



# **XÉT NGHIỆM CHẨN ĐOÁN BỆNH NHIỄM VI NẤM**

Bs. Nguyễn Thanh Liêm

Bộ môn Ký sinh – Khoa Y – ĐHYD TP. HCM

# MỤC TIÊU

1. Trình bày được cách thu thập và bảo quản bệnh phẩm.
2. Trình bày nguyên lý của 3 kỹ thuật xét nghiệm tìm vi nấm trong bệnh phẩm
3. Mô tả 3 kỹ thuật xét nghiệm tìm vi nấm trong bệnh phẩm
4. Chọn bệnh phẩm phù hợp để chẩn đoán vi nấm.

# NỘI DUNG

1. Cách lấy bệnh phẩm
2. Cách vận chuyển bệnh phẩm
3. 3 kỹ thuật xét nghiệm tìm vi nấm trong bệnh phẩm

# I. CÁCH LẤY BỆNH PHẨM

## TRƯỚC KHI LẤY BỆNH PHẨM:

- Có thông tin về bệnh án của bệnh nhân
- Thuốc kháng nấm bệnh nhân dùng gần đây
- Bệnh vi nấm nghi ngờ mắc phải
- Yêu cầu của bác sĩ điều trị
- Chuẩn bị dụng cụ cần thiết

# I. CÁCH LẤY BỆNH PHẨM (MẪU)

- Lấy mẫu vô trùng, hoặc đã được sát trùng thích hợp vùng lấy mẫu.
- Lấy đúng mẫu: đúng vị trí và đúng bệnh phẩm thích hợp
- Lấy đủ mẫu để soi, cấy,...



# I. CÁCH LẤY BỆNH PHẨM

- Lang ben: dùng dao phẫu thuật cạo nhẹ nhàng vùng da nhiễm nấm, hoặc dùng băng keo trong dán lên
- Trứng tóc: cắt những sợi tóc có hạt trứng tóc
- Viêm giác mạc do vi nấm: cạo lấy mảnh vết loét
- Viêm ống tai ngoài: lấy phần ráy tai, hoặc cạo phần vách ống tai

# I. CÁCH LẤY BỆNH PHẨM

- Nấm da: cạo da rìa sang thương, nơi da gồ cao
- Nấm tóc: nhổ sợi tóc gãy, mất bóng, cong, hoặc những sợi phát huỳnh quang dưới đèn Wood.
- Nấm móng: cạo phần lõi xù dưới móng
- Nấm *Sporothrix schenckii*: hút mủ từ u cục mềm chưa vỡ, hoặc dùng tăm bông phết ở đáy vết loét.

# I. CÁCH LẤY BỆNH PHẨM

- Bước nắm: lấy những hạt nhỏ từ các lỗ dò
- Nắm đường hô hấp: lấy đàm buổi sáng sớm sau khi vệ sinh răng miệng và xúc miệng bằng dung dịch sát trùng. Hoặc lấy mẫu bằng cách hút rửa dịch phế quản khi nội soi (BAL)
- Nắm hệ thần kinh trung ương: chọc lấy dịch não tủy
- Nhiễm nấm huyết: lấy máu tĩnh mạch, tủy xương



# I. CÁCH LẤY BỆNH PHẨM

- Phết họng: dùng tăm bông phết làm bong các mảng trắng trên niêm mạc
- Phết dịch âm đạo: dùng tăm bông phết dịch ở túi cùng Douglas, hoặc lấy những mảng trắng bám ở thành âm đạo



- Nước tiểu: lấy nước tiểu giữa dòng

# I. CÁCH LẤY BỆNH PHẨM

- Sinh thiết mô: chia 2 mẫu, 1 mẫu ngâm formol để làm giải phẫu bệnh, 1 mẫu ngâm nước muối sinh lý để tìm nấm
- Phết ấn mô: các trường hợp biểu hiện ngoài da của các vi nấm nội tạng như: *Talaromyces marneffe*, *Histoplasma capsulatum*,...

