

5. **Nguyễn Song Tú.** Tình trạng dinh dưỡng, đặc điểm cấu trúc và một vài yếu tố liên quan đến suy dinh dưỡng thấp còi ở học sinh 11-14 tuổi thuộc trường phổ thông dân tộc bán trú tại tỉnh Kon Tum, năm 2018. Báo cáo nghiệm thu đề tài khoa học cấp Viện, Viện Dinh dưỡng 2020.
6. **Yohanes SK, Hilde B.** Women's empowerment and gender inequality in adolescent nutritional status: evidence from the Indonesian family life survey. J Biosoc Sci. 50(5):640-665. 2018.
7. **Wafaa YAW, Safaa KH et al.** Malnutrition and its associated factors among rural school children in Fayoum Governorate, Egypt. Journal of Environmental and Public health. 2017: 1-9.
8. **Srivastava S, Mahmood SE et al.** Nutritional status of school-age children - A scenario of urban slums in India. Archives of Public health, 2012: 70-8.
9. **Kidanemariam B, Gebrehiwot G, Alem G et al.** Prevalence and associated factors of adolescent undernutrition in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis. BMC Nutr; 5:49. 2019.

## XÂY DỰNG QUY TRÌNH PHÁT HIỆN NẤM CANDIDA SPP. BẰNG PHƯƠNG PHÁP MULTIPLEX PCR

**Nguyễn Tú Anh<sup>1</sup>, Lê Thị Thanh Thảo<sup>1</sup>, Phan Cảnh Trình<sup>1</sup>,  
Nguyễn Minh Thái<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Ngọc Yến<sup>3</sup>, Tôn Hoàng Diệu<sup>2</sup>,  
Trần Quốc Việt<sup>4</sup>, Nguyễn Hiếu<sup>1</sup>**

### TÓM TẮT

**Mở đầu:** Theo Trung tâm kiểm soát và phòng ngừa dịch bệnh Mỹ (Centers for Disease Control and Prevention - CDC) và Mạng lưới an toàn chăm sóc sức khỏe quốc gia của Mỹ, *Candida spp.* được xếp ở vị trí thứ 5 trong các tác nhân gây nhiễm khuẩn bệnh viện và đứng thứ 4 trong số các tác nhân gây nhiễm khuẩn máu. Hiện nay, tại Việt Nam, xu hướng dịch chuyển này cũng đang xảy ra với tỉ lệ nhiễm cao nhất ở 04 loài *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* và *Candida tropicalis*. Tuy nhiên, các phương pháp truyền thống phát hiện các loài thuộc chi *Candida* tuy dễ thực hiện nhưng có nhiều nhược điểm: phụ thuộc vào yếu tố khách quan, tốn nhiều thời gian, dẫn đến chỉ định điều trị không nhanh chóng và kịp thời. 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. **Mục tiêu:** Nghiên cứu này thực hiện với 2 mục tiêu: (1) Xác định và tối ưu hóa điều kiện multiplex PCR phát hiện 04 nấm *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* và *C. parapsilosis*. (2) Xây dựng quy trình phát hiện đồng thời 04 loài nấm *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* và *C. parapsilosis* bằng phương pháp multiplex PCR. **Phương pháp:** Các mẫu *Candida spp.* được thu nhận tại Bệnh viện Đại học Y Dược TP. HCM, Bệnh viện Lê Văn Thịnh và Bệnh viện Quân Y 175 từ tháng 10/2020 đến tháng 5/2021. Vi nấm được phát hiện bằng các phương pháp: (1) thử nghiệm tạo ống mồi, (2) phân lập trên môi trường CHROMagar *Candida*, (3) tối ưu hóa quy

trình phát hiện *Candida spp.* bằng kỹ thuật Multiplex PCR và sử dụng quy trình tối ưu trong phát hiện *Candida spp.* từ mẫu bệnh phẩm và (4) giải trình tự 5 sản phẩm khuếch đại để kiểm tra tính đặc hiệu. Sau đó, tiến hành so sánh và biện luận kết quả phát hiện *Candida spp.* bằng 3 phương pháp: thử nghiệm tạo ống mồi, CHROMagar *Candida* và Multiplex PCR. **Kết quả:** 40 mẫu bệnh phẩm được phát hiện bằng vào 3 phương pháp: thử nghiệm tạo ống mồi: phát hiện 13 loài *C. albicans* và 27 loài non-*albicans Candida*, nuôi cấy môi trường CHROMagar *Candida*: phát hiện 18 loài *C. albicans*, 5 loài *C. tropicalis*, 3 loài *C. glabrata* và 14 loài non-*albicans Candida*. Với multiplex PCR: phát hiện 18 loài *C. albicans*, 7 loài *C. tropicalis*, 8 loài *C. glabrata*, 6 loài *C. parapsilosis* và 1 loài không xác định được. Các thành phần Multiplex PCR phát hiện 4 loài *Candida* được tối ưu trong 1 ống eppendorf: dung dịch đệm PCR 10 X 2,2 µl; MgSO<sub>4</sub> 25 mM 0,6 µl; Taq DNA polymerase 5 UI/µl 0,3 µl; dNTP 10 mM 0,5 µl, mỗi F<sub>alb</sub> 5 pmol 0,3 µl; R<sub>alb</sub> 5 pmol 0,5 µl; F<sub>tro</sub> 5 pmol 0,3 µl; F<sub>para</sub> 5 pmol 0,6 µl; R<sub>para</sub> 5 pmol 0,6 µl; F<sub>gla</sub> 5 pmol 0,3 µl; R<sub>gla</sub> 5 pmol 0,3 µl; dịch chiết DNA 1 µl; nước khử khoáng vừa đủ 25 µl. Chương trình PCR được tối ưu: giai đoạn biến tính ban đầu 95 °C 5 phút (1 chu kỳ), giai đoạn 2 (40 chu kỳ): biến tính 95 °C 30 giây, gắn mồi 59 °C 30 giây, kéo dài mỗi 72 °C 30 giây; giai đoạn kéo dài cuối cùng 72 °C 8 phút (1 chu kỳ).

