

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

=====

TRẦN CẨM VÂN

**XÁC ĐỊNH *MALASSEZIA* TRONG
BỆNH LANG BEN VÀ HIỆU QUẢ
ĐIỀU TRỊ BẰNG THUỐC KHÁNG
NẤM NHÓM AZOLE**

Chuyên ngành: Da liễu

Mã số: 62720152

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

- 1. PGS.TS. Nguyễn Hữu Sáu**
- 2. PGS.TS. Nguyễn Vũ Trung**

HÀ NỘI – 2017

LỜI CẢM ƠN

Trong suốt quá trình học tập và hoàn thành luận án này, tôi đã nhận được sự hướng dẫn, giúp đỡ quý báu của các thầy cô, các anh chị, các em và bạn bè đồng nghiệp. Với lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc tôi xin được bày tỏ lời cảm ơn chân thành tới:

Đảng ủy, Ban giám hiệu, Phòng đào tạo Sau đại học, Bộ môn Da liễu trường Đại học Y Hà Nội, bệnh viện Da liễu Trung Ương đã tạo mọi điều kiện thuận lợi giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và hoàn thành luận án.

Đặc biệt với lòng kính trọng và biết ơn vô cùng sâu sắc, tôi xin trân trọng gửi lời cảm ơn chân thành đến GS.TS Trần Hậu Khang và PGS.TS Nguyễn Văn Thường, những người Thầy đầu tiên hướng dẫn tôi theo học Nghiên cứu sinh, hết lòng giúp đỡ, tạo điều kiện cho tôi hoàn thành luận án này.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS.TS Nguyễn Hữu Sáu, người thầy luôn tận tụy, dạy dỗ chu đáo, cho tôi những kiến thức quý báu trong chuyên môn, nghiên cứu khoa học, trực tiếp giúp đỡ, động viên tôi hoàn thành luận án.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS.TS Nguyễn Vũ Trung, người thầy tận tình giúp đỡ, đóng góp, trực tiếp hướng dẫn tôi những kiến thức và kinh nghiệm quý báu trong lĩnh vực Vi sinh, động viên tôi cố gắng học tập và hoàn thành luận án.

Toàn thể các bác sĩ, kỹ thuật viên khoa Khám bệnh và khoa Xét nghiệm vi sinh nắm ký sinh trùng bệnh viện Da liễu Trung Ương, khoa Xét nghiệm bệnh viện Nhiệt đới Trung Ương đã giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình làm việc học tập và thu thập số liệu tại khoa để tôi có thể hoàn thành được luận án.

Xin chân thành cảm ơn các thầy cô trong hội đồng chấm luận án đã cho tôi những đóng góp quý báu để hoàn chỉnh luận án này.

Xin cảm ơn các bệnh nhân đã hợp tác và cho tôi những thông tin và bệnh phẩm quý giá để nghiên cứu.

Xin chân thành cảm ơn bố mẹ anh chị em và chồng con đã luôn ở bên cạnh yêu thương chăm sóc, động viên, giúp đỡ tôi học tập làm việc và hoàn thành luận án.

Nghiên cứu sinh

Trần Cẩm Vân

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là **Trần Cẩm Vân**, nghiên cứu sinh khóa 33 - chuyên ngành Da liễu, Trường Đại học Y Hà Nội, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của PGS.TS Nguyễn Hữu Sáu và PGS.TS Nguyễn Vũ Trung.
2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.
3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận nơi nghiên cứu

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

Hà Nội, ngày tháng năm

Người viết cam đoan

Trần Cẩm Vân

CÁC CHỮ VIẾT TẮT

BN	: Bệnh nhân
FCZ	: Fluconazole
ITZ	: Itraconazole
KTZ	: Ketoconazole
KHV	: Kính hiển vi
<i>M. caparae</i>	: <i>Malassezia caparae</i>
<i>M. cuniculi</i>	: <i>Malassezia cuniculi</i>
<i>M. dermatis</i>	: <i>Malassezia dermatis</i>
<i>M. equina</i>	: <i>Malassezia equina</i>
<i>M. furfur</i>	: <i>Malassezia furfur</i>
<i>M. globosa</i>	: <i>Malassezia globosa</i>
<i>M. japonica</i>	: <i>Malassezia japonica</i>
<i>M. nana</i>	: <i>Malassezia nana</i>
<i>M. obtusa</i>	: <i>Malassezia obtusa</i>
<i>M. pachydermatis</i>	: <i>Malassezia pachydermatis</i>
<i>M. restricta</i>	: <i>Malassezia restricta</i>
<i>M. slooffiae</i>	: <i>Malassezia slooffiae</i>
<i>M. sympodialis</i>	: <i>Malassezia sympodialis</i>
<i>Malassezia</i> spp.	: <i>Malassezia</i> species plus
<i>P. orbiculair</i>	: <i>Pityrosporum orbiculair</i>
<i>P. ovale</i>	: <i>Pityrosporum ovale</i>
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PCR- RFLP	: PCR đa hình độ dài đoạn cắt hạn chế
PCR sequencing	: PCR giải trình tự gen
TB/VT	: Tế bào/Vi trường

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ.....	1
Chương 1: TỔNG QUAN.....	3
1.1. Nấm <i>Malassezia</i>	3
1.1.1. Vài nét lịch sử	3
1.1.2. Đặc điểm nấm <i>Malassezia</i>	4
1.1.3. Vai trò của <i>Malassezia</i> trong bệnh da.....	5
1.1.4. Một số bệnh lý do nấm <i>Malassezia</i>	7
1.2. Bệnh lang ben	12
1.2.1. Đại cương.....	12
1.2.2. Căn nguyên và sinh bệnh học	15
1.2.3. Xác định <i>Malassezia</i> trong bệnh lang ben	18
1.2.4. Chẩn đoán bệnh lang ben.....	27
1.2.5. Điều trị bệnh lang ben.....	33
1.2.6. Phân bố các loài <i>Malassezia</i> và bệnh lang ben.....	39
Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	45
2.1. Đối tượng nghiên cứu	45
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu cho mục tiêu 1.....	45
2.1.2. Đối tượng nghiên cứu cho mục tiêu 2.....	46
2.2. Địa điểm, thời gian nghiên cứu.....	47
2.3. Vật liệu, dụng cụ nghiên cứu	47
2.3.1. Vật liệu, dụng cụ nghiên cứu cho mục tiêu 1	47
2.3.2. Vật liệu nghiên cứu cho mục tiêu 2	51
2.4. Thiết kế nghiên cứu theo mục tiêu nghiên cứu	49
2.4.1. Phương pháp nghiên cứu mục tiêu 1	49
2.4.2. Phương pháp nghiên cứu mục tiêu 2	59
2.5. Các chỉ tiêu nghiên cứu	61
2.5.1. Đặc điểm chung	61
2.5.2. Đặc điểm lâm sàng bệnh	61

2.5.3. Các chỉ tiêu đánh giá cho mục tiêu 1	62
2.5.4. Các chỉ tiêu đánh giá cho mục tiêu 2	63
2.6. Các biện pháp hạn chế sai số.....	64
2.7. Phương pháp xử lý số liệu	64
2.8. Đạo đức trong nghiên cứu	64
2.9. Hạn chế của đề tài	65
Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	67
3.1. Xác định các loài <i>Malassezia</i> trong bệnh lang ben	67
3.1.1. Xác định các loài <i>Malassezia</i> bằng nuôi cấy định danh	67
3.1.2. Xác định các loài <i>Malassezia</i> bằng PCR sequencing	78
3.1.3. So sánh kết quả định danh của nuôi cấy và PCR sequencing.....	81
3.2. Hiệu quả điều trị lang ben bằng thuốc kháng nấm nhóm azole.....	82
3.2.1. Đặc điểm của nhóm điều trị	82
3.2.2. So sánh triệu chứng lâm sàng, cận lâm sàng trước và sau điều trị ...	84
3.2.3. Kết quả điều trị.....	90
CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN	99
4.1. Xác định các loài <i>Malassezia</i> trong bệnh lang ben	99
4.1.1. Xác định các loài <i>Malassezia</i> bằng nuôi cấy định danh	99
4.1.2. Xác định các loài <i>Malassezia</i> bằng PCR sequencing	113
4.2. Hiệu quả điều trị lang ben bằng thuốc kháng nấm nhóm azole.....	115
4.2.1. So sánh triệu chứng lâm sàng, cận lâm sàng trước và sau điều trị .	116
4.2.2. Kết quả điều trị.....	121
KẾT LUẬN	132
KIẾN NGHỊ.....	133
CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU ĐÃ ĐƯỢC CÔNG BỐ LIÊN QUAN	
ĐẾN NỘI DUNG LUẬN ÁN	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1.	Đặc điểm chung của nấm <i>Malassezia</i>	4
Bảng 1.2.	Phân bố dịch tể các loài <i>Malassezia</i> trên da người khỏe mạnh và da bệnh lang ben	15
Bảng 1.3.	Đặc điểm các môi trường thường dùng trong nuôi cấy <i>Malassezia</i> ..	22
Bảng 1.4.	Đặc điểm kiểu hình của 14 loài <i>Malassezia</i> dựa trên đặc tính sinh lý và sinh hóa.....	23
Bảng 1.5.	Đặc tính các loài <i>Malassezia</i> trên CHROM agar <i>Malassezia</i>	25
Bảng 2.1.	Đánh giá mức độ bệnh theo Karakas	62
Bảng 2.2.	Đánh giá kết quả điều trị sau 4 tuần theo Karakas	63
Bảng 3.1.	Kết quả định danh các loài <i>Malassezia</i> bằng nuôi cấy	68
Bảng 3.2.	Phân bố loài <i>Malassezia</i> gây bệnh lang ben theo giới	70
Bảng 3.3.	Phân bố loài <i>Malassezia</i> gây bệnh lang ben theo địa dư	71
Bảng 3.4.	Phân bố loài <i>Malassezia</i> gây bệnh lang ben theo thời gian bị bệnh ...	72
Bảng 3.5.	Phân bố loài <i>Malassezia</i> gây bệnh lang ben theo tính chất bệnh .	73
Bảng 3.6.	Phân bố loài <i>Malassezia</i> gây bệnh lang ben theo mức độ bệnh ...	74
Bảng 3.7.	Kết quả định danh các loài <i>Malassezia</i> bằng PCR sequencing.....	78
Bảng 3.8.	Phân bố loài <i>Malassezia</i> gây bệnh lang ben theo nhóm tuổi	79
Bảng 3.9.	So sánh kết quả định danh giữa nuôi cấy và PCR sequencing.....	81
Bảng 3.10.	Phân bố bệnh theo tuổi	82
Bảng 3.11.	Phân bố bệnh theo giới.....	83
Bảng 3.12.	Phân bố bệnh theo mức độ bệnh	83
Bảng 3.13.	So sánh triệu chứng vảy da trước và sau điều trị	84
Bảng 3.14.	So sánh triệu chứng ngứa trước và sau điều trị	85
Bảng 3.15.	So sánh sự thay đổi màu sắc dát trước và sau điều trị	85
Bảng 3.16.	So sánh diện tích thương tổn trước và sau điều trị	87
Bảng 3.17.	So sánh tổng điểm mức độ bệnh trước và sau điều trị	88
Bảng 3.18.	So sánh xét nghiệm nuôi cấy nấm trước và sau điều trị	89

Bảng 3.19. Kết quả điều trị chung của 3 nhóm sau 4 tuần	90
Bảng 3.20. Kết quả điều trị theo 3 nhóm	90
Bảng 3.21. Kết quả điều trị theo nhóm tuổi	91
Bảng 3.22. Kết quả điều trị theo giới nam	91
Bảng 3.23. Kết quả điều trị theo giới nữ	92
Bảng 3.24. Kết quả điều trị theo thời gian bị bệnh dưới 3 tháng	92
Bảng 3.25. Kết quả điều trị theo thời gian bị bệnh trên 3 tháng	93
Bảng 3.26. Kết quả điều trị theo tính chất bệnh lần đầu.....	93
Bảng 3.27. Kết quả điều trị theo tính chất bệnh tái phát	94
Bảng 3.28. Kết quả điều trị theo mức độ bệnh nhẹ	94
Bảng 3.29. Kết quả điều trị theo mức độ bệnh vừa-nặng	95
Bảng 3.30. Kết quả điều trị theo loài <i>M. globosa</i>	95
Bảng 3.31. Kết quả điều trị <i>M. globosa</i> của 3 nhóm	96
Bảng 3.32. Kết quả điều trị theo loài <i>M. furfur</i>	96
Bảng 3.33. Kết quả điều trị <i>M. furfur</i> của 3 nhóm	97
Bảng 3.34. Kết quả điều trị theo loài <i>M. dermatis</i>	97
Bảng 3.35. Kết quả điều trị <i>M. dermatis</i> của 3 nhóm	98
Bảng 4.1. Xác định <i>Malassezia</i> bằng nuôi cấy định danh ở các nghiên cứu	101
Bảng 4.2. Kết quả điều trị bệnh lang ben bằng các phác đồ	122

DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 3.1. Kết quả nuôi cấy nấm	67
Biểu đồ 3.2. Phân bố loài <i>Malassezia</i> gây bệnh lang ben theo nhóm tuổi	69
Biểu đồ 3.3. Phân bố loài <i>Malassezia</i> gây bệnh lang ben theo màu sắc da.....	75
Biểu đồ 3.4. Phân bố loài <i>Malassezia</i> gây bệnh lang ben theo vị trí thương tổn ...	76
Biểu đồ 3.5. Phân bố loài <i>Malassezia</i> gây bệnh lang ben theo kết quả soi trực tiếp ...	77
Biểu đồ 3.6. Phân bố loài <i>Malassezia</i> gây bệnh lang ben theo giới	80
Biểu đồ 3.7. Phân bố loài <i>Malassezia</i> gây bệnh lang ben theo địa dư	80

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1.	Siêu cấu trúc của nấm	5
Hình 1.2.	Cơ chế gây bệnh của <i>Malassezia</i>	5
Hình 1.3.	Viêm da dầu ở mặt (a) và gàu da đầu (b)	7
Hình 1.4.	Cơ chế gây bệnh của viêm da dầu và gàu da đầu	7
Hình 1.5.	Viêm da cơ địa ở trẻ nhỏ (a) và hình ảnh tế bào nấm men tập trung thành đám trên KHV vật kính 40x (b)	9
Hình 1.6.	Cơ chế gây bệnh của <i>Malassezia</i> trong viêm da cơ địa	9
Hình 1.7.	Viêm nang lông do <i>Malassezia</i> (a) và hình ảnh tế bào nấm men tập trung thành đám trên KHV vật kính 40 (b).....	10
Hình 1.8.	Hình ảnh giải phẫu bệnh viêm nang lông do <i>Malassezia</i> trên tiêu bản nhuộm HE và nhuộm PAS	11
Hình 1.9.	Hình ảnh mô bệnh học lang ben trên tiêu bản nhuộm Hematoxylin- Eosin	17
Hình 1.10.	Hình ảnh ”Spaghettie and meatball” trên KHV vật kính 40x qua phương pháp soi trực tiếp bằng KOH + Parker™ Ink.....	18
Hình 1.11.	Quy trình thử nghiệm với Tween và Cremophor EL	24
Hình 1.12.	Hình ảnh dát tăng sắc tố (a) và dát giảm sắc tố (b)	27
Hình 1.13.	Hình ảnh dát hồng (thể viêm)	30
Hình 1.14.	Hình ảnh lang ben ở vùng sinh dục (a), ở bàn tay (b)	30
Hình 1.15.	Hình ảnh lang ben thể vòng cung (a) và thể viêm nang lông (b).....	31
Hình 1.16.	Cấu trúc ketoconazole.....	35
Hình 1.17.	Cấu trúc fluconazole	35
Hình 1.18.	Cấu trúc itraconazole	35
Hình 2.1.	Hình ảnh sợi nấm (a), tế bào nấm men (b), sợi nấm+tế bào nấm men (c), trên KHV vật kính 40x	50

Hình 2.2.	Hình ảnh <i>M. furfur</i> (a) và <i>M. globosa</i> (b) trên mDixon	52
Hình 2.3.	Hình ảnh hấp thu cả 4 loại Tween của <i>M. furfur</i> (a) và không hấp thu cả 4 loại Tween của <i>M. globosa</i> (b)	55
Hình 2.4.	Quy trình định danh nấm <i>Malassezia</i> có cải tiến ().....	56
Hình 2.5.	Sơ đồ nguyên lý kỹ thuật PCR sequencing	58
Hình 2.6.	Sơ đồ nghiên cứu	66

ĐẶT VẤN ĐỀ

Malassezia spp. là nấm men ưa lipid thuộc hệ vi sinh vật bình thường trên da người và động vật máu nóng. Năm 1853, Robin phát hiện ra sự hiện diện của vi nấm trên thương tổn bệnh nhân lang ben. Đến năm 1874, Malassez đặt tên là *Malassezia furfur*. Hiện nay, dựa trên đặc điểm hình thái, đặc tính sinh học và siêu cấu trúc, chi *Malassezia* gồm 14 loài trong đó *M. globosa*, *M. furfur*, *M. sympodialis* thường gặp nhất. Nhiễm *Malassezia* có thể gặp ở mọi lứa tuổi, cả hai giới và các vùng địa lý khí hậu khác nhau [1]. Bệnh lý liên quan đến *Malassezia* bao gồm lang ben, viêm da dầu, viêm da cơ địa, viêm nang lông, vảy nến, thậm chí ung thư da... Gần đây, y văn ghi nhận nhiều trường hợp *Malassezia* xâm nhập vào các cơ quan bộ phận gây nhiễm nấm nội tạng và nhiễm nấm huyết [2].

Lang ben là bệnh lý thường gặp, phổ biến khắp nơi trên thế giới, đặc biệt những vùng có khí hậu nhiệt đới nóng ẩm chiếm 18% dân số, vùng ôn đới chỉ chiếm 0,5% dân số [3]. Căn nguyên chủ yếu do *M. globosa* gây nên. Mặc dù bệnh không nguy hiểm đến tính mạng nhưng ảnh hưởng nhiều tới thẩm mỹ, tâm lý và chất lượng cuộc sống người bệnh. Xác định nấm gây bệnh một cách chính xác là bước đầu tiên quan trọng tìm nguyên nhân và đánh giá độ nhạy cảm của loài nấm với kháng sinh kháng nấm, từ đó lựa chọn thuốc điều trị thích hợp và hiệu quả. Phát hiện *Malassezia* gây bệnh lang ben, có nhiều kỹ thuật như: soi đèn wood, soi trực tiếp, nuôi cấy định danh, PCR sequencing... Trong đó, nuôi cấy định danh *Malassezia* thường được sử dụng như một "tiêu chuẩn vàng" để khẳng định căn nguyên gây bệnh. Tuy nhiên, vi nấm không mọc ở môi trường nuôi cấy thông thường mà đòi hỏi điều kiện đặc biệt có cơ chất và dầu oliu với tỷ lệ phù hợp. Tại Việt Nam, một số phòng xét nghiệm đang áp dụng kỹ thuật soi trực tiếp bằng dung dịch KOH 20% đơn thuần để

phát hiện nấm *Malassezia*. Tuy nhiên, vi nấm có hình thái đa dạng và kích thước rất nhỏ nên nhiều trường hợp khó nhận định và dễ bỏ sót. Tại Bệnh viện Da liễu Trung ương, lần đầu tiên đã triển khai và áp dụng thành công kỹ thuật nuôi cấy định danh có cải tiến và PCR sequencing để phân loại *Malassezia*.

Điều trị lang ben nhằm mục đích: (1) ức chế sự phát triển của nấm, (2) giảm triệu chứng, (3) tái phát phòng bệnh. Kháng sinh kháng nấm nhóm azole trong đó ketoconazole, fluconazole và itraconazole là những lựa chọn đầu tay. Phác đồ điều trị có thể bôi, uống thuốc kháng nấm hoặc phối hợp. Thuốc bôi chỉ áp dụng với thương tổn khu trú nhưng bệnh nhân có thể bỏ sót và gặp phải một số phiền hà như: kích ứng, bong rát tại chỗ, bôi nhiều lần trong ngày... Uống thuốc kháng nấm theo phác đồ thường quy có thể tốn kém và đặc biệt ảnh hưởng không nhỏ đến chức năng gan, thậm chí là ở người suy giảm miễn dịch và tiền sử suy gan, thận [4].

Do vậy, để góp phần nghiên cứu đầy đủ và hệ thống về căn nguyên, cơ chế bệnh sinh vi nấm *Malassezia*, đồng thời áp dụng phương pháp chẩn đoán và điều trị hiệu quả bệnh lang ben, chúng tôi tiến hành đề tài: “**Xác định *Malassezia* trong bệnh lang ben và hiệu quả điều trị bằng thuốc kháng nấm nhóm azole**” với mục tiêu:

1. *Xác định các loài Malassezia gây bệnh lang ben tại Bệnh viện Da liễu Trung ương từ tháng 01/2016 đến tháng 12/2016*
2. *Đánh giá hiệu quả điều trị bệnh lang ben bằng thuốc kháng nấm nhóm azole*

Chương 1

TỔNG QUAN

1.1. Nấm *Malassezia*

1.1.1. Vài nét lịch sử

Năm 1853, Robin phát hiện hình thái sợi nấm ở thương tổn bệnh nhân lang ben, đặt tên là *Microsporum furfur*. Đến năm 1874, Malassez mô tả tác nhân gây bệnh lang ben là những tế bào hình tròn hoặc bầu dục, vỏ dày, xung quanh có viền kép, tập trung thành đám và sợi nấm thô ngắn như sợi miễn vụn (hình ảnh "mì ống" và "thịt viên"), đặt tên là *Malassezia furfur*. Từ những hiểu biết ban đầu, người ta cho rằng *Malassezia* là dạng sợi nấm, còn *Pityrosporum* là nấm men. Bằng thực nghiệm chứng minh, Gordon đã nuôi cấy thành công nấm *P. orbiculare* và *P. ovale*, Faergemann J cũng thành công khi gây bệnh thực nghiệm với *P. orbiculare* [5]. Như vậy, thực chất *Malassezia* tồn tại lưỡng dạng và sự xuất hiện hình thái sợi hay men đó là những biến đổi, phân chia trong vòng đời của vi nấm. Hai loài *P. orbiculare* và *P. ovale* được xác nhận thuộc chi *Malassezia* dưới tên chung là *M. furfur* [5].

Khi quan sát trên cơ thể người cũng như trong phòng thí nghiệm các nghiên cứu đã chứng minh sự đa dạng của chi *Malassezia* về hình dạng, siêu cấu trúc của nấm men và đáp ứng miễn dịch của cơ thể [6]. Năm 1995-1996, ứng dụng thành công công nghệ sinh học phân tử giải mã trình tự bộ gen các loài nấm phụ thuộc lipid, đặt tên chung là *Malassezia* spp. [7]. Năm 2004, các nhà khoa học Nhật Bản công bố một số loài mới: *M. dermatis* và *M. japonica* phân lập từ thương tổn da của bệnh viêm da cơ địa [8],[9]; *M. yamatoensis* từ thương tổn da của viêm da dầu và vùng da lành của người khỏe mạnh [10]. Một số loài phụ thuộc lipid phân lập từ da động vật có khả năng gây bệnh cho con người cũng được mô tả như: *M. nana* [11], *M. caprae*, *M. equina* [12], *M. cuniculi* [13]. Và

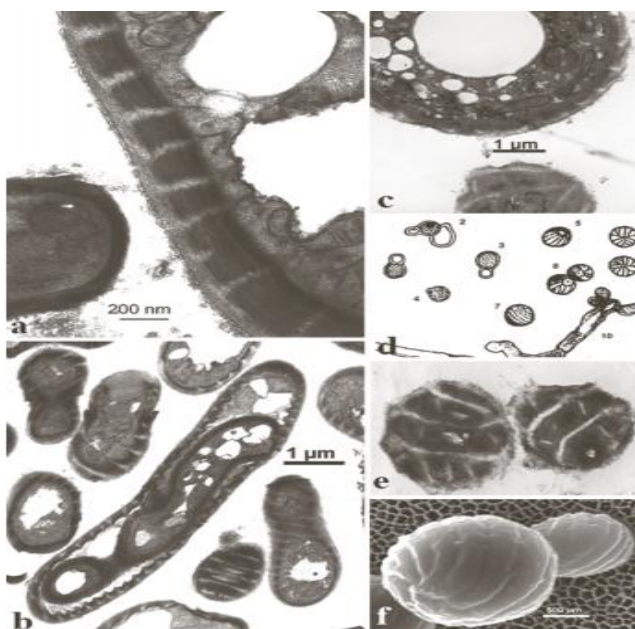
cho đến nay tổng số loài *Malassezia* được y văn công nhận lên tới 14 loài.

1.1.2. Đặc điểm nấm *Malassezia*

Malassezia spp. là nấm men thuộc vi hệ trên da người và động vật máu nóng. Ngày nay người ta phát hiện *Malassezia* đóng vai trò quan trọng trong cơ chế bệnh sinh của nhiều bệnh lý khác nhau ở da như lang ben, viêm da dầu, viêm da cơ địa, viêm nang lông, vảy nến, ung thư da...

Bảng 1.1. Đặc điểm chung của nấm *Malassezia*

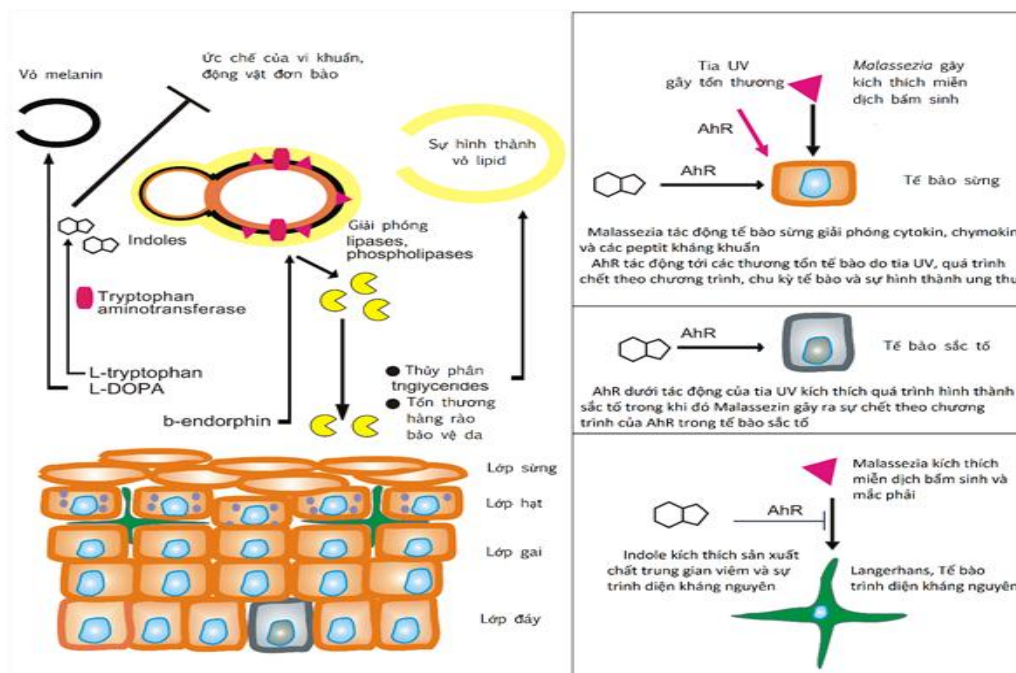
Đặc điểm	Nội dung
Phân loại khoa học	Thuộc ngành <i>Basidiomycota</i> , phân ngành <i>Ustilaginomycotina</i> , lớp <i>Exobasidomycetes</i> , bộ <i>Malasseziales</i> , họ <i>Malasseziaceae</i>
Cấu trúc	Đơn bào, có nhân chuẩn
Hình dạng	Hình tròn hoặc hình bầu dục, vách ngăn rộng, không màu, đôi khi gặp dạng sợi hoặc vô định hình
Kích thước	Dao động từ 3-10 μm , thông thường lớn hơn gấp 10 lần so với vi khuẩn
Khả năng thích nghi	+ Thích nghi môi trường đường cao + Tồn tại trong thiên nhiên, trong các môi trường chứa đường như hoa quả, rau dưa, mật mía
Sinh sản	Sinh sản vô tính theo phương thức nảy chồi. Khi bào tử chồi được sinh ra theo dạng tuyến tính không phân cắt thì hình thành nên cấu trúc gọi là giả sợi nấm
Các loài	Có 14 loài <i>Malassezia</i> trên da người và động vật, trong đó 3 loài gặp nhiều nhất là <i>M. globosa</i> , <i>M. sympodialis</i> , <i>M. furfur</i> [14],[15],[1].



Hình 1.1. Siêu cấu trúc của nấm: *M. furfur* (a,b), *M. globosa* (c,d,e,f) [16]

1.1.3. Vai trò của *Malassezia* trong bệnh da

Trên làn da khỏe mạnh, *Malassezia* sống ký sinh vi hệ, sử dụng chất dinh dưỡng cần thiết cho quá trình sinh trưởng mà không gây bệnh. Khi gặp điều kiện thuận lợi chúng trở thành tác nhân gây bệnh cơ hội.



Hình 1.2. Cơ chế gây bệnh của *Malassezia* [3]

Tác động của nấm men đối với làn da bao gồm: (a) có thể tồn tại vi hệ ở da; (b) tác động chức năng tế bào sắc tố dẫn đến sự thay đổi màu sắc da của da; (c) kích thích quá trình viêm qua đáp ứng miễn dịch dịch thể (trong bệnh viêm da dầu); (d) gây ra các đáp ứng miễn dịch dịch thể (trong bệnh viêm da cơ địa); (e) kích thích tế bào viêm và phá hủy nang lông (trong bệnh viêm nang lông) [17].

Nấm *Malassezia* thích nghi bằng cách sản xuất các enzym sinh năng lượng bao gồm 8 loại lipase và 3 loại phospholipase [15]. Những enzym này tham gia vào quá trình thủy phân axit béo trung tính thành axit béo tự do gây ra các phản ứng trung gian tế bào kích hoạt con đường gây viêm. Đồng thời, tổng hợp một số chất có hoạt tính sinh học như indole và hoạt động thông qua các thụ thể hydrocacbon (Ahr) tập trung ở tế bào lớp biểu bì [17], [18]...Ngoài ra, *Malassezia* spp. sản xuất một số hợp chất khác tham gia đáp ứng miễn dịch và hấp thụ tia cực tím như: indirubin và indolo carbazone (ICZ). Do đó, có giả thuyết cho rằng *Malassezia* tiềm năng gây ung thư da [18], [19], [20]. Năm 1988, Christina Schönborn quan sát thấy 35% trường hợp ung thư da có nhiễm nấm, trong đó 79,2% trường hợp nhiễm *Malassezia* spp. [21]. Năm 2013, Magiatis P và cs chứng minh Ahr có vai trò là tác nhân quan trọng trong cơ chế gây bệnh của nấm *Malassezia* bởi có khả năng làm thay đổi cấu trúc nội môi và gây ra các biểu hiện bệnh lý trên da [19].

Mặt khác, cơ thể luôn tìm cách kháng lại *Malassezia* theo cơ chế bảo vệ: Miễn dịch dịch thể và miễn dịch tế bào [22]. Trong đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào, HR Ashbee (1994) đánh giá sự thay đổi chỉ số CD4/CD8 và khả năng ức chế sự di chuyển bạch cầu. Kết quả cho thấy, chỉ số CD4/CD8 không có sự khác biệt giữa người khỏe mạnh và người bệnh lang ben, nhưng có thay đổi ở người viêm da dầu (chỉ số 2/1 ở người khỏe mạnh và 0,6/2,8 ở người viêm da dầu) [23]. Khi tìm hiểu mối quan hệ giữa kháng nguyên là *Malassezia* với kháng thể, các tác giả thấy rằng có sự xuất hiện phản ứng

miễn dịch chéo giữa các hình thái tế bào nấm men và nấm sợi. Do vậy cho dù kháng nguyên *Malassezia* có là pha men hay pha sợi vẫn chung một loại kháng thể trong huyết thanh bệnh nhân lang ben [22].

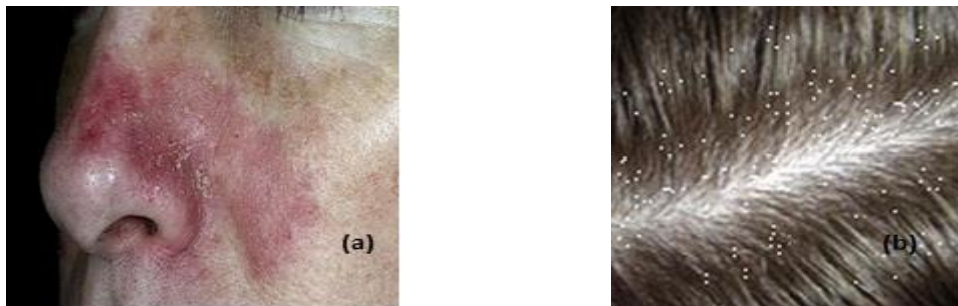
1.1.4. Một số bệnh lý do nấm *Malassezia*

1.1.4.1. Bệnh lang ben

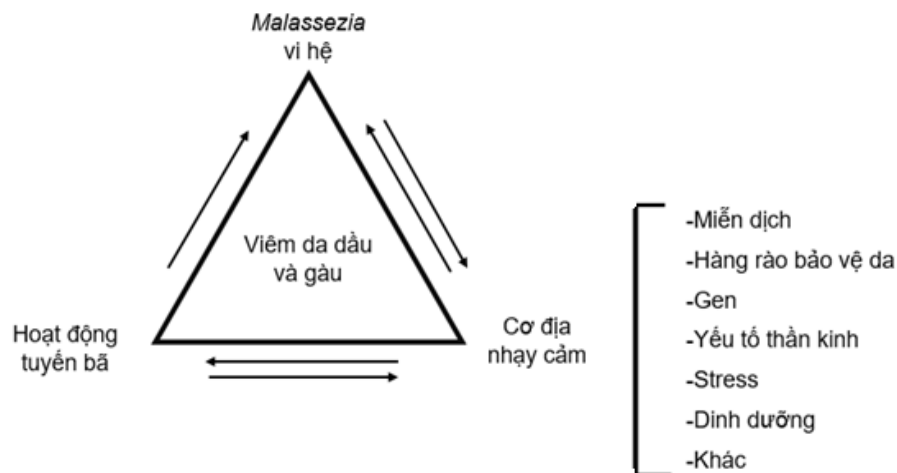
(Xem mục 1.2)

1.1.4.2. Viêm da dầu

Viêm da dầu (Seborrheic Dermatitis - SD) là bệnh da mạn tính thường gặp. Bệnh chủ yếu ở trẻ sơ sinh, tuổi dậy thì và độ tuổi ngoài 50, nam gặp nhiều hơn nữ [24]. Bệnh đặc trưng bởi biểu hiện dát đỏ, ngứa và vảy da bóng mỡ xuất hiện vùng nhiều tuyến bã hoạt động: da đầu, trán, rãnh mũi má, mi mắt, cung mày, sau tai, ống tai ngoài, vùng trước xương ức, vùng liên bả vai.



Hình 1.3. Viêm da dầu ở mặt (a) và gàu da đầu (b)



Hình 1.4. Cơ chế gây bệnh của viêm da dầu và gàu da đầu [24]

Các nghiên cứu về *Malassezia* ở bệnh nhân viêm da đầu đều cho thấy vai trò đặc biệt của nấm men trong cơ chế bệnh sinh của bệnh. Tajima và cộng sự (2008) nghiên cứu trên 31 bệnh nhân viêm da đầu, ở 93,5% vùng da bị tổn thương có *Malassezia* và cao gấp 3 lần so với ở vùng da lành 61,3% [25]. Điều trị viêm da đầu bằng thuốc kháng nấm làm giảm số lượng *Malassezia* do đó cải thiện các triệu chứng lâm sàng của bệnh. Xét nghiệm tìm nấm thấy hình ảnh *Malassezia* chủ yếu dạng nấm men.

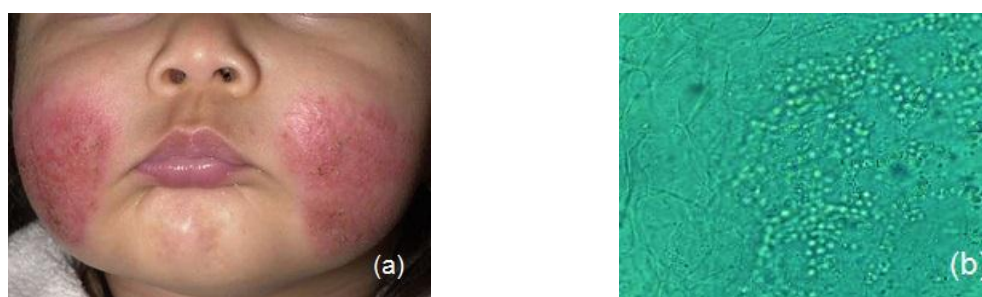
Gàu da đầu

Các biểu hiện bong vảy trên da đầu, thường gọi là "gàu" gây ra bởi nhiều yếu tố của cơ thể kết hợp bùng phát *Malassezia* spp. [26]. Các nghiên cứu lâm sàng đã chỉ ra rằng tác dụng của thuốc kháng nấm tương quan với một tình trạng lâm sàng được cải thiện, khi da khô gặp không khí lạnh trong suốt mùa đông là nguyên nhân phổ biến nhất của ngứa, bong vảy gàu ở đầu. Theo Flakes, những người da khô thường tiết ít dầu hơn so với những người da bình thường nên dễ bị kích thích tăng tiết nhiều bã nhờn. Khi tăng tiết chất bã không chỉ ở da đầu, còn xuất hiện các bộ phận khác: lông mày, hai bên mũi lưng, xương ức... [26], [24].

1.1.4.3. Viêm da cơ địa

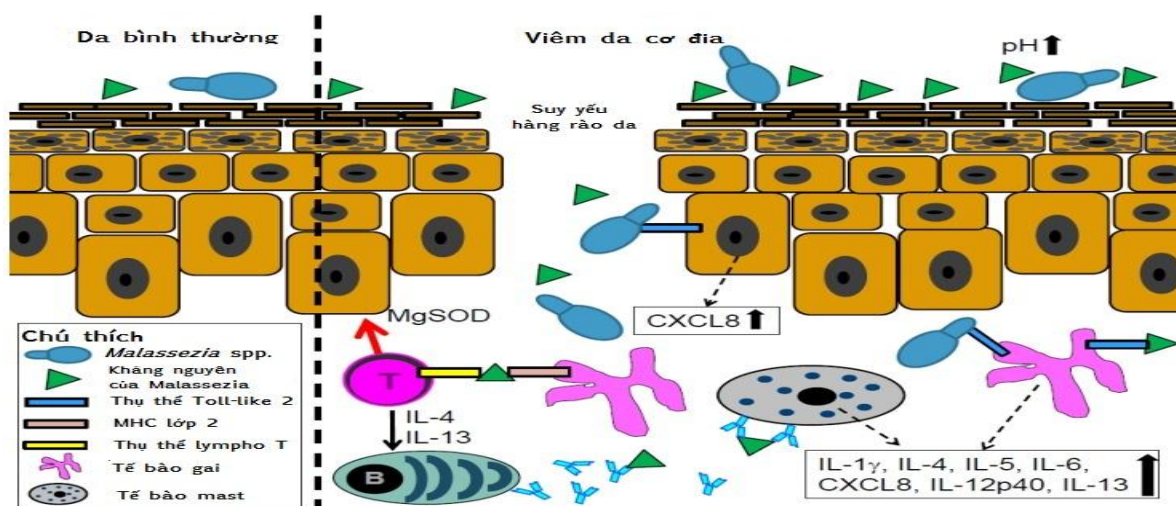
Viêm da cơ địa (Atopic Dermatitis) trước đây gọi là chàm thể tạng hay chàm cơ địa là một bệnh da thường gặp. Bệnh có thể gặp ở mọi lứa tuổi, nhưng hay gặp nhất là trẻ em, đặc biệt là trẻ dưới 2 tuổi. Nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh chưa rõ ràng nhưng đa số các tác giả cho rằng viêm da cơ địa là sự kết hợp giữa một cơ địa dị ứng (Atopy) với những tác nhân gây kích thích gây viêm. Trong đó, căn nguyên vi sinh vật thường được nhắc đến trong nhiều nghiên cứu như vai trò tụ cầu vàng trong viêm da cơ địa. Tuy nhiên, rất ít nghiên cứu đề cập vai trò vi nấm trong cơ chế bệnh sinh khiến tình trạng bệnh thêm trầm trọng.

Nghiên cứu của Trần Cẩm Vân và cộng sự năm 2012 về khảo sát tình trạng nhiễm *Malassezia* spp. trong một số bệnh da cho kết quả: tỉ lệ bệnh nhân nhiễm vi nấm này trong lang ben chiếm tỉ lệ cao 1,48%, tiếp theo là viêm da dầu 0,37%, trong viêm da cơ địa chỉ chiếm 0,28% [27]. Bệnh thường gặp vào cuối mùa xuân và đầu mùa hè, nam và nữ có xu hướng cân bằng, nhóm tuổi có tỉ lệ mắc bệnh cao từ 0-5 tuổi (28- 40%) vị trí thường gặp đầu mặt cổ, xét nghiệm tìm nấm cho thấy dạng tế bào nấm men đứng thành đám.



Hình 1.5. Viêm da cơ địa ở trẻ nhỏ (a) và hình ảnh tế bào nấm men tập trung thành đám trên KHV vật kính 40x (b)

Một nghiên cứu chỉ ra có hơn 90% viêm da cơ địa (vùng đầu và cổ) có hàm lượng kháng thể IgE trong huyết thanh kháng lại kháng nguyên của *Malassezia*. Trong đó khoảng 83% viêm da cơ địa ở người lớn liên quan đến *Malassezia* [28].

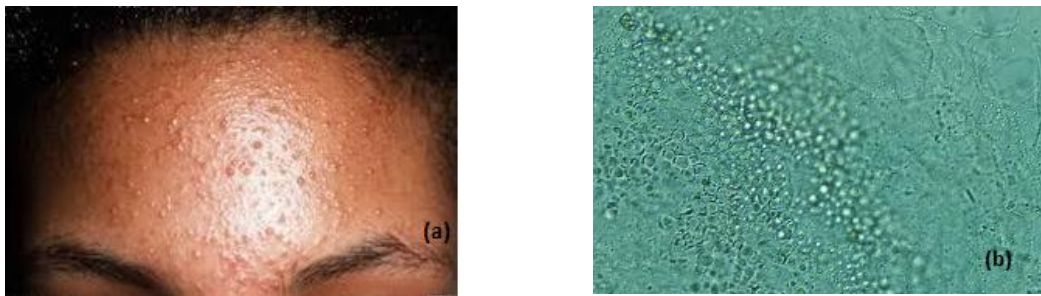


Hình 1.6. Cơ chế gây bệnh của *Malassezia* trong viêm da cơ địa [29]

Nghiên cứu cũng chỉ ra rằng chính việc lạm dụng corticoid cũng như các chất dưỡng ẩm và kết hợp một số yếu tố liên quan khác đã vô hình chung tạo môi trường thuận lợi cho sự gia tăng số lượng cũng như sự sinh sản và phát triển của vi nấm *Malassezia*.

1.1.4.4. Viêm nang lông

Bệnh biểu hiện thương tổn thường lành tính và các triệu chứng thường gặp như: ngứa, mụn mủ, sẩn đỏ nang lông, phân bố chủ yếu ở thân mình, hay gặp lứa tuổi trung niên.

