

DOI:10.13350/j.cjpb.220217

• 临床研究 •

老年萎缩性胃炎患者 Hp 感染状况调查 及根治方法和药物敏感性分析

薛金菊*, 邢梦芸, 林珍

(中南大学湘雅医学院海口附属医院老年病科, 海南海口 570208)

【摘要】 **目的** 调查老年萎缩性胃炎患者幽门螺杆菌(Hp)感染状况,并对 Hp 感染的根治方法以及药物敏感性进行分析。**方法** 选取 2018 年 12 月-2020 年 12 月本院收治的 148 例老年萎缩性胃炎患者,采集胃黏膜标本进行 Hp 的分离培养及鉴定;Hp 阳性者采用铋剂四联或无铋剂三联疗法治疗,然后采用¹³C-UBT 检测 Hp 根治情况;采用琼脂稀释法测定 Hp 药物敏感性;提取 Hp 基因组 DNA,采用测序方法检测克拉霉素耐药菌株 23SrRNA 基因突变位点。**结果** 148 例老年萎缩性胃炎患者中检出 Hp 感染 108 例(72.93%)。经多因素 Logistic 回归分析显示,吸烟、暴饮暴食、进食辣食、有家族性胃肠道疾病史是老年萎缩性胃炎患者发生 Hp 感染的危险因素,进食酸奶是保护因素($P < 0.05$)。108 例患者经治疗后 88 例(81.48%)得到根治,其中 PPI+阿莫西林+克拉霉素、PPI+枸橼酸铋钾+替硝唑+克拉霉素治疗的根治率 > 80%。药敏检测显示, Hp 对克拉霉素、阿莫西林、甲硝唑、左氧氟沙星、四环素的耐药率分别为 35.19%、13.89%、41.67%、53.70%和 18.52%。22 株克拉霉素耐药菌株 23S rRNA 基因中共检出 6 个突变位点(A1821G、G1826A、T1830C、A2143G、T2182C、A2223G),其中 A1821G、G1826A、T1830C 存在于所有(耐药、敏感)菌株中。12 株(54.55%)耐药菌株存在 A2143G 突变,20 株(90.91%)耐药菌株存在 T2182C 突变,8 株(36.36%)耐药菌株存在 A2223G 突变。**结论** 老年萎缩性胃炎患者 Hp 感染率较高,常用抗生素的高耐药性是导致 Hp 根治率下降的重要原因,其中克拉霉素耐药机制多以 Hp 的 23SrRNA 基因位点突变为。

【关键词】 萎缩性胃炎; Hp; 克拉霉素; 基因突变; 耐药性; 根治

【中图分类号】 R378

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)02-0207-05

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Feb;17(2):207-211.]

Analysis of *Helicobacter pylori* infection status, radical cure methods and drug sensitivity in elderly patients with atrophic gastritis

XUE Jin-ju, XING Meng-yun, LIN Zhen (Department of Geriatrics, Department of Geriatrics, Affiliated Haikou Hospital, Central South University Xiangya School of Medicine, Haikou 570208, Hainan, China)*

