

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM PHÂN TỬ CỦA TIỂU ĐƠN VỊ P33 - GENE VACA
CỦA VI KHUẨN *HELICOBACTER PYLORI* TRÊN BỆNH NHÂN MẮC
BỆNH DẠ DÀY TẠI BỆNH VIỆN 19-8, BỘ CÔNG AN

*Phạm Thu Thùy¹, Đỗ Thị Roan², Nguyễn Thị Thu Hiền²
Nguyễn Thị Khuê², Trần Thị Bình Nguyễn³, Lê Công Toán³
Nguyễn Thị Dung⁴, Hoàng Thanh Tuyên¹, Đoàn Thị Thanh Hương²*

TÓM TẮT

Mục tiêu: Đánh giá sự có mặt của gene CagA và VacA của 60 mẫu bệnh phẩm chứa vi khuẩn *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) là mảnh sinh thiết dạ dày của các bệnh nhân được chẩn đoán viêm loét dạ dày, loạn sản tế bào và ung thư dạ dày tại Bệnh viện 19-8, Bộ Công an bằng kỹ thuật multiplex-PCR. Đồng thời giải trình tự gene và phân tích đặc điểm phân tử vùng p33 của gene VacA của 8 chủng *H. pylori* thu nhận. **Đối tượng và phương pháp:** Mẫu nghiên cứu là các mảnh sinh thiết dạ dày có kết quả dương tính với kit Urease. DNA tổng số được tách chiết từ bằng bộ kit DNeasy Blood and Tissue Kits và được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR để thu nhận vùng gene VacA chứa tiểu đơn vị p33. Phân tích phá hệ nguồn gốc được thực hiện bằng chương trình MEGA10 với hệ số tin cậy 1000 bootstrap. **Kết quả:** Tỷ lệ các mẫu *H. pylori* có gene CagA dương tính là 81,6% (49/60 mẫu) và tỷ lệ các mẫu *H. pylori* có gene VacA dương tính là 100% (60/60 mẫu). Vùng gene VacA của 8 chủng *H. pylori* nghiên cứu có tỷ lệ đồng nhất từ 89,8 - 97,0% về nucleotide và 87,0 - 98,6% về amino acid. So sánh với các chủng của thế giới, các chủng *H. pylori* của Việt Nam có tỷ lệ đồng nhất về nucleotide và amino acid lần lượt từ 89,7 - 96,8% và 89,0 - 96,2%. Phân tích phá hệ nguồn gốc dựa trên trình tự nucleotide gene VacA cho thấy các chủng *H. pylori* của Việt Nam rất đa dạng về di truyền và thuộc các nhóm khác nhau

¹Bệnh viện 19-8, Bộ Công an

²Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Học Viện Nông nghiệp Việt Nam

⁴Trường Đại học Thái Nguyên

Người phản hồi: Phạm Thu Thùy (thuyduongx.qn@gmail.com)

Ngày nhận bài: 28/02/2022

Ngày được chấp nhận đăng: 14/3/2022

trên cây phả hệ. **Kết luận:** Các chủng vi khuẩn *H. pylori* của Việt Nam gồm nhiều loại khác nhau và có nhiều biến đổi về trình tự gene so với các chủng phân lập trước đây. Vì vậy, việc bổ sung các dữ liệu sinh học phân tử của vi khuẩn *H. pylori* tại Việt Nam là rất cần thiết, nhằm góp phần làm sáng tỏ thêm về đặc điểm phân tử của các chủng vi khuẩn gây bệnh tại Việt Nam.

* *Từ khóa:* Gene *CagA*; Gene *VacA*; *Helicobacter pylori*; PCR; Phát sinh loài.

MOLECULAR CHARACTERISTIC ANALYSIS THE P33 DOMAIN OF THE VACA GENE OF *HELICOBACTER PYLORI* ISOLATED FROM PATIENTS IN 19-8 HOSPITAL, MINISTRY OF PUBLIC SECURITY

Summary

Objectives: Sixty gastric biopsies isolated from patients diagnosed with peptic ulcer disease, gastric dysplasia, and cancer at 19-8 Hospital, Ministry of Public Security were collected and identified for the presence of the *VacA* and *CagA* gene of *H.pylori* by multiplex-PCR. Next, the p33 region in *VacA* gene of eight *H.pylori* strains from 3 disease groups was sequenced and analysed for molecular characterization. **Subjects and methods:** The study samples were gastric biopsies which were positive with the Urease kit. Total DNA was extracted by DNeasy Blood and Tissue Kits. This DNA was used to PCR with specific primers to obtain *VacA* region which includes p33. Sequences of the *VacA* genes were analyzed phylogeny by MEGA X with bootstrap 1000. **Results:** All of 60 of samples had *VacA* gene (100%), and 49 of 60 samples had *CagA* gene (81,6%). The eight *H.pylori* strains in this study had a similarity rate from 89.8 - 97.0% of nucleotide and 87.0 - 98.6% of amino acid sequences; and from 89.7 - 96.8.0% of nucleotide and 89.0 - 96.2% amino acid with the *H. pylori* strains of Asian countries registered on the GeneBank. Phylogenetic analysis showed that eight *H.pylori* strains in this study have many variations in the *VacA* gene and belong to different groups on the phylogenetic tree. **Conclusion:** The *H. pylori* strains from Vietnam include many different types and have changes in gene sequences compared to previous isolates. The addition of molecular biological data of *H. pylori* bacteria in Vietnam is necessary.

