

Xác định loài nấm *Candida* phân lập từ máu người bằng bộ kit PCR-RFLP do Học viện Quân y sản xuất

Đỗ Ngọc Anh^{1*}, Lê Trần Anh¹, Nguyễn Lê Huyền Trang²
Hoàng Cao Sạ³, Nguyễn Khắc Lực¹

¹Học viện Quân y

²Viện Kiểm nghiệm vắc xin và Sinh phẩm y tế

³Bệnh viện đa khoa Tp. Nam Định

Ngày nhận bài 21.12.2015, ngày chuyển phản biện 25.12.2015, ngày nhận phản biện 20.1.2016, ngày chấp nhận đăng 27.1.2016

Mục tiêu của nghiên cứu là ứng dụng bộ kit PCR-RFLP (Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) do Học viện Quân y sản xuất để xác định loài nấm men phân lập từ máu bệnh nhân nhiễm nấm máu. 93 mẫu nấm men phân lập từ máu bệnh nhân đã được sử dụng để xác định loài bằng bộ kit PCR-RFLP. Loài nấm được xác định căn cứ vào kích thước sản phẩm PCR và số lượng, kích thước các mảnh cắt giới hạn. Kết quả cho thấy, trong số 93 chủng nấm men phân lập từ máu có 18 chủng là *Candida albicans*, 47 chủng *C. tropicalis*, 1 chủng *C. krusei*, 6 chủng *C. glabrata*, 16 chủng *C. parapsilosis* và 5 chủng chưa rõ loài. 5 chủng chưa rõ loài được xác định là *Candida mesorugosa* bằng so sánh trình tự gen. Thông qua nghiên cứu, có thể kết luận rằng: bộ kit PCR-RFLP là công cụ đơn giản, có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, có thể ứng dụng tốt trong xác định các loài nấm phân lập từ máu, độ chính xác cao hơn so với soi tươi và định danh bằng máy vitek 2 compact.

Từ khóa: máu, nấm men, PCR-RFLP, xác định.

Chỉ số phân loại 3.2

Distribution of *Candida* species collected from blood of Vietnamese patients based on PCR-RFLP kit

Summary

The purpose of this study was to identify yeast species isolated from the blood samples by PCR-RFLP kit. In this study, the authors used PCR-RFLP kit as a method for the specification of yeast isolates from 93 blood samples. The amplified product was digested using restriction enzyme by RFLP to identify candida species. The results showed that, the most frequently found species was *C. tropicalis* (n = 47, 50.54%), and followed by *Candida albicans* (n = 18, 19.35%), *C. parapsilosis* (n = 16, 17.20%), *C. glabrata* (n = 6, 6.45%), *C. krusei* (n = 1, 1.08%) and 5 *Candida* spp. By sequencing the PCR products, these 5 isolates were identified as *C. mesorugosa*. In conclusion, PCR-RFLP is an easy, highly sensitive, specific and valuable tool for the rapid identification of yeast isolates from blood. This rapid method will help clinicians to decide on empirical therapy in yeast cases before antifungal susceptibility results are available.

Keywords: blood, identification, PCR-RFLP kit, yeast.

Classification number 3.2

Đặt vấn đề

Candida sp. được xác định là căn nguyên đứng hàng đầu gây nhiễm nấm máu ở người. Trước đây, nhiều nghiên cứu cho rằng *C. albicans* là căn nguyên gây nhiễm nấm máu phổ biến nhất trong số các nấm *Candida sp.* Tuy nhiên, một số nghiên cứu gần đây cho thấy, nhiễm nấm máu do *Candida non-albicans* có xu hướng tăng lên. Theo một số nghiên cứu tại Ấn Độ, *C. tropicalis* là căn nguyên phổ biến nhất gây nhiễm nấm máu [1]. Một số vi nấm khác có thể gây nhiễm nấm máu nhưng tỷ lệ gặp ít hơn là *C. neoformans*, *Penicillium marneffeii*... [2-4].

