

# 基于 PCR-CE 的宁波市奉化区幽门螺杆菌毒力基因谱和耐药谱分析

俞莹, 陈志勇, 应晟, 江唯波, 裘真

【关键词】 幽门螺杆菌; 毛细管电泳; 毒力基因; 耐药基因

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2025.06.026

【中图分类号】 R573 【文献标志码】 A 【文章编号】 1671-0800(2025)06-0640-03

幽门螺杆菌(*helicobacter pylori*, Hp)作为I类致癌原,与慢性胃炎、消化性溃疡及胃癌密切相关。2015年京都共识强调需精准治疗Hp感染,但由于抗生素滥用导致耐药性加剧,快速检测毒力基因及耐药突变对指导治疗至关重要。传统检测方法如培养、病理耗时且灵敏不足,聚合酶链反应-毛细管电泳(polymerase chain reaction-capillary electrophoresis, PCR-CE)能实现多靶点联检,为Hp的检测提供了新的方法。本研究建立基于PCR-CE的Hp检测体系,并揭示宁波市奉化区Hp的分子流行病学特征,现报道如下。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 纳入2022年6月至2023年5月于宁波市奉化区人民医院行胃镜检查的298例患者,纳入标准:(1)有消化不良等消化道症状;(2)无消化道急症,如胃穿孔等;(3)胃黏膜完整;(4)近1个月内未曾服用铋剂、质子泵抑制剂、H<sub>2</sub>受体拮抗剂以及抗菌药物。本研究获得宁波市奉化区人民医院医学伦理委员会(奉人医伦审2022研第017号)批准,所有研究者均同意参加本研究并签署书面知情同意书。

1.2 PCR-CE方法 采用多联检试剂<sup>[1]</sup>同步分析2个保守基因(尿素酶功能基因*ureC*、高拷贝管家基因16S rRNA)、4个毒力基因(*cagA*、*vacA*、*iceA*、*dupA*,含*vacA* s/m分型、*iceA*分型)及3个耐药位点[克拉霉素耐药位点23S rRNA(2143 A→G)<sup>[2]</sup>、阿莫西林

耐药位点*pbp1A*(1667 C→G)<sup>[3]</sup>、左氧氟沙星耐药位点*gyrA*(261 Y→R)]<sup>[4]</sup>。

1.3 灵敏度评估 Hp基因组DNA经数字PCR定量后梯度稀释,使用多联检试剂对同一梯度样本进行20次重复检测,以95%检测结果阳性的浓度为最低检出限。

1.4 特异性评估 对应不同毒力基因及耐药基因各选取16个不同样本,以测序方法为“金标准”,将测序结果在美国国家生物技术信息中心(national center for biotechnology information, NCBI)进行数据比对,获得基因信息与PCR-CE方法检测结果进行比较。

1.5 组织学检查 将通过胃镜获取的胃黏膜组织标本经常规甲醛固定和石蜡包埋,蜡块经切片后按常规脱蜡。用幽门螺杆菌染色液(宁波同盛生物科技有限公司)染色1~2 min,自来水洗30 s后烘干封片镜检。组织中幽门螺旋杆菌呈兰色,细胞核及组织背景呈蓝色,肥大细胞包浆颗粒呈紫红色。

1.6 统计方法 采用R语言(R 4.4.2)计算一致率及Kappa值,绘图使用GraphPad Prism 9软件。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

