

幽门螺杆菌试剂盒研制及应用概况

中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所(102206)

陈晶晶 张建中 蒋秀高

自 Warren 与 Marshall 于 1983 年分离出幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, HP)以来,国内外很多学者相继证实 HP 与慢性胃炎、消化性溃疡密切相关,与胃癌的相关性也日渐受到重视,HP 感染的检测方法很多,但细菌培养、组织染色法和尿素酶试验均需胃镜活检取材,且取材非常局限;同位素标记的 ^{13}C , ^{14}C 呼吸试验需要昂贵的仪器设备,因此目前提倡用血清学方法,而 HP 特异性抗体

的检测在 HP 相关性胃炎的诊断中日益显得重要,而在所有的血清学诊断中,ELISA 法最为常用。

第一代粗制全菌抗原有一定的假阳性,因此开展了第二代部分纯化抗原和以后开展纯化抗原等研究,对幽门螺杆菌相关性疾病的诊断意义是很大的。

近年来国内外研究 HP 诊断试剂盒的主要有潘志军等^[1]用超声粉碎、离心沉淀,取

上清为抗原,用该试剂盒检测 225 例行胃镜检查患者的血清抗幽门螺旋菌抗体 IgG,并同时做培养和涂片。若以后者为标准,则 ELISA 方法的敏感性为 94%,特异性为 87%。抗 HP 抗体 IgG 为特异性的,与空肠弯曲菌和结肠弯曲菌无交叉反应。该实验重复性好(变异系数在 10% 以下),抗原在低温下(-20℃)可长期保存。杨善民等(1995)进行两项试剂盒的研制,①幽门螺杆菌尿素酶,酶联免疫,多聚酶链式反应诊断试剂盒研制②幽门螺杆菌无创性诊断试剂盒研制—免疫色谱法诊断试纸条研制。陈晶晶等^[2]在国内外首次应用 Sephadex G200 柱,从 HP 超声波破碎物离心中,一次性提纯了 HP 尿素酶抗原,SDS-PAGE 分析结果表明,所提取的 HP 尿素酶抗原中仅含有 66KD 及 30KD 两种蛋白成分,与 HP 尿素酶蛋白两种亚基的大小完全相同,提取物中几乎不含有其它杂蛋白成分。经 Western Blot 分析证明所提取的 HP 尿素酶抗原仍具有良好的抗原性,与国外报道中使用的 Sephacryl S400、Bio-gel P100、Superose 12HR 10/30 柱提取尿素酶以及经正辛基葡萄糖初提后,用 Agarose A-5m 柱提取 HP 菌的 HM-CAP(内含尿素酶)相比,简化了分离程序,降低了成本,同时提高了分离纯度和回收率,我们认为 Sephadex G200 是用于尿素酶抗原纯化的理想分离介质,这是 HP 尿素酶纯化方法的改进。用上述 HP 尿素酶抗原试剂盒用 ELISA 法进行测定,经中国预防医学科学院流行病

学微生物学研究所与首都医科大学附属北京天坛医院临床验证,对已知的阳性标本与阴性标本检验,符合率 100%。1 675 例病例检测,与胃镜活检取材的细菌培养,组织染色方法对照,敏感性 98%,特异性 96%,本试剂盒可广泛用于临床,作为 HP 感染的诊断、疗效判定及流行病学研究的重要指标^[3]。

国外研究全菌抗原试剂盒的有 Heok FJ 等, Grabree JE 等及 Granberg C 等^[4-6]用 HP 全菌抗原检测胃病患者血清中 IgA 及 IgG, Figura N 等^[7]用酸性甘氨酸提取尿素酶抗原用于成人及儿童的 HP 诊断,并评价 ELISA 试剂盒作为 HP 感染的血清学诊断的意义, Cognecin P 等用一种快速免疫色谱法对 HP 血清学诊断进行了评价^[8], Mizkami. T 等经超声波处理的纯化 HP 尿素酶抗原,是在 DEAE 纤维素 4B 柱上用 NaCl 线性梯度洗脱,获分子量 65KD 及 27KD 蛋白,作者认为可以此抗原用 ELISA 法检测抗 HP IgG 抗体。对 93 名胃病患者检查,敏感性为 72.5%,特异性为 70.8%,作者认为是对 HP 感染的有意义诊断方法^[9]。Ching CK 等以商用 ELISA 试剂盒对非溃疡性消化不良患者感染 HP 的血清学诊断,对 115 例非溃疡性消化不良(NUD)检测,敏感性 81%,特异性为 90%^[10]。

