

# 基于荧光 ROSE 的幽门螺杆菌实时可视化技术在 HP 除菌治疗全程动态评估中的应用研究

张林，侯艳红，李炳慧，吴凯，张静，杨汨  
(中国人民解放军总医院第一医学中心消化内科医学部，北京 100091)

## 摘要

背景：荧光快速现场评价（ROSE）可实时可视化幽门螺杆菌（HP）并区分活菌（黄绿色）与死菌（橘红色），但其在除菌治疗全过程中的细菌活性及形态演变规律尚不明确。目的：动态观察 HP 阳性患者除菌治疗不同阶段的细菌活性、球形形态变化，同步对比内镜及尿素呼气试验（UBT）结果，明确荧光 ROSE 在疗效评估与复发预警中的价值。方法：纳入 224 例 HP 阳性接受标准铋剂四联疗法（14 天）的患者，分为治疗前（A 组，n=62）、治疗中（B 组，n=55）、治疗后早期（C 组，n=58）、治疗后晚期（D 组，n=49）。所有患者行胃镜+荧光 ROSE 检测，记录活菌/死菌比例、球化率、内镜分型及 UBT OD 值。结果：活菌比例从 A 组（ $57.3 \pm 11.2\%$ ）降至 C 组（ $5.8 \pm 3.9\%$ ）；D 组中根除成功亚组（n=36）活菌近于零，复发/耐药亚组（n=13）回升至  $38.2 \pm 10.5\%$ （ $P < 0.001$ ）。球化率在 B 组显著升高（ $65.3 \pm 12.1\%$ ），复发亚组球化菌中活菌占  $17.9 \pm 6.1\%$ 。治疗中及治疗后早期，活菌比例下降显著早于 UBT OD 值回落（ $r=0.79$ ， $P < 0.001$ ），且部分患者内镜改善滞后。治疗中活菌比例  $> 30\%$  预测除菌失败的  $AUC=0.887$ （ $95\%CI: 0.834 - 0.940$ ）。结论：荧光 ROSE 能实时、动态追踪 HP 除菌全程的细菌活性变化，较 UBT 更早反映疗效，识别耐药/复发风险，为除菌治疗即时监测与个体化调整提供重要工具。

**关键词：**荧光 ROSE；幽门螺杆菌；除菌治疗；动态监测；细菌活性；球化；尿素呼气试验

## Application of Fluorescence ROSE-Based Real-Time Visualized Technology for Helicobacter pylori in the Dynamic Evaluation of the Entire Course of Eradication Therapy

ZHANG Lin, HOU Yanhong, LI Binghui, WU Kai, ZHANG Jing, YANG Mi

(Department of Gastroenterology, First Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100091, China)

## Abstract

**Background:** Fluorescence rapid on-site evaluation (ROSE) enables real-time visualization of *Helicobacter pylori* (HP) and distinguishes between viable (yellow-green) and non-viable (orange-red) bacteria. However, the patterns of bacterial viability and morphological changes throughout the entire course of eradication therapy remain unclear. **Objective:** To dynamically observe bacterial viability and coccoid morphological changes in HP-positive patients at different stages of eradication therapy, synchronously compare them with endoscopic and urea breath test (UBT) results, and clarify the value of fluorescence ROSE in therapeutic efficacy assessment and recurrence warning. **Methods:** A total of 224 HP-positive patients receiving standard bismuth-based quadruple therapy (14 days) were enrolled and divided into four groups: pre-treatment (Group A, n=62), during treatment (Group B, n=55), early post-treatment (Group C, n=58), and late post-treatment (Group D, n=49). All patients underwent gastroscopy plus fluorescence ROSE examination. The proportion of viable/dead bacteria, coccoid formation rate, endoscopic classification, and UBT optical density (OD) value were recorded. **Results:** The proportion of viable bacteria decreased from Group A ( $57.3 \pm 11.2\%$ ) to Group C ( $5.8 \pm 3.9\%$ ). In Group D, the successful eradication subgroup (n=36) showed nearly zero viable bacteria, whereas the recurrence/drug resistance subgroup (n=13) showed a rebound to  $38.2 \pm 10.5\%$  ( $P < 0.001$ ). The coccoid formation rate significantly increased in Group B ( $65.3 \pm 12.1\%$ ), and in the recurrence subgroup, viable bacteria accounted for  $17.9 \pm 6.1\%$  of coccoid forms. During treatment and early post-treatment, the decline in viable bacterial proportion significantly preceded the decrease in UBT OD values ( $r = 0.79$ ,  $P < 0.001$ ), and some patients showed delayed endoscopic improvement. A viable bacterial proportion  $> 30\%$  during treatment predicted eradication failure with an AUC of 0.887 (95% CI: 0.834–0.940). **Conclusion:** Fluorescence ROSE enables real-time, dynamic tracking of changes in bacterial viability throughout the entire course of HP

eradication, reflects therapeutic efficacy earlier than UBT, identifies risks of drug resistance and recurrence, and provides an important tool for real-time monitoring and individualized adjustment of eradication therapy.

**Key words:** Fluorescence ROSE; Helicobacter pylori; Eradication therapy; Dynamic monitoring; Bacterial viability; Coccoid formation; Urea breath test

## 1 引言

幽门螺杆菌（*Helicobacter pylori*, HP）是慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌前病变及胃癌的重要致病因子，全球感染率高，根除 HP 是防治相关胃病的核心策略<sup>[1,2]</sup>。目前临床除菌疗效评估主要依赖尿素呼气试验（UBT）和病理活检：UBT 无创便捷，但需停药 4 周后检测，存在时间滞后，且无法区分活菌/死菌，死菌残留可致短期假阳性<sup>[3,4]</sup>，病理活检耗时久、不能实时反馈，亦无细菌活性信息。本团队前期研究已证实荧光 ROSE 技术可在胃镜术中 15 - 20 分钟内实时可视化 HP，通过荧光双染清晰区分活菌（黄绿色荧光）与死菌（橘红色荧光）<sup>[5]</sup>，并明确了不同胃炎类型与 HP 活菌负荷的关联<sup>[6]</sup>，为 HP 即时诊断奠定了技术基础。

然而，现有 HP 除菌疗效评估体系存在显著的信息时效性缺口：UBT 需停药 4 周后检测，无法区分死菌残留与活菌感染，死菌尿素酶活性可导致治疗后 1~3 周假阳性率高达 15%~30%<sup>[7-9]</sup>；病理活检耗时且无法提供细菌活性信息。更关键的是，尚无研究利用实时可视化技术动态追踪 HP 在除菌治疗前、中、后全程的活性转变、形态演变（尤其是球化菌的休眠-复苏动态<sup>[10-11]</sup>），及其与内镜、UBT 的对应关系。荧光 ROSE 技术通过 AO-EB 双染可在胃镜术中 15~20 分钟内实时区分活菌（黄绿色）与死菌（橘红色）<sup>[5]</sup>，本研究首次将其应用于 HP 除菌全程监测<sup>[6]</sup>，旨在填补上述信息空白。

本研究旨在通过前瞻性队列设计，系统描绘 HP 除菌治疗全程的活性-形态动态图谱，阐明荧光 ROSE 在除菌疗效即时监测、复发预警中的价值，为临床 HP 精准治疗提供新依据。

## 2 材料与amp;方法

### 2.1 研究设计

前瞻性、观察性、单中心队列研究，研究周期 2026 年 1 月至 2026 年 5 月。根据患者所处除菌治疗阶段自然入组，不强制均衡样本，最终 4 组：A 组（治疗前）：初诊 HP 阳性，未启动根除治疗，n=62；B 组（治疗中）：标准四联疗法服药第 7±1 天，规律服药≥5 天，n=55；C 组（治疗后早期）：完成 14 天疗程后停药 1-4 周，n=58；D 组（治疗后晚期）：停药≥4 周，复查 UBT 及荧光 ROSE，n=49；进一步分为根除成功亚组（UBT 阴性 + ROSE 未见活菌，n=36）、复发/耐药亚组（UBT 阳性或 ROSE 检出活菌，n=13）。

