

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
VIỆN SÓT RÉT – KÝ SINH TRÙNG – CÔN TRÙNG TRUNG ƯƠNG

BỘ Y TẾ

-----*-----

ĐINH XUÂN QUANG

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM DỊCH TỄ HỌC
VÀ KẾT QUẢ ĐIỀU TRỊ NHIỄM NẤM TRÊN
BỆNH NHÂN BỎNG NẶNG TẠI BỆNH VIỆN
BỎNG QUỐC GIA (2017 – 2019)**

LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

HÀ NỘI - 2020

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
VIỆN SÓT RÉT – KÝ SINH TRÙNG – CÔN TRÙNG TRUNG ƯƠNG

BỘ Y TẾ

-----*-----

ĐINH XUÂN QUANG

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM DỊCH TỄ HỌC
VÀ KẾT QUẢ ĐIỀU TRỊ NHIỄM NẤM TRÊN
BỆNH NHÂN BÔNG NẶNG TẠI BỆNH VIỆN
BÔNG QUỐC GIA (2017 – 2019)**

Chuyên ngành: Dịch tễ học
Mã số: 972 01 17

LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

Người hướng dẫn khoa học

- 1. PGS. TS. Lê Trần Anh**
- 2. PGS. TS. Lê Thị Hồng Hanh**

HÀ NỘI - 2020

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Đinh Xuân Quang, nghiên cứu sinh khóa 8, Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương, chuyên ngành Dịch tễ học

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu do chính tôi thực hiện dưới sự hướng dẫn trực tiếp của PGS.TS Lê Trần Anh, Học viện Quân y và PGS.TS Lê Thị Hồng Hanh, bệnh viện Nhi Trung ương. Trong quá trình thực hiện luận án, tôi đã đề nghị và được chủ nhiệm và các cộng sự tham gia thực hiện đề tài cấp Bộ Quốc phòng: “Nghiên cứu đặc điểm sinh học, lâm sàng, cận lâm sàng, các yếu tố liên quan và đánh giá kết quả điều trị nhiễm nấm trên bệnh nhân bỏng” cho phép sử dụng mẫu và một phần số liệu của đề tài. Các số liệu và kết quả trong luận án là hoàn toàn trung thực, chưa được công bố ở bất kỳ công trình nào khác. Các bước tiến hành của đề tài đúng như đề cương nghiên cứu, chấp hành các quy định y đức trong tiến hành nghiên cứu.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm về những cam kết này.

Hà Nội, ngày tháng năm 2020

Tác giả

Đinh Xuân Quang

LỜI CẢM ƠN

Với lòng chân thành, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS. TS. Lê Trần Anh, PGS. TS. Lê Thị Hồng Hanh đã hướng dẫn và giúp đỡ tận tình trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án.

Tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc tới PGS. TS. Trần Thanh Dương - Viện trưởng, Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương; PGS. TS. Cao Bá Lợi, trưởng phòng cùng toàn thể cán bộ của Phòng Khoa học - Đào tạo, Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương, đã tạo điều kiện thuận lợi và giúp đỡ tôi nhiệt tình trong thời gian nghiên cứu, học tập và hoàn thành luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn các đồng nghiệp ở bộ môn Ký sinh trùng, Học viện Quân y; khoa Hồi sức cấp cứu, bệnh viện Bỏng quốc gia, Học viện Quân y về sự giúp đỡ chuyên môn trong quá trình thực hiện luận án.

Cuối cùng tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới gia đình, bạn bè đã luôn khuyến khích, chia sẻ, động viên, giúp đỡ tôi trong những lúc khó khăn để hoàn thành luận án này.

Hà Nội, ngày tháng năm 2020

Tác giả

Đình Xuân Quang

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

APACHE : Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (điểm đánh giá tình trạng sức khỏe dài hạn và các thông số sinh lý trong giai đoạn cấp)

BN : bệnh nhân

CI : Colonization index (chỉ số nấm xâm thực).

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute (Viện tiêu chuẩn lâm sàng và xét nghiệm Mỹ)

CVC : Central Venous Catheters (catheter tĩnh mạch trung tâm)

FC : Fungal colonization (nấm phát triển, nhiễm nấm xâm thực)

FWI : Fungal wound infection (nhiễm nấm vết thương).

IA : Invasive aspergillosis (bệnh nấm xâm lấn do *Aspergillus*)

IC : Invasive candidiasis (bệnh nấm xâm lấn do *Candida*)

ICU : Intensive care unit (đơn vị hồi sức tích cực).

IDSA : Infectious Diseases Society of America (Hiệp hội bệnh truyền nhiễm Mỹ)

IFI : Invasive fungal infection (nhiễm nấm xâm lấn)

MIC : Minimum inhibitory concentration (nồng độ ức chế tối thiểu)

SOFA : Sequential Organ Failure Assessment (đánh giá suy đa tạng)

TPN : Total parenteral nutrition (nuôi dưỡng đường tĩnh mạch)

ƯCMD : Thuốc ức chế miễn dịch

MỤC LỤC

	Trang
Trang phụ bìa	
LỜI CAM ĐOAN	I
LỜI CẢM ƠN.....	II
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT	III
MỤC LỤC	IV
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	VII
ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
1.1. Tỷ lệ và yếu tố liên quan nhiễm nấm trên bệnh nhân bỏng	3
1.1.1. Khái niệm, phân loại.....	3
1.1.2. Tỷ lệ nhiễm nấm trên bệnh nhân bỏng	6
1.1.3. Yếu tố liên quan nhiễm nấm	8
1.2. Kỹ thuật định danh và thành phần loài nấm ở bệnh nhân bỏng	15
1.2.1. Kỹ thuật định danh loài nấm.....	15
1.2.2. Thành phần loài nấm ở bệnh nhân bỏng.....	16
1.2.3. Một số nghiên cứu về thành phần loài nấm ở Việt Nam.....	20
1.3. Độ nhạy của nấm với một số thuốc kháng nấm và kết quả điều trị nhiễm nấm trên bệnh nhân bỏng.....	22
1.3.1. Các nhóm thuốc kháng nấm.....	22
1.3.2. Độ nhạy của nấm với thuốc kháng nấm	24
1.3.3. Điều trị nhiễm nấm ở bệnh nhân bỏng	28
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	35
2.1. Đối tượng, phương pháp nghiên cứu mục tiêu 1: xác định tỷ lệ và yếu tố liên quan nhiễm nấm ở bệnh nhân bỏng nặng	35

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu	35
2.1.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu	35
2.1.3. Phương pháp nghiên cứu	36
2.2. Đối tượng, phương pháp nghiên cứu mục tiêu 2 xác định thành phần loài nấm phân lập được ở bệnh nhân bỏng nặng	42
2.2.1. Đối tượng nghiên cứu	42
2.2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu	42
2.2.3. Phương pháp nghiên cứu	42
2.3. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu mục tiêu 3 xác định độ nhạy của nấm và đánh giá kết quả điều trị nhiễm nấm ở bệnh nhân bỏng nặng	49
2.3.1. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu xác định độ nhạy của nấm	49
2.3.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu đánh giá kết quả điều trị nhiễm nấm ở bệnh nhân bỏng nặng	52
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	57
3.1. Kết quả nghiên cứu tỷ lệ và yếu tố liên quan nhiễm nấm ở bệnh nhân bỏng nặng	57
3.1.1. Thông tin về đối tượng nghiên cứu	57
3.1.2. Tỷ lệ nhiễm nấm	59
3.1.3. Các yếu tố liên quan nhiễm nấm ở bệnh nhân bỏng nặng	61
3.2. Kết quả nghiên cứu thành phần loài nấm ở bệnh nhân bỏng nặng ..	68
3.2.1. Thành phần loài nấm gây nhiễm nấm xâm thực	68
3.2.2. Thành phần loài nấm gây nhiễm nấm xâm lấn	74
3.3. Kết quả nghiên cứu xác định độ nhạy của nấm và đánh giá kết quả điều trị nhiễm nấm ở bệnh nhân bỏng nặng	85
3.3.1. Kết quả xác định độ nhạy của nấm với thuốc kháng nấm	85
3.3.2. Đánh giá kết quả điều trị nhiễm nấm ở bệnh nhân bỏng nặng ..	87

CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN	91
4.1. Tỷ lệ và yếu tố liên quan nhiễm nấm ở bệnh nhân bỏng nặng	91
4.1.1. Tỷ lệ nhiễm nấm	91
4.1.2. Các yếu tố liên quan nhiễm nấm ở bệnh nhân bỏng nặng	94
4.2. Thành phần loài nấm ở bệnh nhân bỏng nặng	100
4.2.1. Thành phần loài nấm gây nhiễm nấm xâm thực	100
4.2.2. Thành phần loài gây nhiễm nấm xâm lấn	104
4.3. Độ nhạy của nấm với thuốc kháng nấm và kết quả điều trị nhiễm nấm ở bệnh nhân bỏng nặng	108
4.3.1. Độ nhạy của nấm với thuốc kháng nấm	108
4.3.2. Đánh giá kết quả điều trị nhiễm nấm ở bệnh nhân bỏng nặng	112
KẾT LUẬN	118
KIẾN NGHỊ	120
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU ĐÃ CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN NỘI DUNG LUẬN ÁN	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Thành phần loài gây nhiễm nấm vết thương ở bệnh nhân bỏng	18
Bảng 1.2. Thành phần loài gây nhiễm nấm huyết ở bệnh nhân bỏng	20
Bảng 2.1. Thành phần phản ứng PCR	48
Bảng 2.2. Phân loại mức độ đáp ứng với thuốc kháng nấm của một số loài <i>Candida</i> hay gặp dựa trên nồng độ ức chế tối thiểu ($\mu\text{g/mL}$)	52
Bảng 3.1. Phân bố tuổi đối tượng nghiên cứu (n=400)	57
Bảng 3.2. Một số thông số lâm sàng của đối tượng nghiên cứu (n=400)	58
Bảng 3.3. Diện tích bỏng và ngày nằm điều trị trung bình của đối tượng nghiên cứu (n=400)	59
Bảng 3.4. Tỷ lệ nhiễm nấm ở đối tượng nghiên cứu	59
Bảng 3.5. Tỷ lệ nhiễm nấm theo giới	60
Bảng 3.6. Tỷ lệ nhiễm nấm theo nhóm tuổi	60
Bảng 3.7. Liên quan tình trạng bệnh lý bỏng và nhiễm nấm xâm thực ở đối tượng nghiên cứu	61
Bảng 3.8. Liên quan can thiệp điều trị và nhiễm nấm xâm thực ở đối tượng nghiên cứu	62
Bảng 3.9. Phân tích đa biến yếu tố liên quan nhiễm nấm xâm thực ở đối tượng nghiên cứu	63
Bảng 3.10. Liên quan diện tích bỏng, thời gian điều trị và nhiễm nấm xâm thực	64
Bảng 3.11. Liên quan diện tích bỏng, thời gian điều trị và nhiễm nấm xâm lấn	64
Bảng 3.12. Liên quan tình trạng bệnh lý bỏng và nhiễm nấm xâm lấn ở đối tượng nghiên cứu	65
Bảng 3.13. Liên quan can thiệp điều trị và nhiễm nấm xâm lấn ở đối tượng	

nghiên cứu	66
Bảng 3.14. Phân tích đa biến yếu tố liên quan nhiễm nấm xâm lấn ở đối tượng nghiên cứu	67
Bảng 3.15. Cơ cấu nấm men, nấm sợi ở bệnh nhân bỏng nặng	68
Bảng 3.16. Thành phần loài nấm men ở bệnh nhân nhiễm nấm	69
Bảng 3.17. Một số chuỗi nucleotide nấm men được đăng ký trên ngân hàng gen	73
Bảng 3.18. Thành phần loài nấm sợi ở bệnh nhân nhiễm nấm	74
Bảng 3.19. Cơ cấu nấm men, nấm sợi gây nhiễm nấm vết thương	74
Bảng 3.20. Thành phần loài nấm men gây nhiễm nấm vết thương	75
Bảng 3.21. Thành phần loài nấm sợi gây nhiễm nấm vết thương	77
Bảng 3.22. Một số chuỗi nucleotide nấm sợi đăng ký trên ngân hàng gen	84
Bảng 3.23. Thành phần loài gây nhiễm nấm huyết	84
Bảng 3.24. Tỷ lệ đáp ứng của <i>Candida</i> với từng loại thuốc kháng nấm	85
Bảng 3.25. Đáp ứng của <i>Candida albicans</i> với thuốc kháng nấm	86
Bảng 3.26. Đáp ứng của <i>Candida tropicalis</i> với thuốc kháng nấm	86
Bảng 3.27. Đáp ứng của <i>Candida</i> khác với thuốc kháng nấm	87
Bảng 3.28. Phác đồ điều trị kháng nấm áp dụng trên bệnh nhân	87
Bảng 3.29. Diễn biến điểm Candida score theo kết quả điều trị	88
Hình 3.13. Diễn biến chỉ số nấm xâm thực sau điều trị	88
Bảng 3.30. Thời gian sạch nấm trong mô sinh thiết (ngày, n=32)	89
Bảng 3.31. Thời gian sạch nấm trong máu bệnh nhân nhiễm nấm huyết (n = 10)	89
Bảng 3.32. Kết quả điều trị nhiễm nấm xâm lấn	90
Bảng 3.33. So sánh tỷ lệ tử vong theo phác đồ và thời gian điều trị nấm ở bệnh nhân nhiễm nấm xâm lấn	90

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 2.1. Hình ảnh vi thể của <i>Aspergillus</i>	45
Hình 2.2. Màu sắc nấm <i>Candida</i> trong môi trường Brilliance <i>Candida</i> Agar	46
Hình 2.3. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu	56
Hình 3.1. Phân bố giới đối tượng nghiên cứu (n=400)	57
Hình 3.2. Tỷ lệ nhiễm nấm xâm thực theo thời gian (n=400)	63
Hình 3.3. Tỷ lệ nhiễm nấm xâm lấn theo thời gian ở đối tượng nghiên cứu (n=400)	68
Hình 3.4. Nấm <i>Candida albicans</i> phân lập được từ bệnh nhân nghiên cứu nuôi cấy trên môi trường Brilliance <i>Candida</i> Agar.	70
Hình 3.5. Nấm men phân lập được từ bệnh nhân nghiên cứu nuôi cấy trên môi trường Brilliance <i>Candida</i> Agar	70
Hình 3.6. Hình ảnh sản phẩm điện di một số mẫu nấm phân lập được từ bệnh nhân nghiên cứu	71
Hình 3.7. So sánh chuỗi nucleotide chủng nấm phân lập từ BN_23	72
Hình 3.8. Hình ảnh nấm men trong tiêu bản mô bệnh học ở bệnh nhân 158	75
Hình 3.9. So sánh chuỗi nucleotide chủng nấm phân lập từ bệnh nhân 158	76
Hình 3.10. Hình ảnh nấm phát triển tại vết thương bỏng bệnh nhân 50	77
Hình 3.11. Nấm <i>Aspergillus fumigatus</i> trong tiêu bản mô bệnh học ở bệnh nhân nghiên cứu	78
Hình 3.12. Hình ảnh đại thể, vi thể nấm <i>Aspergillus</i> spp. phân lập được từ mô sinh thiết bệnh nhân 50	78
Hình 3.13. So sánh chuỗi nucleotide chủng nấm phân lập từ bệnh nhân 50	79

Hình 3.14. Hình ảnh nấm <i>Aspergillus oryzae</i> trong tiêu bản mô bệnh học ở bệnh nhân nghiên cứu	80
Hình 3.15. Nấm <i>Aspergillus oryzae</i> trong tiêu bản mô bệnh học ở bệnh nhân nghiên cứu	80
Hình 3.16. So sánh chuỗi nucleotide chủng nấm phân lập từ BN_43	81
Hình 3.17. Hình ảnh nấm <i>Fusarium</i> trong tiêu bản mô bệnh học ở bệnh nhân nghiên cứu	82
Hình 3.18. Hình ảnh đại thể, vi thể <i>Fusarium</i> phân lập được từ bệnh nhân nghiên cứu	82
Hình 3.19. So sánh chuỗi nucleotide chủng nấm phân lập từ BN_43	83

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bỏng là một tổn thương thường gặp, cả trong chiến tranh và thời bình. Trên bệnh nhân bỏng nặng xuất hiện nhiều rối loạn bệnh lý khác nhau, trong đó có suy giảm miễn dịch toàn thân và tại chỗ, do đó bệnh nhân bỏng có nguy cơ cao bị nhiễm trùng. Nhiễm trùng trên bệnh nhân bỏng có thể do nhiều nguyên nhân khác nhau như vi khuẩn, nấm... Cho đến nay nhiễm trùng vẫn là một trong những nguyên nhân tử vong hàng đầu ở bệnh nhân bỏng [1]. Với sự tiến bộ trong chăm sóc bệnh nhân, xuất hiện của nhiều loại kháng sinh thế hệ mới, phổ rộng đã kiểm soát khá hiệu quả căn nguyên nhiễm khuẩn trên bệnh nhân bỏng. Những tiến bộ này, tuy nhiên không làm giảm được tình trạng nhiễm nấm, đôi khi còn tạo điều kiện thuận lợi cho nấm phát triển trên một cơ địa thuận lợi là những bệnh nhân bỏng, đặc biệt là bệnh nhân bỏng nặng.

Nhiễm nấm trên bệnh nhân bỏng có nhiều mức độ khác nhau, có thể chỉ là nấm phát triển trên bề mặt tổn thương, ở các bệnh phẩm không vô khuẩn (như dịch đường tiêu hóa, hô hấp...) hay nấm xâm lấn sâu xuống vùng mô lành, nhiễm nấm huyết. Nhiễm nấm bỏng do nhiều loài nấm khác nhau. *Candida* chiếm thành phần chủ yếu, bao gồm cả *Candida albicans* và *Candida non-albicans*, ngoài ra còn một số loại nấm sợi như *Aspegillus*, *Fusarium*, *Mucor*....

Hiện nay đã xuất hiện tình trạng nấm kháng với thuốc kháng nấm. Mức độ kháng thuốc khác nhau với từng loài nấm và từng loại thuốc kháng nấm. Trong lâm sàng, lý tưởng nhất là từng chủng nấm gây bệnh ở mỗi bệnh nhân cần được xác định độ nhạy để lựa chọn thuốc tuy nhiên do nhiều khó khăn khác nhau nên vấn đề này không thực hiện được trên thực tiễn. Do đó, đa số các hướng dẫn điều trị hiện nay đều dựa vào các thông số thành phần loài và mức độ kháng thuốc kháng nấm trên các loài nấm phân lập được ở từng khu

vực, bệnh viện để lựa chọn phác đồ điều trị.

Tại Việt Nam hàng năm có hàng ngàn bệnh nhân bị bỏng, trong đó có rất nhiều bệnh nhân nặng, phải điều trị tại các đơn vị Hồi sức tích cực [2]. Đã có một số thông báo lâm sàng về bệnh nhân bỏng nhiễm nấm huyết [3], [4]. Tuy nhiên tình trạng nhiễm nấm trên bệnh nhân bỏng còn ít được chú ý nghiên cứu. Các xét nghiệm để chẩn đoán nấm không được thực hiện thường qui như chẩn đoán nhiễm khuẩn do đó các thông tin về tình hình nhiễm nấm trên bệnh nhân bỏng rất hạn chế. Điều trị nhiễm nấm ở bệnh nhân bỏng còn khó khăn do thiếu các thông tin về căn nguyên gây bệnh cũng như tình trạng đáp ứng với thuốc kháng nấm của mầm bệnh, thiếu các nghiên cứu đánh giá về hiệu quả phác đồ điều trị áp dụng trong lâm sàng.

Những thông tin về nhiễm nấm trên bệnh nhân bỏng tại Việt Nam là rất cần thiết nhằm đề ra những hướng dẫn về chăm sóc, chẩn đoán, điều trị bệnh nhân. Do đó chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài luận án “*Nghiên cứu đặc điểm dịch tễ học và kết quả điều trị nhiễm nấm trên bệnh nhân bỏng nặng tại Bệnh viện Bỏng quốc gia (2017 – 2019)*” với 3 mục tiêu:

1. *Xác định tỷ lệ và một số yếu tố liên quan nhiễm nấm ở bệnh nhân bỏng nặng (03/2017 – 12/2019).*

2. *Xác định thành phần loài nấm ở bệnh nhân bỏng nặng bằng phương pháp hình thái và sinh học phân tử.*

3. *Đánh giá độ nhạy của nấm với một số thuốc kháng nấm và kết quả điều trị nhiễm nấm ở bệnh nhân bỏng nặng.*

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tỷ lệ và yếu tố liên quan nhiễm nấm trên bệnh nhân bỏng

1.1.1. Khái niệm, phân loại

1.1.1.1. Khái niệm và đặc điểm bỏng

Bỏng là một loại tổn thương/chấn thương hoặc vết thương do những yếu tố không phải cơ học mà do yếu tố nhiệt (nóng/lạnh), hóa, bức xạ (ion hóa, không ion hóa...) gây nên [1]. Trong đó bỏng do nhiệt là chủ yếu.

Bỏng là tổn thương hay gặp. Ở Hoa Kỳ mỗi năm có khoảng 2 triệu người (khoảng 1% dân số) bị bỏng, trong đó có 70.000 – 100.000 phải vào viện điều trị nội trú. Hậu quả do bỏng rất nặng nề, trên thế giới mỗi năm có 206.000 – 300.000 người tử vong do bỏng, trong đó 2/3 là ở các nước đang phát triển [1]. Việt Nam là nước đang phát triển, do đó người dân có nguy cơ bỏng cao hơn so với các nước phát triển.

Bỏng được coi là một bệnh với các giai đoạn khác nhau, giai đoạn phản ứng cấp tính (trong 48 - 72 giờ đầu) với đặc trưng là sốc bỏng, giai đoạn nhiễm trùng – nhiễm độc cùng các biến chứng (từ ngày thứ 3 tới ngày 60 sau bỏng), giai đoạn phục hồi [1]. Trong giai đoạn nhiễm trùng nhiễm độc có quá trình viêm, nhiễm trùng tại chỗ, lân cận và toàn thân. Các cơ quan, đặc biệt là gan, thận chịu tác động của nhiễm độc – nhiễm trùng, xuất hiện các rối loạn chức năng và tổn thương thực thể, tạo vòng xoắn bệnh lý và làm bệnh bỏng nặng hơn. Hiện nay thời kỳ nhiễm trùng nhiễm độc là thời kỳ có tỷ lệ có biến chứng và tử vong cao nhất [1].

Diện tích và độ sâu bỏng: Để đánh giá, tiên lượng bỏng thì diện tích và độ sâu bỏng có ý nghĩa đặc biệt quan trọng. Để tính diện tích bỏng có thể áp dụng nhiều phương pháp khác nhau như phương pháp Blokhin, phương pháp con số 9 của Pulaski EJ, Tennison CW và Wallace A. Ở Việt Nam Lê Thế

Trung đề xuất phương pháp 1 - 3 - 6 - 9 - 18 [1]. Độ sâu bỏng thường được chia thành hai nhóm gồm bỏng nông - bỏng độ I, II và III; (tổn thương một phần da - (partial thickness burn) và bỏng sâu - bỏng độ IV và V (toàn bộ da - full thickness burn) [1]. Bỏng càng rộng, độ sâu càng lớn thì bệnh bỏng càng nặng. Với cùng diện tích bỏng thì trẻ em (< 15 tuổi) hoặc người già (>65 tuổi) sẽ tiên lượng nặng hơn do đó chỉ tiêu đánh giá mức độ nặng khác nhau giữa người trưởng thành và trẻ em, người già [1].

Các tổn thương do bỏng gây ra tình trạng ức chế miễn dịch, dẫn tới việc bệnh nhân (BN) bỏng dễ bị biến chứng nhiễm khuẩn. Tổn thương bỏng làm mất lớp da che phủ, bảo vệ cơ thể do đó tạo điều kiện cho sự xâm nhập của mầm bệnh. Chấn thương bỏng gây một stress mạnh, gây tăng tiết các chất adrenocorticotrophic hormone (ACTH), cortisol là các chất gây ức chế các cơ quan lympho trong cơ thể; hoại tử bỏng là nguồn sinh sản ra nhiều chất gây suy giảm miễn dịch như các kháng thể tự thân từ mô bỏng, các đa peptit gây ức chế miễn dịch, prostaglandin (PG) đặc biệt là PGE2 là chất gây ức chế miễn dịch mạnh. Suy giảm miễn dịch xuất hiện sớm, kéo dài trong suốt quá trình điều trị, có thể tự phục hồi nhưng cũng có thể phát triển nặng hơn, thậm chí thành trạng thái xóa bỏ miễn dịch, tạo điều kiện cho mầm bệnh phát triển [1].

1.1.1.2. Khái niệm và vai trò y học của nấm

Theo phân loại hiện nay nấm (fungi) được coi là một giới riêng, có những đặc điểm sau đây: Là những sinh vật có nhân thực, có thành tế bào, dị dưỡng (heterotrophic) và sinh sản bằng bào tử [5], [6].

Nấm có thể có kích thước lớn (nấm rơm, mộc nhĩ...) hay kích thước rất nhỏ, phải quan sát dưới kính hiển vi gọi là vi nấm. Nấm có hai bộ phận chính là bộ phận sinh dưỡng và bộ phận sinh sản. Dựa vào hình thể bộ phận sinh dưỡng vi nấm được gọi là nấm men hoặc nấm sợi. Nấm men: Có cấu tạo đơn bào, hình cầu hoặc trái xoan, kích thước 3 - 15 μm ; khuẩn lạc nấm men

thường nhẵn, giống khuẩn lạc của vi khuẩn. Nấm sợi gồm những sợi nấm có cấu tạo đa bào, có loại sợi không vách ngăn (thường có đường kính lớn trên 5 μm), có loại có vách ngăn (thường nhỏ, 2 - 4 μm). Bộ phận sinh sản là nhiều loại bào tử với hình thể, kích thước rất đa dạng [5], [6].

Phần lớn nấm sống trong đất, trên các chất hữu cơ ở môi trường, ví dụ *Aspergillus*, *Fusarium*... sinh ra các bào tử phát tán đến môi trường mới gặp điều kiện thuận lợi lại có thể nảy mầm, phát triển. Một số nấm có thể sống hội sinh ở người và động vật; ví dụ có thể phát hiện một số loài nấm men *Candida* như *C. albicans*, *C. tropicalis*... ở bề mặt niêm mạc, da của người bình thường. Do đó người có thể nhiễm nấm từ môi trường bên ngoài, qua đường hô hấp, tiêu hóa, qua các vết thương hở (như tổn thương bỏng), hoặc nấm hội sinh trong cơ thể [5], [6].

Trừ một vài loại nấm như nấm da (dermatophytes) sống ký sinh bắt buộc, phần lớn nấm ký sinh gây bệnh ngẫu nhiên. Chỉ một số ít nấm có khả năng gây bệnh ở người bình thường còn hầu hết nấm chỉ có khả năng gây bệnh ở những người có yếu tố nguy cơ (suy giảm khả năng bảo vệ của cơ thể). Cơ chế bảo vệ của cơ thể gồm cơ chế bảo vệ không đặc hiệu như sự toàn vẹn của da, niêm mạc, hệ các vi sinh vật hội sinh, các tế bào thực bào..., các immunoglobulins và bổ thể đóng vai trò opsonin. Cơ chế bảo vệ đặc hiệu gồm các đáp ứng tế bào và dịch thể. Trong số các yếu tố bảo vệ, da có vai trò đặc biệt quan trọng trong ngăn chặn và tiêu diệt tác nhân gây bệnh xâm nhập cơ thể [5], [6].

Phân loại bệnh nấm: Có nhiều cách phân loại bệnh nấm. Theo dịch tễ học bệnh được chia thành bệnh nấm lưu hành (endemic: Bệnh do nấm *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*) và bệnh cơ hội (opportunistic: *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*). Theo hình thái nấm bệnh được phân thành bệnh do nấm men, bệnh do nấm sợi và bệnh do nấm

lượng dạng. Thông thường nhất là phân loại theo tổn thương giải phẫu, có thể phân thành hai loại chính là bệnh nấm ở da và bệnh nấm dưới da - nội tạng [5], [6]. Thuật ngữ bệnh nấm xâm lấn thường được dùng để chỉ nhiễm nấm huyết và các trường hợp nấm xâm lấn các cơ quan nội tạng. *Candida* và *Aspergillus* là những tác nhân thường gặp nhất trong số các căn nguyên bệnh nấm xâm lấn.

1.1.1.3. Khái niệm, phân loại nhiễm nấm trên bệnh nhân bỏng

Một bệnh nhân (BN) được chẩn đoán nhiễm nấm khi phát hiện được nấm từ bất kỳ vị trí nào trên cơ thể.

- Phân loại

Nhiễm nấm được phân loại theo nhiều cách khác nhau, phần lớn các tác giả phân loại nhiễm nấm theo mức độ tổn thương để làm cơ sở cho việc áp dụng các biện pháp can thiệp khác nhau tùy thuộc mức độ nhiễm nấm.

Nhiễm nấm ở BN bỏng thường được chia thành ba nhóm là

Nấm phát triển/ô nhiễm nấm/nhiễm nấm xâm thực (fungal colonization - FC) khi phân lập được nấm trên bề mặt vết bỏng hay các vị trí có nấm hoại sinh khác (dịch hô hấp, phân, nước tiểu...);

Nhiễm nấm vết thương/bỏng (fungal wound infection - FWI) khi nấm xâm lấn xuống tổ chức sống tại vết thương;

Nhiễm nấm huyết (fungemia) khi phân lập được nấm trong máu [7].

Thuật ngữ nhiễm nấm xâm lấn/xâm nhập gồm hai mức độ là nhiễm nấm vết thương và nhiễm nấm huyết.

1.1.2. Tỷ lệ nhiễm nấm trên bệnh nhân bỏng

Do mất hàng rào bảo vệ, rối loạn miễn dịch toàn thân và tại chỗ... nên nhiễm trùng bỏng gần như là một quy luật và vẫn là nguyên nhân tử vong hàng đầu ở BN bỏng [8].

1.1.2.1. Tỷ lệ nhiễm nấm xâm thực

Đã có nhiều nghiên cứu về tỷ lệ nhiễm nấm xâm thực trên các đối tượng bệnh nhân khác nhau, đặc biệt là nhiễm nấm xâm thực ở BN nằm ở các đơn vị hồi sức tích cực (ICU). Một nghiên cứu tại Italia trên những BN nằm ở ICU thấy 70,6% BN đã nhiễm nấm ngay khi nhập ICU, tỷ lệ này tăng lên 92,3% vào ngày 15, chỉ số nấm xâm thực (CI) cũng tăng từ 0,34 (ngày 0) lên 0,6 (ngày 15) [9].

Các nghiên cứu về tỷ lệ nhiễm nấm xâm thực ở BN bỏng còn chưa nhiều. Tỷ lệ nhiễm *Candida* ở BN bỏng dao động từ 30–63% [10]. Gupta (2004) nghiên cứu trên 220 BN bỏng tại một bệnh viện ở Ấn Độ thấy 138 BN (62,7%) nhiễm nấm xâm thực [11]. Rafik A (2016) nghiên cứu trên 180 BN bỏng tại Ma Rốc thấy 180/1812 (10%) bệnh nhân nhiễm nấm, phần lớn từ vết thương (69,4%), đờm (42,2%), nước tiểu (22,7%) [12]. NC của Sharma S trên 50 BN bỏng thấy tỷ lệ nhiễm nấm trên bề mặt vết bỏng là 26% [13].

1.1.2.2. Tỷ lệ nhiễm nấm vết thương

Chẩn đoán nhiễm nấm vết thương đòi hỏi phải thực hiện sinh thiết vết bỏng, nhuộm mô bệnh học và phát hiện nấm xâm lấn tới vùng mô lành, giúp phân biệt được nấm ô nhiễm trên bề mặt vết thương và nấm xâm lấn [8]. Tuy nhiên, do là kỹ thuật xâm nhập nên ít được tiến hành. Do đó các nghiên cứu về tỷ lệ nhiễm nấm vết thương trên BN bỏng còn tương đối ít. Tỷ lệ nhiễm nấm vết thương bỏng dao động theo nhiều nghiên cứu khác nhau, có thể từ 2 – 20%. Becker (1991) tổng kết 10 năm (1979 – 1989) trên 2114 BN điều trị tại một trung tâm bỏng ở Mỹ, phát hiện 141 BN có nhiễm nấm vết thương (6,67%) [14]. Nghiên cứu của Horvath và cộng sự (2007) trên 2651 BN bỏng nhiệt điều trị tại một trung tâm bỏng ở Mỹ phát hiện 54 BN (2%) nhiễm nấm vết thương [7]. Một NC ở châu Á trên BN bỏng thấy nhiễm nấm vết thương 10% [15] tuy nhiên tỷ lệ này có thể lên tới 36% ở tuần thứ 4 [16]. Rosanova

và cộng sự (2013) nghiên cứu trên 110 bệnh nhân bỏng trẻ em phát hiện 23 bệnh nhân nhiễm nấm vết thương (20,9%) [17].

1.1.2.3. Tỷ lệ nhiễm nấm huyết

Tỷ lệ nhiễm nấm huyết khoảng 3–5% bệnh nhân bỏng [10]. Tuy nhiên ở trẻ em Rosanova và cộng sự (2013) thông báo tỷ lệ nhiễm nấm huyết là 18,18% [17]. Tại Việt Nam Phạm Phước Tiến (2015) NC tại bệnh viện Chợ Rẫy thấy tỉ lệ dương tính của nấm trong các mẫu cấy máu từ bệnh nhân bỏng ngày càng tăng, từ 3,8% (2012) đến 8,3% (2013) và 27,5% (2014) [18].

Nấm xâm thực ở bề mặt vết thương ít ảnh hưởng đến tỷ lệ tử vong nhưng nhiễm nấm xâm lấn làm tăng nguy cơ tử vong, không phụ thuộc vào diện tích, độ sâu, tuổi của BN [7]. Theo một số tác giả, tỷ lệ tử vong do nhiễm nấm vết thương rất cao, 74,5% [14]; 30–90% [10]. Tỷ lệ tử vong ở BN nhiễm nấm huyết có thể tới 71% [19]. Do đó vấn đề dự phòng, điều trị nhiễm nấm xâm lấn trên BN bỏng rất cần được quan tâm.

1.1.3. Yếu tố liên quan nhiễm nấm

Có nhiều yếu tố liên quan đến nhiễm nấm trên BN bỏng, cả yếu tố liên quan đến BN và cả yếu tố liên quan đến môi trường

1.1.3.1. Các yếu tố liên quan đến bệnh lý bỏng

- Các thay đổi bệnh lý sau bỏng liên quan đến nhiễm nấm

Bỏng hiện nay được coi là một bệnh với các giai đoạn khác nhau gồm giai đoạn phản ứng cấp tính (trong 48 - 72 giờ đầu) với đặc trưng là sốc bỏng, giai đoạn nhiễm khuẩn – nhiễm độc cùng các biến chứng (từ ngày thứ 3 tới ngày 60 sau bỏng), giai đoạn phục hồi [1].

Tác nhân bỏng gồm nhiều loại như bỏng điện, bỏng nhiệt (nhiệt khô và nhiệt ướt), bỏng do hóa chất (axit, bazơ)... Tác nhân bỏng có thể ảnh hưởng đến tổn thương bỏng. Bỏng do nhiệt ướt có thể do nước sôi, thức ăn nóng

(nhiệt độ 50 - 100°C), dầu mỡ sôi nóng (nhiệt độ 180°C), nhiệt độ gây bỏng thường không cao nhưng nếu tác dụng lâu dài trên da cũng gây ra bỏng sâu. Bỏng do nhiệt khô thường có nhiệt độ cao hơn, ngoài ra còn có thể gây bỏng hô hấp. Bỏng do tia lửa điện là loại bỏng nhiệt, nhiệt độ cao (nhiệt độ 3.200 – 4.800°C), tuy nhiên thời gian thường ngắn [1]. Theo các nghiên cứu trên thế giới và Việt Nam thì bỏng nhiệt chiếm tỷ lệ cao nhất. Tại Việt Nam tác nhân gây bỏng thường gặp nhất là nhiệt ướt (86,8%), nhiệt khô (5,3% trong đó bỏng do lửa chiếm 89,7%) [1].

Da có nhiều chức năng như che phủ, đảm bảo cân bằng nội môi, điều hòa nhiệt độ, chống lại nhiễm trùng, chức năng miễn dịch, nhận cảm kích thích thần kinh, chức năng trao đổi chất như chuyển hóa vitamin D. Sự mất toàn vẹn của da là đặc trưng của bỏng dẫn đến nhiều thay đổi bệnh lý khác nhau. Các tổn thương do bỏng gây ra tình trạng ức chế miễn dịch, dẫn tới việc BN bỏng dễ bị biến chứng nhiễm trùng. Có nhiều cơ chế gây suy giảm miễn dịch trong bỏng, chấn thương bỏng gây một stress mạnh, gây tăng tiết các chất gây ức chế các cơ quan lympho trong cơ thể. Nội độc tố vi khuẩn, các chất anaphytatoxin, các sản phẩm chuyển hóa của arachidonic acid đều gây biến đổi chức năng bạch cầu đa nhân trung tính [1]. Đáp ứng chống viêm và ức chế miễn dịch sau bỏng được đặc trưng bởi một số tế bào và cytokines khác nhau. Trình tự chính xác của các sự kiện dẫn đến tình trạng ức chế miễn dịch sau bỏng vẫn chưa được biết rõ; tuy nhiên, những thay đổi sinh hóa có thể ảnh hưởng đến hệ thống miễn dịch bao gồm hệ thống nội tiết, các axit arachidonic, cytokine. Sau khi bị bỏng, có hiện tượng tăng nồng độ vasopressin, aldosterone, hormone tăng trưởng, cortisol, glucagon, và catecholamine. Tăng mức glucocorticoid ức chế sản xuất IFN- γ và IL-2, nhưng không ức chế sản xuất IL-4 và IL-10. Tương tự, norepinephrine được giải phóng sớm sau bỏng ức chế tế bào Th-1. Tăng sản xuất PGE2 bởi các đại

thực bào ức chế đã được quan sát sau bỏng nặng. PGE2 có thể có vai trò quan trọng trong việc ức chế miễn dịch thứ phát, làm giảm tăng sinh lymphocyte, giảm mức độ các cytokines tiền viêm IL-1 β và IL-2, giảm đáp ứng với IL-2, ức chế hoạt động của tế bào NK, và kích hoạt các tế bào T ức chế. Nhiều thay đổi nồng độ cytokine biểu hiện sự thay đổi của đáp ứng miễn dịch thu được, đặc biệt là trong quần thể T-lymphocyte [8].

Tổn thương da do nhiệt cùng sự suy giảm của hệ thống miễn dịch tế bào và dịch thể toàn thân và tại chỗ là những yếu tố quan trọng góp phần gây nhiễm trùng, biến chứng ở BN bị bỏng nặng. Bề mặt vết thương bỏng là một môi trường giàu protein bao gồm các mô hoại tử không có mạch máu (vảy) cung cấp điều kiện thuận lợi cho mầm bệnh cư trú và tăng sinh. Các vùng vô mạch dẫn đến rối loạn qui tập tế bào miễn dịch và hạn chế các thuốc kháng khuẩn/nấm dùng toàn thân đến khu vực, trong khi các độc tố do các mô vảy tiết ra làm ảnh hưởng đến đáp ứng miễn dịch tại chỗ của cơ thể. Mặc dù bề mặt vết bỏng vô trùng ngay sau khi bị bỏng, nhưng sau đó có rất nhiều tác nhân cư trú và phát triển ở những vết thương này. Bản chất và mức độ tổn thương nhiệt cùng với chủng loại và số lượng mầm bệnh xâm chiếm vết bỏng ảnh hưởng nguy cơ nhiễm trùng xâm lấn sâu này [8].

Diễn biến bệnh lý bỏng có các giai đoạn và diễn biến nhiễm trùng tại tổn thương bỏng cũng có tính qui luật: Ngay sau khi bị bỏng vết bỏng chủ yếu là vô trùng, sau đó xuất hiện bội nhiễm. Quá trình xâm nhập của vi khuẩn ở vết bỏng xảy ra sớm. Một NC tại viện Bỏng quốc gia cho thấy không có BN nào nhiễm *Acinetobacter baumannii* trong 3 ngày đầu, ngày thứ 7 là 3,75%; ngày 14 là 28,75% và ngày 21 là 67,5% [20]. Nhiễm nấm thường bắt đầu xuất hiện vào tuần thứ hai, tỉ lệ tăng cao nhất ở tuần thứ ba, thứ tư sau bỏng [21], [22].

Sau khi bị bỏng, nấm *Candida* có mặt sẵn trên da, niêm mạc mũi, họng và đường tiêu hóa của BN là nguồn gốc gây nhiễm nấm *Candida*. Sự có mặt

của nấm *Candida* trên da, niêm mạc là yếu tố liên quan rõ ràng và quan trọng đối với nhiễm nấm huyết và nhiễm nấm nội tạng khác. Nghiên cứu về nguồn gốc lây nhiễm nấm *Candida* Gupta N và cộng sự (2004) thấy các chủng *C. albicans* trên các BN khác nhau tuy nhiên giống nhau trên cùng một BN chứng tỏ vai trò của nấm phát triển sẵn có trên BN [11]. Một NC trên 322 BN thấy các chủng *Candida* trên cùng một BN có kiểu gen giống nhau, thậm chí ở các vị trí khác nhau và sự giống nhau này kéo dài sau 140 ngày theo dõi, không có sự nhiễm chéo nào xuất hiện trong thời gian NC [23].

Các yếu tố liên quan chính trong nhiễm nấm ở BN bỏng là tuổi, diện tích, bỏng hô hấp, thời gian nằm viện kéo dài, phẫu thuật muộn, vết thương hở, da nhân tạo, đặt catheter, kháng sinh, steroid, thông khí nhân tạo kéo dài, nhiễm nấm xâm thực, tăng đường máu, rối loạn miễn dịch [15]. Nghiên cứu của Sharma (2016) thấy tỷ lệ nhiễm nấm 0% trên BN diện tích bỏng 20 – 30%, 22,2% nếu diện tích bỏng 31 – 40%, 40% nếu diện tích bỏng 41 – 50% và 63,6% nếu diện tích bỏng trên 50% [13]. Tỷ lệ nhiễm nấm tăng với những BN bỏng rộng, thời gian nằm viện kéo dài. Tỷ lệ nhiễm *Candida* xâm thực <5% ở những bệnh nhân nằm viện < 7 ngày có thể tăng lên 58% ở bệnh nhân nằm viện trên 7 ngày [11]. Một NC tại Cairo, Ai Cập thấy tỷ lệ nấm xâm thực ở vết thương trong tuần đầu là khoảng 10%; tuần thứ 2 là 20%; tuần thứ 3 gần 40%, tuần thứ 5 tới 60% [24].

Pittet et al. nghiên cứu trên BN phẫu thuật thấy mức độ nặng của bệnh và nhiễm *Candida* xâm thực là những yếu tố độc lập liên quan tới nhiễm *Candida* xâm lấn tiếp theo và tác giả đưa ra chỉ số nấm xâm thực (CI), người có CI lớn hơn hoặc bằng 0,5 được coi là nhiễm nấm xâm thực nặng và có nguy cơ cao nhiễm nấm xâm lấn [25]. Các tác giả đề nghị ở những BN có nguy cơ nấm *Candida* xâm lấn cần sàng lọc 2 lần/tuần các bệnh phẩm sau để phát hiện tình trạng nấm ô nhiễm (nhiễm nấm xâm thực): Dịch hầu họng hoặc

dịch tiết phế quản; dịch dạ dày; phân hoặc hậu môn, nước tiểu, dịch vết thương, tại chỗ catheter [25].

