调查研究 文章编号:0253-3626(2009)08-1077-04

重庆地区分离幽门螺杆菌对克拉霉素耐药性研究

罗红春,吕 琳,杨致邦,梅浙川
(重庆医科大学附属第二医院消化内科,重庆 400010)

【摘 要】目的:了解重庆地区幽门螺杆菌(Heliobacter pylori,Hp)对克拉霉素的耐药情况,探讨 Hp 对克拉霉素耐药的分子机制。方法:分离培养获得 96 株 Hp。采用琼脂稀释法进行体外抗生素敏感试验,检测 Hp 对克拉霉素的最低抑菌浓度(Minimal inhibitory concentration,MIC),拟定克拉霉素 MIC>2 μg/ml 为耐药菌株。比较城市和农村的差异。挑选克拉霉素耐药 Hp10 株,提取细菌 DNA,用 PCR-限制性片段长度多态性(RFLP)分析探讨克拉霉素耐药机制。结果:重庆地区 Hp 对克拉霉素的耐药率为 29.17%,城市和农村耐药率无统计学差异($P>0.05$)。10 株克拉霉素耐药菌株 23S rRNA 基因功能区 V PCR 扩增片段,均被 *Bsa* Ⅰ酶切,未被 *Bbs* Ⅰ酶切,提示 10 株在 2143 位点有 A→G 突变。结论:重庆地区 Hp 对克拉霉素的耐药率较高,且城市和农村无显著差异。大多数克拉霉素耐药 Hp 存在 23SrRNA 基因功能区 V 2143 位点 A→G 突变。

【关键词】幽门螺杆菌;克拉霉素;耐药性;突变
【中国图书分类法分类号】R378 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-04-18

Prevalence and molecular mechanism of helicobacter pylori resistant to clarithromycin in Chongqing area

LUO Hong-chun, et al
(*Department of Gastroenterolog, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the prevalence and resistance mechanism of Helicobacter pylori (Hp) resistant to Clarithromycin in Chongqing area. *Methods*: 96 Hp clinical isolates were cultured. The susceptibilities of the 96 Hp strains to clarithromycin were tested by agar dilution test to determine minimum inhibitory concentration(MIC). These Hp strains with MIC>2 μg/ml were

作者介绍:罗红春(1983-),女,博士,
研究方向:消化系肿瘤。
通讯作者:梅浙川,男,教授,Email:meizhechuan@21cn.com。
基金项目:重庆市自然科学基金项目(渝科发计字[2005]6 号)。

加强病原学检测,以达到合理用药、早期治疗、早期康复的目的。

参 考 文 献

[1] Chkhaidze I, Manjavidze N, Nemsadze K. Serodiagnosis of acute respiratory infections in children in Georgia [J]. Indian J Pediatr, 2006, 73(7):569-572.

[2] Fouchier RA, Rimmelzwaan GF, Kuiken T, et al. Newer respiratory virus infections: human metapneumovirus, avian influenza virus, and human coronaviruses[J]. Curr Opin Infect Dis, 2005, 18(2):141-146.

[3] Woo PC, Lau SK, Chu CM, et al. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia [J]. Virol, 2005, 79(2):884-895.

[4] Allander T, Tammi M T, Eriksson M, et al. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples[J].Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(36):12891-12896.

[5] 李 俊,罗 菁.352 例儿童急性呼吸道感染的病原学检测[J].浙江预防医学,2007,19(4):44-45.

[6] 刘亚谊,谢正德,刘春艳,等.北京地区 2005 年 12 月~2006 年 4 月下呼吸道感染住院患儿病毒病原检测分析[J].实用儿科临床杂志,2007,22(16):1236-1237.

[7] 罗征秀,刘恩梅,李渠北,等.婴幼儿反复、持续吼喘 58 例病因分析[J].临床儿科杂志,2006,24(6):478-479.

[8] 朱景明.小儿反复呼吸道感染的临床分析[J].中外健康文摘·医药月刊,2007,4(4):9-10.

[9] 黄志英,董 琳.人副流感病毒的病原学、流行病学及所致疾病的特点[J].国际呼吸杂志,2006,26(9):687-690.

