

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.03.005

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.03.005>

TaqMan探针法与尿素呼气试验法检测胃镜活检标本 幽门螺旋杆菌的比较

沈和德¹, 褚明亮¹, 易韦¹, 杨文秀²

(贵州医科大学 1. 附属人民医院病理科, 贵阳 550002; 2. 病理学教研室, 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 通过比较幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染的两种检测方法, 探讨TaqMan探针法在诊断幽门螺旋杆菌感染中的价值。方法: 抽取70例有完整病例资料的胃镜活检标本, 进行Hp分型、鉴定检测, 并将实验结果与临床的碳14尿素呼气试验和病理结果进行相关性分析。结果: Hp感染的两种检测方法(TaqMan探针法和呼气实验法)一致性程度尚可(Kappa=0.550), 两种方法检测的阳性率都随病理炎症程度的加重而增加, 而呼气实验法检测Hp的阳性率更高(P<0.05)。但TaqMan探针法可以将Hp进行不同毒力类型的鉴定, 且TaqMan探针法可区分Hp的阳性强度(1+, 2+, 3+), 其与病理的炎症程度有较好的相关性($\gamma=0.564$, P<0.05)。结论: TaqMan探针法可以定性地鉴定Hp, 与呼气实验法有较好的一致性。TaqMan探针法可进一步定量Hp的阳性强度, 更好地反映临床的病理炎症程度。

[关键词] 幽门螺旋杆菌; TaqMan探针法; 尿素呼气试验法

Comparison of TaqMan PCR method and Carbon-14-Urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori*

SHEN Hede¹, CHU Mingliang¹, YI Wei¹, YANG Wenxiu²

(1. Department of Pathology, Affiliated People's Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550002;

2. Department of Pathology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

Abstract **Objective:** To investigate and compare TaqMan PCR method and Carbon-14-Urea breath test on *Helicobacter pylori* (Hp) detection. **Methods:** TaqMan PCR method was used in 70 cases of clinical samples, and the results were analyzed. **Results:** There was no difference in the positive rate of Hp in TaqMan PCR method and Carbon-14-Urea breath test, and there was a good correlation between the two methods, but the positive rate was higher in Carbon-14-Urea breath test. Further study showed that the positive intensity of Hp can be divided into 3 types by TaqMan PCR method, and there was a good correlation between positive intensity and pathological degree of inflammation. **Conclusion:** TaqMan PCR method can be used as a useful molecular biological method for clinical diagnosis of Hp.

Keywords *Helicobacter pylori*; TaqMan PCR method; Carbon-14-Urea breath test

收稿日期 (Date of reception): 2016-12-12

通信作者 (Corresponding author): 易韦, Email: yiwei6252@sina.com

基金项目 (Foundation item): 国家自然科学基金 (81560088)。This work was supported by National Natural Science Foundation of China (81560088).

幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)是一种革兰阴性、微需氧螺旋菌, 根据其基因组是否含有细胞毒素相关蛋白基因cagA和空泡细胞素基因vacA, 将Hp分成I型Hp(cagA+和vacA+)和II型Hp(cagA-和vacA-)^[1-2]。与临床消化性溃疡及相关肿瘤发生密切相关的主要是I型的Hp^[3]。因此, 临床迫切需要对Hp的感染进行可靠诊断并对毒力类型进行精确分类。尿素呼气试验因具有操作简单、无创、灵敏度高等优点而在临床广泛使用, 但是其无法定量判定Hp感染程度, 且无法对Hp的毒力类型进行确切分类。近年来, TaqMan探针技术被应用到Hp的荧光PCR检测中, 其不仅有超高的灵敏度, 而且可以对Hp的感染程度、毒力和耐药模式进行精确分析^[4-9]。但是关于TaqMan探针法和尿素呼气试验法在胃镜Hp结果的比较上, 尚无文献报道。本文通过比较二者的检测结果并分析其与临床病理参数的相关性, 探讨其在临床中的应用价值。

