

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KHÁNG VI KHUẨN VÀ VI NẤM CỦA PHỐI HỢP CLOTRIMAZOL VỚI 5 LOẠI TINH DẦU TRONG ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY *IN VITRO*

Trần Mộng Tố Tâm¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu này khảo sát phối hợp clotrimazol và một số tinh dầu với mục tiêu đánh giá tác dụng kháng nấm *Candida*, kháng khuẩn của clotrimazol phối hợp với 5 loại tinh dầu, xác định loại tinh dầu và tỉ lệ phối hợp phù hợp nhất. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của clotrimazol và tinh dầu đối với *Candida* và vi khuẩn bằng phương pháp pha loãng trong môi trường lỏng. Khảo sát hiệu quả và tỉ lệ phối hợp clotrimazol với từng loại tinh dầu đối với *Candida* và vi khuẩn bằng phương pháp bàn cờ. Khảo sát hiệu quả kháng nấm theo thời gian của phối hợp clotrimazol với tinh dầu hương nhu trắng bằng phương pháp time-kill. Kết quả cho thấy tinh dầu hương nhu trắng có hoạt tính kháng *Candida*, kháng khuẩn tốt nhất, phối hợp clotrimazol với tinh dầu hương nhu trắng cho tác dụng tốt nhất trên cả vi khuẩn và vi nấm với tỉ lệ 1:0,3, đồng thời tinh dầu hương nhu trắng có phối hợp cộng lực với clotrimazol trên *C. albicans*.

ABSTRACT

This study researched the combination of clotrimazole and some essential oils, with the aim of evaluating the anti-*Candida* fungal and antibacterial activities of clotrimazole in combination with five different kinds of essential oils and determining the essential oil type and the optimized ratio. Determining the minimum inhibitory concentration (MIC) of clotrimazole and five essential oils on *Candida* and bacteria by broth dilution method. Surveying effectiveness and fraction of combination of clotrimazole with each kind of essential oil on *Candida* and bacteria by checkerboard method. Surveying antifungal effectiveness over the time of combination of clotrimazole with *Ocimum gratissimum* essential oils by time-kill method. Results show that *Ocimum gratissimum* essential oil has the best anti-*Candida*, antibacterial activity, the combination of clotrimazole with *Ocimum gratissimum* essential oil showed the best effect on both bacteria and fungi with the ratio of 1: 0.3 and *Ocimum gratissimum* essential oil is additive with clotrimazole on *C. albicans*.

Title: *Evaluating the antifungal and antibacterial activities of clotrimazole in combination with essential oils*

Từ khóa: clotrimazol, tinh dầu, hoạt tính kháng khuẩn, hoạt tính kháng nấm

Keywords: clotrimazole, essential oil, antibacterial activity, antifungal activity

Lịch sử bài báo

Ngày nhận bài: 26/5/2022

Ngày nhận kết quả bình duyệt: 23/7/2022

Ngày chấp nhận đăng bài: 15/10/2022

Tác giả:

¹Trường ĐH Yersin Đà Lạt

Email:

tamtmt@yersin.edu.vn

1. Giới thiệu

Viêm âm hộ - âm đạo là bệnh phụ khoa rất thường gặp. Theo thống kê, khoảng 25% phụ nữ bị viêm âm hộ - âm đạo do vi khuẩn, 75% phụ nữ bị nhiễm nấm *Candida* ít nhất một lần trong đời và khoảng 120 triệu phụ nữ nhiễm *Trichomonas vaginalis* trên toàn thế giới. Trong đường âm đạo khỏe mạnh, vi khuẩn *Lactobacillus* chuyển hóa glucose thành acid lactic, duy trì pH âm đạo bình thường trong khoảng 3,5 - 4,6. Đồng thời *Lactobacillus* cũng sinh ra hydro peroxyd có tác dụng diệt khuẩn mạnh, ức chế sự phát triển quá mức của các loại vi sinh vật (VSV) gây bệnh. *Lactobacillus* hiện diện với mức 10^6 CFU/ml trong dịch âm đạo. Vi khuẩn gây bệnh làm cho số lượng *Lactobacillus* giảm xuống dưới 10^3 CFU/ml trong dịch âm đạo. Khi pH môi trường âm đạo tăng, các vi khuẩn gây bệnh phát triển mạnh gây viêm âm hộ - âm đạo (Brown Haywood L., 2005). Bệnh có nguy cơ lây lan đến cổ tử cung, niêm mạc tử cung gây viêm nhiễm vùng chậu và làm tắc vòi trứng gây vô sinh. Viêm nhiễm âm hộ - âm đạo tuy không nguy hiểm đến tính mạng nhưng hay tái phát, dễ gây vô sinh, ảnh hưởng đến đời sống vợ chồng và hạnh phúc lứa đôi. Viêm âm hộ - âm đạo khi mang thai nếu không chữa trị kịp thời có thể lây sang thai nhi, tình trạng nặng có thể gây viêm tiểu khung, thai ngoài tử cung, sinh non, viêm kết mạc ở trẻ sơ sinh dẫn đến mù lòa, viêm phổi ở trẻ sơ sinh nếu người mẹ bị viêm âm đạo do lậu cầu (Schenker J, Sen C, 2006).

