

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ

CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT



VŨ ĐỨC NAM

**XÁC ĐỊNH BỆNH NHÂN TÁI NHIỄM
VÀ TÁI PHÁT *HELICOBACTER PYLORI*
SAU QUÁ TRÌNH ĐIỀU TRỊ**

Chuyên ngành : Vi sinh

Mã số : 60 42 01 03

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC

Giáo viên hướng dẫn: PGS.TS. Nguyễn Thị Hồng Hạnh

HÀ NỘI-2014

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận văn này, trước tiên tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS. TS. Nguyễn Thị Hồng Hạnh, nghiên cứu viên phòng Công nghệ Gen động vật- Viện Công nghệ Sinh học. Người đã trực tiếp hướng dẫn, chỉ bảo, dìu dắt tôi trong suốt quá trình học tập và làm việc tại phòng.

Tôi xin chân thành cảm ơn các cô chú, anh chị em phòng Công nghệ Gen Động vật, các anh chị bệnh Viện E đã tận tình chỉ bảo, động viên và cho tôi những lời khuyên quý giá trong công việc cũng như trong cuộc sống.

Tiếp đến tôi xin được gửi lời cảm ơn chân thành tới các thầy cô của Viện Công nghệ Sinh học, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, trường Đại học Thái Nguyên đã nhiệt tình giảng dạy và chỉ bảo cho tôi trong suốt thời gian tham gia khóa học. Tôi xin cảm ơn cơ sở đào tạo sau đại học Viện Sinh Thái và Tài nguyên sinh vật đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập.

Cuối cùng tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc tới người thân, gia đình, bạn bè và đồng nghiệp đã hết lòng ủng hộ và động viên tôi trong suốt thời gian học tập và làm việc.

Hà Nội ngày 31 tháng 12 năm 2014

Học viên cao học

KS. Vũ Đức Nam

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG I: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Một số vấn đề về <i>H. pylori</i>	3
1.1.1. Lịch sử phát hiện	3
1.1.2. Đặc điểm sinh học	3
1.1.3. Dịch tễ học và phương thức lây truyền	5
1.1.4. Các phương pháp chẩn đoán <i>H. pylori</i>	5
1.1.4.1. Các phương pháp không can thiệp.....	5
1.1.4.2. Các phương pháp can thiệp.....	9
1.2. Vấn đề điều trị trừ <i>H. pylori</i>.....	12
1.2.1. Các thuốc sử dụng để điều trị tiệt trừ <i>H. pylori</i>	12
1.2.2. Phác đồ kết hợp ba thuốc EAC trong điều trị <i>H. pylori</i>	13
1.3. Nguyên nhân thất bại điều trị	14
1.3.1. Đề kháng kháng sinh.....	14
1.3.2. Tuân thủ điều trị	16
1.4. Vấn đề chẩn đoán <i>H. pylori</i> kháng thuốc.....	16
1.5. Một số vấn đề về loét dạ dày	17
1.5.1. Khái niệm	17
1.5.2. Nguyên nhân, cơ chế bệnh sinh	17
1.5.3. Giải phẫu bệnh lý của loét dạ dày	18
1.5.4. Triệu chứng lâm sàng và xét nghiệm của bệnh loét dạ dày	19
1.5.4.1. Triệu chứng lâm sàng.....	19
1.5.4.2. Triệu chứng cận lâm sàng [18], [19]	19
1.5.5. Tiến triển và biến chứng	20
1.5.6. Điều trị.....	20
1.5.6.1. Điều trị nội khoa.....	20
1.5.6.2. Điều trị ngoại khoa.....	22
1.6. Tình hình nghiên cứu <i>H. pylori</i> ở Việt Nam và trên thế giới	23

