

PCR 检测技术在幽门螺杆菌诊断检测中的应用探讨

周 洪¹, 袁 伟² (重庆市渝北区人民医院: 1. 检验科, 2. 消化内科 401120)

【摘要】 目的 探寻聚合酶链反应(PCR)检测技术在幽门螺杆菌(*H. pylori*, Hp)检测中的应用。方法 通过对该院消化内科疑似是患胃或十二指肠溃疡、胃或胃窦炎、胃癌患者于胃镜下取其病变部位组织标本,进行 Hp 分离培养、PCR 体外扩增,患者同时做尿素酶试验、血清学抗体检查,将结果进行比较分析。结果 170 份病例标本中,分离培养 67 例、尿素酶试验 82 例、Hp 抗体检查 152 例、PCR 扩增 144 例阳性。阳性率分别为 39.4%、48.2%、89.5%、84.7%。以细菌培养为金标准,则尿素酶试验、抗体检查、PCR 灵敏度分别为 88.1%、89.5%、98.5%,特异性分别为 94.6%、77.4%、81.7%。这 4 种检测方法中,灵敏度最高的为 PCR 基因扩增法,其次为抗体检查和尿素酶试验;特异性最高的为尿素酶试验,其次为 PCR 扩增和抗体检查。结论 PCR 试验特异性和灵敏度均较高,可以用作 Hp 感染的确诊、基因分型、流行病学调查、微量取材等的检查。

【关键词】 幽门螺杆菌; PCR; 尿素酶试验

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.19.016 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)19-2430-02

Application of PCR measurement technique in diagnosis and detection of *Helicobacter pylori* ZHOU Hong, YUAN Wei (Yubei District People's Hospital: 1. Department of Laboratory; 2. Department of Gastroenterology, Chongqing 401120, China)

【Abstract】 **Objective** To explore the application of polymerase chain reaction(PCR) detection technique in *Helicobacter pylori*(Hp) detection. **Methods** The lesion tissue specimens from the suspected patients with gastric or duodenal ulcer, gastric or antral gastritis and gastric cancer were taken by gastroscopy for Hp isolation and culture in vitro and PCR amplification. Meanwhile, the patients were performed the urease test and serological antibody detection. The results were conducted the comparative analysis. **Results** Among 170 samples, 67 cases were isolated and cultured. The urease test was in 82 cases, the Hp antibody examination in 152 cases and positive PCR amplification in 144 cases. The positive rates were 39.4%, 48.2%, 89.5% and 84.7% respectively. With the bacterial culture as the gold standard, the sensitivities of the urease test, antibody screening and PCR amplification were 88.1%, 89.5% and 98.5%, the specificities were 94.6%, 77.4% and 81.7% respectively. Among 4 detection methods, the PCR gene amplification method had the highest sensitivity, followed by the antibody screening and urease test. The urease test had the highest specificity, followed by the PCR amplification and the antibody screening. **Conclusion** The PCR test has higher specificity and higher sensitivity, which can be used for the detection of diagnosis, genotyping, epidemiological investigation and trace sampling in *H. pylori* infection.

【Key words】 *Helicobacter pylori*; PCR; urease test

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)是由澳大利亚学者 Warren 和 Marshall 于胃内分离出弯曲杆状菌^[1]。1989 年 Goodwin 等建立了螺杆菌属,才将其正式命名为 *Helicobacter pylori*,简称 Hpylori,国内译为“幽门螺杆菌”^[2]。Hp 是人胃主要感染病菌,全球 50% 以上的人群都感染有 Hp,只是其症状轻重程度不一,引发的胃肠疾病也不尽相同^[3]。

