

FORMULATION AND APPLICATION OF NANOSILVER-INFUSED CREAM IN PREVENTION AND TREATMENT OF MASTITIS IN DAIRY COWS

Nguyen Hoai Chau¹, Dao Trong Hien¹, Nguyen Thi Thuy¹, Doan Quang Ha¹,
Dang Thi Duong², Tran Thi Loan², Phung Thi Dieu Linh²,
Tang Xuan Luu², Ngo Dinh Tan², Tran Van Tua^{1,*}

¹Institute of Environmental Technology, VAST, Vietnam

²Ba Vi Cattle and Forage Research Center, National Institute of Animal Science, Vietnam

Received 26 March 2019, accepted 18 May 2019

ABSTRACT

Research on formulation of nanosilver-infused cream was carried out at the Institute of Environmental Technology and the effects of this cream in prevention and treatment of mastitis in dairy cows were assessed at Bavi Cattle and Forage Research Center. Cream with 0.4% carbomer was infused with silver nanoparticles for high uniformity and long-term stability. At concentrations of 50–250 ppm, nanosilver-infused cream proved to be effective against mastitis pathogens such as *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*. Nanosilver cream at concentrations of 150 ppm had the best effect on clinical and subclinical mastitis prevention in dairy cows. Combining nanosilver cream with ceftiofer antibiotic achieved excellent treatment rate, up to 93.33%. For prevention of dairy mastitis, silver cream can be used at a concentration of 150 ppm 15 days before calving and for the whole milking period. Using nanosilver cream in combination with antibiotics led to highly effective mastitis treatment.

Keywords: Dairy cows, mastitis, prevention, nanosilver cream, treatment.

Citation: Nguyen Hoai Chau, Dao Trong Hien, Nguyen Thi Thuy, Doan Quang Ha, Dang Thi Duong, Tran Thi Loan, Phung Thi Dieu Linh, Tang Xuan Luu, Ngo Dinh Tan, Tran Van Tua, 2019. Formulation and application of Nanosilver-infused cream in prevention and treatment of mastitis in dairy cows. *Tap chi Sinh hoc*, 41(2): 89–100. <https://doi.org/10.15625/0866-7160/v41n2.13707>.

*Corresponding author email: tranvantua@gmail.com

©2019 Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)

NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO VÀ SỬ DỤNG KEM NANO BẠC TRONG PHÒNG VÀ TRỊ BỆNH VIÊM VÚ BÒ SỮA

Nguyễn Hoài Châu¹, Đào Trọng Hiền¹, Nguyễn Thị Thúy¹, Đoàn Quang Hà¹,
Đặng Thị Dương², Trần Thị Loan², Phùng Thị Diệu Linh²,
Tăng Xuân Lưu², Ngô Đình Tân², Trần Văn Tựa^{1,*}

¹Viện Công nghệ môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Việt Nam

²Trung tâm Nghiên cứu Bò và đồng cỏ Ba Vì, Viện Chăn nuôi Quốc gia, Việt Nam

Ngày nhận bài 26-3-2019, ngày chấp nhận 18-5-2019

TÓM TẮT

Nghiên cứu chế tạo kem chứa nano bạc được thực hiện tại Viện Công nghệ môi trường và nghiên cứu sử dụng kem trong chăn nuôi bò sữa do Trung tâm nghiên cứu bò và đồng cỏ Ba Vì thực hiện.

Kết quả nghiên cứu đã lựa chọn carbomer 4% làm chất tạo kem kết hợp với nano bạc tạo thành chế phẩm kem nano bạc có độ đồng nhất cao và ổn định lâu dài về màu sắc, độ đồng nhất, kích thước và hàm lượng nano bạc.

Kem nano bạc hàm lượng 50–250 ppm có khả năng kháng rất mạnh các loài vi khuẩn như *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* gây bệnh viêm vú. Kem nano bạc 150 ppm có tác dụng tối đa trong phòng bệnh viêm vú lâm sàng và cận lâm sàng của bò trước khi đẻ. Sử dụng kem nano bạc 150 ppm kết hợp với kháng sinh ceftiofer cho hiệu quả điều trị cao đạt đến 93,33%.

Kết quả nghiên cứu còn cho thấy có thể sử dụng kem nano bạc 150 ppm trong phòng bệnh viêm vú bò sữa trước khi đẻ 15 ngày và toàn bộ thời gian trong giai đoạn vắt sữa. Sử dụng kết hợp kem nano bạc trong điều trị bệnh viêm vú với kháng sinh đưa lại hiệu quả cao.

Từ khóa: Bệnh viêm vú, bò sữa, điều trị, kem nano bạc, phòng bệnh.

*Địa chỉ liên hệ email: tranvantua@gmail.com

MỞ ĐẦU

Viêm vú ở bò sữa là bệnh gây thiệt hại lớn về kinh tế bao gồm giảm khả năng sản xuất sữa, chi phí điều trị, chi phí nhân công và có thể loại thải nếu bệnh kéo dài. Nguyên nhân chính gây bệnh viêm vú bò sữa là các loài vi khuẩn *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* và *Pseudomonas aeruginosa* (Bradley et al., 2007; Idriss et al., 2014).

Các phương pháp thông thường ngăn ngừa bệnh viêm vú đã được sử dụng như

thuốc nhúng đầu vú trước và sau khi vắt sữa cũng như phun tẩy trùng dụng cụ, phương tiện khai thác sữa như Haniodin, Lugol, nước gia ven, cloramin... Các chất này tuy có hiệu quả nhất định nhưng cũng gây hiệu ứng bất lợi cho gia súc như làm tổn thương lớp da non, làm khô da.

Để khắc phục bệnh viêm vú bò sữa, một số loại kem dạng mỡ có chất khử trùng và một số thành phần có nguồn gốc thực vật và các chất hữu cơ phụ trợ khác thường được dùng để bôi lên da vú bò. Các loại kem này có tác dụng chung là khắc phục tình trạng da vú bò

bị khô, duy trì tính đàn hồi và mềm; làm vết thương ở đó không bị nhiễm trùng và chóng liền da; tránh bị các loại ve, ruồi châm đốt; giảm tác động của môi trường như ánh nắng và gió bụi lên vú bò.

