

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT PCR-RFLP ĐỂ XÁC ĐỊNH CÁC ĐỘT BIẾN A2142G VÀ A2143G TRÊN GENE 23S rRNA GÂY ĐỀ KHÁNG CLARITHROMYCIN CỦA VI KHUẨN *HELICOBACTER PYLORI*

Hà Thị Minh Thi, Trần Văn Huy

Trường Đại học Y Dược Huế

Tóm tắt

Đặt vấn đề và mục tiêu: Đề kháng clarithromycin của *Helicobacter pylori* là một nguyên nhân quan trọng làm giảm hiệu quả diệt trừ *H.pylori*. Đề tài nhằm mục tiêu: (1) Đánh giá việc ứng dụng kỹ thuật PCR-RFLP để xác định các đột biến A2142G, A2143G trên gene 23S rRNA gây kháng clarithromycin của *Helicobacter pylori*. (2) Khảo sát tỷ lệ các đột biến A2142G, A2143G trên gene 23S rRNA gây kháng clarithromycin của *Helicobacter pylori* ở các bệnh nhân viêm loét dạ dày-tá tràng bằng kỹ thuật PCR-RFLP. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** 38 bệnh nhân viêm loét dạ dày-tá tràng có nhiễm *Helicobacter pylori* được xác định bằng test nhanh và PCR. Kỹ thuật PCR-RFLP được thực hiện gồm hai bước: khuếch đại đoạn gene 23S rRNA chứa các vị trí 2142 và 2143, tiếp theo sau bởi phản ứng cắt sản phẩm PCR bằng các enzyme BbsI và BsaI để xác định các đột biến A2142G và A2143G. Lượng enzyme sử dụng trong phản ứng cắt được khảo sát ở các mức khác nhau (5U; 7,5U; 10U; 15U và 20U) nhằm xác định lượng enzyme tối ưu. **Kết quả nghiên cứu:** Thành phần phản ứng cắt được tối ưu hóa như sau: thực hiện trong thể tích dung dịch 20 µl, gồm 5 µl sản phẩm PCR (khuếch đại đoạn gene 23S rRNA chứa các vị trí 2142 và 2143), 10 U enzyme (BsaI để phát hiện A2143G, BbsI để phát hiện A2142G), 2 µl đệm G 2X, nước cất cho đủ thể tích. Đã phát hiện được 17 trường hợp mang đột biến A2143G, chiếm tỷ lệ 44,7%. Không có trường hợp đột biến A2142G nào được phát hiện. **Kết luận:** Kỹ thuật PCR-RFLP có thể ứng dụng thường quy để phát hiện đột biến A2142G và A2143G trên gene 23S rRNA gây kháng clarithromycin của *Helicobacter pylori*. Tỷ lệ mang gene đột biến trong nghiên cứu này khá cao.

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

Abstract

DETECTING POINT MUTATIONS A2142G AND A2143G IN THE 23S rRNA GENE CAUSING *HELICOBACTER PYLORI* RESISTANCE TO CLARITHROMYCIN BY PCR RFLP

Ha Thi Minh Thi, Tran Van Huy

Hue University of Medicine and Pharmacy

Background: Clarithromycin-resistance of *H.pylori* is one important cause of decreasing eradication rate of *H.pylori*. This study is aimed at: (1): evaluating the application of PCR RFLP in detecting point mutations A2142G and A 2143G in the 23SrRNA gene resulting Clarithromycin-resistant *H.pylori*. (2) determining the rate of these point mutations by PCR RFLP in patients with gastroduodenitis or peptic ulcers. **Patients and methods:** 38 patients with gastroduodenitis or peptic ulcer were enrolled. *H.pylori* infection was confirmed by rapid Urease test and PCR. PCR was performed in two phases: amplification

- Địa chỉ liên hệ: Trần Văn Huy, email: bstranvanhuy@gmail.com

DOI: 10.34071/jmp.2013.2.8

- Ngày nhận bài: 12/3/2013 * Ngày đồng ý đăng: 20/4/2013*Ngày xuất bản: 30/4/2013

of gene 23S rRNA containing A2143 and A2142, followed by digestion of PCR products by enzymes BbsI and BsaI in order to detecting point mutations A2143G and A2142G. Different quantities of enzyme of digestion were evaluated (5U; 7,5U; 10U; 15U and 20U) in order to determine an optimal quantity.

