

DOI: <https://doi.org/10.59294/HIUJS.KHSK.2025.012>

TỐI ƯU HÓA PHẢN ỨNG REAL-TIME PCR PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN A2143G TRÊN GENE 23S rRNA LIÊN QUAN ĐẾN TÍNH KHÁNG CLARITHROMYCIN CỦA *HELICOBACTER PYLORI*

Đoàn Nguyễn An Khang^{1,2}, Nguyễn Tuấn Anh^{1,2,*}, Hà Mạnh Tuấn^{2,3}, Trần Thiện Khiêm², Quách Hữu Lộc², Hà Thị Anh⁴, Vũ Thị Hải Yến⁴, Huỳnh Thị Thu Thảo⁴, Nguyễn Thị Nga⁴

¹Trung tâm Đào tạo và Chẩn đoán Y Sinh học phân tử, Bệnh viện Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

²Bệnh viện Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh - Cơ sở 2

³Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

⁴Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Điều trị nhiễm khuẩn *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) đang trở nên khó khăn hơn bởi tình trạng kháng Clarithromycin, gây ra bởi các đột biến điểm như A2143G trên gene 23S rRNA. Phương pháp giải trình tự đòi hỏi kỹ thuật cao, khó ứng dụng trong lâm sàng. Vì vậy, việc phát triển một phương pháp chẩn đoán nhanh, đặc hiệu và phù hợp với điều kiện thực tế là hết sức cấp thiết. **Mục tiêu nghiên cứu:** Tối ưu hóa phản ứng allele-specific real-time PCR (AS-qPCR) để phát hiện nhanh đột biến A2143G của *H. pylori* trực tiếp từ mẫu sinh thiết dạ dày - tá tràng. **Vật liệu và phương pháp:** Phản ứng AS-qPCR sử dụng mỗi mẫu dò Taqman để phân biệt ba kiểu gen: hoang dại, đột biến, và hỗn hợp. Các điều kiện phản ứng: Nhiệt độ lai, nồng độ môi và nồng độ mẫu dò được tối ưu lần lượt. **Kết quả:** Phản ứng AS-qPCR được thiết lập có khả năng phát hiện đột biến A2143G, trả kết quả nhanh trong vòng 2 giờ. Phản ứng cho phép phát hiện cả những mẫu hỗn hợp có tần suất allele đột biến thấp tới 20%, cho thấy độ nhạy đáng tin cậy. **Kết luận:** Phản ứng AS-qPCR được thiết lập trong nghiên cứu là một công cụ sinh học phân tử nhanh, khả thi trong việc hỗ trợ lựa chọn kháng sinh Clarithromycin hợp lý, cá thể hóa điều trị.

Từ khóa: *Helicobacter pylori*, Clarithromycin, đề kháng kháng sinh, đột biến A2143G, allele-specific real-time PCR

OPTIMIZING A REAL-TIME PCR REACTION FOR DETECTION OF THE A2143G MUTATION IN THE 23S rRNA GENE ASSOCIATED WITH CLARITHROMYCIN RESISTANCE IN *HELICOBACTER PYLORI*

Doan Nguyen An Khang, Nguyen Tuan Anh, Ha Manh Tuan, Tran Thien Khiem, Quach Huu Loc, Ha Thi Anh, Vu Thi Hai Yen, Huynh Thi Thu Thao, Nguyen Thi Nga

ABSTRACT

Introduction: The treatment of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection is increasingly hindered by Clarithromycin resistance, primarily due to point mutations, such as A2143G, in the 23S rRNA gene. While Sanger sequencing remains the gold standard for mutation detection, its technical complexity limits widespread clinical application. A rapid, specific, and practical diagnostic approach is urgently needed. **Objective:** To optimize an allele-specific real-time PCR (AS-qPCR) assay for the rapid detection of the A2143G mutation in *H. pylori* directly from gastric-duodenal biopsy specimens. **Methods:** The AS-qPCR assay was designed using allele-specific primers and TaqMan probes to differentiate wild-type, mutant, and heterozygous genotypes. Key parameters, including annealing

* Tác giả liên hệ: Nguyễn Tuấn Anh, Email: anh.nt@umc.edu.vn

(Ngày nhận bài: 28/03/2025; Ngày nhận bản sửa: 04/05/2025; Ngày duyệt đăng: 20/05/2025)

temperature, primer concentration, and probe concentration, were systematically optimized. Results: The optimized AS-qPCR assay enabled specific detection of the A2143G mutation within 2 hours. The assay demonstrated high sensitivity, reliably detecting mutant alleles in mixed samples with a frequency as low as 20%. Conclusion: The developed AS-qPCR assay provides a rapid and sensitive molecular tool for identifying Clarithromycin-resistant H. pylori strains. Its clinical applicability may facilitate the timely selection of antibiotics and support personalized treatment strategies.

Keywords: *Helicobacter pylori, Clarithromycin, antibiotic resistance, A2143G mutation, allele-specific real-time PCR.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Helicobacter pylori (*H. pylori*) là vi khuẩn Gram âm, sinh sống ở biểu mô dạ dày - tá tràng và chỉ gây bệnh ở người, được phát hiện vào năm 1982 [1]. Vi khuẩn gây bệnh đau dạ dày, u nhú biểu mô dạ dày và thậm chí là K dạ dày. Từ năm 1994, Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) đã phân loại *H. pylori* là tác nhân gây ung thư nhóm 1 vì sự liên quan của vi khuẩn đối với sự hình thành những khối u ác tính dạ dày [2].

