

NGHIÊN CỨU TÁC DỤNG ỨC CHẾ *IN VITRO* CỦA CAO KHÔ DỊCH CHIẾT DƯỢC LIỆU TRÊN VI KHUẨN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, *STREPTOCOCCUS* SPP. VÀ *E.COLI* PHÂN LẬP TỪ DỊCH VIÊM TỬ CUNG CHÓ VÀ THỬ NGHIỆM ĐIỀU TRỊ

Nguyễn Thanh Hải¹, Nguyễn Văn Thanh²

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm đánh giá tính mẫn cảm của vi khuẩn đối với 14 loại kháng sinh thông dụng dùng trong thú y, đánh giá khả năng ức chế *in vitro* của cao khô dịch chiết 3 loại dược liệu (cỏ lào; đơn mặt trời; tô mộc) đối với 3 chủng vi khuẩn (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. và *E.coli*). Kết quả nghiên cứu cho thấy 3 chủng vi khuẩn đã kháng lại nhiều loại kháng sinh thông dụng. Ở nồng độ 100mg/ml cao khô dịch chiết 3 loại dược liệu nêu trên đều có khả năng ức chế *in vitro* đối với cả 3 chủng vi khuẩn thử nghiệm, đường kính vòng vô khuẩn biến động từ 18,33 mm đến 33,67 mm. Trong 3 loại thảo dược trên, cao khô dịch chiết đơn mặt trời có tác dụng ức chế vi khuẩn *in vitro* tốt nhất. Đối với *Staphylococcus aureus* và *Streptococcus* spp., nồng độ nhỏ nhất của cao khô dịch chiết thảo dược đơn mặt trời khi cho vào lỗ thạch vẫn còn vòng vô khuẩn là 0,195 mg/ml, đối với *E.coli* vẫn còn vòng vô khuẩn là 0,78 mg/ml. Tiến hành điều trị thử nghiệm chó bị viêm tử cung bằng 3 loại thảo dược cho thấy dịch chiết lá cây đơn mặt trời cho hiệu quả tốt.

Từ khóa: Dịch chiết dược liệu (cỏ lào, đơn mặt trời, tô mộc), Ức chế vi khuẩn *in vitro*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *E.coli*, Chó, Viêm tử cung

Study on *in vitro* bacterial inhibition of medicinal plant extracts for *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. and *E.coli* isolated from the metritis in dogs and experimental treatment

Nguyen Thanh Hai, Nguyen Van Thanh

SUMMARY

This study was conducted to evaluate the susceptibility of bacteria to 14 common antibiotics used in veterinary, to investigate *in vitro* bacterial inhibition of 3 medicine plant extracts (*Eupatorium odorata* L.; *Excoecaria cochinchinensis* Lour; *Caesalpinia sappan*) for *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. and *E.coli*. The studied results showed that *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. and *E.coli* resisted to 14 common antibiotics. At concentration of 100mg/ml, 3 medicine plant extracts performed high inhibition to 3 bacteria, the bacterial inhibition zone was ranked from 18.33 mm to 33.67 mm. The extract of *Excoecaria cochinchinensis* Lour showed the best anti-bacterial efficiency. This extract remained the anti-bacterial effect to *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus* spp. at concentration of 0.195mg/ml and 3 medicine plant extracts at concentration of 0,78 mg/ml effected to *E.coli* inhibition. The experimental treatment for the metritis dogs showed that extract of *Excoecaria cochinchinensis* Lour has given good treatment result.

¹ Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

² Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Keywords: Plant extract (*Eupatorium odorata* L., *Excoecaria cochinchinensis* Lour., *Caesalpinia sappan*), Antibacterial effect, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *E.coli*, Dog, Metritis

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây khi phúc lợi động vật được chú trọng, đặc biệt đối với động vật cảnh hay còn gọi là thú cưng như chó và mèo, kèm theo đó sự chăm sóc thú y được chú trọng hơn, do đó việc sử dụng thuốc kháng sinh phòng và trị bệnh ở thú cưng ngày càng phổ biến. Tuy nhiên, việc kiểm soát sử dụng các loại thuốc kháng sinh này trong điều trị cho thú cưng chưa được quan tâm đúng mức. Nhiều nghiên cứu đã cho thấy các chủng vi khuẩn phân lập từ bệnh phẩm của thú cưng đã kháng nhiều loại thuốc kháng sinh. Sự xuất hiện sự đa kháng của vi khuẩn *S.typhimurium* (DT104) ở chó và mèo đã được công bố ở Anh (Wall *et al.*, 1996; Low *et al.*, 1996), ở Đức (Frech *et al.*, 2003), và tại Mỹ (Centers for Disease Control and Prevention, 2001). Các chủng này thường kháng với ít nhất 5 loại kháng sinh, bao gồm ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulphonamide và tetracycline. Theo nghiên cứu của Zhao và cs. (2003), *Salmonella enterica* serotype Newport đã kháng lại ít nhất 9 loại kháng sinh (bao gồm cả cephalosporins) gây bệnh trên cả động vật và người ở Mỹ.

Bệnh viêm tử cung chó đang khá phổ biến, gây ảnh hưởng trực tiếp đến sức khỏe, sức sinh sản, khả năng duy trì nòi giống, thậm chí gây chết nếu không được điều trị kịp thời (Sử Thanh Long, Trần Lê Thu Hằng, 2015). *E.coli*, *Staphylococcus* spp. và *Streptococcus* spp. là những vi khuẩn có liên hệ phổ biến nhất với bệnh viêm tử cung chó (Nguyễn Văn Thanh và cộng sự, 2012). Theo nghiên cứu của nhiều tác giả, vi khuẩn *E.coli* và *Staphylococcus* spp. gây bệnh phân lập từ dịch viêm tử cung của chó có khả năng kháng lại nhiều thuốc kháng sinh thường dùng (Lloyd *et al.*, 1996; Normand *et al.*, 2000).

