

# 儿童幽门螺杆菌免疫组化染色检测分析

徐翠<sup>1</sup>,王涛<sup>1</sup>,周平<sup>2</sup>

(淄博市第一医院 1. 儿科; 2. 病理科, 山东 淄博 255200)

**摘要:**目的 评价儿童幽门螺杆菌(*Hp*)的组织学免疫组化染色的诊断价值。方法 对我院儿科就诊的102例具上消化道症状的患儿均行胃镜检查并取胃窦黏膜活检,分别经快速尿素酶(RUT)试验及组织免疫组化染色检测*Hp*;在胃镜检查前分别行<sup>13</sup>C-尿素呼气试验(<sup>13</sup>C-UBT)和现症感染条带(CIM)血清学检测*Hp*。以<sup>13</sup>C-UBT为诊断金标准,比较免疫组化与其他两种方法的敏感性、特异性和准确性,评价免疫组化染色诊断儿童*Hp*感染的价值。结果 免疫组化染色诊断*Hp*感染的敏感性、特异性及准确性,与CIM比较差异均无统计学意义,与RUT比较其敏感性、特异性及准确性,差异也均无统计学意义。结论 组织学免疫组化染色准确、可靠、易观察,是病理学诊断儿童*Hp*现症感染有效适宜的检测方法。

**关键词:**幽门螺杆菌;儿童;免疫组化;现症感染条带;快速尿素酶试验;<sup>13</sup>C-呼气试验

中图分类号:R725 文献标志码:A

## Immunohistochemical analysis of *Helicobacter pylori* infection in children

XU Cui<sup>1</sup>, WANG Tao<sup>1</sup>, ZHOU Ping<sup>2</sup>

(1. Department of Pediatrics; 2. Department of Pathology, First Hospital of Zibo City, Zibo 255200, Shandong, China)

**Abstract: Objective** To assess the diagnostic value of immunohistochemical staining of *Helicobacter pylori* (*Hp*) infection in children. **Methods** A total of 102 children who had upper gastrointestinal discomfort were recruited among the pediatric outpatients. Endoscopy, antral mucosal biopsy, rapid urease test (RUT) and immunohistochemical staining were performed. Before endoscopy, <sup>13</sup>C-UBT and current infection marker (CIM) were used to detect the *Hp* infection. Parameters including sensitivity, specificity, and accuracy were determined by <sup>13</sup>C-UBT. **Results** There was no significant statistical difference in the sensitivity, specificity and accuracy between immunohistochemistry and CIM, and between immunohistochemistry and RUT. **Conclusion** Immunohistochemical staining is a simple, accurate, and reliable method to determine *Hp* infection in children patients.

**Key words:** *Helicobacter pylori*; Child; Immunohistochemistry; Current infection marker; Rapid urease test; <sup>13</sup>C Urea breath test

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *Hp*)感染与慢性胃炎、消化性溃疡、胃黏膜相关性淋巴瘤和胃癌以及许多胃肠外疾病有关<sup>[1]</sup>,已证实缺铁性贫血和生长发育迟缓与*Hp*密切相关<sup>[2]</sup>。儿童是易感人群,并以每年3%~10%的速度递增<sup>[3]</sup>,至10岁40%~60%儿童受感染。白植峰等<sup>[4]</sup>对有上消化道症状患儿的*Hp*检测显示,感染率从2004年的

33.3%上升到2008年的56.1%。邹明艳等<sup>[5]</sup>对325例有症状患儿的*Hp*检出率为96.3%。*Hp*的检测方法包括侵入性和非侵入性两大类。侵入性方法是通过内镜获取活体组织进行检测,包括胃黏膜的细菌培养、组织病理学检查、快速尿素酶试验等。以往病理学染色以W-S银染色效果最佳,被称为侵入性检测的“金标准”,但费时,且技术要求严格<sup>[5]</sup>。

因此,本研究拟采用非侵入性 $^{13}\text{C}$ -尿素呼气试验( $^{13}\text{C}$ -urea breath test,  $^{13}\text{C}$ -UBT)、现症感染条带(current infection marker, CIM)和侵入性快速尿素酶(rapid urease test, RUT)、免疫组化染色等4种检测方法检测 *Hp*, 来评估免疫组化染色检测儿童 *Hp* 感染的诊断价值。