* *Keywords:* Gene *CagA*; Gene *VacA*; *Helicobacter pylori*; PCR; Phylogeny.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn *Helicobacter pylori* thuộc Ngành: *Proteobacteria*; Lớp: *Epsilon Proteobacteria*; Họ: *Helicobacteraceae*; Bộ: *Campylobacteriales*; Chi: *Helicobacter*; Loài: *H. pylori*. Theo các số liệu thống kê, khoảng ½ dân số thế giới bị nhiễm *H. pylori* [2], trong đó Việt Nam đứng đầu các nước Đông Nam Á về tỷ lệ tử vong do ung thư dạ dày [1].

H. pylori gồm nhiều chủng/geneotype khác nhau. Trong đó, các chủng vi khuẩn có chứa các gene CagA (cytotoxin-associated gene) và VacA (vacuolating toxin gene) được đặc biệt quan tâm, vì các gene này được coi là yếu tố độc lực chủ yếu và khả năng gây bệnh đặc trưng của vi khuẩn *H. pylori*. Sự kết hợp giữa các gene CagA và gene VacA có thể liên quan đến nguy cơ và các mức độ biểu hiện lâm sàng khác nhau của bệnh [3]. Cho đến nay, các nghiên cứu về gene CagA đã được thực hiện và công bố trên thế giới. Các nghiên cứu đã thống nhất chỉ ra gene CagA ảnh hưởng đến các tín hiệu nội bào theo hướng gây ra ung thư dạ dày ở các tế bào biểu mô và người nhiễm *H. pylori* dương tính với gene CagA có khả năng phát triển thành ung thư cao hơn nhiều lần so với những người nhiễm *H. pylori* không mang gene này [4; 5].

Bên cạnh gene CagA, gene VacA mã hóa protein VacA cần thiết cho sự xâm nhiễm ban đầu và quá trình tồn tại

của *H. pylori* trong tế bào chủ [6]. Gene VacA được chia làm ba kiểu gene chính là s1/m1, s1/m2 và s2/m2. Các kiểu gene vacA đặc trưng có liên quan đến hoạt tính gây độc tế bào và viêm, loét đường tiêu hóa, trong đó kiểu gene s2/m2 không có khả năng tạo độc tố và kiểu gene s1/m1 có khả năng tạo độc tố lớn nhất trong ba kiểu gene của VacA [7]. Bên cạnh các kiểu gene trên, protein p33 được chứng minh có ảnh hưởng trực tiếp đến chức năng của ty thể, làm suy giảm hệ miễn dịch của cơ thể và là nhân tố quan trọng giúp vi khuẩn xâm nhập vào tế bào chủ một cách nhanh chóng [9; 12]. Cho đến nay, các nghiên cứu về đặc điểm và vai trò gây bệnh của *H. pylori* ở BN Việt Nam tương đối phong phú. Tuy nhiên, phần lớn các nghiên cứu mới đề cập đến khía cạnh dịch tễ học, lâm sàng và chẩn đoán, chưa có nhiều nghiên cứu về giải mã và phân tích đặc điểm hệ gene, đặc biệt là đối với gene VacA.

Trong bài báo này chúng tôi giới thiệu nghiên cứu về giải trình tự và nghiên cứu đặc điểm phân tử của tiểu đơn vị p33 thuộc gene VacA của các chủng *H. pylori* thu nhận từ các bệnh nhân viêm dạ dày, loạn sản và ung thư dạ dày nhằm: *Góp phần bổ sung các dữ liệu gene VacA của Việt Nam, đồng thời giúp có thêm những hiểu biết về đặc điểm phân tử của các chủng H. pylori đang gây bệnh ở Việt Nam.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu bệnh phẩm là mảnh sinh thiết dạ dày được lấy từ BN nội soi dạ dày tại Bệnh viện 19-8, Bộ Công an.

Bệnh nhân được chỉ định nội soi, lấy một mảnh sinh thiết dạ dày sau đó chia làm hai phần: Một phần được sử dụng để xác định sự có mặt của *H. pylori* bằng xét nghiệm urea (Rapid Urea Test - RUT), phần còn lại được cho vào ống eppendoff 1,5 mL, bảo quản ở nhiệt độ lạnh và vận chuyển đến phòng thí nghiệm sinh học phân tử. Mẫu bệnh phẩm sẽ được bảo quản tiếp ở nhiệt độ -80°C cho đến khi sử dụng.

