

一小时幽门螺杆菌表型药敏检测：基于荧光代谢活性的免培养新技术初步验证

李炳慧，张林，侯艳红，吴凯，韩家峰，刘君钰，张静，杨汨

中国人民解放军总医院第八医学中心消化内科，北京 100091

通讯作者：张林，Email: stepinghuns2@163.com

摘要

背景：随着幽门螺杆菌临床耐药率逐年升高，依托药敏指导下的个体化精准根除需求日益迫切。传统培养法药敏实验可真实反映菌株耐药表型，但培养周期冗长；分子检测速度快，仅能检出已知耐药靶点，无法识别未知突变。针对两类检测方法的缺陷，本研究旨在建立并验证一种免培养即时型幽门螺杆菌表型药敏新技术。

方法：纳入 40 例确诊 Hp 感染的患者，取其胃窦黏膜活检组织，经机械匀浆制备菌悬液；分别加入参照欧洲药敏试验委员会（EUCAST）临界标准配制的阿莫西林、克拉霉素、左氧氟沙星检测体系，采用双荧光探针分别标记死菌与活菌，同时设置无抗生素空白对照组，于 37℃ 孵育 60 min 后使用酶标仪定量检测荧光发射强度，结合相对空白对照组的荧光强度变化判定菌株敏感或耐药。以传统培养 E-test 法为金标准，计算该荧光快速现场评估（Fluorescence rapid on-site evaluation, F-ROSE）法的灵敏度、特异度、Cohen' s kappa 值及与 E-test 法的检测一致率，评价其诊断效能。

结果：40 例标本中，F-ROSE 检测法均检测出 Hp 阳性，同时完成了对三种抗生素的药敏判定，但其中有 14 例样本因培养基生长不满意而被剔除，最终每种抗生素各纳入 26 例样本进行效能评估。F-ROSE 法与 E-test 法的总体符合率：阿莫西林为 84.6%（22/26），左氧氟沙星为 76.9%（20/26），克拉霉素为 69.2%（18/26）。三种药物的 Cohen' s kappa 系数分别为 0.523（0.093 - 0.953）、0.539（0.215 - 0.862）和 0.412（0.074 - 0.751），均达到中度一致水平。

结论：本研究首次构建了 Hp 免培养快速表型药敏（F-ROSE）检测体系，仅需约 1 小时即可完成菌株药敏评估，突破传统培养法耗时数日的长期技术瓶颈，可实现快速诊断、指导个体化靶向根除方案，有望扭转临床先行经验用药、等待药敏结果滞后的诊疗困境；但本研究样本量有限，后续仍需开展大样本前瞻性研究优化检测参数，并通过随机对照试验验证该技术对 Hp 根除疗效等实际临床结局的改善作用，进一步证实其临床推广价值。

关键词：幽门螺杆菌；抗生素药敏试验；表型药敏；免培养；荧光快速现场评估；快速诊断

One-Hour Culture-Free Phenotypic Antimicrobial Susceptibility Testing for *Helicobacter pylori* Based on Fluorescence Metabolic Activity: A Preliminary Validation Study

Binghui Li, Lin Zhang, Yanhong Hou, Kai Wu, Jiafeng Han, Junyu Liu, Jing Zhang,
Mi Yang

Department of Gastroenterology, the Eighth Medical Center of Chinese PLA General
Hospital, Beijing 100091, China

Corresponding Author : Lin Zhang, Email: stepinghuns2@163.com

Abstract

Background: The escalating rate of clinical antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) has underscored the urgent need for susceptibility-guided individualized eradication strategies. Conventional culture-based antimicrobial susceptibility testing (AST) faithfully reflects the resistance phenotype of clinical strains but is hindered by prolonged turnaround times, while molecular detection methods offer rapid results yet are restricted to known resistance determinants and cannot identify novel mutations. To address these limitations, the present study aimed to establish and validate a novel culture-free, point-of-care phenotypic AST platform for *H. pylori*. **Methods:** Forty patients with confirmed *H. pylori* infection were enrolled. Gastric antrum mucosal biopsy specimens were mechanically homogenized to prepare bacterial suspensions, which were then subjected to susceptibility testing for amoxicillin, clarithromycin, and levofloxacin at concentrations based on European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) clinical breakpoints. Viable and non-viable bacteria were differentially labeled using dual fluorescent probes, with antibiotic-free suspensions serving as blank controls. Following incubation at 37° C for 60 minutes, fluorescence emission intensities were quantified by microplate reader, and susceptibility or resistance was determined by comparing fluorescence changes relative to the blank control. The conventional culture-based E-test method served as the reference standard. Sensitivity, specificity, Cohen's kappa coefficient, and concordance rates with E-test were calculated to evaluate the diagnostic performance of the Fluorescence Rapid On-Site Evaluation (F-ROSE) method.

Results: *H. pylori* was detected in all 40 specimens by F-ROSE, and susceptibility profiles for all three antibiotics were simultaneously determined. Fourteen specimens were subsequently excluded due to unsatisfactory growth on culture media, leaving 26 specimens per antibiotic available for performance evaluation. The overall concordance rates between F-ROSE and E-test were 84.6% (22/26) for amoxicillin, 76.9% (20/26) for levofloxacin, and 69.2% (18/26) for clarithromycin. Cohen's kappa coefficients were 0.523 (95% CI: 0.093 - 0.953), 0.539 (0.215 - 0.862), and 0.412 (0.074 - 0.751) for the three agents, respectively, all indicating moderate agreement. **Conclusions:** This study presents the first culture-free rapid phenotypic AST system (F-ROSE) for *H. pylori*, capable of delivering susceptibility results within approximately one hour and thereby overcoming the longstanding bottleneck of conventional culture-based approaches that require several days. This platform holds promise for enabling real-time clinical decision-making and guiding individualized targeted eradication regimens, potentially resolving the clinical dilemma in which empirical therapy must be initiated before susceptibility data become available. Nevertheless, the limited sample size of this pilot study warrants further large-scale prospective investigations to optimize assay parameters, and randomized controlled trials are needed to validate the impact of this technology on *H. pylori* eradication outcomes and to support its broader clinical implementation.