CHƯƠNG II: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	25
2.1. Sơ đồ nghiên cứu	25
2.2. Đối tượng nghiên cứu.....	25
2.3. Phương pháp nghiên cứu.....	26
2.3.1. Hóa chất, thiết bị máy móc	26
2.3.2. Địa điểm thực hiện nghiên cứu	27
2.4. Phương pháp nghiên cứu.....	27
2.4.1. Khám lâm sàng.....	27
2.4.2. Nội soi và lấy bệnh phẩm.....	28
2.4.3. Đánh giá độ nhạy cảm với kháng sinh	28
2.4.3.1 Xác định mức độ nhạy cảm kháng sinh của <i>H. pylori</i>	28
2.4.3.2 Đánh giá độ nhạy cảm với kháng sinh.....	29
2.4.4. Nuôi cấy chủng vi khuẩn	29
2.4.5. Tách chiết DNA từ sinh thiết bệnh nhân.....	30
2.4.6. Định lượng DNA bằng quang phổ kế	30
2.4.7. Phương pháp điện di trên gel Agarose	31
2.4.8 Phương Pháp PCR.....	32
2.4.9. Phân tích trình tự đoạn gen <i>23S rARN</i>	33
CHƯƠNG III: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....	34
3.1. Đặc điểm chung của các bệnh nhân	34
3.1.1. Đặc điểm về tuổi và giới	34
3.1.2. Hình ảnh chụp nội soi dạ dày của các bệnh nhân	34
3.2. Tách chiết DNA sinh thiết	35
3.3. Khuếch đại đoạn gen <i>23S rARN</i> của <i>H. pylori</i> bằng PCR.....	36
3.4. Xác định tái phát và tái nhiễm <i>H. pylori</i> ở các bệnh nhân	38
3.5. Xác định tình trạng nhiễm <i>H.pylori</i> của các bệnh nhân trước và sau điều trị kháng sinh.....	39
3.5.1. Đặt kháng sinh đồ.....	39
3.5.1.1 Kháng sinh đồ sử dụng thanh E-test trên đĩa thạch nuôi vi khuẩn	39

3.5.1.2. Xác định khả năng kháng <i>Amoxicilin</i> và <i>Clarithromycin</i>	39
3.5.1.3 Xác định tái phát và tái nhiễm của các chủng <i>H.pylori</i> sau điều trị kháng sinh	40
KẾT LUẬN	45
KIẾN NGHỊ	45
TÀI LIỆU THAM KHẢO	46

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

(Chữ viết tắt, kí hiệu chuyên ngành)

Từ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>	Axit đeoxyribonucleic
Kb	<i>Kilo base</i>	1000 cặp bazơ
OD	<i>Optical Density</i>	Giá trị mật độ quang
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>	Phản ứng tổng hợp dây chuyền nhờ polymerase
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>	Axit ribonucleic
DNASTAR		Phần mềm cho sinh học phân tử
TAE	<i>Tris - Acetic acid - Ethylen Diamin Tetra Acetic</i>	
TBE	<i>Tris - Borate - Ethylen Diamin Tetra Acetic</i>	
TE	<i>Tris - Ethylen Diamin Tetra Acetic</i>	
<i>T_m</i>	<i>Temperature melt</i>	Nhiệt độ biến tính
<i>R</i>	Resistant	Kháng
<i>S</i>	Susceptible	Nhạy cảm

PHỤ LỤC BẢNG

Bảng 2.1. Hóa chất sử dụng cho thí nghiệm	26
Bảng 2.2. Trình tự môi 23S rARN.....	26
Bảng 2.3. Máy móc thiết bị sử dụng cho thí nghiệm	27
Bảng 2.4. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR.....	33
Bảng 3.1. Độ sạch và nồng độ DNA của một số mẫu	36
Bảng 3.2. Kết quả khuếch đại gen 23S rARN từ DNA sinh thiết bệnh của các bệnh nhân trước nhiễm <i>H. pylori</i> và sau khi điều trị kháng sinh Cla & Amo	37
Bảng 3.3. Các chủng <i>H.pylori</i> sau điều trị kháng sinh Cla và Amox	40