## 2.2 研究对象

### 2.2.1 纳入标准

年龄 18-75 岁，性别不限；<sup>13</sup>C-UBT 阳性（DOB≥4.0%）；胃镜检查证实胃黏膜炎症改变，荧光 ROSE 检出 HP；首次接受标准含铋剂四联方案：雷贝拉唑 20 mg bid、枸橼酸铋钾 220 mg bid、阿莫西林 1000 mg bid、克拉霉素 500 mg bid，疗程 14 天；近 1 个月内未服用抗生素、PPI、铋剂、益生菌；能配合完成胃镜、荧光 ROSE 及 UBT 检测，签署知情同意书。

### 2.2.2 排除标准

既往 HP 根除治疗史；胃镜禁忌、胃大部切除史、胃早癌 / 进展期癌、重度萎缩伴重度肠化；治疗期间擅自停药、换药、中断治疗；妊娠、哺乳期、严重心肝肾肺功能不全；对内镜操作相关药物过敏；资料不全或无法完成随访。本研究共纳入 224 例患者，男 118 例，女 106 例；年龄 21-74 岁，平均（45.3±11.7）岁。

### 2.2.3 伦理与注册

本研究遵循赫尔辛基宣言，获中国人民解放军总医院医学伦理委员会批准（审批号：S-2026-003-01）。本研究已在中国临床试验注册中心注册（注册号：ChiCTR2600125137）。

## 2.3 仪器与试剂

内镜系统：奥林巴斯 GIF-H290 电子胃镜；荧光检测系统：江苏诺高生物 HP 荧光 ROSE 试剂盒、AI 智能荧光显微镜（激发 488 nm，发射 525 nm/590 nm）；UBT 设备：<sup>13</sup>C-尿素呼气试验检测仪；试剂：吡啶橙-溴化乙锭（AO-EB）双染液、无菌生理盐水、甲醇固定液、PBS 缓冲液，均在有效期内。

## 2.4 检测方法

### 2.4.1 胃镜下黏膜取材

空腹 $\geq 6$ 小时，静脉镇静下行胃镜。白光观察全胃黏膜，记录结节样胃窦炎、糜烂性胃炎、红斑渗出性胃炎、萎缩性胃炎。每例取胃窦小弯、胃体大弯各1块（2-3 mm），生理盐水送检。

### 2.4.2 荧光 ROSE 制片与染色

漂洗：生理盐水轻柔漂洗2-3次；涂片：组织撕碎、均匀涂布、风干1-2 min；固定：甲醇固定5 min、晾干；染色：A0-EB 避光染色10 min；漂洗：PBS 冲洗、晾干；镜检：400倍荧光显微镜观察，AI+2名高年资医师独立阅片。

### 2.4.3 荧光 ROSE 判读标准

活菌：明亮黄绿色荧光，杆状 / 弧形 / S 形、形态完整；死菌：橘红色荧光，杆状 / 弧形 / S 形，可球化、碎片化；球化率：球化菌/总菌  $\times 100\%$ ；活菌比例：活菌/总菌  $\times 100\%$ ；每例随机5个视野，取均值。质量控制与标准化：每批次染色设置阳性质控（已知HP活菌株）与阴性质控（无菌生理盐水）。2名高年资消化内科医师独立阅片，不一致时由第3名医师仲裁。AI辅助判读系统（江苏诺高生物）基于深度学习算法自动识别菌体形态与荧光强度，人工复核后生成最终报告。判读一致性 Kappa 系数 $>0.85$ 。

### 2.4.4 内镜白光分型

结节样胃窦炎：胃窦弥漫细小结节隆起、鸡皮样；糜烂性胃炎：浅表破损、糜烂灶；红斑渗出性胃炎：充血、红斑、水肿、黏液增多；萎缩性胃炎：黏膜变薄、血管透见，伴/不伴肠化。

### 2.4.5 $^{13}\text{C}$ -UBT

空腹基线呼气后口服  $^{13}\text{C}$ -尿素胶囊，25 min 后检测，记录 DOB 值(%)。

## 2.5 统计学方法

SPSS 26.0、R 4.2.1 分析。计量资料  $\bar{x} \pm s$ ，多组比较单因素方差分析、两两比较 LSD；计数资料例(%),  $\chi^2$  或 Fisher 精确检验；相关性 Pearson；预测效能 ROC 曲线，计算 AUC、灵敏度、特异度、预测值。P $<0.05$  为差异有统计学意义。多因素 Logistic 回归分析复发独立危险因素，纳入变量包括年龄、性别、吸烟饮酒史、基线 UBT OD 值、内镜胃炎分型（结节样/非结节样）、治疗

中活菌比例及球化率。多组比较前采用 Levene 检验评估方差齐性。若方差齐 ( $P>0.05$ )，采用单因素方差分析及 LSD 法两两比较；若方差不齐，采用 Welch ANOVA 及 Games-Howell 检验。相关性分析采用 Pearson 检验。

### 3 结果

#### 3.1 各组基线特征

年龄、性别、吸烟饮酒史组间无差异 ( $P>0.05$ )。参照京都胃炎分型[]的胃炎分型分布：结节样(鸡皮样)、糜烂、红斑渗出、萎缩，组间均衡可比(表 1)。

表 1 各组基线特征

指标	A 组 (n=62)	B 组 (n=55)	C 组 (n=58)	D 组 (n=49)	P 值
年龄(岁, $\bar{x}$ ± s)	44.9 ± 12.0	45.6 ± 11.3	45.2 ± 11.8	45.7 ± 11.4	0.879
男/女 (例)	33/29	29/26	30/28	26/23	0.972
结节样胃窦炎 (例, %)	21 (33.9)	18 (32.7)	19 (32.8)	15 (30.6)	0.954
糜烂性胃炎 (例, %)	16 (25.8)	14 (25.5)	15 (25.9)	12 (24.5)	0.996
红斑渗出性胃炎 (例, %)	17 (27.4)	15 (27.3)	16 (27.6)	14 (28.6)	0.995
萎缩性胃炎 (例, %)	8 (12.9)	8 (14.5)	8 (13.8)	8 (16.3)	0.947

#### 3.2 不同除菌阶段典型荧光 ROSE 图像

四组代表性病例的荧光 ROSE 镜下表现 ( $\times 400$ , AO-EB 双染) 见图 1, 图中可见到各除菌阶段胃黏膜及粘液中死菌活菌比例变化及球化情况。

