

ĐỘT BIẾN KHÁNG LEVOFLOXACIN TRÊN GEN *gyrA*, *gyrB* CỦA *HELICOBACTER PYLORI* TRÊN BỆNH NHÂN VIÊM LOÉT DẠ DÀY TÁ TRÀNG

Trần Thị Như Lê^{1,2,✉}, Nguyễn Vũ Trung², Trần Ngọc Ánh²

¹Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

²Trường Đại học Y Hà Nội

Viêm loét dạ dày tá tràng là một trong năm lý do phổ biến khiến bệnh nhân đến khám tại các cơ sở y tế. Nguyên nhân chính dẫn đến viêm loét dạ dày tá tràng trong 50 - 70,3% là do vi khuẩn *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). Kháng sinh điều trị *H. pylori* là vấn đề then chốt do đó việc xác định sự đề kháng kháng sinh của *H. pylori* là một cơ sở quan trọng trong việc lựa chọn thuốc điều trị. Ứng dụng kỹ thuật Etest để xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của levofloxacin và kỹ thuật giải trình tự trực tiếp để tìm ra đột biến điểm kháng levofloxacin trên *gyrA*, *gyrB* của *H. pylori*. Kết quả ghi nhận được tỉ lệ kháng levofloxacin 56,9% với đột biến điểm kháng thuốc trên *gyrA*: N87K(12,3%), N87Y(1,5%), D91N(1,5%), D91G(3,1%) và đột biến mới trên *gyrB* là S457A. Bệnh nhân có đột biến điểm thì MIC trung bình cao hơn bệnh nhân không có đột biến điểm ($p < 0,05$). Giám sát đột biến trên *gyrA* và *gyrB* bằng kỹ thuật giải trình tự chuỗi trực tiếp để kiểm soát sự đề kháng kháng sinh của *H. pylori* cũng như liệu levofloxacin điều trị.

Từ khóa: Viêm loét dạ dày tá tràng, *Helicobacter pylori*, levofloxacin, *gyrA*, *gyrB*.

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, theo nghiên cứu của tác giả Vương Tuyết Mai và cộng sự năm 2001 bằng phương pháp xét nghiệm huyết thanh trên 528 người khỏe mạnh, 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 viêm loét dạ dày tá tràng. Theo đồng thuận Masstricht V, lựa chọn phác đồ diệt trừ *H. pylori* lần đầu sẽ căn cứ vào tỉ lệ kháng clarithromycin theo khu vực để quyết định chọn phác đồ ba thuốc chuẩn hay các phác khác... Việt Nam có tỉ lệ kháng

clarithromycin cao có thể xem xét sử dụng phác đồ nối tiếp vì tính tới thời điểm hiện tại cho thấy levofloxacin vẫn có triển vọng hơn trong điều trị *H. pylori*.^{3,4} Levofloxacin là một fluoroquinolon có tác dụng hấp thu nhanh, sinh khả dụng 100%, ít bị ảnh hưởng bởi thức ăn, thâm nhập tốt vào các mô và dịch cơ thể. Hơn nữa, Tanaka M. và cộng sự đã chứng minh rằng levofloxacin và PPI có tác dụng hiệp đồng chống *H. pylori*.⁴ Ở Việt Nam các nghiên cứu phân tích tổng hợp tỷ lệ diệt trừ trung bình của phác đồ dựa trên levofloxacin là 80% và ít tác dụng phụ so với các thuốc khác.⁵ Các nghiên cứu gần đây tỉ lệ đột biến kháng levofloxacin ngày càng tăng và đột biến trong *gyrA* và hoặc *gyrB* chiếm khoảng 83%. Đột biến *gyrA* thường nằm tại vị trí codon 86, 87, 88, và 91 và đột biến *gyrB* chủ yếu xảy ra ở vị trí codon 463, 438, 484.⁶ Hofreuter (2021) nghiên cứu tại Đức phát hiện ra đột biến D91N 28% và D91G 0,04%.⁷ Qua 4 năm nghiên cứu tại Ý Losurdo G ghi nhận những bệnh nhân kháng levofloxacin có đột biến trên

