

- 7 汪复,朱德妹,胡付品,等. 2009 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2010,10(5):325-334.
- 8 朱德妹,汪复,胡付品,等. 2010 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2011,11(5):321-329.
- 9 胡付品,汪复,朱德妹,等. 2011 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2012,12(5):321-329.
- 10 张翊,卢建平,任利珍,等. 住院患者葡萄球菌属分离株临床分布与耐药性[J]. 中华医院感染学杂志,2007,17(2):213-215.
- [收稿日期 2012-12-18][本文编辑 杨光和 韦所苏]

课题研究·论著

EB 病毒 DNA 载量检测在门诊诊断鼻咽癌患者中的应用价值

李友琼, 阳文辉, 黄慧嫔, 覃桂芳, 韦支丰

基金项目: 广西卫生厅科研课题(编号:桂卫 Z2010248)

作者单位: 530021 南宁,广西壮族自治区人民医院检验科(李友琼,阳文辉,黄慧嫔,覃桂芳); 530011 南宁,广西中医药大学附属瑞康医院病理科(韦支丰)

作者简介: 李友琼(1979-),男,医学硕士,主管技师,研究方向:EB 病毒与恶性肿瘤的关系和地中海贫血及其检测技术。E-mail:liyou-qiong327@yahoo.com.cn

通讯作者: 覃桂芳(1955-),女,大学本科,主任技师,研究方向:分子生物学检验和实验室管理。E-mail:qinguifang0512@yahoo.com.cn

[摘要] 目的 探讨 EB 病毒 DNA(EBV-DNA)载量检测在门诊诊断鼻咽癌患者中的应用价值。方法 收集 61 例门诊就诊的可疑鼻咽癌患者,同时进行 EBV-DNA 载量、EBV VCA-IgA 和 EBV EA-IgA 检测,并与病理组织切片检查作比较。结果 病理组织切片检出鼻咽癌 47 例;EBV-DNA 载量、EBV VCA-IgA、EBV EA-IgA 检测的灵敏度分别为 76.6% (36/47)、55.3% (26/47) 和 45.8% (22/48);特异度分别为 64.3% (9/14)、71.4% (10/14) 和 92.3% (12/13);正确率分别为 73.8% [(36+9)/61]、59.0% [(26+10)/61] 和 55.7% [(22+12)/61];三种检测方法阳性检出率与病理组织切片检查比较,除 EBV-DNA 载量检测差异无统计学意义($P>0.05$)外,其余两法均低于病理组织切片检查(P 均 <0.01);EBV-DNA 载量、EBV VCA-IgA 和 EBV EA-IgA 三种方法检测在 NPC 组和对对照组及 NPC 临床分期的中位滴度,除 EBV-DNA 载量检测差异有统计学意义($P<0.01$)外,其他两法差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。结论 在这三种鼻咽癌的筛查技术中,EBV-DNA 载量检测优于 EBV VCA-IgA 和 EBV EA-IgA 检测。

[关键词] EB 病毒 DNA; 鼻咽癌; 载量; VCA-IgA; EA-IgA**[中图分类号]** R 739.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2013)05-0415-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2013.05.05

The value of Epstein-Barr virus DNA load detection in the outpatient with NPC Li You-qiong, YANG Wenhui, HUANG Hui-ping, et al. Department of Laboratory Medicine, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To study the value of Epstein-Barr virus DNA load detection in the outpatient with nasopharyngeal carcinoma(NPC). **Methods** Sixty-one outpatients with suspected NPC were detected respectively EBV-DNA load, EBV VCA-IgA and EA-IgA, and compared with histopathological diagnosis. **Results** Those cases were detected 47 cases of nasopharyngeal carcinoma through histopathology. The sensitivities of EBV-DNA load, VCA-IgA and EA-IgA were 76.6% (36/47), 55.3% (26/47), and 45.8% (22/48) respectively; the specificities were 64.3% (9/14), 71.4% (10/14), and 92.3% (12/13) respectively; the accuracies were 73.8% [(36+9)/61], 59.0% [(26+10)/61], and 55.7% [(22+12)/61] respectively. Compared with histopathology, the positive rate of the three detection methods except EBV-DNA load showed no significant difference($P>0.05$), the other were

