

· 综述 ·

幽门螺杆菌分子检测技术研究进展

崔玉峰¹ 林毅军² 王志民¹**【摘要】**幽门螺杆菌(Hp)感染诊断金标准通常为组织病理、细菌培养或¹³C/¹⁴C尿素呼气试验。

组织学检查和细菌培养为侵入性检查,技术要求高、耗时长,不适用于儿童及患有基础疾病的老年人。¹³C尿素呼气试验价格高,¹⁴C有放射性不推荐儿童或孕妇使用,且尿素呼气试验易受质子泵抑制剂、抗菌药物等药物干扰。分子检测在菌株分型、抗菌药物耐药筛选具有优势,而且样本来源多样,侵入性或非侵入性检测均能应用。本文对Hp分子检测技术做一综述。

【关键词】幽门螺杆菌; 分子诊断; 检测

Research progress on molecular detection technology of *Helicobacter pylori* Cui Yufeng¹, Lin yijun², Wang Zhimin¹. ¹Shanghai BEION Pharmaceutical Technologies Co., LTD, Shanghai 200949, China; ²Department of Gastroenterology, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China
Corresponding author: Wang Zhimin, Email: wzm@beion.com.cn

【Abstract】 Histopathology, bacterial culture or ¹³C/¹⁴C urea breath test are usually considered as the gold standards for diagnosis of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection. Histologic examination and bacterial culture are invasive, with high technical requirements and long process. Therefore, they are not applicable to children and elderly patients with underlying diseases. ¹³C urea breath test is expensive, ¹⁴C is radioactive and not recommended for children or pregnant women, urea breath test is easily interfered by drugs such as proton pump inhibitors, antibiotics and other drugs. Molecular tests have advantages on strain typing and antibiotic resistance screening, and can use different sample types from both invasive and non-invasive approaches. This article provides a review of the molecular detection techniques for *H. pylori*.

【Key words】 *Helicobacter pylori*; Molecular diagnosis; Detection

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)是一种螺旋状、微需氧、革兰阴性的人类病原细菌, Hp感染可引起人类慢性胃炎、萎缩性胃炎、肠化生、黏膜相关淋巴组织淋巴瘤、消化性溃疡和胃癌(gastric cancer, GC)^[1-2], Hp还是强力促结直肠癌因子,可引起多种胃外疾病^[3]。1994年Hp被世界卫生组织国际癌症研究机构列为I类致癌物。2018年,一项来自六大洲73个国家受试者的荟萃分析显示: Hp感染率为44.3%,其中发展中国家感染率为50.8%,发达国家感染率为34.7%^[4]。我国大陆Hp感染率从1983至1994年的58.3%下降到2015至2019年的40.0%^[5]。全球约75% GC和5.5%恶性肿瘤(如咽喉癌、肠癌和胃肠道淋巴瘤等)由Hp引起的炎症和损伤造成^[6]。

根除Hp可减轻胃黏膜炎症,阻止萎缩、化生和异型增生进展,从而降低Hp相关GC的发病率和病死率^[7]。根

除Hp治疗中广泛使用抗菌药物造成Hp的耐药突变和自发耐药突变,是导致根治失败的主要原因之一^[8]。自1982年发现Hp以来,已建立了许多Hp感染检测方法,如细菌培养法、组织病理学诊断、尿素呼气检测(urea breath test, UBT)以及免疫层析或酶联免疫吸附分析法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)等。细菌培养法是显微镜鉴定活检样本的细菌培养物,灵敏度和特异性可分别达92%和100%,但Hp培养困难,对实验室要求高,所需时间长,在取样培养前,患者应停用抗菌药物至少4周^[9]。组织病理学诊断是指组织病理切片后染色观察,常用染色方法有HE染色、吉姆萨染色、美蓝染色和免疫组织化学等,但活检取样位置、样点数、样本大小、染色方法、抗菌药物和质子泵抑制剂(proton-pump inhibitor, PPI)的使用均会影响诊断准确性。UBT是临床最为推荐的Hp非侵入诊断方法,也是Hp诊断金标准。通过检测受检者服用¹³C或¹⁴C尿素胶囊前后呼出气体中¹³C或¹⁴C丰度差异进行诊断。若存在Hp感染,受检者呼出Hp尿素酶分解尿素所释放的¹³CO₂或¹⁴CO₂经小肠吸收进入血液,再随呼气排出时收集并用特殊设备检测。免疫层析或ELISA检测患者粪便或尿

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2024.05.001

基金项目: 国家重点研发计划(No. 2023YFC230)