**Từ khóa:** *Candida spp.*; Multiplex PCR.

### SUMMARY

#### BUILDING PROCESS FOR DETECTING CANDIDA SPP. BY MULTIPLEX PCR METHODS

**Background:** According to the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) and the US National Health Care Safety Network, *Candida spp.* ranked 5th among nosocomial pathogens and 4th among blood-borne pathogens. Currently, this shifting trend in Vietnam is also occurring with the highest infection rates in 04 species of *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, and *Candida tropicalis*. However, the traditional methods of

<sup>1</sup>Đại học Y Dược TP.HCM

<sup>2</sup>Đại học Y Khoa Phạm Ngọc Thạch

<sup>3</sup>Đại học Nguyễn Tất Thành

<sup>4</sup>Bệnh viện Quân Y 175

Chịu trách nhiệm chính:

Email:

Ngày nhận bài: 30.9.2022

Ngày phản biện khoa học: 21.11.2022

Ngày duyệt bài: 30.11.2022

detecting *Candida* species, although easy to implement, have many disadvantages: dependent on objective factors, and are time-consuming, leading to not quick and timely treatment indications. The Molecular logy diagnostic methods have many advantages in detecting and identifying pathogens.

**Objectives:** This study was carried out with two objectives: (1) Determine and optimize multiplex PCR conditions to detect 04 fungi *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, and *C. parapsilosis*. (2) Develop a process to simultaneously detect 04 species of *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, and *C. parapsilosis* by multiplex PCR method. **Method:** *Candida* spp. was admitted to the University of Medicine and Pharmacy Hospital in Ho Chi Minh City, Ho Chi Minh City, Le Van Thinh Hospital, and Military Hospital 175 from October 2020 to May 2021. The fungus was detected by the following methods: (1) germplasm test, (2) isolation on CHROMagar *Candida* medium, (3) optimization of the *Candida* spp detection procedure by Multiplex PCR technique and using the optimal procedure in detecting *Candida* spp. from patient samples and (4) sequenced 5 amplification products to check for specificity. Then, compare and interpret the results of detecting *Candida* spp. by 3 methods: germ tube test, CHROMagar *Candida*, and Multiplex PCR. **Results:** 40 patient samples were detected by 3 methods: Germ tube testing: detecting 13 species of *C. albicans* and 27 species of *C. non-albicans*, culture of CHROMagar *Candida*: detecting 18 species of *C. albicans*, 5 species *C. tropicalis*, 3 species of *C. glabrata* and 14 species of *C. non-albicans*. With multiplex PCR: detected 18 species of *C. albicans*, 7 species of *C. tropicalis*, 8 species of *C. glabrata*, 6 species of *C. parapsilosis* and 1 unidentified species. Multiplex PCR components for optimal detection of 4 *Candida* species in 1 effendop tube: PCR buffer 10 X 2.2  $\mu$ l; MgSO<sub>4</sub> 25 mM 0.6  $\mu$ l; Taq DNA polymerase 5 UI/ $\mu$ l 0.3  $\mu$ l; dNTP 10 mM 0.5  $\mu$ l; primer F<sub>alb</sub> 5 pmol 0.3  $\mu$ l; R<sub>alb</sub> 5 pmol 0.5  $\mu$ l; F<sub>tro</sub> 5 pmol 0.3  $\mu$ l; F<sub>para</sub> 5 pmol 0.6  $\mu$ l; R<sub>para</sub> 5 pmol 0.6  $\mu$ l; F<sub>gla</sub> 5 pmol 0.3  $\mu$ l, R<sub>gla</sub> 5 pmol 0.3  $\mu$ l; DNA extract 1  $\mu$ l; enough demineralized water 25  $\mu$ l. Optimized PCR program: initial denaturation period 95°C 5 min (1 cycle), stage 2 (40 cycles): denaturation 95°C 30 s, primer 59 °C 30 s, primer extension 72°C 30 seconds; final elongation n period 72°C 8 min (1 cycle).

