

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/332497309>

In vitro susceptibility testing of dermatophytes isolated from Hospital of Dermatovenereology in Ho Chi Minh city to ketoconazole and terbinafine

Article · April 2019

CITATIONS

0

READS

115

4 authors, including:



Nguyen Thi Ngoc Yen

Nguyen Tat Thanh University

6 PUBLICATIONS 6 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Trinh Phan-Canh

Max Perutz Labs Vienna

10 PUBLICATIONS 16 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Tropical lichen and lichen-associated microbes [View project](#)



Actinobacteria secondary metabolites [View project](#)

KHẢO SÁT MỨC ĐỘ NHẠY CẢM CỦA NẤM DA PHÂN LẬP TẠI BỆNH VIỆN DA LIỄU THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH VỚI KETOCONAZOL VÀ TERBINAFIN

Nguyễn Thị Ngọc Yến, Phan Cảnh Trình**, Tôn Hoàng Diệu*, Nguyễn Lê Phương Uyên**

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Bệnh nấm da khá phổ biến tại các vùng khí hậu nóng ẩm như Việt Nam, mặc dù bệnh chỉ khu trú ở da nông nhưng ảnh hưởng nghiêm trọng đến chất lượng cuộc sống. Thời gian điều trị dài tác động lớn đến sự tuân thủ trị liệu của bệnh nhân, cũng là cơ hội phát sinh đề kháng với thuốc kháng nấm.

Mục tiêu: Xác định thành phần loài và tính nhạy cảm với ketoconazol, terbinafin của các chủng nấm da phân lập từ bệnh phẩm tại Bệnh viện Da liễu TP. Hồ Chí Minh từ tháng 11/2017 – 12/2017.

Đối tượng – Phương pháp nghiên cứu: Phân lập nấm da từ bệnh phẩm trên môi trường chọn lọc nấm da (dermatophytes test medium - DTM), định danh bằng hình thái học và sinh hoá, xác định tính nhạy cảm với ketoconazol, terbinafin theo hướng dẫn CLSI M44-A2, thay đổi theo Nweze và cs. (2010).

Kết quả: Trong 165 mẫu thu thập từ bệnh phẩm trong tháng 11/2017 của bệnh nhân biểu hiện lâm sàng nấm da, có 104 mẫu da dương tính với xét nghiệm KOH, phân lập trên môi trường chọn lọc thu được 55 chủng, trong đó chi *Trichophyton* chiếm ưu thế (90,91%) so với chi *Microsporum* (9,09%) và không có chi *Epidermophyton*. Về mức độ nhạy cảm với thuốc kháng nấm, có 52,7% chủng nhạy cảm với ketoconazol; 21,8% nhạy cảm trung gian và có 25,5% chủng đã bị đề kháng với ketoconazol. Tất cả các chủng đều nhạy cảm với terbinafin.

Kết luận: Hầu hết các chủng nấm da thuộc chi *Trichophyton*, có 52% chủng nhạy cảm với ketoconazol và 100% chủng nhạy cảm terbinafin.

Từ khóa: nấm da, ketoconazol, terbinafin, mức độ nhạy cảm

ABSTRACT

IN VITRO SUSCEPTIBILITY TESTING OF DERMATOPHYTES ISOLATED FROM HOSPITAL OF DERMATOVENEREOLOGY IN HO CHI MINH CITY TO KETOCONAZOLE AND TERBINAFINE

Nguyen Thi Ngoc Yen, Phan Canh Trinh, Ton Hoang Dieu, Nguyen Le Phuong Uyen

* Ho Chi Minh City Journal of Medicine * Supplement of Vol. 23 - No 2- 2019: 55 – 60

Introduction: Dermatophytosis is common in hot and moist climates like Vietnam, although the infection is normally limited to superficial skin but seriously affects the quality of human life. Long duration of treatment impacts gradually on patients' adherence, which is an opportunity to develop antifungal resistance.

Objectives: Determinating species composition and susceptibility of isolates from clinical specimens at Hospital of Dermatovenereology in Ho Chi Minh city (11/2017-12/2017) to ketoconazole and terbinafine.

Materials and Methods: Isolation of dermatophyte from clinical specimens using selective dermatophytes test medium (DTM); Identification by morphological characters and biochemical reactions; Determination of in vitro susceptibility to ketoconazole and terbinafine according to an instruction of CLSI

*Khoa Dược, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

**Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

Tác giả liên lạc: ThS. Nguyễn Thị Ngọc Yến

ĐT: 0987.228.426

Email: ngyen1028@gmail.com

M44-A2 guideline and being adjusted by Nweze et al. (2010).

