

幽门螺杆菌耐药基因检测的研究现状

何恒, 王洪明, 迟晶

■背景资料

抗生素的广泛应用使 *H pylori* 对抗生素的耐药性和耐药率逐渐增加, 而对 *H pylori* 的根除率却逐渐降低, 选择快速敏感价廉的分子生物学技术对 *H pylori* 耐药基因进行检测, 成为了临床医生选择合理抗生素的关键。

何恒, 王洪明, 迟晶, 中国医科大学附属第一医院消化科 辽宁省沈阳市 110001

作者贡献分布: 何恒与迟晶对此文所作贡献均等; 此课题由何恒、迟晶设计; 研究过程由何恒、王洪明、迟晶操作完成; 数据分析由何恒、迟晶、王洪明完成; 本论文写作由何恒、迟晶、王洪明完成。

通讯作者: 迟晶, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院消化科. cj729302@126.com

电话: 024-22734313

收稿日期: 2007-07-22 修回日期: 2008-01-17

Detection of the drug-resistant gene of *Helicobacter pylori*

Heng He, Hong-Ming Wang, Jing Chi

Heng He, Hong-Ming Wang, Jing Chi, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Jing Chi, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. cj729302@126.com

Received: 2007-07-22 Revised: 2008-01-17

Abstract

Antibiotic-resistant *Helicobacter pylori* (*H pylori*) and the resistance rate are increased due to the wide use of antibiotics. At present, the detection of antibiotic-resistant *H pylori* is focused on the clarithromycin and metronidazole resistance testing using PCR-based molecular biology techniques. However, PCR-restriction fragment length polymorphism and real-time PCR in combination with melting curve analysis techniques have a broad prospect in detecting drug-resistant clarithromycin. They can detect it from tissue biopsy and stool samples, and thus can be used in detecting the resistance of a wide range of antibiotics. Western blot and PCR-restriction fragment length polymorphism can also detect the resistance of metronidazole, and can therefore develop into the routine procedures for detecting drug-resistant *H pylori*.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Drug resistance mechanisms; Drug-resistant gene; Detection methods

He H, Wang HM, Chi J. Detection of the drug-resistant

gene of *Helicobacter pylori*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(5): 510-516

摘要

抗生素的广泛应用使幽门螺杆菌(*H pylori*)对抗生素的耐药性和耐药率逐渐增加, 目前对幽门螺杆菌耐药的检测方法重点在对克拉霉素和甲硝唑两种抗生素耐药的检测, 其检测方法主要是基于聚合酶链式反应为基础的分子生物学技术, 其对克拉霉素发展前景广阔的是聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性分析技术和实时定量聚合酶链式反应结合解链曲线分析技术, 可对活检组织和粪便两种样本进行检测, 同时可以对多种抗生素进行耐药检测; 其对甲硝唑耐药的检测主要是免疫印迹法和聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性分析技术, 有望发展成检测 *H pylori* 耐药的常规项目。

关键词: 幽门螺杆菌; 耐药机制; 耐药基因; 检测方法

何恒, 王洪明, 迟晶. 幽门螺杆菌耐药基因检测的研究现状. 世界华人消化杂志 2008; 16(5): 510-516

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/510.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*H pylori*)在人群中传播广泛, 致病性强, *H pylori* 的感染与慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌以及胃黏膜相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤密切相关, *H pylori* 的清除与根治, 直接关系到这些疾病的转归及预后^[1-5]。随着抗生素的广泛应用, *H pylori* 耐药菌株的发生率逐年上升, 根除的难度逐渐增加。最近报道 *H pylori* 耐药是全球性的, 其耐药是导致根除治疗失败的主要原因^[6-7]。对 *H pylori* 根除治疗的常用抗生素有: 克拉霉素、甲硝唑、阿莫西林、四环素及喹诺酮类等, 大多数 *H pylori* 菌株对这些抗生素的耐药是由突变引起的, 包括自发突变和通过耐药信息的传递引起的突变等。 *H pylori* 对抗生素耐药的检测目前已经不再局限于传统的药物敏感性试验, 由传统的细菌培养、药物敏

■同行评议者

杨昭徐, 教授, 首都医科大学附属北京天坛医院消化科

感试验逐渐转向分子生物学检测方法, 耐药基因突变的检测若能成为*H pylori*检查的常规项目, 无论从患者的医药费开支还是药物对患者引起的不良反应方面, 均有重要意义, 本文就目前对*H pylori*耐药基因检测的最新进展作一综述。

