ISSN 1859-4794

TẠP CHÍ

KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ Việt Nam

Vietnam Journal of Science and Technology - MOST

B

Tập 63 - Số 9 - Tháng 9 năm 2021

TẠP CHÍ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

Tập 63 - Số 9 - Tháng 9 năm 2021

HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP

Nguyễn Văn Hiệu - *Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

Nguyễn Việt Anh - *Trường Đại học Xây dựng*

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

Vũ Dũng - *Hội Tâm lý học Việt Nam*

Trần Thọ Đạt - *Trường Đại học Kinh tế Quốc dân*

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

Vũ Minh Giang - *Đại học Quốc gia Hà Nội*

Trương Nam Hải - *Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

Từ Quang Hiển - *Trường Đại học Nông lâm Thái Nguyên*

Phạm Huy Khang - *Trường Đại học Giao thông Vận tải*

Phạm Gia Khánh - *Chủ tịch Hội Ghép tạng Việt Nam*

Hồ Đắc Lộc - *Trường Đại học Kỹ thuật Công nghệ TP Hồ Chí Minh*

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

Bành Tiến Long - *Trường Đại học Bách khoa Hà Nội*

Lê Quan Nghiệm - *Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh*

Mai Trọng Nhuận - *Đại học Quốc gia Hà Nội*

Nguyễn Thanh Phương - *Trường Đại học Cần Thơ*

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

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

EDITORIAL COUNCIL

Nguyen Van Hieu - *Vietnam Academy of Science and Technology*

Nguyen Viet Anh - *National University of Civil Engineering*

Bui Chi Buu - *Institute of Agricultural Science for Southern Vietnam*

Vu Dung - *Vietnam Association of Social Psychology*

Tran Tho Dat - *National Economics University*

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

Vu Minh Giang - *VNU, Hanoi*

Truong Nam Hai - *Vietnam Academy of Science and Technology*

Tu Quang Hien - *Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry*

Pham Huy Khang - *University of Transport and Communications*

Pham Gia Khanh - *President of Vietnam Society of Organ Transplantation*

Ho Dac Loc - *Ho Chi Minh City University of Technology*

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

Banh Tien Long - *Hanoi University of Science and Technology*

Le Quan Nghiem - *University of Medicine and Pharmacy of Ho Chi Minh City*

Mai Trong Nhuan - *VNU, Hanoi*

Nguyen Thanh Phuong - *Can Tho University*

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

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

PHÓ TỔNG BIÊN TẬP PHỤ TRÁCH
Nguyễn Thị Hương Giang

PHÓ TỔNG BIÊN TẬP
Nguyễn Thị Hải Hằng

TRƯỞNG BAN BIÊN TẬP
Phạm Thị Minh Nguyệt

TRƯỞNG BAN TẠP CHÍ ĐIỆN TỬ
Vũ Văn Hưng

TRƯỞNG BAN TRỊ SỰ
Lương Ngọc Quang Hưng

TRÌNH BÀY
Đinh Thị Luận

EXECUTIVE DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF
Nguyen Thi Huong Giang

DEPUTY EDITOR
Nguyen Thi Hai Hang

HEAD OF EDITORIAL BOARD
Pham Thi Minh Nguyet

HEAD OF E-JOURNAL BOARD
Vu Van Hung

HEAD OF ADMINISTRATION
Luong Ngoc Quang Hung

ART DIRECTOR
Dinh Thi Luan

TÒA SOẠN
113 Trần Duy Hưng - Cầu Giấy - Hà Nội
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

Giá: 18000đ

EDITORIAL OFFICE
113 Tran Duy Hung Str. - Cau Giay Dist. - Hanoi
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

DOI: 10.31276/VJST.63(9).01-05

Đặc điểm xét nghiệm đông máu thường quy và ROTEM ở bệnh nhân đa chấn thương tại thời điểm nhập viện

Trần Thị Hằng*, Trịnh Thị Thu Hiền, Nguyễn Văn Chỉnh, Đoàn An Sơn, Hà Văn Phú, Trần Thị Thanh Huyền, Dương Công Nguyên

Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức

Ngày nhận bài 29/7/2021; ngày chuyển phản biện 2/8/2021; ngày nhận phản biện 27/8/2021; ngày chấp nhận đăng 31/8/2021

Tóm tắt:

Đặt vấn đề: đa chấn thương là một cấp cứu ngoại khoa rất nặng, có tỷ lệ tử vong cao. Một trong những nguyên nhân gây tử vong hàng đầu là do tình trạng rối loạn đông máu không được phát hiện sớm và xử trí kịp thời. Đo độ đàn hồi cục máu (ROTEM) là một xét nghiệm thực hiện trên máu toàn phần để đánh giá các đặc tính của máu trong quá trình hình thành và ly giải cục máu đông. Phương pháp này có thể phát hiện nhanh chóng và chính xác tình trạng rối loạn đông máu, giúp cải thiện khả năng kiểm soát chảy máu sau chấn thương. Mục tiêu của nghiên cứu: mô tả đặc điểm và đánh giá mối tương quan giữa các thông số ROTEM với các xét nghiệm đông máu thường quy ở bệnh nhân (BN) đa chấn thương tại thời điểm nhập viện. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: 110 BN nhập Khoa Cấp cứu, Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức được chẩn đoán đa chấn thương từ tháng 5 đến tháng 7/2021. Tất cả các BN đều được thực hiện xét nghiệm đông máu thường quy và ROTEM ngay tại thời điểm nhập viện. Kết quả: độ tuổi trung bình là 41,4±14,7; nam giới chiếm 77,3%, điểm ISS trung bình là 24,5±6,3. Tỷ lệ BN đa chấn thương có rối loạn đông máu được đánh giá bằng xét nghiệm đông máu thường quy là 50,9%. Có mối tương quan cao giữa các thông số đông máu thường quy và ROTEM: giữa APTT với CFT-INTEM (r=0,65; p<0,01); giữa PT với CFT-EXTEM (r=0,64; p<0,01); giữa số lượng tiểu cầu với MCF-INTEM (r=0,56; p=0,00) và MCF-EXTEM (r=0,57; p=0,00); giữa nồng độ fibrinogen với MCF-INTEM (r=0,71; p=0,00), MCF-EXTEM (r=0,71; p=0,00) và MCF-FIBTEM (r=0,91; p=0,00). Kết luận: tỷ lệ rối loạn đông máu ở BN đa chấn thương được đánh giá bằng xét nghiệm đông máu thường quy là 50,9%. Có mối tương quan cao giữa các thông số đông máu thường quy và ROTEM.

Từ khóa: **đa chấn thương, đo huyết khối, rối loạn đông máu, ROTEM.**

Chỉ số phân loại: **3.1**

Đặt vấn đề

Đa chấn thương là bệnh lý có từ 2 cơ quan bị tổn thương trở lên, trong đó có ít nhất một tổn thương nặng đe dọa tính mạng. Đây là một cấp cứu ngoại khoa rất nghiêm trọng, thường có tỷ lệ tử vong cao [1]. BN đa chấn thương tử vong do nhiều nguyên nhân khác nhau, trong đó mất máu ồ ạt là một trong những nguyên nhân quan trọng, đứng hàng thứ hai chỉ sau chấn thương sọ não nặng. Chảy máu ở các BN chấn thương có thể trực tiếp do các thương tổn mạch máu lớn hoặc cũng có thể là chảy máu do rối loạn đông máu cấp tính sau chấn thương.

Rối loạn đông máu ở BN đa chấn thương là một biến chứng phức tạp, là hậu quả của nhiều yếu tố khác nhau như mất nhiều máu, hòa loãng máu và truyền máu khối lượng lớn. Ngoài ra, rối loạn đông máu thường xảy ra khi có kết hợp với một số yếu tố khác như toan chuyển hóa, hạ thân nhiệt, giảm canxi máu, sốc, nhiễm khuẩn huyết...[2]. Khoảng 25% các BN chấn thương nặng có tình trạng rối loạn đông máu khi nhập viện, khi có biểu hiện này thì tỷ lệ tử vong tăng gấp 4 lần [3]. Vấn đề điều trị cho các BN chấn thương chảy máu không chỉ ở phẫu thuật kiểm soát tổn thương mà quá trình hồi sức và sử dụng chế phẩm máu hợp lý cũng rất quan trọng. Việc phát hiện sớm tình trạng rối loạn đông máu cũng như các yếu tố liên quan sẽ giúp các bác sĩ lâm sàng có cơ sở để đánh giá, dự phòng và kịp thời điều chỉnh các rối loạn một cách hiệu quả.

Hiện nay, trong thực hành lâm sàng, các xét nghiệm đông máu cơ bản như thời gian prothrombin (PT), thời gian thromboplastin từng phần hoạt hóa (APTT), nồng độ fibrinogen đóng vai trò quan trọng trong việc sàng lọc đông máu trước phẫu thuật. Tuy nhiên, bộ xét nghiệm này gặp phải hạn chế vì thời gian thực hiện khá dài, hơn nữa khi phát hiện bất thường có thể cần xét nghiệm thêm vòng hai để xác định nguyên nhân, do đó đôi khi không đáp ứng kịp nhu cầu xử trí các BN có chảy máu cấp tính. Chính vì vậy, sự ra đời của xét nghiệm "Đàn hồi cục máu đồ" trên hệ thống máy ROTEM với thời gian trả kết quả nhanh trong vòng 10-30 phút, cung cấp thêm nhiều thông số, là rất phù hợp với diễn biến của cấp cứu ngoại khoa. Xét nghiệm ROTEM được thực hiện trên máu toàn phần, ghi lại sự thay đổi trạng thái vật lý của máu theo thời gian, từ đó cung cấp dữ liệu về tất cả các giai đoạn của quá trình đông máu. Chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với 2 mục tiêu:

Mục tiêu 1: mô tả đặc điểm xét nghiệm đông máu và ROTEM trên BN đa chấn thương.

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

Characteristics of routine coagulation testing and thromboelastometry in polytrauma patients at admission

Thi Hang Tran*, Thi Thu Hien Trinh, Van Chinh Nguyen, An Son Doan, Van Phu Ha, Thi Thanh Huyen Tran, Cong Nguyen Duong

Viet Duc University Hospital

Received 29 July 2021; accepted 31 August 2021

Abstract:

Background: polytrauma is one of the emergency surgeries with a high mortality rate. One of the leading causes of death is coagulopathy that is not detected early and treated promptly. Thromboelastometry (ROTEM) is a whole blood assay that evaluates the viscoelastic properties during clot formation and clot lysis. This method can detect coagulopathy rapidly and accurately, thereby improving the management of bleeding after trauma. Objectives: describing and evaluating the correlation between ROTEM parameters and routine coagulation tests in polytrauma patients at admission. Method: 110 patients admitted to the Emergency Department, Viet Duc University Hospital from May 2021 to July 2021 were diagnosed with polytrauma. All patients underwent routine coagulation testing and ROTEM parameters at admission. Result: the average age of patients is 41.4±14.7 years old, men accounts for 77.3%, average ISS score is 24.5±6.3. The proportion of the polytrauma patients with coagulopathy by routine coagulation testing was 50.9%. A significant correlation was found between routine coagulation parameters and ROTEM: between APTT with CFT-INTEM (r=0.65; p<0.01); between PT and CFT-EXTEM (r=0.64; p<0.01); between platelet count and MCF-INTEM (r=0.56; p=0.00) and MCF-EXTEM (r=0.57; p=0.00); between fibrinogen level and MCF-INTEM (r=0.71; p=0.00), MCF-EXTEM (r=0.71; p=0.00), and MCF-FIBTEM (r=0.91; p=0.00). Conclusion: proportion of the polytrauma patients with coagulopathy by routine coagulation testing was 50.9%. A significant correlation was found between routine coagulation parameters and ROTEM.

Keywords: **coagulopathy, polytrauma, ROTEM, thromboelastometry.**

Classification number: **3.1**

Mục tiêu 2: đánh giá mối tương quan giữa xét nghiệm ROTEM và các xét nghiệm đông máu thường quy.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Tất cả các BN được chẩn đoán đa chấn thương tại Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức trong thời gian từ tháng 5/2021-7/2021.

Tiêu chuẩn lựa chọn:

- BN tuổi từ 16-70, không phân biệt giới tính.

- Được chẩn đoán đa chấn thương [4] tại Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức.

+ Có từ 2 thương tổn trở lên.

+ Điểm ISS ≥16.

Tiêu chuẩn loại trừ:

- Có tiền sử bệnh lý về máu.

- Có tiền sử suy thận, suy gan, bệnh lý hệ thống.

Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: mô tả tiến cứu.

Quy trình lấy mẫu và nghiên cứu: mẫu máu được lấy ngay sau khi BN nhập viện và được thực hiện xét nghiệm trong vòng 2 giờ kể từ khi lấy mẫu. Máu tĩnh mạch được lấy cho vào ống xét nghiệm chống đông EDTA-K2 với xét nghiệm tế bào máu ngoại vi và ống xét nghiệm chống đông Natricitrat 3,2% (tỷ lệ 9:1) với các xét nghiệm đông máu và ROTEM.

Các thông số nghiên cứu

Thông số huyết học: Hemoglobin và số lượng tiểu cầu. Thực hiện trên máy đếm tế bào tự động ADVIA 2120 của Hãng Siemens.

Thông số đông máu: thực hiện trên hệ thống máy ACLTOP 750 của Hãng Instrumentation Laboratory.

+ PT và tỷ lệ chuẩn hóa quốc tế (INR) (HemosIL RecombiPlasTin 2G).

+ APTT (HemosIL SynthASil).

+ Nồng độ fibrinogen (HemosIL Fibrinogen-C XL).

+ Nồng độ D-dimer (D-dimer HS 500).

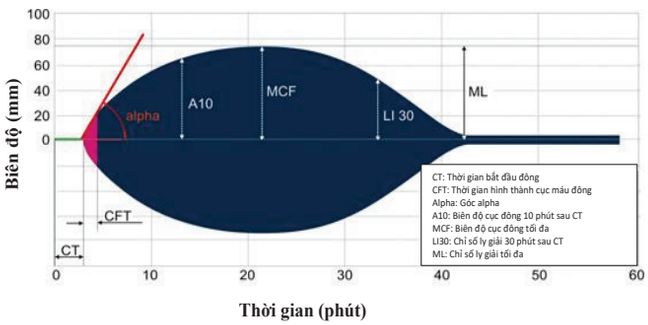
Chúng tôi nhận định BN đa chấn thương có rối loạn đông máu tại thời điểm nhập viện khi: PT<70% và/hoặc APTT bệnh/chứng >1,2 và/hoặc fibrinogen <2 g/l và/hoặc số lượng tiểu cầu <150 G/l [5].

Thông số ROTEM:

Thực hiện phân tích các thông số trên hệ thống máy ROTEM Delta của Hãng Tem Innovations GmbH. Tất cả các bước được thực hiện theo quy trình kỹ thuật xét nghiệm ROTEM tại Khoa Xét nghiệm huyết học, Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức.

Các xét nghiệm ROTEM bao gồm INTEM, EXTEM, FIBTEM được thực hiện đồng thời trên 3 kênh ở 37°C. Chúng tôi tiến hành phân tích các thông số ROTEM: thời gian đông máu (CT), thời

gian hình thành cục máu đông (CFT), góc alpha, biên độ cục máu đông ở thời điểm 5 phút sau CT (A5) và 10 phút sau CT (A10), biên độ cực đại cục máu đông (MCF), độ ly giải cục đông ở thời điểm 30 phút sau CT (LI30) và 60 phút sau CT (LI60) (hình 1).



Hình 1. Các thông số chính của máy ROTEM.

Để nghiên cứu mối tương quan giữa các thông số ROTEM và các xét nghiệm đông máu cơ bản, chúng tôi tổng hợp tất cả các mẫu được lấy để phân tích ROTEM và so sánh với các xét nghiệm đông máu cơ bản ngay tại thời điểm nhập viện. Như vậy, các biến ROTEM được so sánh với từng xét nghiệm đông máu tương ứng: PT so với thông số EXTEM; APTT với các thông số INTEM; số lượng tiểu cầu và nồng độ fibrinogen với các thông số INTEM, EXTEM, FIBTEM [6].

Xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê y học, sử dụng phần mềm SPSS 16.0.

Kết quả

Nghiên cứu này thực hiện trên 110 BN đa chấn thương đủ tiêu chuẩn, nhập viện tại Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức trong khoảng thời gian từ tháng 5/2021-7/2021. Nhóm BN này có các đặc điểm cơ bản: nam giới chiếm 77,3% (85/110 BN); độ tuổi trung bình là 41,4±14,7; tất cả các BN đều bị đa chấn thương với điểm ISS trung bình là 24,5±6,3.

Đặc điểm xét nghiệm tế bào máu và đông máu tại thời điểm nhập viện

Tình trạng rối loạn đông máu dựa theo các xét nghiệm thường quy được quan sát thấy ở 50,9% BN đa chấn thương nhập viện. Trong đó, các rối loạn chủ yếu liên quan đến số lượng tiểu cầu (30,9%) và fibrinogen (26,4%) (bảng 1).

Bảng 1. Tỷ lệ rối loạn đông máu đánh giá theo các xét nghiệm thường quy.

Thông số	Bất thường, n (%)	Bình thường, n (%)
Tiểu cầu (<150 G/l)	34 (30,9)	76 (69,1)
PT% (<70%)	18 (16,4)	92 (83,6)
APTTr (>1,2)	2 (1,8)	108 (98,2)
Fibrinogen (<2,0 g/l)	29 (26,4)	81 (73,6)
Bất thường 1 trong 4 chỉ số	56 (50,9)	-

Các BN bị rối loạn đông máu có điểm đánh giá mức độ nặng theo ISS cao hơn, tình trạng thiếu máu và giảm tiểu cầu rõ rệt kèm theo rối loạn các thông số đông máu thường quy và D-dimer tăng cao hơn hẳn so với nhóm BN không có rối loạn đông máu (bảng 2).

Bảng 2. Các thông số tế bào máu và đông máu tại thời điểm nhập viện.

Thông số	Chung (n=110) (TB±SD)	Không RLĐM (n=54) (TB±SD)	Có RLĐM (n=56) (TB±SD)	p
ISS	24,5±6,3	22,9±5,9	26,0±6,6	0,011
RBC (t/l)	3,9±0,8	4,19±0,6	3,64±0,9	0,000
HGB (g/l)	118,2±25,8	127,5±21,8	109,1±26,2	0,000
PLT (G/l)	200±110,1	245,7±96,7	156,3±85,0	0,000
PT (giây)	12,94±2,24	11,9±1,0	13,9±2.7	0,000
PT (%)	83,2±15,2	90,5±10,9	76,2±15,4	0,000
INR	1,16±0,20	1,07±0,09	1,25±0,24	0,000
APTT (giây)	28,4±5,5	27,2±2,7	29,5±7,0	0,022
APTTr	0,87±0,17	0,84±0,08	0,91±0,22	0,022
Fibrinogen (g/l)	2,78±1,41	3,11±1,22	2,47±1,52	0,018
D-dimer (µg/l)	45100±89335	24000±25000	65000±119810	0,000

RLĐM: rối loạn đông máu.

Các thông số ROTEM (CT, CFT, A5, A10, MCF) có sự khác biệt rõ rệt giữa 2 nhóm BN có rối loạn đông máu và không rối loạn đông máu. Tuy nhiên, chúng tôi không thấy có sự khác biệt của thông số LI60 và ML giữa 2 nhóm nghiên cứu (bảng 3).

Bảng 3. Đặc điểm các thông số ROTEM tại thời điểm nhập viện.

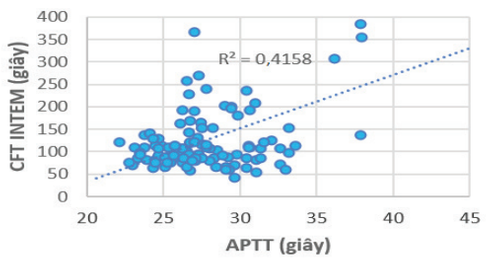
Thông số		Chung (n=110) (TB±SD)	Không RLĐM (n=54) (TB±SD)	Có RLĐM (n=56) (TB±SD)	p
INTEM	CT	190,9±34,7	183,6±22,7	198,1±42,3	0,026
	CFT	138,1±101,9	88,7±23,8	174±128,1	0,000
	A5	36,6±9,2	41,8±6,8	31,6±8,5	0,000
	A10	46,6±9,6	51,7±6,4	41,7±9,6	0,000
	MCF	55,8±8,1	59,9±5,4	51,9±8,5	0,000
	LI60	89,5±21,8	90,7±18,3	88,3±24,9	0,55
	ML	8,8±4,8	9,4±4,8	8,2±4,8	0,182
EXTEM	CT	69,2±26,9	60,8±8,6	77,2±35,1	0,01
	CFT	133,1±98,6	93,1±24,1	171,7±124,3	0,00
	A5	37,6±9,7	43,11±7,5	32,3±8,7	0,00
	A10	47,5±9,9	53,1±6,9	42,2±9,6	0,00
	MCF	57,2±8,8	61,6±5,7	52,8±9,1	0,00
	LI60	94,7±3,2	94,3±3,3	95,1±3,1	0,197
	ML	9,9±4,9	10,3±5,2	9,5±4,7	0,38
FIBTEM	A5	10,6±6,2	12,4±6,1	8,9±5,9	0,003
	A10	11,7±6,7	13,6±6,6	9,8±6,4	0,003
	MCF	12,9±7,4	14,9±7,1	11,1±7,2	0,007
	LI60	92,3 ±2,3	99,2±1,9	99,2±2,5	0,904
	ML	2,8±5,7	2,1±3,6	3,5±7,3	0,21

Mối liên quan của các thông số ROTEM với đông máu cơ bản và số lượng tiểu cầu

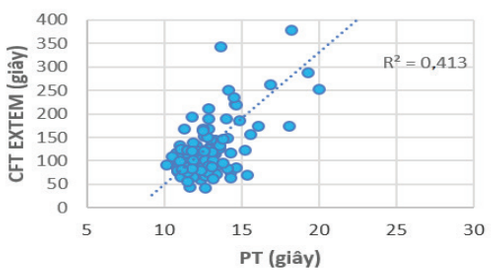
Kết quả nghiên cứu cho thấy, có mối tương quan có ý nghĩa thống kê giữa các thông số ROTEM với PT và APTT (bảng 4). Trong đó, có mối tương quan cao giữa thông số CFT-INTEM với APTT (hình 2) và CFT-EXTEM với PT (hình 3).

Bảng 4. Mối tương quan giữa xét nghiệm APTT với INTEM và PT với EXTEM.

Thông số		APTT (giây)	PT (giây)
INTEM	CT	r=0,61; p<0,01	-
	CFT	r=0,65; p<0,01	-
	A5	r=-0,36; p<0,01	-
	A10	r=-0,38; p<0,01	-
	MCF	r=-0,39; p<0,01	-
EXTEM	CT	-	r=0,43; p<0,01
	CFT	-	r=0,64; p<0,01
	A5	-	r=-0,53; p<0,01
	A10	-	r=-0,56; p<0,01
	MCF	-	r=-0,563; p<0,01



Hình 2. Biểu đồ tương quan giữa CFT-INTEM với APTT.

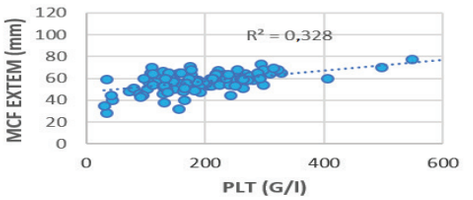


Hình 3. Biểu đồ tương quan giữa CFT-EXTEM với PT.

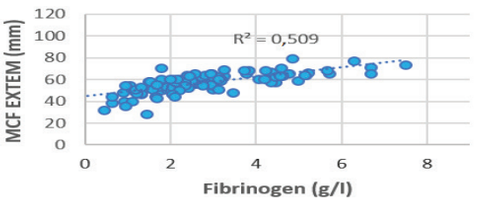
Bảng 5. Mối liên quan giữa các thông số ROTEM với số lượng tiểu cầu và fibrinogen.

Thông số		PLT (G/l)	Fibrinogen (g/l)
INTEM	CFT	r=-0,33; p=0,00	r=-0,49; p=0,00
	A5	r=0,54; p=0,00	r=0,73; p=0,00
	A10	r=0,50; p=0,00	r=0,76; p=0,00
	MCF	r=0,56; p=0,00	r=0,71; p=0,00
EXTEM	CFT	r=-0,34; p=0,00	r=-0,47; p=0,00
	A5	r=0,57; p=0,00	r=0,68; p=0,00
	A10	r=0,53; p=0,00	r=0,70; p=0,00
	MCF	r=0,57; p=0,00	r=0,71; p=0,00
FIBTEM	A5	-	r=0,88; p=0,00
	A10	-	r=0,87; p=0,00
	MCF	-	r=0,91; p=0,00

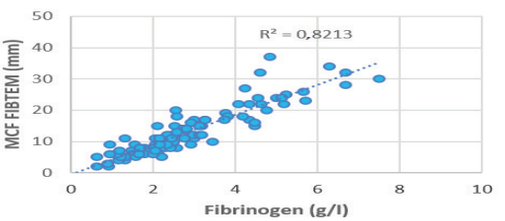
Bảng 5 cho thấy, có mối tương quan có ý nghĩa thống kê giữa số lượng tiểu cầu và fibrinogen với một số thông số ROTEM. Trong đó, có mối tương quan cao giữa thông số MCF-EXTEM với số lượng tiểu cầu (hình 4), MCF-EXTEM với fibrinogen (hình 5), MCF-FIBTEM với fibrinogen (hình 6).



Hình 4. Biểu đồ tương quan giữa số lượng tiểu cầu và MCF-EXTEM.



Hình 5. Biểu đồ tương quan giữa Fibrinogen và MCF-EXTEM.



Hình 6. Biểu đồ tương quan giữa fibrinogen và MCF-FIBTEM.

Bàn luận

Nghiên cứu của chúng tôi có tỷ lệ BN nam (77,3%) cao hơn rõ rệt so với nữ (p<0,05). Trong đó, các BN đa phần đều nằm trong độ tuổi lao động, trung bình là 41,4±14,7 tuổi. Kết quả này phù hợp với nhiều báo cáo trên thế giới [7, 8]. Sự khác biệt về giới tính ở các BN chấn thương đã được ghi nhận đầy đủ, điều này có thể bị ảnh hưởng do tư tưởng, hành vi rủi ro, các yếu tố nguy cơ: sử dụng rượu bia... của giới nam. Bên cạnh đó, phần lớn các nguyên nhân gây đa chấn thương là do tai nạn giao thông, tai nạn lao động... thường xảy ra ở nhóm dân số trẻ, có sự di chuyển nhiều, lao động nặng [9].

Tình trạng rối loạn đông máu sớm, xuất hiện ngay tại thời điểm nhập viện được quan sát thấy ở 56/110 BN đa chấn thương, chiếm 50,9%. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Mujuni và cs (2012) [7] (54%), Puranik và cs (2018) [8] (59,86%). Nhóm BN rối loạn đông máu có điểm đánh giá độ nặng của chấn thương là 26,0±6,6 cao hơn hẳn so với nhóm không rối loạn đông máu là 22,9±5,9 (p=0,011). Điều này cũng phù hợp với một số báo cáo trên thế giới về mối quan hệ giữa mức độ nghiêm trọng của chấn thương và sự xuất hiện của rối loạn đông máu [10, 11].

Trong các biểu hiện của rối loạn đông máu, chúng tôi quan sát thấy tình trạng giảm tiểu cầu là thường gặp nhất với 30,9%. Số lượng tiểu cầu trung bình ở nhóm BN có rối loạn đông máu (156,3±85,0) thấp hơn hẳn nhóm không có rối loạn đông máu. Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Rugeri và cs (2007) [12], Davenport và cs

(2011) [13]. Giảm tiểu cầu là một trong những yếu tố tiên lượng nguy cơ tử vong của BN chấn thương. Theo Brown và cs (2011), số lượng tiểu cầu lúc vào viện có mối tương quan nghịch với tỷ lệ tử vong trong vòng 24 h. Cứ tăng 50 G/l số lượng tiểu cầu tại thời điểm nhập viện thì tỷ lệ tử vong giảm 17% sau 6 h và 14% sau 24 h [14].

Đối với các xét nghiệm đông máu thường quy như PT/INR, APTT và fibrinogen, chúng tôi cũng nhận thấy có sự khác biệt rõ rệt giữa 2 nhóm BN có rối loạn đông máu và không có rối loạn đông máu. Theo đó, ở nhóm BN đa chấn thương có rối loạn đông máu thì PT và APTT kéo dài còn fibrinogen thì thấp hơn hẳn nhóm không có rối loạn đông máu (p<0,05). Kết quả này tương tự với nhiều nghiên cứu khác trên thế giới [7, 8, 12]. Tuy nhiên, sự khác biệt về giá trị trung bình có thể là do sự đa dạng trong việc lựa chọn BN cũng như sự khác nhau về mức độ nghiêm trọng của chấn thương giữa các nghiên cứu này và của chúng tôi.

Bên cạnh các rối loạn trong xét nghiệm đông máu thường quy thì ở BN đa chấn thương cũng có nhiều báo cáo ghi nhận tình trạng tăng các sản phẩm thoái giáng của fibrin như D-dimer, đặc biệt ở những BN có rối loạn đông máu như biểu hiện của một tình trạng tiêu sợi huyết nặng [8, 12].

Hiện nay trên thế giới, máy xét nghiệm ROTEM được đặt trực tiếp tại các trung tâm chấn thương và cấp cứu. Với ưu điểm xét nghiệm thực hiện trên máu toàn phần, đánh giá được tất cả các giai đoạn của quá trình đông máu, từ đó giúp các bác sĩ phát hiện và điều trị sớm các rối loạn đông máu do chấn thương. Chúng tôi đã quan sát thấy có sự thay đổi đáng kể các thông số ROTEM (CT, CFT, A5, A10, MCF) ở BN đa chấn thương có rối loạn đông máu so với nhóm còn lại. Tuy nhiên, không có sự khác biệt về thông số ML và LI60 ở hai nhóm.

Trong nghiên cứu của mình, chúng tôi cũng đã chứng minh được mối tương quan giữa các thông số đông máu cơ bản và ROTEM (bảng 4) giống như một số báo cáo trước đây [15]. Trong đó, có mối tương quan thuận chặt chẽ giữa thông số CFT-INTEM với APTT và CFT-EXTEM với PT. Kết quả tương tự với báo cáo của Rugeri và cs (2007) [12].

Thông số MCF của ROTEM đã được báo cáo là bị ảnh hưởng bởi số lượng và chức năng tiểu cầu [16] và nó cũng phụ thuộc vào tình trạng pha loãng máu hoặc tiêu thụ các yếu tố đông máu. Bên cạnh đó, Gando và cs (2001) [17] cũng đã mô tả vấn đề giảm tiểu cầu thứ phát do giảm các yếu tố đông máu. Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, có mối tương quan giữa số lượng tiểu cầu với các biên độ của EXTEM: A5-EXTEM (r=0,57), A10-EXTEM (r=0,53), MCF-EXTEM (r=0,57). Các BN đa chấn thương trong nghiên cứu của chúng tôi được đánh giá ngay tại thời điểm nhập viện nên chủ yếu biểu hiện của rối loạn đông máu là xu hướng giảm đông do chảy máu. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Rugeri và cs (2007) [12].

Mối liên quan giữa MCF với số lượng tiểu cầu và nồng độ fibrinogen đã được báo cáo lần đầu tiên vào năm 1985 [18]. Sau đấy cũng có một số báo cáo cùng nhận định tình trạng này [15]. Tương tự như vậy, khi tiến hành đánh giá mối tương quan của MCF với nồng độ fibrinogen và số lượng tiểu cầu trong nhóm BN nghiên cứu, chúng tôi nhận thấy có mối tương quan thuận giữa số lượng tiểu cầu với MCF-INTEM (r=0,56; p=0,00) và MCF-EXTEM (r=0,57; p=0,00); có mối tương quan thuận giữa nồng độ fibrinogen với MCF-INTEM (r=0,71; p=0,00), MCF-EXTEM (r=0,71; p=0,00) và MCF-FIBTEM (r=0,91; p=0,00). Giá trị của thông số MCF được coi là rất có ý nghĩa trong việc chẩn đoán rối loạn đông máu do chấn thương và có vai trò quan trọng trong quyết định truyền máu hoặc tiên lượng tử vong [19, 20].

Kết luận

Nghiên cứu xét nghiệm đông máu trên 110 BN đa chấn thương tại Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức cho thấy, có 50,9% BN có rối loạn đông máu, trong đó các rối loạn chủ yếu liên quan đến số lượng tiểu cầu 30,9% và fibrinogen 26,4%. Các thông số ROTEM (CT, CFT, A5, A10, MCF) có sự khác biệt rõ rệt giữa 2 nhóm BN có rối loạn đông máu và không rối loạn đông máu. Có mối tương quan cao giữa các thông số đông máu thường quy với ROTEM: giữa APTT với CFT-INTEM, giữa PT với CFT-EXTEM; giữa số lượng tiểu cầu với MCF-INTEM và MCF-EXTEM; giữa nồng độ fibrinogen với MCF-INTEM, MCF-EXTEM và MCF-FIBTEM.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Nguyễn Hữu Tú (2002), *Nghiên cứu chỉ số TRISS sửa đổi trong đánh giá và tiên lượng bệnh nhân chấn thương*, Luận án tiến sĩ, Trường Đại học Y Hà Nội.

[2] K. Brohi, et al. (2003), "Acute traumatic coagulopathy", *Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*, **54(6)**, pp.1127-1130.

[3] B. Mitra, et al. (2012), "Acute coagulopathy and early deaths post major trauma", *Injury*, **43(1)**, pp.22-25.

[4] C.S. Rau, et al. (2017), "Polytrauma defined by the new berlin definition: a validation test based on propensity-score matching approach", *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **14(9)**, DOI: 10.3390/ijerph14091045.

[5] Nguyễn Anh Trí (2008), *Đông máu ứng dụng trong lâm sàng*, Nhà xuất bản Y học.

[6] M.J. Griffin, et al. (2001), "The effects of heparin, protamine, and heparin/protamine reversal on platelet function under conditions of arterial shear stress", *Anesth. Analg.*, **93(1)**, pp.20-27.

[7] E. Mujuni, et al. (2012), "Acute traumatic coagulopathy among major trauma patients in an urban tertiary hospital in sub Saharan Africa", *BMC Emerg. Med.*, **12**, DOI: 10.1186/1471-227X-12-16.

[8] G.N. Puranik, et al. (2018), "The study of coagulation parameters in polytrauma patients and their effects on outcome", *Journal of Hematology*, **7(3)**, pp.107-111.

[9] S.S. Bajwa, et al. (2011), "Designing, managing and improving the operative and intensive care in polytrauma", *Journal of Emergencies Trauma and Shock*, **4(4)**, pp.494-500.

[10] B. Floccard, et al. (2012), "Early coagulopathy in trauma patients: an on-scene and hospital admission study", *Injury*, **43(1)**, pp.26-32.

[11] E.E. Moore, et al. (2021), "Trauma-induced coagulopathy", *Nat. Rev. Dis. Primers*, **7(1)**, DOI: 10.1038/s41572-021-00264-3.

[12] L. Rugeri, et al. (2007), "Diagnosis of early coagulation abnormalities in trauma patients by rotation thrombelastography", *J. Thromb. Haemost.*, **5(2)**, pp.289-295.

[13] R. Davenport, et al. (2011), "Functional definition and characterization of acute traumatic coagulopathy", *Crit. Care Med.*, **39(12)**, pp.2652-2658.

[14] L.M. Brown, et al. (2011), "A normal platelet count may not be enough: the impact of admission platelet count on mortality and transfusion in severely injured trauma patients", *J. Trauma*, **71(2)** Suppl.3), pp.337-342.

[15] P.V. Veigas, et al. (2016), "A systematic review on the rotational thrombelastometry (ROTEM®) values for the diagnosis of coagulopathy, prediction and guidance of blood transfusion and prediction of mortality in trauma patients", *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine*, **24(1)**, DOI: 10.1186/s13049-016-0308-2.

[16] V.A. Bowbrick, et al. (2003), "Influence of platelet count and activity on thromboelastography parameters", *Platelets*, **14(4)**, pp.219-224.

[17] S. Gando, et al. (2001), "Tissue factor pathway inhibitor response does not correlate with tissue factor-induced disseminated intravascular coagulation and multiple organ dysfunction syndrome in trauma patients", *Crit. Care Med.*, **29(2)**, pp.262-266.

[18] Y.G. Kang, et al. (1985), "Intraoperative changes in blood coagulation and thrombelastographic monitoring in liver transplantation", *Anesth. Analg.*, **64(9)**, pp.888-896.

[19] H. Schöchl, et al. (2011), "Thromboelastometric (ROTEM) findings in patients suffering from isolated severe traumatic brain injury", *J. Neurotrauma*, **28(10)**, pp.2033-2041.

[20] T. Woolley, et al. (2013), "Utility of interim ROTEM(®) values of clot strength, A5 and A10, in predicting final assessment of coagulation status in severely injured battle patients", *Injury*, **44(5)**, pp.593-599.

DOI: 10.31276/VJST.63(9).06-09

Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và tình trạng di căn của ung thư tuyến giáp thể nang

Nguyễn Xuân Hậu[1, 2*], Nguyễn Thị Phương Anh[1], Lê Văn Quảng[1, 3]

[1]Bộ môn Ung thư, Trường Đại học Y Hà Nội
[2]Khoa Ung bướu và Chăm sóc giảm nhẹ, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội
[3]Khoa Ngoại đầu cổ, Bệnh viện K

Ngày nhận bài 28/6/2021; ngày chuyển phản biện 1/7/2021; ngày nhận phản biện 30/7/2021; ngày chấp nhận đăng 9/8/2021

Tóm tắt:

Nghiên cứu được tiến hành nhằm đánh giá đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và tình trạng di căn trong ung thư tuyến giáp (UTTG) thể nang tại Bệnh viện K. Thiết kế kết hợp hồi cứu và tiến cứu trên 48 bệnh nhân chẩn đoán ung thư biểu mô tuyến giáp thể nang được phẫu thuật tại Bệnh viện K từ tháng 1/2016 đến tháng 7/2020. Tuổi mắc bệnh trung bình là 44±16,1, tỷ lệ nữ/nam là 4,3/1. Đa số bệnh nhân khám sức khỏe định kỳ phát hiện có u giáp, khối u chủ yếu ở 1 thùy với đường kính trung bình 21,7±12 mm. Trên siêu âm, 72,9% khối u được đánh giá TIRADS 4, tế bào học có ít vai trò trong chẩn đoán với tỷ lệ kết quả không xác định là 48,9%. Di căn xa gặp ở 18,8%, trong đó xương và phổi là 2 cơ quan thường gặp nhất. Tỷ lệ di căn hạch cổ chung là 31,3%, ung thư ở 2 thùy có tỷ lệ di căn hạch cổ cao hơn có ý nghĩa thống kê (p<0,05).

Từ khóa: **di căn, ung thư tuyến giáp thể nang.**

Chỉ số phân loại: **3.2**

Đặt vấn đề

UTTG thể nang là thể thường gặp thứ 2 trong nhóm UTTG biệt hóa (sau UTTG thể nhú) [1]. So với thể nhú, UTTG thể nang thường gặp ở nhóm tuổi lớn hơn, tỷ lệ di căn hạch thấp hơn thể nhú [2, 3] và di căn xa có thể là triệu chứng đầu tiên của bệnh [4, 5]. Chọc hút tế bào bằng kim nhỏ (FNA) ít có vai trò trong chẩn đoán UTTG thể nang vì rất khó để phân biệt giữa u tuyến thể nang và ung thư thể nang. Chẩn đoán xác định cần bằng chứng về xâm lấn mạch máu và/hoặc xâm lấn vỏ trên mô bệnh học [6]. Hiện nay, điều trị UTTG thể nang gần tương tự như UTTG thể nhú với phẫu thuật là phương pháp điều trị quan trọng nhất. Điều trị I-131 sau đó được chỉ định cho từng trường hợp cụ thể, dựa vào giai đoạn bệnh, tình trạng di căn hạch và di căn xa. Hiểu biết rõ hơn những đặc điểm bệnh học của UTTG thể nang sẽ có giá trị trong chẩn đoán bệnh sớm và có thái độ điều trị thích hợp.

Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về UTTG thể nang, tuy nhiên tại Việt Nam chưa được thực hiện nhiều. Do đó chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm đánh giá đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và tình trạng di căn của UTTG thể nang tại Bệnh viện K.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trên 48 bệnh nhân UTTG thể nang được phẫu thuật tại Bệnh viện K từ tháng 1/2016 đến tháng 7/2020.

Tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân:

- Bệnh nhân được chẩn đoán UTTG được phẫu thuật theo phác đồ có kết quả xét nghiệm giải phẫu bệnh khẳng định là UTTG thể nang.

- Hồ sơ bệnh án đầy đủ kết quả: khám lâm sàng, cận lâm sàng trước và sau mổ.

- Bệnh nhân đồng ý tham gia nghiên cứu.

Tiêu chuẩn loại trừ:

- Bệnh nhân đã được phẫu thuật UTTG tại tuyến trước.

- Bệnh nhân cũ đến điều trị tiếp vì tái phát, di căn hoặc lý do khác.

Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả hồi cứu kết hợp tiến cứu.

Các chỉ số nghiên cứu

- Khai thác các thông tin lâm sàng, cận lâm sàng (siêu âm tuyến giáp đánh giá kích thước u, số lượng u, phân loại TIRADS, tình trạng di căn và chọc hút tế bào trước mổ).

- Phân loại TIRADS được sử dụng theo TIRADS Jin Young Kwak (2011), phân loại giai đoạn bệnh theo AJCC 2017.

- Phương pháp phẫu thuật: cắt tuyến giáp toàn bộ khi phát hiện hạch di căn, u kích thước >1 cm, hoặc xâm lấn cơ trước giáp; vét hạch cổ trung tâm dự phòng hoặc khi phát hiện hạch; vét hạch cổ trung tâm kèm vét hạch cổ bên điều trị khi lâm sàng và cận lâm sàng phát hiện hạch trước mổ hoặc kiểm tra hạch cổ bên trong mổ nghi ngờ di căn.

[*]Tác giả liên hệ: Email: drnguyenxuanhau@gmail.com

Clinicopathological and metastasis status of follicular thyroid cancer

Xuan Hau Nguyen[1, 2*], Thi Phuong Anh Nguyen[1], Van Quang Le[1, 3]

[1]Oncology Department, Hanoi Medical University
[2]Department of Oncology and Palliative Care, Hanoi Medical University Hospital
[3]Head and Neck Department, National Cancer Hospital

Received 28 June 2021; accepted 9 August 2021

Abstract:

This study aims to evaluate the clinicopathological and metastasis status of follicular thyroid cancer at K Hospital. We conducted a retrospective combined with prospective cohort study of 48 follicular thyroid carcinoma patients treated by surgery at K hospital from January 2016 to July 2020. The mean age was 44±16.1 and the female/male ratio was 4.3/1. Most patients presented with an asymptomatic and had a unilateral tumor with mean diameter was 21.7±12 mm. 72.9% of tumors were classified as TIRADS 4 on ultrasound, and FNA did not play a big role in the diagnosis of follicular thyroid carcinoma with undetermined significance result in 48.9% of cases. Distant metastasis in 18.8%, the most common metastatic sites were bone, followed by the lungs. The overall rate of nodal metastasis was 31.3%. Cancer in both thyroid lobes had significantly associated with nodal metastasis (p<0.05).

Keywords: **follicular thyroid cancer, metastasis.**

Classification number: **3.2**

- Kết quả giải phẫu bệnh sau mổ, khám theo dõi định kỳ sau mổ.

Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý theo phần mềm SPSS 26.0. Thống kê mô tả gồm tỷ lệ phần trăm, trị số trung bình, độ lệch chuẩn trung vị và khoảng tứ phân vị. So sánh sự khác biệt giữa 2 tỷ lệ bằng test χ^2, Fisher' Exact test, tính nguy cơ tương đối bằng hồi quy Logistic. Mức ý nghĩa thống kê p<0,05.

Đạo đức nghiên cứu

- Nghiên cứu được sự đồng ý của Phòng Kế hoạch tổng hợp, Bệnh viện K.

- Nghiên cứu chỉ nhằm mục đích nâng cao chất lượng chẩn đoán và điều trị bệnh, không phục vụ mục đích nào khác.

- Mọi thông tin thu thập từ bệnh nhân được đảm bảo bí mật và chỉ dùng cho mục đích nghiên cứu.

- Bệnh nhân được điều trị theo phác đồ và nghiên cứu không ảnh hưởng tới kết quả điều trị của người bệnh.

Kết quả

Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng

Bệnh nhân nữ chiếm đa số với tỷ lệ trên 81%. Tỷ lệ nữ/nam là 4,3/1. Nhóm tuổi <55 chiếm tỷ lệ 72,9%, nhóm ≥55 tuổi chiếm 27,1%. Tuổi mắc bệnh trung bình là 44±16,1, thấp nhất là 12, cao nhất là 75.

Đa số bệnh nhân khám sức khỏe định kỳ phát hiện u giáp, chiếm tỷ lệ 50%. Bệnh nhân tự sờ thấy u vùng cổ có tỷ lệ 25%. Bệnh nhân đến khám vì có triệu chứng ở cơ quan di căn xa là 16,7%. Các nguyên nhân khác: nuốt vướng, khàn tiếng ít gặp. Không có bệnh nhân nào vào viện vì lý do nổi hạch cổ. Đặc điểm khối u giáp qua siêu âm trước mổ được thể hiện ở bảng 1.

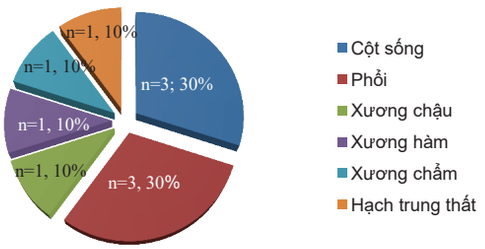
Bảng 1. Đặc điểm khối u giáp qua siêu âm trước mổ.

Đặc điểm u	Số bệnh nhân	Tỷ lệ (%)
Vị trí u (n=48)		
Một thùy	34	70,8
Eo giáp	2	4,2
Hai thùy	12	25,0
Số lượng u (n=48)		
1 u	30	62,5
≥2 u	18	37,5
Kích thước u (n=48)		
<10 mm	7	14,6
11-20 mm	21	43,8
21-40 mm	15	31,2
>40 mm	5	10,4
TIRADS (n=48)		
3	11	22,9
4	35	72,9
5	2	4,2

Về tế bào học, chỉ có 1 bệnh nhân không được chỉ định chọc hút tế bào bằng kim nhỏ. Gần 50% bệnh nhân có kết quả FNA không xác định (Bethesda III và IV), hơn 30% bệnh nhân có kết quả FNA lành tính (Bethesda II) và 12,8% bệnh nhân có kết quả FNA nghi ngờ ác tính. Không có kết quả FNA nào khẳng định ác tính.

Tình trạng di căn

Di căn xa: có 9/48 bệnh nhân di căn xa ngay từ thời điểm phát hiện bệnh. Tỷ lệ di căn xương hay gặp nhất, chiếm 60% (trong đó di căn cột sống chiếm tỷ lệ cao nhất 30%). Di căn phổi đứng thứ 2, chiếm 30%. Có 1 bệnh nhân vừa có di căn phổi vừa có di căn cột sống (biểu đồ 1). Một số yếu tố liên quan tới tình trạng di căn xa được thể hiện ở bảng 2.



Biểu đồ 1. Vị trí di căn xa.

Bảng 2. Một số yếu tố liên quan tới tình trạng di căn xa.

Đặc điểm		Tình trạng di căn xa, n (%)		Giá trị p
		Không di căn xa	*Có di căn xa*	
Tuổi	<55	33 (94,3)	2 (5,7)	0,001
	≥55	6 (46,2)	7 (53,8)	
Giới	Nam	8 (88,9)	1 (11,1)	0,424
	Nữ	31 (79,5)	8 (20,5)	
Kích thước u	≤40 mm	37 (86)	6 (14)	0,039
	>40 mm	2 (40)	3 (60)	

Di căn hạch: có 12/48 bệnh nhân được phẫu thuật cắt thùy + eo (chiếm 25%), các bệnh nhân này không được vét hạch cổ. Còn lại 75% bệnh nhân được cắt toàn bộ tuyến giáp, trong đó 66,7% bệnh nhân được vét hạch cổ. Trong số 24 trường hợp được vét hạch, 37,5% vét hạch nhóm trung tâm đơn thuần và 62,5% kèm vét hạch cổ bên (bảng 3-5).

Bảng 3. Kết quả di căn hạch sau phẫu thuật.

Vét hạch cổ	Số bệnh nhân			Tổng
	Di căn hạch nhóm trung tâm đơn thuần	*Di căn hạch nhóm trung tâm + cổ bên*	*Không di căn*	
Không vét hạch	0	0	24	24
Chỉ vét hạch nhóm trung tâm	3	0	6	9
Vét hạch nhóm trung tâm và hạch cổ bên	3	9	3	15
Tổng, n (%)	6 (12,5)	9 (18,8)	33 (68,7)	48 (100)

Bảng 4. Mối liên quan giữa tỷ lệ di căn hạch cổ và các yếu tố nguy cơ.

Đặc điểm		Tình trạng di căn hạch, n (%)		Giá trị p
		Có di căn hạch	*Không di căn hạch*	
Tuổi	<55	12 (34,3)	23 (65,7)	0,727
	≥55	3 (23,1)	10 (76,9)	
Giới	Nữ	11 (28,2)	28 (71,8)	0,432
	Nam	4 (44,4)	5 (55,6)	
Ung thư hai thùy	Có	3 (75)	1 (25)	0,049
	Không	12 (27,3)	32 (72,7)	
Kích thước u	≤40 mm	13 (30,2)	30 (69,8)	0,642
	>40 mm	2 (40)	3 (60)	

Bảng 5. Mối liên quan giữa tỷ lệ di căn hạch cổ và di căn xa.

Di căn hạch \ Di căn xa	M0, n (%)	M1, n (%)	Tổng	
Không	26 (66,7)	7 (77,8)	33	p=0,724
N1a	5 (12,8)	0	5	
N1b	8 (20,5)	2 (22,2)	10	
Tổng	39 (100)	9 (100)	48	

Bàn luận

Trong nghiên cứu của chúng tôi, tuổi trung bình của bệnh nhân là 44±16,1, thấp nhất là 12, cao nhất là 75, trong đó nhóm bệnh nhân <55 tuổi chiếm đa số (72,9%). Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Su và cs (2019) [7], tuổi trung bình của bệnh nhân UTTG thể nang là 46,65±17,95. Theo SEER (2017) [8], UTTG thể nang hay gặp nhất ở độ tuổi 40-60, độ tuổi mắc trung bình cao hơn so với UTTG thể nhú (30-50 tuổi). Trong nghiên cứu của chúng tôi, UTTG thể nang gặp phần lớn ở nữ giới với tỷ lệ nữ/nam là 4,3/1. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Aschebrook-Kylfoy và cs (2013) [4] và Lê Văn Quảng (2002) [9] với tỷ lệ nữ/nam lần lượt là 3/1 và 2,5/1. UTTG thể nang cũng như UTTG nói chung chủ yếu gặp ở nữ giới và hormon sinh dục dường như là một giả thuyết hợp lý để giải thích cho sự chênh lệch này. Đa số bệnh nhân đều được phát hiện bệnh tình cờ, tỷ lệ tự sờ thấy khối u vùng cổ chỉ 25%. Khác với UTTG thể nhú, UTTG thể nang có tỷ lệ di căn xa cao hơn và nhiều bệnh nhân tới viện do có triệu chứng của cơ quan di căn xa trước khi có biểu hiện tại tuyến giáp. Có 8 trong số 48 bệnh nhân (16,7%) đến khám vì có triệu chứng ở cơ quan di căn xa như đau xương cột sống do di căn xương hoặc ho, khó thở do di căn phổi (biểu đồ 1). Kết quả này tương tự với nghiên cứu của D'Avanzo và cs (2004) [10], theo đó đa số (69,2%) bệnh nhân UTTG thể nang đến viện khám sức khỏe định kỳ phát hiện bệnh, 13,7% bệnh nhân sờ thấy khối u ở cổ và 11,0% bệnh nhân có triệu chứng di căn xa tại thời điểm chẩn đoán. Tuy nhiên theo Thompson và cs (2001) [11], chỉ có 5% bệnh nhân không triệu chứng được phát hiện bệnh nhờ khám định kỳ và có tới hơn 90% bệnh nhân vào viện vì sờ thấy u ở cổ.

Trong 48 bệnh nhân có tới 37,5% có 2 u trở lên, tỷ lệ u ≤4 cm chiếm 89,6%. Chủ yếu bệnh nhân có hình ảnh siêu âm TIRADS 4 (72,9%), nhưng cũng có gần 23% bệnh nhân TIRADS 3 (bảng 1). Nhiều nghiên cứu khác nhau đã chỉ ra tỷ lệ UTTG ở bệnh nhân có một nốt đơn độc không có sự khác biệt so với tỷ lệ ở bệnh nhân có nhiều nốt. Theo Hoang và cs (2007) [12], UTTG thể nang cũng hay gặp trong các u tuyến giáp đa nhân. Kích thước u là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến tiên lượng của bệnh. Kết quả của chúng tôi gần tương đồng với nghiên cứu của Nguyễn Xuân Phong (2011) [13] với 75,5% bệnh nhân có khối u <4 cm. Trong nghiên cứu của chúng tôi, gần 50% bệnh nhân có kết quả FNA không xác định (Bethesda III và IV). Không có bệnh nhân nào có kết quả FNA ác tính và có đến hơn 30% bệnh nhân có kết quả FNA lành tính (Bethesda II). Đa số các bệnh nhân này có đặc điểm nghi ngờ trên siêu âm nên được

chỉ định phẫu thuật. Một số bệnh nhân khác được chẩn đoán UTTG thể nang trước mổ nhờ sinh thiết tổn thương tại vị trí di căn xa. Kết quả này cũng giống các nghiên cứu khác trên thế giới đều chỉ ra rằng rất khó chẩn đoán phân biệt được UTTG thể nang và u tuyến giáp thể nang lành tính dựa vào kết quả chọc tế bào. Năm 2016, Na và cs [14] cũng đã báo cáo bảng phân loại TIRADS ít có vai trò trong phân biệt u tuyến giáp thể nang và UTTG thể nang.

Tỷ lệ di căn xa trong nghiên cứu của chúng tôi là 18,8%. Trong đó có 1 bệnh nhân di căn 2 vị trí là xương và phổi, còn lại di căn 1 vị trí. Di căn xương hay gặp nhất (chiếm 60%), tiếp đến là phổi (30%) (biểu đồ 1). Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Durante và cs (2006) [15], xương và phổi là hai cơ quan di căn hay gặp nhất, có tỷ lệ lần lượt là 36 và 35%. Vị trí di căn xương thường gặp là xương bả vai, xương ức, xương sọ và xương chậu. Theo nghiên cứu của Parameswaran và cs (2017) [16], tỷ lệ di căn xa là 22%, vị trí di căn xa thường gặp nhất là xương (cột sống, xương chậu và xương bả vai, chiếm 42%), sau đó là phổi (33%), não (17%) và hạch (8%). Trong nghiên cứu của chúng tôi, có 6 bệnh nhân di căn xương, trong đó 50% (3 bệnh nhân) là di căn cột sống, 1 bệnh nhân di căn xương chậu, 1 bệnh nhân di căn xương chẩm. Có 1 bệnh nhân di căn xương hàm là vị trí ít gặp trong UTTG thể nang cũng như UTTG nói chung. Tuổi ≥55 và u >4 cm làm tăng nguy cơ di căn xa có ý nghĩa thống kê với p<0,05 (bảng 2). Kết quả này tương đồng với báo cáo của Vuong và cs (2018) [5].