Clotrimazol là thuốc kháng nấm phổ rộng được tìm ra vào cuối những năm 1960 thuộc nhóm azol. Azol là nhóm lớn nhất trong các thuốc kháng nấm được sử dụng trên lâm sàng, bao gồm hai phân nhóm là imidazol và triazol. Clotrimazol

thuộc phân nhóm imidazol (Crowley PD, Gallagher HC, 2014). Clotrimazol được sử dụng phổ biến trong điều trị viêm nhiễm phụ khoa do vi nấm, đặc biệt là nấm *C. albicans*. Tuy nhiên clotrimazol không có tác dụng tốt đối với các loại vi khuẩn gây viêm âm hộ - âm đạo nên chỉ được sử dụng giới hạn trong điều trị viêm nhiễm do nấm. Tất cả các thuốc kháng nấm nhóm azol đều tác động đến sự sinh tổng hợp ergosterol, thành phần chính của màng tế bào nấm. Clotrimazol ức chế sự khử methyl của 14- α -lanosterol phụ thuộc cytochrom P450, bước quan trọng trong sinh tổng hợp ergosterol ở nấm. Kết quả làm mất ergosterol, thay thế bằng một loại sterol lạ là 14- α -methylsterol gây rối loạn tính linh động và tính thấm qua màng tế bào nấm. Clotrimazol làm giảm hoạt tính một số enzym liên quan đến sự tổng hợp màng tế bào, làm tăng sự rò rỉ các thành phần tế bào qua màng. Clotrimazol được xem là chất kìm nấm ở nồng độ thấp và chất diệt nấm ở nồng độ cao. Nghiên cứu *in vitro* cho thấy một số thuốc kháng nấm nhóm imidazol như miconazol, fluconazol không có hiệu quả đối với nấm *Candida non albicans*. *C. glabrata* và *C. tropicalis* kém nhạy hơn 10 lần với miconazol so với *C. albicans* (Horowitz BJ, 1991). Thuốc kháng nấm nhóm imidazol, đặc biệt là clotrimazol vẫn là ưu tiên hàng đầu trong điều trị viêm âm hộ - âm đạo do *C. albicans*. Tuy nhiên sử dụng trực tiếp clotrimazol đường âm đạo có thể gây một số phản ứng tại chỗ như bỏng nhẹ, kích ứng cục bộ, ngứa.

Để hỗ trợ và ngăn ngừa tình trạng viêm nhiễm, các loại tinh dầu đã được sử dụng và nhiều loại có tác dụng khá tốt. Một số loại đã được nghiên cứu chứng minh có tác dụng sinh học *in vitro* cũng như hiệu quả lâm sàng. Bên cạnh đó, cũng có nhiều loại mới được quan tâm sử dụng nên chưa

có nhiều chứng cứ khoa học về tác dụng. Trong những năm gần đây, khuynh hướng phối hợp chất kháng nấm với tinh dầu được quan tâm nhiều với mục tiêu mở rộng phổ tác dụng trên VSV. Nhiều nghiên cứu cho thấy phối hợp tinh dầu với chất kháng nấm cải thiện đáng kể khả năng tác động đối với nhiều loại VSV khác nhau. Tuy nhiên, chưa có nhiều nghiên cứu phối hợp giữa clotrimazol với các loại tinh dầu.

Trong phạm vi bài báo này, chúng tôi tiến hành khảo sát tính kháng khuẩn, kháng nấm của phối hợp clotrimazol và một số loại tinh dầu với mục tiêu khảo sát tính kháng *Candida*, kháng khuẩn của phối hợp clotrimazol với một số tinh dầu và chọn phối hợp cho hiệu quả cao ứng dụng bào chế chế phẩm phòng ngừa, hỗ trợ điều trị bệnh viêm âm hộ - âm đạo.

2. Nội dung

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Clotrimazol đạt tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam V do công ty Mebiphar cung cấp. Giới hạn tạp chất liên quan:

Bảng 1. Giới hạn tạp chất liên quan của nguyên liệu clotrimazol

Tạp chất	Giới hạn
(2-clorophenyl)diphenylmethanol	< 0,2%
1-[(4-clorophenyl)diphenylmethyl]-1H-imidazol	< 0,2%
1-cloro-2-(clorodiphenylmethyl)benzen	< 0,1%
Imidazol	< 0,2%
(2-chlorophenyl) phenylmethanon (2-clorobenzophenon)	< 0,2%
1-(triphenylmethyl)-1H-imidazol (descloroclotrimazol)	< 0,1%

Tinh dầu (bưởi, cam, gừng, hương nhu trắng, trà trà Úc) đạt tiêu chuẩn cơ sở do công ty Saroma cung cấp.

Bảng 2. Thành phần và hàm lượng cấu tử chính của 5 loại tinh dầu thử nghiệm

Loại tinh dầu	Cấu tử chính	Hàm lượng (%)
Bưởi	d-limonen	55,74
Cam	limonen	80,9
Gừng	zingiberen	28,6
Hương nhu trắng	eugenol	75,1
Tràm trà Úc	Terpinen-4-ol	30

Vi nấm *Candida* và vi khuẩn được cung cấp bởi Bảo tàng giống Vi sinh vật, Viện vi sinh vật và Công nghệ sinh học - Đại học quốc gia Hà Nội.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xác định MIC của clotrimazol và các tinh dầu bằng phương pháp pha loãng trong môi trường lỏng

Chuẩn bị VSV thử nghiệm

Vi nấm: Cấy hoạt hóa vi nấm trên môi trường thạch SDA, ủ 37 °C trong 48 giờ. Phân tán 5 khóm nấm vào nước muối sinh lý có 0,05% tween 80. Điều chỉnh mật độ vi nấm đến OD₅₃₀ = 0,08 - 0,12, tương đương 1 - 5 x 10⁶ CFU/ml.

