

SỰ CÓ MẶT CỦA VI KHUẨN *HELICOBACTER PYLORI* MANG *cagA*⁺ STATUS TRONG CÁC SINH THIẾT DẠ DÀY CỦA NGƯỜI VIỆT NAM

TRẦN CÔNG TƯỚC, TRẦN QUỲNH HOA,
NGUYỄN THỊ HỒNG HẠNH

Viện Công nghệ sinh học

NGUYỄN VĂN PHÙNG

Trường Đại học Y khoa Hà Nội

BÙI PHƯƠNG THUẬN

Trường Đại học Khoa học tự nhiên - ĐHQG Hà Nội

Các nghiên cứu khoa học cho thấy vi khuẩn *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) là nguyên nhân chính gây viêm loét dạ dày, tá tràng ở người [1, 2, 3, 4, 8, 9].

Genom *H. pylori* có thể chứa *cag*, một locus di truyền có kích thước khoảng 30 kb. Cho đến nay, nguồn gốc của locus này còn chưa được biết rõ. Trong khi các chủng loại I chứa *cag* có thể gây ra nhiều triệu chứng bệnh lý như: kích thích tế bào tiết interleukin-8, làm thay đổi bề mặt tế bào, hoạt hóa yếu tố AP-1 và hoạt hóa các gen tiềm ung thư *c-fos* và *c-jun* thì các chủng loại II (không chứa gen *cag*) không có các đặc tính nói trên [5]. 60-70% các vi khuẩn *H. pylori* được phân lập từ người bệnh mang *cag island*. Trong các trường hợp ung thư, 100% các vi khuẩn trong quần thể *cagA*⁺ [4, 11].

Các phương pháp chẩn đoán nhiễm *H. pylori* được chia làm hai nhóm chính:

- Nhóm các phương pháp chẩn đoán yêu cầu nội soi: phương pháp soi tìm hình thể trực tiếp từ mảnh sinh thiết trên lam kính, phát hiện *H. pylori* trong tiêu bản giải phẫu bệnh lý, thử nghiệm urea, nuôi cấy.

- Nhóm các phương pháp chẩn đoán không yêu cầu nội soi: phương pháp sử dụng đồng vị phóng xạ (¹³C, ¹⁴C), PCR, phương pháp chẩn đoán miễn dịch.

Do việc nuôi cấy *H. pylori* cực kỳ khó khăn [6, 7, 10] và các chủng *H. pylori* mang tính đặc thù từng địa phương nên việc tìm ra một

phương pháp chẩn đoán *H. pylori* đơn giản và rẻ tiền là việc cần thiết, đặc biệt đối với Việt Nam. Trong bài báo này, chúng tôi bước đầu thông báo việc phân lập và xác định các chủng *H. pylori* mang *cagA*⁺ từ người Việt Nam nhằm phục vụ mục đích trên. Các phương pháp nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường chọn lọc, phương pháp xác định hình thái vi khuẩn bằng kính hiển vi điện tử cũng như lai phân tích Southern được sử dụng trong nghiên cứu này.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nội soi dạ dày, tá tràng được thực hiện bằng máy nội soi ống mềm 2T-10 (Olympus-Nhật Bản) tại Viện Trung ương quân đội 108.

Qua nội soi đánh giá tình trạng viêm dạ dày - tá tràng biểu hiện bằng sự biến đổi của niêm mạc và giãn các mạch máu dưới niêm mạc. Phát hiện ổ loét ở tá tràng và tiến hành sinh thiết 3 mảnh ở niêm mạc xung quanh ổ loét. Hai mảnh sinh thiết dùng làm chẩn đoán vi sinh vật được đặt trong môi trường vận chuyển (theo Seeliger H. P. J và Schroter G., 1990):

Dung dịch A: NaCl: 8,66 g; KH₂PO₄: 0,14 g; NaHPO₄.2H₂O: 1,6 g, pH: 7,3 pha trong nước cất.

Dung dịch B: Glucose 1,5%.

Trộn 75 ml dung dịch A với 25 ml dung dịch B, sau đó đóng ống, bảo quản trong tủ lạnh và có thể dùng trong vòng 1 tháng.

Mảnh còn lại dùng để phết lên tiêu bản nhuộm Gram trực tiếp và làm thử nghiệm urea.