1 *H pylori*对克拉霉素耐药的基因检测

克拉霉素的化学名称是6-甲基红霉素, 是当前应用最广泛的大环内酯类抗生素。该药具有耐酸和能溶解于酸性pH胃液中的特性及*po*后生物利用率高、副作用少等优点。因而, 近年新的抗*H pylori*三联或四联治疗方案中将其作为主要首选药物。克拉霉素的抗菌机制是药物穿透入菌体细胞内, 与核糖体紧密结合, 作用于23S rRNA V区的多肽转移环, 抑制多肽转移酶, 影响核糖体的移位过程, 阻止肽链延长, 从而抑制细菌蛋白质的合成, 达到杀菌目的。但是据报道克拉霉素对敏感菌株和耐药菌株的根除率分别为95%和40%^[8]。关于*H pylori*对克拉霉素的耐药机制, 比较一致的观点是*H pylori* 23S rRNA基因点突变引起克拉霉素与核糖体结合力下降^[9-10], 突变位点包括A2142G、A2142C、A2143G、A2143C、T2717C、T2182C、A2144T、C2245T、T2289C等^[11-15], 其中主要突变位点是: A2142G、A2142C和A2143G。新近快速发展的应用分子生物学技术检测*H pylori*耐药性的实验方法多是检测上游突变位点。用来检测的样本主要为活检胃组织、胃液, 以及近年来备受关注的可用来无创检测的粪便样本等。检测的方法主要是基于分子生物学的PCR技术, 其中近年来应用较广, 效果较好的检测方法有以下几种:

1.1 聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性分析技术(PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism, PCR-RFLP) PCR-RFLP是将目的基因片段PCR扩增后, 利用多种限制性内切酶对扩增产物进行酶切, 不同的基因序列会产生不同的酶切产物, 从而产生不同的电泳图谱, 通过与标准物的对比即可检测出有无变异。Fontana *et al*^[16]先利用半巢式PCR扩增长约783 bp的23S rRNA基因, 扩增的敏感度和特异度均为100%, 然后用限制性内切酶*Bsa* I (A2143G), *Mbo* II (A2142C/G), 和*Hha* I (T2717C)切割目的片段, 可以检测23S rRNA基因点突变的位点。Rimbara *et al*^[17]用巢式PCR-RFLP技术检测粪便中的23S rRNA基因的点突变, 结果在耐药菌株(MIC>1 mg/L)中检测出A2143G位点的突变, Sevin

et al^[18]用此方法检测出A2143G和A2144G位点的突变, 与通过培养*H pylori*来检测耐药菌株的方法相比, 此方法简单、敏感、准确, 是一种非创伤性的检测方法, 临床应用前景广阔, 但是存在临床标本易被污染的缺点。

1.2 实时定量PCR(real-time PCR) 结合解链曲线(melting curve)分析技术此方法的基本原理是寡核苷酸探针与模板结合时, 不匹配碱基将显著影响双链解链温度(*T_m*), 探针与模板完全配对时的*T_m*值比单个碱基错配时的*T_m*值要高, 通过LightCycler实时监测升温时Cy5的荧光信号强度变化以LightCycler软件生成的解链曲线, 了解不同扩增产物的*T_m*值, 便可判断耐药基因的突变。Schabereiter-Gurtner *et al*^[19]应用实时定量PCR结合解链曲线分析的方法, 分别检测92个*H pylori*感染的胃组织标本及粪便标本, 结果显示野生型*H pylori*解链温度为63℃, A2142C突变的菌株解链温度为58℃, A2142G和A2143G突变的菌株解链温度为54℃, 用E-test检测患者的标本, 耐药菌株的最小抑菌浓度(MIC)≥1.0 mg/L, 92例患者中有11例对克拉霉素耐药, 相比之下实时定量PCR检测活检组织有9例耐药, 粪便样本检测中有8例耐药, 其敏感度为64%, 特异度分别为94%和97%。此方法简单准确, 除可以用来检测克拉霉素耐药基因以外, 其检测*H pylori*感染的敏感度和特异度都达到了90%以上, 是检测*H pylori*治疗后情况的一种非创伤性的方法。

1.3 荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH) PCR-FISH是将DNA探针用特殊修饰的核苷酸分子标记(如biotin-dUTP或digoxigenin-dUTP), 然后将标记的探针直接原位杂交到染色体或DNA纤维切片上, 再用与荧光素分子偶联的单克隆抗体与探针分子特异性结合来检测DNA序列在染色体或DNA纤维上的定位。*H pylori*对克拉霉素耐药性的3个突变位点可以特异性的被ClaR1(A2143G), ClaR2(A2144G), 及ClaR3(A2143C)探针所标记, 不同的突变位点对应不同的抗生素最小抑菌浓度, ClaR1>64 mg/L, ClaR2和ClaR3抑菌浓度为8-64 mg/L^[20-22]。Morris *et al*^[20]应用琼脂扩散法确定的敏感与耐药样本, 从286例*H pylori*培养阳性的样本中, 随机选取35例克拉霉素敏感样本和33例克拉霉素耐药样本, 对PCR-FISH的检验效能进行验证, 结果表明PCR-FISH对克拉霉素耐药检测的敏感度达94%, 特异度达86%, 并且此方法可以解释用琼脂扩散法确定的敏感菌株为何治疗失败, 因其在对克拉霉素耐药和敏感的混合菌株。但

■研发前沿

目前对*H pylori*研究的重点是耐药基因及其检测, 开发快速、敏感、价廉的应用分子生物学技术对其耐药基因进行检测, 并应用于临床, 成为亟待解决的问题。

■相关报道

胡伏莲 *et al* 在 *H pylori* 耐药研究进展中, 从 *H pylori* 的流行病学、耐药机制、根除失败原因、治疗及研制和开发 *H pylori* 疫苗的重要性进行了多层次分析。

