

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

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

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Đột biến gene 23S rRNA của *Helicobacter pylori* được xem là nguyên nhân hàng đầu gây đề kháng clarithromycin. Mục tiêu của đề tài: (1) Xác định các đột biến vùng domain V gene 23S rRNA của *Helicobacter pylori* ở bệnh nhân viêm dạ dày mạn bằng kỹ thuật giải trình tự. (2) Khảo sát mối liên quan của các đột biến được phát hiện với kiểu hình đề kháng clarithromycin được xác định bằng E-test. **Đối tượng và phương pháp:** các mẫu sinh thiết niêm mạc dạ dày từ 170 bệnh nhân viêm dạ dày mạn có nhiễm *Helicobacter pylori* được đưa vào nghiên cứu, tách chiết DNA, thực hiện giải trình tự vùng domain V gene 23S rRNA của *H. pylori*, trong đó có 80 mẫu được xác định MIC bằng E-test. **Kết quả:** Phát hiện được 8 loại đột biến điểm, trong đó ở vị trí 2142 và 2143 có hai đột biến là A2143G chiếm tỷ lệ 35,3% và A2142G chiếm tỷ lệ 3,5%, không tìm thấy trường hợp nào có đột biến A2142C; 6 đột biến còn lại là G2172T (0,6%), T2182C (86,5%), C2195T (5,3%), A2223G (42,9%), T2244C (98,2%) và A2302G (8,8%). Xác định được mối liên quan giữa đột biến A2143G với kiểu hình đề kháng clarithromycin, OR = 368,58 và 95%CI: 34,53 – 3934,12. Tỷ lệ đề kháng clarithromycin trong nhóm có đột biến A2143G là 96,7%, trong nhóm không có đột biến này là 10%. Xác định được giá trị tiên đoán đề kháng clarithromycin của các kiểu gene đột biến qua phân tích hồi quy logistic, với độ chính xác 96,1%. **Kết luận:** Có mối liên quan giữa đột biến A2143G và kiểu hình đề kháng clarithromycin. Từ kiểu đột biến gene được xác định bằng giải trình tự vùng domain V gene 23S rRNA có thể tiên đoán được khả năng đề kháng clarithromycin của chủng vi khuẩn *H. pylori*.

Từ khóa: gene 23S rRNA, đề kháng clarithromycin, *Helicobacter pylori*.

Abstract

DETERMINATION OF MUTATIONS IN 23S rRNA GENE OF HELICOBACTER PYLORI AND THE ASSOCIATION OF THESE GENE MUTATIONS WITH CLARITHROMYCIN- RESISTANCE IN CHRONIC GASTRITIS

Hà Thị Minh Thi, Trần Văn Huy, Nguyễn Việt Nhân,
Lê Phan Tường Quỳnh, Phan Trung Nam, Trần Thị Như Hoa
Hue University of Medicine and Pharmacy

Background: Resistance of *Helicobacter pylori* to clarithromycin is mostly due to the point mutations in the 23S rRNA. The aims of the present study were to determine mutations in domain V of 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* in chronic gastritis patients by sequencing; and to assess the association of these mutations with clarithromycin-resistant phenotype determined by E-test. **Patients and methods:**

- Địa chỉ liên hệ: Hà Thị Minh Thi, email: haminhthi@gmail.com

DOI: 10.34071/jmp.2015.4+5.5

- Ngày nhận bài: 10/8/2015 * Ngày đồng ý đăng: 30/8/2015 * Ngày xuất bản: 12/11/2015

Gastric mucosal biopsy specimens from 170 patients with chronic gastritis were entered in the study. DNA was extracted from biopsy specimens obtained by endoscopy and prepared for sequencing domain V of gene 23S rRNA. 80 biopsy specimens were determined MIC by E-test. **Results:** Eight point mutations were detected. At 2142 and 2143 sites of gene, A2143G and A2142G mutations were detected in 35.3% and 3.5%, respectively. Six remaining mutations were G2172T (0.6%), T2182C (86.5%), C2195T (5.3%), A2223G (42.9%), T2244C (98.2%) và A2302G (8.8%). A2143G mutation was associated with clarithromycin-resistant phenotype, OR = 368.58 (95%CI: 34.53 – 3934.12). The rate of clarithromycin-resistance in the group with A2143G mutation was 96.7%, while in the group without A2143G mutation was 10%. Predicted probabilities for clarithromycin-resistance were calculated by logistic regression model with the accuracy rate of 96.1%. **Conclusions:** There was the association between A2143G mutation and clarithromycin-resistant phenotype. Genotypes determined by sequencing domain V of 23S rRNA gene could be used to predict the probabilities of clarithromycin-resistance.

