

ĐỊNH DANH CÁC LOÀI NẤM KÍ SINH VÀ GÂY BỆNH TRÊN BỆNH NHÂN NỮ NHẬP VIỆN Ở HẢI DƯƠNG BẰNG PHƯƠNG PHÁP SO SÁNH CHUỖI GEN VÀ PHÂN TÍCH PHẢ HỆ

Nguyễn Xuân Huy¹, Trần Văn Thanh², Lê Thanh Hòa^{3,4}, ✉

¹Bệnh viện Phụ sản Hải Dương

²Bệnh viện Châm cứu Trung ương

³Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

⁴Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: imibtvn@gmail.com

Ngày nhận bài: 28.3.2017

Ngày nhận đăng: 22.5.2017

TÓM TẮT

Sử dụng phương pháp “mã vạch” DNA (DNA-barcoding), 36 chuỗi nucleotide vùng giao gen ITS (internal transcribed spacer) từ 43 mẫu bệnh phẩm nuôi cấy nấm đơn bào của bệnh nhân nữ nhập viện ở Hải Dương đã được thu nhận và phân tích so sánh với các chủng tham chiếu quốc tế. Chuỗi ITS có độ dài khác nhau tùy từng loài (0,5 – 1,2 kb) thu thập bằng phản ứng PCR và giải trình tự (cặp mồi ITS1F/ITS4R), được sử dụng để truy cập Ngân hàng gen và xác định loài dựa trên so sánh chuỗi và phân tích phả hệ với các loài tương ứng. Kết quả cho thấy, trong số 36 mẫu thực hiện thành công giám định loài, có 29 mẫu được xác định thuộc chi *Candida*, trong đó 13 mẫu là loài *Candida albicans*, 2 mẫu là *C. tropicalis*, 3 mẫu là *C. metapsilosis*, 8 mẫu là *C. glabrata*, 2 mẫu là *C. etchellsii* và một mẫu chỉ được định danh là *Candida* sp. Ngoài ra, 7 mẫu còn lại gồm 2 mẫu thuộc loài *Pichia kudriavzevii* và *Pichia norvegensis*; và một số loài ít gặp khác: i) *Kodamaea ohmeri*; ii) *Fereydownia khargensis*; iii) *Debaryomyces* sp. (có thể là loài *Debaryomyces subglobosus*); iv) *Hanseniaspora* sp. (có thể là loài *Hanseniaspora opuntiae*); và v) *Penicillium citrinum*, với mức độ đồng nhất rất cao (99-100%). Cây phả hệ chủng/loài *Candida* của Việt Nam và thế giới, chia làm 7 nhóm riêng biệt, bao gồm: nhóm *C. albicans*, nhóm *C. tropicalis*, nhóm *C. parapsilosis*, nhóm *C. metapsilosis*, nhóm *Candida* spp., nhóm *C. glabrata* và nhóm *C. etchellsii*. Phả hệ của *Pichia* spp. cũng cho thấy *P. kudriavzevii* và *P. norvegensis* của Việt Nam tập hợp cùng với loài tham chiếu tương ứng. Trên một địa bàn hẹp như tỉnh Hải Dương, kết quả định danh trên bệnh nhân nhập viện đã có đến 6 loài *Candida* khác nhau và 7 loài đặc biệt khác cho thấy tình hình nhiễm nấm *Candida* và nấm đơn bào là khá phức tạp và lẫn tạp. *C. albicans* vẫn là một loài nấm gây bệnh nguy hiểm đang tồn tại, lan tỏa và gây bệnh phổ biến trong cộng đồng phụ nữ ở địa bàn Hải Dương nói riêng và Việt Nam nói chung.

Từ khóa: *Candida*, định danh loài, Hải Dương, ITS, nấm đơn bào, phả hệ

ĐẶT VẤN ĐỀ

Một trong những bệnh phổ biến hiện nay ở người và động vật gây nên những trạng thái khác nhau trong quá trình nhiễm bệnh đó là bệnh nấm kí sinh (mycosis) (Guégan *et al.*, 2016). Bình thường thì cơ thể có khả năng kháng nấm trong một phạm vi nhất định (Kwon-Chung, 2012; Guégan *et al.*, 2016), nhưng khi điều kiện môi trường thuận lợi, nấm kí sinh có thể phát triển mạnh và gây bệnh tràn lan, ở một số vị trí trên cơ thể như: lớp da ngoài, màng nhầy, móng tay, móng chân, tóc, có thể nằm ở các lớp da sâu hơn và phát tán đến máu hay các cơ quan

nội tạng khác (phổi, gan, thận, tủy sống...) gây nhiễm trùng toàn thân (Quinn *et al.*, 2011; Guégan *et al.*, 2016). Bệnh nấm biểu hiện ở các thể và dạng bệnh khác nhau khu trú cục bộ ở cơ quan hoặc có thể ở dạng nhiễm trùng toàn cơ thể (Blanco, Garcia, 2008). Một số loại nấm gây bệnh phổ biến và nguy hiểm là ở chi *Candida*, một số thành viên của chi *Aspergillus* và một số loài đặc biệt khác (Pfaller *et al.*, 2006; Tsai *et al.*, 2012), trong đó một số loài nấm còn sản sinh độc tố (mycotoxin) thuộc các chi *Aspergillus*, *Penicillium* và *Fusarium* gây ngộ độc và làm tê liệt các cơ quan trong cơ thể (Suanthie *et al.*, 2009).

Trong số hơn 1,5 triệu loài nấm ước tính hiện có, chỉ có khoảng 150 - 200 loài có thể gây bệnh ở người, trong đó nhiễm trùng hệ thống vẫn đề là đặc biệt nghiêm trọng và đe dọa tính mạng, đặc biệt với một số nấm sinh độc tố (Richardson, Rautemaa, 2009; Miceli *et al.*, 2011; Ravikumar *et al.*, 2015). Các loại nấm này gây nhiễm trùng cơ hội (opportunistic infection), tạo nên hiện tượng da bị biến sắc, dày lên, gồ ghề, mô cơ lở loét, biến dị móng tay, móng chân, ở đầu làm rụng tóc, hoại tử cơ quan, tê liệt cơ quan thần kinh và vận động, gây nên cảm giác ngứa ngáy, người bệnh khó chịu, hoạt động mất bình thường và ảnh hưởng sức khỏe, có thể tử vong (Yew *et al.*, 2014; Guégan *et al.*, 2016).

