

ĐỊNH DANH LOÀI VÀ THỬ NGHIỆM KHÁNG NẤM ĐỒ CỦA GIỐNG NẤM *ASPERGILLUS* PHÂN LẬP TẠI BỆNH VIỆN TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y DƯỢC HUẾ

Đỗ Thị Bích Thảo, Tôn Nữ Phương Anh, Ngô Thị Minh Châu

Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế

Tóm tắt

Mục tiêu: Định danh loài của giống nấm *Aspergillus* phân lập được từ bệnh nhân và từ không khí tại Bệnh viện Đại học Y Dược Huế; xác định tỷ lệ đề kháng với thuốc kháng nấm của một số loài nấm *Aspergillus* gây bệnh phổ biến. **Phương pháp:** Thu thập mẫu từ bệnh nhân và môi trường không khí bệnh viện, định danh chủng vi nấm *Aspergillus* bằng hình thái học, giữ chủng và thực hiện kháng nấm đồ. **Kết quả:** 6 loài của *Aspergillus* được phân lập từ bệnh nhân: *A. terreus* (58,1%), *A. flavus* (16,1%), *A. niger* (9,7%), *A. versicolor* (9,7%), *A. fumigatus* (3,2%), *A. candidus* (3,2%); 9 loài được phân lập từ môi trường không khí: *A. versicolor*, *A. nidulans*, *A. sydowii*, *A. circumdati groups*, *A. restrictus*, *A. oryzae*, *A. ochraceus*, *A. flocculosus*, *A. japonicus*. Thử nghiệm kháng nấm đồ của các loài phân lập từ bệnh nhân có kết quả: 100% chủng vi nấm nhạy cảm với itraconazole. Tỷ lệ đề kháng với amphotericin B: *A. terreus* (94,4%), *A. flavus* (60%), *A. niger* (67%). Tỷ lệ đề kháng với voriconazole: *A. terreus* (66,7%), *A. flavus* (20%), *A. niger* (67%), *A. versicolor* (67%). Tỷ lệ đề kháng với caspofungin: *A. terreus* (11,1%), *A. flavus* (40%), *A. versicolor* (33%). **Kết luận:** *A. terreus* là loài phổ biến nhất phân lập được với tỷ lệ 58,1%. Sự có mặt của *A. versicolor* và *A. nidulans* bệnh viện là hai loài vi nấm có thể gây ảnh hưởng đến sức khỏe con người. Tất cả các chủng vi nấm đều nhạy cảm tốt với itraconazole. Tỷ lệ đề kháng với amphotericin B và voriconazole khá cao.

Từ khóa: *Aspergillus spp.*, đề kháng thuốc kháng nấm, thử nghiệm kháng nấm đồ.

Abstract

IDENTIFYING SPECIES AND DETERMINING ANTIFUNGAL RESISTANCE OF ASPERGILLUS ISOLATED FROM HUE HOSPITAL OF MEDICINE AND PHARMACY UNIVERSITY

Do Thi Bich Thao, Ton Nu Phuong Anh, Ngo Thi Minh Chau
Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University

Objectives: To identify the species of *Aspergillus* isolated from patients and environment at Hue University of Medicine and Pharmacy Hospital; and to determine the resistance rate to antifungal drugs of common pathogen strains. **Materials and methods:** Samples were collected and identified follow morphology features, strains of *Aspergillus* were stored and checked by antifungal susceptibility testing. **Results:** 6 species of *Aspergillus* were isolated from patients including *A. terreus* (58.1%), *A. flavus* (16.1%), *A. niger* (9.7%), *A. versicolor* (9.7%), *A. fumigatus* (3.2%), *A. candidatus* (3.2%). 9 species of *Aspergillus* were isolated from hospital environment including *A. versicolor*, *A. nidulans*, *A. sydowii*, *A. circumdati groups*, *A. restrictus*, *A. oryzae*, *A. ochraceus*, *A. flocculosus*, *A. japonicus*. In antifungal susceptibility assays, 100% strains isolated from patients were susceptible to itraconazole. The resistance rate of *A. terreus*, *A. flavus*, *A. niger* to amphotericin B were 94.4%, 60% and 67% respectively. Voriconazole resistance of *A. terreus*, *A. flavus*, *A. niger* and *A. versicolor* were 66.7%, 20%, 67%, and 67% respectively. The proportion of caspofungin resistance were *A. terreus* (11.1%), *A. flavus* (40%) and *A. versicolor* (33%). **Conclusion:** *A. terreus* was the dominant species among isolates from patients of Hue Hospital of Medicine and Pharmacy University (58.1%). The appearance of *A. versicolor* and *A. nidulans* isolates from hospital environment might impact to human health. This pilot study displayed the extreme susceptibility of *Aspergillus* species to itraconazole. In addition, these isolates were highly resistant to amphotericin B and voriconazole.

