

· 临床研究 ·

87 例胃部疾病患者胃黏膜幽门螺杆菌检查方法比较

张涛, 田宇, 帅婧, 周晓倩

(贵阳市第一人民医院消化内科 550004)

摘要:目的 探讨细菌分离培养与形态观察、快速尿素酶实验(RUT)以及 16SrDNA 的 PCR 扩增 3 种方法在幽门螺杆菌(Hp)感染检查中的优缺点。方法 对胃镜下所见胃炎、消化性溃疡患者取其病变部位胃黏膜活检标本进行 Hp 的分离培养、快速尿素酶实验、并提取活检组织 DNA 进行 16SrDNA PCR 扩增及 1% 琼脂糖电泳。结果 根据该实验设立的阳性标准判断, 87 例病例中 Hp 感染阳性为 54 例, 检出率达到了 62.1%(54/87), 其中分离培养阳性率约 41.4%(36/87), 敏感性为 66.7%, 总符合率为 79.3%; 尿素酶检查阳性率约 73.6%(64/87), 敏感性为 100%, 总符合率为 88.5%; PCR 扩增阳性率约 65.5%(57/87), 敏感性为 100%, 总符合率为 96.6%。结论 三种检查方法中 PCR 敏感性和总符合率均较高, 是较为准确、省时和简便的 Hp 检查方法。

关键词: 螺杆菌, 幽门; 胃黏膜; 细菌培养; 尿素酶试验; 聚合酶链反应

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2012.33.011

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)33-3490-02

Comparison of examination methods for Helicobacter pylori on gastric mucosa in 87 patients with gastric diseases

Zhang Tao, Tian Yu, Shuai Jing, Zhou Xiaoqian

(Department of Digestive System, First People's Hospital of Guiyang City, Guizhou 550004, China)

Abstract: **Objective** To explore the merits and demerits of such examination methods for Helicobacter pylori(Hp) as isolated culture of bacteria and morphologic observation, rapid urease test(RUT), and polymerase chain reaction(PCR) amplification of 16SrDNA. **Methods** Biopsy specimens of stomach mucosa were taken under a gastroscope from the diseased regions of the patients with gastritis or peptic ulcer. Then we isolated culture of Hp, RUT, and 16SrDNA PCR amplification and 1% agarose electrophoresis were performed respectively. **Results** According to the positive standard of this study, among the 87 patients, 54 patients were detected with Hp positive infection, with the detection rate of 62.1%(54/87). The positive rate of isolated culture of Hp was about 41.4%(36/87), with the sensitivity of 66.7% and the total coincidence of 79.3%; the positive rate of RUT was about 73.6%(64/87), with the sensitivity of 100% and the total coincidence of 88.5%; the positive rate of PCR amplification was about 65.5%(57/87), with the sensitivity of 100% and the total coincidence of 96.6%. **Conclusion** Among the three examination methods for Hp infection, the sensitivity and total coincidence of PCR are the highest, therefore, PCR is an accurate, time saving, simple and convenient method to examine Hp infection.

Key words: Helicobacter pylori; gastric mucosa; bacterial culture; urease test; polymerase chain reaction

幽门螺杆菌(Helicobacter pylori, Hp)是一种生长在胃黏膜表面的致病菌,在人群中传播广泛, Hp 的感染与慢性胃炎、消化性溃疡及胃癌等多种消化道疾病密切相关^[1], 还和许多胃肠外疾病有关^[2]。Hp 的检查对临床的治疗及根除有指导性作用, 本文采用分离培养、快速尿素酶实验、活检组织 DNA 的 Hp16SrDNA PCR 扩增 3 种方法对 87 例胃部疾病患者胃黏膜标本进行 Hp 检查, 并对 3 种方法的敏感性、特异性和总符合率进行比较, 探讨 3 种方法在临床应用的优缺点, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 胃镜下所见胃炎、消化性溃疡患者 87 例, 年龄 20~78 岁, 胃镜下夹取其病变部位胃黏膜。

1.2 方法

1.2.1 菌株与培养基 菌株: Hp 菌株 NCTC11637, 获赠于中国疾病预防控制中心传染病预防控制所。培养基: 哥伦比亚琼脂购自上海晶纯试剂有限公司, 幽门螺杆菌选择添加剂购自友康基业生物科技, 布氏肉汤培养基购自北京奥博星生物技术有限公司, 引物: 参照文献^[3]合成 Hp 菌种特异性 16SrRNA 基因引物, 上游 5'-CTT GCT AGA GTG CTG TTA-3', 下游 5'-TCC CAC ACT CTA GAA TAG T-3', 由北京天根生物工程有限公司合成。其他试剂: Hp 试纸, 购自珠海市克迪科技开发有限公司; 2×Taq PCR MasterMix、DNA Marker II 购自北

