

Nghiên cứu xây dựng quy trình chẩn đoán *Helicobacter pylori* kháng clarithromycin bằng sinh học phân tử

Establishing a molecular biology procedure for detecting *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin

Ngô Tất Trung, Trần Thị Thu Hiền,
Trần Thị Huyền Trang, Nguyễn Thị Nhung,
Lê Hữu Song

Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

Tóm tắt

Mục tiêu: Xây dựng phương pháp chẩn đoán nhanh *Helicobacter pylori* (HP) và các đột biến kháng thuốc A2142G, A2143G bằng phương pháp sinh học phân tử. **Đối tượng và phương pháp:** 15 mẫu sinh thiết dạ dày, tá tràng thu thập tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 đã được đưa vào nghiên cứu. Xác định nhiễm HP và HP đột biến kháng clarithromycin đã được tiến hành bằng PCR đặc hiệu allele có tích hợp công nghệ ARMS. Kết quả được so sánh với giải trình tự gene. **Kết quả:** Xét nghiệm PCR đặc hiệu allele có tích hợp công nghệ ARMS đã được xây dựng thành công. Kết quả cho thấy xét nghiệm này có độ nhạy và độ đặc hiệu tương đương giải trình tự gene, nhưng kinh phí ít hơn, yêu cầu về thiết bị và kỹ thuật viên thấp hơn, thời gian để có kết quả ngắn hơn. **Kết luận:** Quy trình xét nghiệm chẩn đoán đồng thời sự có mặt của vi khuẩn và đột biến gene ribosome 23S của nó tại vị trí A2142G, A2143G trong một lần xét nghiệm đã được xây dựng thành công.

Từ khóa: *Helicobacter pylori*, clarithromycin, kháng kháng sinh.

Summary

Objective: To establish a quick and simple molecular approach for the screening of *H. pylori* and *H. pylori* carrying A2142G, A2143G mutations. **Subject and method:** Fifteen HP colonized endoscopic biopsies were collected as studying subject. Modified polymerase chain reaction (PCR) was applied with intergration of amplification refractory mutation system (ARMS) technology. Result was confirmed by direct sequencing. **Result:** PCR-ARMS was successful established. The result showed that it's sensitivity and specificity was similar to direct sequencing, but low price, less required equipment, technician and time-consuming. **Conclusion:** A bi-directional allele specific PCR implemented with amplification refractory mutation system (ARMS) have been launched, which gave absolute concordance to the classical Sanger sequencing analysis.

Keywords: *Helicobacter pylori*, clarithromycin, antibiotic resistance.

Ngày nhận bài: 14/11/2019, ngày chấp nhận đăng: 03/12/2019

Người phản hồi: Ngô Tất Trung, Email: tattrungngo@gmail.com - Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

1. Đặt vấn đề

Vi khuẩn *Helicobacter pylori* (HP) là tác nhân chủ yếu gây ra các bệnh lý dạ dày hành tá tràng như viêm, loét dạ dày hành tá tràng cấp, mạn tính và là một trong những nguyên nhân gây ung thư dạ dày (Marshall BJ 1984; Necchi, Candusso et al. 2007).

Sử dụng kháng sinh diệt HP là một trong những biện pháp quan trọng để điều trị các bệnh lý dạ dày tá tràng nhiễm vi khuẩn này (Malfertheiner P and EJ Kuipers 2007). Tuy nhiên, do tính chất dịch tể học của vi khuẩn cũng như do việc sử dụng kháng sinh không đúng của cộng đồng nên ngày càng có nhiều chủng vi khuẩn kháng kháng sinh xuất hiện. Một trong những kháng sinh quan trọng trong các phác đồ điều trị gần đây là clarithromycin đã và đang có xu hướng giảm hiệu quả, tăng tính kháng (Nguyen, Bengtsson et al).

Chẩn đoán xác định kháng kháng sinh hiện nay vẫn dựa vào nuôi cấy vi khuẩn và làm kháng sinh đồ. Tuy nhiên, vi khuẩn HP thuộc nhóm các vi sinh vật yếm khí, rất khó nuôi cấy và đòi hỏi thời gian nuôi cấy dài, thường là 4 - 6 ngày. Vì thế, việc xây dựng và làm chủ một quy trình chẩn đoán tính kháng thuốc đơn giản hơn thay thế quy trình làm kháng sinh đồ dựa trên nuôi cấy là đòi hỏi cấp thiết.