Thể bệnh phổ biến nhất là nhiễm nấm *Candida* thể hầu họng (oropharyngeal candidiasis, OPC) và thể niêm mạc âm đạo (vulvovaginal candidiasis, VVC). OPC có liên quan với căn bệnh tiềm ẩn như bệnh tiểu đường (Moran *et al.*, 2011). Ngoài ra, OPC là một trong những biểu hiện kể nhiễm tiên phát của cơ thể bị suy giảm miễn dịch do HIV gây ra và cũng là một chỉ số chủ điểm cho sự tiến triển bệnh do HIV trước khi xuất hiện các triệu chứng nghiêm trọng khác ở bệnh nhân HIV (Perfect, Casadevall, 2006). *C. albicans* chiếm đến 80-85% nguyên nhân gây bệnh thể OPC và VVC; tiếp đến là các loài *C. glabrata*, *C. tropicalis* nhiễm đơn hoặc đa nhiễm (Sobel, 2010; Kalaiarasan *et al.*, 2017). Candidiasis âm đạo (VVC) phổ biến trên toàn thế giới, với tỷ lệ mắc đã tăng lên trong những năm gần đây; có đến 75% phụ nữ mắc ít nhất một loài nấm, trong số đó, trong vòng 12 tháng ít nhất 5% chuyển tiếp tạo nên dạng VVC thường xuyên của một trong 4 giai đoạn tiến triển của candidiasis (Wei *et al.*, 2010). VVC tạo cơ hội cho người bệnh lưu cữu mầm bệnh và phát triển tính kháng thuốc trong quá trình điều trị (Kalaiarasan *et al.*, 2017). Đặc biệt, nhiễm *Candida* phối chéo với non-*albicans Candida*, hoặc nhiễm *Candida* kháng thuốc, hoặc bệnh nhân nữ nhiễm *Candida* spp. trong thời kỳ mang thai hoặc nhiễm HIV hoặc suy giảm miễn dịch là những trường hợp khó can thiệp nhất (Kalaiarasan *et al.*, 2017; Kimura *et al.*, 2017).

Phát hiện chính xác các loài nấm kể cả nấm sinh độc tố (mycotoxigenic fungi) là ứng dụng các phương pháp sinh học phân tử dựa trên PCR và giải trình tự, cung cấp giải pháp thay thế hoặc hỗ trợ cho các phương pháp hình thái học (Konietzny, Greiner, 2003; Massire *et al.*, 2013; Irinyi *et al.*, 2016). Gần đây, PCR và sinh học phân tử, giúp chẩn đoán chính

xác các loài nấm trong thời gian ngắn nhất cũng như mối quan hệ phả hệ về loài và họ của nấm gây bệnh để định hướng phòng chống (Konietzny, Greiner, 2003; Suanthie *et al.*, 2009; Seyedmousavi *et al.*, 2015; Irinyi *et al.*, 2016). Nhiều nước đã ban hành áp dụng phương pháp “mã vạch” DNA (DNA-barcoding) theo qui định quốc tế, sử dụng chỉ thị chuỗi gen ITS (internal transcribed spacer), so sánh và phân tích trình tự nucleotide nhằm giám định loài với các loài tham chiếu và có thể xác định loài nấm gây bệnh trực tiếp từ bệnh phẩm lâm sàng không hoặc qua nuôi cấy (Begerow *et al.*, 2010; Irinyi *et al.*, 2016). Hội Nấm học Quốc tế (The International Society for Human and Animal Mycology, ISHAM) đã xây dựng cơ sở dữ liệu (database) của các loài nấm gây bệnh nguy hiểm ở người và động vật, giúp truy cập và trao đổi dữ liệu trong việc chẩn đoán xác định loài bằng phương pháp “mã vạch” DNA (truy cập miễn phí tại: <http://www.isham.org/> hoặc <http://its.mycologylab.org>) (Begerow *et al.*, 2010; Irinyi *et al.*, 2016).

Trong nghiên cứu này chúng tôi công bố định danh một số loài nấm đơn bào trên bệnh nhân nữ nhập viện ở Hải Dương, sử dụng các phương pháp sinh học phân tử áp dụng PCR và “mã vạch” DNA với cặp mồi ITS1F/ITS4R theo qui trình (Irinyi *et al.*, 2016) thu chuỗi nucleotide vùng giao gen ITS, đồng thời phân tích đối chiếu với các chuỗi gen đã đăng kí trên Ngân hàng gen, phân tích phả hệ và xác định đến loài của các mẫu nấm vi sinh gây bệnh.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thu thập và bảo quản mẫu

Bệnh phẩm là dịch lấy từ âm đạo của bệnh nhân; sau đó, được cấy trên mặt nghiêng thạch ống chứa môi trường nuôi cấy nấm đơn bào. Mỗi một mẫu được cho vào một túi riêng biệt và chuyển về phòng Miễn dịch học, Viện Công nghệ sinh học (Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam) để phân tích và định loại bằng sinh học phân tử. Tổng cộng thu hoạch được 47 mẫu nấm sau nuôi cấy, trong đó 4 mẫu bị nhiễm tạp, loại bỏ. Bốn ba mẫu còn lại được bảo quản ở ngăn mát (4 - 10°C) trong tủ lạnh thường, trong khi tiến hành tách DNA tổng số. Sau đó, toàn bộ bệnh phẩm được tiêu hủy bảo đảm an toàn sinh học.

Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số (DNA hỗn hợp của tế bào nấm) được tách chiết sử dụng bộ kit của hãng Bioneer

(Hàn Quốc), theo qui trình hướng dẫn của nhà sản xuất. Tóm tắt như sau: Dùng que cấy (loop) lấy đầy tế bào nấm từ bề mặt ống nuôi cấy và chuyển vào ống Eppendorf (loại 1,5ml); bổ sung 400 µl đệm TE, đến tổng số 50 ml. Ủ ở 80°C/20 phút, sau đó hạ xuống nhiệt độ phòng; bổ sung 50 µl lysozyme nồng độ 10mg/ml, lắc xoáy (vortex) và ủ 37°C trong 1 giờ. Tiếp tục bổ sung 5 µl proteinase K (10mg/ml) và 70 µl SDS 10%, lắc xoáy nhẹ và ủ ở 65°C/10 phút. Tiếp tục cho 100 µl NaCl 5M, 100 µl CTAB/NaCl (được pha chế theo Wei *et al.* (2010)), đã được làm nóng đến 65°C, lắc xoáy cho đến khi toàn bộ dịch chuyển sang màu trắng sữa và ủ 65°C/10 phút; Bổ sung 450 µl hỗn hợp chloroform/isoamyl alcohol (24:1), lắc xoáy trong 10 giây; ly tâm 13000 vòng/phút trong 5 phút. Chuyển dịch nổi sang ống Eppendorf mới, bổ sung 450 µl isopropanol, ủ trong đá trong 10 phút; ly tâm 13.000vòng/phút trong 15 phút; loại bỏ dịch nổi. Cho 500 µl ethanol 70%, ly tâm 13.000vòng/phút trong 5 phút; loại bỏ dịch nổi và làm khô tủa. Hòa tan tủa trong 50 µl dịch TE. Bảo quản sản phẩm DNA tổng số ở -20°C, cho đến khi thực hiện PCR.

