

ĐỀ KHÁNG CLARITHROMYCIN VÀ LEVOFLOXACIN CỦA *HELICOBACTER PYLORI*: SO SÁNH PHƯƠNG PHÁP ĐĨA KHUẾCH TÁN VÀ E-TEST

Phan Trung Nam^{1,3}, Trần Văn Huy¹, Trần Thị Như Hoa¹, Lê Văn An¹
Antonella Santona², Bianca Paglietti³, Piero Cappuccinelli^{1,3,4}, Salvatore Rubino^{3,4}

(1) Trường Đại học Y Dược Huế

(2) Viện Nghiên cứu và Phát triển Sardinia, Đại học Sassari, Ý

(3) Khoa Khoa học Sinh Y học, Đại học Sassari, Ý

(4) Trung tâm Phát triển Công nghệ sinh học và Nghiên cứu đa dạng sinh học, Đại học Sassari, Ý

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Tỷ lệ đề kháng kháng sinh của *H.pylori* ngày càng gia tăng và là nguyên nhân chính gây thất bại điều trị. Phân lập *H.pylori* và thực hiện kháng sinh đồ đóng vai trò rất quan trọng nhằm đưa ra phác đồ điều trị hiệu quả ở bệnh nhân nhiễm *H.pylori*. **Mục tiêu:** Xác định tỷ lệ đề kháng kháng sinh của các chủng phân lập được đối với kháng sinh clarithromycin (CH) và levofloxacin (LE) tại khu vực miền Trung Việt Nam, so sánh hai phương pháp kháng sinh đồ E-test và đĩa khuếch tán để xác định tính đề kháng của *H.pylori*. **Phương pháp:** 56 chủng được phân lập từ các bệnh nhân nhiễm *H.pylori* tại bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế từ tháng 7/2012 đến tháng 8/2013, trong đó có 13 chủng phân lập từ những bệnh nhân trước đó đã điều trị triệt tiêu *H.pylori* nhưng thất bại. E-test được sử dụng làm kháng sinh đồ xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) đồng thời làm đĩa khuếch tán đối với kháng sinh CH và LE để tìm mối tương quan giữa đường kính vùng ức chế và MIC. **Kết quả:** Tỷ lệ đề kháng kháng sinh chung của 56 chủng phân lập với kháng sinh CH và LE là 42,9% và 44,6%. Tỷ lệ đề kháng thứ phát cao hơn đề kháng tiên phát, đối với kháng sinh CH là 84,6% so với 30,2%, kháng sinh LE là 61,5% so với 39,5% ($p < 0.05$). Tỷ lệ đề kháng LE của nữ giới cao hơn so với nam giới ($p < 0,05$). Với đường kính vùng ức chế đĩa khuếch tán của CH ≥ 24 mm thì xác định được tất cả các chủng nhạy cảm và ≤ 18 mm thì xác định được tất cả các chủng đề kháng qua E-test (MIC $\geq 1 \mu\text{g/ml}$). Đối với kháng sinh LE, đường kính vùng ức chế đĩa khuếch tán ≥ 30 mm xác định được tất cả các chủng nhạy cảm và ≤ 26 mm thì xác định được tất cả các chủng đề kháng qua E-test (MIC $\geq 1 \mu\text{g/ml}$). **Kết luận:** Tỷ lệ đề kháng nguyên phát và thứ phát của *H.pylori* đối với CH và LE cao, cho thấy phác đồ điều trị chuẩn với 3 thuốc có CH không còn hiệu quả như là lựa chọn điều trị đầu tiên ở khu vực miền Trung Việt Nam, đặc biệt ngay cả phác đồ cứu vãn sử dụng LE trong phác đồ bộ ba cũng sẽ không hiệu quả. Có thể áp dụng kỹ thuật đĩa khuếch tán để xác định chủng *H.pylori* nhạy cảm hay đề kháng thay thế cho phương pháp E-test giúp tiết kiệm đáng kể chi phí xét nghiệm.

Từ khóa: *Helicobacter pylori*, levofloxacin, clarithromycin, E-test, đề kháng kháng sinh, đĩa khuếch tán.

Abstract

DIFFUSION METHODS FOR CLARITHROMYCIN AND LEVOFLOXACIN SUSCEPTIBILITY TESTING OF *HELICOBACTER PYLORI*

Phan Trung Nam^{1,3}, Tran Van Huy¹, Tran Thi Nhu Hoa¹, Le Van An¹
Antonella Santona², Bianca Paglietti³, Piero Cappuccinelli^{1,3,4}, Salvatore Rubino^{3,4}

(1) Hue University of Medicine and Pharmacy, Carlo Urbani Center

(2) SaRD - Sardinia Research and Development, University di Sassari, Italy

(3) Department of Biomedical Sciences, University of Sassari, Italy

(4) Center for Biotechnology Development and Biodiversity Research,
University of Sassari, Italy

Background: The rate of antibiotic resistance in *H. pylori* is increasing and has become a main cause for failure of treatment. Antibigram is very important to provide optimal regimens for eradication

