

• 论 著 •

两种方法测定血清人附睾蛋白 4 的方法学比对及偏倚评估

伍启康, 陈斌鸿, 梁指荣, 杨婷婷, 麦爱芬

(佛山市第一人民医院检验科, 广东佛山 528000)

摘要:目的 对电化学发光法与 ELISA 法两种定量检测血清人附睾蛋白 4(HE4)的方法进行性能比较, 探讨其检测结果的准确性及实用价值。方法 根据美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)EP9-A2 文件, 用罗氏全自动电化学免疫分析系统为比较方法(X), 以 ELISA 为实验方法(Y), 两种方法均严格按照试剂盒要求进行操作检测。结果 ELISA 法与电化学发光法均能较准确地反映血清中 HE4 水平, 两种方法比较相关系数 $r \geq 0.975$, 显示高度相关。二者经配对样本 t 检验比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 由于 HE4 因 CLIA'88 未给出具体医学决定水平以及临床可接受水平, 因此不能计算出预期偏倚的可信区间, 未能判断临床是否可接受。根据配对样本 t 检验的比较, 只能说明这两种检测方法在一定程度上可以交替使用。

关键词:人附睾蛋白 4; 电化学发光法; 酶联免疫吸附测定

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.05.018

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)05-0617-02

Methodological comparison on two kinds of method for detecting serum human epididymis protein 4 and bias evaluation

Wu Qikang, Chen Binhong, Liang Zhirong, Yang Tingting, Mai Aifen

(Department of Clinical Laboratory, Foshan Municipal First People's Hospital, Foshan, Guangdong 528000, China)

Abstract: Objective To compare the performance of 2 kinds of quantitative detection method the chemiluminescence immunoassay and the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting serum human epididymis gene product 4 (HE4), and to explore the accuracy and practical value of the two methods. **Methods** In accordance to the document EP9-A2 of NCCLS, the Roche automatic electrochemical immunoassay system as the comparative method (X) and the ELISA as the testing method (Y) were performed according to the requirements of the detection kits. **Results** The serum HE4 level could be accurately reflected by the two methods. The correlation coefficient (r) in comparing these two kinds of method was ≥ 0.975 , which showed that there was a high correlation between them. The detection results of the two methods were compared by paired sample t -test, and no statistically significant difference was found between them ($P > 0.05$). **Conclusion** Because of CLIA '88 giving no specific medical decision level of HE4 and clinical acceptable level, therefore the expected bias of credibility interval can not be calculated or whether being clinically acceptable is unable to be judged. Based on the comparison of paired sample t test, these two kinds of detection methods can be used interchangeably to a certain extent.

Key words: human epididymis gene product 4; chemiluminescence method; enzyme-linked immunosorbent assay

卵巢癌是妇科常见的恶性肿瘤,也是妇科肿瘤病死率最高的肿瘤类型。目前卵巢癌诊断的常用肿瘤标志物是癌抗原 125(CA125),但是这一肿瘤标志物在卵巢癌早期诊断中敏感性与特异度均不够。科学家们急需找到更合适的肿瘤标记物,因此人附睾蛋白 4(HE4)应运而生。HE4 编码基因最早是从附睾上皮远端分离出来,位于染色体 20q 上,全长为 12 kb 左右,1999 年研究者通过 cDNA 微阵列分析,发现 HE4(又名 WFDC2)mRNA 在卵巢癌组织中高表达,而在癌旁组织中不表达。因此近年来国内外已有将血清中 HE4 水平广泛应用于早期卵巢癌诊断的报道^[1-6]。国内外许多厂家都开始陆续研究这一标志物并且提供测定试剂,检测方法学也不尽相同,因此各试剂测定结果的可比性尚待评估,现按照美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)指南文件 EP9-A2^[7],对两种方法测定血清 HE4 进行比较,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 标本来自 2012~2013 年佛山市第一人民医院门诊、住院患者以及体检人群的血清。

