

Rodzinna transmisja *Helicobacter pylori* z wykorzystaniem typowania molekularnego

Intrafamilial transmission patterns of *Helicobacter pylori* strains by using molecular typing

Anna Szaflarska-Popławska¹, Cezary Popławski², Monika Parzęcka¹, Anna Studzińska-Czyszka³, Mieczysława Czerwionka-Szaflarska¹, Andrzej Tretyn³

¹Katedra i Klinika Pediatrii, Alergologii i Gastroenterologii Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

²Zakład Endoskopii Gastroenterologicznej Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

³Zakład Biotechnologii Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Przegląd Gastroenterologiczny 2010; 5 (1): 42–46

Słowa kluczowe: *Helicobacter pylori*, występowanie rodzinne, typowanie genetyczne.

Key words: *Helicobacter pylori*, familiar occurrence, molecular typing.

Adres do korespondencji: prof. dr hab. n. med. Anna Szaflarska-Popławska, Katedra i Klinika Pediatrii, Alergologii i Gastroenterologii Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera, Bydgoszcz, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń, ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel. +48 52 585 48 50, faks +48 52 585 40 86, e-mail: klped@cm.umk.pl

Streszczenie

Wstęp: Rozprzestrzenianie się zakażenia *Helicobacter pylori* jest nadal przedmiotem badań. W krajach rozwiniętych najważniejszą drogą zakażenia okazuje się transmisja rodzinna.

Cel: Ocena transmisji wewnątrzrodzinnej na podstawie typowania genetycznego szczepów *H. pylori* izolowanych od członków rodziny.

Materiał i metody: Do badania zakwalifikowano łącznie 55 członków pochodzących z 22 rodzin, u których rozpoznano zapalenie błony śluzowej żołądka związane z zakażeniem *H. pylori*. Materiał genetyczny bakterii izolowano z wycinków błony śluzowej żołądka przy użyciu zestawu NucleoSpin[®]Tissue (Macherey-Nagel). Podczas analizy szczepów tej bakterii polimerazowej reakcji łańcuchowej poddano geny: *glmM*, *cagA*, *cagE*, *iceA*, oraz wykonano reakcje multiplex PCR dla *vacA* (s1/s2 + m1/m2).

Wyniki: Zapalenie błony śluzowej żołądka wywołane zakażeniem *H. pylori* rozpoznano u 55 członków 22 rodzin, w tym u 13 matek, 11 ojców i 30 potomstwa. Wiek rodziców mieścił się w granicach 31–54 lat (średnia wieku 39,1 roku), a potomstwa 4–26 lat (średnia wieku 11,9 roku). Zgodność typów genetycznych *H. pylori* stwierdzono tylko w 18 spośród 44 par osób będących członkami tej samej rodziny (40,9%). Najczęściej zakażenie tym samym typem genetycznym *H. pylori* wykazano w parach matka–dziecko (70,6%). Tylko jedna z 7 par małżeńskich była zakażona tym samym typem genetycznym bakterii (14,3%). Podobnie rzadko obserwowano zakażenie tym samym typem *H. pylori* między ojcem a jego dzieckiem (27,3%), a także wśród rodzeństwa (22,2%). Wśród 11 rodzin z 3 osobami zakażonymi *H. pylori* tylko w 3 rodzinach

Abstract

Introduction: The spread of *Helicobacter pylori* infection is still a subject of research. Family transmission is the most important transmission way in developed countries.

Aim: To assess of transmission within family on the base of genetic typing of *H. pylori* strains isolated from family members.

Material and methods: Altogether 55 members from 22 families with diagnosed gastritis connected with *H. pylori* infection were included into the study. Bacteria genetic material was isolated from the stomach biopsy specimens with the use of NucleoSpin[®]Tissue kit (Macherey-Nagel). Genes: *glmM*, *cagA*, *cagE*, *iceA* underwent polymerase chain reaction during analysis of *H. pylori* strains and multiplex PCR reaction for *vacA* (s1/s2 + m1/m2) was performed.