Sự chăm sóc gần gũi cũng như sử dụng các loại thuốc kháng sinh của người cho những đối tượng này cũng là một trong những nguyên nhân làm lây lan vi khuẩn kháng thuốc (Luca *et al.*, 2004). Sự kháng thuốc kháng sinh của vi khuẩn đang gia tăng nhanh chóng, là một vấn đề nghiêm trọng, không còn là một dự đoán trong tương lai mà đang xảy ra trong mọi khu vực trên thế giới (WHO, 2014). Tổ chức Y tế thế giới đã nhận định rằng nhiều hợp chất có nguồn gốc thực vật bản địa có khả năng thay thế thuốc kháng sinh. Những nghiên cứu và trao đổi thông tin về thảo dược ngày càng được chú trọng (Amadou, 1998). Rất nhiều thảo dược đã được các nhà nghiên cứu trên toàn thế giới chứng minh là có tác dụng với vi khuẩn gây bệnh (Mahesh, B., *et al.*, 2008; Seyyedneiad, S.M., *et al.*, 2010). Thảo dược đang ngày càng chứng minh được vai trò quan trọng của nó trong nền công nghiệp dược phẩm như là một giải pháp an toàn sinh học thay thế cho các thuốc hóa học tổng hợp (Mahesh *et al.*, 2008; Nguyễn Thanh Hải, Bùi Thị Tho, 2013). Trong khi các nhà khoa học ở các nước phát triển trên thế giới đang có xu hướng nghiên cứu các thảo dược truyền thống thì tại các nước đang phát triển, là nơi vốn có thể mạnh về thuốc cổ truyền lại chưa được tập trung khai thác, việc sử dụng chủ yếu chỉ dựa trên kinh nghiệm dân gian mang tính chất truyền miệng. Việt Nam là một nước có nguồn thảo dược vô cùng phong phú và đa dạng. Việt Nam đang sở hữu cả “kho vàng” dược liệu với gần 4.000 cây có thể dùng trực tiếp làm thuốc hay để tách chiết một số hoạt chất bào chế thuốc thành phẩm. Bên cạnh đó, các nhà nghiên cứu thường chú trọng đến lĩnh vực nhân y nên việc nghiên cứu và ứng dụng trong thú y còn rất hạn chế.

Mục đích của nghiên cứu này, bên cạnh việc đánh giá sự mẫn cảm của vi khuẩn thường gặp

phân lập từ dịch viêm tử cung chó đối với 14 loại kháng sinh thông dụng dùng trong Thú y, còn đánh giá khả năng diệt khuẩn *in vitro* của dịch chiết 3 dược liệu (cỏ lào - *Eupatorium odorata* L.; đơn mặt trời - *Excoecaria cochinchinensis* Lour.; tô mộc - *Caesalpinia sappan*) đối với 3 chủng vi khuẩn *E.coli*, *Staphylococcus aureus* và *Streptococcus* spp. phân lập từ dịch viêm tử cung chó. Nghiên cứu cũng trình bày kết quả điều trị thử nghiệm sử dụng dịch chiết dược liệu trên chó bị mắc bệnh viêm tử cung.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

+ Lá cây đơn mặt trời, cỏ lào được thu hái tại vườn dược liệu Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Thu lá lành lặn, bánh tẻ, không bị sâu. Thu lá sạch vào những ngày khô ráo, khoảng từ 7 – 10 giờ sáng. Lá tươi thu hái về được rửa dưới vòi nước sạch (2-3 lần) rồi rửa lại với nước cất, sau đó được sấy ở 40°C. Mẫu khô được nghiền thành bột mịn (<0,5mm). Bột lá đựng trong túi nilong bảo quản trong bình hút ẩm.

+ Gỗ tô mộc được thu mua, tiến hành chế nhỏ với kích thước < 0,5 cm, rửa dưới vòi nước sạch (2-3 lần) rồi rửa lại bằng nước cất, sau đó được sấy ở 40°C. Gỗ tô mộc sau khi được sơ chế, đựng trong túi nilong và bảo quản trong bình hút ẩm.

+ Vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. và *E.coli* phân lập từ dịch viêm tử cung chó do Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ sinh học Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam (LAS – NN54; ISO 17025:2005) cung cấp.

+ Giấy tẩm kháng sinh do công ty TNHH Nam Khoa sản xuất.

+ Kháng sinh ampicillin và streptomycin sulfat do Công ty cổ phần thuốc Thú y TW 5 (FiveVet) cung cấp.

+ Môi trường Luria - Bertani (LB) dạng lỏng, được hấp khử trùng trong các bình tam giác để nuôi cấy thu dịch khuẩn.

+ Môi trường LB đặc, được hấp tiệt trùng, để nguội tới 40°- 50°C, đổ vào đĩa petri có đường kính 10cm, với độ dày $4 \pm 0,2$ mm.

+ Chó lựa chọn cho thí nghiệm là chó bị bệnh viêm tử cung đưa đến khám và điều trị tại Trung tâm nghiên cứu chó nghiệp vụ, Khoa Thú y - Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

+ *Thu cao dịch chiết dược liệu*: 50g bột dược liệu được chiết bằng hệ thống shoxlets dung tích 1 lít với dung môi ethanol 70% cho tới khi kiệt hoạt chất. Sau đó, dung môi được thu hồi bằng hệ thống chưng cất. Cao đặc được sấy khô ở 45°C đến khối lượng không đổi. Cao cô toàn phần đã loại bỏ hết dung môi bảo quản trong tủ mát 4°C để tiến hành nghiên cứu.