Thiết kế mồi và thực hiện phản ứng PCR

Để thực hiện xác định loài của các mẫu nấm, cặp mồi chung cho các loài nấm kí hiệu ITS1F/ITSR, gồm: ITS1F (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') và ITS4R (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') được thiết kế để thực hiện phản ứng PCR vùng ITS của tất cả các loài nấm (Iriyani *et al.*, 2016).

Phản ứng PCR được thực hiện với cặp mồi, bao gồm mồi xuôi (ITS1F) và mồi ngược ITS4R cho sản phẩm khoảng từ 500 bp đến 1200 bp, tùy từng loài. Dung tích phản ứng PCR là 50 µl, gồm 25 PCR Mastermix (Fermentas Inc.), 2 µl mỗi loại mồi (10 pmol/µl), 3 µl khuôn, 2 µl DMSO (dimethyl sulfoxide) và 16 µl nước khử ion DEPC. Phản ứng được thực hiện trên máy MJ PTC-100 (USA) với chu trình nhiệt bao gồm 1 chu kỳ ở 94°C/5 phút, 35 chu kỳ ở [94 °C/30 giây, 58 °C/30 giây; 72 °C/1 phút], chu kỳ cuối ở 72 °C/10 phút.

Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên agarose 1% và tinh sạch bằng bộ kit QIAquick Purification kit (QIAGEN Inc) (đối với các sản phẩm PCR cho đơn băng, sắc nét) hoặc tinh sạch bằng phương pháp “thời gel” (elution) bằng DNA tương ứng (với những sản phẩm PCR đa băng). Sản phẩm PCR được gửi đi giải trình tự trực tiếp hoặc dòng

hóa vào vector tách dòng pCR2.1TOPO, Invitrogen và chọn lọc plasmid tái tổ hợp để giải trình tự.

Giải trình tự và xử lý số liệu

Sản phẩm PCR được giải trình tự trên máy tự động ABI-3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) (Macrogen, Hàn Quốc). Chuỗi nucleotide được xử lý bằng chương trình Chromas Lite v2.1.6 (<https://technelysium.com.au/wp/chromas/>). Trình tự nucleotide vùng ITS của các chủng nấm được sử dụng để truy cập Ngân hàng gen (BLAST: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), thu thập các chuỗi của các chủng tham chiếu đã được xác định chính xác loài. So sánh đối chiếu nucleotide, xử lý số liệu các chuỗi để xác định mức độ tương đồng bằng chương trình GENEDOC2.7 (<http://www.nrbcs.org/gfx/genedoc/>). Phân tích chuỗi nucleotide bằng chương trình GENEDOC2.7 và phân tích phá hệ sử dụng chương trình MEGA6.06, phương pháp “kết nối liền kề” (Neighbor-joining, NJ) với hệ số tin tưởng (bootstrap) 1000 lần lặp lại (Tamura *et al.*, 2013).

Y đức

Thực hiện theo qui trình y đức của Viện Sốt rét-Kí sinh trùng và Côn trùng Trung ương ban hành theo qui định của Bộ Y tế.

Địa điểm thực hiện

Phòng Miễn dịch học và Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen của Viện Công nghệ sinh học (Viện Hàn lâm khoa học và Công nghệ Việt Nam).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả tách chiết DNA tổng số từ các mẫu nấm nuôi cấy và thực hiện PCR

Tổng số có tất cả 47 mẫu bệnh phẩm nấm nuôi cấy đảm bảo chất lượng, loại bỏ một số mẫu bị tạp nhiễm không tách DNA tổng số. Kiểm tra ngẫu nhiên ở một số mẫu, kết quả cho thấy DNA tổng số hiển thị vệt sáng trên thạch agarose 1% nhuộm ethidium bromide. Bảng 1 thống kê 36 mẫu làm khuôn đã thực hiện PCR và giải trình tự thành công theo qui trình đã mô tả, nhận được chuỗi nucleotide của vùng ITS và kết quả xác định tên loài của các mẫu tương ứng này. Kết quả điện di sản phẩm PCR thu được đại diện được trình bày ở hình 1.

Bảng 1. Danh sách các mẫu bệnh phẩm nuôi cấy và kết quả xác định tên loài.

STT	Kí hiệu mẫu	Kí hiệu DNA tổng số	Chất lượng PCR	Kết quả xác định thuộc loài
1	200361	200361	+++	<i>Candida albicans</i>
2	201655	201655	+++	<i>Kodamaea ohmeri</i>
3	206345	206345	+++	<i>Pichia norvegensis</i>
4	206573	206573	+++	<i>Pichia kudriavzevii</i>
5	215344	215344	+++	<i>Candida albicans</i>
6	218232	218232	++	<i>Fereydounia khargensis</i>
7	231340	231340	+++	<i>Candida albicans</i>
8	227677	227677	+++	<i>Candida albicans</i>
9	234937	234937	+++	<i>Candida sp.</i>
10	238162	238162	+++	<i>Candida albicans</i>
11	243888	243888	+++	<i>Candida glabrata</i>
12	243937	243937	+++	<i>Candida albicans</i>
13	244607	244607	+++	<i>Candida metapsilosis</i>
14	243692	243692	+++	<i>Candida glabrata</i>
15	244695	244695	+++	<i>Candida glabrata</i>
16	F23164	F23164	+++	<i>Candida albicans</i>
17	F17785	F17785	+++	<i>Candida albicans</i>
18	F565	F565	+++	<i>Candida albicans</i>
19	FL4383	FL4383	+++	<i>Candida glabrata</i>
20	F0016320	F0016320	+++	<i>Candida glabrata</i>
21	S0021285	S0021285	+++	<i>Candida glabrata</i>
22	244694	244694	++	<i>Candida albicans</i>
23	F0022889	F0022889a	++	<i>Debaryomyces subglobosus</i> / <i>Debaryomyces sp.</i>
24		F0022889b	++	<i>Candida etchellsii</i>
25	E0289	E0289	+++	<i>Candida albicans</i>
26	08070051	08070051	+++	<i>Candida glabrata</i>
27	S4972	S4972	+++	<i>Candida metapsilosis</i>
28	S3423	S3423	+++	<i>Candida etchellsii</i>
29	S4141	S4141	+++	<i>Candida tropicalis</i>
30	121806	121806	+++	<i>Candida albicans</i>
31	33986	33986	+++	<i>Candida metapsilosis</i>
32	151322	151322	+++	<i>Penicillium citrinum</i>
33	60876	60876	++++	<i>Candida tropicalis</i>
34	060022	060022	+++	<i>Hanseniaspora opuntiae</i> / <i>Hanseniaspora sp.</i>
35	11100071	11100071	+++	<i>Candida glabrata</i>
36	E12026	E12026	+++	<i>Candida albicans</i>

