

幽门螺旋菌感染血清学诊断

王 正 祥

(扬州医学院微生物学教研室, 扬州 225001)

王 晓 玲 吴 岩

(扬州市苏北人民医院)

摘要 运用建立起来的酶联免疫吸附试验对 80 名胃镜确诊胃炎及消化性溃疡患者的血清中抗幽门螺旋菌 (*Helicobacter pylori*) IgG、IgA IgM 进行了检测。结果表明, 抗 *H. pylori* IgG、IgA 都可作为 *H. pylori* 感染的指标, 但前者敏感性较好(92.0%), 后者特异性较高(94.4%); 抗 *H. pylori* IgM 升高和降低与 *H. pylori* 感染无明显关系。抗 *H. pylori* IgG、IgA 水平与 *H. pylori* 感染程度无明显相关关系。正常人群中抗 *H. pylori* IgG 的 50 岁以上阳性率逐渐下降, 而 IgA 升高。

关键词 幽门螺旋菌; 血清抗体; 酶联免疫吸附试验 (ELISA)

幽门螺旋菌 (*Helicobacter pylori*) 感染与慢性胃炎及消化性溃疡密切相关^[1-3]。 *H. pylori* 感染后会激发机体产生特异性体液免疫^[4,5]。因此,不少工作者正致力于将血清中特异性抗体的检测,作为 *H. pylori* 感染的诊断途径^[6-8],但皆局限于抗 *H. pylori* IgG 的检测。作者在以前的研究中发现除特异性 IgG 外,特异性抗体 IgA 可能更能反映机体正受 *H. pylori* 感染^[9]。为此,本文运用酶联免疫吸附试验 (ELISA),对特定群体的血清抗 *H. pylori* IgG、IgA、IgM 进行半定量测定,以确定其临床价值和应 用前景。

材料与方 法

(一) 病例及血清标本

研究对象为 80 例纤维胃镜确诊的慢性胃炎及胃十二指肠溃疡初诊患者,男 51 例,女 29 例,平均年龄 38 岁(18—56 岁)。

血清标本,在作胃镜前从患者外周静脉血中分离,于 -20℃ 存放备用。

(二) 胃粘膜 *H. pylori* 感染验证

经胃镜取胃粘膜标本同时作 *H. pylori* 分离培养^[10]、涂片革兰氏染色镜检及五分钟快速尿素酶试验 (Hp-RUT, 本室研制),并用下列标准考察胃粘膜 *H. pylori* 相对感染量: (1) “+++”: 革兰氏染色见粘膜 *H. pylori* 成群分布,每视野菌量大于 30 个,或尿素酶试验呈强阳性反应,或分离培养时 *H. pylori* 菌落布满 3/4 平板; (2) “++”: 胃粘膜层 *H. pylori* 散在分布,每视野菌量在 10—30 个之间,或尿素酶试验阳性,或分离培养基上 *H. pylori* 菌落遍布 2/4 平板; (3) “+”: 胃粘膜层 *H. pylori* 散在少见,每视野少于 10 个或分离培养基上 *H. pylori* 菌落遍布 1/4 平板; (4) “—”: 胃粘膜层未见 *H. pylori* 及分离培养和尿素酶阴性。凡无法经上述标准判断 *H. pylori* 相对感染量者不在本研究范畴。

(三) *H. pylori* 菌株及其抗原制备

取在 -70℃ 保藏的 *H. pylori* 分离菌株 YC₁、YC₂ 及 YC₃^[10,11] 于 Skirrow 血平板上复

苏并培养。培养在 5.1% O₂、10% CO₂ 的微氧培养箱 (Forma 公司出品) 中进行。72 小时培养物用生理盐水洗下并用 4℃ 生理盐水洗涤两次,沉积打散后在 37℃ 下放置 24 小时,再用玻璃珠轻轻打散 10 分钟,离心取沉积用超声波破碎并反复冻融,离心取上清液,分装保存备用。