Keywords: *Aspergillus spp.*, anti-fungal drugs resistance, antifungal susceptibility testing.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm *Aspergillus* là một trong những giống nấm phân bố phổ biến nhất trên thế giới, và thường phân bố chính ở vùng khí hậu nhiệt đới, cận nhiệt đới. Giống nấm này có thể tồn tại mọi nơi. Bào tử *Aspergillus* được tìm thấy phổ biến ở trong không khí, vì vậy hầu hết mọi người đều phơi nhiễm với vi nấm nhưng tình trạng bệnh phụ thuộc vào số lượng bào tử lây nhiễm, loài vi nấm và tình trạng miễn dịch của cơ thể, ước tính rằng mỗi người hít vào đường hô hấp của mình từ vài chục đến vài trăm bào tử mỗi ngày [8].

Nấm *Aspergillus* có thể là bệnh nguyên của nhiều bệnh cảnh khác nhau ở người. Các triệu chứng lâm sàng của bệnh do vi nấm này biểu hiện thay đổi từ dị ứng do vi nấm đến bệnh cảnh nấm nông hoặc nấm sâu khác. Bên cạnh đó vi nấm cũng có thể sống hoại sinh ở ống tai ngoài của người và gây viêm ống tai ngoài do nấm khi có điều kiện thuận lợi. Trong các vi nấm gây bệnh ở người thì *Aspergillus* là một trong những bệnh nguyên thường gặp của bệnh nấm xâm lấn ở những bệnh nhân suy giảm miễn dịch [4]. Có khoảng 30 loài thuộc giống nấm này có thể gây bệnh ở người, trong đó *A. fumigatus* là loài gây bệnh chiếm tỷ lệ cao nhất, và một số loài khác cũng được kể đến bao gồm: *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. nidulans*.

Đề kháng các thuốc chống nấm thuộc nhóm azole chủ yếu được báo cáo cho *A. fumigatus* [9]. Kể từ giữa những năm 1990, sự xuất hiện và gia tăng đề kháng itraconazole của *A. fumigatus* được gặp trong nhiều trường hợp lâm sàng, dẫn đến thất bại trong điều trị bệnh. Tuy nhiên, sự đề kháng itraconazole cũng đã được phát hiện ở các loài *A. niger*, *A. terreus* và *A. flavus* [9]. Ngoài ra kháng amphotericin B nguyên phát thường được báo cáo với *A. terreus* [6]. Vì vậy việc xác định cụ thể loài *Aspergillus* gây bệnh và thực hiện thử nghiệm kháng nấm đồ đã trở nên quan trọng vì sự khác biệt trong tính chất gây bệnh cũng như đáp ứng khác nhau với thuốc kháng nấm của các loài khác nhau thuộc giống nấm này. Trong các kỹ thuật định danh loài *Aspergillus* hiện nay thì kỹ thuật nuôi cấy và định danh dựa trên hình thái vẫn được sử dụng phổ biến mặc dù kỹ thuật sinh học phân tử đang dần được cải thiện và giúp định danh loài nhanh hơn, chính xác hơn [4].

Nước ta có thời tiết nóng ẩm, môi trường sinh hoạt và điều kiện vệ sinh chưa cao nên tạo điều kiện cho nấm *Aspergillus* phát triển dễ dàng. Hiện nay ở Việt Nam các bệnh lý có liên quan đến suy giảm miễn dịch bẩm sinh hoặc mắc phải được ghi nhận với tần xuất tăng lên như thiếu bổ thể bẩm sinh, thiếu gamma globulin, liệu pháp corticoids, hóa trị

liệu trong ung thư, dùng thuốc ức chế miễn dịch, ghép tạng, bệnh ung thư về máu..., và đây chính là nhóm yếu tố nguy cơ của bệnh *Aspergillus* xâm lấn. Bên cạnh đó, thử nghiệm đánh giá mức độ nhạy của *Aspergillus* với thuốc kháng nấm chưa được nghiên cứu nhiều ở Việt Nam. Do đó, chúng tôi thực hiện nghiên cứu **“Định danh loài và thử nghiệm kháng nấm đồ của giống nấm *Aspergillus* phân lập tại Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế”** nhằm mục tiêu:

1. Định danh loài của giống nấm *Aspergillus* phân lập được tại Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế.
2. Xác định tỷ lệ đề kháng với thuốc kháng nấm của một số chủng nấm *Aspergillus* gây bệnh phổ biến.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

31 chủng vi nấm thuộc giống *Aspergillus* phân lập từ bệnh phẩm thu thập ở bệnh nhân đến khám và điều trị tại Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế.

22 chủng nấm phân lập từ môi trường không khí tại các khoa phòng Bệnh viện Đại học Y Dược Huế

2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu được thiết kế theo phương pháp mô tả cắt ngang và nghiên cứu phòng thí nghiệm.

3. Kỹ thuật tiến hành

3.1. Thu thập bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm từ bệnh nhân: Bệnh phẩm được lấy từ bệnh nhân ngoại trú và nội trú ở những khoa phòng khác nhau. Các bệnh phẩm là: ráy tai, tổ chức xoang mũi, bột móng, tổ chức loét da, dịch chọc rữa phế quản- phế nang, đàm, tổ chức sinh thiết. . . Mẫu được chọn vào nghiên cứu là chủng nấm phân lập được từ bệnh nhân chưa điều trị với thuốc kháng nấm trước đó.

- Cấy nấm ở môi trường không khí tại các khoa phòng: Phòng mổ (vào buổi sáng sớm trước khi thực hiện ca mổ), Khoa Ung bướu, Khoa Điều trị tích cực theo phương pháp lắng bụi của Koch. Vi nấm môi trường không khí được phân lập vào buổi sáng sớm. Kỹ thuật được tiến hành bằng cách đặt 5 đĩa môi trường Sabouraud agar tại các vị trí góc phòng và trung tâm của phòng bệnh, các đĩa đặt cách mặt đất 70 cm. Mở nắp đĩa môi trường, để trong vòng 30 phút, sau đó đậy nắp lại. Nuôi cấy mẫu đã thu thập ở nhiệt độ phòng 28 °C.

Đếm số khuẩn nấm mọc trên mỗi đĩa thạch. Tổng số vi nấm/m³ không khí tại mỗi cụm được xác định theo công thức $X = (A \times 100 \times 100) / (S \times k)$. Trong đó: X là tổng số vi nấm/m³ không khí tại cụm khảo sát (CFU/m³); A là tổng số khuẩn vi nấm mọc trên môi trường; S là diện tích của hộp petri chứa môi

trường, được xác định bằng công thức $S = \pi r^2$ (r tính bằng cm) = 3. 1416x 4,5²; k là hệ số và phụ thuộc vào thời gian đặt hộp thạch. Đặt đĩa thạch trong 30 phút có hệ số k = 6.

100: 100 cm³ môi trường có thể hứng được vi khuẩn có trong 10 lít không khí.

100: Hệ số nhân tính ra số lượng vi sinh vật trong 1 m³ không khí

Quy định mức độ nhiễm nấm bên trong nhà của một số quốc gia.

TT	Giới hạn nấm mốc (CFU/ m3 không khí	Nguồn gốc
1	<100	AGGIH 1989
2	<200	Ú public Health service 1993
3	<300	Robertson (Mỹ) 1997
4	<500	Singapore
5	<50 CFU/m ³ không khí cho từng chủng loại vi nấm (trừ <i>Cladosporium</i> spp.)	WHO Robertson (Mỹ) 1997 Canada 1993

Mặc dù chưa có ước tính về mức độ nhiễm nấm mốc làm tăng nguy cơ nhiễm nấm xâm lấn nhưng hầu hết các nhà nghiên cứu đề nghị mật độ *Aspergillus* không khí nhỏ hơn 5 CFU/m³ và nồng độ mong muốn là thấp hơn 0,1-1 CFU/m³. Tuy nhiên tiêu chuẩn giữa các quốc gia có thể thay đổi từ 10-200 CFU/m³ và đã được các nhà ngoại khoa chấp nhận.

