

PHÁT HIỆN *HELICOBACTER PYLORI* TỪ DỊCH DẠ DÀY BẰNG KỸ THUẬT NESTED PCR

Nguyễn Phú Hùng^{1*}, Trần Ngọc Anh^{1,2}

¹Trường Đại học Khoa học – ĐH Thái Nguyên,

²Trường Đại học Y Dược - ĐH Thái Nguyên

TÓM TẮT

Helicobacter pylori (*H.pylori*) là một trong những vi khuẩn thường gặp gây nhiễm trùng đường tiêu hóa. Có rất nhiều phương pháp để chẩn đoán nhiễm *H.pylori* tùy theo điều kiện cụ thể của từng cơ sở y tế. Các phương pháp chẩn đoán có tính xâm lấn thông qua nội soi gồm thử nghiệm urease, nuôi cấy vi khuẩn, chẩn đoán mô bệnh học. Thông thường, việc chẩn đoán bằng PCR cũng như các xét nghiệm Clotest hiện nay đều trải qua việc sinh thiết một mẫu niêm mạc dạ dày, điều này ít nhiều gây tổn thương cho dạ dày và gây đau đớn cho người bệnh. Trong khi đó, PCR phát hiện từ mẫu phân và mẫu nước tiểu là những xét nghiệm không xâm lấn nhưng tỷ lệ âm tính giả cao do khả năng thu nhận được *H. pylori* từ các mẫu bệnh phẩm này thấp hơn nhiều so với trong mô hoặc dịch dạ dày. Mục tiêu của nghiên cứu này là thiết lập phản ứng Nested PCR để phát hiện *H.pylori* trực tiếp từ dịch dạ dày nhằm giảm tính xâm lấn so với các phương pháp phân tích từ mô dạ dày. Kết quả thu được cho thấy, phản ứng có tính có độ nhạy cao, cho phép phát hiện được *H.pylori* từ chuẩn cũng như mẫu dịch dạ dày của các bệnh nhân.

Từ khóa: Y- sinh; Nested PCR; chuẩn đoán *H. pylori*; mẫu dịch dạ dày; mô dạ dày.

Ngày nhận bài: 14/02/2020; **Ngày hoàn thiện:** 08/6/2020; **Ngày đăng:** 11/6/2020

DETECTION OF *HELICOBACTER PYLORI* IN GASTRIC JUICE BY NESTED PCR

Nguyen Phu Hung^{1*}, Tran Ngoc Anh^{1,2}

¹TNU - University of Sciences,

²TNU – University of Medicine and Pharmacy

ABSTRACT

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is one of the common bacteria that causes digestive tract infections. There are many methods to diagnose *H. pylori* infection depending on the specific conditions of each health facilities. Invasive methods used to diagnose *H.pylori* include urease test, bacterial culture, bacterial nucleus determination and histopathological diagnosis. Usually, the diagnosis by PCR as well as the Clotest tests undergo a biopsy of a gastric mucosal sample, which more or less causes stomach damage and causes pain for the patient. Meanwhile, PCR method used to detect *H.pylori* from faecal samples and urine samples are non-invasive tests but the rate of false-negative is high due to the ability of receiving *H. pylori* from these specimens to be low. The aim of this study is to set up a Nested PCR reaction to detect *H. pylori* directly from gastric juice to reduce invasion compared to *H.pylori* detection methods from gastric tissue. Our this finding shows that this Nested PCR reaction is highly sensitive, allowing detection of *H.pylori* from the gastric juice sample.

Keywords: Biomedicine; Nested PCR; diagnosis of *H. pylori*; gastric juice sample; gastric tissue.

Received: 14/02/200; **Revised:** 08/6/2020; **Published:** 11/6/2020

* Corresponding author. Email: hungnguyenphu@tnus.edu.vn

1. Giới thiệu

H. pylori là nguyên nhân chính gây viêm, loét dạ dày ở mọi lứa tuổi. Theo thống kê của Tổ chức Y tế thế giới, hơn 50% dân số bị nhiễm loại vi khuẩn này [1]. Tỷ lệ nhiễm *H. pylori* đang giảm ở vùng châu Á - Thái Bình Dương, nhưng ở Việt Nam tỷ lệ nhiễm vi khuẩn này còn cao [2]. Tỷ lệ nhiễm *H. pylori* ở những trẻ em bị viêm dạ dày là 70% và ở bệnh nhân loét hành tá tràng là 90% [3]. Ở Việt Nam chưa có những điều tra quy mô lớn và toàn diện, chủ yếu là các số liệu thống kê dựa trên những nghiên cứu rải rác trong các cộng đồng nhỏ.