Điều trị cho bò bị viêm vú bằng kháng sinh tiêm bắp hoặc tiêm trực tiếp vào bầu vú. Các kháng sinh sử dụng là Kanamicin, Gentamycin, Bio-Amox, Bio-Genta, Hamogen. Phương pháp chữa bệnh này có hiệu quả cao nhưng sau khi tiêm thuốc kháng sinh, trong thời gian đầu, sữa bò bắt buộc phải bỏ, do trong sữa có hàm lượng chất kháng sinh, không đáp ứng với những chỉ tiêu qui định về sữa bò. Mặt khác, hiện tượng kháng kháng sinh xảy ra ngày càng nhanh và mạnh đòi hỏi các thuốc kháng khuẩn diệt khuẩn mới và phương pháp điều trị hiệu quả hơn (Berni et al., 2012).

Ngày nay, công nghệ nano phát triển nhanh và được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực khác nhau. Nano bạc có khả năng diệt nấm và vi khuẩn rất mạnh với nồng độ thấp và hiệu quả diệt khuẩn cao của nano bạc là một trong những lựa chọn mới cho việc làm giảm sự phát triển của vi khuẩn (Wilson, 2012). Nano bạc đã được chứng minh là có tiềm năng chống lại vi khuẩn ở phổ rộng (Humberto et al., 2011). Việc giải phóng ion bạc và việc phối hợp giữa kháng sinh và nano bạc đã được chứng minh hiệu quả trong việc diệt khuẩn, chống lại sự kháng kháng sinh của chúng (Birla et al., 2009). Nhiều nghiên cứu về tác dụng diệt khuẩn của nano bạc được thực hiện và chứng minh ở qui mô trang trại (Perugini et al., 2015). Cùng với khả năng diệt khuẩn và nấm cao vì chỉ với nồng độ rất thấp, nano bạc không gây hại cho con người, động vật. Đồng thời, bạc không tích tụ trong cơ thể mà có thể thải ra ngoài qua các con đường khác nhau.

Kem bôi da là dạng thuốc bán rắn, có chứa một hoặc nhiều dược chất được hoà tan hay phân tán vào tá dược thích hợp. Tá dược là môi trường phân tán, có tác dụng tiếp nhận, bảo quản, giải phóng dược chất và dẫn thuốc qua. Nó phải có khả năng tạo thành một chất đồng đều, trong đó dược chất dễ đạt độ phân tán cao. Có pH trung tính hoặc acid nhẹ, gần

giống với pH của da. Không cản trở hoạt động sinh lý bình thường của da, không làm khô và gây kích ứng da. Phải bền vững về mặt lý-hoá, không dễ bị hỏng bởi nấm mốc và vi khuẩn. Để chế tạo kem bôi da, ngoài hoạt chất cần sử dụng tá dược thích hợp.

Ở Việt Nam, nghiên cứu sử dụng nano bạc trong chăn nuôi bò sữa nói chung và phòng trị bệnh viêm vú nói riêng còn chưa được quan tâm. Bài báo này trình bày về kết quả nghiên cứu chế tạo kem chứa nano bạc và đánh giá tác dụng của kem nano bạc đến hiệu quả phòng trị bệnh viêm vú ở bò sữa.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Ba chủng vi sinh vật: *E. coli* (ATCC 14169), *Staphylococcus aureus*, và *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) dùng trong nghiên cứu khả năng kháng khuẩn do Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học (USA) cung cấp. Thực nghiệm tiến hành tại Viện Công nghệ môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Bò dùng đánh giá khả năng phòng trị bệnh viêm vú của kem nano bạc là đàn bò sữa đang ở độ tuổi sinh sản cận sữa và giai đoạn khai thác sữa của Trung tâm nghiên cứu Bò và Đồng cỏ Ba Vì, Viện Chăn nuôi Quốc gia.

Phương pháp nghiên cứu

Quy trình chế tạo 1 kg kem nano bạc (nồng độ nano bạc 150 ppm theo các bước sau: 300 ml dung dịch nano bạc được cho vào bể phản ứng, thêm nước cất và khuấy 1.000 vòng/phút trong 3–5 phút; dùng một lượng polyme khảo sát (carboxymethylcellulose (CMC), alginat hoặc carbomer) được thêm vào hỗn hợp ở bước (1), khuấy 1.000 vòng/phút trong 60–90 phút; thêm tá dược vừa đủ; khuấy 1.000 vòng/phút trong 15–30 phút thu được sản phẩm cuối cùng là kem nano bạc màu vàng nâu.

Đánh giá khả năng phòng bệnh viêm vú:

Đối với bò vắt sữa: 100 bò đang khai thác sữa chia ngẫu nhiên, 50 bò thí nghiệm (TN), 50 bò đối chứng (ĐC). Dùng kem nano bạc bôi đều lên 4 núm vú, với vú bị viêm bôi

lên cả thùy vú, bôi ngày 2 lần. Lô ĐC nhúng vú bằng dung dịch iodine 1% ngày 2 lần sau vắt sữa;

Đối với bò cặn sữa: 50 bò cặn sữa chia ngẫu nhiên thành 2 lô đều nhau. Lô TN bôi đều lên 4 núm vú ngày 2 lần trước khi để 10–

15 ngày. Lô ĐC nhúng vú bằng dung dịch iodine 1% ngày 2 lần;

Đánh giá khả năng điều trị bệnh viêm vú bằng cách chọn ra 45 bò bị viêm vú dạng lâm sàng và đưa vào thí nghiệm điều trị với bố trí như ở bảng 1.

