



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0003970

(51) **C12Q 1/04; C12N 1/20**
2024.01

(13) **Y**

(21) 2-2024-00772

(22) 30/12/2022

(67) 1-2022-08678

(45) 25/02/2025 443

(43) 27/03/2023 420A

(76) 1. Trần Thị Huyền Trang (VN)

Trung tâm Nghiên cứu Ứng dụng tế bào gốc, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108, số 01 Trần Hưng Đạo, quận Hai Bà Trưng, thành phố Hà Nội

2. Vũ Văn Khiên (VN)

Bệnh viện Trung ương Quân đội 108, số 01 Trần Hưng Đạo, quận Hai Bà Trưng, thành phố Hà Nội

3. Lê Hữu Song (VN)

Trung tâm Nghiên cứu Y học Việt - Đức VG - CARE, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108, số 1, phố Trần Hưng Đạo, quận Hai Bà Trưng, thành phố Hà Nội

4. Phan Quốc Hoàn (VN)

Bệnh viện Trung ương Quân đội 108, số 1, phố Trần Hưng Đạo, quận Hai Bà Trưng, thành phố Hà Nội

5. Trần Thị Thanh Huyền (VN)

Trung tâm Nghiên cứu Y học Việt - Đức VG - CARE, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108, số 1, phố Trần Hưng Đạo, quận Hai Bà Trưng, thành phố Hà Nội

6. Bùi Thanh Thuyết (VN)

Bệnh viện Trung ương Quân đội 108, số 1, phố Trần Hưng Đạo, quận Hai Bà Trưng, thành phố Hà Nội

7. Lê Thị Lâm Quý (VN)

Trung tâm Nghiên cứu Y học Việt - Đức VG - CARE, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108, số 1, phố Trần Hưng Đạo, quận Hai Bà Trưng, thành phố Hà Nội

8. Hoàng Anh Hà (VN)

Trung tâm Nghiên cứu Y học Việt - Đức VG - CARE, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108, số 1, phố Trần Hưng Đạo, quận Hai Bà Trưng, thành phố Hà Nội

9. Lê Hữu Phương Anh (VN)

Trung tâm Nghiên cứu Ứng dụng Tế bào gốc, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108, số 01, phố Trần Hưng Đạo, quận Hai Bà Trưng, thành phố Hà Nội

10. Phạm Công Nguyên (VN)

Trung tâm Nghiên cứu Ứng dụng Tế bào gốc, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108, số 01, phố Trần Hưng Đạo, quận Hai Bà Trưng, thành phố Hà Nội

(54) **QUY TRÌNH SẢN XUẤT MÔI TRƯỜNG BẢO QUẢN MẪU SINH THIẾT PHỤC
VỤ NUÔI CẤY VI KHUẨN HELICOBACTER PYLORI VÀ MÔI TRƯỜNG BẢO
QUẢN THU ĐƯỢC TỪ QUY TRÌNH NÀY**

(21) 2-2024-00772

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất môi trường bảo quản mẫu sinh thiết phục vụ nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori*, và môi trường thu được từ quy trình này. môi trường bảo quản mẫu sinh thiết theo sáng chế tối ưu được điều kiện, linh hoạt trong sử dụng đảm bảo được khả năng duy trì và phục hồi vi khuẩn *Helicobacter pylori* trong cả hai điều kiện xét nghiệm thường quy (trong 48 giờ) với khả năng phục hồi trung bình đạt tới 82% sau 72 giờ và cho phép phục hồi trung bình khoảng 60% sau 10 ngày bảo quản ở 4°C. Môi trường bảo quản mẫu sinh thiết theo sáng chế còn cho phép phục hồi trong điều kiện bảo quản đông sâu lên tới 77% sau 2 năm bảo quản. môi trường bảo quản mẫu sinh thiết phục vụ nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori* cho phép bảo quản mẫu linh hoạt kéo dài, dễ dàng vận chuyển mẫu và tăng hiệu quả trong việc phân tích cũng như giảm chi phí xét nghiệm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học, công nghệ vi sinh ứng dụng trong lĩnh vực vi sinh vật học, y học. Cụ thể, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất môi trường bảo quản mẫu sinh thiết cho phép bảo quản, vận chuyển mẫu để phục vụ nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori* và môi trường bảo quản thu được từ quy trình này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Vi khuẩn *Helicobacter pylori* là một loại xoắn khuẩn gram âm thường được tìm thấy ở trên bề mặt và bên dưới lớp nhầy dạ dày. Vi khuẩn *Helicobacter pylori* là một trong những vi khuẩn gây bệnh viêm loét dạ dày có tỷ lệ lây nhiễm phổ biến nhất trên thế giới, từ 30 đến 50 % ở các nước phát triển và 85 đến 95 % ở các nước đang phát triển. Việc phát hiện ra vi khuẩn *Helicobacter pylori* đã mở ra nhiều hiểu biết mới về cơ chế bệnh sinh của các bệnh lý loét và viêm teo mạn tính niêm mạc dạ dày. Từ đó, giúp định hướng chiến lược điều trị dự phòng các bệnh lý dạ dày một cách hiệu quả. Vi khuẩn *Helicobacter pylori* còn được xếp vào nhóm I trong các tác nhân gây bệnh ung thư dạ dày. Do đó, việc điều trị triệt để vi khuẩn *Helicobacter pylori* không những điều trị bệnh đau dạ dày mà còn giúp phòng ngừa biến chứng như loét hay ung thư dạ dày.

Việc xác định, chẩn đoán chính xác nhiễm vi khuẩn *Helicobacter pylori* trong lâm sàng, giúp cho công tác điều trị bệnh đau và viêm loét dạ dày tá tràng. Hiện nay, các phương pháp chẩn đoán có thể chia thành hai nhóm: (1) các thử nghiệm xâm lấn được thực hiện qua nội soi dạ dày tá tràng, bao gồm: nuôi cấy vi khuẩn, xét nghiệm mô bệnh học, thử nghiệm nhanh ureaza; xét nghiệm PCR; và (2) các thử nghiệm không xâm lấn, bao gồm: thử nghiệm nhanh ureaza qua hơi thở (UBT), xét nghiệm phân (phát hiện vi khuẩn, kháng nguyên, ADN vi khuẩn), xét nghiệm nước bọt, nước tiểu, xét nghiệm huyết thanh học (nhằm mục đích phát hiện kháng thể kháng *Helicobacter pylori*). Trong đó, phương pháp nuôi cấy vi khuẩn được coi là tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán dương tính *Helicobacter pylori* do độ đặc hiệu 100 % và đây cũng là bước tiền đề cho thử nghiệm kháng sinh đồ về sau.

Tuy nhiên, về mặt kỹ thuật, độ nhạy của việc nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori* lại có giá trị dao động từ 60 đến 90% và phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố như môi trường vận chuyển, thời gian từ lúc lấy mẫu đến khi xử lý, môi trường nuôi cấy, điều kiện nuôi cấy. Do đó, xét nghiệm nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori* yêu cầu nhiều điều kiện nghiêm ngặt ở mọi khâu từ chuẩn bị mẫu, vận chuyển mẫu, chuẩn bị môi trường đến các điều kiện nuôi cấy như nhiệt độ, nồng độ O₂, CO₂.

Chính vì chịu tác động của các yếu tố này nên để đảm bảo hiệu quả phân tích, thì mỗi mẫu sinh thiết phải được lấy và nuôi cấy trong khoảng thời gian xác định. Do đặc tính kém ổn định của vi khuẩn *Helicobacter pylori*, nên đối với những bệnh nhân ở xa, các mẫu sinh thiết buộc phải được bảo quản trong môi trường bảo quản để vận chuyển đến cơ sở xét nghiệm. Do đó môi trường vận chuyển và bảo quản mảnh sinh thiết, thường là mảnh sinh thiết dạ dày, là một trong những yếu tố đầu tiên quyết định đến khả năng phục hồi thành công vi khuẩn *Helicobacter pylori* trong nuôi cấy.

