

文章编号:1001-5132 (2010) 04-0130-03

# 幽门螺杆菌的左氧氟沙星耐药性及其基因分析

寿佩勤<sup>1</sup>, 费红军<sup>1</sup>, 岑叶平<sup>1</sup>, 王布江<sup>2</sup>, 陈新江<sup>1</sup>

(1.宁波天一职业技术学院 医学技术系, 浙江 宁波 315104; 2.宁波市第一医院, 浙江 宁波 315010)

**摘要:** 分析了宁波地区幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)对左氧氟沙星的耐药情况, 探讨了 Hp 对左氧氟沙星的耐药机制. 取患者胃黏膜组织分离培养 Hp, 检测 Hp 对左氧氟沙星的耐药率; 提取左氧氟沙星耐药 Hp DNA, PCR 扩增并测序比较. 结果表明: 宁波地区 Hp 对左氧氟沙星的耐药率为 22.5%, 左氧氟沙星耐药 Hp 菌株 *gyrA* 基因 91 位密码子发生点突变. 提示宁波地区 Hp 对左氧氟沙星已产生一定的耐药性; 左氧氟沙星耐药 Hp *gyrA* 基因突变可能是本地区左氧氟沙星耐药的重要原因之一.

**关键词:** 幽门螺杆菌; 左氧氟沙星; 耐药性; 基因突变

中图分类号: R573

文献标识码: A

随着常用根除幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)抗生素耐药性的逐年提高, 将左氧氟沙星列入三联/四联疗法已是目前应用较多的根除 Hp 的手段, 有关其临床使用效果也有不少报道. 但 Hp 对喹诺酮类药物较易获得耐药, 并且该类药物存在着交叉耐药性. 已有报道表明<sup>[1-2]</sup>, Hp 对左氧氟沙星的耐药率为 1.4%~21.5%. 在目前治疗 Hp 感染中应用左氧氟沙星较多的情况下, 有必要对 Hp 左氧氟沙星耐药性进行检测, 以便及时调整治疗方案, 提高治疗效果. 笔者检测了宁波地区 Hp 对左氧氟沙星的耐药情况, 并对其耐药基因进行了分析.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Hp 菌株取自宁波市第一医院接受胃镜检查

的患者; Hp NCTC11637 标准株由浙江大学医学院病原生物学教研室惠赠. 酪蛋白绵羊血平皿(宁波华美伦祥和医疗用品有限公司); UNIQ-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒(上海生工生物工程技术服务有限公司); PCR 扩增试剂盒(上海生工生物工程技术服务有限公司); 药敏试验纸片(杭州微生物试剂有限公司); 引物委托上海生工生物工程技术服务有限公司合成, T-A 克隆试剂盒及插入片段测序(上海生工生物工程技术服务有限公司).

### 1.2 方法

#### 1.2.1 Hp 的培养和检测

取尿素酶快速鉴定阳性的 168 个患者胃黏膜活检组织标本作 Hp 培养和鉴定. 将标本研磨后涂布在选择性培养基上, 37℃ 微需氧环境培养 5 d; 将所得细菌进行革兰染色镜检, 尿素酶及过氧化氢试验鉴定, 分离获得 Hp 40 株, 其中 26 株来自慢

性胃炎患者, 14 株来自消化性溃疡患者。

### 1.2.2 药物敏感试验

采用抗生素药敏试验纸片琼脂扩散法, 对分离到的 *Hp* 进行左氧氟沙星药物敏感试验, 同时进行阿莫西林、阿奇霉素、克拉霉素、甲硝唑的耐药情况对照。按照中国药品生物制品检定所制定的抗菌药物药敏试验判定标准判定结果。

### 1.2.3 *Hp* 的 DNA 提取和 PCR 扩增

选取对左氧氟沙星耐药 *Hp* 菌株, 按 UNIQ-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒操作说明提取 *Hp* DNA, 按照引物上游为 5'-TTTAGCTTATCATA T-3'、引物下游为 5'-TCCAAGCGCATGGAAAATT CCATTCTCACTAGTGAA-3' 扩增 *gyrA* 基因。PCR 反应体系同文献[3]。