[10] Gern J E, Rosenthal L A, Sorkness R L, et al. Effects of viral respiratory infections on lung development and childhood asthma [J]. Allergy Clin Immunol, 2005, 115(4):668-674.

[11] 邓 昱,刘恩梅,赵晓东,等.人类博卡病毒感染的持续喘息患儿临床特点分析[J].中华儿科杂志,2007,45(10):732-735.

[12] 吴瑞萍,胡亚美,江载芳,等.诸福棠实用儿科学[M].第 7 版,北京:人民卫生出版社,2002.1191-1195.

[13] 朱汝南,邓 洁,王 芳,等.2000 年秋冬至 2002 年夏北京地区急性呼吸道感染病毒病原学研究[J].临床儿科杂志,2003,21(1):25-28.

(责任编辑:关蕴良)

defined to be resistant to clarithromycin, then prevalence of Hp resistant to Clarithromycin in urban and rural area of Chongqing were compared . 10 Hp strains of being resistant to Clarithromycin were chosen. After the DNAs of Hp were extracted, PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis was used to test 23SrRNA domain V gene mutations. *Results*: The resistance rate of Hp resistant to Clarithromycin in Chongqing area was 29.17%, with no statistically significant difference between urban and rural area ($P>0.05$). 10 clarithromycin-resistant stains of Hp were found to have an A-to-G mutation in 23SrRNA domain V at position of 2143. *Conclusions*: The results indicated that prevalence of Hp resistant to Clarithromycin in Chongqing area was higher, and there was no statistically significant difference between urban and rural area ($P>0.05$). Besides, the majority of clarithromycin-resistant isolates of Hp in Chongqing have an A2143G mutation in 23SrRNA domain V.

【Key words】 Helicobacter pylori; Clarithromycin; Resistance; Mutation

幽门螺杆菌(Heliobacter pylori, Hp)是一种革兰氏阴性微需氧菌。自 Marshall 和 Warren 用微需氧技术分离出 Hp 之后,人们相继发现 Hp 与慢性胃炎、消化性溃疡(Peptic ulcer, PU)、胃癌、胃黏膜相关淋巴组织(Mucosal associatde lymphocyte tissue, MALT)淋巴瘤和一些心血管疾病、血液病、自身免疫性疾病、皮肤病等有密切的关系[1,2]。全球约一半的人口感染过 Hp,通常在儿童时就已感染,若未使用抗生素干预,将会持续终生[1,3]。目前,克拉霉素已成为根除 Hp 的主要抗生素,Hp 对其耐药是治疗失败的主要原因[4]。国外报道克拉霉素耐药是由于 Hp 的 23S rRNA 基因中 2143,2144 位点上 A 到 G 突变引起[5],由于 Hp 的遗传学特征存在明显的地区差异,所以,本试验对重庆地区幽门螺杆菌对克拉霉素的耐药性及耐药机制进行了研究,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 Hp 的来源

96 株 Hp 全部来自重庆医科大学附属第二医院胃镜室,其中城市占 54 株,农村占 42 株。

1.2 Hp 的培养和检测

用无菌活检钳夹取患者胃窦部粘膜两块,一块做快速尿素酶试验,一块置于 Hp 转送液中,选取快速尿素酶试验强阳性标本做 Hp 培养。将标本直接涂于加有抗生素添加剂的布氏肉汤血平板上,在 5%O_2、10%CO_2、80%N_2、5%H_2 的混合气体中,37℃培养 3 d。若培养基上长出无色透明,针尖大小,似露滴的菌落,可将其进行革兰染色镜检和快速尿素酶试验,全部符合标准者,确定为 Hp。置于脱纤维灭菌羊血中,-80℃保存。

1.3 药敏试验

按照美国临床实验标准化委员会制定的琼脂稀释法进行药敏试验。将分离的冻存菌株在培养基上转种以保证其纯度与活力,用生理盐水制成菌悬液,在比浊仪上调整浊度到 0.5 麦氏单位,并计数为 3×10^8 CFU/ml,用于琼脂稀释法。将 1ml 不同稀释浓度的克拉霉素加入 19 ml 布氏肉汤血培养基中,使其浓度范围在 0.125 ~ 256 μg/ml 用多点接种仪将菌液接种于培养基上。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)。拟定克拉霉素 MIC>2 μg/ml 为耐药菌株[6],同时以标准菌株 NCTC11637(重庆医科大学病原微生物教研室提供)做对照。率的比较用 χ^2 检验,$P\leq0.05$ 为差异有统计学意义。