significant difference ($P < 0.01$); The methods of EBV-DNA load, VCA-IgA and EA-IgA were performed between NPC and control groups, and among NPC clinical stages, except that the detection of EBV-DNA load was significant difference ($P < 0.01$), the other were no significant difference ($P > 0.05$). **Conclusion** In three kinds of nasopharyngeal cancer screening technology, EBV-DNA load was better than EBV VCA-IgA and EA-IgA.

[Key words] EB virus DNA; Nasopharyngeal carcinoma(NPC); Load; VCA-IgA; EA-IgA

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是我国南方人群发病率较高的恶性肿瘤,其发病原因虽是多方面的,但是许多研究资料表明,Epstein-Barr 病毒感染与 NPC 的发生、发展关系密切^[1-3]。目前,在广西绝大部分医院实验室采用的是 EBV VCA-IgA 和 EBV EA-IgA 检测,但是检出率并不高。有报道在 NPC 患者中可以检测到 EBV-DNA,但是各家报道的检出率不同^[4-6],是否是 NPC 存在地区差异,又或者是由于实验室因素引起的差异,目前尚不清楚。对于 NPC 患者,早发现、早治疗效果更佳。本文收集在我院门诊就诊的可疑 NPC 患者 61 例,同时进行病理组织切片、EBV-DNA 载量、EBV VCA-IgA 和 EBV EA-IgA 检测分析,旨在探讨更为优良的筛查 NPC 的方法,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集 2010-07 ~ 2011-10 首次来我院就诊的 61 例患者,男 43 例,女 18 例,年龄 20 ~ 80 岁,平均 47.9 岁。其中有 30 例门诊诊断为“鼻咽新生物待查”,19 例为可疑“NPC”,12 例为“颈部肿物待查”,均未使用药物进行治疗。根据病理组织切片诊断为 NPC 组和非 NPC 组。

1.2 主要仪器和试剂 荧光定量 PCR 分析仪为 Roche 公司的 LightCycler 480,PCR 试剂盒购于广东中山大学达安基因股份有限公司。EBV VCA-IgA 和 EBV EA-IgA ELISA 试剂盒购于北京贝尔生物公司。

1.3 病理组织切片分析 将可疑的病变组织用中性福尔马林固定,再用酒精脱水,浸入二甲苯,浸蜡,包埋成蜡块,切片(2 ~ 3 μm),染色,封片,最后显微镜下读片,以发现癌细胞为诊断标准。病理组织切片的最后诊断按 1992 年福州全国鼻咽癌会议推荐的鼻咽癌临床分期法(92 分期法)^[7]进行分期,Ⅰ和Ⅱ期为早期,Ⅲ和Ⅳ期为晚期。

1.4 EBV-DNA 载量检测 用 EDTA 抗凝管采集静脉血 3 ml,混匀后送实验室检测。先 1 500 rpm/min 离心 5 min,取上层血浆 200 μl ,加入 100 μl 浓缩沉淀液,振荡混匀后,1 200 rpm/min 离心 10 min,弃上清;加入 DNA 提取液,振荡溶解后,100 $^{\circ}\text{C}$ 干浴 10 min;12 000 rpm/min 离心 10 min,上清即为 DNA 模板,

备用。PCR 反应体系:43 μl mix 反应液 + 2 μl DNA 模板;PCR 反应条件:93 $^{\circ}\text{C}$ 2 min;93 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,57 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,共 40 个循环。以试剂说明书中明确的 EBV-DNA 载量 ≥ 500 copies/ml 为阳性判断标准。