## II. VẬN CHUYỂN BỆNH PHẨM

- Càng sớm càng tốt
- Đặt trong thùng chứa thích hợp
- Kèm theo bệnh án
- Bảo quản ở 4°C được một thời gian

# III. 3 KỸ THUẬT XÉT NGHIỆM TÌM VI NẤM TRONG BỆNH PHẨM

- Soi trực tiếp
- Cấy
- Gián tiếp: qua các phản ứng sinh hóa, miễn dịch, PCR

# SOI TRỰC TIẾP

- Phát hiện vi nấm khi soi trực tiếp bệnh phẩm dưới kính hiển vi quang học, độ phóng đại trung bình khoảng 400 lần.
- Bệnh phẩm có thể được xử lý bằng nước muối sinh lý, KOH, hoặc phẩm nhuộm trước khi soi.
- Xác định vi nấm dựa vào những đặc điểm hình thể.

# SOI TRỰC TIẾP

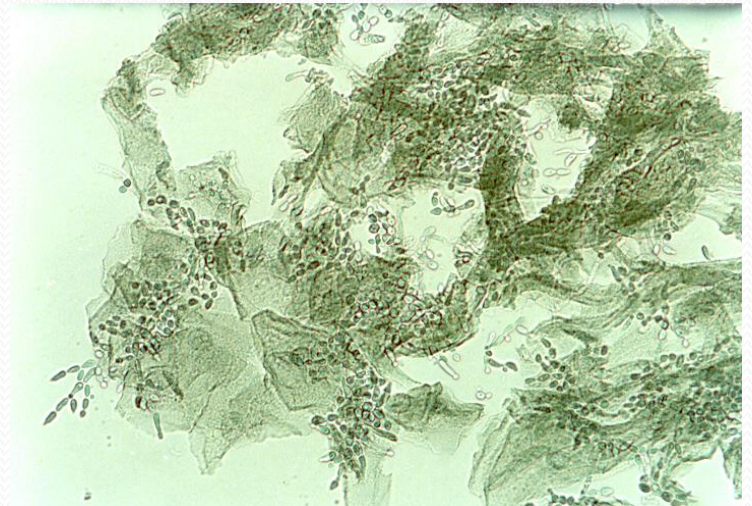
- Nhanh
- Rẻ tiền
- Cần ít trang thiết bị, hóa chất
- Định hướng chọn phương cấy
- Định danh vi nấm sau khi cấy
- Lý giải kết quả cấy

# SOI TRỰC TIẾP

- Có thể gặp dương tính giả hoặc âm tính giả
- Độ nhạy thấp nên soi âm tính cũng không loại trừ được khả năng mắc bệnh. Cần phải bổ sung bằng phương pháp khác