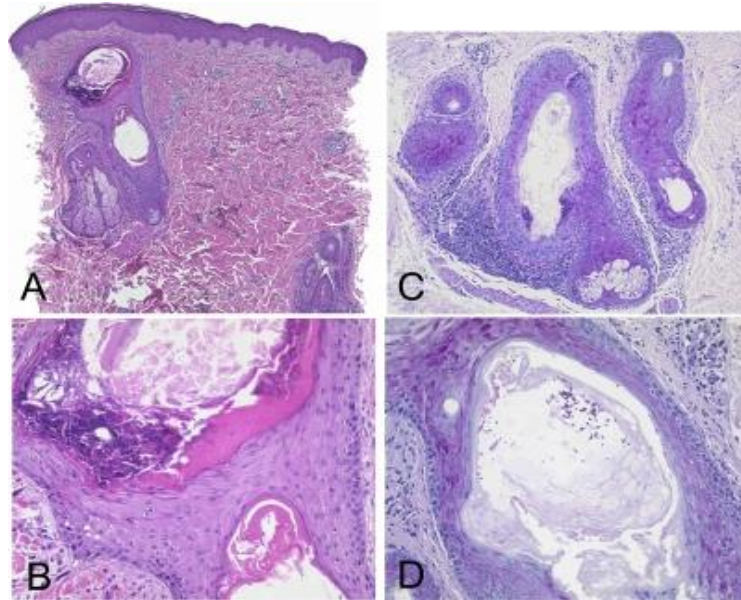


Hình 1.7. Viêm nang lông do *Malassezia* (a) và hình ảnh tế bào nấm men tập trung thành đám trên KHV vật kính 40 (b)

Năm 1973, Potter đã nhận thấy căn nguyên viêm nang lông do vi nấm *Malssezia*. Một báo cáo năm 2008 tại Trung Quốc cho thấy có khoảng 1,5% các bệnh nhân da liễu đã được chẩn đoán viêm nang lông do vi nấm *Malassezia* [30]. Trong số đó, hầu hết họ đều là nam giới khỏe mạnh và đang ở độ tuổi trung niên. Một nghiên cứu khác ở Philippines cho biết có khoảng 16% bệnh nhân viêm nang lông do *Malassezia* trong tổng số bệnh lý nang lông [31].

Những yếu tố thuận lợi bao gồm: đái tháo đường, suy giảm miễn dịch và nhiễm *Candida* hệ thống. Ngoài ra, thói quen dùng các sản phẩm dưỡng da, chăm sóc tóc cùng nhiều loại mỹ phẩm, sữa, kem kháng nắng, chất làm mềm,

dầu ôliu... Nếu không điều trị, vi nấm xâm nhập sâu nang lông có thể gây viêm mạn tính và hoại tử nang lông [17]. Có thể quan sát *Malassezia* trong nang lông bằng kỹ thuật: soi trực tiếp dưới kính hiển vi, nhuộm PAS, nhuộm Grocott-Gomori methenamine và thường gặp hình thái nấm men.



Hình 1.8. Hình ảnh giải phẫu bệnh viêm nang lông do *Malassezia* trên tiêu bản nhuộm HE và nhuộm PAS

(A: Hình ảnh phóng đại 40 lần, nang lông dày sừng và bạch cầu ưa acid. B: Hình ảnh phóng đại 200 lần với các tế bào nấm men tập trung thành đám. C: Hình ảnh phóng đại 100 lần, viêm nang lông mạn tính với lắng đọng mucin trên tiêu bản nhuộm PAS. D: Hình ảnh phóng đại 200 lần C, hình ảnh tế bào nấm men trong nang lông)

1.1.4.5. Nấm móng

Hầu hết căn nguyên nấm móng gây ra bởi các loài nấm sợi. Nhưng gần đây nhiều báo cáo cho thấy nấm *Malassezia* gây bệnh nấm móng. Trong điều kiện thông thường, nấm men thiếu khả năng sừng hóa (keratolytic). Khi có những điều kiện thuận lợi đồng thời xuất hiện những biến đổi không bình thường trong quá trình sinh trưởng nên chúng xâm chiếm và phá hủy móng, chủ yếu móng

tay. Tuy nhiên, vẫn có những báo cáo trái ngược nhau xoay quanh vấn đề vi nấm *Malassezia* là một tác nhân gây bệnh thực sự ở móng hay không [17].

Chowdhary đã phân lập *M. furfur* từ vẩy móng tay thu được ở tổn thương nấm móng tăng sừng trên bàn tay và bàn chân của nam bệnh nhân 13 tuổi [32]. Crespo-Erchiga đã khẳng định, họ đã từng gặp *Malassezia* spp. và *Candida* spp. cùng gây bệnh ở móng [33].

1.1.4.6. Một số bệnh lý khác do *Malassezia*

- *Malassezia* thuộc vi hệ nên chúng có mặt khắp nơi và gây bệnh nhiều vị trí với các biểu hiện triệu chứng đa dạng trong nhiều bệnh cảnh lâm sàng. *Malassezia* có thể gặp trong viêm da cơ địa và thông thường *Malassezia* làm trầm trọng thêm tình trạng bệnh. Ngoài ra, trong một số bệnh lý khác: trứng cá thông thường, u nhú thể mảng, gai- đen, bạch biến...[17].

- Xâm nhập cơ quan, hệ thống: Người ta phát hiện bệnh nhân nằm điều trị hồi sức tích cực nhiễm *Malassezia* huyết. Ngoài ra, nhiều nghiên cứu cũng nhận định nấm *Malassezia* là tác nhân gây bệnh phổi, viêm màng bụng, nhiễm khuẩn huyết qua đặt catheter [34]. Sau khi tiến hành nuôi cấy, định loại nấm và thực hiện kỹ thuật PCR đã xác định có hai loài gây bệnh hệ thống hay gặp: *M. pachydermatis* (46%) và *M. furfur* (63%) [17].

1.2. Bệnh lang ben

1.2.1. Đại cương

1.2.1.1. Khái niệm

Lang ben (*Pityriasis versicolor*) là bệnh nấm nông ở da, căn nguyên do *Malassezia* spp. đặc trưng bởi dát hình tròn hoặc bầu dục, thay đổi màu sắc da trên có vẩy da ẩm mỏng, các tổn thương có thể đứng rải rác hoặc liên kết với nhau thành đám, tập trung chủ yếu ở vùng da giàu bã nhờn ở phần trên cơ thể kèm theo ngứa.

1.2.1.2. Tình hình bệnh trên thế giới và Việt Nam

Lang ben là một trong những bệnh nấm da phổ biến nhất trên thế giới. Tỷ lệ mắc bệnh khác nhau ở mỗi vùng, mỗi khu vực. Nhìn chung, những nơi có khí hậu lạnh như Bắc Âu, tỉ lệ bệnh thấp xấp xỉ 1% dân số [17]. Mặc dù khó đánh giá chính xác tỉ lệ mắc bệnh nhưng có thể ước tính tỉ lệ vào khoảng 5-8% dân số [17]. Theo Hellgren L., tại trung tâm Thụy Điển, nơi có khí hậu lạnh, thuộc vùng ôn đới, bệnh gặp với tỷ lệ 0,5% dân số [35]. Tại khu vực hàn đới, một số nghiên cứu nhỏ ước chừng tỉ lệ này dưới 1% dân số.

Tại Việt Nam, theo một số tác giả khi điều tra về tỉ lệ mắc bệnh da tại một xã thuộc huyện Thanh Trì, Hà Nội, bệnh lang ben chiếm 3,1% số người được khám [36]. Theo Nguyễn Thị Tuyết Mai và cs (1998) tỉ lệ bệnh là 1,76% số bệnh nhân đến khoa khám bệnh tại bệnh viện Da liễu Trung Ương [37]. Nguyễn Văn Hoàn (2015) cũng tiến hành tại bệnh viện Da liễu Trung Ương, bệnh nhiễm nấm chiếm 8,08%, còn bệnh lang ben chiếm 19,07% trong các bệnh nhân này, so với tổng số bệnh nhân đến khám thì tỉ lệ là 1,54% [38].

Các nghiên cứu đều ghi nhận bệnh có thể gặp quanh năm tuy nhiên số lượng bệnh nhân thường tăng lên vào mùa xuân hè. Theo Gupta ở Canada và Asja Prohic ở Bosnia, tỉ lệ bệnh gặp nhiều nhất vào những tháng mùa hè [39], [40]. Theo Elham Zeinali và cs, ở Iran, bệnh thường gặp vào khoảng tháng 7, tháng 8 và tháng 9 [41]. Tại Việt Nam, theo Nguyễn Thị Tuyết Mai và cs, bệnh hay gặp vào những tháng cuối hè đầu thu và đầu mùa đông xuân [37].

Bệnh có thể gặp ở bất cứ lứa tuổi nào, từ trẻ nhỏ cho đến người già nhưng hay gặp nhất là thanh niên trong khoảng từ 20-40 tuổi. Ở Ontario, Canada, theo tác giả Gupta, bệnh có thể gặp ở độ tuổi từ 9 đến 75 tuổi, độ tuổi trung bình là 36,8 tuổi [39]. Theo tác giả Elham Zeinali, ở Iran, bệnh hay gặp nhất ở 20-29 tuổi, chiếm 32,3%, ít gặp ở trẻ nhỏ, nhóm tuổi 0-9 tuổi chỉ chiếm 2,9% [41]. Trong một nghiên cứu tiến hành tại Buerarema- BA, Brazil, của tác giả Juliano và cs, độ tuổi hay gặp là 10-19 tuổi, chiếm 29,5% [42]. Theo Abdul-Razak S.H.

và cs ở Bagda, Irag, nhóm tuổi 21-31 gặp nhiều nhất 45,3%, xếp thứ 2 là nhóm tuổi 12-21 (31,3%) [43]. Theo Nguyễn Thị Tuyết Mai và cs, tuổi hay gặp là 15-30 tuổi (56,84%), tương đồng với các nước nhiệt đới nóng ẩm khác như Brazil [37].

Nhiều tác giả cho rằng tỉ lệ gặp bệnh ở nam và nữ có xu hướng cân bằng. Tại Bosnia, theo Asja Prohic và cs, tỉ lệ nam/nữ là 1/1 [40]. Theo Bitar Tarazonie và cs, tại Iran, tỉ lệ nam/nữ xấp xỉ 1/1 [44]. Tại Iraq, tác giả Abdul-Razak thông báo tỉ lệ nam/nữ xấp xỉ 3/2 [43]. Một nghiên cứu khác của Juliano tại Brazil, tỉ lệ nam/nữ là 1/2 [42]. Theo Nguyễn Thị Tuyết Mai và cs, tỉ lệ nam/nữ là 1/1 [37].

1.1.2.3. Một số yếu tố thuận lợi

Thời kỳ đầu các tác giả cho rằng căn nguyên gây bệnh lang ben do vi nấm *M. furfur* và phụ thuộc pH da, thử nghiệm lâm sàng điều trị bệnh bằng cách thay đổi pH đem lại hiệu quả nhất định nhưng bệnh thường tái phát. Nghiên cứu của Preuss J. (2013) đã phát hiện MfTam1 phát triển thuận lợi pH 8,0, được coi như enzym chính quyết định hoạt động của vi nấm. Sau đó, người ta cũng nghiên cứu với *M. globosa* và phát hiện hệ enzym phân giải lipid với Mglip2 đặc trưng ở pH 6,0 [45],[46]. Các tác giả đi đến kết luận, nấm *Malassezia* phụ thuộc vào hệ enzym hoạt động ở dải pH đặc trưng và khác nhau tùy từng loài. Do đó, pH da kiềm không phải là điều kiện tiên quyết, mà chỉ là một yếu tố trong các yếu tố thuận lợi ảnh hưởng đến khả năng sinh sản, phát triển và gây bệnh của vi nấm.

Những yếu tố thuận lợi khác cũng ảnh hưởng tới sự phát sinh bệnh như: cắt bỏ tuyến thượng thận, đái tháo đường, có thai, suy dinh dưỡng, điều trị corticoid toàn thân, dùng thuốc ức chế miễn dịch hay khi ra nhiều mồ hôi... Nhiều nghiên cứu nhằm tìm lời giải thích về tính cảm thụ của cơ thể khi thay đổi một số điều kiện sinh lý, sinh hóa trong cơ thể.

1.2.2. Căn nguyên và sinh bệnh học

Năm 1853, C. Robin tìm ra trên vảy da của bệnh nhân bị bệnh lang ben có loài nấm, đặt tên là *Micosporum furfur*. Đến năm 1874, Malassez (1842–1909) đã mô tả tác nhân gây bệnh là những tế bào hình tròn hoặc bầu dục, phát triển ở lớp sừng của da bệnh nhân lang ben, đặt tên là *Malassezia furfur*. Từ đó, *M. furfur* được coi là căn nguyên duy nhất của bệnh. Đầu thập niên 90, thành tựu khoa học phát triển nhanh chóng đã ứng dụng thành công trong việc giải mã trình tự bộ gen của vi nấm và tìm ra 7 loài phụ thuộc lipid, đặt tên chung là *Malassezia* spp. [16]. Năm 2000, F. Sanchez nhận ra rằng căn nguyên chính gây bệnh lang ben là *M. globosa* [47].

Bảng 1.2. Phân bố dịch tễ các loài *Malassezia* trên da người khỏe mạnh và da bệnh lang ben [2]

Quốc gia	Điều kiện	SL BN (n)	Vị trí lấy mẫu	Phương pháp lấy mẫu	Phương pháp nuôi cấy	Loài phổ biến nhất (%)
Tây Ban Nha	HS	75	Trán và vai	Cạo da	mDixon	<i>M. sympodialis</i> (91,7)
	PV	75	Thương tổn	Cạo da	mDixon	<i>M. globosa</i> (84)
Canada	HS	20	Nhiều vị trí	Bề mặt liên quan	Leeming Notman	<i>M. sympodialis</i> (47,2)
	PV	24	Nhiều vị trí	Bề mặt liên quan	Leeming Notman	<i>M. sympodialis</i> (62,7)
Hàn Quốc	HS	120	Nhiều vị trí	Chà rửa	Leeming Notman	<i>M. restricta</i> (31,6)
Iran	HS	100	Nhiều vị trí	Chà rửa	mDixon	<i>M. globosa</i> (42)
	PV	94	Nhiều vị trí	Cạo da	mDixon	<i>M. globosa</i> (53)
Ấn Độ	HS	45	Thân mình	Băng keo	mDixon	<i>M. sympodialis</i> (47,6)
	PV	65	Thương tổn	Cạo da	mDixon	<i>M. globosa</i> (51,8)
Indonesia	PV	98	Thương tổn	Cạo da	Leeming Notman	<i>M. furfur</i> (42,9)

(HS: da người khỏe mạnh, PV: Lang ben, SLBN: Số lượng bệnh nhân.)

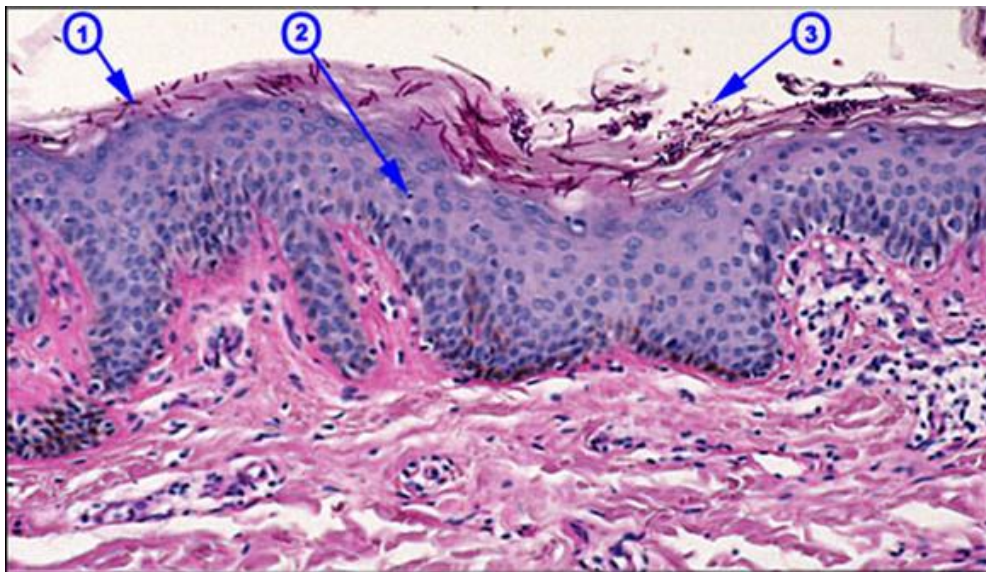
Những nước khí hậu lạnh, *M. sympodialis* gây bệnh với tỉ lệ cao nhất, tiếp theo là *M. globosa*, trong khi đó những nước có khí hậu nóng ẩm, *M. globosa* và *M. furfur* chiếm ưu thế hơn. Dễ dàng nhận thấy được sự tồn tại của loài *M. globosa* ở cả nơi có khí hậu lạnh và nơi có khí hậu nóng, trên da lành và da bệnh. Do đó, sự phân bố loài rộng rãi cũng như khả năng thích nghi, sinh sản phát triển và gây bệnh phổ biến của *Malassezia* không chỉ trong lang ben mà nhiều bệnh lý khác đã được y văn ghi nhận....

Theo Guangxi Wu và cs (2015) trên cơ sở phân tích sâu về bộ gen của *M. globosa* đã phát hiện một hệ thống gồm nhiều enzym phân giải lipid rất đa dạng có nhiệm vụ quyết định mọi hoạt động và cơ chế sinh bệnh của vi nấm, bao gồm: Mg Lip1, Mg Lip2, Mg MDL2. Trong đó, Mg Lip2 (*Malassezia globosa* lipase 2) là enzym quan trọng nhất có khả năng chuyển hóa hầu hết các chất béo có trong tuyến bã nhờn (trừ triglyceride) và thích hợp với pH tối thuận 6,0 [45], [46]. Ngoài ra, một enzym khác được Vullo D. và cs báo cáo carbonic anhydrase (MgCA) có tác động trực tiếp đến các acid amin và amino acid như adrenalin, serotonin, histamin... [48]. Kết quả gây ra quá trình viêm, gặp chủ yếu trong bệnh viêm da dầu và gàu da đầu [49], [50].

Từ thế kỷ 20, *M. furfur* được cho là căn nguyên duy nhất gây bệnh lang ben. Tuy nhiên chưa có nhiều nghiên cứu tìm hiểu khẳng định vai trò của loài nấm này. Đến năm 2013, Preuss J. tìm ra enzym chính quyết định hoạt động phân giải lipid và protein: *Malassezia furfur* tryptophanaminotransferase (MfTam1). Enzym này hoạt động ở pH từ 6,0- 10,0, tối thuận ở pH 8,0 và nhiệt độ thích hợp 40°C [51]. Điều này cũng giải thích lý do một trong những điều kiện thuận lợi của lang ben là pH da kiềm. Bên cạnh đó, *M. furfur* còn có khả năng tự tổng hợp melanin nội tế bào [52]. Theo Yongchim, trong quá trình tổng hợp melanin *M. furfur* có khả năng tự kích hoạt L-DOPA để tạo ra hợp chất giống melanin gây ra các thương tổn sắc tố trên da [52].

Nghiên cứu về cơ chế gây bệnh của *M. sympodialis* có nhiều giả thuyết khác nhau. Một trong những giả thuyết được công nhận khi làm sáng tỏ vai trò của 1→6-β-D-glucan – một kháng nguyên quan trọng có mặt trên vách tế bào nấm [53]. Nhờ đó, *M. sympodialis* tham vào cơ chế bệnh sinh của viêm da cơ địa gây nên đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào thông qua IgE và Interleukin [54],[55]. Có lẽ điều này liên quan đến các thương tổn dát hồng trong bệnh lang ben.

Hình ảnh giải phẫu bệnh không đặc hiệu, có thể thấy tăng sừng, á sừng, tăng gai ít, kèm theo viêm nhẹ lớp thượng bì.



Hình 1.9. Hình ảnh mô bệnh học lang ben trên tiêu bản nhuộm Hematoxylin- Eosin

(1: tăng sừng mà không có á sừng, 2: xâm nhập một số tế bào viêm, 3: hình ảnh sợi nấm và tế bào nấm men)

Dưới kính hiển vi có thể thấy sợi nấm ở giữa lớp sừng, đôi khi xâm lấn vào tế bào sừng. Có sự gia tăng lớp tế bào hạt chứng tỏ thời gian chu chuyển tế bào tăng ở vùng thương tổn. Những hạt sắc tố lớn hơn bình thường ở những vùng thương tổn tăng sắc tố và hạt sắc tố nhỏ hơn bình thường ở thương tổn giảm sắc tố.

1.2.3. Xác định *Malassezia* trong bệnh lang ben

1.2.3.1. Soi trực tiếp tìm nấm

Phương pháp soi trực tiếp tìm nấm dưới kính hiển vi quang học áp dụng phổ biến hơn một thế kỷ qua kể từ khi Malassez mô tả vi nấm vào năm 1874. Đây là phương pháp đơn giản, dễ thực hiện, kết quả nhanh và giúp bác sĩ lâm sàng chẩn đoán sơ bộ vi nấm gây bệnh. Tuy nhiên, kết quả còn phụ thuộc vào kinh nghiệm và kỹ thuật xét nghiệm tìm nấm.



Hình 1.10. Hình ảnh "Spaghettie and meatball" trên KHV vật kính 40x qua phương pháp soi trực tiếp bằng KOH + Parker™ Ink

Kỹ thuật soi trực tiếp tìm nấm tiến hành qua nhiều bước, trong đó 2 bước quan trọng nhất là bóc lộ lớp vỏ dày bao quanh tế bào nấm và nhận định hình thái vi nấm dưới kính hiển vi. Hóa chất thường dùng có tính kiềm mạnh do đó thấm tốt vào lớp sừng giúp làm mềm và trong tổ chức biểu mô, bóc lộ hình thái vi nấm. Các dung dịch kiềm thường sử dụng bao gồm: KOH 10%, KOH 20%, NaOH 10%. KOH có tính kiềm tuy không mạnh bằng NaOH nhưng an toàn, giá thành rẻ, tự pha chế dễ dàng và sẵn có trên thị trường. Tuy nhiên, nhược điểm của KOH là khi thành và bào tương của nấm không còn nguyên vẹn thì sợi nấm không bắt màu nên rất khó quan sát. NaOH cũng được áp dụng tại một số phòng xét nghiệm bởi vì tính thấm sâu vào lớp biểu bì, có tác dụng tốt với bệnh phẩm móng, tóc. Bên cạnh đó, Dimethyl sulfoxide (DMSO) là một

hợp chất hữu cơ lưu huỳnh với công thức $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$, cũng được sử dụng với mục đích là mềm và trong lớp sừng, giúp vi nấm được bộc lộ rõ nét. Nhìn chung, với bệnh phẩm vảy da của bệnh nhân lang ben, KOH tỏ ra hiệu quả hơn, được áp dụng rộng rãi nhưng ái tính kém với tế bào nấm men nên dễ bỏ sót vi nấm khi soi trực tiếp trên kính hiển vi.

Các tác giả cải tiến phương pháp nhuộm soi KOH đơn thuần bằng cách thêm một loại mực đóng vai trò như một chất màu có ái tính với tế bào vi nấm men. Kỹ thuật có thể áp dụng rộng rãi và hữu ích trong chẩn đoán cận lâm sàng bởi ưu điểm: (a) Thời gian cho kết quả nhanh, (b) Nhận định rõ hình thái vi nấm (c) Tránh bỏ sót khi soi trực tiếp, (d) Đánh giá mật độ tập trung của vi nấm. Các chất màu có thể sử dụng bao gồm: ParkerTM blue black ink, ParkerTM black ink, chicao sky blue 6B, calcofluor white. Dung dịch calcofluor white có ưu điểm bởi quan sát hình thái vi nấm rất rõ nét, tuy nhiên cần soi trên kính hiển vi huỳnh quang và đắt tiền. Dung dịch Chicago sky blue 6B (CSB) gần đây cũng được sử dụng như một phương pháp chẩn đoán nhanh, rẻ tiền hơn. Phương pháp thường được dùng là KOH 10% và CSB 1%. Tuy nhiên, CSB 1% dường như có ái tính với tất cả các loại nấm nông trên da, trong nhiều trường hợp, ái tính với nấm *Malassezia* không cao bằng mực Parker. Nghiên cứu của N. Lodha và S. A. Poojary (2015) so sánh mực Chicago sky blue 6B và KOH 10% có độ tương đồng 94% với hệ số kappa 0,38 (mức độ tương đồng thấp) [56]. Nghiên cứu của A. Noviandini và cs (2017) khi so sánh KOH và ParkerTM blue black ink (KBI) với Chicago sky blue 6B (CSB) cho thấy tỉ lệ chẩn đoán đúng trong lang ben là tương đương nhau [57]. Nghiên cứu của Rathnapriya N. và cs cho thấy KBI và KOH 10% có độ nhạy tương đương nhau [58].

Hiện nay, ParkerTM ink được áp dụng rộng rãi tại các phòng xét nghiệm vì tạo nền màu xanh tương phản dễ quan sát hình thái vi nấm hơn nữa dung dịch

này không bắt màu vách tế bào sừng, bóng hơi, tế bào mỡ, không gây mỏi mắt khi quan sát lâu. Gần đây, ParkerTM blue black ink cũng được áp dụng như là một phương pháp thay thế ParkerTM ink. Phương pháp này mang lại nhiều ưu điểm khi quan sát hình ảnh tế bào nấm men, sợi nấm *Malassezia*. Hình thái vi nấm điển hình trên kính hiển vi quang học là những sợi nấm thô ngắn như miến vụn ngay khi thoái hóa, các tế bào nấm men hình tròn đứng tập trung thành đám giống hình ảnh “mì ống” và “thịt viên”. Ngoài ra, một số trường hợp chỉ đơn thuần quan sát hình ảnh các sợi nấm thô ngắn hoặc tế bào nấm men đứng rải rác. Trong trường hợp chỉ quan sát các tế bào nấm men, cần thiết tiến hành xác định số lượng và mật độ tập trung vi nấm trên vi trường theo V. Silva [59], trong đó: chẩn đoán xác định lang ben khi soi trực tiếp tìm nấm quan sát tế bào nấm trên kính hiển vi đánh giá số lượng từ 20 TB/VT.

Khi quan sát trên thương tổn da bình thường và bệnh lý, Asja Prohic và L. Ozegovic quan sát hình thái vi nấm chủ yếu trên da bệnh lý là sợi nấm và tế bào nấm men, còn trên da khỏe mạnh đơn thuần tế bào nấm men nhưng số lượng ít, mật độ rải rác [40].

Tại Việt Nam, năm 2012 chúng tôi ứng dụng kỹ thuật soi trực tiếp tìm *Malassezia* với hóa chất KOH kết hợp ParkerTM blue black ink và lấy bệnh phẩm bằng băng dính không màu rất hữu ích giúp chẩn đoán nhanh tại phòng xét nghiệm. Nghiên cứu của Trần Cẩm Vân (2012) cho thấy hình thái điển hình vi nấm *Malassezia* trong một số bệnh da thường gặp: viêm da dầu, viêm da cơ địa là tế bào nấm men, con lang ben chủ yếu là sợi và tế bào nấm men [27]. Nghiên cứu của Nguyễn Văn Hiếu và Trần Cẩm Vân (2015) cho thấy hình thái vi nấm *Malassezia* trên kính hiển vi ở bệnh phẩm bệnh nhân lang ben chủ yếu là sợi nấm và tế bào nấm men (70%), trong khi đó hình thái sợi nấm chỉ chiếm 12%, tế bào nấm men là 18% [60].

1.2.3.2. Nuôi cấy, định loại

Nuôi cấy, định loại luôn được coi là “tiêu chuẩn vàng” trong xác định căn nguyên vi sinh vật nói chung, trong đó đặc biệt xác định chính xác loài *Malassezia* gây bệnh. Bệnh phẩm là vảy da của bệnh nhân lang ben. Các môi trường nuôi cấy có thể sử dụng bao gồm: thạch Sabouraud, thạch m-Dixon, thạch Leeming- Notman. Lần đầu tiên Sabouraud nuôi cấy trên môi trường cấy nấm thông thường tuy nhiên *Malassezia* phát triển rất kém, hầu như không mọc. Chỉ duy nhất *M. pachydermatis* mọc trên môi trường này bởi chúng phát triển không cần lipid.

Dựa vào đặc tính ưa lipid, Sabouraud cải tiến thành m-Dixon phủ thêm dầu oliu với nồng độ 1%. Sabouraud phát hiện 7 loài bao gồm: *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. restricta*, *M. sympodialis*, *M. slooffiae*, *M. globosa*, *M. obtusa* [5], [6]. Trên môi trường này, khuẩn lạc có thể thu được sau 2-3 ngày nuôi cấy với nhiều hình thái khác nhau. Tuy nhiên, để phân biệt hình thái khuẩn lạc giữa các loài *Malassezia* là tương đối khó khăn, bởi hình ảnh đại thể gần như rất giống nhau giữa các loài. Môi trường Leeming- Notman cũng đưa vào sử dụng và thu được hình ảnh khuẩn lạc trơn, màu hồng đến tím đậm. Trong đó *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. slooffiae* phát triển tốt, *M. globosa* và *M. obtusa* phát triển kém hơn, *M. restricta* phát triển rất kém.

Bảng 1.3. Đặc điểm các môi trường thường dùng trong nuôi cấy *Malassezia* [61]

Môi trường	Thành phần
Thạch Dixon	36g đường malt, 6g peptone, 20g bile, 10ml Tween 40, 2 mL lycerol, 2 mL acid oleic và 12 g thạch
Thạch Leeming-Notman	10 g peptone, 5 g glucose, 0.1 g nấm men, 4 g mật, 1 mL glycerol, 0,5 g glycerol monostearate, 0.5 ml Tween 60, 10 ml sữa and 12 g thạch
Môi trường Ushijima (<i>M. pachydermatis</i>)	10 g trypticase peptone (BBL), 5 g nấm men, 3 g glucose, 2 g NaCl, 12 g KH ₂ PO ₄ (khan), 15 g thạch, 0,1 g ampicillin, và 0,25 g cycloheximide; pH 5,5
Thạch CHROM sửa đổi	56,3 g thạch CHROM <i>Malassezia</i> và 10 ml Tween 40

Một phương pháp khác được Kaneko và cs (2005) đưa ra sử dụng thạch CHROM agar *Candida* có cải tiến để phân lập đồng thời *Candida* và *Malassezia* [62]. Kết quả thu được tương tự như môi trường Leeming Notman thông thường. Năm 2011, Kaneko và cs dùng thạch CHROM agar *Malassezia* và một số tính chất sinh hóa trên một số môi trường khác được đưa vào sử dụng như một phương pháp định danh *Malassezia* chủ yếu ở Nhật [63]. Kaneko dựa trên sự phát triển của *Malassezia* trong môi trường thạch CHROM, đồng thời các phản ứng với Catalase, Cremophor Esculin để xác định được 7 loài: *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. slooffiae*, *M. restricta* và *M. pachydermatis* [63], [64]. Gần đây, phương pháp nhận định khả năng sản xuất chất kết tủa Tween 40 dựa trên các môi trường thạch CHROM *Malassezia*, thạch dextrose của Sabouraud, Cremophor EL, Tween 60 và phản ứng Catalase được dùng để phân biệt 9 loài *Malassezia* bao gồm 7 loài trên cộng thêm 2 loài *M. dermatis* và *M. japonica* [65], [64].

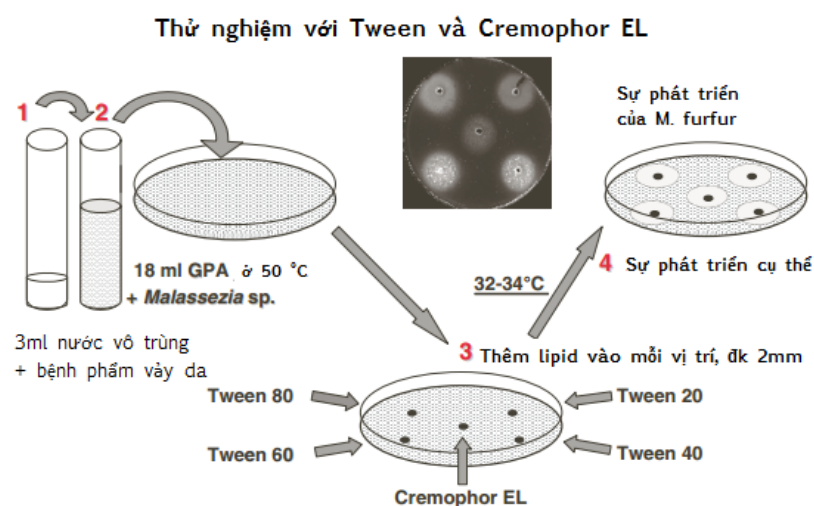
Bảng 1.4. Đặc điểm kiểu hình của 14 loài *Malassezia* dựa trên đặc tính sinh lý và sinh hóa

Loài <i>Malassezia</i>	Môi trường phát triển				Kết quả kiểm tra							Tài liệu tham khảo
	SDA 32 °C	mDA			Tween				Cremophor EL	β Glucosidase	Catalase	
		32 °C	37 °C	40 °C	Tween 20	Tween 40	Tween 60	Tween 80				
<i>M. furfur</i>	-	+	+	+	+/IGP	+/IGP	+/IGP	+/IGP	+/- IGP	+/- IGP	+/- IGP	[6]
<i>M. sympodialis</i>	-	+	+	+	-/±	+	+	+	+/-	+	+	[6]
<i>M. globosa</i>	-	+	-/±	-	-	-/IGP	-/IGP	-	-	-	+	[6]
<i>M. restricta</i>	-	+	+	-	-	-/IGP	-/IGP	-	-	-	-	[6]
<i>M. obtusa</i>	-	+	-/±	-	-	-	-	-	-	+	+	[6]
<i>M. slooffiae</i>	-	+	+	+	+/-	+	+	-/±	-	-	+	[6]
<i>M. dermatis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-	NE	+	[66]
<i>M. japonica</i>	-	+	+	-	-	±	+	-	NE	NE	+	[67]
<i>M. nana</i>	-	+	+	V	V	+	+	±	-	-	+	[35]
<i>M. yamatoensis</i>	-	+	+	-	+	+	+	+	NE	NE	+	[10]
<i>M. equina</i>	-	+	±	-	±	+	+/IGP	+/IGP	-	-	+	[12]
<i>M. caparae</i>	-	+	-/±	-	-/IGP	+/IGP	+/IGP	+/- IGP	-	+/- IGP	+	[12]
<i>M. cuniculi</i>	-	+/-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	[13]
<i>M. pachydermatis</i>	+/-	+	+	+	+/IGP	+	+	+	+/IGP	+/- IGP	+/-	[68]

(SDA: thạch Sabouraud dextrose, mDA: thạch Dixon cải tiến, Tween: thạch Sabouraud có chứa lipid, Cremphor EL: thạch Dixon có chứa lipid, v: có giá trị, IGP: không mọc (hoặc hiếm khi mọc), NE: không xác định được)

Trên thực tế khi quan sát đại thể và vi thể, xét về mặt hình thái học, các loài *Malassezia* tương đối giống nhau nên phân định khá khó. Các tác giả sử dụng các tính chất sinh lý sinh hóa và sự phát triển ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau từng loài để xác định chính xác loài. Sabouraud phát hiện một số đặc tính ưa nhiệt độ chọn lọc khác nhau tùy loài: *M. globosa*, *M. obtusa* và *M. restricta* phát triển tốt ở 32 °C, nhưng ở 37°C chúng hầu như không phát triển hoặc phát triển rất yếu. Phản ứng Catalase âm tính được coi như bước quan trọng để xác định loài *M. restricta*. Tuy nhiên, với các loài khác, thử nghiệm quan trọng định danh một số loài ưa lipid: *M. furfur*, *M. yamatoensis*, *M. dermatis*, *M. slooffiae*, *M. japonica*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. cuniculi*, *M. sympodialis* là sử dụng các loại Tween khác nhau ở thành phần acid béo trong đó Tween 20 có acid lauric, Tween 40 có acid palmitic, Tween 60 có acid stearic và Tween 80 có acid oleic.

Dựa trên khả năng hấp thu khác nhau với các loại Tween trên để xác định các loài *Malassezia*: *M. furfur*, *M. yamatoensis*, *M. dermatis* hấp thu cả 4 loại Tween; *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. dermatis* không hấp thu cả 4 loại Tween; *M. sympodialis* hấp thu yếu hoặc không hấp thu Tween 20; *M. slooffiae* hấp thu yếu hoặc không hấp thu Tween 80, *M. japonica* hấp thu 2 loại Tween 40 và Tween 60.



Hình 1.11. Quy trình thử nghiệm với Tween và Cremophor EL

Ngoài ra, để xác định hình thái và tính chất khuẩn lạc, các tác giả khuyến nghị sử dụng môi trường CHROM agar *Malassezia*. Kết quả thu được *M. furfur* đặc trưng bởi khuẩn lạc màu hồng nhạt và có nếp nhăn; *M. dermatis* với khuẩn lạc hồng nhạt và trơn; *M. yamatoensis* không tạo khuẩn lạc đặc trưng, *M. globosa* tạo khuẩn lạc tím và trơn; *M. obtusa* với khuẩn lạc hồng và trơn; *M. cuniculi* không tạo được khuẩn lạc đặc trưng.

Bảng 1.5. Đặc tính các loài *Malassezia* trên CHROM agar *Malassezia*

Loài <i>Malassezia</i>	Đặc điểm khuẩn lạc trên CHROM		
	Kích cỡ	Màu sắc/hình thái	Kết tủa
<i>M. pachydermatis</i>	Lớn	Hồng/ nhăn	+
<i>M. sympodialis</i>	Lớn	Hồng/nhăn	+
<i>M. globosa</i>	Nhỏ	Đỏ tía/nhăn	+
<i>M. dermatis</i>	Lớn	Hồng đến đỏ tía/ nhăn	+
<i>M. furfur</i>	Lớn	Hồng/ nhăn nheo	-
<i>M. slooffiae</i>	Nhỏ	Hồng/ nhăn	-
<i>M. obtusa</i>	Trung bình	Hồng/xù xì	-
<i>M. restricta</i>	Nhỏ	Hồng/ nhăn	-
<i>M. japonica</i>	Lớn	Hồng/ nhăn	-

Tổng hợp tất cả các tính chất trên và dựa vào điều kiện thực tế tại phòng xét nghiệm nấm Bệnh viện Da liễu Trung Ương, chúng tôi xây dựng quy trình xác định *Malassezia* từ vảy da bệnh nhân lang ben có cải tiến nhằm rút ngắn thời gian, tiết kiệm chi phí đồng thời đơn giản hiệu quả (xem hình 2.4).

Như vậy, lần đầu tiên tại Việt Nam chúng tôi xác định được chính xác 11 loài trong số 14 *Malassezia* gây bệnh bao gồm: *M. globosa*, *M. furfur*, *M. dermatis*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. cuniculi*, *M. equina*, *M. restricta*, *M. sympodialis*, *M. pachydermatis*. Trong thời gian tới nhóm nghiên cứu kỳ vọng sẽ áp dụng kỹ thuật xác định các loài *Malassezia* trong một số bệnh da khác như: viêm da cơ địa, viêm da dầu, viêm nang lông, vảy nến...

1.2.3.3. Phân tích phân tử và PCR

Kỹ thuật phân tử áp dụng trong định danh nấm có nhiều phương pháp bao gồm: phương pháp “dấu vân tay” DNA; kỹ thuật DNA đa hình nhân bản ngẫu nhiên (RAPD); kỹ thuật đa hình độ dài nhân bản chọn lọc (AFLP); điện di DNA biến tính trên gel gradient (DGGE); điện di trong trường xung điện (PFGE); kỹ thuật chỉ thị PCR chuỗi đặc trưng; kỹ thuật PCR đa hình độ dài đoạn cắt hạn chế (RFLP); kỹ thuật PCR đa hình cấu tạo sợi đơn (PCR-SSCP); PCR-Realtime; PCR sequencing. So với nuôi cấy định danh, phương pháp dễ thực hiện hơn, giúp xác định chính xác loài *Malassezia*. Bệnh phẩm có thể được sử dụng vảy da hoặc khuẩn lạc. PCR từ vảy da đơn giản hơn, bệnh phẩm được lấy vào dung dịch đặc biệt, sau đó sử dụng các kỹ thuật PCR khác nhau để xác định loài. Tuy nhiên, phương pháp này có độ nhạy không cao vì trong nhiều trường hợp vảy da của bệnh nhân mỏng, dễ bong, khó lấy được, hơn nữa, còn phụ thuộc vào môi trường bảo quản bệnh phẩm. PCR từ khuẩn lạc cũng được các tác giả áp dụng như là một phương pháp xác định độ nhạy, độ đặc hiệu của phương pháp nuôi cấy. Ưu điểm của phương pháp này là có thể xác định chính xác loài *Malassezia* với độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Tuy nhiên, phương pháp cần nhiều thời gian hơn do phải đợi vi nấm phát triển trên môi trường nuôi cấy, sau đó mới lấy được bệnh phẩm, cho nên tính thực tiễn không cao, có thể áp dụng trong các cơ sở có tính nghiên cứu.

Gaitanis và cs (2002) sử dụng PCR-RFLP để xác định *Malassezia* từ vảy da, kết quả xác định được 7 loài *Malassezia*: *M. furfur*, *M. globosa*, *M. sympodialis*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. pachydermatis* [69]. Theo Ji Young Kim và cs (2013) PCR sequencing cho kết quả xác định loài *Malassezia* chính xác nhất, cao hơn PCR- RFLP và tương đương PCR pyrosequencing [52].

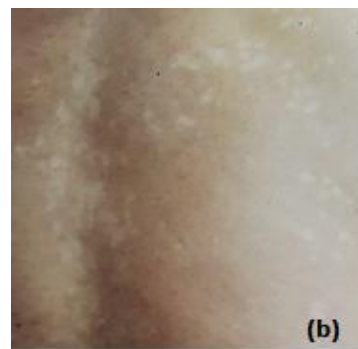
Nghiên cứu này của chúng tôi sử dụng kỹ thuật PCR sequencing từ vảy da bệnh nhân lang ben. Bệnh phẩm được lấy từ vảy da bệnh nhân lang ben, xử lý thô bằng dung dịch nước muối sinh lý NaCl 0,9%. Chúng tôi thiết kế cặp mồi nhằm phát hiện sự có mặt của nấm *Malassezia* trong mẫu bệnh phẩm. Tiếp đó, đưa mẫu bệnh phẩm vảy da được tiến hành PCR, lấy sản phẩm thu được giải trình tự gen. Dựa trên bộ gen của loài *Malassezia* trên ngân hàng gen quốc tế, chúng tôi so sánh trình tự nucleotid thu thập được để xác định các loài *Malassezia*.

1.2.4. Chẩn đoán bệnh lang ben

1.2.4.1. Đặc điểm lâm sàng

Thương tổn cơ bản là các dát, mảng hình tròn hoặc bầu dục. Bệnh thường bắt đầu bằng những chấm màu hồng, nâu hoặc trắng trên da. Các chấm lớn dần, lan rộng và liên kết với nhau thành mảng ranh giới rõ rệt với da lành. Thương tổn có hình bầu dục hoặc đa cung. Kích thước đám thương tổn từ 1-3 cm, đôi khi liên kết với nhau tạo thành mảng thương tổn lan rộng.

Thương tổn đặc trưng bởi sự thay đổi màu sắc da, có thể tăng sắc tố hoặc giảm sắc tố, đôi khi dát hỗn hợp tăng và giảm sắc tố. Màu sắc tổn thương hay gặp nhất là màu nâu (tăng sắc tố) và trắng (giảm sắc tố) vào từng cá thể với số lượng, loại tế bào hắc tố melanin cũng như mức độ hoạt động, sự hiện diện của caroten và độ dày của lớp sừng.



Hình 1.12 Hình ảnh dát tăng sắc tố (a) và dát giảm sắc tố (b)

Trong lang ben, hiện tượng giảm sắc tố là mắc phải, có thể thứ phát do tác động ức chế của acid dicarboxylic lên tế bào sắc tố hoặc bảo vệ tránh tác động từ ánh sáng. Mendez-Tovar cho rằng, khi tiếp xúc với ánh sáng mặt trời, các tế bào nấm sản xuất acid azelaic ức chế enzym tyrosin kinase gây ra những điểm giảm sắc tố trên da [70]. Gần đây, một thử nghiệm *invivo* chứng minh *M. furfur* liên quan đến dát tăng, giảm sắc tố do sự tái hoạt động của Melanin-specific Mab [52].