Di căn hạch cổ thường ít gặp trong UTTG thể nang do bản chất bệnh thường xâm lấn mạch máu. Theo Podda và cs (2015) [17], tỷ lệ di căn hạch cổ là 17% ở UTTG thể nang xâm nhập rộng. Trong nghiên cứu của Pisanu và cs (2011) [18], Kim và cs (2014) [19], tỷ lệ di căn hạch cổ trong UTTG thể nang tương ứng là 7,3 và 5%. Tỷ lệ di căn hạch cổ trong nghiên cứu của chúng tôi là 31,3%, cao hơn so với các nghiên cứu khác do tỷ lệ vét hạch cổ nhiều hơn. Di căn hạch gặp nhiều hơn ở bệnh nhân nam giới, trẻ tuổi, u có kích thước >4 cm, ung thư cả 2 thùy giáp trạng. Trong đó, ung thư hai thùy tuyến giáp làm tăng tỷ lệ di căn hạch có ý nghĩa thống kê với p=0,049. Tỷ lệ di căn hạch cổ ở nhóm chưa có di căn xa là 33,3% và ở nhóm di căn xa là 22,2%, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê (bảng 4). Tuy nhiên theo Vuong và cs (2018) [5], di căn hạch cổ là yếu tố nguy cơ tăng tỷ lệ di căn xa trong UTTG thể nang với OR=5,1 [95%CI 2,59-10,35] với p<0,0001.

Kết luận

Kết quả nghiên cứu 48 bệnh nhân chẩn đoán UTTG cho thấy, tỷ lệ nữ/nam là 4,3/1, độ tuổi trung bình là 44±16,1, chủ yếu ở nhóm tuổi <55 (72,9%). Lý do vào viện thăm khám của người bệnh chủ yếu là tình cờ phát hiện u giáp qua khám sức khỏe (50%) và 16,7% có triệu chứng biểu hiện tại cơ quan di căn xa. U đa số gặp ở một thùy tuyến giáp, thường là u đơn độc, kích thước u trung bình là 21,7±12 mm, chủ yếu được đánh giá TIRADS 4. Chọc hút tế bào kim nhỏ có ít vai trò trong chẩn đoán UTTG thể nang, tỷ lệ kết quả FNA không xác định gần 50%, FNA lành tính chiếm hơn 30%.

Di căn xa gặp ở 18,8% bệnh nhân, xương và phổi là hai cơ quan thường gặp nhất. Tỷ lệ di căn hạch cổ là 31,3%, cao hơn ở bệnh nhân ung thư cả hai thùy tuyến giáp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] V.L. Ricardo, Y. Osamura (2017), *WHO Classification of Tumours of Endocrine Organs*, International Agency for Research on Cancer.

[2] H. Alfalah, et al. (2008), "Risk factors for lateral cervical lymph node involvement in follicular thyroid carcinoma", *World J. Surg.*, **32**, pp.2623-2626.

[3] V. Zaydfudim, et al. (2008), "The impact of lymph node involvement on survival in patients with papillary and follicular thyroid carcinoma", *Surgery*, **144**, pp.1070-1078.

[4] B. Aschebrook-Kilfoy, et al. (2013), "Follicular thyroid cancer incidence patterns in the United States, 1980-2009", *Thyroid.*, **23**, pp.1015-1021.

[5] H.G. Vuong, et al. (2018), "Clinicopathological risk factors for distant metastasis in differentiated thyroid carcinoma: a meta-analysis", *World J. Surg.*, **42**, pp.1005-1017.

[6] G. Grani, et al. (2018), "Follicular thyroid cancer and hurthle cell carcinoma: challenges in diagnosis, treatment, and clinical management", *Lancet Diabetes Endocrinol.*, **6**, pp.500-514.

[7] D.H. Su, et al. (2019), "Prognostic factors on outcomes of follicular thyroid cancer", *J. Formos. Med. Assoc.*, **118**, pp.1144-1153.

[8] https://seer.cancer.gov/statfacts/html/thyro.html.

[9] Lê Văn Quảng (2002), "Nhận xét đặc điểm lâm sàng và các phương pháp điều trị ung thư tuyến giáp tại Bệnh viện K từ năm 1992-2000", *Tạp chí Y học*, **431**, tr.323-326.

[10] A. D'Avanzo, et al. (2004), "Follicular thyroid carcinoma: histology and prognosis", *Cancer*, **100**, pp.1123-1129.

[11] L.D. Thompson, et al. (2001), "A clinicopathologic study of minimally invasive follicular carcinoma of the thyroid gland with a review of the English literature", *Cancer*, **91**, pp.505-524.

[12] J.K. Hoang, et al. (2007), "US features of thyroid malignancy: pearls and pitfalls", *Radiographics*, **27**, pp.847-860.

[13] Nguyễn Xuân Phong (2011), *Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng và một số xét nghiệm trong ung thư biểu mô tuyến giáp*, Luận văn thạc sỹ y học, Trường Đại học Y Hà Nội.

[14] D.G. Na, et al. (2016), "Thyroid imaging reporting and data system risk stratification of thyroid nodules: categorization based on solidity and echogenicity", *Thyroid.*, **26**, pp.562-572.

[15] C. Durante, et al. (2006), "Long-term outcome of 444 patients with distant metastases from papillary and follicular thyroid carcinoma: benefits and limits of radioiodine therapy", *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **91**, pp.2892-2899.

[16] R. Parameswaran, et al. (2017), "Patterns of metastasis in follicular thyroid carcinoma and the difference between early and delayed presentation", *Ann. R. Coll. Surg. Engl.*, **99**, pp.151-154.

[17] M. Podda, et al. (2015), "Follicular thyroid carcinoma: differences in clinical relevance between minimally invasive and widely invasive tumors", *World J. Surg. Oncol.*, **13**, DOI: 10.1186/s12957-015-0612-8.

[18] A. Pisanu, et al. (2011), "Larger tumor size predicts nodal involvement in patients with follicular thyroid carcinoma", *Tumori.*, **97**, pp.296-303.

[19] H.J. Kim, et al. (2014), "Association of vascular invasion with increased mortality in patients with minimally invasive follicular thyroid carcinoma but not widely invasive follicular thyroid carcinoma", *Head Neck*, **36**, pp.1695-1700.

DOI: 10.31276/VJST.63(9).10-13

Phát hiện đột biến gen *RB1* trên mẫu mô u nguyên bào võng mạc tại miền Bắc Việt Nam năm 2020

Lê Thị Phương, Đào Nguyễn Hà Linh, Nguyễn Minh Ngọc, Trần Huy Thịnh, Trần Vân Khánh*

Trường Đại học Y Hà Nội

Ngày nhận bài 18/5/2021; ngày chuyển phản biện 21/5/2021; ngày nhận phản biện 24/6/2021; ngày chấp nhận đăng 28/6/2021

Tóm tắt:

U nguyên bào võng mạc, một bệnh ung thư mắt ở trẻ em, đa phần là do đột biến bất hoạt cả 2 bản sao của gen *RB1*. Chẩn đoán sớm và xác định đột biến gen *RB1* giúp cải thiện kết quả điều trị và quản lý bệnh nhân tốt hơn. Nghiên cứu được thực hiện trên 10 mẫu khối u của bệnh nhân u nguyên bào võng mạc bằng phương pháp giải trình tự trực tiếp. 11 đột biến khác nhau đã được tìm thấy ở 9/10 mẫu mô nghiên cứu bao gồm 6 đột biến vô nghĩa, 1 đột biến sai nghĩa, 1 đột biến vị trí cắt nối intron-exon và 3 đột biến lệch khung dịch mã, trong đó có 1 đột biến mới chưa được mô tả trước đó. Cần làm thêm phương pháp MLPA để xác định đột biến xoá đoạn lớn trên gen *RB1* và nghiên cứu mở rộng trên cỡ mẫu lớn hơn để đưa ra bức tranh về các đột biến gen *RB1* trên các bệnh nhân u nguyên bào võng mạc tại Việt Nam.

Từ khóa: **đột biến, gen *RB1*, giải trình tự gen, u nguyên bào võng mạc.**

Chỉ số phân loại: **3.2**

Đặt vấn đề

U nguyên bào võng mạc (UNBVM) hay ung thư võng mạc là một loại khối u nguyên bào thần kinh ác tính, nội nhãn, phổ biến ở trẻ em với tỷ lệ mắc là 1/16000 trẻ sơ sinh còn sống. Bệnh gây tử vong do di căn nếu không được điều trị kịp thời, vì vậy phát hiện sớm và áp dụng các phương pháp điều trị phù hợp là yếu tố quyết định sự sống còn của trẻ, giúp cứu vãn thị lực cho 1 hoặc cả 2 mắt. Tuy nhiên, việc nhận thức về những dấu hiệu ban đầu của bệnh còn hạn chế, đặc biệt là ở các nước đang phát triển trong đó có Việt Nam. Phần lớn các trường hợp UNBVM ở trẻ em được phát hiện muộn, khi khối u đã phát triển ra ngoài nhãn cầu hay di căn nên rất ít khả năng giữ lại mắt và duy trì thị lực [1].

Các nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra rằng UNBVM là do đột biến bất hoạt cả 2 bản sao của gen ức chế khối u *RB1* (Retinoblastoma Transcriptional Corepressor 1). Đây là gen nằm trên nhánh dài nhiễm sắc thể số 13 vị trí 13q14.2, có kích thước DNA là 183 kb gồm 27 exon mã hóa 928 acid amin, lần đầu tiên được được mô tả bởi Fung và cs vào năm 1987. Khoảng 45% các trường hợp UNBVM là do di truyền, kiểu di truyền trội trên nhiễm sắc thể thường, những người mang đột biến gen *RB1* di truyền cũng làm tăng nguy cơ mắc các khối u không phải mắt trong suốt đời sống của họ; khoảng 55% các trường hợp còn lại chỉ phát hiện đột biến trên mẫu mô ung thư võng mạc, và không có khuynh hướng phát triển khối u ở các vị trí khác. Đến nay, hơn 1000 đột biến gen *RB1* đã được ghi nhận trong các mẫu UNBVM, bao gồm các đột biến tạo mã kết thúc sớm, đột biến sai nghĩa, đột biến vị trí cắt nối intron-exon, đột biến lệch khung, và một phần nhỏ là đột biến mất đoạn lớn nằm rải rác trên vùng promoter và toàn bộ 27 exon [1-3]. Tỷ lệ phát hiện các đột biến trên mẫu mô ung thư là 94,9%, trong khi tỷ lệ phát hiện đột biến trên mẫu máu chỉ là 42,4%; xác định đột biến soma trên mẫu mô ung thư là chỉ điểm để xác định đột biến tế bào mầm trên mẫu máu. Chẩn đoán phân tử để xác định đột biến gen *RB1* cho những bệnh nhân UNBVM là rất cần thiết, không chỉ giúp bác sĩ lâm sàng lựa chọn liệu pháp điều trị thích hợp và có kế hoạch quản lý bệnh nhân hiệu quả, mà còn có ý nghĩa to lớn đối với việc tư vấn di truyền và dự đoán rủi ro cho các gia đình bị ảnh hưởng [4].

Ở Việt Nam, các nghiên cứu chủ yếu tập trung về tỷ lệ mắc bệnh, biểu hiện lâm sàng và các biến chứng của bệnh, một vài nghiên cứu xác định đột biến gen *RB1* đã được tiến hành trên bệnh nhân ở miền Bắc và miền Nam Việt Nam. Tuy nhiên, nghiên cứu trên bệnh nhân miền Bắc mới chỉ phân tích phát hiện đột biến gen *RB1* tế bào dòng mầm trong mẫu máu mà chưa tiến hành xác định đối chiếu trên cả mẫu mô sau phẫu thuật. Do đó, bức tranh về đột biến gen *RB1* ở bệnh nhân UNBVM Việt Nam vẫn chưa được nghiên cứu

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

Detecting *RB1* gene mutations in retinoblastoma tumour of patients in Northern Vietnam in 2020

Thi Phuong Le, Nguyen Ha Linh Dao, Minh Ngoc Nguyen, Huy Thinh Tran, Van Khanh Tran*

Hanoi Medical University

Received 18 May 2021; accepted 28 June 2021

Abstract:

Retinoblastoma, a type of eye cancer in children, is mostly caused by inactivating mutations of both copies of the *RB1* gene. Early diagnosis and identification of *RB1* gene mutations would improve treatment outcomes and patients' management. This study was performed on 10 tumour samples of retinoblastoma patients using the direct sequencing technique. 11 different mutations were found in 9 out of 10 tumour samples, including 6 nonsense mutations, 1 missense mutation, 1 splice site mutation, and 3 frameshift mutations with 1 novel mutation that has not been reported before. The MLPA method was required to identify large deletion mutations in the *RB1* gene and the study on more samples to provide a picture of *RB1* gene mutations in Vietnamese retinoblastoma patients.

Keywords: **mutation, *RB1* gene, retinoblastoma, sequencing.**

Classification number: **3.2**

đầy đủ và còn nhiều khó khăn để tư vấn di truyền, quản lý hiệu quả người mang gen bệnh cũng như chăm sóc, theo dõi bệnh nhân UNBVM sống sót sau khối u đầu tiên.

Từ những thực tiễn trên, nghiên cứu này được tiến hành với mục tiêu: "Phát hiện các đột biến gen *RB1* trên mẫu mô ung thư của một số bệnh nhân UNBVM tại miền Bắc Việt Nam năm 2020 bằng kỹ thuật giải trình tự gen Sanger".

Đối tượng và phương pháp

Đối tượng

- 3 mẫu DNA tách từ mẫu máu người khỏe mạnh để làm mẫu đối chứng và tối ưu quy trình kỹ thuật sinh học phân tử, phân tích gen.

- Nhóm bệnh: 10 mẫu dịch chọc hút khối UNBVM của bệnh nhân đã được chẩn đoán xác định ung thư võng mạc theo tiêu chuẩn nhãn khoa.

- Các mẫu bệnh nhân được thu thập tại Bệnh viện Mắt Trung ương năm 2020, các kỹ thuật sinh học phân tử được thực hiện nghiên cứu tại Trung tâm Nghiên cứu Gen - Protein, Trường Đại học Y Hà Nội.

Phương pháp

Thiết kế nghiên cứu mô tả cắt ngang:

Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu:

- Tách chiết DNA: DNA được tách chiết từ khối UNBVM bằng bộ kit The QIAamp DNA Mini Kit (hãng Qiagen - Đức), quy trình tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất; kiểm tra nồng độ, độ tinh sạch DNA sau tách chiết bằng phương pháp quang phổ.

- Kỹ thuật PCR khuếch đại 27 exon của gen *RB1* sử dụng các cặp mồi đã công bố của Abouzeid và cs (2007) [5] bằng bộ kit GoTaq® Hot Start Master Mixes - Promega, với chu trình nhiệt như sau: 95 độ 15 phút, (95 độ 30 giây, 58 độ 30 giây, 72 độ 30 giây) x35 chu kỳ, 72 độ 10 phút.

- Kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di trên gel agarose 1,5%.

- Phản ứng giải trình tự Sanger toàn bộ gen *RB1* sử dụng bộ kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI - Mỹ).

- Tinh sạch sản phẩm PCR sequencing bằng kit BigDye XTerminator™ Purification Kit (ABI - Mỹ).

- Điện di sản phẩm giải trình tự trên hệ thống phân tích di tryền ABI3500 (Applied Biosystem - Mỹ).

- So sánh kết quả gen *RB1* của bệnh nhân với trình tự chuẩn trên GeneBank (NG_009009) bằng phần mềm CLC main workbench để phát hiện các đột biến.

Đạo đức nghiên cứu trong y học: mẫu nghiên cứu được lấy khi bố mẹ bệnh nhân hoàn toàn đồng ý tham gia nghiên cứu; gia đình có quyền rời khỏi nghiên cứu khi không muốn tiếp tục tham gia vì bất kỳ lý do nào. Kết quả xét nghiệm gen sẽ được thông báo cho bố mẹ bệnh nhân để giúp cho các bác sỹ tư vấn điều trị và tư vấn di truyền. Các thông tin cá nhân sẽ được đảm bảo bí mật.

Kết quả

Bằng kỹ thuật giải trình tự gen toàn bộ 27 exon của gen *RB1* trên mẫu DNA tách từ khối UNBVM, nghiên cứu đã phát hiện được 9/10 (90%) bệnh nhân có đột biến trên gen *RB1*, trong đó có 6/9 bệnh nhân mang đột biến đồng hợp tử, 3/9 bệnh nhân mang 2 đột biến dị hợp tử kết hợp. 11 đột biến khác nhau đã được tìm thấy như bảng 1 dưới đây:

Bảng 1. Kết quả xác định đột biến gen *RB1* trên các bệnh nhân nghiên cứu.

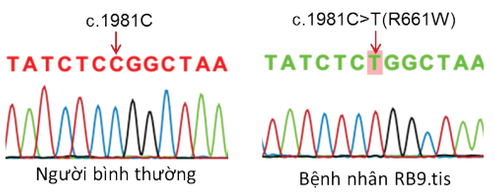
STT	Đột biến	Biến đổi acid amin	Vị trí	Bệnh nhân mang đột biến
	Đột biến tạo mã kết thúc sớm (nonsense)			
1	c.179T>A	p.Leu60Ter	Exon 2	RB7
2	c.1333C>T	p.Arg445Ter	Exon 14	RB5, RB10
3	c.1363C>T	p.Arg455Ter	Exon 14	RB4
4	c.1399C>T	p.Arg467Ter	Exon 15	RB6
5	c.1654C>T	p.Arg552Ter	Exon 17	RB10
6	c.2415T>A	p.Tyr805Ter	Exon 23	RB3
	Đột biến sai nghĩa (missense)			
7	c.1981C>T	p.Arg661Trp	Exon 20	RB9
	Đột biến vị trí cắt nối (splice)			
8	c.2520+5G>A	Mất vị trí cắt nối các exon/intron	Intron 24	RB2
	Đột biến lệch khung (frameshift)			
9	c.32_63del	p.Ala11Glyfs*9	Exon 1	RB1
10	c.1044delA	p.Ile348Metfs*19	Exon 10	RB2
11	c.2330delC	p.Pro777Leufs*33	Exon 23	RB3

11 đột biến khác nhau bao gồm: 6 đột biến tạo mã kết thúc sớm hay còn gọi là đột biến vô nghĩa (nonsense), 1 đột biến thay đổi acid amin (missense), 1 đột biến vị trí cắt nối exon-intron (splice) và 3 đột biến lệch khung (frameshift).

Đột biến thay thế nucleotide

Nghiên cứu đã xác định được 8 đột biến thay thế nucleotide bao gồm 6 đột biến tạo mã kết thúc sớm hay còn gọi là đột biến vô nghĩa (nonsense), 1 đột biến thay đổi acid amin (missense) và 1 đột biến vị trí cắt nối exon-intron (splice).

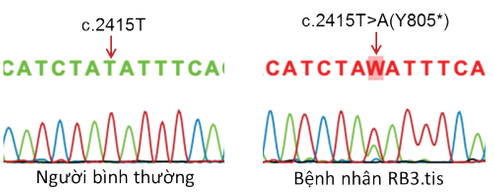
Đột biến thay thế đồng hợp tử:



Hình 1. Đột biến thay thế nucleotide đồng hợp tử.

Hình 1 cho thấy, vị trí 1981 trên cDNA gen *RB1* tương ứng với trình tự nucleotide C ở người bình thường đã bị thay thế bằng nucleotide T ở bệnh nhân RB9 trên cả 2 alen, điều này làm thay đổi bộ 3 CGG mã hóa acid amin Arginin ở vị trí codon 661 thành bộ 3 TGG mã hóa Tryptophan, đây là đột biến đồng hợp tử hay đột biến sai nghĩa (missense).

Đột biến thay thế dị hợp tử:

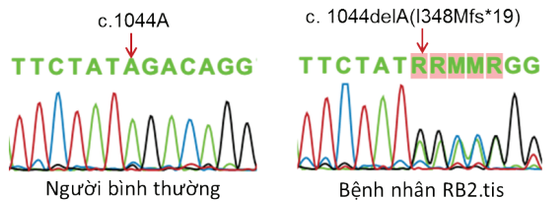


Hình 2. Đột biến thay thế nucleotide dị hợp tử.

Hình 2 cho thấy, tại vị trí c.2415 của gen *RB1* có trình tự là nucleotide T ở người bình thường đã được thay thế bằng nucleotide A ở bệnh nhân RB3, sự thay thế chỉ xảy ra trên 1 alen nên kết quả giải trình tự tại điểm này có 2 đỉnh chồng lên nhau. Đột biến thay thế dị hợp tử T bằng A dẫn đến sự thay thế bộ 3 TAT mã hoá tyrosine (Y) ở vị trí codon 805 bằng bộ 3 kết thúc TAA.

Đột biến làm lệch khung dịch mã (frameshift)

Có 3 đột biến xoá nucleotide đã được tìm thấy trong nghiên cứu, bao gồm đột biến đồng hợp c.32_63del (p.Ala11Glyfs*9) ở bệnh nhân RB1, đột biến dị hợp c.1044delA (p.Ile348Metfs*19) ở bệnh nhân RB2 và đột biến dị hợp c.2330delC(p.Pro777Leufs*33) ở bệnh nhân RB3.



Hình 3. Đột biến dị hợp tử xoá nucleotide A ở bệnh nhân RB2.

Tại vị trí nucleotide c.1044 gen *RB1* ở người bình thường là A, còn ở bệnh nhân RB2 vị trí này bị mất nucleotide A dị hợp tử nên kết quả giải trình tự sau đó các đỉnh bị chồng lên nhau (hình 3). Việc mất nucleotide A sẽ gây nên lệch khung dịch mã và tạo mã kết thúc sớm ở vị trí acid amin thứ 19 bắt đầu từ vị trí đột biến mất nucleotide.

Bàn luận

Ung thư võng mạc xảy ra khi đột biến bất hoạt cả 2 alen của gen áp chế khối u RB1 [6]. Các đột biến trong gen *RB1* mang tính chất không đồng nhất, phân bố trên cả vùng promoter cũng như 27 exon. Hơn 2/3 các đột biến trong gen *RB1* được dự đoán là tạo nên mã kết thúc sớm (nonsense) dẫn tới hình thành protein RB1 không hoàn chỉnh. Cho đến nay, trên 1000 đột biến gen *RB1* đã được đưa vào ngân hàng dữ liệu ClinVar [3]. 16 điểm nóng đột biến của gen *RB1* bao gồm các đột biến vô nghĩa, đột biến ảnh hưởng tới phân cắt mRNA và đột biến sai nghĩa đã được thống kê thường xảy ra tại các exon 9, 10, 14, 17, 18, 20 và 23 trong nghiên cứu tổng hợp (meta-analysis) của Valverde và cs (2005) cũng như nghiên cứu của Tomar và cs trên bệnh nhân Singapore năm 2017 [4, 7].

Các đột biến tạo mã kết thúc sớm là dạng đột biến gen *RB1* thường gặp nhất, đột biến làm thay thế nucleotide tạo nên bộ 3 kết thúc sớm hay tín hiệu dừng dịch mã sớm dẫn đến hậu quả không tạo được sản phẩm protein RB1 hoặc tạo ra protein RB1 không có chức năng gây nên bệnh UNBVM [4]. Có 6/11 đột biến tạo mã kết thúc sớm đã phát hiện được trong nghiên cứu, các đột biến này đã được báo cáo trong các

nghiên cứu trên thế giới. Đột biến c.179T>A(p.Leu60Ter) được công bố lần đầu tiên bởi He và cs (2014) [8] trên các bệnh nhân Trung Quốc, sự thay thế T bằng A làm thay đổi bộ 3 TTA mã hoá Leucin ở vị trí codon 60 trên exon 2 thành bộ 3 kết thúc TAA. Một đột biến thay thế nucleotide dạng đột biến sai nghĩa đã được tìm thấy là c.1981C>T(p.Arg661Trp) ở exon 20, đột biến này cũng đã được báo cáo ở nhiều bệnh nhân UNBVM trên toàn thế giới, Whitaker và cs (1988) đã chứng minh đột biến c.1981C>T(p.Arg661Trp) làm giảm hoạt động của protein RB1 gây nên bệnh lý UNBVM [9]. Một đột biến thay thế nucleotide ở vị trí cắt nối cũng được tìm thấy trong nghiên cứu là c.2520+5G>A ở intron 24, tuy không trực tiếp làm thay đổi trình tự mã hoá acid amin của protein RB1 nhưng ảnh hưởng đến vị trí cắt bỏ intron 24 để nối exon 24 và 25 vào nhau tạo nên mRNA hoàn chỉnh. Đột biến này đã được công bố gây bệnh và được mô tả trên ngân hàng dữ liệu biến thể gen *RB1* (variant ID: 428703) [3].

Những đột biến lệch khung được tìm thấy trong nghiên cứu là c.32_63del(p.Ala11Glyfs*9) ở exon 1, c.1044delA(p.Ile348Metfs*19) ở exon 10 và c.2330delC(p.Pro777Leufs*33) ở exon 23. Những đột biến này sẽ gây lệch khung dịch mã ngay tại vị trí nucleotide bị mất và sẽ tạo nên một tín hiệu kết thúc sớm sau đó một hoặc một số acid amin vì vậy sẽ không tạo được protein RB1 hoặc tạo ra protein RB1 không có chức năng gây nên bệnh UNBVM. Đột biến c.32_63del(p.Ala11Glyfs*9) ở exon 1 đã được mô tả gây bệnh UNBVM trên các công bố khác nhau [3]. Đột biến c.2330delC(p.Pro777Leufs*33) ở exon 23 chưa được ghi nhận trên các ngân hàng dữ liệu đột biến gen *RB1* trong bệnh UNBVM, tuy nhiên đã được George và cs (2015) [10] tìm thấy trong ung thư phổi không tế bào nhỏ c.1044delA(p.Ile348Metfs*19) ở exon 10 là đột biến mới lần đầu tiên được tìm thấy trong nghiên cứu, vị trí c.1044 bị mất nucleotide A dị hợp tử làm cho một mạch của mRNA bị lệch khung dịch mã, các acid min từ vị trí codon 348 sẽ bị thay thế bằng các acid amin khác, sự thay thế này sẽ dừng lại sau đó 19 acid amin do tạo thành mã kết thúc. Đột biến này được tìm thấy ở bệnh nhân mã số RB2, ngoài đột biến dị hợp tử làm lệch khung dịch mã ở exon 10, bệnh nhân còn mang một đột biến dị hợp tử c.2520+5G>A làm mất vị trí cắt nối ở intron 24.

Nghiên cứu mới chỉ tiến hành được trên 10 mẫu dịch chọc hút khối UNBVM nhưng đã phát hiện được 11 đột biến khác nhau trên 9 bệnh nhân. Việc xác định đột biến tế bào soma trên mẫu mô ung thư là chỉ điểm cho việc xác định đột biến tế bào mầm trên mẫu máu ở các bệnh nhân UNBVM, làm cơ sở để xác định tình trạng mang gen trên các thành viên gia đình bệnh nhân. Việc này không chỉ giúp bác sĩ lâm sàng khẳng định chẩn đoán, lựa chọn phương pháp điều trị kịp thời, mà còn giúp tăng nhận thức về nguy cơ mắc để khám đáy mắt định kỳ ở những thành viên gia đình. Đồng thời, đây cũng là cơ sở để tư vấn di truyền, tư vấn trước hôn nhân, chẩn đoán trước sinh hay trước làm tổ đối với những người mang gen nhóm bệnh lý này.

Một bệnh nhân chưa tìm thấy đột biến bằng phương pháp giải trình tự gen trực tiếp có thể do bệnh nhân mang đột biến xoá đoạn lớn gen *RB1* hoặc đột biến ở một gen khác, cần làm thêm phương pháp MLPA hoặc giải trình tự gen thế hệ mới (Next Generation Sequencing) để khẳng định thêm. Nghiên cứu cũng cần mở rộng trên nhiều bệnh nhân hơn để đưa ra bức tranh về các đột biến gen *RB1* trên bệnh nhân UNBVM tại Việt Nam.

Kết luận

Nghiên cứu đã phát hiện được 9/10 (90%) bệnh nhân có đột biến trên gen *RB1* ở mẫu UNBVM. 11 đột biến khác nhau đã được phát hiện, trong đó có 6 đột biến vô nghĩa (nonsense), 3 đột biến lệch khung (frameshift), 1 đột biến thay đổi acid amin (missense) và 1 đột biến vị trí cắt nối intron-exon (splice).

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ kinh phí bởi Đề tài nghiên cứu khoa học và công nghệ cấp Bộ Y tế "Nghiên cứu đặc điểm di truyền đột biến gen *RB1* trên bệnh nhân u nguyên bào võng mạc và các thành viên trong gia đình; đề xuất quy trình xét nghiệm di truyền sàng lọc và chẩn đoán sớm" theo Quyết định số 2385/QĐ-BYT ngày 14/5/2021. Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] H. Dimaras and T.W. Corson (2019), "Retinoblastoma, the visible CNS tumor: a review", *J. Neurosci. Res.*, **97(1)**, pp.29-44.

[2] H.R. Davies, et al. (2021), "Whole-genome sequencing of Retinoblastoma reveals the diversity of rearrangements disrupting *RB1* and uncovers a treatment-related mutational signature", *Cancers (Basel)*, **13(4)**, DOI: 10.3390/cancers13040754.

[3] https://clinvarminer.genetics.utah.edu/variants-by-gene/RB1/significance/any.

[4] S. Tomar, et al. (2017), "Mutation spectrum of *RB1* mutations in retinoblastoma cases from Singapore with implications for genetic management and counselling", *PLOS ONE*, **12(6)**, DOI: 10.1371/journal.pone.0178776.

[5] H. Abouzeid, et al. (2007), "Ten novel *RB1* gene mutations in patients with retinoblastoma", *Mol. Vis.*, **13**, pp.1740-1745.

[6] J.L. Berry, et al. (2019), "The RB1 story: characterization and cloning of the first tumor suppressor gene", *Genes (Basel)*, **10(11)**, DOI: 10.3390/genes10110879.

[7] J.R. Valverde, et al. (2005), "*RB1* gene mutation up-date, a meta-analysis based on 932 reported mutations available in a searchable database", *BMC Genet.*, **6**, DOI: 10.1186/1471-2156-6-53.

[8] M.-Y. He, et al. (2014), "Screening of *RB1* gene mutations in Chinese patients with retinoblastoma and preliminary exploration of genotype-phenotype correlations", *Molecular Vision*, **20**, pp.545-552.

[9] L.L. Whitaker, et al. (1998), "Growth suppression by an E2F-binding-defective retinoblastoma protein (RB): contribution from the RB C pocket", *Mol. Cell. Biol.*, **18(7)**, pp.4032-4042.

[10] J. George, et al. (2015), "Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer", *Nature*, **524(7563)**, pp.47-53.

DOI: 10.31276/VJST.63(9).14-21

Sàng lọc các hợp chất tương tự nucleotide và nucleoside ức chế enzym RNA-dependent RNA polymerase của SARS-CoV-2 bằng phương pháp docking phân tử nhằm điều trị bệnh COVID-19

Tạ Thị Thu Hằng[1], Nguyễn Bảo Kim[1], Lê Đăng Huy[2], Bùi Thanh Tùng[1*]

[1]Trường Đại học Y dược, Đại học Quốc gia Hà Nội
[2]Trường Đại học Dược Hà Nội

Ngày nhận bài 8/6/2021; ngày chuyển phản biện 14/6/2021; ngày nhận phản biện 23/8/2021; ngày chấp nhận đăng 27/8/2021

Tóm tắt:

Đại dịch COVID-19 do virus SARS-CoV-2 gây ra hiện đang là mối quan tâm lớn của toàn nhân loại. Enzym RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) của SARS-CoV-2 tham gia điều hòa quá trình nhân lên của virus được đánh giá là một mục tiêu điều trị tiềm năng để kìm hãm sự lây nhiễm của SARS-CoV-2. Trong nghiên cứu này, các tác giả tiến hành sàng lọc các hợp chất tương tự nucleotide có khả năng ức chế enzym SARS-CoV-2 RdRp bằng cách sử dụng phương pháp docking phân tử. Quy tắc 5 tiêu chí của Lipinski được sử dụng để đánh giá đặc tính giống thuốc của các hợp chất tiềm năng. Các thông số dược động học của các hợp chất tiềm năng được đánh giá bằng công cụ pkCSM. Dựa trên các công bố trước đây, bài báo đã thu thập được 100 hợp chất tương tự nucleotide và nucleoside. Kết quả cho thấy, có 18 hợp chất có tác dụng ức chế enzym SARS-CoV-2 RdRp mạnh hơn cả chất chứng dương remdesivir. Phân tích quy tắc Lipinski cho thấy, 17/18 hợp chất đó có đặc tính giống thuốc. Các hợp chất: novuridin, didanosine, sofosbuvir, puromycin, defibrotite, gemcitabine và nikkomycins là các chất có năng lượng âm nhất và đặc tính dược động học dễ hấp thu, không bị chuyển hóa ở gan, thải trừ qua thận và có thể có độc tính với gan. Chính vì vậy, cần tiến hành các nghiên cứu *in vitro* và *in vivo* để có thể phát triển các hợp chất này thành thuốc điều trị COVID-19.

Từ khóa: ***in silico*****, molecular docking, remdesivir, RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), SARS-CoV-2.**

Chỉ số phân loại: **3.4**

Đặt vấn đề

Kể từ khi hội chứng hô hấp cấp tính COVID-19 lần đầu tiên được phát hiện tại thành phố Vũ Hán, tỉnh Hồ Bắc, Trung Quốc, giới khoa học cũng như toàn nhân loại đã phải đối mặt với một thách thức chưa từng có để tìm ra phương pháp điều trị căn bệnh này. Với tốc độ lây lan nhanh chóng của nó, tính đến ngày 01/6/2021, đã có 171 triệu trường hợp lây nhiễm và 3,57 triệu trường hợp tử vong được báo cáo [1]. Tại Việt Nam, đã ghi nhận 7.625 trường hợp mắc và 48 trường hợp tử vong. Các triệu chứng lâm sàng thường được nhận thấy sau 5 hoặc 6 ngày sau khi nhiễm bệnh nhưng thời gian ủ bệnh có thể lên đến 14 ngày [2]. Sốt, ho, khó thở, mệt mỏi là những triệu chứng phổ biến nhất.

Virus SARS-CoV-2 có bộ gen RNA sợi đơn với kích thước 29,9 kb. Nó bao gồm 14 khung đọc mở (ORF), mã hóa cho tổng số 27 protein được chia thành protein cấu trúc và không cấu trúc [3]. RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) là một enzym quan trọng đối với vòng đời RNA của virus, tham gia vào quá trình phiên mã và dịch mã của bộ gen virus SARS-CoV-2. Do đó, RdRp được coi là mục tiêu chính cho các chất ức chế giúp điều trị virus SARS-CoV-2 [4-7].

Docking phân tử là một kỹ thuật mô hình hóa để dự đoán vị trí và cấu hình thuận lợi mà phân tử cơ chất (phối tử) có thể liên kết với phân tử protein (đích tác dụng). Phương pháp này tiết kiệm thời gian và chi phí trong việc sàng lọc các hợp chất so với phương pháp thực nghiệm [8].

Remdesivir là một loại thuốc kháng virus đã được Cục Quản lý thực phẩm và dược phẩm Mỹ (FDA) chấp thuận để điều trị COVID-19 cho những bệnh nhân phải nhập viện [9]. Là một chất tương tự nucleotide, remdesivir có tác dụng ức chế enzym SARS-CoV-2 RdRp [10]. Các hợp chất tương tự nucleotide là các este phosphat của nucleoside, là tiểu đơn vị của axit deoxyribonucleic (DNA) và axit ribonucleic (RNA). Chúng bao gồm một gốc đường được liên kết với một gốc purin hoặc pyrimidin thông qua liên kết β-N-glycosidic [11]. Trên thực tế, cũng đã có những hợp chất tương tự nucleotide như cidofovir, abacavir, stavudine và entecavir được nghiên cứu trở thành thuốc và được FDA phê duyệt để điều trị các bệnh nhiễm virus khác nhau [12-15]. Do đó, dựa trên giả thuyết rằng, những chất có cấu trúc tương đồng được kỳ vọng là có hoạt tính sinh học giống

*Tác giả liên hệ: Email: tungasia82@gmail.com

Screening nucleotide and nucleoside analogues as potential inhibitors of SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase by the molecular docking method for the treatment of COVID-19

Thi Thu Hang Ta[1], Bao Kim Nguyen[1], Dang Huy Le[2], Thanh Tung Bui[1*]

[1]University of Medicine and Pharmacy, Vietnam National University, Hanoi
[2]Hanoi Pharmaceutical Univercity

Received 8 June 2021; accepted 27 August 2021

Abstract:

The COVID-19 pandemic triggering acute respiratory syndrome is a major global health concern. The SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) enzyme regulating viral replication has been evaluated as a potential therapeutic target for inhibition of the infection of SARS-CoV-2. In this study, we evaluated the ability of RNA-dependent RNA polymerase drug inhibitors by using molecular docking *in silico* model. Lipinski's rule of Five was used to evaluate drug - like properties of potential compound. Pharmacokinetic parameters of potential compounds were assessed using the pkCSM tool. Based on previous publications, we have collected 100 compounds. The results exhibited that 18 compounds have RdRp inhibitory activity stronger than the remdesivir as reference compounds. The Lipinski's rule of Five showed that 17 among 18 compounds had proprietary drug-likenesss. Compounds including novuridine, didanosine, sofosbuvir, puromycin, defibrotite, gemcitabine, and nikkomycins are the most negative energies and have pharmacokinetic good absorption, not metabolised in the liver, excreted by the kidney and may have hepatotoxicity properties. Therefore, it is necessary to conduct the *in vitro* and *in vivo* assays to develop these compounds into drugs for COVID-19 treatment.

Keywords: ***in silico*****, molecular docking, remdesivir, RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), SARS-CoV-2.**

Classification number: **3.4**

nhau, chúng tôi tiến hành sàng lọc các hợp chất tiềm năng có cấu trúc tương tự nucleotide và nucleoside có khả năng ức chế enzym RdRp để điều trị bệnh COVID-19.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Mô hình docking

Chuẩn bị cấu trúc protein: cấu trúc enzym 3D của SARS-CoV-2 RdRp (PDB ID: 7BV2) được truy xuất từ Ngân hàng dữ liệu protein RCSB (www.rcsb.org). Trong phức hợp 7BV2 đã chứa sẵn ligand đồng kết tinh là [(2~{R},3~{S},4~{R},5~{R})-5-(4-azanylpyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-5-cyano-3,4-bis (oxidanyl)oxolan-2-yl] methyl dihydrogen phosphate. Vùng hoạt động (binding site) của protein được xác định bằng phần mềm MOE và Discovery Studio Visualizer 4.0. Để chuẩn bị cho quá trình docking, tất cả các phân tử nước và đồng tinh thể đã được loại bỏ khỏi phân tử protein bằng phần mềm Discovery Studio Visualizer 4.0. Các phân tử hydrogen sẽ được thêm vào bằng phần mềm Autodock Vina trước khi tái lập vùng hoạt động của protein sử dụng phần mềm MGL Autodock tools 1.5.6. Vùng hoạt động của enzym SARS-CoV-2 RdRp được xác định trong một hộp lưới có kích thước 104x80x118 Å, trung tâm (x,y,z) là (87,682, 89,834, 107,939). Sau đó lưu protein dưới định dạng pdbqt để chuẩn bị cho quá trình docking.

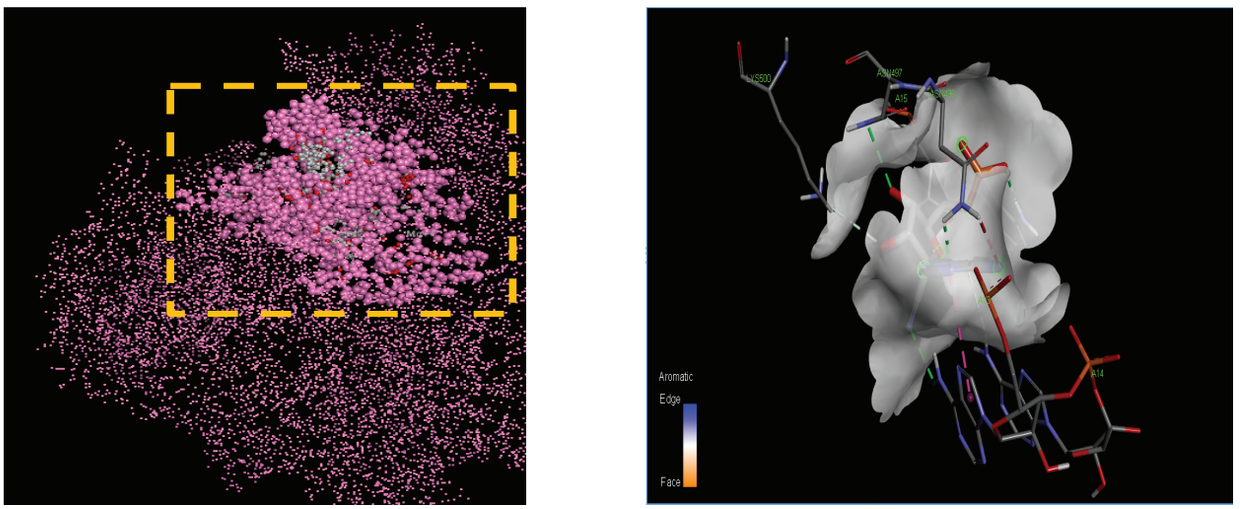
Chuẩn bị cấu trúc phối tử: dựa trên các công bố trước đây, chúng tôi thu thập được 100 hợp chất tương tự nucleotide. Cấu trúc 3D của những hợp chất này được lấy từ cơ sở dữ liệu PubChem ở định dạng sdf, sau đó chuyển thành định dạng pdb bằng phần mềm Chimera [16, 17]. Tiếp theo, các phối tử được tối ưu hóa bằng phần mềm Avogadro sử dụng phương pháp Gradient liên hợp (Conjugate Gradients) rồi chuyển thành định dạng pdbqt bằng phần mềm Autodock Tool [18, 19].

Thực hiện docking phân tử: các phối tử được dock vào trung tâm hoạt động của protein bằng phần mềm Autodock vina. Sử dụng phần mềm Discovery Studio Visualizer 2020 giúp quan sát các liên kết giữa protein và các hợp chất sàng lọc được.

Đánh giá kết quả docking: để đánh giá kết quả quá trình docking, phối tử từ đồng tinh thể đã được re-dock lại vào vị trí hoạt động của mục tiêu. Quá trình được thực hiện thành công nếu giá trị độ lệch bình phương trung bình gốc (RMSD) nhỏ hơn hoặc bằng 1,5 Å.

Đánh giá quy tắc 5 tiêu chí của Lipinski

Quy tắc 5 tiêu chí của Lipinski được sử dụng để đánh giá đặc tính giống thuốc của các hợp chất [20]. Chúng tôi sử dụng công cụ online (http://www.scfbio-iitd.res.in/software/drugdesign/lipinski.jsp) để đánh giá quy tắc 5 tiêu chí của Lipinski [21].



Hình 1. Vùng hoạt động của RdRp được xác định bằng phần mềm MOE (trái) và Discovery Studio Visualizer 2020 (phải).

Dự đoán các thông số dược động học

Kết quả dự đoán các thông số về dược động học bao gồm hấp thu, phân bố, chuyển hóa, thải trừ và độc tính (ADMET) của các hợp chất tiềm năng được đánh giá qua công cụ pkCSM (http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/prediction) [22].

Kết quả

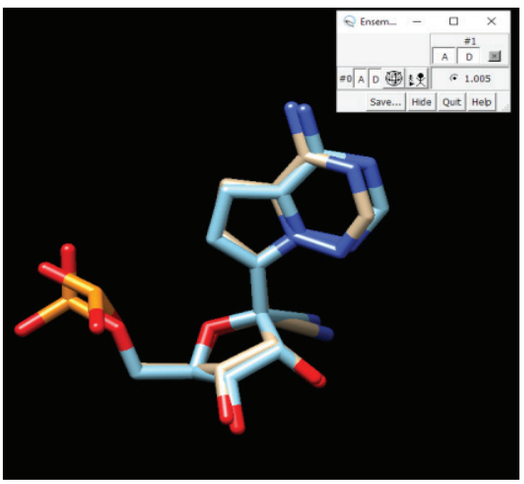
Vùng hoạt động của protein

Vùng hoạt động (vị trí liên kết) của protein RdRp được xác định bằng công cụ SiteFinder của phần mềm MOE và Discovery Studio Visualizer 2020 (hình 1). Đồng thời, các acid amin quan trọng ở vùng hoạt động này cũng được xác định, bao gồm: ASN496, LYS593, THR591, GLY590, LEU758, CYS813, ASP760, ASP761, ASP618, TYR619, PRO620, LYS621, CYS622, ASP623.

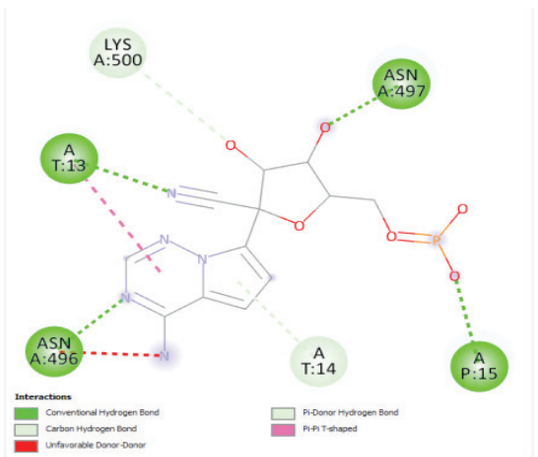
Đánh giá mô hình docking

Trước khi sàng lọc các hợp chất, phối tử đồng kết tinh được tách ra khỏi phức hợp 7BV2 rồi được re-dock lại vào vị trí hoạt động của mục tiêu để xác định độ lệch bình phương trung bình gốc (RMSD), từ đó đánh giá tính phù hợp của các thông số docking. Kết quả sau khi docking lại phối tử đồng tinh thể thu được giá trị RMSD là 1,005 Å (hình 2). Giá trị này thỏa mãn điều kiện RMSD nhỏ hơn 1,5 Å, chứng tỏ kết quả docking phân tử vào mục tiêu là đáng tin cậy.

Sự tương tác giữa phối tử đồng kết tinh và RdRp được thể hiện như trong hình 3. Từ hình ta có thể thấy được phối tử đồng kết tinh hình thành liên kết với nhiều acid amin như: liên kết conventional hydro với ASN496, ASN497; liên kết hydro carbon với LYS500 và liên kết với một số nucleobase như A13, A14, A15.



Hình 2. Kết quả re-dock của phối tử đồng kết tinh.



Hình 3. Tương tác 2D của ligand đồng kết tinh với SARS-CoV-2 RdRp.

Bảng 1. Kết quả docking các phân tử hợp chất vào đích RdRp với mức năng lượng liên kết tương ứng.

STT	Tên	Năng lượng liên kết (kcal/mol)	STT	Tên	Năng lượng liên kết (kcal/mol)
1	Zidovudin	-7,1	52	6-Azauridin	-6,6
2	Tenofovir alafenamit	-7,6	53	Mizoribin	-6,9
3	Zalcitabin	-7,5	54	Acyclovir fleximer 1	-6,1
4	Adefovir dipivoxil	-7,3	55	Acyclovir fleximer 2	-6,4
5	**Defibrotite**	**-8,5**	56	Acyclovir fleximer 3	-5,2
6	Emtricitabin	-6,1	57	CNDAC	-6,8
7	**Azacitidin**	**-8,1**	58	Fluorocyclopentenylcytosin	-6,9
8	Famciclovir	-5,6	59	TaraC	-6,2
9	**Sofosbuvir**	**-8,7**	60	8amino-adenosin	-7,0
10	**Gemcitabine**	**-8,5**	61	8chloro-adenosin	-7,3
11	Nelarabin	-7,2	62	ARC	-4,0
12	Penciclovir	-5,7	63	Valopicitabin	-7,5
13	Stavudin	-6,3	**64**	**Mericitabin**	**-7,7**
14	Decitabin	-6,6	65	Elvucitabin	-6,2
15	Telbivudin	-6,6	66	Apricitabin	-6,1
16	Abacavir	-7,1	67	Cyclopropavir	-7,1
17	Fluorouracil	-5,9	68	Festinavir	-7,5
18	Acyclovir	-6,5	69	4′-thio2´deoxycytidin	-6,1
19	Entecavir	-7,2	70	5aza-4′-thio2´deoxycytidin	-6,0
20	Trifluridin	-7,1	71	Zebularin	-7,0
21	**Ganciclovir**	**-7,8**	72	5-fluorouracil	-5,7
22	Tegafur	-5,9	73	6-thioguanin	-5,5
23	Ribavirin	-6,5	74	6-Mercaptopurin	-4,9
24	Neplanocin	-5,6	75	6-Azacytidin	-6,8
25	Acid Inosinic	-7,4	76	3-Deazauridin	-6,6
26	Tenofovir	-6,0	77	Fludarabin phosphat	-6,9
27	Tezacitabin	-6,8	78	2'-deoxycoformycin	-6,8
28	Triazavirin	-6,0	79	2-Chloro-2'-deoxyadenosin	-7,0
29	Galidesivir	-7,3	80	2'-Deoxy-2'-methylenecytidin	-6,5
30	Ropidoxuridin	-5,3	81	5-Ethyldeoxyuridin	-6,6
31	Acadesin	-6,9	82	Brivudin	-5,9
32	8-azaguanin	-6,1	83	5-(2-Chloroethyl)-2'-deoxyuridin	-6,0
33	GS-441524	-7,6	84	E-5-(2-Iodovinyl)-2'-deoxyuridin	-5,5
34	Troxacitabin	-6,2	85	HPMPA	-6,0
35	**Cyclic GMP**	**-8,2**	**86**	**Novuridin**	**-8,8**
36	Cyclic AMP	-7,6	87	Alovudin	-6,5
37	Cytarabin (Ara-C)	-6,4	**88**	**Neosidomycin**	**-7,9**
38	2-CdA	-6,8	**89**	**Psicofuranin**	**-8,4**
39	Fludarabine	-6,6	90	Tubercidin	-7,3
40	**Didanosine**	**-8,7**	91	Coformycin	-7,2
41	Vidarabine (Ara-A)	-6,9	**92**	**Puromycin**	**-8,7**
42	Valaciclovir	-6,4	**93**	**Blasticidin S**	**-8,0**
43	Brivudin	-6,1	**94**	**Bamicetin**	**-9,8**
44	Valganciclovir	-6,9	**95**	**Nucleocidin**	**-7,7**
45	Lamivudin	-6,0	**96**	**Nikkomycins**	**-8,5**
46	Cidofovir	-5,6	**97**	**Cladribin**	**-7,7**
47	Lobucavir	-6,8	98	Clofarabin	-7,1
48	Adefovir	-5,9	99	Floxuridin	-6,7
49	Idoxuridin	-6,3	**100**	**EIDD-2801**	**-7,9**
50	Immucillins	-6,7	**101**	**Chứng dương Remdesivir**	**-7,7**
51	β-d-N4-hydroxycytidin	-7,0			

Sàng lọc các hợp chất ức chế RdRp

Sau khi chuẩn bị các phối tử, tiến hành docking toàn bộ 100 hợp chất thu thập được vào enzym RdRp để tìm kiếm các hợp chất có khả năng ức chế RdRp. Kết quả thu được ở bảng 1.

So sánh năng lượng liên kết của phối tử đồng kết tinh với 100 hợp chất, chúng tôi thu được 18 hợp chất tối ưu so với phối tử đồng kết tinh remdesivir (-7,7 kcal/mol).

Kết quả đánh giá quy tắc 5 tiêu chí của Lipinski

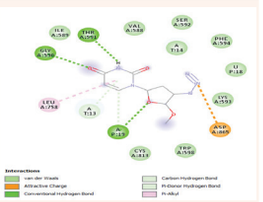
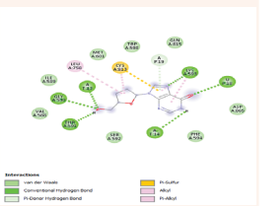
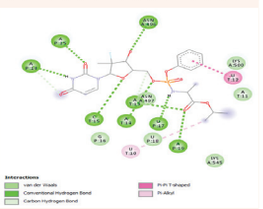
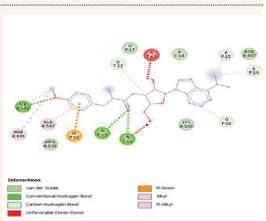
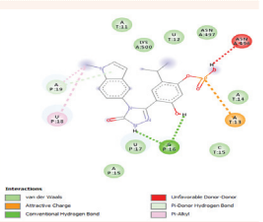
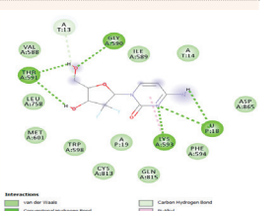
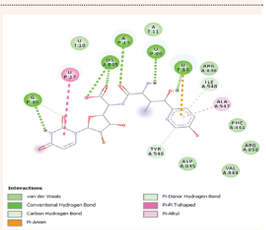
Các hợp chất được gọi là "giống thuốc" khi chúng đáp ứng ít nhất 2 trong 5 tiêu chí theo quy tắc 5 tiêu chí của Lipinski: (1) Khối lượng phân tử <500 Da; (2) Có tính ưa dầu cao (LogP nhỏ hơn 5); (3) Không có nhiều hơn 5 nhóm cho liên kết hydrogen; (4) Không có nhiều hơn 10 nhóm nhận liên kết hydrogen; (5) Độ khúc xạ mol phải nằm trong khoảng 40-130. Kết quả đáp ứng quy tắc 5 tiêu chí theo Lipinski của các hợp chất trên được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả đánh giá quy tắc 5 tiêu chí của Lipinski.

