

# XÁC ĐỊNH LOÀI VI NẤM VÀ ĐÁNH GIÁ SỰ ĐỀ KHÁNG VỚI MỘT SỐ THUỐC KHÁNG NẤM CỦA CÁC LOÀI NẤM CANDIDA SP. GÂY VIÊM ÂM ĐẠO PHÂN LẬP ĐƯỢC Ở BỆNH VIỆN TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y DƯỢC HUẾ

Ngô Thị Minh Châu, Tôn Nữ Phương Anh  
Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế

## Tóm tắt

**Đặt vấn đề:** Viêm âm đạo do nấm là bệnh lý viêm nhiễm sinh dục dưới phổ biến. Tác nhân gây bệnh phổ biến nhất là *C. albicans*, ngoài ra bệnh nguyên khác là *C. non albicans* và một số giống nấm men khác. *C. non albicans* thường ít nhạy cảm với thuốc kháng nấm hơn so với *C. albicans*. Mục tiêu: 1. Định danh loài vi nấm gây viêm âm đạo ở phụ nữ đến khám tại Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế. 2. Đánh giá sự đề kháng với các thuốc kháng nấm của các loài vi nấm phân lập được.

**Phương pháp nghiên cứu:** Chúng tôi áp dụng kỹ thuật khối phổ MALDI - TOF (Maldi Tof Mass: Matrix-assisted laser desorption/ionization Mass Spectrometry) để định danh loài vi nấm được phân lập từ bệnh phẩm khí hư của bệnh nhân đến khám vì triệu chứng nghi ngờ viêm âm hộ - âm đạo do nấm. Kháng nấm đồ được thực hiện bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch.

**Kết quả:** *C. albicans* là loài phổ biến nhất với tỷ lệ 62,96%, tiếp đến là *C. glabrata* 29,64%, *C. parapsilosis* 3,7% và *C. metapsilosis* 3,7%. Thử nghiệm kháng nấm đồ ghi nhận 100% *Candida* sp. nhạy cảm với nystatin và clotrimazole. Đề kháng với flucytosine và caspofungin ghi nhận ở *C. albicans* với tỷ lệ lần lượt là 29,41% và 17,65%. *C. glabrata* đề kháng với các thuốc thuộc nhóm azole gồm ketoconazole, fluconazole, itraconazole và voriconazole với tỷ lệ lần lượt là 18,75%, 18,75%, 62,5% và 37,5%. *C. parapsilosis* và *C. metapsilosis* chưa ghi nhận đề kháng với bất cứ thuốc kháng nấm nào được thử nghiệm trong nghiên cứu này.

**Kết luận:** *C. albicans* và *C. glabrata* là những loài phổ biến gây viêm âm đạo do nấm ở bệnh nhân tại bệnh viện trường Đại học Y Dược Huế. Nystatin và clotrimazole nhạy cảm tốt với tất cả các loài *Candida* sp. *C. glabrata* đề kháng đáng kể với các thuốc kháng nấm thuộc nhóm azole.

**Từ khóa:** viêm âm đạo do nấm, *C. albicans*, *C. non albicans*, thử nghiệm kháng nấm, đề kháng.

## Abstract

### IDENTIFICATION AND ANTIFUNGAL RESISTANCE OF CANDIDA SP. ISOLATED FROM PATIENTS WITH VULVOVAGINAL CANDIDOSES IN HUE UNIVERSITY HOSPITAL

**Background:** Vulvovaginal candidoses are a common gynecological disorder. *C. albicans* is the most common pathogenic in this disease. In addition, it was caused by *C. non albicans* and others yeast. *C. non albicans* is considered less susceptible to antifungal drugs than *C. albicans*. Objectives: 1. To identify yeast species from vulvovaginal candidiasis. 2. To determine the resistance rate to antifungal drugs of *Candida* species by disk diffusion method.

**Materials & methods:** We applied MALDI - TOF Mass Spectrometry techniques to identify yeasts species detected from vaginal discharges of female patients having symptoms of vulvovaginal candidoses. Antifungal susceptibility testing was checked by disk diffusion method.

