

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT MULTIPLEX PCR TRONG CHẨN ĐOÁN PHÁT HIỆN NẤM *Candida Spp.* PHÂN LẬP TỪ BỆNH PHẨM TẠI MỘT SỐ BỆNH VIỆN TẠI THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

Nguyễn Hiếu*

TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành trên mẫu bệnh phẩm của những bệnh nhân được chẩn đoán nhiễm nấm *Candida spp.* tại các bệnh viện và ứng dụng phương pháp và nồng độ các thành phần trong nghiên cứu của PGS.TS Nguyễn Tú Anh về kỹ thuật multiplex PCR trong chẩn đoán nhiễm nấm *Candida spp.*, trên mẫu bệnh phẩm. Tiến hành kỹ thuật multiplex PCR, trên 10 mẫu bệnh phẩm cho kết quả 3 mẫu cho sản phẩm PCR có kích thước ~606 bp tương đương với băng DNA của *Candida albicans*. 3 mẫu cho sản phẩm PCR có kích thước ~126 bp tương đương với băng DNA của *Candida tropicalis*. 3 mẫu cho sản phẩm PCR có kích thước ~490 bp tương đương với băng DNA của *Candida parapsilosis*. 1 mẫu cho sản phẩm PCR có kích thước ~212 bp tương đương với băng DNA của *Candida glabrata*. 10 chủng vi nấm được định danh bằng kỹ thuật giải trình tự, trong đó xác định có 3 mẫu thuộc loài *Candida albicans* với độ tương đồng 97,92 - 99,50%; 3 mẫu thuộc loài *Candida tropicalis* với độ tương đồng 97,27 - 100%; 3 mẫu thuộc loài *Candida parapsilosis* với độ tương đồng 99,17 - 99,79%; 1 mẫu thuộc loài *Candida glabrata* với độ tương đồng 100%.

ABSTRACT

The study was carried out on specimens from patients diagnosed with *Candida spp* from hospitals and applying methods and concentrations of ingredients in Associate Professor Dr. Nguyen Tu Anh's research on multiplex technique PCR in diagnosing *Candida spp.* infection, on clinical specimens. Conducting multiplex PCR technique, on 10 specimens, 3 samples yielded PCR products with a size of ~606 bp, similar to the DNA band of *Candida albicans*, 3 samples yielded PCR products with a size of ~126 bp, similar to the DNA band of *Candida tropicalis*, 3 samples gave PCR products with a size of ~490 bp, similar to the DNA band of *Candida parapsilosis*. and 1 PCR product sample has a size of ~212 bp, similar to the DNA band of *Candida glabrata*. 10 fungal strains were identified by sequencing technique, of which 3 samples were determined to belong to *Candida albicans* species with 97.92 - 99.50% similarity; 3 samples belong to *Candida tropicalis* species with similarity 97.27 - 100%; 3 samples belong to *Candida parapsilosis* species with similarity 99.17 - 99.79%; 1 sample belongs to *Candida glabrata* species with 100% similarity.

Title: Application of Multiplex PCR technique in diagnosis and detection of *Candida spp.* isolated from specimen at some hospital in Ho Chi Minh City

Từ khóa: *Candida spp.*, multiplex PCR

Keywords: *Candida spp.*, multiplex PCR

Lịch sử bài báo

Ngày nhận bài: 21/05/2024

Ngày nhận kết quả bình duyệt: 09/07/2024

Ngày chấp nhận đăng bài: 09/07/2024

Tác giả: *Trường Đại học Yersin Đà Lạt

Email: hieun@yersin.edu.vn

Đặt vấn đề

Hiện nay, các phương pháp chẩn đoán sinh học phân tử có nhiều ưu điểm trong phát hiện, định danh tác nhân vi sinh vật gây bệnh. Trong đó phương pháp multiplex PCR đang được phát triển để chẩn đoán nhiều tác nhân gây bệnh trong cùng một phản ứng sử dụng nhiều cặp mồi đặc hiệu khác nhau. Đặc biệt trong trường hợp bệnh nhân nhiễm nấm xâm lấn thường có tiên lượng xấu, tỉ lệ tử vong cao, vì vậy chẩn đoán xác định được tác nhân gây bệnh sẽ góp phần vào việc sử dụng thuốc hợp lý, an toàn và hiệu quả, nhằm mang lại những đáp ứng lâm sàng tốt và tối ưu hóa hiệu quả điều trị, cũng như giảm tỉ lệ tử vong của bệnh nhân.

