



(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)



2-0003971

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

(13) **Y**

(21) 2-2024-00773

(22) 14/03/2022

(67) 1-2022-01575

(45) 25/02/2025 443

(43) 25/07/2022 412A

(73) Bệnh viện Trung Ương Quân đội 108 (VN)

số 1, phố Trần Hưng Đạo, phường Bạch Đằng, quận Hai Bà Trưng, thành phố Hà Nội

(72) Vũ Văn Khiên (VN); Trần Thị Huyền Trang (VN); Lê Hữu Song (VN); Phan Quốc Hoàn (VN); Trần Thị Thanh Huyền (VN); Bùi Thanh Thuyết (VN); Lê Thị Lâm Quý (VN); Hoàng Anh Hà (VN); Lê Hữu Phương Anh (VN).

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT MÔI TRƯỜNG THẠCH RẰNG ĐỂ NUÔI CẤY CHỌN
LỌC VI KHUẨN *HELICOBACTER PYLORI* VÀ MÔI TRƯỜNG THẠCH RẰNG
THU ĐƯỢC TỪ QUY TRÌNH NÀY

(21) 2-2024-00773

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất môi trường thạch rắn để nuôi cấy chọn lọc vi khuẩn *Helicobacter pylori* và môi trường thạch rắn thu được từ quy trình theo sáng chế. Bằng cách cải tiến thành phần môi trường nuôi cấy sử dụng kháng sinh Vancomycin, Amphotericin B và muối Na_2SO_3 cho phép ức chế hiệu quả vi khuẩn gram dương và nấm, nhưng cho phép vi khuẩn *Helicobacter pylori* phát triển, đồng thời bằng việc bổ sung Tetrazolium tím nên các khuẩn lạc thu được có màu tím nên dễ dàng quan sát trên bề mặt thạch trong, thuận lợi cho quan sát kết quả, iúp đổi màu khuẩn lạc thành màu tím rõ nét trên nền thạch trắng trong, tạo thuận lợi cho việc quan sát kết quả.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học, công nghệ vi sinh ứng dụng trong nuôi cấy vi khuẩn gây bệnh để phục vụ cho việc chẩn đoán và điều trị bệnh nhiễm khuẩn dạ dày. Cụ thể, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất môi trường thạch rắn để nuôi cấy chọn lọc vi khuẩn *Helicobacter pylori* và môi trường thạch rắn thu được từ quy trình này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Helicobacter pylori là một loại xoắn khuẩn gram âm được tìm thấy ở trên bề mặt và bên dưới lớp nhầy dạ dày và chúng được coi là vi khuẩn có tỷ lệ lây nhiễm phổ biến nhất trên thế giới, nó lây nhiễm từ 30 đến 50 % dân số ở các nước phát triển và 85 đến 95 % dân số ở các nước đang phát triển. Việc tìm 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. *Helicobacter pylori* được xác định chịu trách nhiệm chính gây ra bệnh viêm dạ dày mạn, loét dạ dày tá tràng và còn được xếp vào nhóm I trong các tác nhân gây bệnh ung thư dạ dày. Do đó, điều trị triệt để *Helicobacter pylori* không chỉ góp phần điều trị bệnh hiệu quả mà còn giúp phòng ngừa các biến chứng của bệnh như loét hay ung thư dạ dày. Trong điều trị lâm sàng, cần phải có công cụ giúp chẩn đoán chính xác sự lây nhiễm *Helicobacter pylori* hiệu quả để trợ giúp cho công tác điều trị.

Hiện nay, các phương pháp chẩn đoán được chia thành hai nhóm chính bao gồm: (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 test nhanh ureaza; xét nghiệm PCR; và (2) các thử nghiệm không xâm lấn bao gồm: thử nghiệm test 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 có độ đặc hiệu 100 % và đây cũng là bước tiền đề cho thử nghiệm kháng sinh đồ về sau.

Về mặt kỹ thuật, *Helicobacter pylori* là một loại vi khuẩn khó nuôi cấy nên quá trình nuôi cấy *Helicobacter pylori* cần nhiều điều kiện nghiêm ngặt từ yêu cầu về mẫu, môi trường nuôi cấy đến các điều kiện nuôi cấy. Ngoài ra, một yêu cầu bắt buộc dành cho bệnh nhân trước khi lấy mẫu bệnh phẩm là bệnh nhân không được uống thuốc kháng sinh, các loại thuốc kháng tiết và phải ngưng điều trị ít nhất hai tuần trước khi làm xét nghiệm.

Đã có một số môi trường nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori* được công bố, ví dụ CN 106635862 A, đã đề cập đến phương pháp sản xuất và môi trường nuôi cấy phân lập vi khuẩn *Helicobacter pylori*. Môi trường được này được bổ sung máu dê vào môi trường gốc để kích thích sự phát triển của vi khuẩn *Helicobacter pylori*. Môi trường gốc bao gồm pepton, pepton đa hóa trị, chiết xuất thịt bò, chiết xuất nấm men, natri clorua, natri bicarbonat, glucoza, tinh bột ngô không hòa tan, urê, natri bisulfit và thạch. Trong đó môi trường này sử dụng natri bisulfit để hạn chế sự phát triển của vi khuẩn Gram dương nhằm tăng tỷ lệ phát hiện vi khuẩn *Helicobacter pylori* có trong mẫu.

Tài liệu CN 108277257 A đã đề cập môi trường nuôi cấy đặc hiệu nhằm cải thiện độ đặc hiệu cho vi khuẩn *Helicobacter pylori*, trong đó môi trường này sử dụng chiết xuất tim gia súc, chiết xuất não bò, cystein, Na_2HPO_4 , pepton, NaCl và bột agar. Môi trường này cho phép vi khuẩn *Helicobacter pylori* phát triển với khả năng phát triển đạt 98,88% và độ đặc hiệu môi trường nuôi cấy đạt 100%.

Ngoài ra, các tài liệu JP 2011-15664 A, WO2014019696 A1 cũng đã đề cập đến phương pháp sản xuất, môi trường nuôi cấy và phương pháp phát hiện vi khuẩn *Helicobacter pylori* bằng kỹ thuật nuôi cấy trên nền thạch. Tuy nhiên, cần lưu ý rằng, các môi trường và các phương pháp này đã được cải thiện về tính hiệu quả, độ đặc hiệu, tuy nhiên, các thành phần sử dụng là khó kiếm, phức tạp nên cần có những nguồn cung cấp chuyên biệt, không phù hợp để phát triển trong các phòng thí nghiệm vừa và nhỏ.

Ngoài ra, các thành phần môi trường thạch nuôi cấy thường bao gồm agar, các chất hỗ trợ tăng trưởng và các chất bổ sung chọn lọc. Một hạn chế của các môi trường này đó là, đối với những môi trường đặc hiệu, việc sử dụng, ví dụ chiết xuất tim, chiết xuất não bò, hay máu dê vào môi trường thạch sẽ làm thay đổi màu sắc của môi trường thạch, từ đó rất khó quan sát được khuẩn lạc trên các môi trường này. Ngược lại, nếu chỉ sử dụng môi trường cơ bản, việc nuôi cấy thành công vi khuẩn *Helicobacter pylori* là rất khó khăn.