Results: The components of digesting reaction were optimized as followings: performed in a solution volume of 20 µl, including 5 µl PCR products (to amplify gene 23S rRNA containing 2142 and 2143), 10 U enzyme (BsaI to detect A2143G, BbsI to detect A2142G), 2 µl buffer G 2X, and water for a sufficient volume. 17 point mutations A2143G were found (44.7%). **Conclusion:** PCR RFLP could be routinely applied to detect point mutations A2143G and A2142G in the 23S rRNA gene causing clarithromycin-resistant *H.pylori*. The rate of these point mutations in this group of patients was relatively high.

Key words: Clarithromycin resistance, gene 23S rRNA, *Helicobacter pylori*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn *Helicobacter pylori* là một tác nhân gây bệnh của nhiều bệnh lý dạ dày khác nhau như loét dạ dày-tá tràng, viêm dạ dày mạn, ung thư dạ dày. Năm 1994, Tổ chức Y tế thế giới đã xếp *Helicobacter pylori* vào loại gây ung thư nhóm 1 tức là nhóm đã được xác định rõ ràng [8]. Vì vậy, điều trị tiệt trừ *Helicobacter pylori* đóng vai trò rất quan trọng trong phác đồ điều trị các bệnh lý viêm loét dạ dày- tá tràng và góp phần giảm nguy cơ ung thư dạ dày. Clarithromycin là kháng sinh thuộc họ macrolide và được sử dụng hàng đầu trong các phác đồ điều trị *Helicobacter pylori*. Tuy nhiên, một thách thức rất lớn trong điều trị tiệt trừ *Helicobacter pylori* hiện nay là vấn đề kháng clarithromycin. Nhiều nghiên cứu gần đây cho thấy *Helicobacter pylori* kháng clarithromycin ở khu vực châu Á-Thái Bình Dương lên đến xấp xỉ 20% [7] và làm giảm hiệu quả điều trị *Helicobacter pylori* trong hơn 50% trường hợp [6].

Từ trước đến nay, các kỹ thuật vi sinh vẫn được coi là tiêu chuẩn vàng trong việc xác định kiểu hình đề kháng clarithromycin của *Helicobacter pylori*. Tuy nhiên đây là loại vi khuẩn rất khó nuôi cấy và phát triển chậm. Vì thế các xét nghiệm nuôi cấy để xác định tính nhạy cảm kháng sinh như phương pháp pha loãng trên agar, pha loãng canh thang, đĩa khuếch tán hay E-test thường cho kết quả muộn, mất 7-14 ngày, hơn nữa còn có thể bỏ sót những trường hợp có nhiễm nhưng nuôi cấy vi khuẩn không mọc [17].

Từ năm 1996, Versalovic đã phát hiện được

các đột biến điểm ở vị trí 2142 và 2143 trên gene 23S rRNA của *Helicobacter pylori* liên quan đến đề kháng clarithromycin của vi khuẩn này [15]. Hai đột biến thường gặp là A2142G, A2143G chịu trách nhiệm trong hơn 90% trường hợp *Helicobacter pylori* đề kháng clarithromycin [11], [13]. Vì vậy, việc sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử nhằm phát hiện đột biến gene 23S rRNA của *Helicobacter pylori* là một lựa chọn hàng đầu hiện nay trong việc chẩn đoán kháng clarithromycin. Mặt khác, do các đột biến trên đều có liên quan đến vị trí nhận biết của các enzyme cắt hạn chế (restriction enzyme) nên có thể phát hiện bằng kỹ thuật PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism), là một kỹ thuật sinh học phân tử đơn giản, có thể thực hiện ở các phòng thí nghiệm có hệ thống PCR cơ bản. Trong khi đó, ở Việt Nam có rất ít nghiên cứu về *Helicobacter pylori* kháng clarithromycin, và hầu như chưa có nghiên cứu phát hiện đột biến gene 23S rRNA của vi khuẩn này bằng kỹ thuật PCR-RFLP.

Từ thực tế đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm các mục tiêu sau:

1. Đánh giá việc ứng dụng kỹ thuật PCR-RFLP để xác định các đột biến A2142G, A2143G trên gene 23S rRNA gây kháng clarithromycin của *Helicobacter pylori*.

