

纳氏测氨法半定量诊断 HP 感染的方法及其应用¹

陈瑞川¹ 吴艳环² 张长弓¹ 杨善民¹ 林炳珍¹

(¹厦门大学抗癌研究中心 ²厦门市中山医院 厦门 361005)

摘要 对纳氏测氨法尿素酶试验(NUT法)进行半定量标准化后,进一步建立了纳氏测氨半定量诊断人胃粘膜中幽门螺杆菌(HP)感染程度的方法,使NUT法可同时用于定性及半定量诊断HP感染及感染程度。对经过半定量检测的350例患者作分析,显示轻、中、重度感染比率分别为54.6%、34.0%及11.4%,另对其中182例慢性浅表性胃炎进行病变程度与HP感染程度的相关性分析,表明慢性浅表性胃炎的病变程度与HP的感染程度呈明确的正相关性($p < 0.05$),提示胃部疾病的恶性演变尚与感染程度有关。

关键词 幽门螺杆菌, 诊断, 尿素酶试验, 纳氏试剂

中国图书分类号 R 333.2, R378

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, HP)感染是目前世界上最常见的传染疾病之一^[1],与多种胃部疾病有直接的关系,并已被世界卫生组织列为第一类致癌因素^[2]。因此,HP的根除治疗对根治及预防胃部疾病具有重要意义。但目前所采用的大剂量三联抗生素治疗方案常产生多种严重副作用,而使患者难以坚持完成疗程^[3]。若能对患者HP感染度作出定量的评价,则可使临床医生选择适当剂量以减少不必要的副作用。但目前临床上常用的HP感染诊断技术均难以对患者的HP感染程度作出快速诊断。

我们已开发成功纳氏试剂快速检测胃粘膜活检本微量氨来诊断HP感染的方法(NUT法^④)。本文在对NUT法进行半定量标准化的基础上,进一步建立了一种半定量诊断HP感染程度的方法——纳氏测氨法半定量尿素酶试验(半定量NUT法),并以该法对HP感染阳性的人胃粘膜活检标本作了半定量诊断的初步尝试及结果分析。

1 材料与方法

1.1 标本收集及HP感染诊断

胃粘膜活检标本取自486例行胃镜检查患者,无菌条件下分别按文献报道方法进行细菌培养及粘膜涂片^[4]和半定量NUT法检测,各患者均采血样供ELLSA检测抗HP抗体(试剂盒由本单位细胞生物化学研究室提供)。细菌培养、粘膜涂片及ELLSA 3项检测结果中2项以上同时阳性者即被判定为HP感染阳性。另收集74例活检粘膜标本分别用于纳氏反应法定量测定

¹ 本文1996-11-11收到

^④ Chen-Ruichuan et al. Rapid diagnosis of *Helicobacter pylori* detection with analytic chemistry method. International Workshop & Symposium on Therapeutic Endoscopy & Gastroenterology, Shenyang, 1995, 72

氮含量及 NUT 法的半定量标准化实验. 病理组织学镜检 HP 按文献方法^[5]进行, 并按全国统一标准^[6]对浅表性胃炎进行分类.

1.2 胃活检粘膜标本氮含量测定

先以粘膜涂片法对56例活检标本快速涂片镜检. 然后立即测定氮含量: 按纳氏测氮常规方法^[7]配制纳氏试剂并制作标准曲线; 以活检粘膜块代替标准(NH₄)₂SO₄溶液同法对标本进行纳氏反应比色测定, 将 DU-65型分光光度计读值依标准曲线换算为标本含氮量(μmole/标本).

1.3 NUT 法的半定量标准化

NUT 法的线性范围测定 于未添加及添加烘干尿素的微孔中先加入50 μL/孔的无氨水, 再分别加入50 μL/孔系列浓度的(NH₄)₂SO₄标准溶液, 每孔滴加1滴纳氏试剂, 室温反应10 min 后于 MINIREADER 型酶标仪测定410 nm 的 OD 值(酶标仪以空白反应液调零: 100 μL/孔 无氨水+ 1滴纳氏试剂). 实验重复3次, 取平均 OD 值对浓度绘制曲线并分析.

NUT 半定量诊断判断标准的确定 经 NUT 法快速诊断为 HP 阳性的患者, 在同部位夹取2块标本用于半定量判断标准的确定实验, 共采集18例36块活检标本. 每例各取一块用于病理组织学镜检计数标本的相对含 HP 菌体量: 油镜下随机计数3个视野, 取其平均值, 菌体量在1~15个/视野以下为轻度感染, 在15~30个/视野为中度感染, 而大于30个/视野者为重度感染. 另一块则按下述方法进行 NUT 法测定显色反应的 OD 值, 并对结果进行分析, 界定判断标准.