Bảng 1. Phác đồ điều trị bò sữa viêm vú lâm sàng

Tiêu chí	Phác đồ 1	Phác đồ 2	Phác đồ 3
Số bò TN (con)	15	15	15
Thuốc	Nano bạc	Ceftionel-50, Novacin	Ceftionel-50, Novacin, Nano bạc
Phương pháp	Bôi đều lên bầu vú và núm vú	Tiêm bắp	Kết hợp cả hai phương pháp như phác đồ 1 và 2
Thời gian điều trị	5 ngày	5 ngày	5 ngày

Bôi kem nano bạc: Sau khi vắt sữa xong, lấy kem nano bạc bôi và xoa đều lên bầu vú và núm vú dày 1mm, ngày 2 lần; Ceftionel-50, thành phần Ceftiofur 5% do Hà Lan sản xuất được tiêm bắp với liều lượng 1 ml/50 kg P, ngày 1 lần sau khi vắt sữa; Novacin: Thuốc tiêu viêm, giảm đau không steroid, tiêm bắp với liều lượng 1 ml/25 kg P, ngày 1 lần sau khi vắt sữa.

Đánh giá độ đồng nhất của kem nano bạc theo mô tả của Trần Tích (2007); đánh giá các chỉ sức khỏe núm vú: Sử dụng phương pháp của Mein et al. (2001); đánh giá viêm vú cận lâm sàng: Bệnh viêm vú cận lâm sàng được chẩn đoán bằng phương pháp CMT (California Mastitis test) (Anri et al., 2002).

Phương pháp xác định bò mắc bệnh viêm vú lâm sàng: Thông qua biểu hiện toàn thân như sốt, bỏ ăn, và các đặc điểm sưng nóng, đỏ đau của bầu vú, màu sắc của sữa tại thời điểm thí nghiệm; phân lập vi khuẩn có trong sữa: Theo phương pháp của Nguyễn Như Thanh và nnk. (1997); phân biệt và nhận biết các vi khuẩn gây bệnh viêm vú theo Anri et al. (2005); đếm tế bào somatic (SCC): Bằng máy đếm SCC chuyên dụng.

Phương pháp đánh giá khả năng diệt khuẩn của kem nano bạc: Sử dụng phương pháp khuếch tán qua giếng thạch (agar well diffusion method). Quy trình gồm các bước sau:

Chuẩn bị dịch vi khuẩn: cấy vi khuẩn trên môi trường thạch PCA và nuôi ủ ở nhiệt độ 37°C. Sau 24 giờ, vi khuẩn được thu trong ống nghiệm nước RO và bảo quản trong điều kiện nhiệt độ thấp 3–4°C. Dịch vi khuẩn được định lượng dựa vào nguyên tắc pha loãng theo dãy thập phân và phương pháp đổ hộp;

Tạo vòng kháng: Môi trường thạch PCA được đổ vào đĩa petri đã khử trùng và được để qua đêm. Dùng pipet hút 100 µl dịch vi khuẩn vào đĩa thạch PCA. Sử dụng que trải để trải đều vi khuẩn trên bề mặt môi trường thạch đến khi bề mặt môi trường khô ráo. Đục các giếng có đường kính 5 mm và hút gel nano bạc ở các nồng độ 0–250 ppm vào từng giếng. Nuôi ủ ở nhiệt độ 37°C và đo đường kính vòng kháng khuẩn sau 24–36 giờ nuôi cấy. Phương pháp lấy mẫu sữa theo Anri & Kanameda (2002).

Số liệu thu thập được sẽ được xử lý thống kê bằng phép phân tích phương sai ANOVA trên phần mềm Minitab phiên bản 16.0 dạng thiết kế thí nghiệm 1 nhân tố. Sử dụng phương pháp Chi-Square để so sánh.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của chất tạo kem - polymer đến màu sắc và độ đồng nhất của kem nano bạc

Để chế tạo kem bôi da, ngoài hoạt chất cần sử dụng tá dược thích hợp trong đó có chất tạo gel. Trong nghiên cứu này, CMC

được sử dụng nồng độ từ 0,5 đến 2,0%; nồng độ alginat được khảo sát từ 0,5 đến 2,0% và nồng độ carbomer từ 0,1 đến 0,4%.

Kết quả kiểm tra độ đồng nhất của các mẫu kem nano bạc ngay sau chế tạo được chỉ ra ở bảng 2.

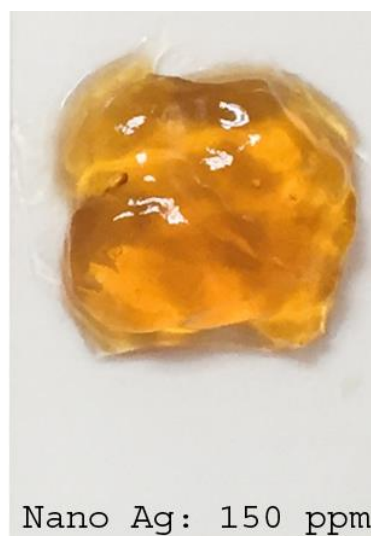
Bảng 2. Độ đồng nhất của kem nano bạc sử dụng tá dược khác nhau

TT	CMC		Alginat		Carbomer	
	Nồng độ (%)	Độ đồng nhất	Nồng độ (%)	Độ đồng nhất	Nồng độ (%)	Độ đồng nhất
1	0,5	Đồng nhất	0,5	Đồng nhất	0,1	Đồng nhất
2	1,0	Đồng nhất	1,0	Đồng nhất	0,2	Đồng nhất
3	2,0	Đồng nhất	2,0	Đồng nhất	0,3	Đồng nhất
4	-	-	-	-	0,4	Đồng nhất