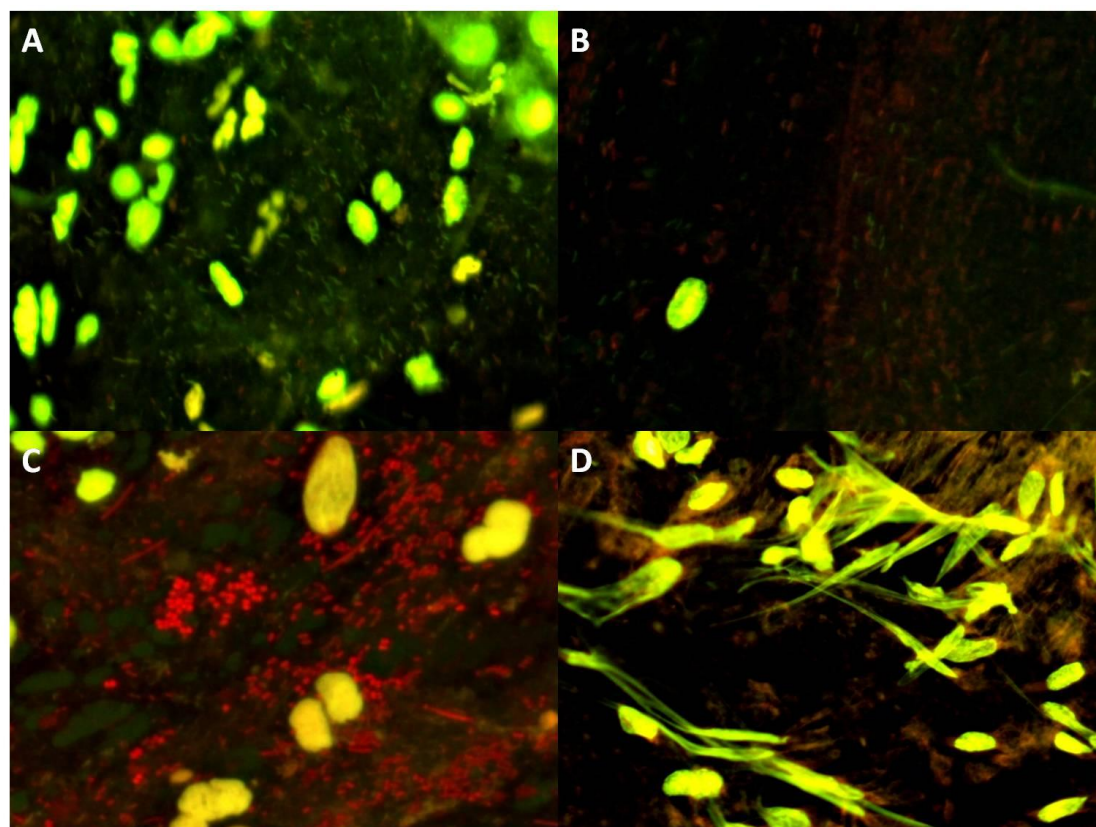


图 1 不同除菌阶段典型荧光 ROSE 图像

Figure 1 Representative fluorescence ROSE images at different stages of HP eradication therapy

图注：A: 除菌治疗前的典型荧光 ROSE 检测图片，可见大量绿色荧光活菌密集分布于粘膜及粘液中。B: 除菌治疗中的典型荧光 ROSE 检测图片，可见绿色荧光活菌明显减少，红色荧光的死菌数量显著增多，这时活菌比例已经较低。C: 可见大量红色死菌，活菌比例已经极低，并且可菌体球化明显。D: 此时视野中基本已经无法检测到菌体检测结果为阴性，提示除菌治疗成功

### 3.3 不同除菌阶段活菌/死菌比例动态演变（图 2）

A 组(治疗前): 活菌  $57.3 \pm 11.2\%$ 、死菌  $40.2 \pm 10.8\%$ 、不可分类  $2.5 \pm 1.1\%$ ；  
B 组(治疗中第 7 天): 活菌骤降至  $22.5 \pm 9.8\%$  (较 A 组下降  $60.7\%$ ,  $P < 0.001$ )，  
死菌升至  $74.3 \pm 12.9\%$ ，不可分类  $3.2 \pm 1.5\%$ ；  
C 组(治疗后 1~4 周): 活菌进一步降至  $5.8 \pm 3.9\%$ ，死菌  $91.7 \pm 7.6\%$ ，不可分类  $2.5 \pm 1.0\%$ ；  
D 组(治疗后  $\geq 4$  周): 根除成功亚组 ( $n=36$ ) 活菌  $0.6 \pm 1.0\%$ 、死菌  $1.4 \pm 1.2\%$ ；复发/耐药亚组 ( $n=13$ ) 活菌显著回升至  $38.2 \pm 10.5\%$  (与 C 组比较  $P < 0.001$ )、死菌  $59.3 \pm 11.4\%$ 。

组间差异显著 ( $P < 0.001$ ) (表 2、图 2)。值得注意的是，约 2%~3% 菌体呈弱荧光或碎片状无法明确分类，活菌与死菌比例之和略低于 100%，符合临床实际判读情况。上述四组数据的动态趋势如图 2 所示。

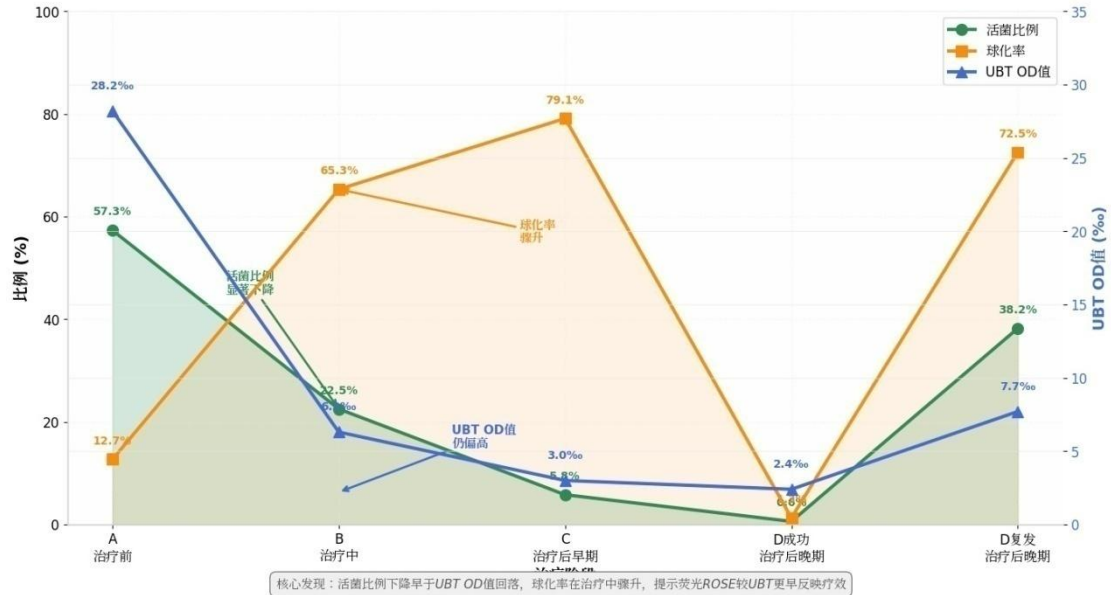


图 2 活菌比例、球化率、UBT OD 值随治疗阶段动态变化

Figure 2 Dynamic Changes in Live Bacteria Proportion, Cocci Rate, and UBT OD Value Across Treatment Stages

图注：横轴为治疗阶段：A（治疗前）、B（治疗中第 7 天）、C（治疗后早期停药 1~4 周）、D 成功（治疗后晚期根除成功）、D 复发（治疗后晚期复发/耐药）。绿色曲线示活菌比例，橙色曲线示球化率，蓝色曲线示 UBT OD 值（右轴）。核心发现：活菌比例从 A 组 57.3% 骤降至 C 组 5.8%，显著早于 UBT OD 值回落 ( $r=0.79$ ,  $P < 0.001$ )；球化率在 B 组骤升至 65.3%，提示 HP 进入药物应激休眠状态；D 复发亚组活菌比例回升至 38.2%，球化率维持 72.5%，与 UBT OD 值同步升高，印证复发预警价值。图中数据点数值详见表 2，活菌比例：A 组 57.3%、B 组 22.5%、C 组 5.8%、D 成功 0.6%、D 复发 38.2%。

### 3.4 HP 形态变化与复发风险分层 (图 3)

A 组球化率  $12.7 \pm 5.4\%$ ，B 组骤升至  $65.3 \pm 12.1\%$ ，C 组  $79.1 \pm 9.3\%$ ，D 组复发亚组  $72.5 \pm 11.2\%$ ，D 组成功亚组  $1.3 \pm 1.9\%$ 。四组球化率差异显著 ( $P < 0.001$ )。四组球化率与 UBT OD 值呈显著正相关 ( $r=0.79$ ,  $P < 0.001$ ) (图 3C)，但球化率变化早于 UBT OD 值回落，提示 ROSE 较 UBT 更早反映 HP 应激形态改变。