1.4 半定量 NUT 检测临床活检标本

所用的检测试剂与 NUT 法相同, 检测步骤如下: 于包被尿素的微孔中滴加2滴无氨水, 待孔内尿素溶解后, 放入粘膜活检标本即滴加1滴纳氏试剂, 5 min 后取出标本目测判断结果, 若为阳性则于室温继续放置5 min, 然后于酶标仪上读取410 min OD 值. 酶标仪的调零孔液为: 2滴无氨水+ 1滴0.25 mmol/L (NH₄)₂SO₄+ 1滴纳氏试剂, 共设三孔, 室温反应10 min 后用于酶标仪调零. 结果判断: 根据上述半定量结果判断标准化结果, 凡0 < OD < 0.50者为轻度感染(+), 0.50 < OD < 1.00者为中度感染(++), 而 OD > 1.00者则为重度感染(+++).

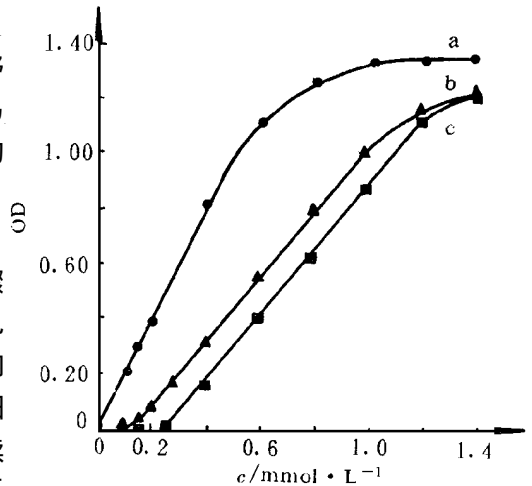


图1 NUT 反应系统反应曲线
a. 不添加尿素 b. 添加尿素
c. 以反应液调零后

Fig. 1 Reaction curve of NUT reaction system

2 结果

2.1 HP 阳性与阴性标本氮含量差别

用于测定氮含量的56例活检标本经粘膜涂片法快速检测, 确定其中20例为 HP 感染阴性, 36例为 HP 阳性, 以纳氏反应直接对这些标本进行氮含量比色测定, 结果见表1. 由表中结果可

见, HP 感染阴性及阳性标本的氨含量之间无交叉现象, 且 HP 阳性标本的氨含量之间亦差别较大(从 $2.6 \times 10^{-2} \sim 12.8 \times 10^{-2} \mu\text{mol}/\text{标本}$). 表明活检标本中氨含量的差别不仅可作为定性诊断 HP 感染的依据, 尚可作为定量或半定量诊断 HP 感染程度的依据.

表1 HP 感染阴性及阳性活检标本氨含量比较

Tab.1 Comparison of ammonia between HP positive and negative biopsy specimens

| | HP 感染 | |
|---|----------------|---------------|
| | 阴 性 | 阳 性 |
| 标本(例) | 20 | 36 |
| 氨含量($\times 10^{-2} \mu\text{mol}/\text{标本}$) | 1.0 ~ 2.4 | 2.6 ~ 12.8 |
| 平均值($\times 10^{-2} \mu\text{mol}/\text{标本}$) | 1.6 \pm 0.37 | 5.4 \pm 1.6 |

2.2 尿素对 NUT 系统线性范围的影响

见图1, 其中曲线 a 为不添加尿素时的反应曲线, 显示线性范围仅 $0 \sim 0.4 \mu\text{mol}/\text{L}$; 曲线 b 为添加尿素后的反应曲线, 显示线性范围扩大到 $0.15 \sim 1.0 \mu\text{mol}/\text{L}$; 当用 $50 \mu\text{L}/\text{孔}$ $0.25 \text{ mmol}/\text{L}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 标准溶液(相当于 $2.5 \times 10^{-2} \mu\text{mol}/\text{孔}$ 的 NH_4^+) 的反应液对酶标仪调零后, 再测定曲线 b 的各反应孔 OD 值得曲线 c, 显示其线性范围为 $0.25 \sim 1.20 \text{ mmol}/\text{L}$, 线性宽度未受影响, 表明 NUT 反应系统可用于定量或半定量快速测定氨含量.

