nhận phù hợp với công bố của nhà sản xuất.

Trường hợp giá trị trung bình nằm ngoài khoảng xác nhận cần tiến hành tính độ chệch Bias giữa giá trị trung bình đo được với TV theo công thức sau:

$$\text{Bias} = \frac{\bar{x} - \text{TV}}{\bar{x}} \times 100\%$$

trong đó: TV là giá trị đích nhà sản xuất cung cấp.

So sánh Bias với Bias được cho phép (theo RCPA). Nếu Bias được cho phép thì độ đúng được xác nhận.

Đạo đức nghiên cứu

Vật liệu sử dụng là các mẫu QC thương mại, không thực hiện trên mẫu bệnh phẩm.

Kết quả

Đánh giá độ chụm

Tiến hành thực nghiệm trên 2 mức QC theo hướng dẫn EP15A3. Kết quả bảng 1 cho thấy, với QC1 giới hạn Grubb's là 2,474-2,75 (mmol/l); với QC2 giới hạn Grubbs là 16,17-17,717 (mmol/l). Tất cả các kết quả chạy lặp lại của 2 mức QC đều nằm trong giới hạn, nên không có số liệu lạc cần loại bỏ trong thực nghiệm.

Bảng 1. Xác định giới hạn Grubb's cho xét nghiệm.

Số lần chạy	QC 1					QC 2				
	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5
1	2,6	2,6	2,6	2,7	2,6	16,8	16,9	16,8	17,1	17,2
2	2,6	2,7	2,6	2,6	2,6	16,9	17,2	16,8	17,1	16,9
3	2,6	2,6	2,6	2,7	2,6	17,3	17,3	16,6	16,8	17,1
4	2,6	2,6	2,6	2,5	2,6	17	16,5	16,4	16,7	17,2
5	2,6	2,7	2,6	2,6	2,6	16,8	16,9	16,9	17,1	17,3
Mean	2,612					16,944				
SD	0,043969687					0,246779254				
CV	1,683372379					1,456440354				
G	3,135					3,135				
Giới hạn Grubb's dưới	2,474					16,170				
Giới hạn Grubb's trên	2,74s					17,717				

Độ chụm ước tính của phòng xét nghiệm ở cả 2 mức QC nhỏ hơn công bố của nhà sản xuất (QC1: $S_R=0,04<0,1=$, $S_{WL}=0,04<0,1=$; QC2: $S_R=0,22<0,6=$, $S_{WL}=0,25<0,3=$. Do vậy, độ chụm được xác nhận (bảng 2).

Bảng 2. Độ chụm ước tính bằng phân tích phương sai một chiều.

Anova	QC1					QC2						
Source of Variation	SS	Df	MS	F	P-value	F crit	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0,0064	4	0,0016	0,8	0,5393	2,866	0,4936	4	0,1234	2,549	0,071	2,866
Within Groups	0,04	20	0,002				0,968	20	0,0484			
Total	0,0464	24					1,4616	24				
MS1	0,0016						0,1234					
MS2	0,002						0,0484					
Vb	0						0,02					
Vw	0,002						0,05					
Sr	0,04						0,22					
Swl	0,04						0,25					
σR	0,1						0,6					
Σwl	0,1						0,3					
Nhận xét	Xác nhận						Xác nhận					

Đánh giá độ đúng

Kết quả bảng 3 cho thấy, giá trị trung bình quan sát của thực nghiệm ở cả 2 mức QC đều không nằm trong khoảng xác nhận, nhưng giá trị Bias nhỏ hơn với giá trị Bias được chấp nhận ($4,5<8\%$, $2,1<8\%$) nên độ đúng của xét nghiệm được xác nhận.

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ đúng.

	QC1	QC2
Giá trị trung bình	2,61	16,94
S_R	0,04	0,22
S_{WL}	0,04	0,25
Sai số chuẩn trung bình quan sát	0,008944272	0,070256672
Sai số chuẩn vật liệu tham chiếu	0	0
Sai số chuẩn hệ thống	0,008944272	0,070256672
Bậc tự do dfc = nRun - 1	4	4
Xác định m theo hàm student có độ chính xác 95% cho 2 mức QC	3,5	3,5
Giá trị đích (TV)	2,5	16,6
Khoảng xác nhận trên VI = TV + m*	2,47	16,35
Khoảng xác nhận dưới VI = TV - m*	2,53	16,85
Độ chệch Bias	4,5%	2,1%
Độ chệch tiêu chuẩn	8%	8%
Đánh giá	Xác nhận	Xác nhận

Bàn luận

EP15A3 là một hướng dẫn của tổ chức CLSI ban hành để hướng dẫn các phòng xét nghiệm xác nhận độ đúng và độ chụm của phương pháp xét nghiệm. Đây là quy trình đơn giản, tiết kiệm, dễ áp dụng và được các phòng xét nghiệm sử dụng phổ biến. Nghiên cứu này được tiến hành theo hướng dẫn EP15A3 nhằm xác nhận phương pháp xét nghiệm glucose máu trên máy Accu-chek Inform II.

Thực nghiệm đánh giá độ chụm được thực hiện bằng việc phân tích mẫu QC với 2 mức nồng độ lặp lại 5 lần trong mỗi lần chạy, trong 5 ngày liên tục. Tính toán các chỉ số giá trị trung bình, phương sai từ số liệu thu được, độ chụm ngắn hạn, độ chụm dài hạn và so sánh với công bố của nhà sản xuất. Tiêu chuẩn xác nhận theo hướng dẫn EP15A3 là độ chụm ngắn hạn và độ chụm dài hạn của phòng xét nghiệm nhỏ hơn công bố của nhà sản xuất, trong trường hợp lớn hơn công bố của nhà sản xuất cần ước tính và so sánh với giới hạn xác nhận trên của phương pháp. Kết quả của thực nghiệm cho thấy, độ chụm trong một lần chạy và độ chụm giữa các lần chạy của xét nghiệm nhỏ hơn công bố của nhà sản xuất ở cả 2 mức QC (QC1: $S_R=0,04<0,1=$, $S_{WL}=0,04<0,1=$; QC2: $S_R=0,22<0,6=$, $S_{WL}=0,25<0,3=$ nên độ chụm của phương pháp được xác nhận. Ở trường hợp này, không cần tính giới hạn xác nhận trên cho độ chụm (UWL). Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của T.D. Jeong và cs (2016) [5] khi tiến hành đánh giá quy mô lớn hiệu năng phương pháp máy Accu-chek Inform II trên 238 thiết bị, trong đó đánh giá độ chụm của 12 thiết bị theo hướng dẫn của EP05-A2. Theo nghiên cứu này, các thông số tiến hành thực nghiệm (CV mức 1: 2,7%; CV mức 2: 1,9%) đảm bảo độ chụm. Một nghiên cứu khác của A. Brouwers và cs (2005) [6] khi tiến hành nghiên cứu hiệu suất lâm sàng và phân tích máy đo nồng độ glucose máu Accu-chek Inform II cũng chỉ ra rằng độ chụm của phương pháp được xác nhận.

Thực nghiệm đánh giá độ đúng sử dụng các số liệu thu được từ chính thực nghiệm đánh giá độ chụm. Độ đúng được đánh giá qua giá trị trung bình quan sát, khoảng xác nhận. Theo hướng dẫn EP15A3, giá trị trung bình nằm trong khoảng xác nhận thì độ đúng được xác nhận (hay độ lệch được chấp nhận). Tuy nhiên, trong nghiên cứu này giá trị trung bình đo được nằm ngoài khoảng xác nhận nên cần tiến hành tính độ lệch Bias (QC1: 4,5%, QC2: 2,1%) và so sánh với độ lệch chấp nhận. Nhiều tổ chức có uy tín như Hiệp hội Bệnh học Hoa Kỳ (College of American Pathologists), Phòng thí nghiệm Sức khỏe và Môi trường của Bang Wisconsin (Wisconsin State Laboratory of Hygiene), Cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) có quy định về độ lệch chấp nhận hay dựa vào biến thiên sinh học quy định về độ lệch để xác định độ

đúng khác nhau. Nghiên cứu này chúng tôi dựa vào tiêu chí chấp nhận độ lệch tối đa cho phép là 8% của RCPA (Chương trình ngoại kiểm tra chất lượng hóa sinh của Hiệp hội Hoàng gia Úc). Như vậy, theo kết quả thực nghiệm độ đúng được xác nhận.

Kết luận

Phương pháp xét nghiệm định lượng glucose máu trên máy Accu-chek Inform II cho thấy, độ chụm ngắn hạn là 0,04 ở mức QC1, 0,22 ở mức QC2 và độ chụm dài hạn là 0,04 ở mức QC1, 0,25 ở mức QC2 đều nhỏ hơn độ chụm của nhà sản xuất nên được công nhận. Khoảng xác nhận ở 2 mức nồng độ lần lượt là 2,47-2,53 (QC1) và 16,35-16,85 (QC2), giá trị trung bình quan sát được nằm ngoài khoảng xác nhận nhưng độ lệch (QC1: 4,5%, QC2: 2,1%) nhỏ hơn độ lệch tối đa cho phép là 8% nên độ đúng cũng được xác nhận.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] M.D.K. Linnet, J.C. Boyd (2016), "Selection and analytical evaluation of methods-with statistical techniques", *Basicmedical Key*, **2**, <https://basicmedicalkey.com/selection-and-analytical-evaluation-of-methods-with-statistical-techniques/>, accessed 20 September 2022.
- [2] Roche Diagnostic GmbH (2017), *Máy xét nghiệm đường huyết Accu-Chek Inform II: Tóm tắt hướng dẫn vận hành thiết bị*, https://dmec.moh.gov.vn/documents/10182/3098079/upload_00062921_1505471594424.pdf?version=1.0&fileId=3127312, accessed 10 September 2022.
- [3] R.N. Carey, F.P. Anderson, H. George, et al. (2006), "LSI EP15-A2 - User verification of performance for precision and trueness", *Clinical & Laboratory Standards Institute*, **25(17)**, pp.2-3.
- [4] N. Carey, A.P. Durham, W.W. Hauck, et al. (2014), "EP15-A3 user verification of precision and estimation of bias", *Clinical & Laboratory Standards Institute*, **34(12)**, pp.1-13.
- [5] T.D. Jeong, E.J. Cho, D.H. Ko, et al. (2016), "Large-scale performance evaluation of Accu-Chek inform II point-of-care glucose meters", *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **76(8)**, pp.657-663.
- [6] A. Brouwers, D. Bernard, M. Langlois (2005), "Clinical and analytical performance of the Accu-chek Inform point-of-care glucose meter", *The Journal of Near-Patient Testing & Technology*, **4(1)**, pp.36-40.

Đặc điểm nông học và đa dạng di truyền của các dòng ngô ngọt ôn đới và nhiệt đới tự phối S4 mới phát triển

Nguyễn Trung Đức^{1*}, Nguyễn Thị Nguyệt Anh¹, Phạm Quang Tuấn¹, Vũ Văn Liết²

¹Viện Nghiên cứu và Phát triển cây trồng, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài 29/11/2022; ngày chuyển phản biện 2/12/2022; ngày nhận phản biện 26/12/2022; ngày chấp nhận đăng 29/12/2022

Tóm tắt:

Nghiên cứu được tiến hành nhằm đánh giá đặc điểm nông học và đa dạng di truyền bằng phương pháp phân tích tương quan, phân tích thành phần chính và phân tích cụm trên 20 tính trạng nông học của 16 dòng ngô ngọt nhiệt đới (NG01-NG016) và 4 dòng ôn đới (NG017-NG020) tự phối đời S4 (phát triển từ các giống nhập nội có nguồn gốc Thái Lan, Trung Quốc, Nhật Bản, Mỹ) với 3 dòng thuần đối chứng là SW1 (ngọt, vàng), D181 (ngọt, trắng) và UV10 (ngọt, tím). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối đầy đủ hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần nhắc lại tại Hà Nội trong vụ thu đông 2022, với 20 tính trạng nông học được chia thành 4 nhóm, gồm 5 tính trạng sinh trưởng, 7 tính trạng đặc điểm hình thái, 7 tính trạng năng suất và 1 tính trạng chất lượng. Kết quả phân tích tương quan cho thấy năng suất cả thể có tương quan thuận ở mức $p < 0,01$ với số hạt/hàng là 0,61, số hàng hạt/bấp 0,57 và tương quan thuận ở mức $p < 0,05$ với đường kính 0,47 và chiều dài bắp 0,45. 20 tính trạng được giảm chiều thành 3 thành phần chính đóng góp 66,8% biến đổi kiểu hình. Trong đó, các tính trạng thời gian sinh trưởng, chiều cao cây, chiều cao đóng bắp, góc lá, số hàng hạt/bắp, số hạt/hàng, khối lượng 1000 hạt, năng suất cả thể và tổng lượng chất rắn hòa tan có thể sử dụng để đánh giá sự khác biệt của các dòng ngô ngọt. Phân tích cụm dựa vào thành phần chính trên 20 tính trạng nông học đã phân 20 dòng ngô thành 3 nhóm chính. Nghiên cứu cung cấp thông tin hữu ích về đa dạng di truyền dựa trên kiểu hình và bổ sung nguồn gen ngô ngọt có giá trị cho chương trình chọn giống ngô thực phẩm cao cấp tại Việt Nam.

Từ khóa: đa dạng kiểu hình, ngô ngọt, phân tích cụm, phân tích thành phần chính, tương quan.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Ngô ngọt (*Zea mays* L. var. *Rugosa* Bonaf.) là một trong những loại rau có giá trị kinh tế cao, được tiêu thụ phổ biến ở Mỹ, Trung Quốc, Thái Lan, Nhật Bản [1, 2]. Tại Việt Nam, giống ngô ngọt ngày càng được trồng phổ biến và mang lại giá trị kinh tế cao [3, 4]. Ngô ngọt có nguồn gốc ôn đới với phổ di truyền hẹp, được phát triển từ các gen lặn như *shrunken2* (*sh2*), *brittle1* (*bt*), *sugary1* (*su1*), *sugary enhancer* (*se*) điều khiển quá trình chuyển hóa đường sang tinh bột [5]. Các giống ngô ngọt chọn tạo ở khí hậu ôn đới mặc dù có chất lượng cao, ngăn ngày nhưng gần như khó phát triển được ở các vùng nhiệt đới do phải đối phó với thời tiết ngày ngắn, ánh sáng hạn chế vào mùa đông, nhiệt độ, độ ẩm cao và nhiều loại sâu bệnh hại [6]. Giới hạn về nguồn gen là những thách thức lớn khi nghiên cứu phát triển các giống ngô ngọt mới, thích ứng với điều kiện khí hậu nhiệt đới ẩm gió mùa tại Việt Nam. Mục tiêu của chọn giống ngô ngọt là kết hợp nhiều tính trạng mong muốn khác nhau trong một giống duy nhất. Những tính trạng như vậy bao gồm năng suất cao hơn, khả năng kháng thuốc trừ sâu, thuốc diệt cỏ, sâu bệnh, chịu được nóng và hạn hán, ngăn ngày, đặc điểm nông học tốt hơn, giá trị dinh dưỡng cao hơn, độ đồng đều trong thời gian nảy mầm, chiều cao cây, tốc độ sinh trưởng, độ chín và kích thước bắp. Để đạt mục tiêu này thì nguồn gen đóng vai trò cốt lõi [7]. Sự đa dạng di truyền là cơ sở để phát triển các dòng bố mẹ hoặc ứng dụng trong các nghiên cứu cải tiến quần thể sẵn có. Do vậy, công tác thu thập, nghiên cứu duy trì, phát triển các nguồn vật liệu ngô

ngọt mới đóng vai trò quan trọng, tạo ra vật liệu khởi đầu phục vụ cho các chương trình chọn giống và phải được tiến hành thường xuyên, liên tục.

Nguồn gen có thể là vô giá nhưng cũng có thể không có giá trị nếu không được khai thác, sử dụng phục vụ mục đích tạo giống hoặc nghiên cứu cơ bản. Đánh giá đặc điểm nông học, tìm hiểu hệ số di truyền các tính trạng quan trọng và mối quan hệ giữa các dòng ngô ngọt xác định tiềm năng di truyền là bước cốt lõi của tất cả các chương trình chọn giống ngô ngọt ưu thế lai [1, 8]. Các phương pháp phân tích tương quan, phân tích thành phần chính và phân tích cụm đã được sử dụng có hiệu quả trong nghiên cứu đa dạng di truyền trên ngô để xác định sự liên hệ giữa các tính trạng, phân nhóm các tính trạng có đóng góp quan trọng xác định biến đổi kiểu hình và phân nhóm đa dạng di truyền nguồn gen, dòng, giống ngô. A. Shelton và W. Tracy (2013) [9] đã áp dụng phương pháp phân tích tương quan trên 15 tổ hợp lai ngô ngọt Mỹ cho thấy, năng suất có tương quan thuận và chặt với chiều cao cây, đường kính bắp, độ ẩm hạt cũng như tổng số bắp/ha. Không chỉ dùng để xác định các tính trạng kiểu hình quan trọng, phương pháp phân tích thành phần chính còn được sử dụng để phân tích dữ liệu kiểu gen SNP trên cây ngô ngọt [10, 2, 11]. B. Mehta và cs (2017) [12] và A. Mahato và cs (2018) [13] đã áp dụng phương pháp phân tích cụm để phân nhóm các dòng ngô ngọt tại Ấn Độ. Như vậy, kết hợp cả 3 phương pháp trên sẽ cho kết quả tối ưu khi tìm hiểu tiềm năng di truyền của các quần thể ngô ngọt mới.

*Tác giả liên hệ: Email: ntduc@vnua.edu.vn

Agronomic performance and genetic diversity of newly developed S4 temperate and tropical sweet corn lines

Trung Duc Nguyen^{1*}, Thi Nguyet Anh Nguyen¹,
Quang Tuan Pham¹, Van Liet Vu²

¹Institute of Crops Research and Development,
Vietnam National University of Agriculture

²Faculty of Agronomy, Vietnam National University of Agriculture

Received 29 November 2022; accepted 29 December 2022

Abstract:

This study aims to evaluate agronomic traits and genetic diversity through correlation analysis, principal component analysis, and cluster analysis on 20 agronomic traits of 16 S4 tropical sweet corn lines (NGO1-NGO16) and 4 S4 temperate lines (NGO17-NGO20) developed from varieties imported from Thailand, China, Japan, and the USA along with 3 inbred check lines viz., SW1 (sweet, yellow), D181 (sweet, white) and UV10 (sweet, purple). The field experiment was arranged in a randomised complete block design with 3 replicates in Hanoi, in the autumn-winter crop 2022 to evaluate twenty agronomic traits, divided into 4 groups viz., 5 growth traits, 7 morphological traits, 7 yield traits, and 1 quality trait. Correlation analysis showed that the single plant yield was positively correlated at $p < 0.01$ with the number of kernels per row 0.61, the number of kernel rows per ear 0.57, and positively correlated at $p < 0.05$ with ear diameter 0.47 and ear length 0.45. Twenty traits were dimensionally reduced to 3 main principal components contributing 66.8% of total phenotypic variation in which growth duration, plant height, ear height, leaf angle, number of kernels row per ear, number of kernels per row, 1000-grain weight, single plant yield and total soluble solids can be used to evaluate the differences of sweet corn lines. Cluster analysis based on principal components on 20 agronomic traits classified 20 sweetcorn lines into 3 main groups. This study provided useful information on phenotypic diversity and valuable sweetcorn genetic resources for breeding programs on speciality corn in Vietnam.

Keywords: cluster analysis, correlation, phenotypic diversity, principal component analysis, sweet corn.

Classification number: 4.1

Nghiên cứu ngô thực phẩm, ngô ngọt chất lượng cao đã được Học viện Nông nghiệp Việt Nam đặc biệt quan tâm, chú trọng trong thập kỷ qua. Nguồn gen ngô ngọt đa dạng, được thu thập nhiều nơi với màu sắc khác nhau đã được phát triển [4, 14]. Nhằm bổ sung và làm phong phú thêm tập đoàn nguồn gen ngô ngọt tại Việt Nam, nghiên cứu này tìm hiểu đặc điểm nông học, hệ số tương quan của các tính trạng năng suất, chất lượng và đa dạng di truyền dựa trên kiểu hình của 20 dòng ngô ngọt tự phối có kiểu gen, màu sắc và nguồn gốc khác nhau. Kết quả nghiên cứu cung cấp thông tin quan trọng cho chiến lược lưu trữ, bảo tồn nguồn gen và cải tiến quần thể phục vụ chương trình chọn tạo ngô thực phẩm chất lượng cao tại Việt Nam.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Thí nghiệm gồm 20 dòng ngô ngọt tự phối đời S4 từ các giống nhập nội Thái Lan, Trung Quốc, Nhật Bản, Mỹ (ký hiệu từ NGO01 đến NGO20). Đối chứng là dòng thuần SW1 (ngọt, vàng), D181 (ngọt, trắng) và UV10 (ngọt, tím) được chọn tạo bởi Viện Nghiên cứu và Phát triển cây trồng (NC&PTCT), Học viện Nông nghiệp Việt Nam [4, 15]. Các dòng ngô ngọt đời S4 này thuộc 2 nhóm

Bảng 1. Thông tin các dòng ngô ngọt nghiên cứu.

Ký hiệu dòng	Giống gốc	Nguồn gốc	Phả hệ	Đời tự phối	Dạng hạt/màu sắc hạt
Dòng tự phối					
NGO01	Super Gold Thailand	Thái Lan	TL1-1.2.1.1	4	Ngọt, vàng
NGO02	Hi-brix 53	Thái Lan	TL2-5.2.1.2	4	Ngọt, vàng
NGO03	Hi-brix 58	Thái Lan	TL3-1.1.1.1	4	Ngọt, vàng
NGO04	Hi-brix 59	Thái Lan	TL4-1.3.2.2	4	Ngọt, vàng
NGO05	Hana 01836	Thái Lan	TL5-4.1.1.2	4	Ngọt, vàng
NGO06	SC2952	Thái Lan	TL6-5.2.2.1	4	Ngọt, vàng
NGO07	GoldenCob	Thái Lan	TL7-5.4.4.5	4	Ngọt, vàng
NGO08	Honey 10	Thái Lan	TL8-1.1.1.2	4	Ngọt, vàng
NGO09	SW1011	Thái Lan	TL9-1.4.2.1	4	Ngọt, vàng
NGO10	Siam Ruby Queen	Thái Lan	TL10-2.4.5.2	4	Ngọt, tím
NGO11	Hybrid Super Sweet Corn 1	Trung Quốc	TQ1-1.1.1.1	4	Ngọt, vàng
NGO12	Hybrid Super Sweet Corn 3	Trung Quốc	TQ2-2.2.2.2	4	Ngọt, vàng
NGO13	ZhongXianTian No.3	Trung Quốc	TQ3-5.2.1.2	4	Ngọt, vàng
NGO14	Great Jean	Trung Quốc	TQ4-3.2.2.1	4	Ngọt, vàng
NGO15	Super Gem	Trung Quốc	TQ5-3.4.1.1	4	Ngọt, vàng
NGO16	Snow Jean	Trung Quốc	TQ6-3.4.1.1	4	Ngọt, trắng
NGO17	Gold Rush (Yellow)	Nhật Bản	NB1-2.5.5.4	4	Ngọt, vàng
NGO18	Gold Rush (White)	Nhật Bản	NB2-1.2.2.1	4	Ngọt, trắng
NGO19	Silver Queen	Mỹ	M1-4.2.1.1	4	Ngọt, trắng
NGO20	Sweet Corn F1	Mỹ	M2-2.2.1.2	4	Ngọt, vàng
Dòng thuần đối chứng					
SW1	Viện NC&PTCT chọn tạo		Dòng thuần		Ngọt, vàng
D181	Viện NC&PTCT chọn tạo		Dòng thuần		Ngọt, trắng
UV10	Viện NC&PTCT chọn tạo		Dòng thuần		Ngọt, tím

chính gồm 16 dòng ngô ngọt nhiệt đới (NGO01-NGO16) và 4 dòng ôn đới (NGO17-NGO20). Dựa trên màu sắc hạt, 20 dòng ngô ngọt được chia thành 3 nhóm chính, gồm nhóm ngô ngọt, vàng (NGO01, NGO02, NGO03, NGO04, NGO05, NGO06, NGO07, NGO08, NGO09, NGO11, NGO12, NGO13, NGO14, NGO15, NGO17 và NGO20), ngọt, trắng (NGO16, NGO18, NGO19) và ngọt, tím (NGO10) (bảng 1). Cơ sở dữ liệu nguồn gen ngô ngọt đã cập nhật tại website: <https://csdlnuongen.vnua.edu.vn/?cat=23>.