**Keywords:** *Candida* spp.; Multiplex PCR

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tỉ lệ nhiễm nấm *Candida* spp. có xu hướng gia tăng rõ rệt trong ba thập kỷ qua, liên quan đến việc sử dụng thuốc chống ung thư, thuốc ức chế miễn dịch, các kháng sinh phổ rộng, ghép tạng, dinh dưỡng qua đường tĩnh mạch, các thiết bị cấy ghép [4]. Trong một số trường hợp, điều trị thuốc kháng nấm theo kinh nghiệm sẽ làm bệnh lý trầm trọng hơn. Chẩn đoán và xác định chính xác loài *Candida* gây bệnh là cơ sở trong việc lựa chọn thuốc kháng nấm phù hợp giúp tăng hiệu quả điều trị, giảm độc tính, giảm tỉ lệ tử vong và giảm chi phí điều trị cho bệnh nhân. Tuy nhiên, việc chẩn đoán xác định loài *Candida*

gây bệnh còn hạn chế. Hiện nay, tại Việt Nam, khuynh hướng dịch chuyển này cũng đang xảy ra với tỉ lệ nhiễm cao nhất ở 04 loài *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* và *C. parapsilosis* [7], [8]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi xây dựng quy trình phát hiện nấm *Candida* spp. bằng phương pháp Multiplex PCR nhằm cung cấp thêm bằng chứng khoa học cho kết quả xét nghiệm trên bệnh nhân nhiễm nấm *Candida* spp. một cách chính xác và kịp thời giúp bác sĩ sử dụng phác đồ điều trị kháng nấm nhanh chóng, hiệu quả.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

**Vật liệu.** Các mẫu *Candida* spp. được thu nhận tại Bệnh viện Đại học Y Dược TP. HCM, Bệnh viện Lê Văn Thinh và Bệnh viện Quân Y 175 từ tháng 10/2020 đến tháng 5/2021.

Nấm *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida tropicalis* ATCC 13803, *Candida glabrata* ATCC 2001, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 được dùng làm chứng dương, lưu giữ tại Bộ Môn Vi sinh- Ký sinh, Khoa Dược – Đại Học Y Dược Thành Phố Hồ Chí Minh.

Hóa chất: Dung dịch đệm PCR 10 X (Abm), dNTPs 10 mM (Abm), MgSO<sub>4</sub> 25 mM (Abm), Enzyme Tag DNA Polymerase 5 UI/ $\mu$ l (Abm), RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (Promega), 100 bp DNA Marker (Abm), Agarose (Promega), Triton X-100 (Merck), EDTA (Sigma), Tween 20 (Merck), Ethanol 96% (Trung Quốc), NaOH (Trung Quốc), đệm tải (Merck), môi trường CHROMagar *Candida* (Himedida<sup>®</sup>, India), môi trường Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Merck), môi trường Sabouraud Dextrose Broth (SDB) (Merck).

**Phương pháp.** Mẫu nấm *Candida* spp. từ bệnh phẩm được các Khoa xét nghiệm lâm sàng của bệnh viện phân lập trên môi trường SDA và được chuyển về phòng thí nghiệm trong vòng 48 tiếng. Tiến hành phát hiện các loài *Candida* bằng các thí nghiệm: thí nghiệm tạo ống mầm, nuôi cấy trên môi trường CHROMagar *Candida* và sử dụng kỹ thuật sinh Multiplex PCR.

Để tối ưu quy trình Multiplex PCR trong phát hiện các loài *Candida*, nghiên cứu tiến hành theo thứ tự công việc như sau: (1) sử dụng DNA khuôn mẫu là DNA chiết tách từ các nhóm nấm *Candida* spp. (2) Thực hiện PCR đơn trên DNA khuôn mẫu từ từng chủng *Candida* spp. để kiểm tra điều kiện và sản phẩm PCR để tối ưu hóa các yếu tố và các điều kiện để phát hiện đồng thời 4 loài: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*. (3) Thực hiện multiplex PCR dựa vào kết quả khảo sát từ PCR đơn trên DNA khuôn mẫu

từ các chủng *Candida* spp. lấy từ bệnh phẩm. (4) Giải trình tự ngẫu nhiên 05 sản phẩm khuếch đại của mỗi loài *Candida* spp. để kiểm tra tính đặc hiệu của quy trình PCR. Trình tự nucleotide được phân tích trên hệ thống dữ liệu NCBI. (5) So sánh và biện luận kết quả phát hiện *Candida* spp. bằng 3 phương pháp: thử nghiệm tạo ống mầm, CHROMagar *Candida* và multiplex PCR.