1. Tổng quan và phương pháp nghiên cứu

1.1. Tổng quan nghiên cứu

Candida spp. là một tác nhân phổ biến gây nhiễm trùng máu bệnh viện chiếm 8–10% các ca bệnh. Đặc biệt ở bệnh nhân mắc hội chứng suy giảm miễn dịch (AIDS) khi mà cơ thể mất đi cơ chế tự bảo vệ cơ thể khỏi tác nhân gây bệnh, nhiễm *Candida* hầu họng, thực quản và âm đạo là ba dạng nhiễm trùng phổ biến. Kết quả từ một nghiên cứu ở Hồng Kông cho thấy tỷ lệ nhiễm nấm *Candida* hầu họng và âm đạo ở phụ nữ nhiễm HIV lần lượt là 9% và 28%. Từ những số liệu trên, nhận thấy nhiễm trùng bệnh viện do *Candida* là vấn đề nghiêm trọng ở các cơ sở y tế chăm sóc sức khỏe và tác nhân gây bệnh không còn giới hạn ở *Candida albicans*. Khoảng 15 loài *Candida* gây bệnh phổ biến ở người, bao gồm *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*,... được phân lập được từ

mẫu bệnh phẩm của bệnh nhân và hơn 1/3 tác nhân gây bệnh là những loài non-*albicans Candida* (NAC). Mặc dù *Candida albicans* vẫn là tác nhân gây bệnh phổ biến nhất nhưng tỷ lệ đang giảm dần và sự xuất hiện của ngày càng nhiều loài gây bệnh NAC là một vấn đề đáng lo ngại. Trong đó, có 4 loài NAC gây bệnh phổ biến ở người là *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*.

Bảng 1. Các loại *Candida* spp. gây nhiễm trùng

Loài	Tỷ lệ
<i>Candida albicans</i>	50%
<i>Candida tropicalis</i>	15–30%
<i>Candida parapsilosis</i>	15–30%
<i>Candida glabrata</i>	15–30%
<i>Candida krusei</i>	~1%
Loài khác	~1%

1.2. Sinh bệnh học

Là tác nhân gây nhiễm nấm phổ biến nhất ở người, *Candida albicans* có thể gây nhiễm trùng nhẹ ở ngoài da, niêm mạc, bộ phận sinh dục hay xâm nhập vào máu làm nhiễm trùng toàn thân đe dọa đến tính mạng của bệnh nhân. Nhiễm trùng nấm *Candida* có thể ở mọi lứa tuổi và thường với người bệnh có những yếu tố nguy cơ: sử dụng kháng sinh phổ rộng trong thời gian dài, tổn thương da hoặc niêm mạc đường tiêu hóa, suy giảm miễn dịch. Ở điều kiện bình thường, *Candida albicans* là một phần của hệ vi sinh vật sống cộng sinh trên bề mặt da và hệ vi sinh đường ruột. Tuy nhiên, *Candida albicans* có thể dễ dàng trở thành mầm bệnh khi hệ miễn dịch vật chủ bị suy yếu đặc biệt là khả năng xâm nhập sâu vào mô và hệ cơ quan của người bệnh gây ra nhiễm trùng bệnh viện.

1.3. Một số bệnh lý nhiễm trùng do *Candida spp.*

Nhiễm nấm *Candida spp.* âm đạo

Ở điều kiện thuận lợi, nấm *Candida* hay cụ thể là *Candida albicans* phát triển quá mức trong bộ phận sinh dục nữ gây ra viêm âm đạo, tình trạng này thường gặp ở nữ giới trong độ tuổi sinh sản. Nghiên cứu cho thấy khoảng 75% nữ giới đã từng mắc chứng viêm âm hộ do *Candida* ít nhất 1 lần trong đời, 20% nữ giới ở độ tuổi từ 15-55 có *Candida albicans* trong âm đạo mà không có bất kỳ triệu chứng nào.