Hiện nay, trên thị trường đã có các môi trường bảo quản và vận chuyển mẫu chứa vi khuẩn *Helicobacter pylori* bán sẵn như Portagerm pylori (bioMérieux, Pháp), GESA MEDIUM (Liofilchem, Ý), hoặc MELAB (Latitec, Việt Nam). Các môi trường này cho phép bảo quản để vận chuyển mẫu từ các nơi lấy mẫu đến cơ sở phân tích với thời gian lên tới 10 ngày với hiệu suất phục hồi khoảng 50%. Tuy nhiên, các mẫu này có nhược điểm là do môi trường bán sẵn nên việc khôi phục mẫu, cũng như bảo quản phải qua bước chuyển đổi qua môi trường dạng lỏng, vì vậy giảm sự linh hoạt của môi trường.

Một nhược điểm không thể khắc phục được của môi trường bán sẵn đó là không thể sử dụng để cấp đông (bảo quản lạnh sâu) mẫu, mặc dù chúng có khả năng bảo quản mẫu chứa *Helicobacter pylori* và cho phép phục hồi vi khuẩn này khi bảo quản ở 4°C lên đến 10 ngày, nhưng chúng không thể bảo quản được mẫu khi cấp đông mẫu bệnh phẩm trong thời gian dài. Chính vì thế, những môi trường bán sẵn này bị hạn chế đối với các nghiên cứu có thời gian thu thập đến xử lý mẫu bị trì hoãn, ví dụ do dịch bệnh phong tỏa hoặc những mẫu nghiên cứu, phân tích cần vận chuyển xa, bảo quản lâu. Thêm nữa, giá thành môi trường này cao, sản xuất phức tạp nên làm tăng giá thành nuôi cấy, từ đó, làm tăng chi phí phân tích mẫu nhiễm vi khuẩn *Helicobacter pylori* cho bệnh nhân.

Cũng đã có một số môi trường bảo quản và vận chuyển dạng lỏng được phát triển trên cơ sở sữa không kem và môi trường cysteine-Albumi bổ sung 17-20% glycerol do

S.W.Han và các cộng sự (1995) phát triển hay như môi trường thử nghiệm ureaza của Stuart bổ sung thêm 0,2g/ml glucoza theo nghiên cứu của Thomas G. Blanchard¹ và John G. Nedrud (2012). Các môi trường vận chuyển dạng lỏng nêu trên chỉ được chỉ định sử dụng để vận chuyển các mảnh sinh thiết ở 4°C trong thời gian ngắn (dưới 5 giờ), hoặc cấp đông ngay lập tức cho mục đích bảo quản lâu dài. Tuy nhiên, số liệu về khả năng phục hồi và tái phục hồi vi khuẩn *Helicobacter pylori* sau khi cấp đông vẫn chưa được ghi nhận.

Do việc phân biệt hai loại môi trường và chức năng rõ ràng nên không thể sử dụng lẫn nhau khiến cho việc thu thập, bảo quản và vận chuyển mẫu khá phức tạp. Vì vậy, cần có quy trình sản xuất môi trường bảo quản mẫu sinh thiết chứa vi khuẩn *Helicobacter pylori* dạng lỏng cho phép linh hoạt trong việc bảo quản mẫu được thu thập và dễ dàng vận chuyển mẫu từ cơ sở lấy mẫu đến cơ sở phân tích. Trường hợp xét nghiệm ngay thì, tốt nhất là đảm bảo khả năng khôi phục mẫu trong vòng 48 giờ hoặc có thể chuyển đổi sang làm môi trường bảo quản lâu dài trong môi trường đông sâu mà không phải qua bước chuyển đổi môi trường phức tạp. Môi trường bảo quản mẫu linh hoạt, đa năng này giúp đơn giản hóa quy trình thu thập mẫu, vận chuyển và bảo quản mẫu phục vụ cho nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori* trong nghiên cứu cũng như trong phân tích bệnh học.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là nhằm khắc phục các tồn tại nêu trên, theo đó sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất môi trường bảo quản mẫu sinh thiết, tốt hơn là mẫu sinh thiết dạ dày, và môi trường bảo quản mẫu sinh thiết cho phép bảo quản, vận chuyển mẫu phục vụ trong nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori*, kéo dài thời gian bảo quản mẫu tươi cũng như mẫu đông sâu, giảm được việc sinh thiết mẫu nhiều lần.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất môi trường bảo quản mẫu sinh thiết phục vụ nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori*, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) Chuẩn bị nguyên liệu pha chế môi trường bao gồm các thành phần theo tỷ lệ % trọng lượng như sau:

Cao nấm men:	0,05-1
Axit casamino:	0,1-2
Pepton:	0,1-2

NaCl:	0,05-0,5
L-cystein:	0,01-0,1
Dextroza:	0,5-5
Glyxerol:	20-35
Nước cất:	60-75

b) Pha chế dung dịch dưỡng chất bằng cách lần lượt hòa tan các thành phần cao nấm men, axit casamino, pepton và NaCl với 4/5 lượng nước cất, sau đó hấp tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút, thu được dung dịch dưỡng chất;

c) Pha chế dung dịch bảo quản bằng cách hòa tan L-cystein với 1/5 lượng nước cất còn lại, chuẩn độ dung dịch đến pH=7 bằng NaOH 0,5M, rồi bổ sung lần lượt dextroza, glyxerol và trộn đều, sau đó lọc dung dịch này qua giấy lọc cỡ 0,22 μm thu được dung dịch bảo quản; và

d) Thu môi trường bảo quản mẫu sinh thiết phục vụ nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori* bằng cách phối trộn dung dịch dưỡng chất với dung dịch bảo quản thu được ở trên, sau khi trộn đều, làm lạnh đến 4°C thu được môi trường bảo quản mẫu sinh thiết phục vụ nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori* dạng lỏng đồng nhất.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến môi trường bảo quản mẫu sinh thiết phục vụ nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori* thu được từ quy trình theo sáng chế, trong đó môi trường bảo quản này ở dạng lỏng và bao gồm các thành phần theo tỷ lệ % trọng lượng sau:

Cao nấm men:	0,05-1
Axit casamino:	0,1-2
Pepton:	0,1-2
NaCl:	0,05-0,5
L-cystein:	0,01-0,1
Dextroza:	0,5-5
Glyxerol:	20-35
Nước cất:	60-75.

Môi trường bảo quản mẫu sinh thiết trong nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori* theo sáng chế ở dạng lỏng, tiệt trùng. Sản phẩm này có khả năng bảo vệ vi khuẩn *Helicobacter pylori* trong mẫu sinh thiết và cho phép tái phục hồi vi khuẩn lên tới 72 giờ khi bảo quản ở 4°C hoặc tới 24 tháng trong điều kiện bảo quản -80°C nên cho phép vận chuyển và bảo quản mẫu mà không làm suy giảm chất lượng mẫu.

Sáng chế cũng đề cập đến quy trình bảo quản mẫu sinh thiết, tốt hơn là mẫu sinh thiết dạ dày, để nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori*, trong đó quy trình này bao gồm bước chuyển mẫu sinh thiết vào môi trường theo sáng chế và giữ ở 4°C trong khoảng thời gian từ 48 đến 72 giờ hoặc giữ ở -80°C trong khoảng thời gian 24 tháng trước khi nuôi cấy để tái khôi phục vi khuẩn *Helicobacter pylori* trong mẫu.

