

NUÔI CẤY MẠT BỤI NHÀ DERMATOPHAGOIDES PTERONYSSINUS

HUYỀN QUANG THUẬN - Học viện Quân y
VŨ MINH THỰC, VÕ THANH QUANG, ĐINH VĂN MINH
Bệnh viện Tai Mũi Họng Trung ương

TÓM TẮT

Dermatophagoides pteronyssinus (D.pt) là loài có vai trò là dị nguyên đường khí chính gây ra các bệnh: viêm mũi dị ứng, hen phế quản dị ứng, viêm kết mạc dị ứng... tại Việt Nam. Để sản xuất lượng lớn các vắc xin dị nguyên *D.pteronyssinus* (D.pt), các kỹ thuật nuôi cấy khối lượng lớn D.pt đã được nghiên cứu. Một hỗn hợp gồm môi trường nấm men *saccharomyces cerevisiae*, thức ăn tổng hợp (tỷ lệ 1:1) cho sản lượng D.pt cao nhất, tương ứng số lượng mạt tăng lên 1069 lần sau 10 tuần. Khi lượng môi trường nuôi là như nhau ở (điều kiện 25°C - 27°C và độ ẩm tương đối 70% - 80 °C), bề mặt nuôi rộng hơn sẽ cho lượng mạt thu được lớn hơn, thể hiện sự tăng lên 1069 lần trong bề mặt 154 cm² (đường kính 14 cm) so sánh với 469 lần ở bề mặt 79 cm² (đường kính 10 cm) sau 10 tuần. Khi bề mặt nuôi mạt 154 cm² được sử dụng, lượng môi trường tối ưu là 50g, và kết quả tốt thu được khi nuôi cấy với 50 con mạt giống. Trong chu kỳ quan sát 20 tuần, số lượng mạt cao nhất là sau 10 tuần nuôi cấy ở tất cả các nhóm kiểm tra của D.pt, và sau đó số lượng mạt giảm.

Từ khoá: *Dermatophagoides pteronyssinus*

SUMMARY

House dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* (D.pt) is a species having an important role as major airborne allergen producing diseases: allergic rhinitis, allergic asthma, allergic conjunctivitis...in Vietnam. In order to produce large amounts of antigens of *D.pteronyssinus* (D.pt), mass-rearing techniques of D.pt were studied. A mixture of

general food powder and dried yeast (w/w = 1:1) gave the highest production of D.pt, showing 1069-fold increase in number after 10 weeks. When the same amount of culture media were used (at 25°C - 27°C and 70% - 80% relative humidity conditions), the larger surface of rearing container gave better production rate, showing 1069-fold and 468-fold increase, respectively in a 154 cm² surface container (14 cm in diameter) compared to a 79cm² surface container (10 cm in diameter) after 10 weeks. When a 154 cm² surface container were used, the best amounts of culture media were 50 gram and the highest production of D.pt were taken when rearing with 50 seed mites. During the 20 weeks observation period, the highest production of D.pt were obtained after 10 weeks of the culture in all test group of D.pt, and after that the number decreased.

Keywords: *Dermatophagoides pteronyssinus*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Mạt quan trọng nhất trong bụi nhà là D.pt, có mặt khắp nơi trên thế giới và tạo ra dị nguyên bụi nhà, nguyên nhân phổ biến của hen và viêm mũi dị ứng. D.pt là nguyên nhân chính của bệnh dị ứng ở nhiều nước trên thế giới.

Sản xuất kháng nguyên D.pt thô hoặc tinh khiết là nhiệm vụ cần thiết không chỉ cho chẩn đoán và điều trị các bệnh nhân dị ứng, mà còn cho các nghiên cứu về đặc tính và tính chất của các protein dị nguyên của các con mạt này. Tuy nhiên, sự phát triển của các kỹ thuật nuôi cấy thu lượng lớn D.pt được nghiên cứu rất

ít cho đến nay, và các con mật này những mật này đã được nuôi cấy với quy mô nhỏ ở nhiều viện nghiên cứu trên thế giới.

