

bệnh nhân có hội chứng suy nút xoang trước và sau cấy máy tạo nhịp vĩnh viễn, Hội nghị Nhịp tim Toàn quốc lần thứ 3.

4. **Ngô Thị Thu Hương** (2016). "Đánh giá kết quả bước đầu triển khai cấy máy tạo nhịp tim vĩnh viễn tại Khoa Tim mạch, Bệnh viện Đa khoa tỉnh Phú Thọ", Hội nghị Nhịp tim Toàn quốc lần thứ 3.

5. **Phạm Chí Hiền, Phan Thị Thanh Xuân, Trần Thanh Hải và các cộng sự** (2012). "Đánh giá kết quả bước đầu cấy máy tạo nhịp vĩnh viễn tại Bệnh viện Đa khoa Trung tâm An Giang", Kỷ yếu Hội Nghị Khoa học Bệnh viện An Giang.

6. **Phạm Như Hùng, Trần Song Giang, Trần Văn Đồng và các cộng sự** (2012). "Thực trạng cấy máy tạo nhịp 1 buồng và 2 buồng tim trong chỉ định nhịp chậm tại Viện Tim mạch Quốc gia Việt Nam", Kỷ yếu tóm tắt các báo cáo khoa học. Đại hội Tim mạch Toàn quốc lần thứ 13, tr. 19-20.

7. **Huỳnh Văn Minh, Nguyễn Cửu Lợi và Lê Phúc Nguyên** (2004). "Vai trò của tạo nhịp tạm thời trong tạo nhịp tim vĩnh viễn", Tạp chí Tim mạch học 37, tr. 315-318.

8. **Phạm Gia Khải, Nguyễn Lân Việt, Đỗ Doãn Lợi và các cộng sự** (2008). "Khuyến cáo 2008 của Hội Tim mạch học Việt Nam về đánh giá, dự phòng và quản lý các yếu tố nguy cơ tim

mạch", Khuyến cáo 2008 về các bệnh tim mạch và chuyển hóa, tr1-19.

9. **Phạm Hữu Đà, Phạm Xuân Anh, Lê Văn Dũng và các cộng sự** (2016). "Đánh giá kết quả bước đầu cấy máy tạo nhịp tim vĩnh viễn tại Bệnh viện Đa khoa Hà Tĩnh", Sở Y tế Hà Tĩnh, truy cập ngày, tại trang web <http://soyte.hatinh.gov.vn/tin-tuc-su-kien/minh-bach-thong-tin/danh-gia-ket-qua-buoc-dau-cay-may-cao-nhip-tim-vinh-vien-tai.html>.

10. ACC/AHA (1998). "ACC/AHA Guidelines for Implantation of Cardiac pacemaker and Antirhythmia Devices", Circulation, 97, tr. 1325-1335.

11. **Thomas M. Bashore, Christopher B. Granger, Patrick Hranitzky và các cộng sự** (2011). Current Medical Diagnosis and Treatment 50th Edition 2011.

12. **Phạm Như Hùng, Tạ Tiến Phước, Trần Văn Đồng và các cộng sự** (2014). "Nhìn lại những chỉ định kinh điển của máy tạo nhịp tim trên cơ sở các nghiên cứu lâm sàng", Tạp chí Tim mạch học, 65, tr. 17.

13. **Phạm Quốc Khánh, Trần Văn Đồng và Tạ Tiến Phước** (2011). Khuyến cáo 2010 về các bệnh tim mạch và chuyển hóa, Nhà xuất bản Y học, Thành phố Hồ Chí Minh.

