

• 论 著 •

## VCA+EA 多肽片段联合包被 ELISA 对血液 EBV IgA 检测效果的研究

陈明星<sup>1</sup>, 廖秀梅<sup>1</sup>, 刘万里<sup>2△</sup>

(1. 广东省龙川县人民医院 517300; 2. 中山大学附属肿瘤医院, 广东广州 510060)

**摘要:**目的 探讨中山大学附属肿瘤医院研制的病毒壳抗原(VCA)+早期抗原(EA)多肽片段联合包被聚苯乙烯微孔板酶联免疫吸附测定(ELISA)方法对血液中 Epstein-Barr 病毒(EBV) 免疫球蛋白 A(IgA)的检测效果,并将其与进口筛选试剂盒进行比较,最终对 VCA+EA 多肽片段联合包被 ELISA 试剂盒性能进行评价。**方法** 收集鼻咽癌患者血清 86 例,健康人群血清 100 例,用 ELISA 检测血清中 IgA 的 OD 值,观察该方法的最低检测限、线性范围、精密度、回收率,同时采用进口的 Epstein-Barr 病毒持续表达核抗原(EBNA1)+VCA-p18 抗原包被 ELISA 方法进行检测,观察其临床性能。**结果** VCA+EA 多肽片段联合包被 ELISA 方法最低检测限为(0.003 4±0.002 6),血清稀释 100 倍数(及以上),其水平与吸光度呈线性关系,阴性标本、弱阳性标本、阳性标本 IgA 水平的日内变异系数为 3.97%、9.76%、9.23%,日间变异变异系数分别为 7.56%、10.20%、7.67%。VCA+EA 多肽片段联合包被试剂盒与 EBNA1+VCA-p18 抗原包被试剂盒比较,相关系数为 0.926 6;检测鼻咽癌敏感性为 88.90%,特异性为 77.80%,阳性预测值为 80.00%,阴性预测值为 87.50%。**结论** VCA+EA 多肽片段联合检测鼻咽癌有较高敏感性,重复性较好,阴性结果预测较可靠,可作为临床筛查鼻咽癌的新方法。

**关键词:**鼻咽癌; Epstein-Barr 病毒; 免疫球蛋白 A

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.21.028

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)21-3024-03

## Evaluation of double peptides of VCA and EA coated ELISA test in detection of serum EBV IgA

CHEN Mingxing<sup>1</sup>, LIAO Xiumei<sup>1</sup>, LIU Wanli<sup>2△</sup>

(1. People's Hospital of Longchuan County, Longchuan, Guangdong 517300, China; 2. Cancer Center of Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong 510060, China)

**Abstract:** Objective To study the value of double peptides of VCA and EA coated ELISA test(EBNA1+ EB-VCA-p18) in serological diagnosis of IgA of Epstein-Barr Viruses(EBV) and to compare the effect with import screening kit. **Methods** By synthetic peptides EBNA1 and EB-VCA-P18 to establish ELISA assay, serum samples from 86 cases with nasopharyngeal carcinoma and 100 healthy people were collected. And the OD value of IgA was detected. The lowest detectable limit, linearity, precision and recovery were observed. The import ELISA kit of EBV VCA-p18/IgA was used as comparison. **Results** The lowest detectable limit of this method was (0.003 4±0.002 6) after the serum was diluted above 100 times. The level of IgA and absorbance had linear correlation. Daily variation coefficients of the level of IgA in negative samples, weakly positive samples and positive samples were 3.97%, 9.76% and 9.23% respectively. Between-day variation coefficients were 7.56%, 10.20% and 7.67% respectively. The double peptides of VCA+EA coated ELISA test was positively correlated with EBNA1+EB-VCA-p18 coated ELISA test( $r=0.926$ ). The sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value of the test were 88.90%, 77.80%, 80.00% and 87.50% respectively. **Conclusion** The double peptides of VCA+EA coated ELISA test has good sensitivity and repeatability, and negative predictive results are reliable, which could be used as a new way to screen nasopharyngeal carcinoma.