Key words: 23S rRNA gene, clarithromycin-resistance, *Helicobacter pylori*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Viêm dạ dày mạn 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]. Ngày nay, *Helicobacter pylori* được chứng minh là nguyên nhân thường gặp của viêm dạ dày mạn cũng như các bệnh lý dạ dày khác. Tỷ lệ nhiễm *Helicobacter pylori* trên toàn thế giới được ước tính khoảng 50% [25]. Việt Nam thuộc khu vực có tỉ lệ nhiễm vi khuẩn này khá cao, một nghiên cứu tại Huế năm 2003 cho thấy tỷ lệ nhiễm *Helicobacter pylori* lên đến 69,2% [2]. 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 là một trong những kháng sinh quan trọng được lựa chọn trong phác đồ điều trị triệt căn *Helicobacter pylori* [17]. Tuy nhiên, hiện nay tình trạng đề kháng 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% [23]; ở Iran năm 2008 là 22,6% nhưng đến năm 2011 là 31,7% [7].

Clarithromycin là một kháng sinh thuộc họ macrolide hoạt động bằng cách gắn vào ribosome của *Helicobacter pylori* mà cụ thể là quai peptidyltransferase thuộc domain V của 23S rRNA. Sự gắn kết này dẫn đến hiện tượng phân ly của peptidyl tRNA ra khỏi ribosome

trong phản ứng kéo dài chuỗi polypeptide, từ đó làm gián đoạn việc tổng hợp protein của vi khuẩn [14]. Năm 1996, Versalovic đã thông báo các đột biến A2142G và A2143G trên gene 23S rRNA có liên quan đến kháng clarithromycin của *Helicobacter pylori* [29]. Về sau nhiều nghiên cứu của các tác giả khác nhau còn tìm ra một số đột biến khác như A2142C, A2223G, C2195T, T2717C và T2182C [12], [13], [16]. Tuy nhiên, ngoại trừ ba loại đột biến A2142G, A2143G và A2142C, vai trò của các đột biến khác trong việc gây đề kháng clarithromycin vẫn đang còn tranh cãi.

Để góp phần tìm hiểu các đột biến điểm trên gene 23S rRNA của vi khuẩn *Helicobacter pylori* ở bệnh nhân viêm dạ dày mạn trong mối liên quan với kiểu hình đề kháng clarithromycin, chúng tôi tiến hành đề tài này nhằm các mục tiêu như sau:

- (1) Xác định các đột biến vùng domain V gene 23S rRNA của *Helicobacter pylori* ở bệnh nhân viêm dạ dày mạn bằng kỹ thuật giải trình tự.
- (2) Khảo sát mối liên quan của các đột biến được phát hiện với kiểu hình đề kháng clarithromycin được xác định bằng E-test.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu gồm mẫu mô sinh thiết niêm mạc dạ dày từ 170 bệnh nhân được chẩn đoán xác định viêm dạ dày mạn có nhiễm *Helicobacter pylori*.

- 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.

+ 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 diệt trừ *Helicobacter pylori* trong vòng 4 tuần; kết quả giải trình tự cho thấy chủng vi khuẩn không phải *H. pylori* (đối chiếu bằng công cụ BLAST).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả cắt ngang, trong đó có 170 mẫu sinh thiết niêm mạc dạ dày của 170 bệnh nhân viêm dạ dày mạn được xác định trình tự vùng domain V gene 23S rRNA để xác định đột biến và 80 mẫu có kết quả nồng độ ức chế tối thiểu của clarithromycin được xác định bằng E-test.

2.2.2. Các kỹ thuật sinh học phân tử

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 A260/280 trên máy Nanodrop, rồi pha loãng ở nồng độ 100 ng/μl.

Tên mồi	Trình tự mồi	Kích thước sản phẩm
ureC-F ureC-R	5'-AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-3' 5'-AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC-3'	294 bp
DomainV-F DomainV-R	5'-GTAAACGGCGGCCGTAATA-3' 5'-GACCGAACTGTCTCACGACG-3'	699 bp

Xác định nhiễm *H. pylori* bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu gene ureC (glmM) do Brisou thiết kế và Bickley mô tả lại [9]. Điều kiện nhiệt độ: biến tính ban đầu 95°C, 5 phút; 30 chu kỳ gồm 95°C 1 phút, 55°C 1 phút, 72°C 1 phút; kéo dài cuối cùng 72°C 8 phút.

Khuếch đại vùng domain V của gene 23S rRNA bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu do Leser thiết kế và Jensen mô tả lại [15]. Điều kiện nhiệt độ: biến tính ban đầu 95°C, 5 phút; 35 chu kỳ gồm 95°C 1 phút, 55°C 1 phút 30 giây, 72°C 1 phút; kéo dài cuối cùng 72°C 8 phút.

Các phản ứng PCR đều có thành phần gồm 12,5 μl GoTaq Green MasterMix (Promega), 10 pmol/μl mỗi mồi, 100 ng DNA khuôn mẫu, nước cất đã khử nuclease cho đủ 25 μl, chạy trên máy luân nhiệt Applied Biosystem 2720. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% có thêm Red Safe (thuốc nhuộm DNA), đọc dưới tia UV.

Sản phẩm PCR khuếch đại domain V được tinh sạch bằng ISOLATE II PCR and Gel Kit (Bioline) để chuẩn bị giải trình tự.

