

2. Đỗ Trung Phần (2008): Bệnh lý tế bào nguồn tạo máu, chẩn đoán, phân loại và điều trị - *NXB YH Chương 2 tr 45-63*
3. Braga E.L.A, Patricia Moura, Luzia MO Pinto, Sonia RN Ignacio, Maria Jose C Oliveria, Marly T Cordeiro, Claire F Kubelka-(2001): Detection of Circulant Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , Soluble Tumor Necrosis Factor p75 and Interferon- $\gamma$  in Brazilian Patients with Dengue Fever and Dengue hemorrhagic Fever; *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol 96(2), pp 229-232*
4. Bethell DB, Flobbe K, Cao XT, Day NP, Pham TP, Buurman WA, Cardoso MJ, White NJ, Kwiatkowski D (1998): Pathophysiologic and prognostic role of cytokines in dengue hemorrhagic fever; *J Infect Dis. 177(3):778-82*
5. Chernoff AE, Granowitz EV, Shapiro L, Vannier E, Lonnemann G, Angel JB, Kennedy JS, Rabson AR, Wolff SM, Dinarello CA (1995): A randomized, controlled trial of IL-10 in humans. Inhibition of inflammatory cytokine production and immune responses; *Immunol 154(10):5492-9*
6. Christine A., Jean S.Marshall, Hashem Alshurafa. and Robert Anderson (2000): Release of vasoactive Cytokines by Antibody-Enhanced Dengue Virus Infection of a Human Mast Cell/ Basophiline; *Journal Of Virology,, p7146-71500022-538X/00/S04.00+0*

## ỨNG DỤNG KỸ THUẬT RFLP-PCR PHÁT HIỆN NẤM *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* GÂY BỆNH Ở NGƯỜI

Đỗ Ngọc Ánh<sup>1</sup>, Mai Thị Minh Ngọc<sup>2</sup>, Trần Việt Tiên<sup>1</sup>,  
Nguyễn Duy Bắc<sup>1</sup>, Nguyễn Khắc Lực<sup>1</sup>

### TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện trên mẫu nấm *Cryptococcus neoformans* dương tính từ kết quả nuôi cấy dịch não tủy. Nấm được pha thành các dịch treo có nồng độ khác nhau, tách DNA và thực hiện phản ứng PCR với các điều kiện như nhau. Sản phẩm PCR sau được cắt giới hạn bằng enzyme *Msp I*. Kết quả đã xây dựng quy trình phát hiện nấm *Cryptococcus neoformans* bằng kỹ thuật RFLP-PCR với cặp mồi ITS1, ITS4 và enzyme *Msp I* với các điều kiện cho phản ứng PCR như sau: nồng độ  $Mg^{2+}$  1.5mM, dNTPs 150 $\mu$ M, nồng độ mồi 0.2-0.3pmol/ $\mu$ l và nhiệt độ gắn mồi là 55°C. Kỹ thuật RFLP-PCR có khả năng phát hiện chính xác nấm *Cryptococcus neoformans* ở ngưỡng  $\geq 10^2$  CFU/ml.

**Từ khóa:** Phát hiện, *Cryptococcus neoformans*, RFLP-PCR

### SUMMARY

#### USING RFLP-PCR TO DETECT *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*

*Cryptococcus neoformans* sample was collected from cerebrospinal fluid to extract DNA and perform PCR in the same condition. PCR products was subjected to separate restriction digestions with *Msp I* enzyme for identification. PCR and restrictive products was compared by 100bp marker. The results showed that RFLP-PCR method with ITS1, ITS4 primers and *Msp I* enzyme allows simple, rapid and reliable to identify *C. neoformans* with 1.5mM  $Mg^{2+}$ , 150 $\mu$ M of

each deoxyribonucleotide, 0.2-0.3pmol/ $\mu$ l of each primer and annealing temperature 55°C. The limited concentration of the detection of *C. neoformans* was less than 100 yeast cells per ml.

