

• 论 著 •

某地区儿童幽门螺杆菌感染病原学研究

钟华敏, 骆明勇, 谢永强, 邓秋连

(广东省广州市妇女儿童医疗中心检验科 510120)

摘 要:目的 了解广州地区儿童幽门螺杆菌(Hp)的感染及耐药情况。方法 对 2008 年 7 月至 2010 年 4 月该院住院、门诊 328 例行胃镜检查的儿童患者,各取胃黏膜标本 1 块进行 Hp 分离培养,对所分离菌株进行抗菌药物敏感性试验,并采用免疫印迹法测定 Hp 感染患儿血清细胞毒素相关蛋白(CagA)、空泡毒素(VacA)抗体,对 Hp 进行血清学菌株分型,并观察其菌株分型与胃黏膜炎症程度的关系。结果 328 例中 194 例分离出 Hp 菌株,阳性率 59.1%,其中 3~5 岁阳性率 30.7%(12/39),>5~8 岁阳性率 40.6%(26/64),>8~11 岁阳性率 62.9%(56/89),>11~14 岁阳性率 73.2%(100/136),各组间阳性率比较差异有统计学意义($P<0.05$)。194 株 Hp 菌株甲硝唑耐药率达 85.6%,阿莫西林、四环素耐药率为 30%~60%,呋喃唑酮、克拉霉素耐药率为 5%~10%,未检出庆大霉素、左氧氟沙星和羟氨苄青霉素耐药菌株。血清学分型检出 Hp I 型菌株 164 株、II 型 16 株、中间型 14 株,各菌株感染引起胃黏膜炎症中重度炎症分别为 145 例(88.4%),7 例(43.8%),7 例(50.0%),差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 儿童胃黏膜 Hp 培养阳性率随年龄增长而上升,其耐药形势日趋严重,临床应结合药敏试验结果选择合理的抗菌药物治疗 Hp 感染。Hp 菌株类型与儿童胃黏膜炎症程度有关。

关键词:儿童; 螺杆菌,幽门; 抗药性; 病原

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.13.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)13-1414-03

Investigation of Helicobacter pylori infection in children in certain area

Zhong Huamin, Luo Mingyong, Xie Yongqiang, Deng Qiulian

(Department of Clinical Laboratory, Guangzhou Women and Children's Medical Centre, Guangzhou 510120, China)

Abstract: Objective To investigate the incidence of Helicobacter pylori(Hp) infection and the resistance in children in Guangzhou and provide clinical timely and reasonable basis for laboratory diagnosis and treatment. Methods Gastric mucosa samples were harvested from inpatient, outpatient 328 children from July 2008 to April 2010 for Hp culture. The drug susceptibility test were performed by the Kirby-Bauer method. The serum CagA and VacA antibodies were measured by the immune blotting method with Hp to confirm types of Hp. The degree of gastric inflammation was also observed. Results 194 strains of Hp. were isolated from the gastric mucosa of 328 patients(59.1%). The positive rate of 3-5 years old was 30.7% (12/39), positive rate of >5-8 years old was 40.6% (26/64), positive rate of >8-11 years old was 62.9% (56/89), positive rate of >11-14 years old was 73.2%(100/136), positive rate among the four groups were significantly different($P<0.05$). Susceptibility test showed that 194 Hp strains, metronidazole resistance rate was 85.6%, amoxicillin, tetracycline resistance was 30%-60%, furazolidone, clarithromycin resistance rate was 5%-10%. The gentamicin and levofloxacin, amoxicillin resistant strains were not detected. Serological detection showed 164 cases of I-type strains, 16 cases of II-type strains, 14 cases of intermediate strains. The strain infection and severe inflammation in gastric mucosa were 145 cases (88.4%), 7 cases (43.8%), 7 cases (50.0%), the difference was significant ($P<0.05$). Conclusion The frequency may incidence with the increase in age, the resistance situation is becoming increasingly serious, attention should be paid. Susceptibility test results should be combined with clinical rational choice of antibacterial drugs. The severity of antral mucosal inflammation correlated with types of Hp strain.