Ngoài ra, sự khác biệt về mặt mô bệnh học trong lang ben giữa tổn thương tăng sắc tố và giảm sắc tố: (1) Hình thái tế bào và sợi nấm gặp nhiều thương tổn tăng sắc tố; (2) Sự xuất hiện của melanocytes trong các tổn thương tăng sắc tố cũng bị thay đổi, kích thước lớn hơn, một vài tế bào phì đại và đứng đơn lẻ [70]. Hiện tượng tăng sắc tố không chỉ đơn thuần là kết quả của việc tăng hoạt động melanin; một giả thuyết cho rằng dát tăng sắc tố là kết quả của phản ứng viêm nhẹ do các loại nấm men. Nghiên cứu năm 2013 của tác giả Sirida Yongchim trong phòng thí nghiệm chứng minh *M. furfur* có khả năng sản xuất hợp chất giống melanin trong tế bào [52]. Tuy nhiên, sự tăng sắc tố không chỉ do loài vi nấm đơn thuần và đã có những báo cáo gặp ở cả thương tổn bệnh lang ben và bạch biến. Trong thực tế, chúng ta thường quan sát trên kính hiển vi sự hiện diện của hình thái tế bào men và sợi nấm khi lấy bệnh phẩm tại các khu vực giàu lipid của cơ thể: mặt, da đầu và thân mình. Các thương tổn có thể lan rộng trên nhiều vùng của cơ thể nhưng rất hiếm khi thấy ở cẳng tay, cẳng chân, nhất là bàn tay và bàn chân. Có nhiều báo cáo về sự hiện diện nấm *Malassezia* trên thương tổn bệnh lý gàu da đầu và người có làn da khỏe mạnh. Đây là những thương tổn rất ít được chú ý khi khám lâm sàng và là nguồn gây tái phát bệnh. Theo Elham Zeinali và cs (2014), thương tổn trên da đầu có liên quan đến tóc và gàu da đầu, trong đó *M. globosa* và *M. obtusa* là những loài thường gặp [41]. Điều này cũng phù hợp với cơ chế bệnh sinh của loài *M. globosa*.

Trên bề mặt thương tổn có phủ lớp vảy da ẩm mỏng như “vảy cám”, trong trường hợp khó phát hiện có thể cạo nhẹ trên bề mặt tổn thương thấy vảy da bong dễ dàng gọi là dấu hiệu “vỏ bào”. Dùng đèn Wood soi vùng rìa thương tổn trong phòng tối có hiện tượng phát quang, có thể xuất hiện màu vàng sáng hoặc vàng huỳnh quang.

Triệu chứng cơ năng thường gặp là ngứa, ngứa tăng lên khi ra mồ hôi đôi khi cảm giác ngứa râm ran. Có thể không ngứa hoặc cảm giác ngứa thoáng qua.

1.2.4.2. Các thể lâm sàng

+ Thể giảm sắc tố: tổn thương cơ bản là các dát màu trắng (giảm sắc tố), thường xuất hiện ở vùng da giàu bã nhờn, tổn thương kích thước nhỏ 1-3 cm, thường đứng riêng rẽ, có khi thành đám, trên có vảy da mỏng, dấu hiệu vỏ bào dương tính, tổn thương hiện rõ dưới ánh sáng đèn wood. Nguyên nhân chủ yếu do trong quá trình gây bệnh, nấm *Malassezia* tạo ra các sản phẩm ức chế cạnh tranh với tyrosinase làm giảm sản xuất melanin và gây độc trực tiếp lên tế bào sắc tố.

+ Thể tăng sắc tố: đặc trưng bởi các dát tăng sắc tố (dát tăng sắc tố), hay gặp ở lưng, ngực, tổn thương thường lan rộng trên một vùng cơ thể, ít khi đơn độc mà thành đám thương tổn, quan sát thấy rõ bằng mắt thường, dấu hiệu vỏ bào (+). Nghiên cứu cho thấy số lượng của các tế bào sắc tố ở vùng thương tổn không tăng so với vùng da lành nhưng các hạt melanosome trong các tế bào sắc tố to ra làm tăng cường sản xuất sắc tố melanin.



Hình 1.13. Hình ảnh dát hồng (thể viêm)

+ Thể viêm: thương tổn là các dát màu hồng nhạt (dát viêm hay tăng, giảm sắc tố). Hiện tượng này do *Malassezia* tương tác với da gây nên quá trình viêm giải phóng các cytokin, chymokin, kích thích sản xuất các interleukin. Tổn thương thường lan rộng trên một vùng cơ thể, vảy da khó quan sát bằng mắt thường, khi nạo bằng dao cùn hoặc dùng băng dính trong, có thể thấy vảy da.

+ Thể theo vị trí tổn thương: Thể thông thường xuất hiện ở vùng lưng, ngực, có thể mặt. Thể lang ben ở các đầu chi như cẳng tay, cẳng chân nhất là bàn tay, bàn chân được coi là thể đặc biệt (thể đầu chi). Tổn thương của thể này tương tự thể thông thường, các dát thường đứng đơn độc ở mặt mu tay, mu chân, không bao giờ thấy tổn thương ở lòng bàn tay, bàn chân.



Hình 1.14. Hình ảnh lang ben ở vùng sinh dục (a), ở bàn tay (b)

+ Thể theo tuổi: bệnh ít gặp ở trẻ em, thương tổn thường là các dát giảm sắc tố, xuất hiện ở mặt, cổ, đứng đơn độc hoặc thành đám. Thể lang ben gặp ở người già, thương tổn có thể là dát giảm sắc tố hoặc nâu, thường xuất hiện ở vị trí điển hình như: lưng, ngực. Bệnh tiến triển trong thời gian dài, đứng đơn độc hoặc thành đám.

+ Thể đảo ngược: Thường gặp vị trí các mặt gấp tay và chân

+ Thể theo hình thái thương tổn: hình vòng cung (circinate), thể teo (atrophic)



Hình 1.15. Hình ảnh lang ben thể vòng cung (a) và thể viêm nang lông (b)

+ Thể viêm nang lông: chủ yếu ở phụ nữ trẻ, đặc trưng bởi các sẩn và mụn mủ ở nang lông, kèm ngứa, thường gặp ở thân mình, cánh tay, cổ và ít khi ở mặt. *M. furfur* phát triển quá mức xâm nhập sâu vào trong nang lông, giải phóng các chất trung gian từ men lipase, dẫn tới quá trình viêm. Xét nghiệm thấy dạng tế bào nấm men, ít gặp dạng sợi nấm.

1.2.4.3. Chẩn đoán xác định

❖ **Biểu hiện lâm sàng**

- Thông thường thể điển hình dễ nhận biết hình thái lâm sàng:
 - + Đám vảy da ranh giới rõ từ trắng, hồng đến nâu hoặc hỗn hợp
 - + Thương tổn mất sắc tố
 - + Sẩn mào đay nang lông

- Vị trí: chủ yếu vùng cổ, ngực, lưng, liên bả cột sống, có thể lan ra vai, cánh tay, và vùng bụng, đùi. Hiếm khi thấy cẳng tay, cẳng chân, hầu như không thấy lòng bàn tay, bàn chân.

- Soi đèn Wood: Phát quang dưới ánh đèn wood màu vàng lưu huỳnh, kể cả thương tổn mắt thường không nhìn thấy.

- Cơ năng: ngứa khi ra mồ hôi.

❖ *Cận lâm sàng*

- Xét nghiệm trực tiếp: Dùng KOH 20% + ParkerTM blue black ink tỷ lệ (1:2) soi trực tiếp dưới kính hiển vi. Nhận định hình thái, số lượng và mật độ *Malassezia*.

- Nuôi cấy và định danh loài *Malassezia* gây bệnh.

- PCR sequencing: dựa trên đoạn DNA đặc trưng nhằm xác định loài nấm.

1.2.4.4. Chẩn đoán phân biệt

+ Chàm khô (pityriasis alba): thương tổn là dát giảm sắc tố trên có vảy phấn. Kích thước đám thương tổn từ 1 – 2 cm đường kính. Vị trí khu trú ở mặt, cánh tay, cẳng tay.

+ Giảm sắc tố sau viêm của các bệnh lý khác

+ Bạch biến: dát giảm sắc tố ranh giới rõ, bờ thẫm màu, thường đối xứng, không có vảy, liên quan đến các bệnh lý tự miễn

+ Phong thể I: dát giảm sắc tố mất cảm giác đau và nóng, lạnh.

+ Viêm da dầu: thường gặp ở vùng da đầu, thương tổn cơ bản là các dát đỏ, trên có vảy da kèm theo gàu ở da đầu.

+ Vảy phấn hồng Gilbert: thường gặp ở trẻ em, thương tổn là dát màu hồng, xung quanh gờ cao, có vảy phấn, ở giữa hơi lõm. Thương tổn thường ở vùng mạng sườn hoặc đùi. Bệnh tự khỏi sau 4 – 6 tuần.

+ Nấm thân mình: điển hình là bệnh hắc bào, dấu hiệu đầu tiên là ngứa vùng bị bệnh, sau đó xuất hiện một vết màu hơi đỏ, tổn thương bờ rõ, trung tâm có xu hướng lành, xung quanh có mụn nước lấm tấm xung quanh, lan rộng tạo thành hình đa cung.

+ Giang mai II: Dát giảm sắc tố, đen trong thời kỳ II của giang mai là vết tích của đào ban giang mai II, kèm theo sưng hạch ngoại vi không đau. Xét nghiệm huyết thanh chẩn đoán giang mai dương tính.

+ Vảy nến thể giọt: dát đỏ ranh giới rõ, trên có vảy da dễ bong. Vị trí tập trung vùng tì đè.

+ Viêm nang lông do nguyên nhân khác, đặc biệt viêm nang lông có ngứa và trứng cá.

1.2.5. Điều trị bệnh lang ben

1.2.5.1. Giáo dục sức khỏe

Giáo dục sức khỏe (GSDK) là một phần quan trọng trong chiến lược điều trị lang ben.

GDSK ở đây chủ yếu là hướng dẫn cho bản thân người bệnh hiểu rõ đặc tính của lang ben là bệnh lý nhiễm nấm, tiến triển mạn tính, dai dẳng, dễ tái phát. *Malassezia* là vi nấm gây bệnh lang ben, thuộc vi hệ, vì vậy mục tiêu của điều trị là nhằm kiểm soát bệnh, phòng tái phát.

GDSK bao gồm phòng tránh các yếu tố thúc đẩy làm nặng thêm tình trạng bệnh như sử dụng xà phòng, chất tẩy rửa, gây tổn hại đến hàng rào bảo vệ da, tạo điều kiện cho vi nấm phát triển. Vệ sinh thân thể, là luộc quần áo trước khi mặc cũng là một phần quan trọng trong chiến lược điều trị.

Ngoài ra, cần giải thích cho bản thân người bệnh hiểu *Malassezia* là vi nấm thuộc vi hệ da bình thường, gây bệnh cơ hội khi gặp điều kiện thuận lợi nên khó lây, ngoài ra có thể gây ra nhiều bệnh lý khác nhau. Do đó, việc phòng bệnh không chỉ giúp điều trị bệnh lang ben mà còn hạn chế khởi phát một số bệnh liên quan *Malassezia* viêm da dầu, viêm da cơ địa, viêm nang lông...

1.2.5.2. Điều trị tại chỗ

Lang ben là bệnh nhiễm nấm nông trên da, do *Malassezia* ký sinh vi hệ lớp sừng gây nên. Trên thực tế có hai quan điểm điều trị bệnh lang ben: (1) dùng thuốc kháng nấm và (2) không dùng thuốc kháng nấm. Một số tác giả cho rằng, bệnh do nấm ký sinh vi hệ ở lớp sừng có thể dùng một số biện pháp điều trị mà không cần dùng thuốc kháng nấm. Do đó, sử dụng các hoạt chất có tính bạt sừng (acid salicylic) làm bong vảy da nơi vi nấm ký sinh, qua đó loại trừ nấm ra khỏi cơ thể. Shi T.W. và cs (2015) sử dụng một hoạt chất khác là adapalene (có nguồn gốc là vitamin A acid) kết hợp với ketoconazole 2% dạng kem để điều trị lang ben, kết quả thu được sau 4 tuần, tỉ lệ khỏi là 92% [71].

Malassezia thuộc vi hệ da người bình thường và chúng có mặt ở khắp mọi nơi trên cơ thể: da đầu, mặt, lưng, ngực... Do đó, với phương pháp điều trị không dùng thuốc kháng nấm khó áp dụng với thương tổn lan tỏa, mạn tính dai dẳng. Phương pháp bôi tại chỗ nên được áp dụng trong một số trường hợp đặc biệt với diện tích thương tổn nhỏ, bị lặn đầu, dị ứng thuốc kháng nấm, không dùng thuốc đường uống do một số bệnh lý gan thận... Các tác giả khuyên dùng hàng ngày một loại xà phòng có thành phần acid salicylic và lưu huỳnh đóng vai trò như một chất diệt nấm, tuy tỏ ra hiệu quả nhất định nhưng hiện nay không được ưa dùng bởi mùi hôi hám khó chịu và những độc tính của thành phần sulfur lưu huỳnh có trong xà phòng Sastid có thể kích ứng da như: đỏ rát, khô da và bong tróc da. Một số tác giả khác khuyên bệnh nhân sử dụng các phương pháp làm thay đổi pH da nhằm thay đổi môi trường thuận lợi dẫn tới kìm hãm sự phát triển của nấm vì cho rằng *Malassezia* ưa phát triển trong môi trường kiềm. Trên thực tế, không phải bất kỳ loài *Malassezia* nào cũng có tính chất ưa kiềm; *M. furfur* có enzym MfTam1 phát triển ở pH da kiềm (pH= 8,0) nhưng *M. globosa* với enzym MgLip2 phát triển ở pH gần

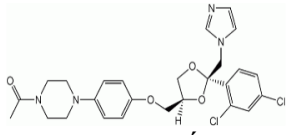
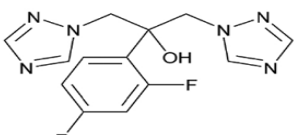
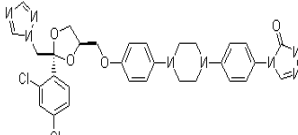
với da bình thường của người (pH = 6,0) trong khi đó pH da người bình thường Việt Nam trung bình pH = 5,5 [51],[45]. Do vậy, việc thay đổi pH da không phải lúc nào cũng mang lại nhiều hiệu quả trong điều trị.

1.2.5.3. Điều trị toàn thân

Hiện nay, các phương pháp điều trị bệnh lang ben bằng thuốc kháng nấm nhóm azole trong đó chủ yếu sử dụng phổ biến 3 thuốc: itraconazole, ketoconazole và fluconazole.

Các thuốc kháng nấm azole

Bảng 1. 6. Các thuốc kháng nấm nhóm azole

	Ketoconazole	Fluconazole	Itraconazole
Bản chất	+ Imidazole + Công thức hóa học: $C_{28}H_{28}Cl_2N_4O_4$	+ Triazole + Công thức hóa học: $C_{13}H_{12}F_2N_6O$	+ Triazole + Công thức hóa học: $C_{35}H_{38}Cl_2N_8O_4$
Cấu trúc	 Hình 1.16. Cấu trúc ketoconazole	 Hình 1.17. Cấu trúc fluconazole	 Hình 1.18. Cấu trúc itraconazole
Cơ chế	+Ức chế enzym lanosterol 14 α -demethylase +Ngăn tổng hợp ergosterol	+Ức chế cytochrom P ₄₅₀ 14-alpha-demethyl-lase +Ngăn tổng hợp ergosterol +Ái lực với cytochrom P ₄₅₀ mạnh hơn imidazole	+ Ức chế chọn lọc mạnh men 14 α - demethylase + Ức chế tổng hợp ergosterol +Ái lực với cytochrom P ₄₅₀ mạnh hơn imidazole
Tác dụng	Kìm hãm sự phát triển của nấm	Kìm hãm sự phát triển của nấm	Kìm hãm sự phát triển của nấm
Hấp thu	Hấp thu tốt qua đường uống	Hấp thu qua đường uống, không bị ảnh hưởng bởi thức ăn	Hấp thu tốt qua đường uống
Sinh khả dụng	+ Nồng độ đỉnh: 1-2h (3,5 mcg/ml sau uống liều 200mg)	+ đường uống $\geq 90\%$ đường tĩnh mạch + Nồng độ đỉnh: 1-2h + Nồng độ ổn định: 5-7 ngày + Bán hủy: 30h	+ Nồng độ đỉnh: 2-5h + Bán hủy: 17h
Phân bố	tồn tại rất lâu trong lớp thượng bì của da cho đến khi bị thải trừ, có thể kéo dài tới 3 tháng	Trong sữa mẹ, dịch khớp, nước bọt, đờm và dịch âm đạo, dịch màng bụng tương tự như huyết tương	Xâm nhập tốt vào dịch cơ thể

Thải trừ	Qua gan (90%) và qua thận (10%)	qua thận (90%) và qua gan (10%)	Qua thận (10%) và qua gan (90%)
Dạng thuốc	+Dạng uống +Dạng tại chỗ: thuốc nước, kem bôi da, xoa tắm và dầu gội đầu	+ Dạng uống + Dạng tiêm	+ Dạng uống
Tác dụng phụ	FDA khuyến cáo về tác dụng phụ nguy hiểm của uống ketoconazole và bị cấm lưu hành tại Mỹ từ năm 2013 [72]	Hiếm xảy ra: Đau đầu, chóng mặt, buồn nôn, nôn, đau bụng, ỉa chảy, tăng men gan, nổi ban, ngứa, tróc vảy	Đau đầu, chóng mặt, buồn nôn, nôn, đau bụng, ỉa chảy, tăng men gan, nổi ban, ngứa, tróc vảy
Tương tác thuốc	(1) gây cảm ứng enzym, (2) các thuốc cùng chuyển hóa qua cytoCHROM P ₄₅₀ ở gan, (3) thuốc ức chế HMG- CoA reductase; (4) thuốc ức chế miễn dịch	Tăng thời gian prothrombin; tăng các triệu chứng tâm thần khi phối hợp benzodiazepin; gây xoắn đĩnh khi sử dụng cùng cisapride; giảm tác dụng thuốc điều trị đái tháo đường; tăng nồng độ theophyllin trong huyết thanh xấp xỉ 13% và dẫn đến ngộ độc	sulfamid kháng tiểu đường, thuốc kháng đông máu kháng vitamin K, benzodiazepin, rifampicin, thuốc tránh thai, bosentan (thuốc kháng sốt rét), thuốc giảm đau không steroid, theophylline, paracetamol, astemizole

Lựa chọn thuốc trong điều trị bệnh lang ben

Ketoconazole là thế hệ đầu tiên của nhómazole ra đời năm 1980. Tuy có cấu trúc khác itraconazole nhưng tác dụng dược lý và hiệu quả tương đương nhau. Gần đây, khi FDA (Cục quản lý thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ) công bố ketoconazole có nguy cơ gây độc tính suy gan thận cấp khi sử dụng đường uống và chỉ chấp nhận dùng dưới dạng chế phẩm tại chỗ; ketoconazole 2% dạng gel hoặc dầu gội [72]. Vì lẽ đó, itraconazole được thay thế và trở thành thuốc kháng nấm đường uống đầu tay. Năm 2003, nghiên cứu mù đôi ngẫu nhiên thử nghiệm lâm sàng so sánh giữa ketoconazole kem 2% kết hợp với adapalene gel 0,1% dùng một lần mỗi ngày x 2 tuần và ketoconazole kem 2% x 2 lần/ ngày x 2 tuần [73]. Sau 4 tuần khám và xét nghiệm nấm, tỷ lệ khởi cao ở cả 2 nhóm, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (92% và 79%, p= 0,009). Tính hiệu quả và an toàn được chứng minh qua nhiều nghiên cứu:

dầu gội ketoconazole 2% hiện nay là lựa chọn ưu tiên khi phòng ngừa tái phát và kiểm soát bệnh lang ben trong thời gian dài mà rất an toàn, tiện dụng. Tuy nhiên, trong quá trình điều trị, bệnh nhân gặp phải một số tác dụng phụ bao gồm cảm giác nóng rát, ban đỏ, khô da. Đồng thời, việc sử dụng đơn độc dầu gội không chữa khỏi hoàn toàn trong một số thể bệnh nặng, lan tỏa. Do đó, lời khuyên nên sử dụng kết hợp thuốc kháng nấm toàn thân đạt hiệu quả điều trị bệnh tốt hơn.

Đầu thập niên 90, fluconazole là thuốc thuộc nhóm triazole đầu tiên được nghiên cứu và đưa vào sử dụng trong điều trị bệnh lang ben. Năm 1997, Mohamed A. Amer và cs đã tiến hành thử nghiệm với 603 bệnh nhân lang ben được phân chia ngẫu nhiên vào 3 nhóm: (1) Uống 150mg fluconazole liều duy nhất mỗi tuần trong vòng 4 tuần, (2) Uống 300mg fluconazole liều duy nhất mỗi tuần trong 4 tuần, (3) Uống 300mg fluconazole liều duy nhất trong tuần 1 và 3 [74]. Kết quả sau 4 tuần tỉ lệ soi tươi nấm âm tính ở 3 nhóm lần lượt là 78%, 93% và 87%. Tác giả Bhogal và cs (2001) tiến hành so sánh ketoconazole và fluconazole, kết quả uống fluconazole 400 mg liều duy nhất cho kết quả tốt nhất về lâm sàng và xét nghiệm, đặc biệt không có bệnh nhân nào tái phát sau 12 tháng điều trị [75]. Partap R và cs (2004) so sánh hiệu quả điều trị của itraconazole và fluconazole với cùng phác đồ liều duy nhất 400 mg, kết quả cho thấy fluconazole cho hiệu quả hơn itraconazole [76]. Nghiên cứu của Phạm Thu Hiền (2014) cho thấy uống fluconazole 400 mg liều duy nhất có hiệu quả điều trị cao hơn uống itraconazole 200mg/ngày trong 7 ngày [77].

Itraconazole là nhóm thuốc kháng nấm mới thuộc nhóm azole hiện đang được sử dụng như một thuốc đầu tay ở hầu hết các bệnh nhiễm nấm nông ở da trong đó có lang ben. Thuốc thường được sử dụng đường uống. Nghiên cứu của Kose và cs (2002) trên 60 bệnh nhân được điều trị itraconazole 400mg liều duy hoặc 200 mg/ ngày trong 7 ngày, tỷ lệ khỏi bệnh ở nhóm dùng liều

duy nhất là 73,33% và có cải thiện là 16,33%, trong khi tỷ lệ ở nhóm còn lại lần lượt là 79,99% và 13,33% [78]. Korturk và cs (2002) so sánh hiệu quả của phác đồ itraconazole 200 mg/ngày trong 5 ngày với các phác đồ 400mg duy nhất/ ngày trong 3 ngày liên tiếp, kết quả hai phác đồ có hiệu quả tương đương [79]. Nghiên cứu của Mohanty và cs (2001) trên 20 bệnh nhân lang ben với phác đồ itraconazole 100mg x 2 lần/ ngày trong 7 ngày [80]. Itraconazole có hiệu quả trong 60% trường hợp trong 2 tuần sau khi điều trị và trong 80% các trường hợp sau 3 tuần. Tại Việt Nam cũng như một số nước đang phát triển sử dụng itraconazole rộng rãi cho hầu hết trường hợp nhiễm nấm gây bệnh nói chung trong đó nhiễm nấm nông nói riêng, dẫn đến nguy cơ kháng kháng thuốc kháng nấm trong tương lai không xa. Hơn nữa, itraconazole có nhiều tác dụng phụ và tương tác thuốc nguy hiểm ảnh hưởng đến tính mạng bệnh nhân.

Điều trị tại chỗ và toàn thân là hai phương pháp cơ bản cổ điển trong các bệnh da liễu nói chung và bệnh lang ben nói riêng. Trong đó, thuốc được ưu tiên là itraconazole dùng toàn thân và ketoconazole dùng tại chỗ. Tuy nhiên, trên thực tế nếu chỉ dùng thuốc bôi tại chỗ hiệu quả điều trị khoảng 50-80%, tỉ lệ tái phát sau điều trị tương đối cao. Điều trị đơn độc bằng đường uống tỉ lệ tái phát có thể gặp nhưng ít hơn khi dùng thuốc bôi đơn thuần. Gần đây, xu hướng kết hợp điều trị tại chỗ và toàn thân với mục đích loại trừ và kiểm soát vi nấm, phòng ngừa tái phát đang thử nghiệm và áp dụng rộng rãi trong thực hành lâm sàng [4]. So sánh hiệu quả điều trị khi dùng đơn độc ketoconazole dạng bôi tại chỗ với sản phẩm phổ biến dầu gội ketoconazole 2% tắm toàn thân cho hiệu quả điều trị trong khoảng 50-80%; itraconazole và fluconazole đạt khoảng 70-80%. Một điểm đặc biệt được công bố trong các nghiên cứu ketoconazole đạt hiệu quả đạt được xét nghiệm nấm âm tính sau 4 tuần rất cao, có những báo cáo lên tới 92%, tuy vậy, sau 8 tuần điều trị, tỉ lệ chữa khỏi hoàn toàn khoảng 50%.

Không giống các azole khác, fluconazole tuy hiệu quả điều trị về mặt xét nghiệm nấm âm tính sau 4 tuần thấp hơn nhưng lại đạt được tỉ lệ chữa khỏi bệnh cao. Theo một số báo cáo trong các thuốc điều trị toàn thân, tùy từng phác đồ cho hiệu quả điều trị khác nhau. Một điểm khác về itraconazole mà rất nhiều nghiên cứu đã báo cáo trong 15 năm qua, tỉ lệ tái phát sau điều trị có tỉ lệ tương đối cao [4]. Khác biệt hẳn, fluconazole có nhiều phác đồ được áp dụng trong đó; dùng liều duy nhất tỏ ra kém hiệu quả, trong khi đó, phác đồ sử dụng fluconazole 300mg mỗi tuần trong 2 tuần liên tiếp cho hiệu quả tốt nhất, đạt mức 80% và chưa có báo cáo nào về tái phát bệnh sau điều trị phác đồ này.

Một lý do quan trọng nữa, itraconazole hiện nay tại Việt Nam được coi là một phác đồ uống phổ biến cho tất cả các bệnh nhiễm nấm da bao gồm cả *Malassezia*. Việc sử dụng như vậy, có thể gây ra tình trạng kháng thuốc điều trị, sau một thời gian có thể làm giảm hiệu quả điều trị.

Vậy nên, việc kết hợp giữa thuốc điều trị tại chỗ ketoconazole 2% và fluconazole 300mg mỗi tuần trong 2 tuần đang được xem xét như một phương pháp điều trị tốt nhất trong bệnh lang ben. Đã có những nghiên cứu đánh giá hiệu quả điều trị của phác đồ này như nghiên cứu của tác giả Badri T và cs (2016) cho thấy hiệu quả điều trị bệnh lang ben tới trên 90% và chưa gặp tình trạng tái phát sau điều trị [81]. Tất nhiên, phác đồ này cần được xem xét trong thời gian lâu hơn, theo dõi tái phát sau điều trị 8, 12 tuần để có đánh giá chính xác về hiệu quả điều trị.

1.2.6. Phân bố các loài *Malassezia* và bệnh lang ben

1.2.6.1. Phân bố các loài *Malassezia* với đặc điểm lâm sàng

Malassezia là một vi nấm men thuộc vi hệ, nhiều nghiên cứu cho thấy khoảng 70-90% vi nấm có mặt trên da người khỏe mạnh [1]. Theo Gupta AK (2001), *Malassezia* hiện diện giữa vùng da khỏe mạnh và vùng da bị bệnh như: lang ben, viêm da dầu, viêm da cơ địa, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê

với $p < 0,05$ [82]. Trong nghiên cứu, tác giả nhận thấy tùy loài có mối liên quan khác nhau đến từng bệnh lý: *M. sympodialis* liên quan với viêm da cơ địa và lang ben, trong khi đó *M. globosa* liên quan đến bệnh viêm da dầu. Nghiên cứu của Nakabayashi (2000) cho biết *M. furfur* liên quan đến bệnh viêm da cơ địa và viêm da dầu, còn *M. globosa* chiếm tỉ lệ cao ở thương tổn bệnh lang ben [82]. Từ những kết quả này, tác giả cho rằng *M. globosa* có thể là căn nguyên gây bệnh lang ben. Theo Asja Prohic và L. Ozegovic (2006), *Malassezia* xuất hiện trên cả vùng da bệnh và vùng da lành trong đó loài hay gặp nhất là *M. globosa*, tiếp đến *M. sympodialis*, *M. furfur* [40]. Như vậy, các nghiên cứu trên thế giới đều chỉ ra rằng *M. globosa* có mối liên quan mật thiết với làn da khỏe mạnh và bệnh lang ben.

Theo Trần Cẩm Vân và cs (2012), *Malassezia* gặp trong nhiều bệnh lý da khác nhau bao gồm lang ben (70,1%), viêm da dầu (13,1%), viêm da cơ địa (4,8%) [27]. Khi soi trực tiếp tìm *Malassezia* tại thương tổn lang ben và da lành của bệnh nhân, mật độ vi nấm giữa hai vùng da có sự khác biệt rõ rệt, *Malassezia* trên vùng da bệnh gấp 10-20 lần vùng da lành, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Trong bệnh lang ben, *Malassezia* là căn nguyên gây bệnh và thường gặp nhất trong khoảng 20-29 tuổi [26]. Đây là đối tượng có sự phát triển mạnh mẽ nhất về mặt thể chất, hoạt động của tuyến mồ hôi cùng vận động thể lực thường xuyên tạo điều kiện cho vi nấm dễ dàng phát triển và gây bệnh. Nghiên cứu của tác giả Abbas Rasi và cs (2009) cho thấy loài thường gặp nhất là *M. globosa* chiếm 43,9% và nhóm tuổi 20-45 tuổi chiếm 45,1% [83]. Nghiên cứu của Rezvab Talaei và cs (2014) cho thấy kết quả cao hơn với loài ưu thế *M. globosa* chiếm 66% và nhóm tuổi 21-30 chiếm 37,88% [84]. Một nghiên cứu khác tiến hành ở Indonesia của Krisanty và cs cho thấy *M. furfur* là loài chiếm ưu thế mà không phải là *M. globosa* và trong nhóm này nhóm tuổi thường gặp nhất là 25-44 tuổi [85]. Nhìn chung, loài

thường gặp nhất là *M. globosa* vì là vi nấm xuất hiện thường xuyên nhất trên vi hệ da lành [86]. Do đó, khi có điều kiện thuận lợi, khả năng gây bệnh của *M. globosa* cao hơn *M. furfur*.

Liệu nấm *Malassezia* gây bệnh có phụ thuộc vào giới tính? Vấn đề này còn nhiều tranh cãi trong suốt chiều dài lịch sử nghiên cứu về *Malassezia*. Cho đến nay người ta vẫn khẳng định rằng tỉ lệ nam luôn cao hơn nữ, có lẽ do sự khác biệt giữa các khu vực địa lý, tập quán sinh hoạt, khí hậu thời tiết, môi trường... [39],[41],[87]. Tuy nhiên, khi phân tích tỉ lệ các loài *Malassezia* giữa nam và nữ, tất cả các nghiên cứu đều cho thấy không có sự khác biệt, hay nói cách khác, giới tính chỉ là một yếu tố nhỏ ảnh hưởng đến sự phát triển của nấm nói chung và không ảnh hưởng đến sự phân bố loài. Môi trường cũng có tác động vào sự phát sinh phát triển của nấm. Mặc dù chưa có một báo cáo cụ thể nào về sự khác nhau giữa thành thị và nông thôn nhưng chúng tôi cho rằng, điều kiện vệ sinh, nhất là những yếu tố tiếp xúc và tương tác với môi trường có ảnh hưởng đến sự phân bố loài này. Chính điều này cũng có thể ảnh hưởng đến khả năng gây bệnh của nấm.

Thời gian bị bệnh lang ben khác nhau tùy từng nghiên cứu, dao động trong khoảng từ vài ngày và có thể đến nhiều năm. Karakas và cs (2009) cho biết có 74,2% bệnh diễn biến dưới 1 năm, 2 trường hợp bệnh trên 10 năm [88]. Một nghiên cứu ở Indonesia của tác giả Krisanty và cs cho thấy, thời gian bị bệnh từ 1 tháng đến 1 năm chiếm 72,4% trường hợp [85]. Như vậy, nhìn chung *Malassezia* spp. gây bệnh lang ben có xu hướng tiến triển mạn tính. Karakas và cs (2009) cho thấy *M. globosa* là loài thường gặp nhất với thời gian mắc bệnh dưới 1 năm và từ 1-5 năm, *M. furfur* chỉ gặp ở thời gian bị bệnh trên 5 năm [88]. Nghiên cứu của Krisanty và cs nhận thấy có mối liên quan giữa loài nấm với thời gian bị bệnh: *M. globosa* có liên quan đến thời gian bị bệnh dưới 1 tháng, từ 1 đến 12 tháng hoặc trên 12 tháng, còn *M. furfur*

không gặp ở đối tượng mắc bệnh dưới 1 tháng [85]. Nhìn chung, trong tất cả loài phân lập được của nghiên cứu này, khoảng thời gian từ 1 tháng đến 12 tháng là thường gặp nhất.

Biểu hiện lâm sàng bệnh lang ben là những dát thay đổi màu sắc loang lổ trên da ảnh hưởng nhiều đến thẩm mỹ và tâm lý bệnh nhân. Dát sắc tố có thể là dát tăng sắc tố, dát giảm sắc tố hoặc dát hồng. Bản chất của những loại dát này là do sự tương tác của vi nấm men *Malassezia* với cơ thể vật chủ. Theo tác giả Pepertua ở Nigeria (2014), dát tăng sắc tố chiếm 85,5%, dát giảm sắc tố chỉ chiếm 14,5% và không có dát hỗn hợp [89]; Krisanty và cs (2008) có kết quả 64,3% dát giảm sắc tố, chỉ 19,4% dát tăng sắc tố, khác biệt nghiên cứu của chúng tôi là dát tăng sắc tố chiếm đa số [85]; Talae và cs (2014) với 50% dát tăng sắc tố [84]; Karakas và cs với 47,4% [88]. *M. globosa* từ nghiên cứu của các tác giả khác đều cho thấy liên quan nhiều nhất đến các dát tăng sắc tố: Talae và cs (2014) với 31/50 trường hợp, Karakas và cs (2009) với trên 60% trường hợp, Prohic và cs (2006) tại Bosnia với trên 70% trường hợp [88], [84], [40]. Crespo nhận định *M. globosa* là căn nguyên chính trong bệnh lang ben [86]. Hiện nay nhiều nghiên cứu tìm thấy mối liên quan giữa *M. furfur* với các dát giảm sắc tố hay dát giảm sắc tố thông qua khả năng sản xuất các acid azelaic, một chất có tác dụng ức chế tyrosin kinase, qua đó ức chế trực tiếp quá trình hình thành sắc tố trên da [70].

Các loài *Malassezia* là nấm men phụ thuộc lipid (trừ *M. pachydermatis*) thông qua hệ thống enzym do chúng tiết ra quyết định sự tồn tại và phát triển ở những vị trí khác nhau trên cơ thể: lưng, ngực, bụng là những vị trí thường quan sát thấy còn mặt, cổ, chi trên, chi dưới là những vị trí ít gặp hơn. Có lẽ liên quan đến những vị trí trên cơ thể thường xuyên tiết nhiều mồ hôi, hoặc tiếp xúc với ánh sáng mặt trời. *M. globosa*, vị trí gây bệnh chủ yếu là lưng và da đầu. *M. furfur* và *M. dermatis* gây bệnh ở vùng lưng ngực, ít gặp da đầu.

Điều này phù hợp với nhận định của nhiều tác giả về những tổn thương trên da đầu chủ yếu do *M. globosa*. Trong nghiên cứu của Ben Salah và cs (2005), Krisanty và cs (2008), Karakas và cs (2009) đều gặp *M. globosa* chủ yếu ở da đầu, rất hiếm khi gặp *M. furfur* [90],[85],[88]. Theo Prohic và cs (2006), *M. globosa* liên quan với các mức độ bệnh khác nhau [40]. Tác giả ghi nhận hơn 60% trường hợp nhiễm *M. globosa* ở mức độ bệnh vừa và nặng. Tác giả không ghi nhận trường hợp nào mắc *M. slooffiae* ở mức độ bệnh nặng. Một số loài như *M. furfur*, *M. sympodialis* đều thấy ở các mức độ bệnh khác nhau, có thể liên quan đến khả năng gây bệnh của mỗi loài cũng như tính chất ký sinh vi hệ từng loài mà có liên quan ảnh hưởng ít nhiều đến các mức độ bệnh nặng nhẹ khác nhau. *Malassezia* spp. tồn tại vi hệ chủ yếu dưới dạng tế bào nấm men. Theo Prohic và cs (2006) cho biết 97,8% nấm *Malassezia* trở thành tác nhân gây bệnh cơ hội khi chuyển đổi hình thái từ dạng men thành dạng sợi và tế bào nấm men [40].

1.2.6.2. Phân bố các loài *Malassezia* với kháng sinh kháng nấm

Mối liên quan giữa loài nấm gây bệnh và thuốc điều trị được nhiều tác giả quan tâm nghiên cứu. Trong phòng thí nghiệm, khi so sánh nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ ức chế tối đa (MIC 50 và MIC 90) của một số thuốc kháng nấm thường dùng đều ở mức rất thấp. Nhưng khi so sánh các thuốc trong nhóm azole ở giá trị MIC 50 và MIC 90, người ta nhận thấy fluconazole có giá trị MIC cao hơn so với các thuốc cùng nhóm như: Itraconazole, ketoconazole thậm chí một số thuốc nhóm azole mới ra đời như voriconazole, posaconazole... Đánh giá dược lực học của thuốc kháng nấm, cần hiểu biết mối liên quan giữa nồng độ và tác dụng kháng nấm. Giá trị này của fluconazole cao hơn rất nhiều so với itraconazole [91]. Hiện nay, tại Việt Nam, itraconazole được coi là thuốc sử dụng đầu tay và chỉ định rộng rãi trong điều trị nhiều bệnh lý do nấm gây ra. Tuy nhiên, đi cùng với thói quen

đó, những hậu quả nguy hiểm về sử dụng thuốc tràn lan; gia tăng tình trạng kháng thuốc cùng với việc điều trị thất bại bởi một số loài nấm men ẩn sâu trong lớp niêm mạc mà khi thuốc dùng không đủ liều, ngắn hạn sẽ không tiêu diệt được hết vi nấm. Sau đó, chúng lại phục hồi và tái hoạt động khi gặp điều kiện thuận lợi.

Một vấn đề quan trọng thường gặp phải trong lâm sàng là hiện tượng kháng thuốc. Một vi nấm được coi là đề kháng thuốc điều trị khi nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của vi nấm đó cao hơn MIC của các loài vi nấm khác cùng loài [92]. Thực tế một loài gọi là “đề kháng” khi nồng độ kháng sinh mà vi nấm có thể chịu đựng được tăng cao hơn nồng độ kháng sinh đạt được trong cơ thể sau khi dùng thuốc. Tóm lại, hiện tượng một vi nấm được coi là đề kháng với kháng sinh khi trong môi trường có thuốc kháng nấm mà chúng vẫn sinh sản và phát triển bình thường. Đáng lưu tâm hơn nữa về tác dụng chọn lọc của thuốc kháng nấm bởi khi dùng rộng rãi nhất là không đúng và đủ liều thì chính kháng sinh đó sẽ chọn lọc và giữ lại những dòng vi nấm đề kháng. Một vấn đề khác đáng quan tâm là hiện tượng đề kháng chéo: sự đề kháng với kháng sinh này có thể gây ra sự đề kháng với kháng sinh khác [93]. Để hạn chế hiện tượng này, các tác giả khuyến cáo nên điều trị phối hợp hoặc dùng liều duy nhất, ngắt quãng nhằm rút ngắn thời gian và tăng hiệu quả điều trị. Đồng thời, tuân thủ nguyên tắc sử dụng thuốc kháng nấm phải theo bậc thang và ưu tiên lựa chọn kháng sinh thế hệ trước nhạy cảm. Do vậy, tuy fluconazole là thuốc kháng nấm thế hệ cũ nhưng được sử dụng nhiều, đặc biệt hiệu quả đối với *Malassezia* spp. Các nghiên cứu lâm sàng cho thấy hiệu quả điều trị vi nấm đạt từ 70 - 80% và không có sự khác biệt so với itraconazole.

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Tất cả bệnh nhân đến khám được chẩn đoán lâm sàng bệnh lang ben và xét nghiệm soi tìm nấm dương tính tại Bệnh viện Da liễu Trung ương từ tháng 01/2016 đến tháng 12/2016.

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu cho mục tiêu 1

❖ Tiêu chuẩn chẩn đoán

Lang ben được chẩn đoán theo bệnh học Da liễu (2009) [94]:

➤ Lâm sàng

+ Dát thay đổi màu sắc: Trắng, nâu hoặc hồng

+ Vị trí: mặt, cổ, lưng, ngực, bụng, tay, chân, da đầu

+ Bề mặt thương tổn có vảy da ẩm, mỏng và dễ bong

➤ Cận lâm sàng: Soi tìm nấm từ vảy da có hình ảnh là sợi nấm thô ngắn và đám bào tử tròn.

❖ Tiêu chuẩn lựa chọn

- Bệnh nhân được chẩn đoán lâm sàng bệnh lang ben [94]. Lâm sàng trên da có dát thay đổi màu sắc (Trắng, nâu hoặc hồng). Vị trí chủ yếu: lưng, ngực, bụng, tay, vai, cổ. Bề mặt thương tổn phủ lớp vảy da ẩm, mỏng và dễ bong.

- Xét nghiệm soi trực tiếp tìm nấm từ vảy da dương tính.

- Bệnh nhân không giới hạn độ tuổi

- Không dùng thuốc kháng nấm, bong sừng bạt vảy trước đó 7 ngày

- Đồng ý tham gia nghiên cứu

❖ Tiêu chuẩn loại trừ

- Không đồng ý tham gia nghiên cứu

- Bệnh nhân dùng thuốc kháng nấm, bong sừng bạt vảy trước đó 7 ngày

2.1.2. Đối tượng nghiên cứu cho mục tiêu 2

❖ Tiêu chuẩn chẩn đoán

Lang ben được chẩn đoán theo bệnh học Da liễu (2009) [94]:

➤ Lâm sàng

+ Dát thay đổi màu sắc: Trắng, nâu hoặc hồng

+ Vị trí: mặt, cổ, lưng, ngực, bụng, tay, chân, da đầu

+ Bề mặt thương tổn có vảy da ẩm, mỏng và dễ bong

➤ Cận lâm sàng: Kết quả xét nghiệm nuôi cấy định danh loài *Malassezia* gây bệnh

❖ Tiêu chuẩn lựa chọn

- Bệnh nhân lang ben có xét nghiệm nuôi cấy định danh loài *Malassezia* gây bệnh

- Bệnh nhân trên 16 tuổi

- Không dùng thuốc kháng nấm, thuốc bong sừng bạt vảy trước đó 7 ngày

- Bệnh nhân tuân thủ điều trị

- Đồng ý tham gia nghiên cứu

❖ Tiêu chuẩn loại trừ

- Bệnh nhân đang có thai hoặc cho con bú.

- Bệnh nhân bôi thuốc kháng nấm, thuốc bong sừng bạt vảy trước đó 7 ngày

- Tiền sử dị ứng với fluconazole, ketoconazole, itraconazole.

- Hiện tại mắc một số bệnh như suy gan, thận, bệnh toàn thân nặng hoặc suy giảm miễn dịch như: HIV/AIDS, tim mạch, nấm sâu, bệnh nấm da khác...(Hỏi tiền sử, khám lâm sàng và bằng chứng xét nghiệm).

- Không tuân thủ điều trị.

- Không đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.2. Địa điểm, thời gian nghiên cứu

❖ Địa điểm

- Khoa Khám bệnh và khoa Xét nghiệm Nấm-vi sinh- ký sinh trùng Bệnh viện Da liễu Trung Ương.

- Khoa xét nghiệm Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung Ương.

