

Khảo sát tác động kháng nấm *in vitro* và *in vivo* trên chuột nhắt gây nhiễm *Candida albicans* của sản phẩm Max Skin care I Free

Đỗ Thị Hồng Tươi^{1*}, Nguyễn Thị Kim Oanh², Phạm Mai Đông Thùy¹
Lê Thị Huỳnh Như¹, Nguyễn Lê Thanh Tuyền²

¹Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

²Trung tâm Khoa học công nghệ Dược Sài Gòn, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

Summary

The aim of this study was to investigate antifungal effect of Max Skin care I free product. The results showed that the product expressed *in vitro* antifungal activity, inhibited 45.83% *Candida albicans* in comparison with negative control. In vaginal candidiasis mouse model, after application of Max Skin care I free product, the proportion of samples have fungal element and the number of CFUs from vaginal lavage decreased significantly compared to control group. This effect of Max Skin care I free was similar to that of Saforelle product control. In conclusions, Max Skin care I free product has been shown antifungal effect. The results provide scientific basis for the clinical application of this product.

Keywords: Max Skin care I free, antifungal effect, *Candida albicans*, vaginal candidiasis.

Đặt vấn đề

Theo Brian và CS. (2014), khoảng một phần ba phụ nữ có biểu hiện triệu chứng viêm âm đạo trong cuộc đời [1]. Bệnh có thể xảy đến với phụ nữ ở mọi lứa tuổi, phổ biến nhất trong độ tuổi sinh sản 15 - 44 tuổi. *Candida* là tác nhân phổ biến nhất gây nhiễm trùng âm đạo. Ước tính khoảng 75% phụ nữ trong độ tuổi sinh sản bị nhiễm *Candida* ít nhất một lần trong đời, trong đó, 90% trường hợp là do *Candida albicans* [3]. Nhiễm nấm âm đạo gây ra tình trạng viêm, ngứa, đau rát và tăng tiết dịch âm đạo, làm giảm chất lượng cuộc sống của bệnh nhân [1]. Nhiễm nấm âm đạo có thể được điều trị bằng thuốc đặt âm đạo (tác dụng tại chỗ) hoặc uống thuốc (tác dụng toàn thân). Ngoài ra, sản phẩm vệ sinh phụ nữ được sử dụng để ngăn ngừa và hỗ trợ điều trị tình trạng này. Gần đây, sản phẩm Max Skin care I Free (gồm nước khử khoáng, glycerin, sodium lauryl sulfat, carboxymethyl

cellulose, tocopheryl acetat, trametes versicolor extract, acid citric, copper, curcumin, methylchloroisothiazolinon, methyl-isothiazolinon, PEG-40 hydrogenated castor oil, fragrance) của Công ty TNHH Matxi Corp được Sở Y tế tỉnh Đồng Nai cấp số công bố 52/2020/CBMP-ĐN làm sản phẩm dùng để vệ sinh cơ quan sinh dục ngoài, giúp giảm ngứa, khử mùi, diệt khuẩn. Để cung cấp cơ sở khoa học về tác dụng của sản phẩm, nghiên cứu báo cáo tác động kháng nấm *in vitro* và *in vivo* trên chuột nhắt gây nhiễm *Candida albicans* của sản phẩm Max Skin care I Free.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Mẫu thử: Sản phẩm Max Skin care I Free gồm nước khử khoáng, glycerin, sodium lauryl sulfat, carboxymethyl cellulose, tocopheryl acetat, trametes versicolor extract, acid citric, copper, curcumin, methylchloroisothiazolinon, methylisothiazolinon, PEG-40 hydrogenated castor oil, fragrance. Số lô: 19D0027-4-12:30; Ngày sản xuất: 21/12/2019; Hạn sử dụng: 01/12/2022; Công ty sản xuất: Công ty TNHH Silk Việt Nam; chịu trách nhiệm sản phẩm,

Chịu trách nhiệm: Đỗ Thị Hồng Tươi

Email: hongtuoi@ump.edu.vn

Ngày nhận: 28/10/2020

Ngày phản biện: 24/12/2020

Ngày duyệt bài: 22/01/2021

phân phối bởi: Công ty TNHH Matxi Corp; được Sở Y tế tỉnh Đồng Nai cấp số công bố 52/2020/CBMP-ĐN, cung cấp từ kho của Công ty TNHH Matxi Corp.