1.5 EBV VCA-IgA 和 EBV EA-IgA 检测 用促凝真空管采集静脉血 3 ml,混匀后送实验室检测。3 000 rpm/min 离心 5 min,设置 1 个阴性对照孔,1 个弱阳性孔,1 个阳性孔,取 100 μl 稀释液分别加入 VCA-IgA 和 EA-IgA ELISA 孔板,再加入 10 μl 样本,震荡混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 30 min;洗涤 6 次,拍干后加入 100 μl 酶标抗体,震荡混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 30 min;洗涤 6 次,拍干后加入显示 A 液和 B 液,15 min 后读取结果。以弱阳性的结果为 1:5 滴度,EBV VCA-IgA $\geq 1:10$ 和 EBV EA-IgA $\geq 1:5$ 为阳性判断标准。

1.6 统计学方法 应用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析。诊断试验结果采用诊断试验四格表算法。滴度采用比值表示,多组中位数比较采用 Kruskal-Wallis H 检验,两组中位数比较采用 Mann-Whitney 秩和检验。计数资料两组阳性检出率比较采用配对四格表 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病理组织切片检查结果 在 61 例可疑 NPC 样本中,检出 47 例 NPC(5 例Ⅰ期,10 例Ⅱ期,11 例Ⅲ期,21 例Ⅳ期),14 例非 NPC(5 例淋巴瘤,1 例鼻息肉,3 例慢性黏膜炎,1 例甲状舌管囊肿,1 例鼻前庭囊肿,1 例良性肿瘤,1 例多型性腺瘤,1 例阴性结果)。

2.2 EBV-DNA 载量检测与病理组织切片检查比较 在 61 例可疑 NPC 样本中,EBV-DNA 检出阳性 41 例(阴性 20 例),其中 36 例为 NPC(1 例Ⅰ期,中位数为 0 copies/ml;5 例Ⅱ期,中位数为 650 copies/ml;9 例Ⅲ期,中位数为 5 410 copies/ml;21 例Ⅳ期,中位数为 16 000 copies/ml),3 例为淋巴瘤(中位数为 650 copies/ml),1 例慢性黏膜炎(中位数为 1 920 copies/ml),1 例为鼻前庭囊肿(中位数为 2 000 copies/ml)。灵敏度为 76.6% (36/47),特异度为 64.3% (9/14),正确率为 73.8% [(36 + 9)/61];两法阳性检出率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 EBV-DNA 载量检测与病理组织切片检查比较(n)

EBV-DNA 检测	病理组织切片诊断		合计
	+	-	
+	36(a)	5(b)	41(a+b)
-	11(c)	9(d)	20(c+d)
合计	47(a+c)	14(b+d)	61(a+b+c+d)

注:两法阳性检出率比较, $\chi^2 = 1.067, P > 0.05$

2.3 EBV VCA-IgA 检测与病理组织切片检查比较
在 61 例可疑 NPC 样本中,EBV VCA-IgA 检出阳性 30 例(阴性 31 例),其中 26 例为 NPC(I 期未检出; 5 例Ⅱ期,中位数滴度为 1:7;7 例Ⅲ期,中位数滴度为 1:10;14 例Ⅳ期,中位数滴度为 1:20),1 例为淋巴瘤(滴度为 1:10),1 例为多型性腺瘤(滴度为 1:10),1 例为慢性黏膜炎(滴度为 1:20),1 例为良性肿瘤(滴度为 1:20)。灵敏度为 55.3% (26/47),特异度为 71.4% (10/14),正确率为 59.0% [(26 + 10)/61],阳性检出率低于病理组织切片检查($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 EBV VCA-IgA 检测与病理组织切片检查比较(n)