Trên thị trường cũng đã có các môi trường nuôi cấy chọn lọc *Helicobacter pylori* thương mại, ví dụ như đĩa Pylori Agar (bioMérieux, Pháp), và đĩa BD Helicobacter Agar, Modified (Becton Dickinson, Hoa Kỳ) được cung cấp để phát hiện vi khuẩn *Helicobacter pylori* trong mẫu nuôi cấy. Tuy nhiên, các môi trường này khi nuôi cấy không những thu được khuẩn lạc *Helicobacter pylori* có kích thước rất nhỏ mà còn có màu trắng trong trùng với màu thạch nên khó khăn cho việc đánh giá kết quả nuôi cấy.

Do đó, vẫn cần quy trình sản xuất và môi trường thạch rắn để cho phép nuôi cấy chọn lọc vi khuẩn *Helicobacter pylori* không chỉ giúp nuôi cấy đặc hiệu vi khuẩn *Helicobacter pylori*, hạn chế sự phát triển của các vi khuẩn tương đồng mà còn giúp cho việc xác định khuẩn lạc một cách dễ dàng, hạn chế các sai sót trong việc đánh giá kết quả, nâng hiệu quả cho việc chẩn đoán và điều trị bệnh nhiễm khuẩn dạ dày bởi vi khuẩn *Helicobacter pylori*.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là nhằm khắc phục các tồn tại đã nêu ở trên, cụ thể bằng cách cải tiến thành phần môi trường cho phép nuôi cấy chọn lọc vi khuẩn *Helicobacter pylori* trên môi trường thạch với khuẩn lạc lớn hơn, có màu tím nên dễ quan sát trực tiếp trên mặt thạch trong suốt, từ đó tăng hiệu quả xác định sự có mặt của vi khuẩn *Helicobacter pylori* trong mẫu, góp phần hiệu quả vào việc chẩn đoán và điều trị bệnh nhiễm khuẩn dạ dày do nhiễm *Helicobacter pylori*. Theo đó sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất môi trường thạch rắn để nuôi cấy chọn lọc vi khuẩn *Helicobacter pylori* và môi trường thạch rắn để nuôi cấy chọn lọc vi khuẩn *Helicobacter pylori* thu được từ quy trình theo sáng chế.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất môi trường thạch rắn để nuôi cấy chọn lọc vi khuẩn *Helicobacter pylori*, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị các nguyên liệu bao gồm cao thịt bò, axit casamino, pepton, glucoza, NaCl, Na₂SO₃, aga, huyết thanh ngựa, Vancomycin, Amphotericin B, Tetrazolium tím với lượng tính cho một lít môi trường, bao gồm:

Cao thịt bò:	5 g
Axit casamino:	10 g
Pepton:	5 g
Glucoza:	2 g
NaCl:	5 g

Na ₂ SO ₃ :	0,05 g
Aga:	15 g
Vancomycin:	10 mg
Amphotericin B:	5 mg
Tetrazolium tím:	50 mg
Huyết thanh ngựa:	100 ml
Nước cất:	vừa đủ 1 lít

b) pha chế môi trường gốc bằng cách hòa tan cao thịt bò, axit casamino, pepton, glucoza, NaCl và Na₂SO₃, aga với nước cất và tiệt trùng ở nhiệt độ 120°C trong 20 phút rồi hạ nhiệt độ xuống 50°C thu được môi trường gốc;

c) pha chế các dung dịch bổ sung bằng cách hòa tan lần lượt vancomycin, amphotericin B, tetrazolium tím với nước cất đến các nồng độ 50 mg/ml, 250 µg/ml và 25 mg/ml, tương ứng, thu được các dung dịch bổ sung vô trùng; và

d) thu môi trường thạch rắn bằng cách phối trộn các dung dịch bổ sung và huyết thanh ngựa vào môi trường gốc ở nhiệt độ 50°C, sau đó bổ sung nước cất vừa đủ để thu được môi trường nuôi cấy lỏng bao gồm cao thịt bò 5g/l, axit casamino 10g/l, pepton 5g/l, glucoza 2g/l, aga 15g/l, NaCl 5g/l, Na₂SO₃, 0,05 g/l, vancomycin 10mg/l, amphotericin B 5mg/l, tetrazolium tím 50mg/l và huyết thanh ngựa 100 ml/l, cuối cùng chia môi trường nuôi cấy lỏng này ra các đĩa nuôi cấy vô trùng, để nguội thu được môi trường thạch rắn.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến môi trường thạch rắn để nuôi cấy chọn lọc vi khuẩn *Helicobacter pylori* thu được từ quy trình theo sáng chế, trong đó môi trường này ở dạng thạch rắn và được điều chế từ các thành phần tính cho một lít môi trường lỏng bao gồm:

Cao thịt bò:	5 g
Axit casamino:	10 g
Pepton:	5 g
Glucoza:	2 g
NaCl:	5 g
Na ₂ SO ₃ :	0,05 g
Aga:	15 g
Vancomycin:	10 mg
Amphotericin B:	5 mg

Tetrazolium tím:	50 mg
Huyết thanh ngựa:	100 ml
Nước cất:	vừa đủ 1 lít

trong đó khác biệt ở chỗ môi trường này bổ sung tetrazolium tím (2-naphthalen-1-yl-3,5-diphenyltetrazol-2-ium;chloride) với lượng 50 mg/l để khuẩn lạc của vi khuẩn *Helicobacter pylori* mọc trên môi trường này có màu tím.

Môi trường thạch rắn để nuôi cấy chọn lọc vi khuẩn *Helicobacter pylori* không chỉ cho phép nuôi cấy đặc hiệu vi khuẩn *Helicobacter pylori* mà còn thu được khuẩn lạc màu tím cho phép dễ dàng phát hiện trên nền thạch trong suốt, giúp hỗ trợ cho công tác phân lập cũng như chẩn đoán bệnh nhiễm vi khuẩn *Helicobacter pylori*.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1: Ảnh chụp khuẩn lạc *Helicobacter pylori* nuôi cấy trên (A) đĩa đối chứng là đĩa thương mại Pylori Agar (bioMérieux, France) và (B) sản phẩm đĩa môi trường theo giải pháp. 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. Khuẩn lạc mọc trên đĩa Pylori Agar có màu trắng trong, còn khuẩn lạc mọc trên đĩa môi trường theo giải pháp có màu tím.

Hình 2: Ảnh chụp qua kính hiển vi của tiêu bản nhuộm Gram khuẩn lạc *Helicobacter pylori* thu được khi nuôi cấy trên (A) đĩa đối chứng là đĩa thương mại Pylori Agar (bioMérieux, France) và (B) sản phẩm đĩa môi trường theo giải pháp. 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 tím 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 .