Phương pháp nghiên cứu

Thí nghiệm đồng ruộng được bố trí theo kiểu khối đầy đủ hoàn toàn ngẫu nhiên, diện tích ô thí nghiệm 30 m², tiến hành trong vụ thu đông năm 2022 tại khu thí nghiệm đồng ruộng của Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Mật độ trồng 6,7 cây/m², tương ứng với khoảng cách hàng cách hàng 60 cm, cây cách cây 25 cm. Bón phân, chăm sóc thí nghiệm, phòng trừ sâu bệnh hại theo Tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 13381-2:2021. Tổng số 30 cá thể đại diện cho mỗi dòng được duy trì bằng phương pháp tự phối sử dụng bao cách ly để tránh lẫn tạp phấn. 20 chỉ tiêu nông học theo dõi trong nghiên cứu này được chia thành 4 nhóm, trong đó gồm 5 chỉ tiêu sinh trưởng (1-5), 7 chỉ tiêu đặc điểm hình thái (6-12), 7 chỉ tiêu năng suất (13-19) và 1 chỉ tiêu chất lượng (20) (bảng 2).

Bảng 2. Các tính trạng nông học theo dõi.

TT	Nhóm	Tên tính trạng	Ký hiệu	Đơn vị
1		Thời gian từ gieo đến tung phấn	TP	Ngày
2		Thời gian từ gieo đến phun râu	PR	Ngày
3	Sinh trưởng	Thời gian thu bắp tươi	TBT	Ngày
4		Thời gian sinh trưởng	TGST	Ngày
5		Chênh lệch tung phấn và phun râu	ASI	Ngày
6		Chiều cao cây	CCC	cm
7		Chiều cao đóng bắp	CDB	cm
8		Tỷ lệ chiều cao đóng bắp/chiều cao cây	CDB/CCC	cm
9	Hình thái	Đường kính gốc	DKG	cm
10		Chiều dài cờ	CDC	cm
11		Số nhánh cờ cấp 1	SNCCI	Nhánh/cờ
12		Góc lá	GOCLA	Độ
13		Chiều dài bắp	ChDB	cm
14		Khả năng kết hạt	KNKH	%
15		Đường kính bắp	DKB	cm
16	Năng suất	Số hàng hạt/bắp	HHB	Hàng hạt/bắp
17		Số hạt/hàng	HH	Hạt/hàng
18		Khối lượng 1000 hạt	KL1000	g
19		Năng suất cá thể	NSCT	g
20	Chất lượng	Hàm lượng chất rắn hòa tan	TSS	°Brix

Phương pháp phân tích số liệu

Số liệu được tổng hợp bằng phần mềm Microsoft Excel, phân tích bằng phương pháp phân tích phương sai trên phần mềm Statistix 10. Thống kê mô tả và phân tích tương quan sử dụng gói “metan”, phân tích thành phần chính và phân tích cụm

dựa trên thành phần chính (Hierarchical clustering on principal components) sử dụng gói “FactoMineR” và “factoextra” trên phần mềm R.4.1.3 [16].

Kết quả và bàn luận

Thống kê mô tả các tính trạng nông học của các dòng ngô ngọt tự phối

Bảng 3 trình bày kết quả phân tích phương sai và thống kê mô tả về 20 tính trạng số lượng của 20 dòng ngô ngọt tự phối. Phân tích phương sai cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p \leq 0,01$) ở tất cả các tính trạng nghiên cứu (bảng 3). Thời gian tung phấn dao động 39,0-61,0 ngày, trung bình là $53,6 \pm 5,8$ ngày, thời gian phun râu 38,0-65,0 ngày, trung bình là $55,7 \pm 6,2$ ngày. Theo nghiên cứu của và B. Liu và cs (2021) [17], P.C. Silva và cs (2022) [18], chênh lệch tung phấn và phun râu ảnh hưởng trực tiếp tới khả năng kết hạt và năng suất hạt, vì vậy nó được cho là một tính trạng quan trọng trong chọn giống ngô, đặc biệt trong việc phát triển các giống ngô chịu hạn [19]. Chênh lệch tung phấn và phun râu của các dòng ngô ngọt tự phối khoảng 1-4 ngày, trung bình là $2,1 \pm 1,0$ ngày; thời gian thu bắp tươi là 58,0-85,0 ngày, trung bình $75,4 \pm 6,6$ ngày; thời gian thu bắp tươi 58,0-85,0 ngày, trung bình $75,4 \pm 6,6$ ngày; thời gian sinh trưởng 65,0-92,0 ngày, trung bình đạt $82,4 \pm 6,6$ ngày, bắp khô có thể thu được sau khoảng 7 ngày

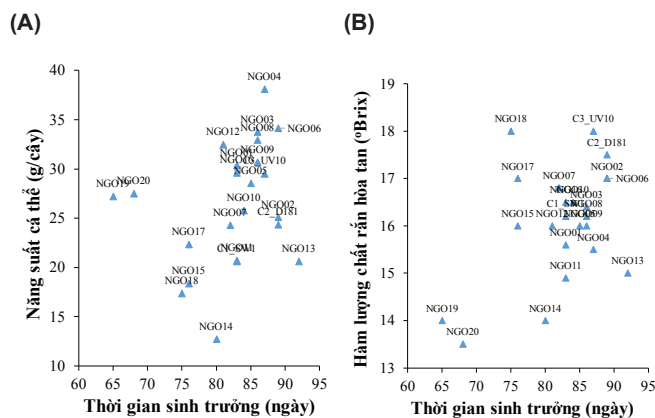
Bảng 3. Thống kê mô tả các tính trạng nông học của các dòng ngô ngọt tự phối.

Tính trạng	Giá trị lớn nhất	Giá trị trung bình	Giá trị nhỏ nhất	Hệ số biến động (%)	Độ lệch chuẩn	Sai số chuẩn	P
TP	61,0	53,6	39,0	10,8	5,8	1,2	**
PR	65,0	55,7	38,0	11,1	6,2	1,3	**
TBT	85,0	75,4	58,0	8,8	6,6	1,4	**
TGST	92,0	82,4	65,0	8,1	6,6	1,4	**
ASI	4,0	2,1	-1,0	47,6	1,0	0,2	**
CCC	195,5	162,4	118,7	13,3	21,7	4,5	**
CDB	82,0	61,3	24,0	28,1	17,2	3,6	**
CDB/CCC	44,5	37,1	20,2	19,5	7,2	1,5	**
DKG	3,4	3,0	2,5	8,5	0,3	0,1	**
CDC	45,0	36,4	29,0	11,1	4,1	0,8	**
SNCCI	18,0	10,0	4,0	33,1	3,3	0,7	**
GOCLA	85,0	56,7	38,5	23,6	13,4	2,8	**
ChDB	17,3	14,3	13,0	7,5	1,1	0,2	**
KNKH	100,0	97,8	85,4	4,4	4,3	0,9	**
DKB	4,2	3,8	3,6	5,0	0,2	0,0	**
HHB	16,0	12,2	10,0	17,1	2,1	0,4	**
HH	35,0	26,2	18,0	17,1	4,5	0,9	**
KL1000	226,9	139,5	101,0	17,7	24,7	5,1	**
NSCT	38,1	26,4	12,7	23,6	6,2	1,3	**
TSS	18,0	16,1	13,5	7,4	1,2	0,2	**

Ghi chú: *: biểu thị có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$; **: biểu thị có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,01$.

từ khi thu bắp tươi. Dòng NGO19 (65,0 ngày) có thời gian thu hoạch sớm nhất, chỉ 24 ngày sau tung phần (hình 1). Chiều cao cây dao động 118,7-195,5 cm, trung bình 162,4±21,7 cm. Chiều cao đồng bắp dao động 24,0-82,0 cm, trung bình 61,3±17,2 cm. Góc lá (GOCLA) là tính trạng hình thái quan trọng trong mô hình kiểu cây lý tưởng. Góc lá hẹp giúp cây tiếp nhận ánh sáng và quang hợp tốt hơn, qua đó có thể tăng mật độ trồng và năng suất trên một đơn vị diện tích. GOCLA của các dòng ngô ngọt dao động 38,5-85,0°. Năng suất cả thể của các dòng ngô ngọt tự phối dao động 12,7-38,1 g/cây, trung bình đạt 26,4±6,2 g/cây.

Hàm lượng chất rắn hòa tan của các dòng ngô ngọt tự phối dao động 13,5-18,0°Brix, trung bình 16,1±1,2°Brix. Các dòng NGO19, NGO20, NGO14 có hàm lượng chất rắn hòa tan thấp nhất, các dòng NGO17, NGO18 có hàm lượng chất rắn hòa tan cao nhất (hình 1). Các dòng ngô ngọt có thời gian sinh trưởng cực ngắn ngày (NGO19, NGO20) nhìn chung có năng suất cả thể ở mức trung bình 25-30 g và chất lượng thấp nhất (13,5-14,0°Brix) so với các vật liệu còn lại và ngắn hơn hẳn so với 3 dòng đối chứng khoảng 20 ngày.

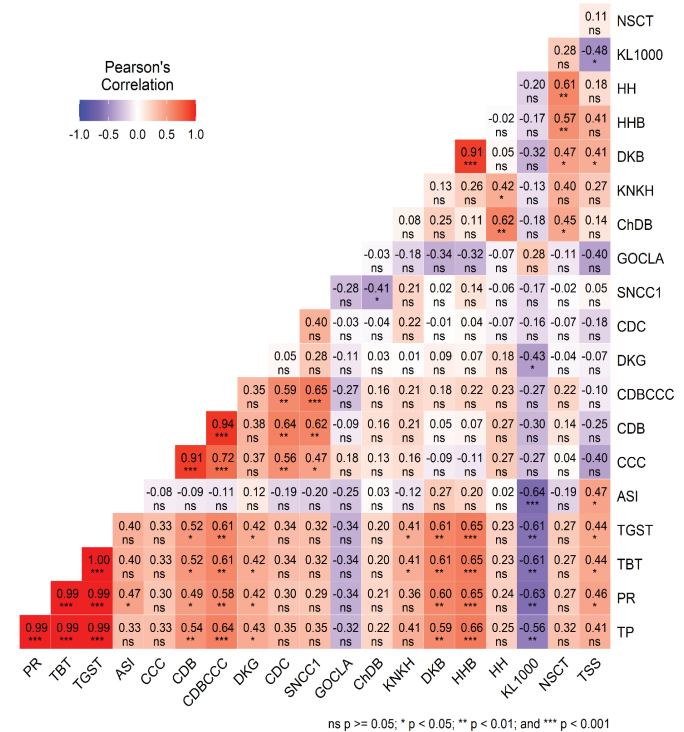


Hình 1. Biểu đồ biểu thị thời gian sinh trưởng với năng suất cả thể (A) và hàm lượng chất rắn hòa tan (B) của các dòng ngô ngọt tự phối.

Tương quan giữa các tính trạng nông học của các dòng ngô ngọt

Hệ số tương quan hỗ trợ xác định mức độ mối quan hệ giữa hai tính trạng riêng biệt cũng như mức độ mà các tính trạng này biến đổi lẫn nhau, từ đó có định hướng chọn lọc phù hợp để có kiểu hình cây lý tưởng nhất [20]. Kết quả phân tích tương quan cho thấy, năng suất cả thể có tương quan thuận ở mức $p < 0,01$ với số hạt/hàng (0,61**), số hạt hàng hạt/bắp (0,57**); tương quan thuận ở mức $p < 0,05$ với đường kính bắp (0,47*) và chiều dài bắp (0,45*) (hình 2). Kết quả tương quan phù hợp với công bố trước đó [4]. Nghiên cứu của E. Ilker (2011) [20] cho thấy, số hàng trên bắp và chiều dài bắp có thể được sử dụng để chọn lọc cải tiến năng suất trong các chương trình chọn giống ngô ngọt. Trong nghiên cứu này, hệ số tương quan thuận nhưng không chặt giữa năng suất và các yếu tố cấu thành năng suất cho thấy, trong chọn lọc dòng ngô ngọt, ngoài áp dụng các phương pháp chọn lọc đa biến, phương pháp chọn lọc độc lập cũng có thể áp dụng. Hệ số tương quan nhìn

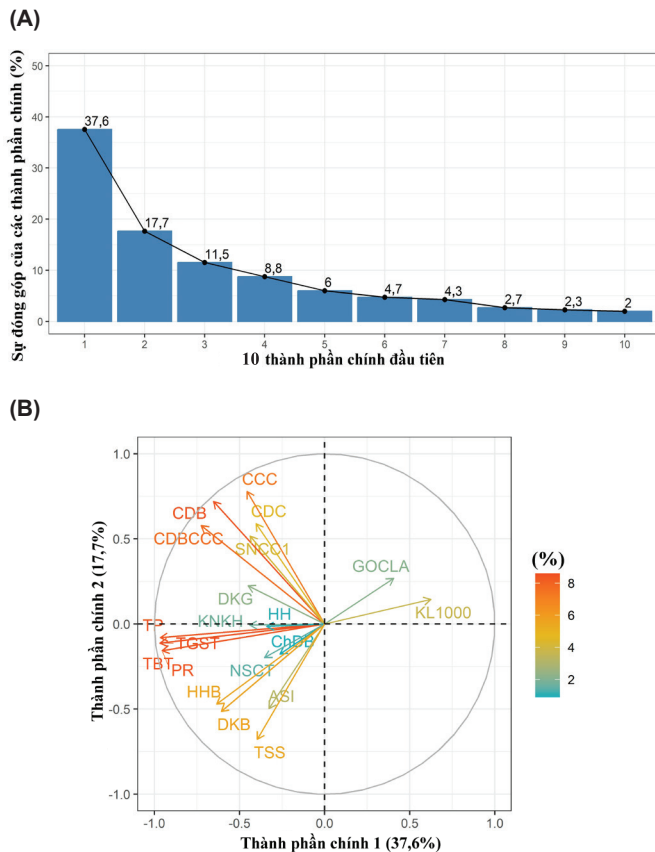
chung chưa chặt giữa năng suất cả thể với chiều dài bắp và đường kính bắp ở thể hệ tự phối S4 này có thể do sự chọn lọc chủ quan dựa trên một hoặc một vài tính trạng mục tiêu đơn lẻ và từ con mắt của nhà chọn giống. Kết quả tương quan này có thể gợi ý cách thức phát triển dòng ngô ngọt mới, khác hẳn so với cách phát triển dòng ngô nếp và ngô tẻ. Tuy nhiên cần có sự kiểm chứng về ưu thế lai, khả năng kết hợp chung và kết hợp riêng ở các nghiên cứu tiếp theo để chứng minh.



Hình 2. Biểu đồ nhiệt biểu thị tương quan giữa các tính trạng nông học theo dõi. ns: biểu thị không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê; *: biểu thị có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$; **: biểu thị có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,01$; ***: biểu thị có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,001$.

Phân tích thành phần chính các tính trạng nông học của các dòng ngô ngọt

Đánh giá kiểu hình là một phương pháp quan trọng để chọn lọc các dòng ngô ngọt tự phối. Theo dõi tất cả các tính trạng kiểu hình trên một quần thể cây trồng lớn là một thách thức đối với các nhà chọn giống. Phân tích thành phần chính là một phương pháp học máy không giám sát, phân tích đa biến hiệu quả để trích xuất thông tin quan trọng từ dữ liệu kiểu hình có tương quan cao trong khi vẫn giữ lại thông tin ban đầu, giúp có được thông tin quan trọng từ tập dữ liệu, từ đó rút ra kết quả quan trọng trong công tác nghiên cứu nông nghiệp [21, 22]. Trong nghiên cứu này, phân tích thành phần chính được áp dụng để giảm chiều các tính trạng nông học thành các thành phần chính (PC). Các tính trạng góp phần lớn trong các thành phần chính của trục thành phần chính 1 và thành phần chính 2 được coi là các tính trạng hữu ích để phân nhóm 20 dòng ngô ngọt tự phối.



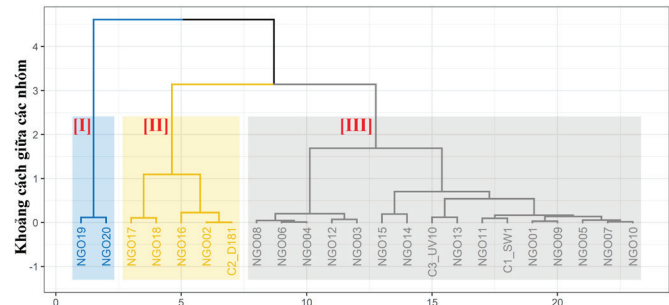
Hình 3. Biểu đồ cột biểu thị đóng góp của 10 thành phần chính đầu tiên tới tổng phương sai kiểu hình (A) và biểu đồ biplot minh họa 2 thành phần chính đầu tiên (B). Các biến có tương quan dương trở về cùng một phía của biểu đồ. Các biến tương quan âm trở đến các cạnh đối diện của đồ thị.

Kết quả phân tích cho thấy, 20 tính trạng được giảm chiều thành 3 thành phần chính PC1 (37,6%), PC2 (17,7%) và PC3 (11,5%) đóng góp 66,8% biến đổi kiểu hình (hình 3A). Trong đó, các tính trạng thời gian sinh trưởng, chiều cao cây, chiều cao đóng bắp, góc lá, số hàng hạt/bắp, số hạt/hàng, khối lượng 1000 hạt, năng suất cá thể và hàm lượng chất rắn hòa tan có thể sử dụng để đánh giá sự khác biệt của các dòng ngô ngọt (hình 3B). Trên thế giới, W.R. Ko và cs (2015) [23] áp dụng phương pháp phân tích thành phần chính cũng chỉ ra các tính trạng tung phần, phun râu, chiều cao cây, chiều cao đóng bắp đóng góp nhiều vào thành phần chính của trục 1 và 2 là những tính trạng hữu ích để xác định 100 dòng ngô siêu ngọt tại Hàn Quốc. Chưa có các nghiên cứu tương tự trên đối tượng cây ngô ở trong nước. Do vậy, đây là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam áp dụng phương pháp phân tích thành phần chính tìm hiểu các thông tin nông học quan trọng trên các dòng ngô ngọt ôn đới và nhiệt đới tự phối S4 mới phát triển.

Phân tích cụm phân nhóm đa dạng di truyền của các dòng ngô ngọt

Hai chiến lược phân cụm phổ biến nhất là phân cụm theo thứ bậc được sử dụng để xác định các nhóm quan sát tương tự trong tập dữ liệu và phân cụm theo vùng (chẳng hạn như thuật toán

k-mean) được sử dụng để chia tập dữ liệu thành nhiều nhóm. Phân cụm theo cấp bậc dựa trên các thành phần chính cho phép kết hợp 3 phương pháp tiêu chuẩn được sử dụng trong phân tích dữ liệu đa biến gồm phương pháp thành phần chính, phân cụm theo thứ bậc và phân cụm theo vùng - đặc biệt là phương pháp k-mean cho phép xác định số cụm tối ưu trên mỗi tập dữ liệu [24].



Hình 4. Phân tích cụm dựa trên thành phần chính của 20 tính trạng nông học trên các dòng ngô ngọt tự phối.

Kết quả phân tích cụm dựa trên thành phần chính của 20 tính trạng nông học trên 20 dòng ngô ngọt tự phối được chia thành 3 nhóm chính (hình 4). Kết quả phân cụm dựa trên thành phần chính đã phân nhóm các dòng ngô ngọt tự phối S4 thành 3 nhóm chính không chỉ theo nguồn gốc địa lý mà còn do quá trình chọn lọc bởi nhà chọn giống. Nhóm I gồm dòng NGO19 và NGO20. Nhóm này có thời gian sinh trưởng cực ngắn và chỉ số độ ngọt trong nhóm thấp nhất. Nhóm II gồm NGO17, NGO18, NGO16, NGO02 và dòng ngô ngọt, trắng đối chứng D181. Đặc điểm của nhóm này phần lớn là dòng ngô ngọt, trắng trừ dòng NGO02, NGO17 và có chất lượng cao thể hiện ở chỉ số độ ngọt >16. Nhóm III là các dòng còn lại, trong đó dòng NGO13 có khoảng cách di truyền rất gần với đối chứng là dòng thuần ngô ngọt, tím UV10, dòng NGO11, NGO01, NGO09, NGO05, NGO07 và NGO10 có khoảng cách rất gần với đối chứng còn lại là dòng ngô, vàng SW1. Trong nhóm III, một nhóm nhỏ gồm 5 dòng nhiệt đới NGO08, NGO06, NGO04, NGO12, NGO03 có chất lượng và thời gian sinh trưởng trung bình so với các dòng còn lại trong nhóm. Đây là những thông tin hữu ích phục vụ công tác lai tạo và dự đoán ưu thế lai giữa các nguồn vật liệu tạo giống. Các nhóm có khoảng cách di truyền xa nhau sẽ có tiềm năng ưu thế lai lớn. Ví dụ, 2 dòng nhiệt đới NGO02 và NGO16 ở nhóm II nếu dùng để lai với các dòng ngô nhiệt đới còn lại ở nhóm III sẽ có tiềm năng tạo giống ngô ngọt ưu thế lai lớn. Lai cải tiến quần thể giữa các dòng ngô ôn đới ở nhóm I với các dòng nhiệt đới ở nhóm III hoặc nhóm II với nhóm III sẽ mở rộng nền di truyền của quần thể ngô ngọt, tiềm năng tạo ra nhiều biến dị mới.

Kết luận

Đánh giá đặc điểm nông học cho thấy, các dòng ngô ngọt ôn đới và nhiệt đới tự phối S4 thích ứng tốt với điều kiện khí hậu miền Bắc Việt Nam với thời gian sinh trưởng dao động 65,0-92,0 ngày, năng suất cá thể dao động 12,7-38,1 g/cây và tổng lượng chất rắn hòa tan dao động 13,5-18,0°Brix.

Phương pháp phân tích tương quan, phân tích thành phần chính và phân tích cụm có hiệu quả trong việc xác định mối liên hệ giữa các tính trạng, giảm chiều dữ liệu để xác định các tính trạng có ý nghĩa trong việc phân loại, chọn lọc và phân nhóm hiệu quả các dòng ngô ngọt mới. Hệ số tương quan thuận nhưng không chặt giữa năng suất và các yếu tố cấu thành năng suất cho thấy để đạt mục tiêu chọn lọc dòng ưu tú, ngoài áp dụng các phương pháp chọn lọc đa biến, phương pháp chọn lọc độc lập cũng có thể áp dụng. Kết quả phân cụm dựa trên thành phần chính đã phân nhóm các dòng ngô ngọt tự phối S4 thành 3 nhóm chính không chỉ theo nguồn gốc địa lý mà còn do quá trình chọn lọc bởi nhà chọn giống.

Nghiên cứu này cung cấp thông tin hữu ích về đa dạng di truyền dựa trên kiểu hình của các dòng ngô ôn đới, nhiệt đới tự phối S4, tạo dựng nguồn vật liệu quan trọng và là nguồn gen quý cho các chương trình chọn tạo, cải tiến giống ngô thực phẩm chất lượng cao tại Việt Nam.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này thuộc nhiệm vụ “Lưu giữ và bảo quản nguồn gen nông nghiệp nhập nội phục vụ công tác nghiên cứu và đào tạo” năm 2022 do Học viện Nông nghiệp Việt Nam chủ trì. Nhóm tác giả trân trọng cảm ơn Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đã hỗ trợ kinh phí thực hiện nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] P. Revilla, C.M. Anibas, W.F. Tracy (2021), “Sweet corn research around the world 2015-2020”, *Agronomy*, **11**(3), DOI: 10.3390/agronomy11030534.
- [2] V. Ruanjaichon, K. Khammona, B. Thunnon, et al. (2021), “Identification of gene associated with sweetness in corn (*Zea mays* L.) by genome-wide association study (GWAS) and development of a functional SNP marker for predicting sweet corn”, *Plants*, **10**(6), DOI: 10.3390/plants10061239.
- [3] Nguyễn Thị Nhài, Đặng Ngọc Hạ, Nguyễn Văn Diện và cs (2020), “Kết quả nghiên cứu chọn tạo và khảo nghiệm giống ngô đường lai ĐL89”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, **4**(113), tr.10-15.
- [4] Nguyễn Trung Đức, Phạm Quang Tuấn, Nguyễn Thị Nguyệt Anh, Vũ Văn Liết (2020), “Nghiên cứu tuyển chọn một số dòng ngô ngọt phục vụ chọn tạo giống ngô trái cây dựa trên kiểu hình và chỉ thị phân tử”, *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, **18**(12), tr.1102-1113.
- [5] W.F. Tracy, S.L. Shuler, H.D. Swenson (2019), “The use of endosperm genes for sweet corn improvement”, *Plant Breeding Reviews*, **43**, pp.215-241.
- [6] J.L. Brewbaker, I. Martin (2015), “Breeding tropical vegetable corns”, *Plant Breeding Reviews*, **39**, pp.125-198.
- [7] P. Langridge, R. Waugh (2019), “Harnessing the potential of germplasm collections”, *Nature Genetics*, **51**(2), pp.200-201.
- [8] J. Zystro, T.E. Peters, K.M. Miller, W.F. Tracy (2021), “Inbred and hybrid sweet corn genotype performance in diverse organic environments”, *Crop Science*, **61**(4), pp.2280-2293.
- [9] A. Shelton, W. Tracy (2013), “Genetic variation and phenotypic response of 15 sweet corn (*Zea mays* L.) hybrids to population density”, *Sustainability*, **5**(6), pp.2442-2456.

