

dụng vitamin A bị ức chế, nghĩa là có sự điều chỉnh hấp thu tăng dự trữ vitamin A, hoặc tăng nhu cầu để gắn kết một phản ứng miễn dịch [9], do đó sẽ dễ dẫn đến tình trạng thiếu vitamin A.

Từ kết quả trên và tham khảo các nghiên cứu đã cho thấy, tình trạng VAD - TLS ở trẻ gái 11-13 tuổi tại Yên Bái ở mức thấp về vấn đề YNSKĐ; tỷ lệ VAD-TLS là 5,2% không phải là mối quan tâm đáng kể. Tuy nhiên, vẫn nên lưu ý tình trạng VAD và nguy cơ VAD - TLS (SR < 1,05 μ mol/L) ở ĐTNV với tỷ lệ 39,9% và hàm lượng retinol huyết thanh TB ở ĐTNV là 1,13 \pm 0,29 μ mol/L; tương đối gần với ngưỡng nguy cơ thiếu vitamin A (< 1,05 μ mol/L). Do đó, vấn đề phòng chống thiếu vitamin A vẫn cần phải lưu ý trong triển khai can thiệp, đặc biệt đối với những đối tượng nguy cơ.

V. KẾT LUẬN

Tỷ lệ VAD-TLS của trẻ gái từ 11 - 14 tuổi tại Yên Bái là 5,2%, ở mức thấp về ý nghĩa cộng đồng. Tỷ lệ VAD và nguy cơ VAD - TLS là 39,9% cao nhất ở dân tộc H'mông (47,4%), tiếp theo là dân tộc Tày (38,8%), dân tộc Dao (35,1%) và giá trị TB retinol huyết thanh là 1,13 μ mol/L. Tỷ lệ thiếu vitamin A ở học sinh nữ 11-13 tuổi tại Yên Bái ở mức thấp, nhưng vẫn cần lưu tâm bởi tình trạng nguy cơ thiếu vitamin A rất cao, đặc biệt trẻ SDD và nguy cơ SDD thấp còi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Stevens GA, Bennet JE, Hennocq Q et al.** Trends and mortality effects of vitamin A deficiency in children in 138 low-income and middle-income countries between 1991 and 2013: a pooled analysis of population-based surveys. *Lancet Glob Health*, 2015. 3(9): e528-36.
2. **WHO.** Vitamin and mineral requirements in human nutrition. 2nd ed. 2005.
3. **Nguyễn Song Tú.** Đặc điểm nhân trắc, tình trạng vi chất dinh dưỡng và một số yếu tố liên quan đến dinh dưỡng thấp còi ở học sinh 11-14 tuổi tại các trường phổ thông dân tộc bán trú ở một số huyện của tỉnh Điện Biên năm 2018. Báo cáo nghiệm thu cấp Viện, Viện Dinh dưỡng, 2021.
4. **Silva R, Nunes IL, Asiss AMO.** Prevalence and factors associated with vitamin A deficiency in children and adolescents. *J Pediatr (Rio J)*, 2014. 90(5): 486-92.
5. **Viện Dinh dưỡng.** Tổng điều tra dinh dưỡng: một số kết quả chính 2019 - 2020, 2021.
6. **Hoàng Nguyễn Phương Linh và CS.** Tình trạng thiếu máu và yếu tố liên quan ở trẻ 7- 9 tuổi của huyện Phú Bình, tỉnh Thái Nguyên, năm 2017. *Tạp chí Y tế công cộng*, 2020. 52: 6-16.
7. **Nguyễn Song Tú, Trần Thủy Nga và CS.** Tình trạng vitamin A ở bà mẹ sau sinh 6 tháng và một số yếu tố liên quan tại huyện Phú Bình, Thái Nguyên. *Tạp chí Y học dự phòng*, 2017. tập 27,(số 3): 18-26.
8. **Akhtar S, Ahmed A, Randhawa MA and al.** Prevalence of Vitamin A Deficiency in South Asia: Causes, Outcomes, and Possible Remedies. *J Health popul nutr*, 2013: 31(4):413-423.
9. **Lima MSR, Ribeiro PPC et al.** Influence of postpartum supplementation with vitamin A on the levels of immunoglobulin A in human colostrum. *J Pediatr (Rio J)*. 2012. 88(2): 115-8.