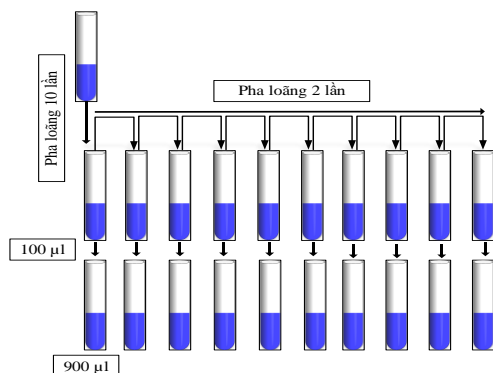
Vi khuẩn: Cấy hoạt hóa vi khuẩn trên môi trường thạch TSA, ủ 37 °C trong 24 giờ. Cấy chuyển 5 khóm vi khuẩn vào môi trường TSB trong khoảng 5 giờ. Điều chỉnh mật độ vi khuẩn đến OD₆₂₅ = 0,08 - 0,12, tương đương 1 - 5 x 10⁸ CFU/ml.

Chuẩn bị chất kháng VSV thử nghiệm

Hòa tan clotrimazol, tinh dầu trong DMSO với nồng độ cao hơn nồng độ cao nhất trong dãy nồng độ thử nghiệm 100 lần (dung dịch mẹ), pha loãng dung dịch mẹ trong môi trường liên tiếp ½ thành dãy nồng độ (nồng độ DMSO cuối cùng 1 - 2%).

Xác định MIC của chất kháng VSV

Mỗi nồng độ hút 100 µl chất thử phối hợp với 900 µl môi trường chứa VSV ở nồng độ 10³ CFU/ml trong ống nghiệm. Tiến hành thử trên 5 loại vi khuẩn và 5 loại vi nấm. Thực hiện song song mẫu chứng âm chứa 1 ml môi trường và chứng dương chứa 1 ml môi trường có VSV. Ủ 37 °C từ 24 - 48 giờ, đọc kết quả. MIC là nồng độ thấp nhất của chất thử ức chế sự phát triển vi khuẩn, vi nấm quan sát được bằng mắt thường (nồng độ của ống nghiệm đầu tiên có môi trường bên trong không bị đục). Thử nghiệm được lặp lại 2 lần, lấy kết quả trung bình.



Hình 1. Sơ đồ thử nghiệm tìm MIC bằng phương pháp pha loãng

2.2.2. Khảo sát tỉ lệ phối hợp của clotrimazol với tinh dầu

Phương pháp pha loãng theo hình bàn cờ

Hai chất nghiên cứu (clotrimazol và tinh dầu) được pha loãng liên tục ½ thành hai dãy có nồng độ từ cao đến thấp trong khoảng 0,25 - 4 x MIC trong bản nhựa 96 giếng. Phối hợp lần lượt từng nồng độ của clotrimazol với từng nồng độ của mỗi tinh dầu thử nghiệm. Chứng âm chứa môi trường không có VSV, chứng dương là môi

trường chứa VSV. Sau thời gian ủ từng loại vi khuẩn và vi nấm, xác định MIC của từng chất kháng VSV riêng rẽ và MIC của các phối hợp. Thử nghiệm được lặp lại 2 lần, lấy kết quả trung bình. Hệ số FICI xác định kiểu tương tác giữa các chất, được tính theo công thức:

$$FICI = \frac{MIC A/PH}{MIC A} + \frac{MIC B/PH}{MIC B}$$

Trong đó:

- MIC A/PH: hàm lượng chất A ở MIC của phối hợp
- MIC A: MIC của chất A
- MIC B/PH: hàm lượng chất B ở MIC của phối hợp
- MIC B: MIC của chất B

		MIC A								
		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	-	+
MIC B	B1	A1B1	A2B1	A3B1	A4B1	A5B1	A6B1	A7B1	-	+
	B2	A1B2	A2B2	A3B2	A4B2	A5B2	A6B2	A7B2	-	+
	B3	A1B3	A2B3	A3B3	A4B3	A5B3	A6B3	A7B3	-	+
	B4	A1B4	A2B4	A3B4	A4B4	A5B4	A6B4	A7B4	-	+
	B5	A1B5	A2B5	A3B5	A4B5	A5B5	A6B5	A7B5	-	+
	B6	A1B6	A2B6	A3B6	A4B6	A5B6	A6B6	A7B6	-	+
	B7	A1B7	A2B7	A3B7	A4B7	A5B7	A6B7	A7B7	-	+

Hình 2. Sơ đồ phương pháp pha loãng theo hình bàn cờ

- Phối hợp có tác động hiệp lực
- Phối hợp có tác động riêng rẽ
- Phối hợp có tác động cộng lực
- Phối hợp có tác động đối kháng

Nhận xét kết quả:

- FICI ≤ 0,5: hiệp lực bội tăng (synergism)
- FICI ≤ 1: cộng lực (additive)
- 1 < FICI ≤ 2: riêng rẽ (indifferent)
- FICI > 2: đối kháng (antagonism)

Phương pháp time-kill

Chuẩn bị dịch treo nấm: Cấy hoạt hóa vi nấm trên môi trường thạch SDA, ủ 37 °C trong 48 giờ. Phân tán 5 khóm nấm vào môi trường YPG. Điều chỉnh mật độ vi nấm đến $OD_{530} = 0,08 - 0,12$, tương đương $1 - 5 \times 10^6$ CFU/ml.

