

幽门螺杆菌对常用抗菌药物的耐药性研究^{*}

吴李培, 周玉贵, 王 敏, 马荣国, 茅 敏, 周 丽, 赵建春, 宣世海[△] (南通大学附属东台医院检验科, 江苏东台 224200)

【摘要】 目的 调查东台地区幽门螺杆菌对 5 种常见抗菌药物的耐药性及其变化趋势。**方法** 收集来自该院胃镜室 150 例胃黏膜组织接种于含有选择性抑制剂的哥伦比亚血琼脂平板, 微需氧条件(5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) 下培养 3~5 d, 分离培养出 78 株幽门螺杆菌, 所有菌株均采用 E-test 法进行药物敏感性试验。**结果** 幽门螺杆菌对四环素、甲硝唑、左氧氟沙星、克拉霉素和阿莫西林的耐药率分别为 3.8%、84.6%、48.7%、30.8% 和 7.7%。**结论** 该地区幽门螺杆菌对甲硝唑的耐药率较高, 应谨慎使用。对左氧氟沙星和克拉霉素的耐药率相对较高, 可与阿莫西林联合使用以提高根除效果。

【关键词】 幽门螺杆菌; 耐药; 抗菌药物; 联合用药
DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.17.008 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)17-2503-02

Research on resistance of Helicobacter pylori to commonly used antibacterial drugs^{*} WU Li-pei, ZHOU Yu-gui, WANG Min, MA Rong-guo, MAO Min, ZHOU Li, ZHAO Jian-chun, XUAN Shi-hai[△] (Department of Clinical Laboratory, Affiliated Dongtai Hospital of Nantong University, Dongtai, Jiangsu 224200, China)

【Abstract】 Objective To investigate the resistance and change trend of Helicobacter pylori to five kinds of common used antibiotic drugs in the Dongtai area of Jiangsu province. **Methods** One hundred and fifty biopsy specimens from the gastroscope room of this hospital were cultured on Columbia sheep blood agar containing elective inhibitor under microaerobic condition(5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) for 3—5 d, 78 strains of helicobacter pylori were isolated, cultured, and performed the drug susceptibility test. **Results** The resistance of isolated helicobacter pylori strains to tetracycline, metronidazole, levofloxacin, clarithromycin and amoxicillin were 3.8%, 84.6%, 48.7%, 30.8% and 7.7%, respectively. **Conclusion** Helicobacter pylori in local area has the higher resistance to metronidazole, so metronidazole should be carefully used. Helicobacter pylori has relatively higher resistance to levofloxacin and clarithromycin, therefore which could be used by combining with amoxicillin for improving the eradication effect.

【Key words】 Helicobacter pylori; drug resistance; antibiotics; combination medication

幽门螺杆菌是慢性胃炎、消化性溃疡的主要致病因子之一, 与胃癌、胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤及一些胃肠外疾病关系密切, 已被世界卫生组织列入 I 类致癌原。幽门螺杆菌根除治疗方案很多, 其中质子泵抑制剂加两种抗菌药物的三联疗法仍是当前国内、外公认的一线治疗方法。然而, 随着抗菌药物在临床上的广泛使用, 幽门螺杆菌的耐药菌株也日益增加。既往研究发现, 对消化性溃疡合并幽门螺杆菌感染的患者进行幽门螺杆菌根除治疗, 不仅有助于溃疡的治愈、减少溃疡的复发率, 还可降低患胃癌及胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤的风险^[1]。因此, 了解幽门螺杆菌的耐药性有助于根除幽门螺杆菌。为此, 本研究对江苏东台地区就诊的部分胃病患者进行幽门螺杆菌的分离培养和 5 种常见抗菌药物敏感性试验, 旨在调查本地区幽门螺杆菌对 5 种常见抗菌药物的耐药性, 为临床合理用药提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 150 例胃黏膜标本取自 2013 年 5 月至 2014 年 5 月本院消化内科进行胃内窥镜检查的消化性溃疡患者, 其中, 男 92 例, 女 58 例; 平均年龄 40.3 岁。以上疾病的诊断标准依照《内科学》^[2]。本研究经本院伦理委员会批准, 且所有患者均签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂 选择性抑制剂、氧化酶试剂(英国 OX-

OID), 过氧化氢溶液(天津药业集团新郑股份有限公司), 哥伦比亚琼脂、微需氧产气袋、四环素、甲硝唑、克拉霉素、阿莫西林和左氧氟沙星 E-test 试纸条及密封培养罐(法国梅里埃), 脱纤维绵羊血(温州市康泰生物科技有限公司), 幽门螺杆菌快速诊断试剂盒(尿素酶法)购自上海惠泰医疗科技公司, H. pylori 标准菌株 26695(上海市消化病研究所)。

