

# 单克隆抗体包被粪便幽门螺杆菌抗原检测的临床研究

闫伟 林静 程艳丽 顾雁 刘秀清 王亚丽 郭伟宏 李玉红 韩彩云 赵灿

**【摘要】** 目的 探讨粪便幽门螺杆菌(Hp)特异性抗原(HpSA)在诊断Hp感染中的价值。方法 371例因上消化道症状就诊于我院消化内科的患者均采用酶免疫分析(EIA)法检测HpSA,以病理组织学或<sup>13</sup>C-尿素呼气试验(<sup>13</sup>C-UBT)作为诊断Hp感染的“金标准”,应用ROCKIT for windows 1.1β和SPSS 15.0进行统计学分析,应用不拘分布形式参数法(拟合双正态模型)和非参数法绘制光滑受试者操作特征分析曲线(ROC curve)和经验ROC曲线,以曲线下面积(Az)评价HpSA试验的诊断价值。结果  $\chi^2$ 检验表明EIA法检测Hp感染与“金标准”比较差异无统计学意义( $P>0.05$ );EIA法检测HpSA敏感度89.2%,特异度96%,Youden指数0.85,Kappa值0.86;EIA法检测HpSA的不拘分布形式参数法和非参数法ROC曲线下面积分别为0.95和0.93,与完全无诊断价值的机会线下面积0.50相比差异均有显著性统计学意义( $P<0.001$ )。结论 HpSA(单克隆抗体包被)是一种非侵入性诊断Hp感染的方法,该法简便易行,值得临床进一步推广。

**【关键词】** 粪便; 抗原; 诊断试验, 常规; 幽门螺杆菌

**Study on diagnosis value of *Helicobacter pylori* stool antigen coated by monoclonal antibody** YAN Wei, LIN Jing, CHENG Yan-li, GU Yan, LIU Xiu-qing, WANG Ya-li, GUO Wei-hong, LI Yu-hong, HAN Cai-yun, ZHAO Can. Department of Gastroenterology, the First Hospital of Tsinghua University, Beijing 100016, China

Corresponding author: LIN Jing, Email: dodo-yan@163.com

**【Abstract】 Objective** To evaluate diagnosis value of the detection of *Helicobacter pylori* (Hp) specific antigen (HpSA) in the stool samples for the diagnosis of Hp infection. **Methods** HpSA specimens were detected by enzyme immunoassay (EIA) in 371 cases, the evaluation of Hp infection status was defined as positive when pathohistology or <sup>13</sup>C-urea breath test (<sup>13</sup>C-UBT) was positive. ROCKIT for windows 1.1β software and SPSS 15.0 software package were used to analyze the datum. Parametric distribution-free approach (PDF) and non-parametric method were used to drawn the relative operating characteristic (ROC) curve. Using the area under the ROC curve (Az) to evaluate significance of the detection of HpSA in the diagnosis of HP infection. **Results** The chi-square test showed that there was not significant difference between diagnosis of Hp infection by EIA and by the gold standard ( $P>0.05$ ). The sensitivity and specificity of detecting the HpSA by EIA were 89.2% and 96%, respectively; Youden's index = 0.85, Kappa = 0.86. The area under the ROC curve of PDF and non-parametric method by EIA were 0.95 and 0.93, respectively, there was significant difference between it and 0.50 ( $P<0.001$ ). **Conclusions** The Hp stool antigen coated by monoclonal antibody test is a simple, non-invasive method which was worth spreading in clinical application.

**【Key words】** Feces; Antigen; Diagnosis test, conventional; *Helicobacter pylori*

应用准确的检测方法诊断幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染对于指导临床诊疗极为重要。随着对Hp研究的逐渐深入,其检测方法也越来越完善,可从Hp的病理学、细菌学、生物学特性以及免疫学

