

XÁC ĐỊNH MIC VÀ ĐỘ BIẾN KHÁNG LEVOFLOXACIN CỦA *HELICOBACTER PYLORI* Ở BỆNH NHÂN VIÊM LOÉT DẠ DÀY TÁ TRÀNG TẠI TIỀN GIANG

Trần Thị Như Lê^{1,2,✉}, Trần Ngọc Ánh², Nguyễn Vũ Trung^{2,3}

¹Trường Đại Học Y Dược cần Thơ

²Trường Đại học Y Hà Nội

³Viện Pasteur Thành Phố Hồ Chí Minh

Tình trạng kháng kháng sinh ở *Helicobacter pylori* đang gia tăng và có thể dẫn đến thất bại điều trị. Nghiên cứu này sử dụng kỹ thuật Etest và kỹ thuật giải trình tự sanger nhằm xác định nồng độ ức chế tối thiểu và các dạng đột biến xuất hiện ở *Helicobacter pylori* trên bệnh nhân viêm loét dạ dày tá tràng tại Tiền Giang. Đồng thời tìm hiểu về mối liên quan giữa nồng độ ức chế tối thiểu với các dạng đột biến *GyrA* kháng levofloxacin của *Helicobacter pylori*. Kết quả nghiên cứu ghi nhận: Đột biến *GyrA* chiếm 60% trong tổng số 65 mẫu nghiên cứu. Trong đó 23,1% (9/39) mẫu nhạy với LEV có nồng độ ức chế tối thiểu của LEV $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ ghi nhận được đột biến làm thay đổi nucleotid ở các vị trí codon P188L, R190Q, M191I, Y81C, P187S, D91T, D108E, R95K, G111A, S185Y. Và 30/39 (66,9%) mẫu có nồng độ ức chế tối thiểu $> 1 \mu\text{g/ml}$ gặp ở các đột biến vị trí N87K, D91N/G, A55S, M191I, Y28F/I, V107F, A27L, V199G, S29F, M30L, G111L, R42K, V65S, A66L, S101L, M102A, N112I, R95G/K, D108V/E, A94G. Kết luận: Đột biến trên *GyrA* ở vị trí codon N87K, D91N/G/T, A55S của *Helicobacter pylori* liên quan đến việc tăng nồng độ MIC của levofloxacin. Chưa xác định được đột biến M191I, Y28F/I, V107F, A27L, V199G, S29F, M30L, G111L, R42K, V65S, A66L, S101L, M102A, N112I, R95G/K, D108V/E, A94G trên *GyrA* có liên quan đến tình trạng kháng LEV của *Helicobacter pylori* ở Tiền Giang, cần nghiên cứu thêm.

Từ khóa: Nồng độ ức chế tối thiểu, *GyrA*, levofloxacin, *Helicobacter pylori*.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Helicobacter pylori (*H. pylori*) là tác nhân gây viêm loét dạ dày tá tràng chiếm khoảng hơn 50% dân số của thế giới.¹ Ở Việt Nam, tỉ lệ nhiễm *H. pylori* là 75,2%, ở trẻ nhỏ thấp hơn người lớn, có thể gặp cả ở trẻ 1 - 2 tuổi và khác nhau giữa các địa phương.² Tiệt trừ *H. pylori* là một trong những mục tiêu hàng đầu trong điều trị các bệnh loét dạ dày - tá tràng, viêm dạ dày type B, u lympho MALT và cũng là một chỉ định trong điều trị ung thư dạ dày.³ Tính nhạy cảm với kháng sinh của *H. pylori* rất quan trọng đối

với sự thành công của một phác đồ điều trị tiệt trừ. Theo khuyến cáo của Maastricht V, phác đồ bộ ba có levofloxacin là phác đồ thứ hai sau khi thất bại với phác đồ đầu tay.⁴ Các nghiên cứu gần đây ghi nhận tỉ lệ đột biến kháng levofloxacin ngày càng tăng như nghiên cứu của tác giả Trần Thiện Trung (2016, Việt Nam) 54,8%, Tuan VP (2019, Campuchia) 65,4% và đột biến trong *GyrA* và hoặc *GyrB* chiếm khoảng 83%.^{5,6} Đột biến *GyrA* thường nằm tại vị trí codon 86, 87, 88, và 91. Nghiên cứu mối liên quan giữa nồng độ ức chế tối thiểu với các dạng đột biến *GyrA* phần nào giúp bác sĩ giải thích được cơ chế kháng LEV của *H. pylori*. Để hiểu biết thêm mức độ kháng LEV, nhất là mức độ kháng liên quan đến *GyrA* chúng tôi thực hiện nghiên cứu: "Xác định MIC và đột biến

