

· 临床研究 ·

## ELISA 检测唾液中乙型肝炎表面抗原方法的优化与评价

张 进

(上海化学工业区医疗中心 200000)

**摘要:**目的 探讨优化用于检测唾液中乙型肝炎表面抗原的 ELISA 法,并对其进行评价。方法 对 ELISA 的不同条件:样品类型、加样体积和孵育温度及时间进行优化,筛选最佳条件;并采用 3 种不同的临界值计算方法,判断最佳临界值。结果 不做任何处理的唾液样品可直接用于检测( $P=0.100$ ),50  $\mu\text{L}$  唾液样品与 100、150  $\mu\text{L}$  加样体积检测结果比较差异无统计学意义( $P=0.070$ )。采用 25  $^{\circ}\text{C}$  孵育 18 h 的优化方法检测的结果和对应血清的检测结果相关性最好,优化后唾液检测乙型肝炎表面抗原方法的特异性和敏感性分别达 92.6% 和 93.6%。结论 优化后的 ELISA 方法在唾液样品的乙型肝炎表面抗原检测中具有潜在的应用价值。

**关键词:**乙型肝炎病毒表面抗原;唾液;ELISA

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.22.016

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)22-2611-02

## Evaluation of modified ELISA method to detect Hepatitis B surface antigen in saliva specimens

Zhang Jin

(Shanghai Chemical Industry Park Medical Center, Shanghai 200000, China)

**Abstract:** Objective To evaluate a modified ELISA method for detecting the Hepatitis B surface antigen (HBsAg) in saliva samples. Methods Optimized the different conditions, including sample type, sample volume and incubation condition, to screen the best condition. Three different methods to calculate cut-off value was evaluated to screen the most acceptable. Results The non-processed saliva sample can be used directly for detection ( $P=0.100$ ). Test results of different sample volume was no significant difference ( $P=0.070$ ). HBsAg was detected in 44 saliva samples out of 47 paired positive serum specimens and not detected in 63 saliva samples out of 68 matched negative serum samples by the optimized ELISA assay. There was excellent agreement between the results for the serum and saliva specimens and the kappa value was 0.87 for saliva specimens. Using an optimized protocol, the sensitivities and specificities were 93.6% and 92.6%, respectively. Conclusion Our data showed a significant promise for the use of the modified commercial ELISA in saliva sample for Hepatitis B virus infection surveillance.

**Key words:** HBsAg; saliva; ELISA

中国是乙型肝炎病毒 (HBsAg) 的高发国家,根据流行病学调查,人群发生率较高。表面抗原携带率约为 15%<sup>[1]</sup>。乙型肝炎的实验诊断对于其治疗及预防有重要参考意义。目前,中国大多数临床实验室都采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法来检测 HBsAg,而检测样品大多数均为血清。抽取静脉血检验,受检者痛苦,且操作步骤繁琐,费时费力,存在一定风险,并不利于乙型肝炎疾病长期临床的检验监测。有相关研究报道,唾液中可以检测到乙型肝炎病毒<sup>[2]</sup>。然而,国内并没有特别针对唾液样品的商品化试剂盒。虽国内有相关研究报道,但方法条件不一,且特异度和敏感度均偏低。因此,本研究以唾液为样品,对 ELISA 条件进行优化,并对改进后的方法进行评价。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 47 例 HBsAg 血清阳性样本均来自本院住院和门诊患者,其中,男 27 例,女 20 例,年龄 18~67 岁,平均 (40 $\pm$ 12) 岁。HBsAg 血清阴性健康对照 68 例,均为来本院健康体检人员,其中,男 36 例,女 32 例,年龄 22~56 岁,平均 (38 $\pm$ 8) 岁,无乙型肝炎病毒感染史。所有患者均签署知情同意书。

