

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG

-----*-----

NGUYỄN THỊ HƯƠNG GIANG

**ĐẶC ĐIỂM DỊCH TỄ, LÂM SÀNG,
YẾU TỐ NGUY CƠ MẮC TIÊU CHẢY
DO *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* Ở NGƯỜI LỚN
TẠI BỆNH VIỆN BẠCH MAI, 2013 – 2017**

LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

HÀ NỘI – 2020

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG

-----*-----

NGUYỄN THỊ HƯƠNG GIANG

**ĐẶC ĐIỂM DỊCH TỄ, LÂM SÀNG,
YẾU TỐ NGUY CƠ MẮC TIÊU CHẢY
DO *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* Ở NGƯỜI LỚN
TẠI BỆNH VIỆN BẠCH MAI, 2013 – 2017**

Chuyên ngành: Dịch tễ học

Mã số: 62.72.01.17

LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS. TS. Trần Như Dương

2. TS. Phạm Thị Thanh Thủy

HÀ NỘI – 2020

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận án này, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc tới:

PGS.TS. Trần Như Dương, Phó Viện trưởng Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương, người thầy đã hết lòng dìu dắt, tận tình chỉ bảo cho tôi các kiến thức và kỹ năng trong thực hành nghiên cứu của người làm khoa học, động viên và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập và thực hiện đề tài, trực tiếp hướng dẫn giúp tôi hoàn thành luận án này.

TS. Phạm Thị Thanh Thủy, nguyên Phó Trưởng khoa Truyền nhiễm – bệnh viện Bạch Mai, người thầy luôn luôn động viên, hướng dẫn, khích lệ tôi tích cực nghiên cứu ngay từ những bước đi đầu tiên, giúp tôi tiếp cận những kiến thức mới, tận tình hướng dẫn giúp tôi hoàn thành luận án này.

TS. Vũ Thị Thu Hương, nguyên Trưởng phòng Vi khuẩn Kỵ khí, khoa Vi khuẩn, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương, chủ nhiệm của đề tài: “Nghiên cứu vai trò gây bệnh và đặc điểm dịch tễ học phân tử của các vi khuẩn kỵ khí và hiếu khí gây hội chứng tiêu chảy liên quan đến kháng sinh ở một số bệnh viện ở Hà nội” do Quỹ phát triển khoa học và công nghệ quốc gia tài trợ, mã số đề tài: 106.03-2012.65; và một số đề tài trong chương trình hợp tác của Nhật Bản với Viện VSDTTW, người đã cho phép tôi tham gia đề tài, sử dụng một phần số liệu trong đề tài vào luận án, tận tình chỉ bảo, chia sẻ kiến thức khoa học, giúp đỡ tôi trong quá trình nghiên cứu và thực hiện luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn:

- Đảng Ủy, Ban Giám đốc và các khoa phòng của Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương đã tạo điều kiện thuận lợi giúp tôi học tập và hoàn thành luận án.
- Đảng Ủy, Ban Giám đốc bệnh viện Bạch Mai đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

- Phòng Đào tạo sau đại học – Khoa Đào tạo và Quản lý Khoa học - Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương đã luôn nhắc nhở, động viên khuyến khích, giúp đỡ và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án.

- Ban lãnh đạo Trung tâm Bệnh nhiệt đới – bệnh viện Bạch Mai đã ủng hộ, giúp đỡ, tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

- Các thầy cô trong bộ môn Dịch tễ học, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương đã nhiệt tình dạy bảo, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

- Các cán bộ nhân viên phòng Vi khuẩn Kỵ khí, khoa Vi khuẩn, Viện VSDTTW đã giúp đỡ tôi trong quá trình nghiên cứu, thực hiện đề tài

- Tập thể cán bộ nhân viên Trung tâm Bệnh nhiệt đới, khoa Hồi sức tích cực, bệnh viện Bạch Mai đã nhiệt tình giúp đỡ, ủng hộ tôi trong suốt quá trình thực hiện đề tài.

Tôi xin gửi lời cảm ơn tới chồng, các con và gia đình - những người thân yêu đã luôn động viên, chia sẻ, khích lệ tôi vượt qua khó khăn trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Hà Nội, ngày tháng năm 2020

Nghiên cứu sinh

Nguyễn Thị Hương Giang

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi được thực hiện dưới sự hướng dẫn của tập thể hướng dẫn.

Các số liệu trong luận án là trung thực và chưa từng được ai khác công bố.

Hà Nội, ngày tháng năm 2020

Nghiên cứu sinh

Nguyễn Thị Hương Giang

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

CA - CDI	community associated <i>C.difficile</i> infection	Tiêu chảy do <i>C.difficile</i> xuất hiện từ cộng đồng
CCFA	Cefoxitin-Cycloserine Fructose Agar	Môi trường thạch kỵ khí chọn lọc CCFA
CCMA	cefoxitin-cycloserine mannitol agar	Môi trường thạch kỵ khí chọn lọc CCMA
CDC	Centers for Disease Control and Prevention	Trung tâm kiểm soát và phòng ngừa dịch bệnh
CDT	<i>Clostridium difficile</i> transferase	Viết tắt độc tố kép của <i>Clostridium difficile</i>
CI	confidence interval	khoảng tin cậy
<i>C.difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>	
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute	Tiêu chuẩn Lâm sàng và Phòng thí nghiệm, để xác định ngưỡng nhạy cảm của các kháng sinh
CO - HCFA	Community onset, healthcare facility associated <i>C.difficile</i> infection	Tiêu chảy do <i>C.difficile</i> có liên quan đến cơ sở y tế, xuất hiện trong cộng đồng
CT scan	Computed tomography scan	Chụp cắt lớp vi tính
DNA	Deoxyribonucleic Acid	
EIAs	Enzyme immunoassays	Thử nghiệm miễn dịch gắn men
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing	Xét nghiệm độ nhạy cảm với kháng sinh của châu Âu
FDA	Food and Drug Administration	Cơ quan quản lý Thực phẩm và Dược phẩm
G/L	Giga/ liter	=10 ⁹ / lít
HIV	Human Immuno-deficiency Virus	Virus gây suy giảm miễn dịch ở người
HO - HCFA	Hospital onset healthcare facility associated <i>C.difficile</i> infection	Tiêu chảy do <i>C.difficile</i> xuất hiện tại cơ sở y tế
IDSA	The infectious diseases society of America	Hội các bệnh truyền nhiễm Hoa Kỳ

IgG	Immunoglobulin G	kháng thể loại G
MIC	Minimal Inhibitory Concentration	Nồng độ ức chế tối thiểu
NAP1	North America pulsed field gel electrophoresis type 1	Tên 1 chủng <i>Clostridium difficile</i> được phát hiện ở Bắc Mỹ, typ 1 khi dùng kỹ thuật điện di xung trường
kD	kilo Dalton	
OR	Odd ratio	tỉ suất chênh
PCR	Polymerase Chain Reaction	phản ứng chuỗi polymerase
REA	Endonuclease Restriction Analysis	Phân tích đoạn nhờ enzym giới hạn
RNA	Ribonucleic acid	
RR	Relative Risk	Nguy cơ tương đối
SHEA	The society for healthcare epidemiology of America	Hội dịch tễ học các vấn đề về y tế Hoa Kỳ
splAST	splA Sequence Typing	Phương pháp phân loại giải trình tự gen splA
tcdA		Gen mã hóa tạo độc tố A của <i>Clostridium difficile</i>
tcdB		Gen mã hóa tạo độc tố B của <i>Clostridium difficile</i>
tcdC		Gen điều hòa âm quá trình sản xuất độc tố của <i>Clostridium difficile</i>
tcdD		Gen điều hòa dương quá trình sản xuất độc tố của <i>Clostridium difficile</i>
tcdE		Gen mã hóa sản xuất một protein trên vùng gen gây bệnh PaLoc của <i>Clostridium difficile</i>
tpi	triose phosphate isomerase	Gen đặc hiệu loài của <i>Clostridium</i>
T/L	Tera/ litter	= 10 ¹² / lít
VSDTTW		Vệ sinh Dịch tễ Trung ương
WHO	World health organization	Tổ chức Y tế Thế giới

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN.....	3
1.1. Một số điểm đại cương về tiêu chảy do <i>Clostridium difficile</i>	3
1.1.1. Vi khuẩn <i>Clostridium difficile</i>	3
1.1.2. Tiêu chảy do <i>Clostridium difficile</i>	9
1.2. Đặc điểm dịch tễ, lâm sàng của tiêu chảy do <i>C.difficile</i>	10
1.2.1. Dịch tễ bệnh tiêu chảy do <i>Clostridium difficile</i>	10
1.2.2. Lâm sàng bệnh do <i>Clostridium difficile</i>	15
1.3. Yếu tố nguy cơ mắc tiêu chảy do <i>C.difficile</i>	23
1.3.1. Yếu tố vật chủ	23
1.3.2. Yếu tố bên ngoài	25
1.4. Đặc điểm phân bố kiểu gen của <i>Clostridium difficile</i>	29
1.4.1. Cấu trúc phân tử của <i>Clostridium difficile</i>	29
1.4.2. Sự phân bố một số kiểu gen của <i>C.difficile</i>	33
CHƯƠNG 2: PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	38
2.1. Đối tượng nghiên cứu:	38
2.2. Địa điểm nghiên cứu	39
2.3. Thời gian nghiên cứu	39
2.4. Thiết kế nghiên cứu.....	39
2.5. Cỡ mẫu nghiên cứu và chọn mẫu.....	40
2.6. Thu thập đối tượng nghiên cứu.....	41
2.7. Sơ đồ nghiên cứu	43
2.8. Vật liệu nghiên cứu:	44
2.9. Thu thập mẫu bệnh phẩm, kỹ thuật xét nghiệm.....	44
2.10. Các biến số và chỉ số trong nghiên cứu	50
2.11. Xử lý và phân tích số liệu:	55
2.12. Không chế sai số	57
2.13. Đạo đức nghiên cứu	57
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	59
3.1. Một số đặc điểm dịch tễ, lâm sàng của tiêu chảy do <i>C.difficile</i> ở người lớn tại bệnh viện Bạch Mai, 2013 – 2017.....	59

3.1.1. Đặc điểm dịch tễ tiêu chảy do <i>C.difficile</i>	59
3.1.2. Đặc điểm lâm sàng tiêu chảy do <i>C.difficile</i>	65
3.2. Một số yếu tố nguy cơ mắc tiêu chảy do <i>C.difficile</i> ở người lớn tại bệnh viện Bạch Mai, 2013 - 2017	74
3.2.1. Các yếu tố nguy cơ mắc tiêu chảy do <i>C.difficile</i> qua phân tích đơn biến ..	75
3.2.2. Yếu tố nguy cơ mắc tiêu chảy do <i>C.difficile</i> ở người lớn trong phân tích đa biến	84
3.3. Một số đặc điểm phân bố kiểu gen của <i>C.difficile</i> gây tiêu chảy ở người lớn tại bệnh viện Bạch Mai, 2013 - 2017	85
3.3.1. Các gen sinh độc tố của <i>C.difficile</i>	85
3.3.2. Đặc điểm về kiểu gen ribotype của <i>C.difficile</i>	90
CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN	97
4.1. Đặc điểm dịch tễ, lâm sàng của tiêu chảy do <i>C.difficile</i> ở người lớn tại Bệnh viện Bạch Mai, 2013 – 2017.....	97
4.1.1. Đặc điểm dịch tễ tiêu chảy do <i>C.difficile</i>	97
4.1.2. Đặc điểm lâm sàng tiêu chảy do <i>C.difficile</i>	102
4.2. Một số yếu tố nguy cơ mắc tiêu chảy do <i>C.difficile</i> ở người lớn tại bệnh viện Bạch Mai, 2013 - 2017	111
4.3. Một số đặc điểm phân bố kiểu gen của <i>C.difficile</i> gây tiêu chảy ở người lớn tại bệnh viện Bạch Mai, 2013 - 2017.	124
4.3.1. Đặc điểm về loại gen sinh độc tố của <i>C.difficile</i>	124
4.3.2. Đặc điểm về kiểu gen ribotype của <i>C.difficile</i>	128
MỘT SỐ HẠN CHẾ CỦA NGHIÊN CỨU	134
KẾT LUẬN	135
KHUYẾN NGHỊ.....	137
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU ĐÃ CÔNG BỐ	
CÓ LIÊN QUAN ĐẾN ĐỀ TÀI LUẬN ÁN	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1: Trình tự các cặp mồi trong phản ứng PCR đa mồi phát hiện gen sinh độc tố	47
Bảng 2.2: Trình tự cặp mồi trong phản ứng PCR ribotype.....	49
Bảng 3.1. Triệu chứng lâm sàng bệnh nhân mắc tiêu chảy do <i>C.difficile</i>	65
Bảng 3.2. Đặc điểm của tiêu chảy do <i>C.difficile</i> trong nghiên cứu	66
Bảng 3.3. Xét nghiệm phản ứng viêm ở bệnh nhân tiêu chảy do <i>C.difficile</i> ..	67
Bảng 3.4. Các xét nghiệm máu khác.....	67
Bảng 3.5. Kết quả soi đại tràng của bệnh nhân tiêu chảy do <i>C.difficile</i>	68
Bảng 3.6. Điểm mức độ nặng của <i>C.difficile</i> theo diễn biến bệnh.	69
Bảng 3.7. Điểm mức độ nặng của <i>C.difficile</i> theo khoa	69
Bảng 3.8. Can thiệp điều trị bệnh nhân tiêu chảy do <i>C.difficile</i>	70
Bảng 3.9. Đề kháng kháng sinh của các chủng <i>C.difficile</i>	71
Bảng 3.10. Diễn biến điều trị bệnh nhân tiêu chảy do <i>C.difficile</i>	73
Bảng 3.11. Phân bố diễn biến điều trị theo nhóm tuổi.....	74
Bảng 3.12. Tuổi bệnh nhân và tiêu chảy do <i>C.difficile</i>	75
Bảng 3.13. Mức bệnh mạn tính và tiêu chảy do <i>C.difficile</i>	75
Bảng 3.14. Loại bệnh mạn tính/ trạng thái sức khỏe và tiêu chảy do <i>C.difficile</i> ...	76
Bảng 3.15. Nơi sống của bệnh nhân tiêu chảy	77
Bảng 3.16. Tiền sử nằm viện trong vòng 8 tuần trước tiêu chảy	77
Bảng 3.17. Tiền sử dùng kháng sinh trong 8 tuần trước tiêu chảy	78
Bảng 3.18. Nhóm kháng sinh sử dụng trong 8 tuần trước tiêu chảy	79
Bảng 3.19. Một số tiền sử can thiệp khác	80
Bảng 3.20. Các triệu chứng lâm sàng	80
Bảng 3.21. Số lần tiêu chảy trong ngày	81
Bảng 3.22. Số ngày tiêu chảy.....	82
Bảng 3.23. Một số triệu chứng cận lâm sàng.....	82

Bảng 3.24. Tổng hợp các yếu tố liên quan có ý nghĩa trong phân tích đơn biến ..	83
Bảng 3.25. Các yếu tố nguy cơ mắc tiêu chảy do <i>C.difficile</i> trong phân tích đa biến.....	84
Bảng 3.26: Tỷ lệ các gen sinh độc tố của <i>C.difficile</i> ở bệnh nhân nghiên cứu	85
Bảng 3.27: Sự phân bố các loại gen sinh độc tố của <i>C.difficile</i> theo năm.....	86
Bảng 3.28 Phân bố nhóm tuổi theo loại gen sinh độc tố của <i>C.difficile</i>	86
Bảng 3.29: Các triệu chứng lâm sàng của <i>C.difficile</i> theo loại gen độc tố	87
Bảng 3.30: Tiền sử nằm viện trong 8 tuần trước tiêu chảy theo gen độc tố ...	88
Bảng 3.31: Tiền sử có bệnh lý mạn tính theo gen sinh độc tố	88
Bảng 3.32: Tiền sử dùng kháng sinh trong 8 tuần trước tiêu chảy theo gen sinh độc tố	89
Bảng 3.33: Diễn biến tiêu chảy do <i>C.difficile</i> theo loại gen sinh độc tố	89
Bảng 3.34: Phân bố kiểu gen ribotype của <i>C.difficile</i> và loại gen sinh độc tố.....	93
Bảng 3.35: Phân bố các kiểu gen ribotype của <i>C.difficile</i> theo năm.....	93
Bảng 3.36: Phân bố các kiểu gen ribotype của <i>C.difficile</i> theo nhóm tuổi.....	94
Bảng 3.37: Phân bố các kiểu gen ribotype của <i>C.difficile</i> theo tiền sử dùng kháng sinh	94
Bảng 3.38: Phân bố các kiểu gen ribotype của <i>C.difficile</i> theo tiền sử nằm viện trong vòng 8 tuần trước tiêu chảy	95
Bảng 3.39: Phân bố kiểu gen ribotype của <i>C.difficile</i> theo mắc bệnh mạn tính ...	96
Bảng 3.40. Diễn biến điều trị của các kiểu gen ribotype của <i>C.difficile</i>	96

DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 3.1:	Phân bố tiêu chảy do <i>C.difficile</i> theo tháng.....	59
Biểu đồ 3.2:	Phân bố tiêu chảy do <i>C.difficile</i> theo mùa.....	60
Biểu đồ 3.3:	Phân bố tiêu chảy do <i>C.difficile</i> theo năm nghiên cứu	60
Biểu đồ 3.4:	Phân bố tiêu chảy do <i>C.difficile</i> theo tỉnh/ thành phố.....	61
Biểu đồ 3.5:	Phân bố tiêu chảy do <i>C.difficile</i> theo vùng kinh tế - xã hội	63
Biểu đồ 3.6:	Phân bố ca tiêu chảy do <i>C.difficile</i> theo khoa điều trị	63
Biểu đồ 3.7:	Phân bố tiêu chảy do <i>C.difficile</i> theo giới tính.....	64
Biểu đồ 3.8:	Phân bố tiêu chảy do <i>C.difficile</i> theo nhóm tuổi.....	64
Biểu đồ 3.9:	Phân bố tuổi bệnh nhân tiêu chảy do <i>C.difficile</i>	65
Biểu đồ 3.10.	Mức độ sốt của bệnh nhân tiêu chảy do <i>C.difficile</i>	66
Biểu đồ 3.11:	Tỉ lệ % chủng <i>C.difficile</i> nhạy cảm với các kháng sinh	72
Biểu đồ 3.12.	Tổng số ngày nằm viện ở bệnh nhân tiêu chảy do <i>C.difficile</i>	73
Biểu đồ 3.13:	Các kiểu gen ribotype của <i>C.difficile</i> trong nghiên cứu	90

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1:	Hình ảnh nhuộm gram <i>Clostridium difficile</i> từ môi trường nuôi cấy..	5
Hình 1.2:	Bề mặt nha bào của <i>C.difficile</i>	6
Hình 1.3:	Cấu trúc nha bào <i>Clostridium difficile</i>	7
Hình 1.4:	Định nghĩa ca bệnh theo thời gian nhiễm <i>C.difficile</i>	10
Hình 1.5:	Sơ đồ biểu diễn mã vùng gen gây bệnh PaLoc của <i>C.difficile</i> ...	30
Hình 1.6:	Vị trí của cặp môi <i>tcdA</i> cho phép phân biệt chủng A+B+ và chủng A-B+.....	32
Hình 1.7:	Phân biệt 3 chủng A+B+, A-B+, A-B- bằng kỹ thuật PCR đa môi	33
Hình 2.1:	Khuẩn lạc vi khuẩn <i>C.difficile</i> của bệnh nhân nghiên cứu trên môi trường thạch chọn lọc CCMA và CCFA sau ủ kỵ khí 48 giờ.	45
Hình 2.2:	Tủ kỵ khí BugBox Plus, hãng Baker Ruskinn – Anh.....	46
Hình 3.1:	Bản đồ phân bố ca bệnh tiêu chảy do <i>C.difficile</i> nghiên cứu	62
Hình 3.2:	Hình ảnh viêm đại tràng giả mạc	68
Hình 3.3:	PCR đa môi xác định gen sinh độc tố của <i>C.difficile</i> ở bệnh nhân nghiên cứu.....	85
Hình 3.4:	Các kiểu gen ribotype của <i>C.difficile</i> mang gen sinh độc tố A-B+ ở bệnh nhân nghiên cứu	91
Hình 3.5:	Các kiểu gen ribotype của <i>C.difficile</i> mang loại gen sinh độc tố A+B+ ở bệnh nhân nghiên cứu.....	92

ĐẶT VẤN ĐỀ

Clostridium difficile (*C.difficile*) là trực khuẩn Gram dương, kỵ khí bắt buộc, sinh nha bào, gây bệnh bằng ngoại độc tố. Tiêu chảy do *C.difficile* có biểu hiện đa dạng, từ tiêu chảy thông thường, viêm đại tràng giả mạc đến viêm đại tràng tối cấp, phình đại tràng nhiễm độc, đặc biệt nghiêm trọng ở bệnh nhân lớn tuổi. Tiêu chảy do *C.difficile* có thể gặp rải rác trong cộng đồng nhưng thường liên quan đến nhiễm trùng bệnh viện, gây nhiều hậu quả như kéo dài thời gian nằm viện, tăng viện phí, nguy cơ tử vong khoảng 2% - 6% [44], [80], [84], tăng lên 13,5% ở người cao tuổi [47].

Nhiễm trùng do *C.difficile* là vấn đề “mới nổi” đầu thế kỷ 21, được quan tâm đặc biệt ở các nước châu Âu, châu Đại dương và Bắc Mỹ. *C.difficile* hiện được ghi nhận là nguyên nhân hàng đầu gây tiêu chảy ở các nước công nghiệp phát triển như Canada, Hoa Kỳ, Vương quốc Anh... với hàng trăm nghìn ca mắc và hàng chục nghìn ca tử vong mỗi năm [80], [153]. Hệ thống y tế chi phí nhiều tỉ đô-la cho chẩn đoán, điều trị và kiểm soát bệnh do *C.difficile* [14], [116]. Nhiều nước đã phải thiết lập chương trình quốc gia nhằm giám sát, tăng cường chẩn đoán, can thiệp điều trị và ngăn ngừa lây nhiễm *C.difficile* trong bệnh viện. Các nghiên cứu trên thế giới về nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* cho thấy có liên quan đến bệnh nhân là người cao tuổi, mắc nhiều bệnh mạn tính làm giảm sức đề kháng, bệnh nhân nằm điều trị trong bệnh viện, điều trị kháng sinh... [80], [106], [124]. Sự lây lan và khả năng gây bệnh của *C.difficile* ở các nước còn liên quan đến một số kiểu gen của vi khuẩn tại các vùng địa lý khác nhau, như chủng mang kiểu gen NAP1/027/BI đã gây các vụ dịch trong bệnh viện ở Bắc Mỹ và châu Âu; kiểu gen ribotype 078 gây bệnh ưu thế ở châu Âu; kiểu gen ribotype 017 thường gây bệnh ở châu Á.

Việt Nam chưa có nhiều nghiên cứu về bệnh liên quan đến *C.difficile*, do hầu hết các bệnh viện chưa thực hiện được xét nghiệm. *C.difficile* chỉ nuôi cấy được ở môi trường kỵ khí tuyệt đối, và phải tìm thấy độc tố mới có thể khẳng định chẩn đoán nó là nguyên nhân gây tiêu chảy [35]. Khó khăn thực hiện xét nghiệm đã gây ra hạn chế của các bác sĩ lâm sàng ở các tuyến trong hiểu biết về dịch tễ và lâm sàng của bệnh do *C.difficile*. Câu hỏi đặt ra là, liệu *C.difficile* có là tác nhân đáng lưu ý gây tiêu chảy ở Việt Nam không? Các biểu hiện dịch tễ, lâm sàng chính là gì? Những yếu tố nào liên quan đến khả năng mắc tiêu chảy do *C.difficile* tại Việt Nam? Sự phân bố các kiểu gen của *C.difficile* ở Việt Nam thế nào? Trả lời cho những câu hỏi nêu trên thực sự là hết sức quan trọng, cần thiết và có ý nghĩa lớn trong lâm sàng cũng như trong y tế công cộng, giúp cho các nhà quản lý, các nhà chuyên môn, đặc biệt là các bác sĩ lập kế hoạch phòng chống và điều trị căn bệnh này. Bệnh viện Bạch Mai là cơ sở điều trị đa khoa tuyến cuối của miền Bắc, tiếp nhận nhiều bệnh nhân nặng thuộc các chuyên khoa, từ nhiều bệnh viện chuyên đến, có một lượng lớn bệnh nhân tiêu chảy chưa xác định được nguyên nhân. Xuất phát từ cơ sở trên, chúng tôi đã thực hiện nghiên cứu này nhằm mục tiêu:

1. Mô tả một số đặc điểm dịch tễ, lâm sàng của tiêu chảy do *Clostridium difficile* ở người lớn tại bệnh viện Bạch Mai, 2013 - 2017.
2. Xác định một số yếu tố nguy cơ mắc tiêu chảy do *Clostridium difficile* ở người lớn tại bệnh viện Bạch Mai, 2013 - 2017.
3. Xác định một số đặc điểm phân bố kiểu gen của *Clostridium difficile* gây tiêu chảy ở người lớn tại bệnh viện Bạch Mai, 2013 - 2017.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

1.1. Một số điểm đại cương về tiêu chảy do *Clostridium difficile*

1.1.1. Vi khuẩn *Clostridium difficile*

1.1.1.1. Lịch sử phát hiện *Clostridium difficile*

Clostridium difficile được Hall và O'Toole phát hiện đầu tiên vào năm 1935, coi như một thành phần của vi khuẩn chí bình thường trong phân trẻ nhỏ. Vì khó nuôi cấy trong ống nghiệm nên lúc đầu vi khuẩn được đặt tên là *Bacillus difficilis*, sau đó là *Clostridium difficile*. Năm 2016, nó được đổi tên thành *Clostridioides difficile*. Khi mới được phát hiện, *C.difficile* dường như không liên quan tới gây bệnh cho người và bị lãng quên cho đến thời kỳ của kháng sinh. Những trường hợp viêm đại tràng giả mạc (mô tả lần đầu tiên vào năm 1893), trở nên nhiều hơn và ban đầu được cho là do *Staphylococcus aureus* gây nên. Uống vancomycin rất có hiệu quả, trở thành thuốc chỉ định điều trị các trường hợp viêm đại tràng giả mạc. Đầu những năm 1970, Tedesco và cộng sự nhận thấy, clindamycin điều trị nhiễm trùng kỵ khí dường như gây tiêu chảy nặng hơn ở một vài bệnh nhân. Đánh giá tần xuất tiêu chảy liên quan đến điều trị bằng clindamycin kết hợp với soi đại tràng, 42 trong 200 bệnh nhân xuất hiện tiêu chảy, 20 bệnh nhân có bằng chứng viêm đại tràng giả mạc trên nội soi, được gọi là “viêm đại tràng clindamycin”. *S.aureus* không phát hiện thấy trong mẫu phân của các bệnh nhân này. Các nghiên cứu và quan sát sau đó cho thấy, sử dụng vancomycin uống cùng lúc có thể ngăn được viêm đại tràng clindamycin. Laughon và cộng sự đã phát hiện độc tố tế bào trong mẫu phân bệnh nhân viêm đại tràng giả mạc. Năm 1978, Bartlett và cộng sự tìm ra liên quan giữa *C.difficile* sinh độc tố và viêm đại tràng giả mạc ở người. Những năm 1980 và 1990, bệnh do *C.difficile* không phải là nguyên

nhân chính gây tử vong và được cho là đã có hiểu biết cần thiết để quản lý và điều trị nhiễm trùng do *C.difficile* [27].

Tuy nhiên, trong thiên niên kỷ mới này, *C.difficile* lại tái xuất hiện, gia tăng về tần xuất và mức độ nặng. Tại Hoa Kỳ, số bệnh nhân nằm viện liên quan đến *C.difficile* năm 2008 - 2009 lên tới 349.000 và 336.600 người [166]. Báo cáo dịch tễ gần đây của Hoa Kỳ đánh giá nhiễm trùng do *C.difficile* là nguyên nhân phổ biến đáng ngại nhất, thay thế cả vấn đề *S.aureus* kháng methicillin trong nhiễm trùng liên quan đến chăm sóc y tế [100].

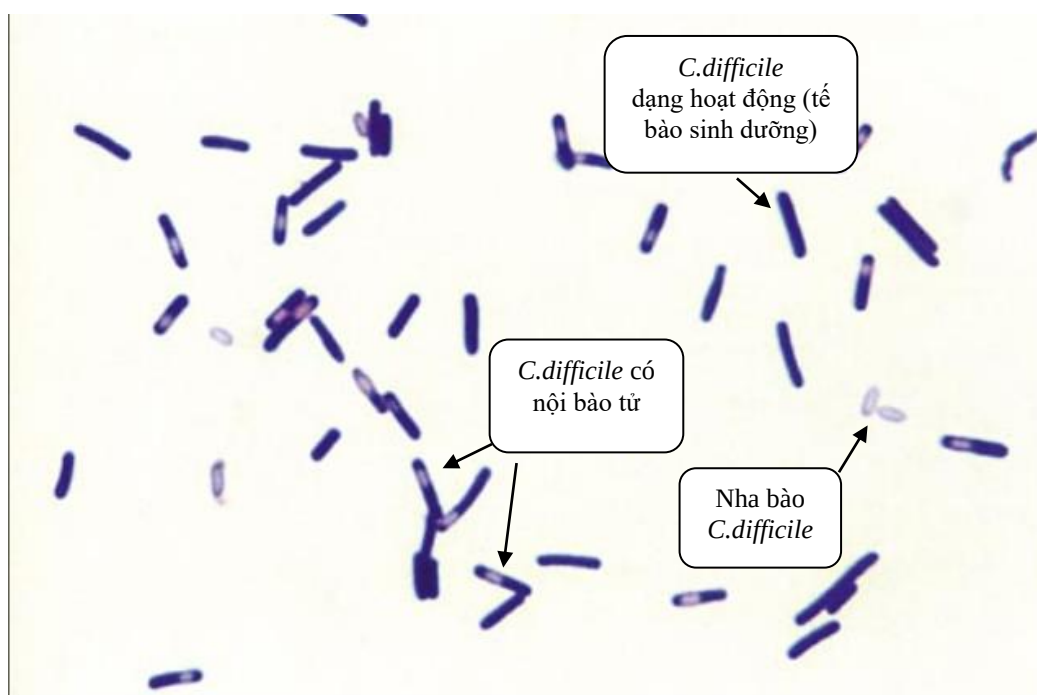
1.1.1.2. Một số đặc điểm của vi khuẩn *Clostridium difficile*

C.difficile là trực khuẩn gram dương, kỵ khí tuyệt đối bắt buộc, sinh nha bào, sản xuất ra ngoại độc tố gây bệnh. Điều kiện ủ môi trường nuôi cấy vi khuẩn kỵ khí phải đảm bảo không có oxy, thay vào đó là khí trường hỗn hợp các khí N₂ (80%), CO₂ (10%), H₂ (10%). Thời gian tiến hành các thao tác nuôi cấy phòng thí nghiệm cũng phải rất nhanh (dưới 20 phút), để không làm chết vi khuẩn. Chất lượng khí ủ phải đảm bảo không có oxy ổn định trong toàn bộ quá trình để tránh thất bại khi nuôi cấy vi khuẩn kỵ khí. *C.difficile* là vi khuẩn rất khó sinh trưởng, đòi hỏi môi trường nuôi cấy đặc biệt, giàu chất dinh dưỡng, có bổ sung các chất như vitamin K, hemin, máu ngựa hoặc cừu, nhũ tương lòng đỏ trứng. Cần bổ sung chất kích thích quá trình nảy mầm của nha bào khi phân lập *C.difficile* từ mẫu phân hoặc từ môi trường như cholate, taurocholate, glycocholate hay glycine [146].

Trong tự nhiên, *C.difficile* tồn tại ở 2 dạng: dạng nha bào và dạng hoạt động. Nha bào tồn tại ở bề mặt môi trường bên ngoài, đất, đường tiêu hóa động vật và người, là dạng không hoạt động, không chịu tác động của kháng sinh. Dạng hoạt động của *C.difficile* chỉ có trong đại tràng của người; một số vật nuôi trong nhà và động vật có vú hoang dại, chịu tác động của kháng sinh, có thể sinh độc tố hoặc không. Chỉ có chủng *C.difficile* dạng hoạt động, sinh

độc tố mới gây bệnh [26], [157]. *C.difficile* có ở đường tiêu hóa của 3% người lớn khỏe mạnh, 20% bệnh nhân nằm viện và 25% - 80% trẻ sơ sinh [158].

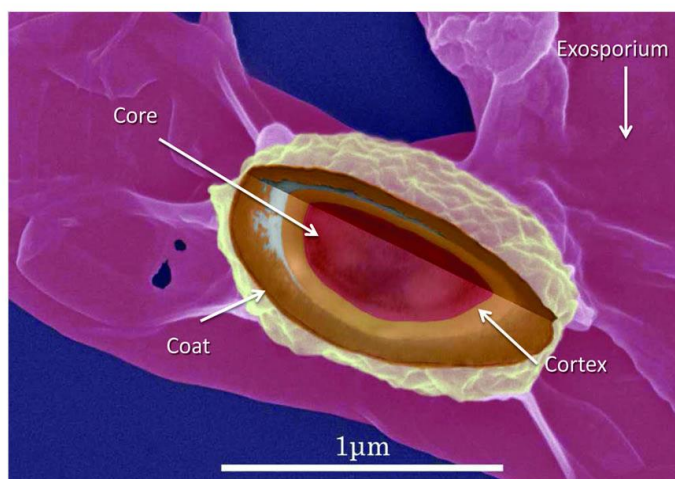
C.difficile trong điều kiện không thuận lợi sẽ tạo nha bào, tồn tại ở bề mặt môi trường bệnh viện rất dài, tới 12 tháng mà không mất khả năng gây bệnh. Nha bào *C.difficile* trong đại tràng người và động vật nhiễm, không chịu tác động của kháng sinh, rất khó bị loại bỏ, là nguyên nhân gây nhiễm cho người xung quanh do nuốt phải đồ ăn nhiễm nha bào và là nguyên nhân của 20% – 25% tái phát bệnh sau điều trị [133]. Nha bào trong môi trường ở cộng đồng và bệnh viện có sức đề kháng cao với nhiệt độ, chất bức xạ, hoá chất, cồn sát khuẩn... [15]. Sát khuẩn bằng cồn rửa tay nhanh không diệt được nha bào, cho thấy sự lây nhiễm cao trong bệnh viện.



Hình 1.1: Hình ảnh nhuộm gram *Clostridium difficile* từ môi trường nuôi cấy [55]
 Các tế bào vi khuẩn dạng hoạt động hình que (tế bào sinh dưỡng); tế bào sinh dưỡng có nội bào tử và nha bào tự do

Hình 1.1. cho thấy ở tiêu bản nhuộm gram, *C.difficile* là trực khuẩn gram dương, kích thước 1 x 3 μm . Nha bào ở gần đầu cực của vi khuẩn hoặc ở dạng nha bào tự do. Vi khuẩn dễ mất màu tím gentian trong quá trình nhuộm gram.

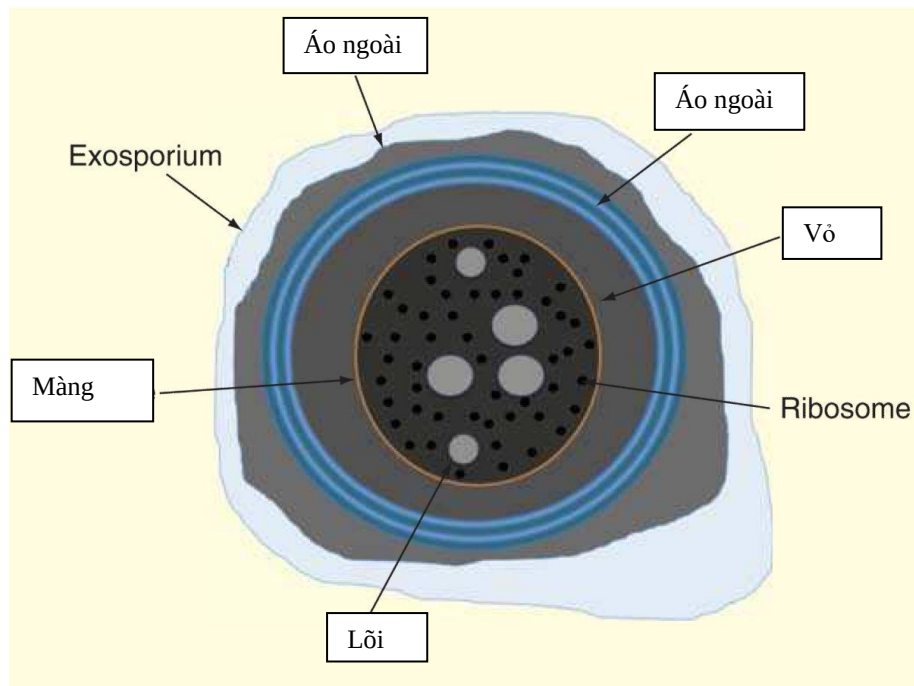
Nha bào vi khuẩn *C.difficile*:



Hình 1.2: Bề mặt nha bào của *C.difficile* [157]

Kính hiển vi điện tử độ phân giải cao, quét được các lớp xếp chồng nhau, truyền dữ liệu hình thái nha bào của chủng *C.difficile* VPI10463 dàn trên một mặt phẳng. Trật tự sắp xếp các phần protein của nha bào có thể quan sát được dễ dàng: lõi (core), vỏ (cortex), áo ngoài (coat), cấu trúc phần ngoài của nha bào (exosporium) là phần dải rườm rà xung quanh. Bộ sưu tập ảnh chụp hiển vi, phòng thí nghiệm Vedantam.

Nha bào *C.difficile* có thể tồn tại lâu và bền vững trong môi trường là do cấu trúc của nó. Nha bào gồm 3 thành phần chính: lớp áo ngoài, lớp vỏ và lõi. Lớp ngoài cùng, nơi tiếp xúc của nha bào với môi trường gọi là exosporium, có đặc điểm của một protein giống collagen, gồm một lớp đáy paracrystalline gắn các sợi xơ, tạo bông lên. Có hay không phần exosporium sẽ quyết định khả năng nảy mầm gây bệnh của nha bào. Phá vỡ hoặc làm mất lớp exosporium sẽ thấy lớp áo ngoài, là lớp bảo vệ nha bào trong môi trường bất lợi bằng cấu trúc dày đặc các electron và protein, bao bọc lớp vỏ và lõi. DNA nằm trong lõi của nha bào [15].



Hình 1.3: Cấu trúc nha bào *Clostridium difficile* [133]

Phần ngoài của nha bào (exosporium), áo ngoài, vỏ, màng, ribosome và lõi.

1.1.1.3. Độc tố và khả năng gây bệnh của *C.difficile*

C.difficile có trong đại tràng người, sản xuất ngoại độc tố và gây bệnh. Hầu như không có sự xâm nhập của *C.difficile* vào tế bào niêm mạc đại tràng. Hai ngoại độc tố do *C.difficile* sản xuất ra gồm: độc tố A (toxin A hay *tcdA*) là độc tố ruột, 308 kD và độc tố B (toxin B hay *tcdB*) là độc tố tế bào, 250 – 270 kD. Cả 2 độc tố A và B đều có hoạt tính độc tế bào. Hiệu quả gây độc xảy ra khi độc tố gắn với các thụ thể nội bào của màng tế bào ruột, đi vào trong tế bào. Để có chức năng này, các *tcdA* và *tcdB* phải vào tế bào vật chủ bằng enzyme nội bào và cần axit nội bào để vào được dịch bào. Sau khi xâm nhập, độc tố A vào trong tế bào ruột, thay thế khung tế bào actin làm các tế bào tròn lại. Độc tố B khi cấy vào tế bào cũng gây ra sự vỡ tròn của tế bào, cho thấy cả hai độc tố này có thể có cùng phương thức hoạt động. Hai độc tố này làm ảnh hưởng đến sinh lý tế bào và dẫn đến chết tế bào theo chương trình. *TcdA* cũng kích thích sản xuất cytokine đóng góp vào giai đoạn sớm của quá trình viêm trong

viêm đại tràng giả mạc [113]. Tìm thấy độc tố trong phân là chỉ điểm cho nhiễm trùng do *C.difficile*.

Độc tố A gây tăng tiết dịch, phá hủy màng nhầy và viêm ruột khi tiêm vào ruột động vật thí nghiệm. Độc tố B có khả năng gây độc gấp 10 - 1000 lần độc tố A, là một độc tố tế bào trong cấy mô [82]. Khi tiêm độc tố A và độc tố B cho động vật thí nghiệm, có khả năng gây cho chúng tổn thương thần kinh thực vật và tử vong. Cơ chế hoạt động trong tế bào của độc tố A và độc tố B vẫn còn chưa được hiểu rõ. Hoạt động của *tcdA* và *tcdB* đang được đánh giá lại về chức năng và các tác động phụ thêm của nó.

C.difficile sản xuất ra độc tố A, độc tố B và gây bệnh. Lúc đầu, người ta nghĩ độc tố A là tác nhân độc tố chính, nhưng gần đây tầm quan trọng của độc tố B đã được khẳng định. Cả hai độc tố A và B đều gây viêm đại tràng lan tỏa và tổn thương tế bào biểu mô, gây mất dịch với biểu hiện tiêu chảy. Chưa ghi nhận trên người trường hợp bị bệnh do *C.difficile* chỉ có độc tố A mà không có độc tố B. Do vậy, khi chẩn đoán bệnh do nhiễm *C.difficile*, người ta ghi nhận chủng *C.difficile* A+B+ hoặc chủng *C.difficile* A-B+.

Một số ít chủng sản xuất độc tố kép (binary toxin) hay CDT (*Clostridium difficile* transferase) có trọng lượng phân tử 43 kD. Những chủng có thêm độc tố kép (chủng ribotype B1/NAP1/027 và chủng ribotype 078) gây bệnh cảnh lâm sàng nặng hơn những chủng không có độc tố này [19]. Vai trò chính xác trong sinh bệnh học về độc lực của chủng sinh độc tố kép vẫn chưa biết rõ, nhưng một số nghiên cứu cho rằng độc tố kép có vai trò trong việc dễ dàng cư trú của *C.difficile* trong vật chủ bị nhiễm [15]. Có khoảng 6% – 12,5% chủng *C.difficile* gây bệnh thông qua sản sinh độc tố kép [27]. Fatima (2019) đề cập đến cơ chế hoạt động của độc tố A là hủy hoại phần actin của các tế bào đích, gây xâm nhập bạch cầu trung tính, bạch cầu lympho, viêm và hoại tử tế bào biểu mô ruột. Độc tố B phá hủy liên kết của các tế bào biểu mô, tăng tính

thấm thành mạch và gây xuất huyết. Độc tố kép làm tăng khả năng gắn của vi khuẩn vào tế bào biểu mô ruột [54].

1.1.2. Tiêu chảy do *Clostridium difficile*

1.1.2.1. Tiêu chảy

Tiêu chảy là nguyên nhân gây bệnh và tử vong thứ 2 trên thế giới, ước tính mỗi năm có 3,1 triệu người tử vong. Ở nước đang phát triển, tiêu chảy và tử vong do tiêu chảy chủ yếu gặp ở trẻ em; còn ở nước phát triển, tử vong liên quan đến tiêu chảy chủ yếu gặp ở người lớn > 60 tuổi (chiếm 85%) [62]. Tiêu chảy xảy ra khi có sự thay đổi nhu động bình thường của ruột, đặc trưng bởi gia tăng lượng nước, khối lượng hoặc số lần đại tiện. Định nghĩa thường sử dụng trong điều tra dịch tễ học, coi “tiêu chảy” khi đại tiện phân không thành khuôn hoặc lỏng trên 3 lần/ ngày. “Tiêu chảy nhiễm khuẩn” nói đến nguyên nhân do vi khuẩn, thường kèm theo nôn, buồn nôn hoặc đau bụng. “Tiêu chảy cấp” là tiêu chảy xảy ra trong khoảng ≤ 14 ngày. “Tiêu chảy kéo dài” khi tiêu chảy > 14 ngày. Một số coi tiêu chảy > 30 ngày là “tiêu chảy mạn” [62].

- Tiêu chảy có liên quan đến sử dụng kháng sinh: Khi có sử dụng kháng sinh trong vòng 8 tuần trước tiêu chảy. Trong đó, 10% - 25% là do độc tố của *C.difficile*, một số liên quan đến *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp, *Klebsiella oxytoca*, *Clostridium perfringens* chủng sinh độc tố ruột. 70% - 80% còn lại không tìm được căn nguyên vi khuẩn [20].

- Tiêu chảy bệnh viện: tiêu chảy xuất hiện sau nhập viện 48 giờ hoặc khởi phát tiêu chảy trong vòng 4 tuần sau khi ra viện.

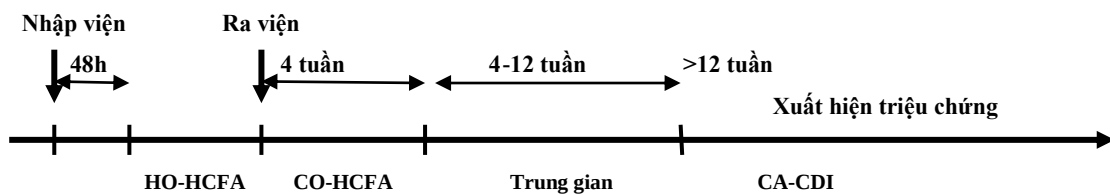
- Tiêu chảy bệnh viện tái phát: bệnh nhân phải tái nhập viện vì xuất hiện tiêu chảy trong vòng 8 tuần sau khi kết thúc điều trị tiêu chảy lần đầu. Nếu xuất hiện hơn 8 tuần sau ngày kết thúc điều trị trước đó là tiêu chảy mắc mới.

- Tiêu chảy cộng đồng: tiêu chảy không thuộc các định nghĩa nói trên.

1.1.2.2. Tiêu chảy do *C.difficile*

- Tiêu chảy do *Clostridium difficile*: lâm sàng có tiêu chảy (phân lỏng 3 lần hoặc nhiều hơn trong 24 giờ) kèm theo: xét nghiệm phân tìm thấy độc tố hoặc gen sinh độc tố của *C.difficile* hoặc soi đại tràng hay xét nghiệm mô bệnh học có viêm đại tràng giả mạc.

- Các loại tiêu chảy do *C.difficile*:



Hình 1.4: Định nghĩa ca bệnh theo thời gian nhiễm *C.difficile* [35]

HO-HCFA: hospital onset, healthcare facility associated: Tiêu chảy do C.difficile xuất hiện tại cơ sở y tế, liên quan đến chăm sóc y tế

CO-HCFA: community onset, healthcare facility associated C.difficile infection: Tiêu chảy do C.difficile có liên quan đến cơ sở y tế, xuất hiện trong cộng đồng.

CA-CDI: community associated C.difficile infection: Tiêu chảy do C.difficile từ cộng đồng.

- Tiêu chảy do *C.difficile* xuất hiện tại cơ sở y tế (hospital onset healthcare facility associated: HO - HCFA): xuất hiện tại bệnh viện, sau 48 giờ vào viện. Tiêu chảy do *C.difficile* có liên quan đến cơ sở y tế, xuất hiện trong cộng đồng (community onset, healthcare facility associated *C.difficile* infection: CO - HCFA): khởi phát tiêu chảy trong vòng 4 tuần (nếu trong vòng 4 – 12 tuần coi là trung gian) sau khi bệnh nhân ra viện.

- Tiêu chảy do *C.difficile* từ cộng đồng (community associated *C.difficile* infection: CA - CDI): Tiêu chảy xuất hiện trong cộng đồng mà không có tiền sử phải nằm viện trong vòng 12 tuần trước đó

1.2. Đặc điểm dịch tễ, lâm sàng của tiêu chảy do *C.difficile*

1.2.1. Dịch tễ bệnh tiêu chảy do *Clostridium difficile*

1.2.1.1. Tình hình bệnh tiêu chảy do *C.difficile* trên thế giới

C.difficile sinh độc tố gây tiêu chảy đã được khẳng định từ cuối những năm 1970. Những năm 1980 – 1990, người ta cho rằng đã có thể kiểm soát được bệnh do *C.difficile*. Tuy nhiên, đầu thế kỷ 21, nhiều nước phát triển ghi nhận sự xuất hiện các vụ dịch tiêu chảy do *C.difficile* chủng độc lực cao, đặc biệt ở bệnh nhân lớn tuổi, trong các bệnh viện, nhà dưỡng lão... với bệnh cảnh lâm sàng nặng, nhiều biến chứng, tái phát cao, gia tăng tử vong [80], [124].

Năm 2002, tại Quebec – Canada, số ca tiêu chảy do *C.difficile* tăng gấp 5 lần so với năm 1997, chiếm 28/1000 ca nhập viện [106]. Nghiên cứu 13 năm, từ 1/1991 - 12/2003, tại bệnh viện trung tâm đại học Sherbrooke – Canada, tỉ lệ mắc tiêu chảy do *C.difficile* đã tăng từ 35,6/100.000 dân lên 156,3/100.000 dân [124]. Năm 2005, 30 bệnh viện tại Quebec báo cáo hàng loạt ca tiêu chảy do *C.difficile* mắc tại bệnh viện, tăng gấp 5 lần số ca trung bình của các năm trước đó, liên quan đến chủng độc lực mới, ribotype 027 [94]. Trung tâm kiểm soát và phòng ngừa bệnh Hoa kỳ (CDC) thông báo, tỉ lệ mắc *C.difficile* năm 2003 tăng gấp đôi so với năm 1996, từ 31 lên 61 trường hợp/100.000 dân [38]. Nhiễm trùng do *C.difficile* phải nhập viện tại Hoa Kỳ cũng tăng rõ rệt, từ 25.200 năm 1998 lên 110.600 trường hợp năm 2009 [26], [166]. Nhưng đó chỉ là một phần ba trong tổng số 336.600 trường hợp nhiễm trùng do *C.difficile*, 226.000 trường hợp còn lại được chẩn đoán trong thời gian nằm viện [166]. Năm 2015, ước tính có hơn 450.000 trường hợp tiêu chảy do *C.difficile* với trên 35.000 tử vong [101],[130].

Ở châu Âu, bùng phát bệnh tiêu chảy do *C.difficile* trong bệnh viện được ghi nhận ở nhiều nước. Vụ dịch đầu tiên xảy ra ở châu Âu từ tháng 10/2003 đến 6/2004 trong bệnh viện Stoke Mandeville của Anh, với 174 ca bệnh do *C.difficile*, 19 ca (11%) tử vong. Vụ dịch thứ 2 cũng xảy ra trong cùng bệnh viện đó từ 10/2004 – 6/2005, 160 ca mới mắc, tử vong 19 ca (12%) [56]. Bỏ bắt đầu điều tra về tiêu chảy do *C.difficile* từ tháng 6/2006 đến tháng 7/2006

ghi nhận hàng loạt trường hợp bệnh ở 11 bệnh viện và 2 bệnh viện khác có những trường hợp bệnh lẻ tẻ. Ở Hà Lan, tháng 4/2006, 5 bệnh viện có các trường hợp bệnh lẻ tẻ và 11 bệnh viện có hàng loạt trường hợp bệnh, tử vong 22%, tái phát 19%. Miền bắc nước Pháp, trong tháng 8/2006, 9 bệnh viện có bùng phát tiêu chảy do *C.difficile* với 194 trường hợp, tử vong 6% [38]. Dữ liệu từ hệ thống báo cáo tiêu chảy do *C.difficile* tại Anh năm 1990 - 2004 cho thấy số mắc bệnh đã tăng từ 1.172 lên 46.501 trường hợp [38]. Bệnh viện Trường đại học Oulu (Phần Lan) ghi nhận 221 - 287 trường hợp tiêu chảy do *C.difficile* hàng năm (giai đoạn 2009 – 2016), với tỉ lệ *C.difficile* dương tính trong các bệnh phẩm xét nghiệm là 10% – 17,8% [111].

Cùng với tăng số mắc tiêu chảy do *C.difficile*, tỉ lệ biến chứng cũng gia tăng: phình đại tràng nhiễm độc, phải phẫu thuật cắt đại tràng, sốc nhiễm khuẩn và tử vong. Điều tra ở Canada cho thấy, từ năm 1991 đến 2003, tỉ lệ biến chứng đã tăng từ 7,1% lên 18,2% và tử vong trong 30 ngày tăng từ 4,7% lên 13,2% [124]. Bên cạnh gánh nặng về bệnh tật, mắc *C.difficile* còn gây ra gánh nặng về kinh tế cho hệ thống y tế. Chi phí trực tiếp cho chăm sóc điều trị nhiễm trùng do *C.difficile* tại Hoa Kỳ là 4,8 tỉ đô la năm 2008, chưa tính đến các chi phí gián tiếp, quản lý, kiểm soát nhiễm khuẩn, mất sức lao động...

Giám sát tỉ lệ mắc *C.difficile* và sự lây lan của chủng độc lực cao (chủng có kiểu gen 027, còn gọi là *NAP1/027/BI* và chủng 078) đã được thiết lập ở các vùng và quốc gia châu Âu từ năm 2007 [162]. Tại Anh, tỉ lệ nhiễm *C.difficile* đã giảm từ năm 2007 – 2008, liên quan đến việc giảm xuất hiện của chủng *C.difficile* *NAP1/027/BI*, số ca tử vong cũng giảm 70% trong khoảng thời gian từ 2007 đến 2010. Nhiều yếu tố góp phần giảm tỉ lệ này, trong đó xác định đúng chủng *C.difficile* giúp đơn vị kiểm soát nhiễm khuẩn có biện pháp dự phòng hiệu quả [162]. Ước tính có 7 bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile*

/10.000 bệnh nhân năm viện ở châu Âu, một trong những nguyên nhân nhiễm trùng bệnh viện hàng đầu với 14.000 tử vong/ năm [110].

Ở châu Á, nhiễm trùng do *C.difficile* chưa được quan tâm như một tác nhân gây bệnh trong bệnh viện. Tại Hàn Quốc, tỉ lệ mắc bệnh do *C.difficile* là 1,7 ca/ 1000 người lớn nhập viện năm 2004, tăng lên 2,7 ca/ 1000 người năm 2008 [26], [92], [166] với 60% - 80% chủng *C.difficile* sinh độc tố [142]. Trung Quốc ghi nhận 36 ca nhiễm *C.difficile* trong 71.428 bệnh nhân năm viện từ 1998 tới 2001. Một số ca nhiễm *C.difficile* được ghi nhận ở Đài Loan, Hồng Kông, Philipin, Thái Lan, Singapo, Malaysia, Indonesia, Ấn Độ, Bangladesh [36]. Nghiên cứu tại bắc Ấn Độ từ 1/2001 - 12/2005, 524 mẫu bệnh phẩm được làm xét nghiệm, tìm thấy 37 trường hợp do *C.difficile* [29]. Năm 2009 - 2010, trong nghiên cứu khác, *C.difficile* có mặt trong 8% bệnh nhân tiêu chảy cấp năm viện và 1,3% bệnh nhân tiêu chảy từ cộng đồng [26],[76]. Tại Pakistan, *C.difficile* là nguyên nhân của 29% trường hợp tiêu chảy liên quan đến kháng sinh [26], [64]. Tại Philipin, bệnh nhân nội soi có viêm đại tràng thì 44% dương tính với *C.difficile* [26]. Yoldaş (2016) tại Thổ Nhĩ Kỳ báo cáo 17,1% bệnh nhân nội trú tiêu chảy dương tính với *C.difficile*, trong khi ở cộng đồng, tỉ lệ này là 15,5% [165]. Một số tác giả ước tính, tại các nước Đông Á (Trung Quốc, Hồng Kông, Nhật Bản, Hàn Quốc, Đài Loan) *C.difficile* có ở 19,5% bệnh nhân tiêu chảy, tại Nam Á (Ấn Độ, Malaysia, Singapore và Thái Lan) là 10,5%, và 11,1% tại các nước Trung Đông (Iran, Jordan, Cô-oet, Li Băng, Qua-ta và Thổ Nhĩ Kỳ) [135].

