

ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN IN VITRO CỦA DUNG DỊCH HL TRÊN MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN GÂY BỆNH

PGS.TS. Hoàng Minh Chung

Khoa Y học cổ truyền, Trường Đại học Hòa Bình
Tác giả liên hệ: hmchung@daihochoabinh.edu.vn

Ngày nhận: 15/12/2022

Ngày nhận bản sửa: 19/12/2022

Ngày duyệt đăng: 20/12/2022

Tóm tắt

Dung dịch HL được bào chế từ một số vị thuốc cổ truyền. Nghiên cứu đánh giá hoạt tính kháng khuẩn in vitro của dung dịch HL đối với một số chủng vi khuẩn gây bệnh, bao gồm một số chủng vi khuẩn chuẩn và chủng vi khuẩn phân lập trên lâm sàng như: *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Escherichia coli*; *Streptococcus pneumoniae* và *Streptococcus pyogenes* tan huyết beta nhóm A. Kết quả cho thấy dung dịch HL có tác dụng ức chế ở nồng độ nguyên (1) và một số nồng độ pha loãng (1/2; 1/4; 1/8 và 1/16). Tác dụng tốt nhất đối với *S.pneumoniae* ATCC; *P.aeruginosa* ATCC và *S.aureus*; *S.pneumoniae*; *P.aeruginosa* được phân lập từ bệnh phẩm (đường kính vòng vô khuẩn tương đương với đường kính vòng vô khuẩn của kháng sinh tương ứng và hơn).

Từ khóa: Dung dịch HL, kháng sinh thực vật, kháng khuẩn.

In vitro Evaluating the Antimicrobial Activity of HL Solution on Pathogenic Bacterial Strains

Abstract

Solution HL is produced from some traditional herbal medicines. The study evaluated the in vitro antibacterial activity of HL solution against some pathogenic bacteria strains including both standard strains and clinical isolates i.e., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* (Beta-hemolytic streptococci group A). The results showed that HL solution had inhibitory effect at whole concentrations (1) and some dilutions (1/2; 1/4; 1/8 and 1/16). The best effect on *S. pneumoniae* ATCC; *P. aeruginosa* ATCC and *S. aureus*; *S. pneumoniae*; *P. aeruginosa* was isolated from the patient specimens (the diameter of the sterile ring was equivalent to that of the corresponding antibiotic and more).

Keywords: HL solution, Herbal antibacteria, Antimicrobial.

1. Đặt vấn đề

Viêm họng là bệnh thường gặp ở mọi lứa tuổi, mọi giới, mọi nơi, mọi mùa. Nguyên nhân gây ra viêm họng có rất nhiều, có tới 50% do virus, số còn lại do vi khuẩn (liên cầu, tụ cầu, phế cầu...). Nguy hiểm hơn, liên cầu khuẩn tan huyết β nhóm A (*Streptococcus pyogenes*) là thủ phạm dẫn đến viêm họng gây biến chứng thấp tim, viêm khớp, viêm thận [1]. Khi nhiễm trùng này trở nên xâm lấn thì sẽ có nguy cơ cao đe dọa đến tính mạng của con người. Ngoài gây bệnh phế cầu và các biến chứng thì *Streptococcus* nhóm A cũng thường được tìm thấy trong đường hô hấp của người khỏe mạnh, đặc biệt là trẻ em [2].

Hiện nay, sử dụng thuốc hóa dược còn có những hạn chế do nhờn thuốc, kháng thuốc và gây tác dụng không mong muốn. Vì vậy, sử dụng các sản phẩm có nguồn gốc thảo dược ngày càng được nhiều thầy thuốc và bệnh nhân mong muốn. Chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu quy trình bào chế, tiêu chuẩn, độc tính cấp, mạn và một số tác dụng dược lý của một công thức được bào chế từ một số vị thuốc cổ truyền lấy tên HL [3]. Ở nghiên cứu này, chúng tôi đưa ra một số kết quả về tác dụng của dung dịch HL đối với một số chủng vi khuẩn chuẩn hay gây viêm họng trên người nhằm mục tiêu: “Xác định khả năng kháng khuẩn in vitro

của dung dịch HL đối với một số chủng vi khuẩn chuẩn và chủng vi khuẩn được phân lập từ bệnh phẩm trên lâm sàng”.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên phụ liệu và chất chuẩn

- Dược liệu: Cam thảo (*Radix Glycyrrhizae*), đại thanh diệp (*Folium Baphicacanthus*), hoàng cầm (*Radix Scutellariae*), kim ngân hoa (*Flos Lonicerae*), kinh giới (*Herba Elsholtzia cristatae*), ngư bàng tử (*Fructus Arctii*), tân di (*Flos Magnoliae*); tế tân (*Radix et Rhizoma Asari*); xạ can (*Rhizoma Belamcandae*) và các tá dược đạt tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam hiện hành [4] và CP 2010 [5].