是也存在此法不能确定除克拉霉素外其他抗生素的耐药性。此方法具有快速、特异性高、准确、经济的优点, 是检测 *H pylori* 感染及其对大环内脂类抗生素敏感性的方法^[23]。

1.4 以PCR为基础的变性高效液相色谱分析技术(PCR-based denaturing high-performance liquid chromatography assay, PCR-DHPLC) PCR-DHPLC检测系统的原理是基于未解链的和部分解链的双链DNA在部分失活条件下具有不同保留的性质。杂合子个体的DNA经PCR扩增产生异源双链, 由于错配位点的氢键被破坏, 因此在异源双链上形成“鼓泡”, 导致他与纯合子个体的DNA扩增产物(完全匹配的同源双链)的解链特征不同。在部分加热变性的条件下, 异源双链DNA分子更易于解链形成Y形结构, 与固定相的结合能力降低, 将先于同源双链被洗脱出来, 带有突变序列的样品呈现出异源双链和同源双链混合物的峰形特点, 而不含突变序列的样品则只有同源双链的峰形。据此可检测出含有单个碱基的置换、插入或缺失的异源双链片段, 从而提供有无突变的信息, 然后再利用序列分析的方法来确定突变的类型和位点。Posteraro *et al*^[24]用此方法检测94例 *H pylori* 感染的样本, 结果发现有51例存在对克拉霉素的耐药, 与E-test的检验结果一样, 其敏感度和特异度都达到100%, 并且分析检测的51例耐药菌株的DNA序列, 发现有25例A2143G突变, 15例A2142G突变, 7例A2142C突变, 此外还发现了3例T2182C突变, 1例C2195T突变, 此方法是一种简单, 快速, 功能强大发现基因突变的技术, 使临床上检测耐药基因的突变成为可能, 但是只能提供样本有无突变的信息, 需要结合序列分析才能得出具体的突变类型。

1.5 优势同源形成分析技术(preferential homoduplex formation assay, PHFA) PHFA是根据同源双链较异源双链优先形成的原理, 将双标记的双链DNA探针与未标记的双链DNA样品进行混合、变性, 当标记的DNA的序列与未标记的DNA序列相同时, 同源双链之间可以进行杂交。由于未标记的DNA分子的稀释, 双标记的双链DNA的比例将会减少。当两者的DNA序列不相同甚至仅一个碱基存在差异时, 同源双链优先形成, 双标记双链DNA分子的比例不会减少。在双标记双链DNA中, 一条标有生物素的DNA链可通过生物素与亲和素之间的亲和力和连接于亲和素包被的微量滴定板上, 当加

入碱性磷酸酶标记的抗DNP抗体和硝基苯酚磷酸盐(p-NPP), 标有DNP的DNA链就可以通过与酶标DNP抗体和p-NPP结合发生的显色反应进行检测。通过制备针对 *H pylori* 23S rRNA基因特定位点突变的双标记双链DNA探针, 可以检测耐药的突变基因。Maeda *et al*^[25]应用PHFA测定412例 *H pylori* 感染的患者23S rRNA基因的突变, 发现337例是纯野生菌株感染, 38例发生单纯A2144G突变, 37例存在野生菌株和突变菌株的混合感染(30例A2144G突变, 5例A2143G突变, 2例A2144G突变和A2143G突变)。与琼脂糖稀释法作比较测定186例 *H pylori* 感染的患者, 结果显示PHFA测定的纯野生菌株感染的149例中有147例在琼脂糖稀释法中的最小抑菌浓度小于0.2 mg/L, 纯突变菌株感染的18例最小抑菌浓度都大于3.13 mg/L, 而在19例混合菌株感染的病例中, 10例最小抑菌浓度小于0.1 mg/L, 9例大于3.13 mg/L, 其敏感度达到95%以上, 并且与PCR-RFLP相比较, PHFA最大的优势是可以检测到只有10个基因拷贝的 *H pylori*, 检测出耐药菌株和野生菌株同时感染的患者。

1.6 反向杂交 反向杂交是用标记的待检测核酸与未标记的固化DNA探针杂交, 目前研究较多的是PCR线性探针分析(PCR-line probe assay[LiPA])。PCR-LiPA检测 *H pylori* 23S rDNA突变的位点, 即先用PCR的方法, 以生物素标记的引物来扩增23S rDNA的某一基因片段, 生物素化的PCR扩增产物变性后, 再与固定在硝酸纤维素膜上的特殊寡聚核苷酸探针杂交, 从而确定有无突变及突变的位点。van Doorn *et al*^[26]通过多中心实验研究, 在不同国家六个实验室的299例 *H pylori* 感染的患者中, 利用最小抑菌浓度试验区分出133例耐药菌株和169例敏感菌株, 而利用PCR-LiPA技术检测其结果在133例耐药菌株中127例存在23S rDNA点突变, 其主要突变位点A2143G占45.2%, A2142G占33.3%。而多位点突变占19.8%, 在169例敏感菌株中167例未发生基因突变。其敏感度和特异度都在95%以上, 此方法准确可靠, 并且可以检测多个耐药基因位点的突变, 其临床发展前景十分广泛。