3. 2. Xét nghiệm trực tiếp với bệnh phẩm

- Bệnh phẩm từ bệnh nhân: Xét nghiệm trực tiếp với dung dịch KOH 20% hoặc nhuộm với thuốc nhuộm Giemsa tùy theo loại bệnh phẩm

- Đọc kết quả xét nghiệm nấm trực tiếp: Quan sát dưới kính hiển vi vật kính 40: thấy có nhiều sợi tơ nấm đường kính 4 - 5µm, phân nhánh, phân vách. Khi phân nhánh, nhánh phụ tạo với nhánh chính góc 45°, đôi khi thấy bào đài, các tiểu bào đài và bào tử.

3. 3. Nuôi cấy, phân lập định danh vi nấm

***Nuôi cấy ban đầu:**

Mẫu bệnh phẩm từ bệnh nhân được nuôi cấy với môi trường SDA (sabouraud dextrose agar)

*** Cấy chuyển, thuần chủng và định danh vi nấm**

Bệnh phẩm được nuôi cấy trên môi trường SDA để ở nhiệt độ 28°C từ 5 -7 ngày. Quan sát đại thể khúm nấm phát triển trên môi trường nuôi cấy, tách rỗng khúm nấm nghi ngờ là *Aspergillus* bằng phương pháp cấy chuyển liên tục.

Chủng vi nấm được cấy chuyển sang môi trường Czapek agar ở nhiệt độ 28°C để định danh loài. Định danh loài dựa vào đặc điểm đại thể và vi thể. Các đặc điểm chi tiết để định danh của một số loài *Aspergillus* thường gặp được mô tả chi tiết theo Atlats vi nấm của Bioforma dựa trên các đặc điểm đại thể (tổ độ mọc, kích thước và tính chất khúm nấm, màu sắc khúm nấm mặt trên và mặt dưới, và các đặc điểm vi thể (tính chất và kích thước bào đài,

tiểu bào đài, bào tử)[10].

3. 4. Cất giữ chủng vi nấm

Chủng vi nấm phân lập từ bệnh nhân được cất giữ trong dung dịch glyceron 15% ở -80°C để thử nghiệm kháng nấm đồ.

3. 5. Thử nghiệm độ nhạy cảm với thuốc kháng nấm bằng phương pháp khuếch tán trên môi trường thạch

Thử nghiệm kháng nấm đồ được thực hiện với những chủng nấm *Aspergillus* đã được định danh loài. Qui trình thử nghiệm được thực hiện theo hướng dẫn của CLSI – M 51- A: thử nghiệm cho các nấm sợi bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Thuốc kháng nấm được sử dụng là amphotericin B (AMB) 10µg, itraconazole (ITC) 8µg, voriconazole (VOR) 1µg, caspofungin (CAS) 5µg.

Đọc kết quả sau 48h bằng cách xác định vòng kháng nấm

Quy trình thử nghiệm luôn được thực hiện kèm theo chủng chuẩn trong mỗi lần thử nghiệm. Chủng chuẩn dùng cho nấm *Aspergillus* là *A. fumigatus* ATCC 204305.

3. KẾT QUẢ

3.1. Đặc điểm mẫu

3.1.1. Nguồn gốc phân lập của các chủng vi nấm phân lập từ bệnh nhân

Trong thời gian nghiên cứu từ tháng 4 năm 2017 đến tháng 3 năm 2018, chúng tôi phân lập được 31 chủng vi nấm từ 27 bệnh nhân. Trong đó chủ yếu bệnh nhân đến từ phòng khám Tai Mũi Họng chiếm 92,6 %, Khoa Nội Tổng hợp 3,7 %, và Khoa Da liễu 3,7 %. Trong đó có 23 bệnh nhân phân lập được 1 chủng vi nấm, 4 bệnh nhân phân lập được 2 chủng vi nấm từ 2 vị trí khác nhau.

Bảng 1. Nguồn gốc phân lập của các chủng vi nấm phân lập từ bệnh nhân

Bệnh phẩm	N	%
Ráy tai	29	93,6
Móng	1	3,2
Dịch rửa phế quản	1	3,2
Tổng	31	100

Nhận xét: vị trí phân lập chủ yếu là ráy tai, chiếm tỷ lệ 93,6 %, bệnh phẩm móng và dịch phế quản chiếm tỷ lệ thấp 3,2%.