- [10] M. Baseggio, M., Murray, M.M. Lundback, et al. (2019), “Genome-wide association and genomic prediction models of tocopherols in fresh sweet corn kernels”, *Plant Genome*, **12**(1), DOI: 10.3835/plantgenome2018.06.0038.
- [11] Y. Hu, V. Colantonio, B.S. Müller, et al. (2021), “Genome assembly and population genomic analysis provide insights into the evolution of modern sweet corn”, *Nature Communications*, **12**(1), pp.1-13.
- [12] B. Mehta, F. Hossain, V. Muthusamy, et al. (2017), “Microsatellite-based genetic diversity analyses of sugary1-, shrunken2- and double mutant-sweet corn inbreds for their utilization in breeding programme”, *Physiol Mol Biol Plants*, **23**(2), pp.411-420.
- [13] A. Mahato, J.P. Shahi, P.K. Singh, M. Kumar (2018), “Genetic diversity of sweet corn inbreds using agro-morphological traits and microsatellite markers”, *3 Biotech.*, **8**(8), DOI: 10.1007/s13205-018-1353-5.
- [14] Trần Thị Thanh Hà, Vũ Văn Liết, Vũ Thị Bích Hạnh, Nguyễn Văn Hà, Dương Thị Loan, Hoàng Thị Thùy (2020), “Chọn lọc và đánh giá khả năng kết hợp của một số dòng ngô ngọt”, *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, **18**(12), tr.1067-1076.
- [15] Phạm Quang Tuấn, Nguyễn Trung Đức, Nguyễn Thị Nguyệt Anh, Vũ Thị Xuân Bình, Vũ Văn Liết (2022), “Phát triển và chọn lọc các dòng ngô trái cây giàu anthocyanin”, *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, **20**(7), tr.853-862.
- [16] R. Development Core Team (2022), R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, <https://cran.r-project.org/bin/windows/base>, accessed March 10, 2022.
- [17] B. Liu, B. Zhang, Z. Yang, et al. (2021), “Manipulating ZmEXPA4 expression ameliorates the drought-induced prolonged anthesis and silking interval in maize”, *The Plant Cell*, **33**(6), pp.2058-2071.
- [18] P.C. Silva, A.C. Sánchez, M.A. Opazo, et al. (2022), “Grain yield, anthesis-silking interval, and phenotypic plasticity in response to changing environments: Evaluation in temperate maize hybrids”, *Field Crops Research*, **285**, DOI: 10.1016/j.fcr.2022.108583.
- [19] G.O. Edmeades, J. Bolanos, A. Elings, et al. (2000), “The role and regulation of the anthesis-silking interval in maize”, *Physiology and Modeling Kernel Set in Maize*, **29**, pp.43-73.
- [20] E. Ilker (2011), “Correlation and path coefficient analyses in sweet corn”, *Turkish Journal of Field Crops*, **16**(2), pp.105-107.
- [21] M. Greenacre, P.J.F. Groenen, T. Hastie, et al. (2022), “Principal component analysis”, *Nature Reviews Methods Primers*, **2**(1), DOI: 10.1038/s43586-022-00184-w.
- [22] Nguyễn Hữu Du (2014), “Phương pháp phân tích thành phần chính và phân tích cụm trong xử lý số liệu thống kê nhiều chiều”, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, **12**(5), pp.762-768.
- [23] W.R. Ko, H.J. Choi, K.J. Sa, et al. (2015), “Analysis of morphological characteristics among super sweet corn inbred lines”, *Korean Journal of Crop Science*, **60**(2), pp.190-196.
- [24] F. Husson, J. Josse, J. Pages (2010), “Principal component methods-hierarchical clustering-partitional clustering: Why would we need to choose for visualizing data?”, *Applied Mathematics Department*, 17pp, http://factominer.free.fr/more/HCPC_husson_josse.pdf, accessed November 25, 2022.

Ảnh hưởng của cao chiết vỏ quế (*Cinnamomum verum*) lên tăng trưởng và khả năng bảo vệ cá rô phi (*Oreochromis* spp.) kháng lại vi khuẩn *Streptococcus agalactiae*

Nguyễn Thị Trúc Quyên^{1,2*}, Đoàn Văn Cường³, Mã Tú Lan³, Nguyễn Thành Nhân³,
Tư Thanh Dung⁴, Nguyễn Thị Ngọc Tĩnh³

¹Khoa Khoa học Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh

²Sở Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn tỉnh Đồng Nai

³Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II

⁴Trường Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

Ngày nhận bài 10/11/2022; ngày chuyển phản biện 14/11/2022; ngày nhận phản biện 6/12/2022; ngày chấp nhận đăng 9/12/2022

Tóm tắt:

Nghiên cứu nhằm đánh giá ảnh hưởng của cao chiết vỏ quế bổ sung vào thức ăn lên các chỉ số tăng trưởng và khả năng bảo vệ cá rô phi kháng lại vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* được phân lập từ cá rô phi (*Oreochromis* spp.) nhiễm bệnh thu tại huyện Củ Chi, TP Hồ Chí Minh. Cao chiết vỏ quế được bổ sung vào thức ăn với các tỷ lệ 10, 20 và 40 g/kg thức ăn. Cá thí nghiệm được gây cảm nhiễm bằng phương pháp tiêm xoang bụng với 0,1 ml vi khuẩn *S. agalactiae* có nồng độ $1,8 \times 10^4$ CFU/ml, nghiệm thức đối chứng âm tiêm 0,1 ml nước muối sinh lý. Kết quả cho thấy, việc bổ sung cao chiết vỏ quế với 3 hàm lượng như trên vào thức ăn đảm bảo an toàn cho sự sống và sinh trưởng của cá rô phi giống; thêm vào đó, bổ sung cao chiết vỏ quế với hàm lượng 20 g/kg thức ăn cho hiệu quả bảo vệ cao nhất (RPS=51,4%). Cao chiết vỏ quế là loại cao chiết thảo dược tiềm năng có thể sử dụng trong phòng bệnh do *S. agalactiae* gây ra trên cá rô phi.

Từ khóa: cao chiết vỏ quế, cá rô phi, *Streptococcus agalactiae*, tăng trưởng.

Chỉ số phân loại: 4.5

Đặt vấn đề

Cá rô phi là loài cá được nuôi phổ biến thứ hai trên thế giới, chỉ sau những loài cá chép [1]. Cá rô phi đã được đưa vào nuôi thương mại ở hơn 100 quốc gia và trở thành loài mang lại giá trị kinh tế cao trong nuôi trồng thủy sản [2]. *S. agalactiae* là nguyên nhân gây bệnh xuất huyết trên cá rô phi, gây ảnh hưởng đến việc nuôi cá rô phi trên thế giới [3]. Nghiên cứu của N.N. Phuoc và cs (2021) [4] cho thấy, chủng vi khuẩn được phân lập từ các mẫu cá rô phi đỏ có dấu hiệu xuất huyết và phù mắt tại Việt Nam là *S. agalactiae* kiểu huyết thanh III (tỉnh An Giang và Đồng Tháp) và Ia (tỉnh Thừa Thiên Huế). Thời gian gần đây, việc sử dụng thảo dược trong phòng trị bệnh nhiễm khuẩn đang ngày càng trở nên phổ biến, do có nhiều ưu điểm như: dễ tìm kiếm, giá thành thấp, hoạt tính kháng khuẩn cao, có khả năng kích thích hệ miễn dịch tự nhiên của vật chủ, thân thiện với môi trường và không gây nên hiện tượng đề kháng thuốc [5]. Bên cạnh đó, các chất kích thích miễn dịch thường được bổ sung vào thức ăn thủy sản bằng phương pháp cho ăn do có nhiều ưu điểm như: có tính kinh tế cao (tỷ lệ hao hụt ít), không gây stress cho thủy sản nuôi, sử dụng được trên bất kỳ giai đoạn nuôi nào của thủy sản... Tuy nhiên, việc bổ sung vào thức ăn các chất kích thích miễn dịch hoặc các thành phần đã được chứng minh có vai trò giúp kháng bệnh tốt nhất vào thức ăn không phải lúc nào cũng giúp đối tượng nuôi nâng cao hệ miễn dịch hoặc đạt được sự tăng trưởng tốt nhất [6, 7]. Trong nghiên cứu Nguyễn Thị Trúc Quyên và cs (2019) [8], cao chiết vỏ quế chiết xuất với dung môi ethanol 96% đã được đánh giá có khả năng đối kháng vi

khẩn gây bệnh xuất huyết, lồi mắt trên cá rô phi trong nuôi trồng thủy sản. Kết quả cho thấy, cao chiết vỏ quế đối kháng mạnh với vi khuẩn *S. agalactiae* (đường kính vòng vô khuẩn ≥ 15 mm). Trong nghiên cứu này, khảo sát ảnh hưởng của việc bổ sung cao chiết vỏ quế vào thức ăn lên tăng trưởng và khả năng bảo vệ cá rô phi (*Oreochromis* spp.) kháng lại vi khuẩn *S. agalactiae* gây bệnh xuất huyết và lồi mắt được tiến hành.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng

Vỏ quế (phần thân) dùng trong nghiên cứu có nguồn gốc từ Viện Y Dược học Dân tộc TP Hồ Chí Minh. Chủng vi khuẩn *S. agalactiae* được phân lập từ cá rô phi (*Oreochromis* spp.) có dấu hiệu bệnh lý lồi mắt, xuất huyết hậu môn, gan nhạt màu thu tại Trung tâm Giống thủy sản và Cây trồng (huyện Củ Chi, TP Hồ Chí Minh) vào tháng 4/2019 (ký hiệu chủng: SA-2.1-CC).

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp chuẩn bị thức ăn thí nghiệm: Cao chiết vỏ quế được chiết xuất bằng 2 phương pháp: cao chiết vỏ quế sử dụng cho thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của việc bổ sung cao chiết vào thức ăn lên tăng trưởng của cá rô phi được chiết xuất bằng phương pháp tách chiết với dung môi ethanol 96% ở nhiệt độ cao theo mô tả của Nguyễn Thị Trúc Quyên và cs (2019) [8]; cao chiết vỏ quế dùng cho thí nghiệm khảo sát khả năng bảo vệ cá rô phi kháng lại vi khuẩn *S. agalactiae* được chiết xuất bằng phương pháp ngâm

*Tác giả liên hệ: Email: nguyentructruyen306@gmail.com

Effect of cinnamon (*Cinnamomum verum*) extracts on the growth and protection ability of tilapia (*Oreochromis* spp.) against *Streptococcus agalactiae*

Thi Truc Quyen Nguyen^{1,2*}, Van Cuong Doan³,
Tu Lan Ma³, Thanh Nhan Nguyen³, Thanh Dung Tu⁴,
Thi Ngoc Tinh Nguyen³

¹Faculty of Biological Sciences, Nong Lam University, Ho Chi Minh City

²Dong Nai Department of Agriculture and Rural Development

³Research Institute for Aquaculture No.2

⁴College of Aquaculture and Fisheries, Can Tho University

Received 10 November 2022; accepted 9 December 2022

Abstract:

This study was conducted to investigate the effect of cinnamon (*Cinnamomum verum*) extract mixed to feed on growth parameters and the ability to protect tilapia against *Streptococcus agalactiae* isolated from infected tilapia (*Oreochromis* spp.) in Cu Chi district, Ho Chi Minh city. Cinnamon extract was mixed to feed with doses of 10, 20, and 40 g/kg feed. Fish were intraperitoneally injected with 0.1 ml of 1.8×10^4 CFU/ml of *S. agalactiae*. The negative control was injected with 0.1 ml of physiological saline. The results showed that the cinnamon extract (*C. verum*) mixed at the three above levels was shown to be safe for the growth and survival rate of tilapia. Moreover, cinnamon extracts well mixed at 20 g/kg feed proved the highest protection (with the relative percent survival (RPS) value being 51.4%). The cinnamon extract can be considered a potential herbal extract for the prevention of disease caused by *S. agalactiae* in tilapia.

Keywords: *Cinnamomum verum* extract, growth, *Oreochromis* spp., *Streptococcus agalactiae*.

Classification number: 4.5

kiệt theo mô tả của Đoàn Văn Cường và cs (2019) [9] (do cao chiết vỏ quế chiết xuất bằng phương pháp ngâm kiệt đã được sử dụng trong thí nghiệm *in vitro* trên cùng chủng vi khuẩn SA-2.1-CC). Cao chiết sau khi chuẩn bị được trộn vào thức ăn viên cho cá rô phi (thức ăn Cargill-7414 với thành phần dinh dưỡng cụ thể ở bảng 1) theo các tỷ lệ 10, 20 và 40 g/kg thức ăn. Sau đó, thức ăn đã được tẩm cao chiết được trộn trong 15 phút bằng máy trộn, rồi tiếp tục được sấy ở 40°C trong 4-5 giờ để còn bay hơi hết, bảo quản trong túi nylon kín ở nhiệt độ phòng và sử dụng trong 7 ngày.

Bảng 1. Thành phần dinh dưỡng của thức ăn dùng trong thí nghiệm (Cargill-7414) theo công bố trên bao bì sản phẩm.

STT	Thành phần	Hàm lượng (%)	STT	Thành phần	Hàm lượng (%)
1	Đạm tối thiểu	40	4	Canxi tối đa	0,5
2	Béo tối thiểu	5	5	Xơ tối đa	5
3	Muối tối đa	2,5	6	Độ ẩm tối đa	11

Phương pháp chuẩn bị cá thí nghiệm: Cá rô phi giống khoảng 3-5 g/con, có nguồn gốc từ Trung tâm Giống thủy sản và Cây trồng. Cá được vận chuyển về cơ sở thực nghiệm thuộc Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II (quận Gò Vấp, TP Hồ Chí Minh), cách ly và nuôi dưỡng 5 ngày trước khi tiến hành bố trí thí nghiệm trong bể composite thể tích 500 l có sục khí liên tục. Trước khi bắt đầu thí nghiệm, cá được kiểm tra sự hiện diện của *S. agalactiae* để đảm bảo hoàn toàn không mang mầm bệnh, bằng cách cấy trực tiếp mô lấy từ thận và não của 5 con cá ngẫu nhiên trên môi trường Bood Agar (BA, Merck) để kiểm tra sự phát triển của vi khuẩn.

Phương pháp xác định ảnh hưởng của việc bổ sung cao chiết vỏ quế vào thức ăn lên tăng trưởng của cá rô phi: Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên trên cá rô phi giống khoảng 5 g/con, kéo dài trong 8 tuần, được thực hiện trong các bể composite (hình 1) thể tích 500 l chứa 300 l nước, 30 con/bể, cho ăn 2 lần/ngày với 4% khối lượng thân/ngày [10] vào lúc 8 và 17 giờ. Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần, tổng cộng 12 bể, bao gồm các nghiệm thức thể hiện ở bảng 2.



Hình 1. Hệ thống bể thí nghiệm xác định ảnh hưởng của việc bổ sung cao chiết vỏ quế vào thức ăn lên tăng trưởng của cá rô phi.

Bảng 2. Các nghiệm thức của thí nghiệm xác định ảnh hưởng của việc bổ sung cao chiết vỏ quế vào thức ăn lên tăng trưởng của cá rô phi.

Nghiệm thức	Ký hiệu	Thức ăn
Đối chứng	ĐC	Không bổ sung thảo dược
	Q10	Bổ sung cao chiết vỏ quế với tỷ lệ 10 g/kg thức ăn
Bổ sung thảo dược	Q20	Bổ sung cao chiết vỏ quế với tỷ lệ 20 g/kg thức ăn
	Q40	Bổ sung cao chiết vỏ quế với tỷ lệ 40 g/kg thức ăn

Không thay nước trong quá trình thí nghiệm và tiến hành siphon 1 lần/ngày vào buổi chiều sau khi cho cá ăn khoảng 1 giờ. Sau khoảng 15 phút cho ăn tiến hành thu thức ăn thừa, quy đổi ra trọng lượng khô để tính toán lượng thức ăn thực tế. Các chỉ tiêu về chất lượng nước trong hệ thống gồm pH, nhiệt độ được theo dõi 1 lần/ngày vào buổi sáng bằng máy đo pH và nhiệt độ cầm tay P-3; chỉ tiêu DO, NH₃ và NO₂ được đo 2 lần/tuần bằng test kit.

Sau khi kết thúc 8 tuần thí nghiệm, thu toàn bộ cá trong các bể để đánh giá các chỉ tiêu tăng trưởng, tỷ lệ sống, FCR ở các nghiệm thức có bổ sung thảo dược vào thức ăn và so sánh với nghiệm thức đối chứng.

- Tỷ lệ sống của cá sau thí nghiệm (X, %) được tính như sau:

$$X = N_t/N_0 \times 100$$

- Tăng trọng khối lượng (WG, g) được tính như sau:

$$WG = W_2 - W_1$$

- Tăng trọng khối lượng theo ngày (DWG, g/ngày) được tính như sau:

$$DWG = (W_2 - W_1)/T$$

- Tốc độ tăng trưởng đặc hiệu theo khối lượng (SGR, %/ngày) được tính như sau:

$$SGR = [\ln(W_2) - \ln(W_1)]/T \times 100$$

- Hệ số chuyển đổi thức ăn (FCR) được tính như sau:

$$FCR = \text{Tổng lượng thức ăn tiêu thụ} / (W_2 - W_1)$$

trong đó: N_t: số lượng cá cuối thí nghiệm; N₀: số lượng cá ban đầu thí nghiệm; W₁: trọng lượng cá (g/con) khi bắt đầu thí nghiệm; W₂: trọng lượng cá (g/con) khi kết thúc thí nghiệm; T: thời gian thí nghiệm.

Phương pháp xác định ảnh hưởng của việc bổ sung cao chiết vỏ quế lên khả năng bảo vệ cá rô phi kháng lại vi khuẩn S. agalactiae:

Thí nghiệm 1: Để xác định liều vi khuẩn *S. agalactiae* gây chết cá (LD₅₀), tiến hành bố trí thí nghiệm với 5 nồng độ gây nhiễm khác nhau bằng phương pháp tiêm vi khuẩn vào xoang bụng cá. Thí nghiệm được thực hiện trong các bể nhựa thể tích nước 40 l, trên cá rô phi giống (4-5 g/con), mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Cá thí nghiệm được tiêm 0,1 ml của dịch vi khuẩn với các mật độ: 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶ và 10⁷ CFU/ml, sục khí và cho ăn trong quá trình thí nghiệm. Ở nghiệm thức đối chứng tiêm 0,1 ml nước muối sinh lý 9‰. Cá được ghi nhận tỷ lệ chết trong 8 ngày sau khi gây nhiễm

(trừ những con chết trong vòng 5 giờ sau khi tiêm). Trong suốt thời gian thí nghiệm, nhiệt độ đo được phù hợp với sự phát triển của vi khuẩn là 28°C. Không thay nước trong quá trình gây nhiễm và tiến hành siphon 1 lần/ngày.

Liều gây chết LD₅₀ được xác định theo công thức của L.J Reed và H. Muench (1938) [11] như sau:

$$LD_{50} = 10^{a-x}$$

trong đó: a là số lũy thừa mà tại đó vi khuẩn gây chết cá thấp nhất (nhưng phải trên 50%); x = (P_a - 50)/(P_a - P_u), với P_a là tỷ lệ chết cận trên 50% và P_u là tỷ lệ chết cận dưới 50%.

Thí nghiệm 2: Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên trên cá rô phi giống khoảng 3 g/con trong các bể nhựa thể tích 90 l (hình 2), mật độ 40 con/bể, cho ăn 4% khối lượng thân/ngày [10]. Các nghiệm thức được bố trí tương tự nghiệm thức tại mục Phương pháp xác định ảnh hưởng của việc bổ sung cao chiết vỏ quế vào thức ăn lên tăng trưởng của cá rô phi. Mỗi nghiệm thức lặp lại 6 lần, tổng cộng 24 bể. Các chỉ tiêu về chất lượng nước trong hệ thống được theo dõi tương tự thí nghiệm xác định ảnh hưởng của việc bổ sung cao chiết vỏ quế vào thức ăn lên tăng trưởng của cá rô phi. Cá thí nghiệm được nuôi trong 28 ngày, sau đó thu toàn bộ cá trong các bể để đánh giá các chỉ tiêu tăng trưởng, tỷ lệ sống, FCR, so sánh giữa nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức thí nghiệm.



Hình 2. Hệ thống bể thí nghiệm xác định ảnh hưởng của việc bổ sung cao chiết vỏ quế lên khả năng bảo vệ cá rô phi kháng lại vi khuẩn *S. agalactiae*.

Sau 28 ngày nuôi, mỗi nghiệm thức ở thí nghiệm 2 được phân thành 2 nhóm, gồm 3 nghiệm thức/nhóm, tổng cộng 12 bể/nhóm. Sau đó, tiến hành gây cảm nhiễm 30 con/nghiệm thức/nhóm với vi khuẩn *S. agalactiae* bằng phương pháp tiêm xoang bụng với 0,1 ml vi khuẩn *S. agalactiae* chủng SA-2.1-CC theo kết quả xác định LD₅₀. Cá sau khi cảm nhiễm vi khuẩn được cho ăn 4% khối lượng thân/ngày bằng thức ăn có hoặc không bổ sung cao chiết vỏ quế. Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần, gồm nghiệm thức đối chứng (đối chứng âm: cá được tiêm nước muối sinh lý không cho ăn thức ăn bổ sung thảo dược; đối chứng dương: cá được tiêm vi khuẩn và không cho ăn thức ăn bổ sung thảo dược), nhóm nghiệm thức 1 (sau khi gây nhiễm, cá được cho ăn thức ăn không bổ sung thảo dược) và nhóm nghiệm thức 2 (sau khi gây nhiễm, cá được tiếp tục cho ăn thức ăn bổ sung thảo dược). Các nghiệm thức cụ thể được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Các nghiệm thức của thí nghiệm xác định khả năng bảo vệ cá của cao chiết vỏ quế.

Nghiem thức	Ký hiệu	Thức ăn	Sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn
Đối chứng	ĐC	Không bổ sung thảo dược	3 bể đối chứng âm 3 bể đối chứng dương
Bổ sung thảo dược	Q10	Bổ sung cao chiết vỏ quế với tỷ lệ 10 g/kg thức ăn	Nhóm 1: 3 bể cho ăn thức ăn không bổ sung cao chiết vỏ quế
	Q20	Bổ sung cao chiết vỏ quế với tỷ lệ 20 g/kg thức ăn	Nhóm 2: 3 bể tiếp tục cho ăn thức ăn bổ sung cao chiết vỏ quế với các hàm lượng như trước khi cảm nhiễm.
	Q40	Bổ sung cao chiết vỏ quế với tỷ lệ 40 g/kg thức ăn	

Trong thời gian 10 ngày sau khi gây cảm nhiễm, tiến hành theo dõi, ghi nhận số cá chết, tình trạng sức khỏe của cá hàng ngày. Hiệu quả bảo vệ của các loại dịch chiết thảo dược được đánh giá thông qua chỉ số tỷ lệ sống tương đối (RPS) theo công thức của D.F. Amend (1981) [12]:

$RPS (\%) = [1 - (\text{Số cá chết ở nghiệm thức thí nghiệm} / \text{số cá chết ở nghiệm thức ĐC dương})] \times 100$

Phương pháp phân tích thống kê: Tất cả các số liệu được nhập và lưu trữ bằng Excel. Các số liệu (trừ các thông số môi trường nước, LD₅₀ và RPS) được xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS 20.0, trắc nghiệm One-way ANOVA bằng phép thử Tukey với độ tin cậy 95%.

Kết quả và bàn luận

Thí nghiệm xác định ảnh hưởng của việc bổ sung cao chiết vỏ quế vào thức ăn lên tăng trưởng của cá rô phi

Trong suốt thời gian thí nghiệm, các yếu tố môi trường nước đều nằm trong khoảng giới hạn phù hợp cho sự tăng trưởng và đảm bảo sức khỏe cá (chi tiết thể hiện ở bảng 4).

Bảng 4. Giá trị các thông số môi trường nước trong thí nghiệm ảnh hưởng của bổ sung cao chiết vỏ quế vào thức ăn lên tăng trưởng của cá rô phi.

Thông số	Giá trị đo được	Giá trị thích hợp [13]
Nhiệt độ (°C)	25-29	24-36
pH	6,5-7,1	6,5-8,0
DO (mg/l)	4,5-6	≥3
NH ₃ (mg/l)	<0,1	<0,1
NO ₂	0	0

Trong suốt 8 tuần thí nghiệm, cá có biểu hiện sức khỏe tốt, bơi lội nhanh nhẹn, bắt mồi tích cực. Khi kết thúc thí nghiệm, tỷ lệ sống ở tất cả các nghiệm thức là khá cao (đều trên 94%) và nghiệm thức được bổ sung cao chiết vỏ quế với hàm lượng 40 g/kg cho tỷ lệ sống cao nhất (98,89%), tuy nhiên sự khác biệt giữa tất cả các nghiệm thức không có ý nghĩa về mặt thống kê ($p > 0,05$). Các thông số liên quan đến tỷ lệ sống và tăng trưởng của cá thí nghiệm được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Tăng trưởng của cá trong thí nghiệm ảnh hưởng của bổ sung cao chiết vỏ quế vào thức ăn lên tăng trưởng của cá rô phi.