方法等方面来进行诊断。Vaira等<sup>[1]</sup>研究发现 Hp 定居于胃上皮细胞表面,而胃上皮细胞更新很快,在其更新的过程中 Hp 随细胞脱落,经过肠道随粪便排出,故检测 Hp 特异性抗原(HpSA)可成为临床诊断 Hp 现症感染的方法之一。我们之前有研究表明酶免疫分析(EIA)法(多克隆抗体包被)检测 HpSA 诊断 Hp 感染其敏感度和特异度均较高<sup>[2]</sup>,但 Leodolter等<sup>[3]</sup>报道多克隆抗体包被检测 Hp 的敏感度(80.0%)低于单克隆抗体包被的敏感度(94.3%),单克隆抗体技术是1975年由英国科学家 Milstein 和 Kohler 所发明,并获得1984年诺贝尔医学奖。单克隆抗体技术与多克隆抗体技术区别在于:当机体受抗原刺激时,抗原分子上的许多决定簇分别激活各个具有不同基因的 B 细胞。被激活的 B 细胞分裂增殖形成该细胞的子孙,即克隆由许多个被激活 B 细胞的分裂增殖形成多克隆,并合成多种抗体。如果能选出一个制造一种专一抗体的细胞进行培养,就可得到由单细胞经分裂增殖而形成细胞群,即单克隆。单克隆细胞将合成一种决定簇的抗体,称为单克隆抗体。本研究旨在探讨应用 EIA 单克隆抗体包被法检测粪便 HpSA 诊断 Hp 感染的准确性和可靠性。

## 对象和方法

1. 对象:随机选择2010年11月至2011年2月在清华大学第一附属医院消化内科门诊或住院患者,排除4周内服用过抗生素、铋剂或质子泵抑制剂等对 Hp 检测有影响的药物以及严重腹泻或水样便患者。入选患者共371例,其中男171例,女200例,男女比为1.17,年龄18~86岁,平均(49±5.28)岁。所有入选患者均次日空腹至少6h以上,留取新鲜粪便标本,以 EIA 法检测 HpSA,同时行<sup>13</sup>C-尿素呼气试验(<sup>13</sup>C-UBT)或病理组织学检查。

2. 方法:(1)设盲:<sup>13</sup>C-UBT、HpSA 及病理组织学均由不同的实验技术人员操作,分别保存各自的检验结果,试验结束后揭盲。(2)HpSA(采用全自动多功能酶标仪及自带检测统计软件分别记录样品、阳性对照、阴性对照和空白孔的吸光度(OD)值,两次重复试验后取平均值进行结果计算和判断。试验方法严格按照试剂盒说明书进行,操作步骤如下:取粪便样品约100mg,加入盛样品稀释液的试管中,置旋涡混合器上振荡20s配成1:4稀释样品;用吸管取2滴(约100 $\mu$ l)1:4稀释样品加于微孔底部;设置空白对照,同时分别取2滴阳性对照和阴性对照加入阳性和阴性对照微孔;每孔滴入2滴酶标抗体,在桌面上轻摇混合;用微孔板封条密封微孔顶部,室温孵育60min后去除封条;使用希尔自动洗板机每孔洗涤6次后拍干;每孔中加2滴底物溶液,轻摇微孔板15s,室温孵育10min;向每孔中加2滴停止液,轻摇动15s;10min内在酶联免疫读数仪上测定每孔的吸光度并记录。

结果判定:单波长光谱法参考 cut-off 值为(450nm)0.160。阳性:OD<sub>450</sub>≥0.161;阴性:OD<sub>450</sub><0.160。

3. 诊断标准:参照中华医学会消化病学分会幽门螺杆菌学组2007年庐山会议提出的《第三次全国幽门螺杆菌感染若干问题共识报告》<sup>[4]</sup>,设<sup>13</sup>C-UBT或病理检查为诊断 Hp 现症感染的“金标准”。

4. 统计学处理:应用 ROCKIT for windows 1.1 $\beta$ 软件和 SPSS 15.0 软件对数据进行统计学分析,具体如下:(1)采用配对计数资料 $\chi^2$ 检验对 EIA 法检测 HpSA 同<sup>13</sup>C-UBT 或病理进行比较,设 $P=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 具有统计学差异。(2)分别计算出两种试验方法的敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值、假阳性率、假阴性率、符合率、Youden 指数。采用 Kappa 值评估诊断试验的一致性(Kappa 值<0为弱一致性、Kappa 值0~0.2为轻度一致、Kappa 值0.21~0.4为好、Kappa 值0.41~0.6为中度一致、Kappa 值0.61~0.8为高度一致、Kappa 值0.8~1.0为最强)。(3)对 EIA 法检测 HpSA 所有数据的 OD 值首先采用 Shapiro-Wilk 方法作正态性检验,其次应用不拘分布形式参数法(拟合双正态模型参数法)<sup>[5,6]</sup>和非参数法分别绘制光滑的受试者操作特征分析曲线(即光滑 ROC 曲线)和经验 ROC 曲线,以曲线下面积(Az)评价 HpSA 试验的诊断价值(ROC 曲线下面积准确度评价标准为 Az=0.5~0.6 判定为无意义, Az=0.6~0.7 判定为差, Az=0.7~0.8 判定为一般, Az=0.8~0.9 判定为好, Az=0.9~1.0 判定为优秀)。

