

NGHIÊN CỨU ĐỘT BIẾN ĐIỂM KHÁNG CLARITHROMYCIN CỦA HELICOBACTER PYLORI Ở QUẢNG NGÃI BẰNG KỸ THUẬT PCR- RFLP

Phạm Ngọc Doanh¹, Trần Văn Huy¹, Hà Thị Minh Thi²

(1) Bộ môn Nội trường Đại học Y Dược Huế

(2) Bộ môn Di truyền y học trường Đại học Y Dược Huế

Tóm tắt

Cơ sở và mục đích: Mục đích của nghiên cứu này là xác định tỷ lệ các đột biến gen đề kháng clarithromycin phổ biến trên gen 23S ribosomal robonucleotide axit (rRNA) của H.pylori ở bệnh nhân viêm dạ dày mạn tại bệnh viện đa khoa Quảng Ngãi bằng kỹ thuật PCR-RFLP. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Đây là nghiên cứu cắt ngang, mô tả ở 64 bệnh nhân nhiễm H.pylori được xác định bằng 3 phương pháp và viêm dạ dày mạn được chứng minh bằng mô học. Mẫu nghiên cứu được thực thu thập tại bệnh viện đa khoa tỉnh Quảng Ngãi và xét nghiệm sinh học phân tử được thực hiện tại bộ môn di truyền học trường Đại học Y Dược Huế. Xét nghiệm urease nhanh, xét nghiệm mô bệnh học nhuộm HE và thực hiện phản ứng PCR một đoạn gen 23S rRNA của H.pylori để xác định nhiễm H.pylori. Phân tích các đột biến điểm trong gen 23S rRNA được thực hiện bằng kỹ thuật PCR-RFLP. **Kết quả:** Trong số 64 mẫu sinh thiết đủ điều kiện đưa vào nghiên cứu, có 41 mẫu có đột biến điểm đề kháng clarithromycin (64%), trong đó 40 (62,5%) có đột biến A2143A, một mẫu có đột biến A2142A (2%). Không có mẫu nào có đột biến A2142C và cũng không có mẫu nào có trên 1 đột biến. **Kết luận:** Đây là lần đầu tiên chúng tôi báo cáo đột biến của H.pylori ở Quảng Ngãi. Tỷ lệ có đột biến khá cao biến gặp nhiều nhất là A2143G và không có đột biến A2142C.

Từ khóa: *Helicobacter pylori, đề kháng clarithromycin, PCR-RFLP, đột biến điểm*

Abstract

PCR-RFLP DETECTION OF POINT MUTATIONS CONFERRING RESISTANCE TO CLARITHROMYCIN OF HELICOBACTER PYLORI IN QUANG NGAI

Pham Ngoc Doanh¹, Tran Van Huy¹, Ha Thi Minh Thi²

(1) Department of Internal Medicine, Hue University of Medicine and Pharmacy

(2) Department of Medical Genetics, Hue University of Medicine and Pharmacy

Background: Clarithromycin resistance of H.pylori is the main cause leading to treatment failure. **Aim:** The purpose of this study was to determine the rate of clarithromycin resistance mutation on gene 23S ribosomal popular robonucleotide acid (rRNA) of H.pylori in patients with chronic gastritis in Quang Ngai General Hospital PCR-RFLP. **Method:** This is a cross-sectional study in 64 patients infected with H.pylori was determined by 3 methods and chronic gastritis proven by histology. Sample collection conducted in Quang Ngai general hospital and molecular biology tests were conducted in the medical genetics department Hue of Medical and Pharmaceutical University. Urease test, histopathological examination and perform HE staining PCR 23S rRNA gene fragment of H.pylori to determine H.pylori infection. Analysis of genetic mutations in the 23S rRNA point is performed by PCR-RFLP technique.

- Địa chỉ liên hệ: Phạm Ngọc Doanh, email: thudoanh123@yahoo.com.vn

DOI: 10.34071/jmp.2015.4+5.7

- Ngày nhận bài: 17/10/2015 * Ngày đồng ý đăng: 04/11/2015 * Ngày xuất bản: 12/11/2015

Results: Of the 64 biopsies qualify included in the study, 41 samples with clarithromycin resistance point mutations (64%), of which 40 (62.5%) had mutations A2143A, one sample with A2142A (2%). No samples had mutations A2142C and no more than one mutation. **Conclusion:** This is the first time we report mutations related to clarithromycin of *H.pylori* in Quang Ngai province. Mutations rate is high (64%), among the common mutations, the most common mutantation is A2143G.