**Results:** *C. albicans* was the dominant species isolated (62.96%), followed by *C. glabrata* 29.64%, *C. parapsilosis* 3.7% and *C. metapsilosis* 3.7%. Antifungal susceptibility testing shown 100% *Candida* sp. were susceptible to nystatin and clotrimazole. The resistance rate of *C. albicans* to flucytosine and caspofungin 29.41% and 17.65% respectively. *C. glabrata* was resistant to azole, including ketoconazole, fluconazole, itraconazole and voriconazole, with resistant rates were 18.75%, 18.75%, 62.5% and 37.5% respectively. *C. parapsilosis* and *C. metapsilosis* were susceptible to all drugs checked in this study.

**Conclusion:** *C. albicans* and *C. glabrata* were the most common pathogenic species isolated from patients with vulvovaginal candidiasis in Hue University of Medicine and Pharmacy Hospital. All *Candida* species were susceptible to nystatin and clotrimazole. There was a significant resistance to azole of *C. glabrata*.

**Keywords:** vulvovaginal candidoses, *C. albicans*, *C. non albicans*, antifungal susceptibility testing, resistance.

## 1. Đặt vấn đề

Viêm âm đạo do nấm là bệnh lý viêm nhiễm sinh dục dưới phổ biến ở phụ nữ. Ước tính 75% phụ nữ ít nhất một lần trong cuộc đời của họ bị bệnh này [7], và 50% trong số họ có thể bị bệnh lần thứ hai và tỷ lệ tái phát là 5% (khái niệm tái phát ở đây được hiểu là bị bệnh từ 3 lần trở lên trong) vòng 1 năm [6].

*Candida albicans* là bệnh nguyên phổ biến nhất của viêm âm đạo do nấm (85-90%), đây là loại vi nấm thường phân lập được ở khuẩn chí của âm đạo [12]. Ngoài ra một số loài khác cũng có vai trò là bệnh nguyên của viêm âm đạo như *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. famata*, *C. lusitaniae*... và những loài này thường được gọi chung là *Candida non albicans* [13, 8]. Về mặt điều trị, viêm âm đạo do *C. albicans* thường nhạy cảm tốt với các thuốc kháng nấm, trong khi đó nhóm *C. non albicans* thường ít nhạy cảm hơn và đây hiện là mối quan tâm của các nhà lâm sàng [5].

Tỷ lệ viêm âm đạo do nấm ở Việt Nam thay đổi theo thống kê của các nghiên cứu khác nhau, nhưng đều cho thấy đây là bệnh cảnh phổ biến. Tỷ lệ này là 30,6% theo nghiên cứu của Nguyễn Duy Tài và cộng sự [2], và 27,2% theo Huỳnh Nguyễn Khánh Trang [3]. Bên cạnh đó. Mặc dù chưa có nhiều nghiên cứu về vấn đề định danh loài nấm *Candida* sp. gây bệnh và đánh giá sự nhạy cảm với các thuốc kháng nấm cụ thể ở Việt Nam nhưng theo tác giả Phan Tuấn Anh và cộng sự, tỷ lệ viêm âm đạo tái phát do nấm là 12,17%, trong đó 85,1% là *C. non albicans* [4]. Nghiên cứu trước đây của chúng tôi năm 2009 ghi nhận tỷ lệ viêm âm đạo do nấm của bệnh nhân tại Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế là 66,1% [1]. Vì vậy vấn đề nghiên cứu định danh loài cụ thể của nhóm *Candida non albicans* và thử nghiệm kháng nấm của các loài vi nấm thuộc giống *Candida* sp. phân lập từ âm đạo là vấn đề cần thiết.