EBV VCA-IgA 检测	病理组织切片诊断		合计
	+	-	
+	26	4	30
-	21	10	31
合计	47	14	61

注:两法阳性检出率比较, $\chi^2 = 9.375, P < 0.01$

2.4 EBV EA-IgA 检测与病理组织切片检查比较
在 61 例可疑 NPC 样本中,EBV EA-IgA 检出阳性 23 例(阴性 38 例),其中 21 例为 NPC(I 期未检出;3

例Ⅱ期,中位数滴度为 0;6 例Ⅲ期,中位数滴度是 1:5; 12 例Ⅳ期,中位数滴度为 1:5),1 例为慢性黏膜炎(滴度是 1:5)。灵敏度为 45.8% (22/48),特异度为 92.3% (12/13),正确率为 55.7% [(22 + 12)/61];阳性检出率低于病理组织切片检查($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 EBV EA-IgA 检测与病理组织切片检查比较(n)

EB VEA-IgA 检测	病理组织切片诊断		合计
	+	-	
+	22	1	23
-	26	12	38
合计	48	13	61

注:两法阳性检出率比较, $\chi^2 = 22.154, P < 0.01$

2.5 NPC 组与非 NPC 组三种检测结果中位数滴度比较
NPC 组与非 NPC 组滴度在 EBV-DNA 载量检测中差异有统计学意义($P < 0.01$),而 VCA-IgA 和 EA-IgA 检测差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。见表 4。

表 4 NPC 组与非 NPC 组三种检测结果
中位数滴度比较(copies/ml)

分 组	例数	EBV-DNA	VCA-IgA	EA-IgA
NPC 组	48	4500	0	0
非 NPC 组	13	0	0	0
U_c	-	2.83	0.00	0.00
P	-	0.005	1.00	1.00

2.6 NPC 临床分期中三种检测结果中位数滴度比较
EBV-DNA 在 NPC 分期中滴度差异有统计学意义($P < 0.01$),而 VCA-IgA 和 EA-IgA 检测在 NPC 分期中滴度差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 5。

表 5 NPC 临床分期中三种检测结果中位数滴度比较(copies/ml)

临床分期	例数	EBV-DNA		VCA-IgA		EA-IgA	
		阳性例数	中位数滴度	阳性例数	中位数滴度	阳性例数	中位数滴度
I 期	5	1	0	0	0:0	0	0:0
II 期	10	5	650	5	1:7	3	0:0
III 期	11	9	5410	7	1:10	6	1:5
IV 期	21	21	16000	14	1:20	12	1:5
H	-	17.239		6.621		6.663	
P	-	0.001		0.085		0.083	

3 讨论

3.1 病理组织切片是诊断 NPC 的金标准,但是这种方法有一定的局限性,比如在肿瘤早期,组织肿块

并不明显,或病变组织并不多时,容易采集到阴性样本。同时,由于采集组织肿块属于创伤性操作,病人不易接受。相对而言,病人更容易接受采集血样进

行检测,血液样本采集容易,且检测方便。目前对于 NPC 的诊断,都是先经过血液初筛,然后针对非常可疑的患者,再进行组织取样进行病理组织切片检查。因此,寻找高效的 NPC 筛查方法一直是研究学者和临床工作者探讨的热点问题。

3.2 本文的研究显示,使用 EBV-DNA 检测 NPC 的灵敏度和正确率分别为 76.6% 和 73.8%,高于 EBV VCA-IgA 检测的 55.3%、59.0% 和 EBV EA-IgA 的 45.8%、55.7%,但是特异度前者(64.3%)低于后两种方法(分别是 71.4%、92.3%)。本文 EBV-DNA 检测 NPC 的灵敏度和正确率高于廖勇^[5]和袁晖等^[8]的报道,低于张玉等^[4]的报道。研究结果存在差异的可能原因有两种:(1) NPC 患者 EBV 感染存在地理差异;(2) 检测方法、检测仪器、扩增片段等^[9]也有不同。一般来说,血清抗体产生相对较晚或不能出现,而感染早期为病毒复制较活跃的时期,可能在发病的早期或肿瘤早期阶段,利用 PCR 检测 EBV 的阳性率和基因拷贝量会比较高。本文研究也证明, NPC 早期(Ⅰ期和Ⅱ期), EBV-DNA 检出 6 例,而 VCA-IgA 仅检出 5 例, EA-IgA 仅检出 3 例。同时,与对照组比较, EBV-DNA 在两组中的检测结果比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),而另外两种方法检测结果比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。提示 EBV-DNA 载量检测的方法在 NPC 筛查中优于 EBV VCA-IgA 和 EBV EA-IgA。