Results: Gastritis caused by *H. pylori* infection was diagnosed in 55 members of 22 families, including 13 mothers, 11 fathers and 30 offspring. Parents' age varied from 31 to 54 years (mean age 39.1 years), but offspring's age varied from 4 to 26 years (mean age 11.9 years). Unanimity of *H. pylori* genetic types were found only in 18 from 44 pairs of persons who are the members of the same family (40.9%). Most often infection with the same genetic type of *H. pylori* was proved in pairs mother-child (70.6%). Only one of seven married couples was infected with the same genetic type of bacteria (14.3%). Infection with the same *H. pylori* type was observed similarly rarely between father and his child (27.3%), but also among siblings (22.2%). Only in three among 11 families with three persons infected with *H. pylori* all family members included in the study (mother and two children two times,

wszyscy członkowie rodziny uczestniczący w badaniu (2-krotnie matka i 2 dzieci, w 1 matka–ojciec–syn) byli zakażeni tym samym typem genetycznym bakterii. W grupie 55 zakażonych *H. pylori* członków rodziny obecność genu *cagA* stwierdzono u 45 z nich (81,8%), genu *cagE* – u 13 (23,6%), genu *iceA* – u 7 (12,7%), genu *vacAs* – u 17 (30,9%), a genu *vasAm* – u 7 (12,7%).

Wnioski:

- 1) Typowanie genetyczne szczepów *H. pylori* izolowanych od członków rodziny potwierdza istotną rolę matki w transmisji zakażenia dzieciom.
- 2) Zakażenia innych członków rodziny, zwłaszcza współmałżonków, wydają się mieć mniejsze znaczenie w przekazywaniu zakażenia.

Wstęp

Helicobacter pylori występuje powszechnie w populacji ludzkiej na całym świecie zarówno u dorosłych, jak i dzieci, szczególnie często w krajach rozwijających się. Jest pierwotnym czynnikiem etiologicznym przewlekłego zapalenia błony śluzowej żołądka u dzieci, choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy, chłoniaka B-komórkowego typu MALT oraz raka żołądka u dorosłych [1, 2].

Do zakażenia dochodzi na drodze ustno-ustnej, kałowo-ustnej oraz żołądkowo-ustnej [3]. Głównym miejscem występowania *H. pylori* jest przewód pokarmowy człowieka [2], choć potencjalnym źródłem zakażenia mogą być również zwierzęta, takie jak psy, koty i ptaki. Niektórzy autorzy wymieniają wodę jako rezerwuar bakterii, uważając, że woda może stanowić istotną drogę zakażenia w krajach rozwijających się [3].

Przebycie zakażenia *H. pylori* w pierwszych latach życia jest zjawiskiem powszechnym. Nie zostało ostatecznie wyjaśnione, czy ściśle wiąże się to z czynnikami środowiskowymi czy z inną niż u osób dorosłych odpowiadającą immunologiczną na zakażenie w wieku dziecięcym. Kluczową rolę w nabywaniu zakażenia tą bakterią, zwłaszcza we wczesnym dzieciństwie, odgrywa bliski kontakt między członkami rodziny. Jedynie w krajach rozwijających się czynniki środowiskowe mogą mieć większe znaczenie niż wewnątrzrodzinna transmisja *H. pylori* [1].

W 1990 r. Drumm i wsp. pierwsi opisali rodzinne występowanie zakażenia *H. pylori* [4]. Znacząco częstsze pojawianie się zakażenia potwierdzono u dzieci obojga zakażonych rodziców niż u dzieci pochodzących z rodzin, w których zakażony był tylko jeden rodzic [5]. Częściej zakażenie obserwowano u dziecka, jeśli zakażona była matka niż ojciec [6, 7]. Wykazano również możliwość horyzontalnej transmisji zakażenia między rodzeństwem, zwłaszcza w przypadku dzielenia łóżka lub sypialni z zakażonym rodzeństwem [8]. Rola transmisji zakażenia między współmałżonkami nie jest

znana. Wiarygodnym dowodem na rozprzestrzenianie się zakażenia *H. pylori* w obrębie rodziny jest identyfikacja i porównanie materiału genetycznego bakterii wyizolowanych od członków rodziny [1].