SO SÁNH VÀ ĐÁNH GIÁ QUY TRÌNH MULTIPLEX PCR TRONG PHÁT HIỆN CANDIDA SPP. TỪ MẪU BỆNH PHẨM

Nguyễn Tú Anh¹, Nguyễn Minh Thái¹, Lê Thị Thanh Thảo¹,
Phan Cảnh Trình¹, Nguyễn Thị Ngọc Yến³, Nguyễn Hiếu¹,
Trần Quốc Việt⁴, Tôn Hoàng Diệu²

TÓM TẮT

Mở đầu: 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. Một trong những phương pháp đơn giản có thể phát hiện nhanh các loài *Candida* spp. có độ tin cậy, độ đặc hiệu cao và đặc biệt có thể phát hiện đồng thời nhiều loài gây bệnh trong mẫu bệnh phẩm đang được nghiên cứu phát triển – Multiplex PCR. **Mục tiêu:** Nghiên cứu này thực hiện với 2 mục tiêu: Phát hiện 4 loài *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* và *C. parapsilosis* bằng kỹ thuật multiplex PCR và bằng phương pháp truyền thống và so sánh và đánh giá quy trình phát hiện 4 loài *Candida* từ mẫu bệnh phẩm bằng kỹ thuật multiplex PCR. **Phương pháp:** Mẫu *Candida* spp. được thu nhận tại 3 bệnh viện tại TP. HCM từ tháng 10/2020 đến tháng 5/2021. Vì năm được định danh 3 bằng phương pháp: (1) thử nghiệm tạo ống mầm, (2) phân lập trên môi

¹Đại học Y Dược TP.HCM

²Đại học Y Khoa Phạm Ngọc Thạch

³Đại học Nguyễn Tất Thành

⁴Bệnh viện Quân Y 175

Chịu trách nhiệm chính: Tôn Hoàng Diệu

Email: tonhoangdiu@gmail.com

Ngày nhận bài: 29.9.2022

Ngày phản biện khoa học: 18.11.2022

Ngày duyệt bài: 29.11.2022

trường CHROMagar Candida và (3) kỹ thuật multiplex PCR. Sau đó, so sánh và đánh giá quy trình phát hiện 4 loài Candida giữa kỹ thuật multiplex PCR và phương pháp phát hiện kiểu hình trên CHROMagar Candida, dựa trên độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị tiên đoán dương, giá trị tiên đoán âm, độ lặp lại và độ chính xác. **Kết quả:** Kết quả phân lập trên môi trường CHROMagar Candida cho thấy 186 chủng phân lập được với tỷ lệ nhiễm cao nhất là *C. albicans* 112/186 (55,45%), *C. tropicalis* 39/186 (19,31%), *C. glabrata* hoặc *C. parapsilosis* 35/189 (17,33%) và 16 mẫu nghi ngờ không thuộc chi Candida. Định danh bằng kỹ thuật multiplex PCR cho thấy *C. albicans* chiếm 112/186 (55,45%), *C. tropicalis* 39/186 (19,31%), *C. glabrata* 25/186 (12,38%), *C. parapsilosis* 10/189 (4,59%) và 16 mẫu không phát hiện sản phẩm PCR. Quy trình multiplex PCR phát hiện 4 loài Candida sp. đạt 5 chỉ tiêu theo yêu cầu theo hướng dẫn của Bộ Y tế (2016): độ nhạy (93,33%), độ đặc hiệu (100%), độ chính xác (96,19%), giá trị tiên đoán dương (100%), độ lặp lại (đạt), giá trị tiên đoán âm (66,67%) < 90%.

Từ khóa: Candida spp.; Multiplex PCR.