Số liệu bảng 2 cho thấy, sau khi chế tạo, cả 3 loại polymer với các nồng độ khác nhau thử nghiệm đều cho độ đồng nhất. Tuy nhiên, sau 3 tháng bảo quản, kem sử dụng CMC và alginat có sự thay đổi, màu của kem đậm hơn có thể do các hạt nano bạc đã bị oxy hóa làm thay đổi màu sắc của kem. Riêng kem sử dụng carbomer không có sự thay đổi. Kuma & Parida (2015) đã sử dụng carbomer làm chất tạo gel nano bạc như sau: carbomer (2%), glycerol (2%), nano bạc (200 ppm), nước cất vừa đủ 100 g. Các kết quả đánh giá đặc trưng của sản phẩm và hoạt tính kháng khuẩn của gel nano bạc chế tạo được cũng tương đương với nghiên cứu này. Vì vậy, carbomer được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Ảnh hưởng của hàm lượng nano bạc trong kem đến màu sắc và độ đồng nhất của kem nano bạc

Hàm lượng nano bạc thấp làm giảm tác dụng diệt khuẩn của kem nano bạc. Ngược lại, hàm lượng nano bạc cao có thể dẫn đến sự tập hợp của các hạt nano thành các hạt lớn hơn, giảm hiệu quả diệt khuẩn và rút ngắn thời hạn sử dụng. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng nano bạc trong kem đến màu sắc và độ đồng nhất của kem nano bạc, các mẫu kem nano bạc chế tạo được đều có màu vàng nâu và đậm dần theo hàm lượng bạc (hình 1, bảng 3).



Hình 1. Mẫu kem nano bạc chế tạo với hàm lượng khác nhau

Bảng 3. Ảnh hưởng của hàm lượng nano bạc đến màu sắc và độ đồng nhất của kem bôi

TT	Nano bạc (ppm)	pH	Màu sắc*	Độ đồng nhất
1	50	5,57	Màu vàng nhạt	Đồng nhất
2	100	5,05	Màu vàng nhạt	Đồng nhất
3	150	4,93	Màu vàng nâu	Đồng nhất
4	200	4,76	Màu nâu nhạt	Đồng nhất
5	250	4,52	Màu nâu đen	Đồng nhất

Ghi chú: *: màu sắc của kem sau 3 tháng bảo quản.

Số liệu ở bảng 3 cho thấy, pH của kem nano bạc giảm dần khi tăng hàm lượng bạc, điều này có thể giải thích khi hàm lượng của nano bạc trong kem tăng, tương ứng hàm lượng chitosan cũng cao hơn vì chitosan được sử dụng làm chất phân tán khi chế tạo dung dịch nano bạc.

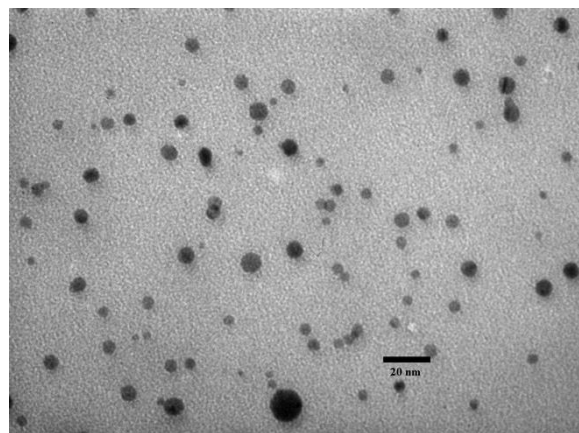
Kết quả kiểm tra độ đồng nhất của các mẫu kem nano bạc ngay sau chế tạo cho thấy, tất cả các mẫu kem khi thay đổi về nồng độ nano bạc không quan sát thấy các vết của tiểu phân nano bạc, điều này cho thấy các mẫu kem nano bạc đều ổn định và đồng nhất.

Đánh giá sự ổn định của kem nano bạc theo thời gian bảo quản

Các mẫu kem nano bạc sau khi chế tạo được bảo quản trong lọ nhựa kín, tối màu. Sau các thời gian bảo quản 3, 6, 12, 18 và 24 tháng, mẫu được đem đánh giá đặc trưng về độ đồng nhất, hàm lượng bạc và kích thước hạt nano bạc trong kem. Kết quả thu được cho thấy, tất cả các mẫu kem nano bạc theo thời gian bảo quản đều ổn định và đồng nhất (bảng 4). Sau 24 tháng bảo quản, không quan sát thấy các vết của tiểu phân nano bạc ở tất cả các mẫu. Như vậy, kem nano bạc có độ đồng nhất khá tốt. Với hàm lượng bạc ban đầu là 150 ppm, kết quả phân tích hàm lượng bạc trong mẫu kem cho thấy, hàm lượng nano bạc trong kem tương đối ổn định theo thời gian bảo quản với sai khác không đáng kể (hình 2).

Bảng 4. Kết quả phân tích hàm lượng bạc và độ đồng nhất của kem bảo quản

STT	Thời gian bảo quản (tháng)	Độ đồng nhất	Hàm lượng phân tích (ppm)
1	3	đồng nhất	153,6±4,12
2	6	đồng nhất	157,3±7,84
3	12	đồng nhất	149,4±1,28
4	18	đồng nhất	150,2±2,16
5	24	đồng nhất	148,7±2,92



Hình 2. Ảnh TEM mẫu kem nano bạc sau 24 tháng bảo quản

Kết quả chụp ảnh TEM cho thấy các hạt nano bạc trong kem bảo quản sau 3, 6, 12, 18 và 24 tháng đều có dạng hình cầu với kích thước nhỏ trung bình từ 8–15 nm và phân bố đồng đều. Điều này chứng tỏ, theo thời gian bảo quản, kích thước các hạt nano bạc trong kem không bị thay đổi.

Đánh giá hoạt tính diệt khuẩn của kem nano bạc sử dụng carbomer

Kết quả đánh giá hoạt tính diệt khuẩn *E. coli* của kem nano bạc sử dụng carbomer sau khi chế tạo được trình bày ở bảng 5.