【Abstract】 **Objective** To analyze the *Helicobacter pylori* (Hp) infection status, radical cure methods and drug sensitivity in elderly patients with atrophic gastritis. **Methods** 148 elderly patients with atrophic gastritis admitted our hospital from December 2018 to December 2020 were enrolled in this study. The patient's gastric mucosal specimens were collected for Hp separation, culture and identification. Bismuth quadruple or triple bismuth-free drugs were used to treat Hp-positive patients, and then the patient's Hp radical cure status was tested by¹³C-UBT. Drug sensitivity was tested by agar dilution method. The Hp genomic DNA was extracted, and the 23SrRNA gene mutation site of clarithromycin-resistant strains was detected by sequencing method. **Results** Among 148 patients with senile atrophic gastritis, 108 cases (72.93%) of Hp infection were detected. Multivariate logistic regression analysis showed that smoking, overeating, eating spicy food, and having a family history of gastrointestinal diseases were risk factors for Hp infection in elderly patients with atrophic gastritis, and eating yogurt was a protective factor ($P < 0.05$). After treatment, 88 patients (81.48%) were cured. Among them, the cure rates of PPI+amoxicillin+clarithromycin and PPI+bismuth potassium citrate+tinidazole+clarithromycin were more than 80%. The drug sensitivity test showed that the resistance rates of Hp to clarithromycin, amoxicillin, metronidazole, levofloxacin, and tetracycline were 35.19%, 13.89%, 41.67%, 53.70%, and 18.52%, respectively. A total of 6 mutation sites (A1821G, G1826A, T1830C, A2143G, T2182C, A2223G) were found in the 23S rRNA gene of 22 clarithromycin-resistant strains, of which A1821G, G1826A, and T1830C exist in all drug-resistant and sensitive strains. 12 (54.55%) resistant strains had A2143G mutation, 20 (90.91%) resistant strains had T2182C mutation, and 8 (36.36%) resistant strains had A2223G mutation. **Conclusion** The Hp infection rate is relatively high in elderly patients with atrophic gastritis. The high resistance of commonly used antibiotics is an important reason for the decline in e-

* **【通讯作者(简介)】** 薛金菊(1985-),女,海南人,本科,主治医师。主要研究方向:消化内科系统疾病的临床诊治。E-mail:343253651@qq.com

radication rate. Among them, the mechanism of clarithromycin resistance is mostly based on the mutation of Hp 23SrRNA gene.

【Key words】 atrophic gastritis; *Helicobacter pylori*; clarithromycin; gene mutation; drug resistance; eradication rate

慢性萎缩性胃炎主要是由幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染所引起的消化系统疾病,以胃黏膜肌层增厚、黏膜萎缩变薄以及腺体萎缩为主要病理表现^[1-2]。目前,对于 Hp 感染的治疗常采用克拉霉素、阿莫西林以及雷贝拉唑组成的三联疗法,尽管已取得良好的效果,但由于抗生素的不合理使用,约有 80% 的患者存在耐药性问题,导致无法根治 Hp,从而影响三联疗法的疗效和预后^[3-4]。克拉霉素是三联疗法中最有效的抗生素, Hp 耐药基因的位点突变降低了 Hp 对克拉霉素的药物敏感性,从而降低了 Hp 的根治率,使得经验治疗逐渐陷入困境^[5]。因此,调查慢性萎缩性胃炎患者的 Hp 感染状况,探讨 Hp 感染的根治情况、药物敏感性以及耐药基因的突变位点对于治疗方案的制定具有重要临床意义。

对象与方法

1 病例

2018年12月-2020年12月本院收治的老年萎缩性胃炎患者148例,其中男78例,女70例,年龄60~80岁,病程2~10年,体质量指数17.2~26.8 kg/m²。纳入标准:(1)符合全国慢性胃炎诊治共识会议制定的2013版《中国慢性胃炎共识意见》中的临床诊断标准^[6],且经过病理诊断及消化内镜检查确诊;(2)出现腹胀、上腹痛、纳差、大便异常、食欲减退、反酸、嗝气等症状;(3)年龄≥60岁;(4)患者及其家属知情同意,并签署知情同意书。排除标准:(1)严重心、肝、肾功能障碍者;(2)伴随胃食管反流或者消化性溃疡等其他胃肠道疾病,消化道出血及消化道恶性肿瘤;(3)患有免疫、血液、神经系统疾病;(4)曾接受胃部手术;(5)药物过敏者,依从性、耐受性差。

该研究获得医院伦理委员会批准。

2 方法

2.1 Hp 的分离培养及鉴定 受试者均于胃镜检查中取1~3块胃黏膜标本,置于含10%血清以及甘油的布氏肉汤运转培养基(杭州微生物试剂公司产品)内,于4 h内转送至检测实验室。采用全自动研磨仪(ST-B100,北京旭鑫仪器设备有限公司生产)对黏膜组织充分研磨,制成悬液,接种于哥伦比亚琼脂培养基(英OXOID公司产品)上,随后将培养基置 Hp 厌氧罐(Hp015,广州海太光电生物科技有限公司生产)内,控制氧浓度,加入适量无菌双蒸水,37℃条件下培养5 d。挑取疑似 Hp 菌落(形态为透明细砂样或水滴样,

