

• 论 著 •

焦磷酸测序法在幽门螺杆菌克拉霉素耐药基因检测及药物疗效评价中的应用^{*}

初亚男, 张婕妤, 陆 瑶, 张晏洁, 封利颖[△]
(东部战区总医院药理科, 江苏南京 210002)

摘 要:目的 本研究建立了幽门螺杆菌(Hp)克拉霉素耐药基因检测的焦磷酸测序方法,在获知耐药情况的同时根据半定量结果初步评估治疗效果。方法 通过考察最合适的扩增引物、体系、退火温度建立最优的 PCR 扩增体系。分别对方法的灵敏度、特异性及一致性进行了评价。通过对 44 例临床标本的检测,比较本方法与快速尿素酶试验和¹³C 呼气试验的检出率。结果 最优的 PCR 扩增体系为 HiFi 体系,最佳退火温度为 59.8℃。本方法特异性良好,灵敏度达到 100 copies/ μ L,与 Sanger 测序结果 100.0%一致。36 例标本快速尿素酶和焦测序法的检出率分别为 48.7%和 81.1%,耐药率为 10.81%。8 例标本¹³C 呼气试验和焦测序法的检出率分别为 75.0%和 87.5%,阳性标本检出一致率为 100.0%。结论 焦测序检测方法具备灵敏度高、快速、半定量的特点,为临床 Hp 克拉霉素耐药检测及初步疗效评价提供了一种新的方法。

关键词:幽门螺杆菌; 克拉霉素耐药; 焦磷酸测序

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.03.002

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2020)03-0262-04

文献标识码:A

Application of pyrophosphate sequencing in detection of clarithromycin-resistance gene of *Helicobacter pylori* and evaluating drug effectiveness^{*}

CHU Ya'nan, ZHANG Jieyu, LU Yao, ZHANG Yanjie, FENG Liying[△]

(Department of Pharmacology, General Hospital of Eastern War Zone, Nanjing, Jiangsu 210002, China)

Abstract: Objective To establish a method of pyrosequencing for the detection of clarithromycin-resistance gene in *Helicobacter pylori* (Hp), and to evaluate the therapeutic effect based on semi-quantitative results. **Methods** To establish the optimal PCR amplification system by examining the optimum amplification primer, system and annealing temperature. The sensitivity, specificity and consistency of the methods were evaluated respectively. 44 clinical specimens were examined to compare the detection rate of this method with the rapid urease test and the ¹³C breath test. **Results** The best PCR amplification system was HiFi system, and the optimum annealing temperature was 59.8℃. This method was specific and has a sensitivity of 100 copies/ μ L, which is 100.0% consistent with the results of the Sanger sequencing. For the 36 specimens, the detection rates of rapid urease test and pyrosequencing method was 48.7% and 81.1% respectively. The resistance rate was 10.81%. In 8 specimens, The detection rates of ¹³C breath test and pyrosequencing method was 75.0% and 87.5%, respectively, and the consistent rate of positive specimen was 100.0%. **Conclusion** Pyrosequencing has the characteristics of high sensitivity, rapid and semi-quantitative, which provides a new method for the detection of clarithromycin-resistance and preliminary therapeutic evaluation.

Key words: *Helicobacter pylori*; clarithromycin-resistance; pyrosequencing

幽门螺杆菌(Hp)是一种革兰阴性杆菌,特异地定植于胃上皮细胞,是人类慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌等疾病的主要诱因,中国有 40%~60%的人群感染 Hp^[1-3]。质子泵抑制剂、克拉霉素和阿莫西林组成的标准三联疗法的治愈率正在逐年下降,造成这种现象

的原因是 Hp 对克拉霉素耐药^[4], Hp 中 23S 核糖体 RNA 基因(23S rRNA 基因)A2142G 和 A2143G 2 个单核苷酸多态性(SNP)位点的突变是导致耐药突变的主要原因^[5-7],因此本研究拟采用无需电泳、荧光标记且具有半定量能力的焦磷酸测序方法,通过在 Hp

^{*} 基金项目:国家自然科学基金项目(21475151);国家自然科学基金青年科学基金项目(81703474)。

作者简介:初亚男,女,主管药师,主要从事分子诊断方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: flying870831@163.com。

本文引用格式:初亚男,张婕妤,陆瑶,等.焦磷酸测序法在幽门螺杆菌克拉霉素耐药基因检测及药物疗效评价中的应用[J].国际检验医学杂志,2020,41(3):262-264.