Có rất nhiều phương pháp để chẩn đoán nhiễm *H. pylori* dựa theo điều kiện cụ thể của từng cơ sở y tế. Các phương pháp chẩn đoán có tính xâm lấn thông qua nội soi gồm thử nghiệm urease, nuôi cấy vi khuẩn, xác định DNA của vi khuẩn, chẩn đoán mô bệnh học, phản ứng chuỗi PCR. Các phương pháp không xâm lấn bao gồm: Nghiệm pháp thở C13 hoặc C14, test nhanh bằng huyết thanh, test huyết thanh phát hiện kháng thể kháng CagA, tìm kháng thể kháng *H. pylori* trong nước tiểu, Immunoblot, dùng PCR chẩn đoán *H. pylori* trong phân, phát hiện kháng nguyên trong phân. Mỗi phương pháp đều cho những ưu nhược điểm riêng [3].

Thông thường, việc chẩn đoán bằng PCR cũng như các xét nghiệm Clotest đều trải qua việc sinh thiết một mẫu niêm mạc dạ dày, điều này ít nhiều gây tổn thương cho dạ dày và gây đau đớn cho người bệnh. Trong khi đó, PCR phát hiện từ mẫu phân và mẫu nước tiểu là những xét nghiệm không xâm lấn nhưng tỷ lệ âm tính giả cao. Những cải tiến của phương pháp PCR cơ bản thành những phương pháp PCR mới nhằm tăng khả năng phát hiện các đối tượng có lượng DNA khuôn thấp đã được nghiên cứu. Nested – PCR là phương pháp được cải biến từ PCR truyền thống với việc sử dụng 2 cặp mồi gồm để khuếch đại đặc hiệu các đoạn DNA có nồng độ thấp. Việc sử dụng Nested PCR đã được

sử dụng nhằm mục tiêu phát hiện gen Hsp60 đã cho phép xác định vi khuẩn *H. pylori* với độ đặc hiệu và độ nhạy lên đến 100% [4]. Nếu sử dụng kỹ thuật PCR một bước, nó sẽ cho phép độ nhạy để phát hiện *H. Pylori* ở mức 70 tế bào vi khuẩn trong mẫu sinh thiết. Trong khi đó, Nested PCR được sử dụng có thể phát hiện 1fg DN, tương ứng với khoảng 3 tế bào [5].

Tại Việt Nam, hiện chưa có một nghiên cứu nào ứng dụng Nested PCR để phát hiện *H.pylori* từ mẫu dịch dạ dày. Chính vì vậy, nghiên cứu này nhằm thiết lập một phản ứng Nested PCR để phát hiện tác nhân *H.pylori* trực tiếp từ dịch dạ dày của các bệnh nhân.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Chứng vi khuẩn *H. pylori* và mẫu bệnh phẩm

Chứng vi khuẩn *H.pylori* ký hiệu là H.p1091 do Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương cung cấp. Chứng được lưu trữ trong điều kiện - 80°C tại phòng thí nghiệm Y sinh – Đại học Khoa học.

Mẫu bệnh phẩm là dịch dạ dày thu nhận từ 35 bệnh nhân được chỉ định nội soi do nghi có tổn thương viêm hoặc loét dạ dày tá tràng và dịch được đến khám tại Bệnh viện Trường Đại học Y Dược – Đại học Thái Nguyên. Tất cả các bệnh nhân đều được biết thông tin và mục tiêu nghiên cứu đích và đồng ý tham gia vào nghiên cứu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp thu nhận mẫu bệnh phẩm dịch dạ dày

Mẫu bệnh phẩm là dịch dạ dày thu nhận từ bệnh nhân được chỉ định nội soi do nghi có tổn thương viêm hoặc loét dạ dày tá tràng để chẩn đoán vi khuẩn. Quá trình hút dùng dây vô trùng luôn cùng dây dẫn nội soi để hút các dịch trong các ổ loét của dạ dày. Sau đó dịch được chuyển vào ống vô trùng mang đến phòng thí nghiệm lưu giữ ở 2 – 8°C trước khi tách chiết DNA tổng số. Loại bỏ những mẫu không đủ lượng dịch (dưới 2 ml).