Key words: child; helicobacter pylori; drug resistance; noxae

幽门螺杆菌(Helicobacter pylori, Hp)是上消化道疾病的主要致病菌,与慢性活动性胃炎、胃十二指肠消化性溃疡、肾腺癌的发生密切相关,同时也与胃腺癌、胃淋巴瘤的发生密切相关。Hp感染呈全球性分布,在发达国家的Hp感染率可达30%~50%,在经济欠发达的国家,50%~90%的成人感染该菌,而儿童是Hp感染的高危时期,来自成人流行病学调查的资料显示,50%以上的成人Hp相关疾病患者是在儿童期感染了Hp而成为Hp携带者的^[1]。抗菌药物耐药菌株的出现是Hp根治失败的主要原因,目前,成人的Hp耐药率在不同国家和地区不尽相同,儿童和青少年感染Hp后对抗菌药物的耐药性问题也已开始得到关注。了解广州地区儿童Hp感染的发生情况及耐药现状,提高对Hp的认识,现对本院2008年7月至2010年4月从328例行胃镜检查的患儿进行胃黏膜Hp培

养及分析结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2008年7月至2010年4月于本院行胃镜检查的儿童患者328例,其中3~5岁39例,>5~8岁64例,>8~11岁89例,>11~14岁136例;男女比率约为1:1(男162例,女166例)。检查前1周均未服用抗菌药物。

1.2 病原菌培养与鉴定

1.2.1 培养基和试剂 Hp运送培养基和Hp选择培养基均为杭州天和微生物试剂有限公司产品,药敏纸片为英国Oxoid公司产品,微需氧袋和API CAMPY生化鉴定试剂条为法国生物梅里埃公司产品。血清细胞毒素相关蛋白(CagA)及空泡毒素(VacA)抗体检测采用深圳市伯劳特生物制品有限公司产品。

1.2.2 采样方法 所有患儿均采用日本富士能电子显微镜(EG-250PE)作常规胃镜检查,取距幽门孔 3~5cm 范围内胃窦黏膜 2 块,1 块进行病理学检查,另 1 块立即放至 Hp 运送培养基中送检。

1.2.3 病原菌分离培养与鉴定 标本送至实验室后立即接种于 Hp 选择培养基中,封装在微需氧袋 37℃ 培养 3~5 d。挑取针尖大小,圆形半透明且表面光滑湿润的单个菌落进行革兰染色镜检,若菌体为革兰阴性,弧状或海鸥状,尿素酶、过氧化氢酶和触酶阳性,则可初步判断为螺杆菌。将初步鉴定为螺杆菌的纯培养物制成 6 麦氏单位的菌液,按要求滴加到 API CAMPY 生化鉴定试剂条上,培养后按操作说明判读结果。

1.3 病原菌的血清学分型 所有 Hp 培养阳性的胃黏膜标本进行常规 HE 染色镜检,诊断按照文献[2]胃窦黏膜炎症程度分类标准进行。同时抽取静脉血 2 mL,分离血清,应用免疫印迹法进行 Hp 分型检查,所用 Hp 抗原印迹膜是将 Hp 产毒株(SS1 标准株,来自澳大利亚)的全菌抗原液,经聚丙烯酰胺凝胶电泳,按相对分子质量大小的不同依次分成各种抗原蛋白区带,再将其转移到硝酸纤维素膜上制成。在含有 Hp 抗原印迹膜的反应槽中加入 1 000 μL 洗涤液,再加待检血清 15 μL,37℃ 温箱孵育 40~60 min,弃槽中液体,于摇床中洗涤 4 次,加显色剂显色后对照标准带(伯劳特公司特制馈赠),观察结果。Hp I 型为产细胞毒素菌株,免疫印迹技术显示 CagA 抗体和 VacA 抗体均为阳性;Hp II 型为不产细胞毒素菌株,即 CagA 抗体和 VacA 抗体均为阴性;Hp 中间型,即 CagA 抗体和 VacA 抗体仅 1 项为阳性的菌株。

1.4 病原菌药敏试验 采用 2005 年美国临床实验室标准化研究所(CLSI)推荐使用的琼脂扩散(Kirby-Bauer)法将被检菌制成 0.5 麦氏单位的菌悬液,用无菌棉拭子将所制菌液均匀涂抹在不含抗菌药物、不加血、厚度为 4 mm 的 MHA 琼脂平板上,待平板干后,贴抗菌药物纸片,至微需氧袋 37℃ 孵育 72 h 后按照 CLSI 标准判读结果,抑菌环的边缘以肉眼见不到细菌生长为限。