Mẫu bệnh phẩm dương tính với *H. pylori* (bằng xét nghiệm Urease) được sử dụng để tách chiết DNA tổng số, sau đó bảo quản ở nhiệt độ -20°C để sử dụng cho các phân tích PCR và giải trình tự gene.

Quá trình tách chiết DNA tổng số, thực hiện PCR khuếch đại gene đích và tinh sạch sản phẩm PCR được sử dụng các bộ sinh phẩm: DNeasy Blood and Tissue Kits - (Qiagene), kit DreamTaq PCR Master Mix (Thermo), kit tinh sạch sản phẩm PCR: GeneJET PCR Purification Kit và GeneJETGel PCR Purification Kit (Thermo) theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất. Các hóa

chất đi kèm gồm: Cồn tuyệt đối (96%) (Meck), agarose tinh khiết (Sigma-Aldrich), các dung dịch dùng để điện di trên thạch agarose, bộ môi cho phản ứng PCR (IDT).

DNA chứng dương được cung cấp bởi Phòng Miễn dịch học - Viện Công nghệ sinh học.

2. Phương pháp nghiên cứu

* Kỹ thuật PCR:

Cặp môi xác định sự có mặt của gene CagA ở các mẫu dương tính với *H. pylori* được tham khảo nghiên cứu của Nguyễn Thị Út và CS (2015), cặp môi thu nhận vùng gene *VacA* chứa tiểu đơn vị p33 được thiết kế dựa trên so sánh trình tự tương đồng chuỗi nucleotide của các chủng *H. pylori* hiện có trên Ngân hàng gene (Bảng 2).

Phản ứng PCR được thực hiện với dung tích là 50 μL , sử dụng kit DreamTaq PCR Master Mix (Thermo) với thành phần như sau: 25 μL dung dịch 2X Dream Taq PCR Master Mix, 2 μL (10 pmol/ μL) mỗi loại môi, 2 μL khuôn DNA (50 ng/ μL), 2 μL DMSO (dimethyl sulfoxide), thêm 17 μL nước khử ion DEPC để đạt dung tích 50 μL .

Phản ứng PCR được thực hiện trên máy MJ PTC-100 (USA): 1 chu kỳ ở $94^{\circ}\text{C}/5$ phút, 35 chu kỳ [$94^{\circ}\text{C}/1$ phút, $42^{\circ}\text{C}/30$ giây; $72^{\circ}\text{C}/2$ phút], chu kỳ cuối ở $72^{\circ}\text{C}/10$ phút. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose

1%, nhuộm Ethidium Bromide và quan sát, chụp ảnh trên máy soi gel dưới ánh sáng tia cực tím (hãng Wealtech, Mỹ).

* *Phân tích xử lý số liệu:*

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ Thermo Scientific GeneJET PCR Purification Kit và gửi đi giải trình tự trực tiếp bằng phương pháp Sanger (the First Base, Singapore). Chuỗi nucleotide được xử lý bằng chương trình Seqed1.3, so sánh bằng chương

trình AssemblyLIGN1.9 và MacVector8.2 (Accelrys Inc.) trên máy tính Macintosh. Các trình tự tương ứng với vùng gene VacA đăng ký tại Ngân hàng gene (*Bảng 1*) được sử dụng để so sánh đối chiếu với chuỗi gene nghiên cứu, sử dụng chương trình GENEDOC2.7 (<http://www.nrbcs.org/gfx/genedoc/>). Phân tích tương đồng di truyền bằng chương trình MEGA10 với hệ số tin cậy 1000 bootstrap [8].

Bảng 1: Danh sách các chủng *H. pylori* sử dụng trong nghiên cứu.

STT	Tên chủng	Nước phân lập	Thời gian phân lập	Số Ngân hàng gene
1	Hp23	Việt Nam	2020	Nghiên cứu này
2	Hp24	Việt Nam	2020	Nghiên cứu này
3	Hp192	Việt Nam	2020	Nghiên cứu này
4	Hp299	Việt Nam	2020	Nghiên cứu này
5	Hp292	Việt Nam	2020	Nghiên cứu này
6	Padang42	Indonesia	2016	LC420364
7	Nias9	Indonesia	2016	LC420353
8	Medan37	Indonesia	2016	LC420356
9	F68	Nhật Bản	1998	AF049648
10	F16	Nhật Bản	2004	AB190960
11	OK129	Nhật Bản	2004	AB190972
12	CHN5147c	Italia	1998	AF050320