Tác giả liên hệ: Trần Thị Như Lê

Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

Email: ttnle@ctump.edu.vn

Ngày nhận: 02/12/2021

Ngày được chấp nhận: 21/12/2021

gyrA tại vị trí codon 87 và 91 làm thất bại phác đồ điều trị lần 2 cao hơn lần đầu ($p < 0,05$).⁸ Và nghiên cứu theo chiều dọc ở Hàn Quốc từ năm 2005/2006 đến năm 2017/2018 ghi nhận tỷ lệ đề kháng levofloxacin tăng từ 19,0% (29/153) lên 43,8% (21/48) và nồng độ ức chế tối thiểu của levofloxacin tăng từ 2-8 $\mu\text{g/mL}$ lên 4-16 $\mu\text{g/mL}$. Đồng thời nghiên cứu cũng đã phát hiện được đột biến của *gyrA* chiếm tỉ lệ 93,1% (27/29) năm 2005/2006 và 100% (21/21) ở năm 2017/2018.⁹ Nghiên cứu tại Thành phố Hồ Chí Minh đã phát hiện có 54,8% ($n = 54$) có đột biến kháng levofloxacin với các dạng đột biến T87I, N87K, D91N.¹⁰ Đề kháng kháng sinh là một vấn đề quan trọng trong việc lựa chọn phác đồ điều trị cho bệnh nhân đặc biệt là sau khi thất bại phác đồ điều trị đầu tay. Để hiểu biết thêm mức độ kháng thuốc, nhất là mức độ kháng liên quan đến kháng levofloxacin chúng tôi thực hiện nghiên cứu: “Đột biến kháng levofloxacin trên gen *gyrA*, *gyrB* của *H. pylori* trên bệnh nhân viêm loét dạ dày tá tràng” nhằm xác định các nồng độ ức chế tối thiểu của levofloxacin và đột biến điểm kháng thuốc levofloxacin trên gen *gyrA*, *gyrB* 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 từ tháng 1/2021 đến tháng 8/2021.

Tiêu chuẩn lựa chọn

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

Chẩn đoán nhiễm *H. pylori* khi bệnh nhân có ít nhất hai xét nghiệm dương tính: CLOtest dương tính, nhuộm Gram mẫu mô sinh thiết

niêm mạc hang vị hoặc thân vị phát hiện vi khuẩn Gram âm hình cánh chim hải âu, cong, mảnh, dấu 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 H2 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 có phân tích.

$$N = Z^2 \frac{p(1-p)}{d^2}$$

N: cỡ mẫu tối thiểu

α : Độ tin cậy ($\alpha = 0,05$)

Z: hệ số tin cậy ($Z = 1,96$)

d: Sai số ước lượng ($d = 0,05$)

P: Tỷ lệ kháng levofloxacin ước tính theo nghiên cứu ở Việt Nam là 18,4%.¹¹

Sai số cho phép 10% tương đương với 23 mẫu vậy số lượng mẫu cần lấy để làm xét nghiệm tìm nồng độ ức chế tối thiểu bằng kỹ thuật E-test là: $N = 253$ mẫu. (Nghiên cứu thu được 65 mẫu và tiến hành giải trình tự trực tiếp 37 mẫu kháng levofloxacin).

2. Phương pháp

Chọn mẫu: Thuận tiện.

Bệnh nhân được lấy mẫu niêm mạc dạ dày tá tràng ở rìa các góc tổn thương loét, ở hang vị, ở thân vị. 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 O₂: 5%, CO₂: 10%, N₂: 85%, Biomeurieux, Pháp) theo quy trình ở nhiệt độ 37°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 pylori agar, túi ủ Genbag (tỷ lệ O₂: 5%, CO₂: 10%, N₂: 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 µg/ml.⁴ Những mẫu kháng với levofloxacin 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°C trong 10 phút 1 chu kỳ, giai đoạn biến tính 95°C trong vòng 30 giây 35 chu kỳ, giai đoạn bắt cặp của mỗi 58°C trong 45 giây 35 chu kỳ, giai đoạn kéo dài 72°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'). *GyrB* (DNA vị trí 1153-1560, dựa trên chủng chuẩn 26695 (CP003904) từ ngân hàng gen GenBank) *gyrB* forward primer (5'-CCC TAA CGA AGC CAA AAT CA-3'), *gyrB* reverse primer (5'-GGG CGC AAA TAA CGA TAG AA-3').¹² Và theo protocol (Takara Taq