Các nghiên cứu gần đây cho thấy rằng tính kháng clarithromycin của HP có được là do các đột biến diễn ra trên gene ribosome 23S mã hóa cho enzyme peptidyl transferase (Inderlied 1995). Các đột biến có thể xảy ra tại nhiều vị trí khác nhau trên gene này nhưng phổ biến nhất là 2 vị trí A2142G/C và A2143G (Agudo, Perez-Perez et al.).

Hiện nay, trên thị trường có một số kit chẩn đoán đột biến gene 23S gây kháng clarithromycin của HP, các kit này hoặc tiến hành theo phương pháp real-time PCR có tích hợp công nghệ phân tích điểm tan chảy với độ phân giải cao (high resolution melting curve analysis) (Claudia Schabereiter - Gurtner 2004) (HRMA) hoặc ứng

dụng công nghệ oligo bắt mồi hai lần (dual - priming - oligo) (Philippe Lehours 2011).

Phương pháp HRMA có ưu điểm là có thể xác định được bất cứ đột biến nào xảy ra trong vùng gene 23S được quan tâm dựa trên sự khác biệt về phổ tan chảy huỳnh quang, tuy nhiên nó đòi hỏi phòng thí nghiệm có trang thiết bị hiện đại và vật tư tiêu hao có giá thành cao. Công nghệ oligo bắt mồi hai lần có độ nhạy kỹ thuật cao nhưng primer được thiết kế theo phương án này đắt gấp 10 lần các primer thông thường, hơn nữa quá trình thiết kế các primer này rất phức tạp đòi hỏi nhiều thử nghiệm kỹ thuật trước khi có thể đưa ra được một quy trình thực hiện phản ứng PCR tối ưu (Philippe Lehours 2011). Trong khi đó nếu tiến hành xác định đột biến gene bằng biện pháp giải trình tự chi phí xét nghiệm sẽ rất cao.

Xuất phát từ những lý do đó chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm: *Thiết lập một quy trình chẩn đoán đơn giản rẻ tiền thuận tiện mà có thể vừa xác định sự có mặt của vi khuẩn HP trong mẫu bệnh phẩm đồng thời cho biết sự có mặt của hai đột biến chính A2142G/C và A2143G liên quan đến tính kháng clarithromycin của vi khuẩn HP.*

2. Đối tượng và phương pháp

2.1. Đối tượng

15 mẫu sinh thiết từ các bệnh nhân chẩn đoán nội soi có nghi ngờ viêm, loét dạ dày hành tá tràng được thu thập tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108.

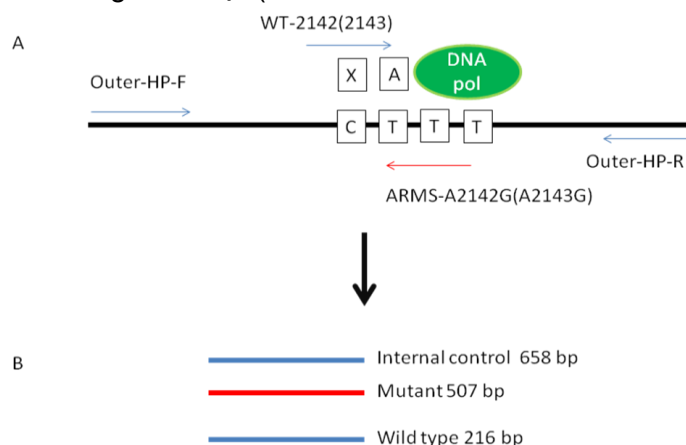
Hóa chất: Phenol, chloroform, isoalmylalcohol, Tris-base Sigma - USA, Taq-DNA polymerase - Promega - USA.

2.2. Phương pháp

PCR đặc hiệu hai hướng allele có tích hợp công nghệ Amplification refractory mutation system (ARMS): Bộ mồi chẩn đoán đột biến tại mỗi vị trí A2142G/C và A2143G được thiết kế bao gồm hỗn hợp 4 primers được thiết kế như

sau (Hình 1): Cặp mồi Outer - HP-F/Outer - HP-R cho phép nhân lên băng nội chuẩn (kích thước 658bp) đặc hiệu cho sự có mặt của HP trong mẫu bệnh phẩm, cặp mồi WT-2142(2143)/Outer - HP-R cho phép nhân lên băng kiểu dại (Wild-

type - 216bp) trong khi đó cặp mồi Outer - HP-F/A2142G(A2143G) hoặc Outer - HP-F/ARMS-A2142G(A2143G) sẽ nhân lên băng đột biến với kích thước là 507bp.