Môi trường bảo quản mẫu sinh thiết, tốt hơn là mẫu sinh thiết dạ dày, trong nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori* thích hợp để lưu giữ, vận chuyển và bảo quản mẫu bệnh phẩm phục vụ trong công tác nuôi cấy, phát hiện vi khuẩn *Helicobacter pylori* cũng như các mẫu xét nghiệm sinh học phân tử, ứng dụng trong nghiên cứu cũng như điều trị nhiễm vi khuẩn *Helicobacter pylori*.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là ảnh chụp khuẩn lạc *Helicobacter pylori* trên đĩa nuôi cấy chọn lọc với mẫu phục hồi từ mảnh sinh thiết tươi được bảo quản trong môi trường MELAB (A1) và môi trường bảo quản theo giải pháp (A2); ảnh chụp khuẩn lạc *Helicobacter pylori* trên kính hiển vi tiêu bản nhuộm Gram phục hồi từ mẫu trong môi trường MELAB (B1) và môi trường bảo quản theo giải pháp (B2).

Hình 2 là ảnh chụp khuẩn lạc *Helicobacter pylori* trên đĩa nuôi cấy chọn lọc được phục hồi từ mảnh sinh thiết được bảo quản ở -80°C sau với mẫu phục hồi từ mảnh sinh thiết tươi được bảo quản trong môi trường bảo quản theo giải pháp sau 27 ngày (A1); sau 365 ngày (A2) và sau 695 ngày (A3) kể từ ngày sinh thiết và ảnh chụp khuẩn lạc trên kính hiển vi tiêu bản nhuộm Gram phục hồi từ mảnh sinh thiết bảo quản trong môi trường bảo quản theo sáng chế ở -80°C sau 30 ngày (B1); 364 ngày (B2) và 695 ngày (B3) kể từ ngày sinh thiết.

Hình 3 là ảnh chụp khuẩn lạc *Helicobacter pylori* trên đĩa nuôi cấy chọn lọc phục hồi từ mảnh sinh thiết bảo quản trong môi trường bảo quản theo sáng chế với (A1) phục hồi lần 1 sau khi nội soi; (A2) phục hồi lần 2 sau 4 tháng, và ảnh chụp ảnh chụp khuẩn lạc được phục hồi từ mảnh sinh thiết bảo quản trong môi trường bảo quản theo sáng chế trên kính hiển vi tiêu bản nhuộm Gram với (B1) phục hồi sau khi nội soi, và (B) phục hồi lần 2 sau 4 tháng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế được mô tả một cách chi tiết với các phương án thực hiện và các ví dụ minh họa cụ thể, tuy nhiên các phương án thực hiện và các ví dụ minh họa cụ thể

này chỉ nhằm làm rõ bản chất của sáng chế chứ không nhằm giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất môi trường bảo quản mẫu sinh thiết phục vụ trong nghiên cứu, phân tích mẫu chứa vi khuẩn *Helicobacter pylori*. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến môi trường bảo quản mẫu sinh thiết phục vụ nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori*, và quy trình bảo quản mẫu sinh thiết sử dụng môi trường này phục vụ nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori*.

Mẫu sinh thiết theo sáng chế đề cập đến mẫu bệnh phẩm thu được từ người hoặc động vật mà chứa hoặc nghi ngờ chứa vi khuẩn *Helicobacter pylori*. Theo khái niệm mở rộng, mẫu sinh thiết theo sáng chế đề cập đến mẫu sinh học có nguồn gốc từ mẫu sinh thiết đã được xử lý sơ bộ hoặc được phân tách sơ bộ, nhằm xác định sự có mặt của vi khuẩn *Helicobacter pylori* sống. Theo ví dụ cụ thể, nhưng không chỉ giới hạn, mẫu sinh thiết cần được bảo quản và vận chuyển này là mẫu sinh thiết dạ dày nhằm xác định sự có mặt cũng như khả năng sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn *Helicobacter pylori*.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất môi trường bảo quản mẫu sinh thiết phục vụ nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori*, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu pha chế môi trường; b) pha chế dung dịch dưỡng chất; c) pha chế dung dịch bảo quản; và d) thu môi trường để bảo quản và vận chuyển mẫu sinh thiết phục vụ nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori*.

Trong bước chuẩn bị nguyên liệu pha chế môi trường bao gồm các thành phần theo tỷ lệ % trọng lượng như sau:

Cao nấm men:	0,05-1
Axit casamino:	0,1-2
Pepton:	0,1-2
NaCl:	0,05-0,5
L-cystein:	0,01-0,1
Dextroza:	0,5-5
Glyxerol:	20-35
Nước cất:	60-75

Cao nấm men là sản phẩm thu được từ phần chiết của nấm men và được bán trên thị trường như một thành phần sử dụng trong nuôi cấy vi sinh vật. Cao nấm men thường ở

dạng bột chiết từ sinh khối nấm men đã được loại nước và làm khô. Trong cao nấm men chứa các axit amin cần thiết cho sự phát triển của vi sinh vật và giàu vitamin B (trừ vitamin B12). Theo sáng chế, cao nấm men đóng vai trò cung cấp dưỡng chất để duy trì sự sinh trưởng của vi khuẩn *Helicobacter pylori* trong mẫu sinh thiết. Lượng cao nấm men được sử dụng theo % trọng lượng môi trường bảo quản là từ 0,05 đến 1%. Theo một phương án ưu tiên cụ thể, lượng cao nấm men trong chế phẩm là khoảng 0,15% trọng lượng môi trường bảo quản theo sáng chế.

Axit casamino là một thành phần dinh dưỡng khác cũng có nguồn gốc từ động vật. Đây là hỗn hợp sản phẩm thu được sau khi thủy phân protein casein bằng axit. Thành phần của hỗn hợp này gồm tất cả các axit amin thiết yếu (trừ tryptophan) và một ít các đoạn peptit nhỏ. Axit casamino không chứa vitamin và axit amin tryptophan do các chất này đã bị phân hủy trong môi trường axit. Với đặc điểm này, axit casamino trở thành nguồn cung cấp nitơ dễ hấp thu, dễ chuyển hóa cho các vi sinh vật (chủ yếu dưới dạng axit amin tự do), nên thường được sử dụng trong chuẩn bị môi trường nuôi cấy. Hàm lượng axit casamino được sử dụng theo % trọng lượng môi trường bảo quản là từ 0,1 đến 2% trọng lượng. Theo một phương án ưu tiên cụ thể, lượng axit casamino trong chế phẩm là 0,8% trọng lượng môi trường bảo quản theo sáng chế.

Pepton được sử dụng như là một thành phần hỗ trợ tăng trưởng, thu được từ quá trình thủy phân protein bằng enzym, chủ yếu là bằng enzym trypsin và pepsin. Sản phẩm thu được là hỗn hợp các axit amin tự do (vẫn giữ nguyên được tryptophan) và các đoạn peptit với chiều dài khác nhau. Do đó, đây là nguồn cung cấp dồi dào nitơ cho sinh trưởng của vi khuẩn *Helicobacter pylori*. Hàm lượng pepton được sử dụng theo % trọng lượng môi trường bảo quản là từ 0,1 đến 2% trọng lượng. Theo một phương án ưu tiên cụ thể, lượng pepton trong chế phẩm là 0,8% trọng lượng môi trường bảo quản theo sáng chế.