Loài nấm *Candida* có thể được xác định bằng các biện pháp truyền thống như soi tươi, nuôi cấy, thử nghiệm huyết thanh, thử phản ứng

*Tác giả liên hệ: Tel: 0989255773, Email: dranhk61@gmail.com

sinh hóa... nhưng các phương pháp này thường mất khá nhiều thời gian hoặc gặp phải những khó khăn nhất định và một số trường hợp vẫn không xác định được loài [1, 5]. Với ưu điểm cho kết quả nhanh và chính xác, kỹ thuật RFLP-PCR được nhiều tác giả trên thế giới lựa chọn sử dụng. Trong khuôn khổ đề tài cấp nhà nước mã số KC10.32/11-15, nhóm nghiên cứu của Học viện Quân y đã chế tạo thành công bộ kit PCR-RFLP xác định 7 loài nấm men gây bệnh thường gặp. Nghiên cứu này nhằm mục tiêu ứng dụng bộ kit PCR-RFLP do Học viện Quân y sản xuất để xác định loài nấm men phân lập từ máu bệnh nhân nhiễm nấm máu.

Đối tượng, vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

93 chủng nấm men được phân lập từ máu của người bệnh nhiễm nấm máu tại Bệnh viện Chợ Rẫy (85 chủng) và Bệnh viện Quân y 103 (8 chủng).

Vật liệu nghiên cứu

Dụng cụ: máy PCR (GeneAmp PCR system 9700 AB - Applied Biosystem, Mỹ), máy ly tâm lạnh Mikro 22R (Hettech, Đức), máy soi và chụp gel Dolphin Doc (Wealtec, Mỹ), bộ điện di...

Sinh phẩm hóa chất: bộ kit PCR-RFLP do Học viện Quân y sản xuất (gồm các thành phần chính: dung dịch MC1-RFLP, MC2-RFLP, M-enzyme, T-buffer, Marker 100, Loading dye, chứng dương, chứng âm...), Sabouraud's Dextrose Agar (SDA), dung dịch NaCl 0,9%, dung dịch mực tàu, bộ kit tách ADN tổng số (QIAGEN, Mỹ), gel agarose, dung dịch TBE 0,5%, các hóa chất cần thiết khác.

Phương pháp nghiên cứu

Phân loại nấm men bằng hình thái: các chủng nấm được tăng sinh bằng cách cấy trên môi trường thạch Sabouraud. Khuẩn lạc sau khi mọc được quan sát, chẩn đoán hình thái (soi tươi - nhuộm mực tàu); còn đối với những nấm *Candida sp.* được tiến hành thử nghiệm huyết thanh.

Thử nghiệm huyết thanh: lấy tế bào nấm từ khuẩn lạc cho vào huyết thanh và ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1-2 giờ; sau đó đem ra làm tiêu bản: nếu xuất hiện ống mầm thì đó là nấm *C. albicans*, không xuất hiện ống

mầm thì là *C. non-albicans*.

Tách chiết ADN và thực hiện nhân đoạn gen đích của nấm men: các mẫu nấm men được tách ADN theo quy trình của Hãng QUIAGEN (Mỹ). Sau đó, ADN được dùng làm khuôn cho phản ứng PCR. Thành phần phản ứng PCR gồm: 2 µl ADN tổng số, 12 µl dung dịch MC1-RFLP và 8 µl dung dịch MC2-RFLP. Phản ứng PCR được thực hiện trên máy luân nhiệt Thermocycle của Hãng Eppendorf (Đức). Thời gian các bước chạy phản ứng PCR như sau: 1 chu kỳ 94°C trong 5 phút; 35 chu kỳ mỗi chu kỳ gồm 94°C trong 40 giây, 56°C trong 45 giây, 72°C trong 1 phút; 1 chu kỳ 72°C trong 15 phút.