2 *H pylori*对硝基咪唑类似物耐药的基因检测

近年 *H pylori* 对硝基咪唑的耐药也呈上升趋势, 严重影响 *H pylori* 的根除。据报道, 兰索拉唑+克拉霉素+甲硝唑的三联疗法对咪唑敏感菌株的 *H pylori* 根除率为83%, 而对耐药菌株的根除率仅为63%^[27]。硝基咪唑类药物治疗 *H pylori* 的主要

机制是在特有的低氧化还原电势和硝基还原酶的作用下, 还原产生亚硝基衍生物和羟胺衍生物引起DNA的损伤和细菌的死亡^[28]. 研究表明 *H pylori* 对硝基咪唑耐药性的产生, 主要是由于无法获得足够低的氧化还原电位^[29]. *H pylori* 有多个硝基还原酶, 包括: NADPH黄素氧化还原酶、氧不敏感的NAPH硝基还原酶、铁氧还蛋白和黄素氧还蛋白等, 其中 $rdxA$ 基因编码的氧不敏感的NADPH硝基还原酶起主要作用^[30-31]. $rdxA$ 基因的突变包括易位突变、错义突变、片段缺失、片段插入等, 可使此酶活性降低, 是导致 *H pylori* 对硝基咪唑耐药的主要机制^[32-33]. 但是 rdx 突变类型与耐药程度不相关, 而且发现耐药菌株来自敏感菌株 rdx 基因的起始突变, 并非水平基因的转移. 此外 $frxA$ 基因(编码黄素氧化还原酶)、 $frxB$ 基因(编码铁氧还蛋白类似物)、 $rdxA$ 基因、 $rdxB$ 基因、 $porA$ 基因的突变也可能影响 *H pylori* 对硝基咪唑类药物的耐药^[34-35], Han *et al*^[36]研究发现 $frxA$ 基因突变能够增强 rdx 基因突变导致的耐药性.

虽然硝基咪唑类药物的耐药与 rdx 基因和其他编码还原酶的基因突变有关, 但是到目前为止还没有一种高效的分析方法检测硝基咪唑类药物的耐药. 公认的检测 *H pylori* 抗生素敏感性方法, 如琼脂糖稀释法、E-test、肉汤微量稀释法等检测硝基咪唑类药物耐药方面得不到满意的结果, 且这些方法费时, 费用高, 技术含量要求较高, 需胃镜下取材, 给患者带来一定的痛苦和创伤. 目前对甲硝唑的耐药的检测主要有两种分子生物学技术.

2.1 免疫印迹法 Latham *et al*^[37]用PCR扩增26695菌株中的 $rdxA$ 基因, 扩增产物经限制性内切酶 *EcoR* I and *Pst* I 酶切后的限制性片段转入到质粒表达载体PMAL-C2上, 用亲和层析法得到净化的MalE- $rdxA$ 融合蛋白(M_r 66 000), 和费氏完全佐剂一起免疫兔子, 6 wk之后分离得到抗 $rdxA$ 蛋白抗体. 再利用免疫印迹的方法, 用特异性的抗 $rdxA$ 蛋白抗体检测耐药菌株, 结果发现27株甲硝唑耐药菌中有25株存在 M_r 24 000 $rdxA$ 蛋白的免疫化合物缺失(93%), 而17株甲硝唑敏感菌株均表达此蛋白. 此方法的最大优点是能够检测出所有影响 $rdxA$ 基因表达的耐药菌株, 包括那些用核苷酸序列分析没有被发现的菌株, 有望成为新的用于临床的检测方法.

2.2 PCR-RFLP 田拥军 *et al*^[38]利用PCR-RFLP将 $rdxA$ 基因分成两个基因型: $rdxA$ 基因 I 型和

$rdxA$ 基因 II 型, 同时与甲硝唑耐药进行统计学分析, 有显著意义, 其 $rdxA$ 基因 II 型中耐药菌株占84%, 敏感菌株占16%. 可以认为 $rdxA$ 基因 II 型是 *H pylori* 耐甲硝唑的特征型别, 如果菌株为 II 型, 则耐药机率大.

3 *H pylori* 对阿莫西林耐药的基因检测

阿莫西林是用于治疗 *H pylori* 感染的唯一 β 内酰胺药物, 其对 *H pylori* 的MIC非常低, β 内酰胺类抗生素能穿越细菌细胞壁, 与细菌内膜的青霉素结合蛋白结合, 干扰细胞壁合成导致细菌死亡. 由于这些位点能与青霉素G共价结合, 故称之为青霉素结合蛋白酶(penicillin-binding protease, PBP). 尽管过去20多年中阿莫西林广泛用于抗菌治疗, 但 *H pylori* 对阿莫西林的耐药仍非常少见^[39]. 对阿莫西林耐药的 *H pylori* 菌株中没有检测到 β 内酰胺酶活性, 其基因的青霉素结合位点的突变是引起阿莫西林耐药的原因. Dore *et al*^[40]报道阿莫西林耐药株仅有3种青霉素结合蛋白酶(PBP-A、B、C), 其PBP-D缺失, 敏感菌株中PBP 4种成分都有. 表明PBP-D表达的改变在 *H pylori* 对阿莫西林的耐药中起重要作用. DeLoney *et al*^[41]报道的结果为: PBP1结合能力的下降和细胞对 β -内酰胺类抗生素的摄取能力下降为 *H pylori* 对阿莫西林耐药的主要原因. 在分子水平的研究显示PBP1的氨基酸序列发生改变导致PBP与阿莫西林的结合力下降, 并且细胞内青霉素的浓度也由于 *H pylori* 质子泵蛋白B、C的结构改变而下降^[42]. 目前研究 *H pylori* 对阿莫西林耐药基因的检测的方法很少, 其 *H pylori* 对阿莫西林的最小抑菌浓度的报道也没有统一的标准. Gerrits *et al*^[43]提出的在PBP1A基因多重突变变化是 *H pylori* 对阿莫西林耐药的主要原因, 目前这项研究的发现否定了用分子生物学技术快速检测 *H pylori* 对阿莫西林耐药的可能性.

