

EB 病毒 Rta-IgG 定量检测试剂盒分析性能评估及其在鼻咽癌血清诊断学中的应用

覃桂芳, 李友琼, 卢秋维, 罗焰芳, 夏莉莉

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

作者简介: 覃桂芳(1956-),女,大学本科,主任技师,研究方向:免疫与分子生物学临床。E-mail: qinguifang0512@yahoo.com.cn

[摘要] 目的 探讨 EB 病毒 Rta 蛋白 IgG 抗体在鼻咽癌诊断中的临床价值。方法 采用间接 ELISA 法检测 612 例临床样本中 EB 病毒 Rta-IgG 含量,同时对试剂盒的分析性能进行评估。结果 267 例鼻咽癌样本的 EB 病毒 Rta-IgG 抗体浓度为 (77.64 ± 3.205) U/ml,检测灵敏度为 94.7% (214/226),特异度为 86.3% (333/386),正确率为 89.4% (547/612);255 例健康体检血样抗体浓度为 (8.31 ± 0.745) U/ml;20 例肝癌样本抗体浓度为 (7.14 ± 1.111) U/ml;30 例肝炎样本抗体浓度为 (7.40 ± 0.581) U/ml;20 例自身免疫病样本抗体浓度为 (13.97 ± 6.943) U/ml;20 例鼻咽息肉样本抗体浓度为 (12.58 ± 6.197) U/ml。各组 EB 病毒 Rta-IgG 含量比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 EB 病毒 Rta-IgG 定量检测试剂盒用于鼻咽癌诊断具有较高的临床价值,为进一步研究鼻咽癌患者治疗效果与患者血清中 EB 病毒 Rta-IgG 的含量的关系奠定了基础。

[关键词] EB 病毒 Rta-IgG; 定量检测; 鼻咽癌; 诊断

[中图分类号] R 730.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2013)10-0942-03

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2013.10.05

Performance evaluation of EB virus Rta-IgG quantitative detection kit and its application in diagnosing nasopharyngeal carcinoma QIN Gui-fang, LI You-qiong, LU Qiu-wei, et al. Department of Clinical Laboratory, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To investigate the clinical value of Epstein-Barr virus (EBV) Rta/IgG in the diagnosis of nasopharyngeal carcinoma (NPC). **Methods** Sera from 612 clinical samples were measured for the Rta-IgG by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. In the present study, we also evaluated the performance of the Rta-IgG ELISA kits. **Results** The mean value of Rta-IgG concentration in 267 NPC patients was (77.64 ± 3.205) U/ml with a sensitivity of 94.7% (214/226) and specificity of 86.3% (333/386) and accuracy of 89.4% (547/612). The mean value of Rta-IgG concentration in 255 healthy volunteers, 20 hepatocellular carcinoma patients, 30 hepatitis patients, 20 patients with autoimmune disease and 20 patients with nasopharyngeal polyp were (8.31 ± 0.745) U/ml, (7.14 ± 1.111) U/ml, (7.40 ± 0.581) U/ml, (13.97 ± 6.943) U/ml and (12.58 ± 6.197) U/ml, respectively. There were significant difference between NPC group and other groups. **Conclusion** Our results suggest that the EBV Rta/IgG ELISA kit is suitable for the clinical diagnosis of NPC. It also provides a basis for further study on the relationship between the therapeutic effect and serum EBV Rta-IgG content in NPC patients.

[Key words] EBV Rta-IgG; Quantitative detection; Nasopharyngeal carcinoma (NPC); Diagnosis

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是一种源于鼻咽部上皮组织的一种恶性程度较高的肿瘤,近年来医学工作者在鼻咽癌的诊断、治疗上进行了大量的基础和临床研究。虽然放射治疗技术和设备得到了不断改善,但 NPC 患者 5 年生存率仍徘徊在

34%~50%左右。早期不容易发现和早期的转移是鼻咽癌死亡的主要原因。因此,寻找早期特异性的标志物将有助于鼻咽癌患者早期发现、早期诊断及早期治疗,以提高鼻咽癌患者生存率。许多研究已经证实鼻咽癌发病与 EB 病毒密切相关^[1,2],检测