STT	Hợp chất	Trọng lượng phân tử	Nhóm cho liên kết hydrogen (HBD)	Nhóm nhận liên kết hydrogen (HBA)	logP	Độ khúc xạ mol (MR)	Hợp chất giống thuốc
1	Defibrotite	444	4	9	3,370198	115,334564	Có
2	Azacitidin	244	5	9	-2,796001	55,109795	Có
3	Sofosbuvir	529	3	12	1,999300	123,152649	Có
4	Gemcitabine	263	4	7	-0,993700	54,697998	Có
5	Ganciclovir	255	5	8	-2,100000	60,020195	Có
6	Cyclic GMP	345	5	11	-1,653200	71,542686	Có
7	Didanosine	236	2	6	-0,043800	58,074993	Có
8	Mericitabin	399	2	9	1,13000	96,686371	Có
9	Novuridin	253	1	9	0,070980	55,173691	Có
10	Neosidomycin	348	4	7	-0,148599	87,392975	Có
11	Psicofuranin	297	6	9	-2,833500	68,767586	Có
12	Puromycin	471	5	11	-0,793701	123,256668	Có
13	Blasticidin S	422	9	13	-1,923828	107,118393	Có
14	Bamicetin	604	8	15	-1,378799	152,718018	Không
15	Nucleocidin	364	6	11	-1,374200	74,813385	Có
16	Nikkomycins	495	9	15	-3,134398	112,759758	Có
17	Cladribin	285.5	4	7	-0,297400	66,364990	Có
18	EIDD-2801	329	4	10	-1,142801	75,353088	Có

Kết quả từ bảng 2 cho thấy, hầu hết các hợp chất đều thỏa mãn lớn hơn hoặc bằng 2/5 tiêu chí trong quy tắc 5 tiêu chí của Lipinski, ngoại trừ bamicetin. Mặc dù bamicetin cho kết quả mức năng lượng âm nhất (-9,8 kcal/mol) nhưng lại không thỏa mãn quy tắc 5 tiêu chí của Lipinski nên khả năng phát triển thành thuốc bị hạn chế. Trong số 17/18 hợp chất thỏa mãn, chúng tôi chọn ra 7 chất có năng lượng liên kết âm

Bảng 3. Tương tác giữa các phối tử với các acid amin và nucleobase của 7 hợp chất có năng lượng âm nhất.

STT	Tên	Năng lượng liên kết (kcal/mol)	Các acid amin và nucleobase liên kết	Biểu diễn tương tác 2D của các hợp chất với acid amin và nucleobase
1	Novuridin	-8,8	A13, A19, GLY590, THR591, LEU758, ASP865	
2	Didanosine	-8,7	A13, A14, A19, U18, GLY590, THR591, LYS593, LEU758, CYS813	
3	Sofosbuvir	-8,7	A13, A14, A15, A19, U10, U12, U17, U18, ASN496	
4	Puromycin	-8,7	A11, A13, A14, A15, A19, U12, U18, G16, ALA547, ILE548, PHE441	
5	Defibrotite	-8,5	A13, U18, A19, G16, ASN496	
6	Gemcitabine	-8,5	U18, GLY590, THR591, LYS593	
7	Nikkomycins	-8,5	A19, U17, G16, U18, U20, LYS545, TYR546, ALA547, ILE548	

nhất gồm: novuridin, didanosine, sofosbuvir, puromycin, defibrotite, gemcitabine và nikkomycins để tiến hành phân tích và đánh giá đặc tính dược động học (hấp thu, phân bố, chuyển hóa, thải trừ và độc tính) của những chất này.

Tương tác giữa 7 hợp chất có năng lượng liên kết âm nhất với các acid amin và nucleotit được tổng hợp trong bảng 3. Kết quả cho thấy, các liên kết phối tử - acid amin và phối tử - nucleobase đều có sự tương đồng so với phối tử đồng tinh thể.

Đánh giá các thông số dược động học và độc tính

Để đánh giá hiệu quả của các hợp chất trên, chúng tôi tiếp tục đánh giá thông số dược động học và độc tính (ADMET) thông qua việc sử dụng pkCSM. Bảng 4 là kết quả dự đoán ADMET của 7/17 chất có năng lượng liên kết âm nhất và thỏa mãn quy tắc Lipinski 5.

Về hấp thu, khả năng hấp thu của một chất được đánh giá dựa vào các thông số: độ tan trong nước, tính thấm qua màng Caco2 và khả năng hấp thu ở ruột (người). Một chất được cho là có khả năng thấm tốt khi tính thấm qua màng Caco2 (log P_{app} trong 10^{-6} cm/s) có giá trị lớn hơn 0,9. Kết quả từ bảng 4 cho thấy, cả 7 chất đều có giá trị nhỏ hơn 0,9, khả năng thấm qua màng thấp. Tuy nhiên, khả năng hấp thu ở ruột người (HIB) của hầu hết các hợp chất này đều khá tốt do HIB của chúng đều lớn hơn 30%, trừ hợp chất nikkomycins không hấp thu ở ruột. Đặc biệt, 2 hợp chất defibrotite và novuridin cho thấy % hấp thu tốt, với giá trị HIB lớn hơn 70%.

Về phân bố, giá trị logBB lớn hơn 0,3 được cho là có khả năng hấp thu tốt qua hàng rào máu não. Kết quả cho thấy, logBB của tất cả các hợp chất đều nhỏ hơn 0,3, không qua hàng rào máu não.

Về chuyển hóa, hệ cytochrome P450 là hệ enzym quan trọng trong quá trình chuyển hóa thuốc ở gan với hai CYP quan trọng là CYP3A4 và CYP2D6. Ở đây, hợp chất defibrotite là cơ chất của CYP3A4, cho thấy chúng có thể bị chuyển hóa ở gan. Ngoài ra, defibrotite được dự đoán có khả năng ức chế CYP3A4. Sáu hợp chất còn lại đều không là cơ chất và không ức chế hai enzym quan trọng này, do đó chúng có thể không bị chuyển hóa ở gan.

Về thải trừ, các hợp chất đều có khả năng thải trừ qua thận, trong đó didanosine thải trừ nhanh nhất với độ thanh thải toàn phần (log ml/min/kg) là 0,94 và defibrotite thải trừ qua thận chậm nhất: -0,107.

Bảng 4. Kết quả đánh giá ADMET.

Hấp thu	Thông số						
	Defibrotit	*Novuridin*	*Didanosin*	*Gemcitabin*	*Sofosbuvir*	*Puromycin*	*Nikkomycins*
Tan trong nước (log mol/l)	-3,019	-3,293	-2,33	-2,749	-3,953	-2,811	-2,892
Tính thấm màng Caco2 (log P_{app} trong 10^{-6} cm/s)	0,195	0,017	0,175	-0,053	0,472	-0,511	-0,714
Hấp thu ở ruột (người) (%)	79,123	71,37	68,748	68,491	68,308	59,883	0
Phân bố							
Thể tích phân bố (người) (log L/kg)	-0,525	-0,101	-0,14	-0,283	-0,728	0,633	-0,069
Tính thấm hàng rào máu não (log BB)	-2,031	-0,636	-1,015	-0,878	-1,873	-1,357	-1,537
Chuyển hóa							
Cơ chất CYP2D6	Không	Không	Không	Không	Không	Không	Không
Cơ chất CYP3A4	Có	Không	Không	Không	Không	Không	Không
Ức chế CYP2D6	Không	Không	Không	Không	Không	Không	Không
Ức chế CYP3A4	Có	Không	Không	Không	Không	Không	Không
Thải trừ							
Độ thanh thải toàn phần (log ml/min/kg)	-0,107	-0,018	0,94	0,415	-0,106	0,703	0,488
Độc tính							
Độc tính AMES	Không	Không	Có	Không	Không	Có	Không
Độc tính gan	Có	Có	Có	Có	Có	Có	Có
Kích ứng da	Không	Không	Không	Không	Không	Không	Không

Về độc tính, các hợp chất đều dự đoán có độc tính trên gan, không gây kích ứng da. Ngoài ra, thử nghiệm AMES là một phương pháp được sử dụng rộng rãi, dùng để phân tích xem một chất có thể gây ra đột biến trong DNA hay không, và kết quả cho thấy là hầu hết các hợp chất không có độc tính AMES, ngoại trừ didanosine và puromycin.

Bàn luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sàng lọc 100 hợp chất tương tự nucleotide và nucleoside. Kết quả cho thấy, có 18 hợp chất có tác dụng ức chế enzym SARS-CoV-2 RdRp mạnh hơn cả chất chứng dương remdesivir và sàng lọc được 7 hợp chất tiềm năng nhất bao gồm novuridin, didanosine, sofosbuvir, puromycin, defibrotite, gemcitabine và nikkomycins.

Defibrotite (DF) là một hỗn hợp của 90% oligonucleotide phosphodiester sợi đơn và 10% oligonucleotide phosphodiester sợi đôi, có nguồn gốc từ niêm mạc ruột lợn [23]. Kết quả nghiên cứu cho thấy, defibrotit có tiềm năng ức chế đích RdRp với năng lượng liên kết là -8,5 kcal/mol. DF đã được chứng minh là làm giảm kích hoạt p38 MAPK thông qua tương tác trực tiếp với các tế bào nội mô, điều trị COVID-19 [24]. Các nghiên cứu đã chứng minh sự gia tăng biểu hiện của phối tử integrin, phá vỡ màng tế bào nội mô và viêm quanh mạch ở COVID-19 [24, 25]. Ngoài ra, DF ức chế mạnh biểu hiện của heparanase (một chất điều hòa chính của quá trình viêm ở nội mạc, đóng vai trò trung tâm trong viêm mạch máu liên quan đến COVID-19) và hoạt động của enzym [24, 26, 27].

Gemcitabine là một chất tương tự cytidine, được FDA chấp thuận để điều trị các bệnh ung thư [28]. Ngày càng có nhiều bằng chứng cho thấy, gemcitabine là một chất kháng virus phổ rộng hiệu quả chống lại nhiều loại virus RNA bao gồm coronavirus, MERS-CoV, SARS-CoV, enterovirus, virus influenza và virus Zika [29-31]. Gemcitabine ức chế MERS-CoV và SARS-CoV với EC50 tương ứng là 1,22 µM và 4,96 µM [31]. Trong một nghiên cứu của Y.-N. Zhang và cộng sự [32] cho thấy, EC50 của SARS-CoV-2 là 1,24 µM. Trong nghiên cứu của chúng tôi, năng lượng liên kết của gemcitabine là -8,5 kcal/mol cùng với khả năng hấp thu ở ruột cao, cho thấy tiềm năng lớn của gemcitabine trong điều trị COVID-19.

Sofosbuvir là một chất tương tự nucleotide, là thuốc chống virus viêm gan C (HCV) đã được phê duyệt lâm

sàng. Sofosbuvir cũng có khả năng ngăn chặn các họ virus RNA sợi dương khác nên nó có tiềm năng ức chế SARS-CoV-2 RdRp [33]. Một số nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng, sofosbuvir có hoạt tính kháng virus *in vitro* và/hoặc *in vivo* chống lại virus Dengue, Zika [34, 35]. Thêm vào đó, sofosbuvir ít tương tác, an toàn và được dung nạp tốt với liều 400 mg mỗi ngày trong chế độ điều trị 24 tuần [36]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tính được năng lượng tự do của sofosbuvir với đích RdRp là -8,7 kcal/mol và dự đoán được khả năng hấp thu ở ruột khá cao (gần 70%). Chính vì vậy, sofosbuvir cần được nghiên cứu *in vitro, in vivo* để đánh giá khả năng ức chế SARS-CoV-2.

Didanosine là một loại thuốc kháng virus HIV thuộc nhóm chất ức chế men sao chép ngược nucleoside và đã được FDA phê duyệt để điều trị nhiễm HIV [37]. Sau khi gắn kết với đích, didanosine cho năng lượng liên kết với protein khá âm (-8,7 kcal/mol) so với phối tử đồng tinh thể. Trong các nghiên cứu *in silico* khác, didanosine cũng cho thấy tiềm năng trong điều trị SARS-CoV-2 [38, 39].

Novuridin là một nucleoside pyrimidine, đã được đánh giá về hoạt tính chống retrovirus với EC50 là 0,36 µM [40]. Novuridin cho kết quả năng lượng liên kết âm nhất (-8,8 kcal/mol) trong số 7 hợp chất thỏa mãn quy tắc Lipinski. Puromycin là một kháng sinh phổ rộng, ngăn chặn sự tổng hợp protein của tác nhân gây bệnh bằng cách phản ứng với polypeptide mới sinh trên vị trí peptidyl-tRNA của ribosome, xúc tác giải phóng các chuỗi peptide không hoàn chỉnh từ phức hợp peptidyl-tRNA-messenger-ribosome, hình thành peptidyl-puromycin [41]. Trong phân tích ADMET, hai hợp chất novuridin và puromycin đều cho thấy khả năng hấp thu ở ruột khá tốt. Nikkomycins là kháng sinh peptidyl nucleoside tự nhiên, ức chế tổng hợp chitin và thể hiện hoạt tính kháng nấm [42]. Trong nghiên cứu này, nikkomycins cho năng lượng tự do khá âm (-8,5 kcal/mol), nhưng không hấp thu ở ruột người. Chính vì vậy, cần nghiên cứu sâu hơn để đánh giá tác dụng cũng như cải thiện khả năng hấp thu của nikkomycins.

Nghiên cứu này đã cho thấy tiềm năng ức chế đích RdRp của hợp chất EIDD-2801 với năng lượng liên kết thấp (-7,9 kcal/mol), cao hơn 7 hợp chất bàn luận ở trên. Đặc biệt, EIDD-2801 đã được chứng minh là có khả năng chống lại SARS, MERS, SARS-CoV-2 và có hiệu quả gấp 3-10 lần so với remdesivir trong việc ngăn chặn sự sao chép của SARS-CoV-2 [43]. Trong một nghiên cứu khác, R. Abdelnabi và cộng sự đã sử dụng EIDD-2801 để điều trị chuột lang bị nhiễm SARS-CoV-2 với 200 mg/kg BID trong 4 ngày liên tục, bắt đầu từ ngày nhiễm bệnh, kết quả làm giảm đáng kể hiệu giá virus lây nhiễm, tải lượng RNA của virus và cải thiện rõ rệt mô bệnh học phổi [44]. Vì vậy, 7 chất có năng lượng liên kết âm nhất ở trên (âm hơn EIDD-2801) càng cho thấy tiềm năng lớn trong ức chế SARS-CoV-2.

Kết luận

Sau khi sàng lọc 100 hợp chất, chúng tôi đã tìm ra 18 hợp chất có tiềm năng ức chế enzym RdRp. Trong đó có 7 hợp chất: defibrotite, gemcitabine, sofosbuvir, didanosine, puromycin, novuridi, nikkomycins có năng lượng liên kết âm nhất, thỏa mãn quy tắc 5 tiêu chí của Lipinski, có đặc tính dược động học như hấp thu khá tốt, không chuyển hóa ở gan, thải trừ qua thận, có thể có độc tính với gan. Do đó cần tiến hành những nghiên cứu sâu hơn in vitro và in vivo để đánh giá và phát triển những hợp chất tiềm năng này trở thành thuốc điều trị SARS-CoV-2.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] https://ncov.moh.gov.vn.

[2] N. Chams, et al. (2020), "COVID-19: a multidisciplinary review", *Front Public Health*, **8**, p.383.

[3] A. Wu, et al. (2020), "Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China", *Cell Host & Microbe.,* **27(3)**, pp.325-328.

[4] A.A. Elfiky (2020), "Anti-HCV, nucleotide inhibitors, repurposing against COVID-19", *Life Sciences*, **248**, p.117477.

[5] G. Li, and E. De Clercq (2020), "Therapeutic options for the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV)", *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **19(3)**, DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117477.

[6] A. Madhvi, et al. (2017), "A screen for novel hepatitis C virus RdRp inhibitor identifies a broad-spectrum antiviral compound", *Scientific Reports*, **7(1)**, DOI: 10.1038/s41598-017-04449-3.

[7] J. Yuan, et al. (2020), "Antibiotic fidaxomicin is an RdRp inhibitor as a potential new therapeutic agent against Zika virus", *BMC. Medicine*, **18(1)**, DOI: 10.1186/s12916-020-01663-1.

[8] A. Amberg (2013), *In Silico Methods, in Drug Discovery and Evaluation: Safety and Pharmacokinetic Assays*, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. pp.1273-1296.

[9] D. Rubin, et al. (2020), "FDA approval of remdesivir - a step in the right direction", *New England Journal of Medicine*, **383(27)**, pp.2598-2600.

[10] C.J. Gordon, et al. (2020), "The antiviral compound remdesivir potently inhibits RNA-dependent RNA polymerase from Middle East respiratory syndrome coronavirus", *J. Biol. Chem.*, **295(15)**, pp.4773-4779.

[11] S. Mahmoud, et al. (2018), "Antiviral nucleoside and nucleotide analogs: a review", *Journal of Advanced Pharmacy Research*, **2**, pp.73-88.

[12] E.D. Clercq (2011), "The clinical potential of the acyclic (and cyclic) nucleoside phosphonates: the magic of the phosphonate bond", *Biochemical Pharmacology,* **82(2)**, pp.99-109.

[13] J.V. Fernandez, A. Munir (2020), *Abacavir*, StatPearls

Publishing.

[14] Z. Temesgen, A.J. Wright (1999), "Antiretrovirals", *Mayo. Clin. Proc.*, **74(12)**, pp.1284-1301.

[15] A. Rivkin (2005), "A review of entecavir in the treatment of chronic hepatitis B infection", *Curr. Med. Res. Opin.*, **21(11)**, pp.1845-1856.

[16] S. Kim, et al. (2021), "PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces", *Nucleic Acids Research*, **49(D1)**, pp.D1388-D1395.

[17] E.F. Pettersen, et al. (2004), "UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis", *J. Comput. Chem.*, **25(13)**, pp.1605-1612.

[18] M.D. Hanwell, et al. (2012), "Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform", *J. Cheminform.*, **4(1)**, DOI: 10.1186/1758-2946-4-17.

[19] G.M. Morris, et al. (2009), "AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility", *J. Comput. Chem.*, **30(16)**, pp.2785-2791.

[20] C. Lipinski, et al. (2004), "Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution", *Drug Discovery Today: Technologies*, **1**, pp.337-341.

[21] B. Jayaram, et al. (2012), "Sanjeevini: a freely accessible web-server for target directed lead molecule discovery", *BMC Bioinformatics,* Springer.

[22] D.E. Pires, et al. (2015), "pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures", *J. Med. Chem.*, **58(9)**, pp.4066-4072.

[23] N. Kornblum, et al. (2006), "Defibrotide, a polydisperse mixture of single-stranded phosphodiester oligonucleotides with lifesaving activity in severe hepatic veno-occlusive disease: clinical outcomes and potential mechanisms of action", *Oligonucleotides*, **16(1)**, pp.105-114.

[24] M. Palomo, et al. (2016), "What is going on between defibrotide and endothelial cells? Snapshots reveal the hot spots of their romance", *Blood,* **127(13)**, pp.1719-1727.

[25] M. Ackermann, et al. (2020), "Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in COVID-19", *New England Journal of Medicine*, **383(2)**, pp.120-128.

[26] D. García-Bernal, et al. (2020), "Defibrotide inhibits donor leucocyte-endothelial interactions and protects against acute graft-versus-host disease", *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **24(14)**, pp.8031-8044.

[27] P. Richardson, et al. (2019), "Systematic review of defibrotide studies in the treatment of veno-occlusive disease/sinusoidal obstruction syndrome (VOD/SOS)", *Bone Marrow Transplantation*, **54(12)**, pp.1951-1962.

[28] H.J. Shin, C. Kim, and S. Cho (2018), "Gemcitabine and nucleos (t) ide synthesis inhibitors are broad-spectrum antiviral drugs that activate innate immunity", *Viruses*, **10(4)**, DOI: 10.3390/v10040211.

[29] O.V. Denisova, et al. (2012), "Obatoclax, saliphenylhalamide, and gemcitabine inhibit influenza a virus infection", *Journal of Biological Chemistry,* **287(42)**, pp.35324-35332.

[30] S. Kuivanen, et al. (2017), "Obatoclax, saliphenylhalamide and gemcitabine inhibit Zika virus infection in vitro and differentially affect cellular signaling, transcription and metabolism", *Antiviral Research*, **139**, pp.117-128.

[31] J.Dyall, et al. (2014), "Repurposing of clinically developed drugs for treatment of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **58(8)**, pp.4885-4893.

[32] Y.-N. Zhang, et al. (2020), "Gemcitabine, lycorine and oxysophoridine inhibit novel coronavirus (SARS-CoV-2) in cell culture", *Emerging Microbes & Infections*, **9(1)**, pp.1170-1173.

[33] B. Sayad, M. Sobhani, and R. Khodarahmi (2020), "Sofosbuvir as repurposed antiviral drug against COVID-19: why were we convinced to evaluate the drug in a registered/approved clinical trial?", *Archives of Medical Research*, **51(6),** pp.577-581.

[34] C.S. Gan, et al. (2018), "Sofosbuvir as treatment against dengue?", *Chemical Biology & Drug Design*, **91(2)**, pp.448-455.

[35] P. Mesci, et al. (2018), "Blocking Zika virus vertical transmission", *Scientific Reports*, **8(1)**, pp.1-13.

[36] A.C. Ferreira, et al. (2019), "Beyond members of the Flaviviridae family, sofosbuvir also inhibits chikungunya virus replication", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **63(2),** DOI: 10.1128/AAC.01389-18.

[37] C.M. Perry, and J.A. Balfour (1996), "Didanosine. An update on its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of HIV disease", *Drugs*, **52(6)**, pp.928-962.

[38] F.M. Alakwaa (2020), "Repurposing didanosine as a potential treatment for COVID-19 using single-cell RNA sequencing data", *Msystems*, **5(2),** DOI: 10.1128/mSystems.00297-20.

[39] C. Cava, G. Bertoli, I. Castiglioni (2020), "In silico discovery of candidate drugs against COVID-19", *Viruses*, **12(4)**, DOI: 10.3390/v12040404.

[40] J. Balzarini, et al. (1988), "Anti-retrovirus activity of 3′-fluoro- and 3′-azido-substituted pyrimidine 2′, 3′-dideoxynucleoside analogues", *Biochemical Pharmacology*, **37(14)**, pp.2847-2856.

[41] K. Isono (1988), "Nucleoside antibiotics: structure, biological activity, and biosynthesis", *The Journal of Antibiotics*, **41(12)**, pp.1711-1739.

[42] R. Furter, D.M. Rast (1985), "A comparison of the chitin synthase-inhibitory and antifungal efficacy of nucleoside-peptide antibiotics: structure-activity relationships", *FEMS Microbiology Letters,* **28(2)**, pp.205-211.

[43] T.P. Sheahan, et al. (2020), "An orally bioavailable broad-spectrum antiviral inhibits SARS-CoV-2 in human airway epithelial cell cultures and multiple coronaviruses in mice", *Science Translational Medicine*, **12(541),** DOI: 10.1126/scitranslmed.abb5883.

[44] R. Abdelnabi, et al. (2020), "Molnupiravir (EIDD-2801) inhibits SARS-CoV2 replication in Syrian hamsters model", *bioRxiv.*

DOI: 10.31276/VJST.63(9).22-25

Đánh giá chất lượng phôi các giai đoạn khi nuôi cấy trong môi trường nồng độ oxy thấp

Nguyễn Linh Chi[1, 2*], Ngô Thị Tường Châu[2], Nguyễn Đình Tảo[1], Nguyễn Ngọc Diệp[3]

[1]Bệnh viện Đa khoa 16A Hà Đông
[2]Khoa Môi trường, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội
[3]Học viện Quân y

Ngày nhận bài 20/5/2021; ngày chuyển phản biện 24/5/2021; ngày nhận phản biện 14/6/2021; ngày chấp nhận đăng 18/6/2021

Tóm tắt:

Mục tiêu: đánh giá chất lượng phôi dựa vào hình thái khi nuôi cấy ở nồng độ oxy thấp (5%) ở các giai đoạn phát triển của phôi: ngày 3, ngày 5. Phương pháp: đánh giá phân tích dựa trên 168 chu kỳ IVF/ICSI từ tháng 10/2019 đến tháng 2/2021, sử dụng 2 loại tủ nuôi cấy: tủ nuôi cấy 3 khí K-system G-210 (Úc) (5% O_2, 5% CO_2, 90%N_2) và tủ nuôi cấy 2 khí Thermo Scientific 371 (Đan Mạch) (5% CO_2, 75%N_2 và sử dụng nồng độ oxy theo khí quyển). Noãn trưởng thành (MI và MII) được nuôi cấy trong môi trường đa bước G1-PLUS™ (Vitrolife) đến ngày 3, và thay sang môi trường G2-PLUS™ (Vitrolife) từ ngày 3 đến ngày 5. Lựa chọn bệnh nhân <37 tuổi, AMH>1,2 ng/ml, AFC≥4. Phôi sẽ được kiểm tra ngày thụ tinh, ngày 3 và 5. Kết quả: chất lượng của phôi ngày 3 không có sự khác biệt đáng kể giữa 2 nhóm nuôi cấy (tỷ lệ phôi tốt và trung bình chiếm 77,28±4,62% và 77,99±5,03% với p>0,05, số lượng phôi xấu chiếm 1,71±0,38 so với 1,97±0,49 với p>0,05). Kết quả phôi ngày 5 cho thấy, tỷ lệ phôi phát triển từ ngày 1 lên ngày 5, cũng như tỷ lệ phôi loại tốt và trung bình có chiều hướng tăng cao hơn (p<0,05) ở nồng độ oxy thấp so với nhóm oxy 20% (lần lượt là 57,79±3,60% so với 53,05±4,50% và 78,62±4,42% so với 70,97±5,67%). Kết luận: nuôi cấy phôi trong môi trường nồng độ oxy thấp giúp phôi phát triển đến giai đoạn ngày 5 tốt hơn so với khi nuôi cấy ở nồng độ khí quyển.

Từ khóa: **IVF, môi trường nuôi cấy, nồng độ oxy thấp, nuôi cấy phôi nang.**

Chỉ số phân loại: **3.5**

Đặt vấn đề

Thụ tinh trong ống nghiệm (In vitro fertilization - IVF) là kỹ thuật điều trị vô sinh - hiếm muộn, trong đó, tinh trùng của người chồng và trứng của người vợ sẽ được thụ tinh trong phòng thí nghiệm để tạo thành phôi. Tạo môi trường tối ưu cho nuôi cấy phôi là bước rất quan trọng để đảm bảo khả năng hình thành phôi và nuôi phôi, từ đó duy trì được kết quả ổn định của thai kỳ. Ngoài môi trường nuôi cấy phôi, sự phát triển của phôi còn phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố khác như: nhiệt độ, oxy, ánh sáng..., trong đó, oxy rất cần thiết cho quá trình trao đổi chất của phôi nhưng lại là con dao hai lưỡi vì có thể làm tổn hại đến phôi thai đang phát triển bởi sự oxy hóa [1].

Trong tự nhiên, noãn và phôi phát triển trong tử cung mẹ có nồng độ oxy dao động trong khoảng 2-8% [2], trong khi hiện tại các tủ nuôi cấy IVF truyền thống có nồng độ oxy là 20%. Có nhiều nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh nồng độ oxy cao gây độc với phôi, và nếu được nuôi trong điều kiện oxy giống với môi trường tự nhiên, phôi sẽ tăng tỷ lệ phát triển thành phôi nang cũng như tăng tỷ lệ đậu thai [3, 4]. Hiện nay, vẫn chưa có kết luận khẳng định về việc sử dụng nồng độ oxy thấp có thực sự mang lại lợi ích tốt hơn cho phôi khi nuôi cấy trong môi trường nhân tạo.

Xu hướng các nghiên cứu đều thể hiện kết quả tích cực khi nuôi cấy phôi ở nồng độ oxy thấp. Tuy nhiên, các kết quả này còn nhiều tranh cãi, nên vẫn còn quá sớm để khuyến nghị nuôi cấy phôi hoàn toàn ở nồng độ oxy thấp. Trong lịch sử, nuôi cấy phôi thụ tinh trong ống nghiệm thường sử dụng nuôi cấy ở nồng độ oxy trong không khí bằng các tủ nuôi cấy phôi chỉ với cảm biến điều chỉnh nồng độ CO_2. Nếu chuyển sang nuôi cấy phôi ở nồng độ oxy thấp, cần thay đổi toàn bộ các thiết bị nuôi cấy với chi phí tốn kém cho đầu tư mua tủ nuôi cấy 3 khí hoặc khí trộn. Ngoài ra, để duy trì phôi ở nồng độ này cần cung cấp khí nitơ hoặc hệ thống khí trộn, do đó cũng làm tăng đáng kể các chi phí.

Vì vậy, mục tiêu nghiên cứu của đề tài là đánh giá ảnh hưởng của nồng độ oxy trong khí quyển 20% và nồng độ oxy thấp 5%, từ đó định hướng sử dụng nồng độ oxy tối ưu cho nuôi cấy phôi người.

Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 10/2019 đến tháng 2/2021, dựa trên các chu kỳ IVF/tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (ICSI) tại Trung tâm Hỗ trợ sinh sản, Bệnh viện Đa khoa 16A Hà Đông. Nghiên cứu sử dụng tủ nuôi cấy 3 khí K-system G-210 (Úc) hoặc tủ nuôi cấy 2 khí Thermo

*Tác giả liên hệ: Email: Linhchi148@gmail.com

Evaluation of the quality of embryo based on morphology cultured at low oxygen concentration

Linh Chi Nguyen[1, 2*], Thi Tuong Chau Ngo[2], Dinh Tao Nguyen[1], Ngoc Diep Nguyen[3]

[1]16A Ha Dong General Hospital
[2]Department of Environment, University of Science, VNU, Hanoi
[3]Vietnam Military Medical University

Received 20 May 2021; accepted 18 June 2021

Abstract:

Objectives: evaluating the quality of embryo morphology cultured at low oxygen concentration (5%) at different stages of embryonic development: day 3, day 5. Methods: the present study examined 168 IVF/ICSI cycles from October 2019 to February 2021 at the Assisted Reproductive Center, 16A Ha Dong General Hospital. Embryos were randomly assigned to 2 groups: group 1 used a K-system G-210 tri-gas incubator (Australia) (5% O_2, 5% CO_2, 90% N_2) while group 2 used a Thermo Scientific 371 dual-gas incubator (Denmark) (5% CO_2, 75% N_2 with 20% atmospheric Oxygen concentration). Participants in the study were patients younger than 37 years old, with AMH>1.2 ng/ml, and AFC≥4. Mature oocytes were injected with sperm, and cultured in a sequential medium (G1,G2-PLUS™). Embryologists assessed embryos on the day of fertilisation, days 3, 5, and compared the results of the two groups, using the method of descriptive statistics and T-test. The results revealed an insignificant difference in fertilisation rate and the quality of cleavages cultured in these 2 groups (percentages of good- and average quality cleavages were, in turn, 77.28±4.62% và 77.99±5.03%, at p>0.05, number of poor quality cleavages were, in turn, 1.71±0.38 vs 1.97±0.49 with p>0.05). The results on day 5 embryo showed that the percentage of blastocysts (from fertilisation) and the percentage of morphologically good- and average-quality blastocysts tended to increase higher when cultured in 5% oxygen concentration (p<0.05) compared with the 20% one (57.79±3.60% and 53.05±4.50%, 78.62±4.42% and 70.97±5.67%, respectively). Conclusions: embryo cultured in a low oxygen concentration helps embryos develop better on day 5 than when cultured at atmospheric concentrations.

Keywords: **culture blastocyst, culture medium, IVF, low oxygen concentration.**

Classification number: **3.5**

Scientific model 371 (Đan Mạch). Các chu kỳ IVF/ICSI được thực hiện trong cùng một phòng Lab với cùng quy trình lâm sàng, quy trình phòng thí nghiệm và vật liệu tiếp xúc. Không có sự thay đổi nhân viên phòng thí nghiệm phôi học, thay đổi duy nhất là thay đổi về môi trường nuôi cấy: sử dụng môi trường nuôi cấy đa bước G-1, G-2 plus của hãng Vitrolife-Thụy Điển, các chu kỳ IVF được sử dụng ngẫu nhiên 2 loại môi trường này trong suốt giai đoạn nghiên cứu. Đã có sự chấp thuận của Hội đồng quản trị Trung tâm Hỗ trợ sinh sản, Bệnh viện 16A Hà Đông, dữ liệu được thu thập từ hồ sơ bệnh án của Trung tâm. Nghiên cứu lựa chọn những bệnh nhân có ít nhất 4 nang thứ cấp vào ngày 2 chu kỳ kinh, tuổi mẹ <37 tuổi và chỉ số AMH >1,2 ng/ml. Tổng số chu kỳ IVF/ICSI được đưa vào nghiên cứu là 168 với 1742 phôi ngày 1, được nuôi cấy trong môi trường đa bước G-1, G-2 plus trong 2 điều kiện oxy khác nhau theo Aafke và cs (2020) [5] và Sobrinho và cs (2011) [6].

Bệnh nhân sau khi được kích thích buồng trứng có kiểm soát 9-12 ngày, sau 36 giờ tiêm rụng, bệnh nhân được hút nang qua hướng dẫn siêu âm. Nang trứng được lấy ra và chuyển vào phòng thụ tinh ống nghiệm trong 2 phút, đặt trong tủ ấm 2-4 giờ để chuẩn bị cho chu kỳ ICSI.

Sau ICSI, tất cả noãn được đặt vào môi trường rửa (có chứa 10% chất thay thế huyết thanh tổng hợp trong 25 vi giọt và được phân chia ngẫu nhiên thành 2 nhóm trong tủ nuôi cấy theo nồng độ oxy thấp K-system G-210 (Úc) hoặc tủ nuôi cấy nồng độ oxy khí quyển Thermo Scientific model 371 (Đan Mạch). Mỗi loại tủ được kiểm soát pH bằng cách điều chỉnh nồng độ CO_2 (chuẩn độ ở mức 5,0-6,5%), tất cả các phôi đều trải qua phân loại chất lượng tiêu chuẩn của ngày 3 để đánh giá số lượng tế bào, tính đối xứng, sự phân mảnh và chỉ định ở mức độ loại 1, 2, 3 theo phương pháp của đồng thuận Istanbul (Alpha Scientists in Reproductive Medicine (2011) [7]. Đến ngày 5, phôi được đánh giá thêm một lần nữa dựa vào các tiêu chí: độ giãn nở của khoang phôi nang, thể tích ICM, thể tích lá nuôi (theo các mức độ: tốt, trung bình và xấu) theo phương pháp của đồng thuận Istanbul [7] kết hợp với so sánh các nhóm phát triển phôi bằng phương pháp phân tích mô tả sử dụng kiểm định T-test.

Quy trình nghiên cứu được thực hiện như sau:

- Thu thập, lựa chọn bệnh nhân
- Tiêm thuốc kích trứng
- Tiêm rụng
- Chọc trứng
- Tách trứng

Phân chia thành 2 nhóm: nhóm nuôi ở nồng độ oxy thấp 5% và nhóm nuôi ở nồng độ oxy 20%. Sau đó tiến hành:

- Đánh giá hình thái phôi ngày 3
- Đánh giá hình thái phôi ngày 5
- Thu thập số liệu và xử lý kết quả

Kết quả

Trong thời gian 1,5 năm (tháng 10/2019 - tháng 2/2021), có 168 chu kỳ IVF được thực hiện với ít nhất một trứng được thụ tinh. Trong đó, 95 chu kỳ có phôi được nuôi cấy trong tủ nuôi cấy có hàm lượng oxy thấp và 73 chu kỳ có phôi được nuôi cấy trong tủ có nồng độ oxy khí quyển. Trong các chu kỳ IVF/ICSI, chỉ số AMH, số noãn và số phôi ngày 1 của nhóm nuôi cấy 20% oxy cao hơn so với nhóm oxy 5% nhưng không có ý nghĩa thống kê (p>0,05); ngược lại, tỷ lệ thụ tinh của nhóm oxy 5% cao hơn so với nhóm 20% nhưng không có ý nghĩa thống kê (p>0,15), mặc dù không có sự khác biệt về tuổi ở cả 2 nhóm nghiên cứu (bảng 1).

Bảng 1. Thông tin cơ bản của bệnh nhân.

Đặc điểm	Nhóm nuôi cấy 5% oxy	Nhóm nuôi cấy 20% oxy	Giá trị t
Số lượng bệnh nhân	95	73	
Tuổi	31,20±0,92	31,45±1,01	0,3669 (p=[0,25-0,5])
AMH (mg/ml)	3,52±0,56	3,99±0,73	1,0162 (p=[0,15-0,2])
Số noãn/chu kỳ	11,93±1,12	13,45±1,63	1,5382 (p=[0,05-0,1])
Tỷ lệ thụ tinh (%)	81,11±2,85	78,82±3,33	1,0394 (p=[0,15-0,2])
Tổng số phôi ngày 1	931	811	
Số phôi/chu kỳ	9,80±0,98	11,11±1,50	1,4553 (p=[0,05-0,1])

Bảng 2 cho thấy, không có sự khác biệt nào đáng kể trong sự phát triển của phôi giai đoạn phôi dâu (phôi ngày 3): chất lượng phôi ngày 3 của cả 2 nhóm chủ yếu là phôi loại tốt và trung bình. Số lượng phôi trung bình chiếm tỷ lệ cao nhất ở cả 2 nhóm. Sự khác biệt của các loại phôi giữa 2 nhóm nghiên cứu không có ý nghĩa thống kê (p>0,05). Tuy nhiên các kết quả cho thấy, khi sử dụng tủ nuôi cấy có nồng độ oxy thấp, số lượng phôi ngày 3 mỗi chu kỳ thấp hơn, không có ý nghĩa thống kê so với khi nuôi phôi bằng nồng độ oxy khí quyển (8,31±0,87 so với 9,26±1,32 với p>0,1).

Bảng 2. So sánh đặc điểm phôi ngày 3 giữa 2 nhóm nghiên cứu.

Đặc điểm	5% oxy	20% oxy	Giá trị t
Tổng số phôi	789	676	
Tỷ lệ phôi N3 (%)	84,96±2,77	84,09±2,15	0,4913 (p=[0,25-0,5])
Số lượng phôi mỗi chu kỳ	8,31±0,87	9,26±1,32	1,2046 (p=[0,10-0,15])
Số lượng phôi tốt	179	179	
Số lượng phôi tốt mỗi chu kỳ	1,88±0,47	2,45±0,64	1,4198 (p=[0,05-0,1])
Tỷ lệ phôi tốt (%)	21,47±4,25	23,37±4,47	0,6142 (p=[0,25-0,5])
Số lượng phôi loại trung bình	448	353	
Số lượng phôi loại trung bình mỗi chu kỳ	4,72±0,62	4,84±0,77	0,2418 (p=[0,25-0,5])
Tỷ lệ phôi trung bình (%)	55,81±5,17	54,62±5,34	0,3190 (p=[0,25-0,5])
Tỷ lệ phôi tốt và trung bình (%)	77,28±4,62	77,99±5,03	0,2074 (p=[0,25-0,5])
Số lượng phôi xấu	162	144	
Phôi xấu/chu kỳ	1,71±0,38	1,97±0,49	0,8588 (p=[0,15-0,2])
Tỷ lệ phôi xấu (%)	22,72±4,62	22,01±5,03	0,2074 (p=[0,25-0,5])

Bảng 3. So sánh đặc điểm phôi ngày 5 giữa 2 nhóm nghiên cứu.

Đặc điểm	5% oxy	20% oxy	Giá trị t
Tổng số phôi	534	430	
Tỷ lệ phôi N5 (%)	57,79±3,60	53,05±4,50	1,6362 (p=[0,05-0,1])
Số lượng phôi N5 mỗi chu kỳ	5,62±0,66	5,89±0,94	0,4660 (p=[0,25-0,5])
Tỷ lệ phôi ngày 5 so với ngày 3 (%)	68,20±3,74	63,34±5,31	1,4877 (p=[0,05-0,1])
Tổng số lượng phôi tốt	292	219	
Số lượng phôi tốt mỗi chu kỳ	3,07±0,52	3,00±0,65	0,1764 (p=[0,25-0,5])
Tỷ lệ loại tốt (%)	51,68±6,13	48,76±7,11	0,6179 (p=[0,25-0,5])
Tổng số lượng phôi trung bình	133	101	
Số lượng phôi trung bình mỗi chu kỳ	1,40±0,29	1,38±0,38	0,0683 (p=[0,25-0,5])
Tỷ lệ loại trung bình (%)	26,95±5,35	22,21±5,98	1,1755 (p=[0,1-0,15])
Tỷ lệ loại tốt và trung bình (%)	78,62±4,42	70,97±5,67	2,1195 (p=[0,01-0,025])
Tổng số lượng phôi xấu	109	110	
Số lượng phôi xấu mỗi chu kỳ	1,15±0,21	1,51±0,25	2,1879 (p=[0,01-0,025])
Tỷ lệ loại xấu (%)	21,38±4,42	29,03±5,67	2,1195 (p=[0,01-0,025])

Bảng 3 cho thấy, chất lượng phôi ngày 5 của cả 2 nhóm chủ yếu là phôi loại tốt. Tỷ lệ phôi loại tốt và trung bình khi nuôi cấy trong môi trường oxy 5% cao hơn so với trong môi trường 20% oxy (78,62±4,42 so với 70,97±5,67, p<0,025). Số lượng phôi xấu của nhóm oxy 20% cao hơn so với nhóm phôi nuôi cấy trong nồng độ oxy thấp (1,51±0,25 so với 1,15±0,21 với p<0,025). Như vậy, chất lượng phôi ngày 5 ở nhóm oxy 5% tốt hơn so với nhóm oxy 20%, mặc dù chất lượng phôi ngày 3 ở 2 nhóm nghiên cứu không có sự khác biệt. Tỷ lệ phôi phát triển từ ngày 3 lên ngày 5 và từ ngày 1 lên ngày 5 lớn hơn khi được nuôi cấy bằng nồng độ oxy 5% so với nồng độ oxy 20%, dù không có ý nghĩa thống kê (0,05<p<0,1).

Bàn luận

Trong nghiên cứu này, số lượng bệnh nhân, tuổi, chỉ số nội tiết AMH là tương tự nhau ở cả 2 nhóm; vì vậy, có thể so sánh khách quan giữa 2 nhóm môi trường. Kết quả cho thấy khi nuôi cấy phôi ở nồng độ oxy 5% cho tỷ lệ thụ tinh, số lượng phôi, chất lượng hình thái phôi của ngày 3 tương đương với nuôi cấy phôi ở nồng độ oxy 20%. Tuy nhiên, nuôi cấy phôi ở 2 nồng độ oxy 5 và 20% có ảnh hưởng đến tiềm năng phát triển tiếp theo của phôi hay không và có ảnh hưởng đến kết cục có thai lâm sàng hay không khi chuyển phôi giai đoạn phân chia sớm thì cần có những nghiên cứu tiếp theo.

Kết quả của chúng tôi tương tự kết quả nghiên cứu của David và cs (2011) [8], khi nuôi cấy phôi ở nồng độ oxy thấp cho tỷ lệ hình thành phôi nang cao hơn, có ý nghĩa thống kê so với nuôi cấy phôi ở nồng độ oxy trong không khí. Tỷ lệ hình thành phôi nang trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn một số nghiên cứu khác, có thể do chúng tôi đã lựa chọn các phôi có chất lượng.

Trên thực tế, trong điều kiện cơ thể, noãn và phôi ở giai

đoạn phân chia sớm được phát triển trong vòi tử cung ở nồng độ oxy 2-5%. Như vậy, việc hạ thấp nồng độ oxy trong điều kiện nuôi cấy phôi xuống dưới 5% có thể thích hợp cho sự thụ tinh và phát triển của phôi ở giai đoạn phôi phân chia sớm.

Trong nghiên cứu này, đánh giá chung nuôi cấy phôi ở nồng độ oxy thấp tốt cho sự thụ tinh và phát triển của phôi giai đoạn phân chia, số lượng phôi và chất lượng phôi cao hơn so với nhóm nuôi cấy phôi ở nồng độ oxy 20%. Đối với sự phát triển của phôi ngày 3, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê, nhưng có ý nghĩa thống kê đối với phôi ngày 5 về số lượng phôi và chất lượng phôi cao hơn so với nhóm nuôi cấy phôi ở nồng độ oxy 20%, các kết quả phù hợp với các tác giả Sobrinho và cs (2011) [6], Ciray và cs (2009) [9], Nguyễn Khang Sơn và cs (2020) [10]. Trong nghiên cứu mới đây của Menken và cs (2017) [11] khi so sánh nuôi cấy phôi từ giai đoạn thụ tinh ngày 1 đến giai đoạn phôi nang ngày 5, ngày 6 ở nồng độ oxy 3,5% so với nuôi cấy phôi ở nồng độ oxy 5%, tác giả nhận thấy tỷ lệ thụ tinh, tỷ lệ phôi giai đoạn phân chia ở nhóm nuôi cấy nồng độ oxy 2-3,5% cao hơn, có ý nghĩa thống kê so với nhóm nuôi cấy phôi ở nồng độ oxy 5% hoặc 20% [11].

Kết luận

Nghiên cứu so sánh ngẫu nhiên 1742 phôi từ 168 chu kỳ, được chia đều thành 2 nhóm nuôi cấy trong 2 tủ nuôi cấy 3 khí K-system G-210 (Úc) và tủ nuôi cấy 2 khí Thermo Scientific model 371 (Đan Mạch). Kết quả cho thấy, không có sự khác biệt nhiều về chất lượng phôi ngày 3, nhưng nhìn chung nồng độ oxy 5% đã nuôi cấy được phôi nang lên ngày 5 phát triển tốt hơn trên phương diện hình thái.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] J.W. Catt, M. Henman (2000), "Toxic effects of oxygen on human embryo development", *Hum. Reprod.*, **15(suppl. 2)**, pp.199-206.

[2] B. Fischer, B.D. Bavister (1993), "Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits", *J. Reprod. Fertil.*, **99**, pp.673-679.

[3] Y. Yang, et al. (2016), "Comparison of 2, 5, and 20% O_2 on the development of post-thaw", *J. Assist. Reprod. Genet.*, **33(7)**, pp.919-927.

[4] N. Guo, et al. (2014), "Two different concentrations of oxygen for culuturing precompaction stage embryos on human embryo development competence: a prospective randomized sibling-oocyte study", *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, **9**, pp.6191-6198.

[5] P.A.V.M. Aafke, et al. (2020), "Reduced oxygen concentration during human IVF culture improves embryo utilization and cumulative pregnancy rates per cycle", *Human Reproduction Open*, **2020(1)**, DOI: 10.1093/hropen/hoz036.

[6] D.B.G. Sobrinho, et al. (2011), "IVF/ICSI outcomes after culture of human embryos at low oxygen tension: a meta-analysis", *Reproductive Biology and Endocrinology*, **9**, DOI: 10.1186/1477-7827-9-143.

[7] Alpha Scientists in Reproductive Medicine (2011), "The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting", *Hum. Reprod.*, **26(6)**, pp.1270-1283.

[8] G.K. David, et al. (2011), *Human Assisted Reproductive Technology - Future Trends in Laboratory and Clinical Practice*, Cambridge University Press, New York, USA.

[9] H.N. Ciray, et al (2009), "In vitro culture under physiologic oxygen concentration improves blastocyst yield and quality: a prospective randomized survey on sibling oocytes", *Fertil. Steril.*, **91(4)**, pp.1459-1461.

[10] Nguyễn Khang Sơn, Lê Ngọc Dung, Nguyễn Thanh Hoa, Nguyễn Thị Thúy, Nguyễn Hương Giang (2020), "Mối tương quan giữa các đặc điểm hình thái của phôi đông lạnh ngày thứ 2 và tiềm năng phát triển phôi bào", *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, **133(9)**, tr.10-18.

[11] J. Menken, et al. (2017), "Impact of 3.5% O_2 culture on embryo development and clinical outcomes: a comparative study", **108(4)**, pp.635-641.

DOI: 10.31276/VJST.63(9).26-32

Nghiên cứu hoạt tính kháng *Escherichia coli* sinh enzyme β-lactamase phổ rộng (ESBL) của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. SS473 phân lập từ thực vật

Nguyễn Trung Hiếu[1], Nguyễn Phước Đạt[1, 2], Nguyễn Thị Ngọc Quyên[2], Trần Lệ Trúc Hà[1], Quan Quốc Đăng[3], Nguyễn Hoàng Chương[4*]

[1]Trường Đại học Nguyễn Tất Thành
[2]Trung tâm Nghiên cứu và Ứng dụng Sinh học TP Hồ Chí Minh
[3]Cục Công tác phía Nam, Bộ KH&CN
[4]Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 2/8/2021; ngày chuyển phản biện 4/8/2021; ngày nhận phản biện 31/8/2021; ngày chấp nhận đăng 6/9/2021

Tóm tắt:

***E. coli* sinh enzyme β-lactamase phổ rộng (ESBL) là vi khuẩn gây bệnh nguy hiểm ở người do khả năng kháng nhiều loại kháng sinh. Đây là vấn đề đặc biệt nghiêm trọng trong bối cảnh số lượng kháng sinh mới được đưa vào sử dụng trong điều trị các bệnh nhiễm trùng do vi khuẩn ngày càng ít. Điều này dẫn tới mối đe dọa về sức khỏe cộng đồng có quy mô toàn cầu và đặt ra nhu cầu cấp thiết phải có các kháng sinh mới trong điều trị bệnh nhiễm khuẩn. Trong nghiên cứu này, các tác giả khảo sát đặc tính kháng khuẩn của một chủng xạ khuẩn phân lập được từ thực vật - chủng xạ khuẩn SS473 phân lập từ cây Xương khỉ (*Clinacanthus nutans*) thể hiện hoạt tính kháng lại các chủng vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL gây bệnh phân lập từ lâm sàng. Ngoài ra, chủng SS473 có phổ kháng khuẩn rộng khi thể hiện hoạt tính kháng khuẩn trên nhiều loại vi khuẩn gây bệnh khác nhau. Môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng đến hoạt tính kháng khuẩn của chủng SS473. Trong thí nghiệm khảo sát tính bền, hoạt tính kháng khuẩn của chủng SS473 vẫn được duy trì đến nhiệt độ 80°C, tuy nhiên hoạt tính này bị mất ở pH 3 và pH 13. Hoạt tính kháng khuẩn của SS473 không bị ảnh hưởng khi bị xử lý bằng tia UV và protease. Dựa trên kết quả phân tích hình thái với môi trường đặc trưng cho nhóm xạ khuẩn và giải trình tự gen 16S rRNA, chủng SS473 được xác định thuộc chi xạ khuẩn *Streptomyces* và được gọi là *Streptomyces* sp. SS473. Kết quả này là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm xác định hợp chất thứ cấp có hoạt tính kháng khuẩn từ chủng SS473 cũng như nghiên cứu con đường sinh tổng hợp hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn.**

Từ khóa: ***E. coli*, ESBL, kháng khuẩn, SS473, *Streptomyces*.**

Chỉ số phân loại: **3.5**

Đặt vấn đề

Thời gian gần đây, tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL (enzyme beta-lactamase phổ rộng) gây bệnh đang tăng lên một cách nhanh chóng ở nhiều nơi trên thế giới, đặc biệt là các nước thuộc khu vực châu Á [1-3]. ESBL là một nhóm enzyme ở vi khuẩn có tác dụng giúp vi khuẩn kháng lại các kháng sinh thuộc nhóm β-lactam gồm cephalosporin và một số dòng kháng sinh khác. Các nghiên cứu tại cộng đồng cũng cho thấy tỷ lệ người khỏe mạnh nhiễm *E. coli* sinh ESBL đang có chiều hướng tăng dần ở hầu hết các châu lục [4]. Ở Việt Nam, một số kết quả nghiên cứu gần đây cho thấy *E. coli* sinh ESBL hiện diện trên bệnh nhân khá cao. Kết quả khảo sát trực khuẩn Gram âm sinh β-lactamase phổ rộng phân lập tại Bệnh viện Đại học Y dược TP Hồ Chí Minh cho thấy tỉ lệ nhiễm vi khuẩn sinh ESBL chiếm 32,4%, trong đó *E. coli* chiếm tỉ lệ cao 71,2% và các chủng vi khuẩn sinh ESBL đề kháng cao với các nhóm kháng sinh aminoglycosides (trừ amikacin) và fluoroquinolones [5]. Một nghiên cứu khác tại bệnh viện Chợ Rẫy cho thấy 174 mẫu phân của bệnh nhân không nhiễm khuẩn tiêu hóa đến khám bệnh có 133 mẫu (76,4%) có vi khuẩn sinh ESBL và chủ yếu là *E. coli* 65,8% [6].

Xạ khuẩn nổi tiếng với khả năng sinh các chất chuyển hoá thứ cấp có hoạt tính sinh học như kháng vi sinh vật, kháng phân bào, ức chế enzyme, ức chế miễn dịch và các đặc tính sinh học quý khác. Hiện nay, khoảng hai phần ba thuốc kháng sinh đang được sử dụng ở người và động vật có nguồn gốc từ xạ khuẩn, điều này cho thấy tầm ứng dụng rất lớn của xạ khuẩn trong sản xuất các thuốc kháng khuẩn có nguồn gốc vi sinh vật [7]. Xu hướng đề kháng kháng sinh hiện nay đang tạo động lực cho các nhà khoa học nỗ lực tìm kiếm các loại kháng sinh mới hiệu quả hơn trên các chủng vi khuẩn đa kháng thuốc. Điển hình tại Nhật Bản, kháng sinh mới yatakemycin được tách chiết từ *Streptomyces* sp. TP - A0356 cho hiệu quả kháng lại nấm *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* và chống lại các tế bào ung thư với giá trị MIC (nồng độ ức chế tối thiểu) là 0,01-0,3 mg/ml [8]. Tại Hàn Quốc, chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. C684 đã được phân lập và cho thấy khả năng sinh chất kháng sinh laidlomycin, chất này có thể tiêu diệt cả tụ cầu khuẩn kháng methicillin (MRSA) và các cầu khuẩn kháng vancomycin (VRE) [9]. Khi phân lập trên 20 mẫu đất, Al-Hulu và cộng sự cũng phân lập

*Tác giả liên hệ: Email: nhchuong@hcmus.edu.vn

Study of antibacterial activity of *Streptomyces* sp. SS473 isolated from plants against ESBL-producing *Escherichia coli*

Trung Hieu Nguyen[1], Phuoc Dat Nguyen[1, 2], Thi Ngoc Quyen Nguyen[2], Le Truc Ha Tran[1], Quoc Dang Quan[3], Hoang Chuong Nguyen[4*]

[1]*Nguyen Tat Thanh University*
[2]*Center for Research and Application in Bioscience, Ho Chi Minh city*
[3]*Agency for Southern Affairs of Ministry of Science and Technology*
[4]*University of Science, Vietnam National University, Ho Chi Minh city*

Received 2 August 2021; accepted 6 September 2021

Abstract:

The broad spectrum β-lactamase-producing *E. coli* (ESBL) is a dangerous bacterial pathogen in humans due to its resistance to many antibiotics. This is especially serious in the context of a limited number of new antibiotics for treating bacterial infections. This leads to a global public health threat and places an urgent need for new antibiotics. In this study, the authors investigated the antibacterial properties of an actinomyces strain isolated from the plant *Clinacanthus nutans* against the ESBL-producing *E. coli* strains. These actinomyces strains were designated as SS473. Moreover, SS473 showed a broad spectrum of antibacterial activity on several clinically isolated pathogenic bacteria. Culture media have different effects on the antibacterial activity of SS473. In stability tests, the antibacterial activity of strain SS473 remained at a temperature up to 80°C but was lost at pH 3 and 13. By contrast, the antibacterial activity was not affected by UV and protease treatments. Based on the results of morphological identification with specific media for *Streptomyces* and molecular identification on 16S rRNA gene, strain SS473 was suggested to belong to the *Streptomyces* genus and was named *Streptomyces* sp. SS473. The results in this study will pave the way for the following research on the identification of secondary metabolites having antibacterial activity and their biosynthetic pathways in *Streptomyces* sp. SS473 in the future.