- Bảo chế: Các dược liệu được sơ chế, chế biến theo quy định; chiết xuất với dung môi thích hợp; loại tạp; đậm đặc dịch chiết và phối hợp với tá dược phù hợp, kiểm định được dung dịch HL chuẩn [3].

- Chủng vi khuẩn chuẩn của Mỹ: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922 và *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27855. Và chủng vi khuẩn phân lập từ bệnh phẩm: *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Escherichia coli*; *Staphylococcus pneumoniae* và *Streptococcus pyogenes* (liên cầu tan huyết beta nhóm A). Bộ môn Vi sinh - Đại học Y Hà Nội cung cấp.

- Khoanh giấy kháng sinh: Erythromycin, Amykacin, Ciprofloxacin,

Amoxicilin và Penicilin V.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Kháng sinh đồ theo nguyên tắc khuếch tán trên đĩa thạch với môi trường Muller-Hinton và môi trường Muller-Hinton được bổ sung 5% máu cừu [6].

- Chuẩn bị: Đĩa môi trường (đường kính 90 mm, độ dày môi trường 4,5 ± 0,5 mm) và chủng vi khuẩn chuẩn được cấy chuyển vào ống thạch nghiêng đều được đặt trong tủ ẩm 370C qua đêm để kiểm tra vô trùng. Dung dịch HL từ nồng độ nguyên chuẩn là N được pha loãng giảm dần 1/2, 1/4, 1/16, 1/32 với nước cất. Dùng tube vô trùng đường kính 5 mm đục giếng trên môi trường, pha huyền dịch vi khuẩn nồng độ 10⁸ vi khuẩn/ml. Dùng tăm bông dàn đều vi khuẩn trên đĩa môi trường, nhỏ dung dịch HL tương ứng vào các lỗ trên môi trường, để ở phòng nuôi cấy trong 30 phút, sau đó để tủ ẩm 370C. Sau 24 giờ, đo vòng vô khuẩn bằng thước kẹp Palmer (với độ phân giải 0,0001 mm). Tiến hành song song mẫu thử và khoanh giấy kháng sinh trên cùng một đĩa môi trường.

2.3. Thiết bị dùng trong nghiên cứu

Nồi khử trùng (ALP - Nhật); Máy lắc (Storius - Đức); Buồng cấy vi sinh vật: (Aura vertical - Ý); Tủ ẩm: (Memmert - Đức); Máy ly tâm sigma 3K30 (Storius - Đức); Máy khuấy từ (IKA - RET - Đức).

Địa điểm nghiên cứu: Khoa Y học cổ truyền; Bộ môn Vi sinh - Đại học Y Hà Nội và CVI Pharma.

3. Kết quả

Bảng 1. Khả năng ức chế vi khuẩn chuẩn của kháng sinh và dung dịch HL ở các nồng độ

TT	Đường kính khuếch tán vòng vô khuẩn trên các chủng vi khuẩn (mm)				
	Chủng vi khuẩn Thuốc thử	<i>S.aureus</i>	<i>S.pneumoniae</i> ATCC	<i>E.Coli</i> ATCC	<i>P.aeruginosa</i> ATCC
1	Erythromycin	25			
2	Amykacin				20
3	Ciprofloxacin			40	
4	Amoxicilin		30		
5	HL nồng độ nguyên (N)	14	32	30	20
6	HL nồng độ 1/2	13	25,5	27	18
7	HL nồng độ 1/4	15	16,0	24	15
8	HL nồng độ 1/8	15	12,5	19	15

Bảng 2. Khả năng ức chế vi khuẩn phân lập từ bệnh phẩm của kháng sinh và dung dịch HL ở các nồng độ