SUMMARY

COMPARISON AND EVALUATION OF MULTIPLEX PCR TECHNIQUE PROCESS OF THE IDENTIFICATION CANDIDA SPP. FROM PATIENT SAMPLES

Background: Although traditional methods of detecting species of Candida are easy to implement, the disadvantages are dependent on objective factors and are time-consuming. The simple methods that can quickly detect Candida spp. with high reliability, specificity, and especially, simultaneous detection of many pathogenic species in the patient samples being researched and developed – the multiplex PCR. **Objectives:** This study aimed to (1) Detect of 4 species of *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, and *C. parapsilosis* by multiplex PCR and traditional methods. (2) Compare and evaluate the process of detecting 4 species Candida spp. from patient samples by multiplex PCR technique. **Method:** Sample Candida spp. was admitted 3 hospitals in Ho Chi Minh city from October 2020 to May 2021. The fungus was detected by 3 methods: (1) Germ tube, (2) isolation on CHROMagar Candida medium, and (3) multiplex PCR technique. Then, compare the detection process of 4 species of Candida by multiplex PCR technique and detection method on CHROMagar Candida, based on sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, repeatability, and accuracy. **Results:** Isolated on CHROMagar Candida medium: 186 isolates with the highest infection rate being *C. albicans* 112/186 (55.45%), *C. tropicalis* 39/186 (19.31%), *C. glabrata* or *C. parapsilosis* 35/189 (17.33%) and 16 samples suspected of not belonging Candida. Identification by multiplex PCR: 186 PCR products were detected, of which *C. albicans* 112/186 (55.45%), *C. tropicalis* 39/186 (19.31%), *C. glabrata* 25/186 (12.38%), *C. parapsilosis* 10/189 (4.59%) and 16 samples did not detect PCR products. Multiplex PCR procedure detected 4 species of Candida spp. The

criteria were evaluated, and there were 5 satisfactory criteria according to the guidance of the Ministry of Health (2016): sensitivity (93.33%), specificity (100%), accuracy (96.19%), positive predictive value (100%), repeatability (pass), negative predictive value (66.67%) < 90%.

Keywords: Candida spp.; Multiplex PCR

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thời gian qua, tỷ lệ gây bệnh của vi nấm Candida có xu hướng gia tăng tại Việt Nam và tập trung vào 4 loài *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* và *C. parapsilosis* [3]. Candida albicans chiếm đến 80 – 85% nguyên nhân gây OPC và VVC; tiếp đến là các loài Candida glabrata, Candida tropicalis đơn nhiễm hoặc đa nhiễm [8]. Sự thay đổi này ảnh hưởng rõ rệt đến phác đồ điều trị do đặc điểm nhạy cảm với thuốc kháng nấm của các loài Candida spp. khác nhau – *C. glabrata* đề kháng tự nhiên đối với các triazole, *C. tropicalis* tương đối nhạy cảm với fluconazole nhưng tình trạng đề kháng với fluconazole của loài này hiện đang được báo động ở một số quốc gia, *C. parapsilosis* có tính đề kháng cao đối với echinocandin, một số chủng *C. parapsilosis* có khả năng kháng 2azole [6].

Tuy nhiên, xét nghiệm vi sinh lâm sàng tại các bệnh viện chủ yếu phát hiện Candida spp. bằng phương pháp nuôi cấy. Mặc dù đây là phương pháp tiêu chuẩn trong xét nghiệm vi sinh nhưng vẫn tồn tại các nhược điểm: kết quả nuôi cấy truyền thống phân biệt phụ thuộc nhiều về cảm quan của xét nghiệm viên, thời gian thu nhận kết quả tương đối dài (2 – 3 ngày), trong các trường hợp đồng thời nhiễm từ 2 loài Candida trở lên rất khó để phát hiện chính xác. Một trong những phương pháp hiện nay có thể phát hiện nhanh các loài Candida spp. có độ tin cậy, đặc hiệu cao và đặc biệt, phát hiện được đồng thời nhiều loài gây bệnh trong mẫu bệnh phẩm đang được nghiên cứu phát triển, đó là kỹ thuật multiplex PCR.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi so sánh và đánh giá quy trình Multiplex PCR trong phát hiện Candida spp. từ mẫu bệnh phẩm nhằm cung cấp thêm bằng chứng khoa học cho kết quả xét nghiệm trên bệnh nhân nhiễm nấm Candida một cách chính xác và kịp thời giúp bác sĩ lựa chọn phác đồ điều trị kháng nấm nhanh chóng, hiệu quả.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu. Mẫu Candida spp. được thu nhận tại Bệnh viện Đại học Y Dược TP. HCM, Bệnh viện Lê Văn Thịnh và Bệnh viện Quân đội 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 trong phản ứng multiplex PCR, lưu giữ tại Bộ Môn Vi sinh- Ký sinh, Khoa Dược – Đại Học Y Dược Thành Phố Hồ Chí Minh. Cỡ mẫu được tính theo công thức $N = [t^2 \times P \times (1 - P)]/m^2$, với độ tin cậy 95%.

Hóa chất: Dung dịch đệm PCR 10 X (Abm), dNTPs 10 mM (Abm), $MgSO_4$ 25 mM (Abm), Enzyme Tag DNA Polymerase 5 UI/ μ l (Abm), RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (Promega, Mỹ), 100 bp DNA Marker (Abm), Đệm tải (Merck), môi trường CHROMagar *Candida* (Himedida^R, India), môi trường Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Merck, Đức), môi trường Sabouraud Dextrose Broth (SDB) (Merck, Đức).