Results: Of 165 clinical specimens collected from patients suffering dermatomycosis in 11/2017-12/2017, there were 104 specimens positive with KOH microscopic examination. After isolating on selective media, we collected 55 isolates, among which that *Trichophyton* sp. accounted for 90.91% in comparison with 9.09% of *Microsporum* sp. and no isolates for *Epidermophyton* sp.. In terms of sensitivity to antifungal agents, there were 52.7% species susceptible to ketoconazole, 21.8% intermediate and 25.5% resistant to ketoconazole. All strains are terbinafine sensitive.

Conclusions: Most of dermatophyte belong to *Trichophyton* sp.. There are 52% isolates that are susceptible to ketoconazole and 100% strains susceptible to terbinafine.

Keywords: dermatophyte, susceptibility, ketoconazole, terbinafine.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm da là bệnh lý phổ biến ở các nước nhiệt đới, tuy không nguy hiểm như các bệnh nấm hệ thống nhưng ảnh hưởng nghiêm trọng đến chất lượng sống của bệnh nhân. Thời gian điều trị tương đối dài, hiểu biết của bệnh nhân về bệnh nấm da chưa cao dẫn đến kém tuân thủ trị liệu, tạo cơ hội phát sinh chủng vi nấm đề kháng với thuốc kháng nấm. Theo dõi thành phần loài và tính nhạy cảm với thuốc kháng nấm thường xuyên sẽ giúp cung cấp bằng chứng trong việc xem xét, điều chỉnh các hướng dẫn sử dụng thuốc an toàn, hợp lý và hiệu quả.

Các báo cáo gần đây cho thấy, tỷ lệ lưu hành bệnh nấm da tại Hàn Quốc từ 2,18% (1979) tăng lên 5,21% (2013), chủ yếu do *Trichophyton rubrum* gây ra⁽³⁾. Bên cạnh đó, vấn đề điều trị bệnh nấm da cũng diễn biến phức tạp. Tại Ấn Độ, theo nghiên cứu của Indira (2014)⁽²⁾ tiến hành trên 119 bệnh nhân nhiễm nấm da đang điều trị, giá trị MIC của terbinafin là thấp nhất so với ketoconazol, itraconazol, griseofulvin và fluconazol. Từ đó, tác giả đánh giá hiệu quả của terbinafin cao hơn so với ketoconazol và các thuốc khác cùng nhóm dược lý.

Tại Việt Nam, tỷ lệ nhiễm nấm da chiếm 42,4-51,8% những bệnh nhân được xét nghiệm^(6,9), phần lớn thuộc chi *Trichophyton* sp., tập trung ở chủng *T. rubrum*, một số thuộc chi *Microsporum* sp., trong các báo cáo này chỉ

có duy nhất 1 trường hợp nhiễm *Epidermophyton floccosum*⁽⁹⁾. Mức độ nhạy cảm với thuốc điều trị cũng thay đổi, khoảng MIC của ketoconazol dịch chuyển từ 0,125-4 µg/ml (2009) lên 2-16 µg/ml (2014)⁽⁶⁾. Đối với terbinafin, 82,8% bệnh nhân cho kết quả âm tính với nấm da sau 2 tuần và tất cả các bệnh nhân quay lại tái khám sau 4 tuần đều khỏi hoàn toàn chứng tỏ terbinafin cho đáp ứng tốt trong điều trị.

ĐỐI TƯỢNG-PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng

165 mẫu bệnh phẩm da, tóc từ bệnh nhân đến khám tại Bệnh viện Da Liễu TP.Hồ Chí Minh từ tháng 11-12/2017.

Chất kháng nấm

Ketoconazol (Himedia, hàm lượng 99,63%), terbinafin (Sigma Aldrich, hàm lượng 99,9%).

Môi trường thử nghiệm

Thạch sabouraud (SDA) (Merck), môi trường chọn lọc nấm da (dermatophyte test medium - DTM), bromocresol purple-milk solid-glucose agar (BCP-MS-G), cornmeal dextrose agar (CMDA), thuốc nhuộm nấm lactophenol cotton blue (LPCB), Christensen's urease agar (CUA), môi trường cháo hoa (rice medium - RM).

Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu

Cắt ngang mô tả (11/2017-12/2017).