Keywords: **antibacterial activity, *E. coli.*, ESBL, SS473, *Streptomyces*.**

Classification number: **3.5**

được chủng *Streptomyces* kháng *E. coli* sinh ESBL mạnh nhất với đường kính vòng kháng khuẩn là từ 12-16 mm [10]. Tại Việt Nam, một nghiên cứu phân lập được chủng *S. autotrophicus* HDL 3.16 từ vùng ven bờ biển Việt nam, chủng này cũng cho thấy tổng hợp được chất có hoạt tính kháng khuẩn cao [11].

Mới đây, các nghiên cứu tập trung phân lập các chủng xạ khuẩn nội sinh trên thực vật, kết quả cho thấy phát hiện được vài chủng xạ khuẩn có khả năng kháng lại các vi khuẩn kháng thuốc. Điển hình như chủng *Streptomyces* sp. SS004 được phân lập từ cây Trinh nữ hoàng cung (*Crinum latifolium*) có khả năng kháng lại cả những vi khuẩn kháng kháng sinh và có thể nuôi cấy [12]. Phân tích hoạt chất từ dịch chiết etyl axetat của chủng *S. cavourensis* YBQ59 phân lập trên cây Quế ở tỉnh Yên Bái thu được các chất 1-monolinolein, bafilomycin D, axit nonactic, daidzein, 3'-hydroxydaidzein. Các chất này thể hiện hoạt tính kháng khuẩn chống lại cả *S. aureus* kháng methicillin ATCC 33591 (MRSA) và *S. epidermidis* ATCC 35984 (MRSE) kháng methicillin. Trong đó, 1-monolinolein, bafilomycin D được đề xuất là chất ức chế cả vi khuẩn kháng thuốc và các dòng tế bào ung thư [13]. Kết quả này cho thấy, nhiều triển vọng phân lập và nuôi cấy được các chủng xạ khuẩn từ thực vật có khả năng kháng lại các chủng vi khuẩn gây bệnh và là tiền đề để nghiên cứu, sản xuất các thuốc kháng sinh kháng lại các chủng vi khuẩn đề kháng kháng sinh.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Chủng xạ khuẩn SS473 được phân lập từ cây Xương khỉ tại Chùa Sam Rong, tỉnh Trà Vinh. Các chủng vi khuẩn gây bệnh gồm *Enterobacter cloaceae*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium* phân lập từ lâm sàng và được cung cấp bởi Trung tâm Nghiên cứu và Ứng dụng Sinh học TP Hồ Chí Minh. Các hóa chất và thành phần của môi trường sử dụng trong nghiên cứu được cung cấp bởi Xilong (Trung Quốc), Himedia (Ấn Độ), Bioline (Anh). Các primer được cung cấp bởi Phù Sa Biochem (Việt Nam). Các đĩa kháng sinh được cung cấp bởi Công ty Nam khoa Biotek (Việt Nam).

Xác định khả năng sinh ESBL của các chủng E. coli

Các chủng *E. coli* trong nghiên cứu này được nuôi cấy trên môi trường Nutrient agar từ 16-18 giờ ở 37°C. Sinh khối được thu nhận và hòa trong nước muối sinh lý (0,9%) ở nồng độ 10^8 CFU/ml. Sau đó, dịch vi khuẩn được trải trên môi trường MHA. Các khoanh giấy lọc chứa kháng sinh (khoanh kháng sinh) bao gồm cefpodoxime (10 µg), ceftazidime (30 µg), aztreonam (30 µg), cefotaxime (30 µg), ceftriaxone (30 µg) được đặt trên đĩa MHA chứa *E. coli* để thực hiện khảo sát ban đầu sinh ESBL (initial screen test). Để khẳng định kiểu hình sinh ESBL (phenotypic confirmatory test), các khoanh kháng sinh ceftazidime (30 µg), ceftazidime/clavuanic acid (30/10 µg), cefotaxime (30 µg) và cefotaxime/clavuanic acid (30/10 µg) được đặt trên đĩa MHA chứa *E. coli*. Các đĩa MHA được ủ ở 37°C trong 16-18 giờ. Kết quả kháng sinh đồ được ghi nhận bằng cách đo đường kính vòng vô khuẩn xuất hiện quanh các khoanh kháng sinh. Chủng *E. coli* được xác định sinh ESBL khi có vòng vô khuẩn đối với các kháng sinh trong thử nghiệm khảo sát ban đầu cụ thể như

sau: cefpodoxime <17 mm; ceftazidime <22 mm; aztreonam <27 mm; cefotaxime <27 mm; ceftriaxone <25 mm. Chủng *E. coli* được khẳng định khả năng sinh ESBL trong thử nghiệm khẳng định kiểu hình khi vòng vô khuẩn từ khoanh kháng sinh ceftazidime/clavuanic acid lớn hơn vòng vô khuẩn từ khoanh kháng sinh ceftazidime 5 mm và vòng vô khuẩn từ khoanh kháng sinh cefotaxime/clavuanic acid lớn hơn vòng vô khuẩn từ khoanh kháng sinh cefotaxime 5 mm. Các chỉ tiêu xác định khả năng sinh ESBL được thực hiện theo hướng dẫn của CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute - Mỹ) [14].

Xác định phổ kháng khuẩn của chủng SS473

Chủng xạ khuẩn SS473 được nuôi cấy trên môi trường thạch FM3. Sau 5 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C, các khối thạch với đường kính 8 mm được thu nhận từ đĩa nuôi cấy SS473 và đặt trên các đĩa môi trường MHA đã trải trước các vi khuẩn gây bệnh khác nhau. Các đĩa môi trường MHA được ủ ở 37°C trong 16-18 giờ. Ghi nhận hoạt tính kháng khuẩn của SS473 bằng cách đo đường kính các vòng vô khuẩn trên mặt thạch MHA.

Ảnh hưởng môi trường nuôi cấy đến hoạt tính kháng khuẩn của chủng SS473

Chủng SS473 được nuôi cấy trên các môi trường thạch khác nhau bao gồm FM3, Fermen, PM1, MNGA và A4H. Sau 5 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C, các khối thạch với đường kính 8 mm từ các môi trường này được thu nhận và đặt trên các đĩa môi trường MHA đã trải trước các vi khuẩn gây bệnh khác nhau. Ủ các đĩa môi trường MHA ở 37°C trong 16-18 giờ. Ghi nhận hoạt tính kháng khuẩn của SS473 bằng cách đo đường kính các vòng vô khuẩn trên mặt thạch MHA.

Khảo sát tính bền của hoạt tính kháng khuẩn từ chủng SS473

Chủng SS473 được nuôi cấy trên môi trường FM3 agar trong 5 ngày ở nhiệt độ 30°C. Sau đó, các môi trường FM3 agar này được vắt bằng vải lọc vô trùng để thu nhận dịch chiết. Dịch chiết môi trường này được sử dụng để khảo sát tính bền trong các điều kiện lý, hóa, sinh học khác nhau. Dịch chiết được xử lý tại các nhiệt độ: nhiệt độ phòng, 60°C, 80°C, 100°C trong 60 phút. Dịch chiết được điều chỉnh pH về giá trị pH 3 và pH 13. Dịch chiết được xử lý với tia UV trong 60 phút. Dịch chiết được xử lý với proteinase K ở nồng độ 1 mg/ml trong 60 phút. Sau đó, các dịch chiết đã xử lý với nhiệt độ, pH, tia UV và protease được khảo sát hoạt tính kháng *E. coli* sinh ESBL bằng phương pháp khuếch tán kháng sinh trên thạch. Ghi nhận hoạt tính kháng khuẩn của các dịch chiết bằng cách đo đường kính các vòng vô khuẩn trên mặt thạch MHA.

Định danh chủng SS473 dựa trên hình thái và sinh học phân tử

Định danh hình thái: chủng SS473 được nuôi cấy trên các môi trường MacConkey, Casein agar, ISP4, ISP5, ISP6, Simmon citrate agar. Sau 5 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C, tiến hành ghi nhận hình thái khuẩn lạc có đối chiếu với các đặc tính khuẩn lạc của nhóm xạ khuẩn.

Định danh sinh học phân tử: chủng SS473 được nuôi cấy trong môi trường TSB trong 2 ngày. Sau đó, thu sinh khối và tách chiết DNA bộ gen bằng phương pháp phenol/chloroform. Nhân bản vùng gen 16S rRNA của chủng SS473 với cặp mồi (primer) 27F/1492R và thu nhận sản phẩm PCR. Tiến hành giải trình tự sản phẩm PCR từ gen 16S rRNA của chủng SS473. Sử dụng công cụ 16S-based ID của dịch vụ EZBioCloud (https://www.ezbiocloud.net) để định danh chủng SS473 dựa trên trình tự nucleotide gen 16S rRNA đã giải mã.

Kết quả

Xác định khả năng sinh ESBL của các chủng E. coli thu nhận từ lâm sàng

Các chủng vi khuẩn *E. coli* cung cấp bởi Trung tâm Nghiên cứu và Ứng dụng Sinh học được xác định khả năng sinh enzyme β-lactamase phổ rộng (ESBL) bằng phương pháp kháng sinh đồ với các đĩa kháng sinh theo hướng dẫn của CLSI (Mỹ). Theo đó, khả năng sinh ESBL được khảo sát qua hai thử nghiệm: khảo sát ban đầu và khẳng định kiểu hình. Kết quả của thử nghiệm khảo sát ban đầu khả năng sinh ESBL được trình bày ở hình 1.



Hình 1. Kết quả thử nghiệm khảo sát ban đầu khả năng sinh ESBL của các chủng *E. coli*. Ec1, Ec2, Ec3: chủng *E. coli* số 1, 2, 3 trong nghiên cứu. 1: cefpodoxime, 2: cefotaxime, 3: aztreonam, 4: ceftriaxome, 5: ceftazidime.

Kết quả khảo sát ban đầu cho thấy đường kính vòng kháng khuẩn đối với các kháng sinh khảo sát của ba chủng *E. coli* Ec1, Ec2, Ec3 như sau: cefpodoxime <17 mm, cefotaxime <27 mm, aztreonam <27 mm, ceftriaxone <25 mm, ceftazidime <22 mm. Đối chiếu với tiêu chuẩn của CLSI thì cả ba chủng Ec1, Ec2, Ec3 đều có khả năng sinh ESBL. Tiếp theo, thử nghiệm khẳng định kiểu hình sinh tính kháng được tiến hành để khẳng định khả năng sinh ESBL của ba chủng *E. coli*. Kết quả được trình bày ở hình 2.



Hình 2. Kết quả thử nghiệm khẳng định kiểu hình sinh ESBL của các chủng *E. coli*. Ec1, Ec2, Ec3: chủng *E. coli* số 1, 2, 3 trong nghiên cứu. 1: cefotaxime/clavuanic acid, 2: cefotaxime, 3: ceftazidime/clavuanic acid, 4: ceftazidime.

Kết quả khảo sát cho thấy, vòng kháng khuẩn của hỗn hợp hai kháng sinh cefotaxime và clavulanic acid lớn hơn vòng kháng khuẩn của cefotaxime đơn lẻ 5 mm. Tương tự, vòng kháng khuẩn của hỗn hợp hai kháng sinh ceftazidime và clavulanic acid lớn hơn vòng kháng khuẩn của ceftazidime đơn lẻ 5 mm. Đối chiếu với tiêu chuẩn của CLSI thì kết quả này khẳng định ba chủng *E. coli* Ec1, Ec2, Ec3 trong nghiên cứu này sinh ESBL.

Khảo sát hoạt tính kháng E. coli sinh ESBL của chủng xạ khuẩn SS473

Chủng SS473 phân lập từ cây Xương khỉ có hình thái trên môi trường SFM và có hoạt tính kháng khuẩn kháng các chủng *E. coli* sinh ESBL ở hình 3.

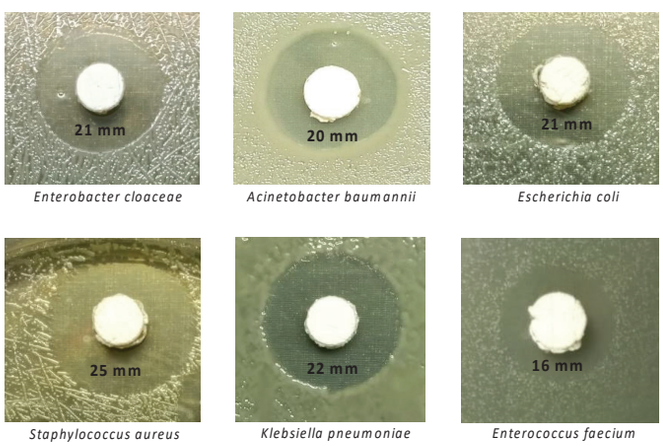


Hình 3. Hình thái và khả năng kháng *E. coli* sinh ESBL của chủng SS473.

Khi được nuôi cấy trên môi trường sinh chất chuyển hóa thứ cấp là FM3, chủng SS473 thể hiện hoạt tính kháng khuẩn kháng cả ba chủng *E. coli* sinh ESBL là Ec1, Ec2, Ec3 với đường kính vòng vô khuẩn trung bình là 21,3±0,57 mm.

Khảo sát phổ kháng khuẩn của chủng SS473

Chúng tôi khảo sát phổ kháng khuẩn của chủng SS473 trên một số vi khuẩn gây bệnh phân lập từ mẫu lâm sàng. Chủng SS473 được cấy trên môi trường sinh chất kháng khuẩn là FM3. Kết quả khảo sát phổ kháng khuẩn được trình bày ở hình 4.



Hình 4. Kết quả khảo sát phổ kháng khuẩn của chủng SS473.

Kết quả cho thấy chủng xạ khuẩn SS473 thể hiện hoạt tính kháng nhiều loại vi khuẩn gây bệnh, trong đó vòng vô khuẩn nhỏ nhất là 16 mm đối với *E. faecium* và lớn nhất là 25 mm đối với *S. aureus*.

Khảo sát ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên hoạt tính kháng khuẩn của SS473

Chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên hoạt tính kháng khuẩn của chủng SS473. Các môi trường sinh chất kháng khuẩn được khảo sát trong nội dung này bao gồm: FM3, Fermen, PM1, MNGA và A4H. Các vi khuẩn thử nghiệm bao gồm *E. cloaceae*, *A. baumannii*, *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. faecium*. Số liệu kháng khuẩn trong thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên hoạt tính kháng khuẩn của chủng SS473 được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến hoạt tính kháng khuẩn của chủng SS440 và chủng SS473.

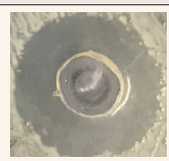
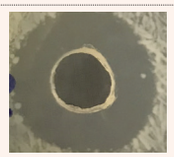
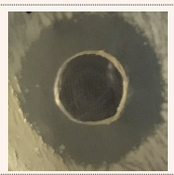
Chủng vi khuẩn gây bệnh	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm) của chủng SS473 với các vi khuẩn gây bệnh khi nuôi trên các môi trường khác nhau				
	FM3	*Fermen*	*PM1*	*MNGA*	*A4H*
E. cloaceae	21±0	11,6±0,57	14,3±0,57	13,6±0,57	13,3±0,57
A. baumannii	19,6±0,57	0	12±0	0	0
E. coli sinh *ESBL*	21±0	0	10,3±0,57	13,3±0,57	12,3±0,57
S. aureus	25,3±0,57	12±0	16±0	15±0	15±0
K. pneumoniae	22±0	12,3±0,57	17±0	16±0	16,6±0,57
E. faecium	16±0	0	0	0	0

Kết quả khảo sát cho thấy môi trường nuôi cấy ảnh hưởng rất khác nhau lên hoạt tính kháng khuẩn của SS473. Chủng SS473 cho hoạt tính kháng khuẩn mạnh trên 6 chủng vi khuẩn khảo sát khi nuôi trên môi trường FM3 (đường kính vòng vô khuẩn từ 16-25 mm). Các môi trường Fermen, PM1, MNGA và A4H kích thích sinh các chất kháng khuẩn khác nhau và yếu hơn so với môi trường FM3.

Khảo sát tính bền của hoạt tính kháng khuẩn từ chủng SS473 đối với nhiệt độ, pH, UV, protease

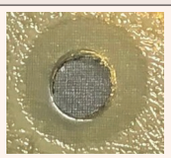
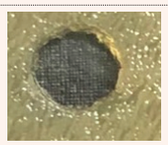
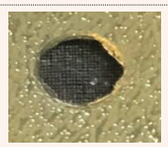
Chúng tôi khảo sát tính bền trong hoạt tính kháng khuẩn của chủng SS473 đối với các tác nhân nhiệt độ, pH, tia UV và protease. Chủng vi khuẩn *E. coli* Ec1 được sử dụng để thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn trong thí nghiệm này. Kết quả khảo sát tính bền của hoạt tính kháng khuẩn chủng SS473 được trình bày trong các bảng 2-5.

Bảng 2. Kết quả khảo sát tính bền đối với nhiệt độ.

Nhiệt độ xử lý	Hoạt tính kháng khuẩn	Đường kính vòng vô khuẩn	% hoạt tính còn lại
Nhiệt độ phòng (28-29°C)		17,3±0,57 mm	100%
60°C		16,6±0,57 mm	95,9%
80°C		14±0 mm	80,9%
100°C		0 mm	0%

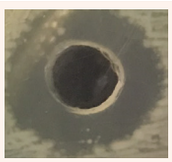
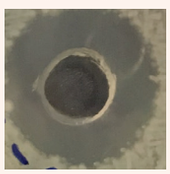
Kết quả khảo sát cho thấy hoạt tính kháng khuẩn giảm khi xử lý ở nhiệt độ 80°C và hoàn toàn mất hoạt tính khi xử lý dịch môi trường ở nhiệt độ 100°C.

Bảng 3. Kết quả khảo sát tính bền đối với pH.

pH xử lý	Hoạt tính kháng khuẩn	Đường kính vòng vô khuẩn	% hoạt tính còn lại
Không xử lý (pH 8,15)		17,3±0,57 mm	100%
pH 3		0 mm	0%
pH 13		0 mm	0%

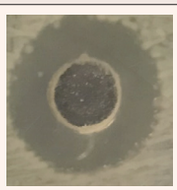
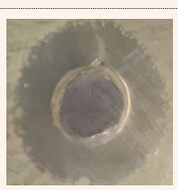
Kết quả khảo sát cho thấy hoạt tính kháng khuẩn của SS473 bị mất khi xử lý ở hai giá trị pH cực đoan là pH 3 và pH 13.

Bảng 4. Kết quả khảo sát tính bền đối với tia UV.

Xử lý UV	Hoạt tính kháng khuẩn	Đường kính vòng vô khuẩn	% hoạt tính còn lại
Không chiếu UV		16,6±0,57 mm	100%
Chiếu UV trong 60 phút		17±0 mm	102,4%

Kết quả khảo sát cho thấy hoạt tính kháng khuẩn của SS473 không bị ảnh hưởng khi xử lý với tia UV trong 60 phút.

Bảng 5. Kết quả khảo sát tính bền đối với protease.

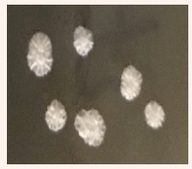
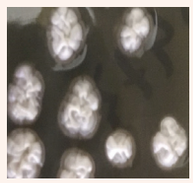
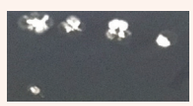
Xử lý protease	Hoạt tính kháng khuẩn	Đường kính vòng vô khuẩn	% hoạt tính còn lại
Dịch nuôi cấy không xử lý protease K		16,6±0,57 mm	100%
Dịch nuôi cấy được xử lý với protease K trong 60 phút ở 37°C		17,6±0,57 mm	106%

Kết quả khảo sát cho thấy, hoạt tính kháng khuẩn của SS473 không bị ảnh hưởng khi xử lý protease trong 60 phút. Kết quả khảo sát tính bền cho thấy, chủng SS473 vẫn giữ được hoạt tính kháng khuẩn đến nhiệt độ 80°C, nhưng bị mất hoạt tính tại hai giá trị pH cực đoan là pH 3 và pH 13. Ngoài ra, hoạt tính kháng khuẩn của chủng SS473 không bị ảnh hưởng bởi tia UV và enzyme protease. Thông tin về tính bền của hoạt tính kháng khuẩn của chủng SS473 là cần thiết để định hướng việc chiết xuất và sử dụng hợp chất kháng khuẩn từ SS473 về sau.

Định danh chủng SSS473 bằng hình thái và phân tử

Kết quả định danh hình thái chủng SS473: để định danh về mặt hình thái chủng SS473, chúng tôi nuôi cấy chủng SS473 trên các môi trường khác nhau bao gồm một số môi trường đặc trưng cho nhóm xạ khuẩn (các môi trường ISP) và quan sát đặc tính vi sinh của chủng SS473 trên các môi trường này. Kết quả định danh về mặt hình thái được trình bày ở bảng 6.

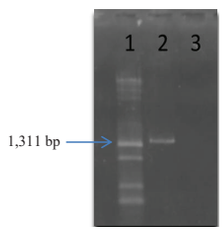
Bảng 6. Kết quả nuôi cấy chủng SS473 trên các môi trường.

STT	Môi trường	Hình ảnh	Mô tả khuẩn lạc
1	MacConkey agar		-Sinh trưởng: -
2	Casein agar		-Sinh trưởng: +++ -Kích thước lớn khoảng 6 mm. -Khuẩn lạc bề mặt bên trong có viền răng cưa, viền ngoài trắng đục. -KTKS: màu trắng đục.
3	ISP4		-Sinh trưởng: +++ -Kích thước lớn khoảng 5 mm. -Khuẩn lạc bề mặt tròn có màu trắng đục. -KTKS: màu vàng nhạt.
4	ISP5		-Sinh trưởng: ++ -Kích thước nhỏ khoảng 2 mm -Khuẩn lạc bề mặt tròn, màu trắng sữa -KTKS: màu vàng nâu
5	ISP6		-Sinh trưởng: +++ -Kích thước lớn khoảng 5 mm. -Khuẩn lạc tròn, bên trong màu trắng, bên ngoài có viền màu trắng đục. -KTKS: màu trắng.
6	Simon citrat agar		-Sinh trưởng: + -Khuẩn lạc nhỏ khoảng 2 mm. -Khuẩn lạc có màu trắng. -KTKS: màu trắng.

Sinh trưởng: "+" kém; "++" tốt; "+++" rất tốt; (-) không mọc; KTKS: khuẩn ty khí sinh.

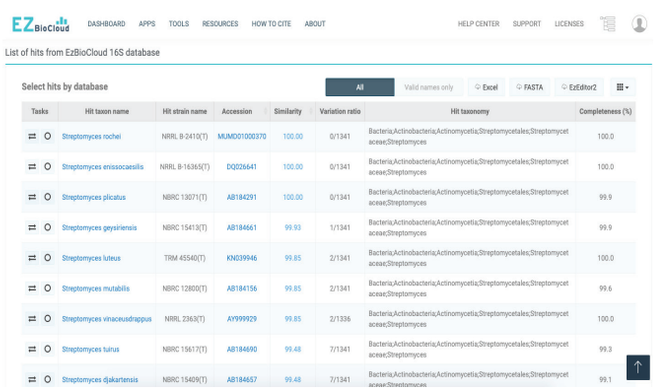
Kết quả nuôi cấy cho thấy, xạ khuẩn SS473 mọc tốt trên cả 5 môi trường nhưng không mọc được trên môi trường MacConkey do đây là môi trường chọn lọc cho vi khuẩn Gram âm và ức chế vi khuẩn Gram dương. Quan sát hình thái khuẩn lạc chủng SS473 trên các môi trường phân loại ISP cho thấy kích thước khuẩn lạc tương đối nhỏ, màu sắc có thay đổi tùy theo môi trường nuôi cấy, trên các môi trường đều có cấu trúc khuẩn ty cơ chất, sinh bào tử. Vì vậy, chúng tôi bước đầu xác định SS473 có khả năng thuộc nhóm xạ khuẩn và bước tiếp theo chúng tôi sẽ tiến hành định danh phân tử để có kết luận chính xác về chủng SS473.

Kết quả định danh sinh học phân tử của chủng SS473: sau khi thực hiện định danh bằng hình thái, chúng tôi tiến hành định danh về mặt phân tử chủng SS473 dựa trên gen 16S rRNA. Các bước định danh bao gồm tách chiết DNA bộ gen chủng SS473 bằng phương pháp phenol/chloroform, nhân bản trình tự gen 16S rRNA bằng PCR với cặp primer 27F-1495R, giải trình tự sản phẩm PCR và xây dựng cây phát sinh loài để định danh phân tử chủng SS473. Kết quả điện di sản phẩm PCR gen 16S rRNA của chủng SS473 được trình bày ở hình 5.



Hình 5. Kết quả nhân bản gen 16S rRNA của chủng SS473 với cặp primer 27F-1495R. 1: thang DNA; 2: sản phẩm PCR từ chủng SS473; 3: mẫu chứng âm PCR.

Kết quả điện di cho thấy, thu được một sản phẩm có kích thước khoảng 1,5 kb khi so sánh với thang DNA. Không có vạch ký sinh trong sản phẩm PCR. Sản phẩm này được gửi đi giải trình tự nucleotide tại Công ty Macrogen (Hàn Quốc). Kết quả giải trình tự được công bố trên GenBank với mã số truy cập MW181654. Trình tự nucleotide gen 16S rRNA của chủng SS473 được sử dụng để định danh phân tử sử dụng công cụ 16S-based ID của dịch vụ EZBioCloud (https://www.ezbiocloud.net). Kết quả định danh phân tử được trình bày ở hình 6.



Hình 6. Kết quả định danh phân tử dựa trên gen 16S rRNA chủng SS473.

Kết quả định danh bằng phần mềm 16S-based ID cho thấy, chủng SS473 có sự tương đồng rất cao với nhiều loài thuộc chi xạ khuẩn *Streptomyces*. Kết quả định danh phân tử 16S rRNA này chưa đủ để khẳng định chính xác đến mức loài trong hệ thống phân loại nên chúng tôi gọi chủng SS473 là *Streptomyces* sp. SS473.

Bàn luận

Nhu cầu phát hiện các hợp chất tự nhiên có hoạt tính kháng khuẩn đang được quan tâm mạnh mẽ trước tình trạng kháng khuốc của vi khuẩn, đặc biệt là các vi khuẩn gây bệnh ở người. Trong các nguồn cung cấp các hợp chất tự nhiên có hoạt tính kháng khuẩn thì các vi khuẩn thuộc nhóm xạ khuẩn có vai trò quan trọng với hơn 2/3 số kháng sinh được sử dụng trên người và động vật có nguồn gốc từ nhóm vi khuẩn này [15]. Theo truyền thống, các chủng xạ khuẩn có hoạt tính sinh học nói chung và hoạt tính kháng khuẩn nói riêng được phân lập chủ yếu từ đất và nước. Gần đây, các chủng xạ khuẩn phân lập từ thực vật thu hút được sự chú ý vì đây là nguồn phân lập mới và hoạt tính sinh học của thực vật, đặc biệt là các cây thuốc dân gian có thể đến từ các vi sinh vật nội sinh trong cây. Nghiên cứu này cũng nằm trong hướng phân lập các chủng xạ khuẩn nội sinh trong thực vật hướng đến hoạt tính kháng khuẩn kháng *E. coli* sinh ESBL.

Chủng xạ khuẩn SS437 được phân lập từ cây Xương khỉ có hoạt tính kháng lại các chủng *E. coli* sinh ESBL từ lâm sàng. Ngoài ra, hoạt tính kháng khuẩn của SS473 là đáng chú ý khi có tác dụng ức chế nhiều vi khuẩn gây bệnh thuộc vi khuẩn Gram âm, Gram dương, cầu khuẩn, trực khuẩn. Thực tế, các chủng vi khuẩn gây bệnh được lựa chọn trong nghiên cứu này được Tổ chức Y tế Thế giới liệt vào nhóm các tác nhân gây bệnh nguy hiểm do đặc tính kháng kháng sinh của chúng [16]. Bên cạnh đó, hoạt tính kháng khuẩn của SS473 cũng tương đối bền với các yếu tố lý, hóa, sinh học như nhiệt độ, pH, UV và protease. Hoạt tính này chỉ bị mất ở điều kiện pH axit hoặc kiềm mạnh là pH 3 và pH 13. Hoạt tính kháng khuẩn được duy trì đến nhiệt độ 80^{o}C và không bị ảnh hưởng bởi tia UV và enzyme protease.

Ở xạ khuẩn, các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học thường do các nhóm gen (gene cluster) chịu trách nhiệm sinh tổng hợp. Các nhóm gen sinh tổng hợp được điều hòa biểu hiện rất khác biệt bởi các yếu tố môi trường, trong đó môi trường và điều kiện nuôi cấy có ảnh hưởng rõ rệt. Trong nghiên cứu này, môi trường FM3 cho thấy khả năng kích thích chủng SS473 sinh hoạt tính kháng khuẩn cao nhất trong số 5 môi trường khảo sát. Môi trường này sẽ được sử dụng cho các nghiên cứu phân lập hợp chất thứ cấp có hoạt tính kháng khuẩn cũng như nghiên cứu con đường sinh tổng hợp và điều hòa sinh tổng hợp hợp chất thứ cấp có hoạt tính kháng khuẩn sau này.

Chủng SS473 cho thấy các đặc điểm hình thái của xạ khuẩn khi được nuôi cấy trên nhiều loại môi trường khác nhau, trong đó có các môi trường nuôi cấy đặc trưng cho nhóm xạ khuẩn (các môi trường ISP). Hơn nữa, kết quả định danh phân tử dựa trên gen 16S rRNA cũng khẳng định SS473 thuộc chi xạ khuẩn *Streptomyces*. Tuy nhiên, để định danh chính xác chủng SS473

đến mức loài thì cần một nghiên cứu tổng hợp (polyphasic taxonomy) bao gồm các bước như định danh hình thái trên các môi trường nuôi cấy khác nhau, xác định khả năng biến dưỡng các cơ chất hữu cơ, phân tích thành phần hóa học của thành tế bào, màng tế bào, giải trình tự và xây dựng cây phát sinh loài trên nhiều gen chỉ thị, chụp hình cấu trúc tế bào dưới kính hiển vi điện tử [17]. Với lý do này, chúng tôi gọi chủng xạ khuẩn SS473 trong nghiên cứu này là *Streptomyces* sp. SS473.

Dựa trên kết quả trong nghiên cứu này về hoạt tính kháng khuẩn của chủng *Streptomyces* sp. SS473, các nghiên cứu khác sẽ được tiến hành tiếp theo nhằm định danh chính xác chủng SS473 đến mức loài, phân lập hợp chất thứ cấp có hoạt tính kháng khuẩn từ SS473, giải trình tự bộ gen và xác định nhóm gen chịu trách nhiệm sinh tổng hợp hợp chất thứ cấp mục tiêu, nghiên cứu con đường sinh tổng hợp và điều hòa sinh tổng hợp của hợp chất thứ cấp mục tiêu. Tất cả những nghiên cứu tiếp theo này tạo tiền đề quan trọng cho việc tổng hợp và ứng dụng hợp chất thứ cấp có hoạt tính kháng khuẩn từ chủng SS473.

Kết luận

Các kết quả nghiên cứu cho thấy chủng xạ khuẩn SS473 có khả năng kháng lại các chủng vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL cũng như các vi khuẩn gây bệnh khác được phân lập từ mẫu lâm sàng. Chủng SS473 có phổ kháng khuẩn mạnh nhất khi nuôi trên môi trường FM3 so với các môi trường còn lại. Hoạt tính kháng khuẩn của chủng SS473 vẫn được duy trì ở nhiệt độ 80°C, tuy nhiên bị mất hoạt tính ở pH 3 và pH 13. Hoạt tính này không bị ảnh hưởng bởi xử lý với tia UV, cũng như với enzyme protease. Khi nuôi cấy trên các môi trường khác nhau, chủng SS473 thể hiện đầy đủ các đặc điểm hình thái đặc trưng cho xạ khuẩn. Kết quả phân tích trình tự gen 16S rRNA cho thấy chủng SS473 có sự tương đồng rất cao với các loài thuộc chi *Streptomyces*. Dựa trên kết quả định danh hình thái và phân tử, chúng tôi gọi chủng SS473 là *Streptomyces* sp. SS473.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ NTTU trong đề tài mã số 2020.01.102. Chúng tôi cũng xin cảm ơn Trung tâm Nghiên cứu và Ứng dụng Sinh học đã cung cấp các chủng vi khuẩn sử dụng trong nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] O. Tenaillon, D. Skurnik, B. Picard, E. Denamur (2010), "The population genetics of commensal *Escherichia coli*", *Nature Reviews Microbiology*, **8(3)**, pp.207-217.

[2] T.A. Russo, J.R. Johnson (2003), "Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on anincreasingly important endemic problem", *Microbes and Infection*, **5(5)**, pp.449-456.

[3] F.R. Blattner, G. Plunkett, C.A. Bloch, N.T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J.D. Glasner, C.K. Rode, G.F. Mayhew, J. Gregor, N.W. Davis, H.A. Kirkpatrick, M.A. Goeden, D.J. Rose, B. Mau, Y. Shao (1997), "The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12", *Science*, **277(5331)**, pp.1453-1462.

[4] D. Rawat, D. Nair (2010), "Extended-spectrum β-lactamases in Gram negative bacteria", *Journal of Global Infectious Diseases*, **2(3)**, pp.263-274.

[5] S. Dahmena, V. Métayera, E. Gay, J.-Y. Madeca, M. Haennia (2013), "Characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-carrying plasmids and clones of *Enterobacteriaceae* causing cattle mastitis in France", *Veterinary Microbiology*, **162(2-4)**, pp.793-799.

[6] C. Ewers, M. Grobbel, A. Bethe, L.H. Wieler, S. Guenther (2011), "Extended-spectrum beta-lactamases-producing Gram-negative bacteria in companion animals: action is clearly warranted", *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, **124(3/4)**, pp.94-101.

[7] R. Cantón, A. Novais, A. Valverde, E. Machado, L. Peixe, F. Baquero, T.M. Coque (2008), "Prevalence and spread of extended- spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe", *Clinical Microbiology and Infection*, **14(1)**, pp.144-153.

[8] Y. Igarashi, K. Futamata, T. Fujita, A. Sekine, H. Senda, H. Naoki, T. Furumai (2003), "Yatakemycin, a novel antifungal antibiotic produced by *Streptomyces* sp. TP-A0356", *Journal Antibiotics*, **56(2)**, pp.107-113.

[9] J.C. Yoo, J.H. Kim, J.W. Ha, N.S. Park, J.K. Sohng, J.W. Lee, S.C. Park, M.S. Kim, C.N. Seong (2007), "Production and biological activity of laidlomycin, anti-MRSA/VRE antibiotic from *Streptomyces* sp. CS684", *Journal of Microbiology*, **45(1)**, pp.6-10.

[10] S.M.Kh. Al-Hulu (2015), "Antibacterial activity of Streptomyces spp. against extended spectrum beta lactamase bacilli isolated from Urine samples", *Al-Kufa University Journal for Biology*, **7(1)**, pp.327-331.

[11] N.V. Hiếu, N.P. Nhuệ, V.T.H. Nguyên, P.T.H. Thảo, P.T. Huyền, P.Q. Tiến, L.G. Hy (2013), "Nghiên cứu chủng xạ khuẩn HLD 3.16 có hoạt tính kháng khuẩn phân lập từ vùng ven bờ biển Việt Nam", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, **51(1)**, tr.29-41.

[12] T.M. Phụng, L.T.T. Hằng, P.T. Hảo, N.T.H. My, N.H. Chương (2017), "Nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của các chủng xạ khuẩn nội sinh trong cây Trinh nữ hoàng cung (*Crinum latifolium*)", *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ*, **20(5)**, tr.69-76.

[13] H.N.T. Vu, D.T. Nguyen, H.Q. Nguyen, H.H. Chu, S.K. Chu, M.V. Chau, Q.T. Phi (2018), "Antimicrobial and cytotoxic properties of bioactive metabolites produced by *Streptomyces cavourensis* YBQ59 isolated from *Cinnamomum cassia* Prels in Yen Bai province of Vietnam", *Current Microbiology*, **75(3)**, DOI: 10.1007/s00284-018-1517-x.

[14] F. Cockerill, Clinical (2008), *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Eighteenth Informational Supplement*.

[15] N.H. Chương (2009), *Nghiên cứu sinh tổng hợp và điều hòa sinh tổng hợp kháng sinh spiramycin ở Streptomyces ambofaciens*, Luận án Tiến sĩ, Đại học Paris Sud 11.

[16] E. Tacconelli, et al. (2018), "Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis", *Lancet Infectious Diseases*, **18(3)**, pp.318-327.

[17] L. Li, J. Wang, Y.-J. Zhou, H.-W. Lin, Y.-H. Lu (2019), "*Streptomyces reniochalinae* sp. nov. and *Streptomyces diacarni* sp. nov., from marine sponges", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **69(1)**, pp.99-104.

Đánh giá khả năng sử dụng Des-γ carboxy prothrombin huyết thanh trong chẩn đoán ung thư biểu mô tế bào gan

Nguyễn Đăng Quân[1*], Nguyễn Thị Thanh Thảo[1], Phạm Nguyễn Thanh Thuỷ[1], Lê Thị Thuý Hằng[2], Trần Công Duy Long[3], Đinh Minh Hiệp[4]

[1]Trung tâm Công nghệ Sinh học TP Hồ Chí Minh
[2]Trung tâm Nghiên cứu và Ứng dụng Sinh học
[3]Bệnh viện Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh
[4]Ban Quản lý Khu Nông nghiệp Công nghệ cao TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 5/4/2021; ngày chuyển phản biện 7/4/2021; ngày nhận phản biện 14/5/2021; ngày chấp nhận đăng 20/5/2021

Tóm tắt:

Ung thư biểu mô tế bào gan (Hepatocellular carcinoma - HCC) là một trong những bệnh ung thư phổ biến trên thế giới và ở Việt Nam. Hầu hết bệnh nhân HCC được chẩn đoán ở giai đoạn muộn, dẫn đến hiệu quả điều trị không cao. Vì vậy, chẩn đoán sớm HCC cho đối tượng có nguy cơ cao bằng chẩn đoán hình ảnh và các chỉ dấu huyết thanh có ý nghĩa quan trọng để kiểm soát căn bệnh này. Hiện nay, α-fetoprotein (AFP) là chỉ dấu huyết thanh được sử dụng phổ biến để tầm soát HCC. Tuy nhiên, AFP huyết thanh không đủ tin cậy trong chẩn đoán HCC, nhất là giai đoạn sớm. Mục tiêu của nghiên cứu này là bước đầu đánh giá giá trị chẩn đoán HCC của chỉ dấu Des-γ carboxy prothrombin (DCP). Nồng độ DCP và AFP trong huyết thanh của 50 bệnh nhân HCC giai đoạn sớm (giai đoạn A), 50 bệnh nhân HCC giai đoạn muộn (giai đoạn B và C), 50 bệnh nhân viêm gan không mắc HCC và 50 người không có yếu tố nguy cơ đã được định lượng. Phân tích đường cong ROC cho thấy, với giá trị ngưỡng (cut-off) 11,93 ng/ml, độ nhạy và độ đặc hiệu chẩn đoán HCC của DCP tương ứng là 50 và 94%. Với HCC giai đoạn sớm, độ nhạy chẩn đoán bệnh của DCP là 34% trong khi độ đặc hiệu không thay đổi. Với chỉ dấu đang được sử dụng AFP, kết quả nghiên cứu cho thấy, ở giá trị ngưỡng 952,1 ng/ml, độ nhạy và độ đặc hiệu chẩn đoán HCC của AFP là 39 và 95%. Với HCC giai đoạn sớm, AFP không có hiệu quả chẩn đoán bệnh. Kết hợp hai chỉ dấu huyết thanh DCP và AFP không giúp cải thiện độ nhạy phát hiện HCC so với khi chỉ sử dụng chỉ dấu DCP. Nghiên cứu cho thấy, chỉ dấu huyết thanh DCP có thể được sử dụng thay cho AFP trong chẩn đoán HCC và làm tăng độ nhạy chẩn đoán bệnh.

Từ khóa: **α-fetoprotein, chẩn đoán, chỉ dấu huyết thanh, Des-γ carboxy prothrombin, ung thư tế bào gan.**

Chỉ số phân loại: **3.5**

Tổng quan

Ung thư gan là một trong tám dạng ung thư thường gặp trên thế giới. Tại Việt Nam, ung thư gan là loại ung thư phổ biến đứng hàng thứ 4 ở cả hai giới. Trong đó, HCC là dạng ung thư ác tính phổ biến chiếm tỷ lệ trên 80% các trường hợp ung thư gan, xảy ra chủ yếu ở những bệnh nhân nhiễm HBV, HCV mạn tính và xơ gan [1]. Việc chẩn đoán sớm có ý nghĩa rất quan trọng đối với hiệu quả điều trị bệnh ung thư gan. Nhiều kỹ thuật đã được áp dụng để chẩn đoán HCC như: chụp CT, siêu âm gan, chụp cộng hưởng từ, sinh thiết gan và định lượng chỉ dấu sinh học trong huyết thanh. Định lượng chỉ dấu sinh học trong huyết thanh là xét nghiệm đơn giản, không đòi hỏi thiết bị đắt tiền, thích hợp để chẩn đoán sàng lọc và bổ trợ cho các kỹ thuật chẩn đoán hình ảnh. Hiện nay, chỉ dấu protein trong chẩn đoán HCC được dùng phổ biến nhất tại Việt Nam là AFP. Tuy nhiên, 80% bệnh nhân HCC với khối u kích thước nhỏ không có sự gia tăng nồng độ AFP, độ nhạy của chẩn đoán HCC dựa trên chỉ dấu AFP là 52 và 25%, tương ứng với khối u có đường kính lớn hơn và nhỏ hơn 3 cm [2]. Hơn nữa, 40-50% bệnh nhân HCC có nồng độ AFP trong huyết thanh nhỏ hơn ngưỡng chẩn đoán dương tính (<400 ng/ml) [3]. Một số bệnh nhân xơ gan và/hoặc viêm gan cũng có thể có sự tăng cao lượng AFP (có khi lên tới 2500 ng/ml) trong máu mà không có sự hiện diện của khối u [3, 4]. Như vậy, AFP chưa phải là một chỉ dấu huyết thanh tốt để chẩn đoán HCC, việc tìm kiếm và sử dụng một chỉ dấu protein khác của HCC là điều cần thiết. Đã có nhiều nghiên cứu trên thế giới được thực hiện nhằm tìm kiếm các chỉ dấu mới để chẩn đoán HCC, trong đó DCP được xem là chỉ dấu nhiều triển vọng [5]. DCP còn được gọi là Protein induced by vitamin K absence or antagonist II (PIVKA-II), là một sản phẩm bất thường do sự rối loạn carboxyl hóa trong quá trình hình thành thrombogen. Nó hoạt động như một yếu tố tăng trưởng tự sinh của các dòng tế bào ung thư biểu mô tế bào gan. Hàm lượng của protein này trong huyết thanh tăng lên rõ rệt ở các bệnh nhân HCC so với người khỏe mạnh và bệnh nhân u gan lành tính. Mặc dù một vài nghiên cứu có kết quả trái ngược, DCP trong

[*]Tác giả liên hệ: Email: ndquan.snn@tphcm.gov.vn

Evaluating the diagnostic value of serum Des-γ carboxy prothrombin in the detection of hepatocellular carcinoma

Dang Quan Nguyen[1*], Thi Thanh Thao Nguyen[1], Nguyen Thanh Thuy Pham[1], Thi Thuy Hang Le[2], Cong Duy Long Tran[3], Minh Hiep Dinh[4]

[1]Biotechnology Center of Ho Chi Minh city
[2]Center for Research and Application on Bioscience
[3]University Medical Center Ho Chi Minh city
[4]Management Board of Agricultural Hi-tech Park of Ho Chi Minh city

Received 5 April 2021; accepted 20 May 2021

Abstract:

Hepatocellular carcinoma (HCC) is amongst the most common cancers in the world and Vietnam. Most HCC patients are diagnosed late, so the effect of treatment is limited. Hence, early diagnosis for high-risk populations using medical imaging and serum markers is very important to control HCC. Recently, α-fetoprotein (AFP) has been popularly used as a serum marker for screening of HCC. Unfortunately, AFP is not trustworthy enough for HCC diagnosis, especially early HCC. Therefore, this study was deployed to estimate the ability of serum Des-γ carboxy prothrombin (DCP) applied in the diagnosis of HCC. DCP and AFP concentration in serum of 50 early HCC patients (stage A), 50 late HCC patients (stage B and C), 50 HBV/HCV-infected patients, and 50 healthy persons were identified. ROC curve analysis manifested that with the cut-off value at 11.93 ng/ml, DCP allowed identifying HCC cases with the sensitivity and specificity of 50 and 94%, respectively. With early HCC, the sensitivity of DCP decreased to 34%, while the specificity was unchanged. In the case of AFP, results showed that the sensitivity and specificity of this marker for HCC were 39 and 95%, with the cut-off value at 952.1 ng/ml. For early HCC, it was impossible to use AFP for diagnosis. The combination of DCP and AFP serum markers in the detection of HCC did not improve the sensitivity of the diagnosis compared to that of DCP alone. The study demonstrated that serum biomarker DCP can be used instead of AFP in the diagnosis of HCC, which improves the diagnostic sensitivity.

Keywords: **α-fetoprotein, Des-γ carboxy prothrombin, diagnosis, hepatocellular carcinoma, serum marker.**

Classification number: **3.5**

huyết thanh và mô đã được nhiều công trình chứng minh là hữu ích hơn AFP trong việc phân biệt HCC với các bệnh gan không phải ung thư, nhất là trong chẩn đoán HCC với khối u nhỏ. Ngoài mục đích sàng lọc HCC, DCP huyết thanh còn có thể được dùng như dấu hiệu tiên lượng bệnh, đánh giá điều trị HCC và có thể phản ánh đặc điểm xâm lấn của khối u [6]. Hướng dẫn của Hiệp hội Nghiên cứu về gan châu Á - Thái Bình Dương (Asian Pacific association for the study of the liver - APASL) từ năm 2010 đã nhìn nhận DCP như là các chỉ dấu huyết thanh tiềm năng trong chẩn đoán và tầm soát HCC [7]. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm góp phần làm rõ thêm cơ sở khoa học về giá trị lâm sàng của DCP trong chẩn đoán - tầm soát HCC, đặc biệt trên đối tượng nghiên cứu là người Việt Nam.

Vật liệu, phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành trên 4 nhóm đối tượng với tiêu chuẩn chọn mẫu như sau:

- Nhóm I: bệnh nhân được chẩn đoán HCC và xác định giai đoạn A dựa theo phác đồ hướng dẫn chẩn đoán của Hiệp hội Nghiên cứu bệnh gan Hoa Kỳ (AASLD) năm 2010.

- Nhóm II: bệnh nhân được chẩn đoán HCC và xác định giai đoạn B, C dựa theo phác đồ hướng dẫn chẩn đoán AASLD năm 2010.

- Nhóm III: bệnh nhân được chẩn đoán viêm gan siêu vi B mạn tính (nhưng không có HCC) dựa theo các tiêu chuẩn sau: HbsAg (+) kéo dài hơn 6 tháng; SGOT, SGPT tăng cao gấp 2 lần trị số bình thường; siêu âm gan không phát hiện sang thương bất thường.

- Nhóm IV: người không có yếu tố nguy cơ được xác định theo tiêu chuẩn: HbsAg (-) và AntiHCV (-); siêu âm gan không phát hiện sang thương bất thường; SGOT và SGPT trong giới hạn bình thường.

Các mẫu máu ngoại vi tham gia nghiên cứu được thu nhận tại Bệnh viện Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh.

Phương pháp tính cỡ mẫu

Cỡ mẫu được tính theo công thức: $n = Z^2_{1-\alpha/2}\frac{p(1-p)}{d^2}$

trong đó: n là cỡ mẫu; $Z_{(1-\alpha/2)}$ là giá trị phân bố chuẩn, được tính dựa trên mức ý nghĩa thống kê; p là tỷ lệ ước đoán; d là mức sai số tuyệt đối chấp nhận do nhà nghiên cứu chọn.

Với độ nhạy của DCP là 51,7% [8], cỡ mẫu n cho nhóm HCC được xác định khoảng 96 mẫu bằng các thông số: Z=1,96 (với sai lầm loại 1 là 5%); p=0,517; 1-p=0,483; d=0,1. Cỡ mẫu thực tế được chọn là 100 bệnh nhân. Chọn mẫu phân tầng cho nhóm HCC [9]: 50 mẫu huyết thanh của bệnh nhân HCC giai đoạn A, 50 mẫu huyết thanh của bệnh nhân HCC giai đoạn B và C.

Với độ đặc hiệu của DCP là 86,7% [8, 10], cỡ mẫu n

cho nhóm không HCC được xác định khoảng 45 mẫu bằng các thông số: Z=1,96 (với sai lầm loại 1 là 5%); p=0,867; 1-p=0,133; d=0,1. Cỡ mẫu thực tế được chọn là 100 bệnh nhân, do nhóm không HCC được phân tầng: 50 mẫu huyết thanh của bệnh nhân viêm gan siêu vi B mạn tính (không HCC), 50 mẫu huyết thanh người không có yếu tố nguy cơ.

Phương pháp thu nhận và bảo quản huyết thanh

Khoảng 2 ml máu toàn phần được cho vào ống thu máu không có chất chống đông (Tube traite, plain serum). Mẫu máu được để đông tự nhiên ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Sau đó ly tâm mẫu ở 1000xg trong 15 phút, 4°C và thu nhận huyết thanh. Huyết thanh được chia thành 3 phần bằng nhau và trữ ở -80°C cho đến khi tiến hành định lượng các chỉ dấu sinh học.

Phương pháp ELISA định lượng DCP

Nồng độ DCP trong mẫu huyết thanh được xác định bằng phương pháp ELISA sử dụng kit thương mại (#MBS700977; MyBioSource, San Diego, CA, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tóm tắt phương pháp như sau: chuẩn bị dãy pha loãng bậc 2 mẫu chuẩn trong sample diluent buffer, nồng độ mẫu chuẩn cao nhất là 20 ng/ml. Các mẫu huyết thanh được pha loãng 20 lần trong sample diluent buffer. Cho vào mỗi giếng của đĩa ELISA đã phủ sẵn kháng thể sơ cấp 100 µl mẫu chuẩn hoặc mẫu huyết thanh đã pha loãng. Ủ đĩa trong 30 phút ở 37°C. Rửa đĩa 3 lần bằng 200 µl wash buffer cho mỗi giếng trong mỗi lần rửa, loại bỏ dung dịch rửa giếng. Cho 100 µl/giếng HRP-conjugate 1X, ủ ở 37°C trong 30 phút. Rửa đĩa như trên 5 lần. Cho vào mỗi giếng 90 µl dung dịch cơ chất TMB. Ủ đĩa trong tối, ở 37°C trong 20 phút. Thêm 50 µl stop solution vào mỗi giếng để dừng phản ứng. Đo giá trị mật độ quang ở bước sóng 450 nm trên máy đọc ELISA 680-Bio-Rad.

Phương pháp ELISA định lượng AFP

Nồng độ AFP trong mẫu huyết thanh được xác định bằng phương pháp ELISA sử dụng kit thương mại (#KA0202; Abnova, Taipei, Taiwan) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tóm tắt phương pháp như sau: pha loãng các mẫu huyết thanh 20 lần trong Zero buffer. Cho 20 µl mẫu chuẩn ở các nồng độ khác nhau (0, 5, 20, 50, 150, 300 ng/ml) vào các giếng, thêm 100 µl Zero buffer. Ở các giếng thử nghiệm, cho 120 µl mẫu huyết thanh đã pha loãng vào các giếng. Ủ đĩa ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Loại bỏ dung dịch trong các giếng và rửa đĩa trong 2 phút bằng 300 µl nước vô trùng cho mỗi giếng/lần rửa. Lặp lại quá trình rửa đĩa như trên trong 5 lần. Bổ sung 150 µl enzyme conjugate reagent vào mỗi giếng. Ủ đĩa ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Rửa đĩa như trên 5 lần. Thêm 100 µl TMB Reagent vào mỗi giếng. Ủ đĩa trong tối ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Dừng phản ứng ở mỗi giếng bằng cách bổ sung 100 µl stop solution. Đo giá trị mật độ quang ở bước sóng 450 nm trên máy đọc ELISA 680-Bio-Rad.

Phương pháp phân tích thống kê

Giá trị trung vị nồng độ DCP và AFP của 4 nhóm mẫu huyết thanh được xác định và được xử lý thống kê Kruskal Wallis bằng phần mềm GraphPad prism. Hiệu quả chẩn đoán HCC của từng chỉ dấu DCP và AFP được xác định bằng đường cong ROC dựng bằng phần mềm GraphPad prism. Hiệu quả chẩn đoán HCC khi kết hợp 2 chỉ dấu DCP và AFP được phân tích bằng phương pháp hồi quy logistic sử dụng phần mềm SPSS kết hợp phân tích ROC bằng phần mềm GraphPad prism.

Giá trị chẩn đoán của mỗi chỉ dấu được xác định như sau:

Kết quả xét nghiệm	Có HCC (D+)	Không HCC (D-)	Tổng cộng
Dương tính (T+)	a (TP)	b (FP)	a+b (TP+FP)
Âm tính (T-)	c (FN)	d (TN)	c+d (FN+TN)
Tổng cộng	a+c (TP+FN)	b+d (FP+TN)	a+b+c+d=N

TP: true positive, dương tính thật; FP: false positive, dương tính giả; FN: false negative, âm tính giả; TN: true negative, âm tính thật.

Độ nhạy (sensitivity)=TP/(TP+FN)=a/(a+c) x100%

Độ đặc hiệu (specificity)=TN/(FP+TN)=d/(b+d)x100%

Tỷ lệ dương tính giả (false positive rate: FPR) =FP/(FP+TN)=b/(b+d)x100%

Tỷ lệ âm tính giả (false negative rate: FNR) =FN/(FN+TP)=a/(c+a)x100%

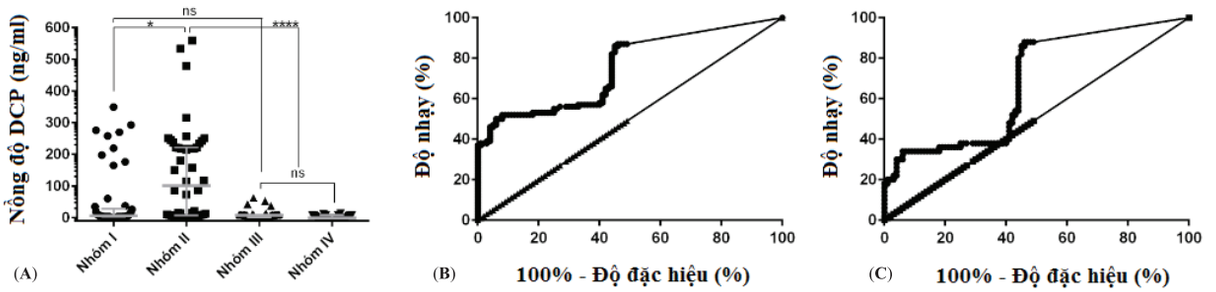
Giá trị tiên đoán dương (positive predictive value: PPV) =TP/(TP+FP)=a/(a+b)x100%

Giá trị tiên đoán âm (negative predictive value: NPV) =TN/(TN+FN)=d/(c+d)x100%.