KẾT QUẢ BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU VỀ QUI TRÌNH LÊN MEN THU NHẬN CÁC KHÁNG NGUYÊN PTg, FHA VÀ Prn2 TỪ CHỦNG VI KHUẨN HO GÀ CẢI BIÊN GEN B.PERTUSSIS BpCNIC0311 TẠI CÔNG TY VẮC XIN PASTEUR ĐÀ LẠT

TRẦN THỊ NGHĨA, TRẦN THỊ CẨM THÚY,
HOÀNG DUY VŨ, ĐÀM THỊ THU NGÂN,
HOÀNG THỊ TÓ LOAN, ĐÀO XUÂN VINH VÀ CS.
Công ty TNHH MTV Vắc Xin Pasteur Đà Lạt
DIOGENES Q. V., ANABEL A. A., LIDIA I. N.P. MAITE D. E.
Trung tâm Công nghệ Gen và Di truyền Cu Ba (CIGB)

TÓM TẮT

Đã thiết lập thành công qui trình lên men chủng *Bordetella pertussis* BpCNIC 0311 cải biên gen tạo kháng nguyên (KN) độc tố PTg không

độc tính và các KN FHA, Prn2 trên Fermenter 30L. Đã thực hiện các lô lên men, đồng thời tách và tinh chế thu KN PTg, FHA và Prn2 tinh khiết và được kiểm tra định tính và định lượng, tính an toàn và khả năng sinh đáp ứng miễn dịch trên chuột. KN đáp ứng chất lượng sử dụng cho nghiên cứu pha chế vắc xin ho gà vô bào 3 thành phần (Ptg, FHA Prn2).

Từ khóa: *Bordetella pertussis* BpCNIC 0311.

SUMMARY

Successfully established fermentation

Chịu trách nhiệm: Đào Xuân Vinh
Email: daox.vinh@gmail.com
Ngày nhận: 06/01/2021
Ngày phản biện: 18/02/2021
Ngày duyệt bài: 25/02/2021

process of *Bordetella pertussis* BpCNIC0311 strain to create non-toxic PTg toxin antigens and FHA, Prn2 antigens on Fermenter 30L. Done batches of fermentation, at the same time separating and purifying and collecting pure PTg, FHA and Prn2 antigens was tested for qualitative and quantitative testing, safety and ability to produce immune responses in mice. The antigen meets the quality used for the study of the preparation of the three-component asbestos pertussis vaccine (PTg, FHA Prn2).

Keywords: *Bordetella pertussis* BpCNIC 0311.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Vắc xin ho gà (VXHG) đã trải qua 2 thế hệ: Vắc xin ho gà toàn tế bào và VXHG vô bào (VXHGV B). VXHGV B được đưa vào sử dụng từ thập niên 80 của thế kỷ 19, được sản xuất dựa trên KN PTg và được khử độc tính KN bằng phương pháp (PP) hóa học hoặc nhiệt. Tuy nhiên phương pháp này có thể làm biến đổi cấu trúc KN PTg (là protein) và đôi khi mất một số nhóm quyết định KN trên phân tử KN. Để khắc phục nhược điểm này, CIGB Cu Ba đã nghiên cứu thành công tạo ra một chủng vi khuẩn ho gà sản xuất ra các KN không độc tính dùng để pha chế VXHGV B bằng kỹ thuật di truyền là Chủng *B.pertussis* BpCNIC0311 [2,3]. Ưu điểm của các KN này là các KN nguyên thủy không độc tính, nên không phải khử độc tính bằng phương pháp hóa học, do đó bảo toàn được cấu trúc KN và hoạt tính KN. Công ty TNHH MTV Vắc Xin Pasteur Đà Lạt đã cộng tác với các chuyên gia CIGB, nghiên cứu và bước đầu sản xuất thành công các KN PTg, FHA và Prn2 từ chủng *B.pertussis* BpCNIC0311 đạt chất lượng để pha chế VXHGV B.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng, thời gian và địa điểm nghiên cứu

- *Đối tượng:* Vi khuẩn Ho gà cải biên gen *Bordetella pertussis* BpCNIC 0311.

- *Thời gian:* 12/2017 – 12/2018.

- *Địa điểm:* Công ty TNHH MTV Vắc xin Pasteur Đà Lạt.