TẠP CHÍ Y DƯỢC HỌC QUÂN SỰ SỐ 3 - 2022

STT	Tên chủng	Nước phân lập	Thời gian phân lập	Số Ngân hàng gene
13	10-252	Nhật Bản	2016	LC185415
14	11-9	Nhật Bản	2016	LC185423
15	F17	Nhật Bản	2004	AB190961
16	F13	Nhật Bản	2004	AB190958
17	F18	Nhật Bản	2004	AB190962
18	10-358	Nhật Bản	2016	LC185417
19	10-453	Nhật Bản	2016	LC185421
20	09-294	Nhật Bản	2016	LC185414
21	10-416	Nhật Bản	2016	LC185418
22	10-447	Nhật Bản	2016	LC185420
23	F15	Nhật Bản	2004	AB190959
24	OK210	Nhật Bản	2004	AB190988
25	OK194	Nhật Bản	2004	AB190985
26	ch2	Italia	1999	AF191639
27	14-200	Nhật Bản	2016	LC185425
28	OK101	Nhật Bản	2004	AB190967
29	MZ12	Ấn Độ	2009	GQ331979
30	10-456	Nhật Bản	2016	LC185422
31	13-330	Nhật Bản	2016	LC185424
32	97-474	Nhật Bản	2016	LC185426
33	Hp1	Việt Nam	2020	Nghiên cứu này
34	F80	Nhật Bản	2004	AB190965

TẠP CHÍ Y DƯỢC HỌC QUÂN SỰ SỐ 3 - 2022

STT	Tên chủng	Nước phân lập	Thời gian phân lập	Số Ngân hàng gene
35	F92	Nhật Bản	2004	AB190966
36	DL1	Ấn Độ	2009	GQ331980
37	Kolaka82	Indonesia	2016	LC420379)
38	PG225	Ấn Độ	2009	GQ331975
39	PG218	Ấn Độ	2009	GQ331974
40	PG227	Ấn Độ	2009	GQ331976
41	Kolaka96	Indonesia	2016	LC420369
42	MZ4	Ấn Độ	2009	GQ331978
43	L1	Ấn Độ	2009	GQ331984
44	L8	Ấn Độ	2009	GQ331983
45	Hp5	Việt Nam	2020	Nghiên cứu này
46	Merauke12	Indonesia	2016	LC420373
47	Merauke8	Indonesia	2016	LC420380
48	Merauke27	Indonesia	2016	LC420375
49	Merauke3	Indonesia	2016	LC420376
50	Merauke5	Indonesia	2016	LC420377
51	Merauke7	Indonesia	2016	LC420378
52	Hp2	Việt Nam	2020	Nghiên cứu này
53	Kolaka79	Indonesia	2016	LC420367
54	Kolaka94	Indonesia	2016	LC420368
55	Kolaka98	Indonesia	2016	LC420370

Bảng 2: Các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu.

Gene đích	Tên mồi	Trình tự mồi (5'-3')	Kích thước
VacA	VacAF	AACCGTGATCATTCCRGCC	0,8 kb
	VacAR	AAATACGCTCCCACRTATTGC	
CagA	CagAF	GTTGATAACGCTGTCGCTTC	0,4 kb
	CagAR	GGGTTGTATGATATTTCCATAA	

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

1. Kết quả xác định sự có mặt của gene VacA và CagA

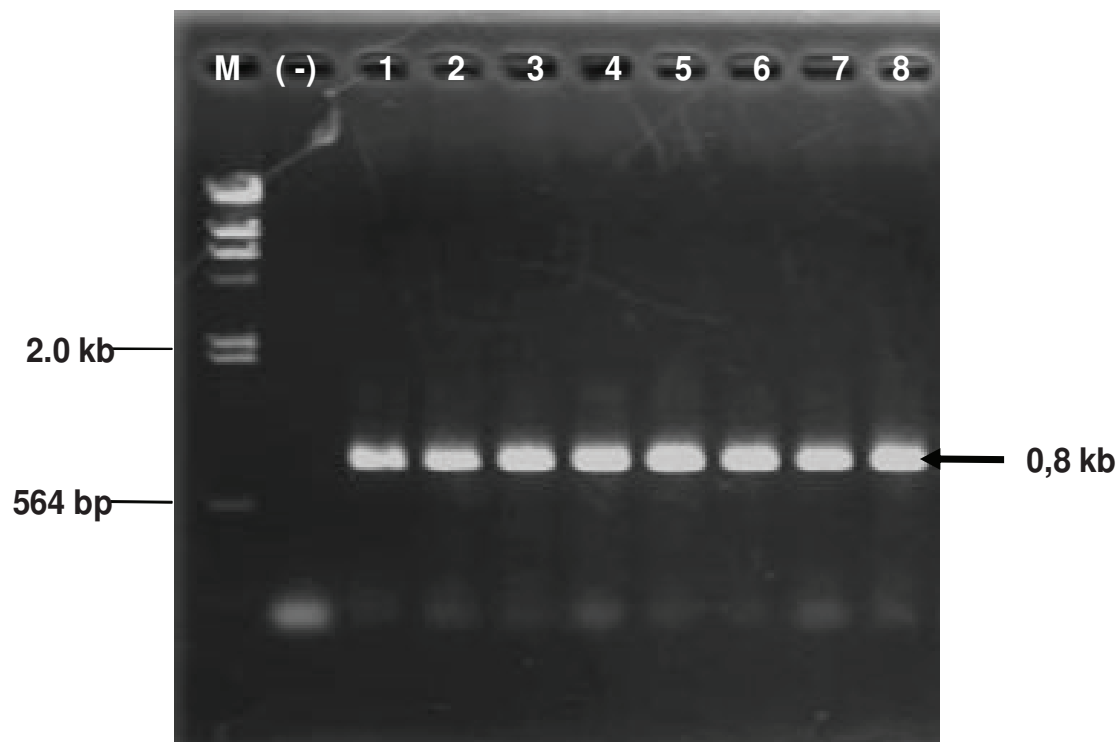
Trong 60 mẫu *H. pylori* kiểm tra, 60/60 mẫu (100%) có chứa gene VacA (dương tính với cặp mồi VacAF-VacAR); 49/60 mẫu (81,6%) có chứa gene CagA dương tính với cặp mồi chẩn đoán CagAF-CagAR), bao gồm 6/6 mẫu loạn sản tế bào và 7/7 mẫu ung thư dạ dày và 36/47 mẫu viêm dạ dày.