Hp 是一种生活于人体和十二指肠的螺旋杆菌,具有传染性。螺旋形的革兰阴性弯曲杆菌,在固体培养基上生长时大多以球菌体的形式存在,螺旋形少见;在活检标本组织中,镜下长大约 2.5~5 μm,宽 0.5~1 μm,有 4~6 条鞭毛,鞭毛有一个特征性的球形末端。Hp 基因组大小为 1.6~1.73 mb 不等,基因组包含的 16S 和 23SrRNA,平均至少有两个拷贝。Hp 在多重基因上的序列多样性包括编码尿素酶结构蛋白及附属蛋白、鞭毛蛋白、空泡细胞毒素和 CagA 基因的多样性。幽门螺杆菌感染是慢性胃病的主要病因之一,是消化性溃疡发病、病变活动性、顽固不愈及复发的主要因素。1994 年世界卫生组织国际癌症研究机构正式将 Hp 列为 I 类致癌原,明确指出 Hp 是诱发胃癌的元凶^[4]。本实验通过对消化内科慢性胃炎、胃溃

疡、胃癌等胃病患者进行胃镜检查,取其病变组织进行细菌培养、尿素酶试验和 PCR 检测,同时对患者进行血清学 Hp 抗体检测,对 4 种检测结果进行比较分析,探讨几种检测方法的优缺点。

1 材料与方法

1.1 样本来源 选择本院 2011 年 4 月至 2012 年 1 月消化内科疑似患胃或十二指肠溃疡、胃或胃窦炎、胃癌患者 170 例于胃镜下取其病变部位组织标本。

1.2 试剂 培养基为哥伦比亚琼脂,幽门螺杆菌选择添加剂由重庆庆通公司提供;尿素酶试验试剂盒由珠海市凯迪科技开发有限公司提供;血清学 Hp 抗体检测试剂盒(胶体金法)由北京康美天鸿生物科技有限公司生产。PCR 扩增试剂盒由广州达安生物科技有限公司配套提供,扩增区段位于幽门螺旋杆菌(Hp)基因组中编码尿素酶 A 的 DNA。HP 引物探针,HP F: 5'-CCT GAT GGG ACC AAA CTC G-3'; HP R: 5'-GCC GAT TTG AAC GGG TCT-3'; HP P: 5'-FAM-CCG TGC ATA CCC CTA TTG AGG CC-TAMRA 3'。

1.3 仪器 扩增仪由广州达安公司生产的 DA7600 型;胃镜

为日本 Olympus GIF-Q150 型号。

1.4 方法

1.4.1 细菌培养 按照东南大学出版社出版的《全国临床检验操作规程》第 3 版中 Hp 鉴定方法^[5]。胃镜取材培养于哥伦比亚琼脂选择性培养基上,3~5 d 观察培养基平板上细小、半透明、灰色菌落,微弱 β 溶血环。染色镜检以及尿素酶、过氧化氢酶、氧化酶同时阳性的菌株通过弯曲杆菌鉴定板鉴定为 Hp 菌株。

1.4.2 尿素酶试验 胃镜活检组织,按试剂和说明书严格操作。

1.4.3 PCR 扩增 胃镜采取胃黏膜组织,用适量灭菌生理盐水清洗送检组织黏带的血液,然后取 50 mg 组织用 1 mL 生理盐水匀浆研磨,转至 1.5 mL 离心管离心后提取,100 ℃ 10 min 处理后备用。扩增时按试剂和说明书严格操作。

1.4.4 血清 Hp 抗体测定 患者静脉采血 3 mL,分离血清,采用金标法进行检测,严格说明书操作。

1.5 统计学分析 采用 χ^2 检验。以 PCR 检测组为对照组,分析其他 3 种检测方法阳性检出率的差异性比较。以细菌培养组为对照组,检测其他 3 种方法的特异性和灵敏度,比较其差异。

2 结果

2.1 阳性检出率比较 170 例病例标本中,67 例分离培养阳性,阳性率 39.4%;82 例尿素酶试验阳性,阳性率 48.2%;152 例血清学抗体检测阳性,阳性率 89.4%。4 种检测方法的检出率以 PCR 法为对照组进行比较,其中分离培养和尿素酶试验差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 4 种检测方法检出率

