

E-test 法检测幽门螺杆菌对 3 种抗生素的耐药性

高承霞 严 祥 韩 俭 王 琼

摘要:目的 了解幽门螺杆菌(*Hp*)对临床常用 3 种抗生素的耐药性,以指导临床合理用药。方法 收集上消化道疾病患者胃黏膜标本,分离培养、鉴定出 42 株 *Hp* 临床菌株,采用 E-test(Epsilome test)方法测定 3 种抗生素对 *Hp* 菌株的最低抑菌浓度(MIC)。结果 42 株临床分离的 *Hp* 菌株对甲硝唑、克拉霉素、阿莫西林的耐药率分别为 64.3%、14.3%和 0。结论 *Hp* 对甲硝唑耐药率高,故甲硝唑不应作为根除 *Hp* 感染的一线药物;*Hp* 对克拉霉素耐药率较高,应在药敏监测下选择使用;*Hp* 对阿莫西林敏感,可作为根除 *Hp* 感染的主要药物。

关键词:幽门螺杆菌;抗生素;耐药性;最小抑菌浓度

DOI: 10.3969/j.issn.1673-534X.2013.01.018

Resistivity of helicobacter pylori to three antibiotics investigated by E-test method GAO Cheng-xia, YAN Xiang, WANG Qiong. Department of geriatrics, First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou (730000), China; HAN Jian. Institute of Biology Pathogens, Lanzhou University, Lanzhou (730000), China

Abstract: Objective The resistivity of *Hp* to three commonly used antibiotics were investigated, thus guiding the reasonable medication in clinical cases. **Methods** The specimens were collected from gastric mucous membrane of patients with upper gastrointestinal disease. From these specimens, total 42 *Hp* strains were isolated, cultivated and identified. The minimum antibacterial concentrations(MIC) of *Hp* strains to three antibiotics were examined with E-test. **Results** The average antibiotics resistance rates of 42 *Hp* strains were estimated as 64.3%, 14.3% and 0 for metronidazole, clarithromycin, and amoxicillin respectively. **Conclusions** Since clinically isolated *Hp* is highly resistant to metronidazole, those metronidazole-contained medicines should not be selected as first-choice treatment for *Hp* infections; It has a high resistivity to clarithromycin, therefore, the latter should be used selectively with drug testing; *Hp* is sensitive to amoxicillin, hence, the latter should be used as a major medicine for curing *Hp* infections.

Key words: Helicobacter pylori; Antibiotics; Resistances; Minimum inhibitory concentration

幽门螺杆菌(*Hp*)是微需氧的革兰阴性杆菌,自 1982 年被发现以来,大量研究证实其感染是慢性胃炎、消化性溃疡的重要致病因素,与胃黏膜相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤以及胃癌等疾病的发生亦相关。1994 年 WHO 已将其列为胃癌的 I 类致癌因子。因此,*Hp* 感染的治疗越来越受到重视,并且成为 *Hp* 研究领域的关键。目前根除 *Hp* 的一线治疗首选为三联疗法(PPI + 两种抗生素),然而,近年来由于抗生素的广泛应用以及治疗的不规律性,随之产生的抗生素耐药情况也日益突出;对于一线治疗失败的患者还需采取四联疗法(PPI + 铋剂 + 两种抗生素)为首选的补救治疗或再次治疗^[1]。导

致 *Hp* 治疗失败的原因是多方面的,但是 *Hp* 对抗生素耐药是导致其根除失败的主要原因^[2-3]。本文选取 3 种常用抗生素对 *Hp* 临床分离株进行药敏试验,并且对其耐药特点进行分析,以更好地了解抗生素耐药情况,为临床合理用药提供依据。

1 材料和方法

1.1 菌株

Hp 临床菌株 42 例(兰州大学第一医院胃镜室),患者年龄介于 21~76(46.2 ± 13.0)岁,其中男性 23 例,女性 19 例,消化性溃疡患者 23 例,胃炎患者 19 例。质控菌株:*Hp* 标准菌株 NCTC11637(中国疾病预防控制中心传染病预防控制所)。