(四) ELISA

按间接 ELISA 操作步骤进行^[9]。其一般步骤为 *H. pylori* 可溶性抗原用 0.1 mol/L, pH 9.6 碳酸盐缓冲液稀释至 30 μg/ml,每孔 0.1 ml 包被聚苯乙烯板 (四川分析仪器厂出品)。10% 小牛血清封闭后 PBS-吐温 20 洗涤两次,加入 0.1 ml 稀释待检血清 (测 IgG 时血清以 1:500 稀释,测 IgA 和 IgM 时血清以 1:100 稀释)。37℃ 孵育 1.5 小时,弃去并用 PBS-吐温 20 洗涤三次,再加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记抗人 Ig (HRP-抗人 γ 链抗体, HRP-抗人 μ 链抗体, HRP-抗人 α 链抗体皆为 Bio-Rad 公司出品,工作浓度均为 1:1000) 于 37℃ 孵育 1 小时。充分洗涤后 TMB 显色 10 分钟,2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, DQ-3022 型酶标仪 (华东电子管厂出品) 读取 OD₄₅₀。

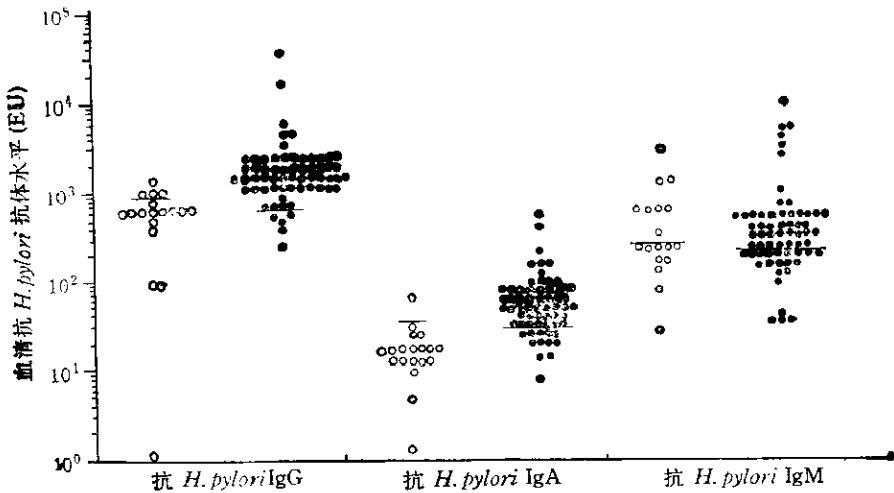
为减少 ELISA 检测过程中批内及批间误差,每份标本皆做复孔,同时在每块板及每次检测时设阴性及弱阳性孔以校正检测样本的 OD 值。

(五) ELISA 结果表示

按 Goodwin 等介绍的方法^[12]用 ELISA 单位 (EU) 表示,即以强阳性混合血清系列稀释液作 ELISA 检测,其平均 OD 值作曲线。各待检样本校正 OD 值查此曲线并换算成 EU。20 份弱阳性血清中抗 *H. pylori* IgG、IgA、IgM 的平均水平分别为 966 ± 98.8, 42 ± 8.2 和 374 ± 69.4 EU, 故以 900, 35 及 300 EU 为无 *H. pylori* 感染的血清中抗 *H. pylori* IgG、IgA 和 IgM 水平上限。

结果与讨论

(一) 血清抗 *H. pylori* 抗体与 *H. pylori* 感染

图 1 血清抗 *H. pylori* IgG、IgA、IgM 水平“●” *H. pylori* (+) “○” *H. pylori* (-)

间接 ELISA 检测血清中抗 *H. pylori* IgG、IgA 及 IgM 结果见图 1。80 份血清中的 62 份确诊 *H. pylori* 感染者中抗 *H. pylori* IgG 和 IgA 阳性者分别为 57 份 (92.0%) 和 50 份 (80.6%)，而 IgM 阳性者仅有 41 份 (66.0%)。在 18 份确诊无 *H. pylori* 感染者中抗 *H. pylori* IgG、IgA 及 IgM 阴性者分别为 14 份 (77.8%)、17 份 (94.4%) 和 10 份 (55.6%)。

H. pylori 感染的证实目前仍以 *H. pylori* 分离培养及组织中发见为依据，因此须依赖胃镜。为此，一个比较稳定而可靠的只通过检测血清中的抗 *H. pylori* 抗体，就可知患者的 *H. pylori* 感染情况是十分有意义的。近来，不少学者在这方面进行了大量的尝试^[7,8]，但基本上都局限于抗 *H. pylori* IgG 的检测。由于 *H. pylori* 感染后可使机体产生多种免疫球蛋白，现已知有 IgG、IgA 和 IgM^[9]。IgA、IgM 类抗体的临床意义怎样尚不清楚。根据上述实验结果，可以看出，特异性 IgG、IgA 对 *H. pylori* 感染皆具有诊断意义，但前者敏感性较好，后者则特异性较好，而特异性 IgM 无诊断价值。