Từ những lí do trên, chúng tôi thực hiện đề tài: "Xác định loài vi nấm và đánh giá sự đề kháng với một số thuốc kháng nấm của các loài vi nấm gây viêm âm đạo phân lập được ở Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế" nhằm các mục tiêu sau:

- Định danh loài vi nấm gây viêm âm đạo ở phụ nữ đến khám tại Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế
- Đánh giá sự đề kháng với các thuốc kháng nấm của các loài vi nấm phân lập được

## 2. Đối tượng phương pháp nghiên cứu

Có 54 chủng nấm men được phân lập từ bệnh nhân đến khám tại Bệnh viện Trường Đại học Y

Dược Huế trong thời gian từ 1.2015 - 6.2015. Quy trình phân lập được tiến hành như sau: bệnh phẩm được nuôi cấy trên môi trường Sabouraud dextrose agar Chloramphenicol (Biorad, France) trong vòng 48 -72 giờ. Sau đó được cấy chuyển sang môi trường Chromogenic agar (Oxoid, UK) để phân biệt *C. albicans*, *C. tropicalis* và các *C. non albicans* khác. Các loài vi nấm phân lập được sau đó được cất giữ ở -20°C trong dung dịch glycerol 15% để định danh và làm kháng nấm đồ.

Kỹ thuật sinh học phân tử định danh loài vi nấm được thực hiện tại Khoa Sinh học phân tử, Đại học Sassari, Cộng hòa Ý. Kỹ thuật được sử dụng là kỹ thuật khối phổ MALDI - TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) để định danh loài vi nấm trực tiếp từ khuẩn nấm nuôi cấy và đọc kết quả bằng hệ thống máy khối phổ Bruker Daltonik MALDI Biotyper.

Từ các chủng vi nấm phân lập được, chúng tôi tiến hành đánh giá sự nhạy cảm với thuốc kháng nấm. Kháng nấm đồ được thực hiện theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch theo hướng dẫn của CLSI, M - 44 A (Clinical and Laboratory Standards Institute, USA) với loại thuốc kháng nấm bao gồm nystatin 100UI, clotrimazole 50 µg, ketoconazole 15 µg, fluconazole 25 µg, itraconazole 8µg, voriconazole 1 µg, flucytosine 1 µg và caspofungin 5µg (Các loại đĩa kháng nấm là sản phẩm của Liofilchem Laboratory, Cộng hòa Ý). Các chủng *C. albicans* ATCC 90028, *C. parapsilosis* ATCC 22019 và *C. krusei* ATCC 6258 được làm các chứng chuẩn của thử nghiệm kháng nấm. Thử nghiệm kháng nấm đồ được thực hiện tại Bộ môn Ký Sinh Trùng, Trường Đại học Y Dược Huế.

## 3. Kết quả

### 3.1. Kết quả định danh bằng cấy trên môi trường Candida Chromogenic agar và kỹ thuật khối phổ MALDI-TOF

**Bảng 1.** Kết quả định danh loài *Candida* sp

Kết quả định danh dựa trên môi trường Chromogenic agar	Số lượng chủng vi nấm (%)
<i>C. albicans</i>	34 (62,96%)
<i>C. non albicans</i>	20 (37,04%)
Kết quả định danh loài bằng kỹ thuật khối phổ MALDI-TOF	
Số lượng chủng vi nấm (%)	
<i>C. albicans</i>	34 (62,96%)
<i>C. glabrata</i>	16 (29,64%)
<i>C. parapsilosis</i>	2 (3,7%)
<i>C. metapsilosis</i>	2 (3,7%)

*C. albicans* chiếm tỷ lệ cao nhất trong các loài phân lập được (62,96%), tiếp đến là *C. glabrata* (29,64%).

3.2. Kết quả thử nghiệm kháng nấm

**Bảng 2.** Kết quả thử nghiệm kháng nấm đồ

Thuốc kháng nấm	Nhạy cảm (%)	Trung gian (%)	Đề kháng (%)
Flucystosine	38(70,37)	6(11,11)	10(18,52)
Nystatin	54(100)	0	0
Clotrimazole	51(94,44)	3(5,56)	0
Ketoconazole	51(94,44)	0	3(5,56)
Fluconazole	48(88,88)	3(5,56)	3(5,56)
Itraconazole	41(75,92)	3(5,56)	10(18,52)
Voriconazole	45(83,33)	3(5,56)	6(11,11)
Caspofungin	42(77,78)	6(11,11)	6(11,11)

Không ghi nhận đề kháng với nystatin và clotrimazole. Có tỷ lệ nhất định đề kháng với tất cả các thuốc còn lại của nhóm azole.