作者单位: 200949 上海, 上海北昂医药科技股份有限公司¹;
100015 北京, 首都医科大学附属北京地坛医院消化科²

通信作者: 王志民, Email: wzm@beion.com.cn

液中Hp抗原,样本易于采集,适用于依从性差的患者,并且免疫层析法适合居家自检。应用ELISA可检测患者的Hp免疫球蛋白G抗体(IgG),但阳性结果并不能区分既往感染与当前感染或既往感染和活动性感染,也无法证明Hp清除效果,血清学检测优势不受PPI或抗菌药物治疗的干扰。随着耐药菌株的出现,又有许多新的分子检测技术问世,特别是等温核酸扩增和新一代测序技术(next-generation sequencing, NGS),其速度快、灵敏度高、特异性强,还能发现或检测单核苷酸变异(single nucleotide variants, SNVs),已广泛应用于病原微生物及耐药性检测。本文重点对Hp分子检测方法进展进行综述,特别是在分型、耐药检测中的应用。

一、核酸扩增技术

1. 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR): (1) Hp定性检测:在特异性引物引导下,DNA聚合酶扩增目的片段已广泛应用于细菌或病毒感染诊断。1990年,PCR技术被证实有望用于Hp的临床检测^[10],检出限(limit of detection, LOD)可低至20拷贝^[11],用于胃组织活检样品时,灵敏度和特异性均可达100%。早期PCR检测需要在扩增反应后用凝胶电泳分析扩增产物,操作繁琐耗时长。实时荧光定量PCR(real-time PCR, RT-PCR)技术不需电泳辅助分析,有研究显示其灵敏度(72/72)和特异性(16/16)均为100%^[12]。

原则上,定性检测应选择具有Hp特异的高度保守位点作靶序列,如16S rRNA基因、ureA、ureC、cagA、23S rRNA基因和vacA等。16S rRNA和23S rRNA基因虽然在细菌中普遍存在且保守^[13],但其特异性可能不足以满足Hp的精确检测需求。cagA和vacA基因不仅能够检测Hp的存在,还能够提供有关其致病性的额外信息^[14],但可能受到菌株变异的影响。因ureA和ureC基因在该菌中的高度保守性和特异性^[15],通常检测性能较为稳定。要尽可能收集美国国家生物技术信息中心DNA序列数据库(GenBank)中所有Hp及其近缘种的基因序列信息,通过比对选择高度保守序列,据此设计引物和探针组合,以提高检测特异性并避免近缘种的干扰,降低LOD值;RT-PCR检测Hp灵敏度和特异性均能达到100%^[12],另外,使用两个不同靶基因也能够提高特异性^[16]。侵入性胃组织活检样本和非侵入性唾液、粪便或牙菌斑样本均可提取DNA供PCR检测,但样本间的检出率会存在差异。

(2) Hp定量分析:2002年,RT-qPCR应用于Hp定量检测胃镜活检样本中Hp的单拷贝ureC基因,未知样本Hp定量可精确到1 000个细菌/反应,线性范围跨6个量级,可检测到细胞培养和组织病理学检测不到的样本^[17]。次年,另一研究组用同样方法检测了23S rRNA基因(2拷贝/基因组)^[18],每个样本精确定量到300个细菌,相当于600个拷贝,定性

检测低至30个细菌,线性范围6个量级。在临床样本检测时,RT-qPCR阳性检出率为62.5%(共120个样本),高于快速尿素酶试验(rapid urease test, RUT)(36%)、细菌培养(24%)、PCR(51%)和组织学(47.5%)^[19],PCR可以从标准方法未检出感染的样本中检测出阳性患者(诊断为Hp感染的标准是培养呈阳性或RUT、组织学、PCR和RT-qPCR中至少2项呈阳性)。因此,笔者建议在监视Hp根除疗效的临床研究中,除标准方法外,可采用RT-PCR,因其是最可靠的Hp鉴定方法,另外RT-PCR也可应用于Hp分型和耐药性检测。

