

HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG VÀ PHIÊN GIẢI KẾT QUẢ VI SINH TRONG THỰC HÀNH CHẨN ĐOÁN NHIỄM NẤM XÂM LẤN

Hoàng Thị Bích Ngọc, Vũ Thị Huyền
Bệnh viện Nhi Trung ương

TÓM TẮT

Sử dụng xét nghiệm soi kính, nuôi cấy, huyết thanh học hay sinh học phân tử xác định nhiễm nấm xâm lấn rất quan trọng. Chẩn đoán nhiễm nấm xâm lấn được chứng minh khi xác định được nấm ở mô bằng soi kính, nuôi cấy từ bệnh phẩm dịch vô trùng hoặc phát hiện kháng nguyên trong dịch não tủy. Có khả năng nhiễm nấm xâm lấn khi phát hiện được nấm bằng soi kính, nuôi cấy từ dịch hữu trùng hoặc phát hiện kháng nguyên, kháng thể ở bệnh nhân suy giảm miễn dịch. Kỹ thuật sinh học phân tử cũng được sử dụng để xác định 5 loài nấm *Candida* phổ biến. Khi xét nghiệm không phát hiện được bằng chứng nhiễm nấm ở bệnh nhân suy giảm miễn dịch, được phân loại có thể nhiễm nấm xâm lấn.

Từ khóa: nhiễm nấm xâm lấn, soi nấm, nuôi cấy nấm, huyết thanh học, sinh học phân tử

GUIDELINE ON USING THE RESULTS OF BIOLOGIC TECHNIQUES TO IDENTIFY INVASIVE FUNGAL INFECTIONS

Hoang Thi Bich Ngoc, Vu Thi Huyen
Vietnam National Children's Hospital

Using microscopic, culture, serology or molecular biology techniques to identify invasive fungal infections is very important. The diagnosis of proven invasive fungal disease can only be made through direct microscopic examination of tissue, cultures of sterile fluids, or detection of antigens in cerebrospinal fluid. Probable invasive fungal disease is considered when fungi are detected by microscopy, culture from non-sterile fluids, or detect antigens or antibodies in Immunocompromised patients. Molecular biology techniques are also used to identify the five common *Candida* species. When tests do not detect evidence of fungal infection in immunocompromised patients, they are classified as possible invasive fungal infection.

Keywords: invasive fungal infections, microscopy, culture, serology, molecular biology.

I. NẤM VÀ GIÁ TRỊ CỦA MARKER NẤM TRONG CHẨN ĐOÁN NHIỄM NẤM XÂM NHẬP

Nấm có thể là vi sinh vật cư trú bình thường trên da và niêm mạc, nhưng cũng có thể là tác nhân gây bệnh. Đặc biệt khi nấm nhiễm vào mô sâu của cơ thể (nhiễm nấm xâm lấn) có thể đe dọa đến tính mạng. Dựa cấu trúc và sự phát triển nấm được chia 3 loại:

Nấm men: có cấu trúc đơn bào, thường có hình cầu hoặc hình bầu dục, thường gặp *Candida* spp, *Cryptococcus neoformans*.

Nấm sợi: có cấu trúc đa bào, dạng sợi, thường gặp *Aspergillus* spp.,

Nấm lưỡng hình: có dạng nấm men khi ở mô cơ thể hoặc nuôi cấy ở 35 – 37°C và có dạng nấm sợi khi phát triển ở nhiệt độ phòng, như *Talaromyces marneffeii*, *Histoplasma capsulatum*.

Dựa tác động của nấm với sức khỏe cộng đồng và/hoặc nguy cơ kháng thuốc kháng nấm, Tổ chức Y tế thế giới đã công bố danh sách gồm 19 loại nấm là mối đe dọa lớn nhất đối sức khỏe con người [1]:

Nhóm ưu tiên quan trọng: *Cryptococcus neoformans*, *Candida auris*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*

Nhóm ưu tiên cao: *Nakaseomyces glabrata* (tên cũ *Candida glabrata*), *Histoplasma* spp., *Eumycetoma*, *Mucorales*, *Fusarium* spp., *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*.