**Keyword:** detection, *Cryptococcus neoformans*, RFLP-PCR

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

*Cryptococcus neoformans* là một loài nấm men gây bệnh cho người, bệnh gặp rất phổ biến ở những người có cơ thể suy bị suy giảm miễn dịch, người nhiễm HIV/AIDS. Bệnh do nấm *C. neoformans* thường gặp ở não, màng não do nấm có đặc tính ưa tổ chức thần kinh. Tuy nhiên, nấm cũng có thể gây bệnh ở các cơ quan tổ chức khác như máu, phổi, da... [1], [2], [3].

Hiện nay, các kỹ thuật truyền thống như quan sát trực tiếp bệnh phẩm được nhuộm mực tàu, nuôi cấy . thường được dùng để chẩn đoán bệnh do nấm *C. neoformans*. Quan sát trực tiếp có ưu điểm thời gian tiến hành ngắn nhưng độ nhạy thấp, đòi hỏi người làm kỹ thuật có chuyên môn vững và khó xác định được nấm khi bệnh phẩm là máu, mô. Nuôi cấy trên môi trường thạch Sabouraud tuy đơn giản nhưng phải mất vài ngày mới có thể chẩn đoán 1 mẫu dương tính [4], [5], [6]. Kỹ thuật miễn dịch ELISA phát hiện kháng

<sup>1</sup> Học viện Quân y, <sup>2</sup> Viện Đại học mở Hà Nội

Phân biệt khoa học: GS.TS. Hoàng Văn Lương

nguyên vò của nấm *C. neoformans* cũng được nhắc tới nhưng chưa phổ biến ở Việt Nam.

PCR là công cụ được phát triển trong vài thập niên trở lại đây. Với ưu điểm độ nhạy, độ đặc hiệu cao PCR đang tỏ ra là thể mạnh trong chẩn đoán các bệnh do căn nguyên vi sinh vật, trong đó có vi nấm. Ở Việt Nam, vấn đề này còn chưa được quan tâm nhiều. Bên cạnh đó, để có thể nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử, trong đó có kỹ thuật PCR vào chẩn đoán, việc nghiên cứu tìm ra các điều kiện tối ưu cho phản ứng PCR là rất cần thiết. Vì vậy, nhằm phát triển kỹ thuật PCR trong chẩn đoán nấm gây bệnh chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục tiêu: *ứng dụng kỹ thuật RFLP-PCR trong phát hiện nấm C. neoformans gây bệnh ở người.*

## II. ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

**2.1. Đối tượng nghiên cứu:** Mẫu nấm men *C. neoformans* được phân lập từ dịch não tủy của người mắc bệnh được chẩn đoán xác định bằng nuôi cấy và quan sát hình thái trên bêu bàn mực tàu.

### 2.2. Vật liệu nghiên cứu

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

- *Sinh phẩm hóa chất:* Môi trường Sabouraud, dung dịch NaCl 0.9%, dung dịch mực tàu, bộ kit tách ADN tổng số (QIAGEN, Mỹ), gel agarose, dung dịch TBE 0.5%, dung dịch enzyme giới hạn *MspI* (Fermentas), các hóa chất cần thiết khác.

- *Cặp mồi cho phản ứng PCR:* Cặp mồi ITS1 (forward, 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') và ITS4 (reverse, 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') đã được chọn (theo *SH Mirhendi và cs, 2001*)

### 2.3. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.3.1. Phân lập mẫu nấm sử dụng trong nghiên cứu

Nấm *C. neoformans* được phân lập từ dịch não tủy của người nhiễm HIV có biểu hiện lâm sàng bằng cách cấy trên môi trường thạch Sabouraud. Khuẩn lạc sau khi mọc được chẩn đoán là *C.*

*neoformans* bằng cách nhuộm mực tàu và quan sát hình thái dưới kính hiển vi ở vật kính 40X.

#### 2.3.2. Tách DNA và nhân đoạn gen đặc hiệu

Mẫu nấm *C. neoformans* dương tính được tách DNA theo qui trình của hãng QIAGEN (Mỹ). Sau đó, DNA được dùng làm khuôn cho phản ứng PCR. Thành phần phản ứng PCR gồm: Master mix, DNA tổng số, mồi và nước cất khử ion vừa đủ 25 $\mu$ l. Thời gian chạy phản ứng PCR như sau: 1 chu kỳ 95°C trong 5 phút; 35 chu kỳ mỗi chu kỳ gồm 95°C trong 30 giây, 55°C trong 45 giây, 72°C trong 1 phút; 1 chu kỳ 72°C trong 7 phút. Sản phẩm phản ứng PCR được bảo quản ở 4°C.

