

## • 检验技术与方法 •

## 恒温扩增-防污染核酸扩增快速试纸法检测幽门螺杆菌的临床意义

董 青<sup>1</sup>, 葛惠男<sup>2</sup>, 杨达人<sup>1△</sup>, 张芸燕<sup>1</sup>, 叶 泓<sup>1</sup>, 孙丹娅<sup>2</sup>, 朱雄雄<sup>2</sup>

(江苏省苏州市中医医院:1. 检验科;2. 消化内科 215009)

**摘 要:**目的 评价恒温扩增-防污染核酸扩增快速试纸法检测幽门螺杆菌(Hp)的临床意义,并对其方法学进行评估。方法 用幽门螺杆菌恒温扩增-防污染核酸扩增快速试纸法对 117 例胃炎、胃溃疡和胃癌患者胃黏膜活组织标本进行幽门螺杆菌检测,并评价该检测方法的特异性、诊断敏感性等方法学指标,同时以细菌培养法作为标准参考对照。结果 细菌培养法诊断 Hp 感染阳性 66 例,阴性 51 例;幽门螺杆菌恒温扩增-防污染核酸扩增快速试纸法在细菌培养法阳性标本中诊断出 62 例阳性,细菌培养法阴性标本中诊断出 49 例阴性,恒温扩增-防污染核酸扩增快速试纸法对幽门螺杆菌的诊断敏感性、特异性分别为 93.9%(62/66)、96.1%(49/51)。结论 幽门螺杆菌恒温扩增-防污染核酸扩增快速试纸法是一种简便、易行、准确性高的诊断方法,具有较强的临床应用价值。

**关键词:**螺杆菌,幽门; 核酸扩增技术; 敏感性; 特异性

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2012.16.040

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2012)16-2001-02

自从 Marshall 和 Warren 两位临床医生从胃黏膜发现幽门螺杆菌(*helicobacter pylori*, Hp)以来<sup>[1]</sup>,由此引发了胃、十二指肠疾病防治策略的彻底变革。越来越多的研究表明,幽门螺杆菌的感染引起的慢性胃炎,显著增加了发展成胃溃疡、十二指肠溃疡、胃腺癌和胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤的风险<sup>[2-3]</sup>。

美国胃肠病专家最近认为内窥镜检查是诊断幽门螺杆菌的最合适的方法<sup>[4]</sup>。内窥镜检查包含的细菌培养法,被认为是诊断胃肠道感染 Hp 的“金标准”。恒温扩增-防污染核酸扩增快速试纸法则可以将幽门螺杆菌 DNA 扩增、核酸杂交和核酸试纸条检测 3 种技术有机融为一体,具有防止实验室扩增物交叉污染,防止假阳性的效果。本文对 117 例胃病患者采用恒温扩增-防污染核酸扩增快速试纸法检测幽门螺杆菌的灵敏度和特异性进行分析,结果报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集本院和苏州市立医院东区 2011 年 1~12 月因上消化道症状接受胃镜检查的患者,排除 4 周内服用过抗菌药物、铋剂和质子泵抑制剂等对 Hp 检查有影响的药物者。符合本研究的 117 例患者,其中男 67 例,女 50 例,平均年龄 56.7 岁(21~81 岁);慢性胃炎 96 例,消化性溃疡病 12 例,胃癌 9 例。

**1.2 试剂** 恒温扩增-防污染核酸扩增幽门螺杆菌快速检测试剂盒由优思达有限公司提供(版本日期:02/11 SM-HPB-CHN-0);幽门螺杆菌生长因子和哥伦比亚琼脂为英国 Oxoid 公司产品;三气培养袋(5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>)为法国梅里埃公司提供;所有试剂都在有效期内使用。

**1.3 标准菌株** 幽门螺旋杆菌、鲍曼不动杆菌、肺炎球菌、白色念球菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、大肠埃希菌、屎肠球菌、铜绿假单胞菌、阴沟肠杆菌、产气荚膜杆菌、洋葱假单胞菌、大肠溶血杆菌等细菌株都来源于国家卫生部临检中心。