Phương pháp. Mẫu nấm *Candida* spp. từ bệnh phẩm được phân lập trên môi trường SDA và được chuyển về phòng thí nghiệm trong vòng 48 tiếng. Đồng thời tiến hành phát hiện song song *Candida* bằng 2 phương pháp: Phương pháp truyền thống và sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử Multiplex PCR. Chúng tôi chọn các phương pháp truyền thống để định danh *Candida* spp.: Phân lập trên môi trường phân biệt CHROMagar *Candida*, thử nghiệm tạo ống mầm và phản ứng lên men đường. a

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. Đây là môi trường có 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* [5].

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. Môi trường kích thích tạo ống mầm thường được sử dụng như huyết thanh người, huyết thanh cừu, lòng trắng trứng,.... 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. Thử nghiệm tạo ống mầm được dùng để phân biệt nhanh *C. albicans* và *C. non-albicans*, nhưng các nghiên cứu gần đây cho thấy một số loài *C. non-albicans* 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 [5].

Lấy 1 khóm nấm *Candida* spp. từ môi trường SDA 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 μ l dịch nuôi cấy, trải đều trên lam kính và hơ trên ngọn lửa đèn cồn, sau đó nhuộm với thuốc nhuộm Fuschin 5 X trong 1 phút, rửa nhẹ nhàng với nước. Quan sát ống mầm dưới kính hiển vi ở vật kính X100.

Lên men đường. Trong điều kiện kỵ khí, vi nấm lên men đường, tạo acid hữu cơ và CO_2 , pH acid làm mất màu tím của chỉ thị Bromocresol purple (BCP) và khí CO_2 sẽ xuất hiện trong ống Durham đặt trong ống nghiệm [4]. Thí nghiệm thực hiện phản ứng lên men 4 đường glucose, maltose, saccharose và lactose. Mỗi mẫu thí nghiệm với 4 ống nghiệm chứa 2 ml môi trường pepton lỏng, thêm 0,001 g chỉ thị BCP và ống Durham úp ngược bên trong, thêm lần lượt 2% các loại đường glucose, maltose, saccharose và lactose. Hút 1 ml dịch nấm (có độ đục 1,0 – 2,0 McFarland $\sim 3,0 - 6,0 \times 10^8$ tế bào/ml) vào mỗi ống nghiệm. Ủ ở 37 °C. Đọc kết quả mỗi 2 – 3 ngày trong 10 ngày.

Kỹ thuật Multiplex PCR. Kỹ thuật multiplex PCR có thể khuếch đại đồng thời nhiều trình tự DNA đích bằng cách sử dụng nhiều cặp mồi trong một PCR. Multiplex PCR được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực y sinh học để phát hiện các vi sinh vật gây bệnh [7]. Trong nghiên cứu của chúng tôi đánh giá quy trình multiplex PCR dung phát hiện 4 loài *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* và *C. tropicalis* – quy trình này đã được nhóm nghiên cứu của Bộ môn Vi sinh ký sinh thiết kế và tối ưu hoá.

Chiết tách DNA từ khóm nấm: lấy một vòng dây cấy khóm nấm phân tán trong 100 μ l nước khử khoáng, thêm 455 μ l dung dịch chiết DNA (NaOH 2M, Ethanol 96% và EDTA 0,025M), lắc nhẹ và đun nóng hỗn hợp ở 80 °C trong 10 phút. Ly tâm hỗn hợp ở 10.000 vòng trong 10 phút, thu tủa, để khô tự nhiên. Sau đó, phân tán tủa vào 100 μ l 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).

Khuếch đại trình tự DNA đặc hiệu bằng Multiplex PCR với thành phần, trình tự mồi và chương trình Multiplex PCR như sau: Dung dịch đệm PCR 10 X 2,2 μ l; $MgSO_4$ 25 mM 2,2 μ l; Taq DNA polymerase 5 UI/ μ l 0,3 μ l; dNTPs 10 mM 0,5 μ l, mỗi cặp mồi xuôi và mồi ngược của mỗi loài có nồng độ 5 μ M 0,3 μ l (trừ cặp mồi của *C. parapsilosis* 5 μ M 0,6 μ l; F của *C. albicans* 5 μ M 0,6 μ l).