Tỷ lệ *H.pylori* dương tính với CagA trong nghiên cứu của chúng tôi là 81,6%, phù hợp với các nghiên cứu trước đây của Trần Thị Bình và CS (2017) [4]; tuy nhiên, cao hơn so với kết quả nghiên cứu trên đối tượng là trẻ em [11]. So sánh với một số kết quả nghiên cứu của các tác giả trên thế giới, tỷ lệ *H.pylori* dương tính với CagA ở Việt Nam tương đương với

một số nước ở châu Á như Trung Quốc, Thái Lan và Indonesia, nhưng cao hơn hẳn so với các nước ở châu Âu [4]. Đặc biệt 100% BN loạn sản tế bào và ung thư dạ dày trong nghiên cứu này đều dương tính với đồng thời hai gene CagA và VacA [10].

2. Kết quả giải trình tự và phân tích gene VacA

Để đánh giá về đặc điểm phân tử của các chủng *H.pylori* đang lưu hành tại Việt Nam, chúng tôi đã lựa chọn 08 mẫu để tiến hành giải trình tự và phân tích đặc điểm vùng gene VacA chứa tiểu đơn vị p33, gồm 02 mẫu bệnh phẩm viêm loét dạ dày (Hp2, Hp5), 03 mẫu loạn sản tế bào (Hp1, Hp23, Hp24) và 03 mẫu ung thư biểu mô dạ dày (Hp192, Hp292, Hp299). Sản phẩm PCR có kích thước khoảng 0,8 kb và được tinh sạch trước khi giải trình tự (Hình 1).



Hình 1: Sản phẩm PCR đã tinh sạch chạy bằng cặp mồi *vacA-F* và *vacA-R*.

Giếng M: Thang DNA chuẩn (DNA của thực khuẩn thể λ được cắt bằng enzyme *HindIII*); giếng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 và 8 lần lượt là sản phẩm PCR (đã tinh sạch) nhân vùng gene *VagA* đầu 5' của các mẫu bệnh phẩm Hp2, Hp5, Hp1, Hp23, Hp24, Hp192, Hp292, Hp299. Giếng (-): Sản phẩm PCR nhân gene *VacA* nhưng khuôn DNA thay bằng nước tinh khiết.

Sản phẩm PCR được giải trình tự trực tiếp bằng phương pháp Sanger (the First Base, Singapore). Trình tự

nucleotide thu nhận được xử lý và phân tích bằng chương trình Genedoc 2.7.

* So sánh tỷ lệ đồng nhất về nucleotide và amino acid vùng gene *VacA*:

Giữa 08 chủng *H. pylori* của Việt Nam có tỷ lệ đồng nhất từ 89,8 - 97,0% về nucleotide và từ 87,0 - 98,6% về amino acid. So sánh với các chủng của thế giới, các chủng của Việt Nam có tỷ lệ đồng nhất về nucleotide và amino acid từ 89,7 - 96,8% và 89,0 - 96,2% (Bảng 1).

Bảng 1: Kết quả so sánh tỷ lệ đồng nhất về nucleotide và amino acid của các chủng *H. pylori* của Việt Nam và thế giới.

