

不同培養基應用於臨床幽門螺旋桿菌分離率之差異分析

沈群勝^{1,2} 謝孟書³ 翁碧娟¹ 劉忠榮¹ 郭昭宏^{3,4} 郭富珍⁵

¹ 高雄醫學大學附設中和紀念醫院 胃腸內科

² 衛生福利部屏東醫院 內科

³ 高雄市立小港醫院 內科

⁴ 高雄醫學大學醫學院醫學系

⁵ 義守大學學士後醫學系

摘要

幽門螺旋桿菌的診斷方式有分侵入性及非侵入性檢查，其中侵入性檢查中有內視鏡檢查，藉由胃部組織切片，從病理組織變化，快速尿素酶檢測及細菌培養鑑定 [尿素酶 (urease)、觸酶 (catalase) 與氧化酶 (oxidase)] 等試驗鑑定之結果，確認為幽門螺旋桿菌得知，其中以細菌培養最困難。臨床上，不管三合一療法或四合一療法，都有一定治療失敗的比率。因此，藉由提升幽門螺旋桿菌培養分離率，才能探究此菌株抗生素敏感性，輔助臨床除菌用藥並提升根除率。本研究探討不同培養基對於幽門螺旋桿菌分離率的差異分析。本研究分別選擇三種培養基 (plates)，分別為 CDC plates (CDC Anaerobic agar plate); EYE plates (EYE anaerobic agar) 及 BAP plates (Blood agar plate)；選擇採檢後 24 小時內及 72 小時內完成幽門螺旋桿菌培養差異比較，期望能提升幽門螺旋桿菌之高分離率。結果顯示，檢體採檢 24 小時內完成幽門螺旋桿菌培養分離率結果為 CDC plates 73%，EYE plates 53%，BAP plates 100%。檢體採檢 72 小時內完成幽門螺旋桿菌培養分離率結果為 CDC plates 37.5%，EYE plates 13% 及 BAP plates 100%。臨床上，胃部檢體採檢後若未能立即進行幽門螺旋桿菌培養，會降低篩出幽門螺旋桿菌的機率，結果顯示，BAP plates 於檢體採檢 24 小時內及 72 小時內相較於 CDC plates 及 EYE plates 均具有高分離率 (100%)，不受檢體採檢後 72 小時才進行幽門螺旋桿菌培養而影響分離率。根據臺灣幽門螺旋菌治療共識，若患者於二線經驗性除菌治療後未能成功除菌，建議進行藥物敏感性的測驗以之訂定治療方案，高篩選幽門螺旋桿菌分離率將有助於菌之抗藥性分析及提升臨床之精準用藥。

關鍵詞：幽門螺旋桿菌 (*Helicobacter pylori*)
培養分離率 (Culture isolation rate)
藥物敏感性測試 (Antimicrobial susceptibility testing)

前言

1982年 Marshall 及 Warren 從人類的胃中分離出此菌，其結構類似於 *Campylobacter species*，所以一開始的命名為 *Campylobacter pyloridis*，後來又重新命名為 *Campylobacter pylori*¹；於 1984 年兩位澳洲醫師 Barry Marshall 和 Robin Warren 自身喝入幽門螺旋桿菌培養液，造成胃炎發作。經胃鏡檢查後，將胃組織進行細菌培養，從胃中發現此幽門螺旋桿菌並培養成功²；但於 1989 年，根據 16SrRNA 定序等研究顯示其並不屬於彎曲菌屬，幽門螺旋桿菌便被獨立歸類至螺旋桿菌屬。此菌與一般的 *Campylobacter species* 不同，因此又重新命名為 *Helicobacter pylori*³。一經感染後通常會持續終身，除非治療根除，目前無疫苗可使用⁴。