2.2.2. Phương pháp tách chiết DNA tổng số từ mẫu chủng vi khuẩn

Quy trình tách DNA sử dụng QIAMP DNA MINI KIT (Cat No./ID: 51304) của Qiagen. Hút 330 μ l vi khuẩn vào ống eppendorf vô trùng, sau đó li tâm 8.000 rpm trong 5 phút. Loại dịch nổi để lại cặn vi khuẩn. Bổ sung 180 μ l Digestion solution + 20 μ l proteinase K. Thêm 200 μ l AL buffer, ủ ở 56°C trong 15 phút. Bổ sung cồn tuyệt đối tỉ lệ 1:1 với mẫu, vortex 15 s và để ở nhiệt độ phòng 1 phút sau đó hút dịch lên cột kit. Ly tâm 8.000 rpm trong 1 phút, bỏ dịch. Thêm 500 μ l buffer AW1, ly tâm 8.000 rpm trong 1 phút, bỏ dịch. Thêm 500 μ l buffer AW2, ly tâm 12.000 rpm trong 4 phút, bỏ dịch. Chuyển cột sang ống eppendorf mới. Thêm 100 μ l nước khử ion hoặc buffer AE, để ở nhiệt độ phòng 1 phút, ly tâm 8.000 rpm trong 1 phút, thu dịch vào ống mới. Bảo quản ở -20°C.

2.2.3. Phương pháp tách chiết DNA tổng số từ mẫu bệnh phẩm

Hút 4 ml dịch vị dạ dày chia đều ra 4 ống eppendorf loại 2 ml (1 ml/ống). Thêm vào mỗi ống 1 ml Tris 0,67 M, ly tâm 10.000 rpm trong 20 phút, loại bỏ dịch nổi. Thêm 200 μ l nước khử ion, mix đều, hút dịch sang ống eppendorf mới. Thêm 20 μ l proteinase K (20 mg/ml), vortex 15 giây. Các bước còn lại tiến

hành giống như tách chiết DNA từ chủng vi khuẩn trong mục 2.2.2, lượng DNA được thu lại trong tổng thể tích 50 μ l.

2.2.4. Phương pháp định lượng DNA tổng số

Để đo nồng độ DNA, quá trình đo được thực hiện trên máy nano drop ở các bước sóng A260/A280. Nồng độ được xác định trên hệ thống máy Nano drop.

2.2.4. Phương pháp Nested PCR

Để phát hiện đoạn DNA đặc hiệu genome *H. pylori*, 2 cặp mồi được thiết kế cho phản ứng Nested PCR gồm: cặp mồi thứ nhất ký hiệu là HpF1 và HpR1 khuếch đại đoạn DNA vòng ngoài kích thước khoảng 417 nucleotide. Cặp mồi thứ 2 là HpF2 và HpR2, khuếch đại đoạn DNA vòng trong kích thước dự kiến 230 nucleotide. Trình tự của các cặp mồi được thể hiện ở bảng 1.

Tổng thể tích cho mỗi phản ứng trong mỗi vòng là 50 μ l gồm 25 μ l master mix (2X), 2 μ l (10 pM/ μ l) mồi xuôi và mồi ngược, 5 μ l DNA (nồng độ thay đổi) và H₂O.

Sản phẩm PCR lần 1 sẽ dùng làm khuôn cho PCR lần 2. Chu kỳ nhiệt được sử dụng chung cho phản ứng vòng 1 và vòng 2 như trình bày trong bảng 2.