3.1.2. Nguồn gốc phân lập của các chủng vi nấm phân lập từ không khí bệnh viện

Bảng 2. Nguồn gốc các chủng vi nấm phân lập từ không khí bệnh viện

Khoa/phòng	Số lượng chủng vi nấm	Tỷ lệ %
Phòng mổ	9	40,9
Khoa Ung Bướu	9	40,9
Khoa hồi sức tích cực	4	18,2
Tổng	22	100

Nhận xét: Tỷ lệ chủng vi nấm phân lập ở phòng mổ chiếm tỷ lệ cao nhất (54,5%).

3.1.3. Mức độ nhiễm nấm Aspergillus tại các khoa phòng

Bảng 3. Mức độ nhiễm nấm *Aspergillus* tại các khoa phòng

Khoa/phòng	Số lượng chủng vi nấm	CFU/m ³
Phòng mổ	9	47
Khoa Ung Bướu	9	47
Khoa hồi sức tích cực	4	21
Trung bình		38,3

Nhận xét: Mức độ nhiễm nấm ở các khoa phòng từ 21 -47 CFU/m³. Trung bình là 38,3 CFU/m³

3.2. Kết quả định danh loài

Bảng 4. Kết quả định danh nấm *Aspergillus* từ bệnh phẩm

Nấm	Nguồn gốc	N	%
<i>A. terreus</i>	Ráy tai	18	58,1
<i>A. flavus</i>	Ráy tai	5	16,1
<i>A. niger</i>	Ráy tai	3	9,7
<i>A. versicolor</i>	Ráy tai	2	3,2
	Móng	1	6,5
<i>A. fumigatus</i>	Dịch chọc rửa phế quản	1	3,2
<i>A. candidus</i>	Ráy tai	1	3,2
Tổng		31	100

Nhận xét: Trong những chủng nấm phân lập được thì *A. terreus* chiếm tỷ lệ cao nhất (58,1%), tiếp theo là *A. flavus* (16,1%), *A. niger* và *A. versicolor* (9,7 %) ,chiếm tỷ lệ thấp hơn là *A. fumigatus* và *A. candidus* (3,2%)

Bảng 5. Kết quả định danh loài với môi trường không khí bệnh viện

Nấm	Phòng mổ	Khoa Ung bướu	Khoa hồi sức tích cực	Tổng	%
<i>A. vesicolor</i>	4	3	1	8	36,4
<i>A. nidulans</i>	1	0	0	1	4,5
<i>A. sydowii</i>	1	0	0	1	4,5
<i>A. circumdati groups</i>	2	4	1	7	31,8

<i>A. oryzae</i>	0	1	0	1	4,5
<i>A. japonicus</i>	0	1	0	1	4,5
<i>A. restrictus</i>	0	0	1	1	4,5
<i>A. ochraceus</i>	0	0	1	1	4,5
<i>A. flocculosus</i>	1	0	0	1	4,5
Tổng				22	100%

Nhận xét: Loài *A. versicolor* chiếm tỷ lệ cao nhất 36,4 % và tiếp theo là nhóm *A. circumdati group* (31,8%).

Bảng 6. Mức độ nhiễm từng loài vi nấm *Aspergillus* phân lập từ không khí tại các khoa phòng

Nấm	Phòng mổ		Khoa Ung bướu		Khoa hồi sức tích cực	
	n	CFU/m ³	n	CFU/m ³	n	CFU/m ³
<i>A. vesicolor</i>	4	21	3	16	1	5
<i>A. nidulans</i>	1	5	0	0	0	0
<i>A. sydowii</i>	1	5	0	0	0	0
<i>A. circumdati groups</i>	2	10	4	21	1	5
<i>A. oryzae</i>	0	0	1	5	0	0
<i>A. japonicus</i>	0	0	1	5	0	0
<i>A. restrictus</i>	0	0	0	0	1	5
<i>A. ochraceus</i>	0	0	0	0	1	5
<i>A. flocculosus</i>	1	5	0	0	0	0

Nhận xét: Mức độ nhiễm từng loài vi nấm tại các khoa phòng từ 0 – 21 CFU/m³

3. Kết quả thử nghiệm độ nhạy cảm với thuốc kháng nấm

Bảng 6. Tỷ lệ đề kháng với thuốc kháng nấm của các chủng *Aspergillus* phân lập từ bệnh nhân