2. Nguyên vật liệu

2.1. Hóa chất sinh phẩm chính: Bordet Gengou Agar, MT Stainer & Scholte, MT THIJSM-BMCD, Ammonium chloride (NH_4Cl) – Merck, Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) – Merck, Potassium chloride (KCl) – Merck, Proline pure – Merck, Tris-(Hydroxymethyl) aminomethane – Merck,

Heptakis (2,6-di-O-methyl)-beta-cyclodextrine (BMCD) – Merck, L - Cysteine hydrochloride monohydrate – Merck, Tris ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$), - Fractogel EMD COO- (M, Fractogel EMD DEAE (M), - Trixton X-100

2.2. Các thiết bị chính

Hệ thống lọc mini cartridge (Sartorius), hệ thống sắc ký trao đổi ion, quang phổ kế (Genesys), hệ thống lên men (LM) Fermenter 30L Kbiotech (Kbiotech), máy đo pH 730 (Inolap), máy đo độ dẫn điện (Inolap), Bơm nhu động WatsonMarlow, bơm nhu động Chemap, tủ lạnh âm Electrolux, vv...

3. Các phương pháp nghiên cứu

3.1. Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu thực nghiệm.

3.2. Phương pháp nhân chủng

Thực hiện nhân chủng đời 1 trên 2 chai 2 lít (200ml MT THIJSM-BMCD/chai) và đời 2 (10% chủng đời 1) trên 4 chai 5 lít (500ml MT THIJSM-BMCD /chai), các chai được lắc trên máy lắc 150v/phút trong 24 giờ và 18-20 giờ.

3.3. Phương pháp xác định các thông số lên men

Các thông số LM thích hợp được xác định bằng phương pháp thiết lập các TN và lựa chọn thông số tối ưu, dựa trên đánh giá bằng mật độ vi khuẩn trong 1 ml dịch lên men ($\text{OD}_{530\text{nm}}$).

3.4. Phương pháp lên men: Sau khi xác định các thông số lên men, tiến hành LM trên fermenter 30 lít, theo pp lên men chìm, có sục khí, kiểm tra vô trùng, pH và OD tại các công đoạn [2,3].

3.5. Phương pháp thu nhận các KN trong dịch lên men: Sau khi kết thúc LM dịch nuôi cấy được tách xác bằng màng 0,45 μ trên hệ thống lọc tiếp tuyến TFF, áp lực duy trì <0,6 bar, tách thu nước nổi (chứa 2 KN là PTg và FHA) và xác tế bào (chứa KN Prn2).

3.6. Phương pháp tinh chế các KN: Bằng sắc ký trao đổi ion với các cột lọc khác nhau.

3.7. Xử lý số liệu: Theo phương pháp thống kê sinh học.

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

1. Kết quả khảo sát các thông số lên men

1.1. Kết quả thiết lập công thức MT nhân chủng và lên men

Các kết quả nghiên cứu đã xác định MT thích hợp cho nhân chủng và lên men *B.pertussis* BpCNIC0311 là MT THIFS có bổ xung các nguyên tố vi lượng.

Đối với chủng vi khuẩn Ho gà *B.pertussis* BpCNIC0311 có một số đặc điểm sinh hóa đặc trưng riêng, do đó MT dùng cho nuôi cấy *B.pertussis* BpCNIC0311 khác biệt với các

chủng vi khuẩn ho gà khác [1]. Về nhu cầu nguồn cacbon, do không có chu trình đường phân glycolysis hoàn chỉnh nên *B.pertussis* BpCNIC0311 không thể sử dụng glucose là chất cung cấp Cacbon (Thalen, 2008) [4,5].

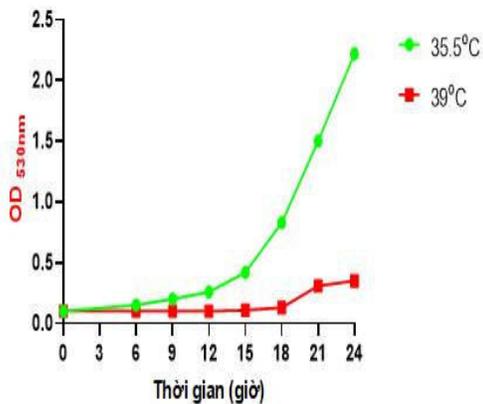
1.2. Tỷ lệ chủng trong lên men

Kết quả đã xác định khi nhân chủng đời 2 đậm độ vi khuẩn đạt OD_{530nm} 2,21±0,10 thì bổ xung vào MT lên men trong fermenter 30 lít (chứa 20 lít MT LM) theo tỷ lệ 10%.

