

· 临床与预防 ·

根除治疗失败患者幽门螺杆菌的耐药特性 及毒力基因研究

何琪云娜¹, 潘美伶², 田海英¹, 何蕾¹, 罗妹菡¹, 郑田利¹, 陈嘉熠¹, 裴晓方¹, 许欣¹, 廖娟^{1,3}

1. 四川大学华西公共卫生学院 / 华西第四医院, 四川 成都 610041;

2. 成都市双流区疾病预防控制中心; 3. 四川大学华西 - 协和陈志潜健康研究院慢病研究中心, 四川 成都 610041

摘要:目的 研究根除治疗失败患者幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)的耐药表型、耐药基因和毒力基因, 为补救治疗提供参考依据。方法 采集根除治疗失败患者胃黏膜组织分离培养 Hp, 药敏实验检测分离菌株对甲硝唑(metronidazole, MTZ)、克拉霉素(clarithromycin, CLA)、左氧氟沙星(levofloxacin, LEV)、阿莫西林(amoxicillin, AMX)、四环素(tetracycline, TET)和呋喃唑酮(furazolidone, FZ)的耐药情况, PCR 扩增 CLA、LEV 耐药基因 23S rRNA、*gyrA* 及毒力基因 *cagA*、*vacA*、*iceA*、*oipA*, 进一步探究耐药表型与耐药及毒力基因的关系。结果 从 58 例患者中分离获得 40 株 Hp (69.0%), 其对 MTZ、CLA、LEV、AMX、TET、FZ 的耐药率分别为 100.0%、82.5%、72.5%、0%、0%、0%。23S rRNA、*gyrA* 基因最常见的突变位点分别为 T2182C (78.6%) 和 N87K (32.0%), 并在 CLA 耐菌株中新发现了 C2165T 和 A2219G 突变。此外, 这些菌株毒力基因 *cagA*、*vacA* s1、*vacA* s2、*vacA* m1、*vacA* m2、*iceA*1、*iceA*2、*oipA* 的阳性率分别为 97.1%、100.0%、0%、42.9%、57.1%、62.9%、11.4%、68.6%, LEV 耐药菌株中 *vacA* m2 基因阳性率更高, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结论 本地区根除治疗失败患者 Hp 分离株对 MTZ、CLA、LEV 的耐药情况严峻, 补救治疗推荐选用 AMX、TET、FZ。CLA 耐药与 C2165T 和 A2219G 突变及 LEV 耐药与 *vacA* m2 的关系值得进一步探讨。

关键词: 幽门螺杆菌; 根除治疗失败; 抗生素耐药性; 耐药基因; 毒力基因

中图分类号: R573 文献标志码: A 文章编号: 1003-8507(2024)07-1331-07

DOI: 10.20043/j.cnki.MPM.202401036

Study on drug resistance and virulence genes of *Helicobacter pylori* in patients with failed eradication therapy

HE Qi-yun-na*, PAN Mei-ling, TIAN Hai-ying, HE Lei, LUO Shu-han, ZHENG Tian-li, CHEN Jia-yi, PEI Xiao-fang, XU Xin, LIAO Juan

*West China School of Public Health, Sichuan University/West China Fourth Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China

Abstract: Objective To study the drug resistance phenotype, drug resistance gene, and virulence gene of *Helicobacter pylori* (Hp) in patients with failed eradication therapy, and to provide reference for remedial therapy. **Methods** Hp was isolated and cultured from gastric mucosa of patients with failed eradication therapy. Drug sensitivity test was used to detect the resistance of isolated strains to Metronidazole (MTZ), Clarithromycin (CLA), Levofloxacin (LEV), Amoxicillin (AMX), Tetracycline (TET), and Furazolidone (FZ). CLA and LEV resistance genes 23S rRNA, *gyrA* and virulence genes *cagA*, *vacA*, *iceA*, *oipA* were amplified by PCR, to further explore the relationship between drug resistance phenotype and drug resistance and virulence genes. **Results** In total 40 strains of Hp were isolated from 58 patients (69.0%). The resistance rates to MTZ, CLA, LEV, AMX, TET, and FZ were 100.0%, 82.5%, 72.5%, 0%, 0%, and 0%, respectively. The most common mutations of 23S rRNA and *gyrA* genes were T2182C (78.6%) and N87K (32.0%), respectively, and new C2165T and A2219G mutations were found in CLA resistant strains. In addition, the positive rates of virulence genes *cagA*, *vacA* s1, *vacA* s2, *vacA* m1, *vacA* m2, *iceA*1, *iceA*2, and *oipA* were 97.1%, 100.0%, 0%, 42.9%, 57.1%, 62.9%, 11.4%, and 68.6%, respectively, and the difference was statistically significant. **Conclusion** The resistance of Hp isolates to MTZ, CLA and LEV in patients with failed eradication therapy in this area is serious, and AMX, TET and FZ are recommended for remedial therapy. The relationship between CLA resistance and C2165T and A2219G mutation and LEV resistance and *vacA* m2 warrants further investigation.