Conclusions:

- 1) Genetic typing of *H. pylori* strains isolated from family members confirms essential role of mother in infection transmission to children.
- 2) Infection of other family members, but particularly married couples seem to be less important in infection transmission.

znana. Wiarygodnym dowodem na rozprzestrzenianie się zakażenia *H. pylori* w obrębie rodziny jest identyfikacja i porównanie materiału genetycznego bakterii wyizolowanych od członków rodziny [1].

Cel

Ocena transmisji wewnątrzrodzinnej na podstawie typowania genetycznego szczepów *H. pylori* izolowanych od członków rodziny.

Materiał i metody

Do badania zakwalifikowano łącznie 55 członków pochodzących z 22 rodzin, u których na podstawie wyniku testu oddechowego z zastosowaniem mocznika znakowanego ¹³C oraz wyniku badania histopatologicznego bioptatów błony śluzowej części przedodźwiernikowej i/lub trzonu żołądka rozpoznano zapalenie błony śluzowej żołądka związane z zakażeniem *H. pylori*. Bioptaty błony śluzowej żołądka pobierano przy użyciu szczypczyków biopsyjnych w trakcie badania endoskopowego górnego odcinka przewodu pokarmowego przeprowadzanego w Pracowni Endoskopowej Kliniki Pediatrii, Alergologii i Gastroenterologii lub Zakładzie Endoskopii Gastroenterologicznej *Collegium Medicum* im. Ludwika Rydygiera Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

Izolacji materiału genetycznego bakterii *H. pylori* z pobranych endoskopowo wycinków błony śluzowej żołądka dokonano w Zakładzie Biotechnologii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy użyciu zestawu NucleoSpin[®]Tissue (Macherey-Nagel). Obecność DNA bakterii w izolatach potwierdzano poprzez wykonanie rozdziału elektroforetycznego na żelu agarozowym 1%, zawierającym interkalujący w dwuniciowe DNA bromek etydyny. Po przeprowadzeniu rozdziału elektroforetycznego uzyskane dane odczytano przy użyciu transiluminatora UVP M-20 i oprogramowania Launch DocITLS. Po wyizolowaniu genomowego DNA

Tabela I. Pokrewieństwo zakażonych *H. pylori* uczestników badania**Table I.** The family constellations of the participants

Liczba rodzin z dziećmi	Liczba rodzin wraz z rodzicami uczestniczącymi w badaniu				Liczba całkowita
	matka + ojciec	matka	ojciec	żadne z rodziców	
1	7	4	4	0	15
2	0	3	0	3	6
3	0	0	0	1	1
łącznie	7	6	4	5	22

H. pylori materiał badawczy poddano tradycyjnym reakcjom amplifikacji i reakcjom multiplex PCR w termocyklerze firmy Eppendorf. Podczas analizy szczepów *H. pylori* polimerazowej reakcji łańcuchowej poddano geny: *glmM*, *cagA*, *cagE* i *iceA*, oraz wykonano reakcje multiplex PCR dla *vacA* (s1/s2 + m1/m2).

Wyniki

W toku badań rodzinnych zapalenie błony śluzowej żołądka wywołane zakażeniem *H. pylori* rozpoznano u 55 członków 22 rodzin, w tym u 13 matek, 11 ojców i 30 mieszkającego we wspólnym gospodarstwie rodzinnym potomstwa (tab. I). Wiek rodziców mieścił się w przedziale 31–54 lat (średnia wieku 39,1 roku), a potomstwa 4–26 lat (średnia wieku 11,9 roku).