**Key words:** nasopharyngeal carcinoma; Epstein-Barr viruses; IgA

鼻咽癌是我国南方常见恶性肿瘤,广东为高发区。其发生、发展与 Epstein-Barr 病毒(EBV)感染密切相关<sup>[1]</sup>。检测血清中 EBV 的某些抗体水平已成为早期诊断鼻咽癌的 1 种有效手段。目前用于检测鼻咽癌的血清抗体有多种,包括有 EBV 持续表达核抗原(EBNA1)产生的 EBNA1-免疫球蛋白 A(IgA)、EBNA1-免疫球蛋白 G(IgG), BamH1Z 转录因子 Zta 产生的 Zta-IgA、Zta-IgG 和病毒壳抗原(VCA)产生的 VCA-IgA、VCA-p18-IgA、VCA-p18-IgG、gp125-IgA, 早期抗原(EA)-IgA<sup>[2]</sup>, EBV 特异性 DNA 酶(EBV-DNase)抗体, ZEBRA-IgG 及近年来新发现的胸苷激酶(TK)抗体等。而检测血清中抗体方法则包括 Western Blot、高效液相色谱(HPLC)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫酶染色法(IEA)、光化学发光法等。临床常用 ELISA 检测患者血清抗体水平。早期诊断鼻咽癌,除检测血清抗体水平外,还可检测血清潜伏蛋白 LMP-1、小分子 RNA<sup>[3]</sup>。不过,早期诊断方法虽多,但大多准确度、特异性不高,其他则方法复杂、操作繁琐、进口试剂昂贵,不利于临床实

际运用,尤其是卫生设施条件较差的社区卫生医疗机构。因此,需要寻求 1 种成熟简单、价格低廉的方法。现就中山大学附属肿瘤医院研究的 VCA+EA 多肽片段联合包被 ELISA 方法报道如下。

**1 资料与方法**

**1.1 一般资料** 健康人群血液标本 100 例,收集广东省龙川县人民医院无偿献血者;阳性血液标本 86 例,收集自中山大学附属肿瘤医院经由鼻咽镜和(或)病理诊断为鼻咽癌患者。收集后分装,-20℃下保存,避免反复冻融。

**1.2 仪器与试剂**

**1.2.1 仪器** 采用 Thermo Labsystems MK3 酶标仪和郑州博赛生物工程有限责任公司生产的 Biocell-AW1 洗板机,上海跃进医疗器械厂生产的 XMT-152A 型 37℃温育箱。

**1.2.2 试剂** 由中山大学附属肿瘤医院中心实验室提供磷酸盐吐温缓冲液(PBST)、血清和兔抗人抗体稀释液(1%的 PBS-Tween 20, 0.1%的牛血清清蛋白,聚乙二醇辛基苯基醚),辣

根过氧化物酶(HRP)标记兔抗人 IgA 及 VCA+EA 多肽片段联合包被酶标板。北京现代高达生物技术有限公司生产的 TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)显色液 A、B 和 0.3 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止液(批号为 200902001)。EBNA1+VCA-p18 进口 IgA 检测试剂盒购自爱尔兰 Vrije Universiteit Medical Center。

**1.3 方法** 将 1:100 稀释血清 100 μL 加入 VCA+EA 多肽片段联合包被 ELISA 酶标板反应孔内,37 °C 温育 1 h,洗涤后加酶标兔抗人 IgA 100 μL,37 °C 温育 1 h,洗涤后加显色液 TMB A、B 液后暗室显色 10 min,加终止液,在 450 nm 主波长和 630 nm 副波长测定 OD 值。

**1.4 统计学处理** 采用统计软件 SPSS13.0 处理数据。计量资料采用(̄x±s)表示,以 P<0.05 表示差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 最低检测限试验** 分析 VCA+EA 多肽片段联合包被 ELISA 方法最低检测限,对 20 次零标准液进行测定,用其吸光度(̄x±2s)表示<sup>[4]</sup>,结果为(0.003 4±0.002 6)。

**2.2 线性试验和线性范围** 取混合血清标本,分别做 5 点倍比稀释(未稀释,1:2,1:4,1:8,1:16)。测得平均 OD 值分别为 1.176,0.723,0.587,0.316,0.254,样品稀释度与测定值呈线性关系,得其直线回归方程 Y=0.954 5X+0.241 8,r=0.970 9,见图 1。通过对血清和稀释液比依次为 0:1,1:250,1:200,1:150,1:100,10:90,30:70,60:40,80:10,1:0 等不同水平的系列标准品进行测定,每点各测 2 次,算得平均 OD 值分别为:0.463,0.456,0.514,1.194,0.734,0.666 5,0.488 5,0.366,0.499 5,0.011,将吸光度与稀释度绘制成标准曲线,见图 2。数据采用最小二乘法原理,采用 SPSS13.0 统计软件处理,得到在血清稀释 100 倍(及以上)时血清 IgA 水平与吸光度呈线性关系。

