

## 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, vẩy 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 giải trình tự gen 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 thương tổn 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.*

## **NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN**

Luận án đã đưa ra được các kết quả hay, đáng tin cậy, có nhiều ý nghĩa thực tiễn, là nghiên cứu đầu tiên áp dụng thành công kỹ thuật

nuôi cấy định danh có cải tiến và kỹ thuật PCR sequencing để xác định được các loài *Malassezia* trong một bệnh lý rất thường gặp tại Việt Nam nhưng cho đến nay chưa có nghiên cứu đầy đủ và hệ thống về căn nguyên gây bệnh cũng như sự phân bố, mối liên quan giữa căn nguyên với một số phương pháp điều trị theo loài gây bệnh. Kết quả thu được đã xác định *Malassezia* trong bệnh lang ben bằng nuôi cấy với tỉ lệ (90,3%), định danh chính xác 97,0% số loài *Malassezia* trong đó có 11 loài: *M. globosa* (42,4%) cao nhất; tiếp đó *M. dermatis* (17,3%), *M. furfur* (14,4%). *M. globosa* gây bệnh chủ yếu nhóm 20-29 tuổi chiếm 36,5%, mức độ bệnh vừa 69,6%, phân bố hầu hết màu sắc dát, gặp các vị trí trên cơ thể với hình thái chủ yếu dạng sợi và tế bào nấm men (42,2%). Xác định *Malassezia* trong bệnh lang ben bằng PCR sequencing có tỉ lệ thành công là 59,7%, định danh chính xác là 91,1% trong đó có 4 loài: *M. globosa* (73,7%), *M. restricta* (11,7%), *M. sympodialis* (5,0%), *M. cuniculi* (0,6%). Đối với mục tiêu điều trị, kết quả thu được có tỉ lệ khỏi hoàn toàn sau điều trị 4 tuần là 73,8%, tỉ lệ đỡ giảm là 26,2%, không có bệnh nhân không khỏi. Trong đó phương pháp điều trị kết hợp uống fluconazole và tắm gội ketoconazole cho tỉ lệ khỏi cao nhất (79,0%), tiếp đến là uống itraconazole đơn thuần 71,3%, tắm gội ketoconazole đơn thuần là 71,1%. Tỉ lệ khỏi cao nhất ở mức độ bệnh nhẹ (87,5%). *M. globosa* có tỉ lệ khỏi (76,3%) cao hơn so với các loài còn lại.

### **CÁU TRÚC LUẬN ÁN**

Luận án dày 165 trang không kể phụ lục và tài liệu tham khảo, gồm 4 chương, 35 bảng, 7 biểu đồ, 26 hình ảnh minh họa, 110 tài liệu tham khảo (tiếng Việt 10, tiếng Anh 100) và phụ lục. Bố cục luận án gồm: đặt vấn đề 2 trang, tổng quan 40 trang, đối tượng và phương pháp nghiên cứu 21 trang, kết quả 30 trang, bàn luận 30 trang, kết luận 2 trang, kiến nghị 1 trang, đóng góp của đề tài 1 trang và 6 bài báo có nội dung liên quan với luận án đã được công bố.



## CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

### 1.1. Nấm *Malassezia*

#### 1.1.1. Vài nét lịch sử

Năm 1874, Malassez mô tả tác nhân gây lang ben có hình ảnh ”mì ống” và ”thịt viên”, đặt tên là *Malassezia furfur*. 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 nấm trên da người và động vật máu nóng. Thuộc ngành *Basidiomycota*, phân ngành *Ustilaginomycotina*, lớp *Exobasidiomycetes*, bộ *Malasseziales*, và họ *Malasseziaceae*.

#### 1.1.3. Vai trò của nấm *Malassezia* trong bệnh da

*Malassezia* sống ký sinh vi hệ, gây bệnh cơ hội khi gặp điều kiện thuận lợi. Chúng thích nghi bằng cách sản xuất các enzym sinh năng lượng bao gồm 8 loại lipase và 3 loại phospholipase. Đồng thời, tổng hợp một số chất có hoạt tính sinh học như indole và hoạt động thông qua các thụ thể hydrocarbon (Ahr) tập trung ở tế bào lớp biểu bì. . 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 dát 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).

#### 1.1.4. Một số bệnh lý do nấm *Malassezia*

- Lang ben, viêm da dầu, viêm da cơ địa, viêm nang lông, nấm móng, xâm nhập cơ quan và nhiễm nấm huyết...

### 1.2. Bệnh lang ben

#### 1.2.1. Đại cương

### 1.2.1.1. Tình hình bệnh tại Việt Nam và trên thế giới.

Lang ben là bệnh da phổ biến, tỉ lệ khoảng 5-8% dân số thế giới, thường gặp ở các nước nhiệt đới, nhóm 20-29 tuổi, giới tính nam. Bệnh hay gặp vào những tháng cuối hè đầu thu và đầu mùa đông xuân. Tại Việt nam, theo Nguyễn Thị Tuyết Mai, tỉ lệ bệnh là 1,76% số bệnh nhân đến khoa khám bệnh tại bệnh viện Da liễu Trung Ương

### 1.2.1.2. Một số yếu tố thuận lợi

- pH da kiềm được coi là quan trọng nhất. Ngoài ra một số yếu tố khác 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.

### 1.2.2. Căn nguyên và sinh bệnh học

Căn nguyên chính là *M. globosa*, bao gồm hệ Enzym phong phú: MgLip2, carbonic anhydrase (MgCA). *M. furfur* có enzym MfTam1. *M. sympodialis* có 1 $\rightarrow$ 6- $\beta$ -D-glucan ở màng tế bào.

### 1.2.3. Xác định *Malassezia* trong bệnh lang ben

#### 1.2.3.1. Soi trực tiếp tìm nấm

Nhuộm soi KOH đơn thuần kết hợp Parker blue ink đóng vai trò như một chất màu có ái tính với tế bào nấm. Hình thái vi nấm điển hình quan sát được là những sợi nấm thô ngắn như miếng vụn, các tế bào nấm men đứng tập trung thành đám giống hình ảnh “mì ống” và “thịt viên”

#### 1.2.3.2 Nuôi cấy định danh

Các môi trường nuôi cấy có thể sử dụng bao gồm: thạch Sabouraud, thạch m-Dixon, thạch Leeming- Notman. Định danh bằng Catalase, Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, Cremophor EL, beta Glucosidase và khả năng phát triển ở các nhiệt độ khác nhau (32 °C, 37 °C, 40 °C), Chromoagar *Malassezia*. Kết quả người ta đã phân biệt được 9 loài: *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. slooffiae*, *M. restricta* và *M. pachydermatis*, *M. dermatis* và *M. japonica*

### **1.2.3.3. Phân tích phân tử và PCR**

Kỹ thuật phân tử áp dụng trong định danh nấm có nhiều phương pháp trong đó PCR sequencing. Bệnh phẩm có thể được sử dụng vẩy da hoặc khuẩn lạc.

### **1.2.3.4. Các phương pháp khác**

## **1.2.4. Chẩn đoán bệnh lang ben**

### **1.2.4.1. Đặc điểm lâm sàng**

Thương tổn cơ bản: Dát, mảng hình tròn hoặc bầu dục, d =1-3 cm, thay đổi màu sắc, thể tăng hoặc giảm sắc tố, đôi khi hỗn hợp, bề mặt có vẩy da ẩm, mỏng dính như vẩy cám, khi dùng dao cùn cạo nhẹ có dấu hiệu “vỏ bào”. Cơ năng thường gặp là ngứa khi vận động hoặc tăng tiết mồ hôi.

### **1.2.4.2. Các thể lâm sàng**

Thể giảm sắc tố, thể tăng sắc tố, thể viêm, thể theo vị trí, thể theo tuổi, thể đảo ngược, thể theo hình thái, thể viêm nang lông

### **1.2.4.3. Chẩn đoán xác định**

Dựa vào biểu hiện lâm sàng và cận lâm sàng

### **1.2.4.4. Chẩn đoán phân biệt**

Chàm khô (pityriasis alba), giảm sắc tố sau viêm, bạch biến, phong thể I, viêm da dầu, vẩy phấn hồng Gilbert, nấm thân mình, giang mai II, vẩy nến thể giọt, viêm nang lông do nguyên nhân khác.

## **1.2.5. Điều trị bệnh lang ben**

### **1.2.5.1. Giáo dục sức khỏe**

GDSK ở đây chủ yếu là hướng dẫn cho bản thân người bệnh hiểu rõ là bệnh lý nhiễm nấm, tiến triển mạn tính, dễ tái phát. Cần kết hợp phòng bệnh và chữa bệnh.

### **1.2.5.2. Điều trị tại chỗ**

Sử dụng các hoạt chất có tính bạt sừng (acid salicylic), xà phòng có thành phần acid salicylic và lưu huỳnh, thay đổi pH da.