Kết quả

Giá trị chẩn đoán HCC của DCP

Kết quả định lượng DCP trong 200 mẫu huyết thanh cho thấy, nhóm bệnh nhân HCC giai đoạn B, C có nồng độ DCP huyết thanh cao nhất trong 4 nhóm mẫu (với giá trị trung vị là 100,84 ng/ml), khác biệt có ý nghĩa thống kê. Trong khi đó, nồng độ DCP huyết thanh của nhóm bệnh nhân HCC giai đoạn A tương tự như nhóm bệnh nhân viêm gan không HCC (giá trị trung vị là 5,66 ng/ml so với 7,57 ng/ml), khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Nhóm không có yếu tố nguy cơ có nồng độ DCP thấp nhất trong 4 nhóm khảo sát (giá trị trung vị là 0,00 ng/ml). Tuy nhiên, xử lý thống kê cho thấy, nồng độ DCP huyết thanh của nhóm không có yếu tố nguy cơ không khác biệt so với nhóm bệnh nhân viêm gan. Như vậy, có thể thấy sử dụng chỉ dấu DCP cho phép phân biệt nhóm bệnh nhân HCC giai đoạn B, C với các nhóm còn lại. Ở nhóm bệnh nhân HCC giai đoạn A, nồng độ DCP huyết thanh có tăng cao ở một số trường hợp, nhưng về tổng thể vẫn khó phân biệt nhóm này với nhóm bệnh nhân viêm gan không HCC và nhóm không có yếu tố nguy cơ (hình 1A).



Hình 1. Giá trị chẩn đoán HCC của DCP. (**A**) Nồng độ DCP trong 4 nhóm mẫu huyết thanh khảo sát (n=50). Nhóm I: HCC giai đoạn A, nhóm II: HCC giai đoạn B-C, nhóm III: viêm gan không HCC, nhóm IV: không có yếu tố nguy cơ. Số liệu được xử lý thống kê Kruskal Wallis bằng phần mềm GraphPad prism; *: khác biệt có ý nghĩa thống kê p<0,05, ****: khác biệt có ý nghĩa thống kê p<0,0001, ns: khác biệt không có ý nghĩa. Vạch xám thể hiện trong hình là giá trị trung vị và khoảng tứ phân vị (interquartile range). (**B**) Phân tích đường cong ROC phép chẩn đoán HCC với chỉ dấu DCP cho 100 mẫu HCC. (**C**) Phân tích đường cong ROC phép chẩn đoán HCC với chỉ dấu DCP cho 50 mẫu HCC giai đoạn A.

Để xác định giá trị chẩn đoán HCC của chỉ dấu DCP huyết thanh, chúng tôi thực hiện hai phép phân tích đường cong ROC với 100 mẫu HCC/100 mẫu không HCC (hình 1B) và 50 mẫu HCC giai đoạn A/100 mẫu không HCC (hình 1C).

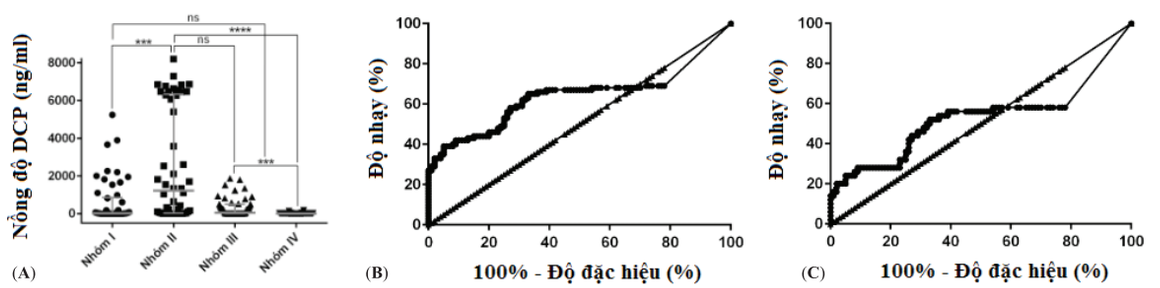
Các thông số thu được từ phân tích ROC với 100 mẫu HCC: diện tích dưới đường cong (area)=0,7531; độ tin cậy 95%; mức ý nghĩa p<0,0001; cut-off nồng độ DCP để phân biệt HCC và không HCC là 11,93 ng/ml; độ nhạy (sensitivity) chẩn đoán HCC là 50%; độ đặc hiệu (specificity) chẩn đoán HCC là 94%; tỷ lệ dương tính giả (FPR) là 6%; tỷ lệ âm tính giả (FNR) là 50%; giá trị tiên đoán dương (PPV) là 89,28%; giá trị tiên đoán âm (NPV) là 65,28% (hình 1B).

Các thông số thu được từ phân tích ROC với 50 mẫu HCC giai đoạn A: diện tích dưới đường cong (area)=0,6789; độ tin cậy 95%; mức ý nghĩa p=0,0004; cut-off nồng độ DCP để phân biệt HCC giai đoạn A và không HCC là 11,93 ng/ml; độ nhạy (sensitivity) chẩn đoán HCC giai đoạn A là 34%; độ đặc hiệu (specificity) chẩn đoán HCC giai đoạn A là 94%; tỷ lệ dương tính giả (FPR) là 6%; tỷ lệ âm tính giả (FNR) là 66%; giá trị tiên đoán dương (PPV) là 85%; giá trị tiên đoán âm (NPV) là 58,75% (hình 1C).

Kết quả trên cho thấy, phép chẩn đoán HCC dựa trên nồng độ DCP huyết thanh có độ chính xác (accuracy) trung bình với diện tích vùng dưới đường cong đạt 0,7531. Độ đặc hiệu của phép chẩn đoán cao - đạt 94% nhưng độ nhạy của phép chẩn đoán ở mức thấp - chỉ đạt tỷ lệ 50 và 34% tương ứng với HCC nói chung và HCC giai đoạn sớm (với nồng độ ngưỡng là 11,93 ng/ml).

Giá trị chẩn đoán HCC của AFP

Kết quả định lượng AFP cho thấy, nhóm bệnh nhân HCC giai đoạn B, C có nồng độ AFP huyết thanh cao nhất (với giá trị trung vị là 1218,80 ng/ml), tiếp theo là nhóm bệnh nhân viêm gan không HCC, nhóm bệnh nhân HCC giai đoạn A và thấp nhất là nhóm không yếu tố nguy cơ (với giá trị trung vị AFP lần lượt là 41,73; 18,70 và 2,22 ng/ml). Xử lý thống kê cho thấy, nồng độ AFP huyết thanh của nhóm bệnh nhân HCC giai đoạn B, C khác biệt có ý nghĩa so với nhóm HCC giai đoạn A và nhóm không có yếu tố nguy cơ. Tuy nhiên, sự tăng nồng độ AFP ở nhóm HCC giai đoạn B, C (nhóm II) không khác biệt có ý nghĩa so với nhóm viêm gan do nồng độ AFP trong các mẫu huyết thanh của nhóm II biến động rất lớn. Trong khi đó, nồng độ AFP huyết thanh của nhóm bệnh nhân HCC giai đoạn A khác biệt không có ý nghĩa so với nhóm viêm gan và nhóm không có yếu tố nguy cơ. Kết quả này cho thấy, AFP không có hiệu quả trong chẩn đoán HCC giai đoạn A. Chỉ dấu này có thể sử dụng để chẩn đoán HCC giai đoạn B, C, nhưng sẽ có khả năng nhầm lẫn với các trường hợp viêm gan không có HCC (hình 2A).



Hình 2. Giá trị chẩn đoán HCC của AFP. (**A**) Nồng độ AFP trong 4 nhóm mẫu huyết thanh khảo sát (n=50). Nhóm I: HCC giai đoạn A, nhóm II: HCC giai đoạn B-C, nhóm III: viêm gan không HCC, nhóm IV: không có yếu tố nguy cơ. Số liệu được xử lý thống kê Kruskal Wallis bằng phần mềm GraphPad prism; ***: khác biệt có ý nghĩa thống kê p<0,001, ****: khác biệt có ý nghĩa thống kê p<0,0001, ns: khác biệt không có ý nghĩa. Vạch xám thể hiện trong hình là giá trị trung vị và khoảng tứ phân vị (interquartile range). (**B**) Phân tích đường cong ROC phép chẩn đoán HCC với chỉ dấu AFP cho 100 mẫu HCC. (**C**) Phân tích đường cong ROC phép chẩn đoán HCC với chỉ dấu AFP cho 50 mẫu HCC giai đoạn A.

Tiếp theo, chúng tôi kiểm tra giá trị chẩn đoán HCC của AFP bằng hai phép phân tích đường cong ROC được thực hiện với 100 mẫu HCC/100 mẫu không HCC (hình 2B) và 50 mẫu HCC giai đoạn A/100 mẫu không HCC (hình 2C).

Các thông số thu được từ phân tích ROC với 100 mẫu HCC: diện tích dưới đường cong (area)=0,6429; độ tin cậy 95%; mức ý nghĩa p=0,0005; cut-off nồng độ AFP để phân biệt HCC và không HCC là 952,1 ng/ml; độ nhạy (sensitivity) chẩn đoán HCC là 39%; độ đặc hiệu (specificity) chẩn đoán HCC là 95%; tỷ lệ dương tính giả (FPR) là 5%; tỷ lệ âm tính giả (FNR) là 61%; giá trị tiên đoán dương (PPV) là 88,64%; giá trị tiên đoán âm (NPV) là 60,9% (hình 2B).

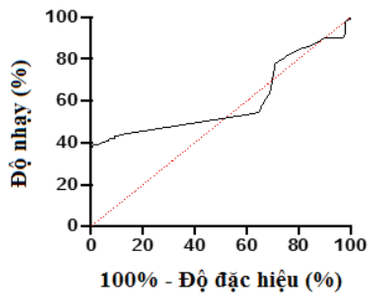
Các thông số thu được từ phân tích ROC với 50 mẫu HCC giai đoạn A: diện tích dưới đường cong (area)=0,5308; độ tin cậy 95%; mức ý nghĩa p=0,5392; cut-off nồng độ AFP để phân biệt HCC giai đoạn A và không HCC là 952,1 ng/ml; độ nhạy (sensitivity) chẩn đoán HCC giai đoạn A là 24%; độ đặc hiệu (specificity) chẩn đoán HCC giai đoạn A là 95%; tỷ lệ dương tính giả (FPR) là 5%; tỷ lệ âm tính giả (FNR) là 76%; giá trị tiên đoán dương (PPV) là 82,76%; giá trị tiên đoán âm (NPV) là 55,55% (hình 2C).

Kết quả trên cho thấy, phép chẩn đoán HCC dựa trên nồng độ AFP có độ chính xác (accuracy) thấp, với diện tích vùng dưới đường cong chỉ đạt 0,6429. Độ đặc hiệu của phép chẩn đoán cao - đạt 95%, nhưng độ nhạy của phép chẩn đoán ở mức thấp - chỉ đạt tỷ lệ 39% với giá trị ngưỡng xác định trong nghiên cứu này là 952,1 ng/ml. Đáng lưu ý là AFP không có giá trị chẩn đoán HCC giai đoạn A khi diện tích dưới đường cong chỉ đạt 0,5308 và khác biệt không có ý nghĩa thống kê với p=0,5392 (>0,05). Cũng như các nghiên cứu trước đây [2, 3], kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy AFP không phải là một chỉ dấu đáng tin cậy trong chẩn đoán HCC.

Hiệu quả chẩn đoán HCC khi sử dụng phối hợp 2 chỉ dấu DCP và AFP

Tiếp theo, chúng tôi phân tích hiệu quả chẩn đoán HCC khi sử dụng phối hợp 2 chỉ dấu sinh học DCP và AFP. Mối quan hệ giữa 2 chỉ dấu trong chẩn đoán HCC được phân tích bằng phương pháp hồi quy logistic đa biến sử dụng phần mềm SPSS. Phân tích đường cong ROC giá trị hồi quy logistic (predicted probability) cho kết quả: diện tích dưới đường cong (area)=0,6000; độ tin cậy 95%; mức ý nghĩa p=0,0146; cut-off giá trị hồi quy logistic 2 chỉ dấu DCP và AFP phân biệt HCC và không HCC là 0,705; độ nhạy (sensitivity) chẩn đoán HCC là 42%; độ đặc hiệu (specificity) chẩn đoán HCC là 93%; tỷ lệ dương tính giả (FPR) là 7%; tỷ lệ âm tính giả (FNR) là 58%; giá trị tiên đoán dương (PPV) là 85,71%; giá trị tiên đoán âm (NPV) là 61,59% (hình 3).

Như vậy, trong phạm vi 200 mẫu huyết thanh đã phân tích, kết hợp DCP với AFP không giúp tăng độ nhạy phát hiện HCC so với khi chỉ sử dụng một chỉ dấu DCP. Độ chính xác (accuracy) của phép chẩn đoán kết hợp 2 chỉ dấu ở mức thấp, với giá trị diện tích vùng dưới đường cong chỉ đạt 0,6000, thấp hơn giá trị diện tích vùng dưới đường cong khi phân tích đơn yếu tố DCP hoặc AFP.



Hình 3. Giá trị chẩn đoán HCC khi kết hợp DCP và AFP. Phân tích đường cong ROC phép chẩn đoán HCC với giá trị hồi quy logistic 2 chỉ dấu DCP và AFP cho 100 mẫu HCC.

Thảo luận

Theo các nghiên cứu trước đây trên thế giới, DCP là chỉ dấu huyết thanh được đánh giá cao trong chẩn đoán HCC. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, DCP có độ nhạy chẩn đoán HCC nói chung và HCC giai đoạn sớm lần lượt là 50 và 34% với độ đặc hiệu 94% ở giá trị ngưỡng 11,93 ng/ml. Nghiên cứu của Lok và cs (2010) [4] ở bệnh nhân người Mỹ đã xác định độ nhạy và độ đặc hiệu của chỉ dấu DCP trong chẩn đoán HCC là 74 và 86%. Một nghiên cứu khác cũng thực hiện ở Mỹ của Marrero và cs (2003) [10] xác định độ nhạy và đặc hiệu chẩn đoán HCC của DCP là và 89 và 95%. Beale và cs (2008) [5] báo cáo DCP có độ nhạy và độ đặc hiệu chẩn đoán HCC là 80% ở đối tượng nghiên cứu là người Anh. Trong khi đó, một nghiên cứu thực hiện tại Đức của Ertle và cs (2013) [11] đã xác định độ nhạy chẩn đoán HCC của DCP là 63,4%. Nghiên cứu hiệu quả chẩn đoán HCC của chỉ dấu DCP cũng đã được thực hiện nhiều ở các nước châu Á. Tại Nhật Bản, Takikawa và cs (1992) [12] xác định độ nhạy và độ đặc hiệu chẩn đoán HCC của DCP là 52,8 và 98,8%. Tại Hàn Quốc, nghiên cứu của Yoon và cs (2009) [13] cho thấy độ nhạy chẩn đoán HCC của DCP là 51,9% và độ đặc hiệu là 97% ở nhóm bệnh nhân HBV mạn mắc HCC và không mắc HCC. Một nghiên cứu khác thực hiện trên 401 bệnh nhân HCC và xơ gan tại Hàn Quốc [14] cho kết quả DCP có độ nhạy và độ đặc hiệu chẩn đoán HCC là 51,0 và 91,2%. Tại Trung Quốc, Cui và cs (2002) [8] công bố độ nhạy chẩn đoán HCC của chỉ dấu DCP là 51,7% với độ đặc hiệu là 86,7%. Như vậy, kết quả độ nhạy chẩn đoán HCC của dấu ấn DCP trong nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn so với các nghiên cứu trước đây thực hiện ở Mỹ và châu Âu nhưng tương đương kết quả một số nghiên cứu thực hiện ở Trung Quốc, Nhật Bản và Hàn Quốc [8, 12-14].

Thêm vào đó, trong khuôn khổ nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy kết hợp 2 chỉ dấu DCP và AFP không giúp

tăng độ nhạy của phép chẩn đoán HCC so với khi chỉ sử dụng chỉ dấu DCP. Một số nghiên cứu trước đây thực hiện ở châu Âu [11], Trung Quốc [15] hay Hàn Quốc [13] cho thấy rằng, kết hợp AFP và DCP đã giúp tăng độ nhạy chẩn đoán HCC so với khi chỉ sử dụng chỉ dấu DCP. Chúng tôi chưa có dữ liệu để giải thích nguyên nhân của khác biệt nêu trên giữa kết quả nghiên cứu của chúng tôi với các công bố trước đây trên thế giới. Điều này cho thấy, cần phải thực hiện các nghiên cứu cẩn thận ở Việt Nam với cỡ mẫu lớn và đa dạng hơn để có cơ sở dữ liệu vững chắc khi áp dụng các chỉ dấu sinh học vào thực tế lâm sàng chẩn đoán bệnh.

So sánh với chỉ dấu đang được sử dụng hiện nay để chẩn đoán HCC là AFP, DCP có độ nhạy chẩn đoán là 50% - tốt hơn độ nhạy của AFP là 39%, độ đặc hiệu của 2 chỉ dấu đều đạt 94-95%. Ở đây, chúng tôi sử dụng giá trị ngưỡng AFP được xác định trong nghiên cứu này là 952,1 ng/ml mà không sử dụng giá trị ngưỡng được công nhận phổ biến trong lâm sàng là 400 ng/ml để có thể so sánh AFP với DCP trong cùng điều kiện. Nếu chọn giá trị ngưỡng AFP là 400 ng/ml để xác định HCC trong nghiên cứu này thì độ nhạy phép chẩn đoán đạt 44% nhưng độ đặc hiệu chỉ đạt 87%. Với cùng độ đặc hiệu chẩn đoán là 87-88%, độ nhạy chẩn đoán HCC của chỉ dấu DCP trong nghiên cứu này được xác định là 52%, vẫn cao hơn so với độ nhạy của chỉ dấu AFP ở cùng điều kiện khảo sát. Với HCC giai đoạn sớm (giai đoạn A), sử dụng chỉ dấu sinh học DCP có thể phát hiện được bệnh với độ nhạy 34%, trong khi chỉ dấu AFP không có ý nghĩa chẩn đoán HCC giai đoạn sớm. Như vậy, nghiên cứu của chúng tôi góp phần khẳng định DCP là chỉ dấu sinh học chẩn đoán HCC tốt hơn AFP [4, 8, 10, 16].

Kết luận và khuyến nghị

DCP có thể là chỉ dấu huyết thanh tiềm năng ứng dụng trong chẩn đoán và sàng lọc HCC ở bệnh nhân Việt Nam. Chỉ dấu huyết thanh DCP có thể được sử dụng thay cho chỉ dấu AFP trong chẩn đoán HCC, giúp tăng độ nhạy chẩn đoán bệnh mà không cần kết hợp với chỉ dấu AFP.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] J.D. Yang, P. Hainaut, G.J. Gores, A. Amadou, A. Plymoth, L.R. Roberts (2019), "A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management", *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **16(10)**, pp.589-604.

[2] G. Malaguarnera, M. Giordano, I. Paladina, M. Berretta, A. Cappellani, M. Malaguarnera (2010), "Serum markers of hepatocellular carcinoma", *Dig. Dis. Sci.*, **55**, pp.2744-2755.

[3] H. Liu, P. Li, Y. Zhai, C.F. Qu, L. Zhang, Y.F. Tan, N. Li, H.G. Ding (2010), "Diagnostic value of glypican-3 in serum and liver for primary hepatocellular carcinoma", *World J. Gastroenterol*., **16(35)**, pp.4410-4415.

[4] A.S. Lok, R.K. Sterling, J.E. Everhart, E.C. Wright, J.C. Hoefs, A.M. Di Bisceglie, T.R. Morgan, H.Y. Kim, W.M. Lee, H.L. Bonkovsky, J.L. Dienstag, HALT-C Trial Group (2010), "Des-gamma-carboxy prothrombin and alpha fetoprotein as markers for the early detection of hepatocellular carcinoma", *Gastroenterology*, **138(2)**, pp.493-502.

[5] G. Beale, D. Chattopadhyay, J. Gray, S. Stewart, M. Hudson, C. Day, P. Trerotoli, G. Giannelli, D. Manas, H. Reeves (2008), "AFP, PIVKAII, GP3, SCCA-1 and follisatin as surveillance markers for hepatocellular cancer in non-alcoholic and alcoholic fatty liver disease", *BMC Cancer*, **8**, DOI: /10.1186/1471-2407-8-200.

[6] L. Zhou, J. Liu, F. Luo (2006), "Serum tumor markers for detection of hepatocellular carcinoma", *World J. Gastroenterol.*, **12(8)**, pp.1175-1181.

[7] M. Omata, L.A. Lesmana, R. Tateishi, P.J. Chen, S.M. Lin, H. Yoshida, M. Kudo, J.M. Lee, B.I. Choi, R.T.P. Poon, S. Shiina, A.L. Cheng, J.D. Jia, S. Obi, K.H. Han, W. Jafri, P. Chow, S.G. Lim, Y.K. Chawla, U. Budihusodo, R.A. Gani, C.R. Lesmana, T.A. Putranto, Y.F. Liaw, S.K. Sarin (2010), "Asian pacific association for the study of the liver consensus recommendations on hepatocellular carcinoma", *Hepatol. Int.*, **4**, pp.439-474.

[8] R. Cui, B. Wang, H. Ding, H. Shen, Y. Li, X. Chen (2002), "Usefulness of determining a protein induced by vitamin K absence in detection of hepatocellular carcinoma", *Chin. Med. J. (Engl.)*, **115(1)**, pp.42-45.

[9] G. Torzilli, M. Donadon, M. Marconi, A. Palmisano, D. Del Fabbro, A. Spinelli, F. Botea, M. Montorsi (2008), "Hepatectomy for stage B and stage C hepatocellular carcinoma in the barcelona clinic liver cancer classification: results of a prospective analysis", *Arch. Surg.*, **143(11)**, pp.1082-1090.

[10] J.A. Marrero, G.L. Su, W. Wei, D. Emick, H.S. Conjeevaram, R.J. Fontana, A.S. Lok (2003), "Des-gamma carboxyprothrombin can differentiate hepatocellular carcinoma from nonmalignant chronic liver disease in American patients", *Hepatology*, **37(5)**, pp.1114-1121.

[11] J.M. Ertle, D. Heider, M. Wichert, B. Keller, R. Kueper, P. Hilgard, G. Gerken, J.F. Schlaak (2013), "A combination of α-Fetoprotein and Des-γ-carboxy prothrombin is superior in detection of hepatocellular carcinoma", *Digestion*, **87**, pp.121-131.

[12] Y. Takikawa, K. Suzuki, K. Yamazaki, T. Goto, T. Madarame, Y. Miura, T. Yoshida, T. Kashiwabara, S. Sato (1992), "Plasma abnormal prothrombin (PIVKA-II): a new and reliable marker for the detection of hepatocellular carcinoma", *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **7(1)**, pp.1-6.

[13] Y.J. Yoon, K.H. Han, D.Y. Kim (2009), "Role of serum prothrombin induced by vitamin K absence or antagonist-II in the early detection of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection", *Scand. J. Gastroenterol.*, **44(7)**, pp.861-866.

[14] E.S. Jang, S.H. Jeong, J.W. Kim, Y.S. Choi, P. Leissner, C. Brechot (2016), "Diagnostic performance of alpha-fetoprotein, protein induced by vitamin K absence, osteopontin, dickkopf-1 and its combinations for hepatocellular carcinoma", *PLOS ONE*, **11(3)**, DOI: 10.1371/journal.pone.0151069.

[15] P. Song, X. Feng, Y. Inagaki, T. Song, K. Zhang, Z. Wang, S. Zheng, K. Ma, Q. Li, D. Kong, Q. Wu, T. Zhang, X. Zhao, K. Hasegawa, Y. Sugawara, N. Kokudo, W. Tang, Japan-China Joint Team for Medical Research and Cooperation on HCC (2014), "Clinical utility of simultaneous measurement of alpha-fetoprotein and des-γ-carboxy prothrombin for diagnosis of patients with hepatocellular carcinoma in China: a multi-center case-controlled study of 1,153 subjects", *Biosci. Trends*, **8(5)**, pp.266-273.

[16] C.S. Wang, C.L. Lin, H.C. Lee, K.Y. Chen, M.F. Chiang, H.S. Chen, T.J. Lin, L.Y. Liao (2005), "Usefulness of serum des-γ-carboxy prothrombin in detection of hepatocellular carcinoma", *World J. Gastroenterol.*, **11(39)**, pp.6115-6119.

DOI: 10.31276/VJST.63(9).39-43

Vận chuyển thuốc qua da bằng kỹ thuật điện di ion: ưu, nhược điểm và phát hiện mới từ những nghiên cứu

Nguyễn Thị Hồng Đức, Võ Quốc Ánh*

Trường Đại học Dược Hà Nội

Ngày nhận bài 17/5/2021; ngày chuyển phản biện 20/5/2021; ngày nhận phản biện 21/6/2021; ngày chấp nhận đăng 29/6/2021

Tóm tắt:

Kỹ thuật điện di ion đã được ứng dụng trong vật lý trị liệu và phục hồi chức năng từ nhiều thập kỷ trước. Tuy nhiên, ứng dụng của nó trong các lĩnh vực điều trị khác còn rất hạn chế vì một số lý do như: thiết bị phức tạp, kém an toàn và thiếu bằng chứng khoa học đầy đủ. Trong hơn một thập kỷ gần đây, kỹ thuật này đã có những cải tiến vượt bậc về thiết kế và tính an toàn của thiết bị. Quan trọng hơn, những nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật này trong việc tăng hấp thu thuốc qua da đã đạt được nhiều kết quả khả quan, cũng như đã chứng minh được tiềm năng trong việc bào chế thuốc hấp thu qua da có chứa các phân tử lớn và các tiểu phân nano. Trong bài báo này, nhóm tác giả trình bày tổng quan các ưu, nhược điểm của kỹ thuật điện di ion, những cải tiến thiết bị quan trọng và những phát hiện mới về ứng dụng của kỹ thuật này trong tăng cường vận chuyển thuốc qua da.

***Từ khóa*: điện di ion, đưa thuốc không xâm lấn, tăng vận chuyển thuốc qua da, vận chuyển protein/peptide, vận chuyển thuốc chủ động.**

***Chỉ số phân loại:* 3.5**

Đặt vấn đề

Kỹ thuật đưa thuốc qua da bằng điện di ion tương đối phổ biến trong vật lý trị liệu nhưng còn hạn chế trong việc áp dụng cho các thuốc điều trị khác do một số lý do như thiết bị phức tạp, kém an toàn, không phù hợp cho tự điều trị cũng như chưa có các nghiên cứu tiền lâm sàng và lâm sàng đầy đủ. Tuy nhiên, trong hơn một thập kỷ gần đây, những nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật này đã đạt được nhiều kết quả rất khả quan trên cả tiền lâm sàng và lâm sàng. Kỹ thuật này đã chứng tỏ được tiềm năng trong việc vận chuyển nhiều loại dược chất không thể thấm qua da bằng cơ chế khuếch tán thụ động. Phương pháp này cho hiệu quả tốt ngay cả với các thuốc có phân tử lượng lớn như các peptide, protein và cả các tiểu phân nano mang thuốc. Thiết bị điện di cũng có những cải tiến đáng kể theo hướng nhỏ gọn, dễ sử dụng và an toàn trong khi vẫn phát huy tốt khả năng đưa thuốc. Sự ra đời của các thiết bị hiện đại đã mở đường và thúc đẩy các nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật này trong điều trị nhiều bệnh khác. Những phát hiện mới về tiềm năng của kỹ thuật điện di ion đã thu hút sự quan tâm của cả giới khoa học và các doanh nghiệp dược.

Phương pháp thu thập tài liệu

Tất cả các tài liệu được dùng để viết bài tổng quan này đều có ngôn ngữ tiếng Anh. Các bài nghiên cứu được tìm kiếm trên cơ sở dữ liệu điện tử Pubmed, ScienceDirect và Google Scholar đến tháng 2/2021 với các từ khóa "iontophoresis", "transdermal", "absorption across skin", "bioavailability enhancement", "absorption enhancement" và "transdermal enhancement". Các bài nghiên cứu được xem xét chi tiết nội dung để kiểm tra tính phù hợp với lĩnh vực tổng quan. Nếu có nhiều nghiên cứu gần giống nhau thì nghiên cứu đầy đủ, tiêu biểu nhất được lựa chọn.

Cơ chế vận chuyển thuốc bằng điện di ion

Điện di ion là kỹ thuật đưa thuốc chủ động qua da và niêm mạc, trong đó các phân tử dược chất được vận chuyển qua hàng rào hấp thu đồng thời bằng 3 cơ chế: dẫn điện (electric mobility), thẩm thấu điện (electroosmosis) và khuếch tán thụ động (permeability). Cơ chế dẫn điện xảy ra khi áp lên da một hiệu điện thế sẽ tạo ra điện trường phân bố ngay dưới các điện cực đẩy các điện tích cùng dấu là các phân tử thuốc dạng ion hoặc các tiểu phân tích điện mang thuốc hướng vào trong da. Cơ chế thứ 2 xảy ra do sự thẩm thấu điện tạo ra các dòng chất lỏng di chuyển trong các vi mao quản. Do thành mao quản trong lớp sừng có điện tích âm và lớp dung dịch sát thành mao quản tích điện dương, dòng chất lỏng sẽ chuyển dịch từ cực dương hướng vào trong da kéo theo các chất đã được hòa tan hoặc phân tán trong nó ngay cả khi không được tích điện. Cơ chế thứ 3 là điện di ion làm tăng sự hydrate hóa của lớp sừng, nhờ đó làm tăng sự khuếch tán thụ động của phân tử dược chất, đặc biệt là đối với các chất ít thân dầu [1]. Như vậy, kỹ thuật điện di ion tăng vận chuyển thuốc qua da không chỉ các phân tử thuốc ion hóa mà cả các thuốc không ion hóa, đặc biệt là các hoạt chất ít thân dầu.

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

Enhancement of drug delivery across the skin barrier using iontophoresis technique: pros, cons, and novel findings from representative studies

Thi Hong Duc Nguyen, Quoc Anh Vo*

Hanoi University of Pharmacy

Received 17 May 2021; accepted 29 June 2021

Abstract:

Iontophoresis has been utilised to deliver medications in physical therapy for a long time, but its applications in treating diseases are still limited. This stemmed partly from its complicated and unsafe instrumentation as well as insufficient scientific evidence. Over the past decade, however, the design and safety aspects of iontophoresis devices have been dramatically improved. More importantly, various optimistic results were revealed from many scientific studies, especially its potential to actively transport large molecules and nanoparticles across the skin barrier that attracts great attention from both academia and industry. This paper aimed to review the advantages and disadvantages of the technique and representative transdermal enhancement studies using iontophoresis.

Keywords: **active transportation of drugs, iontophoresis, noninvasive drug delivery, transdermal enhancement, transportation of proteins/peptides.**

Classification number: **3.5**

Sự phát triển của thiết bị điện di ion

Kỹ thuật điện di ion liên quan đến việc tạo ra một điện trường để điều khiển dòng chuyển động của các phân tử thuốc. Thiết bị điện di ion truyền thống gồm có nguồn điện nối với hai điện cực dạng bản mỏng và các tấm cotton được thấm ẩm bằng dung dịch thuốc hoặc dung dịch đệm, trong đó nguồn điện thường được biến đổi từ nguồn điện sinh hoạt (hình 1A). Thiết bị loại này có ưu điểm là tạo ra được vùng tiếp xúc rộng, tuy nhiên thiết bị cồng kềnh, không tiện lợi và ít an toàn do sử dụng dòng điện tương đối lớn. Thiết bị này phải được sử dụng dưới sự giám sát của người có chuyên môn. Chúng thường được dùng tại các cơ sở vật lý trị liệu, các cơ sở y tế, nơi có đầy đủ các phương tiện cấp cứu y tế, và không an toàn cho việc bệnh nhân tự dùng tại nhà.

Các tấm điện cực có thể được làm từ kim loại trơ, không tham gia vào các phản ứng điện cực. Tuy nhiên, hiện tượng điện phân nước tại các điện cực xảy ra làm thay đổi pH tại nơi tiếp xúc da và có thể gây rát hoặc bỏng da. Phương trình điện phân tại các điện cực xảy ra như sau:

Phản ứng tại cathot (khử): $2H_2O + 2e^- \rightarrow H_2 + 2OH^-$

Phản ứng tại anot (oxy hóa): $2H_2O \rightarrow O_2 + 4H^+ + 4e^-$

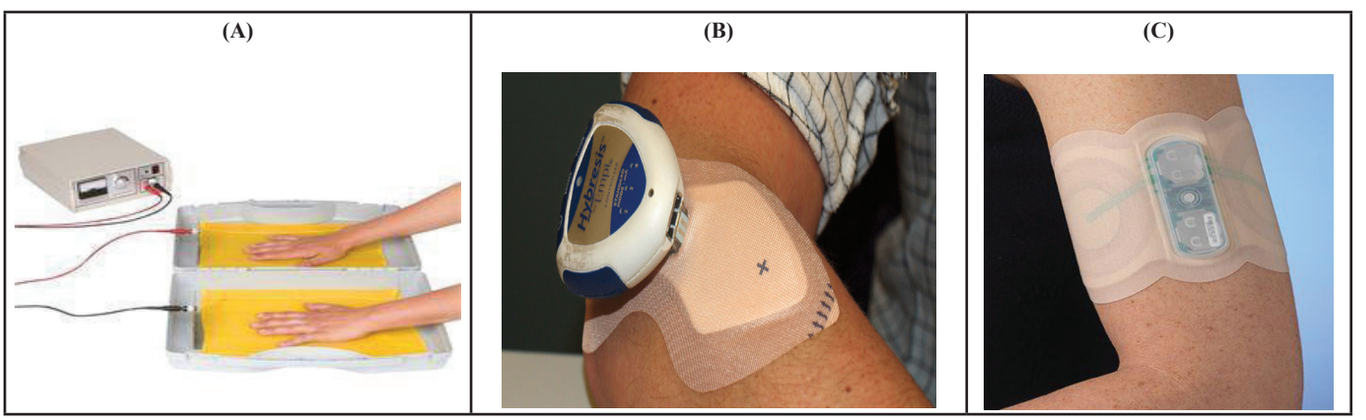
Điện cực AgCl/Ag được sử dụng rộng rãi nhằm khắc phục nhược điểm này của điện di ion. Trong đó, electron được giải phóng tạo ra dòng điện, trong khi AgCl không tan được tạo ra và kết tủa trên bề mặt của anot. Các phản ứng điện cực xảy ra như sau:

Phản ứng tại anot (oxy hóa): $Ag + Cl^- \rightarrow AgCl + e^-$

Phản ứng tại cathot (khử): $AgCl + e^- \rightarrow Ag + Cl^-$

Như vậy, có thể thấy rằng, khi dùng cặp điện cực AgCl/Ag phản ứng tại điện cực xảy ra không ảnh hưởng đến pH của môi trường bao quanh điện cực, và do đó tránh được các tác hại có thể xảy ra tại vùng da điều trị khi dùng điện di ion.

Để tăng tính tiện lợi và khả năng tự điều trị của người bệnh, thiết bị điện di ion được thiết kế nhỏ gọn hơn, an toàn hơn do sử dụng nguồn điện nhỏ, không có khả năng gây hại cho cơ thể (thường có thể dùng pin cúc áo). Trong trường hợp này, thuốc được bào chế dưới dạng bán rắn (gel hoặc cream), sau đó được đưa vào miếng dán có lắp sẵn điện cực và nguồn điện một chiều có hiệu điện thế thấp. Nguồn điện có thể được tích hợp sẵn trong thiết bị hoặc thay thế được dưới dạng các viên pin nhỏ (hình 1B, C).



Hình 1. Các thiết bị điện di ion được áp dụng trong thực tế điều trị. (A) Bộ điện di ion đơn giản; **(B)** Bộ điện di ion Hybresis đa năng có thể dùng với nhiều loại thuốc; **(C)** Bộ điện di ion Zecuity chứa sumatriptan dùng điều trị đau nửa đầu.

Ưu, nhược điểm của kỹ thuật điện di ion

Kỹ thuật điện di ion ứng dụng trong vận chuyển thuốc qua da kế thừa tất cả các ưu điểm của dạng thuốc ngoài da. Đây là kỹ thuật đưa thuốc không xâm lấn, không gây đau, tránh được nguy cơ lây nhiễm, tăng sự tuân thủ phác đồ điều trị của người bệnh và giảm tải cho dịch vụ chăm sóc y tế. Thêm vào đó, so với đường uống, nó giúp tránh được các điều kiện khắc nghiệt của môi trường trong đường tiêu hóa, tránh thuốc bị phân hủy qua gan lần đầu, có thể tập trung thuốc với nồng độ cao khi điều trị các triệu chứng và bệnh tại chỗ.

Kỹ thuật điện di ion còn cải thiện được các nhược điểm cố hữu của thuốc ngoài da, đó là khắc phục được thời gian tiềm tàng trước khi thuốc phát huy tác dụng, ước tính được liều lượng đưa thuốc vào cơ thể, giảm sự biến động cá thể. Thuốc có thể phát huy tác dụng ngay sau khi áp điện thế và việc đưa thuốc được dừng lại ngay khi ngắt kết nối với nguồn điện. Ngoài ra, kỹ thuật này có thể ứng dụng cho các dược chất thân nước, dược chất có phân tử lượng lớn hoặc thuốc dạng siêu vi tiểu phân. Bình thường, khi được bào chế dưới các dạng thuốc ngoài da truyền thống, những dược chất và dạng bào chế này không thể thấm được trực tiếp qua da bằng cơ chế khuếch tán thụ động.

Ngoài chức năng đưa thuốc, kỹ thuật điện di ion còn được ứng dụng trong chẩn đoán, theo dõi nồng độ các chất điều trị mà không cần dùng đến các biện pháp cơ học để lấy mẫu sâu bên trong mô. Ưu điểm của kỹ thuật điện di ngược là không làm phá vỡ cấu trúc sinh lý da và niêm mạc nên không gây đau, tránh được nhiễm khuẩn, vi rút và các bệnh lây qua đường máu. Trên thực tế lâm sàng, điện di ion đã được ứng dụng để theo dõi nồng độ glucose trong máu và chẩn đoán cystic fibrosis.

Bên cạnh những ưu điểm nổi bật nêu trên, kỹ thuật điện di ion cũng có những nhược điểm không dễ khắc phục. Khác với các thuốc bôi ngoài da truyền thống, kỹ thuật này phải sử dụng các thiết bị chuyên dụng. Vì lý do an toàn, sự điện di ion bị giới hạn về thời gian áp điện thế và cường độ dòng điện. Nếu dùng dòng điện mạnh trong thời gian dài sẽ gây rát, bỏng hoặc kích ứng tại ví trí tiếp xúc với điện cực. Cũng vì các giới hạn này, điện di ion có thể không phù hợp với các thuốc có liều điều trị lớn. Tuy có khả năng vận chuyển các thuốc có trọng lượng phân tử lớn, protein và các siêu vi tiểu phân qua da nhưng trong thực tế tốc độ của quá trình này thường rất chậm, lượng thuốc thấm vào không đủ để gây tác dụng điều trị. Do đó, với những đối tượng này, điện di ion thường được kết hợp với các kỹ thuật khác tác động có kiểm soát vào tính toàn vẹn của lớp biểu bì bảo vệ để tăng cường khả năng vận chuyển thuốc bằng cơ chế vận chuyển điện và thẩm thấu điện.

Các nghiên cứu đại diện ứng dụng điện di ion trong vận chuyển thuốc qua da

Ứng dụng kỹ thuật điện di ion trong nghiên cứu tiền lâm sàng và lâm sàng

Kỹ thuật điện di ion đã được ứng dụng thành công trong điều trị các triệu chứng và bệnh tại chỗ, phổ biến là trong vật lý trị liệu và các bệnh da liễu [2]. Những thành công trên lâm sàng của kỹ thuật điện di ion đã thúc đẩy việc nghiên cứu các ứng dụng mới. Số lượng nghiên cứu được công bố tăng 35 lần trong 20 năm qua (từ 40 đến hơn 1400 bản), trung bình có khoảng 70 bài báo được xuất bản mỗi năm [2]. Hoa Kỳ là nước đi đầu về số lượng các nghiên cứu tiền lâm sàng và lâm sàng liên quan đến các ứng dụng của điện di ion trong chẩn đoán và điều trị chứng đau nửa đầu, bệnh thoái hóa thần kinh, ung thư, tim mạch hay nghiên cứu vắc xin [2]. Một số nghiên cứu lâm sàng và tiền lâm sàng tiêu biểu ứng dụng kỹ thuật điện di ion trong điều trị nhiều loại bệnh đã được tóm tắt trong bảng 1.

Bảng 1. Một số nghiên cứu tiền lâm sàng và lâm sàng ứng dụng kỹ thuật điện di ion.

Ứng dụng	Tên hoạt chất	Điều kiện điện di	Đưa thuốc qua mô	Tóm tắt kết quả
Điều trị triệu chứng đau nửa đầu	Sumatriptan	0,5 hoặc 1 mA/cm^2	Da người	Tác dụng kéo dài gấp 4 lần so với 6 mg đường tiêm và gấp 2 lần so với 50 mg đường uống [3].
Thoái hóa thần kinh	Tacrine	0,4 mA/cm^2; 3 giờ	Da người	Nồng độ thuốc trong huyết tương tăng 1,4 lần [4]
Giảm các tổn thương trong ung thư da	Cisplatin	0,5 hoặc 1 mA/cm^2	Da người	50-100% không xuất hiện các tổn thương do ung thư da [5].
Nhiễm vi rút	Acyclovir	0,5 mA/cm^2	Da bụng người	Giảm 14 lần thời gian để đạt được nồng độ điều trị [6].
Giảm đau/viêm cơ xương	Dexamethasone	24 giờ	Da người	Giảm đáng kể 34-40% viêm, đau khuỷu tay. Sức bền và khả năng quay trở lại làm việc tốt hơn sau 6 tháng [7].
Bệnh tim mạch	Metoprolol	0,5 hoặc 0,08 mA/cm^2	Da thỏ	Giảm 30% huyết áp động mạch chủ [8].
Hormone tuyến cận giáp	Parathyroid	0,1 mA/cm^2	Da chuột	Đạt hiệu quả tương đương với tiêm 5 µg/kg/ngày [9].
Nấm móng	Terbinafine	0,5 mA/cm^2	Móng tay người	Thấm qua móng tăng gấp 6 lần so với khuếch tán thụ động [10].
Tiểu đường	Tiểu phân nano chứa Insulin	0,2 mA/cm^2; 3 giờ	Chuột	Đường huyết giảm 33,3 và 28,3% so với mức ban đầu ở 4 và 6 giờ [11].

Ứng dụng điện di ion trong vận chuyển chủ động các thuốc có phân tử lượng nhỏ

Trái với việc hấp thu qua da bằng cơ chế khuếch tán thụ động, kỹ thuật dẫn thuốc chủ động bằng điện di ion có thể phát huy tác dụng tốt với các dược chất thân nước. Kết quả của nhiều nghiên cứu cho thấy kỹ thuật điện di ion đạt hiệu quả dẫn thuốc tốt với các dược chất có phân tử lượng thấp, có khả năng ion hóa và tan tốt trong nước. Một số dược chất tiêu biểu đã được chứng minh tăng khả năng thấm qua da lên nhiều lần bằng kỹ thuật điện di ion được trình bày trong bảng 2. Các dược chất phổ biến được nghiên cứu thuộc nhóm thuốc gây tê tại chỗ, NSAID, kháng sinh, các steroid, thuốc điều trị đau nửa đầu, thuốc an thần giảm đau và thuốc chống ung thư da. Kỹ thuật điện di ion có thể ứng dụng để đưa thuốc có tác dụng tại chỗ hoặc phát huy tác dụng toàn thân. Điện cực phổ biến được sử dụng trong các nghiên cứu là AgCl/Ag. Dòng điện thường dùng là dòng điện liên tục một chiều hoặc dòng điện xung với mật độ dòng điện từ 0,1-0,5 mA/cm^2. Khả năng thấm sâu của

dược chất phụ thuộc vào nhiều yếu tố, trong đó tính chất của dược chất, kích thước phân tử dược chất, mật độ dòng điện, thời gian điện di, đặc điểm sinh lý của vùng da điều trị là những yếu tố đóng vai trò quan trọng.

Bảng 2. Một số hoạt chất tiêu biểu đã được nghiên cứu ứng dụng điện di ion.

Tên hoạt chất	Điều kiện điện di	Đưa thuốc qua mô	Tóm tắt kết quả
Diclofenac	5-20 mA; 20 phút	*In vivo* cơ bắp ở người	Tổng lượng thuốc hấp thu sau 4 giờ tăng 8,2 lần, C_{max} tăng 9,4 lần, t_{max} giảm 2 lần. Tần suất tác dụng phụ 18,75% [12].
Ibuprofen	0,06 mA; 10 phút	Da chuột	Tổng thông lượng vận chuyển thuốc tăng 1,56 lần so với khuếch tán thụ động (7,103 so với 4,54 $\mu g.cm^{-2}.s^{-1}$) [13].
Indemethacin	0,06 mA; 10 phút	Da chuột	Tổng thông lượng vận chuyển thuốc tăng 1,45 lần so với khuếch tán thụ động (0,263 so với 0,182 $\mu g.cm^{-2}.s^{-1}$) [13].
5-Fluorouracil	0,5 mA/cm^2; 15 ph, 6 giờ	Da lợn	Tăng hấp thu thuốc 2 lần, giảm kích thước khối u 2 lần so với khi tiêm dưới da [14].
Ketoprofen	0,2 mA; 6 giờ	Da chuột	Tổng thông lượng vận chuyển thuốc tăng 35 lần và lưu giữ thuốc trong da gấp 22 lần [15].
Riboflavin	1 mA; 5 phút	*In vivo* mắt người	Thị lực được cải thiện: độ cong giác mạc và triệu chứng giảm đáng kể [16].
Sodium salicylate	0,1 mA; 8 giờ	Vòm miệng bò	Thời gian trễ giảm từ 2,2-5,3 giờ; hệ số thấm tăng 10 lần so với khuếch tán thụ động [17].
STAT3 siRNA với imatinib mesylate	0,5 mA/cm^2; 2 giờ	*In vivo* ung thư da ở chuột	Thuốc thấm vào da đến độ sâu 70-100 µm. Ức chế protein Stat và ức chế khối u lên đến 47,2 và 82,02%. Thể tích khối u giảm 4 lần [18].
Terazosin hydrochloride	0,1-0,5 mA/cm^2	Da lợn	Thuốc không hấp thu khi không có dòng điện, tốc độ thấm tăng từ 80-305 $\mu g.cm^{-2}.h^{-1}$ khi dòng điện tăng từ 0,1-0,5 mA/cm^2 [19].

Kỹ thuật điện di ion còn có thể ứng dụng để phân phối đồng thời nhiều dược chất qua da nhằm phối hợp tác dụng và tăng hiệu quả điều trị. Cordery và cs (2019) [20] đã nghiên cứu đưa đồng thời hai dược chất buprenorphine hydrochloride và naltrexone hydrochloride qua da để điều trị cai nghiện ma túy. Thông lượng vận chuyển qua da của 2 dược chất này có thể điều khiển được bằng các thông số của quá trình điện di đạt đến nồng độ điều trị. Trong một nghiên cứu khác của tác giả Delgadillo và cs (2016) [21], granisetron, metoclopramide và dexamethason được điện di đồng thời vào trong da để điều trị buồn nôn và nôn do hóa trị liệu. Granisetron và metoclopramide được đưa vào khoang chứa dược chất ở ngăn anot trong khi dexamethason natri phosphate được hòa tan trong ngăn cathot. Kết quả nghiên cứu cho thấy tốc độ vận chuyển dược chất tỷ lệ thuận với nồng độ các dược chất tương ứng ở trong các khoang điện cực khi dùng dòng điện có mật độ 0,3 mA/cm^2. Mặc dù có các đặc tính lý hóa khá giống nhau, nhưng thông lượng vận chuyển metoclopramide nhanh hơn nhiều so với granisetron.

Ứng dụng kỹ thuật điện di ion để vận chuyển các peptide và protein qua da

Sự ra đời của sinh học phân tử và sự phát triển công nghệ sinh học đã tạo ra các protein, peptide điều trị như insulin, các kháng thể đơn dòng hay các kháng nguyên có hiệu quả tốt trong điều trị và phòng bệnh. Các loại thuốc có bản chất protein ngày càng có vai trò quan trọng trong sản xuất các loại vắc xin và điều trị các bệnh khó chữa trị như viêm khớp, tiểu đường, loãng xương và ung thư. Do bản chất thân nước và kích thước phân tử lớn, các protein và peptide gần như không thể hấp thu qua da bằng cơ chế khuếch tán thụ động. Kỹ thuật điện di ion là một trong những giải pháp hứa hẹn có thể cải thiện được sinh khả dụng khi dùng qua da của các thuốc protein và peptide. Một số nghiên cứu tiểu biểu về ứng dụng kỹ thuật điện di ion trong vận chuyển các thuốc có bản chất là các phân tử lớn (protein và peptide) qua da được tóm tắt trong bảng 3.

Bảng 3. Một số nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật điện di ion để vận chuyển một số thuốc có nguồn gốc sinh học qua da.

Tên hoạt chất	Điều kiện điện di	Đưa thuốc qua mô	Tóm tắt kết quả
Vasopressin	0,78 và 0,47 mA/cm^2; 4 giờ	*In vitro* da chuột	Thông lượng vận chuyển qua da tăng 50 và 500 lần [22].
Desmopressin	0,1 A; 5 phút/lần	Chuột	Hiệu quả kéo dài 6 giờ. Lặp lại 3 lần trong 4 giờ, hiệu quả đến 11 giờ [23].
Thyrotropin Releasing Hormone, Leuprolide acetate	0,16, 0,31 và 0,47 mA/cm^2; 12 giờ	*In vitro* da chuột	Tổng thông lượng vận chuyển thuốc tỷ lệ thuận với mật độ dòng điện và phụ thuộc vào pH [24].
Leutinizing Hormone Releasing Hormone	0,2 mA; 4 giờ	Da người	Nồng độ LHRH huyết thanh tăng từ 11,3-56,4 mIU/ml và hiệu quả điều trị bắt đầu xuất hiện từ phút 60 [25].
Insulin	0,62 mA/cm^2; 4 giờ	Da chuột	Vận chuyển insulin qua da và tích lũy trong da tăng tuyến tính với nồng độ của khoang chứa thuốc [26].
Angiotensin	0,08; 0,17 và 0,28 mA/cm^2	Da chuột	Khả năng vận chuyển Angiotensin tăng 20 lần so với khuếch tán thụ động. Thông lượng điện di tỷ lệ tuyến tính với mật độ dòng điện [27].

Nghiên cứu tiên phong của Meyer và cs (1988) đã chứng minh kỹ thuật điện di ion có thể ứng dụng để vận chuyển hormone tạo hoàng thể qua da đạt được nồng độ điều trị. Tác giả đã so sánh sự hấp thụ qua da của leuprolide (một chất tương tự hormone giải phóng 9 axit amin) trong miếng dán trên da khi có dòng điện 0,2 mA và khi không có dòng điện. Nồng độ hormone luteinizing (LH) trong huyết thanh tăng đáng kể từ 11,3-56,4 mIU/ml ở nhóm dùng điện di ion, trong khi không có sự thay đổi về nồng độ LH ở nhóm còn lại. Điện di thuốc có hiệu quả tương đương với tiêm dưới da. Nghiên cứu cho thấy thuốc có khả năng dung nạp tốt và độc tính trên da không đáng kể [28].

Các nghiên cứu độc lập, đa trung tâm trên đối tượng là calcitonin (thyrocalcitonin-một hormone polypeptide mạch thẳng gồm 32 axit amin để điều trị chứng loãng xương, bệnh paget và tăng canxi huyết) đã chứng minh hiệu quả của việc phân phối calcitonin bằng kỹ thuật điện di ion trên các mô hình động vật [29, 30]. Đầu tiên, Santi và cs (1997) đã nghiên cứu sự vận chuyển calcitonin qua da thỏ với điện cực AgCl/Ag, tần số 100 Hz, mật độ 0,8 mA/cm^2, hai điện cực đặt cách nhau khoảng 3-4 cm trên da bụng thỏ, thuốc được đặt ở cathot, dạng dung dịch hoặc đĩa tẩm thuốc được làm ẩm bằng nước. Mẫu máu được lấy từ tĩnh mạch tai

thỏ để định lượng nồng độ canxi huyết. Kết quả nghiên cứu cho thấy nồng độ canxi huyết giảm đến 20,8% (nhóm sử dụng dung dịch) và 19,3% (nhóm sử dụng đĩa tẩm thuốc) đối với các cá thể áp dụng điện di, trong khi không có đáp ứng hạ canxi huyết ở các cá thể được thử nghiệm tương tự nhưng không kết nối với nguồn điện [29]. Trong chuỗi nghiên cứu này, Chang và cs (2000) đã nghiên cứu sự vận chuyển calcitonin trên biểu bì da người bằng kỹ thuật điện di ion với điện cực AgCl/Ag. Kết quả nghiên cứu cho thấy không phát hiện được có sự vận chuyển của calcitonin qua lớp biểu bì khi chưa kết nối với nguồn điện và thuốc bắt đầu được phát hiện ở khoang nhận khi có dòng điện chạy qua. Thí nghiệm ở các mật độ dòng điện khác nhau từ 0,1-0,75 mA/cm^2 với thời gian điện di 4 giờ cho thấy có mối quan hệ tuyến tính giữa thông lượng vận chuyển calcitonin và mật độ dòng điện. Điều đó gợi ý rằng có thể điều khiển liều lượng và thời gian vận chuyển calcitonin qua da bằng cách lập trình mật độ dòng điện theo thời gian [30].

Kết luận

Kỹ thuật điện di ion là một giải pháp đưa thuốc không xâm lấn có thể khắc phục một số hạn chế cố hữu của các thuốc ngoài da truyền thống, nhờ đó tăng hiệu quả của việc đưa thuốc qua da. Bên cạnh việc dược chất vẫn có thể khuếch tán thụ động qua da, kỹ thuật này cho phép đưa thuốc chủ động với liều lớn hơn, nhanh hơn và có thể điều khiển được thông qua điện trường. Kỹ thuật này đã chứng tỏ khả năng vận chuyển được nhiều dược chất thân nước và các phân tử lớn vào trong da với thông lượng lớn hơn nhiều lần so với khuếch tán thụ động. Những thành công bước đầu trong các nghiên cứu tiền lâm sàng và lâm sàng cùng với sự ra đời của các thiết bị điện di ion nhỏ gọn, an toàn đã và đang thúc đẩy việc nghiên cứu phát triển điện di ion thành một kỹ thuật đưa thuốc hiệu quả và phổ biến. Triển vọng trong thời gian tới chúng ta sẽ được chứng kiến sự ra đời của nhiều sản phẩm thương mại dựa trên kỹ thuật này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] A. Sieg and V. Wascotte (2009), "Diagnostic and therapeutic applications of iontophoresis", *J. Drug Target.*, **17**(**9**), pp.690-700.

[2] X. Ning, et al. (2019), "Iontophoresis enhanced transdermal drug delivery", *Augment. Cust. Strateg. CRM Digit. Age*, **12**, DOI: 10.1002/9783527814633.ch12.

[3] S.J. Siegel, et al. (2007), "A unique iontophoretic patch for optimal transdermal delivery of sumatriptan", *Pharm. Res.*, **24**(**10**), pp.1919-1926.