直径0.1~1 mm),采用革兰染色试剂(珠海贝索生物技术有限公司产品)染色后镜检,显微镜(ECLIPSE 80i,美国AMG公司生产)下呈革兰阴性句号状、螺旋状、海鸥状或弯曲短杆状菌,并且氧化酶试剂(青岛海博生物技术有限公司生产)、脲酶诊断试剂盒(福建三强生物化工有限公司生产)以及触酶试剂(南京建成生物工程研究所生产)检测均为阳性即鉴定为 Hp^[7-8]。

2.2 根治方案的选择 对于 Hp 培养结果呈阳性者,采用铋剂四联[枸橼酸铋钾+质子泵抑制剂(PPI)+2种抗生素]或者无铋剂三联治疗,均治疗14 d。抗生素包括阿莫西林、克拉霉素、左氧氟沙星、四环素、甲硝唑(北京索莱宝科技有限公司生产)。遵循安全、有效的治疗标准。治疗期间禁止吸烟、饮酒、食用辛辣刺激食物,禁止服用胃肠道损伤药物,若出现严重不良反应则应返院评估。治疗完成后患者停药4~8周返院复查¹³C-UBT,若检测结果呈阴性则判定为根治,否则为根治失败。

2.3 克拉霉素耐药性分析 采用琼脂稀释法测定药物最低抑菌浓度。将1~2 μl的 Hp 菌液(0.5麦氏比浊管浓度)分别接种于含有不同浓度的克拉霉素、阿莫西林、甲硝唑、左氧氟沙星、四环素的哥伦比亚血平板上,以无抗生素药物的血琼脂平板、质控菌株 NCTC11637(上海北诺生物科技有限公司提供)为阴性对照。将平板置于厌氧罐中,控制氧浓度,加入适量无菌双蒸水,37℃条件下培养5 d。最终以无细菌生长的最低抗生素浓度为最小抑菌浓度,根据美国临床试验标准委员会制定的耐药临界值范围^[9]进行判定,克拉霉素、阿莫西林、甲硝唑、左氧氟沙星、四环素的临界值分别为的1 μg/ml、8 μg/ml、8 μg/ml、2 μg/ml、2 μg/ml,超过以上临界值则表示存在耐药性。

2.4 克拉霉素耐药菌株突变位点分析 用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司产品)提取 Hp 基因组 DNA,并以此为模板设计 23S rRNA 引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。正向引物:5'-GGACGCATAGGGTTAAGC-3';反向引物:5'-CTCCATAAGAGCCAAAGCCC-3'。扩增片段为715 bp。PCR 反应体系:Es Taq Master Mix 25 μl, DNA 模板 2 μl,正、反向引物各 1 μl (10 μmol/L), ddH₂O 1 μl。反应条件:94℃预变性 5 min;94℃变性 1 min,52℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,共30个循环;72℃延伸 10 min。采用1.5%琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物并测序(由北京六合华大

基因科技股份有限公司完成),采用 ClustalW 软件与国际标准菌株 U27270 的 23S rRNA 基因(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)比对分析测序结果,寻找突变位点。

2.5 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。计数资料以例数(百分数)的表示,进行 χ^2 检验。采用 Logistic 回归法分析老年萎缩性胃炎患者发生 Hp 感染的影响因素。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 Hp 感染情况及危险因素分析

148 例老年萎缩性胃炎患者中检出 Hp 感染 108 例,感染率为 72.93%。经多因素 Logistic 回归分析显示,吸烟、暴饮暴食、进食辣食、有家族性胃肠道疾病史是老年萎缩性胃炎患者发生 Hp 感染的危险因素(均 $P < 0.05$),进食酸奶是 Hp 感染保护因素($P < 0.05$)(表 1)。