Chuẩn bị chất kháng nấm: Pha các dung dịch clotrimazol, tinh dầu hương nhu trắng trong DMSO ở nồng độ cao hơn 100 lần nồng độ cần thử nghiệm.

Tiến hành: Chuẩn bị 4 bình nón:

- Bình 1: dung dịch clotrimazol nồng độ 2 µg/ml trong môi trường YPG.

- Bình 2: dung dịch tinh dầu hương nhu trắng nồng độ 0,625 µl/ml trong môi trường YPG.

- Bình 3: dung dịch phối hợp chứa clotrimazol 1 µg/ml và tinh dầu hương nhu trắng 0,3 µl/ml trong môi trường YPG.

- Bình 4: môi trường YPG không chứa chất kháng nấm (mẫu chứng dương).

Ủ các bình nón ở 37 °C trong 48 giờ. Ở các thời điểm xác định (0, 2, 4, 8, 24 và 48 giờ), lấy 50 µl mẫu từ mỗi dung dịch thử, pha loãng 1/10 và 1/100 trong nước muối sinh lý vô khuẩn. Cấy trải 50 µl mỗi dịch đầu và dịch pha loãng trên đĩa môi trường SDA, mỗi nồng độ cấy 2 đĩa. Ủ các đĩa ở 37

°C trong 48 giờ. Đếm số lượng khóm nấm trên các đĩa và tính số khóm nấm trung bình (CFU/ml). Thử nghiệm được lặp lại 2 lần, lấy kết quả trung bình.

Nhận xét kết quả: Kết quả được phân tích bằng cách so sánh hoạt tính của từng chất khi sử dụng riêng lẻ với hoạt tính của chất trong phối hợp.

- Khi chất trong phối hợp làm giảm số lượng VSV sống $\geq 2\log_{10}$ CFU/ml so với chất riêng lẻ có hoạt tính cao nhất: hai chất có tác động hiệp đồng (synergism).

- Khi chất trong phối hợp làm tăng số lượng VSV sống $\geq 2\log_{10}$ CFU/ml so với chất có hoạt tính cao nhất: hai chất có tác động đối kháng (antagonism).

- Khi chất trong phối hợp làm thay đổi số lượng VSV sống $< 2\log_{10}$ CFU/ml so với mỗi chất riêng lẻ: hai chất có tác động cộng lực hoặc riêng rẽ (additive/indifferent).

2.3. Kết quả nghiên cứu

2.3.1. Xác định MIC của clotrimazol và các tinh dầu

Kết quả MIC của clotrimazol và các tinh dầu: bưởi (B), cam (C), gừng (G), hương nhu trắng (HNT) và trà trà Úc (TTU) được trình bày trong bảng 3 và bảng 4.

Bảng 3. Kết quả MIC của clotrimazol và tinh dầu trên vi khuẩn

	MIC tinh dầu (µl/ml)					MIC CLZ (µg/ml)
	B	C	G	HNT	TTU	
<i>E.coli</i> ATCC 25922	10	10	10	1,25	5	32
<i>P.mirabilis</i>	5	10	10	5	10	32
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	10	10	10	5	5	32
<i>S.aureus</i> ATCC 29213	10	10	10	1,25	5	16
<i>S.faecalis</i> ATCC 29212	5	10	10	1,25	10	32

Kết quả từ bảng 3 cho thấy các tinh dầu có tác dụng ức chế vi khuẩn thử nghiệm tốt. Trong đó tinh dầu hương nhu trắng cho tác dụng ức chế vi khuẩn tốt nhất với MIC 1,25 - 5 µl/ml, sau đó là trầm

trà, bưởi (MIC 5 - 10 µl/ml), cam và gừng (MIC 10 µl/ml). Clotrimazol cũng có khả năng kháng khuẩn với MIC 16 - 32 µg/ml.

Bảng 4. Kết quả MIC của clotrimazol và tinh dầu trên vi nấm

	MIC tinh dầu (µl/ml)					MIC CLZ (µg/ml)
	B	C	G	HNT	TTU	
<i>C.albicans</i> ATCC 10231	2,5	5	5	0,625	5	2
<i>C.glabrata</i> ND 31	5	10	2,5	1,25	2,5	2
<i>C.glabrata</i> ND 32	5	5	1,25	1,25	2,5	2
<i>C.glabrata</i> 961	10	5	1,25	1,25	5	2
<i>C.tropicalis</i> PNT 31	10	2,5	5	0,625	5	4

Kết quả từ bảng 4 cho thấy đối với vi nấm clotrimazol có tác dụng tốt hơn các loại tinh dầu. Clotrimazol ức chế vi nấm với MIC trong khoảng 2-4 µg/ml. Trong các tinh dầu, tinh dầu hương nhu trắng có khả năng ức chế vi nấm tốt nhất với MIC trong khoảng 0,625 - 1,25 µl/ml, sau đó lần lượt là gừng (MIC 1,25 - 5 µl/ml), trầm trà (MIC 1,25 - 5 µl/ml), cam và bưởi (MIC 2,5 - 10 µl/ml).

Như vậy clotrimazol có tác dụng kháng nấm tốt nhưng kháng khuẩn yếu. Các tinh dầu có tác dụng kháng khuẩn và

kháng nấm tốt. Tiến hành khảo sát khả năng phối hợp của clotrimazol với từng loại tinh dầu để xác định loại tinh dầu phối hợp tốt nhất với clotrimazol.