Vi khuẩn chỉ gây bệnh trên người, thông qua 4 con đường lây truyền: miệng - miệng (hôn, bón thức ăn, ăn thức ăn thừa), sử dụng chung dụng cụ nhà bếp (ăn chung và gấp cho nhau), phân - miệng (ăn/uống thức ăn chưa qua nấu chín), qua thủ thuật y khoa (không khử trùng thiết bị đầy đủ) [3]. Tại Việt Nam, tỉ lệ mắc được ghi nhận vào năm 2021 là 83.5%, trong đó tỉ lệ mắc ở trẻ em dưới 12 tuổi là 92.2% [4].

Các kháng sinh được Hiệp hội Tiêu hóa Hoa Kỳ khuyến nghị sử dụng để diệt trừ *H. pylori* gồm có Amoxicillin, Clarithromycin, Levofloxacin, Metronidazole, Rifabutin, Tetracycline [5]. Theo đồng thuận Maastricht VI/Florence 2022, Clarithromycin không nên được kê đơn ở những vùng có tỉ lệ kháng hiện hành > 15% mà chỉ khuyến nghị sử dụng nếu có bằng chứng nhạy với kháng sinh thông qua kháng sinh đồ hoặc thử nghiệm sinh học phân tử (giải trình tự, real-time PCR hoặc digital PCR) [6]. Tại Việt Nam, theo đồng thuận 2023 của Hội tiêu hóa Việt Nam (VNAGE), 2 phác đồ đang được khuyến nghị sử dụng là PALB (PPI + Amoxicillin + Levofloxacin + Bismuth) và PTMB (PPI + Tetracycline + Metronidazole + Bismuth) do tỉ lệ đề kháng với Clarithromycin luôn nằm ở mức > 15% trong nhiều năm liên tiếp [7] và Rifabutin là thuốc chống lao hàng 1 tại Việt Nam, không được sử dụng trong điều trị nhiễm *H. pylori*.

Clarithromycin là kháng sinh họ Macrolide, được sử dụng từ 1993 để điều trị nhiễm *H. pylori* do những ưu điểm như MIC nhỏ, ít ảnh hưởng lên việc tiết acid dạ dày, thẩm thấu tốt [8]. Tuy nhiên, tỉ lệ đề kháng Clarithromycin của *H. pylori* tại Việt Nam được ghi nhận ở mức khá cao: 42.4% (2014, Huế), 85.5% (2016, Thành phố Hồ Chí Minh), 96.3% (2022, Thành phố Hồ Chí Minh) [9 - 11]. Thực tế, tại Việt Nam cho thấy phác đồ điều trị có sử dụng Clarithromycin sequential chỉ có tỉ lệ điều trị thành công 60.3%, thấp hơn so với phác đồ có Bismuth (72.7%) và phác đồ có Tetracycline (82.0%) [4]. Nguyên nhân hàng đầu gây ra tính kháng Clarithromycin là do những đột biến điểm trên 23S rRNA khiến cấu trúc ribosome bị thay đổi khiến kháng sinh không thể gắn vào thực hiện hoạt tính được. Đột biến điểm đóng vai trò chính gây ra sự kháng Clarithromycin gồm có A2142G, A2142C và A2143G và đã có nhiều nghiên cứu về đột biến này [8]. Tuy nhiên, ở quần thể người Việt Nam, đột biến tại vị trí 2142 không phổ biến (tỉ lệ đột biến chỉ có 3.5%) [12].

Từ những điều cấp bách nói trên, việc xác định độ nhạy cảm với kháng sinh của *H. pylori* đối với Clarithromycin là cực kì cần thiết. Phương pháp tiêu chuẩn vàng kháng sinh đồ thông qua nuôi cấy không được khuyến nghị trong lâm sàng do vi khuẩn này mọc chậm (thời gian thực hiện xét nghiệm thường tốn 2 - 3 tuần), tỉ lệ nuôi cấy thành công không cao. Do đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm mục tiêu xây dựng phản ứng real-time PCR phát hiện những đột biến liên quan tính kháng Clarithromycin, cung cấp cho lâm sàng một công cụ sàng lọc nhanh những chủng vi khuẩn nghi ngờ mang đột biến liên quan tính kháng Clarithromycin.