Nhóm ưu tiên trung bình: *Scedosporium* spp., *Cryptococcus gattii*, *Lomentospora prolificans*, *Talaromyces marneffeii*, *Coccidioides* spp., *Pneumocystis jirovecii*, *Pichia kudriavzevii* (tên cũ *Candida krusei*), *Paracoccidioides* spp.

Nhiễm nấm xâm lấn được xác định khi có nấm men hoặc nấm sợi ở các mô sâu. Chẩn đoán nhiễm nấm xâm lấn không chỉ là thách thức với các nhà lâm sàng, mà cũng là thách thức cho các nhà vi sinh do mỗi phương pháp xét nghiệm nấm có những giới hạn nhất định. Theo sự đồng thuận của các nhà khoa học dựa yếu tố vật chủ, triệu chứng lâm sàng và bằng chứng phát hiện nấm. Chẩn đoán nhiễm nấm xâm lấn được chia làm 3 mức độ dựa tiêu chí xét nghiệm phát hiện nấm như sau [2]:

Được chứng minh (proven) nhiễm nấm xâm nhập (áp dụng cho bất kỳ bệnh nhân nào). Phát hiện được nấm trong các trường hợp sau:

- Quan sát bằng kính hiển vi (phương pháp mô bệnh học, tế bào học hay quan sát trực tiếp) với bệnh phẩm từ vị trí vô trùng qua chọc hút hoặc sinh thiết. Quan sát được hình ảnh của nấm men (như *Cryptococcus* hoặc *Candida*) hay hình ảnh của sợi nấm.

- Nuôi cấy bệnh phẩm từ vị trí vô trùng (ngoại trừ dịch rửa phế quản phế nang, dịch xoang, nước tiểu)

- Cấy máu phát hiện nấm men (như *Candida* hoặc *Cryptococcus*) hoặc giống nấm men (như *Trichosporon*), nấm sợi (như *Fusarium*)

- Phát hiện kháng nguyên của *Cryptococcus* trong dịch não tủy

Có khả năng (probable) nhiễm nấm xâm nhập (chỉ áp dụng cho bệnh nhân suy giảm miễn dịch).

- Xét nghiệm trực tiếp (tế bào học, nhuộm soi, nuôi cấy)

Phát hiện được nấm sợi trong đờm, dịch rửa phế quản phế nang, bàn chải phế quản, hút xoang, như nuôi cấy phát hiện *Aspergillus*, *Fusarium*, *Zygomycetes*.

- Xét nghiệm gián tiếp (phát hiện kháng nguyên, kháng thể), phương pháp này không áp dụng cho *Cryptococcus*

Nhiễm *Aspergillus* xâm nhập (*Aspergillo*sis): phát hiện kháng nguyên Galactomannan trong huyết tương, huyết thanh, dịch rửa phế quản phế nang hoặc dịch não tủy

Nhiễm nấm xâm nhập khác: phát hiện B-d-glucan trong huyết thanh

Có thể (possible) nhiễm nấm xâm nhập (chỉ áp dụng cho bệnh nhân suy giảm miễn dịch)

Những trường hợp này mặc dù có triệu chứng lâm sàng nhưng không tìm thấy bằng chứng nhiễm nấm khi xét nghiệm.

II. PHƯƠNG PHÁP XÉT NGHIỆM CHẨN ĐOÁN

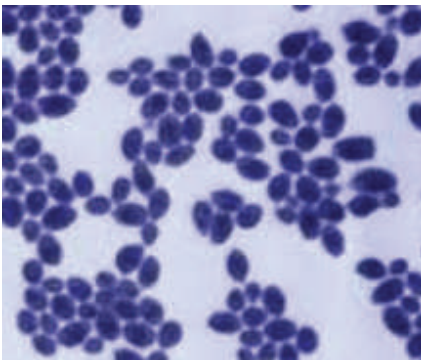
Có nhiều phương pháp xét nghiệm để xác định nấm trong nhiễm nấm xâm lấn, tuy nhiên mỗi phương pháp đều có giới hạn và các phương

pháp đều chưa được phổ biến rộng rãi tại các cơ sở y tế.