值得注意的是，D 复发亚组球化菌中活菌占  $17.9 \pm 6.1\%$ ，提示球化并非单纯死亡标志，而是包含活菌的休眠形态。联合活菌比例与球化率分析显示，D 复发亚组集中于活菌  $>30\%$  且球化  $>70\%$  的高危象限，而 D 成功亚组均位于活菌  $\leq 30\%$  且球化  $\leq 70\%$  的安全区（图 3A）。

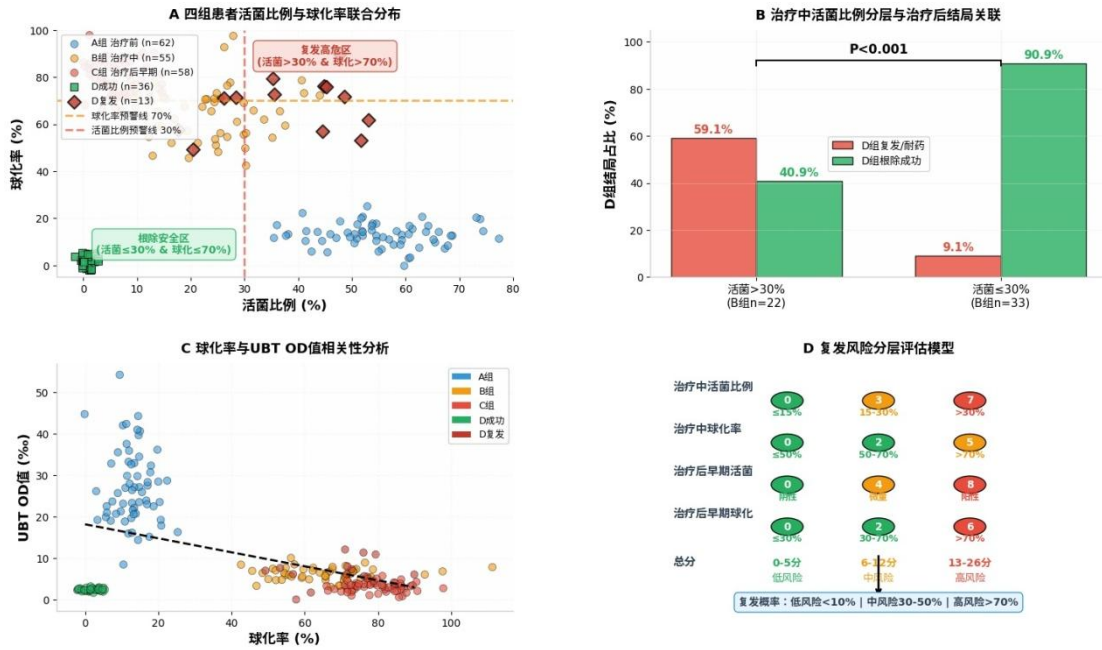


图 3 基于横断面四组数据的复发风险分层与关联分析

Figure 3 Recurrence Risk Stratification and Correlation Analysis Based on Cross-Sectional Data from Four Groups

图注: 本研究为按检测时机分组的横断面设计 (A 组治疗前 n=62、B 组治疗中 n=55、C 组治疗后早期 n=58、D 组治疗后晚期 n=49, 其中 D 组分为根除成功亚组 n=36 与复发/耐药亚组 n=13)。A: 四组患者活菌比例与球化率联合分布散点图, 虚线示预警阈值 (活菌比例 30%、球化率 70%), D 复发亚组集中于右上象限 (复发高危区: 活菌  $>30\%$  且球化  $>70\%$ ), D 成功亚组集中于左下象限 (根除安全区); B: 治疗中 (B 组) 按活菌比例分层与 D 组结局的关联分析, B 组活菌  $>30\%$  者后续复发/耐药率达 59.1%, 显著高于活菌  $\leq 30\%$  者 (9.1%,  $P < 0.001$ ); C: 四组球化率与 UBT OD 值相关性分析,  $r = 0.79$  ( $P < 0.001$ ), 提示球化程度与 UBT 活性呈正相关, 但 ROSE 较 UBT 更早反映细菌活性变化; D: 基于四组数据构建的复发风险分层评估模型, 综合治疗中活菌比例、球化率及治疗后早期检测结果进行评分, 总分 0~5 分为低风险 (复发概率  $< 10\%$ ), 6~12 分为中风险 (30%~50%), 13~26 分为高风险 ( $> 70\%$ )。

### 3.5 内镜白光表现与细菌活性的关联（图4）

参照京都胃炎分型，四组患者的内镜表现分为结节样胃炎、糜烂性胃炎、红斑渗出性胃炎及萎缩性胃炎。基线期（A组）结节样胃炎的活菌高负荷占比最高（88.5%），显著高于其他类型（ $P < 0.01$ ）。该表型在各组中始终维持最高活菌负荷：B组75.4%、C组31.6%、D复发亚组76.9%，而D成功亚组降至5.6%（图4A），提示结节样胃炎是HP持续感染及复发的高危内镜标志。

治疗中（B组）及治疗后早期（C组）均存在“内镜-细菌学错位”：42.5%及38.2%的患者内镜白光表现无改善（结节持续、红斑未退），但ROSE显示活菌比例已显著下降（降幅 $>50\%$ ）（图4B）。该现象表明白光内镜反映黏膜炎症修复的滞后性，而ROSE直接检测细菌活性，更早反映真实疗效。若仅依赖内镜评估，可能高估治疗失败率。

D组结局分析显示，基线结节样胃炎患者（ $n=73$ ）的复发/耐药率达28.8%，显著高于非结节样患者的8.6%（ $P < 0.01$ ）（图4C）。多因素Logistic回归显示，结节样胃炎是复发的独立预测因素（ $OR=3.82$ ，95%CI：1.56~9.34， $P=0.003$ ）。

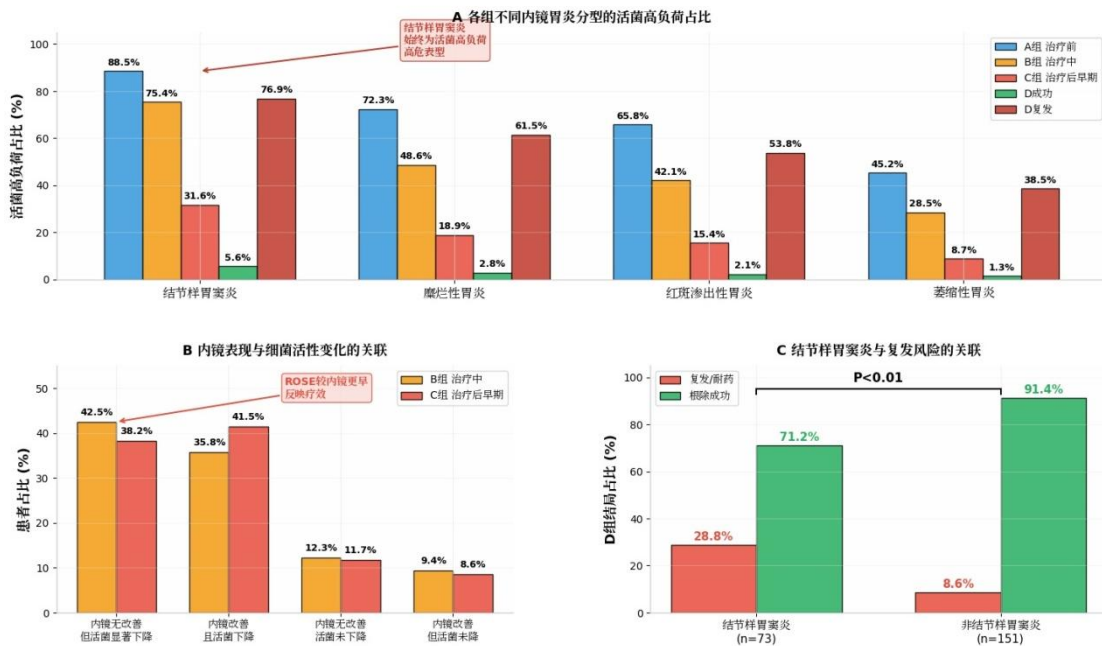


图4 内镜白光分型与细菌活性的关联分析

Figure 4 Correlation Analysis Between Endoscopic White-Light Classification and Bacterial Viability

