

## Khảo sát đặc điểm nuôi cấy nấm *Candida* spp. trên môi trường thạch sinh màu và các môi trường sinh bào tử bao dày

Ngô Thị Minh Châu<sup>1\*</sup>, Nguyễn Thị Hồng Hạnh<sup>2</sup>

(1) Bộ môn Ký sinh trùng, Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế

(2) Sinh viên ngành Kỹ thuật Xét nghiệm Y học, khóa 2019 -2023, Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế

### Tóm tắt

**Tổng quan:** *Candida* là vi nấm gây bệnh phổ biến với nhiều thể bệnh khác nhau. Thử nghiệm sinh bào tử bao dày, cấy trên môi trường thạch sinh màu có thể giúp định danh loài *C. albicans* và một số loài *C. non albicans* khác. **Mục tiêu:** 1. Khảo sát đặc điểm nuôi cấy nấm *Candida* spp. trên môi trường thạch sinh màu Brilliance *Candida* agar và một số môi trường sinh bào tử bao dày. 2. Đánh giá về giá trị định danh *Candida* spp. của các môi trường nói trên. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: 75 chủng vi nấm *Candida* của 5 loài được định danh bằng kỹ thuật khối phổ MALDI-TOF MS trước đó. Vi nấm được cấy trên môi trường thạch sinh màu Brilliance *Candida* agar và các môi trường sinh bào tử bao dày. **Kết quả:** Trên môi trường Brilliance *Candida* agar 100% chủng *C. albicans* có màu xanh lá và mọc mạnh sau 24 giờ nuôi cấy; 100% chủng vi nấm *C. tropicalis* có màu xanh da trời đậm và mọc mạnh sau 48 giờ nuôi cấy; các chủng *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* không cho màu đồng nhất sau 12 - 48 giờ nuôi cấy, và *C. krusei* có đặc điểm khúm nấp khô nhẵn, lan rộng khác với tính chất ướt, bóng láng và gồ của các loài *Candida* khác. 83% -100% chủng *C. albicans* sinh bào tử bao dày sau 3 ngày nuôi cấy. Cấy trên môi trường Brilliance *Candida* agar và thử nghiệm sinh bào tử bao dày có độ đặc hiệu 100% trong định danh *C. albicans*. Môi trường thạch sinh màu có độ nhạy 100% trong định danh *C. albicans*, và độ nhạy của môi trường sinh bào tử bao dày đạt 83% -100% sau 3 ngày nuôi cấy. Môi trường sinh màu có độ đặc hiệu 100% và độ nhạy 100% sau 48 giờ trong định danh *C. tropicalis*. **Kết luận:** Môi trường Brilliance *Candida* agar có độ nhạy và đặc hiệu cao trong định danh *C. albicans* sau 24 giờ và *C. tropicalis* sau 48 giờ nuôi cấy. Thử nghiệm sinh bào tử bao dày có độ nhạy và đặc hiệu cao trong định danh *C. albicans* với mốc thời gian đọc kết quả là 3 ngày.

**Từ khóa:** *Candida* spp., môi trường thạch sinh màu, bào tử bao dày.

## Evaluation of the morphological characteristics of *Candida* species on chromogenic agar medium and media for chlamydospore production

Ngo Thi Minh Chau<sup>1\*</sup>, Nguyen Thi Hong Hanh<sup>2</sup>

(1) Department of Parasitology, Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University

(2) Student of Bachelor of Medical Laboratory, Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University

### Abstract

**Background:** *Candida* is a widespread pathogen with various clinical forms. By testing chlamydospore production and culturing on chromogenic agar, *C. albicans* and some species of *C. non-albicans* could be identified. **Objectives:** 1. To study the morphological characteristics of *Candida* species on Brilliance *Candida* agar and chlamydospore production media; 2. To evaluate the *Candida* species identification value of Brilliance *Candida* agar and chlamydospore production media. **Materials and methods:** 75 *Candida* isolates belonging to five species were identified by MALDI-TOF MS and stored. These isolates were cultured on Brilliance *Candida* agar and chlamydospore production media. **Results:** On Brilliance *Candida* agar: 100% of *C. albicans* isolates grew well and had green colonies after 24 hours, 100% of *C. tropicalis* isolates grew well and had blue color colonies after 48 hours; isolates of *C. krusei*, *C. parapsilosis*, and *C. glabrata* had different coloured colonies after 12 - 48 hours. In addition, *C. krusei* colonies were dry and wrinkled, compared to the other species'colonies, which were creamy, soft, and convex. 83-100% of *C. albicans* isolates produced chlamydospores after 3 days. The specificity of the Brilliance *Candida* agar culture and chlamydospore production test was 100% in identifying *C. albicans*. The sensitivity of Chromogenic Agar was 100% for *C. albicans* identification and 83%-100% for chlamydospore production after 3 days. The specificity and sensitivity of Chromogenic Agar in identifying *C. tropicalis* was 100% after 48 hours. **Conclusions:** Brilliance

Địa chỉ liên hệ: Ngô Thị Minh Châu, email: ntmchau@huemed-univ.edu.vn

DOI: 10.34071/jmp.2023.3.26

Ngày nhận bài: 23/3/2023; Ngày đồng ý đăng: 5/5/2023; Ngày xuất bản: 10/6/2023

*Candida* agar had high specificity and sensitivity in identifying *C. albicans* after 24 hours and *C. tropicalis* after 48 hours. Chlamydospore production test had high specificity and sensitivity in identifying *C. albicans* at 3 days.