Key words: *Helicobacter pylori*, clarithromycin resistance, PCR-RFLP, point mutations.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Helicobacter pylori (*H.pylori*) gây nhiễm trên một nửa dân số người lớn toàn cầu[14], vai trò của vi khuẩn này đối với các bệnh lý đường tiêu hóa như khó tiêu không do loét, viêm dạ dày mạn, loét dạ dày tá tràng, u lympho dạ dày đã được công nhận [32],[4] và đã được tổ chức nghiên cứu ung thư thế giới xếp vào nhóm I gây ung thư[11]. Đã hơn 3 thập kỷ từ khi được khám phá, vi khuẩn này vẫn còn là một bí ẩn[27]. Việc điều trị tiệt trừ vi khuẩn vẫn còn là một khó khăn đối với thầy thuốc bởi vì phác đồ 3 thuốc chuẩn ngày càng giảm tỷ lệ thành công [32]. Nguyên nhân thất bại chính là do đề kháng kháng sinh của vi khuẩn ngày càng gia tăng, trong đó quan trọng nhất là đề kháng clarithromycin [20]. Tỷ lệ đề kháng clarithromycin đang ngày càng gia tăng trên toàn thế giới[10], [19], [20], [29], châu Á và Việt nam cũng không ngoại lệ [2], [12]. Thông tin về tình hình đề kháng clarithromycin ở từng địa phương là rất quan trọng vì nó quyết định phác đồ lựa chọn trong điều trị lần đầu[19]. Cơ chế đề kháng clarithromycin chủ yếu là do các đột biến điểm trên gen 23S rRNA của vi khuẩn. Trong số các đột biến điểm đó, 3 đột biến thường xảy ra nhất và được nghiên cứu nhiều nhất là đột biến A2142G, A2142C, A2143G[13]. Theo Kim và cs hai đột biến thường gặp nhất là A2142G, A2143G chịu trách nhiệm trong hơn 90% trường hợp *H.pylori* đề kháng clarithromycins từ các nghiên cứu ở Hoa Kỳ, châu Âu và châu Á[17]. Có nhiều kỹ thuật để chẩn đoán các đột biến này như PCR-oligonucleotide ligase assay (PCR-OLA)[25], PCR-line prob assay (PCR-LipA)[30], PCR-DNA enzyme immunoassay (PCR-DEIA)[25], PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)[21]. Trên cơ sở phản ứng khuếch đại chuỗi gen (PCR, polymerase chain reaction), sản phẩm sẽ được xử lý để xác định các đột biến gen của

vi khuẩn, trong đó kỹ thuật PCR-RFLP là một kỹ thuật dễ thực hiện, tốn ít thời gian[21]. Tại Việt Nam năm 2013, bộ môn di truyền học trường Đại học Y Dược Huế bước đầu áp dụng kỹ thuật này và đã đưa ra một quy trình ứng dụng khả thi trên một cỡ mẫu nhỏ[3]. Ngoài ra chưa có một nghiên cứu nào khác ứng dụng kỹ thuật này để chẩn đoán đề kháng clarithromycin của *H.pylori*. Chúng tôi nghiên cứu đề tài này nhằm mục đích: Áp dụng kỹ thuật PCR-RFLP đánh giá tỷ lệ các đột biến điểm đề kháng clarithromycin A2142G, A2143G, A2142C của *H.pylori* ở bệnh nhân viêm dạ dày mạn tại bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ngãi.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu gồm 64 bệnh nhân viêm dạ dày đã được chẩn đoán xác định bằng nội soi và sinh thiết niêm mạc dạ dày có viêm dạ dày mạn.

Làm test nhanh (urease test) xác định có nhiễm *H.pylori*, nhuộm mô bệnh học bằng H&E.

Loại trừ những trường hợp có điều trị tiệt trừ *H.pylori* trong vòng 4 tuần, có loét dạ dày tá tràng hoặc nghi có u dạ dày trên nội soi

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả cắt ngang. Các bước nghiên cứu như sau:

2.2.1. Phương pháp thu thập mẫu nghiên cứu

Thu thập mẫu nghiên cứu tại phòng Nội Soi, bệnh viện Đa khoa Quảng Ngãi. 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 hàng vị để khảo sát nhiễm *H.pylori* và sau đó sẽ xác định đột biến gene đề kháng clarithromycin. Tiến hành thử test nhanh (urease test) ngay tại khoa Nội soi để xác định sơ bộ có nhiễm *H.pylori*. Sau đó xét nghiệm mô học, nhuộm H&E xác định có viêm dạ dày mạn. Mẫu sinh thiết niêm mạc dạ

dày đã làm xét nghiệm Clotest dương tính được lưu trữ trong TE ở -20° C tại khoa Huyết học Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Ngãi. Sau đó được vận chuyển đến bộ môn di truyền Y học, trường Đại học Y Dược Huế để làm xét nghiệm PCR-RFLP.