NaCl đóng vai trò là chất phụ trợ có tác dụng duy trì ổn định pH môi trường trong suốt quá trình sinh trưởng của vi sinh vật. Bên cạnh đó, khi môi trường nuôi cấy và tế bào chất của vi khuẩn có sự chênh lệch nồng độ muối với nhau sẽ dẫn đến hiện tượng trương nước hoặc mất nước quá mức đối với tế bào, làm vi khuẩn bị chết. Do vậy, NaCl còn có tác dụng cân bằng áp suất thẩm thấu trong môi trường nuôi cấy. Hàm lượng NaCl được sử dụng theo % trọng lượng là từ 0,05 đến 0,5% trọng lượng môi trường bảo quản. Theo

một phương án ưu tiên cụ thể, lượng NaCl trong chế phẩm là 0,2% trọng lượng môi trường bảo quản theo sáng chế.

L-cystein là axit amin thiết yếu đóng vai trò trong việc bảo vệ tế bào khỏi các tác nhân oxy hóa do đây là cơ chất của các enzym chống oxy hóa. Ngoài ra L-cystein còn tham gia vào quá trình tổng hợp glutathion, phân tử đóng vai trò chính trong quá trình chống peroxi hóa lipid. Nhiều nghiên cứu đã ghi nhận tế bào có thể bị chết khi thiếu hụt L-cystein trong môi trường. Hàm lượng L-cystein được sử dụng theo % trọng lượng là từ 0,01 đến 0,1% trọng lượng môi trường bảo quản. Theo một phương án ưu tiên cụ thể, lượng L-cystein trong chế phẩm là 0,05% trọng lượng chế phẩm bảo quản theo sáng chế.

Dextroza hay còn gọi là D-glucosa là một thành phần dạng bột, màu trắng, dễ tan trong nước. Đây cũng được đóng vai trò như một chất cung cấp nguồn cacbon cho vi khuẩn, tuy nhiên, dextroza được sử dụng theo giải pháp đóng vai trò như một chất góp phần bảo vệ vi khuẩn *Helicobacter pylori* do chúng giúp vi khuẩn tạo màng bảo vệ, cho phép chống chịu tốt hơn với môi trường bảo quản. Khi giảm nhiệt độ xuống nhiệt độ đóng băng, dextroza cho phép giảm được sự mất nước của tế bào vi khuẩn. Hàm lượng dextroza được sử dụng theo % trọng lượng là từ 0,5 đến 5% trọng lượng môi trường bảo quản. Theo một phương án ưu tiên cụ thể, lượng dextroza trong chế phẩm là 1% trọng lượng môi trường bảo quản theo sáng chế.

Glyxerol đóng vai trò làm chất giữ độ ẩm cho môi trường, đây là chất cho phép tạo độ nhớt để hạn chế hoạt động của vi khuẩn *Helicobacter pylori*, giữ ổn định sức căng bề mặt tế bào, giúp cho tế bào vi khuẩn *Helicobacter pylori* không bị vỡ khi lưu giữ ở nhiệt độ âm sâu (-80°C). Glyxerol cũng giúp giảm ảnh hưởng xấu do tinh thể đá tác động lên thành vi khuẩn *Helicobacter pylori*. Hàm lượng glyxerol được sử dụng theo % trọng lượng là từ 20 đến 35% trọng lượng môi trường bảo quản. Theo một phương án ưu tiên cụ thể, lượng glyxerol trong chế phẩm là từ 25 đến 30% trọng lượng chế phẩm bảo quản theo sáng chế.

Môi trường bảo quản mẫu sinh thiết phục vụ nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori* theo sáng chế được bào chế ở dạng lỏng, cho phép duy trì được trạng thái của vi khuẩn *Helicobacter pylori* trong mẫu. Thành phần nước sử dụng là nước cất, tốt nhất là nước khử ion hoặc nước tinh khiết, đảm bảo loại bỏ thành phần vi sinh cũng như tạp chất cho phép hòa tan các chất dinh dưỡng, muối, vitamin, các chất bổ sung chọn lọc, giúp phân tán đều

các thành phần dưỡng chất cũng như thành phần bảo quản trong môi trường, tạo điều kiện cho sự hấp thu dinh dưỡng của vi sinh vật. Lượng nước được sử dụng theo sáng chế từ 60 đến 75% trọng lượng chế phẩm bảo quản theo sáng chế. Theo một phương án ưu tiên cụ thể, lượng nước trong chế phẩm là 70% trọng lượng chế phẩm bảo quản theo sáng chế.

Từ các nguyên liệu nêu trên, tiến hành pha chế dung dịch dưỡng chất và dung dịch bảo quản độc lập để từ đó phối trộn với nhau tạo nên môi trường bảo quản mẫu sinh thiết phục vụ nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori*.

Trong bước pha chế dung dịch dưỡng chất, tiến hành hòa tan lần lượt hòa tan thành phần bao gồm cao nấm men, axit casamino, pepton và NaCl. Lượng nước sử dụng để pha chế được sử dụng là 4/5 lượng nước cất được chuẩn bị ở trên. Sau khi hòa tan các thành phần nguyên liệu đã nêu, thu được hỗn hợp dạng lỏng, Chuyển hỗn hợp này vào hấp tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút. Quá trình này nhằm thu được dung dịch dưỡng chất được tiệt trùng. Quá trình hấp tiệt trùng ở nhiệt độ và áp suất cao giúp tiêu diệt vi sinh vật tạp nhiễm, giúp đảm bảo môi trường sạch về mặt vi sinh khác làm giảm chất lượng cũng như khả năng bảo quản môi trường, hoặc gây ra sự cạnh tranh sinh trưởng với vi khuẩn *Helicobacter pylori* nếu dùng để bảo quản mẫu sinh thiết.

Trong bước pha chế dung dịch bảo quản, các thành phần còn lại được chuẩn bị bao gồm L-cystein, dextroza và glyxerol được phối chế tạo thành dung dịch cho phép tăng cường sự chống chịu của vi khuẩn trong môi trường ngoài cơ thể hoặc trong điều kiện đông sâu. Tiến hành hòa tan lượng L-cystein với 1/5 lượng nước cất còn lại. Tiếp đó, chuẩn độ dung dịch đến pH=7 bằng NaOH 0,5M. Lần lượt bổ sung dextroza rồi glyxerol và trộn đều. Dung dịch này được lọc qua giấy lọc cỡ 0,22 μm để loại bỏ vi sinh vật tạp nhiễm, thu được dung dịch bảo quản. Dung dịch bảo quản được pha chế trong điều kiện vô trùng, các hóa chất đáp ứng tiêu chuẩn tinh sạch về mặt hóa học và sạch về mặt vi sinh.

Để thu môi trường bảo quản mẫu sinh thiết phục vụ nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori*, hai thành phần thu được sau khi pha chế ở trên được phối trộn với nhau. Cụ thể tiến hành phối trộn dung dịch dưỡng chất với dung dịch bảo quản thu được ở trên, sau khi trộn đều. Tiếp đó, làm lạnh hỗn hợp thu được này đến 4°C thu được môi trường bảo quản mẫu sinh thiết phục vụ nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori* dạng lỏng đồng nhất.

