

• 论 著 •

幽门螺杆菌 Warthin-Starry 染色法和 qRT-PCR 检测结果比较及相关性分析

张少华¹, 肖 青², 梁健智¹

(1. 广西梧州市红十字会医院检验科 543002; 2. 广西玉林市卫生学校附属医院检验科 537000)

摘 要:目的 比较 Warthin-Starry 染色法(W-S 染色法)和定量实时聚合酶链反应(qRT-PCR)检测幽门螺杆菌(HP)的阳性率及两种检测方法相关性。方法 选择 106 例该院行胃镜检查患者,取胃黏膜组织分别用 W-S 染色法和 qRT-PCR 检测 HP。结果 W-S 染色法和 qRT-PCR 检测 HP 阳性率分别为 64.2%和 67.9%,差异无统计学意义($P=0.205$);两种检测方法具有较好的相关性($r=0.895$, $P<0.05$)。结论 W-S 染色法与 qRT-PCR 检测 HP 具有相似的阳性率,且价格更便宜,值得临床推广。

关键词:改良 Warthin-Starry 染色法; 定量实时聚合酶链反应; 螺杆菌,幽门

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.15.025

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)15-1712-02

Comparison and correlation analysis of modified Warthin-Starry staining and qRT-PCR for the detection of Helicobacter pylori

Zhang Shaohua¹, Xiao Qing², Liang Jianzhi¹

(1. Clinical laboratory of Wuzhou Red Cross Hospital, Wuzhou Guangxi 543002, China;

2. Clinical Laboratory of Yulin Affiliated Hospital of Health School, Yulin, Guangxi 537000, China)

Abstract: Objective To compare the positive rates of and association between Warthin-Starry staining and qRT-PCR for the detection of Helicobacter pylori (HP). **Methods** 106 patients were enrolled. Gastric mucosa tissues were extracted by gastric endoscopy examination and detected for HP by using Warthin-Starry staining and qRT-PCR respectively. **Results** Positive rates of Warthin-Starry staining and qRT-PCR were 64.2% and 67.9%, respectively, and there were no significant differences of the positive rates ($P=0.205$). There was fine correlation between these two methods ($r=0.895$, $P<0.05$). **Conclusion** The positive rates of Warthin-Starry staining and qRT-PCR for the detection of HP were not statistically different, while Warthin-Starry staining was more cheaper and worthy for widely clinical application.

Key words: modified Warthin-Starry staining; qRT-PCR; Helicobacter pylori

Warthin-Starry 染色法(W-S 染色法)是一种经典的染色方法^[1],与其他传统染色法相比,具有染色对比度高的优点^[2],近年来被应用于幽门螺杆菌(HP)的检测。也有报道采用定量实时聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 HP 16S rRNA 基因,具有灵敏度高和特异性好的优点^[3-4]。本研究拟同时采用 W-S 染色法和 qRT-PCR 法,比较两种方法对 HP 感染诊断的阳性率以及两种检测方法的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集从 2008 年 3 月至 2010 年 3 月因上消化道不适在梧州市红十字会医院行胃镜检查,并取胃黏膜组织进行检查患者共 106 例,其中男性 68 例,女性 38 例,年龄(45±15)岁,所有入选者均明确排除合并胃肠道肿瘤。经胃镜及胃组织检查明确诊断胃溃疡患者 74 例,慢性胃炎患者 30 例,2 例为急性胃炎。患者胃黏膜标本分别用于 W-S 染色法和 qRT-PCR 检查,每份标本均重复检测 3 次。

1.2 仪器与试剂 Trizol、5×逆转录缓冲液、5×SYBR Green I PCR 缓冲液、dNTPs、MMLV、逆转录酶、Taq 酶;ABI 3900 台式高通量 DNA 合成仪、科大创新 HC-3018R 高速冷冻离心机、ABI 9700 PCR 仪、ABI 7500 全自动荧光定量 PCR 仪。

1.3 W-S 染色法

1.3.1 试剂配制及染色方法 (1)切片准备:将胃黏膜标本置于 10%甲醛浸泡 24 h 后石蜡包埋;(2)包埋:常规石蜡包埋切片 4 μm;(3)染色液的配制:酸化水由双蒸水加 1%柠檬酸液配制,调节 pH 值为 4.0;5%明胶液由明胶 5 g、加酸化水 100 mL 溶解配制;显色液由 2%硝酸银溶液 1.5 mL、5%明胶液 3.75 mL、0.15%对苯二酚液 2 mL 混匀配制而成。

1.3.2 染色程序 (1)石蜡切片脱蜡至蒸馏水;(2)1%硝酸银溶液在 45℃水浴浸染 30 min;(3)显色液显色 8~15 min,待组织呈浅蓝色,同时显色剂变成深蓝色时即终止显色;(4)55℃