STT	Nhóm 1									Nhóm 2				Nhóm 3		Nhóm 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1		97.0	96.2	96.5	95.9	95.7	95.7	96.0	95.1	96.7	93.7	93.8	95.1	95.6	95.1	94.9	89.8	92.2
2	97.1		96.7	97.0	96.7	96.7	96.5	96.8	95.7	97.1	95.1	95.4	95.6	95.4	95.7	95.6	90.8	93.3
3	97.1	98.6		96.8	95.7	95.7	95.7	96.3	95.2	96.7	94.8	93.8	95.2	95.6	95.6	95.4	90.6	92.5
4	95.7	98.6	97.6		96.0	96.2	96.7	96.3	96.3	97.0	93.7	94.1	95.2	95.1	94.4	94.6	90.8	92.1
5	94.7	97.6	96.2	96.2		96.8	95.7	96.3	95.1	95.9	94.0	95.2	95.4	94.4	94.6	94.4	90.0	92.1
6	94.7	97.6	97.1	96.2	98.1		96.3	96.5	95.2	97.5	94.6	95.2	95.4	94.8	95.4	95.6	90.8	92.5
7	94.7	97.6	96.2	96.2	96.6	96.2		96.2	94.9	96.5	93.8	93.8	94.8	94.3	94.0	94.1	90.3	92.1
8	96.7	95.8	98.1	98.1	98.6	98.1	98.1		97.3	98.1	94.4	93.3	95.2	95.1	95.6	95.4	90.5	92.7
9	95.7	98.6	97.1	98.1	97.6	97.1	97.1	99.0		96.5	93.8	92.5	94.6	94.8	94.0	93.8	89.8	91.7
10	96.7	97.5	99.0	98.1	97.6	98.1	97.1	99.0	98.1		94.1	93.8	95.6	95.7	95.2	95.4	90.6	92.4
11	93.8	96.7	95.7	95.7	96.6	95.2	95.2	97.1	96.2	96.2		95.4	95.2	92.7	94.6	94.4	90.6	92.9
12	92.8	95.7	94.7	95.2	97.6	95.7	94.3	96.2	95.7	95.2	97.1		95.1	93.0	93.5	94.0	89.7	92.1
13	92.8	95.7	94.7	95.7	95.7	94.3	94.3	96.2	96.7	95.2	97.6	96.7		94.9	95.1	94.8	90.8	92.7
14	93.3	96.2	96.2	95.7	94.2	94.7	93.8	95.7	95.7	96.7	93.3	92.3	93.8		92.6	92.5	89.7	94.1
15	93.3	96.2	96.2	95.2	95.2	95.7	94.7	96.7	95.7	96.7	95.2	93.3	94.7	92.5		98.9	90.8	93.8
16	93.3	96.2	96.2	95.2	95.2	95.7	94.7	96.7	95.7	96.7	95.2	93.3	94.7	92.5	99.1		91.0	94.0
17	85.2	88.0	88.0	87.1	87.0	87.6	87.1	88.5	87.6	88.5	89.0	87.1	87.6	86.8	90.0	90.9		93.7
18	89.0	91.9	91.9	90.9	90.9	91.4	90.9	92.3	91.4	92.3	91.9	90.0	91.4	94.3	93.8	94.7	93.3	

* Ghi chú:

- | | |
|------------------------------------|----------------------------------|
| 1. Hp23-VN; | 10. 97-474-JP-2016(LC185426); |
| 2. Hp24-VN; | 11. Hp1-VN; |
| 3. Hp192-VN; | 12. F80-JP-2004(AB190965); |
| 4. Padang42-ID-2016(LC420364); | 13. DL1-IN-2009(GQ331980); |
| 5. Hp299-VN; | 14. Kolaka96-ID-2016(LC420369); |
| 6. F68-JP-1998(AF049648); | 15. Hp5-VN; |
| 7. CHN5147cVacA-IT-1998(AF050320); | 16. Merauke12-ID-2016(LC420373); |
| 8. Hp292-VN; | 17. Hp2-VN; |
| 9. 14-200-JP-2016(LC185425); | 18. Kolaka98-ID-2016(LC420370). |

3. Phân tích phả hệ nguồn gốc

Để phân tích phả hệ nguồn gốc, các trình tự nucleotide gene VacA của 8 chủng nghiên cứu được so sánh với 47 chủng của thế giới đăng ký trên Ngân hàng Gene (Hình 2). Kết quả phân tích phả hệ nguồn gốc cho thấy các chủng *H. pylori* được tập hợp thành 4 nhóm chính.

Nhóm thứ nhất bao gồm phần lớn các chủng của Nhật Bản và một số chủng của Indonesia. Nhóm thứ hai tập hợp phần lớn các chủng của Ấn Độ, và các chủng của Nhật Bản, Indonesia. Các chủng còn lại của Indonesia tập hợp trong nhóm thứ ba và nhóm thứ tư.

Tám chủng *H. pylori* của Việt Nam trong nghiên cứu được phân bố ở cả 4 nhóm. Trong đó phần lớn các chủng thuộc nhóm thứ nhất (5/8 chủng), một chủng thuộc nhóm thứ hai, một chủng thuộc nhóm thứ ba và một chủng thuộc nhóm thứ tư.

