

酶连免疫吸附试验检测蚊虫体内乙型肝炎表面抗原

丁正荣* 杨进业* 李剑武# 邓洁卿# 邓曼玲+ 秦正英+

国外一些作者从捕获蚊体内检出乙型肝炎(简称乙肝)表面抗原^[1,2,3]或用HBsAg阳性血液人工喂养蚊虫进行实验观察^[4-7],提出蚊虫传播肝炎的可能性^[1-10]。有的报道认为某些蚊虫可能是乙肝的生物学宿主^[3],另一些作者认为蚊虫传播乙肝可能属于机械性传播^[2,7]。

检测蚊体内HBsAg的方法,除个别采用凝胶扩散法和对流电泳法^[5]或用荧光抗体法查肠管细胞外^[3],一般均用固相放射免疫(SPRIA)检测HBsAg^[11]。Prince^[1]用凝胶扩散法和免疫电泳法检测HBsAg结果均阴性,但同批标本用SPRIA重查,在187批蚊体内检出HBsAg阳性28批。为探讨蚊虫在传播乙肝中的作用,我们用ELISA和反向被动血凝法(RPHA),对南宁市区采集的蚊虫标本150批进行HBsAg检测,现报告如下。

材料和方法

一、蚊虫的采集和处理:1980年12月至81年3月于南宁市居民家庭和医院病房共11个点,定时采集。每个点每月采集三次。蚊虫采集后进行种属分类,检查嗜血习性,按照蚊虫种属、吸血和未吸血(肉眼观察)和怀孕与否分组。以同一种属、同一吸血或怀孕情况合并一组,一般以10只蚊虫一组,装入灭菌试管,每管加入pH7.2磷酸缓冲液1.2毫升,吸血蚊虫组每只蚊虫的血量约为0.02~0.03毫升,血液稀释约为1:5。蚊虫置4°C冰箱浸渍2小时,取出用玻棒将蚊体磨碎,冻融三次,以3000转/分,离心20分钟,吸取上清液,移入灭菌试管,管口阻以小片滤纸,以滤去蚊翅鳞片,低温保存待检。

二、材料:辣根过氧化氢酶,系用上海生

物化学研究所出品, RZ=2.5~3.0。以改进法制备酶标记的抗-HBs^[12], HBsAg诊断血清和纯抗-HBs由北京生物制品研究所供应。聚苯乙烯微量板系上海第三塑料厂出品, 721型分光光度计酶标微读者系北京第三分析仪器厂改装。

三、ELISA操作按酶改进法^[13]:

1.以TKE溶液^[14]稀释抗-HBs(蛋白含量50微克/毫升),加入微量板每孔0.2毫升,室温包被过夜。

2.以含0.05%吐温20的0.02M PBS(pH 7.2)洗涤三次,加入1:10稀释的蚊虫悬液,每孔0.2毫升,同一板作阳性和阴性对照。置45°C水浴1小时,洗涤三次。

3.加入酶抗-HBs结合物,每孔0.2毫升。37°C水浴2小时,洗涤三次。

4.加入底物联大茴香胺,无水甲醇和过氧化氢混合液0.2毫升,室温30分钟后,中止反应。

5.结果观察:肉眼观察显色反应,无色为阴性(-),按色泽深浅,阳性分为+、++、+++、并用分光光度计酶标微读者测光密度,以三份阴性血清的平均值作阴性对照,蚊虫标本P/N值>2.1即判为阳性。

中和试验:所有ELISA阳性标本均作中和试验,中和孔于酶抗-HBs结合物加入之前,先以纯抗-HBs 4微克阻断,肉眼观察,对照孔颜色反应明显比中和孔深(相差++以上)或光密度值对照孔比中和孔高50%以上,判确证阳性。

*广西壮族自治区卫生防疫站

*南宁市卫生防疫站

*桂林地区卫生防疫站

四、RPHA法按全国肝炎流行病学调查统一实验方法规程。

结 果

一、150组蚊虫中，包括未吸血蚊虫23组，怀孕蚊虫45组均未发现HBsAg阳性。而吸血蚊虫82组中，由RPHA法检出阳性6组，阳性率为4.0%。在RPHA阳性6组中，一组ELISA阴性，由ELISA法检出阳性15组，阳性率10.0%。在ELISA阳性15组中，10组RPHA阴性，ELISA敏感性高于RPHA。ELISA阳性15组蚊虫标本全部作中和试验，均确证为HBsAg阳性，中和试验为阴性者，判为假阳性。