DNA polymerase Hot Start 0.1µl, Taq DNA polymerase buffer 2.5 µl, dNTP 0.5 µl, *gyrA* Reverse primer 0.5 µl/*gyrA* Forward primer 0.5 µl/*gyrB* Reverse primer 0.5 µl/*gyrB* Forward primer 0.5 µl, DNA mẫu 0.5 µl, H₂O dùng cho PCR 20.4 µl);

(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.¹²

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 giá trị trung bình về nồng độ ức chế tối thiểu giữa nhóm có đột biến và nhóm không có đột biến Independent sample t test. 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 Mega 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. Các sinh phẩm sử dụng trong nghiên cứu đều thuộc danh mục ban hành của Bộ Y tế.

III. KẾT QUẢ

1. Đặc điểm về lâm sàng, cận lâm sàng

Trong thời gian từ 1/2021-8/2021 chúng tôi thu nhận 65 bệnh nhân viêm loét dạ dày tá tràng nhiễm *H. pylori*, trong đó có 37/65(56,9%) bệnh

nhân kháng với levofloxacin.. Độ tuổi trung bình của nhóm nghiên cứu là 47,78±13,74. Đau hơi khó tiêu, đau thượng vị, ợ hơi là triệu chứng lâm sàng gây khó chịu khiến bệnh nhân viêm

loét dạ dày tá tràng do *H. pylori* nhập viện điều trị, tỉ lệ lần lượt là 78,5%, 76,9%, 73,8%. Chẩn đoán nội soi ghi nhận 75,4% bệnh nhân viêm dạ dày và 24,6% bệnh nhân loét dạ dày tá tràng. Bệnh nhân viêm dạ dày thường chiếm ưu thế ở hang vị 91,8%, thân vị 8,2%. Bệnh nhân loét dạ dày tá tràng tại hang vị là 75%, thân vị 12,5% và hành tá tràng 12,5%. Dạng tổn thương điển hình theo Sydney là xung huyết 96,9%, trợt phẳng 15,4% và xung huyết trợt phẳng 12,3%. Những bệnh nhân kháng levofloxacin thì nam

giới có MIC trung bình cao hơn nữ giới, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Không có sự khác biệt về giá trị MIC trung bình giữa các bệnh nhân có hút thuốc và uống rượu ($p > 0,05$). Riêng những bệnh nhân có đột biến thay đổi nucleotide và aminoacid liên quan đến đột biến điểm kháng thuốc đều có nồng độ MIC trung bình cao hơn nhóm không có đột biến điểm kháng thuốc, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Bảng 1. Đặc điểm của đối tượng tham gia nghiên cứu

Đặc điểm		N	Mean ($\mu\text{g/ml}$)	SD ($\mu\text{g/ml}$)	t	p
Tuổi		65	47,78	13,74		
Giới tính	Nam	16	65,69	74,29	2,32	< 0,05
	Nữ	21	19,81	30,42		
Hút thuốc	Có	7	87,00	89,80	1,67	> 0,05
	Không	30	28,60	42,61		
Uống rượu	Có	16	59,69	72,79	1,76	> 0,05
	Không	21	24,38	38,49		
Đột biến thay đổi nucleotide	Có	20	56,75	68,92	2,14	< 0,05
	Không	17	19,53	33,01		
Đột biến thay đổi aminoacid	Có	12	82,67	71,50	2,91	< 0,05
	Không	25	19,00	36,12		

Có 7/12 mẫu đột biến trên *gyrA* đề kháng với MIC $\leq 32\mu\text{g/ml}$ chiếm 58,2% và 41,6% (5/12) chủng đột biến có MIC $> 32\mu\text{g/ml}$

