

DOI:10.22144/ctujos.2023.162

XÁC ĐỊNH ĐIỀU KIỆN THÍ NGHIỆM ĐÁNH GIÁ ĐỘC LỰC *IN VIVO* CỦA VI NẤM SỬ DỤNG ẤU TRÙNG CỦA BƯỚM *Galleria mellonella*

Lê Ngọc Mai, Đỗ Thị Thanh Hoa, Đào Thị Hồng Quyên và Triệu Anh Trung*

Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Triệu Anh Trung (email: trungta@hnue.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 22/02/2023

Ngày nhận bài sửa: 17/04/2023

Ngày duyệt đăng: 28/04/2023

Title:

Optimization of experimental conditions for *in vivo* virulence assay of fungus using *Galleria mellonella* larvae

Từ khóa:

Động vật mô hình, *Galleria mellonella*, khả năng gây bệnh, *Mucor lusitanicus*

Keywords:

Animal model, *Galleria mellonella*, *Mucor lusitanicus*, virulence

ABSTRACT

Mucormycosis is emerging as one of the dangerous fungal infections with a high mortality rate, especially in immunocompromised patients, such as those with HIV, organ transplant, diabetes, or Covid-19. Studies on the pathogenic mechanism, the interaction between the pathogen and the host interest scientists. However, the experimental conditions to evaluate the virulence of fungal pathogens *in vivo* have not been unified in several recent studies. This report identified the experimental and culture conditions using the animal model *Galleria mellonella*: 104 fungus *Mucor lusitanicus*/ larva spores, grown in condition 26°C.

TÓM TẮT

Mucormycosis đang nổi lên là một trong những bệnh nhiễm trùng nấm nguy hiểm với tỷ lệ gây chết cao, đặc biệt là với các bệnh nhân bị suy giảm miễn dịch như các bệnh nhân HIV, ghép tạng, tiểu đường hay Covid-19. Các nghiên cứu về cơ chế gây bệnh, sự tương tác giữa tác nhân gây bệnh và kí chủ đang được các nhà khoa học quan tâm. Tuy nhiên, điều kiện thí nghiệm đánh giá độc lực của vi nấm *in vivo* chưa được thống nhất trong một số nghiên cứu gần đây. Trong nghiên cứu này, điều kiện thí nghiệm đã được xác định và nuôi cấy thích hợp sử dụng đối tượng mô hình là ấu trùng bướm *Galleria mellonella*, cụ thể 10⁴ bào tử nấm *Mucor lusitanicus* trong lượng dung dịch tiêm 10µL/ ấu trùng, điều kiện nhiệt độ 26°C.

1. GIỚI THIỆU

Mucormycosis là một loại bệnh nhiễm trùng nấm hiếm gặp nhưng tỉ lệ gây tử vong cao. Đây là một loại bệnh cơ hội nên đặc biệt nguy hiểm với những bệnh nhân suy giảm miễn dịch như người mắc bệnh tiểu đường, cấy ghép nội tạng, AIDS (Marr et al., 2002). Bệnh *mucormycosis* gây ra bởi nhiều loài trong bộ *Mucorales* (Ribes et al., 2000). Các loài gây bệnh chủ yếu thuộc các họ *Rhizopus*, *Mucor*, *Lichtheimia*, *Apophysomyces*, *Rhizomucor* và *Cunninghamella*. *Mucormycosis* là một trong những bệnh nhiễm trùng nấm sâu khó điều trị, do bệnh đáp ứng kém với các loại thuốc trị nấm thông

thường như amphotericin B và đến nay chưa có liệu pháp điều trị hiệu quả. Nguyên nhân chủ yếu là do những hiểu biết về cơ chế gây bệnh còn hạn chế (Lopez-Fernandez et al., 2018).

Nấm *Mucor lusitanicus* CBS277.49 (tên cũ là *Mucor circinelloides* f. *lusitanicus* CBS277.49) là một trong các loài nấm mô hình dùng cho nhiều nghiên cứu khác nhau như cơ chế phân tử của RNAi, sinh tổng hợp carotene, lipid và bệnh *mucormycosis* (Nicolas et al., 2003). Loài nấm này cũng là một trong số các tác nhân gây bệnh *mucormycosis*.

