

• 论 著 •

基因检测指导耐克拉霉素幽门螺杆菌个体化治疗的研究*

尤文佳^{1,2}, 何帮顺¹, 潘玉琴¹, 孙慧玲¹, 许桃¹, 王书奎^{1△}

1. 南京医科大学附属南京医院中心实验室, 江苏南京 210000; 2. 江苏省泰兴市
人民医院输血科, 江苏泰兴 225400

摘要:目的 探讨幽门螺杆菌(Hp)对克拉霉素的耐药性及其与耐药基因突变检测的一致性,为临床制订个体化 Hp 根除治疗方案提供依据。**方法** 将在南京医科大学附属南京医院就诊,接受¹³C 呼气实验以及胃镜检查的初始未治疗 Hp 阳性患者 284 例纳入研究。从纳入研究的病例中随机抽取 222 例作为试验组进行克拉霉素药敏试验和耐药基因突变检测,其余 62 例作为对照组(不进行克拉霉素耐药的相关检测)。从胃黏膜活检标本中分离培养 Hp,用 K-B 法药敏试验检测分离的 Hp 菌株对克拉霉素的耐药性。采用聚合酶链反应(PCR)检测 Hp 克拉霉素耐药基因突变。对照组患者和药敏试验结果为敏感的患者给予奥美拉唑[20 mg 每日两次(bid)]+阿莫西林(1 000 mg bid)+克拉霉素(500 mg bid)治疗,药敏试验结果为耐药的患者给予奥美拉唑(20 mg bid)+阿莫西林(1 000 mg bid)+呋喃唑酮(100 mg bid)+铋剂治疗。连续服药 2 周,检测患者 Hp 根除情况。**结果** 从 222 例胃黏膜活检标本中成功培养出 222 株 Hp;克拉霉素药敏试验:敏感 155 例(69.82%),耐药 67 例(30.18%);克拉霉素耐药基因突变检测:23S rRNA V 区 A2143G 突变 68 例(94.44%),A2142G 突变 4 例(5.56%)。155 例敏感病例中,150 例(96.74%)23S rRNA V 区无突变,5 例(3.26%)23S rRNA V 区有突变;67 例耐药病例均为 23S rRNA V 区突变。药敏试验与耐药基因检测的一致性较好(Kappa=0.023, P=0.609)。试验组 Hp 根除率高于对照组(P<0.05)。**结论** Hp 对克拉霉素存在耐药情况,临床医生可结合克拉霉素药敏试验和耐药基因突变检测结果来制订个体化的 Hp 根除治疗方案。

关键词:幽门螺杆菌; 耐药; 克拉霉素; 23S rRNA

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.07.008 **中图法分类号:**R446.5

文章编号:1673-4130(2022)07-0806-04 **文献标志码:**A

Individualized treatment of Helicobacter pylori infection with clarithromycin resistance guided by Genetic test*

YOU Wenjia^{1,2}, HE Bangshun¹, PAN Yuqin¹, SUN Huiling¹, XU Tao¹, WANG Shukui^{1△}

1. General Clinical Research Center, Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210000, China; 2. Department of Blood Transfusion, Taixing People's Hospital, Taixing, Jiangsu 225400, China

Abstract: **Objective** To investigate the resistance of Helicobacter pylori(Hp) to clarithromycin and its consistency with the detection of drug resistance gene mutations, so as to provide evidence for the clinical formulate of individualized Hp eradication treatment plans. **Methods** A total of 284 initially untreated Hp-positive patients who had received ¹³C breath test and gastroscopy in Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University were enrolled in the study. From which 222 cases were randomly selected from the included cases as the experimental group for whom clarithromycin susceptibility testing and resistance gene mutation detection were performed, and the remaining 62 cases were used as the control group(no detection of clarithromycin resistance). Hp was isolated and cultured from gastric mucosal biopsy specimens, and the drug resistance of the isolated Hp strains to clarithromycin was detected by K-B method. The mutation of Hp clarithromycin resistance gene was detected by polymerase chain reaction(PCR). The control group and the sensitive patients were given omeprazole [20 mg twice a day(bid)] + amoxicillin(1 000 mg bid) + clarithromycin(500 mg bid) treatment. The patients with drug resistance were given omeprazole(20 mg bid) + amoxicillin(1 000 mg bid)

* 基金项目:江苏省社会发展项目重点研发计划项目(BE2019614)。
作者简介:尤文佳,女,主管技师,主要从事消化道肿瘤标志物研究。 △ 通信作者, E-mail: sk_wang@njmu.edu.cn。
本文引用格式:尤文佳,何帮顺,潘玉琴,等. 基因检测指导耐克拉霉素幽门螺杆菌个体化治疗的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2022, 43(7): 806-809.