Xác định loài nấm men bằng phương pháp RFLP-PCR: sản phẩm phản ứng PCR được cắt giới hạn với các thành phần: 10 µl dung dịch M-enzyme, 11 µl T-buffer và 9 µl sản phẩm PCR. Hỗn dịch được ủ trong bể ổn nhiệt ở nhiệt độ 37°C trong 90 phút. Sản phẩm cắt giới hạn và sản phẩm PCR sau đó được điện di kiểm tra trên thạch Agarose 2% trong thời gian 45 phút ở điện thế 100 V cùng với thang ADN chuẩn 100bp (Norgen). Bản gel điện di tiếp tục được nhuộm bằng ethidium bromide (0,5 µg/ml) trong 15 phút và được ghi hình trên thiết bị chụp gel Dolphin Doc (Wealtec, Mỹ). Hình ảnh điện di được sử dụng để phân tích xác định loài nấm men dựa vào kích thước sản phẩm PCR và cắt giới hạn như bảng 1 [6].

Bảng 1: kích thước sản phẩm PCR và các mảnh cắt giới hạn

Loài nấm	Kích thước sản phẩm PCR	Kích thước sản phẩm cắt giới hạn
<i>C. albicans</i>	535	297, 238
<i>C. glabrata</i>	871	557, 314
<i>C. tropicalis</i>	524	340, 184
<i>C. krusei</i>	510	261, 249
<i>C. guilliermondii</i>	608	371, 155, 82
<i>C. parapsilosis</i>	520	520
<i>C. neoformans</i>	556	428, 128

Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Địa điểm nghiên cứu: Labo Trung tâm Nghiên cứu y dược học quân sự và Labo nấm Bộ môn Ký sinh trùng - Học viện Quân y.

Thời gian nghiên cứu: từ tháng 1.2015 đến tháng 9.2015.

Xử lý và phân tích số liệu

Các số liệu nghiên cứu được xử lý và phân tích bằng các công cụ như SPSS 13.0 for windows, BioEdit...

Kết quả

Kết quả định danh các chủng nấm men bằng phương pháp phân loại theo hình thái được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2: kết quả định danh nấm men bằng hình thái

Loài nấm	Số lượng	Tỷ lệ %
<i>Candida albicans</i>	17	18,28
<i>Candida non-albicans</i>	76	81,72
Tổng	93	100

Các chủng nấm men được phân loại sơ bộ bằng thử nghiệm huyết thanh. Các chủng sinh ống mầm thì kết luận theo hình thái là *C. albicans*. Đối với những chủng không sinh ống mầm tiếp tục được nhuộm mực tàu. Kết quả cho thấy, trong số 93 chủng nấm nghiên cứu có 17 chủng là *C. albicans*, 76 chủng là *Candida non-albicans*. Kết quả định danh các chủng nấm men bằng kỹ thuật PCR- RFLP được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3: kết quả định danh nấm men bằng kỹ thuật PCR- RFLP

Loài nấm	Số lượng	Tỷ lệ %
<i>Candida tropicalis</i>	47	50,54
<i>Candida albicans</i>	18	19,35
<i>Candida parapsilosis</i>	16	17,20
<i>Candida glabrata</i>	6	6,45
<i>Candida krusei</i>	1	1,08
<i>Candida spp.</i>	5	5,38
Tổng	93	100