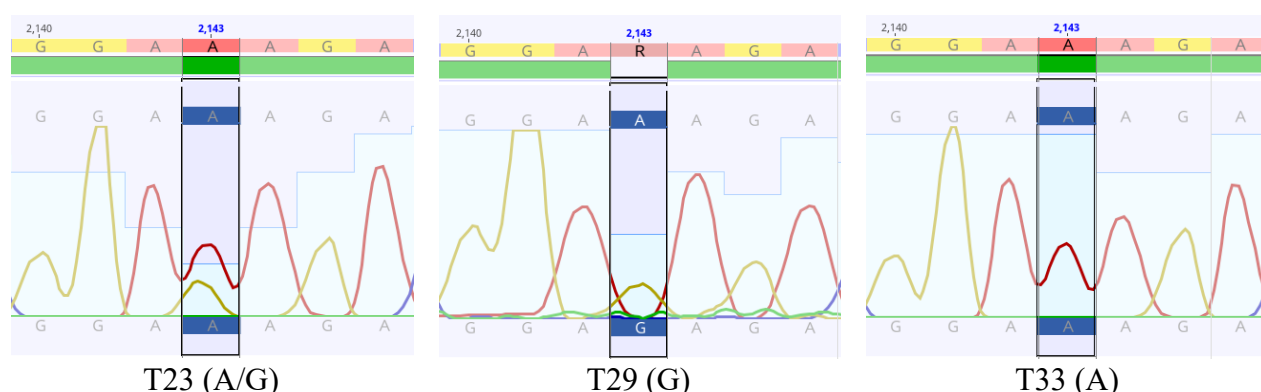
2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU VÀ VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trên mẫu sinh thiết dạ dày - tá tràng của những người bệnh đến khám tại Bệnh viện Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh - Cơ sở 2 với triệu chứng tiêu hóa như đau dạ dày hoặc đầy hơi, khó tiêu. Những người bệnh sử dụng kháng sinh trong vòng 4 tuần, đang mắc K dạ dày sẽ được loại ra khỏi nghiên cứu.

2.2. Mẫu nghiên cứu

Mẫu sinh thiết: Từ các mẫu sinh thiết dạ dày - tá tràng của người bệnh đã được xác nhận dương tính với *H. pylori* bằng Rapid Urease Test (RUT). Những mẫu sinh thiết này được xử lý và tinh sạch để thu được DNA bộ gene. Các mẫu này được thực hiện nhân bản vùng gene 23S rRNA có chứa vị trí 2143 và xác nhận trình tự tại vị trí 2143 bằng phương pháp Sanger như tại Hình 1.



Hình 1. Trình tự tại vị trí 2143 của các mẫu Sinh thiết dùng trong nghiên cứu. T23: Kiểu gene hỗn hợp, T29: Kiểu gene đột biến, T33: Kiểu gene hoang dại

Mẫu amplicon: Sử dụng chủng vi khuẩn thuần *H. pylori* phân lập từ mẫu lâm sàng, chúng tôi tinh sạch DNA của vi khuẩn và tiến hành nhân bản vùng gene của 23S rRNA có chứa vị trí 2143 để tạo thành những đoạn amplicon có độ dài 412 bp. Các amplicon được xác nhận kích thước bằng điện di, xác nhận trình tự tại vị trí 2143 bằng phương pháp Sanger, tinh sạch DNA, định lượng nồng độ (ng/μL) bằng máy quang phổ NanoDrop One (ThermoFisher, Hoa Kỳ) sau đó quy đổi sang đơn vị copies/μL dựa trên kích thước của amplicon, và pha loãng thành dải nồng độ từ 10^7 đến 10^2 copies/μL.

Tinh sạch DNA: Mẫu sinh thiết sau khi được xử lý sẽ được tinh sạch DNA bằng bộ kit Accurive sDNA Prep Kit EX-DNA02.1F (Khoa Thương Biotech, Việt Nam) theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất. Thời gian hoàn thành của toàn quá trình khoảng 30 phút. Dung dịch DNA thu được sau quá trình được lưu trữ ở 4°C nếu sử dụng ngay hoặc lưu trữ ở -20°C.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế môi và mẫu dò: Một cặp môi đặc hiệu đã được thiết kế nhằm nhân bản đoạn gene 23S rRNA của *Helicobacter pylori* bao gồm vị trí đột biến 2143. Đồng thời, hai mẫu dò TaqMan được phát triển song song, mỗi mẫu dò mang chất phát huỳnh quang khác nhau: FAM để nhận diện kiểu gene hoang dại và VIC để phát hiện kiểu gene đột biến A2143G. Thiết kế này cho phép phân biệt rõ ràng giữa các kiểu gene khi phân tích tín hiệu huỳnh quang trong phản ứng real-time PCR. Trình tự của môi và mẫu dò được trình bày chi tiết tại Bảng 1.

Bảng 1. Trình tự môi và mẫu dò dùng trong nghiên cứu. Mẫu dò Pcla1 tương ứng với kiểu gene đột biến, mẫu dò Pcla2 tương ứng kiểu gene hoang dại

STT	Tên	Trình tự (5' - 3')	Chiều dài (bp)	%GC	Tm (°C)
1	2143-F	GGTGAAAATTCCTCCTACCCG	21	52.4	55.4

STT	Tên	Trình tự (5' - 3')	Chiều dài (bp)	%GC	T _m (°C)
2	2143-R	GTGCTAAGTTGTAGTAAAGGTCCA CG	26	46.2	57.3
3	Pcla1	VIC-AAGACGGAGAGACCC-MGBEc	15	60.0	49.8→65
4	Pcla2	FAM-AAGACGGAAAGACCC- MGBEc	15	53.3	47.7→65

Tối ưu phản ứng allele-specific real-time PCR: sử dụng bộ sinh phẩm TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, Hoa Kỳ) đã tối ưu sẵn các thành phần cơ bản của phản ứng real-time PCR như enzyme Taq polymerase, Mg²⁺, đệm, dNTP theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất. Do đó, chúng tôi tiến hành tối ưu những thông số của phản ứng real-time PCR không bao gồm trong bộ sinh phẩm gồm: Nhiệt độ lai, nồng độ môi, nồng độ mẫu dò tuần tự theo thứ tự nói trên. Tiêu chí lựa chọn cho mỗi thông số là phải đảm bảo được độ đặc hiệu và có hiệu suất phản ứng tốt nhất. Các thí nghiệm tối ưu thành phần và chương trình nhiệt của phản ứng real-time PCR được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2. Thành phần phản ứng real-time PCR và các thông số được chọn để tối ưu