+ furazolidone(100 mg bid) + bismuth. After taking the drug for 2 weeks, the eradication of Hp was detected. **Results** A total of 222 strains of Hp were successfully cultured from 222 gastric mucosal biopsy specimens; clarithromycin susceptibility test: 155 cases(69.82%) were sensitive and 67 cases(30.18%) were resistant; clarithromycin resistance gene mutation detection: there were 68 cases(94.44%) with 23S rRNA A2143G mutation in V region, and 4 cases(5.56%) with A2142G mutation. Among the 155 susceptible cases, 150 cases(96.74%) had no mutation in 23S rRNA V region, and 5 cases(3.26%) had mutation in 23S rRNA V region; all 67 resistant cases had mutations in 23S rRNA V region. The consistency of drug susceptibility test and drug resistance gene detection was good($Kappa=0.023, P=0.609$). The eradication rate of Hp in the experimental group was higher than that in the control group($P<0.05$). **Conclusion** Hp is resistant to clarithromycin, and clinicians can formulate individualized Hp eradication treatment plans based on the results of clarithromycin susceptibility test and resistance gene mutation detection.

Key words: Helicobacter pylori; drug resistance; clarithromycin; 23S rRNA

幽门螺杆菌(Hp)是一种微需氧的革兰阴性螺旋杆菌^[1]。Hp 感染与消化性溃疡、萎缩性胃炎、黏膜相关淋巴样组织(MALT)淋巴瘤及胃癌有密切的关系^[2]。Hp 的感染具有家族聚集性^[3],根除 Hp 能有效地阻断其传播,防止感染者发展成慢性胃炎,降低消化性溃疡发病率及复发率,有效缓解 MALT 淋巴瘤^[4],预防胃癌的发生^[5]。然而,随着药物根除 Hp 治疗的广泛应用及抗菌药物的滥用, Hp 耐药性逐年升高^[6], Hp 的根治率在不断下降。为了调查 Hp 对克拉霉素的耐药性,并探究其与耐药基因检测的一致性,本研究选用 K-B 法检测了 Hp 对克拉霉素的耐药性,并选用检测了这些临床分离菌株耐药基因突变状况。根据药敏试验结果进行个体化治疗并评价 Hp 根除情况,可以为耐药 Hp 的用药选择提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将 2018 年 4 月至 2018 年 12 月于南京医科大学附属南京医院就诊,初始未治疗但经¹³C 呼气试验检测为 Hp 阳性的 284 例 Hp 感染病例纳入研究(上述病例均在胃镜室采集过胃组织活检标本)。从纳入研究的病例中随机抽取 222 例作为试验组(将进行克拉霉素药敏试验和耐药基因突变检测),其余的 62 例作为对照组(不进行克拉霉素耐药的相关检测),两组间年龄、性别等一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。排除标准:(1)内镜检查证明有活动性出血者;(2)已接受过 Hp 根除治疗的患者;(3)近 2 周内服用过质子泵抑制剂、H₂ 受体拮抗剂以及近 4 周内服用过抗菌药物、铋剂者;(4)曾对本次医治所用的药物有过敏史或皮试阳性者;(5)孕期及哺乳期者;(6)患者同时服用非甾体抗炎药或酗酒者;(7)存在其他影响本研究结果的严重疾病,如严重的肝病、心脏病、呼吸系统疾病等。本研究经医院伦理委员会同意,所有患者均签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂 HF100 型三气培养箱为力康生物医疗科技控股有限公司产品;CX41RF 型光学显微镜为日本 Olympus 公司产品;Hp 标准株 NCTC11637 购自上海芯超医学检验所有限公司;HiPure Bacterial

DNA Kit 试剂盒购自美基生物有限公司;Hp 耐药突变位点检测试剂盒购自江苏默乐公司;PCR Mix 试剂购自上海翊圣生物科技有限公司;M-H 琼脂培养基(干粉)购自广东环凯生物公司;脑心浸出液肉汤购自海博生物公司。

1.3 方法

1.3.1 取样及培养 在胃镜下用灭菌活检钳夹取距幽门前 2~3 cm 大弯或小弯处胃黏膜组织,用接种环将组织黏膜连同细菌的混匀营养液均匀接种在分离培养基上。取少量菌液加入快速尿素酶反应管后标注编号,观察结果后记录。再将培养基放入培养箱($O_2:5\%, CO_2:10\%$, 温度:37℃)培养 3~5 d。取出初代培养成功的菌株进行二代培养,并进行细菌形态(革兰染色)和生化鉴定(快速尿素酶试验和氧化酶试验)。