(3) Hp分型:PCR可快速检测毒性因子基因型,指导临床医生更快更准确地制定用药方案。Hp毒性因子参与在胃黏膜定植、免疫逃逸和致病等,迄今已发现87个毒性因子相关基因^[20]。依据细胞毒素相关基因A(cagA)和空泡毒素基因A(vacA)将Hp菌系分为两个类型,I型Hp表达CagA和VacA蛋白,II型Hp不表达CagA和VacA蛋白,中间型为CagA或VacA表达,二者表达相互独立^[21]。CagA和VacA与溃疡疾病和高GC风险相关,检测cagA和vacA可预测Hp感染的毒性潜力^[22]。

cagA基因产物CagA蛋白会导致胃黏膜慢性炎症、调节细胞凋亡和促进遗传不稳定诱导癌变^[23]。当前,根据Hp菌株基因组中是否携带cagA基因分为cagA⁺和cagA⁻,但不足以反映cagA多态性及其产物的致病力差异。根据CagA蛋白C末端EPIYA(Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala)基序两侧序列,Hp划分为东亚型与西方型两个亚型。东亚型CagA Hp较西方型CagA Hp有更强的致癌能力^[24]。CagA分布与地域有关,西方国家CagA⁺ Hp感染率约为60%,东亚国家则高于90%^[25],来自我国山东省、广西壮族自治区、湖南省、青海省和黑龙江省共269例患者分离物中,261例患者cagA阳性(97%),其中9例为西方型^[26]。

所有Hp菌株均携带vacA基因^[27],VacA蛋白能诱导真核细胞中空泡形成,导致上皮细胞空泡化、调节自噬对细胞产生毒性。vacA基因多态性导致不同菌株携带不同等位基因^[28],涉及5个变异区域,与致病性相关研究较多的是s区(s1a、s1b、s1c和s2)和m(m1、m2)区,据此分成为不同的亚型。s区的s2变体N端比s1多了12个氨基酸亲水序列,空泡化能力低于s1变体^[29]。携带m1变体的VacA能够结合低密度脂蛋白受体相关蛋白1(low-density lipoprotein receptor-related protein 1, LRP1)而诱导细胞内活性氧累积,激活Akt通路,导致宿主细胞自噬和凋亡,但m2变体不与LRP1结合^[30]。研究发现vacA s1和vacA m1等位基因与较高的癌前病变和GC风险相关^[31]。

(4) Hp耐药性检测:从分子水平看,Hp绝大多数耐药突变是药物靶标基因的SNVs,阻碍了药物与靶基因的特异性结合。如CLA靶向50S核糖体亚基23S核糖体RNA亚基

V区的肽基转移酶而抑制细菌蛋白质合成, 23S rRNA基因的点突变阻碍了CLA与23S rRNA亚基的结合, 导致对CLA的耐药性^[32]。基于PCR的Hp耐药性检测方法如下:

单耐药 (single drug resistance, SDR): 因为绝大多数耐药突变由SNVs导致, 表现为SDR。用高灵敏的PCR或RT-PCR可以很快获得准确的检测结果, LOD值可低至数个细胞或低于尿素酶试验^[33]。

多重耐药 (multidrug resistance, MDR): 多重耐药由相关基因突变累积导致的MDR, 对未知突变可以采用PCR结合测序^[34]或全基因组测序, 对已知突变可采用多重PCR检测相关基因, 如金黄色葡萄球菌多个抗菌药物耐受基因检测^[35]。外排泵基因过表达和生物膜形成导致的MDR检测, 可用RT-PCR^[36]或RT-qPCR检测^[37]。少数超过单碱基水平的耐药突变需要与其他方法联合检测。

异质性耐药 (heteroresistance, HR): 2003年, Kim等^[38]研究发现41例患者胃窦和胃体两个活检部位出现HR, 随机扩增多态性DNA标记 (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 指纹分析证实耐药Hp从敏感Hp发展而来, 而非多菌株共感染, 但未能区分Hp敏感株与耐药株。此后, PCR、荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 和测序技术用于异质性耐药研究^[39]。在上述研究中, 基本都是从胃的两个部位取样, 而最多检测每人32个分离物的ddPCR^[40]检测则避免了对耐药菌株的低估, 显示了ddPCR在HR背景下的分析潜力。在检测HR时, PCR和测序有望成为AST的替代方法。

等温核酸扩增技术: 用PCR-RFLP分析Hp菌株的ureA-ureB、ureC-ureD和flaA基因, 能高效揭示Hp的物种多样性^[41]。但PCR步骤需要变性、退火和延伸等变温循环, 需要热循环仪而且耗时长。为此开发了多种高灵敏、快速和等温的扩增技术, 广泛用于微生物检测。