+ *Phương pháp pha dịch chiết nồng độ 100mg/ml*: Lấy 1g cao cô toàn phần pha với 10ml Dimethyl Sulfoxide (DMSO), dùng đũa thủy tinh khuấy tan hoàn toàn, ta được dung dịch có nồng độ 100mg/ml.

+ *Nuôi cấy vi khuẩn Staphylococcus aureus, Streptococcus* spp. và *E.coli* trên môi trường đặc và lỏng: Vi khuẩn được cấy vạch trong môi trường LB đặc, trên đĩa petri ủ 37°C/24h, chọn khuẩn lạc đơn điển hình. Khuẩn lạc đơn được nuôi cấy trong bình tam giác với môi trường LB lỏng, đặt trong tủ bảo ôn ở 37°C, với tốc độ lắc 200 vòng/phút trong 12 - 14h; thu dịch khuẩn (mật độ vi khuẩn đạt 10^8 tế bào/ml là đạt chuẩn).

+ *Xác định mật độ vi khuẩn*: Mật độ vi khuẩn sau khi nuôi cấy trong môi trường LB lỏng được xác định theo phương pháp đo mật độ quang (OD) ở bước sóng $\lambda = 600\text{nm}$.

+ *Kiểm tra tác dụng ức chế vi khuẩn của các dịch chiết bằng phương pháp kháng sinh đồ khuếch tán trên đĩa thạch của Kirby-Bauer*: Các

thao tác được thực hiện trong tủ cấy vô trùng. Khi mật độ vi khuẩn đạt 10^8 tế bào/ml, lắc đều bình chứa vi khuẩn, dùng pipet hút 100 μ l canh khuẩn nhỏ vào giữa đĩa thạch, dùng đũa thủy tinh tráng đều cho đến khi mặt thạch khô. Sau 15 phút, đục lỗ trên mặt thạch với đường kính 6mm/lỗ, cách nhau khoảng 25mm. Ở mỗi lỗ thạch, nhỏ 100 μ l dịch chiết, đặt đĩa vào tủ ẩm ở 37°C/24h, đọc kết quả bằng cách đo đường kính vòng vô khuẩn, rồi tính số bình quân.

+ *Phương pháp pha loãng dịch chiết*: Chuẩn bị 10 ống nghiệm vô trùng, cho vào mỗi ống 5ml DMSO. Lấy 5 ml mẫu dịch chiết (100mg/ml), cho vào ống nghiệm thứ nhất, làm đồng đều, ta được độ pha loãng 2 lần (2^1). Lấy 5ml dung dịch ở ống nghiệm 2^1 cho vào ống nghiệm thứ 2, ta được độ pha loãng 4 lần (2^2). Cứ làm như vậy, ta được độ pha loãng tiếp theo: $2^3, 2^4 \dots 2^n$.

+ *Phương pháp điều trị thử nghiệm*: Chúng tôi tiến hành thử nghiệm điều trị bằng 2 phác đồ khác nhau.

Phác đồ I (19 chó): Dung dịch Rivonol 0,1% thật rửa tử cung, sau khi thật rửa kích thích tử cung co bóp (xoa bóp vùng bụng) đẩy dung dịch thật rửa ra ngoài hết, dùng amoxillin với liều 50mg/kg P pha trong 100ml nước cất bơm trực tiếp vào tử cung, tiêm bắp; Dexamethason: 0,5 ml/10kg P, tiêm bắp; Vit. B-complex: 1ml/5kg P, tiêm bắp.

Phác đồ II (16 chó): Giống như phác đồ I, chỉ khác ở việc thay amoxillin bằng cao khô dịch chiết lá cây đơn mặt trời với liều lượng 50mg/kg P lượng cao khô được hòa tan hoàn toàn trong ethanol 70% (2-3 ml), sau đó bổ sung nước cất đến 100ml, bơm trực tiếp vào tử cung.

Trong trường hợp chó có hiện tượng tiêu chảy, nôn, bỏ hoặc giảm ăn, chúng tôi kết hợp truyền dung dịch Ringer Lactat và đường Glucose 5% qua tĩnh mạch với liều lượng 20ml/kg P/ngày ở cả 2 phác đồ (trong đó Ringer Lactat chiếm 2/3 và đường Glucose 5% chiếm

1/3 lượng dung dịch truyền). Bên cạnh sử dụng phác đồ điều trị, chó bệnh được chăm sóc, hộ lý chu đáo, cho ăn thức ăn dễ tiêu. Trong quá trình điều trị, chó được ghi nhận khỏi bệnh là những chó có kết quả chẩn đoán là hết sốt, ăn uống bình thường, không còn chảy dịch từ cơ quan sinh dục ra ngoài, bụng không to bất thường. Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm tỷ lệ khỏi và thời gian điều trị trung bình.

2.3 Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên. Số liệu thu được xử lý thống kê sinh học bằng phần mềm Excel 2007.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả đánh giá tính miễn cảm kháng sinh của vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.* và *E. coli* phân lập từ dịch viêm tử cung chó

Việc sử dụng thuốc kháng sinh trong điều trị cho thú cưng chưa được quan tâm đúng mức, hiện tượng sử dụng thuốc kháng sinh tràn lan, không theo quy định, không đúng nguyên tắc... theo nhiều nghiên cứu, đây chính là một trong những nguyên nhân gây ra hiện tượng kháng thuốc của vi sinh vật gây bệnh.