方法	总例数	阳性数	阴性数	阳性率(%)
细菌培养	170	67	103	39.4*
尿素酶试验	170	82	88	48.2*
血清学抗体检测	170	152	18	89.4 [#]
PCR(对照组)	170	144	26	84.7

注:与 PCR 比较,* $P < 0.01$,[#] $P > 0.05$ 。

2.2 特异性和灵敏度比较 如果以 Hp 培养结果为检出的“金标准”,则其他 3 种方法的特异性和灵敏度分别见表 2。

表 2 3 种方法检测 Hp 的特异性和灵敏度

方法		Hp 阳性数 (n=67)	Hp 阴性数 (n=93)	灵敏度 (%)	特异性 (%)
尿素酶试验	阳性	59	5	88.1	94.6
	阴性	8	88		
血清学抗体检测	阳性	60	21	89.5	77.4
	阴性	7	72		
PCR	阳性	66	17	98.5	81.7
	阴性	1	76		

3 讨论

细菌培养被认为是检测 Hp 感染的“金标准”^[6],该法早已应用临床工作中,但细菌培养的影响因素较多,阳性率不高。影响培养结果的因素可能有:(1)组织取材部位不准确,一般组织取材要多部位,多点取材;(2)检查前使用抗生素药物或 H2 受体拮抗剂;(3)活检钳消毒液残留;(4)活检组织放置时间过长,保存送检不当,细菌变形、死亡等;(5)培养条件不够,如培

养基湿度、营养、厌氧条件等。另外,细菌培养周期较长,而且过程复杂,因而临床应用不广泛,往往是应用于科研和标准菌株的分离保存。

尿素酶试验是利用 Hp 含有丰富的尿素酶,该酶可水解尿素而产生氨和二氧化碳,氨可引起 pH 值的改变,从而使 pH 指示剂改变颜色。尿素酶试验就是利用这一原理来检测活组织中的 Hp。Hp 的尿素酶分解检测试剂中的尿素而产生氨,指示剂变色,说明有 Hp 存在。该法具有简便、快速、价廉等优点。但该法受取材部位、大小、含菌量、反应时间、环境温度、目测判断等影响较大,尤其是当组织标本含血液时误差更大^[7]。

血清学抗体检查,Hp 菌体表面存在多种抗原组分,如尿素酶蛋白及其附属蛋白、鞭毛、脂多糖等,这些抗原组分均可刺激机体产生免疫反应而产生 IgG、IgM、IgA 抗体。抗体的产生一般需要 3~4 周时间,并且 Hp 根除后,血中抗体在一定的时间内维持阳性水平,另空肠弯曲菌感染存在交叉反应抗体^[8],故血清抗体检测不能准确反映出 Hp 感染的实际情况和细菌的多少。

PCR 检测技术就是聚合酶链技术,由 Hosina 等^[9]将此技术运用 Hp 诊断。Hp 基因组的大小为 1.6~1.73 Mb 不等, Hp 基因组包含的 16S 和 23SrRNA,平均至少有两个拷贝。多重基因在基因图上位置的变化,表明 Hp 的基因组发生了广泛的重排。Hp 在多重基因图上的序列多样性包括编码尿素酶结构蛋白及其附属蛋白、鞭毛蛋白、空泡细胞毒素和 CagA 基因的多变性。

利用针对与 Hp 的功能基因互补的核酸片段,设计 PCR 引物或探针,以此进行体外扩增或杂交,通过对该菌 DNA 的测定而检测有否 Hp 的存在。PCR 技术核酸碱基互补配对,高度特异性;以及扩增产物扩增周期内指数增长,高灵敏度^[10]。PCR 检测技术的应用也存在一个问题,即已被抗生素杀死而仍然残留在胃中的 Hp DNA,也会扩增出阳性结果^[11]。故 PCR 技术不能用来判断短期的治疗效果,治疗 6~8 周后进行检测,可明显降低假阳性率。