Ghi chú: Sản phẩm PCR: ++: Băng DNA nhìn thấy được tương đối rõ; +++: Nhìn thấy rõ, chất lượng tốt; ++++: Rất rõ, đơn băng, chất lượng cao;

Kết quả cho thấy, ngoài một số mẫu không có DNA hiển thị, hầu hết sản phẩm PCR nhìn thấy rõ, có chất lượng tốt để tinh sạch và giải trình tự (Hình

1). Sản phẩm vùng gen ITS của tất cả các mẫu có kích thước trong khoảng 0,5 kb đến 1,2 kb, phần lớn là 0,8 - 0,9 kb. Trong số các mẫu bệnh phẩm có một

mẫu âm tính không cho sản phẩm PCR; 3 mẫu bị nhiễm tạp loại bỏ trước khi tách DNA tổng số làm khuôn; 07 mẫu có sản phẩm DNA chất lượng trung bình tuy nhiên sau khi giải trình tự chuỗi nucleotide bị rối, do DNA không tinh khiết. Phần lớn mẫu cho sản phẩm đơn băng DNA, sau khi giải trình tự cho

kết quả đơn chuỗi (đơn loài), chứng tỏ chỉ chứa duy nhất một loài nấm gây bệnh. Một mẫu (mẫu F0022889, Hình 1; Bảng 1) cho sản phẩm PCR gồm 2 băng kích thước khoảng 0,8 kb và 0,5 kb, được tách tinh sạch riêng biệt và giải trình tự, kết quả phân tích cho thấy chúng thuộc 2 loài khác nhau.



Hình 1. Ảnh điện di một số sản phẩm PCR vùng gen ITS thu được từ các mẫu nấm đại diện (mẫu 1-11). M: Chỉ thị DNA (Lambda cắt bằng *Hind*III); mũi tên chỉ kích thước sản phẩm PCR thu được (trong khoảng 0,5 kb đến 1,2 kb). Mẫu: 1: 200361; 2: 201655; 3: 206345; 4: 206573; 5: 215344; 6: 218232; 7: 231340; 8: 227677; 9: 234937; 10: 238162; 11: 243888 (kí hiệu mẫu, xem [Bảng 1](#)).

Kết quả xác định loài thuộc chi *Candida* và phân tích phả hệ

Chuỗi nucleotide thu được từ mỗi sản phẩm PCR của mỗi mẫu bệnh phẩm được sử dụng để truy cập Ngân hàng gen (BLAST: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Trên cơ sở kết quả đồng nhất, các chuỗi có trong Ngân hàng gen được thu thập, sắp xếp so sánh và phân tích phả hệ xem xét mối quan hệ về loài của chúng. Trong số 36 mẫu thực hiện thành công giám định loài, có tất cả 29 mẫu được xác định là các loài nấm thuộc chi *Candida*, liệt kê ở bảng 1 và cây phả hệ được trình bày ở hình 2.

Trong đó: i) Mười ba (13) mẫu là loài *C. albicans* (gồm các mẫu: 200361; 215344; 231340; 227677; 238162; 243937; F23164; F17785; F565; 244694; E0289; 121806; E12026); ii) Hai (02) mẫu là loài *C. tropicalis* (gồm các mẫu: S4141; 60876); iii) Ba (03) mẫu là loài *C. metapsilosis* (244607; S4972; 33986); iv) Một (01) mẫu (234937) không có mức độ đồng nhất với bất kỳ một loài cụ thể nào trong chi *Candida*, nên chỉ được định danh là *Candida* sp.; v) Tám (08) mẫu là loài *C. glabrata* (gồm các mẫu: 243888, 243692, 244695, FL4383, F0016320, S0021285, 08070051, 11100071); vi) Hai (02) mẫu là loài *C. etchellsii* (gồm các mẫu: F0022889b, S3423);

Tất cả 29 chuỗi nucleotide ITS của mẫu Việt Nam thuộc chi *Candida* và 15 chuỗi gen tương ứng của các loài tham chiếu thu thập từ Ngân hàng gen được phân tích phả hệ. Cây phả hệ biểu hiện mối quan hệ về loài của chi *Candida* được trình bày ở hình 2.

Cây phả hệ của 44 chủng/loài *Candida* phân vào 7 nhóm riêng biệt rất rõ ràng, bao gồm:

i) Nhóm *C. albicans*: Tập hợp của 13 chủng của Việt Nam và 04 loài *C. albicans* tham chiếu đại diện của Mỹ, Brazil, Australia (ATCC-JX094781; UOA-HCPF3406-GQ376070; ICB954-BR-JX463266; WM10-94-OM-HQ014713);

ii) Nhóm *C. tropicalis*: Gồm 02 chủng nấm của Việt Nam và 03 loài *C. tropicalis* tham chiếu đại diện của Pakistan (PK, số đăng kí Ngân hàng gen: JN159660), Đài Loan (TW, AB467290) và Trung Quốc (CN, FJ662410);

iii) Nhóm *C. parapsilosis*: Không có chủng nào của Việt Nam, tuy nhiên, loài này rất gần và hầu như ở cùng chung nhóm với nhóm của các chủng thuộc loài *C. metapsilosis*;

iv) Nhóm *C. metapsilosis*: Là tập hợp gồm 03 chủng nấm của Việt Nam và 02 loài *C. metapsilosis* tham chiếu đại diện của Australia (AU, số đăng kí Ngân hàng gen: FM178402), và Hy Lạp (GR, JX111995);

