

• 论 著 •

青岛地区幽门螺杆菌多重耐药现状和突变特征分析

王莉莉^{1,2}, 杨超², 董全江², 孙桂荣^{1△}

(1. 青岛大学附属医院检验科, 山东青岛 266003; 2. 青岛市市立医院中心实验室, 山东青岛 266011)

摘要:目的 分析青岛地区幽门螺杆菌(Hp)对常用抗菌药物的单一耐药和多重耐药情况,并探讨相关耐药基因突变的特征。方法 从胃窦黏膜标本分离培养 Hp,应用琼脂稀释法药敏试验分别检测 Hp 对克拉霉素、左氧氟沙星和甲硝唑的敏感性;采用聚合酶链式反应(PCR)方法扩增 Hp 克拉霉素耐药基因 23S rRNA、左氧氟沙星耐药基因 gyrA 和甲硝唑耐药基因 rdxA;PCR 产物测序后应用 ClustalW2 软件进行序列比对分析。结果 药敏检测发现,临床分离的 134 株 Hp 菌株对克拉霉素、左氧氟沙星和甲硝唑 3 种抗菌药物单一耐药率分别为 40.3%、34.3%和 43.3%;仅 17.9% Hp 对 3 种抗菌药物均敏感;多重耐药率为 29.9%,三重耐药率为 9.0%;左氧氟沙星+甲硝唑双重耐药率(3.0%)低于克拉霉素+左氧氟沙星(10.4%),二者差异有统计学意义($\chi^2 = 5.96, P = 0.015$)。耐药基因序列分析表明青岛地区 23S rRNA 最常见突变位点为 A2143G(77.8%),gyrA 基因突变最常见的突变方式为 N87K(78.3%),rdxA 基因最常见的突变方式为第 20、32 位点核苷酸插入 A,产生移码突变,突变率为 44.8%。结论 青岛地区 Hp 多重耐药率高,应根据药敏检测结果选择有效抗菌药物。左氧氟沙星可作为本地区根除治疗方案的一线用药。

关键词: 幽门螺杆菌; 克拉霉素; 左氧氟沙星; 甲硝唑; 耐药

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.24.032

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)24-3583-03

Prevalence and genetic features of multi-drug resistant *Helicobacter pylori* strains from Qingdao

Wang Lili^{1,2}, Yang Chao², Dong Quanjiang², Sun Guirong^{1△}

(1. Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, Shandong 266003, China;

2. Central Laboratory, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao, Shandong 266011, China)

Abstract: **Objective** To analyze the single resistance and multiple resistance situation of *Helicobacter pylori* (Hp) in Qingdao area to commonly used antibacterial drugs and to investigate the mutation characteristics of drug-related resistant genes. **Methods** Hp was isolated from the mucosal samples of gastric antrum. The agar diffusion test was used to determine the susceptibility of Hp to clarithromycin, levofloxacin and metronidazole. The 23s rRNA of clarithromycin resistance gene, gyrA of levofloxacin resistance gene and rdxA of metronidazole resistance gene were amplified by using PCR, after the PCR products sequencing, the sequence comparative analysis was performed by the ClustalW2 software. **Results** The drug susceptibility test results found that the single resistance rates of 134 strains of clinically isolated Hp to clarithromycin, levofloxacin and metronidazole were 40.3%, 34.3% and 43.3%, respectively. Only 17.9% of Hp strains were susceptible to these 3 kinds of antibacterial drug; the multi-drug resistance rate was 29.9%, triple drug resistance rate was 9.0%; furthermore, the double resistance rate of levofloxacin plus metronidazole was significantly lower than that of clarithromycin plus levofloxacin, the difference was statistically significant (3.0% vs. 10.4%, $\chi^2 = 5.96, P = 0.015$). The drug resistance genes sequence analyses showed that the commonest mutation locus was A2143G (77.8%), the commonest mode of gyrA gene mutation was N87K (78.3%), and which of rdxA gene was nucleotide insertion into loci 20/32, generating the frameshift mutation with the mutation rate of 44.8%. **Conclusion** The multi-drug resistance rate of Hp is high in Qingdao area. The effective antibacterial drugs should be selected according to the drug susceptibility test results. Levofloxacin could serve as the first line drug for the eradication therapy scheme in this area.