Do hậu quả nhiễm nấm xâm lấn rất nặng nề nên nhiều tác giả đã đưa ra các qui tắc dự báo nhiễm *Candida* xâm lấn để sử dụng thuốc kháng nấm sớm. Ostrosky-Zeichner và cộng sự đưa ra quy tắc dự đoán *Candida* xâm lấn gồm catheter tĩnh mạch trung ương (CVC) hoặc hô hấp nhân tạo kết hợp với ít nhất hai yếu tố (nuôi dưỡng ngoại vi toàn bộ, lọc máu, phẫu thuật lớn, viêm tụy, dùng ức chế miễn dịch hoặc corticosteroid) [26]. Tuy nhiên Hermsen ED (2011) cho rằng giá trị dự báo dương (PPVs) thấp và giá trị dự báo âm (NPV) cao và quy tắc này chỉ hữu ích trong xác định BN không có khả năng để phát triển nấm *Candida* xâm lấn, hạn chế sử dụng thuốc kháng nấm không cần thiết, tối ưu hóa việc chăm sóc BN ICU và tạo thuận lợi cho việc thiết kế các thử nghiệm lâm sàng chống nấm mới mà ít có ý nghĩa dự báo BN sẽ phát triển *Candida* xâm lấn [27].

1.1.3.2. Các yếu tố liên quan tới điều trị bỏng

Các trung tâm điều trị bỏng hiện đại thường có các phòng đặc biệt, kiểm soát nhiệt độ và độ ẩm, sự trao đổi không khí lớn (ít nhất 10 lần thể tích của phòng mỗi giờ); các bộ trao đổi không khí có kèm các bộ lọc vi khuẩn vì các bào tử nấm và các vi khuẩn khác có thể được lan truyền bởi các đơn vị trao đổi không khí. Ở những BN bị bỏng nặng, cần phải có thêm đèn sưởi để cung cấp nhiệt độ cho BN. Sự kết hợp của nguồn nhiệt bên ngoài, bản thân vết thương và độ ẩm tại vết thương cung cấp một môi trường tăng nguy cơ nhiễm vi sinh vật. Băng vết bỏng bằng các vật liệu ẩm cũng là yếu tố làm gia tăng sự phát triển các loài vi sinh vật và gây nhiễm trùng [28].

Sự kết hợp giữa môi trường thích hợp tại tổn thương bỏng và sử dụng kháng sinh đã tạo điều kiện cho nấm phát triển đặc biệt với những BN bỏng sâu diện rộng do nấm có khả năng tiếp cận trực tiếp tới các mạch máu [19].

Quá trình cấp cứu điều trị bỏng thường sử dụng nước và nguồn nước có thể đã bị ô nhiễm nấm. Việc dùng nước để dập lửa, tưới rửa, ngâm vùng bỏng để làm lạnh vết thương bỏng có thể là nguồn gốc cho nhiễm khuẩn và nấm [29].

Trên BN bỏng phải trải qua nhiều lần phẫu thuật, truyền máu nhiều lần, sử dụng các thuốc vận mạch, an thần, dinh dưỡng bằng đường tĩnh mạch (TPN) và liệu pháp thay thế thận là các yếu tố làm suy giảm hệ miễn dịch của BN từ đó tạo điều kiện cho nhiễm nấm sau bỏng. Việc sử dụng gạc băng vết bỏng tạo ra môi trường kín, không thông thoáng tại chỗ vết bỏng cũng là yếu tố liên quan cho nhiễm khuẩn và nấm ở BN bỏng. Phẫu thuật cắt bỏ vết bỏng không đầy đủ hoặc muộn làm tăng nguy cơ nhiễm trùng, trong khi quá trình phẫu thuật lớn và kéo dài có thể làm xấu đi tình trạng chung của BN. Các phẫu thuật trên BN bỏng có thể gây giải phóng các trung gian hóa học có hoạt tính co mạch, các cytokine và cả vi khuẩn, những yếu tố này không những tác động lên hệ miễn dịch mà còn ảnh hưởng đến quá trình liền vết thương [30].

Các tiến bộ trong điều trị như cắt hoại tử sớm, bảo vệ vết bỏng, sử dụng kháng sinh toàn thân và tại chỗ đã làm giảm tỉ lệ nhiễm khuẩn vết bỏng và tỉ lệ tử vong do nhiễm trùng huyết mặc dù vậy những biện pháp này ít có hiệu quả làm giảm nhiễm nấm bỏng [14]. Với việc chăm sóc BN bỏng tốt hơn, sử dụng các thuốc kháng sinh mới nên tỷ lệ nhiễm khuẩn bỏng có xu hướng giảm nhưng nhiễm nấm lại có xu hướng tăng lên [15]. Nhiễm nấm thường xuất hiện do chậm trễ trong việc cắt hoại tử hoặc do dùng kháng sinh dự phòng kéo dài dẫn đến loạn khuẩn [28].

Sử dụng các thuốc kháng khuẩn, kháng nấm toàn thân hoặc tại chỗ cũng có thể liên quan tới nhiễm nấm. Các thuốc điều trị tại chỗ được áp dụng rộng rãi từ những năm 1970s có tác dụng làm giảm nhiễm khuẩn do vi khuẩn gram âm ở các trung tâm bỏng và làm tăng tỷ lệ nhiễm nấm (có thể lên tới 83%). Một vài kháng sinh như tazobactam (dùng toàn thân) và nystatin (dùng tại

chỗ) đã được chứng minh thúc đẩy nhiễm nấm xâm lấn *non - albicans* sau bỏng [28]. Dùng piperacillin-tazobactam và vancomycin là những yếu tố nguy cơ đáng kể nhiễm nấm huyết do *C. glabrata* hoặc *C. krusei*, ít liên quan tới *C. albicans*, sử dụng fluconazol trước đây không liên quan đáng kể đến *C. albicans* hoặc *C. non-albicans* (*C. glabrata* hoặc *C. krusei*) [31]. Đặt catheter cũng tạo điều kiện cho nấm ở da xâm nhập vào cơ thể của BN bỏng do đó cần đánh giá thường xuyên tình trạng BN [28].

1.1.3.3. Yếu tố liên quan đến môi trường

Bỏng là tổn thương gây mất da, mất hàng rào bảo vệ của cơ thể, làm cho nhiều tác nhân gây bệnh ở môi trường có điều kiện xâm nhập cơ thể. Có NC so sánh giữa chủng nấm trên BN và các đơn vị chăm sóc bỏng cho thấy *A. niger* phân lập được nhiều nhất ở cả BN và buồng bệnh, *A. terreus*, *Penicillium* và *Zygomycetes*, phân lập từ các BN bị bỏng, cũng được tìm thấy nhiều hơn trong các đơn vị chăm sóc bỏng hơn so với nhóm chứng (các khu vực khác trong bệnh viện). Một NC trong 15 năm tại một trung tâm bỏng đã phát hiện 18 BN bị bỏng nặng nhiễm *Aspergillus*. Các đợt xảy ra bệnh dường như liên quan đến ống dẫn khí và bộ lọc không khí bị ô nhiễm. Bảo vệ vết thương khỏi ô nhiễm *Aspergillus* được cho là phương pháp đáng tin cậy duy nhất để ngăn ngừa sự nhiễm nấm *Aspergillus* [32].

Những phát hiện này chỉ ra tiềm năng nguy cơ nhiễm nấm từ môi trường xung quanh của BN trong các đơn vị chăm sóc bỏng. Cần phải có một cách tiếp cận liên ngành bao gồm nhân viên kiểm soát nhiễm trùng, bác sĩ phẫu thuật bỏng, các nhà vi sinh học để giảm thiểu nguy cơ ô nhiễm môi trường đối với BN bỏng.

1.2. Kỹ thuật định danh và thành phần loài nấm ở bệnh nhân bỏng

1.2.1. Kỹ thuật định danh loài nấm

1.2.2.1. Kỹ thuật định danh bằng hình thái

- Định danh nấm men

Các loài nấm men có hình thái tương đối giống nhau nên định danh dựa vào hình thái có giá trị hạn chế. Tuy nhiên có một số kỹ thuật giúp xác định *C. albicans* như nuôi cấy trong điều kiện kỵ khí ở môi trường nghèo đường (môi trường khoai tây - cà rốt - mật bò, thạch bột ngô, thạch cơm) phát hiện bào tử áo; phát hiện sự hình thành ống mầm trong huyết thanh ở 37°C trong vòng 2 - 4 giờ.

Trước kia kỹ thuật định danh nấm men dựa chủ yếu vào các phản ứng sinh hóa như đồng hóa đường, lên men đường, test urease... để phát hiện sự có mặt của các enzyme khác nhau. Gần đây thường sử dụng các môi trường sinh màu, trong môi trường có cơ chất không màu, mỗi loại nấm khác nhau sẽ sinh ra các enzyme biến đổi cơ chất tạo màu sắc khác nhau. Ví dụ: Albicans ID, Candida ID, CHROMagar Candida, Brilliance Candida Agar [33].

- Định danh nấm sợi: Nấm sợi sinh nhiều loại bào tử với hình thái đa dạng và giúp ích nhiều trong định danh nấm sợi. Các đặc điểm được sử dụng định danh là đặc điểm hình ảnh đại thể khuẩn lạc và hình thể vi thể của sợi nấm, bào tử. Các đặc điểm khuẩn lạc như tốc độ phát triển của khuẩn lạc, bề mặt, màu sắc mặt phải, mặt trái khuẩn lạc. Các đặc điểm vi thể của sợi nấm, bào tử, cuống sinh bào tử, cấu trúc mang bào tử, tế bào sinh bào tử, bào tử...

Nhiều tác giả đã đưa ra các khóa định danh dựa vào đặc điểm hình thái. Ví dụ định danh *Aspergillus* theo Raper và Fennell [34], định danh *Fusarium* theo Booth [35].

1.2.2.2. Định danh loài nấm bằng sinh học phân tử

Trước kia nhiều kỹ thuật được áp dụng để định loài nấm như đa hình chiều dài đoạn cắt giới hạn (restriction-fragment-length polymorphism), khuếch đại ngẫu nhiên DNA đa hình (Randomly amplified polymorphic DNA: RAPD), kỹ thuật lai (hybridization)... tuy nhiên hiện nay được thay thế bằng kỹ thuật giải trình tự. Chỉ thị phân tử được sử dụng nhiều nhất trong định danh nấm là vùng giao gen (internal transcribed spacer regions (ITS1/ITS2) [36]. Ngoài ra có thể sử dụng các chỉ thị khác như yếu tố kéo dài (elongation factor 1 (EF-1), the RNA-polymerase subunit RPB2, rodlet protein RodA, b-tubulin... [37].

1.2.2. Thành phần loài nấm ở bệnh nhân bỏng

1.2.2.1. Thành phần loài gây nhiễm nấm xâm thực

Đa số các NC đều cho thấy nhiễm nấm xâm thực chủ yếu do các loài nấm men, ngoài ra còn có thể gặp nấm sợi. Tổng kết trên 435 BN tại Mỹ thấy *Candida* (85%), nấm men không phải *Candida* (21%), *Aspergillus* (14%), nấm sợi khác (9,0%), nấm khác (1,4%) [38]. NC tại Australia thấy hầu hết trường hợp nhiễm nấm *Candida*, tỷ lệ nhiễm nấm không phải *Candida* là 0,04% ; trong 12 BN có 7 trường hợp phân lập được nấm sợi là *A. fumigatus*, *Scedosporium prolificans*, *F. solani*, *Mucor* spp., *Absydia corymbifera*, *Penicillium* và *Alternaria* spp. [39]. NC hồi cứu tại một bệnh viện ở Casablanca, Morocco từ 2011 – 2014 thấy *Candida* chiếm 91,1%; *Aspergillus* 3,9%, nấm men khác 5% [12].

Một số tác giả nhận xét trong các loài *Candida* thì *C. albicans* là tác nhân thường gặp nhất trên BN bỏng, tuy nhiên các loài non-*albicans* có xu hướng đang tăng lên [28]. NC tại Casablanca, Morocco gặp các loài *C. albicans* 65,7%, *C. dublinensis* 15,3%, *C. tropicalis* 12,5%,

C. parapsilosis 4,1%, *C. glabrata* 2,4% [12]. Tại Trung Quốc một NC thấy các loài *Candida* gồm *C. tropicalis* (42,1%), *C. albicans* (31,6%) và *C. famata* (10,5%) [21]. Tại châu Á NC ở một bệnh viện ở Ấn Độ trên 138 BN bỏng gặp *C. albicans* phổ biến nhất (45%) sau đó là *C. tropicalis* (33%), *C. glabrata* (13,5%), *C. parapsilosis* (4%), *C. krusei* (2,75%) và *C. kefyr* (1,75%) [11].

1.2.2.2. Thành phần loài gây nhiễm nấm vết thương

Một số NC trên thế giới cho thấy nấm men là căn nguyên hàng đầu của nhiễm nấm vết thương, tuy nhiên cũng có NC cho thấy nấm sợi lại hay gặp hơn nấm men trong số các nguyên nhân của FWI.

Nghiên cứu tại Ấn Độ trên 869 BN bỏng thấy *Candida* chiếm tỷ lệ cao nhất (45%) trong số các tác nhân nấm gây FWI, sau đó là *Aspergillus* và một số loài nấm sợi khác [40]. NC của Capoor cho thấy trong số các chủng nấm phân lập được từ BN bị FWI *Candida* là tác nhân thường gặp nhất, ngoài ra còn gặp *Aspergillus*, *Syncephalestrum* và *Fusarium* [41].

Schaal và cộng sự (2015) hồi cứu 1.849 BN phát hiện 8 BN nhiễm FWI do *Aspergillus*, 6 BN nhiễm nấm *Mucor*, và 3 BN nhiễm *Fusarium* [42]. Tác nhân nấm sợi thường gặp hơn trong nhiễm nấm bỏng sâu: *Aspergillus*, *Fusarium* (68%), *Candida* (18%), *Mucor*, *Rhizopus* (9,1%), *Microspora* và *Alternaria* (<5%)... [14].

Horvath (2007) xác định 94,4% BN FWI nhiễm *Aspergillus*, 35% nhiễm nấm men, 29,6% nhiễm *Mucor* [7].

Ngoài những tác nhân phổ biến trên một số tác nhân hiếm gặp đã được thông báo như *Absidia*, *Apophysomyces*, *Alternaria*, *Bipolaris*, *Cephalosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Homodendrum*, *Lichtheimia*, *Paecilomyces*, *Phialemonium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saksenaea*, *Syncephalestrum*, *Torula*,

Trichosporon, *Wangiella*, [43].

Bảng 1.1. Thành phần loài gây nhiễm nấm vết thương ở bệnh nhân bỏng

Tác giả	Thời gian	Số BN	n (%)	Loài	Nguồn
Becker (Mỹ)	1979 - 1989	2114 BN bỏng	141 (6,67%)	<i>Aspergillus + Fusarium</i> (68%); <i>Candida</i> 18%; loài khác	[14]
Mousa	1996-1997	130 BN bỏng	26 (20%)	<i>Aspergillus</i> (61,5%), <i>Candida</i> (30,76%), loài khác	[44]
Nermin H. Ibrahim	2007	50 BN bỏng < 50%	18 (36%)	<i>C. albicans</i> (66,67%), non-albicans (1,67%), <i>Aspergillus</i> (1,67%), <i>Fusarium</i> (1,11%)	[16]
Mohammad Ali Bahar (India)	2008 - 2009	869 BN bỏng	113 (13%)	<i>Candida albicans</i> (45%), <i>A. fumigatus</i> (35%), <i>Penicillium</i> (8%), <i>Aspergillus niger</i> (5%), loài khác (7%).	[40]
Capoor	2008-2009	71 BN bỏng	20 (28.2%)	<i>C. tropicalis</i> (14%), <i>C. parapsilosis</i> (5,6%), <i>A. niger</i> (2,8%), <i>C. albicans</i> (1,4%), <i>C. glabrata</i> (1,4%), <i>S.</i> (1,4%), <i>F. solani</i> (1,4%).	[41]
Sarabahi	2008 - 2011	207 BN bỏng, Ấn Độ	48 (23,1%)	<i>C. albicans</i> (6,25%), <i>C. tropicalis</i> 35,42%, <i>C. parapsilosis</i> 20,28%, <i>C. krusei</i> 12,5%; <i>Aspergillus</i> 8,33%, ...	[45]

1.2.2.3. Thành phần loài gây nhiễm nấm huyết

Các NC đều cho thấy nấm men là nguyên nhân chủ yếu của nhiễm nấm huyết. Trong số hơn 30 loài *Candida* hay gặp trên BN, 5 loài hay gặp nhất gây nhiễm nấm xâm lấn là *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* [46].

Thành phần loài *Candida* thay đổi tùy theo vị trí địa lý, đối tượng BN cũng như tiền sử dùng thuốc kháng nấm [46], [47]. Vào những năm 1980, *C. albicans* chiếm khoảng hơn 80% tất cả các chủng nấm men được nuôi cấy từ máu bệnh nhân, vào cuối những năm 1990, tỷ lệ *C. albicans* đã giảm tới 50% tuy nhiên không có sự giảm tương ứng trong nhiễm trùng gây ra bởi các loài không phải *albicans*. Do khả năng đề kháng vốn có (ví dụ, *C. krusei*) hoặc giảm tính nhạy (ví dụ, *C. glabrata*) của nhiều loài nấm không phải *albicans*, sự ra đời của fluconazol vào đầu những năm 1990 được coi là yếu tố làm thay đổi tỷ lệ này mặc dù vậy không có nghiên cứu nào khẳng định điều này [48]. *C. albicans* vẫn là nguyên nhân phổ biến nhất gây ra *Candida* xâm lấn và là loài có độc lực cao nhất trong số các loài *Candida*. *C. tropicalis* có độc lực tương đối mạnh và có xu hướng xâm lấn mô sâu. *C. parapsilosis* có độc tính kém hơn, thường thấy ở trẻ sơ sinh và ở người lớn với catheter tĩnh mạch trung tâm, mặc dù độc lực kém hơn nhưng có nhiều chủng *C. parapsilosis* tạo màng sinh học dày trên bộ phận giả và ống thông làm cho điều trị khó khăn. *C. krusei* ít gặp hơn và thường ở những bệnh nhân suy giảm miễn dịch nặng. *C. glabrata* đã trở thành nguyên nhân quan trọng ở cả người suy giảm miễn dịch, mặc dù độc tính kém hơn các loài *Candida* khác [49].

Phân bố theo khu vực địa lý *C. glabrata* hay gặp ở Bắc Âu và Mỹ, Tây Ban Nha và Braxin ít báo cáo *C. glabrata* mà hay gặp *C. parapsilosis* [50]. *C. parapsilosis* chiếm ưu thế ở Úc, Mỹ Latinh, Châu Phi, Châu Á và Châu Âu. Ngược lại, *C. glabrata* quan trọng ở Mỹ, Trung và Bắc Âu [51].

Trên BN bỏng các loài thường phân lập được trong máu là *C. albicans*, *C. parapsilosis*; *C. tropicalis* với cơ cấu thành phần loài nấm khác nhau tùy theo các nghiên cứu.

Bảng 1.2. Thành phần loài gây nhiễm nấm huyết ở bệnh nhân bỏng

Tác giả	Thời gian	Số BN	n (%)	Loài	Nguồn
Vinson neau	2001 - 2005	851 BN bỏng người lớn	20 (2,35%)	<i>C. albicans</i> (65%), <i>C. parapsilosis</i> (25%); <i>C. tropicalis</i> (10%)	[52]
Junyi Zhou	2012 – 2017	410 BN bỏng > 40%, Trung Quốc	39 (9,51%)	<i>C. parapsilosis</i> (28,21%), <i>C. albicans</i> (15,38%), <i>C. tropicalis</i> (15,38%)	[53]
Escrig	1996 - 2012	2780 BN bỏng rộng (>20%), Tây Ban Nha	33 (1,19%)	<i>C. albicans</i> (61,1%) <i>C. parapsilosis</i> (27,8%),	[54]

1.2.3. Một số nghiên cứu về thành phần loài nấm ở Việt Nam

Ở Việt Nam vẫn còn ít nghiên cứu về cơ cấu thành phần loài nấm phân lập được ở người nói chung và trên bệnh nhân bỏng nói riêng. Hầu hết các điều tra về thành phần loài nấm men phân lập được từ da – niêm mạc, các nghiên cứu về thành phần loài nấm men hoặc nấm sợi xâm lấn rất hiếm.

Nghiên cứu của Vũ Quyết Thắng về thành phần loài *Candida* phân lập được từ âm đạo phụ nữ ở Quảng Ninh là *C. glabrata* 49,4%, *C. albicans* 27,3%, *C. tropicalis* 10,1%, *C. krusei* 6,1%, *C. parapsilopsis* 7,1% [55]. Nghiên cứu của Vũ Đức Bình thấy thành phần loài *Candida* âm đạo phụ nữ ở Phú Thọ là *C. glabrata* 43,5%, *C. albicans* 14,5%, *C. tropicalis* 34,8%,

C. krusei 4,4%, *C. parapsilopsis* 2,9% [56]. Đỗ Ngọc Ánh và cộng sự nghiên cứu thành phần loài nấm phân lập được từ âm đạo phụ nữ đến điều trị vô sinh thấy *C. albicans* (39,76%) là tác nhân phổ biến nhất, sau đó là *C. glabrata* (38,56%), *C. tropicalis* (10,84%), *C. krusei* (7,8,43%), *C. parapsilosis* (2,41%) [57]. Hà Tuấn Minh, Lê Hữu Doanh (2016) nghiên cứu thành phần loài nấm *Candida* ở miệng bệnh nhân bị nấm miệng tại bệnh viện Da liễu trung ương phát hiện 9 loài *Candida* gồm *C. albicans* (71,01%), *C. tropicalis* (8,7%), *C. parapsilosis* (5,8%), *C. krusei* (4,35%), *C. lusitaniae* (4,35%), *C. glabrata* (2,9%), *C. guilliermondii* (1,45%), *C. fumata*; *C. pelliculosa* (1,45%) [58]. Nghiên cứu của Nguyễn Thị Bình và cộng sự (2017) tại bệnh viện phong – da liễu trung ương Quy Hòa thấy tỷ lệ *C. albicans* (54,1%), *C. glabrata* (27,6%), *C. tropicalis* (10,9%), sau đó là *C. krusei* (7,4%) [59]. Nghiên cứu của Mai Anh Lợi trên những BN ung thư điều trị tại bệnh viện quân y 103 và bệnh viện Thống Nhất, thành phố Hồ Chí Minh phát hiện 12 loài *Candida*, các loài hay gặp nhất là *C. albicans* (71,43%), *C. tropicalis* (10,39%), *C. krusei* (6,49%), *C. glabrata* (3,9%)... [60].

Có một số nghiên cứu về chủng loại nấm gây nhiễm nấm huyết, thấy hầu hết là *C. albicans* và *C. tropicalis*, các loài khác chiếm tỷ lệ thấp. Nguyễn Duy Bắc và cộng sự (2019) xác định thành phần loài nấm men phân lập từ máu BN ở một số bệnh viện cả ở miền Bắc và miền Nam thấy *C. tropicalis* chiếm tỷ lệ cao nhất (50,54%), sau đó là *C. albicans/dublinsiensis* (19,35%), *C. parapsilosis* (17,20%), *C. glabrata* (6,45%), *C. mesorugosa* (5,38%) và *C. krusei* (1,08%) [61]. NC tại bệnh viện Bạch Mai năm 2016 thấy *Candida* sp. là nguyên nhân nhiễm trùng huyết phổ biến thứ tư (7,9%) và là tác nhân gây bệnh thường gặp nhất (22%) ở BN nhiễm trùng huyết do nhiều căn nguyên. Căn nguyên chính gây nhiễm nấm huyết là *Candida* sp. (83,6%) (các loài thường gặp là *C. albicans* (38,2%) và *C. tropicalis* (36,1%), ngoài ra còn gặp *Pichia ohmeri* (4,3%) [62].

Trên BN bỏng có một số nghiên cứu công bố về thành phần loài nấm. Nghiên cứu từ 2006 đến 2009 tại bệnh viện bỏng quốc gia phát hiện 5 bệnh nhân bỏng nhiễm nấm huyết, tất cả đều nhiễm *C. albicans* [63]. Nghiên cứu của Nguyễn Hải An và cộng sự (2014) trên 11 bệnh nhân bỏng điều trị tại khoa Hồi sức cấp cứu, bệnh viện Bỏng quốc gia nhiễm nấm huyết, tất cả đều nhiễm *C. albicans* [3].

1.3. Độ nhạy của nấm với một số thuốc kháng nấm và kết quả điều trị nhiễm nấm trên bệnh nhân bỏng

1.3.1. Các nhóm thuốc kháng nấm

Có nhiều nhóm thuốc kháng nấm được sử dụng trong lâm sàng tuy nhiên luận án chỉ trình bày một số nhóm thuốc hay được sử dụng trong điều trị nhiễm nấm xâm lấn.

1.3.1.1. Thuốc nhóm polyene

Thuốc nhóm polyene trong công thức có một nhóm aminosugar gắn với vòng lactone lớn với nhiều liên kết kép về một phía (do đó được gọi là polyene) và một dãy hydroxyl ở phía bên kia do đó phân tử vừa có tính ưa nước vừa có tính kỵ nước. Polyene gắn với sterol ở màng tế bào nấm, tạo ra một kênh làm cho các ion nhỏ (K^+ , H^+) đi qua tự do, làm rối loạn cân bằng điện giải trong tế bào. Amphotericin B (fungizon) được coi là một thuốc cơ bản điều trị nấm nội tạng nhưng rất độc đặc biệt với thận. Tên gọi của thuốc liên quan tới khả năng tạo muối methanol hòa tan cả trong điều kiện base và acid (amphoteric property) [64]. Thuốc có các dạng phức với lipid (LFAmB) như liposomal amphotericin B (AmBisome), amphotericin B lipid complex (Abelcet, ABLC), amphotericin B colloidal dispersion (Amphocil, Amphotec, ABCD), những dạng này ít độc hơn so với amphotericin B. Phổ tác dụng rất rộng, *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Histoplasma capsulatum*,

Talaromyces mameffei. Các loại *Aspergillus terreus*, *Fusarium*, *Malassezia*, *Scedosporium* và *Trichosporon asahii* thường kháng amphotericin B [65].

1.3.1.2. Thuốc nhóm azole

Công thức cấu tạo thuốc nhóm này có hai (imidazole) hay ba phân tử nito (triazole) gắn với nhân azole. Các azole ức chế enzyme lanosterol 14 α -demethylase, ức chế quá trình tổng hợp ergosterol, tích lũy các sterol methyl hóa làm thay đổi cấu trúc và chức năng màng tế bào [66], [65]. Trong điều trị nhiễm nấm xâm lấn thường sử dụng các triazole như fluconazol, itraconazol, posaconazol, voriconazol. Fluconazol tác dụng mạnh nhất với nấm men *Candida sp*, *Cryptococcus*, tác dụng hạn chế với nấm sợi. Itraconazol tác dụng rộng, với *Aspergillus sp*, *B. dermatitidis*, *Candida sp*, *C. immitis*, *Cryptococcus*, *H. capsulatum*, *M. furfur*, *P. brasiliensis*, *T. mameffei*, *Scedosporium apiospermum* và *S. schenckii*. Ít tác dụng với *Fusarium*. Voriconazol tác dụng với *Aspergillus sp* (cả *A. fumigatus* kháng itraconazole), *Candida sp* (cả *C. glabrata*, *C. krusei*), *Cryptococcus*, *Fusarium sp*, *H. capsulatum*, *T. marneffei* và *Scedosporium apiospermum* [65]. Fluconazol có hiệu quả tương tự điều trị nhiễm nấm huyết do *Candida* với độc tính thấp hơn amphotericin B, chi phí rẻ hơn amphotericin B dạng kết hợp lipid [67].

1.3.1.3. Thuốc nhóm echinocandins

Echinocandins ức chế tổng hợp β 1-3 glucan, một thành phần của thành tế bào nấm. Hiện có một số thuốc được sử dụng trong lâm sàng như caspofungin, anidulafungin, micafungin [66]. Phổ tác dụng: Caspofungin có tác dụng với hầu hết *Candida sp* tuy nhiên *C. parapsilosis* và *C. krusei* kém nhạy, cũng có tác dụng với *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus* và *A. terreus*, *Pneumocystis jirovecii*, không tác dụng với *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Zygomycetes*, *Fusarium*. Là thuốc lựa chọn điều trị bệnh xâm lấn do *Candida* hay *Aspergillus*. Độc tính thấp, hiệu quả lâm sàng cao, cơ chế tác dụng đặc

biệt của chúng làm cho chúng trở thành những thuốc hứa hẹn điều trị kết hợp thuốc trong những trường hợp khó điều trị tuy nhiên chi phí cao [67].

1.3.1.4. *Flucytosin (5-FC)*

5-FC là một fluorine-substituted nucleoside, được phát triển làm thuốc chống ung thư nhưng có tác dụng điều trị bệnh nấm *Candida* và *Cryptococcus*. Khi vào tế bào chúng được khử amin (nhờ cytosine deaminase) thành 5-fluorouracil, sau đó gắn với RNA thay thế uracil, làm rối loạn chức năng RNA. Chúng cũng làm rối loạn tổng hợp DNA do một sản phẩm 5-fluorouracil ức chế enzyme thymidylate synthase trong tổng hợp thymidine nucleotides. 5-FC có tác dụng chọn lọc với nấm do được vận chuyển rất ít vào trong tế bào động vật và tế bào động vật không có cytosine deaminase. Phổ tác dụng hẹp (chỉ tác dụng với *Candida*, *Cryptococcus* và *Aspergillus fumigatus*) mặt khác bị kháng rất nhanh nên không dùng đơn độc, khi kết hợp amphotericin B chúng có tác dụng hiệp đồng [66].

1.3.2. **Độ nhạy của nấm với thuốc kháng nấm**

1.3.2.1. *Các kỹ thuật đánh giá độ nhạy của nấm với thuốc kháng nấm*

Việc đánh giá đáp ứng với thuốc kháng nấm của các chủng lâm sàng dựa trên các kỹ thuật *in vitro* khác nhau để xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC), dựa vào MIC mà một chủng được xếp loại là nhạy (S), trung gian (I) hoặc kháng (R), tương ứng với xác suất thành công điều trị cao (S), hiệu quả không chắc chắn (I) hoặc xác suất thất bại điều trị cao (R). Phân loại này dựa trên các điểm gãy lâm sàng (clinical breakpoints - CBPs) xác định bằng các giá trị ngưỡng dịch tễ học (ECV - epidemiological cutoff values) [68]. Các giá trị ECV thường chỉ có với những loài thường gặp, còn những loài ít gặp có thể lấy tương ứng với ECV của những loài thường gặp.

Hiện nay trên thế giới có hai quy trình kỹ thuật chuẩn xác định độ nhạy

của nấm với thuốc kháng nấm *in vitro*, áp dụng kỹ thuật nuôi cấy hòa loãng trên môi trường lỏng (broth microdilution (BMD) có độ tin cậy và tương đồng cao là của Viện tiêu chuẩn lâm sàng và xét nghiệm (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (của Mỹ) và Ủy ban thử nghiệm độ nhạy của vi sinh vật (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (châu Âu). Tuy nhiên những kỹ thuật này phức tạp, chỉ thực hiện được ở các phòng thí nghiệm chuyên sâu, khó áp dụng trong thực hành lâm sàng thường qui. Có một số bộ kit thương mại để xác định MIC như Etest (Biomerieux, Pháp), Vitek 2 (Biomerieux, Pháp), Sensititre YeastOne (Trek Diagnostic Systems, Mỹ) [69]. Vitek2 Compact (Biomerieux, Pháp) là một hệ thống tự động, cho phép định danh và xác định MIC của nấm, cho kết quả tương đồng với các kỹ thuật chuẩn, được sử dụng nhiều trong các phòng xét nghiệm lâm sàng [70], [71].

1.3.2.2. Độ nhạy của nấm với một số thuốc kháng nấm

- Độ nhạy của nấm *Candida* với thuốc kháng nấm

+ Độ nhạy với thuốc nhóm azole

Đáp ứng thuốc khác nhau tùy loài nấm. *C. albicans* thường nhạy với azoles và amphotericin B. *C. glabrata* ít nhạy với azoles và amphotericin B, *C. lusitaniae* và *C. guilliermondii* kháng tự nhiên với amphotericin B. *C. krusei* kém nhạy với tất cả các thuốc khác kể cả amphotericin B. *C. tropicalis* và *C. parapsilosis* có tăng MIC với phần lớn các thuốc [64]. *C. krusei* kháng tự nhiên với fluconazol. Nhìn chung, triazoles có hoạt tính kìm nấm với hầu hết *Candida* spp. [72].

Kháng mắc phải chủ yếu liên quan tới dùng thuốc kéo dài điều trị bệnh do *Candida* ở hầu họng hay thực quản, ít gặp hơn ở những bệnh khác (viêm âm đạo hay nấm huyết). Các azole mới (voriconazol, posaconazol và

raavuconazol) tác dụng mạnh hơn fluconazol hay itraconazol. Nghiên cứu trên 256.882 chủng *Candida* từ 1997 – 2007 trên toàn thế giới thấy tỷ lệ kháng fluconazol và voriconazol của một số loài hay gặp như *C. albicans* 1,4 và 1,2%, *C. parapsilosis* 4,1 và 1,8%, *C. tropicalis* 3,6% và 5,4%; *C. glabrata* có tỷ lệ kháng cao 15,7% và 10,0%, *C. krusei* 78,3 và 7,6%, *C. guilliermondii* 11,4 và 5,7% [46].

+ Độ nhạy với thuốc nhóm echinocandins: Echinocandin có tác dụng tốt với *Candida*, kể cả *Candida* kháng azole, rất hiếm gặp *Candida* kháng echinocandins, mặc dù vậy cũng có những thông báo *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* và *C. krusei* kháng echinocandin [19]. *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis* và *C. guilliermondii* có MIC với echinocandin cao hơn *C. albicans* [72].

+ Độ nhạy với thuốc nhóm polyene: Hiếm gặp *Candida* kháng amphotericin B, tuy nhiên thấy *C. krusei* và *C. glabrata* tăng MICs với amphotericin B. Nấm *C. lusitanae* và *T. beigeli* kháng tự nhiên với polyene (tỷ lệ *C. lusitanae* kháng amphotericin B khoảng 8% - 10%) [73].

+ Độ nhạy với thuốc flucytosin: Tỷ lệ kháng flucytosin tự nhiên thấp (1–2% chủng *Candida* và *C. neoformans*) tuy nhiên tỷ lệ kháng thu được tăng nhanh, do đó thuốc chỉ được dùng kết hợp amphotericin B [73].

- Độ nhạy của nấm sợi với một số thuốc kháng nấm

+ Độ nhạy của *Aspergillus*

Kháng azole đã được phát hiện từ 1999. Tình trạng đa kháng triazole có xu hướng ngày càng gia tăng (0 % giai đoạn 1945 – 1998 lên 12,34% giai đoạn 2002 – 2007 [74]. *A. terreus* kháng với amphotericin B. *A. flavus* và *A. fumigatus* thường nhạy tuy nhiên đã xuất hiện một vài chủng kháng thuốc. *A. ustus* và *A. lentulus* kháng với hầu hết các thuốc [73].

Ở Bắc Âu, Ấn Độ, Trung Quốc và Bắc Mỹ đã phân lập được một số mẫu *Aspergillus* từ môi trường kháng lại một hoặc nhiều azole, có thể liên quan sử dụng azole trong nông nghiệp. Ngoài ra, kháng có thể liên quan thời gian điều trị kéo dài. Việc thực hiện kháng nấm đồ thường qui với *Aspergillus* không được khuyến cáo, tuy nhiên có chỉ định làm kháng nấm đồ khi xuất hiện một mẫu *Aspergillus* nuôi cấy dương tính trong thời gian dùng thuốc kháng nấm. Kháng chéo thường gặp nhất là kháng cả itraconazol và voriconazol [75].

+ Độ nhạy của một số nấm khác

Fusarium thường kháng amphotericin B [73]. Giá trị MIC của phần lớn các thuốc với *Fusarium* thường cao, đặc biệt là với *F. solani* [76].

C. neoformans, *Fusarium spp*, *Scedosporium spp*. và *Zygomycetes* kháng tự nhiên với echinocandins [72].

1.3.2.3. Một số nghiên cứu về độ nhạy của nấm ở Việt Nam

Hà Tuấn Minh, Lê Hữu Doanh (2016) nghiên cứu độ nhạy của nấm *Candida* ở miệng bệnh nhân bị nấm miệng tại bệnh viện Da liễu trung ương thấy tỷ lệ nhạy với amphotericin B 94,2%, itraconazol 43,48%, ketoconazol 36,23%, fluconazol 20,29% [58]. Nghiên cứu của Nguyễn Thị Bình và cộng sự (2017) tại bệnh viện phong – da liễu trung ương Quy Hòa thấy tỷ lệ *Candida* kháng chung ketoconazol 36,3%; clotrimazol 11,7%; fluconazol 57,7%; itraconazol 76,5%; [59]. Hầu hết các NC trên đều áp dụng kỹ thuật khoan giấy, không có giá trị MIC nên rất khó so sánh với các tiêu chuẩn mới. Ngô Thị Minh Châu và cộng sự áp dụng kỹ thuật trên môi trường lỏng theo CLSI thấy tỷ lệ *C. albicans* kháng flucytosin là 19,82%; caspofungin là 15,66%; voriconazol 4,82%; itraconazol 3,61%; fluconazol 2,41%; chưa kháng amphotericin B [77]. Một nghiên cứu trên các chủng nấm phân lập được từ BN ở Việt Nam cho thấy *C. albicans* chưa kháng fluconazol tuy

nhiên chỉ có 61,7% chủng *C. tropicalis* nhạy với fluconazol, 46,7% nhạy với voriconazol [78]. Nhìn chung các nghiên cứu này cho thấy *Candida* phân lập được ở Việt Nam có tỷ lệ kháng cao với một số thuốc. Còn ít nghiên cứu về tình hình độ nhạy của nấm sợi tại Việt Nam với thuốc kháng nấm.

1.3.3. Điều trị nhiễm nấm ở bệnh nhân bỏng

1.3.3.1. Tiếp cận điều trị

Do nhiễm nấm có nhiều mức độ khác nhau, nhiễm nấm bề mặt có thể không cần điều trị nhưng có thể lại là nguy cơ của các nhiễm nấm xâm lấn. Hậu quả của nhiễm nấm xâm lấn rất nặng nề, tỷ lệ tử vong cao, việc chẩn đoán rất khó khăn nên nếu đợi đến khi chẩn đoán chắc chắn mới bắt đầu điều trị thì hiệu quả thấp. Số lượng thuốc kháng nấm rất hạn chế, chỉ có một số loại thuốc được sử dụng điều trị nhiều loại nấm khác nhau, do đó nếu chỉ định rộng rãi sẽ làm gia tăng áp lực thuốc, làm tăng tỷ lệ kháng thuốc. Mặt khác một số loại thuốc mới, có tác dụng mạnh lại có giá thành rất cao, hạn chế khả năng điều trị rộng rãi trên các BN, đặc biệt ở những nước kinh tế còn hạn chế như ở nước ta. Do đó vấn đề lựa chọn phác đồ điều trị gồm thời gian, loại thuốc, đường dùng, liều dùng rất khó khăn.

Hiện nay điều trị nhiễm nấm bao gồm các tiếp cận khác nhau như dự phòng, kinh nghiệm, định hướng, và điều trị mục tiêu.

Điều trị dự phòng (prophylactic) khi BN có nguy cơ cao (ghép tủy, ghép tạng đặc, thủng ruột) nhưng không có biểu hiện lâm sàng.

Điều trị kinh nghiệm (empirical) khi BN có yếu tố nguy cơ, có biểu hiện lâm sàng nghi ngờ nhiễm nấm xâm lấn (sốt mặc dù đã dùng kháng sinh phổ rộng, đặc biệt ở BN giám bạch cầu hạt).

Điều trị định hướng (pre-emptive) khi BN có yếu tố nguy cơ, có biểu hiện lâm sàng, có marker dương tính hay điểm gợi ý (chỉ số xâm thực nặng,

kết quả xét nghiệm kháng nguyên β D Glucan, galactomannan...).

Điều trị đặc hiệu (definitive hoặc targeted) khi có kết quả chẩn đoán xác định (cấy bệnh phẩm vô khuẩn hay bằng chứng mô học) [79].

- Dự phòng nhiễm nấm ở bệnh nhân bỏng

Do BN bỏng có nhiều yếu tố nguy cơ nhiễm nấm và hậu quả nhiễm nấm trên BN bỏng nặng nề, một số tác giả đề xuất dùng thuốc kháng nấm cho BN bỏng với ý nghĩa dự phòng. Có tác giả đề nghị dùng thuốc kháng nấm dự phòng khi BN bỏng > 50%, bỏng hô hấp và giảm bạch cầu, tuy nhiên hiện nay không có bằng chứng nào hỗ trợ chiến lược này [28]. Một số tác giả Trung Quốc khuyến cáo ở BN bỏng rộng (>50%) hay bỏng sâu, bỏng hô hấp, có đái đường, rối loạn miễn dịch liên quan bỏng, người già nên sử dụng thuốc kháng nấm từ ngày thứ 7 sau bỏng [80]. Fluconazol thường được sử dụng mặc dù không tác dụng với *Aspergillus*. Itraconazol ít hiệu quả, posaconazol có hiệu quả hơn trong dự phòng nấm bỏng. Một vài số liệu ủng hộ sử dụng micafungin. Không liệu trình dự phòng nào hiệu quả hoàn toàn [75]. Ít dùng polyene vì độc tính và các phản ứng phụ của chúng [80].

- Điều trị kinh nghiệm

Để có cơ sở chỉ định điều trị kinh nghiệm một số tác giả trên thế giới đã đưa ra các quy tắc dự báo nhiễm nấm xâm lấn ở những BN nằm điều trị ở ICU, chủ yếu áp dụng cho *Candida* (*Candida* Prediction Rules) để xác định những BN nào có lợi ích nhiều nhất khi điều trị thuốc kháng nấm kinh nghiệm. Các quy tắc đầu tiên dựa nhiều vào mức độ nhiễm nấm xâm thực, ví dụ BN nằm ICU có CI \geq 0,5 [23]. Sau đó các tác giả dựa nhiều hơn vào các chỉ tiêu lâm sàng, tiền sử bệnh. León C và cộng sự kết hợp giữa lâm sàng và xét nghiệm, đưa ra điểm *Candida* “*Candida* score” với BN nằm ICU, với điểm > 2,5 thì cần điều trị nấm [81]. Ostrosky-Zeichner xác định những BN

nằm ở ICU có nguy cơ bao gồm hô hấp nhân tạo hoặc đặt catheter tĩnh mạch trung ương (CVC) và ít nhất 1 trong 2 yếu tố sau: TPN, lọc máu, phẫu thuật lớn, viêm tụy, dùng steroid và thuốc ức chế miễn dịch khác [26]. Một số tác giả khác như cũng đưa ra những qui tắc dự đoán như Hermsen, Guillamet, Playford nhưng đặc điểm chung của các quy tắc này là giá trị dự báo dương thấp; giá trị dự báo âm rất cao do đó chỉ phù hợp để xác định BN nào ít cần điều trị thuốc kháng nấm nhất [27], [48].

