

Nghiên cứu / Original Research Articles

Nghiên cứu bước đầu kháng thuốc kháng sinh nguyên phát của *Helicobacter pylori* dựa trên giải trình tự gene

Preliminary study of primary antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* by gene sequencing

TRẦN THIÊN TRUNG¹, CAO MINH NGÀ¹, LÊ QUANG NHÂN², TRẦN LÝ THẢO VY², UNG VĂN VIỆT², VÕ NGỌC QUỐC MINH², TRẦN THIÊN KHIÊM³, QUÁCH HỮU LỘC³, TRẦN ANH MINH¹, NGUYỄN THANH DANH⁴, NGÔ ĐÔNG KHA⁴, NGUYỄN LÂM ĐỨC VŨ⁴, NGUYỄN THỊ HỒNG UYÊN⁵, ĐẶNG NGUYỄN THÀNH AN⁵, LÊ NGỌC HỒNG PHƯỢNG⁶, QUÁCH TRỌNG ĐỨC¹, NGUYỄN TUẤN ANH⁴

1. Đại học Y dược TP. Hồ Chí Minh, 2. Bệnh viện Đại học Y dược TP. Hồ Chí Minh - Cơ sở 1, 3. Bệnh viện Đại học Y dược TP. Hồ Chí Minh - Cơ sở 2, 4. Trung tâm Đào tạo và Chẩn đoán Y Sinh học phân tử, Bệnh viện ĐHYD TP. Hồ Chí Minh, 5. Bộ môn Di truyền, Khoa Sinh-CNSH, Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG TP. Hồ Chí Minh, 6. Trung tâm Di truyền và Sức khỏe Sinh sản, Khoa Y, ĐHQG TP. Hồ Chí Minh

Abstract

Objectives: Detection of primary antimicrobial resistance gene mutations to clarithromycin, levofloxacin, tetracycline, amoxicillin and metronidazole of *H. pylori* directly from gastric biopsies. **Methods:** A cross-sectional study was carried out on patients with gastritis and gastric ulcer caused by *H. pylori*, not ever been eradicated. Antimicrobial resistance status based on gene sequence analysis of 23S rRNA (n=128), gyrA (n=130), 16S rRNA (n=131), pbp1A (n=44), rdxA (n=40) and frxA (n=31) gene directly from gastric biopsies through endoscopy. **Results:** To **clarithromycin**, the mutation T2182C was the most frequent, accounting for 90.6% (116/128). However, there were 96.9% (124/128) samples with at least one point mutation at the position 2142, 2143 or 2182. To **levofloxacin**, two popular mutation positions were amino acid 87 and 91. The mutation rate N87K, N87I, D91G, D91N and D91Y were 20.8% (27/130), 1.5% (2/130), 9.2% (12/130), 9.2% (12/130) and 3.1% (4/130) correspondingly. Particularly, there were 3.8% (5/130) samples containing multiple point mutations at position 91 such as D91G/Y, D91N/S/G, D91N/Y, D91Y/C/G and D91Y/N. To **amoxicillin**, the important mutations were E406A, S543R, T556S and N562T with ratio of 4.4% (2/47); 29.4% (10/44); 2.3% (1/44) and 2.3% (1/44) respectively. More importantly, there was one new mutation with the ratio of 9.5% (4/46) discovered in this study with ability of amoxicillin resistance associated with the insertion of E (Glutamic acid) at the position 465. To **tetracycline**, the mutations including C762T, AGA965-967, C1120T and C1200T contained 15.7% (14/89); 10.7% (14/131); 1.5% (2/131) and 1.5% (2/131) correspondingly. Especially, there were several new mutations at the positions AGA965-967 including cGA and tGA with the ratio of 0.8% (1/131) and 2.3% (3/131) consecutively. To **metronidazole**, 100% surveyed samples had mutation on one or both genes rdxA and frxA. Frameshift mutations were more popular in frxA gene, accounting for 54.8% (17/31), compared to rdxA gene (32.5%; 13/40). In contrast, stop codons were more common in rdxA gene, accounting for 27.5% (11/40), compared to frxA gene (3.2%; 1/31). Amino acid substitution mutations contained equally in both rdxA and frxA genes, including 40.0% (16/40) and 41.9% (13/31)

respectively. **Conclusions:** This study has determined the ratio of primary antimicrobial resistance gene mutations to antibiotics currently used for *H. pylori* eradication and recorded some new mutations discovered for the first time in Vietnam. There is a need for further study to investigate the clinical significance of these mutations in correlation with phenotypic resistance.

