

蛋白芯片技术在儿童幽门螺杆菌感染诊断中的应用

舒小莉 程海英 杨玲蓉 章许平 张雁翼 江米足
(浙江大学医学院附属儿童医院消化实验室,浙江 杭州 310003)

[摘要] 目的 探讨幽门螺杆菌(HP)抗体检测蛋白芯片技术在儿童 HP 感染诊断中的应用价值。方法 本院经胃镜检查的 120 例患儿,行快速尿素酶试验(RUT)及组织切片 Giemsa 染色。同时采用 HP 抗体蛋白芯片检测患儿血清中抗 CagA、抗 VacA、抗 Ure、抗 Hsp60 及抗 RdxA IgG 抗体。以 RUT 及 Giemsa 染色两项均阳性作为 HP 感染阳性的诊断金标准。结果 120 例患儿中,确诊 HP 感染阳性者 60 例。Ure 抗体、Ure + CagA 抗体、Ure + VacA 抗体及 Ure + CagA + VacA 抗体均阳性对 HP 感染的诊断价值与金标准比较,吻合度和 Kappa 一致性检验均有统计学意义($P < 0.001$)。其中 Ure + CagA 抗体诊断的敏感性为 81.7%,特异性为 91.7%,准确度为 86.7%,阳性预测值为 90.7%,阴性预测值为 83.3%,诊断 HP 现症感染最具临床价值。结论 HP 蛋白芯片抗体检测,特别是 Ure 结合 CagA 抗体检测,对诊断 HP 感染有较高的临床价值,可作为 HP 现症感染的诊断方法。

[中国当代儿科杂志,2011,13(9):728-731]
[关键词] 幽门螺杆菌;蛋白芯片技术;尿素酶;诊断;儿童
[中图分类号] R725.7 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2011)09-0728-04

Value of protein array in the diagnosis of Helicobacter pylori infection in children

SHU Xiao-Li, CHENG Hai-Ying, YANG Ling-Rong, ZHANG Xu-Ping, ZHANG Yan-Yi, JIANG Mi-Zu. Department of Gastrointestinal Laboratory, Children's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, China (Jiang M-Z, Email: mizu@zju.edu.cn)

Abstract: Objective To study the value of multiple Helicobacter pylori (H. pylori) antibody detection by protein array in the diagnosis of H. pylori infection in children. **Methods** Biopsy specimens obtained by gastroscopy from 120 children with digestive system symptoms were detected by rapid urease test (RUT) and modified Giemsa staining. Positivity in both RUT and Giemsa staining was the "gold criterion" of H. pylori infection. Serum samples of these patients were obtained and the antibodies against cytotoxin associated gene A protein (CagA), vacuolating toxin A (VacA), urease, heat shock protein 60 (Hsp60) and RdxA (nitroreductase) were detected by protein array technique. **Results** H. pylori infection was identified according to the "gold criterion" in 60 children. Compared with the "gold criterion", the goodness of fit and the coefficient of contingency in the diagnosis of H. pylori infection of the following four groups antibody detection were all statistically significant ($P < 0.001$): anti-Ure antibody alone, anti-Ure antibody combined with anti-CagA antibody, anti-Ure antibody combined with anti-VacA antibody and anti-Ure antibody combined with anti-CagA and anti-VacA antibody. The sensitivity, specificity and accuracy of the detection of anti-Ure antibody combined with anti-CagA antibody for the diagnosis of H. pylori infection were 81.7%, 91.7% and 86.7%, respectively. The antibody detection showed a high positive predictive value (90.7%) and a high negative predictive value (83.3%). **Conclusions** The antibody detection by protein array, especially the detection of anti-Ure antibody combined with anti-CagA antibody, is valuable in the diagnosis of H. pylori infection. [Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (9):728-731]

Key words: Helicobacter pylori; Protein array; Urease; Diagnosis; Child

幽门螺杆菌(Helicobacter pylori, HP)是慢性胃炎、消化性溃疡、胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤及胃癌的主要致病因素,在我国有很高的感染率。儿童也属易感人群,可能是再发性腹痛的主要原因^[1]。目前 HP 的检测方法主要有侵入性和非侵入性方

法^[2-5],但各种方法均存在利弊,因此,有必要寻求能进一步提高儿童 HP 诊断依从性、适用性和准确性的方法。近年来,蛋白芯片技术也用于 HP 感染的诊断,能实现对 HP 多个指标的快速检测,便于 HP 的分型,有助于临床诊断、药物选择、预后判断和疗