1.2.1.2. Tình hình bệnh tiêu chảy do *C.difficile* ở Việt Nam

Ở Việt Nam, việc phân lập vi khuẩn kỵ khí gây bệnh gặp nhiều khó khăn do các phòng xét nghiệm của hầu hết các bệnh viện chưa được trang bị để nuôi cấy bệnh phẩm trong môi trường kỵ khí. Các nghiên cứu và báo cáo về *C.difficile* còn rất ít. Nghiên cứu tại thành phố Hồ Chí Minh, sử dụng sinh

phẩm sinh học phân tử Luminex để chẩn đoán các tác nhân đường tiêu hóa gây tiêu chảy trong 479 mẫu bệnh phẩm phân, xác định được có vai trò gây bệnh của *C.difficile*. Nghiên cứu đã phát hiện được *C.difficile* trong 9% số mẫu bệnh phẩm xét nghiệm [52]. Đây là nghiên cứu đầu tiên tại miền Nam Việt Nam ghi nhận sự có mặt của *C.difficile*. Tuy nhiên, nghiên cứu này chưa đánh giá về lâm sàng, đặc điểm dịch tễ và các típ chủng của *C.difficile*. Trong khi đó, bệnh do *C.difficile* là vấn đề rất được quan tâm của y tế thế giới đầu thế kỷ 21, có nguy cơ cao lưu hành ở nước ta do tình trạng lạm dụng kháng sinh, quá tải bệnh viện, công tác kiểm soát nhiễm khuẩn bệnh viện còn hạn chế... Ở miền Bắc Việt Nam, mới chỉ có một vài báo cáo ca lâm sàng lẻ tẻ mắc tiêu chảy do *C.difficile* [4], [9]. Một báo cáo ca lâm sàng, bệnh nhân có biểu hiện tiêu chảy kéo dài không rõ nguyên nhân, sốt, suy kiệt, thậm chí phải chỉ định soi đại tràng để loại trừ các tổn thương ác tính. Kết quả nội soi là viêm đại tràng giả mạc. Sau đó, bệnh phẩm phân của bệnh nhân được gửi đến Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, xác định tác nhân gây bệnh là *C.difficile* [4]. Các qui trình PCR xét nghiệm tìm độc tố của *C.difficile* đã được Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương nghiên cứu thành công nhưng vẫn chưa được ứng dụng rộng rãi trong thực hành lâm sàng [7], [8]. Hiểu biết về nguy cơ mắc bệnh và tử vong do *C.difficile* của y tế ở các tuyến còn hạn chế nên rất cần các nghiên cứu sâu hơn về dịch tễ và lâm sàng của bệnh do *C.difficile* tại Việt Nam.

1.2.1.3. Dự phòng và kiểm soát bệnh tiêu chảy do *C.difficile*

Tiêu chảy do *C.difficile* là bệnh lây truyền theo đường tiêu hóa, có thể gây ra những vụ dịch trong bệnh viện, do nha bào của vi khuẩn đề kháng rất cao với các chất khử khuẩn thông thường, tồn tại lâu dài trên bề mặt các vật dụng trong môi trường bệnh viện. Hiện nay chưa có vacxin cho bệnh tiêu chảy do *C.difficile*. Phát hiện sớm ca bệnh có giá trị ngăn ngừa lây truyền bệnh. Các biện pháp dự phòng được khuyến cáo là: hạn chế lạm dụng kháng sinh, rửa

tay trước và sau tiếp xúc với từng bệnh nhân, sử dụng găng tay trong xử lý chất thải, khử trùng môi trường nơi có bệnh nhân mắc tiêu chảy do *C.difficile* bằng các dung dịch khử trùng được khuyến cáo, nâng cao nhận thức của nhân viên y tế về bệnh tiêu chảy do *C.difficile* [79], [137]. Khuyến cáo rửa tay bằng xà phòng dưới vòi nước để loại bỏ các nha bào có giá trị hơn, vì rửa tay bằng cồn diệt được *C.difficile* dạng hoạt động nhưng không diệt được các nha bào của *C.difficile* [137].

1.2.2. Lâm sàng bệnh do *Clostridium difficile*

1.2.2.1. Sinh bệnh học tiêu chảy do *Clostridium difficile*

Bệnh lây truyền theo đường tiêu hoá do nuốt phải vi khuẩn *C.difficile*, thường dưới dạng nha bào. Người ta tìm thấy nha bào của *C.difficile* ở bàn tay nhân viên y tế cũng như bề mặt các vật dụng trong bệnh viện như tủ bàn đêm, nhiệt kế điện tử, vật dụng nhà tắm, tay nắm cửa... Nha bào đề kháng rất cao với các yếu tố có hại từ môi trường và thuốc khử khuẩn thông thường, đóng vai trò quan trọng trong lan truyền và tái nhiễm bệnh.

Nha bào bị nuốt phải đề kháng với axit dạ dày, nảy mầm ở hồi tràng trong môi trường giàu muối mật, đến môi trường thiếu khí của manh tràng. Ở đây, vi khuẩn đường ruột bình thường sẽ chuyển hoá dẫn xuất cholate (muối mật nguyên phát) thành deoxycholate (muối mật thứ phát), ngăn cản sự phát triển của *C.difficile* đã nảy mầm. Một ít vi khuẩn đã nảy mầm không gây hậu quả gì trong môi trường thiếu khí của manh tràng ở người khỏe mạnh. Người sử dụng kháng sinh hoặc có yếu tố làm rối loạn các vi khuẩn cư trú ở ruột gây ra sự tăng tương đối của cholate, làm nha bào *C.difficile* nảy mầm nhiều hơn, dễ cư trú, sinh độc tố và gây bệnh [85], [133]. Độc tố của *C.difficile* gây tổn thương tế bào biểu mô đại tràng, kích thích giải phóng các chất tiền viêm gây viêm đại tràng, biểu hiện từ tiêu chảy nhẹ đến phình đại tràng nhiễm độc, thủng ruột và tử vong [110]. Triệu chứng lâm sàng có thể xuất hiện sớm nhất

là 2-3 ngày sau khi *C.difficile* cư trú ở đại tràng [35]. Một số tài liệu đề cập đến thời gian ủ bệnh của tiêu chảy do *C.difficile* dao động từ ≤ 4 tuần (61%) đến ≥ 12 tuần (13%) [80]. Đồng thời, vi khuẩn tiếp tục hình thành nha bào, là yếu tố truyền nhiễm và đảm bảo sự tồn tại dai dẳng của *C.difficile*. Như vậy, bệnh nhân nhiễm *C.difficile* có thể mang mầm bệnh kéo dài. Bệnh có thể tái phát khi gặp điều kiện thuận lợi cho nha bào *C.difficile* nảy mầm, phát triển và sinh độc tố.

1.2.2.2. Các biểu hiện lâm sàng

- Tiêu chảy: là triệu chứng luôn có. Tiêu chảy điển hình xuất hiện trong hoặc ngay sau điều trị kháng sinh nhưng có thể xảy ra vài ngày tới 8 tuần sau khi ngừng kháng sinh. Số lần tiêu chảy thường ít hơn 10 lần/ngày. Phân nhiều nước, có mùi hôi đặc trưng. Phân có thể hơi lầy nhầy hay mềm (liên quan đến sự xâm nhập hoạt động của bạch cầu trung tính ở niêm mạc ruột), ít thấy máu đại thể trong phân (liên quan đến hoại tử xuất huyết tế bào biểu mô ruột).

- Viêm đại tràng giả mạc là biểu hiện đặc trưng cho bệnh do *C.difficile*. Lưu ý trường hợp hiếm, không có tiêu chảy ở người bệnh mắc *C.difficile* nặng, có liệt ruột, ngăn sự di chuyển của phân, bệnh nhân sau mổ, người được dùng thuốc giảm đau nhóm narcotic. Sốt không giải thích được, tăng bạch cầu, đau bụng ở bệnh nhân dùng kháng sinh gần đây nên được cảnh giác với nhiễm trùng do *C.difficile* dù không có tiêu chảy.

- Triệu chứng toàn thân khác có thể gặp trong nhiễm trùng do *C.difficile*:
 - + Đau và chướng bụng: đau bụng dưới âm ỉ kiểu co thắt, không có điểm đau khu trú: 22% trường hợp. Bụng chướng nhiều hơi [20]. Một số ít trường hợp có buồn nôn, nôn.
 - + Sốt: khoảng 28% trường hợp, nhiệt độ có thể tới 40°C.
 - + Tăng bạch cầu máu: gặp trong 50% trường hợp, có thể trên 50 G/L.
 - + Giảm albumin máu: ở trường hợp nặng, tiêu chảy kéo dài.

+ Suy thận: khi tiêu chảy nặng, mất nước, giảm thể tích tuần hoàn. Xét nghiệm có ure, creatinin máu tăng cao [20], [21].

❖ Các thể lâm sàng

- Người mang không triệu chứng: kể cả khi mang chủng *C.difficile* sinh độc tố. Họ thường có kháng thể IgG với độc tố của vi khuẩn.
- Tiêu chảy do *C.difficile*: tiêu chảy mức nhẹ hoặc trung bình, đôi khi có đau thắt bụng dưới, xuất hiện ngay sau dùng kháng sinh hoặc sau vài tuần, thường được cải thiện khi ngừng kháng sinh.
- Viêm đại tràng *C.difficile*: thường gặp nhất của nhiễm trùng *C.difficile* là viêm đại tràng không có giả mạc. Bệnh đôi khi nghiêm trọng với biểu hiện mệt mỏi, đau bụng, buồn nôn, chán ăn và tiêu chảy. Có thể mất nước, sốt nhẹ, tăng bạch cầu đa nhân. Có thể thấy tổn thương không đặc hiệu loang lổ hoặc viêm đại tràng từng nốt không có màng giả trên nội soi.
- Viêm đại tràng giả mạc: là biểu hiện kinh điển của bệnh do *C.difficile* toàn thể. Các mảng màu vàng kích thước từ 2 - 10mm, nằm rải rác trên niêm mạc đại trực tràng quan sát tốt nhất trên nội soi. Bạch cầu máu có thể trên 20 G/L, giảm albumin máu dưới 30g/l, đôi khi có dịch ổ bụng và chỉ liên quan đến viêm đại tràng giả mạc.
- Viêm đại tràng tối cấp: khoảng 3%, tính cho hầu hết các biến chứng nghiêm trọng gồm thủng ruột, tắc ruột kéo dài, phình đại tràng và tử vong [41]. Đau bụng dưới nghiêm trọng hoặc đau bụng lan tỏa, tiêu chảy, căng chướng bụng, đôi khi sốt cao, ớn lạnh, tăng bạch cầu. Thường rất ít tiêu chảy ở bệnh nhân tắc ruột do hậu quả của tăng tiết nhưng đại tràng giãn mất trương lực. Xquang bụng thấy ruột non giãn với mức nước hơi giống tắc ruột hay thiếu máu hoặc giả tắc ruột. Chụp cắt lớp vi tính bụng có giá trị trong trường hợp nặng, xác định vị trí đại tràng tổn thương với hình ảnh giãn đại tràng, dày đại

tràng, viêm quanh đại tràng hoặc có khí tự do trong ổ bụng. Điều trị cần phẫu thuật cấp cứu cắt đại tràng, nhưng tử vong vẫn tới 57% [41].

- Tiêu chảy liên quan đến *C.difficile* tái phát: 15% – 20% bệnh nhân sau điều trị tiêu chảy do *C.difficile* thành công lại tái xuất hiện tiêu chảy, thường trong 1 tuần sau khi ngừng kháng sinh vancomycin hoặc metronidazole [154].

1.2.2.3. Phân loại mức độ nặng tiêu chảy do *C.difficile*

Phân loại mức độ nặng giúp các thầy thuốc lâm sàng lựa chọn kháng sinh điều trị phù hợp ngay từ đầu.

- Cách phân loại thứ nhất [83]

Tính 1 điểm cho mỗi triệu chứng sau:

Tuổi >60; Sốt >38,3°C; albumin máu < 25g/l; bạch cầu máu >15G/l.

Tính 2 điểm nếu có:

Viêm đại tràng giả mạc khi soi đại tràng hoặc

Bệnh nặng cần nằm điều trị tại đơn vị hồi sức

Bệnh mức độ nặng khi có điểm ≥ 2 .

- Cách phân loại thứ hai, chia thành các thể [35], [68], [86].
 - Mắc *C.difficile* nhẹ - vừa: tiêu chảy, có thể kèm theo đau bụng.
 - Mắc *C.difficile* nặng: bạch cầu máu ≥ 15 G/l, creatinine huyết thanh tăng $\geq 1,5$ giới hạn cao của bình thường, sốt >38,3°C, albumin máu < 25g/l.
 - Mắc *C.difficile* nặng có biến chứng: tụt huyết áp, sốc, tắc ruột, phình đại tràng, thủng ruột..., bệnh cần điều trị ở đơn vị hồi sức tích cực.

- Cách phân loại thứ 3, bệnh nặng khi có dấu hiệu sau [137].

Sốt > 38,3°C; albumin máu <25g/l; bạch cầu máu >15 G/l; creatinin máu >133 μ mol/L (hoặc >1,5 lần giá trị nền)

Dù nhiều nghiên cứu cho thấy, tiêu chảy do *C.difficile* thường gặp ở người cao tuổi, bệnh nhân nằm viện điều trị nội trú, phải sử dụng kháng sinh nhưng không có một triệu chứng lâm sàng nào là đặc hiệu riêng cho tiêu chảy do

C.difficile. Cần có các xét nghiệm về vi sinh để khẳng định chẩn đoán nguyên nhân tiêu chảy do vi khuẩn *C.difficile* [42].

1.2.2.4. Các xét nghiệm chẩn đoán tiêu chảy do *C.difficile*

Hội Dịch tễ học Y tế Hoa Kỳ và Hội các bệnh truyền nhiễm Hoa Kỳ định nghĩa ca bệnh tiêu chảy do *C.difficile*: Bệnh nhân đại tiện phân lỏng ≥ 3 lần trong thời gian 24 giờ và có ít nhất một xét nghiệm sau dương tính: xét nghiệm phân tìm thấy yếu tố gây độc tế bào từ độc tố B của *C.difficile*; thử nghiệm miễn dịch men tìm thấy độc tố A hoặc độc tố B trong phân; cấy phân tìm được *C.difficile* (có xác nhận độc tố sinh vật) hoặc nội soi đại tràng/mô bệnh học có viêm đại tràng giả mạc [35], [57].

- Xét nghiệm khả năng gây độc tế bào là xét nghiệm hiện có tốt nhất, có thể phát hiện độc tố của *C.difficile* ở mức picogram, là test nhạy nhất để phát hiện độc tố B (độc tố có trong tất cả các trường hợp bệnh do *C.difficile*), với độ nhạy là 98% và độ đặc hiệu 99% trong một thử nghiệm khi so với chẩn đoán dựa trên cả tiêu chí lâm sàng kết hợp xét nghiệm, tuy không được so sánh với cấy phân tìm gen sinh độc tố của *C.difficile* [121]. Điểm bất lợi chính của xét nghiệm này là nó đòi hỏi có kỹ thuật và thời gian thực hiện khá dài (thường 24 – 48 giờ).

- Thử nghiệm miễn dịch gắn men EIAs phát hiện độc tố A hoặc cả độc tố A và độc tố B trong phân: ít nhạy bằng, bỏ qua khoảng 40% trường hợp khi so với cấy phân, độ nhạy chỉ bằng 70% - 80% so với xét nghiệm khả năng gây độc tế bào. Lưu ý là, độc tố của *C.difficile* không bền vững như nha bào nên đôi khi xét nghiệm phân bệnh nhân tiêu chảy đang hồi phục có kết quả âm tính giả.

- Cấy phân: cần thời gian 24 – 48 giờ và phải xét nghiệm tìm độc tố bằng phương pháp xác định độc tố tế bào hoặc EIAs để khẳng định đó là nguyên

nhân gây bệnh. Cây phân cho phép xác định tí phân tử của vi khuẩn, giám sát dịch tế học phân tử và đánh giá độ nhạy cảm với kháng sinh.

- Nội soi đại tràng/ mô bệnh học: có thể thấy phù nề niêm mạc, các đốm đỏ, tổn thương xuất tiết...và điển hình là các mảng màu vàng 2 – 10 mm rải rác trên niêm mạc đại trực tràng trong viêm đại tràng giả mạc. Tổn thương mô bệnh học thấy xâm nhập bạch cầu trong lớp biểu mô niêm mạc ruột, tổn thương viêm xuất tiết, xuất huyết ở bề mặt biểu mô niêm mạc, lớp collagen dưới biểu mô dày lên, xơ hóa... Một số trường hợp như viêm đại tràng collagen, khi bơm khí để nội soi đã ghi nhận thủng đại tràng do áp lực khí gây tổn thương lớp collagen dưới biểu mô bị dày và xơ cứng. Phình đại tràng nhiễm độc, đường kính ruột trên 7cm gây tăng áp lực trong lòng ruột, kèm tổn thương viêm xuất huyết hoại tử cũng gây nguy cơ thủng đại tràng.

Dù có giải thích có thể tiêu chảy là do nguyên nhân khác ở bệnh nhân có mang *C.difficile* chủng sinh độc tố không triệu chứng thì hầu hết các bác sĩ lâm sàng đều lựa chọn điều trị *C.difficile* cho bệnh nhân tiêu chảy đó hơn là kết luận rằng tiêu chảy này không liên quan đến *C.difficile* [20].

Hiện không có xét nghiệm thương mại nào vừa nhạy và đặc hiệu, với thời gian xét nghiệm ngắn mà giá thành thấp để chẩn đoán nhiễm *C.difficile*. Ở Hoa Kỳ, hơn 90% phòng xét nghiệm sử dụng EIA để chẩn đoán vì giá thành thấp, nhanh, kỹ thuật thực hiện đơn giản. Các phòng xét nghiệm ở Úc và nhiều nước châu Âu thì cây phân để sàng lọc *C.difficile* sau đó xét nghiệm khả năng gây độc tế bào hoặc EIA để phát hiện độc tố của chủng *C.difficile*.

1.2.2.5. Điều trị tiêu chảy do *C.difficile*

Ngừng kháng sinh không cần thiết hoặc thay đổi phác đồ kháng sinh có thể giải quyết được một vài trường hợp tiêu chảy do *C.difficile* mới, thậm chí một vài trường hợp viêm đại tràng giả mạc. Tuy nhiên, các hướng dẫn đều khuyến cáo cần chỉ định kháng sinh đặc hiệu cho bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile*.

Điều trị bằng kháng sinh

Metronidazole uống đã được sử dụng như điều trị chuẩn trường hợp nhiễm *C.difficile* mức độ nhẹ và vừa vì giá thành rẻ và hiệu quả, với liều 500mg x 3 lần/ngày hoặc 250mg x 4 lần/ngày, uống trong 10 ngày. Nhưng phụ nữ có thai và trẻ nhỏ, điều trị bằng metronidazole cần thận trọng. Nhiễm *C.difficile* nặng hoặc có biến chứng, khuyến cáo uống vancomycin 125mg x 4 lần/ngày trong 10-15 ngày [108]. Dù vancomycin đã được cơ quan Dược phẩm và Thực phẩm Hoa Kỳ (FDA) phê duyệt, nhưng cần lưu ý khi dùng vì nguy cơ gây đề kháng vancomycin của các chủng *Enterococci*. Metronidazole và vancomycin đều làm giảm số *C.difficile* dạng hoạt động nhưng không có tác dụng ức chế độc tố hay tác động đến dạng nha bào. Vancomycin ức chế tổng hợp thành vi khuẩn và metronidazole gây tổn thương DNA của vi khuẩn. Một số ca thất bại và một số trường hợp tái phát cho thấy cần có kháng sinh mới trong điều trị. Fidaxomicin là điều trị được lựa chọn vì nồng độ thuốc trong phân cao hơn, ít tác động đến quần thể vi sinh vật cư trú so với vancomycin. Tuy nhiên giá thành nó đắt hơn metronidazole 120 lần và hơn vancomycin 3 lần. Một số tài liệu khác cho rằng uống teicoplanin hay tigercyclin cũng có hiệu quả. Một số kháng sinh khác cũng có tác dụng như rifaximin, ramoplanin, rifalazil và nitazoxanide, nhưng chưa có mặt tại Việt Nam.

Trong hướng dẫn chẩn đoán và điều trị gần đây nhất, năm 2017 của Hội các bệnh Truyền nhiễm Hoa Kỳ (IDSA) và Hội Dịch tễ Y tế Hoa Kỳ (SHEA), metronidazole không còn là lựa chọn đầu tiên nữa, do sự tái phát cao sau điều trị. Fidaxomicin được khuyến cáo lựa chọn do thuốc có tác dụng kéo dài, giảm tái phát sau điều trị, ít ảnh hưởng đến hệ vi sinh đường ruột [163].

Điều trị bằng lợi khuẩn probiotic đường ruột

Mật độ vi sinh vật sống trong đường tiêu hóa là nhiều nhất trong cơ thể, ước tính khoảng 10^{14} vi khuẩn, với hàng ngàn loài khác nhau [58]. Đường tiêu

hoá trẻ sơ sinh là vô khuẩn khi lọt lòng, nhanh chóng được cư trú bởi hàng loạt các vi khuẩn ở ruột. Lúc đầu là các vi khuẩn kỵ khí do áp lực oxy trong lòng ruột thấp hơn. Đa dạng của hệ vi khuẩn tăng lên theo tuổi và chế độ ăn trong năm tiếp theo, dần trở nên ổn định. Hệ vi sinh đường ruột rất khó bị thay đổi vì hệ thống miễn dịch sẵn có đã dung nạp với các vi khuẩn đang cư trú và ngăn ngừa sự xâm chiếm của các vi sinh vật mới. Khi các lợi khuẩn probiotic được đưa vào qua đường uống, các thành phần của vi khuẩn chỉ đường ruột chỉ thay đổi tạm thời và sẽ quay lại trạng thái ổn định cũ khi các chế phẩm sinh học ngừng lại. Dù sao, lợi khuẩn probiotic cũng từng được sử dụng như một biện pháp điều trị tiêu chảy do *C.difficile* liên quan đến kháng sinh. Một phân tích trên Cochran kết luận “có bằng chứng mức độ vừa cho thấy probiotic là an toàn và hiệu quả để phòng tiêu chảy liên quan đến *C.difficile*” [59]. Các vi khuẩn như *Bifidobacterium* và *Lactobacillus* spp. có thể ức chế sự bám dính của độc tố *C.difficile* vào tế bào biểu mô đại tràng và có thể kích thích đáp ứng miễn dịch của tế bào vật chủ. *Lactobacillus* có thể tác động kháng khuẩn trực tiếp bằng cách tiết ra bacteriocins và các peptid kháng khuẩn khác. Tuy nhiên, gần đây một số nghiên cứu lại cho rằng, các lợi khuẩn đường ruột không có vai trò trong điều trị tiêu chảy do *C.difficile*, thậm chí có báo cáo tiền sử dùng lợi khuẩn đường ruột gặp nhiều hơn ở nhóm tiêu chảy do *C.difficile* so với nhóm tiêu chảy không do *C.difficile* [28].

Điều trị bằng cấy ghép phân

Cho rằng nhiễm trùng do *C.difficile* là do suy giảm hệ vi sinh đường ruột khỏe mạnh sau khi sử dụng kháng sinh, nên việc thay thế các “vi khuẩn tốt” bị mất bằng những vi khuẩn lấy từ người khỏe mạnh trở nên hợp lý. Vi khuẩn từ phân của người khỏe mạnh được đưa vào đại tràng của bệnh nhân bị nhiễm *C.difficile* bằng cách thụt. Một bài báo mang tính bước ngoặt trong tạp chí “The New England Journal of Medicine” báo cáo tỉ lệ thành công tới 80% các

trường hợp nhiễm *C.difficile* tái phát bằng truyền phân người khỏe mạnh vào tá tràng so với điều trị vancomycin [156].

Các điều trị khác: Bồi phụ nước, điện giải, dinh dưỡng. Một số trường hợp nặng như phình đại tràng nhiễm độc, thủng ruột cần phải phẫu thuật cấp.

1.3. Yếu tố nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile*

Người mắc tiêu chảy do *C.difficile* khi có một số yếu tố: Một là, người đó bị nhiễm nha bào của chủng *C.difficile* sinh độc tố qua đường tiêu hóa. Hai là, có sự thay đổi của quần thể vi sinh vật thông thường đang có của đại tràng, cho phép *C.difficile* cư trú, phát triển và sinh độc tố. Cả mô hình động vật và nghiên cứu trên người đều cho thấy sự tương tác giữa vi khuẩn với tế bào niêm mạc ruột chịu ảnh hưởng rất lớn của tổ hợp các vi sinh vật đường ruột [25], [27]. Ba là, hệ thống miễn dịch của vật chủ bị thay đổi, với bằng chứng là tỉ lệ mắc bệnh cao hơn, bệnh nặng hơn ở người cao tuổi và người có hệ miễn dịch không đáp ứng hiệu quả [27], [105]. Kháng thể kháng độc tố có tác dụng bảo vệ, giải thích đáp ứng khác nhau ở các cá thể có hệ miễn dịch khác nhau [27], [83]. Đã tìm thấy kháng thể IgG kháng độc tố A ở người mang *C.difficile* không triệu chứng cao gấp 3 lần bệnh nhân mắc tiêu chảy do *C.difficile* [158].

1.3.1. Yếu tố vật chủ

Các yếu tố của vật chủ có nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* gồm: Tuổi cao, có mang bệnh lý mạn tính, đáp ứng miễn dịch của vật chủ bị suy yếu.

- **Tuổi cao**

Tuổi cao là yếu tố nguy cơ quan trọng gây mắc tiêu chảy do *C.difficile*, với 70% – 80% các trường hợp xảy ra ở người 65 tuổi hoặc hơn [12]. Theo các điều tra dịch tễ học, hệ vi khuẩn chí của người nhiều tuổi khi có mang *C.difficile* thì hầu hết là các chủng sinh độc tố, tỉ lệ chủng không sinh độc tố chỉ chiếm số ít. Bệnh nhân nằm viện mang *C.difficile* trên 60 tuổi, chủng không sinh độc tố chỉ chiếm 6,9%, trong khi bệnh nhân dưới 20 tuổi, chủng

không sinh độc tố là 22,8% [117]. Theo định nghĩa nêu trên, chỉ chủng *C.difficile* sinh độc tố mới có thể gây bệnh. Người khỏe mạnh mang *C.difficile*, 42% - 50% các chủng là không sinh độc tố. Một nghiên cứu tại Thụy Điển tìm thấy độc tố của *C.difficile* ở người trên 60 tuổi cao hơn 20 – 100 lần so với người nhóm 10 – 20 tuổi [19], [35], [81].

Nhiều nghiên cứu trên thế giới cho thấy bệnh nhân trên 65 tuổi có nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* cao hơn nhóm người dưới 65 tuổi, với RR = 8,65 (95% CI, từ 8,16 – 9,31) [20], [97], [101].

Tuổi cao cũng là yếu tố nguy cơ làm tăng nặng bệnh với nhiều biến chứng và tử vong. Tỷ lệ tử vong ở người già yếu mắc bệnh do *C.difficile* có thể lên tới 25% [154]. Thống kê năm 2008 tại Hoa Kỳ, 93% những trường hợp tử vong do *C.difficile* xảy ra ở bệnh nhân >65 tuổi và bệnh do *C.difficile* là nguyên nhân tử vong đứng hàng thứ 18 của lứa tuổi này [44], [115].

- **Có mắc bệnh mạn tính**

Người mắc bệnh mạn tính kèm theo như suy gan, suy thận, ghép tạng, đại tháo đường, bệnh ruột viêm... có nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* cao hơn. Lý giải không hoàn toàn rõ ràng, nhưng những bệnh nhân này thường có hệ miễn dịch thiếu hụt. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh, thiếu hụt của hệ miễn dịch làm giảm lượng IgG của niêm mạc ruột với *C.difficile*, làm cơ thể dễ cảm thụ và mắc bệnh. Mắc nhiều bệnh mạn tính, phải sử dụng nhiều thuốc, cơ thể dễ nhiễm khuẩn phải dùng kháng sinh... hoặc phải vào viện, tiếp xúc với môi trường y tế... đều làm tăng nguy cơ mắc bệnh. Có bệnh mạn tính có thể là một yếu tố trong sự phối hợp của nhiều yếu tố nguy cơ [44].

Trong một bài tổng quan phân tích gộp cho thấy người mắc bệnh thận mạn tính và bệnh thận giai đoạn cuối là yếu tố nguy cơ cho tiên lượng xấu ở bệnh nhân nhiễm trùng *C.difficile*. Suy giảm chức năng của hệ miễn dịch như giảm số lượng và chức năng của tế bào lympho đã được ghi nhận ở bệnh nhân mắc bệnh thận mạn và tăng ure máu. Bệnh nhân mắc bệnh thận mạn khi bị nhiễm

trùng do *C.difficile* có nguy cơ cao biến chứng như phình đại tràng nhiễm độc, cần phẫu thuật cắt bỏ đại tràng. Các nghiên cứu cũng cho thấy tần suất mắc bệnh do *C.difficile* và thời gian nằm viện ở bệnh nhân có bệnh thận mạn tính cao hơn, làm gia tăng tử vong lâu dài [152].

Người suy giảm miễn dịch

Ở người lớn, khả năng tạo kháng thể kháng lại độc tố *C.difficile* có vai trò quan trọng trong việc bảo vệ cơ thể, ngăn ngừa xuất hiện bệnh do *C.difficile*. Sử dụng corticoid kéo dài, phải dùng thuốc ức chế miễn dịch hoặc người nhiễm HIV... có suy giảm của hệ miễn dịch, nguy cơ tiêu chảy do *C.difficile* cũng gia tăng. Khi hệ miễn dịch suy giảm, sinh kháng thể immunoglobulin kháng độc tố A của *C.difficile* không đầy đủ. Nồng độ kháng thể kháng độc tố A của *C.difficile* cao có vai trò bảo vệ, chống lại sự phát triển tiêu chảy do *C.difficile* [126]. Suy giảm miễn dịch không chỉ làm tăng khả năng nhiễm trùng do *C.difficile* mà còn làm tăng tái nhiễm [46], [80].

Một số tình trạng sức khỏe đặc biệt

Có những báo cáo ghi nhận một số yếu tố khác cũng làm tăng khả năng mắc tiêu chảy do *C.difficile* gồm: phụ nữ thời kỳ chu sản, người phải phẫu thuật và can thiệp đường tiêu hoá... [80], [97], [126].

1.3.2. Yếu tố bên ngoài

Nằm viện điều trị nội trú làm tăng phơi nhiễm với *C.difficile* và làm tăng nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile*. Nhiễm chủng *C.difficile* có độc lực mạnh cũng làm tăng nguy cơ diễn biến nặng. Các yếu tố làm rối loạn hệ vi khuẩn chí đường ruột cũng làm tăng nguy cơ phát triển và gây bệnh của *C.difficile* như: dùng kháng sinh kéo dài, dùng thuốc ức chế axit dạ dày, các thuốc gây suy giảm hệ miễn dịch (corticoid, thuốc điều trị ung thư...).

- **Tiếp xúc với nguồn vi khuẩn *C.difficile* khi nằm viện**

Ổ chứa chính của *C.difficile* là bệnh nhân và người mang *C.difficile*, môi trường và bề mặt bị nhiễm *C.difficile* trong bệnh viện và các cơ sở chăm sóc y tế. Tỷ lệ mang *C.difficile* ở người khỏe mạnh trong cộng đồng không cao, nhưng ở người lớn nằm viện >1 tuần, thì tỷ lệ này là $\geq 20\%$ [79]. Người ta tìm thấy *C.difficile* ở bàn tay nhân viên y tế, bề mặt môi trường bệnh viện như tủ bàn đêm, nhiệt kế điện tử, vòi tắm... dưới dạng nha bào, là dạng có sức đề kháng cao và là nguồn lây nhiễm cho bệnh nhân nằm viện. Dù có làm vệ sinh bệnh phòng thường xuyên, vẫn thấy 8% mẫu cấy từ các vật dụng trong bệnh phòng nhiễm nha bào *C.difficile*. Ở phòng bệnh nhân mang *C.difficile* có triệu chứng và không triệu chứng thì tỷ lệ này là 49% và 29% [128]. Bệnh nhân nằm viện có tỷ lệ mang *C.difficile* ở đường tiêu hóa cao hơn (10%-25%) so với người khỏe mạnh ở cộng đồng (2%-3%) [20]. Các nghiên cứu dịch tễ cho thấy, 10% - 26% bệnh nhân nằm viện có nguy cơ cao trở thành người mang *C.difficile* khi có sử dụng kháng sinh [154]. Dữ liệu từ Chương trình các bệnh nhiễm khuẩn mới nổi của CDC năm 2010 cho thấy, 94% tiêu chảy do *C.difficile* có liên quan đến chăm sóc y tế, dù 75% các ca bệnh xảy ra ở ngoài bệnh viện, gồm các bệnh nhân vừa ra viện trong thời gian gần, bệnh nhân điều trị ngoại trú, bệnh nhân có tiếp xúc với nhân viên y tế, người ở trong các cơ sở chăm sóc dài hạn... [44].

Nằm viện kéo dài làm tăng nguy cơ mắc *C.difficile*. Thời gian trung bình để có thể mang *C.difficile* khi nằm viện là khoảng 2 tuần [131]. Một nghiên cứu cho thấy, nguy cơ xuất hiện *C.difficile* cư trú trong đại tràng tăng tương đối theo thời gian nằm viện, từ <1% ở bệnh nhân nằm viện < 1 tuần tăng lên 50% ở những bệnh nhân phải nằm viện > 4 tuần, gợi ý việc tiếp xúc với *C.difficile* trong suốt thời gian nằm viện [79],[126]. Nghiên cứu của Ingle (2013) cho thấy, nằm viện ở khoa Hồi sức tích cực cũng làm tăng nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* với OR = 4,47 (p=0,011) [76]. Tiêu chảy do *C.difficile* trong các

đơn vị hồi sức đặc biệt được quan tâm vì nguy cơ xuất hiện các biến chứng và nguy cơ lây truyền giữa các bệnh nhân, có liên quan đến chăm sóc y tế [24].

Ở Việt Nam, một nghiên cứu cho thấy, chỉ có 4/12 chất khử khuẩn hiện đang được sử dụng trong các bệnh viện tuyến tỉnh và trung ương có khả năng ức chế nha bào của *C.difficile* [74], càng chứng minh cho khả năng tồn tại của *C.difficile* trong môi trường bệnh viện là rất cao.

• Độc lực của chủng vi khuẩn *C.difficile*

Độc lực của một số chủng *C.difficile* có ảnh hưởng lớn đến sự lây truyền, làm tăng nguy cơ mắc bệnh, gây dịch trong bệnh viện, tăng nguy cơ bệnh nặng và tử vong. Có sự gia tăng đột biến số ca bệnh tiêu chảy do *C.difficile* đầu thế kỷ 21 tại các nước châu Mỹ và châu Âu liên quan đến chủng *C.difficile* độc lực cao NAP1/027/BI. Do có nhiều phương pháp khác nhau xác định tí sinh học phân tử của *C.difficile* tùy theo từng vùng trên thế giới nên chủng gây dịch này có nhiều tên gọi, như: NAP1 (North American pulsed-field type 1), ribotype 027 hay BI (REA type BI, toxinotype III). Tại Bắc Mỹ, chủng NAP1 được ghi nhận nhiều hơn ở bệnh nhân có liên quan đến chăm sóc y tế so với bệnh nhân mắc từ cộng đồng (30,7% và 18,8%) [101].

Một chủng *C.difficile* khác cũng gây nên những vụ dịch ở châu Âu là chủng 078, toxinotype V cũng sản xuất ra độc tố A, độc tố B và độc tố kép như chủng 027. Nghiên cứu từ 2/2005 - 2/2008 tại Hà Lan ghi nhận mức độ nặng trên lâm sàng của các ca tiêu chảy do *C.difficile* chủng 078 tương tự như chủng NAP1/027. Chủng này ngày càng gặp nhiều hơn, gia tăng từ 3% lên 13%, thường ở bệnh nhân trẻ hơn và ở nhóm bệnh nhân nhiễm phải từ cộng đồng [60]. Các nghiên cứu cho thấy, bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* có sinh độc tố kép (binary toxin – CDT) có nguy cơ tử vong cao hơn mắc chủng *C.difficile* không sinh độc tố kép, với RR = 1,8 (95% CI 1,2 – 2,7) [16].

Tại châu Á, chủng *C.difficile* mang kiểu gen ribotype 027 chỉ có rải rác ở

Singapore, Hồng Kông, Hàn Quốc và Nhật Bản [36]. Tuy nhiên, các nghiên cứu ghi nhận chủng 017 sinh độc tố A-B+ thường gặp và gây bệnh nặng ở các nước Đông Á như Hàn Quốc, Trung Quốc, Nhật Bản, Đài Loan và các nước Đông Nam Á như Thái Lan, Lào, Malaysia... chiếm 23% – 48% các chủng sinh độc tố [36], [56], [75]. Một ribotype khác của *C.difficile* là 018 cũng được ghi nhận gây dịch ở Tokyo và Hàn Quốc [37], [139]. Nói chung, các chủng *C.difficile* thường gặp ở châu Á là chủng 017 và chủng smz/018 [61].

- **Sử dụng kháng sinh**

Kháng sinh làm tăng nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* trong thời gian điều trị cho tới 3 tháng sau khi đã ngừng điều trị. Nguy cơ cao nhất là trong khi dùng kháng sinh đến 1 tháng sau khi ngừng kháng sinh [44], [80].

C.difficile không chịu tác động của hầu hết các loại kháng sinh, trong khi các kháng sinh có thể gây rối loạn hệ vi khuẩn chí đường ruột (liên quan đến mức độ thường xuyên dùng kháng sinh và loại kháng sinh sử dụng) tạo điều kiện cho *C.difficile* phát triển, sinh độc tố và gây bệnh. Kháng sinh có nguy cơ cao nhất gây tiêu chảy do *C.difficile* là cephalosporins, amino-penicillins và clindamycin. Trong một số vụ dịch bùng phát gần đây, kháng sinh fluoroquinolons, đặc biệt là fluoroquinolons phổ rộng có liên quan với nguy cơ mắc bệnh do *C.difficile* chủng gây dịch NAP1/027. Giả thuyết là các chủng *C.difficile* gây dịch đề kháng với fluoroquinolons có lợi thế cạnh tranh với vi khuẩn bị tác động của fluoroquinolons và tăng nguy cơ gây bệnh [60].

- **Sử dụng thuốc ức chế bơm proton**

Sử dụng thuốc ức chế bơm proton cũng được coi là một yếu tố nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* [46], dù điều này còn đang gây tranh cãi [80]. Giảm axit dạ dày dẫn đến giảm khả năng tiêu diệt các vi sinh vật xâm nhập vào đường tiêu hoá, gồm cả *C.difficile*, làm tăng khả năng xâm nhập vào ruột non của các vi sinh vật gây bệnh [154].

Muối mật có vai trò trong sự phát triển nha bào thành *C.difficile* thể hoạt động. Thuốc ức chế tiết axit gây rối loạn hệ vi khuẩn đường ruột, làm thay đổi

nồng độ axit mật tự do, tạo điều kiện cho nha bào *C.difficile* phát triển thành thể hoạt động gây bệnh. Mất cân bằng hệ vi khuẩn đường ruột cũng tạo môi trường thuận lợi cho sự cư trú tại đường tiêu hoá của *C.difficile*.

Một số nghiên cứu cũng cho thấy, các thuốc ức chế tiết axit dạ dày cũng làm giảm hoạt động của bạch cầu trung tính ở ruột, có thể ảnh hưởng đến cơ chế bảo vệ của cơ thể với *C.difficile* [18], [44].

- **Sử dụng các hoá chất điều trị ung thư, thuốc ức chế miễn dịch**

Hoá chất sử dụng trong điều trị ung thư, gồm carboplatin, cisplatin, cyclophosphamid, doxorubicin, methotrexate, paclitaxel, vinorelbine, và 5 – fluorouracil... có thể làm thay đổi hệ vi sinh đường ruột bình thường của cơ thể vật chủ, tạo điều kiện cho *C.difficile* xâm nhập, phát triển và gây bệnh.

Một cơ chế khác là hoá chất điều trị ung thư có thể gây tổn thương viêm nặng, hoại tử ruột, thúc đẩy tạo môi trường kỵ khí trong đường tiêu hoá, giảm sự suy thoái của độc tố *C.difficile*, trì hoãn tái lập hệ vi sinh cơ sở của vật chủ.

Bệnh nhân dùng thuốc ức chế miễn dịch thường không tạo ra lượng kháng thể IgG hiệu quả chống lại độc tố A của *C.difficile* [154]. Bệnh do *C.difficile* thường dễ xảy ra ở các khoa hồi sức tích cực và ung bướu, nơi sử dụng kháng sinh phổ rộng và các thuốc ức chế miễn dịch [154].

1.4. Đặc điểm phân bố kiểu gen của *Clostridium difficile*

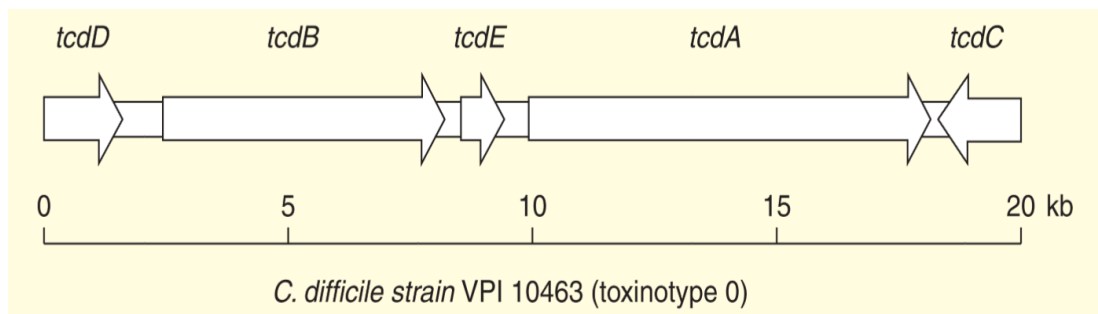
1.4.1. Cấu trúc phân tử của *Clostridium difficile*

Kích thước hệ gen của vi khuẩn *C.difficile* là 4.290.252 bp, tỉ lệ G+C toàn bộ hệ gen khoảng 29%. Cũng như nhiều vi khuẩn khác, *C.difficile* chứa nhiều plasmid với các kích thước khác nhau từ 2,7 x 10⁶ bp đến 100 x 10⁶ bp, tuy nhiên các plasmid này không liên quan đến sinh độc tố, cũng như không có gen độc tố nằm trên phage [133].

Các chủng của *C.difficile* được xếp vào hai nhóm chính: PCR ribotype và toxinotype. Nhóm đầu là kiểu gen 16S-23S rRNA và nhóm hai là để nhận diện gen sinh độc tố. Phân tích PCR đa hình chiều dài đoạn gen gây bệnh

PaLoc bọc lỏ *C.difficile* có 31 toxinotype. Sự chèn vào, xoá đi hoặc đột biến của mỗi toxinotype khi so sánh với chủng VPI 10463 (toxinotype 0) sẽ được đặc điểm hoá cho từng loại toxinotype [133].

Trật tự gen sinh độc tố A và B trong vùng gây bệnh PaLoc:



Hình 1.5: Sơ đồ biểu diễn mã vùng gen gây bệnh PaLoc của *C.difficile* *tcdA*, *tcdB* và ba gen bổ xung của chủng VPI 10463, toxinotype 0 [133]

Vùng gen gây bệnh của *C.difficile* (PaLoc) là vùng gen có chứa 19,6 kb gồm 5 gen: *tcdA* (mã hoá tạo độc tố A gồm 8,130 nucleotit), *tcdB* (mã hoá tạo độc tố B gồm 7.098 nucleotit) và ba gen kết hợp thêm là *tcdC* (điều hoà âm gồm 696 nucleotit), *tcdD* (điều hoà dương gồm 552 nucleotit) và *tcdE* (protein dạng lỗ, giống lỗ thủng gồm 498 nucleotit) [73], [133].

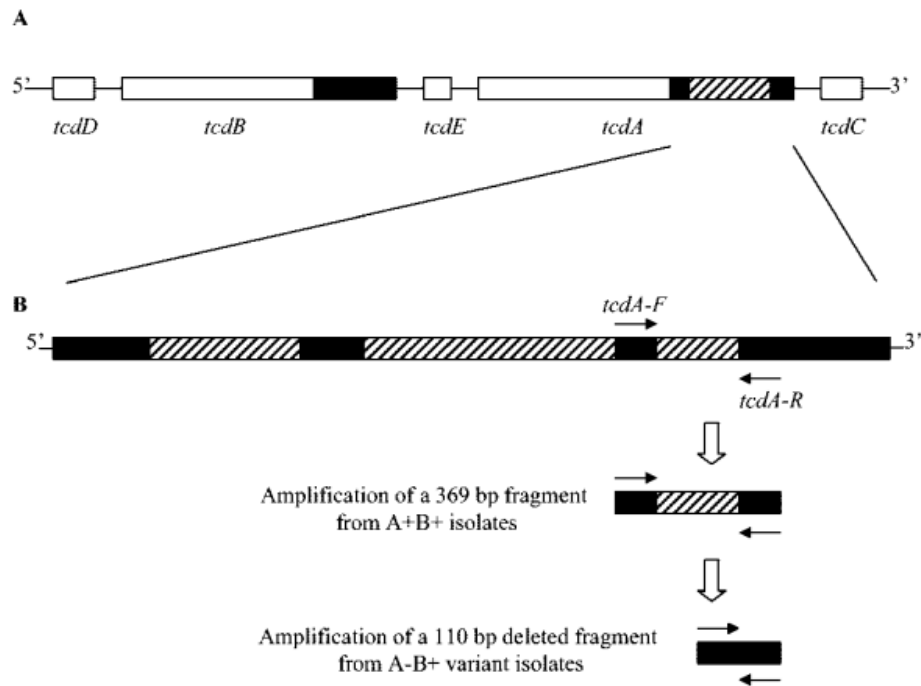
Các chủng không chứa một PaLoc nguyên vẹn, không sản xuất độc tố A và độc tố B, biểu hiện sự rối loạn của gen *tcdA* và *tcdB*, không có đủ độc tố sinh học để gây bệnh. Những chủng này mang kiểu hình “phenotypically” không gây độc. Ví dụ chủng M90 chứa PaLoc không tạo mức độc tố để có thể phát hiện được, có lẽ do sự sao chép gen kém. Một chủng khác phân loại toxinotype IX hay ribotype 033 chứa một đoạn gen *tcdA* nhưng không sản sinh được độc tố A hoặc độc tố B [117].

TcdA và *tcdB* chứa 63% của chuỗi axit amin tương tự nhau và có 4 miền chức năng: miền xúc tác N-terminal, một protease tự xúc tác cysteine, miền chuyển vị trí màng kỵ nước và miền liên kết thụ thể C-terminal. Một số bằng

chúng cho thấy chỉ cần *tcdB* đơn độc có thể gây độc tính nhưng gần đây nhiều tài liệu cho rằng cả hai độc tố đều quan trọng.

Kỹ thuật PCR đa môi đồng thời xác định 2 tính chất, bao gồm xác định loài *C.difficile* và xác định chủng *C.difficile*. Trên người chủ yếu ghi nhận 3 chủng *C.difficile*: A+B+, A-B+ và A-B-. Sự khác biệt là do đột biến mất đoạn 1,8 kb ở vùng lặp lại của gen sinh độc tố A, ở đầu 3' cho ra hai loại sản phẩm khuếch đại là 369bp cho chủng A+B+ và 110bp cho chủng A-B+. Có 3 cặp môi được thiết kế như sau:

- Cặp môi *tpi* (triose phosphate isomerase – một gen housekeeping). Môi *tpi* có trình tự (*tpi-F* [5'-AAAGAAGCTACTAAGGGTACAAA-3'] và *tpi-R* [5'-CATAATATTGGGTCTATTCCTAC-3']), được trích ra từ một đoạn của gen *tpi*. Gen *tpi* tạo ra một đoạn khuếch đại 230 bp đặc hiệu cho *C.difficile*, giúp phân biệt *C.difficile* với các loài *Clostridium* khác.
- Cặp môi đặc hiệu *tcdA* được thiết kế từ vùng 3' của gen *tcdA* có khả năng biến chủng. Nó tạo ra sản phẩm khuếch đại có kích thước 369bp của chủng A+B+ và sản phẩm khuếch đại có kích thước 110bp của chủng A-B+. Trình tự cặp môi đặc hiệu *tcdA* không giống các vùng khác của gen *tcdA*: (*tcdA-F* [5'-AGATTCCTATATTTACATGACAATAT-3'] và *tcdA-R* [5'-GTATCAGGCATAAAGTAATATACTTT-3']).
- Cặp môi đặc hiệu *tcdB*, được thiết kế từ vùng 5' bảo thủ của gen *tcdB*, có trình tự (*tcdB-F* [5'-GGAAAAGAGAATGGTTTTATTAA-3'] và *tcdB-R* [5'-ATCTTTAGTTATAACTTTGACATCTTT-3']), tạo ra sản phẩm khuếch đại có kích thước 160bp.



Hình 1.6: Vị trí của cặp mồi *tcdA* cho phép phân biệt chủng A+B+ và chủng A-B+ [98]

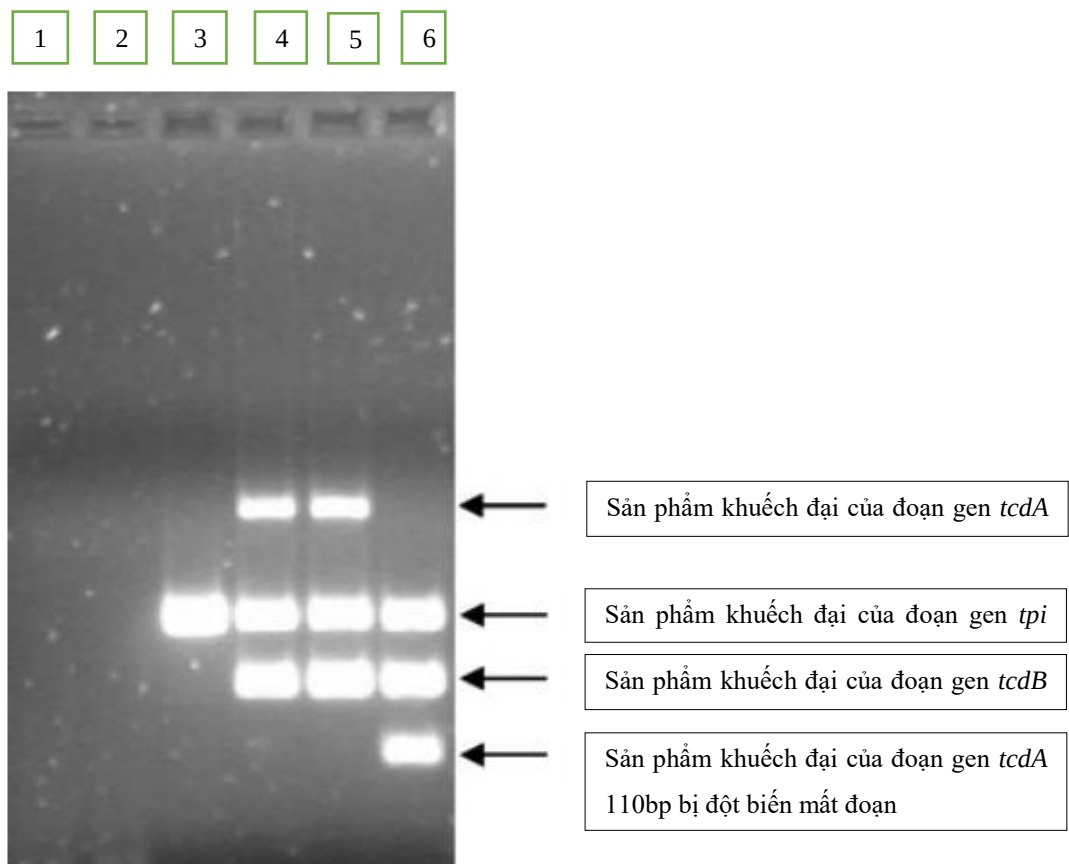
A: phần bản đồ *PaLoc* với gen *tcdA* và *tcdB* và các gen điều hòa *tcdD*, *tcdE* và *tcdC*. Vùng đen đại diện cho chuỗi lặp lại 3' đặc trưng cho gen *tcdA* và *tcdB* của vi khuẩn *C.difficile*. Phần gạch chéo thể hiện cho vùng bị xóa bỏ 1,8kb của hầu hết các chủng A-B+.

B: Chi tiết của sự xóa bỏ 1,8kb, là tổng hợp của xóa bỏ ba vùng nhỏ (các vùng gạch chéo). Cặp mồi *tcdA* tính từ đoạn mất đi nhỏ nhất (ở đầu 3' của gen), tạo nên đoạn khuếch đại 369bp của chủng A+B+ nhưng chỉ tạo đoạn 110bp cho biến chủng A-B+.

Gen sản xuất độc tố A và độc tố B (*tcdA* và *tcdB*) nằm gần các gen kiểm soát hoạt động của chúng *tcdC* và *tcdD* và/hoặc sự giải phóng các dạng sinh học của độc tố (*tcdE*). Vùng 19,6kb của bộ gen *C.difficile* được gọi là locus gây bệnh (*PaLoc*). Sự trình bày gen trên chuỗi *PaLoc* thể hiện sự diễn biến phụ thuộc. Trong giai đoạn bắt đầu tiến triển, mức cao của *tcdC* và mức thấp của *tcdA*, *tcdB* thì *tcdD* sẽ được sao chép. Đến giai đoạn ngừng thì điều ngược lại xảy ra, đưa đến giả thuyết là *tcdC* và *tcdD* có vai trò điều hòa âm và điều hòa dương sản xuất độc tố [47].

Trong chủng đột biến, gen *tcdC* bị xóa mất một nucleotid đơn nên tạo ra kiểu hình protein cắt ngắn. Điều này được cho là làm loại bỏ giai đoạn ngắt

sản xuất độc tố, được ghi nhận như ở chủng NAP1/BI/027. Chủng này mang toxinotype III, mất 18-bp trong gen *tcdC* (gen điều hòa âm việc sản xuất độc tố A và B) và có sự xóa bỏ của vị trí 117, gây thay đổi hình dạng và ngừng sớm, dẫn đến protein *tcdC* bị cắt ngắn. Chủng này sản xuất nhiều độc tố hơn trên in vitro, là nguyên nhân gây bệnh nặng hơn. Trong mô hình ruột, chủng *C.difficile* gây dịch này sản xuất độc tố trong thời gian dài, tạo nhiều độc tố trong một đơn vị thời gian, được cho là do mất cơ chế điều hòa âm.



Hình 1.7: Phân biệt 3 chủng A+B+, A-B+, A-B- bằng kỹ thuật PCR đa mồi [98]

1. *Clostridium bifermentans* 2. *C.sordellii*

3. *C.difficile* A-B-

4.5. *C.difficile* A+B+

6. *C.difficile* A-B+

1.4.2. Sự phân bố một số kiểu gen của *C.difficile*

Có khoảng 116 kiểu gen *C.difficile* dựa vào các đột biến ở vùng gen mã hóa các độc tố khác nhau [27]. Khoảng vùng gen 16S-23S của tổ hợp gen RNA trên ribosom của *C.difficile*, phát hiện bằng kỹ thuật PCR ribotyping

được sử dụng phổ biến ở châu Âu để xác định kiểu gen ribotype của *C.difficile*. Các vùng dịch tễ khác nhau, ở các thời điểm khác nhau thì lưu hành các kiểu gen *C.difficile* khác nhau.

Gia tăng số ca tiêu chảy do *C.difficile* tại các bệnh viện ở châu Mỹ và châu Âu vào đầu thế kỷ 21 đặt ra câu hỏi, liệu có sự thay đổi về dịch tễ và nguy cơ mới cho sự bùng phát của bệnh không? Thực tế là có sự xuất hiện gia tăng của một số chủng *C.difficile*. Chủng 027 đã tăng đột biến (chiếm < 1% các chủng *C.difficile* lưu hành trước năm 2000 ở Hoa Kỳ), phân lập được ở tất cả các tỉnh của Canada và hơn 40 bang của Hoa Kỳ [56], lan rộng ra khắp thế giới và có liên quan đến sự gia tăng mức độ nặng, nhiều tái phát và tử vong cao. Chủng này mang toxinotype III, mất 18-bp trong gen *tcdC* (gen điều hòa âm việc sản xuất độc tố A và B), có sự xóa bỏ của vị trí 117, gây thay đổi hình dạng và ngừng sớm, dẫn đến protein *tcdC* bị cắt ngắn. Trong mô hình ruột, chủng 027 của *C.difficile* sản xuất rất nhiều độc tố trong thời gian dài, được cho là do mất cơ chế điều hòa âm. Chủng này cũng sản xuất độc tố kép, tạo nên một mạng lưới dày đặc trên bề mặt tế bào biểu mô ruột, làm tăng bao bọc và bám dính của *C.difficile* với tế bào biểu mô ruột, tăng khả năng gây bệnh. Chủng gây dịch này, cũng được gọi là NAP1 (North American pulsed-filed type 1), REA (restriction endonuclease analysis) nhóm BI và ribotype 027 (thường được gọi là BI/NAP1/027) giảm nhạy cảm với fluoroquinolone hơn so với các chủng *C.difficile* khác [56]. Nghiên cứu ở Canada cho thấy, tử vong ở bệnh nhân mắc chủng 027 cao gấp đôi so với các chủng khác. Một số chủng *C.difficile* sinh độc tố kép thường gây các vụ dịch là chủng 027 lưu hành ở châu Mỹ và châu Âu, chủng 078 ở châu Âu và chủng 244 ở châu Đại dương. Các chủng này chỉ thấy lẻ tẻ ở một vài nước của châu Á [37].

