



ISSN 1859-4794

TẠP CHÍ

KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ Việt Nam

**Vietnam Journal of
Science and Technology - MOST**

B

Tập 62 - Số 5 - Tháng 5 năm 2020

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 Hiến - 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

TỔNG BIÊN TẬP

Đặng Ngọc Bảo

PHÓ TỔNG BIÊN TẬP

Nguyễn Thị Hải Hằng
Nguyễn Thị Hương Giang

TRƯỞNG BAN BIÊN TẬP

Phạm Thị Minh Nguyệt

TRƯỞNG BAN TRỊ SỰ

Lương Ngọc Quang Hưng

TRÌNH BÀY

Đinh Thị Luận

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 - Vietnam National University, Hanoi
Vu Minh Giang - Vietnam National University, 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 Duc Loc - Ho Chi Minh City University of Technology
Nguyen Thi My Loc - University of Education, Vietnam National University, 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 - Vietnam National University, Hanoi
Nguyen Thanh Phuong - Can Tho University
Nguyen Thanh Thuy - University of Engineering and Technology - Vietnam National University, Hanoi
Pham Hung Viet - VNU University of Science

EDITOR-IN-CHIEF

Dang Ngoc Bao

DEPUTY EDITORS

Nguyen Thi Hai Hang
Nguyen Thi Huong Giang

HEAD OF EDITORIAL BOARD

Pham Thi Minh Nguyet

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: khcnvn@most.gov.vn
Tạp chí điện tử: b.vjst.vn

EDITORIAL OFFICE

113 Tran Duy Hung Str. - Cau Giay Dist. - Hanoi
Tel: (84.24) 39436793; Fax: (84.24) 39436794
Email: khcnvn@most.gov.vn
E-journal: b.vjst.vn

GIẤY PHÉP XUẤT BẢN

Số 1153/GP-BTTTT ngày 26/7/2011
Số 2528/GP-BTTTT ngày 26/12/2012
Số 592/GP-BTTTT ngày 28/12/2016
Giá: 18000^d

PUBLICATION LICENCE

No.1153/GP-BTTTT 26th July 2011
No.2528/GP-BTTTT 26th December 2012
No.592/GP-BTTTT 28th December 2016

Nghiên cứu sự biểu hiện mRNA một số gen liên quan đến con đường *JAK/STAT* và biểu hiện viêm ở bệnh nhân ung thư hạch

Nguyễn Thị Xuân^{1*}, Trần Thị Phương Thảo², Lê Phương Hà³, Hoàng Văn Tổng²

¹Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Nghiên cứu Y dược học Quân sự, Học viện Quân y

³Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Ngày nhận bài 21/10/2019; ngày chuyển phản biện 25/10/2019; ngày nhận phản biện 22/11/2019; ngày chấp nhận đăng 4/2/2020

Tóm tắt:

Ung thư hạch (lymphoma) là bệnh lý ác tính có nguồn gốc từ sự biến đổi của các tế bào lympho trong hệ thống miễn dịch, là một trong những loại ung thư có tỷ lệ mắc và tử vong cao nhất trên thế giới và ở Việt Nam. Ung thư hạch được đặc trưng bởi các yếu tố khác nhau, trong đó có sự kích hoạt bất thường của con đường tín hiệu *JAK/STAT* qua sự hoạt hóa quá mức của các gen *STAT* và sự rối loạn trong kiểm soát miễn dịch. Nghiên cứu này xác định sự biểu hiện mRNA của các gen liên quan đến con đường *JAK/STAT* là *Klotho*, *STAT1*, *STAT3*, *STAT5* và *STAT6* cùng với các gen kiểm soát miễn dịch là *LAG-3*, *CTLA-4*, *PD-1* bằng phương pháp real time-PCR để làm rõ vai trò của chúng trong ung thư hạch, đồng thời xác định nồng độ TNF- α trong máu ngoại vi bằng phương pháp ELISA. Kết quả cho thấy biểu hiện của các gen *STAT1*, *STAT3*, *STAT5* tăng cao ở nhóm bệnh nhân. Ngược lại, *LAG-3* có biểu hiện giảm đi ở nhóm bệnh nhân so với nhóm đối chứng. Nồng độ TNF- α xuất hiện ở nhóm bệnh có giá trị trung bình là 7,789 pg/ml, cao hơn rất nhiều so với nhóm đối chứng. Kết quả của nghiên cứu cho thấy, *STAT1*, *STAT3*, *STAT5* và *LAG-3* có thể là các marker phân tử quan trọng và tiềm năng trong chẩn đoán phát hiện sớm ung thư hạch.

Từ khóa: *CTLA-4*, *Klotho*, *LAG-3*, mRNA, *PD-1*, *STAT*, ung thư hạch.

Chỉ số phân loại: 3.1

Đặt vấn đề

Ung thư hạch (lymphoma) là bệnh lý ác tính bắt nguồn từ những tế bào lympho, khi cơ thể bị tấn công bởi các kháng nguyên như vi khuẩn hay virus, sự hoạt động của hệ miễn dịch bẩm sinh sẽ được kích hoạt thông qua các con đường nội bào. Một trong những nguyên nhân dẫn tới sự hoạt động bất thường chuyển ác tính của các tế bào lympho trong các hạch bạch huyết là sự rối loạn của các con đường truyền tín hiệu, trong đó con đường chính là *JAK/STAT* (Janus kinase/signal transducers and activators of transcription) và sự biểu hiện bất thường của các thụ thể đóng vai trò là các điểm kiểm tra miễn dịch [1]. Thông qua con đường tín hiệu nội bào, các interferon (IFN) và các cytokine như TNF- α là những phối tử của con đường *JAK/STAT* trên bề mặt tế bào [2]. Khi tình trạng viêm nhiễm kéo dài, sự hoạt động quá mức của các tế bào miễn dịch kèm theo các yếu tố viêm sẽ gây rối loạn tín hiệu tế bào, thay đổi hoạt động của các protein *STAT* và hoạt hóa các gen ung thư oncogen. Nhiều nghiên cứu đã cho thấy sự hoạt động quá mức của protein *STAT* đóng vai trò quan trọng trong sự hình thành và phát

triển của khối u. Đối với u lympho, sự hoạt động của *STAT3* có vai trò duy trì sự biến đổi ác tính, bên cạnh đó *STAT5* cũng được tìm thấy trong quá trình kích hoạt khối u ác tính, đặc biệt là bạch cầu và lymphoma. *STAT1* và *STAT6* được chứng minh như là yếu tố điều hòa quan trọng trong cơ chế bệnh sinh của ung thư hạch [3].

Thêm vào đó, *Klotho* là một trong những protein chống lão hóa được xem là yếu tố ức chế sự phát triển của khối u tác động đến con đường tín hiệu *JAK/STAT*. Sự tăng hoạt động của *JAK/STAT* dẫn tới giảm hoạt động của gen *Klotho* đưa các tế bào thoát khỏi con đường apoptosis [4]. *PD-1* và *PD-L1* là những phân tử đặc trưng của hệ thống miễn dịch có vai trò cân bằng chức năng miễn dịch của cơ thể. Khi liên kết với các phối tử, *PD-1* cung cấp tín hiệu đồng ức chế, dẫn tới điều hòa ngược các chức năng của tế bào T và B để duy trì sự cân bằng miễn dịch. Tuy nhiên, trong tế bào khối u và các tế bào di căn có sự biểu hiện quá mức của các thụ thể *PD-L1*, tín hiệu *PD-1* có thể luôn được kích hoạt và duy trì sự tương tác đặc hiệu của *PD-1* và *PD-L1*, dẫn đến suy giảm nghiêm trọng tế bào T. Khi đó, số lượng tế bào miễn dịch

*Tác giả liên hệ: Email: xuannt@igr.ac.vn

Expression of genes involving in *JAK/STAT* signaling pathway and inflammation in patients with lymphoma

Thi Xuan Nguyen^{1*}, Thi Phuong Thao Tran²,
Phuong Ha Le³, Van Tong Hoang²

¹Institute of Genome Research,
Vietnam Academy of Science and Technology

²Institute of Biomedicine and Pharmacy,
Vietnam Military Medical Academy

³University of Science and Technology of Hanoi,
Vietnam Academy of Science and Technology

Received 21 October 2019; accepted 4 February 2020

Abstract:

Lymphoma is a malignant cancer that originates from the uncontrolled growth of lymphocytes in the immune system. Lymphoma is one of the cancer types with the highest incidence and mortality rate worldwide and in Vietnam. The pathogenesis of lymphoma is characterized by various factors including the *JAK/STAT* signaling pathway through abnormal activation of *STAT* genes and the disorders of immune regulation. This study aims to determine the expression of mRNA of genes in relation to *JAK/STAT* pathway including *Klotho*, *STAT1*, *STAT3*, *STAT5*, and *STAT6* as well as immune regulatory genes *LAG-3*, *CTLA-4*, and *PD-1* by realtime PCR method to explore their roles in lymphoma. At the same time, the levels of TNF- α in serum samples were also measured by ELISA method. The results showed that the relative expressions of *STAT1*, *STAT3*, and *STAT5* were significantly higher while *LAG-3* expression was lower in patients with lymphoma compared to controls. The TNF- α levels in lymphoma patients were 7.789 pg/ml which was dramatically higher than these of the controls. The results indicated that *STAT1*, *STAT3*, *STAT5*, and *LAG-3* might be considered as potential biomarkers for early detection of lymphoma.

Keywords: *CTLA-4*, *Klotho*, *LAG-3*, lymphoma, mRNA, *PD-1*, *STAT*.

Classification number: 3.1

không đủ để nhận ra các tế bào lạ hay tế bào ung thư [1]. Ngoài thụ thể *PD-1*, trên các tế bào lympho có chức năng điều hòa miễn dịch còn có các thụ thể *LAG-3* và *CTLA-4*. Trên bề mặt tế bào ung thư có các thụ thể MHC lớp II tương tác đặc hiệu với *LAG-3*, và các thụ thể anti *CTLA-4* như *CD80* và *CD86* tương tác đặc hiệu với *CTLA-4*, làm giảm hoạt động của tế bào T, dẫn tới sự suy yếu của hệ thống miễn dịch chống lại khối u [1].

Đây là những gen quan trọng đang được nghiên cứu ứng dụng trong lâm sàng cho chẩn đoán và điều trị nhiều loại ung thư, trong đó có ung thư hạch. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá biểu hiện mRNA của các gen *Klotho*, *LAG-3*, *CTLA-4*, *PD-1*, *STAT1*, *STAT3*, *STAT5*, *STAT6* và nồng độ TNF- α ở bệnh nhân ung thư hạch để làm rõ thêm vai trò và tiềm năng của các gen này trong chẩn đoán và điều trị ung thư hạch.

Đối tượng và phương pháp

Đối tượng nghiên cứu

Tại Bệnh viện 103, Học viện Quân y, Hà Nội, chúng tôi lấy mẫu máu ngoại vi được thu thập từ 18 bệnh nhân chưa điều trị và được chẩn đoán mắc bệnh ung thư hạch. Các bệnh nhân đã được thăm khám lâm sàng, làm các xét nghiệm cận lâm sàng và giải phẫu bệnh để chẩn đoán xác định bệnh ung thư hạch. Nhóm đối chứng gồm 18 người khỏe mạnh, trong đó không có cá nhân nào đang dùng thuốc hoặc bị bất kỳ bệnh cấp tính hay mạn tính nào khác. Tất cả bệnh nhân và tình nguyện viên đã ký văn bản đồng ý tham gia nghiên cứu. Các quy trình thí nghiệm và việc chăm sóc từng cá nhân được thực hiện theo luật pháp Việt Nam và đã được phê duyệt bởi Hội đồng Đạo đức của Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Tách chiết RNA tổng số và phân tích mức độ biểu hiện gen bằng kỹ thuật RT-PCR

RNA tổng số được phân lập bằng cách sử dụng Kit Qiashredder và RNeasy Mini Kit từ Qiagen theo hướng dẫn của nhà sản xuất. cDNA được tổng hợp từ RNA tổng số (1 μ g RNA tổng số trong 12,5 μ l nước DEPC) trộn với 1 μ l oligo-dT (500 μ g/ml, Invitrogen) và ủ ở 70°C trong 2 phút. Các primer được sử dụng bao gồm: mỗi gen *CTLA-4*: 5'-GTC CGG GTG ACA GTG CTT CG-3' (mũi xuôi) và 5'-CCA GGT AGT ATG GCG GTG GG-3' (mũi ngược); mỗi gen *PD-1*: 5'-TGC AGC TTC TCC AAC ACA TC-3' (mũi xuôi) và 5'-CAC GCT CAT GTG GAA GTC AC-3' (mũi ngược); mỗi gen *STAT1*: 5'-CCC TTC TGG CTT TGG ATT GAA-3' (mũi xuôi) và 5'-CTT CCC GGG AGC TCT CAC TGA-3' (mũi ngược); mỗi gen *STAT3*: 5'-GGA GGA GTT GCA GCA AAA AG-3' (mũi xuôi) và 5'-TGT GTT TGT GCC CAG AAT GT-3' (mũi ngược); mỗi gen *STAT5*: 5'-

CAG ACC AAG TTT GCA GCC AC-3' (mũi xuôi) và 5'-CAC AGC ACT TTG TCA GGC AC-3' (mũi ngược); mỗi gen *STAT-6*: 5'-GCC CAC TCA CTC CAG AGG ACC T-3' (mũi xuôi) và 5'-GGT GTT GGG GAA AGT CGA CAT-3' (mũi ngược); mỗi gen *LAG-3*: 5'-CCT CAC TGT TCT GGG TCT GG-3' (mũi xuôi) và 5'-GGA TAT GGC AGG TGT AGG TC-3' (mũi ngược); mỗi gen *GAPDH*: 5'-GGA GCG AGA TCC CTC CAA A-3' (mũi xuôi) và 5'-GGC TGT TGT CAT ACT TCT CAT-3' (mũi ngược). Phản ứng PCR chứa 20 µl tổng thể tích gồm 2 µl cDNA, 2,4 µl MgCl₂ (3 µM), 1 µl cho 2 loại môi (0,5 µM mỗi loại), 2 µl cDNA Master SybrGreen I mix (Roche Molecular Biochemicals) và 12,6 µl nước DEPC. Đoạn cDNA được khuếch đại ở 95°C trong 10 giây, 62°C trong 10 giây, và 72°C trong 16 giây, số vòng nhắc lại là 40 vòng. Phương pháp RT-PCR định lượng cho *CTL4*, *PD-1*, *STAT1*, *STAT3*, *STAT5*, *STAT6* và *LAG-3* được thực hiện trên hệ thống LightCycler System (Roche Diagnostics). Tỷ lệ giữa gen tương ứng và *GAPDH* đối chứng được tính trên mỗi mẫu theo phương pháp ngưỡng chu trình.

Phương pháp đo nồng độ TNF-α bằng ELISA

Lấy 2 ml mẫu máu ngoại vi của người bệnh và người khỏe, sau đó tách huyết tương và trữ đông ở -20°C cho đến khi phân tích thí nghiệm ELISA. Để đo nồng độ TNF-α trong huyết tương, chúng tôi sử dụng kit thương mại ELISA

Max Deluxe Set Human TNF-α (Biolegend), quy trình dựa trên những hướng dẫn cụ thể của Biolegend.

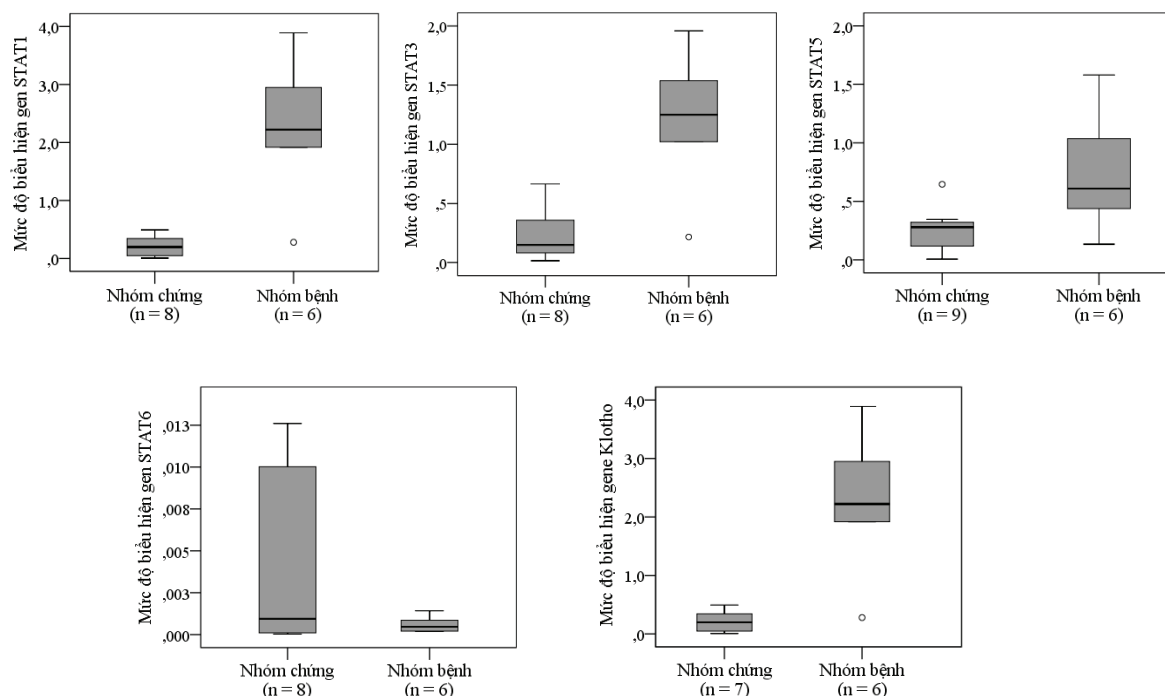
Phân tích thống kê

Số liệu được nhập và quản lý bằng Excel 2013 và được phân tích bằng phần mềm SPSS v.20. Kiểm định sự khác biệt giữa các biến định lượng phân bố không chuẩn bằng phương pháp Mann-Whitney U test. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong các phân tích so sánh khi giá trị $p < 0,05$.

Kết quả

Mức độ biểu hiện của một số gen liên quan đến con đường JAK/STAT trong ung thư hạch

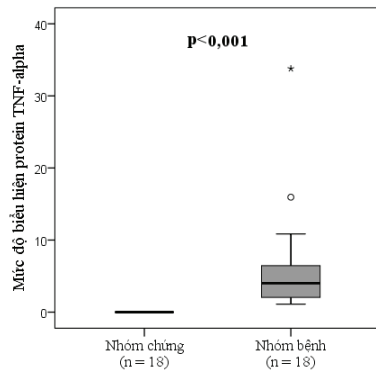
Các gen liên quan đến con đường tín hiệu *JAK/STAT* nghiên cứu bao gồm *Klotho*, *STAT1*, *STAT3*, *STAT5*, và *STAT6*. Kết quả phân tích cho thấy sự biểu hiện tương đối của các gen *STAT1*, *STAT3*, *STAT5* cao hơn ở nhóm bệnh so với nhóm đối chứng (hình 1). Mức độ biểu hiện tương đối của gen *STAT1* ở nhóm bệnh (2,246) cao hơn nhóm đối chứng (0,209) 10,7 lần. Mức độ biểu hiện của *STAT3* ở nhóm bệnh (1,205) cao gấp 5,2 lần so với nhóm đối chứng (0,232) và mức độ biểu hiện của gen *STAT5* ở nhóm bệnh (0,734) cao hơn 3,01 lần so với nhóm đối chứng (0,244). Kết quả phân tích cũng cho thấy có sự khác biệt giữa biểu hiện tương đối của gen *STAT6* và gen *Klotho* giữa nhóm bệnh so với nhóm đối chứng (hình 1).



Hình 1. Mức độ biểu hiện các gen liên quan đến con đường JAK/STAT trong các nhóm nghiên cứu ở bệnh nhân ung thư hạch.

Nồng độ TNF- α trong ung thư hạch

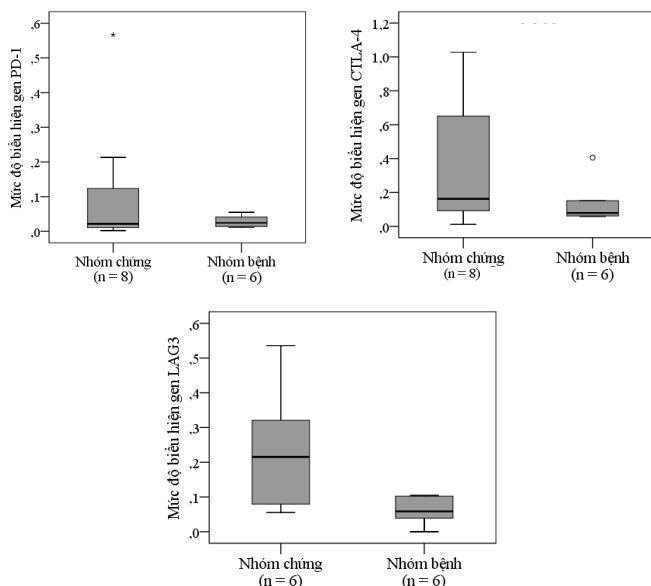
Kết quả phân tích nồng độ TNF- α trong máu ngoại vi ở bệnh nhân ung thư hạch cho thấy nồng độ TNF- α cao hơn có ý nghĩa thống kê ở nhóm bệnh nhân ung thư hạch so với nhóm đối chứng ($p < 0,001$). Nồng độ TNF- α trung bình ở nhóm bệnh là 7,789 pg/ml (hình 2).



Hình 2. Nồng độ TNF- α trong các nhóm nghiên cứu ở bệnh nhân ung thư hạch.

Mức độ biểu hiện của các gen liên quan đến kiểm soát miễn dịch trong ung thư hạch

Các gen liên quan đến kiểm soát miễn dịch được đưa vào nghiên cứu bao gồm *LAG-3*, *CTLA-4*, *PD-1* ở nhóm nghiên cứu. Kết quả phân tích cho thấy sự biểu hiện tương đối của gen *LAG-3* khác biệt giữa nhóm bệnh và nhóm đối chứng. Biểu hiện của gen *LAG-3* ở nhóm bệnh (0,139) thấp hơn nhóm đối chứng (0,356) là 2,56 lần. Có sự biểu hiện khác nhau của gen *CTLA-4* và gen *PD-1* (hình 3).



Hình 3. Mức độ biểu hiện các gen kiểm soát miễn dịch trong các nhóm nghiên cứu ở bệnh nhân ung thư hạch.

Bàn luận

Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy mức biểu hiện mRNA của các gen *STAT1*, *STAT3*, *STAT5* tăng cao hơn ở nhóm bệnh nhân so với nhóm đối chứng và biểu hiện gen *LAG-3* thấp hơn ở nhóm bệnh so với nhóm đối chứng. Sự rối loạn con đường truyền tín hiệu nội bào *JAK/STAT* là một trong những yếu tố quan trọng tham gia vào quá trình hình thành bệnh lý và chuyển từ trạng thái hoạt động bình thường sang bất thường của tế bào lympho. Sự biến đổi của con đường *JAK/STAT* trong bệnh nhân lymphoma Hodgkin có ý nghĩa trong cơ chế bệnh sinh, trong đó 87% số trường hợp trong nghiên cứu này cho thấy sự thay đổi nhiều gen trong con đường *JAK/STAT* bao gồm *STAT3*, *STAT5*, *JAK1*, *JAK2* và *PTPN1* [5].

Hoạt hóa *STAT1* là mấu chốt trong việc giám sát miễn dịch khối u. Tuy nhiên, *STAT1* có thể thúc đẩy quá trình gây ung thư và phát triển của khối u khi có sự hoạt hóa và biểu hiện bất thường. Sự hoạt hóa bất thường *STAT1* đã được quan sát thấy ở nhiều loại tế bào ác tính như ung thư vú, ung thư biểu mô vảy ở đầu và cổ, khối u ác tính, ung thư hạch và bệnh bạch cầu. Điều này cho thấy biểu hiện bất thường *STAT1* có thể góp phần tăng sinh khối u thay vì ức chế sự chuyển hóa ác tính [6]. Mức độ biểu hiện mức protein của *STAT1* tăng cao và được hoạt hóa mạnh trong dòng tế bào ung thư; ngăn cản sự hoạt hóa protein *STAT1* gây ra sự apoptosis tế bào và làm giảm mạnh sự hoạt động của những gen chống apoptosis *IAP-1*, *IAP-2*, *Bcl-xL*, *Bfl1* và *TraF1* [6]. Nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy mức độ biểu hiện mRNA của gen *STAT1* cao hơn ở nhóm bệnh nhân ung thư hạch.

Biểu hiện *STAT3* có vai trò quan trọng đối với sự sống của tế bào ung thư do *STAT3* hoạt hóa các protein chống apoptosis như Survivin và các thành viên của họ *Bcl* hay các protein liên quan đến quá trình kiểm soát chu trình tế bào như cyclin D1, c-Myc và pim-1/2 [7]. *STAT3* như là một yếu tố thúc đẩy và tăng sinh trong nhóm tế bào B xâm lấn có nguồn gốc từ u lympho. Mức độ biểu hiện protein *STAT3* ở bệnh nhân ung thư hạch tăng cao làm tăng biểu hiện của *PD-L1* trong các tế bào T, hoạt hóa *STAT3* quá mức có thể thúc đẩy quá trình trốn tránh miễn dịch của các tế bào ung thư, góp phần vào sự phát triển của khối u [8]. Ở mức độ biểu hiện mRNA, chúng tôi đã đưa ra kết quả tương đồng về sự biểu hiện gen của *STAT3*, mức độ biểu hiện mRNA của *STAT3* cao hơn ở nhóm bệnh nhân ung thư hạch so với nhóm đối chứng.

Biểu hiện bất thường của *STAT5* làm tăng sự biểu hiện của BIC/miR-155 gây ung thư, tăng sinh các tế bào T ác tính [9]. *STAT5* được hoạt hóa cần thiết cho tiến triển của ung thư hạch (lymphoma Hodgkin), *STAT5* gây ra sự tăng sinh trong các tế bào B thông qua tín hiệu IL-21 và con đường *JAK/STAT* bằng cách ức chế sự apoptosis của tế bào hình thành trạng thái bất tử, chuyển các tế bào B thành tế

bào ung thư [10]. Trong nghiên cứu này, ở mức độ biểu hiện mRNA đã cho kết quả tương đồng về mức độ biểu hiện tăng cao của gen *STAT5* trong nhóm bệnh nhân ung thư hạch so với nhóm đối chứng. Thêm vào đó, biểu hiện tăng cao của *STAT6* đã được nhận thấy trong các dòng tế bào có nguồn gốc từ những tế bào lymphoma Hodgkin. Với vai trò hoạt hóa các gen ức chế apoptosis *IAP-1*, *IAP-2*, *Bcl-xL*, *Bfl* và *TraF1*, *STAT6* có khả năng thúc đẩy sự sống của các tế bào tạo điều kiện thuận lợi chuyển sang ung thư [6]. Đột biến gen *STAT6* làm tăng mức độ biểu hiện của *STAT6* trong lymphoma không Hodgkin có vai trò quan trọng trong hình thành và phát triển ung thư [11]. Tuy nhiên, kết quả của chúng tôi về biểu hiện mRNA của *STAT6* trong ung thư hạch có sự khác biệt so với nhóm đối chứng là người khỏe mạnh.

Sự biểu hiện thấp hơn đáng kể của *Klotho* đã được quan sát trong các bệnh nhân ung thư hạch tế bào T so với các hạch bạch huyết bình thường [12]. Chúng tôi cũng đưa ra kết quả về sự khác nhau giữa biểu hiện mRNA của *Klotho* giữa nhóm bệnh nhân ung thư hạch và nhóm đối chứng. Sự khác nhau về kết quả này có thể là do các nghiên cứu trước đây tập trung so sánh mức độ biểu hiện trong mô u và mô lành lân cận để tìm thấy sự khác biệt trong sự biểu hiện gen *Klotho*, còn nghiên cứu của chúng tôi thực hiện trên đối tượng nhóm bệnh và nhóm đối chứng là người khỏe mạnh. TNF- α là cytokine điều hòa miễn dịch liên quan đến chức năng tế bào B và T, đóng một vai trò quan trọng trong cơ chế gây viêm và ung thư. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy sự biểu hiện của TNF- α ở nhóm bệnh cao hơn so với nhóm đối chứng.

LAG-3 là một thành viên của siêu họ *immunoglobulin* và có chức năng như yếu tố điều hòa âm tính trong cân bằng nội môi tế bào T và biểu hiện *LAG-3* đầu tiên được phát hiện trong các tập hợp tế bào CD4⁺, CD8⁺ và NK khi được hoạt hóa. *LAG-3* được biểu hiện bởi lympho T trong các trường hợp mắc bệnh Hodgkin Lymphoma, đặc biệt là ở các mô ác tính [13]. *LAG-3* thường không có mặt trên các tế bào T đang chờ hoạt hóa mà được điều hòa biểu hiện trên các tế bào T đã được kích hoạt. Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy sự giảm biểu hiện của *LAG-3* trong những bệnh nhân ung thư hạch so với nhóm đối chứng.

Tuy nhiên, nghiên cứu này có một số hạn chế là cỡ mẫu dùng để nghiên cứu mức độ biểu hiện của các gen ở bệnh nhân ung thư hạch còn hạn chế, do đó các nghiên cứu tương tự trong tương lai cần tăng số lượng mẫu phân tích. Một hạn chế nữa đó là chưa thể phân tích mối liên quan giữa mức độ biểu hiện các gen với các thông số lâm sàng và cận lâm sàng. Các nghiên cứu tiếp theo cần phân tích mối liên quan này để hiểu rõ hơn vai trò của các gen nghiên cứu đối với biểu hiện lâm sàng ở các bệnh nhân ung thư hạch.

Kết luận

Nghiên cứu cho thấy, có sự tăng cao rõ rệt mức độ biểu hiện mRNA của các gen *STAT1*, *STAT3*, *STAT5* và giảm biểu

hiện mRNA của gen *LAG-3* ở bệnh nhân ung thư hạch so với người khỏe mạnh. Sự biểu hiện tăng bất thường của *STAT1*, *STAT3*, *STAT5* gợi ý vai trò quan trọng trong quá trình kích hoạt khối u ác tính bạch cầu dẫn tới hình thành và phát triển bệnh ung thư hạch. Đồng thời nồng độ TNF- α tăng cao trong nhóm bệnh nhân mắc ung thư hạch. Đây có thể là các marker quan trọng và tiềm năng trong chẩn đoán phát hiện sớm ung thư hạch.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] B.J. Chen, et al. (2019), "The immune checkpoint molecules PD-1, PD-L1, TIM-3 and LAG-3 in diffuse large B-cell lymphoma", *Oncotarget*, **10**(21), pp.2030-2040.
- [2] S. Miscia, et al. (2002), "Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) activates Jak1/Stat3-Stat5B signaling through TNFR-1 in human B cells", *Cell Growth Differ.*, **13**(1), pp.13-18.
- [3] D. Baus, et al. (2009), "STAT6 and STAT1 are essential antagonistic regulators of cell survival in classical Hodgkin lymphoma cell line", *Leukemia*, **23**(10), pp.1885-1893.
- [4] H. Liu, et al. (2017), "Enhanced inflammatory damage by microRNA-136 targeting Klotho expression in HK-2 cells by modulating JAK/STAT pathway", *Pharmazie*, **72**(5), pp.265-271.
- [5] E. Tiacci, et al. (2018), "Pervasive mutations of JAK-STAT pathway genes in classical Hodgkin lymphoma", *Blood*, **131**(22), pp.2454-2465.
- [6] O. Cochet, et al. (2006), "Constitutive activation of STAT proteins in the HDLM-2 and L540 Hodgkin lymphoma-derived cell lines supports cell survival", *Cell Signal.*, **18**(4), pp.449-455.
- [7] Sara Pensa, Gabriella Regis, Daniela Boselli, Francesco Novelli Valeria Pol (2008), "STAT1 and STAT3 in tumorigenesis: two sides of the same coin", *JAK-STAT Pathway in Disease*, Austin: Landes Bioscience, pp.100-121.
- [8] T.L. Song, et al. (2018), "Oncogenic activation of the STAT3 pathway drives PD-L1 expression in natural killer/T-cell lymphoma", *Blood*, **132**(11), pp.1146-1158.
- [9] K.L. Kopp, et al. (2013), "STAT5-mediated expression of oncogenic miR-155 in cutaneous T-cell lymphoma", *Cell Cycle*, **12**(12), pp.1939-1947.
- [10] F.A. Scheeren, et al. (2008), "IL-21 is expressed in Hodgkin lymphoma and activates STAT5: evidence that activated STAT5 is required for Hodgkin lymphomagenesis", *Blood*, **111**(9), pp.4706-4715.
- [11] Michael W. Bösl, Elisa Osterode, Deepak Bararia, Alessandro Pastore, Anette M. Staiger, German Ott, Monika Szczepanowski, Wolfram Klapper, Andreas Rosenwald, Wolfgang Hiddemann, Oliver Weigert (2015), "STAT6 is recurrently and significantly mutated in follicular lymphoma and enhances the IL-4 induced expression of membrane-bound and soluble CD23", *Blood*, **126**(23), Doi: 10.1182/blood.V126.23.3923.3923.
- [12] X. Zhou, et al. (2017), "Klotho suppresses tumor progression via inhibiting IGF-1R signaling in T-cell lymphoma", *Oncol. Rep.*, **38**(2), pp.967-974.
- [13] M.K. Gandhi, et al. (2006), "Expression of LAG-3 by tumor-infiltrating lymphocytes is coincident with the suppression of latent membrane antigen-specific CD8⁺ T-cell function in Hodgkin lymphoma patients", *Blood*, **108**(7), pp.2280-2289.

So sánh các kỹ thuật định danh vi khuẩn *B. pseudomallei* trong xét nghiệm chẩn đoán bệnh Whitmore

Hoàng Việt Hà¹, Bùi Nguyễn Hải Linh², Trần Thị Lệ Quyên², Phạm Thị Huyền¹, Hoàng Quang Trung¹,
Trần Anh Đào³, Nguyễn Vũ Trung⁴ và Trịnh Thành Trung^{2*}

¹Bệnh viện Đa khoa tỉnh Hà Tĩnh

²Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội

³Bệnh viện Đa khoa tỉnh Nghệ An

⁴Trường Đại học Y Hà Nội

Ngày nhận bài 19/2/2020; ngày chuyển phản biện 21/2/2020; ngày nhận phản biện 19/3/2020; ngày chấp nhận đăng 27/3/2020

Tóm tắt:

Burkholderia pseudomallei là một loài vi khuẩn sống trong đất, lây truyền và gây nhiễm melioidosis (hay còn gọi là bệnh Whitmore) cho người và nhiều loài động vật. Đặc điểm sinh học của *B. pseudomallei* là trực khuẩn Gram âm, oxydase dương, kháng tự nhiên với kháng sinh gentamicin (Gen) và colistin (Col) nhưng nhạy cảm với amoxicillin clavulanic acid (AmC). Để áp dụng đặc trưng điển hình này trong định danh các chủng *B. pseudomallei* phân lập từ các mẫu bệnh phẩm lâm sàng, các tác giả đã tiến hành nghiên cứu 169 chủng trực khuẩn Gram âm, oxydase dương phân lập tại Bệnh viện Đa khoa tỉnh Hà Tĩnh từ tháng 7/2018 đến 12/2018. Kết quả định danh bằng real-time PCR đặc hiệu gene TTSS1, giải trình tự gene *recA* và 16S rRNA khẳng định 17 chủng là *B. pseudomallei*. 17 chủng này đều đáp ứng tiêu chí đặc trưng của vi khuẩn *B. pseudomallei* về nhạy cảm 3 khoanh kháng sinh với đường kính (r) kháng Gen (r=6 mm), kháng Col (r=6 mm) và nhạy AmC (18 mm<r<26 mm). Độ chính xác của phương pháp định danh *B. pseudomallei* bằng 3 khoanh kháng sinh này là 100%, trong khi đó độ chính xác của phương pháp sinh hóa API 20NE và Vitek 2 lần lượt là 76,4% (13/17) và 29,4% (5/17). 5 chủng vi khuẩn *Cupriavidus malaysiensis* cũng kháng Gen và Col nhưng đường kính vòng nhạy cảm AmC là khoảng 42-43 mm. Kết quả nghiên cứu này cho thấy, phương pháp định danh *B. pseudomallei* bằng 3 khoanh kháng sinh có độ chính xác cao và có thể triển khai tại nhiều phòng xét nghiệm vi sinh ở Việt Nam nhằm hạn chế việc định danh sai vi khuẩn *B. pseudomallei* và bỏ sót xét nghiệm ca nhiễm melioidosis.

Từ khóa: *Burkholderia pseudomallei*, melioidosis, Whitmore, 3 khoanh kháng sinh.

Chỉ số phân loại: 3.1

Đặt vấn đề

Burkholderia pseudomallei là một loài vi khuẩn sống hoại sinh trong đất và trong nước ở các vùng nhiệt đới, đặc biệt là ở Đông Nam Á và vùng phía Bắc Australia [1]. *B. pseudomallei* là căn nguyên gây nhiễm melioidosis (bệnh Whitmore). Bệnh gặp cả trên người và nhiều loài động vật. Con đường lây truyền chính của bệnh là (i) qua tiếp xúc trực tiếp vết trầy xước da với đất hoặc nước nhiễm khuẩn; (ii) qua hít phải các hạt bụi hoặc hạt sol khí có chứa vi khuẩn; (iii) qua con đường tiêu hóa khi ăn uống phải thực phẩm nhiễm khuẩn. Melioidosis gặp ở mọi lứa tuổi, trong đó độ tuổi >45 chiếm đa số. Bên cạnh các yếu tố nguy cơ như nghiện rượu, sử dụng corticoid dài ngày, bệnh phổi và thận mạn tính thì người bị tiểu đường thuộc nhóm đối tượng có nguy cơ nhiễm

bệnh cao nhất (gấp 13 lần) [2, 3]. Melioidosis là bệnh truyền nhiễm cấp tính nguy hiểm gây tử vong cao và tử vong nhanh (trước 48 giờ nhập viện) nếu bệnh nhân không được chẩn đoán sớm và điều trị kháng sinh kịp thời theo khuyến cáo [2]. Trong số các ca nhiễm melioidosis, hầu hết các bệnh nhân có biểu hiện nhiễm khuẩn huyết và viêm phổi, một nửa số bệnh nhân này có biểu hiện sốc nhiễm khuẩn và có thể tử vong trước 48 giờ nhập viện [4, 5]. Do khả năng lây truyền qua đường hô hấp cùng tính chất gây bệnh nguy hiểm, *B. pseudomallei* được Trung tâm Kiểm soát và phòng ngừa dịch bệnh Mỹ (CDC) xếp vào nhóm các tác nhân có thể sử dụng làm vũ khí sinh học ở cấp độ nguy hiểm loại 1 (tier 1 select agent, <https://www.selectagents.gov/>).

Nhiều thập kỷ qua, Việt Nam được coi là nước nằm

*Tác giả liên hệ: Email: tttrung@vnu.edu.vn

Comparison of different identification methods for *B. pseudomallei* in the diagnosis of Whitmore's disease

Viet Ha Hoang¹, Nguyen Hai Linh Bui², Thi Le Quyen Tran²,
Thi Huyen Pham¹, Quang Trung Hoang¹, Anh Dao Tran³,
Vu Trung Nguyen⁴ and Thanh Trung Trinh^{2*}

¹Ha Tinh General Hospital

²Institute of Microbiology and Biotechnology,
Vietnam National University, Hanoi

³Nghe An General Hospital

⁴Hanoi Medical University

Received 19 February 2020; accepted 27 March 2020

Abstract:

Burkholderia pseudomallei is a soil-dwelling bacterium which can infect human and animals causing a fatal infectious disease of melioidosis (or Whitmore's disease). The biological characteristics of this bacterium are Gram-negative bacilli, oxydase-positive, naturally resistant to gentamicin (Gen) and colistin (Col) but sensitive to amoxicillin-clavulanic acid (AmC). To use these particular characteristics for the identification of *B. pseudomallei*, the authors investigated 169 oxydase-positive and Gram-negative bacilli strains isolated from clinical specimens at Ha Tinh General Hospital from July to December 2018. TTSS1 real-time PCR assay, *recA* and 16S rRNA gene sequence analyses confirmed 17 strains as *B. pseudomallei*. These 17 strains demonstrated the particular characteristics of three-antibiotic disc test with the diameter (r) Gen resistance (r=6 mm), Col resistance (r=6 mm) and AmC sensitivity (18 mm<r<26 mm). The identification accuracy of this method for *B. pseudomallei* was 100% while the accuracy of the two biochemistry methods API 20NE and Vitek 2 were 76.4% (13/17) and 29.4% (5/17), respectively. Five strains of *Cupriavidus malaysiensis* were also resistant to Gen and Col but sensitive to AmC with inhibition zone diameter of 42-43 mm. In comparison with the routine identification methods, the identification of *B. pseudomallei* from oxydase-positive and Gram-negative bacilli using three-antibiotic disc test was a reliable and accurate method and could be implemented in the medical microbiology laboratories in Vietnam to reduce and avoid the misdiagnosis of melioidosis.

Keywords: *Burkholderia pseudomallei*, melioidosis, three-antibiotic disc test, Whitmore.

Classification number: 3.1

trong tâm điểm lưu hành của melioidosis ở cấp báo động đỏ (cấp cao nhất) trên bản đồ dịch tễ học toàn cầu [1]. Tại Thái Lan, mỗi năm có khoảng hơn 4.000 ca melioidosis được phát hiện và số lượng tử vong là gần 2.000 ca [6]. Gần đây, số lượng ca bệnh phát hiện ở các nước láng giềng là Lào và Campuchia cũng tăng lên đáng kể [7, 8]. Mặc dù có sự tương đồng về địa lý, khí hậu và hình thức canh tác nông nghiệp như những nước trong khu vực nhưng số liệu dịch tễ học về tỷ lệ người dân Việt Nam bị nhiễm bệnh cũng như sự phân bố của vi khuẩn *B. pseudomallei* trong các vùng đất canh tác nông nghiệp là gần như không có. Các lý do khiến dẫn cho sự thiếu vắng thông tin của bệnh này là (i) giáo trình dạy cho sinh viên y khoa tại các trường đại học chưa đề cập nhiều đến bệnh, (ii) sinh viên và các kỹ thuật viên không được thực hành xét nghiệm nuôi cấy vi khuẩn, và (iii) các thiết bị xét nghiệm thường quy thực hiện tại các bệnh viện như kỹ thuật định danh vi khuẩn sử dụng thanh thử API 20NE hoặc máy định danh vi khuẩn tự động Vitek 2, Phoenix và MicroScan WalkAway hoặc thậm chí máy định danh dựa trên kỹ thuật khối phổ protein MALDI-TOF thường trả sai kết quả định danh vi khuẩn *B. pseudomallei* thành những loài vi khuẩn khác, dẫn đến chẩn đoán nhầm và bỏ sót ca bệnh [9]. Tất cả các nguyên nhân đó đã làm cho các bác sỹ lâm sàng cũng như các cán bộ xét nghiệm vi sinh tại các bệnh viện (đặc biệt là bệnh viện tuyến dưới) chưa thực sự để ý và chưa có phản ứng nghi ngờ ca bệnh. Điều đó dẫn đến melioidosis đã trở thành căn bệnh bị lãng quên ở Việt Nam trong suốt nhiều thập kỷ qua [10].

B. pseudomallei là trực khuẩn Gram âm, oxydase dương, kháng tự nhiên với Gen và Col nhưng nhạy cảm với AmC [11]. Ngoài ra, *B. pseudomallei* còn có một số đặc tính khác như khuẩn lạc có ánh kim khi nhìn nghiêng dưới đèn ánh sáng trắng hoặc tế bào có hình kim băng khi quan sát nhuộm soi Gram dưới kính hiển vi. Dựa trên những đặc tính sinh học đặc trưng này, thời gian vừa qua, chúng tôi đã tiên phong hướng dẫn nhiều bệnh viện triển khai kỹ thuật nuôi cấy định danh vi khuẩn *B. pseudomallei* sử dụng 3 khoanh giấy kháng sinh Gen, Col và AmC [5]. Mặc dù phương pháp đơn giản này đã giúp nhiều bệnh viện tuyến dưới phát hiện ra ca nhiễm melioidosis nhưng độ chính xác của kỹ thuật định danh vi khuẩn *B. pseudomallei* bằng 3 khoanh giấy kháng sinh vẫn chưa được đánh giá và kiểm chứng rõ ràng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành so sánh kỹ thuật định danh 3 khoanh giấy kháng sinh với các kỹ thuật định danh thường quy khác là API 20NE và máy định danh tự động Vitek 2. Độ chính xác của các kỹ thuật được đánh giá dựa trên kết quả định danh vi khuẩn bằng kỹ thuật real-time PCR gene TTSS1 đặc hiệu *B. pseudomallei* và kỹ thuật giải trình tự gene *recA* và 16S rRNA [12-14].

Đối tượng và phương pháp

Chủng vi khuẩn nghiên cứu

Từ tháng 7/2018 đến 12/2018, chúng tôi tiến hành thu thập 169 chủng trực khuẩn Gram âm, oxydase dương phân lập được từ các loại mẫu bệnh phẩm máu (n=124), đờm (n=18), mủ (n=13) và tiểu (n=14) tại Khoa Vi sinh, Bệnh viện Đa khoa tỉnh Hà Tĩnh. Các chủng vi khuẩn được lưu giữ lạnh sâu trong môi trường Luria-Bertani chứa 20% glycerol ở -70°C để phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

Phương pháp thử tính nhạy cảm kháng sinh

Từ ống lạnh sâu, vi khuẩn được nuôi cấy hoạt hóa qua đêm trên môi trường thạch máu Columbia chứa 5% máu cừu ở 37°C. Tính nhạy cảm kháng sinh được thử bằng phương pháp khuếch tán khoan giấy kháng sinh dựa trên hướng dẫn của Viện Chuẩn thức lâm sàng và Xét nghiệm Mỹ (CLSI M02-A12). Theo đó, tế bào vi khuẩn hoạt hóa được hòa với dung dịch nước muối sinh lý NaCl 0,9% đạt đến giá trị 0,5 McFarland và được cấy trải đều trên môi trường thạch Mueller Hilton bằng que tăm bông. Các khoan kháng sinh (Mast Diagnostics, Anh) gồm Gen (10 µg), Col (10 µg) và AmC (20/10 µg) được lần lượt đặt lên bề mặt môi trường thạch. Đĩa thạch sau đó được nuôi cấy ở 37°C. Kích thước vòng nhạy cảm kháng sinh được đo sau 24 giờ nuôi cấy. Kết quả nhạy cảm kháng sinh của *B. pseudomallei* được phiên giải theo hướng dẫn của Hodgson và cs (2009) [11].

Định danh vi khuẩn bằng thanh thử API 20NE

Phương pháp định danh này được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Theo đó, khuẩn lạc đã được hoạt hóa trên môi trường thạch máu được đưa bằng que tăm bông vào ống môi trường API NaCl 0,85% cho đạt mật độ 0,5 McFarland. Phần huyền phù vi khuẩn này được đưa vào các ống phản ứng trên thanh API 20NE (Biomerieux, Pháp). Các ống phản ứng thử nghiệm lên men đường được phủ kín bằng khoáng dầu. Thanh API được ủ trong tủ ấm ở nhiệt độ 30°C. Sau 24 giờ nuôi cấy, kết quả âm tính và dương tính đối với mỗi phản ứng sinh hóa được đọc theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Kết quả thử nghiệm được chuyển sang dạng số gồm 7 chữ số và được tra cứu trực tuyến trên website của nhà sản xuất <http://apiweb.biomeireux.com/>.

Định danh vi khuẩn bằng máy tự động Vitek 2

Phương pháp được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Theo đó, tế bào vi khuẩn được hòa vào nước muối NaCl 0,45% cho đạt mật độ 0,5 McFarland. Huyền phù tế bào vi khuẩn được chuyển vào thẻ GN định danh

vi khuẩn Gram âm và được đưa vào máy Vitek 2 Compact (Biomerieux, Mỹ). Các thông số của máy định danh được cài đặt theo chế độ chuẩn của hãng. Kết quả định danh được máy trả tự động sau 6 đến 24 giờ.

Định danh vi khuẩn *B. pseudomallei* bằng kỹ thuật real-time PCR đặc hiệu gene *TTSS1*

DNA tổng số của vi khuẩn được tách chiết bằng dung môi hữu cơ sử dụng chloroform: isoamyl alcohol. Sau khi kết tủa trong cồn lạnh, DNA được hòa vào đệm TE (10 mM Tris HCl, 0,1 mM Na₂EDTA) và lưu giữ ở -20°C. Nồng độ và mức độ tinh sạch của DNA được kiểm tra trên máy NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Mỹ). Tiếp theo, 1 µl DNA khuôn này được tra vào ống real-time PCR chứa 12,5 µl Maxima Probe qPCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, Lithuania), 10 pmol mỗi xuôi BpTT4176F (5'-CGTCTCTATACTGTGCGAGCAATCG-3'), 10 pmol mỗi ngược BpTT4290R (5'-CGTGCACACCGGTCAGTATC-3'), 0,26 mM đầu dò BpTT4208P (5'-CCGGAATCTGGATCA CCACCACTTTCC-3'), 400 ng bovine serum albumin (BSA; ThermoFisher Scientific, Mỹ) và nước cho đến đủ 25 µl. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR được thực hiện ở 50°C trong 2 phút, 95°C trong 10 phút và 40 chu kỳ ở 95°C trong 15 giây và 60°C trong 1 phút. Real-time PCR được thực hiện trên máy AriMx Real-time PCR System (Agilent Technologies). Tín hiệu huỳnh quang được ghi nhận trên phần mềm Agilent AriaMx Software v1.5 và giá trị ngưỡng (threshold) được tính toán tự động sử dụng thuật toán baseline-corrected raw fluorescence. Real-time PCR dương tính được ghi nhận khi đường tín hiệu huỳnh quang của mẫu vượt giá trị ngưỡng.