蒸馏水冲洗;(5)脱水、透明、中性树胶封片。

1.4 qRT-PCR

1.4.1 组织总 RNA 提取 (1)组织中加入 Trizol 1 mL 后充分研磨;(2)加入氯仿 0.2 mL,15~30℃孵育 2~3 min,4℃12 000 r/min 离心 15 min,取上清液至 Eppendorf 管;(3)加入等体积异丙醇,15~30℃孵育 10 min,4℃12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液;(4)75%乙醇(含 DEPC 水)洗涤沉淀 1 次,4℃7 500 r/min 离心 5 min,弃乙醇层;(5)真空干燥 5~10 min,加二乙基焦碳酸酯(DEPC)水溶解 RNA,−80℃保存备用。

1.4.2 逆转录反应 反应体系:5×逆转录缓冲液 4 μL,下游引物(10 pmol/μL)0.4 μL, dNTPs(10 mmol/L)0.5 μL, MMLV 逆转录酶(200 U/μL)1 μL, DEPC 水 10.1 μL, RNA 模板 4 μL,总体积 20 μL。反应条件:37℃1 h,然后 95℃3 min。

1.4.3 qRT-PCR 反应 (1)阳性标准品及其梯度的制备;(2)待测样本和阳性标准品按以下反应体系进行:5×SYBR Green I PCR 缓冲液 10 μL,上游引物 F(10 pmol/μL)1 μL,下游引物 R(10 pmol/μL)1 μL, dNTPs(10 mmol/L)1 μL, Taq 酶(3 U/μL)1 μL, cDNA 5 μL, 双蒸水 31 μL,总体积 50 μL;(3)反应条件为:93℃3 min,93℃30 s,55℃45 s,72℃45 s,共 40 个循环;(4)HP 16S rRNA 引物系列:正向引物 5'-TCT GTG CCA CCT GGG AGT CT-3',反向引物 5'-TGT CCC CAC AAT GTA GCC CT-3';甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)(内参基因)正向引物 5'-TGG TCT ACA TGT TCC AGT ATG ACT-3',反向引物 5'-CCA TTT GAT GTT AGC GGG ATC TC-3'。

1.5 统计学处理 计数资料采用百分率表示,组间比较采用 Pearson 卡方检验,同时采用 Spearman 秩相关分析两种检测方

法的关联性;所有统计分析均采用 SPSS15.0 统计软件进行, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 HP 在胃组织中的感染 染色后,可见大量染色呈深蓝色的杆状 HP 位于胃腺体内,与周围正常组织对比明显,见图 1。

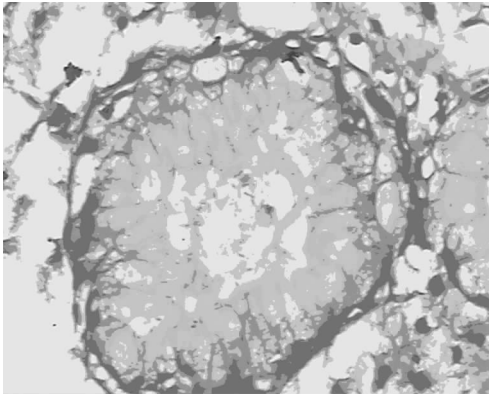


图 1 HP 在胃组织中的感染(400 倍)

2.2 qRT-PCR 标准扩增曲线和回归曲线 本实验所采用的模板浓度均出现阳性扩增,模板浓度与扩增阳性 Ct 值间相关系数 $r^2 = 0.956$,标准回归曲线 $Y = -0.533 \lg X + 28.967$ 。

2.2 W-S 染色法和 qRT-PCR 检测 HP 的阳性率比较 两种检测方法阳性率分别为 64.2% 和 67.9%,qRT-PCR 法阳性率高于改良 W-S 染色法,但差异无统计学意义($P = 0.205$)。

2.3 W-S 染色法和 qRT-PCR 关联性分析 W-S 染色法和 qRT-PCR 两种检测方法阳性符合例数为 66 例,阴性符合例数为 32 例,W-S 染色法和 qRT-PCR 法关联系数 $r = 0.895$ ($P < 0.05$),提示两种检测方法,具有较好的相关性。

3 讨 论

本研究结果表明,采用 W-S 染色法和 qRT-PCR 检测 HP 具有相似的阳性率和阴性率,且两种检测方法具有较好的相关性($r = 0.895$, $P < 0.05$),提示两种检测方法对 HP 检测效率相似。

W-S 染色法是利用 HP 具有嗜银性,在一定条件下能够吸附硝酸银溶液中的银离子,经显色剂孵育处理后,被 HP 吸附

的银离子能够还原为金属银而使 HP 显深蓝色,在不同颜色背景下具有较好的分辨率,能够提高 HP 的检出率,是一种简便又经济的方法,适合在基层医院开展和普及^[5]。既往主要使用普通 PCR 用于分子生物学检测,与传统 PCR 相比,qRT-PCR 具有灵敏度高、特异性强和重复性好的优点^[6-7],近 10 年来 qRT-PCR 也被广泛应用于分子生物学指标的检测,且采用 qRT-PCR 检测 HP 16S rRNA 具有较好的诊断价值。