### 1.3.5.3. Điều trị toàn thân

**Các thuốc kháng nấm azole:** Ketoconazole, Fluconazole, Itraconazole

**Lựa chọn thuốc:** Lựa chọn đầu tiên là itraconazole 200mg/ngày x 7 ngày. Dùng dầu gội ketoconazole 2% đơn thuần; Fluconazole 300mg 1 tuần x 2 tuần kết hợp dầu gội ketoconazole 2% có hiệu quả. Kết hợp thuốc mang lại hiệu quả cao.

### 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

Với *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.

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

Fluconazole có giá trị MIC50 và MIC90 cao hơn các thuốc cùng nhóm như: Itraconazole, ketoconazole.

## Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

#### 2.1.1. Đối tượng nghiên cứu cho mục tiêu 1

##### ❖ Tiêu chuẩn lựa chọn

Bệnh nhân chẩn đoán lâm sàng bệnh lang ben. Xét nghiệm soi trực tiếp tìm nấm dương tính. Không giới hạn độ tuổi, không dùng thuốc kháng nấm, thuốc 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 đang dùng thuốc kháng nấm, thuốc bong sừng bạt vảy, thuốc màu.

#### 2.1.2. Đối tượng nghiên cứu cho mục tiêu 2

##### ❖ 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 bặt vẩy trước đó 7 ngày, tuân thủ điều trị, đồng ý tham gia nghiên cứu

#### ❖ **Tiêu chuẩn loại trừ**

Bệnh nhân đang có thai hoặc cho con bú, bôi thuốc kháng nấm, thuốc bong sừng bặt vẩy trước đó 7 ngày, có 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...

### **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, Dermascopy, đèn wood

##### ❖ **Vật liệu soi trực tiếp tìm nấm**

Dung dịch KOH 20%, dung dịch Parker™ ink blue black

##### ❖ **Vật liệu nuôi cấy định loại**

SDA, m- Dixon, Catalase, Ceremophor, Urease, TE, Esculin, Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, Chromagar *Malassezia*

##### ❖ **Vật liệu PCR sequencing**

Máy GenAmp PCR System 9700 AB (Applied Biosystems, USA); Máy soi gel Wealtec Corp Model MD-20 (USA); Máy chụp ảnh gel Geldoc (Biorad, Mỹ); bộ kit Big Dye X Terminator (Mỹ).

### 2.3.2. Vật liệu nghiên cứu cho mục tiêu 2

Thuốc: **Salgad® (Fluconazole)** viên, 150mg: số đăng ký VN 3274-07. Nhà sản xuất: công ty TNHH dược phẩm An phú – Việt Nam. **Spobet® (Itraconazole)** viên, 100 mg: Hộp 6 vi, mỗi vi 5 viên nang. Số đăng ký VN 14580-12. Nước sản xuất: Romania. **Dezor® shampoo (Ketoconazole 2%)** 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

$\alpha$ : 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 vảy da bệnh nhân lang ben và có xét nghiệm soi tìm nấm dương tính  $p = 0,8$

$\varepsilon$ : 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 KOH 20%+ Parker™ blue black

ink (1:2) và lấy bệnh phẩm bằng băng dính trong (dao cùn): chọn thương tổn điển hình, nhỏ 1-2 giọt hóa chất KOH 20% + Parker™ Blue Black ink (1:2). Quan sát dưới kính hiển vi vật kính 10x, 40x. Kết luận có sợi và tế bào nấm men, tế bào nấm men hoặc sợi nấm.

❖ **Kỹ thuật nuôi cấy định danh loài nấm bằng nuôi cấy:** chọn thương tổn điển hình, lấy bệnh phẩm cấy trong SDA và m-Dixon. Từ khuẩn lạc nuôi cấy được định danh bằng cách sử dụng test catalase, Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, nuôi cấy trên Chromo agar *Malassezia* nhận định hình thái và tính chất.

❖ **Kỹ thuật xác định *Malassezia* bằng PCR sequencing:** chọn thương tổn điển hình, lấy bệnh phẩm, chạy PCR sau đó điện di trên gel, đo nồng độ PCR, giải trình tự gen so sánh với ngân hàng dữ liệu quốc tế NCBI (Genbank).

## 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)

$Z_{\beta}$ : 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

$\varepsilon$ : giá trị tương đối (=0,09)

Thay vào công thức ta có:  $n = 1,96^2 \times 0,7(1-0,7)/(0,7 \times 0,09)^2 = 203,26$

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

### 2.4.2.3. Các kỹ thuật cho mục tiêu 2

- Chia ngẫu nhiên thành 3 nhóm: Nhóm 1 uống Salgad<sup>®</sup> (Fluconazole) 300mg liều duy nhất 1 lần/tuần trong 2 tuần liên tiếp và tắm gội Dezor<sup>®</sup> gel (Ketoconazol 2%) 2 lần/ 1 tuần thay xà phòng, lưu đầu khoảng 5-10 phút trong 2 tuần liên tiếp; Nhóm 2 uống Spobet<sup>®</sup> (itraconazole) 200mg/ngày trong 1 tuần; Nhóm 3 tắm gội Dezor<sup>®</sup> gel (Ketoconazol 2%) hàng ngày thay xà phòng, trong 2 tuần.
- Đánh giá hiệu quả điều trị 3 nhóm tại thời điểm 4 tuần sau ngày đầu tiên dùng thuốc. Theo dõi và liệt kê các tác dụng phụ của thuốc, chúng tôi ngừng điều trị và theo dõi cho bệnh nhân tác dụng phụ

## 2.5. Các chỉ tiêu nghiên cứu

### 2.5.1. Đặc điểm chung

- Tuổi, Giới, Địa dư

### 2.5.2. Đặc điểm lâm sàng bệnh

Thời gian mắc bệnh, tính chất bệnh, ngứa, vảy da, màu sắc dát, vị trí thương tổn, mức độ bệnh, kết quả soi trực tiếp từ vảy da.

### 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; Phân bố các loài *Malassezia* ; Phân bố theo: tuổi, giới, địa dư, thời gian, tính chất bệnh, màu sắc dát, vị trí, soi trực tiếp tìm nấm.
- **Xác định loài *Malassezia* bằng PCR sequencing :** Phân bố các loài *Malassezia*; Phân bố 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:** ngứa; vảy da; màu sắc dát; diện tích; tổng điểm mức độ bệnh; xét nghiệm.
- **Kết quả điều trị:** theo mức độ bệnh và xét nghiệm nuôi cấy nấm.

## 2.6. Các biện pháp hạn chế sai số

Thiết kế nghiên cứu chặt chẽ, các công cụ thu thập số liệu; phòng xét nghiệm chuẩn; các thuật toán thống kê thường dùng.

## 2.6. 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.

## 2.7. Đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu không vi phạm y đức vì tất cả người bệnh 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 được giữ bí mật.

## 2.8. Hạn chế của đề tài

Nghiên cứu của chúng tôi lần đầu tiên thực hiện ở Việt Nam, chưa phản ánh hết sự phân bố các loài *Malassezia* và tình hình dịch tễ của bệnh. Chúng tôi tiến hành nghiên cứu đánh giá hiệu quả điều trị bệnh lang ben sau 4 tuần, chưa có điều kiện theo dõi sự tái phát của bệnh sau 3 tháng đến 1 năm.

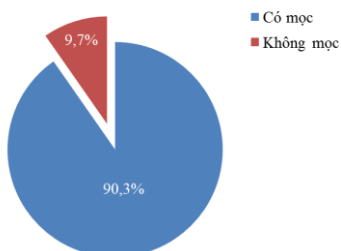
## Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

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

Có 300 bệnh nhân lang ben trong đó 271 bệnh nhân thỏa mãn tiêu chuẩn lựa chọn.

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

#### 3.1.1.1. Kết quả nuôi cấy định danh từ vảy da



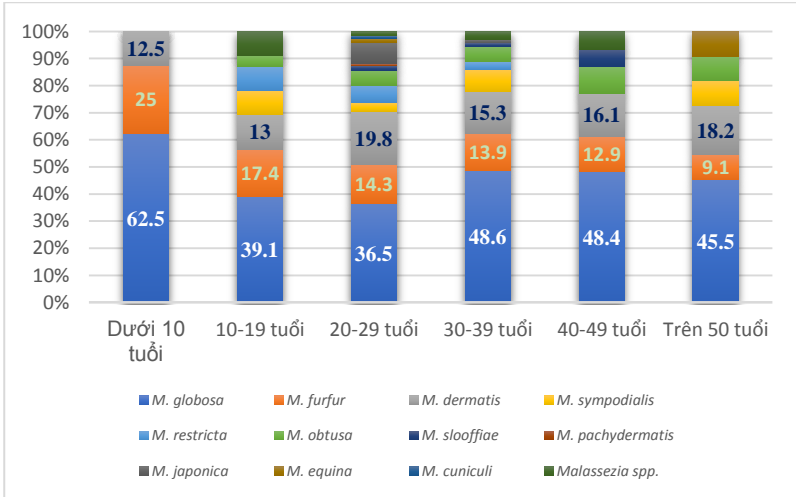
**Biểu đồ 3.1. Kết quả nuôi cấy từ vảy da**