**1.2 试剂** 购自上海科华公司,均在有效期内使用。

**1.3 取样** 受检者静脉采血 2 mL,分离血清,存于 -20  $^{\circ}\text{C}$  待检。同时嘱被检者随机吐唾液 3 mL,存于 -20  $^{\circ}\text{C}$  待检。

**1.4 检测方法** 血清检测具体方法严格按上海科华公司提供的说明书进行。唾液检测具体方法除以下几点外,均按说明书

进行,(1)样品类型:①未处理样本,1 mL 唾液样本直接用于检测;②样本上清,将 2 mL 唾液样本 12 000 r/min 离心 5 min 取上清;③样本沉淀,将上述离心后的沉淀用 2 mL 蒸馏水重悬。(2)加样体积:50、100、150  $\mu\text{L}$ 。(3)样品孵育条件:37  $^{\circ}\text{C}$ ,90 min;25  $^{\circ}\text{C}$ ,18 h。

**1.5 临界值 (cut-off value, CO) 计算方法** 方法 1:CO1 = 阴性对照 OD<sub>450</sub> 均值/3;方法 2:CO2 = 阴性对照 OD<sub>450</sub> 均值 + 3SD;方法 3:使用 MedCalc 统计软件 (version 9.2.1.0),利用 ROC 曲线计算曲线下面积 (AUROC),判断最优临界值 CO3。

**1.6 统计学处理** 血清样品的 HBsAg 检测结果作为评价优化后 ELISA 方法用于检测唾液样品 HBsAg 的敏感度、特异度、阳性预测值和阴性预测值的标准。计量资料采用  $\bar{x}\pm s$  表示,绝对变量比较采用  $\chi^2$  检验;非绝对变量比较采用 Mann-Whitney U 检验,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。唾液和血清检测结果的一致性用  $\kappa$  指数评估。

## 2 结果

阳性血清样品的平均吸光值 (OD<sub>450</sub>) 为 2.274 $\pm$ 1.453,阴性血清样品的平均吸光值 (OD<sub>450</sub>) 为 0.017 $\pm$ 0.026。未处理样本、样本上清和样本沉淀这 3 种不同类型的样品检测结果比较差异无统计学意义 ( $P=0.100$ ),结果如图 1 所示。因此,不做任何处理的唾液样品可直接用于检测。不同加样体积检测结果比较差异无统计学意义 ( $P=0.070$ ),结果如图 2 所示。

因此,加样体积定为 50  $\mu\text{L}$ 。对 50  $\mu\text{L}$  不做处理的唾液样品在 2 种 ELISA 孵育条件(温度、时间)下的检测结果进行分析,发现 25  $^{\circ}\text{C}$  孵育 18 h 条件下的检测结果与对应血清检测结果极为相似,而 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h 条件下的检测结果与血清检测结果差异显著( $P=0.003$ ),见图 3。

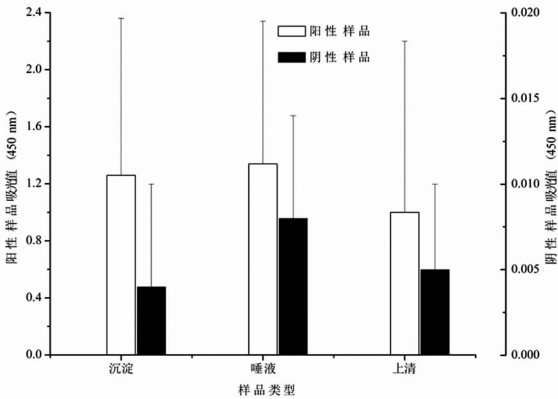


图 1 未处理样本、样本上清和样本沉淀的检测结果

由于目前暂无用于检测唾液中 HBsAg 的商业化试剂盒,且唾液检测在国内医院中并不常用,所以临界值(cut-off value)的计算并没有标准方法。因此,通过对 3 种不同的临界值计算方法进行评估,结果显示 ROC 法(CO3)最合适,临界值为 0.098。采用该方法后,精确度、阳性预测值和阴性预测值均得到提高,分别达到 93.0%、89.9% 和 95.4%,结果见表 1。