- Địa chỉ liên hệ: Phan Trung Nam, email: phan.trungnam2000@gmail.com

DOI: 10.34071/jmp.2013.6.11

- Ngày nhận bài: 20/11/2013 * Ngày đồng ý đăng: 25/12/2013 * Ngày xuất bản: 15/1/2014

of *H.pylori* infected patients. **Objective:** To determine the resistance prevalence to clarithromycin, levofloxacin of *H.pylori* strains from patients in Central Vietnam by E-test and disk diffusion isolated, assess the relationship between two diffusion methods. **Methods:** 56 *H.pylori* strains were isolated from gastric biopsies of *H.pylori* infected patients from 7/2012 to 8/2013, of which 13 strains originated from patients in whom eradication of the infection failed after treatment. E-test was used to determine the minimum inhibitory concentrations of clarithromycin (CH) and levofloxacin (LE). Disk diffusion was evaluated as an alternative method to determine susceptibility and compared with the E-test results. **Results:** In total, the resistant strains (regardless of previous eradication history) to CH, LE were 42,9% and 44,6%, respectively. The ratio of strains with secondary resistance was significantly greater than that of the strains with primary resistance, CH: 84.6% vs. 30.2%, LE: 61.5% vs 39,5% ($p < 0.05$). The resistance rate to LE in female was significantly higher than in male ($p < 0.05$). All CH-sensitive strains by E-test had the inhibition diameters of CH was ≥ 24 mm and all CH-resistant strains had the inhibition diameters was ≤ 18 mm (breakpoint for MIC: 1 μ g/ml). To LE, the inhibition diameters was ≥ 30 mm can determine all LE-sensitive strains and the inhibition diameters was ≤ 26 mm can determine all LE-resistant strains by E-test (breakpoint for MIC: 1 μ g/ml). **Conclusions:** High resistance rate to CH and LE, suggests that standard CH-based triple therapie may not be useful as the first-line treatment and LE-based triple therapy should not use as an alternative therapy in Central Vietnam. The disk diffusion can use as alternative phenotypic method to determine the susceptbility of *H.pylori*, which is more practical and inexpensive.

Keywords: *Helicobacter pylori*, levofloxacin, clarithromycin, E-test antibiotic resistance, disk diffusion.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiễm *Helicobacter pylori* là nguyên nhân chính gây bệnh lý viêm dạ dày mạn, loét dạ dày tá tràng, ung thư và lymphoma dạ dày [7], [18]. Phác đồ điều trị tiêu chuẩn gồm PPI (Proton pump inhibitor) và hai trong ba kháng sinh (amoxicillin, metronidazole, clarithromycin) được sử dụng phổ biến trong thực hành lâm sàng để triệt tiêu *H.pylori* [12]. Mặc dù clarithromycin là kháng sinh chính trong phác đồ điều trị tuy nhiên, hiệu quả điều trị sẽ giảm rõ rệt (66%-70%) khi có sự đề kháng của *H.pylori* [16]. Ở các nước đang phát triển, tỷ lệ đề kháng đối với metronidazole là rất cao và đề kháng clarithromycin ngày càng gia tăng [4]. Do đó, phác đồ điều trị bộ ba sử dụng levofloxacin (PPI và amoxicillin) được đề xuất như là phác đồ thay thế để điều trị cho những bệnh nhân đã thất bại điều trị trước đó [12]. Chính vì vậy, thông tin về đề kháng của *H.pylori* đối với clarithromycin và levofloxacin tại một khu vực, quốc gia là rất quan trọng để lựa chọn phác đồ điều trị phù hợp và hiệu quả.

Trong các phương pháp làm kháng sinh đồ với các chủng *H.pylori* phân lập được, phương pháp pha loãng thạch (agar dilution) là phương pháp tiêu chuẩn dùng để xác định nồng độ ức chế tối thiểu của một kháng sinh (MIC) đã được Viện tiêu chuẩn xét nghiệm lâm sàng Hoa Kỳ (CLSI) xác lập [13]. Tuy nhiên, phương pháp này đòi hỏi nhiều công sức và mất nhiều thời gian thực hiện, khó áp dụng trong thực tế lâm sàng. Hiện nay, phương pháp khuếch tán

qua thanh kháng sinh có phân nồng độ (Epsilometer test) được xem là phương pháp đơn giản, cho kết quả tương đương, thay thế cho phương pháp pha loãng thạch để xác định MIC [13, 14] nhưng giá thành lại rất cao khó áp dụng rộng rãi trên lâm sàng. Phương pháp đĩa khuếch tán (disc diffusion) là phương pháp phổ biến thường được sử dụng làm kháng sinh đồ trong thực tế vì dễ tiến hành và có giá thành thấp, tuy nhiên đối với *H.pylori*, là vi khuẩn rất khó mọc, đòi hỏi phải nuôi cấy dài ngày cho nên hiện nay vẫn chưa có tiêu chuẩn thống nhất đối với phương pháp đĩa khuếch tán để xác định tính nhạy cảm kháng sinh của vi khuẩn.

Việt Nam là nước đang phát triển, có tỷ lệ nhiễm *H.pylori* cao (65-90%) [2], thông tin về tình hình đề kháng kháng sinh của *H.pylori* trong những năm gần đây vẫn chưa nhiều, vì vậy việc phân lập *H.pylori*, xác lập quy trình và điểm gãy (breakpoint) của phương pháp đĩa khuếch tán để xác định tính nhạy cảm kháng sinh là nhu cầu bức thiết trong điều kiện Việt Nam. Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm mục tiêu:

- Xác định tỷ lệ đề kháng với clarithromycin (CH) và levofloxacin (LE) của các chủng *H.pylori* được phân lập tại bệnh viện Đại học Y Dược Huế.