Keywords: *Helicobacter pylori*; Failure of eradication therapy; Antibiotic resistance; Drug resistance gene; Virulence gene

作者简介: 何琪云娜(1995—), 女, 硕士在读, 研究方向: 卫生检验与检疫

通信作者: 廖娟, E-mail: juanliao@scu.edu.cn

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)长期感染可能引发慢性胃炎、消化性溃疡等疾病,并发展为胃腺癌和黏膜相关淋巴组织(mucosa-associated lymphoid tissue, MALT)淋巴瘤,全球感染率高达 50%^[1-2]。1994 年, Hp 被国际癌症研究机构认定为 I 类致癌物,全球近 90% 的远端胃癌是由 Hp 感染引起的^[3]。为防止胃癌的发生和发展, Hp 感染者应接受根除治疗^[4-6]。常用的治疗方案包括标准三联疗法、铋剂四联疗法、伴随疗法和序贯疗法等^[7]。然而,由于抗生素的广泛使用, Hp 的耐药性不断升高,导致根除率逐年下降^[8-9]。因此了解根除治疗失败患者的 Hp 耐药性及相关规律,对补救治疗具有重要意义。Hp 耐药性与地理和社会经济因素有关^[10]。因此,了解成都地区根除治疗失败患者 Hp 分离株的耐药特性对补救治疗药物的选择具有重要意义。而且成都地区根除治疗失败患者 Hp 的耐药性是否与耐药基因发生了突变有关也值得进一步研究。此外,有研究报道了长春地区 Hp 菌株的耐药性与 *vacA* 和 *iceA* 基因密切相关^[11],而成都地区根除治疗失败患者 Hp 分离株的耐药性与毒力基因的研究未见报道。因此,本研究采集成都市某三甲医院根除失败患者的胃黏膜组织进行 Hp 的分离培养,检测其耐药性、耐药相关基因(23S rRNA, *gyrA*)和毒力基因(*vacA*、*cagA*、*iceA* 和 *oipA*),旨在了解根除治疗失败患者 Hp 的耐药情况,探讨耐药表型与耐药基因及毒力基因间的关系,为根除失败患者的补救治疗方案的选择积累宝贵的资料。

1 对象与方法

1.1 研究对象 以成都市某三甲医院就诊的一次或多次根除治疗失败,且同意行胃镜检查 and 胃黏膜活检的患者为研究对象。纳入标准:(1)曾接受过 Hp 根除治疗;(2)治疗后 13C 尿素呼气试验结果为阳性。排除标准:(1)过去 1 个月内使用过抗生素、质子泵抑制剂(proton pump inhibitors, PPIs)和铋剂等药物;(2)有严重凝血功能及严重心、肺、脑疾病;(3)既往行胃部手术或有胃恶性肿瘤病史。本研究经医学伦理委员会批准,所有研究对象均在参与研究前签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂 显微镜(日本 olympus 公司);三气培养箱、iBright 1500 凝胶成像仪(美国 Thermo Fisher 公司);十万分之一电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司);ProFlex™ PCR 仪(美国 ABI 公司)。

哥伦比亚琼脂、Mueller-Hinton(MH)琼脂、脑心浸液(Brain Heart Infusion, BHI)肉汤、氧化酶试验试剂条(青岛高科技工业园海博生物技术有限公司);

3%过氧化氢试验试剂(广东环凯微生物科技有限公司);革兰染液(北京索莱宝科技有限公司);甲硝唑(metronidazole, MTZ)、克拉霉素(clarithromycin, CLA)、左氧氟沙星(levofloxacin, LEV)、阿莫西林(amoxicillin, AMX)、四环素(tetracycline, TET)药敏试纸条(温州康泰生物科技有限公司);抗菌药物药敏纸片(杭州微生物试剂有限公司);脲酶试验试剂(三明市贝真生物科技有限公司);无菌脱纤维绵羊血(郑州益康生物工程有限公司);细菌基因组 DNA 提取试剂盒、Golden Easy PCR System(天根生化科技(北京)有限公司)等。

1.3 Hp 分离和鉴定 将采集到的根除治疗失败患者的胃窦和胃体黏膜样本充分研磨制成匀浆,接种于选择性哥伦比亚血平板,于 37℃, 5% O₂、10% CO₂、85% N₂ 的环境中培养 3~5 d。选取平板上圆形、灰白色或半透明、针尖大小凸起、边缘整齐的小菌落进行革兰染色,观察细菌镜下形态,并进行脲酶、氧化酶和过氧化氢酶试验。根据《幽门螺杆菌感染的基础与临床》^[12]、《幽门螺杆菌感染及其相关疾病的诊治》^[13], *H. pylori* 分离培养阳性的标准为:符合典型 *H. pylori* 菌落特征,显微镜下观察到革兰阴性弯曲杆菌,过氧化氢酶、氧化酶、脲酶试验均为阳性。将 Hp 菌株混悬于含 30% 甘油的 BHI 肉汤中,于 -80℃ 冰箱保存备用。