Bảng 1. Trình tự các cặp mồi dùng để khuếch đại đoạn DNA đặc hiệu trong genome của vi khuẩn *H.pylori*

Tên mồi (primer)	Trình tự mồi (primer) (5'----3')	Nồng độ (pmol/ μ l)	Sản phẩm (bp)	Nguồn gốc
HpF1	CCCTCACGCCATCAGTCCCCAAAAA	10 pmol/ μ l	417	Yamada et al. 2008 [6].
HpR1	AAGAAGTCAAAAACGCCCAAAAC	10 pmol/ μ l		
HpF2	GGCAAATCATAAGTCCGCAGAA	10 pmol/ μ l	230	
HpR2	TGAGACTTTCCTAGAAAGCGGTGTT	10 mol/ μ l		

Bảng 2. Chu kỳ nhiệt PCR

Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
94°C	5 phút	1
94°C	1 phút 30 giây	30
55°C	1 phút 30 giây	
72°C	1 phút 30 giây	
72°C	5 phút	
4°C	∞	1

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả tách DNA từ chủng vi khuẩn *Helicobacter pylori* và dịch dạ dày

Tách chiết và tinh sạch DNA tổng số là bước quan trọng trong quá trình phân lập một đoạn gen vì kết quả của quá trình này ảnh hưởng rất lớn đến kết quả của phản ứng PCR tiếp theo.

Kết quả tách chiết DNA tổng số được trình bày trong bảng 3. Các dữ liệu trình bày trong bảng 3 đã cho thấy rất rõ các mẫu bệnh phẩm (ký hiệu BN1-BN6) có nồng độ DNA thu được là thấp, dao động từ 5 -12 ng/ μ l. Đáng chú ý, tỷ số OD ở bước sóng A260/A280 chỉ đạt từ 0,87-0,94. Trong khi đó mẫu đối chứng là chủng *H. Pylori* nuôi cấy có hàm lượng DNA tổng số đạt 125,5 ng/ μ l. Như vậy, kết quả này chỉ ra rằng, DNA thu nhận từ dịch dạ dày là thấp về số lượng (nồng độ) và chất lượng (độ tinh sạch) so với DNA tách chiết từ chủng đã phân lập bằng nuôi cấy. Những khó khăn trong việc thu nhận DNA tổng số chứa DNA của *H. pylori* từ dịch dạ dày có thể được giải thích bởi môi trường trong dạ dày là môi trường có nồng độ HCl cao, đồng thời dịch dạ dày chứa rất nhiều các thành phần tạp chất từ thức ăn và các loại enzyme trong dịch vị dạ dày. HCl có thể làm thay đổi tính chất của các chất dùng để tách chiết DNA và do đó có thể làm giảm hiệu quả của việc tách chiết.

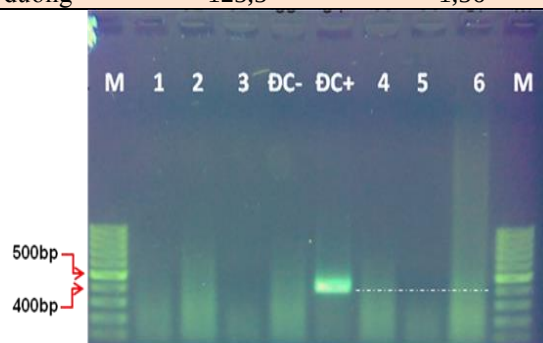
Bảng 3. Nồng độ DNA tổng số tách chiết từ mẫu bệnh phẩm và chủng *H. pylori* đối chứng

STT	Tên mẫu	Loại mẫu	ng/ μ l	A260/A280
1	BN1	Bệnh phẩm	12,1	0,93
2	BN2		10,4	0,87
3	BN3		5,2	0,87
4	BN4		6,6	0,94
5	BN5		9,7	0,91
6	BN6		5,1	0,89
7	ĐC1	Chủng đối chứng dương	125,5	1,56