Định danh vi khuẩn bằng giải trình tự gene *recA*

Phản ứng PCR khuếch đại gene *recA* được tiến hành trong thể tích 25 µl phản ứng chứa 12,5 µl DreamTaq PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, Lithuania), 1 µl DNA vi khuẩn đã tách chiết như đã mô tả ở trên, 10 pmol mỗi loại mỗi gồm BUR1 (5'-GATCGA(AG)AAGCAGTTC-GGCAA-3') và BUR2 (5'-TTGTCCTTGCCCTG (AG) CCGAT-3') và nước cho đến đủ 25 µl. Sau khi biến tính DNA ở 95°C trong 5 phút, phản ứng khuếch đại gene được thực hiện trong 40 chu trình, với mỗi chu trình nhiệt được cài đặt là 95°C trong 30 giây để biến tính tách mạch DNA, 60°C trong 30 giây để gắn mồi, 72°C trong 1 phút để khuếch đại gene. Cuối cùng, chu trình kết thúc ở 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR được điện di và kiểm tra trên gel agarose 1% có bổ sung chất phát huỳnh quang Redsafe (Intron Biotechnology, Hàn Quốc). Sản phẩm PCR được tinh sạch sử dụng

kit Qiaquick của Hãng Qiagen. Với mỗi phản ứng giải trình tự, 10 ng sản phẩm PCR tinh sạch được đưa vào các phản ứng khuếch đại sử dụng kit BigDye® terminator v3.1 theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Applied Biosystem). Sau khi khuếch đại bằng mỗi mô tả như trên, trình tự DNA được đọc trên máy giải trình tự 3100 Avant Genetic Analyzer sử dụng POP-6 polymer. Sắc đồ trình tự được kiểm tra và chỉnh sửa trên phần mềm Chromas lite 2.1. Trình tự của 2 môi được kết nối trên phần mềm Clone Manager (Clone Manager Professional Suite version 8). Mức độ tương đồng về trình tự gene *recA* của chủng nghiên cứu so với các chủng đã công bố trên ngân hàng gen được so sánh, sử dụng công cụ tra cứu BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Định danh vi khuẩn bằng giải trình tự gene 16S rRNA

Phản ứng PCR khuếch đại gene 16S rRNA được tiến hành trong thể tích 25 µl chứa 12,5 µl DreamTaq PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, Lithuania), 10 pmol mỗi loại mỗi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và mỗi 1525R (5'-AAAGGAGGTGATCCA GCC-3') và 1 µl ADN vi khuẩn đã tách chiết như đã mô tả ở trên. Sau khi biến tính DNA ở 95°C trong 5 phút, phản ứng khuếch đại gene được thực hiện trong 35 chu trình, với mỗi chu trình nhiệt được cài đặt như sau: 95°C trong 30 giây để biến tính tách mạch ADN, 55°C trong 30 giây để gắn mồi, 72°C trong 1 phút 45 giây để khuếch đại gene. Sản phẩm PCR với kích thước 1.499 bp được điện di và kiểm tra trên gel agarose 1%. Sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự như đã mô tả ở trên. Phản ứng giải trình tự được thực hiện với mồi 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') và mồi 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'). Trình tự của 2 mồi 518F và 800R được kết nối trên phần mềm Clone Manager (Clone Manager Professional Suite version 8). Mức độ tương đồng cao nhất về trình tự đoạn 16S rDNA của chủng nghiên cứu so với các chủng chuẩn đã công bố được tra cứu sử dụng công cụ 16S-based ID (<https://www.ezbiocloud.net/>) cập nhật đến ngày 31/12/2019.

Kết quả

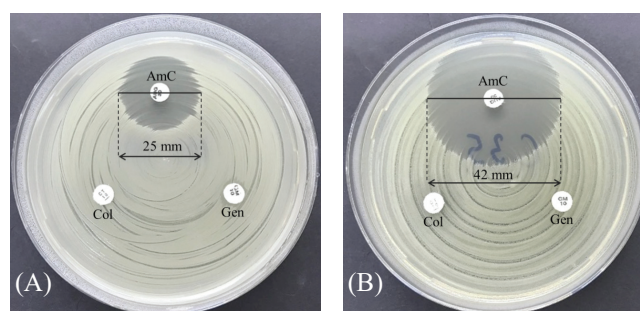
Đặc tính nhạy cảm với 3 khoanh kháng sinh

169 chủng vi khuẩn được thử nghiệm tính nhạy cảm với 3 khoanh kháng sinh. 22 chủng đáp ứng tiêu chí đặc trưng của vi khuẩn *B. pseudomallei* là kháng Gen (r=6 mm) và Col (r=6 mm) nhưng nhạy cảm AmC (r>18 mm). Trong số này, 17 chủng có vòng nhạy cảm AmC trong khoảng đường kính 23-26 mm, 5 chủng có vòng nhạy cảm ở đường kính 42-43 mm. 147 chủng còn lại có các kiểu nhạy cảm khác nhau với 3 khoanh kháng sinh thử nghiệm. Nhóm chủng

này được gọi chung là nhóm không đáp ứng tiêu chí đặc trưng của vi khuẩn *B. pseudomallei* về nhạy cảm 3 khoanh kháng sinh.

Định danh nhóm đáp ứng tiêu chí đặc trưng của vi khuẩn *B. pseudomallei* về nhạy cảm 3 khoanh kháng sinh

Kỹ thuật real-time PCR được triển khai trên 22 chủng đáp ứng tiêu chí. 17 chủng có phản ứng dương tính với gene TTSS1 đặc hiệu *B. pseudomallei*. Trình tự gene *recA* của 17 chủng này tương đồng 100% so với chủng chuẩn *B. pseudomallei* K96243^T. Các chủng này đều có đặc tính kháng Gen và Col nhưng nhạy cảm AmC với đường kính trong khoảng 23-26 mm (hình 1A). Định danh bằng kỹ thuật sinh hóa API 20NE cho kết quả 13 chủng là *B. pseudomallei* với ID từ 81,7 đến 99,9%. 4 chủng còn lại được định danh là *B. cepacia* với ID từ 77,5 đến 86,3%. Định danh bằng kỹ thuật Vitek 2 cho kết quả 5 chủng là *B. pseudomallei* với ID từ 94,0 đến 99,0%. Các chủng còn lại được định danh là *P. aeruginosa* (n=9), *B. cepacia* (n=2), *S. paucimobilis* (n=1) (bảng 1).



Hình 1. Đặc tính nhạy cảm 3 khoanh kháng sinh của chủng kháng Gen và Col nhưng nhạy cảm AmC với vòng nhạy cảm trong khoảng 23-26 mm (A); kháng Gen và Col nhưng nhạy cảm AmC với vòng nhạy cảm trong khoảng 42-43 mm (B).

5 chủng còn lại có phản ứng real-time PCR gene TTSS1 âm tính. Trình tự gene *recA* của 2 trong 5 chủng này tương đồng thấp với chủng *Cupriavidus taiwanensis* LMG 19425^T là 95,1%. Vì cơ sở dữ liệu gene *recA* không đầy đủ trong hệ thống phân loại vi khuẩn nên chúng tôi sử dụng kỹ thuật giải trình tự gene 16S rRNA để định danh và trình tự gene của 5 chủng này đều giống nhau và đều có độ tương đồng là 99,93% so với chủng chuẩn *C. malaysiensis* USMAA1020^T. Các chủng này đều có đặc tính kháng Gen và Col nhưng nhạy cảm AmC ở đường kính trong khoảng 42-43 mm (hình 1B). Định danh bằng kỹ thuật sinh hóa API 20NE cho kết quả 5 chủng là *C. pauculus* với ID là 98,6%. Định danh bằng kỹ thuật Vitek 2 cho kết quả là *Francisella tularensis* (n=1), *Bordetella bronchiseptica* (n=2), *Moraxella* spp. (n=1) và *C. pauculus* (n=1) (bảng 1).

Bảng 1. Kết quả định danh các chủng đáp ứng tiêu chí đặc trưng của vi khuẩn *B. pseudomallei* về nhạy cảm 3 khoanh kháng sinh bằng kỹ thuật sinh hóa API 20NE và Vitek 2.

STT	Chủng	API 20NE		Vitek 2		
		Mã profile	Tên loài	% ID	Tên loài	% ID
Nhóm kháng Gen và Col nhưng nhạy cảm AmC đường kính 23-26 mm						
1	HT01	1156577	<i>B. pseudomallei</i>	99,9	<i>P. aeruginosa</i>	89,0
2	HT03	1156577	<i>B. pseudomallei</i>	99,9	<i>P. aeruginosa</i>	89,0
3	HT04	1156577	<i>B. pseudomallei</i>	99,9	<i>P. aeruginosa</i>	89,0
4	HT37	1156577	<i>B. pseudomallei</i>	99,9	<i>P. aeruginosa</i>	89,0
5	HT72	1556577	<i>B. pseudomallei</i>	99,8	<i>B. cepacia</i>	97,0
6	HT38	1056576	<i>B. pseudomallei</i>	81,7	<i>P. aeruginosa</i>	93,0
7	HT40	1056577	<i>B. pseudomallei</i>	81,7	<i>P. aeruginosa</i>	93,0
8	HT61	1056577	<i>B. pseudomallei</i>	81,7	<i>P. aeruginosa</i>	89,0
9	HT63	1056576	<i>B. pseudomallei</i>	81,7	<i>B. cepacia</i>	97,0
10	HT02	1056577	<i>B. pseudomallei</i>	81,7	<i>P. aeruginosa</i>	87,0
11	HT88	1056576	<i>B. pseudomallei</i>	81,7	<i>B. pseudomallei</i>	97,0
12	HT162	1056577	<i>B. pseudomallei</i>	81,7	<i>B. pseudomallei</i>	94,0
13	HT168	1056576	<i>B. pseudomallei</i>	81,7	<i>B. pseudomallei</i>	94,0
14	HT126	1046577	<i>B. cepacia</i>	86,3	<i>B. pseudomallei</i>	99,0
15	HT26	1456577	<i>B. cepacia</i>	77,5	<i>P. aeruginosa</i>	89,0
16	HT32	1456577	<i>B. cepacia</i>	77,5	<i>Sp. paucimobilis</i>	96,0
17	HT125	1456577	<i>B. cepacia</i>	77,5	<i>B. pseudomallei</i>	99,0
Nhóm kháng Gen và Col nhưng nhạy cảm AmC đường kính 42-43 mm						
18	HT20	0200477	<i>C. pauculus</i>	98,6	<i>F. tularensis</i>	88,0
19	HT35	0200477	<i>C. pauculus</i>	98,6	<i>Bo. Bronchiseptica</i>	97,0
20	HT85	0200477	<i>C. pauculus</i>	98,6	<i>Bo. Bronchiseptica</i>	97,0
21	HT121	0200477	<i>C. pauculus</i>	98,6	<i>Moraxella</i> spp.	96,0
22	HT152	0200477	<i>C. pauculus</i>	98,6	<i>C. pauculus</i>	98,0

Ghi chú: B=Burkholderia; Bo=Bordetella; C=Cupriavidus; F= Francisella; P=Pseudomonas; Sp=Sphingomonas.

Định danh nhóm vi khuẩn không đáp ứng tiêu chí đặc trưng của vi khuẩn *B. pseudomallei* về nhạy cảm 3 khoanh kháng sinh

Real-time PCR gene TTSS1 đều âm tính đối với tất cả 147 chủng không đáp ứng tiêu chí nhạy cảm 3 khoanh kháng sinh của vi khuẩn *B. pseudomallei*. Điều đó một phần minh chứng các chủng vi khuẩn này không phải là *B. pseudomallei*. Để làm rõ hơn về thành phần loài vi khuẩn này, chúng tôi tiến hành cấy rìa 3 pha trên môi trường thạch Ashdown không có kháng sinh Gen và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C. Sau 3 ngày, hình thái khuẩn lạc của các chủng được quan sát. Dựa vào màu sắc, kích thước, cấu trúc bề mặt, cấu trúc mép khuẩn lạc và đặc tính nhạy cảm 3 khoanh kháng sinh, chúng

tôi chia các chủng này thành 20 nhóm khuẩn lạc khác nhau. Một chủng đại diện trong mỗi nhóm khuẩn lạc đặc trưng này được lựa chọn để định danh bằng phương pháp giải trình tự gene 16S rRNA. Các chủng đó được định danh vào 13 loài là *Achromobacter insuavis*, *Aeromonas dhakensis*, *Alcaligenes faecalis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia terrortii*, *Cupriavidus metallidurans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas oryzihabitans*, *Pseudomonas plecoglossicida*, *Ralstonia insidiosa*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio fluvialis* và *Stenotrophomonas maltophilia* (bảng 2).

Bảng 2. Kết quả định danh các chủng không đáp ứng tiêu chí đặc trưng của vi khuẩn *B. pseudomallei* về nhạy cảm 3 khoanh kháng sinh bằng kỹ thuật giải trình tự gene 16S rRNA.

STT	Tên loài	Độ tương đồng (%)	Mã số trình tự tham chiếu/Chủng chuẩn	Số lượng (n=147)
1	<i>Achromobacter insuavis</i>	100	HF586506/LMG 26845 ^T	2
2	<i>Aeromonas dhakensis</i>	99,8	CDBH01000037/CIP 107500 ^T	4
3	<i>Alcaligenes faecalis</i>	100	BBJQ01000024/NBRC 13111 ^T	2
4	<i>Burkholderia multivorans</i>	99,7	ALIW01000278/BAA-247 ^T	3
5	<i>Burkholderia terrortii</i>	100	LK023503/LMG 28158 ^T	53
6	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	99,8	CP000353/CH34 ^T	1
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100	BAMA01000316/JCM 5962 ^T	8
8	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	100	BBIT01000012/NBRC 102199 ^T	3
9	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	100	BBIV01000080/NBRC 103162 ^T	2
10	<i>Ralstonia insidiosa</i>	99,8	AF488779/AU2944 ^T	3
11	<i>Vibrio cholerae</i>	99,8	X76337/CECT 514 ^T	1
12	<i>Vibrio fluvialis</i>	100	BCZR01000036/NBRC 103150 ^T	1
13	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99,9	JALV01000036/MTCC 434 ^T	64

Xác định độ chính xác của các phương pháp định danh vi khuẩn *B. pseudomallei*

Kết quả nghiên cứu giải trình tự gene *recA*, 16S rRNA và real-time PCR gene TTSS1 đặc hiệu khẳng định có 17 chủng vi khuẩn *B. pseudomallei* trong bộ 169 chủng trực khuẩn Gram âm, oxydase dương thu thập tại Bệnh viện Đa khoa tỉnh Hà Tĩnh từ 7/2018 đến 12/2018. Sử dụng kết quả định danh của các phương pháp sinh học phân tử để so sánh độ chính xác với các phương pháp sinh hóa khác cho thấy, phương pháp định danh bằng thanh thử API 20NE và máy Vitek 2 có độ chính xác lần lượt là 76,4 (13/17) và 29,4% (5/17). Phương pháp định danh dựa trên tính chất nhạy cảm 3 khoanh kháng sinh Gen (r=6 mm), Col (r= 6 mm) và AmC (r>18 mm) nhận diện sai các chủng *C. malaysiensis* thành *B. pseudomallei*. Tuy nhiên, nếu đặt tiêu chuẩn mới về nhạy cảm 3 khoanh kháng sinh là Gen (r=6 mm), Col (r=6 mm) và AmC (18 mm<r<26 mm) thì độ chính xác của phương pháp 3 khoanh kháng sinh trong định danh *B. pseudomallei* từ các mẫu bệnh phẩm lâm sàng là 100% (17/17).

Bàn luận

Định danh chính xác căn nguyên vi khuẩn gây bệnh trong mẫu bệnh phẩm lâm sàng không chỉ có ý nghĩa giúp cho bác sỹ định hướng điều trị đúng kháng sinh cho bệnh nhân mà còn giúp cho các nhà quản lý y tế nắm rõ sự tồn tại của một loại bệnh truyền nhiễm cụ thể nào đó tại địa phương cũng như hiểu rõ tình hình dịch tễ của bệnh tại địa phương. Mỗi vùng địa lý khác nhau có một mô hình bệnh tật khác nhau và có sự khác nhau về đặc điểm sinh học của mỗi căn nguyên vi khuẩn gây bệnh [15, 16]. Điều đó dẫn đến mỗi kỹ thuật định danh vi khuẩn dựa trên các tính chất sinh hóa đều có độ chính xác khác nhau ở các vùng địa lý khác nhau [9]. Vì vậy, các kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại như PCR nhận biết gene đặc hiệu hoặc giải trình tự gene thường được coi là tiêu chuẩn vàng trong định danh vi sinh vật, làm giảm độ lệch về kết quả xét nghiệm ở các vùng địa lý. Tuy nhiên, kỹ thuật sinh học phân tử đòi hỏi sự đầu tư các trang thiết bị hiện đại cùng với đào tạo nguồn nhân lực. Đây cũng là sự hạn chế trong công tác triển khai các xét nghiệm kỹ thuật cao này ở các vùng kinh tế còn khó khăn, đặc biệt là các bệnh viện tuyến dưới ở Việt Nam. Trước tình hình đó, việc nghiên cứu triển khai các kỹ thuật đơn giản và đánh giá được độ chính xác của kỹ thuật là điều rất cần thiết nhằm giúp các bệnh viện tuyến dưới sớm tiếp cận và triển khai được phương pháp xét nghiệm bệnh, giảm thiểu bỏ sót ca bệnh.

Kỹ thuật giải trình tự ADN để định danh vi khuẩn đã được ứng dụng từ lâu trong xét nghiệm chẩn đoán bệnh truyền nhiễm. Đối với các sinh vật nhân sơ (prokaryote), gene 16S rRNA là gene phổ dụng thường dùng trong phân loại và định danh các loài vi khuẩn. Payne và cs (2005) [12] đã minh chứng trình tự gene *recA* có khả năng phân tách tốt các loài trong chi *Burkholderia* hơn so với gene 16S rRNA. Cây phát sinh chủng loại xây dựng dựa trên trình tự gene *recA* phân tách rõ *B. pseudomallei* với các loài có quan hệ gần gũi như *B. mallei* và *B. thailandensis*. Vì vậy, trình tự gene *recA* đã được sử dụng phổ biến trong định danh kháng định vi khuẩn *B. pseudomallei* [4, 5, 17].

Giống như nhiều loài vi khuẩn Gram âm khác, *B. pseudomallei* có hệ thống tiết dạng 3 (type three secretion system) có tác dụng tiết các protein hiệu ứng để chống lại các tế bào miễn dịch của vật chủ trong quá trình gây bệnh. Nghiên cứu của Price và cs (2012) [18] trên bộ 2.205 chủng *Burkholderia* có 1.954 chủng *B. pseudomallei* cho thấy, real-time PCR gene TTSS1 có tính đặc hiệu tuyệt đối với *B. pseudomallei* và gene này chỉ có ở *B. pseudomallei* chứ không có ở các loài có quan hệ gần gũi như *B. mallei* và *B. thailandensis*. Kỹ thuật real-time PCR này đã được ứng dụng nhiều trong phát hiện định tính và định lượng *B.*

pseudomallei từ các mẫu bệnh phẩm lâm sàng và môi trường [5, 14, 19]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi minh chứng các chủng trực khuẩn Gram âm, oxydase dương không đáp ứng tiêu chí nhạy cảm 3 khoan kháng sinh đặc trưng của *B. pseudomallei* đều âm tính với real-time PCR gene TTSS1. Điều đó cho thấy, các chủng trực khuẩn này không phải là *B. pseudomallei*. Kết quả đó phù hợp với kết quả định danh bằng phương pháp giải trình tự gene 16S rRNA (bảng 2).

Các kỹ thuật định danh dựa trên tính chất sinh hóa thường được sử dụng trong hệ thống xét nghiệm chẩn đoán vi sinh lâm sàng là API 20NE, Vitek 2, Phoenix và MicroScan WalkAway hoặc thậm chí máy định danh dựa trên kỹ thuật khối phổ protein MALDI-TOF. Tuy nhiên, các kỹ thuật này đã tỏ ra có nhiều nhược điểm khi sử dụng định danh vi khuẩn *B. pseudomallei* [9]. Các kỹ thuật này thường trả kết quả định danh sai vì khuẩn *B. pseudomallei* thành những loài vi sinh vật khác như *B. cepacia*, *P. aeruginosa* và *P. fluorescens* với mức độ sai lệch kết quả phụ thuộc vào từng vùng địa lý khác nhau [20-22]. Đặc biệt, máy tự động Phoenix luôn luôn trả kết quả định danh sai vì khuẩn *B. pseudomallei* [9]. Trong nghiên cứu này, API 20NE cho kết quả định danh đúng *B. pseudomallei* là 76,4% (13/17), trong khi đó kết quả định danh đúng của Vitek 2 chỉ là 29,4% (5/17). Kết quả nghiên cứu này hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu ở các vùng khác trên thế giới.

Vi khuẩn *B. pseudomallei* có đặc tính kháng tự nhiên với Col và nhóm kháng sinh aminoglycoside. Năm 2009, Hodgson và cs (2009) [11] nghiên cứu trên bộ 43 chủng có 30 chủng *B. pseudomallei* đã phát hiện tất cả các chủng *B. pseudomallei* đều nhạy cảm với AmC. Cùng với tính chất vi khuẩn học kinh điển của *B. pseudomallei* là trực khuẩn Gram âm và oxydase dương, các nhà khoa học đã đề xuất sử dụng các tính chất đơn giản đó để định danh vi khuẩn *B. pseudomallei* ở những phòng xét nghiệm vi sinh có điều kiện trang thiết bị hạn chế. Năm 2018, nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã tiên phong triển khai kỹ thuật 3 khoan kháng sinh tới nhiều bệnh viện tuyến dưới tại Việt Nam. Song song với việc khẳng định kết quả định danh bằng các kỹ thuật sinh học phân tử, nhóm chúng tôi đã giúp nhiều bệnh viện phát hiện ra những ca nhiễm melioidosis đầu tiên và giúp nhiều bệnh viện tuyến dưới làm chủ quy trình kỹ thuật phát hiện ra nhiều ca bệnh. Với nghiên cứu này, chúng tôi khẳng định kết quả định danh vi khuẩn *B. pseudomallei* bằng 3 khoan kháng sinh có độ chính xác là 100%, tương đương với các kỹ thuật sinh học phân tử. Tiêu chí đánh giá đường kính nhạy cảm 3 khoan kháng sinh là Gen (r=6 mm), Col (r=6 mm) và AmC (18 mm<r<26 mm). Vì vậy, kỹ thuật này hoàn toàn có thể sử dụng để xét nghiệm chẩn đoán và sàng lọc bệnh nhân nhiễm melioidosis tại các bệnh viện tuyến dưới ở Việt Nam.

Kết luận

Các chủng vi khuẩn *B. pseudomallei* phân lập tại Bệnh viện Đa khoa tỉnh Hà Tĩnh đều có đặc tính kháng Gen ($r=6$ mm), Col ($r=6$ mm) và nhạy cảm AmC ($18\text{ mm}<r<26$ mm). Định danh vi khuẩn *B. pseudomallei* bằng phương pháp 3 khoanh kháng sinh có độ chính xác là 100%, trong khi đó phương pháp định danh bằng thanh thử API 20NE và máy Vitek 2 có độ chính xác lần lượt là 76,4 và 29,4%. Phương pháp định danh *B. pseudomallei* bằng 3 khoanh kháng sinh có thể áp dụng trong xét nghiệm chẩn đoán khẳng định nhiễm melioidosis.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện thông qua nhiệm vụ quỹ gene “Nghiên cứu khai thác nguồn gene vi khuẩn *Burkholderia pseudomallei* và đánh giá đặc tính sinh học nhằm nâng cao hiệu quả chẩn đoán, dự phòng và điều trị” (mã số NVQG-2018/08) do Bộ Khoa học và Công nghệ tài trợ. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D. Limmathurotsakul, et al. (2016), “Predicted global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and burden of melioidosis”, *Nat. Microbiol.*, **1**(1), Doi: 10.1038/nmicrobiol.2015.8.
- [2] W.J. Wiersinga, B.J. Currie, S.J. Peacock (2012), “Melioidosis”, *N. Engl. J. Med.*, **367**(11), pp.1035-1044.
- [3] K. Hodgson, et al. (2015), “Immunological mechanisms contributing to the double burden of diabetes and intracellular bacterial infections”, *Immunology*, **144**(2), pp.171-185.
- [4] D.M. Phuong, et al. (2008), “Clinical and microbiological features of melioidosis in northern Vietnam”, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **102**, Suppl. 1, pp.S30-36.
- [5] T.T. Trinh, et al. (2018a), “A simple laboratory algorithm for diagnosis of melioidosis in resource-constrained areas: a study from north-central Vietnam”, *Clin. Microbiol. Infect.*, **24**(1), pp.84e1-84e4.
- [6] S. Hinjoy, et al. (2018), “Melioidosis in Thailand: present and future”, *Trop. Med. Infect. Dis.*, **3**(2), Doi: 10.3390/tropicalmed3020038.
- [7] D.A.B. Dance, et al. (2018), “Melioidosis in the Lao People’s Democratic Republic”, *Trop. Med. Infect. Dis.*, **3**(1), Doi: 10.3390/tropicalmed3010021.
- [8] S. Bory, et al. (2018), “A report from the Cambodia training event for awareness of Melioidosis (C-TEAM), October 2017”, *Trop. Med. Infect. Dis.*, **3**(1), Doi: 10.3390/tropicalmed3010023.

- [9] A.R. Hoffmaster, et al. (2015), “Melioidosis diagnostic workshop, 2013”, *Emerg. Infect. Dis.*, **21**(2), Doi: 10.3201/eid2102.141045.
- [10] T.T. Trinh, et al. (2018b), “Melioidosis in Vietnam: recently improved recognition but still an uncertain disease burden after almost a century of reporting”, *Trop. Med. Infect. Dis.*, **3**(2), Doi: 10.3390/tropicalmed3020039.
- [11] K. Hodgson, et al. (2009), “Comparison of routine bench and molecular diagnostic methods in identification of *Burkholderia pseudomallei*”, *J. Clin. Microbiol.*, **47**(5), pp.1578-1580.
- [12] G.W. Payne, et al. (2005), “Development of a recA gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus”, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**(7), pp.3917-3927.
- [13] S.H. Yoon, et al. (2017), “Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies”, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **67**(5), pp.1613-1617.
- [14] T.T. Trung, et al. (2011), “Highly sensitive direct detection and quantification of *Burkholderia pseudomallei* bacteria in environmental soil samples by using real-time PCR”, *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**(18), pp.6486-6494.
- [15] J. Deen, et al. (2012), “Community-acquired bacterial bloodstream infections in developing countries in south and southeast Asia: a systematic review”, *Lancet Infect. Dis.*, **12**(6), pp.480-487.
- [16] E.A. Reddy, A.V. Shaw, J.A. Crump (2010), “Community-acquired bloodstream infections in Africa: a systematic review and meta-analysis”, *Lancet Infect. Dis.*, **10**(6), pp.417-432.
- [17] J.L. Ginther, et al. (2015), “Identification of *Burkholderia pseudomallei* near-neighbor species in the Northern territory of Australia”, *PLOS Negl. Trop. Dis.*, **9**(6), Doi: 10.1371/journal.pntd.0003892.
- [18] E.P. Price, et al. (2012), “Development and validation of *Burkholderia pseudomallei* - specific real-time PCR assays for clinical, environmental or forensic detection applications”, *PLOS ONE*, **7**(5), Doi: 10.1371/journal.pone.0037723.
- [19] E.M. Meumann, et al. (2006), “Clinical evaluation of a type III secretion system real-time PCR assay for diagnosing melioidosis”, *J. Clin. Microbiol.*, **44**(8), pp.3028-3030.
- [20] Y. Podin, et al. (2013), “Reliability of automated biochemical identification of *Burkholderia pseudomallei* is regionally dependent”, *J. Clin. Microbiol.*, **51**(9), pp.3076-3078.
- [21] P. Kiratisin, et al. (2007), “Accuracy of commercial systems for identification of *Burkholderia pseudomallei* versus *Burkholderia cepacia*”, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **59**(3), pp.277-281.
- [22] T.J. Inglis, et al. (2005), “Comparison of diagnostic laboratory methods for identification of *Burkholderia pseudomallei*”, *J. Clin. Microbiol.*, **43**(5), pp.2201-2206.

Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng, mô bệnh học u lympho ác tính không Hodgkin vùng đầu cổ

Nguyễn Thanh Bình^{1*}, Tống Xuân Thắng²

¹Khoa Ngoại Đầu Cổ, Bệnh viện K

²Bộ môn Tai Mũi Họng, Trường Đại học Y Hà Nội

Ngày nhận bài 20/11/2019; ngày chuyển phản biện 25/11/2019; ngày nhận phản biện 30/12/2019; ngày chấp nhận đăng 8/1/2020

Tóm tắt:

Mục tiêu của đề tài là nghiên cứu một số đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng bệnh u lympho ác tính không Hodgkin (ULAKH) vùng đầu cổ. Phương pháp nghiên cứu: mô tả hồi cứu kết hợp tiền cứu trên 98 bệnh nhân ULAKH vùng đầu cổ điều trị bằng phác đồ R-CHOP được chẩn đoán và điều trị tại Bệnh viện Tai Mũi Họng Trung ương và Bệnh viện K; nhận xét về các triệu chứng cơ năng, thực thể, toàn thân, xét nghiệm huyết học, mô bệnh học và hóa mô miễn dịch. Kết quả nghiên cứu cho thấy, nhóm tuổi gặp chủ yếu là 51-60. Tỷ lệ bệnh nhân nam/nữ là 1/1,09. Thời gian khởi bệnh đến khi được chẩn đoán chủ yếu ≤ 3 tháng. Vị trí hay gặp nhất: amidan 42,9%, hạch cổ 34,7%, vòm 5,1%. Triệu chứng hay gặp là nuốt đau, nuốt vướng và hạch cổ. Vị trí hiếm gặp như ở hốc mắt 3,0%, hốc mũi 6,1% và đáy lưỡi 8,2%. Triệu chứng có hạch to gặp 34,7%. Giai đoạn theo Ann-Arbor chủ yếu là giai đoạn II, chiếm 57,1%. Hội chứng B gặp 15,3% và chủ yếu là giai đoạn II. Mô bệnh học hay gặp nhất là thể B lớn lan tỏa (diffuse large B-cell lymphoma - DLBCL) 70,4%, u lympho thể nang 7,14%, u lympho tế bào áo nang 8,18%. Loại mô bệnh học hay gặp nhất là WF6 và WF7. Qua nghiên cứu có thể kết luận: ULAKH vùng đầu cổ hay gặp nhất là ở vùng Waldeyer và amidan với triệu chứng biểu hiện tại chỗ là chủ yếu, giai đoạn II, mô bệnh học chủ yếu là DLBCL.

Từ khóa: bệnh học, u lympho ác tính không Hodgkin, ung thư đầu cổ.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

Tỷ lệ mắc ULAKH vùng đầu cổ tăng khoảng 35% trong 20 năm qua [1] và có sự khác biệt giữa các quốc gia. Tuy nhiên, thời gian sống thêm đã được cải thiện trong vài thập kỷ qua, với tỷ lệ sống 5 năm tăng từ 30 lên 50,8%. Tỷ lệ u lympho ác tính toàn bộ vùng đầu cổ khoảng 1-17% và thường gặp ở người >50 tuổi. Các nghiên cứu cho thấy yếu tố nguy cơ bao gồm: suy giảm miễn dịch (bệnh nhân HIV, ghép tạng, ghép tế bào gốc, suy giảm miễn dịch bẩm sinh), mắc bệnh tự miễn, tiếp xúc với tia cực tím, nhiễm Epstein-Barr virus, nhiễm Helicobacter, HHV-8, HTLV-1, HCV, SV40 và tiếp xúc với hóa chất độc hại (thuốc diệt cỏ, thuốc trừ sâu) [2]. Trong ULAKH vùng đầu cổ, ung thư bạch huyết vòng Waldeyer là hay gặp nhất.

Gần đây, với sự tiến bộ trong phân loại hình thái học và sinh học phân tử đã làm rõ nguồn gốc phát sinh dòng tế bào và sự tiến triển bệnh, Tổ chức Y tế thế giới (WHO) đã áp dụng cách phân loại mới, làm sáng tỏ hơn về nhóm bệnh, giúp hiểu biết sâu sắc hơn về bệnh học, hướng điều trị và tiên lượng bệnh ULAKH [3, 4]. Mặc dù ULAKH có tính đa dạng và phức tạp, nhưng cho đến nay tại Việt Nam vẫn còn ít nghiên cứu đi sâu về bệnh lý này. Vì vậy, chúng tôi tiến hành đề tài này nhằm mục tiêu: nghiên cứu một số đặc điểm lâm sàng, mô bệnh học của bệnh ULAKH vùng đầu cổ [5].

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng

Gồm 98 bệnh nhân ULAKH vùng đầu cổ được chẩn đoán và điều trị bằng phác đồ RCHOP tại Khoa Ung bướu và Phẫu thuật đầu cổ - Bệnh viện Tai Mũi Họng Trung ương và Bệnh viện K, từ tháng 1/2016 đến tháng 10/2019.

Phương pháp nghiên cứu

Mô tả hồi cứu kết hợp tiền cứu bệnh nhân ULAKH vùng đầu cổ. Các tham số nghiên cứu bao gồm: tuổi (phân thành các nhóm 10-20; 21-30; 31-40; 41-50; 51-60; 61-70 và >70 tuổi); giới (nam, nữ); thời điểm phát hiện tính từ khi bệnh nhân có các triệu chứng của bệnh cho tới khi có chẩn đoán xác định (theo tháng); vị trí u nguyên phát (tại hạch phân theo 6 nhóm và ngoài hạch); các triệu chứng lâm sàng (giai đoạn khởi phát, giai đoạn toàn phát, giai đoạn cuối); triệu chứng nội soi tai mũi họng, đánh giá tổn thương; giai đoạn bệnh (theo Ann-Arbor gồm 4 giai đoạn); nghiên cứu các đặc điểm trên chụp cắt lớp vi tính với 2 tư thế (coronal và axial), bao gồm: vị trí u nguyên phát, tính chất xâm lấn, kích thước u, cấu trúc u; nghiên cứu về mô bệnh học thường quy và hóa mô miễn dịch; số lần sinh thiết cho tới khi đạt yêu cầu chẩn đoán; kết quả chẩn đoán trên nhuộm HE, phân loại theo tiêu chuẩn phân loại của WHO năm 2008 và theo

*Tác giả liên hệ: Email: nguyenthanhbhinh.k3tt@gmail.com

Assessment of clinical features and histopathologic type of non-Hodgkin lymphoma in head and neck

Thanh Binh Nguyen^{1*}, Xuan Thang Tong²

¹Department of Head and Neck Surgery - Vietnam National Cancer Hospital

²Faculty of Otorhinolaryngology, Hanoi Medical University

Received 20 November 2019; accepted 8 January 2020

Abstract:

Aims: to assess clinical features and histopathologic type of non-Hodgkin lymphoma in head and neck. **Methods:** retrospective and prospective studies on 98 patients with non-Hodgkin lymphoma in head and neck treatment with RCHOP. The study focused on describing the clinical and paraclinical symptoms of non-Hodgkin lymphoma.

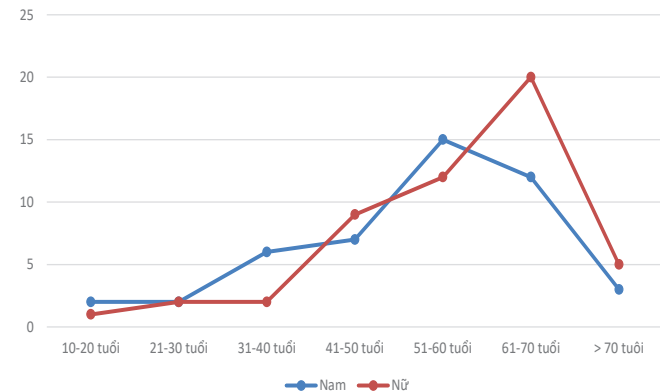
Results: the group of age mostly acquired was 51-60 y.o. The proportion of male and female patients was 1/1.09. The time from symptoms begin to diagnose was mainly under 3 months. The most common non-Hodgkin lymphomas were located in tonsils 42.9%, neck node 34.7%, and arches 5.1% with symptoms such as otalgia, dysphagia, and neck node enlargement. Very rare lymphoma was found at eye socket 3.0%, nasal cavity 6.1%, and tongue base 8.2%. Cases with lymphadenopathy were estimated at 34.7%. Ann-Arbor stage II accounted for the largest part of 57.1%. Syndrome B was mainly stage II with 15.3%. In this research, the most common histopathology was diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) 70.4%, followed by mantle cell 8.18% and follicular lymphoma 7.14%. WF6 and WF7 were the most common histopathologic types. **Conclusion:** non-Hodgkin lymphoma in head and neck was mostly located in the Waldeyer's ring with local symptoms of tumour, neck node enlargement; at the Ann-Arbor stage II, DLBCL was the most common histopathologic type.

Keywords: head and neck cancer, histopathology, non-Hodgkin lymphoma.

Classification number: 3.2

công thức thực hành WF của AFIP (1982); kết quả nhuộm hóa mô miễn dịch để phân loại nguồn gốc tế bào lympho (các kháng thể đơn dòng được sử dụng nhuộm và đọc phân nhóm như: CD20, CD79, CD10, CD3, CD5, CD1a, TdT).

Kết quả nghiên cứu



Biểu đồ 1. Phân bố bệnh nhân theo tuổi, giới.

Tuổi mắc bệnh trung bình là $54,7 \pm 14,08$; thấp nhất là 12 tuổi, cao nhất là 78 tuổi. Tỷ lệ mắc bệnh theo nhóm tuổi tăng dần từ thấp đến cao, nhóm tuổi mắc hay gặp nhất là 51-60 tuổi với nam và 61-70 tuổi với nữ, mắc bệnh chủ yếu là 51-70 tuổi (biểu đồ 1). Tỷ lệ mắc của nam/nữ là 1/1,09.

Bảng 1. Thời gian có triệu chứng đầu tiên tới khi được chẩn đoán.

Thời gian (tháng)	n	Tỷ lệ %
≤3	85	86,7
4-6	12	12,3
7-12	1	1,0
Tổng	98	100

Thời gian khởi bệnh trung bình là 2,2 tháng, ngắn nhất là 0,5 tháng, dài nhất là 12 tháng. Phần lớn bệnh nhân đến viện trong khoảng 1-3 tháng (86,7%) (bảng 1).

Bảng 2. Phân bố vị trí tổn thương vùng đầu cổ.

Vị trí	n	Tỷ lệ %
Amidan	42	42,9
Hạch cổ	34	34,7
Vòm	5	5,1
Hốc mũi	6	6,1
Hốc mắt	3	3,0
Đáy lưỡi	8	8,2
Tổng số	98	100

Bảng 2 cho thấy, vị trí khối u hay gặp nhất là ở amidan - chiếm 42,9%, thứ 2 là ở hạch cổ 34,7%, tiếp theo là đáy lưỡi 8,2%, hốc mũi 6,1%, vòm 5,1% và hốc mắt 3,0%.

Bảng 3. Các triệu chứng cơ năng theo vị trí tổn thương.

Vị trí	Triệu chứng	n
Amidan	- Nuốt vướng nuốt đau	38/42
	- Đau họng	30/42
	- Nói khó	4/42
	- Đau đầu, ù tai	3/42
Vòm	- Ngạt mũi	3/5
	- ù tai	3/5
	- Xì máu mũi	3/5
	- Đau đầu	1/5
Hốc mắt	- Lồi mắt	3/3
Hốc mũi	- Ngạt mũi	6/6
	- Chảy máu mũi	2/6
Đáy lưỡi	- Nuốt vướng	8/8
	- Đau họng	3/8
Hạch cổ	- Hạch to	34/34

Bệnh nhân đến viện với triệu chứng không đặc hiệu, tùy thuộc vị trí tổn thương; vòng Waldeyer, khoang miệng biểu hiện triệu chứng giống viêm nhiễm tại chỗ, chèn ép gây đau họng, nuốt vướng. Đối với khối u nguyên phát ở amidan, triệu chứng hay gặp nhất là nuốt vướng (90,5%). Tương tự, đối với khối u ở đáy lưỡi, triệu chứng nuốt vướng là 100%. Tại vòm có biểu hiện triệu chứng giống ung thư vòm gồm xì máu mũi (60%) và ngạt mũi (60%). Tại hốc mũi, triệu chứng ngạt mũi là 100%. 100% các bệnh nhân ULAKH có hạch cổ to, cứng chắc, ấn không đau, ít di động (bảng 3).

Bảng 4. Liên quan giữa giai đoạn bệnh và vị trí tổn thương.

Vị trí	Giai đoạn I	Giai đoạn II	Giai đoạn III	Giai đoạn IV
Amidan	14	27	0	1
Hạch cổ	13	17	3	1
Vòm	4	1	0	0
Hốc mũi	2	4	0	0
Hốc mắt	1	1	1	0
Đáy lưỡi	2	6	0	0
Tổng	36	56	4	2
Tỷ lệ %	36,7	57,1	4,1	2,1

Bảng 4 cho thấy, giai đoạn lâm sàng chủ yếu là giai đoạn II gặp nhiều nhất 57,1%. Đa số các trường hợp gặp giai đoạn bệnh khu trú I và II, chiếm 93,8%.

Bảng 5. Biểu hiện hội chứng B và giai đoạn bệnh.

Giai đoạn	Hội chứng B	n	Tỷ lệ %
I		2	2,04
II		10	10,2
III		1	1,02
IV		2	2,04
Tổng số		15	15,3

Bảng 5 cho thấy, có 15,3% bệnh nhân có biểu hiện hội chứng B, nhiều nhất là ở giai đoạn II, chiếm 10,2%. Còn lại là các giai đoạn: I (2,04%), III (1,02%) và IV (2,04%).

Bảng 6. Phân bố dòng tế bào dựa theo hóa mô miễn dịch.

Loại mô bệnh học	n	Tỷ lệ %
DLBCL	69	70,4
U lympho tế bào lympho nhỏ	3	3,06
U lympho thể nang	7	7,14
U lympho lympho tương bào	1	1,02
U lympho nguyên tương bào	1	1,02
U lympho tế bào áo nang	8	8,18
U lympho nguyên bào lympho B	2	2,04
U lympho vùng rìa nang	3	3,06
U lympho tế bào B lớn giàu mô bào	1	1,02
MALT	3	3,06

Về phân bố dòng tế bào dựa theo hóa mô miễn dịch, bảng 6 cho thấy, hay gặp nhất là DLBCL 70,4%. Các ULAKH khác được điều trị bằng hóa chất theo phác đồ R-CHOP hay gặp như u lympho thể nang 7,14%, u lympho tế bào áo nang 8,18%.

Bảng 7. Phân bố mô bệnh học theo phân loại Working formulation.

	Loại mô bệnh học	n	Tỷ lệ %
Độ ác tính thấp	WF1: lympho bào nhỏ	0	0
	WF2: dạng nang, ưu thế các tế bào nhỏ nhân khía	1	1,0
	WF3: dạng nang, hỗn hợp tế bào nhỏ và to nhân khía	2	2,0
Độ ác tính trung bình	WF4: dạng nang ưu thế tế bào lớn	7	7,1
	WF5: dạng lan tỏa, tế bào nhỏ nhân khía	4	4,1
	WF6: dạng lan tỏa, hỗn hợp tế bào to và nhỏ	50	51,1
	WF7: dạng lan tỏa tế bào to	32	32,7
Độ ác tính cao	WF8: tế bào to, nguyên bào miễn dịch	0	0
	WF9: nguyên bào lympho	0	0
	WF10: tế bào nhỏ, nhân không khía, tế bào Burkitt hoặc lan tỏa không biệt hóa không phải tế bào Burkitt	1	1,0
	Nhóm không xếp loại: ULAKH thể bất thực sản tế bào lớn, MALToma	1	1,0

Bảng 7 cho thấy, đa số gặp độ ác tính trung bình, chiếm 95,0%, độ ác tính cao chỉ chiếm 2%.

Bảng 8. Liên quan loại mô bệnh học và vị trí tổn thương.

Vị trí	WF2,3,4	WF5	WF6	WF7	WF8,9,10	Không xếp loại
Amidan	2	1	28	11	0	0
Hạch cổ	8	3	5	17	1	0
Vòm	0	0	3	2	0	0
Hốc mũi	0	0	6	0	0	0
Hốc mắt			2	1		0
Đáy lưỡi			6	1		1

Bảng 8 cho thấy, hầu hết là ULAKH nguyên phát vòng Waldeyer và khoang miệng có độ ác tính trung bình WF6 và WF7.

Bàn luận

Trong ULAKH vùng đầu cổ, độ tuổi gặp nhiều nhất là 51-70, nhỏ nhất mắc là 12 tuổi, cao nhất là 78 tuổi. Nhóm tuổi mắc nhiều nhất là 51-60 với nam và 61-70 với nữ. Độ tuổi trung bình là $54,7 \pm 14,08$. Nghiên cứu của tác giả Christian Walter [2] cũng phù hợp với nghiên cứu của chúng tôi, tuy nhiên độ tuổi trung bình của tác giả này cao hơn (62 ± 17 tuổi), và nữ cao hơn nam. Độ tuổi mắc bệnh trung bình của nữ cao hơn nam.

Về giới, nghiên cứu của chúng tôi có tỷ lệ nam/nữ = 1/1,09. Các nghiên cứu khác có tỷ lệ mắc bệnh ở nam cao hơn nữ. Tác giả Seong Jun Lee và cộng sự [6] cho thấy tỷ lệ nam/nữ = 1,5/1.

Phần lớn bệnh nhân đến viện sớm, thời gian trung bình là 2,1 tháng. Ngắn nhất là 0,5 tháng, chủ yếu trong khoảng 0,5-3 tháng từ khi có triệu chứng đầu tiên. Nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với các nghiên cứu khác khi thời gian khởi bệnh ngắn gặp nhiều trong ULAKH nguyên phát tại vòng Waldeyer [7].

Triệu chứng lâm sàng thay đổi theo vị trí tổn thương nguyên phát ngoài hạch, chủ yếu là biểu hiện sưng đau tại vị trí tổn thương kèm theo các dấu hiệu tại chỗ. Đây cũng là đặc điểm khác với triệu chứng của ULAKH chung với biểu hiện chính là hạch to. Các triệu chứng đa dạng, tuy không đặc hiệu nhưng có tính chất định hướng vị trí tổn thương ban đầu. Tại vòng Waldeyer, triệu chứng do sưng tại amidan gây ra chủ yếu là đau họng, nuốt vướng. Trong nghiên cứu của chúng tôi, bệnh nhân đến viện vì nuốt đau, nuốt vướng chiếm 90,47% các trường hợp. Đau họng chiếm 71,42% các trường hợp. Có 9,5% tổn thương amidan lan rộng gây triệu chứng giọng ngậm hạt thị; 6,7% tổn thương lan rộng lên vùng vòm gây triệu chứng đau đầu, ù tai. Theo Vũ Quang Toàn [8], triệu chứng chủ yếu tại vòng Waldeyer là đau họng, nuốt vướng. Một số trường hợp tổn thương nguyên phát tại vòng Waldeyer đến viện vì lý do hạch cổ to. Tổn thương tại hốc mắt chủ yếu là sưng nề hốc mắt và dè đẩy vào. Bệnh nhân biểu hiện triệu chứng lâm sàng chủ yếu là lồi mắt. Đa số các bệnh nhân đến khám chuyên khoa mắt đầu tiên với các triệu chứng lồi mắt, chảy nước mắt, đỏ mắt. Tổn thương tại vòm biểu hiện giống như các triệu chứng của ung thư vòm. Trong nghiên cứu của chúng tôi, biểu hiện ngạt mũi gặp ở 60% các trường hợp, các triệu chứng khác như đau đầu, ù tai, chảy máu mũi gặp ít hơn. Theo tác giả Siddhartha Laskar và cộng sự [9], triệu chứng của ung thư vòm có biểu hiện của khối hạch cổ là 69%, triệu chứng mưng mủ đau đầu 32%, ngạt chảy mũi 51%, chảy máu mũi 19%. Như vậy, kết quả của tác giả này có sự khác biệt với chúng tôi về triệu chứng chủ yếu của lymphoma vòm là nổi hạch cổ.

Giai đoạn lâm sàng theo Ann-Arbor trong nghiên cứu của chúng tôi gặp nhiều nhất là giai đoạn II, chiếm 57,1%. Giai đoạn sớm I, II chiếm đa số (93,8%). Như vậy, ULAKH vùng đầu cổ trong nghiên cứu này chủ yếu là giai đoạn khu trú. Điều này phù hợp với các nghiên cứu trên thế giới. Trong các nghiên cứu, tỷ lệ giai đoạn I, II dao động từ 75-92% tùy theo nghiên cứu.

Triệu chứng toàn thân hội chứng B trong nghiên cứu của chúng tôi là 15,3%. Tỷ lệ này của chúng tôi thấp hơn tác giả Vũ Quang Toàn là 22%. Theo các tác giả, không có sự liên quan giữa hội

chứng B với giai đoạn bệnh và thời gian khởi bệnh. Tuy nhiên, hội chứng B là yếu tố tiên lượng xấu đối với kết quả điều trị của nhóm bệnh nhân.