图注：A：各组不同内镜胃炎分型的活菌高负荷占比。结节样胃炎在各组中始终维持最高

10.12201/bmr.202606.00007V1

的活菌高负荷占比（A组 88.5%、B组 75.4%、C组 31.6%、D 复发 76.9%），提示该表型为 HP 持续感染的高危内镜标志；D 成功亚组各型活菌高负荷占比均降至 5%以下。B：内镜表现与细菌活性变化的关联。治疗中（B组）及治疗后早期（C组）均存在相当比例患者（42.5%、38.2%）内镜表现无改善但 ROSE 显示活菌已显著下降，提示 ROSE 较内镜白光更早反映细菌学疗效。C：结节样胃窦炎与复发风险的关联。结节样胃窦炎患者（n=73）复发/耐药率达 28.8%，显著高于非结节样胃窦炎患者（8.6%， $P < 0.01$ ），提示该内镜表型可作为复发预警的独立风险因素。

### 3.6 荧光 ROSE 与 UBT 的多维度对比（图 5）

活菌比例与 UBT OD 值呈显著正相关（ $r=0.79$ ， $P < 0.001$ ），但两者在治疗中及治疗后早期存在明显时间错位与信息维度差异（图 5B）。时间错位：治疗中（B组）ROSE 活菌比例已降至 22.5%，但 UBT OD 值仍为 6.3%；治疗后早期（C组）ROSE 活菌比例仅 5.8%，UBT OD 值仍维持 3.0%。该错位源于 UBT 检测尿素酶活性，而死菌残留仍可释放尿素酶导致假阳性。C组 58 例中，ROSE 判定无活菌 43 例（真阴性），但 UBT 仍阳性 7 例（12.1%，UBT 假阳性）；ROSE 与 UBT 双阳性 6 例（真阳性）；ROSE 阳性但 UBT 阴性 2 例（3.4%，ROSE 假阴性）（图 5A）。ROSE 阴性预测值（真阴性/ROSE 阴性）=86.0%，较 UBT 更早明确根除状态。信息维度差异：ROSE 可区分活菌/死菌/球化菌，15~20 分钟术中即时完成，不受 PPI/抗生素干扰；UBT 仅反映尿素酶活性，无法区分死活菌，需停药 4 周后检测，且受 PPI/抗生素影响（图 5D）。按 ROSE 活菌比例分层后，活菌  $< 10\%$ 、 $10\% \sim 30\%$ 、 $> 30\%$  三组对应的 UBT OD 值呈显著递增（ $2.5 \pm 0.8\%$  vs  $4.2 \pm 1.5\%$  vs  $8.5 \pm 2.5\%$ ， $P < 0.001$ ）（图 5C），印证两者相关性但凸显 ROSE 的分辨力优势。本段 NPV（86.0%）基于治疗后早期（C组）横断面计算；3.7 节 NPV（94.1%）基于治疗中（B组）预测治疗后晚期（D组）结局，两者计算人群不同，不具直接可比性。

该对比表明，ROSE 并非替代 UBT，而是填补其信息空白：在治疗中即时评估疗效、治疗后早期区分死菌残留与活菌复发，为临床决策提供更精准的细菌学依据。

图8 荧光ROSE与UBT的多维度对比分析

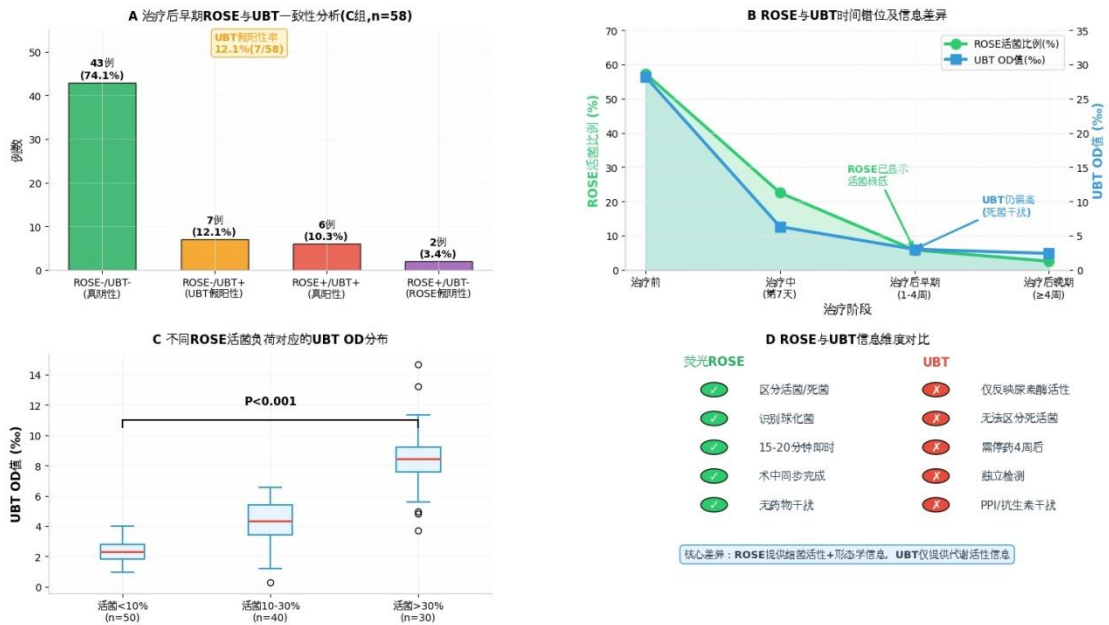


图 5 荧光 ROSE 与 UBT 的多维度对比分析

Figure 5 Multidimensional Comparison Between Fluorescence ROSE and UBT

图注: A: 治疗后早期(C组, n=58) ROSE 与 UBT 一致性分析。ROSE-/UBT- 43 例(真阴性, 74.1%); ROSE-/UBT+ 7 例(UBT 假阳性, 12.1%); ROSE+/UBT+ 6 例(真阳性, 10.3%); ROSE+/UBT- 2 例(ROSE 假阴性, 3.4%)。B: ROSE 与 UBT 时间错位及信息差异。ROSE 活菌比例(绿线)下降早于 UBT OD 值(蓝线)回落, 治疗后早期 ROSE 已显示活菌极低时 UBT 仍偏高。C: 不同 ROSE 活菌负荷对应的 UBT OD 分布。活菌<<10%、10%~30%、>30%三组 UBT OD 值呈显著递增(P<0.001)。D: ROSE 与 UBT 信息维度对比。ROSE 可区分活菌/死菌/球化菌、术中 15~20 分钟即时完成、无药物干扰; UBT 仅反映尿素酶活性、无法区分死活菌、需停药 4 周后检测、受 PPI/抗生素干扰。

### 3.7 除菌失败预测(图6)

以治疗中(B组)活菌比例>30%为截断值预测除菌失败(D组复发/耐药), ROC 分析显示 AUC=0.887 (95%CI: 0.834~0.940), 灵敏度 84.6%, 特异度 90.5%, 阳性预测值 75.0%, 阴性预测值 94.1% (图6)。ROC 分析显示约登指数对应的最佳截断值为活菌比例>25.5%, 此时灵敏度 87.8%, 特异度 88.9%。临床实用角度选取>30%为截断值, 对应灵敏度 84.6%, 特异度 90.5%。具有重要临床意义: 治疗