Bảng 1: Trình tự mồi của Candida spp

Loài	Trình tự đích	Mồi	Trình tự mồi	Kích thước (bp)
C. albicans	IGS 1	F _{alb}	AGATTATTGCCATGCCCTGAG	606
		R _{alb}	CCATGTCGAACGTAGCGTAT	
C. parapsilosis	Protein giả định	F _{para}	TACACCAAGCGACTCAGC	490
		R _{para}	ACCAGCTGCTTTGACTTG	
C. glabrata	Phospholipase 1	F _{gla}	ACCGTGCTTGCCTCTACA	212
		R _{gla}	GACATCTGAGCCTCGTCTGA	
C. tropicalis	IGS 1	F _{tro}	AGAACAAGAAAACAGTGAAGCAA	126
		R _{tro}	CCATGTCGAACGTAGCGTAT	

Chương trình và điều kiện Multiplex PCR: Giai đoạn 1: biến tính khởi đầu 95°C trong 5 phút. Giai đoạn 2 gồm 40 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 3 giai đoạn: giai đoạn biến tính 95°C trong 30 giây; giai đoạn gắn mồi 59°C trong 30 giây; giai đoạn kéo dài 72 °C trong 30 giây. Cuối cùng, giai đoạn kéo dài hoàn chỉnh: 72°C trong 10 phút. Sau đó, chạy điện di ở điện thế 120 V/45 phút để phát hiện các sản phẩm khuếch đại DNA và định danh theo kích thước band điện di.

Đánh giá quy trình phát hiện Candida spp. bằng multiplex PCR

Quy trình phát hiện Candida spp. bằng kỹ thuật multiplex PCR được đánh giá đạt khi: Độ nhạy ≥ 90%, độ đặc hiệu ≥ 90%, giá trị tiên đoán âm ≥ 90%, giá trị tiên đoán dương ≥ 90%, độ chính xác ≥ 90%, độ lặp lại [1], [2]

III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Phân biệt Candida spp. trên môi trường CHROMagar Candida. Trong 185 mẫu bệnh phẩm, có 169 mẫu phân lập được 194 loại nhóm nấm (1 mẫu bệnh phẩm có thể phân lập được > 1 loại nhóm nấm) và 16 mẫu không xác định thuộc chi Candida. Dựa vào màu sắc nhóm, nhận định có 115/210 nhóm là C. albicans (54,76%), 40/210 (19,05%) là C. tropicalis. Theo hướng dẫn của nhà sản xuất, màu sắc nhóm nấm của C. glabrata và C. parapsilosis rất khó phân biệt: C. glabrata có màu tím hoa cà – nâu, còn C. parapsilosis và các loài khác có màu trắng đến màu hoa cà. Vì vậy, 39 loại nhóm có màu từ trắng, hồng tím nhạt đến tím chỉ có thể định danh C. glabrata hoặc C. parapsilosis (18,57%). Có 16 mẫu mặc dù thu được nhóm nấm trên môi trường SDA nhưng trên CHROMagar Candida có màu sắc không theo hướng dẫn của nhà sản xuất, vì vậy chúng tôi nghi ngờ những mẫu này không phải Candida. (Bảng 2).

Bảng 2: Kết quả phân lập 4 loài Candida spp. trên CHROMagar Candida

Màu sắc nhóm nấm	Loài	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Xanh lá	C. albicans	115	54,76

Xanh dương hoặc xanh tím	C. tropicalis	40	19,05
Tím hoặc trắng đến hồng nhạt	C. glabrata hoặc C. parapsilosis	39	18,57
Không xác định		16	7,62
Tổng		210	100,00

Thử nghiệm tạo ống mẫn. 87/185 mẫu xuất hiện ống mẫn sau 4 giờ ủ trong môi trường huyết thanh, 98/185 mẫu không phát hiện được ống mẫn hoặc chỉ quan sát thấy các ống mẫn giả. Thử nghiệm tạo ống mẫn là thử nghiệm chuyên biệt, dựa vào khả năng tạo ống mẫn của hơn 90% C. albicans. Vì vậy, với kết quả thu nhận được, có thể phân biệt có 87 mẫu là C. albicans và 98 mẫu là các loài C. non-albicans. Trong đó, 37 mẫu thu nhận từ bệnh viện ĐHY Dược TP. HCM, 36 mẫu từ bệnh viện Lê Văn Thịnh và 24 mẫu từ bệnh viện Quận Y 175