Tác giả liên hệ: Trần Thị Như Lê

Trường Đại học Y Hà Nội

Email: ttnle@ctump.edu.vn

Ngày nhận: 25/10/2022

Ngày được chấp nhận: 26/11/2022

kháng levofloxacin của *Helicobacter pylori* ở bệnh nhân viêm loét dạ dày - tá tràng tại Tiền Giang” nhằm xác định nồng độ ức chế tối thiểu và các dạng đột biến xuất hiện ở *H. pylori* trên bệnh nhân viêm loét dạ dày tá tràng tại Tiền Giang. Đồng thời tìm hiểu về mối liên quan giữa nồng độ ức chế tối thiểu với các dạng đột biến *GyrA* kháng levofloxacin của *H. pylori*.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

65 bệnh nhân được chẩn đoán viêm loét dạ dày - tá tràng do *H. pylori* đến khám và điều trị tại Bệnh Viện Đa Khoa Trung Tâm Tiền Giang, Đa Khoa Khu vực Cai Lậy, Đa Khoa Khu vực Gò Công từ tháng 1/2022 đến tháng 9/2022.

Tiêu chuẩn chọn lựa

Bệnh nhân > 16 tuổi được chẩn đoán viêm loét dạ dày-tá tràng dựa vào lâm sàng: đau thượng vị, nóng rát, đầy bụng, ợ hơi và xác định tổn thương viêm loét dạ dày tá tràng qua nội soi dạ dày tá tràng.

Chẩn đoán nhiễm *H. pylori* khi bệnh nhân có ít nhất hai xét nghiệm dương tính: CLO test dương tính, nhuộm Gram mẫu mô sinh thiết niêm mạc hang vị hoặc thân vị phát hiện vi khuẩn Gram âm ở dạng xoắn khuẩn cong, mảnh, đầu ngã, chữ S. Hoặc một xét nghiệm nuôi cấy định danh vi khuẩn bằng phương pháp thông thường phát hiện sự hiện diện của vi khuẩn *H. pylori*.

Tiêu chuẩn loại trừ

Bệnh nhân dùng kháng sinh hoặc bismuth trong vòng 4 tuần; dùng thuốc kháng thụ thể H_2 hoặc PPI trong vòng 2 tuần trước đó. Bệnh nhân có chống chỉ định nội soi thực quản - dạ dày - tá tràng. Bệnh nhân không đồng ý tham gia nghiên cứu.

2. Phương pháp

Thiết kế nghiên cứu

Mô tả cắt ngang.

Cỡ mẫu

Cỡ mẫu được lấy theo phương pháp cỡ mẫu thuận tiện.

Nghiên cứu thu được 65 mẫu *H. pylori* phân lập từ niêm mạc dạ dày tá tràng của bệnh nhân viêm loét dạ dày tá tràng bằng kỹ thuật giải trình tự trực tiếp.

Bệnh nhân được lấy 3 mẫu niêm mạc ở rìa các góc tổn thương loét, hang vị, thân vị hoặc trong trường hợp có viêm dạ dày tá tràng và lấy 6 mẫu gồm 3 mẫu ở thân vị và 3 mẫu ở hang vị của các bệnh nhân được chẩn đoán viêm loét dạ dày - tá tràng. Mẫu bệnh phẩm được cho vào môi trường nước muối sinh lý NaCl 0,9% vô trùng hoặc môi trường vận chuyển Portagerm. Bệnh phẩm được chuyển đến phòng xét nghiệm vi sinh của Bệnh viện Đa khoa Trung tâm Tiền Giang để thực hiện xét nghiệm theo đúng quy trình. Bệnh phẩm được nghiền nát và cấy trên đĩa thạch pylori agar, ủ bằng túi ủ Genbag (tỷ lệ O_2 : 5%, CO_2 : 10%, N_2 : 85%, Biomeurieux, Pháp) theo quy trình ở nhiệt độ $37^\circ C/48 - 72h$. Xác định *H.pylori* khi nhuộm Gram phát hiện trực khuẩn âm hình cung hoặc cánh chim hải âu, chữ S, thử nghiệm urease (+), oxidase (+), catalase (+). Vi khuẩn được làm kháng sinh đồ bằng kỹ thuật Etest trên môi trường Muller hinton agar có 5% máu ngựa, túi ủ Genbag (tỷ lệ O_2 : 5%, CO_2 : 10%, N_2 : 85%, Biomeurieux, Pháp) và kháng sinh của hãng Biomeurieux, Pháp ở mật độ huyền dịch vi khuẩn 3 McFarland. Mẫu *H. pylori* đề kháng với levofloxacin khi MIC > 1 $\mu g/ml$, nhạy $\leq 1 \mu g/ml$.⁷ Những mẫu *H. pylori* sẽ được tiến hành giải trình tự gen trực tiếp theo trình tự sau: (1) Tách chiết DNA; (2) Chạy PCR theo quy trình cài đặt giai đoạn biến tính tạm thời $95^\circ C$ trong 10 phút 1 chu kỳ, giai đoạn biến tính $95^\circ C$ trong vòng 30 giây 35 chu kỳ, giai đoạn bắt cặp của mỗi $58^\circ C$ trong 45 giây 35 chu kỳ, giai đoạn kéo dài $72^\circ C$ trong 30 giây 35 chu kỳ và giai đoạn