[收稿日期]2011-04-20;[修回日期]2011-06-09
[作者简介]舒小莉,女,硕士,主管技师。
[通信作者]江米足,教授。

效跟踪^[6-7]。据报道,HP 蛋白芯片技术稳定性好,检测的敏感性与特异性和 ELISA 接近^[6],但其临床应用价值尚需进一步评估。本研究将蛋白芯片检测 HP 感染与诊断金标准比较,评价蛋白芯片技术在儿童 HP 感染诊断中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2009 年 9 月至 2010 年 3 月我院行胃镜检查的患儿 120 例,其中男 67 例,女 53 例,年龄 3 ~ 15 岁,平均 9.5 岁。均行胃黏膜活检标本快速尿素酶试验(RUT)及组织切片 Giemsa 染色,胃镜检查前常规采集血清 - 20℃ 保存待测。以 RUT 及组织切片 Giemsa 染色两项均阳性作为 HP 感染阳性的诊断标准,两项均阴性者为 HP 感染阴性。

1.2 蛋白芯片检测血清 HP 抗体

HP 抗体检测蛋白芯片购自深圳欣康基因数码科技有限公司,取 200 μL 患儿血清按说明书操作进行检测,抗体谱包括抗细胞毒素相关蛋白(CagA)、抗空泡毒素相关蛋白(VacA)、抗尿素酶(Ure)、抗 HP 热休克蛋白 60(Hsp60)及抗硝基还原酶(RdxA) IgG 抗体。蛋白芯片反应后在生物芯片阅读仪扫描,由该系统配备的 Mara4.1 软件进行分析。

1.3 统计学分析

用四格表方法对蛋白芯片抗体检测诊断 HP 感

染的敏感性、特异性、准确性、阳性预测值及阴性预测值进行评价,并采用 SPSS 16.0 统计软件与 HP 感染诊断金标准方法进行吻合度和 Kappa 一致性检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 蛋白芯片检测 HP 抗体与 HP 诊断金标准的比较

Ure 抗体、Ure + CagA 抗体、Ure + VacA 抗体或 Ure + CagA + VacA 抗体均阳性对 HP 感染的诊断价值与金标准比较,吻合度均有统计学意义($P < 0.001$),列联系数 C 值依次为 0.609、0.593、0.549、0.541 ($P < 0.001$);Kappa 一致性检验均有统计学意义,Kappa 系数依次为 0.750、0.733、0.633、0.617 ($P < 0.001$)。Ure 抗体阳性诊断 HP 感染敏感性为 98.3%、特异性为 76.7%、准确度为 87.5%,阳性预测值为 80.8%,阴性预测值为 97.9%;Ure + CagA 抗体阳性诊断 HP 感染敏感性为 81.7%,特异性为 91.7%,准确度为 86.7%,阳性预测值为 90.7%,阴性预测值为 83.3%;Ure + VacA 抗体阳性诊断 HP 感染敏感性为 68.3%、特异性为 95.0%、准确度为 81.7%;Ure + CagA + VacA 抗体阳性诊断 HP 感染敏感性为 66.7%、特异性为 95.0%、准确度为 80.8%。见表 1 ~ 2。

表 1 蛋白芯片 HP 抗体检测与胃黏膜 HP 感染诊断金标准比较 [n(%)]

		HP(病理 + RUT)		C 值	P 值	Kappa 值	P 值
		阳性	阴性				
Ure 抗体	阳性	59(98.3)	14(23.3)	0.609	0.000	0.750	<0.001
	阴性	1(1.7)	46(76.7)				
Ure + CagA 抗体	阳性	49(81.7)	5(8.3)	0.593	0.000	0.733	<0.001
	阴性	11(18.3)	55(91.7)				
Ure + VacA 抗体	阳性	41(68.3)	3(5.0)	0.549	0.000	0.633	<0.001
	阴性	19(31.7)	57(95.0)				
Ure + CagA + VacA 抗体	阳性	40(66.7)	3(5.0)	0.541	0.000	0.617	<0.001
	阴性	20(33.3)	57(95.0)				

表 2 蛋白芯片抗体检测诊断 HP 感染敏感性、特异性、准确度、阳性预测值及阴性预测值 (%)

抗体谱	敏感性	特异性	准确度	阳性预测值	阴性预测值
Ure 抗体	98.3	76.7	87.5	80.8	97.9
Ure + CagA 抗体	81.7	91.7	86.7	90.7	83.3
Ure + VacA 抗体	68.3	95.0	81.7	93.2	75.0
Ure + CagA + VacA 抗体	66.7	95.0	80.8	93.0	74.0

2.2 HP 感染患儿中各抗体阳性率

胃黏膜 RUT 和组织切片 Giemsa 染色二项均阳性 60 例患儿中, Ure 抗体阳性率 98% (59/60), CagA 抗体阳性率 82% (49/60), VacA 抗体阳性率 68.3% (41/60), Hsp60 抗体阳性率 10.0% (6/60), RdxA 抗体阳性者 28.3% (17/60)。

