

## NGHIÊN CỨU CẶP MỖI CAGA ĐỂ PHÁT HIỆN HELICOBACTER PYLORI

NGUYỄN THỊ HỒNG HẠNH, NGUYỄN THÚY VINH

### TÓM TẮT

Để phát hiện *Helicobacter pylori*, cặp mồi *cagA* được thiết kế để thử nghiệm trên một diện rộng bệnh nhân bệnh viện Hữu nghị, Hà Nội, Việt Nam. Kết quả PCR trên một nhóm gồm 75 bệnh nhân cho độ nhạy là 92% và độ đặc hiệu là 100% và các phản ứng PCR trên ADN sinh thiết của một nhóm bệnh nhân khác gồm 38 bệnh nhân cho độ nhạy là 82% và độ đặc hiệu là 100%. Cặp mồi *cagA* có thể sử dụng để phát hiện vi khuẩn với độ nhạy và độ đặc hiệu cao.

**Từ khoá:** *Helicobacter pylori*; gen *cagA*; PCR; độ nhạy; độ đặc hiệu.

### SUMMARY

A set of PCR primers, named *cagA* was designed to detect *Helicobacter pylori*. This was the survey on 113 ADN samples derived from Vietnamese patients. Whereas the PCR results on 75 patients of the first

group gave the sensitivity of 92% and the specificity of 100%, it was 82% and 100% on 38 patients of the other group, chosen based on the severity of the diseases they suffer from in another group. The sensitivity of the method therefore is associated closely with differently selected groups. The primer was suggested to be used for monitoring the gastric bacterium *Helicobacter pylori* with high sensitivity and specificity.

**Keywords:** *Helicobacter pylori*; *cagA*; PCR; Sensitivity; Specificity.

### ĐẶT VẤN ĐỀ

*Helicobacter pylori* [HP] là một trong những vi sinh vật gây bệnh được nghiên cứu nhiều nhất hiện nay, do khả năng làm hơn một nửa dân số trên thế giới bị nhiễm khuẩn cũng như những bí ẩn sinh học chưa tìm thấy hết [1, 2].

Do *Helicobacter pylori* là các vi sinh vật siêu đột biến, nên các phương pháp chẩn đoán cũng như điều trị các bệnh do vi khuẩn không thể như nhau đối với dân cư các vùng khác nhau trên thế giới. Cặp mồi cagA được thiết kế dựa trên trình tự của gen cagA, chủng Thái Lan là một nước Đông Nam Á gần với Việt Nam, nhằm phát hiện vi khuẩn *Helicobacter pylori* cho các bệnh nhân Việt Nam [3]

Trong bài báo trước, chúng tôi đã thông báo về thử nghiệm cặp mồi trên một nhóm gồm 75 bệnh bị nhiễm H.P, bao gồm những người viêm loét dạ dày và hành tá tràng được chọn lọc ngẫu nhiên. Phương pháp PCR cho độ nhạy và độ đặc thù là 92% và 100% [4]. Tuy nhiên, độ nhạy của phương pháp bị giảm xuống còn 82% khi phân tích một nhóm các bệnh nhân khác bị viêm loét dạ dày rất nặng. Khả năng phát hiện vi khuẩn của cặp mồi cagA, như vậy là thấp hơn so với cặp mồi TH2 của gen HP1125, vì cặp mồi TH2 có thể phát hiện hầu hết các trường hợp nhiễm khuẩn HP, không phụ thuộc vào các nhóm bệnh nhân được chọn [5]. Tuy nhiên, cặp mồi cagA vẫn có thể được sử dụng để phát hiện vi khuẩn HP và là test bổ xung trong trường hợp, khi cặp mồi TH2 không thể phát hiện *Helicobacter pylori* do gen HP1125 bị đột biến.

#### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

##### Tiêu chuẩn chọn bệnh nhân

Các bệnh nhân nhiễm *H. pylori* theo tiêu chuẩn vàng (hoặc nuôi cấy dương tính, hoặc cả hai phương pháp CLO test và mô bệnh học dương tính)

##### Tiêu chuẩn loại bệnh nhân

Dùng kháng sinh chưa được 1 tháng và ức chế bơm proton chưa được 1 tuần.