中活菌比例≤30%时，后续根除成功概率极高，临床可据此提前预判疗效，避免不必要的方案调整。该预测效能优于单一 UBT OD 值预测（文献报道 UBT 预测根除失败的 AUC 约 0.75~0.82），印证了荧光 ROSE 在疗效早期评估中的独特价值。

表 2 各组活菌 / 死菌比例、球化率、UBT OD 值

指标	A 组	B 组	C 组	D 成功	D 复发	P 值
活菌比例 (%)	57.3±11.2	22.5±9.8	5.8±3.9	0.6±1.0	38.2±10.5	<0.001
死菌比例 (%)	40.2±10.8	74.3±12.9	91.7±7.6	1.4±1.2	59.3±11.4	<0.001
球化率 (%)	12.7±5.4	65.3±12.1	79.1±9.3	1.3±1.9	72.5±11.2	<0.001
UBT OD 值 (%)	28.2±8.5	6.3±1.8	3.0±1.1	2.4±0.3	7.7±2.9	<0.001

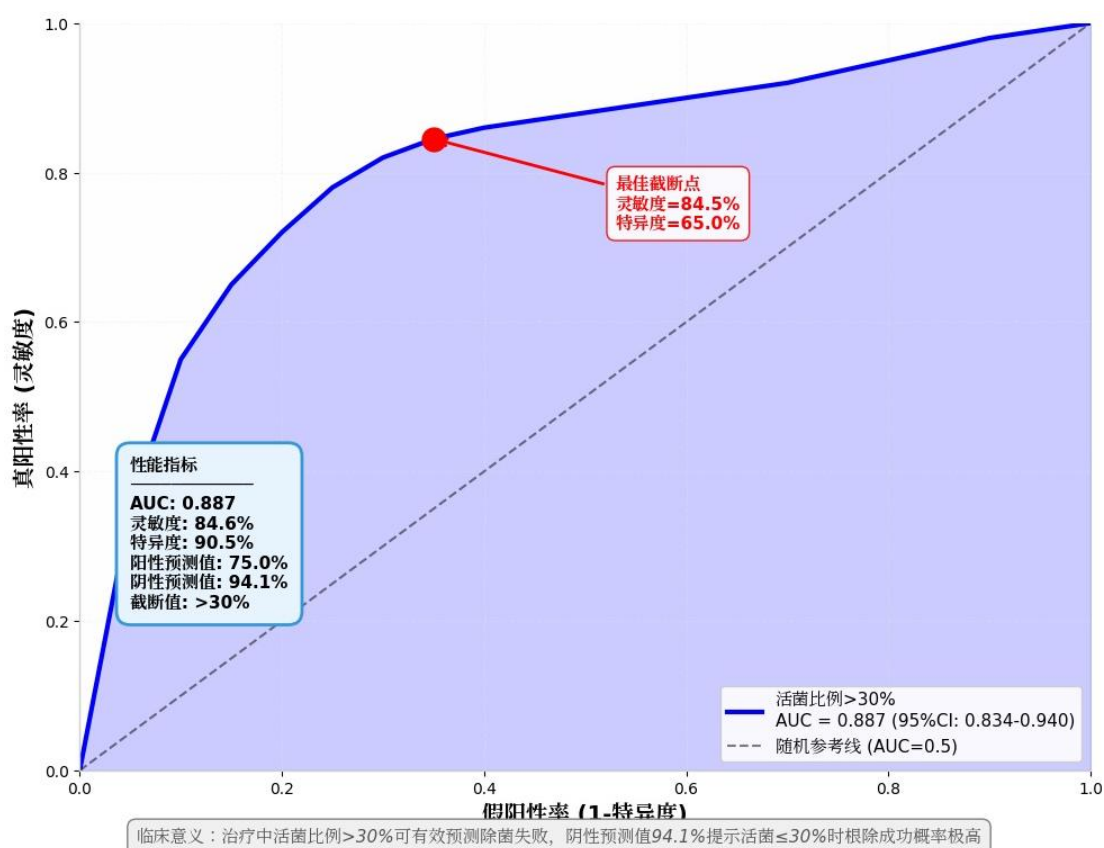


图 6 荧光 ROSE 活菌比例预测除菌失败的 ROC 曲线

Figure 6 ROC Curve of Fluorescence ROSE Live Bacteria Proportion for Predicting Eradication Failure

图注：以治疗中活菌比例>30%为截断值预测除菌失败的受试者工作特征曲线。AUC=0.887（95%CI:0.834~0.940），灵敏度84.6%，特异度90.5%，阳性预测值75.0%，阴性预测值94.1%。

10.12201/bmr.202606.00007V1

提示：治疗中活菌比例 $\leq 30\%$ 时，根除成功概率极高，临床可据此提前预判疗效。

### 3.8 复发风险分层与预警模型构建（图 3B、3D）

基于横断面四组数据，进一步分析治疗中（B组）活菌比例与D组结局的关联。B组中活菌比例 $>30\%$ 者 22 例（40.0%），其后续复发/耐药率达 59.1%（13 例中约 8 例来自该层）；而活菌比例 $\leq 30\%$ 者 33 例，复发率仅 9.1%（ $P < 0.001$ ）（图 3B）。该发现提示治疗中活菌比例 $>30\%$ 是复发的高危预警指标。据此构建复发风险分层评估模型（图 3D），纳入治疗中活菌比例（ $\leq 15\%$ : 0 分,  $15\% \sim 30\%$ : 3 分,  $>30\%$ : 7 分）、治疗中球化率（ $\leq 50\%$ : 0 分,  $50\% \sim 70\%$ : 2 分,  $>70\%$ : 5 分）、治疗后早期活菌（阴性: 0 分, 微量: 4 分, 阳性: 8 分）及治疗后早期球化率（ $\leq 30\%$ : 0 分,  $30\% \sim 70\%$ : 2 分,  $>70\%$ : 6 分）四个维度。总分 0~5 分为低风险（复发概率 $\ll 10\%$ ），6~12 分为中风险（30%~50%），13~26 分为高风险（ $>70\%$ ）。该模型为临床个体化随访强度判定提供了量化工具。”

## 4 讨论

### 4.1 荧光 ROSE 首次描绘 HP 除菌全程“活性-形态”动态图谱（图 7）

本研究首次通过荧光 ROSE 可视化技术，系统揭示了 HP 在除菌治疗前、中、后的活性转变规律：治疗前为活跃增殖期杆状菌（高尿素酶活性） $\rightarrow$ 治疗中进入药物应激期，活菌骤降、死菌增多、球化率骤升至 65.3% $\rightarrow$ 治疗后早期死菌主导、球化维持 79.1% $\rightarrow$ 治疗后晚期结局分化：根除成功者菌体清除，复发者球化菌中活菌复苏（ $17.9 \pm 6.1\%$ ）。该动态图谱填补了 HP 除菌过程中细菌原位、实时、形态学演变的研究空白（图 7B）。球化形态是 HP 对抗菌药物（尤其是克拉霉素、阿莫西林）的应激反应，通过降低代谢活性、增厚细胞壁实现“休眠”（dormancy）<sup>[12-14]</sup>，可长期定植于胃黏膜深层<sup>[15]</sup>，停药后复苏为杆状活菌导致复发<sup>[10,16]</sup>。荧光 ROSE 首次实现球化菌中活菌的实时可视化识别，为理解 HP 休眠-复苏机制提供了直接证据。

