

## 幽门螺杆菌的基因分型技术及其应用

王佳静, 谷海瀛

宁波大学医学院, 浙江 宁波 315211

[摘要] 幽门螺杆菌(Hp)可以在人群中广泛传播,并会引发一系列的胃肠道疾病甚至胃癌。不同基因型的Hp感染可能会引发不同类型的疾病,而基因分型技术是研究这类问题的重要方法。本文主要介绍了多位点序列分型、脉冲场凝胶电泳、随机扩增多态DNA、扩增片段长度多态性和全基因组测序这五种基因分型技术,通过综述这几种技术在Hp基因分型中的应用进展,比较它们之间的优缺点,为今后研究Hp的致病机制、传播机制以及流行病学调查提供方法学依据。



[关键词] 螺杆菌, 幽门; 基因型; 序列标记位点; 电泳, 凝胶, 脉冲场; 多态性, 限制性片段长度; 随机扩增多态DNA技术; 聚合酶链反应; 基因组, 细菌; 综述  
[中图分类号] Q75 [文献标志码] A

### Research progress on genotyping of *Helicobacter pylori*

WANG Jiajing, GU Haiying (Medical School of Ningbo University, Ningbo 315211, Zhejiang Province, China)

Corresponding author: GU Haiying, E-mail: guhaiying@nbu.edu.cn, https://orcid.org/0000-0003-0071-3054

[Abstract] *Helicobacter pylori* (Hp) is widely disseminated in human, and Hp infection causes various gastrointestinal diseases, including gastric cancer. Different genotypes of Hp may cause different diseases, so the genotyping is important for clinical and basic research of Hp. This article introduces the methods for Hp genotyping, including multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, random amplified polymorphic DNA, amplified fragment length polymorphism, and whole-genome sequencing. By reviewing the application of these techniques in Hp genotyping and comparing their advantages and disadvantages, the article provides a theoretical basis for research into the pathogenesis, antibiotic resistance, and epidemiology of Hp infection.

[Key words] *Helicobacter pylori*; Genotype; Sequence tagged sites; Electrophoresis,

收稿日期:2017-12-18 接受日期:2018-01-30

基金项目:浙江省自然科学基金(LZ14H20001)

第一作者:王佳静(1993—),女,硕士研究生,主要从事临床微生物学研究;E-mail: 1126073702@qq.com; https://orcid.org/0000-0002-2752-9364

通信作者:谷海瀛(1966—),男,博士,教授,博士生导师,主要从事临床微生物学研究;E-mail: guhaiying@nbu.edu.cn; https://orcid.org/0000-0003-0071-3054

gel, pulsed-field; Polymorphism, restriction fragment length; Random amplified polymorphic DNA technique; Polymerase chain reaction; Genome, bacterial; Review

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2018,47(1):97-103.]

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)是在人胃黏膜中发现的微需氧菌,是一种比较常见的病原体<sup>[1-2]</sup>,不仅与胃炎、消化性溃疡、十二指肠溃疡和胃腺癌等胃肠道疾病的发病相关,还可能与心血管、皮肤、神经、免疫、血液、肝、胆、呼吸、内分泌和代谢紊乱等胃肠道外疾病存在关联<sup>[3-5]</sup>。一般认为, Hp 在胃内定植是致病的前提。首先, Hp 由鞭毛介导向胃上皮细胞运动,其中 FlaA 和 FlaB 两种鞭毛蛋白的表达是细菌运动所必需的<sup>[6]</sup>;再通过分泌黏附素如 HapA、BabA 和 SabA 等,与宿主细胞上的受体相互作用,使细菌能够长期附着于胃黏膜表面;最后利用 CagA 和 VacA 等多种致病因子作为胃肠道疾病发生的效应蛋白导致宿主组织损害,最终引起一系列胃肠道疾病甚至胃癌<sup>[7]</sup>。Hp 不同菌株中 *cagA*、*vacA* 和 *babA* 等基因在核苷酸序列上的差异表现出基因多态性,这些具有基因多态性的致病因子与宿主、环境之间相互作用,从而引发不同类型的疾病<sup>[8-9]</sup>。