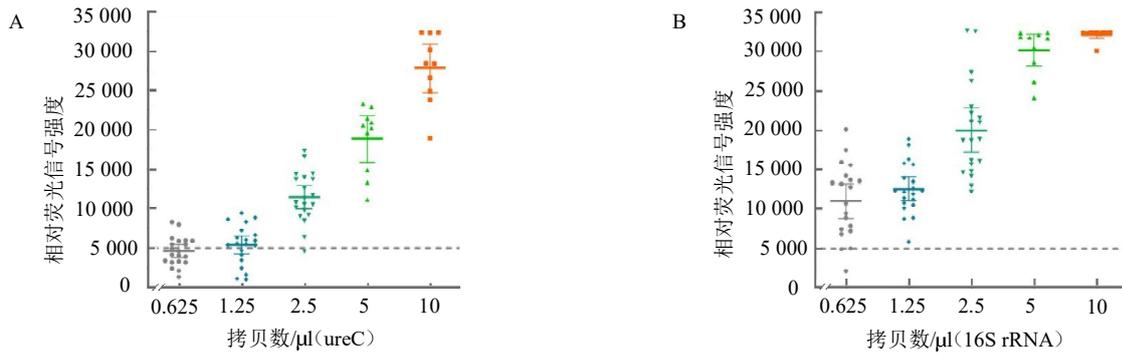
2.1 PCR-CE方法检测Hp的灵敏度 PCR-CE检测Hp的最低检出限可以达到2.5拷贝/μl,见图1。

2.2 PCR-CE方法测定毒力基因及耐药位点的特异性 PCR-CE与测序方法对比,毒力基因*iceA2*一致率为94%(Kappa=0.87,  $P < 0.05$ )、耐药基因*pbp1A*一致率为94%(Kappa=0.82,  $P < 0.05$ ),其他毒力基因及耐药基因检测结果一致率达到100%,见表1~2。

基金项目: 宁波市科技计划项目(2022S040)

作者单位: 315500 宁波,宁波市奉化区人民医院

通信作者: 裘真, Email: 904924692@qq.com



注: Hp 基因组 DNA 经数字 PCR 定量后梯度稀释, 使用多联试剂对同一梯度样本进行 20 次重复检测, 以 95% 检测结果阳性的浓度为最低检出限。A 为基因 ureC 的相对荧光信号强度; B 为基因 16S rRNA 的相对荧光信号强度; 相对荧光信号强度大于 5 000, 判定为阳性

图 1 不同核酸浓度的相对荧光信号强度

2.3 PCR-CE 与组织学检查的一致性 298 例胃黏膜组织样本经组织学检查, 其中 266 例与 PCR-CE 检测结果一致(89.3%,  $Kappa=0.74, P < 0.05$ )。

2.4 Hp 的宁波市奉化区特征 选取 78 例 PCR-CE 检测 Hp 阳性的样本, 其中毒力基因 cagA 检出率较高, dupA 检出率较低, iceA 以 1 型为主, vacA 基因

信号区均为 s1 型, 中间区以 m2 型为主, 见表 3。抗生素耐药基因突变纯合检出率从高到低依次为克拉霉素 23S rRNA(2143 A→G)、左氧氟沙星 gyrA(261 Y→R)、阿莫西林 pbp1A(1667 C→G), 见表 4。

### 3 讨论

本研究结果显示, PCR-CE 在 Hp 检测中表现出显著优势。方法学验证显示其灵敏度达 2.5 拷贝/μl, 能有效识别低载量感染; 与测序对比, 毒力与耐药基因检测一致率 ≥94%, 仅 iceA2 与 pbp1A 因基因分型复杂性(如杂合突变)存在少量差异, 但仍具高度可靠性( $Kappa > 0.8$ )。更重要的是, PCR-CE 与组织学诊断的一致性达 89.3%, 且耗时较传统病理染色缩短, 满足临床对快速精准诊断的需求。

本研究结果显示, 宁波市奉化区 Hp 菌株表现为

表 1 PCR-CE 方法鉴定毒力基因与测序结果的一致性

毒力基因	一致		不一致		一致率 (%)	Kappa 值	P 值
	+/+	-/-	+/-	-/+			
dupA	8	8	0	0	100	1	< 0.05
cagA	12	4	0	0	100	1	< 0.05
iceA1	6	10	0	0	100	1	< 0.05
iceA2	6	9	0	1	94	0.87	< 0.05
vacA(s1)	14	2	0	0	100	1	< 0.05
vacA(s2)	0	16	0	0	100	1	< 0.05
vacA(m1)	6	10	0	0	100	1	< 0.05
vacA(m2)	7	9	0	0	100	1	< 0.05