1.2 试剂

哥伦比亚琼脂培养基(美国 BD 公司);葡萄糖(四川科伦药业股份有限公司);无支原体新生牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);无菌脱纤

基金项目:甘肃省重点中医药科研项目资助(GZK-2009-4)

作者单位:730000 兰州大学第一医院老年病科二病区(高承霞,严祥,王琼);730000 兰州大学病原生物学研究所(韩俭)

通信作者:严祥,Email: yanxiang528@sohu.com

维羊血(兰州大学实验动物中心);万古霉素、两性霉素 B、甲氧苄啶(TMP)(上海生工生物工程有限公司);多黏菌素(美国 Sigma 公司);甲硝唑、克拉霉素、阿莫西林的 E-test 纸条(AB Biodisk 公司);尿素酶试剂(福建三强生物化工有限公司);微需氧产气袋(日本三菱瓦斯化学株式会社)。

1.3 仪器

Hp 厌氧培养罐(HP050,广州海太光电生物科技有限公司);洁净工作台(SW-CJ-2F,苏州净化设备有限公司);生物安全柜(BMC-1300 II,苏州净化设备有限公司);电热恒温培养箱(DHP-9162,上海益恒实验仪器有限公司);光学显微镜(日本 OLYMPUS);电子天平(德国 BP310s sarlorius);立式压力蒸汽灭菌器(LDZX-75KB,上海申安医疗器械厂);-80℃超低温冰箱(美国 Thermo)。

1.4 方法

1.4.1 试剂配制 (1)固体培养基配制:哥伦比亚培养基 42.5 g/L,5%浓度为 10%的葡萄糖,1%选择性抗生素,7%无菌脱纤维羊血。(2)选择性抗生素的配制:万古霉素 250 mg/L,两性霉素 B 200 mg/L,多黏菌素 220 mg/L,甲氧苄啶(TMP)300 mg/L。

1.4.2 *Hp* 分离培养、鉴定及保存 于上消化道疾病患者胃窦部用灭菌活检钳取黏膜组织一块(快速尿素酶试验>++以上者取材)浸没于转运培养基中,立即送实验室于哥伦比亚血琼脂培养基上划线接种,微需氧条件(5% O₂, 10% CO₂ 和 85% N₂),温度为 37℃,湿度大于 95%的情况下培养 3~5 d,肉眼观察菌落形态,挑取可疑菌落涂片革兰染色镜检,尿素酶、氧化酶以及触酶试验阳性可鉴定 *Hp*。将 *Hp* 纯培养增菌后,于-80℃低温冻存。

1.4.3 药敏试验 E-test 法是一项能够结合稀释法和扩散法原理对细菌药敏试验进行直接定量的技术。试纸条背面固定有预先制备的浓度呈连续指数增长的稀释抗生素,正面标有单位为 μg/ml 的最小抑菌浓度(MIC)判读刻度。选取甲硝唑、克拉霉素、阿莫西林 3 种抗生素的 E-test 试纸条对 *Hp* 进行 MIC 的测定。

用灭菌接种环刮取纯培养 48~72 h 的新鲜 *Hp*,充分研磨于灭菌生理盐水中,调整菌液浓度为 2×10⁸ cfu/ml,用无菌棉签沾取菌液,沿管壁旋转挤去多余水分,均匀涂布整个琼脂表面,静置,待平板表面稍干后,取含抗生素的 E-test 试条放置于琼脂表面(1 条/ 90 mm 平皿),无菌镊子轻压试纸条表

面,使试纸条与培养基充分接触,保证其载体上的药物立即且有效地释放入琼脂。将培养皿放入培养罐中,保持湿度大于 95%,温度为 37℃,微需氧环境中培养 48~72 h 后观察结果,椭圆型抑菌环与试纸条交界处的刻度即为 MIC。