Mục đích của nghiên cứu này là tìm ra phương pháp hiệu quả nhất nuôi cấy thu lượng lớn D.pt để sản xuất vắc xin dị nguyên D.pt tại Việt Nam.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Phương pháp nuôi cấy chủ yếu theo chúng tôi ở điều kiện 25°C - 27°C và độ ẩm tương đối 70% - 80°C. Hai dụng cụ kích thước khác nhau được sử dụng, loại nhỏ (đường kính 10 cm) với môi trường nuôi cấy và loại to (đường kính 16 cm) với dung dịch NaCl bão hoà sâu khoảng 1.5-2 cm. Các con mật giống được đưa vào môi trường nuôi và đĩa nuôi không có nắp, được đặt ở giữa vật chứa lớn, nắp của mỗi vật chứa lớn được cho vào, và do đó độ ẩm 75 - 85% được giữ bên trong. Môi trường nuôi được sử dụng là hỗn hợp thức ăn trong phòng thí nghiệm và nấm men khô, và phòng nuôi được giữ ở 25°C - 27°C trong điều kiện tỷ lệ ánh sáng: tối là 14:10 giờ.

Để tìm ra môi trường nuôi hiệu quả nhất một số môi trường được so sánh ở cùng điều kiện. Các môi trường được kiểm tra là:

+ Môi trường 1: Bã bia, bóng bì lợn đã khử mỡ, tỷ lệ 4:1

+ Môi trường 2: Nấm men *saccharomyces cerevisiae*, bóng bì lợn đã khử mỡ tỷ lệ 4:1.

+ Môi trường 3: Nấm men *saccharomyces cerevisiae*, thức ăn tổng hợp (chế biến từ bột ngô, gạo, đậu tương, bột cá, cám gạo, khô dầu lạc, polyvitamine, trứng gà), tỷ lệ 1:1

+ Môi trường 4: Bột mì và nấm men, tỷ lệ 10: 1.

+ Môi trường 5: bột thức ăn cá và nấm men *saccharomyces cerevisiae*, tỷ lệ 3: 2

Kích thước của vật chứa canh trường nuôi quyết định vùng bề mặt của môi trường khi cùng 1 lượng môi trường được sử dụng, và hầu hết mật sống ở phần trên của môi trường nuôi. Các vật chứa có 2 kích cỡ: loại có đường kính 10cm và loại có đường kính 14cm được so sánh với nhau. Môi trường nuôi là môi trường nấm men *saccharomyces cerevisiae*, thức ăn tổng hợp, tỷ lệ 1:1, nhiệt độ 25°C-27°C và độ ẩm tương đối 70 - 80%.

2 lượng môi trường nuôi được so sánh với nhau: 50g và 25g trong bề mặt chứa 154 cm². Các điều kiện nuôi cấy là 25°C - 27°C, độ ẩm tương đối 70 - 80% và môi trường nuôi là nấm men *saccharomyces cerevisiae*, thức ăn tổng hợp (chế biến từ bột ngô, gạo, đậu tương, bột cá, cám gạo, khô dầu lạc, polyvitamine, trứng gà), tỷ lệ 1:1.

KẾT QUẢ

Kết quả nghiên cứu so sánh của các môi trường khác nhau thể hiện ở bảng 1. Trong trường hợp của canh trường D.pt (bảng 1), môi trường nấm men *saccharomyces cerevisiae*, thức ăn tổng hợp (chế biến từ bột ngô, gạo, đậu tương, bột cá, cám gạo, khô dầu lạc, polyvitamine, trứng gà), tỷ lệ 1:1 cho kết quả tốt nhất, thể hiện bằng lượng mật tăng lên 601 và 1069 lần sau 8 và 10 tuần nuôi, và tiếp theo đó là hỗn hợp 60% thức ăn cá + 40% nấm men *Saccharomyces*

cerevisiae cho kết quả lượng mật tăng lên 1015 lần sau 10 tuần nuôi cấy.

Bảng 1. Số lượng của D.pt trong các môi trường khác nhau (50g) ở 25°C - 27°C, độ ẩm tương đối 75% - 85°C. Số lượng mật trong 50g môi trường(con).

Môi trường Thời gian (Tuần)	I	II	III	IV	V
0	50	50	50	50	50
2	83±9	78±7	175± 12	145± 10	155± 10
4	634± 42	646± 52	1046±42	864±50	946± 52
6	1.561± 95	1.589± 168	1.958± 154	1.603± 94	1.708± 194
8	23.750± 423	21.934± 356	30.054± 282	26.854± 312	28.854± 322
10	30.987± 1.872	27.762± 1.649	53.460± 1.465	40.676± 1.543	50.760± 1.643
12	15.253± 1.120	13.264± 1.134	14.345± 855	11.323± 871	11.234± 974
14	2.825± 325	2.276± 254	2.195± 174	1.776± 254	1.976± 154
16	231±87	218± 86	312±65	210± 68	212± 78
18	59±8	45±8	93±8	43	63±8
20	41±4	34	71±3	16	51±3

Khi sử dụng cùng 1 lượng môi trường, bề mặt nuôi lớn hơn sẽ cho sản lượng cao hơn (theo bảng 2), ở bề mặt nuôi 154cm² lượng mật tăng lên 1069 lần và ở bề mặt 79cm² lượng mật tăng lên 469 lần sau 10 tuần nuôi.