目前关于 Hp 的很多问题尚未得到解决,例如 Hp 在胃内属于多克隆感染还是单克隆感染,其具体的传播途径是什么等,需要我们借助现代分子生物学手段从分子水平甚至基因水平研究。目前, Hp 基因分型方法主要有多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)、脉冲场凝胶电泳(pulsed field gel electrophoresis, PFGE)、随机扩增多态性 DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)、扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)和全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)。本文介绍上述方法并综述其在 Hp 研究中的进展。

## 1 多位点序列分型

MLST 技术是由多位点酶电泳衍生出来的一种分型方法。该分型方法通过 PCR 扩增多个管家基因并测定其核酸序列,从而分析菌株的变异。鉴于 Hp 独特的遗传变异性和种内多样性,在进行 Hp 分型时一般选择 *atpA*、*efp*、*mutY*、*ppa*、*trpC*、*ureI* 和 *yphC* 这七个管家基因进行扩增测序<sup>[10-11]</sup>。

与其他分子生物学技术相比, MLST 具有高重复性和高分辨率的优点,且在一定程度上可以提供比人类遗传学分析更详细的人类迁移信息<sup>[12-13]</sup>。

Yamaoka 等<sup>[14]</sup>采用 MLST 技术将全球 Hp 确定为七种现代种群类型(hpEurope、hpEastAsia、hpAfrica1、hpAfrica2、hpAsia2、hpNEAfrica、hpSahul)和六种祖先种群类型(ancestral EastAsia、ancestral Africa1、ancestral Africa2、ancestral Europe1、ancestral Europe2、ancestral Sahul),不同地区的不同种群类型可以为绘制人类迁移模式提供证据。Raaf 等<sup>[15]</sup>利用 MLST 技术对阿尔及利亚地区的 Hp 进行系统地理特征鉴定,结果发现 38 例患者的 42 株 Hp 可分为 hpEurope 和 hpNEAfrica 两种类型。MLST 用于研究 Hp 的传播途径也可以获得理想的结果。Osaki 等<sup>[16]</sup>采用 MLST 技术对来自粪便标本的 Hp 进行基因分型,研究结果提示三个家庭中至少有两个怀疑存在母婴传播,一个怀疑存在父婴传播。之后该研究者同时利用 MLST 和 RAPD 技术评估来自五个家庭的 19 株 Hp 的基因图谱,发现五个家庭中有 3 例患者提示携带两类或更多类型的 Hp 菌株,4 例患者提示存在 Hp 母婴传播,2 例患者提示存在父婴传播,1 例为兄弟姐妹之间的传播<sup>[17]</sup>。综上所述, MLST 技术可以用于 Hp 的传播途径研究和溯源分析,但其分析过程比较复杂,需借助生物信息学方法与质控菌株逐一对比<sup>[16]</sup>,同时该技术仅反映 Hp 某几个管家基因的变异性,存在一定的局限性。

## 2 脉冲场凝胶电泳

PFGE 是 1984 年由 Schwartz 和 Cantor 发明用于分离大片段(30 ~ 50 kb)线状 DNA 的技术。目前 PFGE 技术已经广泛应用于细菌分型。PFGE 实验流程一般包括制备含 DNA 的包埋胶、胶内 DNA 酶切和脉冲电泳。Hp 存在内源性甲基化酶的保护,其基因组 DNA 不易被限制性内切酶消化,何种限制性内切酶最适合用于 Hp 目前尚无定论。Hosaka 等<sup>[18]</sup>发现,选用 *EcoR* I 进行两次限制性内切酶反应,每次反应时间 16 h,其分型率

能达到 97% 以上,比其他限制性内切酶的酶切效果好。另外,其他限制性内切酶如 *Xba* I 在 36 °C 下酶切 4 h 能取得良好的实验结果<sup>[19]</sup>; *Not* I、*Nru* I 在 37 °C 下酶切和 *Sma* I 在 25 °C 下酶切也适用于 Hp<sup>[20]</sup>。同种酶对不同 Hp 菌株的酶切效果也会不一样。Nada 等<sup>[21]</sup>研究 12 例 Hp 根除治疗失败患者治疗前与治疗后的胃窦内 Hp 菌株的差异,共分离出 24 株 Hp 用 PFGE 技术鉴定,在用 *Not* I、*Nru* I 和 *Sma* I 酶切时发现,其中有 8 株(33%)的 DNA 不能用 *Not* I 酶切,6 株(25%)不能用 *Nru* I 酶切,19 株(79%)不能用 *Sma* I 酶切。此外,除了选择合适的内切酶,对酶切条件(时间和温度)和样本浓度的控制也很重要,若样本的浓度不够,会导致实验结果的条带不明显;若浓度过高,则会造成条带拖尾<sup>[22]</sup>。

