

BỘ GIÁO DỤC ĐÀO TẠO

BỘ QUỐC PHÒNG

VIỆN NGHIÊN CỨU Y DƯỢC LÂM SÀNG 108



NGUYỄN VĂN THỊNH

**NHIÊN CỨU TÌNH TRẠNG NHIỄM
HELICOBACTE PYLORI, MỘT SỐ VI KHUẨN KỶ
KHÍ KHÁC VÀ NHỮNG TỔN THƯƠNG NIÊM
MẠC DẠ DÀY TRONG VIÊM DẠ DÀY MẠN**

Chuyên ngành: Nội tiêu hóa

Mã số 62.72.20.01

Tóm tắt luận án tiến sỹ Y học

Hà Nội 2010

Công trình được hoàn thành tại:

Viện nghiên cứu khoa học Y dược lâm sàng 108

Người hướng dẫn khoa học:

GS.TS. Tạ Long

PGS.TS. Nguyễn Thị Hồng Hạnh

Phản biện 1: PGS. TS. Phạm Thị Thu Hồ

Phản biện 2: PGS. TS. Mai Hồng Bằng

Phản biện 3: PGS. TS. Phạm Quang Cừ

Luận án sẽ được bảo vệ tại Hội đồng chấm luận án cấp Nhà nước tại:

Viện nghiên cứu khoa học Y dược lâm sàng 108.

Vào hồi: 8h30 ngày 22 tháng 7 năm 2010.

Có thể tìm hiểu luận án tại:

Thư viện Quốc gia

Thư viện BV TƯQĐ 108

CHỮ VIẾT TẮT

ADN	: Axit Deoxyribo Nucleic
ARN	: Axit Ribo Nucleic
BN	: Bệnh nhân
CagA	: Cytotoxin Associated Gene
CS	: Cộng sự
DDTT	: Dạ dày tá tràng
DSR	: Dịch sản ruột
GPB	: Giải phẫu bệnh
HE	: Hematoxylin-Eosin
H.pylori	: Helicobacter pylori
KSD	: Kháng sinh đồ
LS	: Loạn sản
MALT	: Mucosal- Associated Lymphoma Tissue
MBH	: Mô bệnh học
NMDD	: Niêm mạc dạ dày
PAS	: Periodic Acid Schiff
PCR	: Polymerase Chain Reaction
TB	: tế bào
UTDD	: Ung thư dạ dày
VacA	: Vacuolating Cytotoxin Associated Gene
VDD	: Viêm dạ dày
VDDM	: Viêm dạ dày mạn
Vk	: Vi khuẩn
Vkkk	: Vi khuẩn kỵ khí
XN	: Xét nghiệm

ĐẶT VẤN ĐỀ

Vai trò gây bệnh của *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) đã được chứng minh và công nhận. *H.pylori* là nguyên nhân gây bệnh chủ yếu của viêm dạ dày mạn (VDDM), loét dạ dày tá tràng (DDTT), u MALT và ung thư dạ dày (UTDD). Nhiễm *H.pylori* mạn sẽ gây VDDM, dẫn tới viêm teo niêm mạc, dị sản ruột (DSR), loạn sản (LS) là những tổn thương tiền ung thư. Trong hơn 2 thập kỷ qua, việc điều trị diệt *H.pylori* thành công với các phác đồ 3 thuốc, 4 thuốc cho kết quả tốt. Nhưng đã có những công bố có sự kháng thuốc tăng dần với những kháng sinh chủ yếu như Metronidazole, Clarithromycine, Amoxicilline... trong các phác đồ được khuyến cáo.

Theo Zboril V (2002), dạ dày của người bình thường không chứa vi khuẩn kỵ khí (vkkk). Một số công trình nghiên cứu gần đây lại cho biết trong dạ dày người bệnh không chỉ có *H.pylori* mà còn có nhiều loại vkkk khác, có khả năng khử Nitrat, xúc tác quá trình nitroso hoá muối mật thành các chất gây ung thư. Trên thực nghiệm, Nitrat và Nitrit trong thức ăn cùng các acid amin thứ cấp kết hợp với nhau tạo thành hợp chất N-nitroso là chất gây ung thư ở động vật. Như vậy các vkkk trong dạ dày người có tiềm năng tạo điều kiện gây UTDD. Trong dạ dày - ruột người bệnh còn có nấm gây bệnh *Candida albican*. Có thể còn loại nấm nào khác thuộc chi *Candida* có khả năng gây bệnh?

Trong VDDM có nhiễm *H.pylori*, có tình trạng biến đổi mô bệnh học (MBH) như VDDM, viêm hoạt động, viêm teo và DSR, LS. Tuy nhiên, chưa có công trình nào nghiên cứu những biến đổi ADN của tế bào NMDD. Như vậy có mối liên quan gì giữa tình trạng nhiễm *H.pylori*, nhiễm các vkkk, nấm với các tổn thương MBH và biến đổi ADN của tế bào (TB) dạ dày trong bệnh VDDM không? Tôi thực hiện đề tài:

“Nghiên cứu tình trạng nhiễm *H.pylori*, nhiễm vi sinh vật kỵ khí và tổn thương niêm mạc dạ dày trong viêm dạ dày mạn”

Mục tiêu của đề tài

1. Nghiên cứu tình trạng nhiễm *Helicobacter pylori*, vi khuẩn kỵ khí, nấm và kháng kháng sinh của *Helicobacter pylori* ở bệnh nhân viêm dạ dày mạn..
2. Tìm hiểu tổn thương mô bệnh học và đứt gãy ADN của tế bào biểu mô dạ dày trong viêm dạ dày mạn.

Ý nghĩa của đề tài

Đề tài nghiên cứu đã phát hiện:

- Thực chất tình trạng nhiễm *H.pylori*, sự kháng các thuốc kháng sinh thường dùng hiện nay để giúp lựa chọn thuốc điều trị.
- Ngoài nhiễm *H.pylori* còn có tình trạng nhiễm nấm, vkkk trong VDDM, trong đó phát hiện nấm *Candida parapsilosis* và vkkk *Bacillus sp. HI*. Chứng minh khả năng khử Nitrate và Nitrite của *Bacillus sp. HI*, một tiền đề sinh ung thư.
- Có mối liên quan rõ rệt giữa tình trạng nhiễm *H.pylori* với các tổn thương MBH, đứt gãy ADN (apoptosis), song chưa thấy ảnh hưởng của tình trạng nhiễm nấm và vkkk.

Cấu trúc luận án

Luận án gồm 125 trang với các phần: đặt vấn đề (2 trang), tổng quan (34 trang), đối tượng và phương pháp nghiên cứu (16 trang), kết quả nghiên cứu (33 trang), bàn luận (38 trang), kết luận (2 trang). Ngoài ra, luận án còn các phần tài liệu tham khảo (173 tài liệu), 39 hình, 40 bảng, 1 sơ đồ và phụ lục.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

1.1. VIÊM DẠ DÀY MẠN

Viêm dạ dày (VDD) là một danh từ được sử dụng để miêu tả phản ứng viêm của niêm mạc dạ dày bị tổn thương. Nó không phải là một bệnh mà là một nhóm những rối loạn gây biến đổi viêm ở niêm mạc dạ dày khác nhau về hình ảnh lâm sàng, đặc điểm mô học và cơ chế gây viêm. Gần đây vai trò của *H.pylori* trong VDDM đã được chứng minh và công nhận, sự lây nhiễm từ lúc còn nhỏ và kéo dài đến suốt đời nếu không được điều trị sẽ dẫn tới VDDM, loét DDTT, UTDD.