Loài (số chủng)	AMB		ITC		VOR		CAS	
	Đề kháng	Trung gian	Đề kháng	Trung gian	Đề kháng	Trung gian	Đề kháng	Trung gian
<i>A. terreus</i> (18)	17 (94,4%)	1 (5,6%)	0	0	12 (66,7%)	1 (5,6%)	2 (11,1%)	0
<i>A. flavus</i> (5)	3 (60%)	0	0	0	1 (20%)	1 (20%)	2 (40%)	0
<i>A. niger</i> (3)	2 (67%)	1 (33%)	0	0	2 (67%)	1 (33%)	0	0
<i>A. versicolor</i> (3)	0	0	0	0	2 (67%)	0	1 (33%)	0
<i>A. fumigatus</i> (1)	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. candidus</i> (1)	0	0	0	0	0	0	0	0
Tổng	22(71%)	6,5%	0 (0%)	0 (0%)	17(54,8%)	3(9,7%)	5(16,1%)	0(0%)

Nhận xét: Tất cả các loài vi nấm đều nhạy cảm với itraconazole. Tỷ lệ đề kháng chung với AMB, VOR, CAS lần lượt là 71%, 54,8% và 16,1%. Tỷ lệ đề kháng với amphotericin B của từng loài là: *A. terreus* 66,7 %, *A. versicolor* 67%, *A. niger* 67%. *A. fumigatus* và *A. candidus* nhạy cảm tốt với thuốc kháng nấm.

4. BÀN LUẬN

4.1. Kết quả định danh loài

Nấm *Aspergillus* có thể là bệnh nguyên của nhiều

bệnh cảnh nhiễm nấm khác nhau ở người. Các triệu chứng lâm sàng biểu hiện thay đổi từ dị ứng do vi nấm đến bệnh cảnh nấm nông hoặc nấm sâu khác.

Bệnh do nấm *Aspergillus* có thể thấy từ viêm da, viêm móng, hen phế quản có thể nặng hơn là viêm phổi. Trong nghiên cứu của chúng tôi, các chủng vi nấm phần lớn được phân lập từ bệnh phẩm ráy tai (93,6%), bên cạnh đó có 01 chủng vi nấm được phân lập từ bệnh phẩm móng và 01 chủng từ bệnh phẩm dịch rửa phế quản chiếm tỷ lệ cho từng loại bệnh phẩm là 3,2 %. Theo nghiên cứu của tác giả Phạm Thị Bích Đào và cộng sự thì có 80,5% trường hợp nhiễm nấm ống tai ngoài là do tác nhân *Aspergillus* gây ra [1].

Có khoảng 30 loài thuộc giống *Aspergillus* có thể gây bệnh ở người. Trong đó các loài chiếm tỷ lệ cao lần lượt là *A. fumigatus*, tiếp đến là *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*. Tác giả Heo MS trong nghiên cứu của mình đã định danh 136 chủng vi nấm *Aspergillus* cho kết quả có 5 loài gây bệnh phổ biến là *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. vesicolor* [7]. Theo K. Diba và cộng sự (2007) định danh loài bằng hình thái học với 11 chủng vi nấm thuộc giống *Aspergillus* thì các loài có tần suất cao là *A. flavus*, *A. niger* và *A. fumigatus*. Kết quả định danh chủng vi nấm phân lập từ bệnh nhân của chúng tôi phù hợp với những nghiên cứu trên, trong đó các chủng chiếm tỷ lệ cao lần lượt là *A. terreus* (58,1%), *A. flavus* (16,1%), *A. niger* (9,7%), *A. versicolor* (9,7%), *A. fumigatus* (3,2%), *A. candidus* (3,2%). Tuy nhiên kết quả của chúng tôi khác với nghiên cứu của tác giả Heo MS về tỷ lệ giữa các loài thường gặp. Điều này có thể là do phần lớn chủng vi nấm trong nghiên cứu của chúng tôi được phân lập từ ống tai ngoài. Bên cạnh đó, theo nghiên cứu của Võ Văn Nghị và Nguyễn Hữu Dũng về định danh loài bằng phương pháp PCR với bệnh phẩm ống tai ngoài thì có ba loài vi nấm chiếm tỷ lệ cao nhất lần lượt là *A. terreus*, *A. niger* và *A. flavus* [2].