Falsafi 等<sup>[19]</sup>利用 PFGE 技术鉴定四个不同时期(1997—1999 年、2001—2003 年、2005—2007 年和 2007—2009 年)共 44 株从无亲缘关系的伊朗儿童胃窦黏膜组织中分离出的 Hp 菌株,根据结果推断这些儿童为多克隆感染。Han 等<sup>[20]</sup>利用 PFGE 技术鉴定了来自德国九个家族 27 名成员分离得到的 59 株 Hp。这些来自于胃体、胃窦、十二指肠的菌株最终鉴定为 21 个克隆类型,每人只有一个克隆类型,偶尔有一个克隆变体;相同克隆类型菌株总是发生在兄弟姐妹之间或母亲与其子代之间,但是未发现相同克隆类型菌株存在于夫妻之间。

总之,虽然 PFGE 技术长期以来一直被认为是细菌分型的金标准<sup>[23]</sup>,但是尚未广泛应用于 Hp 的分型中,限制性内切酶的选择以及酶切条件的控制对于该技术在 Hp 分型中的应用十分关键,仍需进一步探索。

### 3 随机扩增多态性 DNA

RAPD 是 20 世纪 90 年代在 PCR 的基础上发明的一种可对整个未知序列基因组进行多态性分析的分型技术。RAPD 不仅具有常规 PCR 所具有的优点,而且只需要微量 DNA 即可进行分析,既不需要预先知道基因组序列,也不需要专门设计扩增的引物。如果选择的引物合理,Hp 基因组扩增后可以获得 3~10 个 DNA 片段,且通常每个菌株产生的片段图谱不相同<sup>[24]</sup>。RAPD 技术实施有四个条件:①进行 PCR 扩增时,引物 3' 端的

碱基必须与目标 DNA 序列相匹配;②基因组 DNA 中成对的偶合位点彼此间距须小于 3 kb;③第一轮产物有效持续扩增;④不同的菌株扩增产物不同。表 1 列出了一系列针对 Hp 的 RAPD 引物,这些引物对菌株的区分率均达到 99% 以上,其中引物 1254 和 1283 对于鉴别混合感染具有较高的敏感度<sup>[25]</sup>。RAPD 扩增产物的凝胶图像经溴化乙锭染色可通过柯达数码科技的一维图像分析软件进行分析,利用该软件可得知条带的相对分子质量。需要注意的是,为提高实验结果的可重复性,保证检测体系的稳定性,应该使用标准菌株 Hp 26695 作为对照<sup>[26]</sup>,并且实验条件如 DNA 模板浓度、*Taq* 聚合酶、引物以及 PCR 参数都需要严格控制<sup>[27]</sup>。

表 1 幽门螺杆菌随机扩增多态性 DNA 分型引物及其区分率

Table 1 Primers and discrimination rates for random amplified polymorphic DNA in genotyping of *Helicobacter pylori*

引物名称	序列(5'→3')	区分率(%)
1281 <sup>[28]</sup>	AACGCGCAAC	100
1254 <sup>[29]</sup>	CCGCAGCCAA	99
1247 <sup>[28]</sup>	AAGAGCCCGT	99
1283 <sup>[29]</sup>	GCGATCCCCA	—
1290 <sup>[24]</sup>	GTGGATGCCA	—