kết thúc 72°C trong 5 phút 1 chu kỳ. Với *GyrA* (DNA từ vị trí 121 - 588, dựa trên chủng chuẩn 26695(CP003904) từ ngân hàng gen GenBank, *GyrA* forward primer (5'-AGC TTA TTC CAT GAG CGT GA-3'), *GyrA* reverse primer (5'-TCA GGC CCT TTG ACA AAT TC-3'). Và theo protocol (Takara Taq DNA polymerase Hot Start 0,1µl, Taq DNA polymerase buffer 2,5µl, dNTP 0,5µl, *GyrA* Reverse primer 0,5µl/*GyrA* Forward primer 0,5µl, DNA mẫu 0,5µl, H₂O dùng cho PCR 20,4µl); (3) Tinh sạch DNA (ExoZAP PCR CleanUp kit); (4) Giải trình tự DNA bằng kỹ thuật giải trình tự trực tiếp trên hệ thống máy ABI 3500 Genetic Analyzer; (5) Mỗi trình tự được so sánh với chủng tham chiếu *H. pylori* 26695 (CP003904) trên ngân hàng Genbank.⁸

3. Xử lý số liệu

Số liệu được nhập vào chương trình Excel và được phân tích bằng phần mềm SPSS 20,0 để xác định các tỷ lệ phần trăm, kiểm định sự khác biệt bằng phép kiểm chi. Các đột biến điểm kháng thuốc chúng tôi tham khảo cấu trúc gen của chủng *H. pylori* 26695 (CP003904) trên ngân hàng Genbank. Sau đó chúng tôi sử dụng phần mềm MegaX để kiểm tra các đột biến điểm trên các chủng nghiên cứu.

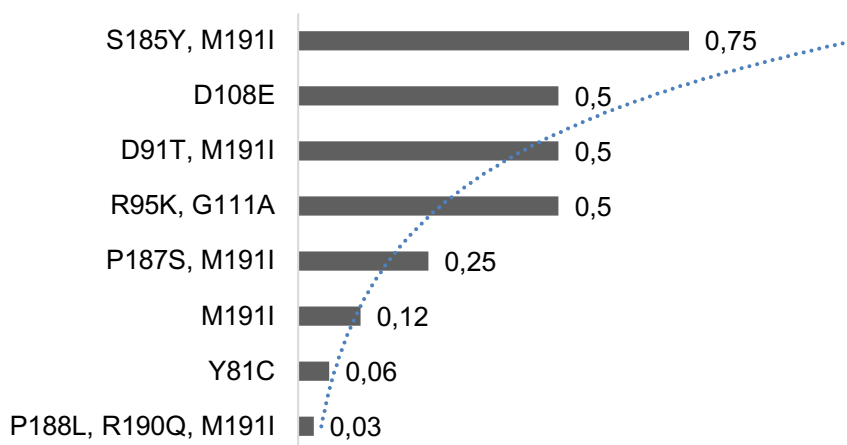
4. Đạo đức nghiên cứu

Đề cương nghiên cứu đã được Hội đồng y đức Đại học Y Dược Cần Thơ thông qua và cho phép tiến hành theo quyết định số 11/HĐĐĐ-PCT mã số đề tài 19.11a-ĐHYDCT ngày 15/2/2019. Các sinh phẩm sử dụng trong nghiên cứu đều thuộc danh mục ban hành của Bộ Y tế.