Tại châu Âu, tháng 7/2005, *C.difficile* mang kiểu gen ribotype 027 gây bệnh ở bệnh viện Harderwijk, Hà Lan làm tăng số bệnh nhân tiêu chảy do

C.difficile từ 4 lên 83/100.000 trường hợp nhập viện. Ngay sau đó, Hà Lan đã thành lập chương trình giám sát *C.difficile* quốc gia, cùng 1 nghiên cứu giám sát kéo dài 4 năm, từ năm 2006. Tỷ lệ mắc *C.difficile* ổn định, đồng thời tỷ lệ chủng 027 đã giảm xuống, còn 3%, trong khi chủng 001 tăng lên 27,5%. Tháng 9/2005, chủng 027 cũng phân lập được ở bệnh nhân trong bệnh viện của Bỉ. Tháng 7/2008, chủng 027 đã tìm thấy trên 16 nước châu Âu, gây các vụ bùng phát ở Bỉ, Đức, Phần Lan, Pháp, Ai-xơ-len, Luc-xăm-bua, Hà Lan, Thụy Sĩ và Vương quốc Anh... Sau đó, chủng 027 cũng được ghi nhận có mặt ở Áo, Đan Mạch, Thụy Điển, Na-uy, Hung-ga-ry, Ba Lan và Tây Ban Nha [56]. Năm 2008 – 2009, các ribotype phổ biến nhất ở Anh là ribotypes 027 (36%), 106 (13%), và 001 (7%). Phân tích đa biến của mạng lưới *C.difficile* châu Âu cho thấy chỉ có ribotype 027 có mối liên quan độc lập với tử vong (OR = 1,9; $p < 0,001$). Sau đó, số trường hợp mắc và tử vong do *C.difficile* giảm hẳn, do đã kiểm soát thành công chủng 027.

Ở châu Âu, khi chủng 027 được kiểm soát thì chủng 078 có sự gia tăng. Từ năm 2005, chủng 078 của *C.difficile* đã tăng lên trong cộng đồng và cả trong bệnh viện [60]. Nghiên cứu tại Hà Lan từ năm 2005 – 2008, tỷ lệ chủng 078 gây tiêu chảy *C.difficile* đã tăng từ 3% lên 13%, với những bệnh nhân tuổi trẻ hơn, mắc phải nhiều hơn từ cộng đồng [60]. Ngoài chủng 078, chủng 014/020 và 001 cũng là những chủng trong cộng đồng thường gặp. So với bệnh nhân nhiễm chủng NAP1/027/BI thì bệnh nhân nhiễm chủng 078 có xu hướng trẻ hơn và ít có bệnh phổi hợp hơn, ở người hay được sử dụng fluoroquinolones hơn (giống chủng 027).

Các vùng dịch tễ khác nhau lưu hành các chủng *C.difficile* khác nhau. Nhưng ngày nay, sự di chuyển dễ dàng của con người có thể đưa ra các ribotype mới cho các vùng lãnh thổ. Trường hợp mắc *C.difficile* chủng 027 đầu tiên ghi nhận ở Úc là một phụ nữ 43 tuổi được mở thông hồng tràng, bị

nhễm khi đi du lịch Hoa Kỳ. Chứng 027 cũng đã được phát hiện ở Nhật Bản với bệnh nhân đầu tiên được báo cáo là một phụ nữ 30 tuổi, nhập viện vì viêm loét đại tràng, phát triển thành viêm đại tràng giả mạc sau nhập viện 1 tháng. Tuy nhiên, chủng này nhạy với kháng sinh quinolone thế hệ mới, giống với các chủng lưu hành ở Bắc Mỹ trước những năm 2001.

Ở châu Á, ít báo cáo về lưu hành *C.difficile* chủng 027, nhưng chủng 017 sinh độc tố A-B+ lại xuất hiện thường xuyên trong nghiên cứu ở các nước Đông Á như Hàn Quốc, Trung Quốc, Nhật Bản và Đài Loan, chiếm tới 23% – 48% các chủng sinh độc tố. Chủng 018 cũng được ghi nhận ở Tokyo (Nhật Bản) và Hàn Quốc. Các chủng *C.difficile* thường gặp gây dịch ở châu Á là chủng smz/018 và chủng 017 [61]. Nghiên cứu dịch tễ học tại Nhật Bản trong 5 năm cũng ghi nhận sự chuyển đổi về dịch tễ học của các chủng *C.difficile*, với chủng ribotype *f* gia tăng từ 45% năm 2000 đã lên 64% năm 2004. Ribotype *f* được nhận diện tương tự ribotype “smz” được báo cáo là chủng gây nhiều đợt bùng phát ở Nhật Bản, nghi ngờ tương ứng với ribotype 001. Đáng chú ý là có tới 70% các chủng *C.difficile* phân lập được không thuộc 23 chủng gây bệnh ở châu Âu và Bắc Mỹ, 11,6% không phân típ được [26]. Một nghiên cứu tại 6 bệnh viện Hàn Quốc cho thấy, tỉ lệ chủng *C.difficile* A-B+ từ <5% trước những năm 2000, tăng lên 13% năm 2003, đỉnh điểm là 50% năm 2004 [56]. Nhìn chung, các chủng *C.difficile* thường gặp được phân lập ở châu Á là chủng 017, 018, 014 và 001 [110], [135]. Ngoài ra, Hàn Quốc có báo cáo chủng *C.difficile* ribotype 130, sinh độc tố kép [36]. Tuy nhiên, các triệu chứng lâm sàng của bệnh do *C.difficile* không liên quan đến sự thay đổi của các ribotype [56].

Ở Việt Nam, còn ít nghiên cứu về kiểu gen của *C.difficile*. Năm 2015, mới có báo cáo ca bệnh được xác định đầu tiên tại bệnh viện Bạch Mai về một bệnh nhân lớn tuổi tiêu chảy kéo dài và viêm đại tràng giả mạc do *C.difficile*, được

Viện VSDTTW xác định có kiểu gen ribotype là *trf* [4]. Đặng Thị Thùy Dương công bố tỉ lệ nhiễm *C.difficile* mang gen độc tố là 24,9% ở quần thể bệnh nhân ≥ 15 tuổi bị tiêu chảy sau dùng kháng sinh ở Hà Nội [1]. Năm 2018, trong một nghiên cứu tại 3 bệnh viện của Hà Nội, Vũ Thị Thu Hương công bố đã xác định được 6 tít dịch tễ học phân tử của *C.difficile* đang lưu hành là ribotype 017, *trf*, *og39*, *cc835*, *001* và *cr* [6]. Cần có thêm nhiều nghiên cứu nữa về đặc điểm và sự phân bố các kiểu gen của *C.difficile* ở nước ta, khả năng gây bệnh và độc lực của các chủng để giám sát và đề ra kế hoạch phòng chống căn bệnh này.

CHƯƠNG 2: PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu:

- *Mục tiêu 1: Mô tả một số đặc điểm dịch tễ, lâm sàng của tiêu chảy do C.difficile ở người lớn tại bệnh viện Bạch Mai, 2013 – 2017.*

Định nghĩa ca bệnh tiêu chảy do C.difficile theo tiêu chuẩn chẩn đoán của Hội Dịch tễ học Y tế Hoa Kỳ và Hội các bệnh truyền nhiễm Hoa Kỳ: lâm sàng có tiêu chảy (phân lỏng 3 lần hoặc nhiều hơn trong 24 giờ), kèm theo xét nghiệm phân tìm thấy độc tố hoặc gen sinh độc tố của C.difficile hoặc soi đại tràng hay xét nghiệm mô bệnh học có viêm đại tràng giả mạc [35].

Tiêu chuẩn chọn bệnh nhân: bệnh nhân được chọn vào nghiên cứu khi có các tiêu chuẩn sau

- Lâm sàng: tiêu chảy ≥ 3 lần trong thời gian 24 giờ
- Xét nghiệm: Cấy phân tìm được C.difficile và xét nghiệm PCR xác nhận có gen sinh độc tố gây bệnh (độc tố A và/ hoặc độc tố B)
- Bệnh nhân từ 15 tuổi trở lên
- Bệnh nhân đồng ý tham gia nghiên cứu

Tiêu chuẩn loại trừ:

Bệnh nhân đáp ứng tiêu chuẩn lựa chọn nhưng không đồng ý lấy bệnh phẩm phân làm xét nghiệm.

(Trong các khoa của bệnh viện Bạch Mai, bệnh nhân dưới 15 tuổi được điều trị tại khoa Nhi. Nghiên cứu lấy bệnh nhân tiêu chảy do C.difficile ở người lớn nằm điều trị tại các khoa lâm sàng, có tuổi từ 15 trở lên).

- *Mục tiêu 2: Xác định một số yếu tố nguy cơ mắc tiêu chảy do C.difficile ở người lớn tại bệnh viện Bạch Mai, 2013 – 2017.*

Đối tượng nghiên cứu gồm nhóm bệnh và nhóm chứng được lựa chọn như sau:

Tiêu chuẩn chọn nhóm bệnh (tiêu chảy do *C.difficile*) Các ca bệnh xác định như mục tiêu 1:

Lâm sàng: tiêu chảy ≥ 3 lần trong thời gian 24 giờ

Xét nghiệm: Cây phân tìm được *C.difficile* và xét nghiệm PCR xác nhận có gen sinh độc tố gây bệnh.

Tiêu chuẩn chọn nhóm chứng (tiêu chảy không do *C.difficile*) Các bệnh nhân tiêu chảy cấy phân tìm *C.difficile* âm tính.

Lâm sàng: tiêu chảy ≥ 3 lần trong thời gian 24 giờ

Xét nghiệm: Cây phân tìm *C.difficile* âm tính.

Các bệnh nhân tiêu chảy nhóm chứng được lựa chọn phù hợp với bệnh nhân nhóm bệnh về thời gian xuất hiện tiêu chảy trong cùng năm, cùng khoa điều trị và cùng giới tính với bệnh nhân mắc tiêu chảy do *C.difficile*.

- **Mục tiêu 3: Xác định một số đặc điểm phân bố kiểu gen của *C.difficile* gây tiêu chảy ở người lớn tại bệnh viện Bạch Mai, 2013 – 2017.**

Đối tượng nghiên cứu là các chủng vi khuẩn *C.difficile* gây tiêu chảy phân lập được từ bệnh nhân ở mục tiêu 1.

2.2. Địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành tại bệnh viện Bạch Mai và Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương.

2.3. Thời gian nghiên cứu

Trong 5 năm, từ năm 2013 đến năm 2017.

2.4. Thiết kế nghiên cứu

- **Mục tiêu 1:** Thiết kế nghiên cứu dịch tễ học mô tả (mô tả hàng loạt ca bệnh tiêu chảy do *C.difficile* ở người lớn).

- *Mục tiêu 2:* Thiết kế nghiên cứu bệnh chứng, để xác định một số yếu tố nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* ở người lớn.

- *Mục tiêu 3:* Thiết kế nghiên cứu mô tả có phân tích phòng thí nghiệm, để phân tích một số đặc điểm phân bố kiểu gen của *C.difficile*.

2.5. Cỡ mẫu nghiên cứu và chọn mẫu

Mục tiêu 1:

- Cỡ mẫu tính toán dựa trên tỉ lệ tiêu chảy do *C.difficile* sinh độc tố trong các trường hợp tiêu chảy. Công thức tính cỡ mẫu cho nghiên cứu mô tả [5], [11]:

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

Trong đó:

α : độ tin cậy = 0,95

$Z_{1-\alpha/2} = 1,96$ (với độ tin cậy 95%)

p : Tỉ lệ dự đoán bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* trong số các trường hợp tiêu chảy nằm viện. Một số nghiên cứu tại châu Á cho thấy tỉ lệ này dao động từ 10% – 25% [26], [44], [64], [76]. Lấy $p = 0,2$.

ε : độ sai số tương đối (0,4)

n : cỡ mẫu tối thiểu cần đạt được.

Căn cứ công thức trên, cỡ mẫu tối thiểu cần đạt được là 97

- Chọn mẫu: Toàn bộ bệnh nhân đủ tiêu chuẩn chẩn đoán ca bệnh theo tiêu chuẩn được chọn lấy vào nghiên cứu. Thực tế thu được 101 bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile*.

Mục tiêu 2:

Để tăng lực thống kê của nghiên cứu và giảm 1 số các yếu tố nhiễu, nghiên cứu lấy mẫu theo tỉ lệ bệnh: chứng là 1:3. Nhóm chứng phù hợp với nhóm bệnh về giới tính, khoa điều trị và thời gian xuất hiện tiêu chảy trong năm, ở giai đoạn 2013 - 2017.

- Áp dụng công thức tính cỡ mẫu cho nhóm bệnh trong nghiên cứu bệnh - chứng của Tổ chức Y tế thế giới (WHO) :

$$n = \frac{\left[Z_{1-\alpha/2} \sqrt{2P_2(1-P_2)} + Z_{1-\beta} \sqrt{P_1(1-P_1) + P_2(1-P_2)} \right]^2}{(P_1 - P_2)^2}$$

p_1 : tỷ lệ cá thể phơi nhiễm với yếu tố nguy cơ (có tiền sử nằm viện trong vòng 8 tuần trước khi tiêu chảy) trong nhóm bệnh, ước lượng là 80% (= 0,8) [33],[122],[137].

p_2 : tỷ lệ cá thể phơi nhiễm với yếu tố nguy cơ trong nhóm chứng, ước lượng là 60% (= 0,6) [137]

Hệ số tin cậy ứng với độ tin cậy 95% = 1,96

Độ mạnh của test $1-\beta = 80\%$

Thay số vào ta được cỡ mẫu $n = 90$.

Tỷ lệ ca bệnh: ca chứng là 1:3, nên cần ít nhất 90 bệnh nhân cho nhóm bệnh và 270 bệnh nhân cho nhóm chứng.

- Trong 101 bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile*, tìm các bệnh nhân nhóm chứng phù hợp với nhóm bệnh theo tiêu chí cùng giới, cùng khoa điều trị và cùng năm, tỉ lệ 1 bệnh: 3 chứng. Chúng tôi chọn được 273 ca chứng có cùng các tiêu chí với 91 ca bệnh.

Mục tiêu 3:

Toàn bộ các chủng *C.difficile* phân lập được từ bệnh nhân của mục tiêu 1.

2.6. Thu thập đối tượng nghiên cứu

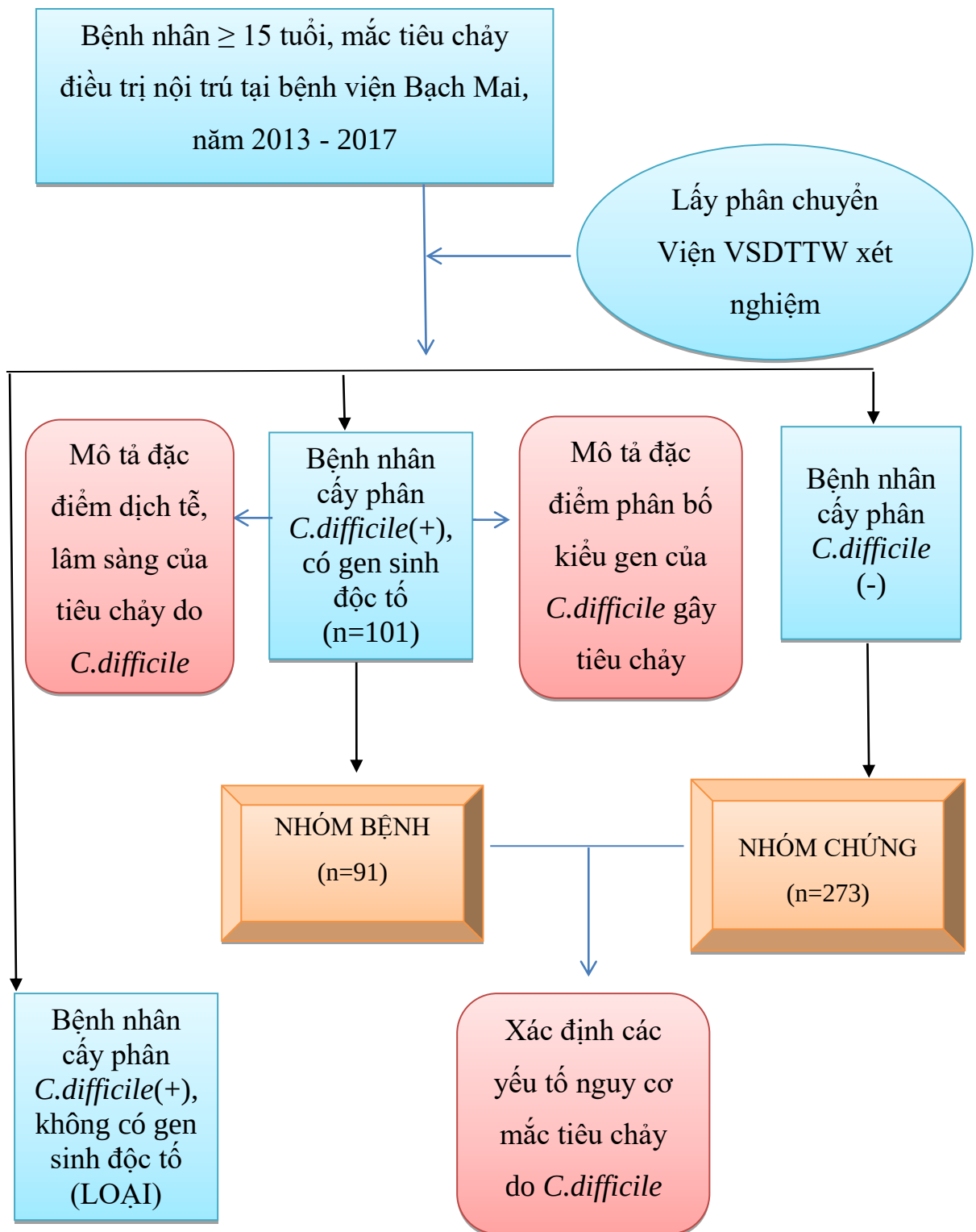
Các bệnh nhân mắc tiêu chảy từ 15 tuổi trở lên, điều trị nội trú tại bệnh viện Bạch Mai được tư vấn đồng ý và hướng dẫn lấy bệnh phẩm phân xét nghiệm. Bệnh phẩm được bảo quản và vận chuyển theo qui trình đến phòng xét nghiệm Vi khuẩn kỵ khí, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương.

Toàn bộ bệnh nhân thỏa mãn các tiêu chuẩn theo định nghĩa ca bệnh trong thời gian nghiên cứu được lựa chọn tham gia vào nghiên cứu.

Các bệnh nhân tiêu chảy thỏa mãn các điều kiện của nhóm chứng, phù hợp với nhóm bệnh theo tiêu chí của nghiên cứu, được lựa chọn theo trình tự thời gian đến khi thu thập đủ cỡ mẫu nghiên cứu. Tất cả các đối tượng này đều được đánh giá các yếu tố dịch tễ, lâm sàng, xét nghiệm, điều trị và diễn biến bệnh. Thông tin của các ca bệnh và ca chứng được thu thập theo cùng một mẫu “Phiếu điều tra bệnh nhân tiêu chảy và các yếu tố liên quan đến tiêu chảy do *Clostridium difficile* tại bệnh viện Bạch Mai” được thiết kế trước. Các thông tin thu thập qua hỏi bệnh, thăm khám lâm sàng, hồ sơ bệnh án, phiếu trả kết quả xét nghiệm.

Tất cả các chủng vi khuẩn *C.difficile* phân lập được từ bệnh nhân tiêu chảy nhóm bệnh được phân tích các đặc điểm kiểu gen tại phòng vi khuẩn kỵ khí, khoa vi khuẩn, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương.

2.7. Sơ đồ nghiên cứu



2.8. Vật liệu nghiên cứu:

- Phiếu điều tra bệnh nhân tiêu chảy và các yếu tố liên quan tiêu chảy do *Clostridium difficile* tại bệnh viện Bạch Mai (Phụ lục 1)
- Mẫu bệnh phẩm phân của bệnh nhân tiêu chảy để nuôi cấy kỵ khí tìm *C.difficile*, chuyển đến Phòng xét nghiệm vi khuẩn kỵ khí, Viện VSDTTW.
- Mẫu bệnh phẩm máu của bệnh nhân để xét nghiệm sinh hóa, huyết học, chuyển đến phòng xét nghiệm bệnh viện Bạch Mai.
- Phòng xét nghiệm vi khuẩn kỵ khí Viện VSDTTW, phòng xét nghiệm sinh hóa, huyết học bệnh viện Bạch Mai đạt chuẩn ISO 15189.
- Các mẫu chứng dương:

Chủng chuẩn *Clostridium difficile* ATCC 700057 và chủng chuẩn *C. difficile* ATCC 43593 không sinh độc tố, công ty Microbiologics, Minnesota, Hoa Kỳ.

Chủng *C.difficile* mang gen độc tố A+B+ và A-B+ của bệnh nhân tiêu chảy trong nghiên cứu, do khoa vi khuẩn - Viện VSDTTW phân lập, khẳng định bằng PCR, gửi kiểm tra khẳng định lại bởi tiến sĩ Kato và cộng sự (trong khuôn khổ hợp tác với Viện Truyền nhiễm quốc gia Tokyo Nhật Bản) [3].

Chủng *C.difficile* tham chiếu mang các kiểu gen ribotype khác nhau *okz*, *og39*, *cc835*, *cr*, *001*, *002*, *014*, *trf*, *017* có nguồn gốc từ khoa Vi khuẩn II, Viện Truyền nhiễm quốc gia Tokyo, Nhật Bản.

- Trang thiết bị và dụng cụ trong nghiên cứu (phụ lục 4)

2.9. Thu thập mẫu bệnh phẩm, kỹ thuật xét nghiệm

• Cách lấy mẫu bệnh phẩm, bảo quản và vận chuyển

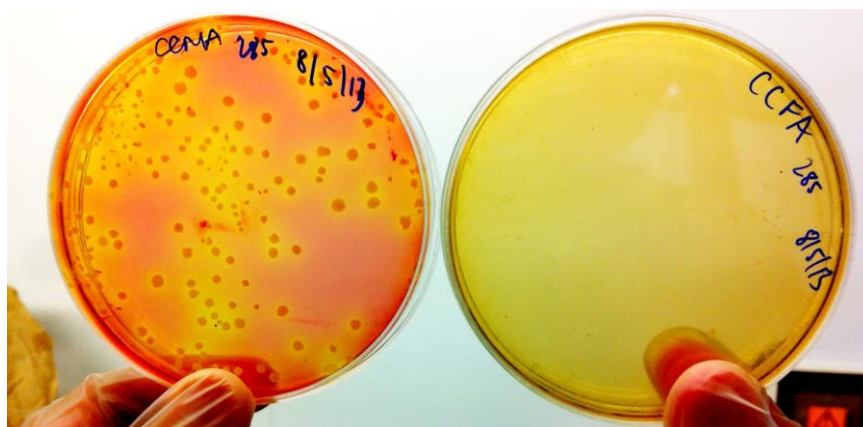
Bệnh nhân đi đại tiện vào xô khô, sạch, tránh lẫn nước tiểu hoặc lấy phân từ bím nếu bệnh nhân rối loạn ý thức. Dùng thìa nhựa sạch chuyển 3ml phân của bệnh nhân vào lọ nhựa chuyên đựng bệnh phẩm có nắp vặn chặt, có ghi rõ tên tuổi bệnh nhân, khoa điều trị và ngày lấy mẫu bằng bút mực không tẩy

được. Thông tin bệnh nhân ghi vào phiếu chuyển bệnh phẩm. Bệnh phẩm bảo quản ở nhiệt độ 4°C, sau đó chuyển về Phòng xét nghiệm vi khuẩn kỵ khí - Viện VSDTTW trong hộp bảo quản, xử lý ngay trong vòng 2 giờ sau khi nhận để nuôi cấy. Nếu không xử lý ngay, mẫu được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4°C hoặc tủ âm sâu.

- **Các kỹ thuật xét nghiệm**

- **Kỹ thuật nuôi cấy phân lập vi khuẩn kỵ khí:**

Nguyên lý: bệnh phẩm phân được nuôi cấy phân lập *C.difficile* bằng phương pháp xử lý shock còn tuyệt đối theo tỉ lệ 1:1 (sốc nhiệt hoặc sốc cồn làm tăng khả năng phân lập được *C.difficile* [27], [67]), trộn kỹ bằng máy vortex liên tục trong 10 phút, 15 phút vortex một lần, tổng thời gian sốc cồn khoảng 60 phút, để chọn lọc vi khuẩn sinh nha bào, sau đó cấy chuyển trên môi trường chọn lọc cycloserin – cefoxitin – mannitol agar, ủ trong điều kiện kỵ khí tuyệt đối 37°C trong 24 giờ đến 48 giờ, kiểm tra khuẩn lạc sau 48 giờ. Chọn khuẩn lạc điển hình với đặc điểm: dẹt hoặc hơi lồi, bờ không đều, bề mặt thô ráp, kích thước từ 2-5mm, màu vàng do chuyển hóa mannitol.



Hình 2.1: Khuẩn lạc vi khuẩn *C.difficile* của bệnh nhân nghiên cứu trên môi trường thạch chọn lọc CCMA và CCFA sau ủ kỵ khí 48 giờ.

Nguồn: Khoa vi khuẩn – Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương.

Sau đó định danh vi khuẩn *C.difficile* bằng cách sử dụng một trong các kỹ thuật sau: bộ thử nghiệm sinh hóa API 20A (Biomérieux, Pháp); kỹ thuật ngưng kết Latex phát hiện các kháng nguyên vách tế bào *C.difficile* dựa trên nguyên lý các hạt Latex gắn IgG đặc hiệu cho kháng nguyên vách; kỹ thuật ngưng kết giữa kháng huyết thanh đặc hiệu với kháng nguyên glutamate dehydrogenase (Nissui, Tokyo, Nhật Bản); phản ứng PCR dương tính với môi tpe đặc hiệu cho loài *C.difficile*; kỹ thuật giải trình tự gen 16S-rARN.



Hình 2.2: Tủ kỵ khí BugBox Plus, hãng Baker Ruskinn – Anh

Nguồn: Khoa vi khuẩn – Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương.

Sinh phẩm: Canh thang BHI 0,05% cysteine, còn tuyệt đối, môi trường thioglycollate thường, thạch kỵ khí chọn lọc chủ yếu là môi trường CCMA (cefoxitin-cycloserine mannitol agar) [2], [159] hoặc CCFA (Cefoxitin-Cycloserine Fructose Agar), môi trường thạch kỵ khí không chọn lọc GAM (môi trường kỵ khí Gifu Modified), dung dịch skim milk 20%.

- **Kỹ thuật PCR phát hiện loại gen sinh độc tố A và B**

Nguyên lý: Phản ứng PCR đa môi sử dụng 3 cặp môi phát hiện lần lượt gen sinh độc tố A (tcdA), gen sinh độc tố B (tcdB) và gen triose phosphate isomerase (*tpi*) đặc hiệu cho loài *C. difficile*. Khuẩn lạc của vi khuẩn được hòa đều vào 200 μ L dung dịch đệm TE, đặt vào bể nước hoặc heating block 95°C/ 15 phút. Sau đó ly tâm 12000 vòng/ 5 phút, hút nước nổi làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR. Mỗi phản ứng PCR có tổng thể tích là 25 μ L bao gồm các thành phần sau: 1 μ M mỗi môi tcdA và TcdB, 0,5 μ M mỗi môi *tpi*, 2,5 μ M MgCl₂, 0,5U Taq polymerase, 1X PCR buffer. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR có 35 chu kỳ bao gồm biến tính ở 95°C trong 5 phút, bắt cặp ở 55°C trong 45 giây, kéo dài ở 72°C trong 1 phút. Sản phẩm PCR được phát hiện bằng điện di trên thạch agarose S 1,5%, hiệu điện thế 120 vôn trong 30 phút. Sử dụng thang chuẩn trọng lượng phân tử 100 bp. Bản gen sau khi điện di được nhuộm với dung dịch thuốc nhuộm ethidium bromide (0,1 μ L/mL) trong 10 phút. Một mẫu phân được xác định là dương tính khi có mặt sản phẩm khuếch đại của gen *tpi* (của loài *Clostridium difficile*) và gen độc tố tcdA và/ hoặc tcdB.

Sinh phẩm: Sử dụng bộ sinh phẩm tách chiết QIAamp DNA tool mini kit của công ty Qiagen, Đức để tách chiết ADN từ mẫu phân.

Các cặp môi cho phản ứng PCR đa môi:

Bảng 2.1: Trình tự các cặp môi trong phản ứng PCR đa môi phát hiện gen sinh độc tố

Tên môi	Gen đích	Trình tự môi (5' - 3')	Sản phẩm (bp)	Tham khảo
<i>tcdB</i> xuôi <i>tcdB</i> ngược	<i>tcdB</i>	GGAAAAGAGAATGGTTTTATTAA ATCTTTAGTTATCTTTGACATCTTT	160	[98]
<i>tcdA</i> xuôi <i>tcdA</i> ngược	<i>tcdA</i>	AGATTCCTATATTTACATGACAATAT GTATCAGGCATAAAGTAATATACTTT	369	[98]
<i>tpi</i> -280 xuôi <i>tpi</i> -280 ngược	<i>tpi</i>	AAAGAAGCTACTAAGGGTACAAA CATAATATTGGGTCATTCCTAC	280	[98]

Độc kết quả: Mẫu phân cho kết quả dương tính khi có mặt sản phẩm khuếch đại của gen *tpi*, gen độc tố *tcdA* và/ hoặc gen độc tố *tcdB*. Mẫu phân âm tính khi không có sản phẩm khuếch đại của cả 3 gen *tpi*, *tcdA*, *tcdB*. Nếu chỉ có sản phẩm khuếch đại của gen *tpi* là chủng *C.difficile* không sinh độc tố (không gây bệnh).

- **Kỹ thuật xác định nồng độ ức chế tối thiểu MIC:** nhằm xác định mức độ nhạy cảm kháng sinh của chủng *C.difficile* phân lập được.

Nguyên lý: Kỹ thuật kháng sinh pha loãng trên thạch được thực hiện theo tiêu chuẩn kiểm soát chất lượng thường qui của CLSI 2014 để đánh giá mức nhạy cảm của *C.difficile* với kháng sinh ampicillin, amoxicillin/clavulanat, cloramphenicol, clindamycin, tetracyclin, moxifloxacin, metronidazole và ceftriaxone.

Tiêu chuẩn của EUCAST 2016 được sử dụng để đánh giá mức nhạy cảm của 1 số kháng sinh không có theo tiêu chuẩn CLSI 2010 như vancomycin và rifampicin.

Mẫu chứng chuẩn:

Chủng *C.difficile* ATCC 700057 và *Bacteroid fragilis* ATCC 25285 mua của công ty MicroBiologics – Mỹ

Độc và phân tích kết quả:

Kết quả MIC được đọc từ nồng độ thấp đến nồng độ cao. Ở nồng độ nào vi khuẩn còn mọc nồng độ tương đương 10^5 vi khuẩn, đọc là (+). Ở nồng độ nào, lượng vi khuẩn giảm rõ rệt so với chúng, đọc kết quả (+/-). Ở nồng độ nào không còn vi khuẩn mọc, đọc là (-). Sau đó phân tích kết quả.

- **Kỹ thuật PCR ribotyping xác định kiểu gen ribotype của *C.difficile***

Nguyên lý: Phương pháp PCR ribotyping được thực hiện theo phương pháp của Stubb và cộng sự [147]. Khuẩn lạc thuần của vi khuẩn *C. difficile* được tách chiết sử dụng kit thương mại QIA gene DNA mini kit theo hướng

dẫn của nhà sản xuất. Sau đó, khuôn mẫu sẽ được sử dụng cho phản ứng PCR khuếch đại vùng xen kẽ của gen 16S-23S. Thành phần mỗi phản ứng PCR Ribotyping gồm có 4 µL dung dịch đệm 1X; 2 µL MgCl₂ 2,5 mM; 0,4 µL dNTPs 0,2 µM; 1 µL mỗi 16S 0,4 µM; 1 µL mỗi 23S 0,4 µM; 0,4 µL Taq polymerase 0,1 U/µL; 9,2 µL nước tiệt trùng (không có ADN, ARN); 2 µL ADN khuôn. Chu kỳ nhiệt cho phản ứng PCR ribotyping như sau: 95°C/ 3 phút; (95°C/ 20 giây; 55°C/ 2 phút; 72°C/ 10 phút) x 35 chu kỳ; giữ ở 4°C: biến tính ở 95°C trong 20 giây, bắt cặp và kéo dài ở 55°C trong 120 giây. Sản phẩm PCR đa hình được phát hiện bằng điện di trên thạch có độ phân giải cao nồng độ 2,5%, 125 vôn/4 giờ. Sử dụng phương pháp PCR ribotyping tạo ra các sản phẩm PCR có kích thước khác nhau dao động từ 200 – 700 bp, quan sát rõ trên gel agarose.

Sinh phẩm:

Bộ sinh phẩm tách chiết ADN từ mẫu phân và từ khuẩn lạc:

DNA Stool mini kit, (code 51504), hãng QIGEN (tách DNA từ phân), Đức

DNA mini kit (Code: 51304), hãng QIGEN (tách DNA từ khuẩn lạc), Đức

Cặp mồi cho phản ứng PCR ribotype:

Bảng 2.2: Trình tự cặp mồi trong phản ứng PCR ribotype

Mồi	Trình tự mồi (5' - 3')	Tham khảo
Xuôi	CTGGGGTGAAGTCGTAACAAGG	[147]
Ngược	GCGCCCTTTGTAGCTTGACC	

Độc kết quả: Dựa vào hình ảnh chụp được, dùng các phần mềm phân tích bionumeric hoặc bằng mắt thường để so sánh các băng DNA giữa các chủng vi khuẩn thu được với các chủng *C.difficile* chuẩn tham chiếu (nguồn gốc từ khoa Vi khuẩn II, Viện Truyền nhiễm quốc gia Tokyo, Nhật Bản) để xác định ribotype của chủng vi khuẩn. Các chủng *C.difficile* được xếp vào cùng một nhóm ribotype nếu chúng có các băng giống nhau về số lượng và kích thước

so với chủng tham chiếu. Cứ một băng khác xuất hiện được coi là một ribotype mới.

- Quy trình xét nghiệm:

Các xét nghiệm được thực hiện theo qui trình thường qui chuẩn của Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương (phụ lục 3)

2.10. Các biến số và chỉ số trong nghiên cứu

• *Các biểu hiện được đánh giá là bệnh nặng của tiêu chảy do C.difficile* [137]:

- Sốt > 38,3°C
- Albumin máu < 25g/l
- Bạch cầu máu > 15 G/l
- Creatinin máu > 133μmol/L (hoặc > 1,5 lần giá trị bình thường).

Mỗi triệu chứng được tính 1 điểm. Tối đa là 4 điểm

• *Các giá trị bình thường của xét nghiệm máu sinh hóa và huyết học theo giá trị tham chiếu của phòng xét nghiệm – bệnh viện Bạch Mai:*

- Hồng cầu: 4,2 – 5,5 T/L
- Bạch cầu: 4 – 10 G/L. Tăng khi > 10 G/L; tăng cao khi >15 G/L.
- Creatinin: 110 μmol/L
- Albumin: 35-50 g/L; giảm khi < 35g/L, giảm nhiều khi < 25 g/L
- Procalcitonin: < 0,05 ng/ml. Tăng khi > 0,05 ng/ml; tăng nhiều khi > 10 ng/ml
- Natri máu: 130 – 145 mmol/L
- Kali máu: 3,4 – 4,5 mmol/L.

Các biến số và chỉ số trong nghiên cứu

Mục tiêu nghiên cứu	Biến số/ chỉ số nghiên cứu	Khái niệm/ phương pháp thu thập
Mục tiêu 1:	Giới	Nam / Nữ.

Mô tả một số đặc điểm dịch tễ, lâm sàng của tiêu chảy do <i>C.difficile</i> gây tiêu chảy ở người lớn	Nơi sống	Theo tỉnh/ thành phố Theo vùng kinh tế xã hội: nông thôn, thành thị.
	Tuổi	Phân nhóm 15 - 29 tuổi, 30 – 44 tuổi, 45 – 60 tuổi, >60 tuổi.
	Tháng mắc bệnh	Phân bố theo tháng trong năm.
	Mùa mắc bệnh	Mùa nóng: từ tháng 5 – tháng 10, mùa lạnh: từ tháng 11 – tháng 4.
	Năm mắc bệnh	Từ năm 2013 đến năm 2017
	Đơn vị điều trị	Theo khoa trong bệnh viện.
	Sốt	Không sốt, nhiệt độ $\leq 37,5^{\circ}\text{C}$ Sốt nhẹ-vừa, nhiệt độ $37,5- 39^{\circ}\text{C}$ Sốt cao, nhiệt độ $> 39^{\circ}\text{C}$
	Đau bụng	Có / không. Dựa hồ sơ bệnh án
	Chướng bụng	Có / không. Dựa hồ sơ bệnh án
	Nôn, buồn nôn	Có / không. Dựa hồ sơ bệnh án
	Tính chất phân có nhầy mũi	Có / không. Dựa hồ sơ bệnh án
	Phân có máu	Có/ không. Dựa hồ sơ bệnh án
	Tụt huyết áp	Khi huyết áp tối đa $< 90\text{mmHg}$
	Số lần tiêu chảy	Nhẹ: 3-6 lần/ ngày Trung bình: 7 -10 lần/ ngày Nặng: > 10 lần/ ngày
	Số ngày tiêu chảy	1-3 ngày; 4-13 ngày; ≥ 14 ngày Dựa hỏi bệnh và hồ sơ bệnh án
	Tổn thương đại tràng	Dựa kết quả nội soi đại tràng
	Số lượng hồng cầu	Dựa kết quả trong hồ sơ bệnh án
	Số lượng bạch cầu	Dựa kết quả trong hồ sơ bệnh án
	Procalcitonin máu	Dựa kết quả trong hồ sơ bệnh án
	Creatinin máu	Dựa kết quả trong hồ sơ bệnh án
	Natri máu	Dựa kết quả trong hồ sơ bệnh án

	Kali máu	Dựa kết quả trong hồ sơ bệnh án
	Albumin máu	Dựa kết quả trong hồ sơ bệnh án
	Điều trị metronidazole	Có/ không. Dựa hồ sơ bệnh án
	Điều trị vancomycin	Có/ không. Dựa hồ sơ bệnh án
	Dùng lợi khuẩn	Có/ không. Dựa hồ sơ bệnh án
	Thuốc bọc niêm mạc	Có/ không. Dựa hồ sơ bệnh án
	Thuốc cầm ỉa	Có/ không. Dựa hồ sơ bệnh án
	Số ngày nằm viện	Dựa hồ sơ bệnh án
	Mức độ nhạy cảm với kháng sinh của các chủng <i>C.difficile</i> đã được phân lập	Kết quả từ phòng thí nghiệm Vi khuẩn kỵ khí – Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương
	Diễn biến bệnh	Khỏi; đỡ - ra viện; chuyển tuyến; nặng - xin về; tử vong.
	Mức độ nặng của bệnh	Tính điểm theo thang điểm mức độ nặng ở trên, dựa vào thông tin trong hồ sơ bệnh án
<i>Mục tiêu 2:</i> Xác định một số yếu tố nguy cơ đến mắc tiêu chảy do <i>C.difficile</i> gây tiêu chảy ở người lớn	Nhóm các yếu tố bên trong	
	Nhóm tuổi	Phân các nhóm tuổi, tìm nhóm có nguy cơ mắc tiêu chảy do <i>C.difficile</i> cao hơn
	Bệnh mạn tính/ Tình trạng sức khỏe của cơ thể	- Có bệnh mạn tính/ Mang nhiều bệnh mạn tính có nguy cơ nguy cơ mắc tiêu chảy do <i>C.difficile</i> - Từng loại bệnh mạn tính có nguy cơ mắc tiêu chảy do <i>C.difficile</i>
	Nhóm các yếu tố bên ngoài	
	Nơi sống	Nông thôn/ thành thị

	Dùng kháng sinh trong 8 tuần trước	- Có nguy cơ cao mắc tiêu chảy do <i>C.difficile</i> không. - Dùng nhiều loại kháng sinh có nguy cơ mắc cao không.
	Tiền sử nằm viện trong 8 tuần trước	- Có nguy cơ cao mắc tiêu chảy do <i>C.difficile</i> không.
	Nguy cơ của từng nhóm kháng sinh được sử dụng trước khi bị tiêu chảy	Penicillin, cephalosporin, carbapenem, quinolone, macrolid, clindamycin, aminoside, glycopeptid, metronidazole có nguy cơ cao không
	Sử dụng thuốc ức chế tiết axit dạ dày	Có nguy cơ mắc tiêu chảy do <i>C.difficile</i> cao không.
	Dùng hoá chất điều trị ung thư	Có nguy cơ mắc tiêu chảy do <i>C.difficile</i> cao không.
	Dùng corticoid	Có nguy cơ mắc tiêu chảy do <i>C.difficile</i> cao không
	Có can thiệp đường tiêu hóa	Can thiệp đặt ống thông dạ dày, nội soi dạ dày, nội soi đại trực tràng, phẫu thuật tiêu hóa... /Có nguy cơ mắc tiêu chảy do <i>C.difficile</i> cao không
	Triệu chứng lâm sàng	-Sốt và mức độ sốt -Đau bụng -Chướng bụng -Buồn nôn, nôn -Phân nhầy mũi -Phân máu -Tụt huyết áp Biểu hiện nào có nguy cơ cao là do <i>C.difficile</i>

	Triệu chứng cận lâm sàng	-Bạch cầu máu -Albumin máu -Procalcitonin máu Biểu hiện nào có nguy cơ cao là do <i>C.difficile</i>
	Số lần tiêu chảy	≤ 6 lần 7-10 lần >10 lần. Biểu hiện nào có nguy cơ cao do <i>C.difficile</i>
	Số ngày tiêu chảy	1-3 ngày 4-13 ngày ≥14 ngày Biểu hiện nào có nguy cơ cao do <i>C.difficile</i>
<i>Mục tiêu 3:</i> Xác định một số đặc điểm phân bố kiểu gen của <i>C.difficile</i> gây tiêu chảy ở người lớn	Phân bố các loại gen sinh độc tố	Tỉ lệ độc tố A+B+, độc tố A-B+, mang 2 độc tố
	Phân bố các loại gen sinh độc tố theo năm	Tỉ lệ độc tố A+B+, độc tố A-B+, mang 2 độc tố theo năm
	Phân bố loại gen sinh độc tố theo nhóm tuổi	Tỉ lệ độc tố A+B+, độc tố A-B+, mang 2 độc tố theo nhóm tuổi
	Các triệu chứng lâm sàng theo loại gen sinh độc tố	Triệu chứng: sốt, đau bụng, buồn nôn - nôn, phân nhầy mũi, phân máu, tổn thương đại tràng trên nội soi.
	Số lần tiêu chảy trung bình	Theo các gen sinh độc tố
	Số ngày tiêu chảy trung bình	Theo các gen sinh độc tố

	Diễn biến điều trị theo loại gen sinh độc tố	Diễn biến: khỏi, đỡ, chuyển tuyến, xin về, tử vong
	Phân bố một số yếu tố nguy cơ theo các loại gen sinh độc tố	-Tiền sử nằm viện trong vòng 8 tuần trước; -có mang bệnh lý nền; -tiền sử dùng kháng sinh trong vòng 8 tuần trước tiêu chảy;
	Các kiểu gen ribotype của <i>C.difficile</i>	Các kiểu gen ribotype của <i>C.difficile</i> xác định được từ phòng xét nghiệm
	Phân bố các kiểu gen ribotype theo loại gen sinh độc tố	Tỉ lệ các kiểu gen ribotype của <i>C.difficile</i> theo loại độc tố A+B+ và A-B+
	Phân bố các kiểu gen ribotype của <i>C.difficile</i> theo một số đặc điểm dịch tễ và yếu tố nguy cơ	-Phân bố các kiểu gen ribotype theo năm; - Phân bố các kiểu gen ribotype theo nhóm tuổi; - Phân bố các kiểu gen ribotype theo tiền sử dùng kháng sinh; - Phân bố các kiểu gen ribotype tiền sử nằm viện; -Phân bố các kiểu gen ribotype theo bệnh lý nền.
	Kết quả điều trị theo các kiểu gen ribotype	Phân mức khỏi- đỡ- chuyển tuyến và mức nặng xin về - tử vong

2.11. Xử lý và phân tích số liệu:

- Số liệu thu thập được được nhập vào máy tính, sử dụng phần mềm Excel 2016 và được phân tích thống kê y học bằng phần mềm STATA 14.0 [10].

- Sử dụng phần mềm Arcgis để vẽ bản đồ phân bố các ca tiêu chảy do *C.difficile* theo tỉnh/ thành phố.
- Trong quá trình xử lý, đã làm sạch các giá trị bị thiếu, nhập sai, không hợp lý, không rõ ràng bằng so sánh với phiếu điều tra giấy.
- Thống kê mô tả được thực hiện qua việc tính toán các tần số, tỉ lệ phần trăm, trung bình để tìm sự phân bố của các biến nhân khẩu học (tuổi, giới, địa dư); đặc điểm dịch tễ học về phân bố ca bệnh theo năm, tháng, mùa, theo khoa; đặc điểm các triệu chứng lâm sàng (sốt, tiêu chảy,...), cận lâm sàng (bach cầu, albumin,...); diễn biến điều trị, đề kháng kháng sinh và đặc điểm phân bố kiểu gen (các loại gen sinh độc tố, các kiểu gen ribotype).
- Các biến định tính được biểu diễn dưới dạng tần suất và tỉ lệ, các biến định lượng được biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình nếu phân bố chuẩn hoặc trung vị nếu phân bố không chuẩn.
- Thống kê suy luận được thể hiện qua test thống kê Khi bình phương (χ^2) với tần số mong đợi >5 hoặc Fisher- Exact test với tần số mong đợi <5 khi kiểm định sự khác biệt giữa các nhóm bệnh nhân theo các nhóm tuổi, kết quả điều trị, loại gen sinh độc tố, kiểu gen ribotype và một số tiền sử về các đặc điểm trên.
- Sử dụng test thống kê Student t-test độc lập (phân bố chuẩn) hoặc Mann-Whitney test (phân bố không chuẩn) để so sánh sự khác biệt giữa các chỉ số định lượng của 2 nhóm. Test thống kê Anova (phân bố chuẩn và phương sai đồng nhất) hoặc Krusal-Wallis test (phân bố không chuẩn) để so sánh sự khác biệt giữa các chỉ số định lượng của từ 3 nhóm trở lên.
- Phân tích các yếu tố nguy cơ mắc tiêu chảy do *Clostridium difficile*, dựa vào: phân tích hồi quy logistic đơn biến theo các nhóm yếu tố nguy cơ từ cá thể bệnh nhân; các yếu tố nguy cơ từ bên ngoài; các yếu tố lâm sàng, cận lâm

sàng và phân tích hồi quy logistic đa biến. Phân tích hồi quy logistic đa biến được thực hiện như sau:

- Dựa vào tổng quan tài liệu để xác định các yếu tố nguy cơ;
 - Tính hệ số tương quan từng cặp giữa các yếu tố;
 - Loại bỏ các yếu tố có hệ số tương quan $>0,7$;
 - Đưa toàn bộ các yếu tố được lọc vào mô hình chạy hồi quy;
 - Loại bỏ dần các yếu tố có giá trị OR ~ 1 và $p \sim 1$;
 - Lựa chọn mô hình tối ưu và kết quả của mô hình được đưa vào báo cáo.
- Mức ý nghĩa thống kê $\alpha = 0,05$ được áp dụng.

2.12. Khống chế sai số

- Thiết kế phiếu nghiên cứu tiêu chảy sớm, có tiêu chuẩn chẩn đoán ca bệnh rõ ràng.
- Các kỹ thuật nghiên cứu được tiến hành tương đồng, hạn chế tối đa phát sinh các sai lệch.
- Làm sạch số liệu trước khi phân tích.
- Khắc phục yếu tố nhiễu bằng cách phân chia nhóm đối tượng khi phân tích số liệu. Sử dụng phân tích hồi quy đa biến.

2.13. Đạo đức nghiên cứu

- Nghiên cứu lấy bệnh phẩm phân để xét nghiệm, nuôi cấy, phân lập, định danh. Đây là qui trình xét nghiệm thường qui trong bệnh viện, không can thiệp, không xâm phạm, không gây đau hay ảnh hưởng đến sức khỏe của bệnh nhân. Các thăm dò, xét nghiệm, điều trị khác đều theo thường qui và theo phác đồ của bệnh viện Bạch Mai. Kết quả xét nghiệm của nghiên cứu được thông báo cho bác sĩ, giúp đưa ra quyết định điều trị chính xác cho bệnh nhân.
- Nghiên cứu được sự chấp thuận của bệnh nhân và gia đình, tự nguyện lấy bệnh phẩm phân để xét nghiệm.

- Kết quả nghiên cứu khi hoàn thành là cơ sở để xây dựng các hướng dẫn lâm sàng, nâng cao kiến thức chẩn đoán, điều trị, dự phòng tiêu chảy do *C.difficile*, mang lại lợi ích cho bệnh nhân, hệ thống y tế và cộng đồng.
- Các thông tin về cá nhân của đối tượng nghiên cứu được bảo mật theo qui định về Y đức.
- Nghiên cứu đã được thông qua Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu Y sinh Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương, số IRB – VN01057 – 33/2015 và số IRB – VN01057 – 32/2016; thông qua Hội đồng Khoa học và Đạo đức của bệnh viện Bạch Mai, số 561/QĐ – BM.

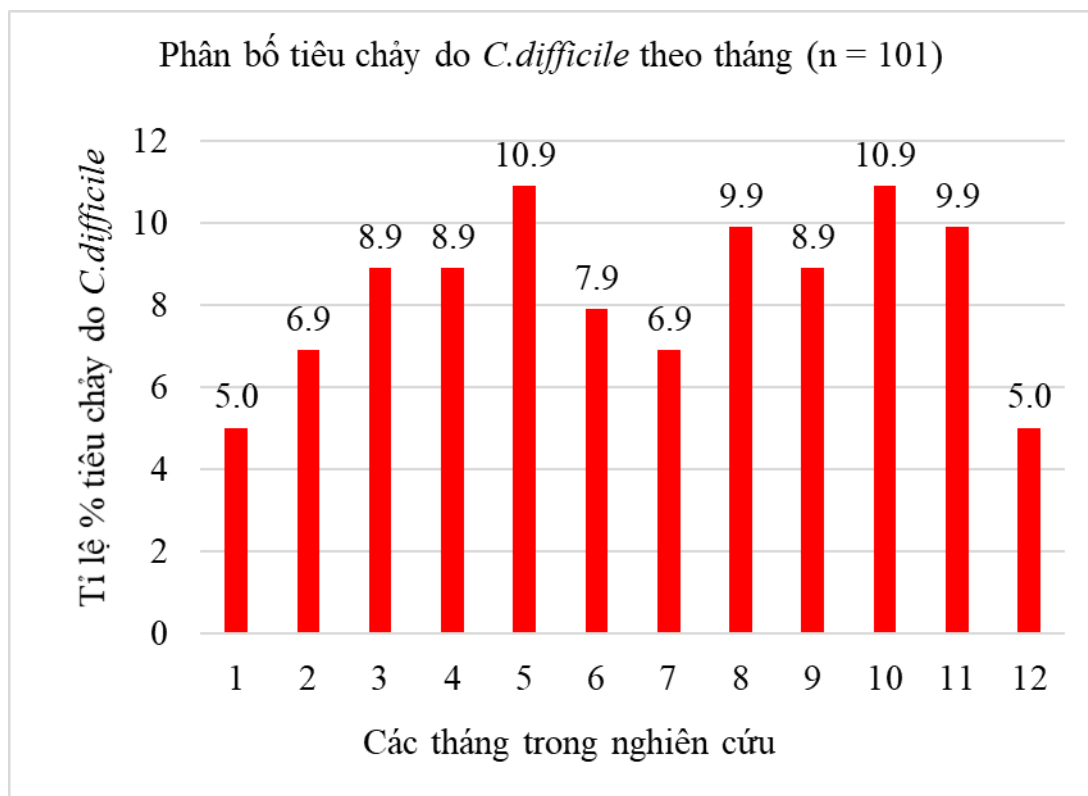
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Một số đặc điểm dịch tễ, lâm sàng của tiêu chảy do *C.difficile* ở người lớn tại bệnh viện Bạch Mai, 2013 – 2017

Trong thời gian từ năm 2013 đến 2017, nghiên cứu thu nhận được 101 bệnh nhân người lớn đủ tiêu chuẩn chẩn đoán xác định mắc tiêu chảy do *C.difficile* đưa vào phân tích một số đặc điểm dịch tễ và lâm sàng.

3.1.1. Đặc điểm dịch tễ tiêu chảy do *C.difficile*

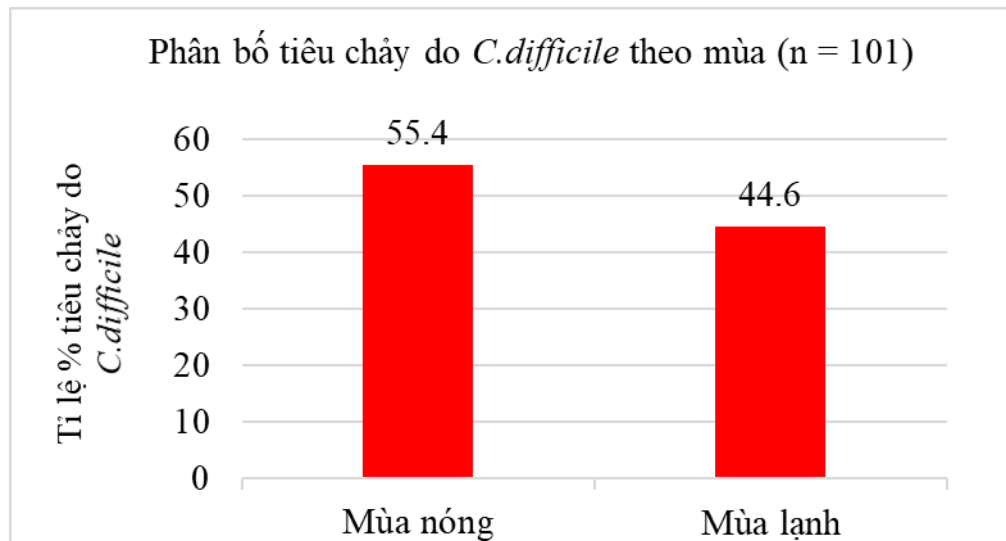
- *Phân bố ca bệnh theo tháng*



Biểu đồ 3.1: Phân bố tiêu chảy do *C.difficile* theo tháng

Biểu đồ 3.1 cho thấy, bệnh ghi nhận ở tất cả các tháng trong năm, nhiều vào tháng 5, tháng 10 (10,9%) và tháng 8, tháng 11 (9,9%). Tổng số ca mắc ở các tháng trong 5 năm nghiên cứu từ 5-11 ca (5% - 10,9%).

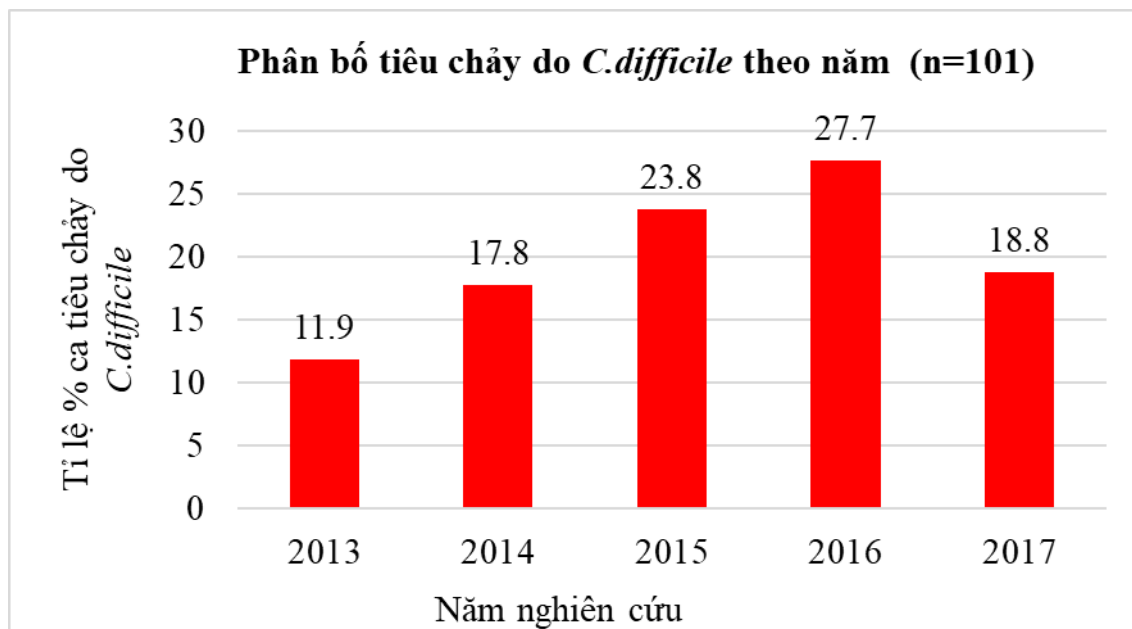
- **Phân bố ca bệnh theo mùa**



Biểu đồ 3.2: Phân bố tiêu chảy do *C.difficile* theo mùa
(Mùa nóng từ tháng 5 đến tháng 10, mùa lạnh từ tháng 11 đến tháng 4)

Biểu đồ 3.2 cho thấy, số ca mắc ở mùa nóng gấp nhiều hơn so với mùa lạnh, tương ứng là 56 ca và 45 ca (chiếm 55,4% và 44,6%).