二、不同蚊种的HBsAg阳性率：150组蚊虫标本中，致乏库蚊(*Culex fatigans* wied.)为145组，RPHA法检出HBsAg阳性6组(阳性率4.1%)，ELISA法检出阳性15组(阳性率为10.3%)。

其他白纹伊蚊(*Aedes albopictus*, Skuse)1组，三带喙库蚊(*Culex tritaeniorhynchus* Giles)3组，二带喙库蚊(*Culex bitaeniorhynchus* Giles)1组，均未检出HBsAg。

讨 论

一、热带、亚热带地区HBsAg阳性率较温带地区高20~100倍^[15,16]，Prince^[1]由肯尼亚和乌干达的森林，沼泽地带采集187批蚊虫，按种属分组，用RIA检测HBsAg，28组蚊虫发现HBsAg阳性。认为热带地区吸血昆虫在乙型肝炎的传播中有重要作用。广西南宁市地处亚热带，居民稠密，蚊虫密度高，由150组蚊虫检出HBsAg阳性蚊虫16组。据1979年调查，南宁市一般人群HBsAg携带率为10.3%。在乙肝的传播中，蚊虫可能有较重要作用。

Smith等^[3]报告致乏库蚊(*Culex pipiens fathans*)在吸入HBsAg阳性血液后10天，在肠管细胞中发现HBsAg，以后消失，至3周时又于唾液腺中再出现。认为HBsAg可能在某

些蚊虫体内复制，成为乙肝的生物宿主。但Bysom等^[7]用7种蚊虫喂以HBsAg阳性血液，用SPRIA检查，发现血液被蚊体内酶消化后，HBsAg也消失，未发现HBsAg的复制，认为蚊虫传播乙肝的机制系由于机械传播。昆虫吸入HBsAg阳性血液能机械传播的根据是：Jupp和Mcelligott^[17]将已感染臭虫，再吸35个盛阴性血液罐上的薄膜时，可使其中3个罐的血液受到污染。臭虫通过吸血还可能将HBsAg传给兔和豚鼠。

Brotman等^[2]在69组吸血蚊虫标本中，12组发现HBsAg阳性，而在62组未吸血蚊虫和24组怀孕蚊虫中均未发现HBsAg。蚊虫感染HBsAg阳性血液90小时内系血液消化时间，血液消化以后则不能查出HBsAg，因此认为HBsAg不能在蚊体内复制或持续存在。但蚊虫可能在机械传播乙肝上起重要作用。本文由吸血蚊虫82组中查出HBsAg阳性16组，而未吸血蚊虫和怀孕蚊虫68批未发现HBsAg阳性，与Brotman报告结果一致。本实验结果证实HBsAg的检出与血液存在有关，未吸血或血液已消失的蚊虫不能发现HBsAg的存在，说明HBsAg不能在蚊虫体内持续存在，但可以认为吸血蚊虫可能通过机械传播在乙肝的传播中起重要作用。这种传播作用在高流行区可能形成或促进幼龄儿童的早期感染。

国内对蚊体内HBsAg检测和蚊在传播乙肝中的作用，尚未见研究报导，本调查发现蚊虫有较高的HBsAg阳性率，蚊虫的HBsAg阳性与血液的存在有关。对这些广泛存在的吸血昆虫和传播途径应引起重视。对蚊虫在传播乙肝中的地位 and 机制，需进一步进行探讨和研究。

小 结

采集南宁市区150批蚊虫用ELISA和RPHA法检测HBsAg，ELISA检出率为10.0%，RPHA为4.0%，ELISA有较高的敏感性。发现蚊虫HBsAg阳性与蚊虫的吸血有关。未吸血蚊虫和怀孕蚊虫均未发现HBsAg阳性。检

查蚊虫种属主要为致乏库蚊。对蚊虫在乙肝的传播作用和传播机制问题进行了讨论。

参 考 文 献

1. Prince AM et al: Lancet, 2: 247, 1972.
2. Brotman B et al: Lancet, 1: 1305, 1973.
3. Smith JA et al: Nature, 237: 231, 1972.
4. Berguest KR et al: Amer J Trop Med Hyg, 25: 730, 1976.
5. Tin KM et al: Lancet, 2: 258, 1973.
6. Leevy CM et al: Gastroenterology, 62: 827, 1972.
7. Bysom NA et al: J Inf Dis, 128: 259, 1973.