❖ Thời gian tiến hành

- Từ tháng 01/2016 đến tháng 12/2016

2.3. Vật liệu, dụng cụ nghiên cứu

2.3.1. Vật liệu, dụng cụ nghiên cứu cho mục tiêu 1

❖ *Dụng cụ thăm khám*

- Kính lúp
- Dermoscopy
- Đèn wood

❖ *Vật liệu soi trực tiếp tìm nấm*

- Dung dịch KOH 20%
- Dung dịch ParkerTM blue black ink
- Thuốc nhuộm Lactophenol blue
- Dao cùn vô khuẩn, băng dính trong
- Lam kính, lá kính
- Giá đỡ lam, lá kính
- Kính hiển vi quang học

❖ *Vật liệu nuôi cấy định danh*

- Dao cùn vô khuẩn, băng dính trong
- Lam kính, lá kính
- Giá đỡ lam, lá kính
- Kính hiển vi quang học

- Tủ ấm nuôi cấy nấm
- Tủ an toàn sinh học bậc II
- Hộp đựng dụng cụ khử khuẩn
- Môi trường nuôi cấy, định danh
- + Sabouraud dextro agar, mDixon
- + Catalase, Cremophor, Urease, TE, Esculin.
- + Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80
- + CHROM agar *Malassezia*

❖ **Vật liệu PCR sequencing**

- Vật liệu PCR
 - + Thành phần các chất tham gia phản ứng (được tối ưu trong điều kiện nghiên cứu): Nước cất; X 10 PCR buffer; dNTP 1,25 mM; MgCl₂ 25 mM; Ampli Taq polymerase 5U; Primer 1 (10 μM).
 - + Trang thiết bị cơ bản làm PCR: Máy điều nhiệt tự động (PCR) GenAmp PCR System 9700 AB (Applied Biosystems, USA); Máy điều nhiệt tự động (PCR) MasterCycler Gradient, Eppendorf (Đức); Máy ly tâm lạnh; Bộ điện di ngang Horizon®58 (Gibco-BRL); Máy soi gel Wealtec Corp Model MD-20 (USA); Máy chụp ảnh gel Geldoc (Biorad, Mỹ)
- Vật liệu đo nồng độ ADN của sản phẩm PCR
 - + Sử dụng máy Bio photometer (Đức)
 - + Tube chứa: 50μl dung dịch PBS hoặc nước cất
 - + Tube mẫu: 5 μl sản phẩm PCR + 45 μl dung dịch PBS hoặc nước cất
- Vật liệu giải trình tự gen
 - + Chạy phản ứng cho giải trình tự gen: Sử dụng bộ kit Big Dye X Terminator (Mỹ). Pha mix theo hướng dẫn của bộ kit: Big Dye Terminator (Ready mix) v3.1 cycle sequencing RR-100: 4,0 μl; Big Dye Terminator v1.1, v3.1 5X sequencing buffer: 2,0 μl; Primer (Sử dụng primer R): 1,0 μl;

ADN template (sản phẩm PCR): 2,5 µl; Nước khử ion: 10,5 µl; Tổng thể tích phản ứng: 20,0 µl.

+ Chứng dương: (1 tube). Thành phần bao gồm: Big Dyeđ Terminator (Ready mix) v3.1 cycle sequencing RR-100: 4 µl; Big Dyeđ Terminator v1.1, v3.1 5X sequencing buffer: 2 µl; pGEM-3Zf (+): 1 µl; Primer F M13(-21) trong bộ kit: 1 µl; Nước khử ion: 12 µl; Tổng thể tích phản ứng: 20 µl.

2.3.2. Vật liệu nghiên cứu cho mục tiêu 2

- Thuốc sử dụng:

+ Salgad® (Fluconazole) viên, 150mg: số đăng ký VN 3274-07. Nhà sản xuất: công ty trách nhiệm hữu hạn dược phẩm An phú – Việt Nam.

+ Spobet® (Itraconazole) viên, 100 mg: Số đăng ký VN 14580-12. Hộp 6 vỉ, mỗi vỉ 5 viên nang. Nước sản xuất: Romania.

+ Dezor® shampoo (Ketoconazole 2%), dầu gội, 60 ml: Số đăng ký VN 13169-11. Nước sản xuất: Malaysia.

2.4. Thiết kế nghiên cứu theo mục tiêu nghiên cứu

2.4.1. Phương pháp nghiên cứu mục tiêu 1

2.4.1.1. Thiết kế nghiên cứu

Mô tả cắt ngang

2.4.1.2. Cỡ mẫu nghiên cứu

Mẫu nghiên cứu được tính theo công thức tính cỡ mẫu mô tả tỉ lệ:

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

n: cỡ mẫu cho nghiên cứu nhóm bệnh

α : Hệ số tin cậy 95%, $Z_{1-\alpha/2} = Z_{\alpha/2} = 1,96$

p: tỷ lệ nuôi cấy có nấm mốc từ bệnh phẩm vẩy da bệnh nhân lang ben và có xét nghiệm soi tìm nấm dương tính $p = 0,8$

ε : giá trị tương đối (=0,06)

Kết quả tính cỡ mẫu là $n= 267$ bệnh nhân

2.4.1.3. Các kỹ thuật cho mục tiêu 1

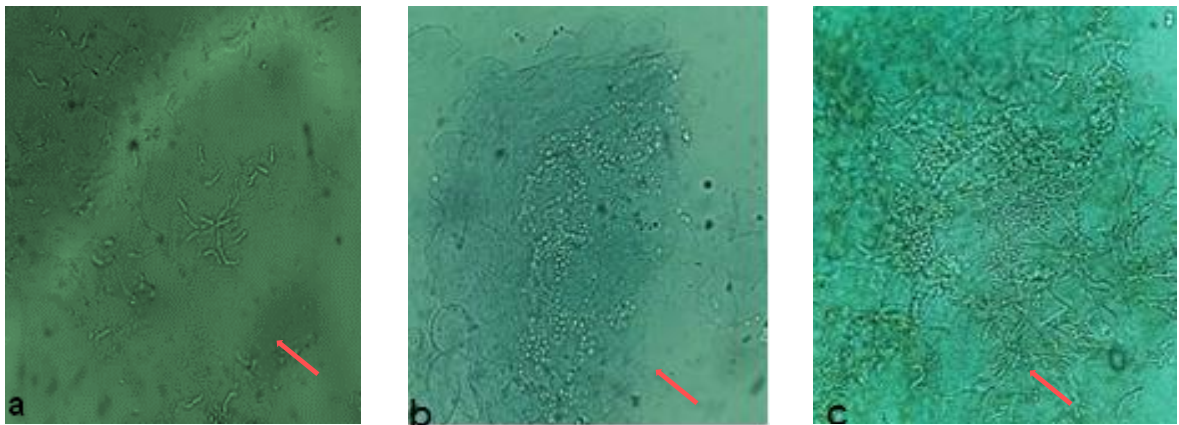
❖ **Kỹ thuật soi trực tiếp sử dụng hóa chất KOH 20% + ParkerTM blue black ink (1:2) và lấy bệnh phẩm bằng băng dính trong (dao cùn)**

- **Chọn thương tổn điển hình:**

Thương tổn da mới xuất hiện, chưa điều trị bằng các phương pháp khác, hình thái lâm sàng điển hình. Trong trường hợp có nhiều vị trí thương tổn, ưu tiên lấy bệnh phẩm theo thứ tự: lưng, ngực, bụng, cổ, mặt, tay, chân, da đầu. Mỗi bệnh nhân chỉ lấy 1 bệnh phẩm từ 1 vị trí xác định.

- **Các bước tiến hành:**

- + Sát khuẩn thương tổn bằng Ete
- + Lấy vảy da bằng dao cùn hoặc băng dính trong
- + Nhỏ 1-2 giọt hóa chất KOH 20% + ParkerTM blue black ink với tỷ lệ (1:2)



Hình 2.1. Hình ảnh sợi nấm (a), tế bào nấm men (b), sợi nấm+tế bào nấm men (c), trên KHV vật kính 40x

- **Nhận định kết quả:** Quan sát sơ bộ vi nấm ở vật kính 10x và khẳng định vật kính 40x:

+ Tế bào và sợi nấm đứng tập trung thành đám, giống hình ảnh “mì ống” và “thịt viên”: kết luận “sợi và tế bào nấm men”

+ Sợi nấm thô ngắn : kết luận “có sợi nấm”

+ Tế bào nấm men đứng thành đám hình tròn hoặc bầu dục: Kết luận hình thái và mật độ vi nấm: “có tế bào nấm men đứng tập trung thành đám”. Đồng thời đánh giá số lượng theo tiêu chuẩn V. Silva 1996 [59]: Âm tính (0 - 3 TB/VT); 1+ (4-9 TB/VT); 2+ (10- 19 TB/VT); 3+ (20- 39 TB/VT); 4+ (≥ 40 TB/VT).

❖ **Kỹ thuật nuôi cấy nấm**

- **Chọn thương tổn điển hình:** (tương tự như phần lấy bệnh phẩm kỹ thuật soi trực tiếp)

- **Cách bước tiến hành:**

+ Sát khuẩn thương tổn bằng ete

+ Lấy vảy da:

○ Kỹ thuật viên đặt dao cùn vuông góc với bề mặt thương tổn, đặt lam kính song song phía dưới dao

○ Tiến hành cạo nhẹ nhàng ở rìa thương tổn để vảy da tập trung vào giữa lam kính, tránh làm chảy máu.

○ Đối với trẻ nhỏ và người lớn thương tổn có rất ít vảy da hoặc ở vùng mặt. Tiến hành dùng băng dính trong để lấy bệnh phẩm.

+ Cấy bệnh phẩm:

○ Thạch SDA gồm 65g Sabouraud dextrose agar hòa tan vào 1000ml nước cất, thêm vào 50mg chloramphenicol, đun tan thạch. Đem hấp ước ở 121⁰C/15 phút. Để nguội 45-50⁰C, thêm 50mg cycloheximide. Lắc đều. Đổ

ống thạch nghiêng.

○ Thạch mDixon cân 106,5g Part A, hút 15ml Part B. Tất cả được hòa tan trong 1000ml nước cất. Đun sôi tan thạch. Hấp ước ở $121^{\circ}\text{C}/15$ phút. Để nguội $45-50^{\circ}\text{C}$. Điều chỉnh pH: $6,0 \pm 0,2$ bằng cách thêm nhỏ 1 vài giọt HCl 0,1N. Đổ ống thạch nghiêng.

+ Bệnh phẩm vẩy da được cấy vào môi trường SDA và mDixon, giữ trong tủ ấm 32°C và 40°C . Theo dõi trong vòng 1 tuần.

- Nhận định kết quả:

+ Quan sát khuẩn lạc:

○ Đại thể: Màu sắc kem, đục hoặc trắng sữa, bề mặt lồi, nhẵn và trơn bóng; kích thước đánh giá trên mDixon, đo các khuẩn lạc riêng rẽ: nhỏ (< 1 mm), trung bình (1-2 mm) và lớn (2-5 mm).

○ Quan sát vi thể trên kính hiển vi: Tế bào nấm hình cầu hoặc bầu dục đôi khi hình trụ hay hình đa giác, nảy chồi 1 cực hoặc nhiều cực, kích thước khoảng $2,0- 6,0 \mu\text{m} \times 1,5-4,5 \mu\text{m}$



Hình 2.2. Hình ảnh *M. furfur* (a) và *M. globosa* (b) trên mDixon

+ Kết luận “nuôi cấy có nấm mốc” và quan sát: số lượng trên 5 khuẩn lạc trong mỗi ống cấy. Khuẩn lạc thuần với đặc điểm điển hình (hình thái, màu sắc đại thể và vi thể như đã nêu trên.)

+ Kết luận “nuôi cấy không có nấm mốc” khi theo dõi môi trường nuôi cấy sau 2 tuần.

❖ **Kỹ thuật định danh loài nấm bằng nuôi cấy**

- **Chọn khuẩn lạc thuần** mang đặc điểm hình thái nấm men mọc ở các môi trường trên: đường kính khoảng 1cm, hình tròn, màu kem hoặc trắng sữa, nhẵn và trơn bóng để xác định đặc điểm các chi.

+ Trên môi trường SDA chỉ có *M. pachydermatis* mọc

+ Trên môi trường mDixon, nhận định sơ bộ khuẩn lạc:

○ *M. furfur* tròn, lồi, đục, đường kính khoảng 4-5mm.

○ *M. globosa* bờ không đều, đục, đường kính 3-5mm.

○ *M. dermatis* màu kem, tròn, lồi, đường kính 3-5mm.

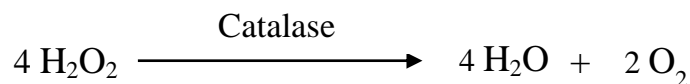
○ *M. sympodialis* trắng đục, tròn, lồi, đường kính 3-5mm, tua.

○ *M. slooffiae* trắng đục, bờ không đều, lồi ở giữa, đường kính 1-2mm.

○ *M. obtusa* trắng đục, bờ đều, lồi, đường kính 1-2mm.

- **Sự có mặt của Catalase:**

+ Nhỏ 1 giọt H₂O₂ 3% lên lam kính sạch. Dùng ống nhựa vô trùng chạm vào khuẩn lạc. Hòa loài nấm vào giọt H₂O₂.



+ Quan sát kết quả sau 5 phút:

○ Phản ứng dương tính khi tạo thành bọt khí là phản ứng dương tính.

○ Phản ứng âm tính khi không tạo thành bọt khí (huyền dịch vi nấm đục).

+ Nhận định kết quả:

○ Phản ứng của *M. restricta* là âm tính.

○ Các loài *Malassezia* còn lại có phản ứng dương tính

- **Phản ứng với Tween:**

+ Nguyên lý: Đánh giá dựa theo khả năng sản xuất trên môi trường thạch Sabouraud dextrose 16ml; Tween® 20 (C₅₈H₁₁₄O₂₆), Tween® 40 (C₆₂H₁₂₃O₂₆), Tween® 60 (C₆₄H₁₂₆O₂₆), Tween® 80 (C₆₄H₁₂₄O₂₆) và CremophorEL (CrEL) cho thấy hình ảnh đặc trưng mỗi loài *Malassezia* khác nhau. Các loại Tween 20,

Tween 40, Tween 60, Tween 80, Cremophor EL tạo huyền dịch vi nấm với một nồng độ nhất định, được hòa tan trong thạch cơ sở SDA có chứa 0,05% chloramphenicol và 0,05% cycloheximide ở nhiệt độ thích hợp. Sau khi thạch đông cứng, đục lỗ 4 lỗ xung quanh đĩa thạch, 1 lỗ ở trung tâm đĩa thạch tạo các giếng, sau đó nhỏ mỗi loại Tween vào 1 giếng theo chiều kim đồng hồ. Giếng ở giữa nhỏ CrEL.

+ Tiến hành

○ Pha chế môi trường cơ sở (SDA): Cân 65g thạch bột Sabouraud dextrose. Đong chính xác 1000ml nước cất bằng cốc đong. Tất cả được cho vào bình cầu. Cho 2 viên chloramphenicol 50mg. Lắc đều và đun tan thạch. Hấp 120⁰C/15p. Khi nhiệt độ bình thạch khoảng 45-50⁰C, thêm 0.05% cycloheximide. Lắc đều. Điều chỉnh pH= 6,0. Đong vào ống vô trùng 16ml. Đổ đĩa petri vô trùng (1).

○ Pha 3ml huyền dịch vi dịch loài nấm (được nuôi cấy thuần trên thạch mDixon sau 4-5 ngày) bằng nước cất vô trùng pha tiêm để đạt độ đục 105 CFU/ml (2) dùng độ đục 108 để ước lượng pha. Đổ vào đĩa petri (1) → Lắc đều, để thạch đông lại.

○ Dùng Punch vô trùng đục 4 lỗ (Tween) đường kính 2 mm trên 1 đĩa thạch, các lỗ cách thành 1,5 cm và cách nhau 2,5 cm và 1 lỗ ở giữa đĩa thạch (CremophorEL).

○ Đánh dấu các loại Tween theo chiều kim đồng hồ

○ Nhỏ 15µl từng loại Tween tương ứng, CrEL ở giữa đĩa

○ Để tủ ấm 32⁰C. Theo dõi kết quả 2-4 ngày

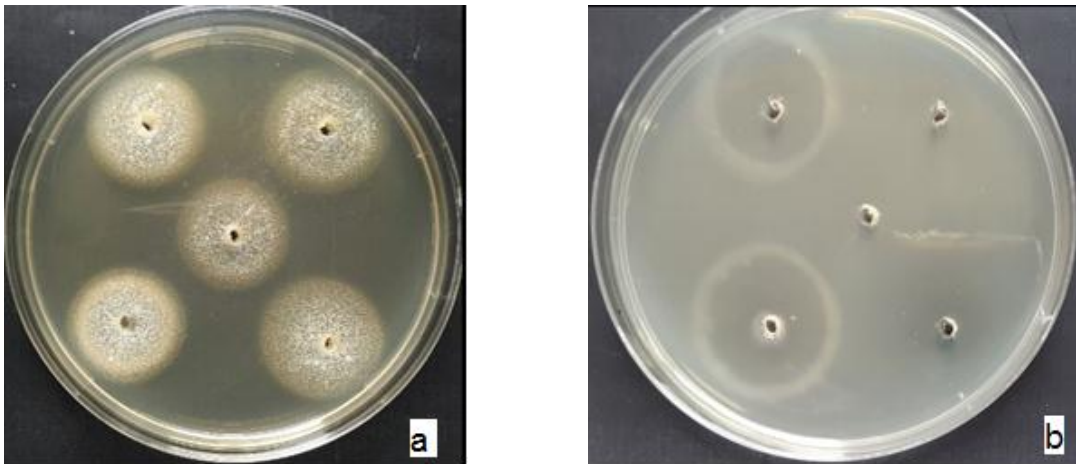
+ Nhận định kết quả:

○ Có sự hấp thu khi có nấm mọc xung quanh giếng được nhỏ Tween và CrEL tương ứng

○ Không hấp thu khi không có nấm mọc

+ Kết luận:

○ Hấp thu cả 4 loại Tween có *M. fufur*, *M. yamatoensis* và *M. dermatis*



Hình 2.3. Hình ảnh hấp thu cả 4 loại Tween của *M. furfur* (a) và không hấp thu cả 4 loại Tween của *M. globosa* (b)

- Hấp thu 2 loại Tween 40 và Tween 60: *M. japonica*.
- Không hấp thu hoặc hấp thu rất yếu Tween 20: *M. sympodialis*.
- Không hấp thu hoặc hấp thu rất yếu Tween 80: *M. slooffiae*.
- Không hấp thu cả 4 loại Tween: *M. globosa*, *M. obtusa* và *M. cuniculi*.
- Phát triển trên thạch Cremophor EL: *M. furfur* và *M. pachydermatis* phát triển, *M. sympodialis* và *M. dermatis* tùy vào từng trường hợp.

- **Nhận định hình thái, tính chất trên CHROM agar *Malassezia***

+ Tiến hành:

- Cân chính xác 56,3g CHROM agar *Malassezia*, thêm 10g Tween 40, 2g Glycerol và 1000ml nước cất cho vào bình cầu vô trùng. Khuấy đều đến khi thạch nở ra. Đun sôi ở 100⁰C, đến khi sôi tạo bọt. Làm nguội đến 45-50⁰C, điều chỉnh về pH: 6,3± 0,3 bằng dung dịch HCl 0,1N. Đổ vào đĩa petri vô trùng. Để đông.

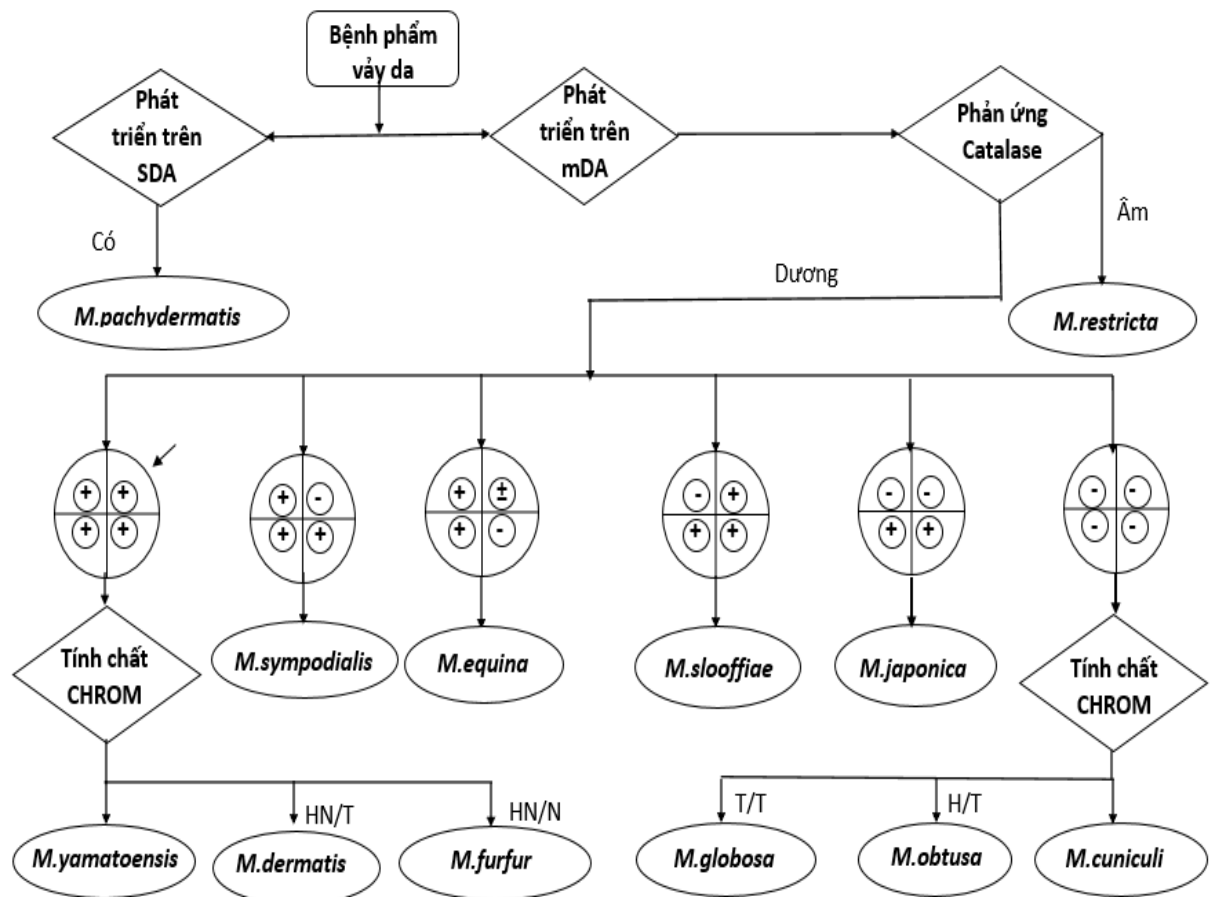
○ Ria cấy loài nấm thuần vào môi trường CHROM agar *Malassezia*. Để ủ ấm 32⁰C. Theo dõi hình thái, kích thước, màu sắc khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch.

+ Nhận định kết quả:

○ *M. furfur*: khuẩn lạc màu hồng nhạt và nếp nhăn đặc trưng có thể dễ dàng phân biệt với các loài *Malassezia* khác

○ Kích thước của khuẩn lạc trên CHROM agar *Malassezia* được đo từ các khuẩn lạc riêng rẽ và được chia thành ba nhóm: nhỏ (*M. globosa*, *M. slooffiae* và *M. restricta*), trung bình (*M. obtusa*) và lớn (*M. dermatis*, *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis* và *M. japonica*).

○ *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. globosa* và *M. dermatis* có tua



Chú thích: HN/T: Hồng nhạt/Tron; HN/N: Hồng nhạt/Nhăn; T/T: Tím/Tron; H/T: Hồng/Tron

Tween theo thứ tự chiều kim đồng hồ từ mũi tên (từ 12h): Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80

Hình 2.4. Quy trình định danh nấm *Malassezia* có cải tiến (1)

(1) Quy trình đã được Ban lãnh đạo bệnh viện phê duyệt và áp dụng tại Bệnh viện Da liễu TW

❖ Kỹ thuật xác định *Malassezia* bằng PCR sequencing

- **Nguyên tắc:** PCR là thử nghiệm nhân bản một đoạn DNA trong ống nghiệm dựa vào các chu kỳ nhiệt độ. Một chu kỳ nhiệt độ sẽ bao gồm 3 giai đoạn. *Giai đoạn biến tính:* đầu tiên nhiệt độ sẽ được đưa lên 94 °C, ở nhiệt độ này các liên kết hydro của mạch đôi DNA sẽ bị mất đi, nhờ vậy DNA đích bị biến tính thành các mạch đơn. *Giai đoạn ghép cặp:* kế đó nhiệt độ được hạ đến 55- 65°C là nhiệt độ thích hợp để các đoạn mồi tìm đến ghép cặp bổ sung vào hai đầu của đoạn DNA đích. Cuối cùng nhiệt độ được đưa lên 72 °C là nhiệt độ thích hợp cho hoạt tính của enzym Taq polymerase để kéo các đầu dNTP lại đầu 3' của đoạn mồi đang ghép cặp trên đầu 5' của sợi DNA đích để bắt nguồn cho sự tổng hợp trên mạch bổ sung. Như vậy, qua một chu kỳ nhiệt, một DNA đích đã được nhân bản thành hai bản sao, nếu chu kỳ này được lặp đi lặp lại liên tục 30 đến 40 lần thì từ một DNA đích đã được nhân bản được thành 2^{30} đến 2^{40} bản sao, tương đương đến hàng tỷ bản sao.

- Kỹ thuật điện di sản phẩm PCR

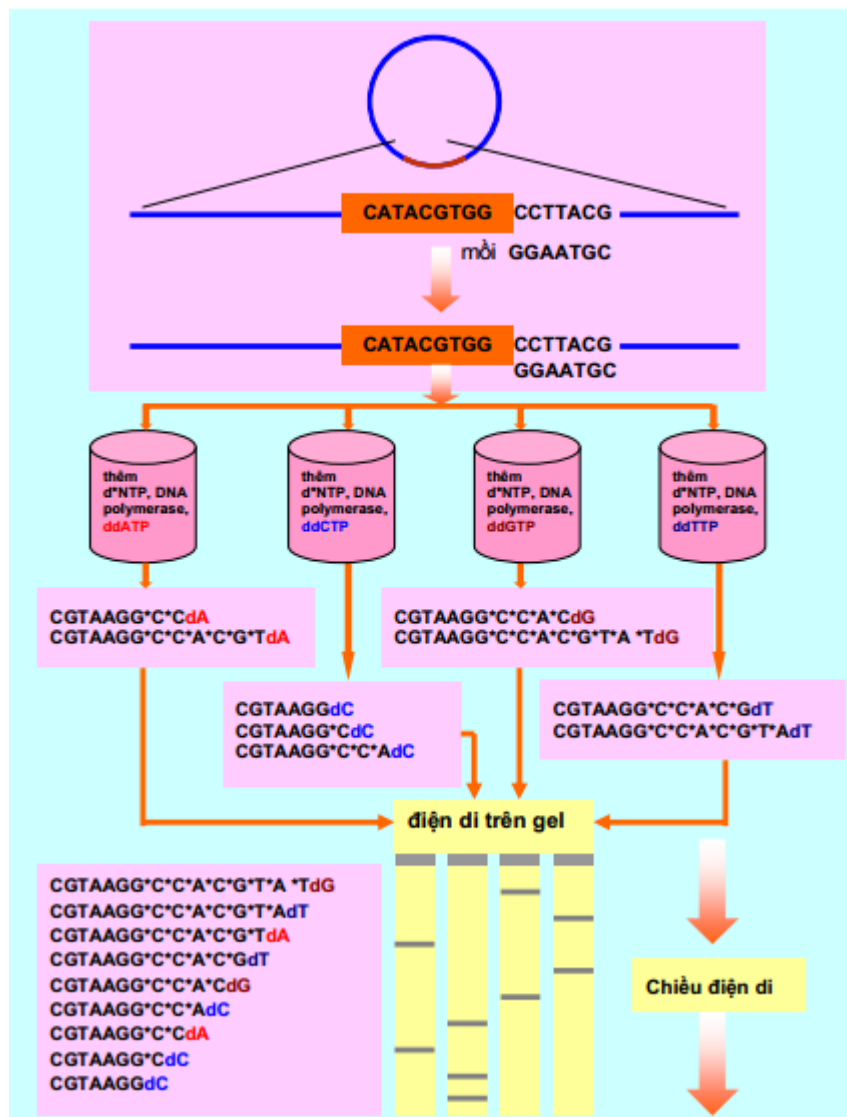
+ Điện di các sản phẩm sau khi chạy PCR trên gel agarose 1,2% với dung dịch đệm TAE.

+ Chuẩn bị gel Agarose 1,2%: Đun sôi cho tan hoàn toàn agarose trong đệm TAE bằng lò vi sóng. Đợi nhiệt độ gel hạ xuống 56-60°C, trộn 1x thể tích gel red và đổ gel vào phiến nhựa điện di (6 x 5,5 cm hoặc 6 x 11 cm tùy theo số lượng mẫu cần điện di). Phiến được đặt thẳng bằng trên mặt phẳng nằm ngang đã đặt sẵn lược.

+ Để gel đông lại (khoảng 30 phút ở nhiệt độ phòng), gỡ bỏ lược, đặt bản gel vào buồng điện di ngang sao cho chìm hẳn trong dung dịch đệm TAE.

+ Dùng micropipette cho các sản phẩm PCR vào các giếng của bản gel. Với các gel sử dụng răng lược nhỏ, dùng 10 µl mẫu cho mỗi giếng.

- + Điện di với hiệu điện thế 120V, cường độ dòng điện 100 mA trong thời gian 30 phút.
- + Các mẫu thực nghiệm được điện di song song cùng với chúng âm và dương.
- + Luôn có thang ADN chuẩn để đối chiếu kết quả khi đọc.
- o Bản gel sau khi điện di được soi trên ánh đèn cực tím, các vạch ADN trên bản gel sẽ phát sáng dưới ánh đèn cực tím.
- o Đọc kết quả bằng máy GelDoc (BioRad) và chụp ảnh bằng phần mềm chuyên dụng.



Hình 2 5. Sơ đồ nguyên lý kỹ thuật PCR sequencing

- Kỹ thuật đo nồng độ ADN của sản phẩm PCR

+ Đo ở bước sóng 260 nm: 1 đơn vị = 50 µg/ml

+ Đọc kết quả: Lượng ADN có trong mẫu (µg/ml) $\times 10 \times 10^3 / 10^3 (\mu\text{l}) =$ nanogram (ng)/µl ($\times 10$: Độ pha loãng 10 lần, $\times 10^3 / 10^3$: đổi đơn vị từ µg/ml sang ng/µl).

- Kỹ thuật giải trình tự gen: Xác định vi nấm *Malassezia*. Các trình tự nucleotide của gen 5.8S, 26S và 18S được xử lý bằng phần mềm ATGC 7.2

- Nhận định kết quả: So sánh trình tự tương đồng trên ngân hàng dữ liệu gen quốc tế NCBI (GenBank), các trình tự *Malassezia* tương đồng có giá trị cao nhất sẽ được lựa chọn.

2.4.2. Phương pháp nghiên cứu mục tiêu 2

2.4.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Mô tả cắt ngang có so sánh trước và sau điều trị

2.4.2.2. Cỡ mẫu

Công thức tính cỡ mẫu cho một tỷ lệ:

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

$Z_{1-\alpha/2}$: Hệ số tin cậy 95% (= 1,96)

Z_{β} : Lực mẫu 80% (= 0,842)

n: cỡ mẫu của nhóm điều trị bằng thuốc kháng nấm nhóm azole

p: tỷ lệ chữa khỏi, p= 0,7

ε : giá trị tương đối (=0,09)

Thay vào công thức ta có: $n = 1,96^2 \times 0,7(1-0,7)/(0,7 \times 0,08) = 203,26$

Như vậy cỡ mẫu tối thiểu trong nghiên cứu là 204 bệnh nhân.

2.4.2.3. Các kỹ thuật cho mục tiêu 2

- Chúng tôi lấy toàn bộ bệnh nhân lang ben định danh được bằng nuôi cấy thỏa mãn tiêu chuẩn lựa chọn đưa vào điều trị, quy trình thực hiện như sau:

- Giải thích cho BN: Căn nguyên bệnh lang ben và các phương pháp nghiên cứu điều trị cũng như phòng tránh bệnh

- Chia ngẫu nhiên các bệnh nhân lang ben đủ tiêu chuẩn thành 3 nhóm:

+ Nhóm 1: điều trị bằng phác đồ 1 gồm :

○ Uống Salgad[®] (Fluconazole) 300mg liều duy nhất 1 lần/tuần trong 2 tuần liên tiếp

○ Tắm gội Dezor[®] gel (Ketoconazole 2%) 2 lần/ 1 tuần thay xà phòng, lưu dầu khoảng 5-10 phút trong 2 tuần liên tiếp.

+ Nhóm 2: điều trị bằng phác đồ 2 uống Spobet[®] (Itraconazole) 200mg/ngày trong 1 tuần.

- Nhóm 3: điều trị bằng phác đồ 3 Tắm gội Dezor[®] gel (Ketoconazole 2%) hàng ngày thay xà phòng, lưu dầu khoảng 5-10 phút trong 2 tuần.

- Làm bệnh án nghiên cứu ngoại trú theo mẫu (phụ lục 1)

- Hướng dẫn bệnh nhân thực hiện theo tờ phiếu tuân thủ điều trị (phụ lục 2)

- Chụp ảnh tổn thương lâm sàng bệnh nhân, lưu vào hồ sơ theo dõi

- Tại thời điểm 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần tính từ khi bắt đầu điều trị: gọi điện thoại cho bệnh nhân để đánh giá tình hình bệnh. Kết thúc 3 tuần điều trị, gọi điện thoại cho bệnh nhân hẹn lịch khám lại, yêu cầu đến bệnh viện để khám trực tiếp (*Các xét nghiệm đều thực hiện miễn phí và đảm bảo quyền lợi cho bệnh nhân*).

- **Đánh giá hiệu quả điều trị:** Đánh giá hiệu quả điều trị của 3 nhóm tại thời điểm 4 tuần sau ngày đầu tiên dùng thuốc.

- **Tác dụng không mong muốn:** Theo dõi và liệt kê các tác dụng phụ của thuốc (tại chỗ và toàn thân). Khi có bất kỳ tác dụng phụ nào chúng tôi ngừng điều trị và theo dõi cho bệnh nhân.

2.5. Các chỉ tiêu nghiên cứu

2.5.1. Đặc điểm chung

- Tuổi: theo nhóm tuổi: 0-9 ,10-19, 20-29, 30-39, 40-49, trên 50
- Giới: Nam, nữ
- Địa dư: Thành thị, nông thôn

2.5.2. Đặc điểm lâm sàng bệnh

- Thời gian mắc bệnh: tính từ thời điểm đầu tiên xuất hiện triệu chứng bệnh đến thời điểm khám dưới 3 tháng, từ 3-6 tháng, trên 6 tháng

- Tính chất bệnh: Đã được điều trị khỏi hoàn toàn, xuất hiện lại triệu chứng từ 3-4 lần/ năm gọi là tái phát. Các trường hợp chưa được điều trị hoặc điều trị không khỏi được coi là mắc bệnh lần đầu.

- Ngứa: có, không

- Vảy da: có, không

- Màu sắc dát: Dát là thương tổn bằng phẳng so với bề mặt da, hình tròn hoặc bầu dục, đôi khi hình đa cung. Đánh giá màu sắc dát như sau:

+ Dát tăng sắc tố là dát có màu đậm hay tăng sắc tố hơn màu da bình thường.

+ Dát giảm sắc tố là dát có màu nhạt hay giảm sắc tố hơn da bình thường.

+ Dát hồng là dát có màu hồng hoặc đỏ hơn màu da bình thường.

+ Dát hỗn hợp là dát mà trên thương tổn có sự xuất hiện của ít nhất 2 trong 3 loại dát trên.

- Vị trí thương tổn: mặt, cổ, lưng, ngực, bụng, tay, chân, da đầu

- Mức độ bệnh: Nhẹ, vừa, nặng đánh giá theo bảng 2.1

Bảng 2.1. Đánh giá mức độ bệnh theo Karakas (2005) [95]

Điểm	Ngứa	Dát sắc tố	Bong vảy
0	Không ngứa	Không dát	Không có vảy
1	Ngứa ít	< 10% diện tích cơ thể	Có vảy rải rác
2	Khi ra mồ hôi, vận động mạnh	10-30% diện tích cơ thể	Vảy cám mỏng nhiều
3	Ngứa nhiều	>30% diện tích cơ thể	Vảy cám bong rất nhiều

Trong đó đánh giá theo tổng điểm:

- Mức độ nhẹ: 1 – 3 điểm
- Mức độ vừa: 4 – 6 điểm
- Mức độ nặng: 7 – 9 điểm

(Diện tích cơ thể được đánh giá theo quy tắc bàn tay, trong đó 1% tương ứng với diện tích của lòng bàn tay bệnh nhân)

- Kết quả soi trực tiếp từ vảy da có thể gặp một trong các hình thái vi nấm trên kính hiển vi: sợi nấm và tế bào nấm men, sợi nấm thô ngắn, tế bào nấm men

2.5.3. Các chỉ tiêu đánh giá cho mục tiêu 1

- Xác định loài *Malassezia* bằng nuôi cấy định danh

- + Tỷ lệ nuôi cấy: có mọc, không mọc
- + Phân bố các loài *Malassezia*
- + Phân bố các loài *Malassezia* theo: tuổi, giới, địa dư, thời gian bị bệnh, tính chất bệnh, màu sắc dát, vị trí thương tổn, kết quả soi trực tiếp.

- Xác định loài *Malassezia* bằng PCR sequencing

- + Tỷ lệ PCR: có sản phẩm, không có sản phẩm
- + Phân bố các loài *Malassezia*
- + Phân bố các loài *Malassezia* theo: tuổi, giới, địa dư
- So sánh kết quả định danh loài theo kỹ thuật nuôi cấy và PCR sequencing

2.5.4. Các chỉ tiêu đánh giá cho mục tiêu 2

- Đánh giá sự thay đổi các triệu chứng lâm sàng

- + Triệu chứng ngứa: có, không
- + Triệu chứng vảy da trước và sau điều trị: có, không
- + Triệu chứng màu sắc dát tổn thương: có, không
- + Diện tích thương tổn trước và sau điều trị: <10%, 10-30%, >30%.
- + Sự thay đổi tổng điểm mức độ bệnh trước và sau điều trị: được đánh giá bằng cách tính điểm trung bình chung.
- + Tỷ lệ nuôi cấy nấm dương tính trước và sau điều trị
- **Kết quả điều trị:** Khỏi, đỡ giảm, không khỏi theo bảng 2.2.

Bảng 2.2. Đánh giá kết quả điều trị sau 4 tuần theo Karakas (2005) [95]

Hiệu quả điều trị	Khỏi	Đỡ giảm	Không khỏi
Triệu chứng			
Mức độ bệnh	0-3 điểm	4-6 điểm	7-9 điểm
Xét nghiệm	Âm tính	Âm tính/Dương tính	Dương tính

- **Kết quả điều trị:** theo nhóm điều trị, theo tuổi, theo giới, theo thời gian bị bệnh, theo tính chất bệnh, theo mức độ bệnh, theo loài *M. globosa*, theo loài *M. furfur*, theo loài *M. dermatis* (Kết quả phân bố theo loài *Malassezia* được lấy theo kết quả định danh từ nuôi cấy).

2.6. Các biện pháp hạn chế sai số

Để loại trừ các sai số có thể xảy ra, trong nghiên cứu này đã thực hiện các biện pháp sau:

- Thiết kế nghiên cứu chặt chẽ, các công cụ thu thập số liệu là các biểu mẫu được chuẩn bị đầy đủ, chi tiết. Các kỹ thuật xét nghiệm đều được thực hiện theo thường quy tại các phòng xét nghiệm chuẩn thức quốc gia của bệnh viện Da liễu Trung Ương, bệnh viện Nhiệt đới Trung Ương.

- Các thuật toán thống kê thường dùng trong y học cũng đã được sử dụng tối đa để loại trừ các sai số ngẫu nhiên.

2.7. Phương pháp xử lý số liệu

- Dữ liệu về mẫu nghiên cứu sẽ được lập thành file Epidata, xử lý bằng phần mềm SPSS 23.0

- Thống kê mô tả: được tính theo tần số tỉ lệ %, và được trình bày dưới dạng bảng biểu.

- Thống kê phân tích:

- + Dùng phép kiểm định khi bình phương và RR ở mức ý nghĩa 5%, khoảng tin cậy (KTC) 95% để đo lường sự khác biệt trong các mối liên hệ của kết quả nghiên cứu.

- + Sử dụng test Fisher với các giá trị nhỏ hơn 5

- + Dùng phép kiểm One-way-ANOVA để so sánh trung bình của mức độ bệnh trước và sau điều trị 4 tuần

2.8. Đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu không vi phạm y đức vì tất cả người bệnh đều được hỏi ý kiến và đồng ý tham gia nghiên cứu, các thủ thuật khám, lấy bệnh phẩm đều không xâm hại đến người bệnh. Đây cũng là các xét nghiệm thường quy áp dụng hàng ngày được ban lãnh đạo bệnh viện phê duyệt. Các thông tin thu nhận được từ người bệnh đều được giữ bí mật, người bệnh khi tham gia nghiên

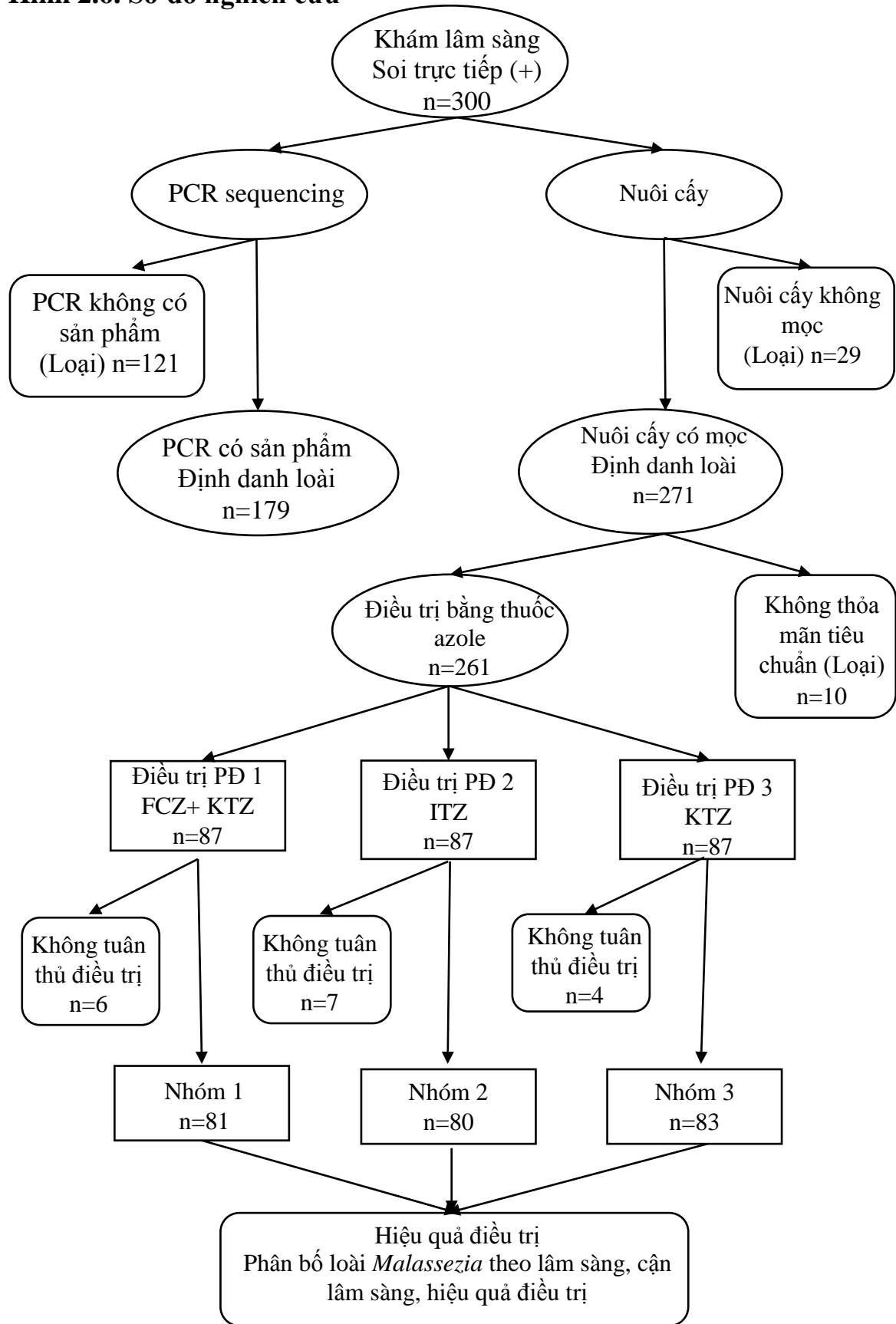
cứu và đến khám trong thời gian nghiên cứu (nếu có nhu cầu) sẽ được hướng dẫn các kiến thức đúng về phòng tránh nhiễm do nấm cũng như được thăm khám đầy đủ đúng quy trình.

