

# 幽门螺杆菌克拉霉素耐药的基因诊断研究

张焕乐 程毅东 邓敏 林秋满 林永恩

(贺州市人民医院 广西贺州 542899)

**摘要:**目的:本研究旨在评估探讨幽门螺杆菌耐药基因,寻找克拉霉素耐药的早期诊断基因,以期为临床诊治提供参考。方法:从胃炎患者体内分离到3株幽门螺杆菌耐药菌株。测定克拉霉素、甲硝唑和左氧氟沙星的最低抑菌浓度,并进行全基因组测序。用逆转录聚合酶链式反应检测到Hp1181和hp1184基因。用基因突变株和耐药株确定hp1181或hp1184与克拉霉素耐药的关系。通过全基因组检测和鉴定,鉴定菌株与hp26695的同源性。基因组序列、基因数量和对3株菌株进行了基因特征检测。耐药基因的预测和功能分析表明, hp1181和hp1184的RNA表达在三株菌中均升高,在人工诱导的克拉霉素耐药菌中也是如此。基因敲除后进行药敏试验。结果:在这些菌株中发现了与hp26695、hp1181和hp1184基因高度同源的菌株, hp1184和hp1181基因的表达与克拉霉素耐药有关。结论:Hp1181和hp1184突变可能是克拉霉素耐药最早和最持久的反应,它们可能是诊断、预防和治疗克拉霉素耐药的潜在靶基因。

**关键词:**幽门螺杆菌;克拉霉素耐药;基因诊断;幽门螺杆菌菌株

幽门螺杆菌(Hp)被认为是一种重要的人类病原体,它定植于胃粘液中,导致浅表性胃炎、萎缩性胃炎和胃癌。目前治疗幽门螺杆菌感染的方法包括质子泵抑制剂、铋联合阿莫西林、甲硝唑和克拉霉素<sup>[1]</sup>。由于抗生素的广泛使用,耐药率正在增加,克拉霉素、甲硝唑和左氧氟沙星的高耐药率与根除幽门螺杆菌的失败有关<sup>[2]</sup>。世界卫生组织将克拉霉素耐药幽门螺杆菌列为抗生素研究和开发的高度优先细菌。目前,幽门螺杆菌耐药机制还不清楚。人们普遍认为<sup>[3]</sup>,对这些抗生素的耐药性与幽门螺杆菌基因的突变有关,克拉霉素耐药菌株在23S核糖体RNA(RRNA)的V区域存在三个点突变:A2142G、A2142C和A2143G。除了突变,外排泵簇也参与了克拉霉素耐药性的形成。然而,可能存在尚不清楚的基因突变位点,耐药机制值得进一步研究<sup>[4]</sup>。我们从人群中分离培养出幽门螺杆菌,并随机选择了三株对克拉霉素具有多重耐药性的幽门螺杆菌。分析基因组全序列以研究菌株的基因组特征并阐明幽门螺杆菌耐药的潜在机制。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究资料

这项研究得到了贺州市人民医院伦理委员会批准,每名患者均获得书面知情同意。胃粘膜组织标本来自贺州市人民医院医院胃体和幽门胃炎或胃溃疡患者。接受调查的患者在检查前至少4wk内没有服用任何抗生素。幽门螺杆菌的分离和鉴定如前所述,这些细菌是在哥伦比亚琼脂培养基上培养的,培养皿中含有5%的新鲜去纤维羊血。微需氧条件为:

5%O<sub>2</sub>、10%CO<sub>2</sub>、85%N<sub>2</sub>, 37℃下反应3~5天。通过革兰氏染色、尿素酶、氧化酶和过氧化氢酶活性检测以及尿素酶基因聚合酶链式反应(PCR)确认可疑菌落。

### 1.2 抗生素药敏试验

幽门螺杆菌的耐药性是参照临床和实验室标准研究所方案用稀释法测定的。简而言之,将幽门螺杆菌的密度调整为 $1 \times 10^6$  cfu/mL,在37℃的微好氧条件下培养3~5d。培养后,对平板进行肉眼检查,确定最低抑菌浓度(MIC)为导致无浑浊的最低浓度。甲硝唑(阿拉丁, d1707126)、阿莫西林(鲜生药业股份有限公司,中国)、左氧氟沙星(山东鲁康药业集团赛特股份有限公司,中国)、克拉霉素(长江药业集团有限公司,中国)。