4 *H pylori* 对喹诺酮耐药的基因检测

随着 *H pylori* 对克拉霉素和甲硝唑类的耐药率不断地上升, 喹诺酮类作为二线根除 *H pylori* 的抗生素成为关注的重点^[44], 对喹诺酮类耐药性的研究也越来越多^[45-47]. 喹诺酮类药物主要是抑制细菌复制过程中所必需的DNA回旋酶和拓扑异构酶IV的作用, 从而抑制细菌的繁殖, 产生抗菌活性. DNA回旋酶的A、B两个亚单位分别由 $gyrA$ 和 $gyrB$ 基因编码, 而拓扑异构酶IV的C亚单位和两个E亚单位分别由 $parC$ 和 $parE$ 基因编码. 其中 $gyrA$ 和 $parC$ 基因突变导致的耐药比

■创新盘点

本文根据国内外最新资料, 分析了目前 *H pylori* 对抗生素的耐药及其耐药基因位点的突变, 并对目前研究的多种分子生物学技术的原理及其检测耐药基因的优缺点做了相应的比较.

■应用要点

分子生物学技术对*H pylori*基因的耐药位点进行检测,必将提高*H pylori*的根除率。

较常见,突变位点集中的区域称为喹诺酮耐药决定区(quinolone resistance-determining region, QRDR)^[48],这个区域内发生基因突变会导致大部分细菌产生高水平的耐药。研究显示,*H pylori*对喹诺酮类抗生素的耐药机制主要是由于编码回旋酶的*gyrA*基因QRDR区域内点突变造成的^[49],*gyrA*基因突变相对应的氨基酸位置主要有87位天冬酰胺突变为赖氨酸,88位丙氨酸突变为缬氨酸,91位天冬氨酸突变为谷氨酸,或者天冬酰胺,或者酪氨酸^[50],此外Cattoir *et al*^[51]发现了三个新的突变位点分别是86位天冬氨酸突变为天冬酰胺、87位苏氨酸突变为异亮氨酸、87位天冬酰胺突变为丙酮酸,并且发现后两种87位氨基酸突变与*H pylori*对喹诺酮类抗生素的获得性耐药有关。目前*H pylori*在传统的检测抗生素敏感的试验中存在易污染和生长不足的缺点,Glocker *et al*^[52]应用实时定量PCR结合荧光共振能转换技术(fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR)对*gyrA*基因进行检测,结果发现87位氨基酸基因突变菌株的解链温度为48.7℃,91位氨基酸基因突变的解链温度分别为:58.5℃、52℃、44.6℃,而野生型菌株的解链温度分别为57℃和47.4℃,从而可以检测出对喹诺酮类药物耐药的菌株,筛选出敏感的患者用喹诺酮类药物进行*H pylori*根除治疗。

5 *H pylori*对四环素耐药的基因检测

四环素是一种廉价有效的治疗*H pylori*感染的抗生素。作为二线治疗的药物,四环素通过结合核糖体的30S小亚基,阻止蛋白质的翻译过程达到抗菌的目的,主要的结合点位于16S rRNA区域^[53]。但是近几年来据报道,四环素耐药性显著的增加。Dailidienne *et al*^[54]已经从159例临床病例中分离出六种四环素耐药的菌株。研究发现16S rRNA基因的突变是导致四环素耐药的主要机制。其分离的六个耐药菌株中有五个是16S rRNA基因发生突变。Gerrits *et al*^[55]发现16S rRNA基因的三个碱基对AGA926-928突变为TTC与*H pylori*对四环素高水平的耐药(MIC 8-64 mg/L)有关,而单个碱基对或者两个碱基对的突变只会导致低水平的耐药(MIC<4 mg/L)或者*H pylori*生长速度的减慢。而Nonaka *et al*^[56]研究发现16S rRNA的965-967位点的核苷酸的替换也和四环素的耐药有关。目前研究其耐药机制并不单纯集中在16S rRNA基因突变上,还与幽门螺杆菌细胞膜的通透性等多方面的因素有关。