1.4 Hp DNA 的提取和 PCR 扩增

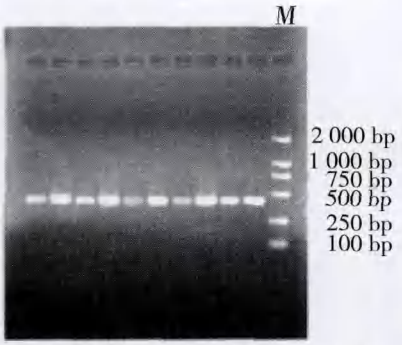
挑选典型克拉霉素耐药 Hp10 株。用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司)提取 HpDNA。PCR 扩增引物 1820~1839(5'-CCACAGCGATGTGGTCTCAG-3')和 2244~2225(5'-CTCCATAAGAGCCAAAGCCC-3')扩增 Hp23S rRNA 功能区 V 的 425 bp 片段。反应体系 50 μl 包括模板 3 μl, 2 × PCR Master Mix(Fermentas 公司)25 μl, 正反引物各 1 μl, 双蒸水 20 μl。扩增反应条件:95℃预变性 5min, 94℃ 45 s, 48℃ 60 s, 72℃ 75 s 共 35 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳观察。

1.5 限制性片段长度多态性分析

将 PCR 产物分别与 *Bsa* Ⅰ 和 *Bbs* Ⅰ 2 种限制性内切酶(Fermentas 公司)酶切。反应条件:PCR 产物 10 μl, 双蒸水 18 μl, 10 × Buffer G 2 μl, *Bbs* Ⅰ 1 μl, 37℃孵育 5 h。*Bsa* Ⅰ 反应条件同上。若存在 2143, 2142A→G 突变时,突变位点可被 *Bsa* Ⅰ 和 *Bbs* Ⅰ 识别并酶切成两个片段[7]。酶切产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳观察。

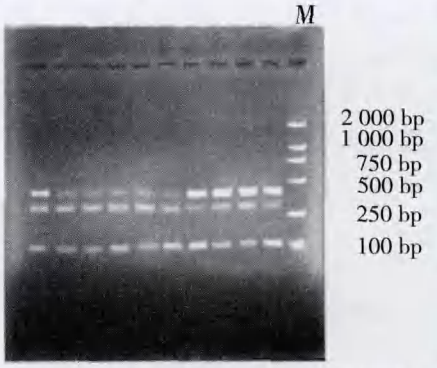
表 1 重庆地区幽门螺杆菌对克拉霉毒耐药情况

地区	耐药菌株(株)	敏感菌株(株)	合计	耐药率(%)
城市	16	38	54	29.63%
农村	12	30	42	28.57%
重庆	28	68	96	29.17%



扩增片段长度约 425 bp,marker 为 DL2000,由上到下片段分别是:2 000 bp、1000 bp、750 bp、500 bp、250 bp、100 bp

图 1 克拉霉素耐药的 Hp23SrRNA 基因功能区 V 扩增片段



425 bp 的扩增片段可被BsaⅠ切段,提示耐药 Hp 在 23SrRNA 基因功能区 V 存在 2143 位点 A→G 突变;M 为 DL2000

图 2 克拉霉素耐药 Hp 扩增片段的 *Bsa* Ⅰ 酶切产物

2 结 果

2.1 药敏结果

重庆地区幽门螺杆菌的耐药情况:本试验收集重庆地区 Hp 共 96 株,对克拉霉素耐药的 Hp 有 28 株,总体耐药率为 29.17%。其中,城市 54 株 Hp 中有 16 株耐药,耐药率为 29.63%。农村 42 株 Hp 中有 12 株耐药,耐药率为 28.57%。如表 1 所示。城市和农村耐药率的比较用 χ^2 检验,$P>0.05$,差异无统计学意义。