1.4 药敏实验 分别用浓度梯度纸条扩散法(E-test 法)和纸片扩散法进行药敏试验。用生理盐水制备 Hp 菌悬液,将其均匀涂布于 MH 血平板。待干燥后,将 AMX、MTZ、LEV、CLA 和 TET 的试纸条有梳齿的一侧插入 MH 血平板,将呋喃唑酮(furazolidone, FZ)的药敏纸片贴于 MH 血平板,以空白纸片为对照。Hp 标准菌株 ATCC 43504 用于质量控制。

判定结果参照欧洲抗菌药敏试验委员会(EUCAST)关于抗菌药敏试验的技术说明和药敏纸片制造商的说明, Hp 对 AMX、CLR、MTZ、LEV 和 TET 耐药定义为最小抑菌浓度分别 >0.125、>0.5、>8、>1 和 >1 mg/L。FZ 药敏纸片抑菌圈直径 ≤14 mm 时,判定为耐药。

1.5 细菌 DNA 提取 从 -80℃ 冰箱取出冻存菌株,复苏后代传活化。刮取适量菌落于无菌生理盐水中,参照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取 DNA。

1.6 耐药及毒力基因扩增 CLA 耐药基因 23S rRNA、LEV 耐药基因 *gyrA* 和毒力基因 *cagA*、*vacA*、*iceA*、*oipA* 的特异性引物序列见表 1。PCR 扩增条件参照参考文献。

表 1 Hp 耐药和毒力基因引物信息

Table 1 Hp drug resistance and virulence gene primer information

基因名称	引物序列(5'→3')	PCR 产物大小(bp)	退火温度(℃)	参考文献
23S rRNA	F: CCACAGCGATGTGGTCTCAG R: CTCCATAAGAGCCAAAGCCC	425	55	[14]
<i>gyrA</i>	F: TTTRGCTTATTTCMATGAGCGT R: GCAGACGGCTTGTTARAATA	428	55	
<i>cagA</i>	F: GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG R: CTGCAAAAAGATTGTTGGCAGA	349	54	
<i>vacA</i> m1/m2	F: CAATCTGTCCAATCAAGCGA R: GCGTCTAAATAATTCCAAGG	570(m1) 645(m2)	55	
<i>vacA</i> s1/s2	F: ATGGAAATACAACAAACACAC R: CCTGAGACCGTTCCTACAGC	176(s1) 203(s2)	57	[15]
<i>iceA1</i>	F: GTGTTTTTAACCAAAGTATC R: CTATAGCCAATTCTTTGCA	247	50	[16]
<i>iceA2</i>	F: GTTGGGTATATCACAAATTTAT R: TTTCCCTATTTTTAGTAGGT	334/229	50	
<i>oipA</i>	F: CGCGAAAGGAACGGGTTTT R: TTAGCGTCTAGCGTTCTGCC	519	54	

1.7 耐药及毒力基因测序和比对 PCR 反应产物经电泳鉴定后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。以 NCBI 在线数据库下载的 Hp 26695 菌株的 23S rRNA 和 *gyrA* 基因序列为阴性对照。23S rRNA 基因序列直接进行比对, *gyrA* 基因序列经 MEGA 11 软件翻译为氨基酸序列后进行比对。毒力基因测序结果于 NCBI 在线数据网站进行 BLAST 比对分析。

1.8 统计学分析 采用 SPSS 26.0 软件对数据进行统计学分析。计数资料采用率(%)进行描述, 组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率进行比较, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 研究对象基本信息 本研究共纳入 58 例 Hp 根除失败患者, 其中男性 27 例, 占 46.6%, 女性 31 例, 占 53.4%; 年龄范围为 19~69 岁, 平均年龄为 (49.1 ± 11.9) 岁。

2.2 Hp 菌株分离情况 成功分离培养出 40 株 Hp, 分离率为 69.0%。根据患者的年龄、性别、是否有上腹不适症状、吸烟史、饮酒史、消化道肿瘤家族史以及家庭成员感染的情况进行分类, 不同分类患者的 Hp 分离情况见表 2。有上腹不适症状的患者胃组织中 Hp 的分离率明显高于无症状患者 ($\chi^2=4.214$, $P<0.05$)。

表 2 不同分类患者的 Hp 分离率比较

Table 2 Comparison of Hp isolation rates in patients of different classifications