Kết quả cho thấy, với nồng độ nano bạc 150 ppm trong kem, khi sử dụng Carbomer ở các nồng độ 0,1–0,4% đều thể hiện hoạt tính diệt khuẩn tốt, với *E. coli* nồng độ $1,2 \times 10^3$ đã bị diệt hoàn toàn, hiệu lực diệt khuẩn đạt 100%. Tuy nhiên, đối với mẫu kem nano bạc có hàm lượng carbomer thấp (0,1%) khi tiếp xúc với môi trường nuôi cấy vi sinh thì khả năng phân tán không tốt, mẫu kem có hiện tượng kết tụ lại. Để thực hiện cho các nghiên cứu tiếp theo, nhóm nghiên cứu đã lựa chọn hàm lượng carbomer 0,4%.

Bảng 5. Hiệu quả diệt khuẩn của kem nano bạc sử dụng Carbomer

Mẫu	Nồng độ Carbomer (%)	Nồng độ <i>E.coli</i> (CFU/ mL)	Hoạt lực diệt khuẩn (%)
ĐC	0	$1,2 \times 10^3$	-
Car-0,1	0,1	0	100
Car-0,2	0,2	0	100
Car-0,3	0,3	0	100
Car-0,4	0,4	0	100

Nghiên cứu ảnh hưởng của kem nano bạc đến khả năng diệt vi khuẩn gây viêm vú bò sữa *E. coli*, *P. aeruginosa* và *S. aureus*

Khả năng kem nano bạc diệt vi khuẩn gây viêm vú như *E. coli*, *P. aeruginosa* và *S. aureus* được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán qua giếng thạch dựa trên đường kính vòng kháng khuẩn của kem nano bạc trên đĩa thạch đã trải 3 loại vi khuẩn này và được

nuôi trong điều kiện 37°C. Sau 24 giờ, kết quả đạt được trình bày ở bảng 6.

Có thể thấy kem không chứa nano bạc không có khả năng diệt khuẩn. Khả năng diệt khuẩn của kem tỉ lệ thuận với hàm lượng nano bạc trong kem, hàm lượng nano bạc càng cao, biểu hiện diệt khuẩn của kem càng cao, đường kính vòng kháng càng lớn.

Bảng 6. Vòng kháng khuẩn của kem nano bạc đối với một số loài vi khuẩn gây viêm vú trên bò sữa

Hàm lượng nano bạc trong kem	Iodine 1%	0 ppm	50 ppm	100 ppm	150 ppm	200 ppm	250 ppm
Đường kính vòng kháng <i>E. coli</i>		0	11	11,5	12	12,5	13
Đường kính vòng kháng <i>P. aeruginosa</i>		0	11	11,5	12	12,5	13
Đường kính vòng kháng <i>S. aureus</i>	11	-	11	11,5	12	12,5	13

Kết quả nghiên cứu này tương tự với kết luận của Akmaz et al. (2013) khi sử dụng hàm lượng nano bạc ở mức 100 đến 200 ppm có

tác dụng diệt *E. coli*. Nghiên cứu của Marslin et al. (2015) cũng chỉ ra kem chứa nano bạc ức chế mạnh lên sinh trưởng của các vi khuẩn

Staphylococcus aureus, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*. So với kem chứa muối bạc, hoạt tính ức chế của kem nano bạc lên các vi khuẩn này cao hơn lần lượt là 200, 31 và 28 lần tương ứng.

Số liệu ở bảng 6 cũng chỉ ra kem nano bạc 50 ppm có đường kính vòng kháng bằng vòng kháng của iodine 1%. Như vậy, kem nano bạc 50 ppm có khả năng diệt khuẩn tương đương với iodine 1%, loại dung dịch được các trang trại, nông dân thường sử dụng trong khử trùng vú bò.

So sánh đường kính vòng kháng khuẩn cho thấy khi tăng hàm lượng bạc, đường kính vòng kháng khuẩn tăng lên không nhiều. Để vừa hiệu quả vừa kinh tế trong sử dụng nano bạc, chúng tôi chọn kem chứa 150 ppm nano

bạc cho nghiên cứu trong phòng và trị bệnh viêm vú bò sữa.

Khả năng phòng bệnh viêm vú của kem nano bạc ở giai đoạn tiết sữa

Kết quả bảng 7 cho thấy, màu sắc núm vú, độ khô của da và sự sùng hóa xung quanh lỗ núm vú của nhóm bò được sử dụng kem nano bạc đều tốt hơn so với nhóm không dùng. Đặc biệt là độ khô của da và sự sùng hóa xung quanh lỗ núm vú cho thấy nhóm bò được sử dụng kem nano bạc có tỷ lệ da bình thường (không thô và khô) cao hơn hẳn so với nhóm bò đối chứng ($P < 0,05$). Kết quả này cho thấy, đối với bò bị viêm vú khi sử dụng kem nano bạc đã đảm bảo được sức khỏe núm vú tốt hơn so với các biện pháp điều trị thông thường hiện nay.

Bảng 7. Kết quả đánh giá tình trạng sức khỏe bầu vú bò đang vắt sữa

Chỉ tiêu		Lô TN	Lô ĐC	P
Số bò thí nghiệm n (con)		50	50	
Màu sắc	Bình thường (con)	40/50 (80%)	37/50 (74%)	> 0,05
	Sung, đỏ	10/50 (20%)	13/50 (26%)	
Độ khô của da	Bình thường (con)	50/50 (100%)	31/50 (19%)	< 0,05
	Thô và rất thô	0/50 (0%)	19/50 (38%)	
Sùng hóa xung quanh lỗ núm vú	Bình thường (con)	45/50 (90%)	27/50 (54%)	< 0,05
	Bị sùng hóa	5/50 (10%)	23/50 (46%)	

Qua kết quả thử CMT đã xác định khả năng phòng bệnh của kem nano bạc đến tỷ lệ mắc bệnh viêm vú cận lâm sàng, theo đó kem nano bạc làm giảm tỷ lệ viêm vú cận lâm sàng theo thời gian sử dụng trong khi với phương pháp phòng thông thường thì tỷ lệ này lại tăng lên (bảng 8). Từ kết quả này chúng tôi nhận thấy, khi sử dụng kem nano bạc trong phòng bệnh viêm vú ở bò đã làm giảm tỷ lệ viêm vú cận lâm sàng và tốt nhất sau 60 ngày sử dụng. Zhao và Stevens (1998) cho rằng, so với các kim loại khác, bạc biểu hiện mức độc tính cao hơn đối với vi sinh vật trong khi nó không có độc tính đối với tế bào động vật có vú. Như vậy, để phòng bệnh viêm vú sau khi điều trị thì trong suốt thời gian bò vắt sữa nên sử dụng kem nano bạc để phòng bệnh viêm vú cho bò, và hiệu quả có thể phòng được tới 93,62%.