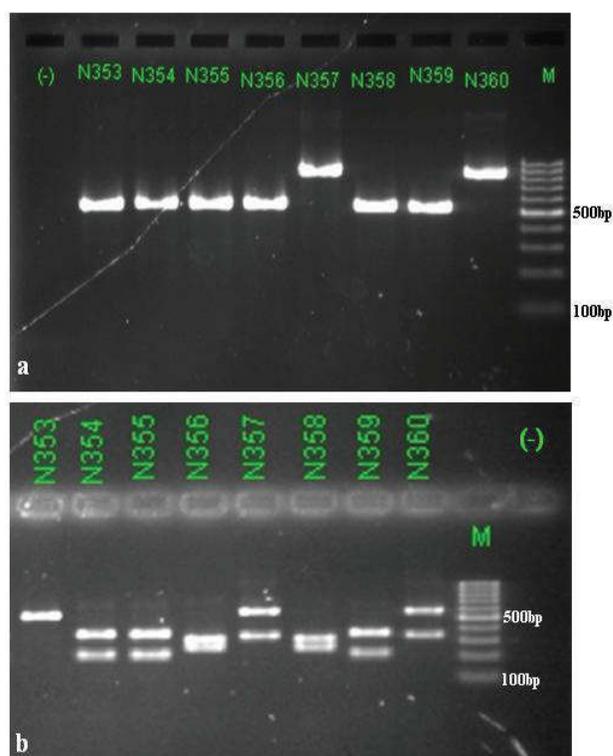
Kết quả xác định loài nấm bằng kỹ thuật PCR-RFLP cho thấy: có 47 chủng là *C. tropicalis*, 18 chủng là *C. albicans*, 16 chủng là *C. parapsilosis*, 6 chủng là *C. glabrata*, 1 chủng là *C. krusei* và 5 chủng chưa xác định. Bảng 4 so sánh kết quả định danh bằng bộ kit

PCR-RFLP do Học viện Quân y sản xuất với máy định danh tự động.

Bảng 4: so sánh kết quả định danh bằng bộ kit PCR-RFLP của Học viện Quân y và máy định danh tự động

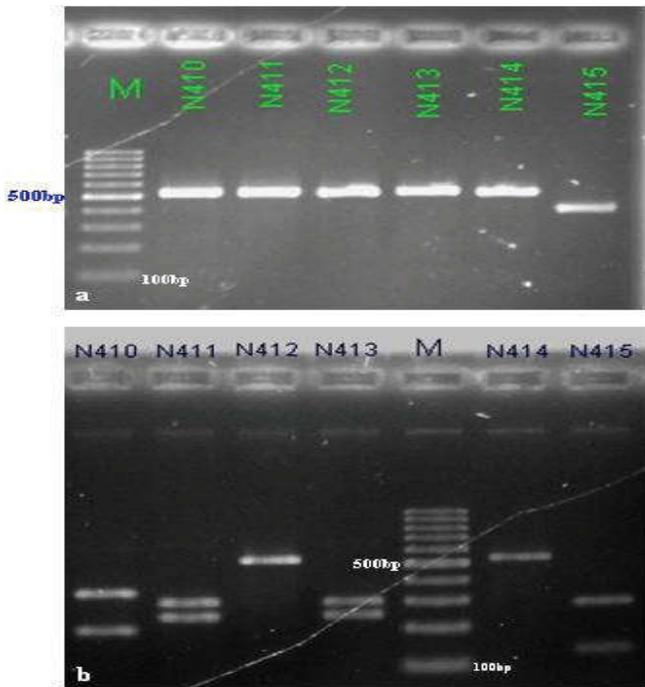
Loài nấm	Định danh bằng nuôi cấy Vitek		Định danh bằng PCR-RFLP	
	Số lượng	Tỷ lệ %	Số lượng	Tỷ lệ %
<i>Candida tropicalis</i>	14	15,05	47	50,54
<i>Candida albicans</i>	19	20,43	18	19,35
<i>Candida parapsilosis</i>	0	0	16	17,20
<i>Candida glabrata</i>	0	0	6	6,45
<i>Candida krusei</i>	33	35,49	1	1,08
<i>Candida spp.</i>	27	29,03	5	5,38
Tổng	93	100	93	100

$\chi^2 = 85,12; p < 0,001$



Hình 1: sản phẩm PCR và cắt giới hạn của các chủng N353÷N360 (N353÷N360 là ký hiệu các chủng nấm nghiên cứu)

Hình 1 cho thấy, các chủng nấm N353÷N360 đều cho kích thước sản phẩm PCR và cắt giới hạn như mô tả ở bảng 1.