Key words: *Helicobacter pylori*; clarithromycin; levofloxacin; metronidazole; resistance

幽门螺杆菌(Hp)是一种革兰阴性、微需氧的螺旋状杆菌,是引起慢性胃炎、胃十二指肠溃疡、胃癌及 MALT 淋巴瘤的主要致病菌^[1]。细菌耐药是引起 Hp 根除治疗失败的主要原因,而多重抗菌药物耐药会显著降低 Hp 根除率。研究发现, Hp 耐药性有明显的地区差异^[2-3],经文献检索,未见青岛地区 Hp 多重耐药的相关报道。本研究通过分析青岛地区 Hp 对常用抗菌药物的单一耐药和多重耐药情况,并探讨相关的耐药基因突变特征,旨在为本地区临床提高 Hp 根除效率提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2011~2014 年在青岛市市立医院经胃镜和病理检查确诊的慢性胃炎患者 168 例,男 95 例,女 73 例,

年龄 30~72 岁,平均(45.7±6.3)岁;胃癌患者 90 例,男 53 例,女 37 例,年龄 41~79 岁,平均(55.5±12.1)岁,所有患者均未接受过根除 Hp 治疗。胃窦黏膜标本经快速尿素酶实验证实 Hp 阳性。胃窦黏膜组织置于 1 mL 脑心浸出液(BHI)液体培养基中,-80℃保存备用。本研究方案通过本院伦理委员会审核,纳入研究前所有患者均签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂 细菌基因组 DNA 提取试剂盒和 2×Taq PCR Master Mix 购自天根生化科技有限公司;BHI 培养基、Hp 选择性添加剂、细菌培养罐和微需氧产气袋均购自英国 Oxoid 公司;革兰染液购自济南百博生物技术有限公司;恒温箱购自美国 Thermo 公司;普通 PCR 仪购自美国 Labnet 公司;凝胶分析仪购自美国 Bio-rad 公司;Hp 标准菌株 NCTC11637 来自本

实验室保存。

1.3 方法

1.3.1 细菌培养及鉴定 胃黏膜活检标本接种于 5% 去纤维马血 BHI 琼脂固体培养基(含 Hp 选择性添加剂)表面接种划痕,置于 37 ℃微需氧环境中(5% O₂,10% CO₂,85% N₂)培养 5~7 d。挑取透明样针尖大小菌落进行尿素酶、过氧化氢酶、氧化酶及革兰染色鉴定 Hp 并传代,2 d 后收集细菌置于磷酸盐缓冲液(PBS)液中,-80 ℃保存,用于提取 Hp 基因组 DNA。

1.3.2 琼脂稀释法药敏试验 分别制备含不同浓度抗菌药物(克拉霉素、左氧氟沙星和甲硝唑)的平板,各在其上划 6 个扇区,每个扇区接种 1 株细菌(10⁸ cfu/ mL)。同时各菌株平行接种于无抗菌药物的平板为对照。置 37 ℃、微需氧条件下培养 3 d 观察结果。以无细菌生长的抗菌药物最高稀释度作为最低抑菌浓度(MIC)。根据美国临床和实验室标准协会(CLSI)指南^[4],克拉霉素 MIC≥1 μg/mL,左氧氟沙星 MIC≥1 μg/mL,甲硝唑 MIC≥8 μg/mL 定为耐药菌株。药敏质控采用 Hp 标准菌株 NCTC11637 与试验同步进行。

1.3.3 PCR 扩增 采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒按照说明书步骤提取 Hp 基因组 DNA。分别扩增 Hp 克拉霉素耐药基因 23S rRNA、左氧氟沙星耐药基因 gyrA 和甲硝唑耐药基因 rdxA。扩增引物由上海英潍捷基生物技术有限公司合成,序列详见表 1。PCR 反应体系为:引物各 5 μmol,模板 DNA 20 ng,2×Taq Mix 12.5 μL,补双蒸水(ddH₂O)至 25 μL。反应条件:94 ℃ 5 min,94 ℃ 1 min,52 ℃ 30 s(rdxA 为 50 ℃)、72 ℃ 1 min 循环 30 次,72 ℃ 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测目的基因长度和完整性,见表 1。