**Keywords:** *Candida*, chromogenic agar, chlamydospore.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh do nấm men *Candida* được ghi nhận phổ biến trên toàn thế giới với các thể bệnh da dạng. Các thể bệnh nấm nông thường gặp như viêm âm đạo do nấm, viêm niêm mạc miệng lưỡi, viêm da do *Candida*, viêm quanh móng- móng. Tác nhân này cũng có thể gây ra các thể bệnh xâm lấn như viêm phổi, nhiễm trùng đường tiểu hoặc nhiễm trùng huyết do nấm. Theo đánh giá của Trung tâm kiểm soát bệnh tật (CDC) Hoa Kỳ, *Candida* là tác nhân gây nhiễm trùng huyết phổ biến trong nhóm 5 tác nhân vi sinh vật phổ biến nhất [1]. Ước tính tỷ lệ tử vong do nấm *Candida* xâm lấn là 40 - 55% [2]. Mặc dù *Candida albicans* (*C. albicans*) là loài gây bệnh phổ biến nhất, ngày nay người ta ghi nhận có sự tăng lên của các loài *C. non albicans* (*C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*,...[2], [3], [4], [5]. Bên cạnh đó các loài *C. non albicans* được đánh giá là đề kháng thuốc hơn *C. albicans* [6]. Để định danh các loài nấm *Candida* hiện nay có nhiều kỹ thuật được áp dụng từ các kỹ thuật truyền thống như thử nghiệm sinh ống mầm, thử nghiệm sinh bao tử bao dày đến các kỹ thuật được phát triển rộng rãi gần đây như cấy trên môi trường thạch sinh màu, các thử nghiệm đồng hóa đường, hoặc các kỹ thuật sinh học phân tử [7].

Do đó, định danh loài nấm *Candida* hiện nay là một vấn đề quan trọng để xác định chính xác tác nhân gây bệnh, định hướng điều trị để có thể điều trị đúng hướng, giảm thiểu chi phí và tác hại cho người bệnh. Từ những vấn đề này cho thấy việc định danh loài nhanh chóng, các kỹ thuật đơn giản có thể áp dụng rộng rãi có ý nghĩa quan trọng, đặc biệt là ở các quốc gia đang phát triển. Vì vậy chúng tôi thực hiện đề tài này nhằm mục tiêu:

1. Khảo sát đặc điểm nuôi cấy nấm *Candida spp.* trên môi trường thạch sinh màu, một số môi trường sinh bào tử bao dày.

2. Đánh giá về giá trị định danh *Candida spp.* bằng môi trường thạch sinh màu và môi trường sinh bào tử bao dày.

## 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

**2.1. Thiết kế nghiên cứu:** mô tả cắt ngang và nghiên cứu phòng thí nghiệm.

**2.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu:** từ tháng 5 năm 2022 đến tháng 3 năm 2023 tại phòng thí nghiệm Bộ môn Ký sinh trùng.

**2.3. Đối tượng nghiên cứu:** 30 chủng nấm *C.*

*albicans* và 45 chủng *C. non albicans* gồm 14 chủng *C. tropicalis*, 14 chủng *C. parapsilosis*, 11 chủng *C. glabrata* và 6 chủng *C. krusei* đã được phân lập, định danh bằng kỹ thuật khối phổ MALDI-TOF MS từ bệnh nhân trước đó và được lưu giữ tại Bộ môn Ký sinh trùng. Bên cạnh đó thử nghiệm được kiểm soát chất lượng bằng *C. albicans* ATCC 90028, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258.

## 2.4. Phương pháp nghiên cứu

### 2.4.1. Chuẩn bị các môi trường thử nghiệm

- Môi trường thạch sinh màu định danh *Candida*: môi trường Brilliance *Candida* agar (Oxoid, Anh) được pha chế theo hướng dẫn của nhà sản xuất và phối ra đĩa petri.

- Môi trường thạch Bột bắp thương mại Cornmeal Agar (HiMedia, Ấn Độ) bổ sung 1% Tween 80 (CAT), phối ra ống nghiệm.

- Môi trường thạch Bột bắp - Tween 80 (BBT) được chuẩn bị với thành phần gồm: bột bắp 50 g, agar 15 g, nước cất 1000 ml. Cách pha chế: cho bột bắp đã được rây lấy bột mịn và thạch vào bình đựng nước cất, đun sôi để hòa tan bột bắp, hấp khử trùng 121°C trong 30 phút, thêm 1% Tween 80 rồi phối ra ống nghiệm

- Môi trường thạch cơm - Tween 80 (RAT) được chuẩn bị với thành phần gồm: bột gạo 20 g, agar 15 g, nước cất 100 ml. Cách pha chế: cho bột gạo và thạch vào bình đựng nước cất, đun sôi để hòa tan bột. Sau đó đem hấp khử trùng 121°C trong 30 phút, thêm 1% Tween 80 rồi đem phối ra ống nghiệm

- Các môi trường trên được phối ra ống nghiệm có đường kính 16 mm với thể tích 3 - 5 ml/ống, tạo môi trường thạch nghiêng, trừ môi trường chromogenic agar phối ra đĩa với bề dày thạch 4 - 4,5 mm. Các môi trường chế xong bảo quản tủ mát 4 - 6°C, hạn dùng 1 - 3 tháng.