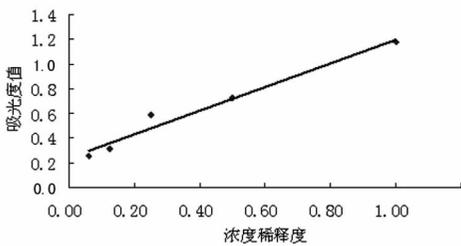


图 1 线性试验水平-吸光度曲线

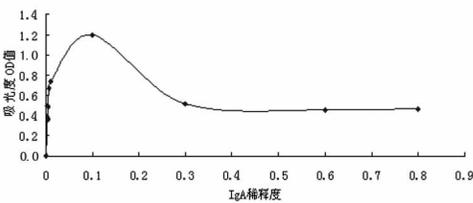


图 2 线性范围试验水平-吸光度曲线

**2.3 精密度试验** 选取阴性、弱阳性、阳性 3 例血清标本分别在 1 d 内重复测试 20 次,得到日内变异系数分别为 3.97%、9.76%、9.23%,见表 1。将这 3 例标本分装在(-20)°C 冰箱保存,每天 1 次,连续 5 d 检测这 3 例标本,得到日间变异系数为 7.56%、10.20%、7.67%,见表 2<sup>[5]</sup>。

表 1 日内变异系数测试结果

标本分类	OD 值	日内变异系数(%)
阴性标本	0.122±0.005	3.97
弱阳性标本	0.543±0.052	9.76
阳性标本	1.745±0.161	9.23

表 2 日间变异变异系数测试结果

标本分类	OD 值					平均 OD 值 (̄x±s)	日间变异 系数(%)
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d		
阴性标本	0.120	0.131	0.119	0.106	0.116	0.118±0.009	7.56
弱阳性标本	0.545	0.494	0.534	0.594	0.642	0.561±0.057	10.20
阳性标本	1.763	1.932	1.722	1.601	1.622	1.728±0.132	7.67

**2.4 回收试验** 取高 OD 值和低 OD 值标本各一例制成混合血清标本,测得混合血清 IgA 的 OD 值为 0.392<sup>[5]</sup>,而 IgA 标准溶液的 OD 值为 1.02,作 4 点回收:第 1 点,混合血清+等体积稀释液;第 2 点,混合血清+等体积原倍标准液;第 3 点,混合血清+(1:2)倍稀释等体积标准液;第 4 点,混合血清+(1:4)倍稀释等体积标准液。使其理论 OD 值分别为 0.196,0.706,0.451,0.323 5。测定值分别为 0.198,0.71,0.46,0.305,得到 IgA 回收率分别为 100.78%,103.52%,85.49%,平均为 96.6%。

**2.5 对比试验** 随机选取正常和异常血清标本各 72 例(共 144 例),分别采用 EBNA1+EB-VCA-p18 联合包被 ELISA 微孔板和 VCA+EA 多肽片段联合包被 ELISA 微孔板,检测标本血清中 IgA 水平的 OD 值,并将 2 种方法的测定结果进行比较,得到线性方程 Y=0.914 2X,和 r=0.959 6。2 种方法测定的 OD 值经统计软件 SPSS13.0 计算整理、比较结果<sup>[6]</sup>,见表 3。将数据分为 NPC 患者和健康人群 2 组制作箱图,结果表明,2 种方法中鼻咽癌患者和健康人群的中位数差距比较显著,阴、阳性判断可靠性较好;2 组中位数上下 25%不相交,可认为 VCA+EA 多肽片段联合包被 ELISA 方法可用于疾病诊断。

表 3 2 种方法 OD 值比较(̄x±s)

标本分类	n	EBN1 和 EB-VCA-p18	VCA+EA 多肽片段	P
阳性标本	70	1.05±0.62*	0.97±0.57*	0.42
阴性标本	70	0.13±0.15	0.16±0.18	0.31
总体标本	140	0.59±0.64	0.57±0.58	0.73