1.1.1. Phân loại viêm dạ dày mạn theo hệ thống Sydney:

Công nhận vai trò gây bệnh của *H.pylori* trong cơ chế bệnh sinh của bệnh lý DDTT. Năm 1990 tại hội nghị tiêu hoá Sydney, phân loại VDDM mới đã được đưa ra dựa trên MBH, vị trí và hình ảnh nội soi. Phân loại VDD theo hệ thống Sydney đã được nhiều nước áp dụng. Về nội soi có 7 dạng tổn thương: VDD xung huyết; VDD dạng trợt phẳng; VDD dạng trợt nổi; VDD dạng teo; VDD xuất huyết; VDD dạng phi đại và VDD do trào ngược.

1.1.4. Phân loại Sydney cập nhật (phiên bản Houston 1996):

Mục đích là: thiết lập thuật ngữ đồng thuận về VDD; xác định, định nghĩa và cố gắng giải quyết một số vấn đề có liên quan đến hệ thống Sydney. Toàn bộ những nguyên tắc chính và sự phân loại mức độ của Hệ thống Sydney được bảo đảm, nhưng sự phân độ được so với một bảng mẫu, nhấn mạnh giữa VDD teo và không teo. Những khuyến cáo đưa ra gồm có: sinh thiết 5 mảnh: 2 ở hang; 2 ở thân vị; và 1 ở vùng góc bờ cong nhỏ. Các mẫu ở hang vị, thân vị và góc bờ cong nhỏ để riêng từng lọ. Gửi thông tin tới nhà GPB: kết quả nội soi, đặc điểm lâm

sàng, vị trí sinh thiết. Nhuộm đặc biệt tìm *H.pylori* trước khi kết luận có viêm mà *H.pylori* âm tính. Nhuộm AB/PAS để đánh giá DSR.

1.1.5. Phân loại OLGA (Operative Link for Gastritis Assessment)

Hệ thống này xếp đặt các tổn thương niêm mạc dạ dày theo bậc thang tăng dần nguy cơ mắc ung thư: từ mức độ thấp nhất là giai đoạn 0 (giai đoạn OLGA 0) và cao nhất là giai đoạn IV (giai đoạn OLGA IV). Phù hợp với chỉ dẫn của hệ thống Sydney, hệ thống OLGA cũng bao gồm các thông tin về nguyên nhân của bệnh viêm nhiễm (do *H.pylori*, do tự miễn...). Đánh giá giai đoạn của VDD là một chỉ dẫn tin cậy về nguy cơ UTDD của từng bệnh nhân.

1.1.6. Các tổn thương MBH cơ bản trong viêm dạ dày mạn.

Các tổn thương như: Thay đổi lớp biểu mô; thay đổi các khe tuyến; thay đổi các tuyến; thay đổi mô đệm; đặc biệt là DSR và LS.

* **Dị sản ruột:** DSR là sự biến đổi tế bào của NMDD sang trạng thái biểu mô ruột với sự xuất hiện tế bào đài chế nhày và tế bào hấp thu có xu hướng hình thành nhung mao với diềm bàn chải ở phía ngọn tế bào. Owen DA. 1999 phân ra hai loại DSR, là DSR non và DSR già, mỗi loại đều có thể là DSR hoàn toàn hoặc không hoàn toàn.

* **Loạn sản:** LS là sự sinh ra một mô bất thường, khác biệt do sự rối loạn quá trình phát triển của bào thai hoặc của tế bào mô đang trưởng thành, đang tái tạo, hoặc biệt hoá. Sự biến đổi này bao gồm cả hình thái, cấu trúc mô và tế bào. LS là sự quá sản và thay đổi phần nào chất lượng của tế bào và mô nhưng vẫn nằm trong sự điều chỉnh của cơ thể. LS có thể bình thường, có thể dẫn đến ung thư.

1.1.7. Những thay đổi tế bào ở mức độ phân tử của NMDD:

Các vi khuẩn, bao gồm *H.pylori* gây nên tình trạng viêm teo NMDD, DSR, LS. Được biết, chính *H.pylori* đã gây nên hàng loạt thay đổi phức tạp đối với biểu hiện các gen của các tế bào trong các mô bị

nhiễm khuẩn. Bằng phương pháp đếm tế bào dòng chảy (flow cytometry) qua các mảnh NMDD sinh thiết từ vùng rìa ổ LDD hoặc hang vị (với loét tá tràng), Kohda K. 1999 thấy rằng tốc độ chết tế bào theo chương trình (apoptosis) ở NMDD của bệnh nhân loét DDTT có nhiễm *H.pylori* tăng gấp 20 lần so với những người bình thường và có liên quan tới số lượng *H.pylori* trên mảnh sinh thiết, hoạt tính của enzym urease và các yếu tố độc do *H.pylori* sản xuất ra.

1.2. HELICOBACTER PYLORI

1.2.1. Lịch sử phát hiện *H.pylori*:

Năm 1982, Warren J.R. và Marshall B.J. đã phân lập được chủng vi khuẩn mới từ mẫu sinh thiết dạ dày của một bệnh nhân loét hành tá tràng. Việc phát hiện vi khuẩn *H.pylori* đã làm thay đổi cơ bản những hiểu biết về bệnh sinh của loét và viêm teo mạn tính NMDD. Tại hội thảo quốc tế ở Dublin, Irland (7/1992) đã kết luận: *H.pylori* có vai trò chủ yếu trong nguyên nhân sinh bệnh VDD, loét DDTT và còn được xếp vào nhóm I trong các tác nhân gây UTDD.

1.2.2. Dịch tễ học *H.pylori*:

H.pylori có lẽ là vi khuẩn có tỷ lệ lây nhiễm phổ biến nhất trên thế giới, những nghiên cứu về dịch tễ học đã làm mọi người ngạc nhiên "hầu như một nửa dân số thế giới bị nhiễm trùng *H.pylori*". Nhiều công trình nghiên cứu của các nhà khoa học trên thế giới cho thấy: tỷ lệ nhiễm *H.pylori* thay đổi theo độ tuổi, theo tập quán, theo vùng địa lý và theo chủng tộc. Ở Việt Nam, Vương Tuyết Mai và cs (2001) sử dụng kỹ thuật Elisa phát hiện tỷ lệ nhiễm *H.pylori* ở 528 người khỏe mạnh, cho thấy: Tỷ lệ nhiễm *H.pylori* trong quần thể nghiên cứu là 75,2%. Tỷ lệ nhiễm ở nam và nữ như nhau. Trẻ nhỏ nhiễm *H.pylori* thấp hơn người lớn, xuất hiện ở cả 1-2 tuổi. Tỷ lệ nhiễm *H.pylori* ở các địa phương cũng khác nhau.