1.3. Nhiệt độ nuôi cấy chủng *B.pertussis* BpCNIC0311

Nhiệt độ nuôi cấy *B.pertussis* BpCNIC0311 trong suốt quá trình LM được xác định là 35,5°C±0,5 [2,3].

Nhiệt độ nuôi cấy vi khuẩn ho gà theo các nghiên cứu trước đây [5] cho thấy vi khuẩn ho gà có thể phát triển trong dải nhiệt độ tương đối rộng từ 32,6°C và 39°C. Tuy nhiên, nhiệt độ thích hợp nhất cho vi khuẩn ho gà là ở nhiệt độ từ 33-36°C, ở nhiệt độ trên 37°C, vi khuẩn sinh trưởng thường rất yếu. Điều này phù hợp với lý thuyết vi khuẩn ho gà tự nhiên lây nhiễm trùng trong hệ hô hấp nơi có nhiệt độ trung bình thấp hơn nhiệt độ cơ thể của vật chủ. Ngoài ra, việc sản xuất PT giảm tới 30% khi nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C so với nuôi cấy ở nhiệt độ khoảng 34°C.



Biểu đồ 1: So sánh nhiệt độ nuôi cấy *B.pertussis* BpCNIC0311 ở 39°C và 35,5°C

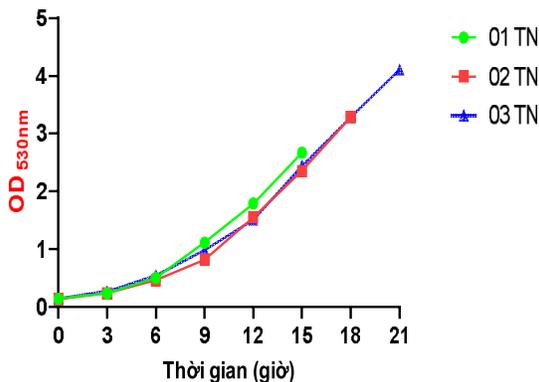
1.4. pH trong quá trình lên men

pH trong quá trình LM *B.pertussis* BpCNIC0311 được xác định thích hợp nhất ở pH = 7,4 ± 0,1 [8,12]. Để điều chỉnh pH sử dụng Orthophosphoric acid 10% [2,3].

1.5. Thời gian lên men

Kết quả nghiên cứu đã xác định thời gian LM *B.pertussis* BpCNIC0311 trên fermenter 30l là 18 giờ [2,3].

Thời gian lên men



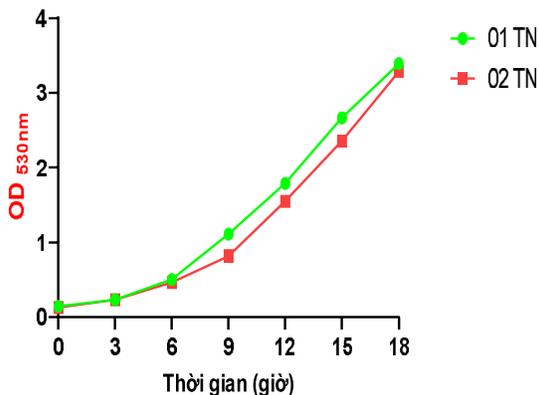
Biểu đồ 2: So sánh các mốc thời gian lên men *B.pertussis* BpCNIC0311

Trong TM 1 thu được hàm lượng protein PT-FHA và Prn2 là thấp nhất, ở TN 2 hàm lượng protein PT-FHA cao hơn 1.20 lần, nhưng protein Prn2 thấp hơn 1.21 lần TN 3. Mặt khác, kháng nguyên PT là thành phần chính đáp ứng miễn dịch của Vắc xin Ho gà vô bào. Do đó, từ kết quả kiểm tra đậm độ vi khuẩn ở bước sóng 530 nm và hàm lượng protein PT-FHA, Prn2 thì thời gian LM 18 giờ là tối ưu [2,3].