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

Tách chiết DNA từ mảnh sinh thiết niêm mạc dạ dày theo protocol chuẩn của kit Wizard Genomic DNA purification (Promega). DNA sau khi tách chiết được đo trên máy Nanodrop rồi pha loãng ở nồng độ 100 ng/uL

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

- Kỹ thuật PCR để khuếch đại đoạn gen 23S rRNA có chứa vị trí các đột biến phổ biến nhất: A2142G, A2143G và A2142C được thực hiện tại bộ môn di truyền học trường Đại học Y Dược Huế

- Trình tự cặp mồi được thiết kế bởi Menard [21]

Mồi xuôi 5'-AGGTTAAGAGGATGCGTCAGTC-3' (HPY-S)

Mồi ngược 5' -CGCATGATATCCCATAGCAGT-3' (HPY-A)

- Các thành phần tham gia phản ứng PCR: Sử dụng bộ sinh phẩm kit Go Taq Green Master Mix (Promega)

Thể tích phản ứng là 25μL gồm:

+12,5 μL Go Taq Green Master Mix 2X

+ 1 μL mồi xuôi (10pmol/ μL)

+ 1 μL mồi ngược (10pmol/ μL)

+ 9,5 μL nước cất

+ 1 μL DNA (100pmol/ μL)

- Điều kiện PCR: Thực hiện phản ứng trên máy luân nhiệt Applied Biosystem 2720, gồm các giai đoạn:

+ Biến tính ban đầu: 95°C trong 5 phút

+Tiếp theo 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.

+ Giai đoạn kéo dài cuối cùng 72°C trong 10 phút

- Kiểm tra sản phẩm PCR: Điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1% trong 30 phút, ở điện thế 80 V, có kèm theo thang chuẩn 100 bp. Đọc kết quả dưới đèn cực tím. Kích thước sản phẩm là 267 bp.

-Cách đổ gel agarose 1%.

-Chuẩn bị khuôn : khuôn dùng để đổ gel (kích thước 7 cm x 6,5 cm) phải được đặt trên mặt phẳng nằm ngang. Dùng thủy bình ké (ligo) để cân chỉnh, đồng thời gắn lược cho khuôn.

- Chuẩn bị bình thủy tinh, cho vào bình V= 7,5 cm x 6,5 cm x 0,4 cm + 18,2 ml dung dịch TBE 1X, cân 0,182 g agarose cho tiếp vào bình, lắc đều cho agarose tan.

- Cho bình chứa agarose vào lò vi sóng hấp 3 lần, mỗi lần 30 giây, sau mỗi 30 giây lấy bình ra lắc đều cho gel tan hoàn toàn cho đến khi thấy trong suốt là được.

- Làm nguội gel dưới vòi nước đến khoảng 50-60 ° C, cho 0,2 μL dung dịch red safe vào gel lắc đều rồi đổ gel vào khuôn.

- Sau 30 phút gel đông, cho gel vào bình điện di, rút lược ra sau đó nhỏ lần lượt thang chuẩn 100 bp (4 μL), sản phẩm PCR (4 μL) vào các giếng, chạy điện di ở điện thế 80 V trong 30 phút. Nhuộm ethidium bromide và đọc dưới đèn cực tím. Kích thước sản phẩm là 267 bp.

2.2.4. Phương pháp xác định các đột biến A2142G, A2143G và A2142C trên gen 23S rRNA bằng kỹ thuật PCR-RFLP

+ Thành phần phản ứng: Thể tích phản ứng cắt bằng enzyme *BbsI*, *BasI* và *BceAI* là 15 μL.

