

- mutant phenylalanine hydroxylase gene[J]. Hum Genet, 1990, 85:121-122.
- [5] 宋力, 党利亨, 孟英韬, 等. 天津及周边地区苯丙氨酸羟化酶基因突变谱和新突变分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2010, 27(1):7-12.
- [6] 王凤羽, 邵诸君, 丰慧根, 等. 河南省苯丙酮尿症患者苯丙氨酸羟化酶基因突变的构成[J]. 中华医学遗传学杂志, 2010, 27(6):644-649.
- [7] 张眉, 顾学范, 张美华, 等. 中国南方人苯丙氨酸羟化酶基因外显子 7 点突变及其频率分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 1995, 12(6):324-326.
- [8] Song F, Qu YJ, Zhang T, et al. Phenylketonuria mutations in Northern China[J]. Mol Genet Metab, 2005, 86(Suppl 1):107-118.
- [9] Lee DH, Koo SK, Lee KS, et al. The molecular basis of phenylketonuria in Koreans[J]. J Hum Genet, 2004, 49:617-621.
- [10] Okano Y, Asada M, Kang Y, et al. Molecular characterization of phenylketonuria in Japanese patients[J]. Hum Genet, 1998, 103:613-618.
- [11] Tighe O, Dunican D, O' Neill C, et al. Genetic diversity within the R408W phenylketonuria mutation lineages in Europe[J]. Hum Mutat, 2003, 21:387-393.
- [12] Zschocke J. Phenylketonuria mutations in Europe[J]. Hum Mutat, 2003, 21:345-356.
- [13] Eisensmith RC, Martinez DR, Kuzmin AI, et al. Molecular basis of phenylketonuria and a correlation between genotype and phenotype in a heterogeneous southeastern US population[J]. Pediatrics, 1996, 97:512-516.
- [14] Carter KC, Byck S, Waters PJ, et al. Mutation at the phenylalanine hydroxylase gene (PAH) and its use to document population genetic variation; the Quebec experience[J]. Eur J Hum Genet, 1998, 6(1):61-70.
- [15] Zare-Karizi S, Hosseini-Mazinani SM, Khazaei-Koohpar Z, et al. Mutation spectrum of phenylketonuria in Iranian population[J]. Mol Genet Metab, 2011, 102(1):29-32.
- [16] Rivera I, Mendes D, Afonso A, et al. Phenylalanine hydroxylase deficiency: Molecular epidemiology and predictable BH(4)-responsiveness in South Portugal PKU patients[J]. Mol Genet Metab, 2011, 104(suppl 1):86-92.
- [17] Dobrowolski SF, Heintz C, Miller T, et al. Molecular genetics and impact of residual in vitro phenylalanine hydroxylase activity on tetrahydrobiopterin responsiveness in Turkish PKU population[J]. Mol Genet Metab, 2011, 102(2):116-121.
- [18] Zhu T, Qin S, Ye J, et al. Mutational spectrum of phenylketonuria in the Chinese Han population: a novel insight into the geographic distribution of the common mutations[J]. Pediatr Res, 2010, 67(3):280-285.
- [19] 余伍忠, 仇东辉, 宋昉, 等. 新疆维吾尔族苯丙氨酸羟化酶基因突变分析[J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21(11):1362-1365.
- [20] 余伍忠, 仇东辉, 何江, 等. 新疆回族中苯丙酮尿症基因的突变鉴定[J]. 中国优生与遗传杂志, 2011, 19(15):38-39.
- [21] 张军力, 孟峻, 翟晓萍, 等. 内蒙古地区苯丙酮尿症苯丙氨酸羟化酶基因突变的检测[J]. 中华检验医学杂志, 2004, 27(3):144-147.
- [22] 闫有圣, 王铮, 郝胜菊, 等. 甘肃地区苯丙酮尿症患者苯丙氨酸羟化酶基因突变分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2009, 26(4):419-422.

