

## • 技术方法 •

# 幽门螺杆菌全菌抗原与尿素酶纯化抗原 ELISA 检测在人群血清学诊断中的应用

陈晶晶<sup>1</sup> 杨昭徐<sup>2</sup> 蒋秀高<sup>1</sup> 张建中<sup>1</sup> 梁丕霞<sup>2</sup>

**摘要** 用纯化的 Hp 抗原对 676 例各型胃病患者进行了血清抗幽门螺杆菌尿素酶抗体的检测。实验证明其特异性为 96%，敏感性为 98%。血清学 ELISA 检测法，尤其适宜于流行病学调查，还可用于药物治疗效果的观察和筛选非溃疡性消化不良。

**关键词** 幽门螺杆菌 尿素酶 酶联免疫法

**A Comparison of Purified Urease Antigen and Whole Cell Antigen of *Helicobacter pylori* by ELISA Test — Study on the Application and Serum Diagnoses of *Helicobacter pylori* Urease Diagnostic Reagent Chen Jing-jing, Yang Zhao-xu, Jiang Xiu-gao, et al. Intitute of Epidemiology & Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 102206**

**Abstract** A useful assay for epidemiological survey of *H. pylori* infection was reported, using the urease antigen of *H. pylori* to detect the anti-urease antibody in sera from 676 patients suffered from gastropathy with ELISA technique, and compared with whole cell antigen. Results showed that the purified urease antigen was better than whole cell antigen. The partially purified urease antigens rapid diagnostic reagent of *H. pylori* was examined in hospital/institution and compared with whole-cell antigens. Results of sera from 676 *H. pylori*-positive gastritis and non-ulcer dyspepsia patients being tested showed that specificity and sensitivity of ELISA were 96% and 98% respectively. It seemed to be very useful for epidemiological studies on *H. pylori* infection. The use of ELISA in the detection of IgG antibodies against *H. pylori* was also sensitive, specific and rapid in assessing the improvement of both acute and chronic inflammation, cleaning of bacteria and the antibody titers after treatment, so as recognized an ideal diagnostic method.

**Key words** *Helicobacter pylori* Urease Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

大量研究资料证明，幽门螺杆菌(*H. pylori*, Hp)是人类慢性胃炎和消化性溃疡的重要致病菌<sup>[1]</sup>且与胃癌的发生密切相关。它可通过胃粘膜活检组织尿素酶试验和幽门螺杆菌培养来诊断其感染，但病人必须接受胃镜检查，由于检查时痛苦较大，更不易被复查

和随访患者接受。幽门螺杆菌的尿素酶抗原可刺激机体产生高滴度的循环抗体，其中 IgG 抗体滴度在未经系统抗幽门螺杆菌治疗的人群中，能确切地反映人体内目前有无幽门螺杆菌感染；在感染病人经抗幽门螺杆菌治疗杀灭了体内幽门螺杆菌 3~6 个月后，IgG 抗体滴度能下降 25%~50%，因此可客观地反映治疗效果<sup>[2]</sup>。

## 材料和方法

1 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所  
北京 102206

2 北京天坛医院

本课题为国家自然科学基金资助项目

一、血液标本：676 例患者，平均年龄

43.5 岁 (18~87 岁), 主要症状为上腹痛及 (或) 食后上腹胀、恶心或呕吐、烧灼感、反酸、嗳气、食欲不振。少数病例经胃镜检查, 结果正常或胃炎等器质性病变。采取肘静脉血 2ml 进行 Hp 抗体检测。

## 二、Hp 尿素酶纯化抗原的制备:

1. 菌株选择及细菌培养: 实验选择尿素酶活性高的 Hp 菌, 接种含 6% 脱纤维羊血的布氏平皿中, 置混合气体 (5% O<sub>2</sub>、10% CO<sub>2</sub> 和 85% N<sub>2</sub>) 环境中, 37℃ 培养 3 天后收菌。