Key words: *Helicobacter pylori*, primary resistance, gene sequencing.

Tóm tắt

Mục tiêu: Xác định tỷ lệ đột biến kháng nguyên phát clarithromycin, levofloxacin, tetracycline, amoxicillin và metronidazole của *H. pylori* trực tiếp từ mẫu sinh thiết dạ dày. **Phương pháp:** Nghiên cứu cắt ngang tiến hành trên một số bệnh nhân viêm loét dạ dày – tá tràng do *H. pylori* chưa từng được điều trị tiết trừ. Tình trạng kháng sinh dựa trên phân tích trình tự gene 23S rRNA (n=128), *gyrA* (n=130), 16S rRNA (n=131), *pbp1A* (n=44), *rdxA* (n=40) và *frxA* (n=31) được xác định trực tiếp từ mẫu mô sinh thiết niêm mạc dạ dày qua nội soi. **Kết quả:** Đối với **clarithromycin**, đột biến T2182C là chủ yếu, chiếm 90,6% (116/128). Nhưng có đến 96,9% (124/128) mẫu sinh thiết có ít nhất 1 đột biến tại vị trí 2142, 2143 hoặc 2182. Đối với levofloxacin, hai vị trí đột biến phổ biến là amino acid 87 và 91. Tỷ lệ đột biến N87K, N87I, D91G, D91N và D91Y lần lượt là 20,8% (27/130); 1,5% (2/130); 9,2% (12/130); 9,2% (12/130) và 3,1% (4/130). Đặc biệt, có 3,8% (5/130) mẫu có đồng thời nhiều đột biến hiện diện tại vị trí 91 như D91G/Y, D91N/S/G, D91N/Y, D91Y/C/G và D91Y/N. Đối với **amoxicillin**, các đột biến kháng thuốc quan trọng là E406A, S543R, T556S và N562T với tỷ lệ tương ứng lần lượt là 4,4% (2/47); 29,4% (10/44); 2,3% (1/44) và 2,3% (1/44). Đặc biệt, có một đột biến mới được phát hiện có khả năng gây kháng amoxicillin là sự chèn E (Glutamic acid) tại vị trí 465 với tỷ lệ 9,5% (4/46). Đối với **tetracycline**, các đột biến hiện diện gồm C762T, AGA965-967, C1120T và C1200T chiếm tỉ lệ lần lượt là 15,7% (14/89); 10,7% (14/131); 1,5% (2/131) và 1,5% (2/131). Đặc biệt, có những đột biến mới phát hiện tại vị trí AGA965-967 là cGA và tGA với tỉ lệ lần lượt là 0,8% (1/131) và 2,3% (3/131). Đối với **metronidazole**, 100% các mẫu khảo sát có đột biến trên một hoặc cả hai gene *rdxA* và *frxA*. Đột biến dịch khung đọc phổ biến hơn ở gene *frxA*, chiếm 54,8% (17/31), so với gene *rdxA* là 32,5% (13/40). Ngược lại, đột biến tạo codon stop phổ biến hơn ở gene *rdxA*, chiếm 27,5% (11/40), so với gene *frxA* là 3,2% (1/31). Đột biến thay thế amino acid chiếm tỷ lệ gần như nhau ở cả hai gene *rdxA* và *frxA*, lần lượt là 40,0% (16/40) và 41,9% (13/31). **Kết luận:** Nghiên cứu đã xác định được tỷ lệ gene đột biến kháng nguyên phát đối với các thuốc kháng sinh hiện đang được sử dụng điều trị tiết trừ vi khuẩn *H. pylori* và ghi nhận một số đột biến lần đầu được phát hiện tại Việt Nam. Cần tiến hành nghiên cứu để đánh giá ý nghĩa lâm sàng của các đột biến này trên thực tế.

Từ khóa: *Helicobacter pylori*, kháng thuốc nguyên phát, giải trình tự gene.