“—”无相关数据。

Konno 等<sup>[30]</sup>用 RAPD 技术研究了 42 例平均年龄为 11.7 岁的 Hp 感染者,发现 32 例(76%)显示出与至少一名家族成员有相同的 DNA 指纹图谱,其中 29 例(69%)的 DNA 指纹图谱与母亲相似,该研究为 Hp 的母婴传播途径提供了有力证据。母婴传播是 Hp 家庭内传播的主要途径<sup>[31]</sup>,但是否存在其他传播途径有待证实。除此之外,RAPD 技术还可以检查单个宿主的 Hp 感染是否存在克隆多样性。Toita 等<sup>[32]</sup>研究了 31 例接受上消化道内窥镜检查的日本患者,从活检标本(胃窦、胃体、十二指肠)和胃液中分离获得 104 株 Hp(每例患者 4 株),发现来自每例患者的分离株的 RAPD 指纹图谱非常相似甚至相同,并且间隔 5~9 年获得的分离株同样显示非常相似或相同的 RAPD 图谱,提示这部分人群为 Hp 单克隆感染。但韩国学者 Kim 等<sup>[33]</sup>采用 RAPD 技术

对 19 例 Hp 感染者的 104 株 Hp 进行分析,结果表明约 60% 的患者存在 Hp 多克隆感染。RAPD 图谱可以比较容易地区分 Hp 菌株之间的差异,且区分率高,但是这种方法无法提供任何关于菌株毒力特性和遗传进化信息。

#### 4 扩增片段长度多态性

AFLP 是在 PCR 基础上发展起来的一种分子标记技术,最初用于农作物的分型,后来广泛用于植物、动物和原核生物的分型。一个完整的 AFLP 实验流程大约需要 3 d;用 Gel Compare 凝胶分析软件对电泳图谱进行分析处理,DNA 片段采用二进制形式按大小进行编码,用 Dice 系数评估相似性,计算结果为 100% 则定义为相同型<sup>[34]</sup>。Gibson 等<sup>[35]</sup>采用 AFLP 技术对 Hp 进行基因分型时选择 *Hind* III 酶切(识别位点为 A ↓ AGCTT) Hp 基因组 DNA,并使用引物 H1-A (5'-GGTATGCCA CAGAGCTTA-3'),获得了理想的实验结果,且不需要昂贵的实验试剂和设备。有研究者同时选用引物 H1-A 和 H1-G (5'-GGTATGCCACAGAGC TTG-3') 进行扩增来优化实验结果,使实验结果具有更高的分辨率<sup>[36]</sup>。但是,AFLP 技术对 DNA 模板质量的要求较高,需要测定 DNA 的浓度和纯度,DNA 量过多会导致酶切不完全,DNA 量过少则会引起模板浓度不够。

Hallinger 等<sup>[37]</sup>采用 AFLP 技术并结合序列分析研究 12 例患者胃窦、贲门、胃体分离得到的 Hp,并检测出这些 Hp 的 *arsS* 基因羧基末端胞嘧啶碱基长度存在差异和胸腺嘧啶碱基缺失的情况,而这两种情况都可以使 *arsS* 开放阅读框(ORF)移位导致羧基末端氨基酸序列改变从而翻译出不同的异构酶。该研究发现了 *arsS* 四种新的羧基末端变异,这些变异提高了 Hp 在胃部不同环境的适应性,促进 Hp 在胃部的定植。Owen 等<sup>[36]</sup>从 35 例消化不良的患者中分离出 89 株 Hp,其中 16 例患者取甲硝唑治疗前后配对的胃窦标本(32 株),19 例患者取克拉霉素和质子泵抑制剂治疗前后标本(57 株),利用 AFLP 分析抗菌药物治疗对 Hp 菌株多型性的影响。结果发现,65% 的患者为多克隆感染,并且抗菌药物治疗并没有明显改变菌株的多型性。此外 Gibson 等<sup>[35]</sup>利用 AFLP 技术研究 Hp 的耐药性。该研究对来自 6 例 Hp 感染者的 24 株 Hp 菌株进行分

型,每例患者分别提供两个抗菌药物处理前和处理后的活检标本,结果发现有 4 例患者治疗前和治疗后的分离株显示相同的 AFLP 图谱,证明了抗菌药物治疗后相同菌株的持续感染。该研究还指出,限制性酶切反应的条件需要严格控制,因为这将是实验室之间结果比较的一个重要参数。与其他基于 PCR 的分型技术相比,AFLP 并不是一种快速检测的方法,但是 AFLP 的指纹图谱能够产生足够多的条带,因此具有重复性好和分辨率高的优点<sup>[35]</sup>。