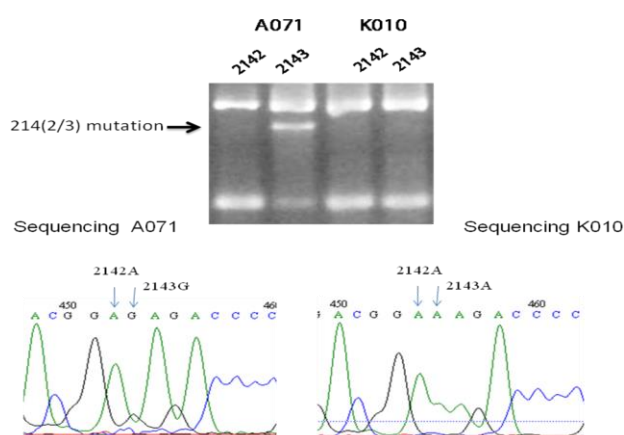
Hình 1. Nguyên lý thiết kế primer và phương pháp PCR đặc hiệu hai hướng allele có tích hợp công nghệ Amplification refractory mutation system (ARMS)

Chú thích: Thông thường để thực hiện các phản ứng PCR đặc hiệu allele mỗi đặc hiệu sẽ bắt cặp bổ sung chính xác với nucleotide đầu tận cùng 3' tại vị trí nghi ngờ có đột biến, tuy nhiên việc thay đổi 1 nucleotide chỉ làm giảm ái lực đặc hiệu của mồi chứ không triệt tiêu hoàn toàn tính chất bắt mồi của oligo. Vì vậy, chúng tôi thay đổi một số vị trí áp chót đầu 3' của chuỗi mồi đặc hiệu theo quy luật Amplification refractory mutation system - ARMS (C.R.Newton 1989). Việc thay đổi này một mặt làm giảm ái lực không đặc hiệu của mồi đột biến với khuôn thể dại

nhưng lại không thay đổi tính đặc hiệu của mồi. Bộ mồi của chúng tôi được đặt tên là SHPT108-Hp-Clares-ARMS (Trình tự cụ thể các mồi này sẽ được cung cấp nếu bạn đọc quan tâm và liên hệ với nhóm tác giả).

Giải trình tự gene: Kết quả PCR đặc hiệu hai hướng allele có tích hợp công nghệ Amplification refractory mutation system (ARMS) sẽ được khẳng định lại bằng giải trình tự gene trên hệ thống giải trình tự gene trực tiếp CEQ8800 (Beckman Coulter - USA).

3. Kết quả



Hình 2. Kết quả xác định đột biến A2142G và A2143G trên gene ribosome 23S của vi khuẩn *Helicobacter pylori*

Panel trên: Kết quả PCR đặc hiệu hai hướng allele có tích hợp công nghệ Amplification refractory mutation system (ARMS). Kết quả được thể hiện bằng hình ảnh chạy điện di sản phẩm PCR sử dụng bộ mồi SHPT108-Hp-Clares-ARMS. Cột 1 - 2 là của bệnh nhân A071, có xuất hiện đột biến gene tại vị trí 2143; cột 3 - 4 là của bệnh nhân K010, không có đột biến tại 2 vị trí này. Panel dưới: Hình ảnh phổ sắc ký giải trình tự gene trực tiếp theo nguyên lý Sanger các mẫu bệnh phẩm A070, K010. Kết quả cho thấy mẫu A071 tại vị trí 2143 Adenine đã được thay bằng Guanine. Trong khi đó, mẫu K010 tại 2 vị trí 2142 và 2143 đều có Adenine (không đột biến).

3.1. Giá trị của PCR đặc hiệu hai hướng allele có tích hợp công nghệ Amplification refractory mutation system (ARMS)

Như lý thuyết đã trình bày trong phần phương pháp, bằng kỹ thuật này chỉ cần một phản ứng (1 lần xét nghiệm) nhưng chúng tôi có thể vừa chẩn đoán xác định mẫu bệnh phẩm có HP hay không,

đồng thời xác định được HP có đột biến kháng thuốc clarythromycin hay không (Hình 2, panel trên). Để khẳng định kết quả của phương pháp vừa được thiết lập chúng tôi tiến hành giải trình tự gene trên hệ thống CEQ8800, kết quả cho thấy sự phù hợp hoàn toàn giữa 2 phương pháp (Hình 2, panel dưới).