- So sánh, đánh giá giữa hai phương pháp kháng sinh đồ E-test và đĩa khuếch tán, tìm giá điểm gãy (breakpoint) của phương pháp đĩa khuếch tán để xác định tính nhạy cảm của *H.pylori* đối với clarithromycin và levofloxacin.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Tiêu chuẩn chọn bệnh: Các bệnh nhân có hội chứng dạ dày (đau thượng vị, khó tiêu, ợ hơi, ợ chua) đến khám tại bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế được chỉ định nội soi dạ dày từ tháng 7/2012 đến tháng 8/2013. Tất cả các bệnh nhân được chỉ định nội soi chẩn đoán, tìm *H.pylori* được giải thích và đồng ý thực hiện thủ thuật, đã được hội đồng khoa học Trường Đại học Y Dược Huế thông qua.

- Tiêu chuẩn loại trừ: các bệnh nhân dùng kháng sinh và PPI trước đó trong vòng 4 tuần.

2.2. Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu mô tả cắt ngang, với các thông số chính trong nghiên cứu: tỷ lệ đề kháng kháng sinh nguyên phát, thứ phát của CH và LE, chỉ số nồng độ ức chế tối thiểu của kháng sinh (MIC) bằng phương pháp E-test, mối tương quan giữa chỉ số MIC với đường kính vùng ức chế của đĩa khuếch tán.

Đề kháng tiên phát: Là những bệnh nhân có chủng phân lập đề kháng kháng sinh nhưng trước đó chưa điều trị diệt *H.pylori*. **Đề kháng thứ phát:** là những bệnh nhân có chủng phân lập đề kháng kháng sinh nhưng trước đó đã từng được điều trị diệt *H.pylori* [14].

2.3. Phương pháp tiến hành

- Các thông tin cá nhân cần thiết, tiền sử bệnh lý và tiền sử điều trị *H.pylori* của bệnh nhân được ghi nhận vào phiếu thu thập số liệu. Bệnh nhân được giải thích và hướng dẫn trước khi tiến hành nội soi dạ dày, sinh thiết lấy mẫu.

- Mỗi bệnh nhân được nội soi và sinh thiết 3 mẫu ở hang vị, một mẫu làm CLO-test, một mẫu nuôi cấy *H.pylori* và một mẫu được lưu giữ ở âm 70°C. Vận chuyển mẫu để nuôi cấy trong dung dịch nước muối sinh lý trong vòng 4 giờ, thực hiện nội soi dạ dày tại Trung tâm Nội soi bệnh viện Trường Đại học Y dược Huế.

- Tiến hành nghiên cứu mẫu trong nước muối sinh lý và nuôi cấy trên môi trường Columbia (Becton Dickinson) có chọn lọc (DENT) với 7% máu cừu ở 37°C trong điều kiện vi khí (10%O₂, 5%CO₂, và 85% N₂) bằng Genbag microaer (Biomérieux, Marcy l'Etoile, Pháp). Ủ đĩa nuôi cấy ở môi trường vi khí từ 3-7 ngày, nếu ở ngày thứ 3 khuẩn lạc mọc nhiều tiến hành làm kháng sinh đồ, nếu sau 5-7 ngày mới có một số khuẩn lạc thì tiến hành cấy chuyển tăng sinh trong vòng 2-3 ngày rồi

tiến hành làm kháng sinh đồ. *H.pylori* được xác định dựa vào đặc điểm hình thái của khuẩn lạc, nhuộm Gram và đặc điểm sinh hóa (đương tính với urease, catalase và oxidase). Tất cả các chủng phân lập được lưu trữ trong dung dịch gồm BHI, glycerol và FBS ở âm 80°C. Thực hiện nuôi cấy và làm kháng sinh đồ tại trung tâm Carlo Urbani & Khoa Vi sinh bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế.

- Làm kháng sinh đồ:

+ Phương pháp Epsilometer test: thanh kháng sinh (Biomérieux, Marcy l'Etoile, Pháp) được sử dụng để xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của kháng sinh CH và LE. Môi trường thạch Mueller Hinton có 7% máu cừu được dùng làm kháng sinh đồ. Huyền dịch vi khuẩn thử nghiệm có độ đục 3 McFarland lấy từ nhiều khuẩn lạc được dàn đều lên thạch nuôi cấy bằng tấm bông. Thanh E-test của từng kháng sinh được đặt lên bề mặt của từng đĩa thạch riêng biệt, ủ trong vòng 3 ngày ở 37°C trong điều kiện vi khí. MIC được xác định ở trị số trên thanh E-test mà vòng ê-líp, ranh giới của vùng ức chế, cắt vào thanh E-test (Hình 1). Chủng được xác định là đề kháng khi MIC $\geq 1\mu\text{g/ml}$ đối với cả CH và LE.