Nhiễm nấm *Candida spp.* ở miệng, cổ họng và thực quản

Bệnh nấm miệng do *Candida* hay còn gọi là bệnh tưa miệng là một tình trạng bệnh lý nhiễm trùng nấm phổ biến nhất là ở người già và trẻ nhỏ. Sự phát triển quá mức của *Candida spp.* trong khoang miệng dẫn đến nhiễm trùng là nguyên nhân phát sinh bệnh. Trong đó, *Candida albicans* tiếp tục là loài nấm chiếm phần lớn ca nhiễm. Sự phát triển quá mức của những loài nấm này tạo ra các mảng trắng trên má trong, lưỡi, vòm miệng, cổ họng và thường gây ra cảm giác khó chịu ảnh hưởng đến chất lượng cuộc sống của bệnh nhân như khó chịu, thay đổi vị giác, khó nuốt đến hay thậm chí dẫn đến nhập viện.

Nhiễm nấm *Candida spp.* xâm lấn

Ở người có yếu tố nguy cơ, *Candida spp.* có thể xâm nhập vào máu và cơ quan nội tạng gây ra nhiễm trùng được gọi là *Candida* xâm lấn chẳng hạn như áp xe ổ bụng, viêm phúc mạc, viêm tủy xương. *Candida* xâm lấn là nguyên nhân chính gây bệnh và tử vong trong bệnh viện, phòng khám. Tỷ lệ tử vong được ghi nhận ở bệnh

nhân nhiễm trùng *Candida* toàn thân là 71-79%. Những nhóm bệnh nhân có nguy cơ cao đối với *Candida* xâm lấn gồm: bệnh nhân chăm sóc đặc biệt (ICU) thời gian dài, bệnh nhân suy giảm miễn dịch, bệnh nhân mới trải qua phẫu thuật, bệnh nhân đặt ống thông tĩnh mạch, bệnh nhân được chỉ định sử dụng kháng sinh phổ rộng trong thời gian dài.

1.4. Các phương pháp phát hiện nấm *Candida spp.*

1.4.1. Các phương pháp nuôi cấy

Các phương pháp định danh *Candida* truyền thống dựa trên các đặc điểm về hình thái và đặc điểm sinh lý đặc trưng để phân biệt giữa các loài với nhau bao gồm các thử nghiệm: tạo ống mầm, tạo bào tử bao dày, lên men carbohydrate, đồng hóa carbon và nitơ, định danh *Candida spp* bằng môi trường sinh sắc tố như CHROMagar. Các phương pháp có một số nhược điểm: chủng *Candida* cần được phân lập trước trên môi trường thích hợp, thời gian thực hiện thử nghiệm dài từ vài ngày đến vài tuần nếu tiến hành trên lượng mẫu lớn, cần lượng lớn hóa chất, dụng cụ, người thực hiện thử nghiệm phải có kinh nghiệm, kết quả phụ thuộc vào nhận định chủ quan của người đọc kết quả.

1.4.2. Kỹ thuật PCR

Phản ứng chuỗi polymerase hay PCR là kỹ thuật được phát triển bởi Kary Mullis vào năm 1985. Kỹ thuật này cho phép khuếch đại đoạn DNA cho số lượng lớn bản sao trong thời gian ngắn nhờ hoạt động của DNA polymerase với các thành phần: DNA khuôn mẫu, DNA polymerase, các đoạn mồi, dNTPs. Sản phẩm PCR được tách bằng phương pháp điện di trên gel agarose và quan sát dưới ánh sáng tử ngoại.

1.4.3. Sản phẩm PCR được phát hiện dựa trên phương pháp điện di trên gel agarose

Phương pháp điện di trên gel agarose được sử dụng để tách hỗn hợp các phân tử có kích thước lớn như DNA, RNA hay protein dựa nhờ điện trường và sự khác nhau về kích thước.

Nguyên lý hoạt động của kỹ thuật điện di: phân tử DNA được cấu tạo từ các nucleobase được nối với nhau bởi khung sườn (backbone) từ đường dideoxybose và một nhóm phosphate mang điện tích âm. Chính điện tích âm này giúp DNA di chuyển về phía cực dương trong quá trình điện di

1. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu.

2.1. Đối tượng nghiên cứu

10 mẫu vi nấm được phân lập từ bệnh phẩm của bệnh nhân điều trị tại các khoa lâm sàng bệnh viên Đại học Y Dược TP.HCM, bệnh viện Lê Văn Thịnh, bệnh viện 175 nhiễm vi nấm. Các chủng vi nấm được định danh bằng phương pháp Multiplex PCR tại khoa Dược, Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh. Vi nấm được bảo quản trong môi trường chứa 10% glycerol, ở -40 °C.