Keywords: *Helicobacter pylori*; antimicrobial susceptibility testing; phenotypic susceptibility; culture-free; fluorescence rapid on-site evaluation; rapid diagnosis

1 引言

幽门螺杆菌（Hp）是定植于胃黏膜的革兰阴性螺旋杆菌，全球感染率约 44%，东亚及多数发展中国家感染率超 60%^{错误！未找到引用源。}，被国际癌症研究机构列为 I 类致癌因子，长期感染可诱发慢性胃炎、消化性溃疡及胃腺癌，国内感染负担沉重^{错误！不能识别的开关参数。}。随着抗菌药物广泛使用，Hp 耐药问题日益突出，克拉霉素、甲硝唑耐药率居高不下，严重影响根除疗效^{错误！未找到引用源。}。《第六次全国幽门螺杆菌感染处理共识报告》明确提出，高耐药区域优先开展药敏指导个体化治疗^{错误！未找到引用源。}。但现有药敏检测各有缺陷：传统培养法耗时 5~7 天，等待周期过长，临床只能先行经验用药^{错误！不能识别的开关参数。}，大幅升高根除失败与继发多重耐药风险；PCR、二代测序等分子检测仅能识别已知突变，缺乏阿莫西林耐药特异性标志物，还会漏检新型耐药机制^{错误！不能识别的开关参数。}，临床亟需兼顾速度与表型真实性的新型检测手段。

目前尚无文献报道针对幽门螺杆菌的、可直接利用临床活检标本进行的免培养快速表型药敏方法。本研究首次报道一种基于荧光快速现场评估技术的免培养快速表型药敏试验，可直接对胃黏膜活检标本进行检测，无需培养。该方法的构思、研发及初步验证工作均由我们的研究团队独立完成。

2 方法

2.1 研究人群

本研究于 2026 年 1 月至 2026 年 6 月期间，在解放军总医院第八医学中心前瞻性纳入连续 40 例接受食管胃十二指肠镜检查、幽门螺杆菌阳性的成年患者。纳入标准为：(1)入组前 2 周内经尿素呼气试验（UBT）或快速尿素酶试验（RUT）证实为幽门螺杆菌阳性；(2)4 周内无幽门螺杆菌根除治疗史及任何系统性抗生素暴露史（包括非根除用途）；(3)2 周内未使用质子泵抑制剂。所有受试者均签署书面知情同意书。研究方案经解放军总医院第八医学中心机构审查委员会批准（批号：[S-2026-003-01]），并在[ClinicalTrials.gov/ChiCTR: ChiCTR2600125137]进行注册。

2.2 基于 F-ROSE 技术的快速表型药敏试验

2.2.1 标本处理

每例患者获取 2 份胃窦活检标本：1 份用于荧光快速现场评估法检测，另 1 份用于传统的基于培养的表型药敏试验。荧光快速现场评估法所用标本立即置于 1mL 无菌磷酸盐缓冲液（PBS）中，使用无菌研磨棒研磨 30 秒，以释放黏膜组织中的细菌。

2.2.2 抗生素暴露

将制备好的细菌匀浆液分装为 4 份，每份 200μL：1 份作为无抗生素空白对照组，其余 3 份分别添加对应的抗生素，各药物暴露终浓度参照 EUCAST 幽门螺杆菌 MIC 敏感临界值设定为阿莫西林 0.125μg/mL、克拉霉素 0.125μg/mL、左氧氟沙星 1.0μg/mL；所有样品置于 37℃微需氧环境（5%O₂、10%CO₂、85%N₂）孵育 1h^[7]。EUCAST 临界浓度用于 F-ROSE 法抗生素暴露浓度设定，而 E-test 判读采用 EUCAST v16.1 标准 MIC 折点，两者为不同用途的参照体系。

2.2.3 荧光检测

孵育结束后，自每管取 100μL，与 100μL 荧光快速现场评估试剂（基于 AO/EB 的活菌染色试剂，专有配方）混合，室温避光孵育 5 分钟。使用 SpectraMax iD3 酶标仪（Molecular Devices 公司）检测荧光强度，激发波长 485nm，发射波长 530nm（绿色荧光，代表活菌）及 620nm（红色荧光，代表死菌）。药敏分级分为敏感（S）、耐药（R）两级判定体系，采用荧光剩余率（Fluorescence residual rate, FRR）判定，FRR 计算公式如下：

$$FRR = (\text{添加抗生素组活菌荧光强度} / \text{对照组活菌荧光强度}) \times 100\%$$

预先规定荧光剩余率（FRR） $\leq 50\%$ 为敏感（即抗生素暴露后活菌荧光较对照降低 $\geq 50\%$ ）；FRR $> 50\%$ 判定为耐药。该临界值是基于标准菌株开展前期优化实验确定（详见下文）。

2.2.4 质量控制

每次检测均设置幽门螺杆菌 ATCC 43504 标准菌株（敏感对照）以及本中心验证过的克拉霉素耐药菌株作为对照。基于 5 份随机抽取标本的三次重复检测，FRR 的批间变异系数低于 8%。

总周转时间：从活检取材到结果报告，约 1 小时。

2.3 传统的基于培养的药敏试验（参考方法）

配对的活检标本在 2 小时内完成处理。标本经研磨后接种于幽门螺杆菌选择性培养基（哥伦比亚琼脂基础培养基添加 7%脱纤维马血、万古霉素 10mg/L、甲氧苄啶 5mg/L、多粘菌素 B 2,500IU/L、两性霉素 B 2mg/L），在 37° C 微需氧环境下培养 5-7 天。通过革兰染色、过氧化氢酶试验、氧化酶试验和尿素酶试验进行菌种鉴定。最低抑菌浓度（MIC）通过 E-test 试纸（bioMérieux 公司）测定，并依据 EUCAST v16.1 幽门螺杆菌 MIC 判读标准^[7]：阿莫西林 $\leq 0.125\mu\text{g/mL}$ 为敏感、 $> 0.125\mu\text{g/mL}$ 为耐药；克拉霉素 $\leq 0.125\mu\text{g/mL}$ 为敏感、 $> 0.5\mu\text{g/mL}$ 为耐药；左氧氟沙星 $\leq 1.0\mu\text{g/mL}$ 为敏感、 $> 1.0\mu\text{g/mL}$ 为耐药。

2.4 统计分析

一致率计算为结果一致的样本（培养敏感/F-ROSE 敏感+培养耐药/F-ROSE 耐药）占样本总数的比例。计算敏感度（荧光快速现场评估法能够正确识别培养法判定的耐药菌株的比例）、特异度（荧光快速现场评估法能够正确识别培养法判定的敏感菌株的比例）、阳性预测值（PPV）和阴性预测值（NPV），以及对应的 95%置信区间（采用 Wilson 评分法），以传统培养法（E-test）为参考标准。Cohen's kappa 系数用于评估排除偶然因素后的一致性， κ 系数的 95%置信区间采用正态近似法计算，判定标准为： ≤ 0.20 为轻微一致，0.21 - 0.40 为一般一致，0.41 - 0.60 为中度一致，0.61 - 0.80 为高度一致， > 0.80 为几乎完全一致^[8]。统计分析使用 SPSS 26.0 软件（IBM 公司）完成。