2. Khảo sát tỷ lệ các đột biến A2142G, A2143G trên gene 23S rRNA gây kháng clarithromycin của *Helicobacter pylori* ở các bệnh nhân viêm loét dạ dày-tá tràng bằng kỹ thuật PCR-RFLP.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu gồm 38 bệnh nhân viêm loét dạ dày-tá tràng đã được chẩn đoán xác định bằng nội soi và sinh thiết niêm mạc dạ dày làm test nhanh (urease test) xác định có nhiễm *Helicobacter pylori*.

Loại trừ những trường hợp có điều trị diệt trừ *Helicobacter pylori* trong vòng 4 tuần.

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 khoa Nội Soi, bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế. Các bệnh nhân đến Nội soi dạ dày có thương tổn viêm loét dạ dày-tá tràng 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.

Tiến hành thử test nhanh (urease test) ngay tại khoa 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 TE ở -20°C tại bộ môn Di truyền Y học, trường Đại học Y Dược Huế.

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/μL

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

Sử dụng cặp mồi đặc hiệu gene 16S rRNA của *H. pylori*, được thiết kế bởi Bickley [5], trình tự mồi:

Hp-F: 5'-AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-3'

Hp-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. 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 trên gel agarose 0,8%, điện thế 80 V, 30 phút. Nhuộm ethidium bromide và đọc dưới đèn cực tím. Kích thước sản phẩm là 109 bp.

2.2.4. Phương pháp các đột biến A2142G, A2143G bằng kỹ thuật PCR-RFLP

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

Cặp mồi được thiết kế bởi Ménard (2002) [13]. Trình tự mồi như sau:

HPY-S: 5'-AGGTTAAGAGGATGCGTCAGTC-3'

HPY-A: 5'-CGCATGATATTCCTTAGCAGT-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 55°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 trên gel agarose 0,8%, điện thế 80 V, 30 phút. Nhuộm ethidium bromide và đọc dưới đèn cực tím. Kích thước sản phẩm là 267 bp.

Bước 2: Thực hiện phản ứng cắt sản phẩm PCR bằng các enzyme cắt *BbsI* và *BsaI* (Thermo Scientific).

Thể tích mỗi phản ứng cắt là 20 μl, gồm 2 μL dung dịch đệm G 10X, 5 μl sản phẩm PCR, enzyme cắt, nước cất cho đủ thể tích phản ứng 20 μl. Mỗi phản ứng cắt được thử nghiệm ba lần với ba lượng enzyme cắt khác nhau là 5U, 7,5 U và 10 U. Đối với các mẫu không xuất hiện sản phẩm cắt với cả ba thử nghiệm trên, chúng tôi tiếp tục thử nghiệm với các lượng enzyme lớn hơn nữa là 15 U và 20 U. Ủ trong bể điều nhiệt 37°C, thời gian ủ là 20 giờ.

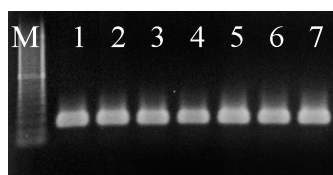
Điện di sản phẩm cắt trên gel agarose 2,5%, thời gian 1 giờ 40 phút. Nhuộm ethidium bromide và đọc kết quả dưới đèn cực tím.

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

	Sản phẩm sau khi cắt bằng BbsI		Sản phẩm sau khi cắt bằng BsaI	
	Bình thường	A2142G	Bình thường	A2143G
Số băng	1	2	1	2
Kích thước	267 bp	219 bp và 48 bp	267 bp	208 bp và 59 bp

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả ứng dụng kỹ thuật PCR-RFLP để xác định đột biến A2142G và A2143G

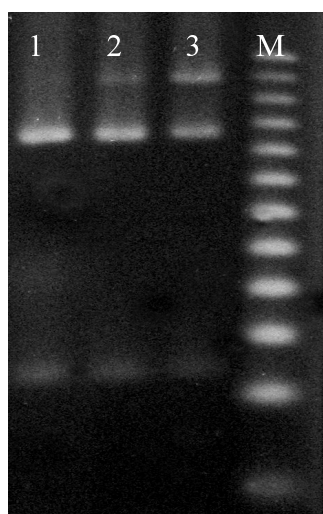


M: thang chuẩn 100 bp

1 đến 7: sản phẩm PCR, kích thước 267 bp

Các băng tương ứng sản phẩm PCR đậm, sắc nét, không có băng không đặc hiệu, không có sản phẩm primer-dimer.