Bảng 1. Các thành phần tham gia trong Kỹ thuật PCR-RFLP

Thành phần phản ứng	Xác định đột biến A2142G	Xác định đột biến A2143G	Xác định đột biến A2142C
Dung dịch đệm 10 X	1,5 μL	1,5 μL	1,5 μL
Enzyme	5 U <i>BbsI</i>	5 U <i>BsaI</i>	0,5 U <i>BceAI</i>
Sản phẩm PCR	2μL	2μL	2μL
Nước cất	Thêm đủ 15μ	Thêm đủ 15μ	Thêm đủ 15μ

+ Điều kiện ủ
 Các thành phần của phản ứng sau khi được trộn đều, ủ ở 37 °C trong bể điều nhiệt, thời gian ủ là 16 giờ
 + Kiểm tra sản phẩm RFLP

Điện di sản phẩm trên gel agarose 2,5%, kích thước 10 cm x 7 cm x 0,4 cm trong 120 phút ở điện thế 80 V có kèm thang chuẩn 25 bp. Đọc kết quả dưới đèn cực tím.

Sản phẩm sau khi cắt bằng *BbsI*, *BsaI*, và *BceI*

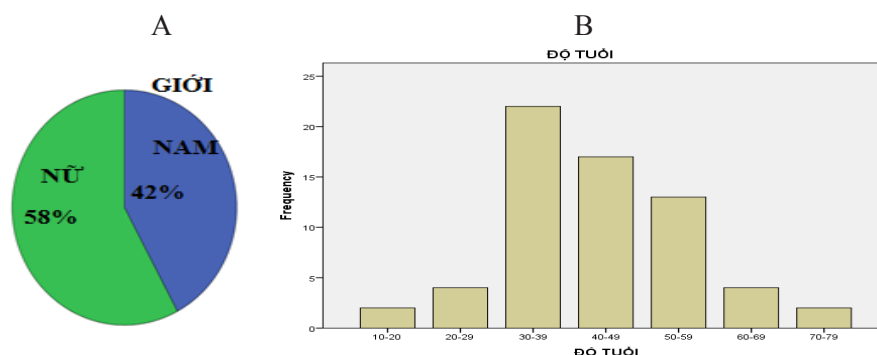
Bảng 2. Sản phẩm sau khi cắt bằng các enzym giới hạn

Số băng	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>BceI</i>	
	1	2	1	2	1	2
Kích thước	267 bp	219 bp 48 bp	267 bp	207 bp 60 bp	195 bp 48bp 24bp	153 bp 48 bp 42 bp 24 bp

1: không có đột biến, 2: có đột biến

3. KẾT QUẢ

Chúng tôi khảo sát 64 bệnh nhân đủ điều kiện đưa vào nghiên cứu gồm 37 (58%) và 27 nam (42%). Tuổi trung bình 43.



Hình 1. Phân bố về giới (A), độ tuổi (B)

Trong số 64 mẫu sinh thiết của 64 bệnh nhân khác nhau được phân tích, tất cả đều chứng tỏ có sự hiện diện của vi khuẩn *H.pylori* bằng kỹ thuật khuếch đại gen với mỗi đặc hiệu được thiết kế bởi Menard [21].

Kết quả phân tích PCR-RFLP, có 41

trường hợp (64,1%) có đột biến đề kháng clarithromycin. Trong đó đột biến A2143G có 40 trường hợp (62,5%), Đột biến A2142G có một trường hợp và không có trường hợp nào có đột biến A2142C. Không có trường hợp nào có trên 1 đột biến (bảng 1)

Bảng 3. Kết quả PCR-RFLP của 64 mẫu sinh thiết dạ dày xác định các đột biến điểm A2142G, A2143G và A2142C

		Tần số	Tỷ lệ (%)
Đột biến các loại	Có đột biến	41	64,1
	Không có đột biến	23	35,9
Đột biến A2143G	Có đột biến	40	62,5
	Không có đột biến	24	37,5
Đột biến A2142G	Có đột biến	1	1,6
	Không có đột biến	63	98,4
Đột biến A2142C	Có đột biến	0	0
	Không có đột biến	64	100

Trong số 41 mẫu có đột biến, 40 mẫu có đột biến A2143G, 1 mẫu có đột biến A2142G không có mẫu nào có đột biến A2142C và không có mẫu nào có trên 1 đột biến. (bảng 4)