#### 5 全基因组测序

WGS 法是对某一种生物基因组的全部基因进行序列测定,历经三代技术的发展。全基因组学的主要流程为测序所得序列经拼接与碱基修正后于美国国立生物技术信息中心网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>)提供的 Hp 全基因组数据进行比对分析。WGS 法不仅可以发现菌株之间的差异,还能发现 Hp 利用表面抗原变异和毒力基因调节来适应宿主环境的机制<sup>[38]</sup>,可以帮助我们深入了解 Hp 基因型和表型的关系。Tomb 等<sup>[39]</sup>于 1997 年完成了第一株 Hp 26695 菌株的 WGS 工作。Hp 26695 拥有 1 667 867 个碱基对和 1590 个预测编码序列,其中 1590 个预测基因的平均大小为 945 bp。根据 Hp 26695 的核苷酸序列进行理化性质分析发现,超过 70% 的蛋白质的等电点大于 7.0,主要由碱性氨基酸(精氨酸和赖氨酸)组成,是流感嗜血杆菌和大肠埃希菌的两倍,这可能提示了 Hp 适应胃酸的原因。Hp 能够适应胃酸还取决于其在酸性条件下能够建立一个正性膜电位。这些基因组的信息不仅可以用于 Hp 菌株之间的差异比较精确到单个碱基,还可以揭示菌株的遗传背景,了解菌株的毒力基因和耐药基因,为临床用药提供可靠的依据。

在近几年的研究中,Thorell 等<sup>[40]</sup>利用 WGS 鉴定了来自尼加拉瓜的 52 株 Hp,并进行系统发育树的构建和毒力因子分析,结果发现尼加拉瓜分离株具有与来自拉丁美洲的血型抗原结合性黏附素(BabA)序列高度相似的 BabA 变体,通过这个 BabA 变体影响发病机制。Iwamoto 等<sup>[41]</sup>利用 MiSeq 平台对克拉霉素耐药 Hp 菌株进行 WGS 分析,清楚地识别了 Hp 基因组上 23S rRNA 基因的点突变,发现所有克拉霉素耐药菌株的测

序结果都是在 23s rRNA 基因相同位置上存在 G 突变,在耐药菌株中还发现了外排泵基因的单核苷酸变体。

综上,WGS 可以识别 Hp 整个基因组核苷酸序列的潜在突变,并在序列突变时识别变异,这是上述任何一种基因分型技术都无法比拟的。

## 6 展 望

上述五种基因分型技术是目前细菌性传染病暴发调查和分子流行病学研究的常规技术。Burucoa 等<sup>[28]</sup>应用 meta 分析计算不同分型技术的区分率值,结果发现 PFGE 和 RAPD 的区分率分别为 24% ~ 88% 和 99% ~ 100%,因此认为 Hp 分型不推荐使用 PFGE。但有研究显示,如选择合适的操作方法和内切酶,采用 PFGE 技术对 Hp 分型的分型率可达 97%<sup>[18]</sup>。MLST 操作简单、快速<sup>[17]</sup>,尤其是近年来在 Hp 的溯源分析方面的作用可圈可点,但是 MLST 技术受选择位点的限制<sup>[42]</sup>,一般仅获得管家基因的 ST 序列,所以在研究中可以考虑结合其他基因分型技术来进行判断<sup>[43]</sup>。RAPD 技术所需的 DNA 样本量少,易于比较菌株之间的差异,可用于寻找细菌的遗传关系和多样性,但是该方法无法提供关于菌株致病因子的相关信息<sup>[28]</sup>。AFLP 结合了 RAPD 技术的优点,分辨率高、重复性好,比较容易构建指纹图谱,但是不如其他分型方法快速。相对于其他四种分型方法来说,WGS 能够了解微生物的全部基因组序列,理论上可以对任何微生物进行分型,分辨率达到单个碱基,是其他四种分型方法无法比拟的。但是就目前情况来看,WGS 实施成本相对较高,实验周期长,在临床实验室和基层公共卫生实验室难以广泛应用。

目前,关于 Hp 的很多问题还有待深入研究。例如,Hp 感染所致不同疾病与菌株分型是否相关? Hp 单克隆和多克隆感染是由什么决定的? Hp 基因分型在上述问题的研究中非常重要,但目前尚没有一种分型方法能够满足所有的研究需求,具体选用哪种分型方法在很大程度上取决于研究目的。随着生物信息技术的发展,WGS 技术实施的成本和周期不断下降,相信在不久的将来,这项新的技术将给 Hp 研究带来新的突破。

## 参考文献

[1] MARSHALL B J, WARREN J R. Unidentified curved

bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration [J]. **Lancet**, 1984, 323 ( 8390 ): 1311-1315.