Nhằm đánh giá hiện tượng kháng thuốc kháng sinh của vi khuẩn phân lập từ dịch viêm tử cung chó, chúng tôi tiến hành kiểm tra mức độ miễn cảm với 14 loại kháng sinh thông dụng dùng trong Thú y của 3 chủng vi khuẩn thử nghiệm. Theo tiêu chuẩn CLSI 2010, cho thấy vi khuẩn *Staphylococcus aureus* thử nghiệm miễn cảm 9/14, miễn cảm trung bình 2/14 và kháng lại 3/14 loại kháng sinh. Vi khuẩn *Streptococcus spp.* thử nghiệm vẫn còn miễn cảm 9/14 và kháng lại 5/14 với các loại kháng sinh. Vi khuẩn *E.coli* thử nghiệm vẫn còn miễn cảm cao với 8/14, miễn cảm trung bình với 1/14 và kháng lại 5/14 các loại kháng sinh (bảng 1).

Bảng 1. Kết quả kiểm tra kháng sinh đồ của 3 chủng vi khuẩn thử nghiệm với 14 kháng sinh thông dụng

STT	Kháng sinh	Nồng độ (µg)	Đường kính vòng vô khuẩn, mm		
			<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus spp.</i>	<i>E.coli</i>
1	Penicillin (Pn)	10	0	25	0
2	Ampicillin (Am)	10	27	24	21
3	Amoxcillin (Ax)	10	28	19	19
4	Streptomycin (Sm)	10	0	0	21
5	Neomycin (Ne)	30	13	3	11
6	Gentamycin (Ge)	10	15	24	18
7	Kanamycin (Kn)	30	17	0	17
8	Amikacin (Ak)	30	15	22	18
9	Tetracyclin (Te)	30	16	21	4
10	Doxycyclin (Dx)	30	14	0	0
11	Norfloxacin (Nr)	10	21	19	0
12	Ofloxacin (Of)	5	19	18	0
13	Colistin (Co)	10	0	0	29
14	Trimethoprim/ Sulfamethoxazol (Bt)	1,25/23,75	10	15	19

Vi khuẩn phân lập từ dịch viêm tử cung chó đã xuất hiện hiện tượng đa kháng. Các vi khuẩn đều có khả năng kháng lại từ 3 đến 5 loại kháng sinh thông dụng đang dùng trong Thú y. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với nhận định của nhiều tác giả khi nhận thấy vi khuẩn *E.coli* và *Staphylococcus* spp. gây bệnh phân lập từ dịch viêm tử cung của chó có khả năng kháng lại nhiều thuốc kháng sinh thường dùng (Lloyd *et al.*, 1996; Normand *et al.*, 2000). Bên cạnh đó, nhiều nghiên cứu về vi khuẩn gây bệnh cho chó nói chung cũng cho kết quả tương tự về hiện tượng

kháng lại thuốc kháng sinh sử dụng trong điều trị (Normand *et al.*, 2000; Wissing *et al.*, 2001; Frech *et al.*, 2003; Nguyễn Văn Thành, 2012).

3.2. Hiệu suất chiết xuất của các dược liệu bằng hệ thống Shoxlets/Ethanol 70%

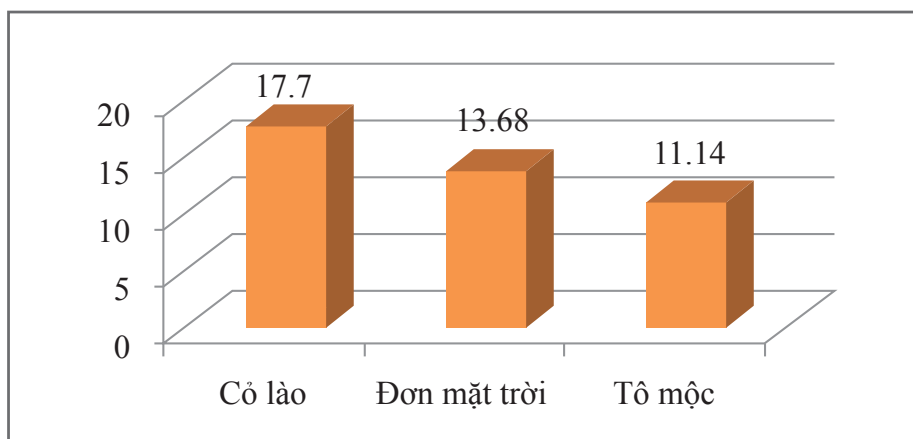
Kết quả tiến hành chiết xuất của 3 loại dược liệu (cỏ lào, đơn mặt trời, tô mộc) bằng hệ thống Shoxlets/Ethanol 70% cho thấy, khối lượng cao khô trung bình thu được từ 50g dược liệu ban đầu, tùy từng loại dược liệu là khác nhau (bảng 2).

Bảng 2. Khối lượng cao khô thu được của 50 g dược liệu bằng hệ thống Shoxlets/Ethanol 70%

Khối lượng cao khô (g)	Loại dược liệu		
	Cỏ lào	Đơn mặt trời	Tô mộc
	8,848 ± 0,144	6,839 ± 0,225	5,571 ± 0,514

Cỏ lào cho khối lượng cao khô trung bình lớn nhất, đạt 8,848 g, tương đương với hiệu suất 17,70%. Tô mộc cho khối lượng cao khô trung

bình là nhỏ nhất, đạt 5,571 g, tương đương với hiệu suất tách chiết là 11,14% (hình 1).