Bảng 4. Tỷ lệ các kiểu đột biến

	n	%
Có đột biến	41	100
A3143G	40	98%
A2143G	1	2%
A2142C	0	0%

4. BÀN LUẬN

4.1. Về kỹ thuật PCR-RFLP và khả năng ứng dụng

Có nhiều phương pháp để chẩn đoán đề kháng clarithromycin của *H.pylori*, các phương pháp này được chia làm 2 nhóm đó là kiểu gen và kiểu hình. Xác định độ nhạy của vi khuẩn với kháng sinh một cách thường quy thường sử dụng nhóm kiểu hình. Các phương pháp này áp dụng sau khi nuôi cấy vi khuẩn, thực hiện kỹ thuật khuếch tán trên thạch hoặc dùng các vạch có tẩm kháng sinh (E-test). Các phương pháp này thường đắt tiền và tốn nhiều thời gian. Một xét nghiệm hoàn chỉnh phải mất đến 2 tuần[18]. Hơn nữa, các phương pháp dựa vào nuôi cấy vi khuẩn có tỷ lệ thất bại khoảng 10% do nhiễm bẩn mẫu sinh thiết hoặc vi khuẩn khó mọc[15]. Trong khi các xét nghiệm dựa vào kiểu hình tốn kém và mất nhiều thời gian thì các kỹ thuật phân tử đã được chứng minh là nhanh hơn và chính xác hơn[18]. Chẩn đoán đề kháng clarithromycin của *H.pylori* bằng kỹ thuật sinh học phân tử chủ yếu là phân tích các đột biến trên gen 23S rRNA. Các kỹ thuật này có thể thực hiện sau khi nuôi cấy nhưng cũng có thể thực hiện trực tiếp trên mẫu sinh thiết hoặc mẫu phân[9],[16],[21]. Theo Klesiewicz và cộng sự [18], hai phương pháp quan trọng nhất được sử dụng để xác định các đột biến là PCR-RFLP và Real-Time PCR, mặc dù các kỹ thuật khác cũng có thể được áp dụng.

Năm 1997 Occhialini và cộng sự đã thực hiện nghiên cứu 2 đột biến A2142G A2143G (lúc đó chưa tìm được enzyme cắt giới hạn đặc hiệu cho đột biến gen A2142C) và cho rằng mặc dù giải trình tự

gen là phương pháp tốt nhất để xác định đột biến điểm, nhưng khó thực hiện và tốn thời gian, do đó việc sử dụng kỹ thuật PCR-RFLP bằng cách sử dụng các enzyme cắt giới hạn BsaI và BbsI để xác định các đột biến A2142G và A2143G là hữu ích khi nghiên cứu dịch tễ học đề kháng macrolide trong tương lai[14].

Năm 2014 Klesiewicz và cs thực hiện nghiên cứu các đột biến đề kháng clarithromycin ở Bồ Đào Nha, tác giả cho rằng kỹ thuật PCR-RFLP thực hiện trên các chủng *H.pylori* được nuôi cấy thuần khiết rút ngắn thời gian 4 ngày so với xác định đề kháng bằng kiểu hình[18]. Trong nghiên cứu này chúng tôi thực hiện kỹ thuật PCR-RFLP trực tiếp trên mẫu sinh thiết dạ dày, xác định nhiễm H-pyori bằng 3 phương pháp đó là xét nghiệm ure nhanh, mô học và khuếch đại gen, không qua bước nuôi cấy, do đó thời gian không quá 2 ngày.

Năm 2007 nghiên cứu của Raymond[24] thấy rằng có mối liên hệ chặt chẽ giữa 3 phương pháp chẩn đoán đề kháng clarithromycin là khuếch tán trên đĩa, E-test và PCR-RFLP. Trên 90 % các chủng đề kháng clarithromycin có đột biến trên gen 23S rRNA gồm A2143G, A2142G và A2142G[23]. Và như vậy PCR-RFLP xác định 3 đột biến này có thể được áp dụng để chẩn đoán đề kháng kháng sinh của *H.pylori*. Ngoài ra, PCR-RFLP còn có thể được sử dụng để xét nghiệm trên mẫu phân, đây là xét nghiệm không xâm lấn có ích trong việc chọn lựa phác đồ điều trị [9]

4.2. Về tỷ lệ đề kháng Clathromycin

Tỷ lệ có đột biến điểm đề kháng kháng sinh trong mẫu nghiên cứu của chúng tôi là 62,5%. Theo Raymond và cs[24], có một mối tương quan chặt chẽ giữa tỷ lệ các đột biến điểm đề kháng clarithromycin với tỷ lệ đề kháng bằng xét nghiệm khuếch tán trên đĩa và E-test. Hơn nữa trên 90% các chủng đề kháng clarithromycin có đột biến trên gen 32S rRNA gồm A2143G, A2142G và A2142C[8],[31]. Do đó có thể ước đoán gần đúng rằng tỷ lệ đề kháng clarithromycin của *H.pylori* trong mẫu nghiên cứu của chúng tôi là 62,5%. Tần suất đề kháng kháng sinh của *H.pylori* ngày càng tăng trên thế giới và trở thành vấn đề sức khỏe toàn cầu[9], trong đó đề kháng clarithromycin là yếu tố quan trọng nhất dẫn đến thất bại điều trị [29].