1.2.3. Đặc tính sinh học của *H.pylori*:

H.pylori là một vi khuẩn gram âm vi ái khí. Dưới kính hiển vi điện tử, *H.pylori* dài 1,5-5 μm , có đường kính 0,3 - 1 μm , có 1- 6 lông mảnh ở một đầu. Trong điều kiện không thuận lợi hoặc sau điều trị bằng một số kháng sinh, *H.pylori* có thể chuyển thành dạng hình cầu. *H.pylori* thường nằm dưới lớp chất nhầy phủ bề mặt niêm mạc dạ dày, bám trên mặt ngọn hoặc chui sâu vào khe giữa các tế bào biểu mô dạ dày, có khi thấy *H.pylori* trong lòng các khe tuyến nông trên gần bề mặt niêm mạc.

1.2.5. Phân loại typ *H.pylori*:

Dựa vào độc tố *CagA* và *VacA* trong vi khuẩn phân ra 4 typ: Typ I: *CagA* (+) *VacA* (+); Typ II: *CagA* (-) *VacA* (-); Typ III: *CagA* (+) *VacA* (-); Typ IV: *CagA* (-) *VacA* (+).

1.2.6. Vai trò của *H.pylori* trong bệnh lý dạ dày tá tràng:

Hiện nay, *H.pylori* được coi là nguyên nhân quan trọng nhất gây VDD, loét DDTT và UTDD. Bằng chứng là tỷ lệ nhiễm *H.pylori* rất cao: 90- 100% trong LTT, khoảng 70 - 90% trong LDD, VDD và 60 - 70% trong UTDD. Gần đây, người ta thấy có mối liên quan chặt chẽ giữa nhiễm *H.pylori* với UTDD. *H.pylori* được xếp vào nhóm I trong các tác nhân gây UTDD. Theo Buruk F và Kuipers E.J., cả UTDD typ ruột và typ lan toả đều có liên quan đến nhiễm *H.pylori*, Craamen cũng có kết quả tương tự khi nghiên cứu trên UTDD sớm.

1.3. CÁC VI SINH VẬT KHÁC TRONG DẠ DÀY:

1.3.1. Nấm :

Trên thế giới, các nhà khoa học đã phát hiện có một số loại nấm trong dạ dày người bệnh như *Candida albicans*, *Candida tropicalis* và *Candida lusitaniae*. Năm 2003, Bondarenko phát hiện một số loài nấm thuộc chi *Candida* ở LDD và loét hành tá tràng. Tại Việt Nam, năm 1998 Trịnh Tuấn Dũng thấy 10% ở đáy ổ loét DD có vsv dạng sợi nghĩ

tới nấm *Candida*. Năm 2004, Nguyễn Kim Giao và cs công bố ảnh chụp các vkkk và nấm phân lập từ sinh thiết dạ dày.

1.3.2. Vi khuẩn kỵ khí:

Hệ tiêu hoá của người chứa một hệ sinh thái gồm nhiều loại vk khác nhau. Theo Zboril V (2002), dạ dày của người bình thường không chứa vkkk. Tuy vậy, các bệnh nhân bị loét DDTT, UTDD mang nhiều vi khuẩn trong dạ dày hơn là các bệnh nhân bị VDDM. Từ dịch dạ dày kiểm của các bệnh nhân (BN) bị VDDM, các nhà khoa học đã phân lập các vi khuẩn yếm khí có khả năng khử nitrate và cả các vkkk có thể chuyển muối mật thành các chất gây ung thư hoặc xúc tác quá trình nitroso hoá muối mật. Năm 2003, Bondarenko nuôi cấy các vkkk từ sinh thiết lấy từ các vùng loét DDTT từ 122 bệnh nhân đã nhận diện được 32 chi và loài vi sinh vật như: *H. pylori*, nấm thuộc chi *Candida*, *Bacteroides*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*... Jame G.F. và cs (2007) cho rằng quá trình nhiễm các vi khuẩn khác ngoài *H. pylori* khi dạ dày giảm tiết acid là bước quan trọng dẫn đến UTDD. Ở Việt nam, tại Viện Công nghệ Sinh học, một nhóm các vi sinh vật phát triển ở điều kiện ái khí và kỵ khí tuyệt đối làm tan tế bào hồng cầu đã được phân lập.

CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu:

279 BN đến khám tại Bệnh viện Bưu điện Hà Nội được nội soi, sinh thiết, xét nghiệm (XN) MBH chẩn đoán xác định VDDM và đáp ứng các tiêu chuẩn đề ra được chọn vào nghiên cứu.

Tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân: BN tuổi từ 18- 80; được nội soi, sinh thiết dạ dày và xét nghiệm đầy đủ theo thiết kế nghiên cứu. BN không dùng kháng sinh trong thời gian 3 tháng trước khi soi.

2.2. Phương pháp nghiên cứu:

Thiết kế nghiên cứu: tiến cứu mô tả cắt ngang.

2.2.1. Phương pháp nội soi dạ dày và sinh thiết:

Máy nội soi dạ dày video OLYMPUS Evis 160 EXERA-I, Evis 160 EXERA-II và các dụng cụ kèm theo. Nội soi dạ dày theo thường quy. Đánh giá kết quả nội soi theo hệ thống phân loại Sydney.

2.2.2. Phương pháp xét nghiệm MBH: tại Bộ môn GPB, ĐHY HN

Mảnh sinh thiết cố định trong formol 10%, chuyển và vùi nén, cắt mảnh dày 3-4 μm , nhuộm theo các phương pháp thông thường. Các tổn thương viêm NMDD được đánh giá theo tiêu chuẩn phân loại của Whitehead R. 1985, gồm viêm teo và viêm hoạt động.

2.2.3. Phương pháp chẩn đoán *H.pylori*:

H.pylori được chẩn đoán bằng 4 phương pháp: Urease-test, Mô bệnh học, Nuôi cấy và PCR (trực tiếp từ mảnh sinh thiết). *H.pylori* được coi là dương tính khi có ít nhất một XN cho kết quả dương tính.

- **Xét nghiệm Urease-test:** Mẫu sinh thiết được cho vào giếng thử, nhỏ dung dịch thuốc thử vào giếng cho ngập mảnh sinh thiết, để ở nhiệt độ phòng. Đọc kết quả trong vòng 24 giờ sau khi xét nghiệm.

- **Xét nghiệm mô bệnh học:** Thực hiện tại Bộ môn Giải phẫu bệnh Trường Đại học Y Hà Nội. Xác định *H.pylori* trên kính hiển vi quang học, phóng đại 1000 lần. Đánh giá mức độ nhiễm *H.pylori*: (-); (+); (++) và (+++).

- **Nuôi cấy *H.pylori*:** Tại Viện Công nghệ sinh học. Mảnh sinh thiết được nghiền kỹ trong dung dịch nước muối sinh lý 0,9% vô trùng. Sau đó, 100 μl huyền phù được nhỏ và trải đều trên mặt đĩa thạch và được nuôi trong bình Jar ở điều kiện vi hiếu khí (5% O_2) không chế nồng độ CO_2 nhiệt độ 37°C trong vòng 48-72 giờ hoặc kỵ khí. Sau 2-3 ngày, khuẩn lạc có màu trắng đục, đường kính 0,5- 1mm.