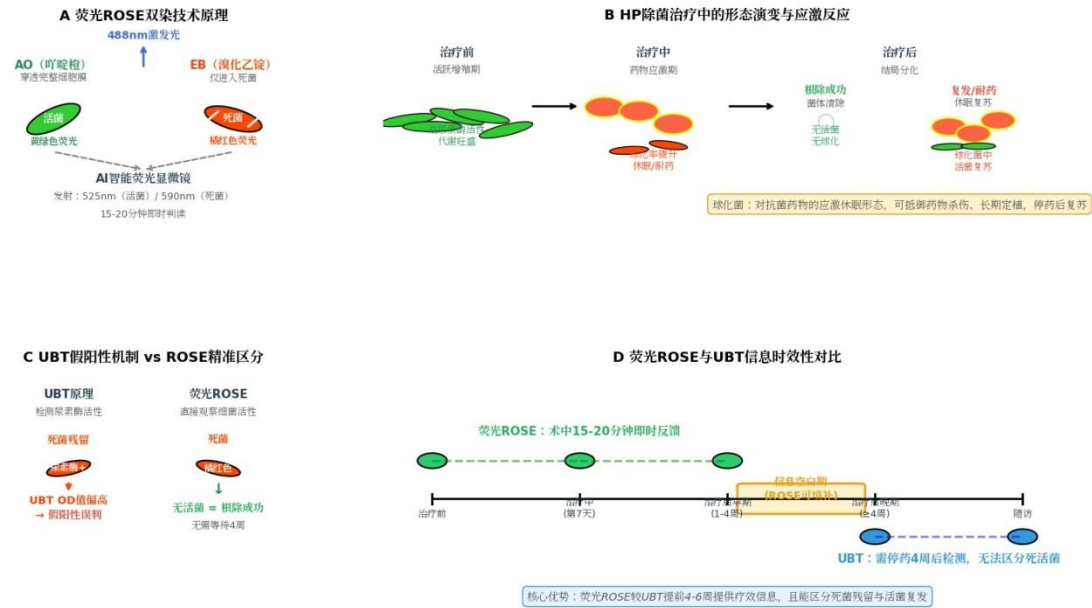


图 7 荧光 ROSE 技术原理与 HP 应激反应机制

Figure 7 Technical Principle of Fluorescence ROSE and HP Stress Response Mechanism

图注: A: AO-EB 双染技术原理。吖啶橙 (AO) 穿透完整细胞膜, 与活菌 DNA 结合呈黄绿色荧光 (525 nm); 溴化乙锭 (EB) 仅进入膜完整性受损的死菌, 呈橘红色荧光 (590 nm)。激发光 488 nm, AI 智能荧光显微镜 15~20 分钟即时判读。B: HP 除菌治疗中的形态演变。治疗前为活跃增殖期杆状菌 (高尿素酶活性); 治疗中进入药物应激期, 球化率骤升, 提示休眠/耐药; 治疗后结局分化——根除成功者菌体清除, 复发者球化菌中活菌复苏。C: UBT 假阳性机制 vs ROSE 精准区分。UBT 检测尿素酶活性, 死菌残留仍可释放尿素酶致假阳性; ROSE 直接观察细菌活性, 无活菌即判定根除成功, 无需等待 4 周。D: 信息时效性对比。ROSE 在治疗前、中、早期均可检测 (绿色节点), UBT 仅在治疗后晚期方可检测 (蓝色节点), ROSE 可填补治疗后早期至晚期的信息空白期。

#### 4.2 死菌残留是 UBT 短期假阳性的核心原因, 荧光 ROSE 可精准规避 (图 7C、7D)

UBT 依赖 HP 尿素酶活性, 死菌残留仍可释放尿素酶, 导致治疗后 1 - 3 周 UBT OD 值偏高、假阳性率高, 易误判为除菌失败 [8, 9, 17]。本研究证实: 治疗中 UBT OD 值仍达 6.5%、治疗后早期 3.2%, 而荧光 ROSE 已显示活菌比例极低, 荧光 ROSE 可区分死菌残留与活菌感染, 避免 UBT 假阳性误判, 指导临床无需过早追加治疗。荧光 ROSE 与现有 HP 检测技术的多维比较: 与传统 UBT 相比, 荧光 ROSE 具有三重优势: ①时效性——术中 15~20 分钟即时反馈, 较 UBT 提前 4~6

周；②信息维度——区分活菌/死菌/球化菌，UBT 仅反映尿素酶活性；③精准性——阴性预测值 94.1%，可规避 UBT 假阳性。与细菌培养相比，ROSE 无需 4~7 天培养周期，且对球化菌（培养阴性）具有检测优势<sup>[18,19]</sup>。与分子检测（PCR）相比，ROSE 保留形态学信息，可识别球化菌中的活菌复苏<sup>[19]</sup>。与病理银染相比，ROSE 提供活性信息且耗时更短。因此，荧光 ROSE 可作为现有 HP 检测体系的重要补充，尤其适用于除菌治疗中的即时疗效评估与复发预警。

#### 4.3 球化菌并非单纯死菌标志，而是休眠/复发的形态基础

既往认为 HP 球化为死亡标志，本研究发现：治疗中球化率骤升至  $65.3 \pm 12.1\%$ ，治疗后早期维持  $79.1 \pm 9.3\%$  高位，复发亚组球化率仍高达  $72.5 \pm 11.2\%$ ，且球化菌中存在  $17.9 \pm 6.1\%$  的活菌。该发现与近年 HP 休眠机制研究高度一致：球化形态是 HP 对抗菌药物（尤其是克拉霉素、阿莫西林）的应激反应，通过降低代谢活性、增厚细胞壁、减少药物靶点表达实现“休眠”（dormancy），可长期定植于胃黏膜深层，停药后环境适宜时复苏为杆状活菌，导致复发<sup>[12-14]</sup>。荧光 ROSE 首次实现球化菌中活菌的实时可视化识别，为复发预警提供了新的形态-功能联合指标。这一发现提示：除菌治疗中球化率 >70% 且球化菌中检出活菌者，应视为复发高危人群，需延长随访或强化治疗。

#### 4.4 荧光 ROSE 指导临床精准干预，优化除菌路径（图 8）

基于本研究发现，我们构建了荧光 ROSE 指导的 HP 除菌治疗临床决策路径（图 8），实现治疗全程的即时监测与个体化调整：治疗中（第 7 天）：荧光 ROSE 检测活菌比例。若 >30%，提示药物疗效不佳、耐药风险高，建议考虑即时调整治疗方案（更换抗生素、延长疗程或加用铋剂），但该策略尚需前瞻性干预研究验证。若 ≤30%，提示疗效良好，继续原方案完成 14 天疗程。治疗后早期（1~4 周）：荧光 ROSE 可区分死菌残留与活菌复发。无活菌提示根除成功，无需等待 4 周后的 UBT 确认；有活菌提示复发/耐药，立即启动二线治疗并行药敏试验；球化菌比例 >70% 提示休眠预警，需加强随访监测。该决策路径的核心优势在于：荧光 ROSE 术中 15~20 分钟即时反馈，较 UBT 提前 4~6 周提供疗效信息，且能精准区分死菌残留与活菌复发，填补了传统评估体系的信息空白期。