PHỤ LỤC HÌNH

Hình 1.1 : Hình ảnh điển hình của <i>Helicobacter pylori</i>	3
Hình 2. Vị trí tác dụng của một số thuốc	21
Hình 2.1. Hệ thống bình nuôi cấy kỵ khí.....	29
Hình 3.1. Ảnh chụp nội soi dạ dày xuất huyết của 17 bệnh nhân.....	35
Hình 3.2. Ảnh điện di DNA tổng số	35
Hình 3.3. Ảnh điện di sản phẩm PCR.....	37
Hình 3.4. Đột biến A2143G trong các chủng <i>H. pylori</i> trước điều trị kháng sinh.....	39
Hình 3.5: Đặt E-Test kháng sinh <i>Clarithromycin</i> và <i>Amoxicilin</i>	40

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngày nay, *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) đã được khẳng định là một trong những tác nhân chủ yếu gây các bệnh viêm loét dạ dày, hành tá tràng và ung thư dạ dày ở người. Theo ý kiến của một số nhà khoa học, nhiễm *H. pylori* ở đường tiêu hóa có thể được xem là bình thường, vì hơn một nửa nhân loại nhiễm *H. pylori*. Tại các nước nghèo tỉ lệ người dân bị nhiễm trùng còn cao hơn. Ví dụ, tại Việt Nam và Trung Quốc, con số này lên đến 75%. Về mặt bệnh học, khoảng 80% số người bị nhiễm *H. pylori* không thể hiện triệu chứng hoặc biến chứng, khoảng 10 - 15% người phát triển loét dạ dày tá tràng và chỉ 1 - 3% bệnh nhân bị ung thư dạ dày sau nhiều năm nhiễm khuẩn. Về mặt dịch tễ học, *H. pylori* lây truyền chủ yếu qua đường ăn uống, nước bọt, dịch tiêu hóa, phân... nên nguy cơ lây giữa các thành viên trong gia đình rất cao. Vì thế, cần chú ý sử dụng nguồn nước sạch, tuân theo những nguyên tắc vệ sinh như ăn chín, uống sôi, rửa tay sạch sẽ trước khi ăn để phòng ngừa các bệnh do nhiễm khuẩn dạ dày.

Hiện nay, liệu pháp kháng sinh được sử dụng rộng rãi để điều trị các bệnh tiêu hóa liên quan đến nhiễm *H. pylori*- loài vi sinh vật gây bệnh đa dạng về mặt di truyền. Ở các nước đang phát triển, việc điều trị bệnh bằng liệu pháp càng ngày càng khó khăn, phần do vi khuẩn trở nên kháng thuốc, phần do điều kiện sống và vệ sinh cộng đồng. Hiện tượng **tái nhiễm** do các chủng vi khuẩn *H. pylori* mới và tái phát do các chủng *H. pylori* tương tự như chủng *H. pylori* trước khi điều trị là nguyên nhân thất bại của điều trị. Ở các nước phát triển, sự có mặt của *H. pylori* sau điều trị kháng sinh thường gắn liền với tái phát, trong khi đó ở các nước đang phát triển, tình hình có thể khác hơn, phụ thuộc nhiều vào điều kiện kinh tế và xã hội. Ở Peru, nước có hoàn cảnh kinh tế và xã hội thấp, tỷ lệ tái nhiễm được xác định là cao. Ở Việt Nam, chưa có công trình nghiên cứu nào đề cập đến vấn đề tái nhiễm và tái phát HP ở các bệnh nhân sau điều trị kháng sinh. Xuất phát từ

thực tế đó, chúng tôi tiến hành đề tài nghiên cứu “**Xác định bệnh nhân tái nhiễm và tái phát *Helicobacter pylori* sau quá trình điều trị**” kháng sinh Clarithromycin (Cla) và Amoxicillin (Amo) với mục đích tìm hiểu nguyên nhân tái phát và tái nhiễm *H.pylori* ở các bệnh nhân Tính kháng thuốc Cla của các chủng *H. pylori* được xác định bằng phân tích đoạn gen *23S rARN* không qua giai đoạn nuôi cấy vi khuẩn mà sử dụng DNA bệnh phẩm.