

Diagnostic methods for small intestinal bacterial overgrowth

Qiwen Si¹ Rina Suo^{2*}

1. Graduate School of Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia, 010110, China

2. Department of Gastroenterology, The First Hospital of Hohhot, Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot, Inner Mongolia, 010030, China;

Abstract

Small Intestinal Bacterial Overgrowth (SIBO) is a common digestive system disease among clinical patients. It has been scientifically proven to be associated with various digestive system discomforts such as bloating, abdominal pain, and diarrhea. Surprisingly, there is currently no internationally recognized unified standard for the definition of SIBO. This review aims to summarize the mainstream detection methods of SIBO and analyze and compare the advantages and disadvantages of each method, with the expectation of providing ideas for the precise definition of SIBO.

Keywords

Overgrowth of small bowel bacteria; diagnostic method; breath test

小肠细菌过度生长的诊断方法

司淇文¹ 索日娜^{2*}

1. 内蒙古医科大学研究生院, 中国·内蒙古 呼和浩特 010110

2. 内蒙古自治区呼和浩特市第一医院消化内科, 中国·内蒙古 呼和浩特 010030

摘要

小肠细菌过度生长 (Small Intestinal Bacterial Overgrowth, SIBO) 是指小肠内菌群数量和 (或) 种类变化, 并达到一定程度产生临床表现。它是临床诊疗过程中常见的消化系统疾病, 经过科学研究被证实与多种消化系统不适感如腹胀、腹痛、腹泻等以及与多种器质性和功能性消化系统疾病相关。但令人诧异的是, 目前针对SIBO的定义却没有一个国际公认的统一标准。本篇综述旨在汇总目前主流的SIBO检测方法, 简述其机制并分析与对比各方法优劣之处, 以期为SIBO的精准定义提供思路。

关键词

小肠细菌过度生长; 诊断方法; 呼气试验

1 引言

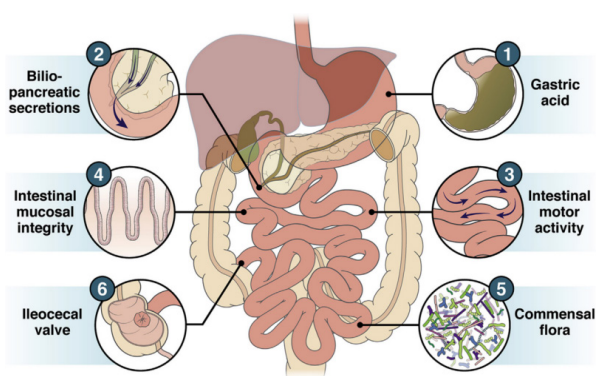
微生物群落是在某个特定的环境中, 所有相互作用的微生物集合。肠道微生物群落是人体各系统中较为复杂的一个群落, 无论是种类、数量还是丰度都是最多的^[1]。在人类肠道微生物群落中, 有超过 1500 个物种、分布有 50 个不同门的微生物共同聚集^[2]。其中, 以拟杆菌门与厚壁菌门为主导门, 其次优势门为变形菌门、梭杆菌门、特尼菌门、放线菌门和疣菌门, 以上菌门总和至少占人体微生物群落的 90%^[3]。肠道菌群不仅数量、种类众多, 且对于人体健康

起到了重要的作用。其中之一便是通过在肠粘膜表面聚集形成定植菌群以及产生多种抗菌物质来起到对抗病原体的作用^[4]。除保护宿主免受病原菌的侵袭外, 还具有促进消化吸收、药物代谢、影响脂肪的吸收和分布、调节能量代谢、调节先天免疫和获得性免疫等^[5]。因此, 肠道菌群在人体内扮演着非常重要的角色, 与人类的健康息息相关。