I. Đặt vấn đề

Tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) ở người Việt Nam rất cao so với thế giới, từ 70 – 90% dân số. Việt Nam cũng là nước có tỷ lệ ung thư dạ dày cao nhất trong số các nước Đông Nam Á. Vì vậy, việc tiết trừ *H. pylori* thành công trở nên rất cần thiết để giảm bớt gánh nặng kinh tế và bệnh tật gây ra do vi khuẩn này. Tuy

nhien, kháng thuốc của vi khuẩn *H. pylori* đang là vấn đề rất cần nhiều quan tâm, vì ảnh hưởng đến tính hiệu quả trong điều trị của các phác đồ tiết trừ *H. pylori* hiện đang được sử dụng. Bên cạnh đó, tổ chức y tế thế giới (WHO) cũng đã xếp *H. pylori* vào nhóm lây nhiễm ưu tiên cao (high-priority group of infection) khi tính kháng kháng sinh của vi khuẩn này đã trở nên phổ biến [1].

Đặc tính kháng kháng sinh của *H. pylori* khác nhau tùy vào khu vực địa lý trên thế giới và cho thấy gia tăng theo thời gian. Ở Việt Nam, *H. pylori* kháng clarithromycin, metronidazole, levofloxacin, tetracycline và amoxicillin lần lượt vào khoảng 71,0 - 85,5% [2, 3]; 45,0 - 83,6% [3, 4]; 32,2 - 41,3% [4, 5]; 10,9 - 23,8% [2, 4] và 10,4 - 17,0% [2, 3]. Trước tình hình đó, đề tài này được thực hiện nhằm bước đầu phát hiện các đột biến kháng thuốc kháng sinh nguyên phát đối với 5 loại kháng sinh ở trên tương ứng với các gene 23S rRNA, *rdxA/frxA*, *gyrA*, 16S rRNA và *pbp1A* của vi khuẩn *H. pylori* trực tiếp từ mẫu sinh thiết niêm mạc dạ dày qua nội soi. Kết quả của nghiên cứu sẽ là cơ sở để các bác sĩ sử dụng kháng sinh trong các phác đồ điều trị một cách hợp lý và hiệu quả nhất cho bệnh nhân, đặc biệt trong trường hợp có sự hiện diện của đột biến kháng thuốc.

II. Đối tượng và phương pháp

Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là bệnh nhân viêm, loét dạ dày do nhiễm *H. pylori*. Đối tượng lấy mẫu là bệnh nhân viêm, loét dạ dày do nhiễm *H. pylori* (chưa từng được điều trị diệt trừ *H. pylori*) đến khám và điều trị tại Bệnh viện Đại học Y được TP. Hồ Chí Minh trong khoảng thời gian từ tháng 08/2019 đến tháng 08/2020.

Tiêu chuẩn chọn bệnh: Bệnh nhân khu vực TP. Hồ Chí Minh và các tỉnh miền Nam, trên 18 tuổi, có các triệu chứng khi đến khám như đau bụng trên rốn, đầy hơi, ợ hơi, khó tiêu, có thể rối loạn đi tiêu phân sống, chưa từng được điều trị diệt trừ *H. pylori*, được nội soi dạ dày và được chẩn đoán bị viêm, loét dạ dày - tá tràng. Bệnh nhân không dùng các loại thuốc dạ dày và các kháng sinh trong vòng một tháng trước khi nội soi và kết quả chẩn đoán phát hiện *H. pylori* dương tính bằng phương pháp PCR.

Tiêu chuẩn loại trừ: Bệnh nhân bị loét dạ dày có biến chứng, bị ung thư dạ dày hoặc đang uống thuốc dạ dày và thuốc kháng sinh.

Phương pháp giải trình tự gene

Phương pháp giải trình tự gene theo Sanger được ứng dụng để giải trình tự các gene 23S rRNA, *rdxA/frxA*, *gyrA*, 16S rRNA và *pbp1A* mang các đột biến

kháng kháng sinh clarithromycin, metronidazole, levofloxacin, tetracycline và amoxicillin tương ứng. Sau khi mẫu sinh thiết dạ dày đã được xác định dương tính với *H. pylori* bằng multiplex PCR (*AccuLite H. pylori Genotyping Kit*, công ty Khoa Thương), phản ứng PCR nhân bản vùng gene có thể chứa đột biến kháng thuốc được tiến hành.