3 结果

3.1 患者基本特征

共纳入 40 例幽门螺杆菌阳性患者（平均年龄 43.9 ± 16.2 岁，其中男性 33 例，女性 7 例）。全部 40 例患者分别针对阿莫西林、盐酸左氧氟沙星、克拉霉素三种抗生素，比较 F-ROSE 法与培养法的药敏判定结果。其中 14 例因培养未成功予以剔除，最终每种抗生素均纳入 26 例进行统计分析。

3.2 F-ROSE 法与培养法的一致性

表 1 展示了各抗生素结果的交叉列联分析。荧光快速现场评估法的总体一致率：阿莫西林为

84.6%（22/26），左氧氟沙星为 76.9%（20/26），克拉霉素为 69.2%（18/26）。Cohen's kappa 系数显示：阿莫西林、左氧氟沙星和克拉霉素均为中度一致，k 值分别为 0.523、0.539、0.412。基于培养金标准四格表计算 F-ROSE 检测敏感度、特异度、PPV、NPV 及 95%CI，结果见表 2。阿莫西林、左氧氟沙星敏感度与 NPV 均为 100.0%，克拉霉素敏感度 90.9%，提示 F-ROSE 漏检耐药菌株概率低，临床排除耐药可靠性较高，但本研究样本量有限，结论仍需扩大样本验证。特异度方面阿莫西林 82.6%最优，左氧氟沙星 68.4%次之，克拉霉素 53.3%最低，区分敏感菌株能力存在药物差异；三种药物 PPV 均处于中等水平，依次为 42.9%、53.9%、58.8%。

表 1. 荧光快速现场评估法与基于培养的药敏试验结果交叉列联表

抗生素	培养 S /F-ROSE S	培养 S /F-ROSE R	培养 R /F-ROSE S	培养 R /F-ROSE R	一致率	Kappa (95%CI)
阿莫西林	19	4	0	3	84.6%	0.523 (0.093 - 0.953)
盐酸左氧氟沙星	13	6	0	7	76.9%	0.539 (0.215 - 0.862)
克拉霉素	8	7	1	10	69.2%	0.412 (0.074 - 0.751)

注：S=敏感；R=耐药。一致率=(培养 S/F-ROSE S+培养 R/F-ROSE R)/样本总数。Cohen's κ 判定标准为≤0.20 轻微一致，0.21 - 0.40 一般一致，0.41 - 0.60 中度一致，0.61 - 0.80 高度一致，>0.80 几乎完全一致。κ 系数的 95%置信区间采用正态近似法计算。

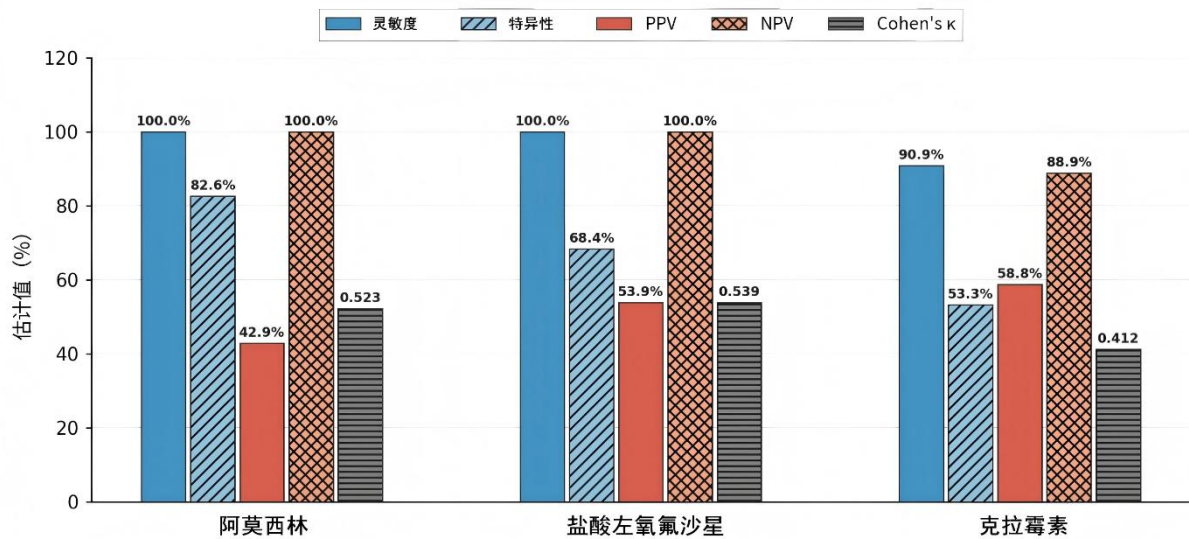
表 2. 荧光快速现场评估药敏试验的诊断学指标

抗生素	敏感度%(95%CI)	特异度%(95%CI)	PPV%(95%CI)	NPV%(95%CI)
阿莫西林	100.0 (43.9 - 100.0)	82.6 (62.9 - 93.0)	42.9 (15.8 - 74.9)	100.0 (83.2 - 100.0)
盐酸左氧 氟沙星	100.0 (64.6 - 100.0)	68.4 (46.0 - 84.6)	53.9 (29.1 - 76.8)	100.0 (77.2 - 100.0)
克拉霉素	90.9 (62.3 - 98.4)	53.3 (30.1 - 75.2)	58.8 (36.0 - 78.4)	88.9 (56.5 - 98.0)