特异性的 23S rRNA 基因的保守区域设计焦磷酸测序引物,得到含耐药位点的 23S rRNA 的部分片段,对片段中的 2 个 SNP 耐药位点进行分析得到耐药信息。实现用药前的耐药评价和感染情况分析,为三联疗法的选择提供依据,同时根据半定量结果实现初步治疗效果的评价。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 5—10 月本院内镜中心进行胃镜检查且无胃部手术史,未接受三联或四联治疗的患者为研究对象,共收集了 37 例患者的镜检组织标本,男 19 例、女 18 例。37 例患者快速尿素酶试验结果及 8 例患者的¹³C 尿素呼气试验检测结果由本院消化内科提供。本研究经医院伦理委员会批准。

1.2 仪器与试剂 QIAamp DNA Mini Kit 试剂盒和焦磷酸测序试剂盒及退火和结合缓冲液购自德国 QIAGEN 公司;2×TransTaq[®] High Fidelity(HiFi) PCR SuperMix I 试剂盒购自中国北京全式金公司;Takara LA Taq[®] with GC Buffer 购自日本 Takara 公司;其他试剂均为分析纯;实验用水均为灭菌双蒸水;Q24 焦磷酸测序仪购自德国 Qiagen 公司;A200 基因扩增仪购自中国杭州朗基科学仪器有限公司;微量紫外分光光度计购自中国南京伍义科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 质粒模板和引物合成 根据 NCBI 中提供 Hp 23S rRNA 基因序列,将包含有 2142GG 型,2143AA 型,长度为 200 bp 的基因片段构建重组质粒,由捷瑞生物合成并构建,作为建立焦磷酸测序反应时条件优化的模板。引物由中国上海 Invitrogen 公司合成,具体引物名称及序列见表 1。

表 1 检测 A2142G 和 A2143G 位点的基因多态性引物	
引物	引物序列(5'-3')
上游引物 1	GTG AAA TTG TAG TGG AGG TGA AAA
上游引物 2	GTG AAA TTG TAG TGG AGG TGA AAA TTC C
下游引物	Biotin-TGT AGT AAA GGT CCA CGG GGT CT
测序引物	ACC CGC GGC AAG ACG G

1.3.2 黏膜组织获取及组织中基因组 DNA 的提取 37 名患者于胃窦大弯侧取黏膜组织约 3 mm×3 mm 2 块,一块用于快速尿素酶实验,另一块放置-80 ℃冰箱低温保存。按照 QIAamp DNA Mini Kit 试剂盒说明操作可同时共提取组织中人和 Hp 的基因组 DNA,采用紫外分光光度计测定标本的水平和纯度。所有标本 A₂₆₀/A₂₈₀ 均在 1.8~2.0 之间,水平均大于 20 ng/μL,可用于后续测序实验。

1.3.3 克拉霉素耐药基因检测的 PCR 扩增体系的建立 采用 Qiagen 公司的 Assay Design Software 2.0 设计序列,将 2 条上游引物分别与下游引物组合,扩增梯度稀释得到 10⁴、10³、10² copies/μL 的 23S

rRNA 基因质粒,每个梯度重复 3 次,PCR 产物电泳后观察扩增条带(亮度和单一性)确定最优的引物组合。

由于 23S rRNA 基因的 GC 水平较高,因此选择了 2 种专门用于扩增高 GC 水平的 2×TransTaq[®] High Fidelity PCR SuperMix I 试剂盒(HiFi 体系)和 TaKaRa LA Taq[®] with GC Buffer(GC 体系)试剂盒。50 μL HiFi 体系包括 2×TransTaq HiFi Mix I 25 μL、上游引物 2 μL、下游引物 2 μL、模板 2.5 μL,加水补充至 50 μL。50 μL GC 体系包括 LA Taq 0.5 μL、2×GC Buffer I 25 μL、dNTP 2 μL、上游引物 2 μL、下游引物 2 μL、模板 2.5 μL,加水补充至 50 μL。选用上述引物组合分别扩增 10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²、10¹ copies/μL 的质粒模板,PCR 产物电泳后观察扩增条带确定最优的扩增体系。

退火温度是影响 PCR 扩增的关键因素,决定了扩增效率和特异性,因此选择 55、58、59.8、63.4、67、70 ℃ 6 个退火温度梯度,用灭菌双蒸水作为空白对照,采用 HiFi 体系进行扩增,PCR 产物电泳后观察扩增条带确定最优的退火温度。

1.3.4 方法特异性考察 由于从组织中提取到的 DNA 绝大部分为人基因组 DNA,因此需要对引物的特异性进行考察,分别以血液中提取获得的人基因组 DNA 和¹³C 确诊为 Hp 感染的人胃窦组织提取的 DNA 为模板进行扩增,考察本方法的特异性,同时对 PCR 扩增产物进行 Sanger 测序,将测序结果与 NCBI 网站公布的 Hp 23S rRNA 基因序列进行比对。