**Bảng 3.1. Kết quả định danh các loài *Malassezia* bằng nuôi cấy**

Loài	n	%
<i>M. globosa</i>	115	42,4
<i>M. furfur</i>	39	14,4
<i>M. dermatis</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. equine</i>	3	1,1
<i>M. cuniculi</i>	1	0,4
<i>Malassezia</i> spp.	8	3,0
Tổng	271	100

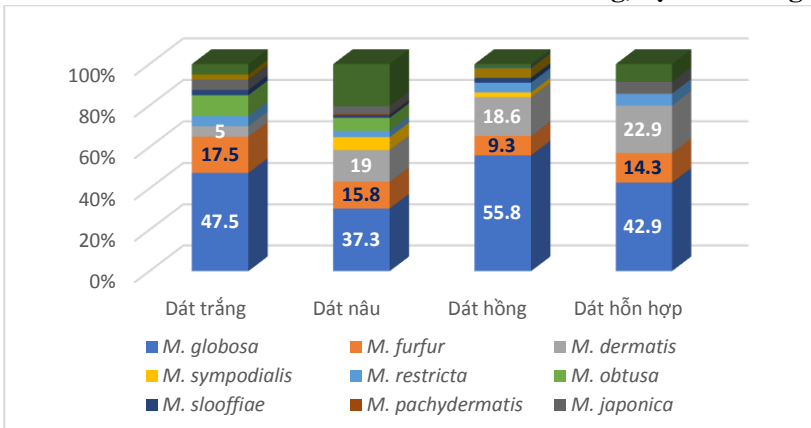
#### 3.1.1.2. Phân bố các loài *Malassezia* theo đặc điểm chung

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

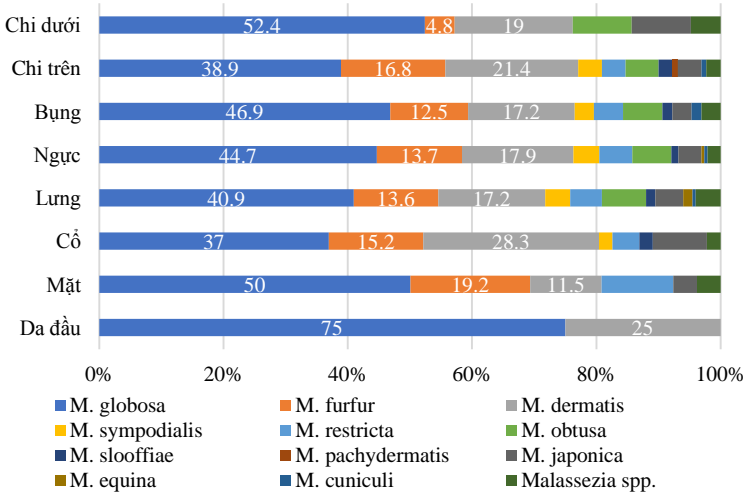


**Biểu đồ 3.2. Phân bố *Malassezia* gây bệnh lang ben theo nhóm tuổi**

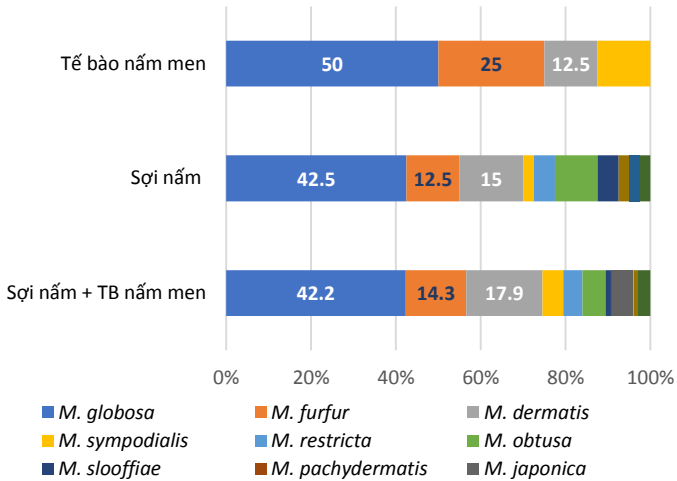
### 3.1.1.3. Phân bố các loài *Malassezia* theo lâm sàng, cận lâm sàng



**Biểu đồ 3.3. Phân bố loài *Malassezia* gây bệnh lang ben theo màu sắc da**



**Biểu đồ 3.4. Phân bố loài *Malassezia* gây bệnh lang ben theo vị trí thương tổn**



**Biểu đồ 3.5. Phân bố *Malassezia* gây bệnh lang ben theo kết quả soi trực tiếp từ vảy da**



### 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 3.2. Kết quả *Malassezia* định danh theo PCR sequencing**

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 spp.</i>	16	9,0
<b>Tổng</b>	179	100

#### 3.1.2.2. Phân bố các loài *Malassezia* theo đặc điểm chung

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

**Bảng 3.3. So sánh kết quả định danh giữa nuôi cấy và PCR sequencing**

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

Nhận xét: Tỉ 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 bệnh lang ben bằng các thuốc kháng nấm nhóm azole

Có 271 bệnh nhân (10 bệnh nhân không đủ tiêu chuẩn lựa chọn; 17 không khám lại và không tuân thủ điều trị), còn 244 bệnh nhân:

nhóm 1 có 81, nhóm 2 có 80, nhóm 3 có 83. Tuổi trung bình ở nhóm 1, nhóm 2, nhóm 3, nhóm tuổi chung lần lượt là  $30,4 \pm 10,5$ ;  $29,9 \pm 9,3$ ;  $29,4 \pm 9,4$ ;  $29,9 \pm 9,7$ . Tỷ lệ bệnh nhân có mức độ bệnh vừa 65,4%.

### 3.2.1. So sánh triệu chứng lâm sàng và cận lâm sàng trước, sau điều trị 4 tuần

**Bảng 3.4. Thay đổi tổng điểm của mức độ bệnh trước và sau điều trị**

Mức độ bệnh	Nhóm 1 (n=81)	Nhóm 2 (n=80)	Nhóm 3 (n=83)	Chung (n=244)	p
<b>Trước điều trị</b>	$4,7 \pm 1,5$	$4,5 \pm 1,6$	$4,6 \pm 1,4$	$4,6 \pm 1,5$	$p_{12} > 0,05$ $p_{13} > 0,05$ $p_{23} > 0,05$
<b>Sau điều trị</b>	$2,2 \pm 1,2$	$2,5 \pm 1,4$	$2,5 \pm 1,2$	$2,4 \pm 1,3$	$p_{12} > 0,05$ $p_{13} > 0,05$ $p_{23} > 0,05$
<b>Độ giảm</b>	$2,5 \pm 1,1$	$2,0 \pm 1,0$	$2,1 \pm 0,8$	$2,2 \pm 1,0$	$p_{12} < 0,05$ $p_{13} > 0,05$ $p_{23} > 0,05$
<b><math>P_{\text{trước-sau}}</math></b>	$< 0,001$	$< 0,001$	$< 0,001$	$< 0,001$	

**Bảng 3.5. So sánh xét nghiệm nuôi cấy nấm trước và sau điều trị**

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

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

### 3.2.2. Kết quả điều trị

**Bảng 3.6. Kết quả điều trị sau 4 tuần**

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. 7. Kết quả điều trị theo 3 nhóm**

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

Nhận xét: Nhóm 1 có tỉ lệ khỏi (79,0%) cao nhất, nhóm 3 thấp nhất (71,1%). Sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

**Bảng 3.8. Kết quả điều trị theo tuổi**

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

**Bảng 3.9. Kết quả điều trị theo mức độ bệnh nhẹ (n=56)**

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

Nhận xét: Tỉ lệ khỏi ở nhóm 2 cao nhất 90,0%, tỉ lệ khỏi ở nhóm 3 thấp nhất 82,4%, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$ .

**Bảng 3.10. 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	%	
<b>Khỏi</b>	47	75,8	39	65,0	45	68,2	131	69,7	$p_{12}>0,05$
<b>Đỡ giảm</b>	15	24,2	21	35,0	21	31,8	57	30,3	$p_{13}>0,05$ $p_{23}>0,05$
<b>Tổng</b>	62	100	60	100	66	100	188	100	--

**Nhận xét:** Tỷ lệ khỏi ở nhóm 1 cao nhất 75,8%, tỉ lệ khỏi ở nhóm 2 thấp nhất 65,0%, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$ .

**Bảng 3. 11. Kết quả điều trị theo loài *M. globosa***

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

**Nhận xét:** Tỷ lệ khỏi ở loài *M. globosa* là 70,5%, không có sự khác biệt với các loài còn lại.

**Bảng 3. 12. Kết quả điều trị với *M. globosa* của 3 nhóm (n=105)**

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

**Nhận xét:** Đối với *M. globosa*, tỉ lệ khỏi ở nhóm 1 cao nhất 77,8%, tỉ lệ khỏi ở nhóm 2 thấp nhất 62,5%, 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

#### 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 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%. 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 cơ mẫu nên chưa có so sánh.