**Phân biệt *Candida* spp. trên môi trường CHROMagar *Candida*.** Vi nấm được phân lập trên môi trường CHROMagar *Candida* trong 48 giờ ở 37 °C, tính phân biệt và chọn lọc cao, được sử dụng để phân lập và xác định nhanh một số loài *Candida* spp. CHROMagar *Candida* có độ nhạy và đặc hiệu > 99% đối với *C. albicans*, *C. tropicalis* và *C. krusei*, môi trường có cơ chất phản ứng với các enzyme do *Candida* spp. tiết ra và tạo khóm nấm có màu sắc khác nhau: *C. albicans* tạo khóm nấm màu xanh lá, *C. dubliniensis* màu xanh lá đậm, *C. glabrata* màu tím đậm, *C. tropicalis* màu xanh tím hoặc xanh dương, *C. krusei* màu hồng viền trắng, các loài khác có màu trắng đến hồng đậm [2].

**Thử nghiệm tạo ống mầm.** Nuôi cấy vi nấm trong huyết thanh từ 2 – 4 giờ ở 37 °C, *C. albicans* sẽ hình thành ống mầm. Ống mầm là sự phát triển quá mức của chồi, có vách ngăn giả, không có sự thắt lại ở phần giao nhau với tế bào mẹ, đây là đặc điểm chính để phân biệt ống mầm với sợi nấm giả [1]. Thử nghiệm này dùng để phân biệt nhanh *C. albicans* và NAC, nhưng các nghiên cứu gần đây cho thấy một số loài NAC như *C. dublinensis*, *C. africana*,... cũng cho thử nghiệm

tạo ống mầm dương tính. Tuy nhiên, thử nghiệm vẫn có giá trị vì 90% *C. albicans* phân lập từ mẫu bệnh phẩm có kết quả dương tính [4].

Lấy 1 khóm nấm *Candida* spp. trên môi trường SDA từ bệnh viện cung cấp đã hoạt hóa qua SDB trong 2 giờ ở 37 °C, cho 1-2 giọt huyền dịch nấm đã hoạt hóa vào ống thử nghiệm chứa 0,5 ml huyết thanh, ủ ở 37 °C trong 2 - 4 giờ. Hút 20 µl dịch nuôi cấy, trải đều trên lam kính và hơ trên ngọn lửa đèn cồn đến khi khô dịch hút, Sau đó nhuộm với thuốc nhuộm Fuschin 5 X trong 1 phút, rửa nhẹ nhàng với nước. Đem quan sát ống mầm dưới kính hiển vi ở vật kính X100.

**Kỹ thuật Multiplex PCR.** Multiplex PCR lần đầu tiên được mô tả bởi Chamberlatin vào năm 1988, được cải tiến từ kỹ thuật PCR đơn giản.. Hiện nay, PCR Multiplex PCR có thể khuếch đại đồng thời nhiều trình tự DNA đích, ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực y sinh học để phát hiện các vi sinh vật gây bệnh [5].

Trong nghiên cứu này, để phát hiện nấm *Candida* spp. bằng phương pháp Multiplex PCR cần tối ưu quy trình, chúng tôi lần lượt khảo sát các yếu tố với DNA khuôn mẫu được chiết từ các chủng ATCC. Sau đó, thực hiện quy trình này trên các mẫu bệnh phẩm được thu nhận từ các bệnh viện, đồng thời so sánh kết quả với các phương pháp truyền thống và giải trình tự gene.

**Thành phần PCR:** Dung dịch đệm PCR 10 X; MgSO<sub>4</sub> 25 mM; Taq DNA polymerase 5 UI/µl; dNTPs 10 mM, mỗi cặp mỗi xuôi và mỗi ngược của mỗi loài có nồng độ 5 µM.

**Trình tự môi (Bảng 1):**

**Bảng 1: Trình tự môi của *Candida* spp.**

Loài	Trình tự đích	Môi	Trình tự môi	Kích thước (bp)
<i>C. albicans</i>	IGS 1	F <sub>alb</sub>	AGATTATTGCCATGCCCTGAG	606
		R <sub>alb</sub>	CCATGTGCGAACGTAGCGTAT	
<i>C. parapsilosis</i>	Protein giả định	F <sub>para</sub>	TACACCAAGCGACTCAGC	490
		R <sub>para</sub>	ACCAGCTGCTTTGACTTG	
<i>C. glabrata</i>	Phospholipase 1	F <sub>gla</sub>	ACCGTGCTTGCCTCTACA	212
		R <sub>gla</sub>	GACATCTGAGCCTCGTCTGA	
<i>C. tropicalis</i>	IGS 1	F <sub>tro</sub>	AGAACAAGAAAACAGTGAAGCAA	126
		R <sub>tro</sub>	CCATGTGCGAACGTAGCGTAT	

