

· 论著 ·

粪便23SrRNA基因检测在幽门螺杆菌感染中的应用及克拉霉素耐药性分析

王志伟*

郑州市中医院检验科(河南 郑州 453000)

【摘要】目的 探究粪便23SrRNA基因检测在幽门螺杆菌(Hp)感染中应用,并分析克拉霉素耐药性。**方法** 选郑州市中医院2020年6月至2022年5月期间98例消化性溃疡患者,所有患者均接受胃黏膜组织活检药敏试验、粪便23SrRNA基因阳性检出率。**结果** 经胃黏膜组织活检,共检出59例Hp阳性;经粪便23SrRNA共检出73例阳性,粪便23SrRNA对Hp阳性检出率较胃黏膜组织活检高($\chi^2=4.547, P=0.033<0.05$);两种诊断方法Kappa为0.63,一致性中等;经粪便23SrRNA检测结果为Hp阳性患者中,经药敏试验确认耐药12例、敏感45例;经粪便23SrRNA检测结果确认耐药14例、敏感43例,其耐药率、敏感率之间相比均未见统计学意义($\chi^2=0.199, P=0.655>0.05$);两种诊断方法Kappa为0.73,一致性较强;突变位点中,2143、2142、2097突变率分别为16.44%、10.96%、5.48%、1.37%。**结论** 粪便23SrRNA对Hp阳性检出率高于胃黏膜活检Hp培养高,克拉霉素耐药率与药敏试验结果相近,提示可将其应用于Hp感染及克拉霉素耐药性分析检验中,为临床治疗方案制定提供更准确参考依据。

【关键词】 幽门螺杆菌(Hp); 粪便23SrRNA基因检测; 克拉霉素耐药性

【中图分类号】 R446

【文献标识码】 A

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2023.03.036

Application of Stool 23SrRNA Gene Detection in Helicobacter Pylori Infection and Clarithromycin Resistance Analysis

WANG Zhi-wei*

Zhengzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine Clinical Laboratory, Zhengzhou 453000, Henan Province, China

Abstract: Objective To explore the application of stool 23SrRNA gene detection in Helicobacter pylori (HP) infection and analyze clarithromycin resistance. **Methods** 98 patients with peptic ulcer in Zhengzhou hospital of traditional Chinese medicine from June 2020 to may 2022 were selected. All patients received drug sensitivity test of gastric mucosa biopsy and positive detection rate of 23srna gene in feces. **Results** HP was detected in 59 cases by gastric mucosal biopsy; A total of 73 cases were positive by stool 23SrRNA. The positive rate of stool 23SrRNA for HP was higher than that of gastric mucosa biopsy ($\chi^2=4.547, P=0.033 <0.05$); Kappa of the two diagnostic methods was 0.63, with moderate consistency; Among the patients whose stool 23SrRNA test results were HP positive, drug resistance was confirmed in 12 cases and sensitivity in 45 cases; The results of stool 23SrRNA detection confirmed that 14 cases were drug-resistant and 43 cases were sensitive. There was no statistical significance between the drug-resistant rate and sensitive rate ($\chi^2=0.199, P=0.655 >0.05$); The kappa of the two diagnostic methods was 0.73, with strong consistency; The mutation rates of 2143, 2142 and 2097 were 16.44%, 10.96%, 5.48% and 1.37% respectively. **Conclusion** The positive rate of stool 23SrRNA for HP is higher than that of gastric mucosa biopsy. The clarithromycin resistance rate is similar to the results of drug sensitivity test, suggesting that it can be used in the analysis and test of HP infection and clarithromycin resistance, and provide more accurate reference for the formulation of clinical treatment plan.

Keywords: Helicobacter Pylori (HP); Fecal 23SrRNA Gene Detection; Clarithromycin Resistance

幽门螺杆菌(Helicobacter pylori, Hp)为消化性溃疡主要发病原因,引发黏膜上皮细胞损伤,诱发局部炎症反应,出现胃溃疡、十二指肠溃疡等上消化道疾病,甚至诱发上消化道恶性肿瘤,威胁患者生命安全^[1]。克拉霉素属14元环大环内酯类抗生素,通过抑制细菌蛋白质合成过程以产生抑菌作用,为Hp感染引发的上消化道疾病主要治疗药物^[2]。目前在上消化道疾病患者是否伴有Hp感染,胃黏膜活检后Hp培养为基础诊断方案,并通过克拉霉素耐药性试验,以确认患者是否存在Hp感染情况,并以耐药性试验确认用药治疗方案,但此种方案具侵入性,且培养时间较长,难以满足临床治疗需求^[3]。粪便23SrRNA基因检测,指通过粪便采样后,经分子生物学方法明确其突变位点、突变率,具诊断灵敏度高、特异度高等特点,且诊断方式具无创性^[4]。为此,本次研究选郑州市中医院2020年6月至2022年5月期间98例消化性溃疡患者,均接受胃镜下黏膜活检后镜检、克拉霉素药敏试验及粪便23SrRNA检验,分析粪便23SrRNA检验对Hp阳性检出率及克拉霉素耐药性诊断质量。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选郑州市中医院2020年6月至2022年5月期间98例消化性溃疡患者,男性51例、女性47例,年龄17~74岁,平均(46.79±8.14)岁。