## 结果

1. 诊断结果:“金标准”诊断 Hp 感染率为39.90%,其中男66例,女82例,男女比为1.124,年龄18~86岁,平均(47±5.69)岁。

2. 统计学检验: Shapiro-Wilk 正态性检验发现 EIA 法检测 HpSA 所得数据的 OD 值不服从正态分布 ( $P < 0.001$ )。

3. EIA 法检测 HpSA 同“金标准”比较: 2 种方法检测 Hp 阳性差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 2.40, P = 0.121$ ) (表 1)。EIA 法检测 HpSA 敏感度 89.20%, 特异度 96%, 阳性预测值 93.62%, 阴性预测值 93.04%, 假阳性率 10.80%, 假阴性率 10.81%, 符合率 93.26%, Youden 指数 0.85, Kappa 值 0.86, 不拘分布形式参数法(拟合双正态模型)绘制的光滑 ROC 曲线见图 1, 非参数法绘制的经验 ROC 曲线见图 2, 各相关指标见表 2。

表 1 EIA 法和金标准检测 HpSA 比较(例)

EIA	金标准		合计
	Hp 阳性	Hp 阴性	
Hp 阳性	132	9	141
Hp 阴性	16	214	230
合计	148	223	371

注:  $\chi^2 = 2.40, P > 0.05$

表 2 不拘分布形式参数法光滑 ROC 曲线和非参数法经验 ROC 曲线各相关指标

HpSA	a	b	Az	SE	95% CI	P 值
参数法	2.31	0.78	0.95	0.005	0.94 ~ 0.98	<0.001
非参数法	-	-	0.93	0.012	0.91 ~ 0.92	<0.001

注: a、b 为拟合双正态模型的光滑 ROC 曲线的两个参数, SE 为曲线下面积的标准误

## 讨 论

自 1983 年澳大利亚学者 Warren 和 Marshall 报道从人胃内成功分离出“未鉴定的弯曲状杆菌”(Campylobacter pylori)<sup>[7]</sup>后, 引起了医学界的广泛兴趣, 人们在研究这种细菌的生物学特性时, 曾几次易其名, 直至 1989 年 Goodwin 等<sup>[8]</sup>建立了螺杆菌属, 才将 Campylobacter pylori 正式命名为 Helicobacter pylori, 简称 H. pylori 或 Hp。国内译为“幽门螺杆菌”。流行病学调查显示, Hp 感染几乎占据世界一半以上的人口, 具有很高的发病率。我国和其他发展中国家 Hp 的感染率高于发达国家<sup>[9-10]</sup>, Kori 等<sup>[11]</sup>研究表明多数婴儿在出生后第一年就已经感染幽门螺旋杆菌, 本研究中 Hp 感染率为 39.89%, 其中男 66 例, 女 82 例, 男女比为 1:1.24, 平均年龄(47 ± 5.69)岁, 其中 50~55 岁为发病最高峰, 与 Marie 等<sup>[12]</sup>研究(幽门螺旋杆菌感染率随年龄的增加呈递增趋势, 且女性感染率高于男性)相符, 人是目前肯定的 Hp 传染源, 有研究表明其传染的载体与受污染的水以及较高的遗传多样性有关<sup>[13-14]</sup>。

关于幽门螺杆菌的致病性, 早在 Marshall 最初分离出 Hp 时就曾预言, 如果 Warren 发现的细菌真的与胃窦炎密切相关, 这种细菌可能会在消化性溃疡和胃癌发病中起一定作用<sup>[1]</sup>。幽门螺杆菌感染已被国际癌症研究中心列为 I 类致癌物<sup>[15]</sup>。众多研究结果表明宿主感染 Hp 后可引起胃炎、消化性溃疡、胃食管反流病、黏膜相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤等胃肠道疾病已得到公认, 此外其与特发性血小板减少性紫癜、缺铁性贫血、荨麻疹、非酒精性脂肪肝病等胃肠道以外有关疾病的发生尚有一定的关系, 与原发性胆汁性肝硬化(PBC)和原发性硬化性胆管炎(PSC)的发生关系尚有待进一步研究<sup>[16-18]</sup>。