+ Phương pháp đĩa khuếch tán: sử dụng đĩa kháng sinh clarithromycin có hàm lượng 15 μg , đường kính 6mm (Oxoid), đĩa kháng sinh levofloxacin có hàm lượng 5 μg , đường kính 6mm (Oxoid) để làm kháng sinh đồ. Huyền dịch vi khuẩn thử nghiệm có độ đục 3 McFarland lấy từ nhiều khuẩn lạc được dàn đều lên thạch Mueller Hinton có 7% máu cừu bằng tấm bông. Đĩa kháng sinh của CH và LE được đặt đối xứng trên bề mặt đĩa thạch (đường kính 90mm) đã được để khô sau khi dàn đều huyền dịch vi khuẩn lên, cách bờ đĩa 1,5-2cm, ủ trong vòng 3 ngày ở 37°C trong điều kiện vi khí. Đo đường kính vùng ức chế bằng thước từ ranh giới của vùng ức chế gần đĩa khuếch tán nhất, bao gồm cả đường kính của đĩa khuếch tán (Hình 2).

2.4. Xử lý số liệu

Số liệu thống kê được phân tích bằng phần mềm SPSS (13.0) và excel 2007. Sử dụng các công cụ của chương trình để so sánh hai trung bình, so sánh hai tỷ lệ, liên quan đơn biến giữa mỗi yếu tố, hệ số tương quan và mô hình tuyến tính được xác định bằng phân tích hồi quy. Số liệu có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Sự đề kháng clarithromycin và levofloxacin của các chủng *H.pylori*

Tổng cộng 85 bệnh nhân ở khu vực miền Trung được đưa vào nghiên cứu từ tháng 7/2012 đến tháng 8/2013 tại bệnh viện trường Đại học Y Dược Huế, trong đó 56 chủng *H. pylori* được phân lập được từ 56 bệnh nhân (28 nam, 28 nữ; tuổi trung

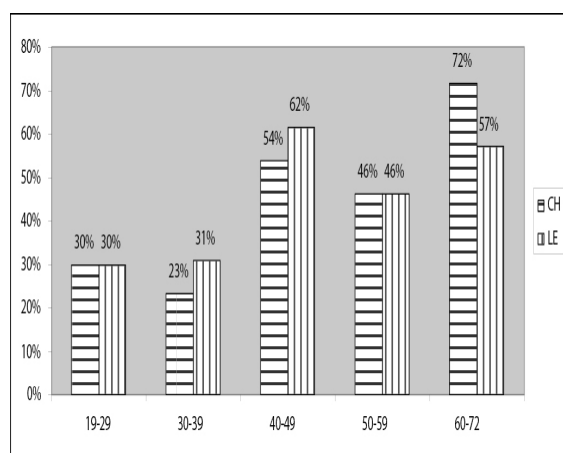
bình: $45,9 \pm 14,2$, thấp nhất 19 tuổi, cao nhất 63 tuổi), với 33 (58,9%) bệnh nhân viêm dạ dày, 22 (39,3%) loét dạ dày – tá tràng, 1 (1,8%) ung thư dạ dày, 29/85 bệnh nhân nuôi cấy âm tính. Trong số 56 chủng, có 43 chủng được phân lập từ 43 bệnh nhân chưa từng điều trị diệt *H.pylori* trước đó và 13 chủng từ 13 bệnh nhân có tiền sử điều trị diệt *H.pylori*.

Bảng 1. Kháng sinh đồ của 56 chủng phân lập

Kháng sinh	Chủng đề kháng phân lập được n (%)				
	Tổng số (n=56)	GAS (n=33)	PUD (n=22)	GC (n=1)	Nam (n=28)
CH	24 (42,9%)	13 (39,4%)	11 (50%)	0	12 (42,9%)
LE	25 (44,6%)	15 (45,5%)	9 (40,9%)	1 (100%)	8 (28,6%)
					17 (60,7%)

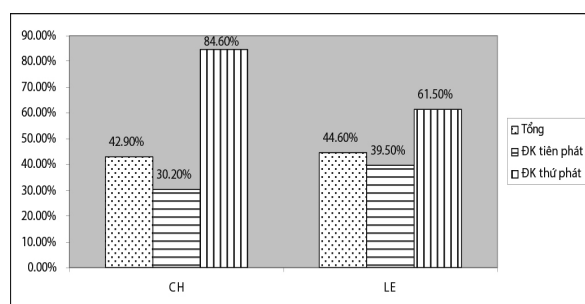
CH: clarithromycin, LE: levofloxacin, GAS: Viêm dạ dày, PUD: Loét dạ dày, GC: Ung thư dạ dày

Nhận xét: Tỷ lệ đề kháng chung của *H.pylori* không kể có hay không có tiền sử điều trị trước đó đối với CH và LE lần lượt là 42,9% và 44,6%. Tỷ lệ đề kháng đối với LE ở nữ giới cao hơn ở nam giới ($P < 0,05$).



Biểu đồ 1. Tỷ lệ đề kháng phân bố theo nhóm tuổi

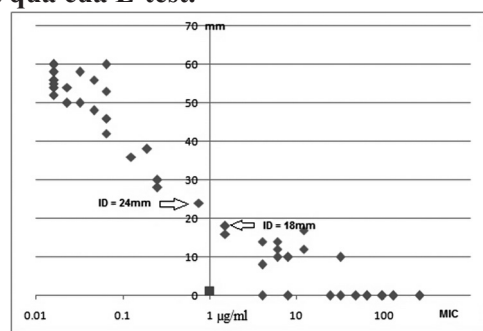
Nhận xét: Ở nhóm tuổi từ 40-49 có xu hướng đề kháng LE cao hơn so với nhóm tuổi khác và đề kháng CH ở nhóm tuổi trên 60 là cao nhất.