幽門螺旋桿菌是革蘭氏陰性細菌，微需氧特性，生存於胃內的各區域內。它會引起胃黏膜的慢性發炎，甚至導致胃及十二指腸潰瘍與胃癌，約有 80% 的帶菌者無明顯臨床診症狀。全球約有 50% 以上的人感染幽門螺旋桿菌⁵，而在台灣，幽門螺旋桿菌的感染率約為 54%⁶。幽門螺旋桿菌與胃腸道疾病有密切關係，如胃炎，消化道潰瘍，甚至胃癌⁷，世界衛生組織已經於 1994 年將幽門螺旋桿菌歸類為第一級致癌物質⁸。幽門螺旋桿菌生長於人類胃黏膜層，並可能導致慢性胃炎，消化性潰瘍和胃癌⁹⁻¹¹。國際癌症研究機構已確認幽門螺旋桿菌感染是導致胃癌的風險因子之一⁸。

檢查胃部是否有幽門螺旋桿菌感染，基上可分成需做胃鏡檢查（侵入性）及不需做胃鏡檢查

的方法（非侵入性）¹²。病人胃鏡檢查所夾出的檢體，立即置入培養液中，進行幽門螺旋桿菌培養，培養於 37°C、微需氧的環境（5% O₂、10% CO₂ 與 85% N₂）培養箱中，一般需 3-7 天¹³。

1984 年起，許多人投注心力於根除幽門螺旋桿菌研究，試驗出最佳治療潰瘍的藥物。由 1990-1993 最初的單一治療、質子幫浦阻斷劑雙重治療、鉍劑三合一之療法開始，1993 年開始以質子幫浦阻斷劑或 RBC (ranitidine bismuth citrate) 三合一療法來治療，直至今日仍以質子幫浦阻斷劑三合一療法或甚至有四合一的療法為治療首選。

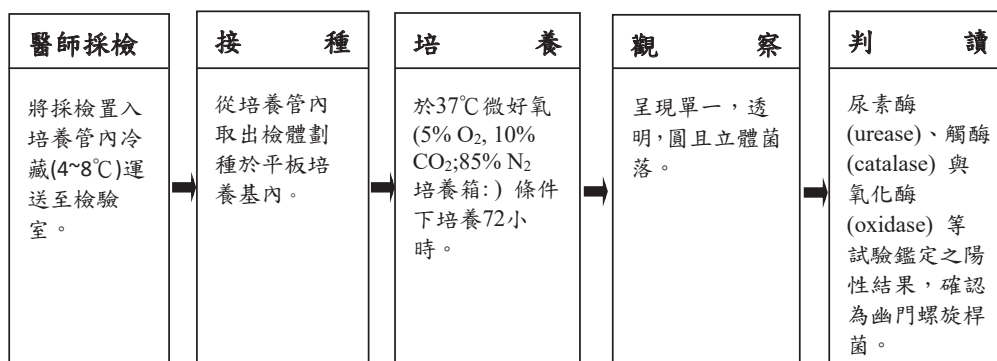
幽門螺旋桿菌使用之藥物目前國內大致以一至兩種消化性潰瘍治療用藥加上兩種抗生素，即可達到殺菌效果；文獻報告常用之潰瘍用藥包括質子幫浦阻斷劑、鉍劑、ranitidine bismuth citrate (RBC)；常用的抗生素則有 clarithromycin (克拉黴素)、amoxicillin (萬博黴素)、tetracycline (四環黴素)、metronidazole (硝基甲嘧啶乙醇) 及 levofloxacin (左氧氟沙星)^{14,15}。

近年來隨著抗藥性菌株的增加，標準三合療法的失敗率在全球正逐漸上升，有許多地區的三合療法失敗率已高達 20% 以上¹⁶。然而，根除菌失敗的原因主要有抗生素之抗藥性¹⁷、病人對藥物之順從性不良以及質子幫浦阻斷劑之代謝過快^{18,19}。幽門螺旋桿菌對 clarithromycin 的抗藥性是第一線標準三合療法失敗的主因^{16,20}。