在人类消化系统中, 小肠是最主要的营养物质分解吸收的器官。加之, 经口摄入的细菌绝大多数被胃酸及胃蛋白酶杀灭; 胆汁酸盐及肠道分泌的免疫球蛋白具有杀菌作用; 消化间期移行性复合运动 (Migrating Motor Complex, MMC) 将肠内容物推向结肠; 回盲瓣单向阀门可防止结肠细菌逆流倒灌入小肠等机制^[6] (图 1 人类消化系统简易结构及功能), 致使小肠内细菌的稳态尤为重要。

【作者简介】司淇文 (1995-), 男, 中国山西大同人, 在读硕士, 从事消化病学研究。

【通讯作者】索日娜 (1969-), 女, 蒙古族, 中国内蒙古赤峰人, 硕士, 主任医师, 从事小肠细菌过度生长等研究。



(图1 人类消化系统简易结构及功能)

小肠细菌过度生长 (Small Intestinal Bacterial Overgrowth, SIBO), 又称小肠淤积综合征、小肠污染综合征或盲袢综合征。早在 1906 年肠管术后狭窄合并贫血患者, 引起了外科医生的注意; 1920 年有医生提出贫血原因可能是“小肠被细菌毒素污染”; 1939 年首次报道了 1 例肠梗阻患者, 其病因与细菌过度生长有关^[7]。伴随基础与临床研究的不断深入, 现将 SIBO 定义为各种原因引起的小肠内细菌数量和/或种类异常, 导致的一组临床综合征, 最常见的表现有腹泻、腹胀、腹痛, SIBO 是肠道菌群失调的一个子集^[8]。随后接下来的数十年里, 关于 SIBO 的研究也百花齐放, PubMed 中以 SIBO 为关键词的文章呈现逐年上升趋势, 研究者们发现 SIBO 与多种疾病均有关联^[9] (Figure 1)。具体 PubMed 中以年为索引 SIBO 的出版物数量详见图 2

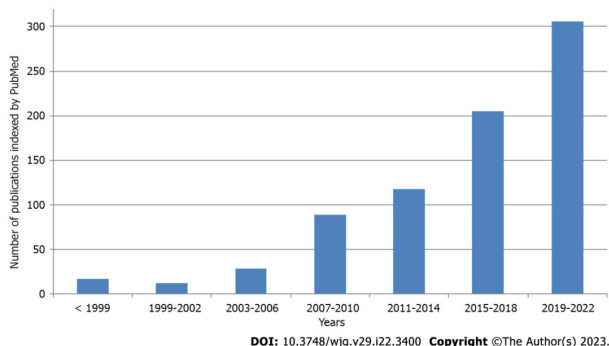


图2 PubMed 中以年为索引 SIBO 的出版物数量

但目前仍有缺憾的是, SIBO 作为一个专有医学名词, 它的定义却均缺乏一致性, 究其原因因为各种检测小肠细菌过度生长的方法, 均有优势和缺陷, 标准尚不统一。下面我将详细介绍目前已有的检测方法, 以期为 SIBO 的精准定义提供思路。

2 十二指肠 / 空肠抽吸液细菌培养

十二指肠 / 空肠抽吸液细菌培养, 检测细菌数量 (每 mL 抽吸物的细菌菌落形成单位, CFU/mL) 和 / 或粘膜微生物群的成分, 是目前最为直接诊断 SIBO 的方法, 也是相对的诊断“金标准”。对于细菌数量, 2017 年北美共识

《胃肠疾病基于氢气和甲烷的呼气测试》和 2020 年美国胃肠病学会《小肠细菌过度生长临床指南》, 认为应当以培养细菌菌落计数阈值 ($\geq 1 \times 10^3$ CFU/mL) 为 SIBO 的诊断标准^[10]。但不同的研究团队之间, 对于诊断标准的阈值仍存在异议。例如一些团队认为培养细菌菌落计数阈值 ($\geq 1 \times 10^5$ CFU/mL) 为 SIBO 的诊断标准^[11]。而 2022 年亚太共识指南《胃肠道疾病中的小肠细菌过度生长》和 2023 年西班牙消化病理学学会《小肠细菌过度生长》则同时承认上述两种诊断标准^{[12] [13]}。