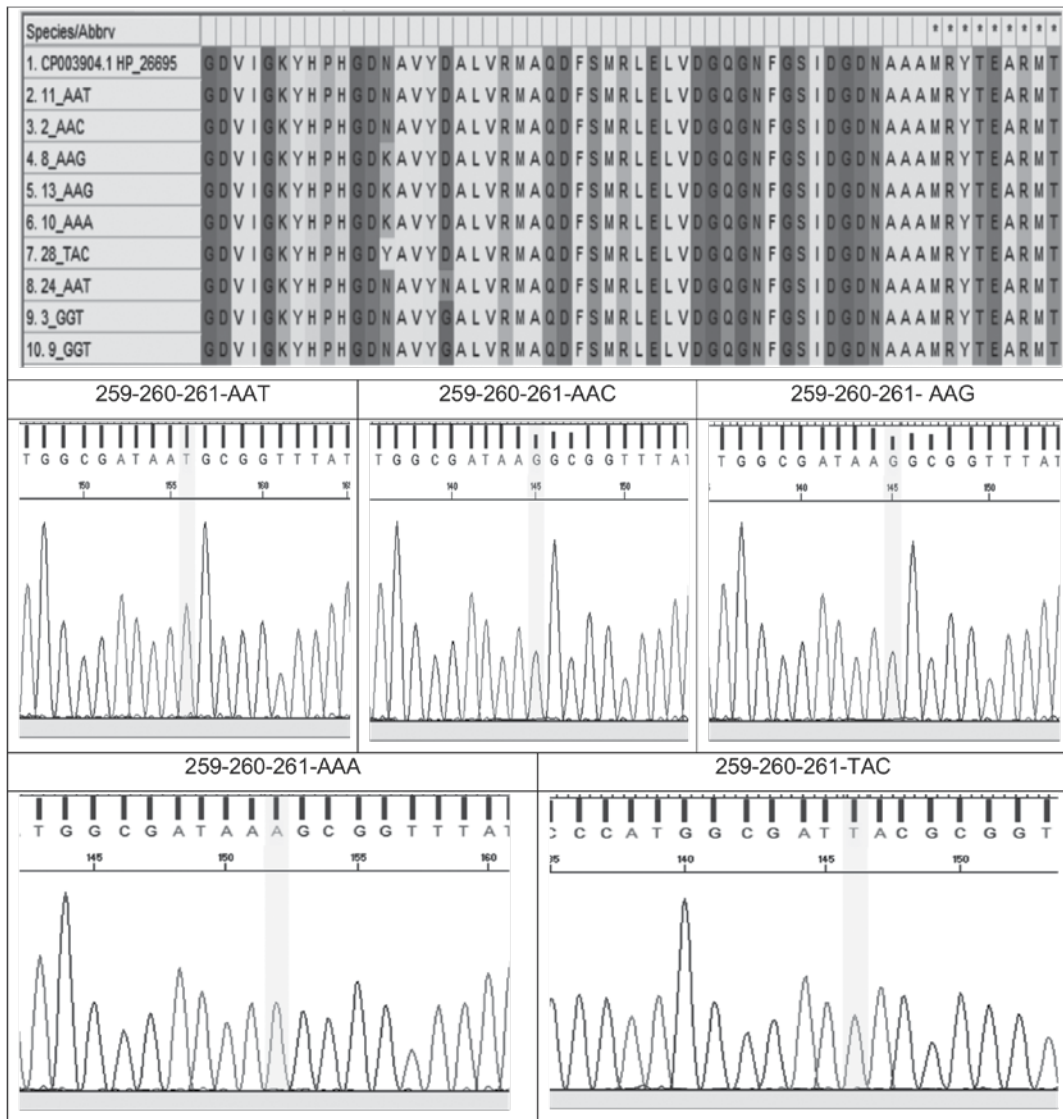
Bảng 2. Phân bố MIC ở các mẫu đột biến trên *gyrA*

Vị trí đột biến	Sự thay đổi nucleotide	N	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
			≤ 32	> 32
N87K	AAT-AAG	8	5/12 (41,6%)	3/12 (25%)
	AAT-AAA			
N87Y	AAT-TAC	1		1/12 (8,3%)
D91N	GAT-AAT	1	1/12(8,3%)	
D91G	GAT-GGT	2	1/12(8,3%)	1/12(8,3%)