- **Phương pháp tổng hợp chuỗi PCR (Polymerase Chain Reaction):** Nghiền mẫu trong 0,2 ml dung dịch muối sinh lý. Cho thêm 50 μl dung

dịch proteinase K vào mẫu và ủ mẫu ở 37°C trong 2 giờ, sau đó, chiết xuất ADN. Để xác định kiểu gen *VacA* theo Yamaoka, 1-10 ng ADN hoà tan trong dung dịch TE được sử dụng làm khuôn mẫu cho 25 µl phản ứng PCR. Phản ứng gồm 45 chu kỳ: 1 chu kỳ gồm: 95°C/ 1 phút, 52°C/ 1 phút, 72°C/ 1 phút.

2.2.4. Phương pháp xét nghiệm kháng sinh đồ với *H.pylori*:

Sau phân lập lần thứ nhất, *H.pylori* được cấy lại ở mật độ cao. Đặt các khoanh kháng sinh (Hãng Bio Rard) lên trên đĩa thạch và ủ đĩa trong điều kiện thích hợp, nhiệt độ 37°C trong 48-72 giờ. Tính nhạy của chủng vi khuẩn đối với kháng sinh được xác định theo bán kính diệt khuẩn đối chiếu với kích thước chuẩn theo tiêu chuẩn của hãng.

2.2.5. Phương pháp xét nghiệm nấm, vkkk khác:

Thực hiện tại viện Công nghệ Sinh học.

- **Nuôi cấy tìm vi khuẩn kỵ khí:** Mảnh sinh thiết hang vị được nghiền kỹ, 100µl dịch nghiền được cấy lên đĩa Petri với môi trường có bổ xung chất kháng nấm. Các đĩa được đặt vào bình kỵ khí của hãng BBL trong vòng 2-3 ngày ở nhiệt độ 37°C. Khuẩn lạc được tách, làm sạch để giám định gen 16S rARN và nghiên cứu tiếp theo.

- **Giám định gen 16S rARN của vi khuẩn:** 1-10 ng ADN chiết xuất từ chủng vi khuẩn kỵ khí được sử dụng làm khuôn để khuếch đại gen 16S rARN. Cặp mồi I được sử dụng để khuếch đại toàn bộ gen 16S rARN và giải phân trình tự từ hai đầu của sản phẩm PCR, còn 4 mồi tiếp sau được thiết kế dựa trên trình tự của đoạn đã biết nhằm giải trình tự của vùng tiếp theo trên gen. Các phản ứng PCR được tiến hành ở điều kiện như sau, với 35 chu kỳ: Mỗi chu kỳ gồm: 94°C / 60''; 55°C / 40''; 72°C / 50''. Các trình tự nucleotide của gen 16S rARN được xác định trực tiếp không qua giai đoạn tạo dòng phân tử, sau đó được so sánh để thiết lập toàn bộ trình tự của gen và phân tích phả hệ bằng

chương trình Blast trên Website (hệ thống Internet). Xác định tính khử Nitrate, Nitrite của vkkk bằng phương pháp Griess với dịch nuôi cấy.

- Nuôi cấy tìm nấm:

Mảnh sinh thiết hang vị sau khi được nghiền kỹ, 100 μ l dịch nghiền được cấy lên đĩa Petri với môi trường bổ xung kháng sinh kháng vi khuẩn và được ủ trong bình kỵ khí của hãng BBL trong vòng 2-3 ngày ở nhiệt độ 37°C. Các chủng vi nấm được tách, làm sạch để giám định vùng ITS II và cho nghiên cứu tiếp.

- Giám định vùng ITSII của vi nấm:

1-5 ng ADN tách từ sinh thiết dạ dày là khuôn mẫu cho 25 μ l, phản ứng gồm 35 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm: 94° C/60 ''; 55° C/40 ''; 72° C/50''. Trình tự nucleotide của đoạn ADN được xác định trực tiếp không qua giai đoạn tạo dòng phân tử, và được phân tích trên chương trình Blast của Website.

2.2.6. Nghiên cứu hiện tượng đứt gãy ADN qua xét nghiệm ADN tổng số tế bào NMDD:

Nghiên kỹ mẫu sinh thiết trong 0.2 ml dung dịch muối sinh lý. Cho thêm 50 μ l dung dịch proteinase K vào mẫu, ủ mẫu ở 37°C trong 2 giờ. Sau đó, tiến hành chiết xuất và hoà ADN trong dung dịch TE như phương pháp đã miêu tả ở trên. 50-100 ng ADN được phân giải trên gel agarose 0.8% trong dung dịch 1xTAE pH 7.5 bằng phương pháp điện di và được chụp ảnh bằng Gel-doc.

2.2.7. Phương pháp xử lý số liệu:

Số liệu được xử lý theo các phương pháp thống kê y học bằng máy vi tính, sử dụng phần mềm SPSS 11.5 và Epi info 6.0. Trình tự ADN được so sánh với trình tự của các vi sinh vật khác có trong Genbank nhờ chương trình BLAST và SIMILARITY- RANK sẵn có trên Internet.

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm chung của các bệnh nhân nghiên cứu

Nghiên cứu trên 279 BN được chẩn đoán VDDM qua xét nghiệm MBH. Nam 137 BN, nữ 142 BN, độ tuổi 18-75, tuổi trung bình $39,46 \pm 12,6$. Các BN được nội soi dạ dày, XN phát hiện *H.pylori* qua 4 phương pháp và làm kháng sinh đồ, XN MBH, điện di ADN TB dạ dày, nuôi cấy vkkk, PCR phát hiện nấm.

3.2. Tình trạng nhiễm, các tıp và tính kháng thuốc của *H.pylori*.

Bảng 3.4. Tỷ lệ phát hiện *H.pylori* qua các xét nghiệm

Xét nghiệm	<i>H.pylori</i> (+)	Tỷ lệ %
Urease-test	162	58,1
MBH	157	56,3
Nuôi cấy	159	57,0
PCR	162	58,1
p	0,967	

Nhận xét: Tỷ lệ phát hiện *H.pylori* của các XN tương tự nhau, $p > 0,05$

- Phối hợp 2 phương pháp cho kết quả phát hiện *H.pylori* $> 60\%$, cao hơn so với 1 phương pháp.

- Kết hợp PCR với một xét nghiệm khác cho tỷ lệ phát hiện $> 69\%$, cao hơn các kết hợp khác (60-62%), khác biệt có ý nghĩa, $p < 0,05$.

Bảng 3.6. Tỷ lệ phát hiện *H.pylori* qua phối hợp 3 và 4 xét nghiệm:

Xét nghiệm	<i>H.pylori</i> (+)	Tỷ lệ %
PCR + MBH + nuôi cấy	198	71,0
PCR+ Urease-test + nuôi cấy	200	71,7
PCR+ Urease-test + MBH	200	71,7
Urease-test + MHB + nuôi cấy	178	63,8
PCR+ Urease-test + MBH + nuôi cấy	203	<u>72,8</u>

p	0,135
---	-------

Nhận xét: - Kết hợp Urease-test, MBH, nuôi cấy tỷ lệ phát hiện thấp.