Hình 3: Thử nghiệm test nhanh Urease. (A) Mẫu đối chứng âm tính; và kết quả thử nghiệm test nhanh Urease của khuẩn lạc *Helicobacter pylori* thu được khi nuôi cấy trên (B) đĩa đối chứng dương là đĩa thương mại Pylori Agar (bioMérieux, France) và (C) sản phẩm đĩa môi trường theo giải pháp. Với mẫu âm tính không có *Helicobacter pylori*, dung dịch chất thử có màu vàng (A). Khi trong mẫu có *Helicobacter pylori*, enzyme urease tạo ra bởi *Helicobacter pylori* sẽ thủy phân Urê [$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$] có trong dung dịch chất thử thành Amoniac (NH_3), từ đó làm tăng pH của dung dịch chất thử, biến chất thử từ màu vàng (âm

tính với *Helicobacter pylori*) chuyển sang màu tím (dương tính với *Helicobacter pylori*) (B, C). Do đó, kết quả cho thấy khuẩn lạc thu được từ cả 2 đĩa môi trường đối chứng và đĩa môi trường theo giải pháp đều là khuẩn lạc của vi khuẩn *Helicobacter pylori*.

Mô tả chi tiết giải sáng chế

Sau đây, sáng chế được mô tả chi tiết với các phương án và các ví dụ thực hiện cụ thể, tuy nhiên các phương án và các ví dụ thực hiện cụ thể này chỉ nhằm làm rõ bản chất của sáng chế chứ không nhằm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất môi trường thạch rắn để nuôi cấy chọn lọc vi khuẩn *Helicobacter pylori* và môi trường thạch rắn để nuôi cấy chọn lọc vi khuẩn *Helicobacter pylori* thu được từ quy trình này.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất môi trường thạch rắn để nuôi cấy chọn lọc vi khuẩn *Helicobacter pylori*, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị các nguyên liệu; b) pha chế môi trường gốc; c) pha chế các dung dịch bổ sung; và d) thu môi trường thạch rắn.

Trong bước chuẩn bị các nguyên liệu, các thành phần nguyên liệu được sử dụng để sản xuất môi trường thạch rắn theo sáng chế bao gồm cao thịt bò, axit casamino, pepton, glucoza, NaCl, Na₂SO₃, aga, huyết thanh ngựa, Vancomycin, Amphotericin B, Tetrazolium tím và nước cất. Các thành phần đáp ứng tiêu chuẩn chung trong y tế và phân tích.

Cao thịt bò là bột chiết xuất từ thịt bò đã được loại nước và làm khô, đây là một thành phần chứa nhiều peptit, axit amin, nucleotit, các axit hữu cơ, các chất khoáng và vitamin cần cho sự phát triển của vi sinh vật. Cao thịt bò là thành phần phổ biến, được sử dụng trong nhiều công thức môi trường nuôi cấy vi sinh vật. Theo sáng chế, cao thịt bò được sử dụng ở dạng bột với lượng tối ưu có trong môi trường thạch rắn thu được từ quy trình theo sáng chế là 5 g/l. Lượng cao thịt bò nhiều hơn sẽ gây ảnh hưởng đến màu sắc của môi trường thạch, nhưng nếu thấp hơn sẽ không cung cấp đủ dinh dưỡng cho vi sinh vật cần nuôi cấy.

Axit casamino là hỗn hợp của axit amin và một số peptit kích thước nhỏ thu được từ quá trình thủy phân casein bằng axit. Axit casamino thường được sử dụng trong các môi trường nuôi cấy vi sinh vật, đóng vai trò môi trường bổ sung dưỡng chất thiết yếu, đặc biệt các axit amin thiết yếu cho quá trình phát triển. Mặc dù axit casamino không chứa tryptophan, nhưng axit casamino vẫn được coi là một nguồn cung cấp nitơ dễ hấp thu, dễ

chuyển hóa cho các vi sinh vật (chủ yếu dưới dạng axit amin tự do), nên hay được sử dụng trong chuẩn bị môi trường nuôi cấy. Theo sáng chế, axit casamino được sử dụng ở dạng bột với lượng tối ưu có trong môi trường thạch rắn thu được từ quy trình theo sáng chế là 10 g/l. Việc sử dụng axit casamino cho phép khống chế được lượng tryptophan có trong môi trường, từ đó cho phép điều chỉnh các thành phần tối ưu cho vi khuẩn *Helicobacter pylori* phát triển, hạn chế sự phát triển của các vi khuẩn cạnh tranh mà hình thành các khuẩn lạc giả ảnh hưởng đến kết quả đánh giá.

Pepton đóng vai trò là thành phần hỗ trợ tăng trưởng thu được từ quá trình thủy phân protein bằng enzym, chủ yếu là bằng các enzym trypsin và pepsin. Sản phẩm thủy phân protein bằng enzym này là hỗn hợp các axit amin tự do, bao gồm cả tryptophan, và các đoạn peptit có kích thước khác nhau. Pepton đóng vai trò là nguồn cung cấp nitơ bổ sung cho vi sinh vật phát triển. Theo sáng chế, pepton được sử dụng ở dạng bột với lượng tối ưu có trong môi trường thạch rắn thu được từ quy trình theo sáng chế là 5 g/l. Lượng pepton sử dụng này nhằm bổ sung lượng tryptophan khuyết thiếu vừa đủ để cho vi khuẩn *Helicobacter pylori* phát triển, nhưng không kích thích các vi khuẩn khác phát triển.

Glucosa là một thành phần dinh dưỡng cơ bản trong quá trình sinh trưởng phát triển của mọi cơ thể sống. Đây là nguồn cacbon sơ cấp cho quá trình tạo thành cacbohydrat ở vi khuẩn. Đồng thời, đây còn là nguồn nguyên liệu đầu vào cho quá trình tổng hợp năng lượng, cung cấp ATP cho mọi hoạt động sống của sinh vật. Với vai trò quan trọng cũng như giá thành rẻ, dễ tìm, glucosa được dùng phổ biến trong các công thức môi trường nuôi cấy. Theo sáng chế, glucosa được sử dụng ở dạng bột với lượng tối ưu có trong môi trường thạch rắn thu được từ quy trình theo sáng chế là 2 g/l.

NaCl đóng vai trò là chất phụ trợ có tác dụng duy trì sự ổn định pH của 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 đóng vai trò cân bằng áp suất thẩm thấu trong môi trường nuôi cấy. Theo sáng chế, NaCl được sử dụng ở dạng tinh thể với lượng tối ưu có trong môi trường thạch rắn thu được từ quy trình theo sáng chế là 5 g/l.