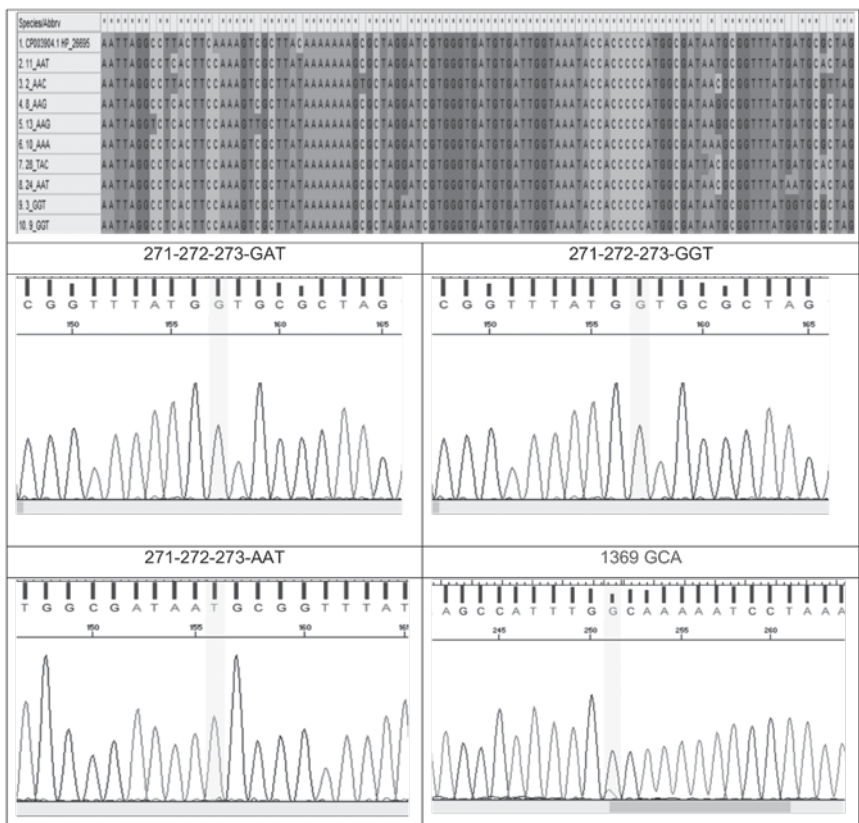
2. Đột biến kháng levofloxacin trên gen *gyrA*, *gyrB* của *H. pylori* được phát hiện

18/37(48,6%) mẫu *H.pylori* kháng levofloxacin có sự thay đổi nucleotide trên gen *gyrA*, 1/37(2,7%) có thay đổi nucleotide trên gen *gyrB*. Trong đó có 9/37 (24,3%) mẫu chỉ thay đổi nucleotide AAT thành AAC không làm thay đổi aminoacid tại vị trí codon 87. Và 8/37(21,6%) mẫu có đột biến thay đổi nucleotide AAT thành AAA-TCA, những đột biến này làm thay đổi aminoacid tại vị trí codon 87 xuất hiện đột biến

điểm N87K và N87Y. 3/37(8,1%) mẫu *H. pylori* có sự thay đổi nucleotide và làm biến đổi aminoacid tại vị trí codon 91 xuất hiện đột biến D91G và D91N. 1/37 (2,7%) và có thay đổi nucleotide TCA-GCA nhưng chưa thay đổi aminoacid tại vị trí codon 457 trên gen *gyrB*. Ngoài ra chúng *H. pylori* mang đột biến N87Y với nồng độ MIC 128 µg/ml được phát hiện có sự thay đổi đồng thời 2 nucleotid tại vị trí 259 A (chủng chuẩn *H. pylori* 26695) đổi thành T và nucleotide vị trí 261 T (chủng chuẩn *H. pylori* 26695) đổi thành C.