1.6. Ảnh hưởng lưu lượng khí, tốc độ khuấy đến quá trình lên men

Kết quả kiểm tra đậm độ vi khuẩn ở bước sóng 530 nm và hàm lượng Protein PT-FHA và Prn2 cho thấy tốc độ khuấy tăng dần từ 100 đến 180 vòng/phút và lưu lượng khí tăng dần từ 1 đến 10 lít/phút theo thời gian nuôi cấy là tối ưu.

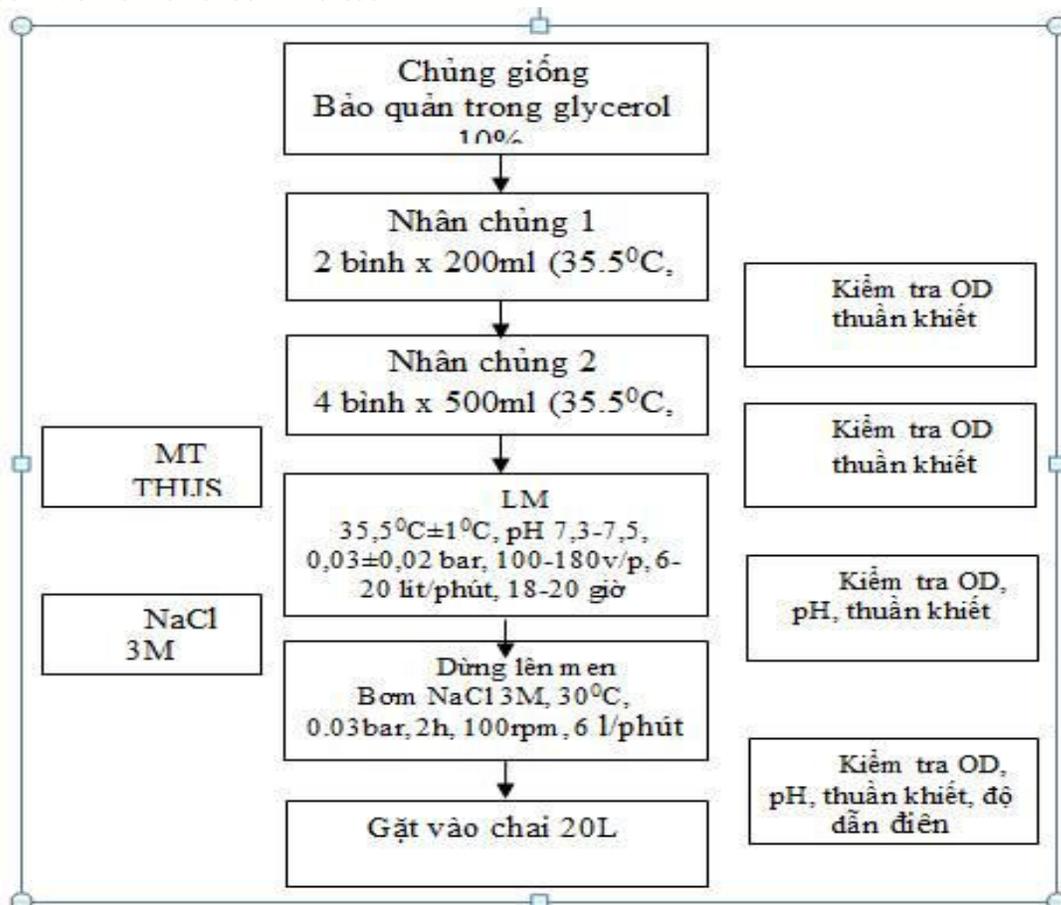
Tốc độ khuấy - Lưu lượng khí



Biểu đồ 3: So sánh mức lưu lượng khí và tốc độ khuấy

1.7. Thiết lập quy trình LM vi khuẩn *B.pertussis* trên fermenter 30 lít

Sau khi xác định các thông số cho LM tiến hành thiết lập quy trình LM chủng *B. pertussis* BpCNIC 0311 trên fermenter 30 L như sau:



Biểu đồ 4: Tóm tắt QTLM chủng *B.pertussis* BpCNIC0311 thu nhận KN PTg, FHA, Prn2 trên fermenter 30L

2. Kết quả xác định quy trình tinh chế các KN ptg, FHA và Prn2 sau lên men

Từ quy trình được thiết lập đã thực hiện LM10 loạt và tinh chế thu các KN PTg, FHA và Prn2.