Chiết tách DNA từ khóm nấm: Mẫu nấm *Candida* spp. thu nhận từ bệnh viện được phân tán trong nước muối 0,85% và phân lập trên môi trường SDA trong 24 - 48 giờ ở 37°C. Chiết tách DNA từ khóm nấm bằng phương pháp hóa học theo quy trình của Vingataramin [6]. Lấy một vòng dây cấy khóm nấm phân tán trong 1 ml nước khử khoáng, đo độ đục ~1,5 – 2 McFarland ở 600 nm (dịch A). Hút 100 µl dịch A thêm 455 µl dung dịch chiết DNA (NaOH 2M, Ethanol 96% và EDTA 0,025M) (dịch B). Lắc nhẹ dịch B và

đun nóng hỗn hợp ở 80°C trong 10 phút. Ly tâm hỗn hợp ở 10.000 vòng /10 phút, bỏ dung dịch ở trên, thu tủa, để khô. Sau đó, phân tán tủa vào 100µl dung dịch phân tán DNA (Tris – HCl pH 8,0 0,5 M; EDTA 0,5M; Triton X 100, Tween 20 và nước khử khoáng) được dịch chiết DNA.

Khảo sát nhiệt độ gắn môi: Khảo sát nhiệt độ gắn môi lần lượt ở các nhiệt độ 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C cho từng cặp môi.

Tối ưu hóa nồng độ MgSO<sub>4</sub>: Sau khi xác định được nhiệt độ gắn môi tối ưu, chúng tôi khảo

nồng độ  $MgSO_4$  ở 2,0mM, 2,2mM, 2,6mM, 2,8mM.

Tối ưu hóa nồng độ Taq DNA polymerase: Tiếp theo, Taq DNA polymerase được khảo sát với 4 nồng độ khác nhau 1,0 UI, 1,25 UI, 1,5 UI, 2,0 UI.

Tối ưu hóa nồng độ dNTP: dNTP được khảo sát với 4 nồng độ khác nhau 0,2 mM, 0,24 mM, 0,28 mM và 0,32 mM.

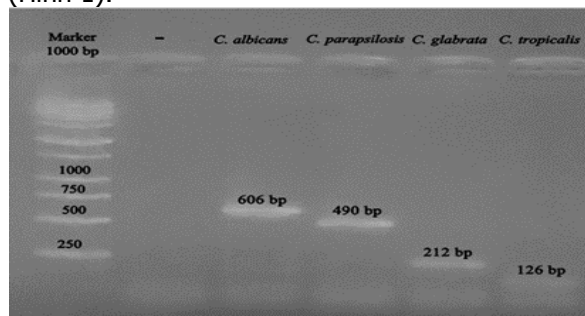
Tối ưu hóa nồng độ mỗi: Sau cùng, mỗi được khảo sát với 5 nồng độ khác nhau 0,03pmol, 0,06pmol, 0,1pmol, 0,12pmol, 0,15pmol.

### III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

**Phân biệt Candida spp. trên môi trường CHROMagar Candida.** Sau khi phân lập trên môi trường CHROMagar Candida ủ ở 37 °C trong 48 giờ, quan sát màu sắc khóm nấm của 40 mẫu: 18 mẫu cho khóm nấm màu xanh lá cây ~ *Candida albicans* ATCC 10231; 11 mẫu khóm nấm màu trắng ~ *Candida parapsilosis* ATCC 22019; 3 mẫu cho khóm nấm màu hoa cà ~ *Candida glabrata* ATCC 2001; 5 mẫu khóm nấm màu xanh dương ánh kim loại ~ *Candida tropicalis* ATCC 13803; 3 mẫu từ mẫu bệnh phẩm phát triển khóm nấm màu tím xanh không xác định loài.

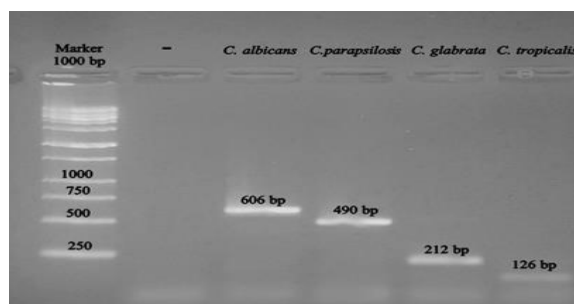
**Thử nghiệm tạo ống mầm.** Toàn bộ 40 mẫu được thực hiện thử nghiệm tạo ống mầm. Sau 4 giờ ủ trong môi trường huyết thanh, quan sát dưới kính hiển vi X100 cho kết quả sau: 13 mẫu có kết quả tạo ống mầm dương tính – tương tự với ống mầm được tạo ra từ *Candida albicans* ATCC 10231; 7 mẫu có các ống mầm giả dài, chiều rộng bằng tế bào mẹ xếp liên tục với nhau, giữa ống mầm giả và tế bào mẹ có nút thắt, giữa các tế bào có các đoạn đứt; 20 mẫu chỉ quan sát được các tế bào hạt men – *C. non - albicans*