Hình 1. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gene 23S rRNA có chứa vị trí 2142 và 2143



M: thang chuẩn 25 bp

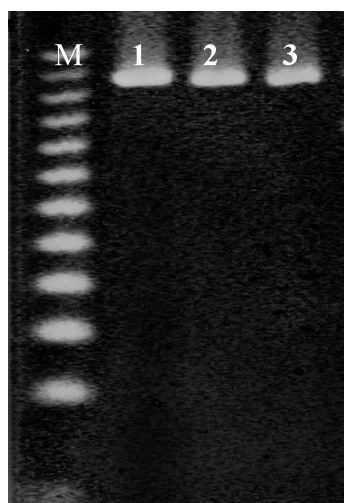
1: sản phẩm cắt với 10 U enzyme BsaI. Có 2 băng kích thước 208 bp và 59 bp. Phản ứng cắt hoàn toàn.

2: sản phẩm cắt với 7,5 U enzyme BsaI. Có 3 băng kích thước 267 bp, 208 bp và 59 bp. Phản ứng cắt không hoàn toàn

3: sản phẩm cắt với 5 U enzyme BsaI. Có 3 băng 267 bp, 208 bp và 59 bp. Phản ứng cắt không hoàn toàn. Băng 267 bp ở cột 3 đậm hơn cột 2 chứng tỏ sản phẩm chưa bị cắt còn nhiều hơn, tức phản ứng cắt kém hơn.

Cả 3 cột được thực hiện với cùng một mẫu sản phẩm PCR. Kết quả chẩn đoán là chủng *Helicobacter pylori* này mang đột biến A2143G

Hình 2. Hình ảnh điện di sản phẩm có mang đột biến A2143G được cắt với các lượng enzyme BsaI khác nhau



M: thang chuẩn 25 bp

1: sản phẩm cắt với 10 U enzyme BsaI

2: sản phẩm cắt với 15 U enzyme BsaI

3: sản phẩm cắt với 20 U enzyme BsaI

Cả 3 cột đều được thực hiện với cùng một mẫu sản phẩm PCR. Nhận xét: Tất cả các phản ứng đều không thấy xuất hiện sản phẩm cắt dù lượng enzyme đã tăng lên đến 20 U.

Kết quả xác định mẫu này không mang đột biến A2143G

Hình 3. Hình ảnh điện di sản phẩm không mang đột biến A2143G được cắt với các lượng enzyme BsaI khác nhau

Đối với phản ứng cắt thực hiện bằng enzyme BbsI để phát hiện đột biến A2142G, chúng tôi không có mẫu nào xuất hiện sản phẩm cắt (219 bp và 48 bp) ở cả 5 mức enzyme sử dụng là 5 U, 7,5 U, 10 U, 15 U và 20 U. Như vậy không có chủng *Helicobacter pylori* nào trong nghiên cứu của chúng tôi có mang đột biến A2142G.

3.2. Tỷ lệ các đột biến A2142G và A2143G của gene 23S rRNA của *Helicobacter pylori* ở bệnh nhân viêm loét dạ dày-tá tràng

Bảng 2. Tỷ lệ các đột biến A2142G và A2143G của gene 23S rRNA

Đột biến	Số lượng	Tỷ lệ %
A2142G	0	0
A2143G	17	44,7
Không có 2 loại đột biến khảo sát	21	55,3
Tổng	38	100

Nhận xét: Tỷ lệ mang đột biến A2143G là 44,7%, không có trường hợp nào mang đột biến A2142G được phát hiện.

4. BÀN LUẬN

4.1. Ứng dụng kỹ thuật PCR-RFLP để xác định đột biến A2142G và A2143G

Kỹ thuật PCR-RFLP là một kỹ thuật sinh học phân tử tương đối đơn giản, có thể thực hiện ở các phòng thí nghiệm được trang bị hệ thống PCR cơ bản. Kỹ thuật này gồm có hai bước được nối tiếp nhau, bước 1 thực hiện PCR để khuếch đại đoạn gene có chứa đột biến cần khảo sát, bước 2 thực hiện phản ứng cắt sản phẩm PCR bằng enzyme cắt hạn chế (restriction enzyme) thích hợp. Tùy theo đột biến tạo ra vị trí nhận biết và cắt mới hoặc làm mất vị trí nhận biết và cắt có sẵn của từng enzyme cắt đặc hiệu trên gene khảo sát mà người ta có thể chọn enzyme cắt sao cho thích hợp. Từ năm 1996, lần đầu tiên Versalovic phát hiện ra hai loại đột biến A2142G và A2143G, tác giả đã xác nhận đột biến A2143G tạo nên vị trí nhận biết và cắt cho enzyme BsaI [15]. Năm 1997, Occhialini đã phát triển kỹ thuật PCR-RFLP để xác định hai