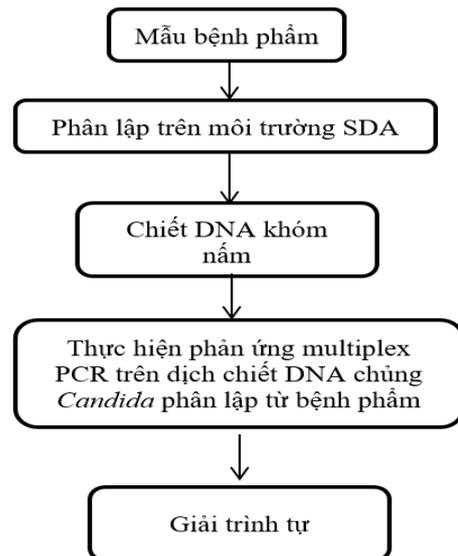
Nấm *Saccharomyces cerevisiae* sử dụng làm chứng âm trong phản ứng PCR do Bộ môn Bộ Môn Vi sinh- Ký sinh, Khoa Dược - Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh cung cấp

Bảng 2.1. Danh sách mẫu bệnh phẩm thu nhận từ các bệnh viện

TT	Mã số	Mẫu bệnh phẩm	Khoa/phòng
1	175.DOB.13	Dịch ổ bụng	Khoa xét nghiệm

2	YD.BL.16	Máu	Khoa xét nghiệm
3	LVT.HT.04	Huyết trắng	Khoa phụ sản
4	175.DA.09	Đàm	Khoa khám bệnh
5	175.NT.05	Nước tiểu	Khoa khám bệnh
6	LVT.M.05	Máu	Khoa xét nghiệm
7	YD.DA.15	Đàm	Khoa khám bệnh
8	175.CCT.21	Chân catheter	ICU khoa tim mạch
9	175.NT.15	Nước tiểu	Khoa khám bệnh
10	YD.DA.52	Đàm	Khoa khám bệnh

2.2. Phương pháp nghiên cứu



Các mẫu bệnh phẩm được thu thập và tiến hành nghiên cứu theo sơ đồ dưới đây (Hình 3.1).

Hình 2.1. Các bước tiến hành nghiên cứu

Các thành phần phản ứng PCR theo nghiên cứu của nhóm tác giả Nguyễn Tú Anh.

Bảng 2.2. Thành phần multiplex PCR

Thành phần	Nồng độ	Thể tích (µl)
Dung dịch đệm PCR	10 X	2,2
MgSO ₄	25 mM	0,6
Taq DNA polymerase	5 UI/µl	0,3
dNTP	10 mM	0,5
Mồi F _{alb}	5 pmol	0,3
Mồi R _{alb}	5 pmol	0,5
Mồi F _{tro}	5 pmol	0,3
Mồi F _{para}	5 pmol	0,6
Mồi R _{para}	5 pmol	0,6
Mồi F _{gla}	5 pmol	0,3
Mồi R _{gla}	5 pmol	0,3
Dịch chiết DNA từ <i>Candida</i>		1
Nước khử khoáng	Vừa đủ	25

Bảng 2.3. Chương trình Multiplex PCR

Giai đoạn	Nhiệt độ	Thời gian
Biến tính ban đầu	95 °C	5 phút
Biến tính	95 °C	30 giây
Gắn mồi	59 °C	30 giây
Kéo dài mồi	72 °C	30 giây
Kéo dài	72 °C	8 phút

3. Kết quả PCR và giải trình tự

3.1. Kết quả điện di sản phẩm PCR

Từ kết quả thành phần và chu trình nhiệt phản ứng multiplex PCR, tiến hành thực hiện phản ứng multiplex PCR phát hiện *Candida spp.* với dịch chiết DNA từ 10 mẫu bệnh phẩm và so sánh sản phẩm điện di với các băng DNA chuẩn theo hướng dẫn của nhóm tác giả. *Saccharomyces cerevisiae* được sử dụng làm chứng âm trong phản ứng PCR.

- Chứng âm *Saccharomyces cerevisiae* không cho băng DNA.

