

胃窦胃体联合培养和荧光定量 PCR 应用于幽门螺杆菌检测的优劣

张小磊¹ 张军¹ 钮萍萍² 蒋海根¹ 蔡旭华¹ 董梁¹ 丁建¹ 唐涛¹ 朱伟华¹ 刘春燕¹ 左飞¹ 施杰民¹ 钟靖²

¹ 湖州市中心医院, 湖州师范学院附属中心医院消化内科, 浙江湖州 313000; ² 湖州市中心医院, 湖州师范学院附属中心医院分子医学重点实验室, 浙江湖州 313000

通信作者: 钟靖, Email: zhongjing1003@126.com

【摘要】目的 了解胃窦胃体联合培养和荧光定量 PCR(qPCR)法在临床幽门螺杆菌(Hp)诊断和耐药检测中的应用价值。**方法** 收集湖州市中心医院 2018 年 7 月至 2019 年 3 月接受胃镜检查的 384 例患者胃窦胃体黏膜组织,进行 Hp 分离培养及常用抗菌药物的药敏试验,并提取患者胃窦处样本的 DNA,采用 qPCR 法进行 Hp 核酸检测及其对左氧氟沙星和克拉霉素耐药性的检测。**结果** 胃窦胃体联合培养 Hp 阳性检出率(147 例,38.28%),与 qPCR 对 Hp 阳性检出率(164 例,42.71%)比较差异无统计意义($P>0.05$)。qPCR 对左氧氟沙星和克拉霉素耐药菌的检出率(56.10%和 57.93%)均高于联合培养(42.18%和 36.73%)($\chi^2=6.009$ 和 13.950, P 均 <0.05)。qPCR 与胃窦胃体联合培养对左氧氟沙星耐药菌检出不一致率为 43.48%,对敏感菌检出的不一致率为 36.11%;对克拉霉素耐药菌检出不一致率为 52.63%,对敏感菌检出的不一致率为 30.43%。**结论** 临床采用胃窦胃体联合培养的方法将极大地提高 Hp 的检出率;胃窦单部位 qPCR 在临床 Hp 感染的诊断中有一定优越性。qPCR 和分离培养法对于 Hp 左氧氟沙星、克拉霉素耐药菌的检出率的不一致性高, Hp 耐药性检测仍应以分离培养方法为准。

【关键词】 螺杆菌, 幽门; 细菌分离培养; 荧光定量 PCR; 耐药

基金项目: 湖州市科学技术局公益性研究应用项目(2018GYB32, 2017GY39)

DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20200311-00061

Comparison of combined culture of gastric antrum/body and fluorescence quantitative PCR in detection of *Helicobacter pylori*

Zhang Xiaolei¹, Zhang Jun¹, Niu Pingping², Jiang Haigen¹, Cai Xuhua¹, Dong Liang¹, Ding Jian¹, Tang Tao¹, Zhu Weihua¹, Liu Chunyan¹, Zuo Fei¹, Shi Jiemin¹, Zhong Jing²

¹Department of Gastroenterology, Huzhou Central Hospital, Affiliated Central Hospital of Huzhou University, Huzhou 313000, Zhejiang, China; ²Huzhou Central Hospital, Huzhou Key Laboratory of Molecule Medicine, Affiliated Central Hospital of Huzhou University, Huzhou 313000, Zhejiang, China

Corresponding author: Zhong Jing, Email: zhongjing1003@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the clinical values of combined culture of gastric antrum/body and fluorescence quantitative PCR (qPCR) in diagnosis of *Helicobacter pylori* (Hp) and drug resistance. **Methods** Hp cultivation and drug resistance tests to the commonly used antibiotics were carried out with the samples of gastric antrum and gastric body collected from 384 patients in Huzhou Central Hospital from July 2018 to March 2019. Hp DNA was extracted from the biopsy specimen of the patients' gastric antrum, and Hp nucleic acid and its resistance to levofloxacin and clarithromycin were detected by qPCR. **Results** The positive detection rate of Hp by combined culture of gastric antrum and gastric body (147 cases, 38.28%) had no significant difference with that by qPCR (164 cases, 42.71%) ($P>0.05$). The drug resistance rates of Hp to levofloxacin and clarithromycin by qPCR (56.10% and 57.93%) were higher than those by combined culture (42.18% and 36.73%) ($\chi^2=6.009$ and 13.950, P both <0.05). The inconsistency rates of detection of levofloxacin-resistant and sensitive Hp between qPCR and combined culture

method were 43.48% and 36.11%, respectively. The inconsistency rates of detection of clarithromycin-resistant and sensitive Hp were 52.63% and 30.43%, respectively. **Conclusions** The combined culture of gastric antrum and gastric body greatly improves the positive detection rate of Hp, and qPCR method for gastric antrum has superiority in the diagnosis of Hp infection. The qPCR method and the isolation culture method have high inconsistency on drugs resistance of Hp to levofloxacin and clarithromycin, and it should still be relied on the isolation culture method to evaluate the drug resistance of Hp.