高篩選幽門螺旋桿菌分離率將有助於菌之抗藥性分析及提升臨床上準確性之用藥。

本研究藉由內視鏡直接採胃黏膜組織，其

處理流程



檢體由切片夾取出後立刻將檢體置入培養管內冷藏(4°C)，分為二組運送時間(24小時內及72小時內)到檢驗室進行幽門螺旋桿菌培養，二組於培養72小時後觀察不同培養基並經尿素酶、觸酶與氧化酶等試驗鑑定之結果，確認為幽門螺旋桿菌。

結果與討論

本研究中有53位病患胃鏡採檢後24小時內完成初次培養，方法是同一病患分別同時使用CDC、EYE及BAP三種平板培養皿進行幽門螺旋桿菌分離率的統計及觀察，另37位病患胃鏡採檢後72小時內完成初次培養，方法也是同一病患分別同時使用CDC、EYE及BAP三種平板培養皿進行幽門螺旋桿菌分離率的統計及觀察。圖一中顯示三種培養皿還未做實驗前的外觀，圖二是菌落判讀標準，圖一及圖二以便於實驗後進行觀察差異分析參考。表一為細項個別分析結果顯示BAP plates雖然材料成本較高，但其他細項中均勝，除了最重要的高分離率(100%)，在陽性發報告時程及未來進行藥敏分析都有相較於其他2種培養皿的時程較短。CDC plates雖低成本但在初次培養上比較多雜菌，對於檢測人員挑選菌上有比較高困難度，EYE plates雖成本適中，有高度差異菌落辨識度，但分離率敏感度太低，失去了客製配置此培養皿的意義。檢測人員培養細菌操作時觀察到BAP plates在培養過程中相較於其他2種培養皿具有高濕度，然而，幽門螺旋桿菌是屬

於喜好高濕度的培養環境，因此BAP plates的高濕度具有培養上的優勢，另外血液培養的養份是培養增量的重點，BAP plates的材料成份較佳，有助於細菌的成長。

選擇採檢後24小時內及72小時內完成幽門螺旋桿菌培養差異比較，期望能提升幽門螺旋桿菌之高分離率。結果顯示，檢體採檢24小時內完成幽門螺旋桿菌培養分離率結果為CDC plates 73%，EYE plates 53%，BAP plates 100%。檢體採檢72小時內完成幽門螺旋桿菌培養分離率結果為CDC plates 37.5%，EYE plates 13%及BAP plates 100%。因此，BAP plates於檢體採檢24小時內及72小時內相較於CDC plates及EYE plates均具有高分離率(100%)，BAP plates也同時克服了偏遠地區採檢到的檢體送運到市區檢驗單位之檢體低培養率的問題，高篩選幽門螺旋桿菌分離率將有助於菌之抗藥性分析及提升臨床上準確性之用藥。

結語

幽門螺旋桿菌的治療在經過大量研究後已有長足的進展，根據不同地域處方之第一線除菌療法雖有極高的成功率，但隨之而來的抗藥性幽門螺旋桿菌的根除問題更值得重視，接受一線及二線幽門螺旋桿菌除菌療法失敗的患者日益增加。依照最新之臺灣幽門螺旋桿菌治療共識²¹建議，若患者於兩次或兩次以上除菌治療後幽門螺旋桿菌仍然無法根除，建議進行幽門螺旋桿菌藥物敏感性測試並以之訂定除菌治