Phản ứng real-time PCR nhân bản gene 23S rRNA, 16S rRNA, *rdxA/frxA*, *gyrA* và *pbp1A* với thành phần đã tối ưu như sau: 1.5-2 U taq DNA polymerase, 200 μ M dNTPs, 1-5 mM MgCl₂, 1X PCR buffer, 200-500 nM mỗi xuôi và ngược tương ứng [6-12], 1X EvaGreen và 5 μ L DNA tách chiết trong tổng thể tích là 25 μ L. Phản ứng được thực hiện trên dòng máy luân nhiệt Rotogene-Q (Qiagen). Chu trình nhiệt như sau: 95°C trong 15 phút, theo sau là 40 chu kỳ lặp lại gồm bước biến tính ở 95°C trong 30 giây, bước lai ở 61°C trong 30 giây và kéo dài ở 72°C trong 60 giây. Giai đoạn cuối cùng là 72°C trong 10 phút. Chương trình phân tích nhiệt độ nóng chảy của sản phẩm tương ứng với quá trình tăng nhiệt độ từ 65°C lên 95°C, mỗi bước tăng 0,5°C và lưu trong 5 giây. Tín hiệu được thu nhận với màu huỳnh quang đặc trưng là EvaGreen/FAM (510 - 530 nm). Đỉnh chảy đặc trưng của từng sản phẩm nhân bản gene 23S rRNA, 16S rRNA, *rdxA/frxA*, *gyrA* và *pbp1A* tương ứng là 87,0 $\pm$ 0,2°C; 89,5 $\pm$ 0,1°C; 85,7 $\pm$ 0,2°C / 85,2 $\pm$ 0,3°C; 87,6 $\pm$ 0,2°C và 85,6 $\pm$ 0,2°C.

Sản phẩm nhân bản được giải trình tự gene tại Khoa Y, Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh. Trình tự trả về được phân tích nhằm xác định các trình tự đã giải được có mang đột biến kháng thuốc hay không bằng phần mềm BioEdit 7.0.9.0 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Trình tự tham chiếu được sử dụng có nguồn gốc từ ngân hàng dữ liệu gene Hoa Kỳ (GenBank).

III. Kết quả

Kết quả phát hiện đột biến kháng clarithromycin

Chúng tôi đã giải trình tự gene 23S rRNA của 128 mẫu sinh thiết niêm mạc dạ dày. Tỷ lệ đột biến A2142G, A2143G và T2182C kháng clarithromycin thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Tỷ lệ kiểu gene kháng clarithromycin

Kiểu gene	A2142G		Kiểu gene	A2143G		Kiểu gene	T2182C	
	n	%		n	%		n	%
A	127	99,2	A	46	35,9	T	12	9,4
G	1	0,8	G	82	64,1	C	116	90,6
Tổng	128	100	Tổng	128	100	Tổng	128	100

Kết quả trên cho thấy đột biến T2182C là chủ đạo, chiếm 90,6% (116/128), kế đến là đột biến A2143G, chiếm 64,1% (82/128) và cuối cùng là đột biến A2142G, chỉ chiếm 0,8% (1/128). Tuy nhiên, có đến 96,9% (124/128) mẫu sinh thiết có ít nhất 1 trong các đột biến trên; chỉ có 3,1% (4/128) mẫu không có đột biến nào trong 3 đột biến được quan sát.

Kết quả phát hiện đột biến kháng levofloxacin

Tổng cộng 130 mẫu sinh thiết niêm mạc dạ dày đã giải trình tự gene *gyrA*. Năm vị trí đột biến kháng levofloxacin bao gồm vị trí amino acid 86, 87, 88, 91 và 92 được quan sát. Số liệu được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2. Tỷ lệ kiểu gene kháng levofloxacin

Vị trí	Amino acid	n	%
D86N	D Aspartic acid	130	100
N/T87K/I	N Asparagine	101	77,7
	I Isoleucine	2	1,5
	K Lysine	27	20,8
A88V/M	A Alanine	129	99,2
	M Methionine	1	0,8
D91G/Y/N/A/M	D Aspartic acid	96	73,8
	G Glycine	12	9,2
	G/Y Glycine/Tyrosine	1	0,8
	M Methionine	1	0,8
	N Asparagine	12	9,2
	N/S/G Asparagine/Serine/Glycine	1	0,8
	N/Y Asparagine/Tyrosine	1	0,8
	Y Tyrosine	4	3,1
	Y/C/G Tyrosine/Cysteine/Glycine	1	0,8
	Y/N Tyrosine/Asparagine	1	0,8
A92M	A Alanine	129	99,2
	M Methionine	1	0,8