1.3.5 方法的灵敏度考察 将含有 23S rRNA 基因的质粒模板梯度稀释成 10⁴、10³、10²、10¹ copies/μL 的模板进行本方法的灵敏度考察,每个水平梯度重复 3 次,将 PCR 产物进行电泳和焦磷酸测序。进行焦磷酸测序时,第一个“G”出现信号峰代表突变型信号,“A”出现信号峰代表野生型信号。以焦磷酸测序是否获得预期的信号峰来评判本方法的灵敏度。

1.3.6 方法与 Sanger 测序的一致性考察 对 20 例组织标本的 PCR 扩增产物分别进行焦磷酸测序和外送至华大基因进行 Sanger 测序,对 A2142G 和 A2143G 位点的检测结果进行分析,评价本方法检测的一致性。

2 结 果

2.1 克拉霉素耐药基因检测的 PCR 扩增体系的条件优化结果 扩增产物的电泳结果表明上游引物 2 加下游引物的组合扩增条带更明亮,扩增效率更高,因此优选此引物组合,同理,最佳扩增体系为 HiFi 体系,最佳温度为 59.8 ℃。

2.2 检测方法的特异性评价 扩增产物的电泳结果表明本方法使用的引物只能特异性地识别含有 Hp 23S rRNA 基因组 DNA 的标本,具备很好的特异性。此外 Sanger 测序比对的结果表明本方法 PCR 扩增的产物序列 100%同源为 Hp 23S rRNA 基因序列,因此

方法的特异性良好。

2.3 灵敏度与基于半定量性能的初步疗效评价 采用焦磷酸测序检测 A2142G 和 A2143G 位点的灵敏度为 100 copies/ μ L 质粒模板。在考察方法灵敏度时,发现由于焦磷酸测序具备较好的定量效果,不同水平的质粒模板与第一个碱基 G 的单碱基峰高呈现一定的对应关系,在检测 10² copies/ μ L 质粒模板时单碱基峰高为约 75 mV,10³ copies/ μ L 质粒模板时单碱基峰高约为 125 mV,10⁴ copies/ μ L 质粒模板时单碱基峰高约为 250 mV。因此,在检测过程中以此为参照,对患者治疗前和治疗后的标本进行检测就可以初步评估患者的治疗效果。见图 1。

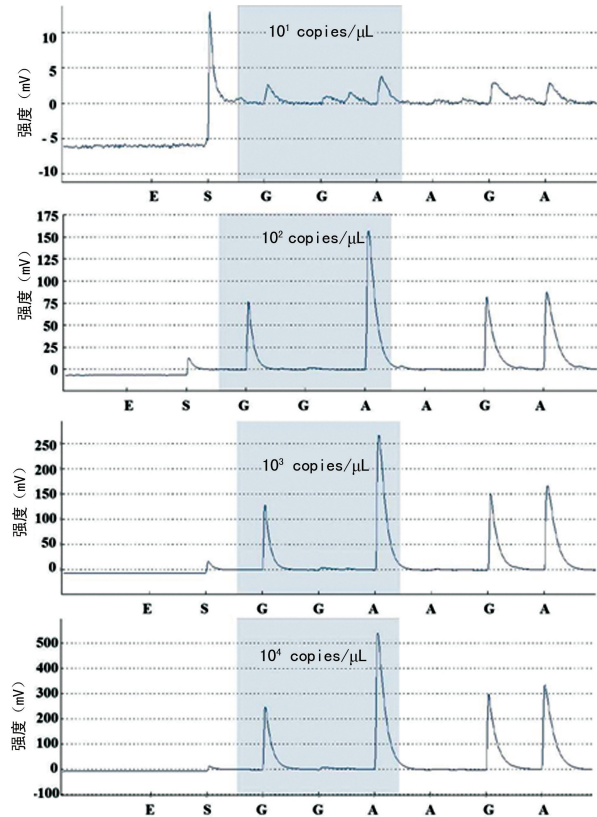


图 1 焦磷酸测序用于评估克拉霉素耐药基因检测的灵敏度

2.4 快速尿素酶试验与本研究建立方法的检出率评价 37 例患者的胃窦组织标本进行快速尿素酶试验检出 18 例阳性, Hp 感染检出率为 48.7%, 焦磷酸测序检出 30 例阳性, Hp 感染检出率为 81.1%。快速尿素酶检出的 18 例阳性标本中除 1 例外, 均与焦测序结果一致。但是由于焦磷酸测序的检测灵敏度高, 可检出低至 100 copies/ μ L 的模板分子, 对于 Hp 水平较低的标本也可以进行有效的检测, 因此对 Hp 感染的检出率明显高于快速尿素酶实验。此外 30 例阳性 Hp 感染的病例中, 发现 4 例克拉霉素耐药, 耐药率为 10.81%(4/37)。