表 1 Hp 感染危险因素分析

Table 1 Analysis of risk factors for *Helicobacter pylori* infection

独立危险因素 Independent risk factor	β	S.E	Wald	P	OR	95% CI for OR	
吸烟	0.853	0.378	5.092	0.024	2.347	1.119	4.923
暴饮暴食	0.911	0.364	6.264	0.012	2.487	1.218	5.076
进食辣食	0.658	0.264	6.212	0.013	1.931	1.151	3.240
家族性胃肠道疾病	0.814	0.356	5.228	0.022	2.257	1.123	4.535
进食酸奶	-0.622	0.252	6.092	0.014	0.537	0.328	0.880

2 Hp 根治方案效果比较

108 例患者经治疗后 88 例(81.48%)Hp 根治,其中 PPI+阿莫西林+克拉霉素、PPI+枸橼酸铋钾+替硝唑+克拉霉素治疗方案的根治率超过 80%。其他方案的根治率为 66.67%~83.33%,差异无统计学意义($\chi^2 = 2.180, P = 0.848$)(表 2)。

表 2 Hp 不同治疗方案根治情况

Table 2 The cure rate of *Helicobacter pylori*

治疗方案 Treatment program	治疗例数 No. of cases	根治例数 Cure (cases)	根治率 (%) Cure rate (%)	χ^2	P
PPI+阿莫西林+克拉霉素	38	32	84.21		
PPI+阿莫西林+左氧氟沙星	10	8	80.00		
PPI+阿莫西林+甲硝唑	8	6	75.00		
PPI+甲硝唑+克拉霉素	6	4	66.67		
PPI+左氧氟沙星+甲硝唑	10	8	80.00		
PPI+枸橼酸铋钾+替硝唑+克拉霉素	36	30	83.33		

3 Hp 药物敏感性

药敏检测显示, Hp 对克拉霉素、阿莫西林、甲硝唑、左氧氟沙星、四环素的耐药率分别为 35.19%、

13.89%、41.67%、53.70%和 18.52%(表 3)。

表 3 Hp 药物敏感性

Table 3 Drug sensitivity of *Helicobacter pylori*

抗生素 Antibiotic	敏感菌株(n) Sensitive strains	耐药菌株(n) Resistant strains	耐药率(%) Resistance rate
克拉霉素	70	38	35.19
阿莫西林	93	15	13.89
甲硝唑	63	45	41.67
左氧氟沙星	47	58	53.70
四环素	75	33	30.56

4 克拉霉素耐药基因突变位点分析

108 株 Hp 中共成功分离出克拉霉素耐药菌株 38 株,提取基因组以及 PCR 扩增后获得 715 bp 大小的基因片段。ClustalW 比对分析显示,成功测序 22 株克拉霉素耐药菌株 23S rRNA 基因,共有 6 个突变位点, A1821G、G1826A、T1830C、A2143G、T2182C、A2223G,其中 A1821G、G1826A、T1830C 存在于所有(耐药、敏感)菌株中。12 株耐药菌株存在 A2143G 突变,突变率为 54.55%;20 株耐药菌株存在 T2182C 突变,突变率为 90.91%;8 株耐药菌株存在 A2223G 突变,突变率为 36.36%(表 4)。

表 4 Hp 克拉霉素耐药基因突变位点分析

Table 4 Analysis of mutation sites of clarithromycin resistance gene

突变位点 Mutation site	突变菌株 Mutant strain	突变率(%) Mutation rate
A1821G	22 株(所有菌株)	100.00
G1826A	22 株(所有菌株)	100.00
T1830C	22 株(所有菌株)	100.00
A2143G	12 株(JL16、JL47、JL57、JL250、JL254、JL267、JL305、JL319、JL337、JL392、JL472、JL482)	54.55
T2182C	20 株(JL3、JL5、JL16、JL47、JL57、JL60、JL90、JL109、JL133、JL250、JL254、JL267、JL283、JL288、JL305、JL319、JL337、JL392、JL472、JL482)	90.9
A2223G	8 株(JL47、JL250、JL288、JL305、JL319、JL337、JL392、JL482)	36.36