1.3.2 药敏试验 取出二代菌的培养基,配制成 3×10^8 CFU/mL 的菌悬液 2 份各 800 μ L。将上述其中 1 份细菌悬液均分等体积分别均匀涂布于 2 块含 10% 羊血的 M-H 琼脂平板培养基上,将克拉霉素药敏纸片贴于平板(3 个/板),将平板放于培养箱中培养 48 h。按照中国药品生物制品检验制订的抗菌药物细菌耐药性检测中心发布的《抗菌药物药敏实验判定标准》^[7]判定抗菌药物药敏实验结果,以克拉霉素最低抑菌浓度 ≥ 1 mg/L 为耐药, <1 mg/L 为敏感。

1.3.3 Hp 基因组提取与耐药基因分析 使用 DNA 提取试剂盒进行 Hp 的基因组提取,PCR 检测耐药突变位点。PCR 反应体系:PCR Mix 25 μ L,引物(10 μ mol/L)5 μ L,水 10 μ L,DNA 10 μ L。PCR 反应条件:94℃预变性 5 min;94℃变性 10 s,55℃退火 20 s,72℃延伸 30 s,40 个循环;最后 72℃终延伸 5 min。

1.3.4 治疗 对照组患者及试验组中经药敏试验判定为敏感的患者给予奥美拉唑[20 mg 一日两次(bid)]+阿莫西林(1 000 mg bid)+克拉霉素(500 mg bid)方案治疗;试验组中经药敏试验判定为耐药的

mg bid)+呋喃唑酮(100 mg bid)+铋剂方案^[6]。连续服药 2 周,用药期间不得服用其他药物,每日三餐需分餐。停药 4 周后经¹³C 呼气实验,检测根除情况。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行数据分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验;采用 Kappa 一致性检验分析药敏试验与耐药基因突变检测结果的一致性;耐药率的比较采用 χ^2 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 药敏试验和耐药基因分析 试验组 222 例胃黏膜的活检标本中均分离出 Hp 菌株,涂片和革兰染色显示 Hp 菌株多呈弧形逗号状、海鸥形态、短杆弯曲,见图 1。K-B 法体外药敏试验显示:敏感 155 例(69.82%),耐药 67 例(30.18%)。PCR 检测:检测到 Hp 对克拉霉素的耐药基因突变为 23S rRNA V 区的 A2143G 和 A2142G 突变, A2143G 突变 68 例(94.44%), A2142G 突变 4 例(5.56%)。155 例敏感病例中,150 例(96.74%)23S rRNA V 区无突变,5 例(3.26%)23S rRNA V 区有突变,67 例耐药病例均为 23S rRNA V 区突变,见图 2。药敏试验与耐药基因检测的一致性较好(Kappa=0.023, $P = 0.609$)。

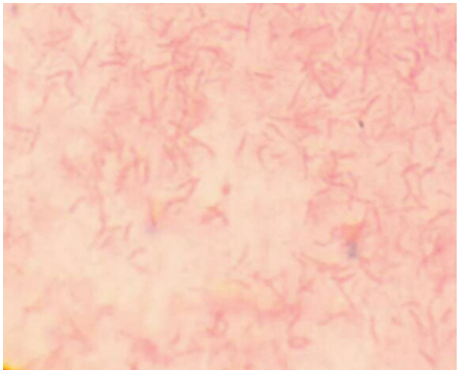
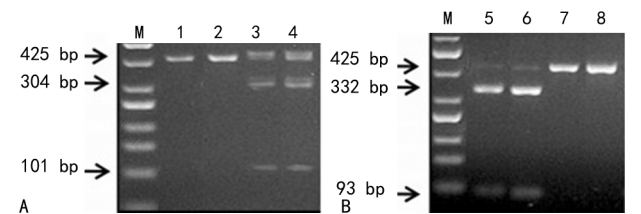


图 1 显微镜下观察 Hp 革兰染色形态(×1 000)



注: A 为 23S rRNA V 区突变位点 A2143G 的检测; B 为 23S rRNA V 区突变位点 A2142G 的检测; M 表示分子标准带; 1、2、7、8 表示 23S rRNA V 区无位点突变; 3、4 表示存在 23S rRNA V 区 A2143G 突变(304、101 bp 2 条带); 5、6 表示存在 23S rRNA V 区 A2142G 突变(332、93 bp 2 条带)。