Để môi trường bảo quản mẫu sinh thiết thu được theo sáng chế có thể dùng để bảo quản cho phép vận chuyển mẫu dễ dàng, môi trường dạng lỏng này được chia vào

trong ống vận chuyển mẫu cryotip tiệt trùng với lượng 1ml/ống. Môi trường được giữ ở 4°C để đảm bảo tính ổn định và tính chất các thành phần trong môi trường thu được.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến môi trường bảo quản mẫu sinh thiết phục vụ nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori* thu được từ quy trình theo sáng chế, trong đó môi trường này ở dạng lỏng bao gồm các thành phần theo tỷ lệ % trọng lượng sau:

Cao nấm men:	0,05-1
Axit casamino:	0,1-2
Pepton:	0,1-2
NaCl:	0,05-0,5
L-cystein:	0,01-0,1
Dextroza:	0,05-0,5
Glyxerol:	20-35
Nước cất:	60-75.

môi trường bảo quản mẫu sinh thiết phục vụ nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori* theo sáng chế ở dạng lỏng, tiệt trùng. Sản phẩm này có khả năng bảo vệ vi khuẩn *Helicobacter pylori*, thường là mẫu sinh thiết dạ dày, và cho phép tái phục hồi vi khuẩn lên tới 72 giờ khi bảo quản ở 4°C hoặc tới 24 tháng trong điều kiện bảo quản -80°C. Việc bảo quản này cho phép vận chuyển và bảo quản mẫu sinh thiết chứa *Helicobacter pylori* mà không làm suy giảm chất lượng của vi khuẩn *Helicobacter pylori* có trong mẫu.

Sáng chế cũng đề cập đến quy trình bảo quản mẫu sinh thiết để nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori*, trong đó quy trình này bao gồm bước chuyển mẫu sinh thiết vào môi trường bảo quản thu được từ quy trình theo sáng chế và giữ ở 4°C trong khoảng thời gian từ 48 đến 72 giờ hoặc giữ ở -80°C trong khoảng thời gian 24 tháng để có thể bảo quản, vận chuyển mẫu trước khi nuôi cấy để tái khôi phục vi khuẩn *Helicobacter pylori* trong mẫu.

Môi trường bảo quản mẫu sinh thiết dạ dày trong nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori* thích hợp dùng làm môi trường bảo quản mẫu bệnh phẩm dùng để nuôi cấy, phát hiện vi khuẩn *Helicobacter pylori* cũng như các mẫu xét nghiệm sinh học phân tử ứng dụng trong nghiên cứu cũng như chẩn đoán, điều trị các bệnh nhiễm vi khuẩn *Helicobacter pylori*.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Sản xuất môi trường bảo quản mẫu sinh thiết phục vụ nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori*

Để sản xuất môi trường bảo quản mẫu sinh thiết phục vụ nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori*, chuẩn bị các nguyên liệu bao gồm các thành phần sau:

Cao nấm men:	1,5g
Axit casamino:	8g
Pepton:	8g
NaCl:	2g
L-cystein:	0,5g
Dextroza:	10g
Glyxerol:	270g
Nước cất:	700g

Hòa tan 1,5g cao nấm men, 8g axit casamino, 8g pepton và 2g NaCl với 560 g nước cất (560ml). Sau đó chuyển hỗn hợp vào nồi hấp tiệt trùng. Nhiệt độ tiệt trùng được duy trì 121°C trong 15 phút. Sau khi tiệt trùng, thu được dung dịch dưỡng chất (dung dịch A).

Hòa tan 0,5 g L-cystein với 140 g (140ml) nước còn lại. Chuẩn độ dung dịch đến pH=7 bằng NaOH 0,5M. Tiếp đó bổ sung lần lượt 10g dextroza, Sau khi hòa tan, bổ sung vào 270g glyxerol và trộn đều. Tiến hành lọc dung dịch này qua giấy lọc cỡ 0,22 µm trong môi trường tiệt trùng. Thu được thu được dung dịch bảo quản (dung dịch B).

Phối trộn dung dịch A và dung dịch B thu được ở trên và trộn đều. Tiếp đó rót dung dịch này vào ống cryotip tiệt trùng (1ml/ống), và bảo quản ở 4°C cho đến khi sử dụng. Thu được các ống chứa môi trường bảo quản mẫu sinh thiết phục vụ nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori*.

Ví dụ 2: Thử nghiệm khả năng hồi phục của vi khuẩn được bảo quản trong môi trường bảo quản mẫu sinh thiết của môi trường

Để thử nghiệm hiệu suất phục hồi vi khuẩn *Helicobacter pylori* từ mẫu bệnh phẩm sinh thiết dạ dày, tiến hành các thử nghiệm nuôi cấy mảnh sinh thiết thu được từ cơ sở lấy mẫu khác nhau trong điều kiện thực địa, được bảo quản bằng môi trường bảo quản mẫu sinh thiết thu được từ Ví dụ 1 và vận chuyển về cơ sở phân tích với các thời gian bảo quản khác nhau.

Mẫu thử nghiệm là mẫu sinh thiết tại vị trí nghi ngờ có mặt của vi khuẩn *Helicobacter pylori*, trong đó mẫu được thu thập từ các bệnh nhân được chẩn đoán viêm dạ dày mạn tính, ung thư dạ dày, loét dạ dày và loét hành tá tràng và đã được xét nghiệm nhanh vi khuẩn *Helicobacter pylori* dương tính thông qua nội soi và xét nghiệm PCR

nhân lên đoạn gen 23S đặc trưng của *Helicobacter pylori*. Tiêu chuẩn loại trừ là các bệnh nhân có tiền sử điều trị vi khuẩn *Helicobacter pylori*; tiền sử sử dụng Bismuth, sử dụng thuốc ức chế bơm proton (PPI) trong vòng 2 tuần trước ngày sinh thiết.

Sau khi sinh thiết, mẫu sinh thiết từ dạ dày bệnh nhân được chuyển vào ống cryotip chứa môi trường bảo quản mẫu sinh thiết thu được từ Ví dụ 1. Mẫu được giữ ở 4°C tối đa 10 ngày đối với các mẫu cấy tươi, hoặc bảo quản cấp đông ở nhiệt độ thấp hơn -25°C cho đến lúc nuôi cấy đối với mẫu đông sâu (mẫu lưu giữ thời gian dài), trên 10 ngày. Các mẫu được phục hồi và đánh giá theo thời gian bảo quản để xác định khả năng lưu giữ và bảo quản vi khuẩn *Helicobacter pylori* trong mẫu sinh thiết của chế phẩm thử nghiệm.

Các mảnh sinh thiết sau khi lưu giữ và bảo quản trong chế phẩm bảo quản thu được từ Ví dụ 1 được phục hồi và cấy trên đĩa nuôi cấy chọn lọc *Helicobacter pylori* thương mại Pylori Agar (bioMérieux, Pháp).

Mảnh sinh thiết được nghiền trong 1 ml môi trường vận chuyển. Sau đó, hút ra 200 μ L dịch nghiền cấy trải trên đĩa nuôi cấy chọn lọc Pylori Agar (bioMérieux, Pháp). Vi khuẩn được nuôi cấy ở điều kiện vi hiếu khí, 37°C, đọc kết quả sau 7 ngày.

Kết quả nuôi cấy được công nhận là vi khuẩn *Helicobacter pylori* khi cho kết quả dương tính với cả 4 phương pháp định danh vi khuẩn sau: (1) định danh qua hình thái khuẩn lạc quan sát trên môi trường đĩa thạch; (2) định danh qua hình thái vi khuẩn khi quan sát tiêu bản nhuộm Gram dưới kính hiển vi; (3) định danh bằng thử nghiệm test nhanh Urease; (4) định danh khuẩn lạc bằng hệ thống định danh vi sinh vật VITEK® MS (bioMérieux, Pháp).

Kết quả nuôi cấy, đánh giá khả năng phục hồi trên các mẫu sinh thiết dạ dày thử nghiệm được bảo quản trong môi trường vận chuyển và bảo quản mẫu sau 72 giờ được thể hiện trên Bảng 1.