Bào tử *Aspergillus* có thể tìm thấy phổ biến trong không khí và mọi người có thể phơi nhiễm với chúng, do đó, chất lượng không khí có tầm quan trọng cơ bản đối với sức khỏe của chúng ta, đặc biệt là ở các bệnh nhân suy giảm miễn dịch: bệnh nhân ung thư máu có giảm bạch cầu hạt, bệnh nhân bị bệnh lý tắc nghẽn phổi mạn tính...

Trong nghiên cứu của chúng tôi đánh giá chất lượng không khí tại ba khoa phòng: Phòng mổ, Khoa hồi sức tích cực và Khoa Ung bướu. Kết quả định danh gồm có các loài *A. vesicolor*, *A. nidulans*, *A. sydowii*, *A. circumdati* groups, *A. restrictus*, *A. oryzae*, *A. restrictus*, *A. ochraceus*, *A. flocculosus*, *A. japonicus*. Trong đó các chủng vi nấm *A. vesicolor* chiếm tỷ lệ cao nhất, đây là loài vi nấm được ghi nhận là phân bố ở mọi nơi, thường phân lập từ đất, mảnh vụn của thực vật, môi trường biển và môi trường

trong nhà. Giống như các loài *Aspergillus* khác, *A. versicolor* là một mầm bệnh cơ hội và được coi là một tác nhân gây bệnh quan trọng của aspergillosis [5]. Kết quả của chúng tôi cũng tìm thấy có loài *A. nidulans* với tỷ lệ thấp.

Đánh giá mức độ nhiễm nấm *Aspergillus* và mức độ nhiễm từng loài vi nấm *Aspergillus* trong môi trường không khí bệnh viện cho thấy giá trị CFU/m³ nằm trong giới hạn cho phép theo tiêu chuẩn của các nước.

4.2. Kết quả kháng nấm đồ

Thử nghiệm kháng nấm trong nghiên cứu của chúng tôi sử dụng bốn loại thuốc thuộc các nhóm thuốc chống nấm được dùng để điều trị bệnh do *Aspergillus* là amphotericin B thuộc nhóm các polyenes; các tria-zoles: bao gồm itraconazole (ITC), voriconazole (VOR); thuốc nhóm echinocandins được sử dụng là caspofungin (CAS). Kết quả cho thấy 100 % các chủng vi nấm *Aspergillus* đều nhạy cảm với itraconazole. Bên cạnh đó, *A. fumigatus* vẫn thường được biết đến là nguyên nhân thường gặp nhất của Aspergillosis xâm lấn nhưng gần đây trong một số nghiên cứu, *A. terreus* đang trở nên phức tạp hơn và nó ít nhạy cảm với amphotericine. *Aspergillus terreus* được ghi nhận là có tính đề kháng tự nhiên đối với amphotericine B và dẫn xuất của thuốc này [6]. Trong đề tài của chúng tôi có 17 trên 18 chủng *A. terreus* được thử nghiệm đề kháng với Amphotericin B, 01 chủng thử nghiệm trung gian với thuốc. Các chủng vi nấm khác cũng có tỷ lệ đề kháng cao với amphotericin B lần lượt là *A. flavus* (60%), *A. niger* (66,7%).

Voriconazole là một triazole phổ rộng đang được khuyến cáo sử dụng để điều trị ban đầu của bệnh *Aspergillus* xâm lấn. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ các chủng vi nấm đề kháng với loại thuốc này khá cao, lần lượt là *A. terreus* (66. 7%), *A. niger* (67%), *A. versicolor* (67%). Theo nghiên cứu của Laura Bedin Denardivà cộng sự tại Braxin cho thấy cho hoạt tính tốt đối với chủng *A. fumigatus* và *A. flavus* [3]. Trong kết quả của chúng tôi, *A. fumigatus* nhạy cảm tốt với voriconazole và một tỷ lệ nhỏ *A. flavus* đề kháng với loại thuốc này. Ngoài ra, kết quả kháng nấm đồ từ nghiên cứu này cũng cho thấy tỷ lệ đề kháng nhất định của *Aspergillus* với caspofungin.