不同等温核酸扩增体系都有其DNA聚合酶的最适温度或温度范围, 如环介导等温扩增技术 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 为60 °C~65 °C, 重组酶聚合酶扩增 (recombinase polymerase amplification, RPA) 为37 °C~42 °C。LAMP应用于粪便样本Hp检测, LOD值可达200~400拷贝^[42]。其他等温核酸扩增方法还有重组酶介导等温核酸扩增 (recombinase-aided isothermal amplification, RAA) 侧向层析 (LOD值: 1.2×10^2 CFU/ml)^[43]和RAA结合肽核酸 (peptide nucleic acid, PNA) 辅助的DNA分裂酶探针 (LOD值: 0.105 CFU/ml)^[44]等。

RPA结合规律间隔成簇短回文重复序列技术 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 结合了RPA快速放大和CRISPR精确识别切割的优势, 为分子诊断提供了新的解决方案。从基于CRISPR的粪便样本检测^[45]到一管式RPA-CRISPR技术的开发^[46], 再到高通量的

Cas12a检测系统优化^[47], 以及利用增强的CRISPR-Cas12a转切割活性提升检测灵敏度^[48], 这些研究为非侵入性Hp检测提供了新的可能性和前景, 随着技术的进一步发展, 预计这些方法将在临床实践中得到广泛应用, 从而帮助改善Hp感染相关疾病的诊断和治疗。

无论PCR还是等温核酸扩增技术, 在满足检出限、灵敏度、特异性等基本要求前提下, Hp多靶点检测是该领域的研究热点之一, 以便同时实现Hp定性、分型以及耐药性等检测。

二、DNA测序技术

DNA测序技术能检测临床样本中Hp的存在、分型、耐药突变和药敏试验。测序技术通常用来检测Hp分型和(或)耐药性突变基因, 不单纯检测Hp的存在与否。样本要经培养或PCR扩增后测序, NGS分析133例胃活检标本中^[49], 成功检测出126例Hp阳性 (灵敏度为95%)。早期报道以ureC为靶标, PCR产物测序与RAPD对29个临床Hp分离物分型比较证实前者区分菌株比后者更具有可重复性和可靠性^[50]。用活检样本扩增并测序Hp的cagA和vacA基因能可靠分型^[51], 并发现毒性更强的cagA⁺ s1m1菌株以及vacA m1基因型在高风险地区比低风险地区更普遍, 这可能是导致这两个地区GC风险差异的原因。此外, GC患者样本的PCR测序^[52]发现最常见的毒性相关基因型是cagA⁺ (97.75%) 和vacA s1m1 (93.25%)。一项NGS对146个Hp菌株的cagA分型证实所有基因型都可准确归类^[53]。

直接测序临床样本的Hp 23S rRNA基因^[54], 确认耐CLA的菌株都有A2143G和A2144G突变, 而敏感菌株无此突变。上述133例胃活检样本中92例有耐药突变 (73%)^[45], 包括63例单基因突变和29例多基因突变, 分别有27例和16例接受治疗; 治疗失败与突变基因数量相关, 单基因突变者治疗失败率为19% (5/27), 多基因突变者治疗失败率达到了69% (11/16)。笔者认为需要一项前瞻性研究来确定是否可以用NGS指导抗菌药物治疗以降低治疗失败的风险。此外, WGS还可以发现与耐药性相关的新基因型^[55]。

NGS可直接预测Hp菌株对抗菌药物的敏感性, 有望成为传统药敏试验的替代方案^[52]。140个临床Hp菌株的E-Test[®]药敏试验对CLA、MTZ、TET、LVX和利福平的表型抗性与NGS的WGS确定的靶基因中SNVs出现情况进行比较, 总体上, CLA、LVX和利福平的表型药敏检测结果与WGS检测的23S rRNA、gyrA和rpoB基因中的SNVs一致性 > 99%。对来自刚果的102个菌株研究^[55]表明, 用WGS的耐药性相关基因变异的发现方法 (发现率为100%) 有助于识别与表型耐药性相关的关键基因突变, 因此认为WGS可以替代抗菌药物敏感性检测, 特别是AMX、CLA和LVX。Zhou等^[56]近期一项研究也证实了CLA和LVX的基因型耐药性与表型耐药性完美符合, 这对根治Hp具有重要意义。

与其他技术相比,测序技术可提供最基础的序列突变信息,使PCR等检测技术的引物设计以及RFLP检测时筛选合适的限制性内切酶有了依据。但上世纪的Sanger测序技术速度慢、操作繁琐以及费用高,一般实验室难以负担,在NGS问世前,数据库中的DNA序列信息十分有限。在美国NIH于2004年启动的\$1 000 Genome项目推动下,NGS测序仪从2005年相继问世。迄今,数百个Hp菌株基因组完成测序。测序技术除可以检测全基因组和直接检测耐药基因突变外,还可以进行分型、遗传多样性分析和基因组进化研究。尽管测序技术有如此多的用途,但核酸扩增技术在分析速度、费用等方面还有优势,在有准确序列信息的前提下,仍推荐采用基于PCR的分子检测。