2.3.2. *Khảo sát tỉ lệ phối hợp của clotrimazol với tinh dầu*

Phương pháp pha loãng theo hình bàn cờ

Kết quả khảo sát tỉ lệ phối hợp clotrimazol với từng loại tinh dầu được trình bày trong bảng 5.

Bảng 5. Kết quả xác định kiểu tương tác và tỉ lệ phối hợp clotrimazol – tinh dầu

	FICI				
	B	C	G	HNT	TTU
<i>E.coli</i> ATCC 25922	0,63	1,13	1,25	0,27	1,06
<i>P.mirabilis</i>	1,13	1,13	1,25	0,10	1,13
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	0,63	0,56	1,25	0,10	1,06
<i>S.aureus</i> ATCC 29213	0,75	0,63	0,75	0,30	0,56
<i>S. faecalis</i> ATCC 29212	1,13	0,56	0,63	0,27	1,13
<i>C.albicans</i> ATCC 10231	1,00	1,00	0,75	1,00	1,00
<i>C.glabrata</i> ND 31	0,75	1,50	1,00	0,74	1,50
<i>C.glabrata</i> ND 32	0,75	2,00	1,50	0,74	1,50
<i>C.glabrata</i> 961	0,63	2,00	1,50	0,37	2,00
<i>C.tropicalis</i> PNT 31	0,75	0,63	0,63	0,28	1,13

Clotrimazol và tinh dầu bưởi có phối hợp cộng lực trên các chủng *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans*, *C. glabrata* ND 31, ND 32, 961 và *C. tropicalis*; không có phối hợp trên *Proteus* và *S. faecalis*. Tỷ lệ phối hợp clotrimazol: tinh dầu bưởi 1:1,25. Clotrimazol và tinh dầu trà có tác động cộng lực trên *S. aureus* và *C. albicans*. Tỷ lệ phối hợp clotrimazol: trà 1:2,5. Clotrimazol và tinh dầu trà không phối hợp trên các chủng *E. coli*, *Proteus*, *P. aeruginosa*, *S. faecalis* và *C. glabrata*. Clotrimazol và tinh dầu gừng có phối hợp cộng lực trên *S. aureus*, *S. faecalis*, *C. albicans*, *C. glabrata* ND 31 và *C. tropicalis*. Tỷ lệ phối hợp clotrimazol: tinh dầu gừng 1:1,25. Đối với các chủng *E. coli*, *Proteus*, *P. aeruginosa*, *C. glabrata* ND 32 và 961 clotrimazol và tinh dầu gừng không có phối hợp. Clotrimazol và tinh dầu hương nhu trắng có phối hợp hiệp đồng trên *E. coli*, *Proteus*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. faecalis*, *C. glabrata* 961 và *C. tropicalis*. Bên cạnh đó có tác động cộng lực trên *C. albicans*, *C. glabrata* ND 31 và 32. Tỷ lệ phối hợp clotrimazol: hương nhu trắng 1:0,3. Clotrimazol và tinh dầu trà có tác động cộng lực trên *S. aureus* và *C. albicans*. Tỷ lệ phối hợp clotrimazol: trà 1:2,5. Clotrimazol và tinh dầu trà không phối hợp trên các chủng *E. coli*, *Proteus*, *P. aeruginosa*, *S. faecalis* và *C. glabrata*.

Như vậy chỉ có tinh dầu hương nhu trắng có phối hợp hiệp đồng hoặc cộng lực trên tất cả 10 chủng VSV thử nghiệm, trong khi các tinh dầu khác không phối hợp với clotrimazol trên một số chủng. Tinh dầu hương nhu trắng có tỷ lệ phối hợp thấp hơn các tinh dầu khác. Trong

phối hợp clotrimazol và tinh dầu hương nhu trắng tỷ lệ 1:0,3 là phù hợp nhất.

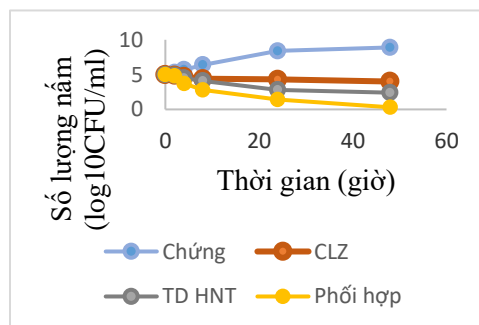
Phương pháp time-kill

Kết quả khảo sát phối hợp của clotrimazol và tinh dầu hương nhu trắng theo thời gian được trình bày trong bảng 6.

Bảng 6. Kết quả số vi nấm sống sau thời gian ủ 48 giờ

Thời gian (giờ)	Log ₁₀ CFU/ml			
	Chứng	CLZ	TD HNT	Phối hợp
0	5,0	5,0	5,0	5,0
2	5,3	4,9	4,9	4,8
4	5,7	4,7	4,5	3,7
8	6,4	4,1	4,1	2,8
24	8,4	4,3	2,8	1,4
48	8,9	4,0	2,4	0,3

Theo kết quả từ bảng 6 và đồ thị hình 3 cho thấy clotrimazol và tinh dầu hương nhu trắng tác dụng cộng lực trên *C. albicans*. So với mẫu chứng (không có chất thử) số lượng vi nấm tăng dần theo thời gian, clotrimazol làm giảm lượng vi nấm theo thời gian không đáng kể. Tinh dầu hương nhu trắng làm giảm lượng vi nấm nhiều hơn clotrimazol. Sau 48 giờ, phối hợp clotrimazol - tinh dầu hương nhu trắng tiêu diệt được 99,998% lượng nấm.