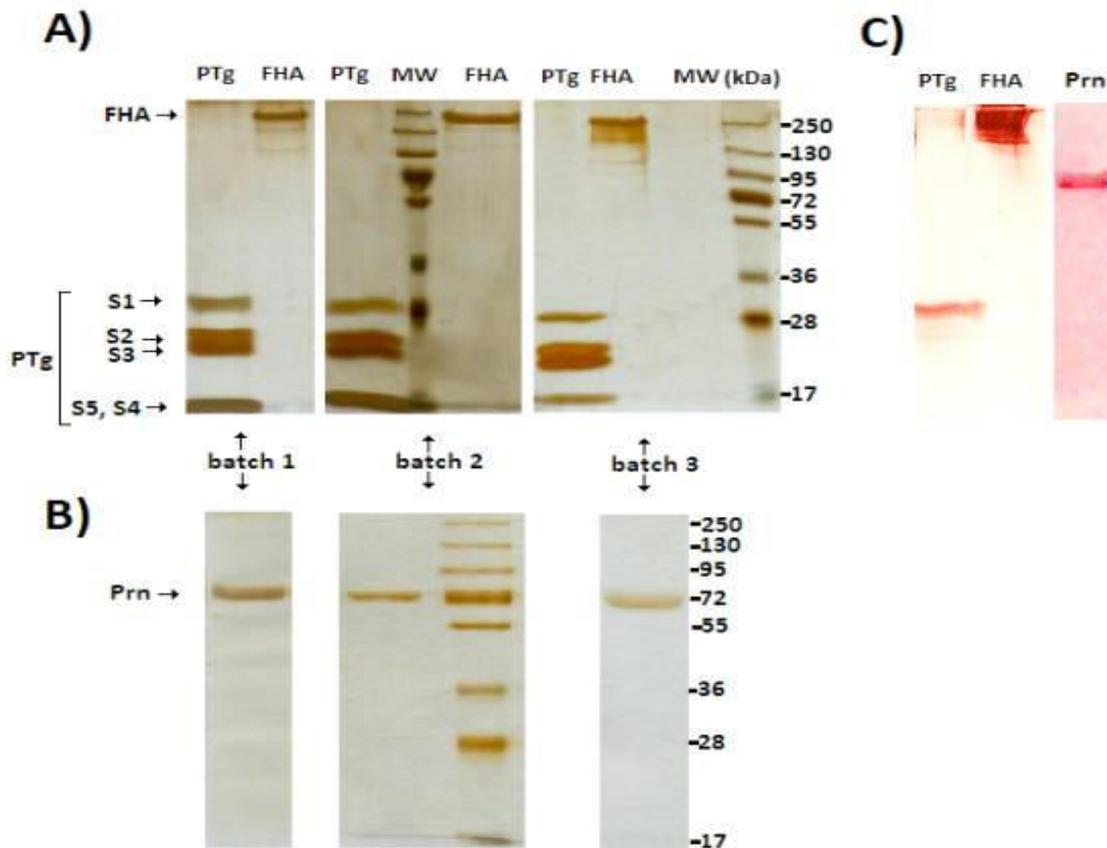
+ **Tinh chế KN PTg và FHA:** nước nổi chứa KN PTg và FHA → lọc Sartobran 0,45±0,2µm (loại VK sống) → cô đặc V xuống 10 lần bằng màng 30kDa → điều chỉnh độ dẫn điện bằng urea 2M (11-12mS/cm → điều chỉnh pH về 6 bằng H₃PO₄ 85% → tinh chế qua sắc ký trao đổi cation sử dụng fractogel COO⁻, đặc biệt chú ý đến pH của 2 dung dịch rửa giải, dung dịch E rửa giải PTg có pH = 7,4 và dung dịch F rửa giải FHA có pH = 8,0, để thu được kháng nguyên tinh khiết ở giai đoạn này.