虽然该方法最直接, 但是存在诸多缺点。细菌培养的方法只能培养出 10%-30% 的肠道微生物群, 严重低估菌群的丰度; 该方法为侵入性手段, 患者需承担一定的风险^[14]; 设备耗材成本高, 不宜推广; 经口腔、食道下镜探查不可避免的会受到此处细菌的污染, 从而导致假阳性; 镜长有限, 通常在十二指肠抽吸小肠液, 无法触及更远端肠道, 可能出现假阴性; 在样品处理和微生物技术方面没有一致的质控标准等问题^[15]。

16S 核糖体 RNA/DNA (16 S rRNA/rDNA) 基因测序, 是通过对被检标本中所有微生物中都含有的 16s rDNA 基因进行计数与测序, 诊断 SIBO 以及明确 SIBO 患者肠道菌群的变化, 探明菌群变化与患者某些症状之间的关系。在 2022 年的一项研究中, 研究者通过此方法发现: SIBO 患者与非 SIBO 患者相比, 链球菌的相对丰度增加, 而拟杆菌的相对丰度降低; 而某些占比少数的大肠杆菌和克雷伯氏菌株 / 种与腹胀、腹泻和腹胀严重程度相关^[16]。另一研究团队则发现: 相比于非 SIBO 患者, SIBO 患者肠道内肠杆菌科的克雷伯氏菌和埃希氏菌 / 志贺氏菌的相对丰度有所增加, 肠杆菌科的相对丰度与腹胀呈正相关^[17]。相比于传统的十二指肠 / 空肠抽吸液细菌培养, 基因测序方法更能明确样本中微生物群的数量和组成等详细信息。但同样存在传统方法的缺点。

宏基因组测序, 其操作方法是先将核酸提取进行预处理, 然后合成每一 DNA 的互补链, 使用特定范围的特异性引物与之结合进行扩增, 最后通过荧光测量或熔解曲线分析的杂交阵列, 对基因组 DNA 或 PCR 扩增产物进行定性与定量分析^[18]。该方法通常采取粪便样本, 除了价格昂贵以外, 提取物内所有的 DNA 都会被测序, 这其中必然有人类的 DNA, 可能涉及到医学伦理, 以及受试者是否同意 DNA 隐私被探明。

3 呼气试验

20 世纪 50 年代, 英国诺贝尔奖获得者马丁 (A.J.P.Martin) 和辛格 (R.L.M. Synge) 联名发表论文, 首次预言色谱流动相可以是气体, 预测了气相色谱法 (Gas Chromatography, GC) 的可行性。由此, 气体分离技术的进步, 奠定了呼气试验在医学诊断等领域的技术基础。

呼气试验,作为一项无创、普及、经济、安全、简便的检测方法,由于其是非侵入性的,被广泛的用于评估有无常见的胃肠道问题,这些胃肠道问题中也包括 SIBO。呼气试验使用的底物主要有葡萄糖、乳果糖、菊粉等,常用于检测的气体有肠道中的 H_2 (氢气)、 CH_4 (甲烷)、 CO_2 (二氧化碳)。

3.1 H_2 和 CH_4 呼气试验

H_2 和 CH_4 呼气试验,是目前应用最广泛的呼气试验。1965年前后,《Nature》、《Gastroenterology》、《The New England Journal of Medicine》发表文章论述道:新生儿出生后的12小时内,不能产生甲烷和氢气,可以得知菌群酵解是肠道中甲烷、氢气的唯一来源^[19];这一推断在禁食受试者摄入碳水化合物后,氢气显著释放,再次得以验证^[20];经过实验还发现,呼吸道排出的氢气,可以作为肠道氢气产生的指标^[21]。由此,菌群酵解不同底物产生氢气、甲烷,通过肠粘膜扩散至血液,经血液循环到达肺泡,利用肺部气体交换呼出体外^[22],为呼气试验在消化系统临床工作中发挥作用奠定了生理基础。