Hình 1. Hiệu suất chiết xuất của 3 dược liệu bằng hệ thống Soxhlets/Ethanol 70%

Có sự khác nhau về hiệu suất chiết xuất, theo chúng tôi có thể do bộ phận dùng của dược liệu cỏ lào và đơn mặt trời là lá nên dung môi Ethanol 70% dễ thấm vào trong tế bào hơn so với dược liệu lõi gỗ tô mộc. Khi dung môi thấm vào trong tế bào dược liệu, nó sẽ hòa tan các chất có trong dược liệu và đồng thời quá trình khuếch tán các chất hòa tan từ trong tế bào ra bên ngoài dung môi ở các tế bào lá dễ dàng hơn tế bào lõi gỗ, do tế bào lõi gỗ có thành cellulose dày hơn. Ngoài ra, có thể do hàm lượng các hợp chất thứ cấp trong dược liệu cỏ lào và đơn mặt trời cao hơn trong dược liệu tô mộc.

Sử dụng phương pháp Soxhlets/Ethanol 70%, hiệu suất tách chiết lá dược liệu cỏ lào và đơn mặt trời đều cao hơn hiệu suất tách chiết khi sử dụng các phương pháp khác. Theo nghiên cứu của Srisuda Hanphakphoom và cộng sự (2016), khi sử dụng phương pháp ngâm kiệt tùy thuộc vào từng dung môi, hiệu suất tách chiết lá cỏ lào biến đổi từ 2,37% (dung môi hexan) đến 12,67% (dung môi nước). Khi sử dụng phương pháp ngâm lạnh và cô quay chân không, hiệu suất tách chiết lá cây đơn mặt trời tùy thuộc từng loại dung môi, biến đổi từ 7,05% (dung môi chloroform) đến 13,60 % (dung môi acid acetic) (Phạm Thị Dung, 2015).

3.3. Đánh giá tác dụng ức chế *in vitro* của dịch chiết dược liệu với 3 chủng vi khuẩn thử nghiệm

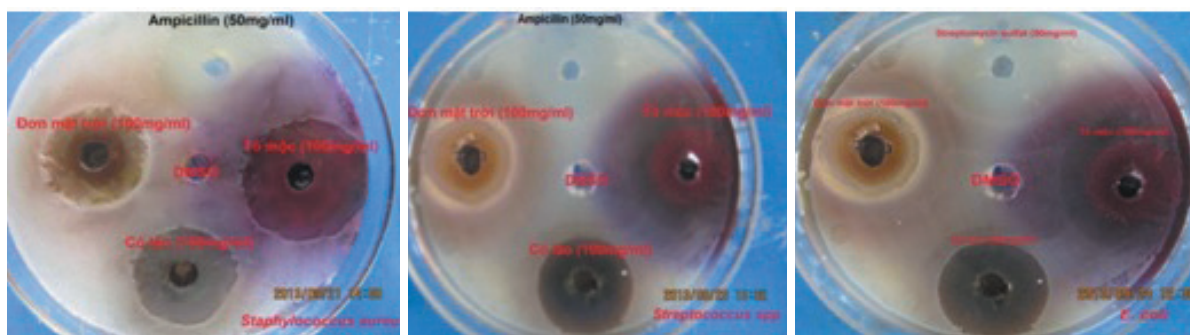
Mẫu cao khô dịch chiết dược liệu thu được từ thí nghiệm trên ở nồng độ 100mg/ml, được sử dụng để đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn *in vitro* đối với 3 chủng vi khuẩn thử nghiệm bằng phương pháp khuếch tán trên thạch. Đối chứng so sánh với kháng sinh chuẩn là ampicillin (50mg/ml) đối với vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. và streptomycin sulfat (50mg/ml) đối với vi khuẩn *E.coli*.

Kết quả thí nghiệm cho thấy cả 3 loại cao khô dịch chiết dược liệu đều có khả năng ức chế vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. và *E.coli* phân lập từ dịch viêm tử cung chó (bảng 3, hình 2).

Đối với vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, đường kính vòng vô khuẩn bình quân dao động từ 21,67 mm (cao khô dịch chiết cỏ lào) đến 33,67 mm (cao khô dịch chiết tô mộc). Ngoài cao khô dịch chiết gỗ tô mộc, 2 loại cao khô dịch chiết còn lại đều cho tác dụng ức chế vi khuẩn *Staphylococcus aureus in vitro* kém hơn so với kháng sinh ampicillin (50mg/ml), với đường kính vòng vô khuẩn là 28,33mm. Đối với vi khuẩn *Streptococcus* spp., đường kính

Bảng 3. Tác dụng kháng khuẩn *in vitro* của dịch chiết dược liệu đối với 3 chủng vi khuẩn thử nghiệm

STT	Thành phần	Nồng độ (mg/ml)	Đường kính vòng vô khuẩn bình quân, mm		
			<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>E.coli</i>
1	Đ/c DMSO	0	0	0	0
2	Streptomycin sulfat	50	-	-	28,33 ± 1,15
	Ampicillin	50	28,33 ± 1,53	30,00 ± 1,00	-
3	Cao khô dịch chiết cỏ lào	100	23,00 ± 1,73	18,33 ± 1,53	24,00 ± 1,00
4	Cao khô dịch chiết đơn mặt trời	100	21,67 ± 1,15	21,67 ± 0,58	22,00 ± 1,00
5	Cao khô dịch chiết tô mộc	100	33,67 ± 1,15	25,00 ± 1,00	19,67 ± 1,53

**Hình 2. Tác dụng diệt khuẩn *in vitro* của cao khô dịch chiết dược liệu đối với vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. và *E.coli* phân lập từ dịch viêm tử cung chó**

vòng vô khuẩn bình quân dao động 18,33 mm (cao khô dịch chiết cỏ lào) đến 25,00 mm (cao khô dịch chiết tô mộc). Cả ba loại cao khô dịch chiết dược liệu đều có tác dụng ức chế vi khuẩn *Streptococcus* spp. *in vitro* kém hơn so với kháng sinh ampicillin (50mg/ml), với đường kính vòng vô khuẩn là 30,00mm. Đối với vi khuẩn *E.coli*, khác với 2 chủng vi khuẩn thử nghiệm trên, cao khô dịch chiết tô mộc lại cho đường kính vòng vô khuẩn nhỏ nhất, chỉ đạt 19,67 mm, cao khô dịch chiết cỏ lào lại cho đường kính vòng vô khuẩn lớn nhất, đạt 24,00 mm. Tương tự như đối với 2 vi khuẩn thử nghiệm trên cao khô dịch chiết các loại dược liệu đều cho tác dụng ức chế vi khuẩn *E.coli in vitro* kém hơn so với kháng sinh streptomycin sulfat (50mg/ml), với đường kính vòng vô khuẩn là 28,33mm (bảng 3).