Biểu đồ 2. Đề kháng tiên phát và thứ phát của các chủng

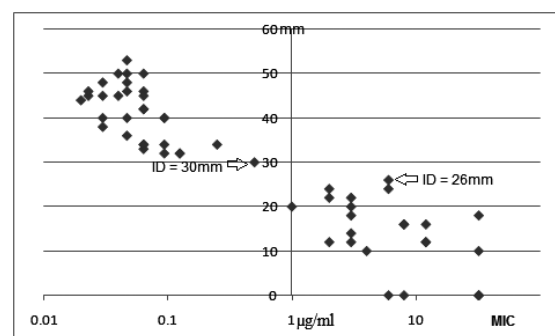
Nhận xét: Tỷ lệ đề kháng kháng sinh ở nhóm đề kháng thứ phát cao hơn so với nhóm nguyên phát ($p < 0,05$). Có 4 chủng đồng thời đề kháng cả CH và LE trong đó 2 chủng ở nhóm đề kháng tiên phát và 2 chủng ở nhóm đề kháng thứ phát.

3.2. Kết quả kháng sinh đồ bằng đĩa khuếch tán của các chủng nhạy cảm và đề kháng qua kết quả của E-test.



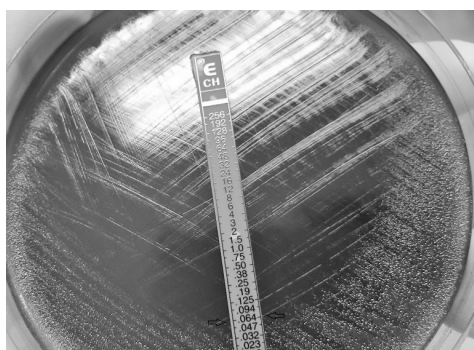
Biểu đồ 3. Phân bố MIC của CH bằng phương pháp E-test và đường kính vùng ức chế (ID) của đĩa kháng sinh CH (15 µg/ml).

Nhận xét: Đường kính vùng ức chế của đĩa khuếch tán đối với các chủng nhạy cảm với CH qua E-test ($MIC < 1 \mu\text{g/ml}$) là lớn hơn hoặc bằng 24mm và đối với các chủng đề kháng là nhỏ hơn hoặc bằng 18mm.

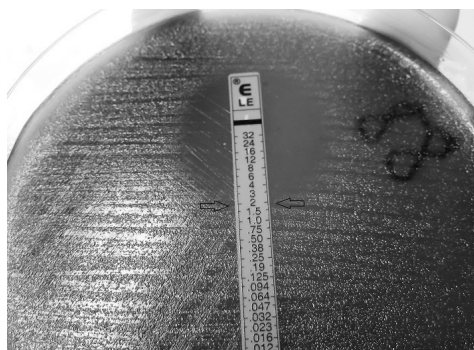


Biểu đồ 4. Phân bố MIC của LE bằng phương pháp E-test và đường kính vùng ức chế (ID) của đĩa kháng sinh LE (5 µg/ml).

Nhận xét: Đường kính ức chế của đĩa khuếch tán đối với các chủng nhạy cảm LE qua E-test ($MIC < 1 \mu g/ml$) là từ 30mm trở lên và đối với các chủng đề kháng từ 26mm trở xuống.