## 1 资料与方法

1.1 研究对象 以2012年1~4月在淄博市第一医院儿科门诊因上消化道不适就诊接受胃镜检查的患儿作为研究对象,共纳入病例102例,2~12岁,其中男54例,女48例,平均( $6.5 \pm 2.1$ )岁,检查前1月内均未使用抗生素及抑酸制剂。

1.2 方法 所有患儿均应用4种方法检测 *Hp*: 胃黏膜快速尿素酶试验法、胃黏膜免疫组化、CIM快速检测及 $^{13}\text{C}$ -UBT。

1.2.1 快速尿素酶(RUT)试验 所有患儿均用奥林巴斯(北京)销售服务有限公司提供的日产OLMPUS 260电子胃镜进行检查,并在胃窦距离幽门5 cm处钳取黏膜组织,分成3块,其中1块行RUT试验,采用珠海市克迪科技发展有限公司提供的 *Hp* 快速诊断试剂盒,1 min 查看结果,颜色变为深紫色为阳性,不变色为阴性。

1.2.2 组织学免疫组化染色 由福州迈新生物技术有限公司提供试剂,该方法是通过 *Hp* 特异性抗体检测组织中 *Hp* 抗原成分,阳性着色除了在 *Hp* 菌体之外,对 *Hp* 菌体成分亦呈阳性着色,其阳性着色为棕褐色,与苏木精复染后的淡蓝色背景相比,更易于观察,见到大量着色为阳性。

1.2.3  $^{13}\text{C}$ -尿素呼气试验( $^{13}\text{C}$ -UBT) 应用北京华亘安邦科技有限公司的 $^{13}\text{C}$ 红外光谱仪,患儿口服河北省协和药业有限公司生产的 $^{13}\text{C}$ 尿素散剂1包,服药前和服药后30 min 分别采集呼出的气体,通过质谱仪检测患儿呼气中的 $^{13}\text{C}$ - $\text{CO}_2$  进行判断。

1.2.4 CIM 现症感染条带 采用上海安倍医疗器械贸易有限公司提供的安速(ASSURE)幽门螺杆菌快速检测试剂盒,使用CIM利用免疫层析技术检测全血、血浆或血清中的 *Hp* 特异抗体。该试剂盒含有一个基于高度保守的重组抗原,故可以区分现症感染或既往感染。患儿空腹或进食2 h 以后采末梢血,15 min 便可得到结果,现症感染带出现红色条带阳性,否则为阴性。

1.3 诊断标准 第3次全国幽门螺杆菌感染若干问题共识意见的 *Hp* 感染的诊断标准<sup>[6]</sup>: ①细菌培

养、尿素呼吸试验、快速尿素酶试验、使用单克隆抗体的粪便 *Hp* 抗原检测中任一项阳性者。② *Hp* 形态学(涂片、免疫学染色或组织学染色)、免疫学(粪便 *Hp* 抗原检测、血清及分泌物抗体检测)、基因检测任二项阳性者。

1.4 统计学处理 采用SPSS 17.0 软件进行统计学分析,计数资料利用配对资料四格表及两个样本率比较(四格表),采取 $\chi^2$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

在102例患儿中以 $^{13}\text{C}$ -UBT为诊断金标准,检测 *Hp* 阳性60例,阴性42例, *Hp* 检出率为58.8%。3种检测方法(具体见表1、2、3)中CIM的敏感性、特异性及准确性最高,但免疫组化染色与CIM敏感性对比无统计学差异( $P > 0.01$ ),特异性及准确性差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),与RUT的敏感性、特异性及准确性差异比较均无统计学意义( $P$ 均 $> 0.05$ ),提示免疫组化染色与其他两种方法对儿童 *Hp* 的诊断价值相当。

以 $^{13}\text{C}$ -UBT为金标准,CIM诊断儿童 *Hp* 阳性58例,检出率为56.7%,其敏感性、特异性及准确性分别为91.7%、92.9%、92.2%(表1)。

表1 以 $^{13}\text{C}$ -UBT为金标准 CIM 检测结果( $n$ )