#### 2.3.3. Phân tích sản phẩm PCR bằng enzyme giới hạn *MspI*

Đoạn gen thu được từ phản ứng PCR với cặp mồi ITS1 và ITS4 được phân tích bằng ù cùng với enzyme giới hạn *MspI* trong thời gian 90 phút ở nhiệt độ 37°C. Thành phần của hỗn dịch đem ù gồm: 5 $\mu$ l sản phẩm PCR, 9 $\mu$ l nước khử ion, 1 $\mu$ l đệm Tango™, 1 $\mu$ l *MspI*.

#### 2.3.4. Kiểm tra sản phẩm PCR và sản phẩm cắt giới hạn

Sản phẩm PCR và sản phẩm cắt giới hạn được điện di trên thạch Agarose 1,2% và 2% trong môi trường đệm TBE với thời gian 45 phút ở điện thế 100V.

#### 2.3.5. Kiểm tra ngưỡng phát hiện

Pha nấm thành các dịch treo có nồng độ từ 10<sup>2</sup> đến 10<sup>7</sup> CFU/ml. Dem dịch treo tách ADN theo cùng 1 phương pháp rồi chạy PCR trong những điều kiện như nhau. ADN cũng được điều chỉnh thành các nồng độ 1pg/ $\mu$ l, 10pg/ $\mu$ l, 100pg/ $\mu$ l và 1000pg/ $\mu$ l để kiểm tra ngưỡng phát hiện.

#### 2.3.6. Kiểm tra tính đặc hiệu

Phản ứng PCR với cặp mồi ITS1 và ITS4 được thực hiện trên ADN của các vi khuẩn *S. aureus*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *E.coli*, *P. aeruginosa*, *M. tuberculosis*, ADN của virus viêm gan B và của người để kiểm tra tính đặc hiệu.

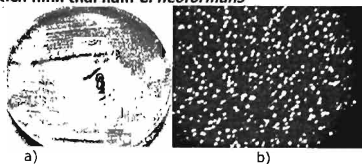
#### 2.4. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

**2.4.1. Địa điểm nghiên cứu:** Labo Trung tâm nghiên cứu Y Dược học Quân sự và labo nấm Bộ môn Ký sinh trùng - Học viện Quân y.

**2.4.2. Thời gian nghiên cứu:** từ 7/2011 - 9/2012.

### III. KẾT QUẢ

#### 3.1. Kết quả phân tích hình thái nấm *C. neoformans*



**Hình 1.** Hình ảnh đại thể và vi thể của mẫu nấm

a) Khuẩn lạc của nấm, b) Tế bào nấm ở vật kính 40X

Khuẩn lạc hình bầu dục, màu nâu, nhão và tế bào nấm trong dung dịch mực tàu có dạng men và có bao ngoài dày.

#### 3.2. Kết quả tối ưu hóa quy trình phản ứng PCR

Phản ứng PCR cần có nhiều thành phần, các thành phần đó cần được tính toán với một lượng cần thiết để phản ứng PCR cho kết quả ổn định, tốt nhất.

##### \* Kết quả tối ưu nồng độ $Mg^{2+}$

Tính toán lượng  $Mg^{2+}$  tương ứng là 1.0 mM, 1.5 mM, 2.0 mM, 2.5 mM, 3.0 mM, 3.5 mM cho mỗi phản ứng PCR.



**Hình 2.** Kết quả PCR theo thang nồng độ  $Mg^{2+}$

(1:  $Mg^{2+}$  1.0 mM; 2:  $Mg^{2+}$  1.5 mM; 3:  $Mg^{2+}$  2mM; 4:  $Mg^{2+}$  2.5 mM; 5:  $Mg^{2+}$  3.0mM; 6:  $Mg^{2+}$  3.5mM; M: Marker 100bp; (-): Chứng âm

Hình 2 cho thấy phản ứng PCR dương tính rõ khi nồng độ  $Mg^{2+}$  từ 1.5 mM.