Theo hướng dẫn của Hiệp hội bệnh truyền nhiễm Mỹ (IDSA 2016) điều trị kháng nấm kinh nghiệm BN không giảm bạch cầu hạt, nằm ở ICU, nghi ngờ nấm *Candida* xâm lấn nên được xem xét. Thuốc kháng nấm theo kinh nghiệm điều trị nên được bắt đầu càng sớm càng tốt ở những BN có các yếu tố nguy cơ và những người có dấu hiệu lâm sàng của sốc nhiễm trùng [82].

Dựa trên các khuyến cáo điều trị kinh nghiệm ở những đối tượng BN khác, một số khuyến cáo điều trị kinh nghiệm nhiễm nấm ở BN bỏng đã được đưa ra. Ví dụ điều trị kinh nghiệm ở giảm BC trung tính, vẫn sốt mặc dù kháng sinh phổ rộng [83], khi BN có sốt kéo dài (96 h), giảm bạch cầu hạt (10 ngày) [79]. Thuốc sử dụng thường là fluconazol, nếu tỷ lệ kháng fluconazol > 24%, nên sử dụng kinh nghiệm micafungin, caspofungin, mặc dù với chi phí cao hơn [10], [79].

- Điều trị định hướng

Khái niệm định hướng “pre-emptive” chưa thống nhất, tuy nhiên mục tiêu là hạn chế sử dụng thuốc, chỉ sử dụng ở giai đoạn sớm nhiễm nấm xâm lấn để giảm độc tính, chi phí, sự xuất hiện các chủng kháng thuốc và cải thiện kết quả điều trị BN. Liệu pháp định hướng có thể là một cách tiếp cận đầy hứa hẹn đối với IFI, đặc biệt là ở BN ICU, dựa vào các xét nghiệm mới (mannan, anti-mannan, β - D glucan hay phản ứng PCR), có giá trị dự báo dương (PPV) cao hơn so với CI [84]. Mặc dù nhạy và đặc hiệu hơn về lý thuyết, tuy nhiên

những kỹ thuật này vẫn còn trong giai đoạn nghiên cứu, và sự hữu ích lâm sàng của chúng vẫn chưa được thiết lập [85]. Liệu pháp định hướng được sử dụng khá phổ biến cho BN ICU ở Châu Âu, chiếm từ 18,2% đến 28% liệu trình kháng nấm ở các ICU [86]. Chiến lược định hướng dựa trên sự phát hiện BDG ngày càng thay thế cho điều trị dự phòng và kinh nghiệm [87]. Mặc dù vậy không có khuyến cáo về liệu pháp pre-emptive trong hướng dẫn của IDSA năm 2016 [82]. Cần theo dõi biến động *Candida* xâm thực ở BN phẫu thuật và các quy tắc dự đoán dựa trên các yếu tố nguy cơ kết hợp có thể được sử dụng để xác định các BN ICU có nguy cơ cao *Candida* xâm lấn và có lợi ích khi điều trị hướng [88].

- Điều trị mục tiêu

+ Điều trị bệnh nấm xâm lấn do *Candida*

Trong số các thuốc kháng nấm có sẵn, echinocandin và triazole cho thấy những lợi thế so với các imidazole và polyene về hiệu quả, độ đặc hiệu, an toàn và sự tuân thủ của BN. Thuốc khởi đầu thường dùng nhất là amphotericin B hoặc caspofungin, với liệu trình xuống thang với voriconazol, itraconazol hoặc fluconazol tùy thuộc vào loài hoặc mức độ bệnh [15]. Theo IDSA, fluconazol vẫn giá trị ở BN bệnh không nặng và những người không mắc loài *Candida* kháng thuốc, trong khi ESCMID không ưu tiên việc sử dụng fluconazol. Các echinocandins (anidulafungin, caspofungin và micafungin) được ưu tiên hơn fluconazol vì hoạt tính kháng nấm tốt, sự xâm nhập của màng sinh học tốt, khả năng dung nạp tốt, và ít tương tác với các thuốc khác [89]. Amphotericin B nên được dành riêng cho bệnh ở nội tạng như viêm màng não, viêm nội tâm mạc hoặc viêm tủy xương, hoặc cho những BN có đồng nhiễm hoặc nghi ngờ đồng nhiễm với các mầm bệnh nấm khác. Hiện nay không có bằng chứng về lợi ích đáng kể trong việc kết hợp các thuốc kháng nấm trong điều trị IC [90].

Chỉ định điều trị phụ thuộc loài: Điều trị bệnh do nấm *C. glabrata* nên dùng echinocandin, không nên chuyển sang fluconazol hoặc voriconazol mà không có xác nhận sự nhạy; sử dụng fluconazol hoặc voriconazol ở những BN ổn định và nuôi cấy âm tính. *C. parapsilosis*: Fluconazol là lựa chọn điều trị ưu tiên ở BN không giảm BC; ít dùng echinocandins vì hiệu quả giảm *in vitro* và các báo cáo về kháng echinocandin của *C. parapsilosis*; chỉ dùng amphotericin B nếu không có fluconazol hoặc dạng lipit của AmB. Nếu BN đang điều trị echinocandin, ổn định lâm sàng, và các kết quả nuôi cấy tiếp theo âm tính, hoàn thành liệu pháp echinocandin là chấp nhận được. *C. krusei*: Echinocandins là điều trị ưu tiên, xuống thang fluconazol đường uống hoặc voriconazol. Ở những BN giảm bạch cầu hạt, các lựa chọn điều trị thay thế là LFAmB (B) và voriconazol (B) [91].

Thời gian điều trị phụ thuộc vào mức độ của tổn thương cơ quan. Với nhiễm nấm huyết không biến chứng, thời gian điều trị là 14 ngày kể từ lần nuôi cấy máu âm tính đầu tiên, cần nuôi cấy máu hàng ngày cho đến khi âm tính [92], [89]. Thời gian này chỉ áp dụng cho những BN không có bệnh lan tràn, áp xe, hoặc bệnh nội tạng. Do đó, tất cả các BN nhiễm *Candida* huyết cần thực hiện các xét nghiệm chẩn đoán để phát hiện tổn thương cơ quan [90].

Liệu trình xuống thang: Để giảm sự xuất hiện kháng echinocandin (đặc biệt trong trường hợp *C. glabrata*) và tránh chi phí cao khi dùng echinocandin, cả IDSA và ESCMID đều khuyến cáo nên dùng chiến lược xuống thang (chuyển sang fluconazol) trong vòng 10 ngày trong trường hợp BN ổn định lâm sàng, không giảm BC, cấy máu âm tính và chủng *Candida* nhạy fluconazol. Có thể áp dụng các tiêu chí khác như xác định được chủng nhạy trên một BN lâm sàng ổn định với kết quả nuôi cấy máu âm tính [93]. Một số tác giả đề xuất 'xuống thang sớm' (ví dụ sau 3-5 ngày) tuy nhiên các tiêu chí cho 'xuống thang sớm' không được xác định rõ ràng [92], [94].

Nghiên cứu ở những BN nặng đã cho thấy tính khả thi của việc xuống thang sớm khi không thấy có kết quả bất lợi về tỷ lệ tử vong [89].

+ Điều trị bệnh nấm xâm lấn do *Aspergillus*

Thuốc điều trị IA bao gồm triazole (voriconazol, itraconazole, posaconazole), echinocandin (caspofungin, micafungin) và amphotericin B (AmB). Trong đó voriconazol là thuốc ưu tiên; caspofungin, posaconazole, lipid-associated AmB là thuốc thay thế. Lựa chọn điều trị IA cấp tính ban đầu là dùng thuốc đường tĩnh mạch. Thời gian điều trị IA có thể từ 3 tháng đến vài năm tùy thuộc đáp ứng và tình trạng miễn dịch của BN [75].

Khuyến cáo của IDSA (2016) điều trị IA: Voriconazole được ưu tiên sử dụng để điều trị và phòng ngừa IA ở hầu hết BN. Amphotericin B (AmB) deoxycholate và dẫn xuất lipid khi không thể dùng voriconazol. AmB chỉ nên dùng ở những nơi hạn chế nguồn lực, không có các thuốc thay thế. Dùng các công thức lipid của AmB khi chống chỉ định hoặc không dung nạp các azole. Echinocandin (micafungin hoặc caspofungin) có thể được sử dụng trong trường hợp chống chỉ định azole và polyene. Echinocandin không nên dùng đơn độc và không dùng điều trị ban đầu. Thời gian điều trị IA tối thiểu là 6-12 tuần, phụ thuộc vào mức độ và thời gian ức chế miễn dịch, vị trí tổn thương, đáp ứng lâm sàng [95].

+ Điều trị bệnh nấm xâm lấn do *Fusarium*

Bệnh nấm xâm lấn do *Fusarium* thường khó điều trị do xu hướng xâm nhập mạch máu và tính kháng thuốc của *Fusarium* [76]. Bệnh nhân bỏng có thể nhiễm *Fusarium* tại vết thương hay nhiễm nấm huyết [96]. *F. solani* là tác nhân thường gặp nhất trong số các loài *Fusarium* spp. gây bệnh ở người [97], [98]. Voriconazol có hiệu quả cao nhất trong điều trị nhiễm *Fusarium* so với các azole khác hay echinocandin nhưng thuốc này cũng không được khuyến

cáo trong trường hợp mắc *F. solani* hay *F. verticillioides* [97]. Phần lớn các nhà lâm sàng bắt đầu điều trị bằng amphotericin B hay voriconazol [76]. Hiệu quả điều trị bệnh nấm *Fusarium* xâm lấn thường kém tuy nhiên ở BN bỏng tỷ lệ tử vong do nhiễm trùng vết thương do *Fusarium* thường thấp [96].

1.3.3.2. Đánh giá kết quả điều trị nhiễm nấm trên bệnh nhân bỏng

Đánh giá kết quả điều trị là vấn đề khó khăn. Trên một BN bỏng có rất nhiều can thiệp như hồi sức chống sốc, kháng sinh chống nhiễm khuẩn, phẫu thuật cắt hoại tử, ghép da che vết thương... Các biểu hiện lâm sàng, cận lâm sàng của bệnh nhân cũng là kết quả của rất nhiều yếu tố toàn thân, tại chỗ do đó đánh giá kết quả của một liệu trình riêng biệt là rất khó khăn.

Ngoài các chỉ tiêu lâm sàng, cận lâm sàng như thân nhiệt, các chỉ số xét nghiệm huyết học, sinh hóa... một số nghiên cứu tập trung đánh giá các chỉ tiêu xét nghiệm nấm, sự xuất hiện các biến chứng nặng ở các nhóm điều trị khác nhau (nhiễm nấm huyết, nhiễm nấm xâm lấn...), kết quả cuối cùng (tử vong/sống). Cortegiani đánh giá trên các chỉ tiêu như tỷ lệ tử vong, tỷ lệ nhiễm nấm xâm lấn, nguy cơ nhiễm nấm xâm thực [99]. Fernández-ruiz và cộng sự đánh giá dựa trên tỷ lệ sống hoặc cấy máu âm tính [100]. Lopez-Cortes so sánh tỷ lệ tử vong trong vòng 30 ngày ở các nhóm dùng thuốc kháng nấm khác nhau [101]. Cui và cộng sự (2017) hồi cứu trên 268/306 (87,6%) bệnh nhân ICI được điều trị kháng nấm thấy điều trị bằng thuốc kháng nấm kinh nghiệm là một yếu tố dự báo độc lập để giảm tỷ lệ tử vong ở bệnh nhân ICU ([102]. Timsit và cộng sự (2016) đánh giá kết quả điều trị kinh nghiệm cho thấy micafungin chỉ làm giảm tỷ lệ nhiễm nấm xâm lấn mới mà không thay đổi tỷ lệ sống sót [103].

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, phương pháp nghiên cứu mục tiêu 1: Xác định tỷ lệ và yếu tố liên quan nhiễm nấm ở bệnh nhân bỏng nặng

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

- Bệnh nhân bỏng nhiệt nóng, mức độ nặng, điều trị tại khoa Hồi sức cấp cứu, bệnh viện Bỏng quốc gia, Học viện Quân y.

+ Tiêu chuẩn lựa chọn:

Bệnh nhân bỏng nặng, điều trị tại khoa Hồi sức cấp cứu.

Không phân biệt tuổi, giới.

Đồng ý tham gia nghiên cứu và cung cấp bệnh phẩm, thông tin.

+ Tiêu chuẩn xác định bệnh nhân bỏng nặng (theo Nguyễn Ngọc Tuấn, 2018) [1].

Căn cứ theo diện tích chung và diện tích bỏng sâu

Trẻ em (< 16 tuổi) và người già (> 65 tuổi): Diện tích bỏng chung > 10%, bỏng sâu > 5%.

Người lớn (16-65 tuổi): Diện tích bỏng chung > 20%, bỏng sâu > 10%.

+ Tiêu chuẩn loại trừ:

Bệnh nhân nằm ở khoa Hồi sức cấp cứu nhưng trong thời gian ngắn (dưới 3 ngày).

Phụ nữ có thai, cho con bú.

Bệnh nhân bỏng do nguyên nhân khác: Hóa chất, tia xạ

Bệnh nhân không đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.1.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- Thời gian nghiên cứu

Từ tháng 3/2017 – 12/2019.

- Địa điểm nghiên cứu

Khám, thu thập thông tin, lấy mẫu xét nghiệm: Khoa Hồi sức cấp cứu, bệnh viện Bông quốc gia, Học viện Quân y.

Các kỹ thuật xét nghiệm phát hiện nấm: Phòng thí nghiệm nấm, bộ môn Ký sinh trùng và côn trùng, Học viện Quân y.

Kỹ thuật xét nghiệm phát hiện nấm trong mô sinh thiết bằng kỹ thuật nhuộm mô bệnh học: Khoa Giải phẫu bệnh, bệnh viện 103, Học viện Quân y.

2.1.3. Phương pháp nghiên cứu

2.1.3.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả, phân tích, tiền cứu.

2.1.3.2. Cỡ mẫu nghiên cứu

Được tính theo công thức nghiên cứu tỷ lệ

$$n = Z_{1-\alpha/2}^2 \frac{1-p}{p\varepsilon^2}$$

Trong đó n: Số mẫu tối thiểu

p: Tỷ lệ nhiễm nấm ước tính

α : Mức ý nghĩa thống kê

$Z_{1-\alpha/2}$: Hệ số tin cậy,

ε : Sai số tương đối.

Với các thông số lựa chọn là độ tin cậy 95%; $Z_{1-\alpha/2} = 1,96$; $\varepsilon=0,1$; tỷ lệ ước tính (p) = 50% (do chưa có điều tra về tỷ lệ nhiễm nấm trên bệnh nhân bông), tính được cỡ mẫu = 385 (bệnh nhân).

Luận án thu thập thông tin của 400 BN.

2.1.3.3. Phương pháp chọn mẫu

Chọn chủ đích, toàn bộ các bệnh nhân đáp ứng tiêu chuẩn nghiên cứu

đến khi đủ cỡ mẫu.

2.1.3.4. Nội dung nghiên cứu

- Xác định tỷ lệ nhiễm nấm xâm thực, nhiễm nấm vết thương, nhiễm nấm huyết, nhiễm nấm xâm lấn; chỉ số nấm xâm thực (CI).

- Xác định yếu tố liên quan nhiễm nấm xâm thực, xâm lấn trên BN bỏng nhiệt.

- Giới hạn phạm vi nghiên cứu

Chỉ xác định tỷ lệ nhiễm nấm, yếu tố liên quan ở BN bỏng nhiệt, mức độ nặng, không nghiên cứu ở BN bỏng do nguyên nhân khác, bỏng mức độ nhẹ.

Chỉ xác định các yếu tố liên quan nhiễm nấm trên BN bỏng, không xác định các yếu tố liên quan ở môi trường, lây nhiễm chéo trong bệnh viện.

2.1.3.5. Phương pháp xác định biến số và đo lường biến số

- Diện tích bỏng: Được tính bằng một hoặc phối hợp nhiều phương pháp với nhau tùy từng trường hợp cụ thể [1]:

Phương pháp con số 9 phân chia cơ thể thành các vùng có diện tích 9% (đầu mặt cổ, chi trên (2 vùng x 9), thân trước (2 vùng x 9), thân sau (2 vùng x 9), một chi dưới (2 vùng x 9), vùng tầng sinh môn 1%; áp dụng với trường hợp bỏng một vùng rộng.

Phương pháp Blokhin tính diện tích một bàn tay tương ứng 1 – 1,25% diện tích cơ thể, áp dụng với bỏng rải rác.

Ở trẻ em cũng dùng các qui tắc trên nhưng có điều chỉnh với diện tích đầu mặt cổ tăng lên, diện tích chi dưới giảm đi.

- Độ bỏng: 5 mức độ I, II, III, IV, V theo qui định áp dụng tại bệnh viện Bỏng quốc gia, do bác sĩ chuyên ngành bỏng xác định. Bỏng độ I là tổn thương lớp nông của lớp sừng; bỏng độ II: Tổn thương các lớp biểu bì nhưng chưa tổn thương tế bào đáy, tế bào mầm; bỏng độ III tổn thương toàn bộ biểu

bì tới một phần trung bì, các phần phụ của da nằm sâu ở trung bì còn nguyên vẹn, bỏng độ III còn được chia thành 2 nhóm nhỏ là bỏng trung bì nông và trung bì sâu; bỏng độ IV tổn thương toàn bộ lớp da hoặc bỏng sâu tới lớp dưới da; bỏng độ V tổn thương toàn bộ da, các bộ phận dưới da. Bỏng nông gồm bỏng độ I, II và III; bỏng sâu là bỏng độ IV và V [1].

- Bỏng hô hấp: Dựa theo các dấu hiệu lâm sàng. Chẩn đoán xác định bỏng hô hấp dựa vào hình ảnh nội soi khí phế quản [104].

- Điểm SOFA tính theo hướng dẫn của Hiệp hội đồng thuận quốc tế về nhiễm trùng, nhiễm trùng huyết lần thứ 3 (phụ lục) [105].

- Nhiễm trùng nặng: Rối loạn chức năng cơ quan (SOFA \geq 2 điểm) đe dọa tính mạng do đáp ứng của cơ thể với nhiễm trùng [105], [106].

- Sốc bỏng: Trạng thái suy sụp đột ngột toàn bộ chức năng sống quan trọng của cơ thể do chấn thương bỏng gây nên [1].

- Chẩn đoán tăng đường huyết

Glucose máu lúc đói $>$ 126 mg/dl (7 mmol/l) hoặc glucose máu bất kỳ \geq 200 mg/dl (11,1 mmol/l), trong ít nhất 2 lần xét nghiệm.

BN không có tiền sử đái tháo đường.

Xảy ra trong thời gian nằm viện và trở về bình thường khi BN ra viện hoặc khi bệnh lý chính được điều trị ổn định [1].

- Thời gian nằm điều trị ở ICU dài ngày: \geq 15 ngày [107].

2.1.3.6. Các chỉ số đánh giá

- Các chỉ số đánh giá tỷ lệ nhiễm nấm

Tỷ lệ nhiễm nấm xâm thực: Số BN nhiễm nấm xâm thực (có nấm *Candida* ở bệnh phẩm không vô khuẩn gồm dịch đờm, dịch họng, nước tiểu, phân, dịch bề mặt vết thương)/tổng số BN.

Chỉ số nấm xâm thực: $CI = \frac{\text{tổng số mẫu (không vô khuẩn) mọc nấm Candida}}{\text{tổng số mẫu (không vô khuẩn) cấy nấm}}$

Nhiễm nấm xâm thực nặng: Khi chỉ số $CI \geq 0,5$ [25].

Tỷ lệ nhiễm nấm vết thương: Số BN nhiễm nấm vết thương (có kết quả chẩn đoán mô học và / hoặc xét nghiệm trực tiếp dương tính + nuôi cấy mẫu sinh thiết dương tính [7])/tổng số BN.

Tỷ lệ nhiễm nấm huyết: Số BN nhiễm nấm huyết (có ít nhất một mẫu cấy máu dương tính với nấm men)/tổng số BN.

Tỷ lệ nhiễm nấm xâm lấn: Số BN nhiễm nấm xâm lấn (nhiễm nấm vết thương và/hoặc nhiễm nấm huyết)/tổng số BN.

Tỷ lệ nhiễm nấm: Số BN nhiễm nấm /tổng số BN.

- Chỉ số xác định yếu tố liên quan nhiễm nấm trên bệnh nhân bỏng nhiệt

Liên quan tổn thương bỏng: Nhiễm trùng nặng, sốc bỏng, bỏng hô hấp, độ nặng theo thang điểm Apache.

Liên quan với các can thiệp điều trị: Hô hấp nhân tạo, đặt catheter, sond tiểu, dùng thuốc ức chế miễn dịch.

2.1.3.7. Các kỹ thuật áp dụng trong nghiên cứu

- Kỹ thuật khám, đánh giá, mô tả tổn thương: do các bác sĩ chuyên ngành bỏng thực hiện, theo qui trình của bệnh viện Bỏng quốc gia.

- Kỹ thuật thu thập bệnh phẩm:

Dịch vết thương: Dùng tăm bông vô khuẩn quệt vào tổn thương, diện tích 5 x 5 cm, nếu tổn thương khô thì lấy nước muối sinh lý làm ẩm tăm bông, quệt vào vùng tổn thương, cho vào ống đựng tăm bông.

Dịch miệng, họng: Quệt tăm bông vô trùng vào miệng, họng cho vào hộp vô trùng.

Phân: Lấy 3 - 5 g bằng tăm bông, cho vào ống đựng tăm bông vô trùng.

Nếu không lấy được phân dùng tăm bông vô trùng quệt ở nếp nhăn hậu môn.

Nước tiểu: Lấy 5 - 10 ml qua sonde tiểu, cho vào ống nghiệm vô trùng.

Đờm, bệnh phẩm hô hấp: Hút đờm, dịch hô hấp, cho vào hộp vô trùng.

Mô sinh thiết: Sinh thiết bằng kim ở vùng tổn thương, lấy từ khu vực có nghi ngờ nhiễm nấm nặng nhất, kích thước 0,5 cm x 0,5 cm với độ dày toàn bộ lớp tổn thương của vết thương cho đến khi chạm vùng mô lành; lấy 3 mảnh cho ngay vào nước muối sinh lý, cồn và formalin trong hộp vô trùng.

Máu: Lấy máu tĩnh mạch, 12 ml máu với BN người lớn và 6 ml ở trẻ em.

+ Thời điểm lấy bệnh phẩm:

Đờm/dịch hô hấp, dịch miệng/họng, phân, nước tiểu: Lấy vào buổi sáng, ngày 1 - 3 của tuần đầu tiên sau bông và các tuần tiếp theo.

Dịch vết thương: Khi BN thay băng, sau khi đã làm sạch tổ chức hoại tử, lấy hàng tuần, ngày 1- 3 của tuần đầu tiên sau bông và các tuần tiếp theo.

Mô sinh thiết, máu: Ngày 1 - 3 của tuần đầu tiên sau bông và các tuần tiếp theo; khi bệnh nhân có sốt hoặc các dấu hiệu nghi ngờ nhiễm trùng tại chỗ vết thương (vết thương phù nề, hoại tử ướt, dịch tiết nhiều...).

- Kỹ thuật phát hiện nấm trong bệnh phẩm:

+ Kỹ thuật nhuộm soi dịch vết thương, dịch miệng/ họng, đờm/dịch hô hấp: Trong dung dịch KOH theo kỹ thuật thường qui.

+ Kỹ thuật nhuộm mô bệnh học: Mô sinh thiết cố định trong formalin, nhuộm hematoxylin, Periodic acid Schiff (PAS), soi kính hiển vi phát hiện, mô tả nấm.

+ Kỹ thuật nuôi cấy, phân lập nấm từ bệnh phẩm dịch, mô sinh thiết: Nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy nấm (Sabouraud), ủ ở nhiệt độ phòng và 37°C. Theo dõi các mẫu nuôi cấy, kiểm tra hàng ngày, phát hiện nấm mọc. Nếu sau 6 tuần không phát hiện nấm mọc mẫu được coi là âm tính.

+ Kỹ thuật nuôi cấy, phân lập nấm từ máu: Máu thu thập được nuôi cấy trong bình cấy Bactec, ủ ở nhiệt độ 37°C. Nếu sau 6 tuần không phát hiện nấm mọc mẫu được coi là âm tính.

- Kỹ thuật xác định yếu tố liên quan nhiễm nấm

+ Xác định các yếu tố liên quan: Thu thập thông tin BN theo bệnh án NC.

+ So sánh nhóm nhiễm – không nhiễm để xác định yếu tố liên quan

2.1.3.8. Vật liệu nghiên cứu

- Bệnh án NC (phụ lục).

- Dụng cụ thu thập bệnh phẩm: Tăm bông vô trùng, ống nghiệm vô trùng, dụng cụ sinh thiết da, bơm kim tiêm vô trùng...

- Dụng cụ xét nghiệm nấm bằng phương pháp nhuộm soi: Dung dịch KOH 10 – 20%, dung dịch xanh methylen, thuốc nhuộm hematoxylin eosin, thuốc nhuộm Periodic acid Schiff (PAS)...

- Môi trường nuôi cấy nấm: Sabouraud Chloramphenicol agar, Malt Extract agar, bình cấy Bactec.

- Tủ ấm nuôi cấy nấm.

2.1.3.9. Phân tích và xử lý số liệu

Các số liệu được phân tích và xử lý theo phương pháp thống kê y sinh học, sử dụng phần mềm SPSS 16.0;

Các số liệu định lượng được thể hiện bằng số trung bình, độ lệch chuẩn; so sánh bằng student t-test. Các số liệu định tính được thể hiện bằng tỷ lệ, so sánh bằng test khi bình phương (chi-square).

Hồi qui đa biến: Phân tích các biến có $p < 0,05$ khi phân tích đơn biến bằng hồi qui logistic, phương pháp enter.

Giá trị $p < 0,05$ được coi là có ý nghĩa thống kê.

2.2. Đối tượng, phương pháp nghiên cứu mục tiêu 2: Xác định thành phần loài nấm phân lập được ở bệnh nhân bỏng nặng

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Nấm: Phân lập được trên BN bỏng tham gia trong mục tiêu 1.

2.2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- Thời gian nghiên cứu

Từ tháng 3/2017 – 12/2019.

- Địa điểm nghiên cứu

Lấy mẫu xét nghiệm: Bệnh viện Bỏng quốc gia, Học viện Quân y.

Các kỹ thuật xét nghiệm định danh nấm: Phòng thí nghiệm Nấm, bộ môn Ký sinh trùng và côn trùng, Học viện Quân y, Phòng xét nghiệm Nấm, khoa Cận lâm sàng, bệnh viện Bỏng quốc gia, Học viện Quân y.

2.2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.2.3.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu thực nghiệm trong phòng thí nghiệm.

2.2.3.2. Cỡ mẫu nghiên cứu

Toàn bộ các mẫu nấm phân lập được từ BN bỏng tham gia mục tiêu 1.

2.2.3.3. Phương pháp chọn mẫu

- Định loài dựa vào đặc điểm hình thái, sinh hóa: toàn bộ các mẫu nấm phân lập được từ BN bỏng tham gia mục tiêu 1.

- Định loài bằng kỹ thuật sinh học phân tử:

Nấm sợi: Các chủng nấm sợi phân lập được từ mô sinh thiết.

Nấm men: Các chủng phân lập được từ máu, mô sinh thiết; các chủng được định danh loài nấm men hiếm gặp, một số chủng đại diện loài hay gặp.

2.2.3.4. Nội dung nghiên cứu

- Định danh loài nấm men, nấm sợi bằng các kỹ thuật truyền thống: Hình thái, đặc điểm sinh hóa.

- Định danh loài nấm men, nấm sợi bằng kỹ thuật sinh học phân tử.

2.2.3.5. Các chỉ số đánh giá

- Thành phần loài nấm men, nấm sợi.

- Thành phần loài gây nhiễm nấm xâm thực, nhiễm nấm vết thương, nhiễm nấm huyết.

2.2.3.6. Các kỹ thuật áp dụng trong nghiên cứu

- Định danh nấm trong tiêu bản mô bệnh học

Kỹ thuật: Mẫu sinh thiết vết bỏng sau khi được sinh thiết cho ngay vào dung dịch cố định (formalin 10%) sau đó chuyển sang khoa Giải phẫu bệnh, bệnh viện 103 thực hiện kỹ thuật nhuộm hematoxylin eosin (HE) và Periodic acid Schiff (PAS). Quan sát tiêu bản để phát hiện, định danh nấm.

- Kỹ thuật nuôi cấy các chủng nấm sợi lên các đĩa môi trường MEA.

Các chủng nấm sợi phân lập được từ mẫu bệnh phẩm sẽ được cấy chuyển sang môi trường malt extract agar (MEA).

Nuôi cấy trong tủ ẩm 25°C, 5-7 ngày, tiến hành quan sát.

- Quan sát hình ảnh đại thể khuẩn lạc bằng mắt thường và kính lúp. Quan sát, xác định:

Tốc độ phát triển của khuẩn lạc.

Hình dáng khuẩn lạc.

Kích thước khuẩn lạc: Đường kính, chiều dày.

Dạng mặt khuẩn lạc: Xốp bông, dạng len, dạng nhung, bằng phẳng hay gợn sóng, tạo khía hay không, chia vòng đồng tâm hay không.

Màu sắc khuẩn lạc, đồng nhất hay chia vùng màu sắc.

Màu sắc mặt trái khuẩn lạc và môi trường xung quanh.

Sự hình thành giọt tiết (màu sắc, to, nhỏ).

Mùi khuẩn lạc.

Các cấu trúc khác: Bó sợi, bó giá, các cấu trúc mang bào tử trần như đĩa giá, túi giá, đệm nấm, hạch nấm.

- Làm tiêu bản soi kính hiển vi:

Nhỏ một giọt nước muối sinh lý lên chính giữa lam kính.

Khử trùng que cấy, dùng que cấy lấy một lượng nhỏ sợi nấm và cơ quan sinh sản đặt vào giọt nước muối sinh lý. Đậy lam lên và soi kính.

- Quan sát các đặc điểm vi thể:

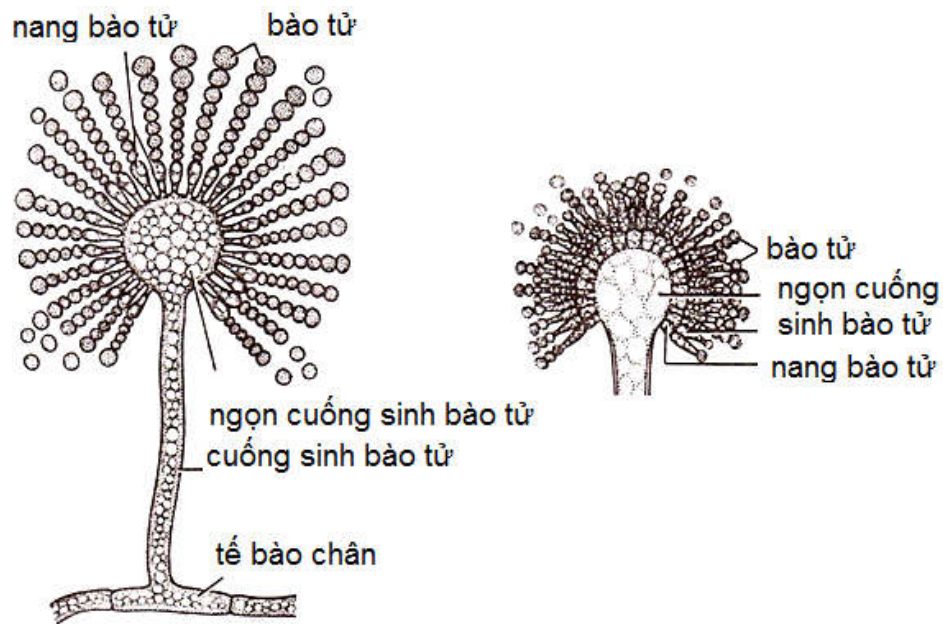
Sợi nấm: Có vách ngăn, không có vách ngăn, máu.

Cuống sinh bào tử: Kích thước, bề mặt (nhẵn, có gai hay nốt sần...); có vách ngăn hay không; có các cấu trúc đặc biệt như tế bào chân, sợi cứng, tầng trưởng ở gốc hoặc ở ngọn, có hoặc không có dạng hình thái đặc biệt như bó giá đệm giá; nhánh bào tử trần (số lượng, kích thước, bề mặt, cách sắp xếp).

Cấu trúc mang bào tử gồm có nang bào tử và nang bào tử nhỏ: Hình dáng, kích thước, màu sắc, bề mặt, cuống nang, nhánh nang, bào tử nang.

Tế bào sinh bào tử: Vị trí, hình dạng, kích thước, màu sắc, số lượng, cách sắp xếp đơn độc hay thành cụm ...

Bào tử: Kiểu phát sinh bào tử, hình dạng, kích thước, màu sắc, bề mặt (nhẵn, gồ ghề, có gai), cách sắp xếp (đơn độc, chuỗi khi non, chuỗi khi già), cách thức giải phóng bào tử khỏi chuỗi...



Hình 2.1. Hình ảnh vi thể của *Aspergillus*

Nguồn Raper & Fennell, 1965 [34]

Thể quả (nếu có): Vị trí, số lượng, hình dạng, kích thước, màu sắc, bề mặt, túi bào tử...

- Kỹ thuật định danh theo khóa phân loại:

Từ các đặc điểm đã xác định được, căn cứ vào các khoá phân loại nấm sợi để định danh tên loài của chủng nghiên cứu.

Các khoá phân loại gồm phân loại *Aspergillus* theo Raper và Fennell [34], phân loại *Fusarium* theo Booth [35].

- Định danh nấm men dựa vào đặc điểm hình thái khuẩn lạc khi nuôi cấy trên môi trường Brilliance Candida Agar

+ Nguyên lý

Môi trường Brilliance Candida Agar chứa hai cơ chất để phát hiện sự hiện diện của hai enzyme đích:

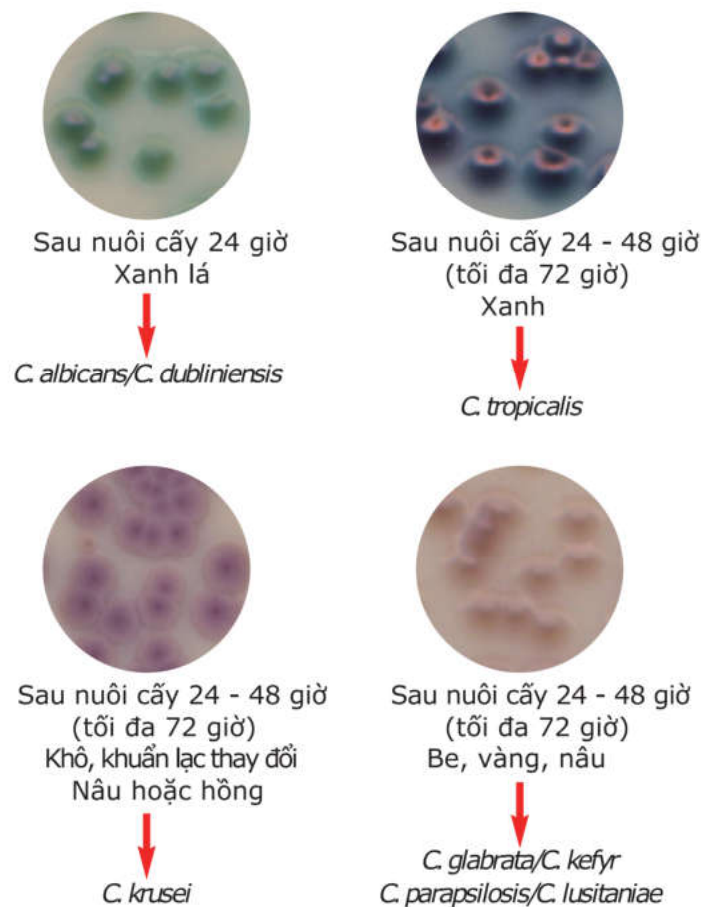
X-NAG (5-bromo-4-chloro-3-indolyl N acetyl β -D-glucosaminide) phát

hiện hoạt động của hexosaminidase.

BCIP (muối 5-bromo-6-chloro-3-indolyl phosphate p-toluidine) phát hiện hoạt tính phosphatase kiềm.

+ Kỹ thuật

Mẫu nấm được cấy lên môi trường thạch. Ủ nấm trong điều kiện hiếu khí, ở nhiệt độ 30°C. Kiểm tra sự phát triển của *Candida* spp. sau 24; 48 và 72 giờ. Dựa vào màu sắc, tính chất khuẩn lạc để định danh nấm



Hình 2.2. Màu sắc nấm *Candida* trong môi trường Brilliance Candida Agar

(theo hướng dẫn của nhà sản xuất)

- Định danh nấm men bằng máy VITEK 2 – COMPACT (Pháp).

+ Nguyên lý

Trên các thẻ (card) chế sẵn có chứa môi trường với các cơ chất khác nhau. Các khuẩn lạc nấm thuần được hòa trong 3ml dung dịch natri clorua 0,45% để tạo huyền dịch đồng nhất, sau đó được máy hút vào các giếng trên thẻ xét nghiệm. Máy sẽ giám sát sự phát triển và hoạt tính của nấm trong các giếng của thẻ xét nghiệm bằng bộ phận đo quang học của máy. Phần mềm so sánh kết quả thu được với cơ sở dữ liệu để đưa ra kết quả định danh.

+ Vật liệu, thiết bị, qui trình chạy: Theo cung cấp và hướng dẫn của nhà sản xuất (phụ lục).

- Định danh nấm bằng kỹ thuật sinh học phân tử: Sau khi có kết quả định danh bằng hình thái, máy VitekII luận án lựa chọn các chủng nấm sợi phân lập được từ bệnh phẩm vô khuẩn (mô sinh thiết, máu), các chủng được định danh loài nấm men hiếm gặp, một số chủng đại diện loài hay gặp; cấy chuyển trong môi trường nuôi cấy nấm để thuần khiết chủng nấm, sau đó tiến hành định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử qua các bước sau

+ Tách chiết DNA: Sử dụng bộ sinh phẩm Fungi/Yeast Genomic DNA Isolation Kit (Cat. 27300) của hãng Norgen Biotek Corp. (Canada) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

+ Đo nồng độ ADN sau khi tách: Máy Nanodrop 1000 (Thermo, Đức).

+ Khuếch đại gen (PCR) với môi ITS1, ITS4:

Môi xuôi ITS1: 5' - TCC GTA GGT GAA CCT GCG G- 3';

Môi ngược ITS4: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC - 3';
(Integrated DNA Technologies, USA) [108].

+ Thành phần phản ứng PCR: Phản ứng PCR được thực hiện với tổng thể tích 50 µl chứa các thành phần như sau:

Bảng 2.1. Thành phần phản ứng PCR

TT	Tên sinh phẩm	Thể tích (μ l)	Nồng độ cuối cùng
1	10X Buffer	5	-
2	dNTPs mix, 2mM mỗi loại	5	0,2mM mỗi loại
3	Mồi xuôi 10pmol/ μ l (ITS1-F)	0,5	0,1 μ M
4	Mồi ngược 10pmol/ μ l (ITS4-R)	0,5	0,1 μ M
5	MgCl ₂ 25mM	5	2mM
6	Taq DNA polymerase 1U	1,25	1,25
7	Nước khử Ion	27,75	-
8	DNA khuôn	5	10pg-100ng

Sử dụng các đầu côn có phin lọc khác nhau khi tra DNA chứng (+), mẫu chạy và chứng (-) trong mỗi lần chạy.

Đậy nắp và trộn đều hỗn dịch. Sau đó ly tâm hoặc spin trong 20 giây.

Chu trình nhiệt của phản ứng PCR: Đưa các ống vào máy PCR và thực hiện phản ứng vòng 1 với chu trình nhiệt như sau:

1 chu kỳ 94 °C trong 5 phút, tiếp theo là 40 chu kỳ [94 °C trong 45 giây, 56 °C trong 45 giây, 72 °C trong 60 giây], sau đó là 1 chu kỳ 72 °C trong 10 phút và cuối cùng 1 chu kỳ 4°C cho tới khi lấy và cất mẫu.

Kiểm tra sản phẩm:

Kết thúc các phản ứng, sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1.5% và ghi hình trên máy chụp gen.

Các mẫu âm tính hoặc bị lỗi (xuất hiện nhiều band) được chạy lại PCR hoặc tiến hành tách chiết lại ADN và thực hiện lại từ đầu.

Chụp ảnh và phân tích kết quả với thiết bị có ánh sáng UV.

+ Giải trình tự gen:

Sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự trực tiếp bằng máy ABI 3130xl Genetic Analyzer.

+ Phân tích trình tự gen vi nấm

Phân tích sửa lỗi trình tự: Xem xét các thông số độ cao, khoảng cách, tín hiệu nền của trình tự, mức độ nhiễu, độ dài chuỗi DNA.

Phân tích trình tự sau sửa lỗi bằng phần mềm Bioedit: Sử dụng các lệnh của phần mềm để phân tích.

So sánh với chuỗi dữ liệu ở genbank bằng công cụ Blast để định danh.

(Các qui trình chi tiết được trình bày trong phần phụ lục).

2.2.3.7. Phân tích và xử lý số liệu

Theo phương pháp thống kê y sinh học, sử dụng phần mềm SPSS 16.0;

2.3. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu mục tiêu 3: Xác định độ nhạy của nấm và đánh giá kết quả điều trị nhiễm nấm ở bệnh nhân bỏng nặng

2.3.1. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu xác định độ nhạy của nấm

2.3.1.1. Đối tượng nghiên cứu

- Nấm: Chủng nấm *Candida* phân lập được trên BN bỏng từ mục tiêu 1.

2.3.1.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- Thời gian nghiên cứu

Từ tháng 3/2017 – 12/2019.

- Địa điểm nghiên cứu

Khám, lấy mẫu xét nghiệm: Bệnh viện Bỏng quốc gia, Học viện Quân y.

Kỹ thuật xét nghiệm xác định độ nhạy với thuốc kháng nấm: Phòng xét nghiệm Nấm, khoa Cận lâm sàng, bệnh viện Bông quốc gia Lê Hữu Trác, Học viện Quân y.

2.3.1.3. Phương pháp nghiên cứu

- Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu thực nghiệm trong phòng thí nghiệm.
- Cỡ mẫu:

Được tính theo công thức nghiên cứu tỷ lệ

$$n = Z_{1-\alpha/2}^2 \frac{1-p}{p\varepsilon^2}$$

Với các thông số lựa chọn là độ tin cậy 95%; $Z_{1-\alpha/2} = 1,96$; $\varepsilon=0,2$; tỷ lệ nhạy ước tính (p) = 61,7% [78], tính được cỡ mẫu = 66 (chúng).

Thực tế luận án đã thực hiện thử nghiệm trên 77 chủng *C. albicans*, 85 chủng *C. tropicalis* và 22 chủng nấm khác (các loài nấm hiếm gặp, không đủ cỡ mẫu tối thiểu 66 chủng), tổng là 184 chủng.

- Phương pháp chọn mẫu: Chọn ngẫu nhiên mẫu đại diện cho các loài hay gặp (*C. albicans* và *C. tropicalis*), các mẫu được định danh là loài ít gặp.