2.2 PCR 扩增和限制性片段长度多态性分析

10 株耐药菌株经 PCR 均扩增出 425 bp 的片段,如图 1 所示。10 株耐药菌株的 PCR 扩增物均可被 BsaI 酶切成两个片段,而未能被 Bbsl 酶切,提示耐药 Hp 在 23S rRNA 基因功能区 V 存在 2143 位点 A→G 突变,如图 2 所示。所有菌株都不存在 2142A→G 的突变。

3 讨 论

克拉霉素是新一代大环内酯类药物,在胃内低 pH 值环境下仍有较好的稳定性和杀菌作用,口服生物利用度好,不良反应少,被认为是 Hp 根除治疗中最有效的抗生素。其抗菌机制是药物进入细菌体内,与核糖体紧密结合,作用于 23SrRNA 肽链转移酶,从而抑制细菌蛋白质合成。然而,随着 Hp 根除治疗的广泛应用,以及治疗当中存在的用药不规范,导致耐药菌株的出现,使其成为治疗失败的主要原因[8-10]。据报道 Hp 对克拉霉素的耐药率在世界范围呈上升趋势,一些欧洲国家,如法国和比利时 Hp 对克拉霉素耐药率,达 10% ~15%[11]。在我国,北京,上海,广东,西安地区对克拉霉素耐药率的报道分别 15.7%、10%、6.1%、0%[12-14]。本试验发现,重庆地区 Hp 对克拉霉素的耐药率高达 29.17%,并且城市和农村的耐药率无显著差异性。这可能与克拉霉素等大环内酯类药物广泛使用及 Hp 出现新的突变位点有关。因此,阐明 Hp 对克拉霉素的耐药机制,对 Hp 感染的治疗有重要意义。

Stone 等首先发现并报告了 Hp 对克拉霉素耐药的分子基础是 23SrRNA 基因中 2143、2144 位点上 A 到 G 的突变[5],在随后的研究中也发现了其他位点上的一些突变亦可导致耐药,比如:A2142C、A2143C、A2143T、A2155G、G2141A、T2717C 等[15-17]。大环内酯类药物的其他耐药机制如:rRNA 甲基化酶引起大环内酯类药物失活;细菌膜渗透性下降,使进入细菌体内的药物减少;大环内酯类药物排出增加等在克拉霉素耐药机制中的作用尚未确定。所以目前认为 Hp 对克拉霉素耐药的主要机制仍是 23SrRNA 基因突变所致。本试验发现,10 株耐药菌株的 PCR 扩增物均可被 BsaI 酶切成两个片段,而未能被 Bbsl 酶切,提示耐药 Hp 在 23SrRNA 基因功能区 V 存在 2143 位点 A→G 突变,不存在 2142A→G 的突变。由此说明,重庆地区 Hp 对克拉霉素的耐药机制主要表现为 23SrRNA 基因 2143 位点上 A 到 G 的突变。随着克拉霉素在根除 Hp 治疗中应用的日益普遍和耐药菌株的增加,临床上迫切需要一种快速、简便的检测 Hp 对克拉霉素敏感性的试验。虽然,已有报道运用寡核苷酸微阵列技术检测 Hp 克拉霉素耐药相关 23SrRNA 基因多态性[18],但是,Hp 的遗传学特征存在明显的地域差异,Hp 耐药株的遗传学特征也存在着明显的地域差别,目前,对克拉霉素耐药株 23SrRNA 基因多态性的研究尚有

限,寡核苷酸探针较少,技术尚未完善,还需要进一步的改进。

综上所述,重庆地区 Hp 对克拉霉素的耐药率较高,已达 29.17%。因此,在根除 Hp 的治疗中,是否应用克拉霉素要慎重考虑。如有条件者,可以先行药敏试验,再选择适当抗生素,以减少耐药菌株的产生和降低治疗失败率。本试验发现,重庆地区 Hp 对克拉霉素的耐药机制主要表现为 23SrRNA 基因 2143 位点上 A 到 G 的突变,为 Hp 对克拉霉素耐药机制的研究提供重庆地区的资料,以利于检测耐药性的分子技术的改进。

参 考 文 献

[1] Alarcon T, Vega A E, Domingo D, et al. Clarithromycin resistance among Helicobacter pylori strains isolated from children: prevalence and study of mechanism of resistance by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(1): 486-488.

