NGHIÊN CỨU CẶP MỒI TH2 TRÊN BỆNH PHẨM SINH THIẾT DẠ DÀY ĐỂ CHẨN ĐOÁN HELICOBACTER PYLORI

NGUYỄN THỊ HỒNG HẠNH, NGUYỄN THUÝ VINH
Viện Công Nghệ Sinh học; Bệnh viện Hữu Nghị

TÓM TẮT

Cặp mồi TH2 đã được thiết kế nhằm khuếch đại gien HP1125 mã hoá cho một trong số 32 protein màng ngoài của Helicobacter pylori và được thử nghiệm trên 113 mẫu ADN tách từ sinh thiết hoặc từ vi khuẩn phân lập từ các bệnh nhân. Độ nhậy và độ đặc hiệu của mồi thiết kế tương ứng là 99.11% và 100. Các bác sĩ có thể sử dụng trực tiếp các sinh thiết dạ dày để làm PCR không cần nuôi cấy vi khuẩn đòi hỏi thời gian và tốn kém. Trong tương lai, cặp mồi TH2 có thể được sử dụng để chẩn đoán H. pylori.

Từ khoá: Helicobacter pylori; gien HP1125; cặp mồi TH2; PCR; độ nhạy; độ đặc hiệu.

SUMMARY

A set of PCR primers named TH2 was designed and tested on ADN samples of 113 Vietnamese patients to monitor Helicobacter pylori. As shown by the results, the domain located on HP1125 gene appears to be highly conserved. It is amplified successfully in almost all cases. The sensitivity as well as the specificity of PCR method are 99. 11% and 100% respectively. In sum, TH2 primers can be used to detect Helicobacter pylori.

Keywords: Helicobacter pylori; gene HP1125; TH2 primers; PCR; Sensitivity; Specificity.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) là căn nguyên của các bệnh về dạ dày ở người và một số động vật. Trên thế giới cũng như ở Việt nam, có hơn một nửa số dân cư bị nhiễm vi khuẩn HP. Do HP là các vi sinh vật siêu đột biến, nên các dấu ấn phân tử của chúng được lựa chọn khác nhau ở các vùng dân cư khác nhau trên thế giới. Chẳng hạn, nếu ở phương Tây, các vi khuẩn HP mang cagA+ status dường như liên quan đến các biểu hiện bệnh dạ dày rất nặng như ung thư, thì ở các nước phương Đông như Nhật, Hàn quốc, Trung Quốc…, qui luật đó không được xem xét [1, 2].Hiện nay, các nhà khoa học ước tính, *H. pylori* có thể có đến 32 gien mã hoá cho protein màng ngoài [3]. Các gien của các protein này được quan tâm nghiên cứu ở nhiều khía cạnh, trong đó có việc sử dụng chúng làm dấu ấn phân tử để phát hiện vi khuẩn HP [4,5].

Trong bài báo này, chúng tôi thông báo các kết quả khảo nghiệm cặp mồi TH2 để phát hiện vi khuẩn HP. Chúng tôi sử dụng phương pháp PCR để khuếch đại một vùng bảo thủ trên gien HP1125 của vi khuẩn H. pylori.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Tiêu chuẩn chọn bệnh nhân : các bệnh nhân có nhiễm *H. pylori* theo tiêu chuẩn vàng (hoặc nuôi cấy dương tính, hoặc cả hai phương pháp Clotest và mô bệnh học dương tính) được lựa chọn cho nghiên cứu.

Tiêu chuẩn loại bệnh nhân:

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

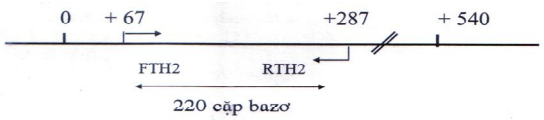
Tổng số 113 bệnh nhân trong đó có 35 nữ và 78 nam. Tuổi của các bệnh nhân từ 20 đến 82, tuổi trung bình là 47,1. Các bệnh nhân được chẩn đoán loét dạ dày và hành tá tràng, đáp ứng các tiêu chuẩn chọn lựa và loại trừ được chọn vào nghiên cứu.

Lấy sinh thiết: sinh thiết được lấy từ 113 bệnh nhân, trong đó 38 mẫu được sử dụng trực tiếp để tách chiết ADN trong vòng một vài tiếng sau khi lấy, còn 75 mẫu được sử dụng để nuôi cấy vi khuẩn theo phương pháp 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.