- Các sự kết hợp khác cho kết quả phát hiện cao hơn, cao nhất là phối hợp 4 phương pháp, khác biệt không có ý nghĩa thống kê, $p > 0,05$.

Bảng 3.8. Tỷ lệ các typ H.pylori (n =203 BN H.pylori(+))

Typ <i>H.pylori</i>	Typ I	Typ II	Typ III	Typ IV	p
Số lượng	90	41	42	30	0,001
Tỷ lệ %	44,3	20,2	20,7	14,8	

Nhận xét: Các chủng *H.pylori* typ I chiếm tỷ lệ cao nhất 44,3%, các typ còn lại chỉ chiếm tỷ lệ thấp hơn, khác biệt có ý nghĩa, $p < 0,01$.

159 chủng *H.pylori* sau nuôi cấy lần một được cấy lại lần 2 làm KSD, có 135 chủng mọc lại chiếm 84,9%.

Bảng 3.9. Kết quả kháng sinh đồ của H.pylori với kháng sinh(n=135)

Kháng sinh	Nhạy cảm	Trung gian	Kháng
Metronidazole	8 5,9%	3	124 91,8%
Amoxicilline	66 48,9%	37	32 23,7%
Ampicilline	55 40,7%	46	34 25,2%
Tetracycline	60 44,4%	33	42 31,1%
Clarithromycine	72 53,3%	22	41 30,4%

Nhận xét: - Clarithromycine nhạy cảm với *H.pylori* cao hơn cả (53,3%), thấp nhất là Metronidazole (5,9%)

- Metronidazole có tỷ lệ kháng cao nhất (91,8%), Amoxicilline có tỷ lệ kháng thấp nhất (23,7%)

3.3. Nhiễm vi sinh vật ở các bệnh nhân VDDM tính.

3.3.1. Tỷ lệ nhiễm nấm.

Bảng 3.11. Tỷ lệ nấm phát hiện trong dạ dày (n =273)

Kết quả PCR	Số lượng	Tỷ lệ %
PCR (+)	265	97,0
PCR (-)	8	3,0
Tổng	273	100

Nhận xét: Tỷ lệ phát hiện nấm 97,0% trong các bệnh nhân VDDM.

- Định danh nấm bằng phương pháp giải trình tự gen vùng ITS2. Trình tự gen ITS2 của nấm được Genbank giám định với mã số **EF543645**, xác định một loài nấm men có trình tự vùng ITS2 của *Candida parapsilosis*.

3.3.2. Tỷ lệ nhiễm vi khuẩn kỵ khí ở các bệnh nhân VDDMT.

Bảng 3.12. Tỷ lệ vi khuẩn kỵ khí từ mảnh sinh thiết hang vị (n=130)

Kết quả nuôi cấy	Số lượng	Tỷ lệ %
Nuôi cấy mọc	60	46,2
Nuôi cấy không mọc	70	53,8
Tổng	130	100

Nhận xét: - Có 130/279 trường hợp (46,6%) được nuôi cấy vkkk.

- Tỷ lệ nuôi cấy vi khuẩn kỵ khí mọc là 46,2% (60/130 BN).

Định danh vi khuẩn bằng phương pháp giải trình tự gen *16S rARN*. Trình tự gen *16S rARN* của chủng vi khuẩn đã được Genbank giám định với mã số **EU711350**, và xác định vkkk thuộc chi *Bacillus*, có tên là *Bacillus sp.H1(2008)*.

3.4.2. Các tổn thương NMDD qua xét nghiệm MBH.

Bảng 3.17. Tổn thương NMDD qua xét nghiệm MBH.

Tổn thương NMDD		Mức độ tổn thương				p
		Bình thường	Nhẹ	Vừa	Nặng	
Viêm	Thân vị	65	127	72	15	

mạn	Hang vị	0	83	80	116	0,001
Viêm hoạt động	Thân vị	154	85	25	15	0,001
	Hang vị	103	59	42	75	
Viêm teo	Thân vị	218	51	10	0	0,001
	Hang vị	76	137	61	5	
DSR	Thân vị	278	1			0,001
	Hang vị	225	54 (19,4%)			
LS	Thân vị	278	1			0,001
	Hang vị	249	30 (10,8%)			

Nhận xét: - DSR chiếm 19,4%, LS chiếm 10,8%.

- Tỷ lệ tổn thương niêm mạc dạ dày xảy ra ở mức độ nặng bao gồm viêm, teo, hoạt động, trong đó các tổn thương ở hang vị cao hơn ở thân vị. DSR và LS ở hang vị cũng cao hơn thân vị, $p < 0,01$.

- Một bệnh nhân có cả DSR và LS ở thân vị và hang vị.

Bảng 3.18 . Tỷ lệ biến đổi ADN.

ADN	Số lượng	%
Biến đổi	39	14,0
Bình thường	240	86,0

Nhận xét: Tỷ lệ biến đổi ADN của bệnh nhân VDDM là 14,0%.

3.5. Mối liên quan giữa tổn thương NMDD với *H.pylori* và vsvkk

Bảng 3.24. Viêm teo hang vị với các yếu tố liên quan.

Viêm teo hang vị	Các yếu tố liên quan									
	<i>H.pylori</i>		<i>CagA</i>		<i>VacA</i>		Vkkk		Nấm	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Teo +	170	33	104	99	115	88	40	52	265	8
Teo -	33	43	16	60	18	58	20	18	0	0

<i>Tổng</i>	203	76	120	159	133	146	60	70	265	8
p	0,001		0,001		0,001		0,34			

Nhận xét: - *H.pylori*, *CagA*, *VacA* có liên quan đến teo hang vị, $p < 0,01$. Không thấy mối liên quan giữa vkkk với teo hang vị, $p > 0,05$.

Bảng 3.25. Dị sản ruột hang vị với các yếu tố liên quan.

Dị sản ruột hang vị	Các yếu tố liên quan									
	<i>H.pylori</i>		<i>CagA</i>		<i>VacA</i>		Vkkk		Nấm	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
DSR +	43	11	30	24	33	21	8	18	53	0
DSR -	160	65	90	135	100	125	52	52	212	8
<i>Tổng</i>	203	76	120	159	133	146	60	70	265	8
p	0,206		0,03		0,028		0,07			

Nhận xét: - *CagA*, *VacA* có liên quan với DSR ở hang vị, $p < 0,05$.

- Không thấy sự liên quan giữa *H.pylori*, vkkk với DSR, $p > 0,05$

Bảng 3.26. Loạn sản hang vị với các yếu tố liên quan.