### 1.3 耐药基因检测和分析<sup>[5]</sup>

筛选出耐药菌株,送入深圳市华大基因有限公司(中国)进行全基因组分析。DNA样品送来后,对样品进行质量检测,然后用来构建BS文库。用CovarisS/E210或Bioruptor将纯化的基因组DNA样品(包括基因组DNA、细菌人工染色体或长片段聚合酶链式反应产物)剪切成小片段。用T4DNA聚合酶、Klenow片段和T4多核苷酸激酶将断裂产生的突出物转化为钝端。在钝化的磷酸化DNA片段的3'端添加'A'碱基后,将接头连接到DNA片段的末端。用凝胶电泳法对目的片段进行纯化、选择性富集化和聚合酶链式反应(PCR)扩增。在PCR阶段适当地将索引标签引入到适配器中,并进行文库质量测试。最后,使用合格的BS文库进行测序。进行了基因组组成和基因功能分析,包括基因预测、tRNA、

sRNA 和基因注释, 以及 GO 预测开放阅读框。

耐药基因检测根据全基因组序列分析的结果预测耐药基因, 并选择逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)进行检测。在 25°C 下反应 10min, 42°C 下反应 60min, 然后在 99°C 下反应 5min。反应包括 32 个循环, 每个循环包括 95°C 下 1min, 56°C 下 4min, 70°C 下 7min, 在 72°C 延伸 15min 后, RT-PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶和 15%丙烯酰胺凝胶上进行电泳, 并带有 200 个碱基的梯形标记。

通过插入 Kan 抗性盒构建了 hp1181 和 hp1184 基因敲除突变体。用 pBSII KS(南京医科大学实验室, 中国)对 Kan 抗性克隆进行自然转化, 获得双基因敲除突变体, pBSII KS 含有一个被 pAV35 中的 CAT 片段打断的内部片段, 同时选择抗性克隆和 CHL 抗性克隆。通过聚合酶链式反应证实了 Kan 和 CAT 耐药盒插入到了幽门螺杆菌假定外排基因的预期位置。检测克拉霉素对 hp26695 的最低抑菌浓度。1/4MIC 诱导耐药。每 2d 更换一次培养液, 每 4d 检测一次 MIC, 根据 MIC 改变诱导药物的浓度。

GC 偏态分析采用基于菌株基因组序列的(G-C)/(G+C)计算。基因分布、ncRNA 分布和基因注释结果如图 1 所示。Hpbs1 正链上有 835 个基因、26 个 tRNAs、6 个 rRNAs 和 2 个 sRNAs。736 个基因, 10 个 tRNAs, 0 个 rRNAs, 负链 5 个 sRNAs, 157 个重复序列, 没有正链和负链。Hpbs2 有 943 个基因, 26 个 tRNAs, 6 个 rRNAs, 3 个 sRNAs, 849 个基因, 10 个 tRNAs, 0rRNA, 3 个 sRNAs, 153 个重复序列; Hpbs3 有 869 个基因, 26 个 tRNAs, 6 个 rRNAs, 3 个 sRNAs, 863 个基因, 10 个 tRNAs, 0rRNA, 3 个 sRNAs, 155 个重复。

#### 1.4 统计学方法

所有数据分析用 SPSS 26.0 软件进行。P 值<0.05 被认为具有统计学意义。分类变量用绝对值和频率记录, 连续变量用均值 ± 标准差记录。对分类变量进行适当的 X<sup>2</sup>分析, 必要时进行 Bonferroni 校正或 FISHER 精确检验。对正态分布的连续变量进行独立 t 检验。非参数连续变量分析采用 Mann-Whitney U 检验。

### 2 结果

#### 2.1 耐药基因数据库的分析

具体如图 1, 图 2 所示, 3 株细菌在 CARD(综合抗生素耐药性数据

库)中的耐药基因数目不同, 分别为 14、13、15 个。然而, 经过排序后, 发现一些基因是重复的。NP\_207975.1 和 NP\_207972.1 是 26695 株细菌的外排泵基因, 即 hp1181 和 hp1184 基因。如图 1 所示, 通过 RT-PCR 验证了它们的耐药性。在敲除耐药基因后, 药物敏感性显著提高, 如图 2 所示。