2. 细菌破碎及预处理: 将收集之 Hp 菌用生理盐水洗 2 遍后, 用凝胶过滤洗脱液将菌稀释至 15 亿菌/ml, 用超声波在冰浴中进行破碎后, 经高速离心 12000r/min 30 分钟后取上清备用。

3. 凝胶过滤用 Sephadex G200 柱进行, 洗脱液测定尿素酶活性并将其活性峰与相应菌全菌蛋白, 上柱液及离心沉渣进行 SDS-PAGE 分析, 观察尿素酶提纯效果, Western blot 分析是将尿素酶活性峰, 经 SDS-PAGE 将各蛋白分离后, 经电泳将蛋白转移到硝酸纤维膜上, 处理、染色照相, 并记录结果。

三、血清抗 Hp 尿素酶抗体的检测: 采用 ELISA (按照 Kesumen 法改良), 检测对象为门诊受诊的各类胃病患者共 676 例, 经纯化尿素酶抗原包被的 40 孔 (或 96 孔) 酶标板, 用 0.5% 明胶 0.1ml 37℃ 作 30 分钟封闭, 用洗涤液洗板三次, 加入待检血清并以特异性抗 HpU 抗体的含量为 66μg/ml 标准阳性血清作为判断标准。加二抗 HRP SPA, 用 PB ST20 稀释后, 每孔加入 0.1ml, 37℃ 孵育 30 分钟, 洗板三次后, 在避光条件下与底物液中加入适量 30% 过氧化氢及邻苯二胺, 溶解后, 每孔加入 0.1ml, 37℃ 孵育, 显色 5~10 分钟, 加 2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止液每孔 0.1ml, 用 492nm 波长测吸光度 (A) [旧称光密度 (OD), 下同] (或目测)。目测观察: 颜色深于或等于标准阳性对照者为阳性, 颜色浅于标准阳性对照者为阴性。仪器测定: 以酶标

仪测定各孔吸光度 (A) 大于或等于标准阳性对照者为阳性, 吸光度 (A) 小于标准阳性对照者为阴性。当标准阳性对照吸光度 (A) 大于或等于 0.2 时, 若阴性对照吸光度 (A) 小于 0.1 则试剂盒有效。ELISA 特异性经吸收试验鉴定, 确定与空肠弯曲菌 (*C. jejuni*)、结肠弯曲菌 (*C. coli*) 及海鸥弯曲菌 (*C. laris*) 无交叉反应。

## 结 果

一、HpU 抗原纯化: 应用 Sephadex G200 柱, 从 Hp 超声破碎物离心上清液中, 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他杂蛋白成分, 经 Western blot 分析, 证明所提纯的 Hp 尿素酶抗原仍具有良好的抗原性。

为了检测 HpU 纯化抗原的敏感性与特异性, 实验选择经 Hp 全菌蛋白抗原对人血清特异性抗 Hp-IgG 抗体检测的阳性及阴性各类胃病 (慢性浅表性胃炎、慢性萎缩性胃炎等) 患者血清各 50 份进行对比研究, 结果用混合多型 HpU 纯化抗原比全菌蛋白抗原为敏感, 且特异性高 (表 1)。

表 1 Hp 全菌抗原与尿素酶纯化  
抗原 ELISA 法检测比较

	Hp 全菌抗原		
	阳性份数	阴性份数	合计
HpU 抗原	阳性份数	50	0
	阴性份数	6	44
合 计	56	44	100

$$\chi^2 = 6.38, P > 0.025$$

二、人血清特异性抗 HpU IgG 抗体的测定: 用目测和酶标仪测定胃病患者人群中血清抗 HpU IgG 抗体。按表 2 分析, 以特异性抗 HpU 抗体的含量为 66μg/ml 标准阳性血清作为判断标准, ELISA 法与免疫印迹分析

对照，敏感性为 98%，特异性为 96%。

表 2 676 份病人血清抗幽门螺杆菌尿素酶抗体 ELISA 检测结果

	ELISA		合计
	阳性份数	阴性份数	
Western blots 阳性份数	375	8	383
阴性份数	19	274	293
合 计	394	282	676

