

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ QUỐC PHÒNG

VIỆN NGHIÊN CỨU Y DƯỢC LÂM SÀNG 108

**ĐỖ NGUYỆT ÁNH**

**NGHIÊN CỨU TÌNH TRẠNG TÁI PHÁT  
VÀ TÁI NHIỄM *HELICOBACTER PYLORI*  
BẰNG XÁC ĐỊNH TÍNH ĐA HÌNH GEN *UreC*  
Ở BỆNH NHÂN LOÉT HÀNH TÁ TRÀNG**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC**

**Hà Nội - 2021**

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ QUỐC PHÒNG

VIỆN NGHIÊN CỨU Y DƯỢC LÂM SÀNG 108

**ĐỖ NGUYỆT ÁNH**

**NGHIÊN CỨU TÌNH TRẠNG TÁI PHÁT  
VÀ TÁI NHIỄM *HELICOBACTER PYLORI*  
BẰNG XÁC ĐỊNH TÍNH ĐA HÌNH GEN *UreC*  
Ở BỆNH NHÂN LOÉT HÀNH TÁ TRÀNG**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC**

**Chuyên ngành: NỘI TIÊU HÓA**

**Mã số: 62.72.01.43**

**Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS. NGUYỄN THÚY VINH**

**PGS.TS. NGUYỄN THỊ HỒNG HẠNH**

**Hà Nội - 2021**

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi. Các số liệu, kết quả nghiên cứu trong đề tài này là trung thực, không sao chép và chưa từng được công bố trong bất cứ công trình nào khác.

*Tác giả luận án*

*Đỗ Nguyệt Ánh*

## LỜI CẢM ƠN

*Tôi xin chân thành cảm ơn Đảng ủy, Ban Giám đốc, Phòng Sau đại học, Bộ môn Nội Tiêu hóa - Viện nghiên cứu khoa học Y Dược lâm sàng 108 đã tạo điều kiện hết sức thuận lợi cho tôi được học tập và nghiên cứu.*

*Tôi xin chân thành cảm ơn Khoa Nội Tiêu hóa (A3), Phòng sau đại học - Bệnh viện Trung ương Quân đội 108, đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi hoàn thành công trình luận án này.*

*Với lòng biết ơn sâu sắc, tôi xin chân thành cảm ơn PGS.TS. Nguyễn Thúy Vinh và PGS.TS. Nguyễn Thị Hồng Hạnh là hai người Thầy đã trực tiếp hướng dẫn, giúp đỡ tôi hoàn thành công trình nghiên cứu và hoàn thiện luận án.*

*Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn tới các Thầy trong Bộ môn Nội Tiêu hóa - Viện nghiên cứu khoa học Y Dược lâm sàng 108, các Thầy trong Hội đồng chấm luận án các cấp đã đóng góp những ý kiến quý báu cho tôi hoàn thiện luận án.*

*Tôi xin chân thành cảm ơn Ban Giám đốc Bệnh viện E Trung ương, Trung tâm Tiêu hóa, Khoa Nội soi- Thăm dò chức năng, khoa Giải phẫu bệnh Bệnh viện E Trung ương, Viện Công nghệ Sinh học- Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, cùng tất cả các bạn bè, đồng nghiệp đã tạo điều kiện và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.*

*Tôi cũng xin dành tình cảm biết ơn tới bố mẹ, chồng, các con và người thân trong gia đình đã luôn động viên tôi trong quá trình học tập.*

*Cuối cùng, tôi xin chân thành cảm ơn tất cả những người bệnh, những người tình nguyện đã tin tưởng, hợp tác giúp tôi hoàn thành nghiên cứu này.*

**Tác giả luận án**

# MỤC LỤC

Trang

Lời cam đoan

Lời cảm ơn

Mục lục

Danh mục các chữ, ký hiệu viết tắt

Danh mục bảng

<b>ĐẶT VẤN ĐỀ</b> .....	<b>1</b>
<b>CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU</b> .....	<b>4</b>
1.1. <i>Helicobacter pylori</i> và bệnh loét tá tràng .....	4
1.1.1. <i>Helicobacter pylori</i> .....	4
1.1.2. Bệnh loét tá tràng .....	12
1.2. Tái nhiễm và tái phát <i>Helicobacter pylori</i> sau điều trị tiệt trừ .....	20
1.2.1. Khái niệm tái nhiễm và tái phát vi khuẩn <i>Helicobacter pylori</i> .....	20
1.2.2. Tình hình tái phát và tái nhiễm của <i>H. pylori</i> sau điều trị tiệt trừ ..	21
1.2.3. Các yếu tố liên quan đến tái phát và tái nhiễm <i>H. pylori</i> .....	24
1.2.4. Ý nghĩa của phân biệt tái nhiễm và tái phát của <i>Helicobacter pylori</i> ..	29
1.3. Các phương pháp phân biệt bộ gen của <i>Helicobacter pylori</i> và phương pháp PCR –RFLP, giải trình tự gen xác định gen <i>UreC</i> .....	30
1.3.1. Các phương pháp phân tích bộ gen của vi khuẩn <i>H. pylori</i> .....	30
1.3.2. Gen <i>UreC</i> .....	30
1.3.3. Phương pháp PCR- RFLP (PCR- Đa hình chiều dài đoạn cắt giới hạn).....	32
1.3.4. Phương pháp giải trình tự gen .....	33
1.3.5. So sánh hai phương pháp PCR –RFLP và giải trình tự gen trong xác định chủng <i>H. pylori</i> .....	36
1.3.6. Các nghiên cứu kiểu gen <i>H. pylori</i> bằng phương pháp PCR-RFLP và giải trình tự gen .....	37
<b>CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b> .....	<b>40</b>
2.1. Đối tượng nghiên cứu .....	40

2.1.1. Tiêu chuẩn chọn bệnh nhân nghiên cứu .....	40
2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ bệnh nhân nghiên cứu .....	40
2.1.3. Nơi tiến hành nghiên cứu .....	40
2.2. Phương pháp nghiên cứu .....	40
2.2.1. Thiết kế nghiên cứu .....	40
2.2.2. Cỡ mẫu nghiên cứu .....	41
2.2.3. Các bước tiến hành nghiên cứu .....	43
2.2.4. Các chỉ tiêu nghiên cứu .....	50
2.2.5. Phương tiện nghiên cứu.....	54
2.2.6. Xử lý số liệu .....	56
2.2.7. Không chế sai số .....	58
2.3. Đạo đức nghiên cứu.....	58
2.4. Sơ đồ nghiên cứu .....	59
<b>CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>60</b>
3.1. Kết quả điều trị loét hành tá tràng có <i>Helicobacter pylori</i> dương tính bằng phác đồ EAC .....	60
3.1.1. Đặc điểm chung của mẫu nghiên cứu .....	60
3.1.2. Triệu chứng lâm sàng và đặc điểm nội soi trước điều trị.....	61
3.1.3. Đặc điểm mức độ nhiễm <i>H. pylori</i> trên mô bệnh học .....	62
3.1.4. Tỷ lệ kháng kháng sinh Clarithromycin và Amoxicillin của <i>H. pylori</i> . .....	62
3.1.5. Kết quả điều trị của phác đồ EAC.....	63
3.1.6. Đánh giá tác dụng không mong muốn của phác đồ điều trị.....	68
3.1.7. Ảnh hưởng của kháng Clarithromycin và Amoxicillin tới hiệu quả điều trị của phác đồ EAC .....	68
3.2. Tình trạng tái phát và tái nhiễm <i>H. pylori</i> sau điều trị .....	71
3.2.1. Sơ đồ về tình trạng tái xuất hiện <i>H. pylori</i> và tái phát ổ loét sau điều trị tiệt trừ <i>H. pylori</i> .....	71
3.2.2. Đặc điểm tái phát và tái nhiễm <i>H. pylori</i> sau điều trị tiệt trừ của nhóm nghiên cứu.....	73
3.2.3. Kết quả sinh PCR-RFLP và giải trình tự gen <i>UreC</i> của các chủng <i>H. pylori</i> nhiễm trước và sau điều trị tiệt trừ.....	76

3.2.4. Minh họa kết quả sinh học phân tử so sánh chủng <i>H. pylori</i> trước và sau điều trị tiệt trừ.....	90
<b>CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN.....</b>	<b>95</b>
4.1. Phân tích tỷ lệ kháng Amoxicillin, Clarithromycin và hiệu quả phác đồ Esomeprazole-Amoxicilin-Clarithromycin (EAC) trên bệnh nhân loét tá tràng có <i>Helicobacter pylori</i> dương tính.....	95
4.1.1. Đặc điểm nhóm nghiên cứu.....	95
4.1.2. Triệu chứng lâm sàng.....	96
4.1.3. Kích thước, số lượng và vị trí ổ loét dạ dày, tá tràng.....	97
4.1.4. Tỷ lệ kháng kháng sinh Clarithromycin và Amoxicillin của <i>H. pylori</i> .....	98
4.1.5. Kết quả điều trị của phác đồ EAC trong điều trị loét tá tràng.....	100
4.1.6. Ảnh hưởng của kháng kháng sinh đối với hiệu quả điều trị của phác đồ EAC.....	108
4.2. Xác định tình trạng tái phát hay tái nhiễm <i>Helicobacter pylori</i> sau điều trị tiệt trừ thành công, bằng kỹ thuật PCR-RFLP và PCR giải trình tự xác định gen <i>UreC</i> .....	112
4.2.1. Tỷ lệ tái xuất hiện <i>H. pylori</i> sau điều trị tiệt trừ thành công.....	112
4.2.2. Tỷ lệ tái phát ổ loét tá tràng.....	115
4.2.3. Kết quả phân biệt tái phát và tái nhiễm <i>H. pylori</i> sau điều trị tiệt trừ <i>H. pylori</i> thành công.....	116
4.3. Hạn chế của nghiên cứu.....	126
<b>KẾT LUẬN.....</b>	<b>128</b>
<b>KIẾN NGHỊ.....</b>	<b>130</b>
<b>DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CỦA TÁC GIẢ</b>	
<b>ĐÃ CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN.....</b>	<b>131</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO.....</b>	<b>133</b>
<b>PHỤ LỤC</b>	

## DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

TT	Phần viết tắt	Phần viết đầy đủ
1	BN	Bệnh nhân
2	bp	Base pair- cặp bazơ
3	CLR	Clarithromycin
4	CS	Cộng sự
5	ddNTP	di-deoxynucleotide triphosphate
6	DDTT	Dạ dày tá tràng
7	DSDD	dị sản dạ dày
8	EAC	Esomeprazole-Amoxicillin- Clarithromycin
9	ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
10	H	<i>HhaI</i>
11	HDI	Human development index- chỉ số phát triển con người
12	H&E	Hematoxylin và Eosin
13	Hn	<i>Hind III</i>
14	HP	<i>Helicobacter pylori</i>
15	IL	Interleukin
16	KS	Kháng sinh
17	KSD	Kháng sinh đồ
18	LDD	Loét dạ dày
19	LPS	Lipopolysaccharide
20	LTT	Loét tá tràng
21	M	<i>MboI</i>
22	MBH	Mô bệnh học
23	MIC	Minimal Inhibitory Concentration (Nồng độ ức chế tối thiểu)
24	NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drug



<b>TT</b>	<b>Phần viết tắt</b>	<b>Phần viết đầy đủ</b>
		Thuốc kháng viêm không steroid
25	OMVs	Outer membrane vesicles – Túi màng ngoài
26	PPIs	Proton Pump Inhibitors Ức chế bơm proton
27	RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA Khuếch đại ngẫu nhiên DNA đa hình thái
28	RFLP	Restriction fragment length polymorphism Đa hình chiều dài đoạn cắt giới hạn
29	VDD	Viêm dạ dày
30	PP	Per protocol

## DANH MỤC BẢNG

Bảng	Tên bảng	Trang
Bảng 1.1.	Tỷ lệ tái nhiễm <i>H. pylori</i> ở các nước sau điều trị tiệt trừ [63]	29
Bảng 1.2.	Kết quả dùng kỹ thuật sinh học phân tử xác định tỷ lệ tái phát và tái nhiễm <i>H. pylori</i> sau điều trị tiệt trừ	39
Bảng 3.1.	Triệu chứng lâm sàng (n=303)	61
Bảng 3.2.	Phân bố kích thước ổ loét của bệnh nhân loét tá tràng n=303)	61
Bảng 3.3.	Phân bố vị trí các ổ loét ở bệnh nhân loét tá tràng (n=303)	62
Bảng 3.4.	Mức độ nhiễm <i>H. pylori</i> (n=303)	62
Bảng 3.5.	Tỷ lệ nuôi cấy vi khuẩn <i>H. pylori</i> thành công (n=303)	62
Bảng 3.6.	Tỷ lệ <i>H. pylori</i> kháng Clarithromycin trước điều trị (n=175)	63
Bảng 3.7.	Tỷ lệ <i>H. pylori</i> kháng Amoxicillin trước điều trị (n=175)	63
Bảng 3.8.	Tỷ lệ bệnh nhân tái khám lần đầu sau điều trị tiệt trừ <i>H. pylori</i> (n=303)	65
Bảng 3.9.	Tỷ lệ giảm triệu chứng đau thượng vị (n=162)	65
Bảng 3.10.	Tỷ lệ tiệt trừ <i>H. pylori</i> thành công (n=162)	65
Bảng 3.11.	Tỷ lệ liền sẹo ổ loét (n=162)	66
Bảng 3.12.	Mối liên quan giữa tiệt trừ <i>H. pylori</i> thành công và liền sẹo ổ loét (n=162)	66
Bảng 3.13.	Tỷ lệ liền sẹo theo mức độ nhiễm <i>H. pylori</i> (n=162)	67
Bảng 3.14.	Tỷ lệ điều trị tiệt trừ <i>H. pylori</i> thành công theo mức độ nhiễm (n=162)	67
Bảng 3.15.	Tỷ lệ tác dụng không mong muốn của phác đồ điều trị (n=162)	68
Bảng 3.16.	Ảnh hưởng của kháng Clarithromycin đến hiệu quả tiệt trừ <i>H. pylori</i> (n=141)	69
Bảng 3.17.	Ảnh hưởng của kháng Amoxicillin đến hiệu quả tiệt trừ <i>H. pylori</i> (n=141)	69
Bảng 3.18.	Ảnh hưởng của kháng Clarithromycin đến tỷ lệ liền sẹo (n=141)	70

<i>Bảng 3.19. Ảnh hưởng của kháng Amoxicillin đến tỷ lệ liền sẹo.....</i>	<i>70</i>
<i>Bảng 3.20. Tỷ lệ bệnh nhân tái khám sau tiệt trừ H. pylori thành công (n=52).....</i>	<i>73</i>
<i>Bảng 3.21. Tỷ lệ tái xuất hiện H. pylori sau điều trị tiệt trừ thành công (n=52).....</i>	<i>73</i>
<i>Bảng 3.22. Tỷ lệ bệnh nhân tái xuất hiện H. pylori và thời gian theo dõi (n=52).....</i>	<i>74</i>
<i>Bảng 3.23. Tỷ lệ loét tái phát và tình trạng H. pylori sau quá trình theo dõi (n=52).....</i>	<i>76</i>
<i>Bảng 3.24. Tỷ lệ tái phát và tái nhiễm sau tiệt trừ H. pylori (n=18) .....</i>	<i>76</i>
<i>Bảng 3. 25. Tỷ lệ tái phát, tái nhiễm H. pylori và thời gian theo dõi.....</i>	<i>77</i>
<i>Bảng 3.26. Tỷ lệ tái phát ổ loét và tái phát, tái nhiễm H. pylori.....</i>	<i>79</i>
<i>Bảng 3.27. Số lượng kiểu RFLP với các enzym cắt giới hạn của các chủng H. pylori phân lập được .....</i>	<i>84</i>
<i>Bảng 3.28. So sánh các kiểu RFLP sau khi dùng enzym với các enzym cắt giới hạn của các chủng H. pylori phân lập được trước và sau điều trị .....</i>	<i>85</i>
<i>Bảng 3.29. So sánh các chủng H.pylori nhiễm trước điều trị với các chủng H.pylori tham chiếu của BLAST.....</i>	<i>87</i>
<i>Bảng 3.30. So sánh các chủng H.pylori nhiễm sau điều trị với các chủng H.pylori tham chiếu của BLAST .....</i>	<i>88</i>
<i>Bảng 3.31. So sánh sự tương đồng gen UreC trước và sau tiệt trừ H. pylori bằng phương pháp giải trình tự gen.....</i>	<i>89</i>
<i>Bảng 3.32. Đoạn PCR được nhân bản từ gen UreC của H. pylori trước điều trị qua phân tích BLAST .....</i>	<i>92</i>
<i>Bảng 3.33. Đoạn PCR được nhân bản từ gen UreC của H .pylori sau điều trị qua phân tích BLAST .....</i>	<i>93</i>
<i>Bảng 3.34. So sánh trình tự đoạn PCR được khuếch đại trước và sau điều trị.....</i>	<i>93</i>
<i>Bảng 4.1. Kết quả tiệt trừ H. pylori bằng phác đồ EAC.....</i>	<i>103</i>
<i>Bảng 4.3. Kết quả liền sẹo sau điều trị của các nghiên cứu.....</i>	<i>107</i>

## DANH MỤC BIỂU ĐỒ, SƠ ĐỒ

<b>Biểu đồ</b>	<b>Tên biểu đồ</b>	<b>Trang</b>
Biểu đồ 3.1.	Phân bố bệnh nhân theo giới.....	60
Biểu đồ 3.2.	Phân bố bệnh nhân theo nhóm tuổi.....	61
Biểu đồ 3.3.	Phân tích Kaplan-Meier của tỷ lệ bệnh nhân tái xuất hiện <i>H. pylori</i> sau tiết trừ thành công.....	75
Biểu đồ 3.4.	Tỷ lệ tái phát và tái nhiễm <i>H. pylori</i> sau điều trị tiết trừ.....	77
Sơ đồ 1.1.	Cơ chế gây loét tá tràng của <i>H. pylori</i> .....	17
Sơ đồ 2.1.	Sơ đồ chọn mẫu nghiên cứu .....	43
Sơ đồ 3.1.	Tái xuất hiện <i>H. pylori</i> sau điều trị tiết trừ.....	71
Sơ đồ 3.2.	Tái phát ổ loét sau điều trị tiết trừ .....	72



## DANH MỤC HÌNH

Hình	Tên hình	Trang
Hình 1.1.	Hình thái của <i>H. pylori</i> .....	4
Hình 1.2.	Tỷ lệ nhiễm <i>H. pylori</i> trong quần thể cư dân trên toàn thế giới .....	6
Hình 1.3.	Nội soi dạ dày bằng ánh sáng thường .....	9
Hình 1.4.	Nội soi dạ dày phóng đại .....	9
Hình 1.5.	Ố loét hành tá tràng.....	15
Hình 1.6.	Tỷ lệ tái xuất hiện <i>H. pylori</i> toàn cầu.....	23
Hình 1.7.	Thay đổi hình thái <i>H. pylori</i> từ hình que, hình V, hình U sang hình cầu.....	26
Hình 1.8.	Hình ảnh mô phỏng màng sinh học của <i>H. pylori</i> .....	27
Hình 1.9.	Kết quả PCR-RFLP của sản phẩm khuếch đại gen <i>UreC</i> từ 12 chủng vi khuẩn <i>H. pylori</i> .....	33
Hình 1.10.	So sánh thang điện di và các đỉnh sóng huỳnh quang .....	35
Hình 2.1.	Hình ảnh kết quả Urease test .....	45
Hình 2.2.	Các vật liệu dùng để nuôi cấy <i>H. pylori</i> .....	47
Hình 2.3.	Hình ảnh khuẩn lạc <i>H. pylori</i> .....	47
Hình 2.4.	Đĩa kháng sinh đồ với Amoxicillin và Clarithromycin sử dụng E-test.....	53
Hình 2.5.	Máy PCR.....	55
Hình 2.6.	Bộ điện di .....	55
Hình 2.7.	Máy giải trình tự.....	56
Hình 2.8.	Sơ đồ nghiên cứu .....	60
Hình 3.1.	Thang DNA chuẩn dùng trong phân tích sản phẩm của PCR từ bệnh phẩm sinh thiết dạ dày.....	79
Hình 3.2.	Minh họa hình ảnh PCR gen <i>UreC</i> 820 bp của mã số bệnh phẩm từ 1 đến 7.....	80
Hình 3.3.	Kết quả sản phẩm PCR sau khi được cắt với enzym cắt giới hạn <i>Hha</i> I (H).....	80
Hình 3.4.	Sản phẩm PCR-RFLP của mẫu bệnh phẩm từ 1 đến 6.....	81

<i>Hình 3.5. Sản phẩm PCR-RFLP của mẫu bệnh phẩm từ 7 đến 12.....</i>	<i>82</i>
<i>Hình 3.6. Sản phẩm PCR-RFLP của mẫu bệnh phẩm từ 13 đến 18.....</i>	<i>83</i>
<i>Hình 3.7. Hình ảnh PCR gen UreC 820 bp.....</i>	<i>90</i>
<i>Hình 3.8. Phân tích PCR khuếch đại đoạn DNA 820 cặp bazơ từ mảnh sinh thiết với enzym cắt giới hạn Hha I (H).....</i>	<i>90</i>
<i>Hình 3.9. Phân tích PCR khuếch đại đoạn DNA 820 cặp bazơ từ mảnh sinh thiết với các enzym cắt giới hạn Mbo I (M).....</i>	<i>90</i>
<i>Hình 3.10. Phân tích PCR khuếch đại đoạn DNA 820 cặp bazơ từ mảnh sinh thiết với các enzym cắt giới hạn Hind III (Hn).....</i>	<i>91</i>
<i>Hình 3.11. Trình tự 712bp gen UreC của chủng H. pylori trước điều trị.....</i>	<i>91</i>
<i>Hình 3.12. Sắc phổ một đoạn trình tự gen UreC của chủng H. pylori trước điều trị.....</i>	<i>91</i>
<i>Hình 3.13. Trình tự 712bp gen UreC của chủng H. pylori sau điều trị.....</i>	<i>92</i>
<i>Hình 3.14. Sắc phổ một đoạn trình tự gen UreC của chủng H. pylori sau điều trị.....</i>	<i>92</i>
<i>Hình 3.15. So sánh trình tự hai chủng H.pylori trước và sau điều trị.....</i>	<i>94</i>

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiễm *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) là một trong những loại nhiễm khuẩn mãn tính hay gặp nhất ở người [1]. Ước tính đến năm 2015 có khoảng 4,4 tỷ người trên toàn thế giới nhiễm vi khuẩn này [2]. Đã có nhiều nghiên cứu khẳng định vai trò của *H. pylori* trong cơ chế bệnh sinh của bệnh viêm loét dạ dày tá tràng, u MALT cũng như ung thư dạ dày [3]. Đặc biệt, *H. pylori* được coi là nguyên nhân chính gây loét dạ dày tá tràng là một bệnh phổ biến trên thế giới cũng như ở nước ta với tỷ lệ mắc chiếm tới 5% đến 10% dân số thế giới [4]. Chính vì vậy, việc diệt trừ *H. pylori* giúp điều trị hiệu quả bệnh viêm loét dạ dày tá tràng có nhiễm *H. pylori* và quan trọng hơn là có thể ngăn ngừa được sự phát triển của ung thư dạ dày [5],[6]. Trong nhiều thập kỷ qua, các phác đồ diệt trừ *H. pylori* đã được áp dụng điều trị cho bệnh nhân loét dạ dày tá tràng có nhiễm *H. pylori*. Tuy nhiên, diệt trừ hoàn toàn *H. pylori* là một thách thức với giới y học nói chung và chuyên ngành tiêu hóa nói riêng. Bằng chứng là tình trạng tái xuất hiện (recurrence) *H. pylori* sau diệt trừ gặp ở nhiều quốc gia và khu vực kể cả ở các nước phát triển. Nghiên cứu của Gisbert và CS thấy tỷ lệ tái xuất hiện *H. pylori* sau diệt trừ trung bình trên toàn thế giới hàng năm là 4,3% đến 4,5% [7],[8]. Nhìn chung, tỷ lệ này ở các nước đang phát triển cao hơn so với ở các nước phát triển (13% so với 2,7%) [9]. Một yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến tái xuất hiện *H. pylori* là hiệu quả của các phác đồ diệt trừ *H. pylori*. Vào những năm đầu 1990, tỷ lệ diệt trừ *H. pylori* của các phác đồ có thể đạt trên 80% [10]. Tuy nhiên, theo thời gian các phác đồ diệt trừ *H. pylori* dần giảm hiệu quả do vi khuẩn kháng kháng sinh ngày càng tăng [11]. Bên cạnh đó, yếu tố phát triển kinh tế xã hội và điều kiện vệ sinh môi trường cũng có mối liên quan mật thiết với tình trạng tái xuất hiện *H. pylori* sau diệt trừ [12].



Có hai hình thức tái xuất hiện *H. pylori* sau tiết trừ là tái phát (recrudescence) và tái nhiễm (reinfection). Tái phát là nhiễm lại các chủng *H. pylori* trước điều trị và tái nhiễm là sau khi tiết trừ thành công bệnh nhân lại nhiễm lại một chủng *H. pylori* khác với chủng nhiễm trước điều trị. Phân biệt tái phát và tái nhiễm giúp cho chuyên ngành tiêu hóa có định hướng, có chiến lược điều trị phù hợp. Đối với tái phát, bác sĩ lâm sàng cần thay đổi và lựa chọn phác đồ điều trị thích hợp. Đối với tái nhiễm, giải pháp là tìm nguyên nhân, các biện pháp phòng như tránh lây nhiễm trong gia đình, cải thiện điều kiện vệ sinh và môi trường sống.

Để chứng minh tình trạng tái nhiễm hay tái phát *H. pylori*, chúng ta cần phải phân biệt được kiểu gen giữa các chủng nhiễm trước và sau điều trị tiết trừ. Có nhiều phương pháp sinh học phân tử xác định kiểu gen của vi khuẩn trong đó PCR- RFLP và PCR giải trình tự gen để xác định kiểu gen các chủng *H. pylori* là hai phương pháp hiện đang được áp dụng phổ biến trong nghiên cứu và thực tiễn lâm sàng. Do kiểu gen của *H. pylori* có tính đa hình cao nên việc lựa chọn gen xác định chính xác sự hiện diện của *H. pylori* là rất quan trọng. Các gen hay được lựa chọn là các gen ổn định ở hầu hết các chủng *H. pylori* như *16S rRNA*, *UreC*, *UreA* còn được coi là các gen “giữ nhà” (housekeeping genes). Trong đó, phân tích gen *UreC* được sử dụng trong nhiều nghiên cứu xác định sự hiện diện của *H. pylori* do có độ đặc hiệu cao và giúp xác định các chủng *H. pylori* [13].

Nhiều công trình nghiên cứu đã thực hiện tại nhiều quốc gia phân biệt tình trạng tái phát và tái nhiễm *H. pylori* sau điều trị tiết trừ vi khuẩn này ở các bệnh nhân loét dạ dày tá tràng cho kết quả rất khác nhau. Tại các nước đã phát triển, các nghiên cứu cho thấy tỷ lệ tái phát cao hơn tái nhiễm. Trong khi đó ở các nước đang phát triển, tỷ lệ tái nhiễm lại cao hơn [8]. Tại Việt Nam, chưa có nhiều công trình nghiên cứu phân biệt tình trạng tái phát và tái nhiễm *H. pylori* bằng phương pháp sinh học phân tử. Xuất phát từ thực tiễn đánh giá

hiệu quả điều trị tiệt trừ vi khuẩn *H. pylori* và phân biệt tái nhiễm hay tái phát sau điều trị tiệt trừ *H. pylori* ở bệnh nhân loét tá tràng - một bệnh phổ biến ở nước ta và có tỷ lệ loét tái phát cao, chúng tôi tiến hành đề tài: **“Nghiên cứu tình trạng tái phát và tái nhiễm *Helicobacter pylori* bằng xác định tính đa hình gen *UreC* ở bệnh nhân loét hành tá tràng”** với hai mục tiêu:

- 1. Phân tích tỷ lệ kháng Amoxicillin, Clarithromycin và hiệu quả phác đồ Esomeprazole-Amoxicilin-Clarithromycin (EAC) trên bệnh nhân loét tá tràng có Helicobacter pylori dương tính*
- 2. Xác định tình trạng tái phát và tái nhiễm Helicobacter pylori sau điều trị tiệt trừ thành công, bằng kỹ thuật PCR-RFLP và giải trình tự xác định gen UreC*

## CHƯƠNG 1

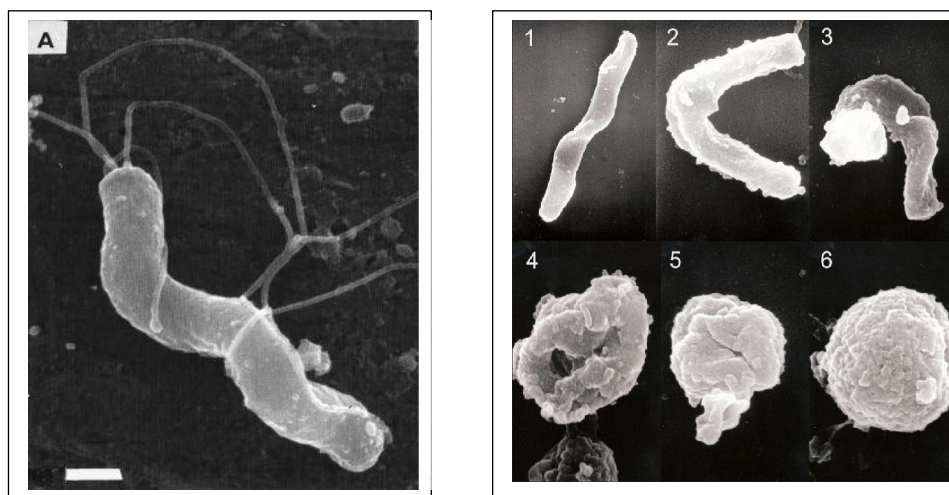
### TỔNG QUAN TÀI LIỆU

#### 1.1. *Helicobacter pylori* và bệnh loét tá tràng

##### 1.1.1. *Helicobacter pylori*

###### 1.1.1.1. Đặc điểm *Helicobacter pylori*

- Đặc điểm vi sinh học: *Helicobacter pylori* là vi khuẩn gram âm, kỵ khí, thường nằm dưới lớp chất nhầy phủ bề mặt niêm mạc dạ dày, bám trên mặt hoặc chui sâu vào khe giữa các tế bào biểu mô dạ dày, có khi *H. pylori* có trong lòng các khe tuyến nông gần bề mặt niêm mạc. Vi khuẩn có hình xoắn hình chữ S với một đến ba lần uốn cong, kích thước  $0,5 \times 5 \mu\text{m}$ . Dưới kính hiển vi điện tử ở một đầu vi khuẩn này có một chùm 5 đến 7 râu có vỏ bọc [14]. Đôi khi cũng gặp *H. pylori* dạng hình cầu (coccoïd) hay “dạng ngủ” của vi khuẩn này. Cấu trúc hình cầu giúp *H. pylori* tồn tại lâu hơn ở môi trường không thuận lợi và sẽ quay lại dạng hoạt động thường gặp ở điều kiện sinh thái thích hợp [15].



*a*

*b*

**Hình 1.1. Hình thái của *H. pylori* [16]**

***a. H. pylori* hình chữ S có 5 râu có vỏ bọc ở một đầu**

***b. H. pylori* dạng hình cầu (coccoïd)**

- Đặc điểm sinh hóa: Đặc tính sinh hóa quan trọng nhất của *H. pylori*

là cho phản ứng urease dương tính nhanh [15].

- Đặc điểm di truyền: Bộ gen của vi khuẩn *H. pylori* là một nhiễm sắc thể mạch vòng có kích thước khoảng 1.67 megabazơ. Đó là một tập hợp tối thiểu các gen mã hóa cho các protein tham gia vào quá trình trao đổi chất của vi khuẩn. Kích cỡ bộ gen của *H. pylori* nhỏ hơn các vi khuẩn khác, tuy nhiên trình tự lại rất thay đổi [17]. *H. pylori* là vi khuẩn siêu đột biến, chính các đột biến dẫn đến xuất hiện nhiều chủng (biến thể) khác nhau. Vì vậy, *H. pylori* có khả năng thích nghi tốt trong môi trường dạ dày khắc nghiệt [18].

- Những yếu tố độc của vi khuẩn

+ Men Urease: Urease đã tạo ra môi trường pH trung tính bao quanh *H. pylori* chống lại tác động của môi trường acid dạ dày. Ngoài ra, urease còn có khả năng kết dính với phân tử kháng nguyên hòa hợp tổ chức lớp II (MHC II) trên biểu mô dạ dày, gây kích ứng chết chương trình tế bào (apoptosis) [19],[15].

+ VacA (vacuolating cytotoxin- gene A): VacA là một độc tố protein của *H. pylori* gây không bào hoá tế bào dạ dày, làm tế bào chết theo chương trình, ức chế hoạt hoá tế bào miễn dịch T.

+ CagA (cytotoxin-associated gene A): CagA là một trong các gen nằm trên đảo bệnh lý cagPAI của *H. pylori*. CagA là protein độc tính, sau khi được vi khuẩn *H. pylori* tiết ra ở dạng thể nang có thể thâm nhập vào trong tế bào biểu mô dạ dày và gây nên hàng loạt các phản ứng dẫn tới sự tăng tiết IL- 8 của tế bào ra ngoài, dẫn đến sự viêm nhiễm [19].

+ Lipopolysaccharide (LPS) và kháng nguyên Lewis: giúp *H. pylori* tránh những đáp ứng miễn dịch ban đầu sau khi xâm nhập và nhờ đó giúp *H. pylori* lưu trú lâu dài trong hốc dạ dày và gây tổn thương gián tiếp và trực tiếp dạ dày [15].

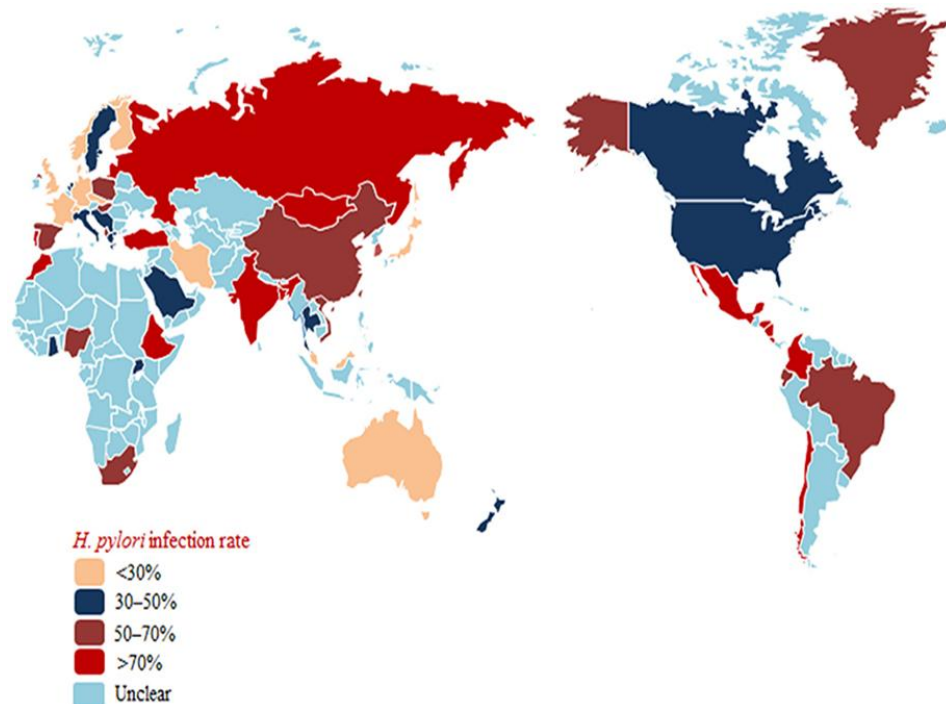
+ Yếu tố bám dính và các thụ thể: Yếu tố bám dính có bản chất protein là các Hop như HopS (BabA), HopH (OMP), HopP (SabA) giúp cho vi khuẩn tồn tại trong môi trường acid và phát triển trong niêm mạc dạ dày. Ngoài ra, protein gây viêm bên ngoài (OipA) cũng là một yếu tố độc lực của *H.*

*pylori* hiệp đồng với các yếu tố độc lực khác có vai trò trong việc cảm ứng các phân tử gây viêm quan trọng như IL-8 [19].

#### 1.1.1.2. Dịch tễ học nhiễm *Helicobacter pylori*

##### - Tỷ lệ hiện nhiễm *Helicobacter pylori*

Nhiều nghiên cứu về dịch tễ cho thấy nhiễm *H. pylori* hiện nay vẫn là một vấn đề liên quan đến sức khỏe có qui mô toàn cầu [2]. Tỷ lệ hiện nhiễm *H. pylori* khác nhau giữa các châu lục, quốc gia và vùng miền. Điều kiện kinh tế, xã hội và vệ sinh cũng ảnh hưởng đến tỷ lệ nhiễm này. Tỷ lệ hiện mắc cao nhất ở châu Phi (79,1%), khu vực Mỹ La tinh và Caribe có tỷ lệ mắc là 63,4% và Châu Á là 54,7%. Ngược lại, khu vực Bắc Mỹ và châu Úc có tỷ lệ mắc thấp hơn tương ứng 37,1% và 24,4%. Ở các nước Bắc Âu và Bắc Mỹ, 1/3 số người lớn bị nhiễm *H. pylori*. Trong khi đó ở Nam và Đông Âu, Nam Mỹ, Châu Á tỷ lệ hiện mắc vẫn cao hơn 50%. Thụy Điển có tỷ lệ mắc thấp nhất là 18,9%. Tại các nước đã phát triển, tỷ lệ mắc *H. pylori* thấp nhưng cộng đồng người di cư từ vùng có tỷ lệ mắc *H. pylori* cao vẫn có tỷ lệ hiện mắc cao [2]. Tỷ lệ nhiễm trong cộng đồng ở một số nước có xu hướng giảm do cải thiện điều kiện kinh tế xã hội và điều trị tiệt trừ *H. pylori* thành công [20].



**Hình 1.2. Tỷ lệ nhiễm *H. pylori* trong quần thể cư dân trên toàn thế giới [21]**

- Phương thức lây truyền *H. pylori*: có ba đường lây truyền thường được khuyến cáo gồm đường phân - miệng, đường miệng- miệng và đường dạ dày - miệng [22],[23].

+ Lây truyền đường miệng- miệng: Vi khuẩn từ trong dạ dày có thể cư trú và phát triển tại khoang miệng sau khi người mang vi khuẩn *H. pylori* trong dạ dày bị nôn. Do vậy, nước bọt có thể là một nguồn lây nhiễm *H. pylori* và người ta có thể nuôi cấy *H. pylori* từ nước bọt. Tuy nhiên, có nghiên cứu cho thấy khả năng lây truyền qua nước bọt không cao. Ngoài ra, *H. pylori* còn được tìm thấy ở các mảng bám răng [23].

+ Lây truyền đường phân- miệng: DNA của *H. pylori* được tìm thấy trong phân. Đây là đường lây phổ biến ở các nước đang phát triển khi điều kiện sinh hoạt hoặc vệ sinh thấp kém. Mức độ vi khuẩn trong phân cao ở người bị tiêu chảy hoặc sử dụng thuốc làm tăng pH dạ dày.

+ Lây truyền đường dạ dày- miệng: vi khuẩn *H. pylori* từ người này lây nhiễm sang người khác do dụng cụ nội soi hoặc ống nội soi dính niêm mạc, dịch dạ dày không được vô khuẩn tốt. Ngoài ra, các nghiên cứu còn ghi nhận sự lây nhiễm từ bệnh nhân cho các nhân viên y tế đặc biệt các bác sĩ chuyên khoa tiêu hóa và các bác sĩ, kỹ thuật viên nội soi do tiếp xúc thường xuyên với các chất dịch của các dụng cụ nội soi [23].

- Các yếu tố nguy cơ nhiễm *H. pylori*

+ Điều kiện sống thấp kém: Tỷ lệ nhiễm khuẩn cao gặp ở nơi điều kiện vệ sinh kém và nguồn nước không sạch. Một nghiên cứu ở Brazil công bố năm 2010 cho thấy nguy cơ nhiễm *H. pylori* cao ở những gia đình đông con, các nhà trẻ, những người sinh sống trong điều kiện vệ sinh kém như không có vệ sinh tự hoại, nơi ở quá đông đúc, chật chội [24].

+ Lây nhiễm trong gia đình: Nhiều nghiên cứu chứng minh có sự lây nhiễm giữa các thành viên trong gia đình. Vấn đề này cũng được đề cập rất

sớm, được coi là một yếu tố nguy cơ lây nhiễm *H. pylori* [25].

+ Chủng tộc: Nghiên cứu của Epplein M và CS tại Mỹ công bố năm 2011 thấy rằng có thể có gen nhạy cảm với khả năng nhiễm vi khuẩn *H. pylori* [26].

#### 1.1.1.3. Các bệnh lý do nhiễm *H. pylori*

Tuy gần một nửa dân số thế giới nhiễm *H. pylori*, nhưng chỉ khoảng 20 đến 30% quần thể phát triển thành bệnh [2]. Nếu vi khuẩn *H. pylori* chỉ cư trú ở niêm mạc dạ dày thì đó không phải là bệnh lý. Khi gặp các điều kiện là các yếu tố nguy cơ, vi khuẩn này sẽ gây nên những biểu hiện thay đổi và rối loạn trên lâm sàng tại hệ thống tiêu hóa và có thể cả ở hệ gan mật và các cơ quan khác ngoài đường tiêu hóa. Các bệnh lý mà vi khuẩn *H. pylori* có thể gây ra bao gồm bệnh lý tại hệ tiêu hóa như viêm dạ dày cấp tính, viêm dạ dày mạn tính, loét dạ dày tá tràng, ung thư dạ dày, u MALT dạ dày. Các bệnh lý ngoài đường tiêu hóa có thể gặp như xuất huyết giảm tiểu cầu miễn dịch tiên phát (Immune thrombocytopenic purpura), thiếu máu thiếu sắt, thiếu máu thiếu vitamin B12, mày đay mạn tính (Chronic urticaria)... [19].

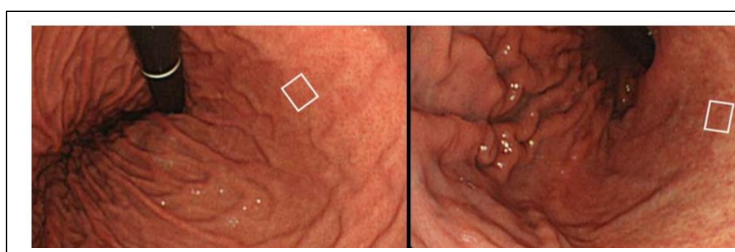
#### 1.1.1.4. Các phương pháp chẩn đoán *H. pylori* và ứng dụng trong lâm sàng

Từ khi phát hiện ra *H. pylori* vào năm 1983, có rất nhiều phương pháp chẩn đoán *H. pylori* được phát triển và sử dụng trong nghiên cứu và lâm sàng. Sử dụng phương pháp chẩn đoán phù hợp rất quan trọng trong chẩn đoán nhiễm *H. pylori* để có lựa chọn điều trị và còn giúp xác định đã diệt trừ thành công vi khuẩn sau điều trị. Từ đó xác định sự tái xuất hiện của vi khuẩn này trong quá trình theo dõi. Mỗi phương pháp đều có ưu điểm và nhược điểm cũng như có độ nhạy và độ đặc hiệu khác nhau có thể được áp dụng cho phù hợp với mục tiêu và điều kiện của cơ sở y tế hoặc cơ sở nghiên cứu.

##### - Các phương pháp chẩn đoán xâm nhập

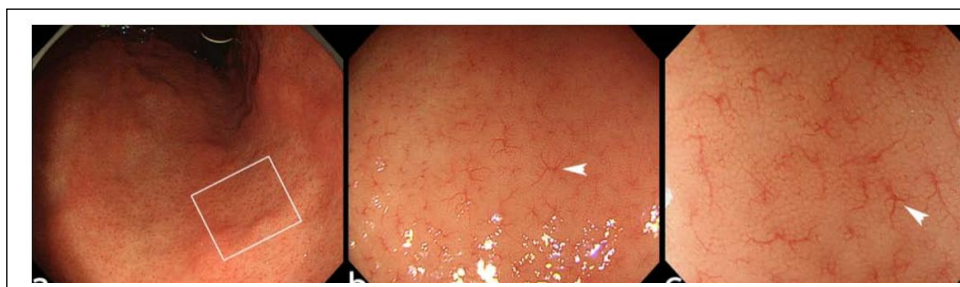
+ Nội soi dạ dày: Nội soi dạ dày tá tràng có thể chẩn đoán nhiễm *H. pylori* ngay tại thời điểm soi. Với nội soi bằng ánh sáng thường, hình ảnh không nhiễm *H. pylori* sẽ có hang vị màu hơi đỏ, đồng nhất và có các nếp niêm mạc chạy dài (Hình 4.1a). Khi dùng các máy nội soi có độ phân giải cao có thể thấy các chấm nhỏ màu đỏ phân bố đều đặn (Hình 4.2a). Hình ảnh nội

soi phóng đại thấy các chấm đỏ này là những đường gân nhỏ tạo thành hình mạng nhện được gọi là tập hợp các tiểu tĩnh mạch “collecting venule” (Hình 4.2b và 4.2c). Sự phân bố đều đặn các tập hợp tiểu tĩnh mạch là đặc điểm thấy ở dạ dày bệnh nhân có *H. pylori* âm tính [27]. Phương pháp chẩn đoán này có độ nhạy là 82% (95% C.I.=71-93%) và độ đặc hiệu là 95% (95% C.I.=90-100%) [28]. Ngược lại, niêm mạc dạ dày bị nhiễm *H. pylori* sẽ có hình ảnh viêm teo hơi trắng và hơi vàng với các mao mạch được nhìn thấy rõ hơn, lớp niêm mạc như mỏng hơn và mất các nếp niêm mạc của dạ dày (Hình 1.2 b).



**Hình 1.3. Nội soi dạ dày bằng ánh sáng thường [29]**

**a: niêm mạc dạ dày bình thường b. Niêm mạc dày viêm teo**



**Hình 1.4. Nội soi dạ dày phóng đại [29]**

Khi sử dụng nội soi phóng đại có độ phân giải cao kết hợp với nhuộm Indigo carmine trong chẩn đoán *H. pylori* dương tính ở bệnh nhân có viêm dạ dày vùng thân vị thì độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp này là 97.6% và 100%. Tuy nhiên độ nhạy và độ đặc hiệu chỉ đạt 88.4% and 75.0% khi chẩn đoán *H. pylori* ở bệnh nhân có viêm dạ dày vùng hang vị [29]. Chẩn đoán nhiễm *H. pylori* qua nội soi còn giúp định hướng vị trí để lấy mẫu sinh thiết làm xét nghiệm chẩn đoán *H. pylori* khác như urease test, mô bệnh học, nuôi cấy vi khuẩn và xét nghiệm sinh học phân tử. Hạn chế của phương pháp là



mất nhiều thời gian thực hiện thủ thuật nội soi.

+ Nghiệm pháp Urease test nhanh:

Urease test là một phương pháp chẩn đoán phát hiện vi khuẩn *H. pylori* đơn giản, thực hiện trong khi nội soi dạ dày tá tràng, cho kết quả nhanh và giá thành thấp. Độ đặc hiệu của test trong khoảng 80%-100% và độ nhạy dao động từ 97 đến 99%. Một số nguyên nhân gây kết quả âm tính giả là mật độ vi khuẩn thấp, niêm mạc loạn sản ruột, sử dụng kháng sinh và ức chế bơm proton trong thời gian gần ngày soi hoặc bệnh nhân đang có chảy máu tại dạ dày [30].

+ Nhuộm gram: Đây là phương pháp chẩn đoán nhanh, đơn giản, giá thành thấp, có thể thực hiện ở tất cả các phòng thí nghiệm. Mẫu sinh thiết được quét trực tiếp lên lam kính, cố định và nhuộm gram. *H. pylori* được xác định là loại khuẩn gram âm, hình gậy cong hoặc chữ S đặc trưng. Phương pháp này có độ nhạy và độ đặc hiệu thấp hơn các phương pháp khác nên được sử dụng để chẩn đoán sàng lọc nhanh *H. pylori* ở các bệnh nhân viêm loét dạ dày tá tràng và cũng được coi là một phương pháp hỗ trợ cho phương pháp nuôi cấy và phân lập vi khuẩn [31].

+ Nuôi cấy vi khuẩn: Mảnh sinh thiết của dạ dày được nghiền trong dung dịch canh thang, nuôi cấy trong môi trường thạch sôcôla hoặc thạch máu 5%, để ở nhiệt độ 37<sup>0</sup> C, đọc kết quả sau 72 giờ. Phương pháp này có độ đặc hiệu 100%, được coi là tiêu chuẩn vàng để chẩn đoán nhiễm vi khuẩn *H. pylori* [32]. Tuy vậy, độ nhạy và độ đặc hiệu phụ thuộc vào kinh nghiệm của trung tâm xét nghiệm. Nhiều phòng xét nghiệm có kinh nghiệm cũng chỉ có tỷ lệ nuôi cấy mọc vi khuẩn từ 50% đến 70% [33]. Miftahussurur M và CS tổng kết độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp nuôi cấy chẩn đoán *H. pylori* ở bốn quốc gia thấy tỷ lệ tương ứng từ 74,2% đến 83,3% và 97,2% đến 98,6% [34]. Trên thực tế lâm sàng, phương pháp nuôi cấy còn giúp làm kháng sinh đồ đánh giá nhạy cảm kháng sinh và mức độ kháng kháng sinh của *H. pylori*. Hạn chế của phương pháp nuôi cấy là chi phí cao, thời gian dài nên chưa được áp dụng rộng rãi ở các cơ sở y tế.

+ Mô bệnh học: Chẩn đoán mô bệnh học mẫu sinh thiết niêm mạc dạ dày và nhuộm bằng Heamatoxyline và eosin (H&E) là một trong những

phương pháp chẩn đoán *H. pylori* thông dụng và đáng tin cậy. Hình ảnh cho thấy *H. pylori* là một xoắn khuẩn điển hình. Phương pháp nhuộm H&E có nhạy và độ đặc hiệu tương ứng là 69-93% và 87-90%. Độ đặc hiệu có thể lên tới 90- 100% khi dùng các phương pháp nhuộm Giemsa cải tiến, nhuộm Warthin-Starry bạc, nhuộm hóa mô miễn dịch [35]. Tuy nhiên, phương pháp này có chi phí khá cao và đòi hỏi người đọc kết quả có kinh nghiệm.

#### + Khuếch đại gen- PCR (Polymerase Chain Reaction)

Mẫu bệnh phẩm (chúng *H. pylori* phân lập được hoặc là mẫu sinh thiết, nước bọt...) được phân tích để lấy DNA đích. Sau đó quá trình khuếch đại gen được thực hiện nhờ cặp mồi gồm hai đoạn DNA đơn trái chiều nhau cùng với các chất xúc tác phản ứng tổng hợp của men Tag polymerase. Để phát hiện *H. pylori*, các gen thường được sử dụng gồm *ureA*, *UreC* (còn có tên *glmM*) hoặc 16S rRNA, 23S rRNA, *Hsp60* [36],[37]. Phương pháp này có thể sử dụng các loại bệnh phẩm khác nhau như mẫu sinh thiết, vi khuẩn phân lập sau nuôi cấy, nước bọt, dịch dạ dày, phân và cả mẫu lấy ngoài môi trường sống như nước sinh hoạt. Độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp tùy thuộc vào bệnh phẩm, cặp mồi của gen đích và loại phương pháp PCR. Với phương pháp này có độ nhạy cao từ 91-97% [38]. Với phương pháp PCR lồng (nested PCR) độ đặc hiệu của phản ứng PCR tăng đến 100% nhờ giảm độ nhiễu do sự khuếch đại ADN không đặc hiệu. Phương pháp PCR là phương pháp chẩn đoán *H. pylori* nhanh (trong vòng một ngày), có thể áp dụng cả trước và sau điều trị diệt trừ *H. pylori*. Một ưu điểm nữa của phương pháp PCR là có thể phát hiện *H. pylori* cả khi vi khuẩn này ở dạng hình cầu (cocoid form) hay thể ngủ của vi khuẩn trong khi các phương pháp khác không phát hiện được [39].

Phương pháp PCR còn được áp dụng cho nghiên cứu bộ gen của các chủng *H. pylori*. Trên cơ sở các sản phẩm PCR của *H. pylori*, phương pháp dùng enzyme cắt giới hạn (RFLP) hoặc giải trình tự gen giúp biệt sự khác nhau giữa các chủng vi khuẩn, phân biệt tái nhiễm hay tái phát, tìm các gen đột biến của *H. pylori* có liên quan đến kháng thuốc [40]. Hạn chế của

phương pháp PCR là chi phí cao, thường sử dụng cho nghiên cứu và chưa được áp dụng rộng rãi để chẩn đoán *H. pylori* ở các cơ sở y tế.

- Các phương pháp chẩn đoán không xâm nhập

+ Nghiệm pháp thở C13 hoặc C14 (Urease Breath Test-UBT)

Phương pháp có độ nhạy và độ đặc hiệu tương ứng 91%- 100% và 74-100% [41]. Xét nghiệm này có ưu điểm có thể trực tiếp phát hiện nhiễm vi khuẩn *H. pylori* bằng đo lượng urease do vi khuẩn này sản xuất trong dạ dày, ít bị ảnh hưởng của sai số do lấy mẫu vì đồng vị cacbon phân bố đều trên toàn bộ bề mặt của niêm mạc dạ dày. Tuy nhiên, vẫn có những yếu tố làm thay đổi độ chính xác của xét nghiệm BUT: dương tính giả do các loại vi khuẩn khác cư trú trong dạ dày (ví dụ: *H. heilmannii*) cũng sản xuất urease hoặc âm tính giả trong trường hợp xuất huyết tiêu hóa hoặc đang dùng thuốc kháng axit [40].

+ Phương pháp chẩn đoán huyết thanh

Chẩn đoán huyết thanh bằng phương pháp ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) để phát hiện kháng thể IgG kháng *H. pylori*. Xét nghiệm này dễ thực hiện, giá thành thấp, thích hợp cho nghiên cứu dịch tễ học với độ nhạy trên 95% và độ đặc hiệu dao động từ 85% –96%. Tuy nhiên, các phản ứng của kháng thể đối với kháng nguyên được duy trì trong một thời gian dài sau khi điều trị triệt trừ, do đó không thể dùng xét nghiệm này xác nhận điều trị thành công [40], [32].

+ Phương pháp phát hiện kháng nguyên trong phân

Phương pháp ELISA xác định sự hiện diện kháng nguyên *H. pylori* trong phân. Phương pháp này rất thuận lợi cho các nghiên cứu dịch tễ học nhất là ở trẻ em khi mà các phương pháp chẩn đoán thông qua nội soi và lấy máu gặp khó khăn. Độ chính xác của phương pháp chẩn đoán này đạt khoảng trên 90% cả trước và sau điều trị [42].

### **1.1.2. Bệnh loét tá tràng**

#### 1.1.2.1. Dịch tễ học loét tá tràng

Loét dạ dày tá tràng là bệnh lý chiếm tỷ lệ cao trong nhóm bệnh lý loét

dạ dày tá tràng. Tổn thương là sự phá hủy lớp niêm mạc bề mặt của tá tràng và có thể xuống đến tận lớp cơ. Loét tá tràng được xác định khi ổ loét có đường kính tối thiểu 0,5cm [43]. Vị trí của loét tá tràng thường gặp ở đoạn I của tá tràng (hành tá tràng), chiếm 95% các trường hợp loét tá tràng. 90% các ổ loét nằm cách ống môn vị trong khoảng 3cm. Kích thước ổ loét thường nhỏ hơn hoặc bằng 1cm, tuy nhiên cũng có ổ loét lớn tới 3cm. Ổ loét tá tràng có bờ rõ. Trường hợp ổ loét sâu có thể tổn thương đến tận lớp cơ. Đáy ổ loét là tổ chức hoại tử nhiễm tương bào và xung quanh là tổ chức xơ. Trên thực tế, rất hiếm gặp ổ loét ác tính ở tá tràng. Tỷ lệ mắc loét dạ dày tá tràng ước tính từ 6% đến 15% ở các nước phương Tây. Tỷ lệ này giảm đáng kể từ năm 1960 đến năm 1980. Tỷ lệ chết cũng như bệnh nhân phải phẫu thuật vì loét dạ dày tá tràng giảm hơn 50% so với 30 năm trước. Nguyên nhân của tỷ lệ giảm nhiều này liên quan đến diệt trừ *H.pylori* [43],[44].

Một báo cáo thống kê các nghiên cứu vào 2009 thấy các nước phát triển có tỷ lệ mắc bệnh loét dạ dày tá tràng hàng năm là 0,1 đến 0,19% ở bệnh nhân ngoại trú và 0,01 đến 0,17% ở bệnh nhân nội trú [45]. Thống kê các bài báo trong ba thập kỷ và công bố năm 2011 đưa ra tỷ lệ loét dạ dày tá tràng không có biến chứng trong cộng đồng dân cư là 1/1000 dân một năm và tỷ lệ loét có biến chứng trung bình là 0,7 ca /1000 dân một năm [46]. Tại Thụy Điển, loét tá tràng thấy ở 2,1% nhóm nghiên cứu 3000 người tham gia, ở Italy tỷ lệ này là 3,9%. Tại Châu Á, tỷ lệ mắc loét tá tràng cao hơn nhiều so với các nước châu Âu như tại Trung Quốc và Đài Loan có tỷ lệ loét tá tràng là 13,3%, và 9,4% [46]. Ở châu Âu, loét tá tràng nhiều gấp 4 lần loét dạ dày và có khuynh hướng xảy ra ở người trẻ trong khi đó bệnh loét dạ dày thường gặp ở người lớn tuổi [43]. Tỷ lệ mắc bệnh ở nam thường cao hơn nữ. Tỷ lệ này ở Nhật là 2:1, ở Pháp là 2,2:1[15].

#### 1.1.2.2. Lâm sàng loét tá tràng

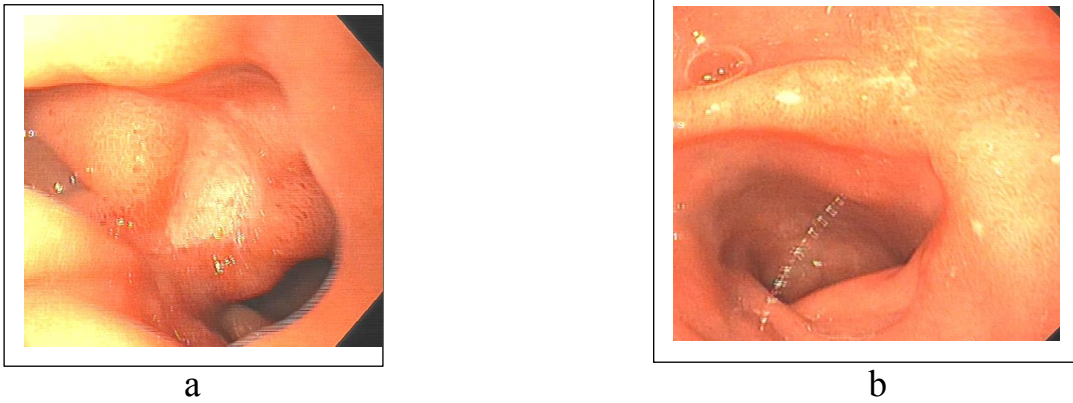
- Triệu chứng thường gặp là đau thượng vị. Vị trí đau trong LTT khu trú ở thượng vị hoặc có thể lan sau lưng. Đặc điểm cơn đau là bệnh nhân cảm

giác tức, nóng rát, ợ hơi, ợ chua. Có trường hợp đau co thắt đến đau dữ dội, buồn nôn, nôn. Triệu chứng đầy bụng, căng tức hoặc cồn cào vùng thượng vị lúc đói cũng thường gặp ở nhiều bệnh nhân. Bệnh nhân đỡ đau và dễ chịu sau khi ăn hoặc uống thuốc kháng acid sau vài phút do trung hòa acid dạ dày tạm thời [15]. Thời gian xuất hiện cơn đau điển hình do loét tá tràng thường xảy ra sau bữa ăn khoảng 2 đến 5 giờ khi dịch acid được tiết vào dạ dày đã hết thức ăn hoặc vào nửa đêm về sáng từ 11 giờ đêm đến 2 giờ sáng khi lượng acid được tiết ra nhiều nhất [47]. Đau có thể xuất hiện vào một mùa nhất định trong năm thường là mùa lạnh hoặc giao mùa. Tuy đau thượng vị là triệu chứng thường gặp của loét dạ dày tá tràng nhưng có bệnh nhân loét tá tràng mà không có triệu chứng. Những bệnh nhân này thường phát hiện ra bệnh khi đã xảy ra biến chứng như chảy máu hoặc thủng ổ loét. Một số nghiên cứu cho thấy 43 đến 87% bệnh nhân có chảy máu ổ loét mà không có triệu chứng báo hiệu trước [48]. Bệnh nhân cao tuổi hoặc các bệnh nhân dùng NSAIDs thường thuộc nhóm phát hiện ra bệnh loét dạ dày tá tràng khi đã bị các biến chứng của bệnh này như nôn ra máu, đi ngoài phân đen hoặc thủng ổ loét.

#### 1.1.2.3. Chẩn đoán loét tá tràng

##### - Nội soi dạ dày

Nội soi là phương pháp chẩn đoán ổ loét chính xác nhất, được xem là tiêu chuẩn vàng để chẩn đoán LTT. Hơn 95% các ổ loét hành tá tràng ở hành tá tràng và phần lớn dưới 1cm [4]. Ổ loét tá tràng có ranh giới rõ, tổn thương tại niêm mạc và có thể lan xuống lớp cơ niêm của thành tá tràng. Phương pháp này có độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Độ nhạy của phương pháp chẩn đoán ổ loét này có thể đạt 95%. Tuy nhiên điều này cũng phụ thuộc vào vị trí ổ loét và kinh nghiệm của bác sĩ nội soi [49]. Ngoài giá trị chẩn đoán ổ loét tá tràng, nội soi còn giúp tiên lượng và điều trị cầm máu trong trường hợp ổ loét tá tràng bị chảy máu nên giảm được lượng máu truyền và giảm chỉ định phẫu thuật cũng như giảm tỷ lệ tử vong vì xuất huyết tiêu hóa do loét hành tá tràng.