在 *H. pylori* 阳性而血清抗 *H. pylori* IgG 阴性的 5 份血清中抗 *H. pylori* IgA 皆升高 ($\bar{X} = 73 \pm 31.4$ EU)，这可能是由于不同

个体对 *H. pylori* 的免疫应答程度和类型等存在着差异。在 4 份 *H. pylori* 阴性而血清抗 *H. pylori* IgG 阳性的血清中抗 *H. pylori* IgA 皆为阴性 ($\bar{X} = 23 \pm 7.5$ EU)，这可能是患者处于 *H. pylori* 感染恢复期以后。以上结果可以看出，血清中抗 *H. pylori* IgG 及 IgA 在诊断 *H. pylori* 感染时具有较好的互补作用，同时检测这两类抗体可更好地反映机体内 *H. pylori* 感染情况。

(二) 血清抗体水平与 *H. pylori* 感染程度

运用间接 ELISA 定量分析血清中抗 *H. pylori* IgG、IgA 水平，并同时根据 *H. pylori* 分离培养、涂片镜检或 Hp-RUT 试验，确定胃粘膜 *H. pylori* 感染程度(图 2)。不同感染程度，抗体阳性率不同，轻度(+)、中度(++)、重度(+++)感染血清抗 *H. pylori* IgG、IgA 的阳性率分别为 75% (9/12) 和 83% (10/12)、89% (8/9) 和 67% (6/9)、97.6% (40/41) 和 83% (34/41)。可见，随着感染程度的加重，血清抗 *H. pylori* IgG 阳性率有明显提高。但无论是 IgG 还是 IgA，其在血清中含量高低都与 *H. pylori* 感染程度无明显相关关系。因此，作者认为血清中抗 *H. pylori* 抗体水平不能反映机体受 *H. pylori* 的感染程度。

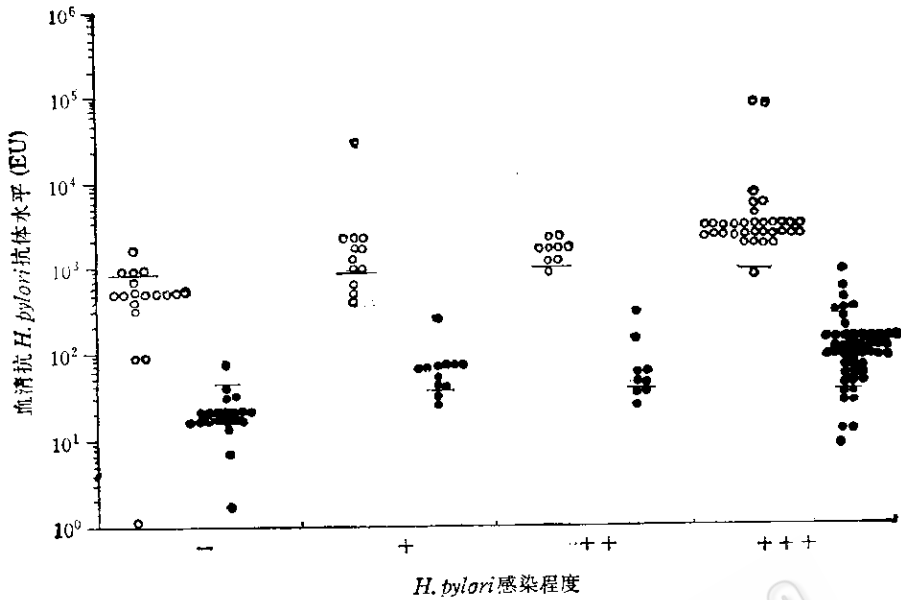


图2 血清抗 *H. pylori* 抗体水平与 *H. pylori* 感染程度的关系
“●” 抗 *H. pylori* IgA “○” 抗 *H. pylori* IgG

(三) 健康人群血清抗 *H. pylori* 抗体水平

运用 ELISA 对 210 份健康人群血清抗 *H. pylori* IgG 及 IgA 进行了测定(图3)。以 10 岁为一年龄组, 可见不同年龄组间抗 *H. pylori* IgG 及 IgA 阳性率存在一定的差异。抗 *H. pylori* IgG 在 10—19 岁年龄组中即呈现较高的阳性率(48%), 表明我国人群在这个时期已受 *H. pylori* 感染, 这比国外报道要早些^[12]。随着年龄的增长, 抗 *H. pylori* IgG 阳性率由低到高再到低, 70 岁以后抗 *H. pylori* IgG 阳