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. pachydermatis*, *M. japonica*, *M. equina*, *M. cuniculi*. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trên thế giới: Bita Tarazooie và cs (2004), Ben Salah và cs (2005), Asja Prohic và cs (2006), Karakas và cs (2009) với 47,7%.

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

###### ❖ Phân bố loài *Malassezia* theo tuổi

Kết quả từ biểu đồ 3.2 cho thấy tất cả các loài đều gây bệnh lang ben. Trong đó, *M. globosa* chiếm ưu thế hơn với tỷ lệ 36,5% ở nhóm từ 20-29 tuổi. Kết quả trên phù hợp với Abbas Rasi và cs (2009), Rezvab Talae và cs (2014); có sự khác biệt với nghiên cứu của Karakas và cs (2009).

##### 4.1.1.3. Phân bố các loài *Malassezia* của nuôi cấy định danh theo lâm sàng, cận lâm sàng

### ❖ Phân bố loài *Malassezia* theo màu sắc thương tổn

Trong nghiên cứu, chúng tôi nhận thấy dát nâu chiếm đa số với tỷ lệ 58,3%. Dát trắng, dát hồng và dát hỗn hợp tương đương nhau (biểu đồ 3.3). Những nơi khí hậu tương đồng, kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với các tác giả khác: Talae và cs (2014) với dát nâu chiếm 50%; Karakas và cs với 47,4%. Chúng tôi thấy rằng những thương tổn có dát sắc tố màu nâu liên quan chủ yếu đến loài *M. globosa* phù hợp với Talae và cs (2014), Karakas và cs (2009), Prohic và cs (2006).

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

Lung, 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 chi dưới là những vị trí ít gặp hơn. Với *M. globosa*, vị trí gây bệnh thường gặp nhất là lung, ít gặp nhất là da đầu, phù hợp với Ben Salah và cs (2005), Krisanty và cs (2008), Karakas và cs (2009). Chỉ có duy nhất một trường hợp chúng tôi bắt gặp tổn thương lang ben do *M. pachydermatis* ở vị trí chân 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.

### ❖ Phân bố loài *Malassezia* theo mức độ bệnh

Chúng tôi nhận thấy 3 loài chủ yếu (*M. globosa*, *M. dermatis* và *M. furfur*) liên quan với các mức độ bệnh lang ben (bảng 3.9). Những loài còn lại, hầu như chỉ gặp ở mức độ bệnh vừa, ít hơn ở mức độ bệnh nặng, thậm chí có loài không gặp như *M. slooffiae*, *M. pachydermatis*, *M. japonica*, *M. equina*, *M. cuniculi*. Kết quả này tương đồng với Prohic và cs.

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

Hầu hết các trường hợp quan sát trên KHV ở dạng sợi và tế bào nấm men, liên quan *M. dermatis* và *M. globosa* chiếm 82,3%, (biểu đồ 3.5). Kết quả này cũng tương đương nghiên cứu của tác giả Prohic và cs (2006) với 97,8% [39]. *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 của các loài vi nấm.

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

Từ 300 mẫu bệnh phẩm vảy da bệnh nhân lang ben, có 179 mẫu dương tính chiếm 59,7%, xác định 4 loài *Malassezia* bao gồm: *M. globosa*, *M. sympodialis*, *M. restricta*, *M. cuniculi* trong đó *M. globosa* cao nhất 73,7% (bảng 3.3). Kết quả này phù hợp với Rezvan Talaei (2014), Gaitanis (2006), Mojtaba Didehdar (2014) .

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

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

##### **❖ Mức độ bệnh**

Kết quả trong bảng 3.4, 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.

##### **❖ Xét nghiệm nuôi cấy nấm**

Bảng 3.5 cho thấy xét nghiệm nấm âm tính sau điều trị là 76,6% giảm so với trước điều trị có ý nghĩa thống kê  $p < 0,001$ . 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 (91%); Fonzo và cs (100%); cao hơn Fernando Montenegro và cs (77%), Mehme Karakas và cs (77,5%). Nhóm 2 sau điều trị có



76,3% bệnh nhân âm tính với nấm, tương đương với Fernando Montengei (73%); Wahab 78%, thấp hơn Phạm Thu Hiền (90%), Nguyễn Văn Hoàn (77,8%), cao hơn Bùi Văn Đức (72,7%). Nhóm 3 có tỉ lệ xét nghiệm nấm âm tính là 72,3%, thấp hơn Rigopoulos (81%), Di Fonzo (100%), tương đương Shi (72%).

#### **4.2.2. Kết quả điều trị**

##### **4.2.2.1. Kết quả điều trị sau 4 tuần**

Sau 4 tuần, tỉ lệ khỏi chung của 3 nhóm dùng thuốc kháng nấm nhóm azole là 73,8% (bảng 3.6). 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%). Nhìn chung, các thuốc nhóm azole hiệu quả tốt với lang ben.

##### **❖ Theo nhóm điều trị**

Kết quả bảng 3.7 cho thấy, nhóm 1 tỉ lệ bệnh nhân kết quả điều trị tốt cao nhất (79,0%), nhóm 3 chiếm tỉ lệ thấp nhất với 71,1%, nhóm 2 là 71,3%, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$ .

##### **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 3.8 nhóm tuổi 10-19 tỉ lệ khỏi thấp nhất 60,0%, so với các nhóm khác sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .

##### **❖ Mức độ bệnh**

Kết quả bảng 3.9 và 3.10, tỉ lệ chữa khỏi đối với mức độ bệnh nhẹ là 87,5% cao hơn so với mức độ bệnh vừa-nặng 69,7%. Đối với mức độ bệnh nhẹ, nhóm 2 có hiệu quả cao nhất, còn đối với mức độ bệnh vừa-nặng, nhóm 1 có hiệu quả cao nhất.

##### **4.2.2.3. Liên quan kết quả điều trị và loài *Malassezia***

Các thuốc nhóm azole đều có tác dụng tốt. Với *M. globosa*, tỉ lệ khỏi 70,5% thấp hơn so với các loài còn lại. Đối với *M. globosa*,

nhóm 1 có tỉ lệ khô cao nhất, nhóm 2 thấp nhất. Sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$ .

## KẾT LUẬN

### 1. Xác định *Malassezia* trong bệnh lang ben

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

- Tỉ 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%

- *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%).

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

- Tỉ lệ PCR sequencing *Malassezia* từ vảy da là 59,7%, tỉ 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 tỉ lệ *Malassezia* gây bệnh đều giảm so với trước điều trị, có ý nghĩa thống kê.

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

- Kết hợp fluconazole và dầu gội ketconazole có tỉ lệ khô 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. globosa* có tỉ lệ đáp ứng với thuốc kháng nấm nhóm azole là 70,5% thấp hơn các loài còn lại. Kết hợp fluconazole và dầu gội ketconazole có hiệu quả tốt với *M. globosa* (77,8%).

### **KIẾN NGHỊ**

Từ kết quả trên chúng tôi xin kiến nghị:

- Xác định *Malassezia* gây bệnh lang ben cần xét nghiệm tiến hành xét nghiệm trực tiếp và nuôi cấy định danh loài.
- Phương pháp kết hợp đường uống bằng Fluconazole và tắm gội toàn thân Ketoconazole rất hiệu quả, thuận tiện và kinh tế cho bệnh nhân lang ben.

## PREFACE

*Malassezia* spp. is lipophilic yeast which is of the normal cutaneous commensal flora on humans and animals. In 1953, Robin detected this fungus from lesion of pityriasis versicolor. Then, in 1874, Malassez named *Malassezia furfur*. Currently, based on morphology, biology and ultrastructure, *Malassezia* genus includes 14 species, in which *M. globosa*, *M. furfur*, *M. sympodialis* are the most common ones. *Malassezia* species can be encountered at any age, gender, geographic region and climate. Symptoms of *Malassezia* fungal diseases include pityriasis versicolor, seborrheic dermatitis, atopic dermatitis, *Malassezia* folliculitis, psoriasis, even skin cancer. Recently, there have been reports of *Malassezia* species that cause systemic disease and blood infections.

Pityriasis versicolor is a common disease, in all parts of the world, especially in tropical countries (18% of the population), cold countries (0.5% of the population). *M. globosa* is the most prevalent specie. Although the disease is not life-threatening, it affects the aesthetics, psychology and quality of life of patients. Detecting pathogenic is an important step and assessing the sensitivity of the antifungal drugs, in order to choose effective treatment method. *Malassezia* has been found, with techniques such as wood light, direct examination, culture, PCR sequencing. *Malassezia* culture is commonly used as a 'gold standard'. However, the fungus does not grow in a simply agar that requires special conditioning and olive oil with appropriate proportions. In Vietnam, some laboratories are using direct microscopy with 20% KOH. However, the fungus having a variety of shapes and sizes are very particularly difficult cases to

identify and easy to miss. At The National Hospital of Dermatology and Venereology, the first time, modified culturing techniques and PCR sequencing have been successfully used to identify *Malassezia* species.