**Tối ưu quy trình multiplex PCR.** Khảo sát nhiệt độ gắn mỗi: Ở 59°C được xác định là tối ưu (Hình 1).



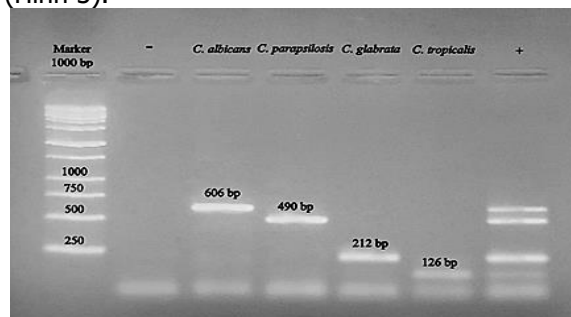
**Hình 1: Sản phẩm multiplex PCR ở nhiệt độ gắn mỗi ở 59 °C sau khi điện di**

Tối ưu hóa nồng độ  $MgSO_4$ : Kết quả cho thấy tại khảo sát nồng độ  $MgSO_4$  2,8 mM cho sản phẩm khuếch đại rõ nhất (Hình 2).



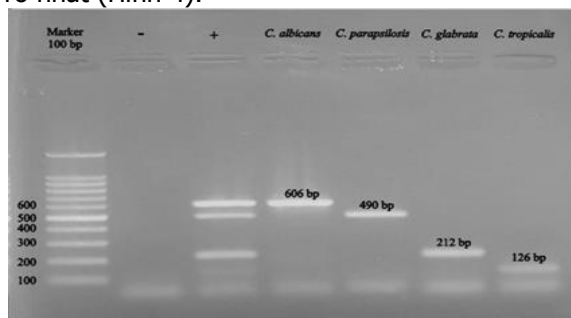
**Hình 2: Sản phẩm multiplex PCR ở nồng độ  $MgSO_4$  2,8 mM sau khi điện di**

Tối ưu hóa nồng độ Taq DNA polymerase: Kết quả khảo sát cho thấy nồng độ 1,5 UI cho sản phẩm tối ưu. Sử dụng các yếu tố đã được tối ưu từ giai đoạn này, chúng tôi có thể PCR với chứng dương là DNA của cả 04 loài *Candida* (Hình 3).



**Hình 3: Sản phẩm multiplex PCR ở nồng độ Taq polymerase 1,5 UI sau khi điện di**

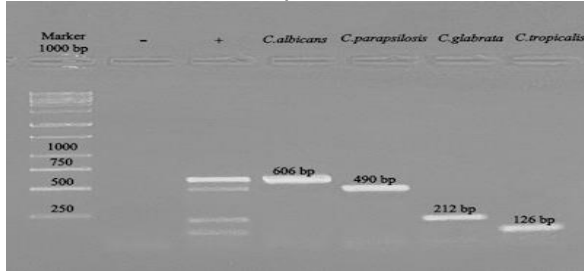
Tối ưu hóa nồng độ dNTP: Ở nhiệt độ gắn mỗi 59 °C, nồng độ dNTP 0,2 mM cho sản phẩm rõ nhất (Hình 4).



**Hình 4: Sản phẩm multiplex PCR với nồng độ dNTP 0,2 mM sau khi điện di**

Tối ưu hóa nồng độ mỗi: Sau khi xác định được nồng độ của  $MgSO_4$ , dNTP, enzyme Taq DNA polymerase và nhiệt độ gắn mỗi, chúng tôi tiếp tục tối ưu hóa nồng độ của từng mỗi. Sau khi sàng lọc, ở nồng độ 0,06 pmol đối với các mỗi  $F_{alb}$ ,  $F_{tro}$ ,  $F_{gla}$ ,  $R_{gla}$ , nồng độ 0,12 pmol đối với  $F_{para}$  và  $R_{para}$  và 0,10 pmol đối với  $R_{alb}$  xuất hiện cả 4 sản phẩm khuếch đại mong muốn (Hình 5).

Chương trình và điều kiện Multiplex PCR: Giai đoạn 1: biến tính khởi đầu 95°C – 5 phút. Giai đoạn 2 gồm 40 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 3 giai đoạn: giai đoạn biến tính 95°C – 30 giây; giai đoạn gắn mỗi 59°C – 30 giây; giai đoạn kéo dài 72 °C – 30 giây. Cuối cùng, giai đoạn kéo dài hoàn chỉnh: 72 °C – 10 phút.



**Hình 5: Sản phẩm multiplex PCR với nồng độ mỗi tối ưu sau khi điện di**

Phát hiện sản phẩm khuếch đại: điện thế 120 V – 45 phút để phát hiện các sản phẩm khuếch đại DNA và định danh theo kích thước band điện di.