注：95%置信区间采用 Wilson 评分法计算。

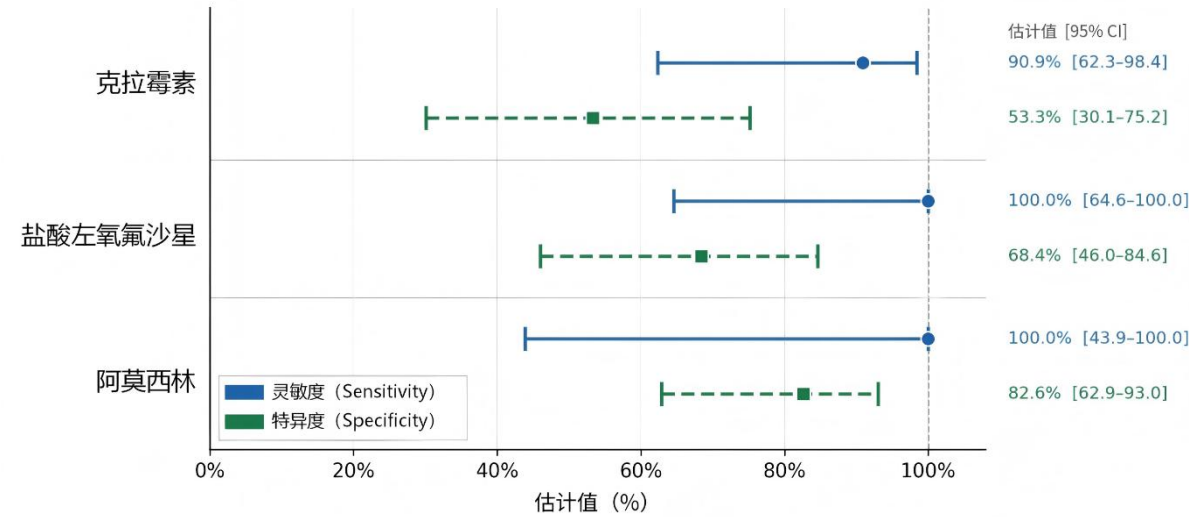
图 1 诊断性能指标对比（分组条形图）

10.12201/bmr.202607.00011V1



注：Cohen's kappa 系数已乘以 100 与其余指标同轴展示（图中标注值为原始 k 值，不带%）。

图 2 三种抗生素敏感度与特异度对比森林图（含 95% CI）



注：95%置信区间采用 Wilson 评分法。

3.3 不一致结果分析

阿莫西林共 4 例检测结果不一致，均为 F-ROSE 假阳性（F-ROSE 判耐药、培养判敏感），无假阴性。无假阴性说明 F-ROSE 可检出全部培养确诊的耐药菌株，漏检风险极低，对应敏感度 100%；4 例假阳性致使特异度仅 82.6%。机制层面，阿莫西林为 β -内酰胺类抗生素，仅作用于增殖期细菌细胞壁；活检标本内部分幽门螺杆菌生长迟缓、代谢停滞，1h 药物孵育后细胞壁抑制效果未充分体现，荧光剩余率未达敏感阈值，造成假阳性。同时活检标本菌量差异会改变孔内实际药物有效浓度，同样会干扰判读。

三种抗生素中克拉霉素不一致病例最多，共 8 例，以假阳性为主：7 例 F-ROSE 判耐药、培养为敏感，仅 1 例假阴性（F-ROSE 判敏感、培养证实耐药）。克拉霉素作用靶点为细菌 50S 核糖体，抑制蛋白合成但不直接损伤细胞膜，而本研究荧光检测依靠细胞膜代谢活性判定结果。MIC 较低的

敏感菌株经 1h 药物处理后，细胞膜荧光信号下降幅度不足 50%，易误判为耐药，这是该荧光检测体系评估大环内酯类药物时固有的方法学缺陷。唯一 1 例假阴性考虑与菌株 23S rRNA A2142G/A2143G 耐药突变相关^[9]：该突变会带来菌株适应性损耗，无药物刺激时基础代谢活性偏低，自发出现荧光减弱信号，造成漏判。上述结果提示，现有 50%荧光剩余率阈值易造成克拉霉素假阳性，可适度上调敏感判定阈值（如 $FRR \leq 60\%$ 判定敏感）提升特异度。

左氧氟沙星共 6 例不一致，全部为假阳性，无假阴性，该结果与阿莫西林一致，说明 F-ROSE 可完整检出所有培养耐药菌株，漏检风险小。左氧氟沙星靶向 DNA 促旋酶，依靠断裂 DNA 发挥抑菌作用，但 DNA 损伤引发的代谢抑制在 1h 短时间孵育中难以完全显现；部分低 MIC 敏感菌株经临界浓度药物处理后仍维持较高细胞活性， $FRR > 50\%$ ，最终出现假阳性。

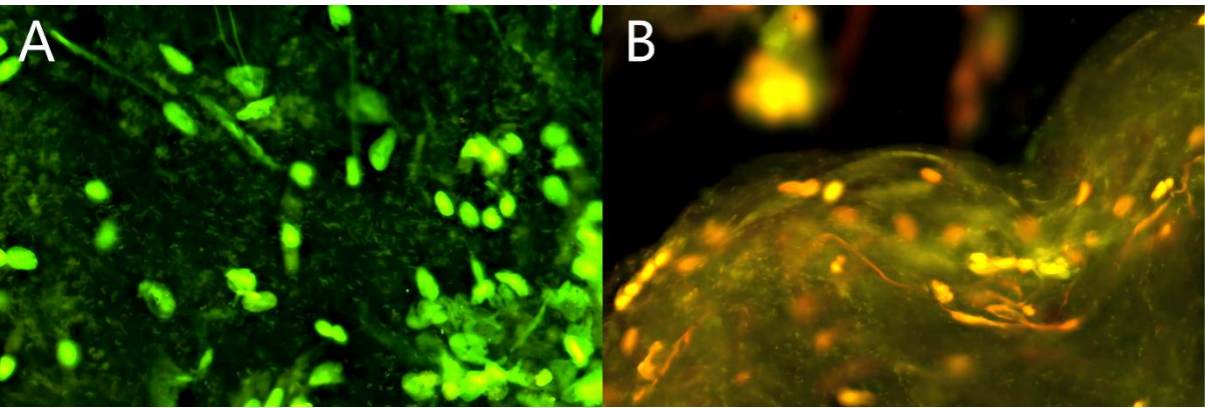
3.4 检测周转时间与成本

荧光快速现场评估法报告结果的时间为 1 小时（范围 55 - 65 分钟），而传统培养法需 5 - 7 天（中位数为 6 天）。每例患者初步估算成本可节约 3000 - 5000 元人民币，主要源于免除培养基使用、长时间孵育设备占用以及反复就诊取报告的费用。

以阿莫西林为例，1 小时抗生素暴露前后荧光快速现场评估成像及定量读出值的代表性图像如下：

(A)敏感菌株（阿莫西林）：暴露后（图 3B）荧光强度对比暴露前（图 3A）显著下降（ $FRR \leq 50\%$ ），提示代谢被抑制。绿色荧光（活菌）显著减弱，红色荧光（非活菌/死菌）相应增加。