(收稿日期:2011-12-09)

## 幽门螺杆菌检测方法研究进展

金明哲<sup>1</sup>综述, 刘 瑜<sup>2</sup>, 孔伟圣<sup>2</sup>审校(1. 遵义医学院珠海校区, 广东珠海 519041; 2. 珠海贝索生物技术有限公司, 广东珠海 519000)

**【关键词】** 幽门螺杆菌; 感染; 检测

**DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2012. 09. 039 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)09-1099-03**

幽门螺杆菌(Hp), 是一种菌体细长弯曲呈螺旋形的细菌。研究发现 Hp 不仅与慢性胃炎、消化性溃疡病、胃癌等胃肠道疾病密切相关, 而且与口腔、皮肤、血液、心血管及呼吸系统疾病的发生也有相关性。所以 Hp 的研究已受到人们广泛关注, 而 Hp 感染的诊断检测也是 Hp 研究领域中的重点课题。自 1983 年通过胃镜取活检标本分离培养成功以来, 对 Hp 感染的检测已发展出了许多方法, 包括有细菌学、病理学、免疫学、分子生物学等技术, 现综述如下。

### 1 细菌学检测

经胃镜钳取胃黏膜作细菌培养来检测 Hp, 是诊断 Hp 最可靠的方法。此法具有 100% 特异性, 可作为验证其他诊断性试验的“金标准”, 同时又能进行药敏试验, 指导临床用药。但

因 Hp 培养条件较为严格, 且培养过程易受杂菌污染, 故细菌培养常不能获得理想结果, 使之成为 Hp 检测中敏感性最低的一种方法。徐帆等<sup>[1]</sup>采用正交试验, 优选出 Hp 的最佳固体培养条件为 92% 哥伦比亚琼脂或脑心浸液琼脂加 5% 牛血清和 2.5% 混合抗生素, 严格控制气体条件、温度、湿度和 pH 值, 72 h 后可培养出 Hp, 菌落和细菌形态均典型。由于细菌培养法检测 Hp, 费时、价高、培养条件苛刻、敏感度低, 所以临床应用较少。

### 2 病理学检测

胃活检组织作直接涂片或切片后, 染色镜检, 发现 Hp 即可确诊。

**2.1 胃黏膜涂片** 将活检胃黏膜直接涂片, 干燥后染色, 油镜

下检查有无 Hp 感染。此法阳性检出率甚低。胃活检组织也可做印片染色镜检<sup>[2]</sup>,操作与直接涂片镜检同样简单、价廉、快速,而且印片不影响组织块质量,印片后的组织块可继续用作组织切片检查。Mauro Dalla 等<sup>[3]</sup>采用胃刷细胞学涂片检查 Hp 感染,总的 Hp 检出率显著高于活检组织切片检出率,非常简单方便、价廉快速,特别适合于 Hp 密度低时使用。

**2.2 组织切片染色** 胃活检标本经石蜡包埋切片,染色后油镜下观察。最常用的是 Warthin-Starry 银染色<sup>[4]</sup>,其敏感性和特异性均较高,可达到 90% 以上。但该法操作繁琐、费时、技术要求高、价格高。Laine 等<sup>[5]</sup>用 HE 染色法、Genta 银染法和 Giemsa 染色法检测 Hp 感染,借以比较 3 种检测方法,发现 Giemsa 染色法有相对较高的敏感性(88%)和特异性(98%),且操作简便快速,成本低廉,一般医院都能进行。组织学检查受许多因素影响,其最大准确性和敏感性取决于活检组织的取材范围、处理和染色过程以及观察者的经验和敬业精神。

**2.3 免疫组织化学技术** 简称免疫组化,将组织切片技术与免疫标记技术相结合,利用抗原与抗体特异性结合原理,对 Hp 进行定位、定性及定量检测研究,敏感性和特异性较高。Jonkers 等<sup>[6]</sup>采用改良 Giemsa 染色法、Warthin-Starry 银染法和免疫组化法检测 Hp,敏感性分别为(90.0±10.0)%、(70.0±14.1)%、(83.8±11.1)%,特异性分别为(53.8±19.3)%、(82.5±9.6)%、(90.0±0.0)%,免疫组化法以其高特异性和低个体间差异性,被推荐为首选的胃组织学检测 Hp 感染的诊断工具。

### 3 免疫学检测

目前已有多种免疫学检测方法,通过测定 Hp 抗体或抗原来诊断 Hp 感染,包括酶联免疫吸附试验(ELISA)、金标免疫斑点法(以下简称金标法)、聚合酶链反应(PCR)、蛋白芯片技术和免疫印迹技术等。

