

NGHIÊN CỨU CÁC ĐỘT BIẾN ĐIỂM VỊ TRÍ 2142 VÀ 2143 TRÊN GENE 23S rRNA CỦA *HELICOBACTER PYLORI* Ở BỆNH NHÂN VIÊM DẠ DÀY MẠN

Hà Thị Minh Thi, Trần Văn Huy, Nguyễn Viết Nhân,
Nguyễn Thanh Hoa, Lê Phan Tường Quỳnh
Trường Đại học Y Dược Huế

Tóm tắt:

Đặt vấn đề: Nguyên nhân chủ yếu của đề kháng clarithromycin được biết là do đột biến điểm vị trí 2142 và 2143 gene 23S rRNA của vi khuẩn *Helicobacter pylori*. Mục tiêu: (1) Xác định tỉ lệ các đột biến A2142G, A2143G và A2142C của gene 23S rRNA ở *H. pylori* trên bệnh nhân viêm dạ dày mạn bằng kỹ thuật PCR-RFLP; (2) Khảo sát mối liên quan giữa các đột biến này với một số đặc điểm lâm sàng, nội soi và mô bệnh học của bệnh nhân viêm dạ dày mạn. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** 226 bệnh nhân được chẩn đoán xác định viêm dạ dày mạn có nhiễm *H. pylori* được xác định các đột biến A2142G, A2143G và A2142C bằng kỹ thuật PCR-RFLP trên các mẫu DNA chiết tách từ mẫu mô sinh thiết niêm mạc dạ dày. **Kết quả:** Tỷ lệ đột biến điểm vị trí 2142 và 2143 gene 23S rRNA của vi khuẩn *H. pylori* ở bệnh nhân viêm dạ dày mạn là 35,4%; trong đó đột biến A2143G chiếm 92,5% và đột biến A2142G chiếm 7,5%; không có đột biến A2142C. Các đột biến này không liên quan với tuổi, giới, vị trí viêm và tình trạng viêm teo. Tỷ lệ đột biến A2143G trong nhóm có tiền sử sử dụng clarithromycin là 44,9%, trong khi tỷ lệ này ở nhóm không có tiền sử sử dụng clarithromycin là 24,8% ($p = 0,0065$). Đột biến A2142G liên quan với tình trạng dị sản ruột – loạn sản. **Kết luận:** Các đột biến điểm vị trí 2142 và 2143 gene 23S rRNA của *H. pylori* chiếm tỷ lệ cao, trong đó hầu hết là đột biến A2143G. Đột biến A2143G có liên quan với tiền sử sử dụng clarithromycin.

Từ khóa: gene 23S rRNA, *Helicobacter pylori*, đột biến A2143G, A2142G, A2142C, đề kháng clarithromycin, viêm dạ dày mạn.

Abstract

STUDY ON POINT MUTATIONS AT POSITIONS 2142 AND 2143 IN 23S rRNA GENE OF *HELICOBACTER PYLORI* AMONG PATIENTS WITH CHRONIC GASTRITIS

*Ha Thi Minh Thi, Tran Van Huy, Nguyen Viet Nhan,
Nguyen Thanh Hoa, Le Phan Tuong Quynh
Hue University of Medicine and Pharmacy*

Background: Clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* has been found to be associated with point mutations at positions 2142 and 2143 in 23SrRNA gene. The Aims: (1) to determine the rates of point mutations A2143G, A2142G and A2142C in 23SrRNA gene of *H. pylori* among patients with chronic gastritis by PCR-RFLP technique; and (2) to assess the association between these mutations and some clinical, endoscopic and histopathological characteristics of chronic gastritis. **Patients and methods:** Two hundreds and twenty six patients with *H. pylori*-positive chronic gastritis were determined A2143G, A2142G and A2142C mutations by PCR-RFLP technique with DNA extracted from endoscopic biopsy specimens of gastric mucosa. **Results:** The rate of point mutations at positions 2142 and 2143 in 23S rRNA gene of *H. pylori* was 35.4% in total, the A2143G and A2142G mutations accounted for 92.5% and 7.5% of all point mutations, respectively. No A2142C mutation was found. These mutations were not associated with age, gender, distribution of gastritis, and the presence of atrophic gastritis. The rate of A2143G mutation in groups with and without a history of clarithromycin treatment were 44.9% and 24.8%, respectively ($p = 0.0065$). The A2142G mutation was associated with intestinal metaplasia and/or dysplasia. **Conclusion:** The point mutations at positions 2142 and 2143 in 23S rRNA gene were found

DOI: 10.34071/jmp.2015.6.2

at a high rate in *H. pylori* strains among patients with chronic gastritis, with the absolute predominance of A2143G mutation. The A2143G mutation was associated with a history of clarithromycin treatment. **Key words:** 23S rRNA gene, *Helicobacter pylori*, A2143G, A2142G, A2142C mutation, clarithromycin resistance, chronic gastritis.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Viêm dạ dày mạn (VDDM) là bệnh lý rất thường gặp trên thế giới, chiếm tỷ lệ trung bình khoảng 35 – 45% trong tổng số các bệnh lý dạ dày – tá tràng [1]. Đồng thuận Maastricht lần IV vào năm 2012 đã ghi nhận viêm dạ dày mạn do *Helicobacter pylori* là nguyên nhân quan trọng nhất gây ung thư dạ dày [17]. Vì vậy, việc điều trị triệt căn *Helicobacter pylori* ở bệnh nhân viêm dạ dày mạn là điều kiện tiên quyết để ngăn ngừa ung thư dạ dày.

Clarithromycin (CLA) là một trong những kháng sinh được lựa chọn trong phác đồ điều trị triệt trừ *Helicobacter pylori* [4], [16], [17]. Tuy nhiên, hiện nay tình trạng đề kháng kháng sinh clarithromycin của *Helicobacter pylori* ngày càng cao. Ở Nhật Bản năm 2003 tỷ lệ đề kháng clarithromycin là 23,5% nhưng đến năm 2007 tỷ lệ này lên đến 79,8% [13], [23]; hay ở Iran năm 2008 là 22,6% nhưng đến năm 2011 là 31,7% [7], [13].