Đối chứng: Dung dịch Saforelle thương mại (Laboratoires Iprad Santé, Pháp; nhập khẩu bởi Công ty Cổ phần Dược phẩm TEDIS - Việt Hà, Lot: 3608, Ngày sản xuất: 21/12/2019; Hạn sử dụng: 06/2021).

Vi nấm: *C. albicans* ATCC 10231.

Môi trường: Môi trường hoạt hóa: Tryptic Soy Broth (TSB) bổ sung 2% glucose, thạch Sabouraud Dextrose Agar (SDA), môi trường pepton chứa 0,1% glucose. Môi trường thử nghiệm: Thạch Mueller - Hinton (Mueller - Hinton agar - MHA) bổ sung 2% glucose, nấu chảy, đổ đĩa petri thủy tinh, đường kính 90 mm lớp thạch dày 3 - 4 mm, mở nắp đĩa petri đặt trong tủ cấy có quạt khoảng 15 phút để khô bề mặt thạch. Môi trường có nguồn gốc từ Công ty Himedia, Ấn Độ; glucose được pha chung với môi trường trước khi hấp tiệt trùng.

Động vật nghiên cứu: Chuột nhắt *Swiss albino* cái, 5 - 6 tuần tuổi, 18 - 22 g, do Viện Vaccin và Sinh phẩm Y tế Nha Trang cung cấp. Chuột khỏe mạnh, không có biểu hiện bất thường, nuôi ổn định trong môi trường thí nghiệm 5 ngày trong lồng nhựa (25 x 35 x 15 cm), cung cấp thức ăn, nước uống đầy đủ trong thời gian thử nghiệm.

Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát hoạt tính kháng nấm *in vitro*

Định tính khả năng kháng nấm của mẫu thử theo phương pháp khuếch tán trong thạch theo CLSI M26-A^[2]. *C. albicans* cấy ria trên môi trường SDA, ủ 37 °C 48 giờ. Lấy 5 khóm nấm riêng rẽ cấy vào môi trường lỏng. Ủ 6 giờ ở 37 °C để hoạt hóa, chỉnh độ đục bằng TSB tương đương McFarland 0,5 (1-5 x 10⁶ CFU/ml). Dùng que bông vô trùng nhúng vào huyền dịch nấm đã chuẩn bị, trải đều lên mặt thạch MHA bổ sung glucose 2%, lặp lại 3 lần, mỗi lần xoay hộp 60 độ, để vi nấm phủ kín đều trên mặt thạch. Đục lỗ đường kính 4 mm bằng ống thép không gỉ, đường kính ngoài 4 mm, được hấp tiệt trùng. Tiến hành song song mẫu chứng âm không có mẫu thử và mẫu đối chứng Saforelle. Cho 60 µl mẫu vào lỗ, để yên 15 phút. Ủ ở 37 °C trong 48 giờ.

Xác định mức độ ức chế vi nấm *in vitro* thông qua tỷ lệ (%) giảm vi nấm theo CLSI M26-A^[2]. Nuôi cấy vi nấm trong môi trường Mueller-Hinton ở 37 °C trong 24 giờ; ly tâm huyền dịch nấm ở tốc độ 3000 g trong 15 phút, thu cặn nấm, rửa hai lần và phân tán cặn trong NaCl 0,9%. Ủ ống chứa 10 ml mẫu thử ở 40 °C (nhiệt độ thử nghiệm hoạt tính ức chế vi nấm thường được sử dụng đối với mẫu thử có độ nhớt như dung dịch phụ khoa để đảm bảo khả năng tiếp xúc với vi nấm) cho 100 µl huyền phù vi nấm vào ống; ủ ở 40°C 10 giây (thời gian thường dung dịch phụ khoa tiếp xúc với da). Xác định lượng vi nấm còn lại trong mẫu thử bằng phương pháp đếm số khóm nấm trên thạch MHA: Dịch thử nghiệm được pha loãng theo cấp số 10. Hút 100 µl ở các bậc pha loãng trải lên thạch MHA, ủ các đĩa thạch ở 37 °C trong 48 giờ, đếm số khóm nấm trên đĩa. Lặp lại ba lần. Thực hiện tương tự với mẫu chứng âm không có mẫu thử (10 ml NaCl 0,9% bổ sung 100 µl huyền dịch nấm) và mẫu đối chứng Saforelle. Hoạt tính ức chế vi nấm được tính theo công thức tính:

$Số\ log_{10}\ giảm = Log(\text{lượng nấm trong mẫu chứng}) - Log(\text{lượng nấm trong mẫu thử})$

Khảo sát tác dụng kháng nấm *Candida* âm đạo^[4,5]

Lấy khóm *C. albicans* riêng lẻ chuyển sang môi trường pepton chứa 0,1% glucose, ủ ở 25 °C trong 18 giờ. Ly tâm ở tốc độ 3000 g trong 15 phút, thu cặn, rửa cặn 2 lần và phân tán với PBS; điều chỉnh mật độ nấm đến 5 × 10⁶/ml bằng buồng đếm Neubauer.

Chuột nhắt cái được chia làm 2 nhóm: Nhóm 1 (không gây bệnh, n = 8): lô sinh lý; nhóm 2 (gây nhiễm *C. albicans* vào bộ phận âm đạo), được chia thành 3 lô (8 chuột/lô): lô chứng bệnh: không điều trị, lô thử: điều trị bằng sản phẩm Max Skin care I Free, lô đối chứng: điều trị bằng Saforelle.

Trong 7 ngày trước và sau khi gây nhiễm nấm vào âm đạo, chuột ở lô sinh lý và lô chứng bệnh được rửa âm đạo bằng nước ấm 2 lần/ngày cách nhau 6 giờ; chuột ở lô điều trị lần lượt được rửa âm đạo 2 lần/ngày cách nhau 6 giờ với 20 µl dung dịch Max Skin care I Free hoặc Saforelle, sau đó rửa lại bằng nước ấm. Trước khi gây nhiễm nấm vào âm đạo 72 giờ, chuột ở lô sinh lý được tiêm dưới da ở vùng bụng dưới 100 µl dầu mè; chuột ở các lô

gây nhiễm nấm *C. albicans* được tiêm 0,1 mg estradiol benzoat pha trong 100 µl dầu mè, tiếp tục tiêm cách ngày đến khi kết thúc thử nghiệm. Gây nhiễm nấm vào âm đạo chuột bằng cách nhỏ 20 µl huyền dịch nấm vào trong âm đạo (đặt đầu tip pipet sâu khoảng 5 mm vào trong âm đạo). Ngày thứ 7 sau khi gây nhiễm nấm, rửa âm đạo chuột (nhỏ 100 µl PBS vô trùng vào trong âm đạo), thu dịch rửa vào tít eppendorf (dùng pipette hút nhiều lần PBS trong âm đạo), soi tươi, xác định sự hiện diện của nấm bằng

kính hiển vi quang học (Olympus, Nhật Bản) có độ phóng đại 600X, xác định mật độ nấm bằng phương pháp đếm số khóm nấm trên thạch SDA: Pha loãng dịch rửa âm đạo với PBS 5 bậc liên tiếp theo cấp số 10. Hút 10 µl dịch rửa âm đạo ở các bậc pha loãng trải lên thạch SDA bổ sung cloramphenicol 50 µg/ml. Ủ ở 37 °C trong 48 giờ. Đếm số khóm nấm trên thạch SDA ở bậc pha loãng n thích hợp. Tính mật độ nấm theo công thức:

$$N \text{ (CFU/ml)} = \{ \text{số khuẩn lạc ở bậc } n + [(\text{số khuẩn lạc ở bậc } n+1) \times 10] \} \times 10^{(n+2)/2}$$

Sau khi rửa âm đạo, gây mê chuột, mổ chuột, tách lấy 2 hạch bạch huyết thất lưng, nghiền trong 1 ml PBS vô trùng, đếm số tế bào lympho sử dụng buồng đếm Neubauer. Tách phần âm đạo ngâm formol 10% (Guangdong guadong, Trung Quốc) để phân tích vi thể sau khi nhuộm Hematoxylin – Eosin (HE) tại Khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện Quận 2, Thành phố Hồ Chí Minh. Quan sát dưới kính hiển vi quang học để đánh giá tình trạng viêm dựa vào mức độ thâm nhập tế bào viêm (lympho bào, bạch cầu,...).