三、分子杂交技术

分子杂交技术用于Hp检测具有高特异性和灵敏度,可以准确识别目标核酸序列,并适用于多种样本如组织和血液。然而,技术也存在一些劣势:相较于PCR,灵敏度较低,探针设计和合成复杂且昂贵,检测时间较长,并且在定量分析方面不如荧光定量PCR精确。尽管如此,分子杂交技术仍然在Hp的分子检测中发挥重要作用,因其不需要通过扩增,能够直接检测样本中的目标核酸序列,减少了操作的复杂性和错误,通常与其他技术结合以提升检测效果。分子杂交是基于核酸的互补性原理,将一个标记了特定序列的探针与待检测的核酸样品结合,杂交过程是高度特异性的,可以根据所使用的探针已知序列进行特异性的靶序列检测,从而对DNA或RNA中特定的序列进行检测、分离和定量分析。1996年,Andrey等^[57]利用快速比色杂交方法对33例接受治疗的患者活检标本进行检测,与标准方法相比(培养法及RUT),阳性符合率为3/3,阴性符合率28/30。

FISH是一种可靠、快速、灵敏的检测和可视化待测菌株的方法,其技术原理是将荧光素直接或间接标记的核酸探针与待测样本中的核酸序列按照碱基互补配对的原则进行杂交,经过洗涤后直接在荧光显微镜下观察。Ebru等^[58]利用FISH计数研究了Hp克拉霉素耐药性,对234例患者的23S rRNA基因的2 142及2 143位点突变进行的检测,结果表明FISH可以同时确定Hp是否存在及克拉霉素的耐药性,确定Hp是否存在时的敏感性和特异性分别达到83.5%和91.4%。另一项来自中东地区的研究也利用FISH技术,对165例胃肠道疾病患者活检标本分离出的Hp的23S rRNA基因进行分析,最终检出19例产生耐药基因突变的标本^[59]。

Liu等^[60]利用单链DNA-量子点(ssDNA-QDs)和互补Hp DNA杂交,开发了一种新型方便的荧光DNA传感器,可以快速定量检测Hp DNA,检测的线性范围是1.25~875 pmol/L,检测限达到0.46 pmol/L。当目标Hp DNA不存在时,ssDNA-QDs被吸附至氧化石墨烯(graphene oxide, GO)表面,导致荧光猝灭现象,而Hp DNA存在时,与

ssDNA-QDs杂交后,结构发生变化,荧光猝灭效应消失,此时检测到的荧光信号与Hp DNA的浓度成正比。

四、总结与展望

虽然大多数Hp感染者并没有症状,但感染后会增加发生消化性疾病的风险,因此早期准确诊断、有效治疗可改善患者临床结局。传统方法如UBT、RUT和血清学检测等,通常具有较高的特异性,但可能会受到胃酸分泌量和抗菌药物使用等因素影响;而分子检测方法具有更高的灵敏度和特异性,能准确检测到Hp的遗传物质,且在低菌量或抗菌药物治疗后的阶段都能适用。分子检测方法被中国《第六次全国Hp感染处理共识报告(非根除治疗部分)》^[61]中推荐为Hp耐药基因型检测的主要方法。

核酸扩增技术优点是高灵敏度和高特异性,能够检测低菌量,适用于早期诊断和治疗效果评估,但其局限性在于需要专门的设备和技术,此外可能会受到样本处理和污染的影响。DNA测序技术优点是可全面分析Hp的基因组,识别抗药性基因和毒力因子,提供详细的遗传信息,其局限性是成本较高,且数据分析复杂,需要较高的技术水平。分子杂交技术优点是可用于直接检测Hp的特定DNA序列,且操作相对简单,适用于快速诊断,局限性是灵敏度和特异性较PCR稍逊,可能需要更长的实验时间。

综上,分子检测技术在Hp检测中具备一定的优势,在特定的需求下选择合适的分子技术可以更精准的检测结果。分子检测可为临床医生的正确用药提供宝贵的参考信息,但不能替代医生在根治Hp过程中的核心作用。随着分子检测技术发展,更便捷的操作方式及采样方法会应用于Hp检测中。此外,Hp分子检测技术有望在灵敏度、特异性、周转时间和费用等方面上实现新突破,实现早期Hp诊断以及耐药性检测,为根除治疗Hp提供更精准的检测结果。