讨 论

萎缩性胃炎是胃病的主要类型,约占 20%,如治疗不及时易引发癌变,癌变率高达 10%^[10]。Hp 是导致萎缩性胃炎的主要因素,全球人群中 Hp 感染率超过 50%^[11]。Hp 侵入机体损伤胃黏膜,导致黏膜细胞异常炎症反应,并激活机体氧化-抗氧化系统,不仅可引发消化性溃疡,最终还能演变成慢性胃炎、胃癌^[12-13]。目前,我国的 Hp 根治率呈下降趋势,抗生素耐药性是引起根治失败的主要原因,甚至出现对克拉霉素、左氧氟沙星、甲硝唑等常用抗生素多重耐药现象^[14]。因此,研究萎缩性胃炎患者 Hp 的感染、耐药及根治情况具有重要意义。本组 148 例老年萎缩性胃炎患者中检出 Hp 感染 108 例(72.93%),与文献^[15]

报道的结果相近。研究认为,不同地理区域人群 Hp 感染率存在差异,我国人群 Hp 感染率普遍在 50%~80%。进一步分析发现, Hp 对不同抗生素耐药率存在差异,其中左氧氟沙星耐药率最高可达 53.70%,甲硝唑耐药率 41.67%。分析认为两种抗生素被广泛应用于口腔疾病、肺部感染、妇科疾病等,容易出现抗生素滥用的问题,导致耐药率的增加^[16]。阿莫西林的耐药率较低,为 13.89%,因此可继续作为临床上的主要抗菌药物。通过多因素 Logistic 回归分析显示,吸烟、暴饮暴食、进食辣食、有家族性胃肠道疾病史是老年萎缩性胃炎患者发生 Hp 感染的危险因素,而进食酸奶是 Hp 感染保护因素($P < 0.05$),与王松等^[17]的研究结果相近。分析认为,尽管吸烟、暴饮暴食、进食辣食不会直接导致消化性溃疡、萎缩性胃炎的发生,但可损伤消化道黏膜而降低抵抗力,从而增加 Hp 感染风险。因此,在健康教育中需重点强调规律的生活作息、健康的饮食习惯以及清洁的饮食环境,同时通过宣传 Hp 感染的常见途径、影响因素,采取积极预防措施,降低 Hp 感染及复发风险。

近年报道的 Hp 对克拉霉素耐药率为 20%~50%^[18],本研究中 Hp 对克拉霉素耐药率为 35.19%。克拉霉素是三联疗法中最有效的抗生素, Hp 对克拉霉素耐药是导致治疗失败的重要原因。关于克拉霉素的耐药机制主要有以下几点: Hp 基因突变降低了靶点蛋白与克拉霉素的亲和力,细胞膜渗透性的降低减少了克拉霉素进入细菌,细菌外排蛋白高表达导致克拉霉素排出增加,其中 23S rRNA 基因突变引起的耐药性是主要原因,而其余机制比重相对较弱^[18-19]。已有大量研究证实, Hp 对克拉霉素产生耐药与其基因位点突变密切相关,其中 Hp23S rRNA 基因多肽转移酶区(V区)的点突变导致核糖体结构改变,克拉霉素与核糖体亚基的亲和力下降,无法有效抑制肽酰基转移酶,药物不能阻止细菌蛋白合成,最终出现耐药性^[20]。本研究成功测序 22 株克拉霉素耐药菌株 23S rRNA 基因,其中 A2143G、T2182C、A2223G 突变仅在耐药菌株中出现,推测可能与 Hp 的耐药存在相关性。研究发现, Hp23S rRNA 基因的某些位点的腺嘌呤(A)可突变为鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C),其中 A→G 被认为是 Hp 耐克拉霉素的重要原因。 Hp 基因突变在不同国家、地区存在差异,其中中国、韩国等东亚地区以 A2143G 突变为主,而美国及欧洲其他国家多存在 A2142G 突变,欧洲地区 Hp 该位点突变率为 23%~33%,而 A2143G 突变率为 2%~10%^[21]。另外,研究认为 2182 位点的碱基分布也存在地域差异,其中欧洲、非洲以 C 为主(突变型),而东亚地区以 T 为主(未突变型)^[22]。本研究中的分离株与国际标准菌株