Phân tích kết quả và xử lý số liệu thống kê

Kết quả xử lý bằng Excel, trình bày

dạng trung bình ± sai số chuẩn của giá trị trung bình (Mean ± SEM) và phân tích thống kê với phần mềm SPSS 24.0 bằng phép kiểm student t-test đối với số liệu phân phối chuẩn và phép kiểm Mann-Whitney đối với số liệu có phân phối không chuẩn. Khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

Kết quả

Khả năng kháng nấm *C. albicans in vitro*

Bằng phương pháp khuếch tán trong thạch, đường kính vòng kháng nấm của mẫu Max Skin care I Free và Saforelle lần lượt là 11 mm và 8 mm. Tiếp tục khảo sát mức độ ức chế vi nấm của 02 mẫu này (bảng 1).

Bảng 1. Kết quả khảo sát mức độ ức chế *C. albicans in vitro*

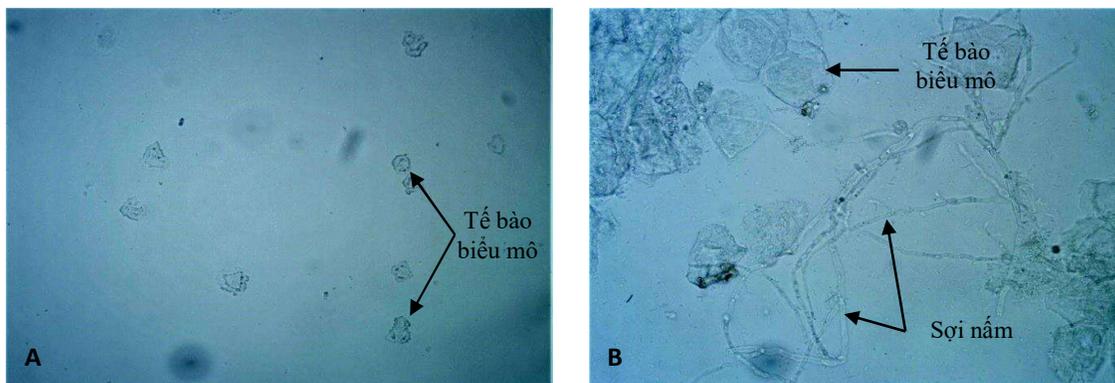
Mẫu thử	Lượng vi nấm trong mẫu chứng (CFU/ml)	Lượng vi nấm trong mẫu thử (CFU/ml)	Hoạt tính ức chế vi nấm (Số log₁₀ giảm)	Tỷ lệ giảm vi nấm (%)
Max Skin care I Free	2,4 x 10 ⁹	1,3 x 10 ⁹	0,27	45,83
Saforelle	2,4 x 10 ⁹	1,6 x 10 ⁹	0,18	33,33

Tác động kháng viêm âm đạo do nấm *C. albicans* trên chuột nhắt

Ảnh hưởng lên tình trạng nhiễm nấm âm đạo khi soi dịch rửa âm đạo

Kết quả cho thấy ở lô sinh lý không gây nhiễm nấm *C. albicans*, dịch rửa âm đạo trong suốt, khi soi tươi không có mẫu xuất hiện nấm ở cả dạng sợi và dạng nấm men. Ở lô chứng bệnh, dịch rửa âm đạo có các mảng nấm trắng, 5/8 (62,5%) mẫu soi tươi trên kính hiển vi có sợi nấm chứng tỏ

mô hình đã gây được tình trạng nhiễm nấm *C. albicans* âm đạo trên chuột nhắt. Ở các lô điều trị được rửa âm đạo với các sản phẩm Max Skin care I Free và Saforelle, tình trạng xuất hiện các mảng trắng trong dịch rửa âm đạo giảm. Khi quan sát trên kính hiển vi, số mẫu xuất hiện sợi nấm ở các lô này lần lượt là 4/8 và 1/8. Kết quả này bước đầu cho thấy khi sử dụng các dung dịch thử nghiệm, tình trạng nhiễm nấm âm đạo cải thiện so với lô chứng bệnh.