Theo nghiên cứu của Leelapornpisid và cs (2011), cao khô dịch chiết của lá cây đơn mặt

trời khi sử dụng các dung môi khác nhau cho đường kính vòng vô khuẩn biến đổi từ 18,00 mm đến 20,67 mm, không có sự sai khác có ý nghĩa về mặt thống kê so với nghiên cứu của chúng tôi. Đối với cao khô dịch chiết cỏ lào, kết quả nghiên cứu có sự sai khác lớn so với công bố của Srisuda Hanphakphoom và cộng sự (2016). Kết quả nghiên cứu này cho thấy, đường kính vòng vô khuẩn của cao khô dịch chiết cỏ lào đối với vi khuẩn *E.coli* biến đổi từ 0 mm (dung môi hexan) đến 13,70 mm (dung môi methanol); vi khuẩn *Staphylococcus aureus* đường kính vòng vô khuẩn biến đổi từ 0 mm (dung môi nước) đến 20,30 mm (dung môi methanol), nhỏ hơn có ý nghĩa về mặt thống kê so với nghiên cứu của chúng tôi. Có sự sai khác này, một trong những nguyên nhân chủ yếu là do dược liệu được trồng ở những vùng có điều kiện thổ nhưỡng, khí hậu khác nhau.

3.4. Đánh giá tác dụng ức chế vi khuẩn *in vitro* của cao khô loại dịch chiết được liệu khi pha loãng

Theo kết quả nghiên cứu khả năng ức chế vi khuẩn *in vitro* của các cao khô dịch chiết được liệu ở nồng độ 100 mg/ml cho thấy, tùy từng loại cao khô dịch chiết và tùy chủng vi khuẩn thử nghiệm, khả năng ức chế vi khuẩn *in vitro* thay đổi khác nhau. Cả 3 loại cao khô dịch chiết được liệu đều cho khả năng ức chế vi khuẩn tốt, đạt độ mẫn cảm cao (đường kính vòng vô khuẩn

> 20mm). Để đánh giá chính xác khả năng ức chế vi khuẩn và xác định nồng độ cao nhất dịch chiết nhỏ nhất vẫn còn khả năng ức chế vi khuẩn, chúng tôi tiến hành đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn khi pha loãng.

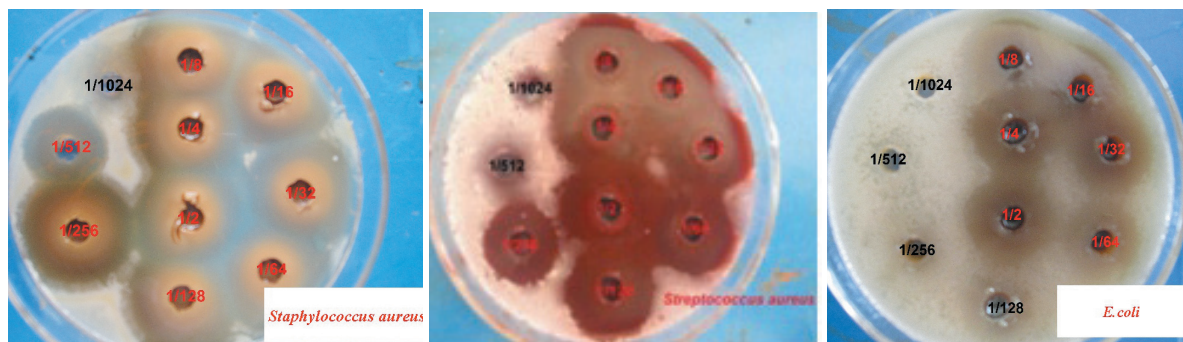
Kết quả đánh giá tác dụng ức chế vi khuẩn *in vitro* của cao khô dịch chiết 3 loại dược liệu đối với vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. và *E.coli* phân lập từ dịch viêm tử cung chó bằng phương pháp hệ nồng độ pha loãng được tóm tắt ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả ức chế vi khuẩn *in vitro* của cao khô dịch chiết dược liệu khi pha loãng đối với vi khuẩn thử nghiệm

[illegible]

Ghi chú: + Quan sát thấy vòng vô khuẩn;

- Không quan sát thấy vòng vô khuẩn



Hình 3. Tác dụng ức chế vi khuẩn in vitro của cao khô dịch chiết dược liệu khi pha loãng
A – cao khô dịch chiết đơn mắt trời; B – cao khô dịch chiết tô mộc; C – cao khô dịch chiết cỏ lào