Với nhiều đặc điểm ưu việt, *Galleria mellonella* trong những năm trở lại đây đã và đang trở thành

một trong những sinh vật mô hình không xương sống được sử dụng phổ biến nhất trong nghiên cứu về các bệnh nhiễm trùng và nấm (Kavanagh & Sheehan, 2018). Trong tự nhiên, ấu trùng của loài bướm này thường xuyên tiếp xúc với rất nhiều tác nhân gây bệnh, do đó ở chúng có sự hình thành và phát triển hệ miễn dịch bảo vệ cơ thể với nhiều điểm tương tự về cấu trúc và chức năng với hệ thống miễn dịch bẩm sinh của động vật có xương sống. Nhờ đó, ấu trùng *G. mellonella* có thể được sử dụng cho nghiên cứu khoa học, cung cấp nhiều thông tin hữu ích về cơ chế gây bệnh, khả năng gây bệnh, sự tương tác giữa tác nhân gây bệnh với vật chủ cũng như hiệu quả của các chất kháng sinh. So với các động vật mô hình không xương sống khác, giới hạn nhiệt rộng (18-37°C) của ấu trùng *G. mellonella* tạo điều kiện thuận lợi để mô phỏng các trạng thái sinh lý của động vật có vú nói chung và con người nói riêng. Thêm vào đó, loài côn trùng này còn đáp ứng được các yêu cầu cần có đối với một sinh vật mô hình điển hình như có tốc độ sinh trưởng và sinh sản nhanh, dễ thao tác, chi phí nhân nuôi thấp, dễ duy trì trong điều kiện phòng thí nghiệm mà không cần tới các thiết bị đắt tiền (Jorjao et al., 2018). Hệ gen của loài này đã được giải mã hoàn chỉnh gần đây (Lange et al., 2018) cho phép các nhà khoa học mở rộng phạm vi tiếp cận và áp dụng các công cụ tin sinh học và sinh học phân tử trong các nghiên cứu sử dụng *G. mellonella* làm động vật mô hình.

So với các động vật mô hình có xương sống, các động vật mô hình không xương sống đã và đang được sử dụng ngày càng rộng rãi hơn trong các nghiên cứu về bệnh nấm mucormycosis; và trong số đó *G. mellonella* với nhiều ưu điểm đã trở thành động vật mô hình không xương sống được lựa chọn nhiều nhất trong những năm gần đây (Jacobsen, 2019). Nhiều đánh giá *in vivo* về khả năng gây bệnh của các chủng khác nhau của nhiều loài nấm thuộc bộ Mucorales, trong đó có *Mucor lusitanicus* đã được nghiên cứu tiến hành trên đối tượng ấu trùng *G. mellonella* (Lee et al., 2014; Trieu et al., 2017; Vellanki et al., 2020). Tuy nhiên, các báo cáo khác nhau sử dụng liều lượng khác nhau của bào tử nấm gây bệnh và điều kiện nuôi khác nhau dẫn đến những khó khăn trong việc tái lập kết quả nghiên cứu. Báo cáo này tiến hành xác định điều kiện thí nghiệm thích hợp sử dụng ấu trùng này và thử nghiệm trên một số dòng nấm *M. lusitanicus* đột biến.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Dòng nấm *M. lusitanicus* R7B (*leuA⁻ pyrG⁺*) được dùng làm chủng kiểu dại, được cung cấp bởi

Bộ môn Di truyền học và Vi sinh vật học, Khoa Sinh học, Đại học Murcia, Tây Ban Nha.

Ấu trùng *G. mellonella* tuổi 5-6 được cung cấp bởi Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện hàn lâm khoa học Việt Nam.

Điều kiện nuôi cấy và sinh trưởng của vi sinh vật

Nấm *Mucor lusitanicus* được nuôi cấy ở 26°C trong điều kiện chiếu sáng liên tục. Các chủng nấm được nuôi trên môi trường MMC (casamino acids 10 g/L, yeast nitrogen base w/o amino acids 0,5 g/L, glucose 20 g/L), YPG (cao nấm men 10 g/L, glucose 20 g/L, peptone 20 g/L). Môi trường có thể được bổ sung uridine (200 µg/mL) hoặc leucine (20 µg/mL) tùy theo mục đích thí nghiệm.