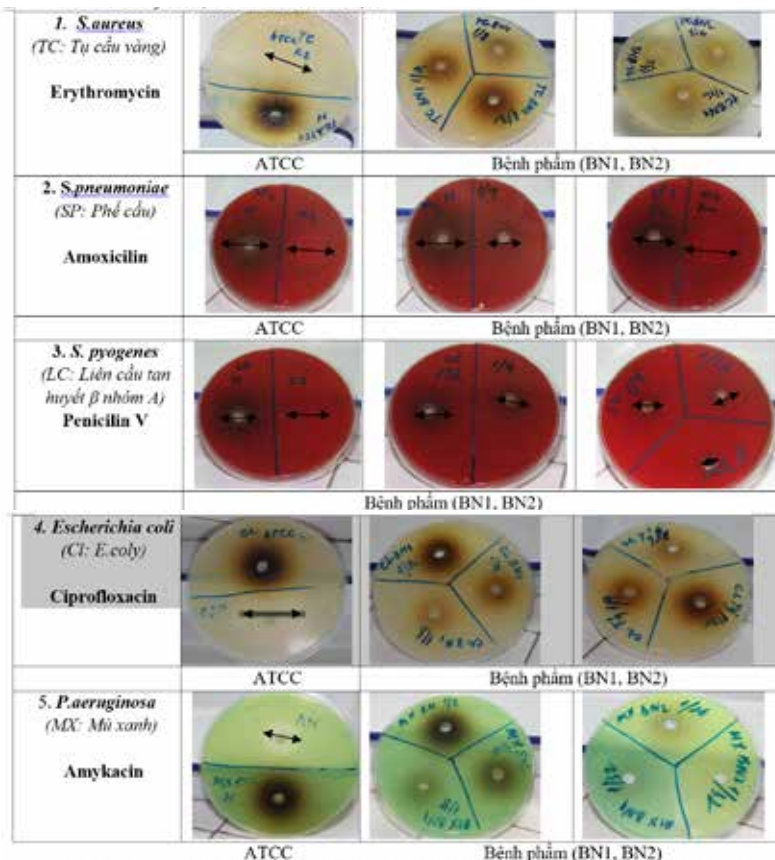
TT	Đường kính khuếch tán vòng vô khuẩn trên các chủng vi khuẩn (mm) n = 5					
	Thuốc thử	<i>S.aureus</i>	<i>S.pneumoniae</i>	<i>S.pyogenes</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E.Coli</i>
1	Erythromycin	0				
2	Amykacin				20	
3	Ciprofloxacin					33
4	Amoxicilin		30			
5	Penicilin V			40		
6	HL nồng độ N	25 - 28	32 - 35	28 - 30	19 - 20	23 - 25
7	HL pha loãng 1/2	18 - 21	25 - 26	22 - 23	17 - 18	22 - 25
8	HL pha loãng 1/4	16 - 20	15 - 17	15 - 16	15 - 16	18 - 19
9	HL pha loãng 1/8	16 - 12	10 - 11	6 - 11	11 - 12	15 - 16

Kết quả Bảng 1 cho thấy: Dung dịch HL có tác dụng ức chế 4 chủng vi khuẩn chuẩn hay gặp khi nhiễm khuẩn đường hô hấp. Khả năng ức chế chủng vi khuẩn *S.pneumoniae* và *P.aeruginosa* ở nồng độ nguyên (N) là tương đương với kháng sinh Amykacin và Amoxicilin.

Kết quả Bảng 2 cho thấy: Dung dịch HL pha loãng có tác dụng ức chế 5 chủng

vi khuẩn được phân lập từ bệnh phẩm và đạt đến hiệu quả cao nhất trong chuỗi thí nghiệm tại nồng độ dung dịch HL nguyên chuẩn được pha loãng ở tỷ lệ 1/8. Đặc biệt tốt đối với chủng *S.aureus* (tụ cầu vàng), *S.pneumoniae* (phế cầu) và *P.aeruginosa* (trực khuẩn mủ xanh). Erythromycin không có tác dụng đối với bệnh phẩm.