图 2 对克拉霉素耐药相关基因的检测

2.2 试验组中敏感和耐药患者一般情况比较及各组间 Hp 根除疗效比较 试验组中的敏感和耐药患者一般资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。敏感和耐药患者的 Hp 根除率均超过 86.00%。对照组患者 Hp 根除率仅为 67.74%。试验组 Hp 根除率高于对照组($P < 0.05$),见表 2。

表 1 试验组中耐药和敏感患者的一般情况比较

项目	敏感患者 (<i>n</i> = 155)	耐药患者 (<i>n</i> = 67)	<i>P</i>
性别[<i>n</i> (%)]			0.090
男	95(61.29)	49(73.13)	
女	60(38.71)	18(26.87)	
年龄($\bar{x} \pm s$, 岁)	43.68 ± 6.35	45.32 ± 5.17	0.067
病种[<i>n</i> (%)]			0.126
慢性胃炎	80(51.61)	36(53.73)	
十二指肠球部溃疡	52(33.55)	15(22.39)	
胃溃疡	23(14.84)	16(23.88)	

表 2 各组间 Hp 根除率比较[*n*(%)]

分组	<i>n</i>	根除	未根除
试验组	222	193(86.94) *	29(4.05)
敏感	155	134(86.45) *	21(13.55)
耐药	67	59(88.06) *	8(11.94)
对照组	62	42(67.74)	20(32.26)

注:—表示该项无数据;与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

3 讨 论

根除 Hp 最好初次治疗就选用疗效高的方案,由于存在抗菌药物滥用和治疗方案不规范的情况, Hp 根除率呈下降趋势^[8-9]。目前,我国治疗 Hp 最常用的抗菌药物为克拉霉素,但临床实践显示 Hp 对克拉霉素的耐药率逐年上升,高达 20%~50%^[10],这也是 Hp 根除率下降的主要原因。有研究报道 Hp 耐药菌株感染者的 Hp 根除率为 20%~40%^[11],而理想的治疗方案的根除率需要超过 90%^[12]。在中国,不同地区 Hp 的耐药率也有差别^[13]。2009—2014 年,浙江省嘉兴市 Hp 克拉霉素耐药率为 17.76%^[14]。2013—2014 年,北京地区 Hp 克拉霉素耐药率为 52.6%^[15]。同时也有研究表明,克拉霉素在首次用药后,若根除治疗失败极易使细菌产生耐药性^[16]。因此,了解抗菌药物耐药情况对 Hp 根除方案的制订有着重要的指导作用。

本研究中,对照组 62 例患者 Hp 根除率仅有 67.74%,与文献报道基本吻合^[17]。本研究采用 PCR 检测 Hp 23S rRNA V 区的克拉霉素耐药基因突变,结果显示突变位点有 2 个,分别为 A2143G 和 A2142G。既往的研究表明, Hp23S rRNA V 区域的点突变是导致大环内酯类抗菌药物耐药的主要原因,抑制了克拉霉素与相应的核糖体亚基的结合,造成蛋白质合成障碍^[18-19]。本研究中的一致性分析显示:克拉霉素耐药的药敏试验结果与 Hp23S rRNA V 区基因突变的检出有高度的一致性;155 例敏感患者中有 150 例(96.74%)23S rRNA V 区基因无突变,5 例(3.26%)23S rRNA V 区基因发生突变;67 例耐药患

者均有 23S rRNA V 区基因突变。仍有克拉霉素敏感的患者检出 23S rRNA V 区基因突变,这是否与杂合感染的存在或者是细菌本身存在多种突变相关,仍需要进一步的探讨。

将 62 例未进行药敏试验的患者作为对照组,给予奥美拉唑+阿莫西林+克拉霉素治疗;222 例患者作为试验组,其中 155 例敏感患者同样给予奥美拉唑+阿莫西林+克拉霉素治疗,67 例耐药患者给予奥美拉唑+阿莫西林+呋喃唑酮+铋剂治疗。给予连续 2 周的治疗,结果显示,试验组患者有较好的 Hp 根除疗效,两类患者的 Hp 根除率均超过 86%^[20],Hp 根除率明显高于对照组(67.74%)。

本研究中,对耐药患者直接使用呋喃唑酮进行治疗,可提升初次治疗的根治率,减少患者无效抗菌药物使用;对敏感患者使用克林霉素,可避免直接使用更高级的抗菌药物呋喃唑酮,减少临床抗菌药物滥用。对于存在 Hp 感染的患者,先进行药敏试验或耐药基因检测,然后制订个体化的治疗方案,可以达到精准给药的目的,提高 Hp 的根除率,减少抗菌药物滥用。