[2] Zentilin P, Seriolo B, Dulbecco P, et a1. Eradication of Helicobacter pylori may reduce disease severity in rheumatoid arthritis[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2002, 16(7): 1291-1299.

[3] Moore J M, Salama N R. Mutational analysis of metronidazole resistance in Helicobacter pylori[J]. Antimicrobical Agents and Chemotherapy, 2005, 49(3): 1236-1237.

[4] Morris J M, Reasonover A L, Bruce M G, et al. 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]. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(7): 3494-3496.

[5] Stone G G, Shortridge D, Flamm R K, et al. Identification of a 23S rRNA gene mutation in clar ithromycin-resistant helicobacter pylori [J]. Helicobacter, 1996, 1(4): 227-228.

[6] Mendonca S, Ecclissato C, Sartori M S, et a1. Prevalence of Helicobacter pylori resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline, and furazolidone in Brazil[J]. Helicobacter, 2000, 5(2): 79.

[7] Megraud F, Lehn N, Lind T, et al. Antimicrobial susceptibility testing of Helicobacter pylori in a large multicenter trial: the MACH 2 study[J]. Antimicrobical Agents and Chemotherapy, 1999, 43(11): 2747-2752.

[8] Realdi G, Dore M P, Piana A, et al. Pretreatment antibiotic resistance in Helicobacter pylori infection: Results of three randomized controlled studies[J]. Helicobacter, 1999, 4(2): 106-112

[9] Pilotto A, Leandro G, Franceschi M, et al. The effect of antibiotic resistance on the outcome of three 1-week triple therapies against Helcobacter pylori[J]. Aliment Pharmacol Ther, 1999, 13(5): 667-673.

[10] Megraud F. Antibiotic resistance in Helicobacter pylori infection[J]. Br Med Bull, 1998, 54(1): 207-216.

[11] Megraud F. Resistance of Helicobacter pylori to antibiotics[J]. Aliment Pharmacol Ther, 1997, 11(s): 43-53.

[12] 成 虹,胡伏莲. 北京地区幽门螺杆菌耐药情况及其变化趋势[J].中华医学杂志,2005,85(39):2754-2757.

[13] 张晓光,胡品津,李瑜元,等.广东城乡病人中分离的幽门螺杆菌对常用 3 种抗菌药物耐药的调查[J].新医学,2002,33(5):275-277.

[14] 乔 文,胡家露,彭道荣,等.西安地区幽门螺杆菌临床分离株耐药性研究[J].中国现代医学杂志,2002,12(6):48-49.

[15] Debets-ossenkopp Y J, Brinkman A B, Kuiperes E J, et al. Explaining the bias in the 23S rRNA gene mutations associated with clarithromycin resistance in clinical isolates of Helicobacter pylori[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1998, 42(10): 2749-2751.

[16] Alarcon T, Domingo, Prieto N, et al. PCR using 3'-mismatched primers to detect A2142C mutation in 23S rRNA conferring resistance to clarithromycin in Helicobacter pylori clinical isolates[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(2): 923-925.

[17] Fontana C, Favaro M, Minelli S, et al. New site of modification of 23SrRNA associated with clarithromycin resistance of Helicobacter pylori clinical isolates[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(12): 3765-3769.

[18] 陈韶华,厉有名,王群燕,等.寡核苷酸微阵列技术用于检测幽门螺杆菌克拉霉素耐药相关 23S rRNA 基因多态性[J].中华微生物学和免疫学杂志,2006,26(11):1053-1056.

(责任编辑:冉明会)

读者·编者·作者

结构式摘要的写作要求

本刊一律采用结构式摘要, 具体层次为: 目的(Objective)、方法(Methods)、结果(Results)和结论(Conclusion)。具体要求:①目的:需与正文前言相一致,与结论相呼应。②方法:需包括文中使用的主要方法的名称、病例(动物)数和必要的分组情况。③结果:与研究结论相关的主要结果及数据、统计学意义均应列出,并与文内核实无误。④结论:需与研究目的相呼应。中文摘要一般在 300 字左右,英文则与之相对应。英文摘要请译出文题,作者姓名、单位科室名称。

本刊编辑部