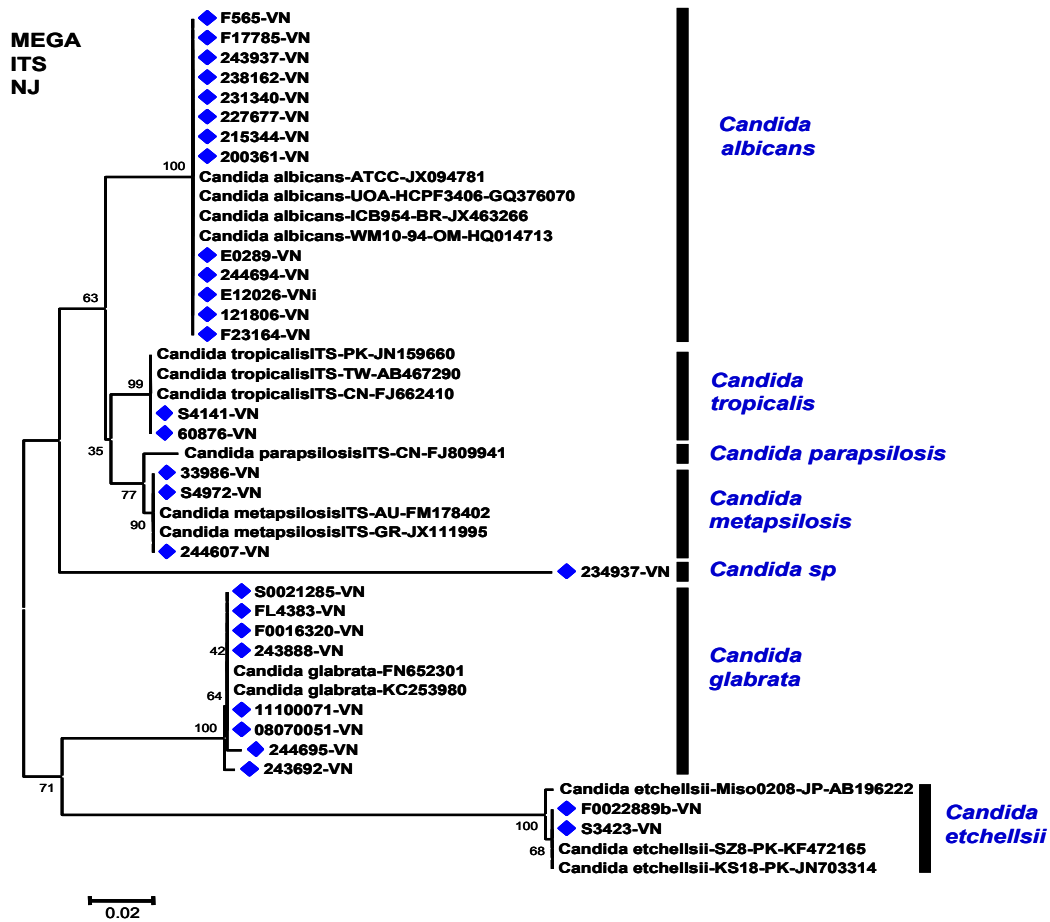
v) Nhóm *Candida* sp.: Chỉ có duy nhất một chủng nấm của Việt Nam (234937) tuy thuộc chi *Candida* nhưng không định danh cụ thể được tên loài;

vi) Nhóm *C. glabrata*: Tập hợp của 08 chủng nấm của Việt Nam và 02 loài *C. glabrata* tham chiếu đại diện có trong Ngân hàng gen (số đăng kí: FN652301 và KC253980);

vii) Nhóm *C. etchellsii*: Gồm 02 chủng của Việt

Nam và 03 loài *C. etchellsii* tham chiếu đại diện, gồm 01 của Nhật Bản (Miso0208-JP, số đăng kí Ngân hàng gen: AB196222) và 02 của Pakistan (SZ8-PK, KF472165; và KS18-PK, JN703314).

Hệ số tin tưởng rất cao (90 - 100%) ở tất cả các phân nhóm (Hình 2) thể hiện tất cả các chủng nấm của Việt Nam được định danh một cách chính xác, phù hợp với các loài tham chiếu.



Hình 5. Cây phả hệ xác định loài và mối quan hệ phân loại các mẫu nấm gây bệnh. Ghi chú: Dấu hình thoi chỉ các chủng nấm cần xác định loài trong nghiên cứu này; các chủng còn lại là các chủng tham chiếu được cung cấp tên loài, số kí hiệu chủng (ở giữa) và số đăng kí Ngân hàng gen (ở cuối chuỗi).

Kết quả xác định loài thuộc chi *Pichia* và phân tích phả hệ

Số mẫu nấm của Việt Nam được xác định thuộc chi *Pichia* bao gồm 02 mẫu: mẫu số 206573-VN được định danh thuộc loài *P. kudriavzevii* và mẫu số 206345-VN thuộc loài *P. norvegensis* (Bảng 1). Kết quả truy cập Ngân hàng gen cho thấy chuỗi gen vùng

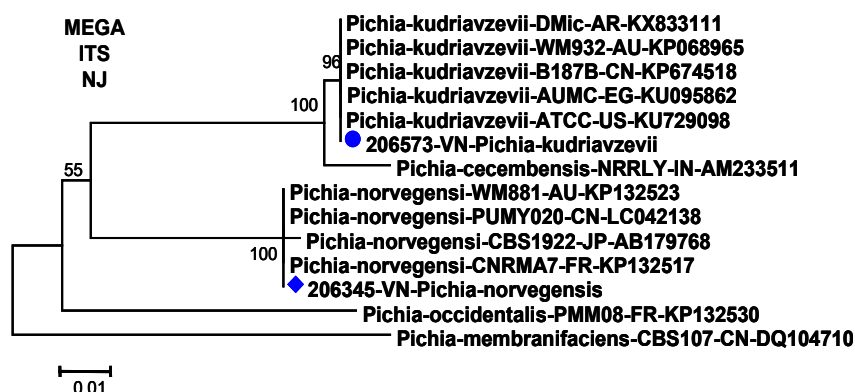
ITS của mẫu số 206573-VN có mức độ đồng nhất đến 100% với loài *P. kudriavzevii* và mẫu số 206345-VN có mức độ đồng nhất đến 99% - 100% với loài *P. norvegensis*.

Chuỗi nucleotide thu được từ kết quả truy cập Ngân hàng gen (chương trình BLAST), ứng với mỗi mẫu số 206573-VN (loài *P. kudriavzevii*) và mẫu số

206345-VN (loài *P. norvegensis*) có trong Ngân hàng gen được sử dụng làm các chủng tham chiếu, thu thập từ các quốc gia Argentina, Australia, Trung Quốc, Ai Cập, Mỹ, Ấn Độ, Nhật Bản và Pháp để phân tích phả hệ (Hình 3).