注: “+”表示阳性, “-”表示阴性; 两种方法依次为 PCR-CE、测序

表 2 PCR-CE 方法鉴定耐药位点突变与测序结果的一致性

耐药基因	一致				不一致	一致率 (%)	Kappa 值	P 值
	野生	突变	混合	阴性				
23S rRNA(2143 A→G)	3(A/A)	6(G/G)	1(R/R)	6(-/-)	0	100	1	< 0.05
pbp1A(1667C→G)	12(C/C)	0(G/G)	0(S/S)	3(-/-)	1(-/C)	94	0.82	< 0.05
gyrA(261Y→R)	5(Y/T)	2(R/G)	0(N/N)	4(-/-)	0	100	1	< 0.05
	2(Y/C)	3(R/A)						

注: R 代表 A/G; S 代表 G/C; Y 代表 C/T; N 代表 A/T/C/G; 两种方法依次为 PCR-CE、测序

表 3 Hp 阳性样本毒力基因检测结果

毒力基因	dupA	cagA	iceA	vacA	
				信号区	中间区
阳性(例)	14	73	56(iceA1) 13(iceA2)	77(s1)	29(m1) 45(m2)
阴性(例)	64	5	9	1	4
检出率(%)	17.9	93.6	88.5	98.7	94.9

表 4 Hp 阳性样本中耐药位点检测结果

耐药基因	23S rRNA (2143 A→G)	pbp1A (1667 C→G)	gyrA (261 Y→R)
野生纯合(例)	31	74	43
突变纯合(例)	32	4	27
杂合(例)	15	0	1
突变纯合检出率(%)	41.0	5.1	34.6

注: 7 例患者未检测到耐药位点 gyrA

s1/m2 型 vacA 和 cagA 高阳性率。cagA 通过激活 SHP-2 通路干扰细胞增殖<sup>[5]</sup>, 其携带率远高于欧洲 (14%~60%)<sup>[6-8]</sup>, 与中国上海 (98.8%)<sup>[9]</sup>、甘肃 (83.6%)<sup>[10]</sup> 数据相近, 可能与中国人群胃癌高发相关。vacA 基因表达一种分泌蛋白, 可诱导细胞空泡化, 与胃癌和消化性溃疡的风险增加有关; 其中 s1 型诱导空泡毒性强于 s2 型, 而 m2 型活性虽弱于 m1 型, 但高频出现仍提示显著致病潜力<sup>[11]</sup>。此外, iceA1 型检出率达 71.8%, 其编码的核酸内切酶可加剧胃上皮损伤, 与消化性溃疡风险正相关<sup>[12]</sup>。上述特征共同提示宁波市奉化区 Hp 菌株具有较强侵袭性, 需积极干预以降低癌变风险。

本研究耐药分析显示, 克拉霉素 (23S rRNA 突变率 41.0%) 和左氧氟沙星 (gyrA 突变率 34.6%) 的潜在耐药较高, 阿莫西林耐药较低仅 5.0%。克拉霉素耐药率高于浙江省既往数据 (26.1%~33.9%)<sup>[13-14]</sup> 和全国数据 (31%), 可能与基层经验性使用大环内酯类抗生素有关。而阿莫西林因靶点 pbp1A 突变率低 (5.0%), 仍可作为一线治疗首选。值得注意的是, 本研究发现 4 例 pbp1A 突变株, 提示需警惕阿莫西林耐药潜在增长趋势。