III. KẾT QUẢ

1. Nồng độ ức chế tối thiểu theo các dạng đột biến *GyrA* của *H. pylori* trên bệnh nhân viêm loét dạ dày tá tràng

Trong thời gian từ 1/2022-9/2022 chúng tôi giải trình tự 65 chủng *H. pylori* phân lập được từ bệnh nhân viêm loét dạ dày tá tràng nhiễm *H. pylori*. Độ tuổi trung bình của nhóm nghiên cứu là 48 ± 15,96, nam 52,3%, nữ 47,7%. Trong đó, 41,5% bệnh nhân có tiền sử đã điều trị tiệt trừ *H. pylori* và 58,5% bệnh nhân chưa từng điều trị tiệt trừ *H. pylori*. Tỷ lệ bệnh nhân kháng với LEV là 69,2% (45/65) và đột biến *GyrA* chiếm 60% (39/65). Trong nhóm đột biến *GyrA* có 76,9% (30/39) kháng với LEV và có 23,1% (9/39) nhạy với LEV. Nồng độ ức chế tối thiểu của LEV ≤ 1 µg/ml và > 1 µg/ml có các dạng đột biến *GyrA* của *H. pylori* sau:

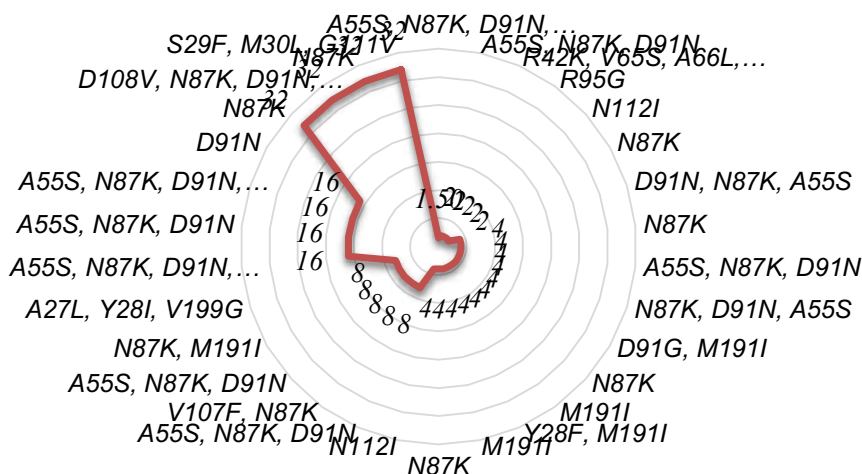


Biểu đồ 1. Phân bố MIC (LEV) ≤ 1 µg/ml theo các dạng đột biến *GyrA* của *H. pylori*

9/39 mẫu có nồng độ ức chế tối thiểu của LEV ≤ 1 µg/ml có xuất hiện đột biến GyrA làm thay đổi nucleotid ở các vị trí codon P188L +

R190Q + M191I; Y81C; M191I; P187S + M191I; D91T + M191I; D108E; R95K + G111A; S185Y + M191I.

Phân bố MIC theo các dạng đột biến GyrA của H. pylori



Biểu đồ 2. Phân bố MIC (LEV) > 1µg/ml theo các dạng đột biến GyrA của H. pylori

30/39 mẫu đột biến kháng levofloxacin của H.pylori ghi nhận được 17 dạng đột biến trong đó đột biến đơn có: N87K 6 mẫu với giá trị MIC lần lượt là 32 µg/ml (2 mẫu), 4 µg/ml (3 mẫu), 2 µg/ml (1 mẫu), D91N với MIC 16 µg/ml, N112I với MIC 4 µg/ml (1 mẫu), 2 µg/ml (1 mẫu); R95G với MIC 2 µg/ml; M191 với MIC là 4 µg/ml (2 mẫu). Đột biến kép: D91G + M191I với MIC 4 µg/ml (1 mẫu); N87K + V107F với MIC 8 µg/ml (1 mẫu); N87K + M191I với MIC 8 µg/ml (1 mẫu); Y28F + M191I với MIC 4 µg/ml (1 mẫu). Đột biến bộ ba gồm N87K + D91N

+ A55S với MIC 16 µg/ml (1 mẫu), 8 µg/ml (2 mẫu), 4 µg/ml (3 mẫu), 2 µg/ml (1 mẫu); S29F + M30L + G111V với MIC 32 µg/ml (1 mẫu). Đột biến bộ tứ gồm N87K + D91N + A55S + V94G với MIC 16 µg/ml (1 mẫu); N87K + D91N + A55S + A92V với MIC 16 µg/ml (1 mẫu); N87K + D91N + A55S + D108V với MIC 32 µg/ml (1 mẫu). Đột biến bộ năm gồm N87K + D91N + A55S + V94G với MIC 1,5 µg/ml; R42K, V65S, A66L, S101L, M102A với MIC là 2 µg/ml.