Tất cả các thao tác về vi sinh vật đều được tiến hành trong điều kiện vô trùng tuyệt đối. Mảnh sinh thiết được lấy bằng que cấy và trải trên mặt thạch columbia chứa 7% máu ngựa và các chất phụ gia, pH 7,0-8,0 hoặc môi trường đặc trưng cho *H. pylori* (hãng ACTT). Đĩa nuôi cấy sau đó được đặt ngay vào trong bình Jar có túi tạo điều kiện vi hiếu khí của hãng BBL (Becton Dickinson Microbiology System, Cockeysville). Tất cả được đặt vào tủ ấm 37°C. Theo dõi khuẩn lạc sau 2-5 ngày. Sau khi khuẩn lạc nhỏ đường kính 0,5-1 mm xuất hiện, dùng que cấy gạt nhẹ các khuẩn lạc lên trên lam kính dùng để chụp vi khuẩn dưới kính hiển vi điện tử quét nhuộm tiêu bản Gram và làm thử nghiệm urease. Phần còn lại được bảo quản trong dung dịch glycerin ở -80°C dùng cho các thí nghiệm sau này.

Song song với nuôi cấy vi khuẩn, mảnh sinh thiết thứ hai được nhuộm theo phương pháp Gram. Các vi khuẩn cong hoặc xoắn nhẹ nằm trên lớp màng nhầy của niêm mạc dạ dày được quan sát dưới kính hiển vi.

Để thử nghiệm trực tiếp hoạt tính men urease từ mảnh sinh thiết, qua đó phát hiện gián tiếp sự có mặt của *H. pylori*, mảnh sinh thiết được cho vào ống môi trường chứa ure có chất chỉ thị, để ở 37°C theo dõi trong vòng 24 giờ. Hoạt động của *H. pylori* sau 15 phút làm môi trường đổi màu da cam sang màu hồng tím trong các thử nghiệm dương tính.

Các nghiên cứu về hình thái của vi khuẩn được tiến hành với:

- Kính hiển vi thường

- Kính hiển vi điện tử quét (SEM) (được thực hiện tại phòng thí nghiệm kính hiển vi điện tử - Viện Kỹ thuật nhiệt đới, Trung tâm KHTN và CNQG).

Xác định các vi khuẩn mang cagA⁺ status:

Các vi khuẩn *H. pylori* được nuôi trên môi trường Brucella có bổ sung một vài hoạt chất ở 37°C để lấy sinh khối. Chúng được phát hiện có mang quần đảo bệnh lý (pathogenicity island) cagA bằng phương pháp lai Southern với mẫu dò mang trình tự đặc trưng cho gen cagA. Màng lai được áp vào đĩa có các khuẩn lạc *H. pylori*. Sau đó ADN vi khuẩn trong các khuẩn lạc trên màng lai được biến tính bằng dung dịch

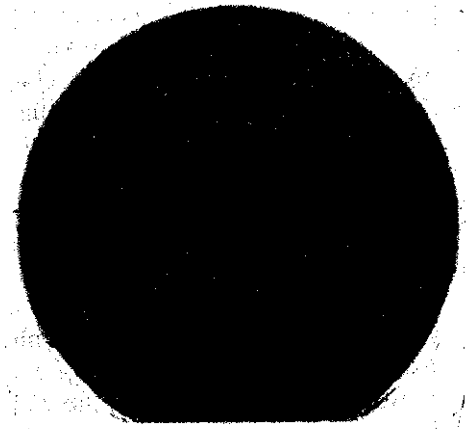
NaOH 0,4 M. Các phản ứng đánh dấu không đồng vị phóng xạ cũng như quá trình lai và phát hiện các khuẩn lạc dương tính được tiến hành theo chỉ dẫn của Kit ECL (Amersham Pharmacia Biotech).

Trình tự của mẫu thử dùng trong lai Southern:

5'-AGAGATCCAAAACAAAGTGGATTT
CATGGAATTTCTTGCACAAAACAACG
TAAATTAGACAACCTGGAGCGAG-3'

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nuôi cấy *H. pylori*: Sinh thiết lấy bằng phương pháp nội soi được bảo quản trong dung dịch vận chuyển cho đến khi nuôi cấy. Các khuẩn lạc xuất hiện trong vòng 2-4 ngày trên môi trường đặc trưng cho *H. pylori* có bổ sung các chất phụ gia trong điều kiện vi hiếu khí, pH 7,0-8,0, nhiệt độ 37°C hoặc trên môi trường ACTT và Columbia (hình 1).