若有条件,可同时加测 CO_2 ,因为在肺泡空气中, CO_2 水平非常稳定在5%左右,因此 CO_2 作为校正因子,测量其浓度不仅有助于识别不合格的样品,还可以提高诊断的准确性^[23]。2009年,有关氢气呼气试验的第一个临床专家共识罗马共识《胃肠道疾病氢气呼气试验的方法和指征》问世^[24]。随后,亚洲、欧洲、美国、德国等专业组织,在有关共识指南中也明确了呼气试验的操作方法、临床应用等,但有关诊断标准与阈值尚未统一,我国至今也还没有该试验应用方面的共识指南。

3.2 CO_2 呼气试验

CO_2 呼气试验,主要依赖于使用碳同位素标记的化合物来测定产生同位素标记的 CO_2 的量,底物分别为 ^{14}C -甘氨酸盐、乳糖- ^{13}C -尿素和 $^{13}/^{14}C$ -D-木糖。

3.2.1 ^{14}C -甘氨酸盐为底物

^{14}C 标记的甘氨酸盐呼气试验,较早已被认可用来诊断 SIBO。初级胆汁酸主要在肝脏合成,次级胆汁酸是初级胆汁酸进入小肠后,在肠道微生物作用下,进行 7α 脱羟作用所形成的胆汁酸。当甘氨酸盐这种初级胆汁酸进入肠道后,会被肠道细菌分解为甘氨酸和此前被其结合的游离胆汁酸。游离胆汁酸被吸收入血回肝脏再次利用,而甘氨酸入血回肝,在肝脏中代谢产生 CO_2 ,最后 CO_2 通过呼吸排出。将甘氨酸1号位C原子替换为同位素 ^{14}C ,接着嘱受试者口服 ^{14}C -甘氨酸盐,若 $^{14}CO_2$ 比正常时间更快的被检测到,则表明小肠细菌过度生长。但该方法无法区分小肠和结肠细菌对甘氨酸的去偶联能力,且存在小肠快速转运的可能,导致试验准确性及特异性受到影响。

3.2.2 乳糖- ^{13}C -尿素为底物

葡萄糖和乳果糖,均可以在小肠菌群作用下产生气体。

前者是一种单糖,在近端小肠快速完全吸收,可能会导致假阴性。后者是一个到达盲肠且吸收差的双糖,通常会出两个气体峰值,第一个峰是由于小肠细菌作用,第二个是由于大肠细菌作用,有时也会出现小肠峰与大肠峰合并。考虑到两种底物各存在优劣,也有学者建议引入碳同位素标记。乳糖- ^{13}C -尿素为底物的呼气试验与传统葡萄糖为底物的呼气试验进行对比,乳糖- ^{13}C -尿素呼气试验的特异性为100%、敏感性为66.7%,葡萄糖呼气试验特异性为44.4%、敏感性为41.7%。

3.2.3 $^{13}/^{14}C$ -D-木糖为底物

D-木糖,是一种戊糖,其中摄入量的约70%在近段空肠被吸收。因此该呼气试验可最大限度的使底物与小肠细菌接触,同时最大限度的减少了底物与结肠细菌接触。将D-木糖标记为 $^{13}/^{14}C$ -D-木糖后,给予受试者口服,若在60分钟内呼出的 $^{13}/^{14}CO_2$ 气体较对照组增加,则认为小肠内细菌过度生长,该试验具有较好灵敏性和特异性。

4 气体胶囊内镜技术

气体胶囊内镜,包含传感肠道内气体的传感器、传感器芯片、小型电源以及一张可渗透气体分子但不可渗透液体的聚合物膜。胶囊内镜经口服进入人体后,延着人体消化道运动,可检测各个部位的 O_2 (氧气)、 CO_2 (二氧化碳)、 H_2 (氢气) 气体,采样时间间隔可从几秒至几分钟。有研究将该技术与传统呼气试验所测得数据进行对比,发现随时间变化的 H_2 波动在幅度上与呼气试验测量结果高度一致,且气体胶囊内镜在测量 H_2 浓度方面更胜一筹。可摄入的胶囊内镜价值不仅在于其监测肠道内气体浓度,还在于其确定肠道内气体产生位置的能力。未来,还可以用于辨别实验个体的饮食改变,也有助于肠道和菌群功能、饮食和补充剂对人体影响的研究。