2. Mối liên quan giữa nồng độ ức chế tối thiểu với đột biến GyrA của H. pylori

Bảng 1. Mối liên quan giữa nồng độ ức chế tối thiểu của LEV với các dạng đột biến GyrA của H. pylori

Đột biến GyrA	MIC (LEV)		95%CI	p
	≤ 1µg/ml	> 1µg/ml		
N87K	Có	0 (0%)	1,37 - 2,28	< 0,05
	Không	20 (43,5%)		

<i>D91N/G/T</i>	Có	1 (7,1%)	13 (92,9%)	0,01 - 1,07	< 0,05
	Không	19 (37,3%)	32 (62,7%)		
<i>A55S</i>	Có	0 (0%)	11 (100%)	1,29 - 1,94	< 0,05
	Không	20 (37%)	34 (63%)		
<i>M191I</i>	Có	6 (54,5%)	5 (45,5%)	0,90 - 13,01	> 0,05
	Không	14 (25,9%)	40 (74,1%)		
<i>N87K + D91N/G/T</i>	Có	0 (0%)	11 (100%)	1,29 - 1,94	< 0,05
	Không	20 (37%)	34 (63%)		
<i>N87K + D91N/G/T+A55s</i>	Có	0 (0%)	11 (100%)	1,29 - 1,94	< 0,05
	Không	20 (37%)	34 (63%)		
<i>A94G</i>	Có	1 (50%)	1 (50%)	0,13 - 38,99	> 0,05
	Không	19 (30,2%)	44 (69,8%)		
<i>D108V/E</i>	Có	1 (33,3%)	2 (66,7%)	0,09 - 13,25	> 0,05
	Không	19 (30,6%)	43 (69,4%)		
<i>R95G/K</i>	Có	1 (50%)	1 (50%)	0,13 - 38,99	> 0,05
	Không	19 (30,2%)	44 (69,8%)		
<i>N112I</i>	Có	1 (50%)	1 (50%)	0,13 - 38,99	> 0,05
	Không	19 (30,2%)	44 (69,8%)		
<i>R42K+ V65S+A66L, S101L+ M102A</i>	Có	0 (0%)	1 (100%)	1,23 - 1,71	> 0,05
	Không	20 (31,3%)	44 (68,8%)		
<i>S29F+M30L+G111V</i>	Có	0 (0%)	1 (100%)	1,23 - 1,71	> 0,05
	Không	20 (31,3%)	44 (68,8%)		
<i>A27L, Y28I, V199G</i>	Có	0 (0%)	1 (100%)	1,23 - 1,71	> 0,05
	Không	20 (31,3%)	44 (68,8%)		
<i>V107F</i>	Có	0 (0%)	1 (100%)	1,23 - 1,71	> 0,05
	Không	20 (31,3%)	44 (68,8%)		
<i>Y28F</i>	Có	1 (100%)	0 (100%)	2,31 - 4,9	> 0,05
	Không	19 (29,7%)	45 (70,3%)		

Bệnh nhân viêm loét dạ dày-tá tràng do *H. pylori* có đột biến *GyrA* ở các vị trí codon N87K, D91N/G/T, A55S riêng lẻ hoặc phối hợp đều có nồng độ ức chế tối thiểu của LEV > 1 µg/ml

và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Còn các đột biến ở vị trí codon M191I, Y28F/I, V107F, A27L, V199G, S29F, M30L, G111L, R42K, V65S, A66L, S101L, M102A,

N112I, R95G/K, D108V/E, A94G thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa nhóm nồng độ ức chế tối thiểu > 1 µg/ml với nhóm có nồng độ ức chế tối thiểu ≤ 1 µg/ml ($p > 0,05$).