1 对象与方法

1.1 对象

收集贵州省人民医院病理科2014年11月至2016年5月, 有完整住院病史资料(包含有碳14尿素呼气试验结果)的胃镜活检石蜡组织标本70例, 其中男40例, 女30例。年龄18~84(58.2±12.1)岁。Hp呼气试验法阳性45例, 阴性25例; 其中男性呼气试验阳性26例, 女性19例。按照更新的悉尼系统标准^[10], 将其分为轻度慢性炎症(20例)、中度慢性炎症(35例)和重度慢性炎症(15例)。病理诊断结果有两位病理医师采用双盲法阅片判定, 如有判定争议的标本, 则不纳入实验统计。

1.2 TaqMan 探针 PCR 法检测 Hp

每例标本切取5 μm左右的石蜡组织薄片5~6张, 放入洁净的E_p管中, 每例标本切取后, 均用毛笔刷干净, 严防交叉污染。按照石蜡标本DNA提取试剂盒(北京厚生博泰科技有限公司)的操作步骤提取总DNA。按照Hp分型鉴定试剂盒(北京新基永康生物科技有限公司)进行TaqMan探针荧光PCR扩增。使用的仪器为安捷伦3000P实时定量PCR仪。实验结束后根据试剂盒说明书对仪器的荧光阈值(Ct值)进行计算判读。结果由2名以上技术人员完成。

1.3 统计学处理

采用SPSS13.0处理数据, 计数资料差异性分析采用 χ^2 检验, 检验水准取 $\alpha=0.05$ 。涉及到的3组不同炎症病理结果之间的比较, 需要进行3次两两比较, 其检验水准取 $\alpha=0.05/3=0.017$ 。一致性检测采用Kappa检验, 其中Kappa>0.4视为有一致性。相关性分析采用Spearman检验, $\gamma \geq 0.3$ 视为有相关性。

2 结果

2.1 TaqMan 探针法检测 Hp 结果及与尿素呼气试验法的比较

TaqMan探针法检测Hp的阳性结果为33例(32例为I型Hp, 1例为II型Hp, 阳性率47.1%), 显著低于尿素呼气试验法阳性结果的45例(阳性率64.3%, $P=0.004$, 表1), 但两种检测方法之间有一定的一致性(Kappa=0.550, 表1)。

表1 2种Hp检测方法结果之间的比较

Table 1 Comparison of methods for the detection of Hp

呼气试验组	TaqMan探针组		合计
	+	-	
+	31	14	45
-	2	23	25
合计	33	37	70

$\chi^2=23.912$, Kappa=0.550, $P=0.004$ (McNemar's test).

2.2 TaqMan 探针法与尿素呼气试验法在不同性别间的比较

TaqMan探针法与尿素呼气试验法结果都显示Hp阳性率在不同性别间差异无统计学意义($P=0.306$, 表2; $P=0.885$, 表3)。

表2 TaqMan探针方法在不同性别组间的结果比较

Table 2 Comparison of TaqMan results between different gender groups

性别	TaqMan探针组		合计
	+	-	
男性	20	20	40
女性	13	17	30
合计	33	37	70

$\chi^2=0.306$, $P=0.580$.

表3 呼气试验方法在不同性别组间的结果比较

Table 3 Comparison of breath test between different gender groups

性别	呼气试验组		合计
	+	-	
男性	26	14	40
女性	19	11	30
合计	45	25	70

$\chi^2=0.021, P=0.885$.

2.3 TaqMan 探针法与尿素呼气试验法在不同病理结果组中的比较

TaqMan探针法结果显示Hp的阳性率在轻度慢性炎症组为10%，在中度慢性炎症组为45%，在重度慢性炎症组为93%，三组之间差异均有统计学意义(表4)。而尿素呼气试验法结果显示Hp的阳性率

在轻度慢性炎症组为45%，在中度慢性炎症组为60%，在重度慢性炎症组为100%，重度慢性炎症组与另外2组间差异均有统计学意义(表5)。

2.4 不同的Hp阳性程度和不同的病理结果的相关性比较

TaqMan探针法将Hp分为3类不同的阳性程度(1+, 2+, 3+)，在轻度慢性炎中，不同阳性程度(1+, 2+, 3+)的比例分别是5%、0%和5%；在中度慢性炎中，不同阳性程度(1+, 2+, 3+)的比例分别是11%、20%和17%；在重度慢性炎中，不同的阳性程度(1+, 2+, 3+)的比例分别是27%、20%和47%；Hp的阳性强度所占病例数量比例随着慢性炎症程度的增加而增加，其与病理组织的不同的病理结果有较好的相关性($\gamma=0.584, P<0.001$ ，表6)。