Phản ứng PCR: *Cặp mồi TH2 được thiết kế dựa trên trình tự đã biết của gien HP1125 của chủng vi khuẩn chuẩn J99 và 26295.*

Cặp mồi khuếch đại gien HP1125*: Sơ đồ hình 1 chỉ vị trí của mồi trên gien HP1125 của chủng chuẩn J99.*



Hình 1. Vị trí của cặp mồi TH2 (F+R) trên gien HP1125 của chủng J99

Cặp mồi TH2 có trình tự như sau:

Th2F: 5'- acttgaattccttgatcggattctttgatttc- 3'

TH2R: 5'-tttaggatccccatggataataagactgtggcc-3'

Chu trình nhiệt của phản ứng PCR

94°C 1 phút

55 °C 50 giây

72 °C 50 giây

Lặp lại 35 chu kỳ

Xác định độ nhậy của phản ứng PCR

Độ nhậy = số các mẫu dương tính thật / số các mẫu dương tính thật + âm tính giả.

Độ đặc thù= số mẫu âm tính thật/ số mẫu âm tính thật + dương tính giả.

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Giới thiệu về bệnh nhân

113 mẫu ADN được tách từ sinh thiết và từ vi khuẩn *Helicobacter pylori*, trong đó số phụ nữ bị nhiễm *H. pylori* là 35 người chiếm 30.97% và nam giới là 78 người chiếm 69.03%.

Kết quả thống kê cho thấy, bệnh dạ dày do vi khuẩn *H. pylori* có liên quan chặt chẽ đến độ tuổi và giới tính của các bệnh nhân. ở độ tuổi dưới 40 số bệnh nhân bị nhiễm *H. pylori* chiếm tỷ lệ thấp, sau đó tăng dần ở độ tuổi 41 đến 50, ở độ tuổi trên 50 tuổi số bệnh nhân bị nhiễm *H. pylori* tăng một cách đột biến chiếm 59.29%. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy, ở

bất cứ độ tuổi nào thì số lượng bệnh nhân nam bị nhiễm *H. pylori* cũng cao số lượng bệnh nhân nữ. Sự liên quan bệnh dạ dày đến độ tuổi, giới tính được chỉ ra ở hình 2 và bảng 1 dưới đây.

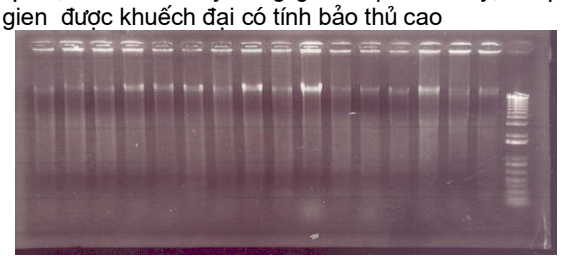
Bảng 1. Bệnh dạ dày do vi khuẩn *H. pylori* theo tuổi và giới

Tuổi Giới tính	< 30	31- 40	41 - 50	> 50	Tổng	Tuổi trung bình	% theo giới tính
Nam	10	6	12	50	78	55.21	68.75
Nữ	6	7	5	17	35	48.93	31.25
% theo độ tuổi	14.3	11.6	15.2	58.9			

Khảo sát cặp mồi TH2 trên 113 mẫu bệnh phẩm

Tất cả 113 mẫu ADN sinh thiết được tách và làm sạch theo phương pháp cải tiến đơn giản và dễ áp dụng trong các bệnh viện. Tất cả ADN đều đạt tiêu chuẩn về chất lượng (hình 3). Chúng đã được sử dụng có kết quả trong các phản ứng PCR nhằm phát hiện vi khuẩn *H. pylori*. Cặp mồi TH2 được sử dụng để khuếch đại đầu 5'của gien HP1125 trên 113 mẫu ADN. Trên điện di đồ (hình 3), sản phẩm PCR là một băng duy nhất có kích thước như mong đợi từ thiết kế là 220 cặp bazơ.

Qua khảo sát PCR trên 113 mẫu ADN, cặp mồi TH2 đã tỏ ra có khả năng nhận biết gien HP1125 rất cao, trong đó 112 mẫu ADN cho kết quả PCR dương tính trên tổng số 113 mẫu ADN nghiên cứu, chiếm tỷ lệ 99,11%. Điều này cũng gián tiếp cho thấy, đoạn gien được khuếch đại có tính bảo thủ cao

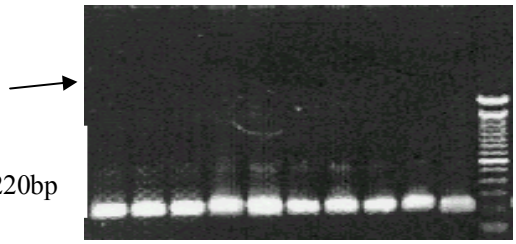


1 2 3 4 5 6 8 7 9 10 11 12 13 14 15 16 M

Hình 3. Điện di đồ một số mẫu ADN tổng số tách từ các chủng vi khuẩn H. pylori.

Giếng: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 có một băng ADN tổng số.

M là bậc thang ADN chuẩn 100 cặp bazơ.