Các kỹ thuật sinh học phân tử ở trên được thực hiện tại bộ môn Di truyền Y học, trường Đại học Y Dược Huế.

Giải trình tự bằng kit BigDye Terminator v3.1 trên máy Genetic Analyser của Applied Biosystem tại phòng xét nghiệm First BASE (Singapore) và bộ môn Di truyền Y học, trường Đại học Y Dược Huế.

Sau khi có kết quả giải trình tự, chúng tôi sử dụng công cụ BLAST nucleotide của NCBI (National Center for Biotechnology Information) để so sánh trình tự domain V của gene 23S rRNA của mẫu với trình tự tham chiếu của chủng *Helicobacter pylori* U27270 đã được công bố trên GenBank.

Ngoài ra, kỹ thuật PCR-RFLP theo quy trình của Menard [19] xác định các đột biến A2142G, A2143G và A2142C đều được thực hiện cho tất cả các mẫu. Kết quả này chúng tôi sẽ công bố trong bài báo tiếp theo, trong phạm vi bài báo này chúng tôi chỉ sử dụng kết quả PCR-RFLP để bàn luận trường hợp đặc biệt (mã số: Bi-63).

2.2.3. Phương pháp nuôi cấy *Helicobacter pylori* và xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của clarithromycin bằng E-test

Có 108 mẫu sinh thiết niêm mạc dạ dày của bệnh nhân viêm dạ dày mạn có test nhanh urease dương tính được chọn ngẫu nhiên để thực hiện

nuôi cấy *H. pylori* và sau đó làm E-test xác định MIC của clarithromycin đối với các chủng *H. pylori* nuôi cấy mọc.

Nuôi cấy trong môi trường Columbia (Becton Dickinson) có chọn lọc (DENT) với 7% máu cừu ở 37°C trong điều kiện vi khí bằng Genbag MicroAir (Biomerieux). Ủ đĩa nuôi cấy ở môi trường vi khí từ 3-7 ngày, nếu ở ngày thứ 3 hoặc 4 khuẩn lạc mọc nhiều tiến hành làm kháng sinh đồ, nếu sau 6-7 ngày mới có một số khuẩn lạc thì tiến hành cấy chuyển tăng sinh trong vòng 3 ngày rồi tiến hành làm kháng sinh đồ. Có 86 mẫu mọc.

Xác định MIC của clarithromycin bằng E-test (Biomerieux – Pháp) trên môi trường thạch Mueller Hinton có 7% máu cừu. Dung dịch nuôi cấy có độ đục vi khuẩn 3 McFarland lấy từ nhiều khuẩn lạc

được phết lên thạch nuôi cấy bằng tăm bông, ủ 3 ngày ở 37°C trong điều kiện vi khí. MIC được xác định ở trị số trên thanh E-test mà vòng e-líp, ranh giới của vùng ức chế, cắt vào thanh E-test. Chủng được xác định là đề kháng clarithromycin khi có MIC $\geq 1\mu\text{g/ml}$. Có 80 mẫu có kết quả MIC được đưa vào phân tích nghiên cứu.

Xét nghiệm được thực hiện tại trung tâm Carlo Urbani và khoa Vi sinh bệnh viện Trường Đại học Y dược Huế.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Các đột biến vùng domain V gene 23S rRNA của *Helicobacter pylori* ở bệnh nhân viêm dạ dày mạn được xác định bằng kỹ thuật giải trình tự

Bảng 3.1. Tỷ lệ các đột biến điểm vùng domain V được phát hiện

Tên đột biến điểm		Số lượng	Tỷ lệ %
Đột biến vị trí 2142 và 2143	A2142G	6	3,5
	A2143G	60	35,3
	A2142C	0	0,0
Đột biến ở vị trí khác trên domain V	G2172T	1	0,6
	T2182C	147	86,5
	C2195T	9	5,3
	A2223G	73	42,9
	T2244C	167	98,2
	A2302G	15	8,8

Nhận xét: Có 8 loại đột biến điểm được phát hiện, tại hai vị trí 2142 và 2143 đều có đột biến thay thế nucleotide A thành G, không có chủng nào mang đột biến A2142C.

Bảng 3.2. Phân bố các kiểu gene đột biến

Số đột biến trên 1 mẫu	Các kiểu đột biến gene	n
0		1
1	T2244C	8
2	A2142G / T2244C	1
	A2143G / T2182C	1
	A2143G / T2244C	2
	T2182C / T2244C	45
	C2195T / T2244C	1
	A2223G / T2244C	5
	T2244C / A2302G	1

3	A2142G / T2182C / T2244C	3
	A2142G / A2223G / T2244C	1
	A2143G / T2182C / A2223G	1
	A2143G / T2182C / T2244C	16
	A2143G/ C2195T /T2244C	2
	A2143G/ A2223G /T2244C	1
	T2182C/C2195T/T2244C	2
	T2182C/A2223G/T2244C	28
	T2182C/T2244/A2302G	10
4	A2142G /T2182C/A2223G/T2244C	1
	A2143G/T2182C/A2223G/T2244C	31
	A2143G/T2182C/ T2244C /A2302G	4
	T2182C/ C2195T/ A2223G /T2244C	3
5	A2143G/T2182C/ C2195T/ A2223G/ T2244C	1
	A2143G/ G2172T / T2182C/ A2223G/ T2244C	1

Nhận xét: Phần lớn các chủng *H. pylori* mang nhiều đột biến phối hợp.