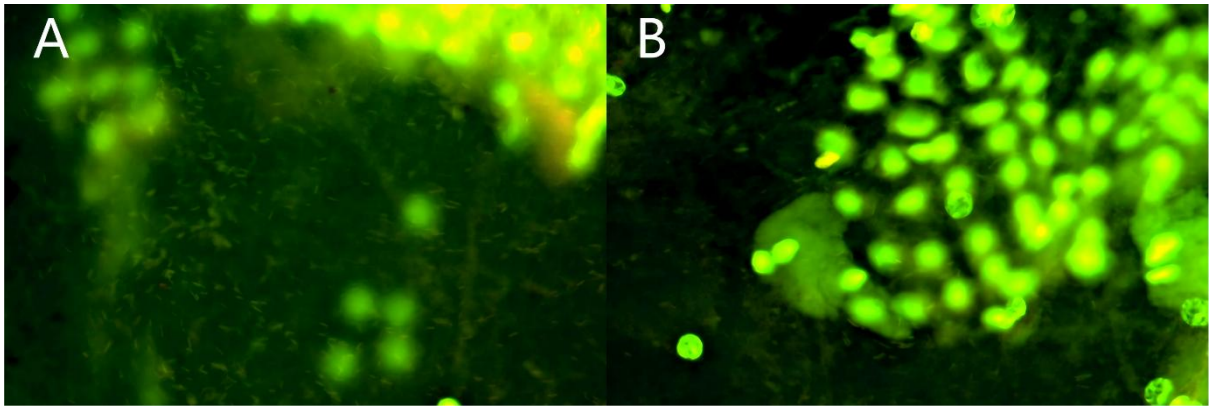
图 3



注：A：阿莫西林敏感菌株抗生素暴露前（400 ×）；B：阿莫西林敏感菌株抗生素暴露后（40 ×）。绿色荧光（激发 485 nm/发射 530 nm）代表活菌，红色荧光（发射 620 nm）代表死菌。

(B)耐药菌株（阿莫西林）：荧光强度未见显著变化（ $FRR > 50\%$ ），提示即使在抗生素暴露下，细菌代谢活性仍得以保持。

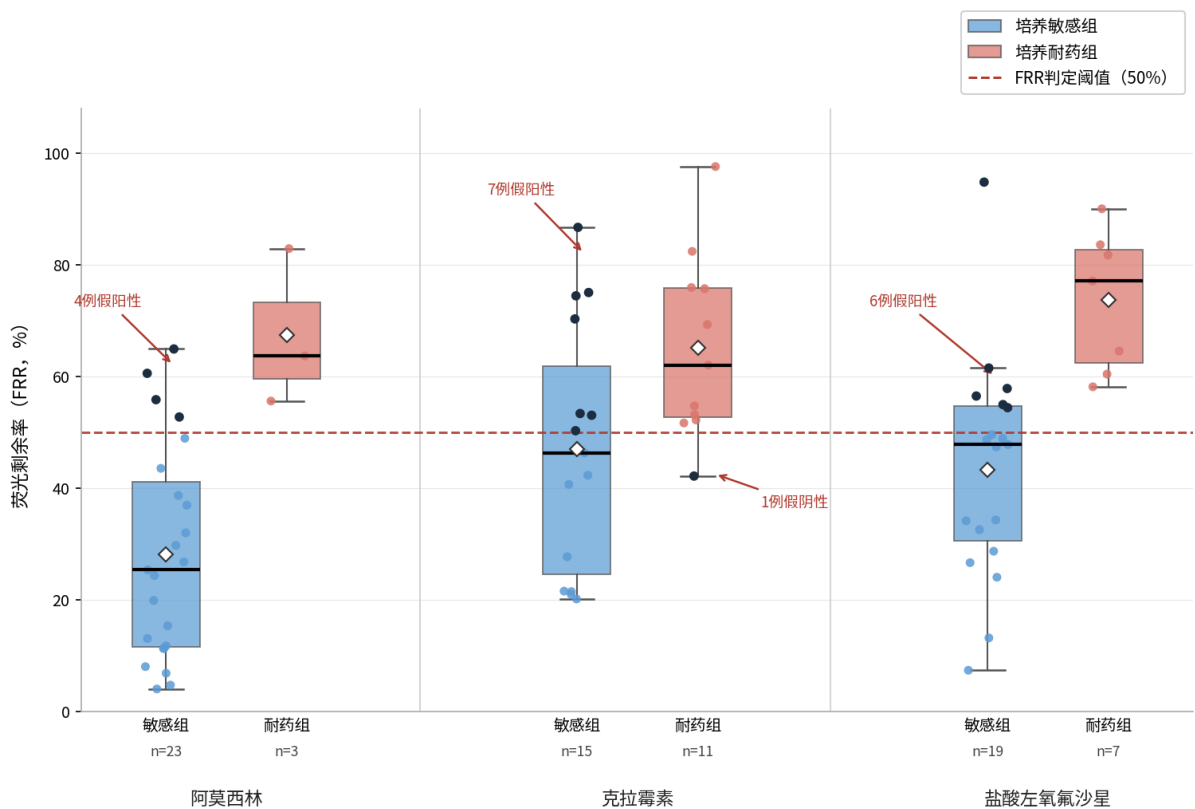
图 4



注：A:阿莫西林耐药菌株暴露前（400 ×）；B: 阿莫西林耐药菌株暴露后（400 ×）

(C) 按基于培养所判定的药敏状态分层，三种抗生素的荧光剩余率定量结果。横向虚线表示50%敏感性阈值。误差棒表示三次重复测量的标准差。

图 5



注：按培养法药敏状态分层，误差棒表示三次重复标准差。比例尺 = 20 μm 。FRR = 荧光剩余率。黑色散点为不符合点（假阳性/假阴性）。

4 讨论

4.1 主要发现与各抗生素检测效能分析

据我们所知，本研究是首次报道针对幽门螺杆菌的免培养快速表型药敏试验，可直接以胃黏

膜活检标本为样本，在 1 小时内出具检测结果。自 1990 年代表型药敏试验标准化以来，幽门螺杆菌的 AST 始终依赖细菌培养^[1]，长达 5-7 天的检测周期导致经验性治疗长期延续，可能间接促进了耐药传播。荧光快速现场评估法通过实时检测抗生素诱导的细菌代谢抑制，绕过了细菌分离与生长的环节，从而打破了这一格局。