Phân lập nấm da

Bệnh phẩm (vẩy da hoặc tóc) từ bệnh nhân được xử lý với KOH 15% và quan sát trên kính hiển vi tìm hình ảnh sợi nấm không màu, có vách ngăn, phân nhánh hay đứt khúc thành chuỗi bào tử đốt. Mẫu bệnh phẩm có kết quả soi tươi dương tính được cấy vào chai mồi chứa môi trường DTM, ủ ở nhiệt độ phòng từ 10-20 ngày, nếu môi trường chuyển từ vàng sang đỏ thì nấm gây bệnh nghi ngờ là nấm da. Các chủng nấm đã phân lập được tiếp tục được định danh bằng các phương pháp hình thái và sinh hoá để xác định nấm da và phân biệt loài^(1,4).

Định danh hình thái học

Đặc điểm khóm nấm

Cấy các chủng nấm đã phân lập trên thạch SDA, sau 7 ngày, đo đường kính khóm nấm để xác định tốc độ phát triển và mô tả đặc điểm khóm nấm.

Đặc điểm hiển vi

Nhuộm vi nấm với thuốc nhuộm LPCB, quan sát dưới kính hiển vi, xác định đặc điểm và hình thể của sợi nấm và cơ quan sinh sản.

Phản ứng sinh hoá và môi trường phân biệt

Thực hiện phản ứng urea trên môi trường Christensen's urease agar (CUA); phân biệt *T. rubrum* và *T. mentagrophytes* bằng sắc tố trên môi trường CMDA, bằng phản ứng tạo kiềm trên môi trường BCP-MS-G; kích thích biểu hiện bào tử đính lớn *Microsporum* sp. bằng môi trường cháo hoa.

CUA dương tính với *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans* và *Trichophyton terrestre* cho màu hồng tím sau 2-4 ngày, âm tính với *Trichophyton rubrum* và *Trichophyton verrucosum*. Trên CMDA, *T. rubrum* sẽ cho sắc tố đỏ rượu

đậm ở mặt trái của khóm trong khi *T. mentagrophytes* sẽ cho nhiều màu sắc khác nhau từ không màu cho đến nâu đỏ. Trên BCP-MS-G, *T. mentagrophytes* tăng trưởng nhanh, làm môi trường đổi màu xanh tím đậm trong khi *T. rubrum* bị ức chế nên tăng trưởng yếu và không làm thay đổi màu môi trường. RM kích thích hình thành bào tử đính lớn ở *Microsporum* sp., đặc biệt là *Microsporum canis*.

Xác định tính nhạy cảm của nấm da với ketoconazol và terbinafin

Mức độ nhạy cảm với thuốc kháng nấm được xác định bằng phương pháp đĩa giấy khuếch tán theo hướng dẫn của CLSI M44-A2 được điều chỉnh bởi Nweze và cs. (2010)^(7,8).

Vi nấm thử nghiệm

Cấy hoạt hóa nấm trên SDA ở 28°C trong 14 ngày. Bào tử nấm được phân tán trong dung dịch NaCl 0,85% bổ sung tween 80 0,05%. Huyền dịch vi nấm được pha loãng và điều chỉnh về độ truyền qua từ 65-82%.

Chất kháng nấm

Đĩa giấy 6 mm được tẩm ketoconazol (15 µg/đĩa) và terbinafin (2 µg/đĩa).

Đường kính vòng ức chế (IZD) theo milimet được xác định sau 4-5 ngày ủ ở 28°C. Trong thử nghiệm này, tất cả chủng nấm da được thực hiện lặp lại 3 lần để xác định giá trị trung bình IZD và độ lệch chuẩn (SD). Tiêu chuẩn về mức độ nhạy cảm với thuốc kháng nấm theo Bảng 1 sau⁽⁸⁾:

Bảng 1: Tiêu chuẩn mức độ nhạy cảm với thuốc kháng nấm theo Pakshir và cs. (2009)⁽⁸⁾

Chất kháng nấm	Nồng độ (µg/đĩa)	Đường kính vòng kháng nấm (mm)		
		Nhạy (S)	Trung gian (I)	Kháng (R)
Ketoconazol	15	≥ 30	23 – 29	≤ 22
Terbinafin	30	≥ 20	12 – 19	≤ 11