3.2. Mối liên quan của các đột biến vùng domain V gene 23S rRNA của *H.pylori* với kiểu hình kháng clarithromycin được xác định bằng E-test

Trong số 80 mẫu xác định được MIC, có 34 mẫu đề kháng (MIC: 1,5 – 256 µg/ml) và 46 mẫu nhạy cảm (MIC: 0,016 – 0,75 µg/ml).

Bảng 3.3. Mối liên quan giữa các đột biến gene với đề kháng clarithromycin

Đột biến		Đề kháng	Nhạy cảm	OR (95%CI)	
				Phân tích đơn biến	Hồi quy logistic
A2143G	+	29	1	261,0	368,58
	-	5	45	(29,00 – 2349,98)	(34,53 – 3934,12)
T2182C	+	31	39	1,85	0,32
	-	3	7	(0,44 – 7,77)	(0,04 – 2,58)
A2223G	+	19	15	2,6	1,91
	-	15	31	(1,05 – 6,54)	(0,31 – 11,55)
A2302G	+	1	4	0,32	0,54
	-	33	42	(0,03 – 2,98)	(0,003 – 88,96)
C2195T	+	2	1	2,81	7,62
	-	32	45	(0,24 – 32,36)	(0,38 – 151,72)
T2244C	+	33	46	0,24	0,00
	-	1	0	(0,01 – 6,08)	(0,00 – 0,00)
Tổng (n = 80)		34 (42,5%)	46 (57,5%)		

Nhận xét: Chỉ có 6 loại đột biến được phát hiện. Phân tích hồi quy logistic cho thấy chỉ có đột biến A2143G có liên quan kiểu hình đề kháng clarithromycin.

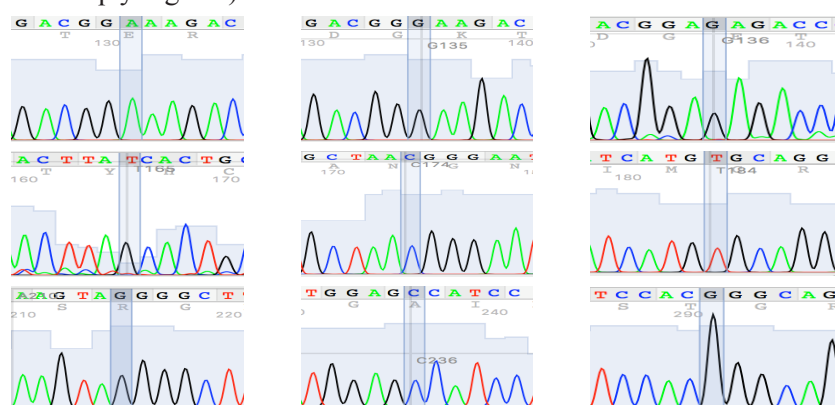
Bảng 3.4. Tỷ lệ đề kháng clarithromycin của các kiểu gene đột biến và giá trị tiên đoán đề kháng của các kiểu gene

Nhóm	Các kiểu đột biến gene	n	R	Tỷ lệ %	Tiên đoán (%)
Có A2143G	A2143G/T2182C	1	1	100,0	99,999
	A2143G/ T2182C / T2244C	11	11	100,0	95,26
	A2143G / A2223G / T2244C	1	1	100,0	99,16
	A2143G/ T2182C / A2223G / T2244C	15	14	93,3	97,46
	A2143G / T2182C / T2244C / A2302G	1	1	100,0	91,49
	A2143G/T2182C/C2195T/A2223G/T2244C	1	1	100,0	99,65
	Tổng nhóm có A2143G	30	29	96,7	
Không có A2143G	T2244C	5	2	40,0	14,38
	T2182C / T2244C	24	0	0,0	5,17
	C2195T / T2244C	1	0	0,0	56,15
	A2223G / T2244C	3	0	0,0	24,26
	T2182C / A2223G / T2244C	13	2	15,4	9,41
	T2182C / T2244C/ A2302G	3	0	0,0	2,84
	T2182C/ C2195T/ A2223G /T2244C	1	1	100,0	44,20
	Tổng nhóm không có A2143G	50	5	10,0	
Diện tích dưới đường cong ROC là AUC = 0,961 (95%CI: 0,892 – 0,992)					

(n số mẫu, R: số mẫu đề kháng được xác định bằng E-test, giá trị tiên đoán và AUC được tính khi phân tích mô hình hồi quy logistic).

Nhận xét: Nhóm kiểu gene đột biến phối hợp A2143G có tỷ lệ đề kháng cao hơn nhóm không phối hợp A2143G ($p < 0,0001$). Từ các kiểu gene đột biến có thể tiên đoán được khả năng đề kháng clarithromycin với độ chính xác cao (96,1%).

