

多种幽门螺杆菌检测方法之间的比较及其临床意义

王小群, 王春飞, 方素芬*

中山大学附属第七医院 消化医学中心, 广东 深圳 518000

【摘要】 目的 通过比较幽门螺杆菌(Hp)感染的多种检测方法探讨其在诊断Hp感染中的价值及临床意义。方法 142例胃病患者先行¹³C-尿素呼气试验(¹³C-UBT),再行胃镜检查及快速尿素酶试验(RUT),同时活检标本送病理进行聚合酶链反应(PCR)检测及免疫组织化学(IHC)检测。以IHC为金标准,对于RUT、¹³C-UBT和PCR方法的敏感度、特异度、准确度等方面进行分析比较。结果 RUT的敏感度、特异度、准确度分别是93.5%、63.3%、77.4%,¹³C-UBT的敏感度、特异度、准确度分别是91.1%、90.5%、92.3%,PCR的敏感度、特异度、准确度分别是88.7%、94.3%、91.1%。PCR诊断Hp感染的特异度最高,敏感度与准确度均稍低于¹³C-UBT。RUT的敏感度最高,但是特异度及准确度均明显低于¹³C-UBT及PCR。结论 ¹³C-UBT与PCR诊断Hp的敏感度、特异度及准确度均较高。¹³C-UBT为无创操作,是判断Hp是否根除的首选,适应于所有年龄和类型的受检者,可在短期内反复应用,而且可以对全胃的感染状况进行观察。但¹³C-UBT无法对Hp的分子毒力进行分型与评估,无法进行耐药相关检测,并受近期服用过抗生素、质子泵抑制剂及铋剂等黏膜保护剂的影响。因此,对于行胃镜检查的患者,PCR检测的敏感度、特异度及准确度更优,且可以对于克拉霉素、左氧氟沙星耐药突变基因型进行检测,对抗生素的选择有重要指导意义。

【关键词】 幽门螺杆菌; 快速尿素酶试验; ¹³C-尿素呼气试验; 聚合酶链反应

Comparison and clinical significance of various methods for detecting *Helicobacter pylori*

Wang Xiaoqun, Wang Chunfei, Fang Sufen *

Center of Digestive Disease, the Seventh Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Shenzhen 518000, Guangdong, China

*Corresponding author: Fang Sufen, E-mail: fangsufen@sysush.com

【Abstract】 Objective By comparing various examination methods of *Helicobacter pylori* (Hp) infection to explore their value in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **Method** 142 patients with gastric diseases were detected by ¹³C-urea breath test (¹³C-UBT), followed by endoscopic biopsy for rapid urease test (RUT) and sent to pathology department for polymerase chain reaction (PCR) and immunohistochemical (IHC) detection. IHC was used as the gold standard to compare the sensitivity, specificity and accuracy of RUT, ¹³C-UBT and PCR. **Result** The sensitivity, specificity and accuracy of RUT were 93.5%, 63.3% and 77.4%, respectively. The sensitivity, specificity and accuracy of ¹³C-UBT were 91.1%, 90.5% and 92.3%, respectively. The sensitivity, specificity and accuracy of PCR were 88.7%, 94.3% and 91.1%, respectively. PCR had the highest specificity in the diagnosis of Hp, though its sensitivity and accuracy were slightly lower than ¹³C-UBT. RUT had the highest sensitivity, but its specificity and accuracy were significantly lower than ¹³C-UBT and molecular PCR. **Conclusion** ¹³C-UBT and PCR have higher sensitivity, specificity and accuracy in the diagnosis of Hp. ¹³C-UBT is a non-invasive operation, which is preferred for the judgment after the eradication of Hp. It is suitable for all ages and types of subjects, and can be repeatedly applied in a short period of time and used to observe the infection status of the whole stomach. However, it could not type the molecular virulence of Hp, could not effectively evaluate its virulence factors, and could not conduct drug-resistance related detection, and was affected by the recent use of antibiotics, PPI, bismuth and other

* 通信作者: 方素芬, E-mail: fangsufen@sysush.com

mucosal protective agents. Therefore, in patients requiring gastroscopy, PCR had the better sensitivity, specificity and accuracy. Moreover, PCR can be used to detect clarithromycin and levofloxacin resistant mutant genotypes, which has important guiding significance for the selection of antibiotics.