Hình 1. Đột biến trên *gyrA* tại vị trí codon 87



Hình 2. Đột biến *gyrA* tại vị trí codon 91 và *gyrB* tại vị trí codon 457

IV. BÀN LUẬN

Kết quả nghiên cứu ghi nhận 56,9% bệnh nhân kháng với levofloxacin. Nghiên cứu của Đặng Ngọc Quý Huệ (2018) tại Huế ghi nhận tỉ lệ kháng là 40,3%,¹³ Nghiên cứu của chúng tôi cao hơn kết quả nghiên cứu của Wang cùng cộng sự (2019) ở Trung Quốc là 56%,¹⁴ Nguyễn Thị Chi (2019) ở miền Bắc Việt Nam là 54,6%.¹⁵ Như vậy cũng thấy được rằng tình trạng kháng levofloxacin đang tăng dần theo thời gian là một mối lo ngại cho các bác sĩ lâm sàng trong vấn đề lựa chọn phác đồ điều trị *H. pylori*. Tuy nhiên tình trạng kháng thuốc levofloxacin ở các nước Châu Âu thì thấp hơn. Cụ thể nghiên cứu của Losurdo cùng cộng sự ở Ý là 19,2%,⁸ Hofreuter (2021) ở Đức là 13,7%.⁷ Điều này chúng ta cần tìm ra nguyên nhân để khắc phục hạn chế tình trạng kháng

levofloxacin của Việt Nam. Độ tuổi trung bình trong nghiên cứu là $47,78 \pm 13,74$ cao hơn nghiên cứu của Đặng Ngọc Quý Huệ (2018) là $38,8 \pm 10,6$,¹³ nhưng tương đồng với nghiên cứu của Rhie cùng cộng sự (2020) $48,6 \pm 14,6$.⁹ Tìm hiểu về mối liên hệ giữa giới tính với tình trạng đề kháng levofloxacin thì thấy nam giới có giá trị MIC trung bình cao hơn so với nữ giới và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê. Wang (2019) tại Trung Quốc ghi nhận nam giới có tỉ lệ kháng levofloxacin cao hơn nữ giới ($p < 0,05$).¹⁴ Bệnh nhân hút thuốc lá và uống rượu thì giá trị MIC kháng levofloxacin trung bình cao hơn nhóm không hút thuốc và uống rượu. Tuy nhiên sự khác biệt này chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Còn đối với các chủng *H. pylori* thì chỉ cần có sự thay đổi một nucleotide mặc

dù không thay đổi aminoacid vẫn làm cho chỉ số MIC trung bình của nhóm này vẫn cao hơn so với nhóm kháng thuốc nhưng không có đột biến ($p < 0,05$). Điều này nói lên rằng chỉ cần một sự thay đổi nucleotide cũng có thể ảnh hưởng đến sức đề kháng của các chủng *H. pylori* và cũng đã được chứng minh trong nghiên cứu của Aldona Binkowska (2019).¹² Còn trong trường hợp có đột biến làm biến đổi aminoacid thì giá trị MIC trung bình luôn cao hơn nhóm không có đột biến, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).⁸ Trong nghiên cứu của chúng tôi cho thấy sự phù hợp giữa các chủng mang đột biến và mối liên quan mật thiết với sự gia tăng nồng độ MIC. Những chủng *H. pylori* kháng thuốc chỉ cần thay đổi một nucleotide thì giá trị MIC trung bình cũng cao hơn so với những chủng kháng thuốc mà không có đột biến (56,75 µg/ml so với 19,53 µg/ml), sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). So sánh giá trị MIC trung bình giữa nhóm có đột biến làm thay đổi aminoacid với nhóm đột biến không thay đổi aminoacid thì nhóm đột biến thay đổi aminoacid có giá trị MIC trung bình cao hơn (82,67 µg/ml so với 19,00 µg/ml), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Vì vậy việc khảo sát sự lưu hành của các chủng mang gen đột biến và sự xuất hiện của các đột biến mới kháng thuốc trong quá trình lây truyền là hết sức cần thiết để kiểm soát đề kháng kháng sinh cũng như xây dựng một hướng dẫn về liều thuốc điều trị thích hợp. Bên cạnh đó phân tích mối liên quan giữa đột biến với MIC ghi nhận đột biến N87K có MIC ≤ 32 µg/ml chiếm 41,6% và MIC > 32 µg/ml chiếm 25%. Đột biến N87Y có nồng độ MIC > 32 µg/ml chiếm 8,3%. Đột biến D91N MIC ≤ 32 µg/ml chiếm 8,3%, D91G có cả MIC ≤ 32 µg/ml và MIC > 32 µg/ml chiếm 8,3%. Mối liên hệ giữa vị trí đột biến và sự đề kháng kháng sinh đã được đánh giá bởi rất nhiều nghiên cứu trước đây. Việc xuất hiện các vị trí đột biến làm giảm ái lực của thuốc đối với protein đích