Bảng 2: Thành phần phản ứng Real time PCR và các thông số được chọn để tối ưu

Thành phần phản ứng			
STT	Thành phần	Nồng độ	Đơn vị
1	Môi 2143-F	200/300/400	nM
2	Môi 2143-R	200/300/400	nM
3	Mẫu dò hoang dại Pcla2	50/100/150	nM
4	Mẫu dò đột biến Pcla1	50/100/150	nM
5	Enzyme TaqPath	5.0	μL
6	Nuclease free water	Vừa đủ cho 15μL	
7	DNA template	5 μL	
Chu trình luân nhiệt			
(Tổng thời gian phản ứng: 01:00:54 trên hệ thống Mx3005P, Stratagene)			
STT	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
1	95°C	15:00	1
2	95°C	00:05	40
3	63°C/65°C/67°C	00:10	

Đánh giá tần suất allele đột biến tối thiểu có thể phát hiện được của quy trình: Sử dụng các mẫu Amplicon của 2 kiểu gene trong dải nồng độ từ 10⁷ đến 10² copies/μL. Kiểu gene đột biến và hoang dại có nồng độ bằng nhau được phối trộn theo các tỉ lệ 1:0, 1:1, 1:4, 1:9 để tạo thành các mẫu có tần suất allele đột biến lần lượt là 100%, 50%, 20%, và 10%. Các mẫu sau đó được tiến hành phản ứng real-time PCR dựa vào điều kiện đã tối ưu ở thí nghiệm bên trên, lặp lại 2 lần mỗi mẫu để loại trừ sai lệch ngẫu nhiên. Tần suất allele đột biến tối thiểu có thể phát hiện được của quy trình là tần suất thấp nhất mà tín hiệu của mẫu dò đột biến có thể phát hiện được ở tất cả các nồng độ.

Xử lý số liệu: Các giá trị Ct (Cutoff threshold) thu được từ các thí nghiệm của nghiên cứu được đánh giá sự khác biệt giữa các nhóm sử dụng kiểm định ANOVA one-way với độ tin cậy 95%. Các số liệu được nhập liệu vào phần mềm Microsoft Excel 365 và xử lý dữ liệu bằng phần mềm RStudio 4.4.2.

Đạo đức trong nghiên cứu: Nghiên cứu được chấp thuận bởi Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu Y Sinh học Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh (số 768/HĐĐĐ-ĐHYD ngày 10/10/2022).

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả tối ưu phản ứng allele - specific real-time PCR

Để tối ưu hóa phản ứng allele-specific real-time PCR, các điều kiện bao gồm nhiệt độ lai (63°C, 65°C và 67°C), nồng độ môi (200 nM, 300 nM và 400 nM), và nồng độ mẫu dò (50 nM, 100 nM

và 150 nM) đã được khảo sát. Mục tiêu là đạt được tín hiệu đặc hiệu và ổn định cho các kiểu gen hoang dại, đột biến và hỗn hợp, đồng thời giảm thiểu hiện tượng nhân bản không đặc hiệu. Các điều kiện tối ưu được lựa chọn dựa trên độ đặc hiệu của tín hiệu, hiệu suất nhân bản và độ ổn định giữa các lần lặp lại (Hình 2).



Hình 2. Kết quả thí nghiệm tối ưu các thông số của phản ứng allele specific real-time PCR

Nhiệt độ lai 63°C - 67°C: Các nhiệt độ lai khác nhau được sử dụng nhằm tối ưu hóa điều kiện phản ứng PCR. Mỗi 200 nM-400 nM: Các nồng độ môi khác nhau đã được thử nghiệm trong phản ứng. Mẫu dò 50 nM - 150 nM: Các nồng độ khác nhau của mẫu dò TaqMan đã được khảo sát trong phản ứng. Các ký hiệu A, G, A/G biểu thị kiểu gen tại vị trí 2143 của gene 23S rRNA. A: Kiểu gene hoang dại (allele hoang dại). G: Kiểu gene đột biến (allele đột biến). A/G: Kiểu gene hỗn hợp (allele hoang dại và đột biến cùng hiện diện). Mỗi biểu đồ hộp (box plot) biểu diễn phân bố giá trị ngưỡng chu kỳ (Ct) ứng với một tập hợp điều kiện cụ thể. Hộp biểu diễn khoảng tứ phân vị (từ bách phân vị thứ 25 đến 75), đường ngang bên trong hộp biểu thị giá trị trung vị, và các “râu” kéo dài đến giá trị nhỏ nhất và lớn nhất nằm trong khoảng 1,5 lần độ rộng khoảng tứ phân vị tính từ hộp. Màu đỏ biểu thị kiểu gene đột biến (G). Màu xanh ngọc biểu thị kiểu gene hoang dại (A).