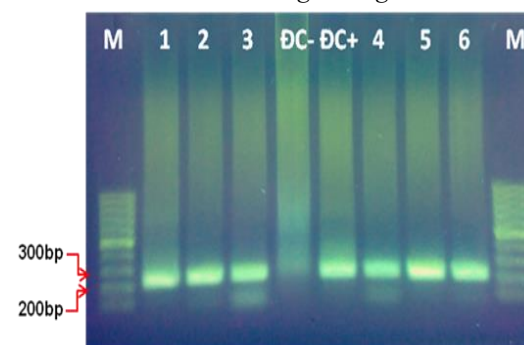
Cùng với đó, dạ dày chứa rất nhiều enzyme pepsin. Điều này cũng ảnh hưởng rất lớn đến khả năng tinh sạch DNA trong quá trình tách chiết. Thêm vào đó, hầu hết các vi khuẩn *H. pylori* bám trên bề mặt của niêm mạc dạ dày hoặc chui vào lớp tế bào biểu mô dạ dày nên tỷ lệ *H. pylori* trong dịch dạ dày cũng thấp. Tuy nhiên, tỷ lệ *H. pylori* có trong dịch dạ dày vẫn được cho là cao hơn trong các mẫu phân và mẫu nước bọt [6].

3.2. Khuếch đại DNA đặc trưng genome của *H. pylori* bằng kỹ thuật Nested PCR

Từ các mẫu DNA tổng số tách chiết từ mẫu bệnh phẩm dịch dạ dày và chủng vi khuẩn *H. Pylori* đối chứng, nhóm tác giả tiến hành khuếch đại đoạn DNA đặc hiệu cho genome của *H. pylori*. Trong phản ứng này, cặp mồi HpF1/HpR1 được sử dụng cho PCR vòng 1, và nồng độ DNA khuôn chung cho cả mẫu bệnh phẩm và mẫu đối chứng đều là 20 ng/ μ l. Kết quả điện di sản phẩm PCR chỉ ra trong hình 1 cho thấy, ở lần PCR vòng 1, chỉ có duy nhất mẫu đối chứng dương có một băng DNA được khuếch đại kích thước khoảng 420 bp, đặc trưng cho *H. Pylori* theo tính toán khi thiết kế các primer. Tất cả các mẫu bệnh phẩm còn lại đều không thể khuếch đại được đoạn DNA đặc hiệu.



Hình 1. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR vòng 1 khuếch đại DNA đặc trưng của vi khuẩn *H. pylori*. Trong đó, M: marker 100 bp. 1-6 mẫu bệnh phẩm. ĐC- là đối chứng âm (H2O), ĐC+ là đối chứng dương



Hình 2. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR vòng 1 khuếch đại DNA đặc trưng của vi khuẩn *H. pylori*. Trong đó, M: marker 100 bp. 1 - 6 mẫu bệnh phẩm. ĐC- là đối chứng âm, ĐC+ là đối chứng dương

Từ kết quả của PCR vòng 1, nhóm tác giả tiến hành pha loãng sản phẩm PCR về nồng độ 20 ng/μl để tiến hành thực hiện phản ứng PCR vòng 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR vòng 2 với cặp mồi HpF2/HpR2 được trình bày trong hình 3.

Từ kết quả điện di chỉ ra trong hình 2 cho thấy toàn bộ 6 mẫu bệnh phẩm từ 1-6 và đối chứng dương (ĐC+) đều cho kết quả là có một băng DNA được khuếch đại kích thước trên 200 bp đúng như tính toán khi thiết kế cặp mồi.

Việc thực hiện phản ứng PCR vòng 1 chưa thể khuếch đại được đoạn DNA đặc hiệu có thể được giải thích bởi hàm lượng DNA thực sự của *H. Pylori* trong mẫu thu được là rất thấp và có thể lẫn tạp chất khác có trong dịch dạ dày. Nhiều nghiên cứu sử dụng Nested PCR để xác định *H. pylori* từ nước bọt hay từ phân cũng đều không chỉ ra sự khuếch đại đoạn DNA đích khi mới chỉ thực hiện PCR ở vòng thứ nhất [6], [7].

