

推行乙肝疫苗的接种，降低了婴幼儿的HBsAg携带率，从而减少水平传播HBV机会的结果。

不同年龄接种疫苗后预防HBsAg阳转的保护率差别显著之结果提示：接种的年龄越小，获得的保护率越高。因此，在乙肝地方性流行区对婴幼儿早期进行乙肝疫苗免疫接种是十分必要的。

本文抗-HBs无应答率为11.19%，与Nowicki等报告的一致。疫苗组所有HBsAg阳转者均为抗

-HBs无应答及母亲HBsAg携带者，提示：每次接种10微克疫苗对乙肝双阳性母亲的婴儿缺乏足够的保护功效，未能阻断HBV的围产期传播，因此，凡母亲为HBsAg携带者的婴幼儿应加大接种剂量，以产生足够的保护功效。

（本文经吴才仰和李荣成医师审阅，特致谢意。对完成本文血清检测的广西区站肝炎研究室及曾参加有关工作的同志致以谢意）

应用单克隆抗体免疫斑点试验检测伤寒Vi抗原

贵州省卫生防疫站 赵国华 张瑞华 陈策 杨洁

我们应用抗伤寒Vi抗原单克隆抗体，建立了免疫斑点试验，以检测伤寒病人血、尿中的Vi抗原，对其敏感性，特异性进行了研究，并利用该法对贵州省毕节县伤寒爆发流行点进行了现场调查。

一、材料和方法：

1. 试剂：3-3'二氨基联苯胺盐酸盐(DBT)为Fluka公司产品，硝酸纤维膜(NC)为浙江省黄岩化工厂产品，HRP-SPA为中国预防医科学院研究所产品。

2. 伤寒病人血、尿标本：

① 1987~1988年在贵州省兴义、六枝、毕节等地对临床诊断为伤寒、血培养阳性者采血95份，采尿75份。

② 双份血、尿标本各14例。

③ 经双份血清检查，肥达氏反应O、H抗体有4倍升高，而细菌培养阴性的病人10例，同时采集了血、尿标本。

3. 收集流行区与非流行区健康人血标本各10和60份，收集流行区血培养和肥达氏反应阴性的非伤寒发热病人16份(包括流感、乙脑、细菌性痢疾)。

4. 血、尿标本的处理：

① 血标本的处理：取0.2ml血清加3%三氯醋酸0.2ml，室温20分钟，离心3000rpm，20分钟，上清用碳酸钠缓冲液稀释成1:20，正常对照血清同法处理。

② 尿标本的处理：15ml尿液离心1000rpm，10分钟，取上清与95%酒精1:5混合，室温2~4h后离心2000rpm，20分钟，用PBS 1ml混悬沉淀，试验时用PBS 1:2稀释，正常对照同法处理。

5. 抗伤寒Vi抗原单克隆抗体的制备与鉴定：

1986年我们建立了抗伤寒Vi抗原单克隆抗体的杂交瘤细胞株，注射BALB/C鼠产生高效价腹水(ELISA效价1:160 000)。经ELISA、PHA证明抗伤寒Vi抗原McAb对伤寒杆菌及其具有Vi抗原的副伤寒丙、巴力鲁普沙门氏菌有反应，经鉴定抗体类别为IgG₁，用饱和硫酸铵盐析后分装，保存于4℃备用。

6. IDB法：将稀释后的血、尿标本2μl，滴于硝酸纤维膜(NC)上，以健康人血、尿为阴性对照。以10ng/ml纯化Vi抗原混于健康人血、尿标本中作阳性对照，37℃干燥后，将NC移入10%小牛血清中，37℃封被1小时，取出后用TTBS(Tris-HCl, Tween-20, pH7.4)洗三次后，置于抗伤寒Vi抗原的McAb溶液中(用含3%FCS的TTBS 1:500稀释)37℃1小时，取出后TTBS洗三次，将NC放入HRP-SPA溶液中(1:500稀释)，37℃1小时，取出用TTBS洗五次，加底物液(DBT 5mg, 30% H₂O₂ 5μl, TTBS 20ml)3~5分钟后，出现黄褐色斑点，置于蒸馏水中，终止反应。

二、结果：

1. IDB法检测伤寒病人血、尿标本的敏感性：

① 将纯化的Vi抗原稀释于正常人血清和尿标本中，IDB法可检测到0.48ng/ml抗原。

② 从兴义、六枝、毕节三地区获得的伤寒病人血培养阳性标本95份，尿标本75份IDB法阳性率分别为93.6%和96%，当血标本稀释到1:1024时IDB仍为

(下转封四)