Cây phả hệ cho thấy hai chủng nấm trong nghiên

cứu này (số 206573-VN và 206345-VN) được phân vào 2 nhóm, tập hợp cùng các chủng tham chiếu tương ứng với loài đã định danh. Chủng nấm 206573-VN nằm trong nhóm định danh thuộc loài *P. kudriavzevii*; và chủng nấm 206345-VN nằm trong nhóm định danh thuộc loài *P. norvegensis*.



Hình 3. Cây phả hệ xác định loài và mối quan hệ phân loại các mẫu nấm gây bệnh thuộc chi *Pichia*. Ghi chú: Dấu hình tròn chỉ vị trí chủng nấm 206573-VN định danh thuộc loài *P. kudriavzevii*; và dấu hình thoi chỉ chủng nấm 206345-VN định danh thuộc loài *P. norvegensis*. Các chủng tham chiếu được cung cấp tên loài, số kí hiệu chủng (ở giữa), tên quốc gia nơi chủng đó công bố và số đăng kí Ngân hàng gen (ở cuối chuỗi). AR: Argentina; AU: Australia; CN: China; EG: Ai Cập; US: Mỹ; IN: Ấn Độ; JP: Nhật Bản; FR: Pháp.

Kết quả xác định loài của một số mẫu nấm đặc biệt khác

Trong số 36 chuỗi ITS thu nhận thành công từ các mẫu nấm Việt Nam trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xác định được một số loài ít gặp: i) *Kodamaea ohmeri* (mẫu số 201655-VN); ii) *Fereydounia khargensis* (mẫu số 218232-VN); iii) *Debaryomyces* sp. (mẫu số F0022889a-VN), có thể là loài *Debaryomyces subglobosus*; iv) *Hanseniaspora* sp. (mẫu số 060022-VN), có thể là loài *Hanseniaspora opuntiae*; và v) *Penicillium citrinum* (mẫu số 151322-VN) (Bảng 1). Cụ thể:

i) *Kodamaea ohmeri* (mẫu số 201655-VN): So sánh với các chủng tham chiếu thuộc loài *K. ohmeri*, chỉ có một vài sai khác nhỏ giữa các chủng, nằm trong giới hạn cho phép sai khác nội loài (intra-specific variation), điều đó chứng tỏ mẫu 201655-VN định danh là loài *K. ohmeri* là chính xác.

ii) *Fereydounia khargensis* (mẫu số 218232-VN): So sánh với các chủng tham chiếu thuộc loài *F. khargensis*, chỉ có một vài sai khác nhỏ giữa các chủng (6 sai khác trong số 727 nucleotide so sánh), nằm trong giới hạn cho phép sai khác nội loài, điều đó chứng tỏ mẫu số 218232-VN định danh là loài *F.*

khargensis là chính xác.

iii) *Debaryomyces* sp. (mẫu số F0022889a-VN): So sánh với các chủng tham chiếu thuộc loài *Debaryomyces* sp., có thể là loài *D. subglobosus*, do chỉ có 05 sai khác nhỏ giữa các chủng trong số 555 nucleotide so sánh. Điều đó chứng tỏ mẫu số F0022889a-VN định danh là thuộc về *Debaryomyces* sp., có thể là loài *D. subglobosus* với khả năng chính xác cao.

iv) *Hanseniaspora* sp. (mẫu số 060022-VN): So sánh với các chủng tham chiếu thuộc loài *Hanseniaspora* sp. và loài *Hanseniaspora opuntiae*, chỉ có 04 sai khác nhỏ giữa các chủng trong số 673 nucleotide so sánh, nằm trong giới hạn cho phép. Điều đó chứng tỏ mẫu số 060022-VN-VN định danh là thuộc về loài *Hanseniaspora* sp. có thể là loài *H. opuntiae* với khả năng chính xác cao.

v) *Penicillium citrinum* (mẫu số 151322-VN): So sánh với các chủng tham chiếu thuộc loài *P. citrinum* công bố từ các nước Ấn Độ và Trung Quốc, không có bất kỳ sai khác nào trong số 491 nucleotide so sánh, đạt độ đồng nhất 100%. Điều đó chứng tỏ mẫu số 151322-VN được định danh là loài *P. citrinum* là chính xác tuyệt đối.

THẢO LUẬN

Chẩn đoán phát hiện và định danh nấm đơn bào trong đó có các loài *Candida* spp. gây nhiễm lâm sàng là vấn đề không đơn giản, đặc biệt là xác định loài nào gây nhiễm sơ cấp, loài nào thứ cấp hoặc đồng nhiễm ở các bệnh phẩm lâm sàng; mặc dù đã áp dụng nhiều phương pháp nuôi cấy, sinh hóa, hình thái đến sinh học phân tử và kết hợp ‘mã vạch’ sàng lọc trực tiếp bệnh phẩm lâm sàng (Xu, 2016; Irinyi *et al.*, 2016; Kalaiarasan *et al.*, 2017; Kimura *et al.*, 2017). Ở mỗi góc độ sử dụng, mỗi một phương pháp đã phát huy tối đa cho phép định danh sát nhất, gần nhất và chính xác nhất loài nấm gây bệnh (Pfaller *et al.*, 2006; Begerow *et al.*, 2010; Guégan *et al.*, 2016; Kimura *et al.*, 2017). Phương pháp PCR kết hợp giải trình tự phân tích chuỗi ITS đang được ứng dụng rộng rãi, không những khẳng định sự có mặt của nấm đơn bào gây bệnh trong bệnh phẩm/bệnh nhân mà còn cho biết genotype của mỗi loài để có biện pháp đối phó can thiệp (Wei *et al.*, 2010; Begerow *et al.*, 2010; Kalaiarasan *et al.*, 2017). Các phương pháp thông thường, mặc dù tốn thời gian công sức và có sự thiếu chính xác nhất định, vẫn còn được áp dụng trong sơ bộ sàng lọc bệnh phẩm lâm sàng, kể cả khảo sát tính kháng thuốc (Kimura *et al.*, 2017).

Tuy nhiên do nhu cầu cần tiêu chuẩn hóa và cần có ngân hàng dữ liệu gen/protein nấm đơn bào gây bệnh, phương pháp sinh học phân tử được chọn làm công cụ hỗ trợ chẩn đoán, phân biệt, phân tích gen học, phá hệ, quan hệ loài và xác định loài gây bệnh sơ và thứ cấp, hiện đang được ứng dụng rộng rãi (Konietzny, Greiner, 2003; Suanthie *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2010; Begerow *et al.*, 2010; Moran *et al.*, 2011; Massire *et al.*, 2013; Xu, 2016; Kimura *et al.*, 2017). Trong các thập niên qua tiêu chuẩn “mã vạch” DNA trong định danh nấm đơn bào gây bệnh đã được xây dựng thành công dựa trên PCR với các cặp môi tương ứng. Dữ liệu vùng gen ITS tham chiếu đã được cung cấp khá đầy đủ trong Ngân hàng gen (GenBank/BLAST: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) và Trung tâm định danh nấm lâm sàng (ISHAM: <http://www.isham.org/>) (Begerow *et al.*, 2010; Irinyi *et al.*, 2016). Cặp môi ITS1F/ITS4R thực hiện phân ứng PCR được chuẩn hóa, hoạt động với khuôn của tất cả các loài nấm đơn bào, được thực hiện với qui trình quốc tế (Irinyi *et al.*, 2016).