Đặc điểm cận lâm sàng, mô bệnh học hay gặp nhất là DLBCL (70,4%). Xếp sau là u lympho tế bào áo nang 8,18%, u lympho thể nang 7,14%. Theo các tác giả Lee và cộng sự [6], Pedersen [10], tỷ lệ DLBCL trong ULAKH đầu cổ là 73%, ở các nghiên cứu khác tỷ lệ này dao động từ 48-70%. Như vậy, nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với các nghiên cứu trên thế giới khi cho rằng DLBCL là thể hay gặp nhất. Theo Vũ Quang Toàn [8], tỷ lệ này là 56,8%. Loại mô bệnh học độ ác tính trung bình là WF6, WF7 chiếm đa số.

Kết luận

Triệu chứng cơ năng và thực thể của ULAKH vùng đầu cổ rất đa dạng, chủ yếu biểu hiện bệnh với triệu chứng tại chỗ u nguyên phát, trong giai đoạn đầu triệu chứng giống với viêm nhiễm thông thường của vùng đầu cổ. Trong đó, khối u ở amidan là hay gặp nhất, chiếm 42,9%.

Đa số các bệnh nhân đến viện sớm (thường trong vòng 3 tháng đầu), giai đoạn bệnh khu trú chủ yếu là giai đoạn I và II. Toàn thân có kèm theo hội chứng B. Đa số các bệnh nhân không có thiếu máu và không thấy thâm nhiễm tủy.

Mô bệnh học chủ yếu của ULAKH vùng đầu cổ là DLBCL, chiếm 70,4%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] K.R. Shankland, J.O. Armitage, B.W. Hancock (2012), "Non-hodgkin lymphoma", *Lancet*, **380**, pp.848-857.
- [2] Christian Walter, Thomas Ziebart, Keyvan Sagheb, et al. (2015), "Malignant lymphomas in the head and neck region - a retrospective, single-center study over 41 years", *Int. J. Med. Sci.*, **12**(2), pp.141-145.
- [3] S. Molica, F. Mauro, D. Giannarelli, et al. (2011), "Differentiating chronic lymphocytic leukemia from monoclonal B-lymphocytosis according to the clinical outcome: on behalf of the GIMEMA chronic lymphoproliferative diseases working group", *Haematologica*, **96**(2), pp.277-283.
- [4] S.H. Swerdlow, E. Campo, N.L. Harris, et al. (2008), *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, Lyon, France: IARC Press.
- [5] K. Triantafyllidou, J. Dimitrakopoulos, F. Iordanidis, et al. (2012), "Extranodal non-hodgkin lymphomas of the oral cavity and maxillofacial region: a clinical study of 58 cases and review of the literature", *J. Oral Maxillofac. Surg.*, **70**, pp.2776-2785.
- [6] Seong Jun Lee, Cheol Won Suh, et al. (2014), "Clinical characteristics, pathological distribution, prognostic factors in non-Hodgkin lymphoma of Waldeyer's ring: nationwide Korean study", *Korean J. Inter. Med.*, **29**, pp.352-360.
- [7] Nguyễn Trần Lâm (2008), *Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng hóa mô miễn dịch và bước đầu đánh giá kết quả điều trị của ULAKH ngoài hạch*, Luận văn bác sĩ nội trú bệnh viện, Trường Đại học Y Hà Nội.
- [8] Vũ Quang Toàn (2006), *Nhận xét đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng, kết quả điều trị bệnh ULAKH nguyên phát ngoài hạch vùng đầu cổ tại Bệnh viện K từ 2000-2005*, Luận văn thạc sỹ y học, Trường Đại học Y Hà Nội.
- [9] Siddhartha Laskar, Mary Ann Muckaden, et al. (2006), "Primary non-hodgkin's lymphoma of the nasopharynx: prognostic factors and outcome of 113 Indian patients", *Leukemia & Lymphoma*, **47**(10), pp.2132-2139.
- [10] R.K. Pedersen (1996), "Primary non-hodgkin lymphoma of the thyroid

Kết quả phẫu thuật chuyển ngón chân phục hồi ngón tay cái

Lê Văn Đoàn, Ngô Thái Hưng, Nguyễn Việt Tân*, Nguyễn Việt Nam, Chế Đình Nghĩa, Nguyễn Văn Phú

Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

Ngày nhận bài 3/7/2019; ngày chuyển phản biện 8/7/2019; ngày nhận phản biện 26/8/2019; ngày chấp nhận đăng 3/9/2019

Tóm tắt:

Ngón tay cái chiếm 50% chức năng của bàn tay. Hiện nay trên thế giới, phẫu thuật chuyển ngón chân phục hồi ngón tay cái bằng kỹ thuật vi phẫu là phương pháp được lựa chọn hàng đầu cho tổn thương này. Nghiên cứu nhằm đánh giá kết quả của phẫu thuật này trên người ở Việt Nam. Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 9/2015 đến 3/2018 theo phương pháp tiến cứu trên 30 bệnh nhân (BN) có tuổi trung bình là 28,6 (7-55 tuổi), tỷ lệ nam/nữ là 25/5. Có 6 mỗm cụt ngón cái kèm theo mất toàn bộ cơ ô mô cái được tạo hình bằng vật ngón chân cái thu nhỏ lấy trên khớp bàn ngón chân; 24 mỗm cụt ngón cái còn ô mô cái được tạo hình bằng 6 vật ngón chân cái thu nhỏ và 18 vật ngón chân thứ 2. Kết quả cho thấy, sau mổ trung bình 19 tháng (12-33 tháng), 100% ngón chuyển sống hoàn toàn. Với kết quả xa, điểm phân biệt cảm giác 2 điểm tĩnh trung bình là 13,4 mm, 5/30 trường hợp (16,7%) bị lệch trục ngón chuyển, 13/30 trường hợp (43,3%) bị biến chứng dính gân. Tất cả các BN đều có thể sử dụng chủ động ngón chuyển trong sinh hoạt và lao động hàng ngày. Với 6 mỗm cụt ngón cái không còn ô mô cái: 4/6 trường hợp phục hồi được động tác đối chiếu cơ bản của ngón cái. Với 24 mỗm cụt ngón cái còn ô mô cái: điểm đối chiếu Kapandji trung bình là 8,2; lực nắm và lực nhón trung bình lần lượt là 80,7 và 51,7% so với bên lành. Như vậy, phẫu thuật chuyển ngón chân phục hồi ngón tay cái là an toàn, với tỷ lệ thành công cao (100%), cho kết quả phục hồi chức năng tốt về vận động và cảm giác.

Từ khóa: mỗm cụt ngón cái, phẫu thuật chuyển ngón chân, tạo hình ngón cái.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

Ngón tay cái chiếm đến 50% chức năng của bàn tay. Do đó, những tổn thương gây cụt, mất ngón tay cái đều ảnh hưởng lớn đến chức năng, thẩm mỹ và tâm lý cho người bệnh. Trong các phẫu thuật phục hồi mỗm cụt ngón tay cái, phẫu thuật chuyển ngón chân bằng kỹ thuật vi phẫu có nhiều ưu điểm, cho kết quả tốt cả chức năng và thẩm mỹ, và ngày nay được coi là sự lựa chọn hàng đầu tại các nước phát triển.

Tại Việt Nam, với xu hướng gia tăng của các vụ tai nạn lao động và giao thông thì tổn thương cụt, mất ngón tay cái không phải là hiếm gặp. Phẫu thuật chuyển ngón chân phục hồi ngón tay cái đã được thực hiện tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 từ năm 1988. Gần đây, cũng có một số trung tâm chấn thương chỉnh hình trong nước bước đầu thực hiện phẫu thuật này. Tuy nhiên, số lượng các báo cáo, nghiên cứu về phẫu thuật trên còn hạn chế, mới chỉ dừng lại là những thông báo về kết quả bước đầu với số lượng BN khiêm tốn. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục tiêu “đánh giá kết quả phục hồi chức năng bàn tay sau phẫu thuật chuyển ngón chân phục hồi ngón tay cái”.

*Tác giả liên hệ: Email: Dr.nguyenviettan@gmail.com

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: nghiên cứu được thực hiện từ tháng 9/2015 đến 3/2018 trên 30 BN được phẫu thuật chuyển ngón chân phục hồi ngón tay cái.

Tiêu chuẩn lựa chọn: BN bị cụt ngón cái đơn thuần; bàn tay còn ít nhất một ngón dài không bị cụt hoặc tổn thương; BN đồng ý tham gia nghiên cứu; đầy đủ hồ sơ tư liệu nghiên cứu.

Tiêu chuẩn loại trừ: BN không đủ điều kiện phẫu thuật, gây mê hồi sức; cụt cả 5 ngón tay; thời gian theo dõi dưới 12 tháng, thiếu hồ sơ, tư liệu.

Phương pháp nghiên cứu: nghiên cứu tiến cứu, theo dõi dọc, không nhóm chứng.

Đánh giá kết quả gần: tỷ lệ ngón sống, tắc mạch, chảy máu, nhiễm trùng.

Đánh giá kết quả xa đạt được tại bàn tay

- Đánh giá chức năng vận động:

+ Với dụng cụ khám bàn tay của hãng Jamar: đo tổng biên độ vận động khớp bàn ngón, khớp liên đốt (TAM). Đo

The results of toe-to-thumb transfer surgery

Van Doan Le, Thai Hung Ngo, Viet Tan Nguyen*,
Viet Nam Nguyen, Dinh Nghia Che, Van Phu Nguyen

108 Military Central Hospital

Received 3 July 2019; accepted 3 September 2019

Abstract:

Thumb makes up 50% of hand function. In the world, toe-to-thumb transfer surgery using microsurgery technique is the standard treatment for thumb reconstruction. A cohort study was performed in 30 patients from September, 2015 to March, 2018 with the age average of 28.6 (range: 7-55), and male/female rate of 25/5. Six thumb stumps without thenar muscles were reconstructed by trans-metatarsal trimmed great toe flap; 24 thumb stumps with thenar muscles were reconstructed by six trimmed great toe flaps and 18 second toe flaps. Average follow-up time was 19 months (range: 12-33 months). Primary result exhibited 100% transferred toes survived completely. Secondary results: the average of static 2-point discrimination was 13.4 mm; 5/30 (16.7%) had mal-rotation of transferred toes; 13/30 (43.3%) had tendon adhesion complication. All patients actively used the reconstructed thumbs for living and laboy activities. Four out of six thumb stump patients without thenar muscles achieved basic thumb opposition. In 24 thumb stumps with thenar muscles, the average of Kapandji thumb opposition score was 8.2; the average of grip strength and key pinch strength was 80.7 and 51.7% of the uninjured side, respectively. In conclusion, toe-to-thumb transfer surgery was safe and effective with high successful rate (100%), and exhibited good outcomes in movement and sensory restoration.

Keywords: thumb reconstruction, thumb stump, toe transfer.

Classification number: 3.2

và so sánh lực nắm, lực nhón tại bàn tay được phẫu thuật và so sánh với bên lành.

+ Tính điểm đối chiếu ngón cái theo thang điểm Kapandji [1].

- Đánh giá phục hồi cảm giác bằng test phân biệt 2 điểm tĩnh và động, từ đó phân độ phục hồi cảm giác theo Hội đồng y học Anh [2].

- Tìm các nhược điểm về thẩm mỹ và chức năng, các biến chứng dính gân, cứng khớp, các biến chứng khác.

- Kiểm tra xương qua phim X-quang: trục xương, sự liền xương.

- Đánh giá dựa trên chủ quan của BN qua bộ câu hỏi: đánh giá chức năng bàn tay theo Michigan (Michigan hand outcomes questionnaire) trên 6 tiêu chí: chức năng chung, khả năng sinh hoạt, khả năng lao động, mức độ đau, điểm thẩm mỹ, độ hài lòng [3].

Xử lý số liệu: số liệu được xử lý bằng thuật toán thống kê y học với phần mềm SPSS 21.0.

Kết quả

Đặc điểm đối tượng

Tuổi trung bình của BN là 28,6 (7-55 tuổi). Tỷ lệ nam/nữ là 25/5.

Nguyên nhân gây cắt, mất ngón tay cái: 66,7% do tai nạn lao động, 26,7% do tai nạn sinh hoạt, 3,3% do tai nạn giao thông và 3,3% do hội chứng vòng thắt bẩm sinh.

Tay phải/trái là 19/11. Tay thuận/tay không thuận là 15/15.

Trong đó, có 24 mỏm cụt ngón cái đơn thuần (vẫn còn ô mô cái) được tạo hình bằng 6 vạt ngón chân cái thu nhỏ và 18 vạt ngón chân thứ 2; 6 mỏm cụt cả ô mô cái được tạo hình bằng vạt ngón chân cái thu nhỏ lấy trên khớp bàn ngón.

Thời gian theo dõi trung bình là 19 tháng (12-33 tháng).

Kết quả gần

Tỷ lệ thành công là 30/30 ngón sống hoàn toàn (100%). Tuy nhiên, có 2 trường hợp bị chèn ép tĩnh mạch (TM) sau mổ. Ở 2 trường hợp này, trong phẫu thuật lần đầu, chúng tôi chỉ thực hiện một miệng nối TM. Qua kiểm tra, chúng tôi phát hiện một trường hợp miệng nối TM còn tốt; trường hợp còn lại, miệng nối TM đã bị tắc. Xử trí: một trường hợp phải nối lại TM và 1 trường hợp chỉ cần lấy máu tụ và cầm máu vết mổ.

Một trường hợp bị biến chứng nhiễm trùng mô nối gân gấp.

Kết quả xa

Kết quả phục hồi vận động: kết quả phục hồi vận động của nhóm không còn cơ ô mô cái: tất cả 6 BN ở nhóm này đều có thể sử dụng chủ động ngón chuyển trong sinh hoạt và lao động hàng ngày. Trong đó, 4/6 BN phục hồi được động tác đối chiếu của ngón cái, từ đó có thể cầm nắm và nhón nhất. 2/6 BN chưa phục hồi được động tác đối chiếu của ngón cái và chỉ có thể cầm, nắm được các đồ vật to (ca, cốc) nhưng không nhón nhất được các đồ vật nhỏ. Ở 2 trường hợp này, tổn thương trước mổ là nặng nề, vị trí móm cụt ở trên khớp thang bàn, các xương tụ cốt ở bờ quay bị mất. Đặc điểm, vị trí móm cụt và kết quả ở 6 BN này được mô tả chi tiết trong bảng 1.

Bảng 1. Kết quả phục hồi vận động và cảm giác của nhóm không còn cơ ô mô cái (n=6).

BN	Tay	Vị trí móm cụt ngón cái	Điểm đối chiếu	Lực nhón (% bên lành)	Lực nắm (% bên lành)	TAM
1	Trái	Khối tụ cốt	0	0	25	30
2	Trái	Nền xương bàn I	8	44	100	30
3	Trái	Nền xương bàn I	7	19	50	0
4	Trái	Khối tụ cốt	0	0	23	40
5	Phải	Nền xương bàn I	4	23	67	85
6	Phải	Khối tụ cốt	7	38	19	90

Kết quả phục hồi vận động của nhóm còn ô mô cái: có 24 móm cụt ngón cái còn cơ ô mô cái. Kết quả phục hồi vận động của hai nhóm được tạo hình bằng ngón chân cái thu nhỏ và ngón 2 được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2. So sánh phục hồi vận động tại nhóm được tạo hình bằng ngón cái thu nhỏ và ngón chân thứ 2 (n=24).

Điểm	Ngón chuyển	Vật ngón chân cái thu nhỏ (n=6)	Vật ngón chân thứ 2 (n=18)	p
Điểm đối chiếu		8,3±1,9	8,2±1,3	0,134
Lực nhón (% với bên lành)		64,4±22,9	47,4±20,6	0,768
Lực nắm (% với bên lành)		73,2±30,5	83,2±32,9	0,675
TAM		42,5±29,8	38,3±23,6	0,364
Điểm chức năng bàn tay		89,5±8,2	84,7±12,7	0,548

Kết quả bảng 2 cho thấy, không có sự khác biệt về phục hồi chức năng của nhóm được tạo hình bằng ngón chân cái thu nhỏ và với ngón chân thứ 2 với $p > 0,05$.

So sánh sự phục hồi vận động giữa hai nhóm mất và còn ô mô cái: kết quả bảng 3 cho thấy, có sự khác biệt trong kết quả phục hồi vận động của nhóm còn cơ ô mô cái và không còn cơ ô mô cái với $p < 0,05$.

Bảng 3. So sánh điểm kết quả vận động đạt được giữa nhóm cụt ngón cái không còn cơ ô mô cái và nhóm cụt ngón cái còn cơ ô mô cái.

Điểm	Mức độ cụt	Cụt ngón cái không còn cơ ô mô cái (n=6)	Cụt ngón cái còn cơ ô mô cái (n=24)	p
Điểm đối chiếu		4,3±3,6	8,2±1,4	0,000
Sức nắm (% bên lành)		47,2±31,8	80,7±32,0	0,03
Điểm chức năng bàn tay		68,3±19,7	85,9±11,4	0,021

Phục hồi cảm giác: điểm phân biệt cảm giác 2 điểm tĩnh trung bình là 13,4±3,8 mm. Điểm phân biệt cảm giác 2 điểm động trung bình là 6,5±2,0 mm. Theo phân độ cảm giác của Hội đồng y học Anh, 24 ngón phục hồi cảm giác đạt mức S3(+) và 6 ngón phục hồi cảm giác đạt S3.

Biến chứng lệch trục, dính gân: 5 ngón tay có biến dạng lệch trục ngón tay. Tỷ lệ dính gân sau phẫu thuật là 13/30 (43,3%), trong đó có 7/13 BN đã được phẫu thuật gỡ dính gân, 6 BN không có nguyện vọng gỡ dính gân.

Kết quả thẩm mỹ: điểm thẩm mỹ trung bình là 79,7±17,0. Trong 12 móm cụt ngón cái được tạo hình bằng vật ngón chân cái thu nhỏ, ngón vẫn to và thô hơn ngón thường, đầu ngón to và búp ngón dày. Có 5/12 BN đã thực hiện phẫu thuật thu nhỏ ngón chuyển thì 2. 18 móm cụt được chuyển ngón chân thứ 2 thì ngón chuyển nhỏ, gầy, có ba đốt, đầu ngón hình bẻ và móng bé, ngắn. Có 3/18 BN đã thực hiện phẫu thuật đóng cứng khớp liên đốt xa sau chuyển ngón thì 2. Điểm thẩm mỹ của hai nhóm được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4. Điểm thẩm mỹ đạt được.

Vật ngón chân	Điểm thẩm mỹ	p
Vật ngón cái thu nhỏ (n=12)	75,8±16,6	0,164
Vật ngón thứ 2 (n=18)	82,3±17,2	

Nhận xét: với đánh giá chủ quan của người bệnh thì không có sự khác biệt trong kết quả thẩm mỹ khi tạo hình bằng vật ngón chân cái thu nhỏ hay ngón chân thứ 2.

Độ hài lòng: độ hài lòng trung bình là 78,0±18,7. Kết quả so sánh độ hài lòng của BN giữa hai nhóm được chuyển vật ngón chân cái thu nhỏ và vật ngón chân thứ 2 được thể hiện trong bảng 5.

Bảng 5. Độ hài lòng đạt được.

Vật ngón chân	Độ hài lòng	p
Vật ngón cái thu nhỏ (n=12)	73,7±17,5	0,24
Vật ngón thứ 2 (n=18)	80,1±19,4	

Nhận xét: không có sự khác biệt về độ hài lòng của người bệnh khi tạo hình bằng vật ngón chân cái thu nhỏ hay ngón chân thứ 2.

Bàn luận

Kết quả gần

Trong nghiên cứu của Gu và cs (1989) trên 226 ca chuyển ngón chân lên ngón tay, tỷ lệ thành công là 94,7% (214/226) và 12 ca thất bại [4]. Trong đó, có 77 trường hợp (34,1%) có những biến chứng tắc mạch trong và sau mổ. Theo nghiên cứu của Jain và cs (2009) trên 103 BN, tỷ lệ thành công là 98% nhưng cũng có tới 13 ca (12,6%) bị biến chứng tắc mạch [5].

Trong nghiên cứu này, tỷ lệ thành công là 100%. Tuy nhiên có 2 trường hợp bị tắc nghẽn TM và cần phẫu thuật kiểm tra lại mối nối. Qua hồi cứu cho thấy đây là 2 trong 7 trường hợp mà chúng tôi chỉ thực hiện 1 miệng nối TM trong thì mổ. Như vậy, việc nối từ hai TM trở lên có tác dụng tăng tuần hoàn cho ngón chuyển và hạn chế những biến chứng tắc, nghẽn TM sau mổ.

Kết quả xa

Kết quả vận động: kết quả ở nhóm mỏm cụt không còn ô mô cái: tổn thương gây cụt ngón cái tại cổ tay (cụt ngón cái và mất toàn bộ ô mô cái) là một tổn thương nặng nề, do đó kết quả tạo hình đạt được cũng sẽ là rất hạn chế. 6 mỏm cụt ngón tay cái không còn cơ ô mô cái được tạo hình với vạt ngón chân cái thu nhỏ được lấy trên khớp bàn ngón. So sánh kết quả về vận động và chức năng bàn tay đạt được của nhóm này với nhóm còn ô mô cái cho sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Với tổn thương này, ngón cái được tạo hình có vai trò chỉ như một “gọng kìm”. Do vậy, để đạt được chức năng bàn tay thì điều quan trọng nhất và quyết định thành công của phẫu thuật là vị trí ngón cái được cố định. Ngón cái cần phải được cố định ở tư thế giang, đối chiều và sắp sao cho kẽ ngón tay đủ rộng để có thể cầm được các đồ vật to, đồng thời sao cho các ngón dài cũng có thể chạm vào đầu mút ngón cái để tham gia động tác nhón, nhặt [6, 7].

Có 4/6 BN đạt được chức năng đối chiều cơ bản. Kết quả đạt được cũng rất khả quan, lực nắm đạt được 19-100%, lực nhóm đạt được 19-44% so với bên lành.

Có 2/6 BN không đạt được chức năng đối chiều cơ bản, chỉ có thể cầm, nắm được các đồ vật to (như ca, cốc) nhưng không thể nhón nhặt do sai lệch vị trí của ngón chuyển. Một lý do khách quan cho kết quả ở 2 BN này là tổn thương trước mổ nặng nề, nửa bờ quay của khối xương tụ cốt bị mất. Do đó, việc cố định vững chắc ngón chuyển vào phần còn lại của khối xương tụ cốt ở vị trí đối chiều trong 1 thì mổ thực sự là một thách thức. Tuy nhiên, bàn tay được tạo hình ở 2 BN này là tay trái, tay không thuận nên BN cũng không có nguyện vọng phẫu thuật chỉnh sửa trục xương thì 2.

Chúng tôi có tham khảo nhiều báo cáo về chuyển ngón

chân phục hồi ngón tay, nhưng số lượng về chuyển ngón chân phục hồi riêng cho nhóm mỏm cụt không còn ô mô cái là hạn chế. Các báo cáo cũng mới chỉ là thông báo về một số kỹ thuật và số lượng BN còn thấp. Năm 2013, Sabapathy và cs báo cáo kết quả chuyển ngón chân thứ 2 để tạo hình phục hồi ngón cái cho 8 trường hợp mỏm cụt ngón cái tại khớp thang bàn, 6/8 trường hợp đạt được chức năng cơ bản của bàn tay [6]. Tuy nhiên, lực nhón nhặt trong kết quả của Sabapathy và cs là yếu và không đủ để đo được trên lực kế. Như vậy, lực nhón của ngón tay cái mới trong nghiên cứu của chúng tôi là cao hơn trong nghiên cứu của Sapabathy và cs.

Kết quả ở nhóm mỏm cụt còn ô mô cái: so sánh kết quả thu được giữa chuyển vạt ngón chân cái hoặc vạt ngón chân thứ hai cho đến nay vẫn là một vấn đề tranh cãi. Đa số các tài liệu trong y văn đều cho rằng, kết quả chức năng và thẩm mỹ đạt được ở bàn tay khi tạo hình ngón tay cái bằng ngón chân cái sẽ cao hơn là ngón chân thứ 2 [8, 9]. Điều này cũng dễ hiểu bởi xét về giải phẫu thì ngón chân cái giống với ngón tay cái hơn là ngón chân thứ 2. Hơn nữa, các phẫu thuật thu nhỏ vạt ngón chân cái sau chuyển để nâng cao thẩm mỹ cũng là đơn giản. Tuy nhiên, những nhận xét của các tác giả công bố mới chỉ là những ý kiến mang tính chủ quan cá nhân mà chưa thể hiện bằng một nghiên cứu cụ thể. Năm 2011, Lin và cs nghiên cứu và so sánh giữa các dạng ngón chuyển dựa trên y học bằng chứng với 450 vạt ngón chân cho kết quả không có sự khác biệt về kết quả đạt được giữa 4 dạng ngón chuyển là: vạt ngón chân cái, vạt ngón chân cái thu nhỏ, vạt bọc ngón chân cái, vạt ngón chân thứ 2 [10]. Ngay sau đó, Waljee và cs (2013) cho rằng, nhận xét của Lin và cs (2011) chưa thuyết phục vì cách tiếp cận trong nghiên cứu này là tập hợp các nghiên cứu đơn lẻ về loạt ca bệnh [11]. Trong báo cáo của mình, tác giả thấy có sự khác biệt về kết quả giữa các dạng vạt ngón chân và cho rằng cần có một nghiên cứu hệ thống hơn với sự đồng nhất về số liệu kết quả để có nhận xét xác đáng về kết quả phục hồi giữa các dạng vạt ngón chân.

Trong nghiên cứu này, 24 mỏm cụt ngón cái còn ô mô cái đã được tạo hình bằng 6 vạt ngón chân cái thu nhỏ và 18 vạt ngón chân thứ 2. So sánh kết quả đạt được ở bàn tay giữa hai dạng vạt này qua bảng 2 đều không cho thấy sự khác biệt với $p > 0,05$. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, số lượng BN còn thấp nên vẫn cần có các nghiên cứu tiếp theo với số lượng BN lớn hơn, đồng nhất hơn để trả lời cho vấn đề đặt ra.

Kết quả phục hồi cảm giác: 24 BN phục hồi cảm giác đạt mức S3+ và 6 BN chỉ đạt mức S3. Trong nghiên cứu của Wei và cs (2000), tác giả cho thấy điểm phân biệt cảm giác 2 điểm động có tương quan với số các tiểu thể Meissner tại búp ngón [12]. Số lượng tiểu thể Meissner tại da mặt gan

ngón chân trước chuyển trung bình là 0,94 đã giảm xuống chỉ còn trung bình là 0,37 sau phẫu thuật chuyển ngón vì thoái hóa khi mà các xung động điện kích thích từ axon thần kinh chưa thể truyền tới nó trong thời kỳ tái tạo thần kinh (ước tính 1 mm/ngày). Do đó, dù có thể nào thì cảm giác của ngón chuyển cũng không thể đạt được như là ngón tay bình thường. Kết quả phục hồi cảm giác của chúng tôi cũng tương tự như của các tác giả.

Các hạn chế: mặc dù đã được tư vấn hướng dẫn và khám lại định kỳ sau ra viện nhưng tỷ lệ dính gân sau phẫu thuật chuyển ngón trong nghiên cứu này là khá cao: 13/30 BN (43,3%) và có chỉ định phải thực hiện phẫu thuật gỡ dính gân thì 2. So với ngón tay, biên độ vận động các khớp của ngón chân cũng không thể linh hoạt và bình thường các ngón chân cũng thường được giữ tại vị trí bất động. Do đó, thật là khó khăn để yêu cầu ngón chuyển có thể phục hồi các biên độ vận động hết như ngón tay bình thường. Theo kinh nghiệm của Henry và cs (2010), phẫu thuật bổ sung thì 2 cũng thường xuyên được thực hiện sau phẫu thuật chuyển ngón và chủ yếu là gỡ dính gân và các phẫu thuật nhằm cải thiện thẩm mỹ sau chuyển ngón [13]. Kết quả nghiên cứu của Buncke và cs cũng cho thấy, phẫu thuật thì 2 là cần thiết và chủ yếu là các phẫu thuật gỡ dính và thu nhỏ ngón [14]. Trong nghiên cứu này, có 7/13 BN bị dính gân đã thực hiện phẫu thuật gỡ dính và 8 trường hợp thực hiện phẫu thuật nhằm cải thiện thẩm mỹ của ngón chuyển thì 2.

Kết quả thẩm mỹ và độ hài lòng của BN: về phương diện thẩm mỹ, việc sử dụng ngón chân cái sẽ cho thẩm mỹ tốt hơn ngón chân thứ 2 [8, 9, 13]. Nguyên nhân chính xuất phát từ đặc điểm giải phẫu. So với ngón tay cái, ngón chân cái to hơn, đường kính ngang và trước sau lớn hơn. Móng của ngón chân cái cũng rộng hơn ngón tay 3-4 mm. Ngón chân thứ 2 nhỏ, đầu ngón bè hình củ hành hoặc hình dùi trống, móng vuông, hẹp và ngắn trong khi móng của ngón tay cái có hình tròn.

Trong nghiên cứu này, so sánh kết quả thẩm mỹ và độ hài lòng đạt được giữa hai nhóm chuyển ngón chân cái thu nhỏ và ngón thứ 2 không có sự khác biệt với $p > 0,05$. Tuy nhiên, cách tính điểm thẩm mỹ và độ hài lòng này là chỉ dựa hoàn toàn vào đánh giá chủ quan của người bệnh. Kết quả này một lần nữa khẳng định vai trò của công tác tư vấn trước mổ. Có lẽ, việc sử dụng các hình mẫu bằng đất sét hay in 3D sẽ giúp BN hình dung tốt hơn về kết quả thẩm mỹ đạt được trong tương lai và làm tăng sự hài lòng của BN sau phẫu thuật [15].

Kết luận

Phẫu thuật chuyển ngón chân phục hồi ngón tay cái là phẫu thuật an toàn, hiệu quả với tỷ lệ thành công cao (100%); kết quả phục hồi vận động đạt cao, 100% đạt cảm

giác từ S3 trở lên; điểm thẩm mỹ và độ hài lòng trung bình lần lượt là 79,7/100 và 78,0/100. Với kết quả này, người bệnh có thể nhanh chóng trở lại sinh hoạt, lao động và tái hòa nhập cộng đồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A. Kapandji (1986), "Clinical test of apposition and counter-apposition of the thumb", *Ann. Chir. Main*, **5(1)**, pp.67-73.
- [2] B. Rosen, G. Lundborg (2000), "A model instrument for the documentation of outcome after nerve repair", *J. Hand Surg. Am.*, **25**, pp.535-543.
- [3] K.C. Chung, et al. (1998), "Reliability and validity testing of the michigan hand outcomes questionnaire", *J. Hand Surgery*, **23A**, pp.575-587.
- [4] Y.D. Gu, M.M. Wu, H.R. Li (1989), "Circulatory crisis in free toe-to-hand transfer and its management: Clinical experience", *J. Reconstr. Microsurg.*, **5(2)**, pp.111-114.
- [5] V. Jain, F.C. Wei (2009), *Trimmed great toe transplantation (TTT) for thumb reconstruction, Surgery of the injured hand toward functional restoration*, Jaypee Brothers Medical Publishers (P) LTD, pp.192-199.
- [6] S.R. Sabapathy, et al. (2013), "Reconstruction of the thumb amputation at the carpometacarpal joint level by groin flap and second toe transfer", *Injury Int. J. Care Injured*, **44**, pp.370-375.
- [7] C.H. Lin, et al. (2008), "Osteoplastic thumb ray restoration with or without secondary toe transfer for reconstruction of opposable basic hand function", *Plast. Reconstr. Surg.*, **121**, pp.1288-1297.
- [8] F.C. Wei, et al. (1994), "Microsurgical thumb reconstruction with toe transfer: Selection of various techniques", *Plast. Reconstr. Surg.*, **93(2)**, pp.345-351.
- [9] S.H. Woo (2019), *Microsurgical Reconstruction*, Springer Nature Singapore Pte Ltd, pp.331-365.
- [10] P.Y. Lin, et al. (2011), "A systematic review of outcomes of toe-to-thumb transfers for isolated traumatic thumb amputation", *Hand (NY)*, **6(3)**, pp.235-243.
- [11] J.F. Waljee, K.C. Chung (2013), "Toe - to - hand transfer: evolving indications and relevant outcomes", *J. Hand Surg. Am.*, **38(7)**, pp.1431-1434.
- [12] F.C. Wei, et al. (2000), "Sensory recovery and Meissner corpuscle number after toe - to - hand transplantation", *Plast. Reconstr. Surg.*, **105(7)**, pp.2405-2411.
- [13] S.L. Henry, F.C. Wei (2010), "Thumb reconstruction with toe transfer", *J. Hand Microsurg.*, **2(2)**, pp.72-78.
- [14] G.M. Buncke, et al. (2007), "Great toe - to - thumb microvascular transplantation after traumatic amputation", *Hand Clin.*, **23**, pp.105-115.
- [15] C.W. Zang, et al. (2017), "3D printing technology in planning thumb reconstructions with second toe transplant", *Orthop. Surg.*, **9(2)**, pp.215-220.

Báo cáo kết quả 5 trường hợp phẫu thuật u tủy sống đoạn ngực - lưng tại Bệnh viện Quân y 7A

Lê Quang Trí*

Bệnh viện Quân y 7A

Ngày nhận bài 5/2/2020; ngày chuyển phản biện 10/2/2020; ngày nhận phản biện 18/3/2020; ngày chấp nhận đăng 25/3/2020

Tóm tắt:

Bài báo mô tả các đặc điểm lâm sàng, hình ảnh học và đánh giá kết quả điều trị phẫu thuật 5 bệnh nhân (4 nữ và 1 nam) u tủy tại Bệnh viện Quân y 7A từ tháng 12/2016-12/2019. Tuổi trung bình của 5 bệnh nhân này là 44,2 (độ tuổi 27-63). Các triệu chứng hay gặp là đau cột sống (5/5 bệnh nhân), rối loạn cảm giác (4/5 bệnh nhân), rối loạn vận động (3/5 bệnh nhân). Vị trí u thường gặp ở vùng ngực thấp - lưng. 3/5 bệnh nhân trải qua phẫu thuật giải ép tủy. Loại u gồm 4/5 bệnh nhân u rễ thần kinh nằm ngoài tủy trong màng cứng tủy và 1/5 bệnh nhân Sarcoma nằm ngoài màng cứng tủy, trong ống sống. Không có biến chứng trong quá trình mổ. Kết quả hồi phục sau mổ tốt. 5/5 bệnh nhân hồi phục hoàn toàn vận động và cảm giác. Tiên lượng và kết quả phẫu thuật u tủy lành tính thường là rất tốt. Hiện nay, phẫu thuật cắt bỏ u tủy sống là một phương pháp tối ưu, giúp cải thiện chức năng thần kinh sau mổ.

Từ khóa: u cột sống vùng ngực thấp - lưng, u tủy sống.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

U tủy thường ít gặp, chiếm tỷ lệ 2,06% các khối u trong cơ thể nói chung và chiếm 15% các u thuộc hệ thống thần kinh trung ương. U tủy là những tổn thương tăng sinh trong ống tủy, có nguồn gốc từ tế bào thần kinh hoặc từ nơi khác đến (ung thư di căn), khi tăng sinh chèn ép cấu trúc xung quanh như rễ thần kinh hoặc tủy sẽ gây ra các triệu chứng rối loạn vận động, cảm giác [1].

Năm 1888, Horsley và Gowers báo cáo về một trường hợp u trong màng cứng ngoài tủy được mổ thành công đầu tiên. Năm 1941, Greengood đã mổ thành công một trường hợp lấy hết u nội tủy, bệnh nhân (BN) này sau đó hồi phục hoàn toàn về mặt thần kinh và 35 năm sau vẫn chưa bị tái phát, đặc biệt sự phát minh ra kính hiển vi phẫu thuật bởi Kurze vào năm 1964 đã giúp cho việc điều trị phẫu thuật u tủy phát triển vượt bậc.

Biểu hiện lâm sàng của u tủy thường là bệnh cảnh chung của chèn ép rễ ở giai đoạn đầu và chèn ép tủy - thương tổn tủy ở giai đoạn tiếp theo. Tuy nhiên, triệu chứng thường không điển hình mà chủ yếu dựa vào biểu hiện lâm sàng để chẩn đoán định khu và chụp cộng hưởng từ là tiêu chuẩn vàng để chẩn đoán xác định u tủy sống.

Trong các nhóm lớn u tủy sống, thường gặp nhất là u bao dây thần kinh (Schwannoma và Neurofibroma) chiếm 30%, u màng não tủy (Meningioma) chiếm 22%, đại đa

số là u lành tính và ngoài tủy. Với những loại u này, việc phẫu thuật lấy triệt để u là biện pháp điều trị lý tưởng nhất nhằm tránh tái phát. Ngoài ra, u tế bào màng lót ống nội tủy (Ependymoma) chiếm 13% và ít hơn nữa là u tế bào sao (Astrocytoma). Đây là những loại u thường nội tủy, nên ngoài việc cố gắng lấy u tối đa thì tạo hình ống sống cũng giúp cho việc cải thiện triệu chứng cũng như kéo dài thời gian biểu hiện bệnh trở lại...

Tại Bệnh viện Quân y 7A, chúng tôi đã triển khai các kỹ thuật mổ cột sống từ năm 2013, đã phát hiện và tiến hành phẫu thuật một số trường hợp u tủy đoạn ngực - lưng. Nghiên cứu này bước đầu mô tả đặc điểm lâm sàng và kết quả phẫu thuật tại Bệnh viện Quân y 7A.

Phương pháp nghiên cứu

Tất cả 5 trường hợp được chẩn đoán xác định, tiến hành phẫu thuật và có kết quả giải phẫu bệnh là u tủy trong thời gian từ tháng 12/2016-12/2019 tại Bệnh viện Quân y 7A.

Phương pháp nghiên cứu được thực hiện như sau:

- + Mô tả tiền cứu một loạt ca bệnh.
- + Các thông tin nghiên cứu cần thu thập:
 - Thông tin chung của người bệnh: tuổi, giới.
 - Biểu hiện lâm sàng của người bệnh.
 - Vị trí khối u, kích thước khối u.

*Email: tsbstri@yahoo.com

The report on results of 5 surgical cases of the lower thoracic-lumbar tumour at 7A Military Hospital

Quang Tri Le*

7A Military Hospital

Received 5 February 2020; accepted 25 March 2020

Abstract:

The article described the clinical features, imaging findings and evaluated the surgical treatment results of 5 cases (4 females and 1 male) of spinal cord tumour at 7A Military Hospital from 12/2016-12/2019. The average age of these 5 patients was 44.2 years (range 27-63 years). The common symptoms were spinal pain (5/5 patients), sensory disorders (4/5 patients), movement disorders (3/5 patients) with the most typical tumour's location in the lower thoracic- lumbar. 3/5 patients underwent spinal decompression surgery. The tumour types included 4/5 cases of intramedullary neurinoma and 1/5 case of extramedullary-intradural sarcoma. There were no complications in the surgical process. The postoperative recovery results were good. 5/5 cases completely recovered the movement and the sensory. The prognosis and the outcome of the surgery for the benign spinal tumour were generally good. Until now, the surgical removal of the spinal cord tumour is the best method to improve the nerve functions after surgery treatment.

Keywords: lower thoracic - lumbar tumours, spinal cord tumours.

Classification number: 3.2

- Kết quả mô bệnh học.
- Kết quả phẫu thuật và các biến chứng.
- Đánh giá kết quả phẫu thuật: chúng tôi dựa vào sự tiến triển phục hồi của các triệu chứng lâm sàng (vận động, cảm giác, cơ tròn...) sau phẫu thuật khi BN ra viện.
- + Phân loại kết quả sau mổ:
- Tốt: tự đi lại, hoạt động tương đối bình thường.
- Trung bình: cần có sự hỗ trợ một phần trong đi lại, hoạt động hàng ngày.
- Xấu: liệt hoàn toàn, tử vong.

Kết quả và thảo luận

Trong 3 năm chúng tôi tiến hành phẫu thuật được 5 BN với các cá thể khác nhau thu được kết quả như bảng 1.

Bảng 1. Tuổi và giới tính các BN.

BN	Tuổi	Giới
BN 1	63	Nữ
BN 2	43	Nữ
BN 3	38	Nữ
BN 4	35	Nữ
BN 5	27	Nam

Trong nghiên cứu này, chúng tôi thấy tuổi trung bình của BN là 41,2, BN cao tuổi nhất là 63, BN nhỏ tuổi nhất là 27. Tỷ lệ nữ gấp nhiều hơn nam (4/1). Các nghiên cứu khác của Nguyễn Vũ và cs (2014) [2]; Võ Bá Tường và cs (2012) [3] cũng cho các kết quả tương tự.

Bảng 2. Thời gian bị bệnh và biểu hiện lâm sàng.

Triệu chứng	BN1	BN2	BN3	BN4	BN5
Thời gian mắc bệnh (tháng)	17	5	8	12	2
Đau cột sống	+	+	+	+	+
Chèn ép tủy	+	+	-	-	-
Rối loạn vận động	+	+	+	-	-
Rối loạn cảm giác	+	+	+	+	-
Rối loạn phản xạ	+	+	+	-	-
Rối loạn cơ tròn	+	+	-	-	-
Rối loạn dinh dưỡng	+	-	-	-	-

Trong các BN, có 2 BN tới viện sau 1 năm bị bệnh và 3 BN tới viện trước 1 năm. Có 1 BN tới viện khá sớm (2 tháng). Trong 5 BN được phẫu thuật, có 2 BN trước đó được y tế tuyến khác chẩn đoán là thoát vị đĩa đệm vùng cột sống thắt lưng, điều trị nội khoa không đỡ (bảng 2).

Về các triệu chứng lâm sàng, tất cả các BN này đều có tình trạng đau cột sống, đau thường xuyên và không liên quan đến vận động. Có 3/5 trường hợp có rối loạn vận động, trong đó có 2 BN liệt 2 chi dưới độ 3/5, 1 BN cảm thấy yếu đùi 1 bên khi đi lại nhiều. Có 4/5 BN có rối loạn cảm giác, chủ yếu là cảm giác nóng, và có triệu chứng tê bì. Theo kết quả nghiên cứu của Lương Viết Hòa và cs (2014) [4], rối loạn vận động là 88,4%, rối loạn cảm giác là 55%; của Nguyễn Vũ và cs [2] rối loạn vận động gặp 66,7%, rối loạn cảm giác gặp 77,8%.

Bảng 3. vị trí và kích thước của khối u.

BN	Vị trí	Kích thước	Vị trí so với màng tủy	Kết quả giải phẫu bệnh
BN 1	L1-L2	4 cm	Trong	Neurinoma
BN 2	D8-D10	2 u, 3 và 1 cm	Trong	Neurinoma
BN 3	D12-L1	3 cm	Trong	Neurinoma
BN 4	L1-L2	2,5 cm	Trong	Neurinoma
BN 5	L1-L2	4 cm	Ngoài	Sarcoma

Tất cả các BN trong nghiên cứu này đều có vị trí u vùng ngực thấp và lưng, kích thước khối u sau phẫu thuật tương đối lớn (2,5-4 cm). Có 1 BN có 2 khối u, cùng xuất phát từ 1 rễ thần kinh (bảng 3, hình 1). Có 4/5 BN u nằm ngoài tủy trong màng cứng tủy, đều là các u rễ thần kinh; 1 BN có u nằm ngoài màng cứng tủy, trong ống sống, BN này có kết quả giải phẫu bệnh là Sarcoma. Kết quả nghiên cứu của Võ Bá Tường và cs [3] cho thấy, u rễ thần kinh gặp 59%, vị trí vùng ngực - thắt lưng gặp 74,2%, u trong màng tủy gặp 81,81%. Nghiên cứu của Engelhard và cs (2010) [5] cho thấy, bệnh màng não tủy có tỷ lệ gặp 24,4%, u tế bào màng lót ống nội tủy 23,7% và schwannoma là 21,2%.



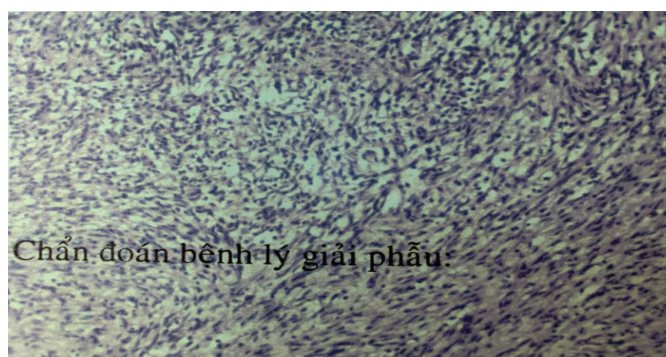
Hình 1. U tủy BN 2.

Bảng 4. Phương pháp phẫu thuật.

BN	Cắt cung sau	Cắt 1/2 cung sau	Đặt ốc chân cung
BN 1		2 cung	+
BN 2		3 cung	+
BN 3		2 cung	+
BN 4		2 cung	+
BN 5	2 cung		+

Trong quá trình phẫu thuật cần cân nhắc việc cắt bỏ xương để tạo phẫu trường đủ lớn và sự mất vững, biến dạng cột sống sau mổ. Chúng tôi tiến hành định vị đốt sống tương ứng với đoạn tủy bị tổn thương dưới màng tăng sáng (C-arm) trước mổ nhằm xác định chính xác vị trí u. Qua đó, hạn chế được chiều dài vết mổ cũng như hạn chế được sự cắt bỏ xương cột sống. Trong quá trình cắt bỏ xương, chúng tôi thường cắt bỏ một bên mảnh cung (4/5 BN) cho các trường hợp u có giới hạn rõ, kích thước nhỏ, còn các trường hợp u lớn, tiên lượng khó khăn trong phẫu thuật thường cắt bỏ cả hai mảnh cung (laminectomy) (bảng 4). Điều này đã được tác giả Lee và Hsieh (2012) [6] khuyến cáo. Cắt mảnh cung một bên có thể bảo tồn được hệ thống dây chằng, không làm mất vững cột sống, không cần cố định trong, giúp giảm đau sau mổ, giảm thời gian sử dụng phương tiện cố định ngoài sau mổ như: nẹp cổ, nẹp lưng... Tất cả các bệnh nhân trong nghiên cứu này đều được đặt ốc chân cung, nghiên cứu của Zhou và cs (2013) cho thấy, đặt ốc chân cung sau cắt cung sau hoặc 1/2 cung sau giúp cải thiện độ vững cột sống, khả năng chống nén và xoay [7].

Về kết quả phẫu thuật, cả 5 trường hợp đều có kết quả tốt sau mổ, với BN có kết quả giải phẫu bệnh là Sarcoma (hình 2), chúng tôi đã hội chẩn với Khoa Ung bướu Bệnh viện Chợ Rẫy và có hướng điều trị tiếp theo cho BN. Tất cả các BN đều hồi phục vận động và cảm giác tốt sau mổ. Kết quả của các tác giả khác, tỷ lệ hồi phục vận động là 55,6-75,4%.



Hình 2. Hình ảnh giải phẫu bệnh BN 4 là Sarcoma.

Kết luận

Qua 5 trường hợp phẫu thuật u tủy tại Bệnh viện Quân y 7A, chúng tôi nhận thấy, u tủy thường gặp ở BN 30-60 tuổi, nữ nhiều hơn nam (4/1). Vị trí u thường gặp ở vùng ngực thấp - lưng. Loại u hay gặp nhất là u rễ thần kinh (4/5 BN). Các triệu chứng hay gặp là đau cột sống (5/5 BN), rối loạn cảm giác (4/5 BN), rối loạn vận động (3/5 BN). Kết quả hồi phục sau mổ rất tốt, 5/5 BN hồi phục vận động và cảm giác. Hiện nay, phẫu thuật cắt bỏ u tủy sống là một phương pháp tối ưu, giúp cải thiện chức năng thần kinh sau mổ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] M. Setzer, et al. (2007), "Management of spinal meningiomas: surgical results and a review of the literature", *Neurosurg. Focus*, **23**(4), p.E14, Doi: 10.3171/FOC-07/10/E14.
- [2] Nguyễn Vũ và cs (2014), "Đặc điểm lâm sàng và kết quả điều trị phẫu thuật u tủy tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội", *Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh*, **18**, tr.86-90.
- [3] Võ Bá Tường và cs (2012), "Đánh giá kết quả điều trị phẫu thuật u tủy tại Bệnh viện Trung ương Huế", *Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh*, **16**, tr.444-448.
- [4] Lương Viết Hòa và cs (2014), "Kết quả điều trị phẫu thuật u dưới màng cứng ngoài tủy tại Bệnh viện Chợ Rẫy", *Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh*, **18**, tr.59-62.
- [5] H.H. Engelhard, et al. (2010), "Clinical presentation, histology, and treatment in 430 patients with primary tumors of the spinal cord, spinal meninges, or cauda equina", *J. Neurosurg. Spine*, **13**(1), pp.67-77.
- [6] B. Lee, P.C. Hsieh (2012), "Minimally invasive lumbar intradural extramedullary tumor resection", *Neurosurg. Focus*, **33**, p.1.
- [7] D. Zhou, et al. (2013), "Application of lamina reimplantation with ARCH plate fixation in thoracic and lumbar intraspinal tumors", *Experimental and Therapeutic Medicine*, **6**(2), pp.596-600.

Hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết ethanol thân rễ Ngải tím (*Kaempferia parviflora* Wall. Ex Baker), Ngải trắng (*Curcuma aromatica* Salisb.), Gừng gió (*Zingiber zerumbet* Sm.)