分类	分组	患者数	分离株数(株)	分离率(%)	χ^2 值	P 值
性别	男	27	17	63.0	0.850	0.404
	女	31	23	74.2		
年龄(岁)	<45	21	16	76.2	0.803	0.398
	≥45	37	24	64.9		
上腹不适症状	有	45	36	80.0	4.214	0.040
	无	13	6	46.2		
吸烟史	有	7	7	100.0	-	0.087
	无	51	33	64.7		
饮酒史	有	9	8	88.9	1.027	0.311
	无	49	32	65.3		
消化道肿瘤家族史	有	8	5	62.5	0.000	0.989
	无	50	35	70.0		
家庭成员 Hp 感染	有	16	12	75.0	0.087	0.768
	无	42	28	66.7		

注: - 为采用 Fisher 确切概率进行比较。

2.3 Hp 分离株耐药情况 40 株 Hp 分离株对 MTZ、CLA、LEV、AMX、TET、FZ 的耐药率分别为 100.0% (40/40)、82.5% (33/40)、72.5% (29/40)、0%、0%、0%，多重耐药情况见表 3。

表 3 Hp 对六种抗生素双重及多重耐药结果

Table 3 The dual and multiple resistance of Hp to six types of antibiotics

耐药类型	抗生素	分离耐药菌株数(株)	菌株比例(%)
单重耐药	MTZ	5	12.5
双重耐药	MTZ+CLA	6	15.0
	MTZ+LEV	2	5.0
三重耐药	MTZ+CLA+LEV	27	67.5

2.4 Hp 耐药率与患者根除治疗失败次数关系分析 比较不同根除次数组间的 Hp 分离株的耐药情况,不同根除次数组间 CLA 和 LEV 的耐药率具有统计学意义($\chi^2=9.190, P<0.05; \chi^2=6.278, P<0.05$),随着根除治疗次数增加, Hp 对 CLA 和 LEV 耐药率不断增加。见表 4。

表 4 不同根除次数 Hp 耐药情况[例数(%)]

Table 4 Hp resistance status based on different eradication attempts (number of cases, %)

根除次数(次)	抗生素		
	MTZ	CLA	LEV
1	13(100.0)	7(53.8)	6(46.2)
2	16(100.0)	15(93.8)	13(81.3)
≥3	11(100.0)	11(100.0)	10(90.9)
χ^2	—	9.190	6.278
P 值	—	0.004	0.048

注:—为不同根除次数患者对 MTZ 耐药率均为 100%, 无法进行比较。

2.5 CLA 与 LEV 耐药相关基因突变分析 共复苏出 35 株冻存菌株,其中 CLA、LEV 耐药分别为 28 株和 25 株。Hp 菌株的 23S rRNA 基因序列比对结果显示,CLA 敏感菌株未发生突变,耐药菌株中除 1 株未发生 23S rRNA V 区突变外,其余 27 株均发生 23S rRNA V 区突变。最常见的突变位点为 T2182C,其次是 A2143G,突变率分别为 78.6% (22/28)、75.0% (21/28)。见表 5。

Hp 菌株的 *gyrA* 氨基酸序列比对结果显示,LEV 敏感菌株未发生突变,耐药株中除 7 株未发生突变外,其余 18 株均发生了突变。其中,N87K 突变率最高,突变率为 32.0%(8/25)。见表 6。

2.6 毒力基因分析 Hp 的毒力基因除 *vacA* s2 未检出外,*cagA*、*vacA* s1、*vacA* m1、*vacA* m2、*iceA1*、*iceA2* 和 *oipA* 均有检出。*cagA* 阳性率为 97.1%(34/35)。*vacA* 基因分 s 和 m 区,所有菌株 s 区分型均为 s1 型

(100.0%);m 区中 m1 型阳性率为 42.9%(15/35)、m2 型阳性率 57.1% (20/35)。*iceA* 阳性率为 74.3% (26/35),两个等位基因 *iceA1* 型与 *iceA2* 型的阳性率分别为 62.9%(22/35)、11.4%(4/35)。*oipA* 基因阳性率为 68.6%(24/35)。Hp 毒力基因 *vacA*、*iceA* 和 *oipA* 在 CLA 和 LEV 耐药和敏感株之间的分布差异见表 7,其中,LEV 耐药菌株中 *vacA* m2 基因阳性率更高 ($P<0.05$)。

表 5 Hp CLA 耐药基因 23S rRNA 突变特征分析(n=28)

Table 5 Clarithromycin resistant gene 23S rRNA mutation characteristic analysis of Hp (n=28)

耐药基因	突变位点	菌株例数(株)	突变率(%)
23S rRNA	T2182C	4	14.3
	A2143G	5	17.9
	A2143G+T2182C	12	42.9
	T2182C+A2223G	2	7.1
	A2143G+T2182C+C2195T	2	7.1
	A2143G+T2182C+A2223G	1	3.6
	A2143G+C2165T+T2182C+	1	3.6
	A2219G	1	3.6
	—	1	3.6

注:—为未见突变。

表 6 Hp LEV 耐药基因 *gyrA* 氨基酸突变特征分析(n=25)

Table 6 Levofloxacin resistance genes *gyrA* amino acid mutational characteristics analysis of Hp (n=25)