Jensen AK 等用 ELISA 法检测 HP-IgG 抗体的八种商品试剂盒,对 122 名 HP 感染的诊断及流行病学进行了研究,结果如下。

	敏感性(%)	特异性(%)
1. Helico GTM (Proton - Cambrige)	71	74
2. G. A. P test (Bio - Rad)	77	65
3. H. pylori antibodies ELISA (Biometra)	90	74
4. Anti - H. pylori (Roche)	84	74
5. 2nd generation H. pylori EIA (Roche)	87	83
6. Anti - H. pylori MTP assay (Roche)	94	83
7. Pylori stat kit (Whittaker)	90	70
8. Pyloriset latex agglutination kit (Orcon)	87	65
(9. In - house ELISA based on heat - stable Antigen)	87	65

陈晶晶等研制的尿素酶纯化抗原与国外同类试剂盒或国内抗 HP 抗体 ELISA 检测方法比较,见表 1 及表 2。

表 1 尿素酶纯化抗原与国外同类试剂盒比较

试剂盒名称	抗原	观察例数	敏感性 %	特异性 %	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)
pylorist	全菌	68	68	76	85	62
GAP - IgG	全菌	64	89	77	86	82
Helico G	全菌	66	82	83	89	74
Bio - Rad IgG	全菌	242	94	80	90	87
EIA - G	全菌	195	92	84	88	90
EIA - A	全菌	195	80	89	89	79
Figuea - IgG	酸浸抗原	成人	95	100	-	-
		儿童	96	98	-	-
Mizukami - IgG	尿素酶	93	73	71	-	-
JensenAK - IgG:						
Helico GTM(Proton - Cambrige)			71	74	-	-
GAP test(Bio Rad)			77	65	-	-
HP antibodies ELISA(Biometra)			90	74	-	-
Anti - H. pylori(Roche)			84	74	-	-
2nd generation HP EIA(Roche)			87	83	-	-
pylori stat kit (whittaker)			90	70	-	-
Anti - HP MTP assay (Roche)			94	83	-	-
pylorist lutex aggutonation kit(Osion)			87	65	-	-
陈晶晶	尿素酶	1 675	98	96	-	-

表 2 尿素酶纯化抗原与国内抗 HP 抗体 ELISA 检测方法比较

作者	抗原	观察例数	敏感性 (%)	特异性 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)
韩淑英	全菌	307	89	89	93	87
杨昭徐	全菌	1 260	94	84	94	91
陈振依	超声波	149	92	87	95	78
吴昌俊	超声波		93	96	-	-
潘志军	超声波	225	94	87	-	-
谭龙益	超声波		95	76	-	-
吴昌俊	酸浸		90	91	-	-
吴昌俊	冻融		72	86	-	-
刘德孟	63KD 蛋白		87	80	-	-
陈晶晶	尿素酶	1 675	98	96	-	-

表 3 HPU 试剂盒对 51 例临床标本考核结果

检测方法	Western Blots		合计
	+	-	
酶标法	26	0	26
	2	23	25
合计	28	23	51

从表 1 和表 2 中可见, 陈晶晶等所研制的 HPU - ELISA 诊断试剂盒, 经大量临床检测应用, 其阳性标准及阴性对照均较适宜, 检出的敏感性及特异性均很高, 经中国药品生物制品检定所检定(检定号 SJCX960033), 幽门螺杆菌 HPU 酶标试剂盒临床考核报告:

51份临床病人血清标本分别采用 HPU 酶标试剂盒和 Western blots 方法检测,其血清中抗幽门螺杆菌抗体,结果见表 3。

从表 3 看出,同 Western blots 结果相比,该套酶标试剂盒,用于检测幽门螺杆菌抗体特异性可达 100%,敏感性及特异性高,而且批内、批间差异均很小,稳定性强,重复性好。