本研究采取 EIA 法(单克隆抗体包被)检测 HpSA, 统计学结果表明 HpSA 检测 Hp 感染与“金标准”比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。其敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值、符合率与国内外报道相符<sup>[19-21]</sup>。Youden 指数表明 ELISA 法和 EIA 法检测 HpSA 真实性较好。Kappa 值表明<sup>13</sup>C-UBT、HpSA 一致性为最强。

本研究采用单克隆抗体包被 EIA 法检测 HpSA 其敏感度、特异度均低于我们之前的研究(多克隆抗体包被 EIA 法检测 HpSA), 与 Leodolter 等<sup>[3]</sup>的研究不符, 分析原因不排除国人与西方国家人群个体差异所致。

ROC 曲线(receiver operating characteristic curves)定义为: “对于可能或将会存在混淆的两种条件或自然状态, 需要试验者、专业诊断学工作者以及预测工作者作出精细判别, 或者准确决策的一种定量方法<sup>[22]</sup>”。曲

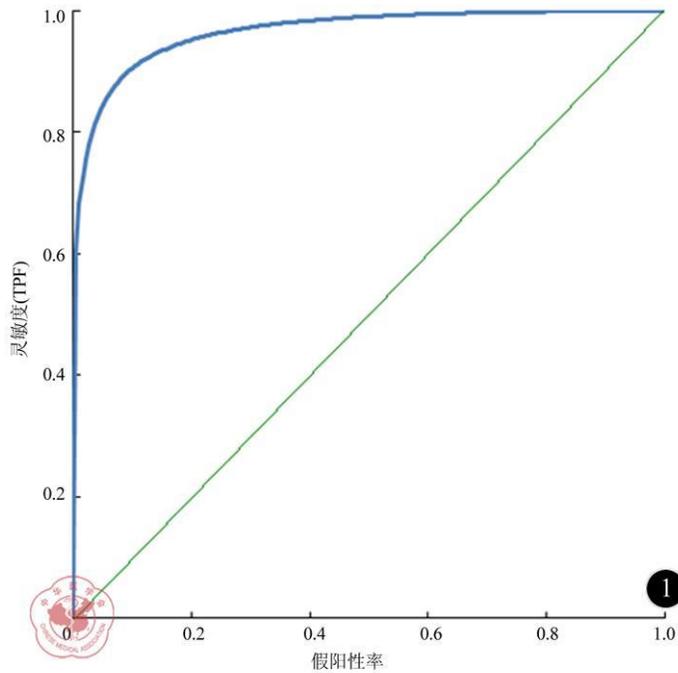


图1 光滑ROC曲线

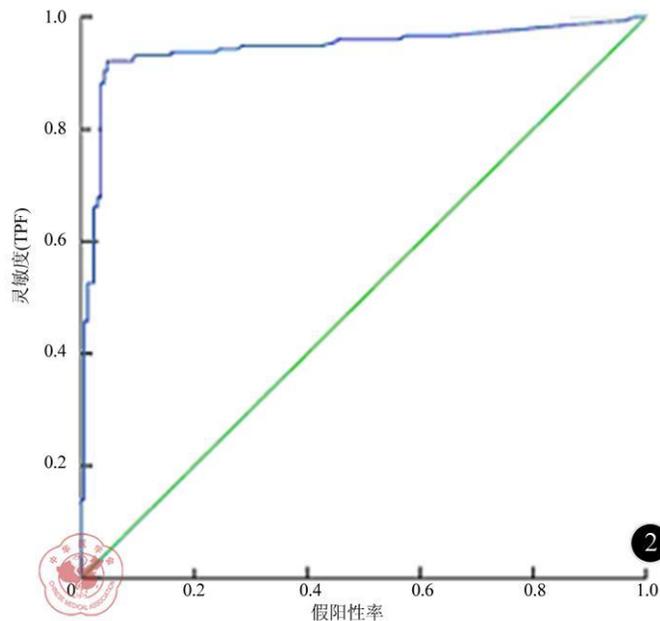


图2 经验ROC曲线

线下面积可以直观评价诊断试验的准确性。本研究应用不拘分布形式参数法(拟合双正态模型参数法)绘制光滑 ROC 曲线和非参数法绘制经验 ROC 曲线,笔者认为光滑 ROC 曲线可以为临床工作者更好地评价诊断试验提供一种新的方法(ROCKIT for windows 1.1 $\beta$  软件绘制光滑 ROC 曲线的优点在于不仅可以得到曲线下无偏倚的面积,而且可对曲线下面积进行差异性比较,评价两种诊断试验真实性有无差异,还可对诊断试验进行等效性检验,进一步评价诊断试验的准确度)。本研究表明 EIA 法检测 HpSA,其曲线下面积与 0.50 相比有统计学意义( $P < 0.001$ ),说明该法诊断 Hp 感染有较好的诊断价值。