本研究首次比较了 W-S 染色法与 qRT-PCR 检测 HP 的阳性率,并评估了两种检测方法的关联性。结果显示,qRT-PCR 阳性率稍高于 W-S 染色法,但差异无统计学意义($P = 0.205$)。根据既往经验及本研究结果,笔者认为 W-S 染色法具有与 qRT-PCR 相似的阳性率,主要是因为 W-S 法染色后 HP 呈现蓝色或深蓝色,在不同颜色背景下具有较高的分辨率^[8-10]。采用 Spearman 秩相关分析提示 W-S 染色法和 qRT-PCR 相关系数 $r = 0.895$ ($P < 0.05$),说明两种检测方法关联性较好。

综上所述,W-S 染色与 qRT-PCR 法具有相似阳性检出率,相关性好,且与 qRT-PCR 相比,W-S 染色法更便宜,适宜在基层医院推广。

参考文献

- [1] 彭霞.改良 W-S 银染法在幽门螺杆菌染色中的应用[J].贵阳中医学院学报,2008,30(3):45.
- [2] 王飞波.胃幽门螺杆菌病理学检测方法的比较[J].现代实用医学,2002,14(5):246-247.
- [3] 王安国,张义东.荧光定量 PCR 快速检测幽门螺杆菌的研究[J].中国卫生检验杂志,2008,18(12):2625-2660.
- [4] 任英霞,崔东来,张玉琢.用荧光定量 PCR 法检测胃黏膜诊断 H. pylori 感染[J].现代中西医结合杂志,2008,17(18):2810-2811.
- [5] 辛强.改良 Warthin-Starry 银染色法在幽门螺杆菌检测中的应用[J].中国卫生检验杂志,2008,18(11):2345.
- [6] 聂常富,何蕴韶,高劲松.荧光定量逆转录聚合酶链反应检测外周血 Wilm's 瘤基因的表达[J].中华检验医学杂志,2001,24(5):309-310.
- [7] 张如华,徐双兵,胡开顺,等.幽门螺杆菌尿素酶基因的克隆及表达[J].分子诊断与治疗杂志,2010,2(6):387-389.

(收稿日期:2011-06-02)

(上接第 1711 页)

为临床合理使用抗菌药物提供重要依据。

参考文献

- [1] 余章斌,朱春,韩树萍,等.降钙素原对新生儿脓毒症诊断价值的 Meta 分析[J].中国循证儿科杂志,2010,5(1):25-34.
- [2] 余加林,吴仕孝.新生儿败血症诊疗方案[J].中华儿科杂志,2003,41(12):897-899.
- [3] Davies JK, Gibbs R. Obstetric factors associated with infection of the fetus and newborn infant[M]. Philadelphia: WB Saunders, 2001:1345-1370.
- [4] 李耿,伍佰祥.新生儿细菌感染标记物的研究进展[J].中华儿科杂志,2007,45(9):674-677.
- [5] Kafetzis DA, Tigani GS, Costalos C. Immunologic marker in the neonatal period Diagnostic value and accuracy in infection[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2005, 5(2): 231-239.
- [6] Chiesa C, Pellegrini G, Panero A, et al. C-reactive protein, interleukin-6, and procalcitonin in the immediate postnatal period: influence of illness severity, risk status, antenatal and perinatal complications and infection[J]. Clin Chem, 2003, 49(1): 60-68.
- [7] Assumma M, Signore F. Procalcitonin concentrations in term de-

- livering mothers and healthy offspring: a longitudinal study[J]. Clin Chem, 2000, 46(10): 1583-1587.
- [8] 刘雪梅,余健,罗莉漫.新生儿败血症中血清降钙素原的动态变化[J].中国当代儿科杂志,2001,3(3):221-223.
- [9] López Sastre JB, Solís DP, Serradilla VR, et al. Evaluation of procalcitonin for diagnosis of neonatal sepsis of vertical transmission[J]. BMC Pediatr, 2007, 7: 9.
- [10] 李齐岳.现代儿科诊疗常手册[M].北京:北京医科大学出版社,1994:40-41.
- [11] 吴静,刘敬,封志纯,等.胎膜早破对健康新生儿危害的研究[J].中华儿科杂志,2009,47(6):452-456.
- [12] Guibourdenche J, Bedu A, Petzold L, et al. Biochemical markers of neonatal sepsis: value of procalcitonin in the emergency setting[J]. Ann Clin Biochem, 2002, 39(Pt 2): 130-135.
- [13] López Sastre JB, Pérez Solís D, Roqués Serradilla V, et al. Procalcitonin is not sufficiently reliable to be the sole marker of neonatal sepsis of nosocomial origin[J]. BMC Pediatr, 2006, 6: 16.
- [14] 苏卫东,翟尔力,黄育丹,等.降钙素原在诊断新生儿感染中的应用价值[J].中华围产医学杂志,2006,9(1):21-23.

(收稿日期:2011-05-18)