EB病毒的相关抗体是诊断及检测患者病情变化的常见方法。越来越多的研究者对EB病毒BRLF1基因表达的Rta蛋白的研究表明^[3-6],在鼻咽癌患者体内可检测出高水平的EB病毒Rta-IgG,提示其可作为用于鼻咽癌筛查和诊断的新指标。2012年卫生部临床检验中心新增EB病毒Rta蛋白抗体IgG检测项目,用于辅助鼻咽癌的早期诊断。本研究通过定量检测鼻咽癌病人血清中EB病毒Rta-IgG抗体水平,进一步探讨EB病毒Rta蛋白IgG抗体在鼻咽癌诊断中的临床意义,为下一步研究鼻咽癌病人治疗效果的监测与病人血清中EB病毒Rta-IgG含量的关系奠定基础。现将检测结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 样本收集 收集2011-01~2012-12本院门诊或住院经病理切片确诊未治疗的鼻咽癌患者血清样本267份,健康人群体检样本255份,对照血清样品90份(包括肝炎患者血清30份,肝癌患者血清20份,自身免疫性疾病患者血清20份,鼻咽部良性病变患者20份)。要求所有被检测血清均清亮、无沉淀、无黄疸;样本1周以内采集者,在4℃条件下贮存;样本采集1周以上者,在-20℃条件下冻存,且避免反复冻融。

1.2 实验试剂 本研究所用的EB病毒Rta-IgG定量检测试剂盒(酶联免疫法)及其质控品由同昕生物技术(北京)有限公司提供。

1.3 实验原理及方法

1.3.1 实验原理 采用间接ELISA方法定量检测人血清中EB病毒Rta-IgG含量。在微孔条上预包被高纯度基因重组Rta蛋白,与血清样品中Rta抗体结合,再加入HRP标记的羊抗人IgG与之结合,然后加入TMB底物显色,再用终止液终止反应。通过酶标仪检测吸光度(A值),经线性回归方程计算出待测样品中EB病毒Rta蛋白抗体IgG。

1.3.2 实验方法 整个实验包括试剂盒性能确认和临床样品检测两个方面。严格按照试剂盒说明书的要求进行操作,最终按照说明书要求以30 U/ml为临界值对检测结果进行判定。临床样本检测开始前,首先对EB病毒Rta-IgG定量检测试剂盒(酶联免疫法)进行分析性能的评估,包括试剂盒的灵敏度、分析内变异、分析间变异、校准曲线的相关系数。只有当试剂盒分析性能符合要求时,方可进行临床样品的检测。

1.4 试剂盒的性能指标

1.4.1 试剂盒灵敏度 用EB病毒Rta-IgG定量检测试剂盒重复测定校准品I点20次,其计数平均值加上两倍标准差(s),根据剂量反应曲线计算得到的浓度值为灵敏度,该批次试剂盒灵敏度为0.91 U/ml。

1.4.2 试剂盒正确率 在剂量反应曲线的不同剂量水平,将已知浓度质控品的 Q_H 用校准品I分别作2倍、4倍稀释,做回收实验,平均回收率为106.6%。

1.4.3 试剂盒校准曲线的相关系数(r) 在校准品浓度范围内,用校准品的含量及其对应的吸光度进行 $\log(X) - \log(Y)$ 直线回归线性拟合,该批次试剂盒的校准品曲线的相关系数(r)为0.9968。

1.4.4 分析内变异 取企业自制质控品的 Q_H 、 Q_L 进行10孔平行实验,计算测定值的平均值(\bar{x})和标准差(s)。按公式 $CV = s/\bar{x} \times 100\%$ 计算变异系数,其分析内变异系数为5.7%和7.4%。

1.4.5 分析间变异 取企业自制质控品的 Q_H 、 Q_L 进行三次重复测定,计算其分析间变异系数(CV),其分析间变异系数为6.6%和10.5%。

1.5 统计学方法 应用SPSS13.0统计软件进行数据分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多个样本均数比较采用单因素方差分析,计数资料组间比较采用 χ^2 检验,以($P < 0.05$)为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血清样本阳性检出结果比较 鼻咽癌组阳性检出率最高(80.1%),各组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 各组血清样本阳性检出结果比较

组别	检测例数	阳性数	阳性检出率(%)
鼻咽癌组	267	214	80.1
肝癌组	20	0	0.0
肝炎组	30	0	0.0
自身免疫疾病组	20	1	5.0
鼻炎息肉组	20	1	5.0
健康体检组	255	10	3.9
合计	612	226	36.9

注:各组阳性检出率比较, $\chi^2 = 380.208, P = 0.000$

2.2 EB病毒Rta-IgG在不同组别的含量比较 平均抗体浓度鼻咽癌组最高,鼻炎息肉组次之,自身免疫疾病组最低,各组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 EB病毒 Rta-IgG 在不同组别的含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Rta-IgG(U/ml)
鼻咽癌组	267	77.64 ± 3.205
肝癌组	20	7.14 ± 1.111
肝炎组	30	7.40 ± 0.581
自身免疫疾病组	20	3.97 ± 6.943
鼻炎息肉组	20	12.58 ± 6.197
健康体检组	255	8.31 ± 0.745

2.3 EBV Rta-IgG 诊断试验结果评价 612 例血清样本检出 214 例 EBV Rta-IgG 阳性,与病理切片诊断方法相比较,检测灵敏度为 94.7% (214/226),特异度为 86.3% (333/386),正确率为 89.4% (547/612)。见表 3。