Năm 1996, Versalovic tìm thấy hai đột biến A2142G, A2143G trên gene 23S rRNA có liên quan đến đề kháng clarithromycin của *Helicobacter pylori*, từ đây mở ra triển vọng ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử trong việc chẩn đoán đề kháng clarithromycin. Về sau nhiều đột biến khác cũng được phát hiện, tuy nhiên ba đột biến A2142G, A2143G và A2142C là thường gặp nhất, chiếm hơn 90% các loại đột biến có liên quan đến tình trạng đề kháng clarithromycin của *Helicobacter pylori*. Có nhiều phương pháp sinh học phân tử đã được sử dụng để phát hiện được các đột biến này, trong đó PCR-RFLP là một phương pháp đơn giản nhưng có khả năng xác định được các đột biến chính xác, cho kết quả nhanh, giá thành vừa phải, có thể thực hiện ở các phòng thí nghiệm sinh học phân tử cơ bản và được nhiều nhà nghiên cứu sử dụng để khảo sát các đột biến trên gene 23S rRNA. Cho đến nay đã có nhiều công trình nghiên cứu về đề kháng clarithromycin của *Helicobacter pylori*, tuy nhiên ở mức độ phân tử thì ở Việt Nam còn rất ít. Để giúp cho việc phát hiện nhanh và chính xác đề kháng clarithromycin của *Helicobacter pylori* ở bệnh nhân viêm dạ dày mạn từ đó chọn các phác đồ điều trị hiệu quả. Chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm các mục tiêu sau:

1. Xác định tỉ lệ các đột biến A2142G, A2143G và A2142C của gene 23S rRNA ở *Helicobacter*

pylori trên bệnh nhân viêm dạ dày mạn bằng kỹ thuật PCR-RFLP.

2. Khảo sát mối liên quan giữa các đột biến này với một số đặc điểm lâm sàng, nội soi và mô bệnh học của bệnh nhân viêm dạ dày mạn.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu gồm 226 bệnh nhân được chẩn đoán xác định viêm dạ dày mạn có nhiễm *Helicobacter pylori*. Các bệnh nhân này có địa chỉ cư trú ở ba tỉnh miền Trung là Thừa Thiên Huế, Quảng Bình và Quảng Trị.

- Tiêu chuẩn chọn bệnh: Có đầy đủ các tiêu chuẩn sau

+ Nội soi có hình ảnh tổn thương viêm dạ dày và kết quả mô bệnh học xác định có viêm dạ dày mạn theo phân loại Sydney cải tiến.

+ Có kết quả test nhanh urease dương tính (CLO test).

+ Có kết quả xác định lại nhiễm *H. pylori* bằng kỹ thuật PCR.

- Tiêu chuẩn loại trừ: những trường hợp có điều trị triệt trừ *Helicobacter pylori* trong vòng 4 tuần; DNA chiết tách từ mẫu mô sinh thiết không đạt số lượng và chất lượng để thực hiện các kỹ thuật về phân tích gene.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả cắt ngang

2.2.1. Phương pháp thu thập mẫu nghiên cứu

Thu thập mẫu nghiên cứu tại Trung tâm Nội Soi tiêu hóa, bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế. Các bệnh nhân đến Nội soi dạ dày có thương tổn viêm dạ dày được sinh thiết niêm mạc dạ dày gồm hai mảnh tại hai vị trí hang vị và thân vị để khảo sát nhiễm *H. pylori* và sau đó sẽ xác định đột biến gene đề kháng clarithromycin; một đến hai mảnh tại vị trí tổn thương đích (tùy theo tổn thương nằm ở hang vị đơn độc, thân vị đơn độc, hay ở cả hai vị trí) gửi khoa Giải phẫu bệnh để làm xét nghiệm mô bệnh học.

Tiến hành thử test nhanh urease ngay tại phòng Nội soi để xác định sơ bộ có nhiễm *H. pylori*. Các mẫu sinh thiết niêm mạc dạ dày sau đó được lưu trữ trong dung dịch TE ở -20°C tại bộ môn Di truyền Y học, Trường Đại học Y Dược Huế.

2.2.2. Biến số nghiên cứu

- Giới: Nam, nữ
- Tuổi: dưới 40 tuổi, từ 40 tuổi trở lên
- Tiền sử sử dụng kháng sinh clarithromycin: có, không, không biết
- Vị trí viêm dạ dày: hang vị đơn độc, thân vị đơn độc, cả hai
- Viêm teo: được xác định dựa vào kết quả mô bệnh học
- Dị sản ruột – loạn sản: dựa vào kết quả mô bệnh học
- Đột biến A2143G, A2142G và A2142C

2.2.3. Phương pháp tách chiết DNA từ mẫu mô sinh thiết niêm mạc dạ dày

Tách chiết DNA từ các mảnh sinh thiết niêm mạc dạ dày theo protocol chuẩn của kit Wizard Genomic DNA purification (Promega). DNA sau khi tách chiết được đo nồng độ và đánh giá tỷ số A260/280 trên máy Nanodrop, rồi pha loãng ở nồng độ 100 ng/μl.

2.2.4. Phương pháp xác định nhiễm *H. pylori* bằng kỹ thuật PCR

Cặp mồi đặc hiệu gene ureC (glmM) của *H. pylori*, do Brisou thiết kế và Bickley mô tả lại [9] với trình tự mồi:

ureC-F:

5'-AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-3'

ureC-R:5'-

AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC-3'

Thành phần phản ứng gồm 12,5 μl GoTaq Green MasterMix (Promega), 10 pmol mỗi mồi, 100 ng DNA khuôn mẫu và nước cất cho đủ 25 μl. Có thực hiện kèm ống chứng dương và chứng âm. Điều kiện nhiệt độ: biến tính ban đầu 95°C, 5 phút; 30 chu kỳ 95°C 1 phút, 55°C 1 phút, 72°C 1 phút; kéo dài cuối cùng 72°C 8 phút. Thực hiện trên máy Applied Biosystems 2720.