1.3 方法

1.3.1 H. pylori 分离培养 无菌条件下取出胃黏膜组织, 2 h 内接种于含有选择性抑制剂的哥伦比亚培养基, 反复将组织各面涂抹在培养基的表面, 尽量使组织多面接触培养基。将接种好的哥伦比亚培养基迅速置于培养罐中, 快速将微需氧产气袋放入密封培养罐, 将培养罐置于恒温培养箱 35 ℃ 培养 3~5 d 后, 观察结果。

1.3.2 菌株鉴定 挑取可疑菌落, 涂片染色镜检呈革兰染色阴性, 菌体细长弯曲呈螺旋形、S 形或海鸥形。菌体一端或两端可有多根带鞘鞭毛, 运动活泼。打开盖子, 观察培养皿内菌落形态, 挑取优势菌落或者疑似菌落做革兰染色, 革兰染色阴性菌落再分别做尿素酶、氧化酶和过氧化氢试验, 三种试验阳性即鉴定为幽门螺杆菌。挑取阳性菌落转种, 进行四区划线纯培养 1~2 d, 以获得单个菌落。

1.3.3 幽门螺杆菌药敏试验 用无菌棉签蘸取细菌, 配置细

^{*} 基金项目: 江苏省卫生和计划生育委员会科研课题(Z201527); 江苏省盐城市科技计划项目(YK2014088)。
作者简介: 吴李培, 男, 硕士, 主管检验师, 主要从事细菌耐药基因研究。 [△] 通讯作者, E-mail: xsh.jyk@163.com。

菌悬液,校正菌液水平相当于 2 个麦氏单位。用无菌棉签蘸取菌液,在管内壁将多余的菌液旋转挤去后,在 M-H 琼脂表面均匀接种 3 次,每次旋转平板 60°,最后沿平板涂抹 1 周。平板置室温下干燥 3~5 min,用无菌镊子将 E-test 试纸条贴于琼脂表面。将平板迅速置于培养罐中,快速将微需氧产气袋放入密封培养罐并盖好,将培养罐置于恒温培养箱 35 ℃ 培养 3~5 d 后,观察结果。

1.4 判断标准 判断标准依据说明书,甲硝唑、四环素、克拉霉素和左氧氟沙星: $<2\text{ }\mu\text{g/mL}$ 为敏感, $\geq 2\sim\leq 8\text{ }\mu\text{g/mL}$ 为中介, $>8\text{ }\mu\text{g/mL}$ 为耐药;阿莫西林: $<8\text{ }\mu\text{g/mL}$ 为敏感, $\geq 8\sim\leq 16\text{ }\mu\text{g/mL}$ 为中介, $>16\text{ }\mu\text{g/mL}$ 为耐药;以标准菌株 26695 作为质控菌株。

2 结 果

2.1 幽门螺杆菌菌株的分离培养及鉴定 150 例胃黏膜标本成功分离培养出幽门螺杆菌菌株 78 株,经生化反应(触酶、氧化酶和尿素酶)三者均阳性,表明 78 株菌株均符合幽门螺杆菌鉴定标准。

2.2 幽门螺杆菌药敏试验结果 5 种抗菌药物药敏试验结果比较,见表 1。

表 1 幽门螺杆菌菌株对 5 种抗菌药物体外药物敏感性试验结果[n(%)]					
类型	四环素	阿莫西林	克拉霉素	左氧氟沙星	甲硝唑
耐药	3(3.8)	6(7.7)	24(30.8)	38(48.7)	66(84.6)
敏感	75(96.2)	72(92.3)	54(69.2)	40(51.3)	12(15.4)

3 讨 论

幽门螺杆菌感染率已达全球人口的 50.0% 以上,且发展中国家感染率稍高^[3-4]。中国也是一个幽门螺杆菌感染率较高的国家,为 42.0%~90.0%^[5]。本地区幽门螺杆菌感染率 52.0%,在国内处于较低水平。