### 1.2.4 *gyrA* 基因测序和序列分析

PCR 产物的纯化及测序由上海生工生物工程技术服务有限公司完成, 所得序列采用 DNAMAN 软件进行比对分析。耐药菌株 *gyrA* 的核苷酸和氨基酸序列与敏感株和 NCTC11637 的 *gyrA* 基因序列作比较。

## 2 结果

### 2.1 药敏试验结果

40 株 *Hp* 中 9 株对左氧氟沙星耐药, 耐药率为 22.5%, 此结果已作报道<sup>[3]</sup>。5 株对阿奇霉素耐药的菌株同时对左氧氟沙星耐药; 2 株对灭滴灵耐药的菌株同时对左氧氟沙星耐药。

### 2.2 PCR 扩增结果

9 株耐药 *Hp* 中有 6 株 *gyrA* 基因扩增出约 240 bp 的 PCR 产物, 部分结果见图 1。

### 2.3 *Hp* 对左氧氟沙星的耐药性与 *gyrA* 基因突变关系分析

与 NCTC11637 菌株和敏感菌株 *gyrA* 基因序列比较, 左氧氟沙星耐药 *Hp* 第 91 位氨基酸 Asp 被 Gly 取代(91 位密码子 GAT 中 A → G)。对左氧氟沙

星敏感 *Hp* 中随机挑选 6 个进行检测, 均未发现与左氧氟沙星耐药有关的 91 位密码子点突变。

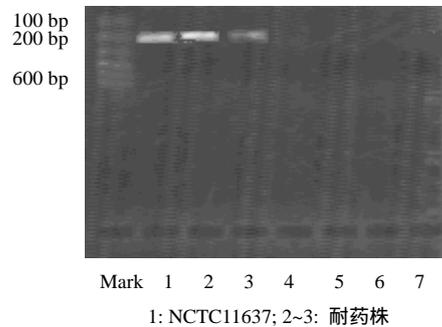


图 1 PCR 扩增 *gyrA* 结果(1.5%琼脂糖凝胶)

## 3 讨论

近几年来, 人群中 *Hp* 耐药菌株比例不断上升, 而且 *Hp* 耐药率在不同国家和地区不尽相同, 对根除 *Hp* 感染带来了困难。左氧氟沙星是一种新型的氟喹诺酮类抗生素, 对大多数革兰阳性菌和革兰阴性菌具有杀菌活性。国内外许多研究已表明, 含有左氧氟沙星的新三联疗法在 *Hp* 根治方面有明显的疗效<sup>[4-5]</sup>。但是随着左氧氟沙星在治疗 *Hp* 中应用的增多, *Hp* 对左氧氟沙星的耐药性也逐渐产生。本研究结果显示, 宁波地区 *Hp* 对左氧氟沙星的耐药率已达到 22.5%, 分析认为这可能与临床其他抗感染治疗中左氧氟沙星应用的日益广泛, 以及 *Hp* 治疗方案中左氧氟沙星使用率的逐渐提高有关, 也有可能是以往较多使用喹诺酮类药物引起交叉耐药所致。

左氧氟沙星对 *Hp* 的耐药机制主要发生在 *gyrA* 基因突变上, 而 *gyrA* 耐药基因突变范围主要集中在 67~106 位氨基酸的区域。在本研究中, 左氧氟沙星耐药 *Hp* 第 91 位氨基酸 Asp 被 Gly 取代(91 位密码子 GAT 中 A → G), 而对左氧氟沙星敏感 *Hp* 菌株均未发现与左氧氟沙星耐药有关的 91 位密码子点突变。上述结果显示, *gyrA* 基因中 91 位 Asp 突变可能是造成本地区 *Hp* 对左氧氟沙星产生耐药性的重要机制。