loại đột biến trên, trong đó BsaI được sử dụng cho phản ứng cắt phát hiện đột biến A2143G và BbsI được sử dụng cho phản ứng cắt phát hiện đột biến A2142G [14]. Từ đó đến nay, kỹ thuật PCR-RFLP được sử dụng một cách rộng rãi nhằm mục đích phát hiện hai loại đột biến trên với kết quả nhanh và chính xác.

Hình 1 là hình ảnh điện di sản phẩm PCR với cặp mồi của Menard cho phép khuếch đại đoạn gene 23S rRNA có chứa các vị trí 2142 và 2143. Kết quả cho thấy tất cả các mẫu DNA tách từ mảnh sinh thiết niêm mạc dạ dày của bệnh nhân trong nghiên cứu này đều có sản phẩm PCR với cặp mồi đặc hiệu gene 23S rRNA chứa các vị trí 2142 và 2143. Băng sản phẩm đậm, sắc nét, không có băng không đặc hiệu và băng primer-dimer (xuất hiện nếu có hiện tượng bắt cặp giữa hai mồi). Điều này chứng tỏ cặp mồi chúng tôi sử dụng là đặc hiệu, điều kiện luân nhiệt, các thành phần phản ứng khuếch đại cũng như trang thiết bị được sử dụng tại phòng thí nghiệm là đạt tiêu chuẩn. Với chất lượng và số lượng sản phẩm PCR đã thu được là đủ điều kiện để thực hiện bước tiếp theo.

Trong kỹ thuật PCR-RFLP, bước thực hiện phản ứng cắt là rất quan trọng vì kết quả được xác định đột biến hay bình thường tùy thuộc vào việc có hay không có sản phẩm cắt. Nếu lượng enzyme cắt được sử dụng không đủ hoặc kém chất lượng thì có thể không xảy ra hiện tượng cắt mặc dù vẫn có xuất hiện vị trí cắt do đột biến. Tuy nhiên, chúng ta cũng không thể sử dụng một cách thừa thải lượng enzyme. Ngoài vấn đề lãng phí ra thì việc sử dụng một lượng lớn enzyme sẽ dẫn đến lượng glycerol (là thành phần có trong các ống enzyme được cung cấp từ các hãng sinh phẩm với nồng độ 50%) vượt quá 5% trong thể tích phản ứng cuối cùng và làm giảm hoạt tính enzyme. Các điều kiện nhiệt độ và thời gian ủ cũng như dung dịch đệm luôn được sử dụng theo đúng protocol của nhà cung cấp enzyme, vì vậy việc tối ưu hóa lượng enzyme sử dụng sao cho vừa đủ theo chúng tôi là quan trọng đối với mỗi phòng thí nghiệm, trước khi sử dụng thường quy để chẩn đoán mỗi loại đột biến.

Trong nghiên cứu này chúng tôi so sánh hiệu quả cắt giữa các lượng enzyme được sử dụng cho mỗi phản ứng thể tích 20 µl (trong đó có 5 µl sản phẩm PCR của bước 1) lần lượt là 5 U; 7,5 U và 10 U. Hình 2 cho thấy ở cột 1 tương ứng lượng enzyme BsaI được sử dụng 10 U có 2 băng xuất hiện rõ với kích thước 208 bp và 59 bp, phù hợp với đột biến A2143G. Các cột 2 và 3 tương ứng với lượng enzyme BsaI được sử dụng là 7,5 U và 5 U thì vẫn còn băng 267 bp ngoài hai sản phẩm cắt 208 bp và 59 bp, chứng tỏ phản ứng cắt xảy ra nhưng chưa hoàn toàn. Băng 267 bp ở cột 3 đậm hơn cột 2 là phù hợp với lượng enzyme BsaI được sử dụng ít hơn. Hình 3 là kết quả điện di sau khi thực hiện phản ứng cắt được thực hiện với một trong các mẫu không có sản phẩm cắt với các mức enzyme BsaI là 5 U, 7,5 U và 10 U. Chúng tôi tiếp tục thực hiện phản ứng cắt với lượng enzyme cao hơn, lần lượt là 15 U và 20 U (tương ứng cột 2 và 3). Tất cả đều không có sản phẩm cắt 208 bp và 59 bp mặc dù lượng enzyme đã tăng rất nhiều, chứng tỏ chủng *Helicobacter pylori* tương ứng không mang đột biến A2143G.