传统对四环素的敏感检测主要为琼脂扩散法和琼脂稀释法,但是其检测缓慢、费时,并且其培养过程中存在*H pylori*生长缓慢、易被其他细菌污染的缺点,目前对其耐药基因的检测主要集中在分子生物学技术,实时定量PCR技术发展成为其快速准确检测16S rRNA点突变的主要技术^[57-58],Lawson *et al*^[57]利用实时定量PCR技术从1006例*H pylori*感染的患者中检测出18例患者对四环素降低了敏感性,其野生型菌株的解链温度68℃,而点突变A928C的解链温度是66℃,A926C的解链温度是64℃,A926G的解链温度是63℃,A926T/A928C的解链温度是62℃,三个碱基对AGA926-928突变为TTC的解链温度是61℃,从而可以确定*H pylori*菌株的耐药性。

了解*H pylori*的耐药状况对选择正确的治疗方案有非常重要的作用^[59],上述分子生物学检测技术何时成为一种快速敏感价廉的方法,对*H pylori*耐药基因进行检测,并广泛的应用到临床,成为目前研究的重点,相信在不远的将来必会有新的研究方法应用到临床,指导临床医生选择合理有效的抗生素,提高*H pylori*的根除率。

6 参考文献

- 1 Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, Stemmermann GN, Nomura A. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 1995; 55: 2111-2115
- 2 Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Perez-Perez GI, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* infection and the risk for duodenal and gastric ulceration. *Ann Intern Med* 1994; 120: 977-981
- 3 Asenjo LM, Gisbert JP. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in gastric MALT lymphoma: a systematic review. *Rev Esp Enferm Dig* 2007; 99: 398-404
- 4 Egi Y, Ito M, Tanaka S, Imagawa S, Takata S, Yoshihara M, Haruma K, Chayama K. Role of *Helicobacter pylori* infection and chronic inflammation in gastric cancer in the cardia. *Jpn J Clin Oncol* 2007; 37: 365-369
- 5 Araujo-Filho I, Brandao-Neto J, Pinheiro LA, Azevedo IM, Freire FH, Medeiros AC. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in advanced gastric carcinoma. *Arq Gastroenterol* 2006; 43: 288-292
- 6 McMahon BJ, Hennessy TW, Bensler JM, Bruden DL, Parkinson AJ, Morris JM, Reasonover AL, Hurlburt DA, Bruce MG, Sacco F, Butler JC. The relationship among previous antimicrobial use, antimicrobial resistance, and treatment outcomes for *Helicobacter pylori* infections. *Ann Intern Med* 2003; 139: 463-469
- 7 Ziemniak W. Efficacy of *Helicobacter pylori* eradication taking into account its resistance to antibiotics. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57 Suppl 3: 123-141
- 8 Bazzoli F, Berretti D, De Luca L, Nicolini G, Pozzato