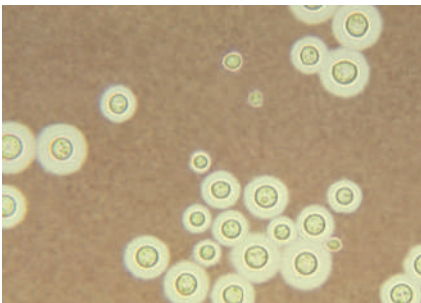
2.1. Phương pháp soi nấm

Phát hiện dựa vào hình thái nấm. Ưu điểm của phương pháp là thực hiện nhanh, áp dụng trên nhiều loại bệnh phẩm. Phương pháp này rất có ý nghĩa với bệnh phẩm lấy từ ở các vị trí vô trùng của cơ thể như soi mực tàu phát hiện *Cryptococcus* trong dịch não tủy, nhuộm Gram phát hiện *Candida* trong bệnh phẩm dịch ổ bụng, dịch màng phổi

Phương pháp này không xác định được chính xác loài nấm, khả năng phát hiện phụ thuộc vào kinh nghiệm của nhân viên xét nghiệm.



(A)



(B)

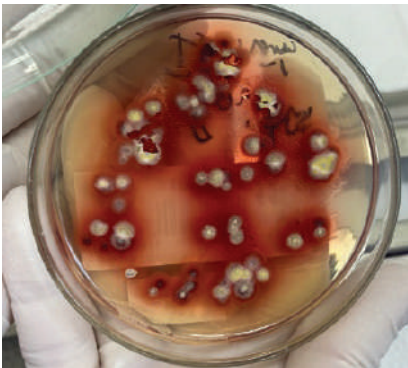
Hình 1. (A) *Candida* trên tiêu bản nhuộm
(B) *Cryptococcus* trên tiêu bản nhuộm mực tàu

2.2. Phương pháp nuôi cấy

Phụ thuộc vào vị trí lấy bệnh phẩm là vô trùng (máu, dịch não tủy, dịch màng bụng) hay không vô trùng (dịch đường hô hấp, nước tiểu) mà kết quả nuôi cấy có bằng chứng mạnh khác nhau. Phương pháp nuôi cấy áp dụng cho nhiều loại bệnh phẩm, xác định được nhiều loại nấm, bên cạnh đó cũng

xác định được tính nhạy cảm của vi nấm với thuốc kháng nấm qua thử nghiệm kháng nấm đồ.

Tuy nhiên nuôi cấy thường phát hiện được vi nấm trong khoảng thời gian 48 giờ, một số trường hợp có thể dài hơn hơn. Nếu bệnh nhân được sử dụng thuốc kháng nấm trước khi nuôi cấy thì giảm độ nhạy của phương pháp nuôi cấy.



Hình 2. Khuẩn lạc của *Talaromyces marneffei* trên môi trường nuôi cấy

2.3. Phương pháp huyết thanh học

Thường thực hiện có kết quả nhanh. Trường hợp bệnh nhân nghi tới nhiễm nấm xâm lấn nhưng không có bệnh phẩm tại nơi tổn thương thì phương pháp huyết thanh học rất có ý nghĩa để cung cấp bằng chứng cho chẩn đoán nhiễm nấm xâm lấn. Phương pháp huyết thanh học có giá trị dự đoán âm tính cao.