## 讨 论

幽门螺杆菌是人胃内唯一产生高活性尿素酶的细菌，可通过检测胃内尿素酶的活性来诊断幽门螺杆菌感染，现已发展了多种检测方法，如<sup>14</sup>N 尿素酶排泄试验。<sup>13</sup>C 或<sup>14</sup>C-呼吸试验，均有较高的敏感性和特异性，但是以上几种方法均需要特殊的检验设备和技术，不易在基层推广和应用，因此血清中 Hp 特异性抗体的检测，在检出与 Hp 相关性胃炎的诊断中尤为重要，与侵入性诊断方法或呼吸试验相比，血清学诊断易为患者接受，而 ELISA 法则更为常用，若用患者自身菌株作抗原较用标准菌株作抗原在 ELISA 试验中更能观察到明显的 IgG 滴度。

目前应用于 ELISA 抗原有三类：①全细胞抗原和超声粉碎物抗原；②部分纯化抗原；③高度纯化抗原。Hp 全菌细胞和未纯化的细胞超声波粉碎物抗原，用于 Hp 感染的血清学诊断一般特异性不高。用 Hp 多种抗原制品的混合物纯化的纯化尿素酶组分抗原，则可获较高的特异性与敏感性。

实验采用 ELISA 法对 676 份人血清进行了抗 HpU 抗体的检测，以特异性抗 HpU 抗体的含量为 66μg/ml 标准阳性血清作为判断标准，其敏感性及特异性各为 98% 及 96%。

对于 Hp 阳性的慢性胃炎，抗菌治疗是

一种新的治疗方法，我们已在研究表明慢性胃炎，尤其是活动性胃炎与 Hp 感染更是密切相关，在抗菌治疗前后用 ELISA 法检测血清 Hp 抗体，抗菌治疗后抗体滴度明显下降，与 Hp 清除有关，炎症程度减轻（活动性胃炎症消失）具有相关性<sup>[3]</sup>。非溃疡性消化不良（NUD）是常见的临床症候群<sup>[4]</sup>，目前对其病因认识尚不清楚，一般认为是多样性（heterogeneous）<sup>[5]</sup>，其中慢性胃炎占很大比例，而与 Hp 感染密切相关，经胃镜胃粘膜活检有半数以上有 Hp 存在，故认为 Hp 在 NUD 病人中有一定致病作用。人群血清抗 HpU 抗体 ELISA 法检查，属无创伤性检测，可用作初筛检查，以后随访，可免去病人多次胃镜检查之苦，节省不必要的检查费用，减少交叉感染机会，有较好的依从性（compliance）和可靠性。总之，用血清抗 HpU 抗体 ELISA 法检测，对于慢性胃炎及非溃疡性消化不良中 Hp 抗体的检出，抗菌治疗方案的确定，抗菌治疗方案的随访与评价及流行病学调查研究，是一项简便、可靠、实用的方法。

## 参 考 文 献

- 张振华. 胃粘膜活检中弯曲菌样细菌的检出. 中华消化杂志, 1985, 5 (4) : 231.
- Alexander M, Hirschl. Kinetics of specific IgG antibody for monitoring the effect of anti-Helicobacter pylori chemotherapy. J Infect Dis, 1993, 168 (3) : 763.
- 杨昭徐, 陈晶晶, 侯曼苓. 诺氟沙星治疗幽门螺杆菌阳性胃炎 142 例及治疗后抗体滴度. 新药与临床, 1993, 12 (1) : 14.
- 张锦坤. 非溃疡性消化不良与幽门弯曲菌感染. 实用内科杂志, 1989, 8 : 395.
- Lambert JR. Campylobacter pylori a role in non-ulcer dyspepsia? Scanned J Gastroenterol, 1989, 24 (supple 160) : 7.

（收稿：1995-09-05 修回：1995-10-08）