+ **Tinh chế KN Prn2:** Xác TB chứa KN Prn2 sau khi thu nhận vào chai → rửa lại với dung dịch H (Tris 2M và NaCl 5M) để loại bỏ các KN PTg và FHA còn tồn lại trong xác TB → thêm 220ml dung dịch I (Na₂HPO₄) → đặt chai vào Bioreactor 7 lít (đã được cài nhiệt độ 60°C) trong 15p → làm lạnh về nhiệt độ phòng → điều chỉnh pH về 6 bằng dd J (CaCl₂.H₂O) → ly tâm 420v/p ở 4°C/30p → thu nước nổi bỏ xác → lọc nước nổi qua lọc Sartobran 0,45±0,2µm → điều chỉnh độ dẫn điện và pH của nước nổi bằng màng 30kDa với trước tiên sử dụng nước cất để đưa độ dẫn điện về 4mS/cm → tiếp theo sử dụng dung dịch K (Tris 2M) để đưa độ dẫn điện về 1mS/cm và pH=8,8 → tinh chế thu Prn2 tinh khiết qua cột trên máy sắc ký trao đổi sắc ký trao đổi anion và fractogel DEAE, dung dịch M rửa giải cũng cần có độ chính xác cao về pH = 8,8 và độ dẫn điện 3-4mS/cm.

3. Đánh giá chất lượng các KN PTg, FHA và Prn2

Sau khi tinh chế các KN PTg, FHA, Prn2 được kiểm tra chất lượng tại DAVAC và CIGB. Kết quả về định tinh đều phát hiện dấu vết các KN và kiểm định lượng cho thấy lượng KN thu được từ 3 loại có hàm lượng cao nhất.

+ Định tính các KN



Hình 1: Kết quả kiểm tra định tính các kháng nguyên PTg, FHA, Prn2 thu nhận từ 3 lô LM, bằng phương pháp SDS-PAGE và western blot

+ Định lượng các KN

Bảng 1. Kết quả xác định hàm lượng KN PTg, FHA và Prn thu được từ 3 lô LM đã được nhận diện KN PTg, FHA, Prn2 (hình 2)

Lô	Hàm lượng peotein (mg/l)		
	PTg	FHA	Prn2
01	1,96	1,85	0,50
02	2,22	4,83	1,20
03	2,17	7,27	3,10
TB	2,12	4,65	1,60

Kết quả kiểm tra định lượng cho thấy: hàm lượng 3 loại KN PTg, FHA và Prn2 đều >1mg/lít.

Sử dụng các KN PTg, FHA và Prn2 thử an toàn và đánh giá khả năng tạo đáp ứng miễn dịch trên chuột (thực hiện tại CIGB) đều cho kết quả an toàn và kích thích chuột tạo đáp ứng miễn dịch ở các liều khác nhau.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

1. Kết luận

1.1. Đã thiết lập thành công qui trình lên men chủng *Bordetella pertussis* BpCNIC 0311 biến đổi gen tạo KN độc tố PTg không độc tính và các KN FHA, Prn2 trên Fermenter 30l với các thông số: Môi trường lên men là MT TH1JS có bổ xung các nguyên tố vi lượng, nhiệt độ LM là $35,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$, tỷ lệ chủng bổ sung vào MT LM là 10%, pH thích hợp là $7,4 \pm 0,1$, thời gian nuôi cấy thích hợp là 18 giờ, tốc độ khuấy tăng dần từ 100 đến 180 vòng/phút và lưu lượng khí tăng dần từ 1 đến 10 lít/phút theo thời gian nuôi cấy là tối ưu.

1.2. Đã thiết lập được qui trình tinh chế các KN *Bordetella pertussis* BpCNIC 0311 bằng

phương pháp sắc ký trao đổi ion và xây dựng được các phương pháp kiểm tra chất lượng các KN PTg, FHA, Prn2. Các KN thu được đạt tính an toàn và sinh MD khi thử nghiệm trên chuột.

2. Đề nghị

Tiến hành lên men trên fermenter 300L để hoàn thiện qui trình sản xuất qui mô công nghiệp và pha vắc xin thử nghiệm tiến lâm sàng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Lan Phương (2007) "Xây dựng phương pháp đánh giá một số kháng nguyên trong vắc xin ho gà và đề xuất qui trình sản xuất vắc xin ho gà an toàn cao tại Viện Vắc xin Nha Trang". Luận án Tiến sĩ Y học. Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương.