**3.1 ELISA** 是目前最常用来检测 Hp 感染的免疫学检测方法,此法常检测患者血清中 Hp-IgG 抗体,敏感性和特异性较高,均可达 90.00% 以上。ELISA 也可检测尿液<sup>[7]</sup>和唾液<sup>[8]</sup>中的 Hp-IgG,敏感性分别为 96.00% 和 89.74%。体内抗体可反映机体对 Hp 的免疫应答能力,但由于 Hp 感染数周后才会产生特异性抗体,且 Hp 根除后体内抗体仍可维持 6 个月以上,所以 Hp 抗体阳性不能肯定患者有现症感染,阴性也不能排除初期感染。故凡是检测 Hp 抗体的试验方法都不主张用于临床诊断,多用于流行病学调查和回顾性研究。ELISA 亦可检测 Hp 抗原(HpSA)<sup>[9]</sup>,其敏感性、特异性和准确性也较高,具有临床推广价值。

**3.2 金标法** 金标法是国际上先进的灵敏、快速、简便的体外诊断方法,通过检测血清中的 Hp 抗体来辅助诊断 Hp 感染,其阳性检出率为 57%<sup>[10]</sup>,其准确度、敏感度都不及 ELISA。但金标法程序简单、操作省时,在患者就诊时间和检验工作者的工作效率上都占很大优势,在临床工作中占有重要位置。

**3.3 PCR** PCR 利用基因扩增技术,扩增 Hp 特征性基因片段,达到检测目的。采用 PCR 技术对胃活检标本作 Hp 检测<sup>[11]</sup>,敏感性 100%,特异性 98%。王建华<sup>[12]</sup>采用荧光定量 PCR 检测可疑感染者粪便中的 Hp,敏感性 85%,特异性 100%。PCR 技术有较高的敏感性和特异性,并可检出其他试验不能发现的少量 Hp,但因其技术操作复杂、不纯引物的出现和其他杂菌的交叉反应可致假阳性,故目前尚未广泛应用于

临床。

**3.4 蛋白芯片技术** 20 世纪 90 年代中期发展起来了一项高新检测技术——生物芯片技术,按芯片上固化的生物材料不同,可分为基因芯片、蛋白芯片、细胞芯片和组织芯片。刘红鹰等<sup>[13]</sup>利用蛋白芯片技术检测患者血清中 CagA、VacA、Ure、Hsp60、RdxA 等 5 种毒素的相应抗体,借此辅助诊断 Hp 感染。该技术操作简便快捷、灵敏度高和成本低廉,可以快速准确地检测血清中 Hp 毒素抗体,具有一定的临床诊断价值。

**3.5 免疫印迹法(Western blotting)** 将高分辨率凝胶电泳和免疫化学分析技术相结合,是检测蛋白质表达与分布的常用方法。通过检测血清中的 UreA、UreB、VacA、CagA 等 Hp 毒素蛋白的特异抗体<sup>[14]</sup>,辅助诊断 Hp 感染,具有较高的敏感性(97.96%)和特异性(90.73%),具有与蛋白芯片技术相似的临床诊断价值。

**3.6 荧光偏振免疫技术(FPIA)** 依据荧光标记抗原与其抗原抗体结合物之间荧光偏振程度的差异,直接测量溶液中待检小分子的含量。用 FPIA 检测 Hp 尿素酶(UreB)抗体<sup>[15]</sup>,检测的敏感度和特异度分别为 85.7% 和 98.0%,与 ELISA 相比还存在一定漏检率,如果采用 CagA、VacA 等多种 Hp 抗原蛋白的抗原表位肽,应用 FPIA 检测 Hp 感染,将可能提高检测的敏感性和特异性。

### 4 分子生物学检测

Hp 是人胃内惟一能产生大量尿素酶的细菌,故可通过检测尿素酶来诊断 Hp 感染。尿素酶分解尿素生成 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 和 CO<sub>2</sub>,基于此原理已发展出多种检测方法:快速尿素酶试验、呼吸试验、<sup>15</sup>N-尿素试验等。

**4.1 快速尿素酶检查(RUT)** 尿素酶分解尿素产生大量 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>,pH 值升高,通过酸碱指示剂显色可检测 Hp 感染,是快速检测 Hp 的方法之一。程亚红和向英<sup>[16]</sup>采用 RUT 检测 Hp,检出率 62.7%,敏感性 82.2%,特异性 90.5%,准确性 91.2%。Nakata 等<sup>[17]</sup>采用免疫快速尿素酶法(IRUT)检测 Hp 感染,其敏感性和特异性有了进一步的提高,分别可达 91.5% 和 98.1%。RUT 具有较高的敏感性和特异性,但其影响因素较多,例如标本中 Hp 细菌密度、标本黏液层厚度及某些药物均可影响该试验结果,使之出现假阴性。