Dưới đây là một số hình ảnh minh họa:



Hình 1. Hình ảnh vòng vô khuẩn của kháng sinh và dung dịch HL ở các nồng độ pha loãng đối với các chủng vi khuẩn chuẩn (ATCC) và bệnh phẩm

4. Thảo luận

Để tìm hiểu khả năng kháng khuẩn của thuốc HL, chúng tôi tiến hành kỹ thuật kháng sinh đồ định tính để sàng lọc khả năng ức chế 5 chủng vi khuẩn hay gặp trên đường hô hấp. Sau đó, làm kháng sinh đồ định lượng để tìm nồng độ pha loãng của dung dịch HL còn tác dụng. Việc sử dụng 5 loại kháng sinh nhạy cảm với cả vi khuẩn gram dương và gram âm song song có thể chứng minh tác dụng của HL nhạy cảm với cả vi khuẩn gram dương và gram âm [6].

Kết quả ở Bảng 1 và 2 cho thấy: Kháng sinh và thuốc HL ở các nồng độ nguyên và pha loãng 1/2; 1/4; 1/8 có tác dụng đối với 4 chủng vi khuẩn chuẩn là: *S.aureus*; *S.pneumoniae*; *P.aeruginosa* và *E.coli*. Với 5 chủng vi khuẩn phân lập từ bệnh nhân là: *S.aureus*; *S.pneumoniae* *S.Pyogenes* tan huyết β nhóm A (vi khuẩn gram dương) và *P.aeruginosa*; *E.coli* (vi khuẩn gram âm) thì chế phẩm HL đều có tác dụng. Erythromycin có tác dụng trên tụ cầu khuẩn (*S.aureus*) chuẩn nhưng không tác dụng với chủng được phân lập từ bệnh phẩm. *S.aureus* là một trong những vi khuẩn được các nhà vi khuẩn học nổi tiếng quan tâm nghiên cứu vì tỉ lệ gây bệnh rất cao, có khả năng gây nhiều bệnh nặng cũng như kháng kháng sinh rất mạnh [7]. Ngoài ra, một tác nhân gây nhiễm khuẩn bệnh viện mắc phải ở những bệnh nhân nằm viện lâu ngày do trực khuẩn mũ xanh (*P.aeruginosa*) ngày càng trở nên trầm trọng thì Amykacin có tác dụng tốt nhưng rất độc cho bệnh nhân, nhất là trẻ em; còn thuốc HL có tác dụng tương đương mà lại an toàn [3]. Với phế cầu khuẩn (*S.pneumoniae*) có thể gây viêm mũi-họng, viêm tai giữa, viêm xoang, viêm phổi thùy, đặc biệt đối với trẻ em và người cao tuổi [8] thì Amoxicilin còn nhạy cảm với vi khuẩn này, dung dịch HL tác dụng có phần tốt hơn (đường kính vòng vô khuẩn tương đương). *E.coli* và *S.pyogenes* rất nhạy với Ciprofloxacin và Penicilin V; còn HL ít nhạy cảm hơn nhưng lại vẫn duy trì được tác dụng ở nồng độ pha loãng.

Sự xuất hiện của tình trạng kháng thuốc kháng sinh gây ra mối đe dọa nghiêm trọng

đối với sức khỏe cộng đồng. Một phần là do việc sử dụng thuốc kháng sinh không hợp lý, sự hiện diện của kháng sinh trong thức ăn động vật và thực vật, thực hành vệ sinh không đầy đủ, sự biến đổi trong cấu trúc gen của vi sinh vật và vai trò của amip sống tự do như là bộ trộn gen đối với các loài nội bào, dẫn đến tăng cường sức đề kháng và độc lực. Vi khuẩn kháng thuốc như *Staphylococcus aureus* kháng Methicillin (MRSA), *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococci* kháng Vancomycin (VRE), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Mycobacterium tuberculosis* kháng Carbapenem, đặc biệt là *Escherichia coli* và *Klebsiella* được báo trước là siêu vi khuẩn của thế kỷ XXI với tỷ lệ tử vong đáng báo động lên đến 50% [1-8]. Người ta ước tính rằng đến năm 2050, số ca tử vong hàng năm do nhiễm trùng kháng thuốc sẽ lên tới 10 triệu người. Nếu tình hình tiếp tục diễn ra, một lần nữa chúng ta sẽ lại bước vào kỷ nguyên tiền kháng sinh. Trong 20 năm qua, số lượng thuốc kháng sinh mới được phê duyệt đã giảm 75%. Ngành công nghiệp Dược phẩm đang tạo ra ít thuốc kháng sinh mới không phải vì lý do tài chính dẫn đến nhu cầu cao về các nguồn thay thế thuốc mới. Do đó, nhu cầu cấp thiết là phải tìm ra các hợp chất kháng khuẩn mới để điều trị bệnh cho người và động vật do vi khuẩn kháng thuốc là rất cần thiết [8].