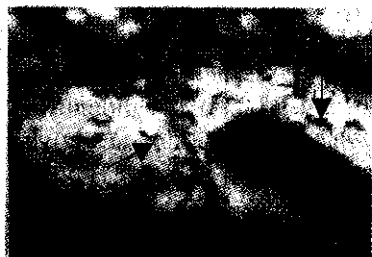
Hình 1. Ảnh chụp các khuẩn lạc trên môi trường đặc trưng cho *H. pylori*

Thử nghiệm urease:

Kết quả cho thấy sau 15 phút (đối với môi trường thử nghiệm urease từ khuẩn lạc) và 2 giờ (đối với môi trường thử nghiệm urease từ mảnh sinh thiết) môi trường chuyển từ màu da cam sang màu hồng tím, chứng tỏ độ pH của môi trường đã tăng do NH₃ (môi trường kiềm). Các vi khuẩn như vậy, đã tiết urease. Có khả năng chúng là *Helicobacter pylori*.

Kết quả nhuộm Gram và chụp kính hiển vi điện tử:

Kết quả nhuộm Gram và chụp ảnh kính hiển vi điện tử quét (hình 2, 3) cho thấy do các vi khuẩn được phân lập là vi khuẩn Gram âm, hình xoắn cong có đường kính 0,1 - 0,3 μm dài từ 1,5 đến 5 μm . Đó là kích thước và hình dạng đặc trưng cho vi khuẩn *H. pylori*.



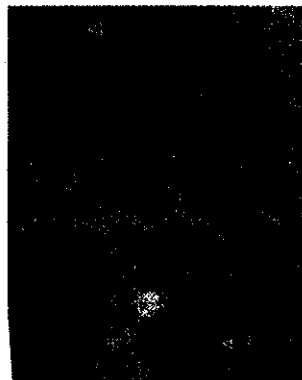
Hình 2. Vi khuẩn được nhuộm Gram trực tiếp từ mảnh sinh thiết (vi khuẩn được chỉ bằng mũi tên)



Hình 3. Vi khuẩn *Helicobacter pylori* được phân lập (Ảnh chụp kính hiển vi điện tử quét với độ phóng đại 10000 lần).

Kết quả lai phân tích Southern: Lai phân tích Southern cho phép xác định các vi khuẩn *H. pylori* được phân lập từ bệnh nhân Việt Nam mang gen *cagA*⁺. Các vi khuẩn được phân lập trên môi trường đặc trưng cho *H. pylori*. Kết luận nói trên được khẳng định bởi phân tích lai Southern với mẫu thử oligonucleotide đặc trưng cho gen *cagA*⁺. Các khuẩn lạc được chuyển vào màng Nylon và lai qua đêm ở 42°C. Khoảng 60% các khuẩn lạc cho tín hiệu dương tính với mẫu thử, chứng tỏ chúng thực sự là *Helicobacter pylori*, loại I (hình 4). Phần còn lại, có thể là các vi khuẩn *H. pylori* loại II mang

gen *cagA*⁻ status. Những thử nghiệm lai Southern tiếp theo oligonucleotide đặc trưng cho gen urease sẽ khẳng định dự đoán nói trên.



Hình 4. Các khuẩn lạc được phân lập cho kết quả dương tính với mẫu thử oligonucleotide đặc trưng cho gen *cagA*⁺ của *H. pylori*. Trên ảnh, tín hiệu lai từ hai trong số các khuẩn lạc được phóng to và chụp ảnh (chỉ bằng mũi tên).

III. KẾT LUẬN

Các test nhuộm tế bào, test urease, việc sử dụng các môi trường chọn lọc cho *H. pylori*, ảnh chụp hiển vi điện tử quét và lai phân tích Southern khẳng định các vi khuẩn được phân lập từ các vết loét dạ dày và tá tràng là *H. pylori*. Ngoài ra, các nghiên cứu còn cho thấy:

- *H. pylori* phát triển tốt trên môi trường thạch máu như môi trường Columbia agar, Brucella ở nhiệt độ từ 35°C-37°C, pH 7,0-8,0. Các yếu tố kích thích tăng trưởng như Isovitalex, Fcs, Vitox giúp cho *H. pylori* phát triển tốt hơn.