- [2] GU H. Role of Flagella in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* [J]. **Curr Microbiol**, 2017, 74 (7):863-869.
- [3] KUO C H, CHEN Y H, GOHK L, et al. *Helicobacter pylori* and systemic disease [J]. **Gastroenterol Res Pract**, 2014, 2014 (6):358494.
- [4] ZAMANI M, MASROUR-ROUDSARI J, ZAMANI V. Hematologic disorder: a manifestation of *Helicobacter pylori* infection [J]. **Caspian J Intern Med**, 2017, 8 (2):133-134.
- [5] VAFAEIMANESH J, BAGHERZADEH M, HEIDARI A, et al. Diabetic patients infected with *Helicobacter pylori* have a higher insulin resistance degree [J]. **Caspian J Intern Med**, 2014, 5(3):137-142.
- [6] XU Y F, LIAN D W, CHEN Y Q, et al. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of patchouli alcohol, a naturally occurring tricyclic sesquiterpene, against *Helicobacter pylori* infection [J/OL]. **Antimicrob Agents Chemother**, 2017, 61(6). pii: e00122-17.
- [7] MATOS J I, DE SOUSA H A, 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.
- [8] 杨成,崔梅花. 幽门螺杆菌致病因子及其致病机制研究进展 [J]. **世界华人消化杂志**, 2017, 25(10): 857-864.
- YANG Cheng, CUI Meihua. Progress in researches on pathogenic factors and pathogenesis of *Helicobacter pylori* [J]. **World Chinese Journal of Digestology**, 2017, 25(10):857-864. (in Chinese)
- [9] CHIURILLO M A, MORAN Y, CAÑAS M, et al. Genotyping of *Helicobacter pylori* virulence-associated genes shows high diversity of strains infecting patients in western Venezuela [J/OL]. **Int J Infect Dis**, 2013, 17(9):e750-e756.
- [10] SECKA O, MOODLEY Y, ANTONIO M, et al. Population genetic analyses of *Helicobacter pylori* isolates from Gambian adults and children [J/OL]. **PLoS One**, 2014, 9(10):e109466.
- [11] SUZUKI R, SHIOTA S, YAMAOKA Y. Molecular epidemiology, population genetics, and pathogenic role of *Helicobacter pylori* [J]. **Infect Genet Evol**, 2012, 12(2):203-213.
- [12] COOPER J E, FEIL E J. Multilocus sequence typing-what is resolved? [J]. **Trends Microbiol**, 2004, 12(8):373-377.
- [13] VALE F F, VADIVELU J, OLEASTRO M, et al.