IV. BÀN LUẬN

Nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận đối với bệnh nhân viêm loét dạ dày tá tràng do *H. pylori* mà có nồng độ ức chế tối thiểu LEV ≤ 1 µg/ml thì vẫn xuất hiện đột biến thay đổi nucleotid ở một số vị trí codon như sau: P188L, R190Q, M191I, Y81C, P187S, D91T, D108E, R95K, G111A, S185Y. Các đột biến này xuất hiện riêng lẻ hoặc phối hợp nhiều đột biến trên cùng một chủng vi khuẩn. Điều này khác xa so với nghiên cứu của Chong-Hou Lok (2020) tại Trung Quốc là không ghi nhận được đột biến *GyrA* ở nhóm bệnh nhân viêm loét dạ dày tá tràng có nồng độ ức chế tối thiểu của LEV ≤ 1 µg/ml.⁹ Đến nghiên cứu của Margarita Camorlinga-Ponce (2020) tại Mexico thì tìm thấy được một đột biến ở vị trí codon T62I.¹⁰ Tương tự, thì nghiên cứu của Tal Domanovich-Asor (2021) ở Israel phát hiện được ba đột biến ở codon A97V, A88V, V199A.¹¹ Như vậy, một số đột biến *GyrA* không liên quan đến kháng LEV của *H. pylori*. Cho nên chúng ta cần hiểu rõ ý nghĩa của từng vị trí đột biến để giải thích đầy đủ nguyên nhân gây kháng kháng sinh LEV của vi khuẩn *H. pylori*. Có những đột biến không làm gia tăng tình trạng kháng LEV của *H. pylori* mà còn làm giảm nồng độ ức chế tối thiểu khi xuất hiện cùng với các đột biến khác có liên quan đến kháng LEV giống như nghiên cứu của Vo Phuoc Tuan (2019) ở Campuchia ghi nhận đột biến phối hợp giữa N87K + D91G thì làm cho nồng độ ức chế tối thiểu dao động trong khoảng 0,125 - 4 µg/ml.⁶ Còn đột biến đơn ở vị trí codon D91G thì nồng độ ức chế tối thiểu dao động 2 - 8 µg/ml, đột biến D91N thì nồng độ ức chế tối thiểu dao động 2 - 4 µg/ml, đột biến N87K thì nồng độ ức chế tối thiểu dao động từ 2 - 32 µg/ml.

Kết quả này cũng giống với nghiên cứu của tác giả Maria Teresa Mascellino (2020) ở Ý, nồng độ ức chế tối thiểu dao động 4 - 32 µg/ml khi có đột biến N87K và 1 - 4 µg/ml với đột biến D91G.¹² Ngoài vị trí codon đột biến, chúng ta cũng nên theo sát sự thay đổi nucleotid ở từng vị trí codon. Vì có những codon đã được xác nhận có liên quan đến kháng LEV của *H. pylori* như vị trí codon 87, 91 vẫn có thể xuất hiện ở những bệnh nhân nhạy cảm với LEV như kết quả nghiên cứu của You-hua Wang (2020) tại Trung Quốc ghi nhận đột biến N87N + D91G xuất hiện ở mẫu có nồng độ ức chế tối thiểu của LEV 0,5 µg/ml.¹³ Và đột biến ở một số vị trí codon chưa được xác nhận rõ có liên quan đến kháng LEV ở *H. pylori* hay không vì chúng vẫn xuất hiện ở cả nhóm có nồng độ ức chế tối thiểu ≤ 1 µg/ml và > 1 µg/ml như đột biến trong nghiên cứu của Nastaran Farzi (2019) Tehran M191I, V199A, G208E, V150A, D143E, I212S, E214K, D86N, D86G, A183V, A207T, S63P, A97V, xuất hiện ở nhóm có nồng độ ức chế tối thiểu ≤ 1 µg/ml. Đột biến D86N, R140K, M191I, G208E, V199A, D86G, M191I, V199A, G208E cũng xuất hiện ở nhóm có nồng độ ức chế tối thiểu của LEV > 1 µg/ml.¹⁴

Tóm lại, không phải tất cả các trường hợp đột biến trên *GyrA* đều liên quan đến kháng LEV mà chỉ một số đột biến trọng điểm. Một số đột biến làm giảm nồng độ ức chế tối thiểu khi cùng xuất hiện với các đột biến điểm có liên quan đến kháng LEV của *H. pylori* đã được xác nhận. Nhưng cũng có những vị trí codon đã xác nhận có liên quan đến kháng thuốc nhưng sự thay đổi nucleotid cũng giữ vị trí quan trọng trong việc thay đổi nồng độ ức chế tối thiểu. Đây là một chỉ số quan trọng hỗ trợ cho bác sĩ lâm sàng trong việc quyết định liệu điều trị cho từng bệnh nhân cụ thể nên chúng ta cần tìm hiểu sâu hơn về mối liên quan giữa nồng độ ức chế tối thiểu của LEV ở từng vị trí đột biến cũng như sự thay đổi nucleotid ở từng vị trí đó.