Thể tích mỗi phản ứng cất là 15 μl, gồm các thành phần sau đây:

Bảng 2.1. Thành phần tham gia phản ứng cất

Thành phần phản ứng	Xác định đột biến A2142G	Xác định đột biến A2143G	Xác định đột biến A2142C
Dung dịch đệm 10X	1,5 μl	1,5 μl	1,5 μl
Enzyme cắt	10 U <i>Bbs</i> I	10 U <i>Bsa</i> I	1 U <i>Bce</i> AI
Sản phẩm PCR	5 μl	5 μl	5 μl
Nước cất	Thêm đủ 15 μl	Thêm đủ 15 μl	Thêm đủ 15 μl

Ủ 37°C trong bể ổn nhiệt, thời gian 24 giờ.

Điện di sản phẩm cắt trên gel agarose 2,5% có bổ sung Red view, điện thế 80 V, thời gian 1 giờ 20 phút. Đọc hình ảnh điện di dưới đèn cực tím.

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% có bổ sung Red view (thuốc nhuộm DNA), điện thế 80V, 30 phút, kèm thang chuẩn 100 bp. Xem hình ảnh điện di dưới đèn cực tím. Kích thước sản phẩm là 294 bp.

Đọc kết quả như sau:

- Có sản phẩm PCR: nhiễm *H. pylori*
- Không có sản phẩm PCR: không nhiễm *H. pylori*

2.2.5. Phương pháp xác định các đột biến vị trí 2142 và 2143 bằng kỹ thuật PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism)

Bước 1: Thực hiện PCR khuếch đại đoạn gene 23S rRNA có chứa vị trí 2142 và 2143.

Cặp mồi được mô tả bởi Ménard (2002)[19].

Trình tự mồi như sau:

HPY-S:

5'-AGGTTAAGAGGATGCGTCAGTC-3'

HPY-A:

5'-CGCATGATATTCCCATTAGCAGT-3'

Thành phần phản ứng gồm 25 μl GoTaq Green MasterMix (Promega), 20 pmol mỗi mồi, 200 ng DNA khuôn mẫu và nước cất cho đủ 50 μl. Điều kiện luân nhiệt: 95°C trong 5 phút; tiếp theo là 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm: giai đoạn biến tính 94°C trong 1 phút, giai đoạn gắn mồi 52°C trong 1 phút, giai đoạn kéo dài mồi 72°C trong 1 phút; cuối cùng thêm 72°C trong 10 phút. Thực hiện trên máy Applied Biosystems 2720.

Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1% có bổ sung Red view, điện thế 80V, 30 phút, kèm thang chuẩn 100 bp. Đọc hình ảnh điện di dưới đèn cực tím. Kích thước sản phẩm là 267 bp.

Bước 2: Thực hiện phản ứng cắt sản phẩm PCR bằng các enzyme *Bbs*I, *Bsa*I (Thermo Scientific và *Bce*AI (BioLab)

Đọc kết quả dựa vào sự xuất hiện của các băng tương ứng với các sản phẩm cắt trên gel điện di như sau:

Bảng 2.2. Sản phẩm sau khi cắt bằng các enzyme *BbsI*, *BbaI*, và *BceAI*

Băng DNA	Sản phẩm sau khi cắt bằng <i>BbsI</i>		Sản phẩm sau khi cắt bằng <i>BsaI</i>		Sản phẩm sau khi cắt bằng <i>BceAI</i>	
	Không đột biến	Đột biến A2142G	Không đột biến	Đột biến A2143G	Không đột biến	Đột biến A2142C
Số băng	1	2	1	2	3	4
Kích thước băng	267 bp	219 bp 48bp	267 bp	207 bp 60bp	195 bp 48 bp 24 bp	153 bp 48 bp 42 bp 24 bp

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Một số đặc điểm của nhóm nghiên cứu

Bảng 3.1. Đặc điểm của nhóm nghiên cứu

Đặc điểm	Số lượng	Tỷ lệ %	p
<i>Giới</i>			
Nam	106	46,9	> 0,05
Nữ	120	53,1	
<i>Tuổi</i>			
Dưới 40 tuổi	144	63,7	< 0,0001
Từ 40 tuổi trở lên	82	36,3	
<i>Tiền sử sử dụng clarithromycin</i>			
Có ⁽¹⁾	78	34,5	So sánh (1) và (2) < 0,05
Không ⁽²⁾	109	48,2	
Không biết	39	17,3	
<i>Vị trí viêm</i>			
Hang vị đơn độc	109	48,2	< 0,0001
Thân vị đơn độc	10	4,4	
Cả hai	107	47,4	
<i>Viêm teo</i>			
Có	70	31,0	< 0,0001
Không	156	69,0	
<i>Dị sản ruột – Loạn sản</i>			
Có	53	23,5	< 0,0001
Không	173	76,5	
Tổng	226	100,0	