Trong nhóm thứ nhất, chủng Hp292 có mối quan hệ gần nhất với chủng 14-200 (số GeneBank: LC185425) phân lập năm 2016 của Nhật Bản; chủng Hp-299 có mối quan hệ gần gũi nhất với chủng F68 (số GeneBank: AF049648) của Nhật Bản phân lập năm 1998; ba chủng còn lại gồm Hp192, Hp23 và Hp24 có mối quan hệ gần hơn với chủng Padang42 (số

Genebank: LC420364) phân lập năm 2016 của Indonesia.

Ở nhóm thứ hai, chủng Hp1 của Việt Nam có mối quan hệ gần gũi hơn với hai chủng F80 và F92 phân lập năm 2004 của Nhật Bản (số Genebank: AB190965 và AB190966).

Ở nhóm thứ ba, chủng Hp5 của Việt Nam có mối quan hệ gần gũi với các chủng phân lập năm 2016 của Indonesia.

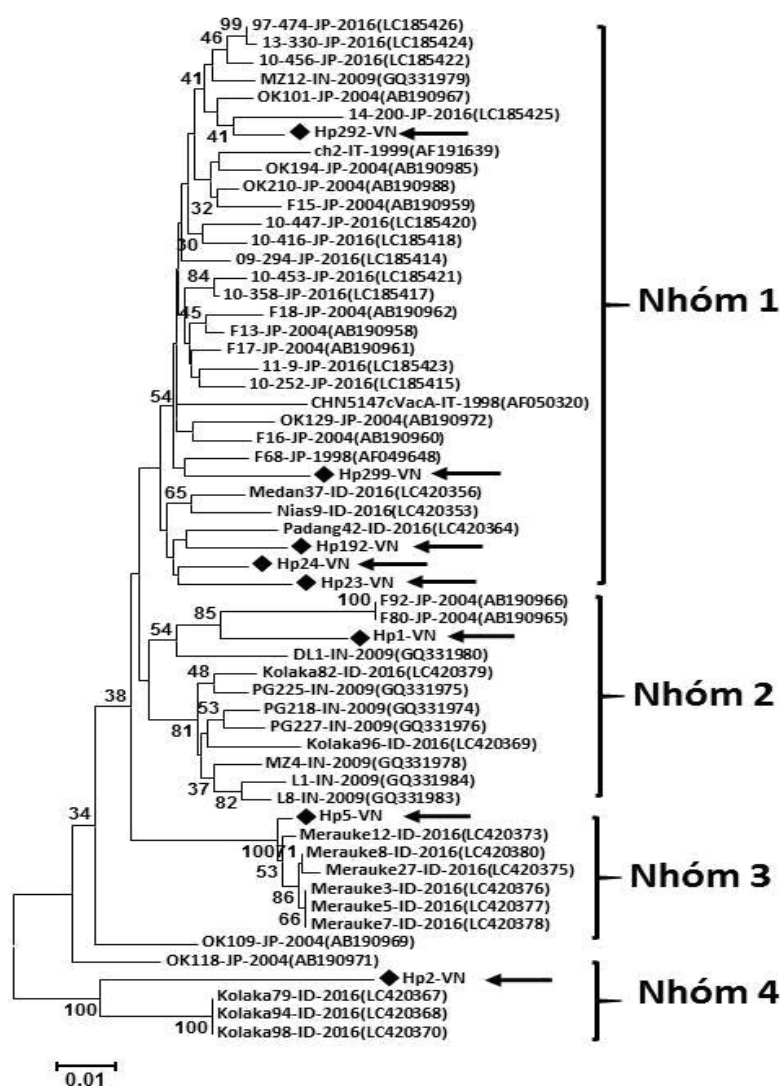
Ở nhóm thứ tư, chủng Hp2 đứng tách thành một nhánh riêng với các chủng của Indonesia.

Như vậy, qua kết quả phân tích phả hệ nguồn gốc đã cho thấy các chủng *H.pylori* của Việt Nam rất đa dạng về đặc tính phân tử, đứng tách biệt thành nhiều nhóm khác nhau và đã có nhiều biến đổi so với các chủng được phân lập trong giai đoạn từ năm 2016 trở về trước. Kết quả phân tích cũng chỉ ra sự đa dạng di truyền của các chủng *H.pylori* ở các nước Đông Nam Á, đặc biệt ở Indonesia và Nhật Bản. Điều này cho thấy rất cần có sự giám sát thường xuyên về dịch tễ học phân tử của các chủng vi khuẩn *H.pylori* để phục vụ tốt hơn việc phòng bệnh và điều trị bệnh đạt hiệu quả cao.