Phát hiện Candida spp. bằng kỹ thuật multiplex PCR. Sau khi thực hiện multiplex PCR trên 185 mẫu, chúng tôi thu nhận 112 sản phẩm ~ 606 bp, 10 sản phẩm ~ 490 bp, 25 sản phẩm ~ 212 bp và 39 sản phẩm ~ 126 bp (Hình 3.7, Phụ lục 6 và Phụ lục 7). Dựa trên kích thước trình tự khuếch đại, nhận định có 112 loài (55,45%) là C. albicans, chiếm tỷ lệ cao nhất; thứ hai là 39 loài C. tropicalis (19,31%), 25 loài C. glabrata (12,38%) và 10 loài C. parapsilosis (4,95%). Trong đó, đơn nhiễm C. albicans nhiều nhất với 97 mẫu (53,59%), đa nhiễm C. albicans và C. glabrata có 11 mẫu (6,08%), C. albicans và C. parapsilosis có 4 mẫu (2,21%). Đơn nhiễm C. tropicalis cao thứ hai với 33 mẫu (18,23%), đa nhiễm C. tropicalis và C. glabrata có 6 mẫu (3,31%). So với kết quả quan sát màu nhóm nấm trên môi trường CHROMagar Candida – khó phân biệt 2 loài C. glabrata và C. parapsilosis, thì kỹ thuật multiplex PCR dễ dàng phân biệt được 2 loài này do chúng có sản phẩm khuếch đại có kích thước khác nhau (lần lượt ~ 212 bp và ~ 126 bp). C. glabrata có 8 mẫu (4,42%) và C. parapsilosis có 6 mẫu (3,31%). 16 mẫu không phát hiện sản phẩm PCR (8,84%), phù hợp với kết quả khi phân lập trên CHROMagar Candida

cho nhận định không phải Candida.

Đánh giá quy trình phát hiện Candida spp. bằng kỹ thuật multiplex PCR. Theo Margarida Neves SOUZA, so sánh 4 phương pháp thường dùng để định danh Candida spp. (2015) cho thấy môi trường CHROMagar Candida có thể phân biệt các loài bằng màu sắc khóm, có độ ổn định cao và dễ thực hiện. Trên thực tế, các bệnh viện cũng đang chủ yếu sử dụng môi trường này để định danh Candida spp. Vì vậy, trong nghiên cứu, chúng tôi sử dụng kết quả phát hiện trên môi trường CHROMagar Candida là phương pháp chuẩn tham khảo [5].

Bảng 3: Kết quả phát hiện Candida spp. từ mẫu bệnh phẩm giữa 2 phương pháp định danh

Loài	Phân lập trên môi trường CHROMagar Candida	Kỹ thuật multiplex PCR
C. albicans	115	112
C. tropicalis	40	39
C. glabrata	39	25
C. parapsilosis		10
Không xác định Candida spp.	16	16
Tổng	210	202

Xác định các chỉ tiêu độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị tiên đoán dương, giá trị tiên đoán âm, độ lặp lại và độ chính xác của quy trình. Theo "Sổ tay xét nghiệm bệnh truyền nhiễm I và II" của Cục Y tế dự phòng (Bộ Y tế) ban hành năm 2016 và 2018, các chỉ tiêu đánh giá độ chính xác, độ đặc hiệu, độ nhạy, giá trị tiên đoán dương và giá trị tiên đoán âm phải đạt $\geq 90\%$. Với kết quả thu được tại Bảng 3, các thông số được xác định như sau: số lượng dương tính thật (TP): 186, số lượng dương tính giả (FP): 0, số lượng âm tính thật (TN): 16, số lượng âm tính giả (FN): 8.

Độ nhạy: $P_{se} = TP / (TP + FN) \times 100 = 93,33\%$

Độ đặc hiệu: $P_{sp} = TN / (TN + FP) \times 100 = 100\%$

Giá trị tiên đoán dương: $PPV = TP / (TP + FP) \times 100 = 100\%$

Giá trị tiên đoán âm: $NPV = TN / (TN + FN) \times 100 = 66,67\%$

Độ chính xác: là tỷ lệ phần trăm có cùng kết quả của một xét nghiệm chẩn đoán cần đánh giá và phương pháp chuẩn tham khảo (cả âm tính và dương tính). Multiplex PCR phát hiện 186 trình tự đặc hiệu và 16 mẫu không phát hiện sản phẩm, xác định độ chính xác $96,1\% > 90\% \sim$ đạt yêu cầu.

