

• 论 著 •

ROC 曲线在评价自制试剂检测日本血吸虫抗体中的应用

李俊立, 王昌富

(湖北省荆州市中心医院检验科 434020)

摘要:目的 探讨使用 ROC 曲线评价自制试剂检测日本血吸虫抗体的效果。方法 以 ROC 曲线对 ELISA 检测可溶性虫卵抗原(SEA)和信号蛋白 14-3-3(rSj14-3-3)2 种方法学所检测日本血吸虫吸光度值分别取最佳 cutoff 值,与传统方法比较判读效果,并通过 ROC 曲线下面积比较 2 种方法的检测效果。结果 ELISA 检测 SEA 和 rSj14-3-3 的 cutoff 值分别为 0.111、0.050,与传统方法获取的 cutoff 值的判读效果比较,差异无统计学意义($P>0.05$),它们 ROC 曲线下面积分别为 0.918、0.935。结论 通过 ROC 曲线分析获得日本血吸虫抗体检测的 cutoff 值是科学的,值得推广的。

关键词:血吸虫,日本; ROC 曲线; 酶联免疫吸附测定

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.03.018

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)03-0327-02

Application of ROC curve in evaluation of self-made reagent to detect schistosoma japonicum antibodies

Li Junli, Wang Changfu

(Department of Clinical Laboratory, Jingzhou Central Hospital, Jingzhou 434020, China)

Abstract: Objective Exploration of use ROC curve to evaluate the effect of self-made reagent to detect schistosoma japonicum antibodies. **Methods** Used receiver operating characteristic(ROC)curve to analysis the absorbance values, which result from the SEA-ELISA, rSj14-3-3-ELISA detection, to look for the best cutoff value, compared to old cutoff value and the area under the curves of the two methods. **Results** The new cutoff value of SEA-ELISA and rSj14-3-3-ELISA were 0.111 and 0.050 respectively, which had no significant statistical difference ($P>0.05$) with old cutoff value in judge effect. The area under the curves were 0.918 and 0.935 respectively. **Conclusion** It is scientific to use ROC curve to obtain the cutoff value in detection of schistosoma japonicum antibodies, and the self-made reagent recombinant protein rSj14-3-3 is satisfactory.

Key words: schistosoma japonicum; ROC curve; enzyme-linked immunosorbent assay

血吸虫病是严重危害人民身体健康和生命安全、阻碍疫区经济发展和社会进步的重大寄生虫病,中国多发日本血吸虫病^[1-2]。其检测方法以 ELISA 为主,现有的血吸虫抗体商品诊断试剂种类繁多,效果参差不齐,存在诸多问题,比如 cutoff 值的确定没有统一标准等。本文应用 ROC 曲线确定 cutoff 值,并对日本血吸虫重组信号蛋白 14-3-3(rSj14-3-3)和可溶性虫卵抗原(soluble egg antigen, SEA)2 种试剂进行比较评价。

1 材料与方法

1.1 材料 含尾蚴的阳性钉螺购自江苏省血吸虫病防治研究所;1.5~2 kg 家兔由长江大学实验动物中心提供;收集 2006 年 5 月至 2009 年 3 月本院门诊及住院血吸虫病患者血清 74 例及 55 例来自非疫区健康人的日本血吸虫阴性血清。

1.2 仪器及试剂 DY-W2 型电泳仪(北京生化仪器厂),生物安全柜(济南鑫贝西生物技术有限公司),ABI-7300DNA 扩增仪(美国 ABI 公司),YLN-2000 凝胶成像系统(北京亚力恩机电技术研究所),全自动酶标仪(上海热电器有限公司);总 RNA 提取试剂盒(Trizol Reagent)为 Invitrogen 公司产品,逆转录试剂盒、耐热聚合酶(Taq 酶)、dNTP 为 Promega 产品, rSj14-3-3 蛋白纯化试剂盒 His. Band Purification Kit 购至 Novagen 公司,羊抗人 IgG-HRP 购自武汉博士德公司,酶结合物的工作浓度为 1:1 000,SEA 抗体诊断试剂盒购自湖北省血吸虫病防治研究所。