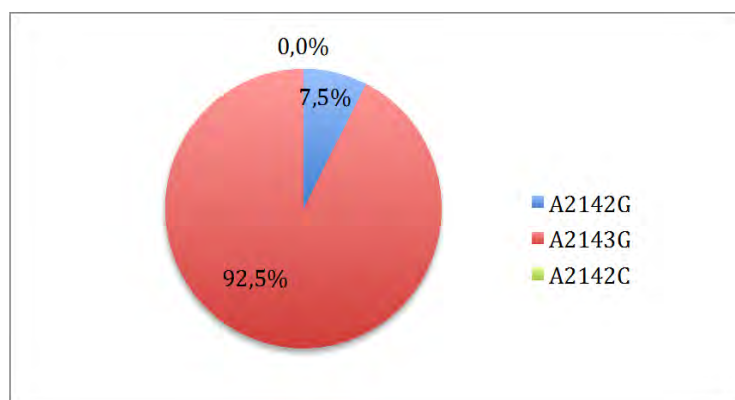
Nhận xét: Tỷ lệ nam nữ trong nhóm nghiên cứu tương đương nhau. Phần lớn các bệnh nhân VDDM là trẻ tuổi, dưới 40 tuổi chiếm 63,7%. Tiền sử có sử dụng kháng sinh clarithromycin là 34,5%. Chỉ có 4,4% bệnh nhân viêm thân vị đơn độc, còn lại phần lớn đều có viêm hang vị (hoặc đơn độc, hoặc phối hợp với viêm thân vị). Có 31% có tình trạng viêm teo và 23,5% có dị sản ruột và/hoặc loạn sản ruột.

3.2. Tỷ lệ các đột biến điểm vị trí 2142 và 2143 trên gene 23S rRNA của *H. pylori*

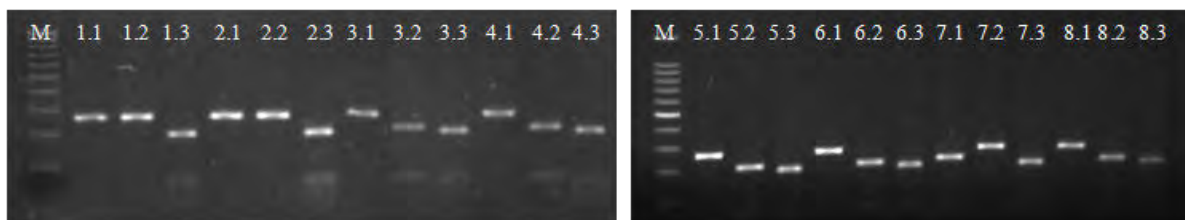
Bảng 3.2. Tỷ lệ các đột biến A2142G, A2143G và A2142C

Đột biến	Số lượng	Tỷ lệ %
<i>Có đột biến</i>	80	35,4
A2142G	6	2,7
A2143G	74	32,7
A2142C	0	0,0
A2142G + A2143G	0	0,0
<i>Không đột biến</i>	146	64,6
Tổng	226	100,0

Nhận xét: Tỷ lệ có đột biến vị trí 2142 và 2143 trên gene 23S rRNA của *H. pylori* là 35,4%.



Hình 3.1. Phân bố của các loại đột biến điểm vị trí 2142 và 2143 gene 23S rRNA
Nhận xét: Đột biến A2143G chiếm đa số, 92,5% trong số các đột biến điểm vị trí 2142 và 2143.
 Đột biến A2142G chiếm 7,5%. Không có đột biến A2142C.



M: Thang chuẩn 100bp. Các cột i.1; i.2; i.3 (i=1,2,...,8) là hình ảnh điện di sản phẩm cắt lần lượt với các enzyme BbsI, BceI, BceAI của mẫu i. Mẫu số 1 và 2: không đột biến. Mẫu 3, 4, 5, 6 và 8 mang đột biến A2143G. Mẫu 7 mang đột biến A2142G

Hình 3.2. Kết quả điện di sản phẩm phản ứng cắt chẩn đoán các đột biến vị trí 2142 và 2143 gene 23S rRNA của *Helicobacter pylori*

3.3. Mối liên quan của các đột biến điểm vị trí 2142 và 2143 trên gene 23S rRNA của *H. pylori* với một số đặc điểm bệnh nhân viêm dạ dày mạn

Bảng 3.3. Tỷ lệ đột biến A2143G và A2142G theo một số đặc điểm của VDDM

Đặc điểm	N	Đột biến A2143G			Đột biến A2142G		
		n	%	p	n	%	p
<i>Giới</i>							
Nam	106	33	31,1	> 0,05	2	1,9	>0,05
Nữ	120	41	34,2		4	3,3	
<i>Tuổi</i>							
Dưới 40 tuổi	144	52	36,1	> 0,05	4	2,8	> 0,05
Từ 40 tuổi trở lên	82	22	26,8		2	2,4	
<i>Tiền sử sử dụng CLA</i>							
Có ⁽¹⁾	78	35	44,9	So sánh (1) và (2) 0,0065	2	2,6	So sánh (1) và (2) > 0,05
Không ⁽²⁾	109	27	24,8		4	3,7	
Không biết	39	12	30,8		0	0,0	
<i>Vị trí viêm</i>							
Hang vị đơn độc	109	34	31,2	> 0,05	4	3,7	> 0,05
Thân vị đơn độc	10	2	20,0		0	0,0	
Cả hai	107	38	35,5		2	1,9	
<i>Viêm teo</i>							
Có	70	23	32,9	> 0,05	2	2,9	> 0,05
Không	156	51	32,7		4	2,6	
<i>Dị sản ruột – Loạn sản</i>							
Có	53	17	32,1	> 0,05	4	7,5	0,0282
Không	173	57	32,9		2	1,2	
Tổng	226	74	32,7		6	2,7	

Nhận xét: Không có mối liên quan giữa đột biến A2143G cũng như đột biến A2142G với tuổi, giới, vị trí viêm, tình trạng viêm teo. Đột biến A2143G có liên quan với tiền sử sử dụng kháng sinh clarithromycin. Đột biến A2142G có liên quan với dị sản ruột – loạn sản.