CIM 检测方法	$^{13}\text{C}$ -UBT		
	阳性	阴性	合计
阳性	55	3	58
阴性	5	39	44
合计	60	42	102

$$\chi^2 = 0.0000, P = 1.0000.$$

RUT诊断儿童 *Hp* 阳性57例,检出率55.9%,其敏感性、特异性及准确性分别为78.3%、76.2%、87.3%(表2)。

表2 以 $^{13}\text{C}$ -UBT为金标准 RUT 检测结果( $n$ )

RUT 检测	$^{13}\text{C}$ -UBT		
	阳性	阴性	合计
阳性	47	10	57
阴性	13	32	45
合计	60	42	102

$$\chi^2 = 0.1739, P = 0.6767.$$

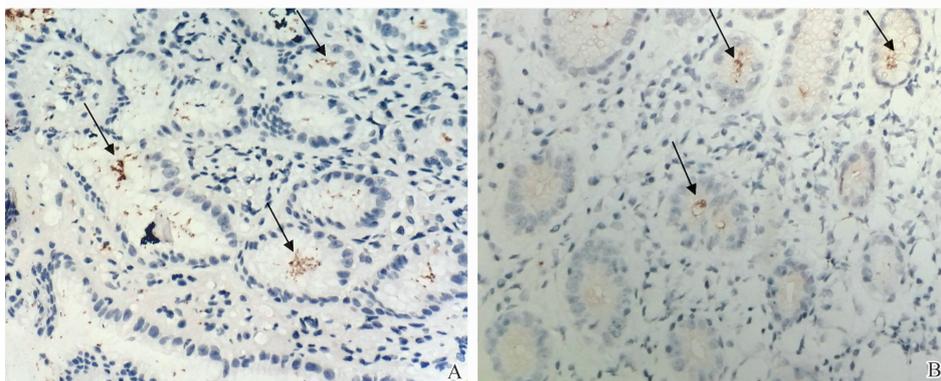
免疫组化染色诊断儿童 *Hp* 阳性51例,检出率为50%,其敏感性、特异性及准确性分别为75.0%、85.7%、79.4%(表3)。

表3 以 $^{13}\text{C}$ -UBT为金标准免疫组化检测结果( $n$ )

病理免疫组化染色	$^{13}\text{C}$ -UBT		合计
	阳性	阴性	
阳性	45	6	51
阴性	15	36	51
合计	60	42	102

$$\chi^2 = 3.0476, P = 0.0809.$$

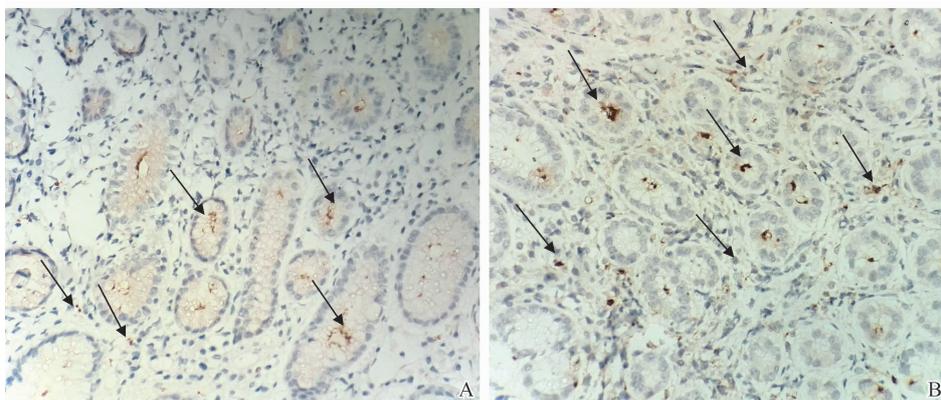
免疫组化染色,色彩对比鲜明,其阳性着色为棕褐色,与苏木精复染后的淡蓝色背景相比,易于观察。本研究染色显示能清晰呈现腺腔、上皮细胞、胃小凹及间质中少量的 *Hp* (图1、2、3),间质中单个的 *Hp* 也清晰可见(图2)。与甲苯胺蓝染色的整个蓝色背景相比,更易观察。

图1 腺腔中的 *Hp* (免疫组化染色,  $\times 100$ )

A: 患者1; B: 患者2。

Fig. 1 *Hp* in the lumens (immunohistochemical staining,  $\times 100$ )