2.9. Hạn chế của đề tài

Xác định chính xác loài *Malassezia* gây bệnh là một kỹ thuật tương đối mới ở Việt Nam. Trước đây, đã có tác giả tiến hành nuôi cấy, định danh thành công nhưng chỉ xác định được 4 loài vi nấm, trong khi đó vi nấm *Malassezia* tồn tại hơn 14 loài. Nghiên cứu của chúng tôi lần đầu tiên thực hiện ở Việt Nam đã định danh 11 loài *Malassezia* bằng quy trình cải tiến. Tuy vậy, thực hiện ở một nơi duy nhất bệnh viện Da liễu Trung Ương nên tỷ lệ trên chưa phản ánh hết sự phân bố các loài *Malassezia* và tình hình dịch tễ của bệnh. Bên cạnh đó, vẫn còn một số hạn chế trong việc lựa chọn môi trường nuôi cấy, cách thức tiến hành làm ảnh hưởng phần nào đến tỉ lệ nuôi cấy và định danh *Malassezia*.

Hiện nay tại Việt Nam có nhiều phác đồ điều trị bệnh lang ben khác nhau được nghiên cứu. Dù vậy bệnh vẫn hay tái phát gây phiền hà cũng như ảnh hưởng tới tâm lý thẩm mỹ của người bệnh và là một thách thức không nhỏ với các nhà lâm sàng. Chúng tôi tiến hành nghiên cứu đánh giá hiệu quả điều trị bệnh lang ben sau 4 tuần. Tuy nhiên, vì một số lý do khách quan chúng tôi chưa có điều kiện theo dõi tái phát sau 3 tháng đến 1 năm điều trị.

Hình 2.6. Sơ đồ nghiên cứu



Chương 3

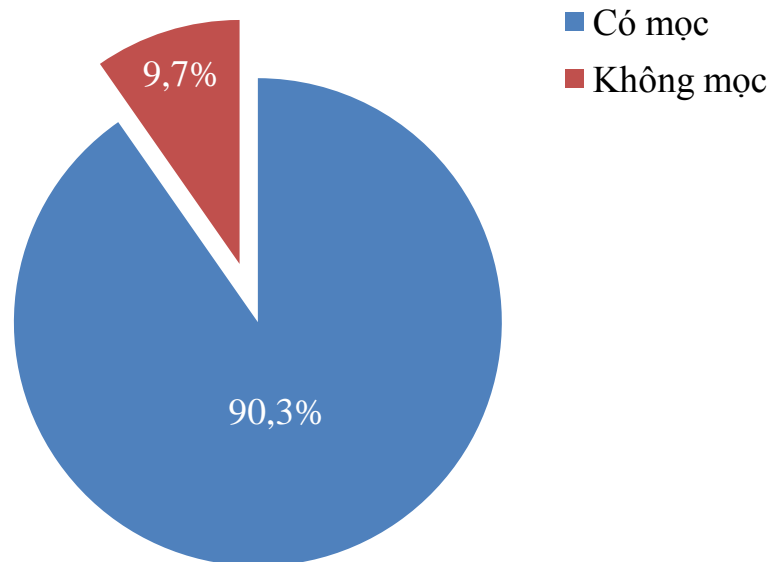
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Xác định các loài *Malassezia* trong bệnh lang ben

Trong thời gian từ 1/1/2016 đến 31/12/2016, tại Bệnh viện Da liễu Trung ương, có 2925 lượt bệnh nhân được chẩn đoán lang ben đến khám và điều trị. Tôi đã trực tiếp khám cho 300 bệnh nhân lang ben có xét nghiệm soi trực tiếp tìm nấm dương tính và chọn được 271 bệnh nhân thỏa mãn tiêu chuẩn đưa vào nghiên cứu.

3.1.1. Xác định các loài *Malassezia* bằng nuôi cấy định danh

3.1.1.1. Kết quả nuôi cấy định danh



Biểu đồ 3.1. Kết quả nuôi cấy nấm (n=300)

Nhận xét: Trong 300 mẫu bệnh phẩm từ vảy da soi trực tiếp tìm nấm dương tính, có 271 mẫu nấm mọc, chiếm 90,3%. Trong đó, 29 trường hợp nuôi cấy không thấy nấm mọc, chiếm 9,7%.

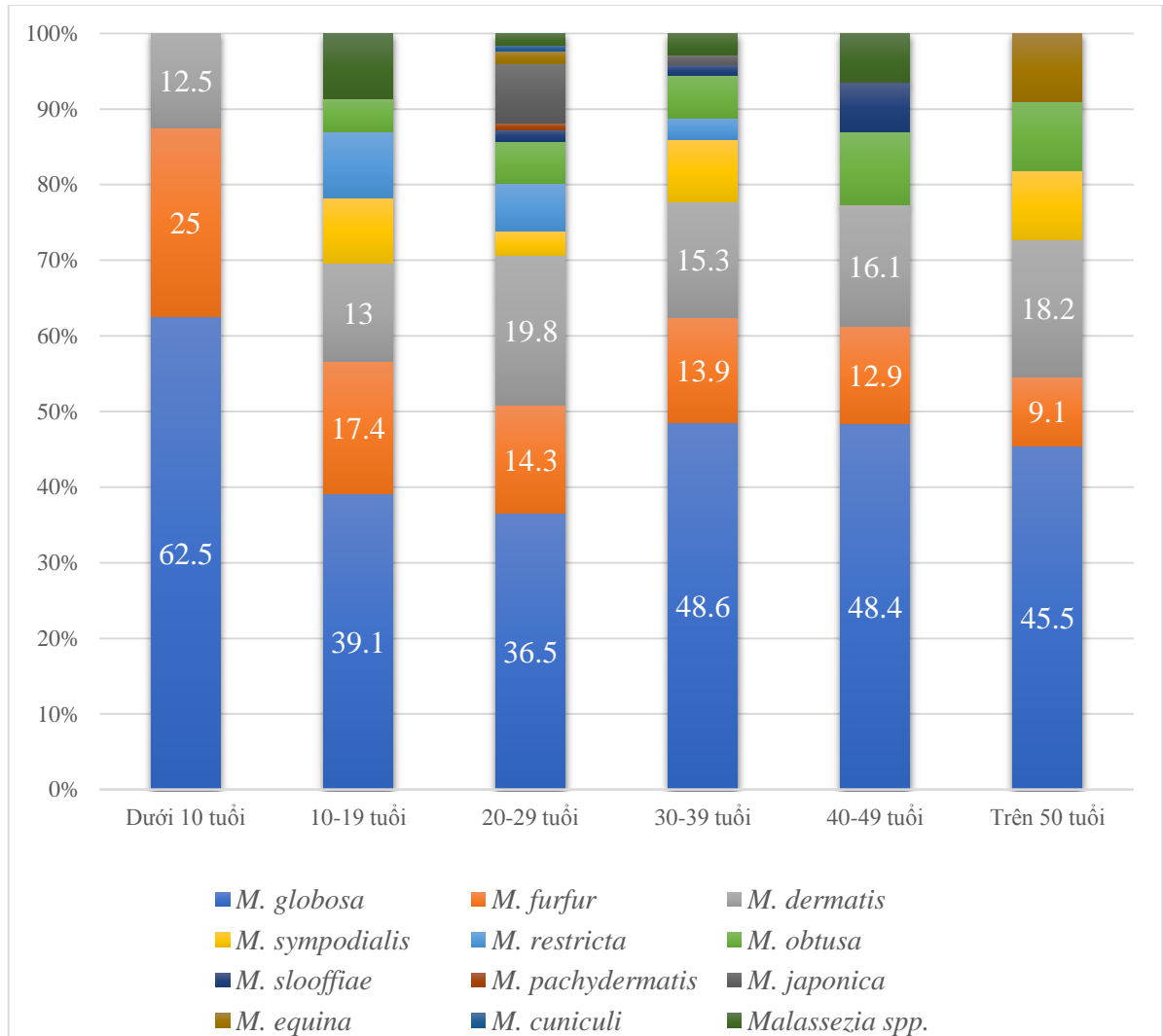
Bảng 3.1. Kết quả định danh các loài *Malassezia* bằng nuôi cấy (n=271)

Loài	n	%
<i>M. globosa</i>	115	42,4
<i>M. furfur</i>	39	14,4
<i>M. dermatitis</i>	47	17,3
<i>M. sympodialis</i>	13	4,8
<i>M. restricta</i>	12	4,4
<i>M. obtusa</i>	16	5,9
<i>M. slooffiae</i>	5	1,8
<i>M. pachydermatis</i>	1	0,4
<i>M. japonica</i>	11	4,1
<i>M. equina</i>	3	1,1
<i>M. cuniculi</i>	1	0,4
<i>Malassezia spp.</i>	8	3,0
Tổng	271	100

Nhận xét: Trong 271 mẫu nuôi cấy có nấm mốc, *M. globosa* chiếm tỉ lệ cao nhất với 42,4%; tiếp đến *M. dermatitis* (17,3%), *M. furfur* (14,4%). Loài chiếm tỉ lệ thấp nhất là *M. pachydermatis* và *M. cuniculi* với 0,4%. Có 8 mẫu khuẩn lạc chưa xác định loài, chiếm tỉ lệ 3,0%.

3.1.1.2. Phân bố các loài *Malassezia* theo đặc điểm chung

Có 271 mẫu bệnh phẩm từ 271 bệnh nhân nuôi cấy cho kết quả như sau:



Biểu đồ 3.2. Phân bố loài *Malassezia* gây bệnh lang ben theo nhóm tuổi (n=271)

Nhận xét: *M. globosa* gặp mọi lứa tuổi. Trong nhóm 20-29 tuổi, *M. globosa* có tỉ lệ cao nhất 36,5%, tiếp đến *M. dermatitis* 19,8% và *M. furfur* 14,3%, các loài còn lại chỉ chiếm 29,4%.

Bảng 3.2. Phân bố loài *Malassezia* gây bệnh lang ben theo giới (n=271)

Loài	Nam		Nữ		Tổng số	
	n	%	n	%	n	%
<i>M. globosa</i>	73	63,5	42	36,5	115	100
<i>M. furfur</i>	31	79,5	8	20,5	39	100
<i>M. dermatis</i>	32	68,1	15	31,9	47	100
<i>M. sympodialis</i>	8	61,5	5	38,5	13	100
<i>M. restricta</i>	10	83,3	2	16,7	12	100
<i>M. obtusa</i>	11	68,8	5	31,3	16	100
<i>M. slooffiae</i>	3	60,0	2	40,0	5	100
<i>M. pachydermatis</i>	1	100	0	0	1	100
<i>M. japonica</i>	6	54,5	5	45,5	11	100
<i>M. equina</i>	2	66,7	1	33,3	3	100
<i>M. cuniculi</i>	1	100	0	0	1	100
<i>Malassezia spp.</i>	7	87,5	1	12,5	8	100
Tổng	185	68,3	86	31,7	271	100
p	> 0,05					

Nhận xét: *Malassezia* gây bệnh ở nam nhiều hơn nữ (tỉ lệ xấp xỉ 2/1). *M. globosa* chủ yếu ở nam. *M. japonica*, *M. slooffiae* nam và nữ tỉ lệ tương đương nhau. *M. restricta* nam gấp 5 lần nữ. Tỉ lệ phân bố các loài không có sự khác biệt giữa nam và nữ với $p > 0,05$.

Bảng 3.3. Phân bố loài *Malassezia* gây bệnh lang ben theo địa dư (n=271)

Loài	Thành thị		Nông thôn		Tổng số	
	n	%	n	%	n	%
<i>M. globosa</i>	59	51,3	56	48,7	115	100
<i>M. furfur</i>	22	56,4	17	43,6	39	100
<i>M. dermatis</i>	27	57,4	20	42,6	47	100
<i>M. sympodialis</i>	7	53,8	6	46,2	13	100
<i>M. restricta</i>	5	41,7	7	58,3	12	100
<i>M. obtusa</i>	9	56,3	7	43,8	16	100
<i>M. slooffiae</i>	5	100	0	0	5	100
<i>M. pachydermatis</i>	1	100	0	0	1	100
<i>M. japonica</i>	7	63,6	4	36,4	11	100
<i>M. equina</i>	1	33,3	2	66,7	3	100
<i>M. cuniculi</i>	0	0	1	100	1	100
<i>Malassezia spp.</i>	2	25,0	6	75,0	8	100
Tổng	145	53,5	126	46,5	271	100
p	> 0,05					

Nhận xét: *Malassezia* gặp ở thành thị nhiều hơn nông thôn. Trong đó, *M. pachydermatis* và *M. slooffiae* chỉ gặp thành thị. *M. restricta* và *M. equina* gặp vùng nông thôn. *M. globosa* phân bố thành thị và nông thôn tương đương nhau. Tỷ lệ phân bố các loài không có sự khác biệt giữa thành thị và nông thôn với $p > 0,05$.

3.1.1.3. Phân bố các loài *Malassezia* theo lâm sàng, cận lâm sàng**Bảng 3.4. Phân bố loài *Malassezia* gây bệnh lang ben theo thời gian bị bệnh (n=271)**

Loài	< 3 tháng		3-6 tháng		> 6 tháng		Tổng số	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>M. globosa</i>	22	19,1	13	11,3	80	69,6	115	100
<i>M. furfur</i>	8	20,5	5	12,8	26	66,7	39	100
<i>M. dermatis</i>	5	10,6	7	14,9	35	74,5	47	100
<i>M. sympodialis</i>	4	30,8	3	23,1	6	46,1	13	100
<i>M. restricta</i>	3	25,0	0	0	9	75,0	12	100
<i>M. obtusa</i>	3	18,8	0	0	13	81,3	16	100
<i>M. slooffiae</i>	1	20,0	1	20,0	3	60,0	5	100
<i>M. pachydermatis</i>	1	100	0	0	0	0	1	100
<i>M. japonica</i>	2	18,2	0	0	9	81,8	11	100
<i>M. equina</i>	0	0	1	33,3	2	66,7	3	100
<i>M. cuniculi</i>	0	0	0	0	1	100	1	100
<i>Malassezia spp.</i>	2	25,0	1	12,5	5	62,5	8	100
Tổng	51	18,8	31	11,4	189	69,7	271	100

Nhận xét: Thời gian bị bệnh trên 6 tháng chiếm tỉ lệ cao nhất 69,7%. Trong đó, chủ yếu là *M. globosa* (chiếm 69,6%) và *M. furfur* (66,7%). *M. pachydermatis* chỉ gặp ở thời gian bị bệnh dưới 3 tháng.

Bảng 3.5. Phân bố loài *Malassezia* gây bệnh lang ben theo tính chất bệnh (n=271)

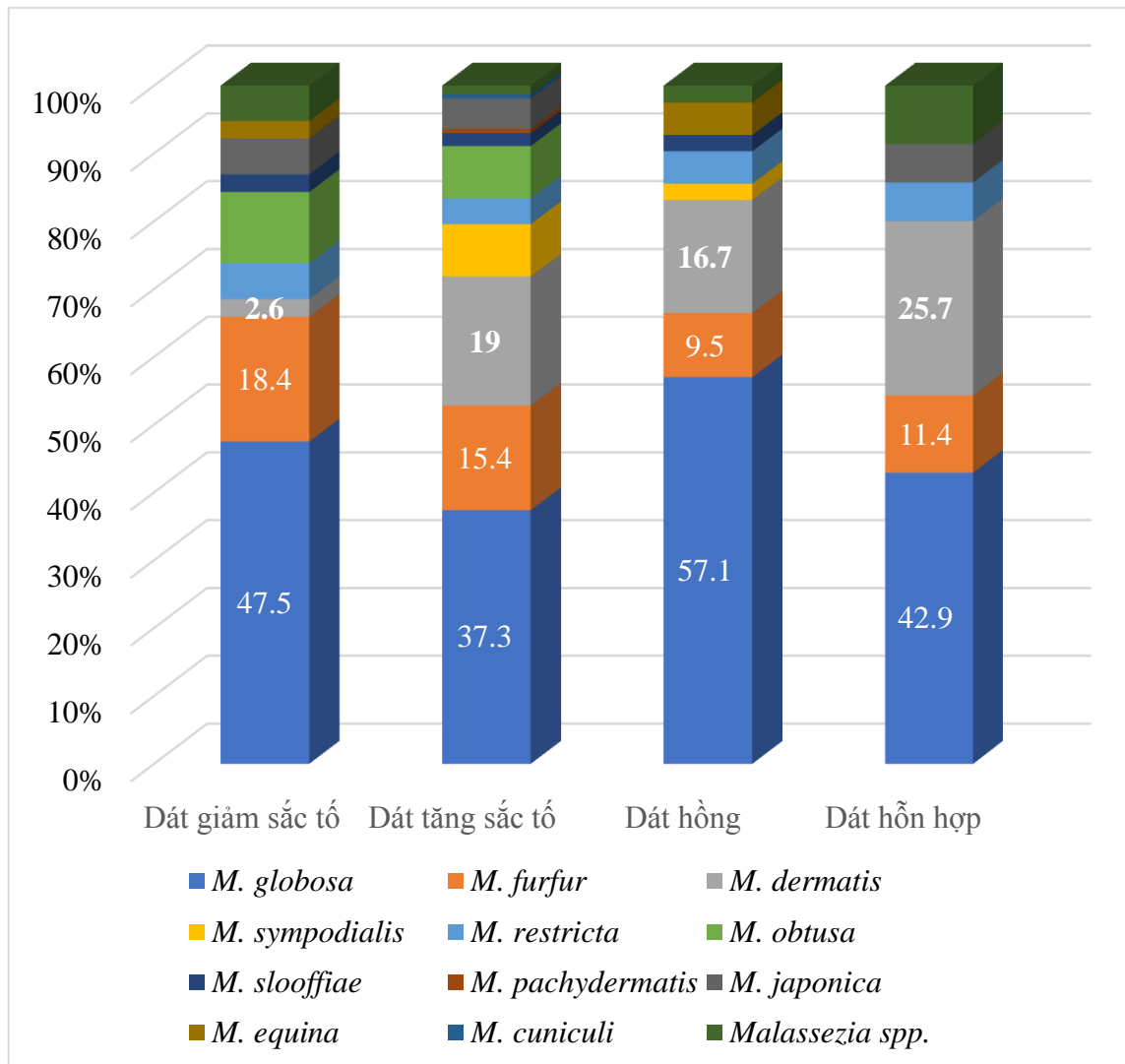
Loài	Lần đầu		Tái phát		Tổng số	
	n	%	n	%	n	%
<i>M. globosa</i>	99	86,1	16	13,9	115	100
<i>M. furfur</i>	33	84,6	6	15,4	39	100
<i>M. dermatis</i>	44	93,6	3	6,4	47	100
<i>M. sympodialis</i>	9	69,2	4	30,8	13	100
<i>M. restricta</i>	9	75,0	3	25,0	12	100
<i>M. obtusa</i>	12	75,0	4	25,0	16	100
<i>M. slooffiae</i>	5	100	0	0	5	100
<i>M. pachydermatis</i>	1	100	0	0	1	100
<i>M. japonica</i>	10	90,9	1	9,1	11	100
<i>M. equina</i>	3	100	0	0	3	100
<i>M. cuniculi</i>	1	100	0	0	1	100
<i>Malassezia spp.</i>	6	75,0	2	25,0	8	100
Tổng	232	85,6	39	14,4	271	100

Nhận xét: *Malassezia* gặp chủ yếu ở đối tượng bệnh lần đầu. *M. globosa* và *M.furfur* thường gặp nhất, chiếm 86,1% và 84,6%. *M. pachydermatis*, *M. slooffiae*, *M. japonica*, *M. equina*, *M. cuniculi* chỉ gặp ở nhóm bị bệnh lần đầu.

Bảng 3.6. Phân bố loài *Malassezia* gây bệnh lang ben theo mức độ bệnh (n=271)

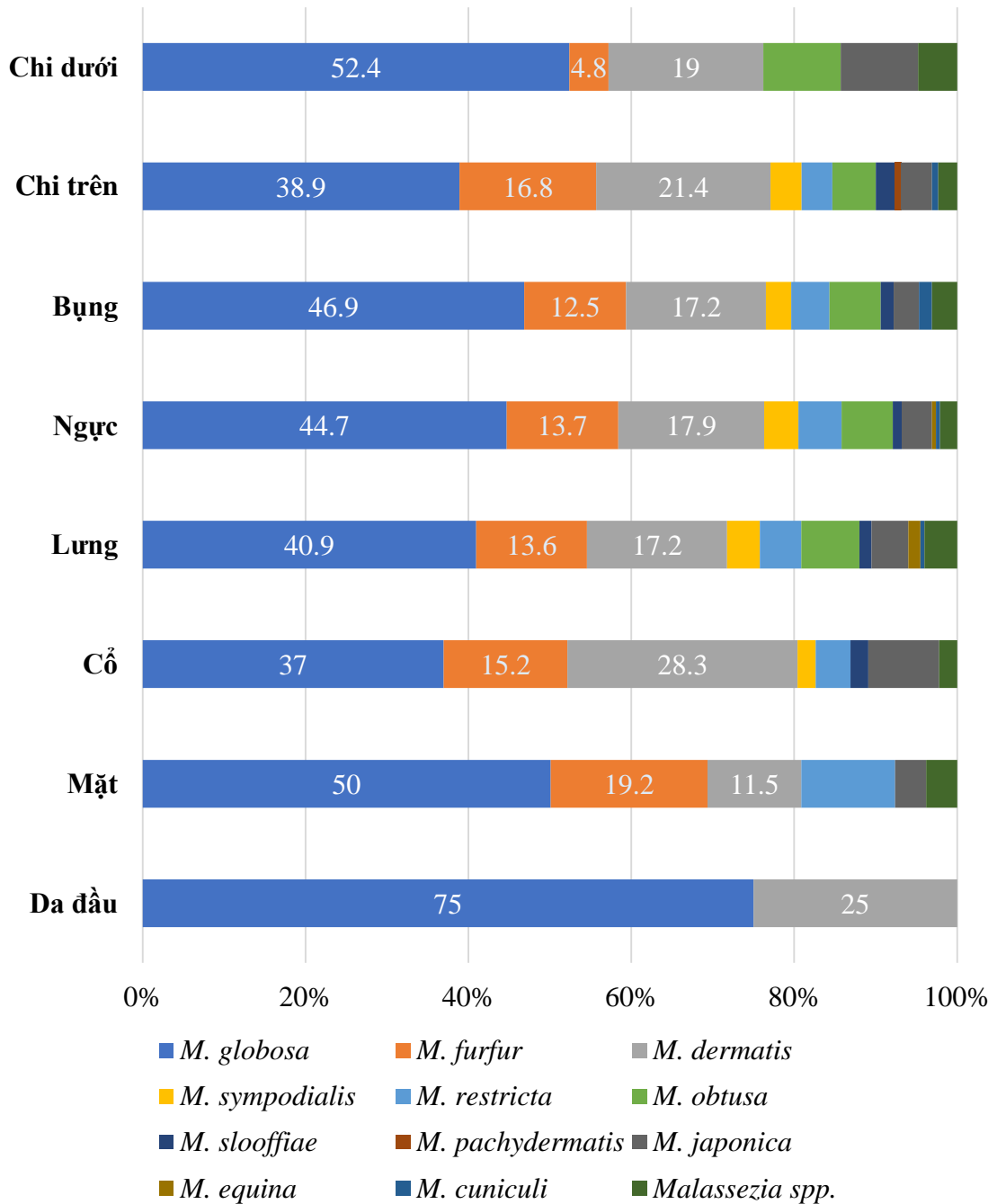
Loài	Nhẹ		Vừa		Nặng		Tổng số	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>M. globosa</i>	21	18,3	80	69,6	14	12,2	115	100
<i>M. furfur</i>	12	30,8	19	48,7	8	20,5	39	100
<i>M. dermatis</i>	12	25,5	28	59,6	7	14,9	47	100
<i>M. sympodialis</i>	5	38,5	7	53,8	1	7,7	13	100
<i>M. restricta</i>	2	16,7	9	75,0	1	8,3	12	100
<i>M. obtusa</i>	2	12,5	13	81,3	1	6,3	16	100
<i>M. slooffiae</i>	2	40,0	3	60,0	0	0	5	100
<i>M. pachydermatis</i>	0	0	1	100	0	0	1	100
<i>M. japonica</i>	2	18,2	9	81,8	0	0	11	100
<i>M. equina</i>	1	33,3	2	66,7	0	0	3	100
<i>M. cuniculi</i>	0	0	1	100	0	0	1	100
<i>Malassezia spp.</i>	3	37,5	4	50	1	12,5	8	100
Tổng	62	22,9	176	64,9	33	12,2	271	100

Nhận xét: *Malassezia* gặp ở nhóm bệnh mức độ vừa (64,9%). *M. globosa* và *M. japonica* với tỷ lệ cao (69,6% và 81,1%). Tiếp theo, *M. slooffiae*, *M. equina* (60% và 66,7%).



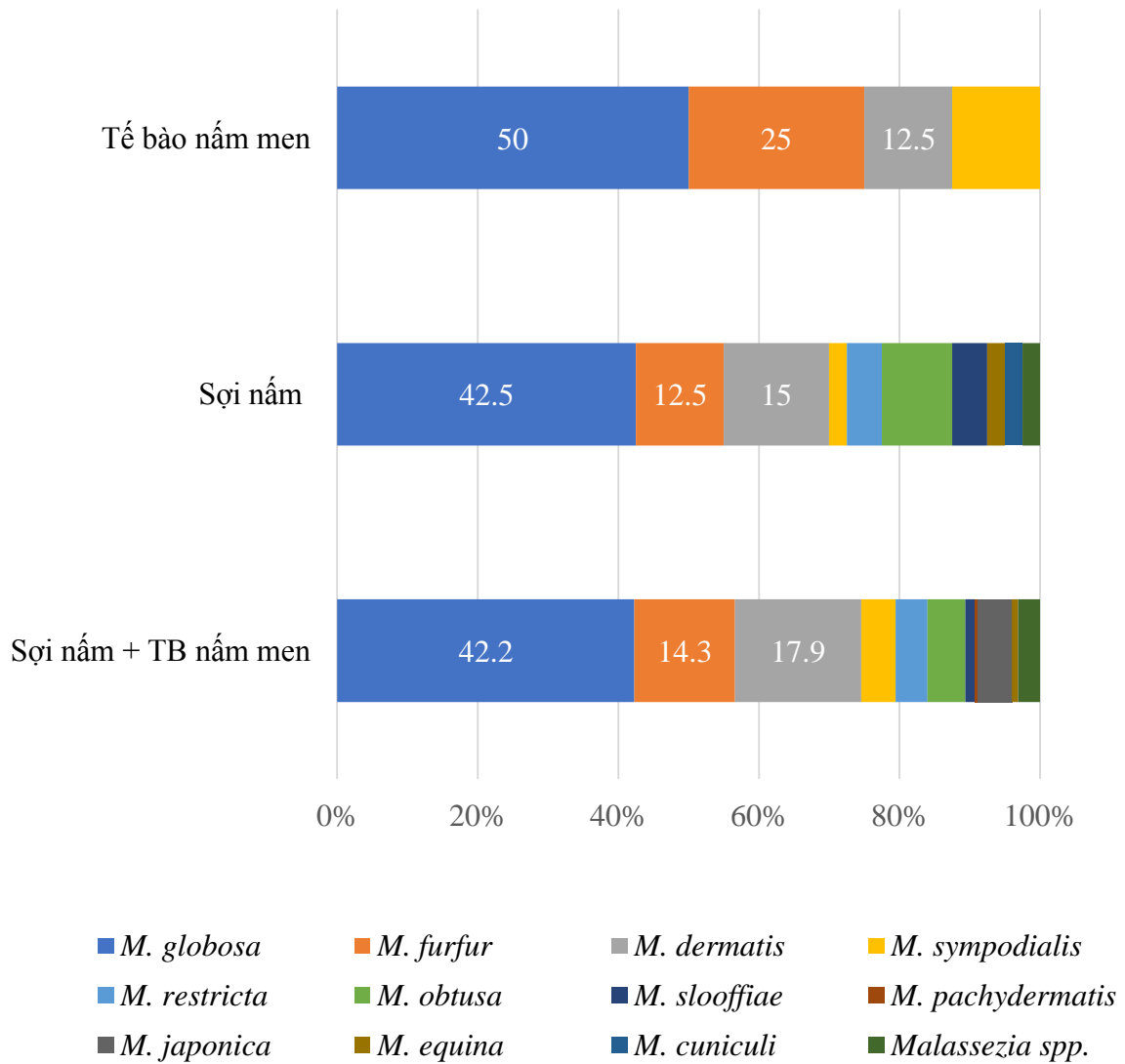
Biểu đồ 3.3. Phân bố loài *Malassezia* gây bệnh lang ben theo màu sắc đất (n=271)

Nhận xét: *M. globosa* phân bố hầu hết ở tất cả màu sắc đất. Dát giảm sắc tố gặp *M. globosa* và *M. furfur*. Dát tăng sắc tố gặp *M. globosa*, *M. dermatitis* và *M. furfur*. Dát hồng và đất hỗn hợp gặp ở *M. globosa* và *M. dermatitis*. Các loài *M. obtusa*, *M. cuniculi*, *M. pachydermatis* chỉ gây đất tăng sắc tố. *M. equina* chỉ gặp ở đất giảm sắc tố và đất hồng.



Biểu đồ 3.4. Phân bố loài *Malassezia* gây bệnh lang ben theo vị trí thương tổn (n=271)

Nhận xét: *M. globosa* thường gặp ở tất cả các vị trí trên cơ thể. Ở lưng, ngực, *M. globosa* chiếm cao nhất sau đó đến *M. dermatitis*, *M. furfur*. Vùng da đầu không gặp *M. furfur*.



Biểu đồ 3.5. Phân bố loài *Malassezia* gây bệnh lang ben theo kết quả soi trực tiếp (n=271)

Nhận xét: *M. globosa* tồn tại 3 hình thái: dạng men, dạng sợi và dạng hỗn hợp. *M. restricta*, *M. obtusa*, *M. slooffiae*, *M. japonica*, *M. equina*, *M. cuniculi*, *M. pachydermatis* không gặp hình thái tế bào nấm men.

3.1.2. Xác định các loài *Malassezia* bằng PCR sequencing

3.1.2.1. Kết quả định danh bằng PCR sequencing

Trong 300 mẫu bệnh phẩm từ 300 bệnh nhân, kết quả PCR có sản phẩm ở 179 mẫu với tỉ lệ 59,7%.

Bảng 3.7. Kết quả định danh các loài *Malassezia* bằng PCR sequencing (n=179)

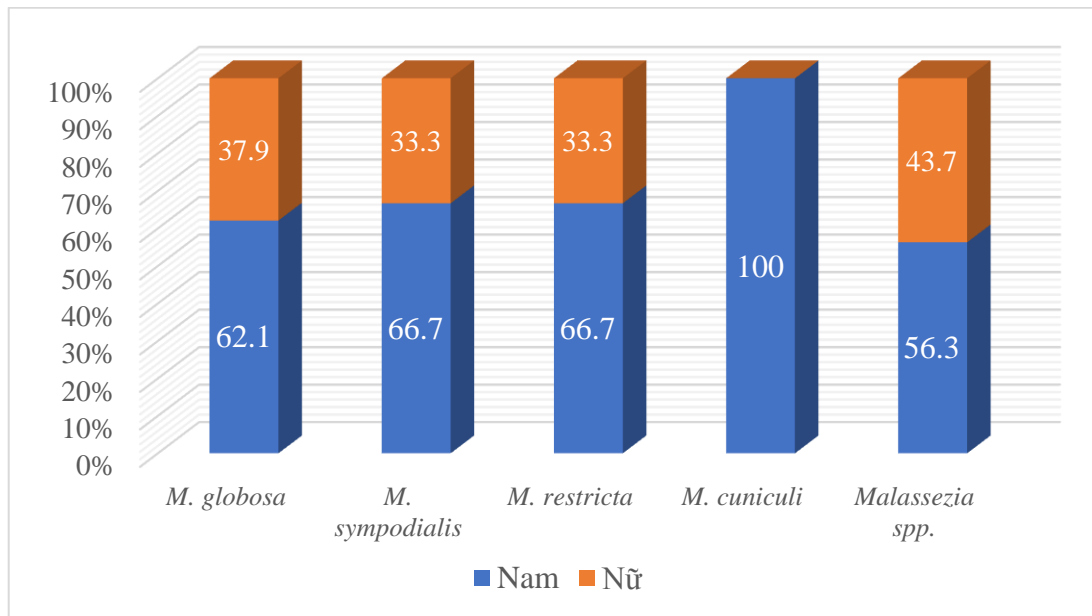
Loài	n	%
<i>M. globosa</i>	132	73,7
<i>M. sympodialis</i>	9	5,0
<i>M. restricta</i>	21	11,7
<i>M. cuniculi</i>	1	0,6
<i>Malassezia</i> spp.	16	9,0
Tổng	179	100

Nhận xét: Từ 179 mẫu PCR có sản phẩm, định danh được 163 loài *Malassezia*. Trong đó, *M. globosa* chiếm tỉ lệ cao nhất với 73,7%, tiếp theo *M. restricta* (11,7%), *M. sympodialis* (5,0%), *M. cuniculi* (0,6%). Có 16 mẫu bệnh phẩm chưa xác định loài chiếm 8,9%.

3.1.2.2. Phân bố các loài *Malassezia* theo đặc điểm chung**Bảng 3.8. Phân bố loài *Malassezia* gây bệnh lang ben theo nhóm tuổi (n=179)**

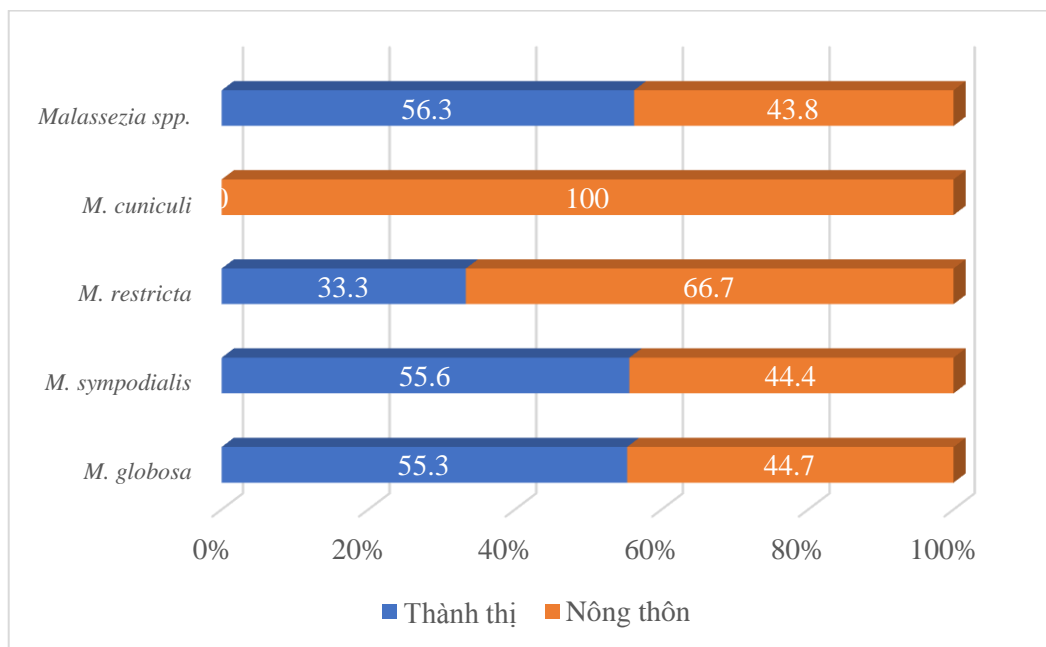
Loài	0-9		10-19		20-29		30-39		40-49		>50		Tổng số	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>M. globosa</i>	7	5,3	9	6,8	67	50,8	35	26,5	13	9,8	1	0,8	132	100
<i>M. sympodialis</i>	0	0	1	11,1	3	33,3	4	44,5	0	0	1	11,1	9	100
<i>M. restricta</i>	0	0	1	4,8	14	66,7	5	23,7	0	0	1	4,8	21	100
<i>M. cuniculi</i>	0	0	0	0	1	100	0	0	0	0	0	0	1	100
<i>Malassezia spp.</i>	0	0	1	6,3	10	62,4	1	6,3	4	25,0	0	0	16	100
Tổng	7	3,9	12	6,7	95	53,1	45	25,1	17	9,5	3	1,7	179	100

Nhận xét: Các loài *Malassezia* gặp chủ yếu ở nhóm 20-29 tuổi. Tỷ lệ *M. globosa* ở nhóm 20-29 tuổi là 50,8%. *M. sympodialis*, *M. restricta*, *M. cuniculi* không gặp ở trẻ nhỏ dưới 10 tuổi.



Biểu đồ 3.6. Phân bố loài *Malassezia* gây bệnh lang ben theo giới (n=179)

Nhận xét: *M. globosa*, *M. sympodialis*, *M. restricta* gặp ở nam nhiều hơn nữ. *M. cuniculi* không gặp ở nữ.



Biểu đồ 3.7. Phân bố loài *Malassezia* gây bệnh lang ben theo địa dư (n=179)

Nhận xét: Về địa dư, *M. globosa* gặp chủ yếu ở thành thị. *M. cuniculi* gặp nông thôn. *M. restricta* gặp ở thành thị và nông thôn.

3.1.3. So sánh kết quả định danh của nuôi cấy và PCR sequencing

Bảng 3.9. So sánh kết quả định danh giữa nuôi cấy và PCR sequencing (n=300)

		Nuôi cấy		Tổng
		Có	Không	
PCR sequencing	Có	167	12	179
	Không	104	17	121
Tổng		271	29	300

Nhận xét: Tỷ lệ định danh được loài của 2 kỹ thuật là 167/300; kỹ thuật nuôi cấy là 271/300 và PCR sequencing là 179/300.

3.2. Hiệu quả điều trị lang ben bằng thuốc kháng nấm nhóm azole

Trong 271 bệnh nhân bị lang ben và có xét nghiệm nuôi cấy định danh loài, chúng tôi loại 10 bệnh nhân không đủ tiêu chuẩn lựa chọn điều trị (dưới 16 tuổi, có bệnh lý gan thận kèm theo), còn lại 261 bệnh nhân được chia ngẫu nhiên thành 3 nhóm điều trị. Sau 4 tuần, có 17 bệnh nhân không khám lại và không tuân thủ điều trị, chúng tôi có được 244 bệnh nhân đáp ứng đủ tiêu chuẩn với kết quả: nhóm 1 có 81 bệnh nhân dùng phác đồ fluconazole uống và ketoconazole tắm gội, nhóm 2 có 80 bệnh nhân dùng phác đồ itraconazole uống, nhóm 3 có 83 bệnh nhân điều trị bằng ketoconazole tắm gội đơn thuần.

3.2.1. Đặc điểm của nhóm điều trị

Bảng 3.10. Phân bố bệnh theo tuổi (n=244)

Nhóm tuổi	Nhóm 1		Nhóm 2		Nhóm 3		Chung	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Dưới 19	7	8,6	6	7,5	7	8,4	20	8,2
20-29	39	48,2	40	50,0	44	53,0	123	50,4
30-39	23	28,4	22	27,5	23	27,7	68	27,9
40-49	8	9,9	9	11,2	6	7,3	23	9,4
≥50	4	4,9	3	3,8	3	3,6	10	4,1
Tổng	81	100	80	100	83	100	244	100
Tuổi trung bình	30,2 ± 10,5		29,9 ± 9,3		29,0 ± 9,6		29,9 ± 9,7	
X ± SD	(16-68)		(16-60)		(16-62)		(16-68)	
(min-max)								
p			> 0,05				--	

Nhận xét: Tuổi trung bình của bệnh nhân ở nhóm 1, nhóm 2, nhóm 3, nhóm tuổi chung lần lượt là 30,2±10,5; 29,9±9,3; 29,0±9,6; 29,9 ± 9,7. Tuổi thấp nhất là 16 tuổi, cao nhất là 68 tuổi. Sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa 3 nhóm với $p > 0,05$.

Bảng 3.11. Phân bố bệnh theo giới (n=244)

Nhóm tuổi	Nhóm 1		Nhóm 2		Nhóm 3		Chung	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Nam	51	63,0	54	67,5	55	66,3	160	65,6
Nữ	30	37,0	26	32,5	28	33,7	84	34,4
Tổng số	81	100	80	100	83	100	240	100
p	> 0,05						--	

Nhận xét: Tỷ lệ nam ở nhóm 2 cao nhất 67,5%, nhóm 1 thấp nhất 63,0%. Sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

Bảng 3.12. Phân bố bệnh theo mức độ bệnh (n=244)

Mức độ bệnh	Nhóm 1		Nhóm 2		Nhóm 3		Chung	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Nhẹ	20	24,7	20	25,0	17	20,5	56	23,0
Vừa	48	59,3	49	61,3	60	72,3	158	64,8
Nặng	13	16,0	11	13,7	6	7,2	30	12,3
Tổng số	81	100	80	100	83	100	244	100
p	> 0,05						--	

Nhận xét: Tỷ lệ bệnh nhân có mức độ bệnh vừa 64,8%, không có sự khác biệt về mức độ bệnh giữa các nhóm, $p > 0,05$.

3.2.2. So sánh triệu chứng lâm sàng, cận lâm sàng trước và sau điều trị

Bảng 3.13. So sánh triệu chứng vảy da trước và sau điều trị (n=244)

Vảy da		Nhóm 1		Nhóm 2		Nhóm 3		Chung		p
		n	%	n	%	n	%	n	%	
Trước điều trị	Có	81	100	79	98,8	83	100	243	99,6	$p_{12}>0,05$
	Không	0	0	1	1,2	0	0	1	0,4	$p_{13}>0,05$ $p_{23}>0,05$
Sau điều trị	Có	18	22,2	25	31,2	27	32,5	70	28,7	$p_{12}>0,05$
	Không	63	77,8	55	68,8	56	67,5	174	71,3	$p_{13}>0,05$ $p_{23}>0,05$
Tổng		81	100	80	100	83	100	244	100	--
$P_{\text{trước-sau}}$		< 0,001		< 0,001		< 0,001		< 0,001		--

Nhận xét: Sau điều trị, tỉ lệ vảy da (28,7%) thấp hơn so với trước điều trị (99,6%), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$.

Sau điều trị, tỉ lệ giảm vảy da của nhóm 1 cao nhất (77,8% từ 100% xuống còn 22,2%), của nhóm 3 thấp nhất (67,5% từ 100% xuống còn 32,5%), của nhóm 2 là 67,6% từ 98,8% xuống còn 31,2%, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm trước và sau điều trị, $p > 0,05$.

Bảng 3.14. So sánh triệu chứng ngứa trước và sau điều trị (n=244)

Ngứa		Nhóm 1		Nhóm 2		Nhóm 3		Chung		p
		n	%	n	%	n	%	n	%	
Trước điều trị	Có	68	84,0	64	80,0	66	79,5	198	81,1	$p_{12}>0,05$
	Không	13	16,0	16	20,0	17	20,5	46	18,9	$p_{13}>0,05$ $p_{23}>0,05$
Sau điều trị	Có	27	33,3	37	46,2	29	34,9	93	38,1	$p_{12}>0,05$
	Không	54	66,7	43	53,8	54	65,1	151	61,9	$p_{13}>0,05$ $p_{23}>0,05$
Tổng		81	100	80	100	83	100	244	100	--
$p_{\text{trước-sau}}$		< 0,001		< 0,001		< 0,001		< 0,001		--

Nhận xét: Sau điều trị, tỉ lệ ngứa (38,1%) thấp hơn so với trước điều trị (81,1%), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$.

Sau điều trị, tỉ lệ giảm ngứa của nhóm 1 cao nhất (giảm 50,7% từ 84,0% xuống còn 33,3%), của nhóm 2 thấp nhất (giảm 33,8% từ 80,0% xuống còn 46,2%), tỉ lệ giảm ngứa của nhóm 3 là 44,6% từ 79,5% xuống còn 34,9%. Sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm, $p > 0,05$.