[4] T. Kankkunen, et al. (2002), "Transdermal iontophoresis of tacrine *in vivo*", *Pharm. Res.*, **19**(**5**), pp.705-708.

[5] B.K. Chang, et al. (1993), "A pilot study of iontophoretic cisplatin chemotherapy of basal and squamous cell carcinomas of the skin", *Arch. Dermatol.*, **129**(**4**), pp.425-427.

[6] N.M. Volpato, et al. (1998), "*In vitro* acyclovir distribution in human skin layers after transdermal iontophoresis", *J. Control. Release*, **50**(**1-3**), pp.291-296.

[7] A. Stefanou, et al. (2012), "A randomized study comparing corticosteroid injection to corticosteroid iontophoresis for lateral epicondylitis", *J. Hand Surg. Am.*, **37**(**1**), pp.104-109.

[8] C.A. Zakzewski and J.K.J. Li (1991), "Pulsed mode constant current iontophoretic transdermal metaprolol tartrate delivery in established acute hypertensive rabbits", *J. Control. Release*, **17**(**2**), pp.157-162.

[9] Y. Suzuki, et al. (2002), "Prevention of bone loss in ovariectomized rats by pulsatile transdermal iontophoretic administration of human PTH(1-34)", *J. Pharm. Sci.*, **91**(**2**), pp.350-361.

[10] A.B. Nair, et al. (2009), "Alteration of the diffusional barrier property of the nail leads to greater terbinafine drug loading and permeation", *Int. J. Pharm.*, **375**(**1-2**), pp.22-27.

[11] H. Chen, et al. (2009), "Iontophoresis-driven penetration of nanovesicles through microneedle-induced skin microchannels for enhancing transdermal delivery of insulin", *J. Control. Release*, **139**(**1**), pp.63-72.

[12] R. Crevenna, et al. (2015), "Iontophoresis driven concentrations of topically administered diclofenac in skeletal muscle and blood of healthy subjects", *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **71**(**11**), pp.1359-1364.

[13] Z. Jing, et al. (2014), "Transdermal enhancement effect and mechanism of iontophoresis for non-steroidal anti-inflammatory drugs", *Int. J. Pharm.*, **466**(**1-2**), pp.76-82.

[14] R. Petrilli, et al. (2018), "Skin cancer treatment effectiveness is improved by iontophoresis of EGFR-targeted liposomes containing 5-FU compared with subcutaneous injection", *J. Control. Release*, **283**, pp.151-162.

[15] S. Lobo and G. Yan (2018), "Improving the direct penetration into tissues underneath the skin with iontophoresis delivery of a ketoprofen cationic prodrug", *Int. J. Pharm.*, **535**(**1-2**), pp.228-236.

[16] H.Z. Jia, et al. (2017), "Iontophoresis-assisted corneal crosslinking using 0.1% riboflavin for progressive keratoconus", *Int. J. Ophthalmol.*, **10**(**5**), pp.717-722.

[17] W. Ren, et al. (2016), "Characterization of cornified oral mucosa for iontophoretically enhanced delivery of chlorhexidine", *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **99**, pp.35-44.

[18] S. Labala, et al. (2017), "Effective melanoma cancer suppression by iontophoretic co-delivery of STAT3 SiRNA and imatinib using gold nanoparticles", *Int. J. Pharm.*, **525**(**2**), pp.407-417.

[19] C. Jiang, et al. (2021), "Transdermal iontophoresis delivery system for terazosin hydrochloride: an *in vitro* and *in vivo* study", *Drug Deliv.*, **28**(**1**), pp.454-462.

[20] S.F. Cordery, et al. (2019), "Simultaneous transdermal delivery of buprenorphine hydrochloride and naltrexone hydrochloride by iontophoresis," *Mol. Pharm.*, **16**(**6**), pp. 2808-2816.

[21] J.C. Delgadillo, et al. (2016), "Controlled transdermal iontophoresis for poly-pharmacotherapy: simultaneous delivery of granisetron, metoclopramide and dexamethasone sodium phosphate *in vitro* and *in vivo*", *Eur. J. Pharm. Sci.*, **85**, pp.31-38.

[22] P. Lelawongs, et al. (1989), "Transdermal iontophoretic delivery of arginine-vasopressin (I): physicochemical considerations", *Int. J. Pharm.*, **56**(**1**), pp.13-22.

[23] M. Nakakura, et al. (1998), "Safe and efficient transdermal delivery of desmopressin acetate by iontophoresis in rats", *Biol. Pharm. Bull.*, **21**(**3**), pp.268-271.

[24] R.R. Burnette and D. Marrero (1986), "Comparison between the lontophoretic and passive transport of thyrotropin releasing hormone across excised nude mouse skin", *J. Pharm. Sci.*, **75**(**8**), pp.738-743.

[25] M.C. Heit, et al. (1994), "Transdermal lontophoretic delivery of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH): effect of repeated administration", *Pharm. Res.*, **11**(**7**), pp.1000-1003.

[26] A.K. Banga and Y.W. Chien (1993), "Characterization of *in vitro* transdermal iontophoretic delivery of insulin", *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **19**(**16**), pp.2069-2087.

[27] M. Clemessy, et al. (1995), "Mechanisms involved in lontophoretic transport of angiotensin", *Pharm. Res.*, **12**(**7**), pp.998-1002.

[28] B.R. Meyer, et al. (1988), "Successful transdermal administration of therapeutic doses of a polypeptide to normal human volunteers", *Clin. Pharmacol. Ther.*, **44**(**6**), pp.607-612.

[29] P. Santi, et al. (1997), "Drug reservoir composition and transport of salmon calcitonin in transdermal iontophoresis", *Pharm. Res.*, **14**(**1**), pp.63-66.

[30] S.L. Chang, et al. (2000), "Transdermal iontophoretic delivery of salmon calcitonin", *Int. J. Pharm.*, **200**(**1**), pp.107-113.

DOI: 10.31276/VJST.63(9).44-47

Đặc điểm hệ nấm nội cộng sinh rễ cây hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) ở một số tỉnh phía Nam

Nguyễn Vũ Phong*, Vũ Trung Nguyên, Trần Kiên, Hà Thị Trúc Mai

Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 10/6/2021; ngày chuyển phản biện 15/6/2021; ngày nhận phản biện 22/7/2021; ngày chấp nhận đăng 30/7/2021

Tóm tắt:

Nấm nội cộng sinh rễ có vai trò quan trọng đối với sinh trưởng của thực vật, đặc biệt khi điều kiện môi trường bất lợi. Từ 60 mẫu đất vùng rễ cây hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) trồng ở các tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu, Đồng Nai và Gia Lai đã xác định sự hiện diện của nấm nội cộng sinh rễ thuộc chi *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Glomite*, *Glomus* và *Scutellospora*, trong đó *Glomus* và *Acaulospora* là hai chi phổ biến nhất. Khi nhân nuôi hỗn hợp nấm cộng sinh hệ số nhân đạt khoảng 8,5 lần trên cây bắp (*Zea mays*) so với 6,5 lần trên cây cao lương (*Sorghum bicolor*) hay cỏ mần trầu (*Eleusine indica*) sau 40 ngày. Hom hồ tiêu giâm trên giá thể bổ sung hỗn hợp nấm rễ cộng sinh có chiều cao hom, số lượng rễ và khối lượng rễ tươi cao hơn có ý nghĩa so với cây đối chứng. Kết quả này cho thấy triển vọng ứng dụng nấm nội cộng sinh như là tác nhân sinh học trong canh tác hồ tiêu bền vững, thích ứng biến đổi khí hậu.

Từ khóa: ***Acaulospora, Gigaspora, Glomite*, *Glomus*, hồ tiêu, nấm nội cộng sinh rễ, *Scutellospora*.**

Chỉ số phân loại: **4.1**

Mở đầu

Ngày nay, các quốc gia nông nghiệp đang hướng tới một nền nông nghiệp bền vững. Các giải pháp sinh học theo hướng "tiếp cận xanh" được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi. Các nghiên cứu phát triển và ứng dụng các chế phẩm sinh học dần thay thế các loại sản phẩm hóa học, giúp tăng năng suất cây trồng và bảo vệ môi trường. Nấm rễ cộng sinh Arbuscular mycorrhizal (AM) được sử dụng như một loại phân bón sinh học làm tăng khả năng hấp thu dinh dưỡng của cây trồng, mặt khác làm ổn định cấu trúc và đặc tính sinh học của đất và là yếu tố chỉ thị cho mức độ suy thoái của đất. Ở Việt Nam đã có một số nghiên cứu về sự phân bố cũng như ảnh hưởng của nấm rễ đến một số loại cây trồng, chủ yếu là cây có múi và cây ngắn ngày. Nguyễn Thị Kim Liên và cs (2012) [1] đã nghiên cứu thành phần và ảnh hưởng của nấm rễ cộng sinh AM đến sinh trưởng của cây cam con. Năm 2017, từ mẫu rễ và đất trồng ngô tại Đồng bằng sông Cửu Long, Võ Thị Tú Trinh và Dương Minh [2] đã xác định sự hiện diện 3 chi nấm *Glomus*, *Acaulospora*, *Entrospora.* Cũng trên cây ngô, Lê Thị Hoàng Yến và cs (2017) [3] đã phân lập được các bào tử thuộc 15 loài nấm rễ AM khác nhau từ 15 mẫu đất thu thập tại Hà Nội. Từ các mẫu đất vùng rễ của một số cây hòa thảo và cây bụi thu thập tại hai vùng đất bạc màu và đất ferralit, Nguyễn Thị Minh và cs (2014) [4] đã phân lập được 15 giống nấm rễ AM thuộc 4 chi *Gigaspora*, *Glomus*, *Scutellospora*, *Acaulospora*. Anandaraj và cs (1994) [5] đã chứng minh khi bổ sung nấm rễ cộng sinh *Glomus fasciculatum* vào trong giá thể đã tăng cường khả năng tạo rễ hom hồ tiêu. Thanuja và cs (2001) [6] đã so sánh ảnh hưởng của 3 loài nấm *Glomus fasciculatum*, *Gigaspora margarita*, *Acaulospora laevis* đến sự sinh rễ và chồi hom hồ tiêu. Kết quả cho thấy, tỷ lệ hom ra rễ và chồi đạt cao nhất khi bổ sung loài *Acaulospora laevis*. Bên cạnh đó, nấm rễ còn đóng vai trò quan trọng trong việc phòng trừ sinh học. Một số loài nấm rễ có thể kiểm soát tốt mầm bệnh trong đất do nấm *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia* và *Sclerotinium*... gây ra, nhờ đó hạn chế thất thu năng suất cây trồng [7]. Ở Việt Nam, có rất ít các công bố về nghiên cứu và ứng dụng của loại nấm rễ cộng sinh trên cây hồ tiêu. Nghiên cứu này trình bày ảnh hưởng của nấm nội cộng sinh rễ phân lập từ mẫu đất và rễ hồ tiêu ở các tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu, Đồng Nai và Gia Lai đến sinh trưởng của hom giâm hồ tiêu.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Mẫu đất và rễ hồ tiêu được thu thập ở độ sâu 5-20 cm tại các vườn chuyên canh hồ tiêu từ 3 năm tuổi ở tỉnh Gia Lai (huyện Iagrai và TP Pleiku), Đồng Nai (huyện Trảng Bom và Thống Nhất), Bà Rịa - Vũng Tàu (huyện Châu Đức và Xuyên Mộc).

Hạt giống cà chua, ngô, cao lương và cỏ mần trầu được mua từ các công ty thương mại hạt giống. Hom hồ tiêu giống Vĩnh Linh được giữ ở nhà lưới Khoa Khoa học sinh học, Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh.

Phương pháp nghiên cứu

Xác định chi nấm dựa vào hình thái bào tử: bào tử nấm rễ được phân lập từ đất bằng kỹ thuật sàng ướt (wet seiwing) qua rây lọc có kích thước lần lượt 350, 150 và 50 µm kết hợp với nồng độ đường sucrose 50% và tách bào tử đơn theo Brundrett và cs (1996) [8]. Bào tử phân lập được chia thành các nhóm khác nhau dựa vào hình thái. Quan sát dưới kính hiển vi Olympus ở độ phóng đại 40X màu sắc, kích thước, bề mặt và cấu trúc vách bào tử. Định danh

*Tác giả liên hệ: Email: nvphong@hcmuaf.edu.vn

Characterisation of arbuscular mycorrhizal fungi community on black pepper (*Piper nigrum* L.) in Northern

Vu Phong Nguyen*, Trung Nguyen Vu, Kien Tran, Thi Truc Mai Ha

Nong Lam University, Ho Chi Minh city

Received 10 June 2021; accepted 30 July 2021

Abstract:

Mycorrhiza was considered to enhance plant growth, especially in unfavourable environmental conditions. From 60 samples of rhizospheric soils and roots of black pepper (*Piper nigrum*) grown in Ba Ria - Vung Tau, Dong Nai, and Gia Lai provinces, the presence of *Acaulospora, Gigaspora, Glomite, Glomus*, and *Scutellospora* genera were detected, of which *Glomus* and *Acaulospora* were dominants. After 40 days of inoculation, mycorrhiza multiplied 8.5 fold on corn (*Zea mays*) and 6.5 fold on sorghum (*Sorghum bicolor*) or goosegrass (*Eleusine indica*). Black-pepper cuttings on substrate supplemented mycorrhiza showed better growth than the non-inoculated cuttings. Results suggest the potential of applying mycorrhizal fungi as biological agents in sustainable black pepper cultivation, adapting to climate change.

Keywords: ***Acaulospora,* arbuscular mycorrhizal fungi, black pepper, *Gigaspora, Glomite, Glomus, Scutellospora*.**

Chỉ số phân loại: **4.1**

nấm dựa vào hình thái bào tử theo phương pháp của Gerdemann và Nicolson (1963) [9].

Hình thái sợi nấm, túi và cấu trúc cộng sinh trong rễ được quan sát theo phương pháp của Giovannetti và Mosse (1980) [10]. Rễ được rửa sạch đất bên ngoài và cắt nhỏ thành từng đoạn 1 cm, tiếp theo nhuộm với Trypan blue 0,1%. Quan sát dưới kính hiển vi độ phóng đại 40X [8].

Nhân nấm nội cộng sinh trên cây ký chủ trong chậu: hạt cà chua, cỏ mần trầu, cao lương và ngô được khử trùng bề mặt bằng cồn 70% và gieo trên giá thể đất mùn. Cây con 4 ngày tuổi được chuyển sang chậu kích thước 22x16 cm chứa 2 kg giá thể (đất:xơ dừa, w/w) hoặc (đất:cát, w/w) đã hấp khử trùng và bổ sung 100 g đất chứa hỗn hợp khoảng 420 bào tử các loài nấm rễ. Tưới nước đủ ẩm đến 5 ngày sau lây nhiễm, khi cây đã ổn định chỉ bổ sung nước 3 lần một tuần. Mỗi nghiệm thức thực hiện 10-15 chậu tùy loại cây. Chậu không bổ sung bào tử nấm rễ làm đối chứng. Sau lây nhiễm 30 hoặc 60 ngày, ghi nhận sinh khối rễ tươi, số lượng bào tử nấm rễ trong giá thể trồng, so sánh với chậu đối chứng và tính hệ số nhân bào tử nấm rễ.

Đánh giá ảnh hưởng của nấm rễ đến sinh trưởng cải xanh và hom tiêu giâm: hạt cải xanh được khử trùng với cồn 70% trong 2 phút và rửa lại nước máy 3 lần, sau đó gieo vào khay trồng gồm đất sạch và tro trấu (1:1) đã khử trùng và bổ sung 100 g đất chứa khoảng 3000 hỗn hợp bào tử nấm. Các khay được tưới nước 2 ngày 1-2 lần tùy thuộc vào nhiệt độ và độ ẩm hằng ngày. Sau 5 ngày, tỉa cây để lại 5 cây trên khay, thí nghiệm trên 4 khay. Các khay không chủng nấm làm đối chứng.

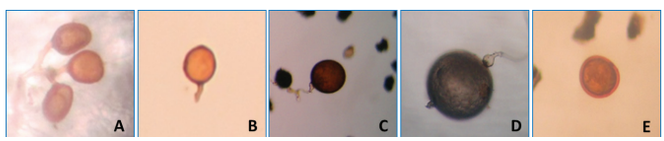
Hom tiêu giống Vĩnh Linh có 2 đốt được xử lý bằng thuốc diệt nấm Ridomil Gold 68WG trong 2 phút, giâm trong chậu nhựa chứa 0,5 kg giá thể đã hấp khử trùng. Sau 60 ngày chọn những hom tương đồng về chiều cao chồi và số lá, sau đó bổ sung 250 bào tử nấm rễ mỗi chậu. Thí nghiệm thực hiện trên 30 chậu, 30 chậu không chủng nấm làm đối chứng.

Sau 30 ngày chủng nấm, các chỉ tiêu như số lá, chiều cao cây, khối lượng tươi phần thân lá, độ dài rễ, khối lượng tươi rễ, số bào tử nấm trong giá thể và trong rễ được ghi nhận và tính hệ số nhân bào tử.

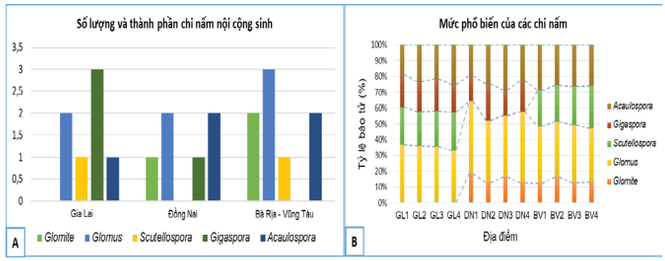
Kết quả

Thành phần nấm rễ trong các mẫu đất thu thập

Từ 54/60 mẫu rễ và 60/60 mẫu đất thu thập đã phân lập được bào tử nấm rễ nội cộng sinh. Dựa vào đặc điểm hình dạng, màu sắc, cuống và thành bào tử, các bào tử được xếp thành 14 kiểu thuộc 5 chi gồm *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Glomite*, *Glomus*, *Scutellospora* thuộc 3 họ, gồm *Acaulosporaceae*, *Glomaceae* và *Gigasporaceae* (hình 1). Tuy nhiên, *Gigaspora*, *Glomite* và *Scutellospora* lại không xuất hiện trong mẫu đất tương ứng thu thập ở tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu, Gia Lai và Đồng Nai. Số lượng bào tử nấm cộng sinh hiện diện trong mẫu đất thu thập đạt trung bình 32-38 bào tử trong 50 g đất. *Acaulospora* và *Glomus* là 2 chi nấm xuất hiện ở tất cả các mẫu thu thập với tỷ lệ bào tử 24,3 và 37,7% tương ứng với 8,7 và 12,9 bào tử/50 g đất, chi *Glomite* có tỷ lệ bào tử thấp nhất là 14,3% với 4,6 bào tử/50 g đất (hình 2).



Hình 1. Kiểu hình bào tử của năm chi nấm phân lập từ đất vùng rễ hồ tiêu thu thập. (**A**) *Glomite*, (**B**) *Glomus*, (**C**) *Scutellospora*, (**D**) *Gigaspora*, (**E**) *Acaulospora*.



Hình 2. Thành phần các chi nấm nội cộng sinh thu thập từ 3 tỉnh (n=60). (**A**) Số lượng và thành phần chi nấm nội cộng sinh hiện diện ở 3 tỉnh; (**B**) Mức độ phổ biến của các chi nấm nội cộng sinh trên 12 vườn trồng tiêu.

Đánh giá khả năng tăng sinh của các chi nấm

Để xác định khả năng sinh trưởng của nấm cộng sinh, thí nghiệm được thực hiện với cây cà chua. Sau 1 tháng lây nhiễm, khả năng sinh trưởng của các chi nấm gấp 5-7 lần so với lần đầu, cao nhất ở *Glomus* và *Acaulospora*, thấp nhất ở *Scutellospora* và *Gigaspora* (bảng 1).

Bảng 1. Hệ số nhân của nấm cộng sinh rễ trên cây cà chua 30 ngày sau lây nhiễm (n=10).

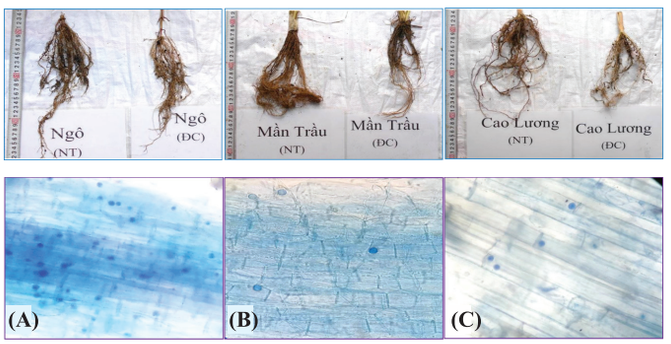
Chi nấm	*Acaulospora*	*Gigaspora*	*Glomite*	*Glomus*	*Scutellospora*
Hệ số nhân	7,13	5,33	6,03	7,25	5,46

Để xác định loại cây ký chủ phù hợp cho nhân nuôi các chủng nấm, thí nghiệm đã được tiến hành trên 3 loại cây gồm ngô, cao lương, mần trầu. Sau 60 ngày nhân nuôi, số bào tử nấm rễ đều tăng rõ rệt. Trong đó, số bào tử trong cơ chất đạt nhiều nhất trên cây ngô với hệ số nhân 8,5 lần, trong khi trên cây mần trầu và cao lương hệ số nhân đạt 6,0-6,5 lần. Đồng thời, sinh khối rễ cây có sự khác biệt rõ rệt với cây đối chứng không bổ sung nấm (bảng 2, hình 3).

Bảng 2. Hệ số nhân bào tử và sinh khối rễ cây ngô, cao lương, mần trầu sau 40 ngày (n=15).

Cây ký chủ	*Acaulospora*	*Gigaspora*	*Glomite*	*Glomus*	*Scutellospora*	Hệ số tăng sinh khối rễ (*)
Ngô	6,73	15,6	7,77	5,82	6,02	1,90
Cao lương	5,48	10,2	5,65	4,53	5,84	1,88
Mần trầu	5,65	9,24	5,84	4,56	5,51	2,09

(*): so với cây không bổ sung nấm rễ.



Hình 3. Rễ và túi nấm trong rễ ngô (A), mần trầu (B), cao lương (C) sau 40 ngày lây nhiễm.

Ảnh hưởng của nấm rễ lên sinh trưởng của cây chủ

Để kiểm tra khả năng giúp tăng cường sinh trưởng cây trồng của nấm cộng sinh, thí nghiệm đã được tiến hành với cây cải xanh. Sau 30 ngày lây nhiễm, ở giá thể bổ sung nấm cây có số lá, chiều cao thân, độ dài rễ, trọng lượng tươi rễ lớn hơn so với các cây đối chứng trong giá thể không bổ sung nấm rễ ($p<0,01$) (bảng 3). Số lượng bào tử nấm cộng sinh sau 1 tháng tăng gấp 3,4 lần so với lượng lây nhiễm ban đầu. Bước đầu có thể nhận định các chủng nấm cộng sinh nghiên cứu có khả năng giúp tăng cường sinh trưởng cây trồng.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nấm AM lên sinh trưởng của cây cải xanh.

Nghiệm thức	Số lá	Chiều cao thân (cm)	Độ dài rễ (cm)	Trọng lượng tươi thân lá (g)	Trọng lượng tươi rễ (g)
Thí nghiệm	4,48±0,36	12,0±0,36	5,5±0,23	34,9±0,05	5,05±0,003
Đối chứng	3,67±0,43	11,6±0,35	5,0±0,06	34,6±0,15	4,89±0,001

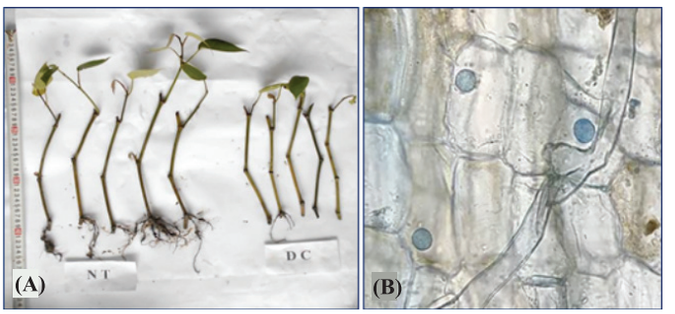
Ghi chú: số liệu được trình bày bởi giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (n=20).

Khả năng thúc đẩy sinh trưởng cây hồ tiêu của nấm cộng sinh được kiểm chứng với hom hồ tiêu giâm trong vườn ươm. Sau 30 ngày bổ sung nấm, các chỉ tiêu như số lá, chiều dài, khối lượng thân lá đều cao hơn gấp đôi so với các hom không bổ sung nấm ($p<0,01$). Chiều dài rễ và khối lượng tươi rễ (9,60 cm, 0,32 g) cao hơn nhiều so với hom đối chứng (0,53 cm, 0,01 g). Ngoài ra, các hiện tượng thường gặp như rụng lóng, hóa nâu và chết giảm đi rõ rệt khi bổ sung nấm vào giá thể giâm (bảng 4). Có thể nhận thấy rõ sự khác biệt giữa hom tiêu trồng trên giá thể bổ sung và không bổ sung nấm rễ (hình 4).

Bảng 4. Ảnh hưởng của nấm AM lên sinh trưởng của hom tiêu.

Nghiệm thức	Số lá	Chiều dài chồi (cm)	KLT thân lá (g)	Chiều dài rễ (cm)	KL rễ (g)	Tỷ lệ hom rụng lóng (%)	Số hom chết (%)
Chủng nấm	2,47 ±0,92	8,75 ±2,32	2,59 ±1,43	9,60 ±1,45	0,32 ±0,13	47,5	6,6
Không chủng nấm	1,33 ±0,83	3,32 ±2,00	0,63 ±0,49	0,53 ±1,39	0,01 ±0,02	85,0	23,3

Ghi chú: KLT: khối lượng tươi, số liệu được trình bày bởi giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (n=30).



Hình 4. Hom tiêu (A) và túi nấm trong rễ hom tiêu (B) sau 30 ngày. NT: bổ sung nấm rễ; ĐC: không bổ sung nấm rễ.

Thảo luận

Trong hệ vi sinh vật đất, nấm rễ cộng sinh là loài phổ biến nhất và đóng một vai trò quan trọng trong mối quan hệ giữa thực vật và đất, sự cộng sinh giữa nấm và cây xảy ra ở hầu hết các môi trường sống và khí hậu khác nhau [11]. Từ 60 mẫu đất thu từ các vườn hồ tiêu 3-4 năm tuổi ở Gia Lai, Đồng Nai và Bà Rịa - Vũng Tàu đã xác định sự hiện diện của nấm nội cộng sinh rễ thuộc 5 chi. Điều ngạc nhiên là không phát hiện nấm Gigaspora trong mẫu đất ở Bà Rịa - Vũng Tàu, khác với công bố của Lê Thị Kim Duyên và cs (2019) [12]. Ngược lại, đó là trường hợp chi *Glomite*, hiện diện trong nghiên cứu này với tỷ lệ thấp nhất trong 5 chi nấm. Vấn đề này cần được kiểm chứng thêm bằng cách tăng số lượng mẫu

kiểm chứng và sử dụng kỹ thuật định danh sinh học phân tử. Bên cạnh đó, số bào tử nấm rễ trong đất ở nghiên cứu này là 32-38 bào tử/50 g đất, thấp hơn so với công bố 110-130 bào tử/50 g đất của Lê Thị Kim Duyên và cs (2019) [12]. Nguyên nhân có thể do mẫu đất thu thập từ vườn trồng thuần hồ tiêu khoảng 3-4 năm tuổi vào cuối mùa mưa nên sự tích tụ về thành phần và mật số bào tử còn thấp so với vườn hồ tiêu lâu năm xen canh với các loại cây trồng khác như chuối, điều, cà phê. Sự hiện diện, phong phú về thành phần và mật độ nấm AM liên quan mật thiết đến hệ sinh thái thực vật hiện hữu [13]. Mặt khác sự đa dạng của nấm AM phụ thuộc vào mùa [14], đặc điểm địa lý và điều kiện môi trường [15]. Để có cái nhìn tổng quát hơn, các đặc tính lý hóa của đất, hiện trạng vườn canh tác, tuổi vườn, giống cây trồng cần được phân tích đánh giá nhằm xác định mối tương quan với mức độ đa dạng di truyền, sự đa dạng loài (species richness) và loài cộng sinh chính (dominant) trên rễ cây hồ tiêu.

Khi nhân nuôi trên cây cà chua, ngô, cao lương và cỏ mần trầu, các chi nấm đều có hệ số nhân khá tốt. Khi có sự cộng sinh giữa nấm và rễ cây trồng, sự tăng trưởng của cây, nhất là sinh khối rễ đều tăng một cách có ý nghĩa. Điều này chứng minh rằng, nấm rễ cộng sinh có tác động tích cực đến sự phát triển bộ rễ của cây trồng, giúp cây trồng phát triển tốt hơn. Bốn loại cây trồng này đều là cây chủ thích hợp để nhân các loại nấm rễ cộng sinh đề cập. Khả năng cộng sinh và thúc đẩy tăng trưởng cây trồng của nấm cộng sinh cũng đã được khảo sát trên cây cải xanh và cây hồ tiêu. Kết quả cho thấy, hỗn hợp nấm cộng sinh đã thiết lập được sự cộng sinh trong rễ cây trồng và có tác động tích cực đến sinh trưởng của cây chủ. Năm 1994, Anandaraj và Sarma [5] đã chứng minh *Glomus fasciculatum* giúp tăng cường sự ra rễ của hom hồ tiêu giâm. Thanuja và cs (2001) [6] báo cáo rằng 69,9% đoạn thân hồ tiêu tạo rễ khi được giâm trong giá thể bổ sung *Acaulospora laevis*, *Gigaspora.* Gogoi và Singh (2011) [16] cho thấy, 23 chủng AM giúp tăng sinh khối và hàm lượng N-P trong thân lá hom tiêu. Tác động tích cực của nấm rễ đến sinh khối, khả năng tạo rễ, tạo chồi, hấp thu chất dinh dưỡng của hom giâm hồ tiêu cũng được các tác giả báo cáo [17-19]. Sự tổng hợp các chất thứ cấp ở hom tiêu cũng được tăng cường khi bổ sung nấm rễ [20, 21].

Nghiên cứu này cung cấp dữ liệu về thành phần, khả năng cộng sinh và tác động của nấm nội cộng sinh rễ cây hồ tiêu đến sinh trưởng của cây trồng, làm cơ sở cho việc nghiên cứu sử dụng nấm nội cộng sinh rễ như là tác nhân sinh học trong bảo vệ cây hồ tiêu, phục vụ canh tác bền vững.

Kết luận

Kết quả khảo sát cho thấy, cả 60 mẫu rễ và đất trồng hồ tiêu được thu thập tại Gia Lai, Bà Rịa - Vũng Tàu, Đồng Nai đều có sự hiện diện của nấm rễ cộng sinh. Năm chi *Glomite*, *Glomus*, *Scutellospora*, *Gigaspora*, *Acaulospora* đã được ghi nhận, trong đó chi *Glomus* và *Acaulospora* hiện diện trong tất cả các mẫu thu thập. Ngô, cao lương, mần trầu, cà chua đều là cây chủ thích hợp cho quá trình nhân nuôi đa bào tử trên môi trường đất. Nấm rễ cộng sinh có tác động tích cực đến sự sinh trưởng của cây trồng. Các nghiên cứu sâu hơn về thành phần loài nấm cộng sinh, tác động tăng cường sự sinh trưởng và giúp cây hồ tiêu chống chịu với tác nhân gây stress sinh học và phi sinh học cần được tiếp tục thực hiện để làm cơ sở sử dụng tác nhân sinh học này trong canh tác nông nghiệp bền vững, thích ứng biến đổi khí hậu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Nguyễn Thị Kim Liên, Lê Thị Thủy, Nguyễn Viết Hiệp, Nguyễn Huy Hoàng (2012), "Nghiên cứu đa dạng hệ nấm cộng sinh Arbuscular mycorrhiza trong đất và rễ cam tại Quỳ Hợp, Nghệ An", *Tạp chí Sinh học*, **4**, tr.436-440.

[2] Võ Thị Tú Trinh và Dương Minh (2017), "Sự phân bố và xâm nhiễm của nấm rễ nội sinh (Vesicular Arbuscular Mycorrhiza - VAM) trong mẫu rễ và đất trồng ngô tại một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long", *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, **53**, tr.105-111.

[3] Lê Thị Hoàng Yến, Lê Thị Lệ Quyên, Lưu Thị Dung, Mai Thị Đàm Linh, Dương Văn Hợp (2017), "Nghiên cứu đa dạng nấm rễ nội cộng sinh (Arbuscular mycorrhizal fungi) phân lập từ đất trồng ngô ở Hà Nội", *Tạp chí Khoa học, Đại học Quốc gia Hà Nội*, **33**, tr.312-318.

[4] Nguyễn Thị Minh, Nguyễn Thu Hà, Phạm Quốc Hưng (2014), "Phân lập và tuyển chọn giống Arbuscular mycorrhizae dùng để sản xuất vật liệu sinh học nhằm tái tạo thảm thực vật phủ xanh", *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, **3**, tr.49-55.

[5] M. Anandaraj, Y.R. Sarma (1994), "Effect of vesicular Arbuscular mycorrhiza on rooting of black pepper (*Piper nigrum* L.)", *Journal of Spices & Aromatic Crops*, **3**, pp.39-42.

[6] T.V. Thanuja, et al. (2001), "Effect of vesicular arbuscular mycorrhizae, types of cutting and mist on rooting and sprouting of pepper (*Piper nigrum* L.) cuttings", *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, **14**, pp.412-416.

[7] A. Al-Askar, Y. Rashad (2010), "Arbuscular mycorrhizal fungi: a biocontrol agent against common", *Plant Pathology Journal*, **9**, pp.31-38.

[8] M. Brundrett, et al. (1996), *Working With Mycorrhizas In Forestry and Agriculture*, Australian Centre for International Agricultural Research.

[9] J.W. Gerdemann, T.H. Nicolson (1963), "Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting", *Transactions of the British Mycological Society*, **46**, pp.235-244.

[10] M. Giovannetti, B. Mosse (1980), "An evaluation of techniques for measuring vesicular Arbuscular mycorrhizal infection in roots", *New Phytologist*, **84**, pp.489-500.

[11] C. Azcón-Aguilar, J.M. Barea (1997), "Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials", *Scientia Horticulturae*, **68**, pp.1-24.

[12] Lê Thị Kim Duyên, Trần Trọng Nghĩa, Trần Đỗ Hoàng, Đào Uyên Trân Đa, Lê Đình Đôn (2019), "Xác định nấm cộng sinh Mycorrhiza trên rễ cây hồ tiêu", *Tạp chí Bảo vệ Thực vật*, **2**, tr.3-7.

[13] B. Börstler, et al. (2006), "Species composition of arbuscular mycorrhizal fungi in two mountain meadows with differing management types and levels of plant biodiversity", *Biology and Fertility of Soils*, **42**, pp.286-298.

[14] A.J. Dumbrell, et al. (2011), "Distinct seasonal assemblages of Arbuscular mycorrhizal fungi revealed by massively parallel pyrosequencing", *New Phytologist*, **190**, pp.794-804.

[15] M. Öpik, et al. (2013), "Global sampling of plant roots expands the described molecular diversity of Arbuscular mycorrhizal fungi", *Mycorrhiza*, **23**, pp.411-430.

[16] P. Gogoi, R.K. Singh (2011), "Differential effect of some arbuscular mycorrhizal fungi on growth of *Piper longum* L. (Piperaceae)", *Indian Journal of Science and Technology*, **4**, pp.119-125.

[17] W.J. Mala, et al. (2010), "Effective spore density of glomus mosseae, arbuscular mycorrhiza, for inoculation of rooted cuttings of black pepper (*Piper nigrum* Linn.)", *Tropical Agricultural Research*, **21(2)**, pp.189-197.

[18] H. Wimalarathne, et al. (2014), "Effect of Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) on shoot and root development of black pepper (*Piper nigrum* Linn.) rooted cuttings", *Int. Invent. J. Agric. Soil. Sci.*, **2**, pp.105-111.

[19] A. Sahur (2020), *Growth Response of Pepper (Piper nigrum* L.*) on Application Arbuscular Mycorrhizal Fungi and the Shallot Filtrate*, IOP Publishing.

[20] S.F. Da Luz, et al. (2016), "Effect of Arbuscular mycorrhizal fungi on the essential oil composition and antioxidant activity of black pepper (*Piper nigrum* L.)", *International Journal of Applied Research in Natural Products*, **9**, pp.10-17.

[21] R. Da Trindade, et al. (2019), "Arbuscular mycorrhizal fungi colonization promotes changes in the volatile compounds and enzymatic activity of lipoxygenase and phenylalanine ammonia lyase in *Piper nigrum* L. 'Bragantina'", *Plants*, **8**, DOI: 10.3390/plants8110442.

DOI: 10.31276/VJST.63(9).48-53

Các phương pháp chẩn đoán bệnh virus trên cà chua (*Solanum lycopersicum*)

Vũ Tuấn Nam[1, 2], Chu Đức Hà[3], Lê Tiến Dũng[4*]

[1]Trung tâm Nghiên cứu thực phẩm và Chuyển đổi sinh học, Đại học Quốc gia Seoul, Hàn Quốc
[2]Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam
[3]Khoa Công nghệ nông nghiệp, Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam
[4]Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, Việt Nam

Ngày nhận bài 14/5/2021; ngày chuyển phản biện 17/5/2021; ngày nhận phản biện 15/6/2021; ngày chấp nhận đăng 22/6/2021

Tóm tắt:

Việc quản lý dịch bệnh do virus gây nên đối với cà chua (*Solanum lycopersicum*) vốn ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất dù được quan tâm thực hiện một cách nghiêm ngặt trong sản xuất, nhưng còn gặp rất nhiều khó khăn do thiếu hụt thông tin về bệnh lý, tác nhân gây bệnh và các kỹ thuật phát hiện bệnh ở giai đoạn sớm. Trong bài viết này, các tác giả tổng hợp một số bệnh virus thường gặp trên cây cà chua kèm theo mô tả ngắn gọn về loài virus cùng với các triệu chứng điển hình. Đồng thời thảo luận về tiềm năng ứng dụng các phương pháp sinh học phân tử trong kiểm soát và chẩn đoán sớm một số nhóm virus gây bệnh hại chính trên cà chua, góp phần cung cấp những dẫn liệu cơ bản cho việc quản lý dịch bệnh do virus trên cây cà chua.

Từ khóa: **cà chua, chẩn đoán, dịch bệnh, LAMP, virus.**

Chỉ số phân loại: **4.1**

Mở đầu

Cà chua (*Solanum lycopersicum*) là cây rau giàu dinh dưỡng, cung cấp nhiều hợp chất quan trọng, đặc biệt là một số chất chống ôxy hóa như lycopene [1]. Tổng sản lượng cà chua xuất khẩu năm 2015 trên toàn thế giới đạt giá trị khoảng 1,3 tỷ USD (http://www.fao.org/faostat), riêng Việt Nam doanh thu xuất khẩu năm 2011 đạt 2,4 triệu USD) (Tổng cục thống kê, 2012). Mặc dù là loại cây trồng dễ canh tác, phổ sinh thái tương đối rộng, góp phần quan trọng trong việc nâng cao thu nhập và giải quyết vấn đề việc làm cho các nông hộ nhưng do nhiều nguyên nhân (chủ yếu là bệnh hại [2]), hiệu quả sản xuất cà chua ở Việt Nam chưa cao, có thời kỳ còn đi xuống (giai đoạn 2011-2014, giá trị xuất khẩu giảm từ 2,4 xuống 1,6 triệu USD - Tổng cục thống kê, 2012, 2015).

Bệnh hại trên cà chua chủ yếu gây ra bởi các tác nhân vi sinh vật, như vi khuẩn, nấm, tuyến trùng (nematode), phytoplasma và virus. Trong đó với đặc trưng khả năng lây lan cao, khó phát hiện triệu chứng ở giai đoạn sớm, bệnh do vius thường gây nên thiệt hại nặng nề [2]. Trong bối cảnh đó, nghiên cứu của chúng tôi tập trung vào việc tổng hợp một số bệnh hại virus chính trên đối tượng cà chua và các phương pháp chẩn đoán ở mức độ phân tử nhằm góp thêm khuyến cáo có ích cho sản xuất.

Một số bệnh hại chính do virus trên cà chua

Cà chua được sử dụng như loài tham chiếu cho chi *Solanum* và là cây mô hình hai lá mầm điển hình trong các nghiên cứu tương tác giữa cây trồng và tác nhân gây bệnh [3]. Điều này xuất phát từ thực tế, mặc dù là một trong những cây rau quan trọng hàng đầu thế giới nhưng sản xuất cà chua hiện nay đang bị ảnh hưởng nghiêm trọng bởi hàng loạt tác nhân gây bệnh [4]. Bên cạnh các tác nhân như nấm và vi khuẩn, rất nhiều loại virus gây bệnh đã được ghi nhận trên cây cà chua ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới. Cụ thể, có khoảng 136 loài virus đã được xác định trên cây cà chua, con số này cao hơn rất nhiều so với các loại cây rau khác, như hạt tiêu (*Piper nigrum*, 62 loài), khoai tây (*Solanum tuberosum*, 57 loài), xà lách (*Lactuca sativa*, 53 loài) [5]. Một số đối tượng gây bệnh trên cà chua điển hình có thể nhắc đến như virus khảm dưa chuột (*Cucumber mosaic virus* - CMV), virus khảm thuốc lá (*Tobacco mosaic virus* - TMV), virus đốm héo cà chua (*Tomato spotted wilt virus* - TSWV), bên cạnh một số virus thường gặp khác như khảm Y khoai tây (*Potato virus* Y), khảm cà chua (*Tomato mosaic virus* - ToMV), héo vàng lá cà chua (*Tomato yellow leaf curl virus* - TYLCV), *Pepino mosaic virus* (PepMV) và *Tomato torrado virus* (ToTV)... Hình ảnh mô tả triệu chứng của một số bệnh virus cà chua được thể hiện trên hình 1.

CMV là một trong những virus phổ biến nhất, gây hậu quả nghiêm trọng cho nhiều loại rau quả khác nhau, như cà rốt, dưa chuột, rau diếp, hạt tiêu và một số cây cảnh. CMV có dạng hình cầu, hạt virus không có vỏ, chứa khoảng 18% vật chất di truyền. Sự phong phú về số lượng loài cây chủ được coi là một nguồn lây lan CMV chủ yếu cho cây cà chua. Các triệu chứng bệnh do CMV trên cà chua có thể khác nhau tùy thuộc mức độ nghiêm trọng và thời gian nhiễm bệnh nhưng thường gặp các triệu chứng điển hình như: cây còi cọc và úa vàng hoặc lốm đốm lá. Đặc điểm đặc trưng nhất của bệnh này là trên lá xuất hiện các nếp nhăn nổi lên giống như dây giầy.

Virus TMV và ToMV là 2 loài rất gần gũi với nhau bởi chúng đều gây ra các triệu chứng tương tự ở các đối tượng cây chủ. Đây

*Tác giả liên hệ: Email: research@letiendung.info

Molecular methods for detection of viral diseases in tomato (*Solanum lycopersicum*)

Tuan Nam Vu[1, 2], Duc Ha Chu[3], Tien Dung Le[4*]

[1]*Center for Food and Bioconvergence, Seoul National University, South Korea*
[2]*Institute of Genome Research, VAST, Vietnam*
[3]*Faculty of Agricultural Technology, University of Engineering and Technology, Vietnam National University, Hanoi*
[4]*Faculty of Biotechnology, Nguyen Tat Thanh University, Vietnam*

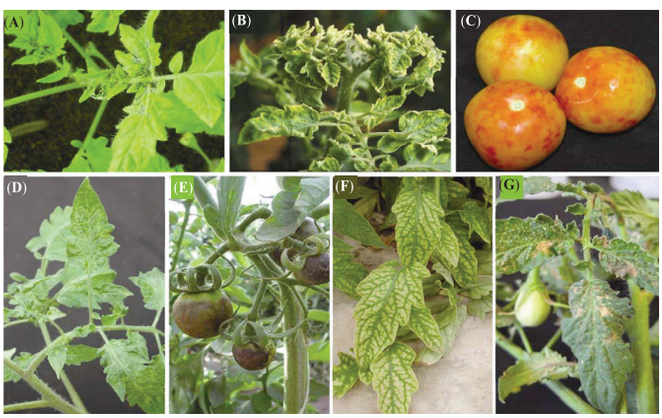
Received 14 May 2021; accepted 22 June 2021

Abstract:

The viral disease is one of the biggest challenges in tomato (*Solanum lycopersicum*) production. Although disease management is highlighted and seriously controlled in whole production areas, there are still many difficulties due to the lack of understanding of the symptoms, pathogens, and detection methods to control the viral disease at early stages. In this review, the authors summarised some major viral diseases in tomato plants with a brief of virus characteristics and their specific symptoms. Then the authors discussed the application of the molecular techniques, with a focus on loop-mediated isothermal amplification (LAMP), for the detection of tomato viral diseases in the early stages of infection, thereby providing a solid foundation for further improvement of virus-free tomato production.

Keywords: **diagnosis, disease, LAMP, tomato, virus.**

Classification number: **4.1**



Hình 1. Một số triệu chứng của cà chua bị nhiễm bệnh gây bởi virus. (**A**) Các đốm hoại tử ở gốc lá do virus ToTV gây ra; (**B**) Lá biến dạng, chuyển màu vàng và còi cọc do virus TYLCV; (**C**) Quả cà chua bị nhiễm bệnh gây ra bởi virus PepMV; (**D**) Các vòng bất thường xuất hiện trên lá bị nhiễm bệnh gây bởi Pelargonium zonate spot virus; (**E**) Quả bị hoại tử do Tomato marchitez virus; (**F**) Hiện tượng bạc lá gây ra bởi Tomato chlorosis virus; (**G**) Đốm hoại tử ở lá gây ra bởi Tomato necrotic spot virus.

là nhóm virus phổ biến cho dạng lây nhiễm do tiếp xúc. Virus TMV có dạng thẳng, khá tương đồng với ToMV, đều không có vỏ và phần nucleocapsid có hình gậy thẳng. Những virus này được coi là phổ biến, có phổ ảnh hưởng rộng, gây bệnh trên một số loại hoa, cỏ dại và các loại rau (như cà chua, hạt tiêu, cà tím). Cây cà chua bị nhiễm bệnh có các đặc trưng: xuất hiện một số đốm sáng màu xanh lá cây và màu xanh đậm trên lá, một số lá có thể bị cuộn tròn. Các triệu chứng khác có thể bao gồm cây còi cọc, quả chín không đều và giảm khả năng tạo quả, dẫn đến năng suất giảm. Những triệu chứng này có thể thay đổi tùy thuộc vào chủng virus, giống cà chua, thời gian lây nhiễm và điều kiện môi trường [6].

Virus TSWV, giống như các loại virus phổ biến khác, có thể lây nhiễm bệnh trên một số lượng lớn cây cảnh, cỏ dại và rau, trong đó cà chua chịu ảnh hưởng rất nghiêm trọng với đặc điểm đốm vàng ở lá non, các vệt tối trên thân và nâu ở ngọn [7]. Quả non thường xuất hiện đốm và phát triển thành các vòng màu vàng, quả trưởng thành thường có các đốm lớn màu trắng hoặc vàng, làm cho chúng khó có thể bán được, gây thiệt hại kinh tế cho người trồng [2]. Ngoài cà chua, virus này còn được coi là tác nhân gây bệnh cho hàng loạt cây trồng khác như đậu, lạc, rau diếp, thuốc lá, khoai tây và hạt tiêu [7].

Pepino mosaic virus, còn được gọi là PepMV, thuộc chi *Potexvirus*, họ *Flexiviridae*, được biết đến như tác nhân gây bệnh khảm xoăn lá phổ biến nhất trên cây cà chua. Cấu trúc điển hình của PepMV là có dạng sợi trần, thường được tìm thấy trong tế bào chất ở các mẫu tế bào lá. Triệu chứng của bệnh xoăn lá do PepMV gây ra là sự xuất hiện các vết khảm, đốm màu vàng, làm lá bị xoăn lại, sau đó thân cây, đôi khi cả cánh hoa xuất hiện các mảng màu nâu, đặc biệt quả chín thường xuất hiện đốm khảm với kích thước khác nhau. Mức độ biểu hiện của PepMV phụ thuộc rất nhiều vào thời tiết do virus này ưa thích điều kiện nhiệt độ và ánh sáng trong nhà kính. Hơn nữa, PepMV có thể tồn tại trong thời gian dài trong hạt và quả, đây được xem như nguyên nhân chính mà bệnh khảm xoăn lá dễ dàng phát tán trên các cây non.

Một số loài virus mới thuộc lớp Torradovirus, đặc trưng bởi các triệu chứng lá bị hoại tử nghiêm trọng [2] cũng đã được ghi nhận. Triệu chứng bệnh ban đầu là các đốm hoại tử được bao quanh bởi một khu vực màu xanh lá cây hoặc màu vàng nhạt xuất hiện ở cuống lá, sau đó lớn dần lên và trở nên rõ ràng hơn dưới dạng các vết bỏng hình 1A). Trong giai đoạn sau, lá và quả bị hoại tử, sinh trưởng của cây bị ngừng trệ dẫn đến thiệt hại kinh tế nghiêm trọng [8]. Tên ToTV đã được đề xuất như một loài mới, dựa trên mô tả về triệu chứng đặc trưng như vết bỏng trên lá, quả của cây cà chua bị nhiễm bệnh [8]. Từ năm 2003, một bệnh gây ra các triệu chứng hoại tử rất giống nhau ở lá, thân và quả đã được quan sát thấy ở cây cà chua Mexico, với tên gọi địa phương là bệnh héo úa. Nguyên nhân ban đầu được cho là do TSWV thuộc chi Tospovirus, mặc dù virus này không thể được phát hiện trong các cây có triệu chứng. Tuy nhiên, khi soi dưới kính hiển vi điện tử, người ta quan sát thấy sự hiện diện của một loài virus khác với các virus được mô tả trước đó và được đề xuất đặt tên là *Tomato apex necrosis virus* (ToANV) [2]. Bên cạnh đó, trong những thập kỷ qua, các loài virus thuộc chi *Crinillin* spp. trở thành vấn đề nghiêm trọng trong sản xuất cà chua, điển hình là *Tomato chlorosis virus* (ToCV) [9] và *Tomato*

infectious chlorosis virus (TICV) [10]. TICV lần đầu tiên được xác định trên các cây cà chua bị bệnh vàng lá trồng tại ruộng vào năm 1993 ở California, với thiệt hại ước tính 2 triệu USD trong năm đó [11]. Ban đầu bệnh được gọi là rối loạn lá vàng do rối loạn dinh dưỡng hoặc nhiễm độc tế bào do thuốc trừ sâu gây nên bởi các phân tích ban đầu không phát hiện sự hiện diện của virus.

Tác nhân virus gây bệnh mới được phát hiện ở cây cà chua

Các tác nhân virus gây bệnh mới trên cây trồng trong đó có cà chua thường xuất hiện do sự thay đổi môi trường, vectơ, vật chủ hoặc cấu trúc hệ gen của virus. Bên cạnh đó, sự phát triển về giao lưu thương mại quốc tế và biến đổi khí hậu cũng được coi là những tác nhân quan trọng. Gần đây, một loại virus gây bệnh mới xuất hiện có thể dẫn đến sự lây lan rộng hơn trong các nhà kính và tại các vườn đã được ghi nhận và mô tả từ các nước Jordan, Israel, Mexico, Hoa Kỳ, Đức, Ý, Palestine, Thổ Nhĩ Kỳ và Trung Quốc là *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) thuộc giống Tobamovirus [12-22]. Salem và cs (2016) [13] là người đầu tiên báo cáo sự bùng phát của ToBRFV trên cây cà chua trong nhà kính vào năm 2015 từ Jordan. Tuy nhiên, sự xuất hiện đột ngột của bệnh này ở các nước hiện đang có bệnh vẫn chưa được hiểu rõ, có thể các triệu chứng thể hiện còn xa lạ. Cây cà chua là vật chủ chính của ToBRFV vì một số nông dân ưa thích các giống cà chua trồng ở miền bắc Palestine [20] có khả năng chứa loại virus này và cũng có thể chúng truyền qua con đường hạt giống khi trồng trong nhà kính ở các nước Bắc Âu. Tuy nhiên, các công bố hiện tại cho thấy căn bệnh mới này có khả năng lây truyền cơ học theo nhựa cây bị nhiễm bệnh thông qua nhiều con đường như bám dính vào cơ thể con người, quần áo, chậu, bao bì, vật liệu vận chuyển cũng như các dụng cụ làm việc và dung dịch dinh dưỡng [23].

Bên cạnh đó, 2 loại virus mới được phân lập từ cà chua trồng ở miền bắc Brazil (*Solanum lycopersicum*) cũng đã được đề xuất đặt tên là *Hibiscus golden mosaic virus* (HGMV) và *Tomato chlorotic leaf curl virus* (ToCLCV) thuộc giống Begomovirus (họ *Geminiviridae*), một nhóm tác nhân gây ra các bệnh nghiêm trọng trên một số loại cây trồng có tầm quan trọng về kinh tế trên toàn thế giới [24].

Tóm lại, biểu hiện bệnh do virus rất phức tạp và khó có thể phân biệt, nhất là ở giai đoạn ủ bệnh. Việc kiểm soát sự phát tán của virus không đơn giản, do chúng có khả năng tồn tại cao và dễ dàng tạo ra các biến chủng mới. Vấn đề này thách thức các nhà khoa học tạo ra giống cà chua kháng bệnh virus, cũng như phát triển các kỹ thuật chẩn đoán bệnh ở giai đoạn sớm. Thực tế cho thấy, công tác kiểm soát dịch bệnh do virus bằng các biện pháp kỹ thuật truyền thống đang gặp rất nhiều khó khăn. Vì thế, những ưu việt của phương pháp sinh học phân tử hiện đại mang lại đã cho phép việc chẩn đoán được chính xác hơn, ở giai đoạn sớm hơn, nhờ đó kiểm soát được mức độ lây lan của bệnh hại cà chua do virus gây ra.

Chẩn đoán bệnh virus trên cà chua bằng phương pháp sinh học phân tử

Triệu chứng bên ngoài của bệnh do virus rất khó phát hiện, đặc biệt là chúng có thể lây lan trong hệ thống nhà kính cũng như qua hạt của cây bị nhiễm bệnh. Chẩn đoán sớm được xem là nền tảng cơ bản cho công tác quản lý dịch bệnh cũng như đưa ra những dự báo chính xác về thiệt hại do bệnh gây ra. Mặt khác, khi bệnh virus đã xuất hiện và lây lan trên đồng ruộng, các biện pháp xử lý thông thường rất ít có hiệu quả nên việc kiểm soát tác nhân virus luôn được ưu tiên hàng đầu. Đã có nhiều phương pháp chẩn đoán bệnh áp dụng trên đối tượng cà chua như sử dụng cây chỉ thị, chỉ thị màu, dựa vào triệu chứng, nhưng nhìn chung những kỹ thuật này tỏ ra kém hiệu quả với tác nhân gây bệnh virus. Gần đây, có hai cách tiếp cận phổ biến để giải bài toán chẩn đoán bệnh virus một cách chính xác là phương pháp kháng huyết thanh (serological method) và phân tử (molecular method) [25].