Bảng 1: Kết quả phục hồi *Helicobacter pylori* trong mảnh sinh thiết thu thập từ các bệnh nhân viêm dạ dày mạn, loét tá tràng, loét dạ dày và ung thư dạ dày sau 72 giờ

			Kết quả phục hồi <i>H.pylori</i>		Tổng
			Không thành công	Thành công	
Chẩn đoán	Viêm dạ dày mạn	Số lượng	10	50	60
		%	16,7%	83,3%	100%
	Loét tá tràng	Số lượng	7	35	42
		%	16,7%	83,3%	100%

	Loét dạ dày	Số lượng	7	45	52
		%	13,5%	86,5%	100%
	Ung thư	Số lượng	12	33	45
		%	26,7%	73,3%	100%
Tổng		Số lượng	36	163	199
		%	18,1%	81,9%	100%

Kết quả cho thấy gần 82% tổng số mảnh sinh thiết dạ dày thu thập từ các bệnh nhân có kết quả test nhanh và PCR xác định có *Helicobacter pylori* dương tính được bảo quản trong môi trường vận chuyển theo giải pháp cho kết quả phục hồi thành công trong nuôi cấy, hiệu suất phục hồi tốt nhất được ghi nhận ở nhóm bệnh loét dạ dày (86,5%). Với giá trị $p > 0,05$ chứng tỏ không có sự khác biệt đáng kể trong khả năng phục hồi *Helicobacter pylori* ở những mảnh sinh thiết lấy từ các nhóm bệnh khác nhau (viêm, loét, ung thư) cũng như các vị trí sinh thiết khác nhau (tá tràng, dạ dày). Đây là một hiệu quả vượt trội so với các môi trường lỏng hiện tại chỉ cho phép phục hồi vi khuẩn *Helicobacter pylori* dưới 5 giờ bảo quản.

Để đánh giá hiệu quả so với môi trường bán rắn thương mại, tiến hành thử nghiệm so sánh với môi trường bán rắn MELAB (Việt Nam). Các mẫu sinh thiết được đưa vào bảo quản trong môi trường theo Ví dụ 1 (TN) và môi trường MELAB. Các mẫu được giữ ở 4°C, thời gian 10 ngày để đánh giá khả năng phục hồi. Đối với mẫu bệnh phẩm bảo quản trong MELAB, các mảnh sinh thiết được chuyển sang 200 μ l canh thang để thuận lợi cho việc nghiên cứu. Các thao tác và điều kiện nuôi cấy theo điều kiện nuôi cấy chuẩn. Kết quả thu được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2: Kết quả đánh giá khả năng nuôi cấy phục hồi mẫu

Mẫu		Kết quả nuôi cấy		Tổng
		âm tính	dương tính	
TN	Số lượng	13	21	34
	Tỷ lệ	38,2%	61,8%	100%
MELAB	Số lượng	17	17	34
	Tỷ lệ	50%	50%	100%

Kết quả thực tế cho thấy, khả năng phục hồi *Helicobacter pylori* từ mảnh sinh thiết bảo quản trong môi trường TN theo sáng chế đạt 61,8% là cao hơn khi so với mẫu sinh thiết được bảo quản trong môi trường MELAB (50%). Như vậy có thể thấy, khả năng

phục hồi vi khuẩn *Helicobacter pylori* trong môi trường vận chuyển và bảo quản theo sáng chế tương đương so với môi trường vận chuyển bán rắn thương mại MELAB.

Kết quả nuôi cấy được thể hiện trên Hình 1, trong đó ảnh chụp khuẩn lạc *Helicobacter pylori* trên đĩa nuôi cấy chọn lọc với mẫu phục hồi từ mảnh sinh thiết tươi được bảo quản trong môi trường MELAB (A1) và môi trường TN theo giải pháp (A2); ảnh chụp khuẩn lạc *Helicobacter pylori* trên kính hiển vi tiêu bản nhuộm Gram phục hồi từ mẫu trong môi trường MELAB (B1) và môi trường TN theo giải pháp (B2). Kết quả cho thấy cả hai đĩa nuôi cấy đều thu được khuẩn lạc điển hình của *Helicobacter pylori*: hình thái tròn, trơn nhẵn, kích thước từ li ti đến nhỏ. Cả hai tiêu bản đều thể hiện hình ảnh hình thái điển hình của vi khuẩn *Helicobacter pylori*: xoắn khuẩn có thể được nhìn thấy dưới dạng que thẳng hoặc cong; bắt màu hồng sau khi nhuộm Gram do *Helicobacter pylori* là vi khuẩn Gram âm. Chiều dài tế bào vi khuẩn khoảng 2,5 đến 4,0 μm và đường kính tế bào khoảng 0,5 đến 1,0 μm .

Như vậy, môi trường bảo quản mẫu sinh thiết theo sáng chế khả năng lưu giữ và phục hồi *Helicobacter pylori* từ các mảnh sinh thiết cho phép dễ dàng bảo quản và vận chuyển mẫu với hiệu quả nuôi cấy phục hồi lên tới 86,5% trong 72 giờ và vẫn giữ được khả năng phục hồi lên tới 10 ngày đạt 61,8% tương đương với môi trường vận chuyển bán rắn MELAB (Việt Nam). Điều này cho thấy môi trường bảo quản theo sáng chế có hiệu quả vượt trội hơn hẳn môi trường lỏng thường dùng (bảo quản dưới 5 giờ) và thuận lợi cho việc thu thập, bảo quản và vận chuyển mẫu phục vụ cho phân tích xét nghiệm thường quy vi khuẩn *Helicobacter pylori*.

Ví dụ 3: Thử nghiệm phục hồi vi khuẩn Helicobacter pylori trong điều kiện bảo quản đông sâu

Theo khuyến cáo từ các nhà sản xuất, môi trường vận chuyển bán rắn MELAB không thích hợp dùng làm môi trường lưu giữ và bảo quản mẫu bệnh phẩm sinh thiết ở điều kiện âm sâu trong khoảng thời gian dài (trên 10 ngày). Việc bảo quản phải được thực hiện với môi trường lỏng chuyên dụng. Để thử nghiệm khả năng sử dụng môi trường bảo quản mẫu sinh thiết thu được từ Ví dụ 1 thay thế môi trường bảo quản chuyên dụng để bảo quản đông sâu mẫu vi sinh, các mẫu sau khi thu thập được chuyển vào các ống chứa môi trường bảo quản mẫu sinh thiết sang bảo quản trong điều kiện đông sâu - 80°C. Tiêu chuẩn chọn mẫu nghiên cứu và phương pháp nuôi cấy được thực hiện tương

tự ví dụ 2. Mẫu sau khi sinh thiết được thao tác trên khay đá lạnh và bảo quản đông sâu và được khôi phục theo thời gian bảo quản để đánh giá khả năng khôi phục mẫu. Kết quả đánh giá tỷ lệ phục hồi *H.pylori* từ nuôi cấy mảnh sinh thiết bảo quản đông sâu trong môi trường vận chuyển dạng lỏng theo giải pháp được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3: Kết quả hồi phục vi khuẩn *Helicobacter pylori* từ mảnh sinh thiết được bảo quản và lưu giữ trong chế phẩm môi trường bảo quản mẫu theo thời gian

			Kết quả phục hồi <i>H.pylori</i>		Tổng
			Không thành công	Thành công	
Thời gian bảo quản	Sau 30 ngày	Số lượng	2	48	50
		%	4%	96%	100,0%
	Sau 1 năm	Số lượng	14	47	61
		%	23,0%	77,0%	100,0%
	Sau 2 năm	Số lượng	20	68	88
		%	22,7%	77,3%	100,0%
Tổng		Số lượng	36	163	199
		%	18,1%	81,9%	100,0%

So sánh trên thời gian lưu trữ và bảo quản mẫu bệnh phẩm sinh thiết dạ dày bằng môi trường bảo quản theo giải pháp cho đến thời điểm nuôi cấy, hiệu suất phục hồi *Helicobacter pylori* thành công nhất với thời gian vận chuyển dưới 30 ngày là 96%.