Hình 2: sản phẩm PCR và cắt giới hạn của các chủng N410-N415

Hình 2 cho thấy, các chủng nấm N410-N414 đều cho kích thước sản phẩm PCR và cắt giới hạn như mô tả ở bảng 1. Riêng chủng N415 kích thước sản phẩm PCR khoảng 400bp, có 2 mảnh cắt giới hạn khoảng 120 và 300bp không như mô tả ở bảng 1.

Bàn luận

Trong nghiên cứu này, bộ kit PCR-RFLP được xây dựng dựa trên công bố trước đó bởi *Mirhendi* và cộng sự năm 2001 [6]. 93 chủng nấm men *Candida* phân lập từ máu bệnh nhân tại Bệnh viện Chợ Rẫy (Tp Hồ Chí Minh) và Bệnh viện Quân y 103 được đưa vào nghiên cứu. Nguyên lý xác định loài nấm của bộ kit PCR-RFLP dựa vào sự khác biệt về kích thước sản phẩm PCR, số lượng và kích thước các mảnh cắt bằng enzyme giới hạn.

Trước khi sử dụng bộ kit PCR-RFLP, chúng tôi đã tiến hành phân loại nấm dựa vào hình thái và tiến hành thử nghiệm huyết thanh. Kết quả cho thấy, có 17 chủng là *C. albicans*, còn lại 76 chủng là *Candida non-albicans*. Với bộ kit PCR-RFLP, có 18 chủng *C. albicans*, 47 chủng *C. tropicalis*, 1 chủng *C. krusei*, 6 chủng *C. glabrata*, 16 chủng *C. parasilosis* và 5 chủng chưa xác định. Như vậy, có sự phù hợp cao về kết quả xác định loài nấm *C. albicans* giữa 2 phương

pháp hình thái, thử nghiệm huyết thanh và PCR-RFLP. Điều này cho thấy, kỹ thuật thử nghiệm huyết thanh cho kết quả phân biệt nấm *C. albicans* và *Candida non-albicans* khá chính xác. Tuy nhiên, đối với các nấm *Candida non-albicans*, căn cứ hình thái và thử nghiệm huyết thanh không xác định được loài nhưng với phương pháp PCR-RFLP đã chỉ ra chính xác loài và loài *C. tropicalis* chiếm tỷ lệ cao nhất với 50,54%. Kết quả này cũng tương tự như kết quả nghiên cứu của *Xess I và cs (2007)* tại Ấn Độ [7]. Như vậy có thể thấy, *C. albicans* không còn chiếm ưu thế trong nhiễm nấm máu mà là các nấm *Candida non-albicans*. Cần mở rộng nghiên cứu để khẳng định kết luận này.

5 chủng chưa được xác định loài là do kích thước sản phẩm PCR và cắt giới hạn không giống như mô tả. Đối với 5 chủng nấm này, kết quả so sánh trình tự gen với ngân hàng gen cho thấy, đây là nấm *Candida mesorugosa* với tỷ lệ tương đồng nucleotide đạt > 99%. Đây là nấm men gây bệnh ít được nhắc tới và thông báo gây nhiễm nấm máu ở Việt Nam.

So sánh kết quả định danh bằng kit PCR-RFLP và máy định danh vitek 2 compact cho thấy, có sự khác biệt có ý nghĩa giữa 2 phương pháp ($\chi^2 = 85,12, p < 0,001$). Sự khác biệt này là do phương pháp nuôi cấy định danh bằng máy định danh dựa vào bảng kết quả lên men thủy phân một số loại đường và một số chất hóa học. Sử dụng càng nhiều phản ứng lên men thì giá trị xác định loài càng cao. Vì thế, trong trường hợp sử dụng hạn chế số lượng các đường lên men thì sẽ có sự nhận diện nhầm một số loại nấm, chẳng hạn như *C. parapsilosis* và *C. krusei*.