Nồng độ nhỏ nhất của cao khô dịch chiết khi cho vào lỗ thạch vẫn còn quan sát thấy vòng vô khuẩn tùy từng loại dịch chiết và vi khuẩn thử nghiệm, dao động từ 0,195 mg/ml đến 1,56 mg/ml. Đối với vi khuẩn *Staphylococcus aureus* và *Streptococcus* spp., nồng độ nhỏ nhất của cao khô dịch chiết khi cho vào lỗ thạch vẫn còn quan sát thấy vòng vô khuẩn là 0,195 mg/ml (cao khô dịch chiết đơn mặt trời). Đối với vi khuẩn *E.coli*, nồng độ nhỏ nhất của cao khô dịch chiết 3 loại dược liệu khi cho vào lỗ thạch vẫn còn quan sát thấy vòng vô khuẩn là 0,78 mg/ml. Kết quả thí nghiệm cho thấy, trong 3 loại dược liệu, cao khô dịch chiết đơn mặt trời có tác dụng ức chế vi khuẩn *in vitro* tốt nhất khi pha loãng đối với cả 3 chủng vi khuẩn thử nghiệm. Theo kết quả nghiên cứu của Leelapornpisid và cs (2011), nồng độ nhỏ nhất của dịch chiết đơn mặt trời sử dụng dung môi ethanol còn có tác dụng ức chế vi khuẩn *in vitro* là 1,56mg/ml, cao hơn so với cao khô dịch chiết của chúng tôi,

chúng tôi cao khô dịch chiết đơn mặt trời của chúng tôi có khả năng ức chế vi khuẩn tốt hơn. Kết quả này cũng phù hợp với thí nghiệm trên khi cao khô dịch chiết ở nồng độ 100mg/ml của chúng tôi cho đường kính vòng vô khuẩn lớn hơn so với nghiên cứu này.

3.5. Kết quả thử nghiệm điều trị bệnh viêm tử cung trên chó

Để kiểm chứng hiệu quả thực tế của cao khô dịch chiết lá cây đơn mặt trời, chúng tôi tiến hành điều trị thử nghiệm trên chó bị bệnh viêm tử cung. Căn cứ hiệu suất chiết xuất của lá cây đơn mặt trời trong thí nghiệm và dựa theo phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ dược liệu (Viện Dược liệu, 2006), chúng tôi lựa chọn liều dùng điều trị thử nghiệm cho chó là 50mg/kg thể trọng và chọn thuốc kháng sinh amoxicillin làm đối chứng trong điều trị thử nghiệm. Theo dõi tiến triển của bệnh trong 7 ngày. Kết quả được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Kết quả điều trị thử nghiệm bệnh viêm tử cung trên chó

Phác đồ	Số chó thử nghiệm	Thời gian điều trị										Tổng hợp		
		3 ngày		4 ngày		5 ngày		6 ngày		7 ngày		Tổng số con khô	Tỷ lệ (%)	Thời gian điều trị trung bình (ngày)
		Số con khô	Tỷ lệ (%)	Số con khô	Tỷ lệ (%)	Số con khô	Tỷ lệ (%)	Số con khô	Tỷ lệ (%)	Số con khô	Tỷ lệ (%)			
I	19	2	10,53	6	31,58	4	21,05	2	10,52	1	5,26	15	78,94	4,60
II	16	0	0,00	1	6,25	3	18,75	6	37,50	2	12,50	12	75,00	5,75

Qua bảng 5 chúng tôi nhận thấy, tỷ lệ chó khỏi bệnh của 2 phác đồ là tương đương nhau (78,94% so với 75,00%). Tuy nhiên thời gian điều trị trung bình ở phác đồ I (phác đồ sử dụng kháng sinh amoxicillin) là 4,60 ngày, ngắn hơn so với phác đồ II (phác đồ sử dụng cao khô dịch chiết lá cây đơn mặt trời) có thời gian điều trị trung bình là 5,75 ngày.

Theo chúng tôi, sở dĩ có kết quả như vậy là do các hoạt chất có trong cao khô dịch chiết lá cây đơn mặt trời có tác dụng ức chế và tiêu diệt vi khuẩn chậm hơn thuốc kháng sinh amoxicillin, do đó phác đồ I ghi nhận số ca khỏi bệnh sớm hơn so với phác đồ II. Kết quả của chúng tôi phù hợp với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Văn Thanh và cộng sự (2014) khi sử dụng cao khô dịch chiết lá cây huyền diệu điều trị bệnh viêm

ruột tiêu chảy cho chó. Trong nghiên cứu này, cao khô dịch chiết lá cây huyền diệp cũng có khả năng điều trị bệnh viêm ruột tiêu chảy chó, nhưng tác dụng của nó chậm hơn kháng sinh gentamycin. Tương tự như vậy, trong nghiên cứu của Nguyễn Văn Thanh, Nguyễn Thanh Hải (2014), cũng khẳng định khả năng điều trị bệnh tiêu chảy lợn con theo mẹ khi sử dụng cao khô cây mò hoa trắng; cao khô dịch chiết thường có tác dụng điều trị chậm hơn so với kháng sinh đối chứng.

IV. KẾT LUẬN

Đã xuất hiện sự đa kháng với kháng sinh của vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. và *E.coli* phân lập từ dịch viêm tử cung chó. Vi khuẩn *Staphylococcus aureus* đã kháng 3/14, *Streptococcus* spp. đã kháng 5/14 và *E.coli* đã kháng 5/14 loại kháng sinh thông dụng dùng trong Thú y.

Ở nồng độ 100mg/ml cao khô dịch chiết, 3 loại dược liệu đều có khả năng ức chế *in vitro* đối với cả 3 chủng vi khuẩn thử nghiệm. Cao khô dịch chiết đơn mặt trời có tác dụng ức chế vi khuẩn *in vitro* tốt nhất khi pha loãng đối với cả 3 chủng vi khuẩn thử nghiệm. Đối với vi khuẩn *Staphylococcus aureus* và *Streptococcus* spp. nồng độ nhỏ nhất của cao khô dịch chiết khi cho vào lỗ thạch vẫn còn quan sát thấy vòng vô khuẩn là 0,195 mg/ml (cao khô dịch chiết đơn mặt trời). Đối với vi khuẩn *E.coli*, nồng độ nhỏ nhất của cao khô dịch chiết 3 loại dược liệu khi cho vào lỗ thạch vẫn còn quan sát thấy vòng vô khuẩn là 0,78 mg/ml.