2.5 ¹³C 尿素呼气试验与本研究建立方法的检出率评价 ¹³C 尿素呼气试验被誉为是 Hp 检测的金标

准, 为了对本方法的检出率进行进一步评价, 研究者另外收集了 8 例患者同时进行 ¹³C 尿素呼气试验和焦磷酸测序实验。呼气试验的 Hp 感染检出率为 75.0%, 本方法的检出率为 87.5%, 且阳性标本检出的一致率为 100.0%。

3 讨 论

幽门螺杆菌感染和胃癌的形成、发展有着密切的关系^[8], 中国也积极开展对 Hp 感染的防控工作^[2], 但是 Hp 的根除率却呈现逐渐下降的趋势^[9], 这与 Hp 的耐药性逐年升高有关^[10-11]。克拉霉素是 Hp 治疗三联疗法中最常用的抗菌药物之一, 流行病学数据表明克拉霉素耐药率也呈现出上升趋势^[12-13]。如能在治疗前准确测定 Hp 的耐药类型, 有针对性的调整抗菌药物治疗方案, 采用个体化三联疗法会达到事半功倍的效果。因此 Hp 治疗前耐药检测非常重要。传统的分离培养 Hp 药敏试验方法虽然特异性强, 但是会存在培养失败和耗时长的缺点, 无法及时为临床指导合理用药提供参考。实时荧光的方法可实现幽门螺杆菌的快速定量检测与分型鉴定, 但对序列存在突变的耐药片段进行检测时存在漏检现象^[14-15]。

本研究基于焦磷酸测序技术建立的 Hp 克拉霉素耐药基因的检测方法具备高灵敏、快速、半定量等优点。

4 结 论

本研究建立的方法在测定耐药情况的同时, 扩增 Hp 特有的 23S rRNA 基因序列, 可用于判定 Hp 感染情况; 通过治疗前后测序峰高的数值, 可进行 Hp 感染情况的半定量评价并初步评估治疗效果; 为 Hp 的克拉霉素耐药检测提供了一种新方案。

参考文献

[1] 张力, 万紫娟, 牛改红. 1 200 例健康体检人群幽门螺杆菌感染状况分析[J]. 微量元素与健康研究, 2018, 35(3): 92-93.

[2] 中华医学会消化病学分会幽门螺杆菌和消化性溃疡学组, 全国幽门螺杆菌研究协作组, 刘文忠, 等. 第五次全国幽门螺杆菌感染处理共识报告[J]. 胃肠病学, 2017, 22(6): 346-360.

[3] MALFERTHEINER P, MEGRAUD F, O' MORAIN C A, et al. Management of Helicobacter pylori infection-the Maastricht IV/Florence consensus report[J]. Gut, 2012, 61(5): 646-664.

[4] 段华容, 翟玉荣, 付强强. 抗幽门螺杆菌药物的临床研究进展[J]. 现代临床医学, 2017, 43(6): 406-409.

[5] 郭姝, 何利华, 张建中, 等. 儿童幽门螺杆菌耐药及对大环内酯类抗生素的耐药基因分析[J]. 中华医学杂志, 2014, 94(8): 563-566.

[6] HAMZA D, ELHELW R, ELHARIRI M, et al. Genotyping and antimicrobial resistance patterns of Helicobacter pylori in human and dogs associated (下转第 269 页)