**Hình 1.5. Ổ loét hành tá tràng**

a. Ổ loét mặt trước hành tá tràng. Bệnh nhân Nguyễn Thị Th. 32tuổi

b. Ổ loét mặt sau hành tá tràng. Bệnh nhân Bùi Thanh H. 37tuổi

- Chụp X quang

Chụp dạ dày có thuốc cản quang baryt là phương pháp tiêu chuẩn để chẩn đoán loét dạ dày tá tràng khi phương pháp nội soi chưa được dùng phổ biến. Phương pháp này chẩn đoán xác định ổ loét một cách gián tiếp với hình ảnh ổ loét có hình dạng thuốc, hình tròn hoặc oval bờ là những nếp lồi do phù nề. Có thể có hình ảnh các nếp lồi tỏa ra từ miệng ổ loét làm biến dạng vùng xung quanh ổ loét do phù nề, co thắt hoặc sẹo. Phương pháp đối quang kép phát hiện được khoảng 80% ổ loét tá tràng. Tuy nhiên những ổ loét nông, đường kính dưới 0,5cm và các tổn thương phù nề các nếp niêm mạc có thể bị bỏ sót. Chẩn đoán dương tính giả cũng có thể xảy ra trong trường hợp baryt bị đọng lại giữa các nếp niêm mạc [50].

1.1.2.4. Vai trò của vi khuẩn *H. pylori* trong bệnh loét tá tràng

Các nghiên cứu từ những năm 1980 về *H.pylori* (mà trước đó được gọi là *Campylobacter pylori*) cho thấy bệnh nhân loét dạ dày tá tràng có tỷ lệ nhiễm vi khuẩn này rất cao [51]. Những nghiên cứu sau đó xác nhận tỷ lệ nhiễm *H. pylori* từ 80 đến 95% bệnh nhân loét hành tá tràng có nhiễm *H. pylori*, trong khi đó ở bệnh nhân loét dạ dày tỷ lệ nhiễm là 30-60% [43].

1.1.2.5. Cơ chế bệnh sinh loét tá tràng do nhiễm *H. pylori*

- Tăng tiết acid dạ dày

+ *H. pylori* tăng tiết acid của dạ dày thông qua tăng tiết gastrin và có sự mất cân bằng mối quan hệ somatostatin - gastrin. Bệnh nhân có nhiễm

*H. pylori* có tăng nồng độ gastrin huyết thanh cơ bản, nồng độ gastrin kích thích và giảm nồng độ somatostatin [52],[1]. Sự thay đổi này do quá trình nhiễm *H. pylori* mạn tính dẫn đến giảm số lượng tế bào D ở niêm mạc hang vị gây ra giảm tiết somatostatin. Khi nồng độ somatostatin giảm sẽ dẫn đến tăng tiết gastrin, kéo theo tăng bài tiết acid của tế bào thành. *H. pylori* gây ra các phản ứng viêm tại chỗ, phóng thích ra nhiều loại cytokine và các cytokine này làm sai lệch chức năng của các tế bào nội tiết (tế bào D và G). *H. pylori* gây kích thích tiết histamin trên tế bào D ở niêm mạc hang vị, gây ức chế somatostatin và hậu quả tăng giải phóng gastrin [53].

+ *H. pylori* và dị sản dạ dày

Sự tăng tiết acid dẫn làm cho acid trong tá tràng rất nhiều dẫn tới tình trạng dị sản dạ dày tại hành tá tràng. Dị sản dạ dày là sự xuất hiện các đám tế bào biểu mô dạ dày bài tiết nhầy nằm ở tá tràng. Dị sản dạ dày là yếu tố tiên quyết để *H. pylori* có thể cư trú ở hành tá vì *H. pylori* chỉ có thể tồn tại ở tế bào biểu mô dạ dày mà không thể ở biểu mô niêm mạc ruột. Khi đã cư trú ở niêm mạc tá tràng, *H. pylori* gây ra các phản ứng viêm tại chỗ, phá vỡ hàng rào niêm mạc ở tá tràng làm cho niêm mạc dễ bị tổn thương bởi acid. Từ đó ổ loét được hình thành [54].

- *H. pylori* làm giảm một số yếu tố bảo vệ niêm mạc gồm:

+ Giảm lớp nhầy trên bề mặt dạ dày tá tràng được coi là một lớp áo bảo vệ niêm mạc phía dưới.

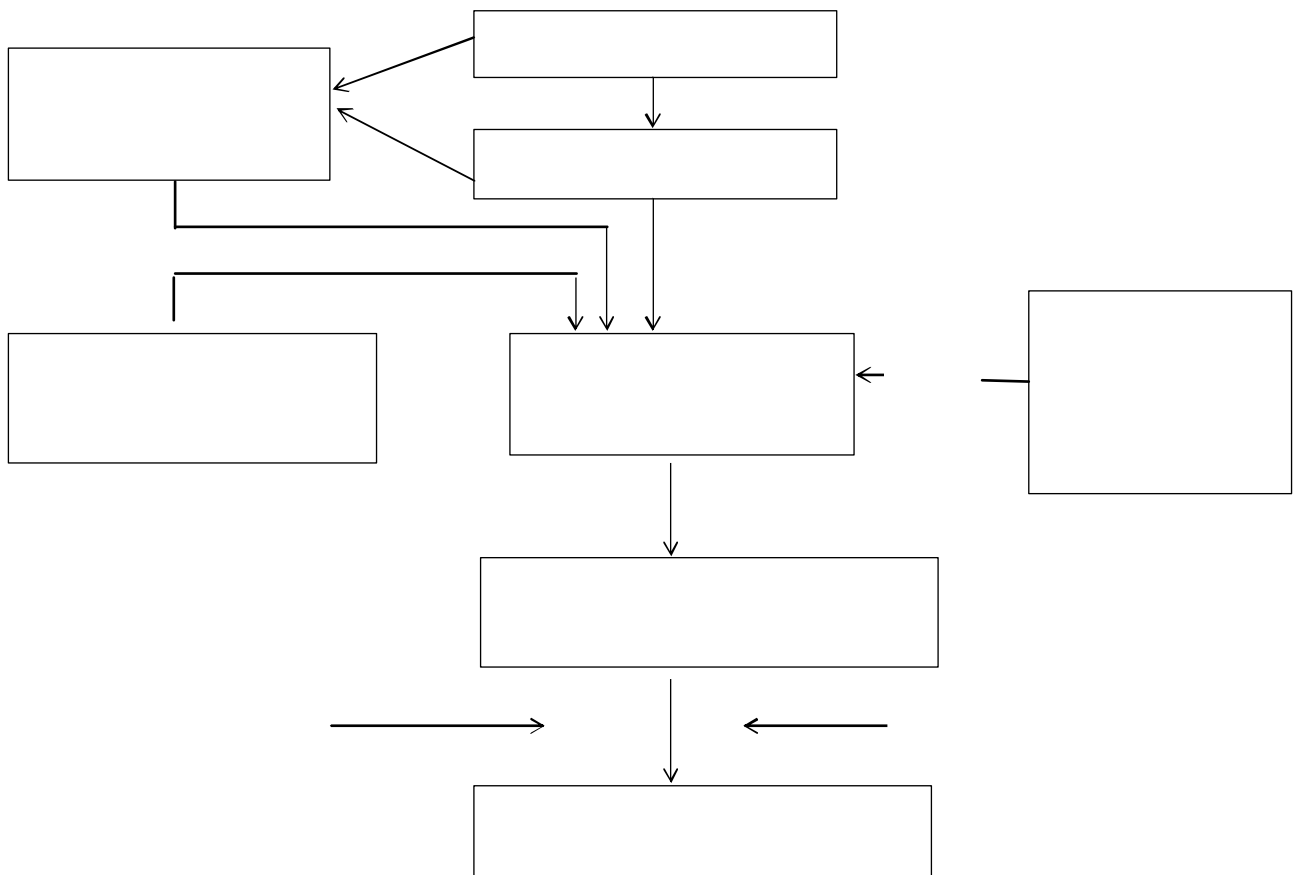
+ Giảm bài tiết bicarbonat. Bicarbonat được xem là cơ chế bảo vệ chủ yếu chống lại tác nhân acid, pepsin gây tổn thương niêm mạc.

+ Giảm yếu tố phát triển biểu mô (Epidermal growth factor - EGF) và yếu tố thay đổi phát triển (alpha transforming growth factor-alpha TGF alpha) cũng có vai trò là các chất ức chế acid dạ dày và kích thích phát triển niêm mạc, bảo vệ niêm mạc.

- Đáp ứng viêm và miễn dịch của người bệnh

Khi nhiễm *H. pylori*, hệ thống miễn dịch của người bệnh sẽ sản xuất các cytokine viêm như interleukin (IL)-1, IL-6, yếu tố hoại tử u alpha, IL-8 gây hoạt hoá các tế bào miễn dịch. Các cytokine gây tổn thương trực tiếp tế bào biểu mô. Các thực bào được kích hoạt giải phóng ra các gốc ôxy và nitơ tự do, dẫn đến hoại tử tế bào biểu mô [1],[55].

- Các yếu tố khác
- + Yếu tố vi khuẩn
- + Vai trò gen khởi động loét tá tràng (*dupA*) của *H. pylori*
- + Yếu tố cá thể người bệnh
- + Sử dụng NSAIDs, hút thuốc lá cũng làm tăng nguy cơ loét tá tràng ở bệnh nhân nhiễm *H. pylori*.



**Sơ đồ 1.1. Cơ chế gây loét tá tràng của *H. pylori* [1]**



### 1.1.2.6. Điều trị bệnh loét tá tràng có nhiễm *H. pylori*

#### - Nguyên tắc

+ Phải diệt được *H. pylori* > 80%.

+ Đơn giản, an toàn, ít tác dụng phụ trên lâm sàng và sinh hóa máu.

+ Dung nạp tốt, có tác dụng hiệp đồng

#### - Chiến lược điều trị tiệt trừ *H. pylori*

+ Phác đồ đầu tay (lần 1)

+ Phác đồ điều trị lần 2: để điều trị tiếp cho bệnh nhân đã thất bại sau điều trị lần 1.

+ Phác đồ điều trị lần 3: Sau hai lần thất bại trong điều trị tiệt trừ *H. pylori*, việc chọn lựa phác đồ điều trị cho bệnh nhân nên dựa vào test nhạy cảm kháng sinh với chủng *H. pylori* mà bệnh nhân bị nhiễm.

#### - Phác đồ EAC trong nghiên cứu

Phác đồ EAC bao gồm ba thuốc: E: Esomeprazole, A: Amoxicillin và C: Clarithromycin. Đây là một công thức của phác đồ chuẩn đầu tay (standard triple therapy) gồm ba thuốc là thuốc ức chế bơm proton (PPI) và hai kháng sinh Amoxicillin và Clarithromycin. Phác đồ ba thuốc được Hội nghiên cứu *Helicobacter pylori* của châu Âu khuyến cáo là lựa chọn đầu tiên cho điều trị tiệt trừ *H. pylori* trong hội nghị đồng thuận Maastricht vào năm 1997. Phác đồ đầu tay 3 thuốc này đã là lựa chọn đầu tiên cho điều trị tiệt trừ *H. pylori* hơn hai thập kỷ qua tại nhiều nước trên thế giới và được các hiệp hội khoa học tại Mỹ và châu Âu khuyến cáo sử dụng. Tuy nhiên, theo thời gian, do tình trạng kháng kháng sinh, đã có các phác đồ điều trị đầu tay khác được khuyến cáo sử dụng cho phù hợp với tình hình kháng kháng sinh của từng khu vực, quốc gia và vùng miền [56].

#### - *Esomeprazole*

Là một đồng phân của Omeprazol, thuốc PPI thế hệ thứ 5, có tác dụng ức chế tiết axit do ức chế men H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase ở tế bào thành dạ dày, do đó

làm giảm tiết axit do bất kỳ nguyên nhân gì, thuốc có tác dụng nhanh và duy trì pH dạ dày cao một cách bền vững do trong công thức có đồng phân quang học S không bị chuyển hóa bởi hệ men cytochrom P450 trong gan. Thuốc làm tăng pH nên bảo vệ cấu trúc của kháng sinh khỏi sự phá hủy của acid trong dạ dày do đó làm tăng tác dụng của thuốc kháng sinh diệt *H. pylori*. Thuốc ít tác dụng phụ, nhưng cũng có thể gặp rối loạn tiêu hóa, buồn nôn, đau đầu, táo bón, ngứa, nổi mề đay... tương đối an toàn với bệnh nhân suy gan, thận.

#### **- Amoxicillin**

Là một kháng sinh họ  $\beta$  lactam bán tổng hợp, có tác dụng ức chế tổng hợp vách của tế bào vi khuẩn, phổ kháng khuẩn rộng, nhạy cảm cao với *H. pylori*, hấp thu tốt qua đường tiêu hóa tới 90%, không bị ảnh hưởng bởi thức ăn, bền vững trong môi trường axit dịch vị. Hoạt tính của thuốc phụ thuộc vào độ pH dịch vị, Nếu pH chuyển từ 5,5 đến 7,5 thì hoạt tính của thuốc tăng 10 đến 20 lần (đây là cơ sở để phối hợp thuốc kháng sinh với thuốc ức chế tiết axit trong điều trị loét dạ dày, tá tràng). Thuốc đạt nồng độ cao nhất trong huyết thanh sau uống 1-2 giờ, bài tiết phần lớn qua nước tiểu và một phần nhỏ qua mật.

Thuốc tương đối an toàn, có thể gây ỉa chảy, dị ứng ... nhưng không nhiều. Thuốc sẵn có trên thị trường, giá rẻ và dễ sử dụng.

#### **- Clarithromycin**

Là kháng sinh thuộc nhóm Macrolid có tác dụng kìm khuẩn mạnh, cơ chế là ức chế tổng hợp protein vi khuẩn do gắn vào tiểu đơn vị 50S của ribosom vi khuẩn, có hiệu quả cao trong việc diệt trừ *H. pylori*. Ở môi trường trung tính, Clarithromycin có tác dụng vượt trội so với các thuốc khác thuộc nhóm Macrolide. Nồng độ tối đa trong máu sau 1-4 giờ, thời gian bán thải 2-3 giờ. Thải trừ chủ yếu qua mật dưới dạng còn hoạt tính.

Thuốc ít độc và dung nạp tốt, chỉ gặp các rối loạn tiêu hóa nhẹ như buồn nôn, tiêu chảy, biến đổi vị giác nhẹ và dị ứng ngoài da.

#### 1.1.2.7. Vi khuẩn *H. pylori* kháng kháng sinh và thất bại điều trị

Từ khi phát hiện *H. pylori* và vai trò của vi khuẩn này trong cơ chế bệnh

sinh gây viêm loét dạ dày tá tràng, đã có nhiều phác đồ điều trị tiệt trừ *H. pylori* được đưa ra trong các hội nghị đồng thuận tại các nước trong khu vực và trên thế giới. Phác đồ phối hợp 3 thuốc là lựa chọn đầu tay, tuy nhiên tình trạng kháng kháng sinh của vi khuẩn đặc biệt là kháng Clarithromycin là một trong những nguyên nhân làm giảm kết quả điều trị bước đầu và cũng gây khó khăn cho điều trị bước tiếp theo.

Trong một nghiên cứu công bố năm 2010 từ tổng kết 31 công trình nghiên cứu từ năm 1993 đến năm 2010 ở tất cả các châu lục cho thấy tỷ lệ đề kháng kháng sinh tính chung của *H. pylori* là 17,2% (16,5-17,9%) với Clarithromycin, 26,7% (25,2-28,1%) với Metronidazole, 11,2% (9,6-12,7%) với Amoxicillin, 16,2% (14,4-18,0%) với Levofloxacin, 5,9% (4,7-7,1%) với Tetracyclin, 1,4% (0,8-1,9%) với Rifabutin, và 9,6% (8,5-10,7%) với  $\geq 2$  kháng sinh [57].

Tại Việt Nam, đã có nhiều công trình nghiên cứu về *H. pylori* kháng kháng sinh từ cuối những năm 1990. Nghiên cứu của Lục Thị Vân Bích cho thấy lệ kháng Metronidazole là 93% và có hiện tượng kháng clarithromycin trên in vitro [58]. Theo tác giả Phan Quốc Hoàn, Tạ Long và CS nghiên cứu ở 163 bệnh nhân LTT, nuôi cấy và làm kháng sinh đồ thấy tỷ lệ kháng Metronidazole từ 7% năm 1996 tăng lên 25% năm 1998 [59]. Vào những năm 2000-2001, nghiên cứu của Nguyễn Thúy Vinh và CS cho thấy tỷ lệ đề kháng của *H. pylori* với Clarithromycin (CLR) ở nước ta thấp dưới 20% (năm 2000 là 11,8% và năm 2001 là 18,9%) [60]. Phần lớn các nghiên cứu kể từ năm 2002 đến nay trên cả nước thấy tỷ lệ *H. pylori* kháng CLR đều tăng. Tác giả Trần Thanh Bình đưa ra tỷ lệ 33,0% (năm 2008), Hà Thị Minh Thi 44,7% (2013), Phan Trung Nam 42,9% (2012-2013) [61].

## ***1.2. Tái nhiễm và tái phát Helicobacter pylori sau điều trị tiệt trừ***

### ***1.2.1. Khái niệm tái nhiễm và tái phát vi khuẩn Helicobacter pylori***

Mặc dù có nhiều phác đồ điều trị tiệt trừ thành công *H. pylori* với tỷ lệ cao nhưng vẫn có tình trạng tái xuất hiện *H. pylori* sau điều trị và đây là một vấn đề khó giải quyết một cách triệt để ở nhiều quốc gia.

- Trong thực hành lâm sàng, tái xuất hiện *H. pylori* (Recurrence) là tình trạng khi xét nghiệm chẩn đoán *H. pylori* âm tính ít nhất 4 tuần sau điều trị lại có kết quả dương tính vào các thời điểm theo dõi sau đó [62]. Có hai hình thức tái xuất hiện *H. pylori* sau điều trị triệt trừ là tái phát (recrudescence) hoặc tái nhiễm (reinfection) [63]:

+ Tái phát (recrudescence) là tình trạng trong 12 tháng sau khi triệt trừ thành công *H. pylori* bệnh nhân lại nhiễm lại chủng đã nhiễm trước điều trị.

+ Tái nhiễm (reinfection) là tình trạng sau khi triệt trừ thành công, bệnh nhân nhiễm một chủng *H. pylori* mới khác với chủng nhiễm trước điều trị.

Các phương pháp sinh học phân tử chẩn đoán DNA có thể phân biệt tái nhiễm và tái phát chính xác nhất. Tuy nhiên, không phải tất cả các nghiên cứu đều có thể thực hiện kỹ thuật này, do đó tái nhiễm được định nghĩa là tình trạng sau 12 tháng âm tính với *H. pylori* với bệnh nhân lại dương tính trở lại với *H. pylori*.

- Các nghiên cứu sử dụng các phương pháp sinh học phân tử như PCR-RFLP, PCR-RAPD, PCR-giải trình tự gen chẩn đoán DNA của vi khuẩn định nghĩa tái phát *H. pylori* khi kỹ thuật dấu ấn vân tay DNA (DNA fingerprinting) xác định chủng nhiễm trước và sau điều trị giống nhau và tái nhiễm khi kỹ thuật dấu ấn vân tay DNA xác định chủng nhiễm trước và sau điều trị khác nhau [8].

Tái phát thường gặp khi phác đồ điều trị hiệu quả thấp. Tái nhiễm hay gặp khi bệnh nhân tái tiếp xúc với nguồn lây nhiễm vì thế hay gặp ở các nước có tỷ lệ nhiễm *H. pylori* cao và có điều kiện vệ sinh môi trường kém [8].

### **1.2.2. Tình hình tái phát và tái nhiễm của *H. pylori* sau điều trị triệt trừ**

Tiệt trừ thành công *H. pylori* có vai trò quan trọng đối với kết quả điều trị triệt để bệnh loét dạ dày tá tràng và phòng biến chứng của loét cũng như trong điều trị bệnh u lympho MALT. Chính vì vậy tái xuất hiện vi khuẩn này sau điều trị triệt trừ là một vấn đề được các nhà lâm sàng cũng như các nhà

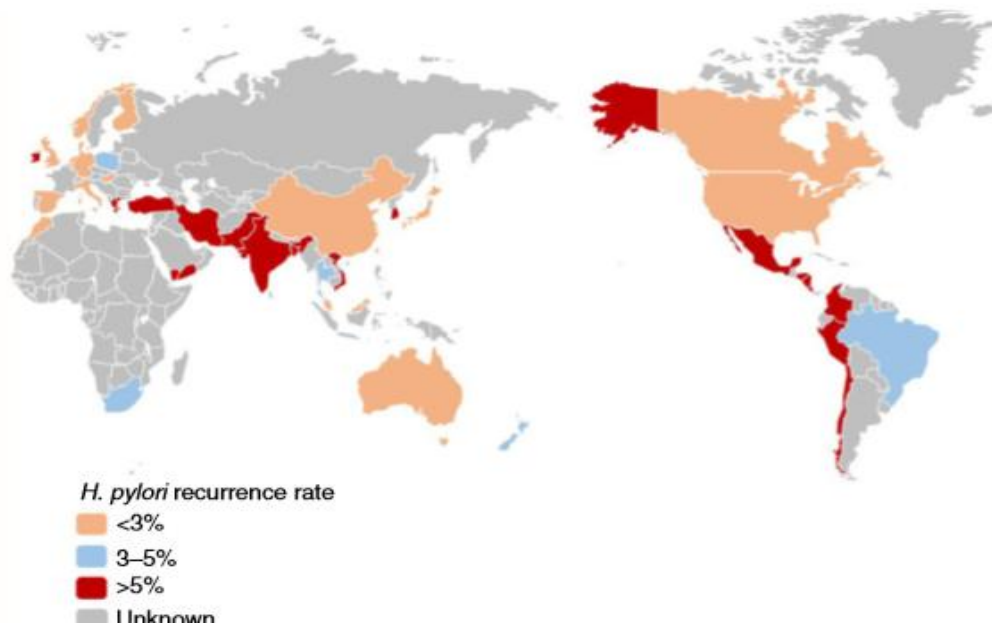
nghiên cứu trong các lĩnh vực liên quan rất quan tâm.

Tổng hợp 132 nghiên cứu từ 1983 đến 2017, Y. Hu và CS thấy tỷ lệ tái xuất hiện *H. pylori* sau điều trị tiệt trừ hàng năm trên toàn cầu là 4.3% (95% CI, 4-5). Tuy nhiên những tỷ lệ này khác nhau giữa các quốc gia và khu vực. Các nước phát triển có tỷ lệ tái xuất hiện *H. pylori* cao hơn ở các nước đang phát triển. Tại Mỹ tỷ lệ tái xuất hiện *H. pylori* là 1.0% (95% CI, 0.1-3). Các nước phát triển ở châu Âu có tỷ lệ này cũng rất thấp thấp như Na Uy 0.9%, (95% CI 0.2-2), Đức 1.4% (95% CI 0.4-3), thấp nhất là Hà Lan 0.2%, (95% CI 0-2). Các nước có tỷ lệ tái xuất hiện *H. pylori* cao như Thổ Nhĩ Kỳ (21.3%, 95% CI 2-53), Bangladesh (14.4%, 95% CI 0.1-43), Mexico (11.7%, 95% CI 9-14), Ấn độ (9.8%, 95% CI 1-23), Chile (7.2%, 95% CI 2-15) [8]. Việt Nam cũng là nước nằm trong khu vực có tỷ lệ tái xuất hiện *H. pylori* cao trên 5%.

Tỷ lệ tái xuất hiện *H. pylori* thay đổi theo thời gian theo dõi. Gisbert và CS theo dõi 1000 bệnh nhân sau điều trị thấy tỷ lệ này là 5.3% sau 1 năm, 6.8% sau 2 năm, 7% sau 3 năm, 7.6% sau 4 năm và 9.3% sau 5 năm [64].

Một yếu tố liên quan trực tiếp đến tỷ lệ tái xuất hiện là tỷ lệ mắc lưu hành (prevalance). Tỷ tái xuất hiện *H. pylori* cao nhất (10.9%, 95% CI 7-16) ở các nước có tỷ lệ nhiễm rất cao, ở các nước có tỷ lệ nhiễm cao và trung bình, tỷ lệ tái xuất hiện *H. pylori* lần lượt là 3.7% (95% CI 3-5) và 3.4% (95% CI 2-5). Tỷ lệ này là 1.6% (95% CI 0.5-3) ở các nước có tỷ lệ nhiễm thấp.

Tỷ lệ này còn liên quan đến chỉ số phát triển con người (HDI- Human development index). HDI là một giá trị trung bình của ba giá trị của sự phát triển con người gồm: tuổi thọ, giáo dục (số năm trung bình học tại trường học) và mức sống tốt (dựa vào thu nhập bình quân quốc nội). Chỉ số HDI càng cao thì tỷ lệ tái xuất hiện *H. pylori* sau điều trị càng thấp. Các nước có chỉ số HDI rất cao và HDI cao có tỷ lệ tái xuất hiện *H. pylori* sau điều trị tương ứng là 3,1% và 6,2%. Các nước có chỉ số HDI trung bình hoặc thấp có tỷ lệ này là 10,9% [8].



**Hình 1.6. Tỷ lệ tái xuất hiện *H. pylori* toàn cầu [8]**

Rất nhiều nghiên cứu đánh giá tình trạng tái xuất hiện *H. pylori* sau điều trị diệt trừ nhưng không phân biệt cụ thể tái phát hay tái nhiễm *H. pylori*. Trong nghiên cứu tổng kết các nghiên cứu về chủ đề này, Y. Hu và CS phân tích kết quả tái phát và tái nhiễm *H. pylori* ở 39 nghiên cứu gồm 16.111 bệnh nhân có tiền hành làm kỹ thuật sinh học phân tử dấu ấn vân tay DNA hoặc có kết quả tái xuất hiện vi khuẩn này trong thời gian 6 tháng thấy tỷ lệ tái nhiễm và tái phát hàng năm tương ứng 3.1% (95% CI, 2-5) và 2.2% (95% CI, 1-3) [8]. Đối với tái phát, tỷ lệ rất khác nhau giữa các nước và khu vực dao động từ 0,2% đến 21,3% [20].

Hiện tượng tái nhiễm *H. pylori* có xu hướng thấp ở các nước phát triển và cao ở các nước đang phát triển và tỷ lệ này khác nhau ở các lứa tuổi, khu vực và chủng tộc. Tái nhiễm hiếm khi xuất hiện nhưng vẫn được mô tả ở châu Âu và ở Mỹ với tỷ lệ tái xuất hiện hàng năm là 1,45% [65]. Zendehtdel và CS thấy sau 3 năm theo dõi, tỷ lệ tái nhiễm khoảng 1% tại Iran [66]. Tại Nhật Bản, một nghiên cứu theo dõi lâu dài các bệnh nhân đã được diệt trừ *H. pylori* trong thời gian 12,5 năm thấy tỷ lệ tái xuất hiện vi khuẩn này ước tính là

0,22% [67]. Các kết quả sinh học phân tử cho thấy tình trạng tái nhiễm có tỷ lệ cao ở các nước đang phát triển do nguy cơ cao phải tiếp xúc với *H. pylori*. Tỷ lệ này có thể lên tới 12% ở một số nước đang phát triển nơi có tỷ lệ nhiễm cao [65]. Tái nhiễm vẫn xuất hiện ở các nước phát triển nhưng với tỷ lệ thấp. Nghiên cứu của Raymond và cộng sự tại Pháp công bố năm 2016 đã xác nhận sự tái nhiễm *H. pylori* thực sự ở những bệnh nhân bị tiệt trừ *H. pylori* thất bại mặc dù đã được điều trị tối ưu và bệnh nhân tuân thủ điều trị nghiêm túc [68].

### **1.2.3. Các yếu tố liên quan đến tái phát và tái nhiễm *H. pylori***

- Các yếu tố liên quan đến tái phát

+ Công thức của phác đồ điều trị và thời gian điều trị

Nhiều nghiên cứu cho thấy các phác đồ điều trị có liên quan mật thiết đến tái xuất hiện *H. pylori* trong vòng 1 năm [64],[62]. Các phác đồ có tỷ lệ tiệt trừ *H. pylori* thấp có thể chỉ tạm thời diệt *H. pylori* hơn là tiệt trừ một cách triệt nên dẫn tới tái phát vi khuẩn này. Tỷ lệ tiệt trừ *H. pylori* thấp sẽ dẫn tới tỷ lệ tái phát cao. Một nghiên cứu tại Hàn Quốc với phác đồ chuẩn đầu tay 3 loại thuốc với tỷ lệ tiệt trừ là 79,9% và phác đồ 4 thuốc có tỷ lệ tiệt trừ là 90,4% cho thấy tỷ lệ tái phát trong vòng một năm ở các bệnh nhân tham gia nghiên cứu tương ứng là 9.3% và 4.5% ( $P < 0.05$ ) [62]. Tuy nhiên, các nước thuộc khu vực địa lý khác nhau lại có tình trạng kháng kháng sinh khác nhau nên cùng một phác đồ điều trị lại có tỷ lệ tiệt trừ *H. pylori* không giống nhau. Vì thế, để tăng tỷ lệ tiệt trừ và giảm tái xuất hiện *H. pylori* sau điều trị cần áp dụng các phác đồ đầu tay dựa vào các nghiên cứu về dịch tễ kháng kháng sinh của *H. pylori* tại quốc gia hoặc khu vực đó [69].

+ Thời gian và phương thức chẩn đoán khi tái khám

Thời gian đánh giá tiệt trừ *H. pylori* rất quan trọng. Hiện nay thời gian này được lựa chọn ít nhất là 4 tuần sau điều trị. Neil và CS thấy thời gian 4 tuần sau điều trị là phù hợp và hiệu quả để đánh giá tiệt trừ *H. pylori* [70].

Một số nghiên cứu khác chọn thời gian lâu hơn là 8 tuần nhằm giảm tỷ lệ âm tính giả cho các xét nghiệm chẩn đoán nhiễm *H. pylori* [71],[72].

Lựa chọn phương pháp chẩn đoán *H. pylori* sau điều trị cũng có ý nghĩa cho việc xác định chính xác tình trạng tiết trừ *H. pylori*. Do các phương pháp chẩn đoán *H. pylori* có độ nhạy và độ đặc hiệu khác nhau vì vậy để giảm thiểu sai sót chẩn đoán, chúng ta cần áp dụng ít nhất hai phương pháp để chẩn đoán tình trạng nhiễm *H. pylori* sau điều trị để xác định sự tái xuất hiện vi khuẩn. Nếu phương pháp chẩn đoán không chính xác ta có thể có kết quả âm tính giả khi vi khuẩn vẫn chưa bị diệt hết nhưng số lượng ít nên không đủ để dương tính với xét nghiệm. Đặc biệt khi tiếp xúc với kháng sinh, vi khuẩn chuyển từ dạng hình que (spiral form) thành dạng hình cầu (cocoid form) để có thể sống sót trong môi trường mới.

+ *H. pylori* cư trú trong khoang miệng

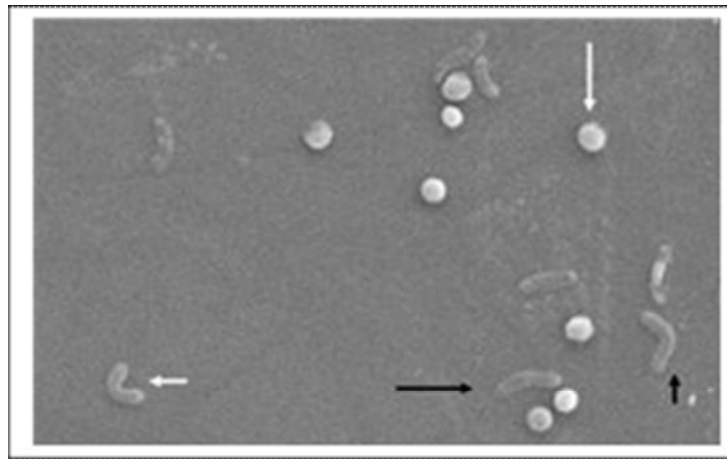
Các đường lây truyền *H. pylori* chính giữa người với người là phân-miệng, miệng- miệng, dạ dày- miệng. Vì thế *H. pylori* trong khoang miệng có thể đóng vai trò quan trọng trong lây nhiễm vi khuẩn này đến dạ dày. Khoang miệng có môi trường vi hiếu khí rất phù hợp cho *H. pylori* tồn tại và phát triển tại mảng bám răng, chân răng [73]. Naviba và CS tổng kết 23 nghiên cứu với 1861 bệnh nhân thấy tình trạng *H. pylori* ở khoang miệng và dạ dày tương đồng 82%. *H. pylori* cư trú ở khoang miệng có thể là một trong các yếu tố nguy cơ gây tái phát vi khuẩn này tại dạ dày [74], [75].

+ *H. pylori* tồn tại ở dạng hình cầu (cocoid form)

Về hình thái học, *H. pylori* tồn tại ở ba hình thái: hình que, trung gian giữa hình V và U, dạng hình cầu. Trong số đó, dạng hình cầu chia thành hai dưới nhóm: tít A bờ không đều, bề mặt thô ráp được coi là dạng đã chết, tít B có bề mặt nhẵn, kích thước nhỏ hơn được coi là thể ngủ [76],[77]. Một số nghiên cứu trước đây đã chứng minh rằng dạng hình cầu của *H. pylori* tồn tại trong dạ dày và tá tràng đặc biệt trong tá tràng nhiều hơn trong dạ dày [78].



Điều này cho thấy mối liên hệ của dạng hình cầu với môi trường sống của chúng. Khi *H. pylori* phải tiếp xúc với môi trường không thuận lợi (sử dụng kháng sinh, pH của môi trường sống, thay đổi nồng độ oxygen...) dạng hình que có thể chuyển thành dạng hình cầu còn gọi là thể ngủ. Thể hình cầu này vẫn duy trì các hoạt động chuyển hóa mức độ thấp như tổng hợp urease và các protein, duy trì các gen độc...[79]. Tuy nhiên, các phương pháp chẩn đoán thông thường hoặc nuôi cấy không thể phát hiện thể hình cầu của *H. pylori*. Khi môi trường thay đổi, dạng hình cầu có thể chuyển thành dạng hoạt động hình que có thể nuôi cấy được và sinh sôi trong dạ dày. Sự biến đổi về hình thái của *H. pylori* cũng là một trong những nguyên nhân tái phát *H. pylori* [80].



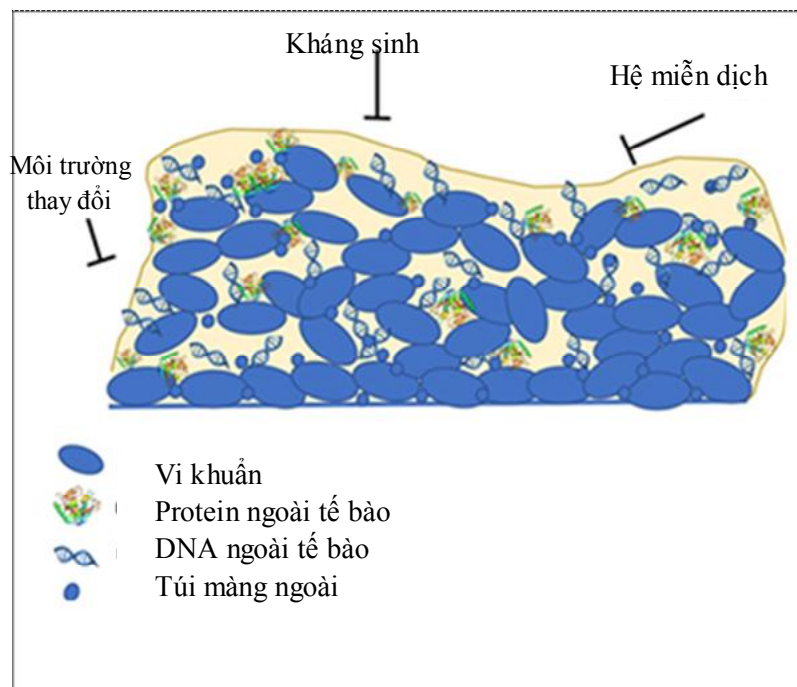
**Hình 1.7. Thay đổi hình thái *H. pylori* từ hình que, hình V, hình U sang hình cầu**

(Nguồn: Hình ảnh chụp từ kính hiển vi điện tử của giáo sư Nuno F.Azevedo- Trường Đại học Oporto-Bồ Đào Nha)

+ Màng sinh học của *H. pylori*

Màng sinh học được định nghĩa là một nhóm các vi sinh vật với các tế bào dính vào nhau và thường dính vào một bề mặt bằng các chất gian bào do chính chúng sản sinh ra. Chất gian bào này bao gồm các chất cao phân tử ngoại bào tạo nên một môi trường chịu được các loại kháng sinh và chống lại đại thực bào rất hiệu quả. Chính cơ chế này làm cho việc diệt trừ vi khuẩn rất

khó khăn. Có nhiều nghiên cứu đã đưa ra bằng chứng *H. pylori* có thể tạo thành màng sinh học [81],[82]. Cammarota và CS tiến hành nghiên cứu ở hai nhóm bệnh nhân, nhóm 1 trước khi điều trị bằng phác đồ tiệt trừ *H. pylori* bệnh nhân được điều trị bằng N-acetylcysteine (là chất có thể cản trở sự hình thành màng sinh học) và nhóm hai không dùng N-acetylcysteine. Kết quả cho thấy tỷ lệ tiệt trừ *H. pylori* của nhóm có dùng N-acetylcysteine cao hơn nhóm không dùng chất này (65% so với 20%,  $P=0,005$ ) [83]. Có giả thiết được đưa ra rằng *H. pylori* tồn tại tại niêm mạc dạ dày với màng sinh học cũng là một yếu tố nguy cơ của tái phát *H. pylori* sau điều trị tiệt trừ. Hình ảnh quan sát dưới kính hiển vi điện tử thấy phần lớn *H. pylori* dưới màng sinh học đều ở dạng hình cầu [84]. Các chất polyme ngoài tế bào kết hợp với DNA ngoài tế bào, protein ngoài tế bào và túi màng ngoài (OMVs) có thể hoạt động như một lá chắn bảo vệ cả cụm vi khuẩn khỏi sự tấn công của các tế bào miễn dịch và các kháng sinh [85]. Sau điều trị tiệt trừ, *H. pylori* có màng sinh học còn lại trong dạ dày không thể tìm thấy bằng các phương pháp phát hiện thông thường và chúng có thể là những “hạt giống” cho tình trạng tái phát sau này.



**Hình 1.8. Hình ảnh mô phỏng màng sinh học của *H. pylori* [86]**

- Các yếu tố liên quan đến tái nhiễm

Hai yếu tố chính liên quan đến tái nhiễm *H. pylori* là sự nhạy cảm của từng cá thể với nhiễm *H. pylori* và tái tiếp xúc với *H. pylori* [87].

- Một số nghiên cứu đã quan sát thấy có sự khác biệt về gen của sự nhạy cảm với nhiễm *H. pylori*. Nghiên cứu 269 cặp sinh đôi cùng trứng và khác trứng thấy tỷ lệ nhiễm *H. pylori* ở các cặp sinh đôi cùng trứng cao hơn (81%) các cặp sinh đôi khác trứng (63%) [88]. Azuma T và CS nghiên cứu thấy tần số alen HLA-DQA\*0301 cao hơn ở những người có *H. pylori* dương tính trong khi đó tần số alen DQA\*0102 cao hơn ở những bệnh nhân có *H. pylori* âm tính. Điều này cho thấy tính đa hình của gen HLA-DQA có ảnh hưởng tới sự nhạy cảm với nhiễm *H. pylori* [89]. Ngoài ra, tính đa hình của một số gen cytokine như interleukin-1B, TNF-A, 89 Lewis (Le), Secretor (Se) cũng có vai trò qua trọng trong sự nhạy cảm với nhiễm *H. pylori* [90]. Những kết quả trên cho thấy yếu tố gen có thể đóng vai trò trong tái xuất hiện *H. pylori* sau điều trị tệt trừ.

- Tái tiếp xúc với *H. pylori* dễ gặp khi sống trong điều kiện vệ sinh yếu kém. Đó là một yếu tố quan trọng gây ra lây nhiễm *H. pylori* trong môi trường. Ở các nước đang phát triển nơi có tỷ lệ nhiễm *H. pylori* cao thì nước uống, thói quen ăn rau sống đã được cho là có vai trò quan trọng trong tái tiếp xúc với nhiễm *H. pylori* [91],[92]. Lây nhiễm trong gia đình cũng làm tái nhiễm dễ dàng hơn và những thành viên nhiễm *H. pylori* không có triệu chứng là nguồn lây nhiễm cho các thành viên khác trong gia đình [93]. Nhiều nghiên cứu đã thấy có sự lây nhiễm giữa các cặp vợ chồng khi một trong hai người có *H. pylori* dương tính. Schutze K và CS đã phân tích các chủng *H. pylori* bằng phương pháp PCR cho các trường hợp tái nhiễm đều cho thấy các chủng đều giống chủng của bạn đời họ bị nhiễm [94]. Weyermann M và CS tiến hành nghiên cứu tại Đức nhận thấy mẹ nhiễm *H. pylori* sẽ là nguồn lây cho con với OR=12,9 (95% CI: 3.2–52.5) [95]. Shimizu và CS báo cáo ca lâm sàng sử dụng kỹ thuật ribotyping xác định chủng *H. pylori* xuất hiện sau điều trị tệt trừ ở một cậu bé 9 tuổi thấy đó là chủng tái nhiễm từ chủng *H. pylori* từ

người mẹ [96]. Tuy nhiên, vẫn có quan điểm không đồng thuận với giả thiết về sự lây nhiễm *H. pylori* trong gia đình và giữa bạn đời. Nghiên cứu tiên cứu, theo dõi dọc của Gisbert JP và CS công bố năm 2002 nhằm đánh giá tình trạng nhiễm *H. pylori* của bạn đời có vai trò trong tái xuất hiện vi khuẩn này sau thời gian tiệt trừ thành công hay không, bằng phương pháp PCR xác định các chủng vi khuẩn, tác giả thấy tất cả các đối tượng được theo dõi nhiễm các chủng khác nhau [97]. Suzuki J và CS phân tích bằng phương pháp PCR cũng chỉ thấy 1 trong 21 cặp vợ chồng có nhiễm cùng một chủng *H. pylori* [98].

**Bảng 1.1. Tỷ lệ tái nhiễm *H. pylori* ở các nước sau điều trị tiệt trừ [63]**

Tác giả	Năm	Đối tượng	Quốc gia	Tỷ lệ tái nhiễm hàng năm (%)
Rollan và cs.	2000	Người lớn	Hà Lan	1,49
Hildebrand và CS	2001	Người lớn	Bangladesh	23,4
Adachi và CS	2002	Người lớn	Nhật Bản	1,23
Seo và CS	2002	Người lớn	Nhật Bản	0,00
Gisbert và CS	2006	Người lớn	Tây Ban Nha	1,04
Lee và CS	2008	Người lớn	Hàn Quốc	2,94
Kim và CS	2013	Người lớn	Hàn Quốc	3,51
Kim và CS	2014	Người lớn	Hàn Quốc	Trong vòng 2 năm 9,3
				Sau 2 năm 2,0
Bruce và CS	2015	Người lớn	Alaska, USA	Trong vòng 2 năm 16,1
Kato và CS	1998	Trẻ em	Nhật	5,36
Leal-Herrer và cs.	2003	Trẻ em	Mexico	9,55
Farrell và CS	2004	Trẻ em	Anh	1,19

#### **1.2.4. Ý nghĩa của phân biệt tái nhiễm và tái phát của *Helicobacter pylori***

Từ khi được phát hiện vào năm 1983, đã có nhiều công trình nghiên cứu ở nhiều nước trên thế giới chứng minh vai trò *H. pylori* trong cơ chế bệnh sinh của các bệnh viêm loét dạ dày tá tràng cũng như ung thư dạ dày. Chính vì vậy, việc tiệt trừ vi khuẩn này sẽ góp phần quan trọng vào việc điều trị hiệu quả cũng như quản lý các bệnh lý dạ dày tá tràng. Đã có nhiều báo cáo về sự

xuất hiện trở lại của *H. pylori* sau điều trị triệt trừ và thường kèm theo loét lại. Tuy nhiên câu hỏi đặt ra là các chủng vi khuẩn mới xuất hiện là do tái nhiễm chủng vi khuẩn trước đây hay nhiễm hoàn toàn một chủng khác. Nhiều nghiên cứu tiến hành ở các nước nhận thấy tái phát hay gặp ở các nước phát triển nơi có điều kiện kinh tế xã hội, điều kiện vệ sinh tốt. Ngược lại, ở các nước đang phát triển gặp tỷ lệ tái nhiễm cao hơn. Tái phát là vấn đề liên quan đến điều trị. Còn tái nhiễm được coi là vấn đề của y học dự phòng cần có nhiều hướng giải quyết. Rất khó để phân biệt tái phát hay tái nhiễm và chủ yếu dựa vào kỹ thuật sinh học phân tử phân tử xác nhận *H. pylori* trước và sau khi điều trị có kiểu gen giống hệt nhau hay khác nhau [56]. Phân biệt tái nhiễm hay tái phát có vai trò quan trọng trong lựa chọn chiến lược điều trị, điều chỉnh phác đồ điều trị lần hai hoặc kiểm soát các yếu tố nguy cơ nếu có. Ở Việt Nam chưa có nhiều công trình nghiên cứu về tái phát, tái nhiễm *H. pylori*. Việc nghiên cứu về vấn đề này có nhiều ý nghĩa thực tiễn ứng dụng lâm sàng và dịch tễ.

### **1.3. Các phương pháp phân biệt bộ gen của *Helicobacter pylori* và phương pháp PCR –RFLP, giải trình tự gen xác định gen *UreC***

#### **1.3.1. Các phương pháp phân tích bộ gen của vi khuẩn *H. pylori***

- Kỹ thuật điện di trong trường xung điện (Macrorestriction of endonuclease analysis using pulsed-field gel electrophoresis -PFGE)
- Phân tích DNA nhiễm sắc thể bằng enzyme giới hạn (restriction endonuclease analysis of chromosomal DNA - REA)
- Kỹ thuật ribotyping: Kỹ thuật PCR ribotyping ứng dụng các cặp mồi đặc hiệu để nhân các vùng gen của ARN (thuộc ribosom hay ARN vận chuyển)
- Khuếch đại ngẫu nhiên DNA đa hình thái (RAPD-PCR)
- PCR- Đa hình chiều dài đoạn cắt giới hạn (PCR –RFLP: PCR Restriction fragment length polymorphism)
- Giải trình tự gen (sequencing)

#### **1.3.2. Gen *UreC***

- Gen *UreC* hay còn được gọi là gen glmM của *H.pylori* là được coi là gen “giữ nhà” (house keeping) tham gia trực tiếp vào tổng hợp thành tế bào,

cần thiết cho việc duy trì chức năng cơ bản của tế bào vi khuẩn trong điều kiện bình thường và bệnh lý. Gen *UreC* có trình tự 1335 cặp bazơ và có chức năng mã hóa cho enzyme phosphoglucosamine mutase - một protein quan trọng cho sự phát triển của *H.pylori*. Enzyme này tham gia xúc tác chuyển hóa glucosamine-6-phosphate thành glucosamine-1-phosphate, sau đó được chuyển thành UDP-N-acetylglucosamine là một trong những tiền chất peptidoglycan của thành tế bào và lipopolysaccharide màng ngoài tế bào. [99].

- Gen *UreC* rất cần thiết cho sự phát triển của thành tế bào vi khuẩn cũng như sự lớn lên của các vi khuẩn nên gen này được sử dụng để xác định sự hiện diện của *H. pylori*. Nghiên cứu của chúng tôi lựa chọn gen *UreC* vì những ưu điểm sau:

+ Gen *UreC* có tính bảo thủ cao đặc thù cho mỗi chủng loại *H.pylori*. *UreC* chứa một vài vùng bảo thủ thích hợp là điểm gắn của phản ứng PCR [100].

+ Ưu thế khi sử dụng gen *UreC* để xác định *H. pylori* bằng mẫu sinh thiết dạ dày là có độ nhạy và đặc hiệu cao. Có nhiều cặp mồi (Primers) được thiết kế dùng để chẩn đoán *H. pylori* trong đó cặp mồi cho gen *UreC* được sử dụng phổ biến do khuếch đại *UreC* chỉ thu được ở vi khuẩn *H. pylori* mà không có ở vi khuẩn nào có urease dương tính khác [13]. Nhiều tác giả đã sử dụng phương pháp PCR xác định gen *UreC* từ mẫu sinh thiết dạ dày để chẩn đoán *H. pylori* cho thấy độ đặc hiệu phương pháp này có độ đặc hiệu 96% đến 100% [101],[13].

Không chỉ chẩn đoán nhiễm *H. pylori*, xác định các kiểu gen của *UreC* bằng phương pháp PCR- RFLP có thể sử dụng cho các nghiên cứu dịch tễ và lâm sàng để phân biệt các chủng *H. pylori*. Các kết quả giúp điều chỉnh phác đồ điều trị cho bệnh nhân khi xác định được nhiễm chủng vi khuẩn mới hay tái phát chủng vi khuẩn cũ. Ngoài ra, kiểu gen *UreC* còn đánh giá mối liên quan giữa sự tồn tại dai dẳng chủng vi khuẩn *H. pylori* trong quá trình theo dõi lâu dài và liệu pháp kháng sinh, xác định tần số đồng nhiễm, xác định đặc điểm cấu trúc cho từng chủng. Bằng phương pháp PCR-RFLP và PCR giải trình tự gen *UreC*, các nhà nghiên cứu phân biệt được các chủng dưới týp, cho thấy sự đa dạng

của các chủng *H. pylori*. Từ đặc điểm này, các hướng nghiên cứu mới có thể triển khai như lĩnh vực vaccine cho *H. pylori*, cơ chế kháng thuốc khác hoặc cơ chế tương tác của vi khuẩn với người nhiễm *H. pylori*.

### **1.3.3. Phương pháp PCR- RFLP (PCR- Đa hình chiều dài đoạn cắt giới hạn)**

Mặc dù có nhiều phương pháp phân tích bộ gen để phân biệt các chủng *H. pylori* nhưng PCR- RFLP là phương pháp dễ thực hiện và giá thành không quá cao.

- PCR là một kỹ thuật sinh học phân tử được sử dụng để khuếch đại một hoặc một vài bản sao của một đoạn DNA theo cấp lũy thừa, tạo ra hàng ngàn đến hàng triệu bản sao của một trình tự DNA nào đó. Kỹ thuật PCR là một phản ứng có 3 bước: biến tính, gắn mồi và kéo dài. Các bước được lặp lại 30 đến 40 chu kỳ. Trong quy trình phản ứng, nhiệt độ có vai trò quan trọng, kèm theo là yếu tố thời gian. Đối với vi khuẩn *H. pylori*, các nghiên cứu dùng phương pháp PCR để chẩn đoán *H. pylori* thường lựa chọn các gen 16S rRNA, *ureA*, 23S rRNA, *UreC* (*glmM*). Các gen này là gen bảo thủ ở hầu hết các chủng *H. pylori*, cung cấp dữ liệu chính xác để chẩn đoán vi khuẩn này.

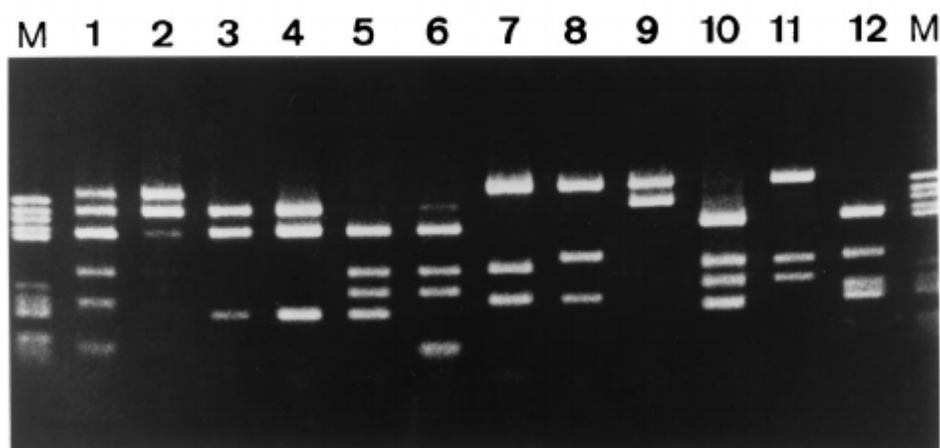
- Kỹ thuật RFLP

Kỹ thuật RFLP nghiên cứu tính đa hình chiều dài của các phân đoạn DNA dựa trên điểm cắt các enzyme giới hạn (Restriction Enzyme, RE). Khi ủ DNA với enzyme giới hạn trong dung dịch đệm thích hợp ở pH, nhiệt độ thích hợp sẽ tạo ra những phân đoạn DNA với kích thước khác nhau, từ đó lập nên các bản đồ gen.

Sản phẩm DNA được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR. Sau đó các sản phẩm này được cắt bằng các enzyme cắt giới hạn (restriction enzyme) rồi điện di trên thạch aragose, sau đó được nhuộm màu với ethidium bromide. Các sản phẩm cắt sẽ được đọc dưới đèn huỳnh quang.

Enzyme cắt giới hạn được chiết tách ra từ các loại vi khuẩn. Mỗi enzyme cắt giới hạn sẽ nhận biết những vị trí cắt trên một đoạn DNA và cắt tại những vị trí đặc hiệu của nó, và do đó sẽ cắt đoạn DNA thành một số đoạn có chiều

dài nhất định. Các chủng khác nhau hoặc có đột biến xảy ra như thay thế 1 nucleotide này thành 1 nucleotide khác, enzyme cắt giới hạn sẽ có thêm hoặc giảm số điểm cắt, do đó sẽ cắt đoạn DNA thành một số đoạn có chiều dài khác. Có nhiều enzyme cắt giới hạn có thể sử dụng để phân tích gen của vi khuẩn. Khi phân tích các đoạn nhỏ của gen *UreB* và *UreC* (820-1100 bp) và các gen *htrA*, *flaA* (1.1 kb và 1.5 kb) các nhà nghiên cứu đã xác nhận rằng cấu trúc bộ gen của *H. pylori* rất đa dạng khi sử dụng các enzyme giới hạn *HaeIII*, *Sau3A*, *HhaI*, *MboI*, *HindIII*, *AloI*, *PvuI* hoặc *MseI*. Khi trộn đoạn 933 bp của gen *UreB* với các enzyme giới hạn *HaeIII*, *Sau3A* thì có thể phân biệt được 17 chủng *H. pylori* [102].



**Hình 1.9. Kết quả PCR-RFLP của sản phẩm khuếch đại gen *UreC* từ 12 chủng vi khuẩn *H. pylori* [103]**

#### **1.3.4. Phương pháp giải trình tự gen**

Phương pháp chẩn đoán *H. pylori* chính xác nhất là giải trình tự gen. Tuy nhiên phương pháp này đòi hỏi máy móc hiện đại, giá thành cao.

- Phân tử DNA là một chuỗi xoắn kép của hai mạch đơn được cấu tạo từ 4 loại nucleotid khác nhau là A(Adenin), C(Cytosine), G(guanine) và T (Thymine). Các nucleotide này nối kết liên tiếp với nhau theo một thứ tự xác định. Giải trình tự gen là phát hiện thứ tự sắp xếp 4 loại nucleotid này trên phân tử DNA.

- Ứng dụng của giải trình tự gen:

+ Giải trình tự bộ gen người



- + Định danh vi khuẩn, nấm
- + Xác định genotype của các virus (HCV, HPV...)
- + Xác định các đột biến, đột biến kháng thuốc
- Các phương pháp giải trình tự gen:
  - + Phương pháp hóa học (Phương pháp Maxam-Gilbert):

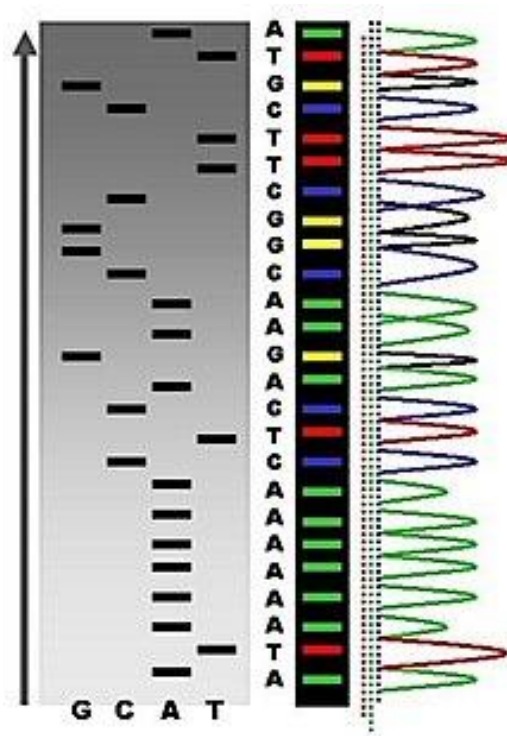
Phương pháp này dùng một số hóa chất nhất định có khả năng gây đứt khung đường- phosphate của AND tại những điểm có bazơ đặc thù. Kích thước của các đoạn này được xác định bằng điện di trên gel và sau đó trình tự được xác định theo nguyên tắc tạo các đoạn oligonucleotide có chiều dài hơn kém nhau 1 nucleotide. Nhược điểm phương pháp là dùng hóa chất độc hại, dùng chất phóng xạ (đánh dấu một đầu DNA bằng phospho đồng vị phóng xạ  $^{32}\text{P}$ ) [104].

- + Phương pháp enzyme sử dụng các dideoxynucleotide (Phương pháp Sanger)

Phương pháp Sanger được Frederick Sanger phát minh vào năm 1977 thực hiện dựa trên kỹ thuật “kết thúc chuỗi” bằng việc sử dụng các chất gây kết thúc mạch đặc trưng di-deoxynucleotide triphosphate (ddNTP). Di-deoxynucleotide thiếu nhóm hydroxyl ở đầu 3' của phân tử đường. Khi một ddNTP được thêm vào chuỗi, vì không có nhóm 3'-OH nên một nucleotide không được thêm vào, phản ứng tổng hợp sẽ dừng lại. Enzyme polymerase xúc tác phản ứng gắn các dNTP vào mạch đơn của DNA để kéo dài mạch ở vị trí 3'-OH và dừng lại nếu gắn các ddNTP vào chuỗi. Sau phản ứng tổng hợp, hình thành các đoạn DNA có độ dài khác nhau. Dựa vào sự sai khác về độ dài các đoạn DNA hiển thị trên bản gel polyacrylamide sau điện di để xác định trình tự trong gen [104],[105]. Kỹ thuật giải trình tự này hữu hiệu nhưng chậm. Theo thời gian, kỹ thuật Sanger được cải tiến bằng xác định trình tự bằng máy phân tích tự động. Kỹ thuật giải trình tự DNA tự động (Dye termination sequencing) sử dụng các ddNTP có đánh dấu huỳnh quang đã giúp cho việc sắp xếp trình tự DNA trở nên nhanh chóng và hiệu quả hơn. Mỗi loại ddNTP (ddA, ddC, ddG, ddT) được gắn một màu có bước sóng phát xạ

huỳnh quang khác nhau cho phép thực hiện giải trình tự trong một phản ứng duy nhất. Hệ thống máy có mao quản chứa gel polyacrylamide, các camera có chùm tia laser đi qua nó để ghi nhận tín hiệu huỳnh quang một cách chính xác. Màu của ánh sáng huỳnh quang phát ra từ mỗi loại oligonucleotide được xác định bằng một bộ tách sóng. Các số liệu phân tích được truyền qua máy tính được chương trình hóa chuyển đổi màu sắc thành các bazơ tương ứng: màu xanh lam chỉ thị cho C, xanh lá cây chỉ thị cho A, màu da cam chỉ thị cho G và đỏ chỉ thị cho T. Từ đó máy tính sẽ cho ra biểu đồ một dãy trật tự các băng màu huỳnh quang kèm theo trật tự các bazơ tương ứng [104].

Giải trình tự Sanger có thể thực hiện với các đoạn DNA tương đối dài (khoảng 900 cặp base). Phương pháp này thường được sử dụng để sắp xếp các DNA riêng lẻ, như plasmid vi khuẩn hoặc DNA được sao chép trong PCR. Tuy nhiên phương pháp này không giải trình tự được toàn bộ hệ gen, mất nhiều thời gian, chi phí cao.



**Hình 1.10 . So sánh thang điện di và các đỉnh sóng huỳnh quang**

(Nguồn Wikipedia- DNA sequencing)

+ Giải trình tự thế hệ mới (Next generation sequencing - NGS)

Giải trình tự gen thế hệ mới là các công nghệ giải trình tự gen dựa trên nguyên tắc của giải trình tự Sanger (thế hệ thứ nhất) do Frederick Sanger mô tả vào năm 1977. Sự phát triển của kỹ thuật giải trình tự mới như nhuộm huỳnh quang, điện di bằng các mao quản thay thế cho điện di trên thạch polyacrylamide, tự động hóa kỹ thuật đã tăng khả năng giải trình tự từ vài trăm cặp bazơ lên hàng nghìn cặp chỉ trong một lần phân tích. Thậm chí với công nghệ giải trình tự mới số cặp bazơ có thể lên tới trên 1 tera bazơ (bằng 1000 triệu bazơ) [106]. Các phương pháp giải trình tự thế hệ mới gồm:

- Pyrosyquencing
- Phương pháp Ion semiconductor
- Phương pháp của Illumina
- Giải trình tự gen tức thời đơn phân tử (Single Molecular Real-Time-SMRT).

Các phương pháp giải trình tự thế hệ mới có ưu điểm là rút ngắn thời gian thực hiện xét nghiệm và giảm giá thành rất nhiều so giải trình tự Sanger. Do đó, các nhà nghiên cứu có thể giải trình tự DNA với số lượng nhiều, nhanh và thu được lượng dữ liệu rất lớn phục vụ cho nhiều mục tiêu nghiên cứu và điều trị trong y học và sinh học cũng như các lĩnh vực liên quan.

### ***1.3.5. So sánh hai phương pháp PCR –RFLP và giải trình tự gen trong xác định chủng *H. pylori****

Hiện nay có nhiều kỹ thuật về sinh học phân tử để phân biệt các chủng *H. pylori* trong đó PCR- RFLP- phân tích tính đa hình đoạn gen giới hạn được sử dụng rộng rãi để phát hiện các chủng đã phân lập được hoặc trực tiếp từ mẫu bệnh phẩm. Với một số gen của *H. pylori*, mục tiêu của phương pháp là phân tích các gen cấu trúc urease và các protein liên quan [107]. Tuy nhiên phương pháp này có hạn chế chỉ phân biệt được sự thay đổi bazơ ở một đoạn giới hạn đặc trưng trong khi đó còn nhiều đoạn khác của gen có thể biến đổi.

Mặt khác, PCR- RFLP không đánh giá được sắp xếp các amino acid và không bộc lộ được sự thay đổi bazơ có ảnh hưởng đến các amino acid hay không.