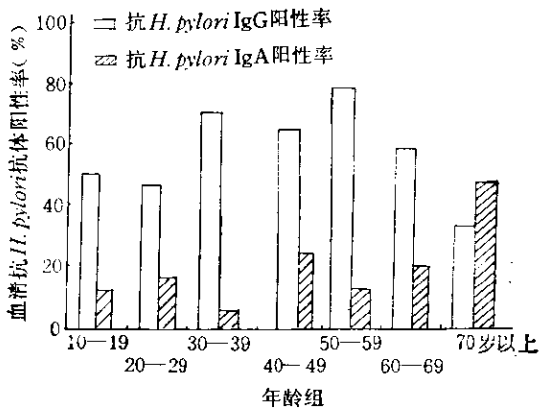


图3 健康人群抗 *H. pylori* 阳性率

性率下降很多, 对此一般认为与机体代谢机能减退有关^[13]。抗 *H. pylori* IgA 从总体而言阳性率维持较低水平下的波浪式变化, 70 岁以后阳性率超过抗 *H. pylori* IgG, 达 46%, 而这种现象无法用代谢机能减退来解释, 可能预示老年人群更易受 *H. pylori* 感染。当然, 我们所研究的人体数量还不多, 人群居住地也比较局限, 因此, 这一问题有待于今后进一步研究。

本研究还对 *H. pylori* 抗原制备过程进行了改进。血清抗 *H. pylori* 抗体检测所使用的抗原有超声破碎抗原、酸抽提抗原及纯化尿素酶抗原^[7,14,15], 但以超声破碎抗原最为常用。已知 *H. pylori* 与一些肠道细菌如空肠弯曲菌、大肠杆菌等有共同抗原, 主要为鞭毛抗原^[16]。因此, 我们在制备抗原时将鞭毛尽可能去掉。

根据本文研究结果, 我们已组建起抗 *H. pylori* IgG、IgA 检测试剂盒, 并已作为我院附院消化内科常规检测项目开展。

参 考 文 献

1. Warren JR: *Lancet*, 1:1273, 1983.
2. Blaser MJ: *Gastroenterol*, 93: 371, 1987.
3. 张振华等: 中华消化杂志, 5: 231, 1985.

4. Rathbone BJ et al.: *Gut*, 27:642, 1986.
5. Rathbone BJ et al.: *Lancet*, 1:1217, 1985.
6. Mitchell HM et al.: *Med J Aust*, 149:604, 1988.
7. Goodwin CS et al.: *J Infect Dis*, 155: 488, 1987.
8. 项兆英等: 中华消化杂志, 10: 208, 1990。
9. 王正祥等: 临床检验杂志, 9: 81, 1991。
10. 王正祥等: 扬州医学院学报, 2: 148, 1990。
11. 王正祥: 微生物学通报, 18: 118, 1991。
12. Jone DM et al.: *J Med Microbiol*, 22:57, 1986.
13. 潘志君等: 中华消化杂志, 10: 9, 1990。
14. Megraud F et al.: *J Clin Microbiol*, 27: 1870, 1989.
15. Dent JC et al.: *Lancet*, 1:1002, 1988.
16. Kuklanczyk LA et al.: *J Clin Microbiol*, 26:1411, 1988.

SERO-DIAGNOSIS OF *HELICOBACTER PYLORI* INFECTION

Wang Zhenxiang

(Department of Microbiology, Yangzhou Medical College, Yangzhou 225001)

Wang Xiaoling, Wu Yan

(Northern Jiangsu People's Hospital, Yangzhou)

Sera from 80 patients suffering from gastritis and/or digestive ulcer were examined for IgG, IgA and IgM to *Helicobacter pylori* by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Anti-*H. pylori* IgG and IgA in serum could be used for diagnosis of *H. pylori* infection, but the former had good sensitivity (92.0%) and the latter had a great specificity (94.4%). Serum anti-*H. pylori* IgM level was not associated with *H. pylori* infection. There were no remarkable relationship between *H. pylori* infection degree and levels of anti-*H. pylori* IgG IgA. The positive percentage of anti-*H. pylori* IgG of health population decreased after 50 years old but the anti-*H. pylori* IgA increased.

Key words *Helicobacter pylori*; Antibodies; ELISA