Chỉ tiêu	ĐVT	Nghiem thức			
		Q10	Q20	Q40	ĐC
W_1	g	5,17±0,17 ^a	5,19±0,28 ^a	5,20±0,15 ^a	5,21±0,14 ^a
W_2	g				
4 tuần		11,27±1,00 ^a	10,23±0,50 ^a	11,13±1,66 ^a	11,17±1,75 ^a
8 tuần		22,02±0,33 ^a	21,03±0,56 ^a	20,57±0,77 ^a	20,84±1,55 ^a
WG	g				
4 tuần		6,10±0,93 ^a	5,04±0,39 ^a	5,93±1,56 ^a	5,96±1,62 ^a
8 tuần		16,85±0,38 ^a	15,85±0,83 ^a	15,37±0,75 ^a	15,63±1,42 ^a
DWG	g/ngày				
4 tuần		0,22±0,35 ^a	0,18±0,02 ^a	0,21±0,06 ^a	0,21±0,06 ^a
8 tuần		0,28±0,01 ^a	0,26±0,01 ^a	0,26±0,01 ^a	0,26±0,03 ^a
SGR	%/ngày				
4 tuần		1,30±0,13 ^a	1,13±0,08 ^a	1,26±0,21 ^a	1,26±0,22 ^a
8 tuần		2,42 ± 0,06 ^a	2,33 ± 0,13 ^a	2,29 ± 0,07 ^a	2,30 ± 0,08 ^a
FCR					
4 tuần		1,28±0,18 ^a	1,24±0,17 ^a	1,33±0,33 ^a	1,38±0,26 ^a
8 tuần		1,48±0,02 ^a	1,38±0,14 ^a	1,50±0,06 ^a	1,54±0,08 ^a
TLS	%	94,44±3,85 ^a	96,66±5,77 ^a	98,89±1,92 ^a	94,45±6,93 ^a

Ghi chú: ĐC: đối chứng; Q: quế; ĐVT: đơn vị tính. Số liệu thể hiện giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn; trên cùng một hàng, các chữ giống nhau biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Kết quả bảng 5 cho thấy, trọng lượng trung bình lúc ban đầu, trọng lượng sau 4 tuần và 8 tuần thí nghiệm của cá tương đương nhau ở các nghiệm thức và sự khác biệt này không có ý nghĩa về mặt thống kê ($p > 0,05$). Kết quả tăng trọng khối lượng (WG) ở các nghiệm thức cho thấy có sự khác biệt, tuy nhiên những sự khác biệt này không có ý nghĩa về mặt thống kê ($p > 0,05$). WG của cá thí nghiệm ở nghiệm thức đối chứng đạt mức trung bình so với các nghiệm thức được bổ sung cao chiết vỏ quế vào thức ăn và WG của cá cao nhất ở hàm lượng bổ sung cao chiết thấp nhất (10 g/kg). Kết quả này được lặp lại khi so sánh tốc độ tăng trưởng đặc hiệu theo khối lượng (SGR) giữa các nghiệm thức. Như vậy, kết quả nghiên cứu này phù hợp với nhận định của nhiều nhà nghiên cứu khi cho rằng, các thành phần đã được chứng minh có vai trò giúp kháng bệnh tốt nhất được bổ sung vào thức ăn có thể làm cho động vật nuôi không đạt được sự tăng trưởng nhanh nhất [6]. Nghiên cứu của D. Ndong và cs (2007) [14] thực hiện trên cá rô phi lai (*O. niloticus* x *O. aureus*) trong 4 tuần với khẩu phần ăn có 0,5% tỏi cho thấy, loại thức ăn này có tác dụng nâng cao miễn dịch nhưng không cải thiện tăng trưởng. Một nghiên cứu khác cũng cho thấy, sự có mặt của đinh hương (*Syzygium aromaticum*) trong thức ăn ảnh hưởng đến tăng trọng của nhiều loại thủy sản [15].

Với chỉ tiêu FCR, cá ở nghiệm thức đối chứng có FCR cao nhất (1,54), cá ở nghiệm thức được ăn thức ăn bổ sung cao chiết vỏ quế với hàm lượng 20 g/kg có FCR thấp nhất (1,38), tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$). Hệ số FCR của cá trong thí nghiệm này tương đương với hệ số FCR ghi nhận được ở các nghiên cứu đã thực hiện trên cá rô phi.

Kết quả xác định liều vi khuẩn *S. agalactiae* gây chết cá (LD_{50})

Chủng vi khuẩn phân lập từ huyện Củ Chi, TP Hồ Chí Minh (SA-2.1-CC) có giá trị $LD_{50}=10^{3,12}$ CFU/ml ($1,3 \times 10^3$ CFU/ml), thấp hơn các giá trị LD_{50} trên cá rô phi đã được công bố (khoảng 10^5 - 10^6 CFU/ml). Kết quả cụ thể được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6. Kết quả xác định LD_{50} của chủng vi khuẩn SA-2.1-CC.

Mật độ vi khuẩn (CFU/ml)	Số cá (con)					Tỷ lệ chết cộng dồn (%)	Giá trị LD_{50} (CFU/ml)
	Ban đầu	Chết	Sống	Chết cộng dồn	Sống cộng dồn		
10^7	36	31	5	31	5	86,1	$1,3 \times 10^3$
10^6	36	24	12	55	17	76,4	
10^5	36	21	15	76	32	70,4	
10^4	36	8	28	84	60	58,3	
10^3	36	4	32	88	92	48,9	

Chú thích: số cá sống cộng dồn, số cá chết cộng dồn tính từ nghiệm thức có nồng độ vi khuẩn cao nhất đến từng nghiệm thức có nồng độ thấp hơn.

Thí nghiệm xác định ảnh hưởng của việc bổ sung cao chiết vỏ quế lên khả năng bảo vệ cá rô phi kháng lại vi khuẩn *S. agalactiae*

Trong quá trình thực hiện thí nghiệm, các chỉ tiêu chất lượng nước được theo dõi hàng ngày nhằm đảm bảo môi trường thuận lợi và ổn định cho sự sống và phát triển của cá thí nghiệm. Qua theo dõi cho thấy, các yếu tố môi trường nước có sự biến động tuy nhiên vẫn nằm trong ngưỡng thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của cá thí nghiệm (bảng 7).

Bảng 7. Giá trị các thông số môi trường nước trong thí nghiệm ảnh hưởng của việc bổ sung cao chiết thảo dược lên khả năng bảo vệ cá rô phi kháng lại vi khuẩn *S. agalactiae*.

Thông số	Giá trị đo được	Giá trị thích hợp [13]
Nhiệt độ (°C)	27-30	24-36
pH	6,5-7,9	6,5-8,0
DO (mg/l)	6-10	≥ 3
NH_3 (mg/l)	<0,01	<0,1
NO_2	0	0

Các thông số liên quan đến tỷ lệ sống và tăng trưởng của cá thí nghiệm được trình bày ở bảng 8. Ghi nhận trong suốt 28 ngày thí nghiệm cho thấy, cá có biểu hiện sức khỏe tốt, bơi lội nhanh nhẹn, bắt mồi tích cực. Kết thúc 28 ngày nuôi tỷ lệ sống ở hầu hết các

nghiệm thức đều cao hơn 87%. Nghiệm thức đối chứng cho tỷ lệ sống cao nhất (trên 90% trong khi các nghiệm thức bổ sung thảo dược đều dưới 90%), tuy nhiên sự khác biệt giữa tất cả các nghiệm thức không có ý nghĩa về mặt thống kê ($p>0,05$).

Bảng 8. Tăng trưởng của cá trong thí nghiệm xác định ảnh hưởng của việc bổ sung cao chiết thảo dược lên khả năng bảo vệ cá rô phi kháng lại vi khuẩn *S. agalactiae*.

Chỉ tiêu	ĐVT	Nghiệm thức			
		Q10	Q20	Q40	ĐC
W_1	g	$3,86 \pm 0,10^a$	$3,80 \pm 0,12^a$	$3,74 \pm 0,05^a$	$3,83 \pm 0,05^a$
W_2	g	$7,33 \pm 0,09^a$	$7,33 \pm 0,04^a$	$7,26 \pm 0,10^a$	$7,33 \pm 0,06^a$
WG	g	$3,47 \pm 0,09^a$	$3,53 \pm 0,11^a$	$3,51 \pm 0,09^a$	$3,51 \pm 0,06^a$
DWG	g/ngày	$0,12 \pm 0,00^a$	$0,13 \pm 0,00^a$	$0,13 \pm 0,00^a$	$0,12 \pm 0,00^a$
SGR	%/ngày	$2,29 \pm 0,08^a$	$2,35 \pm 0,11^a$	$2,37 \pm 0,05^a$	$2,32 \pm 0,04^a$
FCR		$2,25 \pm 0,22^a$	$2,19 \pm 0,14^a$	$2,32 \pm 0,60^a$	$2,12 \pm 0,26^a$
TLS	%	$87,50 \pm 5,00^a$	$87,50 \pm 3,54^a$	$87,08 \pm 7,81^a$	$91,25 \pm 5,18^a$

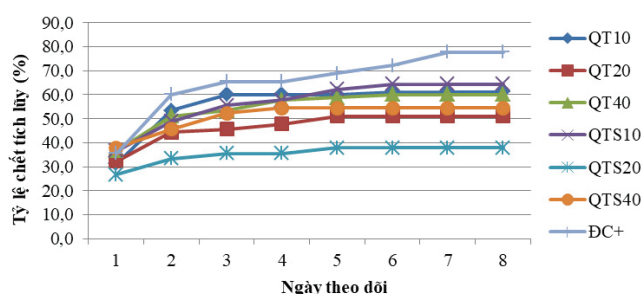
Ghi chú: ĐC: đối chứng; Q: quế; ĐVT: đơn vị tính. Số liệu thể hiện giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn; trên cùng một hàng, các chữ giống nhau biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$).

Kết quả phân tích ở bảng 8 cho thấy, trọng lượng trung bình lúc ban đầu, trọng lượng sau 28 ngày nuôi của cá thí nghiệm tương đương nhau ở các nghiệm thức và sự khác biệt này không có ý nghĩa về mặt thống kê ($p>0,05$). Kết quả DWG, SGR và FCR ở các nghiệm thức cho thấy có sự khác biệt, tuy nhiên những sự khác biệt này không có ý nghĩa về mặt thống kê ($p>0,05$).

Về tình trạng cá sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn *S. agalactiae*, cá ở các nghiệm thức (trừ nghiệm thức đối chứng âm) bắt đầu có các biểu hiện bệnh lý như: bỏ ăn, bơi lơ dờ trên mặt nước, mắt cá lồi và đục (hình 3). Trong vòng 24 giờ sau cảm nhiễm, cá ở các bể bắt đầu chết với số lượng khá nhiều so với các công bố trước đây (hình 4), điều này có thể là do độc lực của vi khuẩn dùng trong nghiên cứu cao. Đến ngày thứ 2, số cá chết ở tất cả các nghiệm thức bắt đầu giảm dần và ngưng chết ở ngày thứ 6. Riêng nghiệm thức đối chứng âm, cá không chết và cũng không có biểu hiện bất thường trong suốt thời gian theo dõi, trong khi đó cá ở nghiệm thức dương chết nhiều từ 24 giờ đầu tiên sau cảm nhiễm và có biểu hiện các dấu hiệu bệnh lý trên cơ thể. Hiệu quả bảo vệ của cao chiết vỏ quế với cá rô phi được cảm nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae* được trình bày ở bảng 9. Cao chiết vỏ quế với hàm lượng 20 g/kg đều cho hiệu quả bảo vệ cao nhất ở các nghiệm thức nhóm 1 và nhóm 2.



Hình 3. Cá biểu hiện lồi mắt, xuất huyết vây mang sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn *S. agalactiae*.



T: cho ăn thức ăn không bổ sung cao chiết vỏ quế sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn.
TS: tiếp tục cho ăn thức ăn bổ sung cao chiết vỏ quế sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn.

Hình 4. Tỷ lệ cá chết tích lũy theo ngày sau cảm nhiễm.

Bảng 9. Hiệu quả bảo vệ của cao chiết vỏ quế với cá rô phi khi gây cảm nhiễm vi khuẩn *S. agalactiae*.

Hàm lượng cao chiết vỏ quế (g/kg thức ăn)	RPS (%)	
	Nghiệm thức 1	Nghiệm thức 2
10	21,4	17,1
20	34,3	51,4
40	22,9	30,0

Ghi chú: RPS: tỷ lệ sống tương đối; nghiệm thức 1: sau khi gây nhiễm, cá được cho ăn thức ăn không bổ sung thảo dược; nghiệm thức 2: sau khi gây nhiễm, cá được tiếp tục cho ăn thức ăn bổ sung thảo dược.

Tỷ lệ cá chết tích lũy theo ngày sau cảm nhiễm (hình 4) của các nghiệm thức được bổ sung cao chiết vỏ quế trong thức ăn đều thấp hơn so với nghiệm thức đối chứng. Ở nhóm các nghiệm thức cá được cho ăn thức ăn không bổ sung cao chiết vỏ quế sau khi được cảm nhiễm với vi khuẩn, việc bổ sung với hàm lượng 20 g/kg trong giai đoạn nuôi 28 ngày cho hiệu quả bảo vệ cao nhất (RPS đạt 34,3%). Trong khi đó, ở nhóm các nghiệm thức cá được tiếp tục cho ăn thức ăn bổ sung cao chiết vỏ quế sau khi được cảm nhiễm với vi khuẩn, hàm lượng bổ sung 20 g/kg cũng cho hiệu quả bảo vệ cao nhất và trên 50%. So sánh giữa hai nhóm nghiệm thức, ghi nhận ở hàm lượng 10 g/kg thức ăn cao chiết vỏ quế được bổ sung, RPS của nghiệm thức cá được tiếp tục cho ăn thức ăn bổ sung cao chiết vỏ quế (17,1%) thấp hơn RPS của nghiệm thức chỉ được cho ăn thức ăn bổ sung cao chiết vỏ quế giai đoạn trước khi cảm nhiễm với vi khuẩn (21,4%). Hiệu quả bảo vệ cá rô phi trong thí nghiệm của chúng tôi thấp hơn kết quả khi bổ sung cây kê huyết đằng (*Spatholobus suberectus*) và cây thanh đại (*Isatis indigotica*) vào thức ăn để khảo sát khả năng kháng vi khuẩn *S. agalactiae* ở cá rô phi được thực hiện bởi G.W. Liang và cs (2019) [16], với chỉ số RPS lần lượt là 75 và 62,5%. Tuy nhiên, trong nghiên cứu của G.W. Liang và cs (2019) [16], cá có sự chênh lệch khá lớn so với trong thí nghiệm này (100-150 g/con).

Các loại cây thảo mộc từ thiên nhiên đã được y học cổ truyền chứng minh hiệu quả chữa trị những bệnh nan y cũng như bồi bổ cơ thể trên người. Nghiên cứu áp dụng những kinh nghiệm của y học cổ truyền để bào chế các chế phẩm từ cây dược liệu có chứa các chất kháng khuẩn để thay thế cho việc sử dụng kháng sinh là một hướng tiếp cận mới và đã được ứng dụng từ lâu trong chăn nuôi. Lã Văn Kính và cs (2012) [17] đã nghiên cứu các quy trình chiết cao bằng phương pháp chiết ngâm kiệt của 10 loại thảo

được, đó là: cây bộ mả (*Pouzolzia zeylanica*), xuyên tâm liên (*Andrographis paniculata*), hoàng liên ô rô (*Mahonia neplensis* DC.), dây cóc (*Tinospora crispa*), gừng (*Zingiber officinale*), vàng đắng (*Coscinium fenestratum*), sài đất (*Wedelia chinensis*), cam thảo (*Glycyrrhiza uralensis*), nghệ (*Curcuma longa*) và hoàng kỳ Mông Cổ (*Astragalus membranaceus*). Nhóm tác giả đã bào chế được 6 loại chế phẩm, trong đó 4 chế phẩm được nghiên cứu khá hoàn thiện. Việc bổ sung các chế phẩm thảo dược vào thức ăn cho gà và lợn đã cải thiện được tăng trọng, giảm tiêu tốn thức ăn, giảm tỷ lệ chết, giảm tỷ lệ tiêu chảy. Trên động vật thủy sản, bên cạnh khả năng kháng khuẩn, các chiết xuất thảo dược đã được chứng minh có tác dụng trên cả tôm và cá nuôi với các vai trò như kích thích tăng trưởng [18-20]; kháng khuẩn và các tác nhân truyền nhiễm khác [21-23]. Theo J.Y. Lee và Y. Gao (2012) [24], các loại thảo mộc hoạt động như là một hương vị, do đó ảnh hưởng đến sự thèm ăn như tiết dịch tiêu hóa và tăng lượng thức ăn ăn vào, đồng thời làm giảm FCR. Nhiều báo cáo đã ghi nhận hiệu quả của các loại thảo mộc như là chất kích thích khả năng bắt mồi và thúc đẩy tăng trưởng trong các loài thủy sản.

Tác giả G. Yin và cs (2008) [25] đã bổ sung chiết xuất của 2 loại thảo dược là kim ngân (*Lonicera japonica*) và nấm linh chi (*Ganoderma lucidum*) trong chế độ ăn của cá rô phi vằn (*Oreochromis niloticus*) cho thấy, các loại thảo dược này đã hoạt động như các chất kích thích miễn dịch, giúp cải thiện tình trạng miễn dịch và khả năng kháng bệnh của cá thí nghiệm. Cả 2 loại thảo dược khi sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp đều làm tăng tỷ lệ sống của cá sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn *A. hydrophila*. Kết quả thí nghiệm *in vivo* trong nghiên cứu của P. Rattanachaisuksonpon và P. Phumkhaichorn (2009) [5] cho thấy, khi cá rô phi ăn thức ăn có bổ sung bột lá xuyên tâm liên tách chiết bằng dung môi nước (tính theo vật chất khô) với tỷ lệ bột lá và thức ăn là 4:36 và 5:35 (tương ứng 10 và 15%), đã giúp làm giảm tỷ lệ chết của cá khi gây nhiễm với *S. agalactiae*. Nghiên cứu của R. Harikrishnan và cs (2010) [26] trên cá vàng (*Carassius auratus*) cho thấy, cá được phòng bệnh bằng cách bổ sung vào khẩu phần ăn 400 và 800 mg/kg cao chiết thảo dược trước khi gây cảm nhiễm bằng vi khuẩn *A. hydrophila* có tỷ lệ chết dao động 25-30%. Cao chiết thảo dược sử dụng trong thí nghiệm là sự phối hợp từ 3 loại thảo dược gồm cây sấu đầu (*Azadirachta indica*), hương nhu tím (*Ocimum sanctum*) và củ nghệ (*Curcuma longa*). Theo Mai Thanh Thanh và Bùi Thị Bích Hằng (2018) [27], sau 14 ngày cho cá điêu hồng (*Oreochromis* sp.) ăn thức ăn bổ sung tỏi (*Allium sativum*) và cảm nhiễm với vi khuẩn *S. agalactiae*, tỷ lệ chết của cá ở nghiệm thức bổ sung tỏi tươi với hàm lượng 0,5 và 1% (70%) và nghiệm thức bổ sung bột tỏi với hàm lượng 0,25% (36,7%) đều giảm so với cá ở nghiệm thức đối chứng (86,7%).

Kết luận

Bổ sung cao chiết vỏ quế với các hàm lượng 10, 20 và 40 g/kg vào thức ăn đảm bảo an toàn cho sự sống và sinh trưởng của cá rô phi giống; giúp làm giảm tỷ lệ chết khi cá được gây nhiễm với vi khuẩn *S. agalactiae*. Việc bổ sung cao chiết vỏ quế với hàm lượng 20 g/kg thức ăn hiệu quả bảo vệ cao nhất (RPS=51,4%) đối với cá rô phi giống gây nhiễm với vi khuẩn *S. agalactiae* chủng SA-2.1-

CC (có giá trị LD_{50} là $1,3 \times 10^3$ CFU/ml). Vò quế là thảo dược tiềm năng, có triển vọng ứng dụng cao trong việc phòng và trị bệnh do *S. agalactiae* gây ra trên cá rô phi. Cần tiếp tục thực hiện các nghiên cứu chuyên sâu, đánh giá ảnh hưởng của cao chiết vò quế khi trộn vào thức ăn lên các chỉ tiêu miễn dịch trên cá rô phi.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ kinh phí bởi Quỹ Phát triển KH&CN TP Hồ Chí Minh, Sở KH&CN TP Hồ Chí Minh cho Trung tâm Quan trắc Môi trường và Bệnh thủy sản Nam Bộ (Hợp đồng số 26/2018/HĐ-QKHCN); chủng vi khuẩn SA-2.1-CC dùng trong nghiên cứu được cung cấp bởi nhóm nghiên cứu của ông Đoàn Văn Cường - Chủ nhiệm đề tài. Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II và Khoa Khoa học Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh đã tạo điều kiện thuận lợi và hỗ trợ nhóm trong quá trình thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] K. Fitzsimmons (2004), "Development of new products and markets for the global tilapia trade", *Proceedings of ISTA*, **6**, pp.624-633.
- [2] W.L. Shelton, T.J. Popma (2006), *Tilapia Biology, Culture and Nutrition*, The Haworth Press Inc, pp.1-49.
- [3] J.J. Evans, P. Klesius, C. Shoemaker, D. Pasnik (2006), "Identification and epidemiology of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactiae* in tilapia, *Oreochromis* spp.", *International Symposium on Tilapia in Aquaculture*, **7**, pp.25-42.
- [4] N.N. Phuoc, N.T.H. Linh, C. Crestani, R.N. Zadoks (2021), "Effect of strain and environmental conditions on the virulence of *Streptococcus agalactiae* (Group B *Streptococcus*; GBS) in red tilapia (*Oreochromis* sp.)", *Aquaculture*, **534**, pp.736256-73257.
- [5] P. Rattanachaiakunsopon, P. Phumkhachorn (2009), "Prophylactic effect of *Andrographis paniculata* extracts against *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)", *Journal Bioscience Bioengineer*, **107**(5), pp.579-582.
- [6] J. Galindo-Villegas, H. Hosokawa (2004), *Immunostimulants: Towards Temporary Prevention of Diseases in Marine Fish*, Avances en Nutricion Acuicola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutricion Acuicola, Hermosillo, Sonora, Mexico, pp.16-19.
- [7] M. Sakai (1999), "Current research status of fish immunostimulants", *Aquaculture*, **172**(1-2), pp.63-92.
- [8] Nguyễn Thị Trúc Quyên, Lê Linh Chi, Đoàn Văn Cường và cs (2019), "Khả năng đối kháng vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* phân lập trên cá rô phi (*Oreochromis* spp.) bởi một số cao chiết thảo dược", *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản, Trường Đại học Nha Trang*, **3**, tr.124-132.
- [9] Đoàn Văn Cường, Nguyễn Thị Ngọc Tình, Mã Tú Lan, Nguyễn Thành Nhân (2019), "Khảo sát tính kháng khuẩn của cao chiết quế (*Cinnamomum verum*) và gừng (*Zingiber officinale* Rose) tách chiết bằng ethanol đối với các chủng vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* phân lập trên cá rô phi giống (*Oreochromis* spp.)", *Tạp chí Nghề cá sông Cửu Long*, **15**, tr.3-13.
- [10] R.C. Bhujel (2013), "On-farm feed management practices for Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Thailand", *On-farm Feeding and Feed Management in Aquaculture*, FAO, pp.59-189.
- [11] L.J. Reed, H. Muench (1938), "A simple method of estimating fifty per cent endpoints", *American Journal of Epidemiology*, **27**(3), pp.493-497.
- [12] D.F. Amend (1981), "Potency testing of fish vaccines. International symposium on fish biologics: Serodiagnostics and vaccines", *Developments in Biological Standardization*, **49**, pp.447-454.
- [13] Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn (2017), *Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về yêu cầu kỹ thuật đối với cơ sở sản xuất giống và nuôi cá rô phi*, QCVN 02-26:2017/BNNPTNT.
- [14] D. Ndong, Y.Y. Chen, Y.H. Lin, et al. (2007), "The immune response of Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in low and high temperatures", *Fish and Shellfish Immunology*, **22**(6), pp.686-694.
- [15] T. Mohan (2004), *Pharmacological screening of some medicinal plants as antimicrobial and feed additives*, Master of Science in Animal and Poultry Sciences (Pharmacology), Department of Animal and Poultry Science Virginia Polytechnic Institute and State University, 81pp.
- [16] G.W. Liang, H.W. Deng, F. Wang, et al. (2019), "In vitro and in vivo screening of herbal extracts against *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)", *Aquaculture*, **503**, pp.412-421.
- [17] Lã Văn Kinh, Châu Văn Minh, Phan Văn Kiêm và cs (2012), "Nghiên cứu một số chế phẩm có nguồn gốc thảo dược trong chăn nuôi lợn và gia cầm", *Kỷ yếu Hội nghị khoa học năm 2012*, tr.372-390.
- [18] M. Reverter, N. Bontemps, D. Lecchini, et al. (2014), "Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives", *Aquaculture*, **433**, pp.50-61.
- [19] G. Jeney, L.D. Wet, Z. Jeney, G. Yin (2015), "Plant extracts", *Dietary Nutrients, Additives, and Fish Health*, Wiley Online Library, pp.321-332.
- [20] T. Citarasu, M.M. Babu, R.R.J. Sekar, M.P. Marian (2002), "Developing Artemia enriched herbal diet for producing quality larvae in *Penaeus monodon*, Fabricius", *Asian Fisheries Science*, **15**, pp.21-32.
- [21] A. Adigüzel, G. Medine, B. Meryem, et al. (2005), "Antimicrobial effects of *Ocimum basilicum* (Labiatae) extract", *Turkish Journal Biology*, **29**(3), pp.155-160.
- [22] G. Immanuel, V.C.B. Vincy, A. Palavesam, M.M. Peter (2004), "Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles", *Aquaculture*, **236**(1-4), pp.53-65.
- [23] R. Praseetha (2005), *Enrichment of Brine Shrimp Artemia Franciscana with Commercial Probiotics and Herbal Extracts and Their Resistance Against Shrimp Pathogen Vibrio sp. (Vibrio parahaemolyticus and Vibrio damsela)*, Manonmaiam Sundaranar University, India.
- [24] J.Y. Lee, Y. Gao (2012), "Review of the application of garlic, *Allium sativum*, in aquaculture", *Journal of The World Aquaculture Society*, **43**(4), pp.447-458.
- [25] G. Yin, L. Ardo, Z. Jeney, et al. (2008), "Chinese herbs (*Lonicera japonica* and *Ganoderma lucidum*) enhance non-specific immune response of tilapia, *Oreochromis niloticus* and protection against *Aeromonas hydrophila*", *Diseases in Asian Aquaculture VI, Fish Health Section*, Asian Fisheries Society, Philippines, pp.269-282.
- [26] R. Harikrishnan, B. Chellam, H.M. Soo (2010), "Herbal supplementation diets on hematology and innate immunity in goldfish against *Aeromonas hydrophila*", *Fish and Shellfish Immunology*, **28**(2), pp.354-361.
- [27] Mai Thanh Thanh, Bùi Thị Bích Hằng (2018), "Ảnh hưởng của việc bổ sung tỏi (*Allium sativum*) vào thức ăn lên một số chỉ tiêu miễn dịch và khả năng kháng khuẩn của cá điêu hồng (*Oreochromis* sp.)", *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, **54**(2), tr.168-176.