Nhiệt độ lai: Cả 3 nhiệt độ lai, phản ứng đều cho thấy khả năng phát hiện đột biến ở những mẫu mang kiểu gene đột biến và hỗn hợp. Tuy nhiên, ở nhiệt độ 63°C, mẫu mang kiểu gene đột biến ghi nhận tín hiệu đối với cả 2 loại mẫu dò cho thấy sự kém đặc hiệu của phản ứng ở nhiệt độ này, khác biệt với 2 nhiệt độ còn lại có độ đặc hiệu đảm bảo. Giá trị Ct mẫu dò VIC của kiểu gene đột biến tại nhiệt độ 65°C thấp hơn so với 67°C (t-test bất cặp, p-value = 0.026 < 0.05, 95% CI), đồng nghĩa với hiệu suất phản ứng tốt hơn. Do đó, nhiệt độ 65°C được lựa chọn cho phản ứng.

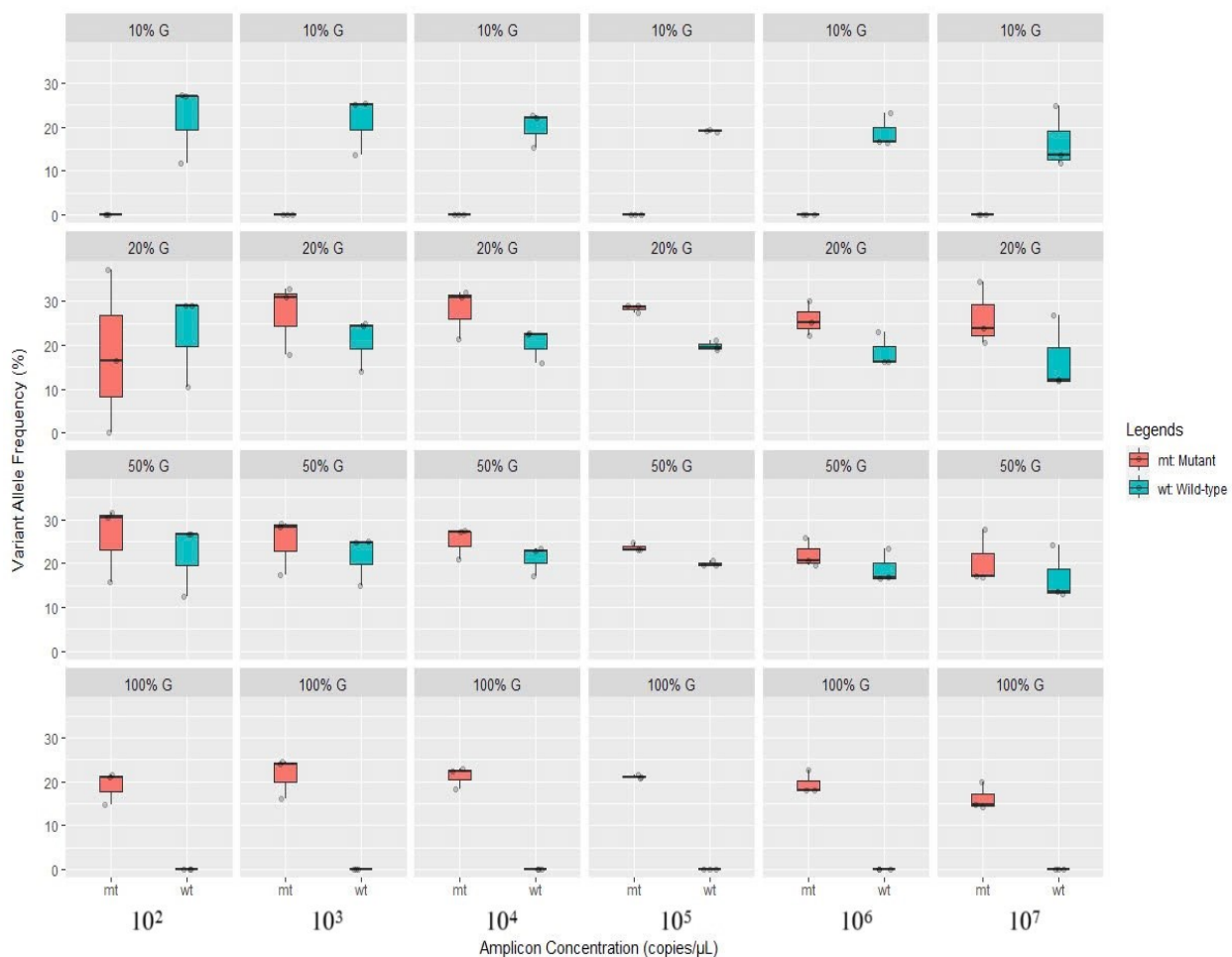
Nồng độ môi: Ở cả 3 nồng độ môi khảo sát, phản ứng đều cho thấy tín hiệu mẫu dò phù hợp với kiểu

gene (FAM đối với mẫu hoang dại, VIC với mẫu đột biến và cả 2 tín hiệu đối với mẫu hỗn hợp). Giá trị Ct thu được ở cả 3 mẫu cho thấy không có sự khác biệt (ANOVA one-way, p -value > 0.05 , 95% CI). Do đó, nồng độ mẫu được lựa chọn cho phản ứng là 300 nM.

Nồng độ mẫu dò: Ở cả 3 nồng độ mẫu dò khảo sát, phản ứng đều cho thấy tín hiệu mẫu dò phù hợp với kiểu gene (FAM đối với mẫu hoang dại, VIC với mẫu đột biến và cả 2 tín hiệu đối với mẫu hỗn hợp). Giá trị Ct thu được ở cả 3 kiểu gene cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (ANOVA one-way, p -value > 0.05 , 95% CI). Do đó, nồng độ mẫu dò được lựa chọn cho phản ứng là 100 nM.