表3 EBV Rta-IgG 诊断试验结果评价

EBV Rta-IgG	病理切片诊断		合计
	+	-	
+	214(a)	53(b)	267(a+b)
-	12(c)	333(d)	345(c+d)
合计	226(a+c)	386(b+d)	612(a+b+c+d)

注:a 呈阳性反应的鼻咽癌患者数;b 呈阴性反应的鼻咽癌患者数;c 呈阳性反应的非鼻咽癌患者数;d 呈阴性反应的非鼻咽癌患者数;灵敏度(Sen) = a/(a+c);特异性(Spe) = d/(b+d);正确率 = (a+b)/(a+b+c+d)

3 讨论

3.1 近几年,关于 EB 病毒 Rta 蛋白 IgG 抗体用于鼻咽癌诊断的研究报道日益增多^[1,2],2012 年国家卫生部临检中心增加 EB 病毒 Rta 蛋白抗体 IgG 检测项目。朱文良^[6]、蔡永林等^[7]对 EB 病毒 Rta 蛋白 IgG 抗体能否指导鼻咽癌临床分期进行了相关研究,研究表明 EB 病毒 Rta 蛋白 IgG 抗体并不随着鼻咽癌病人的分期越高而表达增加,但由于其研究用临床样本数量有限,对其报道结果的可靠性尚不能确认。目前关于 EB 病毒 Rta 蛋白 IgG 抗体含量与鼻咽癌治疗效果临床监测的报道尚无,原因是市场上还没有定量检测 EB 病毒 Rta 蛋白 IgG 抗体的商品化试剂盒。本研究初步评估了 EB 病毒 Rta-IgG 定量检测试剂盒的使用性能,在验证试剂盒的线性、灵敏度、正确率都合格的基础上,进行临床样本的检测,检验该试剂盒的临床检测效果,为下一步开展鼻

咽癌病情监测奠定基础。

3.2 从本研究结果来看,鼻咽癌样本、健康体检样本、肝癌样本、肝炎样本、自身免疫病样本及鼻咽息肉样本的平均抗体浓度组间 EB 病毒 Rta 蛋白 IgG 抗体含量差异有统计学意义。在本研究中,我们选择鼻咽癌病人血清作为试验病例组考察试剂盒的检测灵敏度,选择健康体检组考察试剂盒在健康人群中的特异度;同时选择常见感染性疾病肝炎、常见肝癌、鼻炎息肉及自身免疫疾病血清作为对照,以测试其对试验结果的干扰。研究结果显示,按照说明书要求以 30 U/ml 为临界值对检测结果进行判定,与病理切片诊断方法相比,EB 病毒 Rta-IgG 定量检测试剂盒诊断鼻咽癌的灵敏度为 94.7%,检测特异度为 86.3%,正确率 89.4%。而肝癌组和肝炎组未检出阳性标本,自身免疫病样本和鼻咽息肉样本各仅检出 1 例。我们的研究结果与蔡永林等^[7]报道 EB 病毒 Rta 蛋白 IgG 抗体在鼻咽癌诊断中的研究结果基本一致,说明使用 EB 病毒 Rta-IgG 定量检测试剂盒用于鼻咽癌的诊断具有较高临床价值,为下一步进行鼻咽癌临床治疗效果的监测奠定了基础。

参考文献

- 1 Takada K. Role of EBER and BARF1 in nasopharyngeal carcinoma (NPC) tumorigenesis[J]. Semin Cancer Biol, 2012, 22(2): 162-165.
- 2 Dopakta HD, Schuy W. Compact Epstein-Barr virus diagnosis based on a defined antigen mix and specific IgA[J]. Res Virol, 1996, 147(1): 53-66.
- 3 Feng P, Ren EC, Liu D, et al. Expression of EBV lytic gene BRLF1 in nasopharyngeal carcinoma: potential use in diagnosis[J]. J Gen Virol, 2000, 81(Pt 10): 2417-2423.
- 4 Feng P, Chan SH, Soo MY, et al. Antibody response to EBV Rta protein in patients with nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer, 2001, 92(7): 1872-1880.
- 5 任军, 张晓梅, 张晓光, 等. 以 Rta2/3 为抗原用于鼻咽癌病人检测的初步研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2006, 26(11): 1057-1059.
- 6 朱文良. EB 病毒 Rta 蛋白抗体 IgG 在鼻咽癌诊断中的应用[D]. 广西医科大学, 2009.
- 7 蔡永林, 郑裕明, 成积儒, 等. EB 病毒 Rta/IgG、EBNA1/IgA、VCA/IgA 及 EA/IgA 抗体与鼻咽癌分期的关系[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(3): 509-511.

[收稿日期 2013-02-19][本文编辑 黄晓红 韦颖]