1.5 质量控制 采用 Hp 标准菌株 ATCC43504 作为质控菌株。

2 结 果

2.1 病原菌检出情况 328 例患儿中 Hp 阳性 194 例,阳性率 59.1%,其中男性 56.8% (92/162),女性 61.4% (102/166),经 χ^2 检验,性别间差异无统计学意义($P>0.05$)。Hp 阳性率随年龄的增长而升高,各年龄组间比较差异有统计学意义($P<0.05$)。结果见表 1。

表 1 Hp 检出率			
组别(岁)	<i>n</i>	Hp 阳性(<i>n</i>)	阳性率(%)
3~5	39	12	30.7
>5~8	64	26	40.6
>8~11	89	56	62.9
>11~14	136	100	73.5

2.2 病原菌耐药性分析 194 株 Hp 药敏试验结果见表 2。

2.3 血清学分型结果及菌株类型与胃黏膜炎症程度的关系 194 例 Hp 感染患儿,CagA、VacA 抗体均阳性(I 型菌)164 例(84.5%),CagA、VacA 抗体均阴性(II 型菌)16 例(8.2%),CagA、VacA 抗体仅 1 项阳性(中间型)14 例(7.2%);胃窦黏

膜轻度炎症 35 例(18.0%),中重度炎症例 159(82.0%)。结果见表 3。

表 2 194 株 Hp 对常用抗菌药物的药敏试验结果[n(%)]			
抗菌药物	耐药	中敏	敏感
庆大霉素	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
左氧氟沙星	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
羟氨苄青霉素	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
克拉霉素	8(4.1)	3(1.5)	183(94.3)
呋喃唑酮	16(8.2)	6(3.1)	172(88.7)
阿莫西林	65(33.5)	7(3.6)	122(62.9)
四环素	114(58.8)	9(4.6)	71(36.6)
甲硝唑	166(85.6)	9(4.6)	19(9.8)

表 3 Hp 菌株类型与胃窦黏膜炎症程度的关系[n 或 n(%)]			
菌株类型	轻度炎症	中重度炎症	合计
I 型	19(11.6)	145(88.4)	164
II 型	9(56.2)	7(43.8)*	16
中间型	7(50.0)	7(50.0)*	14
合计	35(18.0)	159(82.0)	194

* : $P<0.05$,与 I 型检出率比较。

3 讨 论

Hp 感染见于世界各地及各年龄组人群,是上消化道疾病的重要原因之一。流行病学资料显示, Hp 感染主要发生在儿童期,尤其在生后最初几年内,可见儿童时期是 Hp 感染的关键阶段^[3];一旦感染,若未经治疗, Hp 感染可持续终身。本研究对 328 例儿童采用 Hp 培养检测,显示 Hp 阳性率达 59.1%,高于国内四川(27.1%)^[4]、天津(45.15%)^[5]地区,但低于非洲肯尼亚地区(80.7%)^[6]。西方发达国家和地区儿童与青少年中的 Hp 感染率很低,如瑞典 4~18 岁自然人群中的 Hp 阳性率仅为 10.1%^[7]。在男女性别比较中,女孩(61.4%)较男孩(56.8%)的阳性率稍高,但无统计学差异,与文献报道一致^[8-9]。本研究显示, Hp 阳性率随着年龄的增长显著升高,与国内外报道一致^[4-5,8-9]。Hp 感染的高流行率可能与生活环境、卫生条件及个体卫生习惯较差等因素有关。

治疗 Hp 感染常采用以抗菌药物为主的三联疗法。随着抗菌药物的广泛应用,耐药菌株不断产生,其中以甲硝唑耐药菌株产生较多;据报道,在发达国家为 10%~50%,在发展中国家可达到 80%~90%,而且呈逐年增加的趋势^[10],主要因甲硝唑价格低廉,在发展中国家使用较多,且在生殖道和牙科感染中经常使用有关;其耐药主要机制是硝基还原酶 *rdxa*、*frxa*、*fdxb* 基因突变失活。直到 1996 年 Midolo 等^[11]报道在澳大利亚发现四环素耐药菌株以前,普遍认为 Hp 不会获得对四环素的耐药性;1997 年研究者在意大利检测到 6%的四环素耐药菌株,而本研究中四环素耐药菌株高达 58.8%,产生如大量四环素耐药菌株的原因不清,是否与来源于其他细菌的四环素耐药质粒有关需进一步研究。1997 年 Fedorak 等^[12]报道在加拿大对阿莫西林耐药的菌株为 2%,在法国、比利时^[13]对克拉霉素耐药的菌株高达 10%。本研究中阿莫西林耐药菌株高达 33.5%,而克拉霉素耐药菌株为 8%。以上两种耐药性的差异