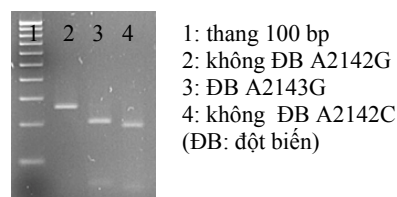
(n số mẫu, R: số mẫu đề kháng được xác định bằng E-test, giá trị tiên đoán và AUC được tính khi phân tích mô hình hồi quy logistic).



Hình 1. Kết quả giải trình tự vùng domain V gene 23S rRNA (bình thường, A2142G, A2143G, G2172T, T2182C, C2195T, A2223G, T2244C, A2302G)



Hình 2. Kết quả xác định MIC bằng E-test (bên trái: nhạy cảm - bên phải: đề kháng)



Hình 3. Kết quả PCR-RFLP xác định đột biến A2142G, A2143G và A2142C của mẫu Bi-63

4. BÀN LUẬN

4.1. Các đột biến vùng domain V gene 23S rRNA của *Helicobacter pylori* ở bệnh nhân viêm dạ dày mạn được xác định bằng kỹ thuật giải trình tự

Cơ chế đề kháng clarithromycin của *Helicobacter pylori* chủ yếu là do macrolide gắn với ribosome, hậu quả của các đột biến điểm xuất hiện trong vùng mã hóa peptidyltransferase của gene 23S rRNA [29]. Đặc biệt, các đột biến ở vị trí 2142 và 2143 được xem là nguyên nhân chính, chiếm hơn 90% các trường hợp đề kháng này [11], các đột biến ở vị trí khác của domain V gene 23S rRNA cũng đã được các tác giả khác công bố, tuy nhiên vai trò trong đề kháng clarithromycin vẫn đang còn tranh cãi.

Sau khi giải trình tự 170 mẫu DNA tương ứng vùng domain V gene 23S rRNA của vi khuẩn *Helicobacter pylori*, chúng tôi phát hiện được 8 loại đột biến điểm được trình bày ở bảng 3.1. Trong đó, đột biến ở vị trí 2142 và 2143 chiếm 38,8% gồm hai đột biến là A2142G (3,5%) và A2143G (35,3%). Nghiên cứu của chúng tôi không phát hiện trường hợp nào mang đột biến A2142C.

Agudo (Tây Ban Nha, 2011) đã nghiên cứu 118 bệnh nhân nhiễm *H. pylori* có 29 trường hợp đột biến A2143G, chiếm 24,6%, có 3 đột biến A2142G chiếm 2,5% và không có trường hợp nào mang đột biến A2142C [8]. Sự phân bố về tỷ lệ ba loại đột biến chính này trong nghiên cứu của chúng tôi và của tác giả Agudo không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p = 0,117$). Nghiên cứu của Yamade (Nhật Bản, 2011) đã thực hiện kỹ thuật PCR đặc hiệu allele trên mẫu bệnh phẩm của 153 bệnh nhân nhiễm *H. pylori* nhận thấy có 82 trường hợp mang đột biến A2143G, 3 trường hợp mang đột biến A2142G chiếm tỷ lệ lần lượt là 53,9%; 1,2%, tác giả không thực hiện các kỹ thuật có khả năng xác định đột biến A2142C nên không biết được có hay không có đột biến này [30]. Kết quả của chúng tôi có tỷ lệ mang đột biến A2143G thấp hơn so với Yamade, $p = 0,001$. Nghiên cứu của Nguyễn Thúy Vinh (Hà Nội, 2015) trên 188 mẫu (loét dạ dày – tá tràng) được giải trình tự có 36,7% mang đột biến

gene 23S rRNA và 100% là A2143G, không có đột biến vị trí 2142 [6]. Không có sự khác biệt giữa tỷ lệ mang đột biến A2143G trong nghiên cứu của chúng tôi và của Nguyễn Thúy Vinh (35% so với 36,7%), tuy nhiên tác giả đã không tìm thấy trường hợp nào mang đột biến A2142G, trong khi chúng tôi có 3,5% mang đột biến này.