### 2.4.2. Cấy các chủng vi nấm lên môi trường thử nghiệm, ủ và đọc kết quả

Mẫu vi nấm được lưu trữ được cấy chuyển 2 lần liên tiếp sang môi trường Sabouraud Dextrose agar (HiMedia, Ấn Độ), ủ 37°C x 24 - 48 giờ để chuẩn bị cho thử nghiệm sau:

- Cấy trên môi trường Brilliance *Candida* agar theo kỹ thuật cấy ria.

- Cấy trên môi trường CAT, BBT, RAT theo kỹ thuật Dalmau: cấy 2 đường song song, ấn sâu vừa phải vào mặt thạch

- Các đĩa/ống môi trường sau khi cấy xong được ủ 37°C, theo dõi đại thể khúm nấm 12 giờ, 24 giờ, 48

giờ với môi trường Chromogenic agar, theo dõi vi thể sau các mốc thời gian 3 ngày, 5 ngày, 7 ngày với các môi trường khác

- Ghi nhận kết quả:

+ Môi trường thạch sinh màu Brilliance Candida agar: quan sát tốc độ mọc của vi nấm, kích thước khúm nấm, màu sắc, làm tiêu bản vi thể soi kính hiển vi sau 48 giờ nuôi cấy

+ Các môi trường sinh bào tử bao dày: làm tiêu bản vi thể để soi ghi nhận hình thái vi nấm: nấm men, nảy búp, sợi giả, bào tử bao dày và các đặc điểm chi tiết.

+ Giá trị định danh của 4 loại môi trường nói trên trong định danh *Candida* spp. gồm độ nhạy, độ đặc hiệu, giá trị dự báo dương tính, giá trị dự báo âm tính.

**2.5. Phương pháp xử lý số liệu:** xử lý và phân tích số liệu theo thống kê y học, số liệu nhập và phân tích trên phần mềm SPSS 20.0.

**3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU**

Trong quá trình nghiên cứu, có 75 chủng vi nấm gồm 30 chủng nấm *C. albicans* và 45 chủng *C. non albicans* (14 chủng *C. tropicalis*, 14 chủng *C. parapsilosis*, 11 chủng *C. glabrata* và 6 chủng *C. krusei*) đã được phân lập từ bệnh nhân trước đó, định danh bằng kỹ thuật khối phổ MALDI-TOF MS và lưu giữ tại Bộ môn Ký sinh trùng được chọn vào nghiên cứu thử nghiệm đánh giá giá trị định danh loài *Candida* spp. trên các môi trường khác nhau.

**Bảng 1.** Nguồn gốc của chủng nghiên cứu

Bệnh phẩm	<i>C. albicans</i> n (%)	<i>C. non albicans</i>			
		<i>C. tropicalis</i> n (%)	<i>C. parapsilosis</i> n (%)	<i>C. glabrata</i> n (%)	<i>C. krusei</i> n (%)
Đàm	1 (3,33%)	2 (14,29%)	1 (7,14%)	2 (18,18%)	1 (16,67%)
Dịch âm đạo	2 (6,67%)			3 (27,28%)	
Dịch dạ dày	5 (16,68%)	3 (21,43%)	1 (7,14%)		2 (33,33%)
Dịch màng bụng	1 (3,33%)				
Dịch màng phổi		2 (14,29%)			
Dịch phế quản	2 (6,67%)				
Miệng	3 (10%)	2 (14,28%)	3 (21,43%)		
Móng	3 (10%)	1 (7,14%)	3 (21,43%)		1 (16,67%)
Nước tiểu	4 (13,33%)	3 (21,43%)	2 (14,29%)	2 (18,18%)	
Phân	4 (13,33%)	1 (7,14%)	2 (14,29%)	2 (18,18%)	2 (33,33%)
Sinh thiết dạ dày	1 (3,33%)				
Vết thương	3 (10%)		1 (7,14%)	2 (18,18%)	
Xoang	1 (3,33%)		1 (7,14%)		
<b>Tổng</b>	<b>30 (100%)</b>	<b>14 (100%)</b>	<b>14 (100%)</b>	<b>11 (100%)</b>	<b>6 (100%)</b>

**Nhận xét:** Có sự đa dạng trong phân bố loài *Candida* spp. ở các bệnh phẩm. Loài *C. albicans* chiếm tỷ lệ cao trong dịch dạ dày, nước tiểu và phân với tỷ lệ lần lượt là 16,68%, 13,33%, 13,33%. *C. tropicalis* cũng có tỷ lệ cao trong dịch dạ dày và nước tiểu, *C. parapsilosis* có tỷ lệ cao ở miệng và móng, *C. glabrata* ở dịch âm đạo, *C. krusei* cao ở dịch dạ dày và phân.