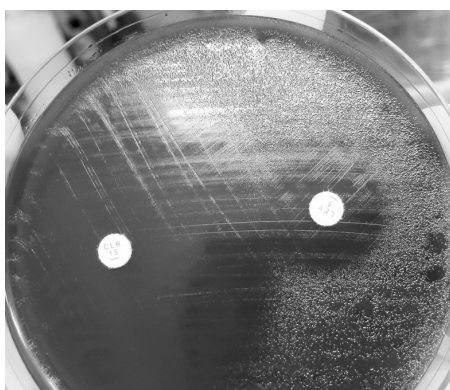


$MIC-CH = 0,064 \mu g/ml$: nhạy cảm

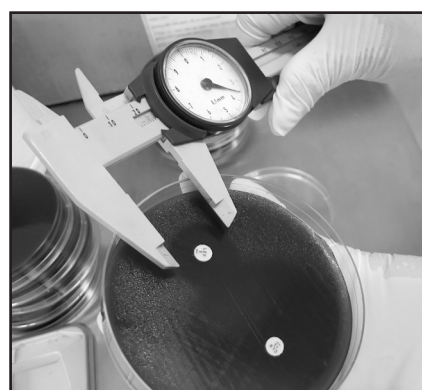


$MIC-LE = 2 \mu g/ml$: đề kháng

Hình 1. Epsilometer test



Đĩa khuếch tán kháng sinh CH và LE



$ID-LE=24mm$ ($MIC=2 \mu g/ml$): đề kháng

Hình 2. Kết quả đĩa khuếch tán của cùng chủng ở hình 1

4. BÀN LUẬN

4.1. Sự đề kháng clarithromycin và levofloxacin của các chủng *H.pylori*

Việt Nam nằm trong nhóm nước đang phát triển có tỷ lệ nhiễm *H.pylori* trong cộng đồng cao từ 65% đến 90% [2] và có tỷ lệ ung thư dạ dày ở mức trung bình [18]. Ngoài ra, bệnh lý loét dạ dày chiếm một tỷ lệ khá cao trong bệnh lý đường tiêu hóa [1]. Kể từ khi Barry Marshall và Robin Warren phát hiện ra vi khuẩn *H.pylori* trong dạ dày và chứng minh mối liên quan giữa chúng với bệnh lý loét dạ dày – tá tràng [9], sau đó là những bằng chứng về mối liên quan của *H.pylori* với bệnh lý lymphoma, ung thư dạ dày và một số bệnh lý khác như thiếu máu thiếu sắt, xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát [7, 10, 12], thì việc điều trị triệt tiêu *H.pylori* được đặt ra. Theo hướng dẫn mới nhất của thế giới, việc điều trị diệt trừ *H.pylori* được thực hiện với cách tiếp cận “tìm và diệt” đối với những bệnh nhân có hội chứng khó tiêu khi đến khám nhằm điều trị các bệnh lý liên quan và

đặc biệt ngăn ngừa tiến trình dẫn đến ung thư dạ dày [12]. Tuy nhiên, theo kết quả nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ đề kháng chung đối với CH có tỷ lệ cao là 42,9%, đặc biệt đối với kháng sinh LE có tỷ lệ đề kháng đến 44,6%. Nếu xét riêng từng nhóm, tỷ lệ đề kháng CH và LE của nhóm đề kháng thứ phát cao hơn nhóm đề kháng tiên phát có ý nghĩa thống kê (CH: 84,6% và 30,2%, LE: 61,5% và 39,5%). Theo khuyến cáo Mastritch IV, ở vùng cộng đồng dân cư có tỷ lệ đề kháng CH trên 20% thì việc điều trị theo phác đồ có CH phải được làm kháng sinh đồ hoặc xét nghiệm phân tử tìm đột biến kháng thuốc trước khi kê đơn, không được kê đơn theo kinh nghiệm [12]. Điều này cũng được áp dụng đối với kháng sinh LE. Mặc dù đối tượng nghiên cứu của chúng tôi còn ít và là những bệnh nhân có hội chứng dạ dày đến khám tại bệnh viện, chưa phản ánh được tỷ lệ đề kháng trong cộng đồng dân cư, tuy nhiên với tỷ lệ đề kháng kháng sinh cao này thì vấn đề điều trị diệt căn trong lựa chọn phác đồ đầu tiên cần phải xem xét lại, liệu có

nên tiến hành làm kháng sinh đồ hay áp dụng kỹ thuật phân tử để tìm đột biến kháng thuốc thường quy trước điều trị ở điều kiện Việt Nam.

Trong phác đồ điều trị bộ ba của lựa chọn đầu tiên, nếu có kháng sinh đề kháng thì tỷ lệ diệt trừ *H.pylori* thành công giảm đi. Đối với đề kháng CH, thì hiệu quả giảm đi rõ rệt từ 66%-70% so với chủng nhạy cảm CH trong phác đồ PPI+AC+CH, còn trong phác đồ PPI+MZ+CH hiệu quả sẽ giảm đi 35% [14,16]. Theo Perna và cộng sự, đối với đề kháng LE trong phác đồ PPI+AC+LE thì hiệu quả điều trị sẽ giảm 41,7% so với nhóm nhạy cảm [14]. Như vậy, đối với phác đồ bộ ba trong lựa chọn đầu tiên, thì vấn đề kháng đối với CH và LE là rất quan trọng vì hiệu quả điều trị sẽ giảm rõ rệt, điều này cũng được khuyến cáo trong Mastritch IV là việc tiến hành làm kháng sinh đồ hoặc xét nghiệm phân tử tìm đột biến kháng thuốc ưu tiên đối với hai kháng sinh này vì có mối tương quan chặt chẽ giữa kết quả xét nghiệm và hiệu quả trên lâm sàng. Mặc dù không khai thác được tiền sử bệnh nhân dùng thuốc gì cụ thể nhưng có thể dự đoán đa số bệnh nhân thất bại điều trị đã dùng phác đồ có CH hoặc có thể LE trước đó. Theo kết quả hai nghiên cứu của Perna (2007) và Nishizawa (2008), nếu thất bại điều trị lần đầu trong phác đồ bộ ba có CH thì nguy cơ đề kháng đối với CH là 65% điều này cũng tương tự đối với LE [14]. Một nghiên cứu khác ở Ba Lan cho thấy tỷ lệ đề kháng thứ phát của kháng sinh CH cao hơn nhiều so với đề kháng tiên phát (80% so với 21%) [6].

Với việc đưa vào sử dụng trong lâm sàng phác đồ điều trị *H.pylori* với bộ ba PPI+AC+LE lần đầu tiên vào năm 2000 tại Italia cho kết quả triệt tiêu *H.pylori* rất tốt lên đến 95% [3] thì phác đồ này được sử dụng để điều trị cứu vãn trong trường hợp thất bại với phác đồ có CH trước đó. Tuy nhiên, theo thời gian điều này không còn đúng nữa ở một số khu vực, trong đó có thể tại Việt Nam, điều này phản ánh một phần nào trong kết quả nghiên cứu của chúng tôi. Tương tự, đối với kháng sinh CH, việc đưa vào sử dụng để điều trị *H.pylori* từ năm 1993 được cho là rất có hiệu quả [14], cho đến nay điều này không còn đúng nữa không chỉ ở những nước đang phát triển mà còn ở một số quốc gia phát triển, tỷ lệ đề kháng CH ngày càng cao làm cho hiệu quả điều trị *H.pylori* giảm rõ rệt [4, 15].