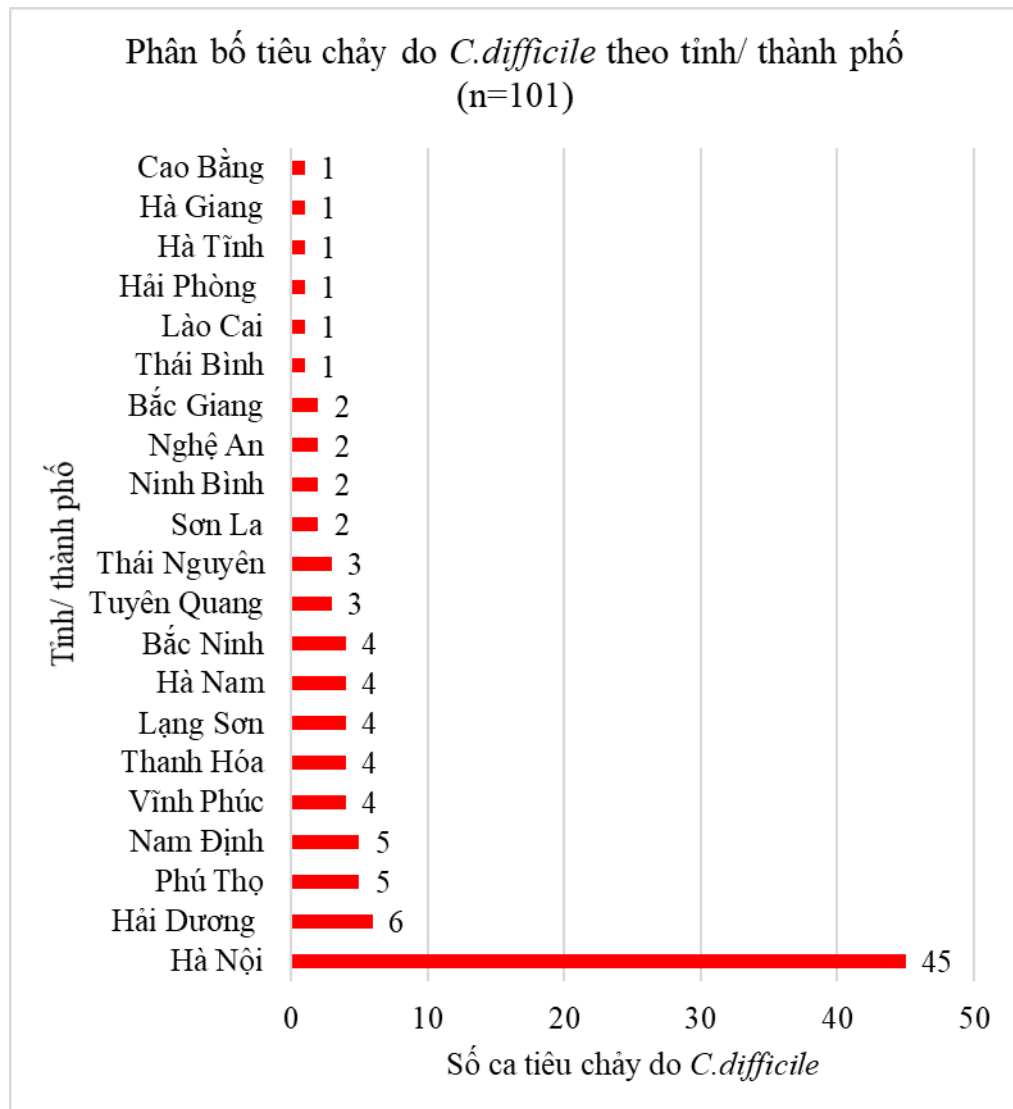
- **Phân bố ca bệnh theo năm:**



Biểu đồ 3.3: Phân bố tiêu chảy do *C.difficile* theo năm nghiên cứu

Biểu đồ 3.3 cho thấy, số ca mắc tăng dần theo năm, đến năm 2016 là cao nhất với 28 ca (27,7%). Năm 2017, số ca mắc giảm hơn.

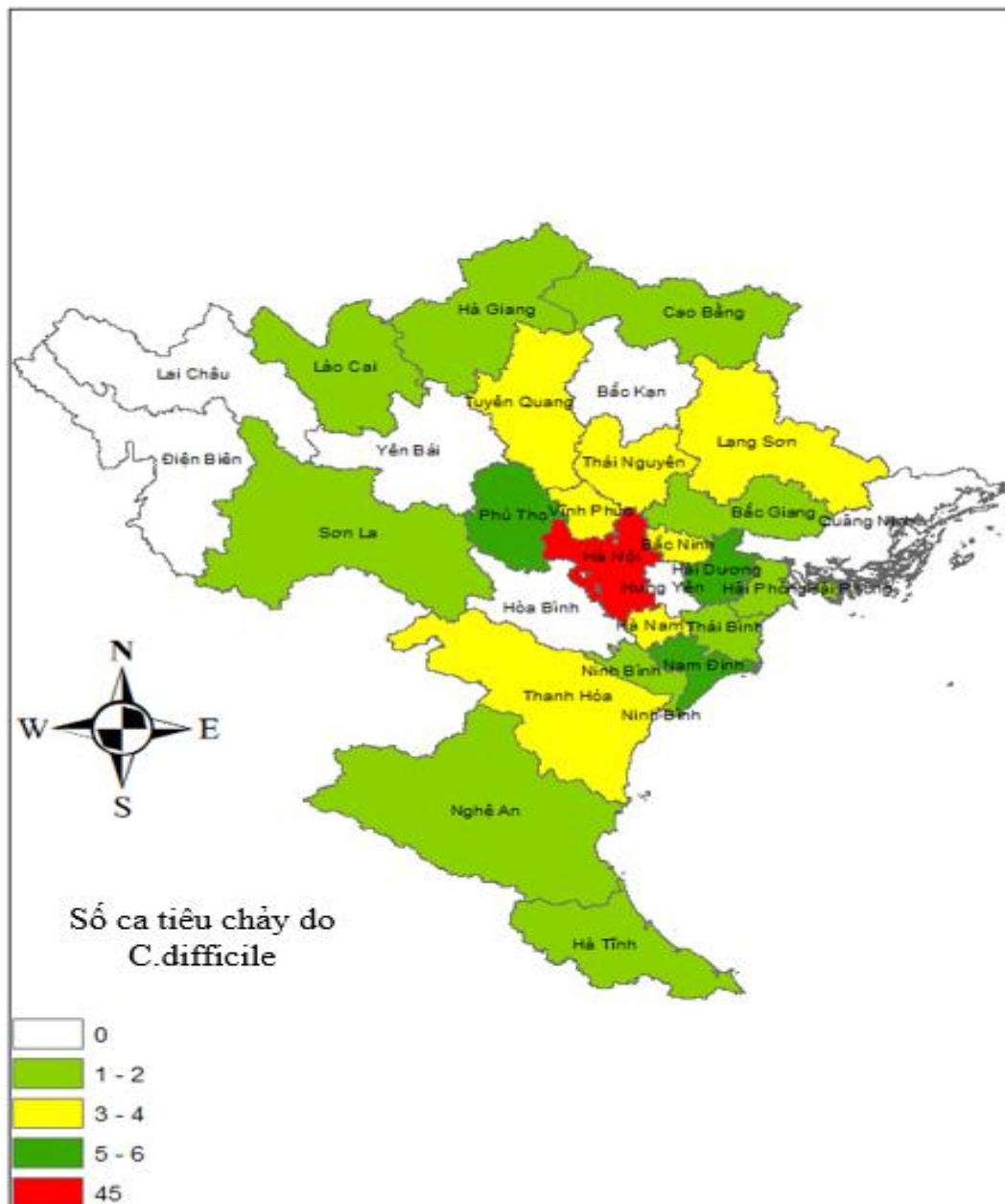
- ***Phân bố ca bệnh theo tỉnh/ thành phố:***



Biểu đồ 3.4: Phân bố tiêu chảy do *C.difficile* theo tỉnh/ thành phố

Bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* đến từ các tỉnh/ thành phố của miền Bắc Việt Nam, nhiều nhất ở Hà Nội (45 trường hợp).

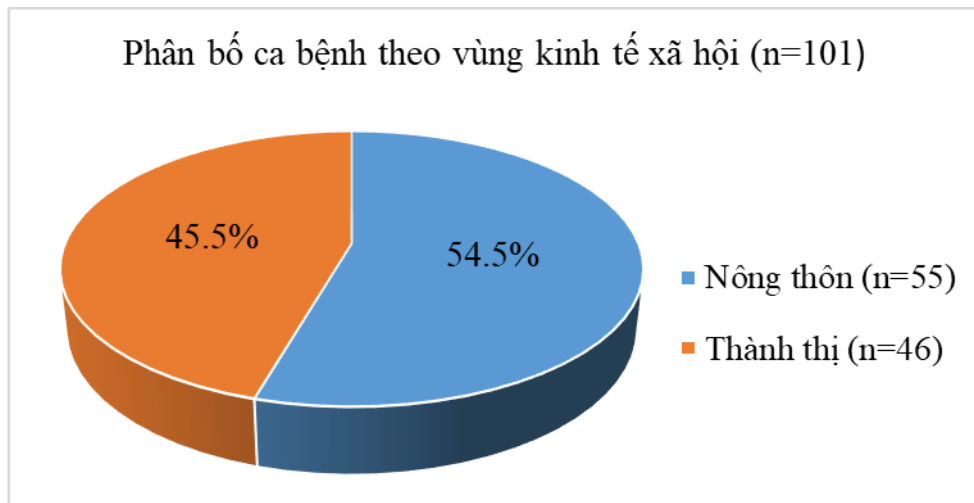
Bản đồ các Tỉnh/Thành phố có ca tiêu chảy do *C.difficile*



Hình 3.1: Bản đồ phân bố ca bệnh tiêu chảy do *C.difficile* nghiên cứu

Hình 3.1 cho thấy phân bố số ca tiêu chảy do *C.difficile* trong nghiên cứu, gặp ở 21/28 tỉnh/ thành phố miền Bắc Việt Nam, nhiều nhất là Hà Nội và các tỉnh lân cận.

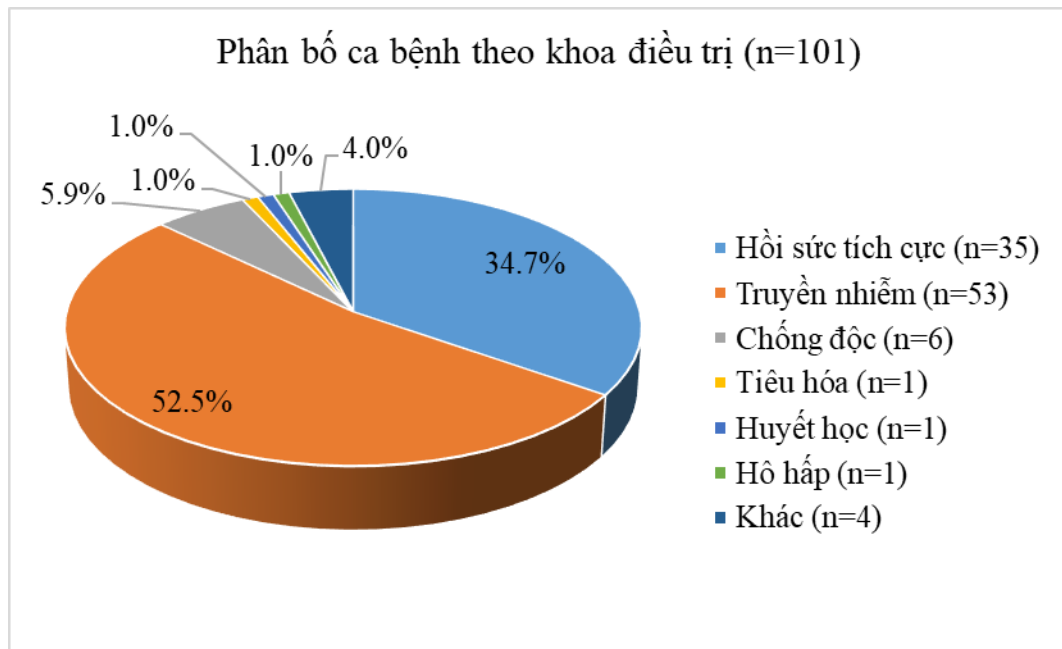
- ***Phân bố ca bệnh theo vùng kinh tế - xã hội***



Biểu đồ 3.5: Phân bố tiêu chảy do *C.difficile* theo vùng kinh tế - xã hội

Biểu đồ 3.5 cho thấy, tỉ lệ bệnh nhân đến từ nông thôn nhiều hơn, chiếm 54,5%, thành thị là 45,5%.

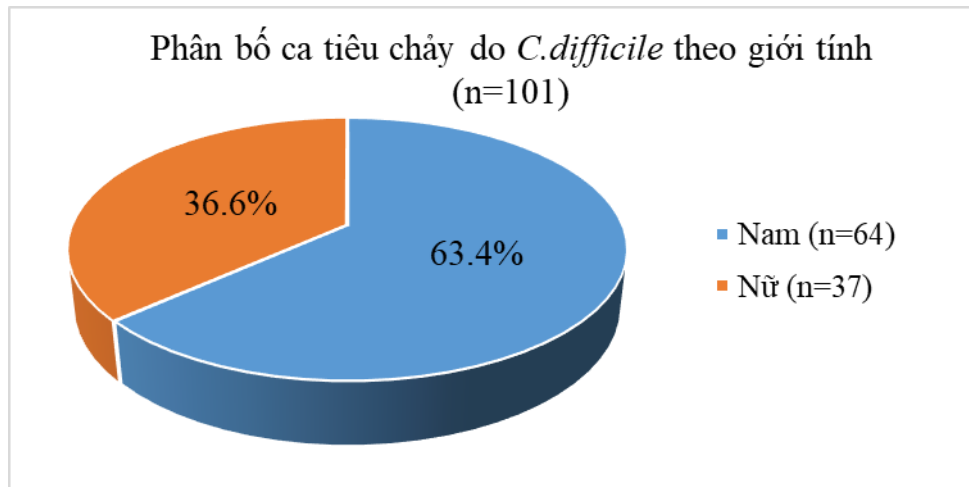
- ***Phân bố ca bệnh theo khoa điều trị***



Biểu đồ 3.6: Phân bố ca tiêu chảy do *C.difficile* theo khoa điều trị

Bệnh nhân trong nghiên cứu chủ yếu từ khoa Truyền nhiễm (52,5%) và khoa Hồi sức tích cực (34,7%).

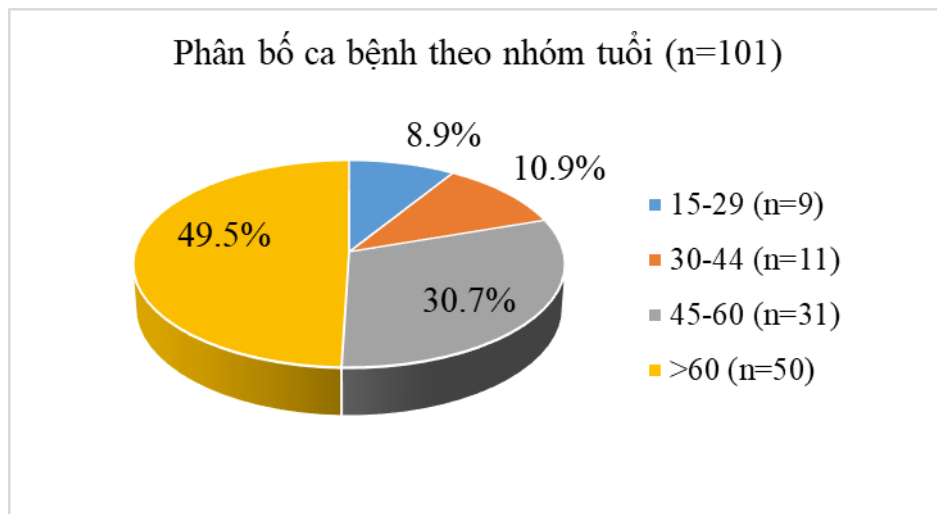
- ***Phân bố ca bệnh theo giới tính***



Biểu đồ 3.7: Phân bố tiêu chảy do *C.difficile* theo giới tính

Nam giới chiếm tỉ lệ cao hơn: 63,4%, nữ giới: 36,6%. Tỉ lệ nam:nữ là 1,7:1.

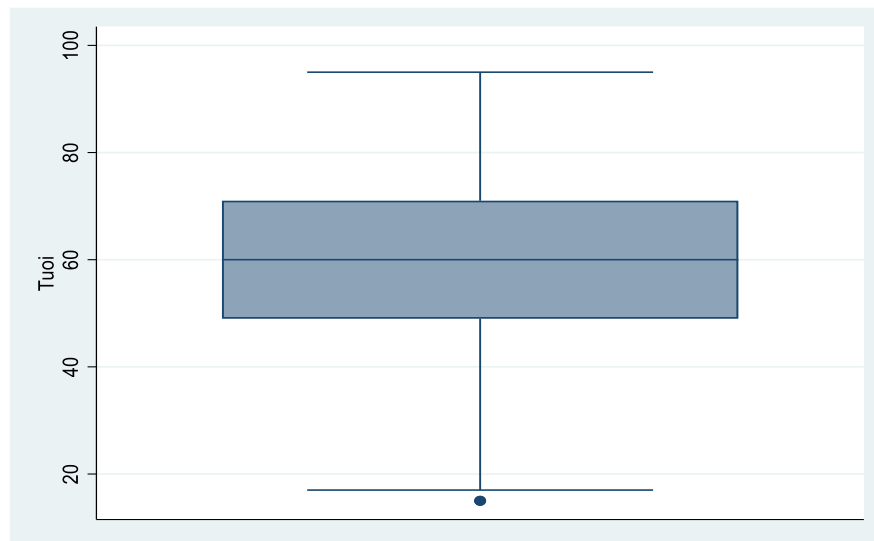
- ***Phân bố ca bệnh theo nhóm tuổi***



Biểu đồ 3.8: Phân bố tiêu chảy do *C.difficile* theo nhóm tuổi

Biểu đồ 3.8 cho thấy, số ca bệnh tăng dần theo nhóm tuổi. Nhóm bệnh nhân trên 60 tuổi chiếm nhiều nhất 49,5%.

- **Phân bố tuổi của bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile***



Biểu đồ 3.9: Phân bố tuổi bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile*

Biểu đồ 3.9 cho thấy, tuổi trung bình các bệnh nhân nghiên cứu là $59,4 \pm 18,6$ tuổi. Trung vị 60 tuổi, khoảng tứ phân vị 49-71. Bệnh nhân ít tuổi nhất của nghiên cứu là 15 tuổi và nhiều tuổi nhất là 95 tuổi.

3.1.2. Đặc điểm lâm sàng tiêu chảy do *C.difficile*

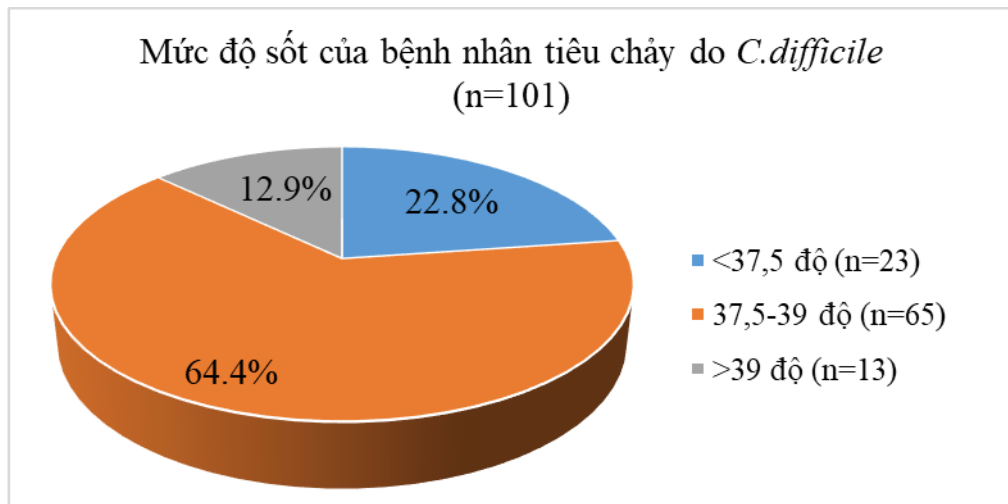
- **Triệu chứng lâm sàng**

Bảng 3.1. Triệu chứng lâm sàng bệnh nhân mắc tiêu chảy do *C.difficile*

Triệu chứng (n=101)	Có n %	Không n %
Sốt	78 (77,2)	23 (22,8)
Đau bụng	63 (62,4)	38 (37,6)
Chướng bụng	79 (78,2)	22 (21,8)
Buồn nôn, nôn	15 (14,9)	86 (85,1)
Phân nhầy mũi	20 (19,8)	81 (80,2)
Phân máu	17 (16,8)	84 (83,2)
Tụt huyết áp	13 (12,9)	88 (87,1)

Bảng 3.1 cho thấy, triệu chứng lâm sàng thường gặp ở bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* là sốt (77,2%), đau bụng (62,4%), chướng bụng (78,2%), ít gặp buồn nôn - nôn; phân nhầy mũi; phân máu. Có 12,9% bệnh nhân tụt huyết áp.

- **Mức độ sốt**



Biểu đồ 3.10. Mức độ sốt của bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile*

Biểu đồ 3.10 cho thấy, bệnh nhân mắc tiêu chảy do *C.difficile* thường sốt mức độ nhẹ - trung bình, từ 37,5°C đến 39°C (64,4%)

Bảng 3.2. Đặc điểm của tiêu chảy do *C.difficile* trong nghiên cứu

		Số lượng (n=101)	tỉ lệ %
Số lần tiêu chảy tối đa trong ngày	3-6 lần	66	65,3
	7-10 lần	25	24,8
	>10 lần	10	9,9
	X ± SD (min, max)	7 ± 4,9 lần (3 – 30 lần)	
Số ngày tiêu chảy	1-3 ngày	20	19,8
	4-13 ngày	50	49,5
	≥14 ngày	31	30,7
	Trung vị (min, max)	8 ngày (1 – 170 ngày)	

X ± SD: trung bình ± độ lệch chuẩn; min: giá trị nhỏ nhất; max: giá trị lớn nhất

Theo bảng 3.2, tiêu chảy do *C.difficile* thường từ 3-6 lần/ ngày (65,3%). Số lần tiêu chảy trung bình là 7 ± 4,9 lần, ít nhất là 3 lần/ ngày, nhiều nhất là 30

lần/ ngày. Thời gian tiêu chảy thường dài hơn 4 ngày (80,2%). Số ngày tiêu chảy trung vị là 8 ngày, thấp nhất là 1 ngày, dài nhất là 170 ngày. Đặc biệt, 30,7% tiêu chảy kéo dài trên 2 tuần.

- **Triệu chứng cận lâm sàng tiêu chảy do *C.difficile***

Bảng 3.3. Xét nghiệm phản ứng viêm ở bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile*

Chỉ số xét nghiệm	Bình thường n (%)	Tăng vừa n (%)	Tăng nhiều n (%)
Số lượng bạch cầu (n=101)	40 (39,6%)	33 (32,7%)	28 (27,7%)
Pro-calcitonin (n=37)	0	28 (75,7%)	9 (24,3%)

Bảng 3.3 cho thấy, số lượng bạch cầu tăng ở 60,4% trường hợp, tăng cao >15 G/L chiếm 27,7%. Có 37 bệnh nhân xét nghiệm pro-calcitonin đều tăng, đa số tăng vừa 0,05 – 10 ng/mL (75,7%), có 24,3% tăng cao trên 10 ng/mL.

Bảng 3.4. Các xét nghiệm máu khác

Chỉ số xét nghiệm	Bình thường n (%)	Giảm n (%)	Tăng n (%)
Số lượng hồng cầu (n= 101)	20 (19,8%)	78 (77,2%)	3 (3%)
Natri (n=100)	75 (75%)	23 (23%)	2 (2%)
Kali (n=100)	60 (60%)	30 (30%)	10 (10%)
Creatinin (n=97)	56 (57,7%)		41 (42,3%)
AST (n=99)	50 (50,5%)		49 (49,5%)
ALT (n=99)	66 (66,7%)		33 (33,3%)
	Bình thường	Giảm vừa	Giảm nhiều
Albumin (n=78)	8 (10,3%)	43 (55,1%)	27 (34,6%)

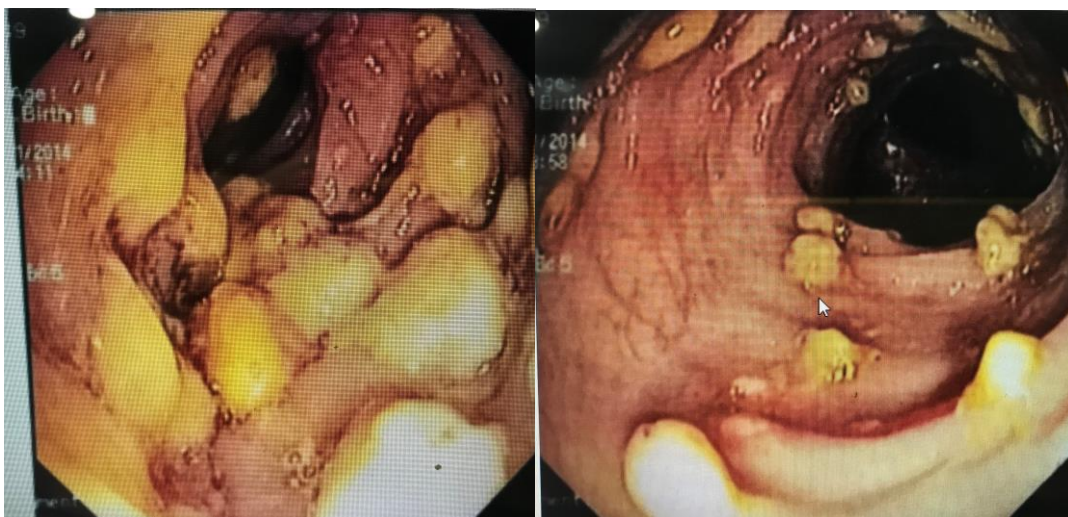
Bảng 3.4 cho thấy, số lượng hồng cầu thường giảm hơn giá trị bình thường <4,2 T/L (77,2%); albumin máu của bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* thường

giảm (89,7%) và giảm nhiều dưới 25 g/L (34,6%). Natri và kali máu đa số ở trong mức bình thường, tương ứng là 75% và 60%. Creatinin máu bình thường ở 57,7% các trường hợp. Các men gan AST và ALT bình thường trong hơn 50% số trường hợp.

Bảng 3.5. Kết quả soi đại tràng của bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile*

Tổn thương đại tràng	Số lượng (n=18)	%
Viêm đại tràng giả mạc	7	38,9
Viêm đại tràng chảy máu	4	22,2
Viêm loét đại tràng	1	5,6
Viêm đại tràng	3	16,7
Không có tổn thương viêm	3	16,7

Trong các bệnh nhân nghiên cứu, chỉ có 18 bệnh nhân (17,8%) được soi đại tràng. Bảng 3.5 cho thấy, 15/18 bệnh nhân có tổn thương viêm của đại tràng (83,3%), 7 bệnh nhân có viêm đại tràng giả mạc (38,9%).



Hình 3.2: Hình ảnh viêm đại tràng giả mạc
(Kết quả nội soi đại tràng của bệnh nhân nghiên cứu Nguyễn Thị N.)

Hình 3.2 cho thấy tổn thương viêm đại tràng giả mạc khi nội soi đại tràng của bệnh nhân Nguyễn Thị N. trong nghiên cứu.

Bảng 3.6. Điểm mức độ nặng của *C.difficile* theo diễn biến bệnh.

	Khỏi-đỡ-chuyển	Nặng xin về-tử vong	p
Trung bình $\pm$ Độ lệch, (min – max)	1,3 $\pm$ 1,1 (0-4)	1,8 $\pm$ 0,7 (1-3)	0,047*
Trung vị Tứ phân vị	1 (1-2)	2 (1-2)	

(Áp dụng thuật toán thống kê: t-test. Min: giá trị nhỏ nhất, max: giá trị lớn nhất)

Bảng 3.6 cho thấy, nhóm bệnh nhân nặng – tử vong có điểm mức độ nặng là 1,8 $\pm$ 0,7 và nhóm bệnh nhân khỏi - đỡ - chuyển tuyến là 1,3 $\pm$ 1,1. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, $p < 0,05$ (t test).

Bảng 3.7. Điểm mức độ nặng của *C.difficile* theo khoa

Khoa	0 đ	1đ	2đ	3đ	4đ	X $\pm$ SD
Hồi sức tích cực (n = 31)	3	14	7	6	1	1,6 $\pm$ 1,0 (0-4)
Truyền nhiễm (n = 36)	8	16	7	4	1	1,3 $\pm$ 1,0 (0-4)
Khoa khác (n = 9)	1	5	2	1	0	1,4 $\pm$ 0,9 (0-3)
Tổng số (n=76)	12	35	16	11	2	1,4$\pm$1,0 (0-4)

$p = 0,39$ (Anova test).

X: giá trị trung bình, SD: độ lệch chuẩn

Theo bảng 3.7, chỉ có 76 bệnh nhân nghiên cứu được làm đầy đủ các xét nghiệm bạch cầu, albumin và creatinin máu để tính điểm mức độ nặng. Tính 1 điểm cho mỗi dấu hiệu nặng: sốt $> 38.3^{\circ}\text{C}$, albumin máu $< 25\text{g/l}$, bạch cầu máu $> 15\text{ G/l}$, creatinin máu $> 133\mu\text{mol/L}$. Bảng 3.7 cho thấy bệnh nhân nằm khoa Hồi sức tích cực có điểm mức độ nặng là 1,6 $\pm$ 1,0 điểm, nằm khoa Truyền

nhễm là $1,3 \pm 1,0$ điểm, ở các khoa nội khác là $1,4 \pm 0,9$ điểm, nhưng sự khác biệt giữa các khoa chưa có ý nghĩa thống kê, $p = 0,39$ (Anova test).

- **Điều trị tiêu chảy do *C.difficile***

Khi bệnh nhân tiêu chảy, xử trí lâm sàng thường là điều trị kháng sinh, dùng thuốc bọc niêm mạc, lợi khuẩn đường ruột, thuốc cầm tiêu chảy hoặc kết hợp 2 – 3 loại thuốc cho bệnh nhân.

Bảng 3.8. Can thiệp điều trị bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile*

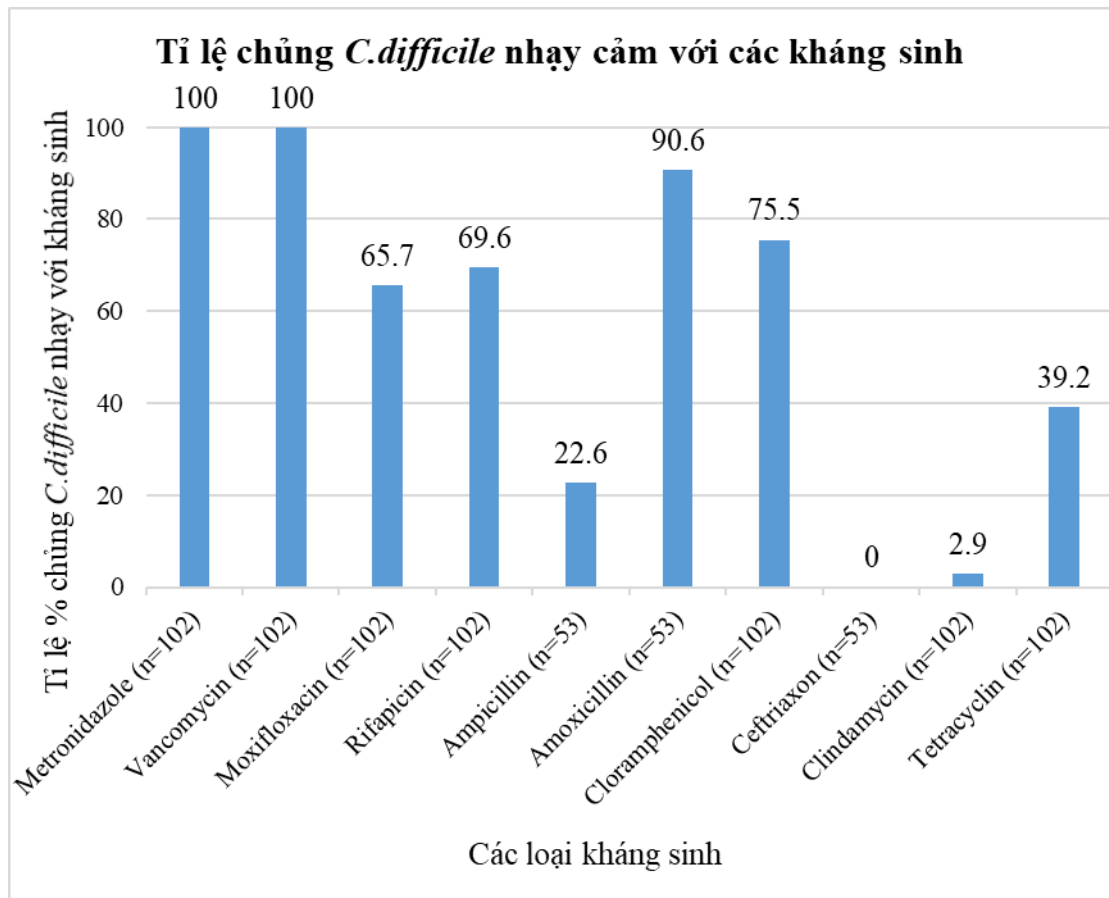
Các xử trí cho bệnh nhân tiêu chảy	Số lượng	%
Dùng metronidazole n = 101	43	42,5
Dùng vancomycin n = 101	18	17,8
Dùng thuốc bọc niêm mạc n = 101	49	48,5
Dùng lợi khuẩn n = 101	44	43,6
Dùng thuốc cầm tiêu chảy n = 101	1	1
Không điều trị n = 101	22	21,8

Bảng 3.8 cho thấy, trong 101 bệnh nhân nghiên cứu, dùng kháng sinh metronidazole chỉ trong 42,5% trường hợp, 17,8% dùng kháng sinh vancomycin, thuốc bọc niêm mạc đường tiêu hóa 48,5%, lợi khuẩn đường ruột 43,6%. Nghiên cứu có 79 bệnh nhân (78,2%) có điều trị một hoặc kết hợp 2-3 thuốc và 21,8% bệnh nhân tiêu chảy không có can thiệp thuốc điều trị.

Bảng 3.9. Đề kháng kháng sinh của các chủng *C.difficile*

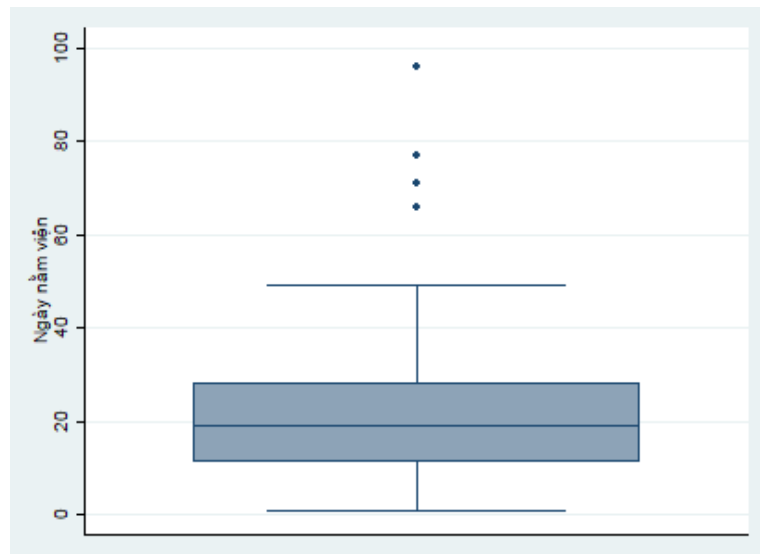
Loại kháng sinh	Kháng kháng sinh		Không kháng kháng sinh	
	n	%	n	%
Metronidazol (n=102)	0	0	102	100
Vancomycin (n=102)	0	0	102	100
Moxifloxacin (n=102)	34	33,3	68	66,7
Rifapicin (n=102)	31	30,4	71	69,6
Ampicillin (n=53)	18	34,0	35	66,0
Amoxicillin (n=53)	2	3,8	51	96,2
Ceftriaxon (n=53)	53	100	0	0
Clindamycin (n=102)	95	93,1	7	6,9
Cloramphenicol (n=102)	5	4,9	97	95,1
Tetracyclin (n=102)	51	50,0	51	50,0

Trong 101 bệnh nhân nghiên cứu, có 6 bệnh nhân mang 2 chủng *C.difficile* (thu được 107 chủng vi khuẩn). Chỉ có 102 chủng *C.difficile* đủ điều kiện làm được kháng sinh đồ. Có 7 kháng sinh đủ sinh phẩm làm kháng sinh đồ cho 102 chủng *C.difficile*, 3 loại kháng sinh khác chỉ đủ sinh phẩm làm kháng sinh đồ cho 53 chủng *C.difficile*. Bảng 3.9 cho thấy, tất cả các chủng *C.difficile* đều kháng với ceftriaxon, đề kháng cao với clindamycin (93,1%). Chưa phát hiện chủng kháng với vancomycin và metronidazole trong nghiên cứu.



Biểu đồ 3.11: Tỉ lệ % chủng *C.difficile* nhạy cảm với các kháng sinh

Biểu đồ 3.11 cho thấy, tất cả các chủng *C.difficile* còn nhạy cảm với metronidazole và vancomycin. Nhạy cảm giảm hơn với amoxicillin, cloramphenicol, rifapicin và moxifloxacin. Không có chủng nào còn nhạy cảm với ceftriaxon.



Biểu đồ 3.12. Tổng số ngày nằm viện ở bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile*

Biểu đồ 3.12 cho thấy, số ngày nằm viện trung bình của các bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* là $22,2 \pm 16,3$ ngày. Trung vị là 19 ngày, tứ phân vị 11-28 ngày. Số ngày nằm viện ngắn nhất là 1 ngày, dài nhất là 96 ngày.

Bảng 3.10. Diễn biến điều trị bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile*

	Khỏi	Đỡ ra viện	Chuyển tuyến	Nặng xin về	Tử vong
Bệnh nhân khoa Hồi sức tích cực (n=35)	4 (11,%)	5 (14,3%)	12 (34,3%)	9 (25,7%)	5 (14,3%)
Bệnh nhân khoa Truyền nhiễm (n=53)	23 (43,4%)	13 (24,5%)	11 (20,8%)	5 (9,4%)	1 (1,9%)
Bệnh nhân khoa khác (n=13)	4 (30,8%)	3 (23%)	4 (30,8%)	2 (15,4%)	0
Tổng số bệnh nhân (n=101)	31 (30,7%)	21 (20,8%)	27 (26,7%)	16 (15,8%)	6 (5,9%)

Bảng 3.10 cho thấy, tỉ lệ bệnh nhân diễn biến xấu (tử vong và nặng xin về) chung của các bệnh nhân nghiên cứu là 21,7%, tử vong là 5,9%. Tỉ lệ này cao

hơn ở các bệnh nhân nặng phải điều trị tại khoa Hồi sức tích cực: diễn biến xấu (tử vong và nặng xin về) là 40%, tử vong 14,3%.

Bảng 3.11. Phân bố diễn biến điều trị theo nhóm tuổi

Diễn biến điều trị	≤ 65 tuổi n = 60	>65 tuổi n = 41	P
Khỏi (n = 31)	20 (33,3)	11 (26,8)	0,518
Đỡ - ra viện (n = 21)	11 (18,3)	10 (24,4)	0,467
Chuyển tuyến (n = 27)	18 (30,0)	9 (21,9)	0,493
Nặng – xin về (n = 16)	10 (16,7)	6 (14,6)	1
Tử vong (n = 6)	1 (1,7)	5 (12,2)	0,039*

(Áp dụng thuật toán thống kê: Fisher's exact test)

Bảng 3.11 cho thấy, bệnh nhân > 65 tuổi có diễn biến xấu (nặng xin về và tử vong) chiếm 26,8%, trong khi nhóm ≤ 65 tuổi là 18,4%. Tử vong ở nhóm bệnh nhân ≤ 65 tuổi là 1,7%, nhưng ở nhóm bệnh nhân >65 tuổi chiếm 12,2%, cao hơn với khác biệt có ý nghĩa thống kê, $p < 0,05$ (Fisher exact test).

3.2. Một số yếu tố nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* ở người lớn tại bệnh viện Bạch Mai, 2013 - 2017

Để tăng ý nghĩa thống kê liên quan đến cỡ mẫu, giảm các yếu tố nhiễu, nghiên cứu các yếu tố nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* lấy mẫu với tỉ lệ 1 bệnh: 3 chứng. Trong 101 bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* chọn được 91 bệnh nhân phù hợp cùng giới, cùng khoa điều trị và cùng năm bị bệnh với 273 bệnh nhân tiêu chảy nhóm chứng để phân tích các yếu tố nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile*.

3.2.1. Các yếu tố nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* qua phân tích đơn biến

Bảng 3.12. Tuổi bệnh nhân và tiêu chảy do *C.difficile*

Tuổi		Nhóm bệnh (n = 91)	Nhóm chứng (n = 273)	OR (95% CI)	P
Nhóm tuổi	15-29	7	32	1	
	30-44	9	57	0,72 (0,25-2,12)	0,554
	45-60	29	71	1,87 (0,74-4,71)	0,186
	>60	46	113	1,86 (0,77-4,52)	0,170
Nhóm tuổi	< 60	42	157	1	
	≥ 60	49	116	1,58 (0,98-2,54)	0,06
Nhóm tuổi	< 65	50	191	1	
	≥ 65	41	82	1,91 (1,17-3,11)	0,009*

Bảng 3.12 cho thấy, bệnh nhân từ 65 tuổi trở lên có nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* cao gấp 1,91 lần bệnh nhân dưới 65 tuổi. (95% CI: 1,17 – 3,11).

Bảng 3.13. Mắc bệnh mạn tính và tiêu chảy do *C.difficile*

Bệnh mạn tính		Nhóm bệnh (n = 91)	Nhóm chứng (n = 273)	OR (95% CI)	P
Có bệnh mạn tính	Có	69	198	1,17 (0,68-2,03)	0,571
	Không	22	74	1	
Số bệnh mạn tính	≥2 bệnh	37	83	1,57 (0,96-2,56)	0,073
	<2 bệnh	54	190	1	
Số bệnh mạn tính	≥3 bệnh	14	19	2,43 (1,16-5,07)	0,018*
	<3 bệnh	77	254	1	

Bảng 3.13 cho thấy, bệnh nhân mang từ 3 bệnh mạn tính trở lên có nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* cao gấp 2,43 lần so với các bệnh nhân ít bệnh mạn tính hơn. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (95% CI: 1,16 – 5,07).

Bảng 3.14. Loại bệnh mạn tính/ trạng thái sức khỏe và tiêu chảy do *C.difficile*

Bệnh mạn tính/ trạng thái sức khỏe		Nhóm bệnh (n = 91)	Nhóm chứng (n = 273)	OR	95% CI	P
Đái tháo đường	Có	21	46	1,48	0,83-2,65	0,186
	Không	70	227	1		
Bệnh gan mạn	Có	13	45	0,84	0,43-1,65	0,620
	Không	78	228	1		
Bệnh thận mạn	Có	11	18	1,95	0,88-4,30	0,99
	Không	80	255	1		
Lọc máu chu kỳ	Có	5	3	5,23	1,23-22,35	0,025*
	Không	86	270	1		
Bệnh hô hấp mạn	Có	11	15	2,37	1,04-5,36	0,039*
	Không	80	258	1		
Bệnh tiêu hóa mạn	Có	5	15	1	0,35-2,83	1
	Không	86	258	1		
Bệnh tim mạch	Có	30	70	1,43	0,85-2,39	0,176
	Không	61	203	1		
Ung thư	Có	2	13	0,45	0,10-2,03	0,299
	Không	89	260	1		
Mắc HIV/AIDS	Có	1	7	0,42	0,05-3,48	0,423
	Không	90	266	1		
Bệnh tự miễn	Có	3	8	1,13	0,29-4,35	0,860
	Không	88	265	1		
Sử dụng corticoid	Có	1	7	0,42	0,05-3,48	0,423
	Không	90	266	1		
Phẫu thuật	Có	6	10	1,86	0,66-5,26	0,244
	Không	85	263	1		
Có thai và cho con bú	Có	1	11	0,26	0,03-2,08	0,206
	Không	90	262	1		

Phân tích 13 yếu tố quan tâm về từng loại bệnh mạn tính/ trạng thái sức khỏe của bệnh nhân với mắc tiêu chảy do *C.difficile*, bảng 3.14 cho thấy, lọc máu chu kỳ có nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* cao gấp 5,23 lần bệnh nhân không lọc máu chu kỳ, $p < 0,05$ (95% CI: 1,23 - 22,35). Người có bệnh hô hấp mạn có nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* cao gấp 2,37 lần người không mắc bệnh hô hấp mạn, $p < 0,05$ (95% CI: 1,04 - 5,36). Người có một số các bệnh mạn tính khác như mắc đái tháo đường, mang bệnh thận mạn tính, bệnh tim mạch, bệnh tự miễn hoặc phải trải qua phẫu thuật ghi nhận có mắc tiêu chảy do *C.difficile* cao hơn, nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê.

Bảng 3.15. Nơi sống của bệnh nhân tiêu chảy

Nơi sống	Nhóm bệnh (n=91)	Nhóm chứng (n=273)	OR (95%CI)	p
Nông thôn	47	178	1	
Thành thị	44	95	1,75 (1,08-2,84)	0,022*

Theo bảng 3.15, bệnh nhân thành thị có nguy cơ tiêu chảy do *C.difficile* cao gấp 1,75 lần các bệnh nhân ở nông thôn, $p < 0,05$ (95% CI: 1,08 – 2,84)

Bảng 3.16. Tiền sử nằm viện trong vòng 8 tuần trước tiêu chảy

Tiền sử nằm viện 8 tuần trước	Nhóm bệnh (n = 91)	Nhóm chứng (n = 273)	OR (95% CI)	p
Có	67 (73,6)	172 (63)	1,64 (0,97-2,78)	0,066
Không	24 (26,4)	101 (37)	1	
Số ngày nằm viện trước tiêu chảy:			1,02 (0,99-1,05)	0,061
Trung vị	10	7		
Tứ phân vị	2-20	2-14		
min, max	(0-84)	(0-90)		

Bảng 3.16 cho thấy, nằm viện trong vòng 8 tuần trước có nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile*, với OR = 1,64. Tuy nhiên, sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê, (95% CI: 0,97 – 2,78). Thời gian nằm viện trước tiêu chảy ở nhóm bệnh có giá trị trung vị là 10 ngày, nhóm chứng là 7 ngày, tuy nhiên sự khác biệt về thời gian nằm viện trước tiêu chảy chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 3.17. Tiền sử dùng kháng sinh trong 8 tuần trước tiêu chảy

Tiền sử dùng kháng sinh trong 8 tuần trước tiêu chảy	Nhóm bệnh (n = 91)	Nhóm chứng (n = 273)	OR (95%CI)	p
Có	61 (67)	165 (60,4)	1,33 (0,81-2,19)	0,262
Không	30 (33)	108 (39,6)	1	
≥ 2 loại	44	125	1,11 (0,69-1,78)	0,671
< 2 loại	47	148	1	
≥ 3 loại	20	52	1,20 (0,67-2,14)	0,544
< 3 loại	71	221	1	

Bảng 3.17 cho thấy, dùng kháng sinh trong vòng 8 tuần trước khi bị tiêu chảy có nguy cơ mắc *C.difficile* cao hơn không dùng kháng sinh, OR = 1,33. Tuy nhiên, sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê, $p > 0,05$ (95% CI: 0,81 – 2,19). Tiền sử dùng 2 đến 3 loại kháng sinh trong 8 tuần trước tiêu chảy giữa 2 nhóm cũng chưa có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Bảng 3.18. Nhóm kháng sinh sử dụng trong 8 tuần trước tiêu chảy

Nhóm kháng sinh dùng trong 8 tuần trước tiêu chảy		Nhóm bệnh (n = 91)	Nhóm chứng (n = 273)	OR (95% CI)	p
Nhóm penicilin	Có	4	9	1,35 (0,41-4,49)	0,626
	Không	87	264	1	
Nhóm cephalosporin	Có	33	74	1,53 (0,92-2,53)	0,098
	Không	58	199	1	
Nhóm carbapenem	Có	37	97	1,24 (0,76-2,02)	0,380
	Không	54	176	1	
Nhóm aminosid	Có	6	12	1,54 (0,56-4,22)	0,405
	Không	85	261	1	
Nhóm macrolid	Có	6	11	1,68 (0,60-4,68)	0,320
	Không	85	262	1	
Nhóm clindamycin	Có	1	4	0,75 (0,08-6,77)	0,796
	Không	90	269	1	
Nhóm quinolon	Có	19	51	1,15 (0,64-2,07)	0,645
	Không	72	222	1	
Nhóm cotrimoxazole	Có	0	2	-	
	Không	91	271	1	
Nhóm metronidazole	Có	4	29	0,39 (0,13-1,13)	0,083
	Không	87	244	1	
Nhóm glycopeptid	Có	3	37	0,22 (0,07-0,72)	0,013*
	Không	88	236	1	

Bảng 3.18 cho thấy, khi sử dụng các kháng sinh trong vòng 8 tuần trước tiêu chảy, bệnh nhân dùng kháng sinh nhóm glycopeptid để chữa bệnh khác có ít nguy cơ mắc *C.difficile* hơn, bằng 0,22 lần ở nhóm chứng, $p < 0,05$ (95% CI: 0,07 – 0,72).

Bảng 3.19. Một số tiền sử can thiệp khác

Tiền sử can thiệp		Nhóm bệnh (n = 91)	Nhóm chứng (n = 273)	OR (95%CI)	p
Dùng thuốc kháng axit dạ dày	Có	39	102	1,26 (0,78-2,04)	0,352
	Không	52	171	1	
Dùng corticoid	Có	9	20	1,39 (0,61-3,17)	0,436
	Không	82	253	1	
Dùng thuốc điều trị ung thư	Có	1	3	1 (0,10-9,73)	1
	Không	90	270	1	
Can thiệp đường tiêu hóa	Có	40	111	1,14 (0,71-1,85)	0,581
	Không	51	162	1	

Bảng 3.19 cho thấy, dùng thuốc kháng axit dạ dày, dùng corticoid hay các can thiệp đường tiêu hóa gặp nhiều hơn ở nhóm bệnh, nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 3.20. Các triệu chứng lâm sàng

Triệu chứng lâm sàng		Nhóm bệnh (n = 91)	Nhóm chứng (n = 273)	OR (95%CI)	p
Sốt	>37,5 độ	74	222	1 (0,54-1,84)	1
	≤37,5 độ	17	51	1	
Sốt	>38,5 độ	35	93	1,21 (0,74-1,98)	0,447
	≤38,5 độ	56	180	1	
Đau bụng	Có	56	171	0,95 (0,59-1,56)	0,851
	Không	35	102	1	
Chướng bụng	Có	72	201	1,34 (0,75-2,37)	0,319
	Không	19	71	1	
Buồn nôn, nôn	Có	12	53	0,63 (0,32-1,24)	0,182
	Không	79	220	1	
Phân nhầy mũi	Có	17	12	4,98 (2,28-10,89)	<0,001*
	Không	74	260	1	
Phân máu	Có	15	21	2,36 (1,16-4,80)	0,018*
	Không	76	251	1	
Tụt huyết áp	Có	12	33	1,10 (0,54-2,24)	0,783
	Không	79	240	1	

Bảng 3.20 cho thấy, phân nhầy mũi là yếu tố có liên quan đến chỉ điểm chẩn đoán mắc tiêu chảy do *C.difficile* cao hơn 4,89 lần so với phân không nhầy mũi, $p < 0,05$ (95%CI: 2,28 – 10,89). Phân có máu cũng là yếu tố có liên quan đến chỉ điểm chẩn đoán mắc tiêu chảy do *C.difficile* cao gấp 2,36 lần phân không có máu, $p < 0,05$ (95% CI: 1,16 – 4,8).

Bảng 3.21. Số lần tiêu chảy trong ngày

Số lần tiêu chảy	Nhóm bệnh (n = 91)	Nhóm chứng (n = 273)	OR (95%CI)	p
≤6 lần	60	205	1	
7-10 lần	21	37	1,94 (1,06-3,56)	0,033*
>10 lần	10	31	1,1 (0,51-2,38)	0,804
Số lần tiêu chảy trung bình	7,0±5,1 (3-30)	6,0±3,7 (3-20)	1,06 (1,0-1,11)	0,049*

Bảng 3.21 cho thấy, tiêu chảy 7-10 lần/ ngày là yếu tố liên quan đến mắc tiêu chảy do *C.difficile* cao gấp 1,94 lần so với tiêu chảy có số lần ít hơn, $p < 0,05$ (95% CI: 1,06 – 3,56). Số lần tiêu chảy trung bình ở nhóm bệnh là $7,0 \pm 5,1$ ngày cũng nhiều hơn nhóm chứng $6,0 \pm 3,7$ ngày ($p < 0,05$).

Bảng 3.22. Số ngày tiêu chảy

Số ngày tiêu chảy	Nhóm bệnh n = 91	Nhóm chứng n =273	OR (95%CI)	p
1-3 ngày	18	84	1	
4-13 ngày	47	138	1,59 (0,87-2,92)	0,135
≥14 ngày	26	51	2,38 (1,19-4,76)	0,014*
Số ngày tiêu chảy Trung vị, tứ phân vị, min - max	8 (1-170) (4 – 15)	5 (1-90) (3 – 10)	1,01 (0,99-1,03)	0,121

Tiêu chảy ≥ 14 ngày có liên quan đến chỉ điểm chẩn đoán mắc tiêu chảy do *C.difficile* cao gấp 2,38 lần tiêu chảy ít hơn, $p < 0,05$ (95%CI: 1,19 – 4,76). Số ngày tiêu chảy ở nhóm bệnh kéo dài hơn nhóm chứng, nhưng khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 3.23. Một số triệu chứng cận lâm sàng

Xét nghiệm máu		Nhóm bệnh n = 91	Nhóm chứng n =273	OR (95%CI)	p
Bạch cầu	10-15	32	66	1	
	<10	33	120	0,57 (0,32-1,00)	0,052
	>15	26	85	0,63 (0,34-1,16)	0,138
Albumin	<25	24	54	1,27 (0,71-2,27)	0,424
	≥ 25	48	137	1	
Procalcitonin	>10	8	24	0,72 (0,28-1,81)	0,483
	≤ 10	26	56	1	

Số lượng bạch cầu máu, albumin máu và procalcitonin máu không có sự khác biệt có ý nghĩa giữa 2 nhóm ($p > 0,05$).

Bảng 3.24. Tổng hợp các yếu tố liên quan có ý nghĩa trong phân tích đơn biến

TT	Các biến số	Nhóm bệnh n =91	Nhóm chứng n =273	OR	95%CI	p
1	≥ 65 tuổi	41	82	1,91	1,17-3,11	0,009
2	Sống ở thành thị	44	95	1,75	1,08-2,84	0,022
3	Có ≥ 3 bệnh mạn tính	14	19	2,43	1,16-5,07	0,018
4	Cần lọc máu chu kỳ	5	3	5,23	1,23-22,35	0,025
5	Có bệnh hô hấp mạn	11	15	2,37	1,04-5,36	0,039
6	Dùng kháng sinh nhóm glycopeptid điều trị bệnh khác trong vòng 8 tuần trước tiêu chảy	3	37	0,22	0,07-0,72	0,013
7	Phân có nhầy mũi	17	12	4,98	2,28-10,89	<0,001
8	Phân có máu	15	21	2,36	1,16-4,80	0,018
9	Tiêu chảy 7-10 lần/ngày	21	37	1,94	1,06-3,56	0,033
10	Số ngày tiêu chảy ≥ 14 ngày	26	51	2,38	1,19-4,76	0,014

Bảng 3.24 cho thấy, khi phân tích đơn biến, có 10 yếu tố liên quan đến tiêu chảy do *C.difficile*. Có 5 yếu tố nguy cơ cho mắc tiêu chảy do *C.difficile* là: tuổi cao ≥ 65 , sống ở thành thị, có mắc sẵn ≥ 3 bệnh lý mạn tính, bệnh nhân cần lọc máu chu kỳ, bệnh nhân bị bệnh hô hấp mạn tính. Có 4 yếu tố liên quan đến chỉ điểm, chẩn đoán mắc tiêu chảy do *C.difficile* là: đại tiện phân có nhầy mũi, đại tiện phân có máu, tiêu chảy 7-10 lần/ ngày, số ngày tiêu chảy kéo dài ≥ 14 ngày. Có một yếu tố bảo vệ là có tiền sử dùng kháng sinh nhóm glycopeptid điều trị bệnh khác trong vòng 8 tuần trước tiêu chảy.