1.3 方法 将阳性钉螺按常规方法逸出尾蚴,感染家兔,6 周后剖杀,经门静脉灌注收集成虫,根据日本血吸虫 14-3-3 基因

序列,利用 Primer5.0 软件设计引物:引物 1(5'-TAG TTA TCC ATG AGG GAT TCG TTC-3')和引物 2(5'-TAG CTC GAG TCA GCC ATC ATT TCC G-3')^[3-4];提取成虫总 RNA,分离 mRNA,合成 cDNA,体外扩增 14-3-3 基因,将扩增产物与原核表达载体 pET28a 连接,转化到感受态细胞,用 SDS-PAGE 鉴定诱导表达的 rSj14-3-3,纯化,棋盘滴定稀释比例后包板,封闭^[5-7];将制备的 rSj14-3-3 与 SEA 一起运用 ELISA 法检测 55 例阴性对照血清和 74 例阳性血清^[8];检测获得的吸光度值,通过 ROC 曲线下面积评价 2 种试剂检测血吸虫抗体的效果。

1.4 统计学处理 所有数据均采用 SPSS13.0 统计分析软件^[9]以及 Excel 进行处理。进行 ROC 曲线分析,找到最佳 cutoff 值并计算曲线下面积;评价传统 cutoff 值即阴性对照血清的吸光度值的 2.1 倍(方法 A)与通过 ROC 曲线分析获得的 cutoff 值(方法 B)的判读效果。

2 结果

2.1 2 种方法学的检测结果 ELISA 法检测 129 例样品的 SEA 和 rSj14-3-3 的吸光度值结果见表 1。

表 1 2 种方法学的检测结果

金标准	SEA	rSj14-3-3
阴性	0.061±0.046	0.036±0.045
阳性	0.251±0.184	0.206±0.149

2.2 2 种试剂之间的比较 获得 ELISA 法检测 129 例样本 SEA 和 rSj14-3-3 的吸光度值的 ROC 曲线(图 1), ROC 曲线下面积分别为 0.918、0.935($P=0.352$)。

2.3 cutoff 值判读结果 根据方法 A、B 分别确定 ELISA 法检测 SEA 的 cutoff 值分别为 0.105、0.111, 检测 rSj14-3-3 的 cutoff 值分别为 0.058、0.050。

2.4 方法 A、B 判读检测结果的灵敏度与特异度的比较 见表 2, A、B 2 种方法判读的结果 P 值均大于 0.05, 即差异无统计学意义。另外, 选择新的 cutoff 值后, 将 rSj14-3-3 试剂与 SEA 试剂的检测效果进行了比较, 灵敏度存在统计学意义差异($P<0.05$), 特异度不具有统计学意义差异($P>0.05$)。

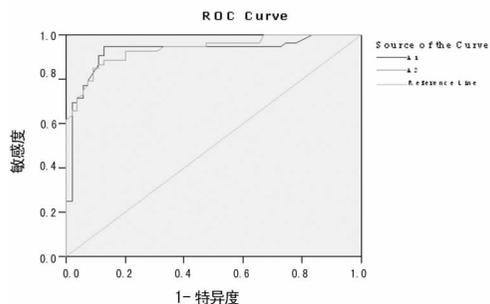


图 1 2 种检测方法的 ROC 曲线

表 2 方法 A、B 判读效果的比较

检测试剂	指标	方法 A	方法 B	P
SEA	灵敏度(SE)	0.811(0.045)	0.811(0.045)	1.000
	特异度(SE)	0.854(0.045)	0.891(0.042)	0.566
rSj14-3-3	灵敏度(SE)	0.878(0.038)	0.905(0.034)*	0.683
	特异度(SE)	0.909(0.039)	0.909(0.038)	1.000

注:采用方法 B 判读,与 SEA 试剂灵敏度相比, * $P<0.05$ 。

3 讨论

日本血吸虫病的防治已逾 50 年, 诊断始终处于中心位置, 从当初的粪检到普及应用 ELISA 法, 无不记录着中国血吸虫病诊断技术的发展历程。随着临床检验医学新的诊断试验方法的不断涌现, 诊断指标的日益丰富, 需要对现有的或新开展的诊断试验从方法学、诊断价值等方面去重新观察、评估从而达到发现新的诊断试验及优选最具有诊断价值的试验。临界值或决定阈值的确定是诊断试验评价的生命线, 不同数值作为临界值, 其灵敏度和特异度等指标是不同的, 存在一个连续的灵敏度和特异度, 将这些数据合并起来就可得到一个极其重要的、判断检测项目准确性的方法, 即 ROC 曲线分析^[10]。ROC 曲线下面积则结合了灵敏度与特异度的关系来综合评价诊断的准确性, 因而 ROC 曲线的应用在日本血吸虫检测中应得到进一步深入。