3.2. Độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp PCR đặc hiệu allele có tích hợp công nghệ amplification refractory mutation system (ARMS) trong chẩn đoán đột biến A2142G và A2143G

Để khẳng định tính đặc hiệu và độ nhạy của phương pháp PCR đặc hiệu allele tích hợp công nghệ ARMS chúng tôi tiến hành chẩn đoán các đột biến A2142G, A2143G bằng bộ mồi SHPT108-Hp-Clares-ARMS trên 15 mẫu bệnh phẩm đã được phân tích trình tự xác định trạng thái đột biến gene ribosome 23S kết quả so sánh này được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. So sánh kết quả chẩn đoán đột biến gene HP ribosome 23S tại 2 vị trí A2142G, A2143G giữa giải trình tự trực tiếp và PCR đặc hiệu allele sử dụng bộ mồi SHPT108-Hp-Clares-ARMS

Mẫu	Sanger sequencing	PCR đặc hiệu allele sử dụng bộ mồi SHPT108-Hp-Clares-ARMS
K005	A2143G	A2143G
K006	A2143G	A2143G

K008	A2143G	A2143G
K010	không phát hiện đột biến	không phát hiện đột biến
K016	không phát hiện đột biến	không phát hiện đột biến
K025	A2143G	A2143G
K027	không phát hiện đột biến	không phát hiện đột biến
K033	không phát hiện đột biến	không phát hiện đột biến
A045	không phát hiện đột biến	không phát hiện đột biến
A048	không phát hiện đột biến	không phát hiện đột biến
A070	A2143G	A2143G
A071	A2143G	A2143G
A072	A2143G	A2143G
A073	không phát hiện đột biến	không phát hiện đột biến
A074	không phát hiện đột biến	không phát hiện đột biến

Nhận xét: Mặc dù, với một cỡ mẫu không quá lớn (15 mẫu) nhưng phương pháp PCR đặc hiệu allele tích hợp công nghệ ARMS (sử dụng bộ mồi SHPT108-Hp-Clares-ARMS) do chúng tôi thiết kế có kết quả chẩn đoán hoàn toàn tương đồng với phương pháp giải trình tự trực tiếp (Sanger sequencing).

3.3. So sánh tính ưu việt của PCR đặc hiệu allele tích hợp công nghệ ARMS với phương pháp giải trình tự trực tiếp (Sanger sequencing)

Đặc điểm so sánh	PCR đặc hiệu allele tích hợp công nghệ ARMS	Giải trình tự trực tiếp
Thời gian	3 giờ	18 giờ
Kinh phí	600.000 VNĐ	1500.000 VNĐ
Thiết bị cần có	PCR thường	PCR + Sequencer
Kỹ thuật viên	Trung cấp, cao đẳng	Đại học

Nhận xét: PCR đặc hiệu allele tích hợp công nghệ ARMS có nhiều ưu điểm hơn so với giải trình tự trực tiếp (Sanger sequencing).

4. Bàn luận

Clarithromycin là một trong những kháng sinh chủ yếu được sử dụng trong các phác đồ điều trị HP. Tuy nhiên, ngày nay tỷ lệ HP kháng lại kháng sinh này đang tăng lên và ở mức độ cao. Nghiên cứu cho thấy, các cộng đồng dân cư khác nhau có tỷ lệ HP kháng clarithromycin không giống nhau: Ở Nhật Bản là 13 - 18%, ở châu Âu là 12 - 25% (Akiko Nakamura - 2007), còn ở Việt Nam chưa có thống kê đầy đủ tuy nhiên số liệu gần đây cho thấy tỷ lệ này là 50,9% (Nguyen, Bengtsson et al). Việc

xác định được chính xác tính kháng thuốc nói chung trong đó đặc biệt quan trọng tính kháng clarithromycin sẽ giúp ích cho bác sỹ lâm sàng cân nhắc lựa chọn được phác đồ điều trị thích hợp cho từng đối tượng bệnh nhân. Vì thế việc chuẩn hóa các phương pháp chẩn đoán tiên lượng tính kháng thuốc của vi khuẩn HP là điều cần thiết trong thực hành lâm sàng. Tuy nhiên HP là vi khuẩn yếm khí, việc nuôi cấy gặp rất nhiều khó khăn và kéo dài: Chỉ khoảng 50 - 60% số sinh thiết nghi ngờ mang vi khuẩn HP cho khuẩn lạc HP. Điều này làm cho việc chẩn đoán kháng thuốc bằng phương pháp kháng sinh đồ trở nên phức tạp vì để làm được điều đó trước hết ta phải nuôi cấy được HP.