Loạn sản hang vị	Các yếu tố liên quan									
	<i>H.pylori</i>		<i>CagA</i>		<i>VacA</i>		Vkkk		Nấm	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
LS	29	1	16	14	15	15	6	9	29	1
KhôngLS	174	75	104	145	118	131	54	61	236	7
<i>Tổng</i>	203	76	120	159	133	146	60	70	265	8
p	0,003		0,22		0,78		0,61		0,88	

Nhận xét:

- *H.pylori* có liên quan với LS hang vị, $p < 0,05$.

- Không thấy liên quan giữa *CagA*, *VacA*, vkkk và nấm với LS, $p > 0,05$.

Bảng 3.31. Typ H.pylori với biến đổi ADN của tế bào NMDD.

Typ <i>H.pylori</i>	ADN		p
	Biến đổi	Bình thường	
Týp 1	20 (22,22%)	70	0,044
Týp 2	4 (9,76%)	37	
Týp 3	3 (10,0%)	27	
Týp 4	7 (16,67%)	35	
<i>H.pylori</i> (-)	5 (6,58%)	71	
<i>Tổng</i>	<i>39</i>	<i>240</i>	<i>279</i>

Nhận xét: Các týp *H.pylori* có liên quan đến biến đổi ADN của các tế bào NMDD vùng hang vị, $p < 0,05$.

CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN

4.2. TÌNH TRẠNG NHIỄM *HELICOBACTER PYLORI*

* Tỷ lệ nhiễm qua các xét nghiệm.

Sử dụng bốn phương pháp khác nhau là Urease test, PCR, mô bệnh học, nuôi cấy để phát hiện nhiễm *H.pylori* ở các bệnh nhân VDDMT. Các kết quả nhận được không có sự khác nhau: theo xét nghiệm Urease là 58,1%, PCR là 58,1%, MBH là 56,3% và nuôi cấy là 57,0%. Phối hợp 2 phương pháp cho kết quả phát hiện *H.pylori* > 60%, cao hơn so với 1 phương pháp; PCR với một XN khác cho tỷ lệ phát hiện > 69%, cao hơn các kết hợp khác (60-62%), khác biệt có ý nghĩa, $p < 0,05$. Fabre R. (1994) đã xác định tỷ lệ nhiễm *H.pylori* trên 54 bệnh nhân VDDM bằng xét nghiệm PCR, Urease-test, nuôi cấy và MBH và thấy các tỷ lệ tương ứng là 53%, 43%, 48% và 50%; Mishra K.K. (2002) cũng có kết quả tương tự. Sự khác biệt về tỷ lệ *H.pylori* khi sử dụng mỗi phương pháp khác nhau đã được công bố bởi một số tác giả:

Bảng 4.2. So sánh tỷ lệ phát hiện *H.pylori* qua một số phương pháp:

Tác giả	Tỷ lệ <i>H.pylori</i> (%)
---------	---------------------------

	PCR	Urease-test	Nuôi cấy	MBH
Fabre R <i>et al</i> (1994)	53	43	48	50
Lage AP <i>et al</i> (1995)	34,6	36,5	33,7	38,5
Mishra KK. (2002)	53	43	48	50
Nguyễn Văn Thịnh (2009)	58,1	58,1	57,0	56,3

Phân tích tỷ lệ phát hiện *H.pylori* với 3 và 4 xét nghiệm khác nhau: với 3 xét nghiệm phối hợp, tỷ lệ phát hiện *H.pylori* là 70,8% đến 71,7%; với 4 xét nghiệm, tỷ lệ phát hiện *H.pylori* là **72,8%** (bảng 3.6). Trong khi kết quả công bố của các tác giả khác trên thế giới từ 25% đến 90%. Theo Zhou (1995) tỷ lệ nhiễm *H.pylori* là 42-67%; theo Zhang (2005) tỷ lệ là 25%. Tại Mozambic, tỷ lệ nhiễm *H.pylori* ở các BN VDDM là hơn 90%.

4.3. NHIỄM VSVKK TRONG DẠ DÀY BỆNH NHÂN VDDM.

4.3.1. Nhiễm nấm: Trong nghiên cứu này tỷ lệ nhiễm nấm ở các bệnh nhân VDDM là 97,0% (bảng 3.11), được xác định bằng phương pháp giám định gen. Cho tới nay, tầm quan trọng của nhiễm nấm trong dạ dày chưa được hiểu rõ và thu hút được sự chú ý. Trong một nghiên cứu tiền cứu, Wu và cs cho biết tỷ lệ nhiễm nấm trong LDD và tác dụng của nó trên sự liền sẹo loét ở 178 LDD lành tính và 97 loét ác tính. Bào tử nấm và / hoặc nấm phát hiện trên vi thể ở 36 BN (20,2%) LDD lành tính và ở 26 BN (26,2%) UTDD. Tuy nhiên sự khác biệt giữa hai nhóm không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,2$). Trên thế giới, các loài nấm như *Candida albicans*, *Candida tropicalis*... đã được phát hiện trong dạ dày người. Ở Việt Nam, 8 năm trước Trịnh Tuấn Dũng khi nghiên cứu bệnh phẩm cắt đoạn dạ dày của 60 BN loét dạ dày đã thấy 10% (6/60) có loại vsv dạng sợi ở đáy ổ loét nghi tới nấm *Candida*. Trong nghiên cứu này đã phân lập được chủng nấm mới là *Candida parapsilosis* có khả năng gây bệnh.

4.3.2. Nhiễm vi khuẩn kỵ khí: 130/279 BN được nuôi cấy vkkk (bảng 3.12), tỷ lệ mọc là 46,2% (60/130 BN). Bằng phương pháp giám định gen *16S rARN*, đã xác định vkkk có tên là *Bacillus sp. HI*. Năm 2001 Bondarenko và cs khi nuôi cấy các vkkk từ sinh thiết của bệnh nhân bị bệnh dạ dày đã nhận diện được 32 chi nấm *candida* và vi sinh vật như: *Helicobacter pylori*, *Bacteroides*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*... Hai năm sau, tác giả công bố thêm các vkkk trong dạ dày người bệnh như *Bacillus*, *Lactobacillus*. Dạ dày của người chữa một hệ sinh thái gồm nhiều loại vi khuẩn khác nhau, bao gồm vi sinh vật bản địa và vi sinh vật vãng lai. Nhiễm *H.pylori* mạn sẽ gây VDDM và viêm teo niêm mạc, sẽ dẫn đến tăng pH dịch vị do mất các tế bào thành, tạo điều kiện cho sự phát triển các vkkk, chúng sẽ khử nitrat (NO_3^- , rất giàu trong thức ăn) thành nitrit (NO_2^-). Nitrit sau đó sẽ phản ứng với các thành phần khác có chứa nitrogen (từ thức ăn và thuốc) để thành lập các phức hợp nitroso đột biến - sinh ung thư ($\text{N}=\text{O}$). Chúng vkkk phân lập được xác định là *Bacillus sp. HI* và bước đầu chứng minh được quá trình khử Nitrate và khử Nitrite của chủng *Bacillus sp. HI* này trên in vitro. Đây là điều kiện thuận lợi tạo phát sinh UTDD.