5 胆汁酸偶联物尿排泄试验

与对氨基苯甲酸结合的胆酸 (p-aminobenzoic acid-cholic acid, PABA-CA) 和与对氨基苯甲酸结合的熊去氧胆酸 (p-aminobenzoic acid-ursodeoxycholic acid, PABA-UDCA) 作为底物,口服后,这两种胆汁酸在小肠中被肠道细菌的胆汁酸水解酶分解,再次变回 CA 或 UDCA 与 PABA。其中 CA 或 UDCA 被机体通过肠肝循环反复利用,而 PABA 则被小肠上皮细胞吸收入血后,经肝代谢、肾排泄的方式,以溶于尿液的形式排出体外。在一项研究中,实验对象分为三组,分别是正常大鼠、经抗生素治疗后大鼠以及 SIBO 大鼠 (通过手术操作制备而成),同时分别给予三组大鼠口服 10mg PABA-CA, PABA 在给药后 6 h 内的总尿排泄量经组内平均后分别为 0.42mg、0.21mg 和 1.11mg。即经抗生素治疗组的排泄量为正常对照组的一半,而 SIBO 大鼠的排泄量却为对照组的 1.25 倍。因此,以 PABA-CA 或 PABA-UDCA 为底物的尿排泄试验可用于诊断 SIBO,但易

受小肠吸收功能和肾、肝功能的影响。

综上所述, 小肠微生态, 在科研与临床方面, 都值得更为深入的探索。SIBO 检测技术一直在发展, 但用于诊断的可靠方法还有待进一步实践予以验证。十二指肠/空肠抽吸液细菌培养, 虽然是最直接的方式, 但因其侵入性、复杂性且价格高昂, 无法普惠患者。以 ^{13}C 和 ^{14}C 为同位素标记的 CO_2 呼气试验, 底物均需要特殊处理, 供应受限、成本高, 且 ^{14}C 具有放射性。气体胶囊内镜技术, 属于新兴方法, 在胃内一般停留 4.5 小时、小肠停留 2.5 小时, 持续时间过长, 且对 CH_4 的检测还未见报道, 有待再评估。16S 核糖体 RNA/DNA 基因测序、宏基因组测序, 止步于成本, 主要用于科学研究。尿排泄试验早在一些动物实验中有参考数据, 人体应用和检测标准化仍有距离。基于菌群代谢组学的 H_2 和 CH_4 呼气试验, 相比其他试验, 是诊断 SIBO 成熟且无创的方法, 更是经济的、无放射性的、易操作的, 被国际共识指南标准普遍推荐。