Hình 3. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc số lượng nấm (log₁₀CFU/ml) theo thời gian

2.4. Bàn luận

Viêm âm hộ - âm đạo là bệnh thường gặp ở phụ nữ trong độ tuổi sinh đẻ. Theo hiệp hội sức khỏe giới tính và HIV Anh quốc (2007), *C. albicans* là tác nhân gây bệnh được phát hiện ở hầu hết các bệnh nhân (chiếm đến 90% các trường hợp), ngoài ra một số chủng *Candida non albicans* cũng có thể gây bệnh, đặc biệt là *C. glabrata* và *C. tropicalis*. Số trường hợp nhiễm nấm do *Candida non albicans* được phát hiện có xu hướng ngày càng tăng (9,9% các trường hợp năm 1988, tăng lên 17,2% năm 1995) (Ringdahl Erika N, 2000). Tác giả Babic cũng nhấn mạnh tỉ lệ nhiễm *Candida non albicans* ngày càng tăng trong 3 thập niên gần đây. Nghiên cứu của Babic và cộng sự cho thấy tần số xuất hiện các chủng *non albicans* trong viêm nhiễm phụ khoa do nấm tăng lên đến 20% (Babic M, Hukic M, 2010). Đồng thời, theo nghiên cứu của Ringdahl, sự đề kháng của các chủng *Candida non albicans* với thuốc kháng nấm là một trong những nguyên nhân quan trọng gây viêm nhiễm tái phát, chiếm khoảng 5 - 8% các trường hợp nhiễm nấm (Ringdahl Erika N, 2000). Mặt khác, nghiên cứu *in vitro* cho thấy một số thuốc kháng nấm nhóm imidazol như miconazol, fluconazol không có hiệu quả đối với nấm *Candida non albicans*. *C. glabrata* và *C. tropicalis* kém nhạy hơn 10 lần với miconazol so với *C. albicans* (Horowitz BJ, 1991). Một nghiên cứu trên 250 chủng *C. albicans* cho thấy không có đề kháng với ketoconazol,

itraconazol và clotrimazol (Fong IW, Bannatyne RM, Wong P, 1993). Thuốc kháng nấm nhóm imidazol, đặc biệt là clotrimazol vẫn là ưu tiên hàng đầu trong điều trị viêm âm hộ - âm đạo do *C. albicans*. Đề tài xác định hoạt tính kháng nấm của clotrimazol và một số tinh dầu (bưởi, cam, gừng, hương nhu trắng, trà trà Úc) bằng phương pháp pha loãng trên các chủng *C. albicans* và *Candida non albicans* và hoạt tính kháng khuẩn trên một số vi khuẩn. Trên cơ sở đó khảo sát khả năng phối hợp clotrimazol với tinh dầu, hướng đến mục tiêu tác động trên các chủng *Candida non albicans* và giảm hàm lượng clotrimazol sử dụng.

Clotrimazol đã được nghiên cứu tác dụng kháng khuẩn, kháng nấm và được sử dụng trong điều trị nhiễm nấm từ những năm 1970. Các tài liệu đều thống nhất khả năng kháng nấm *Candida* của clotrimazol tốt nhưng không có tác dụng đáng kể trên vi khuẩn (Crowley PD, Gallagher HC, 2014, Florey Klaus, 1982, Grayson M Lindsay, 2010, Talaviya S, Majmudar F, 2014). Kết quả nghiên cứu trên nấm cho thấy các chủng *Candida* thử nghiệm đều nhạy với clotrimazol, phù hợp với những công bố về tác dụng của clotrimazol trước đây. Đối với vi khuẩn, clotrimazol có tác dụng không mạnh, thể hiện ở giá trị MIC cao hơn 15 lần so với MIC trên nấm, cũng tương tự tác dụng đã biết của clotrimazol. Clotrimazol cũng có khả năng diệt nấm, diệt khuẩn ở nồng độ cao. Đối với các tinh dầu thử nghiệm, các

tài liệu đã công bố thường chưa có nghiên cứu đầy đủ về tác dụng trên các chủng VSV, nhất là trên các chủng nấm *non albicans*. Các tinh dầu được thử nghiệm thể hiện hoạt tính kháng *Candida* khá tốt, cả *C. albicans* và *non albicans*. Kết quả khảo sát tác dụng kháng *Candida*, kháng khuẩn tương tự với các nghiên cứu trước đây của Nguyễn Thới Nhâm và cộng sự (2002), Mokbel (2005), Carson và cộng sự (2006), Sasidharan và cộng sự (2010), Nguyễn Thanh Huệ và cộng sự (2012), Adesegun và cộng sự (2013), Obidi và cộng sự (2013), Bellik (2014), Soni và cộng sự (2014), Lan-Phi N. T. và cộng sự (2015) và Ou Ming-Chiu và cộng sự (2015). Trong 5 loại tinh dầu khảo sát, tinh dầu hương nhu trắng có tác dụng tốt nhất đối với cả vi khuẩn và vi nấm. Kết quả này cũng phù hợp với các công bố bởi Nakamura và cộng sự (1999), Prabhu và cộng sự (2009), Joshi và cộng sự (2013), Huỳnh Thị Ngọc Lan và cộng sự (2014).