根据以上实验结果,选取 50  $\mu\text{L}$  不做任何处理的唾液样品,采用 25  $^{\circ}\text{C}$  孵育 18 h 的孵育条件进行检测,结果按照 ROC 曲线法判定。通过上述优化后的 ELLSA 方法检测,47 例血清阳性对应的唾液样品中,44 例为阳性;68 例血清阴性对应的唾液样品中,63 例为阴性。该优化方法检测唾液中 HBsAg 结果与对应血清样品结果见图 4。总之,血清和唾液样品检测结果

的一致性比较高, $\kappa$  指数为 0.87。且该方法的特异度和敏感度分别为 92.6% 和 93.6%。

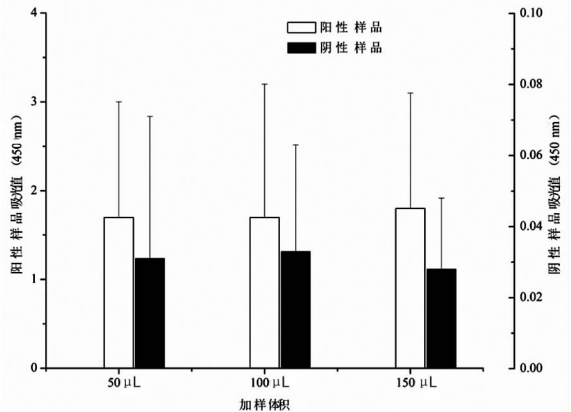


图 2 3 种不同加样体积的检测结果

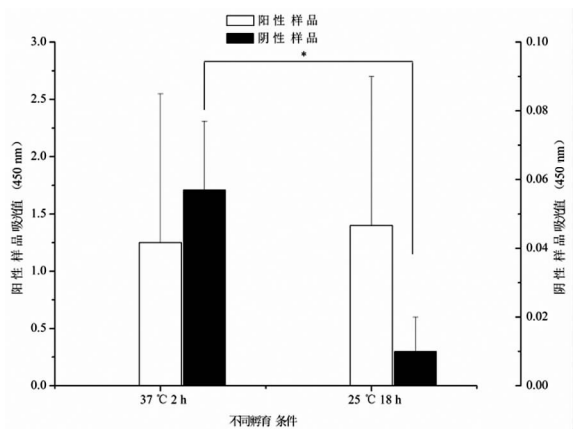


图 3 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h 和 25  $^{\circ}\text{C}$  孵育 18 h 两种孵育条件处理的检测结果

表 1 3 种临界值计算方法的敏感度、精确度、阳性预测值、阴性预测值和精确度

临界值	吸光值	敏感度(%) (95%置信区间)	特异度(%) (95%置信区间)	阳性预测值 (95%置信区间)	阴性预测值 (95%置信区间)	精确度(%)
CO1	1.0	93.6(82.4~98.6)	80.8(69.5~89.4)	77.1(64.1~87.2)	94.8(85.6~98.9)	86.0
CO2	4.432	80.8(66.7~90.8)	94.1(85.6~98.3)	90.4(77.3~97.3)	87.6(77.8~94.2)	88.6
CO2	0.098	93.6(82.4~98.6)	92.6(83.6~97.5)	89.8(77.7~96.6)	95.4(87.2~99.0)	93.0