Nguyễn Trọng Tuấn*, Phạm Thị Sánh

Khoa Khoa học tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

Ngày nhận bài 25/11/2019; ngày chuyển phản biện 28/11/2019; ngày nhận phản biện 26/12/2019; ngày chấp nhận đăng 31/12/2019

Tóm tắt:

Stress oxy hóa là một trong những nguyên nhân gây bệnh tật cho con người, chủ yếu là do tình trạng mất cân bằng của các chất oxy hóa với các chất kháng oxy hóa bảo vệ trong cơ thể. Do đó để nâng cao sức khỏe, hiện nay, các sản phẩm nguồn gốc tự nhiên chứa các chất kháng oxy hóa thường được sử dụng. Các cây thuộc họ Gừng đã được biết chứa nhiều hợp chất kháng oxy hóa tự nhiên. Vì vậy, nghiên cứu này nhằm mục đích đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa của các cao chiết ethanol thân rễ Ngải tím (*Kaempferia parviflora* Wall. Ex Baker), Ngải trắng (*Curcuma aromatica* Salisb.) và Gừng gió (*Zingiber zerumbet* Sm.) bằng cách sử dụng các phương pháp thử nghiệm khác nhau như phương pháp DPPH, ABTS⁺ và năng lực khử (Reducing power). Ngoài ra, hàm lượng polyphenol tổng và flavonoid tổng trong các dịch trích cũng được xác định. Kết quả cho thấy, các cao chiết đều chứa hàm lượng lớn các hợp chất polyphenol tổng và flavonoid tổng. Ngải trắng và Gừng gió thể hiện hoạt tính kháng oxy hóa tốt hơn so với Ngải tím trong các phương pháp thử nghiệm. Nghiên cứu cho thấy tiềm năng lớn trong việc ứng dụng các loài thực vật tự nhiên này vào lĩnh vực thực phẩm và dược phẩm.

Từ khóa: Gừng gió, kháng oxy hóa, Ngải tím, Ngải trắng.

Chỉ số phân loại: 3.4

Đặt vấn đề

Ngải tím (*Kaempferia parviflora* Wall. Ex Baker), Ngải trắng (*Curcuma aromatica* Salisb.) và Gừng gió (*Zingiber zerumbet* Sm.) mọc hoang hoặc được trồng ở khắp cả nước, từ Bắc vào Nam, đặc biệt là các vùng đồi núi [1]. Ngải trắng và Gừng gió đã được mô tả trong danh lục các loài thực vật Việt Nam [2, 3], riêng Ngải tím mới được phát hiện ở các tỉnh Đắk Lắk, Gia Lai (K-Bang) và Thanh Hóa [4]. Đây là các cây thuộc họ Gừng, một họ có nhiều ứng dụng trong y học cổ truyền [1, 2]. Một số nghiên cứu trong và ngoài nước cho thấy đây là các loài thực vật có tiềm năng rất lớn trong lĩnh vực y dược. Ngải tím có chứa 5,7-dimethoxyflavone có khả năng ức chế mạnh enzyme PDE5 và PDE6 điều trị rối loạn cương dương trên chuột [5] cũng như là chất tăng cường sức khỏe tiềm năng cho người cao tuổi do làm giảm stress oxy hóa [6]. Cao chiết ethanol Ngải trắng thể hiện hoạt tính kháng viêm do có chứa lượng lớn acid arachidonic [7], dầu của Ngải trắng có hoạt tính bảo vệ gan khi ức chế sự phát triển khối u của gan đến 51-52% [8]. Gừng gió có khả năng giảm sự tăng trọng lượng cơ thể, lượng mỡ nội tạng và nồng độ lipid huyết tương [9]. Tuy nhiên hoạt tính kháng oxy hóa của các loài thực vật trên còn ít tài liệu

nghiên cứu. Chính vì thế, trong nghiên cứu này, chúng tôi tập trung nghiên cứu hoạt tính kháng oxy hóa của 3 loài thực vật được mô tả ở trên. Các loài thực vật này được thu hái trên địa bàn Núi Cẩm vùng Bảy Núi, thuộc huyện Tịnh Biên, tỉnh An Giang.

Đối tượng và phương pháp

Nguyên liệu

Mẫu nguyên liệu tươi (1 kg) mỗi loại được thu hái tại Núi Cẩm vùng Bảy Núi, huyện Tịnh Biên, tỉnh An Giang. Các mẫu được thu hái tại các tọa độ 10°29'43"N; 104°58'51,13"E ở độ cao 600 m (Ngải tím); 10°29'60"N; 104°58'40"E ở độ cao 400 m (Ngải trắng) và 10°30'24,98"N; 104°58'39,55"E ở độ cao 400 m (Gừng gió). Mẫu được xác nhận bởi Phùng Thị Hằng với số lưu mẫu Ngải tím P1102017-AG(NC)0013, Ngải trắng P1112017-AG(NC)0007 và Gừng gió P1072016-AG(NC, NT)0017. Các mẫu này được thu hái, định danh dựa trên đặc điểm hình thái và so sánh với tài liệu chuyên ngành. Mẫu được lưu trữ tại Phòng thí nghiệm Sinh học thực vật, Bộ môn Sư phạm sinh học, Khoa Sư phạm, Trường Đại học Cần Thơ. Nguyên liệu sau khi thu hái về được rửa sạch, loại bỏ tạp chất, cắt nhỏ, sấy ở 50°C và xay thành bột.

* Tác giả liên hệ: trongtuan@ctu.edu.vn

Antioxidant activity of ethanolic rhizomes extracts of *Kaempferia parviflora* Wall. Ex Baker, *Curcuma aromatica* Salisb., and *Zingiber zerumbet* Sm.

Trong Tuan Nguyen*, Thi Sanh Pham

College of Natural Sciences, Can Tho University

Received 25 November 2019; accepted 31 December 2019

Abstract:

Oxidative stress is one of the causes of humans diseases, mainly due to an imbalance of oxidative compounds with protective antioxidants in the body. Therefore, for improving health, nowadays, natural products containing antioxidants are often used. Plants belonging to the Zingiberaceae family have been known to contain lots of natural antioxidants. Therefore, this research aims to evaluate the antioxidant activities of ethanolic rhizomes extracts of *Kaempferia parviflora* Wall. Ex Baker, *Curcuma aromatic* Salisb., and *Zingiber zerumbet* Sm. by using some different bioassay methods such as DPPH, ABTS⁺, and reducing power. In addition, the content of total polyphenol and total flavonoid in the extracts were also investigated. The results showed that all of the extracts contained high amount of total polyphenol and total flavonoid components. *Curcuma aromatic* Salisb. and *Zingiber zerumbet* Sm. species provided the stronger antioxidant activity than *Kaempferia parviflora* Wall. Ex Baker species in all the tested methods. In brief, this research reveals a great potential for application of these medicinal plants in food and pharmaceutical fields.

Keywords: antioxidant, *Curcuma aromatic* Salisb., *Kaempferia parviflora* Wall. Ex Baker, *Zingiber zerumbet* Sm.

Classification number: 3.4

Xác định độ ẩm bột nguyên liệu

Độ ẩm bột nguyên liệu được xác định theo Dược điển Việt Nam V, theo phương pháp sấy [10].

Điều chế cao chiết

Bột khô thân rễ Ngải tím, Ngải trắng và Gừng gió được chiết với dung môi ethanol 96° bằng phương pháp ngâm trong 24 giờ (3 lần). Tất cả dịch chiết được gom lại và lọc để loại bỏ cặn, bụi. Dịch chiết sau khi lọc đem cô quay đuôi dung môi ở nhiệt độ 40-45°C thu được cao chiết ethanol thân rễ Ngải tím, Ngải trắng và Gừng gió. Cao chiết được đem cân và tính hiệu suất chiết cao, sau đó cao được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4°C cho đến khi thí nghiệm. Hiệu suất chiết cao được tính theo công thức:

$$\%H = \frac{\text{Khối lượng cao chiết}}{\text{Khối lượng bột khô}} \times 100\%$$

Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa của các cao chiết

Khảo sát hiệu quả loại bỏ gốc tự do DPPH: khả năng loại bỏ gốc tự do DPPH của các cao chiết được thực hiện theo Sharma [11]. Hỗn hợp phản ứng gồm 40 µl DPPH (1000 µg/ml) và 960 µl các cao chiết có nồng độ khác nhau. Cao chiết Ngải tím có nồng độ 80-560 µg/ml, cao chiết Ngải trắng có nồng độ 30-210 µg/ml và cao chiết Gừng gió có nồng độ 20-140 µg/ml. Hỗn hợp được ủ trong tối ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 30 phút, đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 517 nm. Đối chứng dương sử dụng là vitamin C. Kết quả hoạt tính kháng oxy hóa của các cao chiết được biểu diễn bằng giá trị EC₅₀ (Effective Concentration of 50%) được tính dựa trên phương trình hồi quy tuyến tính cũng như hàm lượng chất kháng oxy hóa tương đương vitamin C (µg/ml) của dịch chiết khảo sát. Hiệu suất làm sạch gốc tự do được tính theo công thức:

$$\% \text{ ức chế} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100\%$$

Trong đó: A_c là giá trị hấp thụ của DPPH; A_s là giá trị hấp thụ của mẫu thử.

Khảo sát hiệu quả loại bỏ gốc tự do ABTS⁺: hoạt động loại bỏ gốc tự do ABTS⁺ thực hiện theo Nenadis [12]. Chuẩn bị dung dịch ABTS⁺ bằng cách trộn 2 ml dung dịch ABTS 7 mM và 2 ml dung dịch K₂S₂O₈ 2,45 mM, ủ trong tối 16 giờ, sau đó pha loãng bằng ethanol (khoảng 30 lần), điều chỉnh độ hấp thụ ở bước sóng 734 nm đạt 0,7±0,05. Tiến hành cho 990 µl ABTS⁺ vào 10 µl các cao chiết ở các nồng độ khác nhau. Cao chiết Ngải tím có nồng độ 7,5-52,5 µg/ml, cao Ngải trắng có nồng độ 3-21 µg/ml và cao Gừng gió có nồng độ 5-35 µg/ml. Hỗn hợp phản ứng được ủ trong 6 phút, sau đó đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 734 nm. Đối chứng dương được sử dụng là trolox. Kết quả hoạt tính

kháng oxy hóa của các cao chiết được biểu diễn bằng giá trị EC_{50} được tính dựa trên phương trình hồi quy tuyến tính và hàm lượng chất kháng oxy hóa tương đương trolox ($\mu\text{g/ml}$) của dịch chiết khảo sát. Hiệu suất làm sạch gốc tự do được tính theo công thức:

$$\% \text{ Ức chế} = \frac{A_C - A_S}{A_C} \times 100\%$$

Trong đó: A_C là giá trị hấp thụ của ABTS^{•+}; A_S là giá trị hấp thụ của mẫu thử.

Khảo sát năng lực khử (Reducing Power - RP): RP được thực hiện theo phương pháp Ferreira [13]. Hỗn hợp phản ứng gồm 0,5 ml các cao ở nồng độ khác nhau từ 100-700 $\mu\text{g/ml}$, 0,5 ml đệm phosphate (0,2 M, pH=6,6) và 0,5 ml $K_3Fe(CN)_6$ 1%. Sau đó hỗn hợp phản ứng được ủ ở 50°C trong 20 phút, thêm 0,5 ml CCl_3COOH 10% rồi ly tâm 3000 vòng/phút trong 10 phút. Nhẹ nhàng rút 0,5 ml dịch phía trên cho vào 0,5 ml nước và 0,1 ml $FeCl_3$ 0,1%, lắc đều. Đo độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp phản ứng ở bước sóng 700 nm. Chất đối chứng dương sử dụng là trolox. Hiệu quả kháng oxy hóa của các cao chiết ở các nồng độ khác nhau được so sánh với chất chuẩn bằng cách sử dụng nồng độ mà tại đó chất chuẩn hay cao chiết ($\mu\text{g/ml}$) có giá trị $OD_{0,5}$ ($OD_{0,5}$) cũng như hàm lượng chất kháng oxy hóa tương đương trolox ($\mu\text{g/ml}$) của các dịch chiết.

Định lượng polyphenol tổng và flavonoid tổng trong cao chiết

Hàm lượng polyphenol tổng trong các cao chiết được xác định bằng thuốc thử Folin-Ciocalteu theo mô tả của Rebaya [14]. Hàm lượng flavonoid tổng được xác định theo phương pháp so màu $AlCl_3$ của Bag [15].

Kết quả

Độ ẩm bột nguyên liệu và hiệu suất chiết cao

Độ ẩm của bột nguyên liệu Ngải tím, Ngải trắng và Gừng gió đã được xác định và có giá trị lần lượt là $4,736 \pm 0,180\%$, $4,749 \pm 0,132\%$ và $4,888 \pm 0,120\%$. Các giá trị này cho thấy phù hợp theo quy định của Dược điển Việt Nam V [10] (độ ẩm bột nguyên liệu <9%).

Hiệu suất chiết cao đạt từ 9,6 đến 10,21%, và các cao có tính chất được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Hiệu suất, trạng thái và màu sắc của các cao chiết.

Cao chiết	Hiệu suất chiết cao (%)	Trạng thái	Màu sắc
Ngải tím	10,06	Sánh đặc	Tím đen
Ngải trắng	10,21	Sánh đặc	Xanh đen
Gừng gió	9,6	Sánh đặc	Nâu đen

Hoạt tính kháng oxy hóa

Hiệu quả loại bỏ gốc tự do DPPH: hàm lượng chất kháng oxy hóa tương đương vitamin C ($\mu\text{g/ml}$) cũng như giá trị EC_{50} của các cao chiết được tính toán và trình bày ở bảng 2 và bảng 3.

Bảng 2. Phần trăm ức chế và hàm lượng chất kháng oxy hóa tương đương vitamin C ($\mu\text{g/ml}$) của các cao chiết.

Cao chiết	Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Hiệu suất làm sạch gốc tự do (%)	Hàm lượng chất kháng oxy hóa tương đương vitamin C ($\mu\text{g/ml}$)
Ngải tím	80	$12,106 \pm 0,146$	$0,973 \pm 0,010$
	160	$20,357 \pm 0,199$	$1,541 \pm 0,014$
	240	$26,091 \pm 0,241$	$1,935 \pm 0,017$
	320	$32,749 \pm 0,199$	$2,394 \pm 0,014$
	400	$40,076 \pm 0,253$	$2,898 \pm 0,017$
	480	$46,862 \pm 0,417$	$3,365 \pm 0,029$
	560	$53,743 \pm 0,096$	$3,839 \pm 0,007$
Ngải trắng	30	$19,720 \pm 0,096$	$1,497 \pm 0,007$
	60	$32,940 \pm 0,526$	$2,407 \pm 0,036$
	90	$43,135 \pm 0,581$	$3,109 \pm 0,040$
	120	$56,610 \pm 0,345$	$4,037 \pm 0,024$
	150	$66,868 \pm 0,146$	$4,743 \pm 0,010$
	180	$77,636 \pm 0,345$	$5,484 \pm 0,024$
	210	$89,965 \pm 0,287$	$6,333 \pm 0,020$
Gừng gió	20	$18,860 \pm 0,096$	$1,438 \pm 0,007$
	40	$29,086 \pm 0,191$	$2,142 \pm 0,013$
	60	$41,319 \pm 0,253$	$2,984 \pm 0,017$
	80	$50,175 \pm 0,146$	$3,593 \pm 0,010$
	100	$64,097 \pm 0,292$	$4,552 \pm 0,020$
	120	$74,004 \pm 0,191$	$5,234 \pm 0,013$
	140	$82,319 \pm 0,096$	$5,806 \pm 0,007$

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, hàm lượng chất kháng oxy hóa tương đương vitamin C ($\mu\text{g/ml}$) của các cao chiết cũng tăng lên khi nồng độ cao chiết tăng lên. Cụ thể là ở cao chiết Ngải tím hàm lượng chất kháng oxy hóa tương đương vitamin C ($\mu\text{g/ml}$) tăng từ $0,973 \pm 0,010$ lên $3,839 \pm 0,007$ $\mu\text{g/ml}$ với hiệu quả làm sạch gốc tự do DPPH tăng từ $12,106 \pm 0,146\%$ lên $53,743 \pm 0,096\%$ ở nồng độ cao chiết từ 80-560 $\mu\text{g/ml}$. Cao chiết Ngải trắng tăng từ $1,497 \pm 0,007$ lên $6,333 \pm 0,020$ $\mu\text{g/ml}$ với hiệu suất tăng từ $19,720 \pm 0,096\%$ lên $89,965 \pm 0,287\%$ ở nồng độ từ 30-210 $\mu\text{g/ml}$ và cao chiết Gừng gió với hiệu quả làm sạch gốc tự do từ tăng từ $18,860 \pm 0,096\%$ lên $82,319 \pm 0,096\%$ cùng hàm lượng tương đương tăng từ $1,438 \pm 0,007$ lên $5,806 \pm 0,007$ $\mu\text{g/ml}$ khi nồng độ tăng từ 20-140 $\mu\text{g/ml}$.

Kết quả tính toán giá trị EC_{50} ở bảng 3 cho thấy, cao Ngải tím ($EC_{50} = 503,722$ $\mu\text{g/ml}$), cao Ngải trắng ($EC_{50} = 108,984$

$\mu\text{g/ml}$) và cao Gừng gió ($\text{EC}_{50}=78,729 \mu\text{g/ml}$) là khá tốt, đặc biệt là gừng gió ($\text{EC}_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$) đều cao hơn vitamin C ($\text{EC}_{50}=3,581 \mu\text{g/ml}$) lần lượt là 140,649; 30,430 và 21,983 lần. Như vậy, hiệu quả loại bỏ gốc tự do DPPH của các cao chiết được xếp theo thứ tự là cao Gừng gió > cao Ngải trắng > cao Ngải tím. Nhìn chung, trong 3 loài thực vật trên thì Gừng gió và Ngải trắng có hoạt động loại bỏ gốc tự do DPPH tốt vì giá trị EC_{50} thấp.

Bảng 3. Hiệu quả làm sạch gốc tự do DPPH của vitamin C và các cao chiết.

	Phương trình hồi quy tuyến tính	Giá trị EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Vitamin C	$y=14,5253x-2,0211$	3,581
Ngải tím	$y=0,0916x+3,3397$	503,722
Ngải trắng	$y=0,4106x+5,2511$	108,984
Gừng gió	$y=0,5749x+4,7388$	78,729

Khảo sát hiệu quả loại bỏ gốc tự do ABTS^{+} : hàm lượng chất kháng oxy hóa tương đương trolox ($\mu\text{g/ml}$) của các cao chiết được tính toán và trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Hiệu suất làm sạch và hàm lượng chất kháng oxy hóa tương đương trolox ($\mu\text{g/ml}$) của các cao chiết.

Cao chiết	Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Hiệu suất làm sạch gốc tự do (%)	Hàm lượng chất kháng oxy hóa tương đương trolox ($\mu\text{g/ml}$)
Ngải tím	7,5	$12,934 \pm 0,321$	$2,321 \pm 0,057$
	15,0	$22,822 \pm 0,185$	$4,086 \pm 0,033$
	22,5	$30,786 \pm 0,334$	$5,508 \pm 0,060$
	30,0	$42,117 \pm 0,160$	$7,531 \pm 0,029$
	37,5	$51,523 \pm 0,515$	$9,210 \pm 0,092$
	42,5	$57,402 \pm 0,334$	$10,260 \pm 0,060$
	45	$64,511 \pm 0,245$	$11,529 \pm 0,044$
Ngải trắng	3	$10,758 \pm 0,089$	$1,933 \pm 0,016$
	6	$19,826 \pm 0,089$	$3,552 \pm 0,016$
	9	$28,279 \pm 0,177$	$5,061 \pm 0,032$
	12	$35,861 \pm 0,320$	$6,414 \pm 0,057$
	15	$44,057 \pm 0,154$	$7,878 \pm 0,027$
	18	$50,666 \pm 0,154$	$9,057 \pm 0,027$
	21	$58,197 \pm 0,154$	$10,402 \pm 0,027$
Gừng gió	5	$12,632 \pm 0,236$	$2,446 \pm 0,042$
	10	$22,325 \pm 0,496$	$3,998 \pm 0,089$
	15	$29,887 \pm 0,445$	$5,348 \pm 0,080$
	20	$37,654 \pm 0,408$	$6,734 \pm 0,073$
	25	$44,805 \pm 0,178$	$8,011 \pm 0,032$
	30	$53,241 \pm 0,408$	$9,517 \pm 0,073$
	35	$63,477 \pm 0,496$	$11,345 \pm 0,089$

Kết quả ở bảng 4 cho thấy, hàm lượng chất kháng oxy hóa tương đương trolox ($\mu\text{g/ml}$) của các cao chiết cũng tăng lên khi nồng độ cao chiết tăng lên. Cụ thể là ở cao chiết Ngải tím, hàm lượng chất kháng oxy hóa tương đương trolox ($\mu\text{g/ml}$) tăng từ $2,321 \pm 0,057$ lên $11,529 \pm 0,044 \mu\text{g/ml}$ khi nồng độ cao chiết tăng từ 7,5-45 $\mu\text{g/ml}$, cao chiết Ngải trắng tăng từ $1,933 \pm 0,016$ lên $10,402 \pm 0,027 \mu\text{g/ml}$ khi tăng nồng độ từ 3-21 $\mu\text{g/ml}$ và cao chiết Gừng gió tăng từ $2,446 \pm 0,042$ lên $11,345 \pm 0,089 \mu\text{g/ml}$ khi nồng độ tăng từ 5-35 $\mu\text{g/ml}$.

Hiệu quả làm sạch gốc tự do ABTS^{+} của các cao chiết và chất chuẩn được trình bày thông qua giá trị EC_{50} suy ra từ phương trình hồi quy tuyến tính tương ứng, kết quả được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Hiệu quả làm sạch gốc tự do ABTS^{+} của trolox và các cao chiết.

	Phương trình hồi quy tuyến tính	Giá trị EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Trolox	$y=5,6014x-0,0687$	8,939
Ngải tím	$y=1,3599x+1,2638$	35,838
Ngải trắng	$y=2,727x+2,3224$	17,484
Gừng gió	$y=1,7086x+3,2279$	27,375

Kết quả giá trị EC_{50} ở bảng 5 cho thấy, cao Ngải tím ($\text{EC}_{50}=35,838 \mu\text{g/ml}$), cao Ngải trắng ($\text{EC}_{50}=17,484 \mu\text{g/ml}$) và cao Gừng gió ($\text{EC}_{50}=27,375 \mu\text{g/ml}$) đều thể hiện khả năng kháng oxy hóa rất tốt. Tuy nhiên, so với chất chuẩn trolox thì yếu hơn ($\text{EC}_{50}=8,939 \mu\text{g/ml}$) lần lượt là 4,009; 1,956 và 3,063 lần.

Từ kết quả trên cho thấy, hiệu quả loại bỏ gốc tự do ABTS^{+} của các cao chiết được xếp theo thứ tự là cao Ngải trắng > cao Gừng gió > cao Ngải tím. Nhìn chung, cả 3 loài thực vật trên có hoạt động loại bỏ gốc tự do ABTS^{+} rất tốt, giá trị EC_{50} thấp ($< 100 \mu\text{g/ml}$).

Năng lực khử: để đánh giá năng lực khử, giá trị $\text{OD}_{0,5}$ được dùng để so sánh vì khi độ hấp thụ càng cao, năng lực khử càng mạnh. Giá trị $\text{OD}_{0,5}$ cũng được suy ra từ phương trình hồi quy tuyến tính của trolox và các cao chiết tương ứng. Các kết quả nghiên cứu về năng lực khử của các cao chiết được thể hiện ở bảng 6 và 7.

Bảng 6. Năng lực khử của trolox và các cao chiết.

	Phương trình hồi quy tuyến tính	Giá trị $\text{OD}_{0,5}$
Trolox	$y=0,0124x+0,0812$	33,774
Ngải tím	$y=0,0009x+0,0933$	451,889
Ngải trắng	$y=0,0020x+0,1460$	177
Gừng gió	$y=0,0012x+0,0931$	339,083

Kết quả bảng 6 cho thấy năng lực khử của các cao chiết Ngải tím ($\text{OD}_{0,5}=451,889$), Ngải trắng ($\text{OD}_{0,5}=177$) và Gừng gió ($\text{OD}_{0,5}=339,083$) đều thấp hơn chất chuẩn trolox ($\text{OD}_{0,5}=33,774$) lần lượt 13,38, 5,241 và 10,04 lần.

Ngoài giá trị $OD_{0.5}$ thì hàm lượng tương đương chất chuẩn trolox $\mu\text{g/ml}$ (TEC) của các cao chiết cũng được tính toán và thể hiện ở bảng 7.

Bảng 7. Hàm lượng chất kháng oxy hóa tương đương trolox ($\mu\text{g/ml}$) của các cao chiết.

Nồng độ	Ngải tím	Ngải trắng	Gừng gió
100	9,823 $\pm$ 0,352	25,710 $\pm$ 0,213	12,968 $\pm$ 0,161
200	16,435 $\pm$ 0,081	39,769 $\pm$ 0,123	19,661 $\pm$ 0,213
300	23,613 $\pm$ 0,161	57,538 $\pm$ 0,186	26,435 $\pm$ 0,081
400	30,763 $\pm$ 0,246	69,097 $\pm$ 0,161	36,409 $\pm$ 0,246
500	37,349 $\pm$ 0,203	83,828 $\pm$ 0,123	44,634 $\pm$ 0,186
600	45,656 $\pm$ 0,168	101,194 $\pm$ 0,161	58,613 $\pm$ 0,161
700	50,253 $\pm$ 0,259	122,914 $\pm$ 0,186	67,591 $\pm$ 0,186

Kết quả về hàm lượng chất kháng oxy hóa ở bảng 7 cho thấy, hàm lượng chất kháng oxy hóa tương đương trolox ($\mu\text{g/ml}$) của các cao chiết cũng tăng lên khi nồng độ cao chiết tăng lên từ 100-700 $\mu\text{g/ml}$. Cụ thể là ở cao chiết Ngải tím, hàm lượng chất kháng oxy hóa tương đương trolox ($\mu\text{g/ml}$) tăng từ 9,823 $\pm$ 0,352 lên 50,253 $\pm$ 0,259, cao chiết Ngải trắng tăng từ 25,710 $\pm$ 0,213 lên 122,914 $\pm$ 0,186 và cao chiết Gừng gió tăng từ 12,968 $\pm$ 0,161 lên 67,591 $\pm$ 0,186. Từ kết quả trên cho thấy, năng lực khử của các cao chiết được xếp theo thứ tự là cao Ngải trắng > cao Gừng gió > cao Ngải tím, với cao Ngải trắng có giá trị $OD_{0.5}$ thấp hơn 200 $\mu\text{g/ml}$.

Định lượng polyphenol tổng và flavonoid tổng

Hàm lượng polyphenol tổng và flavonoid tổng trong các cao chiết được xác định tương đương hàm lượng acid gallic và quercetin với phương trình đường chuẩn $y=0,0881x+0,0831$ ($R^2=0,9993$) và $y=0,0067x-0,0026$ ($R^2=0,9970$). Kết quả được trình bày ở bảng 8.

Bảng 8. Kết quả định lượng polyphenol tổng và flavonoid tổng của các cao chiết.

Cao chiết	Hàm lượng polyphenol tổng TPC (mg GAE/g cao chiết)	Hàm lượng flavonoid tổng TFC (mg QE/g cao chiết)
Ngải tím	61,585 $\pm$ 0,365	45,124 $\pm$ 0,570
Ngải trắng	133,246 $\pm$ 0,409	81,443 $\pm$ 0,570
Gừng gió	104,075 $\pm$ 0,857	74,229 $\pm$ 0,215

Kết quả ở bảng 8 cho thấy, hàm lượng polyphenol và flavonoid chứa trong Ngải trắng là cao nhất với giá trị lần lượt là 133,246 $\pm$ 0,409 mg GAE/g và 81,443 $\pm$ 0,570 mg QE/g, kế đến là Gừng gió với giá trị tương ứng 104,075 $\pm$ 0,857 mg GAE/g và 74,229 $\pm$ 0,215 mg GE/g, cuối cùng là Ngải tím với 61,585 $\pm$ 0,365 mg GAE/g và 45,124 $\pm$ 0,570 mg GE/g. Kết quả này cũng phù hợp với hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết Ngải trắng và Gừng gió luôn tốt hơn so với cao Ngải tím.

Bàn luận

So sánh kết quả ở bảng 2 đến bảng 8 khi nghiên cứu về Ngải tím của chúng tôi với các nghiên cứu khác cho thấy, hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng của cao chiết ethanol rễ Ngải tím đều cao hơn trong nghiên cứu này (100,15 $\pm$ 8,34 mg GAE/g và 104,36 $\pm$ 0,43 mg QE/g) [16]. Hoạt động làm sạch gốc tự do DPPH của Ngải tím trong nghiên cứu của chúng tôi cũng yếu hơn rất nhiều so với nghiên cứu của Wungsintaweekul, et al. ($EC_{50}=61,5$ $\mu\text{g/ml}$) [17]. Tương tự trong một nghiên cứu khác của Butkhup, et al. với nồng độ cao chiết là 500 $\mu\text{g/ml}$ thì hiệu suất ức chế lên đến 60,64% [18].

Đối với Ngải trắng, qua kết quả nghiên cứu cho thấy hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết Ngải trắng cũng có sự khác biệt. Theo nghiên cứu của Lee, et al. trên cao chiết ethanol thân rễ Ngải trắng của Nhật Bản cho thấy, cao chiết chỉ làm sạch 27,2% gốc tự do DPPH khi ở nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$ và tăng lên 80,2% khi nồng độ cao chiết là 1 mg/ml và EC_{50} là 0,27 $\pm$ 0,01 mg/ml; ở năng lực khử, khi cao chiết ở nồng độ 1 mg/ml thì độ hấp thu chỉ đạt 0,4 và $OD_{0.5}$ lên đến 2,38 $\pm$ 0,04 mg/ml, trong khi đó nghiên cứu của chúng tôi giá trị EC_{50} ở phương pháp DPPH là 108,984 $\mu\text{g/ml}$ và ở năng lực khử với giá trị $OD_{0.5}$ là 177 $\mu\text{g/ml}$. Các kết quả này cho thấy rằng, hoạt tính kháng oxy hóa của Ngải trắng theo nghiên cứu của Lee yếu hơn nghiên cứu này rất nhiều [19]. Trong khi đó, hoạt động làm sạch gốc tự do DPPH của cao chiết methanol trong nghiên cứu của Al-Reza, et al. lại cho kết quả tốt hơn so với nghiên cứu của chúng tôi khi giá trị EC_{50} đạt 16,58 $\mu\text{g/ml}$ [20].

Đối với Gừng gió, hàm lượng polyphenol tổng và flavonoid (104,075 $\pm$ 0,857 mg GAE/g và 74,229 $\pm$ 0,215 mg QE/g) trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn trong nghiên cứu của Nag, et al. (33,64 $\pm$ 3,22 mg GAE/g và 26,79 $\pm$ 0,68 mg QE/g) và hoạt tính kháng oxy hóa cũng mạnh hơn rất nhiều so với EC_{50} trong phương pháp DPPH của Nag đạt 417,14 $\mu\text{g/ml}$ [21]. Trong nghiên cứu của Bhavesh, et al., hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng lại cao hơn (331,93 $\pm$ 1,23 mg GEA/g và 198 $\pm$ 2,65 mg QE/g), tuy nhiên hoạt tính làm sạch gốc tự do DPPH và ABTS⁺ thì yếu hơn so với nghiên cứu của chúng tôi với giá trị EC_{50} lần lượt là 117,65 $\pm$ 1,45 $\mu\text{g/ml}$ và 78,72 $\pm$ 1,12 $\mu\text{g/ml}$ [22].

Tất cả sự khác nhau của nghiên cứu trên có thể là do sự khác biệt về vị trí địa lý, thổ nhưỡng và giống thực vật nghiên cứu. Ngoài ra, còn có thể là do khác nhau về dung môi chiết xuất, methanol là dung môi có thể chiết xuất nhiều thành phần có hoạt tính sinh học hơn dung môi ethanol, tuy nhiên methanol là dung môi có tính độc hơn ethanol.

Kết luận

Nghiên cứu khả năng kháng oxy hóa của cao chiết ethanol thân rễ Ngải tím, Ngải trắng và Gừng gió cho thấy được tiềm năng kháng oxy hóa của các loài thực vật này. Bằng cách sử dụng các phương pháp thử nghiệm hoạt tính sinh học khác nhau cho nghiên cứu như phương pháp DPPH, ABTS⁺ và năng lực khử (Reducing Power), kết quả cho thấy rằng Ngải trắng và Gừng gió thể hiện hoạt tính kháng oxy hóa rất tốt khi các giá trị EC₅₀ thấp. Kết quả này cũng phù hợp với việc định lượng được hai thành phần chính quan trọng có tác dụng kháng oxy hóa mạnh thường xuất hiện trong nhiều loài thực vật là hợp chất polyphenol và flavonoid với kết quả hàm lượng khá cao là 133,246±0,409 mg GAE/g và 81,443±0,570 mg QE/g cho Ngải trắng; 104,075±0,857 mg GAE/g và 74,229±0,215 mg GE/g cho Gừng gió. Kết quả nghiên cứu thể hiện rõ hoạt tính kháng oxy hóa của các loài thực vật này và là một trong số các loài thực vật có tiềm năng ứng dụng vào việc phòng và trị bệnh trên người.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Dong, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiền, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Duy Mai, Phạm Kim Mẫn, Đoàn Thị Như, Nguyễn Tập, Trần Toàn (2004), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
- [2] Phạm Hoàng Hộ (1999), *Cây cỏ Việt Nam*, tập 1-3, Nhà xuất bản Trẻ.
- [3] Đỗ Tất Lợi (2004), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học.
- [4] Bùi Kim Anh, Đoàn Duy Tiên, Phạm Gia Điền, Hồ Đắc Hùng, Phạm Quang Dương, Bá Thị Dương, Nguyễn Thị Ngoan, Vũ Đình Hoàng (2018), “Một số hợp chất phân lập từ thân rễ Ngải đen (*Kaempferia parviflora* Wall. ex. Baker), họ Gừng (Zingiberaceae)”, *Tạp chí Dược học*, **58(1)**, tr.29-31.
- [5] P. Temkitthawon, T.R. Hinds, J.A. Beavo, J. Viyoch, K. Suwanborirux, W. Ponggamornkul, P. Sawasdee, K. Ingkaninan (2011), “*Kaempferia parviflora*, a plant used in traditional medicine to enhance sexual performance contains large amounts of low affinity PDE5 inhibitors”, *Journal of Ethnopharmacology*, **137**, pp.1437-1441.
- [6] J. Wattanathorn, S. Muchimapura, T. Tong-Un, N. Saenghong, W. Thukhum-Mee, B. Sripanidkulchai (2012), *Positive modulation effect of 8-week consumption of Kaempferia parviflora on health-related physical fitness and oxydative status in healthy elderly volunteers*, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.
- [7] A. Kumar, R. Chomwal, P. Kumar, R. Sawal (2009), “Anti inflammatory and wound healing activity of *Curcuma aromatica* Salisb. extract and its formulation”, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **1(1)**, pp.304-310.
- [8] W.Y. Wu, Q. Xu, L.C. Shi, W.B. Zhang (2000), “Inhibitory effects of *Curcuma aromatica* oil on proliferation of hepatoma in mice”, *World Journal of Gastroenterology*, **6(2)**, pp.216-219.
- [9] C.J. Chang, T.F. Tzeng, S.S. Liou, Y.S. Chang, I.M. Liu (2012), “Regulation of lipid disorders by ethanol extracts from *Zingiber zerumbet* in high-fat diet-induced rats”, *Food Chemistry*, **132(1)**, pp.460-467.
- [10] Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V*, Nhà xuất bản Y học.
- [11] O.P. Sharma, T.K. Bhat (2009), “DPPH antioxydant assay revisited”, *Food Chemistry*, **113(4)**, pp.1202-1205.
- [12] N. Nenadis, L.F. Wang, M. Tsimidou, H.Y. Zhang (2004), “Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS⁺ assay”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52(15)**, pp.4669-4674.
- [13] I.C.F.R. Ferreira, P. Baptista, M. Vilas-Boas, L. Barros (2007), “Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity”, *Food Chemistry*, **100(4)**, pp.1511-1516.
- [14] A. Rebaya, S.I. Belghith, B. Baghdikian, V.M. Leddet, F. Mabrouki, E. Olivier, J.K. Cherif, M.T. Ayadi (2015), “Total phenolic, total flavonoid, tannin content, and antioxydant capacity of *Halimium halimifolium* (Cistaceae)”, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **5(1)**, pp.52-57.
- [15] G.C. Bag, P.G. Devi, T. Bhaigiyabati (2015), “Assessment of total flavonoid content and antioxydant activity of methanolic rhizome extract of three hedychium species of manipur Valley”, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, **30(1)**, pp.154-159.
- [16] W. Kusirisin, S. Srichairatanakool, P. Lerttrakarnnon, N. Lailerd, M. Suttajit, C. Jaikang, C. Chaiyasut (2009), “Antioxydative activity, polyphenolic content and anti-glycation effect of some Thai medicinal plants traditionally used in diabetic patients”, *Medicinal Chemistry*, **5(2)**, pp.139-147.
- [17] J. Wungsintaweekul, W. Sitthithaworn, W. Putalun, H.W. Pfeifhofer, A. Brantner (2010), “Antimicrobial, antioxydant activities and chemical composition of selected Thai spices”, *Sonklanakarin Journal of Science and Technology*, **32(6)**, pp.589-598.
- [18] L. Butkhup, S. Samappito (2011), “In vitro free radical scavenging and antimicrobial activity of some selected Thai medicinal plants”, *Research Journal of Medicinal Plant*, **5(3)**, pp.254-265.
- [19] Y.L. Lee, C.C. Weng, J.L. Mau (2007), “Antioxydant properties of ethanolic and hot water extracts from the rhizome of *Curcuma aromatica*”, *Journal of Food Biochemistry*, **31(6)**, pp.757-771.
- [20] S.M. Al-Reza, A. Rahman, M.A. Sattar, M.O. Rahman, H.M. Fida (2010), “Essential oil composition and antioxydant activities of *Curcuma aromatica* Salisb”, *Food and Chemical Toxicology*, **48(6)**, pp.1757-1760.
- [21] A. Nag, M. Bandyopadhyay, A. Mukherjee (2013), “Antioxydant activities and cytotoxicity of *Zingiber zerumbet* (L.) Smith rhizome”, *J. Pharmacogn. Phytochem.*, **2(3)**, pp.102-108.
- [22] V.D. Bhavesh, Y. Nayak, B.S. Jayashree (2013), “In vitro antioxydant and antiglycation activity of *Zingiber zerumbet* (wild zinger) rhizome extract”, *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, **4(4)**, pp.482-489.

Ảnh hưởng của giống và vùng địa lý đến chất lượng hạt chè và dầu hạt chè *Camellia sinensis* O. Kuntze ở Việt Nam

Phan Thị Phương Thảo^{1*}, Trần Thị Thu Hằng¹, Giang Trung Khoa¹, Hoàng Đình Hòa², Vũ Hồng Sơn²

¹Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

Ngày nhận bài 28/8/2019; ngày chuyển phản biện 4/9/2019; ngày nhận phản biện 7/10/2019; ngày chấp nhận đăng 1/11/2019

Tóm tắt:

Chất lượng hạt và dầu hạt của 4 giống chè phổ biến tại Việt Nam là Trung du, Shan, PH1 và LDP1 được trồng tại 7 tỉnh (Phú Thọ, Tuyên Quang, Thái Nguyên, Yên Bái, Nghệ An, Quảng Trị, Lào Cai) đã được xác định. Tỷ lệ hạt/quả chè tươi dao động từ 52,66 đến 64,69% so với trọng lượng quả tươi, các thành phần hóa học trong hạt chè (hàm lượng protein, tro, lipid và polyphenol) ở các giống khác nhau có sự khác nhau, tuy nhiên ở các địa phương khác nhau trong cùng một giống thì chênh lệch không đáng kể. Nhìn chung, giống chè Shan trồng ở các địa phương khác nhau đều có hàm lượng lipid trong hạt cao (18,45-20,09%) nhưng tỷ lệ hạt/quả thấp (chỉ đạt khoảng 52,77%). Ngược lại, giống Trung du ở các tỉnh phía Bắc có tỷ lệ thu hồi hạt cao (khoảng 64,6%) và tỷ lệ chất béo trong hạt cũng tốt (18-20%). Chất lượng dầu được xác định qua các chỉ tiêu hóa lý (trị số peroxit, axit, iod, xà phòng hoá); các chỉ tiêu đánh giá khả năng kháng oxy hoá [polyphenol tổng số, khả năng bắt gốc tự do DPPH (thông qua chỉ số IC₅₀), carotenoid tổng số] của tất cả 15 mẫu, thành phần axit béo được đánh giá ở một số mẫu phù hợp làm nguyên liệu thu nhận dầu hạt chè. Về chất lượng dầu, giống chè không ảnh hưởng có ý nghĩa đến thành phần hoá học và thành phần axit béo của dầu hạt chè. Tuy nhiên, khả năng bắt gốc tự do DPPH, hàm lượng carotenoid cao nhất ở các mẫu dầu hạt chè giống Shan, Trung du trồng ở Phú Thọ. Kết quả phân tích thành phần axit béo từ 3 mẫu dầu hạt chè (2 mẫu Trung du trồng tại Phú Thọ, Tuyên Quang và 1 mẫu giống Shan tại Yên Bái) cho thấy dầu hạt chè có chất lượng cao.

Từ khóa: *Camellia sinensis*, dầu hạt chè, địa phương, giống, hạt chè.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Theo báo cáo của Tổng cục Thống kê năm 2017, Việt Nam là nước sản xuất chè (*Camellia sinensis* O. Kuntze) đứng hàng thứ 7 và xuất khẩu chè lớn thứ 5 trên thế giới. Hiện nay, nước ta có khoảng 124.000 ha chè, hơn 500 cơ sở chế biến với tổng sản lượng đạt khoảng 260.000 tấn chè khô mỗi năm. Với ngành trồng chè ở Việt Nam, sản phẩm thu hoạch là các búp chè non, chỉ một lượng nhỏ hạt chè được sử dụng để sản xuất cây giống còn lại hầu như không sử dụng đến. Theo ước tính, sản lượng hạt chè ở Việt Nam vào khoảng 1,5 triệu tấn/năm [1], tuy nhiên nguồn “phế phụ phẩm” này vẫn chưa được quan tâm khai thác.

Ngày nay, nhiều nước trên thế giới như Đức, Trung Quốc, Nhật Bản, Ấn Độ, Indonexia đã khai thác hạt chè để sản xuất các sản phẩm giá trị cao như mỹ phẩm (dầu chăm sóc da, tóc), thực phẩm (dầu ăn). Các sản phẩm này được thị trường hết sức ưa chuộng do chúng có nhiều axit tốt cho

sức khỏe như oleic, linoleic, palmitic, stearic [1]. Ngoài ra, dầu hạt chè cũng chứa nhiều chất có hoạt tính sinh học cao như carotenoid (251 mg/kg), vitamin E (389 mg/kg), đặc biệt polyphenol có thể lên tới 24,81 mg/kg [2]. Các chất này đã tạo giá trị cho hạt chè trở thành nguồn nguyên liệu tiềm năng để phát triển các sản phẩm giàu chất chống oxy hóa tự nhiên, phù hợp với xu hướng sản phẩm hiện nay của người tiêu dùng [3].

Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng, tùy theo điều kiện sinh trưởng và giống mà đặc tính của hạt chè ở mỗi vùng miền có sự khác nhau. Cụ thể, trọng lượng trung bình của hạt chè Nhật Bản vào khoảng 1,1 g, Trung Quốc 1,25 g, Ấn Độ 1,7 g [4]. Hàm lượng dầu trong nhân của hạt cũng dao động khá lớn, như ở Trung Quốc là 27,72%, Iran 30,5%, nam Ấn Độ 31%, Thổ Nhĩ Kỳ 32,8% [1]. Ở Việt Nam, việc nghiên cứu nhóm yếu tố ảnh hưởng này đến đặc tính của hạt và chất lượng của dầu hạt chè vẫn chưa được quan tâm tìm hiểu. Do vậy, nghiên cứu này góp phần làm sáng tỏ vấn đề trên, từ đó

*Tác giả liên hệ: Email: phanphuongthao.cntp@gmail.com

Effect of variety and cultivation place on the quality of tea seed and tea seed oil in Vietnam

Thi Phuong Thao Phan¹, Thi Thu Hang Tran¹,
Trung Khoa Giang¹, Dinh Hoa Hoang², Hong Son Vu²

¹Vietnam National University of Agriculture

²Hanoi University of Science and Technology

Received 28 August 2019; accepted 1 November 2019

Abstract:

The quality of tea seeds and tea seed oils from four popular tea varieties in Vietnam, namely Trungdu, Shan, PH1, and LDP1, grown in Phu Tho, Tuyen Quang, Thai Nguyen, Yen Bai, Nghe An, Quang Tri, and Lao Cai provinces has been identified. The recovery rate of fresh tea seeds ranged from 52.66-64.69%. Chemical components in tea seeds such as protein, ash, lipid and polyphenol content varied in different varieties, but the results of different cultivation places showed no significant difference. In general, the Shan variety had a high content of lipid in seeds (18.45-20.09%), but the recovery rate of seeds was low (about 52.77%). In contrast, the Trungdu variety had a high seed recovery rate (about 64.6%), and the lipid content in the seed was also good (18-20%). Oil quality was determined by physical and chemical indicators (peroxide value, acid value, iodine value, saponification value); Criteria for evaluation of antioxidant capacity (total polyphenols, DPPH free radical scavenging ability through IC₅₀, total carotenoids) of all 15 samples and fatty acid composition in some samples were evaluated as raw materials for producing tea seed oils. In term of oil quality, the tea varieties did not significantly affect the chemical quality and fatty acid composition of tea seed oils. However, DPPH free radical scavenging ability and carotenoid content were the best in Shan seed oil samples in all cultivation places and Trung Du seed oil samples in Phu Tho. Fatty acid profiles of 3 oil samples (2 samples of Trung du seed oil in Phu Tho and Tuyen Quang provinces; 1 samples of Shan seed oil in Yen Bai province) showed that tea seed oil had a high quality.

Keywords: *Camellia sinensis*, location, tea seed, tea seed oil, varieties.

Classification number: 4.1

tạo cơ sở khoa học hữu ích cho việc khai thác dầu chè cũng như các hợp chất có hoạt tính sinh học cao có trong hạt chè.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Thí nghiệm được tiến hành trên 15 mẫu hạt chè của 4 giống: Trung du, Shan, PH1, LDP1 tại 7 tỉnh trồng chè là Tuyên Quang, Phú Thọ, Thái Nguyên, Lào Cai, Yên Bái, Nghệ An và Quảng Trị.

Quả chè được thu hoạch phục vụ cho nghiên cứu là những quả già có chất lượng đồng đều và không bị sâu bệnh. Hạt chè sau khi bóc tách vỏ quả được sấy khô ở nhiệt độ 80°C đến độ ẩm 8-10%. Sau đó được đựng trong túi hút chân không và bảo quản ở nhiệt độ -20°C cho đến khi phân tích.

Hóa chất: Ether ethylic, etanol, kali hydroxit, phenolphthalein, chloroform, axit axetic, kali iodua, natri thiosunfat, natri cacbonat, axit clohydric, iot, tinh bột, thuốc thử Folin-Ciocalteu, axit galic, DPPH, ethyl acetat, methanol, petroleum ether, acetone, n-hexan, chuẩn axit béo.

Thiết bị: tủ sấy Memmer (Đức), cân phân tích Practum 224-1S (Đức), cân kỹ thuật Ohaus (Mỹ), hệ thống Soxhlet - Gerhardt (Đức), hệ thống Kjeldahl - Gerhardt (Đức), tủ đốt Nabertherm Controller B170 (Đức), máy so màu UV-Vis Shimadzu (Nhật Bản), hệ thống GC Clarus 580 PerkinElmer.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp phân tích:

- Xác định tỷ lệ hạt tươi/quả tươi:

$$X = \frac{m_1}{m_2}$$

Trong đó: X: tỷ lệ hạt tươi/quả tươi (%); m₁: khối lượng hạt đã tách vỏ; m₂: khối lượng hạt và vỏ (quả tươi).

- Xác định tỷ lệ nhân khô/hạt tươi:

$$X = \frac{m_1}{m_2}$$

Trong đó: X: tỷ lệ nhân khô/hạt tươi (%); m₁: khối lượng nhân khô (xử lý qua sấy) đã tách vỏ hạt; m₂: khối lượng nhân và vỏ (hạt tươi).

- Xác định tỷ lệ nhân khô/hạt khô:

$$X = \frac{m_1}{m_2}$$

Trong đó: X: tỷ lệ nhân khô/hạt khô (%); m₁: khối lượng nhân khô đã tách vỏ hạt; m₂: khối lượng nhân và vỏ (hạt khô đã sấy).

- Xác định độ ẩm của nguyên liệu theo TCVN 9706:2013
- Xác định hàm lượng lipid tổng số theo AOAC 945.16
- Xác định hàm lượng protein theo TCVN 8133:2009
- Xác định hàm lượng tro theo TCVN 4327:1993.
- Xác định trị số axit (AV) theo AOCS Official Method Cd 3d-63.
- Xác định trị số peroxit (PV) theo IUPAC method 2.501 Paquot (1979) [5].
- Xác định trị số iod (IV) theo AOCS method Cd 1-25.
- Xác định chỉ số xà phòng hoá (SV) theo AOCS method Cd 3-25.
- Xác định thành phần axit béo của dầu bằng phương pháp AOCS Ce 1 e - 8, 2002.