京天根生物工程有限公司。

1.2.2 Hp 质控菌株的培养 取 Hp 菌株 NCTC11637 划线接种于 7% 绵羊血哥伦比亚血琼脂平板上(100 mL 哥伦比亚琼脂, 7 mL 绵羊血, 2.5 mL 选择添加剂), 37 °C 微需氧(5% O₂、10% CO₂、85% N₂) 培养 3~4 d。

1.2.3 临床胃黏膜处理 胃镜下取病变胃黏膜, 置于布氏肉汤内立即运送至实验室, 将标本分为 3 份, 分别用于细菌培养、尿素酶实验和 Hp16SrDNA 的 PCR 扩增。

1.2.4 Hp 尿素酶活性检查 无菌操作取少量胃黏膜以 Hp 试纸按说明书方法进行快速尿素酶实验。

1.2.5 Hp 的分离培养及生物学特性观察 无菌操作将胃黏膜组织剪碎后接种于 7% 绵羊血哥伦比亚血琼脂平板上 37 °C 微需氧培养 3~4 d。观察平板上有无可疑菌落生长及菌落形态, 并挑取可疑菌落进行革兰染色镜检、尿素酶活性实验。细菌菌落形态、染色特性及尿素酶试验与 Hp 相符判为培养阳性。

1.2.6 16SrDNA 的 PCR 扩增 Hp DNA 的提取: 无菌操作将剪取大小约 0.2 mm×0.2 mm 的胃黏膜组织置于装有 0.2 mL 蒸馏水的 Ep 管中研碎, 将研碎的组织液于 100 °C 水浴 15 min, 小型台式离心机 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液作为 DNA 模板, -20 °C 保存备用。质控菌株 DNA 的提取: 无菌操

表 1 3 种检查方法检测 Hp 结果比较 (n=87)

检测方法	阳性率 [n(%)]	假阳性 (n)	假阴性 (n)	敏感度 (%)	特异性 (%)	假阳性率 (%)	假阴性率 (%)	总符合率 (%)
分离培养	54(62.1)	0	8	66.7	100.0	0.0	33.3	79.3
快速尿素酶实验	64(73.6)	10	0	100.0	69.7	30.3	0.0	88.5
16SrDNA PCR 扩增	57(65.5)	3	0	100.0	90.9	9.1	0.0	96.6

作取哥伦比亚血琼脂平板上的 NCTC11637 菌落于 0.5 mL 蒸馏水中,5 000 r/min 离心 10 min,去上清液,加入 0.5 mL 蒸馏水重悬菌体,100 ℃水浴 15 min,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液作为 DNA 模板,-20 ℃保存备用。16SrDNA 的 PCR:按文献[1]方法,以提取的临床标本和质控菌株的 DNA 为模板,采用 2×Taq Master Mix 和 Hp 菌种特异性 16SrRNA 基因引物进行 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.7 评价标准 按照参考[4],本实验设定符合下列情况之一判为 Hp 感染阳性:(1)临床标本分离培养出典型细菌判为 Hp 感染阳性;(2)临床标本快速尿素酶实验阳性并 16SrDNA PCR 阳性。将 3 种方法分别与本实验阳性标准进行比较。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,采用 χ^2 检验对 3 种方法的特异性、敏感性、假阴性率、假阳性率和总符合率进行计算和分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Hp 快速尿素酶实验检查 87 例临床标本中有 64 例尿素酶阳性。

2.2 HP 的分离培养及生物学特性的观察 87 例临床标本经微需氧培养 3~4 d,有 54 例在哥伦比亚血琼脂平板上见无色针尖样细小菌落,革兰染色镜检为革兰阴性螺杆菌,培养物尿素酶试验阳性。

2.3 16SrDNA 的 PCR 扩增 87 例临床标本中有 57 例 PCR 扩增阳性,扩增产物与阳性对照,即 NCTC11637 的扩增产物相对分子质量一致,均为约 550 bp。