4. BÀN LUẬN

4.1. Một số đặc điểm của nhóm nghiên cứu

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã khảo sát 226 bệnh nhân viêm dạ dày mạn có nhiễm *Helicobacter pylori*, được chẩn đoán bằng test nhanh urease và kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu gene ureC. Sự khác biệt về tỷ lệ hai giới nam và nữ trong nhóm nghiên cứu này không có ý nghĩa thống kê. Độ tuổi trong nhóm các bệnh nhân VDDM này khá trẻ, dưới 40 tuổi chiếm đến 63,7%, cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm từ 40 tuổi trở lên. Tỷ lệ có tiền sử sử dụng kháng sinh clarithromycin là 34,5%, trong khi nhóm không sử dụng chiếm tỷ lệ 48,2%. Phần lớn các bệnh nhân đều có tổn thương viêm ở hang vị, chỉ có 4,4% bệnh nhân viêm thân vị đơn độc. Điều này phù hợp với cơ chế bệnh sinh VDDM do *H. pylori*, hang vị chính là nơi cư trú đầu tiên của vi khuẩn này khi xâm nhập vào cơ thể vật chủ. Viêm teo chiếm tỷ lệ 31%. Đặc biệt có 23,5% trường hợp có dị sản ruột và/hoặc loạn sản ruột, đây là những tổn thương tiền ung thư và vì vậy cần được theo dõi sát để phát hiện ung thư giai đoạn sớm.

4.2. Tỷ lệ các đột biến điểm vị trí 2142 và 2143 trên gene 23S rRNA của *H. pylori*

Chúng tôi đã khảo sát các đột biến điểm vị trí 2142 và 2143 trên gene 23S rRNA của vi khuẩn *Helicobacter pylori* ở 226 bệnh nhân viêm dạ dày mạn. Những đột biến A2142G, A2143G và A2142C được xem là chịu trách nhiệm trong hơn 90% các trường hợp đề kháng kháng sinh clarithromycin [11], các đột biến ở vị trí khác của domain V gene 23S rRNA cũng đã được một số tác giả công bố, tuy nhiên vai trò trong đề kháng clarithromycin vẫn đang còn tranh cãi. Từ khi cơ chế bệnh sinh phân tử của đề kháng clarithromycin ở *H. pylori* được sáng tỏ, các kỹ thuật sinh học phân tử đang dần dần đóng vai trò quan trọng trong việc chẩn đoán đề kháng này để hỗ trợ cho bác sĩ lâm sàng quyết định lựa chọn phác đồ điều trị diệt trừ *H. pylori* thích hợp, nhằm đảm bảo hai yếu tố quan trọng là kịp thời và hiệu quả. So với phương pháp chẩn đoán đề kháng truyền thống là dựa trên kiểu hình thông qua nuôi cấy vi khuẩn và làm kháng sinh đồ thì các phương pháp sinh học phân tử chẩn đoán dựa trên xác định kiểu gene

đột biến liên quan tính đề kháng có nhiều ưu điểm hơn như: thời gian có kết quả nhanh, quy trình chẩn đoán dễ chuẩn hóa và có tính tương đồng giữa các phòng xét nghiệm, hơn nữa giá thành cũng phù hợp. Trong khi đó, các kỹ thuật nuôi cấy làm kháng sinh đồ thường đòi hỏi nhiều thời gian hơn, tỷ lệ nuôi cấy thành công tùy thuộc vào từng phòng xét nghiệm.

Có nhiều kỹ thuật sinh học phân tử đã được sử dụng để phát hiện ba loại đột biến điểm A2142G, A2143G và A2142C. Phần lớn đó là các kỹ thuật dựa trên PCR, như PCR-DNA enzyme immunoassay (PCR-DEIA), PCR-Line probe assay (PCR-LiPA) và Realtime PCR. Tuy nhiên, theo Menard các kỹ thuật này chưa thể hiện được vai trò ưu việt trong việc phân biệt ba loại đột biến này [19], hơn nữa các probe để thực hiện các kỹ thuật này có giá thành khá cao. Từ khi phát hiện mối liên quan của các đột biến A2142G và A2143G với đề kháng clarithromycin của *H. pylori* vào năm 1996 thì Versalovic [26] và sau đó là Occhialini [20] cũng đã sử dụng các enzyme BbsI và BsaI để xác định hai đột biến này bằng kỹ thuật PCR-RFLP. Sau đó, đến năm 2002, Menard đã sử dụng thêm enzyme BceAI để xác định đột biến A2142C. Cho đến nay, kỹ thuật PCR-RFLP vẫn là một kỹ thuật sinh học phân tử đơn giản nhưng rất hiệu quả trong việc xác định các đột biến điểm có liên quan đến vị trí nhận biết và cắt của các loại enzyme cắt hạn chế (Restriction endonuclease).

Bằng việc ứng dụng kỹ thuật PCR-RFLP theo quy trình được mô tả bởi Menard [19] năm 2002, chúng tôi đã xác định được 80 trường hợp bị nhiễm *H. pylori* mang gene 23S rRNA có đột biến vị trí 2142 và 2143 trên domain V, tỷ lệ đột biến trong nhóm nghiên cứu gồm 226 bệnh nhân VDDM của chúng tôi là 35,4% (bảng 3.2). Các bệnh nhân của chúng tôi có địa chỉ cư trú ở ba tỉnh miền Trung là Thừa Thiên Huế, Quảng Bình, Quảng Trị. Theo Đồng thuận Maastricht IV, tỷ lệ đề kháng trong cộng đồng từ 15 – 20% được khuyến cáo là ngưỡng để phân vùng dân cư đó vào khu vực đề kháng cao hay thấp đối với clarithromycin. Như vậy, khu vực ba tỉnh chúng tôi nghiên cứu đang thuộc vùng đề kháng cao. Trong một nghiên cứu được thực hiện cùng thời điểm với nghiên cứu này trên 64 bệnh nhân VDDM ở Quảng Ngãi, Phạm Ngọc Doanh và chúng tôi đã phát hiện tỷ lệ mang đột biến điểm tại vị trí 2142 và 2143 gene 23S rRNA là 64% [2], cao hơn có ý nghĩa thống kê so với tỷ lệ đột biến trong nhóm bệnh nhân VDDM của nghiên cứu này ($p < 0,001$). Một nghiên cứu trên 188 bệnh nhân loét dạ dày – tá