Khi điều kiện multiplex PCR đã tối ưu tiến hành với 40 mẫu nấm phân lập từ bệnh phẩm. Kết quả như sau: 18 sản phẩm có kích thước 606 bp ~ đoạn gen IGS 1 của *C. albicans*; 6 sản phẩm kích thước 490 bp ~ đoạn gen phospholipase 1 của *C. parapsilosis*; 8 sản phẩm kích thước 212 bp ~ đoạn gen protein giả định tương tự *C. glabrata*; 7 sản phẩm kích thước 126 bp ~ đoạn IGS 1 của *C. tropicalis*; 1 mẫu không phát hiện sản phẩm PCR. Để khẳng định tính đặc hiệu của các trình tự khuếch đại đối với 04 loài được nghiên cứu, chọn 20 sản phẩm PCR ngẫu nhiên giải trình tự tại công ty Nam Khoa. Kết quả tất cả các sản phẩm khuếch đại này cho kết quả tương đồng với quy trình Multiplex PCR nhóm nghiên cứu đã thực hiện.

**So sánh kết quả phát hiện Candida spp. giữa các phương pháp:**

Thực hiện 3 phương pháp: nuôi cấy trên CHROMagar Candida, thử nghiệm tạo ống mầm và multiplex PCR, kết quả phát hiện Candida spp. trên 40 mẫu nấm thu được như sau:

Mẫu	Phân lập trên CHROMagar Candida	Thử nghiệm tạo ống mầm	Multiplex PCR	Mẫu	Phân lập trên CHROMagar Candida	Thử nghiệm tạo ống mầm	Multiplex PCR
01	<i>C. tropicalis</i>	NAC	<i>C. tropicalis</i>	21	<i>C. tropicalis</i>	NAC	<i>C. tropicalis</i>
02	NAC	NAC	<i>C. glabrata</i>	22	<i>C. tropicalis</i>	NAC	<i>C. tropicalis</i>
03	<i>C. albicans</i>	NAC	<i>C. albicans</i>	23	<i>C. tropicalis</i>	NAC	<i>C. tropicalis</i>
04	NAC	NAC	<i>C. glabrata</i>	24	<i>C. tropicalis</i>	NAC	<i>C. tropicalis</i>
05	NAC	NAC	<i>C. parapsilosis</i>	25	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
06	NAC	NAC	<i>C. glabrata</i>	26	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
07	<i>C. albicans</i>	NAC	<i>C. albicans</i>	27	NAC	NAC	-
08	NAC	NAC	<i>C. glabrata</i>	28	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
09	NAC	NAC	<i>C. tropicalis</i>	29	NAC	NAC	<i>C. parapsilosis</i>
10	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	30	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
11	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	31	<i>C. albicans</i>	NAC	<i>C. albicans</i>
12	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	32	NAC	NAC	<i>C. glabrata</i>
13	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	33	NAC	NAC	<i>C. glabrata</i>
14	NAC	NAC	<i>C. glabrata</i>	34	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
15	<i>C. glabrata</i>	NAC	<i>C. parapsilosis</i>	35	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
16	<i>C. glabrata</i>	NAC	<i>C. parapsilosis</i>	36	<i>C. albicans</i>	NAC	<i>C. albicans</i>
17	<i>C. glabrata</i>	NAC	<i>C. glabrata</i>	37	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
18	<i>C. albicans</i>	NAC	<i>C. albicans</i>	38	NAC	NAC	<i>C. tropicalis</i>
19	NAC	NAC	<i>C. parapsilosis</i>	39	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
20	NAC	NAC	<i>C. parapsilosis</i>	40	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>

**IV. BÀN LUẬN**

Hiện tại chưa có nhiều phương pháp chẩn đoán nhiễm Candida xâm lấn, vì vậy các bác sĩ lâm sàng thường dựa các dấu hiệu lâm sàng để thiết lập chẩn đoán. Cách tiếp cận này có thể dẫn đến sử dụng các thuốc kháng nấm không cần thiết cho đối tượng không bị nhiễm hoặc chậm trễ điều trị cho đối tượng thật sự nhiễm nấm Candida spp. xâm lấn. Để có thể chọn lựa

liệu pháp kháng nấm phù hợp cần dựa vào tính nhạy cảm của Candida spp. với từng thuốc kháng nấm. Tuy nhiên, cần 3 - 5 ngày để có thể ghi nhận kết quả kháng nấm đồ, vì tính nhạy cảm của mỗi loài Candida rất khác nhau đối với từng thuốc kháng nấm, nên xác định chính xác loài Candida gây bệnh sẽ giúp các nhà lâm sàng chọn lựa thuốc kháng nấm, chế độ liều điều trị kịp thời và hiệu quả hơn.

Tại bệnh viện Quân Y 175, môi trường CHROMagar Candida được sử dụng để xác định các loài Candida, tuy nhiên chỉ có thể định danh chính xác *C. albicans* và *C. tropicalis* khi so với kết quả multiplex PCR của nghiên cứu. Ở bệnh viện Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh, chỉ phân biệt các loài *C. albicans* hoặc NAC, trong trường hợp cần thiết định danh chính xác thì thực hiện kit sinh hoá, tuy nhiên giá thành bộ kit sinh hoá tương đối cao. Bệnh viện Lê Văn Thịnh chỉ định danh nấm gây bệnh đến mức độ chi.