Khi sử dụng các biện pháp phòng bệnh, mẫu sữa vẫn xuất hiện các loại vi khuẩn *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *E. coli* và nấm, tuy nhiên, tỷ lệ này không cao. Đặc biệt, nấm và *E. coli* không thấy xuất hiện trong mẫu sữa của bò sử dụng kem nano bạc trong khi vẫn còn có ở trong mẫu sữa của lô đối chứng với tỷ lệ lần lượt là 2 và 4% (bảng 9).

Bệnh viêm vú thường bị tác động bởi hỗn hợp vi khuẩn *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* và *S. agalactiae* (Kaoud & Yosseif, 2013).. Nghiên cứu gần đây đã chứng minh hiệu quả của nano bạc đối với 3 loài vi khuẩn này (Yuan et al., 2017). Như vậy, việc sử dụng kem nano bạc có khả năng phòng bệnh viêm vú và không làm ảnh hưởng nhiều đến sức khỏe bầu vú, không

làm tăng tỷ lệ viêm vú ở bò sữa. Đặc biệt ngoài núm vú và bầu vú phòng bệnh viêm duy trì sử dụng kem nano bạc bôi ở bên vú tái phát trở lại.

Bảng 8. Tỷ lệ viêm vú cận lâm sàng của bò thí nghiệm

Chỉ tiêu	Thí nghiệm			Đối chứng			Chi-Square	P
	Số mẫu (sữa)	Số mẫu (+)	Tỷ lệ (%)	Số mẫu (sữa)	Số mẫu (+)	Tỷ lệ (%)		
Trước TN	40	10	25,00	41	9	21,95	0,105	>0,05
Ngày thứ 15	41	9	21,95	43	7	16,28	0,348	>0,05
Ngày thứ 30	44	6	13,64	39	11	28,21	2,694	>0,05
Ngày thứ 45	44	6	13,64	36	14	38,89	6,734	<0,05
Ngày thứ 60	47	3	6,38	35	15	42,86	15,578	<0,05
Sau TN 7 ngày	46	4	8,70	35	15	42,86	12,919	<0,05

Bảng 9. Số lượng và loại vi khuẩn có trong mẫu sữa bò thí nghiệm

Vi sinh vật		Lô thí nghiệm (n = 50)	Lô đối chứng (n = 50)	P
<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>S. aureus</i>	1/50 (2%)	1/50 (2%)	>0,05
	CNS	10/50 (20%)	14/50 (28%)	>0,05
<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Streptococcus Agalactiae</i>	1/50 (2%)	3/50 (7,5%)	>0,05
	<i>Streptococcus</i> khác	13/50 (26%)	13/50 (26%)	-
<i>Escherichia coli</i>		0/50 (0%)	2/50 (4%)	>0,05
Nấm		0/50 (0%)	1/50 (2%)	>0,05

Khả năng phòng bệnh viêm vú của kem nano bạc ở giai đoạn cận sữa

Để phòng bệnh viêm vú ở giai đoạn cận sữa của kem nano bạc, kem được bôi vào núm vú 2 lần trong ngày và tiến hành quan sát đánh giá sức khỏe bầu vú bò. Đánh giá tỷ lệ viêm vú lâm sàng và tỷ lệ nhiễm khuẩn trong mẫu

sữa 1–2 giờ từ bầu vú bò sau sinh. Kết quả cho thấy, kem nano bạc duy trì sức khỏe bầu vú tốt hơn so với lô đối chứng (bảng 10). Sử dụng kem nano bạc phòng bệnh viêm vú ở bò trong giai đoạn cận sữa đảm bảo sức khỏe bầu vú tốt hơn so với các biện pháp phòng bệnh thông thường.

Bảng 10. Kết quả đánh giá tình trạng sức khỏe bầu vú bò

Chỉ tiêu		Lô thí nghiệm (n = 25)	Lô đối chứng (n = 25)	P
Màu sắc	Bình thường (con)	22/25 (88%)	20/25 (80%)	> 0,05
	Sung, đỏ	3/25 (12%)	5/25 (20%)	
Độ khô của da	Bình thường (con)	24/25 (96%)	18/25 (72%)	< 0,05
	Thô và rất thô	1/25 (4%)	7/25 (17%)	
Sùng hóa xung quanh lỗ núm vú	Bình thường (con)	23/25 (92%)	17/25 (68%)	< 0,05
	Bị sùng hóa	2/25 (8%)	8/25 (32%)	

Giai đoạn cạn sữa, đặc biệt 15 ngày trước khi đẻ, bò rất dễ bị nhiễm khuẩn hệ thống vú dẫn đến viêm vú. Trong thời gian sử dụng kem nano bạc 15 ngày trước khi đẻ và sau đó xác định tỷ lệ viêm vú lâm sàng và cận lâm sàng sau khi bò đẻ 1–2 giờ. Kết quả cho thấy, trong số 25 bò cái theo dõi, bò được phòng bệnh bằng kem nano bạc đã không xuất hiện viêm vú cận lâm sàng và lâm sàng trong khi lô đối chứng đã có 2 (8,0%) bò xuất hiện viêm vú. Điều này cho thấy khả năng phòng bệnh của kem nano bạc trước khi đẻ ít nhất 15 ngày là hiệu quả.