3 讨论

HP 感染的致病机制较复杂, 有毒力因子、细胞因子、自由基等多种致病因子参与。随着研究的深入, 发现 HP 在体内和体外的存活条件有很大区别^[8], 一些在体内发挥毒力作用的蛋白可能在体外培养条件下完全不能表达, 或者需要依赖体内的一些生理或病理刺激才能表达。因此抗体谱可能是真实反映宿主免疫反应对抗 HP 的可靠指标^[6,8]。

蛋白芯片技术是以蛋白质代替 DNA 作为检测对象的一种方法^[9], HP 抗体蛋白芯片检测系统利用基因重组技术包被 HP 的抗原, 经微孔滤膜的渗滤、浓缩、凝集作用, 使抗原抗体在固相膜上快速反应。目前蛋白芯片包被的 HP 抗原主要有 CagA、VacA、Ure、Hsp60 及 RdxA 等 5 种蛋白, 可同时检测 5 种抗体。CagA 具有很强的免疫原性, 能诱导宿主胃黏膜局部产生多种细胞因子, 进而通过促进中性粒细胞的聚集和活化启动炎症过程, 与 HP 毒力呈高度相关^[10]。VacA 对胃上皮有直接的毒性作用, 损伤上皮, 使胞浆内空泡形成, 损伤胃黏膜, 延缓胃上皮的修复。近年的研究证实 CagA 和 VacA 是 HP 的主要毒力因子^[11]。Ure 是 HP 主要抗原之一, 所有的野生型 HP 均产生 Ure, 可引起患儿产生 IgG 和 IgA。热休克蛋白 (Hsp) 家族成员通过促进自发的细胞增殖及抑制正常的细胞凋亡在肿瘤生长过程中起着重要作用^[12]。HP 的 Hsp60 作为一个黏附分子与胃上皮细胞及黏蛋白相互作用, 同时它也是一个强有力的免疫原, 能刺激宿主单核细胞、巨噬细胞及胃上皮细胞产生各种前炎症因子。新近的研究表明, HP 特有的 Hsp60 可能通过释放各种前炎症因子、促进血管生成及转移从而触动癌变的发生^[13]。Tanaka 等^[14]的研究也提示 Hsp60 与胃癌的发生发展关系极为密切。

一般认为, 具有较高的特异性和准确度、敏感性又较高的诊断方法, 比较具有临床诊断价值。本研究以胃镜活检黏膜 RUT 和病理 HP 诊断两项均阳性为 HP 感染诊断金标准, HP 抗体检测蛋白芯片结果显示, 诊断 HP 感染敏感性较高的为 Ure 抗体阳

性或 Ure + CagA 抗体均阳性, 特异性较高的为 Ure + CagA + VacA 抗体、Ure + VacA 抗体或 Ure + CagA 抗体均阳性, 准确度较高的为 Ure 抗体阳性或 Ure + CagA 抗体均阳性。本研究结果还显示, Ure 抗体、Ure + CagA 抗体、Ure + VacA 抗体或 Ure + CagA + VacA 抗体均阳性对 HP 感染的诊断吻合度与金标准比较均有统计学意义, 提示符合率较高, 但列联系数 C 值以 Ure 抗体阳性或 Ure + CagA 抗体均阳性最高。Kappa 一致性检验也均有统计学意义, 提示蛋白芯片测定结果与金标准诊断结果的一致性较好, 但 Kappa 系数以 Ure 抗体阳性或 Ure + CagA 抗体均阳性最高。提示蛋白芯片 Ure 抗体阳性或 Ure + CagA 抗体均阳性诊断 HP 感染的价值高于 Ure + VacA 抗体或 Ure + CagA + VacA 抗体均阳性。由于 Ure 抗体阳性诊断 HP 感染的特异性较低, 因而认为 Ure 抗体和 CagA 抗体两项均阳性诊断 HP 现症感染最具临床价值。