Muối natri sulfit (Na_2SO_3) là thành phần bổ sung đóng vai trò làm chất chọn lọc, cho phép tăng tính đặc hiệu của môi trường nuôi cấy *Helicobacter pylori* theo sáng chế. Các tác giả đã nghiên cứu và bất ngờ phát hiện ra rằng, bằng việc sử dụng Na_2SO_3 , môi trường nuôi cấy kết hợp với sử dụng một lượng kháng sinh phù hợp có tác dụng ức chế sự phát triển hiệu quả vi khuẩn Gram dương. Do đó, môi trường thu được sẽ tối ưu cho việc phát triển vi khuẩn Gram âm (*Helicobacter pylori* là vi khuẩn Gram âm), giảm được sự tạp nhiễm do vi khuẩn Gram âm gây ra. Theo sáng chế, Na_2SO_3 được sử dụng ở dạng bột với lượng tối ưu có trong môi trường thạch rắn thu được từ quy trình theo sáng chế là 0,05 g/l.

Aga là thành phần thu được từ rau câu đóng vai trò như một chất làm đông, có tác dụng biến môi trường từ dạng lỏng thành dạng thạch. Aga có tính chất bền nhiệt, tan chảy ở 100°C , nên dễ dàng tiệt trùng. Ở nhiệt độ môi trường, aga đông đặc lại và không bị vi sinh vật phân giải. Điều đó giúp aga hình thành nên một bề mặt rắn, cho phép các vi sinh vật có thể sinh trưởng ở trên bề mặt tạo thành các khuẩn lạc. Ngoài ra, do aga có đặc tính trong suốt, nên thuận tiện cho việc quan sát hình thái khuẩn lạc cũng như đếm số lượng khuẩn lạc trong khi nuôi cấy. Lượng aga được sử dụng đảm bảo cho bề mặt không bị quá cứng cũng như không bị vỡ nát khi điều chế môi trường. Theo sáng chế, aga được sử dụng ở dạng bột với lượng tối ưu có trong môi trường thạch rắn thu được từ quy trình theo sáng chế là 15 g/l.

Huyết thanh ngựa là thành phần đóng vai trò là chất hỗ trợ tăng sinh cho vi sinh vật bởi đây là một nguồn cung dồi dào các axit amin, protein, vitamin, cacbohydrat, lipid, hormon, các yếu tố tăng trưởng, chất khoáng và nguyên tố vi lượng. Huyết thanh ngựa thu được sau khi loại bỏ tế bào máu và các yếu tố gây đông máu từ máu ngựa. Trong huyết thanh ngựa chứa hệ thống bổ thể là thành phần của hệ miễn dịch, có thể gây nên sự phân giải tế bào. Do đó, huyết thanh ngựa được sử dụng theo sáng chế được xử lý gây bất hoạt hệ thống bổ thể bằng cách đun bình serum ở trạng thái vẫn còn đông đá trong bể ổn nhiệt chứa nước ở 56°C trong 30 phút. Sau đó, làm lạnh bình huyết thanh nhanh đến -20°C để ngưng hoàn toàn quá trình bất hoạt. Khi sử dụng, lượng huyết thanh được đông tan đến nhiệt độ phòng và sử dụng làm thành phần bổ sung cho môi trường nuôi cấy. Theo sáng chế, huyết thanh ngựa được sử dụng ở dạng lỏng với lượng tối ưu có trong môi trường thạch rắn thu được từ quy trình theo sáng chế là 100 ml/l.

Vancomycin là chất kháng sinh có tác dụng ức chế sự phát triển của vi khuẩn Gram dương, nhưng lại không có tác dụng đối với hầu hết vi khuẩn Gram âm thường được sử dụng để điều trị các bệnh nhiễm trùng da phức tạp hoặc nhiễm trùng máu. Các tác giả sáng chế đã nhận thấy rằng, khi bổ sung một lượng vancomycin kết hợp với Na_2SO_3 cho thấy có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn Gram dương hiệu quả. Do vi khuẩn *Helicobacter pylori* là một loại xoắn khuẩn Gram âm, nên vancomycin giúp làm tăng tính nuôi cấy chọn lọc *Helicobacter pylori*. Cơ chế tác dụng của vancomycin được xác định bao gồm ức chế quá trình tổng hợp thành tế bào, tác động đến tính thấm màng tế bào và quá trình tổng hợp ARN của vi khuẩn. Theo sáng chế, vancomycin được sử dụng ở dạng bột với lượng tối ưu có trong môi trường thạch rắn thu được từ quy trình theo sáng chế là 10 mg/l.

Amphotericin B đóng vai trò là một chất kháng sinh kháng nấm. Cơ chế tác dụng của amphotericin B liên quan đến sự gắn với sterol (chủ yếu là ergosterol), một thành phần của màng tế bào nấm, dẫn đến sự thất thoát nhanh chóng của các ion K^+ , Na^+ , H^+ , Cl^- ra khỏi tế bào nấm. Từ đó, làm thay đổi tính thấm màng tế bào nấm và gây chết tế bào nấm. Việc bổ sung một lượng amphotericin B giúp hạn chế sự phát triển của nấm, cho phép *Helicobacter pylori* phát triển đặc hiệu. Theo sáng chế, amphotericin B được sử dụng ở dạng bột với lượng tối ưu có trong môi trường thạch rắn thu được từ quy trình theo sáng chế là 5 mg/l.

Tetrazolium tím (tetrazolium violet) là một hợp chất trong họ muối tetrazolium có tên theo IUPAC là 2-naphthalen-1-yl-3,5-diphenyltetrazol-2-ium;chloride. Tetrazolium tím thuộc nhóm muối hữu cơ được sử dụng để đánh giá tính sống cũng như độc tính của các chất với tế bào. Theo sáng chế, tetrazolium tím được sử dụng ở dạng muối tinh thể với lượng tối ưu có trong môi trường thạch rắn thu được từ quy trình theo sáng chế là 50 mg/l.

Thông thường, với các môi trường nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori* thương mại mọc trên môi trường thạch thường có màu trắng trong, trùng với màu của môi trường nên việc phát hiện khuẩn lạc gặp nhiều khó khăn. Để giải quyết vấn đề này, các tác giả theo sáng chế đã bất ngờ phát hiện rằng, khi bổ sung một lượng thích hợp tetrazolium tím và môi trường nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori*, môi trường nuôi cấy vẫn giữ được màu trong suốt, nhưng khuẩn lạc của vi khuẩn *Helicobacter pylori* thu được lại có màu tím. Do đó, trong môi trường nuôi cấy chọn lọc vi khuẩn *Helicobacter pylori*, tetrazolium tím được

sử dụng với vai trò như một chất chỉ thị màu đặc hiệu đối với khuẩn lạc vi khuẩn *Helicobacter pylori*. Cơ chế chỉ thị của muối tetrazolium tím này có thể được giải thích thông qua cơ chế xúc tác bởi các enzym dehydrogenaza vốn được vi khuẩn sinh ra để khử NAD^+ hoặc NADP^+ trong quá trình chuyển hóa năng lượng. Khi muối tetrazolium dạng hòa tan (không màu) từ môi trường nuôi cấy thấm qua màng tế bào sẽ được lưu trong tế bào chất của vi khuẩn *Helicobacter pylori*. Khi bị khử bởi các enzym dehydrogenaza, muối tetrazolium tím này sẽ chuyển thành phức formazan không hòa tan, có màu tím dễ nhận biết. Do đó, khuẩn lạc vi khuẩn *Helicobacter pylori* thu được có màu tím cho phép dễ dàng nhận biết trên nền thạch trắng trong.