表 1 PCR 扩增引物列表

基因名称	引物名称	引物序列 5'→3'	PCR 产物大小(bp)
23S rRNA	23SrNAF	CCA CAG CGA TGT GGT CTC AG	425
	23SrRNAR	CTC CAT AAG AGC CAA AGC CC	
gyrA	gyrAF	TTT RGC TTA TTC MAT GAG CGT	428
	gyrAR	GCA GAC GGC TTG GTA RAA TA	
rdxA	rdxAF	AAT TTG AGC ATG GGG CAG A	851
	rdxAF	GAA ACG CTT GAA AAC ACC CCT	

1.3.4 基因测序及结果分析 PCR 产物切胶纯化后采用 Sanger 测序法进行基因测序(AB 3730XL 测序仪,美国),由北京六合华大基因科技股份有限公司完成。采用 MEGA5.1 分子生物学软件分析耐药基因的核苷酸和氨基酸序列,并与 Hp 敏感株 26695 基因序列(GeneBank CP003904.1)进行 ClustalW2 比对,分析突变方式和突变位点。

1.4 统计学处理 应用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理,计数资料以例数或百分率表示,选择 χ^2 检验对计数资料进行统计,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Hp 单一耐药分析 Hp 阳性的活检标本共分离出 134 株 Hp。琼脂稀释法药敏检测发现仅 17.9%(24 株)Hp 菌株对克拉霉素、左氧氟沙星和甲硝唑 3 种抗菌药物均敏感,见表 2,临床分离的 Hp 菌株对克拉霉素、左氧氟沙星和甲硝唑 3 种抗菌药物单重耐药率分别为 40.3%、34.3%和 43.3%,虽然左氧氟沙星耐药率低于克拉霉素和甲硝唑,但 3 种抗菌药物之间

耐药差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 Hp 多重耐药分析 134 株 Hp 中,有 29.9%(40 株)同时对两种或两种以上抗菌药物耐药。由表 2 可见,双重耐药的 Hp 菌株中,克拉霉素+左氧氟沙星耐药率为 10.4%(14/134),而左氧氟沙星+甲硝唑耐药率最低,为 3.0%(4/134),二者差异有统计学意义($\chi^2=5.96,P=0.015$)。这提示青岛地区 Hp 临床分离株对左氧氟沙星+甲硝唑联合用药比克拉霉素+左氧氟沙星更敏感。Hp 临床分离株三重抗菌药物耐药比例为 9.0%(12/134),提示多重耐药菌株将严重影响临床根除 Hp 治疗的效果,见表 2。

表 2 Hp 对 3 种抗菌药物耐药分析

耐药类型	抗菌药物耐药	菌株例数(n)	比例(%)
均敏感	无	24	17.9
单耐药	克拉霉素	54	40.3
	左氧氟沙星	46	34.3
	甲硝唑	58	43.3
双重耐药	克拉霉素+左氧氟沙星	14	10.4
	克拉霉素+甲硝唑	10	7.5
	左氧氟沙星+甲硝唑	4	3.0
三重耐药	克拉霉素+左氧氟沙星+甲硝唑	12	9.0

2.3 Hp 耐药基因突变特征分析 Hp 克拉霉素耐药相关基因 23S rRNA、左氧氟沙星耐药相关基因 gyrA 和甲硝唑耐药相关基因 rdxA 分别经 PCR 法扩增全长序列,PCR 产物直接测序。从 GenBank 中调取 Hp26695 的相对应序列,应用 Clustal W2 程序比对所有耐药基因序列。结果发现:(1)54 株克拉霉素耐药 Hp 菌株的 23S rRNA V 区均有基因突变发生,突变位点 A2143G 最常见,突变率为 77.8%,其他突变方式为 A2174G(5.6%)、A2187G(3.7%)、A2223G(7.3%)等,见表 3(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。(2)46 株左氧氟沙星耐药 Hp 菌株的 gyrA 基因突变最常见的突变方式为 N87K(78.3%),其次依次为 D91Y(10.9%)、A88V(6.5%)等。(3)58 株甲硝唑耐药 Hp 菌株的 rdxA 基因突变以插入和缺失单核苷酸为主,最常见的突变方式为第 20、32 位点核苷酸插入 A,产生移码突变,导致第 23 氨基酸(aa)序列出现终止密码子引起蛋白功能失活,突变率为 44.8%。其他移码突变发生位点散布于全基因序列。