8. Papaevangelou G et al: J Inf Dis, 130: 78, 1974.
9. Hawkes RA et al: Am J Epid, 95: 228, 1972.
10. Cockburn WC Amer J Dis Child, 123: 345, 1972.
11. Ling CM et al: J Immun, 109: 834, 1972.
12. 丁正荣等: 辣根过氧化氢酶结合抗体过碘酸钠法的改进, 未发表资料, 1981.
13. 杨进业等: 三种酶结合物进行ELISA应用于HBsAg检测, 未发表资料, 1981.
14. Field HA Preparation and Standardization of Reagents for the Detection of HBsAg by Enzyme Immuno Assay, WHO 1980.
15. Prince AM: J Trop Med Hyg, 19: 872, 1970.
16. Blumberg BS et al: Bull N.Y. Acad Med, 44: 1566, 1968.
17. Jupp PG et al: South African Med J, 2: 54, 1979.

儿童中ECHO和Coxsackie病毒的抗体检查

中国医学科学院儿科研究所

赵锦铭 丁韵珍 郑 莎

我们于1980年冬至81年春, 收集北京市14岁以内儿童血102份, 分为0~6个月、~1岁、~3岁、~7岁、~14岁五个组, 采用ECHO 6、7、9、11、13、18、29、32、33型病毒和Coxsackie A₁、B₁~₅型病毒测定血清中病毒抗体, 结果抗体阳性率以Coxsackie A₁、B₂、B₄为最高(45.6%, 44.1%, 39.3%); 其次是ECHO₁₈、Coxsackie B₃、ECHO₁₃、EC、HO₉(28%, 27.5%, 19%, 16.7%); 再次是ECHO₆、Coxsackie B₅、ECHO₃₂、₃₃、Coxsackie B₁、EC、HO₇(9.8%, 9.8%, 3.6%, 3.6%, 2.9%, 1.2%);

最低是Coxsackie B₅(0%)。上述结果表明, 北京儿童以Coxsackie A₁、B₂、B₃、B₄、ECHO₁₈诸型病毒传播广泛。值得提出的是, 有ECHO₁₈型病毒抗体约占所检儿童的1/5, 我们曾从急性心肌炎患儿尸心组织分离到病毒, 国外尚无由它引致心肌炎的报道。值得今后注意它与心肌炎的关系。

各年龄抗体阳性率, Coxsackie B组病毒随年龄增高而增高, ECHO(9型例外)和Coxsackie A₁>1岁至3岁时最高, 据分析可能是与接触污物多感染机会多有关。

一起金黄色葡萄球菌食物中毒

四川省荣昌县防疫站 何明盛

1981年8月2日荣昌县某机械厂部分职工及家属, 因饮用牛奶发生食物中毒。经现场调查, 证实为金黄色葡萄球菌所引起。

临床表现: 饮致病牛奶82人, 发病74人(90.2%)。潜伏期最短半小时、最长5小时、平均2.2小时。大多突然起病, 流涎、恶心、胃不适、呕吐、腹痛、腹泻、低烧(最高不超38°C)。呕吐最多16次, 吐物为食物及胆汁; 腹泻为水样便, 最多6次。

74例中, 轻、中型69例, 重型仅5例。病程短, 经镇静、止痛、补液治疗后, 一般在2天内痊愈。无死亡。

流行病学调查: 8月2日上午6时, 该厂售奶员从县农场的牛奶场购回牛奶150斤, 分装三桶。问题

出在第三桶: 当向本厂职工零售牛奶时, 售奶员竟违反食品卫生规定, 将被管理人员污染后、在37°C气温下存放10小时的变质奶8市斤倒入第三桶中, 使与鲜奶混合后出售, 饮用第三桶牛奶者82人, 发病74人; 而饮用第一、二桶牛奶者无人发病。

病原鉴定: 从现场采取第三桶牛奶标本2份, 经分离培养, 均检出金葡球菌。取其滤液3毫升, 腹腔注射幼猫(体重600克), 1小时内出现呕吐、腹泻反应; 将上述致病奶煮沸过滤, 以同法同量, 注射另一只幼猫, 仍然发生呕吐腹泻反应; 而以正常奶为对照组, 均无上述反应。

确认本菌为有致病力菌株。