3.2. Kết quả đánh giá tần suất allele tối thiểu có thể phát hiện của phản ứng

Thí nghiệm nhằm xác thực hiệu quả của phản ứng xét nghiệm trên các nồng độ amplicon DNA khác nhau và ở các tần suất allele đột biến khác nhau. Kết quả cho thấy tín hiệu phát hiện từ kênh huỳnh quang HEX (đại diện cho kiểu gene đột biến) và kênh FAM (đại diện cho kiểu gene hoang dại) thay đổi tùy theo nồng độ DNA và tần suất allele đột biến (Hình 3).



Hình 3. Kết quả đánh giá tần suất allele đột biến A2143G tối thiểu có thể phát hiện của phản ứng

Trục hoành (X-axis): Nồng độ amplicon, từ 10^2 đến 10^7 copies/ μ L - biểu thị nồng độ DNA của amplicon được sử dụng trong mỗi thí nghiệm. Trục tung (Y-axis): Giá trị Ct (ngưỡng chu kỳ). Thang đo 0 - 30: Khoảng giá trị Ct ghi nhận được trong các phản ứng PCR. Các ô phụ (Subpanels): Tần suất allele đột biến (%), từ 10% G đến 100% G - thể hiện tần suất của allele đột biến (G) trong các mẫu DNA, từ 10% (tần suất đột biến thấp) đến 100% (toàn bộ là đột biến). Màu đỏ (mt: mutant): Biểu thị các mẫu dự kiến sẽ phát hiện được allele đột biến (G). Màu xanh ngọc (wt: wild-type): Biểu thị các mẫu dự kiến sẽ phát hiện được allele hoang dại (A).

Ở tần suất 100% (chỉ có kiểu gene đột biến), chỉ có tín hiệu mẫu dò đột biến được ghi nhận còn tín hiệu mẫu dò hoang dại không được ghi nhận ở tất cả các nồng độ khảo sát. Điều này một lần nữa khẳng định tính đặc hiệu của phản ứng ở các nồng độ khác nhau.

Ở các tần suất 50% và 20%, tín hiệu của mẫu dò đột biến và hoang dại có thể được phát hiện đồng thời ở tất cả các nồng độ trong khoảng khảo sát. Ở tần suất 10%, chỉ có tín hiệu mẫu dò hoang dại có thể được ghi nhận còn mẫu dò đột biến không thể ghi nhận tín hiệu ở bất cứ nồng độ nào trong khoảng khảo sát. Do đó, tần suất allele đột biến tối thiểu của phản ứng chúng tôi ghi nhận được là 20%.

4. BÀN LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy phản ứng allele-specific real-time PCR sử dụng mẫu dò TaqMan có khả năng phát hiện chính xác đột biến A2143G trên gene 23S rRNA của *H. pylori* với độ đặc hiệu và hiệu suất phản ứng cao. Ở những nghiên cứu đi trước của nhóm, kỹ thuật được sử dụng để phát hiện đột biến A2143G là giải trình tự Sanger - phương pháp đòi hỏi máy móc đắt tiền và thời gian thực hiện lâu, không thể trả kết quả trong ngày. Đối với phản ứng real-time PCR được tối ưu hóa trong nghiên cứu này, thời gian thực hiện ngắn - chỉ khoảng 2 giờ kể từ khi tiếp nhận mẫu - giúp phương pháp này trở nên đặc biệt phù hợp với yêu cầu sàng lọc nhanh trong lâm sàng. Cụ thể: Quy trình bao gồm 30 phút xử lý và tinh sạch DNA, 15 phút chuẩn bị phản ứng và thiết lập chương trình chạy, 60 phút cho chu trình PCR và 15 phút kiểm tra, phân tích tín hiệu và trả kết quả. Như vậy, toàn bộ quy trình có thể được hoàn tất trong ngày, hỗ trợ kịp thời cho bác sĩ trong việc chỉ định phác đồ điều trị ngoại trú phù hợp.

Trong bối cảnh hiện tại, tỷ lệ đề kháng Clarithromycin tại Việt Nam đang ở mức báo động - có thể lên tới hơn 90% ở một số khu vực như TP.HCM [10, 11]. Việc triển khai một công cụ chẩn đoán nhanh, đáng tin cậy như real-time PCR để phát hiện sớm các đột biến kháng thuốc mang ý nghĩa đặc biệt quan trọng. Phản ứng này không chỉ giúp cá thể hóa điều trị mà còn góp phần giảm thiểu sử dụng kháng sinh không cần thiết, từ đó kiểm soát tốt hơn tình trạng kháng thuốc đang ngày càng gia tăng.