耐药基因	突变位点	菌株例数(株)	突变率(%)
<i>gyrA</i>	N87K	7	28.0
	N87I	4	16.0
	D91G	2	8.0
	D91Y	2	8.0
	A88V	1	4.0
	N87I+D91Y	1	4.0
	N87K+A97V	1	4.0
	—	7	28.0

注:—为未见突变。

3 讨论

本研究首次对成都地区某三甲医院根除治疗失败患者的 Hp 进行分离培养及耐药特性研究,并初步探讨了耐药特性与毒力基因的关系。我们从 58 例患者中成功分离获得了 40 株 Hp,发现 Hp 分离株对 MTZ、CLA、LEV 的耐药情况严峻,并且在 CLA 耐药菌株中发现了 C2165T 和 A2219G 两个新突变位点,此外,还首次观察到 LEV 耐药菌株中毒力基因 *vacA* m2 阳性率更高。

抗生素耐药是影响 Hp 根除治疗方案疗效的主要因素^[17]。全球大多数地区的 Hp 对 MTZ、CLA、LEV 的耐药率均超过 15%^[18]。Hp 的继发耐药是导致耐药情况严重的一个重要因素,首次抗生素治疗后,细菌

表 7 CLA、LEV 耐药性与 *vacA*、*iceA* 和 *oipA* 基因之间的关系

Table 7 Relationship between clarithromycin and levofloxacin resistance and the *vacA*, *iceA*, *oipA* gene

抗生素	分组	<i>vacA</i>				<i>iceA</i>				<i>oipA</i>											
		<i>vacA</i> m1 ⁺ (n=15)	<i>vacA</i> m1 ⁻ (n=20)	χ^2 值	P 值	<i>vacA</i> m2 ⁺ (n=20)	<i>vacA</i> m2 ⁻ (n=15)	χ^2 值	P 值	<i>iceA</i> 1 ⁺ (n=22)	<i>iceA</i> 1 ⁻ (n=13)	χ^2 值	P 值	<i>iceA</i> 2 ⁺ (n=4)	<i>iceA</i> 2 ⁻ (n=31)	χ^2 值	P 值	<i>oipA</i> ⁺ (n=24)	<i>oipA</i> ⁻ (n=11)	χ^2 值	P 值
CLA	耐药 (n=28)	12	16	-	0.660	18	10	-	0.101	18	10	-	0.525	3	25	-	0.609	19	9	-	0.619
	敏感 (n=7)	3	4			2	5			4	3			1	6			5	2		
LEV	耐药 (n=25)	9	16	-	0.179	17	8	-	0.047	16	9	-	0.560	2	23	-	0.319	19	6	-	0.138
	敏感 (n=10)	6	4			3	7			6	4			2	8			5	5		

若产生耐药性,再次使用同类抗生素可能失效^[19]。有报道,亚洲人群对 MTZ、CLA、LEV、AMX 和 TET 的继发耐药率分别为 62.0%、64.3%、15.7%、10.3%、10.4%^[20];而国内叶峰等人^[21]报道的根除失败患者对 MTZ、CLA、LEV、AMX、TET 和 FZ 的耐药率分别为 97.37%、58.95%、48.42%、0%、0%、0%;本研究中,MTZ、CLA、LEV、AMX、TET 和 FZ 的耐药率分别为 100.0%、82.5%、72.5%、0%、0%、0%,提示本地区患者 MTZ、CLA、LEV 耐药情况更为严重。此外,有研究发现根除治疗失败会导致更多的多重耐药菌株出现^[22],我国南方的一项多中心、前瞻性队列研究发现初次治疗失败后对 MTZ+CLA、MTZ+LEV、MTZ+CLA+LEV 的耐药率分别为 34.0%、38.7%、17.8%^[10],本研究中 MTZ+CLA、MTZ+LEV、MTZ+CLA+LEV 的耐药率分别为 15.0%、5.0%、67.5%,相比之下,本地区三重耐药情况更为严重,而且 CLA、LEV 的耐药率随治疗次数增加而升高,提示补救治疗应选择非 MTZ、CLA、LEV 的抗生素以提高成功率,并且应密切关注多重耐药的情况。

Hp 耐药性与耐药基因突变有关^[23],如 CLA 耐药与 Hp 的 23S rRNA 基因 V 区的点突变有关,常见突变位点为 A2142G 和 A2143G^[24],也有 T2182C、A2223G 和 C2195T 等位点突变及检出率的报道^[25-26],如 Albasha 等人^[25]报道的苏丹患者中 CLA 耐药菌株突变位点 A2143G、T2182C 和 C2195T 的突变率分别为 20%、16%、12%;国内张择伟等人^[27]报道的 CLA 耐药菌株常见的突变位点 T2182C、A2143G 的突变率分别为 35.29%、20.0%;而本研究发现的最常见突变位点 T2182C、A2143G 的突变率分别为 78.6%、75.0%,特别值得关注的是我们还发现了 C2165T 和 A2219G 新突变位点,提示本地区根除失败患者的 CLA 耐药菌株 T2182C 和 A2143G 位点突变频率更高,应加强关注。不过新突变位点与 CLA 耐药的关系还需更多研