3.3 本文研究也显示,鼻咽癌不同分期,其 EBV-DNA 载量存在差异,晚期鼻咽癌的病毒载量明显高于早期鼻咽癌患者,提示了病毒载量与肿瘤分期存在相关性。因此, EBV-DNA 载量检测可以作为判断疗效、监测病情及预测预后的一种有效手段^[10,11]。

由于本研究的病例比较有限,这种检测 EBV-DNA 载量的方法,对早期筛查 NPC 和 NPC 的疗效观察及预后预测究竟可以发挥多大的作用,还需要更多的病例研究资料证实。

参考文献

- 1 袁 霞,龚晓昌,李金高.鼻咽癌患者血浆 EBV-DNA 水平的研究进展[J].中华肿瘤防治杂志,2006,13(6):469-471.
- 2 Tan EL, Looi LM, Sam CK. Evaluation of plasma Epstein-Barr virus DNA load as a prognostic marker for nasopharyngeal carcinoma[J]. Singapore Med J, 2006, 47(9):803-807.
- 3 De Paoli P, Pratesi C, Bortolin MT. The Epstein Barr virus DNA levels as a tumor marker in EBV-associated cancers[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2007, 133(11):809-815.
- 4 张 玉,邵红艺,冯惠霞,等.鼻咽癌病人血浆和外周血白细胞 EB 病毒 DNA 定量分析[J].中华医学杂志,2004,84(12):982-986.
- 5 廖 勇,罗志强.血浆 EB 病毒 DNA 定量测定对鼻咽癌的诊断价值[J].中国耳鼻喉咽喉颅底外科杂志,2007,13(3):186-188.
- 6 谭毅菁,苏锡康,崔金环,等.鼻咽癌患者血清中 VCA-IgA、EA-IgA、EBV-DNA 评价的比较[J].重庆医学,2010,39(6):703-706.
- 7 刘泰福,徐国镇.全国鼻咽癌会议纪要[J].中华放射肿瘤学杂志,1992,1(4):204-209.
- 8 袁 晖,杨蓓蓓,许则丰.鼻咽癌患者血浆游离爱波斯坦-巴尔病毒 DNA 定量测定的临床应用价值[J].中华耳鼻喉科杂志,2004,39(3):162-165.
- 9 李友琼,覃桂芳. EB 病毒载量检测在相关疾病中标准化评价的进展[J].中国临床新医学,2011,4(12):1199-1202.
- 10 侯 雪,张 力,赵 充,等.血浆 EB 病毒 DNA 浓度预测鼻咽癌远处转移的研究[J].癌症,2006,25(7):785-792.
- 11 Wang WY, Twu CW, Chen HH, et al. Long-term survival analysis of nasopharyngeal carcinoma by plasma Epstein-Barr virus DNA levels[J]. Cancer, 2012. [Epub ahead of print]

[收稿日期 2012-11-07][本文编辑 黄晓红 韦 颖]

《中国临床新医学》杂志投稿须知

凡投本刊的稿件,务请补全以下内容与项目:

1. 中文摘要、关键词(按规范格式书写)。
2. 英文题目,作者(汉拼),英文单位名称,英文摘要和关键词(按规范格式书写)。
3. 论文的统计学处理方法。
4. 单位投稿介绍信。
5. 作者简介(姓名、出生年月、性别、学历、学位、职称、研究方向)。
6. 须寄(送)A4 纸打印稿一份,并发电子邮件到本编辑部。
6. 第一作者联系地址、邮编、电话和 E-mail。