PCR- giải trình tự trực tiếp có ưu thế hơn là xác định được không chỉ toàn bộ chiều dài của trình tự nucleotide mà còn cả trình tự amino acid, đưa ra sự khác biệt về kiểu gen giữa các chủng *H. pylori*. Tuy nhiên phương pháp giải trình tự cần máy hiện đại, chi phí cao hơn phương pháp PCR- RFLP và cần chuyên gia có kinh nghiệm trong lĩnh vực sinh học phân tử thực hiện kỹ thuật và phân tích kết quả.

### **1.3.6. Các nghiên cứu kiểu gen *H. pylori* bằng phương pháp PCR-RFLP và giải trình tự gen**

Có rất nhiều nghiên cứu về vi khuẩn *H. pylori* có sử dụng phương pháp PCR-RFLP đã đưa ra nhiều kết quả có ý nghĩa về dịch tễ và lâm sàng.

Với một vi khuẩn khó nuôi cấy như *H. pylori*, phương pháp PCR-RFLP đã được áp dụng trong chẩn đoán xác định và phân loại chủng *H. pylori*. Với phương pháp nuôi cấy, độ nhạy của phương pháp này không cao, đòi hỏi nhiều thời gian nhưng phương pháp PCR-RFLP đã khắc phục được điều này. Mặt khác phương pháp này còn có thể áp dụng cho nhiều loại mẫu bệnh phẩm ngoài mẫu lấy từ khuẩn lạc nuôi cấy còn có thể áp dụng cho các mẫu như mẫu sinh thiết, nước bọt, dịch... F.Navabakbar và CS đã tiến hành dùng phương pháp PCR và phân tích tính đa hình chiều dài của các phân đoạn DNA dựa trên điểm cắt các enzyme giới hạn (RFLP) trực tiếp từ mảnh sinh thiết từ dạ dày bệnh nhân nhiễm *H. pylori* với cặp mồi *UreC* cho phản ứng khuếch đại gen và các enzyme cắt *AluI*, *MboI* and *CfoI*. Kết quả này cho thấy PCR-RFLP được xem là phương pháp thuận tiện và hiệu quả phát hiện và định kiểu của *H. pylori* trực tiếp từ mẫu sinh thiết dạ dày mà không cần qua bước nuôi cấy [108]. G.Stone và CS tiến hành nghiên cứu để xác định hiệu quả điều trị của Clarithromycin kết hợp Lansoprazole tệt trừ *H. pylori* ở bệnh nhân loét tá tràng và chậm tiêu không loét đã khuếch đại gen *UreC* có độ dài 820bp để xác định kiểu gen của 83 chủng trước điều trị và 21 chủng sau điều trị. Khi dùng

các enzyme giới hạn *Sau 3A* hoặc *Hha*, các nhà nghiên cứu đã tìm ra được 40 týp có kiểu RFLP khác nhau. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy tính đa dạng về kiểu gen của *H. pylori* [109]. Một nghiên cứu đa trung tâm khác được thực hiện ở nhiều nước châu Âu, phương pháp PCR-RFLP với các enzyme cắt được sử dụng là *Sau3A* và *HhaI* xác định tính không đồng nhất của 100 chủng vi khuẩn *H. pylori* trước và sau điều trị [110].

Nhiều nghiên cứu tiến hành ở các nước châu Á sử dụng phương pháp PCR-RFLP để xác định tái nhiễm (reinfection) hay tái phát (recrudescence) đã đưa ra các kết quả khác nhau. Okimoto và CS tại Nhật Bản đã theo dõi các bệnh nhân sau tiết trừ *H. pylori* và phân biệt các chủng bằng phương pháp PCR-RFLP với enzyme cắt là *HhaI*, *MboI*, *Hind III* thấy 62,5% các chủng nhiễm lại tại thời điểm 6 tháng và 100% các chủng nhiễm lại thời điểm 1 năm khác với chủng bị nhiễm lần đầu trước điều trị [111]. Nghiên cứu tại Bangladesh công bố năm 2001 bằng phương pháp RAPD và PCR-RFLP các tác giả đã xác định tỷ lệ tái phát là 14% trong 3 tháng đầu sau tiết trừ *H. pylori* [112].

Tại Việt Nam, một nghiên cứu kết hợp với trường đại học Karolinska, Thụy Điển được công bố năm 2005 nghiên cứu về tỷ lệ tái xuất hiện *H. pylori* sau điều trị 1 năm cho thấy tỷ lệ này là 23,5%. Với phương pháp RAPD và PCR-RFLP nhằm phân biệt số bệnh nhân nhiễm chủng giống chủng trước điều trị và nhiễm chủng khác với chủng ban đầu thấy kết quả tương ứng 58,8% và 41,2% [113].

Do phương pháp PCR-RFLP có hạn chế chỉ phân biệt được sự thay đổi bazơ ở một đoạn giới hạn đặc trưng nên một số nghiên cứu kết hợp cả phương pháp giải trình tự gen để xác định chủng vi khuẩn *H. pylori*. Nghiên cứu tại Brazil của Silvia và CS dùng phương pháp PCR-RFLP phát hiện kiểu gen *UreC* của *H. pylori* từ mảnh sinh thiết dạ dày. Để khẳng định các trình tự được khuếch đại cho phản ứng PCR là các đoạn gen *UreC* của *H. pylori*, tác giả đã sử dụng phương pháp giải trình tự gen. Kết quả cho thấy tất cả các mẫu DNA của bệnh nhân đều là đoạn *UreC* của chủng *H. pylori* đã được mô tả trong ngân hàng gen (Gene bank) [114].

**Bảng 1.2 Kết quả dùng kỹ thuật sinh học phân tử xác định tỷ lệ tái phát và tái nhiễm *H. pylori* sau điều trị triệt trừ**

Tác giả/Năm/ Quốc gia	Tổng số bệnh nhân	Thời gian theo dõi (tháng)	Tổng số ca tái xuất hiện <i>H. pylori</i>	Số ca tái xuất hiện <i>H. pylori</i> sau 1 năm	Phương pháp xác định gen	Tỷ lệ % tái phát và tái nhiễm		
						Tổng	Trong vòng 12 tháng	Sau 12 tháng
VanderHuls và cs. 1997, Hà Lan	173	42 (12-110,4)	9	Không thông tin	RFLP +RAPD	6 và 2	5 và 0	1 và 2
Gisbert và cs. 2002, Tây Ban Nha	120	6-12	8	Không thông tin	RFLP	0 và 3	0 và 3	Không thông tin
Okimoto và cs. 2003 Nhật Bản	274	15,6 (6-72)	26	7	RFLP	3 và 15	3 và 5	0 và 10
Wheeldon và cs. 2005 Việt Nam	153	11(8-20)	36	Không thông tin	RFLP	10 và 7	Không thông tin	Không thông tin

## CHƯƠNG 2

### ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

303 bệnh nhân sau khi nội soi dạ dày được xác định loét tá tràng và có *H. pylori* dương tính được đăng ký vào nghiên cứu.

##### 2.1.1. Tiêu chuẩn chọn bệnh nhân nghiên cứu

Bệnh nhân  $\geq 16$  tuổi đến khám tại bệnh viện E từ 5/2012 đến 5/2015

- Chẩn đoán loét tá tràng khi có hình ảnh ổ loét từ 0,5 cm trở lên, có bờ rõ, có thể có hoặc không có giả mạc.

- Có nhiễm *H. pylori* với tiêu chuẩn chẩn đoán: hoặc nuôi cấy dương tính hoặc cả test urease và mô bệnh học dương tính.

- Bệnh nhân chưa điều trị diệt trừ *H. pylori* lần nào.

##### 2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ bệnh nhân nghiên cứu

- Bệnh nhân đang dùng kháng sinh hoặc ngừng thuốc chưa được một tháng tính đến thời điểm soi

- Đang dùng thuốc ức chế bơm proton hoặc bỏ thuốc này chưa được một tuần tính đến thời điểm soi

- Bệnh nhân có ung thư dạ dày

- Xuất huyết tiêu hoá nặng, có hẹp môn vị, bệnh nặng như suy thận nặng, xơ gan giai đoạn Child-pugh B hoặc C

- Đa ổ loét nhỏ cấp tính, nghi do dùng thuốc hoặc ngộ độc

##### 2.1.3. Nơi tiến hành nghiên cứu

Khoa Nội soi - Thăm dò chức năng Bệnh viện E, Khoa Nội tiêu hóa Bệnh viện E, Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam.

#### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

##### 2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu được thiết kế theo phương pháp mô tả cắt ngang, can thiệp có theo dõi dọc trong các giai đoạn.

### 2.2.2. Cỡ mẫu nghiên cứu

- Mục tiêu 1: Nghiên cứu mô tả cắt ngang, tiến cứu, có theo dõi dọc nên cỡ mẫu được tính theo công thức:

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

Trong đó: N = cỡ mẫu

$Z_{\alpha/2}$  = mức ý nghĩa mong muốn của sai lầm  $\alpha$

( $\alpha = 0,05$  và  $Z_{\alpha/2} = 1,96$  tra từ bảng Z)

$p = 0,30$        $\varepsilon = 0,18$        $n = 276$

Theo nghiên cứu của Wheeldon và CS tiến hành tại Việt Nam cho thấy tỷ lệ tái xuất hiện vi khuẩn *H. pylori* sau điều trị triệt trừ là 23,5% [113]. Do tỷ lệ kháng thuốc tăng theo thời gian ảnh hưởng tới kết quả điều trị triệt trừ nên chúng tôi ước tính tỷ lệ trong nghiên cứu là 30%.

Với cỡ mẫu tối thiểu cho nghiên cứu là 276 bệnh nhân loét tá tràng có *H. pylori* dương tính (cộng thêm 10% sai số khi bệnh nhân thay đổi ý kiến, làm tròn là 300 bn) sẽ cho các kết quả có độ tin cậy là 95% hay lực nghiệm là 0,95. Lực nghiệm 0,95 là lực nghiệm lớn, kết quả nghiên cứu được chấp nhận, kết luận của nghiên cứu là vững vàng.

- Mục tiêu 2: Chọn mẫu toàn bộ. Những bệnh nhân đã triệt trừ thành công *H. pylori* khi tái khám lần 2 xét nghiệm *H. pylori* âm tính, khi theo dõi định kỳ tái khám lần 3 xét nghiệm *H. pylori* dương tính trở lại (tái xuất hiện *H. pylori*) sẽ được chọn vào mẫu nghiên cứu.

- Chọn mẫu nghiên cứu

Số mẫu được chọn ở 3 lần khám ở các giai đoạn khác nhau:

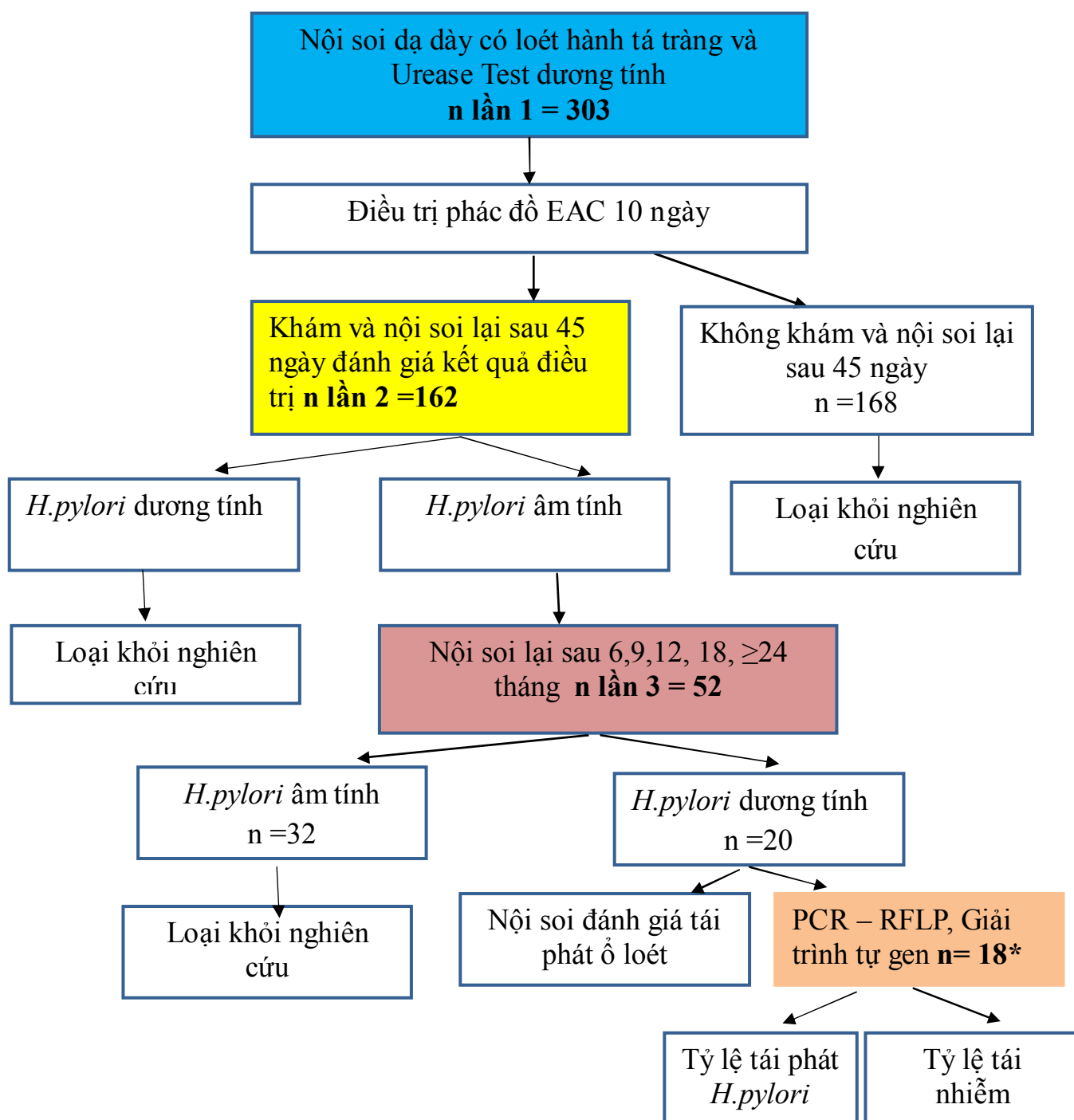
+ Lần 1: số bệnh nhân có loét hành tá tràng có *H. pylori* dương tính và được điều trị phác đồ EAC.

+ Lần 2: Số bệnh nhân sau điều trị phác đồ EAC đến tái khám để đánh giá hiệu quả điều trị



+ Lần 3: Số bệnh nhân đã tiết trừ *H. pylori* thành công quay lại tái khám ở các thời điểm 6,9,12, 18,  $\geq 24$  tháng. Trong số này những bệnh nhân tái xuất hiện *H. pylori* (*H. pylori* dương tính trở lại) sẽ làm xét nghiệm PCR – RFLP và giải trình tự gen để xác định tình trạng tái nhiễm và tái phát *H. pylori*.

Các mẫu lựa chọn được minh họa ở sơ đồ sau:



\* Có 20 mẫu HP dương tính nhưng chỉ có 18 mẫu thực hiện thành công kỹ thuật PCR – RFLP và giải trình tự gen

## **Sơ đồ 2.1. Sơ đồ chọn mẫu nghiên cứu**

### **2.2.3. Các bước tiến hành nghiên cứu**

#### 2.2.3.1. Khám lâm sàng và thu thập số liệu

- Thu thập số liệu lâm sàng, cận lâm sàng vào các thời điểm

+ Lần 1: bệnh nhân thăm khám lần đầu

+ Lần 2: bệnh nhân tái khám kiểm tra sau điều trị 45 ngày.

+ Lần 3: tái khám tại thời điểm

Trước hoặc bằng 1 năm (6,9,12 tháng)

Sau 1 năm (>12, 18 tháng, ≥24tháng)

- Khám lần 1: Các triệu chứng lâm sàng, do người nghiên cứu trực tiếp thực hiện hỏi bệnh, thăm khám và ghi chép vào hồ sơ bệnh án nghiên cứu theo mẫu. Bệnh nhân được nội soi đánh giá tổn thương loét hành tá tràng, làm xét nghiệm chẩn đoán nhiễm *H. pylori* bằng 3 phương pháp: nghiệm pháp Urease nhanh, mô bệnh học, nuôi cấy và làm kháng sinh đồ với Amoxicilin và Clathromycin. Bệnh nhân được sử dụng thuốc theo phác đồ EAC trong 10 ngày.

- Khám lần 2: Sau 45 ngày bệnh nhân đến khám lại để bệnh nhân được đánh giá sự thuyên giảm triệu chứng đau, tác dụng phụ. Bệnh nhân được soi lại dạ dày đánh giá liền ổ loét và làm xét nghiệm đánh giá tình trạng nhiễm *H. pylori* bao gồm nghiệm pháp Urease nhanh, mô bệnh học. Bệnh nhân có *H. pylori* âm tính sau điều trị được hẹn khám và soi kiểm tra lại lần 3 sau 6 tháng, 9 tháng, 12 tháng, 18 tháng, ≥24 tháng.

- Khám lần 3: Bệnh nhân được khám, và nội soi để đánh giá tái phát ổ loét và làm xét nghiệm đánh giá tình trạng nhiễm *H. pylori* bao gồm nghiệm pháp Urease nhanh, mô bệnh học (H&E).

Những bệnh nhân nhiễm *H. pylori* (HP+) sẽ được làm xét nghiệm

PCR - RFLP và giải trình tự gen cho chủng *H. pylori* từ mẫu sinh thiết

dạ dày đồng thời làm xét nghiệm PCR – RFLP và giải trình tự gen cho chủng *H. pylori* lấy từ mẫu sinh thiết trước điều trị để so sánh sự giống và khác nhau của chủng *H. pylori* nhiễm trước và sau điều trị. Từ đó xác định tình trạng tái phát hay tái nhiễm vi khuẩn *H. pylori*.

#### 2.2.3.2. Nội soi dạ dày tá tràng

- Nơi thực hiện kỹ thuật

Khoa Nội soi - Thăm dò chức năng Bệnh viện E. Người nghiên cứu tham gia trực tiếp thực hiện thủ thuật nội soi và sinh thiết.

- Quy trình kỹ thuật gồm các bước:

+ Chuẩn bị và kiểm tra máy

+ Chuẩn bị bệnh nhân

+ Thực hiện kỹ thuật nội soi

- Đánh giá ổ loét:

+ Số lượng: một hay nhiều ổ, hoặc ổ loét đối nhau.

+ Vị trí: Mặt trước hay mặt sau, mặt bên, nhiều vị trí

+ Kích thước

- Sinh thiết mẫu trên mỗi bệnh nhân lấy 6 mẫu sinh thiết (3 mẫu từ hang vị cách môn vị 2 cm và 3 mẫu từ thân vị) để chẩn đoán *H. pylori* bằng 3 phương pháp: nghiệm pháp urease, phương pháp mô bệnh học, và phương pháp nuôi cấy.

\* Xử lý bệnh phẩm:

+ Hai mẫu sinh thiết (một mẫu ở thân vị và một mẫu ở hang vị) làm ngay test Urease tại phòng nội soi.

+ Hai mẫu sinh thiết (một mẫu ở thân vị và một mẫu ở hang vị) cho vào lọ formalin 10% chuyển khoa Giải phẫu bệnh Bệnh viện E.

+ Hai mẫu sinh thiết (một mẫu ở thân vị và một mẫu ở hang vị) cho vào ống Eppendorf được làm lạnh đột ngột bằng nitơ lỏng (snap frozen) xuống

-196<sup>0</sup>C và được chuyển đến Viện Công nghệ Sinh học- Viện hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam để nuôi cấy. Mẫu nghiền để nuôi cấy và một phần được bảo quản -20<sup>0</sup>C để làm xét nghiệm PCR.

### 2.2.3.3. Nghiệm pháp urease nhanh

Nghiệm pháp urease nhanh được tiến hành bằng cách sử dụng Bộ Kit UREASE TEST chẩn đoán nhanh vi khuẩn *Helicobacter pylori* sản xuất tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

- Nguyên lý: urease của *H. pylori* thủy phân urê thành NH<sub>3</sub> làm thay đổi pH, gây ra chuyển màu thuốc thử.

- Đặc điểm kỹ thuật: Độ nhạy 97,4%; độ đặc hiệu 95,2% với giới hạn phát hiện 10<sup>5</sup>- 10<sup>6</sup> vi khuẩn/ml.

- Tiến hành: cho mẫu sinh thiết vào thuốc thử đựng trong ống Eppendorf, đậy nắp. Đọc kết quả từ sau 5 phút, 15 phút, 30 phút. Nếu màu thuốc thử chuyển từ màu vàng sang màu hồng cánh sen là kết quả xét nghiệm dương tính.



**Hình 2.1. Hình ảnh kết quả Urease test**

**a. Âm tính    b. Dương tính**

(Nguồn: Ảnh chụp tại Khoa TDCN-Nội soi Bệnh viện E)

### 2.2.3.4. Xét nghiệm mô bệnh học

- Xét nghiệm mô bệnh học (nhuộm H&E) thực hiện theo quy trình của Khoa Giải phẫu bệnh Bệnh viện E

- Kết quả nhuộm được đọc trên kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 1000 lần.

### 2.2.3.5. Nuôi cấy và làm kháng sinh đồ

- Vận chuyển, bảo quản bệnh phẩm

Các mẫu sinh thiết được làm lạnh đột ngột bằng nitơ lỏng (snap frozen) xuống  $-196^{\circ}\text{C}$ . Nuôi cấy vi khuẩn và làm kháng sinh đồ được thực hiện ở Viện công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm khoa học Việt nam. Vận chuyển bệnh phẩm từ bệnh viện E đến Viện Công nghệ sinh học bằng bình chứa nitơ lỏng.

- Nuôi cấy theo “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành Vi sinh Y học” do Bộ Y tế ban hành năm 2013 [115].

#### Môi trường nuôi cấy

39,5g Campylobacter base

5-7% máu ngựa

Nystatin: 1  $\mu\text{g/ml}$

Trimethoprim: 5  $\mu\text{g/ml}$

Vancomycin: 10  $\mu\text{g/ml}$  và một số kháng sinh khác

#### Cách tiến hành

+ Nghiền mẫu sinh thiết: Mảnh sinh thiết được nghiền nhỏ bằng máy nghiền bệnh phẩm chuyên dụng. Nhỏ 0,5 ml canh thang tim – não vào cối, ngoáy đều tạo thành huyền dịch thuần nhất.

+ Ria cấy: huyền dịch được láng đều trên mặt đĩa thạch bằng que cấy thủy tinh chuyên dụng

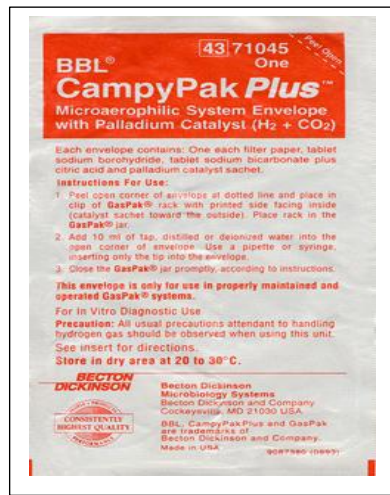
+ Đặt các đĩa thạch với tư thế lộn ngược vào bình cấy vi hiếu khí.

+ Đặt một ống có chứa 10ml nước vào bình cấy để tạo độ ẩm cần thiết vào bình cấy kỵ khí

+ Điều kiện môi trường: Nuôi cấy *H. pylori* ở điều kiện vi hiếu khí sử dụng túi tạo khí CO<sub>2</sub> Campy Pak (Becton Dickinson, USA). Đổ 10ml nước vào túi tạo khí Campy Pak khi thấy sỏi bột, đặt nhanh vào bình cấy, đậy chặt nắp bình và đặt vào tủ ấm  $37^{\circ}\text{C}$  và đọc kết quả sau 2 đến 5 ngày.



a

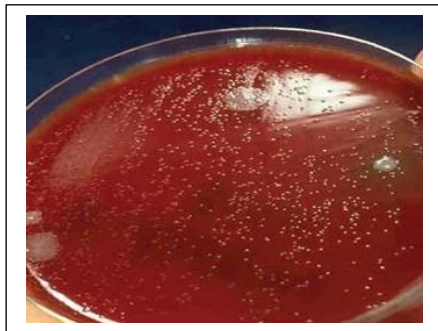


b

**Hình 2.2. Các vật liệu dùng để nuôi cấy *H. pylori***

a. Bình cấy vi hiếu khí

b. Túi tạo khí



**Hình 2.3. Hình ảnh khuẩn lạc *H. pylori***

Bệnh nhân Nguyễn Thị Th. 32 tuổi

#### 2.2.3.6. Kỹ thuật PCR-RFLP gen *UreC* của *H. pylori* [116]

- Đánh số cho 18 cặp mẫu bệnh phẩm trước và sau điều trị của bệnh nhân làm PCR-RFLP và PCR giải trình tự gen: thứ tự từ 1 đến 18. A là mẫu trước điều trị, B là mẫu sau điều trị.

- Tách chiết DNA từ mẫu mô sinh thiết niêm mạc dạ dày

Hai mẫu sinh thiết vùng hang vị và thân vị được nghiền và làm thuần

nhất bằng dung dịch đệm STE và trộn 100 µg/ml của proteinase K (Sigma Chemical Co.) trong 1.0% sodium dodecyl sulfate ủ ở 56<sup>0</sup>C. Dung dịch được làm tinh sạch bằng phenol-chloroform, rửa ethanol và ngưng tụ trong 50 µl nước cất, sau đó sử dụng môi PCR. Sản phẩm DNA được tiến hành điện di trên gel thạch agarose 1,2%. Chất lượng DNA được đánh giá qua quan sát điện di đồ dưới ánh sáng tia cực tím và chụp ảnh nhờ thiết bị có gắn máy ảnh.

- Xác định nhiễm *H. pylori* bằng kỹ thuật PCR

+ PCR lần 1: Khuếch đại đoạn gen *UreC* từ DNA tách chiết được bằng cặp môi:

*UreC* - F: 5'- TGG GAC TGA TGG CGT GAG GG- 3'

*UreC* - R: 5'- AAG GGC GTT TTT AGA TTT TT- 3'

o Các thành phần tham gia phản ứng PCR:

Platinum Green Master Mix: 10 µl

Primer *UreC* - F: 0,25 µM

Primer *UreC* - R: 0,25 u µM

H<sub>2</sub>O: 6 µl

DNA: 1, µl

o Chu trình nhiệt

Biến tính: 95<sup>0</sup>C trong 3 phút

35 chu kỳ mỗi chu kỳ gồm: Giai đoạn biến tính 95<sup>0</sup>C trong 20 giây, giai đoạn gắn môi 55<sup>0</sup>C trong 20 giây, giai đoạn kéo dài môi 72<sup>0</sup>C trong 45 giây.

Chu kỳ cuối cùng là 72<sup>0</sup>C trong 8 phút để đảm bảo tất cả các phân tử được tổng hợp hoàn thành.

o Sản phẩm PCR được điện di ở 100V trong 60 phút trên gel agarose 2%. Các băng có kích thước phân tử khoảng 820 bp cắt băng để tinh sạch gel.

+ PCR lần 2: Khuếch đại đoạn gen *UreC* để thu được sản phẩm duy nhất

Sản phẩm tinh sạch gel được sử dụng làm khuôn DNA cho phản ứng PCR tiếp theo. Thành phần phản ứng, thiết bị và chu trình nhiệt tương tự phản ứng PCR khuếch đại *UreC* lần 1.

Bước cuối cùng: chụp lại ảnh.

- Phân tích PCR- RFLP

+ DNA sử dụng là sản phẩm PCR lần 2

+ Thành phần phản ứng cắt

Buffer 10X:	3 µl
Enzyme (20000U/ml)	1 µl
H <sub>2</sub> O:	18,5 µl
DNA:	7,5 µl
Tổng thể tích	30 µl

Sản phẩm PCR lần 2 cắt bằng enzyme *Hha* I và *Hind* III được ủ ở 37°C trong 1 giờ; *Mbo* I được ủ ở 37°C trong 3 giờ. Sản phẩm sau ủ được điện di ở 100V, 50 phút trên gel agarose 1,5%, soi dưới ánh sáng tia cực tím và chụp ảnh kết quả.

2.2.3.7. Giải trình tự gen *UreC* của chủng vi khuẩn *H. pylori* nhiễm trước và sau điều trị tiệt trừ

- Điện di sản phẩm PCR trên gel agarose

Chuẩn bị gel Agarose 1% + bổ sung GRGreen 1%

Chuẩn bị Loading Dye: bổ sung 1 µl GRGreen trong 50 µl Loading Dye

Đun nóng chảy gel Agarose (2-3 phút), để nguội đến 55 - 60°C, đổ bản gel điện di.

Sau khoảng 20 phút, bản gel điện di đã đông đặc, tiến hành điện di

Thành phần 1 giếng điện di như sau:

4 µl sản phẩm PCR2 (hoặc thang chỉ thị DNA)

6 µl H<sub>2</sub>O



2  $\mu$ l Loading Dye

Trộn đều và tra lần lượt mẫu vào các giếng, điện di với dòng điện 125 V trong 45 phút

Quan sát kết quả điện di trên máy soi tia cực tím, chụp ảnh và đánh giá chất lượng sản phẩm trước khi giải và đọc trình tự.

- Phản ứng Bigdye v3.1

Thành phần:

Bigdye:0.5 $\mu$ l

Primer:0.4 $\mu$ l

Buffer:0.8 $\mu$ l

H<sub>2</sub>O:7  $\mu$ l

BD-64X: 2  $\mu$ l

DNA khuôn (sản phẩm PCR2): 1.0 $\mu$ l

Chu trình nhiệt:

96<sup>0</sup>C trong 3 phút, (96<sup>0</sup>C trong 10 giây, 50<sup>0</sup>C trong 5 giây, 60<sup>0</sup>C trong 2 phút) x 30 chu kỳ, 4<sup>0</sup>C.

Tinh sạch sản phẩm Bigdye và giải trình tự

Tinh sạch sản phẩm Bigdye: BigDye® Sequencing Clean Up Kit.

Quy trình tinh sạch bằng máy tinh sạch tự động KingFisher.

+ Thêm 12  $\mu$ l BigDye® Sequencing Clean Up Kit và 48  $\mu$ l cồn 80<sup>0</sup> vào ống sản phẩm

+ Trộn đều bằng máy và để 3 phút nhiệt độ phòng đưa vào Plate vị trí A.

+ Plate ở vị trí C, D cho 100  $\mu$ l cồn 70 độ vào giếng đủ với số mẫu.

+ Plate ở vị trí E cho 40  $\mu$ l dung dịch EB 1X

Chạy máy KingFisher bằng phần Bigdye Clean Up

#### **2.2.4. Các chỉ tiêu nghiên cứu**

##### **2.2.4.1. Đặc điểm lâm sàng**

○ **Tuổi và Nhóm tuổi:** Tuổi bệnh nhân tính bằng năm và được tính đến năm tiến hành nghiên cứu.

○ **Giới:** Được chia thành 2 nhóm nam và nữ.

○ **Triệu chứng cơ năng và thực thể:** đau thượng vị, đau lúc đói, ợ chua, nôn, buồn nôn, đầy hơi, triệu chứng khác

#### 2.2.4.2. Đặc điểm nội soi

- **Kích thước ổ loét:** 0,5cm đến 1cm; 1cm đến 1,5cm; trên 1,5 cm
- **Vị trí ổ loét:** Mặt trước, mặt sau, mặt bên, nhiều vị trí
- **Số lượng ổ loét:** 1, 2 hoặc 3 ổ
- **Ổ loét liền sẹo:**

Tình trạng ổ loét được đánh giá theo tiêu chuẩn của Malano E.L và Tamada F. năm 1992 gồm các mức độ như sau [117]:

- Ổ loét liền sẹo (S): ổ loét có đáy đầy, phẳng, mặt không còn viêm (liền sẹo tốt), hoặc ổ loét liền sẹo nhưng còn viêm (liền sẹo chưa tốt).

- Ổ loét đang liền sẹo (H): ổ loét thu nhỏ so với trước.

- Ổ loét hoạt động (A): ổ loét như cũ, bờ phù nề, đáy giả mạc

#### 2.2.4.3. Chỉ số urease, mô bệnh học, nuôi cấy, kháng sinh đồ

○ **Urease test:** Dương tính, âm tính

○ **Mức độ nhiễm *H. pylori*** [118]: Xác định *H.pylori* trên kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 1000 lần. Đếm số lượng vi khuẩn trên 5 vi trường nhiều *H.pylori* nhất, chia lấy số lượng trung bình.

- Mức độ nhẹ, *H. pylori* (+): chỉ phát hiện thấy *H. pylori* trên một vài vi trường, có dưới 25 vi khuẩn trên một vi trường.

- Mức độ vừa, *H. pylori* (++) : mức độ vi khuẩn nằm ở mức trung gian giữa mức độ nặng và nhẹ; có từ 25-50 vi khuẩn trên một vi trường.

- Mức độ nặng, *H. pylori* (+++) : khi hầu hết các vi trường đều phát hiện thấy *H. pylori*, có trên 50 vi khuẩn trên một vi trường.

- Không nhiễm, *H. pylori* (-) : khi không thấy vi khuẩn trên tất cả các vi trường.

○ **Nuôi cấy vi khuẩn *H. pylori*:**

Vi khuẩn mọc hoặc không mọc.

Vi khuẩn nuôi cấy mọc được nhận định khuẩn lạc. Khuẩn lạc *H. pylori*

có dạng hạt đầu kim (khoảng 1 mm) tròn, nhẵn, màu xám, trong suốt, nằm thành từng đám. *H. pylori* được nhận biết bằng hình dạng cong hoặc xoắn, gram âm, cho các phản ứng urease, oxidase và catalase dương tính.

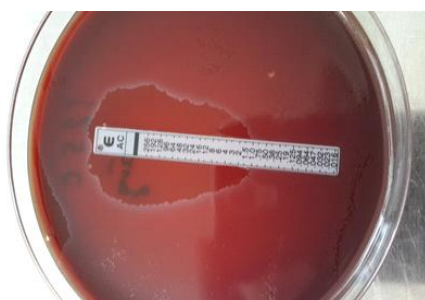
Khuẩn lạc được tách DNA và làm PCR với cặp mồi của gen 23S rRNA là gen đặc hiệu cho *H.pylori* [119]. Sau đó sản phẩm PCR được đọc trình tự gen và đối chiếu với ngân hàng gen (genBank) để khẳng định chắc chắn là *H.pylori*. Khuẩn lạc nhân nuôi trên đĩa sau đó lưu giữ trong glycerol 70% bảo quản ở  $-80^{\circ}\text{C}$  để làm chủng chứng dương cho các lần nuôi cấy sau.

○ **Đánh giá độ nhạy cảm với kháng sinh (kháng sinh đồ):**

Kháng sinh đồ đối với Amoxicillin và Clarithromycin được xác định bằng E-test của hãng BioMérieux sản xuất. E-test là một giải plastic mỏng, trong, dày khoảng 60 mm và rộng 5 mm, trên đó đã được phủ nồng độ kháng sinh pha loãng liên tục (continuous antibiotic concentration gradient) và nồng độ này tương đương với 15 lần pha loãng so với phương pháp pha loãng thông thường, do đó cho kết quả chính xác hơn phương pháp pha loãng thông thường (discontinuous serial dilution) với nồng độ pha loãng không liên tục. Nồng độ cao nhất ở đầu trên và nồng độ thấp nhất ở đầu dưới của thanh E-test. Khi làm kháng sinh đồ, đặt thanh Etest vào đĩa thạch có vi khuẩn, đặt vào môi trường thích hợp một thời gian, vi khuẩn sẽ mọc lên và xuất hiện vùng ức chế hình elip đối xứng qua thanh Etest. Tại điểm cắt của hình elip với thanh E-test, chúng ta xác định được giá trị MIC [120].

Xác định tính nhạy cảm của *H. pylori* với Amoxicillin và Clarithromycin [121]:

Amoxicillin	S: Nhạy cảm (Susceptible) $\leq 1 \mu\text{g/ml}$
	R: Đề kháng (Resistant) $> 1 \mu\text{g/ml}$
Clarithromycin	S: Nhạy cảm (Susceptible) $\leq 1 \mu\text{g/ml}$
	R: Đề kháng (Resistant) $> 1 \mu\text{g/ml}$



**Hình 2.4. Đĩa kháng sinh đồ với Amoxicillin và Clarithromycin sử dụng E-test**

Bệnh nhân Bùi Thanh H. 37 tuổi

Sau điều trị có 4 khả năng có thể xảy ra:

Liên sẹo ổ loét, hết tổn thương viêm và *H. pylori* (-)

Không liên sẹo ổ loét, còn tổn thương viêm và *H. pylori* (-)

Liên sẹo ổ loét, hết tổn thương viêm và *H. pylori* (+)

Không liên sẹo ổ loét, còn tổn thương viêm và *H. pylori* (+)

2.2.4.4. Đánh giá hiệu quả điều trị tiệt trừ *H. pylori*

○ **Tiệt trừ *H. pylori* thành công** (xét nghiệm *H. pylori* âm tính sau điều trị) khi sau điều trị cả hai xét nghiệm Urease test và Mô bệnh học (H&E) đều âm tính

○ **Tiệt trừ *H. pylori* thất bại** (xét nghiệm *H. pylori* dương tính sau điều trị) khi sau điều trị là một trong hai trường hợp sau:

- Xét nghiệm Urease test hoặc Mô bệnh học (H&E) dương tính

- Cả hai xét nghiệm Urease test và Mô bệnh học (H&E) đều dương tính

2.2.4.5. Đánh giá tác dụng phụ của thuốc trong phác đồ

○ **Tỷ lệ bệnh nhân có và không có tác dụng phụ của thuốc**

○ **Tỷ lệ các tác dụng phụ của thuốc xuất hiện trong quá trình điều trị.**

Các triệu chứng có thể gặp do tác dụng phụ của thuốc bao gồm:

- Đắng miệng, buồn nôn

- Đau đầu, mất ngủ

- Nổi mề đay

- Tiêu chảy

2.2.4.6. Đánh giá tái phát và tái nhiễm *H. pylori*

○ Xác định chủng *H. pylori* bằng PCR với cặp môi gen UreC 820bp

○ Kiểm chứng chủng *H. pylori* bằng PCR giải trình tự gen UreC

○ Đánh giá kiểu gen dựa trên RFLP (RFLP pattern)

Khi khuếch đại đoạn DNA 820bp của gen *UreC* từ mảnh sinh thiết và cắt bằng các enzyme giới hạn *Hha* I, *Mbo* I, *Hind* III sẽ thu được các đoạn DNA kích thước khác nhau. Điện di trên thạch Agarose, các đoạn DNA kích thước khác nhau sẽ lên các băng khác nhau trên bảng điện di. Các băng này được so sánh với kích thước của băng DNA chuẩn sẽ đưa ra hình ảnh của mỗi chủng *H.pylori*. Vì thế, có thể phân biệt các chủng *H.pylori* bằng hình ảnh kết hợp giữa các băng sản phẩm khuếch đại các đoạn DNA trên bảng điện di sau dùng các enzyme cắt giới hạn. Đây chính là kiểu gen dựa vào RFLP hay kiểu RFLP cho chủng *H.pylori*

So sánh chủng trước và sau điều trị tiệt trừ bằng phương pháp PCR-RFLP

- Tái phát khi so sánh kiểu RFLP trước và sau điều trị giống nhau
- Tái nhiễm so sánh kiểu RFLP trước và sau điều trị khác nhau

Đánh giá kết quả so sánh chủng nhiễm trước và sau điều trị tiệt trừ bằng sự tương đồng (tỷ lệ phần trăm) của trình tự gen *UreC* chủng nhiễm trước và sau điều trị.

### **2.2.5. Phương tiện nghiên cứu**

#### 2.2.5.1. Nội soi đường tiêu hóa trên

- Hệ thống máy nội soi ống mềm Olympus CV180 sản xuất tại Nhật Bản
- Kim sinh thiết Olympus dùng 1 lần

#### 2.2.5.2. Xét nghiệm

- Nghiệm pháp urease nhanh được tiến hành bằng cách sử dụng Bộ Kit UREASE test chẩn đoán nhanh vi khuẩn *Helicobacter pylori* sản xuất tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương. Sản phẩm được đăng ký tại Cục sở hữu trí tuệ - Bộ Khoa học và công nghệ số VN-0204680.

- Xét nghiệm mô bệnh học (H&E) thực hiện theo quy trình của Khoa Giải phẫu bệnh Bệnh viện E. Kết quả nhuộm được đọc trên kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 1000 lần.

#### 2.2.5.3. Nuôi cấy vi khuẩn và kháng sinh đồ

- Bình chứa nitơ lỏng để bảo quản và vận chuyển bệnh phẩm

- Môi trường nuôi cấy được thực hiện ở môi trường nhân tạo trên thạch máu 5%. Túi khí CO<sub>2</sub> Campy Pak (Becton Dickinson, USA), bình cấy, tủ ấm 37<sup>0</sup>C.

- Thanh E- test Amoxicilin và Clarithromycin của hãng BioMerieux

2.2.5.4. Kỹ thuật PCR-RFLP và giải trình tự gen *UreC* của *H. pylori*

- Kỹ thuật PCR-RFLP

+ Máy PCR – Proflex™ 96- WELL PCR SYSTEM

(AppliedBiosystems/Life Technologies)



**Hình 2.5. Máy PCR**

+Bộ điện di nằm ngang Takara Mupid®-exu



**Hình 2.6. Bộ điện di**

+ Hóa chất sử dụng cho phản ứng khuếch đại gen *UreC* từ DNA ban đầu là Platinum Green Hot Start PCR Master Mix của hãng Thermo Fisher Scientific.

+ Mồi sử dụng: Mồi xuôi, Mồi ngược (hãng Integrated DNA Technologies- IDT tổng hợp)

*UreC* - F: 5'- TGG GAC TGA TGG CGT GAG GG- 3'

*UreC* - R: 5'- AAG GGC GTT TTT AGA TTT TT- 3'

+ Ba loại enzyme sử dụng để thực hiện phản ứng cắt là *Hha* I, *Hind* III và *Mbo*I của hãng New England BioLab- NEB

- Kỹ thuật giải trình tự gen

+ Máy giải trình tự gen 3130xl (Applied Biosystems)



**Hình 2.7. Máy giải trình tự**

+ Máy soi gel, máy ảnh

+ Bộ Kit Bigdye, bộ Kit tinh sạch Bigdye

+ Agarose, GRGreen, Loading Dye, H<sub>2</sub>O, Marker, sản phẩm PCR2

2.2.5.5. Phác đồ điều trị (EAC) dùng trong nghiên cứu

Sử dụng phác đồ 3 kết hợp có chứa ức chế bơm proton và 2 kháng sinh trong vòng 10 ngày với liều như sau:

E: Esomeprazole 20 mg, 1 viên x 2 lần / ngày

A: Amoxicillin 500 mg, 2 viên x 2 lần / ngày

C: Clarithromycin 500 mg, 1 viên x 2 lần / ngày

Các thuốc được sử dụng:

Esomeprazole 20mg (Nexium) của hãng Astra-Zeneca-Thụy Điển VN-11680-11

Clarithromycin 500mg (Claritek) của Getz pharma – Pakistan VN-5562-08

Amoxicillin 500mg (Hagimox) của CT dược Hậu Giang - Việt nam VD-3752-07

### **2.2.6. Xử lý số liệu**

2.2.6.1. Phân tích thống kê sử dụng máy tính với phần mềm thống kê SPSS 16.0.

- Biến định lượng: giá trị trung bình, độ lệch chuẩn, giá trị nhỏ nhất, giá

trị lớn nhất.

- Biến định tính: Tần suất và tỷ lệ phần trăm
- Kiểm định với biến định tính sử dụng test so sánh test  $\chi^2$ , các so sánh có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ . (Sử dụng test Fisher-exact có hiệu chỉnh khi hệ số mong đợi nhỏ hơn 5).
- Các yếu tố liên quan được đánh giá thông qua sử dụng phân tích hồi quy logistics đơn biến và tính tỷ suất chênh OR với khoảng tin cậy 95% (95% CI). Mức ý nghĩa thống kê  $p < 0,05$  được sử dụng để đánh giá mối liên có ý nghĩa trong thống kê phân tích.
- Tỷ lệ tái xuất hiện *H. pylori*/năm được tính bằng tỷ lệ phần trăm số người xét nghiệm tái dương tính trong một năm và được sử dụng thuật toán Kaplan-Meier để phân tích.

2.2.6.2. Đánh giá kết quả PCR-RFLP: So sánh hình ảnh các băng điện di DNA của chủng *H. pylori* nhiễm trước điều trị và sau điều trị tiệt trừ với thang DNA chuẩn để đánh giá giống và khác nhau giữa các chủng *H. pylori*.

#### 2.2.6.3. Kết quả giải trình tự DNA

Sản phẩm PCR được giải trình tự trên máy tự động 3130xl (Applied Biosystems). Chuỗi nucleotide được xử lý bằng chương trình Chromas Lite v2.1.6 (<https://technelysium.com.au/wp/chromas/>).

#### 2.2.6.4. Phân tích kết quả tương đồng của trình tự gen

- Trình tự nucleotide của các chủng *H. pylori* được sử dụng để truy cập Ngân hàng gen BLAST – Basic Local Alignment Search Tool so sánh với các chuỗi của các chủng tham chiếu đã được xác định chính xác loài. (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

- So sánh sự tương đồng giữa hai trình tự gen *UreC* của chủng nhiễm trước và sau điều trị.

BLAST tìm kiếm sự tương đồng cục bộ giữa các trình tự. Chương trình so sánh các trình tự nucleotid hoặc protein với cơ sở dữ liệu và tính toán ra mức độ trùng khớp có ý nghĩa về mặt thống kê. Trong kết quả so sánh của BLAST có 100 chủng *H. pylori* liệt kê với trình tự nghiên cứu theo thứ tự



giảm dần về mặt tương đồng. Nghiên cứu này liệt kê 3 chủng có độ tương đồng cao nhất.

- So sánh đôi chiều nucleotide, xử lý số liệu các chuỗi để xác định mức độ tương đồng của chủng *H. pylori* nhiễm và sau điều trị bằng chương trình BLAST. Các chỉ số được sử dụng để đánh giá sự tương đồng gồm

+ Điểm cao nhất (Max score): Là điểm cao nhất khi BLAST trình tự truy vấn với cơ sở dữ liệu ứng với đoạn tương đồng nhất ( dài nhất) giữa hai trình tự.

+ Tổng điểm (Total score): Là tổng điểm BLAST sinh ra từ những đoạn tương đồng giữa hai trình tự. Nếu tổng điểm bằng điểm cao nhất thì chỉ có một đoạn tương đồng giữa hai trình tự. Nếu tổng điểm cao hơn điểm cao nhất là có nhiều đoạn tương đồng giữa hai trình tự.

+ Tỷ lệ bao phủ (Query cover): là tỷ lệ bao phủ tính qua độ dài của trình tự đưa vào so với trình tự tương đồng tìm thấy trong các trình tự tìm thấy trong cơ sở dữ liệu. Nếu dài bằng nhau là độ bao phủ 100%

+ Giá trị E (E value): Là mức độ giống nhau ngẫu nhiên của các đoạn tương đồng giữa hai trình tự. Giá trị E càng nhỏ, tính ngẫu nhiên càng thấp

+ Độ tương đồng (Identity ): là mức độ tương đồng giữa hai trình tự

### **2.2.7. Khống chế sai số**

- Xây dựng qui trình nghiên cứu, mẫu bệnh án nghiên cứu chi tiết.

- Nội soi và sinh thiết lấy mẫu bệnh phẩm tuân thủ đúng qui trình loại bỏ các mẫu không đạt yêu cầu.

- Các bác sĩ và kỹ thuật viên tham gia nghiên cứu được tập huấn kỹ và thống nhất qui trình nghiên cứu.

- Các xét nghiệm mô bệnh học, PCR, giải trình từ gen được thực hiện trên hệ thống máy móc qui chuẩn của Bệnh viện E và Viện Công nghệ sinh học -Viện Hàn lâm khoa học và công nghệ Việt nam.

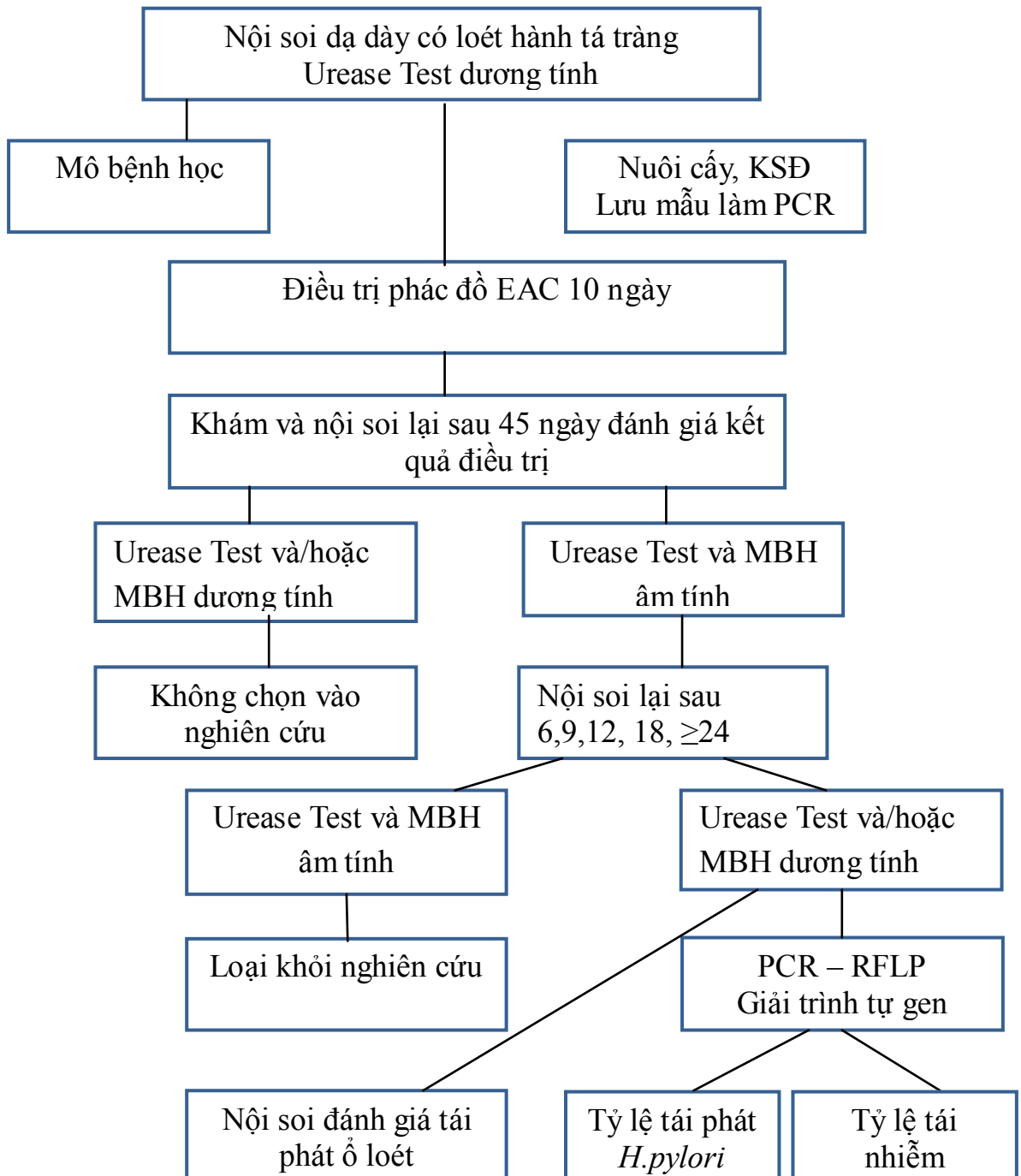
- Bảo quản và vận chuyển bệnh phẩm đúng qui trình, loại bỏ bệnh phẩm kém chất lượng.

- Chỉ đưa vào phân tích các trường hợp có đủ điều kiện nghiên cứu đề ra.

### **2.3. Đạo đức nghiên cứu**

- Nghiên cứu thực hiện theo đề cương nghiên cứu đã được hội đồng chấm đề cương thông qua. Nghiên cứu được sự cho phép của Ban giám đốc, Hội đồng khoa học, Hội đồng đạo đức của Bệnh viện E Trung ương.
- Chỉ tiến hành nghiên cứu với những bệnh nhân đồng ý tham gia
- Tuyệt đối tôn trọng quyền tự quyết của bệnh nhân: bệnh nhân có quyền rút ra khỏi nghiên cứu nếu không muốn tiếp tục tham gia nghiên cứu.
- Đảm bảo giữ bí mật riêng tư cho bệnh nhân.
- Nghiên cứu này không gây bất cứ tác hại nào cho người tham gia nghiên cứu.

#### 2.4. Sơ đồ nghiên cứu



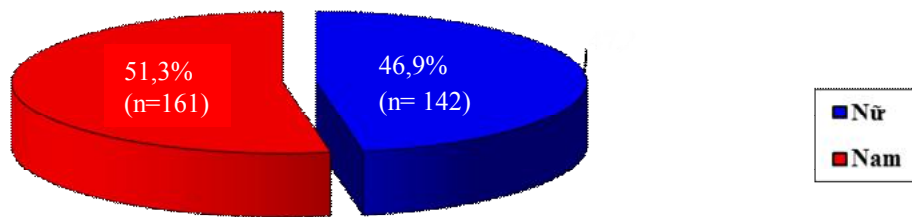
*Hình 2.8. Sơ đồ nghiên cứu*

## CHƯƠNG 3

### KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

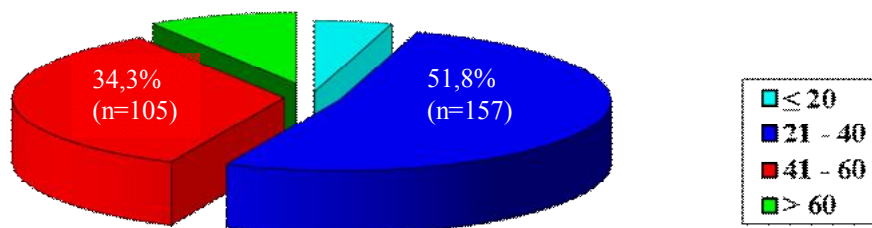
#### 3.1. Kết quả điều trị loét hành tá tràng có *Helicobacter pylori* dương tính bằng phác đồ EAC

##### 3.1.1. Đặc điểm chung của mẫu nghiên cứu



*Biểu đồ 3.1. Phân bố bệnh nhân theo giới*

**Nhận xét:** Mẫu nghiên cứu có 142 bệnh nhân nữ chiếm tỷ lệ 46,9% và 161 bệnh nhân nam chiếm tỷ lệ 51,3%. Tỷ lệ nam/nữ là 1,13/1.



**Biểu đồ 3.2. Phân bố bệnh nhân theo nhóm tuổi**

**Nhận xét:**

- Tuổi thấp nhất là 16, cao nhất là 78
- Tuổi trung bình:  $40,9 \pm 14$  năm
- Nhóm tuổi gặp nhiều nhất từ trên 21 đến 40 tuổi chiếm 51,8%

**3.1.2. Triệu chứng lâm sàng và đặc điểm nội soi trước điều trị**

**Bảng 3.1. Triệu chứng lâm sàng (n=303)**

Triệu chứng	Số lượng BN	Tỷ lệ%
Đau thượng vị	257	84,8
Đau lúc đói	177	58,4
Ợ chua	194	64,0
Nôn, buồn nôn	35	11,6
Đầy hơi	81	26,7
Triệu chứng khác	16	5,3

**Nhận xét:** Triệu chứng đau bụng vùng thượng vị gặp ở đa số các bệnh nhân trong nghiên cứu, chiếm tỷ lệ 84,8%. Các triệu chứng ợ chua, đau lúc đói chiếm tỷ lệ lần lượt là 64,0% và 58,4%.

**Bảng 3.2. Phân bố kích thước ổ loét của bệnh nhân loét tá tràng (n=303)**

Kích thước ổ loét (cm)	Số lượng	Tỷ lệ%
0,5 - < 1	181	59,7
1-1,5	117	38,6
>1,5	5	1,7

Tổng số	303	100
---------	-----	-----

**Nhận xét:** Kích thước ổ loét 0,5- 1cm gặp nhiều nhất, chiếm 59,7%.  
Kích thước ổ loét > 1,5cm gặp ít nhất, chiếm 1,7 %.

**Bảng 3.3. Phân bố vị trí các ổ loét ở bệnh nhân loét tá tràng (n=303)**

Đặc điểm	Vị trí ổ loét				Tổng
	Mặt trước	Mặt sau	Mặt bên	Nhiều vị trí	
Số lượng (n)	213	17	10	63	303
Tỷ lệ (%)	70,3	5,6	3,3	20,8	100

**Nhận xét:** Ổ loét ở mặt trước chiếm đa số với tỷ lệ 70,3%.

### 3.1.3. Đặc điểm mức độ nhiễm *H. pylori* trên mô bệnh học

**Bảng 3.4. Mức độ nhiễm *H. pylori* (n=303)**

Mức độ nhiễm	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Nhẹ	262	86,5
Vừa/ nặng	41	13,5
Tổng số	303	100

**Nhận xét:** Số bệnh nhân nhiễm *H. pylori* mức độ nhẹ chiếm đa số (86,5%)

### 3.1.4. Tỷ lệ kháng kháng sinh Clarithromycin và Amoxycillin của *H. pylori*

**Bảng 3.5. Tỷ lệ nuôi cấy vi khuẩn *H. pylori* thành công (n=303)**

	<b>Mọc</b>	<b>Không mọc</b>	<b>Tổng</b>
Số lượng (n)	175	128	303
Tỷ lệ (%)	<b>57,8</b>	42,2	100

**Nhận xét:** Tỷ lệ nuôi cấy vi khuẩn *H. pylori* thành công là 57,8% (175/303) là một tỷ lệ không cao.

**Bảng 3.6. Tỷ lệ *H. pylori* kháng Clarithromycin trước điều trị (n=175)**

<b>KSD</b>	<b>Kháng sinh đồ của Clarithromycin</b>		
	<b>Đề kháng</b>	<b>Nhạy cảm</b>	<b>Tổng</b>
Số lượng (n)	71	104	175
Tỷ lệ (%)	<b>40,6</b>	59,4	100

**Nhận xét:** Tỷ lệ kháng Clarithromycin *H. pylori* trước điều trị là 40,6% là một tỷ lệ khá cao (71/175)

**Bảng 3.7. Tỷ lệ *H. pylori* kháng Amoxicillin trước điều trị (n=175)**

<b>KSD</b>	<b>Kháng sinh đồ của Amoxicillin</b>		
	<b>Đề kháng</b>	<b>Nhạy cảm</b>	<b>Tổng</b>
Số lượng (n)	43	132	175
Tỷ lệ	<b>24,6</b>	75,4	100

**Nhận xét:** Tỷ lệ kháng Amoxicillin trước điều trị là 24,6% (43/175)

### **3.1.5. Kết quả điều trị của phác đồ EAC**

Trong 303 bệnh nhân được chọn vào nghiên cứu theo thiết kế có 162 bệnh nhân thực hiện đầy đủ yêu cầu của nghiên cứu và có kết quả kiểm tra nội

soi lại sau 45 ngày điều trị (nội soi lần thứ hai, đánh giá kết quả liền sẹo loét và kết quả tiệt trừ *H. pylori*), do đó nghiên cứu chỉ đánh giá hiệu quả điều trị ở 162 bệnh nhân.

**Bảng 3.8. Tỷ lệ bệnh nhân tái khám lần đầu sau điều trị tiệt trừ *H. pylori* (n=303)**

Bệnh nhân	Số lượng	Tỷ lệ
Tái khám	162	53,5
Không tái khám	141	46,5
Tổng số	303	100

**Nhận xét:** Số bệnh nhân đến khám lại sau điều trị chỉ còn hơn một nửa số bệnh nhân tham gia nghiên cứu (53,5%)

**Bảng 3.9. Tỷ lệ giảm triệu chứng đau thượng vị (n=162)**

Kết quả triệu chứng đau	Số lượng (n)	Tỷ lệ (%)
Hết đau	131	80,9
Giảm đau	27	16,6
Không đổi	4	2,5
Tổng	162	100

**Nhận xét:** Số bệnh nhân khám lại có giảm triệu chứng đau thượng vị sau điều trị đạt tỷ lệ cao (80,9%)

**Bảng 3.10. Tỷ lệ tiệt trừ *H. pylori* thành công (n=162)**

Kết quả điều trị	Thành công (HP -)	Thất bại (HP +)	Tổng
Số lượng	110	52	162
Tỷ lệ%	<b>67,9</b>	32,1	100



**Nhận xét:** Tỷ lệ tiết trừ *H. pylori* thành công (*H. pylori* âm tính sau điều trị) là 67,9% là một tỷ lệ không cao.

**Bảng 3.11. Tỷ lệ liền sẹo ổ loét (n=162)**

Kết quả liền sẹo	Liền sẹo	Không liền sẹo	Tổng
Số lượng	124	38	162
Tỷ lệ%	<b>76,5</b>	23,5	100

**Nhận xét:** Tỷ lệ liền sẹo ổ loét là 76,5% là tỷ lệ tương đối cao

**Bảng 3.12. Mối liên quan giữa tiết trừ *H. pylori* thành công và liền sẹo ổ loét (n=162)**

Kết quả liền sẹo		Liền sẹo	Không liền sẹo	OR (95%CI)	p
Thành công	n	97	13	6,91 (2,91-16,62)	<0,01
	%	88,2	11,8		
Thất bại	n	27	25		
	%	51,9	48,1		
Tổng		124	38		

**Nhận xét:** Nhóm tiết trừ thành công *H. pylori* có tỷ lệ liền sẹo cao hơn nhóm không tiết trừ được *H. pylori* (88,2% so với 51,9%). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,01$ ).

**Bảng 3.13. Tỷ lệ liên sọ theo mức độ nhiễm *H. pylori* (n=162)**

Kết quả liên sọ		Liên sọ	Không liên sọ	OR (95%CI)	p
Nhẹ	n	106	16	8,10 (3,32-19,80)	<0,01
	%	86,9	13,1		
Vừa/nặng	n	18	22		
	%	43,6	56,4		
Tổng		124	38		

**Nhận xét:** Bệnh nhân nhiễm *H. pylori* mức độ nhẹ có tỷ lệ liên sọ 86,9% khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0.01$ ) so với tỷ lệ bệnh nhân nhiễm *H. pylori* mức độ vừa và nặng.