đã được ghi nhận trong nhiều nghiên cứu Trần Thiện Trung,¹⁰ Aldona Binkowska.¹²

Gen *gyrA* và *gyrB* đóng là gen mã hóa DNA gyrase. Đột biến *gyrA* và hoặc *gyrB* có khoảng 83% kháng levofloxacin ở các chủng *H. pylori*. Nhiều nghiên cứu đã tiến hành khảo sát đột biến điểm cho thấy có mối liên quan mật thiết với cơ chế đề kháng với kháng sinh quinolon thông qua sự thay đổi cấu trúc protein. Qua phân tích đột biến điểm trên gen *gyrA* và *gyrB* của 37/65 mẫu kháng levofloxacin của *H. pylori* cho thấy các đột biến tại vị trí codon 87 *gyrA* có 12,3% có đột biến N87K, 1,5% có đột biến N87Y. Kết quả này thấp hơn nghiên cứu của Aldona Binkowska (2019) 20% có đột biến N87K.¹² Trong số các chủng có đột biến làm biến đổi amino acid asparagin vị trí 87 thành lysin, chúng tôi phát hiện 2 kiểu biến đổi nucleotide lưu hành trong quần thể bao gồm biến đổi bộ ba codon 259-260-261 AAT (chủng chuẩn *H. pylori* 26695) thành AAG hoặc AAA. Đột biến tại codon 91 của gen *gyrA* nhìn chung trong nghiên cứu của chúng tôi có sự khác biệt với nghiên cứu của Hofreuter (2021) tại Đức D91N 28% và D91G 0.04%.⁷ Trong nghiên cứu chúng tôi ghi nhận tỉ lệ đột biến D91G nhiều hơn so với đột biến D91N (3,1% so với 1,5%) và giống với nghiên cứu của Trần thiện Trung (2014) tại Việt Nam là D91N 17,6%, D91G 29,4%.¹⁰ Kết quả giải trình tự gen *gyrB* phát hiện một đột biến S457A với nồng độ MIC tương ứng là 1 µg/ml, tuy nhiên đột biến này được phát hiện duy nhất 1 chủng *H. pylori* do đó cần tiến hành khảo thêm ở các nghiên cứu sau.