# SOI TRỰC TIẾP VỚI NƯỚC MUỐI SINH LÝ

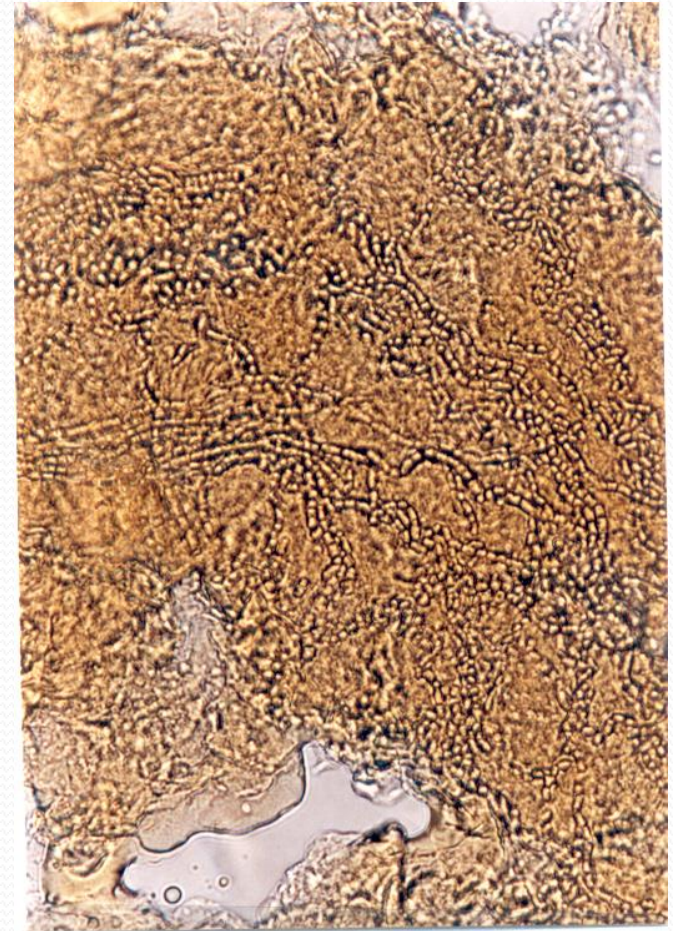
- Bệnh phẩm: huyết trắng, phết họng, đờm, phân, các loại dịch tiết khác
- Hòa loãng bệnh phẩm vào nước muối sinh lý, nhỏ lên lam kính, đẩy lamelle lên, rồi quan sát dưới kính hiển vi





# SOI TRỰC TIẾP VỚI KOH

- Dung dịch KOH 10 – 20% sẽ làm trong bệnh phẩm, giúp quan sát vi nấm dễ dàng hơn
- Bệnh phẩm rắn, dày: da, tóc, móng, mẫu mô



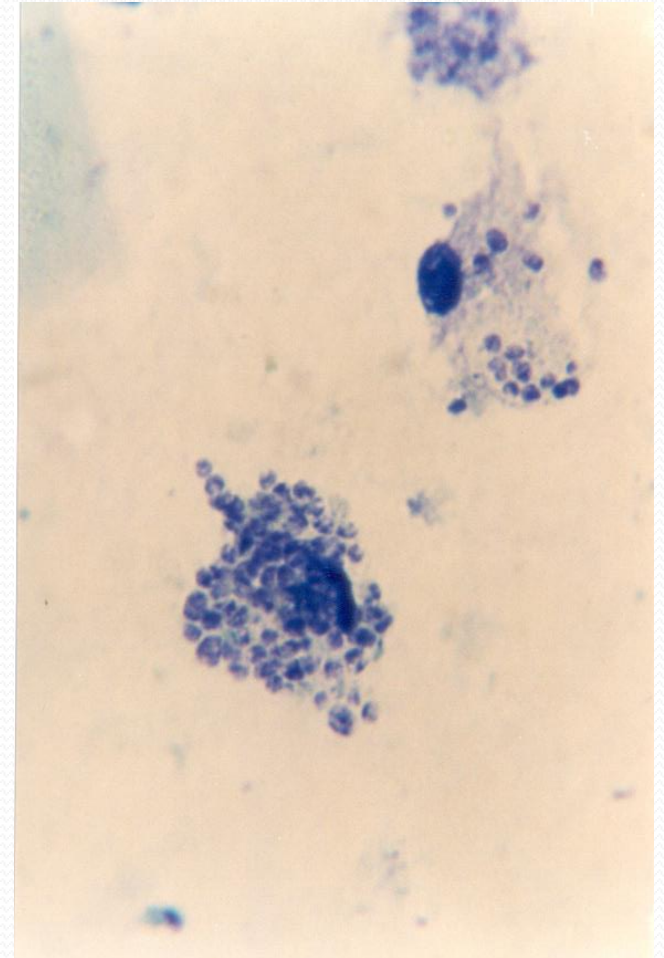
# NHUỘM MỰC TÀU

- Tìm *Cryptococcus neoformans* trong dịch não tủy, đàm, hoặc dịch khác
- Nhỏ một giọt bệnh phẩm cạnh một giọt mực tàu, dùng góc của lamelle trộn đều, rồi quan sát dưới kính hiển vi