2.3.1.4. Nội dung nghiên cứu

- Xác định độ nhạy của nấm *Candida* phân lập được trên bệnh nhân bông với 06 loại thuốc kháng nấm thuộc 04 nhóm thuốc hay dùng điều trị bệnh nấm xâm lấn là amphotericin B (nhóm polyene), fluconazol, voriconazol (nhóm azole), caspofungin, micafungin (nhóm echinocandin), flucytosin.

- Giới hạn phạm vi nghiên cứu

Chỉ xác định độ nhạy của nấm *Candida* phân lập được trên bệnh nhân bông, không xác định độ nhạy của nấm sợi.

2.3.1.5. Các kỹ thuật áp dụng trong nghiên cứu

Xét nghiệm xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) với thuốc kháng

nấm bằng máy VITEK 2 – COMPACT (Pháp).

- Nguyên lý

Mỗi thẻ kháng sinh đồ gồm 64 giếng. Một giếng chứng chứa môi trường nuôi cấy, các giếng còn lại chứa các kháng sinh khác nhau với các nồng độ khác nhau đã xác định trước và môi trường nuôi cấy.

Huyền dịch nấm được pha loãng trong 3ml dung dịch natri clorua 0,45%, sau đó được máy hút vào thẻ xét nghiệm để hòa tan các kháng sinh trong thẻ. Máy sẽ giám sát sự phát triển của nấm trong các giếng của thẻ xét nghiệm bằng bộ phận đo quang học của máy, 15 phút/ lần. Phần mềm so sánh kết quả thu được với cơ sở dữ liệu để đưa ra kết quả giá trị MIC cho mỗi kháng sinh có trong thẻ.

Vật liệu, qui trình chuẩn bị, chạy, phiên giải kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất (phụ lục).

2.3.1.6. Các chỉ số đánh giá

- Mức độ đáp ứng với thuốc kháng nấm: Từ giá trị MIC của từng loài nấm với từng loại thuốc, mức độ đáp ứng với thuốc kháng nấm được phân loại thành 3 mức độ là nhạy, đáp ứng trung gian và kháng căn cứ vào tiêu chuẩn của Viện tiêu chuẩn lâm sàng và xét nghiệm Mỹ (CLSI) [109], [110].

Fluconazol: *C. glabrata* không có đáp ứng nhạy, chỉ có đáp ứng trung gian ($\leq 32 \mu\text{g/mL}$) và kháng ($\geq 64 \mu\text{g/mL}$); [110].

C. krusei đáp ứng nhạy $\leq 0,5 \mu\text{g/mL}$; kháng $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ [71].

Amphotericin B, MICs $> 1 \mu\text{g/ml}$ là kháng [109].

Flucytosin, MIC nhạy $\leq 4 \mu\text{g/ml}$, kháng $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ [111].

Bảng 2.2. Phân loại mức độ đáp ứng với thuốc kháng nấm của một số loài *Candida* hay gặp dựa trên nồng độ ức chế tối thiểu ($\mu\text{g/mL}$)

Thuốc	Loài	Nhạy	Trung gian	Kháng
Fluconazol	<i>C. albicans</i>	≤ 2	$>2 - <8$	≥ 8
	<i>C. parapsilosis</i>	≤ 2	$>2 - <8$	≥ 8
	<i>C. tropicalis</i>	≤ 2	$>2 - <8$	≥ 8
Voriconazol	<i>C. albicans</i>	$\leq 0,12$	$>0,12 - <1$	≥ 1
	<i>C. krusei</i>	$\leq 0,5$	$>0,5 - <2$	≥ 2
	<i>C. parapsilosis</i>	$\leq 0,12$	$>0,12 - <1$	≥ 1
	<i>C. tropicalis</i>	$\leq 0,12$	$>0,12 - <1$	≥ 1
Caspofungin	<i>C. albicans</i>	$\leq 0,25$	$>0,25 - <1$	≥ 1
	<i>C. glabrata</i>	$\leq 0,12$	$>0,12 - <0,5$	$\geq 0,5$
	<i>C. tropicalis</i>	$\leq 0,25$	$>0,25 - <1$	≥ 1
	<i>C. krusei</i>	$\leq 0,25$	$>0,25 - <1$	≥ 1
	<i>C. parapsilosis</i>	≤ 2	$>2 - <8$	≥ 8
	<i>C. guilliermondii</i>	≤ 2	$>2 - <8$	≥ 8
Micafungin	<i>C. albicans</i>	$\leq 0,25$	$>0,25 - <1$	≥ 1
	<i>C. glabrata</i>	$\leq 0,06$	$>0,06 - <0,25$	$\geq 0,25$
	<i>C. tropicalis</i>	$\leq 0,25$	$>0,25 - <1$	≥ 1
	<i>C. krusei</i>	$\leq 0,25$	$>0,25 - <1$	≥ 1
	<i>C. parapsilosis</i>	≤ 2	$>2 - <8$	≥ 8
	<i>C. guilliermondii</i>	≤ 2	$>2 - <8$	≥ 8

Nguồn [109], [110].

2.3.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu đánh giá kết quả điều trị nhiễm nấm ở bệnh nhân bỏng nặng

2.3.2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Bệnh nhân: BN bỏng tham gia nghiên cứu trong mục tiêu 1.

2.3.2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- Thời gian nghiên cứu

Từ tháng 3/2017 – 12/2019.

- Địa điểm nghiên cứu

Khám, lấy mẫu xét nghiệm, chỉ định, theo dõi đánh giá kết quả điều trị: Khoa Hồi sức cấp cứu, Bệnh viện Bỏng quốc gia, Học viện Quân y.

Các kỹ thuật xét nghiệm phát hiện nấm: Phòng thí nghiệm Nấm, bộ môn Ký sinh trùng và côn trùng, Học viện Quân y.

2.3.2.3. Phương pháp nghiên cứu

- Thiết kế nghiên cứu: Đánh giá hiệu quả phác đồ, không đối chứng.
- Cỡ mẫu nghiên cứu: Toàn bộ những bệnh nhân có chỉ định và đồng ý dùng thuốc kháng nấm.
- Phương pháp chọn mẫu: Những BN tham gia nghiên cứu trong mục tiêu 1, có chỉ định điều trị thuốc kháng nấm.
- Nội dung NC: Đánh giá kết quả điều trị nhiễm nấm trên BN bỏng nhiệt, mức độ nặng.

Trong NC này tất cả các BN bỏng đều được chẩn đoán, điều trị theo các qui trình hiện đang áp dụng tại bệnh viện Bỏng quốc gia như hồi sức chống sốc, kháng sinh chống nhiễm khuẩn, phẫu thuật cắt lọc hoại tử, ghép da che vết thương... Luận án không đánh giá kết quả của các can thiệp này, chỉ đánh giá kết quả điều trị nhiễm nấm trên BN.

- Chỉ định điều trị

+ Điều trị định hướng nấm: Khi BN bỏng chưa có kết quả chẩn đoán xác định nhiễm nấm xâm lấn tuy nhiên có yếu tố nguy cơ nhiễm nấm xâm lấn, có sốt mặc dù đã được sử dụng liên tục 2 loại thuốc kháng sinh phổ rộng trong 5 ngày, có các chỉ số và dấu hiệu lâm sàng thỏa mãn các yếu tố sau:

Nhiễm nấm xâm thực nặng ($CI \geq 0,5$);

Quy tắc tiên đoán nhiễm nấm xâm lấn Ostrosky-Zeichner: Bệnh nhân điều trị tại ICU ít nhất 4 ngày, thở máy ít nhất 48 giờ, sử dụng kháng sinh, đặt catheter tĩnh mạch trung ương (ngày 1 – 3 khi nằm ICU) và 1 trong các yếu tố sau: phẫu thuật lớn, viêm tụy, dùng thuốc ức chế miễn dịch hoặc steroid, nuôi dưỡng bằng đường ngoại vi, lọc máu [26].

Điểm Candida (Candida score) > 2,5: Nhiễm nấm *Candida* xâm thực nhiều vị trí (1 điểm), phẫu thuật khi nhập ICU (1 điểm), nhiễm trùng nặng (2 điểm), nuôi dưỡng bằng đường ngoại vi (1 điểm) [81].

+ Điều trị đặc hiệu nấm: Khi chẩn đoán xác định nhiễm nấm xâm lấn.

- Phác đồ điều trị:

Khởi đầu fluconazol cho BN không có tiền sử điều trị bằng thuốc nhóm azole, nhiễm loài có tỷ lệ kháng azole thấp (*C. albicans*).

Khởi đầu bằng caspofungin (echinocandin) ở BN có tiền sử dùng fluconazol hay nhiễm loài có tỷ lệ kháng fluconazol cao (*Candida* không phải *albicans*).

Voriconazol: Khi nhiễm nấm sợi.

- Thuốc sử dụng trong điều trị

Fluconazol: Dung dịch hàm lượng 200 mg/100 ml, Solupharm Pharmazeutische Erzeugnisse GmbH, Đức, số đăng ký: VN-10859-10.

Voriconazol (Vfend): Viên nén bao phim 200 mg, Pfizer, Italia.

Caspofungin (Cancidas): Thuốc tiêm 50/70 mg; Laboratoire Merck Sharp & Dohme - Chibret – PHÁP; số đăng ký: VN-10859-10.

- Liều dùng/đường dùng

Fluconazol: Dùng tĩnh mạch; liều khởi đầu 800mg trong 24 giờ đầu, duy trì 400mg hàng ngày, chia liều cách nhau 12 giờ.

Caspofungin: Dùng tĩnh mạch; liều khởi đầu 70mg trong 24 giờ đầu, duy trì 50mg liều duy nhất trong ngày.

Voriconazol: Uống; liều 400 mg hàng ngày, chia liều cách nhau 12 giờ.

Liệu pháp xuống thang: Chuyển từ echinocandin sang fluconazol sau 5 đến 7 ngày khi lâm sàng ổn định, kháng nấm đồ nhạy với fluconazol.

- Thời gian điều trị: Thời gian điều trị nhiễm nấm xâm lấn ít nhất là 14 ngày. Thời gian điều trị kéo dài tiếp 2 tuần sau khi kết quả cấy máu âm tính và triệu chứng lâm sàng ổn định.

- Các chỉ số đánh giá

Một số chỉ tiêu xét nghiệm nấm: Candida score, chỉ số nấm xâm thực, thời gian cấy nấm âm tính.

Tỷ lệ khỏi/không khỏi theo các phác đồ điều trị/thời gian điều trị.

Khỏi: Các BN có thể rời khỏi khoa Hồi sức cấp cứu, chuyển sang khoa điều trị khác được coi là khỏi.

Không khỏi: BN tử vong tại bệnh viện hay xin về do quá nặng.

- Phân tích và xử lý số liệu

Theo phương pháp thống kê y sinh học, sử dụng phần mềm SPSS 16.0;

So sánh số trung bình bằng Student-t test, so sánh hai tỷ lệ bằng kiểm định khi bình phương (Chi-squared test), Fisher Exact Test.

Giá trị $p < 0,05$ được coi là có ý nghĩa thống kê.

2.3.2.4. Đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu đã được thông qua Hội đồng y đức của Viện Sốt rét, Ký sinh trùng và Côn trùng trung ương.

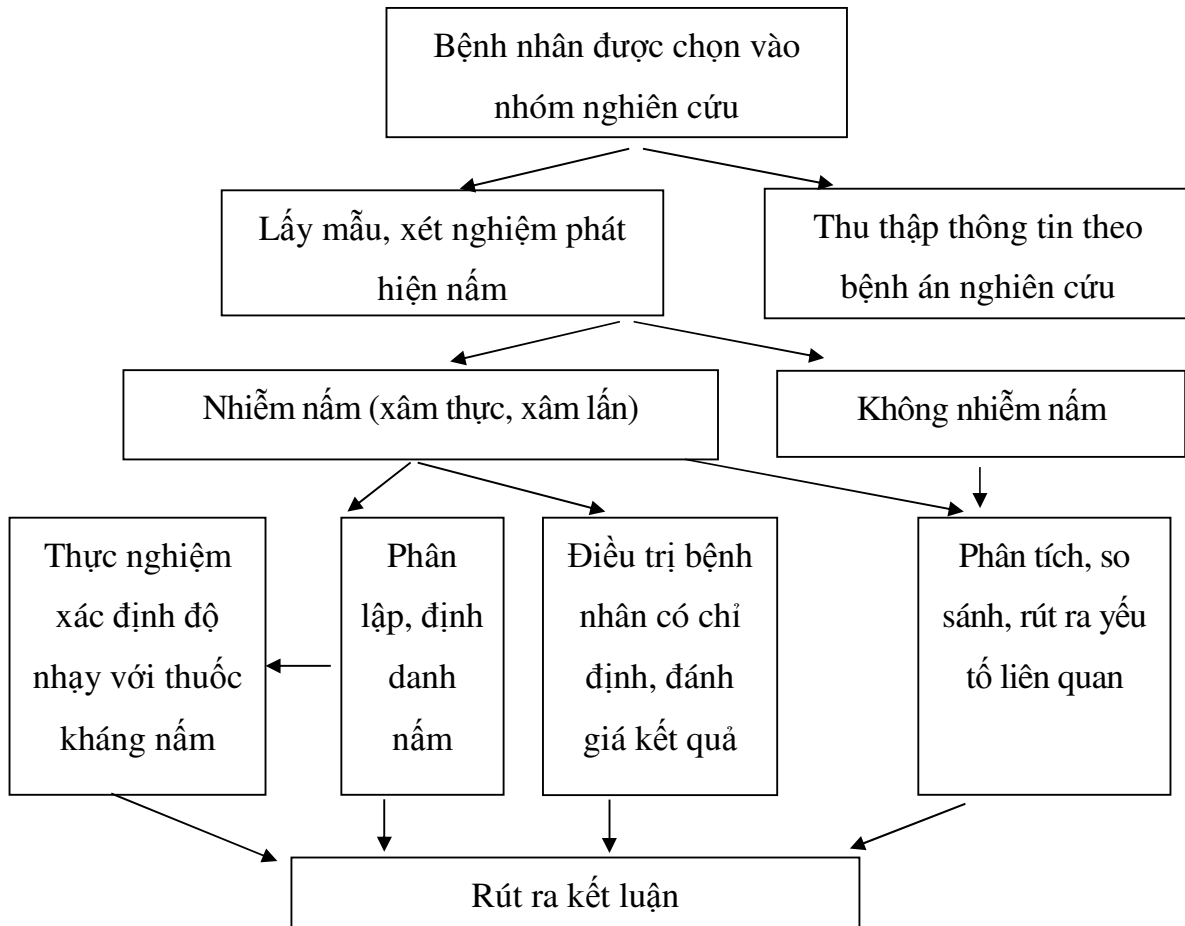
Bệnh nhân tự nguyện tham gia nghiên cứu.

Các bệnh nhân dưới 18 tuổi được sự đồng ý của bố mẹ và người thân.

Các thông tin được giữ bí mật, chỉ dùng cho nghiên cứu.

Chỉ định điều trị nằm dựa trên các kết quả thăm khám lâm sàng, cận lâm sàng, đánh giá của bác sĩ điều trị theo phác đồ xây dựng được.

Sơ đồ nghiên cứu



Hình 2.3. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu

Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả nghiên cứu tỷ lệ và yếu tố liên quan nhiễm nấm ở bệnh nhân bỏng nặng

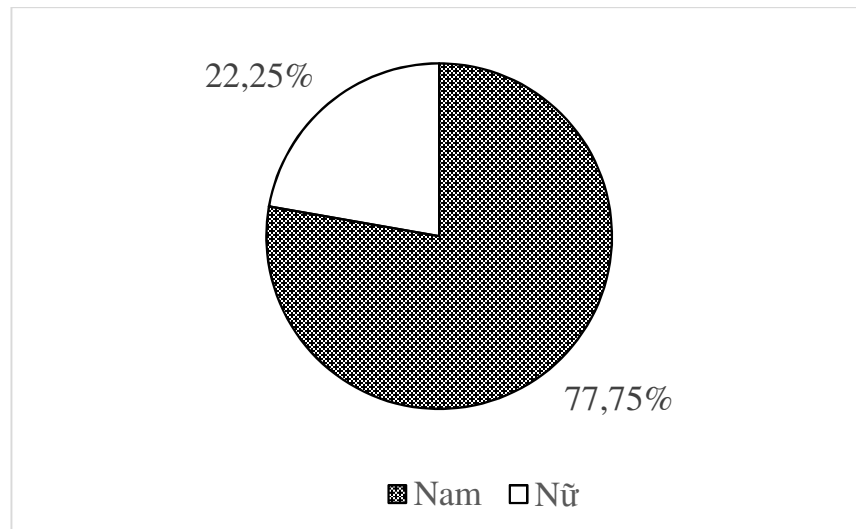
3.1.1. Thông tin về đối tượng nghiên cứu

Bảng 3.1. Phân bố tuổi đối tượng nghiên cứu (n=400)

Chỉ tiêu		Số lượng	Tỷ lệ (%)
Nhóm tuổi (năm)	1 - 15	113	28,25
	16 – 65	34	66,75
	66 - 94	62	5,00
Tuổi trung bình (năm) ($\bar{X} \pm SD$)		29,74 \pm 20,86	

Nhận xét

Tuổi của nhóm BN nghiên cứu từ 1 – 94 tuổi, trung bình 29,74 tuổi.



Hình 3.1. Phân bố giới đối tượng nghiên cứu (n=400)

Nhận xét

Nam giới chiếm tỷ lệ chủ yếu (77,85%), nam/nữ = 3,49/1).

Bảng 3.2. Một số thông số lâm sàng của đối tượng nghiên cứu (n=400)

Thông số		Số lượng	Tỷ lệ (%)
Tình trạng bệnh	Sốc bồng	374	93,50
	Nhiễm trùng nặng	327	81,75
	Đường máu cao	171	42,75
	Suy thận	78	19,50
	Bong hô hấp	69	17,25
	APACHE > 20	31	7,75
Can thiệp điều trị	Sond tiêu	393	98,25
	Nằm lâu ở ICU	369	92,25
	Dinh dưỡng tĩnh mạch	300	75,00
	Catheter	276	69,00
	Thuốc ức chế miễn dịch	210	52,50
	Hô hấp nhân tạo	124	31,00
	Thuốc kháng nấm	67	16,75
	Lọc máu	59	14,75
Hậu quả	Tử vong	78	19,50

Nhận xét

Nhóm BN nghiên cứu có tỷ lệ sốc bồng, nhiễm trùng nặng cao.

Các can thiệp chủ yếu là sond tiêu, dinh dưỡng tĩnh mạch, catheter.

Tỷ lệ tử vong 19,50%.

Bảng 3.3. Diện tích bỏng và ngày nằm điều trị trung bình của đối tượng nghiên cứu (n=400)

Chỉ tiêu	n	Tối thiểu	Tối đa	Trung bình
Diện tích bỏng (%)	400	8	98	44,39 ± 19,35
Diện tích bỏng sâu (%)	400	0	90	17,72 ± 16,43
Thời gian nằm viện (ngày)	400	3	164	36,73 ± 23,61
Thời gian nằm ICU (ngày)	400	3	83	18,39 ± 11,78

Nhận xét

BN nằm ICU bị bỏng nặng, thời gian nằm viện kéo dài.

3.1.2. Tỷ lệ nhiễm nấm

Bảng 3.4. Tỷ lệ nhiễm nấm ở đối tượng nghiên cứu

Chỉ tiêu		n	Tỷ lệ (%)	
Nhiễm nấm (360)	Nhiễm nấm xâm thực đơn thuần (309)	309	77,25	
	Nhiễm nấm xâm thực + nhiễm nấm xâm lấn (51)	Nhiễm nấm vết thương	37	9,25
		Nhiễm nấm huyết	11	2,75
		Nhiễm nấm vết thương – nhiễm nấm huyết	3	0,75
Không nhiễm nấm (40)		40	10,00	
Tổng		400	100	

Nhận xét

Có 90% BN nhiễm nấm xâm thực, 12,75% BN nhiễm nấm xâm lấn.

Tất cả các BN nhiễm nấm xâm lấn đều có nhiễm nấm xâm thực.

Bảng 3.5. Tỷ lệ nhiễm nấm theo giới

Chỉ tiêu Giới	n	Nhiễm nấm xâm thực		Nhiễm nấm xâm lấn	
		n1	Tỷ lệ (%)	n2	Tỷ lệ (%)
Nam	311	277	89,07	36	11,58
Nữ	89	83	93,25	15	16,85
Tổng	400	360	90,00	51	12,75
p		0,317		0,207	

Nhận xét

Phân bố tỷ lệ nhiễm nấm xâm thực và xâm lấn ở bệnh nhân nam là nữ khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê.

Bảng 3.6. Tỷ lệ nhiễm nấm theo nhóm tuổi

Chỉ tiêu Nhóm tuổi	n	Nhiễm nấm xâm thực		Nhiễm nấm xâm lấn	
		n1	Tỷ lệ (%)	n2	Tỷ lệ (%)
1 - 15 (1)	113	97	85,84	6	5,31
16 - 65 (2)	267	244	91,39	42	15,73
66 - 94 (3)	20	19	95,00	3	15,00
Tổng	400	360	100	51	100
p		0,192		0,019	

Nhận xét

Tỷ lệ nhiễm nấm xâm thực chưa khác biệt giữa các nhóm tuổi.

Tỷ lệ nhiễm nấm xâm lấn ở các nhóm tuổi khác nhau có ý nghĩa (nhóm 1 - 15 tuổi có tỷ lệ nhiễm thấp hơn nhóm tuổi khác, $p < 0,05$).

3.1.3. Các yếu tố liên quan nhiễm nấm ở bệnh nhân bỏng nặng

3.1.3.1. Yếu tố liên quan nhiễm nấm xâm thực

Bảng 3.7. Liên quan tình trạng bệnh lý bỏng và nhiễm nấm xâm thực ở đối tượng nghiên cứu

Tình trạng		Nhiễm nấm xâm thực		OR (CI 95%)	p
		Có	Không		
Bỏng hô hấp	Có	66	3	2,769	0,120
	Không	294	37	(0,829 – 9,252)	
Sốc bỏng	Có	337	37	1,188	0,735
	Không	23	3	(0,340 – 4,147)	
Nhiễm trùng nặng	Có	306	27	2,407	0,028
	Không	54	13	(1,175 – 4,933)	
Apache >20	Có	30	1	3,545	0,231
	Không	330	39	(0,470 – 26,722)	
Suy thận	Có	75	4	2,368	0,071
	Không	285	36	(0,817 – 6,862)	
Glucose máu cao	Có	162	9	2,818	0,004
	Không	198	31	(1,304 – 6,090)	

Nhận xét

BN có bỏng hô hấp, sốc bỏng, điểm Apache cao (>20) hay suy thận không tăng nguy cơ nhiễm nấm xâm thực.

Tình trạng nhiễm trùng nặng, glucose máu cao liên quan đến nhiễm nấm xâm thực ($p < 0,05$).

Bảng 3.8. Liên quan can thiệp điều trị và nhiễm nấm xâm thực ở đối tượng nghiên cứu

Nhiễm nấm xâm thực		Có	Không	OR (CI 95%)	p
Can thiệp					
Lọc máu	Có	59	1	7,645	0,018
	Không	301	39	(1,030 – 56,738)	
Nuôi dưỡng bằng đường tĩnh mạch	Có	277	23	2,467	0,011
	Không	83	17	(1,258 – 4,836)	
Hô hấp nhân tạo	Có	116	8	1,902	0,077
	Không	244	32	(0,850 – 4,256)	
Dùng thuốc ức chế miễn dịch	Có	194	16	1,753	0,099
	Không	166	24	(0,901 – 3,411)	
Nằm lâu ở ICU	Có	190	17	1,512	0,245
	Không	170	23	(0,781 – 2,926)	
Đặt catheter	Có	251	24	1,535	0,213
	Không	109	16	(0,785 – 3,004)	

Nhận xét

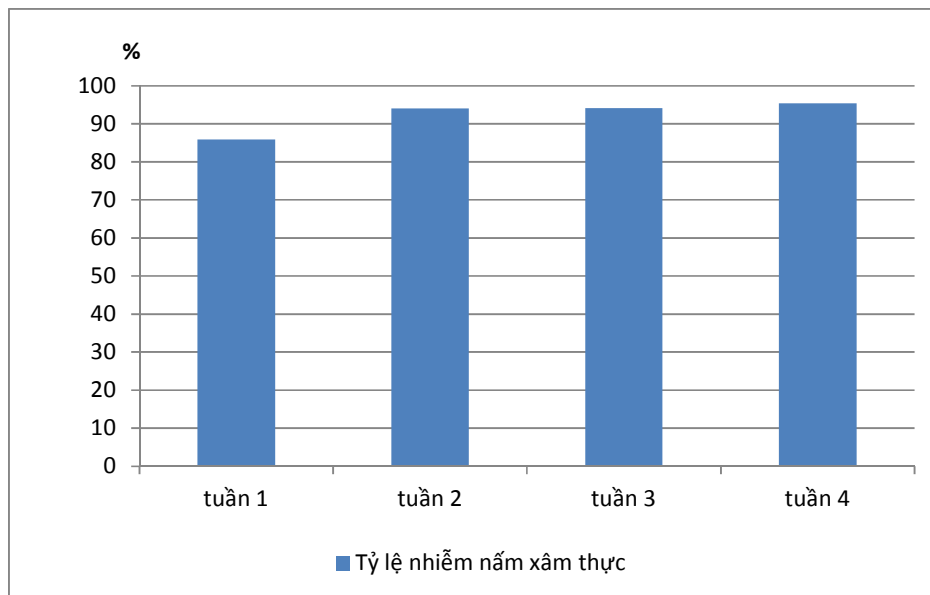
Bệnh nhân cần lọc máu, nuôi dưỡng bằng đường tĩnh mạch có nguy cơ nhiễm nấm xâm thực cao hơn ($p < 0,05$).

Bệnh nhân phải hô hấp nhân tạo, dùng thuốc ức chế miễn dịch, nằm lâu ở ICU (từ 15 ngày trở lên), đặt catheter không gia tăng nguy cơ nhiễm nấm xâm thực.

Bảng 3.9. Phân tích đa biến yếu tố liên quan nhiễm nấm xâm thực ở đối tượng nghiên cứu

Nhiễm nấm xâm thực		Có	Không	OR (CI 95%)	p
Yếu tố					
Nhiễm trùng nặng	Có	306	27	1,620 (0,701 - 3,746)	0,259
	Không	54	13		
Glucose máu cao	Có	162	9	1,355 (0,539 - 3,406)	0,518
	Không	198	31		
Lọc máu	Có	59	1	4,758 (0,594 - 38,139)	0,142
	Không	301	39		
Nuôi dưỡng bằng đường tĩnh mạch	Có	277	23	1,402 (0,626 - 3,138)	0,412
	Không	83	17		

Phân tích đa biến chưa thấy yếu tố nào làm tăng nguy cơ nhiễm nấm xâm thực ở nhóm BN nghiên cứu ($p > 0,05$).



Hình 3.2. Tỷ lệ nhiễm nấm xâm thực theo thời gian (n=400)

Tỷ lệ nhiễm nấm xâm thực ít thay đổi theo thời gian.

Bảng 3.10. Liên quan diện tích bồng, thời gian điều trị và nhiễm nấm xâm thực

Nhiễm nấm xâm thực Chỉ tiêu	Có (n=360)	Không (n=40)	p
Diện tích bồng (%)	45,24 ± 19,38	36,75 ± 17,50	0,006
Diện tích bồng sâu (%)	18,31 ± 16,62	12,35 ± 13,65	0,013
Thời gian nằm viện	36,74 ± 23,73	36,60 ± 22,79	0,970
Thời gian nằm ICU	18,72 ± 11,78	15,57 ± 1,83	0,112

BN nhiễm nấm có diện tích bồng và diện tích bồng sâu lớn hơn BN không nhiễm nấm xâm thực ($p < 0,05$).

BN nhiễm nấm xâm thực có thời gian điều trị ở bệnh viện tương đương ở nhóm BN không nhiễm nấm xâm thực ($p > 0,05$).

3.1.3.2. Các yếu tố liên quan nhiễm nấm xâm lấn

Bảng 3.11. Liên quan diện tích bồng, thời gian điều trị và nhiễm nấm xâm lấn

Nhiễm nấm xâm lấn Chỉ tiêu	Có (n=51)	Không (n=349)	p
Diện tích bồng chung (%)	53,12 ± 18,94	43,49 ± 18,67	< 0,001
Diện tích bồng sâu (%)	29,06 ± 16,16	16,06 ± 15,82	< 0,001
Ngày nằm điều trị (ngày)	47,22 ± 30,09	35,20 ± 22,15	0,008
Ngày nằm ICU (ngày)	30,20 ± 15,12	16,66 ± 10,15	< 0,001

Nhận xét

BN nhiễm nấm xâm lấn có diện tích bồng rộng hơn BN không nhiễm.

BN nhiễm nấm xâm lấn có thời gian điều trị ở bệnh viện dài hơn.

Bảng 3.12. Liên quan tình trạng bệnh lý bông và nhiễm nấm xâm lấn ở đối tượng nghiên cứu

Tình trạng		Nhiễm nấm xâm lấn		OR (CI 95%)	p
		Có	Không		
Bông hô hấp	Có	12	57	1,576 (0,778 – 3,195)	0,233
	Không	39	292		
Sốc bông	Có	49	327	1,648 (0,376 – 7,229)	0,753
	Không	2	22		
Nhiễm trùng nặng	Có	49	284	12,996 (1,765 – 95,683)	< 0,001
	Không	2	65		
Apache >20	Có	5	26	1,350 (0,494 – 3,692)	0,573
	Không	46	323		
Suy thận	Có	21	57	3,586 (1,918 – 6,704)	0,001
	Không	30	292		
Glucose máu cao	Có	45	126	13,274 (5,509 – 31,982)	< 0,001
	Không	6	223		
Nhiễm nấm xâm thực nặng	Có	45	197	5,787 (2,406 – 13,920)	< 0,001
	Không	6	152		

Nhận xét

Tình trạng nhiễm trùng nặng, suy thận, glucose máu cao, nhiễm nấm xâm thực nặng làm tăng nguy cơ nhiễm nấm xâm lấn ở nhóm BN nghiên cứu.

Bông hô hấp, sốc bông, Apachae hơn 20 điểm không làm tăng nguy cơ nhiễm nấm xâm lấn ở nhóm BN nghiên cứu.

Bảng 3.13. Liên quan can thiệp điều trị và nhiễm nấm xâm lấn ở đối tượng nghiên cứu

Nhiễm nấm xâm lấn		Có	Không	OR (CI 95%)	p
Đặt catheter	Có	48	228	8,491 (2,591 – 27,829)	<0,001
	Không	3	121		
Lọc máu	Có	23	38	6,723 (3,523 – 12,830)	<0,001
	Không	28	311		
Nuôi dưỡng bằng đường tĩnh mạch	Có	50	250	19,800 (2,698 – 145,298)	< 0,001
	Không	1	99		
Hô hấp nhân tạo	Có	30	94	3,875 (2,115 – 7,102)	< 0,001
	Không	21	255		
Dùng thuốc ức chế miễn dịch	Có	45	165	8,364 (3,478 – 20,111)	< 0,001
	Không	6	184		
Nằm lâu ở ICU	Có	41	166	4,520 (2,195 – 9,309)	< 0,001
	Không	10	183		

Nhận xét

Tất cả các can thiệp như đặt catheter, lọc máu, nuôi dưỡng bằng đường tĩnh mạch, hô hấp nhân tạo, dùng thuốc ức chế miễn dịch đều làm tăng nguy cơ nhiễm nấm xâm lấn.

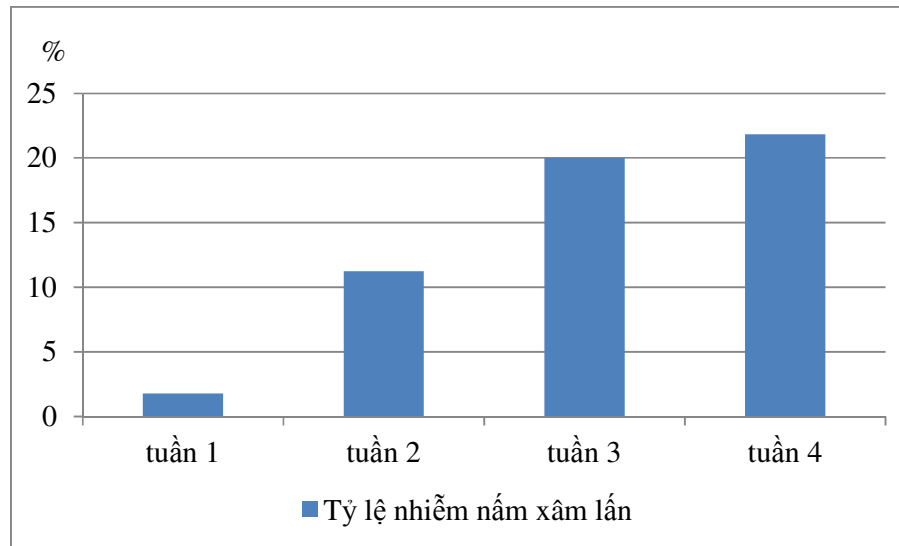
Bệnh nhân nằm lâu ở ICU (từ 15 ngày trở lên) có nguy cơ nhiễm nấm xâm lấn cao hơn so với BN nằm trong vòng 14 ngày.

Bảng 3.14. Phân tích đa biến yếu tố liên quan nhiễm nấm xâm lấn ở đối tượng nghiên cứu

Nhiễm nấm xâm lấn		Có	Không	OR (CI 95%)	p
Yếu tố					
Nhiễm trùng nặng	Có	49	284	0,250	0,167
	Không	2	65	(0,035 - 1,787)	
Nằm lâu ở ICU	Có	41	166	2,572	0,030
	Không	10	183	(1,098 - 6,023)	
Suy thận	Có	21	57	0,899	0,823
	Không	30	292	(0,352 - 2,293)	
Tăng glucose máu	Có	45	126	4,067	0,014
	Không	6	223	(1,333 - 12,408)	
Catheter	Có	48	228	0,976	0,974
	Không	3	121	(0,219 - 4,350)	
Lọc máu	Có	23	38	2,257	0,086
	Không	28	311	(0,892 - 5,709)	
Nuôi dưỡng bằng đường tĩnh mạch	Có	50	250	4,588	0,226
	Không	1	99	(0,389 - 54,155)	
Hô hấp nhân tạo	Có	30	94	0,738	0,502
	Không	21	255	(0,305 - 1,789)	
Thuốc ức chế miễn dịch	Có	45	165	2,398	0,106
	Không	6	184	(0,832 - 6,913)	
Nhiễm nấm xâm thực nặng	Có	45	197	2,790	0,036
	Không	6	152	(1,071 - 7,265)	

Nhận xét

Tăng đường máu, nhiễm nấm xâm thực nặng, nằm lâu ở ICU làm tăng nguy cơ nhiễm nấm xâm lấn.



Hình 3.3. Tỷ lệ nhiễm nấm xâm lấn theo thời gian ở đối tượng nghiên cứu (n=400)

Tỷ lệ nhiễm nấm xâm lấn tăng theo thời gian.

3.2. Kết quả nghiên cứu thành phần loài nấm ở bệnh nhân bỏng nặng

3.2.1. Thành phần loài nấm gây nhiễm nấm xâm thực

Bảng 3.15. Cơ cấu nấm men, nấm sợi ở bệnh nhân bỏng nặng

Nấm men, nấm sợi	Số lượng	Tỷ lệ (%) / tổng số nhiễm nấm (n=360)	Tỷ lệ (%) / tổng số bệnh nhân (n=400)
Nấm men	360	100	90
Nấm sợi	28	7,78	7,00
Nhiễm phối hợp	28	7,78	7,00

Nhận xét

100% trường hợp nhiễm nấm đều nhiễm nấm men.

Có 7,78% BN nhiễm nấm là nhiễm nấm sợi (những BN này nhiễm phối hợp cả nấm men, nấm sợi).

Bảng 3.16. Thành phần loài nấm men ở bệnh nhân nhiễm nấm

Loài	Số lượng	Tỷ lệ (%)
<i>C. albicans</i>	151	41,94
<i>C. tropicalis</i>	164	45,56
<i>C. parapsilosis</i>	23	6,39
<i>C. lusitaniae</i>	4	1,11
<i>C. glabrata</i>	5	1,39
<i>C. dubliniensis</i>	4	1,11
<i>C. famata</i>	3	0,83
<i>C. ciferrii</i>	2	0,56
<i>C. krusei</i>	2	0,56
<i>C. tropicalis</i> + <i>C. duobushaemulonii</i>	1	0,28
<i>C. parapsilosis</i> + <i>Kodemaesa ohmeri</i>	1	0,28
Tổng	360	100

Nhận xét

Phát hiện 11 loài nấm men, có 10 loài *Candida*, trong đó *C. tropicalis* (45,56%) chiếm tỷ lệ cao nhất, sau đó là *C. albicans* (41,94%).

Có hai trường hợp đồng nhiễm hai loài nấm men.



Hình 3.4. Nấm *Candida albicans* phân lập được từ bệnh nhân nghiên cứu nuôi cấy trên môi trường Brilliance Candida Agar.

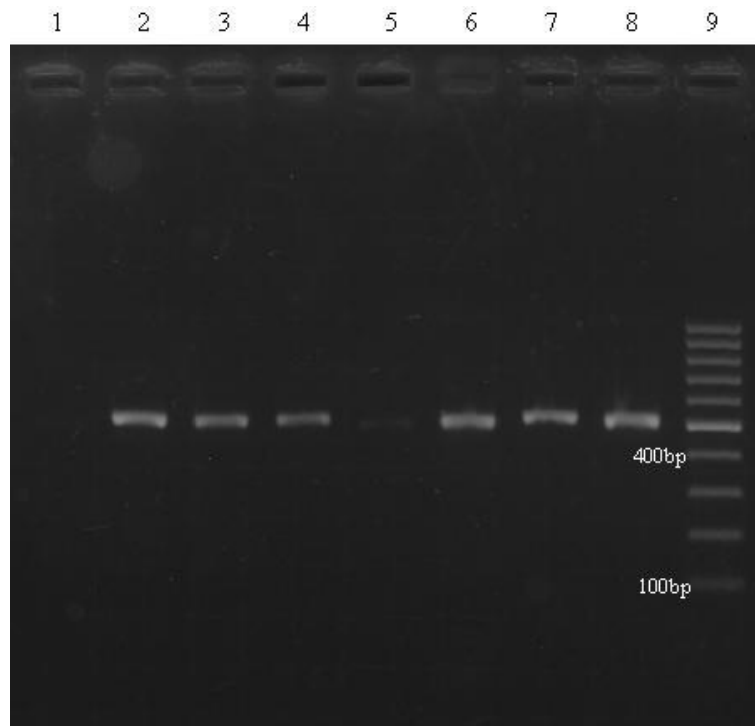
Khuẩn lạc có màu xanh lá, định danh là *C. albicans*.



Hình 3.5. Nấm men phân lập được từ bệnh nhân nghiên cứu nuôi cấy trên môi trường Brilliance Candida Agar

Mẫu BN số 5: Khuẩn lạc màu tím hồng, định danh *C. glabrata*.

Mẫu BN số 14: Khuẩn lạc màu xanh lá, định danh là *C. albicans*.



Hình 3.6. Hình ảnh sản phẩm điện di một số mẫu nấm phân lập được từ bệnh nhân nghiên cứu

1: Chứng âm, mẫu 2 – 8: sản phẩm PCR với môi ITS1; ITS4 nấm phân lập được từ BN. 9: ladder.

Mẫu 2: Nấm phân lập được từ BN 23; 3: nấm phân lập từ BN 31; 4: nấm phân lập từ BN 28; 5: nấm phân lập từ BN 22; 6: nấm phân lập từ BN 25; 7: nấm phân lập từ BN 14; 8: nấm phân lập từ BN 38.

Nhận xét: Kích thước sản phẩm PCR thu được sau khi chạy với môi ITS1; ITS4 một số chủng nấm phân lập được từ BN bằng khoảng hơn 500 bp. Phù hợp với *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*...

Để xác định được loài các chủng lựa chọn được giải trình tự, phân tích trình tự nucleotide thu được.

Candida albicans strain UTI08 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: MG913256.1 Length: 1655 Number of Matches: 1

Range 1: 69 to 1176 [GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	1973 bits(1068)	0.0	1097/1109(99%)	10/1109(0%)	Plus/Minus
Query 18	TCCTAGGT---AAACCGCAGTCCTCGGTCTAGGCTGGCAGTATCGTCAGAGGCTATAACA				
74					
Sbjct 1176	TCCTAGGTAAAAAACCGCAGTCCTCGGTCTAGGCTGGCAGTATCGTCAGAGGCTATAACA				
1177					
Query 75	CACAGCAGAAGCCGTGCCACATTCCTCCGCCATTATCCTGCCCGCTCCAAACCGATGCTGG				
134					
Sbjct 1116	CACAGCAGAAGCCGTGCCACATTCCTCCGCCATTATCCTGCCCGCTCCAAACCGATGCTGG				
1057					
Query 135	CCCGGTAAACCGCAGCGGCCGCCCGAGAGAGCAGCATGCAAAATACCAAGTCTGATCT				
194					
Sbjct 1056	CCCGGTAAACCGCAGCGGCCGCCCGAGAGAGCAACATGCAAAATACCAAGTCTGATCT				
997					
.....*					
Query 912	AGAGATCCGTCTGTGAAAGTTTGTACTATTAGTAATAATCTGGTCTGACAAGTTGATAAA				
971					
Sbjct 276	AGAGATCCGTCTGTGAAAGTTTGTACTATTAGTAATAATCTGGTCTGACAAGTTGATAAA				
217					
Query 912	AAATTGGTTGTAAGTTTAGACCTCTGGCGGCAGGCTGGGCCACCGCCAAAGCAAGTTTG				
1031					
Sbjct 216	AAATTGGTTGTAAGTTTAGACCTCTGGCGGCAGGCTGGGCCACCGCCAAAGCAAGTTTG				
157					
Query 1032	TTTCAAAGAAAAACACATGTGGTGCAATTAAGCAAATCAGTAATGATCCTTCGGCAGGTT				
1091					
Sbjct 156	TTTCAAAGAAAAACACATGTGGTGCAATTAAGCAAATCAGTAATGATCCTTCGGCAGGTT				
97					
Query 1092	CACCTACGCAAAC-TTGT-A-CACCGUUU 1117				
Sbjct 96	CACCTACGCAAACCTTGTTACGAC-TTTC 69				

Hình 3.7. So sánh chuỗi nucleotide chủng nấm phân lập từ BN_23

Nhận xét

Chuỗi nucleotide thu được ở BN 23 trùng hợp >99% với chuỗi trên Genbank. Định danh *C. albicans*.

Bảng 3.17. Một số chuỗi nucleotide nấm men được đăng ký trên ngân hàng gen

Bệnh phẩm	Mã bệnh nhân	Mã genbank	Loài
Phân	3	MN067757	<i>C. tropicalis</i>
Phân	5	MN067758	<i>C. glabrata</i>
Phân	23	MN067759	<i>C. tropicalis</i>
Đờm	92	MN067760	<i>C. albicans</i>
Dịch họng	100	MN067761	<i>C. parapsilosis</i>
Mô sinh thiết	100	MN067739	<i>Kodamaea ohmeri</i>
Dịch họng	116	MN067764	<i>C. tropicalis</i>
Máu	116	MN067763	<i>C. tropicalis</i>
Dịch vết thương	116	MN067762	<i>C. tropicalis</i>
Mô sinh thiết	162	MN174034	<i>C. duobushaemulonis</i>
Phân	162	MN174033	<i>Candida tropicalis</i>
Mô sinh thiết	179	MN174039	<i>C. parapsilosis</i>
Phân	314	MN174038	<i>C. glabrata</i>

Nhận xét

BN 100 đồng nhiễm hai loài là *C. parapsilosis* và *Kodamaea ohmeri*.