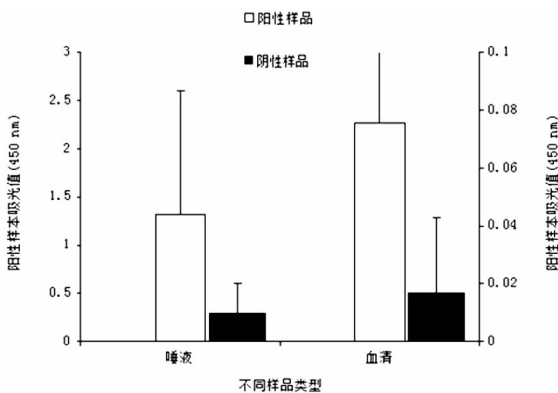


图 4 优化后 ELISA 法检测唾液中 HBsAg 结果与对应血清样品结果比较

### 3 讨论

唾液用于多种传染病的抗体或抗原检测具有方便性。有报道显示,HBV 携带者的唾液可能具有潜在的传染性<sup>[3]</sup>。近年来有大量研究致力于唾液中肝炎病毒标志物检测方法的开发和优化<sup>[4-6]</sup>。唾液取样具有简单、快捷、低成本等优点。因此,在部分血清流行病学检测中,唾液取代血清作为检测样品将产生巨大的社会效益和经济效益<sup>[7]</sup>。本研究主要对 ELISA 检测唾液中乙型肝炎表面抗原的方法进行了优化和评价。研究中发现,个别唾液检测结果为阴性的样品,对应的血清检测结果却为阳性。这可能是由于该唾液样品中 HBV 抗原浓度太低的原因。同时,作者还发现这些阳性血清样品中 HBsAg 浓度很高( $\text{OD}_{450} > 3.0$ ),表明唾液中 HBsAg 浓度与血清中 HBsAg 浓度之间并无显著相关性,该原因仍需进一步研究。

由于目前暂无用于检测唾液中 HBsAg(下转第 2615 页)

式。作者体会:(1)手术操作完全保留脂肪囊,肾蒂淋巴管游离、结扎均需处于同一平面;术中可在肾蒂背侧、腹侧处理后各放置一纱布条作参照,将肾下极抬高,观察确无残留后方可结束手术。(2)充分并尽量彻底结扎肾动、静脉之间的淋巴结缔组织是该手术关键。因腹腔镜下部分淋巴管与肾静脉区分困难时,可向近心端游离以鉴别是否为淋巴管,若出现漏扎易致乳糜尿复发。本研究中 1 例患者因术中将淋巴管误认为肾小静脉未行结扎,术后复发,经再次手术结扎后症状消失。(3)在结扎肾动、静脉头侧淋巴管时,上极需结扎到肾上腺层面。(4)在打开肾周筋膜后游离脂肪囊时,为完整保留脂肪囊,尽量靠近腰肌向腹侧钝性游离,避免造成手术解剖紊乱。(5)分离肾蒂时渗血可放置纱布压迫,大多数分钟可止血,勿需反复电凝造成进一步损伤或立即改开放手术。(6)术中出现腹膜损伤,若暴露困难,可再穿刺入一 Trocar 协助手术,不需缝合腹膜或转开放手术。(7)肥胖患者行脂肪囊外途径手术时,因脂肪多,可行部分脂肪组织切除或改次全性肾脂肪囊外途径手术。

本研究证实,后腹腔镜下肾脂肪囊外肾蒂淋巴管结扎术治疗乳糜尿效果肯定,与脂肪囊内手术途径比较,其创伤小、恢复快、并发症少、低复发率,值得临床推广。

#### 参考文献:

- [1] Zhang X, Ye ZQ, Chen Z, et al. Comparison of open surgery versus retroperitoneoscopic approach to chyluria[J]. *J Urol*, 2003, 169(3): 991-993.
- [2] 王仁辉,徐志伟,柳建发,等. 丝虫病的致病机制研究进展[J]. *地方病通报*, 2007, 22(2): 68-69.
- [3] 孙德建. 中国丝虫病防治成就[J]. *中华流行病学杂志*,

1999, 20(6): 328-330.

- [4] 袁博,杨锦建,贾占奎,等. 后腹腔镜下肾蒂淋巴管剥脱术治疗乳糜尿[J]. *现代泌尿外科杂志*, 2012, 17(2): 165-169.
- [5] 陈勇,张海滨,刁伟霖,等. 后腹腔镜与开放肾蒂淋巴管结扎术治疗乳糜尿疗效分析[J]. *临床泌尿外科杂志*, 2011, 26(2): 121-123.
- [6] 金亿里,汪朔,周长春,等. 后腹腔镜与开放式肾蒂淋巴管结扎术治疗乳糜尿的疗效比较(附 46 例报告)[J]. *中国微创外科杂志*, 2011, 11(11): 995-997.
- [7] 王绪雷,金讯波. 后腹腔镜肾蒂淋巴管结扎术治疗乳糜尿(附 14 例报告)[J]. *中国内镜杂志*, 2011, 17(8): 831-833.
- [8] 张成静,陈仁富,朱海涛,等. 后腹腔镜脂肪囊外肾蒂淋巴管结扎术治疗乳糜尿[J]. *江苏医药*, 2008, 34(7): 680-681.
- [9] 王峰业,李绍堂. 经脂肪囊外途径后腹腔镜肾蒂淋巴管结扎术治疗乳糜尿 23 例分析[J]. *中国社区医师:医学专业版*, 2011, 13(34): 90-91.
- [10] 曾家元,杨伟,庞友瑗,等. 腹膜后腹腔镜与开放肾蒂淋巴管结扎术治疗乳糜尿的疗效分析[J]. *重庆医学*, 2008, 37(14): 1534-1535, 1538.
- [11] 陈仁富,朱海涛,张成静,等. 腹膜后镜肾蒂淋巴管结扎术治疗乳糜尿术式比较[J]. *徐州医学院学报*, 2008, 28(11): 735-737.