V. KẾT LUẬN

Tỉ lệ đột biến levofloxacin trong nghiên cứu chiếm tỉ lệ cao cần được giám sát trong điều trị. Các dạng đột biến tại vị trí codon 87, 91 trên gen *gyrA* và vị trí codon 457 trên gen *gyrB* đã được ghi nhận làm tăng nồng độ MIC của levofloxacin trong điều trị *H. pylori*.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn Ban giám đốc, đồng nghiệp tại Bệnh viện Đa Khoa Trung Tâm Tiền Giang đã hỗ trợ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tonolini M, Ierardi AM, Bracchi E, Magistrelli P, Vella A, Carrafiello G. Non-perforated peptic ulcer disease: multidetector CT findings, complications, and differential diagnosis. *Insights into imaging*. Oct 2017;8(5):455-469. doi:10.1007/s13244-017-0562-5.
2. Vương Tuyết Mai, Nguyễn Khánh Trạch và Phùng Đắc Cam (2001). Kết quả nghiên cứu tỉ lệ nhiễm *Helicobacter pylori* ở 528 người khỏe mạnh. *Tạp chí nội khoa*, 4, 22-26.
3. Kavitt RT, Lipowska AM, Anyane-Yeboah A, Gralnek IM. Diagnosis and Treatment of Peptic Ulcer Disease. *The American journal of medicine*. Apr 2019;132(4):447-456. doi:10.1016/j.amjmed.2018.12.009.
4. 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.
5. Gisbert JP, Morena F. Systematic review and meta-analysis: levofloxacin-based rescue regimens after *Helicobacter pylori* treatment failure. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. Jan 1 2006;23(1):35-44. doi:10.1111/j.1365-2036.2006.02737.
6. Hanafi A, Lee WC, Loke MF, et al. Molecular and Proteomic Analysis of Levofloxacin and Metronidazole Resistant *Helicobacter pylori*. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:2015. doi:10.3389/fmicb.2016.02015
7. Hofreuter D, Behrendt J, Franz A, et al. Antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in an eastern German region. *Helicobacter*. Feb 2021;26(1):e12765. doi:10.1111/hel.12765.
8. Losurdo G, Giorgio F, Pricci M, et al. *Helicobacter pylori* Primary and Secondary Genotypic Resistance to Clarithromycin and Levofloxacin Detection in Stools: A 4-Year Scenario in Southern Italy. *Antibiotics*. Oct 21 2020;9(10)doi:10.3390/antibiotics9100723.
9. Rhie SY, Park JY, Shin TS, Kim JW, Kim BJ, Kim JG. Discovery of a Novel Mutation in DNA Gyrase and Changes in the Fluoroquinolone Resistance of *Helicobacter pylori* over a 14-Year Period: A Single Center Study in Korea. *Antibiotics*. May 27 2020;9(6)doi:10.3390/antibiotics9060287.
10. Trần Thiện Trung, Nguyễn Tuấn Anh, Trần Thiện Khiêm. Nghiên cứu đột biến kháng Clarithromycin và Levofloxacin của vi khuẩn *H.pylori* bằng giải trình tự gen. *Tạp chí khoa học tiêu hóa việt nam*. 2014;9(37):2367-2375.
11. Muhammad Miftahussurur & Yoshio Yamaoka (2015), Appropriate firstline regimens to combat *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: an Asian perspective, *Molecules (Basel, Switzerland)*. 20 (4): 6068-6092.
12. Binkowska A, Biernat MM, Laczmański L, Gosciniak G. Molecular Patterns of Resistance Among *Helicobacter pylori* Strains in South-Western Poland. *Frontiers in microbiology*. 2018;9:3154. doi:10.3389/fmicb.2018.03154.
13. Đặng Ngọc Quý Huệ. Nghiên cứu tỉ lệ kháng Clarithromycin, Levofloxacin của *Helicobacter pylori* bằng Epsilonometer và hiệu quả của phác đồ EBMT ở bệnh nhân viêm dạ dày mạn. *Trường Đại học Y Dược Huế*. 2018.
14. Wang D, Guo Q, Yuan Y, Gong Y. The antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* to five antibiotics and influencing factors in an

area of China with a high risk of gastric cancer.
BMC microbiology. Jul 4 2019;19(1):152.
doi:10.1186/s12866-019-1517-4

15. Nguyễn Thị Chi, Trần Duy Hưng, Trần

Ngọc Ánh. Tình hình kháng kháng sinh của
Helicobacter pylori tại Bệnh viện Đại học Y Hà
Nội từ 2017-2019. *Tạp chí Y học thực hành*.
5/2020: 1133, 92-96

Summary

IDENTIFY THE NON-SYNONYMOUS MUTATIONS BEARING ON *GYRA* AND *GYRB* GENES OF *HELICOBACTER PYLORI* STRAINS AMONG PATIENT WITH PEPTIC ULCER DISEASE

Peptic ulcer disease is one of five leading causes of hospitalization. The most common cause of peptic ulcer disease is *H. pylori* infection which represented from 50% to 70.3%. In term of *H. pylori* treatment, the antibiotic resistant of *H. pylori* is the most concerning issue which would determined a successful therapy. Consequently, it is important to evaluate the antibiotic resistant among antibiotics that are presently prescribed in *H. pylori* eradication regimens and to update the clinical guideline on the treatment and management of *H. pylori* infection. The E-test method is performed to evaluate the minimum inhibitory concentration (MIC) of levofloxacin and identify the point mutation on *gyrA* and *gyrB* gene to explore the molecular genetic resistant mechanism. The results showed that among samples, the levofloxacin resistant strains occupied 56.9%. There are 4 important mutations among *gyrA* gene found including N87K(12.3%), N87Y(1.5%), D91N(1.5%), D91G(3.1%). Besides, we found one novel mutation S457A in *gyrB*. Notably, the bearing point mutation strains had significant higher MIC level when compared with those with no mutation ($p < 0.05$). In conclusion, we suggest to study the point mutation of *gyrA* and *gyrB* to regulate the antibiotic resistant of *H. pylori* as well as to determine the therapeutic dosage of levofloxacin.

Keywords: Peptic ulcer, *Helicobacter pylori*, levofloxacin, *gyrA*, *gyrB*.