Phát triển phương pháp HPLC-DAD định lượng pentostatin trong quả thể nấm dược liệu *Cordyceps militaris*

Vũ Xuân Tạo^{1*}, Nguyễn Thị Hà Ly², Trần Bảo Trâm¹, Nguyễn Đức Duy^{1,3},
Nguyễn Thảo Nhi⁴, Nguyễn Thị Thanh Mai¹, Đào Ngọc Ánh¹, Trần Văn Tuấn³

¹Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ

²Viện Dược liệu, Bộ Y tế

³Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

⁴Trường Trung học Phổ thông Chi Lăng, Lạng Sơn

Ngày nhận bài 20/4/2023; ngày chuyển phản biện 25/4/2023; ngày nhận phản biện 5/5/2023; ngày chấp nhận đăng 9/5/2023

Tóm tắt:

Cordyceps militaris là loài nấm dược liệu quan trọng trong y học cổ truyền. Chúng chứa nhiều hoạt chất có hoạt tính sinh học ứng dụng trong y học như cordycepin, adenosine... Gần đây thông qua phân tích hệ gen, *C. militaris* đã được chứng minh có khả năng sinh tổng hợp pentostatin. Pentostatin là hoạt chất quan trọng trong sản xuất các loại thuốc hóa trị sử dụng trong điều trị ung thư. Tuy nhiên, việc phát triển các phương pháp định lượng pentostatin trong nấm *C. militaris* chưa có nhiều nghiên cứu đề cập. Trong nghiên cứu này, các tác giả xây dựng và thẩm định phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC-DAD) đơn giản với độ chính xác cao để định lượng pentostatin trong quả thể nấm *C. militaris*. Quá trình sắc ký được thực hiện trên cột C_{18} của Hãng Agilent (250x4,6 mm, 5 μ m) với chương trình rửa giải gradient sử dụng hệ dung môi pha động gồm acetonitrile và nước. Tốc độ rửa giải là 0,6 ml/phút, bước sóng phát hiện được lựa chọn là 280 nm. Đường chuẩn xây dựng được đều đạt độ tuyến tính cao với $R^2 > 0,99$. Kết quả thẩm định phương pháp về độ lặp lại, hiệu suất thu hồi, độ chọn lọc đều đạt theo hướng dẫn của Hội nghị quốc tế về hài hòa các thủ tục đăng ký được phẩm sử dụng cho con người (International Conference on Harmonization).

Từ khóa: *Cordyceps militaris*, HPLC-DAD, pentostatin, quả thể nấm.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Nhiều loài nấm thuộc chi *Cordyceps* được sử dụng như một loại dược liệu quý trong y dược học cổ truyền tại các nước châu Á. Trong số những loài nấm thuộc chi *Cordyceps* đã được phát hiện, *C. sinensis* (*Ophiocordyceps sinensis*) và *C. militaris* là 2 loài được quan tâm nghiên cứu và sử dụng nhiều trong y học [1, 2]. *C. sinensis* chủ yếu được khai thác từ tự nhiên với giá rất cao, do sự khai thác quá mức dẫn tới cạn kiệt. Trong khi đó, loài nấm *C. militaris* dễ dàng hình thành quả thể trong môi trường nuôi cấy nhân tạo và sản phẩm thu được cũng có giá trị dược liệu cao, thậm chí hàm lượng hoạt chất cordycepin cao hơn so với loài *C. sinensis* [3]. Hoạt chất cordycepin được chứng minh là có khả năng kháng ung thư, kháng oxy hóa, kháng viêm, tăng cường hoạt động hệ miễn dịch, tăng cường chức năng gan, thận [4-6]. Do vậy, *C. militaris* được đánh giá là có giá trị sử dụng và thương mại hóa cao.

Gần đây thông qua phân tích hệ gen, *C. militaris* đã được chứng minh có khả năng sinh tổng hợp pentostatin [7]. Pentostatin (có tên gọi khác là deoxycoformycin) là một hợp chất chống chuyển hóa, có tác dụng chống ung thư bạch cầu. Nghiên cứu gần đây cho thấy sự kết hợp giữa cordycepin và pentostatin giúp làm tăng tác dụng ức chế sự phát triển của khối u [8]. Như vậy có thể thấy, hoạt chất cordycepin và

pentostatin là những hoạt chất quan trọng để đánh giá chất lượng nấm *C. militaris*. Hiện nay, đã có nhiều nghiên cứu trong nước và trên thế giới về phát triển các phương pháp định tính, định lượng cordycepin trong nấm *C. militaris* [3, 9]. Trên thế giới, việc phát hiện và định lượng pentostatin ở nấm *C. militaris* bước đầu được báo cáo dựa trên phân tích hệ gen kết hợp với phương pháp HPLC [7]. Tuy nhiên tại Việt Nam, việc phát triển phương pháp định lượng pentostatin trong nấm *C. militaris* chưa có nghiên cứu nào đề cập. Vì vậy, nghiên cứu này sẽ phát triển phương pháp HPLC-DAD để phân tích định lượng pentostatin trong mẫu quả thể nấm *C. militaris*.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Mẫu quả thể chủng nấm *C. militaris* SH03, TN01, HL13 và HN01 được cung cấp bởi Trung tâm Sinh học Thực nghiệm thuộc Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ. Các chủng nấm *C. militaris* đều đã được định danh và công bố năm 2022 [10]. Mẫu quả thể tươi sau khi nuôi cấy 65 ngày được thu và sấy khô bằng máy sấy thăng hoa ở nhiệt độ -40°C tới khi độ ẩm đạt dưới 5%.

Chất chuẩn dùng trong nghiên cứu là pentostatin (hình 1) (CAS: 53910-25-1, số Lot: L2203344, độ tinh khiết 98,0%) [11] được cung cấp bởi Hãng Aladdin (Trung Quốc).

*Tác giả liên hệ: Email: taovx.tsa@gmail.com

Development of HPLC-DAD method for the quantification of pentostatin in the fruiting body of *Cordyceps militaris*

Xuan Tao Vu^{1*}, Thi Ha Ly Nguyen², Bao Tram Tran¹,
Duc Duy Nguyen^{1,3}, Thao Nhi Nguyen⁴, Thi Thanh Mai Nguyen¹,
Ngoc Anh Dao¹, Van Tuan Tran³

¹Center of Experimental Biology, National Center for Technological Progress,
Ministry of Science and Technology

²National Institute of Medicinal Materials, Ministry of Health

³Faculty of Biology, University of Science, Vietnam National University, Hanoi

⁴Chi Lang High School, Lang Son Province

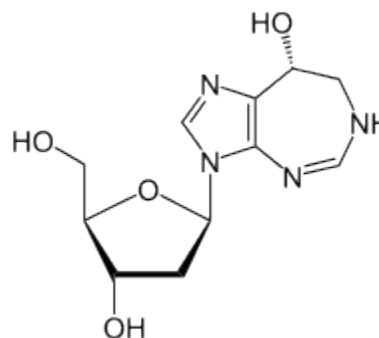
Received 20 April 2023; accepted 9 May 2023

Abstract:

Cordyceps militaris is an important medicinal mushroom in traditional medicine. It contains many bioactive compounds that have applications in medicine, such as cordycepin, adenosine... Recently, through genome analysis, *C. militaris* has been shown to have the ability to synthesise pentostatin. Pentostatin is an important active ingredient in the production of chemotherapy drugs used in cancer treatment. However, there have been few studies on the development of methods for quantifying pentostatin in *C. militaris*. In this study, a simple and sensitive high-performance liquid chromatography with diode-array detection (HPLC-DAD) method for the quantification of pentostatin in *C. militaris* was developed and validated. The chromatographic separations were obtained by an Agilent C₁₈ column (250x4.6 mm i.d., 5 µm particle size) using gradient elution with acetonitrile and water. The flow rate of 0.6 ml/min and detection wavelength of 280 nm were selected. The calibration curve displayed a good linear correlation ($R^2 > 0.99$). The validation results displayed great accuracy, repeatability, linearity, and selectivity according to The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) guideline.

Keywords: *Cordyceps militaris*, fruiting body, HPLC-DAD, pentostatin.

Classification number: 4.6



Hình 1. Công thức cấu tạo hợp chất pentostatin.

Thiết bị dùng trong nghiên cứu là hệ thống HPLC (Shimadzu, Nhật Bản), gồm: bơm LC-20AD, bộ tiêm mẫu tự động SIL-20AHT, detector DAD, lò cột CTO-10AS VP, cột Agilent C18 (250x4,6 mm, 5 µm), kết nối với máy tính có cài đặt phần mềm Labsolution để truy xuất kết quả.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tối ưu hóa điều kiện phân tích sắc ký: Khảo sát bước sóng phát hiện: Phổ UV của dung dịch chuẩn pentostatin được đo trên hệ thống HPLC-DAD và dùng để xác định cực đại hấp thụ (λ_{max}). Lựa chọn bước sóng tại vị trí cực đại hấp thụ làm bước sóng phát hiện. Khảo sát chương trình pha động: Tiến hành khảo sát chương trình rửa giải gradient với pha động gồm acetonitril hoặc methanol (kênh B) và nước (kênh A) theo các tỷ lệ khác nhau.

Để tối ưu hóa các điều kiện phân tích sắc ký, sử dụng các dung dịch sau: Dung dịch chuẩn pentostatin có nồng độ 62,5 µg/ml pha trong nước. Dung dịch mẫu thử: Cân chính xác khoảng 0,2 g bột mẫu thử (quả thể nấm được nghiền và qua rây số 180) vào bình tam giác dung tích 50 ml. Thêm 8 ml nước, chiết siêu âm trong 60 phút (công suất 250 w, tần số 50 kHz, nhiệt độ phòng). Để yên 10 phút, lọc dịch chiết vào bình định mức 10 ml, bổ sung đến vạch mức bằng nước, lắc đều, thu được dung dịch mẫu thử.

Khảo sát phương pháp xử lý mẫu:

- Khảo sát dung môi chiết: nước, ethanol và hỗn hợp ethanol/nước ở các tỷ lệ khác nhau.

- Khảo sát phương pháp chiết: Trong phạm vi phòng thí nghiệm, hai phương pháp chiết được lựa chọn để khảo sát là chiết siêu âm và chiết hồi lưu. Chiết siêu âm là quá trình chiết với sự hỗ trợ của sóng siêu âm, thường được sử dụng trong chuẩn bị mẫu phân tích. Chiết hồi lưu là một trong những phương pháp ngâm chiết truyền thống, được thực hiện trong một hệ thống ngưng tụ. Khảo sát thời gian chiết: Thử nghiệm với các khoảng thời gian chiết khác nhau là 30, 60 và 90 phút. Khảo sát tỷ lệ được liệu/thể tích dung môi chiết (g/ml): Thử nghiệm với các tỷ lệ 0,2 g/5 ml, 0,2 g/10 ml và 0,2 g/25 ml. Khảo sát số lần chiết là 1, 2 và 3 lần.

Thẩm định phương pháp phân tích: Sau khi khảo sát quá trình xử lý mẫu và các điều kiện sắc ký, tiến hành thẩm định phương pháp định lượng pentostatin trong mẫu theo hướng dẫn của ICH. Các chỉ tiêu thẩm định bao gồm: tính thích hợp của hệ thống, độ đặc hiệu, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng, đường chuẩn, độ lặp lại trong ngày và khác ngày, hiệu suất thu hồi [12].

Hàm lượng pentostatin (%), tính trên khối lượng mẫu khô kiệt) trong mẫu thử được tính theo công thức sau:

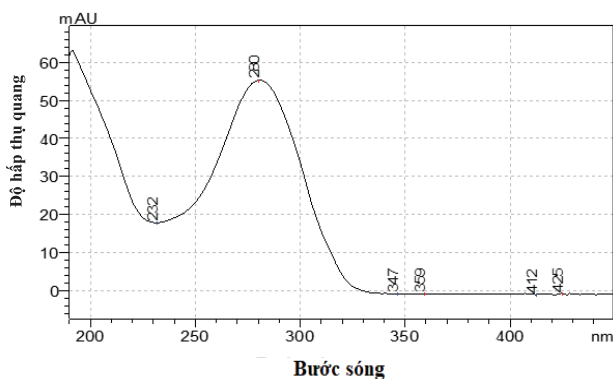
$$X(\%) = \frac{C \times V \times 100}{m \times 10^6 \times (100 - B)} \times 100$$

trong đó: X (%) là hàm lượng của pentostatin có trong mẫu thử; C là nồng độ của pentostatin có trong dung dịch mẫu thử tính từ phương trình đường chuẩn ($\mu\text{g/ml}$); V là thể tích dung dịch chiết (ml); m là khối lượng mẫu thử (g); B là độ ẩm của mẫu thử (%).

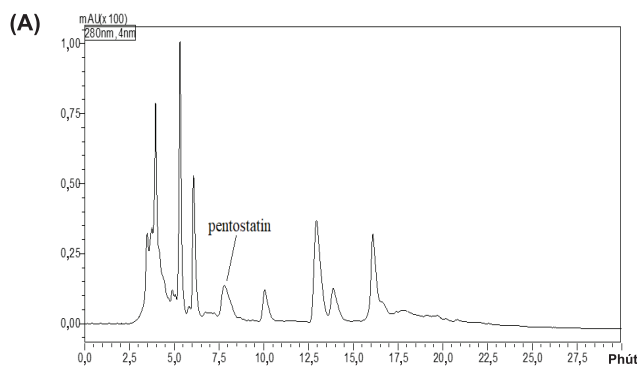
Kết quả và bàn luận

Kết quả tối ưu hóa điều kiện phân tích HPLC-DAD

Nghiên cứu quét phổ UV của dung dịch chuẩn pentostatin cho thấy, pentostatin có cực đại hấp thụ tại 280 nm (hình 2). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Y. Xia và cs (2017) [7]. Do vậy, bước sóng 280 nm được lựa chọn để định lượng pentostatin trong quả thể nấm *C. militaris*.



Hình 2. Phổ UV của dung dịch chuẩn pentostatin.



Hình 3. Sắc ký đồ HPLC-DAD phân tích mẫu dịch chiết quả thể nấm *C. militaris* với một số điều kiện phân tích khác nhau. (A) Điều kiện 1: methanol-nước (7-93 v/v), $v=0,7$ ml/phút, chế độ rửa giải đẳng dòng; (B) Điều kiện 2: acetonitril-nước (7-93 v/v), $v=0,6$ ml/phút, chế độ rửa giải đẳng dòng.

Để lựa chọn được điều kiện phân tích tối ưu hơn, tiến hành khảo sát hệ dung môi pha động và điều kiện rửa giải dựa trên một số tài liệu tham khảo [2, 13]. Kết quả khảo sát được thể hiện ở bảng 1 và hình 3.

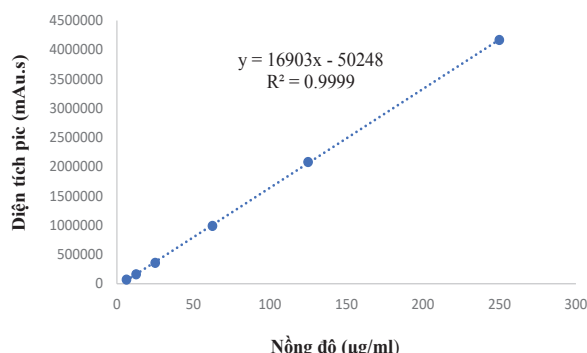
Bảng 1. Thông số pic của pentostatin ứng với các điều kiện phân tích khác nhau.

Thông số	Điều kiện 1	Điều kiện 2
Thời gian lưu (t_R , phút)	7,79	7,25
Độ phân giải R_s (yêu cầu trên 2,5)	2,23	2,69
Hệ số bất đối T_f (yêu cầu trong khoảng 0,8-1,2)	1,86	1,12
Số đĩa lý thuyết N (yêu cầu trên 2000)	2234	68895

Acetonitril và methanol là 2 loại dung môi phổ biến trong sắc ký lỏng, trong đó nhìn chung acetonitril có khả năng rửa giải tốt hơn methanol do có sự khác biệt về độ nhớt, độ phân cực. Tốc độ dòng cũng là yếu tố ảnh hưởng đến sự rửa giải và khả năng phân tách giữa các pic. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát một số tốc độ rửa giải khác nhau trong khoảng 0,5-1,0 ml/phút với 2 loại hệ dung môi rửa giải là acetonitril-nước và methanol-nước. Kết quả khảo sát thu được cho thấy, khi sử dụng pha động là methanol-nước, tín hiệu pic của pentostatin bị loãng rộng và không sắc nhọn, hệ số bất đối là 1,86 (ngoài khoảng quy định) và độ phân giải nhỏ hơn 2,5, chứng tỏ pic của pentostatin chưa đáp ứng các yêu cầu dùng cho phân tích định lượng [12, 14]. Với điều kiện 2, pha động sử dụng là acetonitril-nước, tín hiệu pic của pentostatin cân đối và tách tốt trên nền mẫu thử. Các thông số pic đều đạt so với yêu cầu, vì vậy điều kiện 2 (acetonitril-nước (7-93 v/v), $v=0,6$ ml/phút, chế độ rửa giải đẳng dòng) được lựa chọn cho nghiên cứu tiếp theo.

Kết quả xây dựng đường chuẩn định lượng pentostatin

Chuẩn bị một dãy các dung dịch pentostatin chuẩn có nồng độ của pentostatin 6,25-250 $\mu\text{g/ml}$ pha trong nước và tiến hành phân tích sắc ký theo các điều kiện đã lựa chọn được. Kết quả khảo sát sự tương quan giữa diện tích pic và nồng độ pentostatin được trình bày ở hình 4. Đường chuẩn thu được có hệ số tương quan $R^2 > 0,999$, đạt yêu cầu theo quy định của AOAC và ICH về đường chuẩn dùng trong phân tích định lượng [12, 15]. Từ kết quả thu được cho thấy khoảng nồng độ lựa chọn có tính tuyến tính tốt, phù hợp để áp dụng định lượng pentostatin.



Hình 4. Đường chuẩn pentostatin.

Kết quả xác định các điều kiện xử lý mẫu

Lựa chọn dung môi chiết: Để lựa chọn được dung môi có hiệu suất chiết cao nhất, nghiên cứu tiến hành khảo sát các dung môi chiết gồm: nước, ethanol và hỗn hợp ethanol/nước ở một số tỷ lệ khác nhau. Các thí nghiệm được khảo sát trong điều kiện cố định như sau: khối lượng mẫu 0,2 g, thể tích dung môi chiết 10 ml, phương pháp chiết là siêu âm, thời gian chiết 30 phút, số lần chiết là 1 lần. Hiệu quả chiết của từng dung môi được đánh giá qua hàm lượng pentostatin trong mẫu. Mỗi thí nghiệm được tiến hành 3 lần độc lập. Kết quả thu được cho thấy, khi sử dụng dung môi chiết là nước thì hàm lượng pentostatin xác định được cao hơn khi sử dụng dung môi hữu cơ (bảng 2). Dựa trên công thức cấu tạo của pentostatin (hình 1) và kết quả các nghiên cứu khác đã công bố, hợp chất này có khả năng tan tốt trong nước (độ tan >100 mg/ml), DMSO (độ tan >13,4 mg/ml) và kém tan trong ethanol [11, 13]. Do vậy, nước được lựa chọn là dung môi để chiết xuất pentostatin ra khỏi nền mẫu quả thể nấm *C. militaris* cho phân tích HPLC-DAD.

Bảng 2. Kết quả khảo sát dung môi chiết (n=3).

Dung môi	Khối lượng (g)	Hàm lượng pentostatin trích ly được (%) [*]
Nước	0,2101	0,224±0,003
Ethanol	0,2009	0,168±0,003
Ethanol/nước (20/80)	0,2012	0,207±0,002
Ethanol/nước (30/70)	0,2003	0,202±0,003
Ethanol/nước (40/60)	0,2034	0,197±0,001
Ethanol/nước (50/50)	0,2012	0,195±0,002
Ethanol/nước (80/20)	0,2005	0,170±0,002

^{*}: các kết quả thu được ứng với từng thí nghiệm khảo sát đều được kiểm tra bằng T-test cho thấy $p_{\text{value}} < 0,05$ chứng tỏ sự sai khác giữa các kết quả thu được có ý nghĩa thống kê.

Lựa chọn phương pháp chiết mẫu và thời gian chiết: Với mục tiêu lựa chọn được phương pháp chiết và thời gian chiết cho hiệu suất tối ưu, phù hợp có thể áp dụng rộng rãi, nghiên cứu tiến hành khảo sát các phương pháp và thời gian chiết. Các thí nghiệm được khảo sát trong điều kiện cố định như sau: khối lượng mẫu 0,2 g, thể tích dung môi chiết 10

ml, số lần chiết là 1 lần. Tiến hành phân tích các dung dịch thử bằng HPLC-DAD theo điều kiện đã khảo sát, xác định hàm lượng của pentostatin (bảng 3).

Bảng 3. Kết quả khảo sát phương pháp chiết mẫu và thời gian chiết (n=3).

Điều kiện chiết	Khối lượng (g)	Hàm lượng pentostatin (%)
Siêu âm 30 phút	0,2012	0,223±0,001
Siêu âm 60 phút	0,2009	0,258±0,002
Siêu âm 90 phút	0,2004	0,260±0,002
Hồi lưu 30 phút	0,2004	0,203±0,003
Hồi lưu 60 phút	0,2082	0,219±0,002
Hồi lưu 90 phút	0,2091	0,232±0,003

^{*}: các kết quả thu được ứng với từng thí nghiệm khảo sát đều được kiểm tra bằng T-test cho thấy $p_{\text{value}} < 0,05$ chứng tỏ sự sai khác giữa các kết quả thu được có ý nghĩa thống kê.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, hàm lượng của pentostatin xác định được trong dịch chiết thu được bằng phương pháp chiết siêu âm lớn hơn rõ rệt so với phương pháp chiết hồi lưu. So với phương pháp chiết hồi lưu, chiết siêu âm có nhược điểm là tính chọn lọc kém, dịch chiết thu được lẫn nhiều tạp chất hơn [16]. Tuy nhiên, phương pháp chiết siêu âm vẫn thường được áp dụng bởi một số ưu điểm như thao tác thí nghiệm đơn giản, thiết bị chiết xuất thường quy và được trang bị ở hầu hết các phòng thí nghiệm. Kết quả khảo sát thời gian chiết cho thấy, khi thời gian chiết siêu âm là 60-90 phút thì hàm lượng pentostatin thu được là lớn nhất. Vì vậy, phương pháp chiết siêu âm với thời gian chiết 60 phút được lựa chọn để xử lý mẫu quả thể nấm *C. militaris*.

Lựa chọn tỷ lệ khối lượng được liệu/thể tích dung môi chiết (mg/ml) và số lần chiết: Trong nghiên cứu này, các thí nghiệm được khảo sát trong điều kiện cố định như sau: khối lượng mẫu 0,2 g, phương pháp chiết là siêu âm, thời gian chiết 30 phút. Kết quả nghiên cứu khảo sát tỷ lệ khối lượng được liệu/thể tích dung môi chiết và số lần chiết tới hàm lượng pentostatin thu được được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả khảo sát tỷ lệ khối lượng được liệu/thể tích dung môi chiết (mg/ml) và số lần chiết.