1.4.4 结果判定 参照文献^[4-6],甲硝唑 ≥ 8 mg/L,克拉霉素 ≥ 1 mg/L,阿莫西林 ≥ 0.5 mg/L 判定为耐药。

1.4.5 统计处理 采用 SPSS13.0 软件,统计方法选用 χ² 检验,以 P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *Hp* 对抗生素耐药率的比较

甲硝唑、克拉霉素、阿莫西林的耐药率分别为 64.3%、14.3%和 0。*Hp* 对甲硝唑和克拉霉素的耐药率比较差异有统计学意义(χ² = 22.011, P<0.05)。6 株对克拉霉素耐药的 *Hp* 菌株同时对甲硝唑耐药。*Hp* 对阿莫西林敏感,故未列入统计分析中(见表 1)。

表 1 E-test 法检测 *Hp* 对 3 种抗生素的耐药情况 [n=42,n(%)]

抗生素	MIC(μg/ml)		R	S
	MIC ₅₀	MIC ₉₀		
甲硝唑	8	48	27(64.3)	15(35.7)
克拉霉素	0.380	4	6(14.3)	36(85.7)
阿莫西林	0.016	0.125	0(0)	42(100)

注:R,耐药;S,敏感

2.2 *Hp* 对抗生素耐药与患者性别的关系

Hp 对甲硝唑、克拉霉素耐药在男、女性间进行比较,结果发现不同性别患者体内分离的 *Hp* 菌株对甲硝唑和克拉霉素耐药率差异无统计学意义(P>0.05)。

2.3 *Hp* 对抗生素耐药与患者年龄的关系

两种抗生素的耐药情况在不同年龄段的患者间进行比较,未见有相关性,差异无统计学意义(P>0.05)。

2.4 *Hp* 对抗生素耐药与患者疾病类型的关系

消化性溃疡患者与胃炎患者的 *Hp* 甲硝唑耐药率相比较,差异无统计学意义(P>0.05,见表 2);两种疾病类型患者的 *Hp* 克拉霉素的耐药率差异亦无统计学意义(P>0.05,见表 2)。

表 2 Hp 对抗生素耐药与患者疾病类型的关系 (n=42)

疾病类型	甲硝唑			克拉霉素		
	R	S	耐药率 (%)	R	S	耐药率 (%)
胃炎	11 ^a	8	57.90	3 ^b	16	15.80
消化性溃疡	16 ^a	7	69.60	3 ^b	20	13
X ² 值	0.617			0.064		
P 值	^a P = 0.432			^b P = 0.8		

注:R,耐药;S,敏感

3 讨论

流行病学调查显示中国一般人群的 Hp 总感染率高达 56.22%^[7]。临床治疗 Hp 感染的一线方案中,最常用的抗生素有甲硝唑、克拉霉素、阿莫西林等。近年来由于这些抗生素的广泛应用造成 Hp 耐药情况非常严重,并且研究发现其耐药率有逐年上升趋势^[8-9]。

本研究显示,42 株 Hp 临床分离株对甲硝唑耐药率高达 64.3%,对克拉霉素耐药率为 14.3%,对阿莫西林敏感,与国内外文献报道基本一致^[10-11]。将 Hp 临床株对甲硝唑耐药率和对克拉霉素的耐药率进行比较,发现差异显著,有统计学意义。甲硝唑不应用于根除 Hp 感染的一线方案中,因此,标准三联疗法中的克拉霉素和阿莫西林成为主要抗 Hp 的药物。然而,近年来研究报道, Hp 对这些药物也出现耐药性^[12, 13]。6 株对克拉霉素耐药的菌株同时对甲硝唑耐药,说明 Hp 对克拉霉素耐药和对甲硝唑耐药关系密切^[14]。国内外各地报道的不同性别、年龄、疾病类型 Hp 分离株对甲硝唑和克拉霉素的耐药率各异。美国一项荟萃研究中发现女性患者对甲硝唑及克拉霉素的耐药率明显高于男性^[15],而老年患者更容易对克拉霉素产生耐药性^[16]。本次研究得出各项差异均无统计学意义,其结果的不同可能与样本量大小、样本来源及实验条件等有关。