Kỹ thuật PCR-RFLP đã được nhiều tác giả như *Ayatollahi Mousavi và cs (2007)* [8], *Alireza Farasat và cs (2012)* [5], *Ramraj Vijayakumar và cs (2012)* [1] áp dụng trong xác định thành phần loài nấm men gây bệnh ở người... Hầu hết đều cho rằng, PCR-RFLP là kỹ thuật sinh học phân tử đơn giản, dễ thực hiện, tốn ít thời gian và có độ nhạy, độ đặc hiệu cao. Nhờ phát hiện nhanh loài nấm gây bệnh, các nhà lâm sàng có thể dựa trên kinh nghiệm điều trị đối với từng loài nấm để đưa ra quyết định dùng thuốc mà chưa cần đến kết quả thử độ nhạy với thuốc kháng nấm [1]. Từ các kết quả nghiên cứu, chúng tôi cũng nhận thấy, kỹ thuật này khá đơn giản, chỉ cần 1 kỹ thuật viên được đào tạo khoảng 2-3

tháng là có thể thực hiện được. Thời gian để xác định được loài nấm bằng kỹ thuật này mất khoảng 12 tiếng (tính từ khi tiến hành tách ADN của chủng nấm), nhanh hơn nhiều so với thời gian xác định độ nhạy với thuốc kháng nấm (khoảng 48-72 giờ). Điều này thực sự có ý nghĩa, giúp các nhà lâm sàng có căn cứ lựa chọn thuốc điều trị thay vì phải đợi thêm 2-3 ngày chờ kết quả thử độ nhạy với thuốc kháng nấm. Rõ ràng, nếu được điều trị sớm, bệnh nhân có thể tránh được các biến chứng, di chứng do tiến triển nặng của bệnh gây ra.

Kết luận

Bằng bộ kit PCR-RFLP đã xác định được trong số 93 chủng nấm men phân lập từ máu người có 18 chủng *C. albicans*, 47 chủng *C. tropicalis*, 1 chủng *C. krusei*, 6 chủng *C. glabrata*, 16 chủng *C. parasilosis*. 5 chủng còn lại là nấm *Candida mesorugosa*.

Tài liệu tham khảo

[1] Ramraj Vijayakumar, et al (2012), "Molecular Species Identification of Candida from Blood Samples of Intensive Care Unit Patients by Polymerase Chain Reaction - Restricted Fragment Length

Polymorphism", *Journal of Laboratory Physicians*, **1(4)**, pp.1-4.

[2] Lê Bách Quang và cs (2008), *Ký sinh trùng và côn trùng y học*, Giáo trình giảng dạy đại học - Học viện Quân y, Nhà xuất bản Quân đội nhân dân, tr.382-386.

[3] Trần Xuân Mai và cs (2004), *Vị nấm y học*, Trường Đại học Y dược Tp Hồ Chí Minh, sách tham khảo, tr.107-120.

[4] Nhữ Thị Hoa và cs (2012), "Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng của viêm não - màng não do Cryptococcus neoformans tại Bệnh viện Nhiệt đới Tp Hồ Chí Minh từ 11.2008 đến 6.2009", *Tạp chí Y học Tp Hồ Chí Minh*, **tập 16**, phụ bản của số 1/2012: Chuyên đề Ký sinh trùng, tr.76-82.

[5] Alireza Farasat, et al (2012), "Identification of Candida Species Screened from Catheter Using Patients with PCR-RFLP Method", *European Journal of Experimental Biology*, **2(3)**, pp.651-656.

[6] S.H Mirhendi, et al (2001), "A PCR-RFLP method to Identification of the Important Opportunistic Fungae: Candida Species, Cryptococcus neoformans, Aspergillus fumigatus and Fusarium solani", *Iranian J. Publ. Health*, **3-4(30)**, pp.103-106.

[7] Xess I, et al (2007), "Epidemiology of candidemia in a tertiary care centre of north India: 5-year study", *Infection*, **Vol.35**, pp.256-259.

[8] S.A Ayatollahi Mousavi, et al (2007), "Rapid Molecular Diagnosis for Candida species Using PCR-RFLP", *Biotechnology*, **6(4)**, pp.587-593.