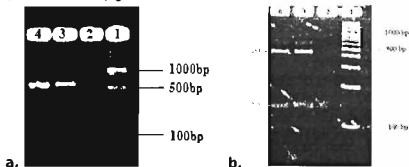
##### \* Kết quả tối ưu nồng độ dNTPs

Phản ứng PCR được thực hiện với nồng độ dNTPs từ 100  $\mu$ M đến 250  $\mu$ M. Kết quả: phản ứng PCR dương tính rõ ở nồng độ dNTPs 150 – 200  $\mu$ M.

##### \* Kết quả tối ưu nồng độ môi

PCR được thực hiện tại các nồng độ môi khác nhau từ 1 đến 25pmol. Kết quả cho thấy phản ứng dương tính khi nồng độ môi trong hỗn dịch phản ứng PCR  $\geq 0.2$  pmol/ $\mu$ l (5pmol mỗi môi trong 25 $\mu$ l hỗn hợp PCR). Tương đương cần cho 0.5 $\mu$ l dung dịch môi nồng độ 10pmol/ $\mu$ l vừa đủ 25  $\mu$ l hỗn hợp PCR.

\* **Kết quả tối ưu nhiệt độ gắn môi:** Hình 3 cho thấy kết quả thực hiện phản ứng nhân gene PCR dương tính rõ, nét ở nhiệt độ gắn môi 55-56°C.



**Hình 3.** Kết quả phản ứng PCR với cặp môi ITS1 và ITS2

a) Kết quả phản ứng PCR với các nhiệt độ gắn mỗi (1: Marker 100, 2: Chứng âm, 3: Nhiệt độ gắn mỗi 55°C, 4: Nhiệt độ gắn mỗi 56°C; b) Kết quả cắt giới hạn bằng enzyme *MspI*

**3.3. Kết quả cắt giới hạn bằng enzyme *MspI***

Hình 3b cho thấy, enzyme giới hạn *MspI* cắt sản phẩm PCR thành 02 mảnh, 1 mảnh có kích thước khoảng 130bp, 1 mảnh có kích thước khoảng 430bp.

**3.4. Kết quả xác định loài dựa vào phân tích trình tự gen và phả hệ**

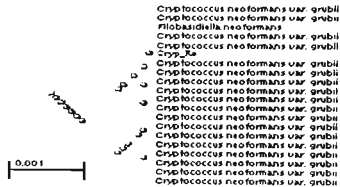
\* **Kết quả so sánh trình tự trên ngân hàng gen**

**Bảng 1.** So sánh trình tự gen thu được so với các trình tự trên ngân hàng gen

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<a href="#">F603455.1</a>	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubei</i> strain AFUP1_CBS833c	321	883	100%	0.0	100%	
<a href="#">F603455.1</a>	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> isolate SMKUCZ1.185	321	883	100%	0.0	100%	

Bảng 1 cho thấy, trình tự gen của mẫu nấm nghiên cứu có sự tương đồng 100% với nấm *C. neoformans* var. *grubii*.

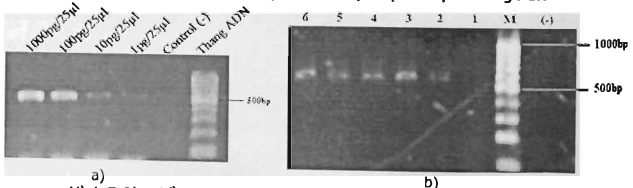
\* **Kết quả phân tích phả hệ**



**Hình 4.** Kết quả phân tích phả hệ dựa trên đoạn gen thu được

Hình 4 cho thấy mẫu nấm nghiên cứu là loài *C. neoformans* var. *grubii*.