Kết quả nuôi cấy được thể hiện trên Hình 2, trong đó cho thấy ảnh chụp khuẩn lạc *Helicobacter pylori* trên đĩa nuôi cấy chọn lọc được phục hồi từ mảnh sinh thiết được bảo quản ở -80°C sau với mẫu phục hồi từ mảnh sinh thiết được bảo quản trong tươi được bảo quản trong môi trường theo giải pháp sau 27 ngày (A1); sau 365 ngày (A2) và sau 695 ngày (A3) kể từ ngày sinh thiết và ảnh chụp khuẩn lạc trên kính hiển vi tiêu bản nhuộm Gram phục hồi từ mảnh sinh thiết bảo quản trong môi trường theo sáng chế ở -80°C sau (B1) 30 ngày; (B2) 364 ngày (1 năm) và (B3) 695 ngày (2 năm) kể từ ngày sinh thiết. Cả ba đĩa nuôi cấy đều thu được khuẩn lạc điển hình của *Helicobacter pylori*: hình thái tròn, trơn nhẵn, kích thước từ li ti đến nhỏ. Cả ba tiêu bản đều thể hiện hình ảnh hình thái điển hình của vi khuẩn *Helicobacter pylori*: xoắn khuẩn có thể được nhìn thấy dưới dạng que thẳng hoặc cong; bắt màu hồng sau khi nhuộm Gram do *Helicobacter pylori* là vi khuẩn Gram âm. Chiều dài tế bào vi khuẩn khoảng 2,5 đến 4,0 μm và đường kính tế bào khoảng 0,5 đến 1,0 μm .

Đặc biệt, thử nghiệm này đã cho thấy hiệu suất phục hồi *Helicobacter pylori* từ mảnh sinh thiết được bảo quản 1 năm lên đến 77% (47/61 mẫu) thậm chí các mẫu bệnh phẩm được bảo quản 2 năm cũng có số liệu tương đương với 77,3% (68/88 mẫu). Kết quả này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Như vậy, môi trường bảo quản mẫu sinh thiết theo giải pháp có khả năng lưu giữ và bảo quản tốt các mẫu sinh thiết dạ dày trong điều kiện lạnh sâu 30 ngày kể từ ngày sinh thiết cho hiệu suất phục hồi lên đến 96%. Kết quả nuôi cấy cũng cho thấy chất lượng ổn định của môi trường bảo quản mẫu sinh thiết theo giải pháp khi sử dụng lưu giữ các mẫu mảnh sinh thiết trong thời gian lên tới 2 năm với hiệu suất phục hồi khoảng 77%. Điều này cho thấy hiệu quả vượt trội của môi trường bảo quản theo giải pháp để bảo quản khôi phục vi khuẩn *Helicobacter pylori* trong mẫu sinh thiết khi bảo quản trong điều kiện đông sâu.

Ví dụ 4: Đánh giá khả năng tái phục hồi Helicobacter pylori từ nuôi cấy các mẫu mảnh sinh thiết bảo quản trong môi trường bảo quản

Để thử nghiệm đánh giá khả năng tái phục hồi *Helicobacter pylori*, các mảnh sinh thiết nội soi sau khi được nghiền trong 1 ml môi trường thu được từ Ví dụ 1. Tiếp đó, sử dụng 200 μ L dịch nghiền cấy trải trên đĩa nuôi cấy chọn lọc Pylori Agar (bioMérieux, Pháp) cho lần đầu. Lặp lại quá trình nuôi cấy với mẫu dịch nghiền này và sau một khoảng thời gian xác định với cùng điều kiện nuôi cấy. Đọc kết quả sau 7 ngày nuôi cấy ở điều kiện vi hiếu khí, 37°C. Kết quả được thể hiện trên Hình 3 cho thấy ảnh chụp khuẩn lạc *Helicobacter pylori* trên đĩa nuôi cấy chọn lọc phục hồi từ mảnh sinh thiết bảo quản trong môi trường theo sáng chế với (A1) phục hồi lần 1 sau khi nội soi; (A2) phục hồi lần 2 sau 4 tháng (120 ngày), và ảnh chụp ảnh chụp khuẩn lạc trên kính hiển vi tiêu bản nhuộm Gram với (B1) phục hồi sau khi nội soi, và (B) phục hồi lần 2 sau 4 tháng (120 ngày).

Các đĩa nuôi cấy đều thu được khuẩn lạc điển hình của *Helicobacter pylori*: hình thái tròn, trơn nhẵn, kích thước từ li ti đến nhỏ. Cả ba tiêu bản đều thể hiện hình ảnh hình thái điển hình của vi khuẩn *Helicobacter pylori*: xoắn khuẩn có thể được nhìn thấy dưới dạng que thẳng hoặc cong; bắt màu hồng sau khi nhuộm Gram do *Helicobacteri pylori* là vi khuẩn Gram âm. Chiều dài tế bào vi khuẩn khoảng 2,5 đến 4,0 μ m và đường kính tế bào khoảng 0,5 đến 1,0 μ m.

Kết quả thu được cho thấy có 28 mẫu tái phục hồi thành công vi khuẩn *Helicobacter pylori*, trong đó 7 mẫu được tái phục hồi trong khoảng 40 ngày, 8 mẫu trong 60 ngày, 8 mẫu trong 70 ngày và 5 mẫu từ 70-140 ngày.

Như vậy, môi trường bảo quản và vận chuyển thu được từ Ví dụ 1 cho thấy có khả năng lưu giữ và bảo quản mẫu bệnh phẩm, cho phép tái phục hồi *Helicobacter pylori* với các khoảng thời gian khác nhau lên tới 140 ngày.

Kết quả thử nghiệm cho thấy môi trường bảo quản mẫu sinh thiết thu được từ Ví dụ 1 không chỉ có hiệu quả vận chuyển và bảo quản tốt mẫu sinh thiết dạ dày ở các nhiệt độ bảo quản khác nhau, từ mẫu tươi cho đến mẫu đông sâu, và cho hiệu suất phục hồi *Helicobacter pylori* cao ở các mẫu có thời gian lưu giữ dài (trên 10 ngày). Môi trường này còn có tiềm năng trong việc tái phục hồi vi khuẩn *Helicobacter pylori* sau các khoảng thời gian khác nhau kể từ lần cấy đầu tiên. Điều này rất thuận lợi trong việc bảo quản và tái sử dụng mẫu bệnh phẩm để nuôi cấy thu lại chủng mà không cần thiết phải nội soi sinh thiết mẫu từ bệnh nhân.