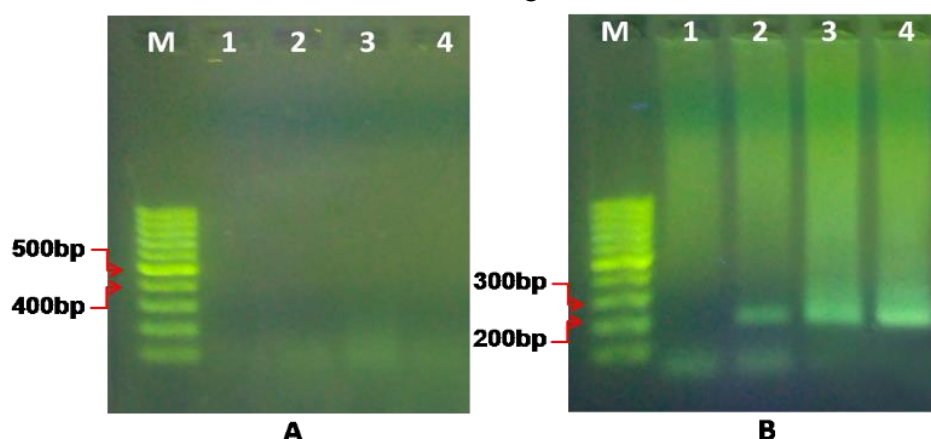
Kết quả thu được trong nghiên cứu này hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu trước đó của Yamada và cộng sự khi sử dụng cặp mồi này để phát hiện *H. Pylori*. Các tác giả cho rằng, *H. pylori* đều có thể có mặt trong hốc miệng, nước bọt, trong phân nhưng với một tỷ lệ thấp hơn nhiều so với trong biểu mô dạ dày [6].

Với phương pháp Nested PCR, phản ứng được thực hiện hai lần liên tiếp. PCR vòng thứ nhất sẽ giúp tăng hàm lượng DNA khuôn là rất cần thiết trước khi tiến hành PCR vòng

2. Sau khi thực hiện phản ứng PCR vòng 1, hàm lượng DNA đã tăng lên nhiều lần so với ban đầu. Trong phản ứng lần 2, cặp mồi thứ 2 sẽ bắt cặp phía trong của sản phẩm PCR lần 1 và khuếch đại đoạn DNA cần xác định. So với PCR thông thường, Nested PCR làm tăng tính đặc hiệu là do sự bắt cặp của cặp mồi thứ hai với đoạn DNA được nhân lên bởi phản ứng PCR thứ nhất, chính vì vậy cho phép phát hiện các mẫu có lượng DNA rất thấp so với PCR truyền thống ở mẫu bệnh phẩm. Đó cũng chính là cơ sở để giải thích việc PCR vòng 1 (tương đương với PCR thông thường) chưa thấy xuất hiện sản phẩm đặc hiệu nhưng PCR lần 2 cho phép khuếch đại được đoạn DNA đặc hiệu từ khuôn là sản phẩm PCR vòng 1.

3.3. Xác định độ nhạy của phản ứng Nested PCR trong phát hiện *H. pylori* từ dịch dạ dày

Để xác định độ nhạy của phản ứng Nested PCR, từ mẫu DNA dương tính với *H. pylori* đã được xác định trong mục 3.2, nhóm tác giả tiến hành pha loãng DNA ban đầu theo các nồng độ 10 fg/μl, 0,1 ng/μl, 1 ng/μl và 10 ng/μl. Phản ứng PCR được thực hiện trong cùng một điều kiện về thể tích, chu kỳ phản ứng. Kết quả điện di sản phẩm PCR vòng 1 cho thấy (hình 3A), tất cả các giếng từ 1 - 4 đều không khuếch đại được đoạn DNA đặc hiệu genome của *H. pylori*.



Hình 3. Độ nhạy của phản ứng Nested PCR khuếch đại đoạn DNA đặc trưng genome *H. pylori*. Trong đó A) điện di sản phẩm PCR vòng 1, B) điện di sản phẩm PCR vòng 2. M: Marker, các giếng 1, 2, 3, 4 tương đương với nồng độ: 0,01 ng/μl, 0,1 ng/μl, 1 ng/μl và 10 ng/μl. Tổng thể tích phản ứng 50 μl.

Như vậy có thể thấy rằng, dù đã tăng lượng DNA ban đầu lên đến 10 ng/μl tương ứng với 50 ng/phản ứng nhưng vẫn chưa đủ hàm lượng DNA khuôn để khuếch đại đoạn DNA đặc hiệu genome *H. pylori*. Cùng với kết quả chạy PCR vòng 1 trong kết quả mục 3.2, có thể khẳng định lượng DNA thực sự là của vi khuẩn *H. pylori* có trong DNA tổng số thu được từ dịch dạ dày là thấp.