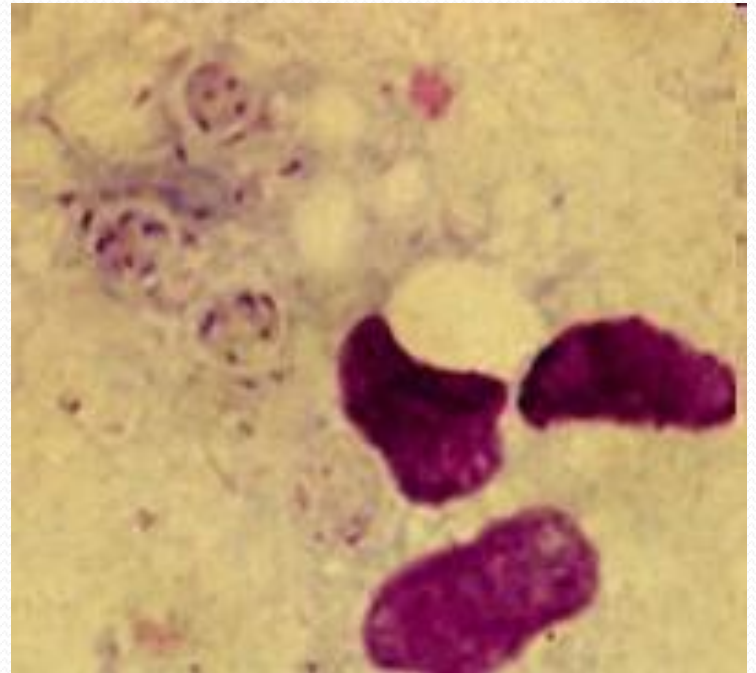
# NHUỘM GIEMSA

- Nhuộm tìm vi nấm ký sinh nội tế bào như *Talaromyces marneffe*, *Histoplasma capsulatum*. Bệnh phẩm từ phết máu, tủy xương, phết ấn mô



# NHUỘM GIEMSA

- Nhuộm thấy thể hoạt động hoặc các thể bên trong bào nang *Pneumocystis jirovecii*. Bệnh phẩm từ đàm hoặc BAL.