Trên cơ sở qui trình qui định theo tiêu chuẩn quốc tế đó, nghiên cứu này đã thực hiện thành công định danh được 13 loài nấm đơn bào *Candida* spp. từ

36 mẫu bệnh phẩm nuôi cấy từ bệnh phẩm lâm sàng thu từ bệnh nhân nhiễm nấm nhập viện ở Hải Dương. Ngoài *Candida* spp., người bệnh còn bị nhiễm một số loài đặc biệt khác trong đó có các loài thuộc chi *Pichia*, *Kodamaea*, *Fereydownia*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora* và *Penicillium*. Ngoài *C. albicans* nổi trội và *C. glabrata* thường gặp, đã xuất hiện nhiễm thêm một số loài ít gặp như *C. etchellsii*. Với tỷ lệ nhiễm cao trong số mẫu định danh *Candida* (13/29), *C. albicans* vẫn là một loài nấm gây bệnh nguy hiểm đang tồn tại, lan tỏa và gây bệnh phổ biến trong cộng đồng phụ nữ ở địa bàn Hải Dương. Nhiễm cao thứ nhất là *C. albicans* là loài phổ biến, chiếm 80-85% trong số *Candida* spp. phân lập lâm sàng trên toàn thế giới (Kalaiarasan *et al.*, 2017). Điều này cũng nhận thấy nhiễm *albicans-Candida* chiếm tỷ lệ rất cao so với tổng số bệnh nhân nhiễm non-*albicans Candida* ở số mẫu chúng tôi khảo sát trong nghiên cứu này.

Đặc biệt, một mẫu bệnh phẩm (mẫu F0022889) là mẫu song nhiễm, được định danh gồm 2 loài, cho chuỗi gen đồng nhất lần lượt của *Debaryomyces* sp. (loài *Debaryomyces subglobosus*) và *Candida* sp. (*C. etchellsii*).

Kết quả định danh loài nấm đơn bào trong 36 mẫu, ở một địa bàn hẹp như tỉnh Hải Dương cho thấy, có đến 06 loài khác nhau phát hiện trong 29 mẫu bệnh phẩm thuộc chi *Candida* và có đến 7 loài khác thuộc 6 chi khác trong số mẫu còn lại, cho phép nhận định nhiễm nấm đơn bào trên địa bàn này là khá phức tạp và lẫn tạp. Định danh bằng sinh học phân tử trong nghiên cứu này chỉ là số liệu tham khảo mang tính dịch tễ học mô tả (descriptive epidemiology), không phải là số liệu điều tra tổng thể hoặc xác định dịch tễ học phân bố của nấm đơn bào gây bệnh ở Hải Dương. Đây cũng chỉ là dữ liệu thu thập từ bệnh phẩm nuôi cấy của bệnh nhân nhập viện, không phải tầm soát trong cộng đồng. Mặc dù vậy, việc phát hiện và xác định đến 13 loài nấm *Candida* spp. trong số 36 mẫu ở nghiên cứu này cũng cung cấp được những dữ liệu khá chính xác về loài, liên quan lâm sàng của nhiễm nấm đơn bào tại bệnh nhân nữ nhập viện ở Hải Dương.

KẾT LUẬN

Từ các mẫu nấm nuôi cấy từ bệnh phẩm, trên tổng số 43 mẫu nghiên cứu, 36 chuỗi nucleotide vùng giao gen ITS đã được thu nhận thành công bằng PCR và giải trình tự với cặp môi ITS1F/ITS4R theo qui trình quốc tế. Truy cập Ngân hàng gen và

phân tích phá hệ hoặc đối chiếu các chủng tham chiếu cho thấy, các mẫu Việt Nam bao gồm các nhóm loài thuộc chi *Candida*, *Pichia*, *Kodamaea*, *Fereydounia*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora* và *Penicillium*. Nhóm các chủng thuộc chi *Candida* bao gồm 13 mẫu thuộc loài *Candida albicans*; 08 mẫu thuộc loài *C. glabrata*; 02 mẫu thuộc loài *C. tropicalis*; 03 mẫu thuộc loài *C. metapsilosis*; 01 mẫu thuộc loài *Candida* sp.; và 02 mẫu thuộc loài *C. etchellsii*. Nhóm các chủng thuộc chi *Pichia* bao gồm 01 mẫu thuộc loài *P. kudriavzevii*; 01 mẫu thuộc loài *P. norvegensis*. Ngoài ra, trong số mẫu nghiên cứu còn phát hiện được sự có mặt một số loài nấm đơn bào ít gặp và đặc biệt khác thuộc loài *Kodamaea ohmeri*; *Fereydounia khargensis*; *Debaryomyces* sp. (có thể là loài *Debaryomyces subglobosus*); *Hanseniaspora* sp. (có thể là loài *Hanseniaspora opuntiae*); và *Penicillium citrinum*.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện dưới sự tài trợ kinh phí của đề tài cấp Sở Khoa học Công nghệ tỉnh Hải Dương. Phòng Miễn dịch, Viện Công nghệ sinh học (Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam) đã giúp đỡ hoàn thành các thao tác sinh học phân tử phòng thí nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Begerow D, Nilsson H, Unterseher M, Maier W (2010) Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Appl Microbiol Biotechnol* 87(1): 99–108.

Blanco JL, Garcia ME (2008) Immune responses to fungal infections. *Vet Immunol Immunopathol* 125: 47e70.

Guégan S, Lanternier F, Rouzaud C, Dupin N, Lortholary O (2016) Fungal skin and soft tissue infections. *Curr Opin Infect Dis* 29(2): 124–130.

Irinyi L, Lackner M, de Hoog GS, Meyer W (2016) DNA barcoding of fungi causing infections in humans and animals. *Fungal Biol* 120(2): 125–136. Review.

Kalaiarasan K, Singh R, Chaturvedula L (2017) Fungal Profile of Vulvovaginal Candidiasis in a Tertiary Care Hospital. *J Clin Diagn Res*. 11(3): DC06–DC09.