注:与同方法阴性标本测定值比较,\* P<0.05。

**2.6 2 种方法临床性能比较** 随机选取正常和异常血清标本各 72 例(共 144 例),分别采用 EBNA1+EB-VCA-p18 联合包被 ELISA 微孔板和 VCA+EA 多肽片段联合包被 ELISA 微孔板检测。结果采用 SPSS13.0 软件分析。绘制受试者工作特征曲线(ROC 曲线),通过曲线下面积(AUC)计算 Cut-off 值及 2 种方法的敏感性、特异性。VCA+EA 多肽片段联合包被 ELISA 方法 Cut-off 值为 0.242,敏感性为 88.90%,特异性为 77.80%。EBNA1+EB-VCA-p18 联合包被 ELISA 方法 Cut-off 值为 0.215,敏感性为 88.90%,特异性为 80.60%<sup>[7]</sup>。EBN1+EB-VCA-p18 联合包被 ELISA 方法的阳性预测值(PPV)为 83.12%,阴性预测值(NPV)为 88.60%。VCA+EA 多肽片段联合包被 ELISA 方法的 PPV 为 80.00%,NPV 为 87.50%。见表 4。

表 4 2 种方法临床性能比较(%)

方法分类	n	敏感性	特异性	PPV	NPV
EBN1+EB-VCA-p18	24	88.90	80.60	83.12	88.60
VCA+EA 多肽片段	24	88.90	77.80	80.00	87.50

**3 讨论**

EBV 是 1 种嗜 B 细胞的人类疱疹病毒,主要侵犯 B 细胞,对人体 B 淋巴细胞亲和力高。人类受 EBV 感染十分普遍,但

仅有极少数个体发生恶性肿瘤,且 EBV 感染个体不论有否发生恶性肿瘤均可产生一系列抗体<sup>[8]</sup>。EBV 与鼻咽癌关系密切,目前常规采用的 EBV 血清学检查项目 VCA-IgA 和 EA-IgA 仍是鼻咽癌患者临床筛查、辅助诊断及疗效判断的观察指标。而血浆中的 DNA 测定在临床分型和鼻咽癌疗效检测方面比 VCA-IgA 和 EA-IgA 更有价值,特异性和敏感性更高<sup>[9]</sup>。但是,单纯定性地测定血浆中的 DNA 意义不大,半定量测定 DNA 需要昂贵的仪器和试剂,对实验室要求高。所以,需要在免疫学上寻找 EBV 特异性抗原及其抗体的不同检测方法,降低成本,提高临床性能。

通过对 VCA+EA 多肽片段联合包被 ELISA 方法的研究试验,发现该方法最低检测限与检测系统有关,如包括微孔板孔差、酶标仪稳定性、电压低噪音等。血清 IgA 水平与吸光度线性相关高度相关,线性相关系数达 0.970 9,血清测定线性范围在稀释 100 倍(及以上)时有较好线性,表明该方法临床采用可行,所需标本量不大。精密度试验显示,VCA+EA 多肽片段联合包被 ELISA 方法的日内变异系数虽在可接受范围内,但日间变异系数存在大于 10% 的情况,表明其稳定性还需进一步改进及论证。回收试验结果表明,VCA+EA 多肽片段联合包被 ELISA 方法准确度可靠,平均回收率达 96.6%。

分别采用 EBNA1+EB-VCA-p18 联合包被 ELISA 微孔板和 VCA+EA 多肽片段联合包被 ELISA 微孔板检测 140 例标本,结果相关系数为 0.926 6,*t* 检验显示 2 种方法差异无统计学意义( $P>0.05$ ),具有可替代性。箱图表明,2 种方法中鼻咽癌患者和健康人群的中位数差距比较显著,阴、阳性判断可靠性较好;2 组中位数上下 25% 不相交,可认为 VCA+EA 多肽片段联合包被 ELISA 方法可用于疾病诊断。

从临床效能 ROC 曲线分析,EBNA1+EB-VCA-p18 联合包被 ELISA 方法 Cut-off 值(0.215)小于 VCA+EA 多肽片段联合包被 ELISA 方法(0.242),2 种方法的敏感性均为 88.90%,表明 2 种方法诊断能力相当;特异性方面,VCA+EA 多肽片段联合包被 ELISA 方法(77.80%)小于 EBNA1+EB-VCA-p18 联合包被 ELISA 方法(80.60%),提示前者鉴别未患 NPC 能力稍弱。VCA+EA 多肽片段联合包被 ELISA 方法 PPV、NPV 都高于 80%,表明其鉴别能力较好。VCA+EA 多肽片段联合包被 ELISA 方法的 4 个指标均小于 EBNA1+EB-VCA-p18 联合包被 ELISA 方法,表明前者与后者存在一定差距;且其低于 Fachiroh 等<sup>[10]</sup>报道的数据,表明其还有改进的空间。从探索新方法检测血清中 IgA 水平上看,VCA+EA 多肽片段联合包被 ELISA 方法的敏感性和 NPV 已经可以满足临床疾病筛查。