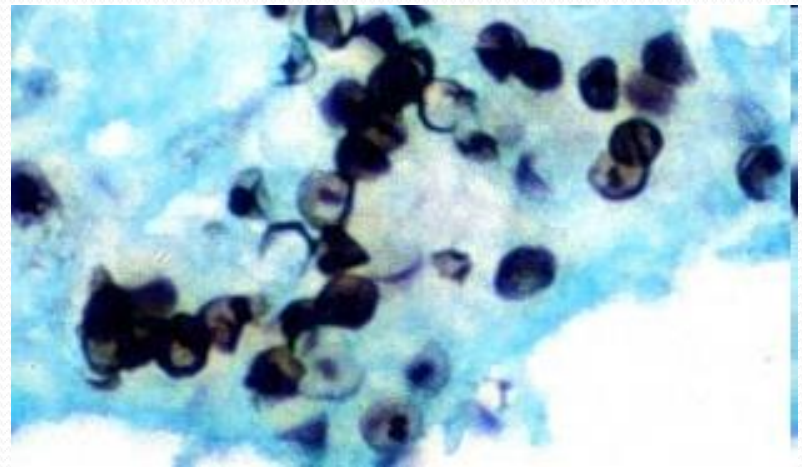


Source: CDC



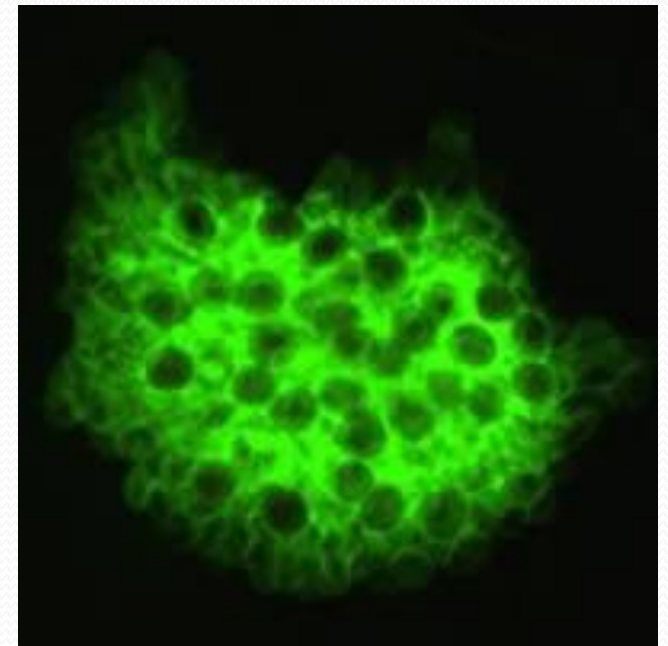
# NHUỘM GOMORI METHENAMINE SILVER (GMS)

- Thấy được thành bào nang của *Peumocystis jirovecii*.



# NHUỘM HUỲNH QUANG

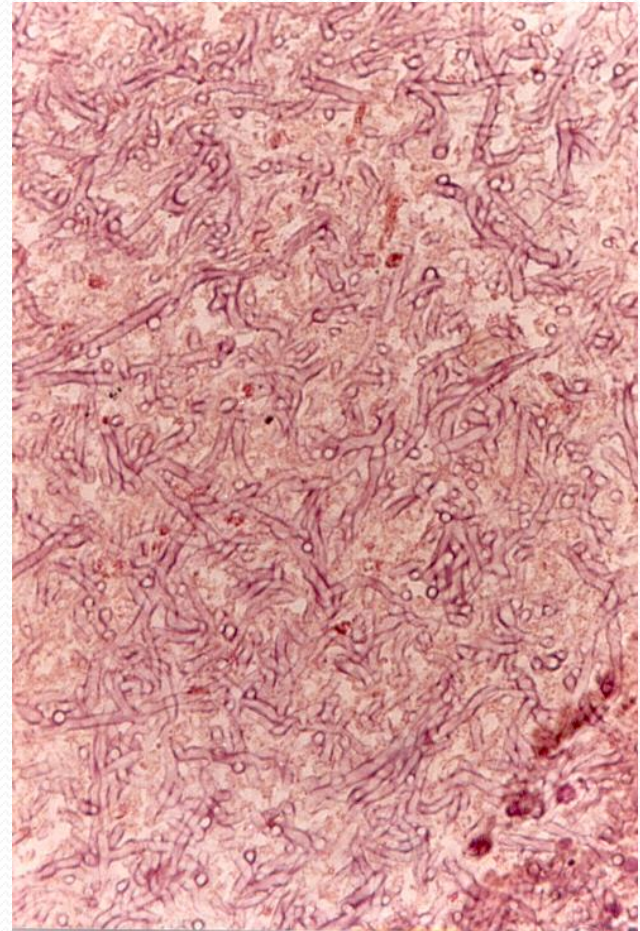
- Dùng kháng thể đơn dòng
- Thấy được thành bào nang của *Peumocystis jirovecii*.



Source: CDC

# NHUỘM H&E VÀ PAS

- Nhuộm vi nấm ký sinh trong mô.
- Nhuộm theo phương pháp mô học, giải phẫu bệnh



# CÂY NẤM

- Cây vi nấm trên các môi trường nhân tạo (BHI, Sabouraud,...), giúp vi nấm tăng sinh về số lượng, đồng thời tạo ra những bào tử có các đặc điểm riêng biệt, giúp định danh vi nấm.
- Giúp chẩn đoán nhiều loại bệnh do vi nấm, đặc biệt những vi nấm gây nhiễm nấm huyết hoặc gây bệnh ở các vị trí vô trùng khác.