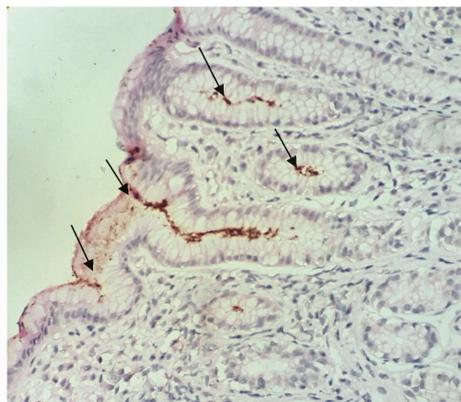
A: Patient 1; B: Patient 2.

图2 腺腔及间质中的 *Hp* (免疫组化染色,  $\times 100$ )

A: 患者1; B: 患者2。

Fig. 2 *Hp* in the lumens and stroma (immunohistochemical staining,  $\times 100$ )

A: Patient 1; B: Patient 2.

图3 上皮细胞表面、胃小凹及腺腔中的 *Hp* (免疫组化染色,  $\times 100$ )Fig. 3 *Hp* in the epithelial cell surface, gastric pit and lumens (immunohistochemical staining,  $\times 100$ )

### 3 讨论

组织切片染色是将胃黏膜标本经乙醇固定、石蜡包埋、切片染色,在显微镜下观察组织切片上的 *Hp* 形态特点以及分布特征,可正确诊断有无 *Hp* 感染,是临床上最常用的一项 *Hp* 诊断的“金标准”<sup>[7]</sup>,在临床抗 *Hp* 感染和治疗效果评价上得以充分应用。组织学诊断 *Hp* 的优点是可以同时进行胃黏膜的病理学诊断,有革兰染色法、HE 染色法、W-S 银染色、Giemsa 染色法、亚甲蓝染色等。其中 W-S 银染色效果最佳,细菌清晰易辨,但费时且需一定技术。新型改良 W-S 银染法与传统 W-S 银染法比

较,试剂配制简便,组织着色牢固稳定,但检测 *Hp* 的效果相近<sup>[8]</sup>,难以判断球状 *Hp* 及胃上皮间质中的 *Hp*。而免疫组化法除了能够轻易观察到黏膜表面及小凹腺腔中的 *Hp*,还可以观察到间质中及上皮细胞内的 *Hp* 菌体及变形的 *Hp* 非菌体的 *Hp* 成分,具有较强的敏感性和特异性,*Hp* 阳性检出率高,结果准确、可靠且稳定,即使 *Hp* 含量很少,甚至是单个也能被清晰显示出来<sup>[9]</sup>。沙莉等<sup>[10]</sup>研究发现免疫组化染色可以更好地反映 *Hp* 在胃黏膜组织中的感染状态,其敏感性要高于银染法,有助于在其致病机制上,特别是球状 *Hp* 感染的意义上做进一步的研究;而且证实 HE 染色也不具有特异性,少量 *Hp* 感染时较易漏诊。蔡正凤<sup>[11]</sup>对甲苯胺蓝染色与 HE 染色、W-S 银染等染色方法进行了比较发现:W-S 银染色时间长,常出现银颗粒沉淀物,影响观察。且碱性品红染色菌体和背景均呈鲜红色,镜检时容易导致视力疲劳。HE 染色较淡,不仅观察困难而且经常容易漏诊,且过程复杂。甲苯胺蓝染色操作相对简便,时间短,染液配制简单,*Hp* 着色稳定鲜明,菌体形态清晰,在显微镜下易于观察。有研究通过改良亚甲蓝染色法观察 *Hp*,在黏液层下方靠近黏膜细胞的表面才容易找到,而 *Hp* 的形态发生变化,需仔细认真观察方能看到,因此容易漏诊<sup>[12]</sup>。对黄敬等<sup>[13]</sup>利用改良 Giemsa 染色观察 *Hp* 发现仅凭形态特征难以鉴定。另外,在胃癌或低胃酸患者组织检测时,其他相似形态的细菌有可能被误诊为 *Hp*,此时需要应用免疫组化染色加以辨认<sup>[14]</sup>。