BN 116 phân tích ba mẫu khác nhau nhưng đều nhiễm cùng 1 loài là *C. tropicalis*

Bảng 3.18. Thành phần loài nấm sợi ở bệnh nhân nhiễm nấm

Loài	Số lượng	Tỷ lệ (%) / tổng số nhiễm nấm (n=360)	Tỷ lệ (%) / số nhiễm nấm sợi (n=28)
<i>A. fumigatus</i>	11	3,06	39,29
<i>A. oryzae</i>	6	1,67	21,43
<i>A. flavus</i>	6	1,67	21,43
<i>A. chevalieri</i>	2	0,56	7,14
<i>A. nomius</i>	2	0,56	7,14
<i>Fusarium solani</i>	1	0,28	3,57

Aspergillus chiếm tỷ lệ chủ yếu (27/28 trường hợp=96,43%), ngoài ra còn gặp *Fusarium solani*.

Loài *A. fumigatus* hay gặp nhất trong số nấm sợi (39,29%).

3.2.2. Thành phần loài nấm gây nhiễm nấm xâm lấn

Bảng 3.19. Cơ cấu nấm men, nấm sợi gây nhiễm nấm vết thương

Nấm men, nấm sợi	Số lượng	Tỷ lệ (%) / nhiễm nấm vết thương (n=40)	Tỷ lệ (%) / tổng số bệnh nhân (n=400)
Nấm men	26	72,50	7,25
Nấm sợi	11	35,00	3,50
Nhiễm phối hợp	3	7,50	0,75
Tổng	40	10,00	1,00

Nhận xét

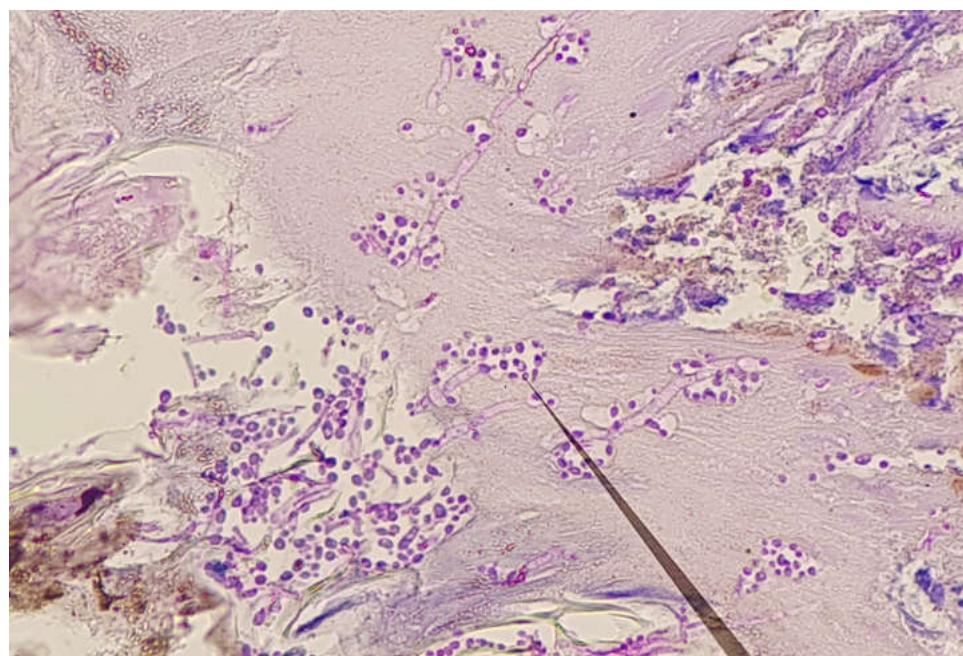
Nấm men là nguyên nhân chủ yếu của nhiễm nấm vết thương (72,5%).

Có 7,5% BN nhiễm nấm vết thương nhiễm phối hợp cả nấm men, nấm sợi.

Bảng 3.20. Thành phần loài nấm men gây nhiễm nấm vết thương

Loài nấm	Số lượng	Tỷ lệ (%)	
		Trên số nhiễm FWI (n=40)	Trên số FWI do nấm men (n=29)
<i>C. tropicalis</i>	20	50,0	68,97
<i>C. albicans</i>	7	17,5	24,14
<i>C. parapsilosis</i>	1	2,5	3,45
<i>K. ohmeri</i>	1	2,5	3,45

Nhiễm nấm vết thương do nấm men phổ biến nhất là *C. tropicalis* (50,0%), *C. albicans* (17,5%).



Hình 3.8. Hình ảnh nấm men trong tiêu bản mô bệnh học ở bệnh nhân 158

BN mã số 158; N8, nhuộm PAS, x400.

Các tế bào nấm men, nảy chồi (mũi tên).

Candida tropicalis strain VIT-NN03 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: MG720231.1 Length: 1644 Number of Matches: 1

Range 1: 60 to 1155 [GenBank](#) [Graphics](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2001 bits(1083)	0.0	1093/1097(99%)	3/1097(0%)	Plus/Minus

Query 17 ACATCCTAGGTATAAACCGCAGTCCTCAGTCTAGGCTGGCAGTATCGACGAAGGCTATAA 76
 |||
 Sbjct 1155 ACATCCTAGGTATAAACCGCAGTCCTCAGTCTAGGCTGGCAGTATCGACGAAGGCTATAA 1096

Query 77 CACACAACCGAAGCCGTGCCACATTCCAACGCAATTCTCTACCGCCAAACTGATGCTG 136
 |||
 Sbjct 1095 CACACAACCGAAGCCGTGCCACATTCCAACGCAATTCTCTACCGCCAAACTGATGCTG 1036

Query 137 GCCCGATAAACTGTAGAGGCCACCCCGAAGAAGTAACATACAAAATACCAAGTCTGATC 196
 |||
 Sbjct 1035 GCCCGATAAACTGTAGAGGCCACCCCGAAGAAGTAACATACAAAATACCAAGTCTGATC 976

Query 197 TCAAGCCCTCCCTTTCAACAATTTACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTT 256
 |||
 Sbjct 975 TCAAGCCCTCCCTTTCAACAATTTACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTT 916

.....

Query 917 TTGAAAGTTTGGACTATTGTAATAATAAATCAAGTTTGGACTGTAAATAAAAAGTTGGTT 976
 |||
 Sbjct 255 TTGAAAGTTTGGACTATTGTAATAATAAATCAAGTTTGGACTGTAAATAAAAAGTTGGTT 196

Query 977 TAGTTATAACCTCTGGCGGTAGGATTGCTCCCGCCACCAAAGAAATTTGTTCAATAAAAA 1036
 |||
 Sbjct 195 TAGTTATAACCTCTGGCGGTAGGATTGCTCCCGCCACCAAAGAAATTTGTTCAATAAAAA 136

Query 1037 ACACATGTGGTGCAATTAAGCAAATCAGTAATGATCCTCCGCAGGTTACCTACGGAAA 1096
 |||
 Sbjct 135 ACACATGTGGTGCAATTAAGCAAATCAGTAATGATCCTCCGCAGGTTACCTACGGAAA 76

Query 1097 C-TTGT-ACAACTTTT 1111
 |||
 Sbjct 75 CCTTGTTACGA-CTTTT 60

Hình 3.9. So sánh chuỗi nucleotide chủng nấm phân lập từ bệnh nhân 158

Chuỗi nucleotide thu được ở BN 158 trùng hợp >99% với chuỗi trên Genbank. Định danh *C. tropicalis*.

Bảng 3.21. Thành phần loài nấm sợi gây nhiễm nấm vết thương

Loài nấm	Số lượng	Tỷ lệ (%)	
		Trên số FWI (n=40)	Trên số FWI do nấm sợi (n=14)
<i>A. fumigatus</i>	6	15,00	42,86
<i>A. flavus</i>	3	7,50	21,43
<i>A. oryzae</i>	2	5,00	14,29
<i>A. nomius</i>	1	2,50	7,14
<i>A. chevalieri</i>	1	2,50	7,14
<i>F. solani</i>	1	2,50	7,14

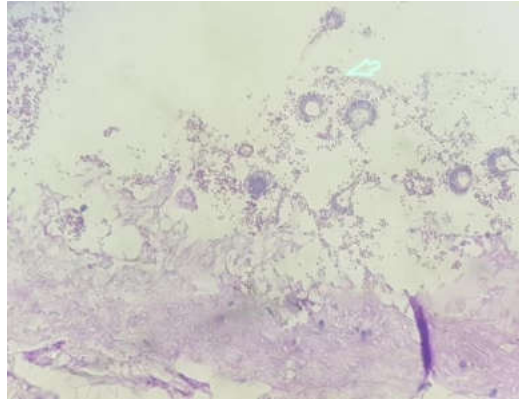
Nấm *Aspergillus* là tác nhân chủ yếu gây FWI do nấm sợi (13/14 trường hợp), ngoài ra còn gặp *F. solani* (1/14 BN).

Loài *Aspergillus* hay gặp là *A. fumigatus* (15%), *A. flavus* (7,5%),.



Hình 3.10. Hình ảnh nấm phát triển tại vết thương bỏng bệnh nhân 50

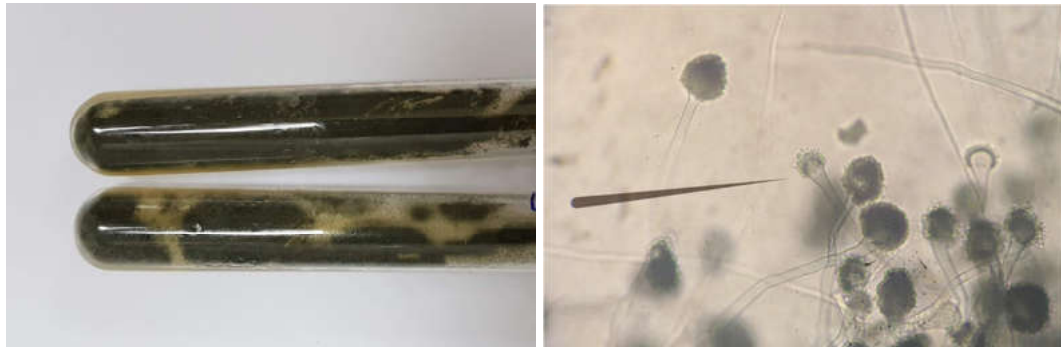
Hình ảnh nhiễm nấm vết thương bỏng, BN 50. Chẩn đoán nhiễm nấm vết thương do *Aspergillus fumigatus*.



Hình 3.11. Nấm *Aspergillus fumigatus* trong tiêu bản mô bệnh học ở bệnh nhân nghiên cứu

BN 50, nhuộm PAS.

Nhận xét: Các sợi nấm ngắn, có vách ngăn, phân nhánh 45° , có các bào tử, cấu trúc tạo bào tử của nấm *Aspergillus*.



Hình 3.12. Hình ảnh đại thể, vi thể nấm *Aspergillus* spp. phân lập được từ mô sinh thiết bệnh nhân 50

Nhận xét: Hình ảnh đại thể trên môi trường Sabouraud khuẩn lạc màu xanh.

Hình ảnh vi thể: Cuống sinh bào tử ngắn, thành nhẵn, ngọn cuống hình bình hoa, màu xanh, 20 - 30 μ m. Nang bào tử một lớp, màu xanh, hình thành ở phần trên của ngọn đính bào đài, dạng cột, mọc cùng hướng với cuống sinh bào tử. Bào tử màu xanh, tròn, có gai, 2 - 3,5 μ m. Định danh: *A. fumigatus*.

Aspergillus fumigatus strain NB_50_02_07 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

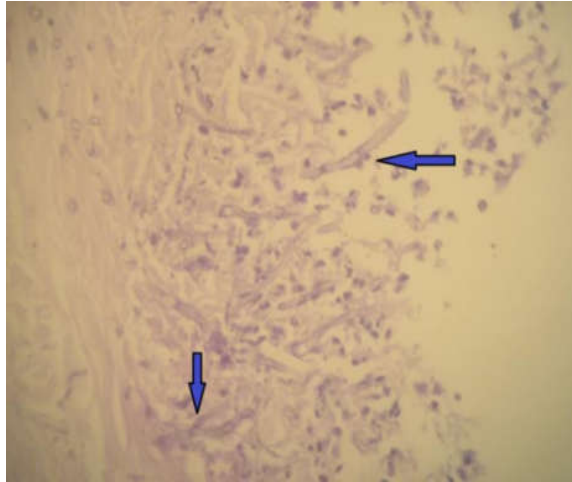
Sequence ID: KR023997.1 Length: 1322 Number of Matches: 1

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	1986 bits(1075)	0.0	1149/1180(97%)	23/1180(1%)	Plus/Minus
Query	21		CGAGCCG-AGCCCGTCCCTCCGTC	CAGGCAGGCCGCATTGCACCCCTCGGCTATAAGACAC	
	79				
Sbjct	1286		CGAGCCGAAGCCGTCCTCCGTC	CAGGCAGGCCGCATTGCACCCCTCGGCTATAAGACAC	
	1227				
Query	80		CCCGAGAGGTGATACATTCCGAGGGCCTTTGACCGGCCGCCAAACCGACGCTGGCCCGC		
	139				
Sbjct	1226		CCCGAGAGGTGATACATTCCGAGGGCCTTTGACCGGCCGCCAAACCGACGCTGGCCCGC		
	1167				
Query	140		CCACGGGAAGTACACCGGCACGAATGCCGGCTGAACCCCGCGGGCGAGTCTGGTCGCAA		
	199				
Sbjct	1166		CCACGGGAAGTACACCGGCACGAATGCCGGCTGAACCCCGCGGGCGAGTCTGGTCGCAA		
	1107				
.....					
Query	920		CCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTGATTACGATAATCAACTCAGACTG		
	979				
Sbjct	386		CCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTGATTACGATAATCAACTCAGACTG		
	327				
Query	980		CATACTTTCAGAACAGCCCTTCATGTTGgggggtcctcgggcggggcgggggccccggggggc		
	1039				
Sbjct	326		CATACTTTCAGAACAGCCCTTCATGTTGGGG-TCTTCGGCGGG-CGCEGG-CCCGGGGG-C		
	271				
Query	1040		gcaagggcctccccggcggcggcgtcgaaaacgggggccccgcGAAACCAACCAGGGT		
	1099				
Sbjct	270		GCAAGG-CCTCCCC-GGC-GGCCGTCGAAA-CGGCGGG-CCCGCCGAAGC-AACAAGG-T		
	218				
Query	1100		ACGATTGAACCCGGCTTGGGAAGGTTTGAACCCCAAAGGGCCCTCACTCCGGTAATGAT		
	1159				
Sbjct	217		ACGATAGA-CACGGGT-GGGA-GGTTGGA--CCCAGAGGGCCCTCACTC-GGTAAT-GAT		
	165				
Query	1160		CCTTCCCCCAAGGTTACCTTACGGAAACCTT-TTACTAC	1198	
Sbjct	164		CCTT-CCGCA-CGTTACCT-ACGGAAACCTTCTTACCAC	128	

Hình 3.13. So sánh chuỗi nucleotide chủng nấm phân lập từ bệnh nhân 50

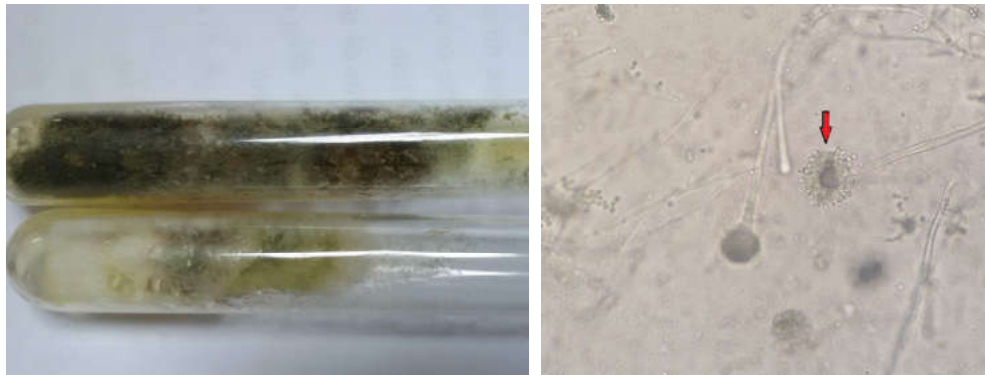
Chuỗi nucleotide thu được ở BN 50 trùng hợp >97% với chuỗi trên Genbank Định danh *A. fumigatus*.



Hình 3.14. Hình ảnh nấm *Aspergillus oryzae* trong tiêu bản mô bệnh học ở bệnh nhân nghiên cứu

BN mã số NB_43, ngày 16 sau bông, nhuộm PAS, x400.

Xuất hiện các sợi nấm ngắn, có vách ngăn, phân nhánh 45° .



Hình 3.15. Nấm *Aspergillus oryzae* trong tiêu bản mô bệnh học ở bệnh nhân nghiên cứu

Nhận xét:

Hình ảnh đại thể: Khuẩn lạc màu vàng xanh, bề mặt mỏng, có nhiều bột mịn, mặt trái màu nâu vàng.

Hình ảnh vi thể: Đầu sinh bào tử (mũi tên) dạng tia, màu vàng xanh. Bọng hình cầu hoặc gần cầu đường kính 25-45 μm . Cuống thể bình 6-10 x 3-

5 μm . Thể bình 6-10 x 4-5 mọc trực tiếp từ bông hay từ cuống thể bình. Bào tử hình cầu tới gần cầu đường kính 3-4 μm , màu xanh xám, xù xì. Định danh: *A. oryzae*.

Aspergillus oryzae strain NB_43_02_07 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

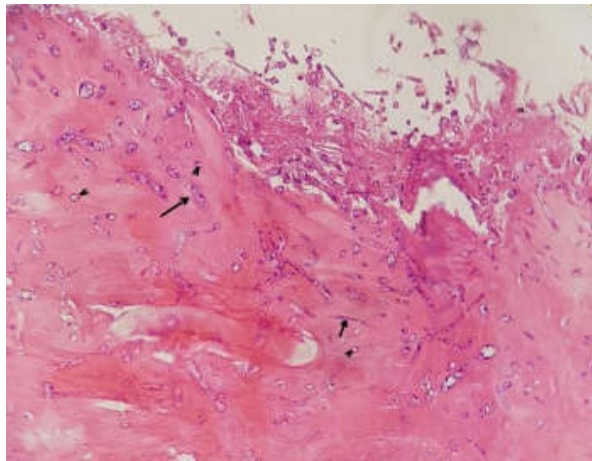
Sequence ID: [MH934917.1](#) Length: 1242 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2294 bits(1242)	0.0	1242/1242(100%)	0/1242(0%)	Plus/Minus
Query	1	AGACGGCTCATCTCATGCGTCGATCGTGGCAGCGCGTTCCTCGGTCCAGGCTGGCCGCAT		
60				
Sbjct	1242	AGACGGCTCATCTCATGCGTCGATCGTGGCAGCGCGTTCCTCGGTCCAGGCTGGCCGCAT		
1183				
Query	61	TGCACTCGGGCTATAAGGTGCCCGGAGGGCACACACATTCGGGAGCCCTTTGACCGGCC		
120				
Sbjct	1182	TGCACTCCGGCTATAAGGTGCCCGGAGGGCACTACATTCGGGAGCCCTTTGACCGGCC		
1123				
Query	121	CCCCAACCGAGCGCTGCCCGCCCGCCAGGCAACTACACCGGCACCAATGCCGCCTCAACC		
180				
Sbjct	1122	CCCCAACCGAGCGCTGCCCGCCCGCCAGGCAACTACACCGGCACCAATGCCGCCTCAACC		
1063				
Query	181	CTGGAGCGGAGTCTCTCGCAAGCGCTTCCTTTCACAATTCACCTGCTTTTTAATC		
240				
480				
Query	1141	CTAACCCCTCCGGTAAAGGATCCCTTTCCGCCAGGGTTCACCCTAACGGAAAACCTTGTAT		
1200				
Sbjct	102	CTAACCCCTCCGGTAAAGGATCCCTTTCCGCCAGGGTTCACCCTAACGGAAAACCTTGTAT		
43				
Query	1201	TAACATCtctctctctctCTCTCAAAAAAGGAGAAAAATAAGGGTT 1242		
Sbjct	42	TAACATCTTTTCTCTCTCAAAAAAGGAGAAAAATAAGGGTT 1		

Hình 3.16. So sánh chuỗi nucleotide chủng nấm phân lập từ BN_43

Nhận xét

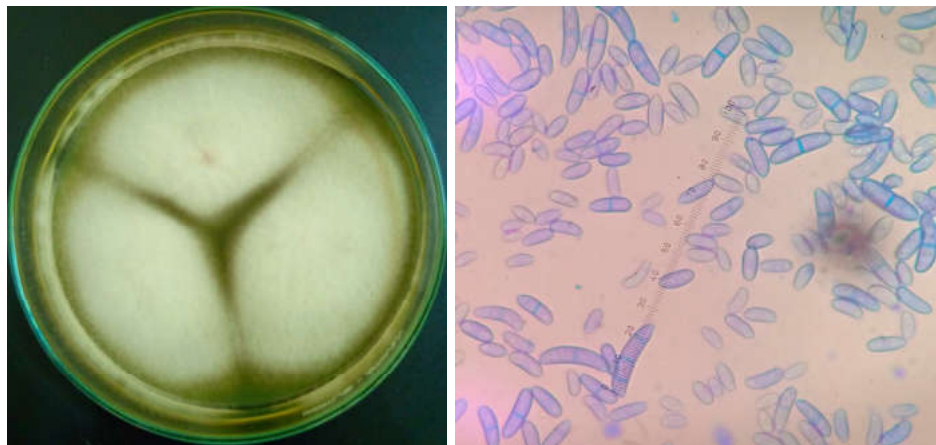
Chuỗi nucleotide thu được ở BN 43 trùng hợp >99% với chuỗi trên Genbank Định danh *A. oryzae*.



Hình 3.17. Hình ảnh nấm *Fusarium* trong tiêu bản mô bệnh học ở bệnh nhân nghiên cứu

BN 366, tiêu bản nhuộm HE.

Trong mô sinh thiết thấy sợi nấm kích thước thay đổi (mũi tên), đôi khi có cấu trúc giống nấm men (đầu mũi tên), nghi ngờ nấm *Fusarium* (BN 366).



Hình 3.18. Hình ảnh đại thể, vi thể *Fusarium* phân lập được từ bệnh nhân nghiên cứu

Phân lập nấm từ mô sinh thiết BN 366: Nấm phát triển nhanh, với sợi nấm không khí màu trắng, mặt trái không màu.

Vi thể: Các đại bào tử cong vừa phải, đầu tròn, 1 - 3 vách ngăn, kích thước 10 - 28 x 2 - 5 μ m. Định danh: *Fusarium solani*.

Fusarium solani isolate DSM 106836 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: MH055400.1 Length: 1143 Number of Matches: 1

Range 1: 34 to 1029		GenBank	Graphics	▼ Next Match	▲ Pr
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1840 bits(996)	0.0	996/996(100%)	0/996(0%)	Plus/Plus	
Query 1	AGGGATCATTACCGAGTTATACAAC	CTCATCAACCTGTGAACATACCTAAAACGTTGGCTT	60		
Sbjct 34	AGGGATCATTACCGAGTTATACAAC	CTCATCAACCTGTGAACATACCTAAAACGTTGGCTT	93		
Query 61	CGGCGGGAACAGACGGCCCCGTAACACGGGCGCCCCGCCAGAGGACCCCCA	AACTCTG	120		
Sbjct 94	CGGCGGGAACAGACGGCCCCGTAACACGGGCGCCCCGCCAGAGGACCCCCA	AACTCTG	153		
Query 121	TTTCTATTATGTTTCTTCTGAGTAAAACAAGCAAATAAAATAAACTTTCA	AACCGGAT	180		
Sbjct 154	TTTCTATTATGTTTCTTCTGAGTAAAACAAGCAAATAAAATAAACTTTCA	AACCGGAT	213		
Query 181	CTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGACGAAATGCGATAAGTAATGTGA	ATTGCAG	240		
Sbjct 214	CTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGACGAAATGCGATAAGTAATGTGA	ATTGCAG	273		
Query 241	AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATT	CTGGCGGCA	300		
Sbjct 274	AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATT	CTGGCGGCA	333		
Query 301	TGCCGTTCGAGCGTCATTACAACCTCAGGCCCGGGCCCTGGCGTTGGGG	ATCGGCA	360		
Sbjct 334	TGCCGTTCGAGCGTCATTACAACCTCAGGCCCGGGCCCTGGCGTTGGGG	ATCGGCA	393		
Query 361	GGGCCCCCTGCGGGCACACGCCCTCCCCAAATACAGTGGCGGTCCC	CGCAGCTTCC	420		
Sbjct 394	GGGCCCCCTGCGGGCACACGCCCTCCCCAAATACAGTGGCGGTCCC	CGCAGCTTCC	453		
.....					
Query 601	CTCAAATTTGAAATCTGGCTCTCGGGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATG	CTTTTGGTG	660		
Sbjct 634	CTCAAATTTGAAATCTGGCTCTCGGGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATG	CTTTTGGTG	693		
Query 661	AGGTGCTTCCGAGTTCCCTGGAACGGGACGCCATAGAGGGTGAGAGCCCG	CTGGTTG	720		
Sbjct 694	AGGTGCTTCCGAGTTCCCTGGAACGGGACGCCATAGAGGGTGAGAGCCCG	CTGGTTG	753		
Query 721	GACACCGATCCTCTGTAAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATG	CTGCTCAA	780		
Sbjct 754	GACACCGATCCTCTGTAAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATG	CTGCTCAA	813		
Query 781	ATGGGAGGTATATGCTTCTAAAGCTAAATACCGGCCAGAGACCGATAGCG	CACAAGTAG	840		
Sbjct 814	ATGGGAGGTATATGCTTCTAAAGCTAAATACCGGCCAGAGACCGATAGCG	CACAAGTAG	873		
Query 841	AGTGATCGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGA	AAATTTGTTGA	900		
Sbjct 874	AGTGATCGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGA	AAATTTGTTGA	933		
Query 901	AAGGGAAGCGCTTGTGACCAGACTTGGGCTTGGTTGATCATCCGGGGTTC	CCCCGGTGC	960		
Sbjct 934	AAGGGAAGCGCTTGTGACCAGACTTGGGCTTGGTTGATCATCCGGGGTTC	CCCCGGTGC	993		
Query 961	ACTCTCCGGCCAGGCCAGCATCAGTTCGCCCTGG	996			
Sbjct 994	ACTCTCCGGCCAGGCCAGCATCAGTTCGCCCTGG	1029			

Hình 3.19. So sánh chuỗi nucleotide chủng nấm phân lập từ BN_43

Nhận xét

Chuỗi nucleotide thu được ở BN 43 trùng hợp >99% với chuỗi MH055400.1 trên Genbank Định danh *Fusarium solani*.

Bảng 3.22. Một số chuỗi nucleotide nấm sợi đăng ký trên ngân hàng gen

Bệnh phẩm	Mã BN	Mã genbank	Loài
Mô sinh thiết	43	MH934917	<i>A. oryzae</i>
Mô sinh thiết	50	MH932411	<i>A. fumigatus</i>
Mô sinh thiết	160	MN173209	<i>A. flavus</i>
Mô sinh thiết	335	MN174035	<i>A. flavus</i>
Mô sinh thiết	350	MN174037	<i>A. chevalieri</i>
Mô sinh thiết	366	MN066126	<i>F. solani</i>
Mô sinh thiết	420	MN174036	<i>A. nomius</i>

Nhận xét

Phân tích phát hiện 6 loài nấm sợi, chủ yếu là *Aspergillus*, có một BN nhiễm *Fusarium*

Bảng 3.23. Thành phần loài gây nhiễm nấm huyết

Loài	Số lượng	Tỷ lệ (%)
<i>C. tropicalis</i>	9	64,29
<i>C. albicans</i>	3	21,43
<i>C. parapsilosis</i>	2	14,29
Tổng	14	100

Nhận xét

Chỉ gặp nấm men gây nhiễm nấm huyết.

Căn nguyên phổ biến nhất là *C. tropicalis* (64,29%), *C. albicans* (21,43%). Ngoài ra còn gặp *C. parapsilosis*.

3.3. Kết quả nghiên cứu xác định độ nhạy của nấm và đánh giá kết quả điều trị nhiễm nấm ở bệnh nhân bỏng nặng

3.3.1. Kết quả xác định độ nhạy của nấm với thuốc kháng nấm

Bảng 3.24. Tỷ lệ đáp ứng của *Candida* với từng loại thuốc kháng nấm

Thuốc	Tổng số mẫu*	Nhạy		Trung gian		Kháng	
		n ₁	%	n ₂	%	n ₃	%
Fluconazol	180	150	83,33	9	5,00	21	11,67
Voriconazol	181	163	90,06	7	3,87	11	6,08
Caspofungin	181	177	97,79	3	1,66	1	0,55
Micafungin	181	180	99,45	1	0,55	0	0,00
Amphotericin B	183	177	96,72	0	0,00	6	3,28
Flucytosin	182	172	94,51	6	3,30	4	2,20

(*: Một số chủng không có kết quả với một hoặc hai loại thuốc kháng nấm)

Nhận xét

Thuốc nhóm echinocandin (caspofungin và micafungin) có tỷ lệ nhạy cao nhất.

Tỷ lệ nhạy thấp nhất là thuốc nhóm azole: Fluconazol (83,33%), sau đó là voriconazol (90,06%).

Thuốc flucytosin (94,51%) và amphotericin B (96,72%) có tỷ lệ nhạy tương đối cao.

Bảng 3.25. Đáp ứng của *Candida albicans* với thuốc kháng nấm

Thuốc	Tổng số mẫu*	Nhạy		Trung gian		Kháng	
		n ₁	%	n ₂	%	n ₃	%
Fluconazol	74	64	86,49	6	8,10	4	5,41
Voriconazol	74	70	94,59	2	2,7	2	2,7
Caspofungin	73	73	100	0		0	
Micafungin	73	73	100	0		0	
Amphotericin B	74	71	95,95	0		3	4,2
Flucytosin	73	70	95,89	1	1,4	2	2,9

Nấm *C. albicans* chưa kháng echinocandin. Tỷ lệ nhạy với fluconazol thấp (86,49%), Tỷ lệ nhạy với flucytosin, voriconazol và amphotericin B khoảng 95%.

Bảng 3.26. Đáp ứng của *Candida tropicalis* với thuốc kháng nấm

Thuốc	Tổng số mẫu*	Nhạy		Trung gian		Kháng	
		n ₁	%	n ₂	%	n ₃	%
Fluconazol	86	69	80,23	3	3,49	14	16,28
Voriconazol	84	73	86,90	2	2,38	9	10,72
Caspofungin	86	84	97,66	1	1,16	1	1,16
Micafungin	86	85	98,84	1	1,16	0	0
Amphotericin B	87	85	97,70	0	0	2	2,30
Flucytosin	86	79	91,86	6	6,98	1	1,16

Tỷ lệ *C. tropicalis* kháng azol cao, kháng echinocandin và amphotericin B thấp.

Bảng 3.27. Đáp ứng của *Candida* khác với thuốc kháng nấm

Thuốc	Tổng số mẫu*	Nhạy		Trung gian		Kháng	
		n ₁	%	n ₂	%	n ₃	%
Fluconazol	19	14	73,68	1	5,26	4	21,05
Voriconazol	20	17	85,0	1	5,0	2	10,0
Caspofungin	21	20	95,24	1	4,76		
Micafungin	21	21	100				
Amphotericin B	21	20	95,24			1	4,76
Flucytosin	21	20	95,24			1	4,76

Nhận xét

Nấm không phải *C. albicans* hay *C. tropicalis* chưa kháng echinocandin.

3.3.2. Đánh giá kết quả điều trị nhiễm nấm ở bệnh nhân bỏng nặng

Bảng 3.28. Phác đồ điều trị kháng nấm áp dụng trên bệnh nhân

Điều trị / Chẩn đoán	Định hướng nấm	Đặc hiệu nấm	Tổng
FC	26	0	26
FWI	16	15	31
Nhiễm nấm huyết	2	5	7
FWI + nấm huyết	1	2	3
Tổng	45	22	67
Tỷ lệ (%)	67,16	32,84	100

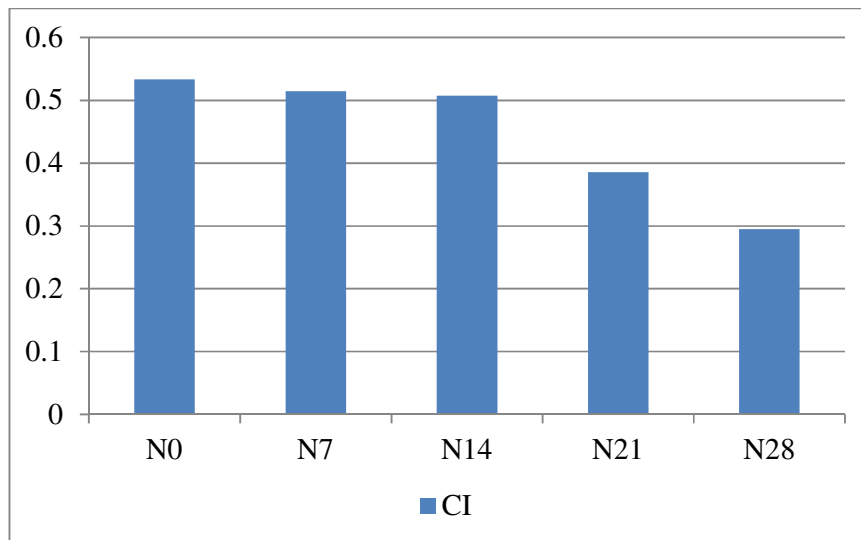
Phần lớn BN sử dụng phác đồ điều trị định hướng nấm.

Bảng 3.29. Diễn biến điểm Candida score theo kết quả điều trị

	Khỏi (n=46)	Tử vong (n=21)	Tổng	p
Tuần 1	4,6 ± 0,63	4,14 ± 0,69	4,23 ± 0,61	>0,05
Tuần 2	4,75 ± 0,58	4,62 ± 0,52	4,69 ± 0,57	>0,05
Tuần 3	4,94 ± 0,24	4,6 ± 0,55	4,78 ± 0,42	>0,05
p 1-2; 2 - 3	>0,05	>0,05	>0,05	
p 1-3	>0,05	>0,05	>0,05	

Nhận xét

Điểm Candida score đều trên 3. Sự thay đổi giữa các nhóm chưa có có ý nghĩa ($p > 0,05$).

**Hình 3.13. Diễn biến chỉ số nấm xâm thực sau điều trị**

Nhận xét

Chỉ số CI có xu hướng giảm so với trước khi điều trị.

Bảng 3.30. Thời gian sạch nấm trong mô sinh thiết (ngày, n=32)

Chỉ tiêu	Ngày
Trung bình	12,71
Độ lệch chuẩn	4,82
Trung vị	12
Tối thiểu – tối đa	7 - 23

(có 40 BN nhiễm nấm vết thương; trong đó có 34 BN được điều trị thuốc kháng nấm tuy nhiên có 2 BN không xét nghiệm lại kiểm tra).

Nhận xét

Thời gian sạch nấm trung bình trong mô sinh thiết bệnh nhân kể từ khi dùng thuốc kháng nấm là 12,71 ngày (7 đến 23 ngày).

Bảng 3.31. Thời gian sạch nấm trong máu bệnh nhân nhiễm nấm huyết (n = 10)

Chỉ tiêu	Ngày
Trung bình	8,11
Độ lệch chuẩn	2,71
Trung vị	9
Tối thiểu – tối đa	4 - 12

(có 14 BN nhiễm nấm huyết; trong đó có 10 BN được điều trị thuốc kháng nấm).

Nhận xét

Thời gian sạch nấm trung bình trong máu bệnh nhân kể từ khi dùng thuốc kháng nấm là 8,11 ngày (4 đến 12 ngày).

Bảng 3.32. Kết quả điều trị nhiễm nấm xâm lấn

Chẩn đoán	n	Khỏi		Không khỏi	
		SL	Tỷ lệ (%)	SL	Tỷ lệ (%)
Nhiễm nấm vết thương	31	24	77,42	7	22,58
Nhiễm nấm huyết	7	2	28,57	5	71,43
FWI + nấm huyết	3	1	33,33	2	66,67
Tổng	41	27	65,85	14	34,15

Kết quả điều trị nhiễm nấm xâm lấn có 65,85% khỏi.

Bảng 3.33. So sánh tỷ lệ tử vong theo phác đồ và thời gian điều trị nấm ở bệnh nhân nhiễm nấm xâm lấn

Chỉ tiêu			Không khỏi	Khỏi	Tổng	p
Định hướng điều trị	Định hướng nấm	n	3	16	19	0,048
		%	15,79	84,21	100	
	Đặc hiệu nấm	n	11	11	22	
		%	50,00	50,00	100	
Thời gian điều trị	Điều trị sớm	n	4	13	17	0,383
		%	23,53	76,47	100	
	Điều trị muộn	n	10	14	24	
		%	41,67	58,33	100	

Nhận xét

Kết quả điều trị phụ thuộc định hướng điều trị; không liên quan thời gian điều trị.

Chương 4. BÀN LUẬN

4.1. Tỷ lệ và yếu tố liên quan nhiễm nấm ở bệnh nhân bỏng nặng

Một số đặc điểm BN: Tuổi trung bình của nhóm BN nghiên cứu là 29,74 tuổi, hầu hết trong độ tuổi lao động (16 – 65 chiếm 66,75%). Nam giới chiếm tỷ lệ chủ yếu, tỷ lệ nam/nữ = 3,49/1.

Kết quả này phù hợp với các tổng kết số liệu trên BN bỏng. Tổng kết hồi cứu các BN bỏng tại bệnh viện Bỏng quốc gia từ 1/2008 đến tháng 12/2017 thấy 43,39% là BN trong độ tuổi lao động (từ 20 – 59 tuổi). Tỷ lệ nam/nữ = 3,49/1; cao hơn so với tỷ lệ bị bỏng chung (nam/nữ = 1,96/1); phù hợp với tổng kết tại viện bỏng là BN bị bỏng nặng hơn ở nam giới cao hơn nữ giới [2].

4.1.1. Tỷ lệ nhiễm nấm

4.1.1.1. Tỷ lệ nhiễm nấm xâm thực

Có 90% (360/400) trường hợp nhiễm nấm xâm thực, trong đó 77,25% trường hợp nhiễm nấm xâm thực đơn thuần và 12,75% trường hợp kết hợp nhiễm nấm xâm lấn. Tỷ lệ nhiễm nấm xâm thực chưa khác biệt giữa hai giới và giữa các nhóm tuổi. Vì tất cả các BN nhiễm nấm xâm lấn (nấm vết thương, nấm huyết) đều nhiễm nấm xâm thực nên tỷ lệ nhiễm nấm chung cũng là tỷ lệ nhiễm nấm xâm thực.

Tỷ lệ nhiễm nấm xâm thực trên BN bỏng rất cao là phù hợp vì đối tượng NC là những BN bỏng nặng, diện rộng, cần phải nằm điều trị tại ICU. Trên thế giới đã có một số nghiên cứu cho thấy tỷ lệ nhiễm nấm xâm thực ở các BN nằm điều trị tại ICU rất cao, có thể lên tới 50-80% [112]. NC tại một ICU ở Italy thấy tỷ lệ nhiễm nấm 92,3% [9]. Trong NC của chúng tôi theo dõi đến khi BN rời khỏi ICU, đánh giá dương tính ở bất kỳ thời điểm nào nên tỷ lệ cao như vậy cũng là phù hợp.

4.1.1.2. Tỷ lệ nhiễm nấm vết thương

Tỷ lệ nhiễm nấm vết thương thấp (9,75%), phù hợp với kết quả của đa số các NC trên thế giới. Trong NC của Spebar MJ, Pruitt BA Jr. (1981) trong 6 năm trên 1.513 BN bông điều trị tại bệnh viện, nhiễm nấm ở 521 BN, trong đó 452 BN nhiễm *Candida*, 36 BN (2,38%) xuất hiện nhiễm nấm vết thương, 75% BN có nhiễm nấm vết thương cũng đồng thời có nhiễm nấm huyết [113].

Nghiên cứu ở châu Á thấy tỷ lệ nhiễm nấm vết thương là 10% [15]. Một số tác giả cho rằng nhiễm *Candida* vết thương khoảng 2–21% [10], 4% - 28,2% [43]. Becker và cộng sự nghiên cứu tại Mỹ thấy 9,9% vết bông có nhiễm trùng trong đó có 67,46% do nấm (nhiễm nấm vết thương bông khoảng 6,6%) [14]. NC tại Iran thấy tỷ lệ nhiễm nấm xâm lấn trong số các BN bông là 13% [114].

Tỷ lệ nhiễm nấm vết thương thấp cũng phù hợp với kết quả NC thấy nhiễm nấm trên bề mặt vết thương cũng rất thấp. Theo các tác giả nguồn nhiễm nấm vết thương bông trên BN chủ yếu là từ bản thân BN. Trong quá trình điều trị một số chủng nấm *Candida* có nguồn gốc từ đường tiêu hóa, hô hấp, tiết niệu... đã lan ra bề mặt vết thương, sau đó nấm trên bề mặt vết thương xâm lấn xuống mô lành. Nhiễm nấm bông trên bề mặt liên quan nhiễm nấm sâu hơn. Đôi khi nhiễm nấm vết thương có thể do nấm từ môi trường xâm nhập vào vết thương khi bảo vệ vết thương không tốt.

4.1.1.3. Tỷ lệ nhiễm nấm huyết

Tỷ lệ nhiễm nấm huyết là 3,75%, phù hợp với một số thông báo trước đó. Spebar MJ, Pruitt BA Jr. (1981) nghiên cứu tổng kết 6 năm trên 1.513 BN bông điều trị tại bệnh viện thấy 52 BN (3,43%) nhiễm nấm huyết; 75% BN có nhiễm nấm vết thương cũng đồng thời có nhiễm nấm huyết [113]. Một số tác giả khác thông báo nhiễm *Candida* spp. huyết khoảng 3–5% BN bông [10],

2,35% [52], 1,8–7,6% trên tổng số BN bỏng; 12–21% trên BN bỏng có *Candida* trên bề mặt tổn thương [19]. Cũng có NC cho thấy tỷ lệ nhiễm nấm huyết trên BN bỏng cao hơn như NC của Fochtmann A (2015) tại Viên, Áo là 11% [115]. Tỷ lệ này cao hơn so với thông báo tại bệnh viện Chợ Rẫy, thành phố Hồ Chí Minh, trong 3 năm (2012 – 2014) có 858 BN nặng được nhận vào khoa bỏng điều trị, tỷ lệ nhiễm nấm huyết 2,09% [18]. Tuy nhiên ở bệnh viện Chợ Rẫy thống kê tất cả những bệnh nhân điều trị bỏng nội trú tại bệnh viện, còn trong nghiên cứu của chúng tôi là những bệnh nhân bỏng nặng, cần điều trị ở khoa Hồi sức cấp cứu nên tỷ lệ nhiễm nấm huyết cao hơn là phù hợp.