3.2.2. Yếu tố nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* ở người lớn trong phân tích đa biến

Bảng 3.25. Các yếu tố nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* trong phân tích đa biến

TT	Các biến số	Nhóm bệnh n = 91	Nhóm chứng n = 273	OR (95%CI)	p
1	≥ 65 tuổi	41	82	2,01 (1,20-3,40)	0,009
2	Sống ở thành thị	44	95	1,76 (1,05-2,96)	0,032
3	Cần lọc máu chu kỳ	5	3	7,32 (1,55-34,60)	0,012
4	Dùng kháng sinh nhóm Glycopeptid điều trị bệnh khác 8 tuần trước tiêu chảy	3	37	0,18 (0,05-0,67)	0,011
5	Phân có nhày mũi	17	12	5,94 (2,50-14,12)	<0,001
6	Tiêu chảy 7-10 lần/ ngày	21	37	1,98 (1,04-3,77)	0,037

Các yếu tố liên quan có ý nghĩa thống kê trong phân tích đơn biến tiếp tục được đưa vào phân tích đa biến theo mô hình hồi quy logistic. Kết quả cuối cùng của phân tích đa biến ở bảng 3.25 cho thấy, có 6 yếu tố độc lập thực sự liên quan đến tiêu chảy do *C.difficile*. Có 3 yếu tố nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* là: tuổi ≥ 65 (OR = 2,01); sống ở thành thị (OR = 1,76); bệnh nhân cần lọc máu chu kỳ (OR = 7,32). Có 2 yếu tố liên quan đến chỉ điểm cho chẩn đoán mắc tiêu chảy do *C.difficile* là đại tiện phân có nhày mũi (OR = 5,94); tiêu chảy mức vừa từ 7 – 10 lần/ ngày (OR = 1,98). Yếu tố bảo vệ với mắc tiêu chảy do *C.difficile* là sử dụng kháng sinh nhóm glycopeptid điều trị bệnh khác trong vòng 8 tuần trước tiêu chảy (OR = 0,18).

3.3. Một số đặc điểm phân bố kiểu gen của *C.difficile* gây tiêu chảy ở người lớn tại bệnh viện Bạch Mai, 2013 - 2017

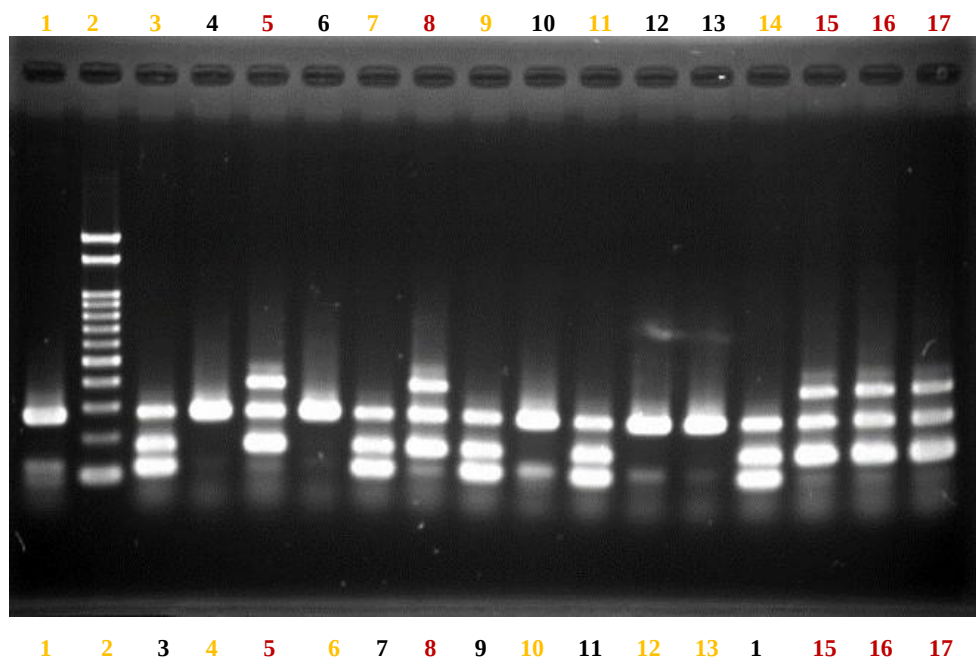
Tất cả các chủng *C.difficile* của bệnh nhân chẩn đoán xác định mắc tiêu chảy do *C.difficile* được phân tích đặc điểm kiểu gen.

3.3.1. Các gen sinh độc tố của *C.difficile*

Bảng 3.26: Tỷ lệ các gen sinh độc tố của *C.difficile* ở bệnh nhân nghiên cứu

Gen sinh độc tố	Số lượng bệnh nhân (n=101)	Tỷ lệ %
A+B+	50	49,5
A-B+	45	44,6
A+B+ và A-B+	6	5,9

Bảng 3.26 cho thấy, đã phát hiện được cả 2 loại gen sinh độc tố của *C.difficile* là A+B+ (49,5% bệnh nhân) và A-B+ (44,6% bệnh nhân). Đặc biệt, có 6 bệnh nhân (5,9%) đồng thời mắc cả 2 chủng *C.difficile*: chủng mang gen sinh độc tố A+B+ và chủng mang loại gen sinh độc tố A-B+.



Hình 3.3: PCR đa môi xác định gen sinh độc tố của *C.difficile*

ở bệnh nhân nghiên cứu (nguồn: Khoa vi khuẩn – viện VSDTTW)

Giếng 4, 6, 10, 12, 13: chỉ có 1 băng của gen *tpi* 280bp đặc hiệu loài *Clostridium*, không có gen sinh độc tố, là chủng *C.difficile* A-B-

Giếng 5, 8, 15, 16, 17: mang 1 băng của gen *tcdA* 369bp, 1 băng của gen *tpi* 280bp và 1 băng của gen *tcdB* 160bp, là chủng *C.difficile* A+B+

Giếng 3, 7, 9, 11, 14: mang 1 băng của gen *tpi* 280bp và 1 băng của gen *tcdB* 160bp, và 1 băng của gen *tcdA* 110bp, là chủng *C.difficile* A-B+

Hình 3.3 minh họa kết quả phản ứng PCR xác định gen *tpi* đặc hiệu cho loài *Clostridium*, gen sinh độc tố A và gen sinh độc tố B của *Clostridium difficile* ở bệnh nhân nghiên cứu.

Tất cả các chủng *C.difficile* sinh độc tố đều phát hiện được 3 băng với đậm độ rõ ràng và bằng nhau.

Bảng 3.27: Sự phân bố các loại gen sinh độc tố của *C.difficile* theo năm

Gen sinh độc tố	Năm 2013 n =12	Năm 2014 n =18	Năm 2015 n = 24	Năm 2016 n = 28	Năm 2017 n = 19	p
A+B+	7 (58,3)	7 (38,9)	10 (41,7)	14 (50,0)	12 (63,2)	0,526
A-B+	3 (25,0)	9 (50,0)	13 (54,2)	13 (46,4)	7 (36,8)	0,493
A+B+ và A-B+	2 (16,7)	2 (11,1)	1 (4,2)	1 (3,6)	0	0,293

(Áp dụng thuật toán thống kê: Fisher's exact test)

Bảng 3.27 cho thấy, chủng *C.difficile* có gen sinh độc tố A-B+ không cao ở năm 2013, có xu hướng tăng vào năm 2014 đến 2015 và giảm xuống cùng với tổng số ca năm 2017. Tuy nhiên, sự khác biệt giữa các chủng *C.difficile* mang các gen sinh độc tố không có sự khác biệt có ý nghĩa giữa các năm nghiên cứu, $p > 0,05$ (Fisher's exact test).

Bảng 3.28 Phân bố nhóm tuổi theo loại gen sinh độc tố của *C.difficile*

Nhóm tuổi	A+B+ n = 50	A-B+ n = 45	A+B+ và A-B+ n = 6	p
15- 60 tuổi	26 (52,0)	21 (46,7)	4 (66,7)	0,661
>60 tuổi	24 (48,0)	24 (53,3)	2 (33,3)	

(Áp dụng thuật toán thống kê: Fisher's exact test)

Bảng 3.28 cho thấy, bệnh nhân >60 tuổi mang loại gen sinh độc tố A-B+ nhiều hơn (53,3%) so với lứa tuổi trẻ hơn, nhưng khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) (Fisher's exact test).

Bảng 3.29: Các triệu chứng lâm sàng của *C.difficile* theo loại gen độc tố

Triệu chứng	A+B+ n = 50	A-B+ n = 45	2 độc tố n = 6	p
Sốt n=101				
Có	39 (78,0)	34 (75,6)	5 (83,3)	0,928 ⁽¹⁾
Không	11 (22,0)	11 (24,4)	1 (16,7)	
Đau bụng n=101				
Có	31 (62,0)	28 (62,2)	4 (66,7)	1 ⁽¹⁾
Không	19 (38,0)	17 (37,8)	2 (33,3)	
Nôn, buồn nôn n=101				
Có	39 (78,0)	42 (93,3)	5 (83,3)	0,110 ⁽¹⁾
Không	11 (22,0)	3 (6,7)	1 (16,7)	
Phân nhầy n=101				
Có	9 (18,0)	10 (22,2)	1 (16,7)	0,846 ⁽¹⁾
Không	41 (82,0)	35 (77,8)	5 (83,3)	
Phân máu n=101				
Có	10 (20,0)	5 (11,1)	2 (33,3)	0,212 ⁽¹⁾
Không	40 (80,0)	40 (88,9)	4 (66,7)	
Soi đại tràng (n=18) (n=9) (n=8) (n=1)				
Có viêm đại tràng	8 (88,9)	6 (75,0)	1 (100)	0,647 ⁽¹⁾
Không viêm	1 (11,1)	2 (25,0)	0	
Viêm đại tràng giả mạc	3 (33,3)	4 (50)	0	0,778 ⁽¹⁾
Không viêm	6 (66,7)	4 (50)	1 (100)	
Số lần tiêu chảy trung bình	7,3±5,3 (3-30)	6,7±4,8 (3-30)	5,8±1,2 (5-8)	0,901 ⁽²⁾

(Áp dụng thuật toán thống kê ⁽¹⁾: Fisher's exact test và ⁽²⁾: Kruskal - Wallis test)

Bảng 3.29 cho thấy, trong 101 bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile*, không có sự khác biệt về triệu chứng lâm sàng của các loại gen sinh độc tố, $p > 0,05$ (Fisher's exact test). Chỉ có 18 bệnh nhân được soi đại tràng, biểu hiện viêm đại tràng cũng như viêm đại tràng giả mạc không có sự khác biệt giữa các loại gen sinh độc tố (Fisher's exact test). Số lần tiêu chảy trung bình không có sự khác biệt giữa các loại gen sinh độc tố, $p > 0,05$ (Kruskal - Wallis test).

Bảng 3.30: Tiền sử nằm viện trong 8 tuần trước tiêu chảy theo gen độc tố

Tiền sử nằm viện trong vòng 8 tuần trước tiêu chảy	A+B+ n (%)	A-B+ n (%)	2 loại độc tố n (%)	Tổng số n (%)	p
Có	32 (64,0)	37 (82,2)	6 (100)	75 (74,3)	0,046
Không	18 (36,0)	8 (17,8)	0	26 (25,7)	
Tổng số	50 (100)	45 (100)	6 (100)	101 (100)	

(Áp dụng thuật toán thống kê: Fisher's exact test)

Bảng 3.30 cho thấy, bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* mang độc tố A+B+, A-B+ hoặc mang cả 2 loại độc tố, đều có tiền sử nằm viện trong vòng 8 tuần trước tiêu chảy cao hơn. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Fisher's exact test).

Bảng 3.31: Tiền sử có bệnh lý mạn tính theo gen sinh độc tố

Bệnh lý mạn tính	A+B+ n = 50	A-B+ n = 45	2 loại độc tố n = 6	Tổng số n = 101	P
Có	36 (72,0)	33 (73,3)	6 (100)	75 (74,3)	0,497
Không	14 (28,0)	12 (26,7)	0	26 (25,7)	

(Áp dụng thuật toán thống kê: Fisher's exact test)

Bảng 3.31 cho thấy, không có sự khác biệt về tỉ lệ mang bệnh lý mạn tính của bệnh nhân có gen sinh độc tố khác nhau, $p > 0,05$ (Fisher's exact test)

Bảng 3.32: Tiền sử dùng kháng sinh trong 8 tuần trước tiêu chảy theo gen sinh độc tố

Sử dụng kháng sinh trong vòng 8 tuần trước tiêu chảy	A+B+ n (%)	A-B+ n (%)	2 loại độc tố n (%)	Tổng số n (%)	p
Có	27 (54,0)	33 (73,3)	6 (100)	66 (65,4)	0,024
Không	23 (46,0)	12 (26,7)	0	35 (34,6)	
Tổng số	50 (100)	45 (100)	6 (100)	101 (100)	

(Áp dụng thuật toán thống kê: Fisher's exact test)

Bảng 3.32 cho thấy, bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* mang độc tố A+B+, A-B+ hoặc mang cả 2 loại độc tố, có tiền sử dùng kháng sinh trong vòng 8 tuần trước khi tiêu chảy cao hơn nhóm không có tiền sử dùng kháng sinh trong 8 tuần trước. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, $p < 0,05$ (Fisher's exact test).

Bảng 3.33: Diễn biến tiêu chảy do *C.difficile* theo loại gen sinh độc tố

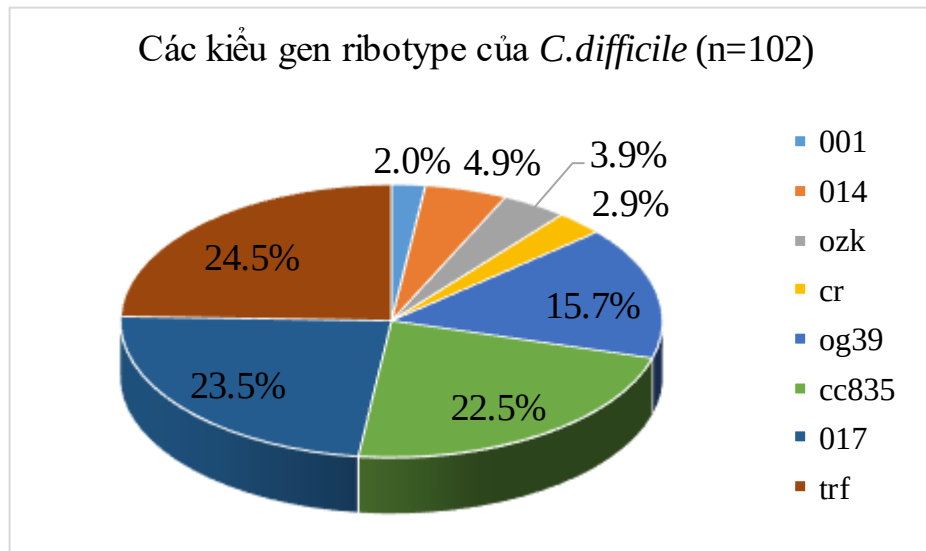
Diễn biến	A+B+ n = 50	A-B+ n = 45	2 loại độc tố n = 6	Tổng số n = 101	p
Khỏi	15 (30,0)	16 (35,6)	0	31 (30,7)	0,205
Đỡ - ra viện	13 (26,0)	7 (15,6)	1 (16,7)	21 (20,8)	0,442
Chuyển tuyến	10 (20,0)	13 (28,9)	4 (66,7)	27 (26,7)	0,046*
Nặng xin về	10 (20,0)	5 (11,1)	1 (16,7)	16 (15,8)	0,495
Tử vong	2 (4,0)	4 (8,9)	0	6 (5,9)	0,493

(Áp dụng thuật toán thống kê: Fisher's exact test)

Bảng 3.33 cho thấy, diễn biến khỏi, đỡ, nặng và tử vong của tiêu chảy do *C.difficile* theo các loại gen sinh độc tố không có sự khác biệt, $p > 0,05$ (Fisher's exact test).

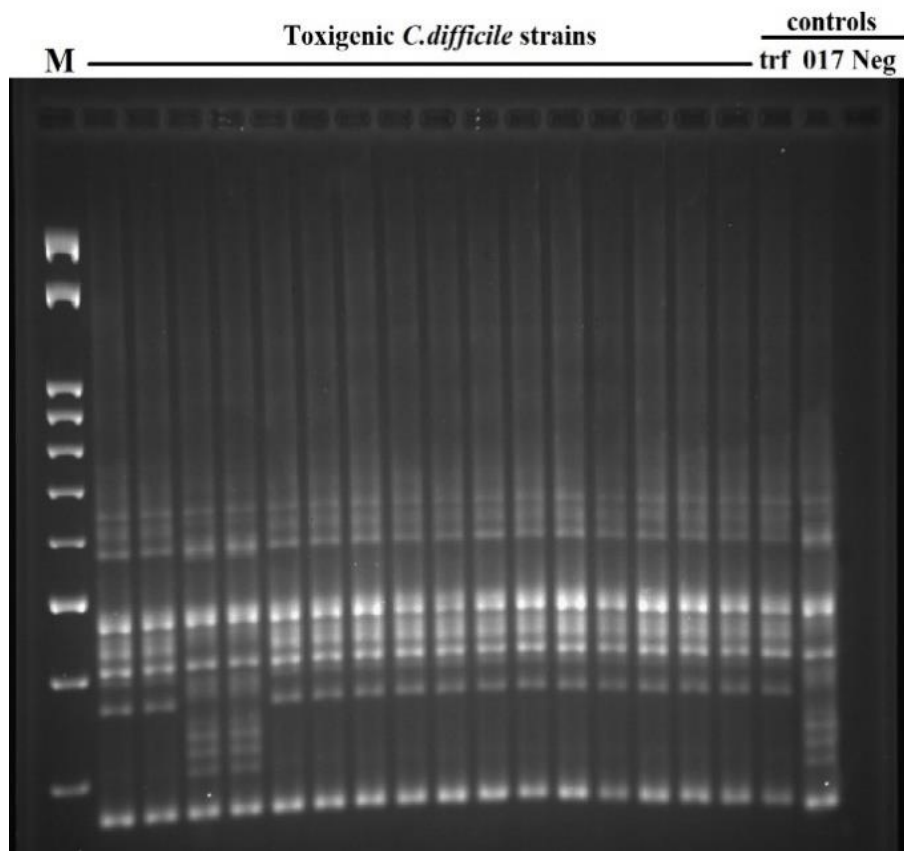
3.3.2. Đặc điểm về kiểu gen ribotype của *C.difficile*

Nghiên cứu đã phân lập được 107 chủng *C.difficile* từ 101 bệnh nhân. Tuy nhiên, khi đưa vào phân tích chỉ có 102 chủng *C.difficile* có đủ điều kiện để xác định được kiểu gen ribotype.



Biểu đồ 3.13: Các kiểu gen ribotype của *C.difficile* trong nghiên cứu

Sử dụng kỹ thuật PCR ribotyping đã xác định được 8 kiểu gen ribotype của *C.difficile*. Biểu đồ 3.13 cho thấy, nghiên cứu này gặp nhiều nhất là kiểu gen ribotype *trf* (24,5%). Các kiểu gen ribotype phổ biến khác là ribotype *017* (23,5%) và *cc835* (22,5%), *og39* (15,7%). Một số kiểu gen ribotype có tỉ lệ gặp ít hơn là *014*, *ozk*, *cr* và *001*.

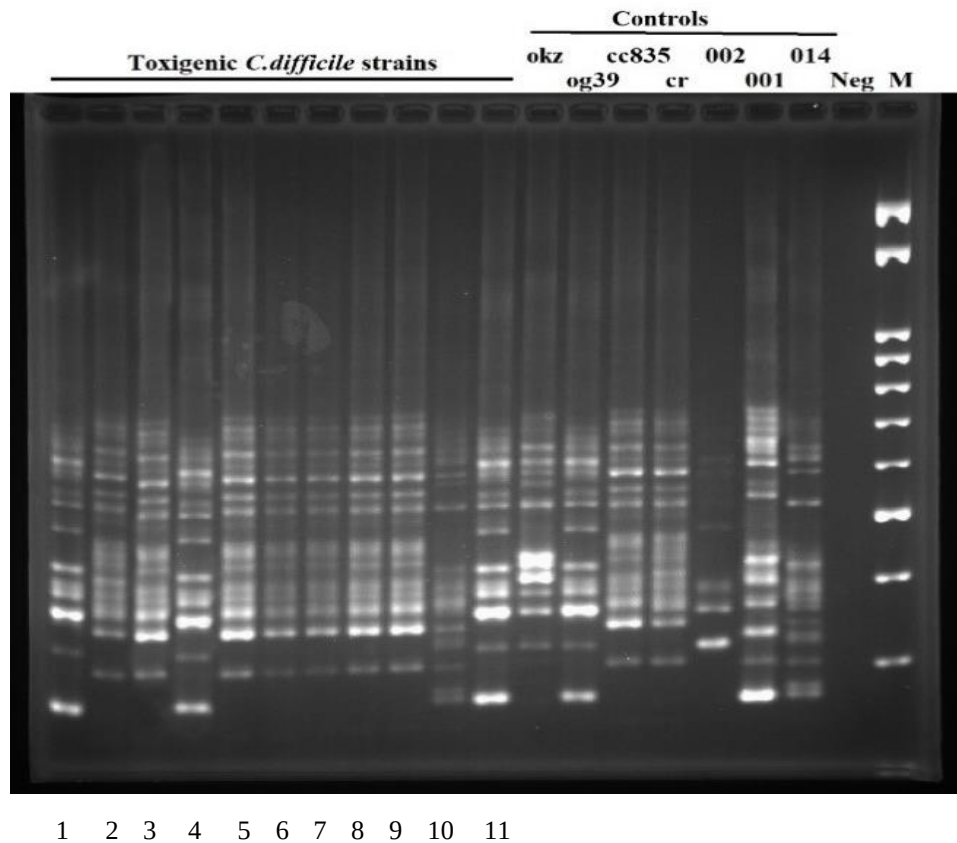


Hình 3.4: Các kiểu gen ribotype của *C.difficile* mang gen sinh độc tố

A-B+ ở bệnh nhân nghiên cứu

(Nguồn: Khoa vi khuẩn – Viện Vệ sinh dịch tễ trung ương)

Hình 3.4 minh họa sản phẩm điện di của các chủng *C.difficile* mang loại gen sinh độc tố A-B+ của nghiên cứu đối chiếu với chủng tham chiếu có kiểu gen *trf* và *017* thực hiện tại phòng xét nghiệm Khoa vi khuẩn – Viện Vệ sinh dịch tễ trung ương.



Hình 3.5: Các kiểu gen ribotype của *C.difficile* mang loại gen sinh độc tố A+B+ ở bệnh nhân nghiên cứu

(Nguồn: Khoa vi khuẩn – Viện Vệ sinh dịch tễ trung ương)

Hình 3.5 minh họa sản phẩm điện di của một số chủng *C.difficile* mang loại gen sinh độc tố A+B+ của nghiên cứu được đối chiếu với các kiểu gen ribotype của chủng tham chiếu, thực hiện tại phòng xét nghiệm của Khoa vi khuẩn – Viện Vệ sinh dịch tễ trung ương.

Bảng 3.34: Phân bố kiểu gen ribotype của *C.difficile* và loại gen sinh độc tố

Kiểu gen ribotype n = 102	A+B+ n = 53	A-B+ n = 49
001	2 (3,8)	0
014	5 (9,4)	0
ozk	4 (7,5)	0
cr	3 (5,7)	0
og39	16 (30,2)	0
cc835	23 (43,4)	0
017	0	24 (49,0)
trf	0	25 (51,0)

Bảng 3.34 cho thấy, *C.difficile* mang loại gen sinh độc tố A+B+ trong nghiên cứu có 6 kiểu gen ribotype là: 001, 014, ozk, cr, og39 và cc835. *C.difficile* mang loại gen sinh độc tố A-B+ có 2 kiểu gen ribotype là 017 và trf.

Bảng 3.35: Phân bố các kiểu gen ribotype của *C.difficile* theo năm

Kiểu ribotype n = 102	2013 n = 13	2014 n = 20	2015 n = 25	2016 n = 28	2017 n = 16
001 n=2	1 (7,7)	1 (5)	0	0	0
cr n=3	1 (7,7)	0	1 (4)	0	1 (6,2)
okz n=4	0	0	3 (12)	0	1 (6,2)
014 n=5	0	3 (15)	1 (4)	1 (3,6)	0
og39 n=16	4 (30,7)	2 (10)	1 (4)	5 (17,9)	4 (25)
cc835 n=23	3 (23,1)	3 (15)	5 (20)	9 (32,1)	3 (18,8)
017 n=24	4 (30,7)	2 (10)	8 (32)	6 (21,4)	4 (25)
trf n=25	0	9 (45)	6 (24)	7 (25)	3 (18,8)

Bảng 3.35 cho thấy, trong 5 năm nghiên cứu, các kiểu gen lưu hành phổ biến nhất là trf, 017 và cc835. Năm 2014 kiểu gen ribotype trf gặp nhiều nhất (45%), rồi giảm dần. Năm 2015, kiểu gen ribotype 017 gặp nhiều nhất (32%), rồi giảm dần. Năm 2016, kiểu gen ribotype cc835 gặp nhiều nhất (32,1%).

Bảng 3.36: Phân bố các kiểu gen ribotype của *C.difficile* theo nhóm tuổi

Kiểu gen ribotype n = 102	15-60 tuổi n = 50	>60 tuổi n = 52	p
<i>001</i> (n=2)	0	2 (3,9)	0,495
<i>cr</i> (n=3)	1 (2,0)	2 (3,9)	1
<i>okz</i> (n=4)	1 (2,0)	3 (5,8)	0,618
<i>014</i> (n=5)	3 (6,0)	2 (3,9)	0,675
<i>og39</i> (n=16)	8 (16,0)	8 (15,4)	1
<i>cc835</i> (n=23)	14 (28,0)	9 (17,3)	0,240
<i>017</i> (n=24)	15 (30,0)	9 (17,3)	0,164
<i>trf</i> (n=25)	8 (16,0)	17 (32,7)	0,066

(Áp dụng thuật toán thống kê: Fisher's exact test)

Bảng 3.36 cho thấy, các kiểu gen ribotype của *C.difficile* gặp ở cả nhóm dưới 60 và trên 60 tuổi. Kiểu gen ribotype *017* và *cc835* gặp nhiều ở nhóm tuổi dưới 60 (tương ứng là 30% và 28%), kiểu gen ribotype *trf* trội lên ở nhóm tuổi trên 60 (chiếm 32,7%). Tuy nhiên sự khác biệt về các kiểu gen theo nhóm tuổi chưa có ý nghĩa thống kê, $p > 0,05$ (Fisher's exact test).

Bảng 3.37: Phân bố các kiểu gen ribotype của *C.difficile* theo tiền sử dùng kháng sinh

Kiểu gen ribotype n = 102	Có dùng kháng sinh trong 8 tuần trước n = 70	Không dùng kháng sinh 8 tuần trước n = 32	p
<i>001</i> (n=2)	2 (2,9)	0	1
<i>cr</i> (n=3)	3 (4,3)	0	0,550
<i>okz</i> (n=4)	1 (1,4)	3 (9,4)	0,090
<i>014</i> (n=5)	1 (1,4)	4 (12,5)	0,033*
<i>og39</i> (n=16)	12 (17,1)	4 (12,5)	0,770
<i>cc835</i> (n=23)	13 (18,6)	10 (31,3)	0,202
<i>017</i> (n=24)	17 (24,3)	7 (21,9)	1
<i>trf</i> (n=25)	21 (30,0)	4 (12,5)	0,082

(Áp dụng thuật toán thống kê: Fisher's exact test)

Bảng 3.37 cho thấy, kiểu gen ribotype *trf* có xu hướng gặp nhiều hơn (30%) trong nhóm có dùng kháng sinh trong 8 tuần trước tiêu chảy và kiểu gen ribotype *cc835* gặp nhiều hơn trong nhóm không dùng kháng sinh trong 8 tuần trước tiêu chảy (31,3%). Tuy nhiên, sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$ (Fisher's exact test).

Bảng 3.38: Phân bố các kiểu gen ribotype của *C.difficile* theo tiền sử nằm viện trong vòng 8 tuần trước tiêu chảy

Kiểu gen ribotype n = 102	Có nằm viện trong 8 tuần trước n = 78	Không nằm viện trong 8 tuần trước n = 24	p
<i>001</i> (n=2)	2 (2,6)	0	1
<i>cr</i> (n=3)	3 (3,9)	0	1
<i>okz</i> (n=4)	2 (2,6)	2 (8,3)	0,235
<i>014</i> (n=5)	2 (2,6)	3 (12,5)	0,069
<i>og39</i> (n=16)	14 (17,9)	2 (8,3)	0,347
<i>cc835</i> (n=23)	13 (16,7)	10 (41,7)	0,023*
<i>017</i> (n=24)	20 (25,6)	4 (16,7)	0,424
<i>trf</i> (n=25)	22 (28,2)	3 (12,5)	0,175

(Áp dụng thuật toán thống kê: Fisher's exact test)

Bảng 3.38 cho thấy, kiểu gen ribotype *cc835* của *C.difficile* gặp ở nhóm không có tiền sử nằm viện trong vòng 8 tuần trước nhiều hơn, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Fisher's exact test). Trong khi kiểu gen ribotype *trf* và *017* lại thường gặp hơn ở bệnh nhân có tiền sử nằm viện trong 8 tuần trước tiêu chảy, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê, $p > 0,05$ (Fisher's exact test).

Bảng 3.39: Phân bố kiểu gen ribotype của *C.difficile* theo mắc bệnh mạn tính

Kiểu gen ribotype n = 102	Có bệnh mạn tính n = 77	Không bệnh mạn tính n = 25	p
001 (n=2)	2 (2,6)	0	1
cr (n=3)	3 (3,9)	0	1
okz (n=4)	3 (3,9)	1 (4,0)	1
014 (n=5)	3 (3,9)	2 (8,0)	0,594
og39 (n=16)	11 (14,3)	5 (20,0)	0,532
cc835 (n=23)	18 (23,4)	5 (20,0)	1
017 (n=24)	18 (23,4)	6 (24,0)	1
trf (n=25)	19 (24,7)	6 (24,0)	1

(Áp dụng thuật toán thống kê: Fisher's exact test)

Bảng 3.39 cho thấy, không có sự khác biệt giữa các kiểu gen ribotype của *C.difficile* với tiền sử mắc bệnh nền mạn tính, $p > 0,05$ (Fisher's exact test).

Bảng 3.40. Diễn biến điều trị của các kiểu gen ribotype của *C.difficile*

Diễn biến	001 n=2	014 n=5	okz n=4	cr n=3	og39 n=16	cc835 n=23	017 n=24	trf n=25	Tổng số	p
Khỏi-đỡ- chuyển	1 (50)	3 (60)	4 (100)	3 (100)	9 (56,2)	20 (87,0)	20 (83,3)	19 (76)	79 (77,5)	0,21
Xin về- tử vong	1 (50)	2 (40)	0	0	7 (43,8)	3 (13,0)	4 (16,7)	6 (24)	23 (22,5)	

(Áp dụng thuật toán thống kê: Fisher's exact test)

Bảng 3.40 cho thấy, không có sự khác biệt về diễn biến điều trị của các kiểu gen ribotype của *C.difficile*, $p > 0,05$ ((Fisher's exact test).

CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN

4.1. Đặc điểm dịch tễ, lâm sàng của tiêu chảy do *C.difficile* ở người lớn tại Bệnh viện Bạch Mai, 2013 – 2017

Đây là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam tiến hành trong 5 năm, từ năm 2013 đến năm 2017, phân tích các đặc điểm dịch tễ và lâm sàng của 101 bệnh nhân người lớn được chẩn đoán xác định mắc tiêu chảy do *Clostridium difficile* điều trị nội trú tại bệnh viện Bạch Mai.

4.1.1. Đặc điểm dịch tễ tiêu chảy do *C.difficile*

Tiêu chảy do *C.difficile* gặp ở tất cả các tháng trong năm, với tổng số mắc trong tháng của 5 năm nghiên cứu từ 5 đến 11 trường hợp (5% đến 10,9%) (**biểu đồ 3.1**). Số mắc ở mùa nóng gặp nhiều hơn mùa lạnh, (khi tính mùa nóng từ tháng 5 đến tháng 10, mùa lạnh từ tháng 11 đến tháng 4), (**biểu đồ 3.2**). Tiêu chảy do các vi khuẩn nói chung hay gặp nhiều hơn vào mùa nóng do khí hậu thuận lợi cho chúng sinh sôi phát triển và lây nhiễm qua đường tiêu hóa. Nhưng *C.difficile* được ghi nhận là tác nhân gây tiêu chảy trong bệnh viện, yếu tố lây truyền và nhiễm bệnh không phụ thuộc vào thời tiết, bệnh gặp ở tất cả các tháng trong năm, tính gây bệnh theo mùa không rõ ràng.

Trong thời gian nghiên cứu, số mắc tiêu chảy do *C.difficile* được phát hiện tăng dần theo các năm, từ năm 2013 đến năm 2016 gặp nhiều nhất là 28 trường hợp (năm 2016). Năm 2017, số mắc tiêu chảy do *C.difficile* có giảm hơn (**biểu đồ 3.3**). Tiêu chảy do *C.difficile*, dù được mô tả trong y văn nhiều chục năm trước, nhưng chẩn đoán xác định ca bệnh là khó khăn do thiếu các xét nghiệm khẳng định sự gây bệnh của vi khuẩn kỵ khí này tại hầu hết các bệnh viện tuyến tỉnh và trung ương, trong đó có bệnh viện Bạch Mai. Những trường hợp đầu tiên nuôi cấy được *C.difficile* trong phân bệnh nhân tiêu chảy đã làm các thầy thuốc tăng cảnh giác về bệnh và tăng chỉ định xét nghiệm tìm *C.difficile*, giải thích việc phát hiện ca bệnh tăng dần theo năm nghiên cứu.

C.difficile được coi như một nhiễm trùng bệnh viện, một vấn đề được quan tâm của y tế hiện đại, các biện pháp dự phòng lây truyền trong bệnh viện đã được quan tâm kịp thời tại các đơn vị tham gia nghiên cứu, và số trường hợp tiêu chảy do *C.difficile* phát hiện đã giảm hơn vào năm 2017. Trên thế giới, sau những năm bùng phát các trường hợp tiêu chảy do *C.difficile* gây bệnh nặng, nhiều tử vong và di chứng, các nước châu Âu và Bắc Mỹ đã thiết lập chương trình quốc gia kiểm soát bệnh do *C.difficile*, số ca bệnh đã giảm đáng kể. Khi xuất hiện các trường hợp tiêu chảy do *C.difficile* chủng gây dịch NAP1/027/BI tại các bệnh viện, chương trình quốc gia giám sát tiêu chảy do *C.difficile* đã được thiết lập ở Anh, tỉ lệ nhiễm *C.difficile* đã giảm từ những năm 2007 – 2008, số tử vong cũng giảm 70% trong khoảng thời gian từ 2007 đến 2010 [162]. Ở Hoa Kỳ, số bệnh nhân ra viện được chẩn đoán tiêu chảy do *C.difficile* tăng từ 33/100.000 người lên 115/100.000 từ năm 1993 đến năm 2008, nhưng cũng đã giảm xuống trong năm 2009 [45]. Marttila-Vaara (2019) cũng báo cáo số ca tiêu chảy do *C.difficile* ở Phần Lan, dao động tăng lên từ năm 2009 đến 2014, sau đó giảm dần trong năm 2015 và 2016 [111].

Bệnh nhân trong nghiên cứu của chúng tôi đến từ hầu hết các tỉnh/ thành của miền Bắc Việt Nam (21/28 tỉnh) (**hình 3.1**), nhiều nhất là Hà Nội với 45 ca và các tỉnh lân cận như Hải Dương, Nam Định, Phú Thọ (**biểu đồ 3.4**), từ cả nông thôn và thành thị (**biểu đồ 3.5**). Bệnh viện Bạch Mai nằm tại thành phố Hà Nội, có thể lý giải bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* chủ yếu đến từ Hà Nội. Bên cạnh đó, có thể do ở gần, thuận tiện giao thông và sinh hoạt, nên số bệnh nhân đến từ các tỉnh/ thành phố lân cận Hà Nội cũng nhiều hơn các tỉnh khác. Nghiên cứu tiến hành ở bệnh viện Bạch Mai, bệnh viện đa khoa tuyến cuối, gồm nhiều bệnh nhân nặng, chưa rõ chẩn đoán trên miền Bắc Việt Nam, lần đầu tiên ghi nhận những ca tiêu chảy do *C.difficile* đến từ hầu hết các tỉnh/ thành phố của miền Bắc, từ nông thôn đến thành thị.

Nghiên cứu tiến hành chủ yếu ở khoa Truyền nhiễm, nơi có bệnh nhân nội khoa thông thường và khoa Hồi sức tích cực, nơi có bệnh nhân nội khoa nặng. Trong 101 bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile*, 53 bệnh nhân đến từ khoa Truyền nhiễm, 35 bệnh nhân đến từ khoa Hồi sức tích cực. 13 bệnh nhân còn lại đến từ các khoa phòng khác trong bệnh viện (**biểu đồ 3.6**). Tiêu chảy khá thường gặp ở các đơn vị hồi sức, 15% - 38% bệnh nhân nằm hồi sức từng có tiêu chảy do nhiều nguyên nhân khác nhau như nuôi ăn qua ống thông dạ dày liên quan đến công thức của thức ăn, dụng cụ cho ăn, do nhiễm khuẩn,... và khó để nhận định tiêu chảy do nhiễm khuẩn hay không nhiễm khuẩn [127]. Tiêu chảy do *C.difficile* là tiêu chảy nhiễm khuẩn thường gặp nhất trong đơn vị hồi sức [131], ước tính 0,4% - 4% bệnh nhân [127], đặc biệt được lưu ý vì khả năng lây nhiễm cao giữa các bệnh nhân và liên quan đến chăm sóc y tế. Hơn nữa, tại các khoa hồi sức, việc sử dụng kháng sinh rất phổ biến, cùng với các thuốc ức chế tiết axit dạ dày làm thuận lợi cho sự rối loạn của vi khuẩn chí đường ruột, khi nhiễm *C.difficile* sẽ dễ dàng mắc bệnh [24]. *C.difficile* được biết là nguyên nhân tiêu chảy nhiễm trùng thường gặp và đáng lo ngại nhất tại các khoa hồi sức, chiếm 1 – 9% tổng số các bệnh nhân hồi sức [39], [131]. Bệnh nhân mắc tiêu chảy do *C.difficile* ở các đơn vị hồi sức có nguy cơ xuất hiện các biến chứng, kéo dài thời gian nằm viện, gia tăng tử vong. Một khoa khác được lựa chọn để thu thập bệnh nhân là khoa Truyền nhiễm, nơi có một lượng lớn bệnh nhân cần sử dụng kháng sinh, được ghi nhận là một yếu tố nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile*. Ngamskulrungronj (2015) báo cáo ở Thái Lan có 57,6% bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* có tiền sử dùng kháng sinh trong 8 tuần trước đó [118]. Bartlett (1980) báo cáo 27% bệnh nhân tiêu chảy sau dùng kháng sinh tìm thấy độc tố của *C.difficile* [21]. Các thống kê cho thấy, 15-20% trường hợp tiêu chảy sau dùng kháng sinh là do *C.difficile*

[20], [35]. Theo Verma và CS (2011), cần nghĩ đến tiêu chảy do *C.difficile* ở người sau dùng kháng sinh xuất hiện tiêu chảy, sốt, tăng bạch cầu máu [158].

Tiêu chảy do *C.difficile* gặp ở nam giới là 63,4%, nhiều hơn nữ giới 36,6%. Tỉ lệ nam: nữ là 1,7:1 (**biểu đồ 3.7**). Nghiên cứu này của chúng tôi thực hiện ở miền Bắc Việt Nam, cũng tương đồng với nghiên cứu của Vũ Thùy Dương và CS (2016) tại một số bệnh viện của miền Nam và Nam Trung Bộ của Việt Nam. Trong 92 bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* > 15 tuổi giai đoạn 2009 – 2014, nữ giới chiếm 39% [52]. Predrag (2016) báo cáo tỉ lệ nam giới: nữ giới là 20: 17 tại Serbia [128]. Một số tác giả cũng cho rằng, nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* ở nam giới cao hơn [61]. Tuy nhiên, với tiêu chảy từ cộng đồng, các nghiên cứu trên thế giới lại báo cáo tỉ lệ tiêu chảy do *C.difficile* gặp ở nữ giới nhiều hơn. Tại Pháp, Ogielska (2015) báo cáo tỉ lệ nam: nữ là 62: 74 [122]. Tại Thái Lan, Ngamskulrungronj (2015) báo cáo nữ giới chiếm 62,3% [118]. Ở Hoa Kỳ, bệnh nhân nữ cũng nhiều hơn, chiếm 76% tiêu chảy do *C.difficile* từ cộng đồng và 60% các trường hợp mắc tại bệnh viện [87].

Tiêu chảy do *C.difficile* gặp nhiều hơn ở người lớn tuổi. Trong nghiên cứu của chúng tôi, số bệnh nhân tăng dần theo nhóm tuổi, trên 60 tuổi chiếm 49,5% (**biểu đồ 3.8**). Tuổi trung bình của bệnh nhân mắc tiêu chảy do *C.difficile* trong nghiên cứu là $59,4 \pm 18,6$ tuổi, trung vị là 60 tuổi. Tuổi thấp nhất là 15 và tuổi cao nhất là 95 (**biểu đồ 3.9**). Các nghiên cứu gần đây ghi nhận, *C.difficile* là nguyên nhân hàng đầu gây tiêu chảy ở người lớn tuổi tại các nước công nghiệp phát triển [80]. Bệnh nhân > 65 tuổi có nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* cao gấp 5-10 lần so với bệnh nhân lứa tuổi ít hơn [40]. Kết quả của chúng tôi tương đồng với nghiên cứu tại Serbia, Predrag (2016) báo cáo tuổi trung bình mắc tiêu chảy do *C.difficile* là $63,4 \pm 17,5$ tuổi [128] và Ogielska (2015) tại Pháp, tuổi trung vị là 64,4 tuổi [122]. Kurti và CS báo cáo bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* tại Hung-ga-ri, tuổi > 60 tuổi chiếm

83,4% [95]. Tiêu chảy do *C.difficile* từ cộng đồng thì tuổi trung bình trẻ hơn (50 tuổi) so với mắc tại bệnh viện (70 tuổi), theo Khanna nghiên cứu tại Hoa Kỳ (2012) [87]. Tại Thái Lan, Ngamskulrungronj (2015), tuổi trung bình mắc tiêu chảy *C.difficile* là 64 [118]. Hàn Quốc, Choi (2015) báo cáo 67% bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* có tuổi > 65 [34]. Ở Anh, các hướng dẫn y tế khuyến cáo cần xét nghiệm tìm *C.difficile* cho tất cả bệnh nhân tiêu chảy từ 65 tuổi trở lên [162]. Có một số cơ sở lý giải việc mắc tiêu chảy do *C.difficile* thường gặp hơn ở người lớn tuổi. Một là, tỉ lệ mang *C.difficile* ở người lớn tuổi cao hơn người trẻ. Người tình nguyện khoẻ mạnh không có triệu chứng, tỉ lệ mang *C.difficile* trong hệ vi khuẩn chí đường ruột là 3% - 7,6% [117], [158]. Trong môi trường bệnh viện, tỉ lệ mang *C.difficile* ở người lớn tuổi chiếm 7% - 20% [80], [158] và tỉ lệ mang *C.difficile* là 16% - 35% ở người nhiều tuổi, nằm viện kéo dài, có sử dụng kháng sinh [94]. Hai là, người lớn tuổi nhiễm *C.difficile* thì chủng *C.difficile* mang gen sinh độc tố chiếm tỉ lệ cao, rất ít chủng không sinh độc tố. Điều tra dịch tễ học trên thế giới cho thấy, ở người khoẻ mạnh tình nguyện nhiễm *C.difficile*, 42% - 50% các chủng là không sinh độc tố. Bệnh nhân nằm viện mang *C.difficile* trên 60 tuổi, chủng không sinh độc tố chỉ chiếm 6,9%, trong khi bệnh nhân dưới 20 tuổi, chủng không sinh độc tố là 22,8% [117]. Ba là, người nhiều tuổi có hệ miễn dịch suy giảm, dễ cảm thụ với *C.difficile* và mắc bệnh. Hệ miễn dịch, với các kháng thể kháng độc tố có tác dụng bảo vệ, giúp cơ thể không mắc bệnh. Người ta tìm thấy kháng thể IgG kháng độc tố A ở người mang *C.difficile* không có triệu chứng cao gấp 3 lần các bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* [158]. Do vậy, thường thấy tỉ lệ mắc bệnh cao hơn, bệnh nặng hơn ở người cao tuổi, hệ miễn dịch suy giảm [27],[83], [105].

4.1.2. Đặc điểm lâm sàng tiêu chảy do *C.difficile*

Triệu chứng lâm sàng thường gặp ở bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* trong nghiên cứu là sốt (77,2 %), đau bụng (62,4 %), chướng bụng (78,2 %). Ít gặp hơn là buồn nôn, nôn (14,9%), phân có nhầy mũi (19,8%), phân có máu (16,8%). Lưu ý có 12,9% bệnh nhân tụt huyết áp cần dùng thuốc vận mạch (**bảng 3.1**). Chậm trễ trong xác định chẩn đoán và điều trị sẽ làm tăng tỉ lệ tử vong. Biểu hiện sốt có liên quan đến tình trạng nhiễm trùng, đau bụng liên quan đến co thắt và tăng nhu động ruột. Phân có nhầy hoặc máu là do tổn thương viêm của tế bào niêm mạc ruột. Trong khi đó, nhiều nhà nghiên cứu thừa nhận, không có triệu chứng lâm sàng nào là đặc hiệu riêng cho tiêu chảy do *C.difficile* [20], [21]. Các triệu chứng trên cũng gặp trong tiêu chảy do nhiều căn nguyên vi khuẩn khác (*Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *E.coli*...). Theo Bartlett, ở bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile*, sốt xảy ra trong 28% và đau bụng xảy ra trong 22% các trường hợp [21]. Bobo (2011) cũng đưa ra tỉ lệ sốt ở bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* là 30% [24], thấp hơn so với nghiên cứu của chúng tôi. Tương đồng với kết quả của chúng tôi, Oldfield (2014) ghi nhận tiêu chảy do *C.difficile* gặp phân máu trong 5%-10% các trường hợp, dù 26% có máu vi thể trong phân [123]. Tại Hàn Quốc, tương đồng với chúng tôi, Kim (2011) báo cáo tỉ lệ bệnh nhân có phân nhầy mũi là 22,5% [90].

Nghiên cứu về biểu hiện sốt ở bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile*, 64,4% sốt mức độ nhẹ - trung bình (37,5⁰C đến 39⁰C), chỉ có 12,9% sốt cao trên 39⁰C (**biểu đồ 3.10**). Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu khác, cho rằng sốt trong tiêu chảy do *C.difficile* thường không cao [131]. Nghiên cứu tại Thượng Hải cũng cho thấy, sốt gặp trong 66,1% bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* [71]. Oldfield (2014) cũng ghi nhận sốt gặp ở khoảng 50% ở bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* và thường ít khi sốt cao hơn 102⁰F (38,9⁰C) [123].

Về đặc điểm của tiêu chảy do *C.difficile*, số lần tiêu chảy 3 - 6 lần/ ngày chiếm 65,3%, chỉ có 9,9% bệnh nhân tiêu chảy > 10 lần/ ngày và số lần tiêu chảy trung bình là $7 \pm 4,9$ lần. Số ngày tiêu chảy do *C.difficile* có thể 1-3 ngày (19,8%), nhưng hầu hết là tiêu chảy kéo dài, trên 4 ngày (80,2%) (**bảng 3.2**). Tương đồng với nghiên cứu của chúng tôi, một nghiên cứu tại Thượng Hải cũng báo cáo thời gian trung bình của tiêu chảy do *C.difficile* là $7 \pm 6,1$ ngày [71] và tại Hàn Quốc, Kim (2011) báo cáo 17,5% tiêu chảy > 10 lần/ ngày [90]. Bartlett (2008) cũng báo cáo, số lần tiêu chảy thường ít hơn 10 lần/ngày và trường hợp bệnh nhẹ - trung bình, tiêu chảy có thể là triệu chứng duy nhất [20]. Theo Predrag (2016), người nhiều tuổi tiêu chảy thường kéo dài, 60% tới 10 ngày, 32% tiêu chảy dài hơn, tới 18 ngày [128]. Nghiên cứu của chúng tôi có 30,7% số bệnh nhân tiêu chảy kéo dài từ 14 ngày trở lên, dài nhất là 170 ngày. Trong một nghiên cứu, Humphreys (2014) cũng ghi nhận, tiêu chảy do *C.difficile* có thể kéo dài trên 30 ngày [72]. Không chẩn đoán được căn nguyên *C.difficile* gây tiêu chảy và không điều trị kịp thời đã làm kéo dài thời gian tiêu chảy. Đó cũng là nguyên nhân làm tăng thời gian nằm viện, tăng viện phí, tăng nguy cơ biến chứng và tử vong cho bệnh nhân.

Xét nghiệm đánh giá phản ứng viêm thường dựa vào số lượng bạch cầu và phản ứng pro-calcitonin. Trong nghiên cứu của chúng tôi, số lượng bạch cầu máu ngoại biên tăng trong 60,2% trường hợp, với 27,7% tăng cao >15 G/L. Phản ứng pro-calcitonin có giá trị cao trong đánh giá mức độ nhiễm trùng, nhưng khá đắt và mới được áp dụng trong thời gian sau của nghiên cứu. Chỉ 37 trong 101 trường hợp tiêu chảy do *C.difficile* được làm xét nghiệm pro-calcitonin, tất cả đều tăng. Có 75,7% số bệnh nhân có pro-calcitonin tăng mức vừa phải (0,5 – 10 ng/ml) và 24,3% trường hợp tăng cao >10 ng/ml (**bảng 3.3**). Số bệnh nhân tăng bạch cầu máu trong nghiên cứu của chúng tôi cũng tương đồng với Bartlett (1980) và Bobo (2011), báo cáo bạch cầu máu tăng

trong khoảng 50% trường hợp, đôi khi tăng lên 50 G/L [21], [24]. Oldfield (2014) cũng báo cáo, tăng bạch cầu máu thường gặp, chiếm 50-60% các trường hợp, 26% tăng trên 20 G/L [123]. Bạch cầu máu tăng cao biểu hiện phản ứng viêm mạnh, tăng > 15 G/L thường gặp trong các trường hợp nhiễm trùng nặng [137]. Tiêu chảy do *C.difficile* là tiêu chảy nhiễm khuẩn, có đáp ứng viêm của niêm mạc đường tiêu hóa với vi khuẩn và độc tố, nên phản ứng viêm pro-calcitonin đều tăng. Trường hợp bệnh nặng, đáp ứng viêm toàn thân, phản ứng pro-calcitonin tăng cao. Tuy nhiên, chưa có nhiều nghiên cứu trên thế giới báo cáo về biến đổi pro-calcitonin ở bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile*.

Xét nghiệm máu khác ở bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile*, chỉ 19,8% bệnh nhân có số lượng hồng cầu trong giới hạn bình thường, 3% bệnh nhân có số hồng cầu tăng, có thể liên quan đến tiêu chảy gây mất nước và cô đặc máu. Có 77,2% bệnh nhân có hồng cầu giảm (**bảng 3.4**). Hồng cầu giảm là triệu chứng thường thấy ở các bệnh nhân nhiễm trùng, và nhất là nhiễm trùng kéo dài. Giả thuyết được cho có thể là do tăng tiêu thụ trong các nhiễm trùng nặng. Điện giải đồ của các bệnh nhân nghiên cứu phần lớn trong giới hạn bình thường, natri máu bình thường trong 75% và kali máu bình thường trong 60% các trường hợp. Men gan AST và ALT bình thường ở hơn nửa các trường hợp. Một số trường hợp có men gan tăng, nhưng tăng không nhiều, có thể liên quan đến tình trạng sốt, mất nước, dùng các thuốc phối hợp... Trong các trường hợp được làm xét nghiệm creatinin, 57,7% các trường hợp trong giới hạn bình thường, 42,3% tăng trên 110 $\mu\text{mol/L}$ (**bảng 3.4**). Trong điều trị và theo dõi đáp ứng điều trị tiêu chảy, cần luôn lưu ý đến chức năng thận của bệnh nhân. Tiêu chảy nhiều lần, kéo dài nếu không được can thiệp kịp thời thường có biểu hiện suy thận, liên quan đến mất nước, gây giảm thể tích tuần hoàn, thiếu tưới máu thận, hậu quả là làm tăng creatinin máu. Suy thận được ghi nhận là một dấu hiệu nặng của tiêu chảy do *C.difficile* [20],[21], khi

creatinin tăng $>133 \mu\text{mol/L}$ hoặc tăng trên 1,5 lần giá trị nền của bệnh nhân [35],[137]. Nghiên cứu này, chúng tôi gặp 89,7% bệnh nhân có albumin máu giảm, và 34,6% giảm nhiều $<25 \text{ g/L}$ (**bảng 3.4**). Albumin máu giảm thường gặp trong trường hợp có kèm viêm đại tràng. Bệnh ruột gây mất albumin do tình trạng ruột viêm làm tăng rò rỉ, thoát albumin vào lòng ruột trong khi gan không tổng hợp kịp gây nên giảm albumin máu. Hơn nữa, Albumin máu giảm cũng là triệu chứng thường thấy ở trường hợp bệnh nhiễm trùng nặng, có tiêu chảy kéo dài, rối loạn hấp thu, suy dinh dưỡng [123].

Nghiên cứu có 18 bệnh nhân (17,8%) được soi đại tràng. Trong 18 bệnh nhân được soi đại tràng, 16,7% không có tổn thương, 38,9% các trường hợp có viêm đại tràng giả mạc (**bảng 3.5**). Tương đồng với nghiên cứu của chúng tôi, Barbut và cộng sự trong một nghiên cứu ở châu Âu (2007) báo cáo 12,2% bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* được soi đại tràng, trong 32,6% có viêm đại tràng giả mạc [17]. Viêm đại tràng giả mạc là tổn thương đặc trưng do *C.difficile* gây ra. Trong 141 bệnh nhân viêm đại tràng giả mạc, theo báo cáo của Bartlett (1980) thì độc tố của *C.difficile* được tìm thấy trong 97% các trường hợp [21]. Nghiên cứu của chúng tôi cũng tương đồng với kết quả của Bobo (2011), viêm đại tràng giả mạc chiếm 50% các trường hợp viêm đại tràng do *C.difficile* [24]. Tuy nhiên, nội soi đại tràng không cần làm thường qui ở bệnh nhân có triệu chứng lâm sàng điển hình, xét nghiệm phân có độc tố của *C.difficile* hay đáp ứng lâm sàng tốt khi điều trị theo phác đồ. Trường hợp nghi ngờ có chẩn đoán khác hoặc cần sinh thiết thì mới soi đại tràng [69]. Ở bệnh nhân có tắc ruột, viêm đại tràng tối cấp không tiêu chảy, nội soi đại tràng có thể thấy hình ảnh viêm đại tràng giả mạc, phân biệt với các nguyên nhân gây bệnh khác. Tuy nhiên, quyết định soi đại tràng những trường hợp này cần thận trọng, linh hoạt, tránh gây tổn thương mô ruột hoặc thủng ruột. **Hình 3.2** mô tả tổn thương viêm đại tràng giả mạc của một bệnh nhân trong

nghiên cứu. Các màng giả trên bề mặt niêm mạc ruột được tạo ra sau khi độc tố của *C.difficile* gây viêm loét đại tràng, tạo ra các protein, chất nhầy và các tế bào viêm. Màng giả trông như các mảng bám màu vàng, có thể nhỏ hoặc to đến 2cm đường kính, nằm rải rác trên niêm mạc đại tràng với các tổn thương từng đoạn hoặc bao phủ toàn bộ đại tràng [154].