- Xác định hàm lượng polyphenol tổng số (TPC) theo phương pháp được mô tả bởi Fu và cs (2011) [6]. Một cách vắn tắt như sau: axit gallic được sử dụng làm chất chuẩn đối chiếu, xây dựng đường chuẩn bằng cách lập dãy điểm chuẩn axit gallic với các nồng độ 20, 40, 60, 80 và 100 µg/ml, lấy 0,5 ml dung dịch chuẩn thêm vào 2,5 ml thuốc thử Folin-Ciocalteu đã được pha loãng 10 lần; sau 4 phút, cho thêm 2 ml dung dịch Na₂CO₃ 7,5%. Độ hấp thụ của hỗn hợp được đo ở bước sóng 760 nm sau khi ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Các mẫu dầu hạt chè được pha loãng 10 lần bằng metanol 80%, sau đó siêu âm không nhiệt độ, ly tâm để xử lý mẫu, lấy 0,5 ml thực hiện các bước tương tự như đối với dung dịch chuẩn. Kết quả được biểu thị bằng miligam tương đương axit gallic (mg GAE/g trọng lượng khô của dầu).

$$X = \frac{OD \times c \times V}{a \times m}$$

Trong đó: X: tổng hàm lượng polyphenol (mg GAE/gck); OD: độ hấp thụ quang của mẫu ở bước sóng 760 nm; c: độ pha loãng dịch chiết (lần); V: thể tích dịch chiết (ml); a: hệ số của phương trình đường chuẩn axit gallic ($y = ax + b$); m: khối lượng mẫu dùng để chiết dịch (gck).

- Xác định hàm lượng carotenoid tổng số theo phương pháp được mô tả bởi Franke và cs (2010) [7] có một số thay đổi. Một cách vắn tắt như sau: 0,04 g dầu được pha loãng trong 5 ml petroleum ether/acetone (tỷ lệ 1/1 theo thể tích). Sự hấp thụ của petroleum ether/acetone (tỷ lệ 1/1 theo thể tích) được dùng làm mẫu đối chứng. Hàm lượng carotenoid (mg/kg) được tính theo công thức sau:

$$X = \frac{A \times y \times 10^7}{A_{cm} \% \times 1.000 \times g}$$

Trong đó: X: hàm lượng carotenoid (mg/kg); A: giá trị độ hấp thụ ở bước sóng 445 nm; y: thể tích dung dịch chiết (ml); g khối lượng mẫu (g); $A_{cm} \%$: hệ số hấp thụ trung bình 2.500 của phân tử carotenoid.

- Xác định hoạt tính kháng oxy hóa (khả năng bắt gốc tự do DPPH) thông qua chỉ số IC₅₀. Phương pháp được thực hiện theo Thaipong và cs (2006) [8]. Dung dịch gốc được điều chế bằng cách hòa tan 24 mg DPPH với 100 ml metanol và sau đó được bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng. Pha loãng dung dịch gốc 10 lần bằng ethyl acetat. Pha loãng mẫu theo các nồng độ 12,5, 25, 50, 100 và 200 mg/ml bằng ethyl acetat. Các mẫu dầu, mẫu đối chứng được thêm 2.850 µl dung dịch DPPH đã pha loãng, để 30 phút trong bóng tối. Tiến hành đo tại bước sóng 517 nm. Kết quả thể hiện bằng phần trăm ức chế gốc tự do I(%): $[(A_{\text{đối chứng}} - A_{\text{mẫu}}) / A_{\text{đối chứng}}] \times 100$, khi có phần trăm ức chế các gốc tự do, tiến hành xây dựng phương trình của mẫu (tương quan giữa I% và nồng độ mẫu) dạng $y = ax + b$. Từ đó, thay thế I% bằng 50% đã thu giá trị IC₅₀ (ức chế 50% gốc tự do).

Phương pháp xử lý số liệu: kết quả được trình bày theo các bảng là trung bình của 3 lần nhắc lại, các số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel, sau đó phân tích phương sai 1 yếu tố (one-way ANOVA) được tiến hành bằng phần mềm Minitab 16 ở mức ý nghĩa 5%. Số liệu thể hiện đều được làm tròn tới chữ số thập phân thứ 2 ± độ lệch chuẩn (SD).

Kết quả và thảo luận

Ảnh hưởng của giống và vùng địa lý đến thành phần cơ lý của quả chè

Thành phần cơ lý của quả chè có ảnh hưởng lớn đến tỷ lệ thu hồi dầu trong mỗi giống chè. Nghiên cứu yếu tố này chúng tôi thu được kết quả trong bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của giống và vùng địa lý đến thành phần cơ lý của quả chè.

Giống	Địa phương	Tỷ lệ hạt tươi/quả tươi (%)	Tỷ lệ nhân khô/hạt tươi (%)	Tỷ lệ nhân khô/hạt khô (%)
Trung du	Phú Thọ	64,69±0,07	71,64±0,16	80,86±0,06
	Tuyên Quang	64,67±0,44	70,96±0,03	80,83±0,14
	Thái Nguyên	63,35±0,41	70,91±0,07	80,50±0,47
	Yên Bái	63,40±0,36	69,75±0,14	80,74±0,13
	Nghệ An	63,36±0,23	69,72±0,44	80,00±0,03
Shan	Quảng Trị	62,89±0,11	70,10±0,06	80,04±0,02
	Yên Bái	52,66±0,38	69,36±0,10	78,71±0,03
	Tuyên Quang	52,77±0,09	69,09±0,07	78,16±0,10
PH1	Lào Cai	53,35±0,03	69,78±0,14	79,00±0,04
	Phú Thọ	61,52±0,17	66,05±0,02	75,54±0,14
	Tuyên Quang	60,35±0,41	66,77±0,07	75,15±0,04
	Nghệ An	60,74±0,49	66,74±0,23	75,16±0,13
LDP1	Quảng Trị	60,36±0,23	66,21±0,06	75,88±0,03
	Phú Thọ	61,22±0,79	67,64±0,14	75,17±0,06
	Thái Nguyên	61,52±0,17	67,64±0,17	75,32±0,43

Ghi chú: các số liệu theo cột có các chữ ở mũ khác nhau là khác nhau có ý nghĩa ở mức ý nghĩa 5%.

Chúng tôi nhận thấy, dường như yếu tố vùng canh tác không ảnh hưởng đáng kể đến tỷ lệ hạt tươi/quả tươi, tỷ lệ nhân khô/hạt tươi và tỷ lệ nhân khô/hạt khô. Ngược lại, yếu tố giống có ảnh hưởng đáng kể đến cả 3 chỉ tiêu này. Cụ thể, trong 4 giống khảo sát, tỷ lệ hạt tươi/quả tươi dao động từ 52,66 đến 64,69%, theo chiều giống Trung du>PH1~LDP1>Shan. Ngược lại, tỷ lệ nhân khô/hạt tươi lại có xu hướng Trung du>Shan>LDP1>PH1, trong khi tỷ lệ nhân khô/hạt khô là Trung du>Shan>PH1~LDP1. Điều này được giải thích bởi giống Shan có vỏ quả khá dày, trong khi vỏ quả và vỏ hạt của giống Trung du đều khá mỏng. Như vậy xét về yếu tố giống, Trung du là giống có lợi nhất trong thu hồi hạt và nhân từ quả.

Ảnh hưởng của giống và vùng địa lý đến thành phần hóa học của hạt chè

Kết quả xác định thành phần hóa học của hạt chè ở các giống và địa phương khác nhau được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của giống và vùng địa lý đến thành phần hóa học của hạt chè.

Giống	Địa phương	Hàm lượng lipid (%)	Hàm lượng protein (%)	Hàm lượng tro (%)	TPC (mg GAE/gck)
Trung du	Phú Thọ	20,05 ^a ±0,01	6,32 ^b ±0,30	10,19 ^b ±0,12	16,59 ^a ±0,15
	Tuyên Quang	18,87 ^b ±0,08	5,22 ^a ±0,01	9,72 ^a ±0,05	16,65 ^a ±0,03
	Thái Nguyên	18,73 ^a ±0,07	4,93 ^a ±0,04	9,19 ^a ±0,09	16,07 ^a ±0,01
	Yên Bái	17,64 ^a ±0,01	4,40 ^a ±0,14	8,48 ^a ±0,07	15,84 ^a ±0,13
	Nghệ An	16,03 ^a ±0,02	4,66 ^a ±0,04	8,08 ^a ±0,03	15,47 ^a ±0,28
	Quảng Trị	17,07 ^a ±0,03	4,15 ^a ±0,03	9,21 ^a ±0,02	15,65 ^a ±0,16
Shan	Yên Bái	20,09 ^a ±0,01	6,76 ^a ±0,27	8,07 ^b ±0,19	16,43 ^a ±0,02
	Tuyên Quang	20,04 ^a ±0,06	6,32 ^b ±0,28	10,70 ^a ±0,13	16,04 ^a ±0,03
	Lào Cai	18,45 ^a ±0,02	6,61 ^a ±0,18	7,94 ^a ±0,04	16,39 ^a ±0,08
PH1	Phú Thọ	17,48 ^b ±0,08	5,03 ^a ±0,02	7,06 ^a ±0,03	14,40 ^a ±0,27
	Tuyên Quang	18,03 ^a ±0,01	5,60 ^a ±0,04	7,02 ^a ±0,02	14,48 ^a ±0,18
	Nghệ An	17,85 ^a ±0,06	4,88 ^a ±0,08	8,19 ^a ±0,02	14,07 ^a ±0,05
	Quảng Trị	15,95 ^a ±0,02	4,92 ^a ±0,01	7,75 ^a ±0,03	14,83 ^a ±0,16
LDP1	Phú Thọ	17,86 ^a ±0,04	5,04 ^a ±0,03	8,85 ^a ±0,05	15,05 ^a ±0,02
	Thái Nguyên	17,93 ^a ±0,01	5,06 ^a ±0,03	8,38 ^a ±0,09	15,55 ^a ±0,09

Ghi chú: các số liệu theo cột có các chữ ở mũ khác nhau là khác nhau có ý nghĩa ở mức ý nghĩa 5%.

Từ kết quả thu được ở bảng 2 cho thấy, nhìn chung hàm lượng lipid, protein, tro và tổng polyphenol (TPC) giữa các giống, giữa các tỉnh trong cùng một giống có sự khác nhau có ý nghĩa thống kê. Trong các chỉ tiêu này, hàm lượng lipid là chỉ tiêu được quan tâm nhiều nhất. Hàm lượng lipid của

giống Trung du tại Phú Thọ, Shan tại Yên Bái, Tuyên Quang không có sự khác biệt ở mức ý nghĩa 5% và có giá trị lớn nhất khoảng 20%. Kết quả của chúng tôi khá tương đồng với nghiên cứu của Ngô Thị Kim Dung (2014) [9], cụ thể hàm lượng dầu ở hạt chè là thấp hơn so với các hạt hướng dương, hạt bí, hạt mè..., nhưng tương đương hoặc cao hơn so với hàm lượng dầu trong đậu nành (16,11%). Tuy vậy, kết quả này thấp hơn một chút so với nghiên cứu của Yahaya và cs (2011) [10] (23%) hay Trần Đình Phá (2011) [1] là 22,9% đối với hạt chè Shan tại Sơn La. Về hàm lượng protein và tro, không nhận thấy ảnh hưởng rõ nét của cả 2 yếu tố giống và vùng trồng đến các chỉ tiêu này (dao động từ 4,15 đến 6,76% đối với protein và 7,02-10,70% đối với chất tro trong hạt chè). Liên quan đến hàm lượng TPC, nếu xét theo trung bình giống thì giống chè Shan cho tổng hàm lượng polyphenol cao, tuy nhiên xét về các tỉnh thì giá trị polyphenol tổng trong hạt chè tại Phú Thọ, Tuyên Quang của giống chè Trung du là lớn nhất.

Ảnh hưởng của giống và vùng địa lý đến chất lượng dầu hạt chè

Kết quả đánh giá chất lượng dầu hạt chè được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của giống và vùng địa lý đến thành phần hóa học của dầu hạt chè.

Giống	Địa phương	PV (Meq/kg)	AV (mg KOH/g)	IV (g I/100 g)	SV (mg KOH/g)	TPC (mg GAE/gck)	IC ₅₀ (mg/ml)	Carotenoid (mg/kg)
Trung du	Phú Thọ	5,07 ^a ±0,02	3,08 ^a ±0,06	100,62 ^a ±1,34	188,45 ^a ±4,79	3,96 ^a ±0,02	69,61 ^a ±0,10	76,50 ^a ±0,5
	Tuyên Quang	5,13 ^a ±0,03	2,98 ^a ±0,01	96,08 ^a ±1,13	199,27 ^a ±1,10	3,84 ^a ±0,02	70,76 ^a ±0,59	76,70 ^a ±1,47
	Thái Nguyên	5,52 ^a ±0,07	3,46 ^a ±0,06	98,80 ^a ±0,89	186,18 ^a ±4,62	3,65 ^a ±0,02	94,33 ^a ±0,10	58,30 ^a ±0,61
	Yên Bái	5,38 ^a ±0,08	3,68 ^a ±0,12	88,03 ^a ±0,07	189,24 ^a ±4,89	3,28 ^a ±0,01	94,80 ^a ±0,31	59,90 ^a ±0,18
	Nghệ An	6,24 ^a ±0,08	3,71 ^a ±0,09	88,60 ^a ±0,23	194,22 ^a ±4,31	3,33 ^a ±0,02	97,35 ^a ±0,07	68,84 ^a ±0,47
	Quảng Trị	5,77 ^a ±0,02	3,94 ^a ±0,09	88,87 ^a ±0,12	189,17 ^a ±4,93	3,32 ^a ±0,02	95,44 ^a ±0,41	58,33 ^a ±0,58
Shan	Yên Bái	5,10 ^a ±0,04	2,95 ^a ±0,04	100,15 ^a ±0,21	191,70 ^a ±4,08	3,98 ^a ±0,03	68,47 ^a ±0,46	75 ^a ±1,00
	Tuyên Quang	5,05 ^a ±0,02	3,04 ^a ±0,02	99,24 ^a ±1,13	211,82 ^a ±2,41	3,93 ^a ±0,04	75,50 ^a ±0,63	75,26 ^a ±0,65
	Lào Cai	5,66 ^a ±0,03	3,47 ^a ±0,03	95,97 ^a ±0,71	207,22 ^a ±2,04	3,63 ^a ±0,04	69,41 ^a ±0,38	72,21 ^a ±0,71
PH1	Phú Thọ	6,27 ^a ±0,02	5,05 ^a ±0,06	87,32 ^a ±1,44	186,54 ^a ±3,80	3,01 ^a ±0,06	84,25 ^a ±0,15	62,42 ^a ±0,52
	Tuyên Quang	6,25 ^a ±0,02	5,24 ^a ±0,03	86,51 ^a ±1,17	209,46 ^a ±6,15	3,12 ^a ±0,02	87,81 ^a ±0,61	72 ^a ±1,00
	Nghệ An	6,31 ^a ±0,03	5,42 ^a ±0,02	75,33 ^a ±3,62	187,83 ^a ±4,63	3,11 ^a ±0,01	91,38 ^a ±1,41	56,95 ^a ±0,08
	Quảng Trị	6,67 ^a ±0,03	5,23 ^a ±0,33	84,50 ^a ±3,51	189,60 ^a ±4,79	3,11 ^a ±0,01	102,51 ^a ±2,09	65,10 ^a ±1,65
LDP1	Phú Thọ	5,34 ^a ±0,04	5,26 ^a ±0,21	87,43 ^a ±1,00	185,99 ^a ±4,63	2,69 ^a ±0,06	94,77 ^a ±0,62	70,25 ^a ±0,03
	Thái Nguyên	5,58 ^a ±0,01	5,69 ^a ±0,06	80,30 ^a ±0,40	188,11 ^a ±3,30	2,93 ^a ±0,08	112,56 ^a ±0,93	51,67 ^a ±1,16

Ghi chú: các số liệu theo cột có các chữ ở mũ khác nhau là khác nhau có ý nghĩa ở mức ý nghĩa 5%.

Chất lượng dầu hạt chè được đánh giá dựa trên trị số peroxit, axit, iod, xà phòng hóa. Trị số peroxit và axit tỷ lệ nghịch với chất lượng của dầu, do đó theo kết quả phân tích thì dầu hạt chè của giống Shan trồng tại các tỉnh Yên Bái, Tuyên Quang và Phú Thọ có chất lượng tốt hơn giống Trung du. Trị số xà phòng hóa, trị số iod khác nhau theo từng giống, từng địa phương. Trị số xà phòng hóa dao động trong khoảng 186-212 mg KOH/g, trị số iod dao động 80-100 g I₂/100 g. Theo Nguyễn Thị Ngọc Yến (2013) [4] khi nghiên cứu về dầu chè Lâm Đồng thì trị số xà phòng hóa khoảng 184-196 mg KOH/g, trị số iod khoảng 75-94 g I₂/100 g. Như vậy, chất lượng của dầu hạt chè trong nghiên cứu của chúng tôi nhìn chung khá tương đồng với các nghiên cứu này.

Khả năng kháng oxy hóa được đánh giá qua các chỉ tiêu TPC, khả năng bắt gốc tự do DPPH, tổng hàm lượng carotenoid. Xét chung về giống, giống Shan có hàm lượng TPC cao nhất, sau đó là Trung du; xét về từng tỉnh thì dầu từ hạt chè Phú Thọ (giống Trung du) và Yên Bái (giống Shan) là cao nhất và không có sự khác nhau ở mức ý nghĩa 5%. So sánh với hàm lượng polyphenol trong dầu đậu nành là 2,44 mg GAE/gck [11] thì hàm lượng polyphenol trong dầu hạt chè khá cao với 3,96 mg GAE/gck. Theo kết quả của Giang Trung Khoa và cs (2016) [12], bột chiết polyphenol từ lá chè *Camellia sinensis* giúp duy trì các tính chất cảm quan, giảm sự hình thành dienes và peroxit cũng như các hợp chất oxy hóa thứ cấp (p-anisidine) trong quá trình oxy hóa khi bổ sung vào dầu đậu nành. Như vậy trong quá trình lưu trữ, có thể dầu chè sẽ có khả năng chống oxy hóa tốt hơn so với các loại dầu khác. Mặt khác, phân tích giá trị IC₅₀ chúng tôi cũng nhận thấy, các mẫu chè có hàm lượng polyphenol và/hoặc carotene càng cao thì chỉ số IC₅₀ này càng thấp, hay khả năng kháng oxy hóa của dầu càng cao. Thật vậy, kết quả phân tích cho thấy khả năng kháng oxy hóa của dầu chè giống Trung du trồng ở các tỉnh Phú Thọ, Tuyên Quang là cao nhất. Hàm lượng carotenoid tại Phú Thọ và Tuyên Quang của giống Trung du đạt giá trị cao hơn so với các địa phương, các giống khác.

Kết quả phân tích về thành phần axit béo trong dầu hạt chè

Thành phần axit béo là chỉ tiêu quan trọng đánh giá chất lượng dinh dưỡng của dầu. Với mục đích khảo sát thành phần axit từ các mẫu nguyên liệu có chất lượng tốt hơn, chúng tôi lựa chọn hạt chè tại 3 địa phương Phú Thọ, Tuyên Quang (đối với giống Trung du) và Yên Bái (đối với giống Shan) để phân tích thành phần axit béo trong dầu hạt chè. Kết quả được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Thành phần axit béo của một số mẫu dầu hạt chè (%).

Axit		Shan	Trung du		
		<i>Yên Bái</i>	<i>Phú Thọ</i>	<i>Tuyên Quang</i>	
SFA	C12:0	0,4	0,38	0,4	
	C14:0	0,27	0,25	0,29	
	C15:0	0,03	0,03	0,03	
	C16:0	18,2	18,3	18,93	
	C18:0	6,04	5,43	5,39	
	C20:0	0,18	0,16	0,16	
	C22:0	0,09	0,07	0,08	
	C24:0	0,1	0,09	0,1	
	Tổng	25,31	24,72	25,39	
UFA	MUFA	C16:1	0,25	0,27	0,26
		C17:1	0,03	0,05	0,04
		C18:1	47,68	48,24	47,44
	PUFA	C20:1	0,8	0,81	0,73
		C18:2	24,78	25,08	25,01
		C20:2	0,03	0,02	0,02
		C18:3	0,9	0,81	0,89
		Tổng	74,69	75,28	74,61

Giữa các mẫu phân tích không có sự chênh lệch lớn về hàm lượng các axit béo (gần như tương đương), chứng tỏ sự ảnh hưởng của giống hay địa phương tới hàm lượng axit béo là không rõ rệt, hay nói cách khác theo kết quả nghiên cứu tổng lượng axit béo không bị ảnh hưởng bởi giống và vùng địa lý.

Hàm lượng axit béo bão hòa của dầu hạt chè (SFA) đạt 24-25%, hàm lượng axit béo không bão hòa khoảng 75-76%. Axit béo không no giúp cơ thể hấp thụ tốt hơn, sự có mặt của các axit không bão hòa làm tăng giá trị dinh dưỡng của dầu. Hàm lượng axit béo không bão hòa (PUFA) của dầu hạt chè chúng tôi phân tích là 25,92%, tương đồng với nghiên cứu của Sahari và cs (2004) [13] (22,47%). Trong số các axit béo, oleic là axit phong phú nhất với tỷ lệ khoảng 48%, sau đó là linoleic với 25,01%, như vậy dầu hạt chè là loại dầu thực vật giàu axit oleic và linolenic. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Xinchu Weng và cs (2018) [14]. Theo tác giả, hàm lượng axit oleic và linoleic trong dầu hạt chè trồng tại Hồ Nam, Trung Quốc tương ứng đạt 52,13 và 24,32%. Axit oleic rất cần thiết trong dinh dưỡng của con người, có tác dụng làm giảm LDL-cholesterol, cholesterol toàn phần và chỉ số đường huyết của cơ thể. Theo báo cáo của Eckel và cs (2006) [15], các loại dầu có lượng axit oleic (C18:1) cao (~50-65%), linoleic (C18:2) khoảng 20-30% và linolenic (C18:3) thấp (~<3%) thường chịu được nhiệt độ cao của quá trình chiên rán, đồng thời có khả năng hạn chế việc tạo ra mùi vị khó chịu sinh ra bởi tác động của nhiệt độ cao hay hình thành từ quá trình oxy hóa. Như vậy, các mẫu dầu

hạt chè mà chúng tôi khảo sát cơ bản đáp ứng các điều kiện này và có tiềm năng ứng dụng cao.

Kết luận

Các giống chè khác nhau cho tỷ lệ thu hồi hạt khác nhau, trong đó giống chè Shan có tỷ lệ thu hồi hạt thấp nhất, có ảnh hưởng tới thành phần hóa học của hạt cũng như chất lượng của dầu hạt chè. Nhìn chung, hạt chè giống Trung du có các ưu điểm như: tỷ lệ thu hồi nhân, hàm lượng lipid, hàm lượng polyphenol, hàm lượng carotenoid và hoạt tính kháng oxy hóa của dầu cao trong các giống khảo sát.

Trong cùng giống chè, vùng địa lý ít ảnh hưởng đến tỷ lệ thu hồi nhân nhưng có ảnh hưởng đáng kể đến thành phần hóa học (lipid, protein, tro, tổng polyphenol) của hạt cũng như chất lượng của dầu hạt chè thu được.

Hàm lượng lipid cũng như chất lượng dầu hạt chè Việt Nam hoàn toàn có thể so sánh được với các sản phẩm tương tự trên thế giới, mở ra tiềm năng khai thác để trở thành sản phẩm mới trong thị trường dầu thực vật tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Trần Đình Phá và cs (2011), “Kết quả nghiên cứu bước đầu về tiềm năng sản xuất dầu từ hạt chè”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, **3(24)**, tr.1-11.
- [2] M. Fazel, M.A. Sahari, M. Barzegar (2008), “Determination of main tea seed oil antioxidants and their effects on common kila oil”, *International Food Research Journal*, **15(2)**, pp.209-217.
- [3] Kelvin Omondi George, et al. (2015), “Quantitation of the total catechin content in oils extracted from seeds of selected tea (*Camellia sinensis* (L) O. Kuntze, Theaceae) clones by RP-HPLC”, *American Journal of Plant Sciences*, **6**, pp.1080-1089.
- [4] Nguyễn Thị Ngọc Yến (2013), *Báo cáo tổng kết đề tài Nghiên cứu quy trình chiết tách dầu từ hạt chè xanh Lâm Đồng*, Trung tâm Phát triển khoa học công nghệ trẻ.
- [5] C. Paquot (1979), *Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives* (6th Edition), Pergamon Press, Oxford, United Kingdom.
- [6] L. Fu, et al. (2011), “Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits”, *Food Chemistry*, **129(2)**, pp.345-350.
- [7] S. Franke, et al. (2010), “Analysis of carotenoids and vitamin E in selected oilseeds, press cakes and oils”, *Europ. J. Lipid Sci. Technol.*, **112**, pp.1122-1129.
- [8] K. Thaipong, et al. (2006), “Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts”, *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**, pp.669-675.
- [9] Ngô Thị Kim Dung (2014), “Xác định hàm lượng dầu và protein thô từ một số loại hạt”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, **15**, tr.15-18.
- [10] L.E. Yahaya, et al. (2011), “Compositional analysis of tea (*Camellia sinensis*) seed oil and its application”, *Int. J. Res. Chem. Env.*, **1(2)**, pp.153-158.
- [11] Dương Thị Phương Liên, Phan Thị Bích Trâm, Hà Thanh Toàn (2014), “Ảnh hưởng quá trình trích ly đến hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa từ đậu nành”, *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, **1**, tr.8-15.
- [12] Giang Trung Khoa, Bùi Quang Thuật, Ngô Xuân Mạnh, Bùi Thị Thanh Tiên (2016), “Hoạt tính kháng oxy hóa của polyphenol chè trong dầu đậu nành”, *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, **14(7)**, tr.1060-1067.
- [13] M.A. Sahari, D. Ataii, M. Hamed (2004), “Characteristics of tea seed oil in comparison with sunflower and olive oils and its effect as a natural antioxidant”, *JAOCs*, **81(6)**, pp.585-588.
- [14] Xinchu Weng, Zhuoting Yun, Chenxiao Zhang (2018), “Comparison of the characteristics of two kinds of tea seed oils: oil-tea seed oil and green-tea seed oil”, *Journal of Food Studies*, **7**, pp.56-67.
- [15] R.H. Eckel, et al. (2006), “Understanding the complexity of trans fatty acid reduction in the American diet: American heart association trans fat conference”, *Trans Fat Conference Planning Group*, **115**, pp.2231-2246.

Hàm lượng dinh dưỡng và enzyme của một số giống đậu Nho nhe (*Vigna umbellata*) thu tại tỉnh Điện Biên, Sơn La và Lai Châu

Nguyễn Hữu Quân*, Nguyễn Thị Ngọc Lan, Chu Hoàng Mậu

Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Thái Nguyên

Ngày nhận bài 2/8/2019; ngày chuyển phản biện 8/8/2019; ngày nhận phản biện 18/9/2019; ngày chấp nhận đăng 7/10/2019

Tóm tắt:

Đậu Nho nhe (*Vigna umbellata*) còn gọi là đậu gạo, là cây trồng thu hạt, cung cấp dinh dưỡng cho người và động vật, đồng thời là cây phân xanh phủ đất tốt cho vùng đồi núi. Cây, lá non và quả non được dùng làm rau xanh và hạt là nguyên liệu chế biến thực phẩm. Tuy nhiên, do thay đổi canh tác và chỉ chú ý đến năng suất mà nhiều giống đậu bản địa quý bị mất dần, vì vậy đánh giá nguồn gen các giống đậu, trong đó có đậu Nho nhe làm cơ sở cho việc bảo tồn và khai thác có hiệu quả giống đậu quý này là rất cần thiết. Nghiên cứu trình bày kết quả đánh giá một số thành phần dinh dưỡng và hoạt động của enzyme protease, amylase trong giai đoạn hạt nảy mầm của 6 mẫu hạt đậu Nho nhe nhằm xác định thời điểm thích hợp cho chế biến các loại thực phẩm có giá trị dinh dưỡng cao và làm cơ sở chọn lọc phục vụ bảo tồn, phát triển nguồn gen giống đậu này. Kết quả cho thấy, hoạt tính α -amylase và protease ở giai đoạn nảy mầm cao hơn nhiều so với giai đoạn hạt khô và khác nhau giữa các giống, cao nhất là giống NN14-ĐB đối với α -amylase và giống NN16-TP đối với protease. Hàm lượng protein cao nhất ở giai đoạn hạt khô và giảm dần khi hạt trương nước tới đa, hạt có rễ mầm và thân mầm; sự giảm hàm lượng protein trong hạt liên quan tới sự tăng hoạt tính protease. Hàm lượng lipid có trong hạt của 6 mẫu đậu Nho nhe dao động 0,68-0,95% và cao nhất ở mẫu NN18-LC (đạt 0,95%). Hàm lượng isoflavone trong mầm hạt đậu Nho nhe của các giống nghiên cứu rất thấp.

Từ khóa: α -amylase, đậu Nho nhe, isoflavone, protease, protein.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Đậu Nho nhe còn gọi là đậu gạo, có tên khoa học là *Vigna umbellata*. Thành phần dinh dưỡng có trong đậu Nho nhe gồm protein, lipid, chất xơ, carbohydrate, vitamin, khoáng chất, các axit amin và axit béo, hàm lượng các chất này cao hơn so với một số loài khác thuộc chi *Vigna*. Trong đó, hàm lượng protein chiếm 25,57% chủ yếu là albumin (6,13-7,47%) và globulin (13,11-15,56%); các axit béo không bão hòa (linoleic, linolenic); các phenolic chiếm 1,63-1,82%, tannin tổng (1,37-1,55%), tannin cô đặc (0,75-0,8%), tannin thủy phân (0,56-0,79%), chất ức chế trypsin (24,55-37,23 mg/g), axit phytic (7,32-8,17 mg/g), hoạt tính lipoxigenase (703-950 U/mg) và saponin 1,2-3,1 mg/100 g. Các oligosacarit liên quan đến chứng đầy hơi như raffinose, stachyose và verbascose lần lượt nằm trong giới hạn 1,66-2,58, 0,94-1,88 và 0,85-1,23% [1]. Đậu Nho nhe có giá trị dinh dưỡng cao, được sử dụng để cải thiện sức khỏe của người, động vật. Các giống đậu Nho nhe được coi là nguồn cung cấp protein, các axit amin, axit béo thiết yếu và khoáng chất [2]. Đối với động vật, đậu Nho nhe được coi như một loại thức ăn giúp tăng sản lượng sữa trong chăn nuôi. Ngoài ra, đậu Nho nhe còn được coi là loại cây trồng giúp cải tạo chất lượng của đất trồng.

Trong đậu Nho nhe còn tìm thấy axit phenolic và flavonoid là các nhóm chất chuyển hóa chính trong hạt. 3 loại axit phenolic (p-coumaric, ferulic, sinapic) và 5 loại flavonoid (catechin, epicatechin, vitexin, isovitexin, quercetin) đã được xác định trong các mẫu đậu Nho nhe. Hợp chất phenolic chiếm ưu thế trong tất cả các giống được tìm thấy là vitexin, tiếp theo là catechin và isovitexin [2]. Các hợp chất phenolic đã được chứng minh giúp giảm nguy cơ ung thư, bệnh tim, tiểu đường và được chứng minh có tính kháng khuẩn, kháng virus, chống viêm [3]. Daisy và cs (2018) đã nghiên cứu về thành phần dinh dưỡng của hạt đậu Nho nhe và chứng minh được vai trò quan trọng của các sản phẩm từ hạt đậu Nho nhe đối với con người khi mang thai, cũng như trong điều trị suy dinh dưỡng [4].

Ở Việt Nam, đậu Nho nhe phân bố ở một số tỉnh miền núi phía Bắc như Hà Giang, Lào Cai, Lai Châu, Điện Biên, Sơn La. Các giống đậu Nho nhe ở mỗi địa phương có kích thước, hình thái, màu sắc hạt và thành phần dinh dưỡng khác nhau. Do sự phân bố rải rác, tập quán canh tác, sự nhập ngoại nhiều giống cây trồng... mà nhiều giống đậu bản địa quý đang bị mất dần, trong đó có đậu Nho nhe. Vì vậy nghiên cứu thu thập, đánh giá nguồn gen đậu Nho nhe ở nước ta là cơ sở của việc bảo tồn, phát triển và khai thác có hiệu quả

* Tác giả liên hệ: Email: quannh@dhsptn.edu.vn

Nutritional quality and enzyme activity of rice bean (*Vigna umbellata*) collected in Dien Bien, Son La and Lai Chau provinces

Huu Quan Nguyen*, Thi Ngoc Lan Nguyen, Hoang Mau Chu

Department of Biology, Thai Nguyen University of Education

Received 2 August 2019; accepted 7 October 2019

Abstract:

Rice bean (*Vigna umbellata*) is a grain plant which provides nutrition for human and animal. It is also a good green-manure plant for keeping the soil surface covered in hill and mountain areas. Immature rice bean plants, young leaves and fruits are used as vegetables; and their seeds are raw materials for food processing. However, due to changes in cultivation and main attention to productivity, many indigenous bean varieties have gradually disappeared in Vietnam, thus assessing the genetic resources of beans, including rice bean, will form the basis for conservation and effective use of beans. This study presents the results of evaluation on some nutritional components and activity of such enzymes as protease, amylase at the germination stage of 6 rice bean samples. This study aims to determine the appropriate time for processing of high nutritional food as well as to provide the basis for selection, conservation of rice bean. The results showed that α -amylase and protease activities at the germination stage were much higher than those of the dry seeds; the NN14-DB got the highest α -amylase activity while the NN16-TP got the highest protease activity. The highest protein content was in rice bean seeds at the dry stage, and it declined when the seeds absorbed maximal water and when the seeds produced sprouts. The decrease in the protein content of rice bean grains was associated with the increase in protease activity. The lipid content in the seeds of 6 rice bean samples, ranged from 0.68-0.95%, and the highest revealed in the model of NN18-LC (reached 0.95%). The isoflavones contents of the seed samples at the germination stage were very low.

Keywords: α -amylase, isoflavones, proteases, proteins, rice bean.

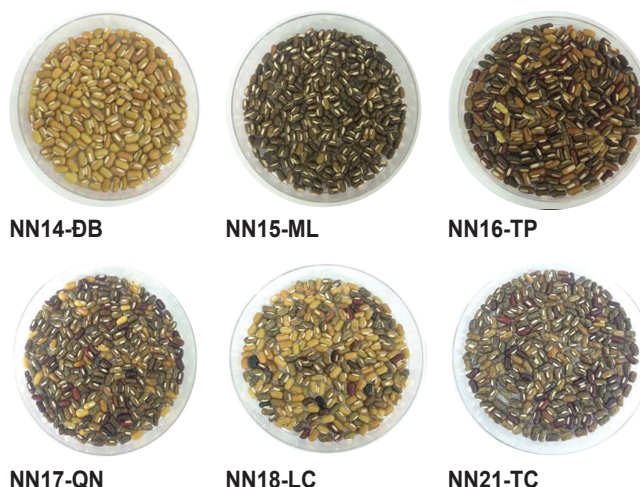
Classification number: 4.1

giống đậu quý này. Nghiên cứu của chúng tôi trình bày kết quả phân tích hàm lượng dinh dưỡng và hoạt tính enzyme trong giai đoạn hạt nảy mầm của một số giống đậu Nho nhe thu tại các tỉnh Điện Biên, Sơn La và Lai Châu nhằm cung cấp các dữ liệu hóa sinh hạt và các căn cứ để đánh giá chất lượng của giống phục vụ bảo tồn, phát triển nguồn gen đậu Nho nhe ở nước ta.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

6 mẫu giống đậu Nho nhe thu tại tỉnh Sơn La, Điện Biên và Lai Châu được định danh bởi Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên (hình 1).



Hình 1. Hình thái hạt của 6 mẫu đậu Nho nhe nghiên cứu. NN14-ĐB: Tuần Giáo, Điện Biên, NN15-ML: Mường Lầm, Sơn La, NN16-TP: TP Sơn La - Sơn La, NN17-QN: Quỳnh Nhai, Sơn La, NN18-LC: Nậm Tăm, Lai Châu, NN21-TC: Thuận Châu, Sơn La.

Hóa chất

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu đều là loại tinh khiết được cung cấp bởi các hãng có uy tín như Wako (Nhật Bản), Merck (Đức), Fermentas (Đức), Bioneer (Hàn Quốc), Research Organics (Mỹ).

Phương pháp ngâm hạt, ủ mầm cho hạt đậu Nho nhe

Hạt đậu Nho nhe có chất lượng tốt được cân xác định khối lượng khô, rửa sạch với nước và ngâm hạt trong nước ấm ở 30-37°C trong thời gian 8 giờ. Hạt được rửa lại với nước sạch giúp loại bỏ nước chua trên bề mặt, để ráo nước và tiến hành cân lại khối lượng trước khi ủ để hạt nảy mầm. Hạt được đặt trong khay thành một lớp có lót bông và giấy lọc để giữ độ ẩm, được che tối và ủ ở 30°C. Theo dõi tiến trình nảy mầm của hạt theo thời gian và sử dụng hạt nảy mầm để nghiên cứu tại 3 thời điểm khác nhau: hạt trương nước (hạt ngâm nước tới kích thước tối đa), hạt bắt đầu ra rễ mầm (rễ mầm dưới 0,5 cm), hạt có rễ và thân mầm [5].

Phương pháp xác định hoạt tính α -amylase trong hạt đậu Nho nhe nảy mầm

Hạt đậu Nho nhe nảy mầm (tương đương với 2 g hạt khô) ở các thời điểm nảy mầm khác nhau được nghiền trong 4 ml nước và 1 ml đệm 0,1 M photphat pH 6,0 rồi lọc bỏ bã và định mức dung dịch bằng nước cất 2 lần trước khi ly tâm loại bỏ cặn tinh bột và protein thu được dịch enzyme. Hoạt tính α -amylase được định lượng bằng cách đo hàm lượng đường glucose giải phóng khi thủy phân tinh bột bởi enzyme theo phương pháp của Miller (1959) [6]. 0,5 ml dịch enzyme được ủ với 0,5 ml tinh bột 1,0% pha trong 20 mM đệm photphat pH 6,0 ở 40°C trong 10 phút, sau đó ngừng phản ứng bằng cách bổ sung 1,0 ml DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) và đun sôi trong 5 phút. Độ hấp phụ của hỗn hợp màu được đo bằng máy quang phổ ở bước sóng 540 nm (mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần). Độ hấp phụ được đối chiếu với đồ thị chuẩn nồng độ tinh bột để tính ra lượng đường giải phóng trong dung dịch giữa enzyme và cơ chất. Một đơn vị hoạt độ được định nghĩa là lượng enzyme xúc tác thủy phân cơ chất tinh bột giải phóng ra lượng đường khử tương đương 1 μ mol glucose trong 1 phút ở 40°C.

Phương pháp xác định hoạt tính protease trong mầm hạt đậu Nho nhe

Dịch đậu Nho nhe nảy mầm (chế biến như phương pháp trên) được xác định hoạt tính protease theo phương pháp của Anson (1938) [7]. 0,5 ml enzyme được hút vào ống nghiệm, để 15 phút ở 40°C, bổ sung 1,0 ml dung dịch casein 1,0%. Hỗn hợp được lắc đều và ủ ở 40°C trong 10 phút, sau đó bổ sung 2,5 ml TCA 5,0%. Hỗn hợp được lắc đều trong khoảng 20 phút cho phản ứng dừng lại hoàn toàn, sau đó được ly tâm 5 phút với tốc độ 10.000 vòng/phút. 0,5 ml dịch trong được hút vào một ống nghiệm khác, bổ sung 2,0 ml dung dịch Na_2CO_3 6,0% lắc đều. Bổ sung 0,5 ml thuốc thử Folin Ciocalteu 0,2 N và lắc đều, sau 30 phút đo ở bước sóng 750 nm dựa vào cường độ màu tạo phức với thuốc nhuộm Folin Ciocalteu.

Phương pháp định lượng protein tan

0,05 g mẫu hạt đậu Nho nhe đã sấy khô tuyệt đối được chiết qua đêm bằng 1,0 ml đệm photphatcitrat (pH 8,0). Ly tâm ở tốc độ 12.000 vòng/phút trong 30 phút ở 4°C (lặp lại 3 lần) thu dịch trong và định mức lên 5 ml. Lấy 0,25 ml dung dịch mẫu bổ sung 2 ml dung dịch C [hỗn hợp dung dịch A và B (tỷ lệ 49:1), trong đó dung dịch A là Na_2CO_3 2% trong NaOH 0,1 N, dung dịch B là CuSO_4 0,5% trong $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ 1%] lắc đều trong 10 phút và bổ sung 0,25 ml dung dịch folin ciocalteu (tỷ lệ 1:1) để 30 phút và đo ở bước sóng 750 nm.

Phương pháp định lượng isoflavone

Hàm lượng isoflavone từ mầm đậu Nho nhe được xác định bằng phương pháp HPLC theo Chen và cs (2010) [8]. Cân 1-2 g mẫu Nho nhe nảy mầm vào ống ly tâm 50 ml, thêm 35 ml dung dịch methanol:HCl 4 N (tỷ lệ 8:2). Thủy phân trong 80°C/1 giờ, để nguội và ly tâm ở tốc độ 6.000 vòng/phút trong 5 phút, gạn lấy phần dịch phía trên. Thêm 10 ml dịch chiết vào phần cặn, lắc đều trong 1 phút rồi đem ly tâm, gộp phần dịch trong cho vào bình định mức 50 ml, định mức bằng methanol. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m, phân tích trên HPLC. Căn cứ vào đường chuẩn tương quan giữa diện tích pic và nồng độ, tính kết quả theo công thức:

$$X = (V \times C_m \times k) / (m \times 10).$$

Trong đó: V là thể tích dịch chiết cuối cùng chạy máy (ml); C_m là nồng độ dung dịch chiết mẫu tính theo đường chuẩn (μ g/ml); k là hệ số pha loãng mẫu; m là khối lượng của mẫu phân tích (g); X là hàm lượng chất phân tích trong mẫu thử (μ g/100 g).

Phương pháp định lượng lipid

Dựa vào tính chất hòa tan của dung môi hữu cơ để chiết lipid, dung môi hữu cơ sử dụng là petroleum ether. Mẫu được sấy khô đến khối lượng không đổi, bóc vỏ, bỏ phôi mầm, nghiền mịn. Cân 0,05 g mẫu cho vào ống eppendorf 2,0 ml. Sau đó, bổ sung 1,5 ml petroleum ether, lắc nhẹ 10 phút để qua đêm ở 4°C, ly tâm 15 phút với tốc độ 12.000 vòng/phút ở 4°C, bỏ dịch. Sấy khô mẫu còn lại trong ống eppendorf ở 70°C đến khối lượng không đổi. Hàm lượng lipid được tính bằng hiệu của khối lượng mẫu trước và sau khi chiết theo công thức:

$$\text{Hàm lượng lipid (\%)} = (A - B) \times 100/A.$$

Trong đó: A là khối lượng mẫu trước khi chiết; B là khối lượng mẫu sau khi chiết.

Kết quả và thảo luận

Xác định sự nảy mầm của hạt đậu Nho nhe

Ở điều kiện nhiệt độ 30°C, hạt của 6 giống đậu Nho nhe nghiên cứu có tỷ lệ nảy mầm và khối lượng khác nhau. Cả 6 giống đều có khối lượng hạt ở giai đoạn trương nước tối đa lớn hơn so với giai đoạn hạt có rễ mầm nhỏ hơn 0,5 cm và nhỏ hơn so với giai đoạn hạt có rễ và thân mầm. Trong đó, giống NN14-ĐB có khối lượng hạt lớn nhất ở cả 3 trạng thái, khối lượng lần lượt đạt 80,2, 78,3 và 85,6 g. Tiếp đến là các giống NN16-TP, NN18-LC, NN17-QN, NN15-ML. Giống NN21-LC có khối lượng hạt thấp nhất ở cả 3 trạng thái, khối lượng lần lượt đạt 41,8, 40,8 và 44,6 g (bảng 1). Như vậy, tỷ lệ hút nước của các giống đậu Nho nhe là khác nhau, nguyên nhân có thể do điều kiện trồng ở các địa phương và khối lượng hạt khô ban đầu là khác nhau.

Mặt khác, giai đoạn hạt ở trạng thái rễ mầm nhỏ hơn 0,5 cm khối lượng nhỏ hơn so với giai đoạn hạt trương nước tối đa có thể do lớp vỏ hạt trong quá trình nảy mầm bị mất, làm giảm khối lượng hạt.

Bảng 1. Đặc điểm nảy mầm của 50 g hạt đậu Nho nhe của 6 giống nghiên cứu ở 30°C

Giống	Trạng thái hạt	Hạt trương nước tối đa		Rễ mầm nhỏ hơn 0,5 cm		Hạt có rễ và thân mầm	
		Thời gian ngâm (h)	Khối lượng (g)	Thời gian ngâm (h)	Khối lượng (g)	Thời gian ngâm (h)	Khối lượng (g)
NN14-ĐB		10	80,2±0,32	10	78,3±1,02	10	85,6±0,26
NN15-ML		10	46,4±0,25	10	45,3±0,32	10	49,5±0,46
NN16-TP		10	59,4±1,20	10	58,0±0,82	10	63,4±0,32
NN17-QN		10	47,9±0,24	10	46,8±0,12	10	51,2±0,42
NN18-LC		10	54,4±0,14	10	53,1±0,34	10	58,1±0,91
NN21-TC		10	41,8±0,26	10	40,8±0,52	10	44,6±0,82

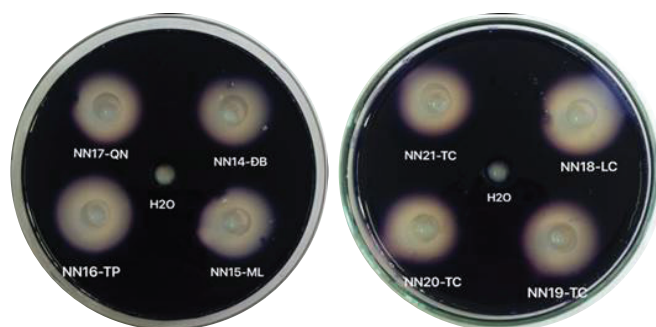
Hoạt tính α -amylase trong hạt đậu Nho nhe nảy mầm

Trong quá trình nảy mầm, ngay sau khi hạt hút đủ nước, các enzyme trong hạt bắt đầu hoạt động. Trong đó, α -amylase là enzyme tham gia thủy phân tinh bột tạo thành đường có vai trò làm tăng áp suất thẩm thấu của tế bào, từ đó làm tăng tính chống chịu của thực vật với các yếu tố cực đoan từ môi trường, giúp cây non phát triển bình thường. Hàm lượng α -amylase trong hạt khô của 6 giống đậu Nho nhe khá thấp, hoạt tính dao động từ 0,06-0,12 U/g. Hoạt tính α -amylase tăng lên ở giai đoạn hạt trương nước tối đa và đạt cực đại ở giai đoạn hạt có rễ mầm nhỏ hơn 0,5 cm; hoạt tính dao động 0,5-1,2 U/g; giống NN14-ĐB có hoạt tính cao nhất đạt 1,2 U/g và giống NN16-TP hoạt tính thấp đạt 0,5 U/g. Ở giai đoạn hạt có rễ và thân mầm, hoạt tính bắt đầu giảm và duy trì 0,4-1,16 U/g (bảng 2). Đặc biệt, hoạt tính α -amylase ở giai đoạn hạt nảy mầm tăng đáng kể so với trạng thái hạt khô.

Bảng 2. Hoạt tính α -amylase của các giống đậu Nho nhe.

Giống	Hoạt tính α -amylase trong hạt đậu Nho nhe ở các giai đoạn (U/g)			
	Hạt khô	Hạt trương nước tối đa	Rễ mầm nhỏ hơn 0,5 cm	Hạt có rễ và thân mầm
NN14-ĐB	0,12±0,02	1,08±0,12	1,20±0,10	1,16±0,05
NN15-ML	0,06±0,01	0,62±0,05	0,69±0,06	0,66±0,11
NN16-TP	0,08±0,02	0,21±0,03	0,50±0,01	0,40±0,01
NN17-QN	0,08±0,01	0,74±0,01	0,90±0,08	0,78±0,09
NN18-LC	0,12±0,04	0,76±0,08	0,88±0,12	0,82±0,12
NN21-TC	0,09±0,01	0,81±0,12	0,98±0,23	0,86±0,03

Hoạt tính α -amylase ở giai đoạn rễ mầm nhỏ hơn 0,5 cm từ 6 giống được định tính trên đĩa thạch có chứa 1,0% tinh bột. Kết quả hình 2 nhận thấy, trên đĩa thạch xuất hiện các vòng phân giải cơ chất màu trắng sau khi nhuộm bằng thuốc nhuộm lugol. Như vậy, các giống đậu Nho nhe trong nghiên cứu khi nảy mầm đều có hoạt tính α -amylase.



Hình 2. Định tính α -amylase trên đĩa thạch của các giống đậu Nho nhe.

Hoạt tính protease trong hạt đậu Nho nhe nảy mầm

Protease là enzyme đóng vai trò quan trọng trong quá trình nảy mầm của hạt, sự phát triển của cây non và có liên quan đến khả năng chịu mất nước của tế bào. Hoạt tính protease từ mầm hạt đậu Nho nhe có mối liên quan với hàm lượng protein trong hạt. Hoạt tính protease từ hạt đậu Nho nhe khô rất thấp, dao động 0,109-0,335 U/g; hoạt tính protease bắt đầu tăng ở giai đoạn hạt trương nước tối đa (hoạt tính dao động 0,310-1,035 U/g), tiếp đến là giai đoạn hạt có rễ mầm nhỏ hơn 0,5 cm (hoạt tính dao động 0,410-1,135 U/g) và hoạt tính protease cao nhất ở giai đoạn hạt có rễ mầm và thân mầm (hoạt tính dao động 0,460-1,235 U/g). Trong đó, giống NN16-TP có hoạt tính protease cao nhất (đạt 1,235 U/g), tiếp đến là giống NN21-TC (đạt 1,212 U/g) và giống NN14-ĐB có hoạt tính thấp nhất (đạt 0,46 U/g) (bảng 3).