2.3.1. Phát hiện kháng nguyên galactomannan

Galactomanna tồn tại chủ yếu trong thành tế bào của *Aspergillus*, được giải phóng vào máu và một số dịch khác ngay trong giai đoạn đầu xâm nhập vào cơ thể, do vậy hữu ích trong chẩn đoán sớm nhiễm nấm xâm lấn. Kháng nguyên này có thể tồn tại từ 1 - 8 tuần. Xét nghiệm Galactomanna ở trẻ em trong dịch rửa phế quản có độ nhạy 91%, độ đặc hiệu 81% cao hơn trong huyết thanh [3].

Galactomanna ngoài có ở nấm *Aspergillus*, còn có ở một số loại nấm khác như *Histoplasma capsulatum*, *Fusarium* spp., *Cryptococcus* spp., *Talaromyces* spp., *Penicillium* spp.,. Dương tính có thể xảy ra khi *Aspergillus* trong đường hô hấp ở trạng thái xâm chiếm (colonization). Dương tính giả có thể xảy ra nếu bệnh nhân có sử dụng

kháng sinh piperacillin-tazobactam, hay trẻ ăn một số sữa công thức [4].

2.3.2. Phát hiện kháng nguyên manna và kháng thể anti manna

Mannan là thành phần chính của thành tế bào *Candida*, khi xâm nhập vào cơ thể kích thích cơ thể sinh kháng thể kháng manna. Phát hiện kháng nguyên manna và kháng thể kháng manna là xét nghiệm đặc hiệu xác định nhiễm *Candida* xâm lấn.

Hầu hết các kháng nguyên *Candida* bị hạn chế trong chẩn đoán do nồng độ trong huyết thanh thấp và đào thải nhanh khỏi máu. Phát hiện kháng nguyên rất khó phân biệt nấm *Candida* xâm chiếm (colonization) hay nhiễm trùng (infection). Trường hợp phát hiện kháng thể có thể cho kết quả âm tính giả khi bệnh nhân suy giảm miễn dịch [5].

2.3.3. Phát hiện kháng nguyên β -D-glucan

β -D-glucan là thành phần chính trong thành tế bào của nấm *Candida*, *Aspergillus* spp., *Pneumocystis jirovecii*, *Talaromyces* spp., *Acremonium* spp., *Fusarium* spp., (ngoại trừ *Cryptococcus*, *Blastomyces*, *Mucorales*). Nấm *Cryptococcus* có vỏ ngoài bao bọc, thu giữ β -D-glucan trước khi được đưa vào máu nên có khả năng không phát hiện được. .

Xét nghiệm kháng nguyên β -D-glucan rất hữu ích trong trường hợp nhiễm nấm ổ bụng, trường hợp cấy máu âm tính. Kháng nguyên này có thể được phát hiện 5–10 ngày trước khi bệnh nhân có dấu hiệu lâm sàng.

Sử dụng kháng nguyên này phát hiện nhiễm *Candida* có giá trị tiên đoán dương tính (PPV) là 83,8% khi sử dụng giá trị ngưỡng là 60 pg/ml, và 89% khi sử dụng giá trị ngưỡng là 80 pg/ml [6]. β -D-glucan là kháng nguyên không đặc hiệu cho nấm, kết quả dương tính chéo có thể xảy ra ở bệnh nhân được điều trị bằng globulin miễn dịch, bệnh nhân phẫu thuật có tiếp xúc với gạc chứa cellulose.

2.4. Phương pháp sinh học phân tử

Các xét nghiệm PCR định danh nấm dựa trên nguyên lý khuếch đại, phân tích trình tự các acid nucleic để phát hiện trực tiếp DNA của nấm trong các mẫu bệnh phẩm lâm sàng cho

kết quả nhanh, có độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Xét nghiệm PCR có thể phát hiện được một số loại nấm như *Aspergillus*, *Pneumocystis jirovecii*, *Zygomycetes*, *Candida*.