U27270 相比,2182 位点突变(T→C)存在于耐药菌株中,即地域分布差异导致该位点碱基分布差异,可能与克拉霉素耐药突变无关。因此,需充分了解一个地区 Hp 的耐药情况,以及 Hp 的耐药机制,以指导临床选择合适的抗生素,采取个性化的抗菌治疗,有效控制 Hp 的感染与复发。

综上所述,老年萎缩性胃炎患者 Hp 感染率较高, Hp 对常用抗生素的高耐药性是导致根治率下降的重要原因,其中克拉霉素耐药机制多以 Hp 的 23SrRNA 基因位点突变为主。本研究可为 Hp 感染的预防与治疗提供参考。

【参考文献】

- [1] 房静远,陈紫暄,高琴琰. 重视慢性萎缩性胃炎癌变的预警、早诊与预防[J]. 中华消化杂志, 2018, 38(3): 145-148.
- [2] Kanai M, Togo R, Ogawa T, et al. Chronic atrophic gastritis detection with a convolutional neural network considering stomach regions[J]. World J Gastroenterol, 2020, 26(25): 3650-3659.
- [3] 王婷婷,张月苗,张学智,等. 荆花胃康胶丸联合 PPI 三联疗法对 Hp 阳性慢性萎缩性胃炎的效果:多中心随机对照临床研究[J]. 中华医学杂志, 2013, 93(44): 3491-3495.
- [4] 任玲,陆红,李海燕,等. 以高剂量和普通剂量雷贝拉唑为基础的改良二联疗法根除 Hp 疗效初探[J]. 中华消化内镜杂志, 2018, 35(1): 60-62.
- [5] 范雪,薛倩,线海鹏,等. 基于克拉霉素耐药检测的个体化治疗在 Hp 感染中的应用[J]. 中华医学杂志, 2019, 99(36): 2826-2830.
- [6] 中华医学会消化病学分会. 中国慢性胃炎共识意见[J]. 现代消化及介入诊疗, 2013, 18(2): 119-128.
- [7] 胡玢婕,赵付菊,柴子岚,等. 上海地区 Hp 的检出率及耐药性分析[J]. 中国感染与化疗杂志, 2016, 16(3): 346-352.
- [8] 周雄杰,吕志刚,柳家红,等. Hp 感染患者影响因素及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(16): 2490-2493.
- [9] National Committee of Clinical Laboratory Stands. Performance stand for antimicrobial susceptibility testing; fourteenth informational supplement. NCCL Sdocument M100-S14 [M]. Wayne, Pennsylvania: NCCLS, 2004: 1-159.
- [10] Ueda K, Ohishi W, Cullings H, et al. Modifying effect of chronic atrophic gastritis on radiation risk for noncardia gastric cancer according to histological type[J]. Radiat Res, 2020, 194(2): 180-187.
- [11] [11]宋宇,周芸竹,薛培丽,等. 某医疗机构健康体检人群幽门螺杆菌感染情况及影响因素分析[J]. 华西医学, 2021, 36(04): 493-498.
- [12] Guo Y, Zhang Y, Gerhard M, et al. Effect of *Helicobacter pylori* on gastrointestinal microbiota: a population-based study in Linqu, a high-risk area of gastric cancer[J]. Gut, 2020, 69(9): 1598-1607.
- [13] Cai Q, Shi P, Yuan Y, et al. Inflammation-associated senescence promotes *Helicobacter pylori*-induced atrophic gastritis[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2021, 11(3): 857-880.
- [14] 黄声雷,郭玮,胡必杰,等. 上海地区 Hp 对克拉霉素耐药的相关基因检测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2019, 19(5): 548-552.
- [15] Liu J, Wang Y, Zhao Q, et al. Prevalence and risk factors for *He-*