左氧氟沙星的抗菌作用机制是通过抑制细菌的 DNA 促旋酶活性, 阻断细菌 DNA 合成和复制, 产生快速杀菌作用. DNA 促旋酶是 1 个由 2 个亚基即 *gyrA* 和 *gyrB* 组成的四聚体酶, 分别由 *gyrA* 基因和 *gyrB* 基因编码, 功能是将 DNA 分子由负超螺旋转为共价闭合双链分子. 左氧氟沙星耐药 *Hp* 由于 *gyrA* 基因发生点突变造成 *gyrA* 空间构象改变, 使左氧氟沙星不能结合 *gyrA* 基因, 从而阻断了抑制 *Hp* 基因组复制的作用而导致细菌耐药.

综上所述, 宁波地区患者感染的 *Hp* 对左氧氟沙星已经产生了一定的耐药性, 部分耐药 *Hp* 存在 *gyrA* 基因突变. 因此, 在使用左氧氟沙星三联疗法根治 *Hp* 时, 如果出现疗效不显著应考虑出现耐药菌株的可能性. 并且, *Hp* 中 *gyrA* 基因突变可能是本地区 *Hp* 对左氧氟沙星耐药的主要因素.

#### 参考文献:

- [1] Lee C C, Lee V W, Chan F K, et al. Levofloxacin resistant *Helicobacter pylori* in Hong Kong[J]. Chemotherapy, 2008, 54(1):50-53.
- [2] Marzio L, Coraggio D, Capodicasa S, et al. Role of the preliminary susceptibility testing for initial and after failed therapy of *Helicobacter pylori* infection with levofloxacin, amoxicillin, and esomeprazole[J]. Helicobacter, 2006, 11(4):237-242.
- [3] 寿佩勤, 费红军, 岑叶平, 等. 宁波地区幽门螺杆菌优势基因型及其与耐药性的关系[J]. 现代实用医学, 2010, 22(2):148-151.
- [4] 冷爱民, 寻琛, 张桂英. 含左氧氟沙星四联幽门螺杆菌补救治疗方案的疗效观察[J]. 临床药物治疗杂志, 2009, 7(4):22-24.
- [5] 高秀芳. 以高剂量左氧氟沙星为基础的补救方案对幽门螺杆菌根除失败后的研究[J]. 中国医药论坛, 2007, 5(4):67-68.

## Study on Levofloxacin Resistance and Resistant Genes of *Helicobacter pylori*

SHOU Pei-qin<sup>1</sup>, FEI Hong-jun<sup>1</sup>, CEN Ye-ping<sup>1</sup>, WANG Bu-jiang<sup>2</sup>, CHEN Xin-jiang<sup>1</sup>

( 1.Department of Medical Technology, Ningbo College of Health Sciences, Ningbo 315104, China;

2.Ningbo First Hospital, Ningbo 315010, China )

**Abstract:** In this paper, we examine the antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* (*Hp*) to levofloxacin in Ningbo, and investigate its possible molecular mechanism of resistance. To determine the resistance rate of *Hp* to levofloxacin, *Hp* is detached from mucous membrane of patients' stomachs, and is subsequently cultured. The levofloxacin-resistant *Hp* DNA is then extracted, and the *gyrA* gene is amplified by PCR from resistance and susceptible strains. These PCR-products are sequenced, and the nucleotide sequences are analyzed. The results show that the resistance rate of *Hp* to levofloxacin is found to be 22.5%, and levofloxacin resistance strains of *Hp* possesses mutation in codon 91. The *Hp* strain in Ningbo has developed resistance to levofloxacin, and mutation of *gyrA* gene plays an important role in the possible mechanism of resistance to levofloxacin.

**Key words:** *Helicobacter pylori*; levofloxacin; antibiotic resistance; mutation

**CLC number:** R573

**Document code:** A

( 责任编辑 史小丽 )