[Key words] *Helicobacter pylori*; Bacteria isolation culture; Fluorescence quantitative PCR; Drug resistance

Fund program: Public Welfare Research and Application Project of Huzhou Science and Technology Bureau (2018GYB3, 2017GY39)

DOI:10.3760/cma.j.cn331340-20200311-00061

幽门螺杆菌(Hp)感染与慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌和 MALT 淋巴瘤等多种胃肠道疾病的发生密切相关^[1-2]。2018 年,Zamani 等^[3]报道不同地区 Hp 感染率在 35.0%~54.9%, 近年来 Hp 对抗菌药物的耐药率逐渐升高, 因此采用快速准确的 Hp 检测手段对临床诊疗具有重要意义。分离培养方法一直是 Hp 药敏检测的“金标准”, 但检测周期长, 培养条件苛刻, 而分子生物学方法检测时间短, 检出率高, 本研究比较 2 种方法对 Hp 的检出率和药敏检测情况, 以期为临床工作提供参考依据。

对象与方法

一、研究对象

以 2018 年 7 月至 2019 年 3 月在湖州市中心医院接受胃镜检查并同意取胃黏膜活检的患者为研究对象。纳入标准:(1)年龄在 16~70 岁, 性别不限;(2)近 4 周内未使用抑酸剂、铋剂及抗菌药物。排除标准:(1)严重胃出血、胃癌、消化道急症;(2)妊娠及哺乳期妇女;(3)合并影响研究结果的其他疾病, 如严重心脏病、肝病、呼吸系统疾病等。本研究共收集 384 例患者, 年龄(47.3±12.7)岁, 范围在 16~70 岁。本研究已通过伦理委员会审查(伦理审批号:2018-006-02)。

二、样本取样及运输

每位患者分别在胃窦和胃体各取 1 块胃黏膜组织, 每块胃黏膜组织采集后, 均分 2 份, 其中 1 份置于脑心浸液肉汤中用于菌种分离培养及药敏检

测。另 1 份置于无菌 EP 管或细胞冻存管内, 做好编号和标记, 用于提取 DNA。

三、Hp 分离培养及鉴定

取胃黏膜组织研磨均匀, 接种于含 5% 脱纤维绵羊血的平板上, 并置于三气培养箱中培养 3 d。通过菌体形态及尿素酶、氧化酶和过氧化氢酶生化反应判定 Hp 阴性或阳性。在 Hp 分离培养过程中, 只要胃窦或胃体其中任意一块组织 Hp 培养为阳性, 则胃窦胃体联合培养鉴定为 Hp 阳性。

四、药物敏感性实验

依据美国临床实验室标准化协会推荐方案将克拉霉素、左氧氟沙星、甲硝唑、阿莫西林、呋喃唑酮、四环素溶液分别加入琼脂稀释成相应的临界点耐药浓度(设定标准为克拉霉素 1 μg/mL、左氧氟沙星 2 μg/mL、甲硝唑 8 μg/mL、阿莫西林 2 μg/mL、呋喃唑酮 2 μg/mL、四环素 2 μg/mL)。若接种点有菌生长, 则该菌株判读为耐药。

五、荧光定量 PCR(qPCR)

提取患者胃窦黏膜的 DNA, 采用耐克拉霉素、耐喹诺酮及非耐药幽门螺杆菌核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)的说明书(江苏默乐生物科技股份有限公司)进行 Hp 及耐药突变的检测。

六、统计学分析

采用 Excel 软件记录和整理数据, 并运用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析, Hp 阳性检出及耐药情况采用例数和率描述, 组间比较采用 χ^2 检验。

结 果

一、Hp 检出率的比较

本研究分别采集了 384 例患者的胃窦、胃体黏膜组织各 1 块,胃窦 Hp 培养阳性检出率为 30.21% (116 例),胃体培养阳性检出率为 28.91% (111 例),两部位阳性检出率差异无统计学意义 ($\chi^2=0.156, P>0.05$)。胃窦胃体联合培养 Hp 阳性检出率为 38.28% (147 例),显著高于胃窦和胃体单部位 Hp 阳性检出率 ($\chi^2=5.557, 7.564, P<0.05$),而 qPCR 法 Hp 阳性检出率为 42.71% (164 例),与联合培养阳性检出率的差异无统计学意义 ($\chi^2=1.562, P>0.05$)。