参 考 文 献

- [1] 田家庚,李熳,王骥煜,等.胃饥饿素介导幽门螺杆菌相关消化不良的动物实验研究[J/CD].中华实验和临床感染病杂志(电子版),2022,16(5):313-319.
- [2] 李梦声,韩中博.胃癌的高危可控因素--幽门螺杆菌感染[J/CD].中华实验和临床感染病杂志(电子版),2023,17(3):145-150.
- [3] Yang H, Mou Y, Hu B. Discussion on the common controversies of *Helicobacter pylori* infection[J]. *Helicobacter*,2023,28(1):e12938.
- [4] 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.
- [5] Ren S, Cai P, Liu Y, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in China: A systematic review and meta-analysis[J]. *J Gastroenterol Hepatol*,2022,37(3):464-470.
- [6] Mladenova I. Clinical relevance of *Helicobacter pylori* infection[J]. *J Clin Med*,2021,10(16):3473.
- [7] Chiang TH, Chang WJ, Chen SLS, et al. Mass eradication of *Helicobacter pylori* to reduce gastric cancer incidence and mortality:

- a long-term cohort study on Matsu Islands[J]. Gut,2021,70(2):243-250.
- [8] Wang G, Wilson TJM, Jiang Q, et al. Spontaneous mutations that confer antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*[J]. Antimicrob Agents Chemother,2001,45(3):727-733.
- [9] 周治中, 王丽梅. 幽门螺杆菌临床诊断进展[J]. 中国热带医学,2011,11(8):1031-1033.
- [10] Hoshina S, Kahn SM, Jian W, et al. Direct detection and amplification of *Helicobacter pylori* ribosomal 16S gene segments from gastric endoscopic biopsies[J]. Diagn Microbiol Infect Dis,1990,13(6):473-479.
- [11] Hammar M, Tyszkiewicz T, Wadström T, et al. Rapid detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy material by polymerase chain reaction[J]. J Clin Microbiol,1992,30(1):54-58.
- [12] Kobayashi D, Eishi Y, Ohkusa T, et al. Gastric mucosal density of *Helicobacter pylori* estimated by real-time PCR compared with results of urea breath test and histological grading[J]. J Med Microbiol,2002,51(4):305-311.
- [13] Yang H, Hu B. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and recent advances[J]. Diagnostics,2021,11(8):1305.
- [14] Mohammed A, Atef S, Ahmed E, et al. *Helicobacter pylori* vacA, cagA and iceA genotypes in dyspeptic patients from southwestern region, Saudi Arabia: distribution and association with clinical outcomes and histopathological changes[J]. BMC Gastroenterol,2019,19(1):1-11.
- [15] Saurabh KP, Girish NM, Chandra BP, et al. *Helicobacter pylori* is not eradicated after triple therapy: a nested PCR based study[J]. BioMed Res Int,2014,2014(1):483136.
- [16] Wang YK, Kuo FC, Liu CJ, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments[J]. World J Gastroenterol, 2015,21(40):11221-11235.
- [17] He Q, Wang JP, Osato M, et al. Real-time quantitative PCR for detection of *Helicobacter pylori*[J]. J Clin Microbiol,2002,40(10):3720-3728.
- [18] Lascols C, Lamarque D, Costa JM, et al. Fast and accurate quantitative detection of *Helicobacter pylori* and identification of clarithromycin resistance mutations in *H. pylori* isolates from gastric biopsy specimens by real-time PCR[J]. J Clin Microbiol,2003,41(10):4573-4577.
- [19] Shukla SK, Prasad KN, Tripathi A, et al. Quantitation of *Helicobacter pylori* ureC gene and its comparison with different diagnostic techniques and gastric histopathology[J]. J Microbiol Methods,2011,86(2):231-237.
- [20] Rodriguez AM, Urrea DA, Prada CF. *Helicobacter pylori* virulence factors: relationship between genetic variability and phylogeographic origin[J]. Peer J,2021,9:e12272.
- [21] Xiang Z, Censini S, Bayeli PF, et al. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin[J]. Infect Immun,1995,63(1):94-98.
- [22] Cardos IA, Zaha DC, Sindhu RK, et al. Revisiting therapeutic strategies for *H. pylori* treatment in the context of antibiotic resistance: focus on alternative and complementary therapies[J]. Molecules,2021,26(19):6078.