$P_{AC} = [(186 + 16) / (194 + 16)] \times 100 = 96,19\%$

Độ lặp lại: chúng tôi tiến hành đánh giá độ lặp lại bằng cách thực hiện thí nghiệm 2 lần độc lập với 2 lần chuẩn bị hóa chất thí nghiệm khác nhau trên 14 mẫu bệnh phẩm ngẫu nhiên. Kết quả cho thấy độ lặp lại của quy trình phát hiện Candida spp. bằng kỹ thuật multiplex PCR đạt 100%, tỷ lệ này cho thấy kết quả xét nghiệm đạt độ ổn định cao và đáng tin cậy.

IV. BÀN LUẬN

Hiện nay, phương pháp nuôi cấy truyền thống và thử nghiệm sinh hóa được xem là phương pháp tiêu chuẩn vàng để xác định nấm men Candida. Tuy nhiên, các phương pháp này thường tốn nhiều thời gian và công sức, kết quả phụ thuộc rất nhiều vào yếu tố chủ quan như kinh nghiệm đọc kết quả của kỹ thuật viên. Phân biệt 4 loài C. albicans, C. tropicalis, C. glabrata và C. parapsilosis trên môi trường CHROMagar Candida dễ thao tác, nhanh chóng và có thể phát hiện các trường hợp nhiễm 2 loài Candida trở lên. Tuy nhiên, C. glabrata và C. parapsilosis cho màu gần giống nhau từ trắng đến hồng nhạt, gây khó khăn khi phân biệt. So sánh giữa phương pháp định danh dựa trên sự tạo ống mầm và CHROMagar cho thấy tỷ lệ nhiễm C. albicans thấp hơn (47,03% và 55,45%). Chúng tôi thực hiện đánh giá quy trình phát hiện 4 loài Candida spp. bằng kỹ thuật multiplex PCR dựa vào 6 chỉ tiêu theo hướng dẫn của Sổ tay xét nghiệm bệnh truyền nhiễm I và II. 5/6 chỉ tiêu có kết quả $> 90\% \sim$ đạt yêu cầu, còn chỉ tiêu giá trị tiên đoán âm chỉ đạt 66,67% $< 90\% \sim$ không đạt. Bảng kỹ thuật multiplex PCR chỉ phát hiện được 186/194 loài Candida, trong đó trên môi trường CHROMagar Candida kết quả này là 194/194.

Các mẫu không phát hiện được bằng multiplex PCR có thể do không thuộc 4 loài Candida. Do đó, để có giá trị tiên đoán âm chính xác, các mẫu này cần được định danh bằng giải trình tự gen. Trong nghiên cứu này, kỹ thuật multiplex PCR đã thể hiện ưu điểm về sự đơn giản của quy trình cũng như thời gian thực hiện để định danh được Candida spp. Các sản phẩm PCR đã được khẳng định mang tính đặc hiệu của 4 loài Candida spp. trong nghiên cứu bằng phương pháp giải trình tự mà nhóm nghiên cứu trước đã thực hiện. Tuy vậy, sản phẩm khuếch đại đoạn gen IGS1 có kích thước 126 bp của C. tropicalis còn chưa rõ, để giải quyết vấn đề này có thể cần phải thiết kế cặp mồi đặc hiệu khác

V. KẾT LUẬN

Kết quả so sánh và đánh giá quy trình phát

hiện Candida spp. bằng kỹ thuật multiplex PCR từ mẫu bệnh phẩm cho thấy phương pháp truyền thống như lên men đường không cho kết quả ổn định chỉ có 43/185 mẫu có kết quả tương đồng với hướng dẫn định danh và thời gian đọc kết quả từ 7 – 10 ngày. Phản ứng tạo ống mầm chỉ phân biệt C. albicans và C. non-albicans và phụ thuộc vào quan sát chủ quan của kỹ thuật viên. Phân lập trên môi trường CHROMagar Candida phụ thuộc vào khả năng phân biệt màu sắc, khó xác định các loại nấm cùng dải màu sắc. Kỹ thuật multiplex PCR có kết quả phát hiện Candida spp. chính xác và khách quan hơn, có thể phân biệt 2 loài C. parapsilosis và C. glabrata dựa vào kích thước sản phẩm multiplex PCR. Quy trình multiplex PCR phát hiện 4 loài Candida spp. đã được đánh giá các chỉ tiêu, có 5 chỉ tiêu đạt yêu cầu theo hướng dẫn của Bộ Y tế (2016). Kết quả nghiên cứu là tiền đề cho việc phát triển các kỹ thuật sinh học phân tử để phát hiện nhanh Candida spp. từ các mẫu bệnh phẩm.