综上所述,本研究发现 Hp 对一线治疗药物克拉霉素存在耐药情况,应结合药敏试验和耐药基因突变检测进行针对性地治疗,有效根除 Hp。

参考文献

- [1] PERENZ A, ON A, KOIEFMAN H, et al. BACTEC FX system as a tool for culturing gastric biopsies and *Helicobacter pylori* diagnosis[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2013, 32(12): 1541-1543.
- [2] 黄晔. 上消化道疾病患者幽门螺旋杆菌感染的调查分析[J]. 中南医学科学杂志, 2015, 43(5): 542-545.
- [3] KAYALI S, MANFREDI M, GAIANI F, et al. *Helicobacter pylori*, transmission routes and recurrence of infection; state of the art[J]. Acta Biomed, 2018, 89(8): 72-76.
- [4] KOTERA T, ITANI K, UCHIYAMA H, et al. A rare combination of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma, autoimmune gastritis, thyroiditis, hemolysis, and systemic lupus erythematosus[J]. Intern Med, 2020, 59(1): 61-65.
- [5] WU J Y, LEE Y C, GRAHAM D Y. The eradication of *Helicobacter pylori* to prevent gastric cancer; a critical appraisal[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 13(1): 17-24.
- [6] 刘文忠, 谢勇, 陆红, 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.
- [7] 姜葵, 张建中, 潘国中, 等. 幽门螺旋杆菌耐药性检测[J]. 中国人兽共患病杂志, 2000, 16(6): 76-78.
- [8] XUE Y, FENG H, ZHOU L Y, et al. Analysis of related

of *H. pylori* eradication therapy efficiency[J]. Chin J Pract Int Med, 2012, 14(4): 333.

- [9] MEGRAUD F, COENEN S, VERSPORTEN A, et al. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption[J]. Gut, 2013, 62(1): 34-42.
- [10] YI D M, YANG T T, CHAO S H, et al. Comparison the cost-efficacy of furazolidone-based versus clarithromycin-based quadruple therapy in initial treatment of *Helicobacter pylori* infection in a variable clarithromycin drug-resistant region, a single-center, prospective, randomized, open-label study[J]. Medicine (Baltimore), 2019, 98(6): e14408.
- [11] GRAHAM D Y, DORE M P. *Helicobacter pylori* therapy: a paradigm shift[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2016, 14(6): 577-585.
- [12] SUGANO K, TACK J, KUIPERS E J, et al. Kyotoglobal consensus report on *Helicobacter pylori* gastritis[J]. Gut, 2015, 64(9): 1353-1367.
- [13] LIU D S, WANG Y H, ZENG Z R, et al. Primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* in Chinese patients: a multiregion prospective 7-year study[J]. Clin. Microbiol. Infect, 2018, 24(7): 780. e5-780. e8.
- [14] JI Z, HAN F, MENG F, et al. The association of age and antibiotic resistance of *Helicobacter pylori*: a study in Jiaying city, Zhejiang province, China[J]. Medicine (Baltimore), 2016, 95(8): e2831.
- [15] ZHANG Y X, ZHOU L Y, SONG Z Q, et al. Primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains isolated from patients with dyspeptic symptoms in Beijing: a prospective serial study[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(9): 2786-2792.
- [16] LIU D S, WANG Y H, ZHU Z H, et al. Characteristics of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance; data from four different populations[J]. Antimicrob Resist Infect Control, 2019, 8: 192.
- [17] 张万岱, 胡伏莲, 萧树东, 等. 中国自然人群幽门螺旋杆菌感染的流行病学调查[J]. 现代消化及介入诊疗, 2010, 15(5): 265-270.
- [18] KOCAZEYBEK B, SAKLI M K, YUKSEL P, et al. Comparison of new and classical point mutations associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from dyspeptic patients and their effects on phenotypic clarithromycin resistance[J]. J Med Microbiol, 2019, 68(4): 566-573.
- [19] 李娜, 聂占国. 幽门螺旋杆菌对抗生素耐药现状及其机制研究进展[J]. 山东医药, 2013, 53(16): 85-88.
- [20] 吴珍萍, 王群英, 滕卫军, 等. “三明治”方案补救治疗幽门螺旋杆菌感染的疗效观察[J]. 浙江医学, 2021, 43(6): 649-652.