临床应用观察到,应用本试剂盒,在慢性胃炎、消化性溃疡、非溃疡性消化不良各类疾病中,以抗 HPU 抗体检测阳性率均甚高,尤其是慢性活动性胃炎、十二指肠溃疡中检出率更高。与文献报道一致^[11-15]。也可减少患者接受胃镜复查 HP 根除与否之痛苦^[16]。此外,抗 HP 抗体检测与消化性溃疡胃泌素释放的相关性研究^[17]和流行病学研究均有重要理论与实际意义。

参考文献

1. 潘志军,等. 幽门螺杆菌抗体酶联免疫检测试剂盒的研制. 上海免疫学杂志, 1991, (3): 157
2. 陈晶晶、张建中、蒋秀高; 幽门螺杆菌尿素酶抗原的分离纯化及其在诊断中的应用, 中华流行病学杂志, 1992, 13(6): 361
3. 杨昭徐、陈晶晶、梁丕霞,等; 抗幽门螺杆菌尿素酶抗体商品化诊断试剂盒的研制与临床应用, 中华消化杂志, 1995, 8月第15卷增刊: 47
4. Heek FJ, et al. Evaluation of the performance of Commercial test kits for detection of Helicobacter pylori antibodies in serum. J. Clin Microbiol, 1992, 30(6): 1525
5. Crabtree JE, et al. Evaluation of the Commercial ELISA for serodiagnosis of Helicobacter pylori infection. J Clin Pathol, 1991, 44(3): 326
6. Granberg C, et al. Diagnosis of Helicobacter pylori infection by using pyloriset EIA - G and EIA - A for detection of serum immunoglobulin G(IgG) and IgA antibodies. J Clin

- Microbiol, 1993, 31(6): 1450
7. Figura - N, Oderda - G, Verdiani - S Evaluation of a Commercial ELISA kit for the serological diagnosis of Helicobacter pylori infection. Microbiologica, 1994, 17(4): 319
8. Cognein P, Costa A, Glacosa A, Serodiagnosis of Helicobacter pylori: Evaluation of a rapid, miniaturized immunochromatographic test. Eur. J, Cancer Prev, 1994, 3(6): 45
9. Mizukami T, Osawa T, Niwa M, et al: An enzyme - link immunosorbent assay for the detection of IgG antibodies against urease of Helicobacter pylori Rinsho Byori, 1994; 42(11): 188
10. Ching CK, Thompson S; Buxton C, et al: Evaluation of a Commercial enzyme - linked Immunosorbent assay (ELISA) Kit for serological diagnosis of Helicobacter pylori infection in a group of non ulcer dyspepsia suffers. Postgrad. Med J. 1993, 68(812): 456
11. 杨昭徐、陈晶晶、侯曼苓等. 诺氟沙星治疗幽门螺旋菌阳性胃炎 142 例及治疗后抗体滴度, 新药与临床, 1993, 12(1): 14
12. Kosunen TU, et al. Diagnostic value of decreasing IgG, IgA and IgM antibody titres after eradication of Helicobacter pylori, Lancet 1993, 339: 893
13. Vaira V et al. Antibody titres to Campylobacter pylori after treatment of gastritis, Brit Med J 1988, 297: 397
14. Veenendaal RA, et al. Long term serological surveillance after treatment of Helicobacter pylori infection, Gut 1991, 32: 1291
15. Arther J, et al, Long - term follow - up of voluntary ingestion of Helicobacter pylori. Annals of Internal Medicine, 1991, 114: 662
16. 杨昭徐、陈晶晶、卜宗芳等. 在非溃疡性消化不良中 ELISA 法测抗幽门螺杆菌抗体的临床意义, 首都医学院学报, 1992, 13(4): 285
17. 梁丕霞、陈晶晶、杨昭徐等. 十二指肠溃疡疾病中胃泌素与幽门螺杆菌感染相关性研究, 首都医学院学报, 1993, 14(2): 128