Hai điểm đột biến phổ biến trong quần thể mẫu khảo sát là vị trí 87 và 91. Đối với vị trí amino acid 87, đột biến phổ biến là N87K, chiếm 20,8% (27/130); còn lại đột biến N87I chỉ chiếm 1,5% (2/130). Đối với vị trí amino acid 91, đột biến rất đa dạng, nhưng chủ yếu là D91G và D91N, điều chiếm tỷ lệ 9,2% (12/130); đột biến D91Y chiếm tỷ lệ 3,1% (4/130). Đặc biệt có 5 mẫu cho thấy nhiều đột biến cùng hiện diện tại vị trí này như D91G/Y, D91N/S/G, D91N/Y, D91Y/C/G và D91Y/N, chiếm tỷ lệ 3,8% (5/130). Tính trên

tổng số, có đến 45,4% (59/130) mẫu sinh thiết có ít nhất 1 trong các đột biến trên; và có 54,6% (71/130) mẫu không thấy có sự hiện diện của các đột biến quan sát.

Kết quả phát hiện đột biến kháng amoxicillin

47 mẫu được giải trình tự gene *pbp1A* và 36 amino acid từ vị trí 315 đến 589 được quan sát, so với trình tự *pbp1A* tham chiếu của chủng 26695 (ATCC 700392). Kết quả tỷ lệ các đột biến quan trọng đối với tính kháng amoxicillin được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Tỷ lệ một số đột biến kháng amoxicillin quan trọng

Kiểu gene	E406A	D465E	S543R	T556S	N562T
Hoang đại (n)	45	42	34	43	43
Đột biến (n)	2	4	10	1	1
% Đột biến	4,4	9,5	29,4	2,3	2,3

Ghi chú: E | Glutamic acid; A | Alanine; D | Aspartic acid; E | Glutamic acid; S | Serine; R | Arginine; T | Threonine; N | Asparagine

Theo y văn, các đột biến quan trọng của *pbp1A* tạo tính kháng với amoxicillin là E406A, S543R, T556S và N562T. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ các đột biến E406A, S543R, T556S và N562T tương ứng lần lượt là 4,4% (2/47); 29,4 (10/44); 2,3% (1/44) và 2,3 (1/44). Đặc biệt, đột biến chèn

thêm E tại vị trí 465, có khả năng tạo tính kháng với amoxicillin, được phát hiện trong nghiên cứu, chiếm tỷ lệ 9,5% (4/46).

Kết quả phát hiện đột biến kháng tetracycline

131 mẫu đã được giải trình tự gene 16S rRNA. Tỷ lệ đột biến trên gene 16S rRNA kháng kháng sinh tetracycline được thể hiện ở Bảng 4.

Bảng 4. Tỷ lệ kiểu gene kháng tetracycline

Kiểu gene	C762T	AGA965–967	C1120T	C1200T
Hoang đại (n)	75	117	129	128
Đột biến (n)	14	14	2	2
% Đột biến	15,7	10,7	1,5	1,5

Các đột biến hiện diện trong nhóm mẫu khảo sát gồm C762T, AGA965 - 967, C1120T, C1200T, lần lượt chiếm tỷ lệ là 15,7% (14/89); 10,7% (14/131); 1,5% (2/131) và 1,5% (2/131). Đột biến tại vị trí rất quan trọng đối với tính kháng tetracycline là AGA965 - 967 hiện diện gồm có AGc 4,6% (6/131); cGA 0,8% (1/131); gGA 3,1% (4/131) và tGA 2,3% (3/131). Trong đó, đột biến

cGA và tGA được phát hiện trong nhóm mẫu khảo sát, chưa thấy được công bố trên thế giới.

Kết quả phát hiện đột biến kháng metronidazole

Tổng cộng 48 trình tự gene *rdxA* và 41 trình tự gene *frxA* đã được giải trình tự. Tỷ lệ đột biến kháng kháng sinh metronidazole trong những mẫu khảo sát thể hiện ở Bảng 5.