Bảng 3.15. So sánh sự thay đổi màu sắc dát trước và sau điều trị (n=244)

Dát thương tổn		Nhóm 1		Nhóm 2		Nhóm 3		Chung		p
		n	%	n	%	n	%	n	%	
Trước điều trị	Có	81	100	80	100	83	100	244	100	$p_{12}>0,05$
	Không	0	0	0	0	0	0	0	0	
Sau điều trị	Có	74	91,4	75	93,7	80	96,4	229	93,9	$p_{23}>0,05$
	Không	7	8,6	5	6,3	3	3,6	15	6,1	
Tổng		81	100	80	100	83	100	244	100	--
$p_{\text{trước-sau}}$		< 0,001		< 0,001		< 0,001		< 0,001		--

Nhận xét: Sau điều trị, tỷ lệ thay đổi màu sắc dát ở thương tổn chiếm tỷ lệ cao (93,7%) sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Sau điều trị, tỉ lệ hết dát thương tổn của nhóm 1 cao nhất (8,6% từ 100% xuống còn 91,4%), của nhóm 3 thấp nhất (từ 100% xuống còn 96,4%), của nhóm 2 là 6,3% từ 100% xuống còn 93,7%. Sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm, $p > 0,05$.

Bảng 3.16. So sánh diện tích thương tổn trước và sau điều trị (n=244)

Diện tích thương tổn		Nhóm 1		Nhóm 2		Nhóm 3		Chung		p
		n	%	n	%	n	%	n	%	
Trước điều trị	< 10%	21	25,9	30	37,5	18	21,7	69	28,3	$p_{12}>0,05$
	10-30%	42	51,9	30	37,5	49	59,0	121	49,6	$p_{13}>0,05$
	>30%	18	22,2	20	25,0	16	19,3	54	22,1	$p_{23}>0,05$
Sau điều trị	< 10%	26	32,1	35	43,7	28	33,7	89	36,4	$p_{12}>0,05$
	10-30%	50	61,7	31	38,8	47	56,6	128	52,5	$p_{13}>0,05$
	>30%	5	6,2	14	17,5	8	9,6	27	11,1	$p_{23}>0,05$
Tổng số		81	100	80	100	83	100	244	100	--

Nhận xét: Sau điều trị, diện tích da bị thương tổn giảm đi rõ rệt, trong đó nhóm có diện tích trên 30% giảm từ 54 trường hợp (22,1%) xuống còn 27 trường hợp (11,1%).

Sau điều trị, tỉ lệ giảm diện tích da bị thương tổn của nhóm 1 cao nhất (giảm 16,0% ở nhóm có diện tích trên 30% từ 22,2% xuống còn 6,2%), của nhóm 2 thấp nhất (giảm 7,5% ở nhóm có diện tích trên 30% từ 25,0% xuống còn 17,5%), của nhóm 3 giảm 9,7% ở nhóm có diện tích trên 30% từ 19,3% xuống còn 9,6%. Sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm, $p > 0,05$.

Bảng 3.17. So sánh tổng điểm mức độ bệnh trước và sau điều trị (n=244)

Mức độ bệnh	Nhóm 1 (n=81)	Nhóm 2 (n=80)	Nhóm 3 (n=83)	Chung (n=244)	p
Trước điều trị	4,7 ± 1,5	4,5 ± 1,6	4,6 ± 1,4	4,6 ± 1,5	p ₁₂ >0,05
					p ₁₃ >0,05
					p ₂₃ >0,05
Sau điều trị	2,2 ± 1,2	2,5 ± 1,4	2,5 ± 1,2	2,4 ± 1,3	p ₁₂ >0,05
					p ₁₃ >0,05
					p ₂₃ >0,05
Độ giảm tổng điểm	2,5 ± 1,1	2,0 ± 1,0	2,1 ± 0,8	2,2 ± 1,0	p ₁₂ <0,05
					p ₁₃ >0,05
					p ₂₃ >0,05
p_{trước-sau}	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	--

Nhận xét: Tổng điểm của mức độ bệnh sau điều trị $2,4 \pm 1,3$ thấp hơn so với trước điều trị $4,6 \pm 1,5$. Sự thay đổi tổng điểm trước và sau điều trị có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$.

Sau điều trị, độ giảm tổng điểm mức độ bệnh của nhóm 1 cao nhất là $2,5 \pm 1,1$, của nhóm 2 thấp nhất $2,0 \pm 1,0$, của nhóm 3 là $2,1 \pm 0,8$. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm 1 và nhóm 2, $p < 0,05$. Sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa nhóm 1 và nhóm 3, nhóm 2 và nhóm 3, $p > 0,05$.

Bảng 3.18. So sánh xét nghiệm nuôi cấy nấm trước và sau điều trị (n=244)

Xét nghiệm nuôi cấy	năm	Nhóm 1		Nhóm 2		Nhóm 3		Chung		p
		n	%	n	%	n	%	n	%	
Trước	Dương tính	81	100	80	100	83	100	244	100	p ₁₂ >0,05
	Âm tính	0	0	0	0	0	0	0	0	
Sau	Dương tính	15	18,5	19	23,7	23	27,7	57	23,4	p ₁₃ >0,05
	Âm tính	66	81,5	61	76,3	60	72,3	187	76,6	p ₂₃ >0,05
Tổng		81	100	80	100	83	100	244	100	--
P _{trước-sau}		< 0,001		< 0,001		< 0,001		< 0,001		--

Nhận xét: Sau điều trị, tỉ lệ nuôi cấy nấm dương tính (23,4%) thấp hơn rất nhiều so với trước điều trị (100%). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$.

Sau điều trị, độ giảm tỉ lệ xét nghiệm nấm dương tính của nhóm 1 cao nhất là 81,5% (từ 100% xuống còn 18,5%), của nhóm 3 thấp nhất 72,3% (từ 100% xuống còn 27,7%), của nhóm 2 là 76,3% (từ 100% xuống còn 23,7%). Sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm, $p > 0,05$.

3.2.3. Kết quả điều trị

3.2.3.1. Kết quả điều trị sau 4 tuần

Bảng 3.19. Kết quả điều trị chung của 3 nhóm sau 4 tuần (n=244)

Kết quả điều trị	Số bệnh nhân (n)	Tỉ lệ %
Khỏi	180	73,8
Đỡ giảm	64	26,2
Không thay đổi	0	0
Tổng	244	100

Nhận xét: Sau điều trị 4 tuần, có 180 bệnh nhân đạt kết quả điều trị tốt chiếm tỉ lệ 73,8%, không có bệnh nhân nào không khỏi bệnh.

Bảng 3.20. Kết quả điều trị theo 3 nhóm (n=244)

Kết quả điều trị	Nhóm 1		Nhóm 2		Nhóm 3		Chung	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Khỏi	64	79,0	57	71,3	59	71,1	180	73,8
Đỡ giảm	17	21,0	23	28,8	24	28,9	64	26,2
Tổng	81	100	80	100	83	100	244	100
p	> 0,05						--	

Nhận xét: Nhóm 1 có tỉ lệ khỏi cao nhất 79,0%, nhóm 2 và nhóm 3 thấp hơn (71,3% và 71,1%), sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

3.2.3.2. Liên quan kết quả điều trị và đặc điểm lâm sàng

Bảng 3.21. Kết quả điều trị theo nhóm tuổi (n=244)

Kết quả điều trị	10-19		20-29		30-39		40-49		>50		Tổng	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Khỏi	12	60,0	88	71,5	50	73,5	21	91,3	9	90,0	180	73,8
Đỡ giảm	8	40,0	35	28,5	18	26,5	2	8,7	1	10,0	64	26,2
Tổng	20	100	123	100	68	100	23	100	10	100	244	100
p	< 0,05											--

Nhận xét: Tỷ lệ khỏi ở nhóm từ 10-19 tuổi thấp nhất (60,0%), nhóm 40-49 tuổi cao nhất (91,3%), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Bảng 3.22. Kết quả điều trị theo giới nam (n=160)

Kết quả điều trị	Nhóm 1		Nhóm 2		Nhóm 3		Chung		p
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Khỏi	41	80,4	38	70,4	37	67,3	116	72,5	$p_{12} > 0,05$ $p_{13} > 0,05$
Đỡ giảm	10	19,6	16	29,6	18	32,7	44	27,5	$p_{23} > 0,05$
Tổng	51	100	54	100	55	100	160	100	--

Nhận xét: Theo giới nam, tỷ lệ khỏi của nhóm 1 cao nhất 80,4%, nhóm 3 thấp nhất 67,3%, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm. Theo giới nam, tỷ lệ khỏi chung của 3 nhóm là 72,5%.

Bảng 3.23. Kết quả điều trị theo giới nữ (n=84)

Kết quả điều trị	Nhóm 1		Nhóm 2		Nhóm 3		Chung		p
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Khỏi	23	76,7	19	73,1	22	78,6	64	76,2	$p_{12}>0,05$ $p_{13}>0,05$
Đỡ giảm	7	23,3	7	26,9	6	21,4	20	23,8	$p_{23}>0,05$
Tổng	30	100	26	100	28	100	84	100	--

Nhận xét: Theo giới nữ, tỉ lệ khỏi của nhóm 3 cao nhất 78,6%, nhóm 2 thấp nhất 73,1%, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm. Theo giới nữ, tỉ lệ khỏi chung của 3 nhóm là 76,2%.

Bảng 3.24. Kết quả điều trị theo thời gian bị bệnh dưới 3 tháng (n=43)

Kết quả điều trị	Nhóm 1		Nhóm 2		Nhóm 3		Chung		p
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Khỏi	8	61,5	13	76,5	9	69,2	30	69,8	$p_{12}>0,05$ $p_{13}>0,05$
Đỡ giảm	5	38,5	4	23,5	4	30,8	13	30,2	$p_{23}>0,05$
Tổng	13	100	17	100	13	100	43	100	--

Nhận xét: Theo thời gian bị bệnh dưới 3 tháng, tỉ lệ khỏi ở nhóm 2 cao nhất 76,5%, nhóm 1 thấp nhất 61,5%, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm. Theo thời gian bị bệnh dưới 3 tháng, tỉ lệ khỏi chung của 3 nhóm là 69,8%.

Bảng 3.25. Kết quả điều trị theo thời gian bị bệnh trên 3 tháng (n=201)

Kết quả điều trị	Nhóm 1		Nhóm 2		Nhóm 3		Chung		p
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Khỏi	56	82,4	44	69,8	50	71,4	150	74,6	$p_{12}>0,05$ $p_{13}>0,05$
Đỡ giảm	12	17,6	19	30,2	20	28,6	51	25,4	$p_{23}>0,05$
Tổng	68	100	63	100	70	100	201	100	--

Nhận xét: Theo thời gian bị bệnh trên 3 tháng, tỉ lệ khỏi ở nhóm 1 cao nhất 82,4%, nhóm 2 thấp nhất 69,8%, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$. Theo thời gian bị bệnh trên 3 tháng, tỉ lệ khỏi chung của 3 nhóm là 74,6%.

Bảng 3.26. Kết quả điều trị theo tính chất bệnh lần đầu (n=210)

Kết quả điều trị	Nhóm 1		Nhóm 2		Nhóm 3		Chung		p
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Khỏi	56	80,0	45	71,4	54	70,1	155	73,8	$p_{12}>0,05$ $p_{13}>0,05$
Đỡ giảm	14	20,0	18	28,6	23	29,9	55	26,2	$p_{23}>0,05$
Tổng	70	100	63	100	77	100	210	100	--

Nhận xét: Theo tính chất bệnh lần đầu, tỉ lệ khỏi ở nhóm 1 cao nhất 80,0%, nhóm 2 thấp nhất 70,1%, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$. Theo tính chất bệnh lần đầu, tỉ lệ khỏi chung của 3 nhóm là 73,8%.

Bảng 3.27. Kết quả điều trị theo tính chất bệnh tái phát (n=34)

Kết quả điều trị	Nhóm 1		Nhóm 2		Nhóm 3		Chung		p
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Khỏi	8	72,7	12	70,6	5	83,3	25	73,5	$p_{12}>0,05$ $p_{13}>0,05$
Đỡ giảm	3	27,3	5	29,4	1	16,7	9	26,5	$p_{23}>0,05$
Tổng	11	100	17	100	6	100	34	100	--

Nhận xét: Theo tính chất bệnh tái phát, tỉ lệ khỏi ở nhóm 3 cao nhất 83,3%, nhóm 2 thấp nhất 70,6%, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$. Theo tính chất bệnh tái phát, tỉ lệ khỏi chung của 3 nhóm là 73,5%.

Bảng 3.28. Kết quả điều trị theo mức độ bệnh nhẹ (n=56)

Kết quả điều trị	Nhóm 1		Nhóm 2		Nhóm 3		Chung		p
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Khỏi	17	89,5	18	90,0	14	82,4	49	87,5	$p_{12}>0,05$ $p_{13}>0,05$
Đỡ giảm	2	10,5	2	10,0	3	17,6	7	12,5	$p_{23}>0,05$
Tổng	19	100	20	100	17	100	56	100	--

Nhận xét: Theo mức độ bệnh nhẹ, tỉ lệ khỏi ở nhóm 2 cao nhất 90,0%, nhóm 3 thấp nhất 82,4%, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$. Theo mức độ bệnh nhẹ, tỉ lệ khỏi chung của 3 nhóm là 87,5%.

Bảng 3.29. Kết quả điều trị theo mức độ bệnh vừa-nặng (n=188)

Kết quả điều trị	Nhóm 1		Nhóm 2		Nhóm 3		Chung		p
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Khỏi	47	75,8	39	65,0	45	68,2	131	69,7	$p_{12}>0,05$ $p_{13}>0,05$
Đỡ giảm	15	24,2	21	35,0	21	31,8	57	30,3	$p_{23}>0,05$
Tổng	62	100	60	100	66	100	188	100	--

Nhận xét: Theo mức độ bệnh vừa-nặng, tỉ lệ khỏi ở nhóm 1 cao nhất 75,8%, nhóm 2 thấp nhất 65,0%, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$. Theo mức độ bệnh vừa-nặng, tỉ lệ khỏi chung của 3 nhóm là 69,7%.

3.2.3.3. Liên quan kết quả điều trị và chủng nấm

Bảng 3.30. Kết quả điều trị theo loài *M. globosa* (n=244)

Kết quả điều trị	<i>M. globosa</i>		Các loài còn lại		Tổng số	
	n	%	n	%	n	%
Khỏi	74	70,5	106	76,3	180	73,8
Đỡ giảm	31	29,5	33	23,7	64	26,2
Tổng	105	100	139	100	244	100
p	> 0,05				--	

Nhận xét: Tỉ lệ khỏi ở loài *M. globosa* là 70,5%, thấp hơn các loài còn lại (76,3%), sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

Bảng 3.31. Kết quả điều trị *M. globosa* của 3 nhóm (n=105)

Kết quả điều trị	Nhóm 1		Nhóm 2		Nhóm 3		p
	n	%	n	%	n	%	
Khỏi	28	77,8	25	62,5	21	72,4	$p_{12}>0,05$
Đỡ giảm	8	22,2	15	37,5	8	27,6	$p_{13}>0,05$ $p_{23}>0,05$
Tổng	36	100	40	100	29	100	--

Nhận xét: Đối với *M. globosa*, tỉ lệ khỏi ở nhóm 1 cao nhất 77,8%, nhóm 2 thấp nhất 62,5%, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

Bảng 3.32. Kết quả điều trị theo loài *M. furfur* (n=244)

Kết quả điều trị	<i>M. furfur</i>		Các loài còn lại		Tổng số	
	n	%	n	%	n	%
Khỏi	31	83,8	149	72,0	180	73,8
Đỡ giảm	6	16,2	58	28,0	64	26,2
Tổng	37	100	207	100	244	100
p	> 0,05					

Nhận xét: Tỉ lệ khỏi ở loài *M. furfur* là 83,8%, cao hơn các loài còn lại (72,0%), sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

Bảng 3.33. Kết quả điều trị *M. furfur* của 3 nhóm (n=37)

Kết quả điều trị	Nhóm 1		Nhóm 2		Nhóm 3		p
	n	%	n	%	n	%	
Khỏi	9	75,0	10	100,0	12	80,0	p ₁₂ >0,05 p ₁₃ >0,05
Đỡ giảm	3	25,0	0	0,0	3	20,0	p ₂₃ >0,05
Tổng	12	100	10	100	15	100	--

Nhận xét: Đối với *M. furfur*, tỉ lệ khỏi ở nhóm 2 cao nhất 100,0%, nhóm 1 thấp nhất 75,0%, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với p > 0,05.

Bảng 3.34. Kết quả điều trị theo loài *M. dermatis* (n=244)

Kết quả điều trị	<i>M. dermatis</i>		Các loài còn lại		Tổng số	
	n	%	n	%	n	%
Khỏi	27	61,4	153	76,5	180	73,8
Đỡ giảm	17	38,6	47	23,5	64	26,2
Tổng	44	100	200	100	244	100
p	< 0,05					

Nhận xét: Tỉ lệ khỏi ở loài *M. dermatis* là 61,4% thấp hơn các loài còn lại (76,5%), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p < 0,05.

Bảng 3.35. Kết quả điều trị *M. dermatis* của 3 nhóm (n=44)

Kết quả điều trị	Nhóm 1		Nhóm 2		Nhóm 3		p
	n	%	n	%	n	%	
Khỏi	9	69,2	7	70,0	11	52,4	p ₁₂ >0,05 p ₁₃ >0,05
Đỡ giảm	4	30,8	3	30,0	10	47,6	p ₂₃ >0,05
Tổng	13	100	10	100	21	100	--

Nhận xét: Đối với *M. dermatis*, tỉ lệ khỏi ở nhóm 2 cao nhất 70,0%, nhóm 3 thấp nhất 52,4%, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

CHƯƠNG 4

BÀN LUẬN

4.1. Xác định các loài *Malassezia* trong bệnh lang ben

Trong thời gian từ 01/01/2016 đến 31/12/2016, tại Bệnh viện Da liễu Trung ương, có 2925 lượt bệnh nhân được chẩn đoán lang ben đến khám và điều trị. Tôi đã trực tiếp khám cho 300 bệnh nhân lang ben có xét nghiệm soi trực tiếp tìm nấm dương tính và chọn được 271 bệnh nhân thỏa mãn tiêu chuẩn đưa vào nghiên cứu.

4.1.1. Xác định các loài *Malassezia* bằng nuôi cấy định danh

4.1.1.1. Kết quả định danh bằng nuôi cấy

Từ 300 mẫu bệnh phẩm vảy da của bệnh nhân lang ben, có 271 trường hợp nấm mọc chiếm lệ 90,3% (biểu đồ 3.1). Nghiên cứu của chúng tôi cao hơn của Dutta S và cs (2002) 58,5%, Kindo AJ và cs (2004) 68,6%, Karakas và cs (2009) 45,4%, Rasi A và cs (2010) 69,9%; thấp hơn Gaitanis G và cs (2006) 93,4%, Chaudhary R và cs (2010) 96% [96],[97],[88],[83],[98]. Tại Việt Nam, Nguyễn Đình Nga và cs đã nuôi cấy 75 loài *Malassezia* từ vảy da bệnh nhân lang ben, gàu da đầu và người bình thường, chúng tôi không tìm thấy cỡ mẫu nên chưa có so sánh cụ thể [99].

Biểu đồ 3.1 cho thấy 29 mẫu bệnh phẩm nuôi cấy không có nấm mọc. Đối với nấm *Malassezia*, khi thực hiện chúng tôi gặp khó khăn trong việc lựa chọn môi trường nuôi cấy, hóa chất sinh phẩm, điều kiện nhiệt độ, độ ẩm,... Môi trường nuôi cấy cơ bản là thạch Sabouraud, nhưng nấm *Malassezia* rất khó mọc trên môi trường này. Chúng tôi tiến hành cải tiến môi trường nuôi cấy qua nhiều giai đoạn. Chúng tôi dựa trên y văn, tiến hành thêm vào môi trường Sabouraud một số chất như: Sabouraud 45g, Ox bile 8g, 5ml Tween 60, 15ml Oliver oil tạo ra môi trường thạch Dixon. Thử nghiệm tiến hành trên

ống thạch nghiêng, ở nhiệt độ 37 °C. Kết quả thu được, trên môi trường này, vi nấm mọc rất yếu, sau 2-3 ngày thu được khuẩn lạc nhỏ, tròn, trơn, bóng nhưng việc định danh loài gặp khó khăn do thiếu hóa chất. Tiếp đó, chúng tôi tạo ra môi trường cải tiến của Dixon gọi là m-Dixon, thành phần bao gồm: Malt extract 36g, peptone 36g, 10ml Tween 40, Oxoi bile disicate 10g, 5ml Glycerol monoleate và 15g Sabouraud. Tiếp theo, thay đổi nhiệt độ nuôi cấy từ 37 °C xuống 32 °C, cấy trên ống thạch nghiêng. Sau 1-2 ngày, chúng tôi thu được khuẩn lạc đường kính 1- 3mm, khuẩn lạc thuần, trơn, bóng, tròn, lồi và có màu trắng kem. Trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy việc lựa chọn môi trường nuôi cấy nấm là bước đầu tiên quan trọng. Một môi trường nuôi cấy tốt giúp vi nấm phát triển nhanh, khuẩn lạc thuần, rút ngắn được thời gian định danh loài. Có lẽ, tỉ lệ nuôi cấy nấm không mọc 9,7% do môi trường nuôi cấy chưa tối ưu nhất cho sự phát triển của nấm. Chúng tôi tiếp tục tiến hành phân loại nấm bằng các test, kết quả thu được một số loài như *M. furfur*, *M. globosa*, *M. dermatis* nhưng đọc kết quả khó khăn. Chúng tôi tiếp tục thay thế sản phẩm Oxoid bile disicate của một nhà sản xuất khác, tạo thành môi trường mới bao gồm: Malt extract 36g, Bacteriological peptone 10g, 10ml Tween 40, Ox bile power 10g, 5ml Glycerol và 15g Sabouraud. Tiếp tục thay đổi nhiệt độ nuôi cấy ở điều kiện nhiệt độ 32 °C. Sau 1-2 ngày, chúng tôi thu được khuẩn lạc đường kính 1 mm, 2 mm, 3 mm, 5 mm, hình thái tròn, lồi, bờ đều hoặc nhẵn, có màu kem. Sau đó, chúng tôi tiến hành định danh *Malassezia* dựa trên phương pháp định danh có cải tiến (hình 2.5). Phương pháp của chúng tôi dựa trên quan sát hình thái đại thể và vi thể của khuẩn lạc nuôi cấy. Đồng thời, tiến hành một loạt phản ứng với: test Catalase, Cremophor EL, Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 và CHROM agar *Malassezia*... nhằm đưa ra được kết quả có tính chính xác, đơn giản và thuận tiện.

Trên 271 mẫu nuôi cấy thành công, chúng tôi tiến hành định danh được 11 loài *Malassezia*: *M. globosa*, *M. furfur*, *M. dermatis*, *M. sympodialis*, *M. restricta*, *M. obtusa*, *M. slooffiae*, *M. japonica*, *M. cuniculi*, *M. equina*, *M. pachydermatis*.

Bảng 4.1. Xác định *Malassezia* bằng nuôi cấy định danh ở các nghiên cứu

Tác giả	Môi trường nuôi cấy	Tỉ lệ nuôi cấy thành công	Số loài xác định được	Tên loài xác định được
Nguyễn Đình Nga và cs (2007) [99]	mDA, SDA	Không xác định	4	<i>M. globosa</i> , <i>M. sympodialis</i> , <i>M. furfur</i> , <i>M. restricta</i>
Abbas Rasi và cs (2009) [83]	mDA, SDA	69,9%	5	<i>M. globosa</i> , <i>M. furfur</i> , <i>M. restricta</i> , <i>M. slooffiae</i> , <i>M. pachydermatis</i>
Kaneko Takamasa và cs (2011) [64]	mDA, SDA	100%	9	<i>M. globosa</i> , <i>M. furfur</i> , <i>M. dermatis</i> , <i>M. obtusa</i> , <i>M. restricta</i> , <i>M. slooffiae</i> , <i>M. japonica</i> , <i>M. sympodialis</i> , <i>M. pachydermatis</i>
Rezvan Talaei và cs (2014) [84]	mDA, SDA	93,3%	5	<i>M. globosa</i> , <i>M. furfur</i> , <i>M. restricta</i> , <i>M. slooffiae</i> , <i>M. sympodialis</i>
Trần Cẩm Vân (2017)	mDA, SDA	90,3%	11	<i>M. globosa</i> , <i>M. furfur</i> , <i>M. restricta</i> , <i>M. obtusa</i> , <i>M. dermatis</i> , <i>M. equina</i> , <i>M. slooffiae</i> , <i>M. japonica</i> <i>M. cuniculi</i> , <i>M. sympodialis</i> , <i>M. pachydermatis</i>

Chúng tôi kiểm tra sự phát triển *M. pachydermatis* trên môi trường thạch Sabouraud (SDA). *M. restricta* có test Catalase phản ứng âm tính. Sau đó, tiến hành làm các phản ứng với Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80. Dựa vào sơ đồ phân loại (hình 2.4), chúng tôi so sánh với hình thái đại thể khuẩn lạc và nhuộm soi vi thể định danh 3 loài bao gồm: *M. sympodialis*, *M. japonica*, *M. slooffiae*. Một số loài khác chúng tôi nuôi cấy trong môi trường CHROM agar *Malassezia*, dựa vào hình thái, màu sắc và tính chất khuẩn lạc, định danh 6 loài bao gồm: *M. furfur*, *M. dermatis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. cuniculi*, *M. yamatoensis*. Kết quả trong nghiên cứu cho thấy cao hơn phương pháp định danh loài của Abbas Rasi và cs (2009), Kaneko Takamasa và cs (2011), Rezvan Talaei và cs (2014), Nguyễn Đình Nga và cs (2007) (bảng 4.1). Tuy nhiên, bên cạnh môi trường nuôi cấy thì điều kiện môi trường khí hậu, địa dư cũng là một yếu tố ảnh hưởng không nhỏ đến sự phân bố các loài *Malassezia*. Hơn nữa, một số loài mới phát hiện trong những năm gần đây như *M. equina*, *M. caprae* (2007), *M. cuniculi* (2011) có thể làm tăng số lượng loài phát hiện được [12], [13].

Nghiên cứu của Nguyễn Đình Nga và cs (2007) tiến hành tại Việt Nam, kết quả cho thấy loài chủ yếu là *M. furfur* (57,33%), *M. globosa* rất thấp chỉ chiếm 4/75 trường hợp [99]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi từ bảng 3.1 cho thấy *M. globosa* là loài chiếm đa số (42,4%), *M. furfur* cũng xuất hiện khá cao trong nghiên cứu (14,4%). Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trên thế giới: Bitar Tarazooie và cs (2004) *M. globosa* chiếm 53,3%, Ben Salah và cs (2005) *M. globosa* chiếm 47%, Asja Prohic và cs (2006) với 63,3%, Karakas và cs (2009) với 47,7% [44],[90],[40],[88]. Như vậy, *M. globosa* chiếm ưu thế ở các khu vực khác nhau trên thế giới và Việt Nam.

4.1.1.2. Phân bố các loài *Malassezia* theo đặc điểm chung

❖ Phân bố loài *Malassezia* theo tuổi

Malassezia spp. là vi nấm men thuộc vi hệ da người. Chúng có nhiều loài trong đó 3 loài thường gặp nhất gây bệnh lang ben: *M. globosa*, *M. furfur*, *M. sympodialis*. Kết quả từ biểu đồ 3.2 cho thấy tất cả các loài *Malassezia* phân lập đều gây bệnh lang ben. Trong đó, *M. globosa* chiếm ưu thế hơn với tỷ lệ 42,4%, thường gặp ở nhóm từ 20-29 tuổi (40,0%). Kết quả trên phù hợp với Abbas Rasi và cs (2009) *M. globosa* chiếm 43,9% và nhóm tuổi 20-45 tuổi chiếm 45,1% [83]. Nghiên cứu của Rezvab Talaei và cs (2014) cho thấy kết quả cao hơn với *M. globosa* chiếm 66% và nhóm tuổi 21-30 chiếm 37,88% [84]. Kết quả của chúng tôi có sự khác biệt với nghiên cứu của Karakas và cs (2009), loài gặp nhiều nhất là *M. globosa* nhưng lại thường gặp ở lứa tuổi dưới 15 tuổi (chiếm 62,5%). Một nghiên cứu khác tiến hành ở Indonesia của Krisanty và cs cho thấy *M. furfur* là loài chiếm ưu thế mà không phải là *M. globosa* và nhóm tuổi thường gặp nhất là 25-44 tuổi [85]. Như vậy, kết quả của chúng tôi có sự tương đồng với các kết quả các tác giả khác trên thế giới; nhóm nghiên cứu nhận thấy rằng dù ở các điều kiện khí hậu khác nhau (nhiệt đới và ôn đới) *M. globosa* là loài thường gặp nhất và căn nguyên chính trong bệnh lang ben [86]. Tuy nhiên, các loài *Malassezia* nói chung (trừ loài hay gây bệnh động vật *M. pachydermatis*), đặc biệt *M. globosa* có thời gian mọc chậm và rất khó mọc trên các môi trường cấy nấm thông thường nên lựa chọn môi trường nuôi cấy phân lập phù hợp mang lại hiệu quả thời gian cũng như kinh tế rất quan trọng và cần thiết nhất là trong thực hành tại các phòng xét nghiệm phục vụ lâm sàng.

Loài *M. furfur* từ trước được y văn đề cập là loài gặp thường xuyên và gây bệnh chủ yếu, nhưng trong nghiên cứu của chúng tôi chỉ chiếm 14,4%, xếp thứ 3 sau *M. globosa* (39,5%) và *M. dermatis* (18,1%). Điều đặc biệt,

M. furfur là loài vi nấm phát triển tốt nên phân lập nuôi cấy phân lập dễ dàng hơn các loài khác trong chi *Malassezia*. Kết quả này của chúng tôi cũng tương tự với các tác giả khác: Karakas và cs (2009), Rezvan Talaei và cs (2014) [88],[84].

Một điểm thú vị, *M. sympodialis* là loài thường thấy ở các khu vực có khí hậu lạnh, cũng xuất hiện với tỉ lệ cao ở các nhóm tuổi. Chỉ duy nhất 2 nhóm tuổi không gặp là nhóm dưới 10 tuổi và 40-50 tuổi. Nghiên cứu của Abbas Rasi (2009) tiến hành ở Iran, một vùng có khí hậu gần giống với Việt Nam nhưng tác giả không tìm thấy loài này [83]. Một nghiên cứu khác của Mojtaba Didehdar (2014) sử dụng phương pháp PCR-RFLP cũng tiến hành tại Iran phát hiện *M. sympodialis* với tỉ lệ 8,4% [100]. Rezvan Talaei (2014) sử dụng phương pháp PCR cũng phát hiện được *M. sympodialis* với tỉ lệ 3% [84]. Liệu rằng phương pháp PCR có khả năng phát hiện loài *M. sympodialis* tốt hơn nuôi cấy định danh? Trong nghiên cứu của Ben Salah (2005), tác giả chỉ sử dụng phương pháp nuôi cấy, kết quả thu được *M. sympodialis* gặp ở 5,55% người khỏe mạnh và 4,0% bệnh nhân lang ben [90]. Một nghiên cứu khác cũng chỉ sử dụng phương pháp nuôi cấy của Prohic (2007) có tỉ lệ *M. sympodialis* ở vùng có thương tổn lang ben là 14,4% và ở vùng da lành là 36,7%, gặp chủ yếu ở nhóm 16-30 tuổi và 31-45 tuổi [40]. Trong nghiên cứu của Krisanty (2009), *M. sympodialis* là loài đứng thứ 2 về tỉ lệ tìm thấy và gặp ở mọi lứa tuổi, nhiều nhất 25-44 tuổi (42,4%) [85]. Như vậy, so sánh với các nghiên cứu khác nhau, kết quả của chúng tôi là phù hợp. Sự khác biệt về tỉ lệ loài *M. sympodialis* giữa nghiên cứu của chúng tôi và các tác giả khác có lẽ đến từ điều kiện khí hậu môi trường cũng như phương pháp định danh. Dù thực hiện kỹ thuật định danh bằng nuôi cấy hay PCR sequencing chúng tôi nhận thấy *M. sympodialis* là loài thường gặp, và cần được quan tâm như một căn nguyên gây bệnh lang ben ở lứa tuổi từ 20-40 tuổi.

Trong nghiên cứu, chúng tôi cũng tình cờ phát hiện một số loài *Malassezia* thường được phát hiện từ động vật như *M. pachydermatis*, *M. japonica*, *M. cuniculi*, *M. equina*. Kết quả này là một phát hiện thú vị. Trong nghiên cứu của Prohic (2007) ở Bosnia [40], Ben Salah (2005) ở Iran [90], Rezvan Talaei (2014) ở Iran [84] đều không phát hiện những loài này từ thương tổn lang ben. Chúng tôi tìm thấy sự phát hiện *M. pachydermatis* từ thương tổn lang ben trong nghiên cứu của Abbas Rasi (2010) với tỉ lệ 7,2% [83]. Chúng tôi cho rằng nấm *Malassezia* có thể gây bệnh cơ hội. Sự hiện diện của những chủng như *M. pachydermatis* từ chó, *M. cuniculi* đến từ thỏ hay *M. equina* đến từ ngựa trên thương tổn lang ben làm đa dạng thêm những loài có thể gây bệnh cho người. Chúng tôi chỉ phát hiện duy nhất một trường hợp *M. pachydermatis* trên bệnh nhân nam 26 tuổi, nghề nghiệp làm ruộng, một trường hợp *M. cuniculi* trên bệnh nhân nam 28 tuổi, sống ở vùng núi cao. Có lẽ các loài gây bệnh cơ hội nguồn gốc từ động vật này liên quan đến nghề nghiệp bệnh nhân nhiều hơn là lứa tuổi.

Chúng tôi cũng nhận thấy trong các nhóm tuổi khác nhau, *M. globosa* luôn chiếm ưu thế, sau đó là *M. dermatis* và *M. furfur* và các loài khác. Nhóm nghiên cứu không gặp *M. furfur* ở người trên 50 tuổi trong khi đó gặp chủ yếu ở những loài thuộc vi hệ như *M. obtusa*. Trong nhóm dưới 10 tuổi, 3 loài thường gặp *M. globosa*, *M. furfur*, *M. dermatis*, trong đó *M. globosa* là chủ yếu.

❖ Phân bố loài *Malassezia* theo giới

Chúng tôi thực hiện nghiên cứu trên 271 bệnh nhân xét nghiệm nuôi cấy nấm dương tính, trong đó 185 nam và 86 nữ, xấp xỉ 2/1 (bảng 3.2). Có lẽ, nam giới là đối tượng lao động chính và ưa hoạt động thể lực, nên sự tiếp xúc với nhiều yếu tố môi trường khác nhau có thể là yếu tố thuận lợi khiến vi nấm bùng phát và gây bệnh dẫn tới tỷ lệ nhiễm nấm ở nam cao hơn nữ.

Sự phân bố tỷ lệ một số loài thường gặp ở cả hai giới tương tự nhau: *M. globosa* 63,5%; *M. dermatis* 68,1%; *M. furfur* 79,5%. Kết quả này của

chúng tôi phù hợp với nghiên cứu của các tác giả khác trên thế giới [39],[88],[84]. Khi so sánh sự phân bố loài giữa 2 giới nam và nữ, chúng tôi thấy không có sự khác biệt với $p > 0,05$ (bảng 3.2). Kết quả này phù hợp với Abbas Rasi (2010) không có sự khác biệt về phân bố loài giữa 2 giới. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, tác giả cũng nhận thấy tỉ lệ gặp *Malassezia* ở nam nhiều hơn nữ với tỉ lệ xấp xỉ 2/1 (78 nam và 38 nữ) trong đó, *M. globosa*, *M. furfur*, *M. slooffiae*, *M. pachydermatis* là những loài gặp ở nam nhiều hơn nữ; chỉ duy nhất một loài *M. restricta* gặp ở nữ nhiều hơn nam. Trong nghiên cứu của Rezvan Talae (2014), tỉ lệ gặp *Malassezia* ở nam cũng nhiều hơn nữ với tỉ lệ xấp xỉ 1/1, trong đó chỉ duy nhất *M. furfur* gặp ở nữ nhiều hơn nam, những loài còn lại đều gặp ở nam nhiều hơn nữ. Krisanty (2009) cho một kết quả tương tự, với tỉ lệ nam/nữ xấp xỉ 2/1 trong đó tất cả các loài đều gặp ở nam nhiều hơn nữ, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. So sánh với kết quả nghiên cứu của chúng tôi, chúng tôi cho rằng tỉ lệ bệnh ở nam nhiều hơn nữ là phù hợp. Nam giới hoạt động thể lực nhiều cùng với sự phát triển tuyến bã, tuyến mồ hôi mạnh mẽ. *Malassezia* spp. là nấm men thuộc vi hệ da người, chúng gây bệnh cơ hội khi có điều kiện thuận lợi nên có lẽ làm cho tỉ lệ bệnh ở nam cao hơn nữ. Tỉ lệ gặp bệnh cao ở nữ có lẽ đến từ sự quan tâm chăm sóc kỹ lưỡng đến làn da.

Như vậy, nấm *Malassezia* gặp ở nam nhiều hơn nữ, tuy nhiên sự phân bố tỉ lệ các loài không có sự khác biệt giữa nam và nữ. Các kết quả trên thế giới khác đều chỉ ra điểm tương tự.

❖ Phân bố loài *Malassezia* theo địa dư

Địa lý và khí hậu là 2 yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển của nấm, nhất là nấm gây bệnh trên người. Tuy nhiên, chúng tôi không tìm được nghiên cứu nào trên thế giới so sánh về vấn đề này. Sở dĩ chúng tôi chọn phân tích 2 điều kiện thành thị và nông thôn bởi vì các điều kiện môi

trường, thói quen tập quán vệ sinh, sinh hoạt khác nhau cũng là một yếu tố quan trọng của bệnh lang ben. Một lý do nữa, có lẽ các nghiên cứu khác đều tiến hành trên một phạm vi dân cư nhỏ, chưa có sự phân hóa rõ rệt vùng miền, đồng thời điều kiện sống đồng đều trong nhóm đối tượng nghiên cứu. Nghiên cứu của chúng tôi tuy tiến hành tại một bệnh viện nhưng có tính đại diện cho quần thể tốt bởi vì bệnh viện Da liễu Trung ương là bệnh viện đầu ngành về bệnh da phong phú về số lượng cũng như đặc điểm điều kiện sống. Kết quả được trình bày ở bảng 3.3, nấm *Malassezia* gặp ở thành thị và nông thôn với tỉ lệ tương đương nhau (53,5% và 46,5%). Khi so sánh về sự phân bố các loài *Malassezia*, không có sự khác biệt giữa thành thị và nông thôn với $p > 0,05$. Chúng tôi nhận thấy một số loài chỉ gặp ở thành thị như *M. slooffiae* và *M. pachydermatis*. Chỉ có duy nhất 1 loài *M. cuniculi* trên da bệnh nhân sống ở vùng nông thôn (bảng 3.3). Theo y văn, *M. cuniculi* được phân lập chủ yếu từ động vật hay gặp ở thỏ, có lẽ lây truyền từ động vật sang người trong môi trường sống thường xuyên tiếp xúc với động vật mang mầm bệnh. Một loài khác, *M. equina* được tìm thấy lần đầu tiên từ ngựa, cũng được tìm thấy ở 3 trường hợp bệnh lang ben trong đó có 1 bệnh nhân nam, và 2 bệnh nhân nữ, tất cả đều sống ở vùng núi. Điều này cũng phù hợp, *M. equina* là một tác nhân gây bệnh cơ hội trên người, nhất là con đường trực tiếp qua tiếp xúc vật nuôi. Nhìn chung không có sự khác biệt giữa thành thị và nông thôn về sự phân bố loài, chủ yếu gặp một số loài: *M. globosa*, *M. dermatis*, *M. furfur* trong đó *M. globosa* chiếm ưu thế với 51,3% ở thành thị và 48,7% ở nông thôn.

❖ Phân bố loài *Malassezia* theo thời gian và tính chất bị bệnh

Thời gian bị bệnh lang ben khác nhau tùy từng nghiên cứu, dao động trong khoảng từ 7 ngày đến 20 năm. Framil và cs cho biết thời gian diễn biến bệnh trên- dưới 2 năm chiếm 41,18% và 58,82% [101]. Karakas và cs (2009) cho biết thời gian diễn biến bệnh trung bình chủ yếu dưới 1 năm chiếm 74,2% chỉ

có 2 trường hợp bệnh trên 10 năm [88]. Nghiên cứu khác ở Indonesia của Krisanty và cs cho thấy, thời gian bị bệnh từ 1 tháng đến dưới 1 năm chiếm 72,4% [85]. Nhìn chung *Malassezia* spp. gây bệnh lang ben có xu hướng tiến triển mạn tính. Nghiên cứu của chúng tôi về thời gian diễn biến bệnh trên 6 tháng có 69,7% trường hợp (bảng 3.4). Trong đó, 3 loài thường gặp *M. globosa*, *M. dermatis* và *M. furfur* (chiếm lần lượt 69,6%, 66,7%, 74,5%). Kết quả này của chúng tôi phù hợp với Karakas và cs (2009), *M. globosa* là loài thường gặp nhất với thời gian mắc bệnh dưới 1 năm và từ 1-5 năm [88]. Tuy nhiên, thời gian bị bệnh trên 5 năm chỉ có 6 trường hợp gặp *M. furfur*. Nghiên cứu của Krisanty và cs công bố *M. furfur* chiếm đa số và *M. furfur* không gặp ở đối tượng mắc bệnh dưới 1 tháng. Trong khi đó *M. globosa* chỉ xếp hàng thứ 3 và liên quan đến thời gian bị bệnh dưới 1 tháng đến trên 12 tháng [85], [85]. *M. sympodialis* có xu hướng gặp ít hơn và dường như không liên quan nhiều đến thời gian mắc bệnh. Một trường hợp hiếm gặp thời gian bị bệnh dưới 3 tháng là *M. pachydermatis*, có lẽ chính sự lây nhiễm từ động vật sang người nên biểu hiện bệnh cấp tính. Các loài khác chủ yếu ở nhóm đối tượng mắc bệnh từ 3-6 tháng. Theo nhóm nghiên cứu sự khác biệt về thời gian mắc bệnh lang ben khác nhau tùy từng khu vực do nguồn lây, tập quán khí hậu, môi trường khác nhau (nhiệt đới và cận xích đạo).

Điều này càng củng cố thêm nhận định: *Malassezia* spp. gây bệnh lang ben có xu hướng tiến triển mạn tính. Sở dĩ có sự khác biệt trong chọn mốc đánh giá thời gian bị bệnh bởi trong quá trình tiến hành nghiên cứu các tác giả nhận thấy sự chênh lệch quá lớn giữa nhóm bệnh nhân có thời gian bị bệnh ngắn nhất và dài nhất nên đặt ra một số mốc thời gian khác nhau tùy theo khuôn khổ của từng nghiên cứu. Theo y văn thời gian đáp ứng miễn dịch chủ động của cơ thể với đối với nấm gây bệnh thông thường 3 tháng do vậy chúng tôi chọn đánh giá thời gian bị bệnh từ tháng thứ 3 đến tháng thứ 6. Tuy có sự đáp

ứng khác nhau giữa các loài vi nấm nói chung nhưng hầu hết đều thông qua hệ miễn dịch lympho T, bên cạnh đó *Malassezia* có thể gây đáp ứng miễn dịch thông qua các cytokin của hệ miễn dịch qua trung gian tế bào; Theo một số báo cáo *M. sympodialis* là loài thường xuyên liên quan đến đáp ứng miễn dịch nhờ kháng nguyên có mặt trên vách tế bào nấm là 1 \rightarrow 6- β -D-glucan [53].

Kết quả bảng 3.5 cho thấy những loài thường gặp ở bệnh nhân bị lang ben tái phát: *M. globosa*, *M. furfur*, *M. dermatis*, *M. sympodialis*, *M. restricta*, trong đó chủ yếu là *M. globosa*. Nghiên cứu chúng tôi phù hợp với Krisanty và cs (2009) cho thấy *M. furfur*, *M. sympodialis* và *M. globosa* là những loài thường xuyên gặp ở bệnh nhân bị lang ben tái phát [85]. Trên vi hệ da người khỏe mạnh cũng như bệnh nhân lang ben *M. globosa* và *M. sympodialis* thường xuyên có mặt và sinh sản phát triển bình thường [1]. Vậy nên, bệnh nhân không được điều trị và phòng bệnh đúng cách, khi gặp điều kiện thuận lợi lang ben có thể tái phát.