Khi so sánh tỷ lệ đề kháng ở giới nam và nữ, chúng tôi thấy tỷ lệ đề kháng đối với LE ở nữ cao hơn ở nam, sự khác biệt có ý nghĩa thống

kê ($P<0,05$). Có thể việc sử dụng nhóm thuốc fluoroquinolon rộng rãi hơn ở nữ giới do tỷ lệ nhiễm trùng tiết niệu ở nữ cao hơn ở nam mà đây là chỉ định chính của nhóm thuốc này. Vì các loại thuốc khác nhau trong nhóm fluoroquinolon có thể gây đề kháng chéo với nhau cho nên tỷ lệ đề kháng đối với LE ở nữ giới cao hơn.

4.2. So sánh hai phương pháp kháng sinh đồ E-test và đĩa khuếch tán (disk diffusion)

Hiện tại, việc xác định tính đề kháng của *H.pylori* qua nuôi cấy và làm kháng sinh đồ vẫn là phương pháp cơ bản, chính xác mặc dù đã xuất hiện một số phương pháp áp dụng kỹ thuật sinh học phân tử có thể thay thế. Trong các phương pháp đánh giá đề kháng kiểu hình, thì phương pháp pha loãng kháng sinh trong thạch là đã được chuẩn hóa và là phương pháp chính xác nhất, tuy nhiên, rất khó áp dụng trong thực tế lâm sàng vì kỹ thuật phức tạp, tốn thời gian và công sức. Phương pháp khuếch tán trên thạch gồm có phương pháp truyền thống là đĩa khuếch tán, và mới đây phương pháp epsilometer test (E-test) là một kỹ thuật mới được áp dụng, với tính chất khuếch tán ổn định và có gradient nồng độ nên có khả năng xác định được MIC. E-test được đánh giá tương đương với kỹ thuật pha loãng thạch trong xác định MIC [13]. Tuy nhiên, nhược điểm của E-test là giá thành cao. Trong khi đó kỹ thuật đĩa khuếch tán rẻ, dễ thực hiện nhưng lại chưa được chuẩn hóa để áp dụng đánh giá tính đề kháng của *H.pylori* do đặc điểm khuếch tán không ổn định đối với loại vi khuẩn đòi hỏi nuôi cấy dài ngày trong môi trường đặc biệt vi ái khí [5, 8, 19]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xác lập được điểm gãy bằng phương pháp đĩa khuếch tán để xác định tính đề kháng và nhạy cảm đối với 2 kháng sinh quan trọng trong phác đồ điều trị nhiễm *H.pylori*. Với đĩa khuếch tán có hàm lượng 15 μ g, thì đường kính vùng ức chế của CH dưới 18mm xác định được các chủng đề kháng bằng E-test và đường kính trên 24mm xác định được các chủng nhạy cảm. Đối với LE, sử dụng đĩa khuếch tán có hàm lượng 5 μ g, đường kính vùng ức chế dưới 26mm xác định được các chủng đề kháng bằng E-test và đường kính trên 30mm xác định được các chủng nhạy cảm. Như vậy, khi áp dụng phương pháp đĩa khuếch tán, chúng tôi đề xuất khoảng trung gian về đường kính vùng ức chế cần đánh giá lại bằng E-test khi có đường kính từ 18mm đến 24mm đối với CH (đĩa 15 μ g x 6mm) và từ 26mm đến 30mm

đối với LE (đĩa 5µg x 6mm). Theo một số nghiên cứu, chủng được xem là nhạy cảm với CH khi đường kính vùng ức chế từ 20-22mm trở lên (đĩa 15µg) và đối với chủng có đường kính vùng ức chế dưới 20mm được xem là đề kháng và xem xét làm thêm E-test để kiểm chứng lại [5, 14]. Một nghiên cứu khác tại Ấn Độ dùng ciprofloxacin (đĩa 5µg), cho thấy 95% chủng có đường kính vùng ức chế lớn hơn 30mm là nhạy cảm [17].

Khi áp dụng phương pháp đĩa khuếch tán cần tuân thủ đúng quy trình kỹ thuật đã được khuyến cáo để đảm bảo kết quả thống nhất và chính xác [11]. Vì *H.pylori* là vi khuẩn rất khó nuôi cấy, dễ chết và dễ tạo thành thể coccoid, là thể không thể nuôi cấy được, khi gặp môi trường không thuận lợi [13]. Do đó, vi khuẩn được nuôi cấy để làm kháng sinh đồ phải được lấy vào giai đoạn đang sinh trưởng mạnh, khoảng vào ngày thứ 3 của nuôi cấy phân lập và từ 2-3 ngày đối với cấy chuyển tăng sinh [11]. Huyền dịch vi khuẩn thử nghiệm làm kháng sinh đồ cần có nồng độ vi khuẩn phù hợp (Macfarland 3) và nuôi cấy trên môi trường thạch chuẩn Mueller Hinton với 7%-10% máu cừu [5,11]. Với việc xác định được điểm gây bằng phương pháp đĩa khuếch tán để xác định tính đề kháng của *H.pylori* đối với CH và LE, đem lại khả năng thực tiễn trong lâm sàng và có tính kinh tế cao khi giá thành của đĩa khuếch tán chỉ bằng

khoảng 1/10 so với E-test, điều này đặc biệt quan trọng trong điều kiện kinh tế của nước đang phát triển như Việt Nam.