**Bảng 3.14. Tỷ lệ điều trị tiệt trừ *H. pylori* thành công theo mức độ nhiễm (n=162)**

Kết quả liên sọ		Thành công	Thất bại	OR (95%CI)	p
Nhẹ	n	105	17	43,24 (13,79-155,50)	<0,01
	%	86,1	13,9		
Vừa/nặng	n	5	35		
	%	10,3	89,7		
Tổng		110	52		

**Nhận xét:** Bệnh nhân nhiễm *H. pylori* mức độ nhẹ có tỷ lệ tiệt trừ thành công *H. pylori* 86,1% khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0.01$ ) so với tỷ lệ bệnh

nhân nhiễm *H. pylori* mức độ vừa và nặng.

### 3.1.6. Đánh giá tác dụng không mong muốn của phác đồ điều trị

**Bảng 3.15. Tỷ lệ tác dụng không mong muốn của phác đồ điều trị (n=162)**

Tác dụng không mong muốn	Số lượng (n)	Tỷ lệ (%)
<b>Không có</b>	<b>133</b>	<b>82,1</b>
<b>Có</b>	<b>29</b>	<b>17,9</b>
Đắng miệng, buồn nôn	20	12,3
Đau đầu, mất ngủ	3	1,9
Nổi mề đay	1	0,6
Tiêu chảy	5	3,1
<b>Tổng</b>	<b>162</b>	<b>100</b>

**Nhận xét:** Tỷ lệ tác dụng không mong muốn gặp 17,9%. Nhóm triệu chứng chính là đắng miệng, buồn nôn(12,3%) và tiêu chảy (3,1%). Các tác dụng không mong muốn khác tỷ lệ rất thấp.

### 3.1.7. Ảnh hưởng của kháng Clarithromycin và Amoxicillin tới hiệu quả điều trị của phác đồ EAC

Trong số 162 bệnh nhân tái khám và làm nội soi lần 2 để đánh giá kết quả điều trị, chỉ có 141 bệnh nhân trước điều trị đã nuôi cấy và làm kháng sinh đồ thành công với Clarithromycin và Amoxicillin. Do đó nghiên cứu này chỉ đánh giá được ảnh hưởng của kháng Clarithromycin và Amoxicillin tới hiệu quả điều trị của phác đồ EAC ở 141 bệnh nhân.

**Bảng 3.16. Ảnh hưởng của kháng Clarithromycin đến hiệu quả diệt trừ *H. pylori* (n=141)**

Tiệt trừ <i>H. pylori</i>		Thành công	Thất bại	OR (95%CI)	p
Kết quả KSD					
Nhạy cảm	n	74	15	7,89 (3,37-18,78)	<0,01
	%	83,1	16,9		
Đề kháng	n	20	32		
	%	38,5	61,5		
Tổng		94	47		

**Nhận xét:** Khi có kháng với Clarithromycin, tỷ lệ diệt trừ *H. pylori* chỉ đạt 38,5%, trong khi đó khi nhạy với Clarithromycin tỷ lệ diệt trừ *H. pylori* có thể đạt tới 83,1%, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$ .

**Bảng 3.17. Ảnh hưởng của kháng Amoxicillin đến hiệu quả diệt trừ *H. pylori* (n=141)**

Tiệt trừ <i>H. pylori</i>		Thành công	Thất bại	OR (95%CI)	p
Kết quả KSD					
Nhạy cảm	n	78	36	1,49 (0,56-3,82)	0,36
	%	68,4	31,6		
Đề kháng	n	16	11		
	%	59,3	40,7		
Tổng		94	47		

**Nhận xét:** Khi có kháng với Amoxicillin, tỷ lệ diệt trừ *H. pylori* chỉ đạt 59,3% và khi nhạy với Amoxicillin tỷ lệ diệt trừ *H. pylori* 68,4%. Sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$ .

**Bảng 3.18. Ảnh hưởng của kháng Clarithromycin đến tỷ lệ liền sẹo (n=141)**

Kết quả liền sẹo Kết quả KSD		Liên sẹo	Không liền sẹo	OR (95%CI)	p
Nhạy cảm	n	79	10	6,27 (2,48 – 16,42)	< 0,01
	%	88,8	11,2		
Đề kháng	n	29	23		
	%	55,8	44,2		
Tổng		108	33		

**Nhận xét:** Nhóm bệnh nhân nhạy cảm với Clarithromycin có tỷ lệ liền sẹo cao hơn nhóm bệnh nhân kháng Clarithromycin tương ứng 88,8% so với 55,8%, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$ .

**Bảng 3.19. Ảnh hưởng của kháng Amoxicillin đến tỷ lệ liền sẹo**

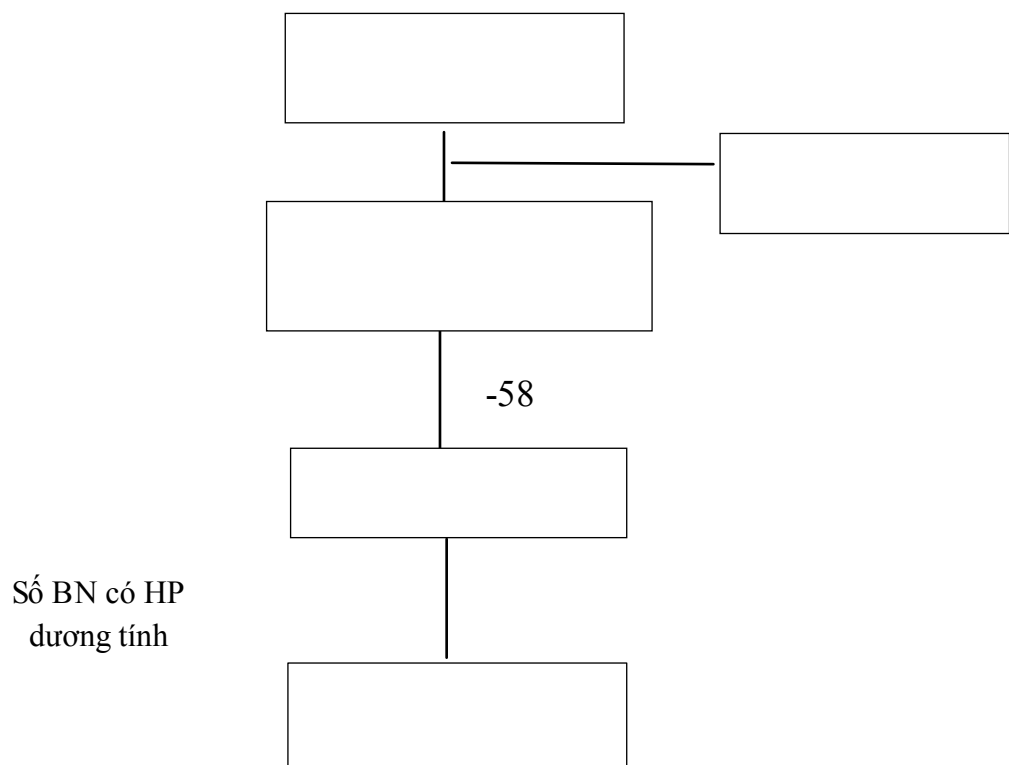
Kết quả liền sẹo Kết quả KSD		Liên sẹo	Không liền sẹo	OR (95%CI)	p
Nhạy cảm	n	88	26	1,18 (0,38-3,33)	0,73
	%	81,5	78,8		
Đề kháng	n	20	7		
	%	18,5	21,2		
Tổng		108	33		

**Nhận xét:** Nhóm bệnh nhân nhạy cảm với Amoxicillin có tỷ lệ liền sẹo khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với nhóm đề kháng với Amoxicillin với  $p > 0,05$ .

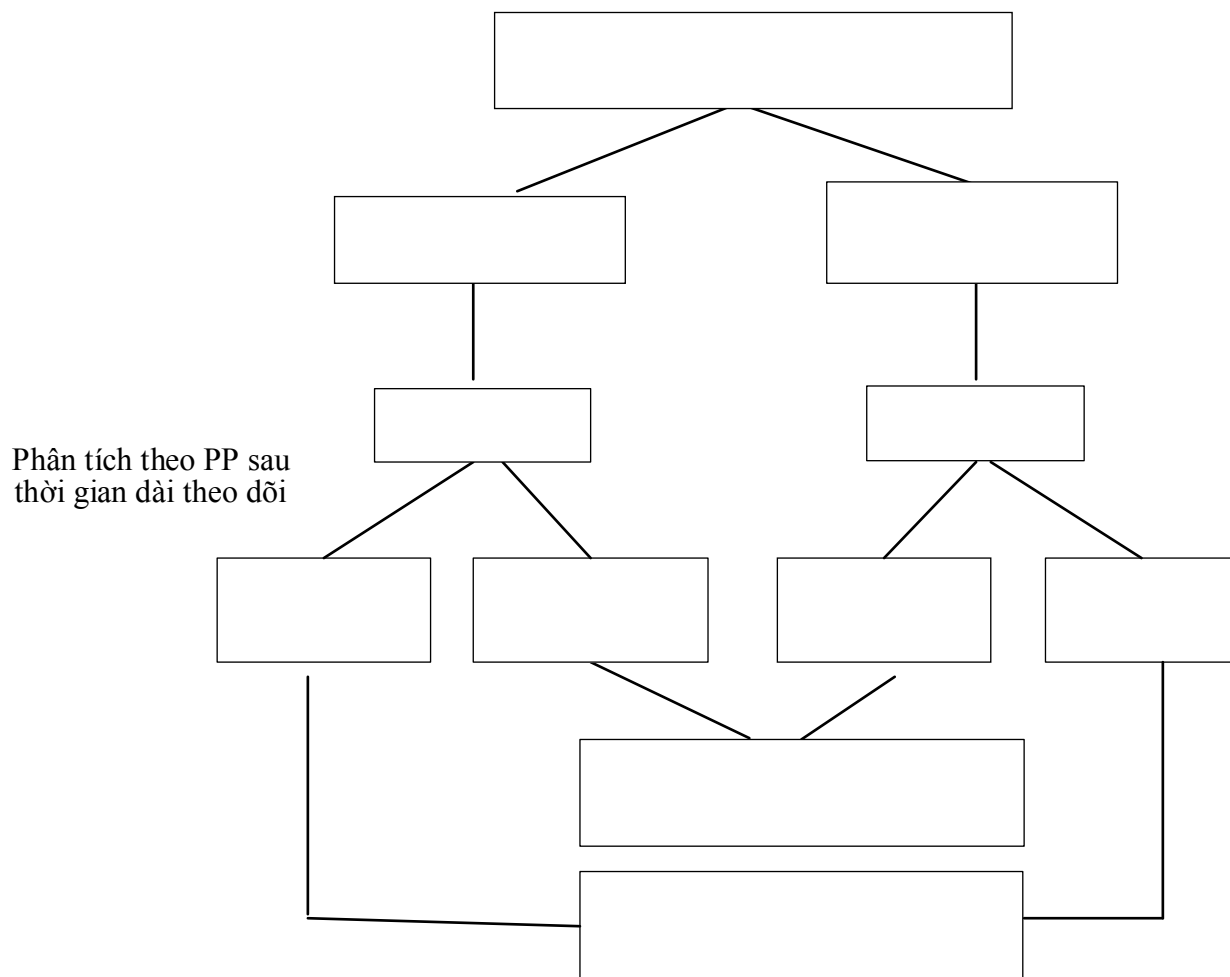
### 3.2. Tình trạng tái phát và tái nhiễm *H. pylori* sau điều trị

Sau điều trị bằng phác đồ EAC, 162 bệnh nhân đến tái khám lần khám thứ 2 đánh giá được tình trạng tiệt trừ *H. pylori*. Trong số đó có 110 bệnh nhân tiệt trừ thành công (xét nghiệm *H. pylori* âm tính). Trong số 110 bệnh nhân này chỉ có 52 bệnh nhân đến khám và nội soi tại các thời điểm từ 6 tháng đến 12 tháng hoặc trên 12 tháng để đánh giá tình trạng tái phát, tái nhiễm *H. pylori* và tái phát ổ loét.

#### 3.2.1. Sơ đồ về tình trạng tái xuất hiện *H. pylori* và tái phát ổ loét sau điều trị tiệt trừ *H. pylori*



Sơ đồ 3.1. Tái xuất hiện *H. pylori* sau điều trị tiệt trừ



*Sơ đồ 3.2. Tái phát ổ loét sau điều trị tiết trờ*

**3.2.2. Đặc điểm tái phát và tái nhiễm *H. pylori* sau điều trị triệt trừ của nhóm nghiên cứu**

**Bảng 3.20. Tỷ lệ bệnh nhân tái khám sau triệt trừ *H. pylori* thành công (n=52)**

Thời gian (năm)	Số lượng (n)	Tỷ lệ %
≤ 1 năm	35	67,3
> 1 năm	17	32,7
Tổng	<b>52</b>	100

**Nhận xét:** số bệnh nhân quay lại tái khám trong vòng 1 năm nhiều hơn sau 1 năm, chiếm tỷ lệ 67,3% (35 bệnh nhân). Số bệnh nhân đến tái khám sau 1 năm là 32,7% (17 bệnh nhân). Số lượng bệnh nhân đến khám lại giảm dần theo thời gian.

**Bảng 3.21. Tỷ lệ tái xuất hiện *H. pylori* sau điều trị triệt trừ thành công (n=52)**

Bệnh nhân Tình trạng HP	Số lượng (n)	Tỷ lệ %
Âm tính	32	61,5
Dương tính	<b>20</b>	<b>38,5</b>
Tổng	52	100

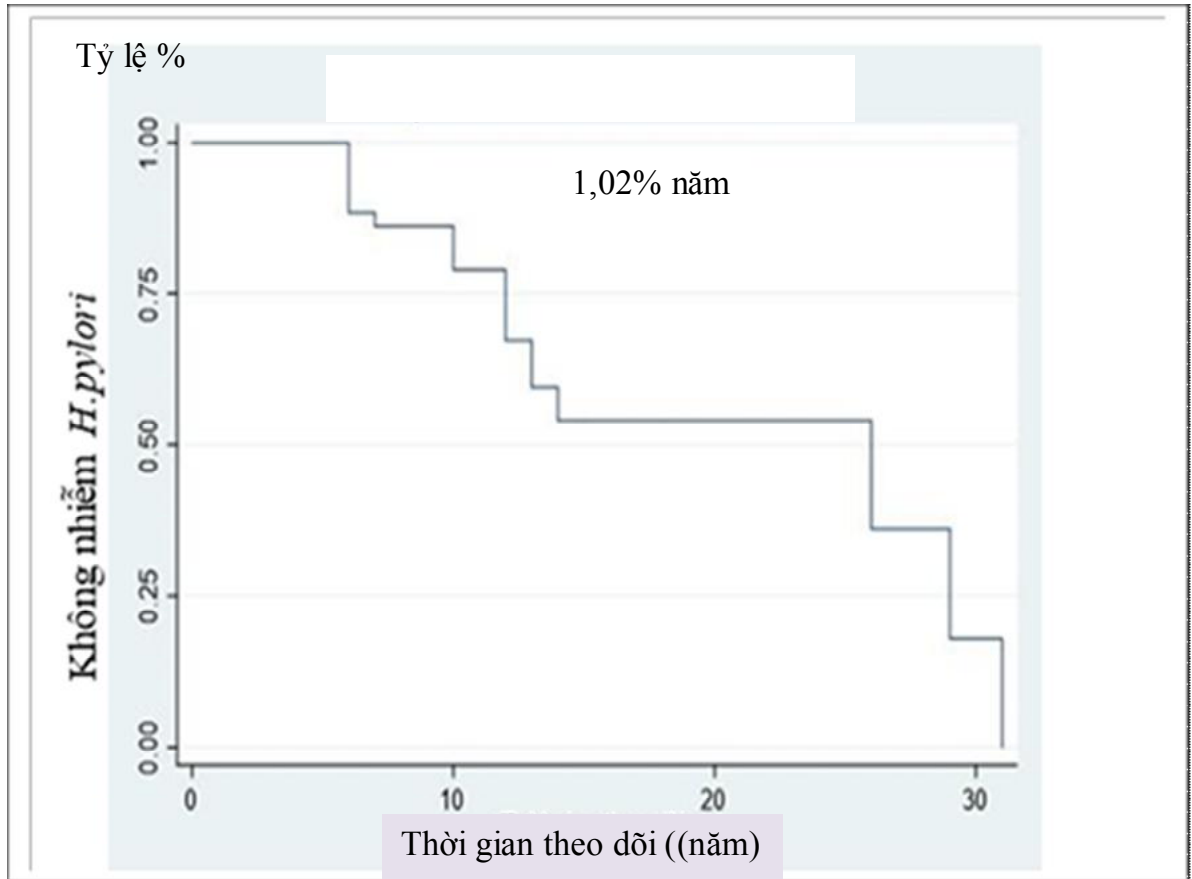
**Nhận xét:** Tỷ lệ bệnh nhân tái xuất hiện *H. pylori* sau triệt trừ khá cao (38,5%)



**Bảng 3.22. Tỷ lệ bệnh nhân tái xuất hiện *H. pylori* và thời gian theo dõi (n=52)**

Tình trạng HP		Thời gian theo dõi	Dương tính	Âm tính	OR (95%CI)	p
≤ 1 năm	n		14	21	1,22 (0,32-5,00)	0,74
	%		<b>40,0</b>	<i>60</i>		
>1 năm	n		6	11		
	%		<b>35,3</b>	<i>64,7</i>		
Tổng			20	32		

**Nhận xét:** Tỷ lệ bệnh nhân tái xuất hiện *H. pylori* trong thời gian theo dõi từ 6 tháng đến 1 năm là 40% không khác biệt với tỷ lệ này của thời gian theo dõi trên 1 năm (35,3%) với  $p > 0,05$ .



**Biểu đồ 3.3. Phân tích Kaplan-Meier của tỷ lệ bệnh nhân tái xuất hiện *H. pylori* sau tiệt trừ thành công**

**Nhận xét:** Thời gian theo dõi sau bệnh nhân sau điều trị tiệt trừ *H. pylori* thành công dài nhất là 31 tháng. Tỷ lệ tái xuất hiện *H. pylori* là 1,02%/năm

**Bảng 3.23. Tỷ lệ loét tái phát và tình trạng *H. pylori* sau quá trình theo dõi (n=52)**

Tình trạng loét		Loét	Không loét	OR (95%CI)	p
Nhiễm HP					
Dương tính	n	13	7	27,85 (4,39-282,60)	<0,01
	%	65	35		
Âm tính	n	2	30		
	%	6,3	93,7		
Tổng		15	37		

**Nhận xét:** Có mối liên quan giữa tình trạng tái xuất hiện *H. pylori* sau điều trị tiết trừ và tình trạng tái phát loét. Bệnh nhân có *H. pylori* dương tính sau điều trị tiết trừ có nguy cơ tái phát loét cao gấp 27,85 lần (95%CI: 4,39-282,60) so với bệnh nhân có *H. pylori* âm tính sau điều trị tiết trừ, p<0,01.

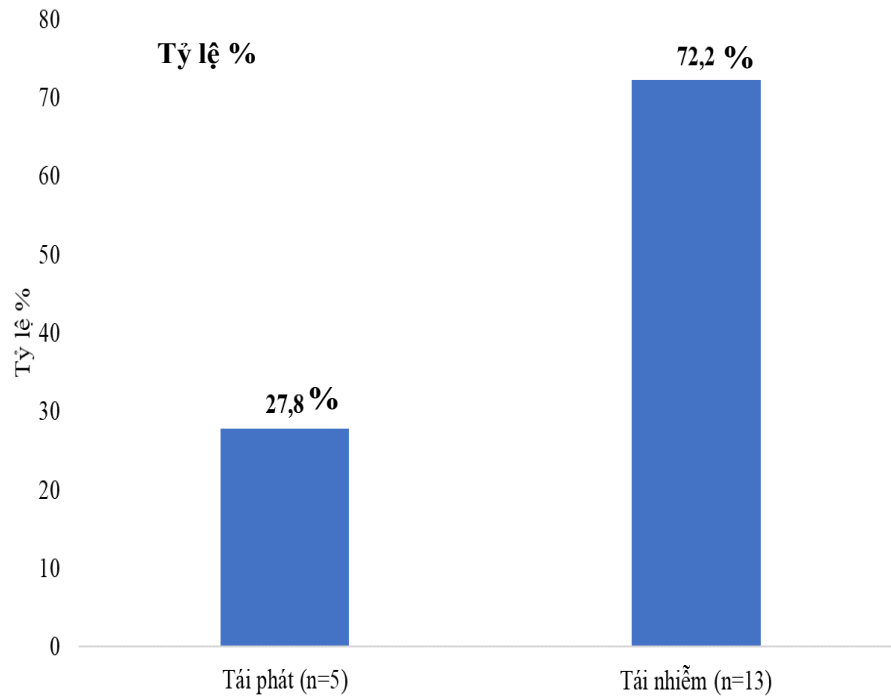
### 3.2.3. Kết quả sinh PCR-RFLP và giải trình tự gen *UreC* của các chủng *H. pylori* nhiễm trước và sau điều trị tiết trừ

Trong số 20 bệnh nhân có *H. pylori* dương tính trở lại sau điều trị tiết trừ chỉ có 18 bệnh nhân phân tích được kết quả xét nghiệm sinh học phân tử gồm PCR-RFLP và giải trình tự gen để xác định chính xác chủng *H. pylori* và phân biệt chủng *H. pylori* nhiễm trước và sau điều trị tiết trừ.

**Bảng 3.24. Tỷ lệ tái phát và tái nhiễm sau tiết trừ *H. pylori* (n=18)**

Tình trạng nhiễm <i>H. pylori</i>	Tái phát	Tái nhiễm	Tổng
n	5	13	18
Tỷ lệ%	27,8	72,2	100

*Nhận xét:* Tỷ lệ bệnh nhân tái nhiễm cao hơn tỷ lệ tái phát *H. pylori* sau điều trị triệt trừ thành công.



**Biểu đồ 3.4.** Tỷ lệ tái phát và tái nhiễm *H. pylori* sau điều trị triệt trừ

**Bảng 3. 25.** Tỷ lệ tái phát, tái nhiễm *H. pylori* và thời gian theo dõi

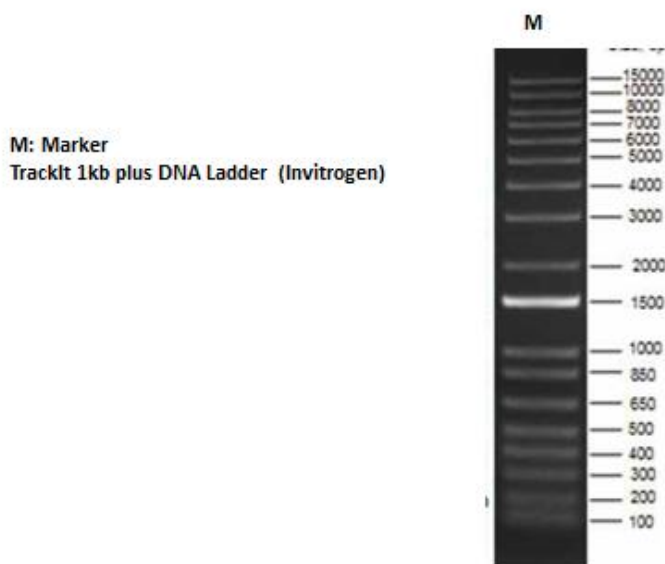
Tình trạng nhiễm HP		Tái phát	Tái nhiễm	Tổng	p
≤ 1 năm	n	3	9	12	>0.01
	%	25	75	100	
>1 năm	n	2	4	6	
	%	33,3	66,7	100	
Tổng	n	5	13	18	
	%	27,8	72,2	100	

**Nhận xét:** Tỷ lệ bệnh nhân tái phát ở thời điểm trước 1 năm và sau một năm không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

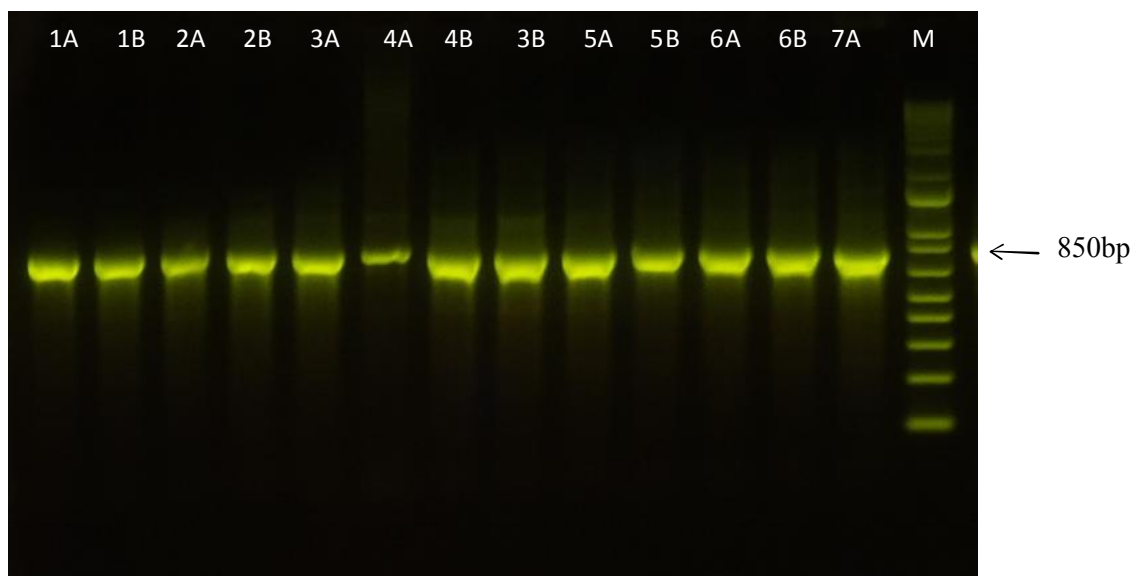
**Bảng 3.26. Tỷ lệ tái phát ổ loét và tái phát, tái nhiễm *H. pylori***

Tình trạng loét		Loét	Không loét	Tổng	p
Nhiễm <i>H. pylori</i>					
Tái phát	n	1	4	5	P>0,01
	%	20	80	100	
Tái nhiễm	n	2	11	13	
	%	15,4	84,6	100	
Tổng	n	3	15	18	
	%	16,7	83,3	100	

**Nhận xét:** Tình trạng tái phát ổ loét ở bệnh nhân tái phát hay tái nhiễm *H. pylori* không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p>0,01$



**Hình 3.1. Thang DNA chuẩn dùng trong phân tích sản phẩm của PCR từ bệnh phẩm sinh thiết dạ dày**

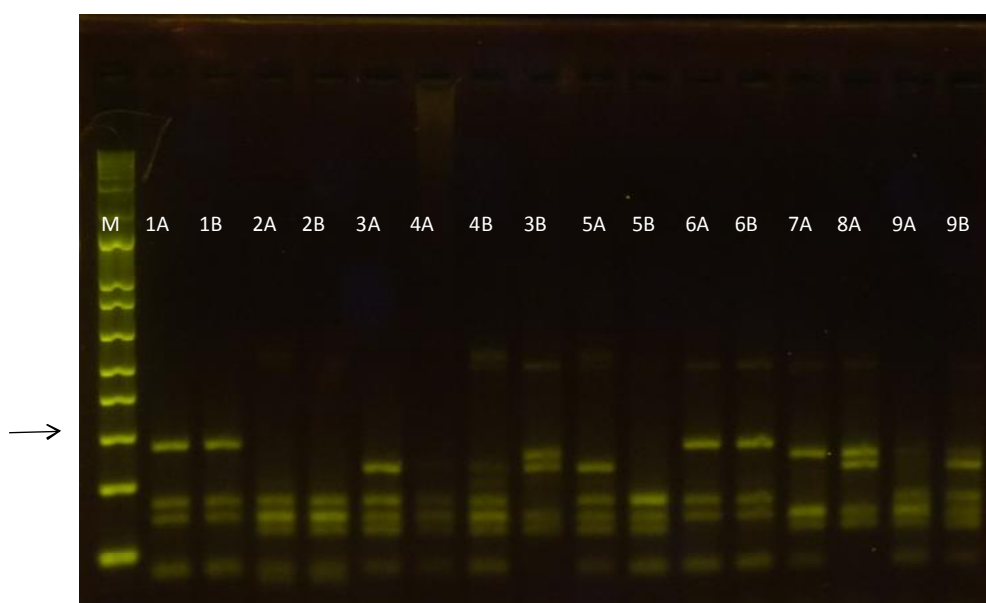


**Hình 3.2. Minh họa hình ảnh PCR gen *UreC* 820 bp của mã số bệnh phẩm từ 1 đến 7**

A: DNA chủng nhiễm ban đầu

B: DNA chủng tái xuất hiện sau tiết trừ

**Nhận xét:** Sản phẩm PCR thu được của bệnh nhân có mã số bệnh phẩm từ 1 đến 7. Hình ảnh các băng đặc hiệu, rõ nét đảm bảo cho phản ứng cắt bằng các enzym giới hạn đặc hiệu và giải trình tự gen tiếp theo xác định chính xác chủng *H. pylori* và sự tương đồng giữa các chủng.



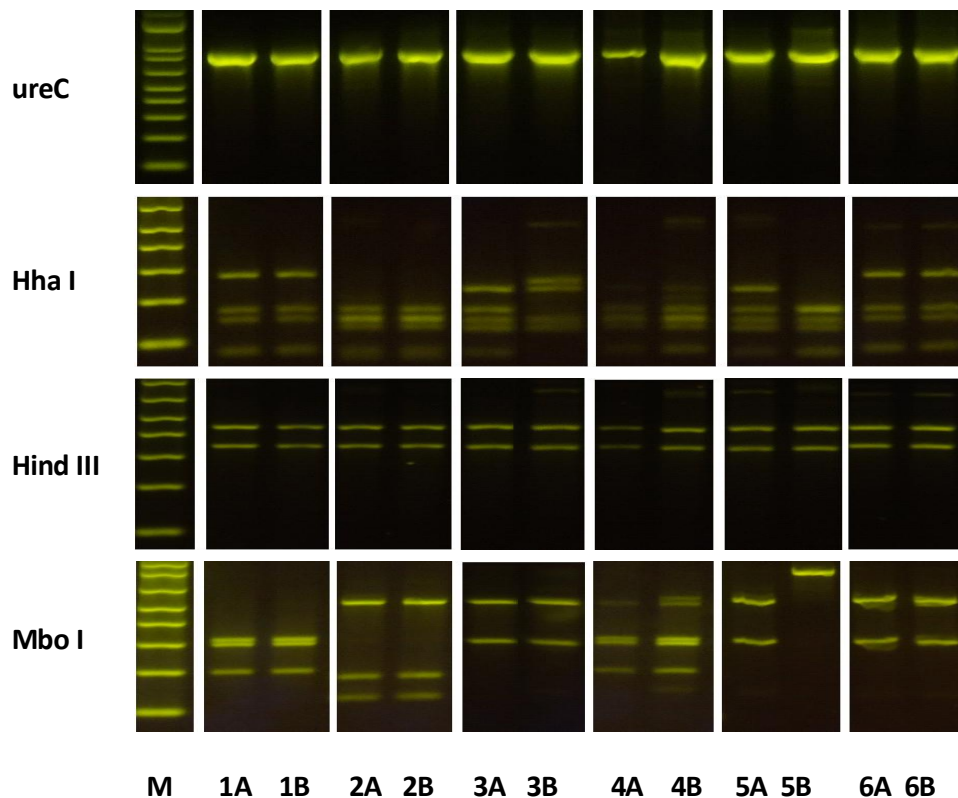
**Hình 3.3. Kết quả sản phẩm PCR sau khi được cắt với enzym cắt giới hạn *Hha* I (H)**

M: đoạn DNA chuẩn

A: DNA chủng nhiễm ban đầu

B: DNA chủng tái xuất hiện sau tiết trừ

**Nhận xét:** Hình 3.3 là các sản phẩm PCR sau khi cắt bởi enzym cắt giới hạn *Hha* I của các cặp mẫu bệnh phẩm từ 1 đến 9. Có các cặp 1A và 1B, 2A và 2B, 6A và 6B các băng của đoạn DNA cắt giống nhau trên bảng điện di



**Hình 3.4. Sản phẩm PCR-RFLP của mẫu bệnh phẩm từ 1 đến 6**

Phân tích PCR khuếch đại đoạn DNA 820cặp bazơ từ mảnh sinh thiết với các enzym cắt giới hạn *Hha*I(H), *Mbo*I(M), *Hind* III(Hn) của bệnh nhân tái xuất hiện *H. pylori* sau điều trị tiết trừ

M: đoạn DNA chuẩn

A: DNA chủng nhiễm ban đầu

B: DNA chủng tái xuất hiện sau tiết trừ

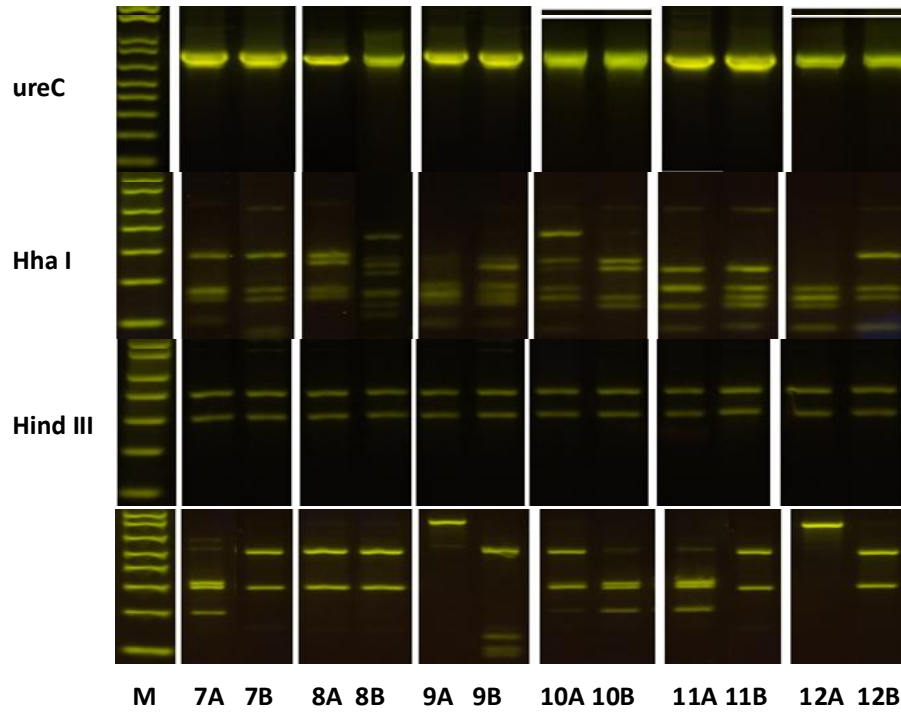


*UreC* : Sản phẩm PCR gen *UreC*

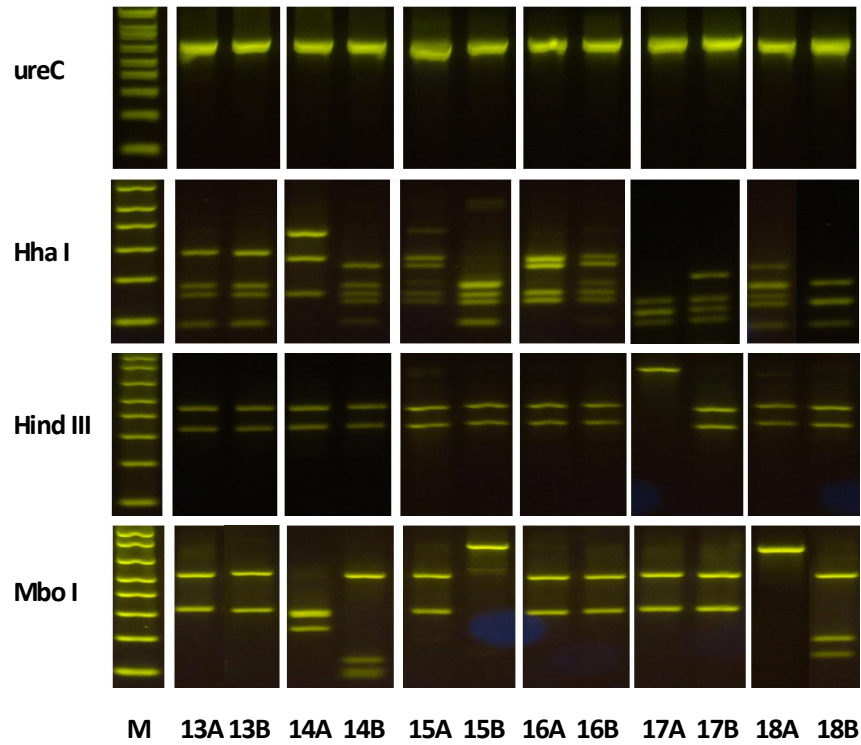
*Mbo* I: khuếch đại đoạn *UreC* DNA cắt bằng *Mbo* I

*Hind* III: khuếch đại đoạn *UreC* DNA cắt bằng *Hind* III

*Hha* I: khuếch đại đoạn *UreC* DNA cắt bằng *Hha* I



**Hình 3.5. Sản phẩm PCR-RFLP của mẫu bệnh phẩm từ 7 đến 12**



**Hình 3.6. Sản phẩm PCR-RFLP của mẫu bệnh phẩm từ 13 đến 18**

**Nhận xét:** Kết quả ở hình 3.4, 3.5, 3.6 cho thấy các các mẫu bệnh phẩm 1,2,6,13,16 có băng điện di DNA giống nhau giữa chủng trước điều trị (A) và chủng sau điều trị (B)

**Bảng 3.27. Số lượng kiểu RFLP với các enzym cắt giới hạn của các chủng *H. pylori* phân lập được**

<i>Hha</i> I		<i>Mbo</i> I		<i>Hind</i> III	
Kiểu RFLP (H)	Số lượng	Kiểu RFLP (M)	Số lượng	Kiểu RFLP (Hn)	Số lượng
1	6	1	2	1	35
2	4	2	2	2	1
3	4	3	15		
4	3	4	1		
5	1	5	1		
6	2	6	4		
7	1	7	3		
8	1	8	1		
9	1	9	1		
10	2	10	2		
11	1	11	1		
12	1	12	1		
13	1	13	2		
14	1				
15	1				
16	1				
17	1				
18	1				
19	1				
20	1				
21	1				
<b>Tổng</b>	<b>36</b>		<b>36</b>		<b>36</b>

**Nhận xét:** Số kiểu RFLP của khi dùng enzym cắt

- 13 kiểu RFLP khi dùng enzym cắt *Hha* I
- 7 kiểu RFLP khi dùng enzym cắt *Hind* III
- 2 kiểu RFLP khi dùng enzym cắt *Mbo* I

**Bảng 3.28. So sánh các kiểu RFLP sau khi dùng enzyme với các enzyme cắt giới hạn của các chủng *H. pylori* phân lập được trước và sau điều trị**

Mã cặp Bệnh phẩm	<i>Hha</i> I Trước điều trị	<i>Hha</i> I sau điều trị	<i>Hind</i> III Trước điều trị	<i>Hind</i> III Sau điều trị	<i>Mbo</i> I Trước điều trị	<i>Mbo</i> I Sau điều trị
1	H1	H1	Hn1	Hn 1	M1	M 1
2	H 2	H 2	Hn 2	Hn 2	M1	M 1
3	H 3	H 4	Hn 3	Hn 3	M1	M 1
4	H 5	H 6	Hn 4	Hn 5	M 1	M 1
5	H 3	H 6	Hn 7	Hn 6	M 1	M 1
6	H 1	H 1	Hn 7	Hn 7	M 1	M 1
7	H 10	H 10	Hn 8	Hn 3	M 1	M 1
8	H 15	H 16	Hn 3	Hn 3	M 1	M 1
9	H 17	H 3	Hn 6	Hn 10	M 1	M 1
10	H 18	H 4	Hn 3	Hn 13	M 1	M 1
11	H 19	H 20	Hn13	Hn 3	M 1	M 1
12	H 2	H 21	Hn 6	Hn 3	M 1	M 1
13	H 1	H 1	Hn 3	Hn 3	M 1	M 1
14	H 11	H 3	Hn 9	Hn 10	M 1	M 1
15	H 14	H 2	Hn 3	Hn 11	M 1	M 1
16	H 4	H 4	Hn 3	Hn 3	M 1	M 1
17	H 12	H 13	Hn 3	Hn 3	M 2	M 1
18	H 8	H 7	Hn 6	Hn 12	M 1	M 1

**Nhận xét:** Có 5 bệnh nhân (5/18) có chủng *H. pylori* phân lập trước và sau điều trị có kiểu RFLP giống nhau đó là các bệnh nhân có mã bệnh phẩm cặp PCR-RFLP số 1,2,6,13,16 chiếm tỷ lệ 27,8%



**Bảng 3.29. So sánh các chủng *H.pylori* nhiễm trước điều trị với các chủng *H.pylori* tham chiếu của BLAST**

Mã số mẫu PCR	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Kích thước gen	712 bp	797 bp	797 bp	750 bp	792 bp	798 bp	702 bp	701bp	749 bp
Độ tương đồng	97.50%	94.52%	94.21%	91.20%	95.62%	94.86%	86.05%	90.28%	95.36%
	97.36%	94.39%	94.20%	91.05%	95.63%	94.86%	86.04%	89.95%	95.23%
	97.36%	94.39%	94.08%	91.05%	95.50%	94.74%	85.76%	89.39%	95.23%
Mã chủng <i>H.pylori</i> tương ứng	Hpbs2	F20	oki154	oki828	F55	HPJP26	7C	ML1	H-137
	F55	MKF8	F209	UM298	oki154	HPJP26	NCTC13345	Hpbs1	GD63
	F30	ausabrJ05	oki673	UM299	H-137	H-137	25-A-EK1	F209	F18
Mã số mẫu PCR	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Kích thước gen	603 bp	721 bp	253 bp	742 bp	775 bp	449 bp	765bp	777bp	763bp
Độ tương đồng	92.92%	94.16%	90.38%	93.98%	92.48%	90.32%	93.46%	93.98%	92.29%
	93.09%	94.16%	89.71%	94.47%	92.48%	89.33%	93.46%	93.85%	92.29%
	92.22%	94.02%	89.71%	94.47%	92.36%	89.33%	93.32%	93.60%	92.29%
Mã chủng <i>H.pylori</i> tương ứng	51	H-137	PeCan18	H-137	MKM1	ML1	ML1	51	51
	83	oki828	C-Mx-2011-171	UM298	XZ274	Hpbs1	F30 DNA	83	A45
	A45	F55	HUP-B14	UM299	PeCan18	83	83	A45	Aklavik117,

**Nhận xét:** Trình tự của toàn bộ 18 chủng *Helicobacter pylori* nhiễm trước điều trị đều xác định là *Helicobacter pylori* khi so sánh với trình tự gen các chủng *Helicobacter pylori* tham chiếu của BLAST. Như vậy, bằng phương pháp giải trình tự gen tỷ lệ chẩn đoán chính xác là 100%.

**Bảng 3.30. So sánh các chủng *H.pylori* nhiễm sau điều trị với các chủng *H.pylori* tham chiếu của BLAST**

Mã số mẫu PCR	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Kích thước gen	712 bp	817 bp	800bp	803 bp	794 bp	838 bp	702 bp	783 bp	760 bp
Độ tương đồng	97.50%	94.52%	94.80%	94.06%	94.47%	90.50%	86.05%	93.92%	95.09%
	97.36%	94.39%	95.33%	93.80%	94.11%	90.50%	86.04%	93.90%	94.96%
	97.36%	94.39%	94.57%	93.54%	94.11%	90.50%	85.76%	93.79%	94.83%
Mã chủng <i>H.pylori</i> tương ứng	Hpbs2	F20	ML1	oki828	H-137	MKF8	7C	oki154	29CaP
	F55	MKF8	F30	H-137	F18	oki128	NCTC13345	F209	C-Mx-2011-145
	F30	ausabrJ05	GD63	oki128	ML3	oki128	25-A-EK1	C-Mx-2011-145	19-A-EK3
Mã số mẫu PCR	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Kích thước gen	667 bp	708 bp	743bp	788 bp	767 bp	770 bp	753bp	681bp	756bp
Độ tương đồng	87.40%	90.21%	93.28%	95.67%	93.69%	94.14%	93.24%	91.88%	92.45%
	87.23%	90.05%	93.67%	95.42%	93.69%	94.01%	93.11%	91.88%	92.43%
	87.23%	89.57%	93.78%	95.42%	94.07%	94.97%	93.11%	91.56%	92.32%
Mã chủng <i>H.pylori</i> tương ứng	oki128	51	F38	H-137	C-Mx-2011-145	OK310 DNA	F209	J182	F211
	oki828	83	MKF3	UM298	29CaP	H-137	UM298	glmM gene	H-137
	F57	A45	F24	UM299	19-A-EK3	F94	UM299	G-Mx-2006-46	F51

**Nhận xét:** Trình tự của toàn bộ 18 chủng *Helicobacter pylori* nhiễm sau điều trị đều xác định là *Helicobacter pylori* khi so sánh với trình tự gen các chủng *Helicobacter pylori* tham chiếu của BLAST. Như vậy, bằng phương pháp giải trình tự gen tỷ lệ chẩn đoán chính xác là 100%.

**Bảng 3.31. So sánh sự tương đồng gen *UreC* trước và sau tiệt trừ *H. pylori* bằng phương pháp giải trình tự gen**

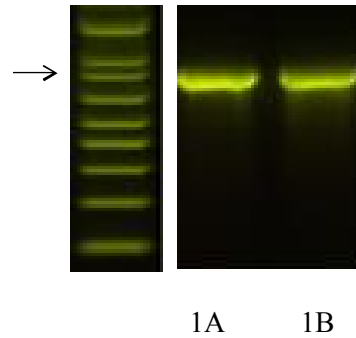
Mã số mẫu PCR	So sánh <i>UreC</i> trước và sau (% tương đồng)
1	100
2	97,19
3	94,2
4	91,35
5	94,4
6	94,34
7	87,28
8	90,97
9	93,07
10	86,85
11	90,3
12	Không có kết quả
13	95,92
14	93,28
15	88,69
16	95,27
17	89,47
18	93,82

**Nhận xét:** Sự tương đồng trên kết quả giải trình tự gen của 5 bệnh nhân có mã số 1,2,6,13,16 đạt từ 94,34% đến 100%. Có 1 cặp trình tự số 12 không so sánh được do một trình tự ngắn.

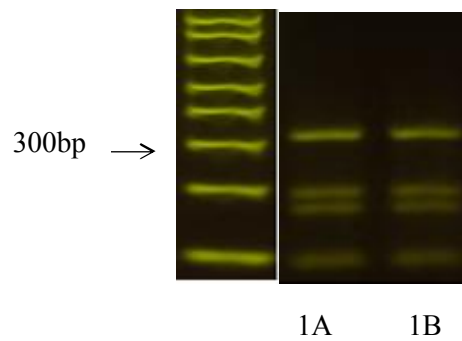


**3.2.4. Minh họa kết quả sinh học phân tử so sánh chủng *H. pylori* trước và sau điều trị tệt trừ.**

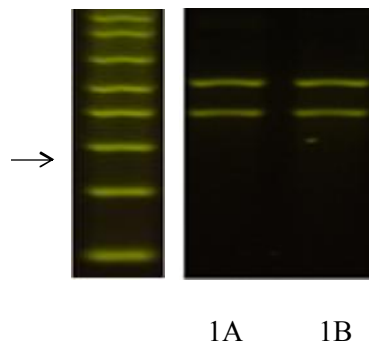
Mã số bệnh phẩm 1- Bệnh nhân 116 Nguyễn Thị Th. 32t



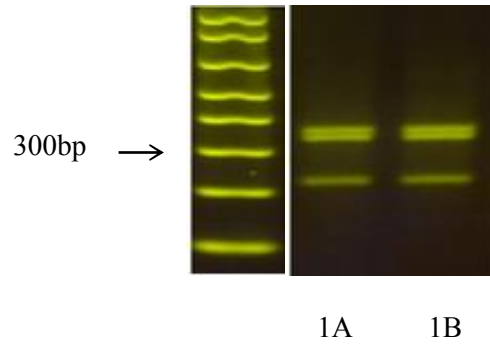
**Hình 3.7. Hình ảnh PCR gen *UreC* 820 bp**



**Hình 3.8. Phân tích PCR khuếch đại đoạn DNA 820 cặp bazơ từ mảnh sinh thiết với enzym cắt giới hạn *Hha* I (H)**



**Hình 3.9. Phân tích PCR khuếch đại đoạn DNA 820 cặp bazơ từ mảnh sinh thiết với các enzym cắt giới hạn *Mbo* I (M)**

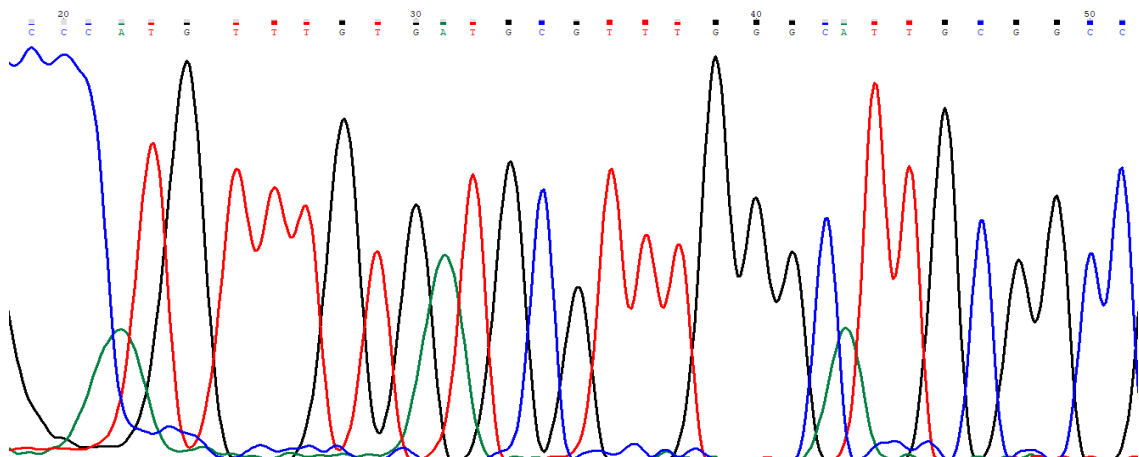


**Hình 3.10. Phân tích PCR khuếch đại đoạn DNA 820cặp bazơ từ mảnh sinh thiết với các enzym cắt giới hạn Hind III (Hn)**

```

ATGTTTGTGA TCGTTTGGG CATTGCGGCC GGATTGTATT TTAAAAACAT TCTAAACGAA
TAAATTTTAA TTGGTAAGAC ACCAGAAAAA GCGGCTATAT GGTAGAAAAC GCTTTAGTGA
GCGCTTTAAC TTCCATAGGC TATAATGTGA TCCAATAGG ACCTATGCC ACCCCTGCAA
TTGCGTTTTT AACCGAAGAC ATGCGCTGTG ATGCGGGTAT TATGATAAGC GCAAGCCACA
ACCCTTTTGA AGATAATGGT ATTAAGTTTT TCAATTCTTA TGGTTATAAG CTTAAAGAAG
AAGAAGAAAA AGCGATTGAA GAAATCTTTC ATGATGAAGA ATTACTGCAT TCTAGCTATA
AAGTGGGCGA GAGCGTCGGT AGCGCTAAAA GGATAGACGA TGTCATAGGG CGCTATATCG
TGCATTTAAA ACACTCTTTC CCCAAACATT TGAATTTACA GAGTTTAAGG ATCGTGCTAG
ATACCGCTAA TGGCGCGGCT
TATAAGGTGG CTCCGGTAGT TTTTAGCGAG CTTGGGGCTG ATGTTTTAGT
GATTAATGAT GAGCCTAATG GGTGTAATAT TAATGAGCAA TGCGGGGCTT
TACACCTTAA CCAATTGAGC CAGGAAGTGA AAAAATACCG TGCGGATTTG
GGCTTTGCTT TTGATGGTGA TGCTGATAGG TGGTGGTGGG GATAATTAGG
GAATATCGTG CA
    
```

**Hình 3.11. Trình tự 712bp gen UreC của chủng H. pylori trước điều trị**



**Hình 3.12. Sắc phổ một đoạn trình tự gen UreC của chủng H. pylori trước điều trị**

**Bảng 3.32. Đoạn PCR được nhân bản từ gen *UreC* của *H. pylori* trước điều trị qua phân tích BLAST**

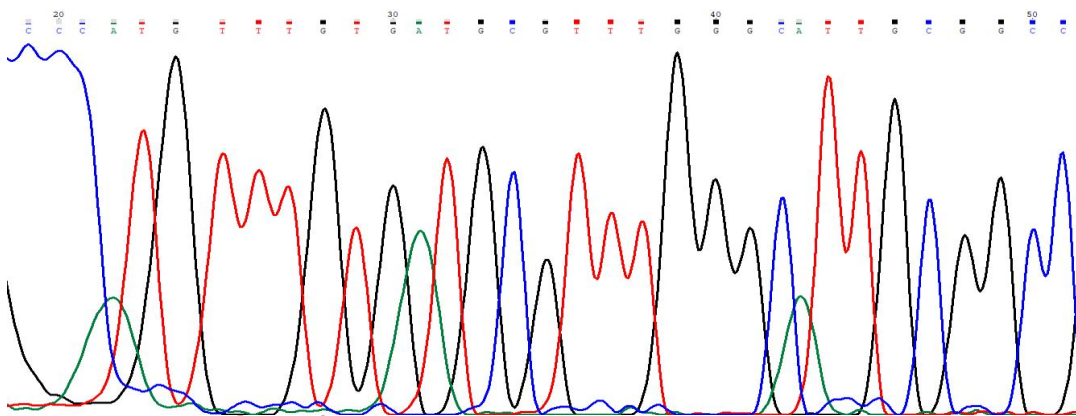
Đoạn trình tự tải để so sánh	Mô tả	Tương đồng
CP035105.1	<i>Helicobacter pylori</i> strain Hpbs2 chromosome, complete genome	97.50%
AP017345.1	<i>Helicobacter pylori</i> DNA, nearly complete genome, strain: F55	97.36%
AP011941.1	<i>Helicobacter pylori</i> F30 DNA, complete genome	97.36%

**Nhận xét:** Tương đồng của trình tự gen *UreC* của chủng nhiễm sau điều trị với 3 chủng *H. pylori* đã xác định đầu tiên trong cơ sở dữ liệu trong ngân hàng gen giống nhau trên 97%. Như vậy, trình tự của chủng trước điều trị là của *H. pylori*

```

TTAAAAACAT TCTAAACGAA TAAATTTTAA TTGGTAAGAC ACCAGAAAAA GCGGCTATAT
GGTAGAAAAC GCTTTAGTGA GCGCTTTAAC TTCCATAGGC TATAATGTGA TCCAAATAGG
ACCTATGCC ACCCCTGCAA TTGCGTTTTT AACCGAAGAC ATGCGCTGTG ATGCGGGTAT
TATGATAAGC GCAAGCCACA ACCCTTTTGA AGATAATGGT ATTAAGTTTT TCAATTCTTA
TGGTTATAAG CTTAAAGAAG AAGAAGAAAA AGCGATTGAA GAAATCTTTC ATGATGAAGA
ATTACTGCAT TCTAGCTATA AAGTGGGCGA GAGCGTCGGT AGCGCTAAAA GGATAGACGA
TGTCATAGGG CGCTATATCG TGCATTTAAA ACACTCTTTC CCCAAACATT
TGAATTTACA GAGTTTAAGG ATCGTGCTAG ATACCGCTAA TGGCGCGGCT
TATAAGGTGG CTCCGGTAGT TTTTAGCGAG CTTGGGGCTG ATGTTTTAGT
GATTAATGAT GAGCCTAATG GGTGTAATAT TAATGAGCAA TCGGGGGCTT
TACACCTAA CCAATTGAGC CAGGAAGTGA AAAAATACCG TCGGGATTTG
GGCTTTGCTT TTGATGGTGA TGCTGATAGG TGGTGGTGGG GATAATTAGG
GAATATCGTG CA
    
```

**Hình 3.13. Trình tự 712bp gen *UreC* của chủng *H. pylori* sau điều trị**



**Hình 3.14. Sắc phổ một đoạn trình tự gen *UreC* của chủng *H. pylori* sau điều trị**

**Bảng 3.33. Đoạn PCR được nhân bản từ gen *UreC* của *H. pylori* sau điều trị qua phân tích BLAST**

Đoạn sequence tải để so sánh	Mô tả	Tương đồng
CP035105.1	<i>Helicobacter pylori</i> strain Hpbs2 chromosome, complete genome	97.50%
AP017345.1	<i>Helicobacter pylori</i> DNA, nearly complete genome, strain: F55	97.36%
AP011941.1	<i>Helicobacter pylori</i> F30 DNA, complete genome	97.36%

**Nhận xét:** Tương đồng của trình tự gen *UreC* của chủng nhiễm sau điều trị với 3 chủng *H. pylori* đã xác định đầu tiên trong cơ sở dữ liệu của ngân hàng gen giống nhau trên 97%. Như vậy, trình tự của chủng trước điều trị là của *H. pylori*.

**Bảng 3.34. So sánh trình tự đoạn PCR được khuếch đại trước và sau điều trị**  
Mã trình tự: Query\_41247 (dna) và Query\_41249 (dna)

Điểm cao nhất	Tổng điểm	Tỷ lệ bao phủ	Giá trị E	Độ tương đồng	Mã số
1315	1315	100%	0.0	100%	Query_21419

```

Query: Seq_1F full Query ID: lcl|Query_21749 Length: 712
>seq_2F full
Sequence ID: Query_21751 Length: 712
Range 1: 1 to 712
Score:1315 bits(712), Expect:0.0,
Identities:712/712(100%), Gaps:0/712(0%), Strand: Plus/Plus
Query 1 ATGTTTGTGATGCGTTTGGGCATTGCGGCCGGATTGTATTTTAAAAACATTCTAAACGAA 60
|
Sbjct 1 ATGTTTGTGATGCGTTTGGGCATTGCGGCCGGATTGTATTTTAAAAACATTCTAAACGAA 60

Query 61 TAAATTTTAATTGGTAAGACACCAGAAAAAGCGGCTATATGGTAGAAAACGCTTTAGTGA 120
|
Sbjct 61 TAAATTTTAATTGGTAAGACACCAGAAAAAGCGGCTATATGGTAGAAAACGCTTTAGTGA 120

Query 121 GCGCTTTAACTTCCATAGGCTATAATGTGATCCAAATAGGACCTATGCCACCCCTGCAA 180
|
Sbjct 121 GCGCTTTAACTTCCATAGGCTATAATGTGATCCAAATAGGACCTATGCCACCCCTGCAA 180

Query 181 TTGCGTTTTTAACCGAAGACATGCGCTGTGATGCGGGTATTATGATAAGCGCAAGCCACA 240
|
Sbjct 181 TTGCGTTTTTAACCGAAGACATGCGCTGTGATGCGGGTATTATGATAAGCGCAAGCCACA 240

Query 241 ACCCTTTTGAAGATAATGGTATTAAGTTTTTCAATTCTTATGGTTATAAGCTTAAAGAAG 300
|
Sbjct 241 ACCCTTTTGAAGATAATGGTATTAAGTTTTTCAATTCTTATGGTTATAAGCTTAAAGAAG 300

Query 301 AAGAAGAAAAAGCGATTGAAGAAATCTTTCATGATGAAGAATTACTGCATTCTAGCTATA 360
|
Sbjct 301 AAGAAGAAAAAGCGATTGAAGAAATCTTTCATGATGAAGAATTACTGCATTCTAGCTATA 360

Query 361 AAGTGGGCGAGAGCGTCGGTAGCGCTAAAAGGATAGACGATGTCATAGGGCGCTATATCG 420
|
Sbjct 361 AAGTGGGCGAGAGCGTCGGTAGCGCTAAAAGGATAGACGATGTCATAGGGCGCTATATCG 420

Query 421 TGCATTTAAAACACTCTTTCCCCAACATTTGAATTTACAGAGTTTAAGGATCGTGCTAG 480
|
Sbjct 421 TGCATTTAAAACACTCTTTCCCCAACATTTGAATTTACAGAGTTTAAGGATCGTGCTAG 480

Query 481 ATACCGCTAATGGCGGGCTTATAAGGTGGCTCCGGTAGTTTTTAGCGAGCTTGGGGCTG 540
|
Sbjct 481 ATACCGCTAATGGCGGGCTTATAAGGTGGCTCCGGTAGTTTTTAGCGAGCTTGGGGCTG 540

Query 541 ATGTTTTAGTGATTAATGATGAGCCTAATGGGTGTAATATTAATGAGCAATGCGGGGCTT 600
|
Sbjct 541 ATGTTTTAGTGATTAATGATGAGCCTAATGGGTGTAATATTAATGAGCAATGCGGGGCTT 600

Query 601 TACACCCTAACCAATTGAGCCAGGAAGTGAAAAAATACCGTGCGGATTTGGGCTTTGCTT 660
|
Sbjct 601 TACACCCTAACCAATTGAGCCAGGAAGTGAAAAAATACCGTGCGGATTTGGGCTTTGCTT 660

Query 661 TTGATGGTGATGCTGATAGGTGGTGGTGGGGATAATTAGGGAATATCGTGCA 712
|
Sbjct 661 TTGATGGTGATGCTGATAGGTGGTGGTGGGGATAATTAGGGAATATCGTGCA 712

```

**Hình 3.15. So sánh trình tự hai chủng *H.pylori* trước và sau điều trị**

## CHƯƠNG 4

### BÀN LUẬN

#### **4.1. Phân tích tỷ lệ kháng Amoxicillin, Clarithromycin và hiệu quả phác đồ Esomeprazole-Amoxicilin-Clarithromycin (EAC) trên bệnh nhân loét tá tràng có *Helicobacter pylori* dương tính**

##### **4.1.1. Đặc điểm nhóm nghiên cứu**

Theo các tài liệu nghiên cứu về bệnh loét dạ dày tá tràng, bệnh thường hay gặp ở nam hơn ở nữ với tỷ lệ nam/nữ là 3/1, đồng thời loét tá tràng gặp nhiều hơn loét dạ dày tới 3 đến 4 lần [1],[4]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, không có sự khác biệt giữa tỷ lệ mắc bệnh giữa nam và nữ với tỷ lệ 51,3% nam và 46,9% nữ (Biểu đồ 3.1). Tỷ lệ này khác với một số kết quả trong nghiên cứu của các tác giả khác như Phan Quốc Hoàn thấy tỷ lệ nam/nữ là 2,7/1, Trần Thiện Trung và cộng sự thấy tỷ lệ là 2/1[59],[122]. Sự khác biệt so với các nghiên cứu trên do đối tượng nghiên cứu chúng tôi lựa chọn là bệnh nhân có loét hành tá tràng đồng thời có xét nghiệm urease nhanh chẩn đoán *H. pylori* dương tính.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, tuổi trung bình là  $40,9 \pm 14$  năm. Nhóm tuổi 21 đến 40 tuổi chiếm tỷ lệ cao nhất (51,8%). Loét tá tràng ở độ tuổi < 20 tuổi và trên 60 tuổi có tỷ lệ thấp tương ứng với 4,6% và 8,9% (Biểu đồ 3.2). Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu của các tác giả khác. Theo Tạ Long, lứa tuổi thường gặp loét tá tràng từ 20-49 tuổi. Trong nghiên cứu của Phan Quốc Hoàn là từ 30 đến 49 tuổi [59],[123]. Nhiều nghiên cứu dịch tễ học cho thấy hơn một nửa dân số thế giới nhiễm *H. pylori* nhưng có gần 70% số người nhiễm vi khuẩn này không có triệu chứng [23]. Trong khi đó chỉ có khoảng 5-15% số người bị nhiễm *H. pylori* có loét [1]. Các nghiên cứu ở các nước cũng cho thấy tình trạng nhiễm *H. pylori* thường rất sớm. Nghiên cứu của Malaty và CS thấy 8% trẻ từ 1 đến 3 tuổi có kháng thể với *H. pylori* và 18 đến

23 tuổi có tỷ lệ nhiễm là 24,5% [124]. Ở các nước đang phát triển, tỷ lệ nhiễm vi khuẩn này có thể tới 80% ở người lớn. Tỷ lệ nhiễm tăng trên 10% trong độ tuổi từ 10-18 tuổi và lên tới 50% ở lứa tuổi lớn hơn [4]. Trong những thập kỷ gần đây, tỷ lệ nhiễm *H. pylori* có xu hướng giảm dần tại nhiều nước đặc biệt ở các nước phát triển do cải thiện tình hình kinh tế, vệ sinh môi trường, nước sạch và các phác đồ diệt trừ *H. pylori* hiệu quả [43].