Tần suất đề kháng clarithromycin rất khác nhau giữa các quốc gia, và ngay cả các vùng khác nhau trong một quốc gia[26]. Tại Việt Nam đã có một số nghiên cứu về đề kháng kháng sinh của *H.pylori*.

Các nghiên cứu đề kháng dựa vào kiểu hình: Năm 2012 Nguyễn Đức Toàn và cộng sự thực hiện kháng sinh đồ bằng kỹ thuật khoan giấy kháng sinh khuếch tán ở bệnh nhân viêm dạ dày và loét tá tràng, tỷ lệ đề kháng clarithromycin là 36,6% [5]. Cùng năm đó, Phan Trung Nam và cộng sự bằng kỹ thuật E-test đã cho thấy tỷ lệ đề kháng clarithromycin ở bệnh nhân nội soi tại trường Đại học Y Dược Huế là 42,6% [2]. Năm 2014 Đinh Cao Minh và Bùi Hữu Hoàng thực hiện kháng sinh đồ bằng phương pháp pha loãng kháng sinh trong thạch bệnh nhân loét dạ dày tá tràng đã điều trị diệt trừ *H.pylori* thất bại tỷ lệ đề kháng clarithromycin là 56,9% [1].

Các nghiên cứu dựa vào kiểu gen: Năm 2014 Trần Thiện Trung và cộng sự thực hiện giải trình tự gen ở những bệnh nhân nội soi được chọn lựa ngẫu nhiên tại Bệnh viện trường Đại học Y dược Thành phố Hồ Chí Minh, tỷ lệ có gen đề kháng clarithromycin là 96,7% [6]. Nghiên cứu của chúng tôi tỷ lệ đề kháng trong các mẫu sinh thiết là 62,5 % là một tỷ lệ khá cao, cao hơn các nghiên cứu trong nước khác và chỉ thấp hơn so với nghiên cứu của Trần Thiện Trung [6]. Đồng thuận Masstricht IV khuyến cáo ở những nơi tỷ lệ đề kháng clarithromycin $\geq 20\%$ thì không nên dùng

phác đồ 3 thuốc chuẩn làm phác đồ lần đầu. Phan Trung Nam [22] trong bài tổng quan năm 2015 đã khuyến cáo không nên sử dụng phác đồ 3 thuốc chuẩn làm phác đồ lần đầu ở Việt Nam nếu chưa đánh giá độ nhạy của clarithromycin. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi ủng hộ quan điểm này

4.3. Về cơ cấu các đột biến gen

Năm 1997, nghiên cứu của Versalovic và cộng sự, trong số 59 chủng có gen đề kháng, có 33 trường hợp có đột biến A2143G (trước kia là A2144G) (52,5%), 23 trường hợp có đột biến A2142G (trước kia là A2143G) (38,9%), còn lại 5 trường hợp không xác định (8,5%)[31]. Năm 2010, Ben Mansour và cộng sự nghiên cứu trên 273 mẫu sinh thiết cả người lớn và trẻ em người Tunisia, trong số 42 chủng có đột biến gen đề kháng trên gen 23S rRNA, đột biến A2143G có 5 trường hợp, chiếm 88%, đột biến A2142G có 37 trường hợp, chiếm 12% và không có đột biến A2142C [7]. Mẫu nghiên cứu của chúng tôi cho thấy đa số các đột biến là A2143G, tương đương với một số nghiên cứu khác [4], [13], và thuộc nhóm có mức độ đề kháng thấp[20]. Ngược lại, nghiên cứu ở Sri-Lanka của Ubhayawardana và cộng sự [28], tất cả 15 mẫu đề kháng kháng sinh đều có đột biến A2142G (100%), không có một đột biến A2143G nào. Nghiên cứu ở Hoa Kỳ, tỷ lệ A2142G (55%) có cao hơn A2143G nhưng không quá nhiều (45%)[25]. Nói chung tỷ lệ các đột biến có khác nhau giữa các nghiên cứu (bảng 5).