Nhìn chung, hầu như tất cả các nghiên cứu trên thế giới đều cho thấy A2143G là đột biến chiếm tỷ lệ cao nhất trong các loại đột biến ở vị trí 2142 và 2143. Đứng hàng thứ hai là đột biến A2142G; còn đột biến A2142C thì chỉ chiếm tỷ lệ rất thấp, vài phần trăm hoặc thậm chí không được tìm thấy. Mặt khác, đột biến A2142C hầu như cũng chỉ tìm thấy chủ yếu ở các nghiên cứu trên 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% [21], nghiên cứu của Toracchio ở Ý (2004) cho thấy trong 73 trường hợp đề kháng clarithromycin có 4 trường hợp mang đột biến A2142C [26]. Trong khi đó, các nghiên cứu ở châu Á như nghiên cứu của Kim (Hàn Quốc, 2008) [16], Zhu (Trung Quốc, 2013) [31], Matsuoka (Nhật Bản, 1999) [18], 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] đều không tìm thấy đột biến A2142C, còn đột biến A2142G cũng rất thấp hoặc không có. Như vậy, có thể thấy phân bố các đột biến vị trí 2143 và 2142 của gene 23S rRNA ở các chủng *H. pylori* có thay đổi tùy theo khu vực địa lý nhưng đột biến A2143G vẫn chiếm đại đa số. Bên cạnh đó, vẫn có một số nghiên cứu cho kết quả ngược lại như nghiên cứu của Ubhayawardana (Sri Lanka, 2015) có 100% là đột biến A2142G, tuy nhiên cỡ mẫu của tác giả còn quá nhỏ ($n = 15$) [27], nghiên cứu của Ribeiro (Brazil, 2003) có tỷ lệ A2142G đến 82,7% trong khi A2143G chỉ 11,5% trong số các chủng đột biến [22].

Nghiên cứu của chúng tôi cũng ghi nhận có các đột biến khác đã từng được công bố như G2172T, T2182C, C2195T, A2223G, T2244C, A2302G. Chúng tôi nhận thấy các đột biến T2182C và

T2244C chiếm tỷ lệ quá cao, đến 86,5% và 98,2%, điều này cũng phù hợp với quan điểm của nhiều tác giả cho rằng các đột biến này thực chất chỉ là các đa hình đơn nucleotide (SNP), xuất hiện trên cả chủng *H. pylori* nhạy cảm và đề kháng [10], [26]. Đột biến A2223G cũng chiếm tỷ lệ đến 42,9%. Các đột biến khác chiếm tỷ lệ thấp như G2172T chiếm 0,6%, C2195T chiếm 5,3%, A2302G chiếm 8,8%. Chúng tôi sẽ phân tích mối liên quan của phần lớn các đột biến trên với kiểu hình đề kháng clarithromycin trong phần tiếp theo.

Các kiểu gene đột biến trong nghiên cứu này rất đa dạng, được chúng tôi trình bày ở bảng 3.2. Có thể thấy rằng, do sự có mặt với tỷ lệ quá cao của các đột biến T2182C, T2244C (mà thực chất là các SNP) trong các chủng *H. pylori* ở bệnh nhân của chúng tôi, nên hầu như tất cả các mẫu đều có chứa ít nhất 1 đột biến điểm, chỉ có 1 trường hợp không mang đột biến nào và có 8 trường hợp chỉ mang một đột biến đơn độc T2244C. Theo Raymond, ở nhóm bệnh nhân đã từng thất bại với liệu pháp diệt trừ *H. pylori* thì tỷ lệ mang đột biến gene 23S rRNA không những cao hơn mà tỷ lệ có cùng hai hay ba đột biến cũng cao hơn [21]. Vì vậy, sự phối hợp nhiều đột biến điểm được ghi nhận trong các mẫu nghiên cứu có thể phản ánh phần nào thực trạng sử dụng thuốc (bao gồm clarithromycin và các loại kháng sinh khác, ức chế bơm proton, bismuth...) không kiểm soát ở nước ta.

4.2. Mối liên quan của các đột biến gene 23S rRNA của *H. pylori* với kiểu hình kháng clarithromycin được xác định bằng E-test

Trong nghiên cứu này chúng tôi có kết quả MIC trên 80 mẫu bệnh phẩm, trong đó có 34 mẫu đề kháng clarithromycin, chiếm 42,5%. Tỷ lệ này tương đương với tỷ lệ trong nghiên cứu của Van Doorn (2001, n = 299) là 43,5% [28], cao hơn so với tỷ lệ trong nghiên cứu của Francesco (Ý, 2010, n = 146) là 18,4% [11], và thấp hơn so với tỷ lệ trong nghiên cứu của Đinh Cao Minh (TP Hồ Chí Minh, 2014, n = 102) là 56,9% [4].

Trong số 80 mẫu có kết quả MIC, giải trình tự chỉ phát hiện 6 loại đột biến điểm là A2143G, T2182C, C2195T, A2223G, A2302G và T2244C, không phát hiện trường hợp nào mang đột biến

A2142G và G2172T. Vì vậy chúng tôi chỉ khảo sát được mối liên quan của 6 đột biến điểm trên với kiểu hình đề kháng clarithromycin. Kết quả ở bảng 3.3 cho thấy khi phân tích đơn biến thì có hai đột biến điểm có liên quan đề kháng clarithromycin ($MIC \geq 1\mu g/ml$) là A2143G và A2223G. Tuy nhiên, khi phân tích hồi quy logistic thì chỉ có đột biến A2143G có liên quan với đề kháng clarithromycin, $OR = 368,58$ và $95\%CI: 34,53 - 3934,12$. Điều này hoàn toàn phù hợp với nhận định đột biến A2143G là nguyên nhân hàng đầu gây đề kháng clarithromycin. Bên cạnh đột biến A2143G, còn có các đột biến vị trí 2142 bao gồm A2142G và A2142C cũng đã được chứng minh có vai trò gây đề kháng kháng sinh này. Tuy nhiên, nghiên cứu của chúng tôi cũng như các nghiên cứu khác ở Việt Nam đều không tìm thấy đột biến A2142C. Nghiên cứu của chúng tôi có phát hiện đột biến A2142G nhưng với tỷ lệ thấp (3,5%) và thật đáng tiếc là ngẫu nhiên trong 80 mẫu có kết quả MIC của chúng tôi lại không có đột biến A2142G, vì vậy chúng tôi không khảo sát được mối liên quan của đột biến này với kiểu hình đề kháng clarithromycin.