各种抗生素的诊断学表现存在差异。阿莫西林的一致率最高 84.6%，方法间一致性达到中度 ($\kappa = 0.523$)，灵敏度达到 100%，特异度也有较高水平 (82.6%)，意味着有较强的识别耐药菌株的能力。鉴于阿莫西林检测目前没有可靠的基因型替代方法，这一表现具有重要的临床意义。左氧氟沙星显示中度一致 ($\kappa = 0.539$)，与阿莫西林相比，虽一致率 (76.9%) 有所降低，但同样表现出较高灵敏度 (100%) 这一特性，概念验证阶段已展现初步可行性，然而，假阳性率偏高 (6/26 例)，提示现有阈值尚需针对左氧氟沙星进行优化。克拉霉素的一致率最低 (69.2%， $\kappa = 0.412$)，其差异主要由假阳性所致，同样需要优化阈值。综合三种药物的不一致数据可见，本次检测不一致结果均以假阳性为主，现有 50% FRR 判定阈值整体偏保守，高估耐药的风险高于漏诊耐药。后续可调整各药物荧光判定阈值，观察特异度与检测一致性的改善效果，同时扩大样本量，验证该误差模式是否稳定存在。

克拉霉素的差异规律值得专门讨论。50% 荧光剩余率判定阈值是基于敏感/耐药 MIC 界限分明的参考菌株建立的。然而，克拉霉素耐药菌株（主要携带 23S rRNA 突变）在 1 小时暴露期内可能仍维持足够的整体代谢活性，使荧光剩余率未能降至 $\leq 50\%$ 阈值，从而导致 7 例假阳性。这一结果提示，50% 的统一阈值对于克拉霉素而言可能过于保守，易产生大量假阳性；适当上调 FRR 敏感判定阈值（如 60%）可扩大敏感判定范围，减少假阳性。这种基于耐药机制的阈值异质性，而非荧光快速现场评估法本身的技术局限，提示需针对不同抗生素分别优化判读标准。我们目前正在开发基于机器学习的多阈值优化方法，将荧光读出值与 MIC 分布进行拟合，初步分析显示该方法可大幅提升克拉霉素的判读一致性。

4.2 阿莫西林检测的临床价值

阿莫西林是幽门螺杆菌根除铋剂四联及伏诺拉生双联方案的核心抗生素，菌株对其耐药将直接导致根除失败。然而，主流药敏检测手段在阿莫西林耐药检测中均存在固有的结构性缺陷，临床缺乏快速、可靠的检测方案。F-ROSE 荧光技术基于直接检测细菌代谢活性的表型原理，规避了上述方法的技术短板，是目前唯一可在 1 小时内完成阿莫西林精准药敏分级的新型手段。

4.2.1 传统培养药敏的固有局限

琼脂稀释法、E-test、纸片扩散法及微量肉汤稀释法均为 CLSI 认证的表型药敏金标准，理论上可定量测定各类抗生素最低抑菌浓度 (MIC)。但应用于幽门螺杆菌阿莫西林耐药检测时，其

方法间一致性与准确度均明显低于克拉霉素、左氧氟沙星、甲硝唑等其他抗菌药物。

（一）方法间一致性差，漏检与假耐药突出

Miftahussurur 等 2020 年对 72 株幽门螺杆菌临床分离株的 ROC 分析显示，E-test 检测阿莫西林耐药的敏感性仅 33.3%、特异性 95.7%、AUC0.783，与琼脂稀释法的 Kappa 系数仅 0.25，存在显著系统性偏差；同批次试验中 E-test 对左氧氟沙星、甲硝唑的敏感性分别达 88.9%与 86.7%^[10]。Ogata 等对 77 株菌株的研究进一步显示，纸片扩散法与琼脂稀释法测定阿莫西林 MIC 的相关系数 $r=-0.36$ ($p=0.0015$)，为所有受试抗生素中最差；纸片扩散法判定的阿莫西林耐药率高达 68.8%，而金标准琼脂稀释法仅为 10.4%，假耐药率极高^[11]。

（二）检测偏差的底层机制与实操短板

幽门螺杆菌可通过 β -内酰胺酶水解、青霉素结合蛋白（PBP）亲和力下降、主动外排泵激活等多重途径产生阿莫西林耐药^[12]，目前已明确 5 类独立且可叠加的耐药通路（详见表 3），无单一标志性基因可覆盖全部耐药表型：

- （1）抗生素灭活：菌株获得外源 *blaTEM-1*，表达 TEM 型 β -内酰胺酶水解阿莫西林 β -内酰胺环，介导高水平耐药^[13]；
- （2）靶蛋白结构改变：*pbp1A*、*pbp2* 点突变改变 PBP1/PBP2 药物结合区域，产生稳定遗传性中低度耐药^[14, 15]；
- （3）外膜渗透屏障：*hopB*、*hopC*突变致外膜孔蛋白功能缺损，药物摄入显著减少^[16]；
- （4）RND 型主动外排：*hefABC*、*hefDEF* 操纵子过表达，通过 HefA 外膜通道蛋白将胞内阿莫西林主动泵出^[17-19]；
- （5）生物膜介导可逆耐受：胞外基质物理阻隔联合 *hefA/hefD* 外排基因上调，双重削弱杀菌效果，无特异性基因标记^[20]。

表 3 幽门螺杆菌对阿莫西林耐药机制汇总

10.12201/bmr.202607.00011V1

耐药分类	耐药原理	作用靶点/结构	相关基因（对应蛋白）
灭活抗生素	获得外源 <i>bla</i> _{TEM-1} ，合成 TEM 型β-内酰胺酶，水解 β-内酰胺环	药物分子结构	<i>bla</i> _{TEM-1} （β-内酰胺酶；内源 HcpA 无临床耐药作用）
靶位结构改变	<i>pbp1A/pbp2</i> 点突变，青霉素结合蛋白空间构象改变，降低药物结合力	细菌细胞壁合成靶蛋白	<i>pbp1A</i> （蛋白 PBP1）、 <i>pbp2</i> （蛋白 PBP2）
外膜渗透屏障	<i>hopB</i> 、 <i>hopC</i> 突变，孔蛋白功能受损，药物摄入减少	外膜通道蛋白	<i>hopB</i> 、 <i>hopC</i> （HopB、HopC）
RND 主动外排	<i>hefABC</i> 、 <i>hefDEF</i> 操纵子高表达，主动泵出胞内阿莫西林	三重外排复合物	核心： <i>hefA</i> （外膜通道 HefA）；配套 <i>hefB</i> 、 <i>hefC</i> 、 <i>hefD</i> 、 <i>hefE</i> 、 <i>hefF</i>
生物膜介导多重耐受	胞外基质物理阻隔，同时上调外排泵基因	生物膜基质+外排系统	无特异性耐药基因，依赖 <i>hefA/hefD</i> 上调协同发挥作用