- 3 mẫu 175.DOB.13, YD.BL.16, LVT.HT.04 cho sản phẩm PCR có kích thước

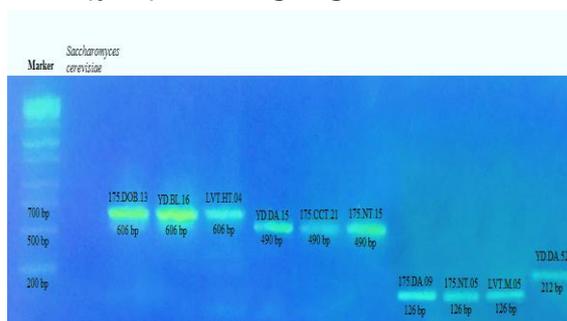
~606 bp tương đương với băng DNA của *Candida albicans*

- 3 mẫu 175.DA.09, 175.NT.05, LVT.M.05 cho sản phẩm PCR có kích thước ~126 bp tương đương với băng DNA của *Candida tropicalis*

- 3 mẫu YD.DA.15, 175.CCT.21, 175.NT.15 cho sản phẩm PCR có kích thước ~490 bp tương đương với băng DNA của *Candida parapsilosis*

- 1 mẫu YD.DA.52 cho sản phẩm PCR có kích thước ~212 bp tương đương với băng DNA của *Candida glabrata*

Kết quả phản ứng multiplex PCR sau khi chạy điện di trên gel agarose 2%



Hình 2.2. Sản phẩm PCR quan sát dưới UV 325 nm

Ưu điểm của phương pháp định danh *Candida* bằng kỹ thuật multiplex PCR so với định danh bằng phương pháp truyền thống:

- Dễ thực hiện, tự động hóa.
- Thời gian cho kết quả ngắn (<2 giờ).
- Chỉ cần sử dụng một lượng nhỏ khám nấm để chiết DNA vì vậy rút ngắn thời gian quá trình phân lập, tăng sinh khám nấm.
- Độ nhạy và độ đặc hiệu cao.

Kết quả định danh chính xác ít phụ thuộc vào ý kiến chủ quan của kỹ thuật viên

3.2. Kết quả giải trình tự

Sau khi tiến hành phản ứng multiplex PCR, sản phẩm được giải trình tự 2 chiều và xử lý bằng phần mềm DNA Star. Các trình tự này được so sánh với ngân hàng dữ liệu của

Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia Hoa Kỳ (NCBI). Kết quả:

Đối với các mẫu xác định *Candida albicans* sau khi PCR và điện di trên gel agarose:

- Trình tự mẫu 175.DOB.13 có tỷ lệ tương đồng với trình tự gen chủng *Candida albicans* CBS 562T là 99,50%

- Trình tự mẫu YD.BL.16 tương đồng với trình tự gen chủng *Candida albicans* clone 38g1 với tỷ lệ 97,92%

- Trình tự mẫu LVT.HT.04 có tỷ lệ tương đồng nucleotide với trình tự chủng *Candida albicans* TIMM 1768 chromosome R là 97,97%.

Đối với mẫu xác định *Candida tropicalis* sau khi PCR và điện di trên gel agarose:

- Trình tự mẫu 175.DA.09 có tỷ lệ tương đồng với trình tự gen chủng *Candida tropicalis* MYA-3404 chromosome R là 97,27%.

- Trình tự mẫu 175.NT.05 có tỷ lệ tương đồng với trình tự gen chủng *Candida tropicalis* MYA-3404 chromosome R là 99,09%.

- Trình tự mẫu LVT.M.05 100,00% tương đồng với trình tự *Candida tropicalis* partial 5S rRNA gene, NTS2 and ETS1, type strain CBS 94T.

Đối với mẫu xác định *Candida parapsilosis* sau khi PCR và điện di trên gel agarose:

- Trình tự mẫu YD.DA.15 có tỷ lệ tương đồng với trình tự *Candida parapsilosis* CDC317 annotated contig 006110 lần lượt là 99,39%.

- Trình tự mẫu 175.CCT.21 có tỷ lệ tương đồng với trình tự *Candida parapsilosis* CDC317 annotated contig 006110 là 99,79%.

- Trình tự mẫu 175.NT.15 có tỷ lệ tương đồng với trình tự *Candida parapsilosis* CDC317 annotated contig 006110 là 99,17%.

Đối với mẫu xác định *Candida glabrata* sau khi PCR và điện di trên gel agarose:

- Mẫu YD.DA.52 có trình tự tương đồng 100,00% với chủng *Candida glabrata* BG2 chromosome A.