4.4. CÁC TỔN THƯƠNG NMDD VÀ MỐI LIÊN QUAN

4.4.2. Tổn thương NMDD qua XN MBH và mối liên quan.

* Về tổn thương viêm:

Trong nghiên cứu này, tổn thương toàn bộ dạ dày chiếm 76,7%, tổn thương hang vị đơn thuần chiếm 23,3%, không có viêm thân vị đơn thuần. Tỷ lệ và mức độ tổn thương viêm mạn ở hang vị nặng hơn thân vị. Các tổn thương được xếp từ nhẹ đến nặng bao gồm: bình thường, nhẹ, vừa và nặng ở thân vị lần lượt là 23,3%, 45,5%, 25,8% và 5,4% so với hang vị lần lượt là 0%, 29,7%, 28,7% và 41,6% (bảng 3.17). Tỷ lệ VDDM ở hang vị cao hơn thân vị, kết quả này phù hợp với các tác giả

khác như Nguyễn Văn Ngoan (2004), Nguyễn Quang Chung (2008), Tytgat GNJ (1996).

*** Liên quan giữa nhiễm *H.pylori*, vsvkk với tình trạng viêm teo:**

Trong nghiên cứu này (bảng 3.17), tỷ lệ viêm teo và mức độ teo ở thân vị cũng nhẹ hơn ở hang vị, trong khi thân vị có tỷ lệ viêm teo là 21,9% (61/279 BN) thì hang vị có tỷ lệ viêm teo là 72,8% (203/279 BN). Bảng 3.23 và 3.24 cho thấy viêm teo NMDD có liên quan đến *H.pylori*. Ở thân vị nhóm BN teo tuyến có tỷ lệ nhiễm *H.pylori* là 82,0% cao hơn nhóm không viêm teo chỉ có 33,0%, khác biệt có ý nghĩa thống kê, $p = 0,001$. Tương tự như vậy tại hang vị tỷ lệ nhiễm *H.pylori* ở bệnh nhân teo tuyến cao hơn ở bệnh nhân không teo, lần lượt là 84,5% và 43,4%, khác biệt có ý nghĩa thống kê, $p = 0,001$. Kết quả này phù hợp với kết luận của nhiều tác giả trong nước và nước ngoài. Trong nghiên cứu này, chưa thấy có sự liên quan giữa nhiễm vkkk và nhiễm nấm với tình trạng viêm teo NMDD, kết quả ở bảng 3.23 và 3.24, $p > 0,05$.

*** Mối liên quan giữa nhiễm *H.pylori* và nhiễm vsvkk với dị sản ruột:**

Trong nghiên cứu này, tỷ lệ DSR ở thân vị rất thấp, chỉ 0,4% (1/279 BN) trong khi đó DSR ở hang vị là 19,4% (bảng 3.17). Kết quả này phù hợp với kết luận của đa số các tác giả trong nước. Theo Tạ Long (1999) tỷ lệ DSR ở bệnh nhân VDDM là 17,1%. Zhang C (2005), thấy tỷ lệ DSR trong VDD là 37,0% và trong LDD là 64,2%. Kết quả ở bảng 3.25, phân tích mối liên quan giữa *H.pylori* với DSR thấy: tỷ lệ *H.pylori* (+) ở nhóm DSR là 79,6% cao hơn nhóm không DSR (71,1%), nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa ($p = 0,20$). Có sự liên quan rõ giữa các gen *CagA* và *VacA* với DSR, *H.pylori CagA*(+) ở nhóm DSR cao hơn nhóm không DSR, tỷ lệ này tương ứng là 55,6% so

với 40,0%, khác biệt có ý nghĩa thống kê, $p = 0,03$. Tương tự như vậy, *H.pylori VacA* (+) ở nhóm DSR cao hơn nhóm không DSR, tương ứng là 61,4% cao hơn so với 44,4%, khác biệt có ý nghĩa, $p = 0,02$; kết quả này tương tự các tác giả khác trong nước và nước ngoài. Kết quả khảo sát mối liên quan giữa vkkk và nấm với DSR được trình bày ở bảng 3.25: không thấy có mối liên quan giữa vkkk và nấm với DSR, $p > 0,05$.

*** Mối liên quan giữa nhiễm *H.pylori* và nhiễm vi sinh vật kỵ khí với loạn sản:**

Trong nghiên cứu này (bảng 3.17), tỷ lệ LS ở thân vị rất thấp, chỉ chiếm tỷ lệ 0,4% (1/279 BN), trong khi ở hang vị tỷ lệ LS là 10,8% (30/279 BN). Kết quả này cao hơn nhận xét của các tác giả khác trong nước.

Tình trạng nhiễm *H.pylori* với loạn sản:

Bảng 3.26 cho thấy tỷ lệ *H.pylori* (+) ở những BN LS là 96,7% (29/30), chỉ 1 BN có LS mà *H.pylori* (-) (3,3%), khác biệt có ý nghĩa thống kê, $p = 0,003$. Về mật độ *H.pylori* với LS (bảng 3.28) thấy mật độ *H.pylori* cao tỷ lệ thuận với LS: mật độ *H.pylori* (+++), (++), (+), và *H.pylori* (-) có tỷ lệ LS tương ứng lần lượt là 20,0%, 17,6%, 17,9% và 0,8%, khác biệt có ý nghĩa, với $p = 0,001$. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả của các tác giả khác trong và ngoài nước. Trong nghiên cứu này không thấy mối liên quan giữa vkkk và nấm với LS (bảng 3.26).

*** Mối liên quan giữa tình trạng nhiễm *H.pylori*, nhiễm vi sinh vật kỵ khí với sự biến đổi ADN:**

Bảng 3.18 trình bày kết quả điện di đồ ADN tách chiết từ sinh thiết lấy ở hang vị dạ dày người bệnh VDDM cho thấy, 14% (39/279) trường hợp có hình dạng như ADN của tế bào chết theo chương trình apoptosis. Các nghiên cứu về vấn đề này còn ít nên không đủ tài liệu để

so sánh. Kohda K. và CS. (1999) thấy rằng tốc độ chết tế bào theo chương trình (apoptosis) ở NMDD của bệnh nhân loét DDTT có nhiễm *H.pylori* tăng gấp 20 lần so với những người bình thường và điều này có liên quan tới số lượng *H.pylori* trên mảnh sinh thiết. Khảo sát mối liên quan giữa *H.pylori* với tình trạng biến đổi ADN (bảng 3.30) thấy tỷ lệ biến đổi ADN ở nhóm *H.pylori* (+) cao hơn nhóm *H.pylori*(-): 16,7% so với 6,6%, khác biệt có ý nghĩa, $p = 0,029$. Các typ *H.pylori* có liên quan đến biến đổi ADN của tế bào NMDD vùng hang vị, với $p = 0,044$ (bảng 3.31). Như vậy, *H.pylori*, các typ, các gen *CagA* và *VacA*, mật độ *H.pylori* dường như có liên quan đến tình trạng biến đổi ADN của tế bào vùng hang vị.