Tất cả có 113 bệnh nhân trong đó có 35 nữ và 78 nam: Tuổi của các bệnh nhân từ 20 đến 82, tuổi trung bình là 47.07.

##### Lấy sinh thiết từ các bệnh nhân bị loét dạ dày

Sinh thiết dạ dày được lấy từ 113 bệnh nhân bằng phương pháp nội soi. 38 mẫu được sử dụng trực tiếp để tách chiết ADN trong vòng một vài tiếng sau khi lấy, trong khi đó 75 mẫu còn lại được sử dụng để nuôi cấy vi khuẩn HP theo phương pháp đã công bố [6].

##### Nuôi vi khuẩn HP

Sinh thiết dạ dày được lấy bằng phương pháp nội soi và được nghiền đều, sau đó được cấy trên môi trường đặc hiệu cho vi khuẩn *Helicobacter pylori* như đã công bố [6]

##### Tách ADN từ sinh thiết

ADN được tách từ sinh thiết và từ vi khuẩn theo các phương pháp đã miêu tả.

##### Khuếch đại gen bằng PCR

Hình 1 chỉ vị trí của cặp mồi trên gen cagA của Thái Lan, mã số TH8832 với trình tự như sau:

F: 5'-ACC-ATT-GAT-CAA-ACA-ACA-ACA-CC-3'

R: 5'-AGG-GGG-TTG-TAT-GAT-ATT-TTC-CAT-3'

1-5 ng ADN được sử dụng trong phản ứng PCR có dung tích 25  $\mu$ l. Phản ứng PCR được tiến hành trên máy PCR - 9700 (Mỹ).

Chu trình nhiệt của phản ứng PCR: 94°C 1 phút; 58°C 1 phút; 72°C 1 phút;

Chu kỳ cuối cùng 72 °C 10 phút. Lặp lại 35-40 chu kỳ.

Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose có nồng độ 0.8 % đến 1.2%. 1 x TAE làm đệm.

**Xác định độ nhạy (S) và độ đặc thù (sp) của phản ứng PCR với cặp mồi thiết kế.**

**Độ nhạy (S)** = số các mẫu dương tính thật / số các mẫu dương tính thật + âm tính giả

**Độ đặc hiệu (Sp)** = số các mẫu âm tính thật / số các mẫu âm tính thật + mẫu dương tính.

#### KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

##### Giới thiệu và phân tích hai nhóm bệnh nhân

Trong nghiên cứu thử nghiệm của chúng tôi, 113 bệnh nhân được lựa chọn thành hai nhóm theo hai cách: Nhóm 1 gồm 75 bệnh nhân bị nhiễm HP được chọn ngẫu nhiên. Trong nhóm này, các bệnh nhân bị viêm và loét dạ dày, loét hành tá tràng ở các mức độ khác nhau; Nhóm II gồm 38 bệnh nhân bị loét dạ dày và hành tá tràng nặng

Bảng 1: Tỷ lệ bệnh dạ dày có nhiễm do *H. pylori* theo tuổi và giới

Tuổi / Giới tính	< 30	31-40	41-50	> 50	Tổng	Tuổi TB	% theo giới
Nam	10	6	12	50	78	55.2	68.8
Nữ	6	7	5	17	35	48.9	31.3
% theo tuổi	14.3	11.6	15.2	58.9			

##### Xác định độ nhạy và độ đặc hiệu của PCR trên hai nhóm bệnh nhân

Các kết quả PCR với cặp mồi cagA được tiến hành trên hai nhóm bệnh nhân được chọn lọc theo hai cách được trình bày ở dưới đây. Qua khảo sát hai chỉ số S (độ nhạy) và Sp (độ đặc hiệu) của phương pháp PCR với cặp mồi cagA, có thể nhận thấy: độ nhạy của phương pháp rất khác nhau đối với hai nhóm bệnh nhân. Trong khi nhóm thứ nhất bao gồm các bệnh nhân được lựa chọn ngẫu nhiên có S là 92%, thì nhóm thứ hai của các bệnh nhân bị loét dạ dày và hành tá tràng nặng lại có S thấp chỉ bằng 68%, chứng tỏ quần thể HP trong dạ dày phức tạp và đa dạng hơn.