tràng của Nguyễn Thúy Vinh (2015) ở Hà Nội có tỷ lệ đột biến là 36,7% [6], không có sự khác biệt so với nghiên cứu của chúng tôi. So sánh với các nghiên cứu trên thế giới, tỷ lệ đột biến trong nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với các nghiên cứu của Abdollahi (Iran, 2011) với tỷ lệ đột biến điểm vị trí 2142 và 2143 gene rRNA được xác định bằng kỹ thuật PCR-RFLP là 31,7% ($n = 63$, $p > 0,05$) [7], nghiên cứu của Agudo (Tây Ban Nha, 2010) có tỷ lệ đột biến điểm vị trí 2142 và 2143 gene rRNA được xác định bằng kỹ thuật giải trình tự là 27,1% ($n = 118$, $p > 0,05$) [8]. Trong khi đó, nghiên cứu của Ho (Mã Lai, 2010) thực hiện PCR-RFLP trên 105 bệnh nhân bệnh lý dạ dày – tá tràng, cho thấy tỷ lệ các đột biến trên rất thấp, chỉ 2,9% [12]. Ngược lại, nghiên cứu của Yamade (Nhật Bản, 2011) sử dụng kỹ thuật PCR đặc hiệu allele và xác định tỷ lệ đột biến A2143G và A2142G lên đến 55,1% ($n = 153$) [27], cao hơn có ý nghĩa thống kê so với chúng tôi.

Trong số 80 đột biến vị trí 2142 và 2143 được chúng tôi phát hiện, không có trường hợp nào mang đột biến A2142C. Kết quả ở biểu đồ 3.1 cho thấy đột biến A2143G chiếm đa số với tỷ lệ 92,5%; còn lại là đột biến A2142G, chiếm tỷ lệ 7,5%. Nhìn chung, hầu hết các nghiên cứu trên thế giới đều cho thấy đột biến A2143G chiếm đa số. Nghiên cứu của Agudo ở trên phát hiện 32 mẫu mang đột biến, trong đó có 29 mẫu mang đột biến A2143G chiếm 90,6%; 3 mẫu mang đột biến A2142G chiếm 9,4% và không có trường hợp nào mang đột biến A2142C [8]. Sự phân bố các đột biến vị trí 2142 và 2143 trong nghiên cứu của chúng tôi và của tác giả Agudo là tương tự nhau, $p > 0,05$. Cho đến nay, các nghiên cứu trên mẫu sinh thiết niêm mạc bệnh nhân bệnh lý dạ dày – tá tràng ở Việt Nam đều không phát hiện trường hợp nào mang đột biến A2142C, còn đột biến A2142G chiếm tỷ lệ cũng rất thấp, cho dù thực hiện kỹ thuật PCR – RFLP hay giải trình tự, như các nghiên cứu của Nguyễn Thúy Vinh (Hà Nội, 2015) [6], Hồ Đăng Quý Dũng (TP Hồ Chí Minh và Hà Nội, 2014) [3], Trần Thiện Trung (TP Hồ Chí Minh, 2014) [5]. Hầu hết các nghiên cứu của châu Á cũng có nhận định tương tự như nghiên cứu của Kim (Hàn Quốc, 2008) [14], Zhu (Trung Quốc, 2013) [28], Matsuoka (Nhật Bản, 1999) [18]. Chúng tôi nhận thấy, đột biến A2142C hầu như chỉ xuất hiện với tần suất rất thấp, một vài phần trăm, và chủ yếu cũng chỉ ở các quần thể người da trắng, như nghiên cứu của Russman ở Đức (2001, $n = 34$) có 6% đột biến A2142C [24], nghiên cứu của Raymond ở Pháp (2008, $n = 530$)

có 5 trường hợp đột biến A2142C chiếm 0,9% [22], nghiên cứu của Toracchio ở Ý (2004) cho thấy trong 73 trường hợp đề kháng clarithromycin có 4 trường hợp mang đột biến A2142C [25]. Do đó, chúng tôi cho rằng trong thực tế lâm sàng chỉ cần thực hiện kỹ thuật PCR-RFLP với hai enzyme BbsI và BsaI để xác định đột biến A2142G và A2143G nhằm giảm chi phí cho bệnh nhân vì enzyme BceAI được dùng để cắt sản phẩm PCR trong việc phát hiện đột biến A2142C có giá thành khá cao.

4.3. Mối liên quan của các đột biến điểm vị trí 2142 và 2143 trên gene 23S rRNA của *H. pylori* với một số đặc điểm bệnh nhân viêm dạ dày mạn

Chúng tôi đã khảo sát mối liên quan của các đột biến A2143G và A2142G với một số đặc điểm của bệnh nhân VDDM (bảng 3.3) và nhận thấy các đột biến này không có liên quan với tuổi, giới, tình trạng viêm teo cũng như vị trí viêm. Trong khi đó, tiền sử sử dụng kháng sinh clarithromycin thì có liên quan với đột biến A2143G và tình trạng dị sản ruột-loạn sản có liên quan với đột biến A2142G.