#### **4.1.2. Triệu chứng lâm sàng**

Các triệu chứng lâm sàng hay gặp nhất trong loét tá tràng là đau thượng vị với mức độ và tính chất khác nhau. Các triệu chứng thường gặp khác như đầy hơi, ợ hơi, ợ chua, nôn, buồn nôn. Nấc, đau ngực, nuốt nghẹn là các triệu chứng ít gặp. Từ số liệu bảng 3.1 cho thấy tỷ lệ bệnh nhân đau thượng vị trong nghiên cứu của chúng tôi là 84,8%, đau lúc đói 58,4%, ợ chua 64%, nôn hoặc buồn nôn 11,6%, đầy hơi 26,7% và triệu chứng khác là 5,3%. Triệu chứng đau thượng vị gặp với tỷ lệ cao nhất như mô tả trong y văn. Tuy nhiên, tỷ lệ triệu chứng này trong nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn so với tỷ lệ trong nghiên cứu của Lê Văn Nho năm 2011 (94,4%) [125], Nguyễn Duy Thắng năm 2010 (100%) [126] và tương tự nghiên cứu của Vũ Thị Lừu năm 2011 (84,8%) [127]. Những bệnh nhân không đau thường có các triệu chứng khác như đầy bụng, ợ hơi..., hoặc tình cờ phát hiện khi phải kiểm tra soi dạ dày trước khi dùng NSAIDs hoặc corticoid. Một nghiên cứu tại Đài Loan đã cho thấy các yếu tố nguy cơ của loét không triệu chứng là người già, hút thuốc, béo phì [128]. Loét không có triệu chứng cũng là nguyên nhân làm cho bệnh nhân tới bệnh viện muộn khi đã có các biến chứng thủng hoặc chảy máu.

Trong nghiên cứu của các tác giả trong nước về loét dạ dày tá tràng cũng đề cập đến nhiều triệu chứng lâm sàng trong đó đau thượng vị vẫn là triệu chứng chiếm tỷ lệ cao nhất. Tác giả Vũ Văn Khiên và CS nghiên cứu 102 bệnh nhân loét dạ dày thấy 98% bệnh nhân có đau thượng vị; 57,8% ợ hơi, ợ chua; 32,3%, nóng rát thượng vị; 22,5% đầy bụng chập tiêu; 15,6% buồn nôn và 8,8% chảy máu tiêu hóa [129]. Nghiên cứu của Nguyễn Duy Thắng thấy

100% bệnh nhân có đau thượng vị, 93,3% nóng rát thượng vị, 100% ợ hơi, ợ chua, 83,3% buồn nôn, nôn [126]. Lê Văn Nho thấy 95,7% có cơn đau thượng vị; 47,9% nóng rát thượng vị; 30,9% ợ chua; 34% đau lúc đói và 26,6% buồn nôn, nôn [125].

#### **4.1.3. Kích thước, số lượng và vị trí ổ loét dạ dày, tá tràng**

- Kích thước ổ loét

Bảng 3.2 cho thấy kích thước ổ loét từ 0,5 đến <1cm chiếm 59,7%. Số lượng bệnh nhân có ổ loét kích thước từ 1cm đến 1,5cm chiếm 38,6%. Loét lớn trên 1,5 cm có tỷ lệ rất thấp là 1,7%. Tỷ lệ ổ loét kích thước từ 1cm đến 1,5cm trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn các nghiên cứu khác. Nghiên cứu của Vũ Thị Lừu (2011) thấy bệnh nhân có ổ loét kích thước  $\leq$  1cm chiếm 66,7%, [127], Lê Văn Nho có kết quả 80,8% ổ loét kích thước < 10 mm, 16% ổ loét kích thước từ 10-15mm và chỉ có 3,2% kích thước ổ loét > 15 mm [125]. So sánh với một nghiên cứu đa trung tâm tại Canada của Veldhuyzen van Zanten và CS trên 149 bệnh nhân LTT cho thấy 87% bệnh nhân loét kích thước từ 5 đến 10 mm, 13% bệnh nhân loét kích thước từ 11 đến 20 mm [130].

Theo các nghiên cứu về loét hành tá tràng, ổ loét phần lớn ở mặt trước (50-60%) [15],[4]. Bảng 3.3 cho thấy trong nghiên cứu của chúng tôi tỷ lệ vị trí ổ loét ở mặt trước cao nhất (70,3%). Kết quả của các nghiên cứu khác cũng thấy ổ loét ở mặt trước hành tá tràng chiếm ưu thế. Trong nghiên cứu của Lê Văn Nho, tỷ lệ ổ loét mặt trước là 74,5% [125]. Loét mặt trước hành tá tràng chiếm tỷ lệ cao hơn các vị trí khác do dị sản dạ dày thường gặp ở vùng này. Dị sản dạ dày ở tá tràng là một trong các cơ chế bệnh sinh loét tá tràng. Đó là hiện tượng có từng đám tế bào dạng niêm mạc dạ dày nằm trên nhung mao tá tràng, là nơi *H. pylori* cư trú, phát triển và gây ra loét hành tá tràng. *H. pylori* gây viêm niêm mạc tá tràng từ đó kích thích dị sản dạ dày phát triển rộng. Trong nghiên cứu của J I Wyatt và CS ở 62 bệnh nhân đánh giá biểu mô dạ dày tại tá tràng có liên quan đến *H. pylori* và các phản ứng viêm, các mẫu



sinh thiết ở 4 vị trí thuộc chu vi hành tá tràng thấy 63% mẫu sinh thiết có di sản dạ dày là vị trí mặt trước tá tràng [131].

Đánh giá mức độ nhiễm *H. pylori* trong nhóm bệnh nhân nghiên cứu, chúng tôi thấy tỷ lệ bệnh nhân nhiễm *H. pylori* mức độ nhẹ nhiều nhất, chiếm tỷ lệ 86,5% (Bảng 3.4). Lai Y.C và CS tại Đài Loan thấy mật độ vi khuẩn liên quan mật thiết với tỷ lệ tiết trừ *H. pylori* của phác đồ điều trị. Các bệnh nhân loét hành tá tràng nhiễm *H. pylori* với mức độ nhẹ và vừa so với các bệnh nhân nhiễm nặng có tỷ lệ tiết trừ tương ứng là 100% và 85,2%. Cũng theo tác giả này, mức độ nhiễm *H. pylori* còn ảnh hưởng đến tỷ lệ liền sẹo ổ loét hành tá tràng sau điều trị [132].

#### **4.1.4. Tỷ lệ kháng kháng sinh Clarithromycin và Amoxicillin của *H. pylori***

Trong điều trị loét dạ dày tá tràng có nhiễm *H. pylori*, kháng kháng sinh là một yếu tố cơ bản ảnh hưởng đến kết quả điều trị. Do vậy nuôi cấy và làm kháng sinh đồ hỗ trợ cho việc xác định tính kháng kháng sinh của vi khuẩn để đánh giá tình trạng kháng thuốc và lựa chọn kháng sinh cho phù hợp.

*H. pylori* là một vi khuẩn khó nuôi cấy, tỷ lệ nuôi cấy thành công vi khuẩn này khác nhau giữa các trung tâm nuôi cấy dao động từ 58% đến 85%-95% [133]. Tỷ lệ nuôi cấy thành công phụ thuộc nhiều vào môi trường nuôi cấy, môi trường bảo quản vận chuyển bệnh phẩm. Nuôi cấy *H. pylori* không chỉ chẩn đoán xác định nhiễm vi khuẩn này với độ đặc hiệu tới 100% mà còn giúp làm kháng sinh đồ đánh giá độ nhạy cảm của kháng sinh dùng trong phác đồ điều trị tiết trừ vi khuẩn này. Tỷ lệ nuôi cấy thành công trong nghiên cứu chúng tôi là 57,8% (Bảng 3.5). Đây là tỷ lệ chưa cao mặc dù đã được cấy chuyển. Môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng nhiều đến tỷ lệ mọc của khuẩn lạc. Trong một nghiên cứu năm 2016, Perez và cộng sự đã tiến hành so sánh nuôi cấy *H. pylori* trong môi trường vi hiếu khí thông dụng và môi trường kỵ khí thấy có sự cải thiện về tỷ lệ mọc của vi khuẩn trong môi trường kỵ khí với 83% ở môi trường kỵ khí và 31,3% ở môi trường vi hiếu khí ( $p=0,01$ ) [134].

Ngoài ra, nuôi cấy vi khuẩn không chỉ để chẩn đoán mà còn giúp làm kháng sinh đồ xác định độ nhạy cảm của vi khuẩn với kháng sinh. Clarithromycin, Amoxicillin là hai kháng sinh được lựa chọn cho phác đồ đầu tay mặc dù tỷ lệ kháng hai loại kháng sinh này cũng tăng dần theo thời gian và tỷ lệ khác nhau giữa các khu vực trong một quốc gia và giữa các quốc gia. Tỷ lệ kháng Clarithromycin, Amoxicillin trước điều trị tương ứng trong nghiên cứu của chúng tôi là 40,6% và 24,6% (Bảng 3.6 và 3.7). Tỷ lệ này cao so với nhiều nghiên cứu khác đã tiến hành ở trong và ngoài nước. Tại Việt Nam đã có nhiều công trình nghiên cứu về kháng thuốc. Ở thành phố Hồ Chí Minh, Lục Thị Vân Bích năm 1997 đã công bố tỷ lệ kháng Metronidazole và Amoxicillin là 93% và 100%, không có kháng Clarithromycin [58]. Ở Hà Nội, Phan Quốc Hoàn và CS thấy rằng tỷ lệ kháng metronidazole là 22,6%, không có kháng Clarithromycin và Amoxicillin [59]. Cả hai tác giả đều sử dụng phương pháp làm kháng sinh đồ khuếch tán trên thạch và khoanh giấy kháng sinh. Trong nghiên cứu của chúng tôi phương pháp Epsilon test (E-test) được sử dụng để xác định kháng sinh đồ. Ưu điểm của E-test là có thể định lượng nồng độ ức chế tối thiểu, có tiêu chuẩn xác định kháng thuốc rõ ràng, chính xác, thống nhất trên toàn thế giới. Nghiên cứu của Nguyễn Thúy Vinh năm 2003, tỷ lệ *H. pylori* kháng Clarithromycin trước điều trị là 20,6% [60]. Nguyễn Văn Thịnh năm 2009 đưa ra tỷ lệ *H. pylori* kháng Clarithromycin trước điều trị là 21,4% [135].

Qua các kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi nhận thấy tỷ lệ *H. pylori* kháng Clarithromycin trước điều trị tăng dần theo thời gian và đặc biệt tăng rất nhanh trong vài năm gần đây. Theo đó, sau thời gian khoảng 10 năm, tỷ lệ *H. pylori* kháng Clarithromycin trước điều trị đã tăng gần gấp 2 lần (40,6% so với 20,6%).

So sánh với các nghiên cứu khác trên thế giới, tỷ lệ *H. pylori* kháng Clarithromycin trước điều trị trong nghiên cứu của chúng tôi cũng cao hơn. Nghiên cứu của Jun Won Chung và CS năm 2012 ở Hàn Quốc thì tỷ lệ này là 18,2% [136]. Theo một báo cáo tổng hợp năm 2010 của Hidekazu và CS thấy

tỷ lệ *H. pylori* kháng Clarithromycin trước điều trị ở Trung Quốc chỉ có 14%, Nhật Bản 15%, Ấn Độ 33% [137]. Một số nước có nền kinh tế phát triển ở Châu Âu như Italia năm 2011 tỷ lệ này là 9,9% [138], ở Đức năm 2010 tỷ lệ này chỉ là 2% [137]. Như vậy, tỷ lệ *H. pylori* kháng Clarithromycin ở các khu vực khác nhau, ở các khoảng thời gian nghiên cứu khác nhau là rất khác nhau. Tuy nhiên tỷ lệ *H. pylori* kháng Clarithromycin trước điều trị ở Việt Nam tăng cao hơn so với các nước trong khu vực Châu Á và cao hơn nhiều so với một số nước phát triển ở Châu Âu. Một giả thiết có thể đưa ra là việc sử dụng kháng sinh ở nước ta không được kiểm soát một cách chặt chẽ trong điều trị các bệnh nhiễm khuẩn nói chung và điều trị tiệt trừ *H. pylori* nói riêng. Một lý do khác nữa là hiện nay ở nước ta nhiều cơ sở y tế, kể cả các bệnh viện tuyến trung ương việc nuôi cấy và xác định tính nhạy cảm của *H. pylori* với kháng sinh trước điều trị cũng chưa được thực hiện một cách thường quy. Đây cũng là một nguyên nhân góp phần tăng tỷ lệ kháng thuốc kháng sinh theo thời gian, ảnh hưởng không nhỏ tới kết quả điều trị, tăng chi phí điều trị cho bệnh nhân. Ngoài ra, tỷ lệ *H. pylori* kháng Clarithromycin tăng cao còn do việc sử dụng kháng sinh nhóm Macrolid nói chung và Clarithromycin nói riêng trong điều trị các bệnh lý nhiễm khuẩn đường hô hấp đang diễn ra khá phổ biến ở Việt Nam. Tuy nhiên, để khẳng định điều này cần có những nghiên cứu tiếp theo với số lượng bệnh nhân lớn hơn và thời gian dài hơn.

#### ***4.1.5. Kết quả điều trị của phác đồ EAC trong điều trị loét tá tràng***

4.1.5.1. Hiệu quả giảm triệu chứng đau thượng vị của phác đồ EAC trong điều trị loét hành tá tràng

Trong bệnh cảnh loét tá tràng, đau thượng vị là triệu chứng thường gặp nhất ở các bệnh nhân. Đây là triệu chứng gây khó chịu khiến cho người bệnh phải đi khám, ngoài ra LTT thường đau vào lúc đói và lúc nửa đêm về sáng nên gây ảnh hưởng nhiều đến tinh thần, giấc ngủ, sức khỏe và khả năng lao động của người bệnh. Vì vậy, việc điều trị làm giảm và hết đau bụng thượng vị càng sớm sẽ giúp cho người bệnh nhanh chóng phục hồi sức khỏe cũng như

khả năng lao động.

Trong nghiên cứu của chúng tôi đánh giá 162 bệnh nhân sau điều trị 45 ngày đến tái khám thấy cải thiện triệu chứng đau như sau (Bảng 3.9):

- Tỷ lệ hết đau hoàn toàn đạt 80,9%
- Tỷ lệ giảm đau là 16,6%
- Triệu chứng đau không đổi là 2,5%

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn nghiên cứu của các tác giả khác ở Miền Bắc các năm trước như: nghiên cứu của Trần Thế Hải (2002) sử dụng phác đồ NAC 7 ngày cho tỷ lệ hết đau thượng vị là 92,3% [139]. Nghiên cứu của Nguyễn Duy Thắng (2010), sử dụng phác đồ EAC thời gian 7 ngày và 14 ngày, tỷ lệ này tương ứng là 93,3% và 96,7% [126]. Trong khi đó tỷ lệ giảm đau theo các nghiên cứu ở miền Trung như nghiên cứu của Phan Thị Minh Hương và Hoàng Trọng Thắng năm 2005 sử dụng phác đồ EAC 7 ngày tỷ lệ hết đau thượng vị là 88,3% [140], nghiên cứu của Lê Văn Nho và CS năm 2011 sử dụng phác đồ EAC trong 14 ngày tỷ lệ này chỉ đạt 43,1% [125].

Từ kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi nhận thấy ở Miền Bắc hiệu quả làm giảm đau của phác đồ EAC đã giảm một cách đáng kể theo thời gian, so với nghiên cứu của Nguyễn Duy Thắng năm 2010, dù thời gian điều trị của chúng tôi dài hơn (10 ngày so với 7 ngày) nhưng hiệu quả giảm đau trên nhóm bệnh nhân nghiên cứu của chúng tôi vẫn thấp hơn (82,4% so với 93,3%), điều này có thể là do tỷ lệ *H. pylori* kháng Clarithromycin trong nghiên cứu của chúng tôi tăng cao hơn so với thời điểm nghiên cứu của các tác giả trước, từ đó ảnh hưởng đến hiệu quả điều trị của phác đồ nói chung và hiệu quả giảm đau bụng thượng vị nói riêng. Cũng qua các nghiên cứu trên, kết quả làm giảm triệu chứng đau bụng thượng vị theo các nghiên cứu ở Miền Trung cũng giảm theo thời gian, từ 88,3% năm 2005 xuống còn 43,1% năm 2011 [125], [140].

#### 4.1.5.2. Kết quả tiệt trừ *H. pylori*

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy Tỷ lệ tiệt trừ *H. pylori* thành

công của phác đồ EAC là 67,9 % (Bảng 3.10). Tỷ lệ diệt trừ *H. pylori* trong nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn so với các nghiên cứu khác trước đây ở Miền Bắc như nghiên cứu của Trần Thế Hải năm 2002 cho tỷ lệ diệt trừ *H. pylori* lên đến 98,1% [139], nghiên cứu của Nguyễn Duy Thắng năm 2010 với phác đồ EAC thời gian 7 ngày và 14 ngày cho tỷ lệ diệt trừ *H. pylori* lần lượt là 90,0% và 93,3% [126], nghiên cứu của Nguyễn Quang Duật và CS năm 2010 sử dụng phác đồ PAC thời gian 10 ngày cho tỷ lệ diệt trừ *H. pylori* là 97,9% [141].

Từ các kết quả nghiên cứu trên chúng tôi nhận thấy, sau khoảng thời gian 10 năm thì tỷ lệ diệt trừ *H. pylori* của phác đồ bộ ba ở Miền Bắc đã giảm nhiều khi so sánh giữa các nghiên cứu trên, tỷ lệ diệt trừ *H. pylori* thành công từ trên 90,0% giảm xuống còn 67,9 %. Tuy nhiên, so sánh với các nghiên cứu của Đào Hữu Khôi và CS năm 2009 ở thành phố Hồ Chí Minh và nghiên cứu của Trần Thiện Trung và CS năm 2009 ở Huế thì kết quả diệt trừ *H. pylori* của chúng tôi tương đương là 67,9 % so với 68,5% và 68,3% [142],[143]. Qua phân tích trên, tỷ lệ diệt trừ *H. pylori* ở các thời điểm khác nhau, khu vực khác nhau là rất khác nhau và phụ thuộc vào tỷ lệ *H. pylori* kháng thuốc kháng sinh ở thời điểm đó và khu vực đó. Do vậy, không có một phác đồ điều trị chung đạt hiệu quả cao cho tất cả các khu vực khác nhau, thời điểm khác nhau. Các nghiên cứu trên thế giới cũng đưa ra tỷ lệ kháng Clarithromycin khác nhau tại các khu vực: Trung quốc 27,6%, Châu Âu 11%, Mỹ 29,3%, Thổ Nhĩ Kỳ 47,5%, Nam Mỹ 17,72% [57],[144], [145]. Tuy nhiên, ở vùng có tỷ lệ kháng Clarithromycin cao nếu bệnh nhân được làm kháng sinh đồ có kết quả nhạy cảm với Clarithromycin thì phác đồ đầu tay là 3 thuốc PPI- Amoxicillin - Clarithromycin vẫn có thể sử dụng và có hiệu quả cao. Martos và CS tiến hành nghiên cứu tại Tây ban Nha đánh giá kết quả diệt trừ *H.pylori* ở hai nhóm bệnh nhân có xét nghiệm *H.pylori* dương tính được điều trị bằng phác Omeprazole, Amoxicillin và Clarithromycin (OAC) trong 10 ngày. Nhóm 1

sau khi có kết quả nuôi cấy nhạy cảm với *H.pylori* sẽ dùng phác đồ OAC, nhóm 2 dùng phác đồ OAC theo kinh nghiệm. Kết quả cho thấy nhóm 1 có tỷ lệ diệt trừ *H.pylori* cao hơn nhóm 2 có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,006$ . Kết quả cụ thể, nhóm 1 có kết quả diệt trừ thành công là 94%, trong khi đó nhóm 2 có tỷ lệ diệt trừ là 72% [146]. Yakoob và cộng sự tiến hành nghiên cứu tại Pakistan nơi có tỷ lệ kháng Clarithromycin trên invitro là 36% nhưng tỷ lệ tái xuất hiện *H.pylori* sau 12 tháng chỉ là 6% [147]. Vì vậy, ở các vùng có tỷ lệ kháng Clarithromycin cao bác sĩ điều trị nên làm kháng sinh đồ với kháng sinh này trước khi chọn phác đồ điều trị diệt trừ *H.pylori* vì vẫn có cá thể vẫn nhạy cảm với Clarithromycin .

Bên cạnh cơ chế kháng kháng sinh làm ảnh hưởng đến kết quả diệt trừ thành công *H.pylori*, các yếu tố khác cũng có ảnh hưởng đến kết quả diệt trừ vi khuẩn này như: yếu tố kiểu gen và yếu tố độc của vi khuẩn, vị trí cư trú và mật độ *H.pylori*, thể cầu của vi khuẩn (coccoid form), tính đa hình gen của người bệnh liên quan đến kiểu gen CYP2C19 [69].

Dưới đây là bảng tóm tắt kết quả diệt trừ *H. pylori* dùng phác đồ EAC của một số tác giả trong và ngoài nước.

**Bảng 4.1. Kết quả diệt trừ *H. pylori* bằng phác đồ EAC**

Tác giả	Phác đồ	Số bệnh nhân (n)	Tỷ lệ diệt trừ <i>H. pylori</i> (%)
Tulassay Z (2008) [148]	EAC 7 ngày	401	82%
Trần Thiện Trung (2009) [122]	EAC 7 ngày	110	63,8
Nguyễn Duy Thắng (2010) [126]	EAC 7 ngày	75	90
Lê Văn Nho (2011) [125]	EAC 14 ngày	72	87,4
<b>Chúng tôi (2014)</b>	EAC 10 ngày	162	67,9

Kết quả của các nghiên cứu cho thấy tỷ lệ diệt trừ *H. pylori* của phác đồ EAC dao động từ 63,8% đến 90%, kết quả này cũng không tỷ lệ thuận với thời gian điều trị 10 ngày hay 7 ngày.

Phác đồ điều trị trong nghiên cứu của chúng tôi thay thế Omeprazole (O) bằng Esomeprazole là đồng phân của omeprazole có tác dụng ức chế axit mạnh hơn. Hiệu quả điều trị của phác đồ EAC 10 ngày trong nghiên cứu của chúng tôi (67,9 %) thấp hơn so với các phác đồ trong các bảng trên. Điều này gợi ý rằng kháng thuốc có thể là yếu tố quyết định hiệu quả điều trị diệt trừ *H. pylori*. Cơ chế chính *H. pylori* kháng kháng sinh là sự đột biến gen của vi khuẩn [149]. Ngoài ra, một yếu tố khác tác động đến hiệu quả diệt trừ là tình trạng vi khuẩn tạo màng sinh học khi gặp môi trường không thuận lợi như các loại thuốc kháng sinh, các vi khuẩn bám dính rất chặt vào bề mặt sinh học bằng các chất gian bào do chính chúng sản sinh ra. Với hình thức tồn tại này vi khuẩn có một môi trường chịu được các loại kháng sinh và chống lại đại thực bào rất hiệu quả. Với hình thức tạo màng sinh học, các vi khuẩn có thể trao đổi các gen tạo nên các tổ hợp gen mới góp phần đáng kể vào khả năng kháng thuốc của *H. pylori* [150].

#### 4.1.5.3. Kết quả liền sẹo ổ loét liên quan với tình trạng nhiễm *H. pylori*

Cơ chế gây loét DDTT là do sự mất cân bằng giữa các yếu tố tấn công và yếu tố bảo vệ, trong đó ở bệnh nhân LTT ổ loét hình thành chủ yếu là do yếu tố tấn công tăng cường hoạt động (tăng tiết acid, nhiễm *H. pylori* ...). Các thuốc làm giảm hoạt động của các yếu tố tấn công này như ức chế bài tiết acid dịch vị, diệt trừ *H. pylori* bằng kháng sinh giúp làm liền sẹo ổ loét.

Kết quả làm liền sẹo ổ loét sau điều trị của phác đồ EAC trong nghiên cứu của chúng tôi được trình bày ở bảng 3.11 cho thấy tỷ lệ liền sẹo đạt 76,5%. Tỷ lệ này thấp so với một số nghiên cứu khác trong nước. Kết quả nghiên cứu của Trần Thế Hải (2002) sử dụng phác đồ OAC cho tỷ lệ liền sẹo là 94,2% [139]. Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thúy Vinh (2003) sử dụng

phác đồ OAC 7 ngày cho kết quả liền sẹo là 81,9% [60]. Nguyễn Quang Duật và CS (2010) sử dụng phác đồ PAC cho tỷ lệ liền sẹo là 91,7% [141]. Nguyễn Duy Thắng (2010) sử dụng phác đồ EAC 7 ngày và 14 ngày cho kết quả liền sẹo lần lượt là 93,3% và 96,7% [126].

Từ các nghiên cứu trên, chúng tôi nhận thấy việc sử dụng phác đồ bộ 3 chứa Clarithromycin tỷ lệ liền sẹo ổ loét đã giảm đáng kể so với trước, từ khoảng trên 90% nay giảm xuống còn 76,5%. Đặc biệt, khi so sánh với nghiên cứu của Nguyễn Thúy Vinh (2003) sử dụng phác đồ bộ 3 OAC cho thấy, dù thời gian điều trị ngắn hơn chúng tôi (7 ngày so với 10 ngày), với PPI khi đó chỉ là Omeprazole (PPI thế hệ 1), thuốc có tác dụng giảm tiết acid yếu hơn so với PPI thế hệ 5 là Esomeprazole (biệt dược Nexium) được chúng tôi sử dụng, nhưng tỷ lệ liền sẹo trong nghiên cứu của chúng tôi vẫn thấp hơn 76,5% so với 81,9% [60]. Như vậy dù đã sử dụng một PPI có tác dụng được cho là tốt nhất hiện nay nhưng có thể với hiện tượng *H. pylori* kháng thuốc tăng cao so với trước thì hiệu quả làm liền sẹo ổ loét của phác đồ bộ 3 vẫn giảm đi đáng kể dù đã tăng thời gian sử dụng và dùng PPI tốt hơn.

Kết quả ở bảng 3.12 cho thấy nếu diệt trừ *H. pylori* thành công thì tỷ lệ liền sẹo ổ loét là 88,2 %, nếu diệt trừ *H. pylori* thất bại thì tỷ lệ liền sẹo chỉ có 51,9%. Sự khác biệt này rất có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$ . Kết quả trên thể hiện hiệu quả liền sẹo ổ loét liên quan đến kết quả điều trị diệt trừ *H. pylori* thành công. Nếu điều trị diệt trừ *H. pylori* thành công thì khả năng liền sẹo ổ loét rất cao và ngược lại. Các kết quả nghiên cứu trước đây cho rằng có thể điều trị liền sẹo loét chỉ bằng ức chế H2 hoặc ức chế bơm proton. Tuy nhiên từ khi phát hiện vai trò của *H. pylori* đối với bệnh lý loét dạ dày tá tràng, các nhà nghiên cứu đã chứng minh điều trị diệt trừ *H. pylori* thành công có vai trò quan trọng, làm thúc đẩy nhanh thời gian làm liền sẹo ổ loét và phòng ngừa được tái phát. Treiber và Lambert đã tiến hành một nghiên cứu tổng hợp (meta-analysis) của 60 nghiên cứu khác nhau với tổng số 4329 bệnh nhân cho



thấy điều trị diệt trừ *H. pylori* thành công làm tăng tốc độ liền sẹo loét với tỷ số chênh (OR) dao động từ 4,2 đến 7,4 tùy theo thời gian theo dõi bệnh nhân từ 6 đến 12 tuần. Hơn thế nữa, diệt trừ *H. pylori* thành công sẽ làm giảm tối đa tái phát ổ loét với tỷ lệ khoảng 2,9% trong 2 năm [151]. Kết quả nghiên cứu trong nước của Nguyễn Thúy Vinh (2003) cho thấy sau điều trị *H. pylori* âm tính thì tỷ lệ liền sẹo ổ loét cao (93,9%), *H. pylori* dương tính thì tỷ lệ liền sẹo thấp (26,5%) [60]. Nghiên cứu của Vũ Thị Lừu năm 2011 cho kết quả sau điều trị nếu *H. pylori* âm tính tỷ lệ liền sẹo là 92,0% còn nếu *H. pylori* dương tính thì 100% bệnh nhân đều không liền sẹo [127]. Như vậy các kết quả này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của chúng tôi: nếu diệt trừ *H. pylori* thành công thì khả năng liền sẹo là 88,2% , trong khi đó thất bại thì tỷ lệ liền sẹo chỉ còn 51,9%. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$ .

Từ kết quả nghiên cứu trên, một lần nữa khẳng định vai trò của *H. pylori* trong cơ chế bệnh sinh của LTT. *H. pylori* gây nên sự dị thường của lớp nhày do chúng ức chế men endopeptidase dẫn đến giảm độ nhớt và tăng tính thấm acid xuống lớp niêm mạc. Ngoài ra *H. pylori* còn tiết ra các độc tố như CagA, (Cytocin associated gene A - yếu tố gây độc tế bào liên quan tới gen A), VacA (Vacuolating cytotoxin A - yếu tố độc A gây rỗng tế bào), các yếu tố hoạt hóa bạch cầu, giải phóng các chất trung gian hóa học như IL1, IL6, IL8 và các yếu tố gây hoại tử làm phù nề, long tróc tế bào biểu mô niêm mạc. Vì thế muốn nâng cao tỷ lệ liền sẹo ổ loét thì ngoài vấn đề ức chế bài tiết acid dịch vị cần kết hợp các thuốc kháng sinh có khả năng diệt trừ *H. pylori* cao, có như vậy mới đạt được hiệu quả tối ưu trong điều trị LTT.

Mặc dù đã diệt trừ *H. pylori* thành công vẫn còn có 11,8% bệnh nhân vẫn không liền sẹo ổ loét. Điều này chứng tỏ không chỉ *H. pylori* ảnh hưởng đến quá trình liền sẹo ổ loét mà còn có các yếu tố khác tác động vào quá trình này. Tình trạng tăng tiết acid, ổ loét kích thước lớn hoặc bệnh nhân có thói quen hút thuốc có thể là những nguyên nhân ảnh hưởng tới quá trình liền sẹo ổ loét [152].

**Bảng 4.3. Kết quả liền sẹo sau điều trị của các nghiên cứu**

Phác đồ	Số lượng BN	Thời gian điều trị (ngày)	Tỷ lệ liền sẹo (%)	Tác giả, năm nghiên cứu
NAC	52	7	94,2	Trần Thế Hải 2002
OAC	72	7	81,9	Nguyễn Thúy Vinh 2003
EAC	30	7	93,3	Nguyễn Duy Thắng 2010
PAC	48	10	91,7	Nguyễn Quang Duật 2010
EAC	72	14	88,9	Lê Văn Nho 2011
EAL	33	10	84,8	Vũ Thị Lừu 2011
EAC	37	10	76,5	Chúng tôi 2014

Mức độ nhiễm *H. pylori* cũng ảnh hưởng tới tỷ lệ tiết trừ thành công *H. pylori* và liền sẹo ổ loét. Kết quả bảng 3.13 cho thấy tỷ lệ liền sẹo ổ loét ở bệnh nhân nhiễm *H. pylori* mức độ nhẹ cao hơn bệnh nhân nhiễm *H. pylori* mức độ vừa và nặng. Những bệnh nhân nhiễm *H. pylori* mức độ nhẹ có tỷ lệ tiết trừ cao hơn những bệnh nhân nhiễm mức độ vừa và nặng (Bảng 3.14). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$ . Kết quả của chúng tôi cũng tương tự với kết quả nghiên cứu Lai và CS thấy tỷ lệ tiết trừ thành công *H. pylori* ở nhóm bệnh nhân nhiễm *H. pylori* nhẹ là 100% và tỷ lệ liền loét là 100%. Trong khi đó hai tỷ lệ này ở nhóm nhiễm *H. pylori* nặng tương ứng là 69,7% và 77,8% [132].

#### 4.1.5.4. Đánh giá tác dụng không mong muốn của phác đồ

Trong suốt quá trình điều trị cho các bệnh nhân, chúng tôi đã theo dõi rất chặt chẽ những tác dụng không mong muốn của phác đồ. Trong số bệnh nhân nghiên cứu có 29 trường hợp gặp phải các tác dụng không mong muốn, chiếm

tỷ lệ 17,9% và có 133 trường hợp không gặp bất cứ tác dụng không mong muốn nào chiếm tỷ lệ 82,1% (Bảng 3.15). Trong số các tác dụng không mong muốn mà bệnh nhân gặp phải, đắng miệng, buồn nôn là tác dụng không mong muốn hay gặp nhất chiếm 12,3%. Tiêu chảy có 5 bệnh nhân (3,5%), đau đầu mất ngủ 3 bệnh nhân (1,9%). Các tác dụng không mong muốn này thường xuất hiện trong vài ngày đầu điều trị, sau đó tự hết mà bệnh nhân không cần phải điều trị gì hoặc khi uống hết thuốc kháng sinh sẽ hết các triệu chứng đã nêu. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Đào Hữu Khôi và CS thấy tác dụng không mong muốn thường gặp của phác đồ EAC là đau đầu, mất ngủ, tiêu chảy, đắng miệng, trong đó đắng miệng là tác dụng không mong muốn hay gặp nhất [142]. Tuy nhiên những tác dụng không mong muốn này đều rất nhẹ và không bệnh nhân nào phải ngừng điều trị vì các tác dụng này.

Như vậy, điều trị LTT bằng phác đồ 3 thuốc EAC cho thấy thuốc dung nạp tốt, bảo đảm an toàn và không có tác dụng không mong muốn trầm trọng nào ảnh hưởng đến sức khỏe bệnh nhân. Ít tác dụng phụ cũng giúp bệnh nhân thực hiện đầy đủ liều lượng thuốc và thời gian dùng thuốc. Điều này cũng rất quan trọng giúp hiệu quả điều trị đạt được mức độ tối đa.

#### ***4.1.6. Ảnh hưởng của kháng kháng sinh đối với hiệu quả điều trị của phác đồ EAC***

Để đánh giá ảnh hưởng của kháng sinh đến hiệu quả của phác đồ điều trị đối với bệnh nhân loét hành tá tràng có nhiễm *H. pylori*, chúng tôi đánh giá ảnh hưởng của các kháng sinh đến tỷ lệ diệt trừ *H. pylori* và tỷ lệ liền sẹo ổ loét.

##### **4.1.6.1. Ảnh hưởng của kháng Clarithromycin đối với phác đồ EAC**

###### **- Ảnh hưởng của *H. pylori* kháng Clarithromycin đến diệt trừ *H.pylori***

Trong nghiên cứu của chúng tôi, khi chủng *H. pylori* nhạy cảm với Clarithromycin thì tỷ lệ diệt trừ thành công là 83,1%. Trong khi đó khi có kháng Clarithromycin thì tỷ lệ diệt trừ *H. pylori* thành công của phác đồ EAC

chỉ còn 38,5% và điều này rất có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$  (Bảng 3.16).

Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra rằng, kháng thuốc và đặc biệt là kháng Clarithromycin là một yếu tố quan trọng nhất ảnh hưởng đến khả năng diệt trừ *H. pylori* và là nguyên nhân làm thất bại điều trị của các phác đồ chứa Clarithromycin [153],[154]. Từ kết quả nghiên cứu, chúng tôi nhận thấy việc lựa chọn kháng sinh trước điều trị có vai trò rất quan trọng, ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng diệt trừ vi khuẩn từ đó ảnh hưởng đến hiệu quả điều trị của phác đồ. Vì vậy với tình hình *H. pylori* kháng thuốc biến đổi theo khu vực và thời gian khác nhau thì việc xác định tính nhạy cảm kháng sinh của *H. pylori* trước điều trị là rất cần thiết và nên được thực hiện một cách thường qui hơn ở các cơ sở y tế, từ đó lựa chọn được kháng sinh nhạy cảm nhất với vi khuẩn, theo dõi được khả năng kháng thuốc một cách chính xác, nâng cao hiệu quả điều trị của phác đồ hơn.

Cũng từ bảng kết quả 3.16 chúng tôi nhận thấy nhóm bệnh nhân nhạy cảm với Clarithromycin vẫn còn 15 bệnh nhân không diệt trừ được *H. pylori* (chiếm tỷ lệ 16,9%), ngược lại ở nhóm bệnh nhân đề kháng với Clarithromycin vẫn có 20 bệnh nhân diệt trừ được *H. pylori* (chiếm tỷ lệ 38,5%). Như vậy với kết quả kháng thuốc kháng sinh trong phòng thí nghiệm (invitro) không có nghĩa là không diệt được *H. pylori* trên cơ thể bệnh nhân (invivo) và ngược lại. Không phải cứ nhạy cảm với kháng sinh trong phòng thí nghiệm thì diệt trừ được hoàn toàn *H. pylori* trong cơ thể người bệnh. Điều này đòi hỏi khi điều trị loét dạ dày tá tràng, các bác sĩ lâm sàng ngoài việc sử dụng đúng, đủ phác đồ theo nguyên tắc chung còn cần phải quan tâm đến tính chất cá thể của từng bệnh nhân.

- Ảnh hưởng của *H. pylori* kháng Clarithromycin đến khả năng làm liền sẹo ổ loét.

*H. pylori* kháng thuốc còn làm giảm khả năng liền sẹo ổ loét. Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.18 cho thấy tỷ lệ liền sẹo ở nhóm bệnh nhân nhạy cảm

với Clarithromycin là 79/89 bệnh nhân (88,8%), trong khi đó ở nhóm bệnh nhân kháng với Clarithromycin thì tỷ lệ liền sẹo chỉ có 29/52 bệnh nhân (55,8%). Như vậy *H. pylori* kháng Clarithromycin trước điều trị đã làm giảm khả năng liền sẹo ổ loét, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$ . Kết quả cho thấy nếu không diệt trừ được *H. pylori* thì giảm khả năng làm liền sẹo ổ loét. Cũng từ bảng kết quả 3.18, nhóm bệnh nhân nhạy cảm với kháng sinh vẫn còn 10 bệnh nhân không liền sẹo, trong khi đó ở nhóm bệnh nhân đề kháng kháng sinh vẫn có đến 29 bệnh nhân liền sẹo. Như vậy có thể thấy việc làm liền sẹo ổ loét không hoàn toàn phụ thuộc vào tác dụng diệt trừ *H. pylori* của kháng sinh mà còn phụ thuộc vào tác dụng ức chế bài tiết acid của PPI trong phác đồ. Nexium là một thuốc PPI có cấu tạo dưới dạng vi hạt, có khả năng thấm tốt qua lớp chất nhầy và đưa pH dịch vị từ 2 lên 5 đã gây bất lợi cho vi khuẩn, đồng thời tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình làm liền sẹo ổ loét và diệt trừ *H. pylori*. Vì thế trong nhóm bệnh nhân nghiên cứu của chúng tôi, dù tỷ lệ diệt trừ *H. pylori* chỉ đạt 67,9% nhưng tỷ lệ liền sẹo vẫn còn ở mức 76,5%.

#### 4.1.6.2. Ảnh hưởng của kháng Amoxicillin đối với phác đồ EAC

Amoxicillin là một trong các thuốc kháng sinh được sử dụng thường xuyên trong phác đồ điều trị kháng sinh *H. pylori*. Do đề kháng kháng sinh được cho là nguyên nhân chính điều trị diệt trừ *H. pylori* thất bại. Do vậy, Amoxicillin là một trong những kháng sinh được sử dụng nhiều trong điều trị diệt trừ *H. pylori* cũng được nghiên cứu về cơ chế *H. pylori* kháng kháng sinh này. Cơ chế hoạt động của Amoxicillin dựa trên việc  $\beta$  lactams và dipeptide D-Alanyl. D-Alanine bình thường được chuyển hoá và hợp nhất với peptidoglycan, một thành phần chính của tế bào. Chính Amoxicillin ức chế lên sự tổng hợp của peptidoglycan dẫn đến làm khiếm khuyết màng tế bào và cũng làm chuyển dạng bình thường của *H. pylori* sang dạng hình cầu. Khi có kháng với Amoxicillin người ta thấy có hiện tượng không hoạt động của men

$\beta$  lactams [155]. Tuy nhiên, các kết quả cho thấy tỷ lệ lưu hành của vi khuẩn kháng thuốc thay đổi rất khác nhau tùy theo từng vùng địa lý. Tại châu Âu tỷ lệ kháng Amoxicillin thấp, dao động từ 0 - 0,9% [156]. Tỷ lệ này ở Mỹ là 0,9 - 2% [157]. Tại châu Á, tỷ lệ kháng có sự dao động lớn tùy theo tác giả: Iran, một nước ở tây Á có tỷ lệ kháng là 2,4% ở người lớn và 5,9% ở trẻ em [158]; ở Hồng Kông, Gu Q. và cs thấy tỷ lệ kháng là 0% [159]. Tỷ lệ *H. pylori* kháng Amoxicillin tại Hàn Quốc tương đối cao so với các nước trong khu vực, theo Bang S.Y. và CS, Kim J.M. và CS tỷ lệ kháng là 11,8 - 18,5% [160],[161]. Một nghiên cứu ở châu Phi đưa ra tỷ lệ kháng Amoxicillin rất cao tới 85,6% [57]. Ở Việt Nam, năm 1997 tại Thành phố Hồ Chí Minh, Lục Thị Vân Bích đo đường kính vòng kháng khuẩn ở 9/29 chủng *H. pylori* tương ứng với MIC từ 4 đến 16  $\mu\text{g/ml}$ , tác giả tạm kết luận rằng *H. pylori* gần như đề kháng 100% với Amoxycillin [58]. Trong khi đó, từ những năm 1998 - 2000 Phan Quốc Hoàn, Tạ Long và CS (1998) lại thấy không có hiện tượng kháng đối với Amoxycillin [59].

Năm 2003 tác giả Nguyễn Thúy Vinh công bố tỷ lệ kháng Amoxicillin là 18,1% [60]. Tỷ lệ này sau 7 năm (2010) tác giả Nguyễn Văn Thịnh đã thấy tăng lên 23,7% [135]. Nghiên cứu của chúng tôi có kết quả tương tự của tác giả Nguyễn Văn Thịnh với tỷ lệ kháng Amoxicillin là 24,6% (Bảng 3.7). Tỷ lệ này cao hơn nhiều so với châu Âu, Mỹ, Tây Á, Hồng Kông, Nhật Bản và cao hơn chút ít so với Hàn Quốc. Tỷ lệ *H. pylori* kháng Amoxicillin cao trong nghiên cứu này có thể do tình trạng sử dụng kháng sinh trong cộng đồng không theo chỉ định chặt chẽ. Mặt khác, kháng sinh này lại được dùng tương đối phổ biến để điều trị các bệnh nhiễm trùng khác như nhiễm trùng hô hấp, tiết niệu, mô mềm..... Một yếu tố khác cũng có thể là nguyên nhân gây nên tình trạng kháng thuốc do bệnh nhân không tuân thủ đầy đủ thời gian điều trị bằng kháng sinh. Trong nghiên cứu của chúng tôi, nhóm bệnh nhân nhạy cảm với kháng sinh Amoxicillin thì tỷ lệ diệt trừ *H. pylori* cao hơn nhóm bệnh nhân

kháng Amoxicillin (68,4% so với 59,3%). Tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$  (Bảng 3.17). So sánh với Clarithromycin, tỷ lệ nhạy cảm với Amoxicillin còn cao là 75,4% (Bảng 3.8). Như vậy, mức độ kháng Amoxicillin trong nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với nhiều nghiên cứu cho thấy Amoxicillin là kháng sinh ít kháng hơn Clarithromycin. Gần đây, Amoxicillin vẫn được sử dụng diệt *H. pylori* nhưng với liều cao trong phác đồ hai thuốc liều cao (high dose dual therapy- HDDT). Trong đó Amoxicillin có liều 1g 3 lần/ngày hoặc 750mg dùng 4 lần/ngày và PPI 3 lần liều cơ bản trong thời gian 14 ngày. Nghiên cứu Yang và CS ở 829 bệnh nhân so sánh hiệu quả và tác dụng phụ của phác đồ hai thuốc liều cao (HDDT) và phác đồ 4 thuốc có Bismuth (BQT) thấy hiệu quả diệt trừ *H. pylori* và dung nạp thuốc ở hai nhóm tương tự nhưng tác dụng phụ ở phác đồ hai thuốc liều cao ít hơn phác đồ 4 thuốc có Bismuth [162].

#### **4.2. Xác định tình trạng tái phát hay tái nhiễm *Helicobacter pylori* sau điều trị diệt trừ thành công, bằng kỹ thuật PCR-RFLP và PCR giải trình tự xác định gen *UreC***

##### **4.2.1. Tỷ lệ tái xuất hiện *H. pylori* sau điều trị diệt trừ thành công**

Tiệt trừ *H. pylori* thành công giúp phòng ngừa các bệnh lý liên quan *H. pylori*, tuy nhiên theo thời gian hiệu quả của các phác đồ điều trị bị suy giảm do gia tăng tình trạng *H. pylori* kháng kháng sinh [163]. Chính vì vậy, tình trạng tái xuất hiện của *H. pylori* hiện nay vẫn là vấn đề khó giải quyết và các yếu tố ảnh hưởng đến tình trạng này thu hút nhiều sự chú ý của các nhà nghiên cứu. Nghiên cứu của chúng tôi cũng đánh giá sự tái xuất hiện của vi khuẩn tại các thời điểm trước và sau điều trị diệt trừ trong vòng 1 năm và sau 1 năm.

Có 303 bệnh nhân loét tá tràng có *H. pylori* dương tính được điều trị bằng phác đồ EAC. Sau 45 ngày điều trị có 162 bệnh nhân quay lại khám, nội soi dạ dày đánh giá kết quả điều trị. Trong số đó, có 110 bệnh nhân diệt trừ *H. pylori* thành công chiếm 67,9% (110/162) (Sơ đồ 3.1). Trong số 162 bệnh

nhân đến khám lần 2 chỉ có 52 bệnh nhân đã tiết trừ *H. pylori* thành công tiếp tục tái khám lần 3 vào các thời điểm 6 tháng đến 12 tháng và sau 12 tháng. Thời gian theo dõi sau điều trị tiết trừ *H. pylori* ngắn nhất là 6 tháng và dài nhất là 31 tháng. Một khó khăn khi tiến hành nghiên cứu mà chúng tôi gặp phải là bệnh nhân quay lại tái khám theo hẹn không đầy đủ. Do đó, số lượng bệnh nhân theo dõi trong thời gian dài nhằm đánh giá tình trạng tái nhiễm hay tái phát *H. pylori* cũng như tái phát ổ loét không nhiều.

Theo số liệu bảng 3.20, trong số bệnh nhân đã điều trị tiết trừ *H. pylori* thành công đến tái khám lần 3 có 67,3% bệnh nhân đến khám trong vòng 1 năm (tại các thời điểm từ 6 tháng đến 12 tháng). 32,7% bệnh nhân đến khám sau 1 năm. Số lượng bệnh nhân đến tái khám giảm dần theo thời gian.

Số liệu ở bảng 3.21 cho thấy, tỷ lệ bệnh nhân tái xuất hiện *H. pylori* (recurrence) ở các bệnh nhân đã tiết trừ *H. pylori* thành công là 38,5%. Tỷ lệ này cao hơn so với các nghiên cứu đã công bố trước đây tại Việt Nam. Tác giả Nguyễn Duy Thắng theo dõi sau 6 tháng tỷ lệ nhiễm *H. pylori* là 10,7% ở nhóm bệnh nhân điều trị bằng phác đồ EAC 1 tuần [126]. Sự khác biệt này có thể lý giải bằng khoảng thời gian theo dõi dài hơn thì tỷ lệ tái xuất hiện *H. pylori* cao hơn. Nghiên cứu phối hợp với các chuyên gia Thụy Điển thực hiện ở các bệnh nhân Việt Nam vào năm 2005 thấy tỷ lệ tái xuất hiện *H. pylori* là 23,5% ở các bệnh nhân đã tiết trừ *H. pylori* thành công. Tuy nhiên nghiên cứu này thực hiện cách đây nhiều năm khi tình trạng kháng kháng sinh đặc biệt là Clarithromycin và Amoxicillin- là các kháng sinh trong phác đồ điều trị đầu tay chưa bị kháng nhiều như thời điểm hiện nay [113].

Kết quả tái xuất hiện *H. pylori* sau điều trị tiết trừ thành công trong nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với xu hướng mà nhiều nghiên cứu nhận thấy là tỷ lệ này thấp ở các nước phát triển và cao hơn nhiều ở các nước đang phát triển [164],[7]. Niv và CS đã tiến hành một phân tích tổng hợp đánh giá tỷ lệ tái xuất hiện *H. pylori* ở các nước phát triển và đang phát triển với 10



nghiên cứu ở các nước phát triển và 7 nghiên cứu ở các nước đang phát triển. Kết quả cho thấy tỷ lệ tái xuất hiện *H. pylori* hàng năm ở các nước phát triển là 2,7% và ở các nước đang phát triển là 12% [9]. Một nghiên cứu tại Chi lê theo dõi thời gian trung bình là 37,2 tháng thấy tỷ lệ bệnh nhân tái xuất hiện *H. pylori* theo thời gian tại thời điểm 1 năm, 2 năm, 3 năm lần lượt là 8%, 11% và 13% [165]. Tại Mexico, tỷ lệ tái xuất hiện *H. pylori* một năm sau điều trị triệt trừ là 15% [166]. Trong nghiên cứu tỷ lệ tái xuất hiện *H. pylori* ở đối tượng nghiên cứu là người lớn, tỷ lệ này được báo cáo là 30% tại Peru và 13% tại Bangladesh [167],[112]. Ngược lại, ở các nước phát triển có tỷ lệ tái xuất hiện *H. pylori* rất thấp. Tại Nhật Bản, Adachi và CS thấy sau triệt trừ thành công *H. pylori* ở 337 bệnh nhân được theo dõi bằng nội soi và test thở ure hàng năm thấy 4 bệnh nhân (1,2%) có *H. pylori* dương tính sau 1 năm. Sau 2 năm có 2 bệnh nhân (1,5%) có *H. pylori* dương tính trong số 133 bệnh nhân được theo dõi [168]. Tại Tây Ban Nha, nghiên cứu của Rodríguez và CS có tỷ lệ tái xuất hiện *H. pylori* trong năm đầu tiên là 6,7%, năm thứ hai và năm ba, năm thứ tư lần lượt là 1,9%; 1,0% và 0% [169]. Bảng 3.22 cho thấy tỷ lệ tái xuất hiện *H. pylori* trong thời gian nhỏ hơn và bằng 1 năm và trên 1 năm tháng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,01$ .

Biểu đồ 3.3 phân tích tỷ lệ bệnh nhân có test *H. pylori* dương tính trở lại sau triệt trừ thành công bằng đồ thị Kaplan - Meier theo dõi trong thời gian trên 1 năm cho thấy tỷ lệ tái xuất hiện *H. pylori* là 1,02% năm. Tỷ lệ này cao hơn so với nghiên cứu tại Hàn Quốc của Ji Hung Nam và cộng sự thấy tỷ lệ tái xuất hiện *H. pylori* là 0,91%/năm với thời gian theo dõi 5 năm ở 647 bệnh nhân [170]. Tại Nhật Bản, Susumu Take và CS tiến hành theo dõi 1609 bệnh nhân sau triệt trừ *H. pylori* thành công với thời gian trung bình là 4,7 năm thấy tỷ lệ tái dương tính với *H. pylori* là 0,33% [67]. Lý giải sự khác biệt tỷ lệ này có hai lý do. Thứ nhất, tỷ lệ nhiễm *H. pylori* tại Việt nam trước điều trị cao hơn. Thứ hai, thiết kế nghiên cứu của chúng tôi có cỡ mẫu nhỏ hơn nhiều so

với thiết kế của hai nghiên cứu trên. Do đó, để có số liệu có ý nghĩa lâm sàng và thống kê hơn về nhiễm *H. pylori* hàng năm, trong tương lai chúng ta cần có nghiên cứu với số lượng bệnh nhân tái khám sau điều trị lớn hơn.

#### **4.2.2. Tỷ lệ tái phát ổ loét tá tràng**

Tỷ lệ loét hành tá tràng ở lần khám thứ 3 trong nghiên cứu của chúng tôi là 28,8% (sơ đồ 3.2) bao gồm những bệnh nhân đã tiết trừ *H. pylori* đã liền loét và chưa liền loét. Trong đó, những bệnh nhân đã liền loét nhưng lại loét tái phát có tỷ lệ 26,1% (12/46). Tỷ lệ loét sau tiết trừ *H. pylori* trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn tỷ lệ của các nghiên cứu đã công bố trước đây. Tác giả Nguyễn Duy Thắng thấy tỷ lệ loét tái phát sau 6 tháng là 3,6% [126]. Nghiên cứu của Wheeldon và CS tại Việt Nam thấy tỷ lệ bệnh nhân tiết trừ *H. pylori* thành công tái phát ổ loét là 10,2% (15/147). Các báo cáo khác có tỷ lệ loét tái phát 2-13% ở các nước công nghiệp và 2,7%-9% ở các nước đang phát triển [113]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, nhóm bệnh nhân nghiên cứu thường tái khám khi có triệu chứng đau. Có lẽ đây là nguyên nhân khiến tỷ lệ có loét trong nhóm nghiên cứu của chúng tôi cao hơn tỷ lệ loét ở các nghiên cứu có bệnh nhân đến tái khám theo hẹn mặc dù không có triệu chứng.

Đánh giá sự liên quan giữa tái xuất hiện *H. pylori* sau điều trị tiết trừ và loét tái phát sau thời gian dài theo dõi chúng tôi thấy 65% bệnh nhân nhiễm *H. pylori* có loét tái phát (Bảng 3.23). Bệnh nhân *H. pylori* dương tính trở lại sau điều trị tiết trừ có nguy cơ loét tái phát cao gấp 27,85 lần so với bệnh nhân có *H. pylori* âm tính. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$ . Tỷ lệ loét ở bệnh nhân tái xuất hiện *H. pylori* trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn tỷ lệ này trong nghiên cứu của Wheeldon và CS (65% so với 22,9%) nhưng tương tự nghiên cứu của Fernandes và CS thấy 2/3 số bệnh nhân tái xuất hiện *H. pylori* có loét tái phát [171]. Tuy nhiên, chúng tôi vẫn thấy có loét tái phát ở bệnh nhân không tái xuất hiện *H. pylori* với tỷ lệ là 6,3% giống với nghiên cứu của Wheeldon và CS [113]. Seo JH và CS thấy tỷ lệ loét dạ

dày tá tràng tái phát ở những bệnh nhân có *H. pylori* âm tính là 36,4% khi theo dõi 553 bệnh nhân trong thời gian 5 năm. Theo tác giả này, các yếu tố khác ảnh hưởng đến tình trạng loét tái phát là tuổi cao, giới tính nam, có bệnh thận mạn tính kèm theo [172].

#### **4.2.3. Kết quả phân biệt tái phát và tái nhiễm *H. pylori* sau điều trị diệt trừ *H. pylori* thành công**

Trong nghiên cứu của chúng tôi, 52 bệnh nhân đã diệt trừ thành công *H. pylori* đến khám lần 3, trong đó có 20 bệnh nhân tái xuất hiện *H. pylori* (Bảng 3.21). Chỉ có 18 trong 20 bệnh nhân có thể phân tích PCR-RFLP của gen *UreC* trực tiếp từ mẫu sinh thiết trước và sau điều trị diệt trừ nhằm so sánh giống và khác nhau giữa các chủng để khẳng định bệnh nhân nhiễm chủng *H. pylori* đã nhiễm trước điều trị (tái phát) hay nhiễm chủng hoàn toàn mới (tái nhiễm).

4.2.3.1. Kết quả phân biệt tái phát và tái nhiễm *H. pylori* bằng kỹ thuật PCR-RFLP xác định gen *UreC*

4.2.3.1.1. Kết quả của phương pháp chẩn đoán *H. pylori* bằng xác định gen *UreC*

Hiện nay có nhiều phương pháp chẩn đoán *H. pylori* nhưng tiêu chuẩn vàng để chẩn đoán vẫn là nuôi cấy vi khuẩn. Tuy nhiên, đối với vi khuẩn “khó tính” như *H. pylori* phương pháp nuôi cấy rất phức tạp đòi hỏi nhiều thời gian và chi phí cao. Với sự phát triển của các kỹ thuật sinh học phân tử phát hiện DNA, đồng thời nhờ sự phát triển trong việc xác định các cặp mồi đặc hiệu (specific primers) dựa vào các gen bảo thủ (house keeping gene) như *UreA*, *UreC*, 16S rRNA thì phương pháp PCR chẩn đoán *H. pylori* được khuyến cáo sử dụng trong chẩn đoán vì có độ chính xác cao. Đặc biệt gen *UreC* là một gen cần thiết cho sự phát triển của thành tế bào và sự phát triển của *H. pylori* nên *UreC* được sử dụng rộng rãi trong các nghiên cứu để xác định nhiễm *H. pylori* với độ nhạy và độ đặc hiệu cao [114]. Trong nghiên cứu của chúng tôi,

bằng phương pháp PCR, có 36 mẫu sinh thiết dạ dày của 18 bệnh nhân (trước điều trị và sau điều trị) được phân tích đoạn DNA 820 cặp bazơ của gen *UreC*. Kết quả PCR cho thấy tất cả các mẫu đều cho sản phẩm gen *UreC* với 820bp (Hình 3.2 và phụ lục 1). Như vậy, 100% mẫu trong nghiên cứu của chúng tôi được chẩn đoán *H. pylori* bằng phương pháp PCR đều có kết quả dương tính. Kết quả này tương tự nghiên cứu của Silvia và CS sử dụng phương pháp PCR xác định gen *UreC* của *H. pylori* từ 141 mẫu sinh thiết dạ dày cũng thấy kết quả 100% dương tính tương đương với phương pháp nuôi cấy [114]. Bảng 3.27 cho thấy số kiểu RFLP sau khi cắt bằng enzyme giới hạn là 13 kiểu RFLP khi dùng enzyme cắt *Hha* I, 7 kiểu khi dùng enzyme cắt *Hind* III, 2 kiểu khi dùng enzyme cắt *Mbo* I. Với việc sử dụng đồng thời nhiều enzyme giới hạn sẽ tạo ra một kiểu hình phổ điện di đặc thù đối với từng gen phân tích. Kết quả cho nhiều kiểu hình phổ điện di phản ánh tính đa dạng về kiểu gen của chủng *H. Pylori* trong nhóm nghiên cứu. Kết quả của chúng tôi cũng tương tự nghiên cứu của Jeen và CS đã sử dụng phương pháp PCR-RFLP nhằm phân biệt nhiễm và tái nhiễm vi khuẩn *H. pylori* trên bệnh nhân loét tá tràng khi phân tích kiểu gen của *UreC* với 3 enzyme cắt hạn chế *Hha* I, *Mbo* I và *Hind* III) đã cho kết quả số lượng kiểu gen lần lượt là 13, 7 và 2 [173].

#### 4.2.3.1.2. Kết quả tái phát *H. pylori*

Phương pháp PCR- RFLP xác định chủng *H. pylori* là một trong hai phương pháp được sử dụng trong nghiên cứu của chúng tôi. Sản phẩm PCR của các mẫu bệnh phẩm được khuếch đại sau đó cắt bằng các enzyme giới hạn *Hha* I, *Mbo* I và *Hind* III. Kết quả 36 mẫu điện di (Hình 3.4-3.5-3.6) cho thấy 5/18 cặp có kiểu RFLP giống nhau (tái phát) chiếm tỷ lệ 27,8% và 13/18 cặp có kiểu RFLP khác nhau (tái nhiễm) chiếm tỷ lệ 72,2% (Bảng 3.28). Kết quả nghiên cứu này phù hợp với nhận xét là tỷ lệ tái nhiễm ở các nước đang phát triển cao hơn ở các nước phát triển.

Ở các nước đã phát triển, số liệu của một số nghiên cứu tiến hành tại châu Âu, khi so sánh các chủng *H. pylori* trước và sau điều trị bằng kỹ thuật sinh học phân tử, các tác giả thấy 80% bệnh nhân tái xuất hiện *H. pylori* là chủng giống với chủng nhiễm trước khi điều trị [7],[174]. Nhiều nghiên cứu đã thấy rằng tỷ lệ tái xuất hiện *H. pylori* trong thời gian từ 3 đến 12 tháng sau điều trị tiệt trừ do tái phát vi khuẩn này. Những trường hợp bệnh nhân âm tính với *H. pylori* 1 năm sau điều trị được coi là tiệt trừ thành công và không có tái phát. Susumu Take và CS trong nghiên cứu đã theo dõi 1609 người bệnh sau tiệt trừ *H. pylori* với thời gian trung bình 4,7 năm thấy 10 bệnh nhân tái xuất hiện *H. pylori* được so sánh chủng nhiễm trước và sau điều trị bằng phương pháp RAPD. Kết quả cho thấy tỷ lệ tái xuất hiện *H. pylori* là 1,6% và một nửa trong số đó xuất hiện trong năm đầu tiên và phần lớn là tái phát [175]. Cũng như Susumu Take và CS, Okimoto và CS cũng nhận thấy rằng các chủng *H. pylori* tái xuất hiện ở giai đoạn sớm sau tiệt trừ (thời điểm 6 tháng) đều là các chủng giống chủng nhiễm trước điều trị. Trong khi đó các chủng *H. pylori* tái xuất hiện ở các giai đoạn theo dõi muộn hơn đều khác với chủng nhiễm trước điều trị [175],[111].