- [23] Jones K, Whitmire J, Merrell DS. A tale of two toxins: *Helicobacter pylori* CagA and VacA modulate host pathways that impact disease[J]. Front Microbiol,2010,1:115.
- [24] Takahashi-Kanemitsu A, Knight CT, Hatakeyama M. Molecular anatomy and pathogenic actions of *Helicobacter pylori* CagA that underpin gastric carcinogenesis[J]. Cell Mol Immunol,2020,17(1):50-63.
- [25] Kao CY, Sheu BS, Wu JJ. *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis[J]. Biomed J,2016,39(1):14-23.
- [26] Xue Z, Yang H, Su D, et al. Geographic distribution of the cagA, vacA, iceA, oipA and dupA genes of *Helicobacter pylori* strains isolated in China[J]. Gut Pathog,2021,13(1):39.
- [27] Soyfoo DM, Doomah YH, Xu D, et al. New genotypes of *Helicobacter pylori* VacA d-region identified from global strains[J]. BMC Mol Cell Biol,2021,22:1-12.
- [28] Amieva MR, El-Omar EM. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection[J]. Gastroenterology,2008,134(1):306-323.
- [29] McClain Mark S, Cao P, Iwamoto H, et al. A 12-amino-acid segment, present in type s2 but not type s1 *Helicobacter pylori* VacA proteins, abolishes cytotoxin activity and alters membrane channel formation[J]. J Bacteriol,2001,183(22):6499-6508.
- [30] Ansari S, Yamaoka Y. Role of vacuolating cytotoxin A in *Helicobacter pylori* infection and its impact on gastric pathogenesis[J]. Expert Rev Anti Infect Ther,2020,18(10):987-996.
- [31] Matos JJ, de Sousa HAC, Marcos-Pinto R, et al. *Helicobacter pylori* CagA and VacA genotypes and gastric phenotype: a meta-analysis[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol,2013,25(12):1431-1441.
- [32] Lin Y, Shao Y, Yan J, et al. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: From potential biomolecular mechanisms to clinical practice[J]. J Clin Lab Anal,2023,37(7):e24885.
- [33] Tshibangu-KE, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* infection and antibiotic resistance--from biology to clinical implications[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol,2021,18(9):613-629.
- [34] Versalovic J, Shortridge D, Kibler K, et al. Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*[J]. Antimicrob Agents Chemother,1996,40(2):477-480.
- [35] Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, et al. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*[J]. J Clin Microbiol,2003,41(9):4089-4094.
- [36] Liu ZQ, Zheng PY, Yang PC. Efflux pump gene hefA of *Helicobacter pylori* plays an important role in multidrug resistance[J]. World J Gastroenterol,2008,14(33):5217-5222.
- [37] Ge X, Cai Y, Chen Z, et al. Bifunctional enzyme SpoT is involved in biofilm formation of *Helicobacter pylori* with multidrug resistance by upregulating efflux pump Hp1174 (gluP)[J]. Antimicrob Agents Chemother,2018,62(11):e00957-18.
- [38] Kim JJ, Kim JG, Kwon DH. Mixed-infection of antibiotic susceptible and resistant *Helicobacter pylori* isolates in a single patient and underestimation of antimicrobial susceptibility testing[J]. Helicobacter,2003,8(3):202-206.
- [39] Kim J, Kocsár I, Buzás G, et al. Efficacy of clarithromycin depends on the bacterial density in clarithromycin-heteroresistant *Helicobacter pylori* infections: an in situ detected susceptibility and quantitative morphometry-based retrospective study[J]. Pathol Oncol Res,2021,27:1609863.
- [40] Sun L, Talarico S, Yao L, et al. Droplet digital PCR-based detection of clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates reveals frequent heteroresistance[J]. J Clin Microbiol,2018,56(9):e00019-18.
- [41] Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU, et al. PCR-based RFLP analysis of DNA sequence diversity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*[J]. Nucleic Acids Res,1992,20(23):6221-6225.
- [42] Park CG, Kim S, Jeon HS, et al. Validation of loop-mediated