Đến thời điểm hiện tại, có một số nghiên cứu được công bố về khả năng phối hợp giữa clotrimazol với tinh dầu cho kết quả khả quan. Nghiên cứu của Carbone và cộng sự (2019) cho kết quả phối hợp clotrimazol với một số tinh dầu Địa Trung Hải có tác động cộng lực đối với các chủng *Candida*. Ngoài ra, khảo sát của Nidhi và cộng sự (2020) cho kết quả tinh dầu cam đắng có phối hợp cộng lực với clotrimazol trên vi nấm *C. albicans*. Da Silva và cộng sự

(2022) nghiên cứu phối hợp giữa một số tinh dầu với clotrimazol cho thấy phối hợp tinh dầu trà trà Úc và tinh dầu bách Ý với clotrimazol có hiệu quả chống tế bào và màng sinh học của *Candida*. Cùng mục đích trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu phối hợp clotrimazol với 5 loại tinh dầu bằng phương pháp pha loãng theo hình bàn cờ nhằm tìm ra phối hợp có tác dụng tốt nhất trên *Candida*, đặc biệt các chủng *non albicans*. Ngoài ra nghiên cứu cũng quan tâm đến hiệu quả kháng khuẩn của các phối hợp. Kết quả thử nghiệm cho thấy các tinh dầu bưởi, cam, gừng, hương nhu trắng và trà trà Úc khi phối hợp với clotrimazol đều làm tăng tác dụng trên *C. albicans* hoặc *Candida non albicans*. Trong đó, tinh dầu hương nhu trắng phối hợp với clotrimazol có tác dụng rất tốt trên *C. glabrata* và *C. tropicalis*. Phối hợp clotrimazol với các tinh dầu đều tăng cường hiệu quả tác dụng đối với vi khuẩn. Đặc biệt tinh dầu hương nhu trắng có tác dụng hiệp đồng với clotrimazol và cải thiện đáng kể tác động trên cả 5 chủng vi khuẩn thử nghiệm. Khi sử dụng tinh dầu trong chế phẩm phụ khoa, tỉ lệ tinh dầu cần sử dụng không được quá nhiều, vì một số loại tinh dầu có thể gây kích ứng. So sánh tỉ lệ phối hợp của 5 loại tinh dầu với clotrimazol thì tinh dầu hương nhu trắng có lượng sử dụng thấp nhất. Khả năng phối hợp của clotrimazol và tinh dầu hương nhu trắng được khẳng định

bằng phương pháp time-kill trên chủng nấm *C. albicans*. Phương pháp time-kill có thể xác định kiểu tương tác giữa 2 chất thử, đồng thời khảo sát khả năng kháng VSV của các chất sau những khoảng thời gian nhất định. Thí nghiệm tiến hành ở nồng độ MIC, clotrimazol và tinh dầu hương nhu trắng đều có tác dụng ức chế nấm theo thời gian. Kết quả cho thấy clotrimazol có tác dụng hiệp đồng với tinh dầu hương nhu trắng. Trong khi từng chất riêng rẽ ở nồng độ MIC chỉ có tác dụng ức chế vi nấm, phối hợp clotrimazol - tinh dầu hương nhu trắng có khả năng diệt được 99,99% số lượng nấm *C. albicans* sau 48 giờ. Kết quả của hai phương pháp tương đồng nhau khẳng định tinh dầu hương nhu trắng có phối hợp tốt nhất với clotrimazol đối với các VSV thử nghiệm.

3. Kết luận

Thử nghiệm bằng phương pháp pha loãng cho thấy trong 5 loại tinh dầu thử nghiệm, tinh dầu hương nhu trắng tác dụng tốt nhất trên vi khuẩn cũng như trên vi nấm. Phối hợp clotrimazol với tinh dầu hương nhu trắng có tác dụng tốt nhất, hiệp đồng và cộng lực trên cả 10 chủng VSV thử nghiệm với tỉ lệ phối hợp clotrimazol - tinh dầu hương nhu trắng 1:0,3. Xác định hiệu quả phối hợp clotrimazol với tinh dầu hương nhu trắng trên nấm *C. albicans* theo thời gian bằng phương pháp time-kill, kết quả phối hợp có tác dụng cộng lực trên *C. albicans*. Sau 48 giờ, phối hợp clotrimazol với tinh dầu hương nhu trắng diệt được hơn 99% lượng vi nấm. Ứng dụng phối hợp clotrimazol - tinh dầu hương nhu trắng (1:0,3) bào chế chế phẩm gel rửa phụ khoa hỗ trợ điều trị viêm âm hộ - âm đạo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Thanh Huệ, Trịnh Minh Khang, Nguyễn Tấn Hoàng Sơn, Nguyễn Thị Bích Thuyền. (2012). Khảo sát thành phần hóa học và hoạt tính kháng vi sinh vật của tinh dầu gừng (*Zingiber officinale* Roscoe) và tinh dầu tiêu (*Piper nigrum* L.). *Tạp chí Khoa học*, 21a, 139-143.
- Huỳnh Thị Ngọc Lan, Hồ Ánh Nguyệt, Lâm Thị Ngọc Phương. (2014). Tính kháng khuẩn của tinh dầu trà trà Úc và tinh dầu hương nhu trắng trên các chủng vi khuẩn đề kháng kháng sinh phân lập từ bệnh phẩm. *Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh*, 18 (2), 209-215.
- Nguyễn Thới Nhâm, Nguyễn Minh Đức, Phạm Hùng Vân, Nguyễn Minh Phúc (2002). Thành phần terpen và tác dụng kháng khuẩn của tinh dầu trà trà Úc *Melaleuca alternifolia* Cheel - Myrtaceae. *Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh*, 6 (1), 33-36.
- Adesegun Adeola S., Samuel Folorunso O., Anthony Ojekale B., Nurudeen Osho A.