Trong nghiên cứu của chúng tôi thấy có 5 bệnh nhân tái phát (Bảng 3.25). Tuy nhiên không phải tất cả các trường hợp tái phát đều gặp tại thời điểm trong vòng một năm sau điều trị. Có 3 bệnh nhân có tái phát trong vòng 1 năm (2 bệnh nhân tái phát tại thời điểm 6 tháng và 1 bệnh nhân tại 12 tháng). Còn lại 2 bệnh nhân tái phát sau 12 tháng (thời điểm 13 tháng và 31 tháng). Hiện tượng tái phát sau thời gian 1 năm tiệt trừ *H. pylori* cũng được công bố trong kết quả nghiên cứu của Raymond và CS phân tích kiểu gen của các chủng vi khuẩn của 3 bệnh nhân được theo dõi từ 1 đến 8 năm thấy có 1 bệnh nhân tái phát sau 1 năm và 1 bệnh nhân tái phát sau 3 năm [68]. Mặc dù cùng nhiễm một chủng giống nhau trước và sau điều trị tiệt trừ, đặc biệt sau một thời gian dài theo dõi cũng chưa thể loại trừ bệnh nhân tái xuất hiện chủng vi khuẩn này từ

cùng một nguồn lây như từ các thành viên khác trong gia đình hoặc bạn đời. Giả thiết này đã được Schutze K và CS đưa ra trong nghiên cứu của mình [94].

Có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến tỷ lệ tái phát *H. pylori* với bằng chứng trong nhiều nghiên cứu bao gồm:

- Hiệu quả của phác đồ điều trị và tuân thủ điều trị là yếu tố được đề cập đầu tiên. Tỷ lệ tái phát *H. pylori* tỷ lệ nghịch với tỷ lệ diệt trừ thành công vi khuẩn này: tỷ lệ diệt trừ thấp thì tỷ lệ tái phát cao. Gisbert và CS tổng kết 1000 bệnh nhân ở hai nhóm được điều trị bằng hai phác đồ có tỷ lệ diệt trừ *H. pylori* thấp và tỷ lệ diệt trừ cao. Nhóm 1 dùng hai phác đồ omeprazole kết hợp amoxicillin hoặc omeprazole kết hợp amoxicillin và metronidazole có tỷ lệ diệt trừ tương ứng là 32% và 56%. Nhóm 2 dùng hai công thức omeprazole kết hợp clarithromycin và/hoặc amoxicillin hoặc metronidazole; bismuth subcitrate, tetracycline chlorhydrate và metronidazole có tỷ lệ diệt trừ tương ứng là 85% và 77%). Kết quả theo dõi sau 1 năm thấy tỷ lệ tái phát của nhóm 1 cao hơn tỷ lệ tái phát của nhóm 2 (11.3% và 4.7%,  $P = 0.006$ ) [64]. Nghiên cứu tương tự tại Hàn Quốc, Kim SY và CS đã theo dõi nhóm bệnh nhân điều trị bằng phác đồ 3 thuốc có tỷ lệ diệt trừ thành công là 79.9% và phác đồ 4 thuốc có tỷ lệ thành công 90.4%. Theo dõi 2 nhóm bệnh nhân này trong 1 năm thấy tỷ lệ tái xuất hiện *H. pylori* tương ứng là 9.3% và 4.5% ( $P < 0.05$ ) [62]. Tuy nhiên sự khác biệt về tỷ lệ kháng kháng sinh còn tùy thuộc từng khu vực. Một số nghiên cứu lại đưa ra quan điểm trái ngược với ý kiến cho rằng phác đồ điều trị không thành công thường đi kèm với tỷ lệ tái phát cao. Zullo và Carta cùng cộng sự thấy rằng không có sự khác biệt về tỷ lệ tái xuất hiện vi khuẩn này giữa các bệnh nhân được điều trị bằng hai loại thuốc (hiệu quả điều trị thấp) và bệnh nhân được điều trị với phác đồ 3 loại thuốc (hiệu quả cao hơn) [176],[177].

- Yếu tố tính chính xác của phương pháp chẩn đoán *H. pylori* sau điều trị diệt trừ cũng có ảnh hưởng tới xác định tỷ lệ tái phát vi khuẩn này sau diệt trừ.

Các phương pháp chẩn đoán *H. pylori* có các ưu nhược điểm riêng để chẩn đoán *H. pylori*. Rõ ràng các phương pháp có độ nhạy thấp (cho kết quả âm tính giả nhiều) sẽ làm ảnh hưởng đến việc xác định kết quả tiết trừ. Ví dụ, xét nghiệm test urease nhanh có thể âm tính giả nếu mẫu bệnh phẩm lấy ở bệnh nhân có viêm teo hoặc dị sản ruột. Trong trường hợp này lấy mẫu xét nghiệm ở thân vị dạ dày làm xét nghiệm nhuộm giema chẩn đoán *H. pylori* có kết quả chính xác hơn [178],[179]. Chính vì vậy, nên có hai phương pháp để xác định *H. pylori* sau điều trị tiết trừ. Nghiên cứu của chúng tôi áp dụng phương pháp test urease nhanh và mô bệnh học để xác định nhiễm *H. pylori* sau điều trị tiết trừ và sau thời gian theo dõi định kỳ giúp chẩn đoán chính xác tình trạng nhiễm *H. pylori* và giảm tỷ lệ kết quả âm tính giả sau điều trị.

- Vai trò *H. pylori* tồn tại ở thể cầu (cocoid form)

*H. pylori* có khả năng khi gặp môi trường không thuận lợi chuyển thành trạng thái vẫn sống được nhưng không nuôi cấy được hay còn gọi là thể VBNC (viable but not culture- VBNC). Một số loại vi khuẩn có khả năng biến đổi để vẫn sống được nhưng không nuôi cấy được để thích nghi với điều kiện môi trường khó sống sót và phát triển như *Samonella*, *Campylobacter* và *Escherichia*. Với hình thức sống được nhưng không nuôi cấy được, các vi khuẩn sẽ giảm kích thước thành các thể hình cầu nhỏ, hạn chế hô hấp và trao đổi chất, thay đổi biểu hiện của gen và tổng hợp phân tử. Phương pháp nuôi cấy thông thường sẽ không phát hiện được vi khuẩn ở trạng thái này. Tuy nhiên khi các điều kiện môi trường thay đổi, các vi khuẩn thể cầu hoặc hồi sinh và trở lại trạng thái hoạt động hoặc thoái hóa. *H. pylori* cũng có cơ chế thích nghi tương tự như vậy. Vi khuẩn này thay đổi từ trạng thái hoạt động hình que sang trạng thái sống được nhưng không nuôi cấy được từ đó dẫn đến thay đổi hình thái vi khuẩn và chuyển hóa, cách thức phát triển [76]. Khi quan sát các mẫu sinh thiết ở dạ dày và tá tràng, Noach và CS đã phát hiện có sự tồn tại của thể cầu ở cả dạ dày và tá tràng, tỷ lệ thể cầu ở tá tràng nhiều hơn ở

dạ dày [78]. Để lý giải điều này, giả thiết được ra là *H. pylori* cố gắng thích ứng với điều kiện sinh học ở tá tràng hoặc tá tràng là môi trường lý tưởng để *H. pylori* ẩn náu với trạng thái sống được nhưng không nuôi cấy được (VBNC) [76]. Dựa trên cơ sở đặc tính này, các nghiên cứu cho các phác đồ điều trị diệt trừ *H. pylori* ở dạng hình que (bacillary form) có thể làm cho vi khuẩn này biến đổi thành dạng hình cầu (cocoid form). Với hình thái thể cầu, *H. pylori* có thể sống sót một thời gian dài trong môi trường dạ dày tá tràng và có thể là nguyên nhân trực tiếp hoặc gián tiếp tái phát vi khuẩn này hay nói một cách khác là điều trị thất bại với biểu hiện là vi khuẩn tái xuất hiện, tái phát viêm loét dạ dày tá tràng. Vì vậy, diệt trừ thành công không chỉ diệt trừ thể hình que của *H. pylori* mà cả thể cầu của vi khuẩn này hoặc chắc chắn rằng không có thể cầu được tạo ra [76].

#### 4.2.3.1.3. Kết quả tái nhiễm *H. pylori*

Nghiên cứu của chúng tôi cũng có tỷ lệ tái nhiễm là 72,2% (Biểu đồ 3.4), cao hơn tỷ lệ tái phát tương tự như nghiên cứu của Okimoto và CS tại Nhật Bản. Các tác giả theo dõi 274 bệnh nhân có 15 bệnh nhân xuất hiện nhiễm *H. pylori* sau 6 tháng diệt trừ vi khuẩn này. Theo dõi trong thời gian 1 năm đến 6 năm thấy tỷ lệ tái xuất hiện vi khuẩn *H. pylori* là 2.0% bệnh nhân năm. So sánh các chủng nhiễm ban đầu và chủng tái xuất hiện sau diệt trừ bằng kỹ thuật PCR- RFLP xử lý bằng các enzyme cắt *Hha* I, *Mbo*I và *Hind* III các tác giả thấy 62.5% bệnh nhân (tại thời điểm 6 tháng) và 100% (thời điểm sau 1 năm) là các chủng khác nhau hay còn gọi là tình trạng tái nhiễm [111]. Một nghiên cứu gần đây cũng tại Nhật Bản, Susumu Take và CS lại thấy tỷ lệ tái xuất hiện *H. pylori* thấp 0,22%/ năm và ở các bệnh nhân có chủng phân lập được đều là tái nhiễm [175].

Với kết quả tỷ lệ tái nhiễm cao theo dõi sau điều trị diệt trừ, nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự với kết quả tiến hành ở các nước đang phát triển. Nghiên cứu của Leal- Herrera và CS tại Mexico thấy rằng 75% các chủng tái



xuất hiện ở các bệnh nhân sau điều trị tiệt trừ là tái nhiễm thực sự [166]. Tại Peru, Gisselle Soto và CS so sánh các chủng *H. pylori* bị nhiễm trước và sau điều trị ở 28 bệnh nhân có thời gian theo dõi trung bình 15,6 tháng thấy có 21% là tái phát và 79% là tái nhiễm [167]. So sánh với nghiên cứu của Wheeldon và CS tiến hành nghiên cứu các bệnh nhân loét dạ dày tá tràng tại Việt Nam, tỷ lệ tái nhiễm trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn (72,2% so với 58.8%) [113]. Tại các thời điểm theo dõi dưới 1 năm và trên 1 năm chúng tôi thấy tỷ lệ bệnh nhân tái nhiễm chiếm tỷ lệ lần lượt là 75% và 66,7% (Bảng 3.25) không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,01$ .

Tỷ lệ tái nhiễm cao hơn tái phát trong nghiên cứu của chúng tôi có thể lý giải bằng một trong các yếu tố ảnh hưởng đến tỷ lệ tái nhiễm *H. pylori* là khoang miệng của chính bệnh nhân có thể là nơi trú ngụ của *H. pylori* và là nguồn tái nhiễm vi khuẩn này. Một phân tích tổng hợp của Zou và CS vào năm 2011 cho thấy tỷ lệ nhiễm *H. pylori* trong khoang miệng ở những bệnh nhân viêm dạ dày có nhiễm *H. pylori* cao hơn đáng kể so với bệnh nhân có *H. pylori* âm tính trong dạ dày với tỷ lệ tương ứng 45% vs 23.9% (OR 3.61,  $P < 0,0001$ ). Hiệu quả tiệt trừ *H. pylori* trong dạ dày và trong khoang miệng tương ứng là 85.8% và 5.7% (OR 55.59,  $P < 0,00001$ ). Điều này chứng tỏ phác đồ tiệt trừ *H. pylori* cư trú trong dạ dày ít hiệu quả đối với *H. pylori* cư trú trong khoang miệng [180]. Như vậy, vi khuẩn này vẫn có thể tồn tại trong khoang miệng mặc dù đã bị tiệt trừ thành công tại dạ dày. Tại khoang miệng, các mảng bám răng là một trong những nơi *H. pylori* trú ngụ. Những bệnh nhân có vệ sinh răng miệng kém sẽ có tỷ lệ nhiễm *H. pylori* ở mảng bám răng và trong dạ dày cao [181]. Pradeep P.S và CS đã đưa khuyến cáo về điều trị dự phòng nhiễm *H. pylori* trong khoang miệng bằng súc miệng dung dịch Chlorhexidine Gluconate 0.2% trong 1 tuần bắt đầu từ ngày đầu tiên sử dụng phác đồ bộ ba thuốc tiệt trừ *H. pylori* giúp ngăn ngừa mảng bám răng trở thành một nguồn chứa *H. pylori* gây nên tình trạng tái nhiễm *H. pylori* [182].

Yếu tố thứ hai gây tái nhiễm *H. pylori* sau điều trị triệt trừ là vệ sinh môi trường đặc biệt là nguồn nước nhiễm vi khuẩn đã được coi là một yếu tố quan trọng. Các nghiên cứu dịch tễ tiến hành ở các khu vực có tỷ lệ nhiễm *H. pylori* cao tại các nước đang phát triển đã đưa ra các bằng chứng về giả thiết về nguồn nước là nguồn gây tái nhiễm *H. pylori*. Nghiên cứu đầu tiên đưa ra giả thiết là nước là yếu tố nguy cơ lây truyền *H. pylori* được tiến hành tại Peru năm 1991. Nghiên cứu tại Nhật Bản công bố năm 2001 dùng phương pháp PCR chẩn đoán *H. pylori* trong mẫu nước giếng, nước máy, nước biển, nước sông thì phát hiện DNA của *H. pylori* trong nước giếng. Tại Tây Ban Nha các tác giả kết hợp cả phương pháp nuôi cấy và PCR đã tìm thấy trong 45 mẫu nước bần có 6 mẫu có nhiễm *H. pylori*. Một nghiên cứu khác công bố năm 2002 được thực hiện tại Kazakhstan đã có các bằng chứng về dịch tễ và thống kê cho thấy nước và các điều kiện vệ sinh yếu kém là các yếu tố nguy cơ để nhiễm *H. pylori*, đặc biệt việc uống nước sông là yếu tố nguy cơ cao nhất. Các nhà nghiên cứu tại Iran đã dùng phương pháp nuôi cấy để phát hiện *H. pylori* nhưng chỉ dương tính được 5 mẫu trong 200 mẫu từ nhiều nguồn nước. Trong khi đó cũng với mẫu này, thực hiện phương pháp khuếch đại gen *UreC* lại tìm thấy *H. pylori* dương tính ở 12 mẫu. Các mẫu cấy âm tính mà PCR dương tính được giải thích là vi khuẩn tồn tại ở thể cầu (coccoid form) do đó vi khuẩn cấy không mọc nhưng vẫn phát hiện được gen *UreC* của vi khuẩn này. Tại các nước châu Âu như Anh và Bồ Đào Nha các nhà nghiên cứu cũng tìm thấy *H. pylori* có thể tồn tại trong nước giếng dưới dạng màng sinh học (Biofilm) [183],[184],[185]. Đề cập đến vai trò của vệ sinh môi trường ảnh hưởng đến tình trạng nhiễm *H. pylori*, nghiên cứu của Lee và CS được công bố vào năm 2012 thực hiện ở 161 bệnh nhân tại Malaysia với phương pháp mô bệnh học để chẩn đoán *H. pylori* cho thấy các thói quen sinh hoạt không hợp vệ sinh cũng như việc sử dụng nước giếng và các điều kiện vệ sinh kém đều làm tăng nguy cơ nhiễm vi khuẩn này (OR = 3.38, 95% CI: 1.76–6.46)

[186]. Tuy nhiên, không chỉ nguồn nước được cho là không sạch có nhiễm *H. pylori* mà cả nguồn nước sạch cũng phát hiện có *H. pylori* nhưng ở hình thái hình cầu hay dạng “ngủ” của *H. pylori*. Nghiên cứu tại Mỹ, Adams và CS thấy trong nước ngọt tự nhiên tại sông hồ vẫn có *H. pylori* tồn tại dưới dạng hình cầu (cocoid form) trong tình trạng vẫn sống nhưng không nuôi cấy được (VBNC: viable but non- cultureable state). Đây chính là nguồn lây *H. pylori* và tiềm ẩn nguy cơ cho sức khỏe cộng đồng [187].

Mặc dù bằng các kỹ thuật sinh học phân tử có thể phân biệt chính xác chủng nhiễm trước và sau điều trị giống hoặc khác nhau. Tuy nhiên có trường hợp bệnh nhân đã tiết trừ thành công *H. pylori* nhưng có thể nhiễm cùng một chủng vi khuẩn đã nhiễm từ cùng một nguồn (từ các thành viên trong cùng một gia đình) do nhiễm *H. pylori* trong một nhóm của gia đình hoặc từ người bạn đời cũng đang mang vi khuẩn *H. pylori* và có thể coi là tái nhiễm (reinfection). Giả thiết này đã được chứng minh ở một số nghiên cứu trên thế giới. Nghiên cứu của Kivi M. và CS phân tích các chủng *H. pylori* bằng phương pháp PCR-RFLP và RAPD đã có những số liệu chứng tỏ sự lây nhiễm giữa mẹ và con, giữa anh em trong một nhà là đường lây cơ bản của *H. pylori* [188]. Schutze K và CS đã phân tích các chủng *H. pylori* bằng phương pháp PCR cho các trường hợp tái nhiễm đều cho thấy các chủng đều giống chủng của bạn đời họ bị nhiễm [94]. Tuy nhiên, vẫn có quan điểm không thống nhất với giả về khả năng lây truyền cùng một chủng giữa các thành viên trong gia đình [189]

4.3.2.2. Kết quả phân biệt tái nhiễm và tái phát vi khuẩn *H. pylori* bằng phương pháp giải trình tự gen *UreC*

Phương pháp PCR có thể chẩn đoán *H. pylori* với độ nhạy và độ đặc hiệu khá cao. Tuy nhiên phương pháp này cũng có hạn chế là có thể dương tính giả do phát hiện DNA của các chủng *Helicobacter non- H. pylori* hoặc âm tính giả nếu số lượng vi khuẩn ít hoặc có các yếu tố ức chế trong mẫu bệnh phẩm

(thường gặp trong trường hợp mẫu là phân hoặc mẫu lấy từ môi trường) [190],[133]. Do đó, để khẳng định chắc chắn bệnh nhân nhiễm *H. pylori*, chúng tôi tiến hành PCR giải trình tự gen của 36 mẫu sinh thiết. Kết quả phân tích BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 36 trình tự cho thấy các gen đều là đoạn gen tương đồng với gen của các chủng *H. pylori* đã được xác định trong ngân hàng gen với tỷ lệ tương đồng 85,76 % đến 97,5% lấy đại diện 3 chủng *H. pylori* trong ngân hàng gen (Bảng 3.29, 3.30 và phụ lục 1). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương tự nghiên cứu của Menoni và CS dùng phương pháp PCR và giải trình tự chẩn đoán xác định *H. pylori* từ mảnh sinh thiết tất cả các mẫu DNA của bệnh nhân phân tích bằng giải trình tự đều là đoạn *UreC* của chủng *H. pylori* đã được mô tả trong ngân hàng gen (Gene bank) [114].

Kết quả của bảng 3.31 cho thấy các trường hợp được khẳng định tái phát *H. pylori* bằng kết quả phân tích PCR-RFLP (chủng nhiễm trước và sau điều trị giống nhau) là bệnh nhân có mã số bệnh phẩm 1, 2, 6, 13, 16 (Hình 3.4, 3.5, 3.6) có sự tương đồng về trình tự gen từ 94,3% đến 100%. Minh họa kết quả PCR-RFLP và giải trình tự gen *UreC* của bệnh nhân có mẫu bệnh phẩm mã số 1 có trình tự gen của chủng trước và sau điều trị tương đồng 100% (Bảng 3.31, hình 3.15). Bệnh nhân có mẫu bệnh phẩm mã số 2 có sự tương đồng 97,19%. Bệnh nhân có mẫu bệnh phẩm mã số 6 có tỷ lệ tương đồng là 94,34 %. Bệnh nhân có mẫu bệnh phẩm mã số 13 có tỷ lệ tương đồng là 95,92 % và mã số 16 là 95,27% (Phụ lục 1). Kết quả cho thấy so sánh các trình tự của các chủng nhiễm trước và sau điều trị ở những bệnh nhân này chỉ có 1 bệnh nhân có sự tương đồng 100% còn lại từ 94,3% đến 97,5%. Sự khác biệt về trình tự của các chủng trước và sau điều trị tiết trừ thành công của nhóm bệnh nhân này có xu hướng thấp từ 0% đến 5,66%. Có thể giải thích do quá trình điều trị, vi khuẩn tiếp xúc với kháng sinh nên có thể có sự đột biến ở một số vị trí của trình tự dẫn tới sự tương đồng của chủng trước và sau điều trị

không đạt 100%. Các kết quả so sánh của 13 cặp trình tự còn lại có sự tương đồng của trình tự trước và sau điều trị tiệt trừ từ 86,85 đến 94,4%. Sự khác biệt về trình tự có xu hướng cao từ 5,6% đến 13,15% (Phụ lục 1).

Có một cặp trình tự mẫu số 12 không so sánh được trước và sau điều trị do số cặp bazơ của trình tự của chủng *H. pylori* nhiễm lần đầu ngắn (có thể do lỗi kỹ thuật) nên không so sánh được với trình tự của chủng nhiễm sau điều trị (Phụ lục 1).

### 4.3. Hạn chế của nghiên cứu

Trong nghiên cứu, chúng tôi áp dụng phác đồ điều trị đầu tay gồm ba thuốc Esomeprazole, Amoxicillin, Clarithromycin là một phác đồ hiện nay không được khuyến khích là phác đồ đầu tay ở khu vực có tỷ lệ kháng kháng sinh cao. Tuy nhiên, đây là phác đồ đã được áp dụng rộng rãi tại các bệnh viện tại thời điểm xây dựng đề cương nghiên cứu với mục đích xác định hiệu quả của phác đồ này, tình trạng kháng Clarithromycin nhằm khuyến cáo phác đồ còn phù hợp với đối tượng là các bệnh nhân loét hành tá tràng có *H. pylori* dương tính trong khu vực hay không. Mục tiêu chính của nghiên cứu của chúng tôi là xác định tình trạng tái nhiễm và tái phát *H. pylori* sau điều trị tiệt trừ do đó kết quả của mục tiêu 1” Đánh giá kết quả điều trị loét hành tá tràng có *Helicobacter pylori* bằng phác đồ Esomeprazole-Amoxicillin-Clarithromycin” là cơ sở để triển khai mục tiêu 2 “ Xác định tình trạng tái phát và tái nhiễm *Helicobacter pylori* sau điều trị tiệt trừ thành công, bằng kỹ thuật PCR-RFLP và giải trình tự xác định gen *UreC* ”.

Hạn chế thứ hai của nghiên cứu là số lượng bệnh nhân tái khám theo hẹn nhằm đánh giá kết quả điều trị chưa cao, chỉ đạt 53,5% (Bảng 3.8). Số lượng bệnh nhân tiệt trừ thành công đến tái khám định kỳ tại các thời điểm dưới 1 năm và trên 1 năm nhằm đánh giá tái phát và tái nhiễm *H. pylori* không nhiều. Chỉ có 20 bệnh nhân tái xuất hiện *H. pylori* trong đó 18 bệnh nhân phân tích được các chủng *H. pylori* nhiễm trước và sau điều trị tiệt trừ bằng kỹ thuật

PCR-RFLP và giải trình tự xác định gen *UreC*. Do đó, số liệu không có ý nghĩa thống kê cao. So sánh với nghiên cứu đã tiến hành ở Việt nam của Wheldon và CS theo dõi 153 bệnh nhân thời gian dài sau điều trị, có 36 bệnh nhân tái xuất hiện *H. pylori* cũng chỉ phân tích được gen của các chủng trước và sau điều trị ở 17 bệnh nhân [113]. Vì vậy, để kết quả nghiên cứu có tính thuyết phục hơn trong nghiên cứu tiếp theo về chủ đề này cần có số lượng chủng *H. pylori* nhiễm trước và sau điều trị nhiều hơn.

## KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu hiệu quả điều trị phác đồ Esomeprazole-Amoxicillin-Clarithromycin (EAC) ở 303 bệnh nhân loét hành tá tràng có *H. pylori* dương tính và đánh giá tình trạng tái phát, tái nhiễm *H. pylori* sau điều trị tiệt trừ chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

### **1. Kết quả điều trị loét hành tá tràng có *Helicobacter pylori* dương tính bằng phác đồ EAC**

- Tỷ lệ tiệt trừ thành công *H. pylori* là 110/162 (67,9%)
- Tỷ lệ liền sẹo ổ loét là (124/162) 76,5%
- Kháng Clarithromycin và Amoxicilin ảnh hưởng tới kết quả điều trị.
- + Tỷ lệ kháng Clarithromycin của *H. pylori* trước điều trị bằng phương pháp nuôi cấy và kháng sinh đồ là 40,6%
- + Tỷ lệ tiệt trừ *H. pylori* giảm có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$  khi có kháng Clarithromycin: Khi có kháng với Clarithromycin, tỷ lệ tiệt trừ *H. pylori* chỉ đạt 38,5%, khi nhạy với Clarithromycin tỷ lệ tiệt trừ *H. pylori* có thể đạt tới 83,1%.
- + Nhóm bệnh nhân nhạy cảm với Clarithromycin có tỷ lệ liền sẹo cao hơn nhóm bệnh nhân kháng Clarithromycin tương ứng 88,8% so với 55,8%, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,01$ .
- + Tỷ lệ kháng Amoxicilin của *H. pylori* trước điều trị bằng phương pháp nuôi cấy và kháng sinh đồ là 24,6%.
- + Khi có kháng với Amoxicillin, tỷ lệ tiệt trừ *H. pylori* 59,3%, khi nhạy với Amoxicillin tỷ lệ tiệt trừ *H. pylori* 68,4%. Sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$
- + Nhóm bệnh nhân nhạy cảm với Amoxicillin có tỷ lệ liền sẹo khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với nhóm đề kháng với Amoxicillin với  $p > 0,05$ .

**2. Tình trạng tái phát hay tái nhiễm *Helicobacter pylori* sau điều trị tiệt trừ thành công bằng kỹ thuật PCR-RFLP và giải trình tự xác định gen *UreC***

- Tỷ lệ tái xuất hiện *H. pylori* sau tiệt trừ thành công và theo dõi thời gian dài sau tiệt trừ là 38,5%

- Tỷ lệ tái xuất hiện *H. pylori* bằng phân tích Kaplan-Meier là 1,02%/năm

- Tỷ lệ tái phát là 27,8% và tái nhiễm *Helicobacter pylori* là 72,2%. Tỷ lệ tái nhiễm *Helicobacter pylori* cao hơn tái phát.

- Không có sự khác biệt về tỷ lệ tái phát và tái nhiễm *Helicobacter pylori* tại các thời điểm theo dõi trước 1 năm và sau 1 năm.

- Chẩn đoán *H. pylori* bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự gen *UreC* sau đó so sánh với gen tương tự của *H.pylori* trong ngân hàng gen bằng chương trình BLAST cho kết quả chính xác 100%.



## KIẾN NGHỊ

Dựa trên kết quả nghiên cứu chúng tôi đưa ra những kiến nghị như sau:

1. Hiệu quả điều trị phác đồ Esomeprazole-Amoxicillin-Clarithromycin (EAC) tại khu vực tiến hành nghiên cứu không cao do tỷ lệ kháng Clarithromycin cao nên bác sĩ điều trị nên cân nhắc khi lựa chọn phác đồ này là phác đồ điều trị đầu tay cho bệnh nhân loét hành tá tràng có *Helicobacter pylori* dương tính. Do đó, nên làm kháng sinh đồ với Clarithromycin trước khi lựa chọn kháng sinh này vào phác đồ điều trị.

2. Với tỷ lệ tái nhiễm cao hơn tái phát *Helicobacter pylori*, bên cạnh chọn phác đồ điều trị hiệu quả, chúng ta cần kiểm soát tốt nguồn lây nhiễm vi khuẩn này.

3. Trong tương lai cần có nghiên cứu đánh giá mối liên quan giữa các yếu tố ảnh hưởng đến tái phát và tái nhiễm và tỷ lệ tái phát, tái nhiễm *Helicobacter pylori* sau điều trị triệt thành công tại Việt Nam.

## **DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU CỦA TÁC GIẢ ĐÃ CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. Đỗ Nguyệt Ánh, Nguyễn Thúy Vinh, Nguyễn Thị Hồng Hạnh (2016), “Xác định tỷ lệ kháng Clarithromycin ở bệnh nhân loét tá tràng được điều trị bằng phác đồ Esomeprazole – Amoxicillin – Clarithromycin tại Bệnh viện E Trung ương“, *Tạp chí Y dược lâm sàng 108*, 11: 320-324
2. Đỗ Nguyệt Ánh, Nguyễn Thúy Vinh, Nguyễn Thị Hồng Hạnh, Nguyễn Diệu Thúy (2019), “Tái nhiễm và tái phát vi khuẩn *H. pylori* ở bệnh nhân loét tá tràng sau điều trị triệt trừ thành công tại Bệnh viện E Trung ương”, *Tạp chí Y dược lâm sàng 108*, 14 (7): 24-29



## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Malfertheiner P, Chan F.K,McColl K.E (2009), "Peptic ulcer disease", *Lancet*. 374 (9699), pp. 1449-1461.
2. Hooi J. K., Lai W. Y., Ng W. K., et al (2017), "Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection: systematic review and meta-analysis", *Gastroenterology*. 153 (2), pp. 420-429.
3. Moss S. F. (2017), "The clinical evidence linking *Helicobacter pylori* to gastric cancer", *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*. 3 (2), pp. 183-191.
4. Lanas A.,Chan F. K. (2017), "Peptic ulcer disease", *The Lancet*. 390 (10094), pp. 613-624.
5. Wu J.-Y., Lee Y.-C.,Graham D. Y. (2019), "The eradication of *Helicobacter pylori* to prevent gastric cancer: a critical appraisal", *Expert review of gastroenterology & hepatology*. 13 (1), pp. 17-24.
6. International Agency for Research on Cancer WHO (1994). "Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans", *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, (61), pp. 241.
7. Gisbert J. P. (2005), "The recurrence of *Helicobacter pylori* infection: incidence and variables influencing it. A critical review", *American Journal of Gastroenterology*. 100 (9), pp. 2083-2099.
8. Hu Y., Wan J. H., Li X. Y., et al (2017), "Systematic review with meta-analysis: the global recurrence rate of *Helicobacter pylori*", *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 46 (9), pp. 773-779.

9. Niv Y., Hazazi R. (2008), "*Helicobacter pylori* recurrence in developed and developing countries: meta-analysis of  $^{13}\text{C}$ -urea breath test follow-up after eradication", *Helicobacter*. 13 (1), pp. 56-61.
10. Graham D. Y., Shiotani A. (2008), "New concepts of resistance in the treatment of *Helicobacter pylori* infections", *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology*. 5 (6), pp. 321-331.
11. Thung I., Aramin H., Vavinskaya V., et al (2016), "the global emergence of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance", *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 43 (4), pp. 514-533.
12. Yan T. L., Hu Q. D., Zhang Q., et al (2013), "National rates of *Helicobacter pylori* recurrence are significantly and inversely correlated with human development index", *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 37 (10), pp. 963-968.
13. Espinoza M. G. C., Vazquez R. G., Mendez I. M., et al (2011), "Detection of the glmM gene in *Helicobacter pylori* isolates with a novel primer by PCR", *Journal of clinical microbiology*. 49 (4), pp. 1650-1652.
14. Mobley H. L., Mendz G. L., Hazell S. L. "Helicobacter pylori: physiology and genetics. 2001", *Amer Soc Microbiol, Washington DC*, pp.
15. Tạ Long (2003 ). "Bệnh lý dạ dày tá tràng và vi khuẩn *Helicobacter Pylori*", Nhà xuất bản Y học, pp. 22, 25, 26.
16. O'Rourke J, Bode G (2001). "*Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics", *Morphology and Ultrastructure*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2452/>, pp.
17. Draper J. L., Hansen L. M., Bernick D. L., et al (2017), "Fallacy of the unique genome: sequence diversity within single *Helicobacter pylori* strains", *MBio*. 8 (1), pp. 1-18.

18. Kennemann L., Didelot X., Aebischer T., et al (2011), "*Helicobacter pylori* genome evolution during human infection", *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108 (12), pp. 5033-5038.
19. Sgouras D. N., Trang T. T. H., Yamaoka Y. (2015), "Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection", *Helicobacter*. 20, pp. 8-16.
20. Sjomina O., Pavlova J., Niv Y., et al (2018), "Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection", *Helicobacter*. 23, pp. e12514.
21. Hu Yi, Zhu Yin L. N.-H. (2017), "Novel and Effective Therapeutic Regimens for *Helicobacter pylori* in an Era of Increasing Antibiotic Resistance", *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 7, pp. 168-168.
22. Stefano K., Marco M., Federica G., et al (2018), "*Helicobacter pylori*, transmission routes and recurrence of infection: state of the art", *Acta Bio Medica: Atenei Parmensis*. 89 (Suppl 8), pp. 72.
23. Vale F., Vítor J. (2010), "Transmission pathway of *Helicobacter pylori*: does food play a role in rural and urban areas?", *International journal of food microbiology*. 138 (1-2), pp. 1-12.
24. Dattoli V. C. C., Veiga R. V., Da Cunha S. S., et al (2010), "Seroprevalence and potential risk factors for *Helicobacter pylori* infection in Brazilian children", *Helicobacter*. 15 (4), pp. 273-278.
25. Khean-Lee Goh, Wah-Kheong Chan S. S., Yoshio Yamaoka (2011), "Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection and Public Health Implications", *Helicobacter*. 16 (1), pp. 1-9.
26. Epplein M., Signorello L. B., Zheng W., et al (2011), "Race, African ancestry, and *Helicobacter pylori* infection in a low-income United States population", *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 20 (5), pp. 826-834.

27. Yagi K., Nakamura A., Sekine A. (2002), "Comparison between magnifying endoscopy and histological, culture and urease test findings from the gastric mucosa of the corpus", *Endoscopy*. 34 (05), pp. 376-381.
28. Tahara T., Shibata T., Nakamura M., et al (2009), "Gastric mucosal pattern by using magnifying narrow-band imaging endoscopy clearly distinguishes histological and serological severity of chronic gastritis", *Gastrointestinal endoscopy*. 70 (2), pp. 246-253.
29. Gonen C., Simsek I., Sarioglu S., et al (2009), "Comparison of high resolution magnifying endoscopy and standard videoendoscopy for the diagnosis of *Helicobacter pylori* gastritis in routine clinical practice: a prospective study", *Helicobacter*. 14 (1), pp. 12-21.
30. Uotani T., Graham D. Y. (2015), "Diagnosis of *Helicobacter pylori* using the rapid urease test", *Annals of translational medicine*. 3 (1), pp.
31. Oyedeji K., Smith S., Arigbabu A., et al (2002), "Use of direct Gram stain of stomach biopsy as a rapid screening method for detection of *Helicobacter pylori* from peptic ulcer and gastritis patients", *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*. 42 (2), pp. 121-125.
32. Trần Thiện Trung (2008 ). *Bệnh lý dạ dày tá tràng và nhiễm Helicobacter pylori*. Nhà xuất bản Y học,
33. Patel S. K., Pratap C. B., Jain A. K., et al (2014), "Diagnosis of *Helicobacter pylori*: what should be the gold standard?", *World journal of gastroenterology: WJG*. 20 (36), pp. 12847.
34. Miftahussurur M., Yamaoka Y. (2016), "Diagnostic methods of *Helicobacter pylori* infection for epidemiological studies: critical importance of indirect test validation", *BioMed research international*. 2016, pp.

35. Lee J. Y., Kim N. (2015), "Diagnosis of *Helicobacter pylori* by invasive test: histology", *Annals of translational medicine*. 3 (1), pp.
36. De Reuse H., Labigne A., Mengin-Lecreulx D. (1997), "The *Helicobacter pylori* ureC gene codes for a phosphoglucosamine mutase", *Journal of bacteriology*. 179 (11), pp. 3488-3493.
37. Rimbara E., Sasatsu M., Graham D. Y. (2013). "PCR detection of *Helicobacter pylori* in clinical samples", *PCR Detection of Microbial Pathogens*, Springer, pp. 279-287.
38. Clayton C., Kleanthous H., Coates P., et al (1992), "Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction", *Journal of Clinical Microbiology*. 30 (1), pp. 192-200.
39. Duš I., Dobosz T., Manzin A., et al (2013), "Role of PCR in *Helicobacter pylori* diagnostics and research--new approaches for study of coccoid and spiral forms of the bacteria", *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 67 (9), pp. 261-218.
40. Kalali B., Formichella L., Gerhard M. (2015), "Diagnosis of *Helicobacter pylori*: Changes towards the Future", *Diseases*. 3 (3), pp. 122-135.
41. Gisbert J., Pajares J. (2004), "<sup>13</sup>C-urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection—a critical review", *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 20 (10), pp. 1001-1017.
42. Seo J.-H., Park J.-S., Rhee K.-H., et al (2018), "Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents in Korea", *Pediatric gastroenterology, hepatology & nutrition*. 21 (4), pp. 219-233.
43. Valle J. D. (2006 ). *Peptic ulcer disease and related disorders*  
McGraw-Hill Medical Publishing division,



44. Narayanan M., Reddy K. M., Marsicano E. (2018), "Peptic ulcer disease and *Helicobacter pylori* infection", *Missouri medicine*. 115 (3), pp. 219.
45. Sung J., Kuipers E., El-Serag H. (2009), "Systematic review: the global incidence and prevalence of peptic ulcer disease", *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 29 (9), pp. 938-946.
46. Lin K. J., García Rodríguez L. A., Hernández-Díaz S. (2011), "Systematic review of peptic ulcer disease incidence rates: do studies without validation provide reliable estimates?", *Pharmacoepidemiology and drug safety*. 20 (7), pp. 718-728.
47. Kang J. Y, Yap I, Guan R, et al (1986), "Acid perfusion of duodenal ulcer craters and ulcer pain: a controlled double blind study", *Gut*. 27 (8), pp. 942-945.
48. Gururatsakul M., Holloway R. H., Talley N. J., et al (2010), "Association between clinical manifestations of complicated and uncomplicated peptic ulcer and visceral sensory dysfunction", *Journal of gastroenterology and hepatology*. 25 (6), pp. 1162-1169.
49. Dooley C. P, Larson A. W, Stace N. H, et al (1984), "Double-contrast barium meal and upper gastrointestinal endoscopy. A comparative study", *Ann Intern Med*. 101 (4), pp. 538-545.
50. Rubesin S. E., Levine M. S., Laufer I. (2008), "Double-contrast upper gastrointestinal radiography: a pattern approach for diseases of the stomach", *Radiology*. 246 (1), pp. 33-48.
51. Marshall B. J, McGeachie D. B., Rogers P. A., et al (1985), "Pyloric *Campylobacter* infection and gastroduodenal disease", *Med J Aust*. 142 (8), pp. 439-444.
52. El Omar E. M, D. P. I., Ardill J. E, et al (1995), "*Helicobacter pylori* infection and abnormalities of acid secretion in patients with duodenal ulcer disease", *Gastroenterology*. 109 (3), pp. 681-691.

53. McColl K. E, Gillen D, E. E.-O. (2000), "The role of gastrin in ulcer pathogenesis", *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 14 (1), pp. 13-26.

54. Waldum H. L., Kleveland P. M., Sørdal Ø. F. (2016), "*Helicobacter pylori* and gastric acid: an intimate and reciprocal relationship", *Therapeutic advances in gastroenterology.* 9 (6), pp. 836-844.

55. Moss S. F, Legon S D. J., Calam, J. (1994), "Cytokine gene expression in *Helicobacter pylori* associated antral gastritis", *Gut.* 35 (11), pp. 1567-1570.

56. Gisbert J., Calvet X. (2011), "the effectiveness of standard triple therapy for *Helicobacter pylori* has not changed over the last decade, but it is not good enough", *Alimentary pharmacology & therapeutics.* 34 (11-12), pp. 1255-1268.

57. De Francesco V., Giorgio F., Hassan C., et al (2010), "Worldwide *H. pylori* antibiotic resistance: a systematic review", *Journal of Gastrointestinal & Liver Diseases.* 19 (4), pp. 410-414.

58. Lục Thị Vân Bích, Đặng Chi Mai, Nguyễn Thanh Bảo (1997), " Khảo sát tính kháng thuốc của *H.pylori* đối với một số kháng sinh thường dùng.", *Y học Thành phố Hồ Chí Minh, số đặc biệt HNKH 1.* phụ bản số 4 pp. 51-65.

59. Phan Quốc Hoàn, Tạ Long, Ngô Vi Hùng, et al (2000), "Kháng kháng sinh của *Helicobacter pylori* trong điều trị bệnh loét tá tràng", *Nội khoa.* 1, pp. 8 - 11.

60. Nguyễn Thúy Vinh, Nguyễn Thị Hồng Hạnh, Hoàng Tuấn Anh, et al (2003), "Vấn đề kháng Clarithromycin, Amoxicillin và Metronidazole của vi khuẩn *Helicobacter pylori* trong 3 năm (2000-2002)", *Y học Việt Nam* 4, pp. 45-52.

61. Phan Trung Nam, Trần Văn Huy, Trần Thị Như Hoa, et al (2013), "Tình hình đề kháng kháng sinh của *Helicobacter pylori* tại khu vực miền Trung hai

năm 2012-2013 bằng kỹ thuật E-test", *Tạp chí Khoa học tiêu hoá Việt Nam*, . VIII (33), pp. tr.2122-2132.

62. Kim S. Y., Hyun J. J., Jung S. W., et al (2014), "*Helicobacter pylori* Recurrence after First and Second Line Eradication Therapy in Korea: The Problem of Recrudescence or Reinfection", *Helicobacter*. 19 (3), pp. 202-206.

63. Kim N. (2016). "Recrudescence and Reinfection After *H. pylori* Eradication Treatment", *Helicobacter pylori*, Springer, pp. 501-505.

64. Gisbert J., Luna M., Gomez B., et al (2006), "Recurrence of *Helicobacter pylori* infection after several eradication therapies: long-term follow-up of 1000 patients", *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 23 (6), pp. 713-719.

65. Niv Y. (2008), "H pylori recurrence after successful eradication", *World journal of gastroenterology: WJG*. 14 (10), pp. 1477.

66. Zendehdel N., Malekzadeh R., Massarrat S., et al (2005), "*Helicobacter pylori* reinfection rate 3 years after successful eradication", *Journal of gastroenterology and Hepatology*. 20 (3), pp. 401-404.

67. Take S, Mizuno M I. K., Imada T, et al (2012), "Reinfection rate of *Helicobacter pylori* after eradication treatment: a long-term prospective study in Japan", *J Gastroenterol*. 47 (6), pp. 641-646.

68. Raymond J., Thiberge J. M., Dauga C. (2016), "Diagnosis of *Helicobacter pylori* recurrence: relapse or reinfection? Usefulness of molecular tools", *Scandinavian journal of gastroenterology*. 51 (6), pp. 672-678.

69. Zhang M. (2015), "High antibiotic resistance rate: A difficult issue for *Helicobacter pylori* eradication treatment", *World Journal of Gastroenterology*. 21 (48), pp. 13432.

70. Neil G., Suchower L., Ronca P., et al (1997), "Time of *Helicobacter pylori* eradication assessment following treatment", *Helicobacter*. 2 (1), pp. 13-20.
71. Morgan D. R., Torres J., Sexton R., et al (2013), "Risk of recurrent *Helicobacter pylori* infection 1 year after initial eradication therapy in 7 Latin American communities", *JAMA*. 309 (6), pp. 578-586.
72. Bruce M., Bruden D., Morris J., et al (2015), "Reinfection after successful eradication of *Helicobacter pylori* in three different populations in Alaska", *Epidemiology & Infection*. 143 (6), pp. 1236-1246.
73. Saeidi E.,Sheikhshahrokh A. (2016), "VacA genotype status of *Helicobacter pylori* isolated from foods with animal origin", *BioMed research international*. 2016, pp. 1-6.
74. Navabi N., Aramon M.,Mirzazadeh A. (2011), "Does the presence of the *Helicobacter pylori* in the dental plaque associate with its gastric infection? A meta-analysis and systematic review", *Dental research journal*. 8 (4), pp. 178.
75. Amiri N., Abiri R., Eyvazi M., et al (2015), "The frequency of *Helicobacter pylori* in dental plaque is possibly underestimated", *Archives of oral biology*. 60 (5), pp. 782-788.
76. Sarem M.,Corti R. (2016), "Role of *Helicobacter pylori* coccoid forms in infection and recrudescence", *Gastroenterología y Hepatología (English Edition)*. 39 (1), pp. 28-35.
77. Reshetnyak V. I.,Reshetnyak T. M. (2017), "Significance of dormant forms of *Helicobacter pylori* in ulcerogenesis", *World journal of gastroenterology*. 23 (27), pp. 4867.
78. Noach L., Rolf T.,Tytgat G. (1994), "Electron microscopic study of association between *Helicobacter pylori* and gastric and duodenal mucosa", *Journal of clinical pathology*. 47 (8), pp. 699-704.

79. Poursina F., Faghri J., Moghim S., et al (2013), "Assessment of *cagE* and *babA* mRNA expression during morphological conversion of *Helicobacter pylori* from spiral to coccoid", *Current microbiology*. 66 (4), pp. 406-413.
80. Hirukawa S., Sagara H., Kaneto S., et al (2018), "Characterization of morphological conversion of *Helicobacter pylori* under anaerobic conditions", *Microbiology and immunology*. 62 (4), pp. 221-228.
81. Attaran B., Falsafi T. (2017), "Identification of factors associated with biofilm formation ability in the clinical isolates of *Helicobacter pylori*", *Iranian journal of biotechnology*. 15 (1), pp. 58.
82. Attaran B., Falsafi T., Moghaddam A. N. (2016), "Study of biofilm formation in C57Bl/6J mice by clinical isolates of *Helicobacter pylori*", *Saudi journal of gastroenterology: official journal of the Saudi Gastroenterology Association*. 22 (2), pp. 161.
83. Cammarota G., Branca G., Ardito F., et al (2010), "Biofilm demolition and antibiotic treatment to eradicate resistant *Helicobacter pylori*: a clinical trial", *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 8 (9), pp. 817-820. e813.
84. Assumpção M. B. (2010), "*Helicobacter pylori* in dental plaque and stomach of patients from Northern Brazil", *World Journal of Gastroenterology*. 16 (24), pp. 3033.
85. Hathroubi S., Servetas S. L., Windham I., et al (2018), "*Helicobacter pylori* biofilm formation and its potential role in pathogenesis", *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 82 (2), pp. e00001-00018.
86. Hathroubi S., Servetas S. L., Windham I., et al (2018), "*Helicobacter pylori* biofilm formation and its potential role in pathogenesis", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 82 (2), pp.
87. Xia H.-X., Talley N. J., Keane C. T., et al (1997), "Recurrence of *Helicobacter pylori* Infection After Successful Eradication (Nature and Possible Causes)", *Digestive diseases and sciences*. 42 (9), pp. 1821-1834.

88. Malaty H. M., Engstrand L., Pedersen N. L., et al (1994), "*Helicobacter pylori* infection: genetic and environmental influences: a study of twins", *Annals of internal medicine*. 120 (12), pp. 982-986.
89. Azuma T., Konishi J., Tanaka Y., et al (1994), "Contribution of HLA-DQA gene to host's response against *Helicobacter pylori*", *The Lancet*. 343 (8896), pp. 542-543.
90. Ikehara Y., Nishihara S., Yasutomi H., et al (2001), "Polymorphisms of two fucosyltransferase genes (Lewis and Secretor genes) involving type I Lewis antigens are associated with the presence of anti-*Helicobacter pylori* IgG antibody", *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 10 (9), pp. 971-977.
91. Enroth H., Engstrand L. (1995), "Immunomagnetic separation and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in water and stool specimens", *Journal of clinical microbiology*. 33 (8), pp. 2162-2165.
92. Hopkins R. J., Vial P. A., Ferreccio C., et al (1993), "Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in Chile: vegetables may serve as one route of transmission", *Journal of Infectious Diseases*. 168 (1), pp. 222-226.
93. Ryu K. H., Yi S. Y., Na Y. J., et al (2010), "Reinfection rate and endoscopic changes after successful eradication of *Helicobacter pylori*", *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 16 (2), pp. 251.
94. Schütze K., Hentschel E., Dragosics B., et al (1995), "*Helicobacter pylori* reinfection with identical organisms: transmission by the patients' spouses", *Gut*. 36 (6), pp. 831-833.
95. Weyermann M., Adler G., Brenner H., et al (2006), "The mother as source of *Helicobacter pylori* infection", *Epidemiology*. 17 (3), pp. 332-334.

96. Shimizu T., Yarita Y., Kaneko K., et al (2000), "Case of intrafamilial *Helicobacter pylori* reinfection after successful eradication therapy", *The Pediatric infectious disease journal*. 19 (9), pp. 901-903.
97. Gisbert J. P., Arata I. G., Boixeda D., et al (2002), "Role of partner's infection in reinfection after *Helicobacter pylori* eradication", *European journal of gastroenterology & hepatology*. 14 (8), pp. 865-871.
98. Suzuki J., Muraoka H., Kobayasi I., et al (1999), "Rare Incidence of Interspousal Transmission of *Helicobacter pylori* in Asymptomatic Individuals in Japan", *Journal of clinical microbiology*. 37 (12), pp. 4174-4176.
99. Taylor N. S., Fox J. G., Akopyants N. S., et al (1995), "Long-term colonization with single and multiple strains of *Helicobacter pylori* assessed by DNA fingerprinting", *Journal of Clinical Microbiology*. 33 (4), pp. 918-923.
100. Tomb J.-F., White O., Kerlavage A. R., et al (1997), "The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*", *Nature*. 388 (6642), pp. 539-547.
101. Bickley J., Owen R. J., Fraser A. G., et al (1993), "Evaluation of the polymerase chain reaction for detecting the urease C gene of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy samples and dental plaque", *J Med Microbiol*. 39 (5), pp. 338-344.
102. Clayton C., Kleanthous H., Morgan D., et al (1993), "Rapid fingerprinting of *Helicobacter pylori* by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis", *Journal of Clinical Microbiology*. 31 (6), pp. 1420-1425.
103. Burucoa C., Lhomme V., Fauchere J. L. (1999), "Performance criteria of DNA fingerprinting methods for typing of *Helicobacter pylori* isolates: experimental results and meta-analysis", *Journal of Clinical Microbiology*. 37 (12), pp. 4071-4080.

104. Lê Duy Thành, Đỗ Lê Thăng, Đinh Đoàn Long (2014). "Phân tích gen và hệ gen", *Cơ sở Sinh học phân tử*, NXB Giáo dục Việt Nam, pp. 194-200.
105. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977), "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors", *Proceedings of the national academy of sciences*. 74 (12), pp. 5463-5467.
106. Lohmann K., Klein C. (2014), "Next generation sequencing and the future of genetic diagnosis", *Neurotherapeutics*. 11 (4), pp. 699-707.
107. Owen R. J., Slater E. R., Xerry J., et al (1998), "Development of a Scheme for Genotyping *Helicobacter pylori* Based on Allelic Variation in Urease Subunit Genes", *Journal of clinical microbiology*. 36 (12), pp. 3710-3712.
108. Navab A., Salehi R. (2004), "PCR and RFLP Analysis for Identification and Typing of *Helicobacter pylori* Strains from Gastric Biopsy Specimens", *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran*. 15 (3), pp. 227- 231
109. Stone G., Shortridge D., Flamm R., et al (1997), "PCR-RFLP typing of ureC from *Helicobacter pylori* isolated in Argentina from gastric biopsies before and after treatment with clarithromycin", *Epidemiology & Infection*. 118 (2), pp. 119-124.
110. Stone G., Shortridge D., Flamm R., et al (1997), "PCR-RFLP typing of ureC from *Helicobacter pylori* isolated from gastric biopsies during a European multi-country clinical trial", *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 40 (2), pp. 251-256.
111. Okimoto T., Murakami K., Sato R., et al (2003), "Is the recurrence of *Helicobacter pylori* infection after eradication therapy resultant from recrudescence or reinfection, in Japan", *Helicobacter*. 8 (3), pp. 186-191.
112. Hildebrand P., Bardhan P., Rossi L., et al (2001), "Recrudescence and reinfection with *Helicobacter pylori* after eradication therapy in Bangladeshi adults", *Gastroenterology*. 121 (4), pp. 792-798.



113. Wheeldon T. U., Hoang T., Phung D., et al (2005), "Long-term follow-up of *Helicobacter pylori* eradication therapy in Vietnam: reinfection and clinical outcome", *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 21 (8), pp. 1047-1053.

114. Menoni S. M. F., Bonon S. H. A., Zeitune J. M. R., et al (2013), "PCR-based detection and genotyping of *Helicobacter pylori* in endoscopic biopsy samples from Brazilian patients", *Gastroenterology research and practice*. 2013, pp. 1-8.

115. Bộ Y tế (2013). *Hướng dẫn qui trình kỹ thuật chuyên ngành vi sinh y học. Số: 26/QĐ-BYT*

116. Kulsantiwong P., Chomvarin C., Mairiang P., et al (2012), "PCR-RFLP and antimicrobial susceptibility profiles of *Helicobacter pylori* isolated from antrum and corpus of dyspeptic patients in Thailand", *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health*. 43 (4), pp. 933-942.

117. Malano EL. ,Tamada F. (1992). "Diagnosis and therapeutics ", *Text book of Gastrointestinal endoscopy* J.B. Lippincott Company Philadelphia pp. 21-25.

118. Trịnh Tuấn Dũng (2000). *Nghiên cứu hình thái học của loét dạ dày. Luận án tiến sỹ y học*, Trường Đại học Y Hà Nội. 49-125.

119. Redondo J. J., Keller P. M., Zbinden R., et al (2018), "A novel RT-PCR for the detection of *Helicobacter pylori* and identification of clarithromycin resistance mediated by mutations in the 23S rRNA gene", *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 90 (1), pp. 1-6.

120. Balouiri M., Sadiki M.,Ibnsouda S. K. (2016), "Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review", *Journal of pharmaceutical analysis*. 6 (2), pp. 71-79.

121. Wayne PA. (2010). *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline- Second Edition. CLSI document M45-A2.*

122. Trần Thiện Trung, Đỗ Trọng Hải, Quách Trọng Đức, et al (2009.), "Hiệu quả của phác đồ đầu tay EAC và EAL trong triệt trừ *Helicobacter pylori* ", *Y Hoc TP. Ho Chi Minh.* 13 pp. 5 - 10.

123. Tạ Long, Trịnh Tuấn Dũng, Trường B. X. (2010 ), "Nhiễm khuẩn *Helicobacter pylori*, loét dạ dày tá tràng và ung thư dạ dày ở Việt Nam", *Tạp chí Khoa học Tiêu hóa Việt Nam.* V (20 ), pp. 1317-1334.

124. Malaty H. M., El-Kasabany A., Graham D. Y., et al (2002), "Age at acquisition of *Helicobacter pylori* infection: a follow-up study from infancy to adulthood", *The Lancet.* 359 (9310), pp. 931-935.

125. Lê Văn Nho, Hoàng Trọng Thắng, Trần Văn Huy (2011), "Nghiên cứu hiệu quả phác đồ Esomeprazole + Amoxicillin + Clarithromycin ở bệnh nhân loét tá tràng có *H. pylori* dương tính ", *Tạp chí Y học Việt Nam số đặc biệt năm 2011.* pp. 147-153.

126. Nguyễn Duy Thắng (2010 ), "Kết quả điều trị loét dạ dày nhiễm HP bằng phác đồ Esomeprazole - Amoxicillin - Clarithromycin 1 và 2 tuần, theo dõi sau 1 tháng và 6 tháng ", *Tạp chí thông tin y dược.* 4, pp. 15-17.

127. Vũ Thị Lừu (2011). *Nghiên cứu hiệu quả của phác đồ EAL và EAM trong điều trị loét tá tràng có H. pylori dương tính tại Bệnh viện E, Học Viện Quân Y.*

128. Wang F. W., Tu M. S., Mar G. Y., et al (2011), "Prevalence and risk factors of asymptomatic peptic ulcer disease in Taiwan", *World J Gastroenterol.* 17 (9), pp. 1199-1203.

129. Vũ Văn Khiên (2008), "Đặc điểm lâm sàng, nội soi, mô bệnh học và hiệu quả điều trị loét dạ dày bằng phác đồ Esomeprazole-Amoxicilline-Clarithromycin (EAC)", *Tạp chí Y học thực hành.* 7, pp. 8-10.

130. Zanten S. J., Bradette M., Farley A., et al (1999), "The DU-MACH study: eradication of *Helicobacter pylori* and ulcer healing in patients with acute duodenal ulcer using omeprazole based triple therapy", *Aliment Pharmacol Ther.* 13 (3), pp. 289-295.
131. Wyatt J. I., Rathbone B. J., Sobala G. M., et al (1990), "Gastric epithelium in the duodenum: its association with *Helicobacter pylori* and inflammation", *J Clin Pathol.* 43 (12), pp. 981-986.
132. Lai Y. C., Wang T. H., Huang S. H., et al (2003), "Density of *Helicobacter pylori* may affect the efficacy of eradication therapy and ulcer healing in patients with active duodenal ulcers", *World journal of gastroenterology: WJG.* 9 (7), pp. 1537.
133. Wang Y. K., Kuo F. C., Liu C. J., et al (2015), "Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments", *World Journal of Gastroenterology: WJG.* 21 (40), pp. 11221.
134. Perez-Perez G. I., Van T. N., Huong D. T., et al (2016), "Isolation and characterization of *Helicobacter pylori* recovered from gastric biopsies under anaerobic conditions", *Diagnostic microbiology and infectious disease.* 86 (2), pp. 136-140.
135. Nguyễn Văn Thịnh (2009), "Tỷ lệ nhiễm *Helicobacter pylori* trong viêm dạ dày mạn tính qua kết hợp nhiều phương pháp phát hiện", *Tạp chí khoa học Tiêu hóa.* IV (17), pp. 1113 - 1119.
136. Chung J. W., Jung Y. K., Kim Y. J., et al (2012), "Ten-day sequential versus triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication: a prospective, open-label, randomized trial", *J Gastroenterol Hepatol.* 27 (11), pp. 1675-1680.
137. Suzuki H., Nishizawa T., Hibi T. (2010), "*Helicobacter pylori* eradication therapy", *Future Microbiol.* 5 (4), pp. 639-648.

138. De Francesco V., Giorgio F., Ierardi E., et al (2011), "Primary clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*: the Multicentric Italian Clarithromycin Resistance Observational (MICRO) study", *J Gastrointestin Liver Dis.* 20 (3), pp. 235-239.
139. Trần Thế Hải (2002). *Kết quả điều trị loét tá tràng có H. pylori dương tính bằng phác đồ Nexium + Amoxicillin + Clarithromycin, theo dõi sau 6 tháng*, Luận văn Thạc sĩ khoa học y dược., Đại học Y Hà Nội.
140. Phan Thị Minh Hương, Hoàng Trọng Thăng (2007), "Nghiên cứu hiệu quả của liệu pháp kết hợp EAC trong điều trị loét tá tràng có *H. pylori*", *Tạp chí khoa học tiêu hóa Việt Nam* 2007. 2 (5), pp. 279-283.
141. Nguyễn Quang Duật, Nguyễn Thái Sơn, Trần Việt Tú, et al (2010 ), "Bước đầu nghiên cứu biến động của kháng thể kháng *H. pylori* trước và sau điều trị bằng phác đồ Pantoprazole + Amoxicillin + Clarithromycin ", *Tạp chí y học Việt Nam* 2, pp. 50-58.
142. Đào Hữu Khôi, Nguyễn Công Kiên, Nguyễn Thị Thanh Tâm, et al (2009), "Hiệu quả của phác đồ Omeprazole + Amoxicillin + Levofloxacin so với Omeprazole + Amoxicillin + Clarithromycin trong điều trị tiết trừ *H. pylori* ở bệnh nhân viêm loét dạ dày-tá tràng ", *Tạp chí khoa học tiêu hóa Việt Nam* pp. 1051-1056.
143. Trần thiện Trung (2008). *Bệnh lý dạ dày tá tràng và nhiễm Helicobacter pylori*, Nhà xuất bản Y học (35), pp. 71-72, 179-197.
144. Megraud F., Coenen S., Versporten A., et al (2013), "*Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption", *Gut.* 62 (1), pp. 34-42.
145. Megraud F., Kist M., Brea M. L., et al (2011), "Surveillance of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe 2008-2009", *Gastroenterology.* 140 (5), pp. S-312.

146. Martos M., Bujanda L., Salicio Y., et al (2014), "Clarithromycin for first-line treatment of *Helicobacter pylori* infection after culture in high-resistance regions", *European journal of gastroenterology & hepatology*. 26 (12), pp. 1380-1384.

147. Yakoob J., Abid S., Jafri W., et al (2013), "Low rate of recurrence of *Helicobacter pylori* infection in spite of high clarithromycin resistance in Pakistan", *BMC gastroenterology*. 13 (1), pp. 33.

148. Tulassay Z., Stolte M., Sjölund M., et al (2008), "Effect of esomeprazole triple therapy on eradication rates of *Helicobacter pylori*, gastric ulcer healing and prevention of relapse in gastric ulcer patients", *European journal of gastroenterology & hepatology*. 20 (6), pp. 526-536.

149. De Francesco V., Zullo A., Hassan C., et al (2011), "Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: An updated appraisal", *World journal of gastrointestinal pathophysiology*. 2 (3), pp. 35.

150. Saito N., Konishi K., Kato M., et al (2008), "Cocoid formation as a mechanism of species-preservation in *Helicobacter pylori*: an ultrastructural study", *The Hokkaido journal of medical science*. 83 (5), pp. 291-295.

151. Treiber G., Lambert J. (1998), "The impact of *Helicobacter pylori* eradication on peptic ulcer healing", *The American journal of gastroenterology*. 93 (7), pp. 1080-1084.

152. Kim H. U. (2015), "Diagnostic and treatment approaches for refractory peptic ulcers", *Clinical endoscopy*. 48 (4), pp. 285.

153. Selgrad M., Malfertheiner P. (2011), "Treatment of *Helicobacter pylori*", *Current Opinion in Gastroenterology*. 27 (6), pp. 565-570.