Aims of treatment pityriasis versicolor are (1) fungal growth inhibition, (2) reducing symptoms, (3) preventing recurrence. The azole antifungal drugs including ketoconazole, fluconazole and itraconazole are the first line. There are 3 applied methods as topical antifungal, oral antifungal or combination. Topical antifungals used when the lesions are localized, the patient may have missed the lesion and some problems such as burns, applied many times a day. Systemic antifungal can be expensive and has toxic on kidney, liver function, especially with impaired immune function

Therefore, we carry out: "Identification of *Malassezia* spp. From pityriasis versicolor and efficacy treatment with azoles antifungal" with the two objectives:

1. Identification of *Malassezia* species from pityriasis versicolor at National Hospital of Dermatology and Venereology from January 2016 to December 2016
2. Assessment of the efficacy of treatment of pityriasis versicolor with azole antifungal.

### **NEW CONTRIBUTIONS OF THE THESIS**

The dissertation has produced good, reliable and practical results. It was the first study in Vietnam to successfully apply modified culturing technique and PCR sequencing to detect *Malassezia* species from a very common disease. Identification of *Malassezia* spp. from pityriasis versicolor by culture: high growth-rate: (90.3%), the

detection rates is 97.0%, including 11 species: *M. globosa* (42.4%); *M. dermatis* (17.3%), *M. furfur* (14.4%). *M. globosa* is the most prevalent species in the 20-29 group 36.5%, in hyphae and yeast cells (42.2%). Identification of *Malassezia* spp. from pityriasis versicolor by PCR sequencing: the demonstrated positive bands is 59.7%, the detection rates is 91.1%, including 4 species: *M. globosa* (73.7%), *M. restricta* (11.7%), *M. sympodialis* (5.0%), *M. cuniculi* (0.6%). Treating pityriasis versicolor with azole antifungal drugs: after 4 weeks the cure rate is 73.8%, the improvement rate is 26.2%. Most patients have improvement in treatment. Combined therapy with fluconazole and ketoconazole gives the highest cure rate (79.0%), followed by oral itraconazole 71.3%, and ketoconazole (71.1%). The difference is not statistically significant. Azole drugs are highly effective with *M. globosa* (76.3%), *M. furfur* (83.8%), poor efficacy with *M. dermatis* (61.4%).

### **STRUCTURE OF THE THESIS**

The thesis is thick, because of not including appendices and references, There are 4 chapters, 35 chapters, 7 chapters, 2 diagrams, 22 illustrations, 110 reference materials (Vietnamese 10, English 100) and appendices. The thesis composition includes: 2- page issue, 40- page overview, 21- page objective and method of research, 30- page result, 30-page discussion, 2- pages conclusion:, 1- page proposal, 1- page contribution and 6 articles related to dissertation have been published.

## CHAPTER 1: DOCUMENT OVERVIEW

### 1.1. *Malassezia* yeast

#### 1.1.1. History

In 1874, Malassez described the pathology of pityriasis versicolor (PV) which had hyphae and spores, the characteristic "spaghetti and meatballs" appearance, named *Malassezia furfur*. Today, the genus *Malassezia* includes 14 lipophilic species.

#### 1.1.2. Characteristics of *Malassezia* species

*Malassezia* spp. is lipophilic yeast which is of the normal cutaneous commensal flora on human and animals. *Malassezia* spp. is lipophilic yeast which is of the normal cutaneous commensal flora on humans and animals.

#### 1.1.3. The role of *Malassezia* in skin disease

*Malassezia* yeasts are living on the microflora humans, causing diseases if having risk factors. *Malassezia* yeasts are adapted by producing enzyme that includes 8 types of lipase and 3 types of phospholipase. Concurrently, synthesis of some biologically active substances such as indole and active through the hydrocarbon receptor (AhR) which concentrates on epidermis.

#### 1.1.4. *Malassezia* and disease

- Pityriasis versicolor, Seborrheic dermatitis, Atopic eczema, *Malassezia* folliculitis, Onychomycoses, *Malassezia* species in systemic disease and blood infection.

## **1.2. Pityriasis versicolor**

### **1.2.1. Background**

#### **1.2.1.1. Epidemiology in the world and Vietnam**

PV is the common disease which affects individuals worldwide but at much higher percentage in tropical climates, in the 20-29 age group, males than females, with rates of 5-8% of the population.

#### **1.1.2.2. Factors related to PV**

### **1.2.2. Pathophysiology**

*M. globosa* is the most causative organisms of PV. *M. globosa* has enzym MgLip2, carbonic anhydrase (MgCA). *M. furfur* has enzym MfTam1. *M. sympodialis* has 1→6-β-D-glucan on cell membrane.

### **1.2.3. Identification of *Malassezia* species from PV**

#### **1.2.3.1. Direct examination**

Direct microscopic examination of samples from the affected area using potassium hydroxide (KOH) with contrast stain which includes Parker<sup>TM</sup> blue black ink and calclfluor white.

#### **1.2.3.2. Culture**

The media cultured includes: Sabouraud agar, m-Dixon agar, Leeming- Notman agar. Identification uses Catalase, Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, Cremophor EL, beta Glucosidase and growth at 32 °C, 37 °C, 40 °C, Chromoagar *Malassezia*.

#### **1.2.3.3. Molecular techniques and PCR**

Molecular techniques applied in identification have many methods in which include PCR sequencing.

#### **1.2.3.4. Other methods**



## **1.2.4. Clinical symptoms and diagnosis**

### **1.2.4.1. Clinical symptoms**

Multiple hypopigmented and hyperpigmented macules; these may coalesce into large, irregular patches, arc or oval 1-3 cm, and have a fine scaly appearance which can become obvious by stretching the skin, located in the sebum- rich body areas such as the face, chest, back and upper arm. Some patients complain of pruritus and tingling sensation.

### **1.2.4.2. Type of clinical**

By hypopigmented, by hyperpigmented, by erythematous, by location, by age, by unusual, by form, by follicular inflammation.

### **1.2.4.3. Definite diagnosis**

Based on clinical symptoms and paraclinical

### **1.2.4.4. Differential diagnosis**

Pityriasis alba, postinflammatory hyperpigmentation, vitiligo, leprosy type I, seborrheic dermatitis, pityriasis rosea, tinea corporis, syphilis II, psoriasis, folliculitis due to other causes.

## **1.2.5. Treatment**

### **1.2.5.1. Health education**

Health education is mainly the guide for patients understanding that PV is fungal infection, chronic progression, recurs easily.

### **1.2.5.2. Topical treatment**

Use of active keratolytic with salicylic acid (salicylic acid), soaping with salicylic acid and sulfur, changing the pH of the skin.

### **1.3.5.3. Systemic treatment**

**Azole antifungal drugs: Ketoconazole, Fluconazole, Itraconazole**

**Opinion treatment:**first line:itraconazole 200mg/day x 7 days.  
Second line: ketoconazole 2% shampoo, fluconazole 300 mg/week x 2 weeks. Combining topical and systemic antifungal have good efficacy.

### **1.2.6. *Malassezia* and pityriasis versicolor**

#### **1.2.6.1. *Malassezia* related with clinical characteristics**

With *M. globosa*, the site of the disease is mainly the back and scalp. *M. furfur* and *M. dermatis* cause disease at the back of the chest, less scalp.

#### **1.2.6.2. *Malassezia* related with azole antifungal drug**

Fluconazole has the variable of MIC50 and MIC90 which is higher than other azole such as itraconazole, ketoconazole.

## **CHAPTER 2: SUBJECTS AND METHODS**

### **2.1.Subjects**

#### **2.1.1. Subject for object 1**

##### **❖ *Criteria of patient selection***

Patients had clinical diagnosis is pityriasis versicolor. Direct microscopic examination is positive. Patients with all ages, not using antifungal drugs, keratolytic agents in 7 days, agreed participant.

##### **❖ *Criteria of patient exclusion***

Patients used antifungal drugs, keratolytic agents within 7 days, not agreed participant.

#### **2.1.2. Subject for object 2**

##### **❖ *Criteria of patient selection***

Patients with pityriasis versicolor had direct microscopy examination positive: >16 years old, using antifungal drugs, keratolytic agents, adherence, agreed participant.

❖ ***Criteria of patient exclusion***

Patients who are pregnant or are breastfeeding, using antifungal drugs, keratolytic agents within 7 days, allergic to fluconazole, ketoconazole, itraconazole, have signs of heart, liver or lung severe diseases, with immunodeficiency (HIV/AIDS, diabetes, immune suppressant medication...)

**2.2. Place and time of study**

❖ **Place of study**

Outpatient department and Microbiology department in National Hospital of Dermatology and Venereology; Laboratory department in National hospital of Tropical diseases.

❖ **Time of study**

Duration: from 01/2016 to 12/2016.