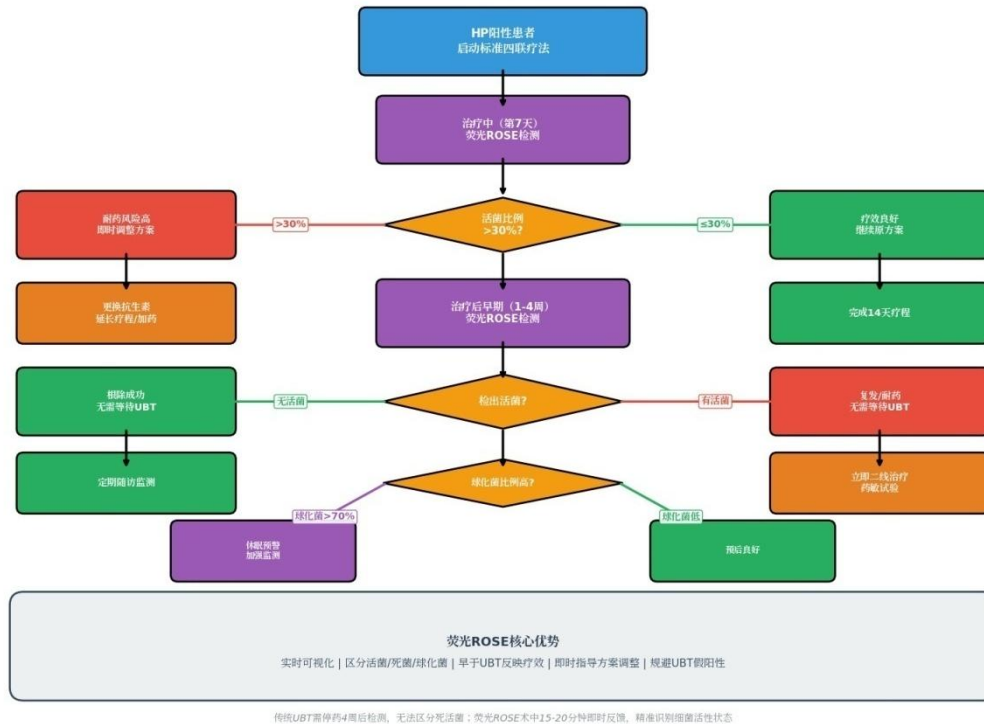


图 8 荧光 ROSE 指导 HP 除菌治疗临床决策路径

Figure 8 Clinical Decision Pathway for HP Eradication Guided by Fluorescence ROSE

图注：基于荧光 ROSE 实时可视化技术的 HP 除菌治疗全程决策流程。治疗中（第 7 天）检测：活菌比例 $>30\%$ 提示耐药风险高，建议即时调整方案（更换抗生素、延长疗程或加用铋剂）；活菌比例 $\leq 30\%$ 提示疗效良好，继续原方案。治疗后早期（1~4 周）检测：无活菌提示根除成功，无需等待 UBT 确认；有活菌提示复发/耐药，立即启动二线治疗；球化菌比例 $>70\%$ 提示休眠预警，需加强随访监测。荧光 ROSE 核心优势：术中 15~20 分钟即时反馈，较 UBT 提前 4~6 周提供疗效信息，且能精准区分死菌残留与活菌复发。

#### 4.5 研究局限性

单中心研究，样本量有限，需多中心、大样本验证；荧光 ROSE 判读存在一定操作者依赖性，需建立标准化 AI 判读系统；未同步行细菌培养及药敏试验，无法直接验证球化菌的耐药基因表达；随访时间较短，长期复发率需进一步追踪。

#### 5 结论

荧光 ROSE 技术可实时、原位、可视化追踪 HP 除菌治疗全程的活性转变与形态适应，精准区分活菌、死菌及休眠球化菌，其信息时效性、丰富度显著优于传统 UBT。本研究首次描绘了 HP 除菌全程“活性-形态”动态图谱，揭示了球化菌作为休眠/复发形态基础的机制，证实治疗中活菌比例 $>30\%$ 可有效预测除菌失败

(AUC=0.887)。该技术可早期预警除菌失败、规避 UBT 假阳性、揭示复发机制，为 HP 除菌治疗的即时监测、个体化方案调整、复发防控提供了全新的可视化工具，具有重要临床推广价值。未来需开展多中心大样本研究验证，并建立标准化 AI 判读系统以降低操作者依赖性。

## 参考文献

- [1] Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med*. 2002;347(15):1175-86. DOI: 10.1056/NEJMra020542.
- [2] Malfertheiner P, Camargo MC, El-Omar E, et al. *Helicobacter pylori* infection. *Nat Rev Dis Primers*. 2023;9(1):19. DOI: 10.1038/s41572-023-00431-8
- [3] Gisbert JP, Pajares JM. Review article: 13C-urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection - a critical review. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004;20(10):1001-17. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2004.02203.x.
- [4] Best LM, Takwoingi Y, Siddique S, et al. Non-invasive diagnostic tests for *Helicobacter pylori* infection. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;3(3):CD012080. DOI: 10.1002/14651858.CD012080.pub2.
- [5] Nakamura RM, Kinomoto M. Detection of viable or non-viable mycobacteria by hydrolysis of fluorogenic substrate. *Kekkaku*. 1990;65(5):365-8. [Article in Japanese], PMID: 1697350.
- [6] Lin Zhang, Yanhong Hou, Binghui Li, et al. (Preprint) Real-Time Pathogen Visualization: Fluorescence ROSE versus Kyoto Classification for *H. pylori* Infection Activity and Eradication Assessment. *biomedrxiv*. 2025.
- [7] Ramírez-Lázaro MJ, Lario S, Casalots A, et al. Occult *H. pylori* infection partially explains 'false-positive' results of (13)C-urea breath test. *United European Gastroenterol J*. 2015;3(5):437-42. DOI: 10.1177/2050640615572723.
- [8] Osaki T, Mabe K, Hanawa T, et al. Urease-positive bacteria in the

stomach induce a false-positive reaction in a urea breath test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *J Med Microbiol.* 2008;57(Pt 7):814-9. DOI: 10.1099/jmm.0.47768-0.

[9] Masafumi Nishino, Toshihiko Kakiuchi, Kayoko Fukuda, et al. Case report: A pediatric case of repeated false-positive urea breath test for *Helicobacter pylori* without decreased gastric acid secretion. *Front Med (Lausanne).* 2023 Sep 1;10:1267180. DOI: 10.3389/fmed.2023.1267180.

[10] Didem Aktas, Melahat Bagirova, Adil M Allahverdiyev, et al. Resuscitation of the *Helicobacter pylori* Coccoid Forms by Resuscitation Promoter Factor Obtained from *Micrococcus Luteus*. *Curr Microbiol.* 2020, 77(9):2093-103. DOI: 10.1007/s00284-020-02043-x.

[11] L Cellini, I Robuffo, E Di Campli, et al. Recovery of *Helicobacter pylori* ATCC43504 from a viable but not culturable state: regrowth or resuscitation? *APMIS.* 1998;106(5):571-9. PMID: 9674895.

[12] Sorberg M, Nilsson M, Hanberger H, et al. Risk of development of in-vitro resistance to amoxicillin, clarithromycin, and metronidazole in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(5):1222-8. DOI: 10.1128/AAC.42.5.1222.

[13] Faghri J, Poursina F, Moghim S, et al. Morphological and bactericidal effects of different antibiotics on *Helicobacter pylori*. *Jundishapur J Microbiol.* 2014;7(1):e8704. DOI: 10.5812/jjm.8704.

[14] Sarem M, Sarem M, Corti R. [Role of *Helicobacter pylori* coccoid forms in infection and recrudescence]. *Gastroenterol Hepatol.* 2016, 39(1):28-35. DOI: 10.1016/j.gastrohep.2015.04.009.

[15] Gladyshev N, Taame M, Ibiliev A, et al. Colonization by various morphological forms of *Helicobacter pylori* in the gingival sulcus and antrum of the stomach. *Recent Adv Antiinfect Drug Discov.* 2022;17(3):199-211. DOI: 10.2174/2772434417666220903093339.

[16] Reshetnyak VI, Reshetnyak TM. Significance of dormant forms of

*Helicobacter pylori* in ulcerogenesis. *World J Gastroenterol.* 2017;23(27):4867-78. DOI: 10.3748/wjg.v23.i27.4867.

[17] Kwon YH, Kim N, Lee JY, et al. The diagnostic validity of citric acid-free, high dose (13)C-urea breath test after *Helicobacter pylori* eradication in Korea. *Helicobacter.* 2015,20(3): 159-68. DOI: 10.1111/hel.12189.

[18] J Hua, B Ho. Is the coccoid form of *Helicobacter pylori* viable? *Microbios.* 1996;87(351):103-12. PMID: 9032959.

[19] Andersen LP, Rasmussen L. *Helicobacter pylori*-coccoid forms and biofilm formation. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009;56(2):112-5. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2009.00556.x.