2.4 3 种检查方法的比较 根据本实验设定的 Hp 感染阳性标准,临床标本 87 例中有 54 例 Hp 阳性,检出率为 62.1%。3 种 Hp 检查方法的敏感性、特异性、假阳性率、假阴性率和总符合率见表 1。

3 讨 论

Hp 是慢性活动性胃炎的主要致病因素,与消化性溃疡的发生和复发密切相关,与胃腺癌的关系也十分密切,WHO 已将其列为第一类致癌因子^[5]。目前诊断 Hp 感染的方法有细菌培养法、组织切片染色法、活检组织尿素酶试验、印片法、血清学检测 Hp 抗体法、尿素呼吸试验、PCR 等^[6-10],各种方法各有利弊。细菌培养准确可靠,常被认为是金标准,特异性高,但敏感性低^[3],本实验结果也表明 Hp 的分离培养特异性高,但假阴性率也较高,达 33.3%。Hp 分离培养对标本采集、运送、处理和培养的技术或条件均有较高的要求,需及时处理标本,且培养需时较长,通常为 3~5 d,若伴有其他细菌感染或标本的污染需要进行分离培养,则需时更长,因此,作为临床常规的检查方法并不十分可取,但如要进行常规的细菌药物敏感实验则必须进行细菌的分离培养。尿素酶试验和 PCR 的敏感性均可达到 100%,但前者的特异性只有 69.7%,有较高的假阳性率。本研究分离培养中也发现,除了 Hp,一些胃黏膜组织还

可培养出尿素酶阳性的其他细菌,当胃内 pH 值改变,这些非幽门螺杆菌类螺杆菌属细菌感染胃黏膜(如海尔曼螺杆菌也呈尿素酶阳性反应,其作为 1%胃炎的病因),或者黏液层过厚都可引起尿素酶假阳性^[11]。但尿素酶法操作简单,价格低廉,出结果快,在有内镜下取材条件的医院均可开展,适用于临床初筛。PCR 法其敏感性及其特异性均较高,且可用于唾液、胃液及粪便中的 Hp 的检查,操作方便也相对省时,但需要 PCR 扩增仪和电泳设备,基层医院可能由于缺乏设备而无法进行。然而,PCR 法具有更广泛的临床应用前景,例如可进行临床菌株的毒力基因分型和耐药基因的检测^[12],以利于指导抗菌药物的选择和了解预后,与常规药物敏感实验(如纸片法、Etest 法)相比,需时至少缩短 1 周。

参考文献:

- [1] 胡伏莲. 幽门螺杆菌感染与上胃肠道疾病[J]. 中国医刊, 2007,42(2):19-22.
- [2] 王江滨, 元文骞, 李冰, 等. 幽门螺杆菌感染与胃肠外疾病[J]. 中华消化杂志, 2011,31(5):358-360.
- [3] 王菲, 陈峥宏, 赵亮. 用 PCR 扩增 16SrRNA 基因鉴定幽门螺杆菌的细胞壁缺陷型[J]. 贵阳医学院学报, 2009,34(3):259-261.
- [4] 胡伏莲, 周殿元, 贾博琦. 幽门螺杆菌感染的基础与临床[M]. 北京:中国科学技术出版社, 1997:398-399.
- [5] Axon A. Review article: Gastric cancer and Helicobacter pylori[J]. Aliment pharmacol Ther, 2002, 16 Suppl 4: S83-88.
- [6] 徐开生, 施为民. 幽门螺杆菌感染的检测方法及其临床应用选择[J]. 现代检验医学杂志, 2010,25(1):27-29.
- [7] 孙莉, 蒋义斌. 幽门螺杆菌感染 4 种检测方法的比较及评价[J]. 中华消化杂志, 2003,23(1):48.
- [8] 辛强. 改良 Warthin-Starry 银染色法在幽门螺杆菌检测中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2008,18(11):2345.
- [9] 严英, 钱利生, 王文凤. 快速诊断幽门螺杆菌感染的研究[J]. 复旦学报:医学版, 2002,29(5):410-413.
- [10] 朱晓玲, 孙艳艳, 吴雪梅. 酶免疫法检测粪便中幽门螺杆菌抗原在临床感染中的价值[J]. 中华医院感染学杂志, 2003,13(6):517-519.
- [11] 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, 2001:330-331.
- [12] 王菲, 康沛萍, 陈峥宏. 60 例上消化道疾病患者幽门螺杆菌 vacA 基因分型检测及意义[J]. 山东医药, 2009, 49(51):48-49.