(A): Mẫu sinh lý (B): Mẫu nhiễm nấm *Candida albicans*
Hình 1. Hình ảnh soi tươi dịch rửa âm đạo trên kính hiển vi (độ phóng đại 600X)

Dịch rửa âm đạo pha loãng 5 bậc theo cấp số 10, chấm 10 µl dịch pha loãng ở mỗi bậc lên thạch SDA. Sau khi ủ, đếm số lượng khóm nấm mọc trên đĩa (bảng 2).

Bảng 2. Mật độ nấm trong dịch rửa âm đạo ở các lô

Lô (n = 8)	Sinh lý	Chứng bệnh	Max Skin care I Free	Saforelle
Mật độ vi nấm ($\times 10^4$ CFU/ml)	0,07 ± 0,01	39,50 ± 3,19**	1,02 ± 0,23***	0,28 ± 0,25***

**p < 0,01 so với lô sinh lý;

***p < 0,01 so với lô chứng bệnh.

Kết quả cho thấy ở lô sinh lý, số lượng khóm nấm đếm được trong dịch rửa âm đạo rất thấp ($0,07 \times 10^4$ CFU/ml). Ở lô chứng bệnh, sau khi gây nhiễm nấm *C. albicans*, mật độ nấm trong dịch rửa thu được là $39,50 \times 10^4$ CFU/ml, tăng 564 lần so với lô sinh lý (p < 0,01). Lô chuột được rửa âm đạo bằng dung dịch Max Skin care I Free trong 7 ngày trước và 7 ngày sau khi cấy nấm *C. albicans* có mật độ nấm trong dịch rửa âm đạo giảm khoảng 39 lần so với lô chứng bệnh (p < 0,01). Ở lô Saforelle, mật độ nấm giảm 141 lần so với lô chứng bệnh (p < 0,01). Như vậy, sản phẩm Max Skin care I Free có tác dụng làm giảm mật độ nấm trong dịch rửa

âm đạo, giảm tình trạng nhiễm nấm âm đạo trên chuột nhất cái gây nhiễm *C. albicans*. Kết quả này phù hợp với hình ảnh soi tươi dịch rửa âm đạo trên kính hiển vi.

Ảnh hưởng lên mật độ tế bào lympho trong hạch bạch huyết thất lưng

Hạch bạch huyết ở thất lưng là các hạch bạch huyết chính của đường sinh dục và là nơi thích hợp nhất để đánh giá các phản ứng miễn dịch toàn thân khi có tác nhân gây viêm nhiễm âm đạo [3]. Kết quả về mật độ tế bào lympho trong hạch bạch huyết thất lưng được trình bày trong bảng 3 và hình 2.

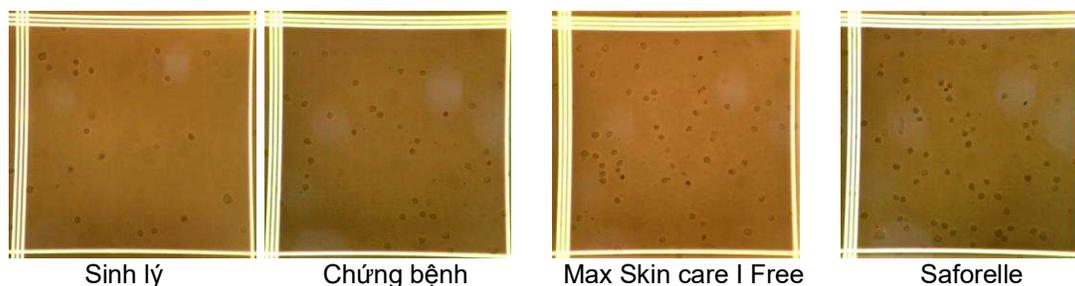
Bảng 3. Mật độ tế bào lympho trong hạch bạch huyết ở các lô

Lô (n = 8)	Sinh lý	Chứng bệnh	Max Skin care I Free	Saforelle
Mật độ tế bào lympho ($\times 10^3$ /ml)	212,0 ± 23,0	380,6 ± 70,1	404,4 ± 40,9	502,7 ± 46,9