**3.5. Kết quả xác định ngưỡng phát hiện và tính đặc hiệu của phản ứng PCR**



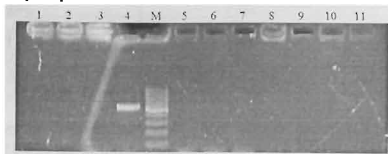
**Hình 5:** Sản phẩm PCR thu được từ các nồng độ ADN và dịch treo khác nhau

a) Kết quả PCR theo thang nồng độ ADN

b) Kết quả PCR theo thang nồng độ dịch treo nấm (1 – 6: dịch treo nấm từ 10<sup>6</sup> đến 10<sup>0</sup>CFU/ml, M: marker 100bp, (-): chứng âm)

Hình 5 cho thấy, phản ứng PCR dương tính rõ khi lượng ADN của nấm trong tổng thể tích phản ứng 25µl lớn hơn 10pg hoặc khi nồng độ dịch treo từ 10<sup>2</sup>CFU/ml.

### 3.6. Kiểm tra tính đặc hiệu



**Hình 6:** Kết quả kiểm tra tính đặc hiệu

1: DNA người, 2: DNA virus HBV, 3: Chứng âm, 4: DNA nấm, M: Marker, 5: DNA VK tụ cầu vàng (*S. aureus*), 6: DNA VK *Acinetobacter baumannii*, 7: DNA VK *K. pneumoniae*, 8: DNA VK *E.coli*, 9: DNA trực khuẩn mủ xanh (*P. aeruginosa*), 10: DNA VK lao, 11: Chứng âm

Hình 6 cho thấy, phản ứng PCR chỉ nhận được đoạn gen của vi nấm.

## IV. BÀN LUẬN

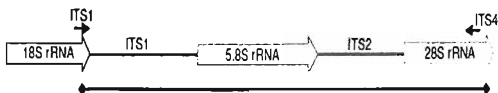
**4.1. Về đặc điểm hình thái:** *C. neoformans* là nấm men có bao ngoài dày, trên môi trường thạch Sabouraud nấm cho khuẩn lạc tròn hoặc bầu dục, màu nâu nhạt, nhão. Quan sát tiêu bản nhuộm mực tàu bằng kính hiển vi thấy các tế bào men tròn sáng trên nền đen của mực với một bao ngoài dày. Bên cạnh những tế bào men chúng ta còn thấy những tế bào men này búp (Trần Xuân Mai, 2004, Lê Bách Quang và cs, 2010). Kết quả nuôi cấy và quan sát tiêu bản mực tàu cho thấy khuẩn lạc và hình ảnh vi thể phù hợp với y văn (Hình 1).

### 4.2. Về kết quả tối ưu hóa kỹ thuật RFLP-PCR xác định nấm *C. neoformans*

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã tối ưu hóa được các điều kiện cho phản ứng nhân gene của nấm *C. neoformans* với cặp mồi ITS1, ITS4 là: nồng độ  $Mg^{2+}$  1.5mM, nồng độ dNTPs 150 $\mu$ M, nồng độ mồi 0.2-0.3pmol/ $\mu$ l và nhiệt độ gắn mồi là 55 $^{\circ}$ C (Hình 2, 3). Kết quả tối ưu về nồng độ  $Mg^{2+}$  và nồng độ mồi tương tự như của *SH Mirhendi* và cs (2001). Nhưng nồng độ của dNTPs và nhiệt độ gắn mồi thấp hơn (150 $\mu$ M so với 200 $\mu$ M và 55 $^{\circ}$ C so với 56 $^{\circ}$ C). Sự khác biệt này

có thể do thiết bị chạy PCR hoặc điều kiện khí hậu của từng nước không giống nhau. Với các điều kiện tối ưu thu được, sản phẩm PCR tiếp tục được cắt giới hạn bằng enzyme *MspI*. Kết quả cắt giới hạn cũng cho các mảnh có kích thước phù hợp với công bố của *SH Mirhendi* và cs (2001).

Theo *SH Mirhendi* và cs (2001), cặp mồi ITS1 và ITS4 có khả năng khuếch đại thành công đoạn gene có kích thước dao động từ khoảng 500-900bp chứa một phần đoạn 18S, một phần đoạn 28S, toàn bộ các đoạn giao gene ITS1, 5.8S và ITS2 (Hình 7) của hầu hết các loài vi nấm gây bệnh ở người. Riêng đối với nấm *C. neoformans*, cặp mồi ITS1 và ITS4 nhận được đoạn gene có kích thước 556bp. Nhưng cặp mồi này cũng nhận được đoạn gene của nhiều nấm khác có kích thước tương tự. Chính vì vậy, để xác định loài tác giả thực hiện thêm công đoạn cắt giới hạn sản phẩm PCR bởi enzyme *MspI* để phân biệt các nấm với nhau (dựa vào các mảnh cắt có kích thước khác nhau). Enzyme *MspI* cắt sản phẩm PCR của nấm *C. neoformans* cho 2 đoạn có kích thước 128bp và 428bp trong khi các nấm khác cho các mảnh có kích thước khác (Bảng 2).