4.1.1.3. Phân bố các loài *Malassezia* theo lâm sàng, cận lâm sàng

❖ Phân bố loài *Malassezia* theo đặc điểm màu sắc thương tổn da

Đặc điểm lâm sàng chủ yếu nhận biết bệnh lang ben là những dát thay đổi màu sắc loang lổ trên da. Những dát này có thể là dát tăng sắc tố, dát màu trắng hoặc dát màu hồng (hay dát viêm) hoặc dát hỗn hợp. Các dát phân bố khắp cơ thể tạo thành nhiều mảng sắc tố loang lổ trên da do đó ảnh hưởng rất lớn đến thẩm mỹ của bệnh nhân. Sự hình thành các dát sắc tố là kết quả quá trình tương tác giữa các loài vi nấm *Malassezia* với cơ thể vật chủ. Trong nghiên cứu, chúng tôi nhận thấy có 58,3% là dát tăng sắc tố, chiếm đa số trong khi đó, dát giảm sắc tố, dát hồng, và dát hỗn hợp có tỷ lệ tương đương nhau (biểu đồ 3.3). Theo tác giả Pepertua ở Nigeria (2014), dát tăng sắc tố chiếm 85,5%, dát giảm sắc tố chỉ chiếm 14,5% và không có dát hỗn hợp [89]. Krisanty và cs (2008) cho biết có 64,3% dát giảm sắc tố, chỉ có 19,4% dát

tăng sắc tố, khác biệt với nghiên cứu của chúng tôi là dát tăng sắc tố chiếm đa số [88]. Chúng tôi cho rằng đặc tính loài có thể biến đổi và thích nghi ở mỗi điều kiện khí hậu, áp xuất khí quyển khác nhau. Do đó, khả năng gây bệnh của mỗi loài *Malassezia* khác nhau dẫn tới những thương tổn đa dạng và khác biệt trên da. Ở những nơi có khí hậu tương đồng như nước ta, kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với các tác giả khác: Talaei và cs (2014) với dát tăng sắc tố chiếm 50%; Karakas và cs với 47,4% [84],[88]. Lý giải cho vấn đề này, chúng tôi cho rằng nếu như dát giảm sắc tố được tạo thành do vi nấm *Malassezia* tiết ra acid azelaic ức chế tế bào sắc tố melanocyte qua con đường tyrosin kinase. Nhiều giả thuyết cho rằng, dát tăng sắc tố bản chất chỉ là thương tổn do tăng sắc tố sau viêm giống với dát hồng (phản ứng viêm). Tuy nhiên, gần đây một số nghiên cứu tìm ra khả năng sản xuất melanin nội tế bào của *M. furfur* thông qua một loạt enzym đặc trưng loài. Nghiên cứu của chúng tôi thấy rằng những thương tổn có dát sắc tố màu nâu liên quan chủ yếu đến *M. globosa* không phải *M. furfur* như y văn mô tả. Điều này cũng tương đương với nghiên cứu của các tác giả khác: Talaei và cs (2014) với 31/50 trường hợp, Karakas và cs (2009) có 60% trường hợp, Prohic và cs (2006) tại Bosnia 70% trường hợp [84],[88],[40]. Trong nghiên cứu, chúng tôi cũng gặp nhiều trường hợp dát hỗn hợp và dát hồng (28,8%). Những thương tổn sắc tố trên do quá trình viêm sinh ra. Trong đó, loài gây bệnh là *M. globosa* chiếm ưu thế tiếp đó là *M. dermatis*. Đúng như tác giả Crespo nhận định, *M. globosa* là căn nguyên chính trong bệnh lang ben [86]. Bên cạnh đó, *M. dermatis*, loài vi nấm được phát hiện lần đầu tiên trên viêm da cơ địa, gặp khá nhiều trong những thương tổn viêm như dát hồng và dát hỗn hợp. Một loài thường thấy ở những nước có khí hậu lạnh, *M. sympodialis* cũng gặp trong nghiên cứu của chúng tôi và liên quan chủ yếu đến dát tăng sắc tố mặc dù đã có những nghiên cứu chỉ ra nó liên quan nhiều hơn đến dát hồng và dát hỗn hợp.

❖ Phân bố loài *Malassezia* theo vị trí tổn thương da

Mỗi loài *Malassezia* về bản chất đều là vi nấm phụ thuộc lipid (trừ *M. pachydermatis*). Tuy nhiên, chính những enzym do chúng tiết ra quyết định sự tồn tại và phát triển ở những vị trí khác nhau trên cơ thể. Lưng, ngực, bụng là những vị trí thường xuyên thấy sự xuất hiện của các loài vi nấm (biểu đồ 3.4); chủ yếu gặp nhiều ở chi trên (131/271 trường hợp). Mặt, cổ, chi trên, chi dưới là những vị trí ít gặp hơn. Điều này có lẽ liên quan đến những vị trí trên cơ thể tiết nhiều mồ hôi và thường xuyên tiếp xúc với ánh sáng mặt trời. Với *M. globosa*, vị trí gây bệnh thường gặp nhất là lưng, ít gặp nhất là da đầu. Tương tự, *M. furfur* và *M. dermatis* cũng thường xuyên gây bệnh ở vùng lưng ngực, ít gặp ở da đầu. Đặc biệt, chúng tôi không phát hiện trường hợp nào có *M. furfur* ở da đầu. Điều này có lẽ cũng phù hợp với nhận định của nhiều tác giả về những tổn thương trên da đầu chủ yếu do *M. globosa*. Trong nghiên cứu của Ben Salah và cs (2005), Krisanty và cs (2008), Karakas và cs (2009) đều gặp *M. globosa* chủ yếu ở da đầu, bên cạnh đó vẫn có *M. furfur* [90],[85],[88]. Chỉ có duy nhất một trường hợp chúng tôi tìm thấy tổn thương lang ben do *M. pachydermatis* ở vị trí chân của bệnh nhân. Điều này cũng phù hợp với đặc điểm *M. pachydermatis* tồn tại trên da động vật và gây bệnh khi lây nhiễm sang người. Chúng tôi cho rằng, có lẽ do da đầu là vị trí hiếm gặp của tổn thương lang ben cho nên chúng tôi chưa gặp được nhiều loài *Malassezia* khác nhau. Chúng tôi phát hiện ra những trường hợp nhiễm vi nấm trên hầu hết đều mọc khuẩn lạc thuần của loài *Malassezia* spp. gây bệnh nhưng chúng tôi không xác định được chính xác loài. Phải chăng thương tổn da do những loài gây bệnh đã tạo điều kiện cho một số loài thuộc vi hệ phát triển và gây bệnh. Điều đó cũng lý giải vì sao bệnh lang ben tiến triển có xu hướng lâu dài mạn tính.

❖ Phân bố loài *Malassezia* theo mức độ bệnh

Một khía cạnh khác hiện nay được các bác sĩ da liễu quan tâm là: liệu rằng có mối liên quan giữa mức độ với loài nấm gây bệnh? Điều này, chúng tôi đã tìm trong y văn và các báo cáo gần đây nhưng chưa có câu trả lời xác đáng. Tuy vậy, trong khuôn khổ nghiên cứu này chúng tôi nhận thấy có mối liên quan giữa 3 loài chủ yếu (*M. globosa*, *M. dermatis* và *M. furfur*) với các mức độ bệnh lang ben (bảng 3.6). Những loài còn lại, hầu như chỉ gặp ở mức độ bệnh vừa, ít hơn ở mức độ bệnh nặng, thậm chí có loài còn không gặp như *M. slooffiae*, *M. pachydermatis*, *M. japonica*, *M. equina*, *M. cuniculi*. Trong nghiên cứu của Prohic và cs (2006) cũng thấy rằng *M. globosa* liên quan nhiều nhất đến các mức độ bệnh, tiếp đó đến *M. sympodialis* và *M. furfur*, riêng ở mức độ bệnh nặng không gặp *M. slooffiae* [40]. Sở dĩ có sự khác nhau giữa loài *M. sympodialis* ở Bosnia và loài *M. dermatis* ở Việt Nam là do điều kiện khí hậu môi trường khác nhau nên có sự phân bố loài khác nhau. Prohic và cs (2006) chỉ ra hơn 50% trường hợp ở mức độ nhẹ, 60% ở mức độ vừa và 60% ở mức độ nặng có liên quan đến *M. globosa* [40]. Tỷ lệ này trong nghiên cứu của chúng tôi lần lượt là nhẹ 33,9%, vừa 45,5%, nặng 42,4%. Tác giả Prohic chỉ nuôi cấy được 5 loài trong khi chúng tôi nuôi cấy thành công 11 loài. Do đó kết quả của chúng tôi có tỷ lệ thấp hơn nhưng là phù hợp với tình hình thực tế diễn biến bệnh. *M. globosa* cũng được phát hiện nhiều hơn ở mức độ bệnh vừa, tương tự đối với *M. dermatis*, *M. furfur*. Điều này chứng tỏ, *Malassezia* thường gây bệnh lang ben thường ở mức độ vừa và liên quan đến tiến triển lâu dài của bệnh.

❖ Phân bố loài *Malassezia* theo hình thái nấm trên kính hiển vi

Từ biểu đồ 3.5, khi quan sát hình thái vi nấm trên KHV từ mẫu bệnh phẩm vảy da, soi trong KOH + ParkerTM ink, kết quả cho thấy chủ yếu hình ảnh sợi nấm và tế bào nấm men tập trung thành đám (chiếm 82,3%).

Nấm *Malassezia* spp. thuộc bộ Endomycetales, là vi nấm men tồn tại trên cơ thể người, sinh sản bằng hình thức nảy chồi, sau đó tế bào men kéo dài tạo nên giả sợi nấm, kết thúc quá trình sinh sản hình thành các sợi nấm hình ống thô ngắn [102]. Một số nghiên cứu trước đây cho rằng *Malassezia* spp. chỉ gây bệnh khi có sự chuyển đổi từ dạng tế bào men sang dạng sợi nấm, kết quả nhiều nghiên cứu trên lâm sàng khi soi tươi nấm ở thương tổn của bệnh nhân lang ben cho biết có khoảng hơn 80% là dạng sợi nấm và tế bào nấm men, bên cạnh đó gặp dạng sợi nấm hoặc tế bào men đơn thuần chiếm khoảng hơn 10%. Theo quan sát của chúng tôi trong nghiên cứu nhận thấy dạng nấm men chiếm tỉ lệ thấp khoảng 3,0%, hình dạng sợi nấm chiếm 14,8%. Nghiên cứu của Juntachai W đã chứng minh dạng tế bào men của *M. furfur* có khả năng gây bệnh [103]. Qua đó, chúng tôi cho rằng vi nấm tồn tại ở dạng men hay dạng sợi đều có khả năng gây bệnh khi có điều kiện thuận lợi. Theo Sabouraud khẳng định, dù nấm ở dạng sợi hay men đều có thể gây bệnh, vì thực chất là sự biến đổi hình thái ở các giai đoạn khác nhau trong vòng đời của *Malassezia* gây bệnh.

Trong nghiên cứu của chúng tôi (biểu đồ 3.5) hầu hết các trường hợp quan sát trên KHV ở dạng sợi nấm và tế bào nấm men, liên quan *M. dermatis* và *M. globosa* (82,3%). Kết quả này cũng tương đương nghiên cứu của tác giả Prohic và cs (2006) với 97,8% [40]. *M. globosa* được phát hiện thấy nhiều nhất với 40%, tiếp đó là *M. dermatis*, *M. furfur*. Đây chính là dạng gây bệnh chủ yếu ở các loài vi nấm men.

4.1.2. Xác định các loài *Malassezia* bằng PCR sequencing

PCR sequencing là một kỹ thuật không mới, tuy nhiên chưa được áp dụng phổ biến để định danh các loài vi nấm, đặc biệt *Malassezia*. Phương pháp xác định loài dựa trên bộ gen đã được công bố trong ngân hàng gen. Từ 300 mẫu bệnh phẩm vảy da bệnh nhân lang ben, chúng tôi tiến hành làm PCR

đã cho kết quả có 179 mẫu dương tính chiếm tỉ lệ 59,7%. Sau đó, chúng tôi tiến hành giải trình tự gen và so sánh ngân hàng gen, kết quả xác định được 4 loài *Malassezia* bao gồm: *M. globosa* (73,7%), *M. restricta* (11,7%), *M. sympodialis* (5,0%), *M. cuniculi* (0,6%) (Bảng 3.7).

Kết quả trong nghiên cứu chúng tôi có sự khác biệt với Gaitanis và cs (2002) tìm được 7 loài bao gồm *M. furfur*, *M. globosa*, *M. sympodialis*, *M. obtusa*, *M. slooffiae*, *M. restricta*, *M. pachydermatis* [69]. Tuy nhiên tác giả Gaitanis sử dụng phương pháp PCR- RFLP nên có lẽ độ nhạy cao hơn PCR sequencing của chúng tôi. Nghiên cứu của Mohammad Ali Afshari (2017), tiến hành trên 102 quân nhân quân đội mắc lang ben và các bệnh nấm nông, sử dụng phương pháp PCR sequencing từ vảy da, kết quả của tác giả *M. globosa* là loài chiếm phổ biến nhất trong bệnh lang ben với 67,0% [104]. Kết quả này là tương tự với nghiên cứu của chúng tôi. Tác giả Rezvan Talaei (2014) cũng sử dụng phương pháp PCR- RFLP để định danh *Malassezia* từ khuẩn lạc nuôi cấy trên môi trường mDixon [84]. Kết quả tác giả thu được tỉ lệ PCR có bệnh phẩm 89,3% trong đó định danh được 5 loài: *M. globosa* (66%), *M. furfur* (26%), *M. restricta* (3%), *M. sympodialis* (3%), và *M. slooffiae* (2%). Kết quả này có đôi chút khác biệt với nghiên cứu của chúng tôi khi tác giả phát hiện được *M. sympodialis* và *M. slooffiae* nhưng không tìm thấy *M. cuniculi*. Tất nhiên, sự khác biệt về phân bố loài có thể đến từ địa dư khác nhau. Một nghiên cứu của Gaitanis (2006) sử dụng phương pháp PCR- SSCP cho kết quả loài gặp chủ yếu là *M. globosa* ở 90% trường hợp trong đó 77% trường hợp nhiễm *M. globosa* đơn thuần và 13% trường hợp nhiễm *M. globosa* cùng với nhiều loài khác [105]. Trong nghiên cứu, chúng tôi tiến hành PCR sequencing trực tiếp từ vảy da bệnh nhân, có lẽ ảnh hưởng đến sự phát hiện đồng nhiễm. Thực tế, trong quá trình định danh bằng nuôi cấy, chúng tôi tìm thấy nhiều trường hợp đồng nhiễm 2 chủng nấm mà

chủ yếu là *M. globosa* với chủng nấm khác. Tuy nhiên, trong điều kiện hạn chế, chúng tôi không tiến hành định danh chủng đồng nhiễm bởi khuẩn lạc không thuần, khó chính xác trong thực hiện các test kiểm tra.

Như vậy, nghiên cứu của các tác giả và chúng tôi tuy có sự khác nhau về phân bố các loài *Malassezia* nhưng *M. globosa* vẫn là loài thường gặp nhất. Tỷ lệ tìm thấy *M. globosa* của Rezvan Talaei (2014) là 66% [84], của Gaitanis (2006) là 90% [105], của Mojtaba Didehdar (2014) là 61,6% [100] và của nghiên cứu chúng tôi là 73,7%. Điều này phù hợp với y văn thế giới.

Có lẽ nghiên cứu của chúng tôi lần đầu tiên tiến hành PCR sequencing từ bệnh phẩm vảy da tại Việt Nam cho nên gặp nhiều khó khăn trong việc thiết kế và chọn môi chuẩn để tiến hành kỹ thuật xác định loài *Malassezia*. Chúng tôi cho rằng, dù kết quả từ phương pháp PCR sequencing (4 loài) thấp hơn nhiều so với phương pháp định danh từ nuôi cấy (11 loài) và tỷ lệ *M. globosa* khác nhau (nuôi cấy chiếm 42,4% so với PCR sequencing chiếm 73,7%). Nhìn chung, phương pháp PCR sequencing từ vảy da vẫn là một phương pháp có giá trị thực tiễn nhất định và đóng góp thêm một kỹ thuật mới trong xác định nhanh loài *Malassezia*.

4.2. Hiệu quả điều trị lang ben bằng thuốc kháng nấm nhóm azole

Trong 271 bệnh nhân bị lang ben và có xét nghiệm nuôi cấy định danh loài, chúng tôi loại 10 bệnh nhân không đủ tiêu chuẩn lựa chọn điều trị (dưới 16 tuổi, có bệnh lý gan thận kèm theo), còn lại 261 bệnh nhân được chia ngẫu nhiên thành 3 nhóm điều trị. Sau 4 tuần, có 17 bệnh nhân không khám lại và không tuân thủ điều trị, chúng tôi có được 244 bệnh nhân đáp ứng đủ tiêu chuẩn với kết quả: nhóm 1 có 81 bệnh nhân dùng phác đồ fluconazole uống và ketoconazole tắm gội, nhóm 2 có 80 bệnh nhân dùng phác đồ itraconazole uống, nhóm 3 có 83 bệnh nhân điều trị bằng ketoconazole tắm gội đơn thuần.

4.2.1. So sánh triệu chứng lâm sàng, cận lâm sàng trước và sau điều trị

❖ Triệu chứng vảy da

Vảy da là triệu chứng quan trọng trong các bệnh lý do nấm nói chung và *Malassezia* nói riêng. Trước điều trị, hầu như tất cả bệnh nhân lang ben đều có vảy da. Tỷ lệ có vảy da sau điều trị là 28,7% giảm so với trước điều trị (99,6%), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$ (bảng 3.13). Trong các nhóm điều trị nhận các phác đồ khác nhau, tỷ lệ bệnh nhân hết vảy da ở nhóm 1 (78,8%) cao hơn nhóm 2 (68,8%) và nhóm 3 (67,5%), sự khác biệt so với trước điều trị đều có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$. Các kết quả này thấp hơn Talel Badri và cs (2016), hiệu quả làm sạch vảy da bằng fluconazole kết hợp ketoconazole đạt 100% sau 28 ngày điều trị, nhóm chứng dùng fluconazole đơn thuần đạt 87,5% [81]. Tuy nhiên trong nghiên cứu này, tác giả chỉ theo dõi 15 bệnh nhân ở nhóm chứng và 11 bệnh nhân ở nhóm bệnh sau 28 ngày điều trị. Sự khác biệt có lẽ do cỡ mẫu nghiên cứu, cách lựa chọn bệnh nhân. Theo Bùi Văn Đức và cộng sự (2004) điều trị bằng fluconazole đơn thuần và itraconazole đơn thuần, tỷ lệ hết vảy sau 4 tuần điều trị lần lượt là 81,8% và 79,4% [106]. Phạm Thu Hiền (2014) sử dụng fluconazole liều duy nhất 400 mg so sánh với itraconazole 200mg trong 1 tuần, kết quả tỷ lệ làm sạch vảy da sau 4 tuần lần lượt là 89,33% và 93,33% [77]. Như vậy, kết quả của chúng tôi là phù hợp với các nghiên cứu khác nhau tại Việt Nam.. Bình thường, lớp sừng là thành phần ngoài cùng trong cấu trúc da người, bao gồm khoảng 8-14 lớp tế bào, trung bình mỗi ngày có 1-2 lớp bị bong ra. Để thay mới lớp tế bào sừng mất khoảng 2 tuần. Trên bệnh nhân lang ben, sự tương tác giữa các tế bào nấm và cấu trúc thượng bì của da làm quá trình này diễn ra nhanh hơn, dẫn đến hình thành vảy da. Thông qua enzym lanosterol 14 α -demethylase, các thuốc nhóm azole ức chế quá trình hình thành ergosterol-thành phần chính cấu tạo nên màng tế bào nấm. Qua đó, các azole kìm hãm sự

phát triển và biệt hóa của tế bào nấm đồng thời kết hợp với sự bong của lớp sừng làm cho bề mặt thương tổn nhanh nhũn trở lại. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn của các tác giả khác có thể do thói quen sinh hoạt, không thực hiện đúng hướng dẫn dùng thuốc, và cơ địa mỗi người.

❖ Triệu chứng ngứa

Ngứa là một triệu chứng cơ năng thường gặp trong nhiều bệnh lý khác nhau. Ngứa có thể liên quan đến sự hình thành các histamin, các chất trung gian viêm, hoặc đôi khi chỉ là cảm giác chủ quan của mỗi người. Trong nghiên cứu của chúng tôi, có 81,1% bệnh nhân có cảm giác ngứa ở các mức độ khác nhau từ ngứa ít, ngứa khi ra mồ hôi, vận động mạnh đến ngứa nhiều, ngứa thường xuyên (bảng 3.14). Tỷ lệ bệnh nhân còn ngứa sau điều trị là 38,1%, giảm đáng kể so với trước điều trị, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$. Theo bảng 3.13, tỷ lệ bệnh nhân hết ngứa ở nhóm 1 là cao nhất với 66,7%, nhóm 2, nhóm 3 thấp là 53,8% và 65,1%. Các kết quả này so với trước điều trị đều có ý nghĩa về mặt thống kê với $p < 0,001$. Các thuốc nhómazole có hiệu quả tốt với giảm triệu chứng ngứa. Kết quả này thấp hơn Phạm Thu Hiền, tỷ lệ bệnh nhân hết ngứa là 100%, và theo Bùi Văn Đức thì tỷ lệ này là 87,9% sau 1 tuần, phải sau 6 tuần thì toàn bộ bệnh nhân mới hết ngứa [77],[106]. Có lẽ cảm giác ngứa mang tính chủ quan của từng người, phụ thuộc nhiều vào sự nhạy cảm của làn da chung nên các tác giả không đề cập nhiều. Do đó, tỷ lệ hết ngứa sau điều trị của các nghiên cứu có thể khác nhau, đôi khi độc lập với kết quả điều trị. Chúng tôi cho rằng, triệu chứng ngứa ở đây có mối liên quan đến sự tồn tại của vi nấm trên làn da. Các thuốc nhómazole nhìn chung đều kìm hãm sự phát triển của vi nấm, sau đó, nhờ quá trình bong sừng tự nhiên loại bỏ vi nấm khỏi da. Cho nên, triệu chứng ngứa phản ánh một phần nào hiệu quả điều trị với *Malassezia*.

❖ Triệu chứng dát thương tổn

Lang ben là bệnh da do nấm đặc trưng nhất bởi các dát thay đổi màu sắc trên da. Theo kết quả ở bảng 3.15, 100% bệnh nhân trước điều trị có các dát thay đổi màu sắc. Tỷ lệ không có dát thay đổi màu sắc sau điều trị chỉ là 6,1%, tuy nhiên sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$. Bảng 3.15 cho thấy nhóm 1 có số bệnh nhân còn dát thay đổi màu sắc da thấp nhất với 91,4%; nhóm 3 cao nhất với 96,4%; ở nhóm 2 là 93,7%. Kết quả này cao hơn của các tác giả Bùi Văn Đức, Phạm Thu Hiền [106],[77]. *Malassezia* trong quá trình tương tác với da gây ra các dát thay đổi màu sắc, có thể trắng, nâu, hoặc hồng. Acid azelaic do vi nấm tiết ra có khả năng ức chế enzym tyrosin kinase dẫn đến giảm quá trình hình thành sắc tố [70]. Trong quá trình tiến hành nghiên cứu, chúng tôi thấy rằng thương tổn giảm sắc tố tồn tại lâu dài mặc dù bệnh nhân có kết quả xét nghiệm âm tính với nấm. Để thương tổn trở về màu sắc bình thường cần có một khoảng thời gian để các tế bào sắc tố được hình thành sau khi acid do nấm *Malassezia* tiết ra được loại trừ. Thời gian dài hay ngắn phụ thuộc vào từng cá thể, trung bình 2-3 tháng. Khác với dát giảm sắc tố, dát tăng sắc tố và dát hồng thường liên quan đến phản ứng viêm. Quá trình hồi phục của làn da sau phản ứng viêm có lẽ nhanh hơn. Mặc dù mối liên quan giữa màu sắc dát và tỷ lệ không có dát sau điều trị chưa được biết rõ nhưng có thể nhận thấy dát tăng sắc tố và dát hồng đáp ứng với điều trị tốt hơn, thời gian hồi phục về làn da bình thường nhanh hơn so với dát giảm sắc tố. Giải thích cho điều này có lẽ do dát tăng sắc tố và dát hồng thường liên quan đến phản ứng viêm.

❖ Diện tích thương tổn

Nhìn chung, sau điều trị, đa phần bệnh nhân vẫn còn thương tổn thay đổi màu sắc trên da nhưng diện tích các dát này đã thay đổi đáng kể sau khi dùng thuốc. Tại thời điểm 4 tuần, kết quả từ bảng 3.16 cho thấy tỷ lệ bệnh

nhân có diện tích thương tổn trên 30% giảm từ 22,1% trước điều trị xuống còn 11,1% sau điều trị. Trong đó, nhóm 1 có tỷ lệ giảm cao nhất (từ 22,2% xuống 6,2%), nhóm 3 thấp hơn (từ 19,3% xuống 9,6%), nhóm 2 thấp nhất (từ 25,0% xuống 17,5%). Liệu sự khác biệt này do phương pháp điều trị khác nhau? Nhóm 1 được sử dụng fluconazole đường uống và ketoconazole đường bôi, nhóm 2 uống đơn thuần itraconazole còn nhóm 3 chỉ dùng ketoconazole đường bôi. Các nghiên cứu trong invitro đều cho thấy, itraconazole và ketoconazole có hiệu quả đối với nấm *Malassezia* tương đương nhau [92]. Sự khác biệt trong kết quả đến từ phương thức dùng thuốc: dùng đường bôi hiệu quả tốt hơn đường uống. Khi sử dụng đường uống, sinh khả dụng của thuốc phụ thuộc rất lớn vào khả năng hấp thu của cơ thể trong khi đó dùng đường bôi, phụ thuộc vào các đặc tính của làn da bao gồm độ ẩm, độ dầu, độ pH.... Chúng tôi cho rằng, kết quả trên là phù hợp, phản ánh đúng đặc điểm của bệnh theo các tác giả trong nước và trên thế giới.

❖ **Mức độ bệnh**

Mức độ bệnh được đánh giá dựa trên các chỉ số bao gồm ngứa, vảy da, diện tích thương tổn cho điểm từ 0-3. Kết quả thu được trong bảng 3.17, tổng điểm của mức độ bệnh sau điều trị ($2,4 \pm 1,3$) thấp hơn so với trước điều trị ($4,6 \pm 1,5$), sự thay đổi có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$. Đối với các nhóm điều trị, độ giảm tổng điểm của nhóm 1 cao nhất ($2,5 \pm 1,1$), nhóm 3 thấp hơn ($2,1 \pm 0,8$), nhóm 2 thấp nhất ($2,0 \pm 1,0$). Kết quả này tương tự khi đánh giá các triệu chứng vảy da, ngứa, hay diện tích thương tổn đơn lẻ. Mức độ bệnh là một tiêu chí quan trọng để lựa chọn các thuốc điều trị. Các tác giả có xu hướng sử dụng các thuốc điều trị toàn thân với các bệnh nhân bị bệnh mức độ vừa đến nặng. Nghiên cứu của chúng tôi các nhóm bệnh nhân được phân chia hoàn toàn ngẫu nhiên, không lựa chọn theo mức độ bệnh. Sau điều trị 4 tuần, hiệu quả làm giảm mức độ bệnh của nhóm 1 cao hơn nhóm 2, nhóm 3. Tắm gội ketoconazole 2% đơn thuần cho hiệu quả thấp hơn có lẽ do sự hấp thu

thuốc trên da đường tại chỗ thấp hơn so với đường toàn thân, nhất là sự tuân thủ điều trị, lưu dầu trên da 5-10 phút, xoa tắm toàn thân không được áp dụng dẫn đến làm giảm hiệu quả điều trị tại chỗ. Việc sử dụng itraconazole đơn thuần cũng cho hiệu quả giảm các triệu chứng lâm sàng kém hơn sử dụng kết hợp fluconazole và ketoconazole 2%.

❖ Xét nghiệm nuôi cấy nấm

Để đánh giá bệnh nhân khỏi bệnh hay không, xét nghiệm tìm nấm cần được tiến hành. Kết quả bảng 3.18 cho thấy xét nghiệm nấm từ dương tính thành âm tính là 76,6%, tỉ lệ giảm này so với trước điều trị có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$.

Nhóm 1 có tỉ lệ xét nghiệm âm tính với nấm sau điều trị là 81,5%. Kết quả này thấp hơn của Talel Badri với 91% ở nhóm dùng kết hợp fluconazole và ketoconazole 2% [81]. Nghiên cứu của Fonzo và cs (2008) cho kết quả 100% bệnh nhân xét nghiệm nấm sau điều trị 5 tuần với ketoconazole dạng kem 2% đơn thuần [107]. Kết quả nghiên cứu của Fernando Monten-Gei và cộng sự năm 1999 tại Mexico; Mehme Karakas và cộng sự năm 2005 tại Thổ Nhĩ Kỳ với cùng phác đồ fluconazole 300 mg trong 2 tuần, tỷ lệ bệnh nhân âm tính với nấm sau 4 tuần điều trị lần lượt là 77% và 77,5% [108],[88]. Theo thống kê của Aditya K. Gupta và cộng sự năm 2014 thì các phác đồ điều trị lang ben bằng fluconazole từ năm 1995 đến năm 2004 gồm: 450mg liều duy nhất, 400 mg liều duy nhất, 300mg/tuần trong tuần 1,3; 300mg/tuần trong 2 tuần liên tiếp, 150mg/tuần trong 4 tuần....thì tỷ lệ bệnh nhân âm tính với nấm từ 44% đến 100% [4]. Theo đó, tác giả khuyến cáo nên dùng phác đồ 300mg/tuần trong 2 tuần để điều trị bệnh lang ben.

Kết quả ở bảng 3.18 cũng cho thấy trong 80 bệnh nhân được điều trị bằng itraconazole 200mg/ ngày trong 7 ngày liên tiếp, sau 4 tuần điều trị có 76,3% bệnh nhân âm tính với nấm. Cùng phác đồ điều trị itraconazole 200mg/ngày trong 7 ngày liên tiếp, kết quả nghiên cứu của Fernando Monten-Gei hay của Wahab và cộng sự ở Bagladesh cho kết quả âm tính lần lượt là 73% và 78%

[108]. Tại Việt Nam tỉ lệ này là 90% trong nghiên cứu của Phạm Thu Hiền, 77,8% trong nghiên cứu của Nguyễn Văn Hoàn hay 72,7% trong nghiên cứu của Bùi Văn Đức [77],[38],[106]. Theo thống kê của Aditya K. Gupta và cộng sự thì các phác đồ điều trị lang ben bằng itraconazole từ năm 1987 đến năm 2004 thì có tỉ lệ khỏi từ 50% đến 100%. Trong đó tác giả khuyến nghị nên dùng phác đồ itraconazole 200mg/ngày trong 7 ngày liên tiếp.

Đối với nhóm 3 điều trị bằng ketoconazole đơn thuần, tỉ lệ xét nghiệm nấm âm tính sau 4 tuần là 72,3%. Với cùng phác đồ, tỷ lệ này thấp hơn Rigopoulos (2007) là 81% [109], Di Fonzo (2008) là 100% [107], tương đương Shi (2014) là 72% [71]. Sự khác biệt này có lẽ là do chúng tôi lựa chọn xét nghiệm nuôi cấy nấm sau điều trị làm tiêu chuẩn trong khi các nghiên cứu kể trên đều sử dụng xét nghiệm soi trực tiếp tìm nấm.

Như vậy, chúng tôi thấy hiệu quả khỏi về vi sinh (xét nghiệm nấm âm tính) ở các nhóm nghiên cứu là phù hợp với các nghiên cứu khác trên thế giới và trong nước.

4.2.2. Kết quả điều trị

4.2.2.1. Kết quả điều trị sau 4 tuần

Sau 4 tuần, chúng tôi đánh giá hiệu quả điều trị theo bảng điểm (bảng 2.2). Kết quả được trình bày ở bảng 3.19. Tỉ lệ khỏi chung của 3 nhóm dùng thuốc kháng nấm nhóm azole là 73,8%. Tỉ lệ đỡ giảm là 26,2%, và không có bệnh nhân nào không khỏi. So với tỉ lệ khỏi về mặt vi sinh (xét nghiệm nấm âm tính), tỉ lệ này thấp hơn (73,8% với 76,6%). Trong những bệnh nhân có xét nghiệm âm tính vẫn có một tỉ lệ nhỏ mức độ bệnh không giảm hoặc giảm ít. Tuy nhiên, nhìn chung, các thuốc nhóm azole hiệu quả tốt với lang ben.

❖ Theo nhóm điều trị

Trong nghiên cứu, chúng tôi sử dụng 3 phương pháp khác nhau để tìm hiểu mối liên quan với hiệu quả điều trị. Kết quả được trình bày trong bảng 3.20 cho thấy, nhóm 1 có tỉ lệ bệnh nhân đạt kết quả điều trị tốt cao nhất, chiếm 79,0%,

nhóm 3 chiếm tỉ lệ thấp nhất với 71,1%, tỉ lệ này ở nhóm 2 là 71,3%, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm với $p > 0,05$.

Bảng 4.2. Kết quả điều trị bệnh lang ben bằng các phác đồ

Tài liệu tham khảo	TK NC	Phác đồ điều trị	SL BN	Tỉ lệ xét nghiệm nấm âm tính	Tỉ lệ chữa khỏi hoàn toàn
Kokturk et al. 2002 [79]	O,R	ITZ 200 mg × 5 ngày	20	Ở ngày 28, 14/20= 70%	Ở ngày 28, 14/20= 70%
		ITZ 400 mg liều duy nhất	20	4/20 = 20%	4/20 = 20%
		ITZ 400mg x 3 ngày	20	15/20 = 75%	15/20 = 75%
Di Fonzo et al. 2008 [107]	R	Dầu gội KTZ 1%, 1 lần/ngày x 14 ngày	22	Ở tuần 5, 18/18=100%	Ở tuần 5, 5/18= 28%
		Dầu gội KTZ 2% x 14 ngày	24	19/19=100%	9/19=47%
Karakas et al. 2005 [95]	O	FCZ 300mg/tuần × 2 tuần	44	Ở tuần 4, 31/40= 78%	Ở tuần 4, 30/40= 75%
Nghiên cứu này	O	FCZ 300mg 1l/tuần kết hợp dầu gội KTZ 2l/tuần x 2 tuần	80	ở tuần thứ 4, 81,5%	ở tuần thứ 4, 79,0%
		ITZ 200mg/ngày x 7 ngày	80	76,3%	71,3%
		KTZ 2% 2l/tuần x 2 tuần	80	72,3%	71,1%

(O: thử nghiệm mở, R: thử nghiệm ngẫu nhiên, TKNC: Thiết kế nghiên cứu, SLBN: số lượng bệnh nhân)

Ketoconazole là thế hệ đầu tiên của nhóm azole ra đời năm 1980. Cho đến hiện nay, ở một số nước đang phát triển, ketoconazole vẫn được sử dụng như một thuốc đầu tay trong điều trị các bệnh lý nhiễm nấm nông trên da. Hiện nay, tại Việt Nam, ketoconazole dạng đường uống không còn được lưu hành, thay vào đó, ketoconazole tại chỗ dạng gel hoặc dạng dầu gội được sử dụng chủ yếu. Trong nghiên cứu này chúng tôi cũng sử dụng ketoconazole 2% dạng dầu gội để điều trị bệnh lang ben. Sau 4 tuần điều trị, tỉ lệ chữa khỏi hoàn toàn là 71,3%, tỉ lệ đỡ giảm là 28,9%, không có bệnh nhân nào không

khỏi (bảng 3.20). Nghiên cứu của Di Fonzo (2008) so sánh sử dụng dầu gội ketoconazole 1% và dầu gội ketoconazole 2% 1 lần 1 ngày trong 14 ngày cho thấy tỉ lệ chữa khỏi hoàn toàn sau 5 tuần cũng là 100% [107]. Trong một nghiên cứu khác, Aggarwal (2003) sử dụng dầu gội ketoconazole 2% 1 lần/tuần trong 3 tuần, tỉ lệ xét nghiệm nấm âm tính sau 4 tuần là 95% tuy nhiên tỉ lệ chữa khỏi hoàn toàn chỉ là 5%, và có 1 bệnh nhân tái phát sau 3 tháng [110]. Kết quả này có sự khác biệt với nghiên cứu của chúng tôi, tỉ lệ xét nghiệm nấm âm tính sau 4 tuần là 72,3% và tỉ lệ chữa khỏi hoàn toàn là 71,1% (bảng 3.18 và 3.20). Có thể sử dụng cùng một thuốc điều trị nhưng những phương pháp sử dụng khác nhau có thể đem đến sự khác biệt trong điều trị. Tác giả Di Fonzo sử dụng ketoconazole 2% 1 lần/ngày trong 14 ngày, Aggarwal sử dụng 1 lần/tuần còn chúng tôi sử dụng 1 lần/ngày tắm toàn thân và 3 lần/tuần với gội đầu. Nghiên cứu của Rigoponlos (2007) sử dụng phương pháp tương tự Di Fonzo, tỉ lệ chữa khỏi hoàn toàn sau 4 tuần là 81% [109]. Tác giả Cantrell (2014) sử dụng dầu gội ketoconazole 2% 2 lần/ngày trong 14 ngày, tỉ lệ xét nghiệm nấm âm tính ở tuần thứ 4 là 55%, có 1 bệnh nhân tái phát sau 4 tuần [111]. Nghiên cứu của Shi (2014) sử dụng phương pháp tương tự Cantrell (2014), tỉ lệ xét nghiệm nấm âm tính sau 4 tuần là 72% [71]. Các kết quả này thấp hơn nghiên cứu của chúng tôi.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng đánh giá hiệu quả điều trị của một thuốc được sử dụng phổ biến tại Việt Nam, itraconazole với liều 200mg/ngày trong 7 ngày. Kết quả sau 4 tuần tỉ lệ chữa khỏi hoàn toàn là 71,1%. Nghiên cứu của Kose và cs (2002) được điều trị itraconazole 200 mg/ ngày trong 7 ngày, tỷ lệ khỏi bệnh là 79,99% và có cải thiện 13,33% [78]. Phác đồ của tác giả tương tự thiết kế nghiên cứu của chúng tôi tuy nhiên kết quả thu được cao hơn. Korturk và cs (2002) so sánh hiệu quả của phác đồ itraconazole 200 mg/ngày trong 5 ngày với các phác đồ 400mg duy nhất/ngày trong 3 ngày liên tiếp, kết quả hai phác đồ có hiệu quả tương đương [79]. Nghiên cứu của

Mohanty và cs (2001) trên 20 bệnh nhân lang ben với phác đồ itraconazole 100mg x 2 lần/ ngày trong 7 ngày [80], itraconazole có hiệu quả trong 60% trường hợp trong 2 tuần sau khi điều trị và trong 80% các trường hợp sau 3 tuần. Như vậy, so sánh kết quả từ các nghiên cứu khác nhau, chúng tôi cho rằng tỉ lệ chữa khỏi hoàn toàn của phác đồ itraconazole 200mg/ngày trong 7 ngày 71,1% là phù hợp.

Một phác đồ mới lần đầu tiên được đưa vào nghiên cứu, uống fluconazole 300mg/tuần và dầu gội ketoconazole 2% 3 lần/tuần trong 2 tuần cũng được chúng tôi đánh giá. Tỉ lệ chữa khỏi hoàn toàn sau 4 tuần là 79,0%. So sánh với nghiên cứu của Badri T (2016), tỉ lệ này là 90%, kết quả của chúng tôi thấp hơn [81]. Chúng tôi và tác giả Badri T cùng thu được kết quả không có bệnh nhân nào tái phát sau điều trị. So sánh với phác đồ điều trị lang ben bằng fluconazole đơn thuần, Montero-Gei và cộng sự tiến hành ở 90 bệnh nhân chia làm 3 nhóm và theo dõi điều trị sau 4 tuần cho kết quả: nhóm 1 uống fluconazole 400mg liều duy nhất ($21/30 = 70\%$), nhóm 2 uống fluconazole 300 mg/tuần x 2 tuần liên tiếp ($29/30 = 97\%$), nhóm 3 uống itraconazole 200 mg x 1 tuần ($24/30 = 80\%$). Vậy trong 3 phác đồ trên nhóm 2 dùng uống fluconazole 300 mg/tuần x 2 tuần liên tiếp tỷ lệ khỏi cao nhất (97%) [112]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn của Montero-Gei.

Qua so sánh với các tác giả khác, chúng tôi thấy kết quả trong nghiên cứu này là phù hợp. Tỉ lệ cao thấp giữa nghiên cứu của chúng tôi và các tác giả khác có lẽ do chúng tôi đánh giá kết quả điều trị theo bảng điểm gồm nhiều tiêu chí lâm sàng và cận lâm sàng trong khi các tác giả chủ yếu đánh giá bằng hiệu quả về mặt vi sinh cận lâm sàng. Chúng tôi cho rằng, dát thay đổi màu sắc sau điều trị hay không là một yếu tố quan trọng trong đánh giá kết quả điều trị. Đồng thời đánh giá tổng điểm mức độ bệnh trước và sau điều trị để khẳng định hiệu quả điều trị bệnh về mặt lâm sàng cho bệnh nhân.

4.2.2.2. Liên quan kết quả điều trị và đặc điểm lâm sàng

❖ Tuổi

Nhóm tuổi cũng có những ảnh hưởng nhất định tới kết quả điều trị. Theo bảng 3.21 nhóm tuổi 10-19 có tỉ lệ khỏi thấp nhất 60,0%, so với các nhóm khác sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Sở dĩ như vậy là do ở nhóm tuổi này sự phát triển của tuyến bã quá mức gây ra tình trạng da nhờn, dầu là nguồn nguyên liệu lý tưởng cho vi nấm ưa lipid *Malassezia* sinh trưởng và phát triển. Do đó, đây là một trong những mục tiêu quan trọng trong điều trị ở nhóm tuổi này. Nhóm tuổi 20-29 tuổi có tỉ lệ khỏi là 71,5%, không có sự khác biệt so với các nhóm còn lại với $p > 0,05$. Về mặt sinh lý bệnh, độ tuổi 20-29 là thời điểm con người phát triển hoàn thiện nhất về mặt thể chất. Sự hoạt động tích cực của hệ thống tuyến bã và tuyến mồ hôi đã tạo ra một môi trường acid lý tưởng cho sự phát triển của các loài nấm, đặc biệt là nấm men ưa mỡ như *Malassezia* spp. Do đó, để điều trị hiệu quả ở nhóm tuổi này, phòng bệnh với các hoạt động thể lực nhẹ nhàng là cần thiết.

❖ Giới

Giới tính cũng đóng vai trò trong nhiều bệnh lý da liễu khác nhau. Bệnh nhiễm nấm đa phần là các bệnh cơ hội, nhìn chung gây bệnh không phụ thuộc vào giới tính. Bảng 3.22 cho thấy tỉ lệ chữa khỏi ở nam, nữ lần lượt là 72,5% và 76,2%, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$. Có thể thấy rằng ở nam giới, sự phát triển hình thể mạnh mẽ hơn nữ giới, cùng với thường xuyên hoạt động thể thao cùng với đó là sự tăng tiết testosterone, tăng sinh lông, tuyến bã dưới da. Các yếu tố thuận lợi này có ảnh hưởng một phần đến tỉ lệ chữa khỏi ở nam thấp hơn nữ. Như chúng tôi đã trình bày trong bảng 3.2, tỉ lệ phát hiện *Malassezia* ở nam là 68,3% cao hơn nữ là 31,7%. Ở người, độ dày da (bao gồm lớp biểu bì và hạ bì) của nam giới lớn hơn của nữ giới, đặc biệt tại bất cứ vị trí nào chất béo dưới da đều cao hơn nữ giới. Dữ liệu trong bảng 3.22 và 3.23 thể hiện điều này khi tỉ lệ khỏi chung ở nam là 72,5% thấp hơn nữ là 76,2%. Điều thú vị là phác đồ kết hợp uống fluconazole kết

hợp tử ketoconazole ở nam có tỉ lệ khỏi 80,4% cao hơn nữ 76,7%. Về mặt sinh bệnh học, những thành phần có trong bã nhờn là một con đường chính dẫn thuốc chính của các thuốc nhómazole. Như đã khẳng định, thành phần bã nhờn ở nam cao hơn nữ, có lẽ làm cho sự kết hợp 2 thuốc fluconazole và ketoconazole cho hiệu quả cao hơn khi sử dụng từng thuốc.