表4 TaqMan探针方法在不同病理结果组间的结果比较

Table 4 Comparison of breath test between different pathological groups

组别	n	TaqMan探针组		阳性率/%
		+	-	
轻度慢性炎症组	20	2	18	10 ^{&}
重度慢性炎症组	15	14	1	93 [#]
中度慢性炎症组	35	17	18	45 [*]

Fisher-exact test. [&]与中度慢性炎症组比较, $\chi^2=8.374, P=0.004$; [#]与轻度慢性炎症组比较, $\chi^2=23.986, P<0.001$; ^{*}与重度慢性炎症组比较, $\chi^2=8.930, P=0.003$ 。

Fisher-exact test. [&] compared with moderate chronic inflammation group, $\chi^2=8.374, P=0.004$; [#] compared with mild chronic inflammation group, $\chi^2=23.986, P<0.001$; ^{*} compared with severe chronic inflammation group, $\chi^2=8.930, P=0.003$.

表5 呼气试验方法在不同病理结果组间的结果比较

Table 5 Comparison of TaqMan results between different pathological groups

组别	呼气试验组			阳性率/%
	+	-	合计	
轻度慢性炎症组	9	11	20	45 ^{&}
中度慢性炎症组	21	14	35	60 [*]
重度慢性炎症组	15	0	15	100 [#]

Fisher-exact test. [&]与中度慢性炎症组比较, $\chi^2=1.155, P=0.283$; [#]与轻度慢性炎症组比较, $\chi^2=9.615$ (校正), $P=0.001$; ^{*}与重度慢性炎症组比较, $\chi^2=6.467$ (校正), $P=0.011$ 。

Fisher-exact test. [&] compared with moderate chronic inflammation group, $\chi^2=1.155, P=0.283$; [#] compared with mild chronic inflammation group, $\chi^2=9.615$ (correction), $P=0.001$; ^{*} compared with severe chronic inflammation group, $\chi^2=6.467$ (correction), $P=0.011$.

表6 *Hp*阳性程度和不同病理结果的相关性Table 6 Correlation between pathological results and the positive degree of *Hp*

病理结果	<i>Hp</i> 鉴定阳性程度				合计
	0+	1+	2+	3+	
轻度慢性炎	18	1	0	1	20
中度慢性炎	18	4	7	6	35
重度慢性炎	1	4	3	7	15

$\gamma=0.564$ (Spearman correlation analysis), $P<0.001$.

3 讨论

*Hp*和胃炎、消化性溃疡胃黏膜相关性淋巴瘤、淋巴瘤及胃腺癌的发生有密切关系^[11-12]。因此,临床一直在寻求快速简便、特异度、敏感度都高的*Hp*检测方法,进而促进*Hp*感染的早期诊断及治疗,其中尿素呼气试验具有操作简单、无创、灵敏度高优点而在临床广泛使用。但是近年来的研究^[3]发现:并不是每个类型的*Hp*都和消化性相关疾病的发生相关,主要是I型*Hp*(*cagA*+和*vacA*+)才具有上述的致病性。另外,临床也希望了解每个患者感染*Hp*的阳性程度,从而可以对其病情进行准确把握。因此,我们采用了TaqMan探针技术对胃活检标本进行荧光PCR检测,期待解决上述问题。

本研究中,TaqMan探针法共检测70例活检标本,对*Hp*进行定性、定量和毒力分型。结果检测到的阳性结果为33例,其中I型*Hp*有32例,II型*Hp*有1例。TaqMan探针法检测的阳性率为47.1%,低于呼气试验法检测阳性率的64.3%($P<0.05$)。在呼气试验法阳性组标本中,TaqMan探针法有14例显示阴性结果,说明呼气试验法的敏感性高,可以弥补TaqMan探针法可能的漏检率。但在呼气试验法阴性组标本中,TaqMan探针法亦检测到2例阳性结果,这表明TaqMan探针法也可减少呼气试验法可能的漏检现象。进一步分析还发现两种方法对*Hp*的检出率有较好的一致性($Kappa=0.550$)。因此,二者在*Hp*的检测上可以做有益的互相补充。由于男性患者有易过食高嘌呤饮食、过度饮酒等不良生活习惯,因此我们猜测不同性别之间*Hp*的阳性率是否有差别。不过实验结果显示:不论是TaqMan探针法还是呼气试验法,*Hp*的阳性率在不同性别组标本中无差异。可能在以后的标本收集,需要详细记录患者的饮食习惯,才能更好地细化分类,而不仅仅依靠性别的差异。关于*Hp*的感染率与病理慢性炎症程度的相关性,我