Một số dấu hiệu nặng được nhiều tác giả thừa nhận là sốt $>38,3^{\circ}\text{C}$, albumin máu $<25\text{g/l}$, bạch cầu máu $>15\text{ G/l}$ và creatinin máu $>133\mu\text{mol/L}$. Nghiên cứu của chúng tôi chỉ có 76 bệnh nhân được đánh giá đầy đủ cả 4 dấu hiệu trên. Mỗi dấu hiệu được tính 1 điểm. Đánh giá điểm mức độ nặng theo nhóm diễn biến khỏi - đỡ - chuyển tuyến và nặng xin về - tử vong, nghiên cứu cho thấy điểm trung bình nhóm khỏi - đỡ - chuyển tuyến là $1,3 \pm 1,1$ điểm, thấp hơn điểm trung bình ở nhóm bệnh nhân nặng - tử vong $1,8 \pm 0,7$ điểm. Khác biệt có ý nghĩa thống kê, $p=0,047$ (t-test) (**bảng 3.6**). Shivashankar (2013) cũng ghi nhận tuổi cao, bạch cầu máu tăng $>15\text{ G/L}$, creatinin tăng cao $>1,5$ lần giới hạn cao của bình thường, sử dụng thuốc giảm đau nhóm narcotic và sử dụng thuốc ức chế bơm proton là các yếu tố độc lập gây tiêu chảy *C.difficile* nặng có biến chứng [143]. Nhiều tác giả trên thế giới cũng ghi nhận các dấu hiệu tính điểm nặng là bạch cầu máu $>15\text{ G/L}$, albumin máu $<25\text{ g/L}$, creatinin máu $>133\mu\text{mol/L}$ và sốt $>38,3^{\circ}\text{C}$ [137].

Trong thực tế, điểm nặng của bệnh nhân khoa Hồi sức tích cực ($1,6 \pm 1$), cao hơn của bệnh nhân khoa Truyền nhiễm ($1,3 \pm 1$) và cao hơn điểm nặng trung bình của bệnh nhân các khoa khác ($1,4 \pm 0,9$), nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê, $p>0,05$ (Anova test) (**bảng 3.7**). Bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* nằm khoa hồi sức tích cực thường diễn biến nặng hơn, tử vong cao hơn... Trong một bài tổng quan, Czepiel (2019) đưa ra tỉ lệ tử vong do *C.difficile* tại khoa hồi sức tích cực ước tính là 34%, cao hơn tử vong ở khoa khác là 5%. Các bệnh nhân tại hồi sức tích cực, khi có tiêu chảy do *C.difficile*,

tử vong cũng tăng gấp đôi so với không mắc *C.difficile* [40]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu của chúng tôi, cỡ mẫu còn nhỏ nên chưa ghi nhận sự khác biệt về điểm đánh giá mức độ nặng của khoa hồi sức tích cực với các khoa khác.

Về điều trị, có 21,8% bệnh nhân không can thiệp điều trị, 78,2% bệnh nhân được xử trí điều trị bằng ít nhất một trong các biện pháp như sử dụng kháng sinh; dùng thuốc bọc niêm mạc; dùng lợi khuẩn probiotic; dùng thuốc cầm tiêu chảy. Điều trị *C.difficile* bằng kháng sinh metronidazole trong 42,5% trường hợp, kháng sinh vancomycin trong 17,8% trường hợp, dùng thuốc bọc niêm mạc trong 48,5%, dùng lợi khuẩn 43,6% trường hợp và dùng thuốc cầm tiêu chảy trong 1% trường hợp (**bảng 3.8**). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương đồng với các nghiên cứu của các tác giả khác trên thế giới. Trong một nghiên cứu tại Hàn Quốc, Kim (2010) cũng báo cáo 25,9% bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* không can thiệp điều trị mà vẫn có cải thiện trên lâm sàng [90]. Nghiên cứu tại Thượng Hải, Trung Quốc, Huang (2008) cũng ghi nhận, chỉ có 44,7% bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* được điều trị bằng kháng sinh metronidazole và/ hoặc vancomycin [71]. Thực tế ghi nhận những trường hợp tiêu chảy do *C.difficile* có thể tự ổn định khi ngừng sử dụng kháng sinh không cần thiết, dùng lợi khuẩn hoặc thuốc bọc niêm mạc đường tiêu hóa, và điều này cũng gây nên sự chủ quan trong lâm sàng. Hiểu biết và sự quan tâm của các thầy thuốc lâm sàng về tiêu chảy do *C.difficile* chưa thật đúng mức, nên nhiều bệnh nhân chưa được can thiệp điều trị theo phác đồ. Chính vì vậy, bên cạnh những trường hợp tiêu chảy do *C.difficile* tự ổn định, có những trường hợp diễn biến kéo dài, chuyển nhiều bệnh viện mà không được chẩn đoán và điều trị, gây những tổn hại về sức khỏe và kinh tế cho bệnh nhân. Theo hướng dẫn, chỉ định điều trị tiêu chảy do *C.difficile* là kháng sinh đặc hiệu (metronidazole, vancomycin, fidaxomicin), với loại kháng sinh tùy mức độ nặng của bệnh, sử dụng theo đường uống. Trường hợp phình đại

tràng, tắc ruột, kháng sinh đường uống không tới được đại tràng, có thể sử dụng vancomycin thụt qua hậu môn và metronidazole truyền tĩnh mạch (do metronidazole có chu trình gan – ruột, đào thải qua đường tiêu hóa ở dạng còn hoạt tính). Lợi khuẩn đường ruột có vai trò chưa rõ ràng, dù đã có ghi nhận làm giảm nguy cơ tái phát nhiễm trùng do *C.difficile* [137]. Một nghiên cứu phân tích kết luận “có bằng chứng mức độ vừa cho thấy lợi khuẩn đường ruột là an toàn và hiệu quả để phòng tiêu chảy liên quan đến *C.difficile*” [156]. Nhưng các nghiên cứu gần đây, với công thức lợi khuẩn khác nhau cho rằng, dùng lợi khuẩn dự phòng ở bệnh nhân có bệnh nền nặng, suy giảm sức đề kháng có thể gây nhiễm trùng do chính các vi khuẩn đưa vào [112],[137].

Có 107 chủng *C.difficile* từ 101 bệnh nhân mắc tiêu chảy do *C.difficile* của nghiên cứu nhưng chỉ có 102 chủng đủ điều kiện được làm kháng sinh đồ. Chỉ 7 kháng sinh đủ sinh phẩm làm kháng sinh đồ cho 102 chủng *C.difficile*, 3 loại kháng sinh khác chỉ đủ sinh phẩm làm kháng sinh đồ cho 53 chủng *C.difficile*. Kết quả là, tất cả các chủng *C.difficile* phân lập được đều chưa kháng với 2 kháng sinh được khuyến cáo cho điều trị là metronidazole và vancomycin (**bảng 3.9**). *C.difficile* còn nhạy với một số kháng sinh amoxicillin (90,6%), chloramphenicol (75,5%), rifapicin (69,6%) hay moxifloxacin (65,7%) (**biểu đồ 3.11**). Nghiên cứu của chúng tôi tương đồng với Ngamskulrungronj (2015) tại Thái Lan, *C.difficile* còn nhạy với metronidazole, vancomycin, daptomycin và tygercyclin 98,2% – 100%, chỉ có 54,8% các chủng còn nhạy cảm với moxifloxacin [118]. Tại Iran, báo cáo năm 2018 cũng thấy 100% các chủng *C.difficile* nhạy với cả 2 kháng sinh metronidazole và vancomycin [138]. Tại Hàn Quốc, Kim (2010) báo cáo 100% các chủng còn nhạy cảm với metronidazole và vancomycin, nhưng chỉ có 11% nhạy với clindamycin và 53% nhạy với moxifloxacin [88]. Tại Trung Quốc, *C.difficile* kháng với moxifloxacin và clindamycin là 46,4% và 76,4%

[78]. Nghiên cứu của Huang (2009) nhận thấy tại Thượng Hải, tất cả các chủng *C.difficile* còn nhạy với metronidazole và vancomycin, nhưng 85,3% kháng clindamycin, 45,3% kháng moxifloxacin. Khác với chúng tôi, nghiên cứu tại châu Âu, ở Stockhom, tỉ lệ *C.difficile* kháng clindamycin và kháng moxifloxacin ít hơn, chỉ có 65% và 15% [70]. Lin (2011) báo cáo, tất cả các chủng *C.difficile* phân lập được đều nhạy với metronidazole và vancomycin, 84% còn nhạy với moxifloxacin [104]. Tang (2016) cũng ghi nhận không có chủng *C.difficile* kháng metronidazole và vancomycin, nhưng có kháng cao với clindamycin 87,1%, ceftriaxon 100% [148]. Nghiên cứu ở 3321 chủng *C.difficile* giai đoạn 2009 – 2016 từ Thụy Điển, chỉ có 1 chủng thuộc ribotype 027 kháng với metronidazole, còn lại tất cả đều nhạy với metronidazole và vancomycin [134].

Mắc tiêu chảy do *C.difficile* làm kéo dài thời gian nằm viện. Số ngày nằm viện trung bình của các bệnh nhân nghiên cứu là $22,2 \pm 16,3$ ngày, trung vị là 19 ngày, nằm viện ngắn nhất là 1 ngày, dài nhất là 96 ngày (**biểu đồ 3.12**). Kết quả này của chúng tôi cũng tương đồng với các nghiên cứu khác trên thế giới. Nghiên cứu ở Đông Âu, các bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* của Kurti (2015) có thời gian nằm viện là $17,6 \pm 10,8$ ngày [95]. Hassan (2012) nghiên cứu ở Malayxia cũng ghi nhận thời gian nằm viện là $27,96 \pm 23,22$ ngày [65]. Cần phát hiện và chẩn đoán sớm tiêu chảy do *C.difficile* để điều trị kịp thời, giảm thời gian nằm viện và biến chứng.

Về kết quả điều trị của bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* trong nghiên cứu, tỉ lệ bệnh nhân diễn biến xấu (nặng xin về - tử vong) đã lên tới 21,7%. Trong đó tử vong là 5,9% và nặng xin về là 15,8%. Tỉ lệ này cao hơn ở các bệnh nhân phải điều trị tại khoa Hồi sức tích cực, diễn biến xấu là 40%, trong đó tử vong là 14,3% và nặng xin về là 25,7% (**bảng 3.10**). Bệnh nhân lớn tuổi nằm ở đơn vị hồi sức tích cực và bệnh nhân nằm viện kéo dài có tỉ lệ mang *C.difficile* là 20% - 50%, trong khi người lớn khỏe mạnh tỉ lệ này là 3% [82].

Khoảng 10% tiêu chảy ở các đơn vị hồi sức tích cực là do *C.difficile* và tỉ lệ mắc *C.difficile* ở đây có thể tới 0,4 – 4% tổng số bệnh nhân [127], có tác giả báo cáo tới 1% - 9% [39]. Nghiên cứu của chúng tôi cũng tương đồng với các nghiên cứu của các tác giả khác. Leffler (2015) cho thấy, *C.difficile* liên quan đến tử vong là 5%, góp phần tử vong trong tất cả các nguyên nhân là 15% - 20% [97]. Trường hợp bệnh có biến chứng viêm đại tràng tối cấp, tử vong có thể tới 60% [131]. Tại Nhật Bản, Riley (2018), trong một tổng quan tài liệu từ năm 2006 đến 2017, đưa ra tỉ lệ tử vong chung của bệnh nhân mắc *C.difficile* là 3,4% – 15,1% [132]. Tại Ba lan, Drózdź (2019), trong 168 bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* nghiên cứu, tử vong chiếm 11% [49]. Novakova (2020) nghiên cứu tại Slovakia cũng đưa ra tỉ lệ tử vong của bệnh nhân mắc *C.difficile* là 11,1% [119]. Một nghiên cứu khác, Bobo (2011) báo cáo *C.difficile* có liên quan đến tử vong là 5,5% - 6,9%, và ở dịch tiêu chảy do *C.difficile* trong bệnh viện, tử vong lên tới 16,7% [24]. Trong một nghiên cứu đa trung tâm tại Canada, Kurrli (2015) đưa ra tỉ lệ tử vong chung của tiêu chảy do *C.difficile* là 15,2% [95]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, một số trường hợp bệnh nặng xin về, chúng tôi xếp vào nhóm diễn biến xấu, vì tình trạng khi về hầu hết là nguy kịch, khả năng cao tử vong sau đó. Tại khoa Hồi sức tích cực, diễn biến xấu ở bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* có thể liên quan đến tình trạng bệnh ban đầu nặng, cần nhập đơn vị hồi sức, bệnh nhân cần tiếp tục sử dụng kháng sinh điều trị, tạo thuận lợi cho sự phát triển của *C.difficile* ở đường tiêu hóa, nên tỉ lệ diễn biến xấu (tử vong và nặng xin về) ở khoa Hồi sức tích cực khá cao, tới 40%.

Với bệnh nhân trên 65 tuổi, tỉ lệ bệnh diễn biến xấu (nặng xin về và tử vong) chiếm 26,2%, trong khi nhóm bệnh nhân ≤ 65 tuổi, tỉ lệ diễn biến xấu chỉ là 18,4%. Có 5 bệnh nhân tử vong trên 65 tuổi (12,2%), cao hơn rõ rệt với tử vong ở nhóm bệnh nhân ≤ 65 tuổi (1,7%), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$ (Fisher's exact test) (**bảng 3.11**). Tiêu chảy do *C.difficile* xảy ra ở

người cao tuổi được thừa nhận là nghiêm trọng, Oldfield (2014) ghi nhận trên 90% tử vong ở bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* xảy ra ở người trên 65 tuổi [123]. Theo Depestel (2013), hơn 93% tử vong do mắc *C.difficile* xảy ra ở người trên 65 tuổi, và báo cáo này cho thấy *C.difficile* là nguyên nhân đứng thứ 18 gây tử vong cho người nhiều tuổi [44]. Cần luôn cảnh giác với khả năng mắc *C.difficile* ở bệnh nhân lớn tuổi bị tiêu chảy để chẩn đoán và điều trị kịp thời, nhằm giảm nguy cơ tử vong ở lứa tuổi này.

Việt Nam chưa có quan tâm đến bệnh do *C.difficile*, và nghiên cứu tìm thấy *C.difficile* gây bệnh với nhiều ca diễn biến xấu là một cảnh báo cho các bác sĩ lâm sàng và các nhà dịch tễ học về sự lưu hành của bệnh này ở nước ta.

4.2. Một số yếu tố nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* ở người lớn tại bệnh viện Bạch Mai, 2013 - 2017

Bệnh nhân bị mắc tiêu chảy do *C.difficile* khi có sự xâm nhập, cư trú, phát triển và sinh độc tố của *C.difficile* trong hệ tiêu hóa, thường gặp ở người nằm viện kéo dài. Hệ miễn dịch của vật chủ đóng vai trò quan trọng bảo vệ cơ thể không bị bệnh do *C.difficile*. Xấp xỉ một nửa số bệnh nhân nằm viện mang *C.difficile* có biểu hiện bệnh trên lâm sàng là do đáp ứng miễn dịch của vật chủ không hiệu quả. Bên cạnh đó, các yếu tố nguy cơ khác được nhiều tác giả thừa nhận là tuổi cao, có mang bệnh nền mạn tính và có tiền sử dùng kháng sinh trong vòng 8 tuần trước tiêu chảy [145].

So sánh về tuổi, nghiên cứu cho thấy, khi phân theo 4 nhóm tuổi: 15-29, 30-44, 45-60 và > 60 tuổi hoặc phân theo 2 nhóm tuổi: < 60 tuổi và ≥ 60 tuổi, thì không có sự khác biệt về nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* giữa nhóm bệnh và nhóm chứng, $p > 0,05$. Tuy nhiên, khi phân theo nhóm tuổi dưới 65 và ≥ 65 tuổi thì có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, $p=0,009$. Bệnh nhân ≥ 65 tuổi có nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* cao gấp 1,91 lần so với các bệnh nhân dưới 65 tuổi, OR = 1,91 (95% CI: 1,17 – 3,11), (**bảng 3.12**). Trên thế

giới, nhiều nghiên cứu về yếu tố nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* đều ghi nhận tuổi cao là một yếu tố nguy cơ quan trọng. Asempa (2017) báo cáo 70% – 80% tiêu chảy do *C.difficile* xảy ra ở người trên 65 tuổi [12]. Một số nghiên cứu trên thế giới ghi nhận nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* ở bệnh nhân ≥ 65 tuổi cao hơn nghiên cứu của chúng tôi. Ở châu Âu, Bauer (2011) báo cáo nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* ở bệnh nhân trên 65 tuổi cao gấp 3,26 lần bệnh nhân nhóm tuổi ít hơn, OR= 3,26 (95% CI: 1,08 - 9,78) [22]. Theo Leffler (2015), khi dịch tiêu chảy do *C.difficile* xảy ra trong bệnh viện, nguy cơ mắc bệnh ở bệnh nhân trên 65 tuổi cao hơn 10 lần bệnh nhân ít tuổi hơn [97]. Giả thuyết về bệnh nhân lớn tuổi có nguy cơ mắc bệnh tiêu chảy do *C.difficile* cao hơn được đưa ra là, tuổi cao liên quan đến khả năng có các bệnh mạn tính, thường tiếp xúc với chăm sóc y tế, và hệ miễn dịch suy giảm.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, nhóm bệnh tiêu chảy do *C.difficile* có mang bệnh lý mạn tính cao hơn nhóm chứng, OR = 1,17. Tuy nhiên, sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê, $p > 0,05$. Phân tích các bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* mang 2 bệnh lý mạn tính trở lên cũng chưa thấy khác biệt so với nhóm chứng. Khác biệt chỉ có ý nghĩa khi phân tích các bệnh nhân mang từ 3 bệnh mạn tính trở lên, nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* cao gấp 2,43 lần bệnh nhân có dưới 3 bệnh mạn tính (95% CI: 1,16 – 5,07) (**bảng 3.13**). Nhiều tác giả cũng thừa nhận, mang nhiều bệnh mạn tính là một nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* [24], [158]. Nghiên cứu của Predrag ghi nhận người mang trên 2 bệnh lý mạn tính ở nhóm tiêu chảy do *C.difficile* cao hơn có ý nghĩa so với nhóm chứng [128]. Lý giải không hoàn toàn rõ ràng, nhưng bệnh nhân mang nhiều bệnh mạn tính thường có hệ miễn dịch thiếu hụt. Nhiều nghiên cứu chứng minh thiếu hụt của hệ miễn dịch làm giảm lượng immunoglobulin IgG của niêm mạc ruột với *C.difficile*, làm cơ thể dễ cảm thụ và mắc bệnh. Hơn nữa, việc mang nhiều bệnh mạn tính, phải sử dụng nhiều thuốc, cơ thể dễ

nhễm khuẩn phải dùng kháng sinh... hoặc việc phải vào viện, phải tiếp xúc với môi trường y tế... đều làm tăng nguy cơ mắc bệnh. Mắc nhiều bệnh lý mạn tính là một yếu tố trong sự phối hợp của nhiều yếu tố nguy cơ [44],[63].

Khi phân tích nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* của từng bệnh mạn tính, chúng tôi nhận thấy, bệnh nhân cần lọc máu chu kỳ có nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* cao hơn 5,23 lần so với bệnh nhân không cần lọc máu (95% CI là 1,23 – 22,35) và bệnh nhân mắc bệnh hô hấp mạn có nguy cơ cao gấp 2,37 lần bệnh nhân không bị bệnh hô hấp mạn (95% CI: 1,04 – 5,36). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (**bảng 3.14**). Ogielska (2015) báo cáo 48% bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* có tình trạng suy giảm miễn dịch như phải lọc máu, ung thư, dùng corticoid kéo dài [122]. Dubberke (2007) cũng ghi nhận nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* như trong nghiên cứu của chúng tôi, bệnh nhân bị bệnh đường hô hấp mạn có nguy cơ tiêu chảy do *C.difficile* cao hơn 1,5 lần so với bệnh nhân không bị bệnh đường hô hấp mạn (95% CI: 1,2 – 2,0) và bệnh nhân cần lọc máu chu kỳ có nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* cao gấp 3,5 lần so với bệnh nhân không phải lọc máu chu kỳ (95% CI: 2,5 – 4,8) [50]. Bệnh nhân lọc máu chu kỳ, ngoài nguy cơ do bản thân bệnh mạn tính, còn tăng khả năng nhiễm trùng do thường xuyên phải lọc máu ở cơ sở y tế, khả năng tiếp xúc với vi khuẩn *C.difficile* cao hơn [63]. Dudzicz (2017) cũng cho thấy, bệnh nhân lọc máu chu kỳ có nguy cơ mắc *C.difficile* cao hơn bệnh nhân không phải lọc máu chu kỳ 3,34 lần [51]. Bệnh nhân mắc bệnh thận mạn trong nghiên cứu của chúng tôi có nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* cao hơn bệnh nhân không bị bệnh thận mạn, OR = 1,95 nhưng khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê (95% CI: 0,88 – 4,3) (**bảng 3.14**). Khác chúng tôi, McDonald nhận thấy, bệnh nhân bị bệnh thận mạn có nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* cao hơn 2-2,5 lần bệnh nhân không bị bệnh thận mạn, khác biệt có ý nghĩa thống kê [112]. Nghiên cứu của Predrag và CS ghi nhận tỉ lệ

mang bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính và tỉ lệ phải lọc máu chu lý ở bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* cao hơn có ý nghĩa so với nhóm chứng [128]. McDonald (2018) cũng ghi nhận, dùng hóa chất điều trị ung thư làm tăng nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile*, có thể liên quan đến suy giảm đề kháng, nằm viện, dùng hóa chất làm giảm bạch cầu. Sử dụng thuốc có corticoid lúc đầu cũng được cho là nguy cơ gây tiêu chảy do *C.difficile* ở bệnh nhân mắc bệnh ruột viêm và corticoid cũng được cho là nguy cơ gây tiêu chảy do *C.difficile* ở bệnh nhân sau ghép tạng đặc. Sartelli (2019) báo cáo nguy cơ tiêu chảy do *C.difficile* khi bệnh nhân có sử dụng corticoid (OR = 1,81), bệnh nhân bị suy thận (OR = 2,64), đái tháo đường (OR = 1,15) [137]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi không thấy sự khác biệt có ý nghĩa giữa nhóm bệnh và nhóm chứng khi đánh giá các yếu tố như: mắc ung thư, bệnh tự miễn, sử dụng corticoid kéo dài, bệnh thận hay đái tháo đường, $p > 0,05$ (**bảng 3.14**). *C.difficile* cũng được ghi nhận như một nguyên nhân thường gặp ở bệnh nhân HIV/AIDS, tuy nhiên khả năng mắc bệnh giảm xuống khi bệnh nhân được điều trị bằng thuốc kháng virus [112]. Chúng tôi chưa thấy sự khác biệt về tình trạng mắc bệnh tiêu hóa mạn và mắc HIV/AIDS giữa 2 nhóm tiêu chảy do *C.difficile* và tiêu chảy không do *C.difficile*. Cùng tương đồng với nghiên cứu của chúng tôi, Lee (2019) cũng thấy mang bệnh mạn tính như đái tháo đường, bệnh tim mạch, bệnh gan mạn, bệnh thận mạn, bệnh đường hô hấp mạn, ung thư cũng chưa có sự khác biệt giữa nhóm bệnh và nhóm chứng [96]. Nghiên cứu ở Hoa Kỳ có báo cáo ca bệnh tiêu chảy nặng do *C.difficile* ở phụ nữ thời kỳ chu sản, có thể liên quan đến phẫu thuật lấy thai hoặc sử dụng kháng sinh [100]. Wilcox (2008) có báo cáo, bệnh nhân có tiền sử chăm sóc trẻ < 2 tuổi là một yếu tố nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile*, khác biệt có ý nghĩa thống kê [162]. Lý giải được cho là ở trẻ nhỏ, trong quần thể vi sinh của đường tiêu hóa từ khi lọt lòng, thường có cư trú của các vi khuẩn kỵ khí,

trong đó có *C.difficile*. Chỉ khi lớn lên, các vi khuẩn kỵ khí dần được thay thế bằng các vi khuẩn hiếu khí. Tiếp xúc với trẻ nhỏ dưới 2 tuổi có nguy cơ tiếp xúc với *C.difficile* nhiều hơn. Tuy nhiên, cỡ mẫu nghiên cứu còn nhỏ, chúng tôi chưa thấy sự khác biệt về yếu tố thai sản hay yếu tố nuôi con bú giữa nhóm bệnh và nhóm chứng (**bảng 3.14**)

Trong nghiên cứu này, bệnh nhân đến từ thành thị có nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* cao hơn các bệnh nhân đến từ nông thôn, với OR=1,75 (95%CI: 1,08 – 2,84) (**bảng 3.15**). Chưa có nhiều nghiên cứu đánh giá về nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* của nơi sống ở nông thôn và thành thị. Lý giải đưa ra là, có thể việc sử dụng thuốc kháng sinh ở thành thị rộng rãi hơn, với nhiều kháng sinh phổ rộng, nguy cơ rối loạn vi khuẩn chí đường ruột cao hơn. Người sống ở thành thị thường tiếp xúc với cơ sở y tế hơn, có thể dễ nhiễm vi khuẩn *C.difficile* hơn. Cần có thêm những nghiên cứu về tỉ lệ mang *C.difficile* trong dân chúng ở các vùng nông thôn và thành thị của Việt Nam để lý giải cho sự khác biệt này.

Bệnh nhân nằm viện trong vòng 8 tuần trước khi tiêu chảy có nguy cơ mắc *C.difficile* cao hơn so với bệnh nhân không phải nằm viện trong vòng 8 tuần trước, OR=1,64 nhưng sự khác biệt trong nghiên cứu của chúng tôi chưa có ý nghĩa thống kê (95% CI: 0,97 – 2,78). Có 73,6% bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* có tiền sử nằm viện trong 8 tuần trước khi tiêu chảy. Thời gian nằm viện trước khi bị tiêu chảy ở nhóm bệnh nhân mắc *C.difficile* (trung vị: 10 ngày) dài hơn so với nhóm tiêu chảy không do *C.difficile* (trung vị: 7 ngày), nhưng sự khác biệt giữa hai nhóm không có ý nghĩa thống kê, $p>0,05$ (**bảng 3.16**). Nhiều tác giả ghi nhận, nằm viện là một yếu tố nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* [158]. Nằm viện kéo dài cũng làm tăng nguy cơ mắc *C.difficile* [137]. Chính vì vậy, lây nhiễm *C.difficile* trong các bệnh nhân nằm viện đã trở thành vấn đề được đặc biệt lưu ý trong đầu thế kỷ 21 ở các nước phát triển,

đòi hỏi phải báo cáo bắt buộc cho chương trình giám sát nhiễm trùng bệnh viện ở nhiều quốc gia. Ogielska (2015) báo cáo tới 80% bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* có tiền sử nằm viện trong 8 tuần trước [122]. Lessa (2015) cho thấy, có 65,8% bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* có tiền sử nằm viện trong vòng 12 tuần trước tiêu chảy [101]. Theo Hensgens (2011) 74,7% bệnh nhân tiêu chảy *C.difficile* có tiền sử nằm viện trong 12 tuần trước tiêu chảy [66]. Tại Ba Lan, Drózdź cho thấy chỉ có 26% bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* không có tiền sử nằm viện trong vòng 12 tuần trước tiêu chảy [49]. Theo dữ liệu từ Chương trình các bệnh nhiễm khuẩn mới nổi của CDC năm 2010 thì 94% tiêu chảy do *C.difficile* có liên quan đến nằm viện và chăm sóc y tế, dù 75% các ca bệnh xảy ra ở ngoài bệnh viện, gồm bệnh nhân vừa ra viện trong thời gian gần, điều trị ngoại trú, có tiếp xúc với nhân viên y tế, người ở trong các cơ sở chăm sóc y tế dài hạn...[44]. Khác với nghiên cứu của chúng tôi, nhiều nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh được nằm viện trước đó là yếu tố nguy cơ cho mắc tiêu chảy do *C.difficile*. Nghiên cứu của Kurti (2015), nguy cơ mắc *C.difficile* cao hơn 2,39 lần ở bệnh nhân có tiền sử nằm viện trước đó (95% CI= 1,61-3,51) [95]. Dubberke (2007) báo cáo, tiền sử nằm viện trong vòng 60 ngày trước tiêu chảy có nguy cơ mắc *C.difficile* cao hơn, RR = 2,3 (95% CI: 1,9-2,8) [50]. Wilcox nghiên cứu từ cộng đồng cũng cho thấy, tiền sử nằm viện trong vòng 6 tháng trước có nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* cao hơn có khác biệt so với nhóm chứng [162].

Tiền sử dùng kháng sinh trong vòng 8 tuần trước khi tiêu chảy hoặc dùng nhiều loại kháng sinh, nguy cơ mắc *C.difficile* cao hơn không dùng kháng sinh. Tuy nhiên, sự khác biệt giữa hai nhóm bệnh và nhóm chứng trong nghiên cứu của chúng tôi chưa có ý nghĩa thống kê, $p > 0,05$ (**bảng 3.17**). Nhiều tác giả trên thế giới thừa nhận, một trong những yếu tố nguy cơ quan trọng của mắc tiêu chảy do *C.difficile* là sử dụng kháng sinh. Kháng sinh

không chỉ làm tăng nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* trong thời gian điều trị mà còn có nguy cơ trong 3 tháng sau khi ngừng kháng sinh [44],[80]. *C.difficile* không chịu tác động của hầu hết các loại kháng sinh. Nguy cơ nhiễm *C.difficile* liên quan đến kháng sinh được cho là do kháng sinh làm tổn thương đến hệ vi khuẩn đường ruột, gây rối loạn hệ vi khuẩn chí, tạo điều kiện cho *C.difficile* phát triển, sinh độc tố và gây bệnh. Asha và cộng sự (2006) báo cáo 85% bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* có dùng kháng sinh trong vòng 28 ngày trước khi khởi phát bệnh [13]. Hensgens (2011) cho thấy 93,5% bệnh nhân tiêu chảy *C.difficile* có tiền sử dùng kháng sinh trước tiêu chảy [51],[66]. Trong nghiên cứu của mình, Khanna (2012) báo cáo tiền sử dùng kháng sinh trong 90 ngày trước chiếm 78% các bệnh nhân mắc tiêu chảy do *C.difficile* từ cộng đồng và 94% mắc tiêu chảy do *C.difficile* từ bệnh viện [87]. Ngamskulrungrroj (2015) báo cáo ở Thái Lan có 57,6% bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* có tiền sử dùng kháng sinh trong 8 tuần trước đó [118]. Verma và CS (2011) cũng cho rằng, bệnh nhân sau dùng kháng sinh mà xuất hiện tiêu chảy, sốt, tăng bạch cầu máu, cần nghĩ đến tiêu chảy do *C.difficile* [158]. Các thống kê cho thấy, 15-20% các trường hợp tiêu chảy sau dùng kháng sinh là do *C.difficile* [20], [35]. Bartlett (1980) báo cáo 27% bệnh nhân tiêu chảy sau dùng kháng sinh tìm thấy độc tố của *C.difficile* [21]. Ingle cũng tương đồng với chúng tôi khi thấy dùng kháng sinh trước tiêu chảy gặp ở nhóm bệnh nhiều hơn, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê [76]. Khác với nghiên cứu của chúng tôi, Wilcox thấy dùng kháng sinh trong vòng 4 tuần trước có nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* cao hơn nhóm chứng [162]. Một tổng quan hệ thống các nghiên cứu cho thấy, sử dụng kháng sinh có liên quan đến mắc tiêu chảy do *C.difficile* với tỉ suất chênh OR= 2,86 – 6,92 [151]. Theo nghiên cứu của Predrag (2016), dùng từ 2 loại kháng sinh trở lên, nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* cao gấp 2,97 lần bệnh nhân dùng

ít hơn 2 loại kháng sinh (95% CI: 1,19–3,04) [128]. Tuy nhiên, nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* còn liên quan đến sự đề kháng của các vi khuẩn đường ruột với các kháng sinh sử dụng và sự thường xuyên sử dụng kháng sinh. Nghiên cứu của chúng tôi thực hiện ở bệnh viện đa khoa tuyến cuối, chủ yếu tại khoa hồi sức tích cực và khoa truyền nhiễm, nơi nhiều bệnh nhân đã sử dụng kháng sinh từ tuyến trước hoặc tự sử dụng kháng sinh trước khi đến bệnh viện. Có thể điều này lý giải cho sự khác biệt không rõ ràng về tiền sử dùng kháng sinh ở các bệnh nhân tiêu chảy của nghiên cứu.

Sự liên quan trong sử dụng từng nhóm kháng sinh với tiêu chảy do *C.difficile* cũng có thể lý giải theo giả định trên. Nhóm kháng sinh sử dụng trước tiêu chảy được đánh giá gồm: nhóm penicillin, cephalosporin, carbapenem, aminoglycoside, macrolid, clindamycin, quinolon, cotrimoxazole, metronidazole và glycopeptid. Không có sự khác biệt giữa hầu hết các nhóm kháng sinh được sử dụng (trừ nhóm glycopeptid) với nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* (**bảng 3.18**). Khác với nghiên cứu của chúng tôi, Predrag (2016) báo cáo sử dụng tất cả các nhóm kháng sinh đều có nguy cơ gây tiêu chảy do *C.difficile* của bệnh nhân điều trị nội trú ở Serbia, như kháng sinh nhóm quinolon, cephalosporin, penicillin, aminoglycosid, carbapenem, clindamycin và vancomycin. Hơn nữa, có tới 51% bệnh nhân của nghiên cứu đó sử dụng từ 2 loại kháng sinh trở lên [128]. Một nghiên cứu dựa trên hệ thống với trên 2 triệu báo cáo gửi hiệp hội thuốc và thực phẩm Hoa Kỳ (FDA) (trên 5 nghìn báo cáo liên quan đến *C.difficile*) cho thấy kháng sinh có nguy cơ tăng mắc tiêu chảy do *C.difficile* theo thứ tự từ cao đến thấp là nhóm lincosamide (clindamycin), monobactams, penicillin, carbapenems, cephalosporins, tetracyclines, macrolides và trimethoprim-sulfonamides [149]. Nghiên cứu của chúng tôi có duy nhất một kháng sinh nhóm glycopeptid, để điều trị bệnh khác trước khi tiêu chảy làm giảm nguy cơ mắc

C.difficile, chỉ còn 0,22 lần so với nhóm không dùng kháng sinh nhóm glycopeptid (95% CI: 0,07 – 0,72) (**bảng 3.18**). Kháng sinh nhóm glycopeptid dùng đường uống có tác dụng trên *C.difficile*. Trong lịch sử, uống vancomycin điều trị thành công các trường hợp viêm đại tràng giả mạc sau dùng kháng sinh [27]. Trong hướng dẫn điều trị nhiễm trùng do *C.difficile*, vancomycin uống hoặc thụt trực tràng là kháng sinh điều trị có hiệu quả [137]. Nghiên cứu của chúng tôi, số lượng bệnh nhân dùng kháng sinh nhóm glycopeptid còn ít và truyền tĩnh mạch kháng sinh nhóm glycopeptid này có tác động đến *C.difficile* tại đường tiêu hóa không thì cần thêm nữa những bằng chứng. Cùng tương đồng với nghiên cứu của chúng tôi, nghiên cứu của Lv và Peng (2014) tại Trung Quốc cũng ghi nhận, dùng kháng sinh nhóm glycopeptid có tác dụng bảo vệ không mắc tiêu chảy do *C.difficile* với OR = 0,069 (95% CI: 0,008 – 0,563) với lý giải là kháng sinh nhóm glycopeptid ức chế sự nảy mầm của nha bào *C.difficile* chuyển thành dạng hoạt động [109].

Một số yếu tố nguy cơ khác gây tiêu chảy do *C.difficile* cũng được đề cập đến trong tổng quan tài liệu như dùng thuốc kháng axit dạ dày, dùng corticoid, thuốc điều trị ung thư hay các can thiệp đường tiêu hóa như đặt ống thông nuôi dưỡng đường tiêu hóa hay nội soi, thụt đại tràng.... Ogielska (2015) báo cáo 48% bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* có tình trạng suy giảm miễn dịch như phải lọc máu, ung thư, dùng corticoid kéo dài [122]. Hensgens (2011) cho thấy 68,8% bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* có tiền sử dùng thuốc ức chế bơm proton [66]. Tỷ lệ bệnh nhân có tiền sử dùng thuốc ức chế bơm proton theo nghiên cứu của Khanna và CS (2012) là 22% với các bệnh nhân mắc tiêu chảy do *C.difficile* từ cộng đồng và 47% mắc từ bệnh viện [87]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, chúng tôi không ghi nhận được sự khác biệt giữa nhóm bệnh và nhóm chứng về yếu tố dùng thuốc kháng axit dạ dày, dùng corticoid, thuốc điều trị ung thư hay các can thiệp đường tiêu hóa,

$p > 0,05$ (**bảng 3.19**). Khác với chúng tôi, Leonard (2007) báo cáo nguy cơ của dùng thuốc kháng axit dạ dày gây mắc tiêu chảy do *C.difficile* là 1,94 (95% CI: 1,37 – 2,75) [99],[114]. Thuốc ức chế bơm proton làm tăng nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* 1,74 lần, trong nghiên cứu của Depestel (2013) với 95% CI: 1,47–2,85 [44]. Kurti (2015) cũng báo cáo nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* khi sử dụng thuốc ức chế bơm proton là 2,082 lần ($p < 0,001$) [95]. Trong một ấn bản của Cơ quan quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa kỳ (FDA) tháng 2 năm 2012, trong 28 nghiên cứu thì có tới 23 nghiên cứu cho thấy phơi nhiễm với các thuốc ức chế tiết axit dạ dày làm tăng nguy cơ mắc bệnh do *C.difficile* từ 1,4 – 2,75 lần [44]. Một nghiên cứu bệnh chứng gần đây, Lee và cộng sự (2019) báo cáo, bệnh nhân dùng thuốc ức chế tiết axit dạ dày có nguy cơ tiêu chảy do *C.difficile* cao hơn nhóm tiêu chảy không do *C.difficile* với OR = 4,77 (95% CI: 1,57 – 14,45) [96]. Oldfield (2014) cũng báo cáo rằng, sử dụng thuốc ức chế bơm proton làm tăng nguy cơ mắc *C.difficile* 1,69 – 2,05 lần khi phân tích đơn biến. Tuy nhiên, liên quan giữa sử dụng thuốc ức chế bơm proton và tiêu chảy do *C.difficile*, khi phân tích đa biến lại chưa thấy sự khác biệt có ý nghĩa. Tác giả này cũng báo cáo, phẫu thuật đường tiêu hóa làm tăng nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* lên 25 lần, có thể liên quan đến nguyên nhân giảm nhu động dạ dày ruột, sử dụng kháng sinh sau phẫu thuật với giả thuyết là do tăng chuyển nha bào sang thể hoạt động, tăng khả năng sống của *C.difficile* trong đường tiêu hóa [123]. Tương đồng với nghiên cứu của chúng tôi, Li (2018) cũng không thấy sự khác biệt của dùng thuốc ức chế tiết axit dạ dày giữa hai nhóm tiêu chảy do *C.difficile* và tiêu chảy không do *C.difficile* [102].

Các triệu chứng lâm sàng như sốt ($> 37,5^{\circ}\text{C}$) hay sốt cao ($> 38,5^{\circ}\text{C}$), đau bụng, chướng bụng, buồn nôn – nôn và tụt huyết áp không có sự khác biệt giữa hai nhóm bệnh và nhóm chứng, $p > 0,05$ (**bảng 3.20**). Các triệu chứng

lâm sàng này thường gặp ở tất cả các bệnh nhân tiêu chảy do các nguyên nhân khác nhau và cũng không đặc hiệu cho một căn nguyên gây tiêu chảy nào. Lee (2019) cũng thấy chưa có sự khác biệt về triệu chứng sốt, nôn, buồn nôn, đau bụng giữa nhóm bệnh và nhóm chứng [96]. Tuy nhiên, khi có triệu chứng phân nhầy mũi thì nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* cao gấp 4,98 lần (95%CI: 2,28 – 10,89), phân máu có nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* cao hơn 2,36 lần (95%CI: 1,16 – 4,8) so với nhóm bệnh nhân tiêu chảy không do *C.difficile*. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (**bảng 3.20**). Nghiên cứu của chúng tôi cũng tương đồng với Skyum (2019), cũng ghi nhận yếu tố có liên quan đến tiêu chảy do *C.difficile* là phân có nhầy mũi với OR = 3,5 (95% CI: 1,02–12,1) [144].

Về số lần tiêu chảy tối đa trong ngày, tiêu chảy từ 7-10 lần ở nhóm bệnh cao hơn có ý nghĩa so với nhóm chứng, OR = 1,94 (95% CI: 1,06 – 3,56). Số lần tiêu chảy trung bình của nhóm bệnh ($7 \pm 5,1$ lần), nhiều hơn so với số lần tiêu chảy trung bình của nhóm chứng ($6 \pm 3,7$ lần), OR = 1,06 (1,00 – 1,11), $p = 0,049$ (**bảng 3.21**). Còn ít nghiên cứu để so sánh sự khác biệt về số lần tiêu chảy giữa nhóm do *C.difficile* và không do *C.difficile*.

Tiêu chảy từ 14 ngày trở lên có nguy cơ do *C.difficile* cao hơn 2,38 lần tiêu chảy không do *C.difficile*, OR = 2,38 (95% CI: 1,19-4,76) (**bảng 3.22**). Tại châu Âu, Skyum (2019) thấy tiêu chảy kéo dài > 3 ngày đã là yếu tố nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* (OR = 5,2) [144]. Số ngày tiêu chảy trung vị ở nhóm bệnh trong nghiên cứu của chúng tôi là 8 ngày, so với nhóm chứng là 5 ngày, nhưng không có sự khác biệt có ý nghĩa giữa 2 nhóm (**bảng 3.22**). Nghiên cứu của chúng tôi cũng tương đồng với Ingle (2013) công bố, số ngày tiêu chảy trung bình ở nhóm bệnh là 8 ngày, so với nhóm chứng là 6 ngày, nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê [76]. Một nghiên cứu bệnh –

chứng tại Israel, Shapiro (2017) báo cáo, thời gian tiêu chảy ở nhóm bệnh nhân mắc *C.difficile* dài hơn nhóm không do *C.difficile* với OR= 2,15 [140].

Các triệu chứng cận lâm sàng chính như bạch cầu, albumin máu và procalcitonin máu giữa nhóm tiêu chảy do *C.difficile* và tiêu chảy không do *C.difficile* không thấy có sự khác biệt, $p > 0,05$ (**bảng 3.23**). Nghiên cứu của chúng tôi cũng tương đồng với nghiên cứu của Predrag (2016) ghi nhận không có sự khác biệt về bạch cầu, albumin máu và procalcitonin giữa nhóm bệnh và nhóm chứng [128]. Tại Trung Quốc, Lv và Peng (2014) cũng ghi nhận không có sự khác biệt về số bạch cầu, albumin máu giữa nhóm bệnh và nhóm chứng [109]. Nhưng Shapiro (2017) trong một nghiên cứu bệnh chứng tại Israel lại ghi nhận các bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* có số bạch cầu cao hơn nhóm tiêu chảy không do *C.difficile* với OR = 1,29 [140]. Khác với chúng tôi, Kurti (2013) báo cáo, bạch cầu máu ở nhóm bệnh cao hơn ở nhóm chứng, ($p < 0,001$), albumin máu ở nhóm bệnh thấp hơn nhóm chứng ($p < 0,001$), không có khác biệt về chỉ số procalcitonin giữa nhóm bệnh và nhóm chứng [95]. Nseir (2019) lại thấy phản ứng viêm CRP tăng cao có ý nghĩa thống kê ở nhóm tiêu chảy do *C.difficile* so với nhóm chứng ($p < 0,001$) [120]. Trong một nghiên cứu khác, Dubberke (2007) báo cáo, albumin máu thấp ($< 30\text{g/L}$) có nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* cao gấp 1,4 lần (95%CI: 1,1 - 1,8) và albumin máu rất thấp ($< 25\text{g/L}$) có nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* cao hơn 1,8 lần nhóm tiêu chảy không do *C.difficile* (95% CI: 1,25 – 2,5) [50]. Bạch cầu và procalcitonin máu tăng trong các phản ứng nhiễm trùng. Giải thích cho việc không có sự khác biệt về công thức bạch cầu và phản ứng procalcitonin giữa nhóm bệnh và nhóm chứng trong nghiên cứu của chúng tôi, có thể là các bệnh nhân nghiên cứu được chọn từ khoa truyền nhiễm và khoa hồi sức tích cực, đều là các bệnh nhân có nhiễm khuẩn, nên công thức bạch cầu và procalcitonin đều tăng trong nhóm bệnh và chứng. Cũng tương

tự, khi nhiễm trùng nặng, tiêu thụ vào quá trình viêm của cơ thể tăng cao, albumin máu cũng bị giảm thấp, và nghiên cứu này của chúng tôi không thấy có sự khác biệt về albumin máu giữa hai nhóm bệnh và chứng.

Tổng hợp lại khi phân tích các yếu tố liên quan với tiêu chảy do *C.difficile* trong phân tích đơn biến (**bảng 3.24**), chúng tôi ghi nhận có 5 yếu tố nguy cơ là mắc bệnh là: Bệnh nhân tuổi cao ≥ 65 ; sống ở thành thị; có mang ≥ 3 bệnh lý mạn tính; bệnh nhân lọc máu chu kỳ; có bệnh hô hấp mạn tính. Có 4 yếu tố liên quan đến chẩn đoán bệnh tiêu chảy do *C.difficile* là: phân có nhầy mũi; phân có máu; tiêu chảy từ 7-10 lần/ ngày; tiêu chảy kéo dài từ 14 ngày trở lên. Có 1 yếu tố bảo vệ với mắc tiêu chảy do *C.difficile* là sử dụng kháng sinh nhóm glycopeptid để điều trị bệnh khác trong vòng 8 tuần trước khi tiêu chảy. Chúng tôi đưa các yếu tố liên quan có ý nghĩa thống kê trong phân tích đơn biến vào phân tích đa biến theo mô hình hồi qui logistic để tìm các yếu tố độc lập liên quan đến mắc tiêu chảy do *C.difficile*. Bệnh nhân mắc ≥ 3 bệnh mạn tính và mắc bệnh đường hô hấp mạn có nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* cao hơn bệnh nhân tiêu chảy không do *C.difficile* khi phân tích đơn biến nhưng khi đưa vào mô hình hồi qui đa biến, sự khác biệt giữa 2 nhóm không rõ ràng. Đại tiện phân có máu và tiêu chảy kéo dài ≥ 14 ngày là yếu tố liên quan đến chẩn đoán tiêu chảy do *C.difficile* trong phân tích đơn biến nhưng không có sự khác biệt giữa nhóm bệnh và nhóm chứng khi đưa vào mô hình hồi qui logistic trong phân tích đa biến.

Kết quả cuối cùng, **bảng 3.25** cho thấy có 3 yếu tố nguy cơ độc lập thật sự liên quan đến tiêu chảy do *C.difficile* gồm: tuổi ≥ 65 (OR=2,01), sống ở thành thị (OR= 1,76), bệnh nhân cần lọc máu chu kỳ (OR=7,32). Có 2 yếu tố liên quan trong xác định chẩn đoán tiêu chảy do *C.difficile* là đại tiện phân có nhầy mũi (OR=5,94) và số lần tiêu chảy ở mức 7-10 lần/ ngày (OR=1,98). Khác với nghiên cứu của chúng tôi, Kurti phân tích đa biến cho thấy các yếu

tổ nguy cơ có ý nghĩa mắc tiêu chảy do *C.difficile* là tiền sử nằm viện trước đó (OR=2,39), điều trị với kháng sinh có nguy cơ (OR=4,09) và sử dụng thuốc ức chế bơm proton (OR= 1,62) [95]. Trong các yếu tố nguy cơ chúng tôi báo cáo, lọc máu chu kỳ là yếu tố có khá nhiều nghiên cứu công nhận. Khi phân tích đa biến, Oldfield đưa ra các yếu tố nguy cơ độc lập cho mắc tiêu chảy do *C.difficile* gồm: nằm viện trong 3 tháng trước OR= 2,45 (95% CI: 1,02-5,84), lọc máu chu kỳ OR= 8,12 (95% CI: 1,80-36,65), và sử dụng corticoid (OR = 3,09, 95% CI: 1,24-7,73) [123]. Tại Canada, Demir (2018) đưa ra các yếu tố độc lập liên quan đến mắc tiêu chảy do *C.difficile* là lọc máu chu kỳ (OR=13,5), sử dụng kháng sinh ngay trước đó (OR= 4,23), rung nhĩ, bạch cầu máu trên 11 G/l [43]. Nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy, sử dụng kháng sinh glycopeptid trong vòng 8 tuần để điều trị bệnh khác trước khi bị tiêu chảy là yếu tố bảo vệ với mắc tiêu chảy do *C.difficile* khi phân tích đa biến OR=0,18 (95% CI: 0,05 – 0,67).

4.3. Một số đặc điểm phân bố kiểu gen của *C.difficile* gây tiêu chảy ở người lớn tại bệnh viện Bạch Mai, 2013 - 2017.

Từ 101 bệnh phẩm phân của bệnh nhân người lớn tiêu chảy do *C.difficile* nằm viện tại bệnh viện Bạch Mai từ năm 2013 đến năm 2017, chúng tôi phân lập được 107 chủng *C.difficile* để mô tả các đặc điểm kiểu gen.

4.3.1. Đặc điểm về loại gen sinh độc tố của *C.difficile*

Bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* mang gen sinh độc tố A+B+ hoặc độc tố A-B+, đặc biệt có bệnh nhân cùng lúc nhiễm cả 2 chủng sinh độc tố, với tỉ lệ chủng sinh độc tố A+B+ là 49,5%, A-B+ là 44,6% và có 6 bệnh nhân mang cùng lúc hai chủng sinh độc tố A+B+ và A-B+ chiếm 5,9% (**bảng 3.26**). Các nghiên cứu trên thế giới đều ghi nhận vai trò của cả 2 chủng sinh độc tố ở bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile*. Chưa phát hiện chủng A+B-, chỉ mang độc tố A mà không có độc tố B trên người. Trước đây, hầu hết ghi nhận vai trò

gây bệnh của các chủng *C.difficile* sinh độc tố A+B+, và cho rằng, độc tố A là tác nhân độc tố chính. Nhưng gần đây tầm quan trọng của độc tố B đã được khẳng định [103]. Nhiều nghiên cứu trên thế giới ghi nhận các ca bệnh nhiễm *C.difficile* chỉ có độc tố B mà không có độc tố A (mang genotyp A-B+) nhưng bệnh cảnh lâm sàng khá trầm trọng [4], [53], [136] và có thể gây các ổ dịch [36], [77]. Một nghiên cứu ở Hàn Quốc, chủng có gen độc tố A-B+ tăng dần, đạt đỉnh là 50% tổng số các chủng *C.difficile* vào năm 2004 [36]. Sau đó, Kim báo cáo các chủng *C.difficile* sinh độc tố A-B+ đã giảm (năm 2010 có 105/337 trường hợp) [88], và năm 2012, chủng A-B+ chỉ chiếm 15,7% các chủng sinh độc tố [89]. Huang (2009) báo cáo tỉ lệ chủng mang gen sinh độc tố A-B+ là 33,3% ở Thượng Hải (Trung Quốc) và 0% ở Stoc-khom (Thụy Điển) [70]. Mang cùng lúc hơn một chủng *C.difficile* gây bệnh như nghiên cứu của chúng tôi cũng đã được báo cáo, chủ yếu ở các nước châu Á. Một nghiên cứu ở Thái Lan, Putsathit (2017) cũng ghi nhận có 4 trong số 100 bệnh nhân có mang cùng lúc hơn 1 chủng *C.difficile* [129]. Cheong (2017) cũng phát hiện được tại Lào cả chủng *C.difficile* mang gen độc tố A-B+ và A+B+ [32]. Wang (2018) báo cáo một ca lâm sàng bệnh nhân 83 tuổi, tiêu chảy ở Trung Quốc nhiễm cùng lúc 2 chủng *C.difficile* A+B+ và A-B+ [160].

Phân bố các chủng *C.difficile* sinh độc tố theo năm, chủng *C.difficile* sinh độc tố A+B+ chiếm đa số, chủng sinh độc tố A-B+ năm 2013 chỉ chiếm 25%. Tuy nhiên sau đó, số chủng *C.difficile* sinh độc tố A-B+ phát hiện được trong năm 2014 và 2015 tăng lên, chiếm 50% và 54,2% số bệnh nhân. Đến năm 2016 và 2017, số bệnh nhân mắc chủng *C.difficile* sinh độc tố A-B+ giảm dần còn 46,4% và 36,8%. Dù vậy, sự khác biệt về phân bố giữa các chủng sinh độc tố của *C.difficile* chưa có ý nghĩa thống kê, $p > 0,05$ (Fisher's exact test) (**bảng 3.27**). Tỉ lệ bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* mang chủng A-B+ của chúng tôi cũng dao động ở từng năm cao tương tự như báo cáo của tác giả

trong vùng. Nghiên cứu ở Hàn Quốc, Shin (2008) cho thấy, chủng *C.difficile* mang gen sinh độc tố A-B+ chỉ chiếm <5% trước năm 2000 đã tăng dần lên 13% năm 2003 và 50% năm 2005 [141]. Tại Trung Quốc, Jin (2010) cũng báo cáo, tỉ lệ chủng *C.difficile* mang gen sinh độc tố A+B+ cũng cao hơn, chiếm 77%, trong khi chủng sinh độc tố A-B+ chỉ chiếm 23% [78].

Về phân bố nhóm tuổi theo loại gen sinh độc tố, chúng tôi nhận thấy chủng mang gen sinh độc tố A+B+ gặp ở nhóm tuổi 15-60 tuổi nhiều hơn (52%), trong khi chủng sinh độc tố A-B+ hay gặp ở nhóm tuổi trên 60 (53,3%). Tuy nhiên, sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê, $p > 0,05$ (Fisher's exact test) (**bảng 3.28**). Luo và cộng sự (2019), nghiên cứu 394 chủng *C.difficile* từ các bệnh viện ở 8 thành phố của Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật Bản, Singapore, Australia, Hoa Kỳ cũng ghi nhận tuổi ≥ 65 thường gặp hơn ở nhóm bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* mang gen độc tố A-B+ [107]. Một số nghiên cứu khác cho thấy, hay gặp độc tố A-B+ ở bệnh nhân dùng thuốc chống ung thư, đặt ống thông dạ dày hoặc điều trị ở các cơ sở y tế [56],[93].

Về triệu chứng lâm sàng như sốt, đau bụng, nôn - buồn nôn, phân nhầy mũi hoặc phân máu, nghiên cứu của chúng tôi không ghi nhận sự khác biệt giữa các bệnh nhân mang chủng *C.difficile* sinh độc tố A+B+; A-B+ và mang 2 độc tố, $p > 0,05$ (Fisher's exact test) (**bảng 3.29**). Kim (2012) nghiên cứu tại Hàn Quốc về tiêu chảy do *C.difficile* mang các loại gen sinh độc tố A+B+ và A-B+, cũng không thấy có sự khác biệt về mức độ nặng, các triệu chứng lâm sàng, xét nghiệm bạch cầu, albumin máu hay CRP [91]. Freedman (2010), trong nghiên cứu của mình cũng báo cáo không có sự khác biệt có ý nghĩa về nhiệt độ, CRP, số bạch cầu, số lần tiêu chảy, đặc điểm của bệnh lý nền khi so sánh giữa các chủng *C.difficile* sinh độc tố A+B+ và A-B+ [56]. Trong nhóm bệnh nhân viêm đại tràng giả mạc, nghiên cứu của chúng tôi cũng không nhận thấy sự khác biệt giữa các loại độc tố, $p > 0,05$ (Fisher's exact test) (**bảng**

3.29). Dù có nghiên cứu ghi nhận, 72% các trường hợp viêm đại tràng giả mạc gặp ở bệnh nhân mang gen sinh độc tố A-B+ [141], trong khi một số tác giả khác lại ghi nhận viêm đại tràng giả mạc hay gặp ở bệnh nhân mang loại gen độc tố A+B+ [56].

Số lần tiêu chảy trung bình của các bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* trong nghiên cứu cũng không có sự khác biệt giữa các loại gen sinh độc tố, $p > 0,05$ (Kruskal-Wallis test) (**bảng 3.29**).

Bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* mang các loại gen sinh độc tố đều có tiền sử nằm viện trong 8 tuần trước tiêu chảy cao hơn có ý nghĩa, như mang gen sinh độc tố A+B+ có tiền sử nằm viện trong 8 tuần trước là 64%, A-B+ là 82,2% và mang 2 loại gen sinh độc tố là 100%. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Fisher's exact test) (**bảng 3.30**). Tương đồng với nghiên cứu của chúng tôi, Ogielska (2015) cũng ghi nhận 80% bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* có tiền sử nằm viện trong vòng 3 tháng trước [122].

Bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* mang các loại gen sinh độc tố A+B+, A-B+ và mang 2 gen sinh độc tố đều có mang bệnh lý mạn tính với tỉ lệ tương ứng là 72%, 73,3% và 100%. Tuy nhiên, do cỡ mẫu còn bé, nên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê, $p > 0,05$ (Fisher's exact test) (**bảng 3.31**). Còn ít các nghiên cứu về các chủng *C.difficile* mang gen sinh độc tố khác nhau ở nhóm bệnh nhân có bệnh mạn tính và không có bệnh mạn tính.

Bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* mang các loại gen sinh độc tố đều có tiền sử dùng kháng sinh trong 8 tuần trước tiêu chảy cao hơn nhóm không có tiền sử dùng kháng sinh, như mang gen sinh độc tố A+B+ có tiền sử dùng kháng sinh trong 8 tuần trước là 54%, A-B+ là 73,3% và mang 2 loại gen sinh độc tố là 100%. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Fisher's exact test) (**bảng 3.32**). Luo và cộng sự (2019), trong nghiên cứu hồi cứu đa trung tâm, cũng ghi nhận ở 1 số thành phố của Thượng Hải, Nhật Bản và Úc, bệnh

nhân tiêu chảy do *C.difficile* có tỉ lệ dùng kháng sinh trong 8 tuần trước đó cao hơn (60%- 84,3%), dù 1 số thành phố khác tỉ lệ này lại không cao [107].

Diễn biến điều trị của các bệnh nhân trong nghiên cứu theo loại gen sinh độc tố, tỉ lệ bệnh nhân khỏi, đỡ ra viện, nặng xin về và tử vong không có sự khác biệt giữa các loại gen sinh độc tố, $p > 0.05$ (Fisher's exact test) (**bảng 3.33**). Nhiều tác giả cũng ghi nhận không có sự khác biệt về kết quả điều trị giữa các bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* mang các loại gen sinh độc tố khác nhau.

4.3.2. Đặc điểm về kiểu gen ribotype của *C.difficile*

Nghiên cứu sử dụng phương pháp PCR ribotyping phân loại 107 chủng *C.difficile* từ 101 bệnh nhân. Loại bỏ các chủng không khôi phục được để làm xét nghiệm PCR ribotyping và không định danh được, chúng tôi còn 102 chủng *C.difficile* phân loại được kiểu gen ribotype. PCR ribotyping là phương pháp phân loại chuẩn, được sử dụng phổ biến ở châu Âu với ưu điểm nhanh, dễ tiến hành, có khả năng phân loại cao, dựa vào kiểu hình có được nhờ khuếch đại vùng xen kẽ giữa gen rDNA 16S và 23S. Có thể sử dụng phương pháp của Stubbs hoặc Bidet để xác định kiểu gen ribotype của *C.difficile* [23], [147]. Tuy nhiên, việc phân tích gel agarose gặp khó khăn vì cần phải có chủng tham chiếu để so sánh. Các nghiên cứu trên thế giới nhận thấy, một số kiểu gen thường gặp nhiều bệnh nhân nặng, hay gây ra các vụ dịch là kiểu gen ribotype 027, 017, 018, 058 và 078 [153]. Nghiên cứu của chúng tôi xác định được 8 kiểu gen ribotype của các bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile*, hay gặp nhất là ribotype *trf*, 017 và cc835 với tỉ lệ là 24,5%, 23,5% và 22,6%. Các ribotype khác là *og39*, 014, *ozk*, *cr* và 001 với tỉ lệ thấp hơn (**biểu đồ 3.13**). Nghiên cứu không phát hiện kiểu gen ribotype 027 gây dịch ở châu Âu và Bắc Mỹ, cũng như ribotype 078 thường gây dịch ở một số nước châu Âu. Kiểu gen ribotype 017 thường gặp trong nghiên cứu của chúng tôi (23,5%),

cũng là chủng thường gặp ở nhiều nước châu Á như Trung Quốc, Đài Loan, Hàn Quốc, Nhật Bản và các nước Đông Nam Á như Thái Lan, Lào, Malaysia... [36],[56], [75]. Sự lưu hành phổ biến và các báo cáo về chủng này từ những năm 1990 gợi ý rằng chủng 017 có thể có nguồn gốc từ châu Á [75]. Nghiên cứu tại Trung Quốc của tác giả Jin (2017), tìm được 10 kiểu gen ribotype, chủ yếu là 017 (16,6%), 001 (14,4%) và 012 (13,4%) [77]. Tại Thượng Hải, Huang (2009) cũng ghi nhận chủng nổi trội mang kiểu gen ribotype 017, chiếm 18,7% [70]. Tại Hàn Quốc, các chủng thường gặp là 017, 018, 001 và có gặp chủng 027 [89], riêng trong các chủng sinh độc tố A-B+ thì kiểu gen 017 chiếm đa số [88]. Cheong (2017) cũng phát hiện được 3 kiểu gen ribotype của *C.difficile* lưu hành tại Lào là 017, 014, 020 [32]. Thái Lan cũng ghi nhận lưu hành 13 kiểu gen ribotype, nhiều nhất là 017 chiếm 41,5% và 014/020 chiếm 20,8% [118]. Tuy nhiên, có một số vùng ở châu Á có khác biệt với chúng tôi. Trong một tổng kết của Collin (2013) về các chủng *C.difficile* tại châu Á, ghi nhận ở Nhật Bản, các kiểu gen ribotype được phát hiện chủ yếu là smz/018, 014, 002, 001, có phát hiện được chủng gây dịch 027, ở Hàn Quốc thì kiểu gen 018 chiếm đa số trong năm 2008 – 2010 [36]. Tổng quan hệ thống các nghiên cứu tại Nhật Bản từ năm 2006 đến 2017, Riley (2018) báo cáo kiểu gen ribotype của *C.difficile* thường gặp là smz/018, 002, 052 và 369 (còn được gọi là trf) [132]. Trong nghiên cứu đa trung tâm về kiểu gen ribotype lưu hành ở châu Âu, Freeman (2010) báo cáo, phát hiện được 66 kiểu gen ribotype của các chủng *C.difficile* từ các bệnh viện, thường gặp nhất là ribotype 001 (13%), ribotype 014 (9%), ribotypes 002, 012, 017, 020 và 027 là 6% cho mỗi loại và ribotype 078 là 3% [56]. Nhiều nước ở châu Âu đã báo cáo về lưu hành các kiểu gen ribotype trong nước. Ở Anh, năm 2008 – 2009, chủng *C.difficile* thường gặp nhất là ribotype 027 (36%), 106 (13%), và 001 (7%) [56]. Drabek (2015) nghiên cứu ở Tiệp Khắc, kiểu gen

ribotype 176 chiếm 51,9% [48]. Hensgens (2011), báo cáo ở Hà Lan, kiểu gen thường gặp là ribotype 014 (15,9%), 078 (12,7%) và 015 (7,9%) [66]. Huang (2009) ghi nhận ở Stockholm (Thụy Điển), thường gặp nhất là ribotype 005 (11,3%) [70]. Một nghiên cứu khác ở Thụy Điển trong 7 năm, từ 2009 đến 2016, Rizzardi (2018) báo cáo các chủng thường gặp ở nước này là ribotype 014, 020, 012, 078, 046 và 017 tuy nhiên mỗi năm có một chủng khác nhau xuất hiện nổi trội [134]. Pituch (2011) báo cáo ở 2 bệnh viện lớn ở Ba Lan, kiểu gen ribotype 017 thường gặp nhất, chiếm 40% và 48,3% [125]. Novakova (2020) đưa ra báo cáo, có 78 trong số 332 chủng *C.difficile* tại 36 bệnh viện của Slovakia được xét nghiệm ribotype, típ chủng thường gặp nhất là 001 (59%), 176 (29,5%), còn lại là 017 (3,8%) và 020, 027, 049, 070 (1,3%) [119]. Nghiên cứu ở Bắc Mỹ, Tenover (2011) ghi nhận 5 kiểu gen ribotype thường gặp nhất trong năm 2008 – 2009 là ribotype 027, 002, 106, 017 và 078 [150]. Nghiên cứu của chúng tôi góp một phần thông tin về các chủng *C.difficile* hiện đang lưu hành tại Việt Nam.

Trong các chủng *C.difficile* mang gen sinh độc tố A-B+, nghiên cứu phát hiện được 2 kiểu gen ribotype là *trf* và 017. Xác định được 6 kiểu gen ribotype của các chủng có độc tố A+B+, gặp nhiều nhất là ribotype cc835 (43,4% số chủng A+B+), và og39 (30,2%) (**bảng 3.34**). Trong 116 kiểu gen ribotype, Stubbs và cộng sự xác định 34 ribotype mang gen độc tố A-B-, 78 ribotype có độc tố A+B+ và chỉ có 4 ribotype có độc tố A-B+ [147]. Một tổng quan lưu hành các chủng *C.difficile* ở châu Á, Collins (2019) báo cáo loại gen A+B+, kiểu gen ribotype hay gặp nhất ở châu Á là 018 thường được gọi là *smz* ở Nhật Bản, và cũng được ghi nhận là nổi trội ở Hàn Quốc. Các kiểu gen thường gặp tiếp theo là kiểu gen 012, cũng được gọi là cc835 và kiểu gen 046 cũng được gọi là og39 hay gặp ở Trung Quốc, 014 và 002 hay gặp ở Đài Loan và Hồng Kông [37]. Các bệnh nhân trong nghiên cứu của chúng tôi không

gặp kiểu gen *018/smz* nhưng kiểu gen nổi trội cũng tương đồng với các bệnh nhân ở Trung Quốc là *cc835* (hay *012*) và *og39* (hay *046*). Độc tố B là độc tố tế bào, có khả năng gây độc gấp 10 - 1000 lần độc tố A [47], [154]. Các nhà chuyên môn luôn cảnh giác, nghiên cứu phân loại kiểu gen của các chủng *C.difficile* khi phát hiện chủng mang gen sinh độc tố A-B+ [133]. Trong một nghiên cứu trên 148 chủng *C.difficile*, Van den Berg (2004) ghi nhận gen sinh độc tố A-B+ chiếm 22%, hầu hết là chủng ribotype *017*, một chủng lưu hành đa số ở châu Á, nhiều hơn hẳn các châu lục khác [155]. Collins cũng ghi nhận, 2 chủng *C.difficile* A-B+ thường gặp nhất ở châu Á là chủng *017* (còn gọi là *fr* ở Nhật Bản), lưu hành ở Nhật Bản, Trung Quốc, Hàn Quốc, Malayxia, Indonesia và chủng *369* (còn gọi là *trf*) thường gặp ở Nhật Bản, gần đây là Trung Quốc [37]. Như vậy, các nghiên cứu trên thế giới ghi nhận có sự khác biệt về kiểu gen của *C.difficile* ở vùng địa lý khác nhau [161].

Tính theo các năm nghiên cứu, chúng tôi ghi nhận có sự thay đổi về phân bố các kiểu gen ribotype theo thời gian. Năm 2013, thường gặp kiểu gen *017* và *og39* (30,7%). Năm 2014, kiểu gen *trf* gặp nhiều nhất (45%). Năm 2015, kiểu gen thường gặp là *017* (32%). Năm 2016, kiểu gen *cc835* lại chiếm đa số (32,1%). Năm 2017 số ca tiêu chảy do *C.difficile* ít hơn, và chủng thường gặp lại là *og39* và *017* (25%) (**bảng 3.35**). Nghiên cứu tại Anh, Wilcox (2012) cũng ghi nhận dịch tễ các kiểu gen ribotype của *C.difficile* cũng thay đổi theo các năm [164]. Tại Nhật Bản có một nghiên cứu năm 2011 - 2013 phát hiện thấy ribotype *trf* thường gặp (15,8%), chỉ đứng sau ribotype *smz/018* (39,2%) [139]. Lưu hành phổ biến kiểu gen *017* trong nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với các báo cáo về kiểu gen thường gặp của châu Á. Imwattana (2019), đồng quan điểm với một số tác giả, cho rằng kiểu gen ribotype *017* có nguồn gốc từ châu Á và trong những năm gần đây đã lan rộng, xuất hiện ở nhiều vùng lãnh thổ trên thế giới [37], [75]. Trong nghiên cứu của chúng tôi,

kiểu gen ribotype *trf* chiếm ưu thế, cao vượt trội so với các nghiên cứu ở châu Á và trên thế giới [32], [47]. Cũng có nghiên cứu tại Nhật Bản báo cáo về kiểu gen ribotype 369, tên gọi khác của *trf*, gây những ca bệnh năm 2009 – 2013, và gây bệnh ở Thượng Hải năm 2014 – 2015 [37].

Khi phân bố theo nhóm tuổi, nhóm bệnh nhân > 60 tuổi thường gặp kiểu gen *trf* (32,7%). Trong khi đó, nhóm bệnh nhân 15 – 60 tuổi gặp kiểu gen 017 và cc835 nhiều hơn (tương ứng là 30% và 28%). Tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê $p > 0,05$ (Fisher's exact test) (**bảng 3.36**). Một nghiên cứu tại Nhật Bản cũng ghi nhận không có sự khác biệt về tuổi giữa các ribotype lưu hành [139].

Về tiền sử dùng kháng sinh, chỉ có kiểu gen 014 là thường gặp ở bệnh nhân không có tiền sử dùng kháng sinh trong vòng 8 tuần trước tiêu chảy, $p < 0,05$ (Fisher's exact test), tất cả các kiểu gen còn lại của *C.difficile* đều không có sự khác biệt giữa nhóm bệnh nhân có và không có tiền sử dùng kháng sinh trong 8 tuần trước tiêu chảy, $p > 0,05$ (Fisher's exact test) (**bảng 3.37**). Một nghiên cứu ở Hồng Kông, Cheng (2011) cho thấy *C.difficile* kiểu gen 002 là thường gặp nhất, cũng không có sự khác biệt về tiền sử dùng kháng sinh với các chủng *C.difficile* khác [31].

Cũng như vậy, chỉ có kiểu gen cc835 là thường gặp hơn ở bệnh nhân không có tiền sử nằm viện trong 8 tuần trước tiêu chảy (gợi ý khả năng nhiễm *C.difficile* từ cộng đồng), $p < 0,05$ (Fisher's exact test), tất cả các kiểu gen còn lại của *C.difficile* đều không có sự khác biệt giữa nhóm bệnh nhân có và không có tiền sử nằm viện trong 8 tuần trước tiêu chảy $p > 0,05$ (Fisher's exact test) (**bảng 3.38**). Sự phân bố các kiểu gen ở các vùng địa lý là khác nhau trên thế giới và hiện còn ít những nghiên cứu kết hợp giữa dịch tễ học và lâm sàng để đánh giá liên quan với các yếu tố như tiền sử dùng kháng sinh, tiền sử nằm viện, các bệnh mạn tính...

Tất cả các kiểu gen của *C.difficile* đều không có sự khác biệt giữa nhóm bệnh nhân có và không có bệnh mạn tính $p > 0,05$ (Fisher's exact test) (**bảng 3.39**). Tương đồng với nghiên cứu của chúng tôi, bệnh nhân mắc chủng *C.difficile* thường gặp ở Hồng Kông cũng không có sự khác biệt với các chủng *C.difficile* khác về mắc các bệnh mạn tính [31].

Tuy nhiên, số lượng các kiểu gen của *C.difficile* trong nghiên cứu còn nhỏ, cần có các nghiên cứu với cỡ mẫu lớn hơn để có thể đưa ra nhận định về liên quan giữa kiểu gen với tiền sử dùng kháng sinh, tiền sử nằm viện và bệnh mạn tính của bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile*.

Về diễn biến điều trị theo các kiểu gen, nghiên cứu không thấy sự khác biệt về tỉ lệ của nhóm Khỏi – đỡ - chuyển tuyến với nhóm Nặng xin về - Tử vong (**bảng 3.40**). Có thể do số mẫu nghiên cứu còn ít hoặc còn nhiều yếu tố ảnh hưởng đến điều trị, nên chưa thấy sự khác biệt về diễn biến điều trị cuối cùng với kiểu gen của *C.difficile*. Tschudin-Sutter (2014), báo cáo tỉ lệ tử vong 30 ngày cao hơn hẳn ở chủng *C.difficile* ribotype 027 và 017, tương ứng là 26% và 23% so với các ribotype khác (3%) [153].

Ứng dụng các kỹ thuật sinh học phân tử, xác định kiểu gen của *C.difficile* là phương pháp có giá trị chiến lược trong đánh giá thay đổi dịch tễ học và tìm hiểu phân tích các vụ dịch nhiễm trùng do *C.difficile*. Nó còn giúp điều tra mối liên quan giữa các tít của *C.difficile* với sinh bệnh học đường tiêu hóa, phân tích mối liên hệ và so sánh về di truyền học của *C.difficile* trên phạm vi toàn cầu [30].

MỘT SỐ HẠN CHẾ CỦA NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu mới chỉ tiến hành chủ yếu tại 2 khoa là khoa Hồi sức tích cực và khoa Truyền nhiễm, cỡ mẫu còn nhỏ ($\varepsilon = 0,4$) và chưa đại diện cho các bệnh nhân nội trú. Cỡ mẫu nhỏ cũng ảnh hưởng đến khả năng phát hiện các yếu tố nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile*. Cần có một nghiên cứu trên tất cả các khoa trong bệnh viện, kết hợp các yếu tố dịch tễ, lâm sàng, vi sinh, sinh học phân tử nhằm đánh giá một cách toàn diện hơn về tiêu chảy do *C.difficile* ở người lớn điều trị nội trú.

Trong 5 năm, nghiên cứu bệnh chứng có số liệu thu thập một phần dựa vào hồ sơ bệnh án, nên các thông tin về cá thể bệnh nhân (như nghề nghiệp, học vấn, tập quán ăn uống...) để phân tích các yếu tố nguy cơ không đầy đủ, theo dõi bệnh nhân có sai số nhất định.

Nghiên cứu chưa đánh giá được tỉ lệ mới mắc, tỉ lệ tái phát. Các thông số trong bệnh án không đủ nên chưa đánh giá hết yếu tố liên quan đến mức độ bệnh để phân tích và xác định các yếu tố tiên lượng nặng/ tử vong của tiêu chảy do *C.difficile* ở bệnh nhân điều trị nội trú.

Nghiên cứu chưa đề cập đến hậu quả của tiêu chảy do *C.difficile* như các thiệt hại về kinh tế, chi phí điều trị tăng thêm, thời gian kéo dài của nằm viện, các tổn hại về sức khỏe, di chứng do *C.difficile* gây ra.

Hạn chế của bối cảnh nghiên cứu, chưa đánh giá được các phương pháp điều trị hiệu quả, các biện pháp kiểm soát nhiễm khuẩn, ngăn ngừa lây truyền bệnh tiêu chảy do *C.difficile* trong bệnh viện.

Vì vậy, cần có những nghiên cứu lớn hơn, qui mô hơn trong tương lai để đánh giá về tiêu chảy do *C.difficile* ở Việt Nam.

KẾT LUẬN

1. Đặc điểm dịch tễ, lâm sàng của tiêu chảy do *C.difficile* ở người lớn tại bệnh viện Bạch Mai, 2013 – 2017.

Đã phát hiện một số lượng đáng kể bệnh nhân người lớn mắc tiêu chảy do *C.difficile* tại bệnh viện Bạch Mai giai đoạn từ năm 2013 đến năm 2017 với 101 trường hợp. Bệnh gặp ở nam nhiều hơn nữ, tỉ lệ nam: nữ là 1,7:1. Bệnh nhân đến từ hầu hết các tỉnh/thành phố của miền Bắc Việt Nam (21/28 tỉnh/thành phố), từ nông thôn đến thành thị. Bệnh gặp tăng dần theo tuổi, cao nhất ở nhóm người > 60 tuổi (49,5%), ở tất cả các tháng trong năm.

Triệu chứng lâm sàng của bệnh tiêu chảy do *C.difficile* không đặc hiệu, thường gặp là sốt, đau bụng, chướng bụng. Tiêu chảy ở mức vừa phải, 3-6 lần/ngày (65,3%), thường gặp tiêu chảy kéo dài trên 4 ngày (80,2%), trên 2 tuần chiếm tới 30,7%. Hồng cầu và albumin máu thường giảm thấp hơn giá trị bình thường, đặc biệt với trường hợp nặng. Phản ứng viêm tăng với tỉ lệ tăng của bạch cầu và procalcitonin máu lần lượt là 60,4% và 100%, bạch cầu tăng cao (> 15G/L) và procalcitonin cao (>10 ng/mL) là 27,7% và 24,3%. Tất cả các chủng *C.difficile* phân lập được đều nhạy cảm với 2 kháng sinh được khuyến cáo sử dụng điều trị là metronidazol và vancomycin. Tỉ lệ bệnh nhân tiêu chảy do *C.difficile* có diễn biến xấu và tử vong tại viện cao (21,7% và 5,9%), đặc biệt là bệnh nhân nặng cần điều trị tại khoa hồi sức tích cực (40% và 14,3%).

2. Yếu tố nguy cơ mắc tiêu chảy do *C.difficile* ở người lớn tại bệnh viện Bạch Mai, 2013 – 2017.

Có 6 yếu tố độc lập liên quan đến tiêu chảy do *C.difficile* gồm 3 yếu tố nguy cơ làm tăng mắc bệnh là tuổi ≥ 65 (OR=2,01), bệnh nhân sống ở thành thị (OR = 1,76) và bệnh nhân cần lọc máu chu kỳ (OR = 7,32); 2 yếu tố liên quan trong chẩn đoán bệnh là đại tiện phân có nhầy mũi (OR = 5,94) và tiêu chảy mức trung bình 7 – 10 lần/ ngày (OR = 1,98); 1 yếu tố bảo vệ là sử dụng

kháng sinh nhóm glycopeptid điều trị bệnh khác trong vòng 8 tuần trước tiêu chảy (OR = 0,18).

3. Đặc điểm phân bố kiểu gen của *C.difficile* gây tiêu chảy ở người lớn tại bệnh viện Bạch Mai, 2013 - 2017.

Phát hiện được cả 2 loại gen sinh độc tố của *C.difficile* gây tiêu chảy ở người lớn tại bệnh viện Bạch Mai gồm gen sinh độc tố A+B+ (49,5%), gen sinh độc tố A-B+ (44,6%), và mang đồng thời cả 2 gen sinh độc tố (5,9%) A+B+ và A-B+ trên cùng một bệnh nhân. Xác định được 8 kiểu gen ribotype: 2 kiểu gen ribotype *trf* và *017* có gen sinh độc tố A-B+ và 6 kiểu gen ribotype *cc835*, *og39*, *014*, *ozk*, *cr* và *001* mang gen sinh độc tố A+B+. Kiểu gen ribotype *017* và *cc835* gặp nhiều ở nhóm bệnh nhân dưới 60 tuổi, trong khi kiểu gen ribotype *trf* lại trội lên ở nhóm tuổi trên 60. Các kiểu gen ribotype của *C.difficile* thường gặp nhất là *trf* (24,5%), *017* (23,5%) và *cc835* (22,5%).

KHUYẾN NGHỊ

1. Bộ Y tế

Ban hành các phác đồ về chẩn đoán và điều trị bệnh tiêu chảy do *C.difficile*, tập huấn và phổ biến về bệnh cho y tế các tuyến để không bỏ sót chẩn đoán, nâng cao hiệu quả điều trị cho bệnh nhân.

2. Bệnh viện Bạch Mai

Triển khai các xét nghiệm xác định mắc tiêu chảy do *C.difficile* để chẩn đoán, điều trị kịp thời cho bệnh nhân

Sàng lọc *C.difficile* khi bệnh nhân tiêu chảy là người nhiều tuổi.

Tập huấn đào tạo về tiêu chảy do *C.difficile* để nâng cao kiến thức và cảnh giác của các bác sĩ lâm sàng về bệnh.

Sử dụng kháng sinh hợp lý và tăng cường công tác kiểm soát nhiễm khuẩn để ngăn mắc *C.difficile* tại cơ sở y tế.

Tiếp tục có nghiên cứu với qui mô lớn hơn, đánh giá toàn diện hơn về các yếu tố nguy cơ và bệnh tiêu chảy do *C.difficile*.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU ĐÃ CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN ĐỀ TÀI LUẬN ÁN

1. Nguyễn Thị Hương Giang, Phạm Thị Thanh Thủy, Vũ Thị Thu Hường, Trần Như Dương (2019), “Một số yếu tố nguy cơ mắc tiêu chảy do *Clostridium difficile* ở người lớn tại bệnh viện Bạch Mai, 2013 – 2017”, *Tạp chí Y học Lâm sàng*, số 112 (11 – 2019), tr. 114 – 120.
2. Nguyễn Thị Hương Giang, Phạm Thị Thanh Thủy, Vũ Thị Thu Hường, Trần Như Dương (2019), “Một số đặc điểm dịch tễ, lâm sàng của tiêu chảy do *Clostridium difficile* ở người lớn tại bệnh viện Bạch Mai, 2013 – 2017”, *Tạp chí Y học Dự phòng*, tập 29, số 13 – 2019, tr. 9 – 17.
3. Nguyễn Thị Hương Giang, Vũ Thị Thu Hường, Phạm Thị Thanh Thủy, Trần Như Dương (2019), “Một số đặc điểm phân bố kiểu gen của *Clostridium difficile* gây tiêu chảy ở người lớn tại bệnh viện Bạch Mai, 2013 – 2017”, *Tạp chí Y học Dự phòng*, tập 29, số 13 – 2019, tr 18 – 25.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt:

1. Đặng Thị Thùy Dương (2018), "*Xác định tỉ lệ nhiễm và một số đặc điểm dịch tễ học phân tử của các chủng Clostridium difficile mang gen độc tố phân lập được từ bệnh nhân tiêu chảy sau dùng kháng sinh tại bốn bệnh viện ở Hà Nội (2013 - 2015)*", Luận án tiến sĩ sinh học, Đại học quốc gia Hà Nội.
2. Đặng Thị Thùy Dương, Bùi Thị Việt Hà, Tăng Thị Nga, Lê Thị Trang, Vũ Thị Thu Hường (2016), "Đánh giá hiệu năng và giới hạn phát hiện của môi trường Cycloserine - Cefoxitine - Manitol - Agar cho nuôi cấy phân lập *Clostridium difficile* từ mẫu phân", *Tạp chí y học dự phòng*, tập 26 (15), tr. 140-148.
3. Đặng Thị Thùy Dương, Bùi Thị Việt Hà, Vũ Thị Thu Hường (2016), "So sánh ba phương pháp xét nghiệm chẩn đoán nhiễm trùng do *Clostridium difficile* tại Việt Nam: miễn dịch phát hiện độc tố, nested PCR và nuôi cấy *Clostridium difficile* sinh độc tố", *Tạp chí Y học dự phòng*, tập 26 (15), tr. 88-96.
4. Nguyễn Thị Hương Giang, Phạm Thị Thanh Thủy, Vũ Thị Thu Hường (2015), "Trường hợp viêm đại tràng giả mạc xuất huyết liên quan với sử dụng kháng sinh do vi khuẩn *Clostridium difficile* sinh độc tố A-B+, ribotype trf ở một bệnh nhân lớn tuổi ở Hà Nội", *Tạp chí Y học dự phòng*, tập 25 (4), tr. 28-34.
5. Lưu Ngọc Hoạt (2015), "*Nghiên cứu khoa học y học*", Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
6. Vũ Thị Thu Hường, Phùng Thị Thu Hằng, Trần Quang Cảnh (2018), "Xác định các tít dịch tễ học phân tử của các chủng *Clostridium difficile* gây tiêu chảy sau dùng kháng sinh tại Hà Nội, Việt Nam bằng kỹ thuật PCR ribotyping", *Tạp chí Y học dự phòng*, tập 28 (2), tr. 70-77.

7. Vũ Thị Thu Hương, Lê Thị Trang, Phùng Thị Thu Hằng (2017), "Đánh giá kỹ thuật Nested PCR một ống cải tiến cho chẩn đoán vi khuẩn *Clostridium difficile* sinh độc tố gây tiêu chảy sau dùng kháng sinh ở Việt Nam", *Tạp chí Y học Dự phòng*, tập 27 (13), tr. 50-59.
8. Vũ Thị Thu Hương, Nguyễn Duy Hà, Nguyễn Thị Hương Giang (2016), "Phát triển qui trình Nested PCR chẩn đoán *Clostridium difficile* gây tiêu chảy sau dùng kháng sinh ở người", *Tạp chí Y học dự phòng*, tập 26 (15), tr. 70-81.
9. Vũ Thị Thu Hương, Nguyễn Bình Minh, Nguyễn Trần Hiền (2012), "Trường hợp bệnh tiêu chảy sau khi sử dụng kháng sinh liên quan tới hai dòng vi khuẩn kỵ khí *Clostridium difficile* A+ B+ và A-B+ sinh độc tố ở một số bệnh viện tại Hà Nội", *Y học Dự phòng*, tập 22 (5), tr. 81-90.
10. Hoàng Văn Minh (2014), "*Phương pháp nghiên cứu khoa học y học: Thống kê ứng dụng và phân tích số liệu*", Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
11. Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương (2013), "*Dịch tễ học (giáo trình giảng dạy sau đại học)*", Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.

Tiếng Anh:

12. Asempa T. E. and Nicolau D. P. (2017), "Clostridium difficile infection in the elderly: an update on management", *Clin Interv Aging*. 12, pp. 1799-1809.
13. Asha N. J., Tompkins D., and Wilcox M. H. (2006), "Comparative analysis of prevalence, risk factors, and molecular epidemiology of antibiotic-associated diarrhea due to *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*", *J Clin Microbiol*. 44(8), pp. 2785-91.

14. Avila M. B., Avila N. P., and Dupont A. W. (2016), "Recent Advances in the Diagnosis and Treatment of Clostridium Difficile Infection", *F1000Res*. 5.
15. Awad M. M., et al. (2014), "Clostridium difficile virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen", *Gut Microbes*. 5(5), pp. 579-93.
16. Bacci S., et al. (2011), "Binary toxin and death after Clostridium difficile infection", *Emerg Infect Dis*. 17(6), pp. 976-82.
17. Barbut F., et al. (2007), "Prospective study of Clostridium difficile infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates", *Clin Microbiol Infect*. 13(11), pp. 1048-57.
18. Barletta J. F. and Sclar D. A. (2014), "Proton pump inhibitors increase the risk for hospital-acquired Clostridium difficile infection in critically ill patients", *Crit Care*. 18(6), p. 714.
19. Bartlett J. G. (2002), "Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea", *N Engl J Med*. 346(5), pp. 334-9.
20. Bartlett J. G. and Gerding D. N. (2008), "Clinical recognition and diagnosis of Clostridium difficile infection", *Clin Infect Dis*. 46 Suppl 1, pp. S12-8.
21. Bartlett J. G., et al. (1980), "Clinical and laboratory observations in Clostridium difficile colitis", *Am J Clin Nutr*. 33(11 Suppl), pp. 2521-6.
22. Bauer M. P., et al. (2011), "Clostridium difficile infection in Europe: a hospital-based survey", *Lancet*. 377(9759), pp. 63-73.
23. Bidet P., et al. (1999), "Development of a new PCR-ribotyping method for Clostridium difficile based on ribosomal RNA gene sequencing", *FEMS Microbiol Lett*. 175(2), pp. 261-6.

24. Bobo L. D., Dubberke E. R., and Kollef M. (2011), "Clostridium difficile in the ICU: the struggle continues", *Chest*. 140(6), pp. 1643-1653.
25. Britton R. A. and Young V. B. (2012), "Interaction between the intestinal microbiota and host in Clostridium difficile colonization resistance", *Trends Microbiol*. 20(7), pp. 313-9.
26. Burke K. E. and Lamont J. T. (2014), "Clostridium difficile infection: a worldwide disease", *Gut Liver*. 8(1), pp. 1-6.
27. Burnham C. A. and Carroll K. C. (2013), "Diagnosis of Clostridium difficile infection: an ongoing conundrum for clinicians and for clinical laboratories", *Clin Microbiol Rev*. 26(3), pp. 604-30.
28. Carvour M. L., et al. (2019), "Predictors of Clostridium difficile infection and predictive impact of probiotic use in a diverse hospital-wide cohort", *Am J Infect Control*. 47(1), pp. 2-8.
29. Chaudhry R., et al. (2008), "Changing pattern of Clostridium difficile associated diarrhoea in a tertiary care hospital: a 5 year retrospective study", *Indian J Med Res*. 127(4), pp. 377-82.
30. Chen Y. B., et al. (2014), "Molecular epidemiology of Clostridium difficile in a tertiary hospital of China", *J Med Microbiol*. 63(Pt 4), pp. 562-9.
31. Cheng V. C., et al. (2011), "Clostridium difficile isolates with increased sporulation: emergence of PCR ribotype 002 in Hong Kong", *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 30(11), pp. 1371-81.
32. Cheong E., et al. (2017), "Clostridium difficile infection in the Lao People's Democratic Republic: first isolation and review of the literature", *BMC Infect Dis*. 17(1), p. 635.

33. Chitnis A. S., et al. (2013), "Epidemiology of community-associated *Clostridium difficile* infection, 2009 through 2011", *JAMA Intern Med.* 173(14), pp. 1359-67.
34. Choi H. Y., et al. (2015), "The epidemiology and economic burden of *Clostridium difficile* infection in Korea", *Biomed Res Int.* 2015, p. 510386.
35. Cohen S. H., et al. (2010), "Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA)", *Infect Control Hosp Epidemiol.* 31(5), pp. 431-55.
36. Collins D. A., Hawkey, P. M., and Riley, T. V. (2013), "Epidemiology of *Clostridium difficile* infection in Asia", *Antimicrob Resist Infect Control.* 2(1), p. 21.
37. Collins D. A. and Riley, T. V. (2018), "*Clostridium difficile* in Asia: Opportunities for One Health Management", *Trop Med Infect Dis.* 4(1).
38. Cookson B. (2007), "Hypervirulent strains of *Clostridium difficile*", *Postgrad Med J.* 83(979), pp. 291-5.
39. Cui Y., et al. (2019), "Risk factors for *Clostridioides difficile* infection and colonization among patients admitted to an intensive care unit in Shanghai, China", *BMC Infect Dis.* 19(1), p. 961.
40. Czepiel J., et al. (2019), "*Clostridium difficile* infection: review", *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 38(7), pp. 1211-1221.
41. Dallal R. M., et al. (2002), "Fulminant *Clostridium difficile*: an underappreciated and increasing cause of death and complications", *Ann Surg.* 235(3), pp. 363-72.
42. Del Prete R., et al. (2019), "*Clostridium difficile*. A review on an emerging infection", *Clin Ter.* 170(1), pp. e41-e47.

43. Demir K. K., Cheng M. P., and Lee T. C. (2018), "Predictive factors of *Clostridioides difficile* infection in hospitalized patients with new diarrhea: A retrospective cohort study", *PLoS One*. 13(12), p. e0207128.
44. Depestel D. D. and Aronoff D. M. (2013), "Epidemiology of *Clostridium difficile* infection", *J Pharm Pract*. 26(5), pp. 464-75.
45. Desai K., et al. (2016), "Epidemiological and economic burden of *Clostridium difficile* in the United States: estimates from a modeling approach", *BMC Infect Dis*. 16, p. 303.
46. Dial S., et al. (2004), "Risk of *Clostridium difficile* diarrhea among hospital inpatients prescribed proton pump inhibitors: cohort and case-control studies", *CMAJ*. 171(1), pp. 33-8.
47. Dingle K. E., et al. (2011), "Clinical *Clostridium difficile*: clonality and pathogenicity locus diversity", *PLoS One*. 6(5), p. e19993.
48. Drabek J., et al. (2015), "Clinical features and characteristics of *Clostridium difficile* PCR-ribotype 176 infection: results from a 1-year university hospital internal ward study", *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 14, p. 55.
49. Drozd M., et al. (2018), "Analysis of risk factors and outcomes of *Clostridium difficile* infection", *Folia Med Cracov*. 58(4), pp. 105-116.
50. Dubberke E. R., et al. (2007), "*Clostridium difficile*--associated disease in a setting of endemicity: identification of novel risk factors", *Clin Infect Dis*. 45(12), pp. 1543-9.
51. Dudzicz S., Adamczak M., and Wiecek A. (2017), "*Clostridium Difficile* Infection in the Nephrology Ward", *Kidney Blood Press Res*. 42(5), pp. 844-852.
52. Duong V. T., et al. (2016), "Evaluation of Luminex xTAG Gastrointestinal Pathogen Panel Assay for Detection of Multiple Diarrheal Pathogens in Fecal Samples in Vietnam", *J Clin Microbiol*. 54(4), pp. 1094-100.

53. Elliott B., et al. (2011), "New types of toxin A-negative, toxin B-positive strains among clinical isolates of *Clostridium difficile* in Australia", *J Med Microbiol.* 60(Pt 8), pp. 1108-11.
54. Fatima R. and Aziz M. (2019), "The Hypervirulent Strain of *Clostridium Difficile*: NAP1/B1/027 - A Brief Overview", *Cureus.* 11(1), p. e3977.
55. Fordtran J. S. (2006), "Colitis due to *Clostridium difficile* toxins: underdiagnosed, highly virulent, and nosocomial", *Proc (Bayl Univ Med Cent).* 19(1), pp. 3-12.
56. Freeman J., et al. (2010), "The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections", *Clin Microbiol Rev.* 23(3), pp. 529-49.
57. Gerding D. N., et al. (1995), "*Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis", *Infect Control Hosp Epidemiol.* 16(8), pp. 459-77.
58. Ghose C. (2013), "*Clostridium difficile* infection in the twenty-first century", *Emerg Microbes Infect.* 2(9), p. e62.
59. Goldenberg J. Z., et al. (2013), "Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults and children", *Cochrane Database Syst Rev*(5), p. CD006095.
60. Goorhuis A., et al. (2008), "Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078", *Clin Infect Dis.* 47(9), pp. 1162-70.
61. Goudarzi M., et al. (2014), "*Clostridium difficile* Infection: Epidemiology, Pathogenesis, Risk Factors, and Therapeutic Options", *Scientifica (Cairo).* 2014, p. 916826.
62. Guerrant R. L., et al. (2001), "Practice guidelines for the management of infectious diarrhea", *Clin Infect Dis.* 32(3), pp. 331-51.

63. Gupta A. and Khanna S. (2014), "Community-acquired Clostridium difficile infection: an increasing public health threat", *Infect Drug Resist.* 7, pp. 63-72.
64. Haider Naqvi S. A. and Chaudhry F. F. (2012), "Clostridium difficile postantibiotic diarrhoea diagnosis", *J Coll Physicians Surg Pak.* 22(10), pp. 640-3.
65. Hassan S. A., et al. (2012), "Prevalence of Clostridium difficile toxin in diarrhoeal stool samples of patients from a tertiary hospital in North Eastern Peninsular Malaysia", *Med J Malaysia.* 67(4), pp. 402-5.
66. Hensgens M. P., et al. (2011), "Clostridium difficile infection in an endemic setting in the Netherlands", *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 30(4), pp. 587-93.
67. Hink T., Burnham C. A., and Dubberke E. R. (2013), "A systematic evaluation of methods to optimize culture-based recovery of Clostridium difficile from stool specimens", *Anaerobe.* 19, pp. 39-43.
68. Honda H. and Dubberke E. R. (2009), "Clostridium difficile infection: a re-emerging threat", *Mo Med.* 106(4), pp. 287-91.
69. Hookman P. and Barkin J. S. (2009), "Clostridium difficile associated infection, diarrhea and colitis", *World J Gastroenterol.* 15(13), pp. 1554-80.
70. Huang H., et al. (2009), "Distinct ribotypes and rates of antimicrobial drug resistance in Clostridium difficile from Shanghai and Stockholm", *Clin Microbiol Infect.* 15(12), pp. 1170-3.
71. Huang H., et al. (2008), "Molecular and clinical characteristics of Clostridium difficile infection in a University Hospital in Shanghai, China", *Clin Infect Dis.* 47(12), pp. 1606-8.
72. Humphreys D. P. and Wilcox M. H. (2014), "Antibodies for treatment of Clostridium difficile infection", *Clin Vaccine Immunol.* 21(7), pp. 913-23.

73. Hunt J. J. and Ballard J. D. (2013), "Variations in virulence and molecular biology among emerging strains of *Clostridium difficile*", *Microbiol Mol Biol Rev.* 77(4), pp. 567-81.
74. Huong Vu Thi Thu, Nga Tang Thi, and Anh Dang Duc (2016), "The comparison of sporicidal activity among different disinfectants used at hospitals in Hanoi, Vietnam against *Clostridium difficile* spores", *Vietnam Journal of Preventive Medicine.* 26(12), pp. 74-81.
75. Imwattana K., et al. (2019), "*Clostridium difficile* ribotype 017 - characterization, evolution and epidemiology of the dominant strain in Asia", *Emerg Microbes Infect.* 8(1), pp. 796-807.
76. Ingle M., et al. (2013), "*Clostridium difficile* as a cause of acute diarrhea: a prospective study in a tertiary care center", *Indian J Gastroenterol.* 32(3), pp. 179-83.
77. Jin D., et al. (2017), "Molecular Epidemiology of *Clostridium difficile* Infection in Hospitalized Patients in Eastern China", *J Clin Microbiol.* 55(3), pp. 801-810.
78. Jin K., et al. (2010), "*Clostridium difficile* infections in China", *J Biomed Res.* 24(6), pp. 411-6.
79. Johnson S. and Gerding D. N. (1998), "*Clostridium difficile*--associated diarrhea", *Clin Infect Dis.* 26(5), pp. 1027-34; quiz 1035-6.
80. Jones A. M., Kuijper E. J., and Wilcox M. H. (2013), "*Clostridium difficile*: a European perspective", *J Infect.* 66(2), pp. 115-28.
81. Karlstrom O., et al. (1998), "A prospective nationwide study of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in Sweden. The Swedish *C. difficile* Study Group", *Clin Infect Dis.* 26(1), pp. 141-5.

82. Kazanowski M., et al. (2014), "Clostridium difficile: epidemiology, diagnostic and therapeutic possibilities-a systematic review", *Tech Coloproctol.* 18(3), pp. 223-32.
83. Kelly C. P. and Kyne L. (2011), "The host immune response to Clostridium difficile", *J Med Microbiol.* 60(Pt 8), pp. 1070-9.
84. Kelly C. P. and LaMont J. T. (2008), "Clostridium difficile--more difficult than ever", *N Engl J Med.* 359(18), pp. 1932-40.
85. Kelly C. P., Pothoulakis C., and LaMont J. T. (1994), "Clostridium difficile colitis", *N Engl J Med.* 330(4), pp. 257-62.
86. Khanna S. and Pardi D. S. (2014), "Clostridium difficile infection: management strategies for a difficult disease", *Therap Adv Gastroenterol.* 7(2), pp. 72-86.
87. Khanna S., et al. (2012), "The epidemiology of community-acquired Clostridium difficile infection: a population-based study", *Am J Gastroenterol.* 107(1), pp. 89-95.
88. Kim H., et al. (2010), "Investigation of toxin gene diversity, molecular epidemiology, and antimicrobial resistance of Clostridium difficile isolated from 12 hospitals in South Korea", *Korean J Lab Med.* 30(5), pp. 491-7.
89. Kim J., et al. (2013), "Epidemiology of Clostridium difficile infections in a tertiary-care hospital in Korea", *Clin Microbiol Infect.* 19(6), pp. 521-7.
90. Kim J., et al. (2011), "Epidemiology and clinical characteristics of Clostridium difficile infection in a Korean tertiary hospital", *J Korean Med Sci.* 26(10), pp. 1258-64.
91. Kim J., et al. (2012), "Clinical and microbiologic characteristics of tcdA-negative variant Clostridium difficile infections", *BMC Infect Dis.* 12, p. 109.

92. Kim Y. S., et al. (2013), "Incidence and clinical features of *Clostridium difficile* infection in Korea: a nationwide study", *Epidemiol Infect.* 141(1), pp. 189-94.
93. Komatsu M., et al. (2003), "High frequency of antibiotic-associated diarrhea due to toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* in a hospital in Japan and risk factors for infection", *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 22(9), pp. 525-9.
94. Kuijper E. J., et al. (2006), "Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe", *Clin Microbiol Infect.* 12 Suppl 6, pp. 2-18.
95. Kurti Z., et al. (2015), "Burden of *Clostridium difficile* infection between 2010 and 2013: Trends and outcomes from an academic center in Eastern Europe", *World J Gastroenterol.* 21(21), pp. 6728-35.
96. Lee H. Y., et al. (2019), "Risk factors and outcomes of *Clostridium difficile* infection in hospitalized patients", *Biomed J.* 42(2), pp. 99-106.
97. Leffler D. A. and Lamont, J. T. (2015), "*Clostridium difficile* infection", *N Engl J Med.* 372(16), pp. 1539-48.
98. Lemee L., et al. (2004), "Multiplex PCR targeting tpi (triose phosphate isomerase), tcdA (Toxin A), and tcdB (Toxin B) genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*", *J Clin Microbiol.* 42(12), pp. 5710-4.
99. Leonard J., Marshall J. K., and Moayyedi P. (2007), "Systematic review of the risk of enteric infection in patients taking acid suppression", *Am J Gastroenterol.* 102(9), pp. 2047-56; quiz 2057.
100. Lessa F. C., Gould C. V., and McDonald L. C. (2012), "Current status of *Clostridium difficile* infection epidemiology", *Clin Infect Dis.* 55 Suppl 2, pp. S65-70.

101. Lessa F. C., et al. (2015), "Burden of Clostridium difficile infection in the United States", *N Engl J Med.* 372(9), pp. 825-34.
102. Li C., et al. (2018), "Incidence and Outbreak of Healthcare-Onset Healthcare-Associated Clostridioides difficile Infections Among Intensive Care Patients in a Large Teaching Hospital in China", *Front Microbiol.* 9, p. 566.
103. Li S., et al. (2015), "Critical roles of Clostridium difficile toxin B enzymatic activities in pathogenesis", *Infect Immun.* 83(2), pp. 502-13.
104. Lin Y. C., et al. (2011), "Antimicrobial susceptibilities and molecular epidemiology of clinical isolates of Clostridium difficile in taiwan", *Antimicrob Agents Chemother.* 55(4), pp. 1701-5.
105. Loo V. G., et al. (2011), "Host and pathogen factors for Clostridium difficile infection and colonization", *N Engl J Med.* 365(18), pp. 1693-703.
106. Loo V. G., et al. (2004), "Clostridium difficile: a formidable foe", *CMAJ.* 171(1), pp. 47-8.
107. Luo Y., et al. (2019), "Different molecular characteristics and antimicrobial resistance profiles of Clostridium difficile in the Asia-Pacific region", *Emerg Microbes Infect.* 8(1), pp. 1553-1562.
108. Lv X., et al. (2019), "Clostridium difficile-associated diarrhea following the therapy with antibiotic and proton pump inhibitors in a 77-year-old man with several comorbidities: A case report", *Medicine (Baltimore).* 98(13), p. e15004.
109. Lv Z., Peng G. L., and Su J. R. (2014), "Factors associated with Clostridium difficile diarrhea in a hospital in Beijing, China", *Braz J Med Biol Res.* 47(12), pp. 1085-90.

110. Martin J. S., Monaghan T. M., and Wilcox M. H. (2016), "Clostridium difficile infection: epidemiology, diagnosis and understanding transmission", *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 13(4), pp. 206-16.
111. Marttila-Vaara M., Ylipalosaari P., and Kauma H. (2019), "Clostridium difficile infections in teaching hospital in northern Finland", *BMC Infect Dis*. 19(1), p. 48.
112. McDonald L. C., et al. (2018), "Clinical Practice Guidelines for Clostridium difficile Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA)", *Clin Infect Dis*. 66(7), pp. 987-994.
113. McDonald L. C., et al. (2005), "An epidemic, toxin gene-variant strain of Clostridium difficile", *N Engl J Med*. 353(23), pp. 2433-41.
114. Mezoff E. A. and Cohen M. B. (2013), "Acid suppression and the risk of Clostridium difficile infection", *J Pediatr*. 163(3), pp. 627-30.
115. Minino A. M., Xu J., and Kochanek K. D. (2010), "Deaths: preliminary data for 2008", *Natl Vital Stat Rep*. 59(2), pp. 1-52.
116. Moore T., Rodriguez A., and Bakken J. S. (2014), "Fecal microbiota transplantation: a practical update for the infectious disease specialist", *Clin Infect Dis*. 58(4), pp. 541-5.
117. Natarajan M., et al. (2013), "A clinical and epidemiological review of non-toxigenic Clostridium difficile", *Anaerobe*. 22, pp. 1-5.
118. Ngamskulrungroj P., et al. (2015), "Molecular Epidemiology of Clostridium difficile Infection in a Large Teaching Hospital in Thailand", *PLoS One*. 10(5), p. e0127026.

119. Novakova E., et al. (2020), "The emergence of *Clostridium difficile* ribotypes 027 and 176 with a predominance of the *Clostridium difficile* ribotype 001 recognized in Slovakia following the European standardized *Clostridium difficile* infection surveillance of 2016", *Int J Infect Dis.* 90, pp. 111-115.
120. Nseir W., et al. (2019), "The Prognostic Value of Inflammatory Markers in *Clostridium difficile*-associated Diarrhea", *Isr Med Assoc J.* 21(10), pp. 658-661.
121. O'Connor D., et al. (2001), "Evaluation of methods for detection of toxins in specimens of feces submitted for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea", *J Clin Microbiol.* 39(8), pp. 2846-9.
122. Ogielska M., et al. (2015), "Emergence of community-acquired *Clostridium difficile* infection: the experience of a French hospital and review of the literature", *Int J Infect Dis.* 37, pp. 36-41.
123. Oldfield Ec Iv, Oldfield E. C., III, and Johnson D. A. (2014), "Clinical update for the diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* infection", *World J Gastrointest Pharmacol Ther.* 5(1), pp. 1-26.
124. Pepin J., et al. (2004), "*Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity", *CMAJ.* 171(5), pp. 466-72.
125. Pituch H., et al. (2011), "Characterization and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* strains isolated from adult patients with diarrhoea hospitalized in two university hospitals in Poland, 2004-2006", *J Med Microbiol.* 60(Pt 8), pp. 1200-5.
126. Poutanen S. M. and Simor A. E. (2004), "*Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults", *CMAJ.* 171(1), pp. 51-8.

127. Prechter F., et al. (2017), "Sleeping with the enemy: Clostridium difficile infection in the intensive care unit", *Crit Care*. 21(1), p. 260.
128. Predrag S. (2016), "Analysis of risk factors and clinical manifestations associated with Clostridium difficile disease in Serbian hospitalized patients", *Braz J Microbiol*. 47(4), pp. 902-910.
129. Putsathit P., et al. (2017), "Prevalence and molecular epidemiology of Clostridium difficile infection in Thailand", *New Microbes New Infect*. 15, pp. 27-32.
130. Rao K. and Malani P. N. (2020), "Diagnosis and Treatment of Clostridioides (Clostridium) difficile Infection in Adults in 2020", *JAMA*.
131. Riddle D. J. and Dubberke E. R. (2009), "Clostridium difficile infection in the intensive care unit", *Infect Dis Clin North Am*. 23(3), pp. 727-43.
132. Riley T. V. and Kimura T. (2018), "The Epidemiology of Clostridium difficile Infection in Japan: A Systematic Review", *Infect Dis Ther*. 7(1), pp. 39-70.
133. Rineh A., et al. (2014), "Clostridium difficile infection: molecular pathogenesis and novel therapeutics", *Expert Rev Anti Infect Ther*. 12(1), pp. 131-50.
134. Rizzardi K., et al. (2018), "National Surveillance for Clostridioides difficile Infection, Sweden, 2009-2016", *Emerg Infect Dis*. 24(9), pp. 1617-1625.
135. Roldan G. A., Cui A. X., and Pollock N. R. (2018), "Assessing the Burden of Clostridium difficile Infection in Low- and Middle-Income Countries", *J Clin Microbiol*. 56(3).
136. Rupnik M., et al. (2003), "New types of toxin A-negative, toxin B-positive strains among Clostridium difficile isolates from Asia", *J Clin Microbiol*. 41(3), pp. 1118-25.

137. Sartelli M., et al. (2019), "2019 update of the WSES guidelines for management of Clostridioides (Clostridium) difficile infection in surgical patients", *World J Emerg Surg.* 14, p. 8.
138. Sedigh Ebrahim-Saraie H., et al. (2018), "A multicenter-based study on epidemiology, antibiotic susceptibility and risk factors of toxigenic Clostridium difficile in hospitalized patients in southwestern Iran", *Infez Med.* 26(4), pp. 308-315.
139. Senoh M., et al. (2015), "Predominance of PCR-ribotypes, 018 (smz) and 369 (trf) of Clostridium difficile in Japan: a potential relationship with other global circulating strains?", *J Med Microbiol.* 64(10), pp. 1226-36.
140. Shapiro D. S., et al. (2017), "Can Procalcitonin Contribute to the Diagnosis of Clostridium difficile Colitis?", *Isr Med Assoc J.* 19(5), pp. 313-316.
141. Shin B. M., et al. (2008), "Multicentre study of the prevalence of toxigenic Clostridium difficile in Korea: results of a retrospective study 2000-2005", *J Med Microbiol.* 57(Pt 6), pp. 697-701.
142. Shin B. M., et al. (2008), "Emerging toxin A-B+ variant strain of Clostridium difficile responsible for pseudomembranous colitis at a tertiary care hospital in Korea", *Diagn Microbiol Infect Dis.* 60(4), pp. 333-7.
143. Shivashankar R., et al. (2013), "Clinical factors associated with development of severe-complicated Clostridium difficile infection", *Clin Gastroenterol Hepatol.* 11(11), pp. 1466-71.
144. Skyum F., et al. (2019), "Risk factors for contagious gastroenteritis in adult patients with diarrhoea in the emergency department - a prospective observational multicentre study", *BMC Infect Dis.* 19(1), p. 133.

145. Solomon K. (2013), "The host immune response to *Clostridium difficile* infection", *Ther Adv Infect Dis.* 1(1), pp. 19-35.
146. Sorg J. A. and Sonenshein A. L. (2008), "Bile salts and glycine as cogerminants for *Clostridium difficile* spores", *J Bacteriol.* 190(7), pp. 2505-12.
147. Stubbs S. L., et al. (1999), "PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes", *J Clin Microbiol.* 37(2), pp. 461-3.
148. Tang C., et al. (2016), "The incidence and drug resistance of *Clostridium difficile* infection in Mainland China: a systematic review and meta-analysis", *Sci Rep.* 6, p. 37865.
149. Teng C., et al. (2019), "*Clostridium difficile* Infection Risk with Important Antibiotic Classes: An Analysis of the FDA Adverse Event Reporting System", *Int J Med Sci.* 16(5), pp. 630-635.
150. Tenover F. C., et al. (2011), "Comparison of strain typing results for *Clostridium difficile* isolates from North America", *J Clin Microbiol.* 49(5), pp. 1831-7.
151. Thomas C., Stevenson M., and Riley T. V. (2003), "Antibiotics and hospital-acquired *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: a systematic review", *J Antimicrob Chemother.* 51(6), pp. 1339-50.
152. Thongprayoon C., et al. (2015), "Chronic kidney disease and end-stage renal disease are risk factors for poor outcomes of *Clostridium difficile* infection: a systematic review and meta-analysis", *Int J Clin Pract.* 69(9), pp. 998-1006.
153. Tschudin-Sutter S. (2014), "Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* for clinical practice", *Swiss Med Wkly.* 144, p. w13995.

154. Vaishnavi C. (2010), "Clinical spectrum & pathogenesis of *Clostridium difficile* associated diseases", *Indian J Med Res.* 131, pp. 487-99.
155. Van den Berg R. J., et al. (2004), "Characterization of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* isolates from outbreaks in different countries by amplified fragment length polymorphism and PCR ribotyping", *J Clin Microbiol.* 42(3), pp. 1035-41.
156. Van Nood E., et al. (2013), "Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*", *N Engl J Med.* 368(5), pp. 407-15.
157. Vedantam G., et al. (2012), "Clostridium difficile infection: toxins and non-toxin virulence factors, and their contributions to disease establishment and host response", *Gut Microbes.* 3(2), pp. 121-34.
158. Verma P. and Makharia G. K. (2011), "Clostridium difficile associated diarrhea: new rules for an old game", *Trop Gastroenterol.* 32(1), pp. 15-24.
158. Vu Thi Thu Huong, Tang Thi Nga, Le Thi Trang, Nguyen Binh Minh, Nguyen Bich Van, Nguyen Van Kinh and Dang Duc Anh (2014), "Comparison of three selective media for the recovery of *Clostridium difficile* from stool specimens", *Vietnam Journal of Preventive Medicine.* 1e(1), pp. 29-34.
160. Wang L., et al. (2018), "Coinfection with 2 *Clostridium difficile* ribotypes in China: A case report", *Medicine (Baltimore).* 97(13), p. e9946.
161. Waslawski S., et al. (2013), "Clostridium difficile ribotype diversity at six health care institutions in the United States", *J Clin Microbiol.* 51(6), pp. 1938-41.
162. Wilcox M. H., et al. (2008), "A case-control study of community-associated *Clostridium difficile* infection", *J Antimicrob Chemother.* 62(2), pp. 388-96.

163. Wilcox M. H. and Rooney C. M. (2019), "Comparison of the 2010 and 2017 Infectious Diseases Society of America guidelines on the diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* infection", *Curr Opin Gastroenterol.* 35(1), pp. 20-24.
164. Wilcox M. H., et al. (2012), "Changing epidemiology of *Clostridium difficile* infection following the introduction of a national ribotyping-based surveillance scheme in England", *Clin Infect Dis.* 55(8), pp. 1056-63.
165. Yoldas O., et al. (2016), "A Diagnostic Algorithm for the Detection of *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea", *Balkan Med J.* 33(1), pp. 80-6.
166. Lucado J., Gould C., and Elixhauser A. (2006), "Clostridium Difficile Infections (CDI) in Hospital Stays, 2009: Statistical Brief #124", *Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs*, Rockville (MD).