Với tổng số ngày nằm ICU của toàn bộ số BN NC là 7356 ngày, tỷ lệ nhiễm nấm huyết là 2,04/1000 ngày. Tỷ lệ này phù hợp với một số NC trên thế giới và Việt Nam. Eggimann P. và cs (2011) thấy tỷ lệ nhiễm nấm huyết ở ICU cao gấp 10 lần so với các khoa khác, từ 0,3 – 1,5/1.000 ngày ICU [88]. Tỷ lệ này thường ở các nước phát triển (ở Đức là 0,07/1000 ngày ICU [116]), cao ở nước kém phát triển hơn, ví dụ ở Ấn Độ là 1,24 /1000 ngày [117].

Đáng chú ý là nhiễm nấm vết thương và nhiễm nấm huyết không phải luôn song hành với nhau. Trong NC này chỉ có $3/39 = 7,69\%$ trường hợp nhiễm đồng thời vết thương và máu, thấp hơn thông báo của Spebar MJ, Pruitt BA Jr. (1981) thấy 75% BN có nhiễm nấm vết thương cũng đồng thời có nhiễm nấm huyết [113]. Điều này có thể lý giải là do nguồn gốc nấm vào máu phần lớn là từ đường tiêu hóa hoặc qua da thông qua một can thiệp xâm lấn như đặt catheter. Con đường nấm xâm nhập từ vết bỏng vào máu ít gặp.

Tỷ lệ nhiễm nấm xâm lấn không khác biệt giữa hai giới tuy nhiên tỷ lệ nhiễm nấm xâm lấn ở các nhóm tuổi khác nhau có ý nghĩa; tuổi 1 - 15 có tỷ lệ nhiễm thấp hơn nhóm tuổi khác. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Fochtmann và cộng sự (2015) thấy tuổi trẻ có tỷ lệ nhiễm nấm huyết thấp hơn so với nhóm người trưởng thành (OR= 0,92–1,0, p = 0,037) [115].

4.1.2. Các yếu tố liên quan nhiễm nấm ở bệnh nhân bỏng nặng

4.1.2.1. Các yếu tố liên quan nhiễm nấm xâm thực

- Kết quả NC cho thấy BN nhiễm nấm xâm thực có diện tích bỏng và diện tích bỏng sâu trung bình lớn hơn của BN không nhiễm nấm.

Kết quả này phù hợp với một số NC khác cho thấy sự liên quan giữa diện tích bỏng với tỷ lệ nhiễm nấm *Candida*. NC của Sharma (2016) thấy tỷ lệ nhiễm nấm 0% trên BN diện tích bỏng 20 – 30%, 22,2% nếu diện tích bỏng 31 – 40%, 40% nếu diện tích bỏng 41 – 50% và 63,6% nếu diện tích bỏng trên 50% [13]. NC của Goyal và cộng sự (2010) cho thấy diện tích bỏng chung và diện tích bỏng sâu khác biệt có ý nghĩa giữa nhóm nhiễm và không nhiễm nấm xâm thực (48,4% và 40,6%; 28,1% và 20,1%) [118].

Phân tích đơn biến thấy nhiễm trùng nặng, nằm lâu ở ICU, glucose máu cao, lọc máu, TPN liên quan nhiễm nấm; tuy nhiên phân tích đa biến không có yếu tố nào làm tăng nguy cơ nhiễm nấm xâm thực. Với tỷ lệ nhiễm nấm ngay từ khi BN vào ICU đã cao và thay đổi không đáng kể trong quá trình nằm ở ICU thì kết quả này là hợp lý. Một số nghiên cứu khác cũng cho kết quả tương tự khi tỷ lệ nhiễm nấm ở BN ICU cao ngay từ khi BN vào nằm điều trị ở ICU [9].

4.1.2.2. Các yếu tố liên quan nhiễm nấm xâm lấn

- Kết quả NC cho thấy tỷ lệ nhiễm nấm xâm lấn không khác biệt giữa nhóm có bỏng hô hấp, sốc bỏng, điểm APACHE>20;

BN nhiễm nấm xâm lấn có diện tích bỏng chung và diện tích bỏng sâu trung bình cao hơn nhóm không nhiễm nấm xâm lấn; tình trạng nhiễm trùng nặng, glucose máu cao, suy thận, catheter tĩnh mạch, lọc máu, hô hấp nhân tạo, nuôi dưỡng đường tĩnh mạch, dùng thuốc ức chế miễn dịch, nằm điều trị dài ngày ở ICU, nhiễm nấm xâm thực nặng làm tăng nguy cơ nhiễm nấm xâm

lần, thời gian nằm ICU kéo dài làm tăng nguy cơ nhiễm nấm xâm lấn. Tuy nhiên phân tích đa biến thấy chỉ có glucose máu cao, nhiễm nấm xâm thực nặng và thời gian nằm ICU kéo dài làm tăng nguy cơ nhiễm nấm xâm lấn.

Hiện nay, có rất ít NC về bệnh nấm xâm lấn ở BN bị bỏng nặng. Những BN này có chung các yếu tố nguy cơ với các bệnh nhiễm nấm xâm lấn như các BN bị bệnh nặng khác tuy nhiên cũng có những đặc điểm khác như việc mất hàng rào bảo vệ ở da do bỏng rộng, nhiễm nấm xâm thực, sử dụng liệu pháp điều trị toàn thân và tại chỗ. Thêm vào đó, tỷ lệ sống sót tăng lên trong những thập kỷ gần đây ở những BN bị bỏng nặng do tiến bộ trong điều trị đã dẫn tới sự gia tăng nhiễm *Candida* xâm lấn. Điều này giải thích mối quan tâm ngày càng tăng trong việc chẩn đoán sớm hơn và chính xác hơn cũng như các phương pháp điều trị hiệu quả hơn để giảm tỷ lệ bệnh và tử vong của nhiễm *Candida* huyết ở những BN bị bỏng nặng. Nhiều NC tại các đơn vị điều trị bỏng cho thấy các yếu tố liên quan nhiễm nấm liên quan đến môi trường hoặc BN (tình trạng bệnh bỏng, can thiệp điều trị...). Ngoài các yếu tố nguy cơ chung, BN bỏng còn có yếu tố khác như tình trạng ức chế miễn dịch liên quan đến tổn thương bỏng

- Bỏng hô hấp ảnh hưởng không đáng kể tới tỷ lệ nhiễm nấm xâm lấn, phù hợp với kết quả NC của Dudoignon E (2019) thấy bỏng hô hấp không liên quan tới nhiễm nấm huyết [119]. Một số tác giả khác cho rằng bỏng hô hấp cũng được coi là yếu tố nguy cơ nhiễm nấm xâm lấn [15], [43]. Fochtmann và cộng sự (2015) thấy các yếu tố liên quan *Candida* huyết trên BN bỏng nặng phải nằm điều trị ở ICU là tuổi trẻ, nữ, biến chứng tiêu hóa cần phẫu thuật, bỏng hô hấp (OR: 7,96) [115].

- Trong NC này thấy sốc bỏng không làm tăng nguy cơ nhiễm nấm xâm lấn. Escrig và cộng sự (2016) cũng nhận xét sốc bỏng liên quan chủ yếu tới nguy cơ tử vong hơn là làm tăng nguy cơ nhiễm nấm xâm lấn [54].

- Điểm APACHE thường được sử dụng để đánh giá mức độ nặng của BN nằm ở ICU. Những bệnh nhân có APACHE > 20 có tiên lượng nặng hơn. Pittet và cộng sự thấy mức độ nặng của bệnh (đánh giá bằng điểm APACHE II) liên quan tới nhiễm *Candida* xâm lấn ($p < 0,01$) [23]. Một NC tại Brazil thấy APACHE II >20 liên quan tới *Candida* huyết [120]. Mức độ nặng của bệnh không những liên quan tới nguy cơ nhiễm nấm xâm lấn mà còn tới nguy cơ tử vong [121]. Trong NC này tình trạng BN nằm ở ICU đánh giá theo điểm APACHE thấy BN có APACHE II >20 không làm tăng nguy cơ nhiễm nấm xâm lấn, có thể do chúng tôi thống kê cả những BN nhiễm nấm vết thương trong nhiễm nấm xâm lấn, trong khi đó phần lớn NC khác chỉ thống kê nhiễm nấm huyết.

- Thở máy và lọc máu không liên quan đến nhiễm nấm xâm lấn. Một số NC cho rằng thông khí nhân tạo có liên quan tới nhiễm nấm huyết [122], làm tăng nguy cơ tử vong [123] tuy nhiên nguy cơ này chủ yếu liên quan tới thông khí nhân tạo kéo dài (> 10 ngày) [15]. Lọc máu cũng được Ostrosky-Zeichner và cộng sự cho là một trong những yếu tố dự báo *Candida* xâm lấn [26] tuy nhiên Hermsen ED (2011) thấy giá trị dự báo dương (PPVs) thấp, giá trị dự báo âm (NPV) cao và cho rằng quy tắc này chỉ hữu ích trong xác định BN không có khả năng phát triển nấm *Candida* xâm lấn, hạn chế sử dụng thuốc kháng nấm không cần thiết, ít có ý nghĩa dự báo BN sẽ phát triển *Candida* xâm lấn [27].

- Đặt catheter, nuôi dưỡng bằng đường tĩnh mạch nhân tạo không liên quan nhiễm nấm. Một số tác giả cho rằng đặt catheter có liên quan tới nhiễm nấm xâm lấn [124], tuy nhiên không phải là nguồn duy nhất của nhiễm nấm trên BN [82] và đôi khi việc phải sử dụng catheter có thể là hậu quả chứ không phải là nguyên nhân của nhiễm *Candida* huyết [125]. Nuôi dưỡng bằng đường ngoại vi (TPN) là một trong những yếu tố dự đoán *Candida* xâm lấn ở

BN ICU [81], [26]. Tuy nhiên những NC này chỉ phân tích nguy cơ với nhiễm nấm huyết nên những yếu tố mở đường cho nấm tiếp cận mạch máu (như TPN, đặt catheter) làm tăng nguy cơ nhiễm nấm huyết. Trong NC của chúng tôi những trường hợp nhiễm nấm xâm lấn chủ yếu là nhiễm nấm vết thương, do đó những yếu tố TPN, đặt catheter không liên quan là phù hợp.

- Sử dụng thuốc ức chế miễn dịch: Một số NC cho thấy nguy cơ nhiễm *Candida* huyết tăng ở BN sử dụng thuốc ức chế miễn dịch [75], [15]. Thuốc ức chế miễn dịch, corticosteroid cũng được coi là nghi ngờ tới nhiễm nấm xâm lấn [26]. Khi phân tích đa biến thì thấy sử dụng thuốc ức chế miễn dịch không làm tăng nguy cơ nhiễm nấm xâm lấn. Ở BN bỏng nặng, liệu trình ức chế miễn dịch thường sử dụng ngắn ngày do đó nguy cơ tăng nhiễm trùng cũng thấp, khác so với người ghép tạng, dùng ức chế miễn dịch dài ngày.

- Nhiễm nấm xâm thực: Nhiễm nấm xâm lấn liên quan tới nhiễm nấm xâm thực và nhiễm nấm xâm thực nặng. Không có BN nào nhiễm nấm xâm lấn mà không có nhiễm nấm ở các vị trí xâm thực khác.

Nhiễm nấm xâm thực là một trong những yếu tố nguy cơ quan trọng nhất của nhiễm nấm xâm lấn [19]. Nhiễm *Candida* xâm thực là một yếu tố nguy cơ độc lập cho sự phát triển của IC, những BN có chỉ số xâm thực (CI) cao hơn có nguy cơ cao hơn phát triển bệnh xâm lấn; nhiễm nấm xâm thực thường đi trước nhiễm nấm xâm lấn và các phương pháp điều trị làm giảm CI đồng thời làm giảm nguy cơ nấm xâm lấn. Việc thiếu vắng *Candida* xâm thực là một chỉ số mạnh loại trừ IC [126].

Sau khi bị bỏng, nấm *Candida* có mặt sẵn trên da, niêm mạc mũi, họng và đường tiêu hóa là nguồn gốc gây nhiễm nấm đặc biệt trên BN có suy giảm miễn dịch. Tình trạng loét dạ dày từ trước hoặc phát sinh trong thời gian điều trị có thể là cửa ngõ cho nấm xâm nhập vào cơ thể. Sự có mặt của nấm *Candida* trên da, niêm mạc là yếu tố liên quan rõ ràng và quan trọng đối với

nhiễm nấm huyết và nhiễm nấm nội tạng khác. Tỷ lệ nhiễm nấm huyết là 1,8–7,6% trên tổng số BN bỏng; 12–21% trên BN bỏng có *Candida* trên bề mặt tổn thương; 34% nếu có ít nhất hai vị trí nhiễm nấm [19]. Trong một NC 143 trường hợp cấy nấm dương tính cho thấy 43 BN có mọc nấm ở nhiều hơn 3 vị trí (không điều trị kháng nấm) dẫn đến tình trạng nhiễm nấm huyết. Tình trạng nấm phát triển ở tổn thương bỏng thấy xuất hiện ở 90% số BN bỏng bị nhiễm *Candida* huyết [52].

Nghiên cứu về nguồn gốc lây nhiễm nấm *Candida* Gupta N và cộng sự (2004) thấy các chủng *C. albicans* trên các BN khác nhau tuy nhiên giống nhau trên cùng một BN chứng tỏ vai trò của nấm sẵn có trên BN. Một số loài nấm có thể từ môi trường bên ngoài. *C. albicans* thường có nguồn gốc nội sinh, *C. tropicalis* có cả nội và ngoại sinh trong khi đó *C. parapsilosis* chủ yếu từ ngoại sinh [11]. Trong NC này có BN giải trình tự 3 chủng nấm phân lập được từ dịch họng, dịch vết thương và máu đều là *C. tropicalis*.

Kết quả phân tích đa biến thấy nhiễm nấm xâm thực nặng liên quan tới nhiễm nấm xâm lấn. Chính vì nguy cơ nhiễm nấm xâm lấn tăng lên cùng với nhiễm nấm xâm thực nặng nên nhiễm nấm xâm thực có mặt trong nhiều quy tắc dự báo nhiễm nấm xâm lấn. Năm 1994 Pittet và cộng sự NC trên BN phẫu thuật thấy mức độ nặng của bệnh cùng với nhiễm *Candida* xâm thực là những yếu tố độc lập liên quan tới nhiễm *Candida* xâm lấn; không phải tất cả BN nhiễm nấm xâm thực đều nhiễm nấm xâm lấn tuy nhiên tất cả những BN nhiễm nấm xâm lấn đều có CI $\geq 0,5$ [23]. León và cộng sự đưa ra điểm Candida score gồm nhiều chỉ tiêu trong đó có nhiễm nấm xâm thực nhiều vị trí để dự đoán BN nhiễm nấm xâm lấn [81]. Năm 2014 Eggimann P thấy chỉ số *Candida* (CI) vẫn là một yếu tố nguy cơ quan trọng nhiễm *Candida* sâu hơn [25]. Các tác giả đề nghị ở những BN có nguy cơ nấm *Candida* xâm lấn cần sàng lọc 2 lần/tuần để phát hiện tình trạng nấm xâm thực [25]. Kết quả

NC của chúng tôi cho thấy nhiễm nấm xâm thực nặng liên quan tới nhiễm nấm xâm lấn, phù hợp với kết quả của nhiều tác giả khác.

- Thời gian nằm điều trị ở ICU: Tỷ lệ BN nhiễm nấm xâm lấn tăng theo thời gian nằm tại khoa ICU.

Các yếu tố liên quan tới nhiễm nấm xâm lấn đã được xác định từ lâu và ít thay đổi, trước những năm 1990 phần lớn NC chú ý tới ung thư và giảm bạch cầu hạt, tuy nhiên gần đây các NC chú ý tới BN không giảm bạch cầu hạt, điều trị ở ICU, yếu tố quan trọng nhất là thời gian điều trị ở ICU [48].

Trong NC này những BN nằm hồi sức từ 15 ngày trở lên được coi là nằm lâu ở ICU. Khi phân tích đơn biến và đa biến thấy thời gian nằm ở ICU trên 15 ngày làm tăng nguy cơ nhiễm nấm xâm lấn. Kết quả này phù hợp với NC của một số tác giả khác Thời gian là một yếu tố nguy cơ quan trọng trong nhiễm nấm xâm lấn. BN càng nằm lâu ở ICU thì nguy cơ nhiễm nấm xâm lấn càng cao [15], Theo một số NC thấy tỷ lệ nhiễm nấm ở BN bỏng tăng theo thời gian [127], [24]. NC tại Trung Quốc thấy 77,78% trường hợp nhiễm nấm từ tuần thứ 2 sau bỏng [21]. NC của Ayelet Raz-Pasteur về căn nguyên gây nhiễm trùng huyết ở những BN bỏng nặng thấy *Candida* chiếm 1% trong tuần đầu, 4% ở tuần thứ 2; 11% ở tuần thứ 3 và 35% ở tuần thứ 4 [22].

- Glucose máu cao: Tăng glucose máu là tình trạng khá thường gặp ở BN bỏng, có thể là biểu hiện của tình trạng đái đường trước đó hoặc cũng có thể là biểu hiện của tăng đường máu do stress hay tăng đường máu bệnh viện (hospital related hyperglycemia) [1]. Khi bị bỏng nặng có nhiều rối loạn nội tiết, làm tăng sản xuất các hormon tăng đường máu như glucagon, catecholamin, cortisol, đây chính là phản ứng của cơ thể nhằm tăng tạo ra glucose để đáp ứng nhu cầu năng lượng sau bỏng [1].

Tăng glucose máu được coi là phản ứng có lợi của cơ thể, nếu không

điều trị thì sau một thời gian đường máu sẽ trở về bình thường, tuy nhiên ở BN bỏng nặng tăng glucose sớm và kéo dài. Tăng glucose máu gây suy giảm miễn dịch, tăng nguy cơ nhiễm trùng ở BN bỏng, khi glucose máu tăng trên 200 mg/dl gây glycosat các globulin miễn dịch từ đó gây giảm đáng kể hoạt động opsonin, tăng trên 250 mg/dl đã làm ảnh hưởng đến hóa ứng động bạch cầu và thực bào; tăng trên 300 mg/dl gây ức chế hoạt động của bạch cầu đa nhân trung tính [1].

Những BN bỏng có glucose máu cao có nguy cơ nhiễm nấm xâm lấn cao hơn. Kết quả này cũng phù hợp với nhận xét của một số tác giả về nguy cơ bệnh *Candida* xâm lấn ở người có glucose máu cao [128], [15] ...

4.2. Thành phần loài nấm ở bệnh nhân bỏng nặng

4.2.1. Thành phần loài nấm gây nhiễm nấm xâm thực

Trong luận án này việc định danh nấm men kết hợp các kỹ thuật truyền thống, dựa vào các đặc điểm hình thái khuẩn lạc khi nuôi cấy trên môi trường Brilliance Candida Agar và đặc tính sinh lý, sinh thái với hệ thống Vitek II, một hệ thống định danh tự động cho kết quả tương đối phù hợp với các kỹ thuật chuẩn [71]. Ngoài ra, luận án còn ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử để thẩm định kết quả định danh với các chủng nấm phân lập được từ mẫu vô khuẩn (mô sinh thiết, máu), một số chủng được định danh là loài hiếm gặp, một số chủng đại diện cho các loài hay gặp (*C. albicans* và *C. tropicalis*). Kết quả chạy PCR với mồi ITS1 - ITS4 thu được sản phẩm có kích thước hơn 500 bp, tương ứng với kích thước của một số loài *Candida* như *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* [129]. Để xác định chính xác loài thu được có thể sử dụng enzyme phân cắt giới hạn, cắt sản phẩm PCR ra thành các mảnh có kích thước nhỏ hơn, sau đó so sánh với tài liệu để định danh [129]. Tuy nhiên kỹ thuật này có nhược điểm là chỉ định danh được một số loài nhất định, thường là các loài hay gặp, không thể định danh được các loài

hiếm gặp như trong luận án. Do đó kỹ thuật giải trình tự, phân tích trình tự thu được đã được ứng dụng để xác định loài nấm men.

Với các nấm sợi, việc định danh dựa vào đặc điểm hình thái dễ dàng hơn nấm men vì hình thái nấm sợi phong phú hơn, đặc biệt là hình thái bào tử nấm sợi, cho phép xác định đến giống, loài tương đối chính xác. Do đó một số tác giả trên thế giới đã phát triển các khóa định loài nấm sợi áp dụng cho *Aspergillus* [34] hay *Fusarium* [35]. Mặc dù vậy thì đòi hỏi quan sát, đo đạc các đặc điểm hình thái, kích thước rất tỷ mỉ và đôi khi rất khó phân biệt các loài tương đối giống nhau. Luận án đã áp dụng kỹ thuật sinh học phân tử để xác định chính xác loài nấm gây nhiễm nấm vết thương.

4.2.1.1. Cơ cấu nhiễm nấm men, nấm sợi

Kết quả NC cho thấy tất cả các BN nhiễm nấm đều nhiễm nấm men, một số ít (7,78%) nhiễm phối hợp nấm men và nấm sợi.

Kết quả này cũng phù hợp với đa số NC cho thấy BN nhiễm nấm bông chủ yếu là nhiễm nấm men, ngoài ra có thể có một số trường hợp nhiễm nấm sợi (*Aspergillus*, *Fusarium*...). Tổng kết trên 435 BN nhiễm nấm tại Mỹ thấy *Candida* (85%), nấm men không phải *Candida* (21%), *Aspergillus* (14%), nấm sợi khác (9,0%), nấm khác (1,4%) [38]. NC hồi cứu tại một bệnh viện ở Casablanca, Morocco từ 2011 – 2014 thấy *Candida* chiếm 91,1%; *Aspergillus* 3,9% [12].

4.2.1.2. Thành phần loài nấm men

- Thành phần loài nấm *Candida*

Phát hiện 11 loài nấm men, hay gặp nhất là *C. tropicalis* (45,56%). Kết quả NC cho thấy *C. albicans* là loài phổ biến nhưng không còn chiếm trên 50%; phù hợp với một số NC trên thế giới và Việt Nam thấy tỷ lệ *C. albicans* đang giảm còn *Candida* không *albicans* đang tăng lên.

Một số NC tại Việt Nam cho thấy *C. albicans* vẫn là loài chiếm tỷ lệ chủ yếu ở các bệnh phẩm không vô khuẩn như dịch âm đạo [130], [131], dịch họng, đờm, dịch rửa phế quản [132], da [59]. Tuy nhiên nghiên cứu căn nguyên nhiễm nấm huyết thấy *C. tropicalis* chiếm tỷ lệ cao nhất, sau đó là *C. albicans* [129], [61].

- Nhóm loài *Candida*

Nấm *Candida* chủ yếu thuộc CTG clade. Các loài không thuộc CTG clade (*C. krusei* và *C. glabrata*) chiếm tỷ lệ thấp. Điều này có ý nghĩa trong lâm sàng vì hiện nay *Candida* kháng fluconazol chủ yếu là kháng tự nhiên, gặp ở *C. krusei* và *C. glabrata*; tỷ lệ kháng ở các loài khác thường thấp. Một số NC tại Việt Nam không phát hiện được *C. krusei* [132] hoặc phát hiện được với tỷ lệ thấp (1%) [61].

- Một số loài *Candida* hiếm gặp

Trong NC này tỷ lệ gặp *C. famata* là 0,83%, phù hợp với nhận xét của một số tác giả khác. *C. famata* (còn gọi là *Debaryomyces hansenii* hay *Torulopsis candida*) hay gặp ở môi trường (pho mát, các sản phẩm từ sữa...), chiếm tỷ lệ 0,2%–2% nhiễm nấm xâm lấn. Tất cả các trường hợp nhiễm huyết do *C. famata* đều là BN suy giảm miễn dịch hay bỏng, giảm nhạy với echinocandins và azoles, đặc biệt ở BN có dùng thuốc trước đó [133].

C. duobushaemulonii thuộc phức *C. haemulonii* (gồm *C. haemulonii*, *C. haemulonii* var. *vulnera* và *C. duobushaemulonii*) đã được thông báo có khả năng gây bệnh ở người, mặc dù ít gặp nhưng rất được chú ý do khả năng kháng thuốc kháng nấm [134], [135], [136]. Bằng các kỹ thuật truyền thống định danh *C. duobushaemulonii* rất khó, thường định danh nhầm với một số loài khác. Nghiên cứu tại Kuwait trên 166 chủng xác định bằng Vitek2 là *C. haemulonii*, bằng kỹ thuật sinh học phân tử xác định là *C. auris* (n=158),

C. haemulonii (n=6) và *C. duobushaemulonii* (n=2) [137]. Trong NC của chúng tôi chủng này đã được giải trình tự và xác định là nấm *C. duobushaemulonii*.

Kết quả này cho thấy cơ cấu nấm *Candida* ở người đang thay đổi với sự giảm tỷ lệ *C. albicans*, tăng các loài không phải *albicans*, xuất hiện các loài hiếm gặp, có tỷ lệ kháng thuốc kháng nấm cao. Điều này đòi hỏi phải theo dõi thường xuyên sự biến động của các loài *Candida*, sự đáp ứng của các chủng nấm lâm sàng để có định hướng điều trị kịp thời.

- Một số loài nấm men khác

Pichia (Kodamaea) ohmeri là một loài nấm men, được coi là dạng hữu tính của *Candida guilliermondii* var. *membranaefaciens* [19]. Ở châu Á có những thông báo ca bệnh ở Ấn Độ [138], Trung Quốc [139]...

4.2.1.3. Thành phần loài nấm sợi

Có 28 BN (7,78%) nhiễm nấm có nhiễm nấm sợi, chủ yếu là *Aspergillus*, một BN nhiễm nấm *Fusarium*. Trong các loài *Aspergillus* thì *A. fumigatus* chiếm đa số (39,29%), ngoài ra còn gặp *A. oryzae*, *A. chevalieri*, *A. nomius*

Kết quả NC của chúng tôi phù hợp với đa số các NC cho thấy nấm sợi gây bệnh thường gặp nhất ở người là *Aspergillus* [48]. Trong không khí có rất nhiều bào tử của các loại nấm sợi, các bào tử này có thể xâm nhập qua đường hô hấp hoặc rơi vào da, niêm mạc, khi gặp điều kiện thuận lợi chúng có thể gây bệnh. Khả năng gây bệnh khác nhau tùy chủng *Aspergillus*. Một NC so sánh giữa các chủng *Aspergillus* môi trường và *Aspergillus* phân lập được từ BN cho thấy chúng đều có các yếu tố độc lực, tuy nhiên sự xuất hiện của các yếu tố độc lực (hoạt tính enzyme liên quan đến gây bệnh) được tìm thấy nhiều hơn trong các chủng *Aspergillus* phân lập từ các mẫu bệnh phẩm so với các mẫu môi trường. Điều này cho thấy tính chất xâm lấn của *Aspergillus* [140].

Ngoài ra luận án cũng phát hiện được *Fusarium solium*, một loài nấm sợi đã có nhiều thông báo gây bệnh ở người [141].

4.2.2. Thành phần loài gây nhiễm nấm xâm lấn

4.2.2.1. Thành phần loài gây nhiễm nấm vết thương

Trong luận án các loài nấm gây nhiễm nấm vết thương được định hướng định danh ngay từ hình ảnh trên tiêu bản mô học. Tiêu bản mô học phát hiện nấm được nhuộm hematoxylin (HE) và Periodic acid Schiff (PAS). Nhuộm HE là phương pháp nhuộm thông thường trong mô học, nhìn rõ cấu trúc mô của cơ thể, có thể quan sát thấy sợi nấm. Nhuộm PAS tương đối đặc hiệu phát hiện nấm, sử dụng axit periodic là tác nhân oxy hoá mạnh, phá vỡ các liên kết giữa hai carbon của một số nhóm hoá học (trong đó có các nhóm hydroxyl của polysaccharide thành tế bào nấm) tạo thành các aldehyde, aldehyde bắt màu đỏ của fuchsin. Tiêu bản nhuộm PAS thấy nấm bắt màu đỏ. Trong tiêu bản mô học nhuộm HE và PAS có thể định hướng được nấm men, nấm sợi. Với nấm sợi có thể phân biệt được nấm có vách ngăn, không có vách ngăn. Với các sợi nấm có vách ngăn có thể phân thành nhóm các loại nấm có đường kính tương đối thuần nhất, phân nhánh tạo góc 45⁰ (ví dụ của *Aspergillus*). Nấm *Fusarium* thường có các sợi nấm đường kính không thuần nhất, đôi khi xuất hiện cấu trúc giống nấm men, sợi nấm phân nhánh vuông góc (90⁰) [97]. Sau khi được định danh sơ bộ trên tiêu bản mô học, các chủng nấm phân lập được từ mẫu sinh thiết và máu được tiếp tục định danh bằng hình thái và sinh học phân tử, giúp định danh chính xác loài nấm gây nhiễm nấm xâm lấn, nhằm giúp đưa ra các chỉ định điều trị thuốc chống nấm chính xác. Việc định danh các chủng này dựa trên phân tích trình tự vùng ITS1 – vùng được ứng dụng nhiều nhất trong định danh các chủng nấm lâm sàng [142].

- Thành phần loài nấm men, nấm sợi

Kết quả nghiên cứu cho thấy nấm men là căn nguyên hàng đầu của FWI,

phù hợp với kết quả NC của một số tác giả khác. NC tại Ấn Độ trên 869 BN bỏng thấy *Candida* chiếm tỷ lệ cao nhất (45%) trong số các tác nhân nấm gây nhiễm nấm vết thương, sau đó là một số loài nấm sợi như *Aspergillus* [40]. NC của Capoor cho thấy trong số các chủng nấm phân lập được từ BN bị FWI *Candida* là tác nhân thường gặp nhất, ngoài ra còn gặp *Aspergillus*, *Syncephalestrum* và *Fusarium* [41]. Tổng kết 20 năm ở một khoa điều trị bỏng, John Hunt, Gary Purdue thấy *Candida* chiếm tới 70%, *Aspergillus* 28%, các nấm khác (*Mucor*, *Rhizopus*, *Fusarium*...) chiếm 2% [143].

Đáng chú ý là tỷ lệ nhiễm nấm vết thương do nấm sợi cao, trong khi đó tỷ lệ nhiễm nấm xâm thực do nấm sợi khá thấp nhấn mạnh tầm quan trọng của việc bảo vệ vết thương khỏi nguy cơ ô nhiễm từ môi trường. Theo các NC thì nguồn gây FWI do nấm sợi chủ yếu từ môi trường ngoại cảnh, khi các bào tử nấm trong không khí, nước, băng gạc... rơi vào vết thương và xâm lấn xuống dưới vết thương [144]. Khác với nấm *Candida* khi nguồn nhiễm chủ yếu từ bản thân bệnh nhân [11]. NC của Horvath và cộng sự (2007) trên những BN mắc FWI thấy tỷ lệ *Aspergillus* (94,4%) và *Mucor* (29,6%) cao hơn so với nhiễm nấm xâm thực bề mặt vết thương (77,7 và 9,1%), trong khi đó tỷ lệ nhiễm nấm men bề mặt vết thương và FWI không đổi (37% BN bị FWI và 35,5% BN nhiễm nấm bề mặt vết thương) [7].

- Thành phần loài nấm men

Kết quả định danh cho thấy nhiễm nấm vết thương phổ biến nhất là *C. tropicalis* (43,59% trường hợp nhiễm nấm vết thương), sau đó là *C. albicans* (17,95%). *C. albicans* vẫn là một tác nhân gây nhiễm nấm xâm lấn quan trọng. NC của Mohammad Ali Bahar trên 869 BN bỏng ở Ấn Độ cho thấy *C. albicans* chiếm tới 45% số tác nhân gây FWI [40]. Tuy nhiên trong NC này *C. tropicalis* là tác nhân phổ biến nhất của FWI, phù hợp với một số NC khác trên thế giới. NC của Capoor (2012) thấy 28,2% BN bỏng bị

FWI, các tác nhân nấm men hay gặp là *C. tropicalis* (14%), *C. parapsilosis* (5,6%), *C. albicans* (1,4%), *C. glabrata* (1,4%) [41]. NC của Sarabahi (2011) tại Ấn Độ thấy thành phần loài nấm men gây FWI là *C. tropicalis* 35,42%, *C. parapsilosis* 20,28%, *C. albicans* (6,25%), *C. krusei* 12,5% [45].

- Thành phần loài nấm sợi

Luận án phát hiện được 14 BN bỏng nhiễm nấm xâm lấn do nấm sợi, hầu hết BN nhiễm *Aspergillus*. Kết quả nghiên cứu cho thấy nấm *Aspergillus* vẫn là căn nguyên phổ biến nhất trong nhiễm nấm vết thương, phù hợp với các nghiên cứu trên thế giới, chứng tỏ độc lực cao của *Aspergillus* trong số các loại nấm sợi thường gặp [141]. Một nghiên cứu tại Iran cho thấy tỷ lệ nhiễm nấm vết thương do *Aspergillus* chiếm tới 35% [114].

Kết quả NC cũng cho thấy *A. fumigatus*, *A. flavus* là căn nguyên hàng đầu của nhiễm nấm sợi xâm lấn trên BN bỏng. Một số NC cho thấy trong số các loài *Aspergillus* gây nhiễm nấm vết thương, hay gặp nhất là *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. terreus* và *A. nidulans* [43]. Đáng chú ý là có trường hợp nhiễm nấm xâm lấn do *A. oryzae*. Nấm *A. oryzae* được coi là tác nhân *Aspergillus* ít gây bệnh nhưng cũng có thông báo trường hợp *A. oryzae* gây nhiễm nấm xâm lấn ở BN nhiễm lao [145] hay viêm nội tâm mạc [146].

Trong NC này chúng tôi gặp một BN nhiễm nấm vết thương do *F. solani*. *Fusarium* là nấm sợi phổ biến trong môi trường tự nhiên. Người có thể nhiễm *Fusarium* qua đường hô hấp hoặc qua da bị tổn thương [141]. Bệnh nấm xâm lấn do *Fusarium* rất khó điều trị vì xu hướng xâm nhập mạch máu và khả năng kháng thuốc điều trị nấm [76]. Do tổn thương mất da mà các BN bỏng được coi là có nguy cơ cao nhiễm nấm *Fusarium*, đặc biệt là những BN bỏng nặng [96]. Trên BN bỏng, tổn thương hay gặp nhất là nhiễm nấm vết thương, tuy nhiên cũng có thể gây nhiễm nấm huyết [96]. BN bỏng trong NC này nhiễm *F. solani*, loài *Fusarium* gặp phổ biến nhất ở người [97], [98].

4.2.2.2. Thành phần loài gây nhiễm nấm huyết

Kết quả NC căn nguyên gây nhiễm nấm huyết thấy *C. tropicalis* chiếm tỷ lệ chủ yếu (64,29%), sau đó là *C. albicans* (21,43%) và *C. parapsilosis*. Đây cũng là những tác nhân thường phân lập được từ máu BN bỏng trong một số NC khác. Vinsonneau và cộng sự (2009) thấy căn nguyên gây nhiễm nấm huyết gồm *C. albicans* (65%), *C. parapsilosis* (25%) và *C. tropicalis* (10%) [52]. NC tại Tây Ban Nha của Escrig (2016) gặp *C. albicans* (61,1%) và *C. parapsilosis* (27,8%) [54]. Junyi Zhou nghiên cứu tại Trung Quốc thấy *C. parapsilosis* (28,21%), *C. albicans* (15,38%) và *C. tropicalis* (15,38%) là căn nguyên gây nhiễm nấm huyết ở BN bỏng [53]

Kết quả này phù hợp với một số NC căn nguyên gây nhiễm nấm xâm lấn ở Việt Nam, thấy hầu hết là *C. albicans* và *C. tropicalis*, các loài khác chiếm tỷ lệ thấp. Trên phạm vi cả nước Đỗ Ngọc Ánh (2015) xác định thành phần loài nấm men phân lập từ máu BN ở một số bệnh viện cả ở miền Bắc và miền Nam thấy *C. tropicalis* chiếm tỷ lệ cao nhất (47%), sau đó là *C. albicans* (18%) [129]. NC tại bệnh viện Bạch Mai năm 2016 thấy *Candida* sp. là nguyên nhân nhiễm trùng huyết phổ biến thứ tư (7,9%) và là tác nhân gây bệnh thường gặp nhất (22%) ở BN nhiễm trùng huyết do nhiều căn nguyên. Căn nguyên chính gây nhiễm nấm huyết là *Candida* sp. (83,6%) (các loài thường gặp là *C. albicans* (38,2%) và *C. tropicalis* (36,1%), ngoài ra còn gặp *Pichia ohmeri* (4,3%) [62].

Sự phổ biến của các loài nấm *Candida* không phải *albicans* là căn nguyên của nhiễm nấm xâm lấn trong nghiên cứu này phù hợp với xu hướng dịch chuyển từ *C. albicans* sang *Candida* spp. không-*albicans* trên thế giới [147], [148], cũng như ở khu vực châu Á – Thái Bình Dương [78] và trên BN bỏng [45]. Trong NC này *C. tropicalis* đã trở thành căn nguyên phổ biến nhất,

cả nhiễm nấm vết thương và nhiễm nấm huyết, tỷ lệ gặp cao hơn của *C. albicans*, phù hợp với một số nghiên cứu tại châu Á [149]. *C. parapsilosis* là căn nguyên hay gặp thứ ba, tương tự với kết quả NC khác ở Việt Nam (17,2%) [61]. Tại Trung Quốc, *C. parapsilosis* thậm chí còn trở thành căn nguyên phổ biến nhất của nhiễm nấm huyết do *Candida* không-*albicans* [150]. Kết quả này cho thấy *C. tropicalis* đã thay thế *C. albicans* và trở thành loài *Candida* gây bệnh xâm lấn phổ biến nhất ở Việt Nam. Nhìn chung *C. albicans* chiếm ưu thế ở châu Âu, *C. tropicalis* ưu thế ở châu Á trong số các tác nhân gây nhiễm nấm xâm lấn [43].

4.3. Độ nhạy của nấm với thuốc kháng nấm và kết quả điều trị nhiễm nấm ở bệnh nhân bỏng nặng

4.3.1. Độ nhạy của nấm với thuốc kháng nấm

Luận án tập trung đánh giá sự nhạy của các chủng nấm men với thuốc kháng nấm do sự phổ biến hơn của nấm men trong gây nhiễm nấm xâm lấn. Mặt khác kỹ thuật đánh giá sự nhạy của nấm sợi tương đối khó thực hiện hơn so với nấm men, hiện tại ở Việt Nam chỉ có một vài phòng thí nghiệm thực hiện được. Chỉ có một nghiên cứu về độ nhạy của 44 chủng nấm *Aspergillus* với hai loại thuốc là amphotericin B và itraconazole, chưa đánh giá trên nhiều loại thuốc kháng nấm khác nhau [151].

Trong NC này luận án đánh giá đáp ứng của nấm *Candida* phân lập được trên BN bỏng với 6 loại thuốc kháng nấm khác nhau. Được đánh giá bằng bộ kit Vitex 2, được coi là có độ tương đồng cao với các kỹ thuật chuẩn của Mỹ khi áp dụng các điểm gãy lâm sàng (Clinical breakpoints) hay giá trị ngưỡng dịch tễ (epidemiological cutoff values) mới [71].

- Tình trạng đáp ứng với thuốc kháng nấm khác nhau

Trừ micafungin, các loại thuốc khác đều có kháng. Tỷ lệ nhạy thấp nhất

là fluconazol, sau đó là voriconazol, flucytosin, amphotericin B. Thuốc nhóm echinocandin (casposfungin và micafungin) có tỷ lệ đáp ứng ở mức nhạy cao.

+ Fluconazol

Sự nhạy của nấm men với fluconazol rất được chú ý vì đây là thuốc được lựa chọn đầu tiên trong điều trị nhiễm nấm xâm lấn, áp dụng với các chủng đáp ứng nhạy với fluconazol. So với thuốc khác fluconazol có hiệu quả tương đối tốt với chi phí rẻ hơn thuốc nhóm echinocandin và an toàn hơn rất nhiều so với amphotericin B [82]. Tỷ lệ nhạy với fluconazol thấp nhất (83,33%). Kết quả này phù hợp với một số NC cho thấy thuốc nhóm azole, đặc biệt là fluconazol có tỷ lệ giảm đáp ứng và kháng thuốc cao [152], [153]. Một số NC tại châu Á như tại Singapore tỷ lệ nhạy với fluconazol là 59,5% [154], tại Trung Quốc kháng 7,6% [155]. Tại Việt Nam có thông báo thấy tỷ lệ *Candida* kháng fluconazol rất cao (57,7%) [59].

+ Voriconazol: Mặc dù voriconazol không phải là lựa chọn đầu tiên trong điều trị bệnh nấm xâm lấn do *Candida* nhưng voriconazol có ưu điểm là hiệu quả cả với các loài *Candida* hay kháng fluconazol (như *C. glabrata*, *C. krusei*), mặt khác thuốc cũng tác dụng với nấm sợi (*Aspergillus*, *Fusarium sp*) nên rất được quan tâm trong lâm sàng [65]. Kết quả cho thấy 90,06% chủng *Candida* nhạy với voriconazol. NC tại Singapore trên 271 chủng lâm sàng thấy tỷ lệ nhạy với voriconazol tương đối thấp (86,9%) [154].

+ Echinocandin: Có tỷ lệ nhạy khá cao (98,90% với casposfungin và 99,45% với micafungin), phù hợp với một số NC thấy echinocandin vẫn là thuốc hiệu quả điều trị *Candida*. Tỷ lệ nhạy echinocandin trên 98% tại Singapore [154], 99% tại Mỹ [152]. Tuy nhiên cũng có NC cho thấy tỷ lệ kháng echinocandin tương đối cao. Tại Italia tỷ lệ *Candida* kháng casposfungin 4,7%, anidulafungin 2,1% và micafungin 1,3% [153]. Kết quả Chương trình giám sát kháng sinh SENTRY (2008-2009) trên 2.085 chủng

Candida thấy tỷ lệ kháng anidulafungin 2,4%; micafungin 1,9% [156].

Hiện nay echinocandin được coi là ưu tiên trong điều trị bệnh nấm do *Candida* [82]. Mặc dù vậy thì qua quá trình sử dụng thuốc nhóm này cần theo dõi sát sự xuất hiện của các chủng kháng echinocandin vì gia tăng sử dụng echinocandin cũng dẫn tới sự gia tăng tỷ lệ *Candida* kháng echinocandin [157] và tỷ lệ *Candida* kháng echinocandins có xu hướng tăng lên [158].

+ Amphotericin B: Tỷ lệ nhạy là 96,72%. Nấm kháng amphotericin B vẫn còn hiếm mặc dù thuốc sử dụng đơn trị liệu trong nhiều năm. Có thể do thuốc có tác dụng diệt nấm, hạn chế lựa chọn đột biến [68]. *C. lusitaniae* là loài duy nhất trong số các loài *Candida* thường kháng [159] do tỷ lệ đột biến kháng thuốc cao [160].

+ Flucytosin: 94,51% chủng nhạy. Tỷ lệ này tương đương với nhận xét của một số tác giả, tỷ lệ *Candida* kháng flucytosin khoảng 5% [73].