纳入标准:接受消化内镜检查确认为消化道溃疡;接受诊断前1个月未接受相关药物治疗(抗生素、铋剂、抑酸剂等);自愿接受镜下活检;无精神异常性疾病,可配合完成检查。排除标准:胃泌素瘤;妊娠期、哺乳期女性;实质性脏器严重功能障碍;伴食管胃底静脉曲张、肝硬化等疾病;消化道出血。

1.2 方法

1.2.1 试剂盒基础信息 试剂、试剂盒:包括脑心浸液、哥伦比亚琼脂培养基等,见表1。

1.2.2 病理组织活检 内镜检查过程中,在其溃疡病灶采集1块胃黏膜组织,立即放入1mL脑心浸出液液体培养基中,-20℃保存;自然解冻后研磨,接种于哥伦比亚琼脂培养基持续培养2~3d(微需氧环境,37℃)。挑取疑似菌落,应用革兰染色试剂染色、镜检,经染色呈现红色,镜检可见螺旋状、海鸥状、S形细菌结构后,初步判断为Hp感染,后经尿素酶、氧化酶、过氧化酶试验再次检验确认是否为Hp阳性。Hp阳性菌株,应用克拉霉素标准品进行药敏试验,耐药临界值为1μg/mL。

1.2.3 粪便23SrRNA提取及测序 患者接受消化内镜检查前1d,在坐便器内无水位置,以取样勺挖取3g未接触空气的粪便样本,置于0.9%氯化钠溶液中-20℃保存。解冻后应用粪便基因组提取试剂盒,进行粪便中核酸提取,对Hp23SrRNA中V区片段扩增,将所提取的核酸为模板进行基因扩增,将所获得产物为扩增模板,

【第一作者】王志伟,男,主管检验技师,主要研究方向:细菌感染与耐药性。E-mail: shengchaoxue2502@126.com

【通讯作者】王志伟

应用23S-2正向及反向引物继续扩增, 获得最终产物; 依据Hp基因序列(GenBank U27270)进行23SrRNA基因引物设计(见表2), 记录基因突变情况(A2143G、A2142G、A2097G、A2097C); 位点中均未发生突变为敏感, 其中任一个位点突变为耐药。

高通量测序: 对于粪便23SrRNA扩增失败样本, 应用高通量测序, 应用美国Thermo Fisher Scientific公司生产的核酸定量仪, 定量粪便样本中核酸浓度, 应用美国Agilent Technologies公司生产的生物分析仪评价核酸分子完整性, 对于质量合格样本应用16S扩增Hp16SrRNA中V3、V4区, 引物设计见表2; 将所获取产物经磁珠纯化后再次扩增(引物带测序接头), 扩增产物经磁珠纯化后, 检测核酸样本合格后进行高通量平台测序(Illumina), 并对核酸测序结果通过拼接、过滤获取有效测序数据。对所获得物种进行分类注释, 获得物种分布情况。

1.3 观察指标 (1)比较胃黏膜组织活检、粪便23SrRNA对Hp感染阳性检出率; (2)比较胃黏膜组织活检、粪便23SrRNA检查Hp对克拉霉素耐药性检出情况; (3)统计粪便23SrRNA不同位点突变发生率情况。

1.4 统计学方法 (%)表示计数资料, ($\bar{x} \pm s$)表示计量资料, χ^2 、t检验; $P < 0.05$ 为统计学验证标准; 数据统计软件为SPSS 24.0; 以Kappa进行一致性分析。

2 结果

2.1 Hp感染阳性检出率 经胃黏膜组织活检, 共检出59例Hp阳性; 经粪便23SrRNA共检出73例阳性, 粪便23SrRNA对Hp阳性检出率较胃黏膜组织活检高($\chi^2=4.547, P=0.033 < 0.05$); 两种诊断方法Kappa为0.63, 一致性中等, 见表3。

2.2 克拉霉素耐药率 经粪便23SrRNA检测结果为Hp阳性患者中, 经药敏试验确认耐药12例、敏感45例; 经粪便23SrRNA检测结果确认耐药14例、敏感43例, 其耐药率、敏感率之间相比均未见统计学意义($\chi^2=0.199, P=0.655 > 0.05$); 两种诊断方法Kappa为0.73, 一致性较强, 见表4。

2.3 粪便23SrRNA耐药基因位点突变情况 突变位点中, 2143、2142、2097突变率分别为16.44%、10.96%、5.48%、1.37%, 见表5。