Bảng 5. Tỷ lệ kiểu gene kháng metronidazole

Loại đột biến	<i>rdxA</i>		<i>frxA</i>	
	n	%	n	%
Dịch khung đọc	13	32,5	17	54,8
Thay thế amino acid	16	40,0	13	41,9
Stop codon	11	27,5	1	3,2
Tổng	40	100,0	31	100,0

Kết quả cho thấy 100% các mẫu khảo sát có đột biến trên 1 hoặc cả hai gene *rdxA* và *frxA*. Đột biến dịch khung đọc phổ biến hơn ở gene *frxA*, chiếm 54,8% (17/31), so với gene *rdxA* là 32,5% (13/40). Ngược lại, đột biến tạo codon stop phổ biến hơn ở gene *rdxA*, chiếm 27,5% (11/40), so với gene *frxA* là 3,2% (1/31). Đột biến thay thế amino acid chiếm tỷ lệ gần như nhau ở cả hai gene *rdxA* và *frxA*, lần lượt là 40,0% (16/40) và 41,9% (13/31). Đặc biệt, hiện tượng đồng nhiễm nhiều chủng được phát hiện bằng giải trình tự gene *rdxA* và *frxA*, lần lượt là 16,7% (8/48) và 24,4% (10/41). Tính trên cả hai gene, tỷ lệ đồng nhiễm là 21,1% (15/71). Đối với các mẫu đồng nhiễm nhiều chủng, không thể xác định chính xác kiểu đột biến nào hiện diện trong mẫu.

IV. Bàn luận

Vi khuẩn *H. pylori* phân bố rộng khắp trên thế

giới và liên quan đến sinh bệnh học của nhiều bệnh đường tiêu hóa. Điều trị tiệt trừ vi khuẩn này phải dùng kết hợp hơn 2 loại kháng sinh, như amoxicillin, metronidazole, clarithromycin, tetracycline và levofloxacin cùng với các chất ức chế proton. Mặc dù các phác đồ hiện tại hiệu quả, đã có nhiều trường hợp điều trị thất bại, chủ yếu vì sự xuất hiện của đột biến điểm – là cơ chế kháng quan trọng và chủ yếu ở *H. pylori*. Tuy nhiên, sự kháng thuốc của vi khuẩn này – cũng như các vi khuẩn khác – mang tính chất “địa phương” rất cao, vì phụ thuộc vào tần suất và thói quen sử dụng kháng sinh tùy vùng miền. Chính vì thế, hiểu được đặc tính di truyền kháng thuốc của vi khuẩn này ở bệnh nhân có thể giúp chọn lựa phác đồ điều trị phù hợp nhất và hạn chế lây lan các chủng kháng thuốc trong cộng đồng [13].

Vì khuẩn *H. pylori* kháng clarithromycin liên quan đến một số đột biến điểm của gene 23S rRNA. Các đột biến điểm đặc biệt quan trọng như A2143G và A2142G/C liên quan đến gần như 90% tính kháng clarithromycin tiên phát. Ngoài ra, các đột biến khác cũng có vai trò trong tính kháng clarithromycin tiên phát cũng như thứ phát, điển hình là T2182C [14]. Kết quả khảo sát sơ bộ của nghiên cứu này cho thấy cơ chế kháng clarithromycin quan trọng trong quần thể quan sát là sự hiện diện của đột biến điểm A2143G và T2182C. Bên cạnh đó, sự hiện diện của các đột biến điểm ở những vị trí khác của những chủng này, làm cho tỷ lệ chủng có đột biến kháng clarithromycin tăng lên rất cao, đến 96,9% chủng có ít nhất 1 đột biến kháng quan sát.

Đột biến gene *gyrA* là cơ chế chính dẫn đến tính kháng thuốc levofloxacin ở *H. pylori*. Trong đó, 3 điểm “nóng” đã được xác định là codon 87 (N87K); 88 (A88V) và 91 (D91G, N, A hoặc Y); Trong đó, phổ biến nhất là đột biến ở codon 87 và 91 [15]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy tương tự khi đột biến kháng levofloxacin trong quần thể khảo sát chủ yếu tại codon 87 và 91. Gần 50% mẫu quan sát có ít nhất 1 đột biến. Đặc biệt, đột biến tại codon 91 cho thấy sự đa dạng rất cao. Thậm chí, trong cùng một mẫu, có nhiều đột biến cùng hiện diện tại vị trí này.