Bảng 5. Tỷ lệ các đột biến của một số nghiên cứu

Đột biến	Ben Mansour và cộng sự[7]	Versalovic và cộng sự[31]	Ubhayawardana và cộng sự[28]	Klesiewicz và cộng sự[18]	Stone và cộng sự [25]	Chúng tôi
	n = 42	59	15	18	40	41
A2143G	37 (88%)	33 (52,5%)	0 (0%)	9 (50%)	22 (55%)	40 (98%)
A2142G	5 (12%)	23 (38,9%)	15 (100%)	9 (50%)	18 (45%)	1 (2%)
A2142C	0 (0%)					
K h ô n g xác định		5 (8,5%)				

5. KẾT LUẬN

Đề kháng clarithromycin của *H.pylori* tại Quảng Ngãi thuộc vào nhóm có tỷ lệ cao. Đột biến liên quan đến đề kháng clarithromycin chủ yếu là

A2143G. Kỹ thuật PCR-RFLP là kỹ thuật tương đối đơn giản, ít tốn thời gian do đó có thể áp dụng thường quy để chẩn đoán đề kháng clarithromycin của *H.pylori*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. 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 tiệt trừ thất bại. Tạp chí Khoa học tiêu hóa Việt Nam, Hội nghị tiêu hóa các nước Đông Nam Á lần thứ 10.
2. Phan Trung Nam và cs (2014). Đề kháng clarithromycin và levofloxacin của helicobacter pylori: so sánh phương pháp đĩa khuếch tán và E- test. Tạp chí Khoa học tiêu hóa Việt nam, Tài liệu hội nghị tiêu hóa các nước Đông Nam Á lần thứ 10, 13-14.
3. Hà Thị Minh Thi, Trần Văn Huy (2013). Ứng dụng kỹ thuật PCR-RFLP để xác định các đột biến A2142G và A2143G trên gen 23S rRNA gây đề kháng clarithromycin của vi khuẩn Helicobacter pylori. Tạp chí Y Dược Học, trường Đại học Y Dược Huế (14), 56-63.
4. Nguyễn Đức Toàn (2012). Tình hình kháng kháng sinh của helicobacter pylori ở bệnh nhân viêm dạ dày và loét tá tràng. Tạp chí Khoa học tiêu hóa Việt Nam, VII (27), 1783-1788.
5. Nguyễn Đức Toàn và cs (2012). Tình hình kháng kháng sinh của helicobacter pylori ở bệnh nhân viêm dạ dày và loét tá tràng. Tạp chí Khoa học tiêu hóa Việt Nam, VII(27), 1783-1789.
6. Trần Thiện Trung và (2014). Nghiên cứu bước đầu các đột biến kháng thuốc Clarithromycin và Levofloxacin của vi khuẩn H.pylori bằng giả trình tự gen. Tạp chí Khoa học tiêu hóa Việt Nam, IX(37), 2367-2375.
7. Ben Mansour K., Buruoca C., Zribi M., Masmoudi A., Karoui S., Kallel L., et al. (2010). Primary resistance to clarithromycin, metronidazole and amoxicillin of Helicobacter pylori isolated from Tunisian patients with peptic ulcers and gastritis: a prospective multicentre study. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 9, 22.
8. Binh T. T., Shiota S., Suzuki R., Matsuda M., Trang T. T., Kwon D. H., et al. (2014). Discovery of novel mutations for clarithromycin resistance in Helicobacter pylori by using next-generation sequencing. J Antimicrob Chemother, 69(7), 1796-1803.
9. Booka M., Okuda M., Shin K., Miyashiro E., Hayashi H., Yamauchi K., et al. (2005). Polymerase chain reaction--restriction fragment length polymorphism analysis of clarithromycin-resistant Helicobacter pylori infection in children using stool sample. Helicobacter, 10(3), 205-213.
10. Camargo M. C., Garcia A., Riquelme A., Otero W., Camargo C. A., Hernandez-Garcia T., et al. (2014). The problem of Helicobacter pylori resistance to antibiotics: a systematic review in Latin America. Am J Gastroenterol, 109(4), 485-495.
11. Caselli M., Zullo A., Maconi G., Parente F., Alvisi V., Casetti T., et al. (2007). Cervia II Working Group Report 2006: guidelines on diagnosis and treatment of Helicobacter pylori infection in Italy. Dig Liver Dis, 39(8), 782-789.
12. Chang S. C., Chen Y. C., Hu O. Y. (2001). Antibiotic use in public hospitals in Taiwan after the implementation of National Health Insurance. J Formos Med Assoc, 100(3), 155-161.
13. Francesco, V. D., Zullo, A., Hassan, C., Giorgio, F., Rosania, R., Ierardi, E. (2011). Mechanisms of Helicobacter pylori antibiotic resistance: An updated appraisal. World J Gastrointest Pathophysiol, 2(3), 35-41.
14. Gasparetto, M., Pescarin, M., Guariso, G. (2012). Helicobacter pylori Eradication Therapy: Current Availabilities. ISRN Gastroenterol, 2012, 186734.
15. Gerrits M. M., Godoy A. P., Kuipers E. J., Ribeiro M. L., Stoof J., Mendonca S., et al. (2006). Multiple mutations in or adjacent to the conserved penicillin-binding protein motifs of the penicillin-binding protein 1A confer amoxicillin resistance to Helicobacter pylori. Helicobacter, 11(3), 181-187.
16. 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. J Dig Dis, 11(2), 101-105.
17. Kim K. S., Kang J. O., Eun C. S., Han D. S., Choi T. Y. (2002). Mutations in the 23S rRNA gene of Helicobacter pylori associated with clarithromycin resistance. J Korean Med Sci, 17(5), 599-603.
18. Klesiewicz K., Nowak P., Karczewska E., Skiba I., Wojtas-Bonior I., Sito E., et al. (2014). PCR-RFLP detection of point mutations A2143G and A2142G in 23S rRNA gene conferring resistance to clarithromycin in Helicobacter pylori strains. Acta Biochim Pol, 61(2), 311-315.
19. Malferteiner, P., Megraud, F., O'Morain, C. A., Atherton, J., Axon, A. T., Bazzoli, F., et al. (2012), "Management of Helicobacter pylori infection--the Maastricht IV/ Florence Consensus Report". Gut, 61(5), 646-664.
20. Megraud F., Coenen S., Versporten A., Kist M.,