表1 试剂、试剂盒基础信息

名称	厂家	型号	规格
脑心浸液	英国OXOID	CM1135	500g
哥伦比亚琼脂培养基	英国OXOID	CM0935	500g
革兰染色试剂	北京陆桥技术股份有限公司	CM1001	10mL×4
尿素酶	中国海博生物技术有限公司	GS004	20支
氧化酶	北京陆桥技术股份有限公司	M-153	20支
过氧化酶	中国海博生物技术有限公司	HB8650	20支
克拉霉素标准品	北京科展生物技术有限公司	S17135	纯度98% , 1g
粪便基因组提取试剂盒	中国天根生化科技有限公司	DP328	50次

表2 引物序列

引物	引物
23S-1	F: 5' -GGCTCTTTGAGTCCTTTTAGGACAA-3' R: 5' -CTCCATAAGAGCCAAAGCCCTTACT-3'
23S-2	F: 5' -CCACAGCGATGTGGTCTCAG-3' R: 5' -CTCCATAAGAGCCAAAGCCC-3'
16S	F: 5' -TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCTACGGGNGGCWGCAG-3' R: 5' -GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACACTACHVGGGTATCTAATCC-3'

表3 Hp感染阳性检出率

	胃黏膜组织活检		合计
	阳性	阴性	
阳性	57	18	73
阴性	2	20	25
合计	59	38	98

表4 克拉霉素耐药率

粪便23SrRNA	药敏试验		合计
	耐药	敏感	
耐药	8	6	14
敏感	4	39	43
合计	12	45	57

表5 粪便23SrRNA耐药基因位点突变情况

位点	突变情况	耐药突变率(n=73)
2143	A→G	12(16.44)
2142	A→G	8(10.96)
2097	A→G	4(5.48)
	A→C	1(1.37)

3 讨论

Hp易聚集在浓酸环境下, 感染后首先引发慢性胃炎、胃溃疡等疾病, 随病症反复发作、迁延不愈, 可诱发上消化道组织癌变, 威胁患者生命安全, 需在发现Hp感染后予以根治性治疗, 以保证患者消化系统功能稳定性^[5]。目前在对Hp感染相关上消化道疾病治疗中, 多应用质子泵抑制剂、抗生素、铋剂等药物共同治疗, 通过改变胃酸强酸环境、清除Hp、促进胃黏膜修复, 以改善消化系统功能。其中克拉霉素抗菌谱与罗红霉素、红霉素等相同, 但对革兰阳性菌(肺炎球菌、葡萄球菌等)抗菌作用更强, 近年来多将其用于Hp清除治疗中, 通过阻碍细胞核蛋白50S亚基结构, 以抑制细菌蛋白质合成, 促进细菌凋亡^[6-7]。但随抗生素使用频率增加、Hp自然进化等多种因素影响, 在对Hp感染患者克拉霉素治疗过程中, 存在一定耐药性, 表现为Hp清除治疗难度大、病情迁延不愈等, 增加治疗难度, 需更换其它方案治疗, 以满足Hp根除治疗需求^[8]。因此在对上消化道疾病患者临床用药指导中, 了解其是否伴有Hp感染及Hp对克拉霉素是否耐药尤为关键。

在对Hp感染常规诊断中, 13C呼气试验为目前被公认的Hp感染有效方法, 诊断用时相对较短, 检查前受检者空腹3小时后, 温开水完整口服一颗C-13尿素胶囊胶囊后, 静坐15min后向专用呼气卡中吹气, 并经专用检测仪器内进行Hp检测, 以检测Hp感染情况^[9]。但此种诊断方案仅可评估患者是否存在Hp感染, 无法明确Hp是否存在克拉霉素耐药情况, 因此单纯应用13C呼气试验对临床指导用药效果相对有限。消化内镜下活检, 可直接观察病灶特征、检查病灶内Hp情况, 诊断具灵敏度高、操作简单。应用消化内镜下活检诊断中, 一般取样位置为溃疡病灶处, 但受医生取样准确性、Hp分布情况等因素影响, 可能会影响Hp阳性检出率, 且在Hp镜下检查中, 存在一定主观性, 同样可能会出现漏诊情况^[10-11]。消化内镜病理组织活检具有创性, 患者对其诊断存在一定恐惧、抵触情绪, 诱发患者生理应激反应, 甚至出现抵触行为, 影响镜下活检组织准确性, 因此在对Hp诊断中, 应用消化内镜病理组织活检诊断, 以出现假阴性、假阳性情况。但应用消化内镜下病理组织活检, 可通过细菌培养后完成药敏试验, 了解患者Hp是否存在克拉霉素耐药情况, 以为临床用药指导提供参考意见, 但因此种诊断方式对Hp阳性检出率相对较低, 因此可能会影响最终药敏试验诊断结果完整性。

(下转第 103 页)