KẾT QUẢ

Định danh nấm da

Bảng 2: Kết quả định danh nấm da

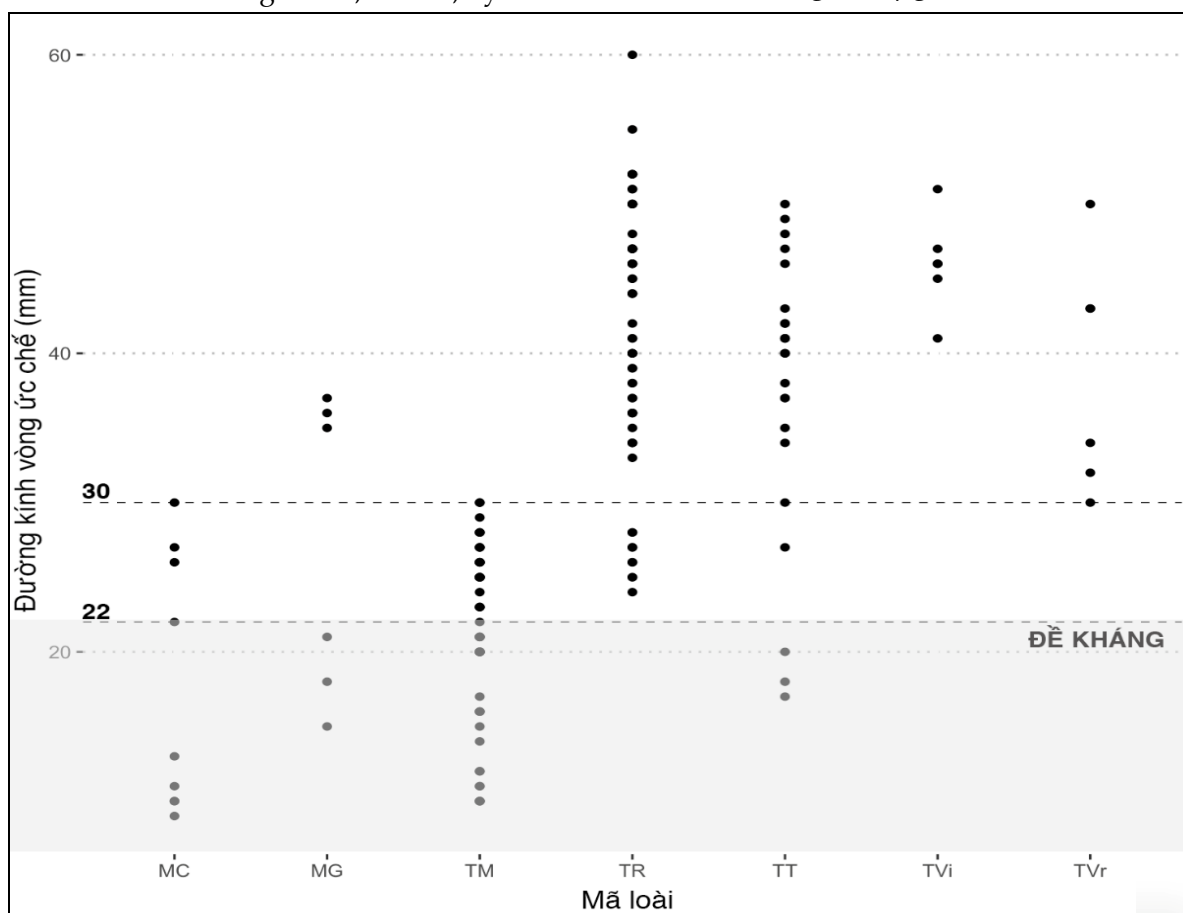
Tên nấm da	Số lượng	Tỷ lệ
<i>T. mentagrophytes</i>	18	32,73%
<i>T. rubrum</i>	20	36,36%
<i>T. tonsurans</i>	8	14,55%
<i>T. violaceum</i>	2	3,64%
<i>T. verrucosum</i>	2	3,64%
<i>M. canis</i>	3	5,45%
<i>M. gypseum</i>	2	3,64%
Tổng	55	100%

Trong 165 mẫu bệnh phẩm da và tóc có 104 mẫu bệnh phẩm da và tóc của bệnh nhân đến khám tại bệnh viện Da liễu TP. Hồ Chí Minh, dương tính khi soi tươi thì chỉ có 55 mẫu phát triển trên môi trường DTM, từ đó, ly trích

được 55 chủng nấm da thuần chủng. Mỗi mẫu da chỉ ly trích được một chủng nấm da, do đó, không có sự nhiễm nhiều chủng trên cùng một bệnh nhân. Kết quả định danh như sau:

Mức độ nhạy cảm của nấm da với thuốc kháng nấm

Kết quả khảo sát tính nhạy cảm với ketoconazol cho thấy có 52,73% chủng nấm da còn nhạy cảm, một số chủng chỉ đáp ứng trung bình (21,82%) và đã có chủng đề kháng (25,45%), trong đó *T. mentagrophytes* và *M. canis* không còn chủng nào nhạy cảm với ketoconazol, *T. mentagrophytes* chiếm đến 10/14 số trường hợp đề kháng ketoconazol. Với terbinafin, tất cả 55 mẫu đều nhạy cảm với terbinafin nồng độ 2 µg/đĩa.