Xác định vi khuẩn cho thấy lô bò sử dụng kem nano bạc, số lượng loài vi khuẩn xuất hiện ít hơn so với lô đối chứng (bảng 11). Đặc

biệt là khả năng hạn chế được các bào tử nấm phát triển của kem nano bạc, đây là một điều khá quan trọng vì viêm vú do nấm gây ra rất khó điều trị trên bò sữa.

Theo Nasrollahi et al. (2011), nano bạc có khả năng diệt các bào tử nấm, tác dụng này cũng đã được khẳng định trong một số nghiên cứu khác (Zhang et al., 2016; Bondarenko et al., 2013). Như vậy, sử dụng kem nano bạc trong phòng bệnh viêm vú ở bò có tác dụng hạn chế các loại vi khuẩn, nấm gây viêm vú và hạn chế tối đa bệnh viêm vú lâm sàng, cận lâm sàng sau khi bò đẻ 1–2 giờ. Đồng thời hạn chế các loài vi khuẩn và nấm có khả năng gây viêm vú ở bò sữa.

Bảng 11. Số lượng và loại vi khuẩn có trong mẫu sữa

Vi sinh vật		Lô thí nghiệm (n=25)	Lô đối chứng (n=25)	P
<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>S. aureus</i>	0/25 (0%)	0/25 (0%)	>0,05
	CNS	4/25 (16%)	5/25 (20%)	
<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Streptococcus Agalactiae</i>	1/25 (4%)	0/25 (0%)	>0,05
	<i>Streptococcus</i> khác	4/25 (16%)	6/25 (24%)	
<i>Escherichia coli</i>		0/25 (0%)	1/25 (4%)	
Nấm		0/25 (0%)	1/25 (4%)	

Khả năng điều trị bệnh viêm vú giai đoạn tiết sữa của kem nano bạc

Ngoài tác dụng để phòng bệnh, kem nano bạc có ý nghĩa cộng hưởng trong việc điều trị bệnh viêm vú ở bò sữa. Kết quả theo dõi 15 bò được điều trị, hiệu quả điều trị viêm vú đạt cao nhất ở phác đồ 3 đến 93,33% so với phác đồ 2 (73,33%) và phác đồ 1 (46,76%). Thực tế khi triển khai thí nghiệm, những trường hợp viêm vú do vi khuẩn môi trường như *E. coli*, CNS,... gây viêm vú với những biểu hiện như sữa có chứa bã đậu thì áp dụng phác đồ 1 thu được kết quả rất khả quan. Có thể coi phương pháp này giúp cho việc đảm bảo an toàn thực phẩm và tiết kiệm chi phí cho người chăn nuôi trong việc điều trị bệnh viêm vú. Đối với những vi khuẩn gây bệnh viêm vú truyền nhiễm như SA và SAG, vi khuẩn xâm nhập sâu vào trong thùy vú nơi có các tế bào tiết sữa thì rất cần có sự tác động toàn thân như

kháng sinh. Tuy nhiên, với việc ngăn chặn vi khuẩn bội nhiễm từ môi trường và việc tiêu diệt vi khuẩn xâm nhập sâu vào bên trong bầu vú của ceftiofur trong phác đồ 3 đã giúp cho tỷ lệ khỏi bệnh viêm vú đạt cao nhất (93,33%). Trong nghiên cứu này, chúng tôi chọn đại diện của nhóm cephalosporin là Ceftiofur vì kháng sinh ceftiofur không thải trừ qua sữa, hạn chế sự tồn dư kháng sinh trong sữa.

Theo Kaoud & Yosseif (2013) áp dụng các phác đồ điều trị viêm vú trên bò gây ra bởi SA, SAG và *E.coli* thu được kết quả như sau: với phác đồ 1 dùng ceftiofur bơm vào bầu vú tỷ lệ khỏi bệnh là 60%; phác đồ 2 dùng Ceftiofur bơm vào bầu vú và tiêm bắp bằng chất kháng viêm và Enrofloxacin tỷ lệ khỏi bệnh là 80%, phác đồ 3 dùng nano bạc bơm vào bầu vú tỷ lệ khỏi bệnh là 60%. Trong nghiên cứu của chúng tôi nano bạc được sử

dùng ở dạng kem nên chỉ có thể bôi ngoài da để ngăn chặn và tiêu diệt vi khuẩn bám trên bề mặt da vú ngăn cho chúng xâm nhập sâu vào bên trong vì thế những vi khuẩn đã xâm nhập gây viêm vú bên trong không tiêu diệt được nên tỷ lệ khỏi thấp hơn (46,67%). Khi áp dụng kháng sinh để điều trị viêm vú, tỷ lệ khỏi bệnh là 93,33%, cao hơn so với nghiên cứu của Kaoud & Yosseif (2013) (60%). Kết quả này có thể do Ceftiofur hiện ít được dùng để điều trị trên đàn bò thí nghiệm trước đó nên ít gây ra hiện tượng kháng thuốc, hơn nữa, khi kết hợp giữa kháng sinh tiêm bắp và thuốc kháng viêm giúp hiệu quả điều trị bệnh tăng lên, giảm các triệu chứng viêm nhanh hơn.

KẾT LUẬN

Kem nano bạc với carbomer làm chất tạo keo có độ đồng nhất cao và duy trì được lâu dài với nồng độ tối ưu của carbomer là 0,4% và nồng độ nano bạc là 150 ppm. Kem có thành phần nano bạc ở nồng độ từ 50–250 ppm có khả năng diệt ba loài vi khuẩn như *E. coli*, *P. aeruginosa* và *S. aureus*.

Kem nano bạc nồng độ 150 ppm có tác dụng tối đa phòng bệnh viêm vú lâm sàng và cận lâm sàng của bò trước khi đẻ. Tỷ lệ khỏi bệnh viêm vú lâm sàng là 46,67%, khi kết hợp với kháng sinh ceftiofer hiệu quả điều trị đạt 93,33%.