Phản ứng do nhóm nghiên cứu phát triển đạt ngưỡng phát hiện tối thiểu là 20% allele đột biến - một mức nhạy đáng kể. Mặc dù VAF của quy trình không thể so sánh được với các kỹ thuật như digital PCR (VAF thấp đến 0.01%) hay giải trình tự thế hệ mới (VAF thấp đến 0.5%) hay không thể là tiêu chuẩn vàng như giải trình tự gene Sanger, chi phí cho phản ứng real-time PCR lại tốt hơn nhiều so với các phương pháp nói trên. Ngoài ra, tần suất này là tương đối cao so với mức 2% như trong phản ứng real-time PCR được công bố bởi Maslah và cộng sự năm 2020 trên đột biến JAK V617F [13]. Tuy nhiên, với ưu điểm về thời gian và chi phí, real-time PCR vẫn là lựa chọn thực tế và khả thi trong điều kiện lâm sàng thông thường. Nghiên cứu của Ji Hae Nahm và cộng sự (2019) tại Hàn Quốc cũng đã khẳng định hiệu quả của phương pháp real-time PCR trong phát hiện đột biến A2143G từ mẫu sinh thiết với độ nhạy 94.4-100% và độ đặc hiệu 100% so với giải trình tự Sanger [14].

Tại châu Âu, nghiên cứu của Monica Oleastro và cộng sự (2003) nhấn mạnh rằng ba đột biến phổ biến nhất liên quan đến kháng Clarithromycin là A2142G, A2142C, và A2143G. Trong đó, đột biến A2143G chiếm ưu thế rõ rệt [15]. Xu hướng này phù hợp với thực tế tại Việt Nam, nơi đột biến A2143G chiếm đa số, trong khi A2142G và A2142C có tỷ lệ rất thấp (chỉ khoảng 3.5%) như kết quả của Hà Thị Minh Thi và cộng sự (2015) đã chỉ ra [12]. Do đó, việc tập trung thiết lập phản ứng phát hiện riêng cho A2143G như trong nghiên cứu hiện tại là hợp lý và có giá trị ứng dụng cao.

Một điểm nổi bật khác của nghiên cứu là việc phản ứng có thể phân biệt rõ kiểu gen hoang dại, đột

biến và hỗn hợp thông qua hệ thống mẫu dò FAM/VIC. Điều này rất quan trọng trong các trường hợp bệnh nhân nhiễm nhiều chủng *H. pylori* đồng thời - vốn không hiếm gặp ở khu vực có tỷ lệ lây nhiễm cao như Việt Nam [4]. Nghiên cứu gần đây của Yao Zhao và cộng sự (2023) tại Trung Quốc cũng đề xuất phương pháp multiplex real-time PCR phát hiện đồng thời các đột biến 23S rRNA, cho thấy đây là xu hướng kỹ thuật hiện đại trong tầm soát đột biến kháng thuốc [16].

Tuy nhiên, nghiên cứu vẫn còn một số hạn chế. Thứ nhất, phản ứng được kiểm tra chủ yếu trên mẫu sinh thiết dạ dày, chưa đánh giá hiệu quả trên các loại mẫu không xâm lấn như phân hay dịch dạ dày - vốn đang được chú trọng trong các nghiên cứu gần đây nhằm đơn giản hóa quy trình lấy mẫu. Như trong nghiên cứu của N. Gareayaghi và cộng sự vào năm 2022, nhóm nghiên cứu đã có thể phát hiện thành công các đột biến liên quan tính kháng Clarithromycin từ mẫu phân bằng phương pháp real-time PCR [17]. Thứ hai, nhóm tác giả chưa tiến hành so sánh trực tiếp với dữ liệu kháng sinh đồ hoặc kết quả điều trị để đánh giá giá trị tiên đoán của đột biến A2143G trong thực hành lâm sàng. Trên thực tế, có những chủng *H. pylori* không mang đột biến A2143G nhưng vẫn có thể có kiểu hình đề kháng.

Tóm lại, phản ứng real-time PCR do nhóm tác giả phát triển đã chứng minh được tính hiệu quả và tiềm năng ứng dụng trong sàng lọc đột biến A2143G liên quan đến kháng Clarithromycin. Phản ứng có thể góp phần quan trọng trong chiến lược điều trị theo cơ chế "test-and-treat" và định hướng lựa chọn phác đồ phù hợp tại các cơ sở y tế trong nước - nơi mà tình trạng kháng thuốc đang là thách thức lớn trong điều trị *H. pylori*.

5. Kết luận và kiến nghị

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thiết lập được phản ứng real-time PCR có khả năng phát hiện đột biến A2143G trên gene 23S rRNA của *H. Pylori* liên quan đến tính kháng Clarithromycin. Phản ứng có thời gian thực hiện ngắn (khoảng 2 tiếng), có thể phát hiện những mẫu hỗn hợp có tần suất allele đột biến thấp đến mức 20%.

Trong khuôn khổ của nghiên cứu, chúng tôi chưa có điều kiện để đánh giá hiệu quả lâm sàng của quy trình cũng như mối liên quan giữa kiểu gene đột biến và kiểu hình đề kháng. Ngoài ra, nghiên cứu chỉ được thực hiện trên mẫu sinh thiết dạ dày - tá tràng chứ chưa khảo sát trên những nền mẫu khác như nước bọt, dịch vị hoặc phân. Những điểm này sẽ là hướng đi để chúng tôi mở rộng nghiên cứu và tiếp tục thực hiện các mục tiêu nói trên trong những nghiên cứu sau.