参考文献

- [1] Neef A, Sanz Y. Future for probiotic science in functional food and dietary supplement development[J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2013 Nov;16(6):679-687.
- [2] Robles-Alonso V, Guarner F. Progress in the knowledge of the intestinal human microbiota[J]. *Nutr Hosp*. 2013 May-Jun;28(3):553-7. Spanish.
- [3] Gomaa, Eman Zakaria. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review[J]. *Antonie van Leeuwenhoek* vol. 113,12 (2020): 2019-2040.
- [4] Mills S, Stanton C, Lane J, et al. Precision Nutrition and the Microbiome, Part I: Current State of the Science[J]. *Nutrients*. 2019 Apr 24;11(4):923.
- [5] Mokhtari Z, Gibson DL, Hekmatdoost A. Nonalcoholic Fatty Liver Disease, the Gut Microbiome, and Diet[J]. *Adv Nutr*. 2017 Mar 15;8(2):240-252.
- [6] Daniel Bushyhead, Eamonn M.M. Quigley. Small Intestinal Bacterial Overgrowth—Pathophysiology and Its Implications for Definition and Management[J]. *REVIEWS IN BASIC AND CLINICAL GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY*. 2022, 163(03):593-607.
- [7] Card WI. “Blind Loop” Syndrome[J]. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*. 1959;52(1):28-31.
- [8] Takakura W, Pimentel M. Small Intestinal Bacterial Overgrowth and Irritable Bowel Syndrome - An Update[J]. *Front Psychiatry*. 2020 Jul 10;11:664.
- [9] Efremova Irina, Maslennikov Roman, Poluektova Elena, et al. Epidemiology of small intestinal bacterial overgrowth[J]. *World journal of gastroenterology*, 2023, 29(22):3400-3421.
- [10] Pimentel Mark, Saad Richard J, Long Millie D, et al. ACG Clinical Guideline: Small Intestinal Bacterial Overgrowth[J]. *The American journal of gastroenterology*, 2020, 115(2):165-178.
- [11] Siniewicz-Luzeńczyk K., Bik-Gawin A., Zeman K., et al. Small intestinal bacterial overgrowth syndrome in children[J]. *Prz. Gastroenterol*. 2015;10:28–32.
- [12] Ghoshal, U.C., Sachdeva, S., Ghoshal, U. et al. Asian-Pacific consensus on small intestinal bacterial overgrowth in gastrointestinal disorders: An initiative of the Indian Neurogastroenterology and Motility Association[J]. *Indian J Gastroenterol* 41, 483–507 (2022).
- [13] Martín Domínguez Verónica, Malagelada Carolina, Santander Cecilio, et al. Small intestinal bacterial overgrowth. A position paper of ASENEM-SEPD.[J]. *Revista española de enfermedades digestivas*, 2023, 116
- [14] Ginnebaugh B., Chey W.D., Saad R. Small intestinal bacterial overgrowth: How to diagnose and treat (and then treat again) *Gastroenterol*[J]. *Clin. N. Am*. 2020;49:571–587.
- [15] 赵婧芳, 游晶. 小肠细菌过度生长的诊治进展[J]. *山东医药*, 2022, 62(28):96-100.
- [16] Bamba S, Imai T, Sasaki M, et al. Altered gut microbiota in patients with small intestinal bacterial overgrowth[J]. *J Gastroenterol Hepatol*. 2023 Jan;38(1):61-69.
- [17] Leite G, Morales W, Weitsman S, et al. The duodenal microbiome is altered in small intestinal bacterial overgrowth[J]. *PLoS One*. 2020;15(7):e0234906. Published 2020 Jul 9.
- [18] Allaband C, McDonald D, Vázquez-Baeza Y, et al. Microbiome 101: Studying, Analyzing, and Interpreting Gut Microbiome Data for Clinicians. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2019;17(2):218-230.
- [19] Calloway DH, Murphy EL, Bauer D. Determination of lactose intolerance by breath analysis. *Am J Dig Dis*. 1969 Nov;14(11):811-5.
- [20] Calloway DH, Colasito DJ, Mathews RD. Gases produced by human intestinal microflora. *Nature*. 1966 Dec 10;212(5067):1238-9.
- [21] Levitt MD. Production and excretion of hydrogen gas in man. *N Engl J Med*. 1969 Jul 17;281(3):122-7.
- [22] Benson T. Massey, Arnold Wald, . Small Intestinal Bacterial Overgrowth Syndrome: A Guide for the Appropriate Use of Breath Testing.[J]. *Digestive diseases and sciences*, 2020, :1-10.
- [23] Hammer K, Hasanagic H, Memaran N, et al. . Relevance of methane and carbon dioxide evaluation in breath tests for carbohydrate malabsorption in a paediatric cohort. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2021;72(3):e71–e77.
- [24] Gasbarrini A, Corazza G R, Gasbarrini G, et al. Methodology and indications of H₂-breath testing in gastrointestinal diseases: the Rome Consensus Conference.[J]. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 2009, 291:41-49.