可能主要与所研究人群的药物使用状况、基因突变等因素有关。阿莫西林是临床常用药,且 Hp 对其不易产生耐药性,一直以来都作为抗 Hp 的首选药物之一;据报道,其耐药性并非由 β -内酰胺酶基因介导^[14]。Dore 等^[15]发现阿莫西林敏感菌株比耐药菌株引起的慢性活动性胃炎组织学型较重,认为耐药菌株比敏感菌株生长慢,细胞死亡率和细菌溶解率较低。但在本地区,阿莫西林耐药菌株 66 例较高,可能与抗菌药物使用情况有关。克拉霉素是新一代大环内酯类药物,在胃内低 pH 值环境下仍有较好的稳定性和杀菌作用,其抑菌机制主要是可逆地与核糖体的 50S 单位结合,抑制肽酰转移酶,影响核糖体的移位过程,阻止肽链延长,从而抑制细菌的蛋白质合成,是目前最有希望的抗 Hp 药物之一。早期资料显示,Hp 对克拉霉素原发性耐药率较低,通常不超过 10%,但近年来随着克拉霉素的广泛应用,其耐药率呈逐年上升趋势。Peitz 等^[16]报道,由于出现 Hp 耐药菌株,含克拉霉素的治疗方案根除率下降至 17%。本研究中,Hp 对克拉霉素的耐药率为 8%,略高于国内报道的成人 Hp 对克拉霉素的耐药率(5.6%)^[17]。目前,尚无 Hp 对羟氨苄青霉素、左氧氟沙星和庆大霉素产生耐药的报道。

国内外学者根据 Hp 菌株的毒力不同而在临床上将其分为两型:I 型细菌为高毒力株,含有 CagA 基因,表达 CagA 蛋白和 VacA 蛋白,具有空泡毒素活性,与胃十二指肠疾病密切相关。II 型细菌为低毒力株,含有 VacA 基因,但不含有 CagA 基因,不表达 CagA 蛋白和 VacA 蛋白。另外为中间型,仅含有一个与疾病有关的毒力因素 CagA 或 VacA。本组 194 株 Hp 中,I 型菌占 84.5%,II 型菌占 8.2%,中间型占 7.2%,与文献报道相近^[18]。提示本地区儿童感染的 Hp 以 I 型菌株多见,应引起临床医师注意。CagA、VacA 与胃黏膜炎症程度的关系,在成人中有争议,多数文献报道其与胃黏膜炎症程度有关,但也有持反对意见者^[19]。本组 164 例 Hp I 型菌株感染者中,胃窦黏膜中重度炎症 145 例(88.4%),而 16 例 II 型菌株、14 例中间型菌株感染者中,胃窦黏膜中重度炎症分别为 7 例(43.8%)及 7 例(50%),差异有统计学意义。提示 Hp 菌株类型与胃窦黏膜炎症严重程度相关。其致病机制可能是 CagA 通过激活转录因子 κ B(NF- κ B)诱导胃上皮细胞产生 IL-8 增加或直接增加胃上皮 IL-8 mRNA 表达和 IL-8 蛋白分泌。IL-8 具有强大的致炎作用,对中性粒细胞有强大的趋化和激活作用,对 T 淋巴细胞以及嗜碱性粒细胞也有刺激活化的作用;可与多形核白细胞(PMN)表面的特异性受体结合,导致细胞外形改变,促进 PMN 脱颗粒,分泌细胞因子 II-1 β 、TNF- α 等,激活 PMN 并使其产生呼吸爆发,释放溶酶体酶和过氧化物,启动和促进炎症反应。而 VacA 能引起上皮细胞空泡变性、坏死,从而导致胃窦黏膜严重损伤。

总之,Hp 感染较为普遍,但感染所造成的结果却有很大的差异。多数感染者只表现为无症状的带菌者,少部分可表现为慢性胃炎、消化性溃疡,甚至发展为胃癌。由于 Hp I 型菌株比 II 型菌株更有可能增加胃癌及消化性溃疡的发生风险,在治疗时,先行 Hp 毒力菌株测定,同时在给药前做药敏试验,对提高 Hp 根除率,减少药物不良反应,防止耐药菌株的增加有较大意义。

参考文献

[1] 刘文忠. 幽门螺杆菌研究进展[M]. 上海:上海科学技术文献出版

社,2001:389.