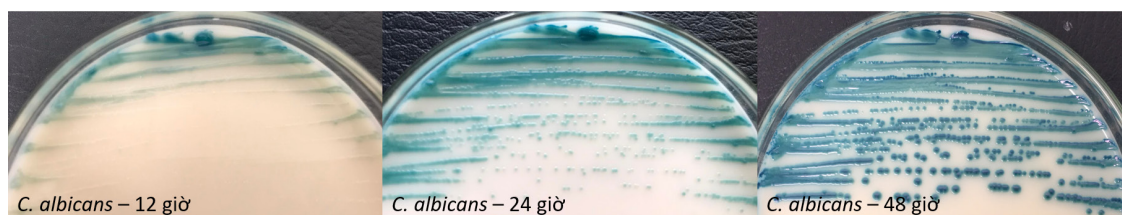
**3.1. Đặc điểm của các loài nấm *Candida* trên các môi trường nuôi cấy**

**Bảng 2.** Kết quả định danh *C. albicans* trên môi trường thạch sinh màu

Thời gian	Khả năng mọc, kích thước khúm nấm			Màu khúm nấm: Xanh lá cây
	Chưa mọc	Mọc yếu (< 1 mm)	Mọc mạnh (1 - 3 mm)	
12 giờ		26 (86,67%)	4 (13,33%)	30 (100%)
24 giờ			30 (100%)	30 (100%)
48 giờ			30 (100%)	30 (100%)

Tính chất đại thể khúm nấm: 100% ướt, bóng, gồ

**Nhận xét:** sau 12 giờ: 100% vi nấm mọc và khúm nấm có màu xanh lá cây, từ sau 24 giờ: khúm nấm mọc mạnh và dễ dàng quan sát màu sắc xanh lá cây bằng mắt thường (Hình 1).



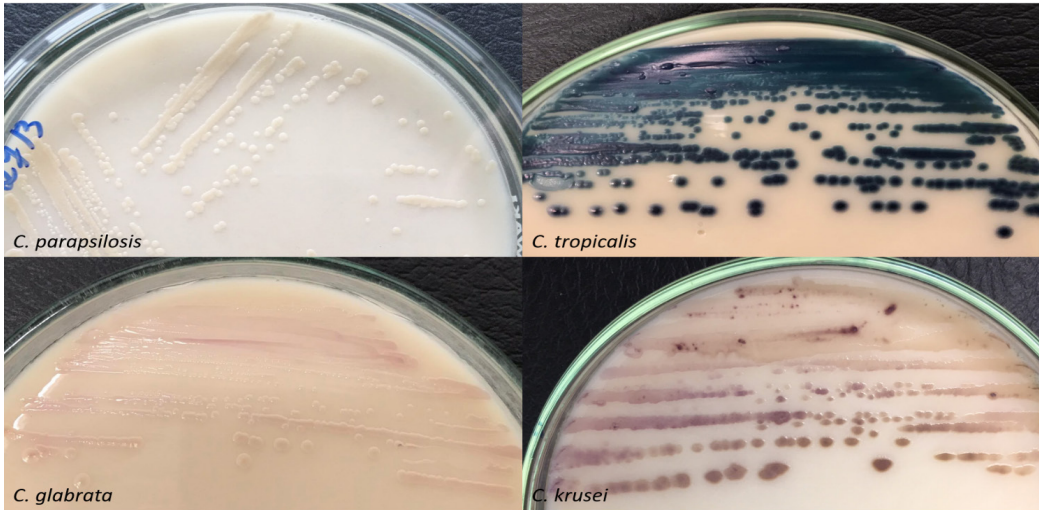
Hình 1. Tính chất đại thể khúm nấm *C. albicans* sau 12 giờ, sau 24 giờ và sau 48 giờ

Bảng 3. Đặc điểm đại thể khúm nấm các *C. non albicans* trên môi trường thạch sinh màu

Loài (Thời gian đánh giá)	Khúm nấm số lượng (%)		Màu khúm nấm số lượng (%)
	Mọc yếu ( $< 1\text{ mm}$ )	Mọc mạnh (1-3 mm)	
<b>C. tropicalis</b>			
12 giờ	8 (57,14%)	6 (42,86%)	Hồng: 4 (28,57%), tím: 4 (28,57%), hồng tím: 4 (28,57%), tím xanh da trời: 2 (14,29%)
24 giờ		100%	Hồng tím: 4 (28,57%), tím xanh da trời: 7 (50%), xanh da trời đậm: 3(21,43% )
48 giờ		100%	Xanh da trời đậm: 14 (100%)
Tính chất đại thể khúm nấm: 100% ướt, bóng, gồ			
<b>C. parapsilosis</b>			
12 giờ	7 (50%)	7 (50%)	Trắng: 10 (71,43%), vàng kem nhạt: 4 (28,57%)
24 giờ		14 (100%)	Trắng: 4 (28,57%), vàng kem nhạt: 6 (42,86%), tím viền trắng: 4 (28,57%)
48 giờ		14 (100%)	Trắng: 1 (7,14%), vàng kem nhạt: 7 (50%), tím viền trắng: 6 (42,86%)
Tính chất đại thể khúm nấm: 100% ướt, bóng, gồ			
<b>C. glabrata</b>			
12 giờ	11(100%)		Trắng kem: 10 (90,91%), vàng kem nhạt: 1 (9,09%)
24 giờ		11 (100%)	Trắng kem: 7 (63,64%), tím viền trắng: 3 (27,27%), vàng kem nhạt: 1 (9,09%)
48 giờ		11 (100%)	Trắng kem: 1 (9,09%), tím viền trắng: 8 (72,73%), tím: 1 (9,09%), vàng kem nhạt: 1 (9,09%)
Tính chất đại thể khúm nấm: 100% ướt, bóng láng, gồ			
<b>C. krusei</b>			
12 giờ	2 (33,33%)	4 (66,67%)	Tím nhạt: 3 (50%), tím nâu nhạt: 2 (33,3%), trắng đục: 1 (16,7%)
24 giờ		6 (100%)	Tím nhạt: 3 (50%), tím nâu nhạt: 2 (33,33%), vàng kem nhạt: 1 (16,67%)
48 giờ		6 (100%)	Tím nhạt: 5 (83,33%), vàng kem nhạt: 1 (16,67%)
Tính chất đại thể khúm nấm: 100% khô, phẳng, lan rộng, bề mặt không trơn láng			