粗抗原 SEA 检测试剂盒已经广泛运用于临床试验, 而重组抗原检测试剂盒还未有成熟产品面世^[11], 因此本研究自制了日本血吸虫 rSj 14-3-3 的重组抗原, 并通过比较来评估此试剂盒的制备及应用的可行性。结果 2 种检测试剂特异度不具有显著性差异, ROC 曲线下面积也无统计学意义差异, 但 rSj14-3-3 较 SEA 敏感($P<0.05$), 这说明自制的重组蛋白 rSj14-3-3 试剂获得了比较好的检测效果, 为检测血吸虫抗体

的重组蛋白试剂的制备及应用提供了理论基础和依据。由于试验条件的限制, 试剂的交叉反应没有得到进一步研究, 这需要在在今后的研究中得到完善。

吴观陵^[12-13]提出, 在 ELISA 法检测血吸虫抗体的过程中, 将提供试剂的单位给出的阴性对照血清的 A 值的 2.1 倍作为 cutoff 值, 是缺乏科学数据支持的。目前, 对日本血吸虫抗体检测的 cutoff 值的研究在国内外鲜有报道。所以本文通过 2 种试剂对 55 例健康人血清及 74 例患者血清的检测结果采用 ROC 曲线分析获得各自试剂新的 cutoff 值, 并将其判读结果的效果与传统的 cutoff 值作比较, 结果是 2 种判读方法不存在显著性差异。因此, 建议在实际的工作应用中, 每种血吸虫抗体检测的试剂盒在使用前需做人群抗体水平分布检测, 采用 ROC 曲线分析定出适宜的阳性判读值, 这就要求各个实验室根据自己所使用的试剂盒的状况, 本地区的流行程度等情况做统计研究, 做出实验室自己的 cutoff 值, 并加强质控管理, 提高对血吸虫患者的诊疗质量。

参考文献

- [1] Steinmann P, Keiser J, Bos R, et al. Schistosomiasis and water resources development: systematic review meta-analysis, and estimates of people at risk[J]. Lancet Infect Dis, 2006, 6(7):411-425.
- [2] 郝阳, 吴晓华, 郑浩, 等. 2006 年全国血吸虫病疫情通报[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2007, 19(6):401-405.
- [3] 刘庆中, 沈继龙, 汪学龙. 日本血吸虫信号蛋白 14-3-3 的虫体免疫定位[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2003, 21(6):330-332.
- [4] 罗庆礼, 沈继龙, 汪学龙, 等. 重组日本血吸虫 26ku 谷胱甘肽-S-转移酶(rSj GST)的表达、纯化及其免疫特性分析用于急性血吸虫病免疫诊断[J]. 安徽医科大学学报, 2005, 40(6):491-494.
- [5] 李锋, 胡敏, 沈继龙. 日本血吸虫重组信号蛋白 14-3-3 的纯化及抗体制备[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2003, 21(4):221-223.
- [6] 查任远, 沈继龙, 汪学龙. 日本血吸虫重组信号蛋白 14-3-3(rSj14-3-3)及其单克隆抗体用于诊断的价值[J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20(10):847-850.
- [7] Hamdan FF, Ribeiro P. Cloning and characterization of a novel form of tyrosine hydroxylase from the human parasite. Schistosoma mansoni[J]. J Neurochem, 1998, 71(4):1369-1380.
- [8] 罗庆礼, 王志成, 李敏, 等. 应用重组信号蛋白 14-3-3 间接 ELISA 诊断日本血吸虫病[J]. 中国人兽共患病杂志, 2007, 23(3):231-235.
- [9] 陈平雁. SPSS 13.0 统计软件应用教程[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005:290-300.
- [10] Soreide K. Receiver-operating characteristic curve analysis in diagnostic, prognostic and predictive biomarker research[J]. J Clin Pathol, 2009, 62(1):1-5.
- [11] 吴锦雅, 周晓红. 重组抗原用于血吸虫病免疫诊断研究进展[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2006, 18(4):315-317.
- [12] Wu GL. A historical perspective on the immunodiagnosis of schistosomiasis in china[J]. Acta Trop, 2002, 82:193-198.
- [13] 吴观陵. 我国血吸虫病免疫诊断发展的回顾与展望[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23(5):323-328.