- isothermal amplification to detect *Helicobacter pylori* and 23S rRNA mutations: A prospective, observational clinical cohort study[J]. J Clin Lab Anal, 2021, 35(1):e23563.
- [43] Zhu X, Zhao Y, Zhu C, et al. Rapid detection of *cagA*-positive *Helicobacter pylori* based on duplex recombinase aided amplification combined with lateral flow dipstick assay[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2022, 103(1):115661.
- [44] Wang Y, Chen X, Wang P, et al. A visual detection assay for *Helicobacter pylori* in saliva based on recombinase-aided amplification and peptide nucleic acid-assisted split DNAzyme probes[J]. Sensor Actuat B-Chem, 2023, 396:134582.
- [45] Qiu E, Jin S, Xiao Z, et al. CRISPR-based detection of *Helicobacter pylori* in stool samples[J]. Helicobacter, 2021, 26(4):e12828.
- [46] Dai B, Xiang A, Du D, et al. Rapid and sensitive assay of *Helicobacter pylori* with one-tube RPA-CRISPR/Cas12 by portable array detector for visible analysis of thermostatic nucleic acid amplification[J]. Front Microbiol, 2022, 13:858247.
- [47] Liu H, Wang J, Hu X, et al. A rapid and high-throughput *Helicobacter pylori* RPA-CRISPR/Cas12a-based nucleic acid detection system[J]. Clinica Chimica Acta, 2023, 540:117201.
- [48] Habimana J, Mukama O, Chen G, et al. Harnessing enhanced CRISPR/Cas12a trans-cleavage activity with extended reporters and reductants for early diagnosis of *Helicobacter pylori*, the causative agent of peptic ulcers and stomach cancer[J]. Biosens Bioelectron, 2023, 222:114939.
- [49] Nezami BG, Jani M, Alouani D, et al. *Helicobacter pylori* mutations detected by next-generation sequencing in formalin-fixed, paraffin-embedded gastric biopsy specimens are associated with treatment failure[J]. J Clin Microbiol, 2019, 57(7):e01834-18.
- [50] Kansau I, Raymond J, Bingen E, et al. Genotyping of *Helicobacter pylori* isolates by sequencing of PCR products and comparison with the RAPD technique[J]. Res Microbiol, 1996, 147(8):661-669.
- [51] Sicinschi LA, Correa P, Peek Jr RM, et al. *Helicobacter pylori* genotyping and sequencing using paraffin-embedded biopsies from residents of colombian areas with contrasting gastric cancer risks[J]. Helicobacter, 2008, 13(2):135-145.
- [52] Li Y, Lin R, Jin Y, et al. Genotyping *Helicobacter pylori* antibiotic resistance and virulence-associated genes in patients with gastric cancer in Wenzhou, China[J]. Arab J Gastroenterol, 2021, 22(4):267-271.
- [53] Hjalmarsson S, Alderborn A, Fock C, et al. Rapid combined characterization of microorganism and host genotypes using a single technology[J]. Helicobacter, 2004, 9(2):138-145.
- [54] Zhao LJ, Huang YQ, Chen BP, et al. *Helicobacter pylori* isolates from ethnic minority patients in Guangxi: Resistance rates, mechanisms, and genotype[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(16):4761-4770.
- [55] Tshibangu-Kabamba E, Ngoma-Kisoko PdJ, Tuan VP, et al. Next-generation sequencing of the whole bacterial genome for tracking molecular insight into the broad-spectrum antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* clinical isolates from the Democratic Republic of Congo[J]. Microorganisms, 2020, 8(6):887.
- [56] Zhou Y, Zhong Z, Hu S, et al. A Survey of *Helicobacter pylori* antibiotic-resistant genotypes and strain lineages by whole-genome sequencing in China[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2022, 66(6):e02188-21.
- [57] Andrey PL, Alan F, Alain B, et al. Rapid colorimetric hybridization assay for detecting amplified *Helicobacter pylori* DNA in gastric biopsy specimens[J]. J Clin Microbiol, 1996, 34(3):530-533.
- [58] Ebru D, Ozlem Y, Asalia ZO, et al. Rapid identification of *Helicobacter pylori* and assessment of clarithromycin susceptibility from clinical specimens using FISH[J]. J Pathol Clin Res, 2017, 3(1):29-37.
- [59] Jina V, Jamal F, Sharareh M, et al. Molecular assessment of resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori* strains isolated from patients with dyspepsia by fluorescent in situ hybridization in the Center of Iran[J]. BioMed Res Int, 2020, 2020(1):2304173.
- [60] Liu Z, Su X. A novel fluorescent DNA sensor for ultrasensitive detection of *Helicobacter pylori*[J]. Biosens Bioelectron, 2017, 87:66-72.
- [61] 中华医学会消化病分会幽门螺杆菌学组. 第六次全国幽门螺杆菌感染处理共识报告(非根除治疗部分)[J]. 胃肠病学, 2022, 27(5):289-304.

(收稿日期: 2024-03-14)

(本文编辑: 孙荣华)

崔玉峰, 林毅军, 王志民. 幽门螺杆菌分子检测技术研究进展[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2024, 18(5):257-262.

中华医学会