【Key words】 *Helicobacter pylori*; Rapid urease test; ^{13}C -urea breath test; Immunohistochemical; Polymerase chain reaction

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)是一种革兰氏阴性的螺旋状、微需氧细菌。Hp感染与慢性萎缩性胃炎、十二指肠溃疡、胃黏膜相关性淋巴瘤组织淋巴瘤和胃腺癌的发生有关。WHO已经将Hp列为第一类致癌因子^[1]。研究发现,非贲门型胃癌是Hp感染、环境因素、遗传因素共同作用的结果,小部分与EB病毒感染有关^[2-3]。Hp感染在非贲门型胃癌归因危险度为75%~89%^[4-5]。肠型胃癌和弥漫型胃癌均与Hp感染相关^[3,5]。贲门型胃癌与Hp感染的关系在全球不同地区存在差异, Hp感染在我国贲门型胃癌中的人群归因危险度为62%^[6]。因此, Hp是胃癌发病最主要的可控危险因素。有研究证明,根除Hp可改善胃黏膜炎症反应,阻止或延缓胃黏膜萎缩、肠上皮化生的发生和发展,部分逆转萎缩及肠上皮化生,但肠上皮化生的逆转似乎在根除Hp很长时间后才发生^[6-8]。因此,选择敏感度及特异度均较高的方法检测Hp感染并根治可有效降低胃癌的发生风险。本文结合临床的实际病例,使用 ^{13}C -尿素呼气试验(^{13}C -urea breath test, ^{13}C -UBT)、快速尿素酶试验(rapid urease test, RUT)、免疫组织化学(immunohistochemical, IHC)及聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)等多种检测方法对其敏感度、特异度及准确度进行统计分析,探讨其优势及局限性,以期对其在临床中的应用提供指导。

1 资料与方法

1.1 一般资料及纳入排除标准 共纳入141例患者,平均年龄(48.8±16.2)岁。纳入标准:消化道出血症状;1个月内使用了抗生素、铋剂及具有抗菌作用的中药;2周内服用了质子泵抑制剂;无胃大部分切除病史。

1.2 试剂及器材 ^{13}C -UBT胶囊、同位素比值及Hp检测红外光谱仪均购自深圳市中核海德威生物科技有限公司;RUT检测试纸购自珠海市克迪科技开发有限公司;活检Hp分子检测分型采用荧光PCR法,试剂盒购自北京新基永康生物科技有限

公司;耐药相关检测试剂盒购自北京新基永康生物科技有限公司;Hp免疫组织化学试剂盒购自Proteintech 生物有限公司。

1.3 方法 所有患者均禁食6 h以上,禁饮4 h以上。行胃镜半小时前先行 ^{13}C -UBT:①受试者维持正常呼吸,吸一口气,屏住呼吸10 s,呼出前半段气体,再把肺部的末段气体吹进集气袋内;②饮用水吞服 ^{13}C 尿素试剂(75 mg),服药后保持静坐、禁饮食、禁烟、避免剧烈活动,等待30 min,收集第二袋气体(收集方法同①)。若怀疑样本采集不规范,可及时重新采集。将两袋气体交给医护人员检测。 ^{13}C -UBT半小时后行胃镜检查,于胃窦、胃体各取一块黏膜组织放在黄色试纸中央,使粘有样本的黄色试纸与胶片紧密结合。对活检样本进行PCR和IHC检测。

按下列公式计算各方法的敏感度、特异度和准确度:敏感度=真阳性人数/(真阳性人数+假阴性人数)×100%;特异度=真阴性人数/(真阴性人数+假阳性人数)×100%;准确度=所有阳性人数/总病例数×100%

1.4 观察指标 RUT:样本置于试纸中央,1~3 min后观察试纸颜色变化,样本边缘呈红色为阳性,不变色为阴性。 ^{13}C -UBT一般以超基准值(delta-over-baseline, DOB)≥4为阳性、<4为阴性。如果实测值在分界值附近(如DOB值在2~6之间),特别是在根除Hp后,检测值下降但未能至阳性数值以下时,宜间隔一段时间后重新复查。Hp的IHC特点如下:低倍镜下观察,胃小凹及胃黏膜表面的腺腔内可见棕黄色颗粒,高倍镜下见菌体呈清晰的“C”形、“S”形、小点状或弯曲短杆状,主要分布于黏膜表面的黏液和胃小凹腺腔内,有些Hp附着于上皮细胞表面,部分位于上皮细胞内及间质中,在感染严重的胃黏膜组织中, Hp沿胃小凹边缘呈“鱼群样”簇状排列,破坏上皮细胞连接。有文献报道IHC的特异度为100%^[9-10],本研究以IHC作为金标准。

1.5 统计方法 采用SPSS 22.0统计学软件,计

量资料数据以(均数±标准差)表示,对连续性变量采用 *t* 检验,二分类变量采用卡方检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