- Các phương pháp như nuôi cấy vi khuẩn, nhuộm Gram trực tiếp từ mảnh sinh thiết, và các thử nghiệm urea trực tiếp từ mảnh sinh thiết hoặc từ khuẩn lạc là những phương pháp có hiệu quả trong chẩn đoán cũng như đánh giá sự có mặt của vi khuẩn *H. pylori*.

- Chụp ảnh kính hiển vi điện tử quét (SEM) cho thấy *H. pylori* là loại vi khuẩn hình xoắn cong đường kính 0,1-0,3 μm dài từ 1,5 đến 5 μm .

Helicobacter pylori là loại vi khuẩn mang

đặc thù đối với dân Việt Nam. Hơn nữa, do cho một gien tương đối linh động nên các quasi-species *H. pylori* không hoàn toàn giống nhau. Điều đó đã gây rất nhiều khó khăn cho công tác chẩn đoán bệnh. Theo giáo sư Keith Henley (Trường đại học tổng hợp Michigan-Hoa Kỳ), ở Việt Nam, chỉ có khoảng 65% trường nhiễm *H. pylori* được phát hiện bằng các kit nhập từ nước ngoài. Do vậy, việc nghiên cứu các chủng *H. pylori* của Việt Nam là việc làm cần thiết. Những nghiên cứu sắp tới của chúng tôi sẽ nhằm vào mục đích trên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Anthony G., Catto S., 1996: Gut flora and mucosal function. Asia pacific J Clin Nutr. 5 Luigina C & Nerion A(1994): 36-39.

2. Handt LK., Fox JO., Deuhist FE et al., 1994: Helicobacter pylori isolated from the domestics cat: public health implication. Infect. Immu. 62: 2367-2374.

3. Irene V. W., 1996: H. pylori and Arcobacter Species: Risks for Foods and Beverages. Journal of food Protection, Vol.59(10): 1127-1132.

4. John L. T., Antonello C., 1994: Unravelling the pathogenic role of H. pylori in

peptic ulcer: potential new therapies and vaccines. Tibtech. 12: 420-4269.

5. Kenji Y. and Yokota H., 1994: Heat Shock Protein Produced by H. pylori. Micro. Immunol. 38(5): 403-405.

6. Luigina C. and Nerino A., 1994: Coccoid H. pylori not culturable in vitro reverst in Mice. Micro. Immunol. 38(11): 843-850.

7. Luigina C. and Nerino A. H., 1994: Helicobacter polori: A Fickle Germ. Micro. Immunol. 38(1): 843-850.

8. Marshall BJ., 1993: Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet: 1273-1275.

9. Marshall BJ. and Wrren JR., 1984: Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastric and peptic ulceration. Lancet: 1311-1315.

10. Muhammad G. M. and Mikio K., 1994: Growth medium containing cyclodextrin and low concentration of horse serum of cultivation of H. pylori. Micro. Immunol. 38(11): 897-990.

11. Richard A., 1999: Genomic-sequence comparision of two unrelated isolates of humar gastric parthogen Helicobacter pylori. Nature 397: 176-180.

THE PRESENCE OF *HELICOBACTER PYLORI* TYPE I (cagA+ STATUS) IN THE GASTRIC BIOPSIES OF VIETNAMESE PATIENTS

TRAN CONG TUOC, et al.

SUMMARY

The duodenal and gastric ulcers caused by *Helicobacter pylori* are the disease popular in Vietnam an many regions over the world. However, the *H. pylori* strains are characteristics for each race. Therefore, it necessary to isolated and the classify them from Vietnamese patients.

In this paper, we reported the first steps to isolate and identified *H. pylori* strains from the Vietnamese patients suffering duodenal and stomachal ulcers. The biopsies taken from gastric ulcers were tested f urease and histological study. The bacteria were cultured on medium specific for *H. pylori* und microaerobic conditions (90%N₂, 5%O₂, and 5%CO₂). The bacteria appear as tiny colonies after 3-5 days (the medium supplemented with growth factors such as Isovitalex, Fcs, Vitox. The temperature appropria for bacteria to grow is 35-37°C. Scanning ELectronic Microscope (SEM) revealed that these isolated bacter are spirally shaped with 0.1-0.3 μ and 1.5-5 μm in length. The were identified as *Helicobacter pylori* type (cagA + status) by an oligonucleotide specific fo cagA gene in Southern blot analysis.

Ngày nhận bài: 26-5-20