Cho đến nay, đây là các dữ liệu gene VacA đầu tiên của vi khuẩn *H. pylori* Việt Nam trên Ngân hàng gene thế giới. Cần tiếp tục có thêm các

ngiên cứu bổ sung để làm sáng rõ hơn về đặc điểm phân tử của vi khuẩn *H. pylori* tại Việt Nam, đặc biệt là giải mã và phân tích thêm các vùng quan trọng khác của gene *VacA*, so sánh giữa

trình tự gene *VacA* của các chủng *H. pylori* chỉ gây viêm loét dạ dày với các chủng *H. pylori* gây bệnh ở mức độ nghiêm trọng hơn bao gồm loạn sản và ung thư dạ dày.



Hình 2: Mối quan hệ phả hệ của các chủng *H. pylori* Việt Nam và thế giới dựa trên trình tự vùng gene *VacA*.

* Biểu tượng hình quả trám và mũi tên để chỉ các chủng của Việt Nam trong nghiên cứu.

KẾT LUẬN

Bằng phương pháp PCR đã xác định chính xác sự có mặt của vi khuẩn *H. pylori* có trong các mảnh sinh thiết dạ của các BN đến khám tại Bệnh viện 19-8, Bộ Công an. Trong 60 chủng *H. pylori* kiểm tra đã cho thấy có 60/60 chủng dương tính với gene *VacA* (100%), 49/60 chủng dương tính với gene *CagA* (81,6%). Kết quả giải trình tự vùng p33 gene *VacA* của 8 chủng *H.pylori* đại diện và phân tích hệ thống nguồn gốc đã bước đầu cho thấy các chủng *H. pylori* của Việt Nam khá đa dạng và có nhiều biến đổi về trình tự nucleotide so với các chủng của khu vực đã phân lập trước đây. Việc mở rộng nghiên cứu với cỡ mẫu lớn hơn và giải mã thêm các vùng gene quan trọng khác của vi khuẩn rất cần thiết để xác định được dịch tễ học phân tử và mối liên quan giữa đặc điểm phân tử của các chủng *H.pylori* với nguy cơ viêm loét dạ dày và ung thư dạ dày tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kimman M, Jan S, Pacella RE, Kingston D (2012). The burden of cancer in member countries of the Association of Southeast Asian Nations (ASEAN). *Asian Pac J Cancer Prev*; 13(2):411-420.
2. Amieva MR and El-Omar EM (2008). Host-Bacterial Interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*; 134:306-323.
3. Kamangar F, Dawsey SM, Blaser MJ, Perez-Perez GI, Pietien P, Newschaffer CJ, Abnet CC, Albanes D, Virtamo J, Taylor PR (2006). Opposing risks of gastric cardia and noncardia gastric adenocarcinomas associated with *Helicobacter pylori* seropositivity. *Journal of the National Cancer Institute*; 98(20):1445-1452.
4. Tran TB, Vo PT, Ho DQD, Pham HT, Tran DT, Ngo PMT, Vu VK, Phan QH, Suzuki R, Tomohisa U, Tran THT, Yamaoka Y (2017). Advanced non-cardia gastric cancer and *Helicobacter pylori* infection in Vietnam. *Gut Pathogenes*; 9:46.
5. Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelmann H (1997). Risk for gastric cancer in people with *CagA* positive or *CagA* negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut*; 40(3):297-301.
6. GoSciiziak G, Gasxewska-Mastalarz A, Przotido-Mordarska A, Zakriezuska- Czenuiriska J, Iwahxak B, Piiiiezuierka E. Diversity of *Helicobacter pylori VacA* gene and cytotoxin production. *Clin Microbiol Infect*; 5:662-667.

7. Ogiwara H, Sugimoto M, Ohno T, Vilaichone RK, Mahachai V, Graham DY, Yamaoka Y (2009). Role of Deletion Located between the Intermediate and Middle Regions of the *Helicobacter pylori* VacA Gene in Cases of Gastrointestinal Diseases. *J Clin Microbiol*; 47(11):3493-3500.
8. S Kumar, Stecher G, Tamura K (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Mol Biol Evol*; 30:2725-2729.
9. Palframan SL, Kwok T, Gabriel K (2012). Vacuolating cytotoxin A (VacA), a key toxin for *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*; 2(92).
10. Nguyễn Thị Ánh (2006). Liên quan giữa các typ của vi khuẩn *Helicobacter pylori* với bệnh lý ung thư dạ dày tại Việt Nam. *Y học Lâm sàng*; 4:29-32.
11. Nguyễn Thị Út, Lê Thanh Hải, Hoàng Thị Thu Hà (2015). Hiệu quả diệt *Helicobacter pylori* của phác đồ 3 thuốc theo kháng sinh đồ so với phác đồ điều trị 4 thuốc ở trẻ em. *Y học Dự phòng*; 8(168).
12. Louw JA, Kidd MS, Kummer AF, Taylor K, Kotze U, Hanslo D (2001). The relationship between *Helicobacter pylori* infection, the virulence genotypes of the infecting strain and gastric cancer in the African setting. *Helicobacter*; 6:268-273.