1.2 仪器与试剂 罗氏 COBAS E601 全自动电化学发光分

析仪;罗氏诊断产品(上海)有限公司 HE4 检测试剂盒;上海研谨生物科技有限公司 HE4 ELISA 检测试剂盒。均采用试剂盒附带的校准品和质控品。

1.3 方法 按用户手册对仪器进行常规维护保养,严格按试剂说明书设置化学参数并校准,当日质控在控进行临床样本测定。取当日 8 份样本编号后,分别用两种方法按顺序 1~8 测定血清 HE4 活性,再按相反顺序 8~1 重复测定,2 h 内完成检测,连续 5 d 得到 40 组数据^[8]。化学发光法为本实验比较方法(X);上海研谨生物科技有限公司 HE4 ELISA 检测试剂盒为实验方法(Y)。

1.4 统计学处理 计算每个标本重复测定值间的差值、每个标本测定值的均值以及两种方法测定结果均值间的差值,按 EP9-A2 文件进行离群值检验。采用 EP 1.85 版软件,软件自动检查方法内及方法间离群点。X 范围尽可能覆盖比较方法的线性范围,同时相关系数 $r \geq 0.975$ ($r^2 \geq 0.95$)。用 SPSS 17.0 统计软件计算相关系数和线性回归方程($Y_{\text{实验}} = BX_{\text{比较}} + A$),制作散点图和偏倚图。用比较方法与实验方法的相关系数(r)粗略估计 X 的分布范围是否合适,如 $r \geq 0.975$,则

认为分布范围合适,直线回归统计的斜率和截距可靠。

2 结 果

实验数据按 EP9-A2 的要求离群值检测,发现方法内及方法间无离群值。从图 1 可以看出,在 $X=0$ 的中线附近无离群的散点。图 2 中线性回归方程 $Y=0.976X-1.165$, $r=0.9984$ ($r^2=0.996$),两种方法相关性良好。实验方法与比较方法的检测结果差别估计对两种检测方法进行配对样本均数的 t 检验,推断实验方法(ELISA 法)与比较方法(电化学发光法)检测结果比较差异有无统计学意义。计算得出全部检测结果经配对后各对差值 d 的均数 $\bar{x}=3.66$,均数的标准差 $s=13.16$,在 95% 的置信区间下, $t=1.76$ 。按 $\alpha=0.05$ 水准,认为两种方法测量结果比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

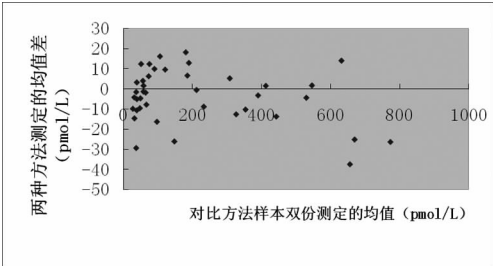


图 1 两种方法测定血清 HE4 结果偏差图

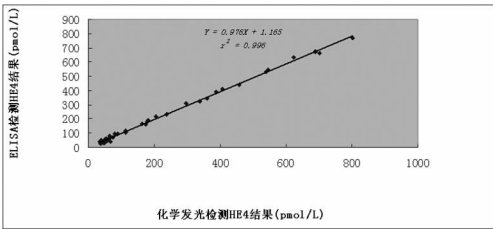


图 2 两种方法测定血清 HE4 均值散点图

3 讨 论

CA125 目前虽被广泛应用于卵巢癌诊断,但由于早期患者中只有 50% 的患者血清 CA125 水平升高,另外有 1% 健康妇女、3% 良性卵巢肿瘤、6% 非卵巢相关的良性疾病也可伴血清 CA125 水平升高,故血清 CA125 测定对早期卵巢癌诊断的敏感度和特异度均不高^[9]。与 CA125 相比,HE4 的敏感度更高、特异度更强,尤其是在疾病初期无症状表现的阶段。疾病早期 HE4 诊断的敏感度是 82.7%,而 CA125 却仅有 45.9%。与 CA125 仅 20% 的特异度相比,HE4 的特异度高达 99%。这意味着,临床医生对 HE4 的检测结果更有信心。当临床医生仅仅凭借 CA125 的检测结果诊断卵巢癌时,10 位女性中可能有 8 位会被误诊。因此 HE4 是目前卵巢癌早期筛查的最好的单一标志物^[10]。随着现代科技的进步和检验医学的迅速发展,测定血清 HE4 的检验方法有了比较多的选择。目前常用的检测血清 HE4 的最主要的方法有 ELISA 和电化学发光法两种,因此对上述两种方法的可比性评估具有非常重要的临床意义。