Điều kiện chiết	Khối lượng (g)	Hàm lượng pentostatin trích ly được (%)	Tổng hàm lượng pentostatin trích ly được (%)
0,2 g/5 ml x lần 1	0,2003	0,231±0,002	Sau 2 lần chiết: 0,261%
0,2 g/5 ml x lần 2	0,2003	0,030±0,003	
0,2 g/5 ml x lần 3	0,2003	0,015±0,003	
0,2 g/10 ml x lần 1	0,2034	0,253±0,001	Sau 2 lần chiết: 0,274%
0,2 g/10 ml x lần 2	0,2034	0,021±0,002	
0,2 g/10 ml x lần 3	0,2034	0,003±0,001 [*]	
0,2 g/25 ml x lần 1	0,2112	0,258±0,003	Sau 2 lần chiết: 0,272%
0,2 g/25 ml x lần 2	0,2112	0,014±0,002	

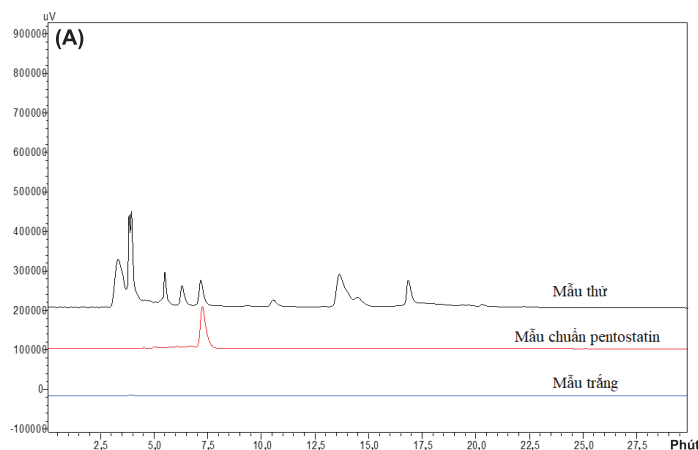
^{*}: dịch chiết được cô cạn và làm đặc lên 10 lần trước khi phân tích HPLC-DAD.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ 0,2 g/10 ml chiết 1 lần cho kết quả hàm lượng pentostatin xác định được là tối ưu (0,253%), tăng khoảng 9,5% so với tỷ lệ 0,2 g/5 ml (0,231%). Khi khảo sát số lần chiết ứng với tỷ lệ 0,2 g/10 ml, sau 2 lần chiết, kết quả hàm lượng pentostatin xác định được là 0,274%, khác biệt không đáng kể so với kết quả thu được sau 3 lần chiết. Kết quả thu được khá tương đồng so với quy trình phân tích đồng thời cordycepin và pentostatin sử dụng tỷ lệ khối lượng mẫu/thể tích dung môi chiết là 0,5 g/50 ml [13]. Tuy nhiên, khi chiết 2 lần, kết quả phân tích pentostatin thu được cao hơn khi chiết 1 lần. Từ đó, nghiên cứu lựa chọn tỷ lệ khối lượng dược liệu/thể tích dung môi chiết là 0,2 g/10 ml và số lần chiết là 2 lần.

Từ các kết quả thu được, nghiên cứu đề xuất quy trình xử lý mẫu quả thể nấm *C. militaris* như sau: cân chính xác 0,2 g bột mẫu thử (qua rây số 180 và đã xác định độ ẩm) vào bình tam giác dung tích 50 ml. Thêm 10 ml nước, tiến hành chiết siêu âm trong 60 phút (công suất 250 w, tần số 50 kHz, nhiệt độ phòng), sau đó để yên 10 phút, lọc qua giấy lọc vào bình định mức 25 ml. Thêm tiếp 10 ml nước vào phần bã được liệu, siêu âm trong 60 phút, sau đó để yên 10 phút và lọc tiếp dịch chiết vào bình định mức 25 ml, bổ sung đến vạch mức bằng nước, lắc đều, thu được dung dịch mẫu thử. Dung dịch mẫu thử được lọc qua màng lọc 0,22 μ m trước khi tiêm vào hệ thống phân tích HPLC-DAD.

Kết quả thẩm định phương pháp phân tích

Độ đặc hiệu của phương pháp: Tiến hành phân tích dung dịch chuẩn, dung dịch mẫu thử (dịch chiết từ quả thể nấm theo quy trình xử lý mẫu đã lựa chọn), dung dịch mẫu trắng (nước cất hai lần đã deion) với các điều kiện sắc ký đã tối ưu hóa được. Kết quả nghiên cứu cho thấy, tín hiệu pic của pentostatin cân đối, sắc nhọn và tách tốt trên nền mẫu thử. Bên cạnh đó, hệ số chồng phổ (Match ratio) của pentostatin mẫu thử so với mẫu chuẩn đều lớn hơn 0,999 (hình 5), đạt yêu cầu theo quy định của AOAC và ICH [12, 15]. Điều này chứng tỏ phương pháp xây dựng đáp ứng yêu cầu về độ đặc hiệu để định lượng pentostatin trong mẫu quả thể nấm *C. militaris*.

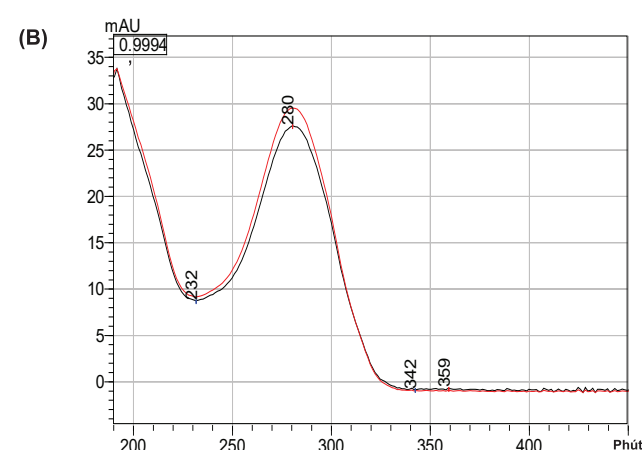


Tính thích hợp của hệ thống: Để đánh giá tính thích hợp của hệ thống, nghiên cứu tiến hành chạy sắc ký 6 lần dung dịch chuẩn pentostatin có nồng độ 62,5 μ g/ml với điều kiện đã khảo sát và ghi lại thời gian lưu và diện tích pic tương ứng. Kết quả cho thấy, các giá trị độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic và thời gian lưu của pentostatin đều nhỏ hơn 2% (bảng 5), đạt yêu cầu so với quy định của AOAC và ICH [12, 15]. Như vậy, các điều kiện sắc ký đã lựa chọn và hệ thống HPLC sử dụng là phù hợp và đảm bảo độ ổn định của phép phân tích định lượng pentostatin.

Bảng 5. Kết quả đánh giá tính thích hợp của hệ thống.

Thứ tự	Thời gian lưu (t_R , phút)	Diện tích pic (S, mAu.s)
1	7,295	987858
2	7,264	992476
3	7,206	977008
4	7,226	981756
5	7,346	1002169
6	7,186	985889
Trung bình	7,254	987859,3
Độ lệch chuẩn (SD)	0,060	8774,560
Độ lệch chuẩn lặp lại (RSD)	0,826	0,888

Độ lặp lại trong ngày và độ lặp lại khác ngày: Đánh giá độ lặp lại trong ngày (ngày 1) được xác định dựa trên kết quả xác định hàm lượng pentostatin của 6 lần chiết và phân tích mẫu thử độc lập (ký hiệu mẫu M1-M6). Độ lặp lại khác ngày (ngày 2) được xác định dựa trên kết quả phân tích hàm lượng pentostatin của 6 lần lặp lại cùng mẫu thử đã phân tích trong ngày 1 (ký hiệu M7-M12). Tiến hành xử lý mẫu và phân tích bằng phương pháp HPLC theo các điều kiện đã tối ưu hóa. Kết quả phân tích ở bảng 6 cho thấy, các giá trị độ lệch chuẩn lặp lại tương đối (% RSD) trong ngày và khác ngày của pentostatin đều đạt yêu cầu theo quy định của AOAC ($RSD\% < 3,7\%$ ứng với mức hàm lượng 0,1% và $RSD\% < 2,7\%$ ứng với mức hàm lượng 1%) [15]. Như vậy, phương pháp phân tích có độ lặp lại đạt yêu cầu đối với pentostatin.



Hình 5. Sắc ký đồ đánh giá tính chọn lọc của phương pháp. (A) Sắc ký đồ HPLC-DAD; (B) So sánh phổ UV của pentostatin trong mẫu thử và mẫu chuẩn.

Bảng 6. Kết quả đánh giá độ lặp lại của phương pháp.

Mẫu	m (mg)	Hàm lượng pentostatin (%)
M1	0,2012	0,271
M2	0,2003	0,275
M3	0,2005	0,274
M4	0,2091	0,268
M5	0,2019	0,273
M6	0,2009	0,277
M7	0,2001	0,278
M8	0,2090	0,273
M9	0,2009	0,267
M10	0,2003	0,272
M11	0,2045	0,273
M12	0,2090	0,282
Trung bình (n=6)		0,273
Trung bình (n=12)		0,274
RSD (n=6)		1,143
RSD (n=12)		1,516

Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ): Phân tích mẫu thử đã được xác định nồng độ pentostatin, sau đó pha loãng dần đến khi trên sắc k đồ của dung dịch thử, tại thời gian lưu của pentostatin, xác định được tỷ lệ S/N=3-4 và S/N=10. Từ đó, nghiên cứu xác định được LOD và LOQ của pentostatin lần lượt là 1,5 và 5,0 µg/ml.

Độ đúng: Độ đúng được đánh giá thông qua hiệu suất thu hồi và được xác định bằng phương pháp thêm chất chuẩn pentostatin vào mẫu quả thể nấm *C. militaris* với 3 mức thêm chuẩn (50, 100 và 150% so với lượng chất pentostatin xác định được trong mẫu thực). Sau đó, tiến hành xử lý mẫu theo quy trình đã trình bày ở trên. Phân tích mẫu quả thể nấm *C. militaris* không thêm chuẩn, từ đó xác định lượng pentostatin tìm lại được và kết quả trình bày trong bảng 7.

Bảng 7. Kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp.

Mẫu	Nồng độ thêm chuẩn theo lý thuyết (mg/ml)	Nồng độ thêm chuẩn tìm lại được (mg/ml)	Hiệu suất thu hồi (%)
Thêm chuẩn mức 50% (1)	11,00	10,35	94,09
Thêm chuẩn mức 50% (2)	11,00	10,38	94,32
Thêm chuẩn mức 50% (3)	11,00	10,51	95,56
Thêm chuẩn mức 100% (1)	22,00	23,27	105,78
Thêm chuẩn mức 100% (2)	22,00	22,27	101,21
Thêm chuẩn mức 100% (3)	22,00	22,37	101,66
Thêm chuẩn mức 150% (1)	34,00	35,48	104,34
Thêm chuẩn mức 150% (2)	34,00	34,84	102,47
Thêm chuẩn mức 150% (3)	34,00	35,25	103,68

Hiệu suất thu hồi của pentostatin ứng với 3 mức thêm chuẩn khác nhau (50, 100 và 150% so với hàm lượng thực tế của pentostatin có trong mẫu thử) xác định được trong khoảng 94,09-105,78%. Theo hướng dẫn của AOAC trên nền mẫu thực phẩm, với mức hàm lượng trên 0,1% thì độ thu hồi cần đạt 95-105% [15]. Theo quy định về độ thu hồi của Hội đồng châu Âu, với mức hàm lượng trên 0,1% thì hiệu suất thu hồi cần đạt 80-110% [14]. Từ các kết quả thu được, chứng tỏ phương pháp xây dựng có độ đúng cao và có thể áp dụng để phân tích định lượng pentostatin trong mẫu nấm đông trùng.

Định lượng pentostatin trong một số mẫu quả thể nấm *C. militaris*

Sử dụng phương pháp đã xây dựng, nghiên cứu này đã tiến hành xác định hàm lượng pentostatin trong một số mẫu quả thể của các chủng nấm *C. militaris* khác nhau bao gồm *C. militaris* SH03, TN01, HL13 và HN01. Các chủng nấm trên đều đã được định danh tới loài và xác định hàm lượng cordycepin trong quả thể [10]. Tuy nhiên, chưa được xác định hàm lượng pentostatin trong quả thể. Kết quả xác định hàm lượng pentostatin trong các mẫu quả thể nghiên cứu được thể hiện trong bảng 8. Các mẫu quả thể nghiên cứu đều cho hàm lượng pentostatin trong quả thể đạt 0,224-0,315%, tương đương với các chủng trên thế giới đã công bố [7]. Tuy nhiên, đây là nghiên cứu đầu tiên xác định hàm lượng pentostatin trong quả thể nấm *C. militaris* nuôi trồng tại Việt Nam.

Bảng 8. Kết quả phân tích pentostatin trong một số mẫu quả thể nấm *C. militaris* (n=3).

Mẫu quả thể chủng nấm	Hàm lượng pentostatin (%)
<i>C. militaris</i> SH03	0,271±0,003
<i>C. militaris</i> TN01	0,224±0,002
<i>C. militaris</i> HL13	0,253±0,004
<i>C. militaris</i> HN01	0,315±0,002

Kết luận

Nghiên cứu đã phát triển được phương pháp HPLC-DAD định lượng pentostatin trong quả thể nấm *C. militaris*. Một số điều kiện xử lý mẫu đã được lựa chọn gồm: dung môi chiết là nước, phương pháp chiết siêu âm trong khoảng thời gian 60 phút, chiết lặp lại 2 lần cho kết quả phân tích hàm lượng pentostatin trong mẫu thử là ổn định và đạt giá trị cao nhất (0,27%). Phương pháp xây dựng đã được thẩm định theo hướng dẫn của ICH và AOAC về tính thích hợp của hệ thống, độ đặc hiệu, độ lặp lại, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng và độ đúng. Giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng của pentostatin lần lượt là 1,5 và 5,0 µg/ml. Hiệu suất thu hồi của pentostatin xác định được trong khoảng 94,09-105,78%.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ về kinh phí từ đề tài của Bộ Khoa học và Công nghệ: Ứng dụng kỹ thuật di truyền trong chọn giống nấm *Cordyceps militaris* mang đơn gen giới tính có năng suất và chất lượng cao phục vụ phát triển một số sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe. Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S.K. Das, M. Masuda, A. Sakurai, M. Sakakibara (2010), “Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: Current state and prospects”, *Fitoterapia*, **81**(8), pp.961-968.
- [2] Chinese Pharmacopoeia Commission (2015), *Pharmacopoeia of The People's Republic of China*, China Medical Science Press, 293pp.
- [3] L. Huang, Q. Li, Y. Chen, et al. (2009), “Determination and analysis of cordycepin and adenosine in the products of *Cordyceps* spp”, *African Journal of Microbiology Research*, **3**(12), pp.957-961.
- [4] Nguyễn Thị Liên Thương, Nguyễn Văn Hiệp, Trịnh Diệp Phương Danh (2016), “Nấm đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris*: Đặc điểm sinh học, giá trị dược liệu và các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình nuôi trồng nấm”, *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, **44**, tr.9-22.
- [5] U.B. Shrestha, K.S. Bawa (2014), “Economic contribution of Chinese caterpillar fungus to the livelihoods of mountain communities in Nepal”, *Biological conservation*, **177**, pp.194-202.
- [6] J.Y. Wu, H.P. Leung, W.Q. Wang, C. Xu (2014), “Mycelial fermentation characteristics and anti-fatigue activities of a Chinese caterpillar fungus, *Ophiocordyceps sinensis* strain Cs-HK1 (Ascomycetes)”, *International Journal of Medicinal Mushrooms*, **16**(2), pp.105-114.
- [7] Y. Xia, F. Luo, Y. Shang (2017), “Fungal cordycepin biosynthesis is coupled with the production of the safeguard molecule pentostatin”, *Cell Chemical Biology*, **24**(12), pp.1479-1489.
- [8] A. Sarvaria, Z. Topp, A. Saven (2016), “Current therapy and new directions in the treatment of hairy cell leukemia a review”, *JAMA Oncology*, **2**(1), pp.123-129.
- [9] Phan Lê Hiền, Hà Minh Hiền (2019), “Nghiên cứu xây dựng quy trình định lượng cordycepin trong đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris* bằng phương pháp HPLC”, *Tạp chí Dược học*, **59**(3), tr.20-23.
- [10] Vũ Xuân Tạo, Trần Bảo Trâm, Nguyễn Thị Mến và cs (2022), “Nghiên cứu xác định gen giới tính MAT, năng suất và hàm lượng cordycepin của một số chủng nấm dược liệu *Cordyceps militaris* đang được nuôi trồng tại Việt Nam”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, **64**(7), tr.60-64.
- [11] C.H. Yoo, M.A. Sadat, W. Kim, et al. (2022), “Comprehensive transcriptomic analysis of *Cordyceps militaris* cultivated on germinated soybeans”, *Mycobiology*, **50**(1), pp.1-11.
- [12] Guideline of ICH Harmonised Tripartite (2005), *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.
- [13] X. Zhao, G. Zhang, C. Li, J. Ling (2019), “Cordycepin and pentostatin biosynthesis gene identified through transcriptome and proteomics analysis of *Cordyceps kyushuensis* Kob”, *Microbiological Research*, **218**, pp.12-21.
- [14] Trần Cao Sơn, Phạm Xuân Đà, Lê Thị Hồng Hào, Nguyễn Thành Trung (2010), *Thẩm định phương pháp trong phân tích hóa học và vi sinh vật*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, 103tr.
- [15] AOAC International (2007), *How to Meet ISO 17025 Requirements for Method Verification, USA*, <https://www.aoac.org/wp-content/uploads/2019/09/ALACC-method-verification.pdf>, accessed March 23, 2023.
- [16] Nguyễn Văn Hân (2017), *Kỹ thuật chiết xuất dược liệu*, Nhà xuất bản Y học, 133tr.

Đặc điểm sinh học và khả năng ức chế của chủng xạ khuẩn *Streptomyces rochei* BT02 đối với vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo xanh

Nguyễn Hoàng Nhật Tân, Hà Thị Trúc Mai, Lương Thị Thùy Dương, Nguyễn Vũ Phong*

Khoa Khoa học Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 16/9/2022; ngày chuyển phản biện 20/9/2022; ngày nhận phản biện 13/10/2022; ngày chấp nhận đăng 17/10/2022

Tóm tắt:

Trong lĩnh vực nông nghiệp, xạ khuẩn là tác nhân phòng trừ sinh học vượt trội trong ức chế sự phát triển các vi sinh vật (VSV) gây bệnh. Dựa vào sổ tay phân loại xạ khuẩn của Dự án Streptomyces Quốc tế (ISP) và trình tự gen 16S-rRNA, chủng xạ khuẩn BT02 được đặt tên là *Streptomyces rochei* BT02. Chủng xạ khuẩn này chứa 2 gen polyketide synthase loại I (*pks-I*) và polyketide synthase loại II (*pks-II*) liên quan đến sự tổng hợp kháng sinh. Kết quả thực nghiệm cho thấy, xạ khuẩn *S. rochei* BT02 phát triển tốt ở nhiệt độ 31°C, 1% muối, pH 7,0, đồng hóa được nhiều nguồn carbon và nitơ khác nhau. *S. rochei* BT02 thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đối với 3 chủng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* thử nghiệm (nồng độ ức chế tối thiểu - MIC là 15 mg/ml). Trong điều kiện nhà lưới, chủng này làm giảm 43,5% chỉ số bệnh héo xanh. Điều đó chứng tỏ *S. rochei* BT02 có thể là một nguồn nguyên liệu đầy hứa hẹn để sản xuất chế phẩm sinh học.

Từ khóa: hoạt tính kháng khuẩn, nồng độ ức chế tối thiểu, polyketide synthase, *Ralstonia solanacearum*, *Streptomyces rochei*.

Chỉ số phân loại: 4.6

Mở đầu

Tại Việt Nam, tính đến năm 2021 giá trị toàn ngành nông nghiệp tăng 2,9%, kim ngạch xuất khẩu đạt 48,6 tỷ USD. Vì vậy, sản xuất nông nghiệp đóng một vai trò vô cùng quan trọng trong nền kinh tế quốc dân với định hướng trở thành một nước nông nghiệp hàng đầu thế giới vào năm 2050. Ở nước ta, ngành rau quả là một trong những nguồn thu nhập chính của nhiều hộ nông dân, trong đó các loại rau họ cà (cà chua, ớt, khoai tây, cà tím) được chú trọng và khuyến khích trồng ở nhiều nơi do nguồn lợi về sức khỏe cũng như giá trị kinh tế mà nó đem lại. Tuy nhiên, nông dân phải đối mặt với nhiều khó khăn liên quan đến bệnh hại như héo rũ gốc mốc trắng (*Sclerotium rolfsii*), bệnh thán thư ớt do nhiều loài thuộc chi *Colletotrichum* và bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* - bệnh đặc trưng của các cây họ cà. Tại các khu vực Đồng bằng sông Cửu Long như huyện Chợ Mới và An Phú tỉnh An Giang, huyện Châu Thành và Chợ Gạo tỉnh Tiền Giang..., bệnh héo xanh gây thiệt hại nặng nề trên các giống ớt trồng và là một trong những vấn đề nan giải đối với người nông dân [1]. Bệnh xuất hiện trên diện rộng và lan ra nhiều vùng gây chết đến hơn 50%, các khoảng không gian bảo của vỏ rễ và các nhu mô mạch trở thành nơi khu trú của chúng làm phá vỡ thành tế bào, tạo điều kiện cho sự lây lan qua hệ thống các mạch dẫn trong cây [2]. Trong mạch xylem, quần thể vi khuẩn nhanh chóng đạt đến mức rất cao, đồng thời với hiện tượng héo và chết cây.

Các nghiên cứu cho thấy, VSV có khả năng sinh kháng sinh - tuy nhiên chất kháng sinh này chỉ có tác dụng chọn lọc với các VSV nhất định, trong đó xạ khuẩn là nhóm những VSV được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi do các chất kháng sinh có nguồn gốc từ xạ khuẩn có phổ kháng khuẩn rộng. Đặc biệt là các loài thuộc chi *Streptomyces* được xem là nguồn sản sinh chất kháng khuẩn nhiều nhất và gần 80% kháng sinh trên thế giới có nguồn gốc từ xạ khuẩn. Trong đất, xạ khuẩn chiếm khoảng 20-40% tổng số VSV, tập trung nhiều ở lớp đất bề mặt. Xạ khuẩn có khả năng sinh tổng hợp nhiều loại enzyme thủy phân có hoạt tính cao, có tiềm năng rất lớn trong việc sinh tổng hợp nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học, phân giải nhiều hợp chất phức tạp, kích thích sự phát triển của cây trồng. Tại Việt Nam đã có một số nghiên cứu sử dụng xạ khuẩn kiểm soát vi khuẩn và nấm bệnh gây hại cây trồng [3, 4], nhưng còn hạn chế đối với vi khuẩn héo xanh. Nghiên cứu này trình bày kết quả định danh, xác định gen liên quan đến khả năng sinh kháng sinh và đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn *R. solanacearum* gây bệnh héo xanh của chủng xạ khuẩn BT02.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Chủng xạ khuẩn BT02 và 3 chủng vi khuẩn *R. solanacearum* (07, 08, 13) gây bệnh héo xanh trên cây ớt được phân lập và lưu trữ ở Phòng Thí nghiệm Sinh học tích hợp thực vật, Khoa Khoa học Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh.

*Tác giả liên hệ: Email: nvphong@hcmuaf.edu.vn

Biological characteristics and ability of *Streptomyces rochei* BT02 to inhibit the *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt disease

Hoang Nhat Tan Nguyen, Thi Truc Mai Ha,
Thi Thuy Duong Luong, Vu Phong Nguyen*

Department of Biological Sciences, Nong Lam University Ho Chi Minh City

Received 16 September 2022; accepted 17 October 2022

Abstract:

In the agricultural field, actinomycetes are outstanding biological control agents to inhibit the growth of pathogenic microorganisms. Based on the manual of bacterial classification of the International Streptomyces Project (ISP) and the 16S-rRNA gene sequence, the actinomycete BT02 strain was named *Streptomyces rochei* BT02. This strain contains two polyketide synthase type I (*pks-I*) and polyketide synthase type II (*pks-II*) genes related to antibiotic synthesis. The result showed that the actinomycetes *S. rochei* BT02 grow well at 31°C, 1% salt, pH 7.0, and assimilate different carbon and nitrogen sources. The *S. rochei* BT02 showed antibacterial activity against three tested strains of *Ralstonia solanacearum* (Minimum inhibitory concentration =15 mg/ml). In greenhouse conditions, this strain reduced 43.5% the wilt disease index. That demonstrated that *S. rochei* BT02 could be a promising source for the production of bioproducts.

Keywords: antibacterial activity, minimum inhibitory concentration, polyketide synthase, *Ralstonia solanacearum*, *Streptomyces rochei*.