Sử dụng cao khô dịch chiết lá cây đơn mặt trời điều trị bệnh viêm tử cung chó cho hiệu quả điều trị khá cao (đạt 75,00%) tương đương với kết quả sử dụng thuốc kháng sinh amoxicillin (78,94%).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Amadou C.K. (1998). Promoting Alternative Medicine. *Africa Health Journal*, Vol. 2, p.20-25.
2. Centers for Disease Control and Prevention. (2001). Outbreaks of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium associated with veterinary facilities - Idaho, Minnesota, and Washington, 1999. Morbidity and Mortality Weekly Report 50, 701 - 4.
3. Frech, G., Kehrenberg, C. & Schwarz, S. (2003). Resistance phenotypes and genotypes of multiresistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium var. Copenhagen isolates from animal sources. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51, 180 - 2.
4. Low, J. C., Tennant, B. & Munro, D. (1996). Multiple-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 in cats. *Lancet* 348, 1391.
5. Luca Guardabassi, Stefan Schwarz and David H. Lloyd (2004). Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Volume 54, Issue 2. Pp. 321-332.
6. Mahesh B., Satish S. (2008). Antimicrobial activity of some important medicinal plants against animal and human pathogens. *World J Agric Sci*, 4 [S], p. 839 – 843.
7. Nguyễn Thanh Hải, Bùi Thị Tho (2013). Nghiên cứu tác dụng diệt khuẩn *in vitro* của dịch chiết tỏi (*Allium sativum* L.) đối với vi khuẩn *E. coli* gây bệnh và *E. coli* kháng ampicillin, kanamycin. *Tạp chí Khoa học và phát triển*, tập 11, số 6: 804 -808.
8. Nguyễn Văn Thanh, Nguyễn Thanh Hải (2014). Nghiên cứu tác dụng diệt khuẩn

- in vitro của dịch chiết cây Mò hoa trắng (*Clerodendron Fragrans* Vent.) trên vi khuẩn *E. coli*, *Salmonella* spp. phân lập từ phân lợn con theo mẹ mắc bệnh viêm ruột tiêu chảy và thử nghiệm điều trị. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, tập 12, số 5: 683-689.
9. Nguyễn Văn Thanh, Nguyễn Thanh Hải (2014). Tác động kháng khuẩn in vitro của dịch chiết lá cây Huyền diệp (*Polyalthia Longifolia* var. *Pendula*) đối với vi khuẩn *E. coli* và *Salmonella* phân lập từ phân chó bị tiêu chảy và điều trị thử nghiệm. *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y* 2014, Tập XXI, Số 8: 23-30.
 10. Nguyễn Văn Thanh, Vũ Như Quán, Nguyễn Hoài Nam (2012). Giáo trình bệnh của chó, mèo. Nhà xuất bản Đại học Nông nghiệp.
 11. Nguyễn Văn Thành (2012). Nghiên cứu sự thay đổi một số chỉ tiêu lâm sàng, vi khuẩn học và thử nghiệm điều trị bệnh viêm ruột tiêu chảy ở chó trên địa bàn thành phố Hà nội. Luận án thạc sĩ nông nghiệp. Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội.
 12. Normand, E. H., Gibson, N. R., Taylor, D. J. *et al.* (2000). Trends of antimicrobial resistance in bacterial isolates from a small animal referral hospital. *Veterinary Record* 146, 151–5.
 13. Phạm Thị Dung (2015). Nghiên cứu tác dụng diệt khuẩn *in vitro* và ứng dụng điều trị bệnh viêm tử cung trên chó của dịch chiết cây đơn đỏ *Excoecaria cochinchinensis* Lour. Luận án thạc sĩ nông nghiệp. Học viện Nông nghiệp Việt Nam.
 14. Seyyednejad, Motamedi S.M., H. (2010). A review on Native medicinal Plant in Khuzestan, Iran with Antibacterial properties. *International Journal of Pharmacology*, 6: 551-560.
 15. Srisuda Hanphakphoom, Sukhumaporn Krajangsang. (2016). Antimicrobial Activity of *Chromolaena odorata* Extracts against Bacterial Human Skin Infections. *Modern Applied Science*; Vol. 10, No. 2; 2016.
 16. Sử Thanh Long, Trần Lê Thu Hằng (2015). Ứng dụng siêu âm trong chẩn đoán bệnh viêm tử cung ở chó nuôi trên địa bàn Hà Nội và phác đồ điều trị. *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 2015, tập 13, số 1: 23-30
 17. Viện dược liệu (2006). Phương pháp nghiên cứu tác dụng dược lý của thuốc từ dược thảo. NXB Khoa học và Kỹ thuật.
 18. Wall, P. G., Threlfall, E. J. & Ward, L. R. (1996). Multiresistant *Salmonella* Typhimurium DT104 in cats: a public health risk. *Lancet* 348, 471.
 19. Wissing, A., Nicolet, J. & Boerlin, P. (2001). Antimicrobial resistance situation in Swiss veterinary medicine. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde* 143, 503–10.
 20. World Health Organization (WHO) (2014). Antimicrobial resistance: Global report on surveillance. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.
 21. Zhao S., *et al.* (2003). Characterization of *Salmonella enterica* Serotype Newport isolated from humans and food animals. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 41 No. 12.