Vì vậy, các tác giả đã bất ngờ khi bổ sung tetrazolium tím với lượng 50 mg/l vào môi trường nuôi cấy, các chỉ tiêu nuôi cấy vi khuẩn không đổi, môi trường thạch rắn thu được vẫn trong suốt và không ảnh hưởng đến kết quả nuôi cấy, nhưng khuẩn lạc thu được lại có màu tím. Đây là điểm khác biệt, mang lại hiệu quả bất ngờ, vượt trội cho môi trường nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori* theo sáng chế so với các chế phẩm thương mại đã biết trên thị trường. Việc nhuộm màu khuẩn lạc vi khuẩn đặc hiệu trên môi trường thạch tạo thuận lợi cho việc quan sát hình thái và đếm số lượng khuẩn lạc trực tiếp bằng mắt thường.

Thành phần được sử dụng để tạo môi trường dạng lỏng là nước cất. Nước cất tốt nhất là nước cất khử ion, vô trùng cho phép hòa tan các thành phần nguyên liệu. Lượng nước có trong môi trường cho phép đóng vai trò như dung môi hòa tan các chất dinh dưỡng, muối, vitamin, các chất bổ sung chọn lọc, giúp phân tán đều các thành phần này trong môi trường, tạo điều kiện cho sự hấp thu dinh dưỡng của vi sinh vật và điều chỉnh các thành phần đến nồng độ thích hợp.

Trong bước chuẩn bị các nguyên liệu, các thành phần bao gồm cao thịt bò, axit casamino, pepton, glucoza, NaCl , Na_2SO_3 , aga, huyết thanh ngựa, Vancomycin, Amphotericin B, Tetrazolium tím với lượng tính cho một lít môi trường, bao gồm:

Cao thịt bò:	5 g
Axit casamino:	10 g
Pepton:	5 g
Glucoza:	2 g
Aga:	15 g

NaCl:	5 g
Na ₂ SO ₃ :	0,05 g
Vancomycin:	10 mg
Amphotericin B:	5 mg
Tetrazolium tím:	50 mg
Huyết thanh ngựa:	100 ml
Nước cất:	vừa đủ 1 lít

Trong bước pha chế môi trường gốc, các thành phần nguyên liệu tạo nên môi trường gốc bao gồm cao thịt bò, axit casamino, pepton, glucoza, NaCl và Na₂SO₃, aga được hòa với nước cất đến nồng độ phù hợp. Nồng độ này tương ứng theo tỷ lệ các thành phần nguyên liệu được chuẩn bị ở trên và nồng độ không được thấp hơn nồng độ cuối. Sau khi hòa tan các thành phần, môi trường gốc này được tiệt trùng ở nhiệt độ 120°C trong 20 phút rồi hạ nhiệt độ xuống 50°C thu được môi trường gốc. Quá trình tiệt trùng này nhằm tiêu diệt các vi sinh vật sống trong môi trường, đảm bảo môi trường không bị tạp nhiễm bởi các vi sinh vật khác làm giảm chất lượng môi trường, hoặc gây ra sự cạnh tranh sinh trưởng với vi khuẩn *Helicobacter pylori* khi nuôi cấy. Một điều cần lưu ý nữa là việc duy trì môi trường ở nhiệt độ 50°C sau khi tiệt trùng là nhằm mục đích giữ cho môi trường luôn ở trạng thái lỏng, không bị đông đặc cho phép bổ sung các thành phần bổ sung cũng như dễ dàng phân phối lên các đĩa nuôi cấy để tạo môi trường rắn.

Trong bước pha chế các dung dịch bổ sung, các dung dịch này được pha chế bằng cách hòa tan lần lượt vancomycin, amphotericin B, tetrazolium tím với nước cất đến các nồng độ 50 mg/ml, 250 µg/ml và 25 mg/ml, tương ứng, thu được các dung dịch bổ sung vô trùng. Do đây là các thành phần nhạy cảm, dễ bị phân hủy trong điều kiện nhiệt độ cao, áp suất cao nên được bổ sung sau khi môi trường gốc đã được khử trùng. Các thành phần bổ sung được giữ ở điều kiện vô trùng.

Trong bước thu môi trường thạch rắn, tiến hành phối trộn các dung dịch bổ sung thu được ở trên và thành phần huyết thanh ngựa đã được chuẩn bị vào môi trường gốc ở nhiệt độ 50°C. Sau đó bổ sung một lượng nước cất vừa đủ để thu được môi trường nuôi cấy lỏng bao gồm cao thịt bò 5g/l, axit casamino 10g/l, pepton 5g/l, glucoza 2g/l, aga 15g/l, NaCl 5g/l, Na₂SO₃ 0,05 g/l, vancomycin 10mg/l, amphotericin B 5mg/l, tetrazolium tím 50mg/l và huyết thanh ngựa 100 ml/l. Sau khi phối trộn đồng nhất, tiến hành chia môi trường nuôi

cấy lỏng này ra các đĩa nuôi cấy vô trùng. Quá trình này cần nhẹ nhàng, tránh tạo bọt khí để tạo bề mặt nuôi cấy phẳng, dễ dàng cho việc nuôi cấy vi khuẩn. Sau khi để nguội thu được môi trường thạch rắn. Các đĩa môi trường thạch này có thể được sử dụng để nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori* hoặc có thể được bảo quản trong điều kiện 4°C để duy trì độ ẩm và tránh tiếp xúc với ánh sáng cho đến khi sử dụng.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến môi trường thạch rắn để nuôi cấy chọn lọc vi khuẩn *Helicobacter pylori* thu được từ quy trình theo sáng chế, trong đó môi trường này ở dạng thạch rắn và được điều chế từ các thành phần tính cho một lít môi trường lỏng bao gồm:

Cao thịt bò:	5 g
Axit casamino:	10 g
Pepton:	5 g
Glucose:	2 g
Aga:	15 g
NaCl:	5 g
Na ₂ SO ₃ :	0,05 g
Vancomycin:	10 mg
Amphotericin B:	5 mg
Tetrazolium tím:	50 mg
Huyết thanh ngựa:	100 ml
Nước cất:	vừa đủ 1 lít

trong đó khác biệt ở chỗ môi trường này bổ sung tetrazolium tím (2-naphthalen-1-yl-3,5-diphenyltetrazol-2-ium;chloride) với lượng 50 mg/l để khuẩn lạc của vi khuẩn *Helicobacter pylori* mọc trên môi trường này có màu tím.