Để phòng bệnh viêm vú bò sữa, sử dụng kem nano bạc tốt nhất trước khi đẻ 15 ngày và toàn bộ thời gian trong giai đoạn vắt sữa. Sử dụng kết hợp kem nano bạc trong điều trị bệnh viêm vú với kháng sinh đưa lại hiệu quả cao.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện trong khuôn khổ Dự án KHCN trọng điểm cấp Viện Hàn lâm KHCVN “*Nghiên cứu ứng dụng công nghệ nano trong nông nghiệp*”, Mã số VAST.TĐ.NANO-NN/15–18.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Akmaz S, Adiguzel E. D., Yasar M., Erguven O., 2013. The effect of Ag content of the chitosan-silver nanoparticle composite material on the structure and antibacterial activity. *Advances in Materials Science and Engineering. Volume 2013*, Article ID

690918, 6 pages. <https://dx.doi.org/10.1155/2013/690918>

Anri A., Kanameda M., 2002. Tập huấn về Bệnh viêm vú bò sữa: Phương pháp chẩn đoán trong phòng thí nghiệm và kiểm soát hiệu quả tại Việt Nam, Bản dịch, lưu hành nội bộ. Dự án Nâng cao năng lực JICA - Viện Thú y, tr. 15–22.

Anri A., Nguyễn Thị Kim Anh, Trần Thị Hạnh, 2005. Các quy trình xét nghiệm phát hiện vi sinh vật gây bệnh viêm vú cận lâm sàng ở bò sữa. JICA - NIAH.

Berni E., Marcato P. D., Nakazoto G., Kobayashi R. K. T., Vacchi F. I., Umbuzeiro G. A., Durán N., 2012. Violacein/poly (ϵ -caprolactone)/chitosan nanoparticles against bovine mastitis: Antibacterial and ecotoxicity evaluation. *International Conferences on Safe Production and Use of Nanomaterials. Journal of Physics: Conference Series*, 429: 1–7.

Birla S. S., Tiwari V. V., Gade A. K., Ingle A. P., Yadav A. P., Rai M. K., 2009. Fabrication of silver nanoparticles by *Phonma glomerata* and its combined effect against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Lett Appl Microbiol.*, 48: 173–179.

Bondarenko O., Ivask A., Kakinen A., Kurvet I., Kahru A., 2013. Particle-cell contact enhances antibacterial activity of silver nanoparticles. *PloS ONE* 2013 e64060.

Bradley A. J., Leach K. A., Breen J. E., Green L. E., Green M. J., 2007. Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in English and Wales, *Veterinary Record*, 160, p. 253–258.

Cheng Y, Wang F., Fang C., Su J., Yang L., 2016. Preparation and characterization of size and morphology controllable silver nanoparticles by citrate and tannic acid combined reduction at a low temperature. *J. Alloy. Compd.*, 658: 684–688.

Humberto H. L., Elsa N. G. T., Liliana I. T., Dinesh K. S., 2011. Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and

- virucidal compounds. Lara et al. *Journal of Nanobiotechnology*, 2011, 9:30. <http://www.jnanobiotechnology.com/content/9/1/30>.
- Idriss Sh. E., Foltys V., Tancin V., Kirchnerová K., Tancinoá D., Zaujec K., 2014. Mastitis pathogen and their resistance against antimicrobial agents in dairy cow in Nitra, Slovakia. *Slovak Journal of Animal Science*, 47(1): 33–38.
- Kaoud H. A, Yosseif S., 2013. Innovative method for the treatment of mastitis in dairy animals. *The Journal of Veterinary Science. Photon.*, 114: 240–244.
- Kumar A. P., Parida P., 2015. Development and Evaluation of Gel Incorporated with Biogenically Synthesised Silver Nanoparticles. *Journal of Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*, 3, 1–6.
- Marslin G., Selvakesavan R. K., Franklin G., Sarmento B., Dias A. C. P., 2015. Antimicrobial activity of cream incorporated with silver nanoparticles biosynthesized from *Withania somnifera*. *Int. J. Nanomedicine*, 2015(10): 5955–5963.
- Mein G. A., Neijenhuis F., Morgan W. F., Reinemann D. J., Hillerton J. E., Baines J. R., Ohnstad I., Rasmussen M. D., Timms L., Britt J. S., Farnsworth R., Cook N. B., Hemling T., 2001. Evaluation of bovine teat condition in commercial dairy herds: 1. Non - infectious factors. Proceedings of the 2nd International Symposium on Mastitis and Milk Quality.
- Nasrollahi A., Pourshamsian Kh., Mansourkiaee P., 2011. Antifungal activity of silver nanoparticles on some fungi. *Int. J. Nano. Dim.*, 1: 233–239.
- Perugini B. G., R. E. Otaguniri S., Morey A. T., 2015. Effect of Eugenol against streptococcus agalactiae and Synergistic Interaction with Biologically Produced Silver Nanoparticles. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015:861497. doi:10.1155/2015/861497.
- Nguyễn Như Thanh, Nguyễn Bá Hiền, Trần Thị Lan Hương, 1997. *Vì Sinh Vật Thú y*. Nxb Nông Nghiệp, H.: 60–96.
- Wilson W., 2012. Consumer products inventory Project on Emerging Nanotechnologies, Woodrow Wilson International Center for Scholars.
- Yuan Y. G, Peng Q. L., Gurunathan S., 2017. Effects of silver nanoparticles on multiple drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from mastitis-tifected Goat: An alternative approach for antimicrobial therapy. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017(18): 569.
- Zhang X. F., Shen W., Gurunathan S., 2016. Silver Nanoparticle-Mediated Cellular Responses in Various Cell Lines: An in Vitro Model. *Int. J. Mol. Sci.*, 17: 1603.
- Zhao G. J, Stevens S. E., 1998. Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion. *Biometals*, 11: 27–32.