Sự kháng amoxicillin ở *H. pylori* thường nhỏ hơn 1%, vì thế amoxicillin là kháng sinh chủ đạo trong điều trị *H. pylori*. Tuy nhiên, đã có những báo cáo trên thế giới cho thấy tiệt trừ *H. pylori* thất bại khi vi khuẩn có biểu hiện kháng amoxicillin. Các đột biến điểm trên gene *pbp1A* là cơ chế phổ biến giúp *H. pylori* kháng amoxicillin. Đột biến điểm xuất hiện chủ yếu bao phủ vùng BPB-motif thứ 1 (STGK₃₃₈₋₃₄₁ | AGCACCGGTAAG), thứ 2 (SKN₄₀₂₋₄₀₄ | AGTAAAAAC) và thứ 3 (KTG₅₅₅₋₅₅₇ | AAAACGGGG). Các đột biến nằm trong hay gần những motif gắn penicillin này của *pbp1A* tạo tính kháng amoxicillin đối với *H. pylori* [16]. Trong nghiên cứu này, ngoài các đột biến kháng amoxicillin quan trọng mà y văn thế giới đã đề cập tới, như E406A, S543R, T556S và N562T, đột

biến chèn thêm E | Glutamic acid tại vị trí 465, có khả năng tạo tính kháng với amoxicillin mới được phát hiện (kết quả giải trình tự được so sánh với kết quả E-test, không trình bày ở đây). Các đột biến tại 31/36 vị trí còn lại có khả năng phản ánh sự đa hình di truyền đặc trưng ở các chủng *H. pylori* của Việt Nam, khác biệt so với các chủng *H. pylori* của thế giới, có thể không liên quan đến tính kháng amoxicillin, cần được chứng minh trên quần thể mẫu lớn hơn.

Tetracycline là kháng sinh hiệu quả khi phối hợp với các kháng sinh khác để điều trị tiệt trừ vi khuẩn *H. pylori*. Sự kháng với tetracycline chủ yếu do đột biến điểm của gene *tet1* 116S rRNA. Đột biến xảy ra ở một số vị trí nucleotide quan trọng liên kết với tetracycline trong phân tử 16S rRNA, như C762T, AGA₉₆₅₋₉₆₇, C1120T, C1200T; trong đó, quan trọng nhất là AGA₉₆₅₋₉₆₇ thành gGA, AGc, gtA hoặc gGc [17]. Ngoài các đột biến này, đột biến cGA và tGA được phát hiện trong nhóm mẫu khảo sát, chưa thấy được công bố trên thế giới. Cần có nghiên cứu sâu hơn chứng minh vai trò của các đột biến mới này đối với tính kháng tetracycline ở các chủng *H. pylori* của Việt Nam.

Kháng metronidazole của *H. pylori* là một vấn đề nghiêm trọng đối với hầu hết các khu vực trên thế giới, bao gồm cả Việt Nam. Đột biến trên gene *rdxA*, mã hóa cho oxygen-insensitive NADPH nitroreductase và gene *frxA*, mã hóa NADPH flavin oxidoreductase là nguyên nhân chính khiến *H. pylori* kháng metronidazole cao [18]. Kết quả nghiên cứu này cho thấy 100% các mẫu khảo sát có đột biến trên 1 hoặc cả hai gene *rdxA* và *frxA*. Các đột biến quan trọng kháng metronidazole là đột biến dịch khung đọc, phổ biến hơn ở gene *frxA* và đột biến tạo codon stop, phổ biến hơn ở gene *rdxA*. Ngoài ra, đột biến thay thế amino acid - chiếm tỷ lệ gần như nhau ở cả hai gene *rdxA* và *frxA* – cũng đóng một vai trò rất quan trọng trong tính kháng metronidazole, vì khi số lượng amino acid bị thay thế càng nhiều, thì khả năng kháng metronidazole càng mạnh. Đặc biệt, nghiên cứu này cũng cho thấy sự biến

động di truyền rất lớn trên hai gene *rdxA* và *frxA* của các chủng *H. pylori* ở Việt Nam. Sự biến động di truyền này, làm khó khăn cho việc xác định chính xác kiểu đột biến hiện diện khi giải trình tự gene. Hơn nữa, sự biến động di truyền còn tạo nên các chủng *H. pylori* mới, sẽ phần nào gây khó khăn trong điều trị; mặc dù sự kháng metronidazole có thể vượt qua khi sử dụng với liều cao (1500 – 1600 mg / ngày) trong phác đồ 4 thuốc có bismuth [18].