在敏感度上,RUT最高,其次为¹³C-UBT,PCR最低;在特异度上,PCR最高,其次为¹³C-UBT,RUT最低;准确度最高的是¹³C-UBT,其次为PCR,最低的为RUT(表1~4)。

表1 RUT诊断结果与IHC的比较(例)

RUT	IHC		合计
	阳性	阴性	
阳性	86	18	104
阴性	6	31	37
合计	92	49	141

表2 ¹³C-UBT诊断结果与IHC的比较(例)

¹³ C-UBT	IHC		合计
	阳性	阴性	
阳性	72	6	78
阴性	7	57	64
合计	79	63	142

表3 PCR诊断结果与IHC的比较(例)

PCR	IHC		合计
	阳性	阴性	
阳性	63	3	66
阴性	8	50	58
合计	71	53	124

表4 多种Hp检测方法的敏感度及特异度的比较(%)

方法	敏感度	特异度	诊断准确度	检测患病率	实际患病率
RUT	93.5	63.3	77.4	73.8	65.2
¹³ C-UBT	91.1	90.5	92.3	54.9	55.6
PCR	88.7	94.3	91.1	50.8	57.3

3 讨论

目前指南推荐的Hp检测方法可以分为侵入性和非侵入性试验^[11]。技术的选择取决于患者的需要。有胃镜检查的适应证的患者允许医生直接观察黏膜,收集活检样本进行组织学检查、尿酶检测、细菌培养或者分子PCR检测。在没有内镜检查推荐的情况下,非侵入性测试,例如尿素呼气测

试或粪便抗原测定则适用于活动性感染检查。血清学可用于特定情况以帮助医生诊断细菌感染。而细菌培养是检测Hp的金标准,可能还需要进行药敏试验,但它需要上消化道镜检查 and 专门的实验室条件,大部分地方很难达到要求。

随着越来越多的检测方法的出现,临床发现多个检测方法的结果经常存在不一致甚至相互矛盾,例如患者¹³C-UBT的结果处于临界值时,或者患者胃部出现严重萎缩、肠化会影响Hp的检测结果时,我们都需要结合多种检测方法的优点进行综合判断。本研究发现,PCR及¹³C-UBT诊断Hp的敏感度、特异度及准确度均较高,RUT的敏感度较高但其特异度及诊断准确度均明显低于PCR及¹³C-UBT。因¹³C-UBT为无创操作,首选用于Hp根除后的效果判断,适应于所有年龄和类型的受检者,可在短期内反复应用,并可以对全胃的感染状况进行观察。但是其无法对Hp的分子类型进行分型,对其毒力进行有效的评估,且无法进行耐药相关检测,且受近期服用过抗生素、PPI及铋剂等黏膜保护剂的影响^[12]。所以,在需行胃镜检查患者中,PCR检测方法是更优的选择,其敏感度、特异度高,且不受检查前服用PPI、铋剂、抗生素(包括具有抗菌药物的中药)的影响;采用PCR技术还可检测克拉霉素、左氧氟沙星耐药突变基因型,对指导抗生素的使用具有重要临床价值。

PCR技术不仅可以检测是否存在Hp感染,而且能根据Hp的毒力因子进行分型。研究发现,Hp结构多样,能产生多种毒力因子,并能分泌多种高活性的酶及细胞毒素,可以造成胃黏膜的直接损伤并产生炎症反应^[13]。Hp的毒力因子较多,最主要的是空泡毒素(vacuolating cytotoxin, VacA)和细胞毒素相关基因A蛋白(cytotoxin-associated gene A, CagA)。研究发现,由于CagA、VacA阳性Hp均属高毒株,致病力强,感染后可能会致胃黏膜组织细胞损害^[14],并影响胃壁细胞分泌功能,胃酸分泌减少可为亚硝酸盐等致癌物质形成、集聚创造有利条件,加速胃黏膜正常组织细胞恶性演变过程。

此外,PCR检测还可用于鉴定致病基因和抗生素耐药性突变,采用PCR技术检测克拉霉素、左氧氟沙星耐药基因型,对指导抗生素的选择有重要临床价值^[15]。Hp的耐药性通常是由点突变引起的,而自然转化、外排泵及基因突变等也是造成耐药性的原因。与克拉霉素耐药相关的常见突变