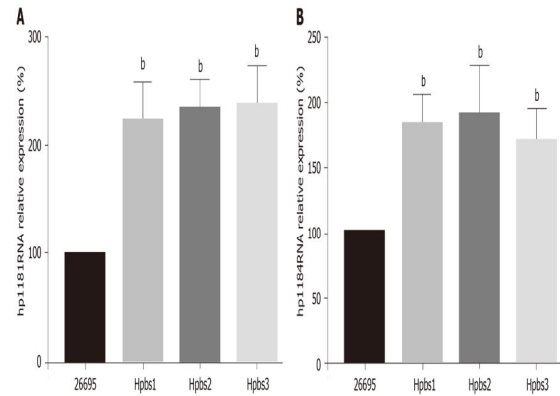


图 1 耐药菌株中 hp1181 和 hp1184 基因的表达。A: Hp1181; B:

Hp1184。<sup>b</sup>p<0.01。

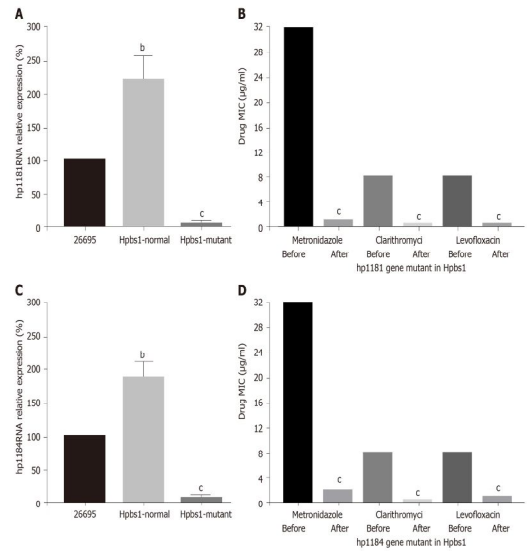


图 2 耐药基因敲除后, 药物敏感性得到改善。A: Hp1181 基因敲除; B: hp1181 基因敲除后的最小抑菌浓度(MIC); C: Hp1184 基因敲除后的 MIC; D: hp1184 基因敲除后的 MIC。MIC: 最小抑制浓度。<sup>b</sup>P<0.01, <sup>c</sup>P<0.001。

#### 2.2 耐药菌株的基因突变研究

具体如图 3 所示, 经克拉霉素诱导后, Hp26695 的耐药性在第 12 天增强, 第 16 天达到最高水平, 第 24 天增加到 8 μg/mL。Hp1181 和

hp1184 的表达也随着克拉霉素耐药性的增加而增加,尤其是 hp1184。在 23S RNA 中只检测到 A2142G 和 A2143G 突变,没有发现其他突变位点。这些数据表明,这两个基因可能参与了克拉霉素耐药性的早期调节。

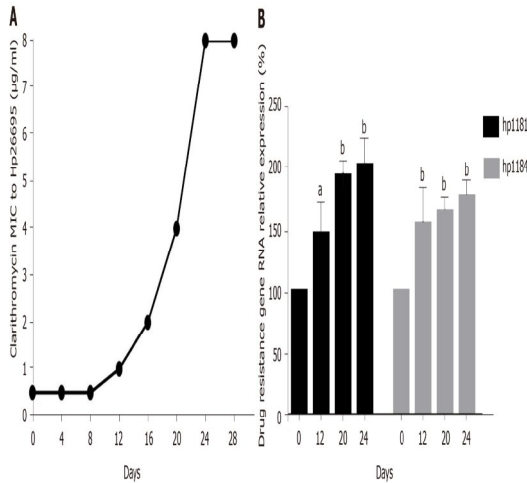


图 3 幽门螺杆菌对克拉霉素耐药性的诱导及耐药基因的表达。A: 诱导克拉霉素耐药; B: 耐药基因表达。\*P<0.05; <sup>†</sup>P<0.01。