*p < 0,05 và **p < 0,01 so với lô sinh lý

Ở lô chứng bệnh, mật độ tế bào lympho trong hạch bạch huyết thất lưng tăng 1,8 lần so với lô sinh lý (p < 0,05), điều này cho thấy khi gây nhiễm nấm âm đạo, cơ thể chuột có đáp ứng miễn dịch toàn thân bằng cách tăng sinh bạch cầu lympho tại các hạch bạch huyết

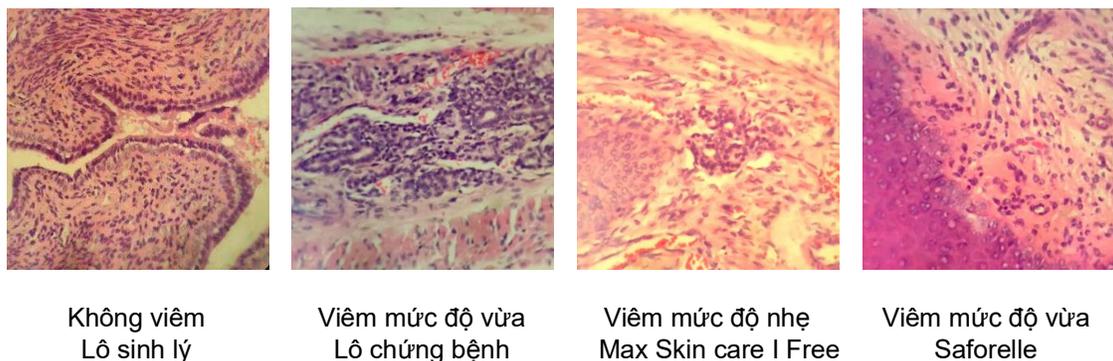
thất lưng. Ở các lô sử dụng dung dịch Max Skin care I Free hoặc Saforelle, mật độ tế bào lympho trong hạch bạch huyết thất lưng thay đổi nhưng không có ý nghĩa so với lô chứng bệnh (p > 0,05). Kết quả này phù hợp với quan sát mức độ viêm trên vi thể âm đạo (bảng 4, hình 3).



Hình 2. Mật độ tế bào lympho trong hạch bạch huyết ở các lô thí nghiệm

Bảng 4. Mật độ tế bào lympho trong hạch bạch huyết ở các lô

Lô (n = 6)	Kết quả phân tích vi thể âm đạo (số mẫu)		
	Bình thường	Viêm ở mức độ nhẹ	Viêm ở mức độ vừa
Sinh lý	5	1	0
Chứng bệnh	0	3	3
Max Skin care I Free	0	3	3
Saforelle	0	3	3



Hình 3. Mức độ viêm âm đạo của các lô thử nghiệm (vật kính 40X)

Kết luận

Sản phẩm Max Skin care I Free thể hiện tác động kháng nấm *Candida albicans in vitro* với tỷ lệ giảm vi nấm 45,83% so với 33,33% của mẫu đối chứng Saforelle và làm giảm tình trạng nhiễm nấm âm đạo trên mô hình gây nhiễm *Candida albicans* ở chuột nhắt cái giúp làm giảm mật độ nấm trong dịch rửa âm đạo, giảm mức độ viêm âm đạo.

Tài liệu tham khảo

1. Brian M. Peters, Junko Yano, Mairi C. Noverr, Paul L. Fidel Jr. (2014), "Candida vaginitis: When opportunism knocks, the host responds", *PLOS Pathogens*, 10 (4), e1003965.
2. Clinical and laboratory standards institute (CLSI) (2013), "Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents",

Approved guideline. CLSI document M26-A.

3. Jack D. Sobel (1997), "Vaginitis", *The New England Journal of Medicine*, 37 (26), pp. 1896-1897.
4. Jin-E Zhang, Dan Luo, Rong-Yi Chen, Yan-Ping Yang, Ying Zhou, Yi-Ming Fan (2013), "Feasibility of histological scoring and colony count for evaluating infective severity in mouse vaginal Candidiasis", *Experimental Animals*, 62 (3), pp. 205-210.
5. Yano J., Fidel Jr., P. L. (2011), "Protocols for vaginal inoculation and sample collection in the experimental mouse model of *Candida* vaginitis", *J. Vis. Exp.* (58), e3382, doi: 10.3791/3382.