**1.4 引物和探针** 幽门螺旋杆菌的特异性引物探针如下: HPF3: 5'-TAG ATA CGG CTA ATG GCG, HPB3: 5'-ACT AGC CTG TCA GCA TCG; HPFP: 5'-CCG GTC GTT TTT AGC GAG, HPBP: 5'-GCA AAG CCT AAA TCT GCG; HP-DF5F: 5'-FITC-ACT AAC ACA TCA GCC CCA AG, HP-

DR5B: 5'-Biotin-CAA CCA ATT AAG CCA GGA AG。

**1.5 胃黏膜活检组织标本检测 Hp** 患者进行胃镜检查时,取 2 块胃窦距幽门 5 cm 处的胃黏膜组织,分别采用细菌培养法和恒温扩增-防污染核酸扩增快速试纸法检测幽门螺旋杆菌。恒温扩增-防污染核酸扩增快速试纸法检测幽门螺旋杆菌按照试剂盒检测说明书进行。细菌培养采用分区划线接种法接种于血平板(含 10% 新鲜绵羊血、10% Hp 生长因子的哥伦比亚琼脂),放入三气培养袋中(5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>),37 °C 培养箱培养 5~7 d,挑取琼脂平板上透明针尖样的可疑菌落,通过革兰染色、氧化酶试验、脲酶试验和硝酸盐还原试验进行鉴定。

**1.6 恒温扩增-防污染核酸扩增快速试纸法** 核酸恒温扩增技术是利用新发现的切口酶和 BST DNA 聚合酶,将核酸扩增反应的全过程都在同一温度下进行。切口酶辨认特异的序列后,只切断 DNA 的一条链,BST DNA 聚合酶则具备链置换功能,合成 DNA 新链的同时,可以从切口处将“旧链”剥离下来。各反应步骤均在恒温下进行,DNA 靶分子呈指数扩增,直到原料耗尽或酶活性丧失。在优化条件下,靶分子可在 30 min 内被扩增数千亿倍。

检测结果的判定采用核酸免疫薄膜层析技术。恒温扩增反应体系中,设计两条特异性扩增引物,其中一条引物用半抗原 B 标记(以下简称抗原 B),适宜的扩增条件下,当有被检核酸存在时,特异性核酸片段被扩增并被抗原 B 标记;当被检核酸不存在时,设计一条特异性探针 A,探针序列与扩增物片段序列碱基互补,进行特异性杂交,形成扩增物-探针杂交复合物。将探针 A 用抗原或半抗原 A 标记(以下简称抗原 A),将标准通用的抗 A 抗体吸附于有色颗粒,在颗粒表面形成抗体包被;将另一种标准通用的无色抗 B,以线条状固定于膜上形成检测线。当存在待检的特异性扩增产物时,核酸扩增物与探针 A 杂交,其中探针 A 有 A 抗原标记,引物 B 有 B 抗原标记,从而形成扩增物-探针抗原 A-引物抗原 B 杂交物;将形成的扩增物-探针抗原 A-引物抗原 B 杂交物与颗粒表面抗体包被中的抗体 A 结合,形成扩增物-探针抗原 A-颗粒抗体 A-引物抗原 B 有色颗粒复合物,将得到的有色颗粒复合物在溶液中通

过毛细现象沿纤维膜向上流动至抗体 B 检测线条,与线条上的抗体 B 结合,形成扩增物-探针抗原 A-颗粒抗体 A-引物抗原 B-线条抗体 B 有色颗粒复合物,从而滞留在检测线上,形成肉眼可见的有色线条,此为阳性;当特异性扩增物不存在时,不能形成肉眼可见的有色线条,此为阴性。

防污染封闭式核酸快速检测装置通过内芯与外盒的双重密封,使扩增物不产生外泄,从而防止实验室扩增物交叉污染及假阳性结果的产生。使用该装置无需打开 PCR 管盖,反应结束后直接将反应管放入装置内芯中固定,然后将内芯放入外盒中,合上外盒根据试纸条的显色即可判读结果,从而使得检测的整个过程都在物理封闭条件下完成,降低了扩增物外泄的可能性,如图所示。