Chúng tôi đã phân tích mô hình hồi quy logistic và tính được các giá trị tiên đoán đề kháng clarithromycin của từng kiểu gene đột biến, với độ chính xác 96,1% (bảng 3.4). Qua các giá trị tiên đoán khác biệt rõ rệt giữa nhóm có đột biến A2143G và nhóm không có đột biến này, có thể thấy vai trò quan trọng của đột biến điểm A2143G trong việc gây nên đề kháng clarithromycin. Ngoài ra, tỷ lệ đề kháng clarithromycin trong nhóm có mang đột biến A2143G là 96,7%, trong khi ở nhóm không có đột biến A2143G chỉ 10%, với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, $p < 0,0001$.

Trong 6 kiểu đột biến gene phối hợp A2143G thì có đến 5 kiểu có tỷ lệ đề kháng là 100%, chỉ nhóm kiểu gene A2143G / T2182C / A2223G / T2244C là có tỷ lệ đề kháng 93,3% với 1 trường hợp nhạy cảm. Nghiên cứu của Oleastro (Pháp, 2003) cho thấy có 188 mẫu (chiếm 96,4%) có sự tương đồng giữa kết quả xác định đột biến vị trí 2142 và 2143 bằng kỹ thuật Realtime PCR và kết quả xác định đề kháng/nhạy cảm bằng E-test và

thạch pha loãng. Nghiên cứu của tác giả đã cho thấy 4 trường hợp có đột biến vị trí 2142/2143 nhưng kiểu hình lại nhạy cảm, tác giả đã giải thích là do có sự hiện diện cả kiểu gene bình thường và kiểu gene đột biến trên cùng một mẫu [20]. Trong nghiên cứu của mình năm 2010, Francesco cũng có cùng quan điểm với Oleastro khi giải thích kết quả có một nửa số mẫu mang đột biến vị trí 2142 và 2143 của tác giả có kiểu hình nhạy cảm [11]. Khi phân tích trường hợp có kiểu gene đột biến A2143G / T2182C / A2223G / T2244C nhưng kiểu hình nhạy cảm (MIC: 0,25 µg/ml), chúng tôi nhận thấy trong kết quả giải trình tự của mẫu này chỉ có một đỉnh tín hiệu huỳnh quang cho tất cả các vị trí, đồng thời trong kết quả PCR-RFLP cũng thấy hình ảnh toàn bộ sản phẩm PCR tương ứng bị cắt bởi enzyme BsaI (hình 3, mẫu Bi-63). Điều đó chứng tỏ mẫu sinh thiết dạ dày này chỉ nhiễm một chủng *H. pylori* và không có kiểu hỗn hợp của đột biến A2143G (vừa có kiểu bình thường, vừa có kiểu đột biến). Do đó, chúng tôi không thể giải thích nguyên nhân tại sao chủng vi khuẩn có đột biến A2143G - một nguyên nhân hàng đầu gây đề kháng clarithromycin - lại có kiểu hình nhạy cảm.

Mặt khác, kết quả của chúng tôi cũng cho thấy có 5 trường hợp không mang đột biến A2143G cũng như các đột biến A2142G và A2142C nhưng lại có kiểu hình là đề kháng clarithromycin; gồm 2 trường hợp có kiểu gene T2244C đơn độc, 2 trường hợp kiểu gene T2182C / A2223G / T2244C và 1 trường hợp kiểu gene T2182C/ C2195T/ A2223G /T2244C. Các kiểu gene này đều có giá trị tiên đoán đề kháng clarithromycin thấp, lần lượt là 14,38%; 24,26% và 44,20% với độ chính xác là 96,1% (bảng 3.4). Vì vậy, có khả năng sự đề kháng clarithromycin ở 5 trường hợp này xảy ra do cơ chế khác - cơ chế bơm đẩy thuốc ra (efflux pumps).