- [3] DAYER M J, JONES S, PRENDERGAST B, et al. Incidence of infective endocarditis in England, 2000-13: a secular trend, interrupted time-series analysis [J]. *Lancet*, 2015, 385(9974): 1219-1228.
- [4] CECCHI E, TRINCHERO R, IMAZIO M, et al. Are the duke criteria really useful for the early bedside diagnosis of infective endocarditis? Results of a prospective multicenter trial [J]. *Ital Heart J*, 2005, 6(1): 41-48.
- [5] ZHANG H B, CHEN J, LAN Q F, et al. Diagnostic values of red cell distribution width, platelet distribution width and neutrophil-lymphocyte count ratio for sepsis [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(4): 2215-2219.
- [6] ELLAHONY D M, EL-MEKKAWY M S, FARAG M M. A study of red cell distribution width in neonatal sepsis [J]. *Pediatric Emerg Caere*, 2017; 1.
- [7] WOŁOWIEC Ł, ROGOWICZ D, BANACH J, et al. Prognostic significance of red cell distribution width and other red cell parameters in patients with chronic heart failure during two years of follow-up [J]. *Kardiol Pol*, 2016, 74(7): 657-664.
- [8] OZSU S, ABUL Y, GUNAYDIN S, et al. Prognostic value of red cell distribution width in patients with pulmonary embolism [J]. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2014, 20(4): 365-370.
- [9] TSELIU E, TERROVITIS J V, KALDARA E E, et al. Red blood cell distribution width is a significant prognostic marker in advanced heart failure, Independent of hemoglobin levels [J]. *Hellenic J Cardiol*, 2014, 55(6): 457-461.
- [10] ISIK T, KURT M, TANBOGA I H, et al. The impact of admission red cell distribution width on long-term cardiovascular events after primary percutaneous intervention: a four-year prospective study [J]. *Cardiol J*, 2016, 23(3): 281-288.
- [11] SAHIN O, AKPEK M, SARLI B, et al. Association of red blood cell distribution width levels with severity of coronary artery disease in patients with non-ST elevation myocardial infarction [J]. *Med Princ Pract*, 2015, 24(2): 178-183.
- [12] KIM N Y, CHUN D H, KIM S Y, et al. Prognostic value of systemic inflammatory indices, NLR, PLR, and MPV, for predicting 1-Year survival of patients undergoing cytoreductive surgery with HIPEC [J]. *J Clin Med*, 2019, 8(5): 589.
- [13] SEONG Y W, HAN S J, JUNG W, et al. Perioperative change in neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) is a prognostic factor in patients with completely resected primary pulmonary sarcomatoid carcinoma [J]. *J Thorac Dis*, 2019, 11(3): 819-826.
- [14] BROCA-GARCIA B E, SAAVEDRA M A, MARTINEZ-BENCOMO M, et al. Utility of neutrophil-to-lymphocyte ratio plus C-reactive protein for infection in systemic lupus erythematosus [J]. *Lupus*, 2019, 28(2): 217-222.
- [15] DJORDJEVIC D, RONDOVIC G, SURBATOVIC M A, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio, monocyte-to-lymphocyte ratio, platelet-to-lymphocyte ratio, and mean platelet volume-to-platelet count ratio as biomarkers in critically ill and injured patients; which ratio to choose to predict outcome and nature of bacteremia? [J]. *Mediators Inflamm*, 2018: 3758068.
- [16] CAHILL T J, BADDOUR L M, HABIB G, et al. Challenges in infective endocarditis [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2017, 69(3): 325-344.

(收稿日期: 2019-07-11 修回日期: 2019-10-17)

(上接第 264 页)

- with A2142G and A2143G point mutations in clarithromycin resistance [J]. *Micro Pathog*, 2018, 123(3): 330-338.
- [7] XIE Y, WANG Y, LI Z, et al. A systematic review and meta-analysis of genotypic methods for detecting antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* [J]. *Helicobacter*, 2018, 23(2): e12467.
- [8] 刘雪梅, 骆子义, 邱智辉, 等. 312 例胃底腺息肉临床及病理分析 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2016, 30(3): 270-272.
- [9] 向仍运, 李凯, 欧廷宏. 幽门螺杆菌感染的各种治疗方案对幽门螺杆菌根除率的对比分析 [J]. *实用医院临床杂志*, 2018, 15(3): 159-161.
- [10] 韩一凡, 于新娟, 王莉莉, 等. 中国幽门螺杆菌耐药情况研究 [J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2017, 26(6): 664-669.
- [11] 孙路, 何利华, 张艺瑶, 等. 幽门螺杆菌克拉霉素异质性耐药及其特征分析 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2018, 34(5): 391-395.
- [12] 何利华, 周丽雅, 刘国栋, 等. 2008—2014 年间北京地区幽门螺杆菌耐药变迁分析 [J]. *疾病监测*, 2018, 33(4): 285-288.
- [13] 刘军. 699 株幽门螺杆菌对常用抗菌药物的耐药情况分析 [J]. *中国医院用药评价与分析*, 2018, 18(2): 274-279.
- [14] 荣倩玉, 陈醒醒, 刘艺凝, 等. 幽门螺杆菌 TaqMan MGB 探针双重荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2018, 31(6): 572-579.
- [15] 孙婷, 陈泽鑫, 李鹏, 等. 幽门螺杆菌耐药性及三种耐药检测方法的比较 [J]. *世界华人消化杂志*, 2018, 26(18): 1111-1118.

(收稿日期: 2018-12-31 修回日期: 2019-04-08)