二、两种方法对 Hp 耐药检出情况的对比

联合培养获得的 147 株 Hp 对甲硝唑、左氧氟沙星、克拉霉素的耐药率分别为 100.00% (147 株)、42.18% (62 株)、36.73% (54 株),对阿莫西林的耐药率为 3.40% (5 株),对盐酸四环素和呋喃唑酮均敏感。

qPCR 方法检测到 164 例 Hp 阳性患者,其中 92 例患者存在 *gyrA* 基因突变,检出率为 56.10%,高于联合培养对左氧氟沙星的耐药率 ($\chi^2=6.009, P<0.05$); 95 例患者存在 23S rRNA 基因突变,检出率为 57.93%,高于联合培养对克拉霉素的耐药率,差异具有统计学意义 ($\chi^2=13.950, P<0.05$),见表 1。

表 1 两种方法检测 Hp 对左氧氟沙星/克拉霉素耐药结果

检测方法	Hp 阳性(例)	耐药情况[例(%)]	
		左氧氟沙星	克拉霉素
联合培养	147	62(42.18)	54(36.73)
qPCR	164	92(56.10)	95(57.93)

注:Hp:幽门螺杆菌;联合培养:胃窦或胃体培养;qPCR:荧光定量 PCR

在 92 例存在 *gyrA* 基因突变的患者中,qPCR 和联合培养对于左氧氟沙星耐药情况检出的不一致率为 43.48% (40/92)。在未检测到 *gyrA* 基因突变的 72 例患者中,qPCR 和联合培养对于左氧氟沙星敏感菌检出的不一致率为 36.11% (26/72)。在 95 例存在 23S rRNA 基因突变的患者中,qPCR 和联合培养对于克拉霉素耐药菌检出的不一致率为 52.63% (50/95); 在未检测到 23S rRNA 基因突变的 69 例患者

中,qPCR 和联合培养对于克拉霉素敏感菌检出的不一致率为 30.43% (21/69)。

讨 论

Hp 与多种疾病相关联,早发现、早诊断、早治疗对疾病防治具有重要意义。既往临床多采用胃窦单部位活检进行 Hp 培养,多个共识及研究表明多部位活检能显著提高 Hp 检出率^[4-5]。本研究结果也表明胃窦胃体联合培养 Hp 阳性检出率明显高于胃窦及胃体单部位培养。随着分子生物学技术的发展,qPCR 方法已开始应用于 Hp 感染的检测及对多种抗菌药物的耐药性检测^[6]。本文胃窦单部位 qPCR 对 Hp 检出率高达 42.71%,且方法简单、快速,显示出较好的适用性和优越性。

调查显示,截至 2016 年 10 月我国 Hp 对克拉霉素、左氧氟沙星的耐药率分别为 28.9% 和 28.0%^[7]。笔者之前的研究显示,2013—2015 年湖州地区 Hp 对左氧氟沙星、克拉霉素的耐药率分别为 26.86% 和 20.60%^[8]。此文联合培养法发现本地区 Hp 对左氧氟沙星、克拉霉素的耐药率分别为 42.18%、36.73%,耐药率明显升高,提示近年来湖州地区 Hp 耐药情况严峻。Hp 对左氧氟沙星耐药的主要机制与 *gyrA* 基因突变有关^[9],而 Hp 对克拉霉素耐药的主要原因与其 23S rRNA V 功能区基因位点发生点突变有关^[10-12]。本研究采用 qPCR 法结合 Taqman 荧光探针技术检测 *gyrA* 基因的 6 种常见突变位点 (A260T、C261A、T261G、G271A、G271T、A272G) 以及与克拉霉素耐药相关的 23S rRNA 基因的 3 种常见突变位点 (A2142C、A2142G、A2143G)。结果发现,qPCR 法对左氧氟沙星和克拉霉素耐药基因检出率分别为 56.10% 和 57.93%,与 Hp 分离培养对两者耐药性检测结果的 inconsistency 率均较高。考虑其中的原因主要包含以下几点:(1)Hp 培养对实验环境及技术人员操作能力有很高要求,敏感性低,Hp 阳性检出率低于 qPCR 法;(2)一些培养结果为敏感型的菌株也被检测出有基因突变的情况,有可能是药敏试验中培养的 Hp 菌株混合株,里面含有一定比例的耐药菌株,而 qPCR 法相比于传统的药敏试验方法灵敏,故能