LỜI CẢM ƠN

Xin chân thành cảm ơn Bệnh viện Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh - Cơ sở 2 đã tạo điều kiện thuận lợi về cơ sở vật chất cũng như hỗ trợ cung cấp các mẫu sinh thiết dạ dày từ người bệnh, góp phần quan trọng vào quá trình thực hiện và hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] K. Robinson, D. P. Letley, and K. Kaneko, "The Human Stomach in Health and Disease: Infection Strategies by *Helicobacter pylori*," Springer Cham, 2017. doi: 10.1007/978-3-319-50520-6.
- [2] M. Asaka, A. R. Sepulveda, T. Sugiyama, and D. Y. Graham, "Gastric Cancer," *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*, 2001, Accessed: Mar. 27, 2025. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2445/>
- [3] S. Z. Ding, Y. Q. Du, H. Lu, Z. S. Li, "Chinese Consensus Report on Family-Based *Helicobacter pylori* Infection Control and Management (2021 Edition)," *Gut*, vol. 71, no. 2, pp. 238-253, Feb.

2022, doi: 10.1136/gutjnl-2021-325630.

[4] D. V. Long, D. V. Hang, N. T. Hao, N. D. Thang, “*Helicobacter pylori* Infection and Eradication Outcomes among Vietnamese Patients in the same households: Findings from a Non-Randomized Study,” *PLoS One*, vol. 16, no. 11, p. e0260454, Nov. 2021, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0260454.

[5] W. D. Chey, C. W. Howden, S. F. Moss, S. C. Shah, “ACG Clinical Guideline: Treatment of *Helicobacter pylori* Infection,” *American Journal of Gastroenterology*, vol. 119, no. 9, pp. 1730-1753, Sep. 2024, doi: 10.14309/AJG.0000000000002968.

[6] P. Malfertheiner, F. Megraud, T. Rokkas, L. Zhou, “Management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht VI/Florence consensus report,” *Gut*, vol. 71, no. 9, pp. 1724-1762, Sep. 2022, doi: 10.1136/gutjnl-2022-327745.

[7] T. T. K. Tường, “Hiệu quả của liệu pháp kép liều cao trong diệt trừ *Helicobacter pylori* trên bệnh nhân đã thất bại phác đồ 3 thuốc chuẩn,” *Tạp chí Y học Tp. Hồ Chí Minh*, vol. 23, no. 2, pp. 254-258, 2019.

[8] A. T. Marques, J. M. B. Vitor, A. Santos, M. Oleastro, and F. F. Vale, “Trends in *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin: From phenotypic to genomic approaches,” *Microb Genom*, vol. 6, no. 3, 2020, doi: 10.1099/mgen.0.000344.

[9] P. T. Nam, A. Santona, T. V. Huy, B. Paglietti, “High rate of levofloxacin resistance in a background of clarithromycin- and metronidazole-resistant *Helicobacter pylori* in Vietnam,” *Int J Antimicrob Agents*, vol. 45, no. 3, pp. 244-248, 2015, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.10.019.

[10] C. Quek, P. T. Son, Tran. T. Kieu, P. H. Van, “Antimicrobial susceptibility and clarithromycin resistance patterns of *Helicobacter pylori* clinical isolates in Vietnam,” *F1000Res*, vol. 5, 2016, doi: 10.12688/F1000RESEARCH.8239.1.

[11] N. H. Thanh and T. T. K. Tường, “Đề kháng kháng sinh nguyên phát của vi khuẩn *Helicobacter pylori* ở bệnh nhân viêm loét dạ dày tá tràng,” *Pham Ngoc Thach Journal of Medicine and Pharmacy*, no. 2022-Volume 1.4, Dec. 2022, doi: 10.59715/pntjmp.1.4.16.

[12] H. T. M. Thi, T. V. Huy, N. V. Nhân, T. T. N. Hoa, “Xác định đột biến gene 23S rRNA của *Helicobacter pylori* và mối liên quan của các đột biến gene này với đề kháng clarithromycin ở bệnh nhân viêm dạ dày mạn,” *Tạp chí Y Dược học - Trường Đại học Y Dược Huế*, vol. 28+29, 2015, doi: 10.34071/jmp.2015.4+5.5.

[13] N. Maslah, E. Verger, M. H. Schlageter, B. Cassinat, “Next-generation sequencing for JAK2 mutation testing: advantages and pitfalls,” *Ann Hematol*, vol. 98, no. 1, pp. 111-118, Jan. 2019, doi: 10.1007/s00277-018-3499-y.

[14] J. H. Nahm, W. K. Kim, Y. Kwon, and H. Kim, “Detection of *Helicobacter pylori* with clarithromycin resistance-associated mutations using peptide nucleic acid probe-based melting point analysis,” *Helicobacter*, vol. 24, no. 5, Oct. 2019, doi: 10.1111/HEL.12634.

[15] M. Oleastro, A. Ménard, A. Santos, F. Mégraud, “Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*,” *J Clin Microbiol*, vol. 41, no. 1, pp. 397-402, Jan. 2003, doi: 10.1128/JCM.41.1.397-402.2003.

[16] Y. Zhao, Y. Li, Z. Luan, C. Shi, “Establishment of a TaqMan-MGB probe multiplex real-time

PCR system for one-step levofloxacin and clarithromycin resistant *Helicobacter pylori* detection,” *J Microbiol Methods*, vol. 192, p. 106393, Jan. 2022, doi: 10.1016/J.MIMET.2021.106393.

[17] N. Gareayaghi and B. Kocazeybek, “Detection of A2143G, A2142C, and A2142G Point Mutations with Real-Time PCR in Stool Specimens from Children Infected with *Helicobacter pylori*,” *Diagnostics*, vol. 12, no. 9, p. 2119, Aug. 2022, doi: 10.3390/diagnostics12092119.