Đánh giá *in vivo* khả năng gây bệnh của các chủng nấm đột biến

Khả năng gây bệnh của các chủng nấm đột biến được đánh giá trên động vật mô hình là ấu trùng bướm *G. mellonella* bằng cách gây nhiễm trực tiếp. Các ấu trùng bởi dịch bào tử theo quy trình đã được mô tả bởi Kelly and Kavanagh (2011).

Các chủng nấm *M. lusitanicus* khác nhau bao gồm các chủng đối chứng (R7B) và các chủng đột biến ($\Delta m211$ và $\Delta m212$) được nuôi cấy trên môi trường đĩa thạch YPG pH 4,5 để thu bào tử. Bào tử được ly tâm (10 rpm trong 5 phút) và rửa 2 lần bằng đệm PBS với nồng độ bào tử được điều chỉnh phù hợp với từng thí nghiệm. Mật độ bào tử được tính toán sử dụng buồng đếm hồng cầu (Neubauer) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Ấu trùng *G. mellonella* được chọn cho thí nghiệm là những ấu trùng khỏe mạnh, nặng khoảng 250-350 mg, chiều dài đạt khoảng 2 cm. Ấu trùng được gây nhiễm nấm *M. lusitanicus* bằng cách tiêm trực tiếp dịch bào tử nấm qua vị trí chân giả cuối cùng bên trái với lượng tiêm 10 µL, sử dụng kim tiêm chuyên dụng. Các nhóm ấu trùng *G. mellonella* đối chứng gồm (1) nhóm ấu trùng không tiêm và (2) nhóm ấu trùng được tiêm 10 µL dung dịch đệm PBS. Ấu trùng sau khi tiêm được đặt trong các đĩa Petri đã khử trùng có lót giấy lọc Whatman ẩm, giữ trong bóng tối ở hai điều kiện nhiệt độ 26°C hoặc 30°C.

Để xác định được lượng bào tử *M. lusitanicus* gây nhiễm thích hợp cho thí nghiệm đánh giá khả năng gây bệnh của các chủng nấm, bào tử của chủng R7B với số lượng 5×10^3 , 10^4 hoặc 10^5 (bào tử/ mL) lần lượt được tiêm vào các nhóm ấu trùng *G. mellonella* khác nhau. Thí nghiệm được lặp lại 2 lần với mỗi lần gồm 2 nhóm \times 5 lô/nhóm \times 10 ấu

trùng/lô với 3 lô ấu trùng bị gây nhiễm và 2 lô đối chứng, nuôi ở 26°C và 30°C. Số lượng ấu trùng sống sót được theo dõi và ghi nhận tại mỗi 24 h trong vòng 168 h sau tiêm. Tỷ lệ ấu trùng sống sót (%) sau mỗi 24 h được tính theo công thức sau:

$$\text{Tỷ lệ sống sót (\%)} = \frac{\text{Số lượng ấu trùng còn sống sót}}{10} \times 100\%$$

Lượng bào tử gây nhiễm thích hợp được xác định là liều tiêm mà tại đó ít nhất 90% ấu trùng bị nhiễm nấm và chết (LD₉₀). Dịch phân lập từ mô vết bệnh (phần bị hóa đen) của các ấu trùng chết trong thí nghiệm được nuôi cấy trên đĩa thạch YPG pH 4,5. Ấu trùng được xác định là bị nhiễm *M. lusitanicus* khi có sự xuất hiện của chủng R7B của loài nấm này trên môi trường phân lập.

Sau khi xác định được lượng bào tử gây nhiễm thích hợp, thí nghiệm đánh giá khả năng gây bệnh của các chủng nấm đột biến loại bỏ gen myosin II gồm Mc19 ($\Delta m211$) và Mc20 ($\Delta m212$) so với chủng đối chứng (R7B) được thiết kế và tiến hành theo quy trình đã nêu. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần và bước phân lập được tiến hành sau mỗi thí nghiệm trên các môi trường thích hợp để đảm bảo ấu trùng đã được gây nhiễm với đúng từng chủng nấm trong thí nghiệm.

Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu có được từ các thí nghiệm đánh giá các chỉ tiêu sinh trưởng và khả năng gây bệnh của các chủng nấm đột biến trong nghiên cứu này được lưu trữ, phân tích và minh họa bằng phần mềm Microsoft Excel và Origin 2021b. Kiểm định ANOVA hai chiều ($p < 0,05$) cùng với phân tích Turkey được áp dụng để xử lý số liệu và xác định các sai khác có ý nghĩa thống kê.

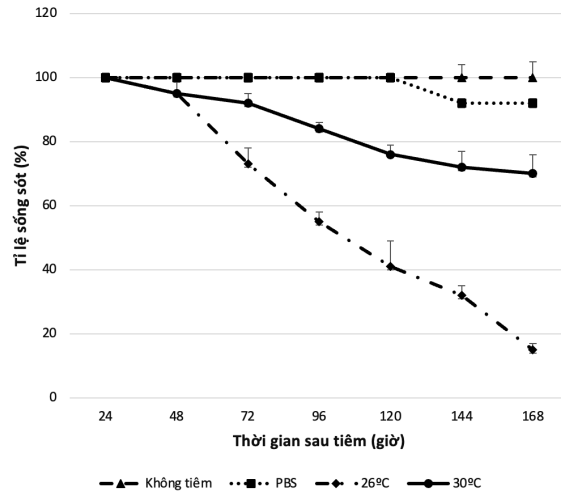
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định nhiệt độ nuôi thích hợp

Nấm *M. lusitanicus* sinh trưởng thích hợp nhất tại 25-27°C, nhưng với ấu trùng *G. mellonella*, nhiệt độ thích hợp nhất là 30°C. Do đó, hai điều kiện nhiệt độ khác nhau được lựa chọn để thử nghiệm là 26°C và 30°C. Sau khi tiêm cùng một lượng bào tử (10⁴ bào tử/ liều tiêm), các lô thí nghiệm được theo dõi và đếm số ấu trùng còn sống trong thời gian 7 ngày. Kết quả được thể hiện trong đồ thị ở Hình 1.

Có thể thấy nhiệt độ có ảnh hưởng lớn đến khả năng gây độc của *M. lusitanicus* R7B. Theo đó, ở nhiệt độ 26°C, chủng nấm này thể hiện độc lực đối với ấu trùng *G. mellonella* cao hơn đáng kể, khi tỷ lệ

sống sót của cả 3 lô ấu trùng thí nghiệm trong điều kiện 26°C đều thấp hơn nhiều so với các nhóm được nuôi ở mức nhiệt độ 30°C. Ngược lại, khả năng gây bệnh của nấm giảm đi trong điều kiện nhiệt độ cao hơn, đặc biệt là ở nhóm ấu trùng gây nhiễm với lượng bào tử thấp. Cụ thể, sau 168 h, tỷ lệ sống sót trung bình của các nhóm ấu trùng bị gây nhiễm với bào tử ở 30°C đạt khoảng 70%, so với xấp xỉ 18% của các nhóm ấu trùng bị gây nhiễm được nuôi ở điều kiện nhiệt độ 26°C (Hình 1). Như vậy, nhiệt độ phù hợp cho thí nghiệm này ở mức 26°C.



Hình 1. Tỷ lệ sống sót (%) của ấu trùng *G. mellonella* sau gây nhiễm với 10⁴ bào tử nấm *M. lusitanicus*

3.2. Xác định lượng bào tử/liều tiêm

Để xác định được lượng bào tử *M. lusitanicus* gây nhiễm thích hợp cho thí nghiệm đánh giá khả năng gây bệnh của các chủng nấm, bào tử của chủng đại R7B với số lượng 5×10³, 10⁴ hoặc 10⁵ lần lượt đã được tiêm vào các nhóm ấu trùng *G. mellonella* khác nhau.