- [2] 段丽萍,段晓文,叶嗣懋,等. 13C-尿素呼吸试验对幽门螺杆菌密度及胃窦黏膜炎症的判断价值[J]. 中华内科杂志,1999,38(12): 824-826.
- [3] Malaty HM, El-Kasabany A, Graham DY, et al. Age at acquisition of *Helicobacter pylori* infection: a follow-up study from infancy to adulthood[J]. *Lancet*, 2002, 359(3): 931-935.
- [4] 朱红枫,陈书琴,李清平,等. 儿童幽门螺杆菌感染的流行病学研究[J]. 中华中西医杂志,2002,3(6): 499-500.
- [5] 徐晓华,刘凤霖,张书红,等. 1 442 例儿童幽门螺杆菌感染状况及相关性疾病分析[J]. 中华流行病学杂志,2002,21(2): 100-102.
- [6] Nabwera HM, Nguyen VanTam JS, Logan RF, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Kenyan school children aged 3—15 years and risk factors for infection[J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2000, 12(2): 483-487.
- [7] Granquist A, Bredberg A, Sveger T, et al. A longitudinal cohort study on the prevalence of *Helicobacter pylori* antibodies in Swedish children and adolescents[J]. *Acta Paediatr*, 2002, 91(3): 636-640.
- [8] Lin DB, Nieh WT, Wang HM, et al. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection among preschool children in Taiwan[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1999, 61(3): 554-558.
- [9] Ayse Selimoglu M, Ertekin V, Inandi T. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in children living in eastern Turkey[J]. *Pediatr Int*, 2002, 44(5): 666-669.
- [10] Megraud F. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* infection [J]. *British Medical Bulletin*, 1998, 54(2): 207-216.
- [11] Midolo PD, Korman MG, Turnidge JD, et al. *Helicobacter pylori* resistance to tetracycline[J]. *Lancet*, 1996, 347(10): 1194-1195.
- [12] Fedorak R, Archambault A, Flamm R, et al. Antimicrobial susceptibility of *H. Pylori* in Canada to three key antibiotics: metronidazole, clarithromycin and amoxicillin [J]. *Gastroenterology*, 1997, 112: A115.
- [13] Goddard AF, Logan RPH. Antimicrobial resistance and *Helicobacter pylori*[J]. *J Antimicrob Chemother*, 1996, 37(3): 639-644.
- [14] 吴红,王洪涛,时晓东,等. 幽门螺杆菌抗生素敏感性及 CagA 基因检测[J]. 上海医学,2001,24(2): 117-118.
- [15] Dore MP, Piana A, Carta M, et al. Amoxycillin resistance is one reason for failure of amoxycillin-omeprazole treatment of *Helicobacter pylori* infection[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 1998, 12(3): 635-639.
- [16] Peitz U, Sulliga M, Wolle K, et al. High rate of post-therapeutic resistance after failure of macrolide-nitronidazole triple therapy to cure *Helicobacter pylori* infection: impact of two second-line therapies in a randomized study[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2002, 16(2): 315-319.
- [17] 姜葵,潘国宗,张建中,等. 幽门螺杆菌耐药性检测[J]. 中国人兽共患病杂志,2000,16(6): 76.
- [18] 陈肖肖,尚世强,来庆和,等. 具有 CagA、VacA 基因的幽门螺杆菌及其表达产物的研究[J]. 中华儿科杂志,2003,11(1): 56-57.
- [19] 凌江红,洪瑞香,韦宗平. 幽门螺杆菌相关胃十二指肠疾病患者血清 CagA-HpIgG 的检测及临床意义[J]. 广西医学,2000,22(6): 1180-1182.

(收稿日期:2011-04-13)