**Hình 7:** Minh họa đoạn gen cặp mồi ITS1 và ITS4 nhận được.

**Bảng 2.** Kích thước sản phẩm PCR và độ dài các mảnh cắt giới hạn bằng enzyme *MspI* của một số loại nấm (*SH. Mirhendi* và cs, 2001).

Loài nấm	Kích thước thu được với cặp mồi ITS1-ITS4	Kích thước của các mảnh giới hạn với <i>MspI</i>
<i>C. albicans</i>	535	297, 338

<i>C. glabrata</i>	871	557, 314
<i>C. tropicalis</i>	524	340, 184
<i>C. krusei</i>	510	261, 249
<i>C. guilliermondii</i>	608	371, 155, 82
<i>C. parapsilosis</i>	520	520
<i>C. neoformans</i>	556	428, 128
<i>A. fumigatus</i>	597	4, 19, 38, 43, 57, 94, 101, 108, 115

Trong nghiên cứu này, chúng tôi thấy phản ứng PCR với cặp mồi ITS1 và ITS4 đã nhân được đoạn gene kích thước khoảng 550bp, kích thước này phù hợp với nghiên cứu của *SH Mirhendi và cs (2001)*. Bên cạnh đó, kết quả phân tích sản phẩm PCR bằng enzyme giới hạn *MspI* cũng cho 2 mảnh có kích thước phù hợp với nghiên cứu của *SH Mirhendi và cs (2001)*. Mặt khác, từ trình tự gene thu được, tiến hành so sánh trình tự và phân tích phả hệ cho thấy mẫu nấm nghiên cứu là *C. neoformans var. grubii*. Như vậy, giải trình tự đã xác minh cả phương pháp RFLP-PCR và phương pháp hình thái đều cho kết quả nấm nghiên cứu là *C. neoformans*, phù hợp với kết quả trước đó *SH Mirhendi và cs (2001)* đã công bố.

#### 4.3. Về ngưỡng phát hiện của phản ứng RFLP-PCR

Để xác định ngưỡng phát hiện của kỹ thuật, lượng ADN đã được chúng tôi tính toán để đưa vào 25µl phản ứng PCR 1pg, 10pg, 100pg và 1000pg. Mặt khác, các dịch treo nấm ở nồng độ khác nhau cũng được tách ADN và chạy phản ứng PCR trong những điều kiện như nhau sau khi được tối ưu hóa. Sản phẩm PCR sau đó được kiểm tra trên gel agarose 2% với 1 thể tích như nhau và được chụp ghi lại hình ảnh trên máy chụp gene. Phản ứng cho phép nhìn rõ band ở nồng độ 10pg trở lên hoặc khi lượng ADN thu từ dịch treo nồng độ từ  $10^2$ CFU/ml. Chúng tôi cũng nhận thấy, lượng ADN thu được từ dịch treo  $10^2$ CFU/ml tương đương với lượng ADN tối thiểu để phản ứng PCR dương tính và kết quả PCR cũng phù hợp nhau. Nói cách khác, phản ứng PCR với cặp mồi ITS1, ITS4 dương tính khi tổng lượng ADN trong 25µl  $\geq 10$ pg (tương ứng với nồng độ ADN  $\geq 0.4$ pg/µl) hoặc dịch treo nấm có nồng độ  $10^2$ CFU/ml.