Classification number: 4.6

Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát các điều kiện nuôi cấy ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của chủng xạ khuẩn BT02: Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại 4 đĩa petri ở 2 nồng độ pha loãng xạ khuẩn. Ở mỗi nồng độ pha loãng 10^{-3} , 10^{-4} , cấy trải lần lượt trên 2 đĩa môi trường Gause 1 đã điều chỉnh theo yêu cầu từng thí nghiệm [5]. Cấy trải 100 µl dịch xạ khuẩn pha loãng trên môi trường Gause 1, điều chỉnh pH (5, 6, 7, 8, 9 và 10), nồng độ muối (0, 1, 2, 3, 4 và 5%), nhiệt độ (25, 28, 31, 34 và 37°C). Sau 5 ngày ủ mẫu, ghi nhận số lượng khuẩn lạc hình thành (CFU/ml).

Cấy trải 100 µl dịch xạ khuẩn pha loãng trên môi trường ISP9 bổ sung 1% các nguồn carbon gồm D - glucose, D

- maltose, D - sorbitol, D - xylose, D - mannitol, lactose, sucrose hoặc bổ sung 0,1% các nguồn nitrogen gồm NH_4NO_3 , L - tyrosin, peptone, yeast extract. Sau 7 ngày cấy, ghi nhận số lượng khuẩn lạc hình thành và tính mật số xạ khuẩn [6].

Định danh dòng xạ khuẩn dựa vào trình tự gen 16S rRNA: DNA tổng số của xạ khuẩn được tách theo phương pháp [7], đoạn gen 16S-rRNA được khuếch đại bằng PCR sử dụng cặp primer 27F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' và 1492R 5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3' [8]. Chu trình nhiệt gồm các bước 94°C trong 5 phút, 35 chu kỳ (94°C trong 30 giây, 55°C trong 30 giây, 72°C trong 1 phút), 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Kích thước của đoạn DNA thu được sau phản ứng PCR được so sánh với thang DNA chuẩn 1 kb (Thermo Scientific). Sản phẩm PCR được tinh sạch, giải trình tự hai chiều (First Base, Malaysia), hiệu chỉnh và so sánh với trình tự gen sẵn có trên Genbank nhờ công cụ BLAST (www.ncbi.nih.gov) và 16S-based ID (<https://www.ezbiocloud.net>). Phân tích quan hệ di truyền bằng phần mềm MEGAX [9].

Xác định sự hiện diện gen mã hóa *pks-I* và *pks-II* của xạ khuẩn: DNA tổng số của 2 dòng xạ khuẩn được dùng làm khuôn cho phản ứng PCR với các cặp mồi suy biến của PKS-I (K1F 5'-TSA AGT CSA ACA TCG GBC A-3' và M6R 5'-CGC AGG TTS CSG TAC CAG TA-3') [10]; PKS-II (KsaF 5'-TSG CST GCT TGG AYG CSA TC-3' và KsaR 5'-TGG AAN CCG CCG AAB CCG CT-3') [11]. Chu trình nhiệt gồm 95°C trong 5 phút, 35 chu kỳ (95°C trong 60 giây, 64°C (KsaF/KsaR) và 59°C (K1F/M6R) trong 60 giây, 72°C trong 1 phút), chu kỳ cuối ở 72°C trong 7 phút và giữ mẫu ở 4°C; sản phẩm của phản ứng PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1,0%.

Khảo sát khả năng ức chế vi khuẩn *R. solanacearum* của xạ khuẩn: Xạ khuẩn được cấy thành đường giữa đĩa petri trên môi trường NA (peptone 5 g, NaCl 5 g, yeast extract 3 g, agar 20 g), ủ 28°C trong 5 ngày. Sau 5 ngày, cấy 3 chủng vi khuẩn *R. solanacearum* vuông góc với đường cấy xạ khuẩn. Ủ 28°C, trong 24 giờ [12]. Theo dõi sự phát triển của vi khuẩn *R. solanacearum*, xác định khả năng đối kháng của xạ khuẩn BT02.

Đánh giá khả năng sinh enzyme ngoại bào: Cấy xạ khuẩn vào tâm đĩa petri chứa môi trường bổ sung các cơ chất tương ứng (tinh bột tan, CMC, casein agar, Tween 20, huyền phù chitin). Các đĩa petri được đặt ở nhiệt độ phòng. Xác định hoạt tính enzyme bằng cách cho thuốc nhuộm TCA, lugol 1% vào đĩa, sau 2 phút đổ bỏ phần dung dịch thừa và tráng bề mặt agar với nước. Quan sát và đo đường kính vòng phân giải ở các thời điểm 48, 72, 96 và 120 giờ sau cấy. Thí nghiệm kiểm tra khả năng sinh enzyme được tiến hành 2 lần.

Xác định MIC và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) của dịch kháng sinh thô: Xạ khuẩn được nuôi trên môi trường R2YE (sucrose 10,3 g, K₂SO₄ 0,025 g, MgCl₂.6H₂O 1,012 g, glucose 1,0 g, yeast extract 0,5 g) ở 28°C, lắc 150 vòng/phút. Sau 7 ngày, dịch nuôi cấy được ly tâm ở 4.000 vòng/phút, trong 10 phút để loại bỏ sinh khối xạ khuẩn, thu dịch nổi. Dịch nổi được trộn đều với dung môi hữu cơ ethyl acetate tỷ lệ 1:2 trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng, sau đó cô quay thu nhận cặn. Sau khi cân khối lượng, cặn được pha trong DMSO tạo dung dịch gốc 120 mg/ml, từ đó pha loãng thành các nồng độ khác nhau với môi trường Mueller-Hinton broth (MHB). Kháng sinh streptomycin (Sigma) được chuẩn bị theo cách tương tự với nước cất vô trùng.

Thí nghiệm được thực hiện trên đĩa 96 giếng. 100 µl nước vô trùng, DMSO, kháng sinh Streptomycin và dịch kháng sinh thô xạ khuẩn BT02 với nồng độ giảm dần được phân phối vào các giếng. Tiếp theo 100 µl dịch vi khuẩn *R. solanacearum* (mật độ 10⁸ CFU/ml) được thêm vào các giếng. Đĩa thử nghiệm được ủ ở 28°C trong 18 giờ. Sau đó thêm 20 µl dung dịch resazurin 0,01% vào các giếng và ủ tiếp ở 28°C trong 30 phút. Nếu có sự tăng trưởng của vi khuẩn, các giếng sẽ chuyển từ màu vàng sang màu hồng. Giá trị MIC được định nghĩa là nồng độ thấp nhất của dịch kháng sinh thô có thể ức chế hoàn toàn sự tăng trưởng của vi khuẩn [11].

Để xác định nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC), 100 µl mẫu từ các giếng không chuyển sang màu hồng sẽ được trải trên môi trường King' B (peptone 20 g, K₂HPO₄ 1,5 g, MgSO₄.7H₂O 1,5 g, glycerol 10 ml, agar 20 g), ủ ở 28°C. Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của dịch kháng sinh thô được xác định dựa vào sự không xuất hiện của vi khuẩn trên đĩa thạch [13]. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn *R. solanacearum* của xạ khuẩn: Chuẩn bị cây cà chua và vi khuẩn theo mô tả của N. Singh và cs (2018) [14]. Dịch vi khuẩn *R. solanacearum* có mật độ xấp xỉ 10⁸ CFU/ml (OD₆₀₀=1,0) và dịch chiết thô (30 mg/ml) từ xạ khuẩn được sử dụng thử nghiệm.

- Thử nghiệm *in vitro*: Rễ cây cà chua 7 ngày tuổi được lây nhiễm dịch vi khuẩn, sau đó cây con được chuyển vào một ống 1,5 ml. Sau khoảng 5 phút, 1 ml nước cất vô trùng được thêm vào ống. Sự tiến triển của bệnh trên cây cà chua con được theo dõi trong 7 ngày. Các nhóm nghiệm thức gồm (1) Lây nhiễm vi khuẩn; (2) Xử lý dịch chiết xạ khuẩn trước hoặc sau lây nhiễm vi khuẩn 24 giờ; (3) Xử lý bằng nước vô trùng; (4) Xử lý streptomycin trước và sau lây nhiễm vi khuẩn. Mỗi nghiệm thức thực hiện trên 3 cây con, thí nghiệm được lặp lại 2 lần.

- Thử nghiệm nhà lưới: Cây cà chua 28 ngày tuổi được trồng trong chậu với đất khử trùng. 6 nghiệm thức gồm NT1 (lây nhiễm RS13), NT2 (RS13, DITACIN 8SL (chứa

ningnanmycin 1 ml/l), NT3 (RS13, dịch chiết thô), NT4 (nước vô trùng), NT5 (dịch chiết thô, lây nhiễm RS13), NT6 (DITACIN 1 ml/l, RS13). Các nghiệm thức được lặp lại 3 lần với 6 cây mỗi lần lặp lại. Theo dõi tỷ lệ cây bệnh (%) và chỉ số bệnh (%) sau lây nhiễm 7, 14, 21 và 28 ngày. Phân cấp bệnh theo thang đánh giá: cấp 0: không bệnh; cấp 1: có 1-10% lá héo; cấp 2: có 11-30% lá héo; cấp 3: 31- 60%; cấp 4: >60%; cấp 5: tất cả các lá đều héo [15-16].

$$\text{Chỉ số bệnh (\%)} = (x \times nx) / (5 \times N)$$

trong đó nx: số cây nhiễm bệnh cấp x tương ứng; N: tổng số cây điều tra.

Hiệu lực phòng trừ tính theo công thức: [(chỉ số bệnh NT1 - chỉ số bệnh xử lý)/chỉ số bệnh NT1] x 100% [17].

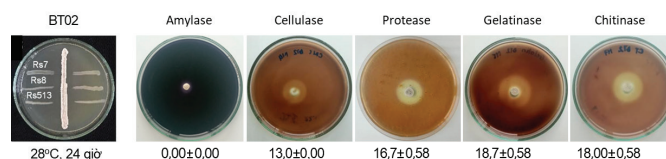
Phân tích số liệu

Sử dụng phần mềm Microsoft Excel 2016 để tổng hợp số liệu, phân tích thống kê theo ANOVA, trắc nghiệm phân hạng bằng XLSTAT 2016 (nếu có). Số liệu được chuyển đổi (nếu cần thiết) đảm bảo phân phối chuẩn trước khi phân tích thống kê.

Kết quả và bàn luận

Khả năng ức chế vi khuẩn *R. solanacearum* và sinh enzyme của *Streptomyces* sp. BT02

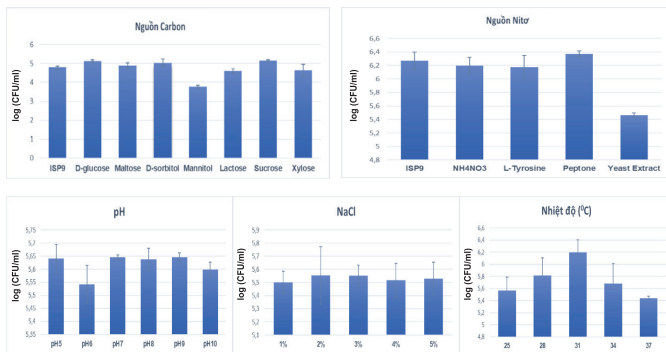
Với phương pháp cấy chữ thập trên môi trường NA, BT02 có khả năng ức chế sự phát triển cả 3 chủng vi khuẩn *R. solanacearum* 07, 08, 13 sau 24 giờ. Bên cạnh đó, BT02 có khả năng sản sinh cellulase (13 mm), protease (16,7 mm), gelatinase (18,7 mm) và chitinase khá cao (18 mm) ở thời điểm 120 giờ sau cấy (hình 1).



Hình 1. Khả năng ức chế vi khuẩn *R. solanacearum* và sinh enzyme của chủng BT02.

Các điều kiện nuôi cấy ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của xạ khuẩn

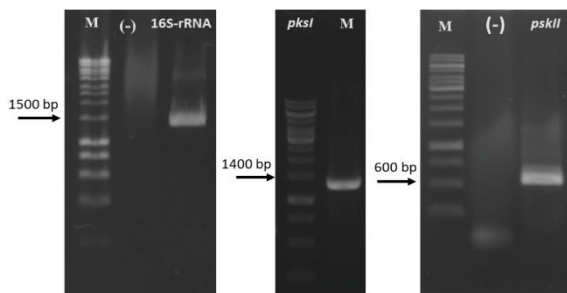
Chủng xạ khuẩn BT02 có khả năng đồng hóa hầu hết các nguồn carbon, trong đó khả năng sử dụng D-glucose, sucrose tốt nhất (kích thước khuẩn lạc lớn và mật độ khuẩn cao), phát triển kém nhất trên môi trường bổ sung mannitol ($p < 0,05$). Chủng xạ khuẩn BT02 có khả năng sử dụng hầu hết các nguồn nitrogen như L-tyrosin, yeast extract, NH₄NO₃ và tốt nhất là peptone ($p < 0,05$). Dòng xạ khuẩn phát triển tốt trong khoảng nhiệt độ 25-34°C (tốt nhất ở 31°C), trong khoảng pH 5,0-10,0 (tốt nhất ở pH 7,0-8,0) và nồng độ muối 1-5% (tốt nhất ở 1%) (hình 2).



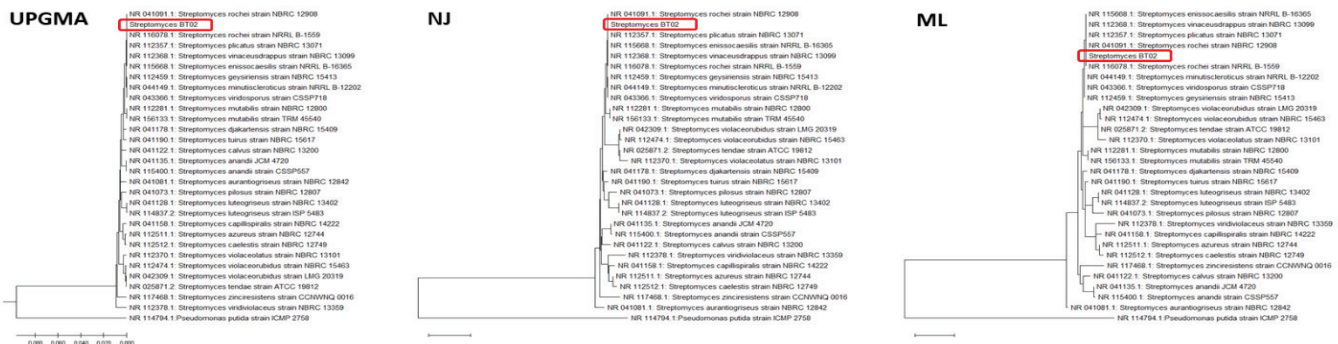
Hình 2. Các điều kiện nuôi cấy ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của xạ khuẩn BT02. Giá trị thể hiện là trung bình của 3 lần lặp lại và độ lệch chuẩn, mỗi thí nghiệm được lặp lại 2 lần.

Định danh dòng xạ khuẩn dựa vào trình tự gen 16S rRNA

Kích thước sản phẩm khuếch đại vùng trình tự 16S-rRNA của dòng xạ khuẩn BT02 khoảng 1.500 bp (hình 3). Trình tự 16S-rRNA của dòng BT02 được so sánh với các loài *Streptomyces* hiện diện trong Genbank bằng BLAST (NCBI) và 16S-based ID (<https://www.ezbiocloud.net>). Kết quả phân tích bằng 3 phương pháp UPGMA, Neighbor Joining và Maximum Likelihood cho thấy BT02 tương đồng 99,97% với *S. rochei* (hình 4). Kết hợp với kết quả so sánh các đặc điểm hình thái, sinh lý theo khóa phân loại ISP và Bergey [5], chủng xạ khuẩn này được đặt tên là *S. rochei* BT02.



Hình 3. Sản phẩm PCR gen 16S rRNA, *pks-I*, *pks-II* của chủng xạ khuẩn BT02. M: ladder 1,5 kb; (-): đối chứng âm.



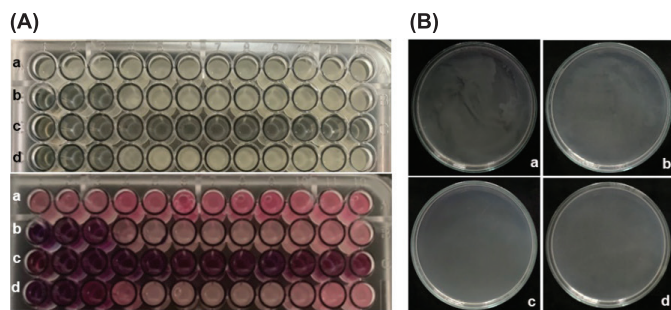
Hình 4. Mối quan hệ di truyền giữa chủng BT02 và các loài *Streptomyces* hiện diện trên Genbank. UPGMA, NJ: Neighbor Joining; ML: Maximum Likelihood. Giá trị bootstrap 1000. *Pseudomonas putida* được sử dụng làm outgroup.

Xác định gen mã hóa *pks-I* và *pks-II* của BT02

Kết quả khuếch đại gen *pks* bằng phản ứng PCR cho một băng DNA duy nhất có kích thước khoảng 1400 bp (*pks-I*) và 600 bp (*pks-II*) (hình 3).

MIC và MBC đối với *R. solanacearum* của dịch kháng sinh thô BT02

Kết quả thử nghiệm MIC đối với 3 chủng *R. solanacearum* 07, 08 và 13 cho thấy, ở nồng độ 15 mg/ml dịch kháng sinh thô của BT02 đã ức chế sự phát triển của vi khuẩn. Tuy vậy, kết quả MBC có sự khác biệt giữa 3 chủng vi khuẩn *Ralstonia* 07, 08, 13 với giá trị lần lượt là 120, 60, 30 mg/ml (hình 5 trình bày kết quả với *R. solanacearum* 13).



Hình 5. Kết quả MIC (A) và MBC (B) của chủng xạ khuẩn BT02 đối với chủng *Ralstonia solanacearum* 13. (A) Nước cất vô trùng (a), DMSO (b), *R. solanacearum* và Streptomycin (c), *R. solanacearum* và BT02 (d); (B) *R. solanacearum* 13 (a), DMSO (b), Streptomycin (c), xạ khuẩn BT02 (d).

Khả năng ức chế in vitro của dịch chiết xạ khuẩn đối với vi khuẩn *R. solanacearum*

Sau khi nhiễm vi khuẩn 72 giờ, cây cà chua con xuất hiện triệu chứng bệnh và héo hoàn toàn ở 7 ngày sau khi chủng bệnh. Ở các nghiệm thức xử lý dịch chiết xạ khuẩn trước (BT02-RS07, BT02-RS08, BT02-RS13) và sau (RS07-BT02, RS08-BT02, RS13-BT02) lây nhiễm vi khuẩn, cây vẫn phát triển bình thường sau 7 ngày lây nhiễm, tương đồng với các nghiệm thức đối chứng Streptomycin (30 mg/ml) (RS07-Streptomycin, RS08-Streptomycin, RS13-

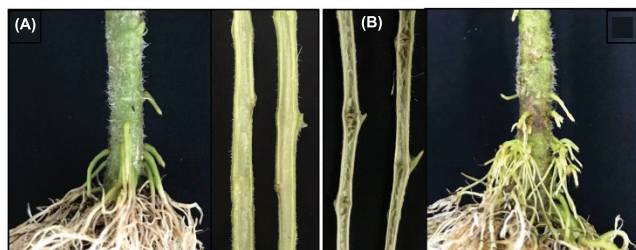
Streptomycin, Streptomycin-RS07, Streptomycin-RS08, Streptomycin-RS13). Kết quả thí nghiệm cho thấy, dịch chiết xạ khuẩn có khả năng hạn chế sự phát triển của vi khuẩn trong điều kiện *in vitro*, tạo tiền đề cho nghiên cứu đối kháng trên cây cà chua điều kiện nhà lưới (hình 6).



Hình 6. Ảnh hưởng của dịch chiết xạ khuẩn BT02 đối với cây cà chua sau 7 ngày lây nhiễm vi khuẩn *R. solanacearum* 13.

Hiệu quả giảm bệnh héo xanh của dịch chiết xạ khuẩn BT02 điều kiện nhà lưới

Bệnh héo xanh xuất hiện ở nghiệm thức đối chứng dương ở 3 ngày sau nhiễm (NSN) vi khuẩn, sớm hơn so với các nghiệm thức xử lý dịch chiết xạ khuẩn và thuốc bảo vệ thực vật sau (7 NSN) hoặc trước (14 NSN) lây nhiễm vi khuẩn. Các cây xanh tươi bị héo đột ngột vào ban ngày nhất là buổi chiều, vào ban đêm và đầu buổi sáng cây xanh lại nếu bệnh còn nhẹ (7 và 14 NSN), nhưng các nhánh lá sẽ chết héo khi đã bị nặng. Từ thời điểm 21 NSN (cây 49 ngày tuổi - đang thời kỳ ra hoa) biểu hiện bệnh của cây xuất hiện một cách rõ ràng hơn. Thân thối mềm vì bó mạch đã bị tắc nghẽn và phân hủy thúc đẩy hình thành nhiều rễ phụ khí sinh mọc ra dọc trên thân và rễ (hình 7).



Hình 7. Rễ và bó mạch cây cà chua ở 28 NSN. (A) Cây bình thường; (B) Cây bị héo xanh vi khuẩn.

Ở 28 NSN, các chỉ tiêu bao gồm chiều cao cây, đường kính cây, số lá, số nhánh và số hoa đều không có khác biệt (số liệu không trình bày). Riêng sinh khối rễ trung bình của cây cà chua ở nghiệm thức lây nhiễm vi khuẩn thấp nhất (11,07 g/cây). Tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh ở các nghiệm thức xử lý dịch chiết xạ khuẩn và thuốc bảo vệ thực vật đều thấp có ý nghĩa so với đối chứng dương lây nhiễm xạ khuẩn. Hiệu quả giảm bệnh của dịch chiết thô xạ khuẩn đạt 43,5 và 28,3% trước và sau khi lây nhiễm vi khuẩn *R. solanacearum* 13 (bảng 1).

Bảng 1. Hiệu quả giảm bệnh héo xanh trên cây cà chua của dịch chiết xạ khuẩn BT02 ở 28 NSN.

Nghiệm thức	Sinh khối rễ tươi (g/cây)	Tỷ lệ bệnh (%)	Chỉ số bệnh (%)	Hiệu quả giảm bệnh (%)
Rs13 (+)	11,07±4,64 ^b	36,39±21,28 ^a	51,11	-
Rs13-DITACIN	14,88±7,63 ^{ab}	15,99±20,49 ^b	24,44	52,2
Rs13-BT02	14,82±7,73 ^{ab}	20,56±11,41 ^b	36,67	28,3
Nước (-)	15,44±6,85 ^{ab}	0,00±0,00 ^c	0,0	-
BT02-Rs13	14,73±6,42 ^{ab}	12,22±11,78 ^{bc}	28,89	43,5
DITACIN-Rs13	18,20±6,57 ^a	17,62±13,34 ^b	32,22	40,0

Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có kí tự theo sau khác nhau thì có sự khác biệt về mặt thống kê ($p < 0,05$).

Trong nghiên cứu này, chủng xạ khuẩn BT02 ức chế sinh trưởng 3 chủng *R. solanacearum* gây bệnh héo xanh trên ớt [18] ở điều kiện *in vitro*. Chủng xạ khuẩn này cũng thể hiện khả năng sinh các enzyme phân giải như cellulase, protease, gelatinase và chitinase ở mức khá cao. Đây là những enzyme có khả năng tác động đến màng tế bào vi khuẩn gây bệnh thực vật, giảm tỷ lệ bệnh và thúc đẩy tăng trưởng thực vật [19]. Polyketide là những chất chuyển hóa thứ cấp đa dạng về cấu trúc đã được ứng dụng rộng rãi trong dược phẩm, đặc biệt là kháng sinh. Theo O. Cédric và cs (2013) [20], enzyme polyketide synthase II (PKS-II) tham gia tổng hợp cấu trúc cơ bản chuỗi polyketide và polyketide synthase I (PKS-I) chịu trách nhiệm tạo khung polyketide hoàn chỉnh. Chủng BT02 mang 2 gen *pkcs-I* và *pkcs-II* qua kết quả phân tích PCR, điều này chứng tỏ chủng vi khuẩn này có tiềm năng trong tổng hợp các chất kháng sinh, cần được nghiên cứu làm rõ.

Sự tổng hợp các chất cao phân tử ngoại bào (Extracellular polymeric substances) và các protein khác nhau của *R. solanacearum* được cho là nguyên nhân hình thành màng gây tắc nghẽn xylem thực vật, là một trong những yếu tố có lợi cho độc lực gây bệnh [21]. Một nghiên cứu báo cáo các chất chuyển hóa từ *Streptomyces californicus* đã ức chế hơn 90% màng sinh học từ *S. aureus* [22] và 4 chủng *Streptomyces* sp. ức chế hơn 80% màng sinh học từ *R. solanacearum* giúp giảm tỷ lệ bệnh trên cây cà chua [23].