**2.3. Materials**

**2.3.1. Materials for object 1**

❖ ***Materials for clinical examination***

Magnifier, Dermascopy, wood lamp

❖ ***Materials for direct microscopy examination***

20% KOH mount, Parker™ ink blue black stain

❖ ***Materials for culturing***

SDA, m- Dixon, Catalase, Ceremophor, Urease, TE, Esculin, Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, Chromagar *Malassezia*

❖ ***Materials for PCR sequencing***

***Materials for PCR:*** GenAmp PCR System 9700 AB machine (Applied Biosystems, USA); Wealtec Corp Model MD-20 machine

(USA); gel Geldoc machine(Biorad, USA); **Materials for sequencing:** Big Dye X Terminator (USA)

### 2.3.2. Materials for object 2

Drugs: **Salgad® (Fluconazole)**tablet, 150mg: Licensed in VietNam by decision No VN-3274-07; produced by An Phu Ltd. **Spobet® (Itraconazole)**tablet, 100 mg: Licensed in VietNam by decision No VN-14580-12; produced in Romania. **Dezor® shampoo (Ketoconazole 2%)** 60 ml: Licensed in VietNam by decision No VN-13169-11; produced in Malaysia.

## 2.4.Methods

### 2.4.1. Method for object 1

#### 2.4.1.1.Method

Cross-section

#### 2.4.1.2. Sample size

Sample size is estimated according to the following sample size calculator:

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

n: sample size

$\alpha$ :Probability of type 1 error ( $\alpha = 0,05$ )  $\rightarrow Z_{1-\alpha/2} = 1,96$ .

p: Ratio of the positive culture in patients with PV who had direct microscopy examination positive  $p = 0,8$

$\varepsilon$ : Relative value ( $=0,06$ )

Result:  $n = 267 \rightarrow$ The minimum sample size is 267.

#### 2.4.1.3. Technique for object 1

❖ **Technique: direct microscopy with 20% KOH mount+ Parker<sup>TM</sup> blue black ink (1:2) and the collected scrapings with scotch tape**

*(blunt knife)*

❖ *Culturing technique and identification*

❖ *Technique PCR sequencing*

## **2.4.2. Methods for object 2**

### **2.4.2.1. Methods for object 2**

Cross-section, comparison before and after treatment

#### **2.4.2.2. Sample size**

Sample size is estimated according to the following sample size calculator:

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

n: sample size

$\alpha$ : Probability of type 1 error ( $\alpha = 0,05$ )  $\rightarrow Z_{1-\alpha/2} = 1,96$ .

$\beta$ : Probability of type 2 error  $\rightarrow Z_{1-\beta} = 1,28$ .

p: ratio of cure treatment  $p = 0,7$

$\varepsilon$ : Relative value ( $=0,09$ )

Instead of the sample size calculator:  $n = 1,96^2 \times 0,7(1-0,7)/(0,7 \times 0,08) = 203,26 \rightarrow$  The minimum sample size is 204.

#### **2.4.2.3. Technique for object 2**

- We randomly split PV patient into 3 groups: Group 1 will be treated with orally Salgad<sup>®</sup> (Fluconazole) 300mg/a week, a regimen including shower by Dezor<sup>®</sup> gel (Ketoconazol 2%) twice a week; duration: 2 weeks. Group 2 will be treated with orally Spobet<sup>®</sup> (itraconazole) 200mg /day x 7 days; Group 3 will be treated with shower Dezor<sup>®</sup> gel (Ketoconazol 2%) daily x 2 weeks.

- Assess the result: Assess the clinical symptoms and culturing after 4 weeks.

## **2.5. Evaluation criteria**

### 2.5.1. General characteristic

- Age, sex, geography

### 2.5.2. Clinical characteristics

Duration of disease, histology of PV lesions, pruritus, scale, color lesions, site of lesions, degree of disease, direct examination.

### 2.5.3. Evaluation criteria for object 1

- **Identifying *Malassezia* by culturing:** ratio of culturing, distribution of *Malassezia* species, distribution of *Malassezia* with: age, sex, geography, duration of disease, history of PV lesions, color lesions, site of lesions, direct examination.

- **Identifying *Malassezia* by PCR sequencing :** Distribution of *Malassezia* species; distribution of *Malassezia* species with age, sex, geography.

- **Comparing the result of culturing technique and PCR sequencing**

### 2.5.4. Evaluation criteria for object 2

- **Evaluating the change of clinical symptoms:** pruritus, scale, color lesions, are lesions, total score degree of disease, culture.
- **Evaluating treatment result by degree of disease and culture**

### 2.6. Data processing:

The data are processed and analysed by using EpiInfo software, SPSS 23.0. Descriptive statistics: Frequently, percentage is presented in the form of table and diagram. Statistical analysis: Use  $\chi^2$  and RR at 5% significance, confidence intervals (CI) 95% to measure differences in the relationship of results, fisher test with variable  $< 5$ . Using One-Way-ANOVA to compare average scores of degrees of disease after 4 weeks of treatment.

## 2.7. Research ethics

Proposal of the research was put forward by the Council of PhD proposal of Hanoi Medical University. Patients are explained and agreed to voluntarily participate in the study. The procedure of examination does not harm the patient. This is routinely tested and approved by National Hospital of Dermatology and Venereology. All object information is kept secret through the computerized system.

## 2.8.Limits of the study

Our study is first conducted in Vietnam, but in a place, so no reflection of distribution of *Malassezia* and epidemiology of PV. We evaluated the treatment result after 4 weeks, did not allow follow-up the recurrence after 3 months to 1 year.

## CHAPTER 3: RESULTS

### 3.1.Identification of *Malassezia* from pityriasis versicolor

300 patients with PV had 271 people who conform criteria of patient selection

#### 3.1.1. Identification of *Malassezia* species isolated by culture

##### 3.1.1.1. Culturing result from skin scale

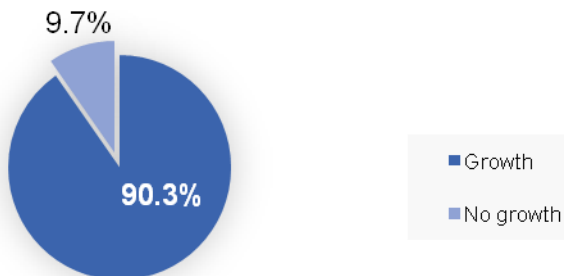


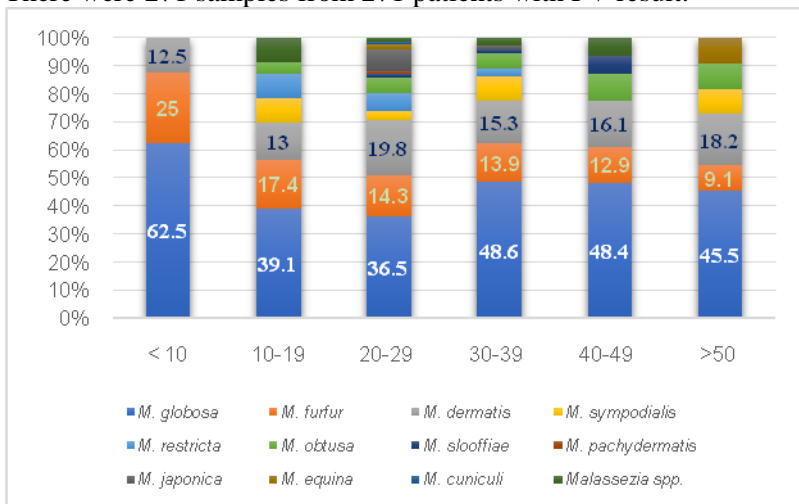
Fig. 3.1. Culturing result from skin scale

**Tab. 3.1. Distribution of *Malassezia* species by culture**

<i>Malassezia</i> species	n	%
<i>M. globosa</i>	115	42.4
<i>M. furfur</i>	39	14.4
<i>M. dermatis</i>	47	17.3
<i>M. sympodialis</i>	13	4.8
<i>M. restricta</i>	12	4.4
<i>M. obtuse</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. equine</i>	3	1.1
<i>M. cuniculi</i>	1	0.4
<i>Malassezia</i> spp.	8	3.0
Total	271	100

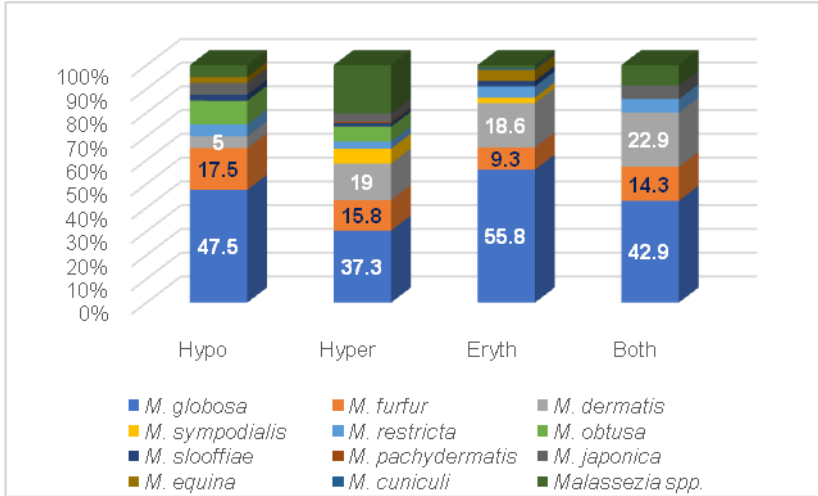
### 3.1.1.2. Distribution of *Malassezia* species isolated according to general characteristics, clinical, subclinical