- Dormant phages of *Helicobacter pylori* reveal distinct populations in Europe[J]. **Sci Rep**,2015,5:14333.
- [14] YAMAOKA Y. *Helicobacter pylori* typing as a tool for tracking human migration [J]. **Clin Microbiol Infect**,2009,15(9):829-834.
- [15] RAAF N, AMHIS W, SAOULA H, et al. Prevalence, antibiotic resistance, and MLST typing of *Helicobacter pylori* in Algiers, Algeria [J/OL]. **Helicobacter**,2017,22(6):e12446.
- [16] OSAKI T, OKUDA M, UEDA J, et al. Multilocus sequence typing of DNA from faecal specimens for the analysis of intra-familial transmission of *Helicobacter pylori*[J]. **J Med Microbiol**,2013,62(Pt 5):761-765.
- [17] OSAKI T, KONNO M, YONEZAWA H, et al. Analysis of intra-familial transmission of *Helicobacter pylori* in Japanese families[J]. **J Med Microbiol**, 2015,64(Pt 1):67-73.
- [18] HOSAKA Y, IRINODA K, NAKANO R, et al. Use of the restriction enzyme *EcoR* I for pulsed-field gel electrophoretic analysis of *Helicobacter pylori*[J]. **J Clin Microbiol**,2005,43(2):931-932.
- [19] FALSAFI T, SOTOUDEH N, FEIZABADI M M, et al. Analysis of genomic diversity among *Helicobacter pylori* strains isolated from Iranian children by pulsed field gel electrophoresis[J]. **Iran J Pediatr**,2014,24(6):703-709.
- [20] HAN S R, ZSCHAUSSCH H C, MEYER H G, et al. *Helicobacter pylori*: clonal population structure and restricted transmission within families revealed by molecular typing[J]. **J Clin Microbiol**,2000,38(10):3646-3651.
- [21] NADA T, ANDO T, NOBATA K, et al. DNA typing for *Helicobacter pylori* isolates from eradication-failed patients: comparison of the isolates before and after therapy [J]. **Aliment Pharmacol Ther**,2004,20 Suppl 1:39-47.
- [22] 陶风云,谷海瀛. 幽门螺杆菌 PFGE 基因分型方法的研究进展[J]. **中国微生态学杂志**,2016,28(6):728-732.
- TAO Fengyun, GU Haiying. Progress in researches on *Helicobacter pylori* PFGE genotyping[J]. **Chinese Journal of Microecology**,2016,28(6):728-732. (in Chinese)
- [23] SALIPANTE S J, SENGUPTA D J, CUMMINGS L A, et al. Application of whole-genome sequencing for bacterial strain typing in molecular epidemiology[J]. **J Clin Microbiol**,2015,53(4):1072-1079.
- [24] FINGER S A, VELAPATIÑO B, KOSEK M, et al. Effectiveness of enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR and random amplified polymorphic DNA fingerprinting for *Helicobacter pylori* strain differentiation[J]. **Appl Environ Microbiol**,2006,72(7):4713-4716.
- [25] FARZI N, MALEKIAN T, ALEBOUYEH M, et al. Genotype diversity and quasispecies development of *Helicobacter pylori* in a single host[J]. **Jpn J Infect Dis**,2015,68(3):176-180.
- [26] NAHAR S, KIBRIA K M, HOSSAIN M E, et al. Evidence of intra-familial transmission of *Helicobacter pylori* by PCR-based RAPD fingerprinting in Bangladesh[J]. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**,2009,28(7):767-773.
- [27] KIBRIA K M, HOSSAIN M E, SULTANA J, et al. The prevalence of mixed *Helicobacter pylori* infections in symptomatic and asymptomatic subjects in Dhaka, Bangladesh[J]. **Helicobacter**,2015,20(5):397-404.
- [28] BURUCOA C, LHOMME V, FAUCHERE J L. Performance criteria of DNA fingerprinting methods for typing of *Helicobacter pylori* isolates: experimental results and meta-analysis [J]. **J Clin Microbiol**,1999,37(12):4071-4080.
- [29] BEN M K, FENDRI C, BATTIKH H, et al. Multiple and mixed *Helicobacter pylori* infections: comparison of two epidemiological situations in Tunisia and France[J]. **Infect Genet Evol**,2016,37:43-48.
- [30] KONNO M, YOKOTA S, SUGA T, et al. Predominance of mother-to-child transmission of *Helicobacter pylori* infection detected by random amplified polymorphic DNA fingerprinting analysis in Japanese families[J]. **Pediatr Infect Dis J**,2008,27(11):999-1003.
- [31] MAMISHI S, ESHAGHI H, MAHMOUDI S, et al. Intrafamilial transmission of *Helicobacter pylori*: genotyping of faecal samples[J]. **Br J Biomed Sci**,2016,73(1):38-43.
- [32] TOITA N, YOKOTA S, FUJII N, et al. Clonality analysis of *Helicobacter pylori* in patients isolated from several biopsy specimens and gastric juice in a Japanese urban population by random amplified polymorphic DNA fingerprinting [J]. **Gastroenterol Res Pract**,2013,2013:721306.
- [33] KIM Y S, KIM N, KIM J M, et al. *Helicobacter pylori* genotyping findings from multiple cultured isolates and mucosal biopsy specimens: strain diversities of *Helicobacter pylori* isolates in individual hosts[J]. **Eur J Gastroenterol Hepatol**,2009,21(5):522-528.
- [34] VUYLSTEKE M, PELEMAN J D, VAN EIJK M J.