Nhận xét: 100% chủng *C. tropicalis* cho màu xanh da trời đậm sau 48 giờ nuôi cấy. Các chủng *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* không cho màu đồng nhất sau 12 - 48 giờ nuôi cấy





Hình 2. Tính chất đại thể khóm nấm *C. non albicans* ở môi trường thạch sinh màu

Bảng 4. Tỷ lệ *Candida albicans* sinh bào tử bao dày trên các môi trường theo thời gian nuôi cấy

Môi trường	Thời gian	Bào tử bao dày		
		KT < 7,5 μm	KT: 7,5 - 10 μm	Tỷ lệ %
CAT	Ngày 3	8 (26,67%)	17 (56,66%)	83,33%
	Ngày 5	8 (26,67%)	20 (63,33%)	90%
	Ngày 7	8 (26,67%)	22 (73,33%)	100%
BBT	Ngày 3	4 (13,33%)	25 (83,33%)	96,67%
	Ngày 5	4 (13,33%)	26 (86,67%)	100%
	Ngày 7	4 (13,33%)	26 (86,67%)	100%
RAT	Ngày 3	12 (40%)	18 (60%)	100%
	Ngày 5	12 (40%)	18 (60%)	100%
	Ngày 7	12 (40%)	18 (60%)	100%

Nhận xét: Trên môi trường CAT sau 3, 5 và 7 ngày nuôi cấy tỷ lệ loài *C. albicans* sinh bào tử bao dày ở 28°C lần lượt là 83,33%, 90% và 100%. Trên môi trường BBT sau 3, 5 và 7 ngày cấy tỷ lệ *C. albicans* sinh bào tử bao dày ở 28°C lần lượt là 96,67%, 100% và 100%. Trên môi trường RAT tỷ lệ *C. albicans* sinh bào tử bao dày sau 3, 5 và 7 ngày cấy là 100%.



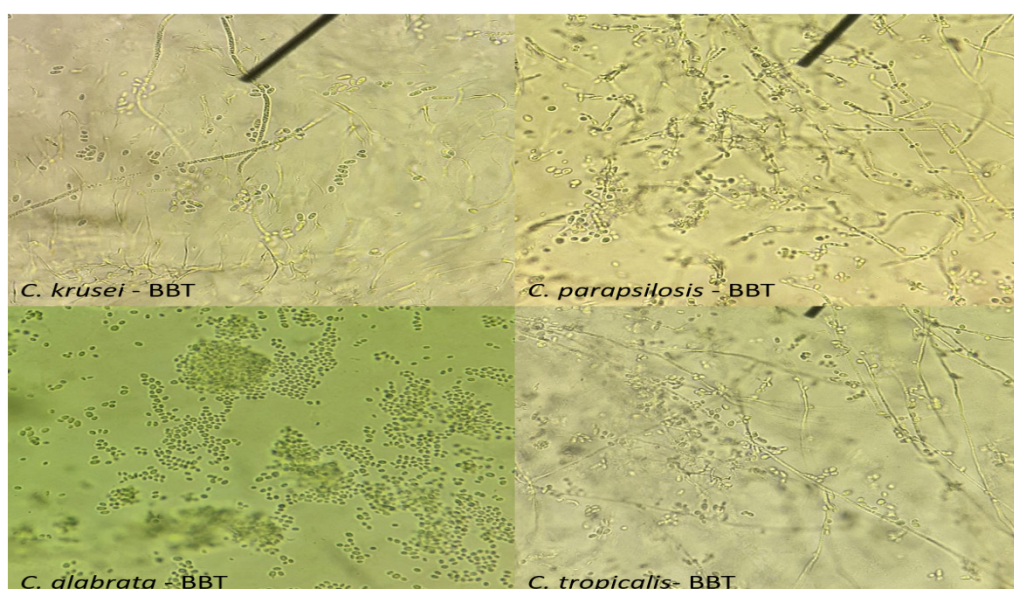
Hình 3. Hình ảnh vi thể *C. albicans* trên các môi trường sinh bào tử bao dày

**Bảng 5.** Đặc điểm vi thể *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* trên các môi trường sinh bào tử bao dày

Mỗi loài *C. non albicans* trong nghiên cứu này cho kết quả đồng nhất về hình ảnh vi thể trên các môi trường sinh bào tử bao dày với kết quả như sau:

Loài	Nấm men, nấm men nảy búp		Sợi giả	
	< 3 $\mu$ m	3 - 5 $\mu$ m	< 2,5 $\mu$ m	2,5 $\mu$ m
<i>C. tropicalis</i>	2 (14,29%)	12 (85,71%)	10 (71,43%)	4 (28,57%)
<i>C. parapsilosis</i>	12 (85,71%)	2 (14,29%)	9 (64,29%)	5 (35,71%)
<i>C. glabrata</i>	11 (100%)			
<i>C. krusei</i>	4 (66,67%)	2(33,33%)	2 (33,33%)	4 (66,67%)

**Nhận xét:** Tất cả các chủng thử nghiệm của các loài *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* đều có hình thái nấm men, nảy búp, sợi giả trên môi trường sinh bào tử bao dày, trừ *C. glabrata* chỉ có hình thái nấm men, nảy búp kích thước nhỏ hơn 3  $\mu$ m. Không có chủng *C. non albicans* nào có bào tử bao dày.