表一：三種培養基之差異分析比較

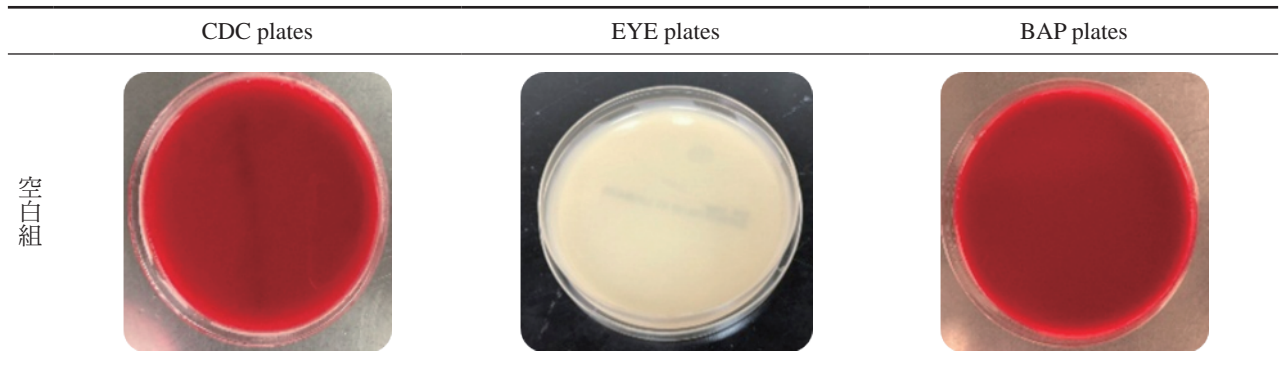
產品名稱	CDC plates	EYE plates	BAP plates	
耗材成本	較低	勝	較高	較高
培養皿濕度	居中	低	高	勝
最終報告時效性	快速	慢	最快速	勝
發出陽性報告所需日程	4~7天	6~8天	3~5天	勝
陽性報告後進行藥敏試驗所需日程	14天	16天	7-10天	勝
採檢後24小時內完成初次培養之幽門螺旋桿菌分離率	73%	53%	100%	勝
採檢後72小時內完成初次培養之幽門螺旋桿菌分離率	37.5%	13%	100%	勝
整體效能排名	第二名	第三名	第一名	勝

療。雖然藉由藥物敏感性測試所訂定之除菌治療較經驗性除菌藥物較為有效，但目前因為細菌培養與藥物敏感性測試所費不貲且因設備問題無法普及，若能藉由高分離成功率的細菌培養基，降低幽門螺旋桿菌培養與後續藥物敏感性測試的醫療成本，能讓臨床醫師除了經驗性