**Bảng 3.** Tỷ lệ % đề kháng của các loài nấm Candida sp. với nystatin, flucytosine, caspofungin và nhóm azole

Thuốc kháng nấm	C. albicans	C. glabrata	C. parapsilosis	C. metapsilosis
Nystatin	0	0	0	0
Flucytosine	29,41%	0	0	0
Caspofungine	17,65%	0	0	0
Clotrimazole	0	0	0	0
Ketoconazole	0	18,75%	0	0
Fluconazole	0	18,75%	0	0
Itraconazole	0	62,5%	0	0
Voriconazole	0	37,5%	0	0

Đề kháng được ghi nhận xảy ra với C. albicans và C. glabrata. Trong đó C. albicans đề kháng với flucytosine và caspofungin, C. glabrata đề kháng với tất cả thuốc thuộc nhóm azole trừ clotrimazole.

4. Bàn luận

Nấm Candida sp. là tác nhân gây viêm nhiễm sinh dục dưới phổ biến theo báo cáo từ nhiều nghiên cứu khác nhau [12,13]. Ở người phụ nữ có hệ thống miễn dịch khỏe mạnh bệnh nguyên phổ biến thuộc giống này là C. albicans, trong khi đó các tác nhân thuộc nhóm C. non albicans thường phân lập được ở viêm nhiễm âm đạo do nấm của những phụ nữ có yếu tố thuộc lợi của suy giảm miễn dịch, phụ nữ mãn kinh hoặc đái tháo đường type 2 [9].

Kết quả cấy trên môi trường thạch Candida Chromogenic agar cho kết quả 62,96% C. albicans và 37,04% C. non albicans. Kết quả này tương đồng với kết quả định danh bằng kỹ thuật khối phổ MALDI - TOF (Bảng 1). Hiện nay kỹ thuật khối phổ MALDI - TOF được nhiều nghiên cứu trên thế giới đề cập đến với ưu điểm là có độ nhạy, độ chính xác cao, thực hiện tự động hóa và ít tốn thời gian. Những ưu điểm này làm cho kỹ thuật khối phổ được ứng dụng rộng rãi trong nghiên cứu các tác nhân vi sinh vật gây bệnh ở người trong đó có nấm men. Trong thực tế kỹ thuật khối

phổ MALDI - TOF có thể giúp định danh bệnh nguyên từ khuẩn lạc trong vài phút và kỹ thuật này còn giúp phân biệt đồng phân của một số loài mà với các kỹ thuật định danh thông thường không phân biệt được. Vì vậy hiện nay người ta biết đến nhóm C. parapsilosis complex gồm C. parapsilosis, C. metapsilosis và C. orthopsilosis, hoặc C. rugosa complex gồm C. rugosa sensu stricto, Candida pseudorugosa, Candida neorugosa and Candida mesorugosa [5].