Tóm lại, chúng tôi đã phát hiện được 38,8% trong số 170 bệnh nhân viêm dạ dày mạn bị nhiễm các chủng *H. pylori* mang gene 23S rRNA đột biến A2143G và A2142G, là các đột biến đã được xem là nguyên nhân gây đề kháng clarithromycin. Tỷ lệ đề kháng kiểu hình được xác định bằng E-test trong 80 mẫu cũng lên đến 42,5%. Những kết quả này cho thấy tỷ lệ đề kháng clarithromycin của *H. pylori* ở các bệnh nhân viêm dạ dày mạn ở khu vực miền Trung là khá cao, cảnh báo nguy cơ thất bại với liệu trình điều trị loét căn *H. pylori* bằng phác đồ có phối hợp clarithromycin. Vì vậy, cần có chỉ định xét nghiệm xác định đề kháng loại kháng sinh này trước khi điều trị, nhất là những trường hợp có tiền sử điều trị thất bại.

5. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã giải trình tự vùng domain V gene 23S rRNA để xác định đột biến của các chủng *H. pylori* ở 170 mẫu mô sinh thiết niêm mạc bệnh nhân viêm dạ dày mạn, trong đó có 80 mẫu được xác định MIC bằng E-test và rút ra một số kết luận như sau:

- Phát hiện được 8 loại đột biến điểm, trong đó ở vị trí 2142 và 2143 có hai đột biến là A2143G chiếm tỷ lệ 35,3% và A2142G chiếm tỷ lệ 3,5%, không tìm thấy trường hợp nào có đột biến A2142C; 6 đột biến còn lại là G2172T (0,6%), T2182C (86,5%), C2195T (5,3%), A2223G (42,9%), T2244C (98,2%) và A2302G (8,8%).

- Xác định được mối liên quan giữa đột biến A2143G với kiểu hình đề kháng clarithromycin, OR = 368,58 và 95%CI: 34,53 – 3934,12. Tỷ lệ đề kháng clarithromycin trong nhóm có đột biến A2143G là 96,7%, trong nhóm không có đột biến này là 10%. Xác định được giá trị tiên đoán đề kháng clarithromycin của các kiểu gene đột biến, với độ chính xác 96,1%.

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. Hồ Đăng Quý Dũng (2003), *Nghiên cứu tỷ lệ nhiễm Helicobacter pylori ở bệnh nhân viêm dạ dày mạn tính*, Luận văn Thạc sĩ Y học, Trường Đại học Y Dược Huế.
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. Đinh Cao Minh, Bùi Hữu Hoàng (2014), “Đánh giá đề kháng kháng sinh của *Helicobacter pylori* trên bệnh nhân viêm loét dạ dày - tá tràng đã điều trị diệt trừ thất bại”, *Tạp chí khoa học tiêu hóa Việt Nam*, IX(37), tr. 2358-2366.
 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. Burucoa C., Landron C., Garnier M., Fauchère J.-L. (2005), “T2182C mutation is not associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*”, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(2), pp. 868-870.
 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. De Francesco V. a. M. M., Zullo A., Hassan C., Troiani L., Burattini O., Stella F., Di Leo A., Russo F., Marangi S., et al. (2006), “Clarithromycin-resistant genotypes and eradication of *Helicobacter pylori*”, *Annals of Internal Medicine*, 144 (pp. 94-100).
 13. Fontana C., Favaro M., Minelli S., Criscuolo A. A., Pietroiusti A., Galante A., Favalli C. (2002), “New site of modification of 23S rRNA associated with clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* clinical isolates”, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(12), pp. 3765-3769.
 14. Hultén K. G. A., Sköld O., and Engstrand L. (1997), “Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: mechanism and stability in strains from clarithromycin-treated patients”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(11), pp. 2550-2553.
 15. Jensen L. B.,Aarestrup F. M. (2001), “Macrolide resistance in *Campylobacter coli* of animal origin in Denmark”, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(1), pp. 371-372.
 16. 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.
 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. Oleastro M., Ménard A., Santos A., Lamouliatte H., Monteiro L., Barthélémy P.,Mégraud F. (2003), “Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*”, *Journal of clinical microbiology*, 41(1), pp. 397-402.

21. 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.
22. Ribeiro M. L., Vitiello L., Miranda M. C., Benvengo Y. H., Godoy A. P., Mendonca S., Pedrazzoli J. (2003), "Mutations in the 23S rRNA gene are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates in Brazil", *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 2(1), pp. 11.
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 of *Helicobacter pylori*", *J Clin Microbiol*, 39(11), pp. 4142 – 4144.
25. Sandeep M. (2012), "Chronic gastritis", University of Nebraska Medical Center.
26. Toracchio S., Aceto G. M., Mariani Costantini 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.
27. Ubhayawardana N., Weerasekera M., Weerasekera D., Samarasinghe K., Gunasekera C., Fernando N. (2015), "Detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains in a dyspeptic patient population in Sri Lanka by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism", *Indian journal of medical microbiology*, 33(3), pp. 374.
28. Van Doorn L.-J., Glupczynski Y., Kusters J. G., Mégraud F., Midolo P., Maggi-Solcà N., Queiroz D. M., Nouhan N., Stet E., Quint W. G. (2001), "Accurate prediction of macrolide resistance in *Helicobacter pylori* by a PCR line probe assay for detection of mutations in the 23S rRNA gene: multicenter validation study", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(5), pp. 1500-1504.
29. 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.
30. 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.
31. 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.