Môi trường thạch rắn để nuôi cấy chọn lọc vi khuẩn *Helicobacter pylori* không chỉ cho phép nuôi cấy đặc hiệu vi khuẩn *Helicobacter pylori* mà còn thu được khuẩn lạc màu tím cho phép dễ dàng phát hiện trên nền thạch, giúp hỗ trợ cho công tác phân lập cũng như chẩn đoán bệnh nhiễm vi khuẩn *Helicobacter pylori*.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Sản xuất môi trường thạch rắn để nuôi cấy chọn lọc Helicobacter pylori

Để sản xuất môi trường thạch rắn nuôi cấy chọn lọc *Helicobacter pylori*, các thành phần nguyên liệu để pha chế bao gồm cao thịt bò, axit casamino, pepton, glucoza, NaCl, Na₂SO₃, aga, huyết thanh ngựa, Vancomycin, Amphotericin B, Tetrazolium tím và nước như sau:

Cao thịt bò:	5 g
Axit casamino:	10 g
Pepton:	5 g
Glucoza:	2 g
Aga:	15 g
NaCl:	5 g
Na ₂ SO ₃ :	0,05 g
Vancomycin:	10 mg
Amphotericin B:	5 mg
Tetrazolium tím:	50 mg
Huyết thanh ngựa:	100 ml
Nước cất:	900 ml

Hòa tan 5g cao thịt bò, 10g axit casamino, 5g pepton, 2g glucoza, 5g NaCl, 0,05g Na₂SO₃ và 15g aga với 500ml nước cất. Sau khi khuấy để các thành phần này hòa tan, tiến hành tiệt trùng trong thiết bị hấp ở nhiệt độ 120°C trong 20 phút. Sau đó hạ nhiệt độ xuống 50°C thu được môi trường gốc.

Hòa tan lần lượt 10mg vancomycin, 5mg amphotericin B, 50mg tetrazolium tím với nước cất đến các nồng độ 50 mg/ml, 250 µg/ml và 25 mg/ml, tương ứng. Tiếp đó bổ sung vào môi trường gốc và trộn đều, cuối cùng bổ sung 100 ml huyết thanh ngựa và chuẩn đến 1 lít bằng lượng nước cất còn lại và trộn đều thu được 1 lít môi trường lỏng bao gồm cao thịt bò 5g/l, axit casamino 10g/l, pepton 5g/l, glucoza 2g/l, aga 15g/l, NaCl 5g/l, Na₂SO₃, 0,05 g/l, vancomycin 10mg/l, amphotericin B 5mg/l, tetrazolium tím 50mg/l và huyết thanh ngựa 100 ml/l.

Chia đều môi trường nuôi cấy lỏng thu được này ra các đĩa petri kích thước 90x15mm nuôi cấy vô trùng với mỗi đĩa khoảng 20ml thu được 50 đĩa môi trường. Sau khi để nguội ở 24 giờ thu được các đĩa petri chứa môi trường thạch rắn để nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori*.

Ví dụ 2. Thử nghiệm nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori*

Để đánh giá hiệu quả nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori* trên môi trường thạch thu được từ Ví dụ 1, tiến hành thử nghiệm nuôi cấy mảnh sinh thiết thu thập từ các bệnh nhân bị đau dạ dày nghi bị nhiễm vi khuẩn *Helicobacter pylori*.

Các mẫu được thu từ bệnh nhân được chẩn đoán bị viêm dạ dày mạn tính, ung thư dạ dày và loét, đã test nhanh *Helicobacter pylori* dương tính và chưa qua điều trị. Tiêu chuẩn loại trừ là các bệnh nhân có tiền sử điều trị *Helicobacter pylori*, tiền sử sử dụng Bismuth, sử dụng thuốc ức chế bơm proton (PPI) trong vòng 2 tuần trước đó.

Với mỗi bệnh nhân, tiến hành nội soi, thu thập ít nhất 6 mảnh sinh thiết ở các vị trí nghi nhiễm *Helicobacter pylori* trong dạ dày. Các mảnh sinh thiết được bảo quản trong môi trường vận chuyển chuyên biệt trong tủ lạnh trước khi tiến hành nuôi cấy.

Trong thử nghiệm này, mẫu sinh thiết được chia làm hai nhóm dựa theo thời điểm thu thập mẫu và tiến hành nuôi cấy.

+ Nhóm 1 là nhóm mẫu đông lạnh. Thời gian từ khi mẫu được thu thập (năm 2019) đến khi mẫu được lấy ra cấy (năm 2021) là hai năm. Trong suốt thời gian đó, mẫu được bảo quản ở -80°C.

+ Nhóm 2 là nhóm mẫu tươi. Mẫu được đem đi nuôi cấy ngay lập tức sau khi thu thập ở phòng soi.

Các mảnh sinh thiết được sử dụng làm mẫu nuôi cấy được nghiền nát trong 200 µl canh thang. Sau đó, chia đôi dịch nghiền, đem cấy song song trên hai loại đĩa môi trường thu được từ Ví dụ 1 (mẫu TN) và đĩa thương mại Pylori Agar của bioMérieux, Pháp (mẫu ĐC) để làm đối chứng. Mỗi đĩa được cấy 100 µl dịch.

Để kiểm chứng, kết quả nuôi cấy chỉ 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 Ureaza; và (4) định danh khuẩn lạc bằng hệ thống định danh vi sinh vật VITEK® MS (bioMérieux, Pháp).

Kết quả nuôi cấy cả hai nhóm mẫu sinh thiết đông lạnh và mẫu sinh thiết tươi được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả nuôi cấy mảnh sinh thiết

Loại mẫu		Mẫu ĐC		Mẫu TN	
		Số mẫu có khuẩn lạc quan sát được	Tỉ lệ xuất hiện khuẩn lạc	Số mẫu có khuẩn lạc quan sát được	Tỉ lệ xuất hiện khuẩn lạc
Mẫu đông lạnh	Mẫu ung thư	9	30,00 %	10	33,33 %
	Mẫu loét	21	45,65 %	21	45,65 %
	Mẫu viêm	2	33,33 %	2	33,33 %
	Tổng	32	39,02 %	33	40,24 %
Mẫu tươi	Mẫu loét	4	50,00 %	4	50,00 %
Tổng số mẫu thử nghiệm		36	40,00 %	37	41,11 %

So sánh trên từng nhóm mẫu thử nghiệm (nhóm TN) và nhóm mẫu đối chứng (nhóm ĐC) cho thấy, đối với mẫu đông lạnh, kết quả cho thấy tỉ lệ các mẫu nuôi cấy có xuất hiện khuẩn lạc giữa nhóm TN với nhóm ĐC là giống nhau ở mẫu loét (45,65 %) và mẫu viêm dạ dày mạn (33,33 %). Đối với mẫu ung thư dạ dày, tỉ lệ xuất hiện khuẩn lạc của nhóm TN cao hơn (33,33 %) so nhóm đối chứng (30,00 %). Đối với mẫu đông lạnh, tỉ lệ xuất hiện khuẩn lạc trên nhóm mẫu TN và nhóm ĐC không có nhiều khác biệt (40,24 % với 39,02 %).

Với mẫu tươi, kết quả nuôi cấy xuất hiện khuẩn lạc trên hai nhóm TN và nhóm ĐC cũng không có sự khác biệt, đều là 4 mẫu dương trên tổng số 8 mẫu được cấy, số mẫu xuất hiện khuẩn lạc chiếm tỉ lệ 50,00 %.