- (2013). Antioxidant and inhibitory properties of essential oil of *Ocimum gratissimum* against extracellular protease of *Escherichia coli*. *Iosr Journal of Pharmacy*, 3 (1), 50-55.
- Babic Mirela, Hukic Mirsada. (2010). *Candida albicans* and *non-albicans* species as etiological agent of vaginitis in pregnant and non-pregnant women. *Bosnia Journal of Basic Medical Sciences*, 10 (1), 89-97.
- Bellik Yuva. (2014). Total antioxidant activity and antimicrobial potency of the essential oil and oleoresin of *Zingiber officinale* Roscoe. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4 (1), 40-44.
- British Association for Sexual Health and HIV. (2007). *Management of vulvovaginal Candidiasis*.
- Carson C. F., Hammer K. A., Riley T. V. (2006). *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clinical Microbiology Reviews*, 19 (1), 50-62.
- Carbone C, Maria do C T, Maria do C S, Carlos M-G, Amelia M. S, Eliana M B S, Teresa M. (2019). Clotrimazole-Loaded Mediterranean Essential Oils NLC: A Synergic Treatment of *Candida* Skin Infections. *Pharmaceutics*, 11:231-251.
- Crowley P. D., Gallagher H. C. (2014). Clotrimazole as a pharmaceutical: past, present and future. *Journal of Applied Microbiology*, 117, 611-617.
- Florey Klaus. (1982). *Analytical profiles of drug substances*, New York: Academic Press Inc.
- Fong I. W., Bannatyne R. M., Wong P. (1993). Lack of *in vitro* resistance of *Candida albicans* to ketoconazole, itraconazole and clotrimazole in women treated for recurrent vaginal candidiasis. *Genitourinary Medicine Journal*, 165, 44-46.
- Grayson M. Lindsay. (2010). *Kucers' the use of antibiotics - a clinical review of antibacterial, antifungal, antiparasitic and antiviral drugs*. CRC Press.
- He Jin-Zhe, Shao Ping, Liu Jian-Hua, Ru Qiao-Mei. (2012). Supercritical carbon dioxide extraction of flavonoids from pomelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) peel and their antioxidant activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 13065-13087.
- Horowitz B. J. (1991). Mycotic vulvovaginitis: a broad overview. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 165, 1188-1192.
- Joshi R. K. (2013). Chemical composition, *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of *Ocimum gratissimum*, *O. sanctum* and their major constituents. *Indian Journal of Pharmaceutical Science*, 75 (4), 457-462.
- Lan-Phi N. T., Vy T. T. (2015). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of peels' essential oils of different pomelo varieties in the south of Vietnam.

- International Food Research Journal*, 22 (6), 2426-2431.
- Mokbel Matook Saif, Hashnaga Fumio. (2005). Evaluation of the antimicrobial activity of extract from Buntan (*Citrus grandis* Osbeck) fruit peel. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8 (8), 1090-1095.
- Nakamura Celso Vataru, Tania Ueda-Nakamura, Bando Erika, Fernandes Abrahao Melo Negroao, Diogenes Aparicio Garcia Cortez, Benedito Prado Dias Filho. (1999). Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94 (5), 675-678.
- Nidhi Prakriti, Rajan Rolta, Vikas Kumar, Kamal Dev, Anuradha Sourirajan. (2020). Synergistic potential of *Citrus aurantium* L. essential oil with antibiotics against *Candida albicans*. *Journal of Ethnopharmacology*, 262.
- Obidi O. F., Adelowotan A. O., Ayoola G. A., Johnson O. O., Hassan M. O., Nwachukwu S. C. U. (2013). Antimicrobial activity of orange oil on selected pathogens. *The International Journal of Biotechnology*, 2 (6), 113-122.
- Ou Ming-Chiu, Liu Yi-Hsin, Sun Yung-Wei, Chan Chin-Feng. (2015). The composition, antioxidant and antibacterial activities of cold-pressed and distilled essential oils of *Citrus paradisi* and *Citrus grandis* (L.) Osbeck. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 205, 91-100.
- Prabhu K. S., Lobo R., Shirwaikar A. A., Shirwaikar A. (2009). *Ocimum gratissimum*: A review of its chemical, pharmacological and ethnomedicinal properties. *The Open Complementary Medicine Journal*, 1, 1-15.
- Rafael Alves da Silva, Nagela Bernadelli Sousa Silva, Carlos Henrique Gomes Martins, Regina Helena Pires, Denise Von Dolinger de Brito Röder, Reginaldo dos Santos Pedroso. (2022). Combining Essential Oils with Each Other and with Clotrimazole Prevents the Formation of *Candida* Biofilms and Eradicates Mature Biofilms. *Pharmaceutics*, 14:1872-1884.
- Ringdahl Erika N. (2000). Treatment of recurrent vulvovaginal Candidiasis. *American Family Physician Journal*, 61 (11), 3306-3312.
- Sasidharan Indu, Menon A. Nirmala. (2010). Comparative chemical composition and antimicrobial activity fresh and dry ginger oils (*Zingiber officinale* Roscoe). *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 2 (4), 40-43.
- Soni Sangeeta, Soni U. N. (2014). *In vitro* antibacterial and antifungal activity of select essential oils. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6 (6), 586-591.
- Talaviya Smita, Majmudar Falguni. (2014). Analysis of antifungal agents by RP-HPLC: a review. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3 (12), 397-409.