Zgodność typów genetycznych *H. pylori* stwierdzono tylko w 18 spośród 44 par osób będących członkami tej samej rodziny (40,9%). Najczęściej (70,6%) zakażenie tym samym typem genetycznym *H. pylori* wykazano w parach matka–dziecko. Tylko 1 z 7 par małżeńskich była zakażona tym samym typem genetycznym bakterii (14,3%). Podobnie rzadko obserwowano zakażenie tym samym typem *H. pylori* między ojcem a jego dzieckiem (27,3%), a także wśród rodzeństw (22,2%) (tab. II).

Wśród 11 rodzin z 3 osobami zakażonymi *H. pylori* tylko w 3 rodzinach wszyscy członkowie rodziny uczestniczący w badaniu (2-krotnie matka i 2 dzieci, w jednym

matka–ojciec–syn) byli zakażeni tym samym typem genetycznym bakterii.

W grupie 55 zakażonych *H. pylori* członków rodziny obecność genu *cagA* stwierdzono u 45 z nich (81,8%), genu *cagE* – u 13 (23,6%), genu *iceA* – u 7 (12,7%), genu *vacAs* – u 17 (30,9%), a genu *vasAm* – u 7 (12,7%).

Omówienie

Bakteria *H. pylori* zakaża błonę śluzową żołądka około połowy populacji na świecie, będąc tym samym jedną z najczęstszych infekcji bakteryjnych u człowieka [9]. Rozprzestrzenianie się zakażenia jest nadal przedmiotem wielu badań. Transmisję zakażenia *H. pylori* między członkami rodziny uważa się obecnie za główną drogę zakażenia tą bakterią, zwłaszcza w krajach rozwiniętych, gdzie przestrzeganie zasad higieny, kształtowanie właściwych nawyków higienicznych oraz poprawa warunków socjoekonomicznych znacząco zmniejszyła częstość zakażeń [1, 9].

W badaniach własnych podjęto próbę oceny wewnątrzrodzinnej transmisji zakażenia *H. pylori* poprzez typowanie genetyczne szczepów bakteryjnych pochodzących od członków rodzin. Zgodność typów genetycznych bakterii *H. pylori*, którą było zakażonych 55 osób z 22 rodzin, oceniano na podstawie identyfikacji genów: *glmM*, *cagA*, *cagE*, *iceA* i *vacA*, izolowanych z bioptatów błony śluzowej żołądka.

Wykazano, że największa (70,6%) zgodność genetyczna w zakresie badanych genów dotyczyła bakterii izolowanych od matek i ich dzieci. Jest to obserwacja zgodna z danymi z piśmiennictwa, w których matkę uważa się za odgrywającą kluczową rolę w przekazywaniu zakażenia *H. pylori* dzieciom. W szwedzkich badaniach epidemiologicznych z udziałem 162 dzieci i 480 członków ich rodzin zakażenie matki było silnym niezależnym czynnikiem ryzyka wystąpienia zakażenia *H. pylori* u dziecka, podczas gdy posiadanie zakażonego bakterią ojca nie było istotne po uwzględnieniu innych czynników ryzyka [10]. Porównywalne wyniki badań uzyskali również Rocha i wsp. [6], badając rodziny zamieszkujące obszary wiejskie w Brazylii. W bada-

Tabela II. Zgodność typów genetycznych *H. pylori* wśród uczestników badania**Table II.** *Helicobacter pylori* strain concordance of the participants

Pokrewieństwo zakażonych uczestników badania	Odsetek (n/n) członków rodzin zakażonych zgodnymi genetycznie typami <i>H. pylori</i>
matka–dziecko	70,6% (12 z 17)
ojciec–dziecko	27,3% (3 z 11)
dziecko–dziecko	22,2% (2 z 9)
matka–ojciec	14,3% (1 z 7)