关于幽门螺杆菌感染的治疗一直是广大胃肠病工作者关注和研究的热点,而在幽门螺杆菌感染治疗中关键问题在于其对抗菌药物的耐药性,幽门螺杆菌对抗菌药物耐药是导致幽门螺杆菌根除失败的主要原因。本研究结果显示,本地区幽门螺杆菌对甲硝唑的耐药率高达 84.6%,明显高于西安、福州地区^[6]。分析原因可能与甲硝唑在胃内具有高稳定性和高活性有关。幽门螺杆菌对甲硝唑的耐药机制比较复杂,目前多数研究认为与 *rdxA* 基因及 *frxA* 基因突变有关^[7-8]。本试验结果显示,幽门螺杆菌对克拉霉素和左氧氟沙星的耐药也较为严重,耐药率分别为 30.8%、48.7%。本地区克拉霉素的耐药率与全国中心报道相似,略高于本课题组 2010 年报道的 25.0%^[9-10]。幽门螺杆菌对克拉霉素的耐药机制与幽门螺杆菌 23S rRNA 基因突变有关,但存在区域差异,最常出现 A2143G、A2142G、A2144G、A2142C 的突变。本项目组以往研究发现,江苏东台地区耐克拉霉素幽门螺杆菌菌株的 23S rRNA 突变以 A2143G 为主^[11]。本地区左氧氟沙星的耐药率明显高于香港、上海地区,与北京地区差别不大^[12-14]。其耐药机制与 *gyrA* 基因突变有关,其氨基酸突变形式主要为 ASn-87、Asp-91。阿莫西林和四环素的耐药率较低,与本课题组 2008 年报道的阿莫西林耐药率相比,虽略有升高,但相对于其他抗菌药物,其耐药还处于较低水平。这可能与幽门螺杆菌并非通过产生 β -内酰胺酶而对阿莫西林耐药的特殊机制有关。

2012 年“第四次全国幽门螺杆菌共识会议——井冈山共识”推荐根除方案:铋剂+质子泵抑制剂+两种抗菌药物组成

的四联疗法。抗菌药物组成方案有 4 种:阿莫西林+克拉霉素;阿莫西林+左氧氟沙星;阿莫西林+呋喃唑酮;四环素+甲硝唑或呋喃唑酮。本研究结果显示,本地区幽门螺杆菌对甲硝唑的耐药率较高(84.6%),应谨慎使用。对左氧氟沙星和克拉霉素的耐药率相对较高,可与阿莫西林联合使用以提高根除效果。

综上所述,本地区用于根除幽门螺杆菌 5 种常见抗菌药物的耐药率高于其他地区。本试验结果显示,阿莫西林可作为本地区根除幽门螺杆菌的一线治疗药物。因此,在根除幽门螺杆菌前,检测其常见抗菌药物的耐药性对于临床医生合理使用抗菌药物、避免幽门螺杆菌耐药菌株的产生有着重要的临床意义。

参考文献

[1] Qian J, Ye F, Zhang J, et al. Levofloxacin-containing triple and sequential therapy or standard sequential therapy as the first line treatment for *Helicobacter pylori* eradication in China[J]. *Helicobacter*, 2012, 17(4): 478-485.

[2] 王吉耀, 廖二元, 胡品津. 内科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 387-431.

[3] Bener A, Uduman SA, Ameen A, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection among low socio-economic workers[J]. *J Commun Dis*, 2002, 34(6): 179-184.

[4] Strnad M, Presecki V, Babus V, et al. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection[J]. *Lijec Vjesn*, 2002, Suppl 1: 5-9.

[5] 胡伏莲. 中国 *H. pylori* 耐药研究现状[J]. 胃肠病学和肝脏病学杂志, 2008, 7(7): 517-518.

[6] 张玲霞, 宋瑛, 张沥, 等. 西安地区就医人群幽门螺杆菌耐药状况及变化趋势[J]. 现代消化及介入诊疗, 2013, 4(8): 252-254.

[7] Kaakoush NO, Asencio C, Mégraud F, et al. A redox basis for metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(5): 1884-1891.

[8] Marais A, Bilardi C, Cantet F, et al. Characterization of the genes *rdxA* and *frxA* involved in metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* [J]. *Res Microbiol*, 2003, 154(2): 137-144.

[9] 刘文忠, 谢勇, 成虹, 等. 第四次全国幽门螺杆菌感染处理共识报告[J]. 胃肠病学, 2012, 10(5): 618-625.

[10] 宣世海, 周玉贵, 周洁, 等. 苏中沿海地区幽门螺杆菌对 6 种常用抗生素耐药性的调查与分析[J]. 重庆医学, 2010, 39(20): 2779-2781.

[11] 周玉贵, 宣世海, 崔亚林, 等. 与克拉霉素耐药相关的幽门螺杆菌基因 23S rRNA 序列分析[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(3): 259-261.

[12] Lee CC, Lee VW, Chan FK, et al. Levofloxacin-resistant *Helicobacter pylori* in Hong Kong [J]. *Chemotherapy*, 2008, 54(2): 50-53.

[13] 胡伏莲. 中国幽门螺杆菌耐药研究现状[J]. 胃肠病学和肝脏病学杂志, 2008, 17(4): 517-518.

[14] Gao W, Cheng H, Hu F, et al. The evolution of *Helicobacter pylori* antibiotics resistance over 10 years in Beijing, China[J]. *Helicobacter*, 2010, 15(10): 460-466.