V. Kết luận

Mặc dù mới chỉ là nghiên cứu bước đầu về các cơ chế kháng thuốc kháng sinh ở mức phân tử của vi khuẩn *H. pylori* đối với 5 loại thuốc đang được sử dụng phổ biến, kết quả cũng cho thấy được sự đa dạng di truyền kháng thuốc của các chủng *H. pylori* ở Việt Nam. Tỷ lệ đột biến kháng thuốc tiên phát ở mức độ phân tử là rất cao, đặc biệt đối với metronidazole và clarithromycin. Kế tiếp, khoảng 50% mẫu khảo sát có đột biến kháng levofloxacin. Còn lại, tỷ lệ đột biến kháng đối với amoxicillin và tetracycline vào khoảng 30% và 15%; tuy nhiên, cũng rất cần được chú ý trong chẩn đoán và điều trị tiết trừ *H. pylori*.

Tài liệu tham khảo

1. Fock, K.M. and T.L. Ang, Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer in Asia. *J Gastroenterol Hepatol*, 2010. 25(3): p. 479-86.
2. Quek, C., et al., Antimicrobial susceptibility and clarithromycin resistance patterns of *Helicobacter pylori* clinical isolates in Vietnam. *F1000Res*, 2016. 5: p. 671.
3. H., V.P., et al., Challenges in selecting antibiotics treatment for *H. pylori* in Vietnam. 2016.
4. Khiên, V.V., H.D.Q. Dung, and T.T. Binh, Perspectives in Vietnam. The 25th Conference of Korean college of *Helicobacter* and Upper Gastrointestinal Research and The 14th Japan-Korea Joint Conference on *Helicobacter* Infection, 2017.
5. Phan, T.N., et al., High rate of levofloxacin resistance in a background of clarithromycin- and metronidazole-resistant *Helicobacter pylori* in Vietnam. *Int J Antimicrob Agents*, 2015. 45(3): p. 244-8.
6. Khademi, F., et al., The study of mutation in 23S rRNA resistance gene of *Helicobacter pylori* to clarithromycin in patients with gastrointestinal disorders in Isfahan - Iran. *Adv Biomed Res*, 2014. 3: p. 98.
7. Trespalacios-Rangel, A.A., et al., Surveillance of Levofloxacin Resistance in *Helicobacter pylori* Isolates in Bogota-Colombia (2009-2014). *PLoS One*, 2016. 11(7): p. e0160007.
8. Liou, J.M., et al., Efficacy of genotypic resistance-guided sequential therapy in the third-line treatment of refractory *Helicobacter pylori* infection: a multicentre clinical trial. *J Antimicrob Chemother*, 2013. 68(2): p. 450-6.
9. Dailidienė, D., et al., Emergence of tetracycline resistance in *Helicobacter pylori*: multiple mutational changes in 16S ribosomal DNA and other genetic loci. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002. 46(12): p. 3940-6.
10. Zerbetto De Palma, G., et al., Occurrence of Mutations in the Antimicrobial Target Genes Related to Levofloxacin, Clarithromycin, and Amoxicillin Resistance in *Helicobacter pylori* Isolates from Buenos Aires City. *Microb Drug Resist*, 2017. 23(3): p. 351-358.
11. Diab, M., et al., Detection of antimicrobial resistance genes of *Helicobacter pylori* strains to clarithromycin, metronidazole, amoxicillin and tetracycline among Egyptian patients. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 2018.
12. Marais, A., et al., Characterization of the genes *rdxA* and *frxA* involved in metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Res Microbiol*, 2003. 154(2): p. 137-44.
13. Vianna, J.S., et al., Drug Resistance in *Helicobacter Pylori*. *Arq Gastroenterol*, 2016. 53(4): p. 215-223.
14. Zhang, X.Y., et al., Detection of the clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa by the amplification refractory mutation system combined with quantitative real-time PCR. *Cancer Med*, 2019. 8(4): p. 1633-1640.
15. Binyamin, D., et al., Phenotypic and genotypic correlation as expressed in *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin and fluoroquinolones. *Gut Pathogens*, 2017. 9(48).

16. Gerrits, M.M., et al., 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*, 2006. 11(3): p. 181-7.
17. Gerrits, M.M., et al., 16S rRNA mutation-mediated tetracycline resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002. 46(9): p. 2996-3000.
18. Pourakbari, B., et al., High frequency of metronidazole and clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* in formalin-fixed, paraffin-embedded gastric biopsies. *Br J Biomed Sci*, 2018. 75(2): p. 61-65.