究予以确证。另一方面,LEV 耐药机制与喹诺酮类耐药决定区 *gyrA* 基因的突变有关,常见突变在第 87 位(N87L、I、A 或 K)和第 91 位(D91G、N、A、Y 或 H)的氨基酸取代^[28],还发现了 A88V、A97V 等突变位点^[29-30]。Wang 等人^[31]的研究中常见突变 N87K、D91N 突变率分别为 20.2%、10.5%,而本研究中突变以 N87K、N87I 为主,突变率分别为 32.0%、20.0%,未发现新的突变位点。

值得关注的是 Hp 耐药表型可能与毒力基因相关,如意大利西西里地区的一项研究显示 CLA 耐药性与 *cagA* 基因相关^[32];蒋洁^[11]等人发现,Hp 菌株 CLA 耐药与 *iceA1* 基因与密切相关,但与 *cagA* 基因无关;林定赛^[33]等人发现,CLA 耐药可能与 *vacA* 基因有关;而本研究我们发现对 LEV 耐药的菌株中 *vacA* m2 基因阳性率更高($P < 0.05$),提示 LEV 耐药可能与 *vacA* m2 基因相关。因此,CLA、LEV 的耐药性与 *vacA*、*iceA* 及 *oipA* 之间的关系值得进一步探讨。

此外,本研究在对根除失败患者感染的 Hp 分离培养中发现,从有上腹不适症状患者的标本中分离获得 Hp 的比例为 80.0%,显著高于无该症状患者的标本($P < 0.05$),提示有上腹不适症状患者的 Hp 分离成功率更高。

本研究发现,根除失败患者 Hp 分离株对 MTZ、CLA 和 LEV 的耐药率高。因此,在临床补救治疗中,建议首选 AMX、TET 和 FZ。此外,CLA 耐药与 C2165T 和 A2219G 突变的关系,以及 LEV 耐药与毒力基因 *vacA* m2 的关系值得进一步深入研究。

利益冲突声明 本研究不存在任何利益冲突

参考文献

[1] Tshibangu-Kabamba E, Yamaoka YS. Helicobacter pylori infection and antibiotic resistance - from biology to clinical implications[J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2021, 18 (9): 613-629.