Mặc dù hai loại thuốc (amphotericin B và flucytosin) không phải là lựa chọn ưu tiên trong điều trị bệnh nấm xâm lấn tuy nhiên chúng có thể dùng thay thế trong trường hợp không có azole hay echinocandins [82]. Tỷ lệ nhạy ở mức cao của hai thuốc này cho thấy tiềm năng sử dụng trong lâm sàng.

- Đáp ứng của loài *Candida* khác nhau với thuốc kháng nấm

+ Đáp ứng của *C. albicans* với thuốc kháng nấm

Nấm *C. albicans* chưa kháng echinocandin. Tỷ lệ nhạy với fluconazol là 88,31%, với các thuốc khác được đánh giá trong NC này khoảng 95%. Kết quả này cũng phù hợp với nhận xét của đa số các tác giả là đa số chủng *C. albicans* vẫn nhạy với các loại thuốc kháng nấm phổ biến tuy nhiên cũng có tỷ lệ kháng, đặc biệt với fluconazol và flucytosin. NC tỷ lệ *C. albicans* nhạy fluconazol tại Singapore là 95,2% [154], tại Trung Quốc là 95,7% [155], tại Việt Nam *C. albicans* kháng fluconazol 2,41% [59]. Nghiên cứu của Ngô

Thị Minh Châu và cộng sự phát hiện tỷ lệ *C. albicans* kháng flucytosin là 19,82%; caspofungin là 15,66%; voriconazol 4,82%; fluconazol 2,41%; chưa kháng amphotericin B [77].

+ Đáp ứng của *C. tropicalis* với thuốc kháng nấm

Nấm *C. tropicalis* kháng echinocandin với tỷ lệ thấp; tỷ lệ kháng fluconazol (15,66%), và voriconazol (9,88%) khá cao.

Sự kháng thuốc của *C. tropicalis* ngày càng tăng do việc sử dụng rộng rãi các thuốc kháng nấm và kháng thuốc thu được ở *C. tropicalis* thường cao hơn so với *C. albicans* [68]. Tổng kết tại khu vực châu Á thấy *C. tropicalis* có tỷ lệ nhạy với fluconazol (75,8%) thấp hơn so với *C. albicans*, tuy nhiên tỷ lệ nhạy với echinocandins vẫn cao (trên 99% chủng nhạy) [78]. NC tại Singapore từ 2012 – 2015 thấy kháng fluconazol được phát hiện chủ yếu ở *C. tropicalis* [154]. NC tại Trung Quốc thấy tỷ lệ *C. tropicalis* kháng fluconazol là 10,7%; voriconazol 7,1%; flucytosin 1,2%; chưa kháng amphotericin B [155].

Tại Việt Nam Nguyễn Thị Bình và cộng sự (2017) thấy tỷ lệ *C. tropicalis* kháng thuốc fluconazol (72,5%) cao hơn so với *C. albicans* (55,6%) [59]. Với tỷ lệ gặp *C. tropicalis* ngày càng tăng ở các trường hợp nhiễm nấm xâm lấn, tỷ lệ đáp ứng nhạy với thuốc, đặc biệt là fluconazol ngày càng giảm, vấn đề lựa chọn thuốc điều trị nhiễm *C. tropicalis* cần phải được xem xét cẩn thận, nên chọn các loại thuốc chưa hoặc ít kháng như echinocandin.

+ Đáp ứng của *Candida* không phải *C. albicans* hay *C. tropicalis*

Các loài *Candida* không phải *C. albicans* hay *C. tropicalis* có tỷ lệ kháng thuốc cao hơn so với *C. albicans* hay *C. tropicalis*, đặc biệt là với thuốc nhóm azole. Tỷ lệ kháng fluconazol tới 20,00%, đây là tỷ lệ kháng khá cao, đòi hỏi

cần phải lựa chọn thuốc hợp lý khi phát hiện những loài này ở BN. Thuốc có hiệu quả cao với nhóm này là echinocandin (caspofungin hoặc micafungin), chỉ có 1 chủng đáp ứng trung gian với caspofungin, còn tất cả đều nhạy.

Loài *C. duobushaemulonii* kháng fluconazol (MIC = 64 µg/ml). Đây là loài ít gặp nhưng có khả năng kháng thuốc kháng nấm. Một NC tại Brazil thấy 6/6 chủng *C. duobushaemulonii* đều giảm nhạy hoặc kháng Fluconazol (MIC từ 8-> 64 µg/mL) [134]. NC tại Panama trên 17 chủng *C. duobushaemulonii*, MICs với fluconazol, voriconazol và amphotericin B đều tăng, chưa thấy kháng echinocandins [135]. NC tại Trung Quốc trên 13 chủng *C. haemulonii* thấy tất cả các chủng đều tăng MICs với amphotericin B (2 - >8 µg/ml) và fluconazol (≥ 128 µg/ml) nhưng MICs thấp (≤ 0.5 µg/ml) với echinocandins [136].

Nấm *C. glabrata* chưa xuất hiện kháng với tất cả các thuốc kháng nấm nghiên cứu. Nấm *C. krusei* có một chủng kháng cả amphotericin B và flucytosin.

Nhìn chung kết quả NC cho thấy các loại thuốc kháng nấm đều xuất hiện giảm đáp ứng hay kháng thuốc ở mức độ khác nhau. Tỷ lệ kháng cao nhất gặp ở thuốc nhóm azole và tỷ lệ còn nhạy cao nhất là nhóm echinocandin. Loài *C. albicans* có tỷ lệ nhạy với thuốc cao hơn so với các loài *Candida* khác không phải *albicans*. Các loài *Candida* không phải *C. albicans* hay *C. tropicalis* có tỷ lệ kháng thuốc cao hơn so với *C. albicans* hay *C. tropicalis*, đặc biệt là với thuốc nhóm azole. Kết quả này giúp lựa chọn thuốc kháng nấm trong điều trị.

4.3.2. Đánh giá kết quả điều trị nhiễm nấm ở bệnh nhân bỏng nặng

4.3.2.1. Phác đồ điều trị nhiễm nấm ở bệnh nhân bỏng nặng

Do nhiễm nấm ở BN bỏng có nhiều mức độ khác nhau, nhiễm nấm xâm

thực không cần điều trị nhưng là nguy cơ của nhiễm nấm xâm lấn. Hậu quả của nhiễm nấm xâm lấn rất nặng nề nên nếu đợi đến khi chẩn đoán chắc chắn mới bắt đầu điều trị thì hiệu quả thấp. Số lượng thuốc kháng nấm rất hạn chế, chỉ có một số loại thuốc được sử dụng điều trị nhiều loại nấm khác nhau, do đó nếu chỉ định rộng rãi sẽ làm gia tăng áp lực thuốc, làm tăng tỷ lệ kháng thuốc. Mặt khác một số loại thuốc mới, có tác dụng mạnh lại có giá thành rất cao, hạn chế khả năng điều trị rộng rãi trên các BN, đặc biệt ở những nước kinh tế còn hạn chế như ở nước ta. Do đó vấn đề lựa chọn phác đồ điều trị gồm loại thuốc, thời gian, đường dùng, liều dùng rất khó khăn.

Một số tác giả trên thế giới đã đưa ra các quy tắc dự báo nhiễm nấm xâm lấn, chủ yếu xác định những BN nào có lợi ích nhiều nhất khi điều trị thuốc kháng nấm. Đặc điểm chung của các quy tắc này là giá trị dự báo âm rất cao do đó chỉ phù hợp để xác định BN nào ít cần điều trị thuốc kháng nấm nhất, ít giá trị xác định BN cần điều trị thuốc kháng nấm [48].

Hiện nay điều trị nhiễm nấm bao gồm các tiếp cận khác nhau như dự phòng, kinh nghiệm, định hướng, và điều trị mục tiêu. Ở Việt Nam chưa có hướng dẫn chính thức của Bộ Y tế về điều trị nhiễm nấm xâm lấn, chỉ có hướng dẫn của hội Hô hấp, hội Hồi sức cấp cứu và chống độc, tuy nhiên hướng dẫn của hai hội này cơ bản là dựa trên các hướng dẫn điều trị nấm xâm lấn của Hiệp hội bệnh nhiễm trùng Mỹ [82], [95].

Dựa trên các hướng dẫn điều trị trên thế giới và thực tiễn Việt Nam, tại viện Bông quốc gia, dựa trên nghiên cứu về đặc điểm nhiễm nấm trên BN luận án áp dụng điều trị định hướng nấm và đặc hiệu nấm (điều trị mục tiêu), không áp dụng điều trị dự phòng. Điều trị định hướng nấm tương đương với tiếp cận điều trị kinh nghiệm (empiric) và điều trị định hướng (pre-emptive) ở các hướng dẫn trên thế giới. Tiếp cận này hơi khác so với điều trị nhiễm khuẩn trên BN bông. Hiện nay hai tiếp cận điều trị nhiễm khuẩn trong bông là

liệu pháp kháng sinh dự phòng, chỉ định ở BN có nguy cơ nhiễm khuẩn cao (bỏng rộng, người cao tuổi, ổ nhiễm khuẩn trước đó, BN suy giảm miễn dịch) hoặc BN có hội chứng nhiễm khuẩn nặng; liệu pháp kháng sinh điều trị đích khi biết rõ mầm bệnh [1]. Việc lựa chọn thuốc kháng nấm cũng dựa theo các nguyên tắc lựa chọn kháng sinh trong bỏng như dùng kháng sinh chọn lọc, sử dụng kháng sinh có tác dụng đặc hiệu nhất với mầm bệnh, lựa chọn theo kháng sinh đồ, liều lượng tùy theo nồng độ huyết thanh và khả năng diệt khuẩn *in vitro* và *in vivo*; chỉ phối hợp kháng sinh khi thật cần thiết; cần tính tới kháng sinh dành cho những trường hợp biến chứng nhiễm khuẩn nặng... [1]. Các thuốc kháng nấm được dùng trên BN căn cứ vào các hướng dẫn của hiệp hội nhiễm trùng Mỹ [82], [95], kết quả đánh giá độ nhạy của nấm phân lập được trên BN điều trị tại bệnh viện Bỏng quốc gia với thuốc kháng nấm.

Trong NC này tất cả các BN bỏng đều được chẩn đoán, điều trị theo các qui trình hiện đang áp dụng tại viện Bỏng quốc gia như hồi sức chống sốc, kháng sinh chống nhiễm khuẩn, phẫu thuật cắt hoại tử, ghép da che vết thương... Luận án chỉ đánh giá kết quả điều trị nhiễm nấm trên BN.

Kết quả đánh giá trên các chỉ tiêu chính là các xét nghiệm nấm và kết quả điều trị cuối cùng. Các BN có thể rời khỏi khoa Hồi sức cấp cứu, chuyển sang khoa điều trị khác được coi là khỏi, những BN không khỏi gồm tử vong tại bệnh viện hay do tiên lượng quá nặng, BN xin về.

4.3.2.2. Sự thay đổi thông số xét nghiệm nấm

- Điểm *Candida*: Tất cả các BN đều có điểm *Candida* score trên 3 tại các thời điểm đánh giá, không có sự thay đổi nào có ý nghĩa thống kê giữa các thời điểm đánh giá trong cả hai nhóm điều trị khỏi và tử vong. Do thang điểm nhằm mục đích đánh giá nguy cơ nhiễm nấm xâm lấn nên kết quả trên nhóm NC là phù hợp với các NC trước đó. Trong NC của Juneja (2012) tỷ lệ mắc nấm *Candida* xâm lấn là 17,6% ở BN có điểm *Candida* score = 4, và 50% ở

BN có điểm Candida score = 5 [161]. Theo Leroy (2011) khi điểm Candida score trên 3 thì tỷ lệ nhiễm nấm xâm lấn cao và khuyến cáo điều trị kháng sinh kháng nấm sớm với các BN nặng trong nhóm này [162].

- Chỉ số nấm xâm thực (Colonization index - CI): Nhiễm nấm xâm thực nặng ($CI \geq 0,5$) là một nguy cơ nhiễm nấm xâm lấn trên BN bỏng và theo dõi CI có thể đánh giá tác động của liệu pháp điều trị kháng nấm. Trong các BN của chúng tôi, chỉ số CI sau điều trị thuốc kháng nấm có xu hướng giảm dần. Ở tuần thứ 2 sau điều trị CI đã $< 0,5$; dưới mức nhiễm nấm xâm thực nặng. Theo khuyến cáo của IDSA (2016), $CI \geq 0,5$ là chỉ số chính kết hợp với Candida score giúp các nhà lâm sàng có thể đưa ra chỉ định điều trị nhiễm nấm, đặc biệt trong nhiễm nấm xâm lấn [82]. Mặc dù vậy thì các bệnh nhân được dùng thuốc điều trị nấm thì vẫn phát hiện được nấm trên các bệnh phẩm không vô khuẩn.

- Kết quả điều trị nấm huyết thấy thời gian sạch nấm trong máu tương tự một số thông báo khác. Bienvenu và cộng sự (2020) NC thấy thời gian (trung vị) thấy để cấy máu âm tính dao động từ 1 đến 32 ngày [163]; Reboli và cộng sự (2011) thấy thời gian âm tính từ 1 – 13 ngày [164]. Trung vị thời gian sạch nấm trong máu là 9 ngày, tương đối dài hơn so với một số nghiên cứu khác, có thể là trong nghiên cứu này thuốc bắt đầu chủ yếu là fluconazol. Reboli và cộng sự (2011) thấy anidulafungin có thời gian làm sạch nấm nhanh hơn so với fluconazol; trung vị thời gian cấy máu âm tính với anidulafungin là 2 ngày, với fluconazol là 5 ngày [164]. Một nghiên cứu khác điều trị nhiễm nấm huyết do *Candida* bằng anidulafungin thấy trung vị thời gian để cấy máu âm tính cho tất cả các bệnh nhân là hai ngày (với ngày 1 là ngày bắt đầu điều trị thuốc) [165]. Kullberg và cộng sự (2005) so sánh voriconazol với phác đồ amphotericin B/sau đó là fluconazol trong điều trị nấm huyết do *Candida*, thấy trung vị thời gian cấy máu âm tính là 2 ngày [166].

Kết quả điều trị nhiễm nấm vết thương khó đánh giá hơn, một số trường hợp mặc dù được điều trị thuốc kháng nấm nhưng trên lâm sàng thấy dấu hiệu nhiễm trùng giảm đi nên không có chỉ định sinh thiết, mặt khác việc sinh thiết lấy mẫu không thường xuyên được như lấy máu nên thời gian dài hơn. Những trường hợp bằng xét nghiệm theo dõi được thì thời gian sạch nấm dài nhất là 23 ngày, nằm trong khung thời gian cấy máu âm tính (1 đến 32 ngày) [163].

4.3.3.2. Kết quả điều trị cuối cùng

Kết quả điều trị cuối cùng được phân tích dựa vào tỷ lệ khỏi, tử vong ở những bệnh nhân mắc nấm xâm lấn, được điều trị thuốc kháng nấm theo phác đồ đã xây dựng. Kết quả điều trị thuốc kháng nấm ở 41 BN mắc nấm xâm lấn, trong đó có 27 BN khỏi (65,85%), 14 BN tử vong.

Tỷ lệ đáp ứng khỏi ở nhóm BN bị nấm xâm lấn (65,85%) trong luận án tương đương với một số tác giả khác. Reboli AC (2011) so sánh tác dụng của anidulafungin và fluconazol trong điều trị nhiễm nấm huyết và nấm xâm lấn do *Candida* thấy tỷ lệ khỏi do anidulafungin (81,1%) cao hơn so với fluconazol (62,3%) [164]. Kullberg BJ (2005) đánh giá hiệu quả điều trị nhiễm nấm huyết do *Candida* thấy tỷ lệ thành công của voriconazol (65%) tương đương với amphotericin B/fluconazol (71%) [166]. Bienvenu và cộng sự (2020) đánh giá kết quả điều trị nhiễm nấm huyết do *Candida* trên các bệnh nhân nằm điều trị ở ICU thấy tỷ lệ khỏi sau 30 ngày với azole là 40,6%, echinocandins là 53,2% [163]. Trong luận án này chủ yếu BN được bắt đầu điều trị bằng fluconazol nên tỷ lệ thành công như vậy cũng phù hợp.

Phân tích kết quả điều trị theo tiếp cận điều trị và thời gian điều trị cho thấy tiếp cận điều trị có ý nghĩa quan trọng hơn thời điểm điều trị. Những BN được chỉ định điều trị định hướng nấm có tỷ lệ tử vong thấp hơn so với điều trị đặc hiệu nấm, trong khi đó điều trị sớm (bắt đầu trong vòng 14 ngày sau bông) không làm giảm tỷ lệ tử vong so với nhóm điều trị muộn. Lopez-Cortes

và cộng sự (2016) NC cho thấy liệu trình điều trị thuốc kháng nấm theo kinh nghiệm liên quan đến tiên lượng tốt hơn trong khi đó liệu pháp mục tiêu không liên quan đáng kể với tỷ lệ tử vong [101]. Một NC tại Trung Quốc thấy điều trị kinh nghiệm thuốc kháng nấm là một yếu tố dự đoán độc lập làm giảm tỷ lệ tử vong ở BN điều trị tại ICU [102]. Tuy nhiên cũng có NC thấy điều trị kinh nghiệm bằng micafungin chỉ làm giảm tỷ lệ nhiễm nấm xâm lấn mới mà không thay đổi tỷ lệ sống [103].

Theo Morrell (2005), việc điều trị muộn 48 giờ sau khi chẩn đoán nhiễm nấm huyết sẽ làm tăng tỷ lệ tử vong lên gấp 2 lần [167]. Phần lớn các BN điều trị mục tiêu đều tử vong chứng tỏ việc bắt đầu điều trị mục tiêu trên những BN này đang trong giai đoạn nặng của bệnh. Các BN nhiễm nấm đều là các BN có thời gian điều trị kéo dài gây tăng nguy cơ bội nhiễm. Một NC cho thấy ở những BN *Candida* huyết thì mức độ nghiêm trọng về lâm sàng chứ không phải là chiến lược lựa chọn thuốc kháng nấm ban đầu có ảnh hưởng đáng kể với tỷ lệ tử vong [168]. Điều trị kinh nghiệm bệnh nấm có thể liên quan đến tỉ lệ sống sót cao hơn, nhưng thời gian tối ưu để bắt đầu điều trị kháng nấm kinh nghiệm vẫn chưa được xác định. Do thiếu dữ liệu, không có khuyến cáo nào có thể được đưa ra để chọn một loại thuốc cụ thể cho điều trị. Nhiều tác giả cho rằng sự lựa chọn nên dựa trên dịch tễ học nhiễm nấm và tương tác thuốc trong từng cá nhân. Nên bắt đầu với BN ICU với sốt mặc dù dùng kháng sinh phổ rộng, APACHE II > 6; BN ICU có sốt kéo dài nhưng không có bằng chứng nhiễm trùng; ICU với BDG (+) [92]. Chiến lược này tránh sử dụng rộng rãi điều trị dự phòng nhưng có thể điều trị quá muộn. Hơn nữa, rất khó để quyết định khi nào nên ngưng điều trị nếu không có chẩn đoán chắc chắn. Trì hoãn liệu pháp kháng nấm phù hợp có liên quan với kết quả xấu hơn, nhưng dữ liệu cho thấy sự cải thiện tỷ lệ sống với điều trị theo kinh nghiệm vẫn còn thiếu [84].

KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu 400 bệnh nhân bỏng nhiệt, mức độ nặng, điều trị tại khoa Hồi sức cấp cứu, bệnh viện Bỏng quốc gia Lê Hữu Trác, từ năm 2017-2019, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

1. Tỷ lệ và yếu tố liên quan nhiễm nấm ở bệnh nhân bỏng nặng điều trị tại bệnh viện Bỏng quốc gia

- Tỷ lệ nhiễm nấm: 90% trường hợp nhiễm nấm, trong đó 77,25% trường hợp nhiễm nấm xâm thực đơn thuần, 12,75% trường hợp nhiễm nấm xâm thực và xâm lấn (9,25% nhiễm nấm vết thương, 2,75% nhiễm nấm huyết, 0,75% phối hợp nhiễm nấm vết thương, nấm huyết). Tỷ lệ nhiễm nấm xâm thực, xâm lấn chưa khác biệt theo nhóm tuổi, giới ngoại trừ tỷ lệ nhiễm nấm xâm lấn ở trẻ em (1 – 15 tuổi) thấp hơn nhóm tuổi khác.

- Yếu tố liên quan nhiễm nấm:

Liên quan nhiễm nấm xâm thực: Bệnh nhân bỏng nặng có tỷ lệ nhiễm nấm cao ngay từ khi nhập viện. Phân tích đa biến không có yếu tố nào liên quan nhiễm nấm xâm thực.

Liên quan nhiễm nấm xâm lấn: Phân tích đa biến thấy glucose máu cao (OR = 4,067), nhiễm nấm xâm thực nặng (OR = 2,790) và nằm lâu ở đơn vị hồi sức tích cực (OR = 2,572) làm tăng nguy cơ nhiễm nấm xâm lấn.

2. Thành phần loài nấm ở bệnh nhân bỏng nặng

Thành phần loài nấm gây nhiễm nấm xâm thực: 100% trường hợp nhiễm nấm đều nhiễm nấm men, có 7,78% BN nhiễm phối hợp cả nấm men, nấm sợi. Phát hiện 17 loài nấm, gồm 11 loài nấm men và 6 loài nấm sợi. Nấm men: *Candida tropicalis* chiếm tỷ lệ cao nhất (45,56%), sau đó là *Candida albicans* (41,94%). Nấm sợi: Chủ yếu là *Aspergillus* (trong đó *Aspergillus fumigatus* chiếm 39,29%).

Thành phần loài gây nhiễm nấm vết thương: 72,5% trường hợp do nấm men, phổ biến nhất là *Candida tropicalis* (50,0%), *Candida albicans* (17,5%). 35% trường hợp do nấm sợi, hay gặp *Aspergillus fumigatus* (15%), *Aspergillus flavus* (7,5%), ngoài ra còn gặp *Fusarium solani* (2,5%).

Nhiễm nấm huyết: *Candida tropicalis* chiếm tỷ lệ chủ yếu (64,29%), sau đó là *Candida albicans* (21,43%), *Candida parapsilosis* (14,29%).

3. Độ nhạy của nấm với thuốc kháng nấm và kết quả điều trị nhiễm nấm ở bệnh nhân bỏng nặng

- Đánh giá độ nhạy của 184 chủng nấm *Candida* thấy

Thuốc nhóm echinocandin (caspofungin và micafungin) có tỷ lệ nhạy cao. Thuốc azole có tỷ lệ nhạy thấp nhất.

Nấm *Candida albicans* chưa kháng echinocandin; 5,19% kháng fluconazol.

Nấm men không phải *Candida albicans* có tỷ lệ kháng cao với azole và amphotericin B, tỷ lệ kháng echinocandin thấp.

- Đánh giá kết quả điều trị

Trên 67 bệnh nhân dùng thuốc kháng nấm: Điểm Candida score ít thay đổi. Chỉ số nấm xâm thực có xu hướng giảm so với trước khi điều trị. Thời gian sạch nấm trung bình trong mô sinh thiết là 12,71 ngày (7 đến 23 ngày); trong máu là 8,11 ngày (4 đến 12 ngày).

Trên 41 bệnh nhân nhiễm nấm xâm lấn: Tỷ lệ khỏi 65,85%. Điều trị định hướng nấm có tỷ lệ tử vong thấp hơn điều trị đặc hiệu nấm. Thời gian điều trị nấm sớm (trong vòng 14 ngày) chưa làm giảm tỷ lệ tử vong so với điều trị muộn (sau 14 ngày).

KIẾN NGHỊ

1. Tích cực sàng lọc nhiễm nấm ở bệnh nhân bông nặng, đặc biệt ở những bệnh nhân có glucose máu cao, thời gian nằm viện kéo dài.

2. Sử dụng phác đồ điều trị định hướng nấm khi bệnh nhân có yếu tố nguy cơ (bông nặng, glucose máu cao), có sốt mặc dù đã được sử dụng liên tục kháng sinh, khi bệnh nhân có nhiễm nấm xâm thực nặng (Colonization index $\geq 0,5$); Candida score $> 2,5$; Quy tắc tiên đoán nhiễm nấm xâm lấn theo Ostrosky-Zeichner.

3. Thử độ nhạy cảm của nấm với thuốc kháng nấm ở những bệnh nhân nhiễm nấm huyết hay nhiễm nấm vết thương do *Candida* để lựa chọn kháng sinh phù hợp.

4. Theo dõi biến động thành phần loài và mức độ nhạy với thuốc kháng nấm thường xuyên để có những khuyến cáo điều trị phù hợp.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

1. Đây là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam xác định được tỷ lệ nhiễm nấm xâm thực, xâm lấn cũng như các yếu tố liên quan trên bệnh nhân bỏng nhiệt mức độ nặng.

2. Ứng dụng phương pháp hình thái và kỹ thuật sinh học phân tử xác định được thành phần loài nấm trên bệnh nhân bỏng. Kết quả cho thấy bệnh nhân bỏng nặng thường nhiễm nấm men, phát hiện được 10 loài *Candida* trong đó *Candida tropicalis* và *Candida albicans* là căn nguyên phổ biến nhất của nhiễm nấm xâm thực và nhiễm nấm xâm lấn. Các loài nấm sợi gây nhiễm nấm vết thương chủ yếu là *Aspergillus*, ngoài ra còn gặp *Fusarium*.

3. Đánh giá được mức độ nhạy của nấm *Candida* với các thuốc kháng nấm hay dùng trong điều trị, áp dụng các chỉ tiêu cập nhật nhất về mức độ nhạy, kháng của các loài nấm khác nhau. Những kết quả này góp phần giúp chọn lựa thuốc trong các phác đồ điều trị thuốc kháng nấm ở bệnh nhân.

4. Luận án cũng xây dựng được các phác đồ điều trị và đánh giá kết quả điều trị phác đồ thuốc kháng nấm ở bệnh nhân bỏng.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU ĐÃ CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN NỘI DUNG LUẬN ÁN

1. Đinh Xuân Quang, Lê Trần Anh, Nguyễn Thái Ngọc Minh, Đỗ Ngọc Ánh, Nguyễn Thị Vân, Nguyễn Khắc Lực (2020), “Tỷ lệ nhiễm và thành phần loài nấm trên bệnh nhân bỏng điều trị tại Khoa hồi sức tích cực, Bệnh viện Bỏng quốc gia (2017 – 2019)”, *Tạp chí Phòng chống Bệnh Sốt rét và các bệnh Ký sinh trùng*, 3 (117), tr. 68-75.

2. Đinh Xuân Quang, Lê Trần Anh, Nguyễn Như Lâm, Nguyễn Thái Ngọc Minh, Ngô Tuấn Hưng (2017), “Chẩn đoán và điều trị nhiễm nấm *Aspergillus* vết thương bỏng tại Bệnh viện Bỏng quốc gia”, *Y dược học quân sự*, 42 (9), tr. 130-137.

Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Ngọc Tuấn (2018), *Giáo trình Bỏng dành cho đối tượng sau đại học*, Quân đội nhân dân, Hà Nội.
2. Ngô Minh Đức (2018), Đặc điểm thu dung bệnh nhân điều trị bỏng tại viện bỏng quốc gia từ năm 2008 đến 2017, *Y học thảm họa và bỏng*, (5).
3. Nguyễn Hải An, Trần Đình Hùng, Lê Quang Thảo, Nguyễn Thái Ngọc Minh, và cs. (2014), Đặc điểm nhiễm nấm huyết trên bệnh nhân bỏng nặng tại khoa hồi sức cấp cứu – viện Bỏng Quốc gia, *Y học thảm họa và bỏng*, (5), 91–100.
4. Lê Quốc Chiêu, Trương Thị Thu Hiền, Ngô Minh Đức, Nguyễn Văn Mạnh (2018), Căn nguyên và mức độ kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn gây bệnh thường gặp tại Viện Bỏng Quốc gia năm 2017, *Y học thảm họa và bỏng*, (22 – 29), 22–29.
5. Trần Thanh Dương (chủ biên) (2015), *Dịch tễ học Ký sinh trùng y học (Giáo trình giảng dạy sau đại học)*, Y học, Hà Nội.
6. Trần Thanh Dương (chủ biên) (2016), *Ký sinh trùng y học (giáo trình giảng dạy sau đại học)*, Y học, Hà Nội.
7. Horvath, E., Murray, C., Vaughan, G., Chung, K., *et al.* (2007), Fungal wound infection (not colonization) is independently associated with mortality in burn patients, *Ann Surg*, 245 (6), 978–85.
8. Church, D., Elsayed, S., Reid, O., Winston, B., and Lindsay, R. (2006), Burn Wound Infections, *Clin. Microbiol. Rev.*, 19 (2), 403–434.
9. Caggiano, G., Puntillo, F., Coretti, C., and Giglio, M. (2011), Candida Colonization Index in Patients Admitted to an ICU, *Int J Mol Sci.*, 12 (10), 7038–7047.
10. Ha, J.F., Italiano, C.M., Heath, C.H., Shih, S., *et al.* (2011), Candidemia and invasive candidiasis : A review of the literature for the burns surgeon, *Burns*, 37 (2), 181–195.
11. Gupta, N., Haque, A., Lattif, A.A., Narayan, R.P., *et al.* (2004), Epidemiology and molecular typing of Candida isolates from burn patients, *Mycopathologia*, 158 (4), 397–405.
12. Rafik, A., Diouri, M., Bahechar, N., and Chlihi, A. (2016), Epidemiology of nosocomial fungal infections in the National center for burns in Casablanca, Morocco, *Ann. Burns Fire Disasters*, XXIX (June), 90–93.
13. Sharma, S., Bajaj, D., and Sharma, P. (2016), Fungal Infection in Thermal Burns: A Prospective Study in a Tertiary Care Centre, *J Clin Diagn Res.*, 10 (9), PC05–PC07.
14. Becker, W.K., Cioffi, W.G., McManus, A.T., Kim, S.H., *et al.* (1991), Fungal Burn Wound Infection A 10-Year Experience, *Arch Surg*, 126 (January), 44–48.

15. Capoor, M.R., Sarabahi, S., Tiwari, V.K., and Narayanan, R.P. (2010), Fungal infections in burns: Diagnosis and management., *Indian J Plast Surg*, 43 (Suppl), S37-42.
16. Ibrahim, N.H., and Amer, T.A. (2008), Frequency of Bacterial and Fungal Infections of Burn Wounds at Cairo University Burn Center, *Egypt. J. Med. Microbiol.*, 17 (4), 573–583.
17. Rosanova, M.T., Stambouljian, D., and Lede, R. (2013), Risk factors for mortality in burn children, *Braz J Infect Dis.*, 18 (2), 144–149.
18. Phạm Phước Tiến, Trần Đoàn Đạo, Lê Nguyễn Diên Minh (2015), Đặc điểm nhiễm nấm máu trên bệnh nhân bỏng nặng tại khoa bỏng Bệnh viện Chợ Rẫy từ năm 2012-2014, *Y học thảm họa và bỏng*, (2).
19. Anaissie, E.J., McGinnis, M.R., Pfaller, M.A., Anstead, G.M., and Arora, A. (2009), *Clinical Mycology*, Elsevier Inc.
20. Nguyễn Như Lâm (2011), Nghiên cứu đặc điểm nhiễm khuẩn *Aci. baumannii* trên bệnh nhân bỏng nặng, *Y học thảm họa và bỏng*, 4, 33–36.
21. Luo, G., Peng, Y., Nie, Z., Zhang, X., *et al.* (2009), [A clinical study of fungal infection in burn patients] [Article in Chinese], *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*. 2009 Apr;25(2)91-3, 25 (2), 91–3.
22. Raz-Pasteur, A., Hussein, K., Finkelstein, R., Ullmann, Y., and Egozi, D. (2013), Blood stream infections (BSI) in severe burn patients--early and late BSI: a 9-year study., *Burns*, 39 (4), 636–42.
23. Pittet, D., Monod, M., Suter, P.M., Frenk, E., *et al.* (1994), Candida Colonization and Subsequent Infections in Critically Ill Surgical Patients, *Ann. Surg.*, 220 (6), 751–758.
24. Badawi, D. (2015), Fungal infections in acute burn injuries - Cairo university burn center experience (232), *Ann. Burns Fire Disasters*, XXVIII (September), 5–6.
25. Eggimann, P., and Pittet, D. (2014), Candida colonization index and subsequent infection in critically ill surgical patients : 20 years later, *Intensive Care Med*, (40), 1429–1448.
26. Ostrosky-Zeichner, L., Pappas, P., Shoham, S., Reboli, A., *et al.* (2011), Improvement of a clinical prediction rule for clinical trials on prophylaxis for invasive candidiasis in the intensive care unit, *Mycoses*, 54 (1), 46–51.
27. Hermsen, E.D., Zapapas, M.K., Maiefski, M., Rupp, *et al.* (2011), Validation and comparison of clinical prediction rules for invasive candidiasis in intensive care unit patients : a matched case-control study, *Crit Care*, 15 (4), R198.
28. Struck, M.F., and Gille, J. (2013), Fungal Infections in Burns : A Comprehensive Review, *Ann. Burns Fire Disasters*, XXVI (3), 147–153.
29. Ribeiro, N., Heath, C., and Kierath, J. *et al.* (2010), Burn wounds infected by contaminated water: case reports, review of the literature and recommendations

- for treatment, *Burns*, (36), 9–22.
30. Calum, H., Moser, C., and Jensen, PØ, et al. (2009), Thermal injury induces impaired function in polymorphonuclear neutrophil granulocytes and reduced control of burn wound infection, *Clin Exp Immunol.*, (156), 102–10.
 31. Lin, M., Carmeli, Y., and Zumsteg, J. et al. (2005), Prior antimicrobial therapy and risk for hospital-acquired *Candida glabrata* and *Candida krusei* fungemia: A case-case-control study, *Antimicrob Agents Chemother.*, 49, 455–60.
 32. Stone, H., Cuzzell, J., Kolb, L., Moskowitz, M., and McGowan, J.J. (1979), *Aspergillus* infection of the burn wound, *J Trauma.*, 19 (10), 765–7.
 33. Nguyễn Khắc Lực (chủ biên) (2017), *Giáo trình Ký sinh trùng và côn trùng y học (dùng cho đào tạo trình độ cử nhân xét nghiệm y học)*, Quân đội nhân dân, Hà Nội.
 34. Raper, K., and Fennell, D.I. (1965), *The Genus Aspergillus*, Williams and Wilkins, Philadelphia.
 35. Booth, C. (1971), *The Genus Fusarium*, Commonwealth Mycological Institute, Surrey.
 36. Raja, H., Miller, A., Pearce, C., and Oberlies, N. (2017), Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community, *J. Nat. Prod.*, 80 (3), 756–770.
 37. Willinger, B., Kienzl, D., and Kurzai, O. (2014), Diagnostics of Fungal Infections, in *Human Fungal Pathogens, The Mycota XII* (eds. Kurzai, O.), Springer Berlin Heidelberg, pp. 229–259.
 38. Ballard, J., Edelman, L., Saffle, J., Sheridan, R., et al. (2008), Positive fungal cultures in burn patients: a multicenter review, *J Burn Care Res*, 29 (1), 213–21.
 39. Katz, T., Wasiak, J., Cleland, H., and Padiglione, A. (2014), Incidence of non-candidal fungal infections in severe burn injury: an Australian perspective, *Burns*, 40 (5), 881–6.
 40. Ali, M., Reza, M., Gholipourmalekabadi, M., Samadikuchaksaraei, et al. (2013), The prevalence of fungal infections in a level I Iranian burn hospital, *Asian Biomed.*, 7 (6), 829–833.
 41. Capoor, M.R., Gupta, S., Sarabahi, S., Mishra, A., et al. (2012), Epidemiological and clinico-mycological profile of fungal wound infection from largest burn centre in Asia, *Mycoses*, 55 (2), 181–188.
 42. Schaal, J., Leclerc, T., Soler, C., Donat, N., et al. (2015), Epidemiology of filamentous fungal infections in burned patients_ A French retrospective study, *Burns*, 41 (4), 853–63.
 43. Arnould, J., and Le Floch, R. (2015), Infections fongiques des brules: revue, *Ann. Burns Fire Disasters*, 28 (1), 21–28.
 44. Mousa, H. (1999), Fungal infection of burn wounds in patients with open and

- occlusive treatment methods, *East Mediterr Heal. J*, 5 (2), 333–6.
45. Sarabahi, S., Tiwari, V.K., Arora, S., Capoor, M.R., and Pandey, A. (2011), Changing pattern of fungal infection in burn patients, *Burns*, 38 (4), 520–528.
 46. Pfaller, M., Diekema, D.J., Gibbs, D.L., Newell, V., *et al.* (2010), Results from the artemis disk global antifungal surveillance study, 1997 to 2007: A 10.5-year analysis of susceptibilities of candida species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion, *J. Clin. Microbiol.*, 48 (4), 1366–1377.
 47. Kim, S.H., Shin, J.H., Kim, E.-C., Lee, *et al.* (2009), The relationship between antifungal usage and antifungal susceptibility in clinical isolates of Candida: a multicenter Korean study, *Med. Mycol.*, 47 (3), 296–304.
 48. Paramythiotou, E., Frantzeskaki, F., Flevari, A., and Armaganidis, A. (2014), Invasive Fungal Infections in the ICU: How to Approach, How to Treat, *Molecules*, 19, 1085–1119.
 49. Chisholm-Burns, M.A., Wells, B.G., Schwinghammer, T.L., Malone, *et al.* (2013), *Pharmacotherapy Principle and practice*, McGraw-Hill Education.
 50. Guinea, J. (2014), Global trends in the distribution of Candida species causing candidemia, *Clin Microbiol Infect.*, 20 (Suppl 6), 5–10.
 51. Quindós, G. (2014), Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face, *Rev Iberoam Micol.*, 31 (1), 42–8.
 52. Vinsonneau, C., Benyamina, M., Baixench, M.T., Stephanazzi, J., *et al.* (2009), Effects of candidaemia on outcome of burns., *Burns*, 35 (4), 561–4.
 53. Zhou, J., Tan, J., Gong, Y., Li, N., and Luo, G. (2019), Candidemia in major burn patients and its possible risk factors: A 6-year period retrospective study at a burn ICU, *Burns*, 45 (5), 1164–1171.
 54. Escrig, A.I.R., Salavert, M., Vivó, C., Cantón, *et al.* (2016), Candidemia in major burns patients, *Mycoses*, 59 (6), 391–398.
 55. Vũ Quyết Thắng (2015), Nghiên cứu thực trạng nhiễm ký sinh trùng đường sinh sản ở phụ nữ độ tuổi 18 – 49 đã có chồng ở thị xã Quảng Yên tỉnh Quảng Ninh và hiệu quả điều trị, Luận án tiến sỹ Y học, Viện Sốt rét - Ký sinh trùng và Côn trùng trung ương.
 56. Vũ Đức Bình (2015), Thực trạng, nguy cơ nhiễm Candida sp, Trichomonas vaginalis đường sinh dục phụ nữ tuổi sinh đẻ tại huyện Tam Nông tỉnh Phú Thọ và hiệu quả điều trị, giáo dục sức khỏe (2011 – 2013), Luận án tiến sỹ Y học, Viện Sốt rét - Ký sinh trùng và Côn trùng trung ương.
 57. Anh, D.N., Bac, N.D., Anh, L.T., Quang, L.B., *et al.* (2019), Prevalence of Candida Species Isolated from Vaginal Discharge of Women Undergoing in vitro Fertilization- Embryo Transfer in Vietnam, *Biomed J Sci Tech Res*, 14 (5).
 58. Hà Tuấn Minh, Lê Hữu Doanh (2016), Mức độ nhạy cảm với kháng sinh chống nấm của một chủng Candida gây bệnh ở miệng, *Nghiên cứu y học*, 101 (3), 40–

- 46.
59. Nguyễn Thị Bình, Hồ Văn Hoàng, Vũ Tuấn Anh (2017), Khảo sát mức độ nhạy của một số chủng nấm Candida ở âm đạo phụ nữ tuổi sinh đẻ với thuốc kháng nấm tại bệnh viện Phong – da liễu trung ương Quy Hòa năm 2016, *Phòng chống bệnh sốt rét và các bệnh ký sinh trùng*, 96 (số đặc biệt), 339 – 345.
 60. Mai Anh Lợi (2019), Nghiên cứu một số đặc điểm nhiễm và thành phần loài nấm miệng ở bệnh nhân ung thư tại bệnh viện quân y 103 và bệnh viện Thống Nhất (2015 – 2017), Luận án tiến sỹ Y học, Viện Sốt rét - Ký sinh trùng và Côn trùng trung ương.
 61. Bac, N.D., Anh, L.T., Quang, L.B., Luc, N.K., *et al.* (2019), Prevalence of Candida bloodstream isolates from patients in two hospitals in Vietnam, *Iran J Microbiol*, 11 (2), 108–113.
 62. Nguyễn Nhị Hà, Phạm Hồng Nhung (2017), Tình hình nhiễm nấm máu tại bệnh viện Bạch Mai từ tháng 1/2016 đến tháng 10/2016, *Nghiên cứu y học*, 107 (2).
 63. Chu Anh Tuấn, Đặng Thế Hạnh (2010), Một số nhận xét về 5 trường hợp nhiễm nấm huyết tại khoa điều trị tích cực – viện bỏng quốc gia từ 2006 – 2009, *Y học thảm họa và bỏng*, (3), 62–37.
 64. Dismukes, W., Pappas, P.G., and Sobel, J.D. (2003), *Clinical Mycology*, Oxford University Press, New York, USA.
 65. Richardson, M.D., and Warnock, D.W. (2003), *Fungal Infection Diagnosis and Management*, Blackwell Publishing Ltd, Massachusetts 02148-5020, USA.
 66. Deacon, J. (2006), *Fungal Biology*, Blackwell Publishing Ltd.
 67. Eschenauer, G.A., Nguyen, M., and Clancy, C.J. (2015), Is Fluconazole or an Echinocandin the Agent of Choice for Candidemia, *Ann Pharmacother.*, 49 (9), 1068–74.
 68. Maubon, D., Garnaud, C., Calandra, T., Sanglard, D., and Cornet, M. (2014), Resistance of Candida spp. to antifungal drugs in the ICU: Where are we now?, *Intensive Care Med.*, 40 (9), 1241–1255.
 69. Truant, A.L. (ed.) (2016), *Manual of Commercial Methods in Clinical Microbiology*, John Wiley & Sons, Inc.
 70. Sanguinetti, M., Porta, R., Sali, M., La Sorda, M., *et al.* (2007), Evaluation of VITEK 2 and RapID yeast plus systems for yeast species identification: experience at a large clinical microbiology laboratory, *J. Clin. Microbiol.*, 45 (4), 1343–1346.
 71. Pfaller, M., Diekema, D., Procop, G., and Rinaldi, M. (2013), Comparison of the Vitek 2 yeast susceptibility system with CLSI microdilution for antifungal susceptibility testing of fluconazole and voriconazole against Candida spp., using new clinical breakpoints and epidemiological cutoff values, *Diagn Microbiol Infect Dis.*, 77 (1), 37–40.
 72. Ahmad, I., Owais, M., Shahid, M., and Aqil, F. (eds.) (2010), *Combating*

Fungal Infections Problems and Remedy, Springer.