Bảng 2. Lượng mật D.pt trong 50g môi trường nuôi (môi trường nấm men *saccharomyces cerevisiae*, thức ăn tổng hợp, tỷ lệ 1:1) với 2 bề mặt nuôi khác nhau ở 25°C - 27°C, độ ẩm tương đối 70% - 80°C.

Tuần	Đường kính bề mặt nuôi 10cm		Đường kính bề mặt nuôi 14cm	
	Lượng mật	Lần tăng	Lượng mật	Lần tăng
0	50	0	50	0
2	189±18	3.8	175±12	3.5
4	581±45	11.6	1046±42	20.9
6	1.210±109	24.2	1.958±154	39.2
8	20.605±215	412.1	30.054±282	601.1
10	23.450±1.450	469	53.460±1.465	1069
12	10.550±870	211	14.345±855	286.9
14	2.030±275	40.6	2.195±174	43.9
16	245±78	4.9	312±65	6.2
18	84±6	1.7	93±8	1.9
20	55	1.1	71±3	1.4

Bảng 3 cho thấy kết quả nghiên cứu của lượng mật giống tối ưu (được cho vào từ đầu) và lượng môi trường tối ưu khi nuôi ở bề mặt nuôi 154 cm² (đường kính 14 cm). Khi sử dụng 25g môi trường, lượng mật trong 10 tuần là 41275, 44250 và 42995 ở tương ứng các nhóm 50, 100 và 150 mat giống, điều đó có nghĩa là sự tăng lượng mật giống không dẫn đến sự tăng lên của sản lượng mật *D. pteronyssinus* thu được. Khi sử dụng 50g môi trường, lượng mật sau 10 tuần nuôi là 53460, 55470 và 54015 trong các nhóm sử dụng

tương ứng 50, 100 và 150 hạt giống, nó có cùng kết quả như kiểm tra với sử dụng 25g môi trường. Khi sử dụng 50g môi trường thu được lượng hạt tăng lên cao

hơn một chút so với sử dụng 25 g môi trường không phụ thuộc vào số lượng hạt giống cho vào.

Bảng 3. Tỷ lệ sinh trưởng của *D. pteronyssinus* trong môi trường nuôi (nấm men *saccharomyces cerevisiae*, thức ăn tổng hợp, tỷ lệ 1:1) ở điều kiện 25°C - 27°C, độ ẩm tương đối 70% - 80°C. Bề mặt nuôi có đường kính 14 cm.

	Trong 25 g môi trường nuôi					Trong 50 g môi trường nuôi				
	0 tuần	4 tuần	6 tuần	8 tuần	10 tuần	0 tuần	4 tuần	6 tuần	8 tuần	10 tuần
Trung bình	50	715	1835	26115	41275	50	1046	1958	30054	53460
Lần	1	14.3	36.7	522.3	825.5	1	20.9	39.2	601.1	1069
Trung bình	100	1750	4070	32195	44250	100	1560	2750	32740	55470
Lần	1	17.5	40.7	322	442.5	1	15.6	27.5	327.4	554.7
Trung bình	150	132.0	4710	29840	42995	150	2070	3810	46005	54015
Lần	1	19.6	31.4	198.9	286.6	1	13.8	25.4	306.7	360.1

Tóm lại, sản lượng hạt thu được cao nhất ở *D. pteronyssinus* là khi nuôi với 50g môi trường nấm men *saccharomyces cerevisiae*, thức ăn tổng hợp, tỷ lệ 1:1, nuôi trong bề mặt 154 cm² (đường kính 14cm) và 25°C và độ ẩm tương đối 70-80% với *D. pteronyssinus*. Sản lượng hạt cao nhất thu được sau 10 tuần nuôi cấy.