Đối với phản ứng cắt bằng enzyme BbsI để xác định đột biến A2142G, chúng tôi đã thử cả 5 lượng enzyme BbsI khác nhau là 5 U, 7,5 U, 10 U, 15 U và 20 U nhưng tất cả đều không có sản phẩm cắt 219 bp và 48 bp cho tất cả 38 trường hợp nghiên cứu. Lượng enzyme BsaI cũng như BbsI mà các tác giả trên thế giới sử dụng cho mỗi phản ứng cắt để xác định các đột biến tương ứng cũng chỉ trong khoảng từ 5-10 U (với thể tích phản ứng cắt là 15-20 µl). Vì vậy, chúng tôi có thể khẳng định rằng trong 38 mẫu nghiên cứu của mình không có chủng *Helicobacter pylori* nào mang đột biến A2142G.

Qua các kết quả đã phân tích, chúng tôi kết luận rằng có thể sử dụng kỹ thuật PCR-RFLP với cặp mồi của Menard, 10 U enzyme cắt mỗi loại (BsaI và BbsI) lần lượt được sử dụng để cắt 5 µl sản phẩm PCR, thể tích phản ứng là 20 µl có thể được sử dụng thường quy nhằm phát hiện đột biến A2143G, A2142G trên gene 23S rRNA của *Helicobacter pylori* từ các mẫu mô sinh thiết niêm

mạc dạ dày. Kỹ thuật này tương đối đơn giản, chi phí không cao, thời gian cho kết quả nhanh chóng (sau 2 ngày).

4.2. Tỷ lệ đột biến A2142G và A2143G trên gene 23S rRNA của *Helicobacter pylori* ở bệnh nhân viêm loét dạ dày-tá tràng

Trong nghiên cứu này, chúng tôi thực hiện trên 38 bệnh nhân đã có kết quả test nhanh và PCR chẩn đoán xác định nhiễm *Helicobacter pylori*. Kết quả cho thấy tỷ lệ các chủng *Helicobacter pylori* mang đột biến A2143G trên gene 23S rRNA là 44,7%, không có chủng nào mang đột biến A2142G. Như vậy tỷ lệ các chủng *Helicobacter pylori* mang đột biến gene 23S rRNA được chúng tôi phát hiện là 44,7%, trong đó A2143G chiếm 100%. Các đột biến gene A2142G và A2143G được xem là thường gặp nhất của gene 23S rRNA gây kháng thuốc clarithromycin. Tần suất các đột biến trong số các chủng *Helicobacter pylori* đề kháng clarithromycin là khác nhau tùy từng khu vực trên thế giới. Nhiều nghiên cứu đã được tổng kết và cho thấy ở Mỹ đột biến A2142G chiếm tỷ lệ 48-53%, còn A2143G chiếm tỷ lệ thấp hơn, khoảng 39-45%, đột biến A2142C chiếm tỷ lệ 0-7%. Còn ở châu Âu thì ngược lại, A2143G chiếm tỷ lệ cao nhất, khoảng 44-67%, trong khi A2142G chỉ 23-33% và A2142C thì chiếm 2-10% [11]. Ở châu Á nhiều nghiên cứu cho thấy tỷ lệ A2143G thì chiếm tỷ lệ cao hơn, như nghiên cứu của Kargar (Iran, 2011) có tỷ lệ A2143G là 68,3%, trong khi A2142G chiếm 15,8% [9]. Một số nghiên cứu ở Nhật Bản như của Maeda (2000) và Kato (2002) thì cho thấy tỷ lệ A2143G chiếm hơn 90% các trường hợp kháng clarithromycin, trong khi không tìm thấy trường hợp nào mang đột biến A2142G [10], [12]. Như vậy nghiên cứu của chúng tôi khá tương đồng với các nghiên cứu ở Nhật Bản.