Hình 1: Phân bố mức độ nhạy cảm của nấm da với ketoconazol theo loài (TM: *T. mentagrophytes*, TR: *T. rubrum*, TT: *T. tonsurans*, TVi: *T. violaceum*, TVr: *T. verrucosum*, MC: *M. canis* và MG: *M. gypseum*; IZD (đề kháng ketoconazol nếu IZD ≤ 22 mm)

Bảng 3: Mức độ nhạy cảm của nấm da với ketoconazol và terbinafin

Tên loài (số chủng)	Terbinafin (2 µg/đĩa)			Ketoconazol (15 µg/đĩa)			
	IZD ± SD (mm)	Phân bố IZD	Tính nhạy cảm	IZD ± SD (mm)	Phân bố IZD	Số chủng	Tính nhạy cảm
TM (18)	76,65 ± 4,25	56-80	S	25,54 ± 2,75	20-30	8	I
				17,53 ± 4,95	10-26	10	R
TR (20)	79,38 ± 1,40	74-80	S	37,17 ± 6,36	33-60	17	S
				26,22 ± 1,31	24-28	3	I
TT (8)	≥ 80	≥ 80	S	40,38 ± 5,77	27-50	7	S
				18,33 ± 1,25	17-20	1	R
TVi (2)	≥ 80	≥ 80	S	46,00 ± 2,94	41-51	2	S
TVr (2)	≥ 80	≥ 80	S	38,67 ± 7,16	32-50	2	S
MC (3)	77,89 ± 2,02	75-80	S	26,33 ± 3,30	22-30	1	I
				13,17 ± 5,87	9-26	2	R
MG (2)	75,33 ± 1,49	72-76	S	36,00 ± 0,82	35-37	1	S
				18,00 ± 2,45	15-21	1	R

Ghi chú: TM: *T. mentagrophytes*, TR: *T. rubrum*, TT: *T. tonsurans*, TVi: *T. violaceum*, TVr: *T. verrucosum*, MC: *M. canis* và MG: *M. gypseum*.

BÀN LUẬN

Trong nghiên cứu này, các chủng nấm da có sự phân bố tập trung ở 2 chi *Trichophyton* sp. và *Microsporum* sp., không có trường hợp nào nhiễm *Epidermophyton floccosum*. Trong đó, chi *Trichophyton* sp. vẫn là chi nấm gây bệnh chiếm ưu thế với tỷ lệ là 90,91% vượt trội so với chi *Microsporum* sp. là 9,09%. Cụ thể như sau: *T. rubrum* (36,36%), *T. mentagrophytes* (32,73%), *T. tonsurans* (14,55%), *T. violaceum* (3,64%), *T. verrucosum* (3,64%), *M. canis* (5,45%) và *M. gypseum* (3,64%). Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu của Indira (2014)⁽²⁾ và Kim và cs (2016)⁽³⁾.

Đối với tình hình nhiễm nấm các khu vực trong nước, kết quả khá tương đồng với số liệu từ nghiên cứu trong nước nhưng tỉ lệ nhiễm *T. rubrum* thấp hơn nghiên cứu tiến hành tại Khoa Da liễu Bệnh viện Đại học Y dược Huế (2010-2011)⁽⁹⁾ (36,26% so với 58,01%); tỷ lệ nhiễm *T. rubrum* và *T. tonsurans* cũng thấp hơn nghiên cứu của Nguyễn Vũ Giang Bắc và cs. (2014)⁽⁶⁾ tiến hành trong cùng bệnh viện (50,91% so với 76,56%). Tỷ lệ nhiễm *T. mentagrophytes*, *T. violaceum* và *T. verrucosum*

lại cao hơn, lần lượt là 32,73%, 3,64% và 3,64% so với 12,5%, 2,76% và 1,1% (2013)⁽⁴⁾ hay 12,4%, 0 và 0,7% (2016)⁽⁵⁾. Có thể do thời gian lấy mẫu ngắn và chưa theo dõi nghề nghiệp của bệnh nhân nên tỉ lệ *T. rubrum* trong nghiên cứu thấp hơn y văn và một số nghiên cứu khác.