Tỷ lệ đột biến A2143G trong nhóm có tiền sử sử dụng clarithromycin là 44,9%, trong khi tỷ lệ này ở nhóm không có tiền sử sử dụng clarithromycin là 24,8%, với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p = 0,0065$). Kết quả của chúng tôi cũng phù hợp với nhận định của Liu trong nghiên cứu ở Trung Quốc năm 2008, với tỷ lệ đột biến A2143G trong nhóm có và không có tiền sử điều trị với clarithromycin lần lượt là 31,7% và 10,2%, $p < 0,05$ [15]. Một nghiên cứu của Aldana (Nhật Bản, 2002) đã cho thấy tần suất đề kháng clarithromycin tăng có ý nghĩa thống kê theo thời gian, từ 7% vào năm 1997-1998 lên đến 15,2% vào năm 1999-2000, đồng thời tác giả nhận định nguyên nhân là do sự tiêu thụ kháng sinh clarithromycin [21]. Trong nghiên cứu của Agudo ở Tây Ban Nha (2010), tác giả cũng đã nhận định nguyên nhân gây nên tần suất đề kháng clarithromycin của *H. pylori* (trong đó có 85,3% mang đột biến A2143G) gia tăng ở trẻ em là do từ năm 1991 các kháng sinh macrolide thế hệ mới, bao gồm cả clarithromycin được sử dụng nhiều để điều trị nhiễm trùng hô hấp cho trẻ [8].

Dị sản ruột và loạn sản là những thương tổn tiền ung thư. Trong nghiên cứu của chúng tôi các thương tổn này không có mối liên quan với đột biến A2143G nhưng có liên quan với đột biến A2142G. Tỷ lệ đột biến A2142G trong nhóm có dị sản ruột – loạn sản là 7,5%, cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm không có các thương tổn này là 1,2%, với $p = 0,0282$ (Bảng 3.3). Như

vậy, đột biến này có thể có liên quan với những chủng *H. pylori* mang độc lực. Một nghiên cứu của Boyanova (Bulgaria, 2015) cho thấy đột biến A2142G có liên quan với các chủng có độc lực mang gene *vacA* i1, trong khi đột biến A2143G có liên quan với các chủng ít độc lực mang gene *vacA* i2 [10].

Tóm lại, tỷ lệ đột biến điểm vị trí 2142 và 2143 gene 23S rRNA của vi khuẩn *H. pylori* ở bệnh nhân VDDM trong nghiên cứu của chúng tôi khá cao cho thấy khu vực các tỉnh miền Trung thuộc vùng đề kháng cao với clarithromycin. Đột biến A2143G có liên quan với tiền sử sử dụng kháng sinh và đột biến A2142G có liên quan với tình trạng dị sản ruột – loạn sản.

5. KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu các đột biến điểm vị trí 2142 và 2143 gene 23S rRNA liên quan kháng clarithromycin của vi khuẩn *H. pylori* ở 226 bệnh nhân viêm dạ dày mạn bằng kỹ thuật PCR - RFLP, chúng tôi có một số kết luận như sau:

- Tỷ lệ đột biến điểm vị trí 2142 và 2143 gene 23S rRNA của vi khuẩn *H. pylori* ở bệnh nhân viêm dạ dày mạn là 35,4%; trong đó đột biến A2143G chiếm 92,5% và đột biến A2142G chiếm 7,5%; không có đột biến A2142C.

- Các đột biến này không liên quan với tuổi, giới, vị trí viêm và tình trạng viêm teo. Đột biến A2143G liên quan với tiền sử sử dụng clarithromycin. Đột biến A2142G liên quan với tình trạng dị sản ruột – loạn sản.

Đây là kết quả của đề tài khoa học công nghệ cấp Tỉnh được ngân sách nhà nước Tỉnh Thừa Thiên Huế đầu tư

Đính chính: Bài báo “Xác định đột biến gene 23S rRNA của *Helicobacter pylori* và mối liên quan của các đột biến gene này với đề kháng clarithromycin ở bệnh nhân viêm dạ dày mạn” đăng trong Tạp chí Y Dược học, số 28-29, trang 36-46 của tác giả Hà Thị Minh Thi là kết quả của đề tài Khoa học công nghệ cấp Tỉnh được ngân sách nhà nước tỉnh Thừa Thiên - Huế đầu tư.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Hòa Bình (2001), *Nghiên cứu chẩn đoán bệnh viêm dạ dày mạn tính bằng nội soi, mô bệnh học và tỷ lệ nhiễm Helicobacter pylori*, Đại học Y Hà Nội.
2. Phạm Ngọc Doanh, Trần Văn Huy, Hà Thị Minh Thi (2015), “Nghiên cứu đột biến điểm kháng clarithromycin của *Helicobacter pylori* ở Quảng Ngãi bằng kỹ thuật PCR-RFLP”, *Tạp chí Y Dược - Trường Đại học Y Dược Huế*, 28+29, tr. 54-61.
3. Hồ Đăng Quý Dũng, Trần Thanh Bình, Nguyễn Lâm Tùng, Trịnh Tuấn Dũng, Tạ Long (2014), “Khảo sát kiểu đột biến điểm ở 23S rRNA của *Helicobacter pylori* đề kháng clarithromycin”, *Tạp chí khoa học tiêu hóa Việt Nam*, IX(37), tr. 2384-2389.
4. Vĩnh Khánh, Trần Văn Huy (2011), “Cập nhật về điều trị *Helicobacter pylori*”, *Tạp chí Y Dược - Trường Đại học Y Dược Huế*, tr. 176 - 183.
5. Trần Thiện Trung, Nguyễn Tuấn Anh, Trần Thiện Khiêm, Quách Hữu Lộc, Trần Anh Minh, Trần Ái Anh, Nguyễn Thị Minh Tâm, Hồ Huỳnh Thùy Dương (2014), “Nghiên cứu bước đầu các đột biến kháng thuốc clarithromycin và Levofloxacin của vi khuẩn *H. pylori* bằng giải trình tự gen”, *Tạp chí khoa học tiêu hóa Việt Nam*, IX(37), tr. 2367-2375.
6. Nguyễn Thúy Vinh, Đỗ Nguyệt Ánh, Nguyễn Thị Hồng Hạnh (2015), “Xác định tính kháng clarithromycin của vi khuẩn *Helicobacter pylori* bằng phương pháp PCR giải trình tự gene 23S rRNA từ bệnh phẩm sinh thiết”, *Y học Việt Nam*, Số đặc biệt - Kỷ yếu các công trình nghiên cứu khoa học bệnh viện E, tr. 188-198.
7. Abdollahi M. S. M., Zahedi M. J., Moghadam S.D., and Abasi M.H (June 2011), “Detection of A2142C, A2142G and A2143G mutations in 23S rRNA gene conferring resistance to clarithromycin among *Helicobacter pylori* isolates in Kerman, Iran”, *Iran J Med Sci*, 36(2), pp. 104 – 110.
8. Agudo S. P. P. G., Alarcon T., and Lopez – Brea M. (Oct. 2010), “High prevalence of clarithromycin – resistant *Helicobacter pylori* strains and risk factors associated with resistance in Madrid, Spain”, *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 3703 – 3707.
9. Bickley J., Owen R., Fraser A., Pounder R. (1993), “Evaluation of the polymerase chain reaction for detecting the urease C gene of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy samples and dental plaque”, *Journal of medical microbiology*, 39(5), pp. 338-344.
10. Boyanova L., Markovska R., Yordanov D., Gergova G., Mitov I. (2015), “Clarithromycin Resistance Mutations in *Helicobacter pylori* in Association with Virulence Factors and Antibiotic Susceptibility of the Strains”, *Microbial Drug Resistance*.
11. De Francesco V., Zullo A., Ierardi E., Giorgio F., Perna F., Hassan C., Morini S., Panella C., Vaira D. (2010), “Phenotypic and genotypic *Helicobacter pylori* clarithromycin resistance and therapeutic outcome: benefits and limits”, *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(2), pp. 327-332.
12. HO S. L., Tan E. L., Sam C. K., GOH K. L. (2010), “Clarithromycin resistance and point mutations in the 23S rRNA gene in *Helicobacter pylori* isolates from Malaysia”, *Journal of digestive diseases*, 11(2), pp. 101-105.