上述五类耐药通路或依赖独立的遗传标记（如 *bla*_{TEM-1}、*pbp1A*），或完全不留基因突变印记（如生物膜介导的外排泵高表达），任何单一基因检测均无法覆盖全谱。而 F-ROSE 荧光法直接定量抗生素暴露后的活菌代谢活性，无论耐药经由哪条通路发生，只要药物未能有效抑制代谢，均可被捕获——这正是其原理上天然绕开上述全部通路的根本所在。

此外，幽门螺杆菌需 5%O₂、10%CO₂ 的微需氧环境，培养周期长达 5-7 天，对基层机构的设备与技术水平要求较高；采样前还需停用质子泵抑制剂 2 周、抗生素 4 周，患者依从性差，导致大量内镜样本无法获得有效药敏结果^[12]。

4.2.2 分子检测的结构性盲区

PCR 衍生技术、一代测序与全基因组测序（WGS）、FISH、基因芯片等分子手段已成熟应用于克拉霉素、左氧氟沙星耐药的快速筛查，其前提是该两类药物耐药机制单一、突变位点固定——克拉霉素耐药几乎全部源于 23S rRNA A2142G/A2143G 突变，左氧氟沙星耐药集中于 *gyrA* QRDR 区 N87K、D91N 等高频突变。商用 GenoType HelicoDR 试剂盒检测克拉霉素耐药的敏感性与特异性分别达 94%与 99%^[21]。然而，此类技术路线并不适用于阿莫西林耐药的精准预判。

（一）大样本临床证据：基因型无法预测真实耐药表型

Wang 等于 2026 年报道的南京回顾性研究纳入 2018—2024 年 7227 例患者（培养阳性 5729 例）的基因型—表型匹配分析，克拉霉素 23S rRNA 与左氧氟沙星 *gyrA* 的 Kappa 系数分别达 0.9046 与 0.9187，一致性优良；而阿莫西林仅 0.0239，四环素、呋喃唑酮、甲硝唑同样接近 0，提示单纯检测 *pbp1A* 突变无法反映真实耐药状态^[22]。Wang P 等对 141 株杭州临床菌株的 WGS 分析也显示，基于 *pbp1A* 突变的阿莫西林耐药预测符合率仅 83.69%，低于克拉霉素的 92.91%与左氧氟沙星的 89.13%^[23]。全基因组测序仅能检出数据库已知突变，无法识别新发突变及生物膜、外排泵等非遗传介导的耐药机制，易产生假敏感结果^[12, 23]。

10.12201/bmr.202607.00011V1

（二）现有分子平台的共性局限

各类 PCR 衍生检测技术（PCR-RFLP、DPO-PCR、qPCR、ddPCR）仅可检出数据库中已报道的已知耐药突变；荧光原位杂交技术（FISH）因阿莫西林耐药靶点基因分散、缺乏统一靶序列而尚无商用成熟探针体系（克拉霉素 23S rRNA 已有^[24]）；耐药基因芯片受限于设计时录入的位点，全面覆盖成本高。更关键的是，生物膜屏障与外排泵的可逆性高表达仅产生表型层面的药物耐受，基因序列无任何突变标记，所有基于基因的检测手段均存在天然盲区^[20,22]。基于上述缺陷，Maastricht VI/Florence 共识指出，仅依靠基因型检测指导阿莫西林根除方案存在明显的临床局限^[5, 12]。

4.2.3 F-ROSE 荧光技术的临床优势

（一）核心原理：机制无关的直接表型检测

F-ROSE 荧光技术不依赖耐药基因识别，而是直接定量检测阿莫西林暴露后幽门螺杆菌的活菌荧光剩余率。无论菌株通过 β -内酰胺酶、PBP 突变、孔蛋白缺损、外排泵或生物膜中的任意单一或叠加机制产生耐药，只要药物干预后活菌代谢活性不受抑制（FRR 比值 $\geq 50\%$ 阈值），即可被精准识别，从而规避分子方法的基因盲区^[12]。其判定思路与琼脂稀释金标准一致，但将 5-7 天检测周期压缩至 1 小时，可适配内镜即时诊疗需求。

（二）检测效能对比

传统手段的检测效能存在显著短板：E-test 敏感性仅 33.3%，近 2/3 耐药菌株漏检^[10]；基因型检测 Kappa 系数仅 0.0239，预判结果近似随机^[22]。相比之下，F-ROSE 荧光技术在 26 例临床样本中验证的耐药检测敏感性 100.0%（43.9% - 100.0%）、特异性 82.6%（62.9% - 93.0%），且检测成功率 100%。可见，F-ROSE 荧光技术敏感性高于 E-test，并从原理层面解决了分子检测中基因型—表型脱节的结构性缺陷。这一三方对比明确揭示：在阿莫西林药敏检测中，E-test 存在近三分之二的耐药漏检风险，基因型方法的一致性近乎随机，而本研究 F-ROSE 法实现了零漏检（敏感性 100.0%），验证了表型直接检测路线的临床可行性。

（三）临床应用价值

基于上述表型直接检测的原理优势与初步验证数据，F-ROSE 荧光法为铋剂四联及伏诺拉生方案中阿莫西林的精准使用提供了可行的实验室依据，有望在内镜诊疗同步完成当日药敏，推动幽门螺杆菌根除治疗由经验性走向个体化。

4.3 研究局限性与展望

本研究存在若干局限性。这是一项小样本、单中心的初步研究，旨在确立概念可行性。预先设定的 50%阈值尚未优化，且很可能因抗生素不同而需差异化设定；当前分析在统一阈值下进行，

代表的是“最坏情况”。参考方法（基于培养的药敏试验）本身亦存在固有局限性：部分耐药菌株可能存在适应性代价^[9]，导致培养失败或生长延迟，从而被漏检；此外，培养条件（微需氧、培养基成分）可能与体内环境存在差异。此外，本研究尚未评估混合感染或异质性耐药对荧光读出值的影响。

为弥补这些局限性并将这一技术进一步转化为临床实践，我们已启动一项前瞻性随机对照试验，比较以 1 小时荧光快速现场评估检测指导下的根除治疗与经验性铋剂四联疗法对幽门螺杆菌的根除效果（注册号：[ChiCTR2600125137]）。主要终点为根除率；次要终点包括抗生素消耗量、不良事件以及成本效益。该试验将为快速表型药敏在幽门螺杆菌临床诊疗中的应用提供最高级别的循证依据。