Sau khi Versalovic phát hiện ra hai loại đột biến kể trên, tác giả cũng nhận thấy có mối tương quan giữa đột biến gene 23S rRNA với nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của clarithromycin, các chủng mang đột biến A2142G có MIC cao hơn (trên 64 mg/l) các chủng mang đột biến A2143G [16]. Sau này, nhiều tác giả khác cũng xác nhận

kết luận trên. Như vậy các chủng mang đột biến gene 23S rRNA gây kháng thuốc clarithromycin trong nghiên cứu của chúng tôi tương ứng với MIC không cao. Tuy nhiên, tỷ lệ có đột biến gene 23S rRNA gây kháng clarithromycin trong nghiên cứu của chúng tôi là khá cao, đến 44,7%. Hiện tại, ở Việt Nam chưa có các công bố được xuất bản nào liên quan đến tỷ lệ các đột biến gene 23S rRNA gây kháng clarithromycin nên chúng tôi chưa so sánh trực tiếp được. Từ trước đến nay, các nghiên cứu kháng clarithromycin của *Helicobacter pylori* chỉ mới thực hiện bằng các phương pháp vi sinh học thông qua nuôi cấy. Nghiên cứu của Lê Đình Minh Nhân năm 2006 cho thấy tỷ lệ kháng clarithromycin ở bệnh nhân viêm loét dạ dày tá tràng là 38,5% [1]. Nghiên cứu của Nguyễn Văn Thịnh (2009) có tỷ lệ này ở bệnh nhân loét hành tá tràng là 21,4% [3]. Năm 2010, Nguyễn Thị Nguyệt đã phân lập các chủng *H. pylori* ở bệnh nhân viêm dạ dày mạn, loét dạ dày và ung thư dạ dày, kết quả cho thấy có 26,67% đề kháng clarithromycin [2]. Nguyễn Đức Toàn cũng khảo sát tình hình kháng kháng sinh của *H. pylori* ở bệnh nhân viêm dạ dày và loét dạ dày tá tràng, nhận thấy tỷ lệ kháng clarithromycin là 36,6% [4]. Như vậy có thể thấy tỷ lệ kháng clarithromycin ở nghiên cứu của chúng tôi cũng như của các tác giả trên đều cao trên 20%. Theo đồng thuật Maastricht, những khu vực có tỷ lệ đề kháng clarithromycin trên 20% đã được gọi là vùng đề kháng clarithromycin cao,

còn khu vực dưới 20% được gọi là vùng đề kháng thấp. Việc xác định tỷ lệ đề kháng clarithromycin trong cộng đồng là rất quan trọng, đây chính là chìa khóa để lựa chọn phác đồ điều trị tiết trừ *Helicobacter pylori*. Tỷ lệ kháng clarithromycin càng ngày sẽ tăng cao một cách nhanh chóng, do sự sử dụng không đúng cách kháng sinh này trong điều trị nhiều bệnh lý khác nhau, chủ yếu là để điều trị các nhiễm khuẩn đường hô hấp và tiết trừ *Helicobacter pylori*. Vì vậy, việc triển khai một kỹ thuật PCR-RFLP thường quy giúp xác định đề kháng clarithromycin của *Helicobacter pylori* là hết sức cần thiết giúp cho nhà lâm sàng có cơ sở để lựa chọn phác đồ điều trị. Kỹ thuật này có các ưu điểm là đơn giản, dễ thực hiện, giá thành không cao, cho kết quả nhanh chóng sau 2 ngày.

5. KẾT LUẬN

5.1. Chúng tôi đã ứng dụng kỹ thuật PCR-RFLP để xác định đột biến A3143G và A2142G trên gene 23S rRNA của *Helicobacter pylori* từ các mẫu sinh thiết dạ dày và có thể đưa vào làm xét nghiệm thường quy. Phản ứng cắt được thực hiện trong thể tích dung dịch 20 μ l, gồm 5 μ l sản phẩm PCR (khuếch đại đoạn gene 23S rRNA chứa các vị trí 2142 và 2143), 10 U enzyme (BsaI để phát hiện A2143G, BbsI để phát hiện A2142G), 2 μ l đệm G 2X, nước cất cho đủ thể tích.