- P, Fossi S, Zagari M. What can be learnt from the new data about antibiotic resistance? Are there any practical clinical consequences of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11 Suppl 2: S39-S42; discussion S43-S45
- 9 Megraud F. Basis for the management of drug-resistant *Helicobacter pylori* infection. *Drugs* 2004; 64: 1893-1904
- 10 Versalovic J, Shortridge D, Kibler K, Griffy MV, Beyer J, Flamm RK, Tanaka SK, Graham DY, Go MF. Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 477-480 2002; 8: 70-73
- 11 Fontana C, Favaro M, Minelli S, Criscuolo AA, Pietroiusti A, Galante A, Favalli C. New site of modification of 23S rRNA associated with clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3765-3769
- 12 Kim KS, Kang JO, Eun CS, Han DS, Choi TY. Mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with clarithromycin resistance. *J Korean Med Sci* 2002; 17: 599-603
- 13 Khan R, Nahar S, Sultana J, Ahmad MM, Rahman M. T2182C mutation in 23S rRNA is associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates obtained in Bangladesh. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3567-3569
- 14 Hao Q, Li Y, Zhang ZJ, Liu Y, Gao H. New mutation points in 23S rRNA gene associated with *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin in northeast China. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1075-1077
- 15 Toracchio S, Aceto GM, Mariani-Costantini R, Battista P, Marzio L. Identification of a novel mutation affecting domain V of the 23S rRNA gene in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2004; 9: 396-399
- 16 Fontana C, Favaro M, Pietroiusti A, Pistoia ES, Galante A, Favalli C. Detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* in stool samples. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3636-3640
- 17 Rimbara E, Noguchi N, Yamaguchi T, Narui K, Kawai T, Sasatsu M. Development of a highly sensitive method for detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* from human feces. *Curr Microbiol* 2005; 51: 1-5
- 18 Sevin E, Lamarque D, Delchier JC, Soussy CJ, Tankovic J. Co-detection of *Helicobacter pylori* and of its resistance to clarithromycin by PCR. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 165: 369-372
- 19 Schabereiter-Gurtner C, Hirschl AM, Dragosics B, Hufnagl P, Puz S, Kovach Z, Rotter M, Makristathis A. Novel real-time PCR assay for detection of *Helicobacter pylori* infection and simultaneous clarithromycin susceptibility testing of stool and biopsy specimens. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4512-4518
- 20 Morris JM, Reasonover AL, Bruce MG, Bruden DL, McMahon BJ, Sacco FD, Berg DE, Parkinson AJ. Evaluation of seaFAST, a rapid fluorescent in situ hybridization test, for detection of *Helicobacter pylori* and resistance to clarithromycin in paraffin-embedded biopsy sections. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3494-3496
- 21 Yilmaz O, Demiray E. Clinical role and importance of fluorescence in situ hybridization method in diagnosis of *H pylori* infection and determination of clarithromycin resistance in *H pylori* eradication therapy. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 671-675
- 22 Trebesius K, Panthel K, Strobel S, Vogt K, Faller G, Kirchner T, Kist M, Heesemann J, Haas R. Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent in situ hybridisation. *Gut* 2000; 46: 608-614
- 23 Can F, Yilmaz Z, Demirbilek M, Bilezikci B, Kunefeci G, Atac FB, Selcuk H, Arslan H, Boyacioglu S, Sahin FI. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and determination of clarithromycin resistance by fluorescence in situ hybridization from formalin-fixed, paraffin-embedded gastric biopsy specimens. *Can J Microbiol* 2005; 51: 569-573
- 24 Posteraro P, Branca G, Sanguinetti M, Ranno S, Cammarota G, Rahimi S, De Carlo M, Posteraro B, Fadda G. Rapid detection of clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* using a PCR-based denaturing HPLC assay. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 71-78
- 25 Maeda S, Yoshida H, Matsunaga H, Ogura K, Kawamata O, Shiratori Y, Omata M. Detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains by a preferential homoduplex formation assay. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 210-214
- 26 van Doorn LJ, Glupczynski Y, Kusters JG, Megraud F, Midolo P, Maggi-Solca N, Queiroz DM, Nouhan N, Stet E, Quint WG. Accurate prediction of macrolide resistance in *Helicobacter pylori* by a PCR line probe assay for detection of mutations in the 23S rRNA gene: multicenter validation study. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1500-1504
- 27 Poon SK, Chang CS, Su J, Lai CH, Yang CC, Chen GH, Wang WC. Primary resistance to antibiotics and its clinical impact on the efficacy of *Helicobacter pylori* lansoprazole-based triple therapies. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 291-296
- 28 Jorgensen MA, Manos J, Mendz GL, Hazell SL. The mode of action of metronidazole in *Helicobacter pylori*: futile cycling or reduction? *J Antimicrob Chemother* 1998; 41: 67-75
- 29 Cederbrant G, Kahlmeter G, Ljungh A. Proposed mechanism for metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother* 1992; 29: 115-120
- 30 Solca NM, Bernasconi MV, Piffaretti JC. Mechanism of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*: comparison of the rdxA gene sequences in 30 strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2207-2210
- 31 Goodwin A, Kersulyte D, Sisson G, Veldhuyzen van Zanten SJ, Berg DE, Hoffman PS. Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* is due to null mutations in a gene (rdxA) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase. *Mol Microbiol* 1998; 28: 383-393
- 32 Jeong JY, Mukhopadhyay AK, Dailidienė D, Wang Y, Velapattino B, Gilman RH, Parkinson AJ, Nair GB, Wong BC, Lam SK, Mistry R, Segal I, Yuan Y, Gao H, Alarcon T, Brea ML, Ito Y, Kersulyte D, Lee HK, Gong Y, Goodwin A, Hoffman PS, Berg DE. Sequential inactivation of rdxA (HP0954) and frxA (HP0642) nitroreductase genes causes moderate and high-level metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 2000; 182: 5082-5090
- 33 Jenks PJ, Edwards DI. Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 19: 1-7
- 34 Hughes NJ, Clayton CL, Chalk PA, Kelly DJ.

■名词解释

PCR为基础的变性高效液相色谱分析技术(PCR-DHPLC): 由于杂合子个体和纯合子个体的DNA扩增产物的解链特征不同, 在部分加热变性的条件下, 根据色谱峰形的不同来确定有无突变, 然后再利用序列分析的方法来确定突变的类型和位点。