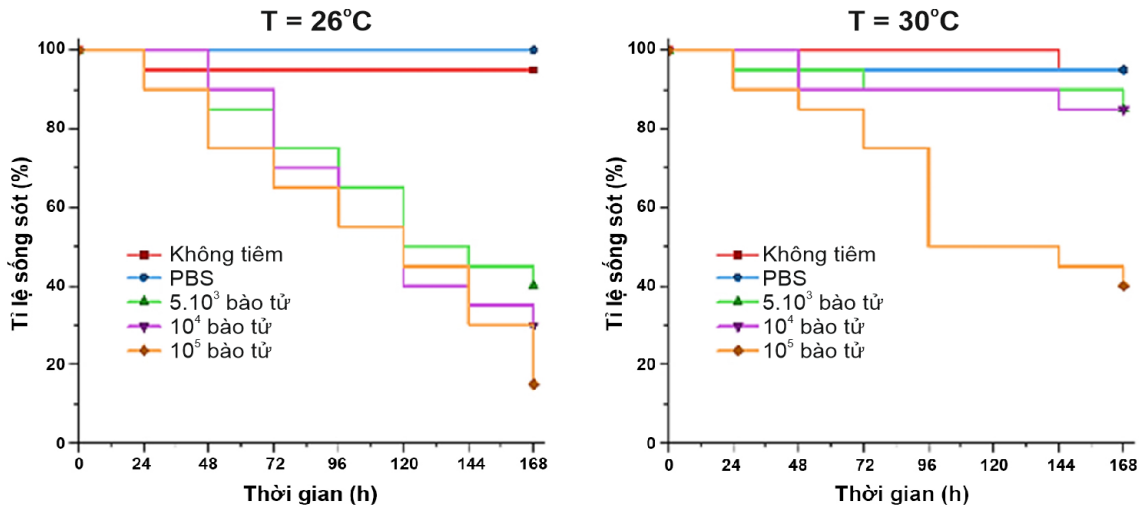
Như đã mô tả, thí nghiệm được lặp lại 2 lần, mỗi lần gồm 2 nhóm × 5 lô/nhóm × 10 ấu trùng/lô với 3 lô ấu trùng bị gây nhiễm và 2 lô đối chứng; hai nhóm được nuôi ở hai điều kiện nhiệt độ khác nhau là 26°C và 30°C. Số lượng ấu trùng sống sót được theo dõi và ghi nhận tại mỗi 24h trong vòng 168h sau tiêm. Tỷ lệ ấu trùng sống sót (%) sau mỗi 24h đã được đánh giá thống kê.

Kết quả thí nghiệm đánh giá khả năng gây bệnh của *M. lusitanicus* được thể hiện ở Bảng 1 và biểu đồ Hình 2.

Bảng 1. Số lượng ấu trùng *G. mellonella* sống sót khi bị gây nhiễm với dịch bào tử *M. lusitanicus* chủng R7B ở nhiệt độ 26°C và 30°C