Kết quả định danh của chúng tôi ghi nhận có 4 loài vi nấm gồm C. albicans, C. glabrata, C. parapsilosis và C. metapsilosis (Bảng 1), và kết quả của nghiên cứu này bước đầu cho thấy loài phổ biến nhất phân lập ở phụ nữ viêm âm đạo do nấm tại bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế là C. albicans (62,96%), tiếp theo là C. glabrata (29,64%). Kết quả này tương tự ghi nhận của các nghiên cứu khác nhau trên thế giới là các loài có tần xuất phân lập cao ở âm đạo là C. albicans, C. glabrata, C. parapsilosis, C. tropicalis. Nghiên cứu của Lui X.P. và cộng sự ở Trung Quốc năm 2104, tỷ lệ các loài Candida sp. phân lập từ âm đạo như sau: C. albicans 85%, C. glabrata 10,6%, C. parapsilosis 1,5%, C. tropicalis 1%, C. krusei 0,5%, C. famata 0,4%, C. lusitaniae 0,1%. Saccharomyces cerevisiae 0,7%, Rhodotorula sp. 0, 2% [8]. Tác giả Mukasa K.J và cộng sự phân lập nấm âm đạo ở Uganda cho kết quả C. albicans 78.95%, C. glabrata 14.35%, C. krusei 3.35%, C. tropicalis 1.44%, C. famata 0.96%, C. parapsilosis 0.48% và C. lusitaniae 0.48% [11]. Một khảo sát khác ở Hà Lan và Đức phân lập 472 chủng nấm Candida từ bệnh nhân viêm âm đạo, định danh cho kết quả C. albicans 95,3%, C. glabrata 2,1%, C. krusei 0,9 % và 2,3% là loài khác [9]. Tỷ lệ C. glabrata trong kết quả của chúng tôi cao hơn các nghiên cứu nói ở trên có thể được giải thích do đối tượng nghiên cứu của chúng tôi bao gồm cả phụ nữ trong độ tuổi sinh đẻ, phụ nữ mãn kinh, phụ nữ mang thai...C.glabrata chiếm tỷ lệ phân lập cao thường từ nhóm phụ nữ mãn kinh, phụ nữ đái tháo đường typ 2, hoặc có yếu tố suy giảm miễn dịch [9].

Kết quả thử nghiệm kháng nấm đồ bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch thực hiện với 54 chủng nấm Candida sp. phân lập từ nghiên cứu của chúng tôi cho thấy 100% nhạy cảm với nystatin. Đề kháng được xác định với các thuốc 5- fluorocytosine, ketoconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole và caspofungin với tỷ lệ lần lượt là 5,56%, 5,56%, 18,52%, 11,11% và 11,11%. Giới hạn chính của nghiên cứu này là số lượng chủng vi nấm thử nghiệm còn ít nên khó có thể rút ra một kết luận

chính xác, tuy nhiên những con số này bước đầu cho thấy có tỷ lệ nhất định Candida sp. đề kháng với một số thuốc kháng nấm thường dùng để điều trị viêm âm đạo do nấm tại Việt Nam như fluconazole. Mặt khác đánh giá tỷ lệ đề kháng theo loài vi nấm ở nghiên cứu này cho thấy chỉ có C. albicans và C. glabrata có đề kháng, cụ thể là 29,41% C.albicans đề kháng với flucytosine và 17,65% loài này đề kháng với caspofungin. Trong khi đó C. glabrata đề kháng với các thuốc thuộc nhóm azole gồm ketoconazole (18,75%), fluconazole (18,75%), itraconazole (62,5%) và voriconazole (37,5%). Theo kết quả của Mukasa và cộng sự ghi nhận tỷ lệ C. albicans đề kháng với nystatin, clotrimazole lần lượt là 0,61%, 0,61%, trong khi đó tỷ lệ đề kháng với clotrimazole và itraconazole của C. glabrata là 36,67% và 100% [11]. Nhóm nghiên cứu này cũng ghi nhận khoảng 10% C. albicans và C. glabrata đề kháng với voriconazole. Vậy nghiên cứu của chúng tôi cũng như nghiên cứu nói trên nói chung ghi nhận C. glabrata đề kháng với azole hơn C. albicans. Kết quả này cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu của Lui X.P và cộng sự [8].

Vậy từ kết quả nghiên cứu này cho thấy vấn đề nuôi cấy để định danh Candida sp. là cần thiết trong vấn đề lựa chọn thuốc điều trị, theo dõi điều trị trong bệnh viêm âm đạo do nấm. Mặt khác kháng nấm đồ là cần thiết được thực hiện trong một số trường hợp

như viêm âm đạo do C. non albicans hay viêm âm đạo tái phát, để từ đó có lựa chọn thuốc phù hợp. Mặt khác Nystatin là lựa chọn tốt nhất trong điều trị viêm âm đạo do nấm nếu không có điều kiện thực hiện các kỹ thuật phân lập vi nấm và làm kháng nấm đồ.