在更广阔的幽门螺杆菌诊断领域，我们的研究团队已建立起一套系统化的研究路径：从高准确性诊断（基于荧光快速现场评估的前期研究约 10 项）→快速表型药敏检测（本研究）→临床终点验证（正在进行的随机对照试验）。这一以单一荧光检测平台为核心的整合研究路径，从诊断到药敏再到临床验证形成闭环，为消化病学领域的方法学创新提供了新的思路。

5 结论

本研究初步证实利用荧光快速现场评估技术对幽门螺杆菌实施免培养 1 小时表型药敏检测是可行的。该方法将传统需 5-7 天的表型药敏检测压缩至 1 小时内，为当日制定药敏指导下的个体化治疗方案提供了实验室基础。对于目前缺乏基因型替代方法的阿莫西林检测尤其价值。随着算法优化的推进和随机对照试验的开展，该项技术的免培养 1 小时特性已展现出向临床应用转化的明确路径。

致谢

作者谨以此项工作致敬整个研究团队，感谢他们在将这项技术从概念推进至临床应用的全过程中所付出的不懈努力。

利益冲突声明：作者声明无相关利益冲突。

参考文献

- [1] 刘文，谢勇，成虹，等。第五次全国幽门螺杆菌感染处理共识报告 [J]. 中华消化杂志，2017, 37 (6):364-378.
- [2] 房静远，杜奕奇，刘文忠，等。中国慢性胃炎共识意见（2017 年，上海）[J]. 胃肠病学，2017, 22 (11):670-687.

- [3] 陆红，胡伏莲。中国幽门螺杆菌耐药现状及临床应对个体化策略 [J]. 中华医学杂志，2020, 100 (12): 881-885.
- [4] 中华医学会消化病学分会幽门螺杆菌和消化性溃疡学组，全国幽门螺杆菌研究协作组，刘文忠，等。第六次全国幽门螺杆菌感染处理共识报告（2022 年）[J]. 中华消化杂志，2022, 42 (11): 745-756.
- [5] MALFERTHEINER P, MEGRAUD F, ROKKAS T, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht VI/Florence consensus report[J]. Gut, 2022, 71(12): 1724-1762.
- [6] TSHIBANGU-KABAMBA E, YAMAOKA Y. *Helicobacter pylori* infection and antibiotic resistance - from biology to clinical implications[J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2021, 18(11): 663-682.
- [7] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters: Version 16.1[EB/OL]. (2026-06-24) [2026-06-27]. <https://www.eucast.org>.
- [8] LANDIS J R, KOCH G G. The measurement of observer agreement for categorical data[J]. Biometrics, 1977, 33(1): 159-174.
- [9] BJÖRKHOLM B, et al. Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(25): 14607-14612.
- [10] MIFTAHUSSURUR M, FAUZIA K A, NUSI I A, et al. E-test versus agar dilution for antibiotic susceptibility testing of *Helicobacter pylori*: a comparison study[J]. BMC Research Notes, 2020, 13(1): 22.
- [11] OGATA S K, GALES A C, KAWAKAMI E. Antimicrobial susceptibility testing for *Helicobacter pylori* isolates from Brazilian children and adolescents: comparing agar dilution, E-test, and disk diffusion[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2014, 45(4): 1439-1448.
- [12] GOU L Z, MA Z H, HAN M, et al. Antimicrobial drug susceptibility testing for the management of *Helicobacter pylori* infection in personalized eradication therapy[J]. Frontiers in Microbiology, 2025, 16: 162693.
- [13] TSENG Y H, LIN N T, WU C T, et al. High-level amoxicillin resistance in clinical *Helicobacter pylori* isolates associated with blaTEM-1 β -lactamase gene[J]. Journal of Medical Microbiology, 2009, 58(9): 1192-1197.
- [14] QURESHI N N, GALLAHER B, SCHILLER N L. Evolution of amoxicillin resistance of *Helicobacter pylori* in vitro: characterization of resistance mechanisms[J].

- Microbial Drug Resistance, 2014, 20(6): 509–516.
- [15] QURESHI N N, MORIKIS D, SCHILLER N L. Contribution of specific amino acid changes in penicillin binding protein 1 to amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori* clinical isolates[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011, 55(1): 101–109.
- [16] CO E M, SCHILLER N L. Resistance mechanisms in an in vitro-selected amoxicillin-resistant strain of *Helicobacter pylori*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006, 50(12): 4174–4176.
- [17] LIU Z Q, ZHENG P Y, YANG P C. Efflux pump gene *hefA* of *Helicobacter pylori* plays an important role in multidrug resistance[J]. World Journal of Gastroenterology, 2008, 14(33): 5217–5222.
- [18] GONG X L, WANG Y H, AN Y, et al. The crosstalk between efflux pump and resistance gene mutation in *Helicobacter pylori*[J]. Gut Microbes, 2024, 16(1): 2379439.
- [19] FALSAFI T, EHSANI A, NIKNAM V. The role of active efflux in antibiotic-resistance of clinical isolates of *Helicobacter pylori*[J]. Indian Journal of Medical Microbiology, 2009, 27(4): 335–340.
- [20] YONEZAWA H, OSAKI T, HOJO F, et al. Effect of *Helicobacter pylori* biofilm formation on susceptibility to amoxicillin, metronidazole and clarithromycin[J]. Microbial Pathogenesis, 2019, 132: 100–108.
- [21] NISHIZAWA T, SUZUKI H. Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance and molecular testing[J]. Frontiers in Molecular Biosciences, 2014, 1: 19.
- [22] WANG H C, LI C, PENG R, et al. Phenotypic and genotypic analysis of *Helicobacter pylori* resistance patterns, molecular characteristics, and CYP2C19 polymorphisms in Nanjing: a retrospective cross-sectional study[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2026, 16: 1852534.
- [23] WANG P P, ZHAO J, LV B, et al. Genomic insights into antibiotic resistance, virulence traits and phylogenetic lineages of 141 clinical *Helicobacter pylori* isolates from Eastern China[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2026, 15: 1726881.
- [24] CERQUEIRA L, FERNANDES R M, FERREIRA R M, et al. Validation of a fluorescence in situ hybridization method using peptide nucleic acid probes for detection of *Helicobacter pylori* clarithromycin resistance[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2013, 51(6): 1887–1893.