Hình 4. Đầu 5' của gien HP1125 được khuếch đại trên mẫu ADN của các bệnh nhân nhiễm khuẩn *H. pylori.*

Giếng: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 có một băng ADN kích thước 220bp

M: Thang chuẩn ADN 100 cặp bazơ.

Các kết quả PCR trên 113 mẫu ADN, được xử lý bằng chương trình Excel và thống kê sinh học cho thấy độ nhậy của cặp mồi TH2 thiết kế > 99.11% và độ đặc thù của phản ứng PCR đạt 100%. Bảng 2 dưới đây là kết quả PCR của các mẫu ADN nghiên cứu.

Bảng 2 : Kết quả PCR nhận được khi khảo sát 113 mẫu ADN

Chỉ tiêu nghiên cứu	Kết quả PCR
Số mẫu ADN cho sản phẩm PCR dương tính thật	112/ 113
Số mẫu AND cho sản phẩm PCR dương tính giả	0/113
Số mẫu AND cho sản phẩm PCR âm tính thật	1/113
Số mẫu ADN cho sản phẩm PCR âm tính giả	0/113
Độ nhậy của cặp mồi TH2	99,11%
Độ đặc thù của cặp mồi TH2	100%

Việc phát hiện các nguồn bệnh bằng khuếch đại một số gien đặc trưng của vi khuẩn bằng phản ứngPCR là một phương pháp nhanh, nhậy, chính xác và tương đối dễ thao tác. Tuy nhiên, vấn đề sẽ khó khăn hơn, nếu các nguồn bệnh có một hệ gienom linh hoạt và luôn thay đổi như virus HIV, nguyên sinh động vật *Trypanosoma*, vi khuẩn *Helicobacter pylori…*Trong những trường hợp như vậy, các nhà khoa học bắt buộc phải tìm kiếm các vùng bảo thủ nhất trên hệ gien nhằm đạt một độ nhậy cũng như độ đặc thù cao cho phải ứng PCR. Trong nghiên cứu của mình, chúng tôi đã may mắn tìm thấy một trong những vùng như vậy trên gien HP1125 của vi khuẩn. Điều đó giải thích độ nhậy đạt 99,11% cũng như độ đặc thù cao 100% của phương pháp.

Chúng tôi cho rằng, cặp mồi TH2 có thể sử dụng nhằm chẩn đóan vi khuẩn *H. pylori* ở Việt Nam.

KẾT LUẬN:

Cặp mồi TH2 đã được thiết kế nhằm khuếch đại gien HP1125 mã hoá cho một trong số 32 protein màng ngoài của *Helicobacter pylori* và được thử nghiệm trên 113 mẫu ADN tách từ mảnh sinh thiết dạ dày của bệnh nhân. Độ nhậy và độ đặc hiệu của mồi thiết kế tương ứng là 99.11% và 100. Cặp mồi TH2 có thể được sử dụng để chẩn đoán *H. pylori* trực tiếp từ các mảnh sinh thiết dạ dày bằng phương pháp PCR mà không cần nuôi cấy vi khuẩn đòi hỏi thời gian và tốn kém.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Warburton, V.J., Everett, S., Mapstone, N.P., Axon, A.T and HawkeyP., Dixon, M. F (1998). Clinical and Histological associations of cagA and vacA genotypes in Helicobacter pylori. *J. Clin. Pathol.* 51{1): 55-61.

2 .Shimoyama, T., Yoshimura, T., Mikami, T., Fukuda, S., Crabtree, J.E., Munakata, A (1998). Evaluation of Helicobacter pylori in Japanese patients with gastric cancer. *J. Clin. Pathol. 51(4) : 299- 301.*

3..Richard, Alm *et a*l (2000). Comparative Genomic of *Helicobacter pylori* :Analysis of the outer membrane protein families. *Infect and Immu. Vol 68 (7) : 4155- 4167.*

4. Nguyễn Thị Hồng Hạnh *(2001).* Sử dụng protein màng ngoài HP1125 của vi khuẩn *Helicobacter pylori* làm kháng nguyên đặc hiệu trong các phân tích

Western. *Đại hội lần thứ 2 Hội nghị khoa học Sinh Y Dược năm 2001, trang 125-129* .

5. Nguyễn Thị Hồng Hạnh (2003). Sử dụng kháng nguyên tái tổ hợp HP1125 để chẩn đoán nhiễm khuẩn *Helicobacter pylori. Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống. Báo cáo khoa học. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật. Hà Nội 2003. Tr. 889-991.*

6. Trần Công Tước., Trần Quỳnh Hoa., Nguyễn Thị Hồng Hạnh., Nguyễn Vân Phủng và Bùi Phương Thuân (2000). Sự có mặt của vi khuẩn *Helicobacter pylori* mang CagA+ trong các sinh thiết dạ dày của người Việt Nam. *Tạp chí Sinh học 23 (2) : 51-54.*

7. 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. Trang106 -113.*