3 讨 论

目前国内推荐用于 Hp 根除治疗的抗菌药物包括:克拉霉素、甲硝唑、左氧氟沙星、阿莫西林、呋喃唑酮和四环素^[5]。本研究针对最常用的抗菌药物包括克拉霉素、左氧氟沙星和甲硝唑进行药敏检测,结果发现青岛地区仅 17.9%的 Hp 菌株对上述 3 种抗菌药物均敏感,而多重耐药菌株达 29.9%,其中三重耐药菌株达 9.0%。这些结果提示无药敏检测指导的随机选取抗菌药物治疗 Hp 感染的有效率会显著下降。不同地区 Hp 多重耐药率有所差异,浙江地区为 23.6%^[6],上海地区高达 37.8%^[7],可能与经济水平、地理分布、时间跨度及当地医生的用药习惯有一定的相关性。依据 Maastricht-IV 共识,基于药敏试验结果选用抗菌药物用于根除疗法仅为三线方案^[8]。由于本地区多重耐药率高达近 1/3 而敏感菌株仅不到 1/5,因此无药敏检测指导的一、二线治疗方案的效果肯定将会显著下降。据此本研究认为在多重耐药率高的地区,应在药敏检测指导下选择有效抗菌药物进行根除治疗方案,韩国的一项研究也

支持本观点^[9]。无药敏检测指导的三联或者四联方案不但有效率低,而且可能进一步导致抗菌药物耐药的发生。

本研究临床分离的 Hp 菌株双重耐药率由低到高依次为:左氧氟沙星+甲硝唑耐药率(3.0%)、克拉霉素+甲硝唑(7.5%)和克拉霉素+左氧氟沙星(10.4%)。Maastricht-IV 共识推荐在克拉霉素高耐药(15%~20%)的地区,一线方案为铋剂四联疗法,二线方案为左氧氟沙星三联疗法。本地区临床分离的 Hp 菌株对克拉霉素耐药率为 41.8%,含克拉霉素双重耐药率为 18%,属于克拉霉素耐药高的地区,因此基于克拉霉素的标准三联方案不应为本地区的一线治疗方案。本地区 Hp 对左氧氟沙星耐药率低于克拉霉素和甲硝唑,尤其左氧氟沙星+甲硝唑双重耐药率也比较低。桂西地区的研究发现左氧氟沙星+甲硝唑双重耐药率仅 1.7%,也支持这一结果^[10]。因此本地区可选择含左氧氟沙星的 Hp 根除治疗为一线方案。

前期研究表明 23S rRNA V 区基因点突变导致 Hp 对大环内酯类抗菌药物耐药,常见突变位点为 2142 和 2143^[11]。本研究发现 A2143G 突变率为 77.8%,其他突变方式为 A2174G(5.6%)、A2187G(3.7%)、A2223G(7.3%)等,未见 2142 位点突变,提示青岛地区 23S rRNA 基因 A2143G 为克拉霉素耐药的主导因素。编码 DNA 螺旋酶亚单位 *gyrA* 基因的喹诺酮类耐药决定区(QRDR)基因突变可导致 Hp 对左氧氟沙星耐药,常见耐药位点为 86~88、91^[12]。本研究发现 *gyrA* 基因突变最常见的突变方式为 N87K,与之前报道一致^[13]。*rdxA* 基因突变引起的酶活性丧失是 Hp 对甲硝唑耐药的主要因素^[14]。本研究发现耐甲硝唑 Hp 菌株的 *rdxA* 基因第 20、32 位点核苷酸插入 A 产生移码突变,突变率为 44.8%,为本地区 Hp 对甲硝唑耐药的主导因素。

综上所述,青岛地区 Hp 多重耐药率高,应根据药敏检测结果选择有效抗菌药物。左氧氟沙星可作为本地区根除治疗方案的一线用药,其临床疗效有待于进一步验证。

参考文献

- [1] Qi D, Wang LL, Tian ZB, et al. Reduced genome size of *Helicobacter pylori* originating from East Asia[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(19): 5666-5671.
- [2] Yoon KH, Park SW, Lee SW, et al. Clarithromycin-based standard tripletherapy can still be effective for *Helicobacter pylori* eradication in some parts of the Korea[J]. *J Korean Med Sci*, 2014, 29(9): 1240-1246.
- [3] 梁晓萍, 杨焕丽, 张粉娟, 等. 咸阳地区上消化道疾病患者幽门螺

杆菌感染状况分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 34(16): 2191-2192.