本研究采用福州迈新生物技术开发有限公司提供试剂进行免疫组化染色,保存时间长,可反复使用。其敏感性相对其他研究也较低,考虑与取材部位和数量有关。因受 *Hp* 在胃内呈灶性分布影响,国内外没有统一取材标准,有研究提倡取材多达 12 块。杨文义等<sup>[15]</sup>研究发现,胃窦黏膜检出率明显高于胃体黏膜检出率,提倡胃窦加病变部位两个部位联合取材。为提高阳性率可考虑胃窦和病变部位多块取材。

组织学免疫组化染色准确,可靠,技术简单,易长时间保存,更易观察,在病理组织学染色中是有效适宜的检测方法,可作为病理学诊断儿童 *Hp* 现症感染的首选检测手段。

#### 参考文献:

- [1] 王瑞锋,刘泉波. 儿童幽门螺杆菌感染检测方法评估[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(5): 564-566.
- [2] Baggett H C, Parkinson A J, Muth P T, et al. Endemic iron deficiency associated with *Helicobacter pylori* infection among school-aged children in Alaska [J]. *Pediatrics*, 2006, 117(3): 396-404.
- [3] 张运玲,朱朝敏. 儿童幽门螺杆菌感染的诊断与治疗[J]. 实用儿科临床杂志, 2012, 27(19): 1541-1544. ZHANG Yunling, ZHU Chaomin. Diagnosis and treatment of *Helicobacter pylori* infection in children [J]. *Journal of Applied Clinical Pediatrics*, 2012, 27(19): 1541-1544.
- [4] 白植峰,吴晓霞,金国信. 儿童幽门螺杆菌感染率 5 年跟踪分析[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(23): 3998-3999.
- [5] 邹明艳,张勇,李锦霞,等. 儿童上消化道疾病的临床特征及与幽门螺杆菌感染的关系[J]. 实用医学杂志, 2013, 29(7): 1138-1139.
- [6] 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意见(2007 年 8 月庐山)[J]. 胃肠病学, 2008, 17(10): 577-578.
- [7] 中华医学会消化病学分会. 中国慢性胃炎共识意见(全国第二届慢性胃炎共识会议 2006 年)[J]. 胃肠病学, 2006, 11(11): 674-684.
- [8] 黄培宁,邓有辉,陆伟,等. 改良 W-S 银染法与传统 W-S 银染法检测幽门螺杆菌的对比观察[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(11): 1859-1861. HUANG Peining, DENG Youhui, LU Wei, et al. Comparison between improved and traditional W-S silver staining to detect *Helicobacter pylori* [J]. *Chinese Journal of Laboratory Diagnosis*, 2011, 15(11): 1859-1861.
- [9] 胡小安,张润,卢静. 特殊染色与免疫组化染色显示幽门螺杆菌的效果对比[J]. 临床与实验病理学杂志, 2009, 25(2): 111-112.
- [10] 沙莉,朱东兵,沈小建,等. 银染与免疫组化染色检测幽门螺杆菌的效果对比[J]. 诊断病理学杂志, 2013, 20(8): 509-510.
- [11] 蔡正凤. 幽门螺杆菌检测胃黏膜活检的几种染色方法比较[J]. 实验与检验医学, 2013, 31(3): 290-291.
- [12] 陈琼霞,李艳,陈莹,等. 胃黏膜活检组织中幽门螺杆菌检测方法的改进[J]. 江汉大学学报:自然科学版, 2013, 41(1): 91-92.
- [13] 黄敬,邓秋莲,周珍文,等. 儿童幽门螺杆菌感染 4 种诊断方法的对比[J]. 广东医学, 2010, 31(16): 2087-2089.
- [14] 伍冬梅,李春鸣,张赟. 幽门螺杆菌感染、端粒酶活性与胃癌、癌前病变关系的研究[J]. 重庆医学, 2011, 40(14): 1386-1387. WU Dongmei, LI Chunming, ZHANG Yun. Relationship between infection of *Helicobacter pylori* and telomerase activity in gastric cancer and precancerous lesions [J]. *Chongqing Medicine*, 2011, 40(14): 1386-1387.
- [15] 杨文义,韩大正,丁春生. 胃黏膜取材部位对诊断幽门螺杆菌感染的影响[J]. 临床荟萃, 2011, 26(12): 1069-1071.