5. Kết luận

Nghiên cứu của chúng tôi áp dụng kỹ thuật khối phổ MALDI - TOF để định danh loài của nấm men phân lập được từ bệnh nhân viêm âm đạo do nấm tại Bệnh viện trường Đại học Y Dược Huế, và thử nghiệm kháng nấm đồ của các chủng vi nấm này được thực hiện theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Kết quả ghi nhận như sau:

- C. albicans là loài phổ biến nhất với tỷ lệ 62,96%, tiếp đến là C. glabrata 29,64%, C. parapsilosis 3,7% và C. metapsilosis 3,7%.

- Thử nghiệm kháng nấm đồ không ghi nhận đề kháng của Candida sp. với nystatin và clotrimazole. Đề kháng với flucytosine và caspofungin ghi nhận ở C. albicans với tỷ lệ lần lượt là 29,41% và 17,65%. C. glabrata đề kháng với các thuốc thuộc nhóm azole gồm ketoconazole, fluconazole, itraconazole và voriconazole với tỷ lệ lần lượt là 18,75%, 18,75%, 62,5% và 37,5%. C. parapsilosis và C. metapsilosis chưa ghi nhận đề kháng với bất cứ thuốc kháng nấm nào được thử nghiệm trong nghiên cứu này.

Tài liệu tham khảo

1. Tôn Nữ Phương Anh, Ngô Thị Minh Châu, Nguyễn Thị Hóa, Nghiên cứu đặc điểm nhiễm nấm Candida albicans và Candida non albicans ở một số phụ nữ đến khám phụ khoa tại Bệnh viện Trường Đại học y Dược Huế, Tạp chí Y Dược học Quân sự (2009), Số chuyên đề 01, 133 -138
2. Nguyễn Duy Tài, Tỷ lệ viêm âm đạo do ba tác nhân thường gặp và các yếu tố liên quan ở phụ nữ 18-55 tuổi tại Cần Giờ -Thành phố Hồ Chí Minh, Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh 2012, 16(1), 152 -154.
3. Huỳnh Nguyễn Khánh Trang, Nguyễn Đình Quân, Viêm âm đạo và các yếu tố liên quan ở người phụ nữ Êđê trong độ tuổi sinh sản tại tỉnh DakLak, Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh 2008, 12(1), 1-4
4. Phan Anh Tuấn, Cù Thị Kim Loan, xác định tỉ lệ và đặc điểm dịch tế học bệnh viêm âm đạo do vi nấm tái phát, Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh 2010, 14(1), 194 -199
5. Bendel, C.M., CHAPTER 33 - Candidiasis, in Infectious Diseases of the Fetus and Newborn (Seventh Edition), J.S.R.O.K.B.W.N.A. Maldonado, Editor. 2011, W.B. Saunders: Philadelphia. p. 1055-1077.
6. Eckert LO, Hawes SE, Stevens CE et al. Vulvovaginal candidiasis: clinical manifestations, risk factors, management algorithm.Obstet Gynecol 1998; 92: 757-65.
7. Fidel PL Jr. History and update on host defense against

8. Liu, X. P., et al. (2014). "Species distribution and susceptibility of Candida isolates from patient with vulvovaginal candidiasis in Southern China from 2003 to 2012." Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology 24(2): 106-111.
9. Mendling W, Brasch J, Cornely OA et al. Guideline: vulvovaginal candidosis (AWMF 015/072), S2k (excluding chronic mucocutaneous candidosis). Mycoses 2015; 58: 1-15.
10. Mendling W, Krauss C, Fladung B. A clinical multicenter-study comparing efficacy and tolerability of topical combination therapy with Clotrimazole (Canesten, two formats) with oral single dose fluconazole (Diflucan) in vulvovaginal mycoses. Mycoses 2004; 47:136-42
11. Mukasa, K. J., et al. (2015). "Antifungal Susceptibility Patterns of Vulvovaginal Candida species among Women Attending Antenatal Clinic at Mbarara Regional Referral Hospital, South Western Uganda." British microbiology research journal 5(4): 322-331.
12. Sobel JD, Faro S, Force RW et al. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. Am J Obstet Gynecol 1998; 178: 203-11.
13. Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. Lancet 2007; 51: 1961-71.