Trên thực tế nấm *C. neoformans* có thể được chẩn đoán bằng các kỹ thuật khác nhau như: soi tươi nhuộm mực tàu, nuôi cấy, phát hiện kháng nguyên vò, các kỹ thuật sinh học phân tử như Nested-PCR (*Paola Rappelli và cs, 1998*; *Ralf Blalek và cs, 2002*), SemiNested-PCR (*Shahindokht Bassiri Jahromi và cs, 2006*), RFLP-

PCR (*SH Mirhendi và cs, 2001*; *Xiaobo Feng Zhirong Yao và cs, 2008*) hay Realtime PCR (*Ralf Blalek và cs, 2002*)... Đối với kỹ thuật soi tươi nhuộm mực tàu, *S. Bassiri Jahromi và cs (2006)* cho rằng đây là kỹ thuật dễ thực hiện, nhanh nhưng kém nhạy và yêu cầu người soi có kỹ năng tốt. Ngoài ra, kỹ thuật này sẽ gặp rất nhiều khó khăn khi nồng độ nấm  $< 10^4$ CFU/ml (*Jeremy N Day, 2004*) hay với bệnh phẩm là máu, mô. Nuôi cấy mặc dù làm tăng khả năng phát hiện hơn so với soi tươi nhuộm mực tàu nhưng phải mất khoảng 3 ngày (72 giờ) mới phát hiện được (*S. Bassiri Jahromi và cs, 2006*, *T. Bicanic và T. S. Harrison, 2005*). Với Nested-PCR, theo *S. Bassiri Jahromi và cs (2006)* và *Paola Rappelli và cs (1998)* ngưỡng phát hiện của kỹ thuật là  $\geq 10^2$ CFU/ml. Kỹ thuật RFLP-PCR chúng tôi áp dụng trong nghiên cứu này cũng cho độ nhạy  $\geq 10^2$ CFU/ml. Tuy nhiên, chúng tôi nhận thấy kỹ thuật RFLP-PCR có ưu điểm là nếu thực hiện một cách liên tục, thời gian chẩn đoán chỉ khoảng 12 giờ (1.5 giờ phá màng tế bào nấm bằng enzyme lyticase, 4 giờ tách chiết ADN, 2.5 giờ chạy PCR, 1 giờ cắt giới hạn bằng enzyme *MspI*, 0.5-1 giờ điện di kiểm tra), thời gian này nhanh hơn rất nhiều so với kỹ thuật nuôi cấy. Rõ ràng với thời gian này kỹ thuật sẽ đáp ứng tốt yêu cầu chẩn đoán nhanh, chính xác căn nguyên *C. neoformans* gây bệnh. Điều này giúp người bệnh được điều trị sớm, đúng thuốc làm giảm thời gian nằm viện, giảm chi phí điều trị và tránh được những tai biến, biến chứng do chẩn đoán muộn, điều trị không đúng, không kịp thời gây ra.

#### 4.4. Về tính đặc hiệu của kỹ thuật

Kết quả nghiên cứu cho thấy kỹ thuật RFLP-PCR sử dụng không nhân nhằm ADN của người, của virus viêm gan B và của 6 loại vi khuẩn gây bệnh thường gặp. Hay nói cách khác, kỹ thuật sử dụng cho phép phân biệt nhiễm nấm với 6 loại vi khuẩn nêu trên. Tuy nhiên, cần tiếp tục nghiên cứu trên ADN của các vi khuẩn khác để chứng

minh tinh đặc hiệu của kỹ thuật sử dụng trước khi đưa vào phục vụ chẩn đoán trong lâm sàng.

## V. KẾT LUẬN

- Đã xác định được các điều kiện cho kỹ thuật RFLP-PCR trong phát hiện *C. neoformans* (nồng độ  $Mg^{2+}$  1.5mM, dNTPs 150 $\mu$ M, mỗi 0.2-0.3pmol/ $\mu$ l và nhiệt độ gần mỗi là 55°C). Bằng 2 lần phân tích (lần 1 bằng PCR, lần 2 bằng enzyme *MspI*), kỹ thuật RFLP-PCR cho phép xác định chính xác nấm *C. neoformans*.