本次试验参考 EP9-A2 文件的规定对血清 HE4 进行比对研究,并根据 NCCLS EP9A2-40 批准文件中的以下条件对用化学发光法作为参比方法进行确定:(1)具有比待评方法更好

的精密度;(2)可能的情况下,不受已知干扰物质的干扰;(3)使用与待评方法相同的单位;(4)可能的情况下,与标准品或参考方法有已知的相对偏倚(可溯源性)。从图 2 中发现,以电化学发光法的检测结果为参考标准,ELISA 法与之相比较的相关系数 $r=0.9984$,二者呈直线相关($r^2=0.996$)。相关系数只是告知数据分布范围是否可用于回归分析,而不能用来作为判断方法性能的可接受指标,因此,必须还要将医学决定水平代入相应的回归方程,计算出该处的预期偏倚的可信区间,来评估两种方法之间的误差是否在允许的范围内,方可判断临床是否可接受。由于 HE4 是一个近年推出的卵巢肿瘤标志物指标,虽然大量研究表明 HE4 作为新的卵巢肿瘤标志物具有较高的敏感度和特异度,在卵巢癌的早期筛查上有非常大的潜力,但是由于血清 HE4 目前因 CLIA'88 未给出具体的医学决定水平以及临床可接受水平,因此不能计算出预期偏倚的可信区间,不能判断临床是否可接受。因此希望能够尽快给出这个项目明确统一的医学决定水平、参考标准、参考方法等使之能够溯源,才可以有效地减少系统误差,使以后应用在临床上的不同检测系统之间的结果得以互认,以尽量减少不必要的重复检测。根据配对样本 t 检验的比较,电化学发光法和 ELISA 这两种方法测定血清 HE4 的结果比较差异无统计学意义($P>0.05$),因此这两种方法在一定程度上可以交替使用。

参考文献

[1] 黄啸,蔡树模,范建立,等.晚期卵巢上皮性癌的综合治疗和预后分析[J].中华妇产科杂志,2002,37(5):291.

[2] Hellström I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M, et al. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma[J]. Cancer Res, 2003, 63(13):3695-3700.

[3] Moore RG, Brown AK, Miller MC, et al. The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass[J]. Gynecol Oncol, 2008, 108(2):402-408.

[4] Drapkin R, von Horsten HH, Lin Y, et al. Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas[J]. Cancer Res, 2005, 65(6):2162-2169.

[5] 卢仁泉,郭林,胡娟.人附睾上皮分泌蛋白 4 在卵巢癌诊治中的应用价值[J].中华检验医学杂志,2009,32(12):1379-1383.

[6] 李多孚,杜静,吴才良,等.血清 HE4 在诊断妇女盆腔疾病中的应用[J].西部医学,2012,24(5):982-984.

[7] 李莉,王睿,周欣.血清 CA125 和 HE4 水平与卵巢癌病情的相关性研究[J].中国实验诊断学,2013,17(5):829-832.

[8] 王惠萱,贾雄飞,滕毅,等.不同试剂检测血清 ALT 结果的可比性及偏倚评估研究[J].现代检验医学杂志,2009,24(5):61-63.

[9] Moss EL, Hollingworth J, Reynolds TM. The role of CA125 in clinical practice[J]. J Clin Pathol, 2005, 58(3):308-312.

[10] 张月萍.人附睾蛋白 4 诊断卵巢癌的临床应用[J].中国实验诊断学,2012,17(1):115-116.

(收稿日期:2014-11-10)