5.2. Tỷ lệ đột biến A2143G là 44,7% (17/38). Không có trường hợp đột biến A2142G nào được phát hiện trong nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Đình Minh Nhân, Võ Thị Chi Mai (2006), “Tính đề kháng kháng sinh của *Helicobacter pylori* trong bệnh viêm loét dạ dày tá tràng”, *Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh*, 10(1), trang 73-75.
2. Nguyễn Thị Nguyệt (2010), “Khảo sát tính kháng thuốc các chủng *Helicobacter pylori* phân lập từ các bệnh nhân viêm dạ dày mạn tính, loét dạ dày và ung thư dạ dày”, *Tạp chí Y học thực hành*, 712(4), trang 20-22.
3. Nguyễn Văn Thịnh (2009), “Tình hình kháng kháng sinh của *Helicobacter pylori* ở những bệnh nhân loét hành tá tràng trong 6 tháng đầu năm 2009”, *Tạp chí Y học thực hành*, 669(8), trang 14-18.
4. Nguyễn Đức Toàn, Tạ Long (2012), “Tình hình kháng kháng sinh của *Helicobacter pylori* với kháng sinh đồ ở bệnh nhân viêm dạ dày và loét tá tràng”, *Tạp chí khoa học Tiêu hóa Việt Nam*, VII(27), trang 1783-1789.
5. Bickley J., Owen J.R., Fraser G.A., Pounder E.R. (1993), “Evaluation of the polymerase chain reaction for detecting the urease C gene of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy sample and dental plaque”, *J. Med. Microbiol.*, 39:338-344.
6. Dore M. P., Leandro G., Realdi G., Sepulveda A. R., Graham D. Y. (2000), “Effect of pretreatment

- antibiotic resistance to metronidazole and clarithromycin on outcome of *Helicobacter pylori* therapy: a meta-analytical approach", *Dig Dis Sci*, 45, pp. 68-76.
7. Fock K. M., Katelaris P., Sugano K., Ang T. L., Hunt R., Talley N. J., Lam S. K., Xiao S-D., Tan H. J., Wu C-Y, Jung H. C., Bui Huu Hoang, Kachintorn U., Goh K-L, Chiba T., Rani A. A. (2009), "Second Asia-Pacific consensus guidelines for *Helicobacter pylori* infection", *Gastroenterology and Hepatology*, 24, pp. 1587-1600.
 8. IARC (International agency for research on cancer) (1994), "Infection with *Helicobacter pylori*", *Schistosomes, Liver Fluke and Helicobacter pylori*, Vol 61, pp.177-179, WHO.
 9. Kargar M., Ghorbani-Dalini S., Doosti A., Baghernejad M. (2011), "Molecular assessment of clarithromycin resistant *Helicobacter pylori* strains using rapid and accurate PCR-RFLP method in gastric specimens in Iran.
 10. Kato S., Fujimura S., Udagawa H., Shimizu T., Maisawa S., Ozawa K., Iinuma K. (2002), "Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains in Japanese children", *J. Clin. Microbiol*, 40:649-653.
 11. Kim K.S., Kang J.O., Eun C.S., Han D.S., Chol T.Y. (2002), "Mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with clarithromycin resistance", *Journal Korean Medical Science*, 17:599-603.
 12. Maeda S., Yoshida H., Matsunaga H., Ogura K., Kawamata O., Shiratori Y., Omata M. (2000), "Detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains by a preferential homoduplex formation assay", *J. Clin. Microbiol*, 38:210-214.
 13. Ménard A., Santos A., Mesgnaud 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 Agent and Chemotherapy*, 46(4):1156-1157.
 14. Occhialini A., Urdaci M., Doucet-Populaire F., Bebear C.M., Lamouliatte H., Megraud F. (1997), "Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes", *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, 41:2724-2728.
 15. Versalovic J., Shortridge D., Kibler K., Griffy M.V., Beyer J., Flamm R.K., Tanaka S.K., Graham D.Y., Go M.F. (1996), "Mutation in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*", *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, 40(2):477-480.
 16. Versalovic J., Osato M.S., Spakovsky K., Dore M.P., Reddy R., Stone G.G., Shortridge D., Flamm R.K., Tanaka S.K., Graham D.Y. (1997), "Point mutation in 23S rRNA gene in *Helicobacter pylori* associated with different levels of clarithromycin resistance", *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, 40:283-286
 17. Xia H. H-X., Fan X-G., Talley N.J. (1999), "Clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* and its clinical relevance", *World Journal of Gastroenterology*, 5(3): 263-266.