5. KẾT LUẬN

Qua kết quả nghiên cứu về tình trạng đề kháng kháng sinh tại trường Đại học Y Dược Huế, chúng tôi nhận thấy tỷ lệ đề kháng nguyên phát và thứ phát của *H.pylori* đối với CH và LE cao, điều này có thể cho thấy phác đồ điều trị chuẩn với 3 thuốc có CH không còn hiệu quả như là lựa chọn điều trị đầu tiên nữa ở khu vực miền Trung Việt Nam, đặc biệt ngay cả phác đồ cứu vãn sử dụng LE trong phác đồ bộ ba cũng sẽ không hiệu quả. Có thể áp dụng kỹ thuật đĩa khuếch tán để xác định chủng *H.pylori* nhạy cảm hay đề kháng thay thế cho phương pháp E-test giúp tiết kiệm đáng kể chi phí xét nghiệm.

6. KIẾN NGHỊ

Việc lựa chọn phác đồ bộ đầu tiên trong điều trị tiết trừ *H.pylori* tại khu vực miền Trung Việt Nam cần phải xem xét lại và cân nhắc chỉ định nuôi cấy làm kháng sinh đồ bằng phương pháp E-test hoặc đĩa khuếch tán hoặc áp dụng kỹ thuật phân tử phát hiện đột biến gây đề kháng thuốc CH và LE đối với các trường hợp thất bại điều trị nhiều lần trước đó.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phan Trung Nam, Trần Văn Huy (2009), Tình hình bệnh lý dạ dày - tá tràng tại bệnh viện trường Đại học Y Dược Huế trong 2 năm 2007-2008. Tạp chí Y học thực hành, Bộ Y tế, No 668, pp 441-446.
2. Truong, B. X., V. T. C. Mai, H. H. Hai, T. Long, N. K. Trach, and T. Azuma (2008). Helicobacter pylori infection and gastric cancer situation in Northern and Southern Vietnam. Vietnamese J. Gastroenterol. 12: 5-11.
3. Cammarota, G., R. Cianci, et al. (2000). "Efficacy of two one-week rabeprazole/levofloxacin -based triple therapies for Helicobacter pylori infection." Aliment Pharmacol Ther 14(10): 1339-1343.
4. De Francesco, V., F. Giorgio, et al. (2010). "Worldwide H. pylori antibiotic resistance: a systematic review." J Gastrointest Liver Dis 19(4): 409-414.
5. Grignon, B., J. Tankovic, et al. (2002). "Validation of diffusion methods for macrolide susceptibility testing of Helicobacter pylori." Microb Drug Resist 8(1): 61-66.
6. Karczewska, E., I. Wojtas-Bonior, et al. (2011). "Primary and secondary clarithromycin, metronidazole, amoxicillin and levofloxacin resistance to Helicobacter pylori in southern Poland." Pharmacol Rep 63(3): 799-807.
7. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ (2006). "Pathogenesis of Helicobacter pylori infection". Clin Microbiol Rev 19 (3): 449-90.
8. Lang L, Garcí a F (2004). Comparison of E-test and disk diffusion assay to evaluate resistance of Helicobacter pylori isolates to amoxicillin, clarithromycin, metronidazole and tetracycline in Costa Rica. Int J Antimicrob Agents;24:572-7.
9. Marshall, B.J. and Warren, J.R. (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet 1, 1311-1315.
10. McColl KE (2010). Clinical practice: Helicobacter pylori infection. N Engl J Med. 362:1597-1604.
11. McNulty, C., R. Owen, et al. (2002). "Helicobacter pylori susceptibility testing by disc diffusion." J Antimicrob Chemother 49(4): 601-609.

12. Malfertheiner, P., F. Megraud, et al. (2012). "Management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht IV/ Florence Consensus Report." *Gut* 61(5): 646-664.
13. Megraud F, Lehours P (2007). *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clin Microbio Rev*, p.280-322.
14. Megraud F. (2010). Part I.4 Antimicrobial Resistance and Approaches to Treatment - *Helicobacter pylori* in the 21st Century, CAB International.
15. Megraud, F., S. Coenen, et al. (2013). "Helicobacter pylori resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption." *Gut* 62(1): 34-42.
16. Megraud, F. (2004). "H pylori antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing." *Gut* 53(9): 1374-1384.
17. Mishra KK, Srivastava S, Garg A, Ayyagari A (2006). Antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori* clinical isolates: comparative evaluation of disk-diffusion and E-test methods. *Curr Microbiol*;53:329-34.
18. Yamaoka, Y. (2010). "Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7(11): 629-641.
19. Yu, C., L. Li, et al. (2011). "Levofloxacin susceptibility testing for *Helicobacter pylori* in China: comparison of E-test and disk diffusion method." *Helicobacter* 16(2): 119-123.