Dựa trên nguyên lý sử dụng kháng thể đặc hiệu để nhận biết kháng nguyên, một số kỹ thuật chẩn đoán đã được ghi nhận như phương pháp miễn dịch liên kết enzym (Enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA), phân tích miễn dịch học mô mẫu (Tissue blot immunoassay - TBIA), cảm biến miễn dịch tinh thể thạch anh (Quartz crystal microbalance immunosensor - QCM), trong đó, phương pháp ELISA tỏ ra hiệu quả do thao tác khá đơn giản, nhanh chóng, tiện lợi, có thể thương mại hóa thành bộ kit [25]. Theo đó, một số virus gây bệnh chính trên cà chua, như PepMV, CMV, TMV, ToMV, PVY và PVMV [26-30] đã được phát hiện và xác định trên các mẫu lá, hạt bằng kỹ thuật ELISA (bảng 1). Tương tự, TBIA cũng sử dụng kháng thể chống lại virus, nhờ vào mẫu dò đã được đánh dấu để phát hiện sự có mặt của virus. Phương pháp TBIA cũng có các ưu điểm nhanh, nhạy, đơn giản (không cần dịch chiết của virus) và cũng có thể phát triển thành bộ kit [25]. Gần đây, kỹ thuật mới QCM cũng đã được phát triển với mục tiêu giảm bớt thời gian thao tác nhằm phát hiện bệnh virus một cách chính xác với độ nhạy rất cao. Mặc dù các phương pháp này rất thông dụng nhưng độ chính xác lại phụ thuộc khá lớn vào lớn yếu tố, như chất lượng kháng thể, mẫu, thời gian lây bệnh và hóa chất.

Bảng 1. Tóm lược thành tựu trong chẩn đoán một số virus gây bệnh chính trên cà chua bằng kỹ thuật ELISA và LAMP.

TT	Tên virus	Kỹ thuật chẩn đoán		Nguồn
		ELISA	*LAMP*	
1	PepMV	+	+	[26]
2	CMV	+	+	[27, 31]
3	TMV	+	+	[28, 32]
4	ToMV	+	+	[6, 28]
5	PVY	+	+	[29, 33]
6	PVMV	+	-	[30]

Bên cạnh đó, chẩn đoán bệnh thông qua việc phát hiện vật chất di truyền đặc trưng của virus (DNA hoặc RNA) bằng kỹ thuật sinh học phân tử cũng đã thu được nhiều kết quả tích cực trong việc phát hiện sớm sự có mặt của virus trên mẫu cà chua. Đại diện cho nhóm phương pháp chuẩn đoán bệnh virus cà chua theo hướng này có thể kể đến như PCR với chỉ thị RFLP truyền thống, PCR lồng (Nested PCR), RT-PCR (Reverse-transcription PCR). Nhìn chung, các kỹ thuật này cũng gặp phải một số vấn đề như chi phí cao, đòi hỏi trang thiết bị hiện đại, trong khi sự tạp nhiễm có thể dẫn đến kết quả dương tính giả [34]. Vì thế, một trong những mối quan tâm hàng đầu hiện nay là việc chẩn đoán bệnh hại cây cà chua nói riêng

và cây trồng nói chung bằng các kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại với tiêu chí chẩn đoán nhanh, dễ thao tác, giá thành thấp nhưng vẫn phải đạt độ chính xác cao.

Kỹ thuật đầu tiên được đề cập là khuếch đại vòng tròn cuốn (Rolling circle amplification - RCA) để nhân các trình tự DNA mạch vòng trên nguyên lý chung là dùng enzyme DNA polymerase của thực khuẩn thể ϕ29 và mồi hexamer để nhân các phân tử DNA mạch vòng thành các multimer mạch thẳng, mang nhiều đoạn DNA sợi đơn (single-strained DNA - ssDNA) của virus. Sản phẩm RCA sau đó được cắt bằng enzym cắt giới hạn thích hợp trong điều kiện không triệt để tạo thành nhiều phân mảnh chứa trình tự 1 bộ gen (monomer), 2 bộ gen (dimer) và nhiều bộ gen (multimer) của virus. Bằng cách này, RCA tỏ ra ưu việt hơn so với phương pháp PCR truyền thống. Năm 2006, các nhà khoa học đã thành công trong việc phát hiện một số virus gây bệnh, trong đó có *Tomato golden mosaic virus*, *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) ở nồng độ chỉ từ 1 đến 50 pg trong 50 ng mẫu DNA. Gần đây, một số nhóm nghiên cứu khác cũng đã xây dựng hoàn chỉnh phương pháp RCA để xác định sự có mặt của TYLCV [35].

Tiếp theo, kỹ thuật RT-PCR cũng được sử dụng nhiều ở quy mô phòng thí nghiệm nhằm tổng hợp DNA trên khuôn mẫu RNA virus. Kỹ thuật RT-PCR không chỉ giúp ích cho việc chẩn đoán bệnh virus mà sản phẩm khuếch đại của RT-PCR cũng được sử dụng để giải trình tự, từ đó có thể nghiên cứu sâu hơn về các dòng virus gây bệnh. RT-PCR được ứng dụng trong việc phát hiện *Southern tomato virus* (STV), một loại virus RNA sợi kép (dsRNA) thuộc giống Amalgavirus (họ *Amalgamaviridae*) trên cây cà chua với độ nhạy từ 10^4 đến 10^{11} bản sao của STV trên mỗi nanogram RNA tổng số. STV được phát hiện trong các mô cây cà chua khác nhau, cũng như trong vỏ và phôi hạt với nồng độ virus không thay đổi theo thời gian trong các mô lá. Kỹ thuật RT-qPCR có thể được sử dụng trong các chương trình vệ sinh để hạn chế sự lây lan của virus và trong nghiên cứu ảnh hưởng của STV ở các bệnh nhiễm trùng hỗn hợp hoặc các điều kiện căng thẳng phi sinh học [36]. Phương pháp RT-PCR cũng tỏ ra cực kỳ hiệu quả trong khả năng nhận dạng và xác định ToBRFV. Hầu hết các điểm bùng phát ToBRFV tại Mexico, Hoa Kỳ, Đức, Italya, Palestine, Thổ Nhĩ Kỳ và Trung Quốc (được nêu ở phần trên) đều có thể được xác định bằng kỹ thuật RT-PCR [15-22].

Với ưu điểm trội so với PCR truyền thống, kỹ thuật tổng hợp DNA vòng, còn gọi là LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) được sử dụng rộng rãi trong chẩn đoán tác nhân gây bệnh trên cây trồng nói chung. Cho đến nay, khoảng 20% tác nhân gây bệnh đã được xác định thông qua kỹ thuật LAMP, trong đó có ít nhất 50 loại virus thực vật. Nguyên tắc chung của LAMP là sử dụng 4 mồi khác nhau, bao gồm FIP (Forward inner primer), F3 (Forward outer primer), BIP (Backward inner primer) và B3 (Backward outer primer) được thiết kế đặc hiệu để nhận biết 6 trình tự riêng biệt trên gen đích. Quá trình khuếch đại gen có thể được thực hiện trong một bước bằng cách ủ hỗn hợp mẫu DNA, mồi, *Bst* DNA polymerase ở nhiệt độ thích hợp [37]. Ưu điểm của phương pháp này là hiệu quả khuếch đại gen rất cao (10^9-10^{10} lần) trong khi thời gian phản ứng ngắn (45-60 phút), và nhiệt độ phản ứng chỉ dao động trong khoảng 60-65°C. Điều này cho phép kỹ thuật LAMP có thể được tiến hành ngay trong điều kiện ruộng thí nghiệm với một số thiết bị gia nhiệt cần thiết. Cho đến nay, các nhà khoa học đã thành công trong việc xác định một loạt virus gây bệnh trên cà chua bằng kỹ thuật LAMP và RT-LAMP (reverse-transcription LAMP), như CMV, TMV [31, 32]. Gần đây, các bệnh hại *Tomato back ring virus* [38], *Tomato chlorosis virus* [10], *Tomato torrado virus* [39], *Southern tomato virus* [40], *Chrysanthemum stem necrosis virus* [41] cùng nhiều bệnh virus cà chua khác cũng đã được phát hiện bằng kỹ thuật này (bảng 1). Các chỉ thị phân tử được sử dụng để phát hiện các tác nhân virus gây bệnh phổ biến trên cây cà chua được tóm tắt ở bảng 2.

Bảng 2. Các đoạn mồi phân tử được sử dụng để nhận biết các tác nhân gây bệnh trên cà chua.

Tên mồi	Trình tự mồi	Mục tiêu	Phương pháp	Nguồn
TMV330F	TCAAACACARCAAGC	ToMV, TMV, Pepper mild mottle virus (PMMoV)	RT-PCR	[28]
TMV685R	AGGTCCARACCAMCCCAG			
ToMV5723F	CTCCATCGCAATTTGTG			
ToMV6153R	CCCAGACATACTTTC			
PMMoV5543F	GGTCAGTGCCGAACAAG			
PMMoV6012R	CGTCTACTCTACGAGTAGC			
CMV II (F)	CTACGTTTATCTTCC	CMV subgroup II	Multiplex RT-PCR	[42]
CMV II (R)	AACCGGTGATTTACCATCGC			
CMV I (F)	GCCACCAAAAATAGACCG	CMV subgroup I		
CMV I (R)	ATCTGCTGGCGTGGATTTCT			
TMV (F)	CGATGATGATTCGGAGGC	TMV		
TMV (R)	GAGGTCCARACCAAMCCAG			
ToMV (F)	CATCTGTATGGGCTGAC	ToMV		
ToMV (R)	GAGGTCCARACCAAMCCAG			
F3	GATGATCTCTAGAATTGTTATTTGG	Chrysanthemum stem necrosis virus (CSNV)	RT-LAMP	[41]
B3	GTTGGCAGCAGTTTTCTG			
FIP	GCATGTTTGGATCTACCAGTGC GT CTGCCCTACTATTCCG			
BIP	TTGAAAGGTCAAGGCACTATAACA GTGTTATTCATTTTTGGTATAGACC			
F-loop	GCCATCAATTTGCCAGTTGG			
B-loop	GATCCTATCTGTTTTGTGTT			
CSNV-N5	GAGCGACTGCGGAATACTCT	Chrysanthemum stem necrosis virus (CSNV)	RT-PCR	[43]
CSNV-N3	GACACACTTTAAATCTTTAACACACC			
FIP	TGGTGAGGACAATACCCAGTGTACA ACAATCCTACTTTCACTC	PepMV	one-step RT-LAMP	[44]
BIP	TCAATCAGTGCCAGGTCATCATTAA GAACTTCGGG TGTG			
Loop F	GTATGAGGACATTAAGCTTGTTTCC			
Loop B	GACGGTGCAGCCATAGTTA			
F3	TCAAGACGGAACTAAGAAG			
B3	AACTTAACCCGTTCCAAG			
ToCVF3	CTGCCTCATCTCATTTGATG	Tomato chlorosis virus	RT-LAMP, RT-PCR	[10]
ToCVB3	GTTTCATACTGTCCGGTCT			
ToCVFIP	GTTCTGTGCAAAAATTGCATCC G TCAACGATTTTATGTCAGTGG			
ToCVBIP	ACCTGTTGAGAAGATGGTCCTT GCCAAGAATTTTCGAGACA			

PA	TAATATTACCKGWKGVCCSC	Tomato yellow leaf curl virus	PCR	[45]
PB	TGGACYTTRCAWGGBCCTTCACA			
F3	ATACGACATAGGAGAAACTGA	Potato virus Y	RT-LAMP RT-PCR	[46]
B3	ACGCTTCTGCAACATCTGAG			
FIP	GTTTGGCGAGGTTCCATTTTCTG TGATGAATGGGCTTATGGT			
BIP	TGAAACCAATCGTTGAGAATGA TGTGCCATGATTTGCCTAAG			
Y3S	ACGTCCAAAATGAGAATGCC			
Y4A	TGGTGTTCGTGATGTGACCT			
PVY 1F	AAATGACACAATTGATGCAGGAG	Potato virus Y	RT-PCR, SSCP	[29]
PVY 1R	TAAAAGTAGTACAGGAAAAGCCA			
PVY 2F	ACGTCMAAAATGAGAATGCC			
PVY 2R	CATTTGWATGTGCGCTTCC			
F3_Vp35	ACCAACCCATATCCTCCC	Tomato torrado virus	RT-LAMP	[39]
B3_Vp35	CCTTACAGCTTCATTGGCA			
FIP_Vp35	GCCTGCTCCTTTGCCACATTGAT TGTTATGATGGCTTAACG			
BIP_Vp35	GTGGCCCAAACTAGTGTGGAAT TCATGCTATCCACACTGC			
LoopF_Vp35	CTCTAGCTCACTGCGAACTT			
LoopB_Vp35	ATACCATCCACCTCATTCGC			
F3-CP	GAGACTCAGAGGAATGACATG	Southern tomato virus	RT-LAMP	[40]
B3- CP	CCTCCTTGACTTGCTTCC			
FIP-CP	TTGGTTGCGATCAAGTCCTCC GAGGAGGAGATCGCTGAT			
BIP-CP	GAGCCTGTTAGCCGGTATGTGG GGTTGAACTGCTGGTAAA			
LoopF-CP	CGCTTGACAATCTTACGCTG			
LoopR-CP	TGAGTGACTACGAGTTGAACTG			
CPF	GCCTGTCTCTCTCGCAATG	Tomato black ring virus	RT-LAMP RT-PCR	[38]
CPR	AAGGAG CCAAACTGAAATG			
FIP	GGTTTCTGGTGCTAGG GGTGC ACGGCAAATTTTGGGGA			
BIP	ACATATCCATGGTATAAAGGCCAA G-CCAA GCAAAATGCTGGTTA			
F3	ACTCTGCAAATACAGTCTCC			
B3	TGTATCGAGATGCTCAAGC			
F3 SF371	TGCAGTCCGTTGAGGAAAC	Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)	LAMP PCR	[47]
B3 SF372	CCTGTACGTCCATGATCGTC			
FIP SF373	AGTCACGGGCCCTTACAACAGCC CAATACATTGGGCCACG			
BIP SF374	CTCGAAGGTTCGCCGAAGGCGA CAATGGGGACAGCAGC			
F3 SF448	GAGCCTCTGACTTACTGCC			
B3 SF449	CATCCAAACATTCAGGGAGC			
FIP SF450	GACGGACGATCTGCACGTGGAG TTAAGAGCTGCGGCGTA			
BIP SF451	GAAACTCACCCCAGTCGACGG ATCCAGTTCAGACGTCAAGT			
F3 SF432	GCATGTTGAAATGAATCGGTG			
B3 SF433	CATCTGTGTAACCCTCGTG			
FIP SF434	ACCAAATAGCCATTAGGTGTCCA ATCCCTCAAAGCTCTATGGCAAT			
BIP SF435	CAAATCATTAAAGCGGCCATCCG TCCACATAAAAGGAAAAGGCG			
SF301	GTCTTATGAGCAACGGGATG			
SF303	GAACATGACCTGATTAGTGTG			

Kết luận

Hiện có hơn 136 loài virus gây bệnh trên cây cà chua cùng với các triệu chứng điển hình đã được phát hiện và mô tả chi tiết, nhưng việc nhận dạng và phân biệt chúng bằng mắt thường tương đối khó, nhất là ở giai đoạn ủ bệnh. Việc ứng dụng các kỹ thuật sinh học phân tử để chẩn đoán bệnh chính xác ở giai đoạn sớm kết hợp chọn tạo các giống kháng để quản lý dịch hại, giảm thiểu khả năng lây lan vốn rất mạnh của virus, do vậy có tính cấp thiết rõ rệt.

Trong lĩnh vực chẩn đoán bệnh hại trên cây trồng nói chung, cây cà chua nói riêng, các phương pháp PCR truyền thống, RT-PCR hiện đại và LAMP đã thu được những thành công nhất định với tiêu chí ưu tiên là phát hiện sớm, chi phí thấp, dễ thao tác ngoài thực tế, độ chính xác cao và không đòi hỏi máy móc phức tạp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] E. Elbadrawy, A. Sello (2016), "Evaluation of nutritional value and antioxidant activity of tomato peel extracts", *Arab. J. Chem.*, **9**, pp.1010-1018.

[2] K.B. Scholthof, et al. (2011), "Top 10 plant viruses in molecular plant pathology", *Mol. Plant Pathol.*, **12**, pp.938-954.

[3] C. Gebhardt (2016), "The historical role of species from the *Solanaceae* plant family in genetic research", *Theor. Appl. Genet.*, **129**, pp.2281-2294.

[4] V.K. Singh, et al. (2017), "Disease management of tomato through PGPB: current trends and future perspective", *3 Biotech*, **7**, DOI: 10.1007/s13205-017-0896-1.

[5] C. Xu, et al. (2017), "Diversity, distribution, and evolution of tomato viruses in China uncovered by small RNA sequencing", *J. Virol.*, **91**, DOI: 10.1128/JVI.00173-17.

[6] T. Watanabe, M. Furukawa (2008), "An assay for detection of *Tobacco mosaic virus* and *Tomato mosaic virus* from their infected tomato (*Lycopersicon esculentum*) leaves by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)", *Bulletin of the Fukui Agricul. Exp. Stat.*, **48**, pp.43-47.

[7] R. Gupta, et al. (2018), "An insight into the Tomato spotted wilt virus (TSWV), tomato and thrips interaction", *Plant Biotech. Rep.*, **12**, pp.157-163.

[8] M. Verbeek, et al. (2007), "Identification and characterisation of *tomato torrado virus*, a new plant picorna-like virus from tomato", *Arch. Virol.*, **152**, pp.881-890.

[9] E. Fiallo-Olivé, J. Navas-Castillo (2019), "Tomato chlorosis virus, an emergent plant virus still expanding its geographical and host ranges", *Mol. Plant Pathol.*, **20**, pp.1307-1320.

[10] R.N. Zhao, et al. (2013), "First report of *Tomato chlorosis virus* in China", *Plant Disease*, **97**, DOI: 10.1094/PDIS-12-12-1163-PDN.

[11] J. Duffus, et al. (1994), "Lettuce chlorosis virus - a new whitefly-transmitted closterovirus in the southwest", *Phytopathology*, **84**, pp.591-596.

[12] J.O. Oladokun, et al. (2019), "Tomato brown rugose fruit disease: current distribution, knowledge and future prospects", *Plant Pathol.*, **68**, pp.1579-1586.

[13] N. Salem, et al. (2016), "A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan", *Arch. Virol.*, **161**, pp.503-506.

[14] N. Luria, et al. (2017), "A new Israeli tobamovirus isolate infects tomato plants harboring *Tm-2*^{2} resistance genes", *PLOS ONE*, **12**, p.0170429.

[15] J.M. Cambrón Crisantos, et al. (2018), "First report of *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) in Michoacan, Mexico", *Revista Mexicana De Fitopatología*, **37**, pp.185-192.

[16] https://blogs.cdfa.ca.gov/Section3162/?p=5843.

[17] K.S. Ling, et al. (2019), "First report of Tomato brown rugose fruit virus infecting greenhouse tomato in the US", *Plant Disease*, **103**, DOI: 10.1094/PDIS-01-20-0212-PDN.

[18] W. Menzel, et al. (2019), "First report of Tomato brown rugose fruit virus infecting tomato in Germany", *New Disease Reports*, **39**, DOI: 10.5197/j.2044-0588.2019.039.001.

[19] S. Panno, et al. (2019), "First report of tomato brown rugose fruit virus on tomato crops in Italy", *Plant Disease*, **103**, DOI: 10.1094/PDIS-12-18-2254-PDN.

[20] R. Alkowni, et al. (2019), "Molecular identification of tomato brown rugose fruit virus in tomato in Palestine", *J. Plant Pathol.*, **101**, pp.719-723.

[21] https://www.hortidaily.com/article/9109530/first-report-of-tomato-brown-rugose-fruit-virus-on-tomato-in-turkey/#:~:text=USD%3A%201.2142-,First%20report%20of%20Tomato%20brown%20rugose%20fruit%20virus%20on%20tomato,their%20magazine%20New%20Disease%20Reports.

[22] Z.Y. Yan, et al. (2019), "First report of tomato brown rugose fruit virus infecting tomato in China", *Plant Disease*, **103**, DOI: 10.1094/PDIS-05-19-1045-PDN.

[23] A. Wilstermann, H. Ziebell (2019), "Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV)", *JKI Data Sheets - Plant Diseases and Diagnosis*, **2019**, pp.1-4.

[24] A.F.F. Quadros, et al. (2019), "Two new begomoviruses infecting tomato and *Hibiscus* sp. in the Amazon region of Brazil", *Arch. Virol.*, **164**, pp.1897-1901.

[25] J.J. Jeong, H.J. Noh (2014), "A review of detection methods for the plant viruses", *Res. Plant Disease*, **20**, pp.173-181.

[26] A. Salomone, P. Roggero (2002), "Host range, seed transmission and detection by ELISA and lateral flow on an Italian isolate of *pepino mosaic virus"*, *J. Plant Pathol.*, **84**, pp.65-68.

[27] H. Eryigit (2006), "Identification of *Cucumber mosaic virus* in tomato (*Lycopersicon esculentum*) growing areas in the north-west Mediterranean region of Turkey AU - Yardimci", *NZ J. Crop. Hortic. Sci.*, **34**, pp.173-175.

[28] J.E.M. Almeida, et al. (2018), "Procedure for detecting tobamovirus in tomato and pepper seeds decreases the cost analysis", *Bragantia*, **77**, pp.590-598.

[29] J. Aramburu, et al. (2006), "Characterization of potato virus Y isolates from tomato crops in northeast Spain", *Eur. J. Plant Pathol.*, **115**, pp.247-258.

[30] A. Ahmad, M. Ashfaq (2016), "First report of Chilli veinal mottle virus in tomato in Pakistan", *J. Plant Pathol.*, **99**, pp.1-13.

[31] A.I. Bhat, et al. (2013), "Rapid detection of *Piper yellow mottle virus* and *Cucumber mosaic virus* infecting black pepper (*Piper nigrum*) by loop-mediated isothermal amplification (LAMP)", *J. Virol. Methods*, **193**, pp.190-196.

[32] Y. Liu, et al. (2010), "Rapid detection of *Tobacco mosaic virus* using the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method", *Arch. Virol.*, **155**, pp.1681-1685.

[33] K. Treder, et al. (2017), "Detection of *Potato virus Y* (PVY) by reverse-transcription loop-mediated nucleic acid amplification (Rt-LAMP)", *Plant Breed Seed Sci.*, **75**, pp.77-85.

[34] D.T. Le, N.T. Vu (2017), "Progress of loop-mediated isothermal amplification technique in molecular diagnosis of plant diseases", *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **60**, pp.169-180.

[35] B. Bang, et al. (2014), "A rapid and efficient method for construction of an infectious clone of *Tomato yellow leaf curl virus*", *Plant Pathol. J.*, **30**, pp.310-315.

[36] L. Elvira-Gonzalez, et al. (2018), "A sensitive real-time RT-PCR reveals a high incidence of Southern tomato virus (STV) in Spanish tomato crops", *Span. J. Agric. Res.*, **16(3)**, DOI: 10.5424/sjar/2018163-12961.

[37] K. Nagamine, et al. (2002), "Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers", *Mol. Cellul. Probes.*, **16**, pp.223-229.

[38] B. Hasiow-Jaroszewska, et al. (2015), "Rapid detection of genetically diverse *Tomato black ring virus* isolates using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification", *Arch. Virol.*, **160**, pp.3075-3078.

[39] M. Budziszewska, et al. (2016), "One-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for detection of *Tomato torrado virus*", *Arch. Virol.*, **161**, pp.1359-1364.

[40] L. Elvira-Gonzalez, et al. (2016), "Fast detection of *Southern tomato virus* by one-step transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)", *J. Virol. Methods*, **241**, pp.11-14.

[41] R. Suzuki, et al. (2016), "Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay as a simple detection method of *chrysanthemum stem necrosis virus* in chrysanthemum and tomato", *J. Virol. Methods*, **236**, pp.29-34.

[42] S. Chen, et al. (2011), "Multiplex RT-PCR detection of *Cucumber mosaic virus* subgroups and Tobamoviruses infecting Tomato using 18S rRNA as an internal control", *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, **43**, pp.465-471.

[43] M. Takeshita, et al. (2011), "Molecular and biological characterization of *Chrysanthemum stem necrosis virus* isolates from distinct regions in Japan", *Eur. J. Plant. Pathol.*, **131**, pp.9-14.

[44] B. Hasiow-Jaroszewska, N. Borodynko (2013), "Detection of *Pepino mosaic virus* isolates from tomato by one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification", *Arch. Virol.*, **158**, pp.2153-2156.

[45] Y. Xie, et al. (2013), "Highly sensitive serological methods for detecting *Tomato yellow leaf curl virus* in tomato plants and whiteflies", *Virol. J.*, **10**, p.142.

[46] X. Nie, R.P. Singh (2001), "A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves, and tubers", *J. Virol. Methods*, **91**, pp.37-49.

[47] S. Fukuta, et al. (2003), "Detection of *Tomato yellow leaf curl virus* by loop-mediated isothermal amplification reaction", *J. Virol. Methods*, **112**, pp.35-40.

DOI: 10.31276/VJST.63(9).54-58

Nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng trong quá trình sản xuất bột dinh dưỡng ăn liền từ ốc gai *Indothais lacera* (Born, 1778)

Lê Doãn Dũng*, Đặng Thị Yến, Vũ Thị Hường, Nguyễn Thị Hồng Ngọc, Phan Thị Thùy Dương, Phạm Bảo Huyền Linh, Quách Tú Mỹ

Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 18/6/2021; ngày chuyển phản biện 23/6/2021; ngày nhận phản biện 26/7/2021; ngày chấp nhận đăng 2/8/2021

Tóm tắt:

Ốc gai *Indothais lacera* (Born, 1778) phân bố dọc theo các rạn san hô, rạn đá ven bờ từ Bắc vào Nam ở vùng biển Việt Nam. Hiện nay, phần lớn loài ốc gai này đang được sử dụng để chế biến thành những món ăn đơn giản, thông thường nên giá trị kinh tế chưa cao. Nghiên cứu này nhằm mục đích khảo sát một số điều kiện tối ưu trong quy trình sản xuất bột dinh dưỡng ăn liền từ ốc gai để đa dạng hóa sản phẩm thực phẩm, mang lại giá trị kinh tế cao cho loài ốc này. Nghiên cứu đã bố trí các thí nghiệm khảo sát điều kiện luộc và sấy, sau đó tiến hành phân tích một số chỉ tiêu dinh dưỡng chủ yếu của thịt ốc sau khi luộc, sấy. Kết quả cho thấy, khi sử dụng acid phosphoric để điều chỉnh pH nước luộc thì pH nước luộc phù hợp nhất là 5,5, thời gian luộc là 5 phút tính từ khi nước sôi. Với điều kiện đó, hàm lượng protein của thịt ốc sau khi luộc là 64,18±4,23%. Thịt ốc sau khi luộc được thái nhỏ và tiến hành sấy. Điều kiện sấy phù hợp nhất là ở 50°C trong khoảng thời gian 15h. Ở điều kiện sấy này, thịt ốc sau khi sấy có hàm lượng protein và vitamin C cao nhất, lần lượt đạt 66,07±4,81% và 0,66±0,036 mg/g. Độ ẩm sau khi sấy là 4,28±0,48%, phù hợp để sản xuất bột dinh dưỡng ăn liền.

Từ khóa: **ăn liền, bột dinh dưỡng, *Indothais lacera*, ốc gai.**

Chỉ số phân loại: **4.5**

Mở đầu

Trong xã hội phát triển ngày nay, bột dinh dưỡng ăn liền ngày càng trở thành một sản phẩm thực phẩm ưa thích của người tiêu dùng ở nhiều quốc gia trên thế giới. Với ưu điểm của bột dinh dưỡng ăn liền là chỉ cần rất ít thời gian chuẩn bị nhưng vẫn đảm bảo đủ thành phần dinh dưỡng thiết yếu cho nhu cầu hàng ngày, đã có nhiều sản phẩm bột dinh dưỡng ăn liền được sản xuất và trao đổi trên thị trường. Bên cạnh đó, từ trước tới nay có nhiều đề tài nghiên cứu trong và ngoài nước đã và đang được thực hiện với mong muốn tìm ra quy trình chế biến bột dinh dưỡng ăn liền từ các nguồn nguyên liệu khác nhau nhằm đa dạng hóa sản phẩm thực phẩm, đáp ứng nhu cầu của con người [1-5].

Ốc biển là loại sinh vật có hàm lượng dinh dưỡng cao. Hàm lượng protein trong ốc gai *Chicoreus ramosus* đạt 14,35%, ốc mỏ vịt *Hemifusus puliginus* 6,09%; hàm lượng carbohydrate của 2 loài ốc này lần lượt là 4,82 và 4,12%... [3]. Tuy nhiên, cho đến nay có rất ít đề tài nghiên cứu sản xuất bột dinh dưỡng ăn liền từ ốc biển [6, 7]. Một số công trình nghiên cứu tiêu biểu trên thế giới như nghiên cứu sản xuất bột dinh dưỡng từ loài *Chicoreus ramosus* [2], *Lambris lambris* [4]... Ở nước ta hiện nay chưa có một sản phẩm bột dinh dưỡng ăn liền nào được sản xuất từ nguyên liệu ốc biển.

Biển Việt Nam có trữ lượng ốc biển được đánh giá là tương đối lớn [8, 9]. Phần lớn ốc biển được sử dụng để chế biến thành những món ăn đơn giản, thông thường nên chưa đa dạng hóa được các loại sản phẩm thực phẩm từ ốc biển. Nhiều loài ốc có giá trị dinh dưỡng cao (protein, vitamin, chất khoáng…) nhưng chưa được sử dụng hoặc sử dụng chưa đúng cách để mang lại lợi nhuận kinh tế cao, trong đó ốc gai *I. lacera* là một điển hình. Loài ốc gai *I. lacera* thuộc họ ốc biển Muricidae, phân bố dọc theo các rạn san hô ven bờ, ven đảo từ Bắc vào Nam với độ sâu khoảng 30 m. Ốc sau khi khai thác từ biển về được bán ở các chợ hoặc cảng cá. Ở TP Hồ Chí Minh, ốc gai được bán nhiều ở một số chợ, nhưng chủ yếu ở chợ đầu mối Bình Điền với giá dao động 30.000-45.000 đồng/kg. Để sử dụng loài ốc gai này chế biến ra các sản phẩm có giá trị sử dụng cao, phục vụ nhu cầu xã hội cần phải có quy trình sản xuất. Việc nghiên cứu một quy trình sản xuất thường rất khó khăn vì có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm như nhiệt độ sấy, thời gian hấp, loại dung môi…

Nghiên cứu này nhằm mục đích xác định một số điều kiện thích hợp trong quá trình luộc thịt ốc, quá trình sấy đến hàm lượng protein, vitamin C của thịt ốc. Kết quả của nghiên cứu là cơ sở khoa học để tiếp tục áp dụng vào nghiên cứu quy trình sản xuất bột dinh dưỡng ăn liền từ ốc gai.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Ốc gai tươi (*I. lacera*) nguyên con được mua ở chợ Bình Điền (đại lộ Nguyễn Văn Linh, khu phố 6, quận 8, TP Hồ Chí Minh), bảo quản bằng đá lạnh trong thùng xốp và vận chuyển về Trung tâm Thí nghiệm thực hành, Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP Hồ Chí Minh.

*Tác giả liên hệ: Email: dungld@hufi.edu.vn

Study of some affecting factors in the production of instant nutritional powder from sea snail *Indothais lacera* (Born, 1778)

Doan Dung Le*, Thi Yen Dang, Thi Huong Vu, Thi Hong Ngoc Nguyen, Thi Thuy Duong Phan, Bao Huyen Linh Pham, Tu My Quach

Ho Chi Minh city University of Food Industry (HUFI)

Received 18 June 2021; accepted 2 August 2021

Abstract:

Sea snail *Indothais lacera* (Born, 1778) is found along coral reefs and rocky reefs in the coastal zone from the north to the south of Vietnam. Currently, most of this species are being used as fresh seafood, so their economic value is not high. This study aims to investigate some optimal conditions in the production of instant nutritional powder from *Indothais lacera* to diversify food varieties and create a high economic value for this sea snail species. Experiments were carried out to examine the conditions of boiling and drying, then some nutritional compositions of snail meat were analysed after being boiled and dried. The results showed that using phosphoric acid to adjust the pH level of water for boiling sea snail indicated the optimum pH level of boiling water was 5.5; the shells were boiled in 5 minutes after boiling. Under these conditions, the protein content of boiled snail meat was 64.18±4.23%. The boiled snail meat was cut into small pieces then dried. The optimal drying condition was the temperature at 50°C for 15 hours, when the snail meat contained the highest content of protein and vitamin C of 66.07±4.81% and 0.66±0.036 mg/g, respectively; the moisture content of dried snail meat was 4.28±0.48% suitable for producing instant nutritional powder.

Keywords: ***Indothais lacera*, instant, nutritional powder, sea snail.**

Classification number: **4.5**

Tại phòng thí nghiệm, ốc được rửa sạch bằng nước sinh hoạt ở phòng thí nghiệm và tiến hành bỏ vỏ, bỏ nội tạng, chỉ giữ lại phần thịt ốc để làm thí nghiệm. Thịt ốc sau đó được đựng trong túi nylon khoảng 0,5 kg/túi và bảo quản bằng tủ đông lạnh ở nhiệt độ từ -15 đến -18°C.

Phương pháp bố trí thí nghiệm

Khảo sát chế độ luộc: thịt ốc sau khi cấp đông được tiến hành rã đông chậm, sau đó thái nhỏ, rửa sạch bằng nước sinh hoạt phòng thí nghiệm và để ráo. Tiến hành khảo sát chế độ luộc với 2 thông số cần khảo sát là pH nước luộc và thời gian luộc. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Thịt ốc sau khi luộc được tiến hành xác định hàm lượng protein để lựa chọn điều kiện tốt nhất.

Thí nghiệm 1 (khảo sát pH nước luộc): pH nước luộc là 4,5, 5,5 và 6,5. pH nước luộc được điều chỉnh bằng acid H_3PO_4 vì loại acid này đã được một số nghiên cứu trước đây sử dụng để khử tanh thịt ốc trong quá trình luộc [2, 3]; thời gian luộc là 5 phút tính từ khi nước sôi; nhiệt độ luộc là 120°C; tỷ lệ nước/thịt ốc là 1/1 (w/w).

Thí nghiệm 2 (khảo sát thời gian luộc): thời gian luộc tính từ khi nước sôi là 4, 5, 6 và 7 phút; pH nước luộc tối ưu được xác định từ thí nghiệm 1; nhiệt độ luộc là 120°C; tỷ lệ nước/thịt ốc là 1/1 (w/w).

Khảo sát chế độ sấy: thịt ốc sau khi luộc được vớt ra, để nguội, rửa bằng nước sinh hoạt phòng thí nghiệm nhằm trung hòa acid và để ráo. Thịt ốc sau đó được sử dụng để khảo sát chế độ sấy bằng tủ sấy đối lưu cưỡng bức MEMMERT UF110 (Đức) với 2 thông số cần theo dõi là nhiệt độ và thời gian. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Sau khi sấy, tiến hành phân tích hàm lượng ẩm, protein và vitamin C của thịt ốc để xác định điều kiện tốt nhất.

Thí nghiệm 3 (khảo sát nhiệt độ sấy): nhiệt độ sấy được bố trí ở 4 điều kiện là 40, 50, 60 và 70°C; thời gian sấy là 15h.

Thí nghiệm 4 (khảo sát thời gian sấy): thời gian sấy được thử nghiệm là 9, 12, 15 và 18h; nhiệt độ sấy tối ưu được xác định từ thí nghiệm 3.

Phương pháp phân tích các chỉ tiêu

Xác định chỉ tiêu hình học: từng cá thể ốc gai dùng làm nguyên liệu được xác định khối lượng (g) bằng cân điện tử 2 số, xác định chiều cao (mm) và chiều rộng (mm) bằng thước kẹp Palme.

Xác định độ ẩm (W_m): độ ẩm thịt ốc sau khi sấy được đo bằng máy đo ẩm hồng ngoại Infrared Moisture Determination Balance KETT FD-720 (Nhật Bản). Phương pháp xác định theo TCVN 4326:2001.

Xác định hàm lượng protein (W_p): hàm lượng protein của các mẫu ốc sau khi luộc, sấy với các chế độ thời gian, nhiệt độ khác nhau được xác định theo TCVN 3075-90. Hàm lượng protein sau đó được quy về phần trăm theo chất khô dựa trên hàm lượng độ ẩm theo công thức:

$$W_{pd} = \frac{100 \times W_p}{100 - W_m}$$

trong đó: W_{pd} là hàm lượng protein thô (tính bằng phần trăm khối lượng chất khô); W_p là hàm lượng protein thô (tính bằng phần trăm khối lượng với độ ẩm tự nhiên theo TCVN 3075-90); W_m là độ ẩm được xác định ở trên.

Xác định hàm lượng vitamin C: hàm lượng vitamin C của các mẫu ốc sau khi sấy với các chế độ thời gian, nhiệt độ khác nhau được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC-DAD. Hàm lượng vitamin C sau đó được quy đổi theo khối lượng khô dựa trên hàm lượng độ ẩm (W_m) của mẫu để phù hợp cho việc nghiên cứu.

Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microft Office Excel 2016 và phần mềm thống kê IBM SPSS Statistics 20. Kết quả phân tích ANOVA với độ tin cậy 95%, so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức qua phép thử LSD.

Kết quả nghiên cứu

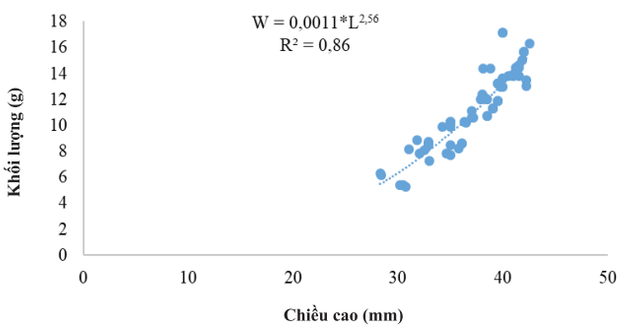
Một số đặc điểm về đối tượng và nguyên liệu nghiên cứu

Một số đặc điểm sinh học của ốc gai: tổng số 114 cá thể ốc được sử dụng để nghiên cứu đặc điểm sinh học. Kết quả cho thấy, chiều cao trung bình 37,7 mm, dao động 30,5-42,5 mm; chiều rộng trung bình 21,0 mm, dao động 15,9-24,5 mm; trọng lượng cá thể ốc trung bình 11,5 g, dao động 5,4-17,1 g (bảng 1). Từ kích cỡ nhận thấy, tất cả các cá thể ốc biển trong thí nghiệm này đều đạt đến giai đoạn trưởng thành, đảm bảo để chế biến làm thực phẩm.

Bảng 1. Một số chỉ tiêu sinh học của loài ốc gai *I. Lacera*.

TT	Chỉ tiêu sinh học	Kết quả phân tích		
		Trung bình	*Dao động*	*Số lượng cá thể (n)*
1	Chiều cao (mm)	37,7	30,5-42,5	114
2	Chiều rộng (mm)	21,0	15,9-24,5	114
3	Khối lượng (g)	11,5	5,4-17,1	114
4	Tương quan chiều cao (mm) - khối lượng (g)	$W=0,0011 \times L^{2,56}$		114

Sự tăng trưởng của các loài sinh vật được xác định thông qua việc phân tích mối quan hệ giữa chiều dài toàn thân (L) - khối lượng (W) của từng cá thể theo công thức $W=a*L^b$ [10]. Đặc điểm tăng trưởng của sinh vật được thể hiện thông qua tham số tăng trưởng b: nếu b=3, tăng trưởng đồng bộ; nếu b<3, tăng trưởng ưu thế chiều dài hơn khối lượng; nếu b>3, tăng trưởng ưu thế khối lượng hơn chiều dài [11]. Đối với ốc biển, chỉ số chiều cao được sử dụng thay cho chiều dài trong công thức trên. Từ phương trình tương quan chiều cao (mm) - khối lượng (g) đối với loài ốc gai cho thấy b=2,56<3 (hình 1), kết luận loài ốc gai nghiên cứu có tăng trưởng ưu thế chiều cao hơn khối lượng.



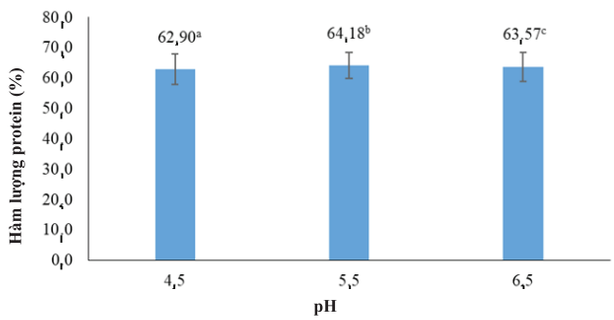
Hình 1. Phương trình tương quan chiều cao - khối lượng của loài ốc gai *I. lacera*.

Thành phần hóa học và dinh dưỡng của một số loài ốc gai: hàm lượng protein của loài ốc gai tương đối cao là 14,46±3,18%, lipid 0,32±0,37%, vitamin C 0,142±0,061 mg/g và nước 74,63±6,03%. So với một số loài ốc biển khác như *Chicoreus ramosus*, *Hemifusus pugilinus* [3], *Lambis lambis* [4] thì loài ốc gai trong nghiên cứu này có hàm lượng protein cao hơn, nhưng hàm lượng vitamin C lại thấp hơn.

Ảnh hưởng của pH nước luộc đến hàm lượng protein của thịt ốc

Hàm lượng protein trong thịt ốc sau khi luộc cao nhất là 64,18±4,23% ở điều kiện pH nước luộc là 5,5 (hình 2). Khi pH nước luộc tăng lên 6,5 thì hàm lượng protein giảm xuống 63,57±4,76%. Điều này có thể được giải thích do tính chất của protein thường hòa tan tốt, thậm chí một số loại protein bị biến tính trong môi trường kiềm. Ngoài ra, khi tiến hành luộc trong điều kiện pH lớn hơn 7, hiện tượng racemic hóa thường xảy ra đối với protein, sản phẩm thủy phân là racemic D, L-amino acid làm giảm giá trị dinh dưỡng [12, 13]. Cũng theo nghiên cứu [12, 13], điều kiện pH lớn hơn 7, nhiều acid amin dễ dàng bị ôxy hóa nên làm giảm chất lượng, hàm lượng protein.

Trong nghiên cứu này mặc dù điều kiện pH thí nghiệm là 6,5 (thấp hơn 7) nhưng trong quá trình thí nghiệm đã kết hợp với việc gia nhiệt ở nhiệt độ cao 120°C nên đã làm cho protein dễ dàng bị biến đổi hơn, từ đó hàm lượng protein giảm xuống. Khi pH thấp (pH=4,5), hàm lượng protein thấp hơn so với pH=5,5. Như vậy, điều kiện pH nước luộc bằng 5,5 là phù hợp nhất. Kết quả phân tích thống kê cho thấy, sự khác nhau về hàm lượng protein ở các điều kiện pH nước luộc là có ý nghĩa thống kê với khoảng tin cậy là 95%.



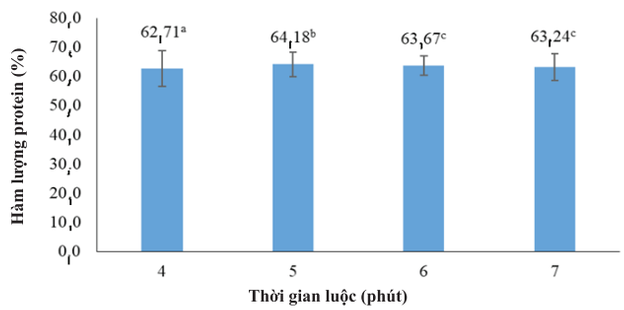
Hình 2. Biến đổi hàm lượng protein của thịt ốc theo pH nước luộc. Các ký hiệu a, b, c chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với khoảng tin cậy 95%.

Ảnh hưởng của thời gian luộc đến hàm lượng protein của thịt ốc

Thời gian luộc được tiến hành ở các ngưỡng là 4, 5, 6 và 7 phút với điều kiện pH nước luộc được xác định ở thí nghiệm 1 (pH=5,5) cho thấy, thời gian luộc 5 phút cho hàm lượng protein thô tính theo khối lượng khô của thịt ốc là cao nhất (64,18±4,23%). Khi thời gian luộc kéo dài từ 4 lên 5 phút, hàm lượng protein tăng, nhưng sau đó nếu tiếp tục kéo dài thời gian luộc ốc lên 6 hoặc 7 phút thì hàm lượng protein có xu hướng giảm nhẹ (hình 3).

Khi luộc ốc ở nhiệt độ cao là 120°C, thời gian luộc càng lâu thì protein càng bị biến tính tạo thành các chất liên kết khó tiêu hóa [14], từ đó dẫn đến hàm lượng protein khi luộc với thời gian

6 và 7 phút thấp hơn 5 phút. Trong trường hợp khi luộc với thời gian ngắn là 4 phút, hàm lượng protein lại thấp hơn so với luộc 5 phút, điều này có thể là do thời gian luộc càng lâu, nước và một số chất dễ hòa tan có trong thịt ốc như lipid, Trimetylamin oxit, acid succinic… thoát ra ngoài càng nhiều, dẫn đến hàm lượng protein trong thịt tăng lên [15]. Ngoài ra, thịt ốc sau khi luộc với thời gian 4 phút vẫn còn có mùi tanh nhẹ, trong khi đó thịt ốc luộc với thời gian 6 và 7 phút có xu hướng dai do hàm lượng nước và một số chất dễ hòa tan trong thịt ốc còn lại ít. Như vậy, thời gian luộc 5 phút vừa đảm bảo có hàm lượng protein cao, thịt ốc sau khi luộc lại có vị thơm đặc trưng và giòn.



Hình 3. Biến đổi hàm lượng protein của thịt ốc theo thời gian luộc. Các ký hiệu a, b, c chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với khoảng tin cậy 95%.

Ảnh hưởng của nhiệt độ sấy đến hàm lượng protein, vitamin C của thịt ốc

Các mẫu thịt ốc sau khi sấy ở các mức nhiệt độ 40, 50, 60 và 70°C với thời gian 15h được tiến hành phân tích hàm lượng protein. Thông thường nhiệt độ sấy từ 40 đến 70°C thì không ảnh hưởng đến cấu trúc của phân tử protein có trong thịt ốc. Sự thay đổi về hàm lượng protein trong thịt ốc khi sấy ở khoảng nhiệt độ trên có thể do sự thay đổi hàm lượng của một số chất khác có trong thịt ốc như hàm lượng lipid, vitamin C… Kết quả bảng 2 cho thấy, khi nhiệt độ sấy tăng thì hàm lượng protein có trong thịt ốc tăng, tuy nhiên hàm lượng protein tăng nhanh từ 65,24±4,12% lên 66,07±4,81% khi nhiệt độ sấy tăng từ 40 lên 50°C, sau đó nếu tiếp tục tăng nhiệt độ sấy lên 60 và 70°C thì hàm lượng protein có tăng nhưng không đáng kể.

Bảng 2. Biến đổi độ ẩm, hàm lượng protein và vitamin C trong thịt ốc theo nhiệt độ sấy với thời gian sấy 15h.

TT	Nhiệt độ sấy (°C)	Độ ẩm (%)	Hàm lượng protein (%)	Hàm lượng vitamin C (mg/g)
1	40	5,21±0,31^a	65,24±4,12^a	0,59±0,051^a
2	50	4,28±0,48^b	66,07±4,81^b	0,66±0,036^b
3	60	3,59±0,27^c	66,19±4,41^c	0,60±0,081^c
4	70	2,33±0,23^c	66,27±3,28^d	0,55±0,055^d

Ghi chú: các ký hiệu a, b, c, d chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với khoảng tin cậy 95%.

Vitamin C là chất dễ tan trong nước, có tính ôxy hóa khử mạnh nên rất dễ bị ôxy hóa ở nhiệt độ thường. Ngoài ra, khi nhiệt độ sấy càng cao sự tổn thất vitamin C càng nhiều [5]. Kết quả nghiên cứu ở bảng 2 cho thấy, khi sấy với khoảng thời gian là 15h, hàm lượng vitamin C đạt cao nhất ở nhiệt độ sấy 50°C (0,66±0,036 mg/g), hàm lượng vitamin C sau đó giảm dần khi sấy ở nhiệt độ 60 và 70°C. Sự khác nhau về hàm lượng vitamin C khi sấy ở nhiệt độ 40 và 50°C có thể là do sự biến đổi về hàm lượng một số chất như chất béo, đường tự do… của thịt ốc trong quá trình sấy. Khi nhiệt độ sấy ở 50°C một số chất này có trong thịt ốc bị thất thoát nhiều hơn khi sấy ở 40°C dẫn đến hàm lượng vitamin C tăng lên. Tuy nhiên, do điều kiện nghiên cứu có hạn nên vấn đề này cần được tiếp tục tìm hiểu trong thời gian tới.

Kết quả phân tích về hàm lượng protein, vitamin C trong thịt ốc sấy ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau cho thấy, hàm lượng protein có trong thịt ốc tăng lên không đáng kể khi nhiệt độ sấy tăng dần từ 40 đến 70°C, tuy nhiên hàm lượng vitamin C ở nhiệt độ sấy 50°C là cao nhất, khi nhiệt độ sấy tăng lên 60-70°C thì tốc độ thất thoát của vitamin C xảy ra nhanh. Từ đó, 50°C là nhiệt độ sấy tối ưu trong nghiên cứu này để vừa đảm bảo về hàm lượng protein và vitamin C trong thịt ốc. Kết quả khảo sát về nhiệt độ sấy này cũng phù hợp với một số nghiên cứu trước đây liên quan đến sản xuất bột dinh dưỡng ăn liền từ ốc biển như nhiệt độ sấy phù hợp là 40-50°C [2, 4], 50-60°C [3].

Ảnh hưởng của thời gian sấy đến hàm lượng protein, vitamin C của thịt ốc

Khi sấy ở cùng nhiệt độ sấy là 50°C, hàm lượng protein tăng dần theo thời gian sấy. Thời gian sấy càng lâu thì hàm lượng protein trong thịt ốc càng cao. Kết quả bảng 3 cho thấy, khi thời gian sấy kéo dài từ 9 lên 12h, hàm lượng protein có trong thịt ốc tăng lên. Tuy nhiên, khi kéo dài thời gian sấy từ 12 lên 15 và 18h thì hàm lượng protein tăng rất chậm.

Do hàm lượng protein được tính theo khối lượng chất khô, sự gia tăng hàm lượng protein khi thời gian sấy càng kéo dài có thể liên quan đến sự thất thoát của một số chất trong quá trình sấy, ví dụ như lipid, chất thơm, vitamin C… Khi thời gian sấy càng lâu thì hàm lượng các chất đó bị thất thoát càng nhiều, nhưng nếu tiếp tục kéo dài thì hiện tượng thất thoát sẽ dừng lại. Từ đó, có thể dẫn đến một nhận định là có thể khối lượng protein trong các mẫu ốc sấy ở các điều kiện thời gian khác nhau là không khác nhau, hay nói cách khác khi sấy ở nhiệt độ 50°C thì hoàn toàn không ảnh hưởng đến đặc tính, cấu trúc của protein trong thịt ốc.

Bảng 3. Biến đổi độ ẩm, hàm lượng protein và vitamin C trong thịt ốc theo thời gian với nhiệt độ sấy 50°C.

TT	Thời gian sấy (h)	Độ ẩm (%)	Hàm lượng protein (%)	Hàm lượng vitamin C (mg/g)
1	9	6,64±0,28^a	65,24±5,28^a	0,57±0,032^a
2	12	5,54±0,25^b	65,91±4,36^b	0,62±0,029^b
3	15	4,28±0,48^c	66,07±4,81^{ab}	0,66±0,036^c
4	18	2,81±0,31^d	66,09±6,21^b	0,63±0,045^b

Ghi chú: các ký hiệu a, b, c, d chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với khoảng tin cậy 95%.

Biến đổi hàm lượng vitamin C trong thịt ốc sau khi sấy ở nhiệt độ 50°C với các thời gian khác nhau được thể hiện ở bảng 3. Kết quả cho thấy, khi thời gian sấy tăng từ 9 đến 15h thì độ ẩm trong thịt ốc giảm, dẫn đến hàm lượng vitamin C tăng rõ rệt. Nếu tiếp

tục sấy đến 18h thì hàm lượng vitamin C lại giảm đáng kể và thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa so với 15h. Sự suy giảm hàm lượng vitamin C khi kéo dài thời gian sấy từ 15 lên 18h có thể được giải thích là do vitamin C là chất rất dễ bị ôxy hóa nên thời gian sấy càng kéo dài thì vitamin C có trong thịt ốc càng tiếp xúc lâu với không khí nên bị ôxy hóa mạnh [5].

Từ kết quả phân tích về hàm lượng độ ẩm, protein và vitamin C khi sấy ở 50°C với thời gian sấy khác nhau cho thấy protein dường như không bị ảnh hưởng nhiều ở thời gian sấy khác nhau; hàm lượng vitamin C có xu hướng giảm rõ rệt khi thời gian sấy kéo dài từ 15 lên 18h. Hơn nữa, với thời gian sấy là 9 và 12h thì độ ẩm của thịt ốc tương đối cao, lần lượt là 6,64±0,28 và 5,54±0,25%, với thời gian sấy là 18h thì độ ẩm lại tương đối thấp (2,81±0,31%), không phù hợp để sản xuất sản phẩm bột dinh dưỡng. Theo một số nghiên cứu cho thấy, độ ẩm phù hợp của bột dinh dưỡng thường từ 3 đến 5% [2, 3, 5]. Từ đó, với nhiệt độ sấy là 50°C thì thời gian sấy 15h là phù hợp nhất.

Kết luận

Loài ốc gai *I. lacera* sử dụng trong nghiên cứu này có hàm lượng protein 14,46±3,18%, lipid là 0,32±0,37 mg/g, vitamin C 0,142±0,061 mg/g, nước 74,63±6,03%. Hàm lượng protein của loài ốc gai có xu hướng cao hơn các loài ốc biển khác nhưng hàm lượng vitamin C lại thấp hơn.

Trong quy trình sản xuất bột dinh dưỡng ăn liền từ ốc gai *I. lacera*, điều kiện pH nước luộc phù hợp nhất là pH=5,5, thời gian luộc là 5 phút tính từ khi nước sôi, nhiệt độ luộc là 120°C, tỷ lệ nước/thịt ốc là 1/1 (w/w). Hàm lượng protein tính theo khối lượng khô của thịt ốc sau khi luộc ở điều kiện này là 64,18±4,23%.

Điều kiện sấy phù hợp nhất để sản xuất bột dinh dưỡng ăn liền từ ốc gai *I. lacera* là thịt ốc sau khi luộc được sấy với thời gian là 15h, nhiệt độ sấy là 50°C. Ở điều kiện sấy này thịt ốc sau khi sấy có hàm lượng protein là 66,07±4,81%, hàm lượng vitamin C là 0,66±0,036 mg/g và độ ẩm là 4,28±0,48%.