HP 蛋白芯片检测还可进行菌株毒力性、耐药性及癌变风险因子检测, 对临床治疗及预后评估具有重要意义。在西方国家, 50% ~ 60% 的 HP 临床分离株呈 CagA 阳性, 但在亚洲国家, 如中国、日本及韩国, CagA 阳性菌株的比例都在 90% 以上。本研究显示快速尿素酶试验、组织切片染色二项均阳性患儿中 CagA 抗体阳性率达 81.7%, 高于国内报道^[7], 表明儿童感染的 HP 菌株大部分毒力都较强。国外研究显示, 含有 RdxA 蛋白的菌株, 对甲硝唑敏感, 不含 RdxA 的菌株则对甲硝唑有耐药性, 而 11% ~ 70% 的 HP 临床分离株对甲硝唑耐药^[15], 这一比例在我国更高^[16]。本研究 HP 感染患儿中 RdxA 抗体阳性者为 28.3%, 表明 71.7% (43/60) HP 感染患儿对甲硝唑耐药, 提示选择药物时要注意耐药性问题。另外, 本研究还发现, 60 例患儿中有 10% 的 Hsp60 抗体阳性, 由于 Hsp60 抗体与肿瘤的密切关系, 要引起高度重视, 对其进行必要的随访和观察。

综上所述, 蛋白芯片技术检测 HP 抗体谱有一定的临床应用前景, 其中 Ure 抗体和 CagA 抗体均阳性诊断 HP 感染有较高的临床价值, 可作为 HP 现症感染的诊断方法。

[参 考 文 献]

- [1] 孙弢, 郁春雷, 唐进, 汤华平, 陆敏. 幽门螺杆菌感染与 6 岁以上儿童再发性腹痛的关系及其治疗[J]. 实用儿科临床杂志, 2010, 25(7): 499-500.
- [2] Monteiro L, Oleastro M, Lehours P, Mégraud F. Diagnosis of Helicobacter pylori infection[J]. Helicobacter, 2009, 14(Suppl 1):

8-14.

[3] Ricci C, Holton J, Vaira D. Diagnosis of Helicobacter pylori: invasive and non-invasive tests[J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2007, 21(2): 299-313.

[4] 闫伟, 曹建彪. 胃幽门螺杆菌检测技术进展[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(15): 1527-1533.

[5] Guarner J, Kalach N, Elitsur Y, Koletzko S. Helicobacter pylori diagnostic tests in children: review of the literature from 1999 to 2009[J]. Eur J Pediatr, 2010, 169(1):15-25.

[6] Han FC, Li XJ, Jiang H, Qin LP, Li D, Guo YH, et al. Detection of H. pylori antibody profile in serum by protein array[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(25):4044-4048.

[7] 姚宝珍, 夏利平, 何斌, 王军陵. 儿童幽门螺杆菌感染的检测[J]. 中华医院感染学杂志, 2006, 16(4):466-468.

[8] Kimmel B, Bosserhoff A, Frank R, Gross R, Goebel W, Beier D. Identification of immunodominant antigens from Helicobacter pylori and evaluation of their reactivities with sera from patients with different gastroduodenal pathologies [J]. Infect Immun, 2000, 68(2):915-920.

[9] Hartmann M, Roeraade J, Stoll D, Templin MF, Joos TO. Protein microarrays for diagnostic assays[J]. Anal Bioanal Chem, 2009, 393(5):1407-1416.

[10] Costa AC, Figueiredo C, Touati E. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection[J]. Helicobacter, 2009, 14(Suppl 1):15-20.

[11] Torres J, Backert S. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection [J]. Helicobacter, 2008, 13(Suppl 1):13-17.

[12] Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis[J]. Trends Biochem Sci, 2006, 31(3):164-172.

[13] Lin CS, He PJ, Tsai NM, Li CH, Yang SC, Hsu WT, et al. A potential role for Helicobacter pylori heat shock protein 60 in gastric tumorigenesis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 392(2):183-189.

[14] Tanaka A, Kamada T, Yokota K, Shiotani A, Hata J, Oguma K, et al. Helicobacter pylori heat shock protein 60 antibodies are associated with gastric cancer [J]. Pathol Res Pract, 2009, 205(10):690-694.

[15] Jenks PJ, Edwards DI. Metronidazole resistance in Helicobacter pylori[J]. Int J Antimicrob Agents, 2002, 19(1):1-7.

[16] 黄烈平, 庄满利, 顾承萍. 36株青少年幽门螺杆菌耐药分析[J]. 中国当代儿科杂志, 2009, 11(3):210-212.

(本文编辑:王庆红)

· 消息 ·

中国医师协会新生儿专业委员会第二次 全国新生儿科学术会议征文通知(首轮)

经中国医师协会新生儿专业委员会常委会研究决定,并报中国医师协会学术会员部批准,第二次全国新生儿科学术会议定于2012年3月在北京召开。现开始征文,与新生儿各专业有关的论文(基础研究、临床研究、护理及管理)等)可投稿。请将论文电子版全文及800字以内的结构式摘要发至新生儿专业委员会学会办公室电子信箱:xinshengerywh@126.com。

联系人:张倩,电话:010-84024716。

中国医师协会新生儿专业委员会
2011年7月5日

• 731 •