There were 271 samples from 271 patients with PV result:

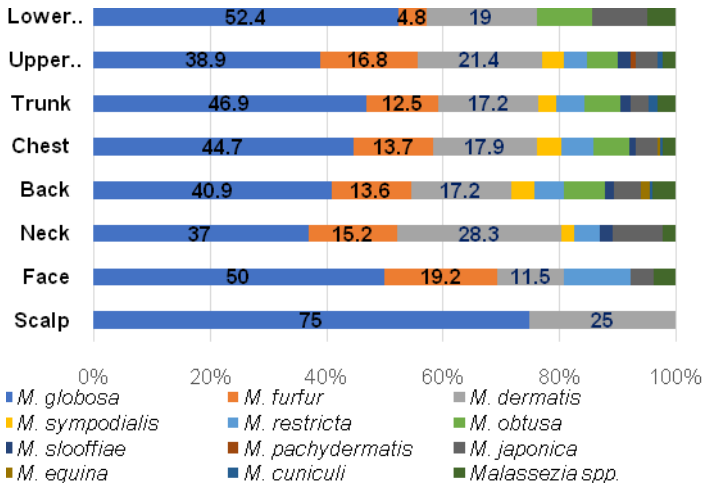


**Fig. 3.2. Distribution of *Malassezia* species isolated according to group of ages**

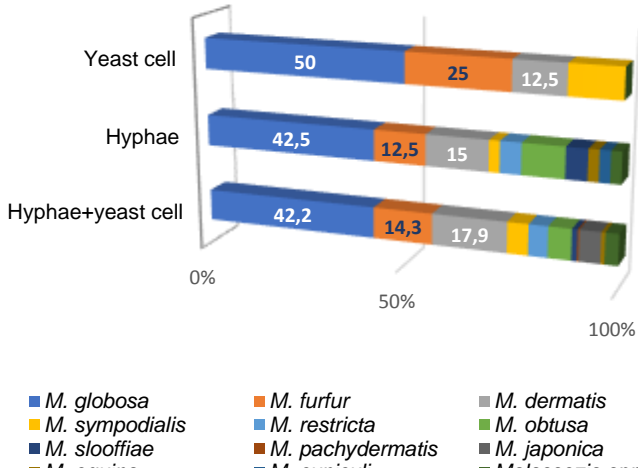




**Fig. 3.3. Distribution of *Malassezia* species isolated according to color lesions**



**Fig. 3.4. Distribution of *Malassezia* species isolated according to site of lesions**



**Fig. 3.5. Distribution of *Malassezia* species isolated according to direct examination**

**3.1.2. Identification of *Malassezia* isolated by PCR sequencing**

From 300 samples of 300 patients, the result of PCR is positive with 179 samples, with ratio of 59,7%.

**Tab. 3.2. Distribution of *Malassezia* species by PCR sequencing**

<i>Malassezia</i> species	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
Total	179	100

### 3.1.3. Comparing result of *Malassezia* species isolated by culturing and PCR sequencing

**Tab. 3. 3. Comparing result of *Malassezia* species by culturing and PCR sequencing**

		Culture		Total
		Positive	Negative	
PCR sequencing	Positive	167	12	179
	Negative	104	17	121
Total		271	29	300

Comments: The ratio of identification positive of both technique was 167/300; of culturing was 271/300 and of PCR sequencing was 179/300.

### 3.2. Efficacy of treatment by azole antifungal drugs

271 patients (10 patients not conforming criteria of patient selection; 17 with no re-examination and no adherence), so 244 patients: Group 1 with 81, group 2 with 80, group 3 with 83.

#### 3.2.1. Demographic data of the patients

The age of patient in group 1, group 2, group 3, group total was  $30.4 \pm 10.5$ ;  $29.9 \pm 9.3$ ;  $29.4 \pm 9.4$ ;  $29.9 \pm 9.7$ , respectively. The ratio of degree of patient with moderate is 65.4%.

### 3.2.2. Comparing clinical and subclinical symptoms at baseline, 4 weeks

**Tab. 3. 4. Comparing total score of degree of disease at baseline, 4 weeks**

<b>Degree of disease</b>	<b>Group 1 (n=81)</b>	<b>Group 2 (n=80)</b>	<b>Group3 (n=83)</b>	<b>General (n=244)</b>	<b>p</b>
Baseline	4.7 ± 1.5	4.5 ± 1.6	4.6 ± 1.4	4.6 ± 1.5	p <sub>12</sub> >0,05 p <sub>13</sub> >0,05 p <sub>23</sub> >0,05
4 weeks	2.2 ± 1.2	2.5 ± 1.4	2.5 ± 1.2	2.4 ± 1.3	p <sub>12</sub> >0,05 p <sub>13</sub> >0,05 p <sub>23</sub> >0,05
Reduction	2.5 ± 1.1	2.0 ± 1.0	2.1 ± 0.8	2.2 ± 1.0	p <sub>12</sub> <0,05 p <sub>13</sub> >0,05 p <sub>23</sub> >0,05
p	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	

**Tab. 3. 5. Comparing culture at baseline and 4 weeks**

Culture		Group 1		Group 2		Group 3		General		p
		n	%	n	%	n	%	n	%	
Baseline	Positive	81	100	80	100	83	100	244	100	$p_{12}>0.05$ $p_{13}>0.05$
	Negative	0	0	0	0	0	0	0	0	
4 weeks	Positive	15	18.5	19	23.7	23	27.7	57	23.4	$p_{23}>0.05$
	Negative	66	81.5	61	76.3	60	72.3	187	76.6	
Total		81	100	80	100	83	100	244	100	--
p		< 0,001		< 0.001		< 0.001		< 0.001		--

Comments: After 4 weeks, ratio of positive culturing is 23.4% lower baseline (100%). the difference is statistically significant with  $p < 0.001$ .

### 3.2.3. Result

**Tab. 3. 6. Treatment result after 4 weeks**

Result	n	%
Cure	180	73.8
Improvement	64	26.2
No improvement	0	0
Total	244	100

Comments: After 4 weeks, the cure rates is 73.8%, no patient has no cure.

**Tab. 3. 7. Treatment results according to 3 groups**

Treatment result	Group 1		Group 2		Group 3		General	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Cure	64	79.0	57	71,3	59	71,1	180	73,8

Improvement	17	21.0	23	28,8	24	28,9	64	26,2
Total	81	100	80	100	83	100	244	100
p	> 0.05						--	

**Tab. 3. 8. Treatment results according to ages**

Result	10-19		20-29		30-39		40-49		>50		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Cure	12	60.0	88	71.5	50	73.5	21	91.3	9	90.0	180	73.8
Improvement	8	40.0	35	28.5	18	26.5	2	8.7	1	10.0	64	26.2
Total	20	100	123	100	68	100	23	100	10	100	244	100
p	< 0.05										--	

**Tab. 3. 9. Treatment results according to mild degree of disease**

Treatment result	Group 1		Group 2		Group 3		General		p
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Cure	1	89.	1	90.	1	82.	4	87.	p <sub>12</sub> >0.0 5
	7	5	8	0	4	4	9	5	
Improvement	2	10.	2	10.	3	17.	7	12.	p <sub>13</sub> >0.0 5 p <sub>23</sub> >0.0 5
		5		0		6		5	
Total	1	100	2	100	1	100	5	100	--
	9		0		7		6		

*Comment:* Group 2 has the highest cure rate : 90.0% , group 3 has the lowest cure rate: 82.4%, the difference is not statistically significant, p >0.05.

**Tab. 3. 10. Treatment results according to moderately- severe degree of disease**

Treatment result	Group 1		Group 2		Group 3		General		p
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Cure	47	75.8	39	65.0	45	68.2	131	69.7	$p_{12} > 0.05$
Improvement	15	24.2	21	35.0	21	31.8	57	30.3	$p_{13} > 0.05$ $p_{23} > 0.05$
Total	66	100	60	100	66	100	188	100	--

Comment: Group 1 has the highest cure rate: 75.8% , group 2 has the lowest cure rate: 65.0%, the difference is not statistically significant,  $p > 0.05$ .

**Tab. 3. 11. Treatment results according to *M. globosa***

Treatment result	<i>M. globosa</i>		Other		Total	
	n	%	n	%	n	%
Cure	74	70.5	106	76.5	180	73.8
Improvement	31	29.5	33	23.7	64	26.2
Total	105	100	139	100	244	100
P	> 0.05				--	

Comments: The cure rate of *M. globosa* is 0.5%, the difference is not statistically significant with  $p > 0.05$ .