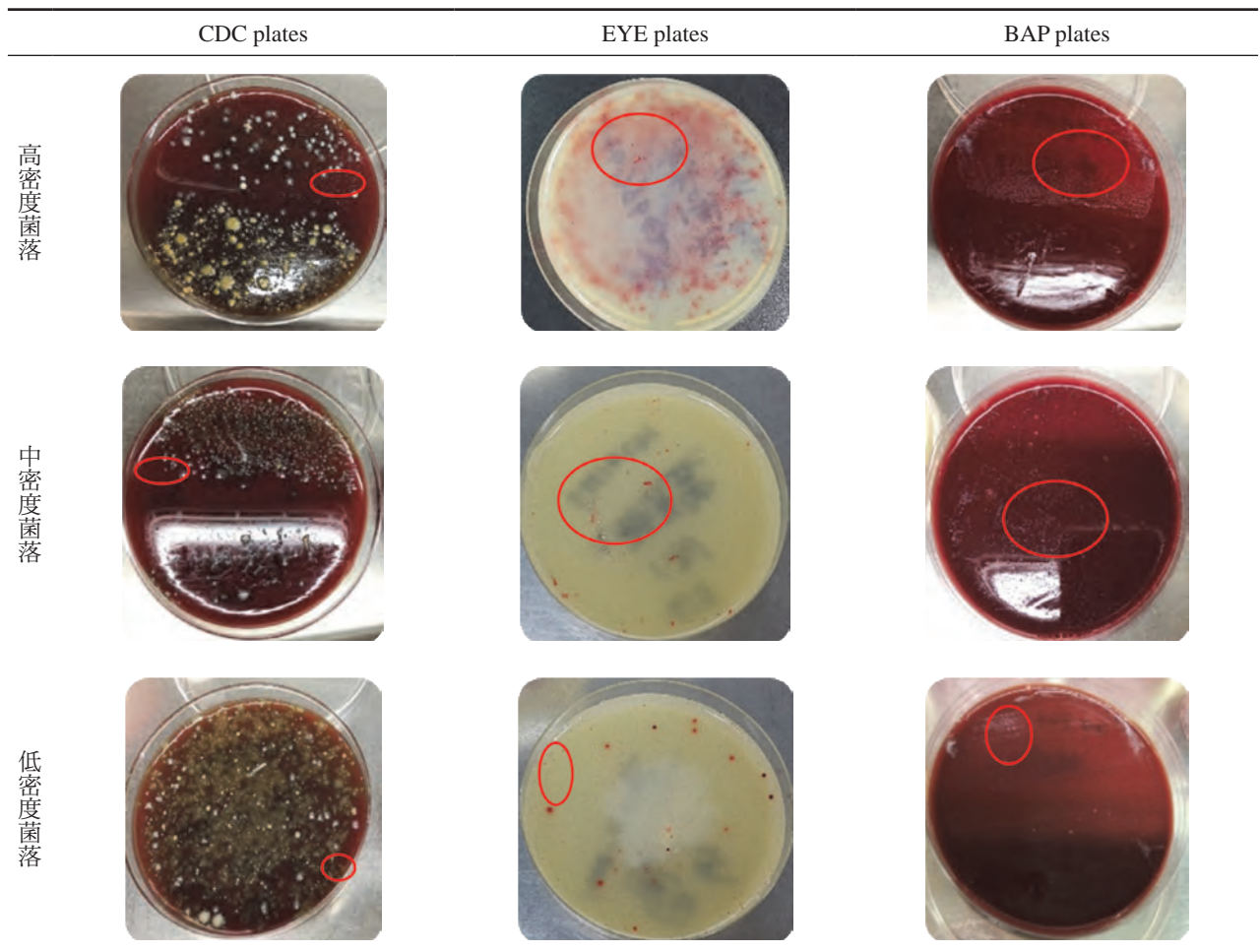
療法外能更準確進行幽門螺旋桿菌的除菌治療。

致謝

智一生醫股份有限公司 (WiseOne Biomed Co. Ltd.) <http://www.wiseone-bio.com>.



圖一：三種培養基之空白組。



圖二：三種培養基於不同細菌密度之表現。

參考文獻

1. Blaser MJ, Duncan DJ, Warren GH, Wang WL. Experimental *Campylobacter jejuni* infection of adult mice. *Infect Immun* 1983; 39(2): 908-16.
2. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 1(8390): 1311-5.
3. Marshall BJ, McCallum RW, Prakash C. *Campylobacter pyloridis* and gastritis. *Gastroenterology* 1987; 92(6): 2051.
4. Kokkola A, Kosunen TU, Puolakkainen P, et al. Spontaneous disappearance of *Helicobacter pylori* antibodies in patients with advanced atrophic corpus gastritis. *APMIS* 2003; 111(6): 619-24.
5. Everhart JE, Kruszon-Moran D, Perez-Perez GI, Tralka TS, McQuillan G. Seroprevalence and ethnic differences in *Helicobacter pylori* infection among adults in the United States. *J Infect Dis* 2000; 181(4): 1359-63.
6. Lin JT, Wang JT, Wang TH, Wu MS, Lee TK, Chen CJ. *Helicobacter pylori* infection in a randomly selected population, healthy volunteers, and patients with gastric ulcer and gastric adenocarcinoma. A seroprevalence study in Taiwan. *Scand J Gastroenterol* 1993; 28(12): 1067-72.
7. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10(4): 720-41.
8. Vainio H, Heseltine E, Wilbourn J. Priorities for Future IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Environ Health Perspect* 1994; 102(6-7): 590-1.
9. Whitehead R, Truelove SC, Gear MW. The histological diagnosis of chronic gastritis in fiberoptic gastroscopy biopsy specimens. *J Clin Pathol* 1972; 25(1): 1-11.
10. Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, et al. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 325(16): 1127-31.
11. Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Kato I, Perez-Perez GI, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N Engl J Med* 1991; 325(16): 1132-6.
12. Bravos ED, Gilman RH. Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori*. Other tests. *Gastroenterol Clin North Am* 2000; 29(4): 925-9.
13. Perez-Perez GI. Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori*. Culture, including transport. *Gastroenterol Clin North Am* 2000; 29(4): 879-84.
14. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 2007; 56(6): 772-81.
15. Fuccio L, Minardi ME, Zagari RM, Grilli D, Magrini N, Bazzoli F. Meta-analysis: duration of first-line proton-pump inhibitor based triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Ann Intern Med* 2007; 147(8): 553-62.
16. Megraud F. *H pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut* 2004; 53(9): 1374-84.
17. Huang AH, Sheu BS, Yang HB, Huang CC, Wu JJ, Lin XZ. Impact of *Helicobacter pylori* antimicrobial resistance on the outcome of 1-week lansoprazole-based triple therapy. *J Formos Med Assoc* 2000; 99(9): 704-9.
18. Sheu BS, Fock KM. CYP2C19 genotypes and *Helicobacter pylori* eradication. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23(8 Pt 1): 1163.
19. Sheu BS, Kao AW, Cheng HC, et al. Esomeprazole 40 mg twice daily in triple therapy and the efficacy of *Helicobacter pylori* eradication related to CYP2C19 metabolism. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21(3): 283-8.
20. Fischbach L, Evans EL. Meta-analysis: the effect of antibiotic resistance status on the efficacy of triple and quadruple first-line therapies for *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26(3): 343-57.