是 A2143G 和 A2142G, 较少见的是 A2142C 和其他突变^[16-17]。喹诺酮耐药是由 *gyrA* 基因突变引起的, 四环素耐药与 16S rRNA 基因突变有关, 利福平耐药是由 *rpoB* 基因突变引起的, 青霉素结合蛋白基因突变、膜通透性改变和外排泵可导致阿莫西林耐药, 许多不同机制也可导致甲硝唑耐药^[18]。因此, 针对菌株药物敏感性检测在多药耐药不断增加的情况下显得尤为重要。但本研究仍存在不足之处, 纳入的样本量均较少, 且为单中心研究, 未对患者耐药率进一步统计, 后续需进一步加大样本量并纳入多中心的研究, 并分析不同检测方法的局限性及优势, 为临床应用提供参考。

参考文献

- [1] YU FJ, WU DC, KUO CH, et al. Diagnosis of Helicobacter pylori infection by stool antigen test in southern Taiwan [J]. Kaohsiung J Med Sci, 2001, 17(7): 344-350.
- [2] SMYTH EC, NILSSON M, GRABSCH HI, et al. Gastric cancer [J]. Lancet, 2020, 396(10251): 635-648.
- [3] SEENEVASSAN L, BESSEDE E, MEGRAUD F, et al. Gastric Cancer: Advances in Carcinogenesis Research and New Therapeutic Strategies [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(7): 3418.
- [4] DUAN F, SONG C, ZHANG J, et al. Evaluation of the Epidemiologic Efficacy of Eradicating Helicobacter pylori on Development of Gastric Cancer [J]. Epidemiol Rev, 2019, 41 (1): 97-108.
- [5] BALAKRISHNAN M, GEORGE R, SHARMA A, et al. Changing Trends in Stomach Cancer Throughout the World [J]. Curr Gastroenterol Rep, 2017, 19(8): 36.
- [6] YANG L, KARTSONAKI C, YAO P, et al. The relative and attributable risks of cardia and non-cardia gastric cancer associated with Helicobacter pylori infection in China: a case-cohort study [J]. Lancet Public Health, 2021, 6(12): e888-e896.
- [7] CORREA P, FONTHAM ET, BRAVO JC, et al. Chemoprevention of gastric dysplasia: randomized trial of antioxidant supplements and anti-helicobacter pylori therapy [J]. J Natl Cancer Inst, 2000, 92(23): 1881-1888.
- [8] SUNG JJ, LIN SR, CHING JY, et al. Atrophy and intestinal metaplasia one year after cure of H. pylori infection: a prospective, randomized study [J]. Gastroenterology, 2000, 119 (1): 7-14.
- [9] SHUKLA S, PUJANI M, AGARWAL A, et al. Correlation of serology with morphological changes in gastric biopsy in Helicobacter pylori infection and evaluation of immunohistochemistry for H. pylori identification [J]. Saudi J Gastroenterol, 2012, 18 (6): 369-374.
- [10] COEKHO M, RIBEIRO HG, GOMES C, et al. Helicobacter pylori chronic gastritis on patients with premalignant conditions: Olga and Olgin evaluation and serum biomarkers performance [J]. Arq Gastroenterol, 2021, 58(1): 39-47.
- [11] 中华医学会消化病学分会幽门螺杆菌学组. 第六次全国幽门螺杆菌感染处理共识报告(非根除治疗部分)[J]. 中华消化杂志, 2022, 42(5): 15.
- [12] ZHOU Q, LI L, AI Y, et al. Diagnostic accuracy of the (14)C-urea breath test in Helicobacter pylori infections: a meta-analysis [J]. Wien Klin Wochenschr, 2017, 129(1-2): 38-45.
- [13] CARDOS AI, MAGHIAR A, ZAHA DC, et al. Evolution of Diagnostic Methods for Helicobacter pylori Infections: From Traditional Tests to High Technology, Advanced Sensitivity and Discrimination Tools [J]. Diagnostics (Basel), 2022, 12(2): 508.
- [14] ENROTH H, KRAAZ W, ENGSTAND L, et al. Helicobacter pylori strain types and risk of gastric cancer: a case-control study [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2000, 9(9): 981-985.
- [15] 刘文忠, 谢勇, 陆红, 等. 第五次全国幽门螺杆菌感染处理共识报告 [J]. 中华内科杂志, 2017(7): 532-545.
- [16] CHEY WD, LEONTIADIS GI, HOWDEN CW, et al. ACG Clinical Guideline: Treatment of Helicobacter pylori Infection [J]. Am J Gastroenterol, 2017, 112(2): 212-239.
- [17] SAVOLDI A, CARRARA E, GRAHAM DY, et al. Prevalence of Antibiotic Resistance in Helicobacter pylori: A Systematic Review and Meta-analysis in World Health Organization Regions [J]. Gastroenterology, 2018, 155(5): 1372-1382.
- [18] ALOS JI. Antibiotic resistance: A global crisis [J]. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2015, 33(10): 692-699.