- [2] Ansari S, Yamaoka YS. Helicobacter pylori Infection, Its Laboratory Diagnosis, and Antimicrobial Resistance: a Perspective of Clinical Relevance [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2022, 35 (3): e0025821.
- [3] Thrift AP, Wenker TN, El-Serag HB. Global burden of gastric cancer: epidemiological trends, risk factors, screening and prevention [J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2023, 20(5): 338–349.
- [4] Malfertheiner P, Camargo MC, El-Omar E, et al. Helicobacter pylori infection[J]. *NATURE REVIEWS DISEASE PRIMERS*, 2023, 9(1): 19.
- [5] Ford AC, Yuan YH, Moayyedi P. Helicobacter pylori eradication therapy to prevent gastric cancer: systematic review and meta-analysis[J]. *Gut*, 2020, 69(12): 2113–2121.
- [6] Malfertheiner P, Megraud F, Rokkas T, et al. Management of helicobacter pylori infection: the Maastricht VI/Florence consensus report[J]. *Gut*, 2022, 71: 1724–1762.
- [7] Sun QF, Yuan CZ, Zhou SN, et al. Helicobacter pylori infection: a dynamic process from diagnosis to treatment[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2023, 13: 1257817.
- [8] Shah SC, Iyer PG, Moss SF. A clinical practice update on the management of refractory helicobacter pylori infection: expert review [J]. *Gastroenterology*, 2021, 160(5): 1831–1841.
- [9] Suzuki S, Kusano CK, Horii T, et al. The ideal helicobacter pylori treatment for the present and the future [J]. *Digestion*, 2022, 103(1): 62–68.
- [10] Lyu T, Cheung KS, Ni L, et al. High prevalence and risk factors of multiple antibiotic resistance in patients who fail first-line Helicobacter pylori therapy in southern China: a municipality-wide, multicentre, prospective cohort study [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2020, 75(11): 3391–3394.
- [11] 蒋洁, 于军, 江海洋, 等. 长春地区幽门螺杆菌耐药性与毒力基因相关性分析 [J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2020, 29(7): 784–788.
- Jiang J, Yu J, Jiang HY, et al. The correlation between virulence genes and antibiotic resistance in Helicobacter pylori isolates in Changchun area [J]. *Chinese Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2020, 29(7): 784–788.
- [12] 胡伏莲, 周殿元. 幽门螺杆菌感染的基础与临床[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2002.
- Hu FL, Zhou DY. Basis and clinical aspects of helicobacter pylori infection[M]. Beijing: China Science and Technology Press, 2002.
- [13] 池肇春, 邹全明, 姜相君. 幽门螺杆菌感染及其相关疾病的诊治[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2017.
- Chi ZC, Zou QM, Jiang XJ. Diagnosis and treatment of helicobacter pylori infection and related diseases [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2017.
- [14] 王莉莉. 幽门螺杆菌耐药性及相关基因突变特征研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2016.
- Wang LL. Study on the resistance and related gene mutation characteristics of helicobacter pylori [D]. Qingdao: Qingdao University, 2016.
- [15] 潘美伶, 李荧, 沈丹芸, 等. 不同类型慢性胃炎患者幽门螺杆菌的分离培养、耐药与毒力基因研究[J]. *现代预防医学*, 2022, 49 (8): 1480–1484, 1494.
- Pan ML, Li Y, Shen DY, et al. Study on isolation, drug resistance and virulence genes of Helicobacter pylori from patients with different types of chronic gastritis [J]. *Modern Preventive Medicine*, 2022, 49 (8): 1480–1484, 1494.
- [16] 董霄, 吴多智, 曹芹芳, 等. 海口地区老年 Hp 相关性胃病患者病原菌基因型检测及其与疾病病理类型的关系[J]. *中国老年学杂志*, 2022, 42(23): 5700–5703.
- Dong X, Wu DZ, Cao QF, et al. Pathogenic gene typing of helicobacter pylori in elderly patients with hp-related gastric diseases in Haikou area and its relationship with disease pathological types[J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2022, 42(23): 5700–5703.
- [17] Kasahun GG, Demoz GT, Desta DM. Primary resistance pattern of helicobacter pylori to antibiotics in adult population: a systematic review[J]. *Infection and Drug Resistance*, 2020, 13: 1567–1573.
- [18] Savoldi A, Carrara E, Graham DY, et al. Prevalence of antibiotic resistance in helicobacter pylori: a systematic review and meta-analysis in World Health Organization regions [J]. *Gastroenterology*, 2018, 155(5): 1372–1382.
- [19] 王春燕, 李胜棉. 2017 幽门螺杆菌感染诊治相关国内外指南更新[J]. *河北医科大学学报*, 2019, 40(2): 125–127, 132.
- Wang CY, Li SM. Update on the diagnosis and treatment guidelines for helicobacter pylori infection in 2017: a review of domestic and international guidelines [J]. *Journal of Hebei Medical University*, 2019, 40(2): 125–127, 132.
- [20] 王舟一. 亚洲人群幽门螺杆菌分离株对抗生素耐药率的系统评价[D]. 泸州: 西南医科大学, 2018.
- Wang ZY. A systematic review of antibiotic resistance rates of helicobacter pylori isolates in Asian populations [D]. Luzhou: Southwest Medical University, 2018.
- [21] 叶峰, 陈涵, 杨振, 等. 幽门螺杆菌根除失败患者耐药情况分析 [J]. *江苏医药*, 2021, 47(12): 1267–1269.
- Ye F, Chen H, Yang Z, et al. An analysis of antibiotics resistance in patients with Helicobacter pylori eradication failure [J]. *Jiangsu Medical Journal*, 2021, 47(12): 1267–1269.
- [22] Rokkas T, Ekmektzoglou K. Advances in the pharmacological and regulatory management of multidrug resistant Helicobacter pylori[J]. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 2023, 16(12): 1229–1237.
- [23] Mannion A, Dzink-Fox JA, Shen ZL, et al. Helicobacter pylori Antimicrobial Resistance and Gene Variants in High- and Low-Gastric-Cancer-Risk Populations [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2021, 59(5): e03203–e03220.
- [24] Rosli NA, Al-Maleki AR, Loke MF, et al. Polymorphism of virulence genes and biofilm associated with in vitro induced resistance to clarithromycin in Helicobacter pylori[J]. *Gut Pathogens*, 2023, 15(1): 52.
- [25] Albasha AM, Elnosh MM, Osman EH, et al. Helicobacter pylori 23S rRNA gene A2142G, A2143G, T2182C, and C2195T mutations associated with clarithromycin resistance detected in Sudanese patients[J]. *BMC Microbiology*, 2021, 21(1): 38.
- [26] 宋顺佳, 王鑫莹, 姜菲菲, 等. 幽门螺杆菌对克拉霉素、甲硝唑和左氧氟沙星的耐药率及其相关耐药基因突变特征[J]. *吉林大学学报: 医学版*, 2022, 48(3): 630–637.
- Song SJ, Wang XY, Jiang FF, et al. Resistance rates of Helicobacter pylori to clarithromycin, metronidazole, and levofloxacin and