niach Rothenbachera i wsp. [7] częstość występowania zakażenia tej bakterii u dzieci matek z obecnymi specyficznymi przeciwciałami przeciwko *H. pylori* w klasie IgG w ślinie była znacząco większa w porównaniu z dziećmi matek seronegatywnych (17,3 vs 5,1%). Płeć, liczba starszego rodzeństwa, stopień wykształcenia matki i ojca nie wpływały na status *H. pylori* dziecka, podczas gdy zaludnienie miejsca zamieszkania oraz brak antybiotykoterapii w przeszłości wykazywały silny związek z zakażeniem *H. pylori*. W badaniach Kivi i wsp. [11] te same szczepy bakteryjne u matki i przynajmniej jednego jej dziecka wykryto w 10 spośród 18 badanych rodzin. Zakażenie tym samym szczepem *H. pylori* występowało w 40% par matka–dziecko. Obecność identycznych szczepów *H. pylori* wykazali również Han i wsp. [12] u matek i ich dzieci oraz wśród rodzeństwa. W badaniach rodzinnych przeprowadzonych na terenie północno-wschodniej Polski w 68% rodzin członkowie rodziny byli zakażeni szczepem bakterii o tym samym genotypie, najczęściej s1mx (35,5% rodzin) lub s1m2 (34,3% rodzin). Znaczenie zakażenia matczyne wskazuje na rolę bliskich kontaktów w transmisji infekcji w grupie pediatrycznej.

Wyniki badań epidemiologicznych potwierdzają, że dzieci są skolonizowane szczepem bakteryjnym pochodzącym od matki częściej niż od ojca [12], choć wydaje się, że ojcowie mogą również odgrywać pewną rolę w transmisji zakażenia *H. pylori* [7]. W badaniach własnych tylko w 3 parach ojciec–dziecko na 11 stwierdzono obecność identycznych szczepów *H. pylori*. Był to odsetek znacząco mniejszy niż w przypadku par matka–dziecko. Podobną zależność stwierdzili również Rothenbacher i wsp. [7], którzy co prawda wykazali zwiększone ryzyko wystąpienia zakażenia *H. pylori* u dzieci, których ojcowie mieli podwyższony poziom swoistych przeciwciał w klasie IgG w ślinie, ale związek ten nie był tak silny, jak w przypadku seropozytywnych matek. Kivi i wsp. [11] nie odnotowali zgodności genotypów *H. pylori* w żadnej parze ojciec–dziecko.

W badaniach Kivi i wsp. [11] aż 14 spośród 17 badanych rodzeństw (82%) miało ten sam typ genetyczny *H. pylori*. Co więcej, w 6 rodzinach, w których matka była zakażona innym szczepem bakteryjnym niż jej dzieci, wykazano zgodność genetyczną bakterii występujących u rodzeństw. Znaczenie zakażeń między rodzeństwem potwierdzają również wyniki badań przeprowadzonych w grupie obejmującej 684 2–9-letnich kolumbijskich dzieci sugerujące, że posiadanie starszego rodzeństwa zakażonego *H. pylori* istotnie zwiększa ryzyko wystąpienia zakażenia niż zakażone rodzeństwo młodsze. Ryzyko wystąpienia zakażenia zwiększa również mała różnica wieku między rodzeństwem [13]. W badaniach własnych tylko u 2 par rodzeństw wykry-

to zakażenie tym samym typem genetycznym *H. pylori*. Biorąc pod uwagę, że w obu przypadkach również matka dzieci była zakażona tym samym szczepem bakteryjnym, prawdopodobieństwo transmisji zakażenia wśród rodzeństwa wykazane w badaniach własnych wydaje się niewielkie.

Pojedyncze doniesienia wskazują na możliwość nabywania zakażenia *H. pylori* przez osoby dorosłe od zakażonych współmałżonków [14]. Wyniki badań własnych oraz badań Kivi i wsp. [10], w których zgodność genetyczną szczepów *H. pylori* izolowanych od współmałżonków oszacowano odpowiednio na 14,3 i 22% par, sugeruje możliwość takiej transmisji. Bez wątplenia posiadanie większej liczby dzieci jest czynnikiem ryzyka wystąpienia zakażenia u osób dorosłych, a duży odsetek reinfekcji po osiągniętej eradykacji u osób dorosłych zamieszkujących obszary o dużym odsetku osób zakażonych prawdopodobnie wiąże się z ryzykiem wystąpienia wewnątrzrodzinnej transmisji bakterii [15].