Trong khi đó, một số nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra rằng tính kháng clarithromycin của vi khuẩn HP có liên quan đến các đột biến gene ribosome 23S đặc biệt là tại các vị trí A2142G và A2143G (Inderlied 1995) vì thế các phương pháp chẩn đoán gián tiếp tính kháng clarithromycin đều xoay quanh việc xác định sự có mặt của các đột biến này trong mẫu bệnh phẩm (Claudia Schabereiter-Gurtner 2004; Monique M Gerrits 2006).

Tại nước ta chưa có một cơ sở y tế hay nghiên cứu nào triển khai các xét nghiệm chẩn đoán kiểu gene kháng clarithromycin ở mức độ phân tử, điều đó khích lệ chúng tôi xây dựng phương pháp chẩn đoán nhanh các đột biến A2142G và A2143G bằng kỹ thuật sinh học phân tử.

Trên thực tế đã tồn tại một số kit chẩn đoán đột biến kháng clarithromycin sử dụng các kỹ thuật enzyme cắt giới hạn (Norazah Ahmad 2009), phân tích điểm tan chảy (Claudia Schabereiter-Gurtner 2004), PCR đặc hiệu allele bắt mỗi hai đoạn - dual primer oligo (Philippe Lehours 2011). Các phương pháp này đều cho kết quả rất tương đồng với tiêu chuẩn vàng là giải trình tự trực tiếp. Tuy nhiên, chúng hoặc sử dụng vật tư tiêu hao và trang thiết bị đắt tiền, hoặc thời gian thực hành xét nghiệm kéo dài ít thân thiện với kỹ thuật viên xét nghiệm. Điều này đòi hỏi chúng tôi thiết kế ra một giải pháp khác khắc phục được các điểm yếu nói trên.

Phương pháp PCR đặc hiệu allele mặc dù đã được sử dụng thành công trong chẩn đoán một số đột biến như đột biến gene EGFR (Dahse, Berndt et al. 2008; Dahse, Berndt et al. 2008; Dahse, Driemel et al. 2009), nhưng nó có điểm yếu là có thể tạo ra hiện tượng dương tính giả. Điều này cũng đã được khẳng định trong nghiên cứu của chúng tôi: (Kết quả không trình bày tại đây). Để hạn chế điểm yếu đó chúng tôi thiết kế bộ mỗi đặc hiệu allele theo nguyên lý ARMS điều này một mặt giúp làm giảm đáng kể sự bắt cặp không đặc hiệu của mỗi nhưng lại

không ảnh hưởng tới sự bắt mỗi đặc hiệu đột biến nhờ đó hiện tượng dương tính giả đã được chúng tôi loại bỏ hoàn toàn và phương pháp này cho kết quả hoàn toàn tương đồng với kỹ thuật giải trình tự trực tiếp. Một số nhóm nghiên cứu khác trên thế giới cũng đã công bố kỹ thuật tương tự như của chúng tôi (Akiko Nakamura 2007) nhưng ý đồ sắp xếp các vị trí băng đột biến, băng nội chuẩn và băng kiểu đại quá gần nhau (239/234 - 288/287) gây khó khăn trong việc phân biệt chính xác vị trí các băng trên bản điện di agarose đặc biệt là khi sử dụng các agarose có chất lượng thấp. Nhưng với cách thiết kế của chúng tôi kích thước băng điện di tương ứng sẽ là 658/507/216 bp, với kích thước này hoàn toàn có khả năng phân tách tốt ngay cả khi sử dụng các gel agarose rẻ tiền chất lượng thấp. Như vậy, chỉ cần một lần xét nghiệm chúng tôi có thể vừa xác định được sự có mặt hay không của vi khuẩn HP và các đột biến gene kháng thuốc clarythromycin thường gặp.