Bảng 3. Hoạt tính protease của các giống đậu Nho nhe.

Giống	Hoạt tính protease trong hạt đậu Nho nhe ở các giai đoạn (U/g)			
	Hạt khô	Hạt trương nước tối đa	Rễ mầm nhỏ hơn 0,5 cm	Hạt có rễ và thân mầm
NN14-ĐB	0,110±0,12	0,310±0,04	0,410±0,01	0,460±0,06
NN15-ML	0,243±0,02	0,643±0,01	0,943±0,22	0,983±0,09
NN16-TP	0,335±0,22	1,035±0,22	1,135±0,19	1,235±0,16
NN17-QN	0,109±0,04	0,509±0,03	0,709±0,08	0,769±0,07
NN18-LC	0,229±0,01	0,529±0,02	0,729±0,14	0,829±0,09
NN21-TC	0,312±0,10	1,012±0,08	1,112±0,15	1,212±0,12

Hàm lượng protein trong hạt đậu Nho nhe ở giai đoạn nảy mầm sớm

Nghiên cứu hàm lượng protein tan nhằm xác định giá trị dinh dưỡng của đậu Nho nhe và kiểm tra được sự khác biệt về đặc điểm hóa sinh liên quan tới điều kiện thổ nhưỡng. Kết quả cho thấy, hàm lượng protein tan của 6 mẫu đậu Nho nhe thu tại các tỉnh Điện Biên, Lai Châu, Sơn La có sự khác nhau được thể hiện ở bảng 4. Hàm lượng protein tan tổng số của hạt đậu Nho nhe khô dao động 43,5-51,2%. Trong đó, mẫu hạt đậu Nho nhe NN14-ĐB có hàm lượng protein tổng

số cao nhất (51,2%); tiếp đến là các mẫu NN21-TC, NN15-ML (50,1-50,2%) và mẫu NN17-QN thấp nhất (43,5%). Hàm lượng protein giảm dần khi hạt ở giai đoạn trướng nước tối đa đến khi hạt có rễ mầm nhỏ hơn 0,5 cm và hạt có rễ và thân mầm. Trong đó, giống NN17-QN và NN16-TP hàm lượng protein giảm mạnh nhất (chỉ còn khoảng 32,4-32,7%). Hàm lượng protein giảm dần theo giai đoạn có thể do hoạt tính protease hoạt động mạnh ở các giai đoạn hạt có rễ và thân mầm sẽ thủy phân protein.

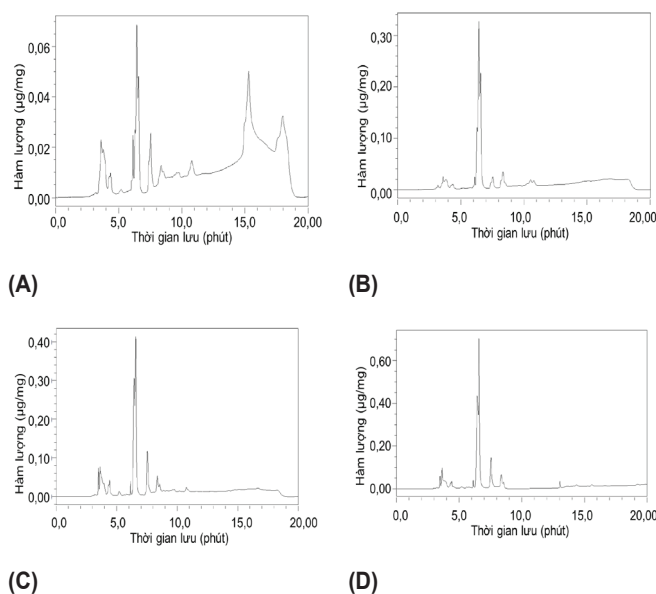
Bảng 4. Hàm lượng protein tan của các giống đậu Nho nhe.

Giống	Hàm lượng protein trong hạt đậu Nho nhe ở các giai đoạn (%)			
	Hạt khô	Hạt trướng nước tối đa	Rễ mầm nhỏ hơn 0,5 cm	Hạt có rễ và thân mầm
NN14-ĐB	51,2±2,4	46,2±1,3	44,6±1,4	40,3±2,0
NN15-ML	50,1±0,4	46,3±1,1	43,4±3,4	39,8±1,7
NN16-TP	48,4±1,4	39,4±2,0	35,2±0,1	32,7±1,8
NN17-QN	43,5±2,1	40,2±1,8	36,4±0,9	32,4±0,2
NN18-LC	44,8±1,2	40,5±0,9	35,8±2,2	33,1±0,6
NN21-TC	50,2±2,5	40,4±1,2	36,7±1,5	32,8±1,3

Hàm lượng isoflavone trong hạt đậu Nho nhe ở giai đoạn hạt nảy mầm

Isoflavone là các polyphenol không màu thuộc lớp flavonoid. Isoflavone gồm daidzein, genistein và glycitein được tổng hợp thông qua con đường phenylpropanoid với sự tham gia của nhiều enzyme, trong đó có hai loại enzyme quan trọng tham gia tổng hợp isoflavone được biết đến là chalcone isomerase và isoflavone synthase. Các chất này chỉ khác nhau về nguyên tử hydro và các nhóm hydroxyl. Genistein khác daidzein ở nhóm hydroxyl liên kết với carbon số 5. Daidzein và genistein là những chất isoflavone phổ biến nhất, có cấu trúc hóa học đặc trưng.

Sử dụng kỹ thuật phân tích HPLC định lượng daidzein và genistein chiết từ hạt đậu Nho nhe nảy mầm 3 ngày tuổi của 4 mẫu thu ở Sơn La, Lai Châu và Điện Biên từ sắc ký đồ ở hình 3 và phương trình đường chuẩn kết quả phân tích HPLC được thể hiện ở bảng 5. Kết quả bảng 5 cho thấy, ở cả 4 mẫu đậu nghiên cứu, hàm lượng daidzein và genistein khá ít, đều dưới 10 µg/g. Như vậy, qua phân tích cho thấy hàm lượng isoflavone trong mầm hạt đậu Nho nhe rất thấp.



Hình 3. Sắc ký đồ phân tích daidzein và genistein từ mầm hạt đậu Nho nhe sau 3 ngày tuổi. (A) NN14-ĐB; (B) NN16-TP; (C) NN18-LC; (D) NN21-TC.

Bảng 5. Hàm lượng isoflavone trong hạt nảy mầm 3 ngày của 4 mẫu giống đậu Nho nhe.

Mẫu	Chất	Daidzein	Genistein	Isoflavone (daidzein + genistein)
NN14-ĐB		<10 µg/g	<10 µg/g	<10 µg/g
NN16-TP		<10 µg/g	<10 µg/g	<10 µg/g
NN18-LC		<10 µg/g	<10 µg/g	<10 µg/g
NN21-TC		<10 µg/g	<10 µg/g	<10 µg/g

Hàm lượng lipid trong hạt đậu Nho nhe ở giai đoạn nảy mầm sớm

Lipid là thành phần có nhiều trong cây đậu tương, đậu nành để sản xuất dầu ăn và hàm lượng lipid phụ thuộc vào loại cây trồng, thời gian và cách bảo quản. Trong nghiên cứu này, 6 mẫu đậu Nho nhe đã được xác định hàm lượng lipid có trong hạt khô. Kết quả bảng 6 cho thấy, hàm lượng lipid có trong hạt của 6 mẫu đậu Nho nhe dao động 0,64-0,95%. Trong đó, hàm lượng lipid cao nhất ở mẫu đậu Nho nhe NN18-LC (đạt 0,95%), tiếp theo là NN14-ĐB (đạt 0,73%) và thấp nhất là mẫu NN15-ML (đạt 0,64%).

Năm 2012, Nguyễn Ngọc Quát và cs đã báo cáo hàm lượng lipid từ 10 giống đậu xanh trồng tại các tỉnh Nghệ An và Hà Tĩnh dao động trong khoảng 0,46-1,26% [9]. Như vậy, hàm lượng lipid từ các mẫu đậu Nho nhe trong nghiên cứu này có giá trị trung bình (dao động trong khoảng 0,64-0,95%) và khác so với lipid từ một số giống đậu xanh đã công bố.

Bảng 6. Hàm lượng lipid của các giống đậu Nho nhe.

TT	Mẫu đậu Nho nhe	Hàm lượng lipid (%)
1	NN14-ĐB	0,73±0,01
2	NN15-ML	0,64±0,11
3	NN16-TP	0,65±0,03
4	NN17-QN	0,66±0,05
5	NN18-LC	0,95±0,12
6	NN21-TC	0,72±0,09

Kết luận

6 giống đậu Nho nhe nghiên cứu có tỷ lệ nảy mầm và khối lượng khác nhau ở các giai đoạn hạt trương nước tối đa, hạt có rễ mầm nhỏ hơn 0,5 cm, hạt có rễ và thân mầm. Hoạt tính α -amilase và protease rất thấp ở giai đoạn hạt khô và tăng lên khi hạt trương nước, hạt có rễ và thân mầm. Hoạt tính α -amilase mạnh nhất khi hạt có rễ mầm nhỏ hơn 0,5 cm đối với giống NN14-ĐB; hoạt tính protease mạnh nhất khi hạt có rễ và thân mầm đối với giống NN16-TP và NN21-TC. Sự gia tăng hoạt tính protease có tác dụng làm giảm hàm lượng protein tổng số ở các giai đoạn tương ứng của 6 giống đậu Nho nhe. Hàm lượng lipid ở giai đoạn nảy mầm sớm dao động 0,64-0,95%. Đặc biệt, hàm lượng isoflavone trong giai đoạn hạt nảy mầm của các giống đậu Nho nhe rất thấp. Kết quả nghiên cứu bước đầu đã cung cấp những thông tin về hàm lượng protein, lipid, isoflavone và enzyme α -amilase, protease của hạt đậu Nho nhe.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Bộ Giáo dục và Đào tạo thông qua đề tài Quỹ gen cấp bộ mã số B2018-TNA-09-GEN. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] R. Katoch (2013), "Nutritional potential of rice bean (*Vigna umbellata*): an underutilized legume", *J. Food Sci.*, **78**(1), pp.8-16.
- [2] Y. Yao, X.Z. Cheng, L.X. Wang, S.H. Wang, G.X. Ren (2011), "Biological potential of sixteen legumes in China", *International Journal of Molecular Sciences*, **12**(10), pp.7048-7058.
- [3] N. Sutivisedsak, N.C. Huai, L.W. Julious, W.C. Lesch, R.R. Tangsrud, B. Atanu (2010), "Microwave-assisted extraction of phenolics from bean (*Phaseolus vulgaris* L.)", *Food Research International*, **43**(2), pp.516-519.
- [4] Daisy Kameng Baruah, Mamoni Das, Rumamoni Bhattacharyya (2018), "Formulation and quality evaluation of ricebean (*Vigna umbellata*) based convenient food multi mixes", *International Journal of Home Science*, **4**(2), pp.216-221.
- [5] S. Jiang, W. Cai, B. Xu (2013), "Food quality improvement of soy milk made from short-time germinated soybeans", *Foods*, **2**(2), pp.198-212.
- [6] G.L. Miller (1959), "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars", *Anal. Chem.*, **1**, pp.426-428.
- [7] M.L. Anson (1938), "The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin", *J. Gen. Physiol.*, **22**, pp.79-89.
- [8] S.L. Chen, H. Yao, J.P. Han, C. Liu, J.Y. Song, L.C. Shi, Y.J. Zhu, X.Y. Ma, T. Gao, X.H. Pang (2010), "Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species", *PLOS ONE*, **5**(1), doi: Artn E8613.
- [9] Nguyễn Ngọc Quát, Nguyễn Văn Thắng, Nguyễn Thị Chinh (2012), "Nghiên cứu phát triển một số giống đậu xanh triển vọng cho tỉnh Nghệ An và Hà Tĩnh", *Báo cáo Hội thảo quốc gia về khoa học cây trồng lần thứ nhất*, tr.455-460.

Khả năng sinh sản và ưu thế lai của vịt bố mẹ (CT12xCT34)

Vũ Đức Cảnh, Phạm Thùy Linh*, Nguyễn Quý Khiêm, Nguyễn Ngọc Dung, Nguyễn Thị Nga, Trần Thị Thu Hằng, Phạm Thị Xuân, Khuất Thị Tuyên, Hoàng Đình Trường, Phùng Duy Độ

Trung tâm Nghiên cứu gia cầm Thụy Phương, Viện Chăn nuôi

Ngày nhận bài 16/12/2019; ngày chuyển phản biện 19/12/2019; ngày nhận phản biện 20/1/2020; ngày chấp nhận đăng 7/2/2020

Tóm tắt:

Nghiên cứu này nhằm đánh giá khả năng sinh trưởng, sinh sản, ưu thế lai của vịt bố mẹ (CT12xCT34) từ 4 dòng vịt chuyên thịt CT1, CT2, CT3, CT4 mới chọn tạo tại Trạm nghiên cứu gia cầm Cẩm Bình thuộc Trung tâm Nghiên cứu gia cầm Thụy Phương, bằng phương pháp lai kinh tế và bố trí phân lô ngẫu nhiên hoàn toàn một nhân tố. Kết quả cho thấy, khối lượng cơ thể ở 24 tuần tuổi của vịt trống CT12 đạt 4288,67 g, vịt mái CT34 đạt 3323,00 g, năng suất trứng/mái/42 tuần đẻ đạt 225,36 quả, ưu thế lai về năng suất trứng là 8,19%, tiêu tốn thức ăn (TTTĂ)/10 trứng là 3,98 kg, ưu thế lai về TTTĂ/10 trứng -5,61%, tỷ lệ phôi đạt 93,91%, ưu thế lai về tỷ lệ phôi là 1,24%, số vịt con loại 1/mái là 155,84 con.

Từ khóa: khả năng sinh sản, ưu thế lai, vịt bố mẹ.

Chỉ số phân loại: 4.2

Đặt vấn đề

Giai đoạn 2010-2015, Trung tâm Nghiên cứu gia cầm Thụy Phương đã nghiên cứu chọn tạo được 4 dòng vịt chuyên thịt CT với các tính trạng về sinh trưởng, sinh sản đạt cao: khối lượng cơ thể ở 5 tuần tuổi dòng CT1 vịt trống đạt 1888,32 g, vịt mái đạt 1725,14 g; dòng CT2 vịt trống đạt 1699,26 g, vịt mái đạt 1576,13 g. Dòng CT3 có năng suất trứng/mái/48 tuần đẻ đạt 228,95 quả, dòng CT4 có năng suất trứng/mái/48 tuần đẻ đạt 239,11 quả [1].

Từ năm 2017 đến 2019, Trung tâm tiếp tục chọn lọc ổn định năng suất 4 dòng vịt chuyên thịt nêu trên. Để đánh giá khả năng sản xuất của vịt bố mẹ từ tổ hợp lai 4 dòng vịt này, chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài “Khả năng sinh sản và ưu thế lai của vịt bố mẹ (CT12xCT34) nhằm đánh giá khả năng sinh trưởng, sinh sản, ưu thế lai của vịt bố mẹ (CT12xCT34).

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng, địa điểm và thời gian nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trên vịt sinh sản (CT1xCT2), (CT3xCT4), (CT12xCT34) tại Trạm nghiên cứu gia cầm Cẩm Bình thuộc Trung tâm Nghiên cứu gia cầm Thụy Phương từ năm 2018 đến 2019.

* Tác giả liên hệ: Email: thuylinh175@gmail.com

Phương pháp nghiên cứu

Sơ đồ tạo vịt bố mẹ (CT12xCT34):

Vịt ông bà	♂ CT1	x	♀ CT2	♂ CT3	x	♀ CT4
		↓			↓	
Vịt bố mẹ		♂ CT12			♀ CT34	

Bố trí thí nghiệm: thí nghiệm được bố trí như mô tả ở bảng 1.

Bảng 1. Sơ đồ bố trí thí nghiệm.

Lô	Lô 1 (CT1xCT2)	Lô 2 (CT3xCT4)	Lô 3 (CT12xCT34)
Số lượng (con)	25 ♂ + 100 ♀	25 ♂ + 100 ♀	25 ♂ + 100 ♀
Số lần lặp lại	3	3	3
Tổng số (con)	75 ♂ + 300 ♀	75 ♂ + 300 ♀	75 ♂ + 300 ♀

Chế độ chăm sóc nuôi dưỡng vịt chuyên thịt sinh sản được thể hiện ở bảng 2 và 3.

Bảng 2. Giá trị dinh dưỡng thức ăn nuôi vịt chuyên thịt sinh sản.

Chỉ tiêu	1-8 tuần tuổi	9-20 tuần tuổi	21-24 tuần tuổi	>24 tuần tuổi
Protein (%)	20	15,5	16,5	18,5
ME (kcal/kg thức ăn)	2850	2700	2750	2750
Lysine (%)	1,30	0,90	1,10	1,20
Methionine (%)	0,50	0,35	0,50	0,55
Canxi (%)	1,00	0,80	2,50	3,75
Phot pho (%)	0,60	0,40	0,50	0,60

Ghi chú: ME là năng lượng trao đổi.

The reproductive ability and heterosis of broodstock ducks (CT12xCT34)

Duc Canh Vu, Thuy Linh Pham*, Quy Khiem Nguyen, Ngoc Dung Nguyen, Thi Nga Nguyen, Thi Thu Hang Tran, Thi Xuan Pham, Thi Tuyen Khuat, Dinh Truong Hoang, Duy Do Phung

Thuy Phuong Poultry Research Center, NIAS

Received 16 December 2019; accepted 7 February 2020

Abstract:

This study aims to evaluate the growth, reproduction, and heterosis advantage of broodstock ducks (CT12xCT34) from four newly selected CT1, CT2, CT3, and CT4 duck lines at Cam Binh Poultry Research Station in Thuy Phuong Poultry Research Center by commercial crossing method and random plots allocation of complete factor. The results exhibited that the body weight at 24 weeks of drake CT12 was 4288.67 g, of duck CT34 was 3323.00 g, egg productivity/duck/42 weeks of calving was 225.36 eggs, heterosis for egg productivity was 8.19%, feed consumption/10 eggs was 3.98 kg, heterosis for feed consumption/10 eggs was -5.61%, embryo rate reached 93.91%, heterosis of embryo rate was 1.24%, and the number of ducklings type 1/duck was 155.84.

Keywords: broodstock duck, heterosis, reproductive ability.

Classification number: 4.2

Bảng 3. Chế độ chăm sóc nuôi dưỡng vịt chuyên thịt sinh sản.

Giai đoạn (tuần tuổi)	Mật độ (con/m ²)	Tỷ lệ trống/mái	Chế độ cho ăn	Ánh sáng (giờ/ngày)
0-2	12	-	Tự do	23-24 giờ, sau giảm dần đến 18 giờ/ngày
3-4		-	Định lượng	
5-8	8	-	Định lượng	Ánh sáng tự nhiên
9-23	7	-	Định lượng	Ánh sáng tự nhiên, từ tuần 23 tăng dần 16 giờ/ngày
>23	3,1	1/3,5	Theo tỷ lệ đẻ	16-17 giờ/ngày

Đàn vịt được cho ăn tự do 2 tuần đầu, sau đó được cho ăn theo định lượng, cân mẫu kiểm tra khối lượng 2 tuần 1 lần (trống 60 con/lô, mái 90 con/lô).

Chăm sóc nuôi dưỡng, thú y phòng bệnh theo quy trình nuôi vịt của Trung tâm Nghiên cứu gia cầm Thụy Phương [2] và có tham khảo khuyến cáo của Hãng nuôi vịt Super M3, SM3 Super Heavy [3, 4].

Các chỉ tiêu theo dõi

Tỷ lệ nuôi sống, khối lượng cơ thể, TTTA/con/giai đoạn, tuổi thành thực sinh dục, tỷ lệ đẻ, năng suất trứng, TTTA/10 trứng, tỷ lệ phôi, kết quả ấp nở.

Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu được thu thập hàng ngày, ghi chép và xử lý theo phương pháp thống kê sinh vật học trên phần mềm Excell và Minitab 16.

Kết quả và thảo luận

Tỷ lệ nuôi sống

Tỷ lệ nuôi sống của vịt chuyên thịt CT bố mẹ được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Tỷ lệ nuôi sống của vịt CT bố mẹ qua các giai đoạn (ĐVT: %).

Giai đoạn (tuần tuổi)	Lô 1	Lô 2	Lô 3
1-8	97,87	98,13	98,40
9-24	98,64	99,18	98,64
1-24	96,53	97,33	97,07

Kết quả bảng 4 cho thấy, tỷ lệ nuôi sống ở giai đoạn 1-24 tuần tuổi cao nhất là lô 2 (97,33%), thấp nhất là lô 1 (96,53%). Kết quả tỷ lệ nuôi sống của vịt bố mẹ (CT12xCT34) giai đoạn 1-24 tuần tuổi tương đương với kết quả của Phùng Đức Tiến và cs (2010) [5] nghiên cứu trên vịt SD bố mẹ có tỷ lệ nuôi sống 1-24 tuần tuổi đạt 96,81-97,68%. Cũng theo Phùng Đức Tiến và cs (2012) [6], trên dòng vịt SH bố mẹ có tỷ lệ nuôi sống 1-24 tuần tuổi đạt 96,12-97,50%. Còn Nguyễn Đức Trọng và cs (2010) [7] khi nghiên cứu trên vịt CV Super M3 Super Heavy (SM3SH) cho biết tỷ lệ nuôi sống 1-26 tuần tuổi là 95,73-97,20%.

Khối lượng cơ thể

Khối lượng cơ thể của vịt trống CT bố mẹ được thể hiện ở bảng 5.

Bảng 5. Khối lượng cơ thể vịt trống CT qua các tuần tuổi (n=60).

Tuần tuổi	Lô 1		Lô 2		Lô 3	
	$\bar{X}$ (g)	CV (%)	$\bar{X}$ (g)	CV (%)	$\bar{X}$ (g)	CV (%)
4	1117,67	9,05	1035,17	8,17	950,17	9,48
8	2580,00 ^a	8,73	2408,83 ^b	8,96	2563,20 ^a	9,63
12	3014,50	9,67	2561,00	9,88	2995,00	9,05
16	3479,00	9,51	3034,50	9,60	3403,00	9,72
20	3965,50	8,48	3412,50	8,99	3898,50	8,83
24	4325,83 ^a	7,77	3822,33 ^b	8,03	4288,67 ^a	8,03

Ghi chú: theo hàng ngang các số mang các chữ cái khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$.

Kết quả bảng 5 cho thấy, khối lượng cơ thể vịt trống ở 24 tuần tuổi cao nhất ở lô 1 và 3, đạt lần lượt 4325,83 và 4288,67 g (2 lô này có khối lượng tương đương nhau), lô 2 đạt 3822,33 g. Sự sai khác giữa các lô có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Hệ số biến dị thấp (7,77-9,88%), đàn vịt sinh trưởng phát triển tốt và tương đối đồng đều. So sánh với kết quả nghiên cứu của Dương Xuân Tuyền và cs (2015) [8], khối lượng đến 24 tuần tuổi của vịt trống ở lô 3 trong nghiên cứu này cao hơn khối lượng vịt trống ở 24 tuần tuổi của vịt bố mẹ V2212 nuôi tại Trung tâm VIGOVA (3921,33 g). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương đương với nghiên cứu của Phùng Đức Tiến và cs (2012) [6] trên đàn vịt SH bố mẹ (vịt trống đạt 4308,71-4394,88 g), đồng thời tương đương với kết quả nghiên cứu trên đàn vịt bố mẹ SD (khối lượng cơ thể 24 tuần tuổi vịt trống đạt 4226 g) [5].

Khối lượng cơ thể của vịt mái CT bố mẹ được thể hiện ở bảng 6.

Bảng 6. Khối lượng cơ thể vịt mái CT qua các tuần tuổi (n=90).

Tuần tuổi	Lô 1		Lô 2		Lô 3	
	$\bar{X}$ (g)	CV (%)	$\bar{X}$ (g)	CV (%)	$\bar{X}$ (g)	CV (%)
4	1055,67	9,85	967,83	9,97	891,00	9,01
8	2221,00 ^a	9,53	2108,33 ^b	9,94	2164,27 ^{ab}	9,06
12	2505,00	8,75	2359,00	9,25	2414,67	9,32
16	2947,00	9,18	2554,67	9,16	2721,00	8,46
20	3386,17	9,78	2891,00	9,40	3043,17	8,57
24	3876,00 ^a	8,54	3160,50 ^c	8,60	3323,00 ^b	9,22

Ghi chú: theo hàng ngang các số mang các chữ cái khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$.

Kết quả bảng 6 cho thấy, khối lượng cơ thể vịt mái ở 24 tuần tuổi cao nhất ở lô 1 (3876,00 g), lô 2 thấp nhất (3160,50 g). Sự sai khác giữa các lô có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Hệ số biến dị thấp (8,46-9,97%), đàn vịt sinh trưởng phát triển tốt và tương đối đồng đều. Kết quả này cao hơn kết quả nghiên cứu của Phùng Đức Tiến và cs (2010) [5] trên đàn vịt bố mẹ SD (3008,7 g), tương đương với nghiên cứu của Dương Xuân Tuyền và cs (2015) [8] trên vịt mái bố mẹ V1727 (3304,67 g).

Tuổi thành thực sinh dục

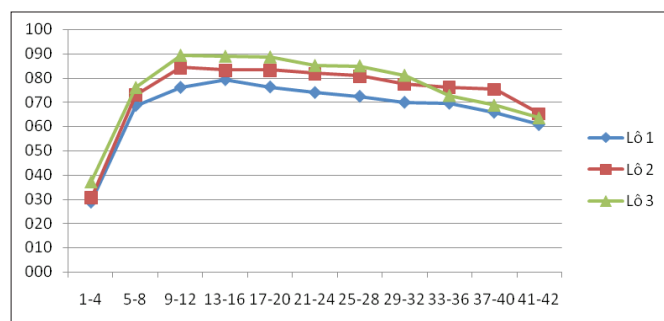
Bảng 7. Tuổi đẻ, khối lượng cơ thể, khối lượng trứng của vịt chuyên thịt CT bố mẹ.

Chỉ tiêu	Số lượng	Lô 1		Lô 2		Lô 3	
		$\bar{X}$	CV (%)	$\bar{X}$	CV (%)	$\bar{X}$	CV (%)
Tuổi đẻ 5% (ngày)		172		176		174	
Khối lượng trứng (g)	90	76,14	4,15	74,62	5,32	74,98	4,37
Khối lượng vịt (g)	90	3885,13	8,43	3171,21	7,91	3341,35	8,41
38 tuần tuổi							
Khối lượng trứng (g)	180	88,12	3,84	84,06	3,99	85,00	3,99
Khối lượng vịt (g)	90	4025,54	6,15	3302,37	7,71	3556,38	7,65

Kết quả bảng 7 cho thấy, tuổi đẻ 5% vịt bố mẹ là 172-176 ngày. Tương đương với tuổi đẻ 5% vịt bố mẹ SD (166 ngày) và vịt bố mẹ SH (168-172 ngày) [5, 6]. Khối lượng trứng 38 tuần tuổi đạt 84,06-88,12 g.

Khả năng sinh sản

Kết quả nghiên cứu cho thấy, cả 3 lô đều có tỷ lệ đẻ tăng dần lên từ tuần đẻ 1 đến tuần đẻ 14, sau đó giảm xuống đến 42 tuần tuổi, tỷ lệ đẻ của lô 3 đạt cao nhất, thấp nhất là lô 1 (hình 1). Năng suất trứng/mái/42 tuần đẻ cao nhất ở lô 3 đạt 225,36 quả, lô 1 thấp nhất là 198,86 quả. Ưu thế lại về năng suất trứng/mái/42 tuần đẻ của lô 3 là 8,19% (bảng 8). Theo Dương Xuân Tuyền và cs (2015) [8], vịt bố mẹ (V2212xV1727) có năng suất trứng/mái/42 tuần đẻ đạt 209,96 quả, còn theo Nguyễn Đức Trọng và cs (2009) [9], vịt Star 76 bố mẹ có năng suất trứng/48 tuần đẻ đạt 205,9 quả. Kết quả nghiên cứu này cho thấy, năng suất trứng của vịt bố mẹ (CT12xCT34) cao hơn kết quả nghiên cứu của các tác giả nêu trên.



Hình 1. Tỷ lệ đẻ của vịt CT bố mẹ qua các tuần đẻ.

Bảng 8. Tỷ lệ đẻ, năng suất trứng, TTTA/10 trứng (n=3).

Chỉ tiêu	Đơn vị tính	Lô 1	Lô 2	Lô 3
Tỷ lệ đẻ	%	67,64 ^c	73,96 ^b	76,65 ^a
Năng suất trứng	quả	198,86 ^c	217,44 ^b	225,36 ^a
TTTA/10 trứng	kg	4,50 ^a	3,93 ^b	3,98 ^b
Ưu thế lai về năng suất trứng	%			8,19
Ưu thế lai về TTTA/10 trứng	%			-5,61

Ghi chú: theo hàng ngang các số mang các chữ cái khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$.

Theo Nguyễn Văn Duy (2013) [10], ưu thế lai về năng suất trứng/mái/42 tuần đẻ của vịt MT12 so với trung bình năng suất trứng của vịt MT1 và MT2 là 8,25% thì ưu thế lai về năng suất trứng/mái/42 tuần đẻ là tương đương. TTTA/10 trứng ở 3 lô khác nhau, trong đó lô 1 cao nhất (4,50 kg), lô 2 và lô 3 đạt tương đương nhau lần lượt là 3,93 và 3,98 kg. Ưu thế lai về TTTA/10 trứng của vịt lô 3 là -5,61%. Kết quả này tương đương với kết quả nghiên cứu Nguyễn Văn Duy (2013) [10] trên vịt MT12 (3,93 kg).

Tỷ lệ phối, kết quả ấp nở

Bảng 9. Tỷ lệ phối, kết quả ấp nở của vịt chuyên thịt CT bố mẹ.

Chỉ tiêu	Đơn vị tính	Lô 1	Lô 2	Lô 3
		$\bar{X} \pm SE$	$\bar{X} \pm SE$	$\bar{X} \pm SE$
Tổng trứng ấp	Quả	14544	16145	17208
Tỷ lệ phối	%	91,67 $\pm$ 0,38	93,85 $\pm$ 0,42	93,91 $\pm$ 0,39
Ưu thế lai về tỷ lệ phối	%			1,24
Tỷ lệ nở/tổng trứng có phối	%	81,46 $\pm$ 0,30	83,74 $\pm$ 0,33	83,38 $\pm$ 0,37
Vịt con loại 1/mái	Con	125,61 $\pm$ 0,82	146,76 $\pm$ 0,97	155,84 $\pm$ 1,01

Kết quả bảng 9 cho thấy, lô 1 có tỷ lệ phối thấp nhất (91,67%), cao nhất ở lô 3 (93,91%). Ưu thế lai về tỷ lệ phối của vịt bố mẹ là 1,24%. Tỷ lệ phối của vịt bố mẹ cao hơn tỷ lệ phối của vịt T15 (87,85%), T51 (87,82%), T46 (92,44%), T64 (90,88%) theo Hoàng Thị Lan và cs (2009) [11], tương đương với kết quả nghiên cứu của Phùng Đức Tiến và cs (2012) [6] trên vịt SH bố mẹ (92,47-93,22%).

Kết luận

Vịt bố mẹ (CT12xCT34) có tỷ lệ nuôi sống giai đoạn 1-24 tuần tuổi đạt 97,07%. Khối lượng cơ thể ở 24 tuần tuổi: vịt trống 4288,67 g, vịt mái 3323,00 g. Năng suất trứng/mái/42 tuần đẻ đạt 225,36 quả (ưu thế lai là 8,19%). TTTA/10 trứng là 3,98 kg (ưu thế lai là -5,61%). Tỷ lệ phối đạt 93,91% (ưu thế lai là 1,24%).

Vịt bố mẹ (CT12xCT34) có năng suất cao hơn một số giống vịt hiện có như SD, SH, Super M; phù hợp với chăn nuôi công nghiệp, bán công nghiệp và các vùng miền trong cả nước, đáp ứng thị hiếu và nhu cầu phát triển sản xuất của người chăn nuôi, góp phần thúc đẩy ngành chăn nuôi phát triển bền vững.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Ngọc Dung, Phùng Đức Tiến, Nguyễn Quý Khiêm, Lê Thị Nga, Nguyễn Thị Nga, Vũ Đức Cảnh, Phạm Thị Xuân, Khuất Thị Tuyên, Trần Thị Thu Hằng, Nguyễn Thị Quê, Phạm Thị Thu Phương, Nguyễn Thị Luyến, Lưu Thị Thủy và Phạm Thùy Linh (2018), *Chọn tạo 4 dòng vịt chuyên thịt năng suất chất lượng cao*, Kỷ yếu Hội nghị khoa học và công nghệ chuyên ngành chăn nuôi, thú y giai đoạn 2013-2018, tr.67-76.
- [2] Phùng Đức Tiến (2007), *Chăn nuôi gia cầm trang trại*, Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- [3] Cherry Vallay Farm Ltd. (2015), *Grandparent Management Manual Super M3*.
- [4] Cherry Vallay Farm Ltd. (2015), *Grandparent Management Manual SM3 Super Heavy*.
- [5] Phùng Đức Tiến, Nguyễn Ngọc Dung, Lê Thị Nga, Vũ Đức Cảnh, Nguyễn Thị Hương, Phạm Thị Xuân, Lê Thị Cẩm, Trần Thị Thu Hằng (2010), *Chọn tạo hai dòng vịt SD*, Báo cáo khoa học Viện Chăn nuôi, Phần di truyền giống vật nuôi, tr.412-423.
- [6] Phùng Đức Tiến, Nguyễn Ngọc Dung, Lê Thị Nga, Vũ Đức Cảnh, Phạm Thị Xuân, Lê Thị Cẩm, Trần Thị Thu Hằng, Nguyễn Thị Hương, Phạm Thị Thư, Lưu Thị Thủy (2012), *Kết quả chọn tạo hai dòng vịt SH*, Báo cáo khoa học và công nghệ Trung tâm Nghiên cứu gia cầm Thụy Phương, Phần di truyền chọn giống, tr.104-115.
- [7] Nguyễn Đức Trọng, Nguyễn Văn Duy, Doãn Văn Xuân, Đặng Thị Vui, Nguyễn Thị Thúy Nghia, Đồng Thị Quyên (2010), *Khả năng sản xuất của vịt CV Super M3 Super Heavy (SM3SH)*, Báo cáo khoa học Viện Chăn nuôi, Phần di truyền giống vật nuôi, tr.147-155.
- [8] Dương Xuân Tuyền, Lê Thanh Hải và Hồ Văn Thế (2015), *Kết quả chọn tạo hai dòng vịt cao sản hướng thịt (dòng trống V22 và dòng mái V27) cho sản xuất tại các tỉnh phía Nam*, Báo cáo khoa học năm 2013-2015 Viện Chăn nuôi, Phần di truyền giống vật nuôi, tr.277-294.
- [9] Nguyễn Đức Trọng, Phạm Văn Chung, Lương Thị Bột, Hoàng Văn Tiệu, Nguyễn Thuý Nghia, Đồng Thị Quyên (2009), *Khả năng sản xuất của vịt Star 76 nuôi tại Trung tâm Nghiên cứu vịt Đại Xuyên*, Báo cáo khoa học Viện Chăn nuôi, Phần di truyền giống vật nuôi, tr.123-132.
- [10] Nguyễn Văn Duy (2013), *Chọn lọc nâng cao năng suất vịt MT1 và MT2, tạo vịt MT12 làm mái nền lai với ngan RT11*, Luận án tiến sĩ nông nghiệp, Viện Chăn nuôi.
- [11] Hoàng Thị Lan, Nguyễn Văn Duy, Nguyễn Đức Trọng, Hoàng Văn Tiệu, Lê Sỹ Cương, Nguyễn Thị Thúy Nghia (2009), “Khả năng sản xuất của các tổ hợp vịt lai T15, T51, T46 và T64”, *Tạp chí Khoa học Công nghệ Chăn nuôi*, 17, tr.8-15.

Hiệu quả ức chế virus gây bệnh Gumboro của interferon trên gà thực nghiệm

Nguyễn Thị Thanh Giang^{1*}, Nguyễn Đăng Quân¹, Hồ Quảng Đô²

¹Trung tâm Công nghệ sinh học TP Hồ Chí Minh

²Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

Ngày nhận bài 10/2/2020; ngày chuyển phản biện 20/2/2020; ngày nhận phản biện 3/4/2020; ngày chấp nhận đăng 15/4/2020

Tóm tắt:

Nghiên cứu hiệu quả điều trị bệnh Gumboro của interferon gà tái tổ hợp (recombinant chicken interferon, rChIFN) khi sử dụng chỉ mỗi interferon alpha gà (ChIFN- α) hay có sự kết hợp với interferon gamma (ChIFN- γ) được thực hiện trên gà 3 tuần tuổi. Đầu tiên gà được công cường độc với virus Gumboro độc lực cao (1×10^5 ELD₅₀ mỗi con) bằng cách nhốt mắt, nhốt mũi; sau 8 giờ xử lý với virus, gà được điều trị bằng cách nhốt mắt và nhốt mũi với rChIFN ứng với 1 trong 6 nhóm nghiệm thức. Nhóm sử dụng rChIFN- α 100 μ g/con, tỷ lệ gà được bảo hộ là 56,67%, tỷ lệ sống là 93,33%; nhóm sử dụng rChIFN- α 100 μ g/con kết hợp rChIFN- γ (1 μ g/con) tỷ lệ gà được bảo hộ là 70,00%, tỷ lệ sống là 93,33%; nhóm sử dụng rChIFN- α 10 μ g/con tỷ lệ gà được bảo hộ là 36,67%, tỷ lệ sống là 80,00%; nhóm sử dụng rChIFN- α 10 μ g/con kết hợp rChIFN- γ (1 μ g/con) tỷ lệ gà được bảo hộ là 53,33%, tỷ lệ sống là 86,67%. Trong khi đó, nhóm đối chứng dương (gà nhiễm virus, không được điều trị), gà không được bảo hộ (tỷ lệ nhiễm bệnh là 100%) và tỷ lệ sống chỉ đạt 60,00%; đối chứng âm (gà không nhiễm virus, không xử lý với rChIFN) gà hoàn toàn không nhiễm bệnh và tỷ lệ sống 100%. Kết quả này cho thấy, sử dụng rChIFN- α làm tăng tỷ lệ bảo hộ, tỷ lệ sống khi gà bị nhiễm bệnh Gumboro theo nồng độ sử dụng. Đồng thời sử dụng rChIFN- α kết hợp rChIFN- γ đã làm tăng hiệu quả điều trị so với sử dụng chỉ mỗi rChIFN- α .

Từ khóa: gà, Gumboro, protein tái tổ hợp, rChIFN- α , rChIFN- γ .

Chỉ số phân loại: 4.3

Đặt vấn đề

Gumboro là bệnh truyền nhiễm cấp tính nguy hiểm, chủ yếu xảy ra ở gà và gà tây. Bệnh có đặc điểm là gây viêm túi Fabricius, xuất huyết cơ ngực, cơ đùi, làm hoại tử thận, đặc biệt là làm suy giảm hệ thống miễn dịch hoặc mất khả năng đáp ứng miễn dịch đối với vaccine phòng các bệnh khác và dễ bị cảm nhiễm các bệnh truyền nhiễm khác. Bệnh thường xảy ra khi gà ở giai đoạn 3-6 tuần tuổi. Bệnh gây tổn thất kinh tế rất lớn do tỷ lệ nhiễm bệnh có thể lên đến 100% và tỷ lệ chết có thể từ 20 đến 50% [1]. Bệnh do Birnavirus tác động vào túi Fabricius gây suy giảm miễn dịch, do đó không thể sử dụng kháng sinh để điều trị và rất khó để khu trú ổ dịch khi có dịch bệnh xảy ra. Ngày nay, với sự phát triển mạnh mẽ của lĩnh vực protein tái tổ hợp, các protein đã được tạo ra dễ dàng, số lượng lớn, giá thành rẻ và được ứng dụng phổ biến để hỗ trợ trong chăn nuôi. Trong số này, interferon được đặc biệt chú ý vì nó có thể ức chế sự tăng sinh của virus, ức chế sự phát triển của các tế bào khối u, do vậy interferon được sử dụng như một chất điều trị không đặc hiệu cho mọi nhiễm trùng do virus. Ở gà, rChIFN- α đã được chứng minh có hiệu quả ức chế sự nhân lên của virus trong các điều kiện *in vitro* và *in vivo* [2-8]. Ngoài

ra, với sự phát triển mạnh mẽ của các nghiên cứu protein tái tổ hợp, việc biểu hiện các protein có hoạt tính sinh học, số lượng lớn và giá thành rẻ đã được thực hiện dễ dàng. Hệ thống biểu hiện protein tái tổ hợp phổ biến hiện nay là *Pichia pastoris* vì nó có nhiều ưu điểm, đặc biệt là nó cung cấp môi trường thích hợp để protein tái tổ hợp tiết ra ngoài môi trường, gấp cuộn và thực hiện các biến đổi sau dịch mã. Hơn nữa, thành phần môi trường nuôi cấy *Pichia pastoris* lại đơn giản, chi phí lên men thấp, các phương pháp sử dụng, chủng, vector biểu hiện đều đã được thương mại hóa, rất phù hợp cho sản xuất lớn. Trung tâm Công nghệ sinh học TP Hồ Chí Minh đã nghiên cứu biểu hiện thành công rChIFN- α từ nấm men *Pichia pastoris* và chứng minh protein này có hoạt tính kháng virus gây bệnh Gumboro ở điều kiện *in vitro* [9]. Chính vì thế, trong nghiên cứu này chúng tôi thực hiện đánh giá hiệu quả điều trị của protein tái tổ hợp ở điều kiện *in vivo* trong thời gian 2018-2019.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Đối tượng thí nghiệm: gà giống Tam Hoàng 1 ngày tuổi từ trại gà giống ở Vĩnh Long, được nuôi tại trại thực nghiệm,

*Tác giả liên hệ: Email: ntgiang84@yahoo.com.vn

Efficiency of inhibiting infectious bursal disease virus in vivo

Thi Thanh Giang Nguyen^{1*}, Dang Quan Nguyen¹,
Quang Do Ho²

¹Biotechnology Center of Ho Chi Minh city

²College of Agriculture, Can Tho University

Received 10 February 2020; accepted 15 April 2020

Abstract:

A study on the efficiency of recombinant chicken interferon (rChIFN) in the treatment of Gumboro disease by using only chicken interferon alpha (ChIFN- α) or combining with interferon gamma (ChIFN- γ) was carried out in 3-week-old chickens. The experiment was performed as the following procedure: firstly, chickens were exposed to eye/nasal drops with virulent Gumboro disease virus with a dose of 1×10^5 ELD₅₀ per chick. After 8 hours of challenges virus, chickens were exposed to eye/nasal drops with rChIFN- α for one of the six experimental groups. The chickens were used rChIFN- α 100 μ g/chick having the protection and the survival rate in respectively 56.67% and 93.33%. The chickens were used rChIFN- α 10 μ g/chick combining with rChIFN- γ (1 μ g/chick) having the protection and the survival rate in respectively 70.00% and 93.33%. The chickens were used rChIFN- α 10 μ g/chick having the protection and the survival rate in respectively 36.67% and 80.00%. The chickens were used rChIFN- α 10 μ g/chick combining with rChIFN- γ (1 μ g/chick) having the protection and the survival rate in respectively 53.33% and 86.67%. Meanwhile, the positive control group (chickens were infected, untreated), chickens were not protected (100% infection rate) and survival rate was only 60.00%; negative control group (non-viral chickens, not treated with rChIFN), whole chickens were not infected and 100% survival rate. The results suggested that using rChIFN- α increased the protection and survival rate of Gumboro infected chickens depending on rChIFN concentration. Concurrently, using rChIFN- α combined with rChIFN- γ had increased the treatment efficiency compared to using only rChIFN- α .

Keywords: chicken, Gumboro, rChIFN- α , rChIFN- γ , recombinant protein.

Classification number: 4.3

Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ. Gà được kiểm tra kháng thể thụ động kháng virus Gumboro khi đạt 3 tuần tuổi tại Phòng thí nghiệm virus học, Bộ môn Thú y, Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ. Tất cả gà cho kết quả âm tính với phản ứng kết tủa khuếch tán trên thạch (AGP-Agarose Gel Precipitation) sẽ được sử dụng làm thí nghiệm. Tổng số gà thí nghiệm là 225 con (45 con sử dụng khảo sát khả năng gây độc của rChIFN- α , rChIFN- γ và 180 con thực hiện trong thí nghiệm khảo sát điều trị của hiệu quả rChIFN).

Vật liệu thí nghiệm: virus Gumboro có độc lực cao (NAVETCO); rChIFN- α ; rChIFN- γ (Trung tâm Công nghệ sinh học TP Hồ Chí Minh); kháng nguyên và kháng thể chuẩn kháng virus Gumboro (Australian animal health laboratory, CSIRO, Australia); agarose và các sinh phẩm cần thiết dùng trong phản ứng AGP; bộ kit FlockCheck IBD-XR (IDEXX Laboratories, USA); vaccine Gumboro, vaccine đậu gà, vaccine cúm gia cầm, vaccine Newcastle, vaccine tụ huyết trùng gia cầm (NAVETCO); trứng gà có phôi 9-11 ngày tuổi (dùng thí nghiệm tính liều gây chết 50% phôi - ELD₅₀: embryo lethal dose 50%).

Phương pháp thí nghiệm

Chuẩn bị gà làm thí nghiệm: gà 1 ngày tuổi được mua từ trại về, nuôi ổn định và chăm sóc đến khi gà đạt 3 tuần tuổi mới đưa vào thí nghiệm. Trong quá trình nuôi, gà được phòng các bệnh truyền nhiễm khác trừ bệnh Gumboro bằng vaccine hoặc kháng sinh theo quy trình (bảng 1). Gà được lấy máu ở tĩnh mạch cánh để kiểm tra kháng thể thụ động kháng virus Gumboro ở 7, 14 và 21 ngày tuổi bằng phản ứng AGP. Lúc gà đạt 21 ngày tuổi, tất cả gà thí nghiệm đều không còn kháng thể kháng virus Gumboro và được đưa vào sử dụng.

Bảng 1. Quy trình phòng bệnh cho gà thí nghiệm.

Ngày tuổi	Tên vaccine	Cách tiêm ngừa
3	Newcastle	Nhỏ mắt mũi
10	Đậu	Chung qua cánh
15	Cúm	Tiêm dưới da cổ
21	Newcastle	Nhỏ mắt mũi
30	Cúm	Tiêm dưới da cổ
40	Tụ huyết trùng	Tiêm dưới da cổ

Chuẩn độ xác định liều gây chết 50% phôi gà (ELD₅₀ - Embryo lethal dose 50%) ELD₅₀ (ml) của virus Gumboro: phôi gà 10 ngày tuổi (trứng gà có trống được thu từ gà mẹ không có kháng thể kháng Gumboro) được chia ngẫu nhiên thành 8 nhóm, mỗi nhóm 5 phôi. Dịch virus Gumboro được pha thành những nồng độ theo lg từ 10^{-1} đến 10^{-8} , được tiêm vào màng nhũn của phôi, mỗi phôi được tiêm 0,2 ml dịch virus ở các nồng độ khác nhau. Sau khi tiêm virus vào màng nhũn của phôi, dùng parafilm hàn chỗ tiêm và

buồng hơi thật, tiếp tục ấp trứng ở 37°C. Soi trứng hàng ngày để phát hiện phôi chết. Sau 5 ngày tiêm virus, mổ toàn bộ phôi để tính liều gây chết trên phôi [10]. Cách tính liều ELD₅₀ (50% embryo lethal dose - liều gây chết 50% phôi thử nghiệm) dựa vào phương pháp của Reed và Muench [11].

Xác định liều an toàn của rChIFN trên gà 3 tuần tuổi: thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên trên gà 3 tuần tuổi, sạch bệnh, không có kháng thể kháng Gumboro. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, tổng gà thí nghiệm là 45 con, chia làm 3 nhóm. Nhóm xử lý rChIFN-α hoặc rChIFN-γ, gà được nhỏ mắt/mũi với 0,2 ml dịch rChIFN hàm lượng 100 µg/gà. Nhóm đối chứng, gà nhỏ mắt/mũi 0,2 ml nước muối sinh lý 9%. Sau khi được xử lý rChIFN, gà được theo dõi 72 giờ, ghi nhận các biểu hiện và tỷ lệ sống của gà thí nghiệm.