**Tab. 3. 12. Treatment results according to 3 groups**

Treatment result	Group 1		Group 2		Group 3		General		p
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Cure	28	77.8	25	62.5	21	72.4	28	77.8	$p_{12} > 0.05$

Improvement	8	22.2	15	37.5	8	27.6	8	22.2	$p_{13}>0.05$ $p_{23}>0.05$
Total	36	100	40	100	30	100	36	100	--

Comments: Group 1 has the highest cure rate: 77.8% , group 2 has the lowest cure rate: 62.5%, the difference is not statistically significant,  $p > 0.05$ .

## CHAPTER 4: DISCUSSION

### 4.1. Identification of *Malassezia* species from pityriasis versicolor

#### 4.1.1. Identification of *Malassezia* species isolated by culture

##### 4.1.1.1. Culturing result

From 300 specimens of skin scales, the growth rate is 271 (90.3%) (Figure 3.1). Our study has higher growth rate than that of Dutta S et al. (2002) 58.5%, Kindo AJ et al. (2004) 68.6%, Karakas et al. (2009) 45.4%, Rasi A et al. 69.9%; lower ones than that of Gaitanis G et al (2006) 93.4%, Chaudhary R et al. (2010) 96%. In Vietnam, Nguyen Dinh Nga et al. found 75 *Malassezia* species from scale, dandruff and volunteer, we did not find the sample size, so there is no comparison.

On 271 colonies, we identified 11 *Malassezia* species included: *M. globosa*, *M. furfur*, *M. dermatis*, *M. sympodialis*, *M. restricta*, *M. obtusa*, *M. slooffiae*, *M. pachydermatis*, *M. japonica*, *M. equina* and *M. cuniculi*. Our findings are in accordance with other researches in the world: Bitar Tarazooie et al. (2004), Ben Salah et al. (2005), Asja Prohic et al. (2006), Karakas et al. (2009) with 47.7%.



#### **4.1.1.2. Distribution of *Malassezia* species isolated according to general characteristics, clinical and subclinical.**

The results from Figure 3.2 show that all *Malassezia* isolated causing PV. In particular, *M. globosa* is present at 42.4%, most commonly in the 20-29 age group (40.0%). The results are similar to Abbas Rasi et al. (2009), Rezvab Talaei et al. (2014). There is a difference with Karakas et al. (2009).

#### **❖ Distribution of *Malassezia* species isolated according to color of lesions**

In the study, we found that 58.3% is brown in color, while the majority is white, pink, and both (Figure 3.3). In similar climates, our findings are the same as other authors: Talaei et al. (2014) with 50% brown; Karakas et al., 47.4%. Our study found that the hyperpigmented lesions are related to *M. globosa* in accordance with Talaei et al. (2014), Karakas et al. (2009), Prohic et al. (2006).

#### **❖ Distribution of *Malassezia* species isolated according to location of lesions**

Back, chest, and abdomen are frequent sites for the appearance of fungal species (Figure 3.4); Mainly found in the upper extremities (131/271 cases). Face, neck and lower extremities are the less common sites. For *M. globosa*, the most common pathogenic site is at the back, which is the least common one, in the scalp, in accordance with Ben Salah et al. (2005), Krisanty and cs (2008), Karakas et al. (2009). There was only one case where we caught the lesion caused by *M. pachydermatis* in the leg. *M. pachydermatis* that exists on animal skins and causing disease when it is transmitted to humans.

## ❖ **Distribution of *Malassezia* species isolated according to direct examination**

In our study (Figure 3.5), most cases were observed on hyphae and yeast cells, with *M. dermatis* and *M. globosa* (82.3%). This result is similar to Prohic et al. (2006) with 97.8%. *M. globosa* is found at many location of lesions with 40%, followed by *M. dermatis*, *M. furfur*.

### **4.1.2. Identification of *Malassezia* species isolated by PCR sequencing**

Of the 300 sample, the desmonstrated positive bands is 179 (59.7%). After comparing the *Malassezia* gene bank, the detection rates is 91.0%, including 4 species: *M. globosa* (73.7%), *M. restricta* (11.7%), *M. sympodialis* (5.0%), *M. cuniculi* (0.6%), in which *M. globosa* has the highest rate 73.7% (table 3.3). The result is the same as Rezvan Talaei (2014), Gaitanis (2006), Mojtaba Didehdar (2014).

## **4.2. Efficacy of treatment by azole antifungal drugs**

### **4.2.1. Comparing clinical and subclinical symptoms at baseline, 4 weeks**

#### ❖ **Degree of disease**

The results obtained in Table 3.4, the total score of the degree of disease level is  $2.4 \pm 1.3$  lower than before treatment  $4.6 \pm 1.5$ , the change is statistically significant with  $p < 0.001$ . For treatment groups, the highest reduction in group 1 ( $2.5 \pm 1.1$ ), lower in group 3 ( $2.1 \pm 0.8$ ), the lowest is group 2 ( $2.0 \pm 1.0$ ). This finding is similar to assessing scaly skin, itching, or single lesion area.

#### ❖ **Culture**

Table 3.5 shows that after treatment the culturing growth is 76.6% lower than before treatment with a statistically significant  $p < 0.001$ . Group 1 has a negative prevalence of 81.5%. This result is lower than Talel Badri (91%); Fonzo et al. (100%); higher than Fernando Monten-Gei et al. (77%), Mehme Karakas et al. (77.5%). After treatment group 2 had 76.3% of patients negative, the equivalent of Fernando Monten-Gei (73%); Wahab 78%, Pham Thu Hien (90%), Nguyen Van Hoan (77.8%), and Bui Van Duc (72.7%). Group 3 has a negative examination rate of 72.3%, lower than Rigopoulos (81%), Di Fonzo (100%), equivalent to Shi (72%).

#### **4.2.2. Result**

After 4 weeks, the cure rate is 73.8% (Table 3.6). The improvement rate is 26.2%, and no patients have no cure. Compared with the rate of microbiological cure rate (negative test), this rate is lower (73.8% as 76.6%). In patients with negative tests, there is still a small proportion of the degree of disease does not decrease or decrease less. However, in general, the azole is highly effective in treatment of PV.

##### **4.2.2.1. Efficacy treatment with clinical and subclinical**

###### **❖ By group**

The results presented in Table 3.7 show that group 1 has the highest number of patients who were cured (79.0%); group 3 has the lowest with 71.1%; group 2 is 71.3%, the difference is not statistically significant among groups with  $p > 0.05$ .

###### **❖ By age**

Age groups also have a definite effect on the outcome. As indicated in Table 3.8, 10-19 has the lowest cure rate (60.0%), compared with the other groups. This difference is statistically significant with  $p < 0.05$ .

**❖ By degree of disease**

The results obtained in Table 3.9 and 3.10 show that mild degree of disease has the rate cure which is higher than the moderate-severe. For mild, group 2 is the most effective, so for moderate-severe, group 1 is the most effective.

**4.2.2.2. Efficacy treatment with *Malassezia species***

For *Malassezia*, azole drugs are effective. With *M. globosa*, the recovery rate in Table 3.10 is 70.5% lower than that of other species, but the difference is not statistically significant at  $p > 0.05$ . Thus, for the *M. globosa*, group 1 has the highest effective, group 2 has the lowest effective, the difference is not statistically significant with  $p > 0.05$ .

## CONCLUSION

### 1. Identification of *Malassezia* species from pityriasis versicolor

#### 1.1. Identification of *Malassezia* species by culture

- The growth rate is 90.3%; the detection rate is 97.0%, including 11 species: *M. globosa* (42.4%), *M. dermatis* (17.3%), *M. furfur* (14.4%).
- *M. globosa* is the most prevalent species in the 20-29 group 36.5%, in hyphae and yeast cells (42.2%)

#### 1.2. Identification of *Malassezia* species by PCR sequencing

- The demonstrated positive bands is 59.7%, the detection rates is 91.0%, including 4 species: *M. globosa* (73.7%), *M. restricta* (11.7%), *M. sympodialis* (5.0%), *M. cuniculi* (0.6%)

### 2. Efficacy of treatment by azole antifungal drugs

#### 2.1. Results

- After 4 weeks, total point of degree of disease and the rate finding *Malassezia* has reduced significantly
- The cure rate after 4 weeks treatment by azole drugs is 73.8%. The improvement rate is 26.2%, no patient has no cure
- Group 1 has the highest cure rate (79.0%), followed by group 2 (71.3%), and group 3 (71.1%)

#### 2.2. Efficacy treatment with clinical

- Combined therapy with fluconazole and ketoconazole has the highest effective rate with duration of disease from zero to 3 months (82.4%), degree of disease from moderate to severe (75.8%). Itraconazole has the highest effective rate with duration of disease over 3 months (76.5%), mild degree disease (90.0%)

#### 2.3. Efficacy treatment with *Malassezia* species

- *M. globosa* responses to azole drugs: 70.5%, which is lower than other species. Combined therapy with fluconazole and ketoconazole has the highest effective rate with *M. globosa* (77.8%).

### **SUGGESTION**

From results we recommend:

- Identification of *Malassezia* spp. from pityriasis versicolor should use direct and culturing microscopy examination.
- Combined therapy with fluconazole and ketoconazole has the highest cure rate.