W analizach epidemiologicznych oceniających drogi wewnątrzrodzinnej transmisji *H. pylori*, opierających się na molekularnym typowaniu szczepów bakterii, należy również pamiętać, że u tego samego człowieka można stwierdzić kilka różnych szczepów tej bakterii różniących się istotnie materiałem genetycznym. U 8 spośród 104 osób pochodzących z rodzin zakażonych *H. pylori* badanych przez Kivi i wsp. [10] z trzonu i części przedodźwiernikowej żołądka izolowano różne szczepy bakteryjne. W badaniach własnych izolowano bakterię z bioptatu pobranego z części przedodźwiernikowej żołądka, co należy uwzględnić w interpretacji wyników badania.

Wnioski

- 1) Typowanie genetyczne szczepów *H. pylori* izolowanych od członków rodziny potwierdza istotną rolę matki w transmisji zakażenia dzieciom.
- 2) Zakażenia innych członków rodziny, zwłaszcza współmałżonków, wydają się mieć mniejsze znaczenie w przekazywaniu zakażenia.

Piśmiennictwo

1. Maciorkowska E, Kaczmarski M, Roszko I i wsp. Postępy diagnostyczno-terapeutyczne w zakażeniu *H. pylori* u dzieci. *Pediatra po Dyplomie* 2008 (wyd. specjalne): 113-20.
2. Zhang Z. The risk of gastric cancer in patients with duodenal and gastric ulcer: research progresses and clinical implications. *J Gastrointest Canc* 2007; 38: 38-45.
3. Czerwionka-Szaflarska M, Parzęcka M. Rodzinne występowanie zakażenia *Helicobacter pylori* – aktualny stan wiedzy. *Pediatr Pol* 2006; 81: 679-83.

4. Drumm B, Perez-Perez GI, Blaser MJ, et al. Intrafamilial clustering of *Helicobacter pylori* infection. *N Eng J Med* 1990; 322: 359-63.
5. Dominici P, Bellentani S, Di Biase AR, et al. Familial clustering of *Helicobacter pylori* infection: population based study. *BMJ* 1999; 319: 537-40.
6. Rocha GA, Rocha AM, Silva LD, et al. Transmission of *Helicobacter pylori* infection in families of preschool-aged children from Minas Gerais, Brazil. *Trop Med Int Health* 2003; 8: 987-91.
7. Rothenbacher D, Winkler M, Gonser T, et al. Role of infected parents in transmission of *Helicobacter pylori* to their children. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21: 674-9.
8. Farrell S, Doherty GM, Milliken I, et al. Risk factors for *Helicobacter pylori* infection in children: an examination of the role played by intrafamilial bed sharing. *Pediatr Infect Dis J* 2005; 24: 149-52.
9. Kivi M, Rodin S, Kupersmidt I, et al. *Helicobacter pylori* genome variability in a framework of familial transmission. *BMC Microbiology* 2007; 7: 54-61.
10. Kivi M, Johansson AL, Reilly M, et al. *Helicobacter pylori* status in family members as risk factors for infection in children. *Epidemiol Infect* 2005; 133: 645-52.
11. Kivi M, Tindberg Y, Sörberg M, et al. Concordance of *Helicobacter pylori* strains within families. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5604-8.
12. Han SR, Zschausch HC, Meyer HG, et al. *Helicobacter pylori*: clonal population structure and restricted transmission within families revealed by molecular typing. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3646-51.
13. Goodman KJ, Correa P. Transmission of *Helicobacter pylori* among siblings. *Lancet* 2000; 355: 358-62.
14. Brenner H, Rothenbacher D, Bode G, et al. Active infection with *Helicobacter pylori* in healthy couples. *Epidemiol Infect* 1999; 122: 91-5.
15. Kivi M, Tindberg Y. *Helicobacter pylori* occurrence and transmission: a family affair? *Scand J Infect Dis* 2006; 38: 407-17.