(收稿日期:2013-01-08 修回日期:2013-04-22)

(上接第 2612 页)

的商业化试剂盒,且唾液检测在国内医院中并不常用,所以临界值(cut-off value)的计算并没有标准方法。3 种不同的临界值计算方法在其他研究中均有成功的报道<sup>[8-11]</sup>。因此,本研究对此 3 种方法进行评价,结果显示 AUROC 分析法最为合理,可得到较高的敏感度和特异度。通过对其他条件(样品类型、加样体积、孵育温度和时间)进行优化,最终使该方法的精确度达到 93%。

#### 参考文献:

- [1] 王萍. 中国乙型肝炎的流行及疫苗研究[J]. *医学动物防治*, 2012, 28(8): 872-874.
- [2] 吴晓蔓,冯秀兰,周利纯. 乙肝病毒携带产妇产乳汁、唾液乙肝病毒标志物检测结果分析[J]. *中国妇幼保健*, 2009, 24(8): 1036-1038.
- [3] 张健,窦翠云,李晓哲,等. 乙型肝炎患者唾液中 HBV-M 与 HBV DNA 的相关性研究[J]. *中国误诊学杂志*, 2007, 7(2): 209-211.
- [4] Heiberg IL, Hoegh M, Ladelund S, et al. Hepatitis B virus DNA in saliva from children with chronic hepatitis B infection: implications for saliva as a potential mode of horizontal transmission [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2010, 29(5): 465-467.
- [5] Hutse V, Verhaegen E, De Cock L, et al. Oral fluid as a medium for the detection of Hepatitis B surface antigen

[J]. *J Med Virol*, 2005, 77(1): 53-56.

- [6] Amado LA, Villar LM, De Paula VS, et al. Comparison between serum and saliva for the detection of hepatitis A virus RNA[J]. *J Virol Methods*, 2008, 148(1/2): 74-80.
- [7] 黄晨艳,方衣兵,蔡娟,等. 围生期产妇产血清、乳汁、唾液乙肝病毒标志物间的关联性[J]. *中国妇幼保健*, 2006, 26(26): 4081-4084.
- [8] Judd A, Parry J, Hickman M, et al. Evaluation of a modified commercial assay in detecting antibody to hepatitis C virus in oral fluids and dried blood spots[J]. *J Med Virol*, 2003, 71(1): 49-55.
- [9] Cruz HM, da Silva EF, Villela-Nogueira CA, et al. Evaluation of saliva specimens as an alternative sampling method to detect hepatitis B surface antigen[J]. *J Clin Lab Anal*, 2011, 25(2): 134-141.
- [10] Ljungdahl M, Montgomerie C, Gyan BA, et al. Screening for HIV and hepatitis C virus using saliva tests in a prison in Ghana. a study of the prevalence and the status of knowledge[J]. *Lakartidningen*, 2012, 109(4): 161-163.
- [11] Arora G, Sheikh S, Pallagatti S, et al. Saliva as a tool in the detection of hepatitis B surface antigen in patients[J]. *Compend Contin Educ Dent*, 2012, 33(3): 174-176.

(收稿日期:2013-01-08 修回日期:2013-03-11)