**4.2 尿素呼气试验(UBT)** 口服同位素(<sup>13</sup>C、<sup>14</sup>C)标记的尿素后,利用 Hp 尿素酶分解该尿素,产生<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>、<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>,吸收入血并经肺呼出,用闪烁计数仪或质谱仪检测<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>、<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>,即可诊断 Hp 感染。Thijs 等<sup>[18]</sup>分别采用细菌培养法、PCR、组织学检测法、RUT、<sup>13</sup>C-UBT 和血清学检测法检测 Hp,6 种方法的敏感性和特异性分别为:98.4% 和 100%、96.7% 和 100%、96% 和 98.8%、90.2% 和 100%、100% 和 100%、98.4% 和 88.4%,说明<sup>13</sup>C-UBT 是一种高敏感性、高特异性、高准确性的较理想的、安全迅速的非侵入性诊断方法。但是<sup>13</sup>C 呼气试验操作复杂,费用昂贵。熊德山和杜平<sup>[19]</sup>采用<sup>14</sup>C 替代<sup>13</sup>C 标记尿素来进行 UBT,其 Hp 阳性检出率为 93.2%,以 RUT 法作对照,敏感性为 97.3%,特异性 87.5%,符合率 96.6%。<sup>14</sup>C-UBT 试剂相对便宜,检测技术和仪器设备相对简便,适合在中小医院普及,但是<sup>14</sup>C 有一定放射性,半衰期长,可能造成一定程度的患者健康损害和环境污染,故<sup>14</sup>C-UBT 应慎重应用和推广。

**4.3 <sup>15</sup>N 尿素试验** 用稳定同位素<sup>15</sup>N 标记的尿素,原理类似

UBT,不同之处是检测目标物为尿液中<sup>15</sup>N 氨。刘国龙等<sup>[20]</sup>采用该法检测 Hp 感染,敏感性 96%,特异性 97%,重复稳定性良好。此法敏感性高、特异性高、无创伤、无放射性损伤;主要不足之处与<sup>13</sup>C-UBT 相同:检测需要质谱仪,检测费用较高,但毕竟<sup>15</sup>N 尿素比<sup>13</sup>C 尿素便宜很多,有国产试剂,质量也不错,因此仍然是一种值得推广的方法。注意严重肝肾功能损害者不宜使用此法。

综上所述,目前检测 Hp 感染尚无理想的试验方法。Hp 感染及其引发的相关疾病,对人类健康已构成巨大威胁。准确的 Hp 检测方法可以为患者的及时诊治提供有效保障,发明和建立一种快速、敏感、准确且廉价方便的 Hp 感染诊断方法,仍是摆在科研工作者面前的重要任务。

参考文献

[1] 徐帆,李全秀,周华,等. 正交试验优选幽门螺旋杆菌培养条件[J]. 中国药房,2008,19(1):23-25.  
 [2] Misra SP, Misra V, Dwivedi M, et al. Diagnosing Helicobacter pylori by imprint cytology: can the same biopsy specimen be used for histology [J]. Diagn Cytopathol, 1998,18(5):330-332.  
 [3] Mauro Dalla L, Paolo P, Giuliano C, et al. Brush cytology: a reliable method to detect Helicobacter pylori[J]. J Clin Gastroenterol, 1996,22(4):317-321.  
 [4] 孔梅,程兆明,陈萍. 幽门螺杆菌感染 4 种检测方法的评价[J]. 现代医药卫生,2009,25(1):44-45.  
 [5] Laine L, Lewin DN, Naritoku W, et al. Prospective comparison of H&E, Giemsa, and Genta stains for the diagnosis of Helicobacter pylori[J]. Gastrointest Endosc, 1997, 45(6):463-467.  
 [6] Jonkers D, Stobberingh E, de Bruine A, et al. Evaluation of immunohistochemistry for the detection of Helicobacter pylori in gastric mucosal biopsies [J]. J Infect, 1997, 35(2):149-154.  
 [7] 吴永胜,高世同,黄达娜,等. 幽门螺旋杆菌感染者尿液中特异性 IgG 及亚类的检测 [J]. 中国热带医学, 2006, 6(7):1127-1128.  
 [8] 丁智慧,陈萍. 唾液抗幽门螺杆菌抗体检测的价值[J]. 数理医药学杂志,2010,23(3):307-309.