154. Chung J. W., Jung Y. K., Kim Y. J., et al (2012), "Ten-day sequential versus triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication: A prospective, open-label, randomized trial", *Journal of gastroenterology and hepatology*. 27 (11), pp. 1675-1680.

155. Megraud F. (1997), "Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics", *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 11 (S1), pp. 43-53.
156. Aguemon B., Struelens M., Deviere J., et al (2005), "Primary antibiotic resistance and effectiveness of *Helicobacter pylori* triple therapy in ulceroinflammatory pathologies of the upper digestive tract", *Acta gastroenterologica belgica*. 68, pp. 287-293.
157. Bruce M. G., Bruden D. L., McMahon B. J., et al (2006), "Alaska sentinel surveillance for antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori* isolates from Alaska native persons, 1999–2003", *Helicobacter*. 11 (6), pp. 581-588.
158. Siavashi F., Safari F., Doratotaj D., et al (2006), "Antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* isolates from Iranian adults and children", *Arch Iran Med*. 9(4), pp. 308-314.
159. Gu Q., Xia H., Wang J., et al (2006), "Update on clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* in Hong Kong and its effect on clarithromycin-based triple therapy", *Digestion*. 73 (2-3), pp. 101-106.
160. Kim J. M., Kim J., Jung H. C., et al (2004), "Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* isolated from Korean patients in 2003", *The Korean journal of gastroenterology*. 44 (3), pp. 126-135.
161. Bang S. Y., Han D. S., Eun C. S., et al (2007), "Changing patterns of antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* in patients with peptic ulcer disease", *The Korean journal of gastroenterology= Taehan Sohwagi Hakhoe chi*. 50 (6), pp. 356-362.
162. Yang X., Wang J.-X., Han S.-X., et al (2019), "High dose dual therapy versus bismuth quadruple therapy for *Helicobacter pylori* eradication treatment: A systematic review and meta-analysis", *Medicine*. 98 (7), pp.

163. Papastergiou V., Georgopoulos S. D., Karatapanis S. (2014), "Treatment of *Helicobacter pylori* infection: Past, present and future", *World journal of gastrointestinal pathophysiology*. 5 (4), pp. 392.
164. Soto G., Bautista C. T., Roth D. E., et al (2003), "*Helicobacter pylori* reinfection is common in Peruvian adults after antibiotic eradication therapy", *J Infect Dis*. 188 (9), pp. 1263-1275.
165. Rollan A., Giancaspero R., Fuster F., et al (2000), "The long-term reinfection rate and the course of duodenal ulcer disease after eradication of *Helicobacter pylori* in a developing country", *The American journal of gastroenterology*. 95 (1), pp. 50-56.
166. Leal-Herrera Y., Torres J., Monath T. P., et al (2003), "High rates of recurrence and of transient reinfections of *Helicobacter pylori* in a population with high prevalence of infection", *The American journal of gastroenterology*. 98 (11), pp. 2395-2402.
167. Soto G., Bautista C. T., Roth D. E., et al (2003), "*Helicobacter pylori* reinfection is common in Peruvian adults after antibiotic eradication therapy", *The Journal of infectious diseases*. 188 (9), pp. 1263-1275.
168. Adachi M., Mizuno M., Yokota K., et al (2002), "Reinfection rate following effective therapy against *Helicobacter pylori* infection in Japan", *Journal of gastroenterology and hepatology*. 17 (1), pp. 27-31.
169. Rodríguez B. G., Feria M. R., Montes M. G., et al (2004), "Incidence and factors influencing on *Helicobacter pylori* infection recurrence", *Rev Esp Enferm Dig*. 96 (9), pp. 620-623.
170. Nam J. H., Ryu K. H., Park B. J., et al (2019), "Rate and predictive factors of *Helicobacter pylori* recurrence: Analysis of a screening cohort", *Saudi Journal of Gastroenterology: Official Journal of the Saudi Gastroenterology Association*. 25 (4), pp. 251.

171. Fernandes Y. C. F., Bonatto G. d. R., Bonatto M. W. (2016), "Recurrence rate of *Helicobacter pylori* in patients with peptic ulcer five years or more after successful eradication", *Arquivos de gastroenterologia*. 53 (3), pp. 152-155.
172. Seo J. H., Hong S. J., Kim J.-H., et al (2016), "Long-term recurrence rates of peptic ulcers without *Helicobacter pylori*", *Gut and liver*. 10 (5), pp. 719.
173. Jeon Y. T., Lee S. W., Im Kwon S., et al (2001), "Differentiation between reinfection and recrudescence of *Helicobacter pylori* strains using PCR-based Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis", *Yonsei Medical Journal*. 42 (1), pp. 41-45.
174. Peitz U., Hackelsberger A., Malfertheiner P. (1999), "A practical approach to patients with refractory *Helicobacter pylori* infection, or who are re-infected after standard therapy", *Drugs*. 57 (6), pp. 905-920.
175. Take S., Mizuno M., Ishiki K., et al (2012), "Reinfection rate of *Helicobacter pylori* after eradication treatment: a long-term prospective study in Japan", *Journal of gastroenterology*. 47 (6), pp. 641-646.
176. Carta M., Dore M., Idda M., et al (2000), "Effect of cure rate on reinfection with *H. pylori*: a three-year follow-up study", *The American journal of gastroenterology*. 95 (11), pp. 3324.
177. Zullo A., Rinaldi V., Hassan C., et al (2000), "Clinical and histologic predictors of *Helicobacter pylori* infection recurrence", *Journal of clinical gastroenterology*. 31 (1), pp. 38-41.
178. Shin C. M., Kim N., Lee H. S., et al (2009), "Validation of diagnostic tests for *Helicobacter pylori* with regard to grade of atrophic gastritis and/or intestinal metaplasia", *Helicobacter*. 14 (6), pp. 512-519.



179. Kang H. Y., Kim N., Park Y. S., et al (2006), "Progression of atrophic gastritis and intestinal metaplasia drives *Helicobacter pylori* out of the gastric mucosa", *Digestive diseases and sciences*. 51 (12), pp. 2310-2315.
180. Zou Q. H., Li R. Q. (2011), "*Helicobacter pylori* in the oral cavity and gastric mucosa: a meta-analysis", *Journal of oral pathology & medicine*. 40 (4), pp. 317-324.
181. Al Asqah M., Al Hamoudi N., Anil S., et al (2009), "Is the presence of *Helicobacter pylori* in the dental plaque of patients with chronic periodontitis a risk factor for gastric infection?", *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 23 (3), pp. 177-179.
182. Pradeep P. S, G M. M., Ganesh Prasad B, et al (2018), "Oral prophylaxis as an adjunct to systemic H.pylori eradication therapy", *International Journal of Oral Health Dentistry*. 4 (4), pp. 230-233
183. Nurgalieva Z. Z., Malaty H. M., Graham D. Y., et al (2002), "*Helicobacter pylori* infection in Kazakhstan: effect of water source and household hygiene", *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 67 (2), pp. 201-206.
184. Aziz R. K., Khalifa M. M., Sharaf R. R. (2015), "Contaminated water as a source of *Helicobacter pylori* infection: A review", *Journal of advanced research*. 6 (4), pp. 539-547.
185. Bahrami A. R., Rahimi E., Ghasemian Safaei H. (2013), "Detection of *Helicobacter pylori* in city water, dental units' water, and bottled mineral water in Isfahan, Iran", *The Scientific World Journal*. 2013, pp. 1-5.
186. Lee Y. Y., Ismail A. W., Mustaffa N., et al (2012), "Sociocultural and dietary practices among Malay subjects in the north-eastern region of Peninsular Malaysia: a region of low prevalence of *Helicobacter pylori* infection", *Helicobacter*. 17 (1), pp. 54-61.

187. Adams B., Bates T., Oliver J. (2003), "Survival of *Helicobacter pylori* in a natural freshwater environment", *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (12), pp. 7462-7466.
188. Kivi M., Tindberg Y., Sorberg M., et al (2003), "Concordance of *Helicobacter pylori* strains within families", *J Clin Microbiol.* 41 (12), pp. 5604-5608.
189. Gisbert J. P., Arata I. G., Boixeda D., et al (2002), "Role of partner's infection in reinfection after *Helicobacter pylori* eradication", *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 14 (8), pp. 865-871.
190. Sugimoto M., Wu J.-Y., Abudayyeh S., et al (2009), "Unreliability of results of PCR detection of *Helicobacter pylori* in clinical or environmental samples", *Journal of clinical microbiology.* 47 (3), pp. 738-742.

# PHỤ LỤC 1

## KẾT QUẢ PCR-RFLP VÀ GIẢI TRÌNH TỰ CỦA GEN *UreC*

### Bệnh phẩm mã số 1-Bệnh nhân 116. Nguyễn Thị Th.

#### I. Phân tích PCR & PCR-RFLP của gen *UreC* trước điều trị

##### 1. Trình tự 712 bp

```

ATGTTTGTGATGCGTTTGGGCATTGCGGCCGGATTGTATTTTAAAAACATTCTAAACGAATAAAATTTTAATTG
GTAAGACACCAGAAAAAGCGGCTATATGGTAGAAAACGCTTTAGTGAGCGCTTTAACTTCCATAGGCTATAAT
GTGATCCAAATAGGACCTATGCCCACCCCTGCAATTGCGTTTTTAAACCGAAGACATGCGCTGTGATGCGGGTA
TTATGATAAGCGCAAGCCACAACCCTTTTGAAGATAATGGTATTAAGTTTTTCAATTCTTATGGTTATAAGCT
TAAAGAAGAAGAAGAAAAAGCGATTGAAGAAATCTTTCATGATGAAGAATTACTGCATTCTAGCTATAAAGTG
GGCGAGAGCGTCGGTAGCGCTAAAAGGATAGACGATGTCATAGGGCGCTATATCGTGCATTTAAAAACTCTT
TCCCCAACATTTGAATTTACAGAGTTTAAGGATCGTGCTAGATACCGCTAATGGCGCGGCTTATAAGGTGGC
TCCGGTAGTTTTTAGCGAGCTTGGGGCTGATGTTTTAGTGATTAATGATGAGCCTAATGGGTGTAATATTAAT
GAGCAATGCGGGGCTTTACACCCTAACCAATTGAGCCAGGAAGTGAAAAAATACCGTGCGGATTTGGGCTTTG
CTTTTGATGGTGTGCTGATAGGTGGTGGTGGGGATAATTAGGGAATATCGTGCA
    
```

##### 2. Đoạn PCR được nhân bản từ gen *UreC* của *H.pylori* qua phân tích BLAST

Đoạn sequence tải để so sánh	Mô tả	Tương đồng
CP035105.1	<i>Helicobacter pylori</i> strain Hpbs2 chromosome, complete genome	97.50%
AP017345.1	<i>Helicobacter pylori</i> DNA, nearly complete genome, strain: F55	97.36%
AP011941.1	<i>Helicobacter pylori</i> F30 DNA, complete genome	97.36%

#### II. Phân tích PCR & PCR-RFLP của gen *UreC* sau điều trị

##### 1. Trình tự 712bp

```

ATGTTTGTGATGCGTTTGGGCATTGCGGCCGGATTGTATTTTAAAAACATTCTAAACGAATAAAATTTTAATTG
GTAAGACACCAGAAAAAGCGGCTATATGGTAGAAAACGCTTTAGTGAGCGCTTTAACTTCCATAGGCTATAAT
GTGATCCAAATAGGACCTATGCCCACCCCTGCAATTGCGTTTTTAAACCGAAGACATGCGCTGTGATGCGGGTA
TTATGATAAGCGCAAGCCACAACCCTTTTGAAGATAATGGTATTAAGTTTTTCAATTCTTATGGTTATAAGCT
TAAAGAAGAAGAAGAAAAAGCGATTGAAGAAATCTTTCATGATGAAGAATTACTGCATTCTAGCTATAAAGTG
GGCGAGAGCGTCGGTAGCGCTAAAAGGATAGACGATGTCATAGGGCGCTATATCGTGCATTTAAAAACTCTT
TCCCCAACATTTGAATTTACAGAGTTTAAGGATCGTGCTAGATACCGCTAATGGCGCGGCTTATAAGGTGGC
TCCGGTAGTTTTTAGCGAGCTTGGGGCTGATGTTTTAGTGATTAATGATGAGCCTAATGGGTGTAATATTAAT
GAGCAATGCGGGGCTTTACACCCTAACCAATTGAGCCAGGAAGTGAAAAAATACCGTGCGGATTTGGGCTTTG
CTTTTGATGGTGTGCTGATAGGTGGTGGTGGGGATAATTAGGGAATATCGTGCA
    
```

2. Đoạn PCR được nhân bản từ gen *UreC* của *H. pylori* tái xuất hiện sau điều trị tiệt trừ qua phân tích BLAST

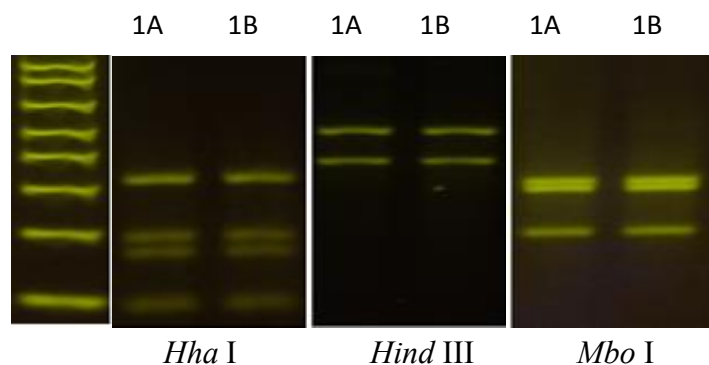
Đoạn sequence tải để so sánh	Mô tả	Tương đồng
CP035105.1	<i>Helicobacter pylori</i> strain Hpbs2 chromosome, complete genome	97.50%
AP017345.1	<i>Helicobacter pylori</i> DNA, nearly complete genome, strain: F55	97.36%
AP011941.1	<i>Helicobacter pylori</i> F30 DNA, complete genome	97.36%

III. So sánh trình tự đoạn PCR được khuếch đại trước và sau điều trị

Mã trình tự: Query\_12485 (dna)

Điểm cao nhất	Tổng điểm	Tỷ lệ bao phủ	Giá trị E	Độ tương đồng	Mã số
1315	1315	100%	0.0	100%	Query_21419

IV. So sánh kết quả PCR- RFLP trước và sau điều trị



V. Nhận xét:

- So sánh với trình tự các chủng *H. pylori* trong ngân hàng gen xác định vi khuẩn trong mẫu sinh thiết trước và sau điều trị tiệt trừ đều là *H. pylori*.
- Kết quả phân tích PCR-RFLP của chủng trước và sau điều trị giống nhau khi cắt bằng 3 loại enzyme cắt giới hạn *Hha* I, *Hind* III, *Mbo* I.

- Giải trình tự gen *ureC* thấy độ tương đồng hai trình tự 100%
  - Chủng *H.pylori* nhẽm sau điều trị tiệt trừ giống chủng nhiễm trước điều trị
- Bệnh phẩm mã số 2 -Bệnh nhân 219. Nguyễn Thị Thanh L.**

## I. Phân tích PCR &PCR-RFLP của gen *UreC* trước điều trị

### 1. Trình tự 797 bp

```
TCCGCTCAAGCGCTTCCCTCCCCCATGTTTGTGATGCGTTTAGGCATTGCGGCCGGGCTGTATTTAAAAACA
TTCTAAACGAATAAATTTTATTGGTAAGACACCAGAAAAGCGGCTATATGGTAGAAAACGCTTTAGTGAGCGC
TTTAACTTCCATAGGCTATAATGTGATTCAAATAGGGCCTATGCCTACCCCTGCGATTGCGTTTTTAACCGAA
GACATGCGCTGCGATGCGGGCATTATGATAAGCGCGAGCCACAACCCTTTTGAAGATAATGGGATTAAGTTTT
TCAATTCTTATGGTTATAAGCTTAAAGAAGAAGAAGAAAAAGCGATTGAAGAAATCTTTCATGATGAAGGATT
ACTGCATTCTAGCTATAAAGTGGGCGAGAGTGTGCGGTAGCGCTAAAAGGATAGACGATGTCATAGGGCGCTAT
ATCGCGCATTTAAACACTCTTTCCCCAACATTTGAATTTACAGAGTTTAAGGATCGTGCTAGATACCGCTA
ATGGCGCGGCTTATAAGGTGGCTCCAGTAGTTTTTAGCGAGCTTGGGGCTGATGTGTTAGTGATTAATGATGA
GCCTAACGGGTGTAATATCAATGAGCAATGCGGGGCTTTACACCCTAATTTTCATTGAGCCAGGAAGTAAAAA
TACCGCGCGGATCTGGCTTTGCTTTTGATGGCGATGCCGATAGGCTAGTGGTGGTGAATATTTAGGCATATC
GTGCCATGGGGATAAGCTTTAGGGTGTAGGGGTTTATCATCATCTCATAAAAACGCGCTCTCTACA
```

### 2. Đoạn PCR được nhân bản từ *H.pylori* qua phân tích BLAST

<b>Đoạn sequence tải để so sánh</b>	<b>Mô tả</b>	<b>Tương đồng</b>	<b>Mã số</b>
AP017333.1	<i>Helicobacter pylori</i> DNA, nearly complete genome, strain: F20	94.52%	AP017333.1
AP017358.1	<i>Helicobacter pylori</i> DNA, nearly complete genome, strain: MKF8	94.39%	AP017358.1
CP011485.1	<i>Helicobacter pylori</i> strain ausabrJ05, complete genome	94.39%	CP011485.1

## II. Phân tích PCR &PCR-RLFL của gen *UreC* sau điều trị

### 1. Trình tự 817 bp

```
AAGGGGGGCTGCCCTCGCCCCCATGTTTGTGATGCGTTTAGGCATTGCGGCCGGGCTGTATTTAAAAACATTC
TAAACGAATAAATTTTAAATTGGTAAGACACCAGAAAAGCGGCTATATGGTAGAAAACGCTTTAGTGAGCGCT
TTAACTTCCATAGGCTATAATGTGATTCAAATAGGGCCTATGCCTACCCCTGCGATTGCGTTTTTAACCGAAG
ACATGCGCTGCGATGCGGGCATTATGATAAGCGCGAGCCACAACCCTTTTGAAGATAATGGGATTAAGTTTTT
CAATTCTTATGGTTATAAGCTTAAAGAAGAAGAAGAAAAAGCGATTGAAGAAATCTTTCATGATGAAGGATTA
CTGCATTCTAGCTATAAAGTGGGCGAGAGTGTGCGGTAGCGCTAAAAGGATAGACGATGTCATAGGGCGCTATA
TCGCGCATTTAAACACTCTTTCCCCAACATTTGAATTTACAGAGTTTAAGGATCGTGCTAGATACCGCTAA
TGGCGCGGCTTATAAGGTGGCTCCAGTAGTTTTTAGCGAGCTTGGGGCTGATGTGTTAGTGATTAATGATGAG
CCTACGGGTGTAATATCAATGAGCAATGCGGGGCTTTACACCCTAATTCATTGAGCCAGGAAGTAAAAATAC
CGCGCGGATCTGGGCTTTGCTTTTGATGGCGATGCCGATAGGCTAGTGTGGTGGATATTTAGGAATATCGTGC
ATGGGATAGCTTTAGGGTGTAGGGTTATCATCTTTCAAAAACCGCCCTTAATGGATAGAGCTCAGCGCTGCG
CGTACTCAGCTGAC
```

2. Đoạn PCR được nhân bản từ *H. pylori* qua phân tích BLAST

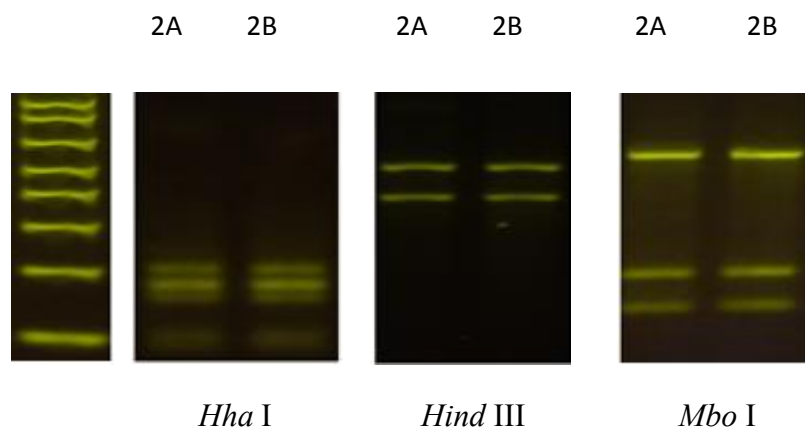
<b>Đoạn sequence tải để so sánh</b>	<b>Mô tả</b>	<b>Tương đồng</b>
AP017333.1	<i>Helicobacter pylori</i> DNA, nearly complete genome, strain: F20	94.52%
AP017358.1	<i>Helicobacter pylori</i> DNA, nearly complete genome, strain: MKF8	94.39%
CP011485.1	<i>Helicobacter pylori</i> strain ausabrJ05, complete genome	94.39%

III. So sánh trình tự đoạn PCR được khuếch đại trước và sau điều trị

Mã trình tự: Query\_22693 (dna)

Điểm cao nhất	Tổng điểm	Tỷ lệ bao phủ	Giá trị E	Độ tương đồng	Mã số
1306	1306	97%	0.0	97.19%	Query_22695

IV. So sánh kết quả PCR- RFLP trước và sau điều trị



V. Nhận xét

- So sánh với trình tự các chủng *H.pylori* trong ngân hàng gen xác định vi khuẩn trong mẫu sinh thiết trước và sau điều trị tiệt trừ đều là *H.pylori*.
- Kết quả phân tích PCR-RFLP của chủng trước và sau điều trị giống nhau khi cắt bằng 3 loại enzyme cắt giới hạn *Hha* I, *Hind* III, *Mbo* I.

- Giải trình tự gen *ureC* thấy độ tương đồng hai trình tự 97.19%, có 2,81% khác so với trình tự chủng ban đầu.

- Chủng *H.pylori* nhiễm sau điều trị tiệt trừ giống chủng nhiễm trước điều trị.

**Bệnh phẩm mã số 3-Bệnh nhân 73. Lê Thị Hồng Tr.**

**I. Phân tích PCR &PCR-RFLP của gen *UreC* trước điều trị**

**1. Trình tự 797 bp**

```
CAACGGGGCTTCTACCCCCCATGTTTGTGATGCGTTTGGGCATTGCGGCCGGATTGTATTTTAAAAAGCATT
CTATACCCTATATCTTATTGGTAAGACACCAGAAAAGCGGCTATATGGTAGAAAACGCTTTAGTGAGCGCTTTA
ACTTCCATAGGCTACAATGTGATTCAAATAGGACCTATGCCTACCCCTGCGATTGCGTTTTTAACCGAAGACA
TGCGCTGTGATGCGGGTATTATGATAAGCGCGAGCCACAACCCTTTTGAAGATAATGGCATTAAAGTTTTTCAA
TTCTTATGGTTATAAGCTTAAAGAAGAAGAAGAAAAGCGATTGAAGAAATCTTTCATGATGAAGAATTACTG
CATTCTAGCTATAAAGTGGGCGAGAGCGTCGGTAGCGCTAAAAGGATAGACGATGTCATAGGGCGCTATATCG
TGCATTTAAACACTCTTTCCCAAACATTTGAATTTACAGAGTTTAAAGGATCGTGCTAGATACCGCTAATGGT
GCGGCTTATAAGGTGGCTCCGGTAGTTTTTAGCGAGCTTGGGGCTGATGTTTTAGTGATTATGATGAGCCTAT
GGGTGTACATTATGAGCAATGTGGGCTTTACACCCTAACCAGTTGAGCCAGGAAGTGAAAAATACCGCGCGAT
TTGGGCTTTGCTTTTGATGCGATGCTGATAGCTGTGTGTGATAATTTAGGGAATATCGTGCATGCGATAGCTT
TAGGTGTAGGGTTATCATTCTCAAAAAGCGCCCTATATTGGCAATAGCTATCCGTCTGTTAATCTA
```

**2. Đoạn PCR được nhân bản từ *H.pylori* qua phân tích BLAST**

<b>Đoạn sequence tải để so sánh</b>	<b>Mô tả</b>	<b>Tương đồng</b>
CP006823.1	<i>Helicobacter pylori</i> oki154, complete genome	94.21%
AP017332.1	<i>Helicobacter pylori</i> DNA, nearly complete genome, strain: F209	94.20%
CP006825.1	<i>Helicobacter pylori</i> oki673, complete genome	94.08%

**II. Phân tích PCR &PCR-RLFL của gen *UreC* sau điều trị**

**1. Trình tự 800bp**

```
CAAGGAAGGTGAACTCGCCCCATGTTTGTGATGCGTTTGGGCATTGCGGCCGGATTGTATTTTAAAGCATTCT
AAACCAATAAATCTTATTGGTAAGACACCAGAAAAGCGGCTATATGGTAGAAAACGCTTTAGTAAGTGCTTTA
ACTTCCATAGGCTACAATGTGATTCAAATAGGGCCTATGCCCCACCCTGCGATTGCGTTTTTAACCGAAGACA
TGCGCTGTGATGCGGGTATTATGATAAGCGCGAGCCACAACCCTTTTGAAGATAATGGCATTAAAGTTTTTCAA
TTCTTATGGTTATAAGCTTAAAGAAGAAGAAGAAAAGCGATTGAAGAAATCTTTCATGATGAAGAATTACTG
CATTCTAGCTATAAAGTGGGCGAGAGCGTCGGTAGCGCTAAAAGGATAGACGATGTCATAGGGCGCTATATCG
TGCATTTAAACACTCTTTCCCAAACATTTGAATTTACAGAGTTTAAAGGATCGTGCTAGATACCGCTAATGG
TGCGGCTTATAAAGTGGCTCCGGTAGTTTTTAGCGAGCTTGGGGCTGATGTTTTAGTGATTAATGATGAGCCT
ATGGGTGCAATATTATGAGCATGCGGGGCTTTACACCCAACCAATTGAGCCAGGAAGTGAAAAATACCGCGCG
GATTTGGGCTTTGCTTTTGATGGCGATGCTGACAGGCTAGTGGTGGTAGATATTTAAGGGATATCGTGCATGG
GATAGCTTTTAAAGGTGTTAGGGGTTATCATTACTCAAGAAAACGCCCTTATATTGGGGGGGAAACGTG
```

2. Đoạn PCR được nhân bản từ *H. pylori* qua phân tích BLAST

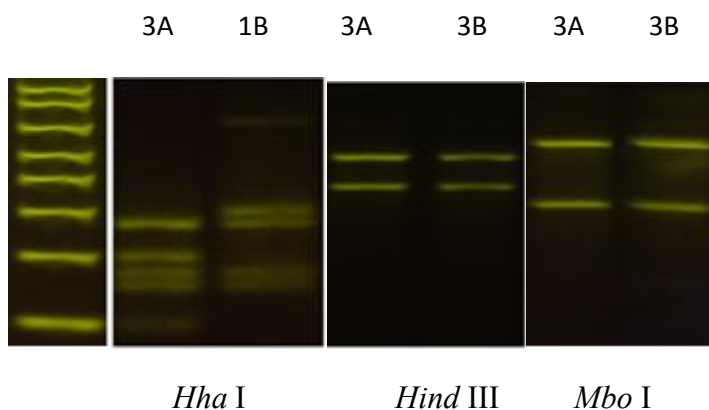
<b>Đoạn sequence tải để so sánh</b>	<b>Mô tả</b>	<b>Tương đồng</b>
AP014710.1	<i>Helicobacter pylori</i> DNA, complete genome, strain: ML1	94.80%
AP011941.1	<i>Helicobacter pylori</i> F30 DNA, complete genome.	95.33%
CP031558.1	<i>Helicobacter pylori</i> strain GD63 chromosome, complete genome	94.57%

III. So sánh trình tự đoạn PCR được khuếch đại trước và sau điều trị

Mã trình tự: Query\_50625 (dna)

<b>Điểm cao nhất</b>	<b>Tổng điểm</b>	<b>Tỷ lệ bao phủ</b>	<b>Giá trị E</b>	<b>Độ tương đồng</b>	<b>Mã số</b>
1158	1158	94%	0.0	94.20%	Query_50627

IV. So sánh kết quả PCR- RFLP trước và sau điều trị



V. Nhận xét:

- So sánh với trình tự các chủng *H. pylori* trong ngân hàng gen xác định vi khuẩn trong mẫu sinh thiết trước và sau điều trị tiết trừ đều là *H. pylori*.
- Kết quả phân tích PCR-RFLP của chủng trước và sau điều trị khác nhau ở kết quả cắt bằng enzyme cắt giới hạn *Hha* I.



- Giải trình tự gen *ureC* thấy độ tương đồng hai trình tự trước và sau điều trị là 94,2%. Trình tự chủng nhiễm sau điều trị có 5,8% khác so với trình tự chủng ban đầu

- Chủng *H.pylori* nhiễm sau điều trị tiết trừ khác chủng nhiễm trước điều trị.

### **Bệnh phẩm mã số 4-Bệnh nhân 142. Bùi Thanh H.**

#### **I. Phân tích PCR &PCR-RFLP của gen *UreC* trước điều trị**

##### **1. Trình tự 750 bp**

```
ACCGGAGCTACCTCCCCCATGTTTGTGATGCGTTTGGGCATTGCGGCTGGGTTGTATTTTAAAAACATTCTCA
ACCAGTAAATTTTAATTGGTAAGACACCAGAAAAAGCGGCTATATGGTAGAAAACGCTTTAGTGAGCGCTTTAA
CTTCCATAGGCTATAATGTGATCCAATAGGGCCTATGCCTACCCCTGCGATTGCGTTTTTAACCGAAGACATG
CGCTGTGATGCGGGTATTATGATAAGCGCAAGCCACAACCCTTTTGAAGATATGGCATTAAAGTTTTTCAACTC
TTATGGTATAGCTTAAAGAAGAAGAGAAAAAGCGATTGAAGAAATCTTTCATGGATGAGAATACTGCATTCTA
GTTATAAAGTGGGCGAGAGCGTCGGTAGCGCTAAAAGGATAGACGATGTCATAGGCGCTATATCGTGCAATTA
AAACCCCTCTCCCCAAACATTTGAATTACGAAGTTAAAGATCGTGCTAGATACCGCTAATGGGCGGGCTTATA
GGGGCTCCGGTAGTTTTTTAGCGAGCTTGGGGCGATGGGTAGGGATAATGATGAGCCTAATGGGTGTATATTAT
GAGCATGCGGGCTTTCCCTACTATGAGCAGGAGTGAAAAACCCGCGGATTGGGATTGCTTTTTGTGCGATCTG
ACAGCTACTAGAGTGATATAGGAATCGGCTGGAAGCTTTAGGGGGTAGGGTTACATCACACACACGCTCTCATA
GGGGGAGGACGTGGGGTGCG
```

##### **2. Đoạn PCR được nhân bản từ *H.pylori* qua phân tích BLAST**

<b>Đoạn sequence tải để so sánh</b>	<b>Mô tả</b>	<b><u>Tương đồng</u></b>
CP006826.1	<i>Helicobacter pylori</i> oki828, complete genome	91.20%
CP006610.2	<i>Helicobacter pylori</i> UM298, complete genome	91.05%
CP005491.3	<i>Helicobacter pylori</i> UM299, complete genome	91.05%

#### **II. Phân tích PCR &PCR-RLFL của gen *UreC* sau điều trị**

##### **1. Trình tự 803 bp**

```
AAAGGGGGGCGGGGAGTCGCTCCATGTTTGTGATGCGTTTGGGCATTGCGGCTGGGTTGTATTTTAAAAACATT
CTACACCAATAAAATTTTATTGGTAAGACACCAGAAAAAGCGGCTATATGGTAGAAAACGCTTTAGTGAGCGC
TTTAACTTCCATAGGCTATAATGTGATCCAATAGGGCCTATGCCTACCCCTGCGATTGCGTTTTTAACCGAA
GACATGCGCTGTGATGCGGGTATTATGATAAGCGCAAGCCACAACCCTTTTGAAGATAATGGCATTAAAGTTTT
TCAACTCTTATGGTTATAAGCTTAAAGAAGAAGAAGAAAAAGCGATTGAAGAAATCTTTCATGATGAAGAATT
ACTGCATTCTAGTTATAAAGTGGGCGAGAGCGTCGGTAGCGCTAAAAGGATAGACGATGTCATAGGCGCTAT
ATCGTGCAATTTAAACACTCTTTCCCCAAACATTTGAATTTACAGAGTTAAGGATCGTGCTAGATACCGCTA
ATGGGCGGGCTTATAAGTGGCTCCGGTAGTTTTTTAGCGAGCTTGGGGCTGATGTGTTAGTGATTAATGATGAG
CCTAATGGTGTATATTATGAGCATGCGGGCTTTACACCCTAACCATTTGAGCCAGGAAGTGAAAAATACCGC
```

GCGGATTTGGGCTTTGCTTTTGGATGGCGATGCTGACAGCTAGTGTGTGATATTTAGGGAATATCGTGCATGAG  
 ATAGCTTTAGGGTGTAGGGGTTATCATTCCATCTAAAACCGCCGCCTTGCTTTGGGGGAAGAACCTGTGCC

## 2. Đoạn PCR được nhân bản từ *H.pylori* qua phân tích BLAST

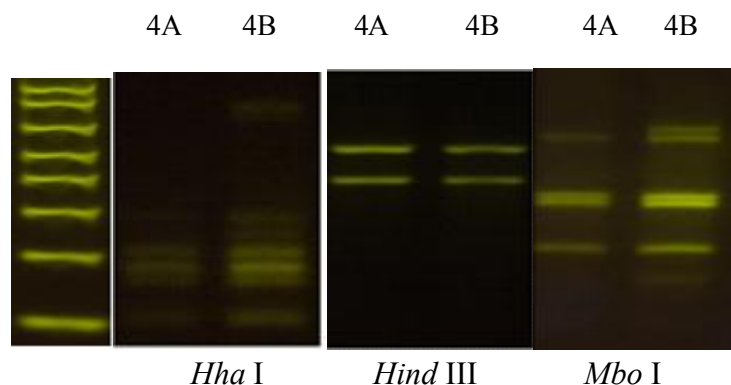
Đoạn sequence tải để so sánh	Mô tả	Tương đồng
CP006826.1	<i>Helicobacter pylori</i> oki828, complete genome	94.06%
CP025474.1	<i>Helicobacter pylori</i> strain H-137 chromosome, complete genome	93.80%
CP006822.1	<i>Helicobacter pylori</i> oki128, complete genome	93.54%

### III. So sánh trình tự đoạn PCR được khuếch đại trước và sau điều trị

Mã trình tự: Query\_51195 (dna)

Điểm cao nhất	Tổng điểm	Tỷ lệ bao phủ	Giá trị E	Độ tương đồng	Mã số
968	968	92%	0.0	91.35%	Query_51197

### IV. So sánh kết quả PCR- RFLP trước và sau điều trị



### V. Nhận xét

- So sánh với trình tự các chủng *H.pylori* trong ngân hàng gen xác định vi khuẩn trong mẫu sinh thiết trước và sau điều trị tiệt trừ đều là *H.pylori*.

- Kết quả phân tích PCR-RFLP của chủng trước và sau điều trị khác nhau ở kết quả cắt bằng enzyme cắt giới hạn *Hha* I và *Mbo* I.
- Giải trình tự gen *ureC* thấy độ tương đồng hai trình tự 91.35%. Trình tự chủng nhiễm sau điều trị có 8,65% khác so với trình tự chủng ban đầu.
- Chủng *H.pylori* nhiễm sau điều trị tiệt trừ khác chủng nhiễm trước điều trị.

## Bệnh phẩm mã số 5-Bệnh nhân 266. Nguyễn Thị L.

### I. Phân tích PCR &PCR-RFLP của gen *UreC* trước điều trị

#### 1. Trình tự 792 bp

CAAAGGGGCTGACTCACCCCATGTTTGTGATGCGTTTGGGCATTGCGGCCGGATTGTATTTTAAAAGCATTCTAAACCAATAAAAATCTTAATTGGTAAGACACCAGAAAAAGCGGCTATATGGTAGAAAACGCTTTAGTGAGCGCTTTAACTTCCATAGGCTACAATGTGATTCAAATAGGACCTATGCCTACCCCTGCGATTGCGTTTTTAAACCGAAGACATGCGCTGTGATGCGGGTATTATGATAAGCGCGAGCCACAACCCTTTTGAAGATAATGGCATTAAAGTTTTCAATTCTTATGGTTATAAGCTTAAAGAAGAAGAAGAAAAAGCGATTGAAGAAATCTTTCATGATGAAGAATTACTGCATTCTAGCTATAAAGTGGGCGAGAGCGTCGGTAGCGCTAAAAGGATAGACGATGTCATAGGGCGCTATATCGTGCATTTAAAACACTCTTCCCAAAACATTTGAATTTACAGAGTTTAAGGATCGTGCTAGATACCGCTAATGGTGCAGGCTTATAAGGTGGCTCCGGTAGTTTTTAGCGAGCTTGGGGCTGATGTTTTAGTGATTAATGATGAGCCTAATGGGTGTAACATTAATGAGCAATGTGGGGCTTTACACCCTAACCAGTTGAGCCAGGAAGTGAAAAATACCGCGCGGATTTGGGCTTTGCTTTTATGCGATGCTGATAGCTGTGTGTGATATTTAGGGATATCGTGCATGGGATAGCTTTAGGGTGTAGGGTTATCATCAATTCAAAAAAACCGCCCTCTATACGATGAT

#### 2.Đoạn PCR được nhân bản từ *H.pylori* qua phân tích BLAST

<b>Đoạn sequence tải để so sánh</b>	<b>Mô tả</b>	<b><u>Tương đồng</u></b>
AP017345.1	<i>Helicobacter pylori</i> DNA, nearly complete genome, strain: F55	95.62%
CP006823.1	<i>Helicobacter pylori</i> oki154, complete genome	95.63%
CP025474.1	<i>Helicobacter pylori</i> strain H-137 chromosome, complete genome	95.50%

### II. Phân tích PCR &PCR-RLFL của gen *UreC* sau điều trị

#### 1. Trình tự 794 bp

CAAAGGGGCTGACTCACCCCATGTTTGTGATGCGTTTGGGCATTGCGGCCGGATTGTATTTTAAAAGCATTCTAAACCAATAAAAATCTTAATTGGTAAGACACCAGAAAAAGCGGCTATATGGTAGAAAACGCTTTAGTGAGCGCTTTAACTTCCATAGGCTACAATGTGATTCAAATAGGACCTATGCCTACCCCTGCGATTGCGTTTTTAAACCGAAGACATGCGCTGTGATGCGGGTATTATGATAAGCGCGAGCCACAACCCTTTTGAAGATAATGGCATTAAAGTTTTCAATTCTTATGGTTATAAGCTTAAAGAAGAAGAAGAAAAAGCGATTGAAGAAATCTTTCATGATGAAGAATTACTGCATTCTAGCTATAAAGTGGGCGAGAGCGTCGGTAGCGCTAAAAGGATAGACGATGTCATAGGGCGCTATATCGTGCATTTAAAACACTCTTCCCAAAACATTTGAATTTACAGAGTTTAAGGATCGTGCTAGATACCGCTAATGGTGCAGGCTTATAAGGTGGCTCCGGTAGTTTTTAGCGAGCTTGGGGCTGATGTTTTAGTGATTAATGATGAGCCTAATGGGTGTAACATTAATGAGCAATGTGGGGCTTTACACCCTAACCAGTTGAGCCAGGAAGTGAAAAATACCGCGCGGATTTGGGCTTTGCTTTTATGCGATGCTGATAGCTGTGTGTGATATTTAGGGATATCGTGCATGGGATAGCTTTAGGGTGTAGGGTTATCATCAATTCAAAAAAACCGCCCTCTATACGATGAT

2. Đoạn PCR được nhân bản từ *H.pylori* qua phân tích BLAST

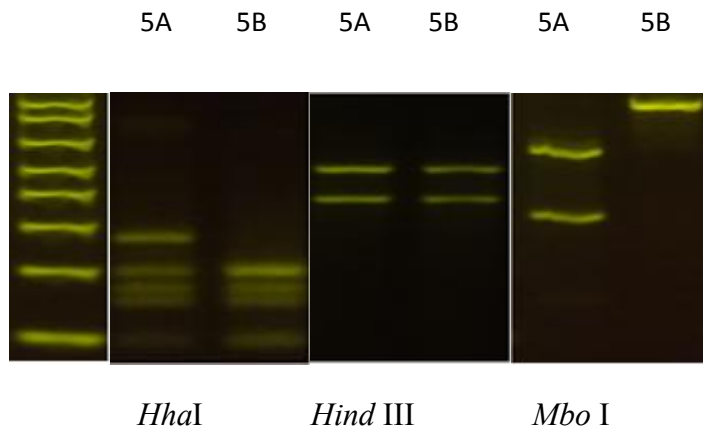
Đoạn sequence tải để so sánh	Mô tả	Tương đồng
CP025474.1	<i>Helicobacter pylori</i> strain H-137 chromosome, complete genome	94.47%
AP017331.1	<i>Helicobacter pylori</i> DNA, nearly complete genome, strain: F18	94.11%
AP014712.1	<i>Helicobacter pylori</i> DNA, complete genome, strain: ML3	94.11%

III. So sánh trình tự đoạn PCR được khuếch đại trước và sau điều trị

Mã trình tự: Query\_35659 (dna)

Điểm cao nhất	Tổng điểm	Tỷ lệ bao phủ	Giá trị E	Độ tương đồng	Mã số
1136	1136	93%	0.0	94.41%	Query_35659

IV. So sánh kết quả PCR- RFLP trước và sau điều trị



V. Nhận xét

- So sánh với trình tự các chủng *H.pylori* trong ngân hàng gen xác định vi khuẩn trong mẫu sinh thiết trước và sau điều trị tiết trừ đều là *H.pylori*.
- Kết quả phân tích PCR-RFLP của chủng trước và sau điều trị khác nhau ở kết quả cắt bằng enzyme cắt giới hạn *Hha I* và *Mbo I*.

- Giải trình tự gen *ureC* thấy độ tương đồng hai trình tự 94.41%. Trình tự chủng nhiễm sau điều trị có 5,59% khác so với trình tự chủng ban đầu.
- Chủng *H.pylori* nhiễm sau điều trị tiết trừ khác chủng nhiễm trước điều trị.

**Bệnh phẩm mã số 6-Bệnh nhân 85. Phạm Thị Nh.**

**I. Phân tích PCR &PCR-RFLP của gen *UreC* trước điều trị**

**1. Trình tự 798 bp**

GAAGGGGGGGTGTGCTCACCCCATGTTTGTGATGCGTTTTGGGCATTGCGGCCGGATTGTATTTTAAAACATTC  
TAAACCAATAAAATCTTAATTGGTAAAGACACCAGAAAAGCGGCTATATGGTAGAAAACGCTTTAGTGAGCGC  
TTTAACTTCCATAGGCTACAATGTGATTCAAATAGGGCCTATGCCTACCCCTGCAATTGCGTTTTTAAACCGAA  
GACATGCGCTGTGATGCGGGTATTATGATAAGCGCAAGCCACAACCCTTTTGAAGATAATGGCATTAAAGTTTT  
TCAATTCTTATGGTTATAAGCTTAAAGAAGAAGAAGAAAAGCGATTGAAGAAATCTTTCATGATGAAGAATT  
GCTGCATTCTAGCTATAAAGTGGGCGAGAGCGTCGGTAGCGCTAAAAGGATAGACGATGTCATAGGGCGCTAT  
ATCGTGCAATTTAAAACACTCTTTCCCAAACATTTGAATTTACAGAGTTTAAAGGATCGTGCTAGATACGGCTA  
ATGGCGCAGCTTATAAAGTGGCTCCGGTAGTTTTTTAGCGAGCTTGGGGCTGATGTTTTTAGTGATTAATGATGA  
GCCTAATGGGTGTAATATTATGAGCAATGCGGGCTTTACACCCTAACAGTTGAGCCAGGAAGTGA AAAATA  
CCGTGCGGATTTGGGCTTTGCTTTTGTGATGCGATGCTGATAGCTGTGTGGTGGATATTCAGGGATATCGTGAT  
GGGACAGCTTTAGGGTATAGGGTTATCATCTATCTAAAAACCGCCCTTATCTGGCAGGGTTCGCACGG

**2. Đoạn PCR được nhân bản từ *H.pylori* qua phân tích BLAST**

<b>Đoạn sequence tải để so sánh</b>	<b>Mô tả</b>	<b><u>Tương đồng</u></b>
CP023448.1	<i>Helicobacter pylori</i> strain HPJP26 chromosome, complete genome	94.86%
CP006822.1	<i>Helicobacter pylori</i> oki128, complete genome	94.86%
CP025474.1	<i>Helicobacter pylori</i> strain H-137 chromosome, complete genome	94.74%

**II. Phân tích PCR &PCR-RLFL của gen *UreC* sau điều trị**

**1. Trình tự 838 bp**

CCGCTAAGGGGGGTGACTCCCCCATGTTTGTGATGCGTTTTGGGCATTGCGGCCGGATTGTATTTTAAAACATT  
CTAAACCAATAAAATCTTATTGGTAAAGACACCAGAAAAGCGGCTATATGGTAGAAAACGCTTTAGTGAGCGCTTT  
AACTTCCATAGGCTACAATGTGATTCAAATAGGGCCTATGCCTACCCCTGCAATTGCGTTTTTAAACCGAAGAC  
ATGCGCTGTGATGCGGGTATTATGATAAGCGCAAGCCACAACCCTTTTGAAGATAATGGCATTAAAGTTTTTCA  
ATTCTTATGGTTATAAGCTTAAAGAAGAAGAAGAAAAGCGATTGAAGAAATCTTTCATGATGAAGAATTGCT  
GCATTCTAGCTATAAAGTGGGCGAGAGCGTCGGTAGCGCTAAAAGGATAGACGATGTCATAGGGCGCTATATC  
GTGCATTTAAAACACTCTTTCCCAAACATTTTGAATTTACAGAGTTTAAAGGATCGTGCTAGATACGGCTAAT  
GGGCGCAGCTTATAAGGTGGCTCCGGTAGTTTTTTAGCGAGCTTGGGGCTGATGTTTTTTAGTGATTAATGA  
TGGAGCCCTATGGGTGTAATTATTAATTGAGCATTGCGGGGCTTTTACACCCTAACAGTTTGTAGCCCAG  
GGAAGTGGAAAAATAACCGGTGGCGGAATTTGGGCCTTTTGGCTTTTGGATGGGCGGATGCTGATAGGGCT

GGGTGGGGTGGGGTGGGATATCTCAAGGGACTATTTCGGTGGCATGGGGGACAGCTTTTAAGGGAGTATCAGGG  
GTCTATCCAATCCTCCTAAAAAGCGCCCCTCTATA

## 2. Đoạn PCR được nhân bản từ *H. pylori* qua phân tích BLAST

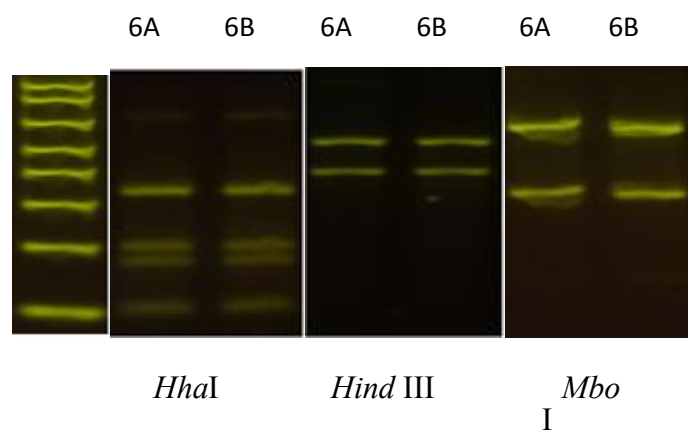
Đoạn sequence tải để so sánh	Mô tả	Tương đồng
CP023448.1	<i>Helicobacter pylori</i> DNA, nearly complete genome, strain: MKF8	90.50%
AP017358.1	<i>Helicobacter pylori</i> oki128, complete genome	90.50%
CP006822.1	<i>Helicobacter pylori</i> oki128, complete genome	90.50%

## III. So sánh trình tự đoạn PCR được khuếch đại trước và sau điều trị

Mã trình tự: Query\_28879 (dna)

Điểm cao nhất	Tổng điểm	Tỷ lệ bao phủ	Giá trị E	Độ tương đồng	Mã số
1077	1077	86%	0.0	94.34%	Query_28881

## IV. So sánh kết quả PCR- RFLP trước và sau điều trị



## V. Nhận xét

- So sánh với trình tự các chủng *H. pylori* trong ngân hàng gen xác định vi khuẩn trong mẫu sinh thiết trước và sau điều trị tiết trừ đều là *H. pylori*.
- Kết quả phân tích PCR-RFLP của chủng trước và sau điều trị giống nhau ở kết quả cắt bằng 3 enzyme cắt giới hạn *Hha* I , *Hind* III và *Mbo* I.

- Giải trình tự gen *ureC* thấy độ tương đồng hai trình tự 94.34%. Trình tự chủng nhiễm sau điều trị có 5,66% khác so với trình tự chủng ban đầu.
- Chủng *H.pylori* nhiễm sau điều trị tiết trừ giống chủng nhiễm trước điều trị.

**Bệnh phẩm mã số 7-Bệnh nhân 190. Nguyễn Thị U.**

## I. Phân tích PCR &PCR-RFLP của gen *UreC* trước điều trị

### 1. Trình tự 702 bp

```
CCAGGGGGTGACTCAGCTCATGTTGTGATGCGTTTTAGGCATTGCTGCCGGATTGTATTTTAAAGACATTCTCAA
CGAATAGATTCTAATCGGTAAGACACCAGAAAAGCGGCTATATGGTAGAAAACGCTTTAGTGAGTGCTTTACTT
CCATAGGCTATATGTGATCCAATAGGGCTATGCCACCCCTGCGATTGCGTTTTTAAACCGAAGACATGCGCTGT
GATGCGGGTATTATGATAGCGCAAGCCCAACCCTTTTGAAGATATGGTATTAAGTTTTTCAATTCTTATGGTA
TAGCTTAAAGAAGAAGAAGAAGAGCGATTGAGAATCTTTCATGATGAAGGATTACTGCATTCTAGCTATAAAGT
GGCCAGAGCGTCGGTAGCGCTAAATGATAGACGATGTCATAGGGCGCTATATCGTGCATTTAAACACTCTTCC
CCAACATTTGGATTTGCAAATTTATGATCGTCTAGATACGCTATTGCGCGCTTATAGTGCTCCGTCGTTTTAG
CAGCTGGCTGATTGGTCATCATCATGATGGCCTATGGGGTACTTGATGGCATGGGGCTTACTCCTACATTGGG
CCAGAAGTAAAATACCGGCGATTAGGTTGTTCTTGTGCATCTCAAGCTAAGTAATGAAAATTAGATTCCGGCT
GGGTAACCTTAAGGGGTAGGTTTCATCACAACGCCTTAGGGGCGC
```

### 2. Đoạn PCR được nhân bản từ *H.pylori* qua phân tích BLAST

Đoạn sequence tải để so sánh	Mô tả	Tương đồng
CP012905.1	<i>Helicobacter pylori</i> strain 7C, complete sequence	86.05%
LR134517.1	<i>Helicobacter pylori</i> strain NCTC13345 genome assembly, chromosome: 1	86.04%
CP032906.1	<i>Helicobacter pylori</i> strain 25-A-EK1 chromosome, complete genome	85.76%

## II. Phân tích PCR &PCR-RLFL của gen *UreC* sau điều trị

### 1. Trình tự 602 bp

```
CCCCTCCGGAGCGGTCCTCCCCCATGTTTGTGATGCGTTTTAGGCATTGCGGCCGGATTGTATTTTAAAACA
TTCCCCCAAATAAATTTTATTGTCCAGACACCAGAAAAGCGGCTATATGGTAGAAAACGCTTTAGTGAGCG
CTTTAACTTCCATAGGCTATAATGTGATTCAAATAGGGCCTATGCCTACCCCTGCGATTGCGTTTTTAAACCGA
AGACATGCGCTGTGATGCGGGTATTATGATAAGCGCAAGCCACAACCCTTTTGAAGATAATGGCATTAAAGTTT
TTCAATTCTTATGGTTATAAGCTTAAAGAAGAAGAAGAAAAGCGATTGAAGAAAATCTTTCCTGATGAAGAA
TTGCTGCATTCTAGCTATAAAGTGGGCGAGAGCGTCGGGTAGCGCTAAAAGGATAGATGATGTCATAGGGGCGC
TATATTGCGCATTTTAAACACTCCTTTCCCCAACCATTTTGAATTTTACAGAGTTTAGGATCGTGCTAGATAC
CCGCTAATGGCGCCGCTTATAAGGTGGCCCCGGTAGTTTTTACCGAGCTTGGGCTGATGTTTTTATGGAT
TATGGATTGAGCCCAAAT
```



2. Đoạn PCR được nhân bản từ *H.pylori* qua phân tích BLAST

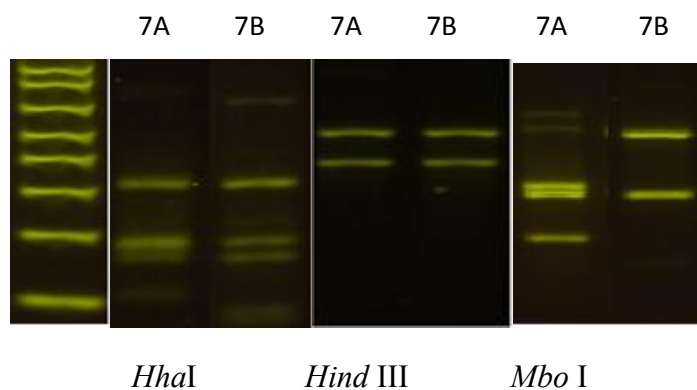
Đoạn sequence tải để so sánh	Mô tả	Tương đồng
AP017335.1	<i>Helicobacter pylori</i> DNA, nearly complete genome, strain: F211	92.91%
CP048601.1	<i>Helicobacter pylori</i> strain GCT 27 chromosome, complete genome	92.70%
CP032037.1	<i>Helicobacter pylori</i> strain G-Mx-2011-147 chromosome	92.57%

III. So sánh trình tự đoạn PCR được khuếch đại trước và sau điều trị

Mã trình tự: Query\_41159 (dna)

Điểm cao nhất	Tổng điểm	Tỷ lệ bao phủ	Giá trị E	Độ tương đồng	Mã số
549	549	67%	1e-160	87.28%	Query_41161

IV. So sánh kết quả PCR- RFLP trước và sau điều trị



V. Nhận xét

- So sánh với trình tự các chủng *H.pylori* trong ngân hàng gen xác định vị khuẩn trong mẫu sinh thiết trước và sau điều trị tiết trừ đều là *H.pylori*.
- Kết quả phân tích PCR-RFLP của chủng trước và sau điều trị khác nhau ở kết quả cắt bằng enzyme cắt giới hạn *Hha* I và *Mbo* I.

- Giải trình tự gen *ureC* thấy độ tương đồng hai trình tự 87.28%. Trình tự chủng nhiễm sau điều trị có 12,72% khác so với trình tự chủng ban đầu.
- Chủng *H.pylori* nhêm sau điều trị tiệt trừ khác chủng nhiễm trước điều trị.

## Bệnh phẩm mã số 8-Bệnh nhân 291. Nguyễn Thị Thu Tr.

### I. Phân tích PCR &PCR-RFLP của gen *UreC* trước điều trị

#### 1. Trình tự 701bp

```
ACGGCCGGCGCTGACTCGCTCCATGTTGTGATGCGTTTGGGCATTGCGTGCCGGATTGTATCTTTCAGAGCAT
TCTCACACCATAACATCTTATTGGTAAGACACCAGAAAAGCGGCTATATGGTAGAAAACGCTTTAGTAGTGCTTTA
CTTCCATAGGCTACATGTGATTCAATAGGGCCTATGCCACCCCTGCGATTGCGTTTTTAACCGAAGACATGCG
CTGTGATGCGGGTATTATGATAAGCGCGAGCCACAACCCTTTTGAAGATAATGGCATTAAAGTTTTCAATTCTT
ATGGTTATAAGCTTAAGATGAAGAAGAAAAGCGATTGAAGAATCTTTCATGATGAAGGATTACTGCATTCTAG
CTATAAGTGGGCGAGAGCGTCGGTAGCGCTAAATGATAGACGATGTCATAGGGCGCTATATCGTGCATTTAAA
ACACTCTTCCCAACATTTGATTTACAGAGTTTATGGATCGTGCTAGATACGGCTATGTGCGCTATAGTGGC
TCCGGTAGTTTTAGCGAGCTGGGCTGATGTTTGTGATCATGATGAGCTATGGTGCATATATGAGCATGCGGG
CTTACCCACATGAGCAGATGGAATACCGCCGATGGCTGCTTGTGCGATCTGCAGGCTATGGGGAATAGGAT
CGCTGGTAAGCTAGGGGTAGTCCATCGAACGCCTAGGGGGGGGA
```

#### 3. Đoạn PCR được nhân bản từ *H.pylori* qua phân tích BLAST

Đoạn sequence tải để so sánh	Mô tả	Tương đồng
AP014710.1	<i>Helicobacter pylori</i> DNA, complete genome, strain: ML1	90.28%
CP034071.1	<i>Helicobacter pylori</i> strain Hpbs1 chromosome, complete genome	89.95%
AP017332.1	<i>Helicobacter pylori</i> DNA, nearly complete genome, strain: F209	89.39%

### II. Phân tích PCR &PCR-RLFL của gen *UreC* sau điều trị

#### 1. Trình tự 783 bp

```
TCCGTGCGTGAGTCGCCCCATGTTTGTGATGCGTTTGGGCATTGCTGCCGGATTGTATTTAAAACATTCTC
AACCAATAAATCTTATTGGTAAGACACCAGAAAAGCGGCTATATGGTAGAAAACGCTTTAGTGAGCGCTTTC
ACTTCCATAGGCTATAATGTGATTCAAATAGGGCCTATGCCTACCCCTGCGATTGCGTTTTTAACCGAAGACA
TGCGCTGTGATGCGGGTATTATGATAAGCGCGAGCCACAACCCTTTTGAAGATAATGGCATTAAAGTTTTTCAA
TTCTTATGGTTATAAGCTTAAAGAAGAAGAAGAAAAGAGCGATTGAAGAATCTTTCATGATGAAGAATTACT
GCATTCTAGCTATAAAGTGGGCGAGAGCGTCGGTAGCGCTAAAAGGATAGACGATGTCATAGGGCGCTATATC
GTGCATTTAAAACACTCTTCCCAACATTTGAATTTACAGAGTTTAAAGGATCGTGCTAGATACCGCTAAT
GGCGCGGCTTATAAGTGGCTCCGGTCGTTTTTGTGATGCGGCTTGGGGCTGATGTGTTAGTGATCAATGATGAGCC
TAATGGGTGTATATTATGAGCATGCGGGGCTTTACACCCCTAATCATTTGAGCCAGAGTGAAAAATACCGCGC
GGATCTGGGCTTTGCTTTTGTGATGGCGATGCTGATAGGCTAGTGTGTGATATTTAGGATATCGTGCATCGATAG
CTTTCAGGGGTGTAGGGTTATCATCTATCTAAACAAACGACCGCGCCTCTATA
```

## 2. Đoạn PCR được nhân bản từ *H.pylori* qua phân tích BLAST

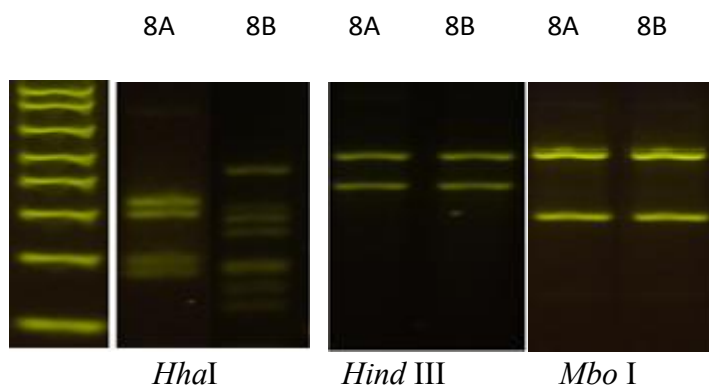
Đoạn sequence tải để so sánh	Mô tả	Tương đồng
CP006823.1	<i>Helicobacter pylori</i> oki154, complete genome	93.92%
AP017332.1	<i>Helicobacter pylori</i> DNA, nearly complete genome, strain: F209	93.90%
CP032034.1	<i>Helicobacter pylori</i> strain C-Mx-2011-145 chromosome	93.79%

### III. So sánh trình tự đoạn PCR được khuếch đại trước và sau điều trị

Mã trình tự: Query\_30283 (dna)

Điểm cao nhất	Tổng điểm	Tỷ lệ bao phủ	Giá trị E	Độ tương đồng	Mã số
797	797	83%	0.0	90.97%	Query_30283

### IV. So sánh kết quả PCR- RFLP trước và sau điều trị



### V. Nhận xét

- So sánh với trình tự các chủng *H.pylori* trong ngân hàng gen xác định vị khuẩn trong mẫu sinh thiết trước và sau điều trị tiết trừ đều là *H.pylori*.
- Kết quả phân tích PCR-RFLP của chủng trước và sau điều trị khác nhau ở kết quả cắt bằng enzyme cắt giới hạn *Hha* I..
- Giải trình tự gen *ureC* thấy độ tương đồng hai trình tự 90.97%. Trình tự chủng nhiễm sau điều trị có 9,03% khác so với trình tự chủng ban đầu.