们做了详细的分析。2种检测结果都表明:随着慢性炎症程度的加重,*Hp*的感染率亦随着升高。而临床医师更感兴趣的是*Hp*的感染程度,因为不同的感染程度,临床的用药治疗情况就不同。而本研究中的TaqMan探针法通过定量每个检测标本中的*Hp*数量,去评估其感染程度。我们又进一步将*Hp*的感染程度和临床病理慢性炎症程度进行相关性分析,发现随着慢性炎症程度的加重,*Hp*的感染程度亦随着加重,二者之间有较好的相关性($\gamma=0.564$, $P<0.05$)。因此,TaqMan探针法的结果可更好地反映临床的病理炎症程度。但是TaqMan探针法,必须要胃镜下取材才能够进行,且操作繁琐、价格较贵。而呼气试验法则简单、方便、无创,更易在临床推广应用。

综上所述,TaqMan探针法和呼气试验法相比,除了有较好的一致性,还可以对胃镜活检标本中的*Hp*进行定性、定量检测和毒力分型。因此,TaqMan探针法可以作为临床诊断*Hp*的一个有效的分子生物学方法。

参考文献

- Roy RK, Hoppe MM, Srivastava S, et al. CEACAM6 is upregulated by *Helicobacter pylori* CagA and is a biomarker for early gastric cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(34): 55290-55301.
- Agudo S, Pérez-Pérez G, Alarcón T, et al. High prevalence of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains and risk factors associated with resistance in Madrid, Spain[J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(10): 3703-3707.
- Covacci A, Rappuoli R. *Helicobacter pylori*: molecular evolution of a bacterial quasi-species[J]. *Curr Opin Microbiol*, 1998, 1(1): 96-102.
- Fonseca TL, Moraes EP, Juliano CR, et al. Detection of *Helicobacter pylori* by phenotypic and genotypic methods[J]. *Dig Dis Sci*, 2010, 55(6): 1643-1648.
- Mégraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial

- susceptibility testing[J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20(2): 280-322.
6. Menoni SM, Bonon SH, Zeitune JM, et al. PCR-based detection and genotyping of *Helicobacter pylori* in endoscopic biopsy samples from Brazilian patients[J]. Gastroenterol Res Pract, 2013, 2013: 951034.
 7. Cerqueira L, Fernandes RM, Ferreira RM, et al. Validation of a fluorescence in situ hybridization method using peptide nucleic acid probes for detection of *Helicobacter pylori* clarithromycin resistance in gastric biopsy specimens[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(6): 1887-1893.
 8. Chung WC, Jung SH, Oh JH, et al. Dual-priming oligonucleotide-based multiplex PCR using tissue samples in rapid urease test in the detection of *Helicobacter pylori* infection[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(21): 6547-6553.
 9. Linpisarn S, Koosirirat C, Prommuangyong K, et al. Use of different PCR primers and gastric biopsy tissue from CLO test for the detection of *Helicobacter pylori*[J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2005, 36(1): 135-140.
 10. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, et al. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994[J]. Am J Surg Pathol, 1996, 20(10): 1161-1181.
 11. O'Connor A, Gisbert JP O'Morain C, et al. Treatment of *Helicobacter pylori* infection 2015[J]. Helicobacter, 2015, 20(Suppl 1): 54-61.
 12. Leja M, Axon A, Brenner H. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection[J]. Helicobacter, 2016, 21(Suppl 1): 3-7.

本文引用: 沈和德, 褚明亮, 易韦, 杨文秀. TaqMan探针法与尿素呼气试验法检测胃镜活检标本幽门螺旋杆菌的比较[J]. 临床与病理杂志, 2017, 37(3): 473-477. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.03.005

Cite this article as: SHEN Hede, CHU Mingliang, YI Wei, YANG Wenxiu. Comparison of TaqMan PCR method and Carbon-14-Urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylorus*[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2017, 37(3): 473-477. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.03.005