检测出突变的情况;(3)Hp 耐药可能是由除上述提到的几个突变位点外的其它突变或其它耐药机制引起的;(4)胃肠道存在其他病原微生物,试剂盒在检测中产生交叉反应,造成假阳性。

综上所述,我们认为临床采用胃窦胃体联合培养的方法将极大地提高 Hp 的检出率;胃窦单部位 qPCR 在临床 Hp 感染的诊断中有较好的适用性和优越性。qPCR 检测克拉霉素和左氧氟沙星耐药突变阳性率虽然高于 Hp 培养的药敏结果,但存在 Hp 耐药的基因型与表型不一致的问题,故建议本地区 Hp 耐药性检测仍应以分离培养方法为准。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

志谢 感谢国家体外诊断试剂临床实验项目(HP B/2)的大力支持

参 考 文 献

- [1] Tan MC, Graham DY. Gastric cancer risk stratification and surveillance after *Helicobacter pylori* eradication; 2020 [J]. *Gastrointest Endosc*, 2019, 90 (3): 457–460. DOI: 10.1016/j.gie.2019.05.034.
- [2] Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht V/Florence Consensus Report [J]. *Gut*, 2017, 66 (1): 6–30. DOI: 10.1136/gutjnl-2016-312288.
- [3] Zamani M, Ebrahimitabar F, Zamani V, et al. Systematic review with meta-analysis: the worldwide prevalence of *Helicobacter pylori* infection [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2018, 47 (7): 868–876. DOI: 10.1111/apt.14561.
- [4] Mégraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2007, 20 (2): 280–322. DOI: 10.1128/CMR.00033-06.
- [5] Selgrad M, Tammer I, Langner C, et al. Different antibiotic susceptibility between antrum and corpus of the stomach, a possible reason for treatment failure of *Helicobacter pylori* infection [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20 (43): 16245–16251. DOI: 10.3748/wjg.v20.i43.16245.
- [6] Hays C, Delerue T, Lamarque D, et al. Molecular diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in gastric biopsies: Evaluation of the Amplidiag® *H. pylori* + ClariR assay [J]. *Helicobacter*, 2019, 24 (2): e12560. DOI: 10.1111/hel.12560.
- [7] Hu Y, Zhu Y, Lu NH. Primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* in China [J]. *Dig Dis Sci*, 2017, 62 (5): 1146–1154. DOI: 10.1007/s10620-017-4536-8.
- [8] 钟婧, 张军, 钮萍萍, 等. 湖州地区幽门螺杆菌耐药情况分析 [J]. *国际流行病学传染病学杂志*, 2016, 43 (3): 164–168. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4149.2016.03.005.
Zhong J, Zhang J, Niu PP, et al. Analysis of antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* in Huzhou [J]. *Inter J Epidemiol Infect Dis*, 2016, 43 (3): 164–168. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4149.2016.03.005.
- [9] 张薇, 吴李培, 宣世海. 东台地区幽门螺杆菌多重耐药现状和相关基因突变的分析 [J]. *实用预防医学*, 2019, 26 (3): 364–367. DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2019.03.032.
Zhang W, Wu LP, Xuan SH. Multiple drug resistance status of *Helicobacter pylori* and related gene mutation analysis in Dongtai area [J]. *Practical Preventive Medicine*, 2019, 26 (3): 364–367. The DOI: 10.3969 / j.issn.1006-3110.2019.03.032.
- [10] Redondo JJ, Keller PM, Zbinden R, et al. A novel RT-PCR for the detection of *Helicobacter pylori* and identification of clarithromycin resistance mediated by mutations in the 23S rRNA gene [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2018, 90 (1): 1–6. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.09.014.
- [11] Miyamoto S, Watanabe Y, Oikawa R, et al. Analysis of *Helicobacter pylori* genotypes in clinical gastric wash samples [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37 (8): 10123–10132. DOI: 10.1007/s13277-016-4886-4.
- [12] Boyanova L, Markovska R, Yordanov D, et al. Clarithromycin resistance mutations in *Helicobacter pylori* in association with virulence factors and antibiotic susceptibility of the strains [J]. *Microb Drug Resist*, 2016, 22 (3): 227–232. DOI: 10.1089/mdr.2015.0199.

(收稿日期: 2020-03-11)