Điều này cho thấy môi trường bảo quản mẫu sinh thiết theo sáng chế có khả năng cung cấp môi trường vận chuyển và phục hồi hiệu quả, dễ sản xuất và đặc hiệu với vi khuẩn *Helicobacter pylori*. Ngoài ra, sản phẩm có cải tiến trong việc bảo quản mẫu bệnh phẩm ở nhiệt độ âm sâu sau hơn 1 năm mà vẫn giữ hiệu suất phục hồi tới 77%.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Quy trình sản xuất môi trường bảo quản mẫu sinh thiết theo sáng chế cho phép sản xuất được môi trường bảo quản mẫu sinh thiết dạng lỏng có tác dụng lưu giữ và bảo quản ổn định vi khuẩn *Helicobacter pylori* trong mẫu bệnh phẩm sinh thiết phục vụ cho xét nghiệm nuôi cấy và phân tích về sau. Quy trình sản xuất đơn giản, hiệu quả cho phép phát triển được môi trường đặc hiệu cho phép thay thế các môi trường bảo quản bán rắn trong việc bảo quản mẫu sinh thiết tươi và các môi trường bảo quản mẫu sinh học chuyên dụng cho mẫu đông sâu. Quy trình theo sáng chế chủ động được nguồn môi trường cần cho quá trình vận chuyển và bảo quản *Helicobacter pylori* cho phép sinh thiết mẫu từ cơ sở xa và vận chuyển về các phòng xét nghiệm cho phép giảm được chi phí nghiên cứu lẫn chi phí khám chữa bệnh.

môi trường bảo quản mẫu sinh thiết phục vụ nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori* dạng lỏng theo sáng chế là một môi trường lưu trữ, bảo quản tối ưu và ổn định (cho khả năng phục hồi *Helicobacter pylori* trung bình gần 82% ở tất cả các mẫu tươi (4°C) đến đông sâu (-80°C)). Đồng thời, môi trường vận chuyển dạng lỏng mang đến giải pháp thuận tiện cho phép bảo quản mẫu bệnh phẩm sinh thiết ổn định *Helicobacter pylori* trong khoảng thời gian đáng kỳ vọng (tỉ lệ phục hồi *Helicobacter pylori* ở những mẫu lưu trữ sau 1 năm đạt tới 77%). Đây là một cải tiến khác biệt vượt trội, giải quyết điểm yếu về thời gian bảo quản (<10 ngày) của các môi trường bán rắn trên thị trường. Ngoài ra, sản phẩm môi trường vận chuyển còn ghi nhận khả năng tái phục hồi *Helicobacter pylori* trong các khoảng thời gian khác nhau kể từ lần cấy đầu tiên. Điều này mang đến một giải pháp trong việc tái sử dụng mẫu bệnh phẩm để nuôi cấy lấy lại chủng cho các nghiên cứu lâu dài mà không cần nội soi sinh thiết lại từ bệnh nhân.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất môi trường bảo quản mẫu sinh thiết phục vụ nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori*, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) Chuẩn bị nguyên liệu pha chế môi trường bao gồm các thành phần theo tỷ lệ % trọng lượng như sau:

Cao nấm men:	0,05-1
Axit casamino:	0,1-2
Pepton:	0,1-2
NaCl:	0,05-0,5
L-cystein:	0,01-0,1
Dextroza:	0,5-5
Glyxerol:	20-35
Nước cất:	60-75

b) Pha chế dung dịch dưỡng chất bằng cách lần lượt hòa tan các thành phần cao nấm men, axit casamino, pepton và NaCl với 4/5 lượng nước cất, sau đó hấp tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút, thu được dung dịch dưỡng chất;

c) Pha chế dung dịch bảo quản bằng cách hòa tan L-cystein với 1/5 lượng nước cất còn lại, chuẩn độ dung dịch đến pH=7 bằng NaOH 0,5M, rồi bổ sung lần lượt dextroza, glyxerol và trộn đều, sau đó lọc dung dịch này qua giấy lọc cỡ 0,22 µm thu được dung dịch bảo quản; và

d) Thu môi trường bảo quản mẫu sinh thiết phục vụ nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori* bằng cách phối trộn dung dịch dưỡng chất với dung dịch bảo quản thu được ở trên, sau khi trộn đều, làm lạnh đến 4°C thu được môi trường bảo quản mẫu sinh thiết phục vụ nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori* dạng lỏng đồng nhất.

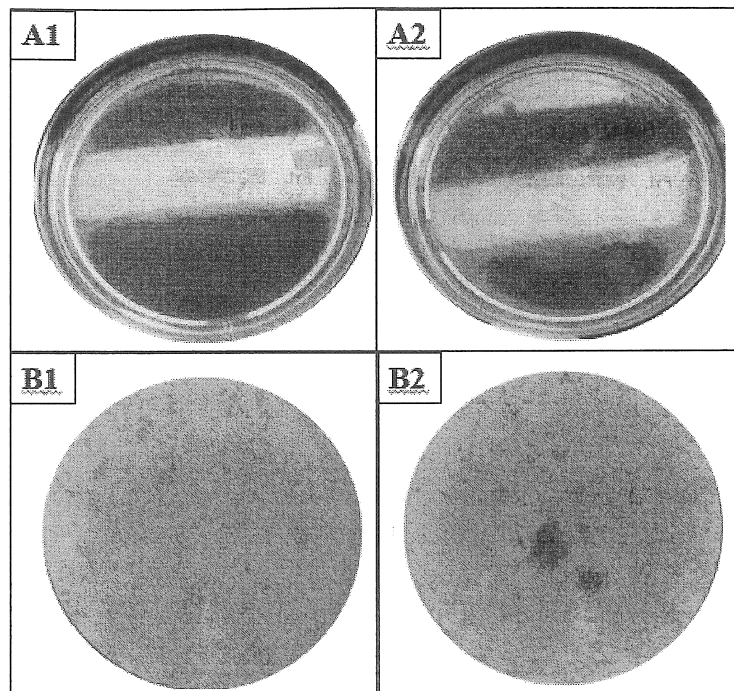
2. Môi trường bảo quản mẫu sinh thiết phục vụ nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori* thu được từ quy trình theo điểm 1, trong đó môi trường bảo quản này ở dạng lỏng và bao gồm các thành phần theo tỷ lệ % trọng lượng sau:

Cao nấm men:	0,05-1
Axit casamino:	0,1-2
Pepton:	0,1-2
NaCl:	0,05-0,5

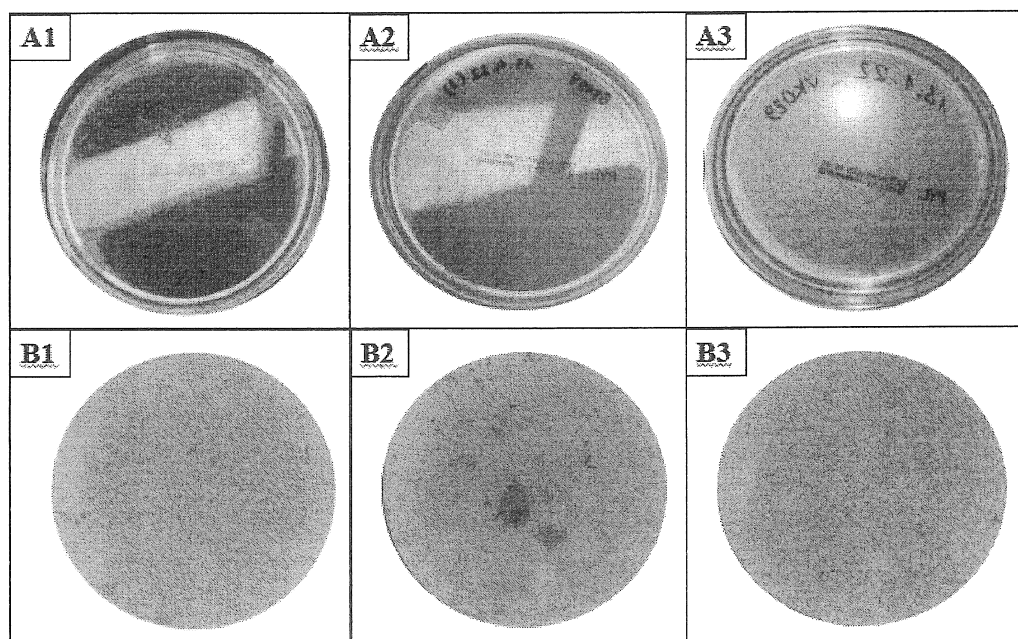
L-cystein:	0,01-0,1
Dextroza:	0,5-5
Glyxerol:	20-35
Nước cất:	60-75.

1/2

HÌNH 1



HÌNH 2



2/2

HÌNH 3