- Ngưỡng phát hiện nấm *C. neoformans* của kỹ thuật RFLP-PCR là 10pg ADN vi nấm trong 25 $\mu$ l thể tích phản ứng PCR hoặc khi nồng độ dịch treo nấm  $\geq 10^2$  CFU/ml; kỹ thuật RFLP-PCR không nhân gen DNA của người, vì rút viêm gan B và 6 loại vi khuẩn gây bệnh thường gặp.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Bách Quang và cs (2008). *Kỹ sinh trùng và côn trùng y học*. Giáo trình giảng dạy đại học – Học viện Quân y. Nhà xuất bản Quân đội nhân dân, tr: 382-386.
2. Lê Bách Quang và cs (2010). *Kỹ thuật Ký sinh trùng*. Giáo trình giảng dạy đại học – Học viện

Quân y. Nhà xuất bản Quân đội nhân dân, tr: 310-319.

3. Trần Xuân Mai và cs (2004). *Ví nấm y học*. Trường đại học Y dược Tp.HCM. Sách tham khảo, tr: 107-120.
4. Rui Kano, Yasuhito Fujino, Nobuko Takamoto, Hajime Tsujimoto, Atsuhiko Hasegawa (2001). PCR detection of the *Cryptococcus neoformans* CAP59 gene from a biopsy specimen from a case of feline cryptococcosis. *J Vet Diagn Invest* 13:439-442 (2001).
5. SH Mirhendi et al (2001). *A PCR-RFLP method to Identification of the Important Opportunistic Fungae: Candida Species, Cryptococcus neoformans, Aspergillus fumigatus and Fusarium solani*. *Iranian J. Publ. Health*, Vol. 30, Nos. 3-4, PP, 103-1-6.
6. Ralf Bialek et al (2002). Detection of *Cryptococcus neoformans* DNA in Tissue Samples by Nested and Real-Time PCR Assays. *CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY*, Mar. 2002, Vol. 9, No. 2. p. 461-469.
7. Shahindokht Bassiri Jahromi, Mansoor Abachi et al (2006). Detection of *Cryptococcus neoformans* by Semi-Nested PCR in cerebrospinal fluid. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*, Vol. 20, No. 2, 62-65, 2006.

## ĐẶC ĐIỂM SỬ DỤNG KHÁNG SINH VÀ ĐỀ KHÁNG KHÁNG SINH TẠI BỆNH VIỆN HỮU NGHỊ VIỆT ĐỨC GIAI ĐOẠN 2009-2011

Trần Thị Minh Đức\*, Trần Thị Lan Phương\*,  
Trịnh Hồng Sơn\*, Nguyễn Hoàng Anh\*\*

### TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát đặc điểm sử dụng kháng sinh và đề kháng kháng sinh tại bệnh viện Hữu nghị Việt Đức, giai đoạn 2009-2011. Dữ liệu lưu về sử dụng kháng sinh, số ngày nằm viện, vi sinh được hồi cứu tại khoa Dược, phòng Kế hoạch tổng hợp và khoa Vi sinh của bệnh viện. Số lượng kháng sinh sử dụng hàng năm của bệnh viện rất lớn (DDD<sub>100</sub> = 326,55). Năm nhóm kháng sinh sử dụng phổ biến tại bệnh viện bao gồm: cephalosporin thế hệ 3/4, phối hợp penicillin/chất ức chế beta-lactamase, dẫn chất 5-nitroimidazol, aminoglycosid và fluoroquinolon. Các vi khuẩn Gram âm gây nhiễm trùng bệnh viện: *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* đặc biệt là *Acinetobacter spp* phân lập tại bệnh viện có tỷ lệ đề

kháng cao với nhiều kháng sinh thông dụng. Kết quả thu được giúp định hướng xây dựng chương trình quản lý sử dụng kháng sinh hợp lý tại bệnh viện.

### SUMMARY

#### ANTIBIOTIC CONSUMPTION AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE AT VIETDUC HOSPITAL FROM 2009 TO 2011

This study was aimed at determining the pattern of usage of antibiotics at Viet Duc Hospital. Data were retrospectively retrieved from records at Pharmacy, General Planning and Microbiology departments during the period from 2009 to 2011. The annual total antibiotic consumption was high with defined daily dose units per 100 patient-day (DDD<sub>100</sub>) about of 326,55. The 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> cephalosporin generations,

\* Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức, \*\* Trường Đại học Dược Hà Nội  
Phân biện khoa học: PGS.TS. Nguyễn Quốc Kính