■同行评价

本文立意较新颖,且参考文献较新,行文流畅,是一篇较好的文章,有一定的参考价值。

- Helicobacter pylori porCDAB and oorDABC genes encode distinct pyruvate:flavodoxin and 2-oxoglutarate:acceptor oxidoreductases which mediate electron transport to NADP. *J Bacteriol* 1998; 180: 1119-1128
- 35 Matteo MJ, Perez CV, Domingo MR, Olmos M, Sanchez C, Catalano M. DNA sequence analysis of rdxA and frxA from paired metronidazole-sensitive and -resistant Helicobacter pylori isolates obtained from patients with heteroresistance. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27: 152-158
- 36 Han F, Liu S, Ho B, Yan Z, Yan X. Alterations in rdxA and frxA genes and their upstream regions in metronidazole-resistant Helicobacter pylori isolates. *Res Microbiol* 2007; 158: 38-44
- 37 Latham SR, Owen RJ, Elviss NC, Labigne A, Jenks PJ. Differentiation of metronidazole-sensitive and -resistant clinical isolates of Helicobacter pylori by immunoblotting with antisera to the RdxA protein. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3052-3055
- 38 田拥军, 胡国平, 刘战利, 熊汉华, 张正茂, 叶嗣颖. 幽门螺杆菌耐甲硝唑基因分型与耐药性关系研究. *中国微生态学杂志* 2002; 14: 252-253
- 39 Toro C, Garcia-Samaniego J, Carbo J, Iniguez A, Alarcon T, Lopez-Brea M, Baquero M. Prevalence of primary Helicobacter pylori resistance to eight antimicrobial agents in a hospital in Madrid. *Rev Esp Quimioter* 2001; 14: 172-176
- 40 Dore MP, Graham DY, Sepulveda AR. Different penicillin-binding protein profiles in amoxicillin-resistant Helicobacter pylori. *Helicobacter* 1999; 4: 154-161
- 41 DeLoney CR, Schiller NL. Characterization of an In vitro-selected amoxicillin-resistant strain of Helicobacter pylori. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 3368-3373
- 42 Co EM, Schiller NL. Resistance mechanisms in an in vitro-selected amoxicillin-resistant strain of Helicobacter pylori. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 4174-4146
- 43 Gerrits MM, Godoy AP, Kuipers EJ, Ribeiro ML, Stof J, Mendonca S, van Vliet AH, Pedrazzoli J Jr, Kusters JG. Multiple mutations in or adjacent to the conserved penicillin-binding protein motifs of the penicillin-binding protein 1A confer amoxicillin resistance to Helicobacter pylori. *Helicobacter* 2006; 11: 181-187
- 44 Vaira D, Ricci C, Lanzini A, Perna F, Romano A, Corinaldesi R. How to proceed in Helicobacter pylori-positive chronic gastritis refractory to first- and second-line eradication therapy. *Dig Dis* 2007; 25: 203-205
- 45 Nishizawa T, Suzuki H, Umezawa A, Muraoka H, Iwasaki E, Masaoka T, Kobayashi I, Hibi T. Rapid detection of point mutations conferring resistance to fluoroquinolone in gyrA of Helicobacter pylori by allele-specific PCR. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 303-305
- 46 Nishizawa T, Suzuki H, Kurabayashi K, Masaoka T, Muraoka H, Mori M, Iwasaki E, Kobayashi I, Hibi T. Gatifloxacin resistance and mutations in gyra after unsuccessful Helicobacter pylori eradication in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1538-1540
- 47 Zullo A, De Francesco V, Scaccianoce G, Manes G, Efrati C, Hassan C, Maconi G, Piglionica D, Cannaviello C, Panella C, Morini S, Ierardi E. Helicobacter pylori eradication with either quadruple regimen with lactoferrin or levofloxacin-based triple therapy: a multicentre study. *Dig Liver Dis* 2007; 39: 806-810
- 48 Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Nakamura S. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase gyrA gene of Escherichia coli. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 1271-1272
- 49 Hughes NJ, Clayton CL, Chalk PA, Kelly DJ. Helicobacter pylori porCDAB and oorDABC genes encode distinct pyruvate:flavodoxin and 2-oxoglutarate:acceptor oxidoreductases which mediate electron transport to NADP. *J Bacteriol* 1998; 180: 1119-1128
- 50 Moore RA, Beckthold B, Wong S, Kureishi A, Bryan LE. Nucleotide sequence of the gyrA gene and characterization of ciprofloxacin-resistant mutants of Helicobacter pylori. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 107-111
- 51 Cattoir V, Nectoux J, Lascos C, Deforges L, Delchier JC, Megraud F, Soussy CJ, Cambau E. Update on fluoroquinolone resistance in Helicobacter pylori: new mutations leading to resistance and first description of a gyrA polymorphism associated with hypersusceptibility. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29: 389-396
- 52 Glocker E, Kist M. Rapid detection of point mutations in the gyrA gene of Helicobacter pylori conferring resistance to ciprofloxacin by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR approach. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2241-2246
- 53 Trieber CA, Taylor DE. Mutations in the 16S rRNA genes of Helicobacter pylori mediate resistance to tetracycline. *J Bacteriol* 2002; 184: 2131-2140
- 54 Dailidienė D, Bertoli MT, Miculeviciene J, Mukhopadhyay AK, Dailide G, Pascasio MA, Kupcinskas L, Berg DE. Emergence of tetracycline resistance in Helicobacter pylori: multiple mutational changes in 16S ribosomal DNA and other genetic loci. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3940-3946
- 55 Gerrits MM, Berning M, Van Vliet AH, Kuipers EJ, Kusters JG. Effects of 16S rRNA gene mutations on tetracycline resistance in Helicobacter pylori. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2984-2986
- 56 Nonaka L, Connell SR, Taylor DE. 16S rRNA mutations that confer tetracycline resistance in Helicobacter pylori decrease drug binding in Escherichia coli ribosomes. *J Bacteriol* 2005; 187: 3708-3012
- 57 Lawson AJ, Elviss NC, Owen RJ. Real-time PCR detection and frequency of 16S rDNA mutations associated with resistance and reduced susceptibility to tetracycline in Helicobacter pylori from England and Wales. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 282-286
- 58 Glocker E, Berning M, Gerrits MM, Kusters JG, Kist M. Real-time PCR screening for 16S rRNA mutations associated with resistance to tetracycline in Helicobacter pylori. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3166-3170
- 59 Sung H, Chung HJ, Kim MN, Lee GH. Clinical Usefulness of Antimicrobial Susceptibility Test for Helicobacter pylori. *Korean J Lab Med* 2006; 26: 179-184