13. Kargarl M. B. M., Doosti A., and Dalini S.G. (2011), "Clarithromycin Resistance and 23S rRNA mutations in *Helicobacter pylori*", *Gastrointestinal Endoscopy In Tech*.
14. Kim J. M., Kim J. S., Kim N., Kim Y.-J., Kim I. Y., Chee Y. J., Lee C.-H., Jung H. C. (2008), "Gene mutations of 23S rRNA associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from Korean patients", *Journal of microbiology and biotechnology*, 18(9), pp. 1584-1589.
15. Liu Z., Shen J., Zhang L., Shen L., Li Q., Zhang B., Zhou J., Gu L., Feng G., Ma J. (2008), "Prevalence of A2143G mutation of *H. pylori*-23S rRNA in Chinese subjects with and without clarithromycin use history", *BMC microbiology*, 8(1), pp. 81.
16. Malfertheiner P. M. F., O'Morain C., Bazzoli F., El-Omar E., Graham D., Hunt R., Rokkas T., Vakil N., Kuipers E.J., and EHS (2007), "Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report", *Gut*, 56, pp. 772-781.
17. Malfertheiner P. M. F., O'Morain C. A., et al. (2012), "Management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht IV/ Florence Consensus Report", *Gut*, 61, pp. 646 - 664.
18. Matsuoka M., Yoshida Y., Hayakawa K., Fukuchi S., Sugano K. (1999), "Simultaneous colonisation of *Helicobacter pylori* with and without mutations in the 23S rRNA gene in patients with no history of clarithromycin exposure", *Gut*, 45(4), pp. 503-507.
19. Ménard A., Santos A., Mégraud F., Oleastro M. (2002), "PCR-restriction fragment length polymorphism can also detect point mutation A2142C in the 23S rRNA gene, associated with *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(4), pp. 1156-1157.
20. Occhialini A. U. M., Florence D. P., Bébéar C. M., Lamouliatte H., and Mégraud F. (1997), "Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(12), pp. 2724-2728.
21. Perez Aldana L., Kato M., Nakagawa S., Kawarasaki M., Nagasako T., Mizushima T., Oda H., Kodaira J., Shimizu Y., Komatsu Y. (2002), "The relationship between consumption of antimicrobial agents and the prevalence of primary *Helicobacter pylori* resistance", *Helicobacter*, 7(5), pp. 306-309.
22. Raymond J., Lamarque D., Kalach N., Chaussade S., Burucoa C. (2010), "High level of antimicrobial resistance in French *Helicobacter pylori* isolates", *Helicobacter*, 15(1), pp. 21-27.
23. Rimbara E. N. N., Kijima H., Yamaguchi T., and Sasatsu M. (2007), "Mutations in the 23S rRNA gene of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* from Japan", *International journal of antimicrobial agents*, 30, pp. 250 - 254.
24. Russmann H. A. K., Haas R., Gebert B., Koletzko S., and Heesemann J. (2001), "Rapid and accurate determination of genotypic clarithromycin resistance in cultured *Helicobacter pylori*", *J Clin Microbiol*, 39(11), pp. 4142 - 4144.
25. Toracchio S., Aceto G. M., MarianiCostantini R., Battista P., Marzio L. (2004), "Identification of a novel mutation affecting domain V of the 23S rRNA gene in *Helicobacter pylori*", *Helicobacter*, 9(5), pp. 396-399.
26. Versalovic J. a. S. D., Kibler K., Griffy M.V., Beyer J., Flamm R.K., Tanaka S.K., Graham D.Y., and Go M.F. (1996), "Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(2), pp. 477 - 480.
27. Yamade M. S. M., Uotani T., Nishino M., Kodaira C., Furuta T. (2011), "Resistance of *Helicobacter pylori* to quinolones and clarithromycin assessed by genetic testing in Japan", *Journal of gastroenterology and hepatology*, 26(pp. 1457-1461.
28. Zhu Z.-H., Huang D.-Q., Xie Y., Liu L., Lu N.-H. (2013), "Characterization of 23S rRNA gene mutation in primary and secondary clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains from East China", *Turk J Gastroenterol*, 24(1), pp. 5-9.