Tóm lại, kết quả kháng nấm đồ bước đầu cho thấy tỷ lệ đề kháng với thuốc kháng nấm của giống nấm *Aspergillus*, trong đó *A. terreus* cao hơn so với các loài khác. Tuy nhiên, do thời gian nghiên cứu ngắn, bên cạnh đó nguồn gốc chủng vi nấm của chúng tôi chủ yếu từ ráy tai nên số lượng mẫu cũng như tần suất xuất hiện của các chủng vi nấm *A. fumigatus* đang còn hạn chế.

5. KẾT LUẬN

Từ 31 chủng vi nấm *Aspergillus* phân lập từ bệnh nhân có kết quả định danh loài như sau: *A. terreus* (58,1%), *A. flavus* (16,1%), *A. niger* (9,7 %), *A. versicolor* (9,7%), *A. fumigatus* (3,2%), *A. candidus* (3,2%). Có 9 loài và nhóm loài định danh từ 22 chủng vi nấm phân lập từ môi trường khí bệnh viện, trong đó có 2 loài vi nấm *A. versicolor* và *A. nidulan* được ghi nhận có thể gây bệnh ở người với mức độ nhiễm nằm trong giới hạn cho phép (0- 21 CFU/m³). Thử nghiệm đánh giá độ nhạy cảm với thuốc kháng

nấm của các loài *Aspergillus* phân lập từ bệnh nhân, ghi nhận 100% chủng vi nấm được thử nghiệm nhạy cảm tốt với itraconazole. Tỷ lệ đề kháng chung với AMB, VOR, CAS lần lượt là 71%, 54,8% và 16,1%. Tỷ lệ đề kháng với thuốc amphotericin B của từng loài là *A. terreus* (94,4 %), *A. flavus* (67%), *A. niger* (60%). Tỷ lệ đề kháng với thuốc voriconazole là *A. terreus* (66,7%), *A. niger* (67%), *A. versicolor* (67%), *A. flavus* (20%). *Aspergillus* đề kháng caspofungin ghi nhận với các loài *A. terreus*, *A. flavus* và *A. versicolor*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phạm Thị Bích Đào và Phạm Ngọc Minh, “Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng nhiễm trùng nấm ống tai ngoài”, *Tạp chí phòng chống bệnh sốt rét và các bệnh ký sinh trùng* 96/ 2017, tr. 156-161.
2. Võ Văn Nghị và Nguyễn Hữu Dũng (2013), “Định danh nấm bằng pcr ứng dụng trong chẩn đoán và điều trị nấm ống tai ngoài”, *Y Học TP. Hồ Chí Minh ,Tập 17, Phụ bản của Số 1, 2013*, tr. 157-163.
3. Bedin Denardi Laura , et al (2018), “In vitro antifungal susceptibility of clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus* in Brazil”, *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 22 (1), pp. 30-36.
4. Diba K. , et al (2007), “Identification of *Aspergillus* species using morphological characteristics”, *Pakistan Journal of Medical Sciences*. 23 (6), pp. 867.
5. Fomichevab G. M. , Vasilenkob O. V. và and O. E. Marfeninaa (2005), “Comparative Morphological, Ecological, and Molecular Studies of *Aspergillus versicolor* (Vuill.) Tiraboschi Strains Isolated from Different Ecotopes”, *ISSN 0026-2617, Microbiology, 2006, Vol. 75, No. 2, pp. 186–191. © Pleiades Publishing, Inc. , 2006*.
6. Hadrich I. , et al (2012), “Invasive aspergillosis: resistance to antifungal drugs”, *Mycopathologia*. 174 (2), pp. 131-141.
7. Heo Min Seok , et al (2015), “Molecular identification and amphotericin B susceptibility testing of clinical isolates of *Aspergillus* from 11 hospitals in Korea”, *Annals of laboratory medicine*. 35 (6), pp. 602-610.
8. Smith NL. và Denning DW. (2011), “Underlying conditions in chronic pulmonary aspergillosis including simple aspergilloma”, *European Respiratory Journal*. 37 (4), pp. 865-872.
9. Susan Julie Howard và Maiken Cavling Arendrup (2011), “Acquired antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus*: epidemiology and detection”, *Medical mycology*. 49 (Supplement 1), pp. S90-S95.
10. Bioforma (2002), “*Aspergillus*”, *Les Moisissures*, pp. 46-67.