- Lopez-Brea M., Hirschl A. M. et al. (2013). *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. *Gut*, 62(1), 34-42.
21. Menard A., Santos A., Megraud 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. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(4), 1156-1157.
 22. Nam P. T., Huy T. V., Hoa T. T. N., An L. V., Antonella Santona S. R., Bianca Paglietti (2015). Antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*: current situation and management strategy in Vietnam. *J Infect Dev Ctries* 9(6), 609-613.
 23. Phan T. N., Santona A., Tran V. H., Tran, T. N., Le V. A., Cappuccinelli P., et al. (2015). High rate of levofloxacin resistance in a background of clarithromycin- and metronidazole-resistant *Helicobacter pylori* in Vietnam. *Int J Antimicrob Agents*, 45(3), 244-248.2.
 24. Raymond J., Burucoa C., Pietrini O., Bergeret M., Decoster A., Wann A., et al. (2007). Clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from French children: prevalence of the different mutations and coexistence of clones harboring two different mutations in the same biopsy. *Helicobacter*, 12(2), 157-163.
 25. Stone G. G., Shortridge D., Versalovic J., Beyer J., Flamm R. K., Graham D. Y., et al. (1997). A PCR-oligonucleotide ligation assay to determine the prevalence of 23S rRNA gene mutations in clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*, 41(3), 712-714.
 26. Tepes B., O'Connor A., Gisbert J. P., O'Morain C. (2012). Treatment of *Helicobacter pylori* infection 2012. *Helicobacter*, 17 Suppl 1, 36-42.
 27. Testerman T. L., Morris J. (2014). Beyond the stomach: an updated view of *Helicobacter pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment. *World J Gastroenterol*, 20(36), 12781-12808.
 28. Ubhayawardana N. L., Weerasekera M. M., Weerasekera D., Samarasinghe K., Gunasekera C. P., 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 J Med Microbiol*, 33(3), 374-377.
 29. Vakil N., Megraud F. (2007). Eradication therapy for *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 133(3), 985-1001.
 30. van Doorn L. J., Glupczynski Y., Kusters J. G., Megraud F., Midolo P., Maggi-Solca N., et al. (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. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(5), 1500-1504.
 31. Versalovic J., Osato M. S., Spakovsky K., Dore M. P., Reddy R., Stone G. G., et al. (1997). Point mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with different levels of clarithromycin resistance. *J Antimicrob Chemother*, 40(2), 283-286.
 32. Yang J. C., Lu C. W., Lin C. J. (2014). Treatment of *Helicobacter pylori* infection: current status and future concepts. *World J Gastroenterol*, 20(18), 5283-5293.