Trong nghiên cứu này, dịch kháng sinh thô BT02 đã làm chậm thời gian xuất hiện triệu chứng héo xanh và giảm đến 43,5% chỉ số bệnh héo xanh vi khuẩn khi xử lý trước khi nhiễm vi khuẩn cây cà chua, tương đương với đối chứng là hoạt chất sinh học ningnanmycin. Xạ khuẩn *S. rochei* được xếp vào nhóm VSV có độ an toàn sinh học mức 2/4 theo Hướng dẫn số 90/679/EWG của Cộng đồng châu Âu về an toàn sinh học. Kết quả này hứa hẹn khả năng phòng ngừa bệnh héo xanh vi khuẩn trên các loại cây trồng, cần có các nghiên cứu ở quy mô đồng ruộng và trên các loại cây trồng khác.

Kết luận

Chủng xạ khuẩn BT02 có khả năng sinh các enzyme ngoại bào như lipase, protease, chitinase cao. Chủng xạ khuẩn sinh trưởng tốt ở 31°C, 1% muối, pH 7-10, có khả năng đồng hoá nhiều nguồn carbon và nitrogen khác nhau. Dựa vào trình tự 16S-rRNA, đặc điểm hình thái, đặc điểm hóa sinh, chủng xạ khuẩn BT02 được xác định thuộc loài *S. rochei*. Chủng BT02 mang 2 gen *pks-I* và *pks-II* có nồng độ ức chế tối thiểu MIC là 15 mg/ml đối với 3 dòng vi khuẩn *R. solanacearum*. Chủng BT02 có khả năng giúp giảm 43,5% bệnh héo xanh trên cây cà chua trong điều kiện nhà lưới, cho thấy xạ khuẩn rất có tiềm năng phát triển chế phẩm sinh học bảo vệ thực vật. Cần nghiên cứu khả năng thúc đẩy tăng trưởng thực vật, các hợp chất có hoạt tính diệt khuẩn và khả năng phòng trừ bệnh điều kiện đồng ruộng để phát triển sản phẩm sinh học quản lý bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây trồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Võ Thị Bích Thủy, Trần Thị Ba, Lê Thị Bích Trâm (2016), “Khảo sát đặc điểm hình thái, năng suất và khả năng chống chịu bệnh héo xanh vi khuẩn (*Ralstonia solanacearum*) trên 12 giống ớt (*Capsicum* spp.)”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, **11**, tr.117-125.
- [2] J. Vasse, P. Frey, A. Trigalet (1995), “Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*”, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **8**(2), pp.241-251.
- [3] Nguyễn Thị Phong Lan, Võ Thị Thu Ngân, Trần Phước Lộc, Trần Hà Anh (2015), “Tuyển chọn các chủng xạ khuẩn (*Streptomyces* spp.) đối kháng nấm *Pyricularia grisea* gây bệnh đạo ôn hại lúa”, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, **13**(8), tr.1442-1451.
- [4] Lê Minh Tường, Ngô Thành Trí, Nguyễn Hồng Quý (2018), “Định danh xạ khuẩn có khả năng ức chế nấm *Fusarium solani* gây bệnh vàng lá thối rễ cây có múi”, *Tạp chí Bảo vệ Thực vật*, **4**, tr.38-42.
- [5] T. Stanley, M.E. Williams, J.G. Sharpe (1989), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams & Wilkins, pp.2452-2492.
- [6] L. Maturin, J.T. Peeler (2001), *BAM: Aerobic Plate Count Bacteriological Analytical Manual Chapter 3 Aerobic Plate Count*, 8th Edition, Silver Spring.
- [7] J. Sambrook, D. Russell (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd, Cold Spring Harbor Laboratory.
- [8] J. Li, G.Z. Zhao, H.Y. Huang, et al. (2012), “Isolation and characterization of culturable endophytic actinobacteria associated with *Artemisia annua* L.”, *Antonia Van Leeuwenhoek*, **101**(3), pp.515-527.
- [9] S. Kumar, G. Stecher, M. Li, et al. (2018), “MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms”, *Molecular Biology and Evolution*, **35**(6), pp.1547-1549.
- [10] A.A. Sacido, O. Genilloud (2005), “New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: Detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups”, *Microb. Ecol.*, **49**(1), pp.10-24.
- [11] M.M. Ketela, V. Salo, L. Halo, et al. (1999), “An efficient approach for screening minimal PKS genes from *Streptomyces* FEMS Microbiol. Lett., **180**(1), pp.1-6.
- [12] T.D. Brock, M.T. Madigan, J.M. Martinko, J. Parker (1994), *Biology of Microorganisms*, 7th Edition, Englewood Cliffs, Prentice, Hall, International Inc.
- [13] I. Wiegand, K. Hilpert, R.E. Hancock (2008), “Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances”, *Nature Protocols*, **3**(2), pp.163-175.
- [14] N. Singh, R. Kumar, S.K. Ray (2018), “An innovative approach to study *Ralstonia solanacearum* pathogenicity in 6 to 7 days old tomato seedlings by root dip inoculation”, *Bio-Protocol*, **8**(21), DOI: 10.21769/BioProtoc.3065.
- [15] E.M. Ateka, A.W. Mwang'ombe, J.W. Kimenju (2001), “Reaction of potato cultivars to *Ralstonia solanacearum* in Kenya”, *African Crop Science Journal*, **9**(1), pp.251-256.
- [16] J. Arwiyanto, M. Goto, S. Tsuyumu, Y. Takikawa (1994), *Biological Control of Bacterial Wilt of Tomato (*Lycopersicon esculenta*) by an Avirulent Strain of *Pseudomonas solanacearum* Isolated from *Strelitzia reginae**, Annals of The Phytopathological Society of Japan.
- [17] X. Zhuang, C. Gao, C. Peng, et al. (2020), “Characterization of a novel endophytic actinomycete, *Streptomyces physcomitrii* sp. nov., and its biocontrol potential against *Ralstonia solanacearum* on tomato”, *Microorganisms*, **8**(12), DOI: 10.3390/microorganisms8122025.
- [18] Đỗ Thị Thanh Trang, Nguyễn Thanh Phong, Châu Thị Thanh Thảo và cs (2021), “Đặc điểm vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Smith gây bệnh héo xanh trên cây ớt”, *Kỷ yếu Hội thảo quốc gia bệnh hại thực vật Việt Nam*, tr.124-132.
- [19] N. Amaresan, V. Jayakumar, K. Kumar, N. Thajuddin (2019), “Biocontrol and plant growth-promoting ability of plant-associated bacteria from tomato (*Lycopersicon esculentum*) under field condition”, *Microbial pathogenesis*, **136**, DOI: 10.1016/j.micpath.2019.103713.
- [20] O. Cédric, S. Carlson, B. Kaushal, et al. (2013), “Tool for characterizing bacterial protein synthesis inhibitors”, *Antimicrob Agent Chemother*, **57**(12), pp.5994-6004.
- [21] P. Saxena, Y. Joshi, K. Rawat, R. Bisht (2019), “Biofilms: Architecture, resistance, quorum sensing and control mechanisms”, *Indian J. Microbiol.*, **59**, pp.3-12.
- [22] R. Singh, A.K. Dubey (2020), “Isolation and characterization of a new endophytic actinobacterium *Streptomyces californicus* strain adr1 as a promising source of anti-bacterial, anti-biofilm and antioxidant metabolites”, *Microorganisms*, **8**(6), DOI: 10.3390/microorganisms8060929.
- [23] M. Kaari, J. Joseph, R. Manikkam, et al. (2022), “Anti-biofilm activity and biocontrol potential of *Streptomyces* cultures against *Ralstonia solanacearum* on tomato plants”, *Indian Journal of Microbiology*, **62**(1), pp.32-39.

QUY ĐỊNH VỀ BÀI BÁO ĐĂNG TẢI TRÊN TẠP CHÍ

Yêu cầu chung

Bài báo gửi đăng trên Tạp chí phải là bài báo nguyên thủy (chưa được công bố trước đó). Tác giả không được gửi đăng bài báo trên các tạp chí khác cho đến khi có quyết định xét duyệt của Ban Biên tập.

Bài báo dài không quá 10 trang (bao gồm cả bảng biểu, ghi chú, tài liệu tham khảo và phụ lục); font chữ: Times New Roman; cỡ chữ 13; khổ giấy A4, lề trên 2 cm, lề dưới 2 cm, lề trái 3 cm, lề phải 2 cm.

Bài báo gửi qua Hệ thống gửi bài trực tuyến tại địa chỉ https://b.vjst.vn/index.php/ban_b/about/submissions hoặc có thể gửi trực tiếp đến Tạp chí (Phòng 507, số 113 Trần Duy Hưng, phường Trung Hòa, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam) hoặc qua hòm thư điện tử: khoahocvacaongnghevietnam@most.gov.vn.

Cấu trúc của các loại bài báo khác nhau có thể thay đổi tùy theo loại hình nghiên cứu và nội dung của bài báo. Sau đây là chi tiết các thành phần chính của bài báo.

Tên bài báo

- Tên bài báo được viết bằng tiếng Việt và tiếng Anh, trên trang đầu của bài báo, in đậm, không gạch chân hay viết nghiêng.
- Tên bài báo phải ngắn gọn, rõ ràng và phù hợp với nội dung bài báo.
- Phía dưới tên bài báo là tên tác giả không viết chức danh và học hàm, học vị. Nếu có nhiều tác giả làm việc ở các cơ quan khác nhau thì tên tác giả được đánh số ^(1,2,...) ở phía trên. Dấu hoa thị (*) chỉ tác giả liên hệ, được viết ở cuối trang đầu tiên của bài báo.
- Khi liệt kê cơ quan công tác của tác giả, cần nêu rõ tên cơ quan và địa chỉ cơ quan (số nhà, tên đường, phường, quận, thành phố, quốc gia) bằng tiếng Việt và tiếng Anh.

Tóm tắt

Tóm tắt bằng tiếng Việt và tiếng Anh (khoảng 160-250 từ). Nêu được mục đích, phương pháp nghiên cứu chính, kết quả nghiên cứu và kết luận chủ yếu. Từ khóa bằng cả tiếng Việt và tiếng Anh theo thứ tự alphabet (ít nhất 3 từ khóa). Chỉ số phân loại (theo hướng dẫn).

1. Đặt vấn đề/Dẫn nhập/Mở đầu

Định nghĩa vấn đề; tóm lược vấn đề nghiên cứu đã được công bố trong và ngoài nước, nêu mục tiêu nghiên cứu và giải thích sự lựa chọn đề tài và mục tiêu nghiên cứu để thấy được tính thời sự, tính khoa học và sự cần thiết của vấn đề nghiên cứu.

2. Đối tượng/Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu cần trình bày tiêu chuẩn lựa chọn, đặc điểm đối tượng nghiên cứu. Phương pháp nghiên cứu cần nêu rõ cách tiếp cận nghiên cứu, loại hình nghiên cứu, phương pháp đo lường, công thức tính cỡ mẫu, phương pháp xử lý số liệu, mô tả kỹ các kỹ thuật tiến hành trong nghiên cứu; các quan điểm, lập luận, ý kiến tranh luận, các dẫn chứng...

3. Kết quả

Trình bày đầy đủ, khách quan các kết quả thu được sau nghiên cứu, các kết quả này phải phục vụ cho mục tiêu nghiên cứu. Các số liệu phải chính xác và khớp với nhau.

Phân kết quả nghiên cứu chỉ trình bày các kết quả nghiên cứu của đề tài, không giải thích, so sánh và bàn luận.

4. Bàn luận (phần này có thể gộp với phần kết quả)

Chủ yếu bàn luận các vấn đề liên quan đến mục tiêu đề tài. Nhận xét, đánh giá một cách khách quan các kết quả nghiên cứu, có so sánh với các tác giả khác để khẳng định hoặc phủ định những hiểu biết đã có, qua đó nêu được những điểm mới và đóng góp của đề tài. Dự báo hướng nghiên cứu tiếp và khả năng ứng dụng các kết quả nghiên cứu vào thực tiễn.

5. Kết luận

Nêu kết quả nghiên cứu chủ yếu của đề tài có tính khái quát liên quan đến mục tiêu nghiên cứu, đề xuất các vấn đề tiếp tục nghiên cứu.

LỜI CẢM ƠN (nếu có)

Tác giả cảm ơn các tổ chức/cá nhân đã tài trợ kinh phí hoặc hỗ trợ cho nghiên cứu.

Phụ lục (nếu có)

Đăng tải bảng số liệu, thông tin để hỗ trợ thêm cho nội dung bài báo.

Chú thích và tài liệu tham khảo

Chú thích được đánh số theo thứ tự xuất hiện ^(1, 2, 3,...) và được trình bày ngay ở cuối trang viết (footnote). Các tài liệu tham khảo được đánh số theo thứ tự xuất hiện để chỉ dẫn chúng được trích dẫn ở đâu trong bài báo. Số thứ tự được đánh trong ngoặc vuông, ví dụ: [3] với một hoặc [2, 5, 7-9] với nhiều số chỉ dẫn.

- Lưu ý:
- Đối với trích dẫn trong bài báo: tài liệu tham khảo có nhiều hơn một tác giả chỉ để tên tác giả đầu tiên và cộng sự, viết tắt là cs, ví dụ: T.V. Nguyen và cs (năm xuất bản) [thứ tự trong danh mục tài liệu tham khảo].
 - Đối với danh mục tài liệu tham khảo cuối bài: tài liệu tham khảo bằng tiếng Anh, các tài liệu không phải tiếng Anh cần được dịch sang tiếng Anh và chú thích ở cuối câu, ví dụ: (in Vietnamese), (in French)...
 - Tài liệu tham khảo là các đường link cần bổ sung ngày truy cập.

Tác giả (Năm xuất bản), "Tên tài liệu được trích dẫn", *Tên nguồn*, **tập(số)**, trang/số trang/trang đầu-trang cuối (nếu có), số DOI (nếu có), URL (nếu có), ngày truy cập (ghi rõ ngôn ngữ nào nếu không phải tài liệu bằng tiếng Anh).

Tác giả: là tác giả/các tác giả của tài liệu được tham khảo, trích dẫn: liệt kê đầy đủ tên tác giả (chữ viết tắt đưa lên trước) với những tài liệu tham khảo có ≤3 tác giả; liệt kê 3 tác giả đầu tiên và theo sau là "et al." khi có từ 4 tác giả trở lên.

Năm xuất bản: năm xuất bản của tài liệu được tham khảo, trích dẫn.

Tên tài liệu được trích dẫn: là tên bài báo, chương/phần sách... (chỉ viết hoa chữ cái đầu, trừ tên riêng và sau dấu hai chấm), viết trong ngoặc kép.

Tên nguồn có thể là tên tạp chí, tên sách, hay tên tài liệu gốc của tài liệu được trích dẫn (phần này được *in nghiêng*), viết hoa chữ cái đầu tiên của mỗi từ chính.

Tập(số): dành cho nguồn trích là tạp chí, sách hoặc các xuất bản phẩm khác (phần này **in đậm**).

Trang/số trang/trang đầu-trang cuối phản ánh nơi cư trú của tài liệu được trích dẫn trong tài liệu nguồn.

Nếu có ≥2 tài liệu tham khảo do cùng tác giả đầu tiên và cùng năm công bố, thì các tài liệu tham khảo này cần được đánh dấu a, b... sau năm xuất bản (ví dụ: 1986a, 1986b...).

Nếu có một số tài liệu tham khảo có cùng 1 bài báo được trích dẫn có số trang khác nhau thì cần trích dẫn thêm số trang, ví dụ: A. Amber (1982, p.39).

Chi tiết vui lòng xem thêm tại: https://b.vjst.vn/index.php/ban_b/quy-dinh-bai-viet.

Các yêu cầu khác

- Bài viết không đạt yêu cầu, Toà soạn không trả lại bản thảo.
- Bài viết chỉ được đăng khi phản biện nhận xét về chất lượng bài báo đồng ý cho đăng.
- Bản quyền: tác giả đồng ý trao bản quyền bài viết (bao gồm cả phần tóm tắt) cho Ban Biên tập Tạp chí.

Quy định này áp dụng từ năm 2022 trở đi.

PHÂN LOẠI LĨNH VỰC KHOA HỌC

1. Khoa học tự nhiên

- 1.1. Toán học và thống kê
- 1.2. Khoa học máy tính và thông tin
- 1.3. Vật lý
- 1.4. Hóa học
- 1.5. Khoa học trái đất và môi trường
- 1.6. Khoa học sự sống
- 1.7. Khoa học nano
- 1.8. Khoa học tính toán
- 1.9. Các lĩnh vực khác của khoa học tự nhiên

2. Khoa học kỹ thuật và công nghệ

- 2.1. Kỹ thuật dân dụng; kỹ thuật kiến trúc; kỹ thuật xây dựng; kỹ thuật kết cấu và đô thị; kỹ thuật giao thông vận tải; kỹ thuật thủy lợi; kỹ thuật địa chất công trình
- 2.2. Kỹ thuật điện, kỹ thuật điện tử, kỹ thuật thông tin
- 2.3. Kỹ thuật cơ khí, chế tạo máy
- 2.4. Kỹ thuật hóa học
- 2.5. Kỹ thuật vật liệu và luyện kim
- 2.6. Kỹ thuật y học
- 2.7. Kỹ thuật môi trường
- 2.8. Công nghệ sinh học công nghiệp
- 2.9. Công nghệ nano
- 2.10. Kỹ thuật thực phẩm và đồ uống
- 2.11. Các lĩnh vực khác của khoa học kỹ thuật và công nghệ

3. Khoa học y - dược

- 3.1. Y học cơ sở
- 3.2. Y học lâm sàng
- 3.3. Y học dự phòng
- 3.4. Dược học
- 3.5. Các lĩnh vực khác của khoa học y - dược

4. Khoa học nông nghiệp

- 4.1. Trồng trọt
- 4.2. Chăn nuôi
- 4.3. Thú y
- 4.4. Lâm nghiệp
- 4.5. Thủy sản
- 4.6. Công nghệ sinh học trong nông nghiệp, thủy sản
- 4.7. Các lĩnh vực khác của khoa học nông nghiệp

5. Khoa học xã hội và nhân văn

- 5.1. Tâm lý học
- 5.2. Kinh tế và kinh doanh
- 5.3. Khoa học giáo dục
- 5.4. Xã hội học
- 5.5. Pháp luật
- 5.6. Khoa học chính trị
- 5.7. Địa lý kinh tế và xã hội
- 5.8. Thông tin đại chúng và truyền thông
- 5.9. Lịch sử và khảo cổ học
- 5.10. Ngôn ngữ học và văn học
- 5.11. Triết học, đạo đức và tôn giáo
- 5.12. Nghiên cứu về khu vực và quốc tế
- 5.13. Các lĩnh vực khác của khoa học xã hội và nhân văn

Phát hiện đột biến mới trên gen *OCA2* và chẩn đoán di truyền tiền làm tổ bệnh bạch tạng tuýp 2 (oculocutaneous albinism 2 - *OCA2*).

Triệu Tiến Sang, Trần Văn Khoa, Nguyễn Văn Phong, Lê Trọng Tuấn, Lê Văn Hải

Tỷ lệ mang liên cầu nhóm B và kết quả thai kỳ ở sản phụ sinh tại Bệnh viện Phụ sản Hà Nội.

Phạm Thu Trang, Phạm Thị Thanh Hiền, Đỗ Tuấn Đạt, Dương Thị Trà Giang

Nghiên cứu sự kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn gram âm gây nhiễm khuẩn đường tiết niệu phân lập tại Bệnh viện Hữu nghị Đa khoa Nghệ An.

Quế Anh Trâm

Đặc điểm các biến dạng ở mũi trên bệnh nhân khe hở môi một bên, ứng dụng trong phẫu thuật tạo hình mũi tại Bệnh viện Chợ Rẫy.

Lê Hoàng Vĩnh, Trần Việt Luân, Đỗ Quang Hùng

Đánh giá kết quả sớm điều trị nang tuyến vú bằng vi sóng tại Bệnh viện Chợ Rẫy.

Huỳnh Quang Khánh, Nguyễn Thành Phát

Đánh giá ban đầu một số kết quả sau phục hình cầu - chụp - pivot cố định tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 từ tháng 4/2020 đến tháng 10/2021.

Đinh Xuân Thụ, Nguyễn Thị Tuyết, Nguyễn Điện Biên

Nghiên cứu bào chế viên ngậm chứa cao Đẳng sâm (*Codonopsis javanica* (Blume) Hook. f. & Thomson).

Phạm Thị Diệu Như, Đỗ Quang Dương, Nguyễn Đức Hạnh

Nghiên cứu bào chế hydrogel chứa vi nhũ tương ibuprofen dùng trên da.

Hồ Hoàng Nhân, Hoàng Thị Ngọc Duyên

Áp dụng hướng dẫn EP15A3 của CLSI trong xác nhận phương pháp định lượng glucose máu bằng máy Accu-chek Inform II.

Lê Hoàng Bích Nga, Trần Thị Thuý Quỳnh, Lê Lâm Kiều Oanh, Nguyễn Thị Ngọc Lan

Đặc điểm nông học và đa dạng di truyền của các dòng ngô ngọt ôn đới và nhiệt đới tự phối S4 mới phát triển.

Nguyễn Trung Đức, Nguyễn Thị Nguyệt Anh, Phạm Quang Tuấn, Vũ Văn Liết

Ảnh hưởng của cao chiết vỏ quế (*Cinnamomum verum*) lên tăng trưởng và khả năng bảo vệ cá rô phi (*Oreochromis spp.*) kháng lại vi khuẩn *Streptococcus agalactiae*.

Nguyễn Thị Trúc Quyên, Đoàn Văn Cường, Mã Tú Lan, Nguyễn Thành Nhân, Từ Thanh Dung, Nguyễn Thị Ngọc Tĩnh

Phát triển phương pháp HPLC-DAD định lượng pentostatin trong quả thể nấm dược liệu *Cordyceps militaris*.

Vũ Xuân Tạo, Nguyễn Thị Hà Ly, Trần Bảo Trâm, Nguyễn Đức Duy, Nguyễn Thảo Nhi, Nguyễn Thị Thanh Mai, Đào Ngọc Ánh, Trần Văn Tuấn

Đặc điểm sinh học và khả năng ức chế của chủng xạ khuẩn *Streptomyces rochei* BT02 đối với vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo xanh.

Nguyễn Hoàng Nhật Tân, Hà Thị Trúc Mai, Lương Thị Thùy Dương, Nguyễn Vũ Phong

1 A novel mutation on *OCA2* gene detection and preimplantation genetic diagnosis for oculocutaneous albinism type 2 (*OCA2*).

Tien Sang Trieu, Van Khoa Tran, Van Phong Nguyen, Trong Tuan Le, Van Hai Le

8 Prevalence of group B streptococcus colonisation and pregnancy outcomes of pregnant women at Hanoi Obstetrics and Gynecology Hospital.

Thu Trang Pham, Thi Thanh Hien Pham, Tuan Dat Do, Thi Tra Giang Duong

12 Research of antibiotics resistance of gram-negative bacteria strains causing urinary tract infections isolated at Nghe An Friendship General Hospital.

Anh Tram Que

17 Unilateral cleft lip anatomy combined with nasal deformities for clinical application in rhinoplasty at Cho Ray Hospital.

Hoang Vinh Le, Viet Luan Tran, Quang Hung Do

21 Breast cyst microwave ablation: Early treatment result assessment at Cho Ray Hospital.

Quang Khanh Huynh, Thanh Phat Nguyen

26 Initial evaluation of some results after fixed spherical-capture-pivot restorations at the 108 Military Central Hospital from April 2020 to October 2021.

Xuan Thu Dinh, Thi Tuyet Nguyen, Dien Bien Nguyen

30 Development of lozenges containing extract of *Codonopsis javanica* (Blume) Hook. f. & Thomson.

Thi Dieu Nhu Pham, Quang Duong Do, Duc Hanh Nguyen

36 Formulation of ibuprofen-loaded microemulsion-based hydrogel for topical administration.

Hoang Nhan Ho, Thi Ngoc Duyen Hoang

43 Application of CLSI's EP15A3 guideline in Accu-chek Inform II method verification.

Hoang Bich Nga Le, Thi Thuy Quynh Tran, Lam Kieu Oanh Le, Thi Ngoc Lan Nguyen

47 Agronomic performance and genetic diversity of newly developed S4 temperate and tropical sweet corn lines.

Trung Duc Nguyen, Thi Nguyet Anh Nguyen, Quang Tuan Pham, Van Liet Vu

53 Effect of cinnamon (*Cinnamomum verum*) extracts on the growth and protection ability of tilapia (*Oreochromis spp.*) against *Streptococcus agalactiae*.

Thi Truc Quyen Nguyen, Van Cuong Doan, Tu Lan Ma, Thanh Nhan Nguyen, Thanh Dung Tu, Thi Ngoc Tinh Nguyen

60 Development of HPLC-DAD method for the quantification of pentostatin in the fruiting body of *Cordyceps militaris*.

Xuan Tao Vu, Thi Ha Ly Nguyen, Bao Tram Tran, Duc Duy Nguyen, Thao Nhi Nguyen, Thi Thanh Mai Nguyen, Ngoc Anh Dao, Van Tuan Tran

67 Biological characteristics and ability of *Streptomyces rochei* BT02 to inhibit the *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt disease.

Hoang Nhat Tan Nguyen, Thi Truc Mai Ha, Thi Thuy Duong Luong, Vu Phong Nguyen