Tỷ lệ tương đồng nucleotide để có thể định danh được ở mức độ loài, theo hướng dẫn của Viện Tiêu chuẩn Lâm sàng và Xét nghiệm (Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI) là $\geq 99,0\%$. Nhưng theo Nilsson và cộng sự thì tỷ lệ tương đồng nucleotide $>97\%$ ở vùng ITS có thể định danh ở mức độ loài, một nghiên cứu khác của Sugita cho kết quả: tỷ lệ tương đồng nucleotide 50-95% ở vùng IGS1 xấp xỉ với 99% tỷ lệ tương đồng nucleotide ở vùng ITS. Như vậy, chúng tôi có thể đưa ra kết luận: các chủng 175.DOB.13, YD.BL.16 và LVT.HT.04 là *Candida albicans*; các chủng 175.NT.05, 175.NT.05, LVT.M.05 là *Candida tropicalis*; các chủng YD.DA.15, 175.CCT.21, 175.NT.15 là *Candida parapsilosis*; và chủng YD.DA.52 là *Candida glabrata*. Từ kết quả giải trình tự trên cho thấy, kết quả của sản phẩm Multiplex PCR cho các băng DNA và nhận định kết quả chính xác ở cấp độ loài khi so sánh với kết quả giải trình tự để xác định *Candida* spp.

3.3 Kết luận

Hiện nay các phương pháp chẩn đoán phân tử đang được ứng dụng rộng rãi trong chẩn đoán các tác nhân gây bệnh, đặc biệt trong các bệnh nhiễm khuẩn do vi khuẩn và vi nấm. Nhằm góp phần tối ưu hóa hiệu quả điều trị, chi phí và tỉ lệ tử vong trên bệnh nhân nhiễm nấm xâm lấn. Phương pháp Multiplex PCR có thể khắc phục được các nhược điểm như: tốn thời gian, nhận định kết quả, độ chính xác và độ đặc hiệu thấp, phụ thuộc vào chủ quan của người của các phương pháp chẩn đoán truyền thống như nuôi cấy, phản ứng sinh hóa,...

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abu-Elteen K. , Abu-Alteen R. (1998). The prevalence of *Candida albicans* populations in the mouths of complete denture wearers. *The new microbiologica*. **21** (1), pp. 41-48.
- Aguin T. J. , Sobel J. D. (2015). Vulvovaginal candidiasis in pregnancy. *Current infectious disease reports*. **17** (6), pp. 30.
- Banerjee S. N., Emori T. G., Culver D. H. et al (1991). Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980–1989. *The American journal of medicine*. **91** (3), pp. S86-S89.
- Calderone R. , Clancy C. (2012). *Candida and candidiasis*, ASM Press. Washington, DC
- Chan K., Wong K. , Lee S. (1997). HIV Infection in Women: the Hong Kong Experience to date. *First Annual Scientific Meeting, Hong Kong Society for Infectious Disease. Hong Kong*.
- Fraser V. J., Jones M., Dunkel J. et al (1992). Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology, risk factors, and predictors of mortality. *Clinical infectious diseases*. **15** (3), pp. 414-421
- Magill S. S., Edwards J. R., Bamberg W. et al (2014). Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *New England Journal of Medicine*. **370** (13), pp. 1198-1208
- Nguyễn, T. A. , Lê, T. T. T., Phan, C. T. , Nguyễn, M. T., Nguyễn, T. N. Y., Tôn, H. D. , Trần, Q. V. , & Nguyễn, H. (2023). XÂY DỰNG QUY TRÌNH PHÁT HIỆN NẤM CANDIDA SPP. BẰNG PHƯƠNG PHÁP MULTIPLEX PCR. *Tạp Chí Y học Việt Nam*, 521(1).
- Pappas P. G., Lionakis M. S., Arendrup M. C. et al (2018). Invasive candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers*. **4** (1), pp. 1-20.
- Pfaller M. A. , Diekema D. J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical microbiology reviews*. **20** (1), pp. 133-163.
- Wages Jr J. (2005). Polymerase chain reaction. *Encyclopedia of Analytical Science*, pp. 243
- Williams D. W., Jordan R. P., Wei X.-Q. et al (2013). Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. *Journal of oral Microbiology*. **5** (1), pp. 224-34.
- Yapar N. (2014). Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Therapeutics and clinical risk management*. **10**, pp. 95