笔者认为 HpSA(无论单克隆抗体包被或多克隆抗体包被)以其独特的优点,如:操作简便、省时、价廉、重复性好、标本采集便捷、无需贵重设备以及具有很高的准确性和可靠性等优点有着广泛的应用前景,值得

## 临床进一步推广。

志谢 衷心感谢美国芝加哥大学 Charles Metz 教授馈赠 ROCKIT for windows 1.1  $\beta$  软件用于统计学分析

## 参 考 文 献

- [1] Vaira D, Malfertheiner P, Megraud F, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection with a new non-invasive antigen-based assay. *Lancet*. 1999, 354: 30-33.
- [2] 闫伟, 曹建彪, 王继恒, 等. 受试者工作特征曲线法分析粪便幽门螺杆菌特异性抗原试验的诊断效率. *中华消化杂志*, 2010, 30: 154-157.
- [3] Leodolter A, Peitz U, Ebert MP, et al. Comparison of two enzyme immunoassays for the assessment of *Helicobacter pylori* status in stool specimens after eradication therapy. *Am J Gastroenterol*. 2002, 97: 1682-1686.
- [4] 中华医学会消化病学分会. 第三次全国幽门螺杆菌感染若干问题共识报告(2007年8月庐山). *胃肠病学*, 2008, 13: 42-46.
- [5] Alonzo TA, Pepe MS. Distribution-free ROC analysis using binary regression techniques. *Biostatistics*. 2002, 3: 421-432.
- [6] 王晓芳. 不拘分布形式参数法 ROC 分析及其医学诊断试验应用. 山西: 山西医科大学, 2008.
- [7] Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983, 2: 1273-1275.
- [8] Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T, et al. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov. respectively. *Int J Syst Bacteriol*. 1989, 39: 397-405.
- [9] Frenck RW Jr, Clemens J. *Helicobacter* in the developing world. *Microbes Infect*. 2003, 5: 705-713.
- [10] 胡品津, 胡伏莲. 中华医学会第四次全国幽门螺杆菌学术会议纪要. *中华消化杂志*, 2005, 25: 698-699.
- [11] Kori M, Goldstein E, Granot E. *Helicobacter pylori* infection in young children detected by a monoclonal stool antigen immunoassay. *Pediatr Infect Dis J*. 2009, 28: 157-159.
- [12] Marie MA. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in large series of patients in an urban area of Saudi Arabia. *Korean J Gastroenterol*. 2008, 52: 226-229.
- [13] Kennemann L, Didelot X, Aebischer T, et al. *Helicobacter pylori* genome evolution during human infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 22, 108: 5033-5038.
- [14] Mandeville KL, Krabshuis J, Ladep NG, et al. Gastroenterology in developing countries: issues and advances. *World J Gastroenterol*, 2009, 15: 2839-2854.
- [15] International Agency for Research on Cancer, Schistosomes, Liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans 1994, 61: 177-241.
- [16] Grande M, Cadeddu F, Villa M, et al. *Helicobacter pylori* and gastroesophageal reflux disease. *World J Surg Oncol*. 2008, 6: 74.
- [17] Matsui T. *Helicobacter pylori* and arteriosclerosis. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2011, 38: 365-369.
- [18] Takuma Y. *Helicobacter pylori* infection and liver diseases. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2011, 38: 362-364.
- [19] 刘文忠, 萧树东, 王吉耀, 等. 幽门螺杆菌粪便抗原试验的多中心研究. *胃肠病学*, 2002, 7: 136-139.
- [20] Yang HR, Seo JK. *Helicobacter pylori* stool antigen (HpSA) tests in children before and after eradication therapy: comparison of rapid immunochromatographic assay and HpSA ELISA. *Dig Dis Sci*. 2008, 53: 2053-2058.
- [21] Faruqi AN, Majid U, Ahmad L, et al. *Helicobacter pylori* stool antigen test (HpSA) for the diagnosis of gastric infection. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2007, 17: 316-319.
- [22] Amitage P, Colton T. *Encyclopedia of biostatistics*. New York: John Wiley, 1998: 3738-3744.

(收稿日期: 2011-03-31)

(本文编辑: 戚红丹)

闫伟, 林静, 程艳丽, 等. 单克隆抗体包被粪便幽门螺杆菌抗原检测的临床研究[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2011, 5(14): 4038-4042.