Nhiệt độ (°C)	Thí nghiệm	Thời gian nuôi cấy (giờ)						
		24	48	72	96	120	144	168
T=26°C	Không tiêm	9,5±0,5 ^{ab}	9,5±0,5 ^{ab}	9,5±0,5 ^{ab}	9,5±0,5 ^{ab}	9,5±0,5 ^{ab}	9,5±0,5 ^{ab}	9,5±0,5 ^{ab}
	PBS	10,0 ^a	10,0 ^a	10,0 ^a	10,0 ^a	10,0 ^a	10,0 ^a	10,0 ^a
	5x10 ³ bào tử	10,0 ^a	8,5±0,5 ^{abcd}	7,5±0,5 ^{bcde}	6,5±0,5 ^{defg}	5,0 ^{fghi}	4,5±0,5 ^{ghi}	4,0 ^{hi}
	10 ⁴ bào tử	10,0 ^a	9,0 ^{abc}	7,0±1,0 ^{cf}	5,5±0,5 ^{efgh}	4,0 ^{hi}	3,5±0,5 ^{hij}	3,0 ^{ij}
	10 ⁵ bào tử	9,0±1,0 ^{abc}	7,5±0,5 ^{bcde}	6,5±0,5 ^{defg}	5,5±0,5 ^{efgh}	4,5±0,5 ^{ghi}	3,0 ^{ij}	1,5±0,5 ^j
T=30°C	Không tiêm	10,0 ^a	10,0 ^a	10,0 ^a	10,0 ^a	10,0 ^a	9,5±0,5 ^{ab}	9,5±0,5 ^{ab}
	PBS	10,0 ^a	9,5±0,5 ^{ab}	9,5±0,5 ^{ab}	9,5±0,5 ^{ab}	9,5±0,5 ^{ab}	9,5±0,5 ^{ab}	9,5±0,5 ^{ab}
	5x10 ³ bào tử	9,5±0,5 ^{ab}	9,5±0,5 ^{ab}	9,0 ^{abc}	9,0 ^{abc}	9,0 ^{abc}	9,0 ^{abc}	8,5±0,5 ^{abcd}
	10 ⁴ bào tử	10,0 ^a	9,0±1,0 ^{abc}	9,0±1,0 ^{abc}	9,0±1,0 ^{abc}	9,0±1,0 ^{abc}	8,5±0,5 ^{abcd}	8,5±0,5 ^{abcd}
	10 ⁵ bào tử	9,0 ^{abc}	8,5±0,5 ^{abcd}	7,5±0,5 ^{bcde}	5,0 ^{gh}	5,0 ^{gh}	4,5±0,5 ^{ghi}	4,0 ^{hi}

Ghi chú: Số liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (n=2).



Hình 2. Tỷ lệ sống sót của ấu trùng *G. mellonella* sau gây nhiễm với bào tử nấm *M. lusitanicus* chủng R7B ở nhiệt độ 26°C và 30°C

Về lượng bào tử gây nhiễm, kết quả thí nghiệm cho thấy trong cả hai điều kiện nhiệt độ, độc lực của *M. lusitanicus* chủng R7B là cao nhất ở lượng tiêm 10⁵ bào tử, thể hiện qua tỷ lệ sống sót trung bình của ấu trùng *G. mellonella* sau khi bị gây nhiễm 168 h ở 26°C và 30°C lần lượt là 15% và 40%. Ở nhiệt độ 26°C, khả năng gây bệnh của bào tử nấm chủng R7B ở các lượng gây nhiễm 5x10³ và 10⁴ cũng là tương đối cao khi tỷ lệ sống sót của ấu trùng ở hai nhóm này chỉ đạt 40% và 30%. Về mặt thời gian, sự khác biệt có ý nghĩa về số lượng ấu trùng sống sót giữa các nhóm thí nghiệm so với hai nhóm đối chứng xuất hiện trong khoảng từ 48 h đến 72 h sau thời điểm gây nhiễm. Trong khi đó, ở nhiệt độ 30°C,

không có sự khác biệt rõ ràng về số lượng ấu trùng sống sót ở các nhóm bị gây nhiễm với lượng bào tử thấp hơn (5.10³ và 10⁴) so với các nhóm đối chứng; chỉ có nhóm ấu trùng bị gây nhiễm với lượng 10⁵ bào tử là thể hiện sự sai khác với các nhóm còn lại kể từ thời điểm 96 h sau gây nhiễm (Bảng 1).

Nguyên nhân chính dẫn tới các kết quả trên có thể là do sự khác nhau về khoảng giới hạn nhiệt độ giữa hai loài sinh vật sử dụng trong thí nghiệm. *M. lusitanicus* mặc dù là sinh vật có giới hạn nhiệt rộng, nhưng tốc độ sinh trưởng và khả năng sinh bào tử của loài nấm này lại suy giảm khá rõ rệt khi ở ngoài khoảng nhiệt độ cực thuận là 25-27°C (Hussain, 2019) và có liên quan chặt chẽ đến khả năng gây

bệnh của nấm. Mặt khác, nhiệt độ phù hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của ấu trùng *G. mellonella* là ở 30°C (Brennan et al., 2002), bởi vậy chúng có thể có khả năng miễn dịch mạnh mẽ hơn và nhờ đó tỉ lệ sống sót của ấu trùng bị nhiễm nấm ở nhiệt độ này cao hơn hẳn so với ở mức nhiệt 26°C.