Cho đến hiện nay, giải trình tự gene bằng phương pháp Sanger sequencing vẫn đang là tiêu chuẩn vàng để xác định các đột biến gene. Tuy nhiên, để thực hiện xét nghiệm này đòi hỏi phải có trang thiết bị hiện đại, vật tư tiêu hao đắt tiền và phải có đội ngũ cán bộ có kinh nghiệm. Do đó, giá thành một xét nghiệm giải trình tự thường cao (1.500.000 VNĐ/xét nghiệm). Trong khi đó, bằng phương pháp của chúng tôi chỉ cần một hệ thống máy PCR đơn giản, vật tư tiêu hao rẻ tiền, kỹ thuật viên có thể thực hiện. Giá thành giảm có ý nghĩa so với giải trình tự gene trực tiếp (600.000 VNĐ). Đây là một bước đột phá về kỹ thuật qua đó có thể chuyển giao, phổ biến đến các cơ sở y tế tuyến tỉnh trong cả nước.

5. Kết luận

Quy trình xét nghiệm chẩn đoán đồng thời sự có mặt của vi khuẩn và đột biến gene ribosome 23S của nó tại vị trí A2142G, A2143G trong một lần xét nghiệm đã được xây dựng thành công.

Tài liệu tham khảo

1. Agudo S, Perez-Perez G et al (2010) *High prevalence of clarithromycin-resistant Helicobacter pylori strains and risk factors associated with resistance in Madrid, Spain*. J Clin Microbiol 48(10): 3703-3707.
2. Nakamura A, Furuta T, Shirai N, Sugimoto M, Kajimura M, Soya Y, Hishida A (2007) *Determination of mutations of the 23S rRNA gene of Helicobacter pylori by allele specific primer-polymerase chain reaction method*. J Gastroenterol Hepatol 22(7): 1057-1063.
3. Newton CR, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalshekerl N, Smith JC and Markham AF (1989) *Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS)*. Nucleic Acids Research 17(7): 2503-2516.
4. Schabereiter-Gurtner C, Hirschl AM, Dragosics B, Hufnagl P, Puz S, Kovách Z, Rotter M, Makristathis A (2004) *Novel real-time PCR assay for detection of Helicobacter pylori infection and simultaneous clarithromycin susceptibility testing of stool and biopsy specimens*. J Clin Microbiol 42(10): 4512-4518.
5. Dahse R, Berndt A et al (2008) *Two allele-specific PCR assays for screening epidermal growth factor receptor gene hotspot mutations in lung adenocarcinoma*. Mol Med Report 1(1): 45-50.
6. Dahse R, Berndt A et al (2008) *PCR-based testing for therapy-related EGFR mutations in patients with non-small cell lung cancer*. Anticancer Res 28(4B): 2265-2270.
7. Dahse R, Driemel O et al (2009) *Epidermal growth factor receptor kinase domain mutations are rare in salivary gland carcinomas*. Br J Cancer 100(4): 623-625.
8. Nash KA, Inderlied CB (1995) *Genetic basis of macrolide resistance in Mycobacterium avium isolated from patients with disseminated disease*. Antimicrob Agents Chemother 39(12): 2625-630.
9. Marshall BJ (1984) *Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration*. Lancet 1(8390): 1311-135.
10. Gerrits MM, van Vliet AH, Kuipers EJ, Kusters JG (2006) *Helicobacter pylori and antimicrobial resistance: Molecular mechanisms and clinical implications*. Lancet Infect Dis 6(11): 699-709.
11. Necchi V, Candusso ME et al (2007) *Intracellular, intercellular, and stromal invasion of gastric mucosa, preneoplastic lesions, and cancer by Helicobacter pylori*. Gastroenterology 132(3): 1009-1023.
12. Nguyen TV, Bengtsson C et al (2012) *Eradication of Helicobacter pylori in children in Vietnam in relation to antibiotic resistance*. Helicobacter 17(4): 319-325.
13. Norazah Ahmad, Sheikh Anwar Abdullah, Ramelah Mohamed (2009) *Characterization of clarithromycin resistance in Malaysian isolates of Helicobacter pylori*. World J Gastroenterol 15(25): 3161-3165.
14. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, Hunt R, Rokkas T, Vakil N, Kuipers EJ (2007) *Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection: the Maastricht III Consensus Report*. Gut 56: 772-781.
14. Lehours P et al (2011) *DPO multiplex PCR as an alternative to culture and susceptibility testing to detect Helicobacter pylori and its resistance to clarithromycin*. BMC Gastroenterology 11: 112.