综上所述,细菌培养经典,但影响因素较多,阳性率不够,容易造成漏诊;尿素酶试验方别、快速、价廉,但其特异性、灵敏度稍差;血清学抗体检查简单、快速、无需侵入取材,灵敏度高但特异性差;PCR 检测方法灵敏度和特异性较高,检测结果准确可靠,但是 PCR 检测需要侵入取材,需要技术和条件,其技术特点决定其不能用来判断短期疗效观察;因此,检验人员要根据不同的人群以及需要选择不同的方法。如细菌培养用作确诊检查、尿素酶试验用作易感人群的常规检查、血清学抗体检查用作流行病学调查以及群体筛查、PCR 试验主要用作 Hp 感染的确诊、基因分型、流行病学调查、微量取材等的检查。

参考文献

[1] Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium active chronic gastritis [J]. Lancet, 1983,1(8336):1273-1275.
 [2] Goodwin CS, Larmstrong JA, Chilvers T, et al. Helicobacter nemestrinae sp. nov., a spiral bacterium found in the stomach of a pigtailed macaque (Macaca nemestrina) [J]. Int J Syst Bacteriol, 1991,41(1):397-405.
 [3] 李云彪. 关于幽门螺杆菌检测的分析 [J]. 中国现代药物应用, 2010,4(19):31-32. (下转第 2433 页)

2.2 精浆 IgA 型 AsAb 对精液主要参数的影响 精浆 IgA 型 AsAb 阳性组患者的精子的密度、精子活率、精子总活力(PR+NP)均明显低于阴性组,差异具有统计学意义($P < 0.01$);阳性组的正常形态精子百分率和阴性组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

3 讨论

2009 年,世界卫生组织针对精液常规检查制定出了第 5 版精液分析标准化手册(第 5 版《世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册》),我国各大医院也将陆续推广并实施新的标准^[2]。新版手册相对于旧版手册调整主要体现在 3 个方面:(1)在旧版手册中,A、B、C、D 级分别代表显微镜下快速前进运动、慢速前进运动、非向前运动、极慢速运动或不动这 4 类精子,A 级精子所占比例在 25%及以上、或 A 级和 B 级精子加起来在 50%及以上的为正常。而新版手册建议,前向运动(PR)和非前向运动(NP)总和(PR+NP)≥40%为正常。(2)旧版手册规定精子密度大于或等于 $20 \times 10^7/\text{mL}$,精子总数大于或等于 $40 \times 10^7/\text{mL}$ 为正常,新版手册则把精子密度大于或等于 $15 \times 10^7/\text{mL}$,精子总数大于或等于 $39 \times 10^7/\text{mL}$ 定为正常。(3)旧版手册规定正常形态的精子占总数 15%及以上为正常,新版手册则将这一标准大幅度降为 4%。本文的精液参数及参考值均按第 5 版手册要求施行。

男性不育症是 21 世纪影响人类健康的主要问题之一,其发病率占已婚夫妇的 15%,其中男方因素约占 50%^[3]。AsAb 是机体产生的与精子表面抗原特异性结合的抗体,它具有凝集精子,抑制精子通过宫颈黏液流向宫腔内的迁移,进而降低生育能力的作用^[4]。正常情况下,由于男性生殖道存在血睾屏障,抗精子抗体与机体免疫系统隔离,因而不会产生抗精子抗体,但在某些异常情况下,如男性生殖道炎症,如前列腺炎、精囊炎、输精管炎或睾丸受病毒感染,或者受到外伤、高温、化学药物的损害时损伤与梗阻会产生抗体,因睾丸或输精管的黏膜表面有损伤,巨噬细胞进入生殖道吞噬降解精子,并成为激活免疫网络的抗原刺激机体产生 AsAb。本文结果显示不育男性 AsAb 阳性率为 30.4%,略高于陈大宇等^[5]相关报道。