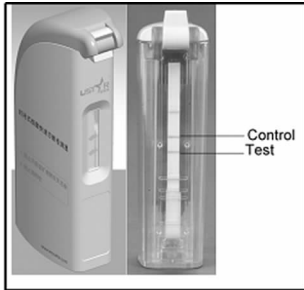


图 1 封闭式防污染检测装置

1.7 恒温扩增-防污染核酸快速试纸法敏感性测定 采用生理盐水将幽门螺杆菌标准菌株稀释成每 1 mL 中含 10 000、1 000、100、10、0 个幽门螺旋杆菌,10 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,然后沉淀物内加入 40  $\mu$ L DNA 提取液,100  $^{\circ}$ C 10 min,冷却至室温后,10 000 r/min 离心 5 min,留取上清液 DNA 模板备用。接着按照恒温扩增-防污染核酸快速试纸法操作说明书进行操作,通过检测试纸条判定检测结果。

1.8 恒温扩增-防污染核酸快速试纸法特异性测定 应用 Hp 恒温扩增-防污染核酸快速试纸法,采用幽门螺杆菌特异性引物和探针分别检测鲍曼不动杆菌、肺炎球菌、白色念珠菌、葡萄球菌、粪肠球菌、大肠埃希菌、尿肠球菌、铜绿假单胞菌、阴沟肠杆菌、产气荚膜梭菌、洋葱假单胞菌、大肠溶血杆菌等待检样品,以分析该方法的特异性。

1.9 恒温扩增-防污染核酸快速检测法重复性测定 用梯度稀释的幽门螺杆菌质粒( $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、10、0)稀释液同上述条件平行检测 10 次,验证该方法的稳定性。

1.10 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件对检测结果进行分析,四格表卡方检验计算恒温扩增-防污染核酸快速试纸试验的评价指标,并对该方法与细菌培养检测法的敏感性和特异性进行统计学分析,并对采用 Spearman 相关性分析,评价恒温扩增-防污染核酸快速试纸法与细菌培养检测法的相关性。

2 结 果

2.1 恒温扩增-防污染核酸快速试纸法敏感性分析 用幽门螺杆菌恒温扩增-防污染核酸快速检测试纸法对系列倍比稀释的幽门螺杆菌标准菌株液进行检测,结果显示恒温扩增-防污染核酸快速检测试纸法最低检测量为 10 个细菌/毫升。

117 例患者胃黏膜组织标本中,66 例细菌培养检测法诊断幽门螺杆菌阳性的标本中有 62 例恒温扩增-防污染核酸扩增快速试纸法检测幽门螺杆菌阳性,51 例细菌培养检测法诊断幽门螺杆菌阳性的标本中有 49 例恒温扩增-防污染核酸扩增

快速试纸法检测幽门螺杆菌阴性,据此得出恒温扩增-防污染核酸扩增快速试纸法检测幽门螺杆菌的诊断敏感性为 93.9% (62/66),诊断特异性为 96.1% (49/51),其他指标见表 1。结果经  $\chi^2$  检验显示细菌培养检测法和恒温扩增-防污染核酸快速试纸法两者指标阳性率差异无统计学意义( $P>0.05$ )。经 Spearman 相关分析,两种检测方法的相关系数( $r$ )=0.952,  $P<0.01$ ,提示两种检测方法呈显著相关。

表 1 恒温扩增-防污染核酸快速试纸法检测指标分析

实验方法	敏感性(%)	特异性(%)	阳性似然比	阴性似然比
恒温扩增-防污染核酸扩增快速试纸法	93.9	96.1	24.09	0.063 4

2.2 恒温扩增-防污染核酸快速检测方法特异性分析 采用恒温扩增-防污染核酸快速试纸法对鲍曼不动杆菌、肺炎球菌、白色念球菌、葡萄球菌、粪肠球菌、大肠杆菌、尿肠球菌、铜绿假单胞菌、阴沟肠杆菌、产气荚膜梭菌、洋葱假单胞菌、大肠溶血杆菌进行了检测,结果均呈阴性,特异性 100%,表明恒温扩增-防污染核酸快速试纸法诊断幽门螺杆菌不会出现假阳性,结果可靠。

2.3 恒温扩增-防污染核酸快速试纸法重复性测定 用梯度稀释的幽门螺旋杆菌( $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、10、0)稀释液平行检测 10 次,结果均一致,表明恒温扩增-防污染核酸快速试纸法诊断幽门螺杆菌重复行好。