- Chủng *H.pylori* nhiễm sau điều trị tiệt trừ khác chủng nhiễm trước điều trị.  
**Bệnh phẩm mã số 9-Bệnh nhân 115. Đỗ Thị B.**

## I. Phân tích PCR &PCR-RFLP của gen *UreC* trước điều trị

### 1. Trình tự 749 bp

AGCCCCTTAAAAGACTTATCCCCATGCACGATATTCCCTAATTATCCACCACCACTAGCCTGTCAGCATCGCC  
 ATCAAAGCAAAGCCCCAAATCCGCGCGGTATTTTTTCACTTCTGGCTCAACTGGTTAGGGTGTAAAGCCCCGC  
 ATTGCTCATTAATATTACACCCATTAGGCTCATCATTAATCACAAAACATCAGCCCCAAGCTCGCTAAAAAC  
 TACCGGAGCCACCTTATAAGCCGCGCCATTAGCGGTATCTAGCACGATTCTTAAACTCTGTAAATTCAAATGT  
 TTGGGGAAAGAGTGTTTTAAATGCACGATATAGCGCCCTATGACATCGTCTATCCTTTTAGCGCTACCGACGC  
 TCTCGCCCACTTTATAGCTAGAATGCAGTAATTCTTCATCATGAAAGATTTCTTCAATCGCTTTTTCTTCTTC  
 TTCTTTAAGCTTATAACCATAAGAATTGAAAACTTAATGCCATTATCTTCAAAGGGTTGTGGCTTGCCTT  
 ATCATATACCCGCATCACAGCGCATGTCTTCGGTTAAAACGCAATCGCAGGGGTGGGCATAGGCCCTATTTGG  
 ATCCACATTATAGCCTATGGAAGTTAAGCGGCTCACTAAAGCGTTTCTACCATTATAGCACTTTTTCTGGTGT  
 CTTTACCGATAGAATTTATCGGTTTAGAATGTTTTTAAATACATCCGGCGCATGCCAAACGCTCCAAACATGG  
 GGGGAGTTCCCCTCGTACT

### 2. Đoạn PCR được nhân bản từ *H.pylori* qua phân tích BLAST

<b>Đoạn sequence tải để so sánh</b>	<b>Mô tả</b>	<b>Tương đồng</b>
CP025474.1	<i>Helicobacter pylori</i> strain H-137 chromosome, complete genome	95.36%
CP031558.1	<i>Helicobacter pylori</i> strain GD63 chromosome, complete genome	95.23%
AP017331.1	<i>Helicobacter pylori</i> DNA, nearly complete genome, strain: F18	95.23%

## II. Phân tích PCR &PCR-RLFL của gen *UreC* sau điều trị

### 1. Trình tự 760 bp

AAGGCGGTAATCCCCATGCACGATATTCCCTAATTATCCACCACCACTAGCCTATCCGCATCGCCATCAAAGC  
 AAGCCCAGATCCGCGCGGTATTTTTTCACTTCTGGCTCAATTGGTTAGGGTGTAAAGCCCCGCATTGCTCAT  
 TAATGTTACACCCATTAGGCTCATCATTGATCACTAACACATCAGCCCCAAGCTCGCTAAAAACGACCGGAGC  
 CACCTTATAAGCCGACCATTAGCGGTATCTAGCACGATCCTTAAACTCTGTAAATTCAAATGTTTGGGGAAA  
 GAGTGTTTTAAATGCACGATATAGCGCCCTATGACATCGTCTATCCTTTTAGCGCTGCCGACGCTCTCGCCCA  
 CTTTATAACTAGAATGCAGTAATTCTTCATCATGAAAGATTTCTTCAATCGCTCTTTCTTCTTCTTTAAG  
 CTTATAGCCATAAGAATTGAAAACTTAATGCCATTGTCTTCAAAGGGTTGTGGCTCGCGCTTATCATAATG  
 CCCGCATCACAGCGCATGTCTTCGGTTAAAACGCAATCGCAGGGGTAGGCATAGGCCCTATTTGAATCCAC  
 ATTATAGCCTATGGAAGTGGAGAGCGCTCCACTAAAGCGTTTCTACCATGTACCGCTTTTTTCTGGTGTTC  
 TTTACCGATAAATTTATCCGTTTGGAGAATGTTTTTAAATAACATCCGGCAGCATGCCTAACGCATCCAAAC  
 CTGGGGGTGAGTTCCCCTGTACTCTCT

2. Đoạn PCR được nhân bản từ *H.pylori* qua phân tích BLAST

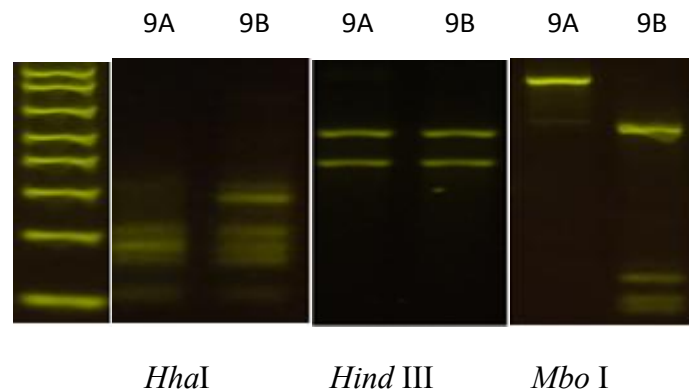
Đoạn sequence tải để so sánh	Mô tả	Tương đồng
CP012907.1	<i>Helicobacter pylori</i> strain 29CaP, complete genome	95.09%
CP032034.1	<i>Helicobacter pylori</i> strain C-Mx-2011-145 chromosome	94.96%
CP032911.1	<i>Helicobacter pylori</i> strain 19-A-EK3 chromosome, complete genome	94.83%

III. So sánh trình tự đoạn PCR được khuếch đại trước và sau điều trị

Mã trình tự: Query\_4025 (dna)

Điểm cao nhất	Tổng điểm	Tỷ lệ bao phủ	Giá trị E	Độ tương đồng	Mã số
1077	1077	97%	0.0	93.07%	Query_4025

IV. So sánh kết quả PCR- RFLP trước và sau điều trị



V. Nhận xét

- So sánh với trình tự các chủng *H.pylori* trong ngân hàng gen xác định vi khuẩn trong mẫu sinh thiết trước và sau điều trị tiết trừ đều là *H.pylori*.
- Kết quả phân tích PCR-RFLP của chủng trước và sau điều trị khác nhau ở kết quả cắt bằng enzyme cắt giới hạn *Hha I* và *Mbo I*.
- Giải trình tự gen *ureC* thấy độ tương đồng hai trình tự 93.07%. Trình tự chủng nhiễm sau điều trị có 6,93% khác so với trình tự chủng ban đầu.

- Chủng *H.pylori* nhiễm sau điều trị tiết trừ khác chủng nhiễm trước điều trị.  
**Bệnh phẩm mã số 10 -Bệnh nhân 214. Nguyễn Công V.**

## I. Phân tích PCR &PCR-RFLP của gen *UreC* trước điều trị

### 1. Trình tự 603 bp

ACTGTCCTGGGTTGACCTCCCCCATGTTTGTGATGCGTTTTGGGCATTGCAGCCGGATTGTATTTTAAAAGCA  
 TTCTACCACCCTAGATTTTATTGCTCAGACACCAGAAAAGCGGCTATATGGTAGAAAACGCTTTAGTGAGCG  
 CTTTAACCTCCATAGGCTATAATGTGATTCAAATAGGGCCTATGCCTACCCCTGCGATTGCGTTTTTAACCGA  
 AGACATGCGCTGTGATGCGGTATTATGATAAGCGCAAGCCACAACCCTTTTGAAGATAATGGTATTAAGTTT  
 TTCAATTCTTATGGTTATAAGCTTAAAGAAGAAGAAGAAAAGCGATTTGAAGAAATCTTTCATGATGAAGAA  
 TACTGCATTCTAGCTATAAAGTGGGCGAGAGCGTCCGGTAGCGCTAAAAGGATAGATGATGTCATAGGGCCGC  
 TATATCGTGCAATTTAAAACACTCTTTCCCCAACATTTGAATTACAAAGTTTAAAGGATCGCGCTAAATTACG  
 GCTAATGGTGCACCTTTATAAGGTGGCTCCGATAGTTATTTACCGAGCTTGGGGTGATGTGTTAATGAATTATT  
 GATTGACCCAATGGTGGCA

### 2. Đoạn PCR được nhân bản từ *H.pylori* qua phân tích BLAST

<b>Đoạn sequence tải để so sánh</b>	<b>Mô tả</b>	<b>Tương đồng</b>
CP000012.1	<i>Helicobacter pylori</i> 51, complete genome	92.92%
CP002605.1	<i>Helicobacter pylori</i> 83, complete genome	93.09%
CP053256.1	<i>Helicobacter pylori</i> A45 chromosome, complete genome	92.22%

## II. Phân tích PCR &PCR-RLFL của gen *UreC* sau điều trị

### 1. Trình tự 667 bp

CCAGGGGGTGACTCGCTCCATGCTCTGTGATGCGTTTTGGCATTGCGGCTGGGTTGTATTTTCAAACATTCTCA  
 CACGATACATTTTATTGGTAAGACACCAGAAAGCGGCTATATGGTAGAACGCTCTAGTGAGTGCTTACTTCAT  
 AGGCTATATGTGATCAATAGGGCTATGCCTACCCCTGCGATTGCGTTTTTAACCGAAGACATGCGCTGTGATGC  
 GGGTATTATGATAAGCGCAAGCCACACCCTTTTGAAGATAATGCATAAGTTTTTCACTCTTATGGTTATAAGCT  
 TAAAGATGAGAAGAAAAGCGATTGAGAATCTTCATGATGAAGAATTACTGCATTCTAGTATAAGTGGGCGAGA  
 GCGTCCGGTAGCGCTAAAGGATAGACGATGTCATAGGGCGCTATATCGTGCAATTTAAACACTCTTCCCCAACAT  
 TTGATTTACAGAGTTTAGGATCGTGCTAGATACGCTATGTGCGCTATAGTGGCTCCGGTAGTTTAGCGAGCTG  
 GCTGATGTTAGGATCATGATGAGCTATGATGATATATGAGCATGCGGGCTACCCACATGAGCAGATGAAAAT  
 ACGGCGATGGCTGCTTTGATGCGATGTGCGCTAGGTGTGTATAAGATCGCATGGTAGCTAGGGTAAGGTCATC  
 CAAACGGCTA

## 2. Đoạn PCR được nhân bản từ *H.pylori* qua phân tích BLAST

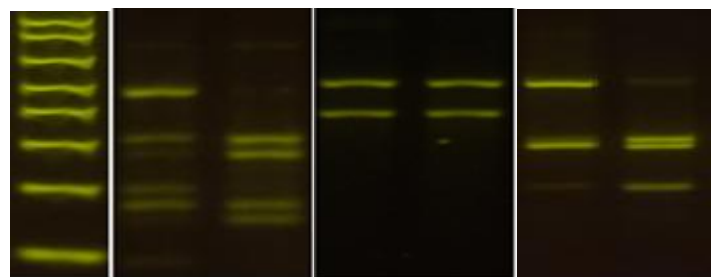
Đoạn sequence tải để so sánh	Mô tả	Tương đồng
CP006822.1	<i>Helicobacter pylori</i> oki128, complete genome	87.40%
CP006826.1	<i>Helicobacter pylori</i> oki828, complete genome	87.23%
AP011945.1	<i>Helicobacter pylori</i> F57 DNA, complete genome	87.23%

### III. So sánh trình tự đoạn PCR được khuếch đại trước và sau điều trị

Mã trình tự: Query\_1111 (dna)

Điểm cao nhất	Tổng điểm	Tỷ lệ bao phủ	Giá trị E	Độ tương đồng	Mã số
564	564	89%	5e-165	86.85%	Query_1113

### IV. So sánh kết quả PCR- RFLP trước và sau điều trị



*HhaI*

*Hind III*

*Mbo I*

### V. Nhận xét

- So sánh với trình tự các chủng *H.pylori* trong ngân hàng gen xác định vị khuẩn trong mẫu sinh thiết trước và sau điều trị tiết trừ đều là *H.pylori*.
- Kết quả phân tích PCR-RFLP của chủng trước và sau điều trị khác nhau ở kết quả cắt bằng enzyme cắt giới hạn *Hha I* và *Mbo I*.
- Giải trình tự gen *ureC* thấy độ tương đồng hai trình tự 86.85%. Trình tự chủng nhiễm sau điều trị có 13,15% khác so với trình tự chủng ban đầu.
- Chủng *H.pylori* nhiễm sau điều trị tiết trừ khác chủng nhiễm trước điều trị



## Bệnh phẩm mã số 11 -Bệnh nhân 241. Đỗ Thế Lực

### I. Phân tích PCR &PCR-RFLP của gen *UreC* trước điều trị

#### 1. Trình tự 721 bp

AGGGGGGGGGTGAGCTCCCCCATGTTTGTGATGCGTTTGGGCATTGCGGCTGGGTTGTATTTTAAAAACATT  
CTAAACGAATAAATTTTAAATTGGTAAGACACCAGAAAAGCGGCTATATGGTAGAAAACGCTTTTAGTGAGCGC  
TTTAACTTCCATAGGCTATAATGTGATCCAAATAGGGCCTATGCCTACCCCTGCGATTGCGTTTTTAAACCGAA  
GACATGCGCTGTGATGCGGGTATTATGATAAGCGCAAGCCACAACCCTTTTGAAGATAATGGCATTAAAGTTTT  
TCACTCTTATGGTTATAAGCTTAAAGAAGAAGAAGAAAAGCGATTGAAGAAATCTTTCATGATGAAGAATTA  
CTGCATTCTAGTTATAAAGTGGGCGAGAGCGTCGGTAGTGCTAAAAGGATAGACGATGTCATAGGGCGCTATA  
TCGTGCATTTAAAACACTCTTTCCCAAACATTTGAATTTACAGAGTTTAGGATCGTGCTAGATACCGCTAAT  
GGTGC GGCTTATAAGGTGGCTCCGGTAGTTTTTAGCGAGCCTTGGGGGCTGATGTTTTAGTGATTATGATGAG  
CCTATGGATGTATATTATGAGCAATGCGGGCTTGCACCTACCAGTTGAGCAGGATGTGAAAAATACCGCGCGA  
TTTGGGCTTTGCTTTTGTGATGGCGATGCCGATAAGCTAGTGGTGGCGAATATTTAGGGATACCGT

#### 2. Đoạn PCR được nhân bản từ *H.pylori* qua phân tích BLAST

Đoạn sequence tải để so sánh	Mô tả	Tương đồng
CP025474.1	<i>Helicobacter pylori</i> strain H-137 chromosome, complete genome	94.16%
CP006826.1	<i>Helicobacter pylori</i> oki828, complete genome	94.16%
AP017345.1	<i>Helicobacter pylori</i> DNA, nearly complete genome, strain: F55	94.02%

### II. Phân tích PCR &PCR-RLFL của gen *UreC* sau điều trị

#### 1. Trình tự 708 bp

CAAGAGAGGGGTGAGCTCACCCCATGTTTGTGATGCGTTTGGGCATTGCGGCCGATTGTATTTTAAAGCATT  
CTAAACCATAAATCTTATTGGTAAGACACCAGAAAAGCGGCTATATGGTAGAAAACGCTTTTAGTGAGCGCTTTA  
CTTCCATAGGCTACATGTGATTCAATAGGACCTATGCCTACCCCTGCGATTGCGTTTTTAAACCGAAGACATGC  
GCTGTGATGCGGGTATTATGATAAGCGCGAGCCACAACCCTTTTGAAGATAATGGCATTAAAGTTTTTCATTCT  
TATGGTTATAAGCTTAAAGAGAGAGAAAAGCGATTGAAGAATCTTTCATGATGAGATTACTGCATTCTAGCTAT  
AAGTGGGCGAGAGCGTCGGTAGCGCTAAAGGATAGACGATTGTCATAGGGCGCTATATCGTGCATTTAAAACAC  
TCTTTCCCAAACATTTGATTTACAGAGTTTAGATCGTGCTAGATACGCTATGGTGC GGCTTATAGTG GGCTCCG  
TAGTTTTAGCGAGCTTGGGGCTGATGTTTTATGATTATGATGACCTATGGTGTAACTTATGACATGTGGGCTTT  
ACCCCTACAGTGGCGGAGTGAAAATTCCGCGATTGCTTGCTTTGATGCATGCTGTAGCTGGGGGATTAGATT  
CGCATGGTAGCTTAAAGGTAGTTCATTCAAAGCCATAGGAGTCCCGATCC

2. Đoạn PCR được nhân bản từ *H.pylori* qua phân tích BLAST

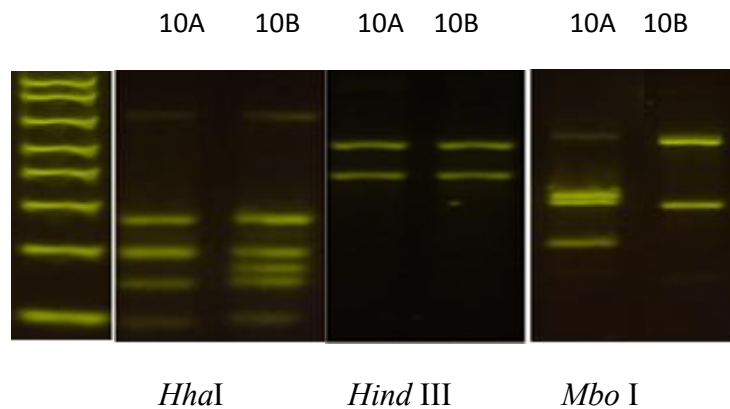
<b>Đoạn sequence tải để so sánh</b>	<b>Mô tả</b>	<b>Tương đồng</b>
CP000012.1	<i>Helicobacter pylori</i> 51, complete genome	90.21%
CP002605.1	<i>Helicobacter pylori</i> 83, complete genome	90.05%
CP053256.1	<i>Helicobacter pylori</i> A45 chromosome, complete genome	89.57%

III. So sánh trình tự đoạn PCR được khuếch đại trước và sau điều trị

Mã trình tự: Query\_43749 (dna), Query\_43751 (dna)

<b>Điểm cao nhất</b>	<b>Tổng điểm</b>	<b>Tỷ lệ bao phủ</b>	<b>Giá trị E</b>	<b>Độ tương đồng</b>	<b>Mã số</b>
811	811	89%	0.0	90.31%	Query_43751

IV. So sánh kết quả PCR- RFLP trước và sau điều trị



V. Nhận xét

- So sánh với trình tự các chủng *H.pylori* trong ngân hàng gen xác định vi khuẩn trong mẫu sinh thiết trước và sau điều trị tiết trừ đều là *H.pylori*.
- Kết quả phân tích PCR-RFLP của chủng trước và sau điều trị khác nhau ở kết quả cắt bằng enzyme cắt giới hạn *Hha I* và *Mbo I*.
- Giải trình tự gen *ureC* thấy độ tương đồng hai trình tự 90.31%. Trình tự chủng nhiễm sau điều trị có 9.69% khác so với trình tự chủng ban đầu.
- Chủng *H.pylori* nhiễm sau điều trị tiết trừ khác chủng nhiễm trước điều trị

## Bệnh phẩm mã số 12-Bệnh nhân 300. Nguyễn Thành L.

### I. Phân tích PCR &PCR-RFLP của gen *UreC* trước điều trị

#### 1. Trình tự 253 bp

```
TAAAGTGGATTCCCCCACCCCCCTGTTTGTGATGCGTTTAGGCTTGCTGCCGGATTGTATTTTAAAAACCT  
TCAACAACAAATAAATTCTAATCGGGAAGACCCAGAAAAGCGGCTACATGGTACAAAACGCTTTAGTGAGCGC  
TTTAACTTCCATAGGCTATAATGTGATTCCATAGGGCCTATGCCTACCCCTGCTATTGCGTTTTTAACCGAAA  
CATGCGCTGAGATGCAAGCATTATTATAAGCCGA
```

#### 2.Đoạn PCR được nhân bản từ *H.pylori* qua phân tích BLAST

Đoạn sequence tải để so sánh	Mô tả	Tương đồng
CP003475.1	<i>Helicobacter pylori</i> PeCan18, complete genome	90.38%
CP032033.1	<i>Helicobacter pylori</i> strain C-Mx-2011-171 chromosome	89.71%
CP003486.1	<i>Helicobacter pylori</i> HUP-B14, complete genome	89.71%

### II. Phân tích PCR &PCR-RLFL của gen *UreC* của *H.pylori* sau điều trị

#### 1.Trình tự 743bp

```
CGAAACCCCTAAAAAGCTTATCCCCATGCACGATATTCCCTAATTATCCACCACCACCAACCTGTCAGCATC  
GCCATCAAACAAGCCCAATCCGCGCGGTATTTTTTCACTTCCTGGCTCAATTGGTTGGGGTGTAAGCCCCA  
CATTGCTCATTAATATTACACCATTAGGCTCATCATTAATCACTAAAACATCAGCCCCAAGCTCGCTAAAAA  
CTACCGGAGCCACCTTATAAGCCGCGCCATTAGCCGTATCTAGCACAATCCTTAAACTCTGTAAATTCAAATG  
TTTGGGGAAAGAGTGTTTTAAATGCACGATATAGCGCCCTATGACATCATCTATCCTTTTAGCGCTACCGACG  
CTCTCGCCACTTTATAGCTAGAATGCAGTAATTCTTCATCATGAAAAGATTTCTTCAATCGCTTTTTCTTCT  
TCTTCTTTAAGCTTATAGCCATAAGAATTGAAAAACTTAATGCCATTGTCTTCAAAAAGGGTTGTGGCCTCG  
CGCTTATCATAATGCCTGCATCACAGCGCATGTTCTTCGGTTAAAAAACGCAATCGCAGGGGGTAGGCCATA  
GGCCCCCTATTTGAAATCAACATTATAGGCCCTATGGAAGTTTAAAGGCGCTCCACCTAAAGGCGTTTTCTTA  
CCCAATGTAGCCCGCTTTTTTCTGGATGTCCTTTACCCGATTAGAATGTCTATTTCGGTTAGCAGCATCGGCTCT  
CTCTCACAATTAC
```

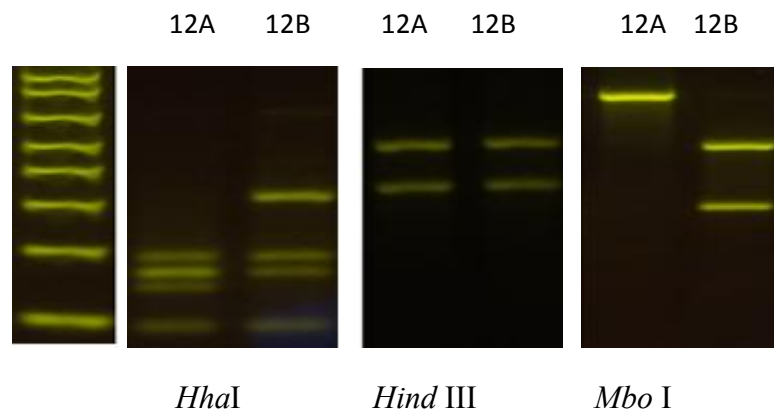
## 2. Đoạn PCR được nhân bản từ *H.pylori* qua phân tích BLAST

Đoạn sequence tải để so sánh	Mô tả	Tương đồng
AP017341.1	<i>Helicobacter pylori</i> DNA, nearly complete genome, strain: F38	93.28%
AP017357.1	<i>Helicobacter pylori</i> DNA, nearly complete genome, strain: MKF3	93.67%
AP017338.1	<i>Helicobacter pylori</i> DNA, nearly complete genome, strain: F24	93.78%

### III. So sánh trình tự đoạn PCR được khuếch đại trước và sau điều trị

Không so sánh được hai trình tự

### IV. So sánh kết quả PCR- RFLP trước và sau điều trị



### V. Nhận xét:

- So sánh với trình tự các chủng *H.pylori* trong ngân hàng gen xác định vi khuẩn trong mẫu sinh thiết trước và sau điều trị tiết trừ đều là *H.pylori*.
- Kết quả phân tích PCR-RFLP của chủng trước và sau điều trị khác nhau ở kết quả cắt bằng enzyme cắt giới hạn *Hha I* và *Mbo I*.
- Không so sánh được hai trình tự do trình tự gen *UreC* trước điều trị có số lượng cặp bazơ ít (253bp) so với số cặp bazơ của trình tự gen *UreC* sau điều trị. Điều này có thể do lỗi kỹ thuật khi giải trình tự.

## Bệnh phẩm mã số 13-Bệnh nhân 150. Cao Thị Ng.

### I. Phân tích PCR &PCR-RFLP của gen *UreC* trước điều trị

#### 1. Trình tự 742 bp

```
ACGGGGGGTACTCACCCCATGTTTGTGATGCGTTTAGGCATTGCGGCCGGATTGTATTTTAAAAACATTCT
AAACGAATAAAATTTAATTGGTAAGACACCAGAAAAAGCGGCTATATGGTAGAAAACGCTTTAGTGAGCGCTT
TAACTTCCATAGGCTATAATGTGATTCAAATAGGGCCTATGCCTACCCCTGCGATTGCGTTTTTAACCGAAGA
CATGCGCTGTGATGCGGGTATTATGATAAGCGCAAGCCACAACCCTTTTGAAGATAATGGCATTAAAGTTTTTC
AATTCTTATGGTTATAAGCTTAAAGAAGAAGAAGAAAAAGCGATTGAAGAAATCTTTCATGATGAAGAATTGC
TGCATTCTAGCTATAAAGTGGGCGAGAGCGTCGGTAGCGCTAAAAGGATAGACGATGTCATAGGGCGCTATAT
CGTGCATTTAAAGCACTCTTTCCCAAACATTTGAATTTACAGAGTTTAAGGATCGTGCTAGATACCGCTAAT
GGCGCAGCTTATATGTGGCTCCGGTCGTTTTTAGCGAGCTTGGGGCTGATGTGTTAGTGATTATGATGAGCCT
AACGGGTGTACATTATGAGCATGCGGGCTTTACACCCTACATTGAGCAGAGTGAAAAATACCGAGCGATTTG
GGCTTTGCTTTGATGCGATGCTGACGCTGTGTGTGATATTTAGGAATATCGTGCATGGGATAGCTTCAGGGTG
TAGGTTATCATC
```

#### 2.Đoạn PCR được nhân bản từ *H.pylori* qua phân tích BLAST

Đoạn sequence tải để so sánh	Mô tả	Tương đồng
CP025474.1	<i>Helicobacter pylori</i> strain H-137 chromosome, complete genome	93.98%
CP006610.2	<i>Helicobacter pylori</i> UM298, complete genome	94.47%
CP005491.3	<i>Helicobacter pylori</i> UM299, complete genome	94.47%

### II. Phân tích PCR &PCR-RLFL của gen *UreC* sau điều trị

#### 1. Trình tự 788 bp

```
GAAAAGCCGTGACTCAAGCCCATGTTTGTGATGCGTTTAGGCATTGCGGCCGGATTGTATTTTAAAAACATT
CTAAACGAATAAAATTTAATTGGTAAGACACCAGAAAAAGCGGCTATATGGTAGAAAACGCTTTAGTGAGCG
CTTTAACTTCCATAGGCTATAATGTGATTCAAATAGGGCCTATGCCTACCCCTGCGATTGCGTTTTTAACCGA
AGACATGCGCTGTGATGCGGGTATTATGATAAGCGCAAGCCACAACCCTTTTGAAGATAATGGCATTAAAGTTT
TTCAATCTTATGGTTATAAGCTTAAAGAAGAAGAAGAAAAAGCGATTGAAGAAATCTTTCATGATGAAGAAT
TGCTGCATTCTAGCTATAAAGTGGGCGAGAGCGTCGGTAGCGCTAAAAGGATAGACGATGTCATAGGGCGCTA
TATCGTGCATTTAAAGCACTCTTTCCCAAACATTTGAATTTACAGAGTTTAAGGATCGTGCTAGATACCGCT
AATGGCGCAGCTTATAAGTGGCTCCGGTCGTTTTTAGCGAGCTTGGGGCTGATGTGTTAGTGATTAATGATGA
GCCTAACGGGTGTAACATTAATGAGCAATGCGGGCTTTACACACCTAACCATTTGAGCAAGGAAGTAAAAAT
```

ACCGAGCGGATTTGGGCTTTGCTTTTGGATGGCGATGCTGACAGCTGGTGTGGTGATAATTTAGGGAATATCGT  
GCATGCGGATAAGCTTTTAAGGGTGTAGGGGTTATCAAATCTCTGAAACGGCCCTTCA

## 2. Đoạn PCR được nhân bản từ *H.pylori* qua phân tích BLAST

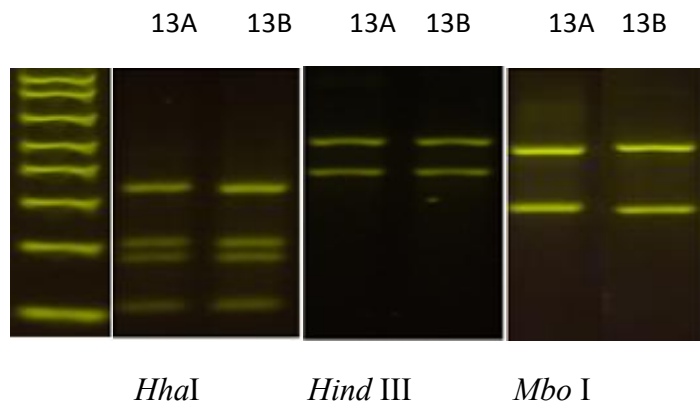
<b>Đoạn sequence tải để so sánh</b>	<b>Mô tả</b>	<b>Tương đồng</b>
CP025474.1	<i>Helicobacter pylori</i> strain H-137 chromosome, complete genome	95.67%
CP006610.2	<i>Helicobacter pylori</i> UM298, complete genome	95.42%
CP005491.3	<i>Helicobacter pylori</i> UM299, complete genome	95.42%

### III. So sánh trình tự đoạn PCR được khuếch đại trước và sau điều trị

Mã trình tự: Query\_2141 (dna), Query\_2143 (dna)

<b>Điểm cao nhất</b>	<b>Tổng điểm</b>	<b>Tỷ lệ bao phủ</b>	<b>Giá trị E</b>	<b>Độ tương đồng</b>	<b>Mã số</b>
206	1206	98%	0.0	95.92%	Query_2143

### IV. So sánh kết quả PCR- RFLP trước và sau điều trị



### V. Nhận xét

- So sánh với trình tự các chủng *H.pylori* trong ngân hàng gen xác định vi khuẩn trong mẫu sinh thiết trước và sau điều trị tiệt trừ đều là *H.pylori*.
- Kết quả phân tích PCR-RFLP của chủng trước và sau điều trị giống nhau ở kết quả cắt bằng 3 enzyme cắt giới hạn *Hha I* và *Mbo I*, *Hind III*.

- Giải trình tự gen *ureC* thấy độ tương đồng hai trình tự 95.92%. Trình tự chủng nhiễm sau điều trị có 4,08 % khác so với trình tự chủng ban đầu.
- Chủng *H.pylori* nhiễm sau điều trị tiết trừ giống chủng nhiễm trước điều trị

**Bệnh phẩm mã số 14 -Bệnh nhân 189. Lê Thị Hồng L.**

**I. Phân tích PCR &PCR-RFLP của gen *UreC* trước điều trị**

**1. Trình tự 775 bp**

```
CTGGGCGAACAAGGGTGACTCACCCCATGTTTGTGATGCGTTTAGGCATTGCTGCCGGATTGTATTTAAAA
ACATTTCTCAACAAATAAAATTCTAATCGGTGAGACACCAGAAAAAGCGGCTATATGGTAGAAAACGCTTTAGT
GAGTGCTCTCACTTCCATAGGCTATAATGTCAATCAAATAGGGCCTATGCCTACCCCTGCGATCGCATTTTTA
ACCGAAGACATGCGCTGCGATGCGGGTATTATGATAAGCGCGAGCCACAACCCTTTTGAAGATAATGGCATT
AGTTTTTCAATTCTTATGGTTATAAGCTTAAAGAAGAAGAAGAAAAAGCGATTGAAGAAATCTTTCATGATGA
AGAATTGCTGCATTCTAGCTATAAAGTGGGCGAGAGCGTCGGTAGCGCTAAAAGGATAGACGATGTCATAGGG
CGCTATATCGTGCATTTAAACACTCTTTCCCAAACATTTGAATTTACAGAGTTTAAAGGATCGTGCTAGATA
CCGCTAATGGTGCGGCTTATAAAGTGGCTCCGGTAGTTTTTAGCGAGCTTGGGGCTGATGTTTTAGTGATTAAT
GATGAGCCTAATGGGTGTACATTATGAGCATGTGGGGCTTTACCCCTACCAGTTGAGCAGAGTGAAAAATACC
GTGCGGATTGGGCTTTGCTTTGATGCCGATGCTGACAGCTGGTGTAGTGATACTACGGATATCCGTGCATGGG
GATAGCTTTAGGTGTTAGGTTATCAATCTTAAACGGCCCTAGTT
```

**2.Đoạn PCR được nhân bản từ *H.pylori* qua phân tích BLAST**

<b>Đoạn sequence tải để so sánh</b>	<b>Mô tả</b>	<b>Tương đồng</b>
AP017359.1	<i>Helicobacter pylori</i> DNA, nearly complete genome, strain: MKM1	92.48%
CP003419.1	<i>Helicobacter pylori</i> XZ274, complete genome	92.48%
CP003475.1	<i>Helicobacter pylori</i> PeCan18, complete genome	92.36%

**II. Phân tích PCR &PCR-RLFL của gen *UreC* sau điều trị**

**1. Trình tự 767 bp**

```
GAAAAGGGGTGAACTCACCCCATGTTTGTGATGCGTTTAGGCATTGCTGCCGGATTGTATTTAAAAACATT
CTCAACGAATAAAATTTAATCGGTAAAGACACCAGAAAAAGCGGTTACATGGTAGAAAACGCTTTAGTGAGC
GCTCTCACTTCCATAGGCTATAATGTGATTCAAATAGGGCCTATGCCTACCCCTGCGATTGCGTTTTTAAACCG
AAGACATGCGCTGTGATGCGGGCATTATGATAAGCGCGAGCCACAACCCTTTTGAAGACAATGGCATTAAAGTT
TTTCAATTCTTATGGCTATAAGCTTAAAGAAGAAGAAGAAAGAGCGATTGAAGAAATCTTTCATGATGAAGAA
TTACTGCATTCTAGTTATAAAGTGGGCGAGAGCGTCGGCAGCGCTAAAAGGATAGACGATGTCATAGGGCGCT
ATATCGTGCATTTAAACACTCTTTCCCAAACATTTGAATTTACAGAGTTTAAAGGATCGTGCTAGATACCGC
TAATGGTGCGGCTTATAAAGTGGCTCCGGTCTTTTTAGCGAGCTTGGGGCTGATGTGTTAGTGATCATGATG
```

AGCCTATGGGTGTACATTAATGAGCAATGCGGGCCTTACACCCTACCATTGAGCAGGAGTGAAAAATACCGCG  
 CGGATCTGGCCTTGCTTTGATGCGATGCGATAGCTAGTGCTGTGATATTAAGGATATCGTGATGGGATAAGC  
 TTTAGGTGTTAGGTTTATCAAATCCAAACGCCCTTAC

## 2. Đoạn PCR được nhân bản từ *H.pylori* qua phân tích BLAST

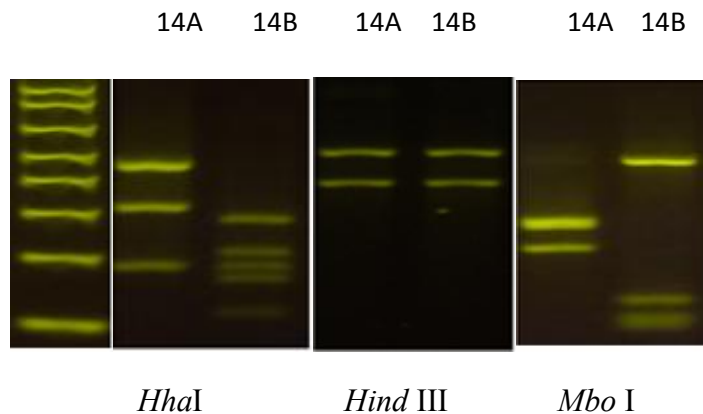
Đoạn sequence tải để so sánh	Mô tả	Tương đồng
CP032034.1	<i>Helicobacter pylori</i> strain C-Mx-2011-145 chromosome	93.69%
CP012907.1	<i>Helicobacter pylori</i> strain 29CaP, complete genome	93.69%
CP032911.1	<i>Helicobacter pylori</i> strain 19-A-EK3 chromosome, complete genome	94.07%

### III. So sánh trình tự đoạn PCR được khuếch đại trước và sau điều trị

Mã trình tự: Query\_58607 (dna), Query\_58609 (dna)

Điểm cao nhất	Tổng điểm	Tỷ lệ bao phủ	Giá trị E	Độ tương đồng	Mã số
1103	1103	96%	0.0	93.28%	Query_58609

### IV. So sánh kết quả PCR- RFLP trước và sau điều trị



### V. Nhận xét

- So sánh với trình tự các chủng *H.pylori* trong ngân hàng gen xác định vi khuẩn trong mẫu sinh thiết trước và sau điều trị tiệt trừ đều là *H.pylori*.



- Kết quả phân tích PCR-RFLP của chủng trước và sau điều trị khác nhau ở kết quả cắt bằng enzyme cắt giới hạn *Hha I* và *Mbo I*.
- Giải trình tự gen *ureC* thấy độ tương đồng hai trình tự 93.28%. Trình tự chủng nhiễm sau điều trị có 6,72% khác so với trình tự chủng ban đầu.
- Chủng *H.pylori* nhiễm sau điều trị tiết trừ khác chủng nhiễm trước điều trị

## Bệnh phẩm mã số 15 -Bệnh nhân 114. Nguyễn Thị U.

### I. Phân tích PCR &PCR-RFLP của gen *UreC* trước điều trị

#### 1. Trình tự 449 bp

```
CGAAACAAGAGAAAAAGCGTATTTCTTTTTTTTTTAAACATCACTTTCCAAGGCAAGGGAGCAGCCCATGT
TTGTGAGCGTTTTGGGCTTGC GGCCGGATTGTATTTCAAGCATTCTAGACCAATAAATCTTAATTGGTAAGAC
ACCAAAAAAGCGGCTATATGGTAGAAAACGCTTTATAAGTGCTTTAACTTCCATAGGCTACAATGTGATTCAA
ATAGGGCCTATGCCACCCCTGCGATTGCGTTTTTTAACCGAAGACATGCGCTGTGATGCGGGTATTATGATA
AGCGCGAGCCCAACCCTTTTGAAAATAATGGCATAAGTTTTTTCATTCTTATGGTTATATCTTAAAGAAAAAAA
AAAAACCATTGAAAATCTTTCTGATGAAAATTACTGCATTCTAACTATAAAACGGGCCAGACCGCAGAAGAT
TAAAAGGATAC
```

#### 2. Đoạn PCR được nhân bản từ *H.pylori* qua phân tích BLAST

Đoạn sequence tải để so sánh	Mô tả	Tương đồng
AP014710.1	<i>Helicobacter pylori</i> DNA, complete genome, strain: ML1	90.32%
CP034071.1	<i>Helicobacter pylori</i> strain Hpbs1 chromosome, complete genome	89.33%
CP002605.1	<i>Helicobacter pylori</i> 83, complete genome	89.33%

### II. Phân tích PCR &PCR-RLFL của gen *UreC* sau điều trị

#### 1. Trình tự 770 bp

```
ACAAGGGCCCGCCAAAATTCACCTCTCATGTTTGTGATGCGTTTAGGCATTGCGGCCGGGCTGTATTTTAAA
AACATTCTAAACGAATAAATTTTAATTGGTAAAGACACCAGAAAAAGCGGCTATATGGTAGAAAACGCTTTAG
TGAGCGCTTTAACTTCCATAGGCTATAATGTGATTCAAATAGGGCCTATGCCTACCCCTGCGATTGCGTTTTT
AACCGAAGACATGCGCTGTGATGCGGGTATTATGATAAGCGCAAGCCACAACCCTTTTGAAGATAATGGCATT
AAGTTTTTCAATTCTTATGGTTATAAGCTTAAAGAAGAAGAAGAAAAAGCGATTGAAGAAATCTTTCATGATG
AGAATTACTGCATTCTAGCTATAAAGTGGGCGAGAGCGTTCGGTAGTGCTAAAAGGATAGACGATGTCATAGG
CGCTATATCGTGCAATTTAAAACACTCTTTCCCAAACATTTGAATTTACAGAGTTTAAAGAATCGTGCTAGAT
```

ACCGCTAATGGCGCGGCTTATAATGTGGCTCCGGTAGTTTTTTAGCGAGCTTGGGGCTGATGTTTTGGTGATTA  
 TGATGAGCCTATGGTGTATATTATGAGCATGCGGGGCTTTACACCCTACCAGTTGAGCAGGAAGTGAAAATAC  
 CGCGGATTTGGGCTTTGCTTTGATGCGATGCTGATAGCTAGTGTGTGATATTAGGAATATCGTGCATGGATA  
 GCTTTAGGTGTAGGGTTATCATCTCACAAACGCGCCTAAA

## 2. Đoạn PCR được nhân bản từ *H.pylori* qua phân tích BLAST

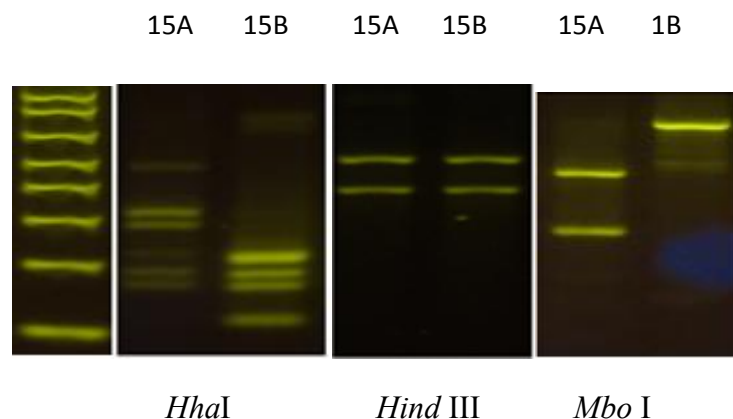
Đoạn sequence tải để so sánh	Mô tả	Tương đồng
AP012601.1	<i>Helicobacter pylori</i> OK310 DNA, complete genome	94.14%
CP025474.1	<i>Helicobacter pylori</i> strain H-137 chromosome, complete genome	94.01%
AP017355.1	<i>Helicobacter pylori</i> DNA, nearly complete genome, strain: F94	94.97%

## III. So sánh trình tự đoạn PCR được khuếch đại trước và sau điều trị

Mã trình tự: Query\_22697 (dna), Query\_22699 (dna)

Điểm cao nhất	Tổng điểm	Tỷ lệ bao phủ	Giá trị E	Độ tương đồng	Mã số
468	468	84%	3e-136	88.69%	Query_22699

## IV. So sánh kết quả PCR- RFLP trước và sau điều trị



## V. Nhận xét

- So sánh với trình tự các chủng *H.pylori* trong ngân hàng gen xác định vị khuẩn trong mẫu sinh thiết trước và sau điều trị tiệt trừ đều là *H.pylori*.
- Kết quả phân tích PCR-RFLP của chủng trước và sau điều trị khác nhau ở kết quả cắt bằng enzyme cắt giới hạn *Hha I* và *Mbo I*.
- Giải trình tự gen *ureC* thấy độ tương đồng hai trình tự 88.69%. Trình tự chủng nhiễm sau điều trị có 11,31% khác so với trình tự chủng ban đầu.
- Chủng *H.pylori* nhiễm sau điều trị tiệt trừ khác chủng nhiễm trước điều trị.

### Bệnh phẩm mã số 16-Bệnh nhân 134. Phí Trường Th.

#### I. Phân tích PCR &PCR-RFLP của gen *UreC* trước điều trị

##### 1. Trình tự 765bp

ACGGCTCCGGGTGGACTCACCCCATGTTTGTGATGCGTTTGGGCATTGCGGCCGGATTGTATTTTAAAGCAT  
TCTAAACCAATAAATCTTAATTGGTAAAGACACCAGAAAAAGCGGCTATATGGTAGAAAACGCTTTAGTAAAGT  
GCTTTAACTTCCATAGGCTACAATGTGATTCAAATAGGGCCTATGCCACCCCTGCGATTGCGTTTTTAAACCG  
AAGACATGCGCTGTGATGCGGGTATTATGATAAGCGCGAGCCACAACCCTTTTGAAGATAATGGCATTAAAGTT  
TTTCAATTCTTATGGTTATAAGCTTAAAGAAGAAGAAGAAAAAGCGATTGAAGAAATCTTTCATGATGAAGAA  
TTACTGCATTCTAGCTATAAAGTGGGCGAGAGCGTCGGTAGCGCTAAAAGGATAGACGATGTCATAGGGCGCT  
ATATCGTGCATTTAAACACTCTTTCCCAACATTTGAATTTACAGAGTTTAAAGGATCGTGCTAGATACGGC  
TAATGGTGC GGCTTATAAAGTGGCTCCGGTAGTTTTTAGCGAGCTTGGGGCTGATGTTTTAGTGATTATGATG  
AGCCTATGGTGCATATTATGAGCATGCGGGCTTTACACCCACCATTGAGCAGAGTGAAAAATACCGCGCGAT  
TTGGGCTTGCTTCGATGCGATGCTGACTGCTAGTGTGTGATATTTAGATATCGTGCATGGGATAGCTTTAGG  
GTGTAGGGTACATCTCTATAAAAAAACCCCTATAA

##### 3. Đoạn PCR được nhân bản từ *H.pylori* qua phân tích BLAST

Đoạn sequence tải để so sánh	Mô tả	Tương đồng
AP014710.1	<i>Helicobacter pylori</i> DNA, complete genome, strain: ML1	93.46%
AP011941.1	<i>Helicobacter pylori</i> F30 DNA, complete genome	93.46%
CP002605.1	<i>Helicobacter pylori</i> 83, complete genome	93.32%

#### II. Phân tích PCR &PCR-RLFL của gen *UreC* sau điều trị

##### 1. Trình tự 753bp

CACAGGGGGTGTGACTCGCCCCATGTTTGTGATGCGTTTGGGCATTGCGGCCGGATTGTATTTTAAAGCATTC  
TAAACCAATAAATCTTAATTGGTAAAGACACCAGAAAAAGCGGCTATATGGTAGAAAACGCTTTAGTGAGCGCT  
TTAACTTCCATAGGCTACAATGTGATTCAAATAGGACCTATGCCTACCCCTGCGATTGCGTTTTTAAACCGAAG

ACATGCGCTGTGATGCGGGTATTATGATAAGCGCGAGCCACAACCCTTTTGAAGATAATGGCATTAAAGTTTTT  
 CAATTCTTATGGTTATAAGCTTAAAGAAGAAGAAGAAAAGCGATTGAAGAAATCTTTCATGATGAAGAATTA  
 CTGCATTCTAGCTATAAAGTGGGCGAGAGCGTCGGTAGCGCTAAAAGGATAGACGATGTCATAGGGCGCTATA  
 TCGTGCATTTAAAACACTCTTTCCCAACATTTGAATTTACAGAGTTTAAGATCGTGCTAGATACCGCTAAT  
 GGTGCGGCTTATAAGTGGCTCCGGTAGTTTTTAGCGAGCTTGGGGCTGATGTTTAGTGATTATGATGAGCCTA  
 TGGGTGTATATTATGAGCATGTGGGCTTTACACCCTACAGTTGAGCAGAGTGAAAATACGCGCGATTGGGCTT  
 GCTTGATGCGATGCTGATAGCTAGTGTGTGATATTCAGAATATCGTGCATGGATAGCTTAGGTGTAGGGTTAT  
 CATCTATAAAAAACGGCCTATAA

## 2. Đoạn PCR được nhân bản từ *H. pylori* qua phân tích BLAST

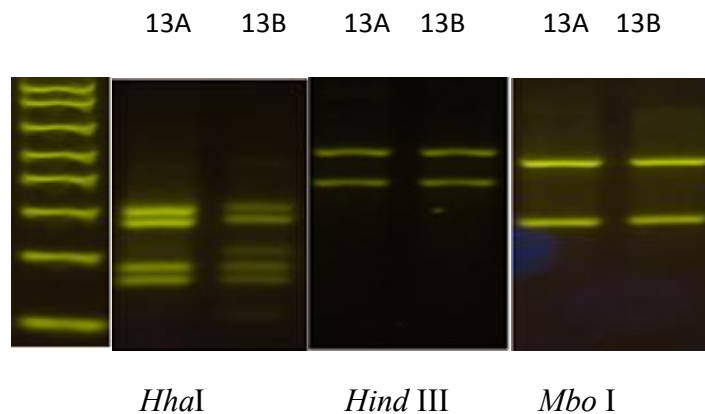
Đoạn sequence tải để so sánh	Mô tả	Tương đồng
AP017332.1	<i>Helicobacter pylori</i> DNA, nearly complete genome, strain: F209	93.24%
CP006610.2	<i>Helicobacter pylori</i> UM298, complete genome	93.11%
CP005491.3	<i>Helicobacter pylori</i> UM299, complete genome	93.11%

### III. So sánh trình tự đoạn PCR được khuếch đại trước và sau điều trị

Mã trình tự: Query\_39167 (dna), Query\_39169 (dna)

Điểm cao nhất	Tổng điểm	Tỷ lệ bao phủ	Giá trị E	Độ tương đồng	Mã số
1190	1190	98%	0.0	95.27%	Query_39169

### IV. So sánh kết quả PCR- RFLP trước và sau điều trị



### V. Nhận xét

- So sánh với trình tự các chủng *H.pylori* trong ngân hàng gen xác định vị khuẩn trong mẫu sinh thiết trước và sau điều trị tiết trừ đều là *H.pylori*.
- Kết quả phân tích PCR-RFLP của chủng trước và sau điều trị giống nhau ở kết quả cắt bằng 3 enzyme cắt giới hạn *Hha* I và *Mbo* I, *Hind* III.
- Giải trình tự gen *UreC* thấy độ tương đồng hai trình tự 95.27%. Trình tự chủng nhiễm sau điều trị có 4,73 % khác so với trình tự chủng ban đầu.
- Chủng *H.pylori* nhiễm sau điều trị tiết trừ giống chủng nhiễm trước điều trị.

## Bệnh phẩm mã số 17 -Bệnh nhân 217. Nguyễn Đắc T.

### I. Phân tích PCR &PCR-RFLP của gen *UreC* trước điều trị

#### 1. Trình tự 777bp

ACAATGGAGTGACTCACCCCATGTTTGTGATGCGTTTGGGCATTGCGGCCGGGTGTATTTTAAAAACATTC  
TAAACGAATAAAATTTTAATTGGTAAGACACCAGAAAAAGCGGCTATATGGTAGAAAACGCTTTAGTGAGCGC  
TTTAACTTCCATAGGCTATAATGTGATTCAAATAGGGCCTATGCCTACCCCTGCGATTGCGTTTTTAAACCGAA  
GACATGCGCTGTGATGCGGGCATTATGATAAGCGCAAGCCACAACCCTTTTGAAGATAATGGCATTAAAGTTTT  
TCAATTCCTTATGGTTATAAACTTAAAGAAGAAGAAGAAAAAGCGATTGAAGAATCTTTCATGATGAAGAATTG  
CTGCATTCCTAGCTATAAAGTGGGCGAGAGCGTCGGTAGCGCTAAAAGGATAGACGATGTCATAGGGCGCTATA  
TCGTGCATTTAAAACACTCTTTCCCAAACATTTGAATTTACAGAGTTTAAAGGATCGTGCTAGATACGGCTAA  
TGGCGCGGCTTATAAGTGGCTCCGGTAGTTTTTAGCGAGCTTGGGGCTGATGTTTTAGTGATTAATGATGAGC  
CTAACGGGTGTATATTATGAGCATGCGGGCTTTATACCCTACCCTAAGCCAGGAGTGAAAAATACCGCGCG  
GATTTGGGCTTTGCTTTGATGCGATGCTGACAGGCTAGTGTGTGATATTTAGCATATCGTGCATGCGATAGCT  
TTAGGGGTGTAGGGTTATCATCACTATAAAAACGCCGCGCCTATATA

#### 2. Đoạn PCR được nhân bản từ *H.pylori* qua phân tích BLAST

<b>Đoạn sequence tải để so sánh</b>	<b>Mô tả</b>	<b>Tương đồng</b>
CP000012.1	<i>Helicobacter pylori</i> 51, complete genome	93.98%
CP002605.1	<i>Helicobacter pylori</i> 83, complete genome	93.85%
CP053256.1	<i>Helicobacter pylori</i> A45 chromosome, complete genome	93.60%

### II. Phân tích PCR &PCR-RLFL của gen *UreC* sau điều trị

#### 1. Trình tự 681bp

GCAGTTCTACCTCACCCCATGTTTGTGATGCGTTTGGGCGTTTCTGCGGATTGTATTTTAAAAACATTCTAAC  
GAATAATTTTATTGGCAAGACACTAGAAAGCGGCTATATGGTAGAACGCTTTAGTGAGCGCTCTCACTTCCAT  
AGGCTATATGTGATTCAATAGGGCCTATGCCTACCCCTGCGATTGCGTTTTTAAACCGAAGACATGCGCTGTGA  
TGCGGGCATTATGATAAGCGCGAGCCACAACCCTTTTGAAGATAATGGTATTAAGTTTTTTCATTCTTATGGTT  
ATAAGCTTAAAGAAGAAGAAGAAAAGCGATTGAAGAATCTTTCATGATGAGGATTACTGCATTCTAGCTATAA  
AGTGGGCGAGAGCGTCGGTAGCGCTAAAAGGATAGACGATGTCATAGGGCGCTATATCGTGCATTTAAAACAC

TCTTTCCCCAACATTTGATTTGCAGAGTTAAGGATCGTGCTAGATACGGCTATGGTGCGCTATAAGTGGCTCC  
 GGTCGTTTTAGCGAGCTGGGCTGATGTGTAGTGATATGATGAGCTATGGTGTATATTATGAGCATGCGGGCTT  
 TACCTACATGAGCAGATGAAATACCGGCGATAGCTGCTTTGATGCCATCTGCAGCTATGTGTGATATAGATCG  
 CTGGTAGCTAAGGGGGTAGTCATC

### 3. Đoạn PCR được nhân bản từ *H.pylori* qua phân tích BLAST

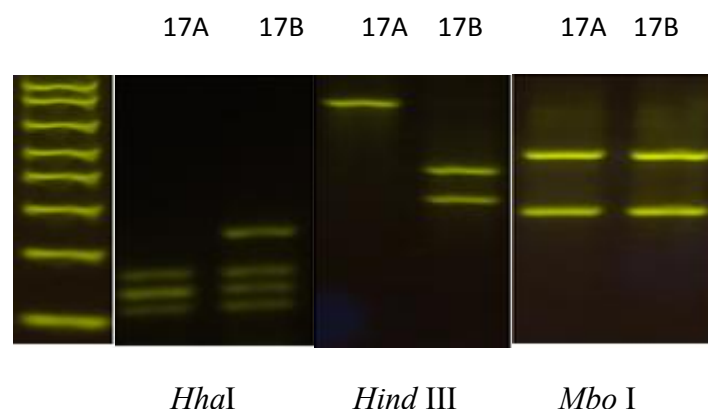
Đoạn sequence tải để so sánh	Mô tả	Tương đồng
CP024947.1	<i>Helicobacter pylori</i> strain J182 chromosome, complete genome	91.88%
AF405553.1	<i>Helicobacter pylori</i> phosphoglucosamine mutase (glmM) gene, partial cds	91.88%
CP032046.1	<i>Helicobacter pylori</i> strain G-Mx-2006-46 chromosome	91.56%

### III. So sánh trình tự đoạn PCR được khuếch đại trước và sau điều trị

Mã trình tự: Query\_39127 (dna), Query\_39129 (dna)

Điểm cao nhất	Tổng điểm	Tỷ lệ bao phủ	Giá trị E	Độ tương đồng	Mã số
828	828	89%	0.0	89.47%	Query_39129

### IV. So sánh kết quả PCR- RFLP trước và sau điều trị



## V. Nhận xét

- So sánh với trình tự các chủng *H.pylori* trong ngân hàng gen xác định vị khuẩn trong mẫu sinh thiết trước và sau điều trị tiết trừ đều là *H.pylori*.
- Kết quả phân tích PCR-RFLP của chủng trước và sau điều trị khác nhau ở kết quả cắt bằng enzyme cắt giới hạn *Hha I* và *HindIII*.
- Giải trình tự gen *ureC* thấy độ tương đồng hai trình tự 89.47%. Trình tự chủng nhiễm sau điều trị có 10,53% khác so với trình tự chủng ban đầu.
- Chủng *H.pylori* nhiễm sau điều trị tiết trừ khác chủng nhiễm trước điều trị.

## Bệnh phẩm mã số 18 -Bệnh nhân 225

### I. Phân tích PCR &PCR-RFLP của gen *UreC* trước điều trị

#### 1. Trình tự 763bp

```
AACGAGGCGTGAAGTCGCCCATGTTTGTGATGCGTTTTAGGCATTGCTGGCCGGGTCTGTATTTTAAAAACATT
CTCAAACGAATATATTTTATTGGTAAGACACCAGAAAAGCGGCTATATGGTAGAAAACGCTTTAGTGAGCGCT
TTCAC TTCCATAGGCTATAATGTGATTCAAATAGGGCCTATGCCTACCCCTGCGATTGCGTTTTTAACCGAAG
ACATGCGCTGTGATGCGGGTATTATGATAAGCGCGAGCCACAACCCTTTTGAAGATAATGGCATTAAAGTTTTT
CAATTC TTATGGTTATAAGCTTAAAGAAGAAGAAGAAAAGCGATTGAAGAAATCTTTCATGATGAAGAATTA
CTGCATTCTAGCTATAAAGTGGGCGAGAGCGTCGGTAGTGCTAAAAGGATAGACGATGTCATAGGGCGCTATA
TCGTGCATTTAAAACACTCTTTCCCAAACATTTGAATTTACAGAGTTTAAGGAATCGTGCTAGATACCGCTA
ATGGCGCGGGCTTATAAGTGGCTCCGGTAGTTTTTTAGCGAGCTTGGGGCTGATGTGTTGGTGATCATGATGAGC
CTATGGTGTAAATATTATGAGCATGCGGGCTTTACACCCTACCAGTTGAGCCAGAGTGAAAAATACGCGCGATC
TGGGCTTTGCTTTGATGCGATGCTGATAGCTAGTGTGTGATATTTAGGATATCGTGATGGATAGCTTTAGGG
TG TAGGTATCATCATTCAAAAAAACC GCCTTAA
```

#### 4. Đoạn PCR được nhân bản từ *H.pylori* qua phân tích BLAST

Đoạn sequence tải để so sánh	Mô tả	Tương đồng
CP000012.1	<i>Helicobacter pylori</i> 51, complete genome	92.29%
CP053256.1	<i>Helicobacter pylori</i> A45 chromosome, complete genome	92.29%
CP003483.1	<i>Helicobacter pylori</i> Aklavik117, complete genome	92.29%

### II. Phân tích PCR &PCR-RFLP của gen *UreC* sau điều trị

#### 1. Trình tự 756bp

```
AACGGGGCGTGAGCTCACCCCATGTTTGTGATGCGTTTTAGGCATTGCTGCCGGATTGTATTTTAAAAACATT
CTCAACGAATAAAATTCTAATCGGTAAGACACCAGAAAAGCGGCTATATGGTAGAAAACGCTTTAGTGAGCG
```

CTTTAACTTCCATAGGCTACAATGTGATTCAAATAGGGCCTATGCCTACCCCTGCGATTGCGTTTTTAACCGA  
 AGACATGCGCTGTGATGCGGGTATTATGATAAGTGCAGCCACAACCCTTTTGAAGATAATGGCATTAAAGTTT  
 TTCAATTCTTATGGTTATAAGCTTAAAGAAGAAGAAGAAAAGCGATTGAAGAATCTTTCATGATGAAGAATT  
 GCTGCATTCTAGCTATAAAGTGGGCGAGAGCGTCCGGTAGCGCTAAAAGGATAGATGATGTCATAGGGCGCTAT  
 ATTGCGCATTTAAACACTCTTTCCCAACATTTGAATTTACAGAGTTTAAGGATCGTGCTAGATACCGCTA  
 ATGGTGCGGCTTATAAGTGGCTCCGGTAGTTTTTAGCGAGCTTGGGGCTGATGTTTTAGTGATTATGATGAGC  
 CTATGGTGTACATTATGAGCATGCGGGCTTTACACCCTACCAGTTGAGCAGGAGTGAAAATACGCGCGATCTG  
 GGCTTGCTTTGATGCGATGCTGACTGCTAGTGTGTGATATTAGATATCGTGCATGGGATAGCTTAGGGTGTTA  
 GGGTATCATTAATAAAGCGCTATAAA

## 2. Đoạn PCR được nhân bản từ *H.pylori* qua phân tích BLAST

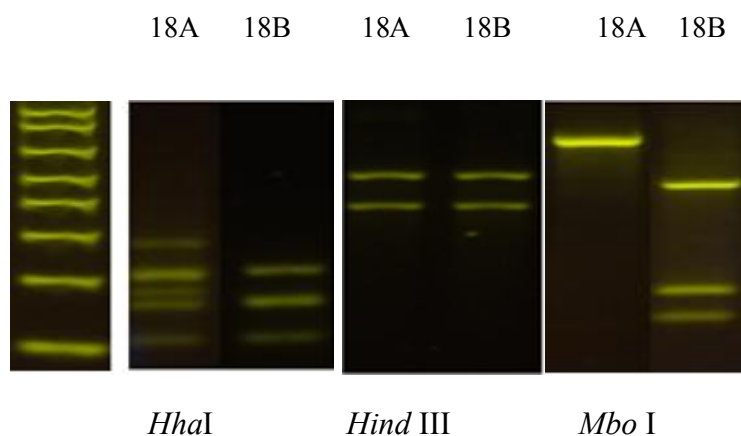
Đoạn sequence tải để so sánh	Mô tả	Tương đồng
AP017335.1	<i>Helicobacter pylori</i> DNA, nearly complete genome, strain: F211	92.45%
CP025474.1	<i>Helicobacter pylori</i> strain H-137 chromosome, complete genome	92.43%
AP017343.1	<i>Helicobacter pylori</i> DNA, nearly complete genome, strain: F51	92.32%

### III. So sánh trình tự đoạn PCR được khuếch đại trước và sau điều trị

Mã trình tự: Query\_6179 (dna), Query\_6181 (dna)

Điểm cao nhất	Tổng điểm	Tỷ lệ bao phủ	Giá trị E	Độ tương đồng	Mã số
1123	1123	98%	0.0	93.82%	Query_6181

### IV. So sánh kết quả PCR- RFLP trước và sau điều trị



### V. Nhận xét



- So sánh với trình tự các chủng *H.pylori* trong ngân hàng gen xác định vi khuẩn trong mẫu sinh thiết trước và sau điều trị tiết trừ đều là *H.pylori*.
- Kết quả phân tích PCR-RFLP của chủng trước và sau điều trị khác nhau ở kết quả cắt bằng enzyme cắt giới hạn *Hha* I và *Hind*III..
- Giải trình tự gen *ureC* thấy độ tương đồng hai trình tự 93.82%. Trình tự chủng nhiễm sau điều trị có 6,18 % khác so với trình tự chủng ban đầu.
- Chủng *H.pylori* nhiễm sau điều trị tiết trừ khác chủng nhiễm trước điều trị