Về kết quả khảo sát mức độ nhạy cảm với terbinafin, tất cả các chủng nấm da phân lập được đều nhạy cảm với terbinafin cho thấy terbinafin vẫn còn tác dụng tốt trong trị liệu nấm da, phù hợp với nghiên cứu của Nguyen Thai Dung (2016)⁽⁶⁾. Với ketoconazol, chỉ 52,73% chủng nấm da còn nhạy cảm, đặc biệt tất cả các chủng *T. mentagrophytes* và *M. canis* phân lập được không còn nhạy với thuốc này. Kết quả này cho thấy phần lớn các loài nguồn gốc từ thú và đất tương đối kém nhạy với thuốc hơn các loài nguồn gốc từ người. Tuy nhiên, sự tăng dần các chủng nấm da bị đề kháng với ketoconazol là dấu hiệu cho thấy xu hướng kháng trị với ketoconazol trong cộng đồng và nguy cơ đề kháng chéo với các azol khác. Kết quả nghiên cứu cho thấy cần có những khuyến cáo cần thiết đến nhân viên y tế, đặc biệt là bác sĩ, dược sĩ nhà thuốc trong việc kê đơn, tư vấn sử dụng ketoconazol và

terbinafin hợp lý, tuân thủ liều lượng và thời gian điều trị nhằm tránh phát sinh thêm chủng kháng thuốc đối với 2 chế phẩm thông dụng này.

KẾT LUẬN

Hầu hết các chủng nấm da thuộc chi *Trichophyton*, có 52% chủng nhạy cảm với ketoconazol và 100% chủng nhạy cảm terbinafin.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ates A, Ozcan K, & Ilkit M (2008), "Diagnostic value of morphological, physiological and biochemical tests in distinguishing *Trichophyton rubrum* from *Trichophyton mentagrophytes* complex", *Sabouraudia*, 46(8), pp. 811-822.
2. Indira G (2014), "In vitro antifungal susceptibility testing of 5 antifungal agents against dermatophytic species by CLSI (M38-A) micro dilution method", *Clin Microbial*, 3(3).
3. Kim SL, Lee KC, Jang YH, Lee SJ, et al. (2016), "The epidemiology of dermatophyte infection in Southeastern Korea (1979-2013)", *Annals of dermatology*, 28(4), pp. 524.
4. Nasimuddin S, Appalaraju B, Surendran P & Srinivas CR (2014), "Isolation, Identification and comparatative analysis of SDA and DTM for dermatophytes from clinical samples in a tertiary care hospital", *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences (IOSR-JDMS)*, 13(11).

5. Nguyen Thai Dung, Le Tran Anh, Nguyen Khac Luc (2016), "Efficacy and safety of terbinafine in the treatment of dermatophytosis at Nghe An provincial leprosy, dermatology centre (2015-2016)", *Y dược học quân sự*, 41(7), tr. 53-58.
6. Nguyễn Vũ Giang Bắc, Huỳnh Thế Hà, Nguyễn Đình Nga (2014), "Khảo sát sự phân bố và mức độ đáp ứng với ketoconazol của một số chủng nấm da ly trích từ bệnh nhân năm 2012", *Chuyên đề Dược, Y Học TP. Hồ Chí Minh*, Phụ bản 18(2), tr. 261-263.
7. Nweze EI, Mukherjee PK & Ghannoum MA (2010), "Agar-based disk diffusion assay for susceptibility testing of dermatophytes", *Journal of clinical microbiology*, 48(10), 3750-3752.
8. Pakshir K, Bahaedinie L, Rezaei Z, Sodaifi M & Zomorodian K (2009), "In vitro activity of six antifungal drugs against clinically important dermatophytes", *Jundishapur Journal of Microbiology*, 2(4), pp. 158-163.
9. Tôn Nữ Phương Anh, Ngô Thị Minh Châu, Phan Thị Hằng Giang (2013), "Nghiên cứu bệnh nguyên bệnh vi nấm ở da của bệnh nhân khám tại bệnh viện trường Đại học Y Dược Huế", *Chuyên đề Dược, Y Học TP. Hồ Chí Minh*, Phụ bản 17(1), tr. 190-197.

Ngày nhận bài báo: 18/10/2018
 Ngày phản biện nhận xét bài báo: 01/11/2018
 Ngày bài báo được đăng: 15/03/2019