Kết quả khảo sát về điều kiện tối ưu trong quá trình luộc và sấy đạt được trong bài báo này là cơ sở khoa học để tiếp tục nghiên cứu các nội dung khác như tỷ lệ phối trộn các thành phần phụ gia và gia vị với thịt ốc sau khi sấy, đánh giá chất lượng sản phẩm sau khi thử nghiệm chế biến để hoàn thiện quy trình sản xuất bột dinh dưỡng ăn liền từ ốc gai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] M.A. Krishnaswamy, et al. (1962), "Manufacture of ready-to-serve/cook fish paste", *Journal of Science and Industrial Research*, **21**, pp.303-304.

[2] J. Patterson, K. Ayyakkannu (1997), "Instant soup powder from King Albalone (*Chicoreus ramosus*)", *Phuket Marine Biological Center Special Publication*, **17**, pp.305-308.

[3] R.E. Renitta (2005), *Development of Value Added Products from Marine Mollusca, Chicoreus Ramosus (Gastropoda: Muricidae) and Hemifusus Puliginus (Gastropoda: Melongenidae) and Popularization*, Thesis of Doctor of Philosophy, Manonmaniam Sundaranar University.

[4] R.E. Renitta, et al. (2006), "Development of chutney powder from spider conch, *Lambris lambris* (Linne, 1758)", *Asian Fisheries Science*, **19**, pp.309-317.

[5] Nguyễn Duy Tân, Trần Phương Lan, Nguyễn Thị Hạnh Dúng, Nguyễn Minh Thủy (2019), "Nghiên cứu chế biến bột dinh dưỡng có hàm lượng Anthocyanin và vitamin C cao từ khoai lang tím và chuối xiêm", *Tạp chí Dinh dưỡng & Thực phẩm*, *Trường Đại học Cần Thơ*, **15**, tr.39-48.

[6] K. Dhanapaul, et al. (1994), "Processing chank meat (*Xancus pyrum*) into pickles", *Fisheries Technology (Cochin)*, **31**, pp.188-190.

[7] J. Patterson, et al. (1995), "Processing meat of *Chicoreus ramosus* into pickles", *Phuket Marine Biological Center Special Publication*, **15**, pp.17-19.

[8] Lê Doãn Dũng, Hoàng Đình Chiều, Nguyễn Văn Hiếu (2015), *Hiện trạng đa dạng sinh học trong hệ sinh thái rạn san hô ở 6 điểm nghiên cứu ven bờ*, Viện Nghiên cứu Hải sản.

[9] Đỗ Văn Khương, Đỗ Anh Duy, Lê Doãn Dũng (2016), "Đa dạng sinh học trong hệ sinh thái rạn san hô và vùng ven đảo", *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, **11**, tr.96-106.

[10] D. Pauly (1983), *Some Simple Methods for The Assessment of Tropical Fish Stocks*, FAO Fisheries Technical Paper.

[11] R. Froese (2006), "Cube law, condition factor and weight-length ralationships: history, meta-analysis and recommendations", *Journal of Applied Ichthyology*, **22**, pp.241-253.

[12] Võ Thị Thu Hằng (2003), *Giáo trình Hóa học lập thể*, Trường Đại học Sư phạm TP Hồ Chí Minh.

[13] Cao Đăng Nguyên (2007), *Giáo trình Công nghệ protein*, Nhà xuất bản Đại học Huế.

[14] Hoàng Kim Thanh (2020), *Ảnh hưởng của nhiệt độ cao trong chế biến tới các thành phần dinh dưỡng của thức ăn*, Tổng hội Y học Việt Nam.

[15] Trần Thị Luyến, Nguyễn Trọng Cẩn, Đỗ Văn Ninh, Nguyễn Anh Tuấn, Trang Sĩ Trung, Vũ Ngọc Bội (2010), *Khoa học - công nghệ Surimi và sản phẩm mô phỏng*, Nhà xuất bản Nông nghiệp.

DOI: 10.31276/VJST.63(9).59-64

Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn chuyển hóa nitrite từ bùn đáy của vùng nuôi tôm hùm ở vịnh Xuân Đài, tỉnh Phú Yên

Trương Phước Thiên Hoàng*, Đỗ Huỳnh Dân, Võ Trần Quốc Thắng, Nguyễn Phú Hòa

Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 13/5/2021; ngày chuyển phản biện 17/5/2021; ngày nhận phản biện 21/6/2021; ngày chấp nhận đăng 1/7/2021

Tóm tắt:

Nghiên cứu đã thực hiện phân lập và tuyển chọn nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitrite từ vùng đáy lồng bè nuôi tôm hùm tại vịnh Xuân Đài, tỉnh Phú Yên. Từ 21 mẫu bùn lấy từ khu vực 11 lồng bè nuôi tôm hùm đã phân lập được 16 chủng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa nitrite. Sau khi tiến hành khảo sát đặc điểm sinh học và khả năng chuyển hóa nitrite của các chủng vi khuẩn, thu được 10 chủng có khả năng chuyển hóa nitrite trên 95% trong thời gian là 72 giờ, 10 chủng vi khuẩn có hiệu suất xử lý NO_2^- cao nhất được định danh sinh hóa bằng kit API 20E, API 20NE và phương pháp giải trình tự gen vùng 16S RNA, tra cứu trên BLAST SEARCH đã xác định được 5 loài là *Stenotrophomonas pavanii, Chryseobacterium gleum, Stenotrophomonas maltophilia, Delftia lacustris, Acinetobacter junii*.

Từ khóa: **nitrite, nuôi tôm hùm lồng bè, vi khuẩn chuyển hóa nitrite, vịnh Xuân Đài.**

Chỉ số phân loại: **4.6**

Đặt vấn đề

Trong những năm gần đây, ngành nuôi thủy sản lồng bè (trong đó có nuôi tôm hùm) ở nhiều địa phương đang phải đối mặt với những khó khăn có thể dẫn đến nguy cơ thất bại. Nguyên nhân chính là do ô nhiễm môi trường nước vùng nuôi, dịch bệnh và hệ thống sinh thái bị phá hủy. Đặc biệt, ở các đầm phá/vịnh có hoạt động nuôi trồng thủy sản, nước lưu thông không thông thoáng vào một số thời điểm trong năm. Ngoài ra, các đầm/vịnh không được nạo vét nên phân của sinh vật nuôi, thức ăn thừa, xác động vật thủy sinh, xác rong, tảo, các loại hóa chất sử dụng trong quá trình nuôi, các loại vi khuẩn gây bệnh tích tụ ở đáy làm cho nước và bùn đáy trong đầm/vịnh có khuynh hướng ô nhiễm. Các chất hữu cơ tích tụ lại ở đáy đầm/vịnh bị phân hủy kị khí sinh ra các sản phẩm như: NH_3, H_2S, NO_2^-, NO_3^-… gây hại cho tôm cá và các sinh vật khác sống trong đầm/vịnh. Khi đầm/vịnh có hoạt động nuôi thủy sản bị ô nhiễm sẽ dẫn đến những nhóm vi sinh vật có hại có cơ hội phát triển mạnh, không kiểm soát được và hậu quả là vật nuôi bị bệnh. Nitrate là sản phẩm tiếp theo của quá trình oxy hóa NO_2^- trong chu trình chuyển hóa nitơ, khi hàm lượng NO_2^- vượt quá 10 mg/l sẽ gây nên sự phú dưỡng, ảnh hưởng đến nuôi trồng thủy sản (Boyd, 1998) [1]. Đã có những nghiên cứu vi khuẩn chuyển hóa nitơ từ bùn đáy ao nuôi tôm thẻ, sú trong nước cũng như trên thế giới và tạo ra những sản phẩm sinh học hữu ích cho ao nuôi thủy sản, tuy nhiên việc tuyển chọn nhóm vi khuẩn chuyển hóa NO_2^- từ bùn đáy ở vùng nuôi tôm nước mặn hầu như rất ít được nghiên cứu. Xu hướng hiện nay là triển khai các mô hình nuôi tôm hùm trong bể xi măng nhằm kiểm soát được nguồn nước cũng như các dư lượng thuốc sử dụng trong nuôi trồng thủy sản [2]. Vì vậy, việc nghiên cứu xác định các loài vi sinh vật chuyển hóa NO_2^- trong bùn đáy vùng nuôi tôm hùm là hết sức cần thiết, nhằm ứng dụng để sản xuất các chế sinh học cho xử lý nước trong bể nuôi tôm hùm.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Mẫu bùn được thu từ đáy của khu vực 11 lồng nuôi tôm hùm Vịnh Xuân Đài, thị xã Sông Cầu, tỉnh Phú Yên từ tháng 8/2016 đến tháng 7/2017 với độ mặn của nước biển dao động từ 29-35‰, định kỳ 1 tháng/ 1 lần. Các mẫu thu gồm 6 mẫu từ lồng treo ký hiệu lần lượt là T_1, T_2, T_3, T_4, T_5 và TKT là lồng treo không có nuôi tôm hùm; 5 mẫu từ lồng chìm ký hiệu lần lượt là C_1, C_2, C_3, C_4 và CKT là lồng chìm không có nuôi tôm hùm. Ở mỗi vị trí dưới lồng thu khoảng 100 g bùn được giữ lạnh bằng đá và chuyển về phòng thí nghiệm bảo quản ở 4°C.

Phương pháp phân lập và tăng sinh vi khuẩn chuyển hóa NO_2^-

Môi trường nitrite-calcium-carbonate được sử dụng để phân lập và định lượng vi khuẩn chuyển hóa NO_2^- dựa trên

*Tác giả liên hệ: Email: hoangtp@hcmuaf.edu.vn

Isolation and selection of nitrite metabolising bacteria from the bottom mud of lobster culture area in Xuan Dai bay, Phu Yen province

Phuoc Thien Hoang Truong*, Huynh Dan Do, Tran Quoc Thang Vo, Phu Hoa Nguyen

Nong Lam University, Ho Chi Minh city

Received 13 May 2021; accepted 1 July 2021

Abstract:

The study had isolated and selected groups of bacteria that metabolise nitrite from the bottom mud of lobster cages in Xuan Dai bay, Phu Yen province. Analysis results from 21 sludge samples taken from 11 cages of lobster farming area isolated 16 strains of bacteria capable of nitrite metabolism. After investigating biological characteristics and nitrite metabolism of bacteria strains, 10 strains of bacteria were collected with the ability to metabolise nitrite over 95% in 72 hours. In addition, 10 strains of bacteria with the highest NO_2^- treatment efficiency, identified by genetic analysis and looked up on BLAST, defined as *Stenotrophomonas pavanii*, *Chryseobacterium gleum*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Delftia lacustris*, *Acinetobacter junii*.

Keywords: **lobster cage culture, nitrite, nitrite metabolising bacteria, Xuan Dai bay.**

Classification number: **4.6**

phương pháp MPN của Ehrlich (1975) [3].

Đếm mật số vi khuẩn theo phương pháp MPN: mẫu bùn được pha loãng ở các nồng độ từ 10^1-10^5 với 3 lần lặp, ủ ở 28°C trong 21 ngày. Kiểm tra sự có mặt của NO_2^- ở các ống nghiệm chứa dung dịch huyền phù vi khuẩn và đối chứng âm bằng thuốc thử Griess-Ilosway. Tra cứu bảng MPN tiêu chuẩn để xác định số lượng vi khuẩn chuyển hóa NO_2^- trong 1 g mẫu bùn.

Môi trường Aleem và Alexander (1960) [4] được sử dụng để nuôi tăng sinh vi khuẩn chuyển hóa NO_2^-.

Đánh giá khả năng chuyển hóa NO_2^- của các chủng vi khuẩn bằng phương pháp trắc quang 4500 NO_2-B

Các chủng vi khuẩn sau khi tuyển chọn được nuôi cấy tăng sinh trong môi trường TSB đạt mật độ 10^7 CFU/ml thì tiến hành các thí nghiệm đánh giá khả năng xử lý NO_2^- với 3 lần lặp bằng cách hút 1 ml dịch khuẩn (10^7 CFU/ml) cho vào các ống falcon chứa 50 ml môi trường định lượng NO_2^-, các chủng vi khuẩn được nuôi cấy mẻ qua đêm ở 30°C, 150 vòng/phút trong 24 giờ. Mẫu được thu tại thời điểm 12, 24, 36, 48, 60, 72 giờ để phân tích hàm lượng NO_2^- theo phương pháp trắc quang 4500 NO_2-B [5, 6]. Sau đó, các kết quả định lượng NO_2^- sẽ được đưa về hiệu suất xử lý theo công thức sau:

$$H = \frac{a-b}{a} x\ 100\%$$

trong đó: H là hiệu suất xử lý (%), a là hàm lượng chất ban đầu (mg/l), b là hàm lượng chất sau khoảng thời gian i (mg/l).

Định danh bằng các phản ứng sinh hóa, kit API 20E, API 20NE và phân tích trình tự gen 16S rRNA

Vi khuẩn được nhuộm Gram và quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính 40 X, vật kính 100 X có giọt dầu. Đồng thời xác định hình dạng tế bào vi khuẩn, nhuộm bào tử, thực hiện các phản ứng oxidase, catalase, kiểm tra di động/bất động, khảo sát nhiệt độ phát triển, khảo sát nồng độ muối vi khuẩn có thể phát triển.

Sử dụng kit API 20E và API 20NE theo hướng dẫn của hãng BioMerieux (Pháp) [7], đọc kết quả dựa vào bảng hướng dẫn và tra phần mềm để xác định tên chi/loài của vi khuẩn thử nghiệm. Sau đó, các chủng vi khuẩn được gửi phân tích trình tự gen 16S rRNA với cặp mồi 27F (5′-AGA GTT TGA TC[A/C] TGG CTC AG-3′) and 515R (5′-TAC CGC GGC TGC TGG CAC-3′) [8] tại Công ty TNHH dịch vụ và thương mại Nam Khoa (793/58 Trần Xuân Soạn, P. Tân Hưng, Q.7, TP Hồ Chí Minh).

Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý với phần mềm Microsoft Excel 2010 và phần mềm thống kê MSTATC.

Kết quả và thảo luận

Kết quả khảo sát sự hiện diện của nhóm vi khuẩn chuyển hóa NO_2^-

132 mẫu bùn thu từ vịnh Xuân Đài, thị xã Sông Cầu, tỉnh Phú Yên được chuyển vào các ống nghiệm chứa môi trường nitrite-calcium-carbonate, ủ ở 28°C trong 21 ngày, kiểm tra sự hiện diện nhóm vi khuẩn chuyển hóa NO_2^-, kết quả đã chọn lọc được 21 mẫu bùn có hiện diện của nhóm vi khuẩn có khả năng chuyển hóa NO_2^-, trong đó có 10 mẫu bùn có mật số MPN của vi khuẩn nhỏ hơn 10^3 MPN/g và 11 mẫu bùn có mật số MPN lớn hơn 10^3 MPN/g được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Chỉ số Most Probable Number (MPN) của mẫu bùn.

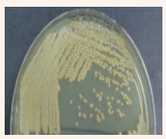
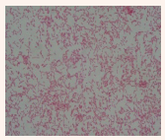
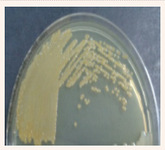
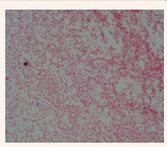
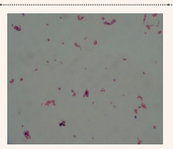
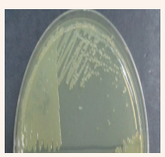
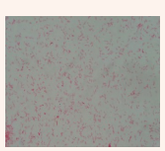
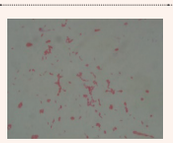
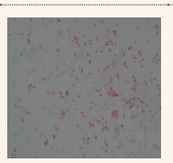
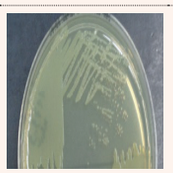
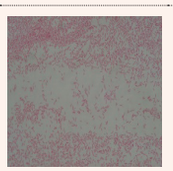
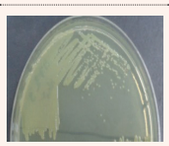
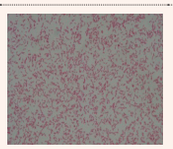
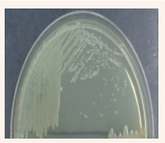
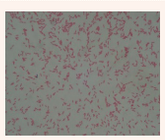
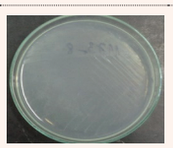
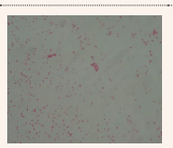
STT	Tên mẫu	Độ pha loãng			Kết quả (MPN/g)
		10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	
1	CKT	3	3	1	$4,6x10^4$
2	C_1	3	3	1	$4,6x10^4$
3	C_2	3	3	2	$1,1x10^5$
4	C_3	3	1	0	$4,3x10^3$
5	C_4	3	3	0	$2,4x10^4$
6	TKT	2	2	1	$2,8x10^3$
7	T_1	3	1	1	$7,5x10^3$
8	T_2	3	2	0	$9,3x10^3$
9	T_3	2	2	1	$2,8x10^3$
10	T_4	3	1	0	$4,3x10^3$
11	T_5	3	3	1	$4,6x10^4$

Kết quả bảng 1 cho thấy, nhóm vi khuẩn chuyển hóa NO_2^- (NOB) ở các mẫu bùn nằm trong khoảng 10^3 đến $1,1x10^5$ (MPN/g) và hầu như các mẫu bùn ở lồng treo và lồng chìm đều có mật số vi khuẩn từ 10^3 MNP/g. Theo nghiên cứu về mật độ nhóm NOB trong đất của một số tác giả như Degrange và Bardin (1995) [9], quần thể NOB nằm trong khoảng 10^1, 10^2 hoặc 10^3 CFU/g. Ngoài ra, Rennie và Schmidt (1977) [10] cho biết mật độ của chúng cao hơn, từ 10^3-10^4 CFU/g. Ở Việt Nam, Phạm Thị Tuyết Ngân và Nguyễn Hữu Hiệp (2010) [11] cũng nghiên cứu khảo sát về biến động nhóm NOB bằng phương pháp MPN trong ao nuôi tôm sú thâm canh và cho thấy mức dao động từ 5,5 đến $2,6x10^3$ MPN/g. Hoạt động của NOB giảm ngay sau khi tiếp xúc với ánh nắng mặt trời [12] và NOB trong bùn thấp là do hoạt động và sự phát triển của chúng dễ bị ức chế bởi các yếu tố môi trường như nồng độ NH_3 và pH cao; oxy hòa tan (DO) và NO_2^- thấp, nhiệt độ thấp [13]. Ngoài ra, NOB bị giới hạn mạnh bởi cường độ và thời gian chiếu sáng chủ yếu là ánh sáng xanh dương và tím [14]. Trong các ao nuôi thủy sản, NOB được xác định mẫn cảm với ánh sáng nhiều hơn nhóm vi khuẩn chuyển hóa ammonia (AOB), điều này góp phần làm mất cân bằng quần thể giữa chúng [15]. Kết quả phân tích chỉ số MPN trong nghiên cứu này cho thấy, nhóm NOB tập trung khoảng 10^3-10^5 MPN/g tại vùng đáy vịnh Xuân Đài, khá tương đồng với các nghiên cứu khác ở trong và người nước. Do đó, nghiên cứu tiếp tục phân lập vi khuẩn trên môi trường thạch để chọn lọc nhóm NOB.

Phân lập nhóm vi khuẩn chuyển hóa NO_2^-

Những ống nghiệm có sự hiện diện của nhóm vi khuẩn NOB được tiến hành phân lập trên môi trường thạch nitrite-calcium-carbonate, kết quả thu được 16 chủng vi khuẩn. Sau khi sàng lọc khả năng chuyển hóa NO_2^- của các dòng vi khuẩn, chọn được 10 chủng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa NO_2^- cao nhất thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Đặc điểm khuẩn lạc và nhuộm gram của 10 chủng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa NO_2^- cao nhất.

STT	Ký hiệu chủng vi khuẩn	Khuẩn lạc	Nhuộm Gram	Mô tả
1	CKT			Khuẩn lạc tròn, lồi, nhầy, màu vàng đục. Tế bào hình que, gram âm, không di động, không sinh bào tử, catalase (+), phát triển yếu trên môi trường NaCl 3%.
2	C_2/1			Khuẩn lạc tròn, lồi, nhầy, màu vàng đục. Tế bào hình que, gram âm, không di động, không sinh bào tử, catalase (+), phát triển yếu trên môi trường NaCl 3%.
3	C_2/2			Khuẩn lạc tròn, lồi, nhầy, màu trắng đục. Tế bào hình que, gram âm, không di động, không sinh bào tử, catalase (+), phát triển trên môi trường NaCl 3%.
4	C_3/1			Khuẩn lạc tròn, lồi, nhầy, màu trắng đục. Tế bào hình que, gram âm, không di động, không sinh bào tử, catalase (+), phát triển trên môi trường NaCl 3 và 4,5%, phát triển mạnh ở nhiệt độ 42°C.
5	C_4/2			Khuẩn lạc tròn, lồi, nhầy, màu trắng đục. Tế bào hình que, gram âm, không di động, không sinh bào tử, catalase (+), phát triển trên môi trường NaCl 3%.
6	TKT			Khuẩn lạc tròn, lồi, nhầy, màu trắng đục. Tế bào hình que, gram âm, không sinh bào tử, không di động, catalase (+), phát triển trên môi trường NaCl 3%.
7	T_1			Khuẩn lạc tròn, lồi, nhầy, màu trắng đục. Tế bào hình que, gram âm, không di động, không sinh bào tử, catalase (+), phát triển trên môi trường NaCl 3 và 4,5%, phát triển mạnh ở nhiệt độ 42°C.
8	T_2/2			Khuẩn lạc tròn, lồi, nhầy, màu trắng đục. Tế bào hình que, gram âm, không di động, không sinh bào tử, catalase (+), phát triển trên môi trường NaCl 3%.
9	T_3/1			Khuẩn lạc tròn, lồi, nhầy, màu trắng đục. Tế bào hình que, gram âm, di động, không sinh bào tử, catalase (+), phát triển trên môi trường NaCl 3%.
10	T_4/1			Khuẩn lạc tròn, lồi, nhầy, màu trắng trong. Tế bào hình que, gram âm, không di động, không sinh bào tử, catalase (+), phát triển trên môi trường NaCl 3%.

Khả năng xử lý NO_2^- của các chủng vi khuẩn được tuyển chọn

Sau khi chọn lọc nhóm vi khuẩn có khả năng chuyển hóa NO_2^- cao nhất, tiến hành khảo sát khả năng xử lý NO_2^- của các chủng vi khuẩn. Hiệu suất chuyển hóa NO_2^- của 10 chủng vi khuẩn CKT, $C_2/1$, $C_2/2$, $C_3/1$, $C_4/2$, TKT, T_1, $T_2/2$, $T_3/1$, $T_4/1$ nuôi cấy trong môi trường định lượng nitrite với hàm lượng NO_2^- được bổ sung lúc ban đầu là 0,62 mg/l (mật độ vi khuẩn ban đầu là 10^7CFU/ml) sau 12 h khảo sát được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3. Hiệu suất chuyển hóa NO_2^- của 10 chủng vi khuẩn.

STT	Chủng vi khuẩn	Hiệu suất chuyển hóa NO_2^- (%)					
		12 h	*24 h*	*36 h*	*48 h*	*60 h*	*72 h*
1	CKT	$16,90^{d}$±0,01	$34,26^{d}$±0,01	$64,87^{c}$±0,03	$89,77^{bc}$±0,08	$94,56^{bc}$±0,02	$96,62^{abc}$±0,01
2	$C_2/1$	$9,80^{fg}$±0,08	$34,64^{cd}$±0,46	$64,95^{c}$±1,16	$87,06^{de}$±1,14	$96,86^{ab}$±0,67	$97,99^{a}$±0,58
3	$C_2/2$	$15,53^{d}$±0,58	$24,67^{e}$±0,27	$61,90^{d}$±0,58	$87,94^{cd}$±0,57	$96,16^{ab}$±0,57	$96,16^{abc}$±0,58
4	$C_3/1$	$9,52^{fg}$±0,06	$19,96^{f}$±0,57	$56,64^{e}$ ±0,57	$83,10^{fg}$ ±0,46	$90,76^{e}$±0,58	$95,31^{bc}$±0,60
5	$C_4/2$	$12,25^{e}$±0,69	$26,54^{e}$±0,57	$60,34^{d}$±0,66	$85,07^{ef}$±0,53	$91,65^{de}$±0,57	$95,15^{bc}$±0,57
6	TKT	$27,73^{b}$±0,57	$35,58^{cd}$±1,15	$74,86^{b}$±0,57	$89,19^{bcd}$±0,48	$93,58^{cd}$±0,81	$95,73^{bc}$±0,58
7	T_1	$13,14^{e}$±0,48	$25,59^{e}$±0,21	$56,25^{e}$±0,57	$82,07^{g}$±0,38	$92,90^{cde}$ ±0,27	$95,05^{c}$±0,60
8	$T_2/2$	$21,39^{c}$±0,68	$64,86^{b}$±0,57	$80,73^{a}$±1,17	$94,76^{a}$±0,58	$97,52^{a}$±0,23	$98,21^{a}$±0,46
9	$T_3/1$	$31,97^{a}$±0,06	$36,57^{c}$±0,06	$81,19^{a}$±0,05	$94,30^{a}$±0,35	$96,60^{ab}$±0,57	$97,29^{ab}$±0,23
10	$T_4/1$	$17,96^{d}$±0,58	$52,52^{b}$±0,06	$76,17^{b}$±0,46	$91,41^{b}$±0,29	$93,91^{bc}$±0,57	$96,18^{abc}$±0,17

Kết quả ở bảng 3 cho thấy khả năng chuyển hóa NO_2^- của nhóm vi khuẩn bắt đầu tăng cao sau 36 h. Ở thời điểm 72 h, hiệu suất xử lý của các chủng vi khuẩn đều tăng lên và đạt trên 95%, trong đó chủng vi khuẩn $T_2/2$ có hiệu suất xử lý cao nhất (98,21%). Điều này cho thấy các chủng vi khuẩn đã thích nghi và đang hoạt động mạnh. Kết quả tương tự cũng được tìm thấy ở nghiên cứu của nhóm tác giả Nguyễn Thị Phi Oanh (2019) [16] cho rằng nhóm vi khuẩn chuyển hóa NO_2^- được phân lập tại ao tôm thẻ chân trắng ở Bạc Liêu cho hiệu suất xử lý NO_2^- là 97,2% trong thời gian 3 ngày. Do đó, để đánh giá được thời điểm xử lý NO_2^- cho mạnh nhất của từng dòng vi khuẩn cần phải tiến hành khảo sát tại các mốc thời gian liên tiếp nhau. Kết quả định lượng NO_2^- thấy, khả năng xử lý NO_2^- của mỗi chủng vi khuẩn tại các thời điểm khác nhau là có sự khác biệt và tùy thuộc vào môi trường, chủng vi sinh vật. Do vậy, 10 chủng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa NO_2^- cao nhất (với hiệu suất trên 95%) được lựa chọn (CKT, $C_2/1$, $C_2/2$, $C_3/1$, $C_4/2$, TKT, T_1, $T_2/2$, $T_3/1$, $T_4/1$) để tiến hành định danh sinh hóa và sinh học phân tử.

Định danh vi khuẩn bằng các phản ứng sinh hóa và kit chuẩn đoán API 20E, API 20NE

Sau khi chọn lọc được 10 chủng vi khuẩn có khả năng xử lý NO_2^- trên 95% trong thời gian 72 h, tiến hành cho thử nghiệm sinh hóa các chủng vi khuẩn bằng kit API, kết quả được thể hiện ở bảng 4 và bảng 5.

Bảng 4. Kết quả phản ứng sinh hóa của các chủng vi khuẩn theo kit API 20E.

Phản ứng sinh hóa	Chủng vi khuẩn					
	TKT	*T_1*	*$T_2/2$*	*$C_2/2$*	*$C_3/1$*	*$C_4/2$*
ONPG (β-galactosidase)	+	+	+	+	+	+
ADH (arginine dihydrolase)	-	-	-	-	-	-
LDC (lysine decarboxylase)	-	+	-	-	+	-
ODC (ornithine decarboxylase	-	-	-	-	-	-
CIT (citrate)	+	+	+	+	+	+
H2S (hydrogen sunfite)	-	-	-	-	-	-
URE (enzyme urease)	-	-	-	-	-	-
TDA (enzyme tryptophan deaminase)	-	+	-	-	+	-
IND (indole test)	-	-	-	-	-	-
VP (voges-proskauer)	-	-	-	-	-	-
GEL (enzyme gelatinase)	+	+	+	+	+	+
GLU (lên men glucose)	-	-	-	-	-	-
MAN (D-manose)	-	-	-	-	-	-
INO (inositol)	-	-	-	-	-	-
SOR (sorbitol)	-	-	-	-	-	-
RHA(rhamnose)	-	-	-	-	-	-
SAC (sucrose)	-	-	-	-	-	-
MEL (melibiose)	-	-	-	-	-	-
AMY (amygdalin)	-	-	-	-	-	-
ARA (arabinose)	-	-	-	-	-	-
OX (oxidase test)	-	+	-	-	+	-

Ghi chú: (+): dương tính; (-): âm tính.

Bảng 5. Kết quả phản ứng sinh hóa của các chủng vi khuẩn theo kit API 20NE.

Phản ứng sinh hóa	Chủng vi khuẩn			
	$T_3/1$	*$T_4/1$*	*CKT*	*$C_2/1$*
NO_3 (khử nitrate)	+	-	+	+
TRP (phản ứng indole)	-	-	+	+
GLU (lên men glucose)	-	-	-	-
ADH (arginine dihydrolase)	-	-	-	-
URE (urease)	-	-	+	+
ESC (esculin)	-	-	+	+
GEL (gelatinase)	-	-	+	+
PNG (β-galactosidase)	-	-	+	+
GLU - assim (đồng hóa glucose)	-	-	-	-
ARA (arabinose)	-	-	-	-
MNE (mannose)	-	-	-	-
MAN (D-mannitol)	+	-	-	-
NAG (N-acetyl glucosamine)	-	-	-	-
MAL (D-maltose)	-	-	-	-
GNT (gluconate)	-	-	-	-
CAP (capric acid)	-	+	-	-
ADI (adipic acid)	-	-	-	-
MLT (malic acid)	+	-	-	-
CIT (citrate)	+	+	-	-
PAC (phenyl acetic acid)	+	-	-	-
OX (oxidase)	+	-	+	+

Ghi chú: (+): dương tính; (-): âm tính.

Kết quả bảng 4 cho thấy, cả 4 chủng vi khuẩn TKT, T_2/2, C_2/2, C_4/2 dương tính với citrate, β-galactosidase, thủy phân gelatin, tra trên phần mềm API 20E V5.0 thì 4 chủng vi khuẩn này có độ tương đồng với chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia* là 96,7%. Hai chủng vi khuẩn T_1, C_3/1 dương tính với β-galactosidase, lysine decarboxylase, citrate, enzyme tryptophan deaminase, oxidase, thủy phân gelatin, tra phần mềm API 20E V5.0 cho thấy 2 chủng vi khuẩn này có độ tương đồng 99,7% với chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia.*

Bảng 5 cho thấy, 2 chủng vi khuẩn CKT và C_2/1 dương tính với phản ứng khử nitrate, phản ứng indole, urease, esculine, thủy phân gelatin, β-galactosidase, oxidase. Tra phần mềm API 20NE V8.0 thấy rằng 2 chủng vi khuẩn này có độ tương đồng 99,8% với chủng vi khuẩn *Chryseobacterium indologenes.*

Tại bảng 5, hầu hết các phản ứng sinh hóa của chủng vi khuẩn T_3/1 dương tính với phản ứng khử nitrate, phản ứng oxidase, sử dụng cơ chất mannitol, malic acid, citric acid, phenyl acetic acid, tra phần mềm API 20NE V8.0 cho thấy chủng vi khuẩn này có độ tương đồng 72,5% với chủng vi khuẩn *Delftia acidovorans.* Chủng vi khuẩn T_4/1 đều âm tính, chỉ dương tính với phản ứng citric acid, capric acid. Phần mềm API 20NE V8.0 cho thấy, chủng vi khuẩn này có độ tương đồng 90,9% với chủng vi khuẩn *Acinetobacter junii/johnsonii.*

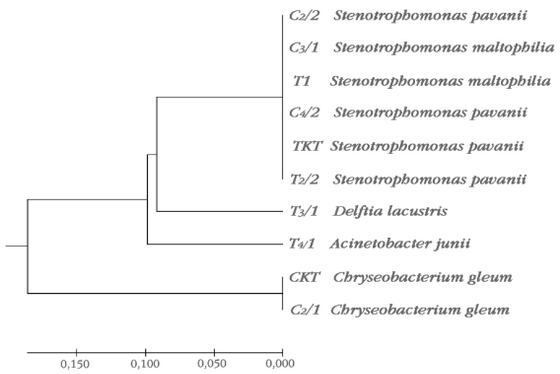
Các chủng vi khuẩn trước khi *định danh bằng* bộ kit API sẽ được nhuộm gram và thực hiện các phản ứng như oxidase và catalase. Theo hướng dẫn của nhà sản xuất bộ kit API [7] thì nhóm vi khuẩn gram âm và oxidase âm tính thì sử dụng bộ kit API 20E, tuy nhiên trong quá trình thử nghiệm kit API 20E, chủng T_4/1 chỉ cho kết quả chi *Acinetobacter,* do đó tiến hành thử nghiệm trên kit API 20NE để xác định loài. Tương tự, các chủng vi khuẩn gram âm và oxidase dương tính được thử nghiệm trên bộ kit API 20 NE, chủng T1 và C_3/1 cũng cho kết quả là chi *Stenotrophomonas*, do đó tiếp tục tiến hành thử nghiệm trên kit API 20E để xác định loài. Hai chi vi khuẩn *Stenotrophomonas* và *Acinetobacter* có thể dùng cả 2 loại kit API 20E, API 20NE.

Định danh vi khuẩn bằng phân tích trình tự gen 16S rRNA

Sau khi thực hiện phản ứng sinh hóa, tiến hành định danh 10 chủng vi khuẩn có hiệu suất chuyển hóa NO_2^- cao nhất (trên 95%) bằng phương pháp giải trình tự gen vùng 16S rDNA, kết quả được thể hiện ở bảng 6 và hình 1.

Bảng 6. Kết quả định danh các chủng vi khuẩn.

STT	Chủng vi khuẩn	Tên khoa học	Độ tương đồng
1	CKT	*Chryseobacterium gleum*	99%
2	C_2/1	*Chryseobacterium gleum*	100%
3	C_2/2	*Stenotrophomonas pavanii*	100%
4	C_3/1	*Stenotrophomonas maltophilia*	100%
5	C_4/2	*Stenotrophomonas pavanii*	100%
6	TKT	*Stenotrophomonas pavanii*	99%
7	T_1	*Stenotrophomonas maltophilia*	99%
8	T_2/2	*Stenotrophomonas pavanii*	100%
9	T_3/1	*Delftia lacustris*	99%
10	T_4/1	*Acinetobacter junii*	99%



Hình 1. Cây phát sinh loài các chủng vi khuẩn chuyển hóa nitrite.

Cây phát sinh loài ở hình 1 vẽ theo phương pháp UPGMA (Unweighted PairGroup Method with Arithmetical Averages) bằng phần mềm MEGA 7.2 thể hiện khi ở vùng đoạn gen được giải trình tự hầu như không phát sinh loài có họ hàng gần với các loại đã được định danh, chỉ riêng chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia* và *Stenotrophomonas pavanii* có độ tương đồng 100% và kết quả sinh hóa trên kit API cho thấy cả 6 chủng vi khuẩn đều là *Stenotrophomonas maltophilia,* tuy nhiên khi thực hiện nuôi các chủng vi khuẩn trên môi trường có sự hiện hiện của muối NaCl 4,5% và ủ vi khuẩn ở nhiệt độ 42°C thì hai chủng vi khuẩn C_3/1 và T_1 mọc trên môi trường thạch đĩa, còn 4 chủng vi khuẩn TKT, T_2/2, C_2/2, C_4/2, không thấy mọc trên môi trường. Tham khảo kết quả nghiên cứu của tác giả Guzik Urszula và cs (2009) [17], Patrıcia L. Ramos và cs (2011) [18] có thể nhận định chủng vi khuẩn C_3/1 và T_1 là *Stenotrophomonas maltophilia* và các chủng vi khuẩn TKT, T_2/2, C_2/2, C_4/2 là *Stenotrophomonas pavanii*.

Dựa vào kết quả giải trình tự gen 16S rRNA, có thể nhận định chủng vi khuẩn CKT và C_2/1 là *Chryseobacterium gleum*, chủng T_3/1 là *Delftia lacustris,* chủng ký hiệu T_4/1 là *Acinetobacter junii*.

Theo tác giả Phạm Thị Tuyết Ngân và cs (2011) [6], *Nitrosomonas nitrosa* và *Nitrobacter winogradskyi* là 2 loài vi khuẩn nitrite hóa hiện diện trong ao nuôi tôm sú thâm canh, phù hợp với nghiên cứu của các tác giả khác là nhóm vi khuẩn NO_2^- bao gồm 5 giống khác nhau: *Nitrosomonas, Nitrosococcus, Nitrosobrio, Nitrozolobus* và *Nitrosospira* [19-21]. Tuy nhiên, theo kết quả định danh sinh học phân tử trong nghiên cứu này đã xác định được các loài vi khuẩn *Stenotrophomonas pavanii*, *Chryseobacterium gleum*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Delftia lacustris*, *Acinetobacter junii* là các dòng chuyển hóa NO_2^- trong môi trường nước mặn được phân lập từ bùn đáy ở vịnh Xuân Đài, tỉnh Phú Yên. Nguyên nhân của kết quả trên có thể là do độ mặn của nước biển và thức ăn tươi cho tôm hùm làm ảnh hưởng đến hệ vi sinh vật chuyển hóa NO_2^- trong nước mặn và nhóm vi khuẩn được phân lập, định danh có kết quả khác với một số nghiên cứu phân lập vi khuẩn chuyển hóa NO_2^-

trong ao tôm thẻ chân trắng hay tôm sú. Hiện nay, những nghiên cứu về nhóm vi sinh vật chuyển hóa NO_2^- trong bùn nuôi tôm hùm còn rất hạn chế, các loài vi khuẩn được xác định trong nghiên cứu này vẫn chưa được đề cập đến việc chuyển hóa NO_2^- trong nuôi trồng thủy sản, tuy nhiên có một số nghiên cứu trên thế giới đã minh chứng vi khuẩn *Acinetobacter* sp. có khả năng chuyển hóa NO_2^- trong bùn của nước thải xử lý thực vật [22], chủng vi khuẩn *Delftia lacustris* có khả năng phân hủy chất peptidoglycan trong tự nhiên [23], chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia* có khả năng sử dụng các hợp chất thơm [17], chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas pavanii* phân lập từ thân của một giống mía ở Brazil có khả năng cố định nitơ [18], chủng vi khuẩn *Chryseobacterium gleum* phân hủy dầu mỏ tại các vùng đất nhiễm xăng dầu [24]. Trong các chủng vi khuẩn được định danh thì chủng vi khuẩn *Stenotrophomonas maltophilia* có khả năng xử lý các hợp chất chứa nitơ như ammonia, NO_2^- nhưng đây cũng là một chủng vi khuẩn gây nhiễm khuẩn cơ hội cho con người tại các bệnh viện. Vì vậy cần đặc biệt lưu ý và có biện pháp kiểm soát khi tiến hành sử dụng chủng vi khuẩn này trong các nghiên cứu sau.

Kết luận

Đã phân lập, tuyển chọn và định danh được 5 chủng vi khuẩn có khả năng chuyển hóa NO_2^- ở vùng bùn đáy lồng bè nuôi tôm hùm vịnh Xuân Đài, Phú Yên. Đó là các loài vi khuẩn như *Stenotrophomonas pavanii*, *Chryseobacterium gleum*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Delftia lacustris*, *Acinetobacter junii*. Trong đó, chủng *Stenotrophomonas pavanii* có khả năng chuyển hóa NO_2^- cao nhất trong thời gian 72 h với hiệu suất 98,21%, kế đến là chủng vi khuẩn *Chryseobacterium gleum, Delftia lacustris* có khả năng chuyển hóa NO_2^- với hiệu suất 97,99% và 97,29%. Có thể ứng dụng các chủng vi khuẩn này vào sản xuất chế phẩm sinh học ứng dụng xử lý NO_2^- trong nuôi trồng thủy sản.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được hoàn thành là một phần kết quả nghiên cứu của đề tài độc lập cấp nhà nước mã số ĐTĐL.CNN-60/15. Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] C.E. Boyd (1998), *Water Quality for Pond Aquaculture*, Auburn University.

[2] Nguyễn Hữu Hào, Trần Văn Vinh, Nguyễn Duy Lâm, Nguyễn Hải Bình, Lê Văn Hùng, Huỳnh Văn Cánh (2010), *Nghiên cứu đề xuất giải pháp khai thác bền vững nguồn lợi tôm hùm giống tỉnh Bình Định,* Chi cục Bảo vệ nguồn lợi thủy sản Bình Định.

[3] G.G. Ehrlich (1975), "Water quality: analytical methods - nitrifying bacteria (most probable number, MPN, method)"*, R. J. Pickering,* **75**, p.13.

[4] M.I. Aleem, M. Alexander (1960), "Nutrition and physiology of *Nitrobacter agilis*", *Applied and Environmental Microbiology*, **8(2)**, pp.80-84.

[5] APHA (2012), *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*.

[6] Phạm Thị Tuyết Ngân, Trần Nhân Dũng và Dương Minh Viễn (2011), "Khảo sát mật độ và sự đa dạng của vi khuẩn nitrate hóa trong ao nuôi tôm", *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, **20b**, tr.69-78.

[7] The Global Health Network (2013), *Bacterial Indenfitication Using BioMerieux API Kits.*

[8] Tim Schuurman, Richard F. de Boer, Anna M.D. Kooistra-Smid, and Anton A. van Zwet (2004), "Prospective study of use of PCR amplification and sequencing of 16s ribosomal DNA from cerebrospinal fluid for diagnosis of bacterial meningitis in a clinical setting", *Journal of Clinical Microbiology*, **42(2)**, pp.734-741.

[9] V. Degrange, R. Bardin (1995), "Detection and counting of Nitrobacter population in soil by PCR"*, Applied and Environmental Microbiology*, **61(6)**, pp.2093-2098.

[10] R.J. Rennie, E.L. Schmidt (1977), "Immunofluorescence studies nitrobacter population in soils", *Can. J. Microbiol.*, **23**, pp.1011-1017.

[11] Phạm Thị Tuyết Ngân và Nguyễn Hữu Hiệp (2010), "Biến động mật độ vi khuẩn hữu ích trong ao nuôi tôm sú (*Penaeus monodon*) thâm canh", *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, **14**, tr.166-176.

[12] A. Vanzella, M.A. Gurreno, R.D. Jones (1985), "Effects of CO_2 light on ammonium and nitrite oxidation by chemolithotrophic bacteria", *Mar. Ecol.-Pcol. Ser*., **57**, pp.69-76.

[13] B. Balmelle (1992), "Study of factors controlling nitrite build-up in biological processes for water nitrification", *Water Sci. Technol.*, **26**. pp.1018-1025.

[14] R.J. Olson (1981), "Differential photoinhibition of marine nitrifying bacteria: a possible mechanism for the formation of the primary nitrite maximum", *J. Mar. Res.*, **39**, pp.227-238.

[15] T. Yoshioka, Y. Saijo (1984), "Photoinhibition and recovery of NH_4^+ - oxidizing bacteria and NO_2 oxidizing bacteria", *J. Gen. Appl. Microbiol.,* **30**, pp.151-166.

[16] Nguyễn Thị Phi Oanh, Nguyễn Thị Trúc Mai (2019), "Phân lập vi khuẩn có khả năng chuyển hóa nitrite trong một số ao nuôi tôm ở Bạc Liêu", *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, **55(6B)**, tr.75-81.

[17] Guzik Urszula, Gre Izabela, Wojcieszy Ska Danuta, Abu Ek Sylwia (2009), "Isolation and characterization of a novel strain of *Stenotrophomonas maltophilia* possessing various dioxygenases for monocyclic hydrocarbon degradation", *Brazilian Journal of Microbiology*, **40**, pp.285-291.

[18] Patrıcia L. Ramos, Stefanie Van Trappen, Fabiano L. Thompson, Rafael S. Rocha, Heloiza R. Barbosa, Paul De Vos and Carlos A. Moreira-Filho (2011), "Screening for endophytic nitrogen-fixing bacteria in Brazilian sugar cane varieties used in organic farming and description of *Stenotrophomonas pavanii* sp.nov.", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **61**, pp.926-931.

[19] E. Bock and H.P. Koops (1992), "The genus nitrobacter and related genera in balows, truper, dsorkin, harder and schleifer", *A Handbook on the Biology of Bacteria*, **3**, pp.2302-2309.

[20] R.A. Herbert (1999), "Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems", *FEMS Microbiology Reviews*, **23**, pp.563-590.

[21] W.S. Waston, E. Book, H. Harms, H. Koops and A.B. Hooper (1989), "Nitrite - oxidizing bacteria", *Begrey's Manul of Systematic Bacteriology,* **3**, pp.1810-1815.

[22] Bin Li, Ran Lv, Ying Xiao, Wei Hu, Yuliang Mai, Jingwen Zhang, Lan Lin, Xiaoyong Hu (2019), "A novel nitrite-base aerobic denitrifying bacterium *Acinetobacter* sp. YT03 and its transcriptome analysis", *Frontiers in Microbiology*, **10**, pp.1-13.

[23] Niels O.G. Jørgensen, Kristian K. Brandt, Ole Nybroe1, Michael Hansen (2009), "*Delftia lacustris* sp. nov., a peptidoglycandegrading bacterium from fresh water and emended description of *Delftia tsuruhatensis* as a peptidoglycan-degrading bacterium", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **59**, pp.2195-2199.

[24] Đinh Thị Vân, Ngô Cao Cường (2018), "Phân lập, định danh và nghiên cứu đặc điểm sinh học một số chủng vi sinh vật có khả năng phân hủy dầu mỏ trong mẫu đất, bùn nhiễm xăng dầu tại Quân khu 7", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, **61(6)**, tr.24-28.

QUY ĐỊNH VỀ BÀI VIẾT ĐĂNG TẢI TRÊN TẠP CHÍ

Yêu cầu chung

Bài viết gửi đăng trên Tạp chí phải là bài viết nguyên thuỷ (chưa được công bố trước đó). Tác giả không được gửi đăng bài viết 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 viết gửi về Toà soạn dưới dạng file mềm và bản in; có thể gửi trực tiếp đến Tạp chí (Phòng 507, số 113 Trần Duy Hưng, Cầu Giấy, Hà Nội) hoặc qua hòm thư điện tử, địa chỉ: khcnvn@most.gov.vn.

Tên bài báo

- Tên bài báo được viết bằng tiếng Việt và tiếng Anh, trên trang đầu của bài báo, 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.

Tóm tắt

Tóm tắt bằng tiếng Việt và tiếng Anh. Nêu được mục đích, phương pháp nghiên cứu chính, kết quả nghiên cứu và kết luận chủ yếu. Từ khoá bằng cả tiếng Việt và tiếng Anh theo thứ tự alphabet. Chỉ số phân loại (theo hướng dẫn).

Dẫn nhập/đặt vấn đề

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.

Đối tượng và phương pháp

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...

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.

Phần kết quả nghiên cứu chỉ trình bày các kết quả nghiên cứu của đề tài, không giải thích, so sánh và bàn luận.

Bàn luận

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.

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.

Chú thích và tài liệu tham khảo

Chú thích được đánh số theo thự 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 1 hoặc [2, 5, 7-9] với nhiều số chỉ dẫn.

Tác giả (Năm xuất bản), "Tên tài liệu được trích dẫn", *Tên nguồn,* **tập (số)**, pp<trang đầu-trang cuối>

Tác giả: là tác giả/các tác giả của tài liệu được tham khảo, trích dẫn.

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…

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*).

Tập (số): dành cho nguồn trích là tạp chí, sách hoặc các xuất bản phẩm khác (phần này **in đậm**).

Trang đầu-trang cuối là số thứ tự các trang phản ánh nơi cư trú của tài liệu được trích dẫn trong tài liệu nguồn.

Chú ý: nếu có ≥ 2 tài liệu tham khảo do cùng 1 tác giả/nhóm tác giả, cùng năm công bố, thì các tài liệu tham khảo này cần được đánh dấu a, b… sau năm xuất bản (ví dụ: 1986a).

Nếu có một số tài liệu tham khảo trong cùng 1 bài báo được trích dẫn có số trang khác nhau thì cần trích dẫn thêm số trang, ví dụ: Kitchen (1982, p 39).

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.

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 thuỷ 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 Y - dược học

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

TẠP CHÍ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

Vietnam Journal of Science and Technology - MOST

Volume 63 - Number 9 - September 2021

Đặc điểm xét nghiệm đông máu thường quy và ROTEM ở bệnh nhân đa chấn thương tại thời điểm nhập viện.
Trần Thị Hằng, Trịnh Thị Thu Hiền, Nguyễn Văn Chỉnh, Đoàn An Sơn, Hà Văn Phú, Trần Thị Thanh Huyền, Dương Công Nguyên

Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và tình trạng di căn của ung thư tuyến giáp thể nang. 1
Nguyễn Xuân Hậu, Nguyễn Thị Phương Anh, Lê Văn Quảng

Phát hiện đột biến gen *RB1* trên mẫu mô u nguyên bào võng mạc tại miền Bắc Việt Nam năm 2020. 6
Lê Thị Phương, Đào Nguyễn Hà Linh, Nguyễn Minh Ngọc, Trần Huy Thịnh, Trần Vân Khánh

Sàng lọc các hợp chất tương tự nucleotide và nucleoside ức chế enzym RNA-dependent RNA polymerase của SARS-CoV-2 bằng phương pháp docking phân tử nhằm điều trị bệnh COVID-19. 10
Tạ Thị Thu Hằng, Nguyễn Bảo Kim, Lê Đăng Huy, Bùi Thanh Tùng

Đánh giá chất lượng phôi các giai đoạn khi nuôi cấy trong môi trường nồng độ oxy thấp. 14
Nguyễn Linh Chi, Ngô Thị Tường Châu, Nguyễn Đình Tảo, Nguyễn Ngọc Diệp

Nghiên cứu hoạt tính kháng *Escherichia coli* sinh enzyme β-lactamase phổ rộng (ESBL) của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. SS473 phân lập từ thực vật. 22
Nguyễn Trung Hiếu, Nguyễn Phước Đạt, Nguyễn Thị Ngọc Quyên, Trần Lệ Trúc Hà, Quan Quốc Đăng, Nguyễn Hoàng Chương

Đánh giá khả năng sử dụng Des-γ carboxy prothrombin huyết thanh trong chẩn đoán ung thư biểu mô tế bào gan. 26
Nguyễn Đăng Quân, Nguyễn Thị Thanh Thảo, Phạm Nguyễn Thanh Thuỷ, Lê Thị Thuý Hằng, Trần Công Duy Long, Đinh Minh Hiệp

Vận chuyển thuốc qua da bằng kỹ thuật điện di ion: ưu, nhược điểm và phát hiện mới từ những nghiên cứu. 33
Nguyễn Thị Hồng Đức, Võ Quốc Ánh

Đặc điểm hệ nấm nội cộng sinh rễ cây hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) ở một số tỉnh phía Nam. 39
Nguyễn Vũ Phong, Vũ Trung Nguyên, Trần Kiên, Hà Thị Trúc Mai

Các phương pháp chẩn đoán bệnh virus trên cà chua (*Solanum lycopersicum*). 44
Vũ Tuấn Nam, Chu Đức Hà, Lê Tiến Dũng

Nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng trong quá trình sản xuất bột dinh dưỡng ăn liền từ ốc gai *Indothais lacera* (Born, 1778). 48
Lê Doãn Dũng, Đặng Thị Yến, Vũ Thị Hường, Nguyễn Thị Hồng Ngọc, Phan Thị Thùy Dương, Phạm Bảo Huyền Linh, Quách Tú Mỹ

Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn chuyển hóa nitrite từ bùn đáy của vùng nuôi tôm hùm ở vịnh Xuân Đài, tỉnh Phú Yên. 54
Trương Phước Thiên Hoàng, Đỗ Huỳnh Dân, Võ Trần Quốc Thắng, Nguyễn Phú Hòa

Characteristics of routine coagulation testing and thromboelastometry in polytrauma patients at admission. 1
Thi Hang Tran, Thi Thu Hien Trinh, Van Chinh Nguyen, An Son Doan, Van Phu Ha, Thi Thanh Huyen Tran, Cong Nguyen Duong

Clinicopathological and metastasis status of follicular thyroid cancer. 6
Xuan Hau Nguyen, Thi Phuong Anh Nguyen, Van Quang Le

Detecting *RB1* gene mutations in retinoblastoma tumour of patients in Northern Vietnam in 2020. 10
Thi Phuong Le, Nguyen Ha Linh Dao, Minh Ngoc Nguyen, Huy Thinh Tran, Van Khanh Tran

Screening nucleotide and nucleoside analogues as potential inhibitors of SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase by the molecular docking method for the treatment of COVID-19. 14
Thi Thu Hang Ta, Bao Kim Nguyen, Dang Huy Le, Thanh Tung Bui

Evaluation of the quality of embryo based on morphology cultured at low oxygen concentration. 22
Linh Chi Nguyen, Thi Tuong Chau Ngo, Dinh Tao Nguyen, Ngoc Diep Nguyen

Study of antibacterial activity of *Streptomyces* sp. SS473 isolated from plants against ESBL-producing *Escherichia coli*. 26
Trung Hieu Nguyen, Phuoc Dat Nguyen, Thi Ngoc Quyen Nguyen, Le Truc Ha Tran, Quoc Dang Quan, Hoang Chuong Nguyen

Evaluating the diagnostic value of serum Des-γ carboxy prothrombin in the detection of hepatocellular carcinoma. 33
Dang Quan Nguyen, Thi Thanh Thao Nguyen, Nguyen Thanh Thuy Pham, Thi Thuy Hang Le, Cong Duy Long Tran, Minh Hiep Dinh

Enhancement of drug delivery across the skin barrier using iontophoresis technique: pros, cons, and novel findings from representative studies. 39
Thi Hong Duc Nguyen, Quoc Anh Vo

Characterisation of arbuscular mycorrhizal fungi community on black pepper (*Piper nigrum* L.) in Northern. 44
Vu Phong Nguyen, Trung Nguyen Vu, Kien Tran, Thi Truc Mai Ha

Molecular methods for detection of viral diseases in tomato (*Solanum lycopersicum*). 48
Tuan Nam Vu, Duc Ha Chu, Tien Dung Le

Study of some affecting factors in the production of instant nutritional powder from sea snail *Indothais lacera* (Born, 1778). 54
Doan Dung Le, Thi Yen Dang, Thi Huong Vu, Thi Hong Ngoc Nguyen, Thi Thuy Duong Phan, Bao Huyen Linh Pham, Tu My Quach

Isolation and selection of nitrite metabolising bacteria from the bottom mud of lobster culture area in Xuan Dai bay, Phu Yen province. 59
Phuoc Thien Hoang Truong, Huynh Dan Do, Tran Quoc Thang Vo, Phu Hoa Nguyen