2.3 半定量 NUT 结果判断标准的确定

对 18 例 32 块活检标本分别进行 NUT 测定反应液 OD 值及病理组织学镜检计数 HP 相对菌体含量, 并按病理组织学镜检计数的判断标准对 NUT 测定结果进行比较. 除 2 例外, 其余 16 例的 NUT 测定 OD 值分布可归类为: 轻度感染者 OD 值分布在 $0 < \text{OD} < 0.05$; 中度感染者 OD 值分布在 $0.50 < \text{OD} < 1.00$, 重度感染者的 OD 值均大于 1.00, 符合率为 88.90%, 因此在后期的检测中, 结果的判断即以此为标准. 其中 2 例例外者, 可能是由于所夹取的两块粘膜大小不一致或未在同部位采集粘膜标本所致.

2.4 半定量 NUT 临床检测诊断结果分析

在 485 例胃粘膜标本中, 被判定为 HP 感染阳性者为 368 例, HP 感染率为 75.9%. 其中 350 例标本进行半定量 NUT 法测定, 结果显示呈轻度 HP 感染者为 54.6% (191/350), 属中度感染者为 34.0% (119/350), 而重度感染者仅占 11.4% (40/350), 可见大多数 HP 感染属于轻、中度 HP 感染(88.6%). 在这些经半定量检测的标本中, 经病理组织学诊断为慢性浅表性胃炎者 182 例, 按其病变程度及相应的 HP 感染程度进行初步分类比较(见表 2), 显示 87.3% 的轻度浅表性胃炎患者为轻度 HP 感染, 无重度感染者; 63.2% 的中度浅表性胃炎为中度 HP 感染, 重度感染仅 10.5%, 而慢性重度浅表胃炎患者中 55.6% 呈重度 HP 感染, 呈轻度感染者仅 7.4%. 可见在慢性浅表胃炎 HP 感染阳性的人群中, HP 感染程度与相应的胃炎病变程度呈现明确的对应性($p < 0.05$).

表2 HP 感染程度与各类胃部疾病的相关性

Tab.2 Relationship between HP infection levels and gastric disease

| 疾病类型 | 例数 | HP 感染程度(%) | | |
|---------|-------|------------|-----------|-----------|
| | | 轻度 | 中度 | 重度 |
| 慢性浅表性胃炎 | (182) | | | |
| 轻度 | 79 | 69(87.34) | 10(12.66) | 0(0.00) |
| 中度 | 76 | 20(26.32) | 48(63.16) | 8(10.53) |
| 重度 | 27 | 2(7.14) | 10(37.04) | 15(55.56) |
| 慢性萎缩性胃炎 | (59) | | | |
| 轻度 | 36 | 26(72.22) | 6(16.67) | 4(11.11) |
| 中度 | 16 | 14(87.50) | 2(12.50) | 0(0.00) |
| 重度 | 7 | 7(100.00) | 0(0.00) | 0(0.00) |
| 胃溃疡 | 22 | 5(22.73) | 14(63.64) | 3(13.64) |
| 十二指肠溃疡 | 61 | 26(42.62) | 25(40.98) | 10(16.39) |
| 肠化生 | 15 | 12(80.00) | 3(20.00) | 0(0.00) |
| 不典型增生 | 7 | 6(85.71) | 1(14.29) | 0(0.00) |
| 胃癌 | 4 | 4(100.00) | 0(0.00) | 0(0.00) |
| 总计 | 350 | 191 | 119 | 40 |

3 讨论

最近, Furuta 等^[8]报道以定量 PCR 来定量诊断胃活检粘膜上 HP 的感染程度, 认为精确评估 HP 感染程度是一项有价值的临床诊断指标, 但基于尿素酶试验原理或氨测定方法的定量或半定量快速诊断 HP 感染程度尚未见有报道. 由于胃酸的中和作用, HP 尿素酶分解胃液尿素所形成的 HN_3 将不断地被胃酸所中和生成 NH_4Cl 并进入胃液^[9], 而在胃粘膜 HP 定植灶内的氨含量则应维持动态平衡并与 HP 菌体数量成正比. 本文的研究结果直接证实了 HP 感染者胃粘膜 HP 定植灶的氨含量不仅高于非感染者, 且与 HP 的相对菌体数量成正比(见表 1), 该结果揭示可通过测定活检标本氨含量来定性及定量诊断 HP 感染及感染程度. 但在研究过程中也发现胃镜夹取的粘膜大小并非均一, 要进行严格的定量诊断既不可能也没必要. 我们对判断标准依病理组织学镜检计数结果人为划分为轻、中、重度感染三级标准后, NUT 检测的结果与计数的结果符合率可达 88.9%, 从而提高了结果判断的可靠性及重复性. 因此, 只需对 NUT 反应系统的检测步骤略加修改并以酶标仪进行结果测定, 即可使该反应系统既能用于定性诊断又可进行半定量诊断, 若以标准色板代替酶标仪进行比色目测, 尚可省去酶标仪, 为临床实际应用提供更大的方便.