# CÂY NẤM

- Phối hợp với phương pháp soi trực tiếp, PCR.
- Phát hiện nhiễm nấm ở những mẫu bệnh phẩm có mật độ vi nấm thấp.



# CÂY NẤM

- Cây càng sớm càng tốt
- Cây trên nhiều môi trường, ở cả nhiệt độ phòng (25 - 30°C) và ủ (35 - 37°C) để diễn giải kết quả tốt hơn.
- Cycloheximide ức chế phần lớn vi nấm ngoại nhiễm mọc giúp cho vi nấm gây bệnh mọc tốt hơn, tuy nhiên Cycloheximide cũng ức chế cả *Candida* và *Aspergillus*

# CÂY NẤM

- Cần bổ sung thêm kháng sinh vào môi trường để ức chế sự phát triển của vi trùng, vi trùng phát triển sẽ kìm hãm vi nấm phát triển.
- Một số vi nấm chỉ mọc được trên môi trường được bổ sung một số chất như: vitamin B1, dầu olive,...

# CÂY NẤM

- Sabouraud
- BHI
- Các môi trường cấy vi trùng cũng thường được dùng nhưng cho tốc độ mọc chậm hơn
- một số vi nấm cần môi trường chuyên biệt để định danh: môi trường Czapek để định danh *Aspergillus*, CHROMagar để định danh *Candida*



# CÂY NẤM

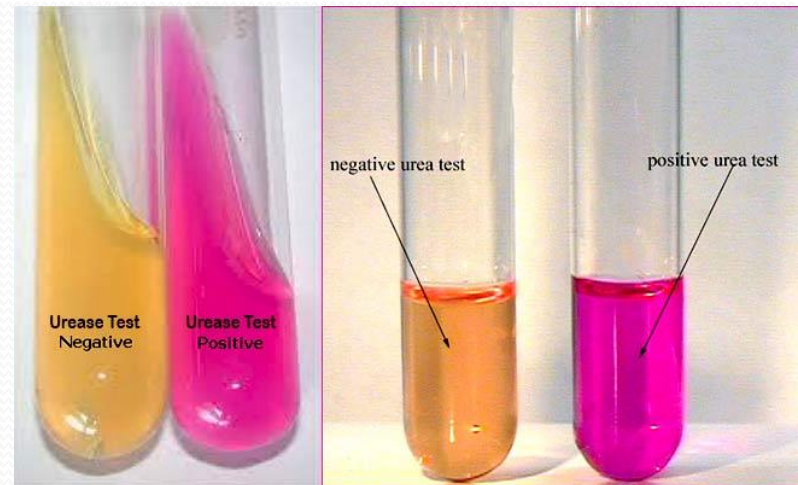
- Thời gian cấy trung bình 1 - 2 tuần. Tuy nhiên có những vi nấm mọc rất nhanh chỉ cần 2 -3 ngày, cũng có vi nấm mọc rất chậm cần tới 4 tuần như *Histoplasma capsulatum*, các vi nấm ngoài da.
- Với sự trợ giúp của các thiết bị theo dõi liên tục giúp phát hiện sớm vi nấm mọc, và những trường hợp mật độ vi nấm thấp. Hỗ trợ tốt trong trường hợp nhiễm nấm huyết.

# PHƯƠNG PHÁP GIÁN TIẾP

- Xác định vi nấm dựa vào đặc điểm sinh hóa, miễn dịch, cấu trúc gene của vi nấm.
- Phát hiện vi nấm từ bệnh phẩm, hoặc từ canh cấy bệnh phẩm.