2. Diógenes Q.V., Maité D., Gilda L., Edelgis C., Yassel R., Yanet T., Luis J.G., Gerardo G.E., Anabel A. (2015), "Assessment of the Bordetella pertussis BpCNIC0311 Strain as a Producing Strain of Genetically Detoxified

Toxoid (PT), Filamentous Hemagglutinin (FHA) and Type 2 Pertactin (Prn2)".

3. Quintana-Vázquez et al (2015). "Assessment of the Bordetella pertussis BpCNIC0311 Strain as a Producing Strain of Genetically Detoxified Toxoid (PTg), Filamentous Hemagglutinin (FHA) and Type 2 Pertactin (Prn2)". Journal of Infectious Diseases and Therapeutics, 3, 8-20.

4. Stainer D.W., Scholte M.J. (1970), "A Simple Chemically Defined Medium for the Production of Phase I Bordetella pertussis". Journal of General Microbiology, (1971), 63:211-220.

5. Thalen M, Venema M, Van den Ijssel J, berwald L, Beuvery C, Martens D, Tramper J (2006). Effect of relevant culture parameters on Pertussis Toxin expression by Bordetella pertussis. Biologicals. Step; 34(3):213-20.

ĐẶC ĐIỂM LÂM SÀNG VÀ VI SINH Ở BỆNH NHÂN VIÊM NỘI TÂM MẠC NHIỄM KHUẨN DO STAPHYLOCOCCUS AUREUS

HOÀNG VĂN SỸ, TRẦN CÔNG DUY
Trường Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Mở đầu: Mặc dù có nhiều tiến bộ trong chẩn đoán và điều trị, tần suất viêm nội tâm mạc nhiễm khuẩn (VNTMNK) do Staphylococcus aureus (S.aureus) vẫn tiếp tục tăng và góp phần gây ra tiên lượng xấu.

Mục tiêu: Khảo sát đặc điểm lâm sàng và vi sinh của bệnh nhân VNTMNK do S.aureus.

Phương pháp: hồi cứu, cắt ngang mô tả ở các bệnh nhân VNTMNK do S.aureus điều trị nội trú tại Bệnh viện Chợ Rẫy từ 01/2015 đến 12/2019.

Kết quả: Trong giai đoạn 5 năm (2015-2019), 39 bệnh nhân VNTMNK do S.aureus nhập Bệnh viện Chợ Rẫy. Tuổi trung bình của bệnh nhân là $42,9 \pm 18,2$ và nam chiếm 53,9%. VNTMNK do S.aureus xảy ra ở 69,2% bệnh van tim tự nhiên;

10,3% van tim nhân tạo; 5,1% bệnh tim bẩm sinh và 15,4% không có tiền sử bệnh tim mạch.

Đường vào phổ biến nhất của tác nhân gây bệnh là qua da (23,1%). Triệu chứng lâm sàng thường gặp nhất ở bệnh nhân VNTMNK do S.aureus là sốt (92,3%) với thời gian sốt trung bình trước nhập viện là 13,5 ngày. Tỷ lệ vi khuẩn S.aureus kháng methicillin (MRSA) là 64,1% và 100% S.aureus nhạy với kháng sinh vancomycin, teicoplanin, linezolid và tigecycline.

Kết luận: VNTMNK do S.aureus có một số đặc điểm lâm sàng riêng biệt cần lưu ý trong chẩn đoán và tỷ lệ cao đề kháng với methicillin.

Từ khóa: Viêm nội tâm mạc nhiễm khuẩn, Staphylococcus aureus.

SUMMARY

CLINICAL AND MICROBIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH STAPHYLOCOCCUS AUREUS INFECTIVE ENDOCARDITIS

Introduction: To despite plenty of advances in diagnosis and treatment, the frequency of Staphylococcus aureus (S.aureus) infective

Chịu trách nhiệm: Trần Công Duy
Email: dr.trancongduy@ump.edu.vn
Ngày nhận: 12/01/2021
Ngày phản biện: 17/02/2021
Ngày duyệt bài: 26/02/2021