呈正相关的现象,提示 HP 感染程度越重,上皮微局部糜烂病变也越重。Tytgat^[1]的研究结果也表明胃粘膜上 HP 感染程度与粘膜炎症的程度相对应。本文以半定量 NUT 法证实 HP 感染程度与慢性浅表性胃炎的病变程度具明确的相关性($p < 0.05$),与上述报道结果相符,提示胃部疾病的恶化演变不仅与 HP 的持续感染有关^[1],而且与 HP 的感染程度有关。其诊断结果对于指导临床医生用药及病因学分析等可能有一定的实用价值。但 HP 在胃粘膜上一般呈灶性分布,取材于活检粘膜的 HP 感染程度分析是否能确切反映胃内 HP 感染全貌尚需进一步的研究。

参 考 文 献

- 1 Michell H M et al. Epidemiology of *Helicobacter Pylori* in southern China : Identification of early childhood as critical period for acquisition. *J. Infect. Disease*, 1992, 166: 149 ~ 154
- 2 张锦坤等. 幽门螺杆菌研究的十年里程碑. 中华消化杂志, 1995, 15(增刊): 3 ~ 4
- 3 贾博琦. 关于胃十二指肠溃疡时幽门螺杆菌感染的根除. 中华消化杂志, 1995, 15(增刊): 1 ~ 2
- 4 Thillainayaham A V et al. Diagnostic efficiency of an ultrarapid endoscopy room test for *Helicobacter pylori*. *Gut*, 1991, 32: 467 ~ 469
- 5 周殿元等编. 幽门螺杆菌与胃十二指肠疾病. 上海: 上海科学技术出版社, 1992: 4677 ~ 475
- 6 全国胃癌研究协作组病理组. 胃及十二指肠疾病. 沈阳: 辽宁人民出版社, 1981: 133 ~ 134
- 7 福州部队总医院编. 临床医学检验. 上海: 上海科技出版社, 1984: 300 ~ 310
- 8 Furuta T et al. Quantitative study of *Helicobacter pylori* in gastric mucus by competitive PCR using synthetic DNA fragments. *J. Clin. Microbiol.*, 1996, 34: 2 241 ~ 2 425
- 9 Neithercut W D et al. Detection of HP infection of the gastric mucosa by measurement of gastric aspartate, NH_3 and urea concentration. *Gut*, 1991, 32: 973 ~ 976
- 10 周殿元等编. 幽门螺杆菌与胃十二指肠疾病. 上海: 上海科学技术出版社, 1992: 237 ~ 245
- 11 Tytgat G N J. Does the stomach adapt to *Helicobacter pylori*. *Scand. J. Gastroenterol.*, 1992, 27(suppl. 193): 28

Nessler's NH_3 Detection Method for Semi-quantitative Diagnosis of *H. pylori* Infection Levels and Its Application

¹Chen Ruichuan ²Wu Yanhuan ¹Zhen Changgong ¹Yang Shanmin ¹Lin Binshen
(¹Cancer Res. Center., Xiamen Univ., ²Xiamen Zhongshan Hospital, Xiamen 361005)

Abstract A new method for semi-quantitative diagnosing *Helicobacter pylori* (HP) infection levels in human gastric mucus was derived from the NUT system which was based on the principle of Nessler's reaction. The results of semi-quantitative diagnosis of 350 patients showed that the portions of light, middle and heavy HP infection level were 54.6%, 34.0% and 11.4% respectively. The analysis of clinical test results revealed that the corresponding relationship between HP infection level and the pathological change of chronic superficial gastritis was considerably definite ($p < 0.05$). Also, the detection procedure proved that the NUT system could be used for both qualitative and semi-quantitative diagnosis with one biopsy specimen in the same time, which may be convenient and useful for daily clinical diagnosis of HP infection.