### 3 讨论

目前,幽门螺杆菌感染的治疗仍依赖铋四联症。临床上常用的抗生素包括克拉霉素、阿莫西林、甲硝唑、四环素和左氧氟沙星可根除幽门螺杆菌<sup>[6]</sup>。然而,近年来,抗生素耐药性的增长导致了根除幽门螺杆菌的失败。最严重的耐药药物包括甲硝唑、克拉霉素和左氧氟沙星<sup>[7]</sup>。细菌耐药性的常见机制包括产生失活的酶、抗菌药物靶位的改变、细菌外膜通透性的改变、对主动流出系统的影响、细菌生物膜的形成和交叉耐药<sup>[8]</sup>。每种细菌的耐药机制都有所不同,但同一种细菌在不同地区对同一种抗生素仍有不同的耐药性。幽门螺杆菌的耐药机制尚不清楚,有待进一步研究<sup>[9]</sup>。

我们选择了使用甲硝唑、克拉霉素和左氧氟沙星的耐药菌株进行基因组测序分析。我们发现,CARD 数据库中的耐药基因数量没有明显差异。这可能是因为幽门螺杆菌可以产生两种抗生素耐药<sup>[10]</sup>,耐药基因主要是 hp1181 和 hp1184。Hp1181 编码与主要促进剂超家族相关的 NDA 转位酶,是一种完整的膜蛋白<sup>[11]</sup>; hp1184 编码另一种属于 Mate 家族的转位酶,导致上述易感性<sup>[12]</sup>。这些药物可能会通过多药耐药-耐药外排蛋白、抗生素主动外排和其他外排泵基因,如 HEFA。这两个基因被敲除后,药物的最低抑菌浓度(MIC)显著降低,敏感性增加<sup>[13]</sup>。值得注意的

是,除了这两个基因外,肠球菌的 GE2270A 基因和大肠杆菌的 Mura 基因也显示出相关性。其他菌株的耐药质粒很可能通过转化或其他机制入侵幽门螺杆菌<sup>[14]</sup>。幽门螺杆菌以外的细菌患者的胃粘膜可以间接证实这一观点。其主要原因可能是长期的耐酸治疗、胃侵蚀或肠道细菌反流。这将导致耐药性变得更加难以预防和控制<sup>[15]</sup>。此外,三株菌均对克拉霉素耐药。克拉霉素耐药机制主要体现在 A2142G、A2143G 和 G2144T 突变上。此外,在同一菌株中有几个突变是很常见的<sup>[16]</sup>。

Hp1181 和 hp1184 与多药耐药和克拉霉素耐药有关,这已在文献中报道<sup>[17]</sup>。随着克拉霉素耐药的出现, hp1181 和 hp1184 的 RNA 表达增加,其中 hp1184 的表达增加最快<sup>[18]</sup>。因此,这些基因也参与了耐药的调节,可能是 H.幽门螺杆菌对克拉霉素耐药。与临床分离株相比,仅有 A2142G 和 A2143G 突变的人工诱导株幽门螺杆菌 23S RNA 突变位点较少<sup>[19]</sup>。这可能归因于人工诱导的单一因素,它不像人类胃环境那样复杂。更重要的是, hp1181 和 hp1184 突变可能是对克拉霉素耐药最早和最持久的反应,可能是诊断、预防和治疗克拉霉素耐药的主要靶基因<sup>[20]</sup>。初步鉴定了该地区幽门螺杆菌多重耐药株的遗传特征:通过对幽门螺杆菌耐药株的基因组序列分析和基因功能鉴定,确定了 hp1181 或 hp1184 与克拉霉素耐药的关系。本研究进一步为幽门螺杆菌耐药的防治提供了更完善的实验依据。

综上所述, Hp1181 和 hp1184 突变可能是克拉霉素耐药最早和最持久的反应,可能是诊断、预防和治疗克拉霉素耐药的主要靶基因。

### 参考文献:

[1]Bacic A, Milivojevic V, Petkovic I, et al. In Search for Reasons behind Helicobacter pylori Eradication Failure-Assessment of the Antibiotics Resistance Rate and Co-Existence of Helicobacter pylori with Candida Species[J]. J Fungi (Basel), 2023,9(3).

[2]Gong Y, Zhai K, Sun L, et al. RdxA Diversity and Mutations Associated with Metronidazole Resistance of Helicobacter pylori[J]. Microbiol Spectr, 2023,11(2):e390322.

[3]Adachi K, Kato S, Koshino A, et al. A Vonoprazan, Clarithromycin, and Metronidazole Regimen as Helicobacter pylori Eradication Therapy for Patients with Penicillin Allergy in Light of Clarithromycin Resistance[J].