3 讨 论

幽门螺杆菌感染是全世界范围内的疾病,人群患病率与年龄,种族,地理分布和社会经济地位密切相关,发展中国家的患病率高达 70%,发达国家幽门螺旋杆菌感染引起疾病的患病率约 40%<sup>[5-6]</sup>。目前细菌培养法是临床上对幽门螺杆菌诊断的“金标准”,细菌培养阳性,即可诊断为幽门螺杆菌阳性。该诊断方法的敏感性和特异性分别为 56.6%~97.4% 和 93.5%~100.0%<sup>[7-10]</sup>。

本研究利用恒温扩增-防污染核酸快速试纸法检测胃黏膜中的幽门螺杆菌阳性检出率为 52.3% (62/117),与细菌培养法的阳性检出率 56.4% (66/117)比较,该方法的敏感性、特异性、重复性、阳性似然比、阴性似然比差异无统计学意义。由于恒温扩增-防污染核酸快速试纸法是基于核酸检测,不需要活菌,同时具有恒温反应、运行设备要求较低、不需昂贵的仪器设备、操作简单、结果容易判断,整个检测操作过程只需要 63~65  $^{\circ}$ C 的普通水浴锅即可,一般 1 h 可检测完毕,密封装置可以避免不同标本之间的交叉污染等优点,可以在普通的实验室开展,特别适合一些中小医院检验科开展幽门螺杆菌的检测项目,将具有更为广阔的临床应用前景。

参考文献

[1] Correa P, Piazuolo MB. Natural history of Helicobacter pylori infection[J]. Digestive and Liver Disease, 2008, 40(7): 490-496.  
[2] Kandulski A, Selgrad M, Malfertheiner P. Helicobacter pylori infection; a clinical overview[J]. Digestive and Liver Disease, 2008, 40(8): 619-626.  
[3] Correa P, Houghton J. Carcinogenesis of helicobacter pylori[J]. Gastroenterology, 2007, 133(2): 659-672.  
[4] Chey WD, Wong BC. Practice parameters Committee of the American college of gastroenterology. American college(下转第 2012 页)

酸,能够在核酸提取过程中竞争结合能力,这会为检测阶段人为地增加一个检测范围上限,导致检测结果的错误解释。同样地,特别高的靶病毒载量可能会超过提取方法的结合能力,这可能对相对小的基因组的病毒被测量具有低的风险,但是对于原核或真核靶物质是值得关注的。

**2.3 结果分析** 使用差值检查能够帮助实验室在报告发出前发现检测差错。差值检查对同一患者检查结果与之前相比发生的变化。差值检查可以在当前多数的实验室信息系统中使用到。在一些小到中等规模能接入到电子病历系统的实验室中,其可以通过与患者的病史比较以发现问题的存在。而这种方法不适合于大规模的参考实验室,对结果的趋势分析以及差值检查随时间的比例可能在识别出检测前和检测中差错中

有用。

回顾检测结果以及过去阳性结果和阴性结果所在比例同样是有用的质量保证活动。突然出现的阳性结果,尤其是弱阳性结果,可能提出存在污染,应该引起关注。阳性值的降低可能提示出分析灵敏度的降低,原因在于试剂缺陷、过程差错或者突发的靶序列变异(探针或引物不结合)。应该要求有对试剂性能系统的评价以及标准操作程序的检查。研究发现由于探针结合位点单核苷酸多态性会导致实时 PCR 结果发生假阴性<sup>[10]</sup>。这些变异的存在可以通过定期对公开序列库的查看以及分析反应产物(判断出扩增子是否是合成了但没有检测到)来发现。通常,使用电泳(凝胶或毛细管)方法来检测扩增子,之后进行测序,以确定出潜在的变异体。

表 1 高质量核酸获取的挑战--因素和相关的标本类型

项目	因素	标本
降低核酸完整性	核酸酶 pH 化学交联多糖组成的厚细胞壁	尿液、大便、支气管肺泡灌洗液(BAL)、全血尿液、大便
酶抑制	高细胞含量 DNA 干扰物质的携带效应	福尔马林固定的组织含分枝杆菌和葡萄球菌的血液和体液 全血、骨髓尿液、大便