Từ kết quả nghiên cứu cho thấy dung dịch HL là một chế phẩm thảo dược có tác dụng kháng khuẩn đối với các chủng vi khuẩn thường gây bệnh ở đường hô hấp trên [6]. Tác dụng kháng khuẩn của HL có thể cho rằng: Công thức bào chế HL là phù hợp, phương pháp bào chế HL đạt được kỹ thuật nhất định nên đã giữ lại những thành phần có tác dụng kháng khuẩn như flavonoid có trong kim ngân hoa, xạ can và hoàng cầm. Flavonoid có tác dụng dọn gốc tự do, khả năng tạo phức với các ion kim loại tránh các phản ứng oxy hoá, giảm tổn thương. Ngoài ra, thành phần tinh dầu có tác dụng sát khuẩn tốt, thành phần này có trong kinh giới, tể tân, tân di. Hai nhóm hoạt chất này cũng là hai nhóm hoạt chất lớn thường gặp

trong dược liệu, có tác dụng thanh nhiệt giải độc, thanh nhiệt trừ thấp, trừ phong, giải dị ứng của y học cổ truyền [3]. Việc sử dụng những sản phẩm có nguồn gốc tự nhiên như chế phẩm HL cho phòng và chữa viêm họng có tác dụng tương đương kháng sinh, vừa tránh được tình trạng kháng thuốc vừa an toàn cho người sử dụng và cũng được coi là nguồn “Kháng sinh thực vật” tiềm năng mà con người đang tìm kiếm [8].

5. Kết luận

Chế phẩm HL ở các nồng độ nguyên chuẩn N và pha loãng 1/2; 1/4 và 1/8 có tác dụng đối với 4 chủng vi khuẩn chuẩn là: *S.aureus* ATCC; *S.pneumoniae* ATCC; *P.aeruginosa* ATCC; *E.coli* ATCC và 5 chủng vi khuẩn phân lập từ bệnh nhân là: *S.aureus*; *S.pneumoniae* *S.pyogenes* tan huyết β nhóm A và *P.aeruginosa*; *E.coli*.

Tài liệu tham khảo

- [1]. Sidrah Kanwall; Pradeep Vaitla2 (2021), *Streptococcus pyogenes*, Allama Iqbal Medical College, Lahore, Pakistan and University of Mississippi Medical Center, StatPearls Publishing LLC.
- [2]. MSD Manual (2021), Nhiễm liên cầu, Theo Larry M. Bush, MD, FACP, Charles E. Schmidt College of Medicine, Florida Atlantic University; Maria T. Vazquez-Pertejo, MD, FACP, *Wellington Regional Medical Center*.
- [3]. Hoàng Minh Chung (2010), *Nghiên cứu bào chế, tiêu chuẩn, tác dụng của dung dịch HL trong điều trị bệnh viêm họng đỏ*, đề tài cấp Thành phố, Mã số: 01C- 08/10-2009-2.
- [4]. Bộ Y tế, *Dược điển Việt Nam V* (2017), NXB Y học, tập 2.
- [5]. Pharmacopoeia of the people's Republic of China (English edition 2010), “Chemical Industry press Beijing China”, Vol I.
- [6]. Bộ môn Vi sinh - Trường Đại học Y Hà Nội (1990), *Chẩn đoán vi sinh lâm sàng và thử nghiệm kháng kháng sinh của một số vi khuẩn gây bệnh thường gặp*, Tài liệu dùng cho lớp Bồi dưỡng Vi sinh lâm sàng do WHO tài trợ.
- [7]. Centers for Disease Control and Prevention (2011), *Staphylococcus aureus in healthcare setting*, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Healthcare.
- [8]. Salwa Mansur Ali, Ruqaiyyah Siddiqui, Naveed Ahmed Khan (2018), *Antimicrobial discovery from natural and unusual sources*, Department of Biological Sciences, School of Science and Technology, Sunway University, Subang Jaya, Selangor, Malaysia, Royal Pharmaceutical Society, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 70 (2018), pp. 1287-1300.