Intern Med, 2023.

[4]Lin Y, Shao Y, Yan J, et al. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: From potential biomolecular mechanisms to clinical practice[J]. J Clin Lab Anal, 2023:e24885.

[5]Lyu T, Cheung K S, Deng Z, et al. Whole genome sequencing reveals novel genetic mutations of *Helicobacter pylori* associating with resistance to clarithromycin and levofloxacin[J]. Helicobacter, 2023:e12972.

[6]Dascalu R I, Bolocan A, Paduaru D N, et al. Multidrug resistance in *Helicobacter pylori* infection[J]. Front Microbiol, 2023,14:1128497.

[7]Zhang Y, Feng X, Bian L, et al. Antibiotic Resistance of *Helicobacter pylori* and Related Risk Factors in Yangzhou, China: A Cross-Sectional Study[J]. J Clin Med, 2023,12(3).

[8]Cho S H, Park M S, Park S Y, et al. Effectiveness of 7-day triple therapy with half-dose clarithromycin for the eradication of *Helicobacter pylori* without the A2143G and A2142G point mutations of the 23S rRNA gene in a high clarithromycin resistance area[J]. Front Med (Lausanne), 2023,10:1150396.

[9]Feng S, Lin J, Zhang X, et al. Role of AlgC and GalU in the Intrinsic Antibiotic Resistance of *Helicobacter pylori*[J]. Infect Drug Resist, 2023,16:1839-1847.

[10]Orsten S, Yilmaz E, Akyon Y. Molecular Characterization of Clarithromycin Resistance in *Helicobacter pylori* Strains[J]. Turk J Gastroenterol, 2023.

[11]Mormeneo B S, Belles B A, Vazquez G D, et al. Antibiotic Susceptibility and Clarithromycin Resistance Determinants in *Helicobacter pylori* in the Northeast of Spain: A One-Year Prospective Study[J]. Antibiotics (Basel), 2023,12(2).

[12]Fauzia K A, Aftab H, Tshibangu-Kabamba E, et al. Mutations Related to Antibiotics Resistance in *Helicobacter pylori* Clinical Isolates

from Bangladesh[J]. Antibiotics (Basel), 2023,12(2).

[13]Galos F, Boboc C, Iesanu M I, et al. Antibiotic Resistance and Therapeutic Efficacy of *Helicobacter pylori* Infection in Pediatric Patients—A Tertiary Center Experience[J]. Antibiotics (Basel), 2023,12(1).

[14]Boyanova L, Gergova G, Kandilarov N, et al. Geographic distribution of antibiotic resistance of *Helicobacter pylori*: A study in Bulgaria[J]. Acta Microbiol Immunol Hung, 2023,70(1):79-83.

[15]Megraud F, Graham D Y, Howden C W, et al. Rates of Antimicrobial Resistance in *Helicobacter pylori* Isolates From Clinical Trial Patients Across the US and Europe[J]. Am J Gastroenterol, 2023,118(2):269-275.

[16]Bailey K S, Brown H E, Lekic V, et al. *Helicobacter pylori* treatment knowledge, access and barriers: A cross-sectional study[J]. Helicobacter, 2023,28(2):e12954.

[17]Borka B R, Melit L E, Marginean C O. Current Worldwide Trends in Pediatric *Helicobacter pylori* Antimicrobial Resistance[J]. Children (Basel), 2023,10(2).

[18]Shrestha A B, Pokharel P, Sapkota U H, et al. Drug Resistance Patterns of Commonly Used Antibiotics for the Treatment of *Helicobacter pylori* Infection among South Asian Countries: A Systematic Review and Meta-Analysis[J]. Trop Med Infect Dis, 2023,8(3).

[19]Sholeh M, Khoshnood S, Azimi T, et al. The prevalence of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* isolates: a systematic review and meta-analysis[J]. PeerJ, 2023,11:e15121.

[20]Wang Y Z, Chen J, Pei S Q, et al. Treatment strategies and pharmacist-led medication management for *Helicobacter pylori* infection[J]. Drug Dev Res, 2023,84(2):326-336.

广西壮族自治区卫生健康委员会自筹经费科研课题(编号 Z-J20221785)