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. **Bộ Y Tế - Cục Y tế dự phòng**, (2018), Sổ tay xét nghiệm bệnh truyền nhiễm II, pp.
2. **Bộ Y Tế - Cục Y tế Dự Phòng**, (2016), Sổ tay xét nghiệm bệnh truyền nhiễm Tập 1, pp. 5-7.
3. **Nguyễn Thị Hoài Thu**, (2019), "Định danh Candida trên môi trường CHROMagar Candida ở người bệnh bị viêm quanh móng đến khám tại Bệnh viện Da Liễu Đà Nẵng", Tạp chí Y học Dự phòng, 29 (6), pp. 259.
4. **Amy L. Leber**, (2016), Clinical Microbiology Procedures Handbook, pp. 1303-1308.
5. **Deorukhkar S. C, Roushani S**, (2018), "Identification of Candida Species: Conventional Methods in the Era of Molecular Diagnosis", Identification of Candida Species: Conventional Methods in the Era of Molecular Diagnosis, 1 (1), pp. 1-6.
6. **Kimura M, Araoka H, Yamamoto H, Asano-Mori Y, et al**, (2017), "Clinical and Microbiological Characteristics of Breakthrough Candidemia in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients in a Japanese Hospital.", Antimicrob Agents Chemother, 61 (4), pp. pii: e01791-01716.
7. **Singh A., Goering RV., Simjee S e a**, (2006), "Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection", Clinical Microbiology Reviews, 19 (3), pp. 512-530.
8. **Sobel JD**, (2010), "Changing trends in the epidemiology of Candida bloodstream infections: a matter for concern", Crit Care Med, 38 (3), pp. 990-992.

ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ BƯỚC ĐẦU ĐIỀU TRỊ UNG THƯ BIỂU MÔ TẾ BÀO GAN BẰNG ĐỐT SÓNG CAO TẦN TẠI BỆNH VIỆN BẠCH MAI

Trần Thanh Thủy Nhân¹, Phạm Minh Thông^{2,3}, Lê Văn Kháng³

TÓM TẮT

Mục tiêu nghiên cứu: đánh giá hiệu quả điều trị, độ an toàn và các yếu tố liên quan đến hiệu quả điều trị ung thư biểu mô tế bào gan bằng phương pháp sóng cao tần (RFA). **Đối tượng và phương pháp:** Nghiên cứu tiền cứu khảo sát 67 u trên 58 bệnh nhân có chẩn đoán ung thư biểu mô tế bào gan được điều trị bằng phương pháp RFA tại Bệnh viện Bạch mai 2021-2022. Hiệu quả điều trị bước đầu được đánh giá bằng tỉ lệ đáp ứng điều trị hoàn toàn trên

phim CHT gan, mật sau 1-3 tháng và 6 tháng điều trị. **Kết quả:** Có 67 u trên 58 bệnh nhân được điều trị bằng phương pháp RFA qua da. Kích thước u trung bình là $31,2 \pm 7,4$ mm. Tỉ lệ đáp ứng điều trị hoàn toàn sau 3 tháng điều trị chiếm 95.5% và sau 6 tháng là 91.0%. Các khối u kích thước lớn hơn 30mm cần kết hợp điều trị TACE và RFA trong điều trị bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan. **Kết luận:** Đốt sóng cao tần là phương pháp an toàn và hiệu quả trong điều trị bệnh nhân HCC

Từ khóa: đốt sóng cao tần (RFA), ung thư biểu mô tế bào gan.

SUMMARY

ASSESSMENT OF FIRST STEP RESULTS IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA TREATMENT USING RADIOFREQUENCY ABLATION AT BACH MAI HOSPITAL

Background and aims: Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common

¹Bệnh viện Đa khoa tỉnh Điện Biên

²Trường Đại học Y Hà Nội

³Bệnh viện Bạch Mai

Chịu trách nhiệm chính: Trần Thanh Thủy Nhân

Email: tranthanhthuyhancdha@gmail.com

Ngày nhận bài: 26.9.2022

Ngày phản biện khoa học: 21.11.2022

Ngày duyệt bài: 28.11.2022