- [4] Glupczynski Y, Broutet N, Cantagrel A, et al. Comparison of the E test and agar dilution method for antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2002, 21(3): 549-552.
- [5] 刘文忠, 萧树东. 幽门螺杆菌新国际共识解读[J]. *胃肠病学*, 2012, 17(1): 1-4.
- [6] 周晴接, 潘杰. 浙江地区幽门螺杆菌临床分离株的耐药性[J]. *世界华人消化杂志*, 2014, 22(23): 3552-3556.
- [7] 林永辉, 杨行堂, 张丽, 等. Hp 临床分离株对 5 种抗生素的耐药性分析[J]. *同济大学学报: 医学版*, 2009, 30(5): 86-89.
- [8] Malfertheiner P, Megraud F, O'morain CA, et al. Management of *helicobacter pylori* infection—the Maastricht IV/ Florence consensus report[J]. *Gut*, 2012, 61(5): 646-664.
- [9] Park CS, Lee SM, Park CH, et al. Pretreatment antimicrobial Susceptibility-Guided Vs. Clarithromycin-Based triple therapy for *helicobacter pylori* eradication in a region with high rates of multiple drug resistance[J]. *American Journal of Gastroenterology*, 2014, 109(10): 1595-1602.
- [10] 李晓华, 黄赞松, 黄衍强, 等. 桂西地区幽门螺杆菌多重耐药现状和治疗方案分析[J]. *重庆医学*, 2013, 42(14): 1578-1579.
- [11] Barile KA, Silva AL, Xavier JN, et al. Characterization of 23S rRNA domain V mutations in gastric biopsy patients from the eastern Amazon[J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2010, 105(3): 314-317.
- [12] Wang LH, Cheng H, Hu FL, et al. Distribution of *gyrA* mutations in fluoroquinolone-resistant *Helicobacter pylori* strains[J]. *World J Gast*, 2010, 16(18): 2272-2277.
- [13] 王松松, 苏艳华, 战淑慧, 等. 青岛地区幽门螺杆菌对左氧氟沙星耐药性及 *gyrA* 基因突变分析[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2013, 22(5): 428-430.
- [14] Han F, Liu S, Ho B, et al. Alterations in *rdxA* and *frxA* genes and their upstream regions in metronidazole-resistant *Helicobacter pylori* isolates[J]. *Res Microbiol*, 2007, 158(2): 38-44.

(收稿日期: 2015-08-16)



(上接第 3582 页)

小于 10%者,不可轻易否定 HS 的诊断,必要时进行 RBC 膜蛋白测定以确诊^[7]; (8) 注意鉴别诊断。既要与可出现球形 RBC 的自身免疫性溶血性贫血鉴别,又要与地中海贫血、G6PD 酶缺陷等遗传性溶血性疾病鉴别。

随着科学技术的发展,一些先进的技术应用于 HS 的检测,其诊断率不断提高,但很多尚未普及,目前大多数医院仍然使用传统的检测方法,医务人员应正确掌握诊断要点、加强检验与临床的沟通交流、重视显微镜下红细胞形态检查及提高红细胞形态识别能力,使患者早期诊断,早期治疗,避免出现胆结石、再障危象等并发症,减少患者的经济负担和精神痛苦。

参考文献

- [1] 张之南, 沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京: 科学出版

社, 2007: 43-46.

- [2] 徐龄, 李以贵. 成人遗传性球形红细胞增多症 2 例[J]. *海南医药*, 2013, 24(5): 758-759.
- [3] 谭地清, 彭贤贵, 孔佩慈, 等. 遗传性球形红细胞增多症长期误诊原因分析[J]. *西部医学*, 2013, 25(2): 256-258.
- [4] 王小钦, 林果为. 提高遗传性球形红细胞增多症的诊断水平[J]. *国际输血及血液学杂志*, 2009, 32(6): 488-489.
- [5] 何清, 薛军. 成人遗传性球形红细胞增多症临床分析[J]. *中华医学杂志*, 2014, 94(8): 603-605.
- [6] 毕慧, 何勤, 王旭, 等. 遗传性球形红细胞增多症 15 例临床分析[J]. *临床血液学杂志*, 2010, 23(1): 41-43.
- [7] 丘玉铃, 林发全. 遗传性球形红细胞增多症研究进展[J]. *广东医药*, 2010, 31(13): 1761-1762.

(收稿日期: 2015-08-13)