Phụ lục 1:

**PHIẾU ĐIỀU TRA BỆNH NHÂN TIÊU CHẢY VÀ CÁC YẾU TỐ LIÊN QUAN
TIÊU CHẢY DO *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* TẠI BV BẠCH MAI**

MÃ BỆNH ÁN:..... SỐ LƯU TRỮ:.....MÃ NGHIÊN CỨU:

A. TIÊU CHUẨN CHỌN BỆNH NHÂN: Bệnh nhân tiêu chảy ≥ 3 lần/ 24h

Loại trừ: Tiêu chảy do sử dụng thuốc tẩy, thuốc nhuận tràng

B. THÔNG TIN CƠ BẢN:

1. Họ và tên:2. Tuổi:3. Giới:4. Dân tộc:
5. Nghề:6.Địa chỉ:..... 7. Đ.thoại:
8. Ngày vào viện:9. Ngày ra/chuyển viện:
- 10.Ngày bắt đầu bệnh:11. Khoa điều trị:.....
12. Phòng:.....13. Giường:

C. THÔNG TIN YẾU TỐ LIÊN QUAN ĐẾN TIÊU CHẢY:

1. Tiền sử sức khoẻ (đánh giá bệnh nền): ☐ khoẻ ☐ Bệnh mạn tính
Bệnh mạn tính: ☐ Đái tháo đường ☐ Ung thư ☐ Bệnh lý gan
☐ Bệnh thận ☐ Bệnh tim mạch ☐ Bệnh tiêu hoá
☐ Bệnh hô hấp ☐ HIV/AIDS ☐ Bệnh máu
☐ Bệnh hệ miễn dịch ☐ Liên quan thai sản ☐ Dùng Corticoid
☐ Liên quan phẫu thuật ☐ Dùng giảm đau narcotic
2. Tiền sử nằm viện trước khi bị tiêu chảy: (Mới ra viện trong 8 tuần hoặc nằm viện > 48h) ☐ Có ☐ Không Tiêu chảy sau nằm viện:ngày
3. Chuyển đến từ BV khác: ☐ Có ☐ không
4. Tiêu chảy trước khi vào viện Bạch mai: ☐ Có ☐ không (tiêu chảy sau vào viện)
5. Can thiệp thủ thuật đường tiêu hoá: ☐ Có ☐ Không
☐ Sonde dạ dày ☐ Thụt tháo phân ☐ Phẫu thuật tiêu hoá ☐ Nội soi đại tràng
6. TS dùng kháng sinh trước khi bị tiêu chảy: (trong vòng 8 tuần trước khi bị tiêu chảy)
☐ Có ☐ Không Không biết. Tiêu chảy sau dùng kháng sinh:ngày
(Ngày dùng KS: Ngày tiêu chảy:).
7. Loại kháng sinh được dùng:
☐ Nhóm Penicillin G và A ☐ Cephalosporin ☐ Carbapenem ☐ Clindamycin
☐ Quinolon ☐ Aminoside ☐ Glycopeptid khác.....

8. TS dùng thuốc kháng acid dạ dày: ☐ Có ☐ Không ☐ Không biết
9. TS dùng thuốc giảm nhu động ruột ☐ Có ☐ Không ☐ Không biết
10. TS dùng corticoid ☐ có ☐ không
11. TS dùng hóa chất: ☐ có ☐ không

D. BIỂU HIỆN LÂM SÀNG KHI TIÊU CHẢY:

1. Chẩn đoán khi vào viện:
2. Sốt khi có tiêu chảy (>37.5 độC): ☐ Có ☐ Không
3. Đau bụng..... ☐ Có ☐ Không
4. Đầy, chướng bụng..... ☐ Có ☐ Không
5. Buồn nôn, nôn: ☐ Có ☐ Không
6. Có Phù không:..... ☐ Có ☐ Không
7. Độ mất nước khi tiêu chảy: ☐ Nhẹ ☐ Trung bình ☐ Nặng ☐ Không đánh giá
8. Mạch:Huyết áp:..... Nhịp thở:..... Nhiệt độ max:
9. Phân có nhày:..... ☐ Có ☐ Không ☐ Không biết
10. Phân có máu: ☐ Có ☐ Không ☐ Không biết
11. Số lần tiêu chảy max/ ngày:lần
12. Số ngày tiêu chảy: ngày

E. CẬN LÂM SÀNG:

1. Hồng cầu:.....T/l. Hb:g/l. Bạch cầu:.....G/l. (TT:.....%,
L:.....%. M:.....%, Eo:%, B:%) Tiểu cầu:G/l
2. Na:.....K:.....Clo:.....
3. Ure:....mmol/l. Creatinin:.....Mmol/l. Glucose:....mmol/l. Procalcitonin:....ng/ml
4. GOT:..... GPT:..... Protein:g/l Albumin:g/l
5. Soi đại tràng: ☐ Có ☐ Không

- ☐ Viêm đại tràng ☐ Viêm đại tràng giả mạc ☐ Viêm đại tràng chảy máu
- ☐ Bình thường ☐ Khác:

Vị trí tổn thương: ☐ Trực tràng ☐ Đại tràng sigma ☐ Đại tràng xuống

☐ Đại tràng ngang ☐ Đại tràng lên ☐ Khác:.....

6. Siêu âm bụng: ☐ Có ☐ Không ☐ Dịch lòng ruột
- ☐ Dịch ổ bụng ☐ Giãn quai ruột.
- 7.Xquang/CT bụng: ☐ Có ☐ Không ☐ Dày thành đại tràng
- ☐ Giãn đại tràng ☐ Dịch trong lòng ruột ☐ Tắc ruột
- ☐ Viêm quanh đại tràng ☐ Khí ổ bụng

8. Soi phân: ☐ Có ☐ Không ☐ Bạch cầu ☐ Hồng cầu ☐ loạn khuẩn

ĐIỀU TRỊ:

1. Điều trị bệnh chính: ☐ kháng sinh, ☐ corticoid, ☐ giảm acid, ☐ hoá chất,
☐ giảm nhu động ruột ☐ Sonde đường tiêu hoá ☐ Thụt tháo phân
☐ Phẫu thuật tiêu hoá ☐ soi đại tràng. Khác:

Thuốc	Đường dùng	Ngày bắt đầu	Ngày kết thúc

2. Điều trị tiêu chảy: ☐ Ngừng KS ☐ Bọc niêm mạc (smecta...)
☐ Cầm ỉa (loperamid, Imodium) ☐ Lợi khuẩn ☐ Bù dịch
☐ Kháng sinh ☐ Phẫu thuật Khác

Thuốc kháng sinh	Đường dùng	Ngày bắt đầu	Ngày kết thúc

3. Diễn biến: Ngày bắt đầu tiêu chảy:..... Ngày hết tiêu chảy:.....

Kết quả: ☐ Khỏi ☐ Đỡ ra viện ☐ Chuyển tuyến/viện khác
☐ Nặng xin về ☐ Tử vong

4. Chẩn đoán ra viện:

F. XÉT NGHIỆM PHÂN:

1. Cây phân tìm C.dif ☐ Dương tính ☐ Âm tính
2. Độc tố: ☐ Có ☐ Không Nếu có, là loại độc tố: ☐ A+ ☐ B+
3. Typ ribotype của C.dif:
4. Kháng sinh đồ:

Phụ lục 2:

**DANH SÁCH BỆNH NHÂN TIÊU CHẢY ĐIỀU TRỊ NỘI TRÚ TẠI
BỆNH VIỆN BẠCH MAI TRONG NGHIÊN CỨU**

TT	HỌ VÀ TÊN	Mã BN	Mã bệnh án	Ngày vào viện	Tuổi
1	Ngô Văn Q.	1000	130206420	24/04/2013	49
2	Nguyễn Trọng Th.	1005	131100313	14/09/2013	73
3	Đặng Thị Kim Th.	1007	131300376	26/09/2013	71
4	Nguyễn Tuấn Q.	1011	141004175	28/11/2014	54
5	Nông Thanh B.	1012	130215401	07/10/2013	22
6	Trần Thị Kh.	1016	113100476	09/10/2013	74
7	Trần Thị H.	1017	113100378	28/09/2013	33
8	Nguyễn Phi H.	1019	131100322	16/11/2013	81
9	Trần Bá Trung H.	1020	130047246	23/12/2013	15
10	Lê Văn Th.	1022	131100247	09/12/2013	61
11	Phạm Đức Ch.	1023	130216448	19/10/2013	46
12	Ngô Kim C.	1024	130217937	31/10/2013	69
13	Hoàng Văn Gi.	1025	131100515	20/12/2013	64
14	Lê Thị Huyền Th.	1033	150801439	31/03/2015	24
15	Lê Việt Th.	1056	141004087	10/12/2014	43
16	Vũ Văn Th.	1057	140231654	08/12/2014	48
17	Ngô Quang D.	1089	141100062	20/01/2014	60
18	Lê Thị Nh.	1091	130801131	16/07/2013	65
19	Trần Công Đ.	1092	130800995	22/07/2013	67
20	Võ Đại V.	1093	130210613	23/07/2013	52
21	Chu Đức Ch.	1095	130211227	15/08/2013	36
22	Nguyễn Thị L.	1096	130214863	15/10/2013	66
23	Phạm Văn H.	1098	130801475	23/09/2013	44
24	Nguyễn Thị S.	1100	130801102	17/08/2013	75
25	Mai Thanh Th.	1102	130210338	23/07/2013	40
26	Nguyễn Văn Th.	1105	130044237	04/11/2013	75
27	Vũ Hoàng S.	1106	140202682	11/02/2014	59
28	Hoàng Văn H.	1108	130217879	12/11/2013	50
29	Dương Văn Nh.	1120	130216871	06/11/2013	66
30	Mã Thanh H.	1131	130801477	23/09/2013	33
31	Phan Văn V.	1132	131002728	25/09/2013	69

32	Phạm Văn D.	1133	130903226	24/09/2013	53
33	Bùi Hữu H.	1136	130801441	04/10/2013	33
34	Nông Hoàng H.	1137	130032617	21/09/2013	39
35	Bùi Thị Th.	1139	130031305	10/10/2013	39
36	Ngô Huy Ph.	1140	130801466	25/09/2013	31
37	Nguyễn Xuân H.	1141	130033518	03/09/2013	53
38	Đỗ Đình M.	1144	130217432	23/10/2013	50
39	Leo Thị Nh.	1145	130031364	19/09/2013	28
40	Vũ Viết Th.	1146	130213262	07/09/2013	55
41	Lê Thị Th.	1147	130904257	17/10/2013	50
42	Hoàng Xuân L.	1148	130800937	07/10/2013	46
43	Trần Đình C.	1149	130215580	08/10/2013	70
44	Lường Thị L.	1150	130044301	30/10/2013	30
45	Đào Minh Th.	1151	140300091	06/03/2014	37
46	Phùng Thị H.	1152	140800277	26/02/2014	56
47	Vương Thị L.	1153	130801998	18/12/2013	25
48	Nguyễn Vinh H.	1154	130048486	02/12/2013	30
49	Đỗ Thị O.	1155	130215291	25/11/2013	84
50	Bùi Thị Huệ L.	1156	150800726	21/09/2015	32
51	Nguyễn Thị N.	1157	140039247	15/11/2014	84
52	Phạm Hồng Ph.	1161	140800380	06/02/2014	39
53	Dương Văn Q.	1164	130904953	24/12/2013	65
54	Trần Thị Phương L.	1165	130802376	20/11/2013	28
55	Trần Văn T.	1167	140800460	22/04/2014	44
56	Trần Thanh Ngh.	1171	140203762	10/02/2014	67
57	Nguyễn Thị Đ.	1173	140800063	26/03/2014	55
58	Trương Thị Ch.	1174	140206488	10/03/2014	36
59	Trần Minh Ch.	1175	140800322	10/03/2014	49
60	Nguyễn Thị M.	1176	140205436	05/03/2014	67
61	Phan Văn T.	1177	140010123	04/04/2014	77
62	Triệu Văn Th.	1181	131003587	21/11/2013	34
63	Đinh Viết Ch.	1183	130801369	26/11/2013	77
64	Trần Trọng Ch.	1184	140202563	08/02/2014	62
65	Nguyễn Văn Th.	1186	130216073	20/11/2013	49
66	Nguyễn Thị N.	1187	130219230	03/12/2013	79
67	Nguyễn Lâm Th.	1192	140203723	09/02/2014	64
68	Nguyễn Ngọc Th.	1198	140200653	19/02/2014	80
69	Trịnh Thị T.	1202	130044535	12/11/2013	54

70	Phùng Văn L.	1203	140200826	13/01/2014	39
71	Nguyễn Văn T.	1204	140202056	06/02/2014	42
72	Nguyễn Hữu T.	1208	140201900	02/02/2014	45
73	Hoàng Văn Ch.	1210	141100068	18/02/2014	26
74	Phạm Văn R.	1214	140207318	14/03/2014	62
75	Nguyễn Thị Thanh M.	1217	141100228	02/05/2014	68
76	Hồ Phạm Th.	1219	140301119	05/04/2014	82
77	Lưu Thị H.	1220	140210023	07/04/2014	64
78	Nguyễn Thị L.	1231	141100224	21/04/2014	32
79	Phạm Thị T.	1233	140214614	26/05/2014	66
80	Vũ Thị K.	1235	140211631	04/05/2014	77
81	Lưu Thị T.	1238	140213087	30/07/2014	82
82	Hứa Thị L.	1241	140014893	22/04/2014	58
83	Đỗ Thị M.	1244	140302528	31/05/2014	74
84	Tạ Quang H.	1251	140301451	05/04/2014	64
85	Phạm Đức Y.	1252	141100223	20/04/2014	61
86	Hoàng Thị H.	1254	140210544	05/02/2014	32
87	Đào Thanh B.	1256	140302409	12/06/2014	17
88	Nguyễn H.	1262	140218108	11/07/2014	60
89	Nguyễn Thế S.	1263	141100299	18/06/2014	81
90	Nguyễn thị V.	1264	140303218	04/08/2014	76
91	Hoàng Trọng D.	1266	140223783	28/08/2014	17
92	Vũ Huy H.	1269	140218503	30/07/2014	19
93	Nguyễn Văn T.	1271	140232691	29/12/2014	27
94	Trương Xuân Th.	1277	150301726	27/03/2015	51
95	Hoàng Đình D.	1278	151100154	17/04/2015	85
96	Nguyễn Thị H.	1280	140216067	11/06/2014	55
97	Bùi Thị T.	1286	140801054	25/11/2014	43
98	Nông Thị Y.	1287	150215671	24/05/2015	55
99	Phạm Thị S.	1288	150801469	06/04/2015	58
100	Đinh Ngọc T.	1292	161600056	12/01/2016	95
101	Hoàng Thị Mai L.	1294	140213867	04/05/2014	22
102	Trịnh Thị Th.	1296	150211278	01/04/2015	58
103	Nguyễn Xuân A.	1300	140219487	28/07/2014	81
104	Vũ Thị T.	1303	142001865	24/07/2014	69
105	Cao Viết T.	1305	140802427	07/08/2014	51
106	Nguyễn Ngọc Q.	1311	140229018	04/11/2014	26
107	Văn Đăng Ng.	1314	140801474	15/08/2014	67

108	Nguyễn Lý H.	1315	140226210	25/10/2014	69
109	Trần Thị D.	1316	140802396	12/12/2014	63
110	Đỗ Thị X.	1340	140801045	28/11/2014	51
111	Lê Thị Tr.	1342	140801927	24/11/2014	82
112	Lê Quý Th.	1349	140802417	07/08/2014	32
113	Hoàng Thị Đ.	1350	140801378	30/07/2014	82
114	Trần Thị D.	1351	140802139	14/09/2014	66
115	Nguyễn Thị L.	1361	140802485	10/09/2014	74
116	Đậu Văn S.	1365	140801635	05/09/2014	72
117	Trịnh Thị H.	1366	140226617	27/10/2014	34
118	Phan Thanh Tr.	1370	140229026	02/11/2014	55
119	Vũ Đức H.	1371	140227405	28/10/2014	54
120	Lưu Thị T.	1372	141302179	06/11/2014	55
121	Nguyễn Hồng H.	1375	140228834	03/11/2014	34
122	Cù Xuân T.	1376	150201814	03/01/2015	56
123	Trần Thị Th.	1377	150903770	12/07/2015	53
124	Ngô Ngọc L.	1384	150216726	24/05/2015	61
125	Bùi Thế Th.	1385	150215726	04/11/2014	64
126	Phạm Thị Nh.	1386	151600943	16/04/2015	67
127	Nguyễn Thị Th.	1388	150027858	16/08/2015	34
128	Lê Mạnh H.	1393	150207655	17/03/2015	23
129	Đinh Công C.	1394	160202568	16/01/2016	56
130	ứng Thị L.	1396	150206432	06/02/2015	39
131	Trịnh Quang H.	1400	141100630	20/12/2014	81
132	Nguyễn Thị V.	1410	141100546	14/09/2014	59
133	Nguyễn Thị Nh.	1412	150017575	25/05/2015	75
134	Nguyễn Thị X.	1415	140043370	16/12/2014	62
135	Phạm Văn T.	1431	150801032	30/06/2015	67
136	Lê Đăng H.	1432	150800917	30/06/2015	80
137	Trần Quốc Kh.	1435	150800930	30/04/2015	47
138	Phí Công H.	1439	150219073	08/07/2015	43
139	Nguyễn Hữu N.	1440	150217736	14/06/2015	71
140	Trần Thị Hương Gi.	1449	150212964	10/04/2015	29
141	Nguyễn Văn L.	1453	150800933	12/05/2015	76
142	Nguyễn Văn H.	1454	150801133	01/05/2015	54
143	Nguyễn Văn C.	1459	150800834	26/06/2015	32
144	Hoàng Thị H.	1460	150800860	16/08/2015	21
145	Lê Đình Q.	1465	150801539	29/09/2015	78

146	Nguyễn Hữu T.	1468	150801186	04/06/2015	65
147	Phan Văn H.	1469	150801660	13/10/2015	53
148	Phạm Xuân Đ.	1472	150801575	08/10/2015	76
149	Vũ Thị X.	1473	150010479	31/03/2015	20
150	Phạm Thu Ng.	1474	150801118	08/04/2015	40
151	Vũ Thị Q.	1475	150016813	19/05/2015	67
152	Hoàng Thị H.	1476	150214070	27/05/2015	80
153	Nguyễn Văn T.	1478	150209803	07/05/2015	47
154	Phạm Quang Th.	1479	150800314	15/05/2015	51
155	Lê Hồng T.	1484	150902388	15/06/2015	67
156	Trần Quang T.	1487	150220609	16/07/2015	77
157	Nguyễn Văn Tr.	1488	150218048	20/07/2015	44
158	Đàm Xuân Đ.	1489	150218685	04/07/2015	78
159	Nguyễn Văn Ph.	1490	150220570	12/07/2015	53
160	Vũ Đức Th.	1493	150221935	02/08/2015	54
161	Hoàng Văn H.	1495	150801383	14/07/2015	63
162	Phạm Quang L.	1499	150216709	24/06/2015	48
163	Nguyễn Thị L.	1500	150219271	14/07/2015	85
164	Nguyễn Văn T.	1504	150800814	19/06/2015	62
165	Vũ Huy T.	1505	150216516	21/07/2015	63
166	Trần Minh Th.	1515	150219824	29/07/2015	23
167	Tạ Thanh Th.	1518	150225227	25/09/2015	43
168	Vũ Ngọc L.	1523	150225901	16/10/2015	93
169	Nguyễn Hoàng Như Ý.	1530	151100247	03/09/2015	16
170	Nguyễn Văn T.	1532	150802142	24/11/2015	54
171	Vũ Thị T.	1533	151100225	17/09/2015	85
172	Cầm Thị C.	1535	150800897	31/07/2015	52
173	Dương Thị Đ.	1536	150219851	28/07/2015	25
174	Vũ Văn B.	1537	150800768	04/08/2015	67
175	Nguyễn Thị H.	1538	156002041	17/08/2015	66
176	Cao Văn D.	1539	150028914	17/08/2015	30
177	Đàm Văn V.	1545	151002946	28/08/2015	47
178	Trần Thị Tr.	1547	150800736	22/09/2015	71
179	Trần Đức T.	1549	150221743	17/10/2015	59
180	Lê Tiến L.	1550	150904849	09/10/2015	75
181	Phạm Thị H.	1551	151003295	26/10/2015	56
182	Lê Minh M.	1552	150801687	10/10/2015	55
183	Đồng Quang M.	1553	150225246	27/09/2015	22

184	Vũ Trung D.	1554	150800691	25/08/2015	41
185	Ngô Văn L.	1555	150228007	13/09/2015	63
186	Trần Ngọc L.	1556	151100414	30/11/2015	52
187	Cao Văn A.	1558	150225418	14/09/2015	51
188	Phạm Thị Ch.	1560	150800564	16/09/2015	87
189	Trương Thị L.	1561	150232761	30/11/2015	36
190	Trịnh Chí T.	1563	150033601	15/12/2015	70
191	Trần H.	1568	150047021	28/12/2015	48
192	Nguyễn Song Th.	1574	150223258	18/09/2015	30
193	Hoàng Văn Th.	1579	150228334	06/10/2015	55
194	Vũ Bá V.	1587	151003654	03/11/2015	90
195	Nguyễn Việt L.	1588	150801814	07/11/2015	61
196	Nguyễn Văn Q.	1590	150232667	10/11/2015	71
197	Đỗ Đ.	1592	150801702	22/10/2015	65
198	Hoàng Anh S.	1614	150802166	25/11/2015	69
199	Nguyễn Văn S.	1615	150801921	01/12/2015	52
200	Đặng Thanh H.	1617	150802404	08/12/2015	49
201	Trần Công Đ.	1619	150232287	11/12/2015	63
202	Thắm Chí M.	1629	150233066	22/12/2015	77
203	Mai Văn Th.	1633	160000761	07/01/2016	37
204	Tô Văn Th.	1654	160800516	25/03/2016	79
205	Nguyễn Văn V.	1658	160800049	01/01/2016	63
206	Hà Văn Tr.	1674	160800171	01/02/2016	78
207	Cao Văn S.	1675	160800271	11/02/2016	45
208	Trịnh Thị T.	1677	160800313	19/02/2016	64
209	Nguyễn Văn H.	1678	160004064	15/02/2016	58
210	Đỗ Thị Th.	1680	160200830	21/01/2016	46
211	Vũ Bá Tr.	1681	160800475	29/02/2016	19
212	Phạm Thị Doan Th.	1682	161100122	26/02/2016	35
213	Nguyễn Thị C.	1683	160205393	29/02/2016	68
214	Nguyễn Thị C.	1684	160800346	24/02/2016	83
215	Trịnh Xuân L.	1685	160800315	24/02/2016	83
216	Lăng Thị Th.	1689	160207511	19/03/2016	22
217	Trần Thị H.	1690	160008096	10/03/2016	26
218	Trần Thế T.	1691	161000964	21/03/2016	47
219	Nguyễn Thị Th.	1693	160204136	17/02/2016	39
220	Vũ Thị M.	1695	161100070	26/03/2016	83
221	Vũ Bá T.	1698	160800626	01/04/2016	94

222	Lê Văn Đ.	1699	160207476	29/03/2016	74
223	Đỗ Đình T.	1700	160800666	06/04/2016	58
224	Lê Thị Q.	1701	160401148	03/04/2016	24
225	Hoàng Văn M.	1704	160205100	08/04/2016	52
226	Bùi Quang C.	1705	160800694	07/04/2016	62
227	Lê Trọng N.	1708	160209739	21/03/2016	56
228	Hoàng Thị H.	1709	160211304	11/04/2016	79
229	Trịnh Khắc C.	1710	161100185	11/04/2016	84
230	Hoàng Thị Nh.	1721	160206908	23/04/2016	55
231	Phạm Đức Ng.	1722	160211579	16/04/2016	67
232	Phạm Quốc T.	1723	160213836	25/04/2016	29
233	Hà Văn Th.	1724	160800739	22/04/2016	64
234	Nguyễn Thị Th.	1725	160800929	11/05/2016	53
235	Khổng Văn B.	1726	160902495	07/05/2016	62
236	Nguyễn Quang B.	1729	160800951	16/05/2016	88
237	Sawa N.	1730	161600988	25/04/2016	70
238	Phạm Thị Th.	1731	160800948	12/05/2016	69
239	Đoàn Thị X.	1732	160800956	14/05/2016	34
240	Ngô Thành Tr.	1733	160214777	16/05/2016	35
241	Nguyễn Văn C.	1734	160801010	25/05/2016	66
242	Vũ Thị H.	1735	160213856	19/05/2016	31
243	Đỗ Văn T.	1737	161100174	16/05/2016	30
244	Nguyễn Thị P.	1738	160216911	04/06/2016	38
245	Hồ Sỹ Th.	1740	161001511	31/05/2016	49
246	Đặng Văn Th.	1741	160217820	03/06/2016	51
247	Nguyễn Thị H.	1742	160801043	25/05/2016	75
248	Lê Thị Thu H.	1744	160215921	08/06/2016	51
249	Dương Xuân Ng.	1745	160801193	08/06/2016	86
250	Nguyễn Đức Th.	1747	160101655	27/05/2016	76
251	Võ Văn Q.	1749	160801264	21/06/2016	53
252	Lê Văn L.	1750	161001816	22/06/2016	65
253	Lê Hữu P.	1751	160801227	23/06/2016	17
254	Lê Thị Thiệu Ng.	1752	160023605	23/06/2016	45
255	Nguyễn Văn T.	1758	160021229	08/06/2016	55
256	Phạm Thị H.	1761	160221301	06/07/2016	28
257	Nguyễn Thị Thu H.	1762	160023865	27/06/2016	20
258	Chu Thị Thanh H.	1763	160801340	16/07/2016	25
259	Nguyễn Thị H.	1764	160220296	01/07/2016	60

260	Nguyễn Thị L.	1768	160219146	20/07/2016	28
261	Nguyễn Văn H.	1770	160027980	26/07/2016	53
262	Nguyễn Thị B.	1772	161001722	19/07/2016	71
263	Hoàng Ngọc Thu Q.	1773	160801335	27/07/2016	57
264	Nguyễn Thị Th.	1779	160801301	14/08/2016	43
265	Phạm Thị O.	1781	160801560	29/07/2016	64
266	Đinh Tiến D.	1783	161100252	23/06/2016	72
267	Đặng Thị H.	1784	160224642	11/08/2016	59
268	Nguyễn Văn Ph.	1786	161002532	12/08/2016	33
269	Nguyễn Đức L.	1787	160801601	13/08/2016	26
270	Nguyễn Xuân tr.	1790	161100361	02/08/2016	62
271	Trần Thị H.	1791	160223142	05/08/2016	76
272	Nguyễn Duy H.	1792	160305179	01/08/2016	80
273	Nguyễn Học Th.	1793	160223768	20/08/2016	54
274	Trần Văn S.	1795	161302093	12/08/2016	61
275	Nguyễn Văn H.	1798	160801890	01/09/2016	50
276	Nguyễn Văn H.	1799	160226057	04/09/2016	34
277	Nguyễn Bá L.	1809	160227248	18/09/2016	52
278	Võ Thị M.	1822	160229984	28/09/2016	68
279	Nguyễn Thị M.	1828	160227128	24/04/2016	35
280	Nông Thị Ch.	1829	161100423	25/09/2016	25
281	Lăng Thị S.	1830	160031188	19/08/2016	68
282	Lê Thị N.	1831	160801958	08/10/2016	27
283	Phạm Thị H.	1839	160801956	17/10/2016	62
284	Nguyễn Văn Ch.	1841	160036932	12/10/2016	77
285	Nguyễn Thị Tr.	1843	160231068	19/10/2016	80
286	Nguyễn Văn D.	1848	160230781	17/10/2016	39
287	Nguyễn Văn L.	1850	160802298	31/10/2016	69
288	Nguyễn Thị L.	1854	160232245	01/11/2016	69
289	Trần Quốc B.	1855	160232163	31/10/2016	65
290	Trần Văn Th.	1857	160233510	14/11/2016	56
291	Nguyễn Q.	1863	161100570	17/11/2016	82
292	Đoàn Thị Th.	1864	160231787	27/10/2016	78
293	Nguyễn Ngọc Th.	1865	160233945	15/11/2016	54
294	Hoàng Trọng Ng.	1870	161100547	23/11/2016	58
295	Phạm Bá V.	1878	160234916	27/11/2016	69
296	Vũ Thị M.	1880	160234786	05/12/2016	85
297	Trần Thị H.	1882	161100564	19/11/2016	71

298	Phạm Tuệ T.	1887	161100529	10/12/2016	90
299	Hoàng Thị Th.	1892	160237869	29/02/2016	66
300	Nguyen Tổng Th.	1901	170800063	04/01/2017	30
301	Đào Thị T.	1902	170000254	04/01/2017	57
302	Dương Thanh S.	1908	170800163	21/01/2017	48
303	Nguyễn Duy T.	1909	170201606	19/01/2017	26
304	Tạ Thị B.	1910	171100014	18/01/2017	65
305	Phạm Thị M.	1912	172300079	10/01/2017	62
306	Nguyễn Bá H.	1913	170003062	02/02/2017	68
307	Lê Thị Ch.	1914	170010618	27/03/2017	87
308	Phạm Văn N.	1915	170002689	31/01/2017	62
309	Lê Văn Đ.	1917	170800110	12/02/2017	33
310	Đỗ Hồng Nh.	1932	170205242	23/02/2017	21
311	Phan Trần S.	1933	170205171	22/02/2017	81
312	Tưởng Văn H.	1934	170005396	27/02/2017	63
313	Trần Văn H.	1938	170300892	17/02/2017	71
314	Nguyễn Văn S.	1941	170800102	27/02/2017	52
315	Trần Việt H.	1943	170800988	13/03/2017	42
316	Lê Thị V.	1948	171100094	12/03/2017	81
317	Bùi Văn H.	1950	171100070	20/03/2017	62
318	Đặng Văn Ch.	1953	172000555	28/02/2017	43
319	Nguyễn Văn T.	1954	170800491	24/03/2017	46
320	Lý Văn Th.	1956	170006999	01/03/2017	50
321	Nguyễn Thị Nh.	1958	171100107	21/03/2017	76
322	Mùi Thị D.	1961	170211486	31/03/2017	59
323	Nguyễn Văn Th.	1963	170800507	29/03/2017	63
324	Trương Duy K.	1966	170800705	11/04/2017	70
325	Lê Văn Tr.	1967	170014730	12/04/2017	29
326	Trần Thị Kim Th.	1974	170210412	17/04/2017	47
327	Thái Thị Tuyết A.	1975	170209834	11/04/2017	56
328	Phạm Thị Ng.	1983	170800763	03/05/2017	65
329	Nguyễn Thị H.	1984	170302169	26/04/2017	76
330	Trần Thị Th.	1986	170012716	03/05/2017	53
331	Vũ Thị L.	1988	170801071	09/05/2017	34
332	Nguyễn Thị B.	1992	170017518	15/05/2017	60
333	Đỗ Thị H.	1996	170801006	21/05/2017	47
334	Nguyễn Thị Thanh X.	2001	170215318	26/05/2017	79
335	Đỗ Thị L.	2003	170215222	27/05/2017	38

336	Đỗ Văn M.	2004	170218647	19/05/2017	54
337	Nguyễn Văn D.	2008	171100212	28/05/2017	61
338	Nguyễn Văn H.	2009	170215367	27/05/2017	44
339	Lê Bá Th.	2010	170216174	06/06/2017	76
340	Nguyễn Ngọc T.	2011	171100198	06/06/2017	43
341	Phùng Văn Kh.	2015	170216257	03/06/2017	39
342	Nguyễn Tuấn A.	2016	171002208	21/06/2017	24
343	Đào Thiện T.	2017	170215521	29/05/2017	40
344	Nguyễn Thị Thùy D.	2018	170801149	13/06/2017	24
345	Lê Thị T.	2019	172017507	12/06/2017	44
346	Ngô Ngọc S.	2023	171100200	12/06/2017	60
347	Nguyễn Ngọc C.	2034	170021560	12/06/2017	54
348	Trần Văn Th.	2060	170801648	31/07/2017	49
349	Nguyễn Thành Ch.	2062	170232998	27/07/2017	42
350	Đào Ngọc H.	2065	170031455	16/08/2017	58
351	Đỗ Ngọc S.	2066	170229491	15/08/2017	55
352	Nguyễn Văn Th.	2071	170802922	27/08/2017	19
353	Phạm Thị Nh.	2073	170228784	07/08/2017	19
354	Vũ Hoàng T.	2075	170801911	12/09/2017	75
355	Nguyễn Thanh S.	2078	170801909	15/09/2017	55
356	Bàng Nguyên S.	2083	170224834	12/09/2017	68
357	Trương Quang H.	2088	170228545	19/09/2017	32
358	Nguyễn Quốc C.	2093	171100562	27/09/2017	36
359	Nguyễn Cảnh K.	2094	170231904	01/10/2017	74
360	Phạm Thị H.	2098	170230337	04/10/2017	30
361	Nguyễn Thị U.	2099	170232617	13/09/2017	79
362	Vi văn S.	2107	171001287	20/09/2017	52
363	Nguyễn Văn B.	2112	171602805	12/10/2017	61
364	Nguyễn Văn H.	2117	170223437	16/10/2017	70
365	Lê Thành T.	2118	170235859	01/11/2017	37
366	Đinh Thị Th.	2121	170235430	27/10/2017	84

367	Trần Văn K.	2130	171003209	18/11/2017	62
368	Nguyễn Ngọc T.	2133	170234087	30/11/2017	36
369	Hoàng Văn T.	2135	170234620	23/11/2017	45
370	Nguyễn Chí K.	2136	171100466	10/11/2017	61
371	Đình Công L.	2139	170241359	10/12/2017	32
372	Lục Đức Ch.	2140	170241560	11/12/2017	60
373	Hoàng Khắc X.	2141	171100365	28/11/2017	68
374	Lê Ấ.	2150	170045046	23/12/2017	91

Xác nhận của phòng kế hoạch tổng hợp
Bệnh viện Bạch Mai

TS. Nguyễn Thị Lan Anh
(đã ký)

Phụ lục 3

CÁC QUY TRÌNH XÉT NGHIỆM *C.DIFFICILE* TRONG NGHIÊN CỨU

(Nguồn: Khoa Vi khuẩn – Viện VSDTTW)

1. Nuôi cấy mẫu phân cho phân lập vi khuẩn kỵ khí:

- **Mục đích:** Thường qui này để nuôi cấy phân lập và định danh *C.difficile* từ mẫu bệnh phẩm phân

- **Phạm vi áp dụng:** Thường qui này dùng cho phòng thí nghiệm Vi khuẩn kỵ khí – Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương

- **Nguyên lý:** *C.difficile* là vi khuẩn kỵ khí tuyệt đối, gram dương, sinh nha bào, tên “*difficile*” hàm ý vi khuẩn này thường khó phân lập và xác định đặc điểm. Hiện nay *C.difficile* được cho là căn nguyên hàng đầu gây tiêu chảy bệnh viện, chúng có thể không gây triệu chứng hoặc gây tiêu chảy ở các mức độ nặng nhẹ khác nhau, đặc biệt có thể gây viêm ruột kết nguy hiểm đến tính mạng hoặc tử vong.

- **Trách nhiệm:**

Những nhân viên của phòng thí nghiệm sử dụng thường qui này được đào tạo chuẩn thức trước khi làm.

Ghi lại chính xác kết quả vào sổ nhật ký thí nghiệm.

- **Định nghĩa và các từ viết tắt:**

Mẫu: Mẫu bệnh phẩm ban đầu thu thập từ bệnh viện, phòng khám để làm xét nghiệm.

Kỵ khí (Điều kiện kỵ khí hoặc môi trường kỵ khí): Khí trường hoàn toàn không chứa oxy (hỗn hợp khí gồm 80% N₂, 10% CO₂ và 10% H₂). Sử dụng bình ủ kỵ khí hoặc túi ủ kỵ, túi tạo kỵ khí để tạo điều kiện kỵ khí. Chỉ thị màu kỵ khí được cho vào bình hoặc túi ủ kỵ khí để kiểm soát chất lượng hỗn hợp khí nuôi cấy.

Các từ viết tắt:

CCMA (cefoxitin-cycloserine mannitol agar): Môi trường thạch CCMA

GAM: Môi trường kỵ khí Gifu modiffied.

BHI (Brain heart infusion): Canh thang não tim

EYA (Egg yolk agar): Thạch lòng đỏ trứng

Vit K1: Vitamin K1

Thioglycolate HK: Canh thang Thioglycolate có bổ xung Hemin và Vitamin K

Thioglycolate thường: Canh thang Thioglycolate không bổ xung Hemin và Vitamin K

- An toàn

Thao tác với căn nguyên vi khuẩn đường ruột theo thường qui hướng dẫn an toàn phải làm việc trong phòng thí nghiệm an toàn cấp độ 2

- Kiểm soát chất lượng

Luôn sử dụng chủng chuẩn *Clostridium difficile* ATCC 700057 để kiểm soát chất lượng mỗi lô môi trường chọn lọc CCMA. Chất lượng môi trường được ghi vào sổ theo dõi kiểm soát chất lượng môi trường. Lô môi trường nào không đạt chất lượng, cần phải loại bỏ, không dùng cho xét nghiệm và được tìm hiểu nguyên nhân không đạt chất lượng để lưu ý cho lần pha chế sau.

Luôn sử dụng chỉ thị kỵ khí cho mỗi hộp nuôi cấy kỵ khí

- Nguyên vật liệu và trang thiết bị

Nguyên vật liệu: Mẫu bệnh phẩm phân.

Trang thiết bị: Máy trộn voltex. Kính hiển vi. Xylene (Biomerieux). Tủ kỵ khí BugBox Plus, Hãng Baker Ruskinn – Anh. Tủ an toàn sinh học cấp 2 code AC24E1, hãng ESCO – Singapore. Tủ ấm CO2 NU-5100E, NUAIRE – Mỹ. Máy ủ nhiệt Biosan PCH-100, BIOSAN, Hàn Quốc. Nồi hấp tiệt trùng HV-50, Hirayama, Nhật Bản.

Vật tư tiêu hao: Tube Eppendorf. Đầu côn có fill lọc. Găng dùng 1 lần. Chỉ thị kỵ khí. Bộ nhuộm Gram. Túi ủ kỵ Gaspak – Mishumishi – Nhật Bản. Que cấy bệnh phẩm inox – Việt Nam. Đầu tip – Corning, Mỹ

Sinh phẩm: Canh thang BHI 0,05% cysteine. Cồn tuyệt đối. Môi trường Thioglycollate thường. Thạch kỵ khí chọn lọc và không chọn lọc (Thạch CCMA - PTN tự pha chế, Thạch GAM – hãng Nissui – Nhật Bản). Dung dịch skim milk 20%.

- Các bước tiến hành

Mẫu được vận chuyển đến phòng thí nghiệm sẽ được xét nghiệm ngay trong vòng 2 giờ sau khi thu thập. Nếu không làm xét nghiệm ngay, có thể bảo quản mẫu ở -80°C.

Phương pháp shock cồn: thuận lợi của phương pháp này để chọn lọc vi khuẩn *C.difficile* vì chỉ vi khuẩn sinh nha bào có thể sống sót, do đó loại bỏ được sự sinh trưởng của những vi sinh vật không sinh nha bào trong phân

Cách làm: Pha loãng 1 phần thể tích phân với 1 phần thể tích canh thang BHI 0.05% cystein. Sau đó trộn đều với 2 phần thể tích cồn tuyệt đối (hoặc cồn 95%). Trộn đều bằng máy trộn voltex, để ở nhiệt độ phòng 1 giờ, cứ 10 phút voltex mẫu để làm đều mẫu.

Nuôi cấy

Môi trường dùng cho nuôi cấy: Môi trường chọn lọc CCMA, hoặc Môi trường không chọn lọc

Kỹ thuật nuôi cấy

- Lấy 100 µl hỗn dịch mẫu đã shock cồn, dùng que cấy bệnh phẩm cấy đều bệnh phẩm trên đĩa thạch để tách khuẩn lạc rồi trên môi trường chọn lọc CCMA đã khử oxy.

- Ủ đĩa môi trường đã cấy ở 37°C/48h trong điều kiện môi trường kỵ khí, sử dụng bình ủ kỵ khí hoặc túi ủ kỵ khí. Chỉ thị kỵ khí được cho vào bình hoặc túi ủ khí để kiểm soát chất lượng hỗn hợp khí nuôi cấy.
- Đĩa cấy có thể được kiểm tra sau khi ủ qua đêm nhưng không được bỏ ra khỏi môi trường kỵ khí bởi vì sự hình thành bào tử bị ức chế trên môi trường chọn lọc và những khuẩn lạc non dễ bị chết khi phơi nhiễm với không khí.
- Đọc kết quả chỉ thị khí trước khi đọc kết quả bệnh phẩm. Điều kiện kỵ khí được đảm bảo mới tiếp tục đọc kết quả bệnh phẩm.
- Đếm số khuẩn lạc nghi ngờ là CDF sau đó cấy chuyển. Khi cấy chuyển, chọn tối đa trên mỗi đĩa 5 khuẩn lạc nghi ngờ, cấy chuyển sang môi trường không chọn lọc để kiểm tra.

Định danh

Dựa vào hình thái khuẩn lạc: Khuẩn lạc *C.difficile* có thể thay đổi tùy thuộc loại môi trường nuôi cấy từ dạng nhẵn đến gồ ghề, từ màu vàng nhạt đến trắng, từ tròn đến dẹt, có rãnh giả hoặc bờ không đều.

Khuẩn lạc điển hình của *C.difficile* trên môi trường CCMA là khuẩn lạc tròn với bờ không đều, dẹt, có kích thước khoảng 4mm, màu vàng.

Có thể nhận biết khuẩn lạc *C.difficile* bằng các đặc tính sau:

- + Mùi: Mùi riêng biệt giống mùi phân ngựa (dễ nhận ra mùi này từ đĩa cấy chủng thuần)
- + Màu huỳnh quang dưới ánh sáng UV: Để mở đĩa khuẩn lạc để mở dưới ánh sáng tím bước sóng dài (365nm) trong phòng tối và nhìn bằng sự phản xạ thấy khuẩn lạc *C.difficile* bắt màu huỳnh quang. Sự bắt màu huỳnh quang của khuẩn lạc *C.difficile* khác nhau tùy thuộc mật độ huỳnh quang do vi khuẩn tiết ra nhưng thường có màu xanh vàng hoặc màu lục nhạt. Ánh sáng huỳnh quang yếu trên một số thạch cơ bản và mạnh nhất trên thạch CCMA hoặc thạch chứa máu. Khi làm thử nghiệm huỳnh quang trên khuẩn lạc phải có

chúng chứng để xác định rõ kết quả. Sự bắt màu huỳnh quang đối với khuẩn lạc già hơn 48h trên thạch không chọn lọc sẽ bị giảm đi do sự hình thành nha bào tăng lên. Đánh dấu tất cả khuẩn lạc nghi ngờ ở mặt dưới đĩa thạch bằng bút dạ. Cấy chuyển sang môi trường thạch GAM không chọn lọc và ủ ở điều kiện kỵ khí trong 48h để làm các test định danh khác.

Dựa vào hình thể vi khuẩn trên kính hiển vi

Nhuộm Gram khuẩn lạc nghi ngờ, xem HDKT-VKKT Hình ảnh nhuộm gram *C.difficile* là trực khuẩn gram dương, 2 bờ song song, rộng 0.5 µm, dài 3-5 µm với nha bào hình oval ở gần đầu tận cùng. Nha bào vi khuẩn thường không nhìn thấy trực tiếp từ thạch chọn lọc nhưng rất điển hình khi cấy chuyển trên thạch không chọn lọc.

2. Quy trình xét nghiệm PCR đa môi phát hiện gen sinh độc tố của *C.difficile*

- Tách chiết DNA:

Mẫu phân được tiến hành xử lý cho tách chiết DNA sử dụng bộ sinh phẩm tách chiết QIAamp DNA tool mini kit của công ty Qiagen theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Kỹ thuật PCR:

Kỹ thuật PCR được sử dụng để phát hiện gen mã hoá cho độc tố A (tcdA) và độc tố B (tcdB) và thụ thể gắn độc tố CDT bằng các cặp mồi đặc hiệu. Các độc tố này là yếu tố độc lực vi khuẩn nhằm xác định vai trò gây bệnh của *C.difficile*.

Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng PCR

Thực hiện phản ứng PCR trên máy luân nhiệt

Điện di và chụp ảnh sản phẩm PCR

Phân tích kết quả

Chúng dương phải rõ ràng

Có vạch trên gel và đúng kích thước khi so sánh với thang ADN chuẩn.
Vạch có hình ảnh rõ nét

Mỗi lần chạy PCR đều có các chứng dương A+B+, A-B+ và chứng âm là nước cất siêu sạch dùng cho PCR.

Định danh xác định: Dựa vào đặc tính sinh hóa của chủng cùng với đặc điểm khuẩn lạc và hình thể vi khuẩn nhuộm gram hoặc giải trình tự gen 16S-rRNA.

Bảng 1: Đặc tính sinh hóa của một số loài Clostridium

Loài	Thạch lòng đỏ trứng		Genlatinase	Tiêu hóa sữa	Indole	Sinh axit			
	Lecithinase	Lipase				G	M	L	S
<i>C.perfringens</i>	+	-	+	-	-	+	+	+	
<i>C.sordellii</i>	+	-	+	+	+	+	+	-	
<i>C.botulinum I</i>	-	+	+	+	-	+	+	-	
<i>C.botulinum II</i>	-	+	+	-	-	+	+	-	
<i>C.botulinum III</i>	-	+	+	V	-	+	V	-	
<i>C.septicum</i>	-	-	+	-	-	+	+	+	
<i>C.histolyticum</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	
<i>C.tetani</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	
<i>C.difficile</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	

3. Quy trình xác định genotype *Clostridium difficile* bằng phương pháp PCR ribotyping

- ***Tách DNA từ khuẩn lạc C. difficile sinh độc tố bằng kit:***

Mẫu phân được tiến hành xử lý cho tách chiết DNA sử dụng bộ sinh phẩm tách chiết QIAamp DNA tool mini kit của công ty Qiagen theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- ***Kiểm tra loại độc tố của chủng vừa tách DNA:***

Bằng phương pháp PCR đa mồi cho vi khuẩn *C.difficile* (sử dụng 3 cặp mồi của 2 gen sinh độc tố TcdtA, TcdtB và gen đặc hiệu loài tpi) xác định gen đặc hiệu loài và gen sinh độc tố của vi khuẩn *Clostridium difficile*

Chỉ có DNA của chủng vi khuẩn sinh độc tố A+B+ hoặc A-B + mới được dùng để phân loại typ ribotype

- **Chạy PCR khuếch đại vùng gen 16S và 23 S của *C. difficile***

Chuẩn bị PCR reagent mix : Mỗi lần chạy PCR ribotype chạy với mấy chủng chuẩn, những chủng nào ?

Nguyên liệu	1X (µl)	10X (µl)	Nồng độ cuối
Buffer 5X	4	40	1X
MgCl ₂ 25mM	2	20	2,5mM
PCR nucleotide mix 10mM	0,4	4	0,2µM
Primer 16S 10µM	1	10	0,4µM
Primer 23S 10µM	1	10	0,4µM
Tag polymerase 5U/µl	0,4	4	
Nước cất tinh sạch dùng cho PCR	9,2	920	
Tổng phụ	18µl	18µl	
DNA template	2µl	2µl	

- **Chạy PCR với chu trình nhiệt**

Chạy PCR với chu trình nhiệt như sau

Bước	Nhiệt độ	Thời gian	
	94°C	3 phút	
Biến tính	95°C	20 giây	35 chu kỳ
	55°C	2 phút	
Kéo dài	72°C	10 phút	

- ***Điện di và chụp ảnh sản phẩm PCR***

Chuẩn bị: Kích thước bản thạch, Thể tích và nồng độ gel, khối lượng gel cân cho một lần đổ? Các lưu ý khi đổ thạch (Low melting agarose)

- Nhỏ mẫu chứng chứng ở những vị trí nào trong bản thạch ? Điện di : ? μ l Sản phẩm PCR được trộn với ? μ l Loading Dye và chạy trên thạch Low melting agarose 2,5%, hiệu điện thế 125V trong 5-6 giờ. Marker được nhỏ vào 2 giếng đầu mút của bản gel.

- Bản thạch được ngâm với Ethyldium Bromide nồng độ 10 μ l/ml trong 15 phút, rửa và lắc nhẹ trong nước cất 20 phút trước khi chụp chụp ảnh.

- ***Phân tích và phiên giải kết quả***

Dựa vào hình ảnh chụp được dùng các phần mềm phân tích hoặc bằng mắt thường để so sánh các băng DNA giữa các chủng vi khuẩn và với chủng chuẩn từ đó xác định ribotype của từng chủng vi khuẩn.

- ***Xử lý mẫu, dụng cụ, chất thải***

Các tuýp chứa DNA và đầu côn hút DNA sau khi sử dụng, cho vào túi đựng rác thải y tế và vận chuyển về Khoa An toàn sinh học và quản lý chất lượng để xử lý.

Dung dịch nhuộm có chứa EtBr cũng như các vật dụng tiếp xúc với EtBr cần để riêng biệt và xử lý.

4. **Kỹ thuật xác định nồng độ ức chế tối thiểu MIC:**

- ***Mục đích:*** Nhằm xác định mức độ nhạy cảm kháng sinh của chủng *C.difficile* phân lập được.

- ***Phạm vi áp dụng:*** Thường qui này dùng cho phòng thí nghiệm Vi khuẩn kỵ khí – Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương

Kỹ thuật kháng sinh pha loãng trên thạch được thực hiện theo thường qui của CLSI 2010 sử dụng chủng quốc tế chuẩn *C.difficile* ATCC cho kiểm soát chất lượng.

- **Các từ viết tắt**

MIC : Minimum inhibitor Concentration

PTN: Phòng thí nghiệm

C.difficile: Vi khuẩn *Clostridium difficile*

Brucella HK : Môi trường Brucella có thành phần Hemin và Vitamin K

GAM HT : môi trường GAM có bổ xung 5% máu ngựa, hoặc máu cừu.

Control trước : Đĩa môi trường kiểm soát chất lượng trước thí nghiệm

Control sau : Đĩa kiểm soát chất lượng sau thí nghiệm

Control trước và control sau là những đĩa môi trường dùng để nuôi cấy vi khuẩn trước khi bắt đầu và sau khi kết thúc quá trình nuôi cấy vi khuẩn trên các đĩa có kháng sinh. Đĩa này có thành phần và thể tích tương đương với các đĩa làm MIC chỉ khác là không có kháng sinh.

- **An toàn**

Quy trình được thực hiện ở phòng thí nghiệm an toàn cấp 2. Các bước của quy trình thực hiện trong tủ an toàn sinh học cấp 2

- **Tiêu chuẩn kỹ thuật**

Kết quả MIC chỉ được xác nhận khi:

Giới hạn MIC của các chủng vi khuẩn chúng dương phải nằm trong khoảng cho phép theo tiêu chuẩn của CLSI

Chủng vi khuẩn phải thuần, không bị nhiễm với vi khuẩn khác.

Đĩa vi khuẩn kiểm soát chất lượng trước và sau thí nghiệm có nồng độ vi khuẩn tương đương nhau.

Mỗi chân trong bộ chấm có thể tích 10 μ l canh khuẩn, tương đương 10⁵ vi khuẩn/chủng.

Các chủng trên đĩa control có nồng độ tương đương 10^5 vi khuẩn. Chủng nào có nồng độ quá thấp sẽ không được ghi nhận kết quả và cần phải làm lại thí nghiệm.

- ***Nguyên vật liệu và trang thiết bị***

Môi trường thịt chín (CMM) tham khảo quy trình HDKT ...

Thạch GAM HT (Thạch GAM bổ xung 5% máu cừu hoặc máu ngựa và 5% SodiumTaurocholate)

Canh thang GAM

Thạch GAM H (Thạch GAM bổ xung 5% máu cừu hoặc máu ngựa)

Thạch Brucella HK 5% laked blood: Thạch Brucella bổ xung 5% máu cừu tan đông

Đệm TES. Dung dịch NaCl 0.9%.

Bột kháng sinh chuẩn

Bộ cấy vi khuẩn 32 chân + Khay inox 32 giếng.

Tủ an toàn sinh học cấp 2

Que cấy, Tăm bông, Que tre sấy vô trùng

Hộp ủ kỵ khí và tủ tạo kỵ khí, chỉ thị kỵ khí

- ***Chọn chủng làm MIC***

Nếu chủng lưu giữ trong môi trường CMM ở nhiệt độ phòng. Dùng que tre vô trùng phá vỡ các hạt thịt. Sau đó cấy 20 μ l canh thang CMM lên ½ đĩa thạch GAM HT. Ủ kỵ khí 37°C/48 giờ

Nếu chủng lưu giữ -80°C, dùng que cấy lấy môi trường giữ chủng cấy lên ½ đĩa thạch GAM HT. Ủ kỵ khí 37°C/48 giờ

- ***Thuần chủng và tăng sinh***

Kiểm tra các đĩa nuôi cấy ngày 1 xem vi khuẩn có thuần không? Có khuẩn lạc rời không? Sau đó chọn 1 khuẩn lạc rời và cấy chuyển lạc lên ¼ đĩa GAM. Ủ kỵ khí 37°C/48 giờ

- ***Định danh xác định lại chủng vi khuẩn và độc tố***

Kiểm tra tính thuần của vi khuẩn trên các đĩa nuôi cấy ngày 2 (đĩa $\frac{1}{4}$ GAM), sau đó cấy chuyển vài khuẩn lạc lên 1 ống canh thang GAM 2 – 3ml. Ủ kỵ khí 37°C/48 giờ.

Đồng thời tách DNA bằng phương pháp nhiệt. Sau đó, định danh xác định lại vi khuẩn và độc tố bằng phương pháp PCR đa môi cho vi khuẩn *C.difficile* với 2 gen sinh độc tố TcdtA, TcdtB và gen đặc hiệu loại tpi (tham khảo qui trình PCR đa môi trong). Chỉ có các chủng *C.difficile* sinh độc tố loại A+B+ hoặc A-B+ mới được chọn làm MIC.

- ***Pha nồng độ kháng sinh gốc***

- ***Pha nồng độ kháng sinh trung gian:***

Sử dụng phiếu “Pha loãng kháng sinh” khi pha kháng sinh nồng độ trung gian và nồng độ cuối để kiểm soát số bậc kháng sinh, nồng độ trung gian, nồng độ cuối.

- ***Pha kháng sinh nồng độ cuối (Chuyển kháng sinh ra đĩa và đổ thạch)***

Ghi tên kháng sinh và nồng độ viết tắt lên nắp đĩa petri theo thứ tự từ bậc 1 đến bậc cuối cùng.

- ***Xác định MIC bằng phương pháp trên thạch***

- ***Đọc kết quả và phân tích kết quả***

Đọc kết quả MIC sau 44– 48 giờ nuôi cấy kỵ khí ở 37°C.

Kết quả ghi vào “Phiếu đọc kết quả MIC”

Kết quả MIC được đọc từ nồng độ thấp đến nồng độ cao.

Ở nồng độ nào vi khuẩn còn mọc nồng độ tương đương 10^5 vi khuẩn thì đọc là dương, ghi dấu (+).

Ở nồng độ nào, lượng vi khuẩn giảm rõ rệt so với control, đọc kết quả cộng trừ, ghi dấu (+/-).

Ở nồng độ nào không còn vi khuẩn mọc đọc là âm, ghi dấu (-)

Phân tích kết quả.

Phụ lục 4:

Trang thiết bị và dụng cụ sử dụng trong nghiên cứu

Trang thiết bị	Hãng sản xuất
Tủ an toàn sinh học cấp II	Esco
Tủ sạch Clean Beach	Esco
Tủ âm	Sanyo
Máy khuếch đại gen	ABI, Eppendorf
Bể và nguồn điện di	Enduro TM
Máy soi chụp gel	Eppendorf
Hệ thống phân tích di truyền 3500	ABI, Eppendorf
Máy đo mật độ AND	Eppendorf
Máy ly tâm	Eppendorf
Nồi hấp ưót tiệt trùng	Hirayama
Kính hiển vi quang học	Olympus
Tủ lạnh 4°C	Panasonic
Tủ lạnh -20°C	Sanyo
Tủ lạnh -80°C	Hitachi

Dụng cụ và vật tư tiêu hao: hộp đựng mẫu phân, tube Eppendorf, đầu côn có fill lọc, găng dùng 1 lần, giấy chỉ thị kỵ khí của hãng BD, túi ủ kỵ khí Gaspak EZ của hãng BD, que trải bệnh phẩm inox, pipet, bộ nhuộm Gram và các dụng cụ cần thiết khác