**Hình 4.** Hình ảnh vi thể các loài *C. non albicans* trên các môi trường thạch sinh bào tử bao dày

### 3.2. Giá trị của các môi trường trong định danh *C. albicans* và *C. tropicalis*

**Bảng 6.** Giá trị định danh của các môi trường đối với *C. albicans*

Môi trường	Thời gian thử nghiệm	Độ nhạy	Độ đặc hiệu
Brilliance Candida agar	24 giờ	100%	100%
	48 giờ	100%	100%
Bột bắp thương mại- Tween 80 (CAT)	3 ngày	83,33%	100%
	5 ngày	90%	100%
	7 ngày	100%	100%
Bột bắp tự chế - Tween 80 (BBT)	3 ngày	96,67%	100%
	5 ngày	100%	100%
	7 ngày	100%	100%

Cơm- Tween 80 (RAT)	3 ngày	100%	100%
	5 ngày	100%	100%
	7 ngày	100%	100%

**Nhận xét:** Môi trường thạch sinh màu và sinh bào tử bao dày có độ đặc hiệu 100% trong định danh *C. albicans*. Môi trường thạch sinh màu có độ nhạy 100% ở các mốc thời gian khảo sát 24 giờ hay 48 giờ; sau 3 ngày nuôi cấy, độ nhạy của của các môi trường CAT, BBT, RAT lần lượt là 83,33%, 96,67% và 100%, và tất cả các môi trường đều có độ nhạy 90 - 100% sau 5 và 7 ngày nuôi cấy trong định danh *C. albicans*.

**Bảng 7.** Giá trị định danh của môi trường Brilliance Candida agar đối với *C. tropicalis*

Môi trường	Thời gian thử nghiệm	Độ nhạy	Độ đặc hiệu
Brilliance Candida agar	24 giờ	21,43%	100%
	48 giờ	100%	100%

**Nhận xét:** Thử nghiệm sinh màu có độ đặc hiệu 100% trong định danh *C. tropicalis*. Trong đó thử nghiệm có kết quả độ nhạy cao nhất sau 48 giờ nuôi cấy với độ nhạy là 100%.

#### 4. BÀN LUẬN

*Candida* là vi nấm gây bệnh phổ biến được phân lập từ nhiều bệnh phẩm khác nhau [8], [9]. Các chủng vi nấm *Candida* trong nghiên cứu này được thu thập từ nhiều loại bệnh phẩm khác nhau định danh bằng kỹ thuật MALDI-TOF MS đã được công bố trước đây [5]. Hiện nay định danh một số loài *Candida* gây bệnh phổ biến thông thường được thực hiện bằng cách nuôi cấy trên môi trường sinh màu (chromogenic agar). Một số môi trường thương mại được sử dụng gồm Chromagar (BioRad, Pháp), Brilliance Candida agar (Oxoid, Anh), HiCrome Candida agar (HiMedia, Ấn Độ). Đặc trưng các môi trường này thường giúp định danh *C. albicans* và *C. tropicalis*, và một số loài *Candida* thường gặp như *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* cũng được đề cập có thể định danh tuy nhiên mức độ phân biệt không cao. Cụ thể trên môi trường Chromagar Candida thì *C. albicans* có màu xanh lá (green), *C. tropicalis* có màu xanh da trời ánh kim loại (metallic blue), *C. krusei* có màu hồng, khúm nấm nhẵn, *C. glabrata* có màu tím hoa cà (mauve). Môi trường Brilliance Candida agar hướng dẫn giúp định danh *C. albicans* và *C. tropicalis* nhanh chóng trong vòng 48 giờ với màu đặc trưng là *C. albicans* màu xanh lục (green) và *C. tropicalis* màu xanh da trời (blue) [10]. Kết quả khảo sát của chúng tôi trong nghiên cứu này cho thấy môi trường này có khả năng định danh *C. albicans* chính xác sau 24 giờ nuôi cấy với màu sắc đặc trưng, tốc độ mọc mạnh với độ nhạy và độ đặc hiệu của môi trường trong định danh loài *C. albicans* đều đạt 100%. Với *C. tropicalis*, thời gian định danh chính xác với màu đặc trưng là màu xanh da trời là sau 48 giờ nuôi cấy. Nghiên cứu của Pravin Charles ghi nhận độ nhạy và độ đặc hiệu của môi trường sinh màu HiCrome Candida agar trong định danh *C. albicans* lần lượt là 90% và 96,42%; giá trị này