Từ kết quả sản phẩm PCR vòng 1, DNA thu được tiếp tục được pha loãng theo nồng độ 0,01 ng/μl, 0,1 ng/μl, 1 ng/μl và 10 ng/μl để tiến hành khuếch đại đoạn DNA genome bằng phản ứng PCR vòng 2 với cặp mồi HpF2/HpR2. Kết quả điện di trong hình 3B đã cho thấy, ở nồng độ DNA từ 0,1 ng/μl DNA đến 10 ng/μl (sản phẩm PCR vòng 1) đều cho sản phẩm phẩm khuếch đại là đoạn DNA đặc hiệu, kích thước trên 200 bp ở vòng 2. Ở ngưỡng nồng độ thấp hơn (0,01 ng/μl),

phản ứng PCR vòng 2 đã không thể khuếch đại được đoạn DNA genome của *H. pylori*. Như vậy, có thể nói ngưỡng phát hiện của phản ứng Nested PCR trong nghiên cứu này từ 0,1 ng/μl tương đương với 0,5 ng/phản ứng (sử dụng 5 μl DNA khuôn/phản ứng). Cũng bằng kỹ thuật Nested PCR và các cặp mồi này, Gilali và cộng sự đã phát hiện được 11 mẫu sản phẩm từ thịt bị nhiễm *H. pylori* trong tổng số 150 mẫu được kiểm tra [8].

3.4. Áp dụng kỹ thuật Nested PCR để đánh giá mức độ nhiễm *H. pylori* trên các mẫu bệnh phẩm

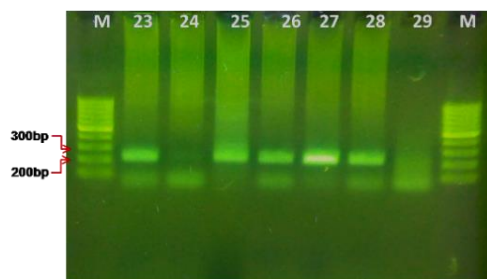
Từ các kết quả nghiên cứu trình bày trong các phần nêu trên, nhóm tác giả tiến hành áp dụng Nested PCR vào việc phân tích trên 35 mẫu bệnh phẩm là dịch dạ dày thu nhận từ các bệnh nhân trong quá trình nội soi tại Bệnh viện Trường Đại học Y - Dược, Đại học Thái Nguyên.

Bảng 4. Kết quả phân tích từ mẫu bệnh phẩm bệnh nhân

STT	Mã bệnh nhân	Tuổi	Kết quả xác định <i>H. pylori</i>		STT	Mã bệnh nhân	Tuổi	Kết quả xác định <i>H. pylori</i>	
			Dương tính	Âm tính				Dương tính	Âm tính
1	BN1	65	v		18	BN18	33	v	
2	BN2	29	v		19	BN19	72	v	
3	BN3	38	v		20	BN20	25	v	
4	BN4	52	v		21	BN21	56	v	
5	BN5	56		v	22	BN22	45	v	
6	BN6	37		v	23	BN23	28	v	
7	BN7	42	v		24	BN24	38		v
8	BN8	67	v		25	BN25	33	v	
9	BN9	38	v		26	BN26	54	v	
10	BN10	40	v		27	BN27	63	v	
11	BN11	43	v		28	BN28	57	v	
12	BN12	61	v		29	BN29	51		v
13	BN13	52		v	30	BN30	54	v	
14	BN14	30	v		31	BN31	51	v	
15	BN15	26	v		32	BN32	29	v	
16	BN16	61	v		33	BN33	65	v	
17	BN17	13	v		34	BN34	70	v	
					35	BN35	61	v	

Tỷ lệ dương tính 85,7% (30/35), âm tính 14,3% (5/35). v = biểu thị

Kết quả phân tích trên 35 bệnh nhân lấy mẫu dịch dạ dày qua nội soi được trình bày ở bảng 4 đã cho thấy, tỷ lệ bệnh nhân dương tính với vi khuẩn *H. pylori* chiếm 85,7%, tỷ lệ âm tính chiếm 14,3%. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại DNA đặc trưng của vi khuẩn *H. pylori* (vòng 2) từ một số bệnh phẩm được thể hiện ở hình 4.