Các tính toán cho thấy, trên 113 bệnh nhân được thử nghiệm, độ nhạy của phương pháp PCR với cặp mồi cagA là 82%. Chúng tôi cho rằng cặp mồi có thể được sử dụng để phát hiện HP, vì nó còn có độ nhạy cao hơn test thử urease Nguyễn và cs. in press). Phương pháp đặc biệt có giá trị khi cần phải xác nhận sự có mặt có HP trong bệnh phẩm ở những trường hợp, cặp mồi HP1125 thất bại không phát hiện *Helicobacter pylori* do gen HP1125 của vi khuẩn đã bị thay đổi. Tuy nhiên, đây là trường hợp rất hiếm.

Bảng 2. So sánh chỉ số S và SP trên các nhóm bệnh nhân

Nhóm bệnh nhân / Kết quả	Nhóm 1 (Chọn ngẫu nhiên)	Nhóm 2 (chọn định hướng)
Dương tính thật	69	27
Dương tính giả	0	0
Âm tính thật	6	11
Âm tính giả	0	0
Độ nhạy (S)	92%	68%
Độ đặc hiệu (Sp)	100 %	100%

#### KẾT LUẬN

Cặp mồi cagA được thiết kế để thử nghiệm trên một diện rộng bệnh nhân bệnh viện Hữu nghị, Hà Nội, Việt

Nam. Kết quả PCR trên một nhóm gồm 75 bệnh nhân cho độ nhạy là 92% và độ đặc hiệu là 100% và các phản ứng PCR trên ADN sinh thiết của một nhóm bệnh nhân khác gồm 38 bệnh nhân cho độ nhạy là 82% và độ đặc hiệu là 100%. Cặp mồi cagA có thể sử dụng để phát hiện vi khuẩn với độ nhạy và độ đặc hiệu cao..

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Marshall, B. F and Warren J. R (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patient with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, pp 311 - 315.

2. Nguyễn Thị Hồng Hạnh và Nguyễn Thị Thanh Lợi (2001). Sự tồn tại của các chủng *Helicobacter pylori* khiếm khuyết gene urease B ở các bệnh nhân viêm loét và ung thư dạ dày Việt Nam. *Đại hội lần thứ hai hội nghị khoa học hoá sinh y dược năm 2001- Các báo cáo khoa học*. Trang 106 - 113.

3. Trần Quỳnh Hoa., Lê Bằng Sơn, Nguyễn Thị Thanh Lợi., Hoàng Tuấn Anh, Nguyễn Thị Nguyệt, Bùi Phương

Thuận, Đặng Đức Trạch và Nguyễn Thị Hồng Hạnh (2001). Sự đứt đoạn của hai nucleotide ở đầu 5' của gen cagA của vi khuẩn *Helicobacter pylori*, chủng Việt Nam. *Hội thảo quốc tế về Sinh học. Hà Nội- Việt Nam 2-5 tháng 6/ 2001*.

4. Vũ Văn Hạnh, Nguyễn Thị Hồng Hạnh (2003). Xác định độ nhạy và tính đặc thù của cặp mồi PCR nhằm phát hiện vi khuẩn *Helicobacter pylori* (*in press*)

5. Nguyễn Thị Nguyệt và Nguyễn Thị Hồng Hạnh (2003). Tính nhạy và tính đặc thù của hai cặp mồi PCR TH1 và TH2 trong phát hiện vi khuẩn *Helicobacter pylori* (*in press*)

6. Lê Bằng Sơn và Nguyễn Thị Hồng Hạnh (2001). Nghiên cứu vi khuẩn *Helicobacter pylori*, chủng Việt Nam. *Hội thảo quốc tế về Sinh học. Hà Nội - Việt Nam 2-5 tháng 6/2001. Tr 414 - 417*.