AsAb 导致男性不育的机制可能有:(1)影响精子运输。精子凝集抗体和制动抗体可影响精子活动力,通过 AsAb 细胞毒作用可以杀死精子,包裹精子的抗体可阻碍精子穿透宫颈黏液的能力^[6]。(2)AsAb 可能破坏精子质膜功能。AsAb 阳性的不育患者高渗肿胀值与具有同等精子活率的 AsAb 阴性患

者相比,显著降低。在经过高渗处理之后,质膜上吸附有 AsAb 的精子细胞内钙离子和顶体反应与无 AsAb 吸附的精子相比,出现降低现象。提示 AsAb 至少部分改变精子质膜功能完整性,能使受精率和怀孕率下降。(3)AsAb 结合到精子头部,能干扰精子与透明带 ZP 结合位点的识别,从而影响精卵结合;结合到精子尾部,影响精子的运动,使精子活动率、活力明显降低。(4)AsAb 能抑制人类精子质膜的流动性。精子制动抗体能抑制人类精子质膜的流动性,阻止精子获能,进而影响顶体反应^[7]。

本文研究结果表明,精浆 IgA 型 AsAb 不影响精液的正常精子百分率,但能使精子的密度、活率、总活力明显降低。所以,不育男性患者做精液常规检查时,最好能同时检测抗精子抗体等免疫学方面项目,并根据结果对症治疗,才能取得良好的治疗效果。

参考文献

- [1] 秦庆,胡瑛. 男性不育患者血清抗精子抗体与精液主要参数的关系分析[J]. 检验医学与临床,2010,7(2):118-119.
- [2] 国家人口和计划生育委员会科学技术研究所,译. 世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册[M]. 5 版. 北京:人民卫生出版社,2011:7-192.
- [3] Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM, et al. Best practice policies for male infertility[J]. Fertil Steril, 2002, 77(5):873-882.
- [4] 胡建新,何坚,罗战利,等. 解脲支原体感染与抗精子抗体阳性及其男性不育症的关系[J]. 贵州医药,2008,32(10):873-874.
- [5] 陈大宇,卢旭妹,李广植. 精浆抗精子抗体对精液主要参数的影响分析[J]. 华夏医药,2010,23(4):430-432.
- [6] Chin WW, Chan LW. Clinical associations and mechanisms of action of antisperm antibodies[J]. Fertil Steril, 2004, 83(3):529-533.
- [7] 任明,田芹,许宗革,等. 精浆抗精子抗体对精子形态及运动特征的影响[J]. 中国妇幼保健,2008,23(17):2451-2453.

(收稿日期:2012-03-09)

(上接第 2431 页)

- [4] 曾凡玲,向林. 重庆市城区体检人群幽门螺杆菌感染的血清流行病学调查[J]. 重庆医科大学学报,2009,34(2):224-225.
- [5] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2006:855-857.
- [6] 黄敬,邓秋莲,周珍文,等. 儿童幽门螺杆菌感染 4 种诊断方法对比[J]. 广东医学,2010,31(16):2087-2089.
- [7] 刘红军,赵振军,聂凤英,等. 幽门螺杆菌尿素酶抗体检测的临床应用[J]. 中国当代医药,2010,17(5):62-63.
- [8] 闫伟,曹建彪. 胃幽门螺杆菌检测技术进展[J]. 世界华人消化杂志,2009,17(15):1527-1533.

- [9] Hosina S, Kahn SM, Jiang W, et al. Direct detection and amplification of Helicobacter pylori ribosomal 16S gene segments from gastric endoscopic biopsies[J]. J Clin Microbiol Infect Dis, 1990, 13(6):473-479.
- [10] 梁利民. 荧光 PCR 法检测人胃组织中幽门螺旋杆菌核酸的实验研究[J]. 安徽医药,2011,15(8):1010-1011.
- [11] Vaira D, Vakil N, Menegatti M, et al. The stool antigen test for detection of Helicobacter pylori after eradication therapy[J]. Ann Intern Med, 2002, 136(4):280-287.

(收稿日期:2012-02-21)