Hình 4. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR khuếch đại DNA đặc trưng của vi khuẩn *H.pylori* (vòng 2) từ một số mẫu bệnh phẩm. M: Marker; 23 – 29: số mẫu bệnh phẩm.

Phương pháp PCR vòng đơn thông thường để phát hiện *H.pylori* đặc biệt là sau khi điều trị tiệt trừ không thể phát hiện mầm bệnh nhưng có thể được phát hiện bởi Nested PCR với độ nhạy cao gấp nhiều lần so với PCR vòng đơn. Do đó, Nested PCR có thể được đề xuất theo tiêu chuẩn vàng với điều kiện PCR đang được quan tâm.

Nghiên cứu của Mishra và cộng sự bằng Nested-PCR để phát hiện gen mục tiêu Hsp60 đã báo cáo rằng 62,5% bệnh nhân dương tính với *H.pylori* [5]. Một nghiên cứu của Nguyễn Văn Ngoan và cộng sự tại Việt Nam đã cho thấy nhiễm *H. pylori* mức độ nhẹ chiếm 44,3%, mức vừa là 32,9% và mức nặng là 23,1% [9].

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả đã tách chiết được DNA tổng số từ mẫu bệnh phẩm là dịch dạ dày và DNA từ chủng đối chứng, trong đó, mẫu bệnh phẩm thu được hàm lượng DNA thấp và độ tinh sạch cũng thấp so với DNA tách được từ chủng đối chứng. Đã xác định được sự có mặt của vi khuẩn *H. pylori* trong mẫu bệnh phẩm bằng phản ứng Nested PCR ở ngưỡng nồng độ từ 0,1 ng/μl. Phân tích trên 35 mẫu bệnh phẩm đã chỉ ra tỷ lệ dương tính với *H.pylori* là 85,7%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1]. J. P. Gisbert, "Rescue Therapy for *Helicobacter pylori* Infection 2012," *Gastroenterol Res Pract*, vol. 2012, p. 974594, 2012.
- [2]. T. Binh et al., "Molecular Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection in a Minor Ethnic Group of Vietnam: A Multiethnic, Population-Based Study," *IJMS*, vol. 19, no. 3, p. 708, Mar. 2018.
- [3]. A. T. B. Abadi, "Diagnosis of *Helicobacter pylori* Using Invasive and Noninvasive Approaches," *Journal of Pathogens*, vol. 2018, p. 13, 2018.
- [4]. V. Singh et al., "Evaluation of nested PCR in detection of *Helicobacter pylori* targeting a highly conserved gene: HSP60," *Helicobacter*, vol. 13, no. 1, pp. 30-34, Feb. 2008.
- [5]. S. Mishra, V. Singh, G. R. K. Rao, V. K. Dixit, A. K. Gulati, and G. Nath, "Prevalence of *Helicobacter pylori* in asymptomatic subjects—A nested PCR based study," *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 8, no. 6, pp. 815-819, Dec. 2008.
- [6]. R. Yamada, A. Yamaguchi, and K. Shibasaki, "Detection and Analysis of *Helicobacter pylori* DNA in the Gastric Juice, Saliva, and Urine by Nested PCR," *Oral Science International*, vol. 5, no. 1, pp. 24-34, May 2008.
- [7]. V. Singh et al., "Evaluation of Nested PCR in Detection of *Helicobacter pylori* Targeting a Highly Conserved Gene: HSP60: Nested PCR in Detection of *H. pylori*," *Helicobacter*, vol. 13, no. 1, pp. 30-34, Jan. 2008.
- [8]. A. Gilani, V. Razavilar, N. Rokni, and E. Rahimi, "VacA and cagA genotypes of *Helicobacter pylori* isolated from raw meat in Isfahan province, Iran," *Vet Res Forum*, vol. 8, no. 1, pp. 75-80, 2017.
- [9]. V. N. Nguyen, "Study of clinical features, endoscopy, histopathology and results of treatment of chronic gastritis with *Helicobacter pylori* infection in children", PhD thesis of Medicine, Hanoi Medical University, 2004.