73. Hospenthal, D.R., and Rinaldi, M.G. (2008), *Diagnosis and Treatment of Human Mycoses*, Humana Press Inc, New Jersey.
74. Verweij, P.E., Mellado, E., and Melchers, W.J.G. (2007), Multiple-Triazole-Resistant Aspergillosis, *N. Engl. J. Med.*, 356 (14), 1481–3.
75. Kasper, D.L., Hauser, S.L., Jameson, J.L., Fauci, A.S., *et al.* (2015), *Harrison's principles of internal medicine*, McGraw-Hill.
76. Muhammed, M., Coleman, J., Carneiro, H., and Mylonakis, E. (2011), The challenge of managing fusariosis, *Virulence*, 2 (2), 91–6.
77. Ngô Thị Minh Châu, Tôn Nữ Phương Anh, Santona, A., and Cappuchinelli, P. (2017), Xác định gen độc lực và tỷ lệ kháng thuốc kháng nấm của *Candida albicans*, *Phòng chống bệnh sốt rét và các bệnh ký sinh trùng*, 96 (số đặc biệt), 119–125.
78. Tan, T.Y., Hsu, L.Y., Alejandria, M.M., Chaiwarith, R., *et al.* (2016), Antifungal susceptibility of invasive *Candida* bloodstream isolates from the Asia-Pacific region, *Med. Mycol.*, 54 (5), 471–7.
79. Esser, K. (ed.) (2014), *The mycota*, Springer.
80. Luo, G., Tan, J., Peng, Y., Wu, J., and Huang, Y. *et al.* (2014), Guideline for diagnosis, prophylaxis and treatment of invasive fungal infection post burn injury in China 2013, *Burn. Trauma*, 2 (2), 45–52.
81. León, C., Ruiz-Santana, S., Saavedra, P., Galván, B., *et al.* (2009), Usefulness of the “*Candida* score” for discriminating between *Candida* colonization and invasive candidiasis in non-neutropenic critically ill patients: a prospective multicenter study, *Crit Care Med.*, 37 (5), 1624–33.
82. Pappas, P.G., Kauffman, C.A., Andes, D.R., Clancy, C.J., *et al.* (2016), Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America, *Clin Infect Dis.*, 62 (4), e1-50.
83. Golan, Y., Wolf, M., Pauker, S., Wong, J., and Hadley, S. (2005), Empirical anti-*Candida* therapy among selected patients in the intensive care unit: a cost-effectiveness analysis, *Ann Intern Med.*, 143 (12), 857–69.
84. Groth, C.M., and Dodds-Ashley, E.S. (2016), Fungal Infections in the ICU, in *CCSAP 2016 Book 1 Infection Critical Care*, ACCP.
85. León, C., Ostrosky-Zeichner, L., and Schuster, M. (2014), What's new in the clinical and diagnostic management of invasive candidiasis in critically ill patients, *Intensive Care Med.*, 40 (6), 808–19.
86. Bassetti, M., Righi, E., Montravers, P., and Cornely, O.A. (2018), What has changed in the treatment of invasive candidiasis? A look at the past 10 years and ahead, *J Antimicrob Chemother*, 73 (Suppl 1), i14–i25.
87. De Pascale, G., and Tumbarello, M. (2015), Fungal infections in the ICU: advances in treatment and diagnosis, *Curr Opin Crit Care.*, 21 (5), 421–9.

88. Eggimann, P., Bille, J., and Marchetti, O. (2011), Diagnosis of invasive candidiasis in the ICU, *Ann Intensive Care.*, 1 (37).
89. Antinori, S., Milazzo, L., Sollima, S., Galli, M., and Corbellino, M. (2016), Candidemia and invasive candidiasis in adults : A narrative review, *Eur J Intern Med*, 34, 21–28.
90. Bassetti, M., Peghin, M., and Timsit, J. (2016), The current treatment landscape : candidiasis, *J Antimicrob Chemother*, 71 (Suppl 2), ii13–ii22.
91. Allothman, A.F., Al-musawi, T., Al-abdely, H.M., Al, J., *et al.* (2014), Clinical practice guidelines for the management of invasive *Candida* infections in adults in the Middle East region : Expert panel recommendations, *J Infect Public Heal.*, 7 (1), 6–19.
92. Cornely, O.A., Bassetti, M., Calandra, T., Garbino, J., *et al.* (2012), ESCMID * guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients, *Clin Microbiol Infect.*, 18 (Suppl. 7), 19–37.
93. Ruhnke, M. (2014), Antifungal stewardship in invasive *Candida* infections, *Clin Microbiol Infect.*, 20 (Suppl 6), 11–18.
94. Ruhnke, M., Rickerts, V., Cornely, O., Buchheidt, D., *et al.* (2011), Diagnosis and therapy of *Candida* infections: joint recommendations of the German Speaking Mycological Society and the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy, *Mycoses*, 54 (4), 279–310.
95. Patterson, T.F., Iii, R.T., Denning, D.W., Fishman, J.A., *et al.* (2016), Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis : 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America, *Clin. Infect. Dis.*, 1–60.
96. Teresa, M., Brizuela, M., Villasboas, M., Guarracino, F., Alvarez, V., Santos, P., and Finquelievich, J. (2016), *Fusarium* spp infections in a pediatric burn unit: nine years of experience, *Brazi J Infect Dis.*, 20 (4), 389–392.
97. Nucci, M., and Anaissie, E. (2007), *Fusarium* Infections in Immunocompromised Patients, *Clin. Microbiol. Rev*, 20 (4), 695–704.
98. Lockhart, S.R., and Guarner, J. (2019), Emerging and reemerging fungal infections, *Semin Diagn Pathol.*
99. Cortegiani, A., Russotto, V., Maggiore, A., Attanasio, M., *et al.* (2016), Antifungal agents for preventing fungal infections in non-neutropenic critically ill patients, *Cochrane Database Syst Rev*.
100. Fernández-ruiz, M., Guinea, J., Lora-pablos, D., Zaragoza, Ó., *et al.* (2017), Impact of fluconazole susceptibility on the outcome of patients with candidemia: data from a population-based surveillance, *Clin. Microbiol. Infect.*
101. Lopez-Cortes, L.E., Almirante, B., Cuenca-Estrella, M., Garnacho-Montero, *et al.* (2016), Empirical and targeted therapy of candidemia with fluconazole versus echinocandins : a propensity score e derived analysis of a population-based, multicentre prospective cohort, *CMI*, 22 (733), e1–e8.

102. Cui, N., Wang, H., Su, L., Qiu, H., Li, R., and Liu, D. (2017), Initial therapeutic strategy of invasive candidiasis for intensive care unit patients : a retrospective analysis from the China- SCAN study, *BMC Infect. Dis.*, 17 (93), 1–13.
103. Timsit, J., Azoulay, E., Schwebel, C., Charles, *et al.* (2016), Empirical Micafungin Treatment and Survival Without Invasive Fungal Infection in Adults With ICU-Acquired Sepsis, Candida Colonization, and Multiple Organ Failure: The EMPIRICUS Randomized Clinical Trial, *JAMA*, 316 (15), 1555–1564.
104. Dries, D., and Endorf, F. (2013), Inhalation injury: epidemiology, pathology, treatment strategies, *Scand J Trauma Resusc Emerg Med.*, 21 (31).
105. Singer, M., Deutschman, C.S., Seymour, C.W., Shankar-Hari, *et al.* (2016), The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3), *JAMA*, 315 (8), 801–810.
106. Rhodes, A., Evans, L., Alhazzani, W., Levy, *et al.* (2017), Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016, *Intensive Care Med.*, 43 (3), 304–377.
107. Arabi, Y., Venkatesh, S., Haddad, S., Shimemeri, *et al.* (2002), A prospective study of prolonged stay in the intensive care unit: predictors and impact on resource utilization, *Int. J. Qual. Heal. Care*, 14 (5), 403–410.
108. White, T., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. (1990), Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, in *Protocols and Applications - A Laboratory Manual*, 1ed., Academic Press, pp. 315–22.
109. CLSI (2008), *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard M27- A3*, Wayne, PA.
110. CLSI (2012), *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth International Supplement. CLSI document M27-4.*, Wayne, PA.
111. Singh, R.I., Xess, I., Mathur, P., Behera, B., *et al.* (2011), Epidemiology of candidaemia in critically ill trauma patients : experiences of a level I trauma centre in North India, *J. Med. Microbiol.*, 60, 342–348.
112. Hankovszky, P., Társy, D., Öveges, N., and Molnár, Z. (2015), Invasive Candida Infections in the ICU : Diagnosis and Therapy, *J Crit. Care Med.*, 1 (4), 129–139.
113. Spebar, M., and Pruitt, B.J. (1981), Candidiasis in the burned patient, *J Trauma*, 21 (3), 237–9.
114. Bahara, M.A., Pakyarib, M.R., Gholipourmalekabadi, M., and Samadikuchaksaraei, A. (2013), The prevalence of fungal infections in a level I Iranian burn hospital, *Asian Biomed.*, 7 (6), 829–833.
115. Fochtman, A., Forstner, C., Hagmann, M., Keck, M., *et al.* (2015), Predisposing factors for candidemia in patients with major burns, *Burns*, 41 (2),

326–32.

116. Meyer, E., Geffers, C., Gastmeier, P., and Schwab, F. (2013), No increase in primary nosocomial candidemia in 682 German intensive care units during 2006 to 2011, *Euro Surveill.*, 18 (24).
117. Tan, B., Chakrabarti, A., Li, R.Y., Patel, A.K., *et al.* (2015), Incidence and species distribution of candidaemia in Asia: a laboratorybased surveillance study, *Clin Microbiol Infect.*, 21, 946–53.
118. Goyal, N.K., Gore, M.A., and Goyal, R.S. (2010), Fungal colonisation in burn wounds : An Indian scenerio, *Indian J Surg*, 72, 49–52.
119. Dudoignon, E., Alanio, A., Anstey, J., Depret, F., *et al.* (2019), Outcome and potentially modifiable risk factors for candidemia in critically ill burns patients: A matched cohort study, *Mycoses*, 62 (3), 237–246.
120. Gaspar, G.G., Meneguetti, M.G., Auxiliadora-Martins, M., Basile-Filho, A., and Martinez, R. (2015), Evaluation of the predictive indices for candidemia in an adult intensive care unit, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 48 (1), 77–82.
121. Fraser, V.J., Jones, M., Dunkel, J., Storfer, S., *et al.* (1992), Candidemia in a Tertiary Care Hospital: Epidemiology, Risk Factors, and Predictors of Mortality, *Clin Infect Dis.*, 15 (3), 414–421.
122. Xiao, Z., Wang, Q., Zhu, F., and An, Y. (2019), Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility and mortality risk factors of candidemia among critically ill patients: a retrospective study from 2011 to 2017 in a teaching hospital in China, *Antimicrob Resist Infect Control.*, 8 (1), 89.
123. Salehi, M., Ghomi, Z., Mirshahi, R., Manshadi, S.A.D., and Rezahosseini, O. (2019), Epidemiology and Outcomes of Candidemia in a Referral Center in Tehran, *Casp. J Intern Med.*, 10 (1), 73–79.
124. Tigen, T., H, B., Gurun, P., A, D., B, O., N, C., and V, K. (2017), Risk factors, characteristics, and outcomes of candidemia in an adult intensive care unit in Turkey, *Am J Infect Control.*, 45 (6), e61–e63.
125. Damonti, L., Erard, V., Garbino, J., Schrenzel, J., *et al.* (2017), Catheter retention as a consequence rather than a cause of unfavorable outcome in candidemia, *Intensive Care Med.*, 43 (6), 935–939.
126. Yapar, N. (2014), Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis., *The Clin Risk Manag.*, 10, 95–105.
127. Ithendra, K., Pathapati, R.M., Premanadham, N., Madhavulu, B., *et al.* (2015), Identification of Fungal Pathogens in Burns Patients with reference to Candida, *J Evid. Based Med & Hlthcare*, 2 (1), 1–8.
128. Shoham, S., Han, G., Granek, T., Walsh, T., and Magee, M. (2009), Association Between Blood Glucose Levels and Development of Candidemia in Hospitalized Patients, *Endocr. Pract.*, 15 (2), 111–115.
129. Đỗ Ngọc Ánh, Lê Trần Anh, Hoàng Cao Sạ, Nguyễn Khắc Lực (2015), Xác

- định thành phần loài nấm men phân lập từ máu người bằng kỹ thuật PCR-RFLP, *Y dược lâm sàng* 108, 10 (10), 51–53.
130. Nguyễn Thị Thanh Huyền (2005), Nghiên cứu căn nguyên hội chứng tiết dịch âm đạo ở phụ nữ đến khám tại viện Da liễu từ tháng 1-9/2002, *Thông tin Y dược*, 3, 36–38.
 131. Trần Cẩm Vân, Nguyễn Hữu Sáu (2013), Xác định các chủng *Candida* spp. và đánh giá độ nhạy cảm với kháng sinh chống nấm ở bệnh nhân viêm âm đạo tái phát, *Y học Việt Nam*, (2), 26–30.
 132. Nguyễn Ngọc San, Đỗ Quyết, Lê Trần Anh, Nguyễn Văn Tâm và cs, (2006), Nghiên cứu mối liên quan giữa nấm đường hô hấp và bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, *Y học quân sự, chuyên đề các công trình nghiên cứu về bệnh nhiệt đới*, (4), 157–60.
 133. Beyda, N.D., Chuang, S.H., Alam, M.J., Shah, D.N., *et al.* (2013), Treatment of *Candida famata* bloodstream infections: case series and review of the literature, *J Antimicrob Chemother*, 68, 438–443.
 134. Boatto, H., Cavalcanti, S., Del Negro, G., Girão, M., *et al.* (2016), *Candida duobushaemulonii*: an emerging rare pathogenic yeast isolated from recurrent vulvovaginal candidiasis in Brazil, *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 111 (6), 407–10.
 135. Ramos, R., Caceres, D., Perez, M., Garcia, N., *et al.* (2018), Emerging multidrug-resistant *Candida duobushaemulonii* infections in Panama hospitals: importance of laboratory surveillance and accurate identification, *J Clin Microbiol*, 56, e00371-18.
 136. Hou, X., Xiao, M., Chen, S., Wang, H., *et al.* (2016), Identification and Antifungal Susceptibility Profiles of *Candida haemulonii* Species Complex Clinical Isolates from a Multicenter Study in China, *J Clin Microbiol.*, 54 (11), 2676–2680.
 137. Khan, Z., Ahmad, S., Al-Sweih, N., Joseph, L., *et al.* (2018), Increasing prevalence, molecular characterization and antifungal drug susceptibility of serial *Candida auris* isolates in Kuwait, *PLoS ONE*, 13 (4), e0195743.
 138. Chakrabarti, A., Rudramurthy, S., Kale, P., Hariprasath, P., *et al.* (2014), Epidemiological study of a large cluster of fungaemia cases due to *Kodamaea ohmeri* in an Indian tertiary care centre, *Clin Microbiol Infect.*, 20 (2), O83-9.
 139. Cao, H., Huang, B., and Mao, S. (2016), [A case of bioprosthetic valve endocarditis due to *Pichia ohmeri*] [Article in Chinese], *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi.*, 44 (1), 72–3.
 140. Raksha, Singh, G., and Urhekar, A. (2017), Virulence Factors Detection in *Aspergillus* Isolates from Clinical and Environmental Samples, *J Clin Diagn Res.*, 11 (7), DC13-DC18.
 141. Enoch, D.A., Yang, H., Aliyu, S.H., and Micallef, C. (2017), The Changing Epidemiology of Invasive Fungal Infections, *Methods Mol Biol.*, (1508), 17–65.

142. Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., *et al.* (2012), Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 109 (16), 6241–6246.
143. Hunt, J., and Purdue, G. (2003), Fungal infections in a burn unit: there is little fungus among us, *J. Burn. Surg. Wound Care*, 2.
144. Guinea, J., Viedma, D.G. de, Peláez, T., *et al.* (2011), Molecular Epidemiology of *Aspergillus fumigatus*: An In-Depth Genotypic Analysis of Isolates Involved in an Outbreak of Invasive Aspergillosis Downloaded from <http://jcm.asm.org/> on September 30, 2018 by guest, *J. Clin. Microbiol.*, 49 (10), 3498–503.
145. Jabbari Amiri, M., Aghili, S., Shokohi, T., Hedayati, M., *et al.* (2016), Invasive forms of *Candida* and *Aspergillus* in sputum samples of pulmonary tuberculosis patients attending the tuberculosis reference laboratory in Ghaemshahr, Northern Iran: An analysis of samples collected during the past 10 years, *Int J Mycobacteriol.*, 5 (Suppl 1), S179–S180.
146. Mazza, A., Luciani, N., Luciani, M., Cammertoni, F., *et al.* (2017), Fungal Endocarditis Due to *Aspergillus oryzae*: The First Case Reported in the Literature, *J Hear. Valve Dis.*, 26 (2), 205–7.
147. Lamoth, F., Lockhart, S.R., Berkow, E.L., and Calandra, T. (2018), Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis, *J. Antimicrob. Chemother.*, 73 (suppl_1), i4–i13.
148. Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Turnidge, J.D., Castanheira, M., and Jones, R.N. (2019), Twenty Years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for *Candida* Species From 1997-2016, *Open forum Infect. Dis.*, 6 (Suppl 1), S79–S94.
149. Yang, Y.-L., Cheng, H.-H., Lo, H.-J., *et al.* (2006), Distribution and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from different age populations in Taiwan, *Med. Mycol.*, 44 (3), 237–242.
150. Xiao, M., Fan, X., Chen, S.S.C., Wang, H., *et al.* (2015), Antifungal susceptibilities of *Candida glabrata* species complex, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* species complex and *Candida tropicalis* causing invasive candidiasis in China: 3 year national surveillance, *J Antimicrob Chemother*, 70 (3), 802–10.
151. Ngô Thị Minh Châu, Đỗ Thị Bích Thảo, Tôn Nữ Phương Anh (2019), Thử nghiệm đánh giá sự nhạy cảm của các loài *Aspergillus* phân lập từ bệnh nhân tại bệnh viện trường đại học Y Dược Huế với amphotericin B và itraconazole, *Kỷ yếu Hội nghị Ký sinh trùng toàn quốc lần thứ 46*, 92–99.
152. Cleveland, A., Farley, M., Harrison, L., Stein, B., *et al.* (2012), Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: results from population-based laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008-2011,

Clin Infect Dis, 55 (10), 1352.

153. Caggiano, G., Coretti, C., Bartolomeo, N., Lovero, G., *et al.* (2015), Candida Bloodstream Infections in Italy: Changing Epidemiology during 16 Years of Surveillance, *BioMed Res. Int.*, 1–9.
154. Teo, J.Q., Candra, S.R., Lee, S.J., Chia, S.Y., *et al.* (2017), Candidemia in a major regional tertiary referral hospital – epidemiology, practice patterns and outcomes, *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, 6 (27).
155. Zhang, L., Zhou, S., Pan, A., Li, J., and Liu, B. (2015), Surveillance of antifungal susceptibilities in clinical isolates of *Candida* species at 36 hospitals in China from 2009 to 2013, *Int J Infect Dis.*, 33, 1–4.
156. Pfaller, M.A., Moet, G.J., Messer, S.A., *et al.* (2011), Geographic Variations in Species Distribution and Echinocandin and Azole Antifungal Resistance Rates among *Candida* Bloodstream Infection Isolates: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008 to 2009) ¶ , *J Clin Microbiol*, 49 (1), 396–399.
157. Fekkar, A., Dannaoui, E., Meyer, I., Imbert, S., *et al.* (2014), Emergence of echinocandin-resistant *Candida* spp. in a hospital setting: a consequence of 10 years of increasing use of antifungal therapy?, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 33 (9), 1489–96.
158. Cleveland, A.A., Harrison, L.H., Farley, M.M., Hollick, R., *et al.* (2015), Declining Incidence of Candidemia and the Shifting Epidemiology of *Candida* Resistance in Two US Metropolitan Areas , 2008 – 2013: Results from Population-Based Surveillance, *PLoS One*, 10 (3), e0120452.
159. Toscano, C.M., and Jarvis, W.R. (1999), Emerging Issues in Nosocomial Fungal Infections, *Curr Infect Dis Rep.*, 1 (4), 347–361.
160. Arendrup, M.C. (2010), Epidemiology of invasive candidiasis., *Curr. Opin. Crit. Care*, 16 (5), 445–452.
161. Juneja, D., Nasa, P., Singh, O., Javeri, Y., and Garg, S. (2012), Candiduria in ICUs: incidence, course and outcome, *Crit. Care*, 16 (Suppl 3), P19–P19.
162. Leroy, G., Lambiotte, F., Thévenin, D., Lemaire, C., *et al.* (2011), Evaluation of “*Candida* score” in critically ill patients: a prospective, multicenter, observational, cohort study, *Ann. Intensive Care*, 1 (1), 50.
163. Bienvenu, A., Pradat, P., Guerin, C., Aubrun, F., *et al.* (2020), Evaluation of first-line therapies for the treatment of candidemia in ICU patients: A propensity score analysis, *Int J Infect Dis*, 93, 15–21.
164. Reboli, A.C., Shorr, A.F., Rotstein, C., Pappas, P.G., *et al.* (2011), Anidulafungin compared with fluconazole for treatment of candidemia and other forms of invasive candidiasis caused by *Candida albicans*: a multivariate analysis of factors associated with improved outcome, *BMC Infect Dis.*, (11), 261.

165. Vazquez, J., Reboli, A.C., Pappas, P.G., Patterson, T.F., *et al.* (2014), Evaluation of an early step-down strategy from intravenous anidulafungin to oral azole therapy for the treatment of candidemia and other forms of invasive candidiasis : results from an open-label trial, *BMC Infect Dis.*, (14), 97.
166. Kullberg, B., Sobel, J., Ruhnke, M., Pappas, *et al.* (2005), Voriconazole versus a regimen of amphotericin B followed by fluconazole for candidaemia in non-neutropenic patients: a randomised non-inferiority trial, *Lancet*, 366 (9495), 1435–42.
167. Morrell, M., Fraser, V.J., and Kollef, M.H. (2005), Delaying the empiric treatment of candida bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49 (9), 3640–5.
168. Murri, R., Scoppettuolo, G., Ventura, G., Fabbiani, M., and Giovannenze, F. (2016), Initial antifungal strategy does not correlate with mortality in patients with candidemia, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 35 (2), 187–93.

PHỤ LỤC

ĐƠN XIN SỬ DỤNG SỐ LIỆU ĐỀ TÀI

DANH SÁCH BỆNH NHÂN THAM GIA NGHIÊN CỨU

BẢNG ĐIỂM SOFA

Điểm	0	1	2	3	4
Hô hấp PaO ₂ /FiO ₂	> 400	≤ 400	≤ 300	≤ 200	≤ 100
Đông máu Tiểu cầu G/L	>150	≤ 150	≤100	≤50	≤20
Gan Bilirubin μmol/l	<20	20– 32	33 – 101	102 – 204	>204
Tim mạch Tụt huyết áp	Không tụt HA	HATB < 70mmHg	Dopamin ≤ 5 hoặc Dobutamin	Dopamin > 5 hoặc Adre ≤ 0,1 hoặc Nora ≤ 0,1	Dopamin > 15 hoặc Adre > 0,1 hoặc nora > 0,1
Thần kinh Điểm glasgow	15	13 – 14	10 – 12	6 – 9	< 6
Thận Creatinine (μmol/l) hoặc lưu lượng nước tiểu	<110	110 – 170	171 – 299	300 – 400 hoặc < 500ml/ngày	>440 hoặc < 200ml/ngày

ĐÁNH GIÁ TÌNH TRẠNG NẶNG BẰNG THANG ĐIỂM APACHE II

Điểm	4	3	2	1	0	1	2	3	4
Nhiệt độ (°C)	≥41	39-40,9		38,5–38,9	36–38,4	34–35,9°	32–33,9°	30–31,9°	≤29,9°
HATB (mmHg)	≥ 160	130–159	110–129		70–109		50–69		≤ 49
Tần số tim	≥ 180	140–179	110–139		70–109		55–69	40–54	≤ 39
Tần số thở	≥ 50	35–49		25–34	12–24	10–11	6–9		≤ 5
A-aDO ₂ *	≥ 500	350–499	200–349		< 200				
PaO ₂ ** (mm Hg)					> 70	61–70		55–60	< 55
PH động mạch	≥ 7,7	7,6–7,69		7,5–7,59	7,33–7,49		7,25–7,32	7,15–7,24	< 7,15
Na (mmol/L)	≥ 180	160–179	155–159	150–154	130–149		120–129	111–119	≤ 110
K (mmol/L)	≥ 7	6–6,9		5,5–5,9	3,5–5,4	3–3,4	2,5–2,9		< 2,5
Creatinine (mg/dL)	≥ 3,5	2–3,4	1,5–1,9		0,6–1,4		< 0,6		
Hct (%)	≥ 60		50–59,9	46–49,9	30–45,9		20–29,9		< 20
WBC (G/L)	≥ 40		20–39,9	15–19,9	3–14,9		1–2,9		< 1
Glasgow	15 – điểm Glasgow								

*Nếu FiO₂≥0,5, **Nếu FiO₂<0,5

BỆNH ÁN NGHIÊN CỨU

ĐỀ TÀI :NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC, LÂM SÀNG, CẬN LÂM SÀNG, YẾU TỐ LIÊN QUAN
VÀ ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ ĐIỀU TRỊ NHIỄM NẤM TRÊN BỆNH NHÂN BÔNG

BỆNH ÁN NGHIÊN CỨU- SỐ

Số bệnh án		Ngày vào viện	
Họ và tên		Giới: Nam <input type="checkbox"/> Nữ <input type="checkbox"/>	Tuổi:
Địa chỉ		Buồng ICU	
Số ngày điều trị	Tại ICU	Tại VBQG	
Chẩn đoán	Tổng S: %	Bông sâu: %	Tác nhân: Bông HH: Có <input type="checkbox"/> Không <input type="checkbox"/>
Thời gian đến VBQG		KQ sơ/cấp cứu	Toàn thân Vết thương
Phẫu thuật	Số lần PT:	Thứ 1: % - N	Thứ 2: % - N Thứ 3: % - N
		Thứ 4: % - N	Thứ 5: % - N Thứ 6: % - N

Alb									
Glu									

Thang điểm xâm nhiễm nấm

Chỉ số xâm nhiễm nấm – Colonization Index					Thang điểm Candida Score				
					W 1	W 2	W 3	W 4	
số mẫu cấy mọc nấm Candida CI= ----- tổng số mẫu cấy các vị trí	W1	W2	W3	W4	Nhiễm trùng nặng				
					Phẫu thuật				
					Dinh dưỡng tĩnh mạch				
					Candida xâm nhiễm nhiều vị trí (≥ 2)				
					Tổng điểm				

Yếu tố liên quan

	CHỈ TIÊU	Có/Không	Tổng số ngày	
--	----------	----------	--------------	--

	Điều trị dài ngày tại các khoa Hồi sức cấp cứu			
	Catheter tĩnh mạch trung tâm			
	Catheter động mạch xâm nhập			
	Catheter lọc máu			
	Lọc máu			
	Nuôi dưỡng đường tĩnh mạch			
	Điều trị hóa chất/dùng thuốc ức chế miễn dịch			
	Đặt sonde tiêu			
	Thông khí nhân tạo			
	Phẫu thuật			
	Dùng kháng sinh phổ rộng			
	Suy thận			
	Đái tháo đường / tăng đường huyết			

	Điểm APACHE II > 20			
	Bị ung thư			
	Có tình trạng cư trú của Candida trong cơ thể			
	Viêm tụy cấp			
Tổng số				

Phác đồ dự phòng nấm

Lựa chọn kháng sinh

STT	Tên kháng sinh	Đường dùng	Ngày bắt đầu	Ngày kết thúc	Liều sử dụng
1	Fluconazole				
2	Intraconazol				
3	Cancidas				
4	Voriconazole				
5	Amphotericin B				

Phác đồ tiếp cận

Dự phòng <input type="checkbox"/>	Định hướng <input type="checkbox"/>	Kinh nghiệm <input type="checkbox"/>	Mục tiêu <input type="checkbox"/>
-----------------------------------	-------------------------------------	--------------------------------------	-----------------------------------

Phác đồ điều trị nấm

STT	Tên kháng sinh	Đường dùng	Ngày bắt đầu	Ngày kết thúc	Đường dùng và Liều sử dụng
1	Fluconazole				
2	Intraconazol				
3	Cancidas				
4	Voriconazole				
5	Amphotericin B				
6	Phối hợp				

Kết quả xét nghiệm nấm: Dương tính/Âm tính; Tên nấm

Xét nghiệm	W1	W2	W3	W4
Dịch vết thương	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dịch họng	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Đờm	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Da lành	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mô sinh thiết	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nước tiểu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Phân	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Máu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Kết quả điều trị nhiễm nấm

- Diễn biến vết bỏng nông :

- Diễn biến vết bỏng sâu :

- Sạch nấp sau : ngày

- Diễn biến lâm sàng :

.....

.....

Qui trình chạy máy VITEK 2 – COMPACT (Pháp) để định danh và xác định độ nhạy của nấm men với thuốc kháng nấm

1. Chuẩn bị

Thiết bị

Máy đo độ đục chuẩn: VITEK 2 DensiCHEK Plus Kit

Bộ chuẩn máy đo độ đục: DensiCHEK™ Plus Standards Kit

VITEK® 2 Cassette

Vật tư

Ống tube trong vô trùng kích thước 12 x 0,75mm

Ăng cây

Đèn cồn

Bộ hút nước muối: Dispenser

Pipette cố định thể tích 280µl và đầu côn.

VITEK Card: YST Card (21343), thẻ kháng nấm đồ (AST YS0), bảo quản ở 2-8°C

Dung dịch natri clorua vô trùng 0,45% pH (4,5 – 7,0)

Bệnh phẩm

Khuẩn lạc thuần: 18 - 72 giờ

Điều kiện ủ: 35 – 37°C, hiếu khí, không có CO₂

Chủng chứng : *Candida albicans* ATCC® 14053

- Chạy kiểm tra (QC)

+ Chuẩn bị chủng chứng: nấm cấy trên môi trường Sabouraud Dextrose Agar (SDA), ủ ở 35°C trong 24 giờ. Kiểm tra khuẩn lạc thuần

+ Qui trình chạy QC

Trước khi xét nghiệm QC, thông tin mỗi lần nhận hóa chất cho mỗi loại thẻ xét nghiệm phải được nhập vào phần mềm. Từ màn hình chính kích chuột vào biểu tượng QC.

Sau khi đăng nhập vào QC, kích vào biểu tượng Record Shipment trên thanh công cụ

Nhập số lô, số lượng và ngày nhập cho mỗi loại thẻ xét nghiệm, phần mềm sẽ tự động nhập hạn sử dụng và thông tin về loại thẻ xét nghiệm

Quy trình chạy giống chạy mẫu bệnh phẩm bình thường nhưng khác nhau về nhập thông tin trên máy tính: Từ phần mềm Vitek 2 Compact, tạo virtual cassette -> New virtual cassette. Chọn Cassette -> Quét barcode của thẻ xét nghiệm. Kích vào cột QC của cassette.

Phần mềm sẽ hiển thị một danh sách các chủng chuẩn làm QC cho từng thẻ xét nghiệm.

Chọn chủng làm QC, sau đó kích vào OK và lưu thông tin.

- Xem kết quả QC

Kích vào biểu tượng QC trên màn hình chính để xem lại kết quả.

Báo cáo sẽ chứa các giá trị mong đợi và kết quả chạy thực tế, kết quả lệch so với giá trị mong đợi sẽ được tô màu vàng.

An toàn

- Áp dụng các biện pháp an toàn sinh học khi xử lý mẫu và thực hiện xét nghiệm.

- Phải mang găng tay trong suốt quá trình thực hiện xét nghiệm

- Không được ăn uống, hút thuốc ở khu vực làm xét nghiệm

- Xem tất cả các mẫu thử như là nguồn lây nhiễm.

2. Thực hiện

2.1. Chuẩn bị

- Mẫu bệnh phẩm là các khuẩn lạc thuần đã chuẩn bị theo đúng yêu cầu
- Chuẩn bị thẻ xét nghiệm: Lấy thẻ xét nghiệm và để ở nhiệt độ phòng khoảng 30 phút trước khi làm xét nghiệm.
- Kiểm tra máy đo độ đục bằng bộ chuẩn máy theo hướng dẫn sử dụng của máy DENSICHEK PLUS sau đó chuẩn 0 bằng nước muối
- Ghi lên phiếu XN số cassette, ngày & giờ làm XN, tên người làm (Bench), mã bệnh phẩm (Lab ID), loại thẻ XN cho từng mẫu.

2.2. Các bước thực hiện

- Lấy ống nghiệm vô trùng kích thước 12 x 0.75 cm (chú ý: không chạm tay vào miệng ống nghiệm) đặt trên khay cassette
- Pha huyền dịch định danh: lấy 3 ml dung dịch natri clorua 0,45% vào ống nghiệm
- Sử dụng que cấy vô trùng lấy các khuẩn lạc đã phân lập, nghiền kỹ trên thành ống, trộn đều và đưa vào máy đo độ đục: đạt độ đục 1,8 – 2,2 McFarland.
- Chuẩn bị ống nghiệm làm kháng nấm đồ: Lấy 3ml dung dịch natri clorua 0,45% vào ống nghiệm mới và đặt vào cassette
- Pha mẫu huyền dịch nấm làm kháng nấm đồ: Dùng pipette hút 280µl huyền dịch nấm đã chuẩn bị sang ống nghiệm làm kháng nấm đồ.
- Lấy thẻ từ túi bảo vệ và đặt vào cassette
- Nhập thông tin cassette vào máy tính: Từ phần mềm Vitek 2 Compact, tạo virtual cassette -> New virtual cassette. Chọn Cassette -> Quét barcode của thẻ xét nghiệm. Nếu làm đồng thời cả định danh và KSD thì bôi đen cả 2

đồng định danh và KSD. Lưu thông tin cassette

- Đặt cassette vào buồng hút của máy và nhấn “Start fill”. Chờ khoảng 70 giây, máy hút xong. Chờ đèn báo kết thúc, mở cửa buồng hút trước sau đó mở cửa buồng vận hành và chuyển cassette từ buồng hút buồng vận hành.

- Chờ đến khi đèn báo kết thúc và trạng thái của buồng Loader trên màn hình máy là “Remove” thì lấy cassette từ buồng vận hành và đóng cửa lại.

- Nhập thông tin bệnh nhân vào phần mềm

- Nhập thông tin bệnh nhân: Từ màn hình chính kích vào “Enter Manage Patient Information View”, màn hình “View and Maintain Patient Information” xuất hiện. Kích vào “Add Patient”. Các trường có dấu hoa thị màu đỏ là các trường bắt buộc phải nhập thông tin.

- Máy VITEK 2 Compact sẽ đọc 15 phút một lần đến khi thu được kết quả, thẻ xét nghiệm sẽ được tự động đẩy vào thùng rác trong máy

- Chờ kết quả. Kết quả hoàn thành - Review kết quả và in kết quả (nếu cần)

Chú ý

- Nếu chỉ làm xét nghiệm định danh, có thể bỏ qua bước làm kháng nấm đồ.

- Nếu chỉ làm xét nghiệm kháng nấm đồ: vẫn phải làm cả bước định danh.

2.3. Diễn giải và báo cáo, phân tích kết quả

Dữ liệu sẽ được tự động ghi vào phần mềm trên máy tính. Phần mềm phân tích kết quả và xác định vi sinh vật dựa và các phản ứng sinh hóa, giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và phiên giải kết quả (tham khảo): S (nhạy), I (trung gian), R (kháng) cho mỗi kháng nấm có trong thẻ. Phần mềm suy luận đưa ra kết quả S, I, R cho các kháng nấm không có trong thẻ

Phần mềm phân tích và đưa ra độ tin cậy của các kết quả kháng sinh đồ, hiển thị bằng các màu sắc: xanh, vàng, đỏ, tím.

+ Màu xanh (Mức độ tin cậy chắc chắn): các phenotype đưa ra không làm thay đổi giá trị MIC, có thể thay đổi phiên giải kết quả cho điều trị

+ Màu vàng (mức độ tin cậy chắc chắn với sự hiệu chỉnh): Các phenotype đưa ra khi có một sự thay đổi giá trị MIC hoặc thay đổi giá trị thử nghiệm (ví dụ: beta lactamase, ESBL,...) trong phân tích của phần mềm. Có thể thay đổi phiên giải kết quả cho điều trị.

+ Màu đỏ (mức độ tin cậy không chắc chắn): Các phenotype không thể đưa ra. Các kết quả kháng sinh là không phù hợp với cơ sở dữ liệu của phần mềm. Không sử dụng các kết quả kháng sinh đồ có màu đỏ

+ Màu tím (chưa có cơ sở dữ liệu, phần mềm không thực hiện phân tích): Các phenotype không thể đưa ra. Các phenotype cho các sinh vật xét nghiệm không được mô tả trong cơ sở dữ liệu của phần mềm.

Quy trình định danh nấm bằng kỹ thuật sinh học phân tử

+ Tách chiết DNA bằng bộ sinh phẩm Fungi/Yeast Genomic DNA Isolation Kit (Cat. 27300) của hãng Norgen Biotek Corp. (Canada) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Chuẩn bị bộ sinh phẩm tách chiết DNA: thêm 42 ml cồn Ethanol tuyệt đối vào dung dịch Wash Solution A.

Thêm 500 μ l nước cất vào 1 ống eppendorf 1.5 ml. Dùng que cấy lấy 1 ít bào tử nấm rồi hòa tan vào ống nước cất.

Ly tâm 14,000 rpm trong 1 phút, loại bỏ dịch nổi.

Thêm 250 μ l Resuspension Solution A, vortex nhẹ để hòa tan. Thêm 20 μ l Lyticase, ủ ở 37°C trong 45 phút. Thường xuyên lắc trong quá trình ủ.

Thêm 500 μ l Lysis Buffer L, 5 μ l RNase A rồi hòa tan.

Chuyển hỗn hợp vào Bead Tube, vortex ở tốc độ tối đa trong 5 phút.

Ủ ống Bead Tube ở 65°C trong 10 phút, lắc 2 - 3 lần trong khi ủ.

Ly tâm nhẹ sau đó chuyển tất cả dung dịch bao gồm cả các tế bào vào ống ly tâm. (Không được lấy các hạt trong Bead Tube)

Ly tâm 14,000 rpm trong 2 phút, chuyển dịch nổi sang ống mới.

Thêm một lượng cồn bằng với thể tích dịch nổi vừa hút, trộn đều.

Thêm 300 μ l Solution BX, vortex.

Hút 650 μ l hỗn hợp vào cột lọc, ly tâm 10,000 rpm trong 1 phút, bỏ dịch phía dưới. Sử dụng ống cũ, thực hiện như trên với phần hỗn hợp còn lại.

Thêm 500 μ l Wash Solution A vào cột lọc. Ly tâm 10,000 rpm trong 1 phút. Bỏ dịch phía dưới, sử dụng ống cũ.

Lặp lại bước trên, rửa lần 2.

Ly tâm 14,000 rpm trong 2 phút

Chuyển cột lọc vào một ống Elution 1.7 ml. Thêm 100 µl Elution Buffer B, ly tâm 10,000 vòng trong 2 phút.

Nếu không thu được toàn bộ thể tích thì ly tâm thêm 1 phút nữa.

+ Kỹ thuật đo nồng độ ADN sau khi tách: bằng máy Nanodrop 1000 (Thermo, Đức).

Khởi động máy tính kết nối với thiết bị;

Click đúp vào biểu tượng phần mềm của thiết bị Nanodrop 1000 trên Desktop. Một cửa sổ giao diện của phần mềm hiện ra.

Tiếp tục Click vào biểu tượng Nucleotid, khi đó có một cửa sổ giao diện mới hiện ra;

Bật nắp mắt quang của thiết bị, nhỏ 1 µl nước khử ion vào mắt, đóng nắp và click chuột vào vị trí OK trong cửa sổ mới trên máy tính;

Dùng khăn giấy khô lau nước trên mắt thiết bị và tiếp tục nhỏ 1 µl vào đó. Đóng nắp mắt thiết bị và bấm vào phím Blank trên cửa sổ giao diện của phần mềm hiện ra trên máy tính;

Dùng khăn giấy khô lau nước trên mắt thiết bị và nhỏ 1 µl dung dịch ADN cần đo vào đó. Đóng nắp thiết bị và Click chuột vào vị trí Measurement. Vài giây sau đó kết quả đo sẽ hiện trên cửa sổ giao diện của thiết bị trên màn hình máy tính với các thông số chính: nồng độ, chỉ số OD (260/280)...

Các mẫu tiếp theo cần đo lặp lại như ở bước trên;

Kết thúc đo, kết quả đo được ghi chép và lưu trên máy tính;

ADN của các mẫu nấm sau khi tách chiết và đo đạc được bảo quản ở -20°C cho tới khi chạy PCR.

+ Kỹ thuật khuếch đại gen (PCR) với mồi ITS1, ITS4

Kiểm tra sản phẩm: điện di trên gel agarose 1.5% và ghi hình trên máy

chụp gen. Sản phẩm PCR của các mẫu xuất hiện band (dương tính) tiếp tục được sử dụng cho cắt giới hạn. Các mẫu âm tính hoặc bị lỗi (xuất hiện nhiều band) được chạy lại PCR hoặc tiến hành tách chiết lại ADN và thực hiện lại từ đầu.

Chụp ảnh và phân tích kết quả với thiết bị có ánh sáng UV:

So sánh kích thước gen với các tác giả khác để định loại nấm.

+ Giải trình tự gen: Sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự trực tiếp bằng máy ABI 3130xl Genetic Analyzer.

Tinh sạch sản phẩm PCR chuẩn bị cho giải trình tự: sử dụng bộ kit tinh sạch ADN của hãng Omega:

Lấy 20 μ l sản phẩm PCR trong các tube của các mẫu cần giải trình tự cho vào các tube eppendorf.

Bổ sung 20 μ l dung dịch bám màng (membrane binding solution) vào 20 μ l sản phẩm PCR cần tinh sạch.

Hút hỗn dung dịch để chuyển toàn bộ sang cột SV minicolumn, ủ ở nhiệt độ phòng trong thời gian 1 phút sau đó ly tâm 12.000 vòng/phút trong 3 phút, loại bỏ dịch chảy xuống dưới ống thu.

Thêm 700 μ l dung dịch rửa màng (membrane wash solution) và ly tâm 12.000 vòng/phút trong 3 phút, loại bỏ dịch chảy xuống dưới ống thu.

Lặp lại bước trên với 500 μ l dung dịch rửa màng để làm sạch hoàn toàn.

Chuyển SV minicolumn sang ống thu eppendorf 1,5ml và thêm 30 μ l nucleaza-free để hòa tan ADN, ủ trong 1 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó ly tâm 12.000 vòng/phút trong 3 phút và thu dịch dưới ống eppendorf, loại bỏ cột lọc.

Dịch thu được chứa ADN tinh sạch được bảo quản trong tủ -20°C cho đến khi giải trình tự.

Chạy Bigdye:

Bảng. Thành phần phản ứng Bigdye

Thành phần	Thể tích (µl)
ADN khuôn (20ng)	2
Bigdye reaction mix	1
Dung dịch đệm 5X bigdye	2
Mồi (2pmol)	2
Nước khử ion	3

Chu trình nhiệt: 96°C (10 giây) - 59 °C (5 giây) - 60 °C (2 phút) - 4 °C(+∞)

Nạp mẫu vào máy giải trình tự tự động ABI 3130 để giải trình tự

Sản phẩm sau khi chạy Bigdye được chuẩn bị để nạp vào máy đọc trình tự tự động ABI 3130.