Đột biến *GyrA* trong vùng kháng quinolon (QRDR) đã được xác nhận có liên quan đến kháng LEV của *H. pylori*. Điều thú vị là trong nghiên cứu của chúng tôi, việc giải trình tự gen *GyrA* cho thấy đột biến A55S cũng liên quan đến kháng LEV khi nồng độ ức chế tối thiểu > 1 µg/ml ($p < 0,05$). Đột biến này đã được so sánh với chủng tham chiếu *H. pylori* 26695 có trong cơ sở dữ liệu của GenBank và giống với kết quả nghiên cứu của tác giả Arslan và cộng sự.¹⁵ Ngoài ra nghiên cứu của chúng tôi cũng đã ghi nhận thêm được một số đột biến điểm ở các vị trí khác nằm ở nhóm có nồng độ ức chế tối thiểu > 1 µg/ml bao gồm M191I, Y28F/I, V107F, A27L, V199G, S29F, M30L, G111L, R42K, V65S, A66L, S101L, M102A, N112I, R95G/K, D108V/E, A94G. Tuy nhiên các đột biến này chưa chứng minh được tình trạng kháng LEV của *H. pylori* vì sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ở nhóm nồng độ ức chế tối thiểu > 1 µg/ml với nhóm có nồng độ ức chế tối thiểu ≤ 1 µg/ml ($p > 0,05$). Tương tự, như nghiên cứu của tác giả Evariste Tshibangu-Kabamba (2020) cũng phát hiện thêm đột biến điểm mới liên quan đến kháng LVX bao gồm A92T (10,4%), R130K (11,9%), nghiên cứu của Yan Zhou (2022) đã ghi nhận thêm đột biến tại vị trí codon A88V, T239M, V172I là những đột biến chưa ghi nhận trước đây.^{16,17} Nghiên cứu của Ying Li (2022) cho thấy rằng đột biến *GyrA* không chỉ ở vị trí codon 87, 91, 86, 88 mà còn ở nhiều vị trí khác như H57Y, S63P, V65I, V77A, S83A, A129T, R103H, D155N, D161N, P188S, V741I.¹⁷ Và cũng có nghiên cứu Nastaran Farzi (2019) không phát hiện được đột biến điểm nào kháng LVX trên codon thứ 87 và 91 mà lại phát hiện được đột biến liên quan đến codon 86, 191, 199, 208, 140 ở người dân vùng Tehran.¹⁴ Như vậy, câu hỏi đặt ra là chủng tộc có liên quan gì đến vị trí đột biến kháng LVX của *H. pylori* gây kháng thuốc hay không thì cần tìm hiểu thêm.

V. KẾT LUẬN

Đột biến trên *GyrA* ở vị trí codon N87K, D91N/G/T, A55S của *H. pylori* làm gia tăng nồng độ ức chế tối thiểu của levofloxacin. Chưa xác định được đột biến M191I, Y28F/I, V107F, A27L, V199G, S29F, M30L, G111L, R42K, V65S, A66L, S101L, M102A, N112I, R95G/K, D108V/E, A94G trên *GyrA* có liên quan đến tình trạng kháng LEV của *H. pylori* ở Tiền Giang, cần nghiên cứu thêm.

Lời cảm ơn

Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn Ban Giám Đốc, quý đồng nghiệp tại Bệnh viện Đa Khoa Trung Tâm Tiền Giang, Đa khoa Khu vực Cai Lậy, Đa Khoa khu vực thị xã Gò Công đã hỗ trợ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tonolini M, Ierardi AM, Bracchi E, Magistrelli P, Vella A, Carrafiello GJlii. Non-perforated peptic ulcer disease: multidetector CT findings, complications, and differential diagnosis. 2017; 8(5): 455-469.
2. Hương VTT, Chính VQ, Châu NTH, Cư LVJTcKhvCnTI. Kết quả nghiên cứu thực trạng và các giải pháp quản lý môi trường trong chăn nuôi hộ gia đình và trang trại nhỏ ở một số tỉnh Miền Bắc. 2013; 8.
3. Hoàng Trọng Thăng, Hoàng Thị Tú Anh. Đánh giá hiệu quả của phác đồ Rabeprazole-Levofloxacin- Tinidazole trên bệnh nhân viêm dạ dày mạn nhiễm *Helicobacter pylori*. *Tạp chí Khoa học tiêu hóa Việt Nam*. 2015; IX(41): tr.115-120.
4. Miftahussurur M, Yamaoka YJM. Appropriate first-line regimens to combat *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: an Asian perspective. 2015; 20(4): 6068-6092.
5. Trần Thiện Trung, Trần Anh Minh, Nguyễn