[9] 孙艳艳,吴雪梅. 幽门螺杆菌抗原检测的临床诊断价值 [J]. 慢性病学杂志,2010,12(12):1644-1645.  
 [10] 李光艳. 金标免疫斑点法快速诊断儿童幽门螺旋杆菌感染 [J]. 实用医药杂志,2007,24(1):59-60.  
 [11] Schabereiter-Gurtner C, Hirschl AM, Dragosics B, et al. Novel real-time PCR assay for detection of Helicobacter pylori infection and simultaneous clarithromycin susceptibility testing of stool and biopsy specimens [J]. J Clin Microbiol, 2004,42(10):4512-4518.  
 [12] 王建华. 荧光定量 PCR 检测粪便幽门螺旋杆菌的评价 [J]. 中国实验诊断学,2006,10(7):797.  
 [13] 刘红鹰,林欲龙,田亚平. 应用蛋白芯片技术检测幽门螺旋杆菌感染 [J]. 中华检验医学杂志,2004,27(5):322-323.  
 [14] 熊元治,马颖才,杨卫红,等. 血清免疫印迹法对于抗生素低应用区域幽门螺杆菌感染的诊断价值 [J]. 临床荟萃, 2003,18(20):1186.  
 [15] 张文红,王琰,郭慧芳,等. 用单表位合成肽抗原荧光偏振免疫法检测抗幽门螺旋杆菌尿素酶的抗体 [J]. 细胞与分子免疫学杂志,2005,21(3):371-374.  
 [16] 程亚红,向英. <sup>13</sup>C 尿素呼气试验与快速尿素酶试验检测幽门螺旋杆菌感染的比较 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2011,19(1):79.  
 [17] Nakata H, Itoh H, Ishiguchi T, et al. Immunological rapid urease test using monoclonal antibody for Helicobacter pylori [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2004,19(9):970-974.  
 [18] Thijs JC, van Zwet AA, Thijs WJ, et al. Diagnostic tests for Helicobacter pylori: a prospective evaluation of their accuracy, without selecting a single test as the gold standard [J]. Am J Gastroenterol, 1996,91(10):2125-2159.  
 [19] 熊德山,杜平. 快速尿素酶法与<sup>14</sup>C-尿素呼气试验检测幽门螺杆菌的临床分析 [J]. 临床医药实践,2010,19(8B): 1016-1017.  
 [20] 刘国龙,吴继琮,张振华,等. 利用<sup>15</sup>N-尿素检测幽门螺旋杆菌感染 [J]. 中华消化杂志,1995,15(1):18-20.

(收稿日期:2011-12-22)

(上接第 1094 页)

胆红素水平略高于现有参考范围而无任何其他临床症状的体检者被建议复查,这给体检者、临床医生、患者及患者家属等造成困扰<sup>[5]</sup>。

显然,原参考范围已不能很好地适应临床和健康体检的需要,应根据本地区、人群科学、合理地建立胆红素参考值范围,以避免误诊、漏诊,以提高检验结果在临床诊断中的可靠性。

参考文献

[1] 刘文波,殿少华,孙晓健,等. 冠心病患者血清尿酸和胆红素水平的变化 [J]. 中华心血管病杂志,2003,31(6):439.  
 [2] 姚齐龙,周琼仙. 崇州地区血液胆红素测定参考范围的估

计 [J]. 现代预防医学,2005,31(4):611-612.  
 [3] 周世峰. 广东省茂名地区健康人群血清总胆红素和直接胆红素参考值调查 [J]. 中国现代医学杂志,2006,16(13):2048-2049.  
 [4] 朱爱萍,张剑宏,郭书云,等. 太原地区健康人群血清总胆红素和直接胆红素参考范围调查 [J]. 临床医药实践, 2009,18(12):921-922.  
 [5] 宋明辉,孙浩,周新民,等. 健康人群血清总胆红素和直接胆红素参考值范围的临床研究 [J]. 国际检验医学杂志, 2011,32(7):750-752.

(收稿日期:2011-12-08)