总之, Hp 菌株对常用抗生素耐药率较高给临床治疗 Hp 感染带来了很大的困难。如何提高治疗效果以及如何防治菌株耐药已经成为科学研究和临床治疗的重点。除了研发安全有效的疫苗,规范使用抗生素,制定合理的治疗方案,展开药敏试验等常规预防策略外,开发新的抗 Hp 的药物将是治疗 Hp 感染的又一重要手段。

参 考 文 献

1 中华医学会消化病学分会,幽门螺杆菌学组/幽门螺杆菌科研协作组. 第三次全国幽门螺杆菌感染若干问题共识报告(2007·庐

山). 现代消化及介入诊疗, 2008, 13: 73-76.

2 Koivisto TT, Rautelin HI, Voutilainen ME, et al. First-line eradication therapy for Helicobacter pylori in primary health care based on antibiotic resistance: results of three eradication regimens. Aliment Pharmacol Ther, 2005, 21: 773-782.

3 Kim JM, Kim JS, Jung HC, et al. Distribution of antibiotic MICs for Helicobacter pylori strains over a 16-year period in patients from Seoul, South Korea. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 8: 4843-4847.

4 National Committee for Clinical Laboratory Standards(2009). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Nineteenth Informational Supplement M100-S19 Wayne, PA, National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2009.

5 Megraud F, Lehours P. Helicobacter pylori detection and antimicrobial susceptibility testing. Clin Microbiol Rev, 2007, 20: 280-322.

6 Abadi ATB, Mobarez AM, Taghvaei T, et al. Antibiotic resistance of Helicobacter pylori in mazandaran north of Iran. Helicobacter, 2010, 15: 505-509.

7 张万岱, 胡伏莲, 萧树东, 等. 中国自然人群幽门螺杆菌感染的流行病学调查. 现代消化及介入诊疗, 2010, 15: 265-270.

8 Gao W, Cheng H, Hu FL, et al. The evolution of Helicobacter pylori antibiotics resistance over 10 years in Beijing, China. Helicobacter, 2010, 15: 460-466.

9 Sun QJ, Liang X, Zheng Q, et al. Resistance of Helicobacter pylori to antibiotics from 2000 to 2009 in Shanghai. WJG, 2010, 16: 5118-5121.

10 Kostamo P, Veijola L, Oksanen A, et al. Recent trends in primary antimicrobial resistance of Helicobacter pylori in Finland. Int J Antimicrob Agents, 2011, 37: 22-25.

11 Mishra KK, Srivastava S, Garg A, et al. Antibiotic susceptibility of Helicobacter pylori clinical isolates: comparative evaluation of disk-diffusion and E-test methods. Curr Microbiol, 2006, 53: 329-334.

12 温晋锋, 陈春晓. 幽门螺杆菌克拉霉素耐药的研究现状. 国际消化病杂志, 2011, 31: 9-12.

13 林旭芳, 陈军贤. 幽门螺杆菌对克拉霉素耐药机制的研究进展. 国际消化病杂志, 2010, 30: 257-258.

14 成虹, 胡伏莲. 北京地区幽门螺杆菌耐药情况及其变化趋势. 中华医学杂志, 2005, 85: 2754-2757.

15 Ikewaki J, Nishizono A, Goto T, et al. Therapeutic oral vaccination induces mucosal immune response sufficient to eliminate long-term Helicobacter pylori infection. Microbiol Immunol, 2000, 44: 29-39.

16 Meyer JM, Siliman NP, Wang W, et al. Risk factors for helicobacter pyloriresistance in the United States: the surveillance of H. pylori antimicrobial resistance partnership (SHSRP) study, 1993-1999. Ann Intern Med, 2002, 136: 13-24.

(收稿日期:2012-04-10)

(本文编辑:周骏)