- Tuấn Anh. Nghiên cứu tỷ lệ đột biến kháng thuốc clarithromycin và levofloxacin của H. Pylori bằng giải trình tự gen. *Tạp chí khoa học tiêu hóa Việt Nam*. 2017; IX(49): 3074-3082.
6. Tuan VP, Narith D, Tshibangu-Kabamba E, et al. A next-generation sequencing-based approach to identify genetic determinants of antibiotic resistance in Cambodian *Helicobacter pylori* clinical isolates. 2019; 8(6): 858.
7. Alarcon T, Urruzuno P, Martinez MJ, et al. Antimicrobial susceptibility of 6 antimicrobial agents in *Helicobacter pylori* clinical isolates by using EUCAST breakpoints compared with previously used breakpoints. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*. May 2017; 35(5): 278-282. doi: 10.1016/j.eimc.2016.02.010.
8. Bińkowska A, Biernat MM, Łaczmanski Ł, Gościński GJFim. Molecular patterns of resistance among *Helicobacter pylori* strains in south-western Poland. 2018; 9: 3154.
9. Lok C-H, Zhu D, Wang J, et al. Phenotype and Molecular Detection of Clarithromycin and Levofloxacin Resistance in *Helicobacter pylori* Clinical Isolates in Beijing. 2020; 13: 2145.
10. Camorlinga-Ponce M, Gómez-Delgado A, Aguilar-Zamora E, et al. Phenotypic and genotypic antibiotic resistance patterns in *Helicobacter pylori* strains from ethnically diverse population in Mexico. 2021; 10: 539115.
11. Domanovich-Asor T, Motro Y, Khalfin B, Craddock HA, Peretz A, Moran-Gilad JJM. Genomic analysis of antimicrobial resistance genotype-to-phenotype agreement in *Helicobacter pylori*. 2020; 9(1): 2.
12. Mascellino MT, Oliva A, Miele MC, De Angelis M, Bruno G, Severi CJA. Secondary antibiotic resistance, correlation between genotypic and phenotypic methods and treatment in *Helicobacter pylori* infected patients: A retrospective study. 2020; 9(9): 549.
13. Wang Y-h, Gong X-l, Liu D-w, et al. Characteristics of *Helicobacter pylori* heteroresistance in gastric biopsies and its clinical relevance. 2022: 1409.
14. Farzi N, Yadegar A, Sadeghi A, et al. High prevalence of antibiotic resistance in Iranian *Helicobacter pylori* isolates: importance of functional and mutational analysis of resistance genes and virulence genotyping. 2019; 8(11): 2004.
15. Arslan N, Yılmaz Ö, Demiray-Gürbüz EJWJoG. Importance of antimicrobial susceptibility testing for the management of eradication in *Helicobacter pylori* infection. 2017; 23(16): 2854.
16. Tshibangu-Kabamba E, Ngoma-Kisoko PdJ, Tuan VP, et al. Next-generation sequencing of the whole bacterial genome for tracking molecular insight into the broad-spectrum antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* clinical isolates from the Democratic Republic of Congo. 2020; 8(6): 887.
17. Zhou Y, Zhong Z, Hu S, et al. A Survey of *Helicobacter pylori* Antibiotic-Resistant Genotypes and Strain Lineages by Whole-Genome Sequencing in China. 2022: e02188-21.

Summary

DETERMINATION OF MIC AND LEVOFLOXACIN RESISTANCE MUTATION OF *HELICOBACTER PYLORI* IN PATIENTS WITH GASTRITIS AND PEPTIC ULCER DISEASE IN TIEN GIANG

Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* is increasingly more common and can lead to treatment failure. This study used the Etest and Sanger sequencing techniques to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and mutant forms of *Helicobacter pylori* in patients with gastritis and peptic ulcer disease in Tien Giang province, Vietnam. The relationship between the MIC and levofloxacin-resistant mutant forms of *H. pylori* was also explored. Results showed that GyrA mutations accounted for 60% of the total 65 samples studied. Among these mutations, 23.1% (9/39) of LEV-sensitive samples with a MIC of LEV \leq 1 μ g/ml had mutations at codon positions P188L, R190Q, M191I, Y81C, P187S, D91T, D108E, R95K, G111A, and S185Y; and 30/39 (66.9%) samples with MIC > 1 μ g/ml were found to have mutations at positions N87K, D91N/G, A55S, M191I, Y28F/I, V107F, A27L, V199G, S29F, M30L, G111L, R42K, V65S, A66L, S101L, M102A, N112I, R95G/K, D108V/E, and A94G. This study suggested that mutations in GyrA at codon positions N87K, D91N/G/T, and A55S of *H. pylori* were associated with increased MIC concentration of levofloxacin. The related mutations M191I, Y28F/I, V107F, A27L, V199G, S29F, M30L, G111L, R42K, V65S, A66L, S101L, M102A, N112I, R95G/K, D108V/E, and A94G on GyrA were not identified. Further research on the LEV resistance of *H. pylori* in Tien Giang is needed.

Keywords: *Helicobacter pylori*, levofloxacin, GyrA.