của *C. tropicalis* lần lượt là 80% và 100% [11]. Nghiên cứu của Souza ghi nhận độ nhạy và độ đặc hiệu của môi trường Chromagar Candida với *C. albicans* là 78% và 88%, với *C. tropicalis* là 46% và 95% [12]. Điều này cho thấy môi trường Brilliance Candida agar có độ nhạy và độ đặc hiệu cao hơn trong định danh 2 loài *Candida* nói trên. Kết quả này có ý nghĩa trong hỗ trợ cho việc lựa chọn nhanh chóng thuốc điều trị thích hợp do có sự khác biệt về về sự nhạy cảm với thuốc kháng nấm của *C. albicans* và *C. non albicans* với thuốc kháng nấm [2], [4]. Đối với các loài *C. non albicans* khác không phải là *C. tropicalis*, cần thiết phải sử dụng các thử nghiệm khác để định danh ví dụ như thử nghiệm đồng hóa đường, tuy nhiên vẫn có một tỷ lệ nhất định vẫn không cho kết quả định danh chính xác nhóm này. Nghiên cứu của Hoàng Đình Cảnh và cộng sự cho thấy có 17% kết quả định danh *Candida* spp. bằng thử nghiệm đồng hóa đường với kit API 20C AUX không đồng nhất với kết quả giải trình tự gen, gặp với các loài *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* [13]. Vậy từ kết quả của chúng tôi cũng như một số nghiên cứu trên cho thấy môi trường sinh màu có khả năng định danh chính xác *C. albicans* và *C. tropicalis*. Ngoài ra kết quả của chúng tôi cũng cho thấy với *C. albicans*, kết quả định danh trên môi trường sinh màu cho kết quả định danh chính xác với độ nhạy và độ đặc hiệu như nhau ở mốc thời gian 24 giờ và 48 giờ, vì vậy có ý nghĩa giúp định danh nhanh chóng, chính xác loài gây bệnh phổ biến nhất là *C. albicans*.

Kết quả định danh *C. albicans* của chúng tôi trên các môi trường sinh bào tử bao dày cho thấy trên 80% chủng *C. albicans* có bào tử bao dày sau 3 ngày nuôi cấy và tỷ lệ này tăng lên sau 5 ngày, ở mốc thời gian 7 ngày 100% sinh bào tử bao dày; trong khi đó tất cả các chủng thử nghiệm của các loài *C.*



*tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* đều có hình thái nấm men, nảy búp, sợi giả trên môi trường sinh bào tử bao dày, trừ *C. glabrata* chỉ có hình thái nấm men, nảy búp kích thước nhỏ hơn 3  $\mu$ m, không có chủng *C. non albicans* nào có bào tử bao dày. Nghiên cứu của Evren và cộng sự cho thấy có sự tương đồng cao trong định danh *C. albicans* giữa kỹ thuật MALDI-TOF MS, thử nghiệm sinh bào tử bao dày và cấy trên môi trường thạch sinh màu [7]. Ưu điểm của kỹ thuật khối phổ MALDI-TOF MS là định danh chính xác và nhanh chóng không những chỉ *C. albicans* mà còn là các loài *C. non albicans* khác, tuy nhiên kỹ thuật này đòi hỏi trang thiết bị đắt tiền nên khó áp dụng rộng rãi, đặc biệt là ở các nước đang phát triển như Việt Nam. Vì vậy các kỹ thuật định danh đơn giản nhưng có độ chính xác cao giúp phân biệt được *C. albicans* và *C. non albicans* như cấy trên môi trường thạch sinh màu vẫn có ý nghĩa thực tế ở những cơ sở y tế mà trang thiết bị còn đơn giản. Bên cạnh đó môi trường thạch sinh màu còn có ý nghĩa giúp phát hiện và thuần chủng các mẫu bệnh phẩm nhiễm nhiều loài *Candida* khác nhau. Hạn chế của kỹ thuật sinh bào tử bao dày là thời gian định danh lâu hơn các thử nghiệm khác, nên mặc dù kết quả định danh *C. albicans* chính xác nhưng ít có ý nghĩa thực tế trong thực hành vi nấm lâm sàng [7], mà chỉ có ý nghĩa trong công tác giảng dạy thực hành về vi nấm y học. Kết quả nghiên cứu chúng tôi cũng cho thấy các môi trường tự chế như môi trường thạch bột ngô hay môi trường cơm có bổ sung Tween 80 đều có độ nhạy và độ đặc hiệu tương đương môi trường thạch bột ngô thương mại trong định danh *C. albicans*, vì vậy các cơ sở giảng dạy vi nấm y học có thể tự chuẩn bị các môi trường này theo công thức ở trên. Mặt khác, ở phòng nghiên cứu về vi nấm y học, thử nghiệm sinh bào tử bao dày của *C. albicans* cũng hữu ích trong việc nghiên cứu phòng thí nghiệm về đáp ứng miễn dịch trong bệnh nấm *Candida* vì nghiên cứu trên chuột cho thấy bào

tử bao dày của vi nấm có thể trốn tránh hiện tượng thực bào nên có thể trốn miễn dịch và lan tỏa [14].

Tóm lại kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy môi trường thạch sinh màu Brilliance Candida agar có độ nhạy và đặc hiệu cao trong định danh *C. albicans* ở mốc thời gian 24 giờ và *C. tropicalis* sau 48 giờ. Các môi trường sinh bào tử bao dày thương mại hay tự chế đều có độ nhạy và độ đặc hiệu cao sau 3 ngày nuôi cấy, trong đó môi trường thạch cơm - Tween 80 có kết quả tốt nhất.