Xét trên tổng cả hai nhóm mẫu tươi và mẫu đông lạnh, tỷ lệ số mẫu nuôi cấy xuất hiện khuẩn lạc đối với cả hai nhóm ĐC và TN là tương đương, với 40,00 % với nhóm ĐC và 41,11 % với nhóm TN.

Để đánh giá hiệu quả, tổng số mẫu thử nghiệm được kiểm tra chéo lại bằng các phương pháp nhuộm Gram, thử bằng test nhanh ureaza và định danh khuẩn lạc bằng hệ thống định danh vi sinh vật VITEK® MS (bioMérieux, Pháp). Kết quả kiểm tra chéo cho phép khẳng định lại sự xuất hiện của vi khuẩn *Helicobacter pylori* trong các mẫu thử nghiệm. Các kỹ thuật phát hiện được thực hiện theo phương pháp chuẩn hoặc theo hướng dẫn của nhà cung cấp kit. Kết quả thu được cho thấy nhóm TN cho kết quả phát hiện vi khuẩn *Helicobacter pylori* chính xác 100% trong khi nhóm ĐC cho kết quả có sai số chủ yếu do khó quan sát chính xác khuẩn lạc trên môi trường thạch và chỉ đạt 90% với mẫu ung thư. Mẫu tươi cho kết quả phát hiện ở cả hai nhóm là tương đương. Kết quả này cho thấy độ đặc hiệu và hiệu quả của môi trường nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori* theo sáng chế.

Bảng 1. Độ đặc hiệu của môi trường nuôi cấy thử nghiệm

<u>Mẫu xét nghiệm</u>	<u>Tổng số mẫu (+)</u>	<u>Nhóm ĐC</u>		<u>Nhóm TN</u>	
		<u>Mẫu (+)</u>	<u>Độ đặc hiệu (%)</u>	<u>Mẫu (+)</u>	<u>Độ đặc hiệu (%)</u>
<u>Ung thư</u>	<u>10</u>	<u>9</u>	<u>90%</u>	<u>10</u>	<u>100%</u>
<u>Mẫu loét</u>	<u>21</u>	<u>21</u>	<u>100%</u>	<u>21</u>	<u>100%</u>
<u>Mẫu viêm</u>	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>100%</u>	<u>2</u>	<u>100%</u>
<u>Mẫu tươi</u>	<u>4</u>	<u>4</u>	<u>100%</u>	<u>4</u>	<u>100%</u>

Kết quả thu được cho thấy, đối với các mẫu thử nghiệm, khả năng phát hiện chính xác vi khuẩn *Helicobacter pylori* trên môi trường nuôi cấy thu được theo Ví dụ 1 là 100%. Kết quả thử nghiệm được thể hiện trên các hình từ Hình 1 đến Hình 3.

Hình 1 là ảnh chụp đĩa petri chứa khuẩn lạc *Helicobacter pylori* nuôi cấy với (A) là hình thái khuẩn lạc trên đĩa đối chứng là đĩa thương mại Pylori Agar (bioMérieux, France), theo đó khuẩn lạc nhỏ li ti, khó quan sát do có màu trắng trùng với màu của thạch. Ngược lại, với (B) là ảnh chụp đĩa petri với khuẩn lạc phát triển trên môi trường thử nghiệm cho thấy khuẩn lạc lớn hơn và có màu tím nên dễ dàng quan sát được. Cả hai đĩa nuôi cấy đều thu được khuẩn lạc điển hình của *Helicobacter pylori* với hình thái tròn, trơn nhẵn, kích thước từ li ti đến nhỏ.

Hình 2 cho thấy ảnh chụp qua kính hiển vi của tiêu bản nhuộm Gram khuẩn lạc *Helicobacter pylori* thu được khi nuôi cấy trên (A) đĩa đối chứng là đĩa thương mại Pylori Agar (bioMérieux, France) và (B) sản phẩm đĩa môi trường nuôi cấy thu được từ Ví dụ 1. 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 tím 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 .

Hình 3 là kết quả thử nghiệm test nhanh ureaza. (A) Mẫu đối chứng âm tính; và kết quả thử nghiệm test nhanh ureaza của khuẩn lạc *Helicobacter pylori* thu được khi nuôi cấy trên (B) đĩa đối chứng dương là đĩa thương mại Pylori Agar (bioMérieux, France) và (C) sản phẩm đĩa môi trường theo giải pháp. Với mẫu âm tính không có *Helicobacter pylori*, dung dịch chất thử có màu vàng (A). Khi trong mẫu có *Helicobacter pylori*, enzym ureaza tạo ra bởi *Helicobacter pylori* sẽ thủy phân urê $[\text{CO}(\text{NH}_2)_2]$ có trong dung dịch chất thử thành amoniac (NH_3), từ đó làm tăng pH của dung dịch chất thử, biến chất thử từ màu vàng (âm tính với *Helicobacter pylori*) chuyển sang màu tím nhạt (dương tính với *Helicobacter*

pylori) (B, C). Do đó, kết quả cho thấy khuẩn lạc thu được từ cả 2 đĩa môi trường đối chứng và đĩa môi trường theo giải pháp đều là khuẩn lạc của vi khuẩn *Helicobacter pylori*.

Tóm lại, với kết quả thử nghiệm cho thấy rằng môi trường thạch rắn để nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori* thu được từ Ví dụ 1 cho thấy tính đặc hiệu, không bị các vi sinh vật khác phát triển ảnh hưởng đến kết quả. Đặc biệt môi trường nuôi cấy theo sáng chế có tính ổn định, đặc hiệu và chọn lọc cao với vi khuẩn *Helicobacter pylori* và cho phép hiện màu khuẩn lạc (tím đậm) nên dễ dàng quan sát, đánh giá kết quả, thậm chí còn dễ quan sát hơn khi so với kỹ thuật đánh giá bằng test nhanh ureaza phức tạp (cho kết quả màu tím nhạt).

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Quy trình sản xuất môi trường thạch rắn theo sáng chế cho phép sản xuất ra môi trường đặc hiệu để nuôi cấy chọn lọc vi khuẩn *Helicobacter pylori*. Bằng cách cải tiến các thành phần môi trường, bổ sung các chất kháng vi khuẩn Gram dương, nấm và bổ sung Tetrazolium tím, quy trình cho phép phát triển môi trường ổn định, đặc hiệu cho sự phát triển của vi khuẩn *Helicobacter pylori*. Quy trình theo sáng chế đơn giản, dễ thực hiện và không cần các thiết bị chuyên dụng phức tạp.