Trong xét nghiệm vi sinh lâm sàng, môi trường CHROMagar Candida có thể phát hiện mẫu bệnh phẩm nhiễm nhiều hơn 1 loài Candida sẽ với màu sắc khác nhau, dễ dàng phân biệt. Tuy nhiên, trên thực tế mẫu lâm sàng có thể sinh sắc tố đa dạng và khác biệt so với các chủng chuẩn, do đó gây nhiều khó khăn cho việc nhận định kết quả dẫn đến chỉ định điều trị không chính xác. Vì vậy so với phương pháp tạo ống mầm và CHROMagar Candida thì multiplex PCR cho kết quả sớm và đặc hiệu hơn để xác định một số loài Candida gây bệnh [3]. Kỹ thuật multiplex PCR phát hiện Candida spp. từ mẫu bệnh phẩm có nhiều ưu điểm so với phương pháp truyền thống: thời gian cho kết quả nhanh; chỉ cần sử dụng khóm nấm để chiết DNA vì vậy rút ngắn thời gian quá trình phân lập, tăng sinh khóm nấm; có thể phát hiện đồng thời nhiều loài Candida spp. trong trường hợp mẫu bệnh phẩm nhiễm nhiều hơn một loài Candida; kết quả định danh chính xác ít phụ thuộc nhận định chủ quan của kỹ thuật viên.

## V. KẾT LUẬN

Định danh vi nấm gây bệnh bằng phương pháp truyền thống như nuôi cấy trên môi trường phân biệt CHROMagar Candida, thử nghiệm huyết thanh tạo ống mầm cần nhiều thời gian thử nghiệm, khó phân biệt giữa các loài Candida, phụ thuộc chủ quan vào người đọc kết quả. Do đó, quy trình phát hiện các loài Candida bằng kỹ thuật multiplex PCR được nghiên cứu và đã một số kết quả sau:

- Tối ưu hoá thành phần và điều kiện multiplex PCR để phát hiện đồng thời 4 trình tự DNA đặc hiệu của 4 loài Candida: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*.

- Trình tự đặc hiệu của 4 loài *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* sau khi được khuếch đại với DNA khuôn mẫu chiết tách từ mẫu bệnh phẩm đã được gửi giải trình tự. Kết

quả cho thấy trình tự khuếch đại của cả 4 loài có độ tương đồng cao với các trình tự trong ngân hàng dữ liệu của NCBI, từ 94,95 – 100%.

- Với 40 mẫu bệnh phẩm được phát hiện bằng 3 phương pháp: phân biệt khóm nấm trên môi trường phân biệt CHROMagar Candida, thử nghiệm huyết thanh tạo ống mầm và multiplex PCR, thu được kết quả: bằng thử nghiệm tạo ống mầm: Phát hiện 13 loài *C. albicans* và 27 loài Candida non-*albicans*; bằng môi trường CHROMagar Candida: Phát hiện 18 loài *C. albicans*, 5 loài *C. tropicalis*, 3 loài *C. glabrata* và 14 loài non-*albicans* Candida; bằng multiplex PCR: Phát hiện 18 loài *C. albicans*, 7 loài *C. tropicalis*, 8 loài *C. glabrata*, 6 loài *C. parapsilosis* và 1 loài không xác định được.

## VI. LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện dựa trên nguồn kinh phí của Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh cấp cho PGS. TS. Nguyễn Tú Anh theo hợp đồng nghiên cứu khoa học số 223/2020/HĐ-ĐHYD và các anh chị đồng nghiệp cùng tham gia xây dựng nghiên cứu này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Deorukhkar, Sachin C, et al**, (2012), "Evaluation of different media for germ tube production of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*", 3 (9), pp. 704-707.
2. **Neppelenbroek, K. H., et al**, (2014), "Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques", Oral Dis, 20 (4), pp. 329-344.
3. **Pappas, P. G., et al**, (2018), "Invasive Candidiasis", Nat Rev Dis Primers 4pp. 126-180.
4. **Sardi, J. C. O., et al**, (2013), "Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options", J Med Microbiol, 6 (1), pp. 10-24.
5. **Singh A., Goering RV., Simjee S**, (2006), "Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection", Clinical Microbiology Reviews, 19 (3), pp. 512-530.
6. **Vingataramin, Laurie Frost, Eric H**, (2015), "A single protocol for extraction of gDNA from bacteria and yeast", Biotechniques, 58 (3), pp. 120-125.
7. **Phùng Nguyễn Thế Nguyên**, (2015), "Đặc điểm bệnh nhi nhiễm nấm tại Khoa Hồi sức tích cực- Chống độc Bệnh viện Nhi Đồng 1", Y học TP Hồ Chí Minh, 19 pp. 22-28.
8. **Trương Thiên Phú**, (2018), "Phân bố các tác nhân gây nhiễm nấm máu và tình hình kháng thuốc kháng nấm tại Bệnh viện Chợ Rẫy năm 2017", Y học TP Hồ Chí Minh, 22 pp. 149-154.