Analysis of *Helicobacter Pylori* Isolation Rate from Different Culture Plate

Chun-Sheng Shen^{1,2}, Meng-Shu Hsieh³, Bi-Chuang Weng¹,
Chung-Jung Liu¹, Chao-Hung Kuo^{3,4}, and Fu-Chen Kuo⁵

¹*Division of Gastroenterology, Department of Internal Medicine, Kaohsiung Medical University Hospital, Kaohsiung, Taiwan;*

²*Department of Internal Medicine, Pingtung Hospital, Ministry of Health and Welfare, Ping-Tung, Taiwan;*

³*Department of Internal Medicine, Kaohsiung Municipal Hsiao-Kang Hospital, Kaohsiung, Taiwan;*

⁴*Department of Medicine, Faculty of Medicine, College of Medicine, Kaohsiung Medical University, Kaohsiung, Taiwan;*

⁵*School of Medicine, College of Medicine, E-Da Hospital, I-Shou University, Kaohsiung, Taiwan*

Helicobacter pylori infection can be diagnosed by non-invasive techniques and by invasive techniques via endoscopy examination and biopsy (e.g. histological examination, rapid urease test and culture with urease, catalase and oxidase base culture plate) and the most challenging part is culture due to technical difficulties. Although combination treatment of triple therapy and quadruple therapy are effective for eradicating *Helicobacter pylori*, a significant portion of patients failed the eradication treatment. Furthermore, we could investigate susceptibility of each strain and increase eradication rate by improving *Helicobacter pylori* isolation rate. This study focuses on the different analysis from distinct culture plate for *Helicobacter pylori*. Three types of plate were chosen, CDC plates with blood agar, EYE plates with *Helicobacter pylori* selective agar and BAP plates with blood agar. The endpoints of isolation rate were 24 hours and 72 hours after cultivation for determine better isolation rate. The result yielded that isolation rate of 73% with CDC plates, 53% with EYE plate, and 100% with BAP plates at 24 hours after cultivation. Meanwhile, at 72 hours after cultivation, 37.5%, 13% and 100% of CDC plates, EYE plates and BAP plates respectively. BAP plates undoubtedly obtained better result than CDC plates and EYE plates. Better isolation rate of *Helicobacter* certainly aided analysis of antibiotic susceptibility and resistance thus improved the accuracy of eradication regimen in clinical practice. (J Intern Med Taiwan 2019; 30: 396-401)