BÀN LUẬN

Sự có mặt của hạt trong bụi nhà có liên quan tới nhiều yếu tố về vật lý và thời tiết, đặc biệt là nhiệt độ và độ ẩm (Arlan, 1976). Hạt bụi nhà có thể hấp thụ nước bị động và chủ động từ không khí không bão hòa, và ở khía cạnh khác, hạt cũng luôn luôn và đồng thời mất nước khỏi bề mặt cơ thể do hô hấp hoặc thông qua quá trình có quan hệ với dinh dưỡng, sinh sản, bỏ đi và bài tiết. Tỷ lệ dinh dưỡng của *Dermatophagoides pteronyssinus* cao hơn đáng kể ở hoạt động của hơi nước xung quanh phía trên cao hơn so với hoạt động cân bằng chủ yếu ở dưới (Arlan, 1977). Koekkoek và Bronswijk (1972) đã báo cáo rằng sự phát triển tối ưu của *D. pteronyssinus* được thể hiện ở nhiệt độ 25°C và sau 8 tuần lượng hạt được nuôi ở 30°C bằng 40% lượng hạt nuôi ở 25°C và 15% của lượng hạt ở 20°C. Miyamoto et al. (1975) đã báo cáo rằng lượng hạt *D. pteronyssinus* thu được cao nhất ở điều kiện độ ẩm tương đối 75% và nhiệt độ 25°C.

Lựa chọn môi trường nuôi là một trong các yếu tố quan trọng cho thành công để nhân nuôi hạt bụi nhà khối lượng lớn. Miyamoto et al. (1975) đã phát hiện ra rằng hỗn hợp 2 phần của bột thức ăn động vật phòng thí nghiệm, 2 phần của nấm men khô và 1 phần của bột thức ăn cá là phù hợp nhất để nuôi hạt *D. pteronyssinus* thu lượng lớn.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi chỉ ra rằng môi trường 3 (nấm men *saccharomyces cerevisiae*, thức ăn tổng hợp, tỷ lệ 1:1) ở điều kiện 25°C - 27°C và độ ẩm tương đối 70% - 80 °C, bề mặt nuôi 154 cm² (đường kính 14 cm), lượng môi trường tối ưu là 50g, cho sản lượng *Dermatophagoides pteronyssinus* cao nhất

Trong chu kỳ quan sát 20 tuần, số lượng hạt cao nhất là sau 10 tuần nuôi cấy ở tất cả các nhóm kiểm tra của *D.pt.*, và sau đó số lượng hạt giảm..

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đào Đ (1986), *Dị ứng học đại cương*, Người dịch: TSKH Nguyễn Năng An, TS Trương Đình Kiệt, NXB Mir, Matxcova, tr. 74-85.
- Vũ Minh Thục (1997) "Một số đặc điểm của dị nguyên bụi nhà" *Y học thực hành*, N4, (19 – 21).
- Vũ Minh Thục, Phạm Quang Chính, Đái Duy Ban (2002), "Kết quả điều tra hai loài hạt bụi nhà gây bệnh dị ứng *Glycyphagus domesticus* (Acarina, Glycyphagidae) và *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acarina, Pyrogly-phidae) ở Hà Nội và vùng phụ cận", *Báo cáo khoa học Hội nghị côn trùng học toàn quốc (Lần thứ tư)*, NXB Nông nghiệp, Hà Nội, tr. 94-99.
- Hong. C. S. (1991) Sensitization of house dust mites in the allergic patients and mite ecology in their house dusts. *J. Korean Soc. Allergol.*, 11: 457-465. (in Korean with English summary).
- Hong, C. S. and M. K. Lee (1992) Measurement of group I allergens of house dust mites in dusts of Seoul and monthly variation of *Derf I*. *J. Korean Soc. Allergol*, 12: 482-492 (in Korean with English summary).
- Kim, S. K., H. S. Park., S. H. Oh and C. S. Hong (1988) Distribution of house dust mites allergen in houses measured by RAST inhibition test. *Korean J. Int. Med.*, 35: 65-75 (in Korean with English summary).
- Miyamoto, J., A. Ishii and M. Sasa (1975) A successful method for mass culture of the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trousart, 1897). *Jpn. J. Exp. Med.*, 45: 133-138.
- Ree, H. I., S. H. Jeon, I. Y. Lee, C. S. Hong and D. K. Lee (1997) Fauna and geographical distribution of house dust mites in Korea. *Korean J. Parasitol.*, 35: 9-17.
- Solomon, M. W. (1952) Control of humidity with potassium hydroxide, sulphuric acid or other solutions. *Bull. Entomol. Res.*, 42: 543-554.