3 检验后期质量控制

定量分子检测的结果报告应该含检测值、解释性评论以及检测标记。扩增中得出的数据应该以 log<sub>10</sub> 转换后的数据进行报告,同时报告中也应该有原始数据。由于许多定量检测是用于治疗监测或预防管理的,对病毒载量变化(在复杂中代表着显著的改变)进行的微型解释性评论对于临床具有重要的意义。为确保结果报告的准确性,使用的方法和实验室人员的数量取决于检测仪器是否连接到了实验室信息系统。当这种连接实施时,结果报告是最准确的。此时,准确性的确保与校准品和质控品的检测(为了确保其落在检测范围内)是一样的简单,将结果在仪器上进行电子转化并传输到实验室信息系统中。

检测后阶段的质量保证是非常复杂的,当结果是手工输入到实验室信息系统中时是很容易发生差错的。此时,通常以打印形式报告的结果必须与原始结果进行人工比较,同时也要对质控品和校准品的有效性进行检查。这些活动应该在检测完成后快速地进行,以帮助及时发现无效的检测和抄写差错,并且这些活动应该在有审核者签字和日期的检测后报告中记录。

参考文献

[1] CLSI. MM06-Quantitative Molecular Methods for Infectious Dis-

eases. A Approved Guideline-Second Edition CLSI document[J]. Wayne, PA:CLSI, 2010.

[2] 王治国. 临床检验方法确认与性能验证[M]. 北京:人民卫生出版社, 2009:1.

[3] 王治国. 临床检验质量控制技术[M]. 北京:人民卫生出版社, 2008:1.

[4] 李金明. 实时荧光 PCR 技术[M]. 北京:人民军医出版社, 2010:1.

[5] 杨雪,王治国. 常规实验室检验血液标本处理程序[J]. 中国医院, 2011,15(11):61-64.

[6] 韦美德,贺望娇,戴盛明. 加强临床实验室分析前质量控制的重要行和紧迫性[J]. 国际检验医学杂志, 2009,30(6):617-618.

[7] 李臣,李振勤. 检验科全程质量控制的措施[J]. 国际检验医学杂志, 2011,32(15):1774-1775.

[8] 曾蓉,王治国. 临床实验室质量指标体系的建立[J]. 中华医院管理杂志, 2011,27(3):211-214.

[9] 曾蓉,王治国. 肿瘤标志物应用的质量要求[J]. 国际检验医学杂志, 2011,32(7):746-747.

[10] Stevenson J, Hymas W, Hillyard D. Effect of sequence polymorphisms on performance of two real-time PCR assays for detection of herpes simplex virus[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(5):2391-2398.

(收稿日期:2012-01-05)

(上接第 2002 页)

of gastroenterology guideline on the management of helicobacter pylori infection[J]. Am J Gastroenterol, 2007, 102(8):1808-1825.

[5] Replogle ML, Glaser SL, Hiatt RA, et al. Biologic sex as a risk factor for Helicobacter pylori infection in healthy young adults[J]. Am J Epidemiol, 1995, 142(8):856-863.

[6] Fraser AG, Scragg R, Metcalf P, et al. Prevalence of helicobacter pylori infection in different ethnic groups in New Zealand children and adults[J]. NZ J Med, 1996, 26(5):646-651.

[7] Ng TM, Fock KM, Ho J, et al. Clotest(rapid urease test) in the diagnosis of Helicobacter pylori infection[J]. Singapore Med J, 1992, 33(6):568-569.

[8] Tseng CA, Wang WM, Wu DC. Comparison of the clinical feasibility of three rapid urease tests in the diagnosis of Helicobacter pylori infection[J]. Dig Dis Sci, 2005, 50(3):449-452.

[9] Van KN, Van HE, Deboer WA. Validation of a new, commercially available dry rapid urease test for the diagnosis of Helicobacter pylori infection in gastric biopsies[J]. Neth J Med, 2006, 64(9):329-333.

[10] Liao CC, Lee CL, Lai YC, et al. Accuracy of three diagnostics tests used alone and in combination for detecting Helicobacter pylori infection in patients with bleeding gastric ulcers[J]. Chin Med J, 2003, 116(12):1821-1826.

(收稿日期:2012-01-10)