❖ Thời gian bị bệnh

Lang ben là một bệnh nhiễm nấm nhưng có tiến triển mạn tính, hay phát. Trong nghiên cứu chúng tôi đã gặp những bệnh nhân có thời gian bị bệnh rất dài. Kết quả điều trị có sự khác nhau giữa nhóm thời gian bị bệnh dưới 3 tháng và trên 3 tháng, lần lượt là 69,8% và 74,6% (bảng 3.24 và bảng 3.25). Như vậy, có vẻ như thời gian bị bệnh dài hơn thì tỉ lệ khỏi bệnh cao hơn. Thực tế, miễn dịch đối với nấm *Malassezia* thường được hình thành trong thời gian 3 tháng. Khi bị bệnh trên 3 tháng có thể là vi nấm đã thoát được sự tấn công từ hệ thống bảo vệ của cơ thể. Điều trị trong những trường hợp này khó khăn hơn. Mặc dù chưa tìm được nghiên cứu nào tương tự để so sánh, chúng tôi cho rằng kết quả này là phù hợp với điều kiện thực tế. Nhóm bệnh nhân dưới 3 tháng thường là những đối tượng thanh niên khỏe mạnh, có nhiều yếu tố nguy cơ và thuận lợi cho sự phát triển của nấm. Do vậy, đáp ứng với điều trị của nhóm này kém hơn. Đối với thời gian bị bệnh trên 3 tháng, đây đều là nhóm đối tượng có thời gian mắc bệnh lâu dài, bệnh đã tiến triển sang giai đoạn mạn tính, tỉ lệ chung của nhóm này là 74,6% (bảng 3.25). Có lẽ tỉ lệ này thấp là do những bệnh nhân này có thời gian dài sống chung với bệnh, sự quan tâm đến sức khỏe chưa cao, tuân thủ điều trị kém hơn so với các nhóm khác. Dữ liệu trong bảng 3.24 và 3.25 cũng đưa ra một nhận định, phác đồ dùng itraconazole hiệu quả tốt nhất với nhóm bị bệnh dưới 3 tháng trong khi đó sự kết hợp fluconazole và ketoconazole có tỉ lệ khỏi cao nhất ở nhóm bị bệnh trên 3 tháng. Điều này dường như đi ngược với nhận định sự kết hợp 2 thuốc mang lại kết quả điều trị tốt hơn dùng đơn độc 1 thuốc. Cần để ý rằng, itraconazole hiện nay được coi là thuốc đầu tay trong điều trị các bệnh nấm

nông trên da. Sở dĩ như vậy bởi vì itraconazole tác động vào 2 đích CYP51 và CYP3A4, còn fluconazole chỉ tác động đến CYP51. Nấm *Malassezia* trong quá trình tương tác với cơ thể thông qua CYP51 và CYP3A4 [113]. Như vậy, thời gian bị bệnh cũng có thể ảnh hưởng đến kết quả điều trị bệnh lang ben.

❖ Tính chất bệnh

Tính chất bệnh được thể hiện bằng bị bệnh lần đầu hay là bị bệnh tái phát. Hầu hết bệnh nhân đến với chúng tôi đều bị bệnh lần đầu với 210 bệnh nhân so với 34 bị tái phát (bảng 3.26 và 3.27). Khi tiến hành so sánh kết quả điều trị, tỉ lệ khỏi ở nhóm bị bệnh lần đầu là 73,8% cao hơn nhóm bị tái phát 73,5%. Điều này phù hợp với y văn, những bệnh nhân tái phát thường đáp ứng với điều trị kém hơn. Trong lĩnh vực vi sinh, định nghĩa tái phát có nhiều quan điểm khác nhau. Có tác giả cho rằng tái phát là sau khi xét nghiệm kết quả loại gây bệnh lần đầu tiên điều trị và lần tiếp theo điều trị giống nhau. Tuy nhiên, đối với vi nấm *Malassezia*, là loài thuộc vi hệ bình thường, các tác giả đều thống nhất cho rằng tái phát là khi bệnh nhân đã điều trị khỏi, xuất hiện thương tổn thay đổi sắc tố trở lại, và không cần xác định chính xác loài. Xét trên nhóm bị bệnh lần đầu, phác đồ có hiệu quả nhất là fluconazole kết hợp ketoconazole (80,0%) (bảng 3.26). Tuy nhiên, phác đồ có hiệu quả nhất với tính chất bệnh tái phát là sử dụng ketoconazole đơn thuần (83,3%). Giải thích cho kết quả này có nhiều quan điểm khác nhau. Với những bệnh nhân mắc bệnh lần đầu, sự tương tác giữa nấm và cơ thể mạnh mẽ hơn, khi sử dụng các thuốc điều trị mang lại hiệu quả tốt hơn. Một phần không nhỏ, vi nấm *Malassezia* là những vi sinh vật ưa lipid, chúng không có khả năng tự tổng hợp mà sử dụng chính lipid của cơ thể người làm nguồn cung cấp. Những bệnh nhân bị bệnh lần đầu ở đây chủ yếu có diễn biến bệnh trong một khoảng thời gian dài trên 6 tháng. Vậy nên, với những trường hợp này, phác đồ kết hợp fluconazole và ketoconazole cho hiệu quả cao hơn. Với trường hợp bệnh tái phát, căn nguyên mới xuất hiện và đang trong giai đoạn tăng trưởng về kích thước quần thể, đồng thời còn có sự bảo vệ của cơ thể chống lại các tác

nhân. Có lẽ điều đó làm cho phác đồ sử dụng thuốc tại chỗ tẩm gội ketoconazole cho hiệu quả tốt nhất. Ở đây cần xét đến nguyên nhân gây bệnh. Có lẽ kết quả điều trị của thuốc kháng nấm phụ thuộc vào loài nấm gây bệnh nhiều hơn tính chất bệnh.

❖ **Mức độ bệnh**

Chúng tôi cũng tiến hành so sánh kết quả điều trị giữa nhóm bị bệnh nhẹ, vừa và nặng. Dữ liệu trong bảng 3.28 và 3.29 cho thấy, tỉ lệ chữa khỏi đối với mức độ bệnh nhẹ là 87,5% cao hơn so với mức độ bệnh vừa-nặng 69,7%. Điều này cũng phù hợp với y văn Việt Nam và thế giới. Mức độ bệnh nhẹ trong nghiên cứu đa phần là những bệnh nhân bị bệnh cấp tính dưới 3 tháng, thương tổn còn khu trú, có sự quan tâm đến sức khỏe nên tuân thủ điều trị tốt. Đây là nhóm bệnh nhân có nhiều yếu tố tiên lượng kết quả điều trị tốt. Trái ngược với mức độ nhẹ, ở nhóm bệnh nhân mức độ nặng, thương tổn diễn biến rất lâu dài, phản ứng tại chỗ qua giai đoạn cấp chuyển sang mạn, đáp ứng với điều trị kém hơn. Chúng tôi cũng không tìm được mối liên quan giữa kết quả điều trị và mức độ bệnh nhẹ. Sự khác biệt trong kết quả điều trị thể hiện ở bảng 3.28 đều không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$. Tuy nhiên, chúng tôi thấy rằng nhóm 1 có hiệu quả điều trị cao nhất, hơn nhóm 2, nhóm 3. Đối với mức độ bệnh vừa – nặng, theo kết quả từ bảng 3.29, nhóm 1 có tỉ lệ khỏi bệnh cao hơn nhóm 2 và nhóm 3, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Đa phần bệnh nhân đến điều trị với chúng tôi ở mức độ bệnh vừa, kết quả này cho thấy phác đồ kết hợp fluconazole và ketoconazole 2% cho hiệu quả cao hơn các phác đồ trước đó (itraconazole hay ketoconazole 2%), nhất là với mức độ bệnh vừa- nặng. Các kết quả của chúng tôi cũng phù hợp với nghiên cứu của Nguyễn Văn Hoàn (2015), Hoàng Thị Vân (2015), Phạm Thu Hiền (2014), Bùi Văn Đức (2004) [38],[114],[77],[106].

4.2.2.3. Liên quan kết quả điều trị và chủng nấm

Đối với loài *Malassezia*, các thuốc nhóm azole đều có tác dụng tốt. Với *M. globosa*, tỉ lệ khỏi là 70,5% thấp hơn so với các loài khác 76,3%, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$ (bảng 3.30). Cho đến hiện nay, các tác giả vẫn cho rằng, *M. globosa* cùng với *M. sympodialis* là những loài đặc biệt nhất trong loài *Malassezia*. Sở dĩ như vậy bởi vì chỉ có 2 loài này có sự hiện diện của MAT loci, một locus quyết định đến khả năng sinh sản hữu tính của loài. Tuy nhiên, ở đây có 2 quan điểm khác nhau giữa đây có thật sự sinh sản “hữu tính” hay “giả hữu tính”. Laura Pulg (2017) tiến hành nghiên cứu thực nghiệm thấy rằng sau mỗi thế hệ vi nấm *M. sympodialis* được tạo ra đều có sự khác biệt về kiểu gen so với thế hệ trước, tuy nhiên, dường như các gen nằm trên cùng 1 nhiễm sắc thể. Lý giải cho điều này, tác giả cho rằng đây là hiện tượng “giả hữu tính” [115]. Tuy nhiên, điều đáng ngạc nhiên là cho đến hiện nay, chưa tìm thấy hiện tượng kháng thuốc của *M. globosa* và *M. sympodialis* đối với kháng sinh chống nấm nhóm azole. Những dữ liệu từ nghiên cứu của chúng tôi dường như cũng phù hợp quan điểm này. Khi so sánh kết quả điều trị giữa 3 nhóm được trình bày trong bảng 3.31, tỉ lệ chữa khỏi của nhóm 1 là cao nhất 77,8%, nhóm 2 là thấp nhất 62,5%, còn nhóm 3 là 72,4%. Có lẽ sự kết hợp 2 thuốc chống nấm mang lại hiệu quả tốt hơn sử dụng đơn độc một thuốc chống nấm. Ngay từ thời kỳ đầu, các tác giả đã sử dụng ketoconazole như một thuốc điều trị hàng đầu cho bệnh lang ben. Đến khi itraconazole ra đời năm 1992, quan điểm dịch chuyển từ sử dụng ketoconazole sang hướng sử dụng thuốc mới. Nghiên cứu thực nghiệm đều chỉ ra, itraconazole có thể thay thế ketoconazole như một thuốc đầu tay trong điều trị nấm [113]. Cần để ý rằng, ketoconazole là một imidazole còn itraconazole hay fluconazole đều là triazole. Có lẽ một phần sự khác nhau trong cấu trúc ảnh hưởng dẫn đến tác dụng điều trị đối với *M. globosa* của mỗi thuốc là khác biệt. Cần

những nghiên cứu chuyên sâu hơn về cấu trúc *M. globosa* để tìm hiểu về tác động của thuốc chống nấm.

Với *M. furfur*, theo bảng 3.32, tỉ lệ khỏi là 83,8% cao hơn so với các loài còn lại, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$. *M. furfur* là tác nhân gây bệnh được biết đến sớm nhất. Có nhiều nghiên cứu khác nhau đều chỉ ra sự nhạy cảm cao của *M. furfur* với thuốc chống nấm nhóm azole dù đường toàn thân hay tại chỗ [92]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỉ lệ chữa khỏi của *M. furfur* là 83,8%, tỉ lệ này cao hơn của *M. globosa* 76,3%. Theo Florencia D. Rojas (2017), MIC tối thiểu của *M. globosa* là thấp hơn so với *M. furfur* ở các thuốc chống nấm nhóm azole như fluconazole, ketoconazole, itraconazole [116]. Chúng tôi so sánh kết quả điều trị giữa 3 nhóm đối với *M. furfur*. Kết quả trong bảng 3.33 thể hiện nhóm 2 có tỉ lệ chữa khỏi 100%, cao hơn nhóm 1 và nhóm 3 lần lượt là 77,% và 80,0%. Trong phòng thí nghiệm, nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ ức chế tối đa (MIC 50 và MIC 90) của các thuốc chống nấm azole thường dùng đều ở mức rất thấp. Nhưng khi so sánh các thuốc trong nhóm azole ở giá trị MIC 50 và MIC 90, người ta nhận thấy fluconazole có giá trị MIC cao hơn so với MIC của các thuốc cùng nhóm như: Itraconazole, Ketoconazole thậm chí một số thuốc nhóm azole mới ra đời như Voriconazol, Posaconazole. Như vậy kết quả nghiên cứu của chúng tôi là phù hợp.

Với *M. dermatis*, bảng 3.34 cho thấy, tỉ lệ khỏi là 61,4%, thấp hơn so với các loài khác, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Khi xét về hình thái tổn thương lâm sàng, *M. dermatis* có liên quan nhiều đến dát hồng, biểu hiện của một tổn thương viêm. Tại những thương tổn này, diễn ra quá trình tương tác giữa nấm và hệ miễn dịch của cơ thể. Nhìn chung, các thuốc chống nấm nhóm azole không có ảnh hưởng đến hệ miễn dịch mà cơ chế chính là chúng ức chế sự phát triển của nấm thông qua sự ức chế tạo thành ergosterol. Do vậy, điều này có thể là một lý do làm cho tỉ lệ chữa khỏi đối với *M. dermatis* thấp hơn so với các loài còn lại. Khi so sánh 3

nhóm điều trị, có thể thấy rằng phác đồ itraconazole đơn thuần và phác đồ fluconazole kết hợp ketconazole cho tỉ lệ chữa khỏi tương đương nhau (70,0% và 69,2%), cao hơn so với ketoconazole đơn thuần (bảng 3.35). Kết quả này gợi ý rằng dùng thuốc kháng nấm toàn thân có tác dụng tốt với *M. dermatis* hơn là các thuốc tại chỗ.

Như vậy đối với *M. furfur* các thuốc azole có kết quả điều trị khỏi cao, trong khi đó với *M. globosa* và *M. dermatis* kết quả này kém hơn. Điều này gợi ý rằng thêm một loại thuốc điều trị khác kết hợp với azole để đem lại hiệu quả điều trị cao hơn với mỗi loài.

KẾT LUẬN

1. Xác định *Malassezia* trong bệnh lang ben

1.1. Xác định *Malassezia* trong bệnh lang ben bằng nuôi cấy

- Tỷ lệ nuôi cấy *Malassezia* trong bệnh lang ben 90,3%, xác định loài bằng định danh có cải tiến tìm được 11 loài *Malassezia*, chiếm 97,0%. Trong đó, *M. globosa* (42,4%); *M. dermatis* (17,3%); *M. furfur* (14,4%).

- *M. globosa* gây bệnh chủ yếu nhóm 20-29 tuổi chiếm 36,5%, nam nhiều hơn nữ (63,5% và 36,5%); thành thị 51,3%; thời gian bị bệnh trên 6 tháng 69,6%; lần đầu 86,1%, mức độ bệnh vừa 69,6%.

- *M. globosa* phân bố hầu hết dát thương tổn và các vị trí trên cơ thể với hình thái chủ yếu dạng sợi và tế bào nấm men (42,2%). *M. furfur* gặp dát tăng sắc tố và giảm sắc tố, phân bố chủ yếu nửa trên thân mình với hình thái tế bào nấm men (25%). *M. dermatis* phân bố dát tăng sắc tố và dát hồng, phân bố chủ yếu vùng đầu mặt cổ và chi trên.

1.2. Xác định *Malassezia* trong bệnh lang ben bằng PCR sequencing

- Tỷ lệ PCR sequencing *Malassezia* từ vảy da là 59,7%, tỷ lệ định danh *Malassezia* là 91,0% với 4 loài sau: *M. globosa* (73,7%), *M. restricta* (11,7%), *M. sympodialis* (5,0%), *M. cuniculi* (0,6%).

2. Hiệu quả điều trị lang ben bằng thuốc kháng nấm nhóm azole

2.1. Kết quả điều trị chung theo 3 nhóm điều trị

- Sau điều trị 4 tuần, tổng điểm mức độ bệnh và tỷ lệ *Malassezia* gây bệnh đều giảm so với trước điều trị, có ý nghĩa thống kê.

- Tỷ lệ khỏi hoàn toàn sau 4 tuần điều trị thuốc kháng nấm nhóm azole là 73,8%. Tỷ lệ đỡ giảm 26,2%, không có bệnh nhân không khỏi.

- Kết hợp fluconazole và dầu gội ketconazole có tỷ lệ khỏi 79,0% cao hơn uống itraconazole và tắm gội ketoconazole (71,3% và 71,1%).

2.2. Kết quả điều trị theo đặc điểm lâm sàng

- Kết hợp fluconazole và dầu gội ketconazole hiệu quả tốt với thời gian bị bệnh trên 3 tháng (82,4%) , mức độ bệnh vừa-nặng (75,8%).
- Uống itraconazole hiệu quả tốt với thời gian bị bệnh dưới 3 tháng (76,5%), mức độ bệnh nhẹ (90,0%).
- Tắm gội ketoconazole ít hiệu quả với thời gian và mức độ bệnh.

2.3. Kết quả điều trị theo loài *Malassezia*

- *M. furfur* có tỉ lệ đáp ứng với thuốc kháng nấm nhóm azole là 83,8% cao hơn các loài còn lại.
- *M. globosa* và *M. dermatis* có tỉ lệ đáp ứng với thuốc kháng nấm nhóm azole lần lượt là 70,5% và 61,4% thấp hơn các loài còn lại.
- Kết hợp fluconazole và dầu gội ketconazole có hiệu quả tốt với *M. globosa* (77,8%), uống itraconazole có hiệu quả tốt với *M. furfur* (100,0%), *M. dermatis* (70,0%).

KIẾN NGHỊ

Từ kết quả trên chúng tôi xin kiến nghị:

- Xác định *Malassezia* gây bệnh lang ben cần tiến hành xét nghiệm trực tiếp và nuôi cấy định danh loài.

- Phương pháp kết hợp đường uống bằng fluconazole 300mg/tuần và tắm gội toàn thân ketoconazole 2% 2 lần/ tuần trong 2 tuần rất hiệu quả, thuận tiện và kinh tế cho bệnh nhân lang ben.

**CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU ĐÃ ĐƯỢC CÔNG BỐ
LIÊN QUAN ĐẾN NỘI DUNG LUẬN ÁN**

1. Nguyễn Hữu Sáu, Trần Cẩm Vân, Hoàng Thị Vân (2015), So sánh hiệu quả điều trị bệnh lang ben bằng uống fluconazole 300mg/tuần x 2 tuần với uống itraconazole 200 mg/ngày x 7 ngày, *Da liễu học Việt Nam*, 24, 42 – 48.
2. Nguyễn Văn Hiếu, Trần Cẩm Vân, Nguyễn Hữu Sáu (2015), Đặc điểm lâm sàng và một số yếu tố liên quan của bệnh lang ben, *Da liễu học Việt Nam*, 23, 15 – 20.
3. Hoàng Thị Vân, Nguyễn Hữu Sáu, Trần Cẩm Vân (2015), Đánh giá hiệu quả điều trị bệnh lang ben bằng uống fluconazole 300 mg/tuần trong 2 tuần tại Bệnh viện Da liễu Trung ương, *Y dược lâm sàng 108*, 12(3), 68 – 73.
4. Trần Cẩm Vân, Nguyễn Hữu Sáu (2016), Điều trị bệnh lang ben, *Da liễu học Việt Nam*, 24, 67 – 70.
5. Trần Cẩm Vân, Nguyễn Minh Thu, Nguyễn Hữu Sáu (2016). Đánh giá hiệu quả điều trị bệnh lang ben bằng fluconazole kết hợp ketoconazol tại Bệnh viện Da liễu Trung ương, *Y học Việt Nam*, 456(1), 125-127.
6. Trần Cẩm Vân, Trần Hậu Khang, Nguyễn Thị Xuân, Nguyễn Minh Thu, Nguyễn Hữu Sáu (2017), “ Tình hình nhiễm *Malassezia* ở một số bệnh da thường gặp tại Bệnh viện Da Liễu TW”, *Y học Việt Nam*, 457(1), 176 – 179.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cabañes F. Javier (2014), Malassezia Yeasts: How Many Species Infect Humans and Animals?, *PLoS Pathog*, 10(2), e1003892.
2. Prohic Asja, Jovovic Sadikovic Tamara, Krupalija-Fazlic Mersiha et al (2016), Malassezia species in healthy skin and in dermatological conditions, *International Journal of Dermatology*, 55(5), 494-504.
3. Velegraki A., Cafarchia C., Gaitanis G. et al (2015), Malassezia infections in humans and animals: pathophysiology, detection, and treatment, *PLoS Pathog*, 11(1), e1004523.
4. Aditya K. Gupta, Kelly A. Foley (2015), Antifungal Treatment for Pityriasis Versicolor, *Journal of Fungi*, 113-29.
5. Gordon Morris A. (1951), The Lipophilic Mycoflora of the Skin. I. In Vitro Culture of *Pityrosporum orbiculare* n. sp, *Mycologia*, 43(5), 524-535.
6. Gueho E., Midgley G., Guillot J. (1996), The genus *Malassezia* with description of four new species, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 69(4), 337-355.
7. Guillot J., Gueho E., Lesourd M. et al (1996), Identification of *Malassezia* species : A practical approach, *Journal de mycologie médicale*, 6(3), 103-110.
8. Sugita T., Takashima M., Shinoda T. et al (2002), New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis, *J Clin Microbiol*, 40(4), 1363-1367.
9. Sugita T., Takashima M., Kodama M. et al (2003), Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects, *J Clin Microbiol*, 41(10), 4695-4699.

10. Sugita Takashi, Tajima Mami, Takashima Masako et al (2004), A New Yeast, *Malassezia yamatoensis*, Isolated from a Patient with Seborrheic Dermatitis, and Its Distribution in Patients and Healthy Subjects, *Microbiology and Immunology*, 48(8), 579-583.
11. Hirai A., Kano R., Makimura K. et al (2004), P-15 Identification of *Malassezia* spp. isolated from a cat and cattle, including a new species, *M. nana*, *Veterinary Dermatology*, 1545-45.
12. Cabanes F. J., Theelen B., Castella G. et al (2007), Two new lipid-dependent *Malassezia* species from domestic animals, *FEMS Yeast Res*, 7(6), 1064-1076.
13. Cabañes F. J., Vega S., Castellá G. (2011), *Malassezia cuniculi* sp. nov., a novel yeast species isolated from rabbit skin, *Med Mycol*, 49(1), 40-48.
14. Crespo Erchiga V., Delgado Florencio V. (2002), *Malassezia* species in skin diseases, *Curr Opin Infect Dis*, 15(2), 133-142.
15. Gupta A. K., Batra R., Bluhm R. et al (2004), Skin diseases associated with *Malassezia* species, *J Am Acad Dermatol*, 51(5), 785-798.
16. Teun Boekhout, Eveline Guého-Kellermann, Peter Mayser et al (2010), *Malassezia and the Skin*, 1 ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin.
17. Gaitanis G., Magiatis P., Hantschke M. et al (2012), The *Malassezia* Genus in Skin and Systemic Diseases, *Clin Microbiol Rev*, 25(1), 106-141.
18. Vlachos C., Schulte B. M., Magiatis P. et al (2012), *Malassezia*-derived indoles activate the aryl hydrocarbon receptor and inhibit Toll-like receptor-induced maturation in monocyte-derived dendritic cells, *British Journal of Dermatology*, 167(3), 496-505.

19. Magiatis P., Pappas P., Gaitanis G. et al (2013), Malassezia yeasts produce a collection of exceptionally potent activators of the Ah (dioxin) receptor detected in diseased human skin, *J Invest Dermatol*, 133(8), 2023-2030.
20. Murray I. A., Patterson A. D., Perdew G. H. (2014), Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe, *Nat Rev Cancer*, 14(12), 801-814.
21. Schönborn Christina, Bolck Frauke (1988), Histologischer Pilzbefall in Hauttumoren, *Mycoses*, 31(8), 411-417.
22. Thomas D. S., Ingham E., Bojar R. A. et al (2008), In vitro modulation of human keratinocyte pro- and anti-inflammatory cytokine production by the capsule of Malassezia species, *FEMS Immunol Med Microbiol*, 54(2), 203-214.
23. Ashbee H. R., Ingham E., Holland K. T. et al (1994), Cell-mediated immune responses to Malassezia furfur serovars A, B and C in patients with pityriasis versicolor, seborrheic dermatitis and controls, *Exp Dermatol*, 3(3), 106-112.
24. Borda L. J., Wikramanayake T. C. (2015), Seborrheic Dermatitis and Dandruff: A Comprehensive Review, *J Clin Investig Dermatol*, 3(2).
25. Tajima M., Sugita T., Nishikawa A. et al (2008), Molecular analysis of Malassezia microflora in seborrheic dermatitis patients: comparison with other diseases and healthy subjects, *J Invest Dermatol*, 128(2), 345-351.
26. Saunders C. W., Scheynius A., Heitman J. (2012), Malassezia Fungi Are Specialized to Live on Skin and Associated with Dandruff, Eczema, and Other Skin Diseases, *PLoS Pathog*, 8(6).

27. Trần Cẩm Vân, Trần Hậu Khang, Nguyễn Thị Xuân và cộng sự (2017), Khảo sát tình hình nhiễm *Malassezia* spp. ở một số bệnh da thường gặp tại Bệnh viện Da liễu Trung Ương từ tháng 1 đến tháng 12 năm 2012, *Y học Việt Nam*, 466(1), 176-179.
28. Gioti A., Nystedt B., Li W. et al (2013), Genomic insights into the atopic eczema-associated skin commensal yeast *Malassezia sympodialis*, *MBio*, 4(1), e00572-00512.
29. Glatz M., Bosshard P. P., Hoetzenecker W. et al (2015), The Role of *Malassezia* spp. in Atopic Dermatitis, *J Clin Med*, 4(6), 1217-1228.
30. Bulmer G. S., Pu X. M., Yi L. X. (2008), *Malassezia* folliculitis in China, *Mycopathologia*, 165(6), 411-412.
31. Jacinto-Jamora S., Tamesis J., Katigbak M. L. (1991), *Pityrosporum* folliculitis in the Philippines: diagnosis, prevalence, and management, *J Am Acad Dermatol*, 24(5 Pt 1), 693-696.
32. Chowdhary A., Randhawa H. S., Sharma S. et al (2005), *Malassezia furfur* in a case of onychomycosis: colonizer or etiologic agent?, *Med Mycol*, 43(1), 87-90.
33. Serrano Falcón Cristina, Serrano Falcón Ma del Mar, Delgado Ceballos Jaime et al (2009), Onychomycosis by *Chaetomium* spp, *Mycoses*, 52(1), 77-79.
34. Marcon M. J., Powell D. A., Durrell D. E. (1986), Methods for optimal recovery of *Malassezia furfur* from blood culture, *J Clin Microbiol*, 24(5), 696-700.
35. Hellgren L., Vincent J. (1983), The incidence of tinea versicolor in central Sweden, *J Med Microbiol*, 16(4), 501-502.
36. Trần Lan Anh (1996), Tình hình bệnh da ở một số xã Thanh Trì, Hà Nội, *Nội san Da liễu*, 215.

37. Nguyễn Thị Tuyết Mai (1998), *Tình hình bệnh Lang ben và đánh giá tác dụng điều trị bằng uống ketoconazole tại viện Da liễu từ năm 1997-1998*, Luận án Thạc sỹ y học. Đại học Y Hà Nội.
38. Nguyễn Văn Hoàn (2015), *Đánh giá hiệu quả điều trị bệnh Lang ben bằng uống itraconazole liều xung*, Luận văn Thạc sỹ y học. Đại học Y Hà Nội.
39. Gupta A. K., Kohli Y., Faergemann J. et al (2001), Epidemiology of *Malassezia* yeasts associated with pityriasis versicolor in Ontario, Canada, *Med Mycol*, 39(2), 199-206.
40. Prohic A., Ozegovic L. (2007), *Malassezia* species isolated from lesional and non-lesional skin in patients with pityriasis versicolor, *Mycoses*, 50(1), 58-63.
41. Zeinali E., Sadeghi G., Yazdinia F. et al (2014), Clinical and epidemiological features of the genus *Malassezia* in Iran, *Iran J Microbiol*, 6(5), 354-360.
42. Santana J. O. (2013), Pityriasis versicolor: clinical-epidemiological, 88(2), 216-221.
43. Abdul- Razak Sh. Hasan, Abass A. Alduliami, Khidier M. Al-Kialy (2009), Clinical and fungal study of pityriasis versicolor infection among patients with skin mycoses in Baquba, *Iraqi Journal of Community Medicine*, 130-33.
44. Tarazooie B., Kordbacheh P., Zaini F. et al (2004), Study of the distribution of *Malassezia* species in patients with pityriasis versicolor and healthy individuals in Tehran, Iran, *BMC Dermatol*, 45.
45. Xu H., Lan D., Yang B. et al (2015), Biochemical Properties and Structure Analysis of a DAG-Like Lipase from *Malassezia globosa*, *Int J Mol Sci*, 16(3), 4865-4879.

46. Sommer B., Overy D. P., Haltli B. et al (2016), Secreted lipases from *Malassezia globosa*: recombinant expression and determination of their substrate specificities, *Microbiology*, 162(7), 1069-1079.
47. F. Sanchez Fajardo (2000), *Malassezia globosa* as the causative agent of pityriasis versicolor, *British Journal of Dermatology* 143799.
48. Vullo D., Del Prete S., Capasso C. et al (2016), Carbonic anhydrase activators: Activation of the beta-carbonic anhydrase from *Malassezia globosa* with amines and amino acids, *Bioorg Med Chem Lett*, 26(5), 1381-1385.
49. Del Prete S., Vullo D., Osman S. M. et al (2015), Anion inhibition studies of the dandruff-producing fungus *Malassezia globosa* beta-carbonic anhydrase MgCA, *Bioorg Med Chem Lett*, 25(22), 5194-5198.
50. Entezari Heravi Yeganeh, Bua Silvia, Nocentini Alessio et al (2017), Inhibition of *Malassezia globosa* carbonic anhydrase with phenols, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(9), 2577-2582.
51. Preuss J., Hort W., Lang S. et al (2013), Characterization of tryptophan aminotransferase 1 of *Malassezia furfur*, the key enzyme in the production of indolic compounds by *M. furfur*, *Exp Dermatol*, 22(11), 736-741.
52. Youngchim S., Nosanchuk J. D., Pornsuwan S. et al (2013), The role of L-DOPA on melanization and mycelial production in *Malassezia furfur*, *PLoS One*, 8(6), e63764.
53. Kruppa M. D., Lowman D. W., Chen Y. H. et al (2009), Identification of (1->6)-beta-D-glucan as the major carbohydrate component of the *Malassezia sympodialis* cell wall, *Carbohydr Res*, 344(18), 2474-2479.
54. Selander C., Engblom C., Nilsson G. et al (2009), TLR2/MyD88-dependent and -independent activation of mast cell IgE responses by the skin commensal yeast *Malassezia sympodialis*, *J Immunol*, 182(7), 4208-4216.

55. Hata T. R., Gallo R. L. (2008), Antimicrobial Peptides, Skin Infections and Atopic Dermatitis, *Semin Cutan Med Surg*, 27(2), 144-150.
56. Lodha N., Poojary S. A. (2015), A Novel Contrast Stain for the Rapid Diagnosis of Pityriasis Versicolor: A Comparison of Chicago Sky Blue 6B Stain, Potassium Hydroxide Mount and Culture, *Indian J Dermatol*, 60(4), 340-344.
57. Anggraeni Noviandini, Sunarso Suyoso, Linda Astari (2017), Parker ink-KOH stain, Chicago Sky Blue (CSB) stain, and Fungi Culture, for The Diagnosis of Superficial Dermatomycoses *Berkala Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin – Periodical of Dermatology and Venereology*, 29(1), 21-29.
58. Rathnapriya N, UshaKrishnan K, Janaki C et al (2016), Isolation of Malassezia yeast using Modified Dixon's Agar from Pityriasis versicolor lesions, *Indian Journal of Basic and Applied Medical Research*, 5(3), 123-129.
59. Silva V., Fischman O., Zaror L. (1996), Importancia Del examen microscopio directo semi- cuantitativo em el diagnostico de Malassezia furfur, *Rev. Iberoamerica de Micologia*, 1390-92.
60. Nguyễn Văn Hiếu, Trần Cẩm Vân (2016), *Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng và một số yếu tố thuận lợi bệnh lang ben*, Luận văn tốt nghiệp, Đại học Y Hà Nội, Hà Nội.
61. Cafarchia C., Gasser R. B., Figueredo L. A. et al (2011), Advances in the identification of Malassezia, *Mol Cell Probes*, 25(1), 1-7.
62. Kaneko T., Makimura K., Onozaki M. et al (2005), Vital growth factors of Malassezia species on modified CHROMagar Candida, *Med Mycol*, 43(8), 699-704.

63. Kaneko T., Makimura K., Abe M. et al (2007), Revised culture-based system for identification of *Malassezia* species, *J Clin Microbiol*, 45(11), 3737-3742.
64. Kaneko T. (2011), A study of culture-based easy identification system for *Malassezia*, *Med Mycol J*, 52(4), 297-303.
65. Kaneko T., Makimura K., Sugita T. et al (2006), Tween 40-based precipitate production observed on modified CHROMogenic agar and development of biological identification kit for *Malassezia* species, *Med Mycol*, 44(3), 227-231.
66. Shuster S. (1984), The aetiology of dandruff and the mode of action of therapeutic agents, *Br J Dermatol*, 111(2), 235-242.
67. Shparago N. I., Bruno P. P., Bennett J. (1995), Systemic *Malassezia furfur* infection in an adult receiving total parenteral nutrition, *J Am Osteopath Assoc*, 95(6), 375-377.
68. Shibata N., Okanuma N., Hirai K. et al (2006), Isolation, characterization and molecular cloning of a lipolytic enzyme secreted from *Malassezia pachydermatis*, *FEMS Microbiol Lett*, 256(1), 137-144.
69. Gaitanis G., Velegraki A., Frangoulis E. et al (2002), Identification of *Malassezia* species from patient skin scales by PCR-RFLP, *Clin Microbiol Infect*, 8(3), 162-173.
70. Mendez-Tovar L. J. (2010), Pathogenesis of dermatophytosis and tinea versicolor, *Clin Dermatol*, 28(2), 185-189.
71. Shi T. W., Zhang J. A., Tang Y. B. et al (2015), A randomized controlled trial of combination treatment with ketoconazole 2% cream and adapalene 0.1% gel in pityriasis versicolor, *J Dermatolog Treat*, 26(2), 143-146.

72. FDA 2013, posting date. FDA warns that prescribing of Nizoral (ketoconazole) oral tablets for unapproved uses including skin and nail infections continues; linked to patient death. [Online.]
73. Rathi S. K. (2003), Ketoconazole 2% shampoo in pityriasis versicolor: an open trial, *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 69(2), 142-143.
74. Amer Mohamed A., Egyptian Fluconazole Study Group (1997), Fluconazole in the treatment of tinea versicolor, *International Journal of Dermatology*, 36(12), 940-942.
75. Bhogal C. S., Singal A., Baruah M. C. (2001), Comparative efficacy of ketoconazole and fluconazole in the treatment of pityriasis versicolor: a one year follow-up study, *J Dermatol*, 28(10), 535-539.
76. Partap R., Kaur I., Chakrabarti A. et al (2004), Single-dose fluconazole versus itraconazole in pityriasis versicolor, *Dermatology*, 208(1), 55-59.
77. Phạm Thu Hiền (2014), *Đặc điểm Lâm sàng, cận lâm sàng, độ pH da và hiệu quả điều trị bệnh Lang ben bằng fluconazole 400mg liều duy nhất*, Luận văn Thạc sỹ Y học, Đại học Y Hà Nội.
78. Kose O., Bulent Tastan H., Riza Gur A. et al (2002), Comparison of a single 400 mg dose versus a 7-day 200 mg daily dose of itraconazole in the treatment of tinea versicolor, *J Dermatolog Treat*, 13(2), 77-79.
79. Kokturk A., Kaya T. I., Ikizoglu G. et al (2002), Efficacy of three short-term regimens of itraconazole in the treatment of pityriasis versicolor, *J Dermatolog Treat*, 13(4), 185-187.
80. Mohanty J., Sethi J., Sharma M. K. (2001), Efficacy of itraconazole in the treatment of tinea versicolor, *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 67(5), 240-241.
81. Badri T., Hammami H., Bziouche N. et al (2016), Comparative clinical trial: fluconazole alone or associated with topical ketoconazole in the treatment of pityriasis versicolor, *Tunis Med*, 94(2), 107-111.

82. Gupta A. K., Kohli Y., Summerbell R. C. et al (2001), Quantitative culture of *Malassezia* species from different body sites of individuals with or without dermatoses, *Med Mycol*, 39(3), 243-251.
83. Rasi Abbas, Naderi Reza, Behzadi Ashkan Heshmatzade et al (2010), *Malassezia* yeast species isolated from Iranian patients with pityriasis versicolor in a prospective study, *Mycoses*, 53(4), 350-355.
84. Talae R., Katirae F., Ghaderi M. et al (2014), Molecular Identification and Prevalence of *Malassezia* Species in Pityriasis Versicolor Patients From Kashan, Iran, *Jundishapur J Microbiol*, 7(8).
85. Krisanty R. I., Bramono K., Made Wisnu I. (2009), Identification of *Malassezia* species from pityriasis versicolor in Indonesia and its relationship with clinical characteristics, *Mycoses*, 52(3), 257-262.
86. Crespo Erchiga V., Ojeda Martos A., Vera Casano A. et al (2000), *Malassezia globosa* as the causative agent of pityriasis versicolor, *Br J Dermatol*, 143(4), 799-803.
87. Prohic A., Simic D., Sadikovic T. J. et al (2014), Distribution of *Malassezia* species on healthy human skin in Bosnia and Herzegovina: correlation with body part, age and gender, *Iran J Microbiol*, 6(4), 253-262.
88. Karakas M., Turac-Bicer A., Ilkit M. et al (2009), Epidemiology of pityriasis versicolor in Adana, Turkey, *J Dermatol*, 36(7), 377-382.
89. Perpetua Ibekwe (2014), *Correlation of Malassezia species with clinical characteristics of pityriasis versicolor*. the Medical Faculty of Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Germany.
90. Ben Salah S., Makni F., Marrakchi S. et al (2005), Identification of *Malassezia* species from Tunisian patients with pityriasis versicolor and normal subjects, *Mycoses*, 48(4), 242-245.

91. Gupta A. K., Lane D., Paquet M. (2014), Systematic review of systemic treatments for tinea versicolor and evidence-based dosing regimen recommendations, *J Cutan Med Surg*, 18(2), 79-90.
92. Carrillo-Munoz A. J., Rojas F., Tur-Tur C. et al (2013), In vitro antifungal activity of topical and systemic antifungal drugs against *Malassezia* species, *Mycoses*, 56(5), 571-575.
93. Patrick Vandeputte, Selene Ferrari, Alix T. Coste (2012), Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections, *International Journal of Microbiology*, 2012.
94. Phạm Văn Hiến (2009). Bệnh Lang ben. *Bệnh Da liễu*, Nhà xuất bản y học, Hà Nội, 92-95.
95. Karakas M., Durdu M., Memisoglu H. R. (2005), Oral fluconazole in the treatment of tinea versicolor, *J Dermatol*, 32(1), 19-21.
96. Dutta S., Bajaj A. K., Basu S. et al (2002), Pityriasis versicolor: socioeconomic and clinico-mycologic study in India, *Int J Dermatol*, 41(11), 823-824.
97. Kindo A. J., Sophia S. K., Kalyani J. et al (2004), Identification of *Malassezia* species, *Indian J Med Microbiol*, 22(3), 179-181.
98. Chaudhary R., Singh S., Banerjee T. et al (2010), Prevalence of different *Malassezia* species in pityriasis versicolor in central India, *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 76(2), 159-164.
99. Nguyễn Đình Nga, Lê Thị Ngọc Huệ, Phạm Ngọc Hiền Vy (2007), Ly trích và định danh *Malassezia* spp. từ vẩy da của một số người Việt Nam tỉnh nguyên, *Tạp chí Y dược học Thành phố Hồ Chí Minh*, 11(2), 186-191.
100. Didehdar M., Mehbod A. S., Eslamirad Z. et al (2014), Identification of *Malassezia* Species Isolated from Patients with Pityriasis Versicolor Using PCR-RFLP Method in Markazi Province, Central Iran, *Iran J Public Health*, 43(5), 682-686.

101. Framil V. M., Melhem M. S., Szeszs M. W. et al (2011), New aspects in the clinical course of pityriasis versicolor, *An Bras Dermatol*, 86(6), 1135-1140.
102. Phạm Văn Thân (2007). Tổng quan về nấm ký sinh-Bệnh do vi nấm gây ra. *Ký sinh trùng*, Nhà xuất bản y học, Hà Nội, 290-312.
103. Juntachai W., Oura T., Murayama S. Y. et al (2009), The lipolytic enzymes activities of *Malassezia* species, *Med Mycol*, 47(5), 477-484.
104. Afshari Mohammad Ali, Kachuei Reza, Jafari Hossein et al (2017), Molecular Identification of *Malassezia* Species Using PCR-Sequencing Method in Military Forces on Islands of Abu-Musa, Great Tonb and Sirri, Persian Gulf, 2011, *Journal of Military Medicine*, 18(4), 344-352.
105. Gaitanis G., Velegraki A., Alexopoulos E. C. et al (2006), Distribution of *Malassezia* species in pityriasis versicolor and seborrhoeic dermatitis in Greece. Typing of the major pityriasis versicolor isolate *M. globosa*, *Br J Dermatol*, 154(5), 854-859.
106. Bùi Văn Đức, Hoàng Văn Minh, Phan Anh Tuấn (2004), Nghiên cứu điều trị lang ben bằng Itraconazole 400mg liều duy nhất, *Tạp chí Y dược học Thành phố Hồ Chí Minh*.
107. Di Fonzo E. M., Martini P., Mazzatenta C. et al (2008), Comparative efficacy and tolerability of Ketomousse (ketoconazole foam 1%) and ketoconazole cream 2% in the treatment of pityriasis versicolor: results of a prospective, multicentre, randomised study, *Mycoses*, 51(6), 532-535.
108. Montero-Gei Fernando, Robles Miguel Eduardo, Suchil Patricia (1999), Fluconazole vs. Itraconazole in the treatment of tinea versicolor, *International Journal of Dermatology*, 38(8), 601-603.
109. Rigopoulos D., Gregoriou S., Kontochristopoulos G. et al (2007), Flutrimazole shampoo 1% versus ketoconazole shampoo 2% in the treatment of pityriasis versicolor. A randomised double-blind comparative trial, *Mycoses*, 50(3), 193-195.

110. Aggarwal K, Jain V, Sangwan S (2003), Comparative study of ketoconazole versus selenium sulphide shampoo in pityriasis versicolor, *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology*, 69(2), 86-87.
111. Cantrell W. C., Elewski B. E. (2014), Can pityriasis versicolor be treated with 2% ketoconazole foam?, *J Drugs Dermatol*, 13(7), 855-859.
112. Montero-Gei F., Robles M.E., Suchil P (1999), Fluconazole vs. itraconazole in the treatment of tinea versicolor, *Int. J. Dermatol*, 38601-603.
113. Warrilow A. G. S., Price C. L., Parker J. E. et al (2016), Azole Antifungal Sensitivity of Sterol 14 α -Demethylase (CYP51) and CYP5218 from *Malassezia globosa*, *Sci Rep*, 6.
114. Hoàng Thị Vân, Nguyễn Hữu Sáu (2015), *Hiệu quả điều trị bệnh lang ben bằng Fluconazole tại bệnh viện Da liễu Trung ương*, Luận văn tốt nghiệp, Đại học Y Hà Nội, Hà Nội.
115. Puig L., Bragulat M. R., Castella G. et al (2017), Characterization of the species *Malassezia pachydermatis* and re-evaluation of its lipid dependence using a synthetic agar medium, *PLoS One*, 12(6), e0179148.
116. Rojas F. D., Cordoba S. B., de Los Angeles Sosa M. et al (2017), Antifungal susceptibility testing of *Malassezia* yeast: comparison of two different methodologies, *Mycoses*, 60(2), 104-111.