- mutation characteristics of their related drug resistance genes [J]. Journal of Jilin University(Medicine Edition), 2022, 48(3): 630–637.
- [27] 张择伟,张新颖,王晓东,等. 张家口市某院幽门螺杆菌的抗生素耐药菌株突变基因与耐药的相关性分析[J]. 医学动物防制, 2023,39(3):267–271, 277.
- Zhang ZW, Zhang XY, Wang XD, et al. Correlation analysis of mutation gene and drug resistance of *Helicobacter pylori* antibiotic-resistant strains in a hospital in Zhangjiakou City [J]. Journal of Medical Pest Control, 2023, 39(3): 267–271, 277.
- [28] Medakina I, Tsapkova L, Polyakova V, et al. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: molecular basis and diagnostic methods [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(11): 9433.
- [29] 简文华,李清秀,何朝晖. 幽门螺杆菌治疗的研究新进展[J]. 大医生,2023,8(8):131–134.
- Jian WH, Li QX, He CH. Recent advances in the treatment of *Helicobacter pylori* infection[J]. Doctor, 2023, 8(8): 131–134.
- [30] 王松松,苏艳华,战淑慧,等. 青岛地区幽门螺杆菌对左氧氟沙星耐药性及 *gyrA* 基因突变分析[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2013,22(5):428–430.
- Wang SS, Su YH, Zhan SH, et al. Analysis of the levofloxacin resistance and *gyrA* gene mutation of *Helicobacter pylori* in Qingdao [J]. Chinese Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2013, 22(5): 428–430.
- [31] Wang YH, Wang FF, Gong XL, et al. Genotype profiles of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies and strains with antimicrobial-induced resistance [J]. Therapeutic Advances in Gastroenterology, 2020, 13(期缺失): 1756284820952596.
- [32] Fasciana T, Calà C, Bonura C, et al. Resistance to clarithromycin and genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated in Sicily [J]. Journal of Medical Microbiology, 2015, 64(11): 1408–1414.
- [33] 林定赛,夏莲,方蕾,等. 幽门螺杆菌 *VacA* 基因型与耐药性相关性研究[J]. 医学研究杂志,2018,47(2):124–126.
- Lin DS, Xia L, Fang L, et al. Relevance analysis of *VacA* virulence gene of *Helicobacter pylori* and its drug resistance [J]. Journal of Medical Research, 2018, 47(2): 124–126.

收稿日期:2024-01-03

(上接第 1330 页)

- Molecular Medicine (Berlin, Germany), 2018, 96(8): 777–790.
- [57] 王媛媛,朱静,刘娜娜,等. 溶质载体家族 1 成员 5 及谷氨酰胺酶 2 对人甲状腺癌细胞体外恶性行为的影响及机制研究[J]. 陕西医学杂志,2023,52(3):344–348.
- Wang YY, Zhu J, Liu NN, et al. Effect of solute carrier family 1 member 5 and glutaminases 2 on malignant behavior of human thyroid cancer cells in vitro and its mechanism [J]. Shaanxi Medical Journal, 2023, 52(3): 344–348.
- [58] 黄本林,付瑞,王宁,等. 铜死亡与肿瘤的关系研究进展[J]. 临床误诊误治,2022,35(11):112–116.
- Huang BL, Fu R, Wang N, et al. Research progress on the relationship between Copper mortality and cancer [J]. Clinical Misdiagnosis & Mitherapy, 2022, 35(11): 112–116.
- [59] 唐妮娜,肖生祥. 微量元素与黑色素瘤[J]. 国外医学:医学地理分册,2007,28(2):67–68.
- Tang NN, Xiao SX. Trace elements and melanoma [J]. Foreign Medical Sciences(Section of Medgeography), 2007, 28(2): 67–68.
- [60] Lv HZ, Liu X, Zeng XH, et al. Comprehensive analysis of Cuproptosis -Related genes in immune infiltration and prognosis in melanoma[J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13: 930041.
- [61] Zhang C, Zeng YX, Guo XC, et al. Pan-cancer analyses confirmed the cuproptosis-related gene *FDX1* as an immunotherapy predictor and prognostic biomarker [J]. Frontiers in Genetics, 2022, 13: 923737.
- [62] 袁媛. *GLS1*、*HIF-1 α* 在结直肠癌中的表达及临床意义[D]. 十堰:湖北医药学院,2020.
- Yuan Y. Expression and clinical significance of *GLS1* and *HIF-1 α* in colorectal cancer[D]. Hubei: Hubei University of Medical, 2020.
- [63] 王婷,李春晓,南鹏,等. 基于多数据库分析代谢相关基因 *DLAT* 在结直肠癌中的表达及其临床意义 [J]. 解放军医学杂志,2019,44(4):311–317.
- Wang T, Li CX, Nan P, et al. Analysis of metabolic associated gene *DLAT* expression in colorectal cancer based on multi-database and its clinical significance [J]. Medical Journal of Chinese People's Liberation Army, 2019, 44(4): 311–317.

收稿日期:2023-11-01