# SINH HÓA

- Một số vi nấm, đặc biệt là vi nấm hạt men như *Candida*, *Cryptococcus* sau khi cấy phân lập được từ bệnh phẩm cần làm thêm các phản ứng sinh hóa để định danh chính xác tên vi nấm
- Đồng hóa đường, nitrat
- Lên men đường
- Urease



# MIỄN DỊCH TÌM KHÁNG THỂ

- Tìm kháng thể trong huyết thanh của một số vi nấm như: *Histoplasma capsulatum*, *Candida*, *Aspergillus*,..
- Kháng thể xuất hiện muộn sau khi nhiễm vi nấm.
- Nồng độ kháng thể thấp ở người suy giảm miễn dịch
- Kháng thể tồn tại từ lần nhiễm nấm trước
- Tìm kháng thể kháng lại thành phần mannan của vi nấm
- Phương pháp: ELISA, cố định bổ thể, ngưng kết

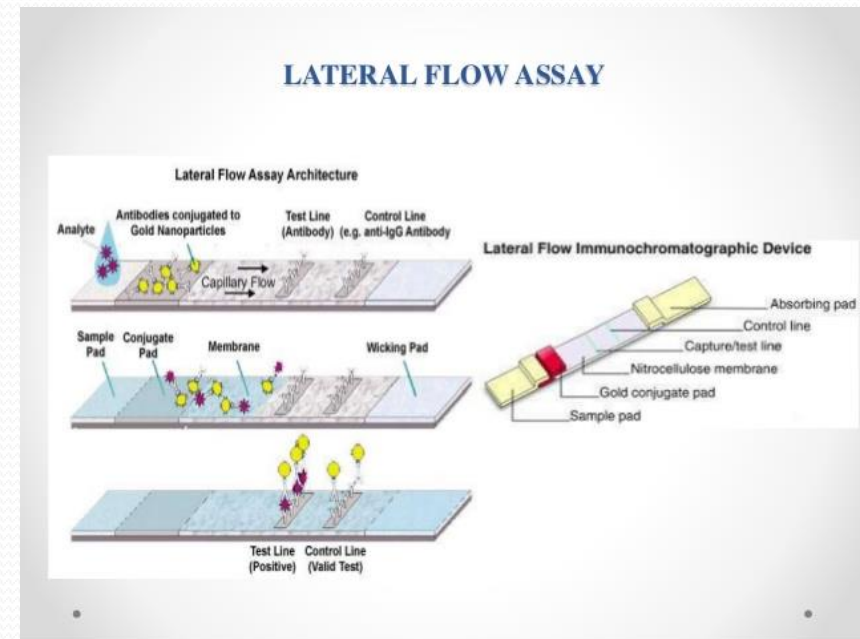


# MIỄN DỊCH TÌM KHÁNG NGUYÊN

- Cũng bằng các phương pháp như: ELISA, EIA, ngưng kết
- Tìm thành phần mannan của vi nấm
- Tìm kháng nguyên enolase của nấm *Candida*
- Tìm thành phần  $\beta$ -1-3-Glucan của *Candida*, *Aspergillus*
- Galactomannan là thành phần quan trọng ở thành tế bào nấm *Aspergillus*