Môi trường thạch rắn theo sáng chế được phát triển từ các nguồn thông dụng, được tối ưu hóa các thành phần, bổ sung thành phần đóng vai trò chất chỉ thị màu cho phép thu được các khuẩn lạc của vi khuẩn *Helicobacter pylori* có màu tím đậm, dễ dàng phát hiện bằng mắt thường, hiệu quả hơn cả bằng kỹ thuật phát hiện ureaza phức tạp (cho màu tím nhạt). Môi trường nuôi cấy vi khuẩn *Helicobacter pylori* giải quyết được hạn chế của việc khó kiểm tra khuẩn lạc trong các môi trường thông thường, cho phép trợ giúp hiệu quả trong việc nghiên cứu, chẩn đoán bệnh liên quan đến vi khuẩn *Helicobacter pylori*.

Môi trường thạch rắn theo sáng chế có tính đặc hiệu chọn lọc cao với thành phần dễ tiếp cận và có khả năng phát hiện chính xác 100% khuẩn lạc của vi khuẩn *Helicobacter pylori* do được bổ sung các chất ức chế chọn lọc với nấm và vi khuẩn Gram dương. Việc bổ sung chất chỉ thị màu giúp đổi màu khuẩn lạc mọc trên môi trường cho phép đọc kết quả nuôi cấy dễ dàng hơn. Đây là một cải tiến mang lại hiệu quả vượt trội của môi trường theo sáng chế so với các môi trường thương mại khác trên thị trường.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất môi trường thạch rắn để nuôi cấy chọn lọc vi khuẩn *Helicobacter pylori*, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị các nguyên liệu bao gồm cao thịt bò, axit casamino, pepton, glucoza, NaCl, Na₂SO₃, aga, huyết thanh ngựa, Vancomycin, Amphotericin B, Tetrazolium tím với lượng tính cho một lít môi trường, bao gồm:

Cao thịt bò:	5 g
Axit casamino:	10 g
Pepton:	5 g
Glucoza:	2 g
NaCl:	5 g
Na ₂ SO ₃ :	0,05 g
Aga:	15 g
Vancomycin:	10 mg
Amphotericin B:	5 mg
Tetrazolium tím:	50 mg
Huyết thanh ngựa:	100 ml
Nước cất:	vừa đủ 1 lít

b) pha chế môi trường gốc bằng cách hòa tan cao thịt bò, axit casamino, pepton, glucoza, NaCl và Na₂SO₃, aga với nước cất và tiệt trùng ở nhiệt độ 120°C trong 20 phút rồi hạ nhiệt độ xuống 50°C thu được môi trường gốc;

c) pha chế các dung dịch bổ sung bằng cách hòa tan lần lượt vancomycin, amphotericin B, tetrazolium tím với nước cất đến các nồng độ 50 mg/ml, 250 µg/ml và 25 mg/ml, tương ứng, thu được các dung dịch bổ sung vô trùng; và

d) thu môi trường thạch rắn bằng cách phối trộn các dung dịch bổ sung và huyết thanh ngựa vào môi trường gốc ở nhiệt độ 50°C, sau đó bổ sung nước cất vừa đủ để thu được môi trường nuôi cấy lỏng bao gồm cao thịt bò 5g/l, axit casamino 10g/l, pepton 5g/l, glucoza 2g/l, aga 15g/l, NaCl 5g/l, Na₂SO₃, 0,05 g/l, vancomycin 10mg/l, amphotericin B 5mg/l, tetrazolium tím 50mg/l và huyết thanh ngựa 100 ml/l, cuối cùng chia môi trường nuôi cấy lỏng này ra các đĩa nuôi cấy vô trùng, để nguội thu được môi trường thạch rắn.

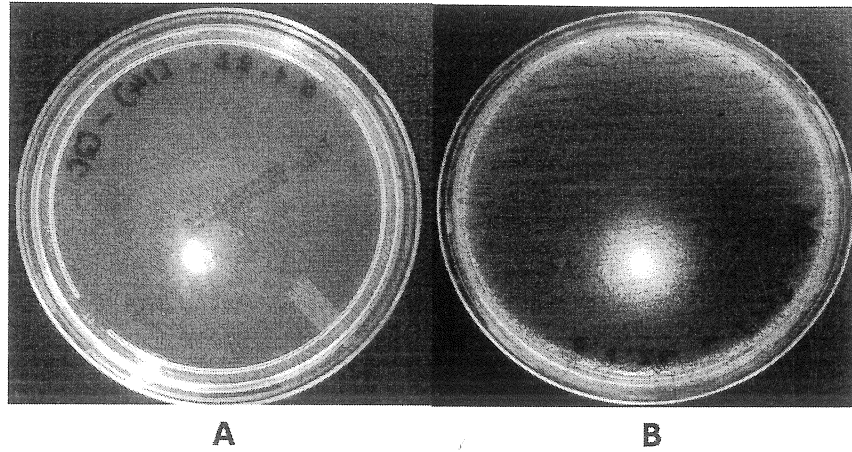
2. Môi trường thạch rắn để nuôi cấy chọn lọc vi khuẩn *Helicobacter pylori* thu được theo điểm 1, trong đó môi trường này ở dạng thạch rắn và được điều chế từ các thành phần tính cho một lít môi trường lỏng bao gồm:

Cao thịt bò:	5 g
Axit casamino:	10 g
Pepton:	5 g
Glucosa:	2 g
NaCl:	5 g
Na ₂ SO ₃ :	0,05 g
Aga:	15 g
Vancomycin:	10 mg
Amphotericin B:	5 mg
Tetrazolium tím:	50 mg
Huyết thanh ngựa:	100 ml
Nước cất:	vừa đủ 1 lít

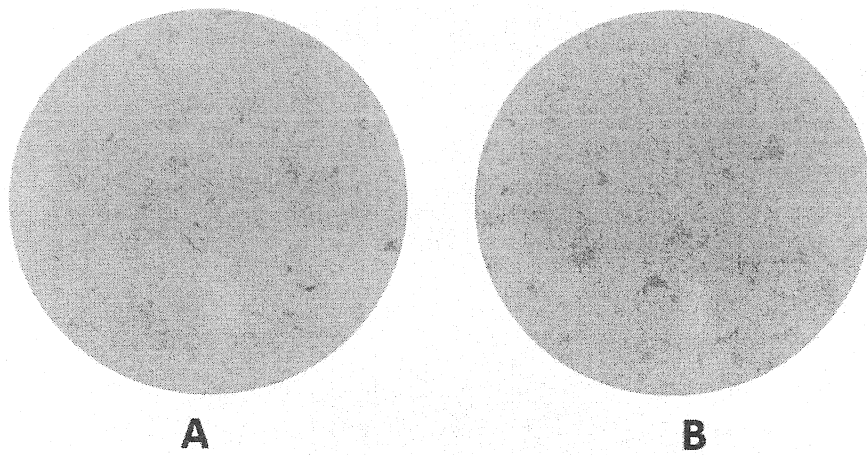
trong đó khác biệt ở chỗ môi trường này bổ sung tetrazolium tím (2-naphthalen-1-yl-3,5-diphenyltetrazol-2-ium;chloride) với lượng 50 mg/l để khuẩn lạc của vi khuẩn *Helicobacter pylori* mọc trên môi trường này có màu tím.

1/1

HÌNH 1



HÌNH 2



HÌNH 3