Xác định hiệu quả của rChIFN trong điều trị bệnh Gumboro: thí nghiệm được lặp lại 3 lần, tổng gà mỗi nhóm là 30 con. Gà 3 tuần tuổi, không có kháng thể kháng Gumboro, được chia làm 6 nhóm ngẫu nhiên (bảng 2). Các nhóm gồm: 4 nhóm điều trị sử dụng rChIFN-α với các nồng độ 10 µg/con hoặc 100 µg/con có hoặc không có kết hợp với rChIFN-γ (1 µg/con); nhóm đối chứng nhiễm virus, không được điều trị (ĐC (+)); nhóm đối chứng gà khỏe mạnh, không nhiễm virus, không sử dụng rChIFN (ĐC (-)). Mỗi gà được lây nhiễm với virus Gumboro liều 1×10⁵ ELD₅₀ bằng cách nhỏ mắt/mũi; sau 8 giờ nhiễm virus, mỗi gà được điều trị bằng 1 liều rChIFN với nồng độ khác nhau phụ thuộc vào nhóm thí nghiệm. Theo dõi và ghi nhận tỷ lệ gà bệnh, gà chết. Gà chết sẽ được mổ khám để ghi nhận triệu chứng. Sau 3 tuần kể từ ngày gây nhiễm virus, sẽ thu huyết thanh gà để kiểm tra kháng thể kháng Gumboro.

Bảng 2. Bố trí thử nghiệm xác định hiệu quả của rChIFN trong điều trị bệnh Gumboro.

Nhóm	Số lượng gà	Virus	Đường cấp
rChIFN-α 10 µg/con	30	+	Mắt/mũi
rChIFN-α/ γ (10-1 µg/con)	30	+	Mắt/mũi
rChIFN-α 100 µg/con	30	+	Mắt/mũi
rChIFN-α/ γ (100-1 µg/con)	30	+	Mắt/mũi
Đối chứng virus (ĐC (+))	30	+	Mắt/mũi
Đối chứng không tác động (ĐC (-))	30	-	Mắt/mũi

Chỉ tiêu theo dõi:

Tỷ lệ gà được bảo hộ (%) = [(Số gà thí nghiệm - Số gà bệnh)/Số gà thí nghiệm] x 100

Tỷ lệ gà chết (%) = (Số gà chết/Số gà thí nghiệm) x 100

Tỷ lệ gà sống (%) = 100 - tỷ lệ gà chết

Hiệu giá kháng thể (HGKT) kháng Gumboro: log₁₀ hiệu giá = 1,09(log₁₀^{S/P}) + 3,36 (theo hướng dẫn của bộ kit phát hiện

kháng thể kháng Gumboro, kit FlockCheck IBD-XR). Trong đó, S/P là tỷ lệ dương tính của mẫu. Chỉ số S/P ≤ 0,2 tương ứng với kết quả âm tính (mẫu huyết thanh âm không chứa kháng thể kháng Gumboro); chỉ số S/P > 0,2 tương ứng với kết quả dương tính (gà đã được tiêm ngừa hoặc đã tiếp xúc với virus Gumboro). HGKT ≥ 396: mẫu huyết thanh dương tính với kháng thể kháng virus Gumboro.

Kết quả và thảo luận

Chuẩn độ xác định chỉ số ELD₅₀/0,1 ml của virus gây bệnh Gumboro trên phôi

Sau 3-5 ngày tiêm 0,2 ml dịch virus Gumboro (IBDV) cho mỗi phôi gà, số phôi gà chết được tổng hợp trong bảng 3. Kết quả khảo sát những phôi chết có bệnh tích đặc trưng do virus Gumboro như: xuất huyết da chân, da đầu, đặc biệt ở vùng đại não, có những điểm hoại tử ở thận, xuất huyết ở gan và màng nhện. Những biểu hiện này cũng giống như miêu tả của Hồ Thị Việt Thu và Nguyễn Đức Hiền (2012) [12] về phôi gà chết do virus Gumboro, phôi chết sẽ có các biểu hiện như sung huyết và xuất huyết điểm ở da, bụng căng phồng ứ nước, xuất huyết ở vùng đầu, có những điểm hoại tử nhỏ và xuất huyết ở gan, sung huyết ở phổi, lách nhạt màu.

Bảng 3. Tỷ lệ phôi gà chết ở các nồng độ.

Độ pha loãng virus	Số thật		Số tổng hợp		Tỷ lệ	
	Sống (phôi)	Chết (phôi)	Sống (phôi)	Chết (phôi)	Số chết (phôi)	Tỷ lệ chết (%)
10 ¹	0	5	0	24	24/24	100,00
10 ²	0	5	0	19	19/19	100,00
10 ³	0	5	0	14	14/14	100,00
10 ⁴	1	4	1	9	9/10	90,00
10 ⁵	2	3	3	5	5/8	62,50
10 ⁶	3	2	6	2	2/8	25,00
10 ⁷	5	0	11	0	0/11	0,00
10 ⁸	5	0	16	0	0/16	0,00

Bảng 3 cho thấy, ở độ pha loãng 10⁵ đạt được nồng độ virus thấp nhất gây chết trên 50% phôi và độ pha loãng 10⁶ đạt được nồng độ virus cao nhất gây chết dưới 50% phôi với tỷ lệ tương ứng là 62,5% và 25,0%. Tính toán theo công thức của Reed - Muench, xác định liều ELD₅₀ là 10^{5,33} (ở độ pha loãng 1:10^{5,33}, khi tiêm 0,2 ml dịch virus Gumboro sẽ gây chết 50% phôi thí nghiệm - 0,2 ml huyền dịch virus ban đầu có chứa 10^{5,33} liều gây chết 50% phôi).

Sau khi xác định được liều ELD₅₀ trên phôi, nghiên cứu đã sử dụng liều 1×10⁵ ELD₅₀ để gây nhiễm cho gà thí nghiệm.

Xác định liều an toàn của rChIFN trên gà thí nghiệm

Sau 72 giờ được nhỏ mắt/mũi với rChIFN- α hoặc rChIFN- γ , gà thí nghiệm không có biểu hiện bệnh, vẫn ăn uống, sinh hoạt như thường. So với nhóm đối chứng, gà được nhỏ mắt/mũi với 0,2 ml nước muối sinh lý, gà không có biểu hiện khác lạ giữa các nhóm và toàn bộ gà đều sống.

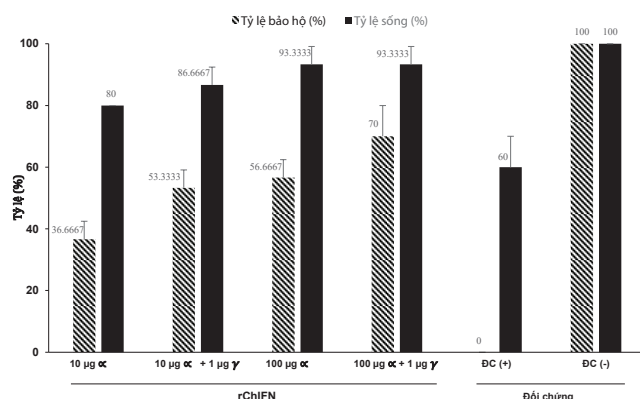
Bảng 4. Nồng độ rChIFN- α không ảnh hưởng đến sự sống của gà thí nghiệm.

Nhóm	Số gà thí nghiệm	Số gà sống khỏe mạnh
rChIFN- α 100 μ g/con	15	15
rChIFN- γ 100 μ g/con	15	15
Đối chứng	15	15

Kết quả bảng 4 cho thấy, hàm lượng rChIFN sử dụng là an toàn cho gà thí nghiệm.

Hiệu quả của rChIFN trong điều trị bệnh Gumboro

Sau 24 giờ nhiễm virus Gumboro, gà được điều trị bằng rChIFN. Kết quả điều trị cho thấy, rChIFN có hiệu quả kháng virus, tỷ lệ gà được bảo hộ và tỷ lệ sống cao, khác biệt so với nhóm gà không được điều trị. Kết quả chi tiết được thể hiện qua hình 1.



Hình 1. Biểu đồ tỷ lệ bảo hộ, tỷ lệ sống của gà ở các nhóm thí nghiệm. ĐC(+): gà nhiễm virus, không được điều trị; ĐC(-): gà không nhiễm virus, không sử dụng rChIFN; rChIFN: các nhóm gà nhiễm virus và được điều trị bằng rChIFN.

Kết quả thể hiện trong hình 1 cho thấy, ở nhóm ĐC (+), gà nhiễm virus và không được điều trị, sau 3-5 ngày nhiễm virus, toàn bộ gà trong nhóm có các biểu hiện đặc trưng của bệnh Gumboro như ủ rũ, lông xù, run rẩy tụ tập thành từng đám, gà tự mổ vào hậu môn, quanh hậu môn dính đầy phân, tiêu chảy phân nhiều nước và có màu hơi trắng. Toàn bộ các triệu chứng này hoàn toàn trùng hợp với mô tả về bệnh Gumboro trên gà của Cosgrove [13]. Bên cạnh đó, những gà chết trong toàn bộ thí nghiệm đều được mổ khám bệnh tích, nhận thấy toàn bộ gà chết đều có triệu chứng: túi Fabricius sưng hoặc xuất huyết; xuất huyết cơ đùi, cơ ngực. Ngoài ra,

vẫn ghi nhận được các biểu hiện bệnh tích như xuất huyết giữa dạ dày cơ và dạ dày tuyến; thận sưng; tuyến ức có điểm hoặc mảng xuất huyết. Các biểu hiện này là đặc trưng bệnh tích của bệnh Gumboro [14]. Điều này chứng tỏ, virus sử dụng trong thí nghiệm là virus cường độc và lượng sử dụng đủ mạnh để có thể gây bệnh cho 100% gà thí nghiệm và tỷ lệ chết lên đến 40%. Ở nhóm này, gà hoàn toàn không được bảo hộ và tỷ lệ sống chỉ đạt 60%, các tỷ lệ này khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nhóm còn lại. Giữa các nhóm có xử lý rChIFN, tỷ lệ gà sống có sự khác nhau, dao động 80-93,33%, tuy nhiên khác biệt này không có ý nghĩa thống kê. Tỷ lệ bảo hộ ở các nhóm có sử dụng rChIFN có sự khác biệt rõ rệt, nhóm sử dụng rChIFN- α 100 μ g/con phối hợp rChIFN- γ (1 μ g/con) đạt tỷ lệ bảo hộ cao nhất (70%). Kế đến là nhóm sử dụng rChIFN- α 100 μ g/con và rChIFN- α 10 μ g/ml phối hợp rChIFN- γ (1 μ g/con), tỷ lệ bảo hộ tương ứng đạt 56,67 và 53,33%. Tỷ lệ bảo hộ thấp nhất là ở nhóm sử dụng rChIFN- α 10 μ g/con, đạt 36,67%. Kết quả đã chứng tỏ rChIFN có hiệu quả trong điều trị bệnh Gumboro.

Đặc biệt, khi sử dụng rChIFN- α kết hợp rChIFN- γ , hiệu quả bảo hộ tăng rõ rệt và khác biệt có ý nghĩa thống kê. Tỷ lệ gà được bảo hộ khi sử dụng rChIFN- α 10 μ g/con có kết hợp rChIFN- γ (53,33%) cao hơn so với nhóm chỉ sử dụng rChIFN- α 10 μ g/con (36,67%). Tương tự, tỷ lệ bảo hộ của nhóm sử dụng rChIFN- α 100 μ g/con kết hợp rChIFN- γ (70,00%) cũng cao hơn khác biệt so với nhóm chỉ sử dụng rChIFN- α 100 μ g/con. Đặc biệt, tỷ lệ bảo hộ ở nhóm sử dụng rChIFN- α 10 μ g/con có kết hợp rChIFN- γ (53,33%) tương đương với nhóm rChIFN- α 100 μ g/con (56,67%). Điều này cho thấy, rChIFN- α khi sử dụng kết hợp với rChIFN- γ đã làm giảm lượng rChIFN- α sử dụng, mà tỷ lệ bảo hộ vẫn không giảm.

Interferon là một trong những cytokine có khả năng kháng lại virus bằng cách cản trở sự tổng hợp RNA và protein của virus [15]. Ở gia cầm, interferon alpha gà (ChIFN- α) đã được chứng minh là có tác dụng làm giảm tình trạng nhiễm virus Newcastle khi cho uống với liều cao [4]; có khả năng phòng và trị nhiều bệnh do virus khác như virus cúm H9N2 [16], virus gây bệnh viêm phế quản truyền nhiễm [6], virus gây bệnh Gumboro và Newcastle trên gà thương phẩm [5]. Điều này giúp giải thích kết quả nghiên cứu của chúng tôi khi sử dụng rChIFN- α , gà sẽ được bảo hộ và tỷ lệ bảo hộ phụ thuộc nồng độ sử dụng. Ngoài ra, ChIFN- α có khả năng kháng virus cao nhưng không có yếu tố kích thích đại thực bào, trong khi đó, ChIFN- γ tuy có tính kháng virus kém hơn nhưng lại có khả năng tác động tích cực đến đại thực bào MHC lớp II [17], nên việc kết hợp ChIFN- α và ChIFN- γ sẽ giúp tăng hiệu quả điều trị nên sẽ làm giảm tỷ lệ gà bệnh và chết. Theo nghiên cứu của Sekellick và cs (1998) [7] trên tế bào xơ phôi gà, trường hợp sử dụng kết hợp ChIFN- α và

ChIFN- γ thì số lượng vết tan hình thành (do virus gây ra) giảm đi 8 lần và các vết tan có kích thước nhỏ hơn, đồng thời nồng độ các ChIFN khi tác động phối hợp thấp hơn nồng độ của các ChIFN khi tác động riêng lẻ khoảng 4 lần và cho hiệu quả kháng virus gấp 2,5 lần. Kết quả nghiên cứu thực tế của chúng tôi cũng hoàn toàn phù hợp với các lý thuyết trên, khi sử dụng rChIFN- α có kết hợp rChIFN- γ thì tỷ lệ bảo hộ khác biệt có ý nghĩa so với nhóm chỉ sử dụng rChIFN- α .

HGKT kháng Gumboro khi sử dụng rChIFN

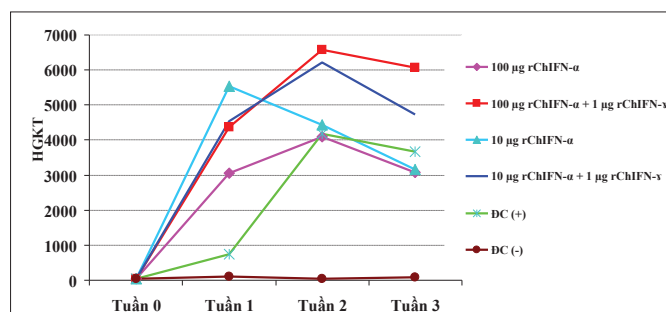
Trước khi gây nhiễm virus Gumboro 1 tuần (tuần 0 thí nghiệm), và trong 3 tuần thí nghiệm (khi đã gây nhiễm virus Gumboro), gà được lấy máu tại thời điểm đầu mỗi tuần để kiểm tra kháng thể kháng Gumboro. HGKT được xác định bằng bộ kit FlockCheck IBD-XR (IDEXX Laboratories, USA), với HGKT ≥ 396 thì mẫu huyết thanh sẽ dương tính với kháng thể kháng virus Gumboro.

Kết quả về HGKT của gà trong thí nghiệm được trình bày cụ thể trong bảng 5 và hình 2.

Bảng 5. HGKT của gà trước và sau gây nhiễm virus Gumboro.

Nhóm	HGKT			
	Tuần 0	Tuần 1	Tuần 2	Tuần 3
100 μ g rChIFN- α	45,2 $\pm$ 37,9	3056 $\pm$ 1454	4094 $\pm$ 397	3079 $\pm$ 816
100 μ g rChIFN- α + 1 μ g rChIFN- γ	53,3 $\pm$ 49,4	4378 $\pm$ 1952	6577 $\pm$ 1192	6069 $\pm$ 1160
10 μ g rChIFN- α	54,2 $\pm$ 28,6	5530 $\pm$ 1226	4426 $\pm$ 735	3156 $\pm$ 554
10 μ g rChIFN- α + 1 μ g rChIFN- γ	53,2 $\pm$ 37,9	4542 $\pm$ 1908	6212 $\pm$ 953	4732 $\pm$ 625
ĐC (+)	54,3 $\pm$ 28,6	740 $\pm$ 349	4168 $\pm$ 1013	3660 $\pm$ 589
ĐC (-)	50,8 $\pm$ 38,9	108 $\pm$ 22	52,7 $\pm$ 19	80,2 $\pm$ 19

ĐC (+): gà được gây nhiễm virus và không được điều trị bằng rChIFN; ĐC (-): gà không nhiễm virus, không điều trị bằng rChIFN. Các số trong cùng một cột mang những chữ số mũ khác nhau thì sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).



Hình 2. Biểu đồ HGKT trước và sau khi gây nhiễm virus Gumboro.

Bảng 5 cho thấy, trước khi nhiễm virus, toàn bộ gà thí nghiệm đều có kết quả âm tính (tuần 0) khi kiểm tra kháng thể kháng Gumboro. Sau 1 tuần gây nhiễm virus, gà ở các nhóm thí nghiệm có tiếp xúc với virus đều biểu hiện đáp

ứng miễn dịch thông qua gia tăng HGKT. Cùng thời điểm này, gà ở nhóm đối chứng âm (gà không nhiễm virus, không xử lý với rChIFN) hoàn toàn âm tính với virus Gumboro.

Hình 2 và bảng 5 cho thấy, sau 1 tuần gây nhiễm với virus Gumboro và sử dụng rChIFN, lượng kháng thể của gà tăng nhanh và khác nhau ở các nhóm, cao nhất là ở nhóm sử dụng 100 μ g rChIFN- α (HGKT: 5530), kế đến là 2 nhóm có sử dụng kết hợp với rChIFN- γ (HGKT: 4378 và 4542); tiếp theo là nhóm sử dụng 100 μ g rChIFN- α (HGKT: 3056) và thấp nhất là ở nhóm ĐC (+) (HGKT: 740). Khi xử lý thống kê, HGKT của gà ở các nhóm được xử lý với rChIFN khác biệt, nhưng lại khác biệt có ý nghĩa so với nhóm ĐC (+). Kết quả này chứng tỏ rằng, gà sau khi bị bệnh có khả năng đáp ứng miễn dịch tốt đối với virus Gumboro. Đồng thời rChIFN cũng làm cơ thể gà tăng cường các đáp ứng miễn dịch để kháng lại virus, HGKT của các nhóm có sử dụng rChIFN tăng cao hơn 4-7 lần so với ĐC (+).

Sau 2 tuần nhiễm virus, hàm lượng kháng thể gà ở nhóm ĐC (+) tăng lên mạnh mẽ, đạt đỉnh và HGKT không khác biệt so với các nhóm có sử dụng rChIFN. Hai nhóm sử dụng rChIFN- α kết hợp rChIFN- γ và nhóm sử dụng 100 μ g rChIFN- α cũng đạt HGKT cao sau 2 tuần nhiễm virus. So với các nhóm sử dụng mỗi rChIFN- α , các nhóm có sử dụng kết hợp rChIFN- γ vẫn có HGKT cao nhất (6577 và 6212 tương ứng với nhóm sử dụng 100 μ g và 10 rChIFN- α), mặc dù khác biệt này không có ý nghĩa thống kê. Nhóm sử dụng 10 μ g rChIFN- α HGKT đạt đỉnh sau 1 tuần nhiễm virus và sau 2 tuần bắt đầu giảm, tuy nhiên vẫn cao và không khác biệt so với các nhóm khác. Theo lý thuyết, khi gà đang bị bệnh hoặc khỏi bệnh sẽ tạo ra một lượng kháng thể rất cao do chính virus gây bệnh Gumboro đã tạo ra, kháng thể đạt hàm lượng cao nhất từ 10-12 ngày sau khi gây nhiễm và giảm dần theo thời gian [14]. Hơn nữa, interferon được xem là yếu tố quan trọng nhất trong sức đề kháng không đặc hiệu của cơ thể đối với virus, bằng cách kích thích hàng loạt tế bào có thẩm quyền miễn dịch như đại thực bào, tế bào giết tự nhiên, tế bào lympho..., các tế bào này giúp tăng cường hoạt lực cho cơ thể [4]. Điều đó cho thấy, sau 2 tuần nhiễm virus, kháng thể tạo ra ở các nhóm gà thí nghiệm đều tuân theo quy luật tự nhiên và rChIFN- α kết hợp rChIFN- γ đã tăng cường khả năng đáp ứng miễn dịch của gà khi bị nhiễm bệnh. Sau 3 tuần nhiễm virus, những gà còn sống hầu hết sẽ khỏi bệnh, nồng độ kháng thể lúc này bắt đầu giảm so với tuần 2. HGKT lúc này vẫn đạt cao nhất ở các nhóm có sử dụng kết hợp với rChIFN- γ , tuy nhiên sự khác biệt này so với các nhóm còn lại không có ý nghĩa thống kê.

Các kết quả về HGKT cho thấy, khi gà nhiễm virus, có sử dụng rChIFN- α hoặc sử dụng kết hợp rChIFN- γ sẽ giúp cơ thể gà kích hoạt nhanh các cơ chế miễn dịch, HGKT tăng

cao, tăng nhanh sau 1 tuần nhiễm virus. Đồng thời, HGKT vẫn duy trì ở mức cao sau 2 tuần tiếp theo, nên giúp gà được bảo hộ và đạt tỷ lệ sống cao hơn so với nhóm ĐC (+).

Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy, rChIFN- α có hiệu quả kháng lại virus gây bệnh Gumboro ở nồng độ 10 $\mu\text{g}/\text{con}$ và 100 $\mu\text{g}/\text{con}$ với tỷ lệ bảo hộ tương ứng là 36,67 và 56,67%. Đồng thời, khi kết hợp rChIFN- α cùng rChIFN- γ (1 $\mu\text{g}/\text{con}$), tỷ lệ gà được bảo hộ tăng lên, đạt 53,33 và 70,00% tương ứng với nhóm gà sử dụng rChIFN- α 10 $\mu\text{g}/\text{con}$ và 100 $\mu\text{g}/\text{con}$. Bên cạnh đó, đánh giá hiệu quả kháng thể cũng cho thấy, rChIFN- α không ảnh hưởng đến khả năng đáp ứng miễn dịch của gà khi bị nhiễm virus. Tuy nhiên, khi sử dụng kết hợp rChIFN- γ và rChIFN- α , khả năng đáp ứng miễn dịch của gà tăng cao và duy trì đỉnh nồng độ kháng thể sau hơn 2 tuần nhiễm virus.

Tóm lại, khi sử dụng rChIFN- α kết hợp hoặc không kết hợp với rChIFN- γ hoàn toàn có hiệu quả trong điều trị bệnh Gumboro cho gà khi được cấp bằng đường nhỏ mắt/mũi. Hiệu quả bảo hộ đạt 37-70% và tỷ lệ gà sống đạt 80-93% phụ thuộc vào liều rChIFN sử dụng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Phạm Sĩ Lăng và Nguyễn Thiện (2004), *Một số bệnh mới do virus ở gia súc, gia cầm nhập nội và biện pháp phòng trị*, NXB Nông nghiệp, tr.170-171.
- [2] F. Hou, K. Liu, T. Shen, B. Zhou, R. Cao, P. Li, P. Chen (2011), "Antiviral activity of rChIFN- α against vesicular stomatitis virus and Newcastle disease virus: a novel recombinant chicken interferon- α showed high antiviral activity", *Research in Veterinary Science*, **91**(3), pp.e73-e79.
- [3] K.W. Jarosinski, W. Jia, M.J. Sekellick, P.I. Marcus, K.A. Schat (2001), "Cellular responses in chickens treated with IFN- α orally or inoculated with recombinant Marek's disease virus expressing IFN- α ", *Journal of Interferon & Cytokine Research*, **21**(5), pp.287-296.
- [4] P.I. Marcus, L.V.D. Heide, M.J. Sekellick (1999), "Interferon action on avian viruses. I. Oral administration of chicken interferon-alpha ameliorates Newcastle disease", *Journal of Interferon & Cytokine*

Research, **19**(8), pp.881-885.

- [5] C.W. Mo, Y.C. Cao, B.L. Lim (2001), "The in vivo and in vitro effects of chicken interferon α on infectious bursal disease virus and Newcastle disease virus infection", *Avian Diseases*, **45**(2), pp.389-399.
- [6] J. Pei, M.J. Sekellick, P.I. Marcus, I.S. Choi, E.W. Collisson (2001), "Chicken interferon type I inhibits infectious bronchitis virus replication and associated respiratory illness", *Journal of Interferon & Cytokine Research*, **21**(12), pp.1071-1077.
- [7] M.J. Sekellick, J.W. Lowenthal, T.E. O'neil, P.I. Marcus (1998), "Chicken interferon types I and II enhance synergistically the antiviral state and nitric oxide secretion", *Journal of Interferon & Cytokine Research*, **18**(6), pp.407-414.
- [8] C. Xia, J. Liu, Z.G. Wu, C.Y. Lin, M. Wang (2004), "The interferon- α genes from three chicken lines and its effects on H9N2 influenza viruses", *Animal Biotechnology*, **15**(1), pp.77-88.
- [9] Võ Thị Minh Tâm, Nguyễn Thị Thanh Giang, Nguyễn Đăng Quân, Nguyễn Quốc Bình (2014), "Tạo dòng, biểu hiện và xác định hoạt tính sinh học của interferon gà tái tổ hợp thu nhận từ hệ thống nấm men *pichia pastoris*", *Tạp chí Sinh học*, **36**(1se), tr.216-225.
- [10] S.B. Hitchner (1970), "Infectivity of infectious bursal disease virus for embryonating eggs", *Poultry Science*, **49**(2), pp.511-516.
- [11] L.J. Reed and H. Muench (1938), "A simple method of estimating fifty per cent endpoints", *American Journal of Epidemiology*, **27**(3), pp.493-497.
- [12] Hồ Thị Việt Thu và Nguyễn Đức Hiền (2012), *Giáo trình bệnh truyền nhiễm gia súc gia cầm*, NXB Đại học Cần Thơ, tr.244-248.
- [13] A.S. Cosgrove (1962), "An apparently new disease of chickens: avian nephrosis", *Avian Diseases*, **6**(3), pp.385-389.
- [14] Lê Văn Năm (2004), *Bệnh Gumboro ở gà và biện pháp phòng trị*, NXB Nông nghiệp, tr.1-53.
- [15] I.R. Tizard (2004), "Cytokines and the immune system", *Veterinary Immunology - An Introduction*, 7th ed, Elsevier, USA, pp.133-143.
- [16] S. Meng, L. Yang, C. Xu, Z. Qin, H. Xu, Y. Wang, L. Sun, W. Liu (2011), "Recombinant chicken interferon- α inhibits H9N2 influenza virus in vivo by oral administration", *J. Interferon Cytokine Res.*, **20**(5), pp.1-6.
- [17] M. Suresh, K. Karaca, D. Foster, J.M. Sharma (1995), "Molecular and functional characterization of turkey interferon", *Journal of Virology*, **69**(12), pp.8159-8163.

Sàng lọc và nghiên cứu một số chủng vi khuẩn vùng rễ kích thích sinh trưởng phân lập từ cây nghệ vàng (*Curcuma longa* L.) tại Việt Nam

Hoàng Kim Chi^{1,2}, Nguyễn Đình Tuấn¹, Trần Hồ Quang³, Nguyễn Thành Lam⁴,
Lê Hữu Cường¹, Trần Thị Hồng Hà¹, Lê Mai Hương¹, Trần Thị Như Hằng^{1*}

¹Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

²Học viện KH&CN, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

³Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

⁴Bộ Tài nguyên và Môi trường

Ngày nhận bài 16/9/2019; ngày chuyển phản biện 19/9/2019; ngày nhận phản biện 20/10/2019; ngày chấp nhận đăng 29/11/2019

Tóm tắt:

Từ các mẫu đất thu tại vùng chuyên canh cây nghệ vàng (*Curcuma longa* L.) ở Hưng Yên, nhóm nghiên cứu đã phân lập được 9 chủng vi khuẩn có khả năng hòa tan phosphate vô cơ. Trong số các chủng phân lập, PGP-V5, PGP-V20 và PGP-V21 được xác định có khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng thực vật IAA (indole acetic acid) với hàm lượng 63,11-73,87 ppm. Bằng phương pháp sinh học phân tử kết hợp với nghiên cứu các đặc điểm sinh lý, sinh hóa, đã xác định được vị trí phân loại học của các chủng lựa chọn, lần lượt là *Bacillus* sp. PGP-V5, *Enterobacter* sp. PGP-V20 và *Bacillus* sp. PGP-V21. Đặc biệt, qua thử nghiệm trên đĩa thạch, chủng *Bacillus* sp. PGP-V21 còn biểu hiện khả năng kháng nấm gây bệnh thực vật *Aspergillus niger* và *Fusarium oxysporum*. Vì vậy có thể nói, kết quả sàng lọc và nghiên cứu đặc tính các chủng vi khuẩn vùng rễ kích thích sinh trưởng đạt được sẽ là cơ sở cho việc tạo ra chế phẩm sinh học hiệu quả và an toàn không chỉ cho cây nghệ vàng *C. longa* mà còn cho một số cây trồng tại khu vực Đồng bằng Bắc Bộ.

Từ khóa: *Curcuma longa* L., hoạt tính kháng nấm, hòa tan phosphate, kích thích sinh trưởng thực vật, sinh IAA, vi khuẩn vùng rễ.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Vùng rễ thực vật được định nghĩa là vùng đất mỏng bao quanh rễ, có đặc điểm giàu dinh dưỡng, là nơi sống của nhiều loài vi sinh vật quan trọng cho sinh trưởng và phát triển của cây trồng [1]. Trong hệ sinh thái đất vùng rễ, sự tương tác giữa rễ cây, đất và vi sinh vật làm thay đổi đáng kể tính chất vật lý, hóa học của đất và đặc điểm sinh học của thực vật [1, 2]. Vi khuẩn vùng rễ kích thích sinh trưởng thực vật (plant growth promoting rhizobacteria - PGPR) là nhóm vi khuẩn cư trú ở vùng rễ và có tác động tích cực trực tiếp hoặc gián tiếp tới sinh trưởng của thực vật [3, 4]. Trong những thập kỷ vừa qua, nhiều loài vi khuẩn PGPR đã được phát hiện và nghiên cứu, bao gồm một số loài thuộc các chi *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Serratia*... [5-7]. Trên cơ sở những tác dụng đáng kể của PGPR trong kích thích sinh trưởng và phát triển ở thực vật, nhóm vi sinh vật này đang được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu với mục tiêu tạo chế phẩm sinh học giúp nâng cao chất lượng

cây trồng, trong đó có nhiều loại cây thuốc. Có thể nói, việc tìm ra những chủng vi khuẩn PGPR cộng sinh với cây được liệu sẽ là cơ sở để tạo ra chế phẩm sinh học đặc trưng giúp làm tăng chất lượng cây trồng, đặc biệt là tăng sinh khối và hàm lượng các hoạt chất trong thực vật. Đây là một hướng đi có ý nghĩa to lớn đối với sản xuất cây thuốc nguyên liệu, đặc biệt trong điều kiện biến đổi khí hậu hiện nay.

Nghiên cứu về vi khuẩn vùng rễ của một số loài cây được liệu được coi là vấn đề quan trọng, bởi chúng đã được chứng minh là có tác động tích cực lên sự phát triển và sự tạo thành các hợp chất thứ cấp cũng như đến chất lượng của cây thuốc [8]. Cây nghệ vàng (*Curcuma longa* L.) là một loại cây trồng có củ thuộc họ Gừng (*Zingiberaceae*), phổ biến tại khu vực nhiệt đới, đặc biệt là một số nước châu Á như Ấn Độ, Trung Quốc, Indonesia và Việt Nam [9]. Trong khoảng hai thập kỷ gần đây, nhu cầu tạo vùng nguyên liệu sản xuất nghệ chất lượng cao để phục vụ cho công nghiệp được ở nước ta trở nên ngày một cần thiết.

Chính vì vậy, chúng tôi đã thực hiện phân lập và nghiên

*Tác giả liên hệ: Tel: 0912736970; Email: hangmy97@yahoo.com

Screening and characterisation of plant growth promoting rhizobacteria isolated from turmeric plant (*Curcuma longa* L.) in Vietnam

Kim Chi Hoang^{1,2}, Dinh Tuan Nguyen¹, Ho Quang Tran³, Thanh Lam Nguyen⁴, Huu Cuong Le¹, Thi Hong Ha Tran¹, Mai Huong Le¹, Thi Nhu Hang Tran^{1*}

¹Institute of Natural Products Chemistry, VAST

²Graduate University of Science and Technology, VAST

³Institute of Biotechnology, VAST

⁴Ministry of Natural Resources and Environment

Received 16 September 2019; accepted 29 November 2019

Abstract:

From rhizosphere soils of turmeric plant (*Curcuma longa* L.) collected in Hungyen province (Vietnam), nine inorganic phosphate solubilising bacterial strains were isolated. Among them, PGP-V5, PGP-V20, and PGP-V21 were identified as potent IAA producing strains with the amount ranging from 63.11 to 73.87 ppm. The strains were morphologically, physiochemically and molecular-biologically determined as *Bacillus* sp. PGP-V5, *Enterobacter* sp. PGP-V20, and *Bacillus* sp. PGP-V21. The strain *Bacillus* sp. PGP-V21 exhibited antifungal activities against fungal strains of *Aspergillus niger* and *Fusarium oxysporum* in a plate-based test. The results showed that the selected microbial strains can be used for preparing effective biofertilisers not only for *C. longa* but also for other crops in the Red River Delta.

Keywords: antifungal activity, *Curcuma longa* L., IAA production, phosphate solubilising, plant growth promoting, rhizobacteria.

Classification number: 4.6

cứ đặc tính của một số chủng vi khuẩn PGPR từ đất trồng cây nghệ vàng (*C. longa* L.) nhằm xây dựng bộ chủng vi sinh vật hữu hiệu để tạo chế phẩm sinh học an toàn và hiệu quả cho loài cây thuốc này.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Nguyên vật liệu

Mẫu đất: các mẫu đất vùng rễ được thu tại vùng chuyên canh cây nghệ vàng ở xã Đại Tập, huyện Khoái Châu, tỉnh Hưng Yên có tọa độ 20°47'27"N, 105°56'46"E.

Các chủng vi sinh vật kiểm định: bộ chủng vi sinh vật kiểm định được cung cấp từ Phòng sinh học thực nghiệm thuộc Viện Hoá học các hợp chất thiên nhiên, gồm có 2 chủng nấm mốc là *Aspergillus niger* ATCC 6275 và *Fusarium oxysporum* VTCC-Y-62.

Trình tự cấp môi để nhân bản đoạn gen 16S rDNA của các chủng vi khuẩn được khảo sát: Pr16F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và Pr16R (5'-TACGGTTACCTTGTACCGACTT-3').

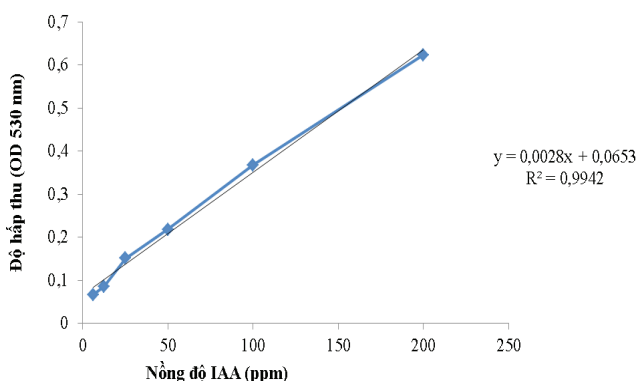
Phương pháp nghiên cứu

Thu mẫu: các mẫu đất vùng rễ (bao gồm cả phần rễ cây) được lấy ở độ sâu 10-15 cm dưới mặt đất bằng các dụng cụ thu mẫu vô trùng. Sau khi thu, mẫu được giữ trong các túi nilon sạch và được bảo quản ở 4°C cho đến khi tiến hành phân lập vi khuẩn [10].

Phân lập vi khuẩn vùng rễ có khả năng hòa tan phosphate vô cơ: phân lập vi khuẩn có khả năng hòa tan phosphate vô cơ theo phương pháp của Gerretsen (1948) với một số thay đổi theo điều kiện thí nghiệm [11]. Dùng kẹp vô trùng gạt phần đất mỏng bám trên rễ cây nghệ vàng vào đĩa petri sạch để thu phần đất vùng rễ phục vụ phân lập. Lấy 5 g đất vùng rễ cho vào các bình tam giác 100 ml có chứa 45 ml dung dịch đệm PBS 100 mM [công thức (g/l): NaCl 8,5, Na₂HPO₄ 1,91, KH₂PO₄ 0,38, pH=7-7,5], sau đó lắc đều (120 vòng/phút) trong vòng 10 phút. Sau khi pha loãng liên tục dung dịch đất bằng đệm PBS tới nồng độ 10⁻⁷, hút 0,1 ml dịch và cấy trải trên đĩa thạch IPA [công thức (g/l): glucose 10, NH₄Cl 5, NaCl 1, MgSO₄·7H₂O 1, Ca₃(PO₄)₂ 0,8, agar 15, pH=7,2] [12]. Ủ các đĩa thạch ở nhiệt độ 30°C và quan sát sự hình thành khuẩn lạc trên các đĩa phân lập sau mỗi 24h. Các khuẩn lạc vi khuẩn có vòng phân giải cơ chất trên đĩa thạch được chọn lọc và cấy ria trên đĩa thạch LB [công thức (g/l): casein 10, cao nấm men 5, NaCl 10, agar 15, pH=7,5] để lựa chọn bộ chủng tinh sạch.

Xác định khả năng sinh IAA: khả năng sinh IAA của các chủng vi sinh vật được xác định theo phương pháp Salkowski cải tiến [13]. Dịch nuôi của các chủng vi khuẩn trong môi trường King's B [công thức (g/l): Proteose peptone 20, K₂HPO₄ 1,15, MgSO₄·7H₂O 1,5, glycerol 1,5, L-tryptophan 1, agar 15, pH 7,2] (30°C, 24h) được thu và ly tâm (12.000 vòng/phút, 15 phút). Hút 1 ml phần dịch sau ly tâm cho

vào các ống Durham, thêm 2 ml thuốc thử Salkowski [dung dịch FeCl_3 0,5 M trong dung dịch perchloric acid (HClO_4) 35% tỷ lệ 1:50 v/v] và ủ trong bóng tối (30°C , 10 phút) để phản ứng xảy ra hoàn toàn. Tiến hành đo độ hấp thụ quang phổ (OD) ở bước sóng 530 nm. Từ kết quả đo OD_{530 nm} và phương trình đồ thị đường chuẩn (hình 1), nồng độ IAA đo các đồng vi khuẩn tạo ra được xác định.



Hình 1. Đường chuẩn tương quan giữa nồng độ IAA và mật độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 530 nm.

Xác định hoạt tính kháng nấm: hoạt tính kháng vi sinh vật của các chủng vi khuẩn được xác định bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch theo Ahmad và cs (1998) [14]. Các chủng nấm kiểm định được nuôi trên môi trường thạch Sabouraud [công thức (g/l): glucose 40, peptone 10, agar 15, pH=7,2], sau 72h bảo tử nấm hình thành trên đĩa thạch được thu và hòa vào 10 ml dung dịch NaCl 0,85%. Sau khi được pha loãng tới mật độ 10^5 CFU/ml, hút 0,1 ml dịch bào tử nấm và cấy trải trên đĩa petri chứa môi trường thạch Muller Hinton (Himedia, Ấn Độ). Hút 0,2 ml dịch nuôi chủng vi khuẩn thử nghiệm ($\approx 2 \times 10^7$ CFU/ml) nhỏ vào các giếng thạch đục trên đĩa petri chứa bào tử nấm kiểm định. Sau 5 ngày nuôi ở 30°C , kiểm tra sự hình thành các vòng vô khuẩn trên đĩa thạch xung quanh các giếng thử nghiệm.

Xác định đặc tính vi khuẩn: các chủng có hoạt tính tốt sẽ tiếp tục được xác định các đặc điểm hình thái hiển vi và các chỉ tiêu sinh lý, sinh hóa theo khóa phân loại Bergey [15], bao gồm: nhuộm Gram, tính hiếu khí, vi hiếu khí, khả năng di động, khả năng sinh enzyme catalase, oxidase, urease, H_2S , khả năng acid hóa các nguồn đường (glucose, fructose, galactose, arabinose, xylose), khả năng đồng hóa tinh bột, nhiệt độ và pH tối ưu cho sinh trưởng.

Định danh các chủng vi khuẩn được chọn lọc dựa trên trình tự đoạn gen 16S rDNA:

ADN tổng số của các chủng PGPR lựa chọn được tách theo quy trình mô tả bởi Mirza và cs (2001) [16].

ADN tổng số của vi khuẩn được sử dụng làm nguyên liệu cho phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen 16S rDNA

để phục vụ giải trình tự. Mỗi phản ứng PCR (50 μl) gồm 0,5 μl Taq DNA polymerase (5 U/ μl , Fermentas), 5 μl Taq buffer (Fermentas), 5 μl dNTPs (200 μM), 5 μl (100 ng/ μl) mỗi Pr16F, 5 μl Pr16R, 24,5 μl H_2O và 1 μl ADN tổng số. Quá trình phản ứng được thực hiện trên hệ PCR system 2720 (Applied Biosystems, Singapore) với các bước như sau: 94°C trong 5 phút, tiếp theo là 34 chu kỳ (94°C trong 1 phút, 55°C trong 1,5 phút, 72°C trong 2 phút), 72°C trong 7 phút. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit QIAquick spin (QIAGEN) trước khi giải trình tự.

Trình tự đoạn gen 16S rDNA của các chủng vi khuẩn được đọc trên máy Perkin-Elmer (ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer, Applied Biosystems) sử dụng kit giải trình tự AmpliTaqFS DNA polymerase (Applied Biosystems) và được phân tích so sánh với các trình tự đã công bố trên ngân hàng GenBank bằng công cụ BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Xây dựng cây phân loại bằng công cụ so sánh được thực hiện bởi phần mềm BioEdit [17] và MEGA X [18, 19].

Kết quả và thảo luận

Phân lập vi khuẩn vùng rễ có khả năng hòa tan phosphate và xác định khả năng sinh IAA

Cùng với đạm và kali, lân được coi là nguồn dinh dưỡng quan trọng nhất cho thực vật. Mặc dù trong đất trồng luôn có một lượng lớn lân nhưng chúng phần lớn tồn tại ở dạng không tan và khó hấp thu, vì vậy hoạt động của các vi khuẩn giúp chuyển hóa lượng lân vô cơ thành dạng tan có ý nghĩa rất lớn đối với dinh dưỡng cho cây trồng. Từ các mẫu đất vùng rễ, đã phân lập được 9 chủng vi khuẩn biểu hiện khả năng hòa tan phosphate vô cơ trên đĩa thạch. Khả năng hoà tan phosphate được đánh giá bằng cách đo đường kính (ĐK) phân giải cơ chất bằng công thức: ĐK (mm) = D-d; trong đó D là đường kính vòng phân giải cơ chất và d là đường kính khuẩn lạc vi khuẩn. Đường kính vòng phân giải của 9 chủng vi khuẩn phân lập trên môi trường có cơ chất tri-calcium phosphate [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Khả năng hòa tan phosphate và sinh tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn.

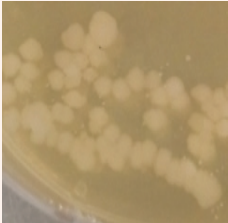
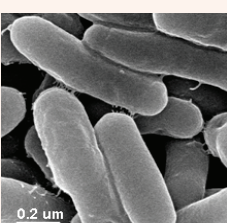
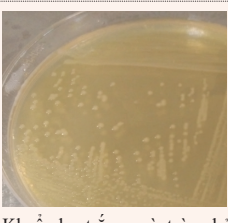
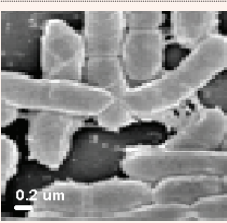
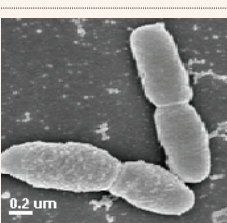
STT	Ký hiệu chủng	Khả năng hòa tan phosphate (D-d, mm)	Khả năng sinh tổng hợp IAA (ppm)
	PGP-V2	3	24,80 $\pm$ 2,21
	PGP-V4	5	9,66 $\pm$ 1,72
	PGP-V5	3	67,51 $\pm$ 2,11
	PGP-V15	5	35,47 $\pm$ 3,05
	PGP-V18	3	26,82 $\pm$ 1,46
	PGP-V20	4	77,87 $\pm$ 2,78
	PGP-V21	6	63,11 $\pm$ 2,09
	PGP-V22	4	11,61 $\pm$ 1,85
	PGP-V24	4	45,81 $\pm$ 2,89

Các chủng vi khuẩn chọn lọc được ở bước sàng lọc khả năng hoà tan phosphate tiếp tục được khảo sát và đánh giá khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng thực vật IAA. Kết quả sàng lọc (bảng 1) cho thấy, tất cả 9 chủng thí nghiệm đều biểu hiện hoạt tính sinh IAA với mức độ khác nhau, trong đó các chủng PGP-V5, PGP-V20 và PGP-V21 sinh IAA với lượng lớn nhất (trên 60 ppm), vì vậy được lựa chọn để nghiên cứu thêm một số đặc điểm phân loại học, bao gồm đặc điểm hình thái, các đặc điểm sinh lý, sinh hóa và phân tích trình tự đoạn gen đặc trưng (gen 16S rRNA).

Đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa và phân loại học của các chủng vi khuẩn lựa chọn

Đặc điểm hình thái khuẩn lạc trên đĩa thạch chứa môi trường LB của các chủng vi khuẩn được xác định dựa trên quan sát bằng mắt thường. Đặc điểm hình thái hiển vi và kích thước tế bào vi khuẩn được xác định bằng quan sát dưới kính hiển vi Olympus (Japan) với độ phóng đại x1000. Kết quả được tóm tắt ở bảng 2.

Bảng 2. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và hiển vi của các chủng vi khuẩn.

Tên chủng	Hình thái khuẩn lạc	Hình thái hiển vi tế bào
PGP-V5	 Khuẩn lạc trắng vàng, tròn, đường kính 1,5 mm, bề mặt lồi, trơn bóng, không sinh sắc tố	 Tế bào hình que, đứng đơn, kích thước 0,6-1,8 μm
PGP-V20	 Khuẩn lạc trắng ngà, tròn nhỏ đều, đường kính 0,8 mm, bề mặt trơn, lồi, bóng, không sinh sắc tố	 Tế bào hình que, đứng đơn, kích thước 0,8-3,0 μm
PGP-V21	 Khuẩn lạc trắng ngà, phẳng có viền trong bao quanh, vô định hình, đường kính 1,5 mm, không sinh sắc tố	 Tế bào hình que, đứng đơn, kích thước 1,0-2,5 μm

Để xác định đặc điểm sinh lý và sinh hóa của các chủng vi khuẩn, chúng tôi đã thực hiện một số thử nghiệm liên quan đến tính bất màu trong nhuộm Gram, tính hiếu khí, vi hiếu khí, khả năng di động, khả năng sinh enzyme catalase, oxidase, urease, H₂S, acid hóa các nguồn đường C6 (glucose, fructose, galactose), C5 (arabinose, xylose) và đường đôi (sucrose), khả năng thủy phân tinh bột, khoảng nhiệt độ và pH tối ưu cho sinh trưởng. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa của các chủng vi khuẩn lựa chọn.

TT	Đặc điểm	PGP-V5	PGP-V20	PGP-V21
1	Gram	+	-	+
2	Nội bào tử	+	-	+
3	Hiếu khí	+	+	+
4	Vi hiếu khí	-	-	-
5	Khả năng di động	-	-	-
6	Sinh enzyme catalase	+	+	+
7	Sinh enzyme oxidase	+	-	+
8	Sinh enzyme urease	-	-	-
9	Sinh H ₂ S	+	-	-
10	Khả năng acid hóa các nguồn đường:			
	Glucose	+	+	+
	Fructose	-	+	+
	Galactose	+	-	-
	Arabinose	+	+	-
	Xylose	-	+	-
	Sucrose	-	+	+
11	Khả năng thủy phân tinh bột	-	+	+
12	Nhiệt độ tối ưu cho sinh trưởng	28-32°C	28-32°C	30-37°C
13	pH thích hợp cho sinh trưởng	6,0-7,5	6,0-7,5	6,5-7,0

Đối chiếu các đặc điểm hình thái (bảng 2), sinh lý và sinh hóa (bảng 3) với khóa phân loại Bergey [15], đã xác định được PGP-V5 là chủng vi khuẩn thuộc nhóm *Bacillus* spp. 3 (bao gồm *B.adius*, *B. insolitus*, *B. laterosporus*, *B. pasteurii*, *B. marinus* và *B. sphaericus*), PGP-V20 thuộc nhóm Enterobacteriaceae 2 (bao gồm *Enterobacter intermedius*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *E. amnigenus*, *Erwinia carotovora* và *Serratia rubidaea*), PGP-V21 là vi khuẩn thuộc nhóm *Bacillus* spp. 1 (bao gồm *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. polymyxa*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. licheniformis*, *B. alvei*, *B. anthracis* và *B. coagulans*).