Tóm lại: Các đặc điểm về tuổi, giới, triệu chứng lâm sàng trong nghiên cứu này không khác biệt với các nghiên cứu trong nước và quốc tế. Tỷ lệ nhiễm *H.pylori* có thể tăng gần 20% nếu làm đồng thời cả 4 xét nghiệm Urease-test, MBH, nuôi cấy và PCR so với chỉ làm 1 xét nghiệm. Tình trạng kháng kháng sinh của *H.pylori* với các kháng sinh chủ yếu hiện đã tăng lên rất cao có thể sẽ làm thất bại kết quả điều trị. Phát hiện sự đồng nhiễm vkkk và nhiễm nấm cùng với *H.pylori* trong VDDM, trong đó phân lập được vkkk *Bacillus sp. H1* và nấm *Candida parapsilosis*. Bước đầu chứng minh được quá trình khử Nitrate và khử Nitrite của chủng *Bacillus sp. H1* này trên in vitro ở các mảnh sinh thiết dạ dày. Các tổn thương MBH và sự đứt gãy ADN đều có liên quan với tình trạng nhiễm *H.pylori* nhất là với *H.pylori* mang gen *CagA*(+) *VacA*(+).

Với một nghiên cứu cắt ngang nên chưa thể làm rõ được những biểu hiện hoặc ảnh hưởng khi có sự đồng nhiễm *H.pylori* với các vsvkk.

KẾT LUẬN

Từ những kết quả thu được trong nghiên cứu tình trạng nhiễm *H.pylori*, nhiễm các vi khuẩn kỵ khí, nấm và tổn thương mô bệnh học, đứt gãy ADN của tế bào niêm mạc dạ dày trên 279 bệnh nhân viêm dạ dày mạn, tôi rút ra một số kết luận sau:

1. Tình trạng nhiễm *H.pylori*, vi khuẩn kỵ khí và nấm ở dạ dày:

* Tỷ lệ nhiễm *H.pylori* trong viêm dạ dày mạn là:

- Tỷ lệ phát hiện *H.pylori* với các xét nghiệm Urease-test, MBH, nuôi cấy và PCR lần lượt là 58,1%, 56,3%, 57,0% và 58,1%.
- Kết hợp PCR với 1 trong 3 test (MBH, Urease-test, nuôi cấy) tỷ lệ phát hiện là 69,5%-69,9%.
- PCR kết hợp thêm 2 test tỷ lệ phát hiện 71,0%-71,7%
- Kết hợp 4 phương pháp tỷ lệ phát hiện là 72,8%.
- Phân theo typ thì typ I (CagA+; VacA+) cao nhất chiếm 43,3%, các typ khác thấp hơn (14,8%-20,7%), khác biệt có ý nghĩa, $p < 0,01$, $\chi^2 = 56,3$.
- Trong nghiên cứu này, tình trạng kháng các thuốc kháng sinh của *H.pylori* với các thuốc: Metronidazole; Amoxicillin; Ampicillin; Tetracycline và Clarithromycine lần lượt là : 91,9%; 23,7%; 25,2%; 31,1% và 30,4%.

* Nhiễm các vi khuẩn kỵ khí và nấm:

- Tỷ lệ phát hiện nấm là 97%, trong đó đã phát hiện mới nấm *Candida parapsilosis* bằng việc giải trình tự đoạn ITS2 so với Genbank.
- Tỷ lệ phát hiện vi khuẩn kỵ khí là 46,2%, trong đó đã phân lập được chủng mới thuộc chi *Bacillus*, có tên là *Bacillus sp.H1(2008)* và phát hiện được đặc tính khử Nitrate, Nitrite của nó.

2. Các tổn thương niêm mạc dạ dày và các mối liên quan.

- Trên mô bệnh học, các tổn thương viêm mạn chủ yếu ở hang vị, cao hơn rõ rệt so với ở thân vị ($p < 0,01$), đặc biệt là viêm teo vừa và nặng ở hang vị (23,7%) cao hơn nhiều so với ở thân vị (3,6%).
- Ở hang vị tỷ lệ dị sản ruột là 19,4%, loạn sản là 10,4%, đa số ở độ nhẹ, trong khi ở thân vị chỉ gặp 1 trường hợp có cả dị sản ruột và loạn sản chiếm 0,4%.
- Tỷ lệ đứt gãy ADN của tế bào biểu mô hang vị là 14,0%.
- Các tổn thương mô bệnh học và biến đổi ADN đều có mối liên quan với tình trạng nhiễm *H.pylori*, các gen *CagA*, *VacA* ($p < 0,05$).
- Chưa thấy mối liên quan giữa nhiễm nấm, vi khuẩn kỵ khí với các tổn thương mô bệnh học và đứt gãy ADN của tế bào niêm mạc dạ dày trong nghiên cứu cắt ngang về viêm dạ dày mạn này ($p > 0,05$).

NHỮNG BÀI BÁO LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN ĐÃ CÔNG BỐ

1. Nguyễn Văn Thịnh, Tạ Long, Nguyễn Thị Nguyệt, Vũ Thị Quyên, Dương Thu Hương, Nguyễn Thị Hồng Hạnh (2007), *Phát hiện nấm Candida parapsilosis trong sinh thiết dạ dày các bệnh nhân viêm dạ dày mạn tính*. Tạp chí khoa học tiêu hóa Việt nam, tập II, số 6-2007, tr. 355-361.
2. Nguyễn Văn Thịnh, Nguyễn Thị Nguyệt, Vũ Thị Quyên, Tạ Long, Nguyễn Thị Hồng Hạnh (2008), *Tình hình kháng thuốc của Helicobacter pylori tại bệnh viện bưu điện Hà Nội từ 8/2006-3/3007*. Tạp chí khoa học tiêu hóa Việt nam, tập III, số 9-2008, tr. 536-540.
3. Nguyễn Thị Nguyệt, Nguyễn Thị Hồng Hạnh, Nguyễn Văn Thịnh, Tạ Long (2008), *Giải mã và phân tích trình tự một nấm men trong sinh thiết dạ dày bệnh nhân viêm dạ dày mạn*. Tạp chí khoa học tiêu hóa Việt nam, tập III, số 10-2008, tr. 608-612
4. Nguyen Thi Hong Hanh, Nguyen Van Thinh, Nguyen Thi Nguyet, Ta Long, Nguyen Quoc Khang, Tran Van Hop (2008), *Fungi-status and gastritis in Viet Nam*. Tạp chí khoa học tiêu hóa Việt Nam, tập III, số 12-2008, tr. 742-748.
5. Nguyễn Văn Thịnh, Nguyễn Thị Nguyệt, Nguyễn Thị Hồng Hạnh, và cs (2009). *Tỷ lệ nhiễm H. pylori trong viêm dạ dày mạn tính qua kết hợp nhiều phương pháp hiện*. Tạp chí khoa học tiêu hóa Việt nam, tập IV, số 17-2009, tr. 1113-1119.
6. Nguyễn Văn Thịnh, Tạ Long, Trần Văn Hợp, Nguyễn Thị Hồng Hạnh, Nguyễn Thị Nguyệt (2009), *Nghiên cứu mật độ Helicobacter pylori và tổn thương mô bệnh học trong viêm dạ dày mạn*. Báo cáo tại hội nghị tiêu hóa Hà Nội 28/11/2009.