- AFLP technology for DNA fingerprinting [J]. **Nat Protoc**,2007,2(6):1387-1398.
- [35] GIBSON J R, SLATER E, XERRY J, et al. Use of an amplified-fragment length polymorphism technique to fingerprint and differentiate isolates of *Helicobacter pylori* [J]. **J Clin Microbiol**, 1998, 36 (9): 2580-2585.
- [36] OWEN R J, FERRUS M, GIBSON J. Amplified fragment length polymorphism genotyping of metronidazole-resistant *Helicobacter pylori* infecting dyspeptics in England [J]. **Clin Microbiol Infect**, 2001,7(5):244-253.
- [37] HALLINGER D R, ROMERO-GALLO J, PEEK R M, et al. Polymorphisms of the acid sensing histidine kinase gene *arsS* in *Helicobacter pylori* populations from anatomically distinct gastric sites [J]. **Microb Pathog**,2012,53(5-6):227-233.
- [38] KUMAR N, MARIAPPAN V, BADDAM R, et al. Comparative genomic analysis of *Helicobacter pylori* from Malaysia identifies three distinct lineages suggestive of differential evolution [J]. **Nucleic Acids Res**,2015,43(1):324-335.
- [39] TOMB J F, WHITE O, KERLAVAGE A R, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori* [J]. **Nature**,1997,388(6642):539-547.
- [40] THORELL K, HOSSEINI S, PALACIOS G R V, et al. Identification of a Latin American-specific BabA adhesin variant through whole genome sequencing of *Helicobacter pylori* patient isolates from Nicaragua [J]. **BMC Evol Biol**,2016,16:53.
- [41] IWAMOTO A, TANAHASHI T, OKADA R, et al. Whole-genome sequencing of clarithromycin resistant *Helicobacter pylori* characterizes unidentified variants of multidrug resistant efflux pump genes [J]. **Gut Pathog**,2014,6:27.
- [42] BULLOCK K K, SHAFFER C L, BROOKS A W, et al. Genetic signatures for *Helicobacter pylori* strains of West African origin [J/OL]. **PLoS One**, 2017, 12(11):e0188804.
- [43] BREUREC S, RAYMOND J, THIBERGEJ M, et al. Impact of human migrations on diversity of *Helicobacter pylori* in Cambodia and New Caledonia [J]. **Helicobacter**,2013,18(4):249-261.
- [本文编辑 余方沈敏]

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 本刊参考文献著录格式示例

期刊:[序号]作者(3人以下需全列出,超过3人时列前3人后加et al或等).文题[J].刊名,年份,卷(期):起页码-迄页码.

- [1] 张大勇,林义茜,何非,等. TpcC 通过促进活性氧的产生诱导巨噬细胞凋亡[J]. **浙江大学学报(医学版)**, 2013,42(5):486-491.

ZHANG Dayong, LIN Yiqian, HE Fei, et al. TpcC induces apoptosis of macrophages through promoting ROS production [J]. **Journal of Zhejiang University (Medical Sciences)**, 2013,42(5):86-491. (in Chinese)

- [2] MAYER T K, FREEDMAN Z R. Protein glycosylation in diabetes mellitus: a review of laboratory measurement and of their clinical utility [J]. **Clin Chem Acta**, 1983,127(2):147-152.

图书:[序号]作者.书名[M].版次(初版可不写).出版地:出版社,年份:起页码-迄页码.

- [1] 王淑贞. **实用妇产科学** [M]. 北京:人民卫生出版社,1987:303-308.

WANG Shuzhen. **Practice of Gynecology and Obstetrics** [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 1987: 303-308. (in Chinese)

电子资源:[序号]作者.电子资源名[文献类型/载体类型].(发表或更新日期)[引用日期].文献网址.

- [1] PARK S H, VEERAPU N S, SHIN E C, et al. Subinfectious hepatitis C virus exposures suppress T cell responses against subsequent acute infection [J/OL]. (2013-11-24)[2013-11-25]. <http://www.nature.com/nm/journal/vaop/ncurrent/full/nm.3408.html>.