Kimura M, Araoka H, Yamamoto H, Asano-Mori Y, Nakamura S, Yamagoe S, Ohno H, Miyazaki Y, Abe M, Yuasa M, Kaji D, Kageyama K, Nishida A, Ishiwata K, Takagi S, Yamamoto G, Uchida N, Izutsu K, Wake A, Taniguchi S, Yoneyama A. Clinical and Microbiological Characteristics of Breakthrough Candidemia in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients in a Japanese Hospital. *Antimicrob Agents Chemother*. 61(4). pii: e01791–16.

Konietzny U, Greiner R (2003) The application of PCR in the detection of mycotoxigenic fungi in foods. *Brazilian J Microbiol* 34: 283–300.

Kwon-Chung KJ (2012) Taxonomy of fungi causing mucormycosis and entomophthoromycosis (zygomycosis) and nomenclature of the disease: molecular mycologic perspectives. *Clin Infect Dis* 54 Suppl 1: S8–S15.

Massire C, Buelow DR, Zhang SX, Lovari R, Matthews HE, Toleno DM, Ranken RR, Hall TA, Metzgar D, Sampath R, Blyn LB, Ecker DJ, Gu Z, Walsh TJ, Hayden RT (2013) PCR followed by electrospray ionization mass spectrometry for broad-range identification of fungal pathogens. *J Clin Microbiol*. 51(3): 959–966.

Miceli MH, Díaz JA, Lee SA (2011) Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis* 11(2): 142–151.

Moran GP, Coleman DC, Sullivan DJ (2011) Comparative genomics and the evolution of pathogenicity in human pathogenic fungi. *Eukaryot Cell* 10(1): 34–42.

Perfect JR, Casadevall A (2006) Fungal molecular pathogenesis: what can it do and why do we need it? In: Heitman J, Filler SG, Edwards Jr JE, Mitchell AP, editors. *Molecular principles of fungal pathogenesis*. Washington DC: ASM Press; pp. 3e11.

Pfaller MA, Pappas PG, Wingard JR (2006) Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. *Clin Infect Dis* 43(Suppl. 1): S3e14.

Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, FitzPatrick ES, Fanning S, Hartigan PJ (2011) *Veterinary Microbiology and Microbial Disease. 2nd Edition*. Blackwell Science.

Ravikumar S, Win MS, Chai LY (2015) Optimizing Outcomes in Immunocompromised Hosts: Understanding the Role of Immunotherapy in Invasive Fungal Diseases. *Front Microbiol* 6: 1322.

Richardson M, Rautemaa R (2009) How the host fights against *Candida* infections. *Front Biosci* (Schol Ed) 1: 246–57. Review.

Seyedmousavi S, Guillot J, Toloee A, Verweij PE, de Hoog GS (2015) Neglected fungal zoonoses: hidden threats to man and animals. *Clin Microbiol Infect* 21: 416–425.

Sobel JD (2010) Changing trends in the epidemiology of *Candida* blood stream infections: a matter for concern? *Crit Care Med*. 38(3): 990–992.

Suanthie Y, Cousin MA, Woloshuk CP (2009) Multiplex real-time PCR for detection and quantification of mycotoxigenic *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *J Stored Prod Res* 45: 139–145.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725–2729.

Tsai P W, Chen YT, Hsu PC, Lan CY (2012) Study of *Candida albicans* and its interactions with the host: A mini review. *BioMedicine* 3(1): 51–64.

Wei YP, Feng J, Luo ZC (2010) Isolation and genotyping of vaginal non-albicans *Candida* spp. in women from two different ethnic groups in Lanzhou, China. *Int J Gynaecol Obstet* 110(3): 227–230.

Xu J (2016) Fungal DNA barcoding. *Genome*. 59(11): 913–932.

Yew SM, Chan CL, Lee KW, Na SL, Tan R, Hoh CC, Yee WY, Ngeow YF, Ng KP (2014) A five-year survey of dematiaceous fungi in a tropical hospital reveals potential opportunistic species. *PLoS ONE* 9(8): E104352.

IDENTIFICATION OF PATHOGENIC FUNGI IN HOSPITALIZED FEMALE PATIENTS IN HAI DUONG BY COMPARATIVE AND PHYLOGENETIC ANALYSES BASED ON THEIR SEQUENCES

Nguyen Xuan Huy¹, Tran Van Thanh², Le Thanh Hoa³

¹*Hai Duong Obstetrics and Gynecology Hospital*

²*National Acupuncture Hospital*

³*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

⁴*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

SUMMARY

Using “DNA-barcoding” method, 36 nucleotide sequences of ITS region (internal transcribed spacer) from 43 samples of cultured fungi collected from hospitalized female patients in Hai Duong provinces have been obtained, analyzed, and compared with the global reference strains. ITS sequences of different lengths (depending on the species) collected by PCR and sequencing (primers ITS1F / ITS4R), were used as entry data to access the Genbank; and identified based on comparative sequence and phylogenetic analyses. Results showed that, of 36 samples successfully identified for species, 29 were identified to the genus *Candida*, of which there are 13 *Candida albicans*, 2 *C. tropicalis*, 3 *C. metapsilosis*, 8 *C. glabrata*, 2 *C. etchellsii* and one as a *Candida* sp. In addition, the remaining 7 samples included 2 samples of the genus *Pichia*, ie. *P. kudriavzevii* and *P. norvegensis*; and others of rare species: i) *Kodamaea ohmeri*; ii) *Fereydounia khargensis*; iii) *Debaryomyces* sp (probably, *Debaryomyces subglobosus*); iv) *Hanseniaspora* sp (probably, *Hanseniaspora opuntiae*); and v) *Penicillium citrinum*, with high identity (99-100%). Phylogenetic tree of the Vietnamese and global *Candida* species/strains divided into seven distinct groups, including *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis*, *Candida* sp., *C. glabrata* and *C. etchellsii* groups. Phylogeny of *Pichia* spp. also showed placement of *P. kudriavzevii* and *P. norvegensis* of Vietnam in the right reference species clusters, respectively. Within a narrow geographical area as Hai Duong Province, the taxonomic identification revealing 06 different *Candida* and other special 7 species indicated that the situation of *Candida* and other fungal infections is quite complex and cross-contaminated. Moreover, *C. albicans* is still a dangerous, widespread and highly pathogenic disease-causing clinical fungus in the women’s community in Hai Duong Province in particular, and in Vietnam in general.

Keywords: *Candida*, Hai Duong, ITS, phylogeny, species identification, unicellular fungi