Dựa vào các kết quả và phân tích có được, lượng gây nhiễm được chọn cho các thí nghiệm đánh giá khả năng gây bệnh của các chủng nấm đột biến đối với ấu trùng *G. mellonella* là 10⁴ bào tử trong lượng dung dịch tiêm 10 µL trong điều kiện 26°C.

3.3. Thử nghiệm đối với đột biến xóa gen myosin II ở nấm *M. lusitanicus*

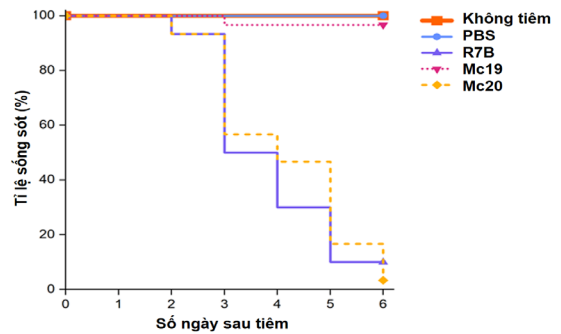
Myosin là một trong những họ protein đã được xác định có vai trò trong việc kiểm soát kiểu hình hệ sợi và khả năng gây bệnh của nấm *Mucor* (Trieu et al., 2017). Để nghiên cứu vai trò của myosin II ở *M. lusitanicus*, hai dòng đột biến xóa hai gen Mc19 và Mc20 tương ứng với hai gen *m211* và *m212* thuộc họ myosin II đã được tạo ra. Để thử nghiệm điều kiện thí nghiệm đã được xác định đối với các đột biến xóa gen này ở nấm *M. lusitanicus*, 10⁴ bào tử trong lượng dung dịch tiêm 10 µL, điều kiện nhiệt độ 26°C đã được áp dụng. Kết quả so sánh khả năng gây bệnh của chủng nấm dại với các chủng nấm đột biến được thể hiện ở đồ thị hình 3.

Kết quả cho thấy các thí nghiệm đối chứng âm (không tiêm và tiêm bằng dung dịch PBS) đều không ảnh hưởng đến khả năng sống của ấu trùng. Đối chứng dương sử dụng chủng R7B gây chết khoảng 90% ấu trùng sâu *G. mellonella* sau 6 ngày sau tiêm. Trong 2 dòng đột biến xóa gen Mc19 ($\Delta m211$) và Mc20 ($\Delta m212$), chủng Mc19 gần như mất khả năng gây bệnh (tương đương đối chứng âm). Trong khi chủng Mc20 gần như không bị suy giảm khả năng gây bệnh. Kết quả này cho thấy hai gen *m211* và *m212* tuy có trình tự tương đồng cao nhưng vai trò của chúng khác nhau đối với độc lực của *M. lusitanicus*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Brennan, M., Thomas, D. Y., Whiteway, M., & Kavanagh, K. (2002). Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 34(2), 153-157. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2002.tb00617.x>

Hussain SA, N. Y., Hameed A, Yang W, Mustafa K, Song Y. (2019). Optimization of Diverse Carbon Sources and Cultivation Conditions for Enhanced Growth and Lipid and Medium-Chain Fatty Acid (MCFA) Production by *Mucor circinelloides*.



Hình 3. Tỉ lệ sống sót của ấu trùng *G. mellonella* sau gây nhiễm với bào tử nấm *M. lusitanicus* kiểu dại và đột biến ở nhiệt độ 26°C

R7B: chủng kiểu dại, Mc19 và Mc20: hai dòng nấm đột biến xóa gen mã hóa myosin II

Kết quả trên cho thấy điều kiện thí nghiệm đã xác định có thể được ứng dụng trong các nghiên cứu đánh giá khả năng gây bệnh của các chủng nấm *M. lusitanicus* với điều kiện 10⁴ bào tử trong lượng dung dịch tiêm 10 µL, điều kiện nhiệt độ 26°C.