Dựa trên nguyên lý khuếch đại acid nucleic, panel T2*Candida* có thể phát hiện 5 loài *Candida*: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* và *C. glabrata* từ bệnh phẩm máu toàn phần. Kết quả có trong vòng 4–5 giờ sau khi thực hiện, với độ nhạy và độ đặc hiệu đã được báo cáo là >91% và >99%. Hiện nay có panel T2 *C. auris* để phát hiện loại nấm này.

Giới hạn của phương pháp PCR là phát hiện giới hạn số loài nấm. Các bào tử nấm có mặt khắp nơi trong không khí và môi trường có khả năng dương tính giả do mẫu nhiễm bẩn. Do cấu trúc thành một số loại nấm khó tách chiết DNA có thể cho kết quả âm tính giả [7].

Hiện nay ngoài sử dụng kỹ thuật PCR để xác định nấm còn sử dụng kỹ thuật phân tử khác để xác định nấm như giải trình tự gen (next generation sequencing -NGS),

III. KHUYẾN CÁO SỬ DỤNG XÉT NGHIỆM VI SINH TRONG THỰC HÀNH LÂM SÀNG CHẨN ĐOÁN NHIỄM NẤM XÂM LẤN.

Nếu triệu chứng lâm sàng của bệnh nhân nghĩ tới nhiễm nấm máu, nên thực hiện xét nghiệm:

- Cấy máu 2 mẫu, sử dụng chai cấy máu tìm nấm.
- Kháng nguyên Manna (nghĩ tới *Candida* spp) với bệnh phẩm là máu.
- Kháng nguyên Galactomanna (nghĩ tới *Aspergillus* spp) với bệnh phẩm là máu.
- Kháng thể *Aspergillus fumigatus* với bệnh phẩm là máu.
- Kháng nguyên β -D-glucan với bệnh phẩm là máu.
- PCR nấm (như panel T2*Candida* nghĩ tới 5 loại nấm *Candida* thường gặp) với bệnh phẩm là máu

Nếu triệu chứng lâm sàng của bệnh nhân nghĩ tới nhiễm nấm phổi, nên thực hiện xét nghiệm:

- Cấy dịch nội khí quản hoặc dịch phế quản phế nang tìm nấm

- Kháng nguyên Galactomanna (nghĩ tới *Aspergillus* spp) với bệnh phẩm là máu hoặc dịch phế quản phế nang
- Kháng thể *Aspergillus fumigatus* với bệnh phẩm là máu

Mỗi phương pháp xét nghiệm tìm nấm có ưu và nhược điểm khác nhau, nên phối hợp các phương pháp xét nghiệm để tăng hiệu quả chẩn đoán cho bệnh nhân.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. World Health Organization fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/363682/9789240060241-eng.pdf?sequence=1>
2. **Infectious Diseases Society of America.** Definitions of Invasive Fungal Disease, Clinical Infectious Diseases 2008;46(12):1813–182. <https://doi.org/10.1086/588660>
3. **Avcu G, Karapinar DY.** A Review of a Diagnostic Tool: Galactomannan. J Immunol Sci 2018;2(5):38-42. <http://dx.doi.org/10.29245/2578-3009/2018/5.1137>
4. **Arvanitis M, Anagnostou T, Fuchs BB et al.** Molecular and Nonmolecular Diagnostic Methods for Invasive Fungal Infections 2014;27(3):490–526. <https://doi.org/10.1128/cmr.00091-13>
5. **Clancy CJ, Nguyen MH.** Diagnosing Invasive Candidiasis. J Clin Microbiol 2018;56(5):e01909-17. <https://doi.org/10.1128/jcm.01909-17>
6. **Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH et al.** Multicenter clinical evaluation of the (1→3) beta-d-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. Clin Infect Dis 2005;41(5):654–659. <https://doi.org/10.1086/432470>
7. **Fang W, Wu J, Cheng M et al.** Diagnosis of invasive fungal infections: challenges and recent developments. J Biomed Sci 2023;30(1):42. <https://doi.org/10.1186/s12929-023-00926-2>