ELISA 发展已久,已成为一项成熟检测工艺,其检测血液中的抗原(抗体)相对比较开放,只要包被不同抗原(抗体)和提

供酶标二抗,就可检测标本中相应抗体(抗原),并可尝试用不同的抗原检测病毒血清抗体<sup>[11]</sup>,以寻求临床早期诊断和疾病疗效监测的最佳监测条件。VCA+EA 多肽片段联合包被 ELISA 方法作为一种改进方法,可称为提高医疗技术水平的 1 种新途径。

## 参考文献

- [1] Chan AT, Teo PM, Huang DP. Pathogenesis and treatment of nasopharyngeal carcinoma [J]. *Semin Oncol*, 2004, 31(6):794-801.
- [2] 胡维维,宗永生,李凤萍,等. 6 种抗 EB 病毒抗体检测在鼻咽癌血清学诊断中的比较[J]. *中国肿瘤临床*, 2006, 33(14):795-798.
- [3] 王军,崔德威. 鼻咽癌早期诊断的研究进展[J]. *广东医学院学报*, 2003, 21(6):579-581.
- [4] 冯仁丰. 临床检验质量管理技术基础[M]. 4 版. 上海:上海科学技术文献出版社, 2003:111-113.
- [5] 钱士匀. 临床生物化学和生物化学检验试验指导[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2003:76-78.
- [6] 倪宗瓚. 医学统计学[M]. 2 版. 北京:高等教育出版社, 2006:26-27.
- [7] 李萍. 临床实验室管理学[M]. 12 版. 北京:高等教育出版社, 2006:29-43.
- [8] 钟碧玲,张敏,莫建坤. 健康成人外周血 EB 病毒感染 98 例的研究[J]. *第一军医大学分校学报*, 2005, 28(1):3-5.
- [9] Shao JY, Li YH, Gao HY, et al. Comparison of plasma Epstein-Barr virus (EBV) DNA levels and serum EBV immunoglobulin A/virus capsid antigen antibody titers in patients with nasopharyngeal carcinoma [J]. *Cancer*, 2004, 100(6):1162-1170.
- [10] Fachiroh J, Paramita DK, Hariwiyanto B, et al. Single-assay combination of Epstein-Barr virus (EBV) EBNA1 and viral capsid antigen-p18-derived synthetic peptides for measuring anti-EBV immunoglobulin G (IgG) and IgA antibody levels in sera from nasopharyngeal carcinoma patients: options for field screening [J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(4):1459-1467.
- [11] 伊强,王文华,陈丹,等. 以合成肽为抗原建立 ELISA 试验检测鼻咽癌患者 EB 病毒抗体的研究[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2008, 15(8):610-611.

(收稿日期:2016-02-03 修回日期:2016-04-23)

(上接第 3023 页)

- [5] 张秀明. 浅析定量检验程序分析性能验证试验方案设计 [J]. *中华检验医学杂志*, 2015, 38(6):428-430.
- [6] 中国合格评定国家认可委员会. ISO 15189-2012. 医学实验室质量和能力认可准则[S]. 北京:中国合格评定国家认可委员会, 2012.
- [7] CLSI. EP 15-A2-2005 User verification of performance for precision and trueness, approved guideline-second edition[S]. Wayne, PA, USA:CLSI, 2005.
- [8] 中华人民共和国卫生部. WS/T 408-2012. 临床化学设备线性评价指南[S]. 北京:中华人民共和国卫生部, 2012.
- [9] 田国力,龚振华,王燕敏. 非衍生化串联质谱法检测酰基

肉碱方法的应用[J]. *检验医学*, 2011, 26(9):598-601.

- [10] 王志国. 临床检验方法确认与性能验证[M]. 北京:人民卫生出版社, 2009.
- [11] 段义飞,崔亚利,江永梅. 干血斑用于新生儿遗传代谢病筛查的方法学进展[J]. *中华检验医学杂志*, 2015, 38(4):220-222.
- [12] 尚世强,杨建滨. 新生儿疾病筛查和诊断的发展及存在的问题与思考[J]. *中华检验医学杂志*, 2015, 38(4):217-219.

(收稿日期:2016-02-07 修回日期:2016-04-27)