4. KẾT LUẬN

Từ các kết quả nghiên cứu trên, có thể rút ra kết luận điều kiện thí nghiệm thích hợp nhằm đánh giá khả năng gây bệnh của nấm *M. lusitanicus* trên đối tượng ấu trùng *G. mellonella* với 10⁴ bào tử trong lượng dung dịch tiêm 10µL/ ấu trùng, điều kiện nhiệt độ 26°C. Kết quả này có thể được áp dụng trong các thí nghiệm nhằm đánh giá khả năng gây bệnh nhiễm trùng vì nấm trên đối tượng động vật mô hình. Hướng nghiên cứu này sẽ tiếp tục được mở rộng với các loại nấm gây bệnh khác nhau nhằm có thể đưa ra khuyến cáo và hướng dẫn cho các nghiên cứu khác.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106.02-2018.345.

Fermentation, 5(2), 35.

<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/fermentati on5020035>

Jorjao, A. L., de Oliveira, F. E., Leao, M. V. P., Jorge, A. O. C., & de Oliveira, L. D. (2018). Effect of *Lactobacillus rhamnosus* on the response of *Galleria mellonella* against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* infections. *Arch Microbiol*, 200(3), 383-389. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1441-7>

- Kavanagh, K., & Sheehan, G. (2018). The Use of *Galleria mellonella* Larvae to Identify Novel Antimicrobial Agents against Fungal Species of Medical Interest. *J Fungi (Basel)*, 4(3), 113. <https://doi.org/10.3390/jof4030113>
- Kelly, J., & Kavanagh, K. (2011). Caspofungin primes the immune response of the larvae of *Galleria mellonella* and induces a non-specific antimicrobial response. *J Med Microbiol*, 60(2), 189-196. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.025494-0>
- Lange, A., Beier, S., Huson, D. H., Parusel, R., Iglauer, F., & Frick, J. S. (2018). Genome Sequence of *Galleria mellonella* (Greater Wax Moth). *Genome Announc*, 6(2). <https://doi.org/10.1128/genomeA.01220-17>
- Lee, S. H., Son, Y. G., Sohn, S. S., & Ryu, S. W. (2014). Successful treatment of invasive gastric mucormycosis in a patient with alcoholic liver cirrhosis: A case report. *Exp Ther Med*, 8(2), 401-404. <https://doi.org/10.3892/etm.2014.1753>
- Lopez-Fernandez, L., Sanchis, M., Navarro-Rodriguez, P., Nicolas, F. E., Silva-Franco, F., Guarro, J., Garre, V., Navarro-Mendoza, M. I., Perez-Arques, C., & Capilla, J. (2018). Understanding *Mucor circinelloides* pathogenesis by comparative genomics and phenotypical studies. *Virulence*, 9(1), 707-720. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1435249>
- Marr, K. A., Carter, R. A., Crippa, F., Wald, A., & Corey, L. (2002). Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis*, 34(7), 909-917. <https://doi.org/10.1086/339202>
- Nicolas, F. E., Torres-Martinez, S., & Ruiz-Vazquez, R. M. (2003). Two classes of small antisense RNAs in fungal RNA silencing triggered by non-integrative transgenes. *EMBO J*, 22(15), 3983-3991. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg384>
- Ribes, J. A., Vanover-Sams, C. L., & Baker, D. J. (2000). Zygomycetes in human disease. *Clin Microbiol Rev*, 13(2), 236-301. <https://doi.org/10.1128/cmr.13.2.236-301.2000>
- Trieu, T. A., Navarro-Mendoza, M. I., Perez-Arques, C., Sanchis, M., Capilla, J., Navarro-Rodriguez, P., Lopez-Fernandez, L., Torres-Martinez, S., Garre, V., Ruiz-Vazquez, R. M., & Nicolas, F. E. (2017). RNAi-Based Functional Genomics Identifies New Virulence Determinants in Mucormycosis. *PLoS Pathog*, 13(1), e1006150. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006150>
- Vellanki, S., Billmyre, R. B., Lorenzen, A., Campbell, M., Turner, B., Huh, E. Y., Heitman, J., & Lee, S. C. (2020). A Novel Resistance Pathway for Calcineurin Inhibitors in the Human-Pathogenic Mucorales *Mucor circinelloides*. *MBio*, 11(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.02949-19>