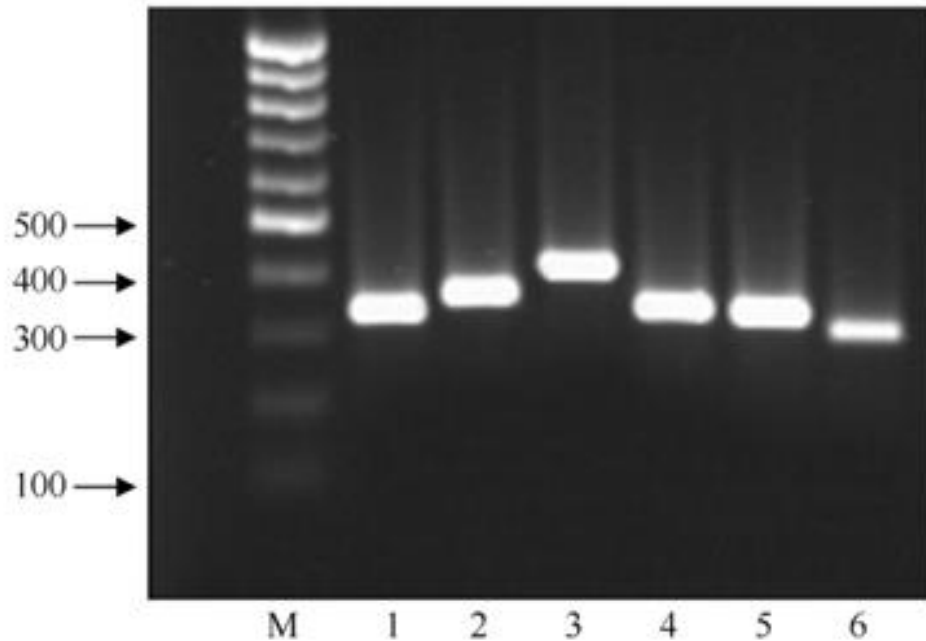
# MIỄN DỊCH TÌM KHÁNG NGUYÊN

- LFA là test nhanh xác định thành phần glucuronoxylomannan trong bao nang polysaccharide của vi nấm *Cryptococcus*



# SINH HỌC PHÂN TỬ

- Định danh chính xác loài vi nấm sau khi phân lập được.
- Giúp chẩn đoán những trường hợp mật độ vi nấm thấp, với kỹ thuật mới có thể phát hiện mật độ nấm trong máu dưới 1 CFU/ml



**Figure 2** - PCR amplification of genomic DNAs of 6 *Candida* spp. with universal fungal primers. Lane M: 100-bp molecular size marker, Lane 1: *C. tropicalis*, Lane 2: *C. albicans*, Lane 3: *C. glabrata*, Lane 4: *C. krusei*, Lane 5: *C. dubliniensis*, and Lane 6: *C. parapsilosis*.

# CÂU HỎI CLICKER (4)

Để xác định vi nấm gây bệnh nhiễm nấm huyết, người ta sẽ cấy nấm trên môi trường BHI. Tuy nhiên, có những trường hợp mật độ vi nấm thấp, hoặc vi nấm khó nuôi cấy, sẽ cho kết quả cấy máu âm tính. Để tăng khả năng phát hiện bệnh, phương pháp chẩn đoán được chọn là

- A. Cấy trên môi trường Czapek
- B. Cấy trên môi trường CHROMagar
- C. Sinh học phân tử
- D. Thử nghiệm lên men đường


ĐÁP ÁN: C

# TÓM TẮT

- Phương pháp nhuộm, soi tươi, kết hợp với cấy nấm sẽ góp phần chẩn đoán được phần lớn các trường hợp nhiễm nấm.
- Lấy mẫu đúng vị trí thì quan trọng để cho kết quả chính xác nhất.
- Vi nấm ký sinh nội tế bào cần phải nhuộm với phẩm nhuộm để phát hiện vi nấm

# TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Xuân Mai (2015), ký sinh trùng y học, NXB y học, Tp. HCM, tr. 437 – 530.
2. Elias J. Anaissie, Michael R. McGinnis, Michael A. Pfaller (2009), clinical mycology, Elsevier, Churchill Livingstone, pp. 55 – 78.
3. Patrick R. Murray, Ken S. Rosenthal, , Michael A. Pfaller (2016), Medical Microbiology, Elsevier, Philadelphia, pp. 585 – 594.

- 
- Sinh viên nhớ làm feedback cho nội dung bài giảng và phương pháp giảng dạy.
  - Email: [liem1088@yahoo.com](mailto:liem1088@yahoo.com)