(接192页)

阳性。

③经血培养阴性、肥达氏反应抗体4倍升高的血标本10例，IDB法检测全为阳性。经过 χ^2 检验，检查血和尿标本阳性率没有显著差别。

2.IDB法的特异性：用抗伤寒Vi抗原的McAb建立的IDB法对伤寒Vi抗原和副伤寒丙呈现阳性反应外，对伤寒O901和副伤寒甲、乙无反应，用该法检测流行区健康人血和尿均为阴性，对流行区伤寒血培养阴性及肥达氏反应阴性的16例发热病人，IDB法为阴性。

3.IDB法检测伤寒Vi抗原在血、尿中的变化：我们同时用IBD法检查伤寒爆发点14例血培养阳性病人双份血尿标本，在治疗前IDB检查血、尿标本均为阳性，其中经过医院正规治疗的5人，治疗后8~10天（即25病日），5人血尿中Vi抗原转为阴性，血培养也为阴性，临床症状也消失，而未经治疗的9例病人，在第25病日只有两人体温降至正常，血尿Vi抗原转阴。经过精确概率计算法进行显著性测验， $P=0.01$ ，有显著性差别，即伤寒Vi抗原在血尿中的滞留时间与治疗有很大关系。

三、讨论：对伤寒病的诊断，一直采用细菌培养和肥达氏反应，血培养至少需3~5天才能报告结果，影响细菌培养的检出率而导致漏诊；肥达氏反应特异性不高，且需双份血清达不到早期诊断的目的。长期以来，各国学者都在试图改善该病的诊断方法，相继应用了协同凝集试验，反向血凝试验和ELISA等方

法，对于他们的实际应用价值还有待更进一步的研究。

免疫斑点法（IDB）是近年来新发展的一种检测抗原的技术，其原理是把抗原固定在硝酸纤维膜上，然后与抗体反应来测定抗原。我们应用单克隆抗体建立的检测伤寒Vi抗原的IDB法，从获得的结果看，用IDB法检测病人血尿标本中Vi抗原，特异性、敏感性均好，该法能检测到 $0.48\text{ng}/\text{ml}$ 的Vi抗原，较1979年报道的协同凝集试验（ $100\text{ng}/\text{ml}$ ）和1980年Wetherall报道的ELISA（ $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ）要敏感，而且该法所用试剂量仅为常规ELISA的 $1/20$ ，操作简便，所需时间短，不需特殊仪器及试剂，结果容易判断，特别是采集尿标本方便易行，更适于在基层推广使用。

我们同时用IDB法检测14例双份血、尿标本，证明当血中Vi抗原阳性时，尿标本也为阳性，随着血中Vi抗原的消除，尿中Vi抗原也为阴性。而且Vi抗原在血尿中的滞留时间与病人是否具发热体征有很大的关系，Vi抗原随着病人体温降至正常而转阴。正规系统的治疗对Vi抗原转阴有很大的作用。

从我们初步研究结果看，应用抗伤寒Vi抗原单克隆抗体建立的免疫斑点试验，代替目前常用的血培养和肥达氏反应两种方法，是很有希望的。

（在此项工作中，蒙兴义卫生局熊汉泉同志，六枝卫生防疫站，毕节卫生防疫站及毕节地区医院协助，在此一并致谢）

中华流行病学杂志

ZHONGHUA LIUXING BINGXUE ZAZHI
Chinese Journal of Epidemiology

（双月刊）

1981年8月 创刊

总 编 辑：何观清

编辑室主任：张宝安

中华流行病学杂志编辑委员会编辑 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所出版 北京昌平流字5号，邮政编码102206 北京市邮政局总发行 全国各地邮局订购 国外总发行：中国国际图书贸易总公司（中国国际书店 北京2820信箱）流研所印刷厂 北京星城印刷厂印刷 国内统一刊号：C N 11—2338

CHINESE JOURNAL OF EPIDEMIOLOGY is published bi-monthly by the Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, P.O. Box 5 Changping Beijing 102206. Subscriptions: Domestic Local Post Offices, Foreign: China International Book Trading Corporation, P.O. Box 2820, Beijing, THE PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA

1989年 第10卷 第3期 1989年6月10日出版

Vol.10 No.3 Publication date: June 10, 1989

本刊代号：2—73(BM724)

国内定价：全年6.30元，每期1.05元