PCR-CE 通过单次检测同步实现 Hp 感染诊断、毒力评估及耐药预测, 较传统“分步检测”策略可节省检测成本。针对本地区耐药特点, 建议优先采用阿莫西林+四环素(耐药率低)或铋剂四联方案, 规避克拉霉素经验用药。但本研究为单中心横断面设计, 未追踪耐药突变与治疗结局的关联, 后续需扩大样本并开展多中心验证; 且耐药基因突变的检出, 不等同于耐药力。因此, 本研究提出的 PCR-CE 整合检测模式为实现 Hp 精准诊疗提供了技术支撑, 未来仍需通过动态随访验证耐药基因型与表型的对应关系, 同时结合区域性耐药流行病学数据优化检测位点, 为建立基于分子诊断的个体化治疗路径提供循证依据。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

## 参 考 文 献

- [1] CHI W J, WANG S, LIU T, et al. A rapid and high-throughput multiplex genetic detection assay for detection, semi-quantification and virulence genotyping of *Helicobacter pylori* in non-invasive oral samples[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023, 13: 1267288.
- [2] PIANA A, ARE B M, MAIDA I, et al. Genotypic characterization of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains[J]. *New Microbiol*, 2002, 25(2): 123-130.
- [3] MATTA A J, ZAMBRANO D C, MARTINEZ Y C, et al. Point mutations in the glycosyltransferase domain of the pbp1a gene in amoxicillin-resistant *Helicobacter pylori* isolates[J]. *Rev Gastroenterol Mex (Engl Ed)*, 2023, 88(2): 100-106.
- [4] LOK C H, ZHU D, WANG J, et al. Phenotype and molecular detection of clarithromycin and levofloxacin resistance in *Helicobacter pylori* clinical isolates in Beijing[J]. *Infect Drug Resist*, 2020, 13: 2145-2153.
- [5] 马元康, 李梦迪, 于国伟. 幽门螺杆菌毒力基因与胃癌的研究进展[J]. *中国研究型医院*, 2020, 7(4): 62-65.
- [6] POMARI E, URSINI T, SILVA R, et al. Concomitant infection of *Helicobacter pylori* and intestinal parasites in adults attending a referral centre for parasitic infections in north eastern Italy[J]. *J Clin Med*, 2020, 9(8): E2366.
- [7] FRANCK C, HOFFMANN A, LINK A, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection among blood donors in Saxony-Anhalt, Germany - a region at intermediate risk for gastric cancer[J]. *Z Gastroenterol*, 2017, 55(7): 653-656.
- [8] VAN BLANKENSTEIN M, VAN VUUREN A J, LOOMAN C W N, et al. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in the Netherlands[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2013, 48(7): 794-800.
- [9] 胡玢婕, 赵付菊, 王诗雯, 等. 幽门螺杆菌毒力基因与临床相关性的分析[J]. *检验医学*, 2016, 31(6): 479-485.
- [10] 王兴昌, 卢林芝, 孙丽琴, 等. 武威地区成年居民幽门螺杆菌感染现状、耐药性及分子流行特征调查[J]. *华南预防医学*, 2024, 50(6): 496-500.
- [11] XUE Z J, LI W J, DING H L, et al. Virulence gene polymorphisms in Shandong *Helicobacter pylori* strains and their relevance to gastric cancer[J]. *PLoS One*, 2024, 19(9): e0309844.
- [12] CHO H Y, CHO H, SONG W S, et al. Structural analysis of the virulence gene protein IceA2 from *Helicobacter pylori*[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 612: 162-168.
- [13] PAN J, SHI Z C, LIN D S, et al. Is tailored therapy based on antibiotic susceptibility effective? a multicenter, open-label, randomized trial[J]. *Front Med*, 2020, 14(1): 43-50.
- [14] 孙婷, 陈泽鑫, 李鹏, 等. 幽门螺杆菌耐药性及三种耐药检测方法的比较[J]. *世界华人消化杂志*, 2018, 26(18): 1111-1118.
- [15] 周燕, 郝倩, 白飞虎. 中国成人幽门螺杆菌分离株对抗菌药物耐药性的 Meta 分析[J]. *国际流行病学传染病学杂志*, 2024, 51(1): 49-55.

收稿日期: 2025-02-08

(本文编辑: 吴迪汉)