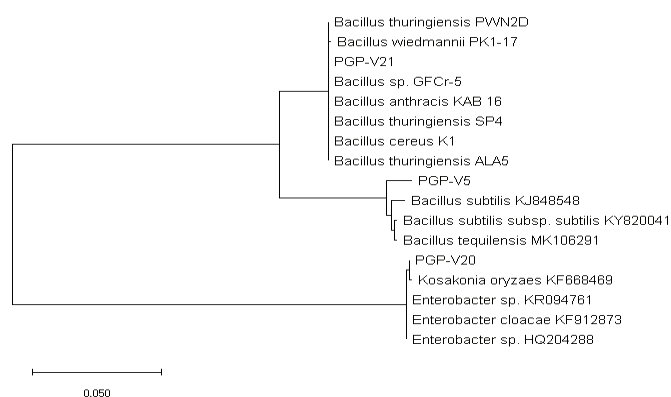
Kết quả giải trình tự và phân tích đoạn gen 16S rRNA của các chủng vi khuẩn cho thấy, đoạn trình tự gen 16S rRNA của chủng PGP-V5 tương đồng 97,97-98,08% với các đoạn tương ứng của các chủng vi khuẩn thuộc *Bacillus* sp., *B. subtilis* và *B. tequilensis*; chủng PGP-V20 tương đồng 99,31% với các đoạn tương ứng của các chủng vi khuẩn

thuộc *Kosakonia oryzae* (tên cũ: *Enterobacter oryzae* [20]), *Enterobacter* sp., *Kosakonia* sp. và chủng PGP-V21 tương đồng 99,80-99,90% với các đoạn tương ứng của các chủng vi khuẩn thuộc *B. thuringiensis*, *Bacillus* sp., *B. anthracis* và *B. cereus* (bảng 4).

Bảng 4. Kết quả tìm kiếm các đoạn trình tự tương đồng trên ngân hàng gen với đoạn 16S rDNA của các chủng vi khuẩn lựa chọn.

Tên chủng vi khuẩn	Kết quả tìm kiếm trên ngân hàng gen				
	Vi sinh vật có trình tự tương đồng	Total score	Query coverage	Độ tương đồng (%)	Sequence ID
PGP-V5	<i>Bacillus</i> sp.	1615	99%	98,07%	KU667123.1
	<i>Bacillus subtilis</i>	1615	99%	97,97%	KJ848548.1
	<i>Bacillus subtilis</i>	1615	99%	98,08%	KC465728.1
	<i>Bacillus subtilis</i>	1611	99%	98,07%	KY820041.1
	<i>Bacillus tequilensis</i>	1609	99%	98,07%	MK106291.1
PGP-V20	<i>Kosakonia oryzae</i>	1825	99%	99,31%	KT275833.1
	<i>Kosakonia oryzae</i>	1825	99%	99,31%	CP014007.1
	<i>Enterobacter</i> sp.	1825	99%	99,31%	KR094761.1
	<i>Kosakonia</i> sp.	1825	99%	99,31%	KM253162.1
	<i>Kosakonia oryzae</i>	1825	99%	99,31%	KF668469.1
PGP-V21	<i>Bacillus thuringiensis</i>	1860	100%	99,90%	MK026854.1
	<i>Bacillus</i> sp.	1857	100%	99,80%	KC693736.1
	<i>Bacillus anthracis</i>	1857	100%	99,80%	JX971515.1
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	1855	100%	99,80%	MG270578.1
	<i>Bacillus cereus</i>	1855	100%	99,80%	MK045762.1

Dựa trên các kết quả tìm kiếm được trên ngân hàng gen, kết hợp với phân tích ClustalW alignment (phần mềm BioEdit) và phân tích Maximum likelihood (phần mềm MEGA) đã xây dựng được cây phân loại của các chủng PGP-V5, PGP-V20 và PGP-V21 (hình 2). Kết hợp với các đặc điểm hình thái, sinh lý, hóa sinh (bảng 2 và 3) và khóa phân loại của Bergey đã xác định được các chủng lựa chọn là *Bacillus* sp. PGP-V5, *Enterobacter* sp. V20 và *Bacillus* sp. V21.



Hình 2. Cây phân loại của các chủng PGP-V5, PGP-V20, PGP-V21 và một số chủng vi sinh vật đã biết dựa trên trình tự đoạn 16S rRNA gen đã công bố (phân tích sử dụng phần mềm MEGA, phương pháp maximum likelihood với 1000 bootstrap replicates).

Năm 2016, tại Ấn Độ, Kumar và cs [21] đã phân lập được 9 chủng vi khuẩn vùng rễ của cây nghệ vàng *C. longa* và xác định vị trí phân loại thuộc các chi *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Klebsiella* và *Pseudomonas*. Kết quả này không đồng nhất với nghiên cứu của chúng tôi, có thể do phân bố của các vi khuẩn trong vùng rễ không chỉ phụ thuộc vào đặc tính di truyền của cây chủ, mà còn liên quan đến nhiều yếu tố khác như điều kiện địa lý và chế độ canh tác. Đây không phải lần đầu tiên các chủng vi khuẩn PGPR của cây nghệ vàng *C. longa* được phân lập và xác định đặc tính, nhưng kết quả nghiên cứu này đã phát hiện ra một số chủng vi khuẩn có vị trí phân loại mới và có tính đặc trưng nhất định.

Hoạt tính kháng nấm bệnh hại thực vật

Để tìm hiểu thêm về hoạt tính kích thích sinh trưởng gián tiếp của các chủng vi khuẩn lựa chọn, chúng tôi thực hiện xác định khả năng kháng nấm bệnh thực vật in vitro dựa trên sự ức chế sự hình thành sợi nấm *A. niger* và *F. oxysporum* trên đĩa thạch. Kết quả thử nghiệm cho thấy, trong số 3 chủng thử nghiệm, *Bacillus* sp. PGP-V21 là chủng vi khuẩn duy nhất biểu hiện hoạt tính kháng cả hai chủng nấm kiểm định (thuộc *A. niger* và *F. oxysporum*) với đường kính vòng phân giải lần lượt là 9 và 3 mm. Chủng PGP-V5 cũng biểu hiện hoạt tính kháng nấm *A. niger*, tuy nhiên đường kính vòng kháng khuẩn tương đối nhỏ và không đáng kể (bảng 5).

Bảng 5. Thử nghiệm hoạt tính kháng nấm bệnh thực vật của các chủng vi khuẩn dựa trên đường kính vòng vô khuẩn (D-d, mm).

Vi sinh vật kiểm định	Đường kính vòng vô khuẩn (D-d, mm)		
	<i>B. subtilis</i> PGP-V5	<i>Enterobacter</i> sp. PGP-V20	<i>Bacillus</i> sp. PGP-V21
<i>A. niger</i>	1	0	9
<i>F. oxysporum</i>	0	0	3

Kết quả thử nghiệm (bảng 5) cho thấy, chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. PGP-V21 không chỉ có đặc tính kích thích sinh trưởng trực tiếp (khả năng hòa tan phosphate vô cơ và sinh chất kích thích sinh trưởng) mà còn có tác dụng kích thích gián tiếp (khả năng kháng nấm bệnh thực vật). Năm 2012, các tác giả tại Ấn Độ đã phân lập được 2 chủng vi khuẩn từ vùng rễ cây nghệ vàng, xác định thuộc các loài *Pseudomonas fluorescens* và *Bacillus subtilis*, có khả năng đối kháng nấm *Pythium aphanidermatum* gây bệnh thối rễ. Từ đó, các tác giả đã thử nghiệm và nhận thấy các chủng vi khuẩn này có tác dụng làm giảm đáng kể tỷ lệ nhiễm bệnh thối rễ của cây nghệ vàng ở quy mô nhà kính và đồng ruộng [22]. Như vậy có thể nói, trong nghiên cứu này, chúng tôi đã lựa chọn được chủng *Bacillus* sp. PGP-V21, là một chủng PGPR với tiềm năng ứng dụng cao trên các đối tượng cây trồng, đặc biệt là cây nghệ vàng tại Việt Nam.

Kết luận

Qua sàng lọc và nghiên cứu đã xác định được 3 chủng vi khuẩn có khả năng hòa tan phosphate vô cơ và sinh chất kích thích sinh trưởng thực vật (IAA) từ đất vùng rễ cây nghệ vàng (*C. longa* L.) tại Hưng Yên là *Bacillus* sp. PGP-V5, *Enterobacter* sp. PGP-V20 và *Bacillus* sp. PGP-V21. Chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. V21 còn biểu hiện hoạt tính kháng nấm bệnh thực vật, vì vậy có tiềm năng ứng dụng cao trong sản xuất các chế phẩm vi sinh kích thích sinh trưởng và bảo vệ thực vật.

LỜI CẢM ƠN

Công trình được tiến hành dưới sự tài trợ của đề tài “Nghiên cứu sản xuất và ứng dụng chế phẩm vi sinh vật phân hủy photpho hữu cơ (OP) góp phần giảm thiểu ô nhiễm môi trường và tăng năng suất cây trồng”, thuộc Chương trình Công nghệ sinh học nông nghiệp - thủy sản cấp nhà nước (giai đoạn 2018-2020). Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] L. Philippot., et al. (2013), “Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere”, *Nature Reviews Microbiology*, **11**(11), p.789.
- [2] V. Nihorimbere., et al. (2011), “Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health”, *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, **15**(2), pp.327-337.
- [3] L. Hiltner (1904), “Über neuere erfahrungen und probleme auf dem gebiet der boden bakteriologie und unter besonderer berucksichtigung der grundung und branche”, *Arb. Deut. Landw. Ges.*, **98**, pp.59-78.
- [4] B.R. Glick. (2012), “Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications”, *Scientifica*, **2012**, p.15.
- [5] J.K. Vessey (2003), “Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers”, *Plant and Soil*, **255**(2), pp.571-586.
- [6] M. Lucy, et al. (2004), “Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria”, *Antonie Van Leeuwenhoek*, **86**(1), pp.1-25.
- [7] S. Compant, et al. (2010), “Plant growth-promoting bacteria in the rhizo-and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization”, *Soil Biology and Biochemistry*, **42**(5), pp.669-678.
- [8] A. Bafana, R. Lohiya (2013), “Diversity and metabolic potential of culturable root-associated bacteria from *Origanum vulgare* in sub-Himalayan region”, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **29**, pp.63-74.

- [9] N.A. Luu-dam, et al. (2016), “Ethnobotany of colorant plants in ethnic communities in Northern Vietnam”, *Anthropology*, **4**(1), doi:10.4172/2332-0915.1000158.
- [10] H. Chung, et al. (2005), “Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea”, *Soil Biology and Biochemistry*, **37**(10), pp.1970-1974.
- [11] F.C. Gerretsen (1948), “The influence of microorganisms on the phosphate intake by the plant”, *Plant and Soil*, **1**(1), pp.51-81.
- [12] S.C. Verma, et al. (2001), “Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice”, *Journal of Biotechnology*, **91**(2-3), pp.127-141.
- [13] A. Ehmann (1977), “The Van Urk-Salkowski reagent - a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives”, *Journal of Chromatography A*, **132**(2), pp.267-276.
- [14] I. Ahmad, et al. (1998), “Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties”, *Journal of Ethnopharmacology*, **62**(2), pp.183-193.
- [15] P.H. Sneath, et al. (1986), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, **2**, Springer.
- [16] M.S. Mirza, et al. (2001), “Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro”, *Plant and Soil*, **237**(1), pp.47-54.
- [17] T. Hall, et al. (2011), “BioEdit: an important software for molecular biology”, *GERF Bull. Biosci.*, **2**(1), pp.60-61.
- [18] K. Tamura, M. Nei (1993), “Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees”, *Molecular Biology and Evolution*, **10**(3), pp.512-526.
- [19] S. Kumar, et al. (2018), “MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms”, *Molecular Biology and Evolution*, **35**(6), pp.1547-1549.
- [20] C. Brady, et al. (2013), “Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA)”, *Systematic and Applied Microbiology*, **36**(5), pp.309-319.
- [21] A. Kumar, et al. (2016), “Isolation of plant growth promoting rhizobacteria and their impact on growth and curcumin content in *Curcuma longa* L.”, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **8**, pp.1-7.
- [22] K. Kavitha, et al. (2012), “Rhizobacterial-mediated induction of defense enzymes to enhance the resistance of turmeric (*Curcuma longa* L.) to *Pythium aphanidermatum* causing rhizome rot”, *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, **45**(2), pp.199-219.

Xây dựng mô hình chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* cho nấm dược liệu *Cordyceps militaris* G12

Trần Văn Tuấn^{1,2*}, Vũ Xuân Tạo^{2,3}

¹Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein,
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

³Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ KH&CN

Ngày nhận bài 25/3/2020; ngày gửi phản biện 27/3/2020; ngày nhận phản biện 24/4/2020; ngày chấp nhận đăng 29/4/2020

Tóm tắt:

Cordyceps militaris là một loài nấm dược liệu quý và đã được chứng minh là có chứa nhiều hoạt chất có lợi cho sức khỏe, như adenosine, cordycepin, pentostatin, polysaccharide, carotenoid. Do đó, loài nấm này gần đây được coi là mô hình triển vọng để nghiên cứu cơ chế phân tử của quá trình hình thành quả thể và sinh tổng hợp các chất có hoạt tính sinh học. Phát triển các hệ thống chuyển gen hiệu quả ở *C. militaris* sẽ góp phần quan trọng trong việc thực hiện các nghiên cứu cải biến di truyền loài nấm dược liệu này. Trong nghiên cứu hiện tại, một chủng *C. militaris* thu thập tại Việt Nam được định danh chính xác về mặt phân loại dựa trên các đặc điểm hình thái và giải trình tự cùng ITS của rDNA. Chủng này được đặt tên là *C. militaris* G12 và được sử dụng để nghiên cứu chuyển gen. Chủng *C. militaris* G12 được đánh giá về mức độ miễn cảm với ba loại kháng sinh phổ biến dùng trong chuyển gen là hygromycin, nourseothricin và phleomycin. Kết quả cho thấy chủng *C. militaris* G12 chỉ bị ức chế bởi hygromycin ở nồng độ 200 µg/ml. Hiệu quả chuyển gen vào chủng *C. militaris* G12 nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* với marker chọn lọc là gen kháng hygromycin đạt trung bình 800 thể chuyển gen/10⁶ bào tử. Việc chuyển thành công gen chỉ thị *DsRed* và *GFP* vào hệ gen của *C. militaris* G12 đã được xác nhận bằng PCR với các cặp mồi đặc hiệu.

Từ khóa: chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*, *Cordyceps militaris*, marker kháng hygromycin, vector nhệ thể.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Cordyceps militaris là một loài nấm ký sinh, được sử dụng nhiều trong y học cổ truyền như một loại dược liệu quý. Có hơn 400 loài *Cordyceps* đã được tìm thấy và mô tả. Tuy nhiên chỉ một số loài nhất định được nuôi trồng phổ biến ở điều kiện nhân tạo để sản xuất sinh khối quả thể [1-3]. Nấm *C. militaris* đã được chứng minh là có khả năng kháng khuẩn, kháng nấm, kháng ung thư, kháng viêm, điều hòa miễn dịch, chống oxy hóa... [1-6]. Điều đó mở ra nhiều tiềm năng ứng dụng cho loài nấm này phục vụ chăm sóc sức khỏe con người. Gần đây, hai hợp chất có hoạt tính kháng ung thư là cordycepin và pentostatin do một nhóm các gen chuyên biệt chịu trách nhiệm sinh tổng hợp đã được phát hiện có mặt trong hệ gen của *C. militaris* [7]. Tuy nhiên, năng lực sinh tổng hợp các chất có lợi của các chủng tự nhiên thường tương đối thấp. Việc can thiệp vào hệ gen

nấm bằng kỹ thuật di truyền có thể giúp tăng hiệu suất sinh tổng hợp các chất có hoạt tính sinh học mong muốn. Một trong những phương pháp chuyển gen phổ biến hỗ trợ cho kỹ thuật chỉnh sửa hệ gen ở nấm là phương pháp chuyển thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Phương pháp này đã được chứng minh là rất hiệu quả đối với nhiều loài nấm sợi khác nhau [8]. Cho đến nay, một số nghiên cứu về chuyển gen vào nấm *C. militaris* sử dụng vi khuẩn *A. tumefaciens* đã được thực hiện thành công ở Trung Quốc. Tuy nhiên, hiệu quả chuyển gen vào *C. militaris* chưa cao và còn tùy thuộc vào chủng nấm được sử dụng [9, 10]. Trong nghiên cứu này, chủng nấm *C. militaris* G12 phân lập tại Việt Nam được xác nhận chính xác về mặt phân loại để phục vụ cho nghiên cứu chuyển gen. Việc chuyển gen vào chủng *C. militaris* G12 đã thành công với phương pháp chuyển gen nhờ vi khuẩn *A. tumefaciens* sử dụng marker chọn lọc là gen kháng kháng sinh hygromycin.

* Tác giả liên hệ: Email: tuantran@vnu.edu.vn

Establishment of an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer approach for the medicinal fungus *Cordyceps militaris* G12

Van Tuan Tran^{1,2*}, Xuan Tao Vu^{2,3}

¹Faculty of Biology, University of Science, Vietnam National University, Hanoi

²Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology, University of Science, Vietnam National University, Hanoi

³Center of Experimental Biology, National Center for Technological Progress, Ministry of Science and Technology

Received 25 March 2020; accepted 29 April 2020

Abstract:

Cordyceps militaris is a valuable edible and medicinal mushroom, which has been demonstrated to possess beneficial ingredients such as adenosine, cordycepin, pentostatin, polysaccharides, and carotenoids. Therefore, this fungus represents a promising cell factory for investigating the molecular mechanism of fruiting body formation and biosynthesis of bioactive metabolites. The development of efficient transformation systems in *C. militaris* plays an important role in the genetic manipulation of this fungus. In the present study, a commercial strain of *C. militaris* isolated in Vietnam has been identified on the basis of morphological characteristics and the ITS (internal transcribed spacer) sequence of ribosomal DNA. This strain was designated as G12 and employed for the genetic transformation. Assays for antifungal sensitivity of the *C. militaris* G12 strain towards three antifungal compounds including hygromycin, nourseothricin, and phleomycin revealed that this *C. militaris* strain was inhibited only by hygromycin at the concentration of 200 µg/ml. Under optimised conditions for the genetic transformation of the strain G12 using the hygromycin resistance marker and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation method, the transformation efficiency could reach about 800 transformants per 10⁶ spores. Further, the transfer of the *DsRed* and *GFP* reporter genes into the genome of *C. militaris* G12 has been demonstrated to be successful by PCR analyses with the gene-specific primers.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, binary vectors, *Cordyceps militaris*, hygromycin resistance marker.

Classification number: 4.6

Vật liệu và phương pháp

Vật liệu nghiên cứu

Mẫu quả thể nấm (ký hiệu G12) thu thập từ cơ sở nuôi trồng nấm *C. militaris* ở Hà Nội được dùng để phân lập chủng nấm thuần khiết dùng cho nghiên cứu.

Vector nhị thể pPK2-Red [11] và pGreen2 [12] mang cấu trúc gen kháng hygromycin và gen chỉ thị *DsRed* hoặc *GFP* dưới sự điều hòa của promoter *gpdA* từ nấm *Aspergillus nidulans* được cung cấp bởi Phòng Genomic, Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

Các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu này được liệt kê chi tiết trong bảng 1.

Bảng 1. Các mồi sử dụng trong nghiên cứu.

Tên mồi	Trình tự (5'-3')	Kích thước sản phẩm (bp)	Nguồn tham khảo
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	~550	[13]
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
GFP-F	ATGGTGAGCAAGGGCGAG	720	[14]
GFP-R	TCACCTGTACAGCTCGTCCATGC		
DsRed-F	AACCTCGAGCACGTGCTTAAGGAT ATCATGGCCTCCTCCGAGG	729	[14]
DsRed-R	AAGGATCCCCGCGGAGCTCGAT ATCCTACAGGAACAGGTGGTGGC		
HPH-F	CCGGTGACTCTTTCTGGC	1890	[11]
HPH-R	CTATTCCTTGCCCTCGG		

Phân lập và quan sát hình thái

Tách 1 phần sợi quả thể nấm, làm sạch sơ bộ bằng nước cất và khử trùng bề mặt quả thể bằng cồn. Sau đó phân sợi quả thể được cắt bỏ ở hai đầu, phần giữa được cắt thành các lát nhỏ và đặt lên môi trường PDA (potatose dextrose agar) chứa chloramphenicol (100 µg/ml). Kháng sinh chloramphenicol có tác dụng ức chế sinh trưởng của vi khuẩn. Đĩa được ủ ở 23°C trong tối 5 ngày. Hệ sợi nấm màu trắng xuất hiện từ các lát quả thể được thuần khiết bằng phương pháp tách bào tử đơn và cấy chuyển sang đĩa môi trường PDA mới. Chủng thuần khiết được nuôi cấy trực tiếp trên tiêu bản hiển vi vô trùng có chứa môi trường PDA để quan sát hình thái của hệ sợi nấm và cuống sinh bào tử dưới kính hiển vi quang học [11].

Xác nhận chủng G12 bằng giải trình tự vùng ITS

Chủng nấm G12 được nuôi trong môi trường dịch thể PDB (potato dextrose broth) để thu hệ sợi dùng cho tách chiết DNA tổng số. Việc tách chiết DNA tổng số được thực hiện theo quy trình nhóm nghiên cứu đã công bố trước đây [14]. DNA tổng số được dùng làm khuôn để khuếch đại

vùng ITS của rDNA bằng PCR với cặp mồi đa năng ITS1/ITS4 (bảng 1). Sản phẩm PCR tinh sạch được giải trình tự bởi công ty 1st BASE (Singapore). Trình tự ITS được so sánh với dữ liệu trong Ngân hàng gen quốc tế (GenBank) sử dụng chương trình BLAST và phân tích vẽ cây phát sinh chủng loại bằng phần mềm MEGA7.

Đánh giá mức độ mẫn cảm kháng sinh của chủng G12

Môi trường PDA được bổ sung kháng sinh hygromycin (50, 100, 150, 200 µg/ml), nourseothricin (50, 100, 200 và 300 µg/ml) hoặc phleomycin (50, 100, 200, 300 µg/ml). Nhỏ 10 µl dịch bào tử nấm (10^6 bào tử/ml) lên môi trường và đĩa được ủ ở 23°C trong 7 ngày. Nồng độ kháng sinh ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của chủng G12 sẽ được sử dụng để chuyển gen.

Chuyển gen và xác nhận các thể chuyển gen

Quy trình chuyển gen vào *C. militaris* G12 nhờ vi khuẩn *A. tumefaciens* được tiến hành theo Zheng và cộng sự (2011) [9] với sự điều chỉnh về thời gian đồng nuôi cấy là 2,5 ngày. Cụ thể như sau: vector nhũ thể pPK2-Red (hoặc pGreen2) được biến nạp vào chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* AGL1 bằng xung điện sử dụng hệ thống Bio-Rad Gene Pulse Xcell™ Electroporation System. Vi khuẩn *A. tumefaciens* AGL1 mang vector pPK2-Red được sử dụng cho chuyển gen vào *C. militaris* G12. Dịch vi khuẩn AGL1 được pha loãng và nuôi cấy trong môi trường có bổ sung acetosyringone (200 µM) để đạt mật độ quang (OD) khoảng 0,6-0,8. Vi khuẩn sau đó được trộn với bào tử nấm (10^6 bào tử/ml) theo tỷ lệ 1:1 và được trải đều lên màng giấy lọc cellulose phủ sẵn trên đĩa môi trường cấy ứng. Đĩa được ủ trong tối ở 23°C trong 2,5 ngày để kích hoạt quá trình chuyển gen từ *A. tumefaciens* sang chủng *C. militaris* G12. Màng giấy lọc sau đó được chuyển sang môi trường PDA có bổ sung kháng sinh hygromycin (200 µg/ml) để chọn lọc các khuẩn lạc nấm chuyển gen và bổ sung kháng sinh cefotaxime (300 µg/ml) để diệt vi khuẩn *A. tumefaciens*. Đĩa được ủ ở nhiệt độ 23-25°C trong 7 ngày.

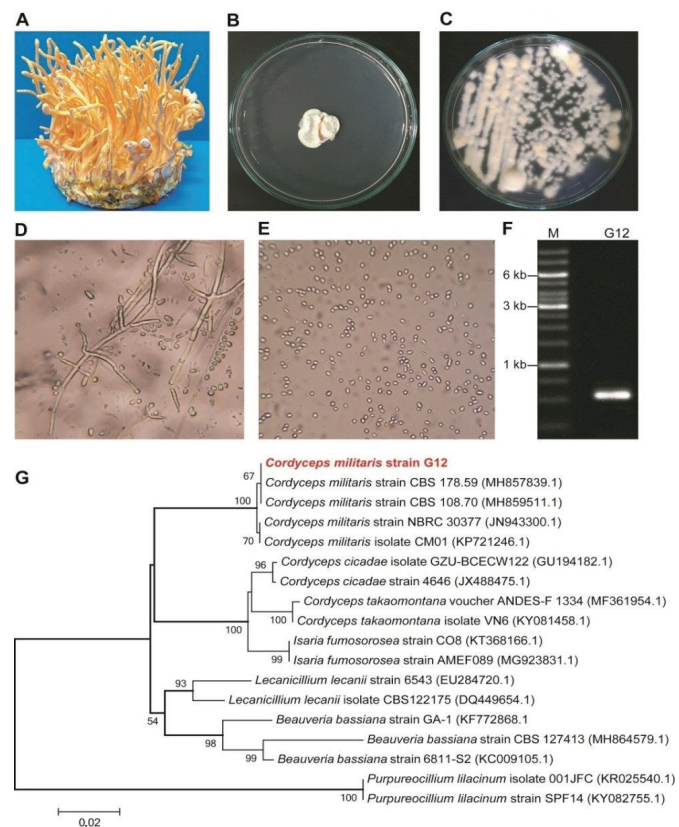
Các thể chuyển gen sau đó được thuần khiết và DNA tổng số được tách chiết phục vụ cho xác nhận thể chuyển gen bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu HPH-F/HPH-R và DsRed-F/DsRed-R hoặc GFP-F/GFP-R (bảng 1).

Kết quả và thảo luận

Chủng G12 được xác nhận thuộc loài *C. militaris*

Từ mẫu quả thể (hình 1A), chủng G12 đã được phân lập ở dạng thuần khiết. Sau 5 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA, chủng nấm sinh trưởng tạo hệ sợi màu trắng. Quan sát dưới kính hiển vi, hệ sợi bao gồm cấu trúc phân đốt bởi các vách ngăn (hình 1B, C, D). Sau 7 ngày nuôi cấy, chủng G12 hình thành bào tử dạng trứng (hình 1E). Dựa

trên mẫu quả thể màu vàng điển hình và các đặc điểm hình thái quan sát được có thể khẳng định chủng G12 thuộc chi *Cordyceps* [15, 16]. Để đảm bảo độ chính xác của chủng G12 dùng cho nghiên cứu chuyển gen, chúng tôi tiến hành giải trình tự vùng ITS của rDNA. So với các gen 18S rRNA và 28S rRNA của rDNA thì vùng ITS (gồm ITS1; 5,8S rRNA; ITS2) ở nấm có mức độ biến đổi cao hơn giữa các loài có quan hệ gần gũi với nhau. Do đó, vùng trình tự này được sử dụng phổ biến trong phân loại nấm [17]. Khuếch đại vùng ITS với cặp mồi ITS1/ITS4 (bảng 1) từ DNA tổng số của chủng G12 chỉ cho một băng DNA duy nhất với kích thước khoảng 550 bp (hình 1F). Trình tự ITS của chủng G12 tương đồng 100% với các trình tự ITS của *C. militaris* có trong cơ sở dữ liệu GenBank. Phân tích mô phỏng cây phát sinh chủng loại với phần mềm MEGA7 xác nhận chủng thuộc loài *C. militaris* (hình 1G).

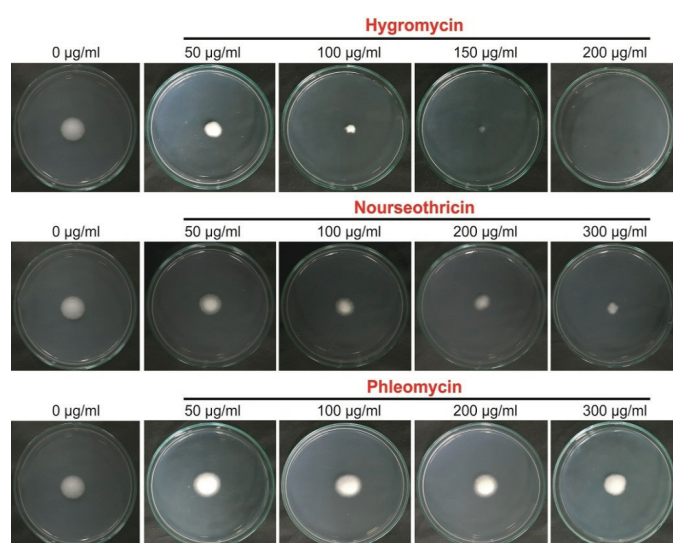


Hình 1. Phân lập và định danh chủng *C. militaris* G12. (A) Quả thể nấm; (B, C) Chủng G12 trên môi trường PDA; (D, E) Cấu trúc hệ sợi và bào tử; (F, G) Phân tích phát sinh chủng loại chủng G12 dựa trên trình tự ITS của rDNA.

Chủng *C. militaris* G12 mẫn cảm với kháng sinh hygromycin

Để lựa chọn được loại kháng sinh cũng như nồng độ kháng sinh thích hợp sử dụng trong sàng lọc các thể chuyển gen, chủng *C. militaris* G12 được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung kháng sinh hygromycin, nourseothricin hoặc

phleomycin với các nồng độ khác nhau. Cả ba kháng sinh này đều là những kháng sinh được sử dụng phổ biến trong nghiên cứu chuyển gen ở nấm [8, 9, 11, 12, 18, 19]. Sau 7 ngày nuôi ở nhiệt độ 25°C, chủng *C. militaris* G12 kháng với nourseothricin và phleomycin ở các nồng độ tương đối cao là 50, 100, 200 và 300 µg/ml. Tuy nhiên, sự sinh trưởng của chủng G12 bị ức chế hoàn toàn bởi hygromycin ở nồng độ 200 µg/ml (hình 2). Các nghiên cứu gần đây cho thấy nhiều chủng thuộc loài *C. militaris* kháng với kháng sinh hygromycin, nhưng một số chủng lại mẫn cảm với hygromycin [9, 10]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi chỉ ra rằng chủng *C. militaris* G12 mẫn cảm với hygromycin ở nồng độ 200 µg/ml và kháng sinh này phù hợp để sử dụng cho các thí nghiệm chuyển gen vào chủng G12.

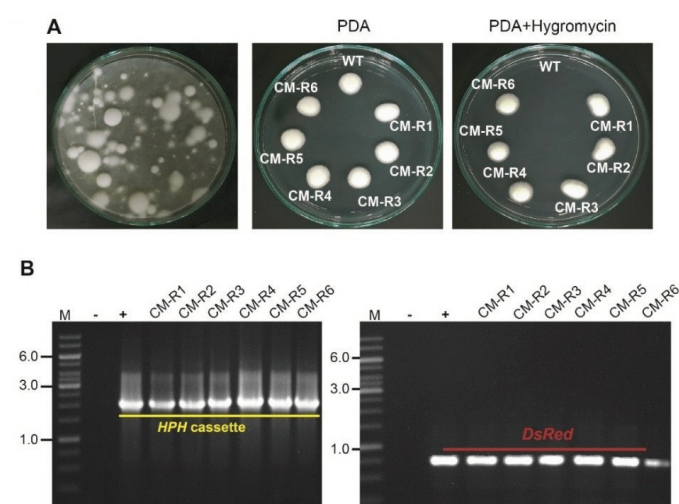


Hình 2. Khả năng mẫn cảm kháng sinh của chủng *C. militaris* G12.

Chuyển gen vào chủng *C. militaris* G12 sử dụng vi khuẩn *A. tumefaciens*

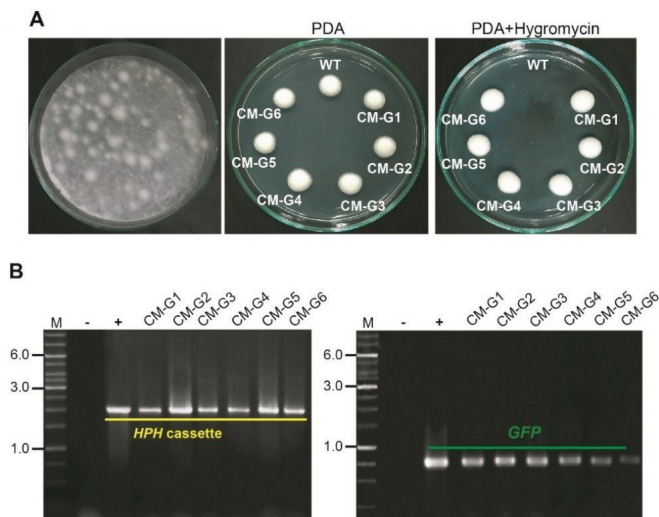
Để thử nghiệm chuyển gen vào chủng G12 nhờ *A. tumefaciens*, vector nhị thể pPK2-Red được sử dụng. Sau quy trình chuyển gen, chúng tôi đã thu được rất nhiều khuẩn lạc xuất hiện trên môi trường chọn lọc PDA có bổ sung kháng sinh hygromycin (hình 3A). Sáu khuẩn lạc ngẫu nhiên (ký hiệu CM-R1 đến CM-R6) được chọn để thuần khiết, xác nhận lại khả năng kháng hygromycin. DNA tổng số của 6 chủng được tách chiết để dùng cho PCR xác nhận sự chuyển gen thành công. Hai cặp mồi HPH-R/HPH-F đặc hiệu cho gen kháng hygromycin và DsRed-F/DsRed-R đặc hiệu cho gen chỉ thị *DsRed* (bảng 1) được sử dụng cho PCR. Kết quả nuôi cấy trên môi trường chọn lọc xác nhận cả 6 chủng chuyển gen đều kháng với hygromycin (hình 3A). Thêm vào đó, kết quả PCR cũng chỉ ra rằng gen kháng hygromycin là *HPH* và gen chỉ thị *DsRed* từ vi khuẩn *A. tumefaciens* đã được chuyển và tích hợp thành công vào

hệ gen của cả 6 chủng với sự xuất hiện của các băng DNA có kích thước tương ứng (hình 3B). Như vậy, chúng tôi đã thành công trong việc chuyển gen vào chủng *C. militaris* G12 sử dụng vi khuẩn *A. tumefaciens* với marker chọn lọc là gen kháng hygromycin. Hiệu quả chuyển gen trong nghiên cứu này đạt trung bình 800 thể chuyển gen cho 10^6 bào tử và cao hơn 1,3 lần so với công bố của Zheng và cộng sự (2011) [9]. Kết quả đạt được cao hơn nghiên cứu trước đây có thể là do thời gian đồng nuôi cấy trong quy trình chuyển gen này kéo dài hơn 0,5 ngày và chủng G12 có lẽ cho hiệu quả chuyển gen tốt hơn. Một ưu điểm nữa của chủng G12 là nồng độ hygromycin sử dụng cho chuyển gen thấp hơn 2 lần so với chủng *C. militaris* JM4 trong nghiên cứu của Zheng và cộng sự (2011).



Hình 3. Xác nhận thể chuyển gen *DsRed*. (A) Kết quả chuyển gen *DsRed* vào chủng *C. militaris* G12 sử dụng vi khuẩn *A. tumefaciens*; (B) Xác nhận chuyển gen thành công bằng PCR với cặp mồi HPH-R/HPH-F và DsRed-F/DsRed-R, trong đó (-) là đối chứng âm, (+) là đối chứng dương.

Kết quả tương tự cũng nhận được khi thực hiện chuyển gen *GFP* vào chủng *C. militaris* G12 sử dụng vector nhị thể pGreen2 (hình 4A). Các chủng (ký hiệu CM-G1 đến CM-G6) được xác nhận chuyển gen thành công bằng PCR sử dụng cặp mồi HPH-F/HPH-R và GFP-F/GFP-R. Kết quả chỉ ra rằng, cả 6 chủng chuyển gen được lựa chọn ngẫu nhiên đều xuất hiện 2 băng DNA tương ứng với gen kháng hygromycin *HPH* và gen chỉ thị *GFP* (hình 4B). Như vậy, kết quả đã khẳng định việc chuyển gen thành công vào chủng *C. militaris* G12 khi sử dụng gen kháng kháng sinh hygromycin. Mô hình chuyển gen thiết lập cho chủng *C. militaris* G12 có nguồn gốc Việt Nam sẽ là cơ sở quan trọng hỗ trợ cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm kích hoạt khả năng sinh tổng hợp các hoạt chất có lợi ở loài nấm được liệu quan trọng này.



Hình 4. Xác nhận thể chuyển gen GFP. (A) Kết quả chuyển gen GFP vào chủng *C. militaris* G12 sử dụng vi khuẩn *A. tumefaciens*; (B) Xác nhận chuyển gen thành công bằng PCR với cặp mồi HPH-F/HPH-R và GFP-F/GFP-R.

KẾT LUẬN

Chủng G12 phân lập tại Việt Nam được xác nhận chính xác thuộc loài *Cordyceps militaris* dựa trên đặc điểm hình thái và giải trình tự vùng ITS của rDNA. Chủng *C. militaris* G12 bị ức chế hoàn toàn bởi kháng sinh hygromycin ở nồng độ 200 $\mu\text{g/ml}$ và không mẫn cảm với kháng sinh nourseothricin và phleomycin. Nghiên cứu này đã chứng minh việc chuyển gen thành công vào chủng G12 có nguồn gốc Việt Nam nhờ vi khuẩn *A. tumefaciens* với marker chọn lọc là gen kháng hygromycin. Hiệu quả chuyển gen vào chủng *C. militaris* G12 đạt trung bình 800 thể chuyển gen/ 10^6 bào tử.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí bởi Đại học Quốc gia Hà Nội thông qua đề tài mã số QG.20.19 “Nghiên cứu phát triển công nghệ mới để lai tạo, phục hồi và duy trì các chủng nấm dược liệu *Cordyceps militaris* có hiệu suất cao về hình thành quả thể và sinh tổng hợp cordycepin”. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S.K. Das, M. Masuda, A. Sakurai, M. Sakakibara (2010), “Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: current state and prospects”, *Fitoterapia*, **81**(8), pp.961-968.
- [2] R.R. Paterson (2008), “*Cordyceps*: a traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory?”, *Phytochemistry*, **69**(7), pp.1469-1495.
- [3] B. Shrestha, S.K. Han, W.H. Lee, S.K. Choi, J.O. Lee, J.M. Sung (2005), “Distribution and *in vitro* fruiting of *Cordyceps militaris* in Korea”, *Mycobiology*, **33**(4), pp.178-181.
- [4] K. Yue, M. Ye, Z. Zhou, W. Sun, X. Lin (2013), “The genus *Cordyceps*: a chemical and pharmacological review”, *Journal of Pharmacy and*

Pharmacology, **65**(4), pp.474-493.

- [5] Y. Ohta, J.B. Lee, K. Hayashi, A. Fujita, D.K. Park, T. Hayashi (2007), “*In vivo* anti-influenza virus activity of an immunomodulatory acidic polysaccharide isolated from *Cordyceps militaris* grown on germinated soybeans”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**(25), pp.10194-10199.
- [6] P. Qin, X. Li, H. Yang, Z.Y. Wang, D. Lu (2019), “Therapeutic potential and biological applications of *Cordycepin* and metabolic mechanisms in *Cordycepin*-producing fungi”, *Molecules*, **24**(12), pp. 2231.
- [7] Y. Xia, F. Luo, Y. Shang, P. Chen, Y. Lu, C. Wang (2017), “Fungal cordycepin biosynthesis is coupled with the production of the safeguard molecule pentostatin”, *Cell Chemical Biology*, **24**(12), pp.1479-1489.
- [8] C.B. Michielse, P.J. Hooykaas, C.A. van den Hondel, A.F. Ram (2005), “*Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi”, *Current Genetics*, **48**(1), pp.1-17.
- [9] Z. Zheng, C. Huang, L. Cao, C. Xie, R. Han (2011), “*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in medicinal fungus *Cordyceps militaris*”, *Fungal Biology*, **115**(3), pp.265-274.
- [10] B.X. Chen, T. Wei, Z.W. Ye, F. Yun, L.Z. Kang, H.B. Tang, L.Q. Guo, J.F. Lin (2018), “Efficient CRISPR-Cas9 gene disruption system in edible-medicinal mushroom *Cordyceps militaris*”, *Frontiers in Microbiology*, **9**, pp.1157.
- [11] T.X. Vu, T.T. Ngo, L.T.D. Mai, T.T. Bui, D.H. Le, H.T.V. Bui, H.Q. Nguyen, B.X. Ngo, V.T. Tran (2018), “A highly efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for the postharvest pathogen *Penicillium digitatum* using *DsRed* and *GFP* to visualize citrus host colonization”, *Journal of Microbiological Methods*, **144**, pp.134-144.
- [12] V.T. Tran, S.A. Braus-Stromeier, H. Kusch, M. Reusche, A. Kaever, A. Kühn, O. Valerius, M. Landesfeind, K. Aßhauer, M. Tech, K. Hoff, T. Pena-Centeno, M. Stanke, V. Lipka, G.H. Braus (2014), “*Verticillium* transcription activator of adhesion Vta2 suppresses microsclerotia formation and is required for systemic infection of plant roots”, *New Phytologist*, **202**(2), pp.565-581.
- [13] T.J. White, T. Bruns, S.J.W.T. Lee, J. Taylor (1990), “Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics”, *PCR protocols: a guide to methods and applications*, **18**(1), pp.315-322.
- [14] K.T. Nguyen, Q.N. Ho, T.H. Pham, T.N. Phan, V.T. Tran (2016), “The construction and use of versatile binary vectors carrying *pyrG* auxotrophic marker and fluorescent reporter genes for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Aspergillus oryzae*”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **32**(12), pp.204-212.
- [15] H.L. Barnett, B.B. Hunter (1972), *Illustrated genera of imperfect fungi*, Publishing Company.
- [16] J.J. Luangsa-ard, K. Tasanathai, S. Mongkolsamrit, N.L. Hywel-Jones (2008), *Atlas of invertebrate-pathogenic fungi of Thailand*, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand.
- [17] J. Curran, F. Driver, J.W.O. Ballard, R.J. Milner (1994), “Phylogeny of *Metarhizium*: analysis of ribosomal DNA sequence data”, *Mycological Research*, **98**(5), pp.547-552.
- [18] M.J. De Groot, P. Bundock, P.J. Hooykaas, A.G. Beijersbergen (1998), “*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi”, *Nature Biotechnology*, **16**(9), pp.839-842.
- [19] P.J. Punt, C.A. van den Hondel (1992), “Transformation of filamentous fungi based on hygromycin B and phleomycin resistance markers”, *Methods in Enzymology*, **216**, pp.447-457.

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 thủy (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 Tòa 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 thứ tự xuất hiện (^{1,2,3...}) và được trình bày ngay ở cuối trang viết (footnote). Các tài liệu tham khảo được đánh số theo thứ tự xuất hiện để chỉ dẫn chúng được trích dẫn ở đâu trong bài báo. Số thứ tự được đánh trong ngoặc vuông, ví dụ: [3] với 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, Tòa 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 thủy lợi; kỹ thuật địa chất công trình
- 2.2. Kỹ thuật điện, kỹ thuật điện tử, kỹ thuật thông tin
- 2.3. Kỹ thuật cơ khí, chế tạo máy
- 2.4. Kỹ thuật hóa học
- 2.5. Kỹ thuật vật liệu và luyện kim
- 2.6. Kỹ thuật y học
- 2.7. Kỹ thuật môi trường
- 2.8. Công nghệ sinh học công nghiệp
- 2.9. Công nghệ nano
- 2.10. Kỹ thuật thực phẩm và đồ uống
- 2.11. Các lĩnh vực khác của khoa học kỹ thuật và công nghệ

3. Khoa học y - dược

- 3.1. Y học cơ sở
- 3.2. Y học lâm sàng
- 3.3. Y học dự phòng
- 3.4. Dược học
- 3.5. Các lĩnh vực khác của 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 62 - Number 5 - May 2020

Nghiên cứu sự biểu hiện mRNA một số gen liên quan đến con đường *JAK/STAT* và biểu hiện viêm ở bệnh nhân ung thư hạch.

Nguyễn Thị Xuân, Trần Thị Phương Thảo, Lê Phương Hà, Hoàng Văn Tông

So sánh các kỹ thuật định danh vi khuẩn *B. pseudomallei* trong xét nghiệm chẩn đoán bệnh Whitmore.

Hoàng Việt Hà, Bùi Nguyễn Hải Linh, Trần Thị Lệ Quyên, Phạm Thị Huyền, Hoàng Quang Trung, Trần Anh Đào, Nguyễn Vũ Trung, Trịnh Thành Trung

Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng, mô bệnh học u lympho ác tính không Hodgkin vùng đầu cổ.

Nguyễn Thanh Bình, Tống Xuân Thắng

Kết quả phẫu thuật chuyển ngón chân phục hồi ngón tay cái.

Lê Văn Đoàn, Ngô Thái Hưng, Nguyễn Việt Tân, Nguyễn Việt Nam, Chế Đình Nghĩa, Nguyễn Văn Phú

Báo cáo kết quả 5 trường hợp phẫu thuật u tủy sống đoạn ngực - lưng tại Bệnh viện Quân y 7A.

Lê Quang Trí

Hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết ethanol thân rễ Ngải tím (*Kaempferia parviflora* Wall. Ex Baker), Ngải trắng (*Curcuma aromatica* Salisb.), Gừng gió (*Zingiber zerumbet* Sm.).

Nguyễn Trọng Tuấn, Phạm Thị Sánh

Ảnh hưởng của giống và vùng địa lý đến chất lượng hạt chè và dầu hạt chè *Camellia sinensis* O. Kuntze ở Việt Nam.

Phan Thị Phương Thảo, Trần Thị Thu Hằng, Giang Trung Khoa, Hoàng Đình Hòa, Vũ Hồng Sơn

Hàm lượng dinh dưỡng và enzyme của một số giống đậu Nho nhe (*Vigna umbellata*) thu tại tỉnh Điện Biên, Sơn La và Lai Châu.

Nguyễn Hữu Quân, Nguyễn Thị Ngọc Lan, Chu Hoàng Mậu

Khả năng sinh sản và ưu thế lai của vịt bố mẹ (CT12xCT34).

Vũ Đức Cảnh, Phạm Thùy Linh, Nguyễn Quý Khiêm, Nguyễn Ngọc Dung, Nguyễn Thị Nga, Trần Thị Thu Hằng, Phạm Thị Xuân, Khuất Thị Tuyên, Hoàng Đình Trường, Phùng Duy Độ

Hiệu quả ức chế virus gây bệnh Gumboro của interferon trên gà thực nghiệm.

Nguyễn Thị Thanh Giang, Nguyễn Đăng Quân, Hồ Quảng Đồ

Sàng lọc và nghiên cứu một số chủng vi khuẩn vùng rễ kích thích sinh trưởng phân lập từ cây nghệ vàng (*Curcuma longa* L.) tại Việt Nam.

Hoàng Kim Chi, Nguyễn Đình Tuấn, Trần Hồ Quang, Nguyễn Thành Lam, Lê Hữu Cường, Trần Thị Hồng Hà, Lê Mai Hương, Trần Thị Như Hằng

Xây dựng mô hình chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* cho nấm dược liệu *Cordyceps militaris* G12.

Trần Văn Tuấn, Vũ Xuân Tào

1 Expression of genes involving in *JAK/STAT* signaling pathway and inflammation in patients with lymphoma.

Thi Xuan Nguyen, Thi Phuong Thao Tran, Phuong Ha Le, Van Tong Hoang

6 Comparison of different identification methods for *B. pseudomallei* in the diagnosis of Whitmore's disease.

Viet Ha Hoang, Nguyen Hai Linh Bui, Thi Le Quyen Tran, Thi Huyen Pham, Quang Trung Hoang, Anh Dao Tran, Vu Trung Nguyen, Thanh Trung Trinh

13 Assessment of clinical features and histopathologic type of non-Hodgkin lymphoma in head and neck.

Thanh Binh Nguyen, Xuan Thang Tong

17 The results of toe-to-thumb transfer surgery.

Van Doan Le, Thai Hung Ngo, Viet Tan Nguyen, Viet Nam Nguyen, Dinh Nghia Che, Van Phu Nguyen

22 The report on results of 5 surgical cases of the lower thoracic-lumbar tumour at 7A Military Hospital.

Quang Tri Le

26 Antioxidant activity of ethanolic rhizomes extracts of *Kaempferia parviflora* Wall. Ex Baker, *Curcuma aromatica* Salisb., and *Zingiber zerumbet* Sm.

Trong Tuan Nguyen, Thi Sanh Pham

32 Effect of variety and cultivation place on the quality of tea (*Camellia sinensis* O. Kuntze) seed and tea seed oil in Vietnam.

Thi Phuong Thao Phan, Thi Thu Hang Tran, Trung Khoa Giang, Dinh Hoa Hoang, Hong Son Vu

38 Nutritional quality and enzyme activity of rice bean (*Vigna umbellata*) collected in Dien Bien, Son La and Lai Chau provinces.

Huu Quan Nguyen, Thi Ngoc Lan Nguyen, Hoang Mau Chu

44 The reproductive ability and heterosis of broodstock ducks (CT12xCT34).

Duc Canh Vu, Thuy Linh Pham, Quy Khiem Nguyen, Ngoc Dung Nguyen, Thi Nga Nguyen, Thi Thu Hang Tran, Thi Xuan Pham, Thi Tuyen Khuat, Dinh Truong Hoang, Duy Do Phung

48 Efficiency of inhibiting infectious bursal disease virus in vivo.

Thi Thanh Giang Nguyen, Dang Quan Nguyen, Quang Do Ho

54 Screening and characterisation of plant growth promoting rhizobacteria isolated from turmeric plant (*Curcuma longa* L.) in Vietnam.

Kim Chi Hoang, Dinh Tuan Nguyen, Ho Quang Tran, Thanh Lam Nguyen, Huu Cuong Le, Thi Hong Ha Tran, Mai Huong Le, Thi Nhu Hang Tran

60 Establishment of an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer approach for the medicinal fungus *Cordyceps militaris* G12.

Van Tuan Tran, Xuan Tao Vu