## 5. KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu đặc điểm nuôi cấy của 75 chủng nấm của các loài vi nấm *Candida* gồm *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* và *C. krusei* trên môi trường thạch sinh màu và các môi trường sinh bào tử bao dày, kết quả như sau:

- Trên môi trường Brilliance Candida agar: 100% chủng *C. albicans* có màu xanh lá và mọc mạnh sau 24 giờ nuôi cấy; 100% chủng vi nấm *C. tropicalis* có màu xanh da trời đậm và mọc mạnh sau 48 giờ nuôi cấy; các chủng *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* không cho màu đồng nhất sau 12 - 48 giờ nuôi cấy, và *C. krusei* có đặc điểm khúm nấm khô nhẵn, lan rộng, khác với tính chất ướt, bóng láng và gồ của các loài *Candida* khác. 83% - 100% chủng *C. albicans* sinh bào tử bao dày sau 3 ngày nuôi cấy, không có chủng *C. non albicans* nào có bào tử bao dày.

- Cấy trên môi trường Brilliance Candida agar và thử nghiệm sinh bào tử bao dày có độ đặc hiệu 100% trong định danh *C. albicans*. Trong đó, môi trường thạch sinh màu đều có độ nhạy 100% ở các mốc thời gian khảo sát 24 giờ hay 48 giờ. Độ nhạy của các môi trường bột bắp thương mại, bột bắp tự chế - Tween 80 và cơm - Tween 80 trong định danh *C. albicans* đạt 83% -100% sau 3 ngày nuôi cấy. Môi trường sinh màu có độ đặc hiệu 100% và độ nhạy 100% sau 48 giờ trong định danh *C. tropicalis*.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Yapar, N., *Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis*. Ther Clin Risk Manag, 2014. **10**: p. 95-105.
2. Logan, C., I. Martin-Loeches, and T. Bicanic, *Invasive candidiasis in critical care: challenges and future directions*. 2020. **46**(11): p. 2001-2014.
3. Pappas, P.G., M.S. Lionakis, M.C. Arendrup, L. Ostrosky-Zeichner, and B.J. Kullber., *Invasive candidiasis*. Nature Reviews Disease Primers, 2018. **4**(1): p. 18026.
4. Guinea, J., *Global trends in the distribution of Candida species causing candidemia*. Clin Microbiol Infect, 2014. **20 Suppl 6**: p. 5-10.
5. Ngô Thị Minh Châu, Tôn Nữ Phương Anh, Đỗ Thị Bích Thảo và cộng sự, Định danh loài một số chủng nấm men phân lập từ bệnh nhân bằng kỹ thuật khối phổ Malditof (MALDI TOF MAS SPECTROMETRY) và giải trình tự gen. Báo cáo Khoa học toàn văn Hội nghị KST toàn quốc lần thứ 42, Nhà Xuất bản Khoa học tự nhiên và công nghệ 2015: tr. 72-78.
6. Ngô Thị Minh Châu, Tôn Nữ Phương Anh, Đỗ Thị Bích Thảo và cộng sự, *Ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử định danh loài một số chủng nấm men và xác định tỷ lệ đề kháng với thuốc kháng nấm bằng phương pháp khuếch tán trên*



đĩa thạch. Y học thực hành, 2016. **1005**: tr. 484-489.

7. Evren, E., J.S. Göçmen, et al., *Medically important Candida spp. identification: an era beyond traditional methods*. Turk J Med Sci, 2022. **52**(3): p. 834-840.

8. Kangogo, M., M.W. Wanyoike, G. Revathi, B. Cc, and C.C. Bii.. *Phenotypic characterization of Candida albicans from clinical sources in Nairobi, Kenya*. Afr J Health Sci, 2011; **19**: p.19-23

9. Lê Trần Anh, Nguyễn Khắc Lực, Đỗ Ngọc Ánh, Đặc điểm nhiễm nấm ở bệnh nhân đến khám và điều trị tại Bệnh viện Quân Y 103 (2009 -2013). Tạp chí Y học Quân sự, 2014. **9**: tr. 76- 81.

10. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/CM1002B>

11. Pravin Charles, M.V., A. Kali, and N.M. Joseph,

*Performance of chromogenic media for Candida in rapid presumptive identification of Candida species from clinical materials*. Pharmacognosy Res, 2015. **7**(Suppl 1): p. S69-73.

12. Souza, M.N., S.O. Ortiz, et al., *Comparison between four usual methods of identification of Candida species*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, 2015. **57**(4): p. 281-287.

13. Hoàng Đình Cảnh, Trần Quang Phục, *Nghiên cứu tỷ lệ thành phần loài nấm Candida spp. ở da niêm mạc trên người đến khám tại Bệnh viện Phong Da liễu Quy Hòa*. Y học Cộng đồng, 2023. **64**: tr. 74-85.

14. Citiulo, F., G.P. Moran, D.C. Coleman, and D.J. Sullivan, *Purification and germination of Candida albicans and Candida dubliniensis chlamydospores cultured in liquid media*. FEMS Yeast Res, 2009. **9**(7): p. 1051-60.