

粪便与十二指肠液等对乙型肝炎表面抗原(HBsAg)的作用观察

四川医学院卫生系流行病学教研室 乔宗恺 盖宝璞

乙型肝炎传播途径颇多,流行特征复杂,一般的流行病学调查难以断定粪便传播的有无。检测粪便中HBV或HBsAg虽有利于判断,但由于检测结果很不一致^[1~4, 6],且这些矛盾至今未能得到圆满解释,故乙型肝炎的粪便传播问题仍有争议。有些学者认为,粪便中有HBsAg抑制物,但对抑制物的看法不太一致^[6, 8~11]。因此,本实验使用对流电泳(CEP)及反向血凝法(RPHA),以HBsAg为指标,观察了粪便与十二指肠液等对HBsAg的作用,以探讨乙肝粪便传播的可能性。现将方法与结果报告如下。

材料与方法

一、实验材料

1. 粪便:收取8名HBsAg健康携带者(成人)及10名HBsAg阴性成人的新鲜粪便各1份,共计18份。取后立即加生理盐水使粪便浓度为33%, (W/V),充分搅拌后2,000rpm20分钟离心,上清液用于实验。

2. 十二指肠液与肝胆汁:十二指肠液取自1名HBsAg阴性成年患者,取后立即按A、B、C、D液分装,2,000rpm20分钟离心,上清液用于实验。肝胆汁取自1名HBsAg阴性肝管结石术后肝管引流的成年患者。取后立即2,000rpm20分钟离心。上清液用于实验。

3. 胃肠粘膜:取自1名12岁因格林巴氏综合征死亡患者。于死后10小时内取得标本。取后立即用盐水冲洗,剥去肌层组织,将粘膜按胃、十二指肠、回肠、空肠、横结肠、直肠分装。实验前将1份粘膜加2份盐水使成33%浓度(W/V),用小型玻璃匀浆器充分捣研后2,500rpm20分钟离心,上清液用于实验。

上述粪便、十二指肠液、肝胆汁及胃肠粘膜保存时均放4°C冰箱之冰槽内。保存时间均在一个月之内。

对上述所有材料在实验前均作HBsAg(CEP与RPHA)及抗-HBs(CEP)检测,结果除1份HBsAg阳性携带者粪便为HBsAg阳性外(RPHA 1:8, CEP阴性),其余均为阴性。

4. 血清HBsAg:取自1名HBsAg阳性供血者,HBsAg滴度为1:64(CEP),亚型adr, HBeAg阳性。将血清以生理盐水调至CEP为1:16备用。

5. 纯化HBsAg:将上述阳性血清(CEP 1:64)经22,000rpm24小时超速离心后,弃上清,沉淀以PBS悬浮,并用PBS调至CEP 1:16(约为纯化前液量的1倍)备用。

二、实验方法

1. 抑制试验操作法:将供实验用之上清液或生理盐水(作对照)0.1毫升置于康氏试管,加入等量HBsAg阳性液(经调整后的纯化HBsAg或血清HBsAg),充分混匀,37°C水浴120分钟,每隔20分钟摇动一次。水浴完毕立即取实验液作HBsAg检测。

作用结果均经2次以上实验验证。

2. 对流电泳(CEP):诊断血清由卫生部生研所提供。

3. 反向血凝(RPHA):诊断血球由卫生部生研所提供。

结 果

一、粪便抑制作用观察:8份血清HBsAg阳性及10份阴性者粪便以CEP检测,对纯化HBsAg有抑制作用,而以RPHA检测均无抑制(表1)。

表 1 粪便对HBsAg作用结果*

实验材料	标本份数	HBsAg(CEP)					HBsAg(RPHA)						
		原液	1:2	1:4	1:8	1:16	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
HBsAg 阳性者粪便	8	0	0	0	0	0	8	8	8	8	8	8	1
HBsAg 阴性者粪便	10	0	0	0	0	0	10	10	10	10	10	10	0
盐水对照	20	20	20	20	19	0	20	20	20	20	20	20	0

*对纯化HBsAg与血清HBsAg作用结果相同。HBsAg滴度下数字为作用后仍阳性的份数。

二、十二指肠液及肝胆汁抑制作用观察：十二指肠A、B、C、D液以CEP与RPHA检测，对纯化HBsAg均有抑制作用；肝胆汁无

抑制作用(表2)。对血清HBsAg则均未发现抑制作用。

三、粪便与十二指肠液对HBsAg作用的

表 2 十二指肠液及肝胆汁对纯化HBsAg作用结果*

实验材料	HBsAg(CEP)					HBsAg(RPHA)						
	原液	1:2	1:4	1:8	1:16	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
十二指肠A液	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
十二指肠B液	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
十二指肠C液	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
十二指肠D液	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
肝胆汁	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
盐水对照	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-

*对血清HBsAg均未见抑制作用。

性质比较：虽然以RPHA检测粪便对HBsAg无抑制，但发现CEP检测仍有抑制。考虑到CEP检测发现的这种抑制如为粪便中十二指肠液抑制物性质继续作用的结果，则应与十二指肠液相同。故以CEP作了抑制物某些性质的观察。

1.不同温度下抑制作用比较：以CEP检测不同温度(4℃、22℃、37℃、56℃)孵育下粪便(取自1名HBsAg携带者)与十二指肠B液对纯化HBsAg的作用，发现4℃时十二指肠B液未表现抑制作用，随温度上升表现出抑制；而粪便则无论4℃或其他温度下均有抑制作用(图1)。

2.不同孵育时间下抑制作用比较：以CEP检测不同水浴时间(1、2、16、24、48小时)及未作水浴(即标本液与HBsAg阳性液混合后立即电泳，0小时)情况下1名HBsAg携带者粪便与十二指肠B液对纯化HBsAg的作用，发

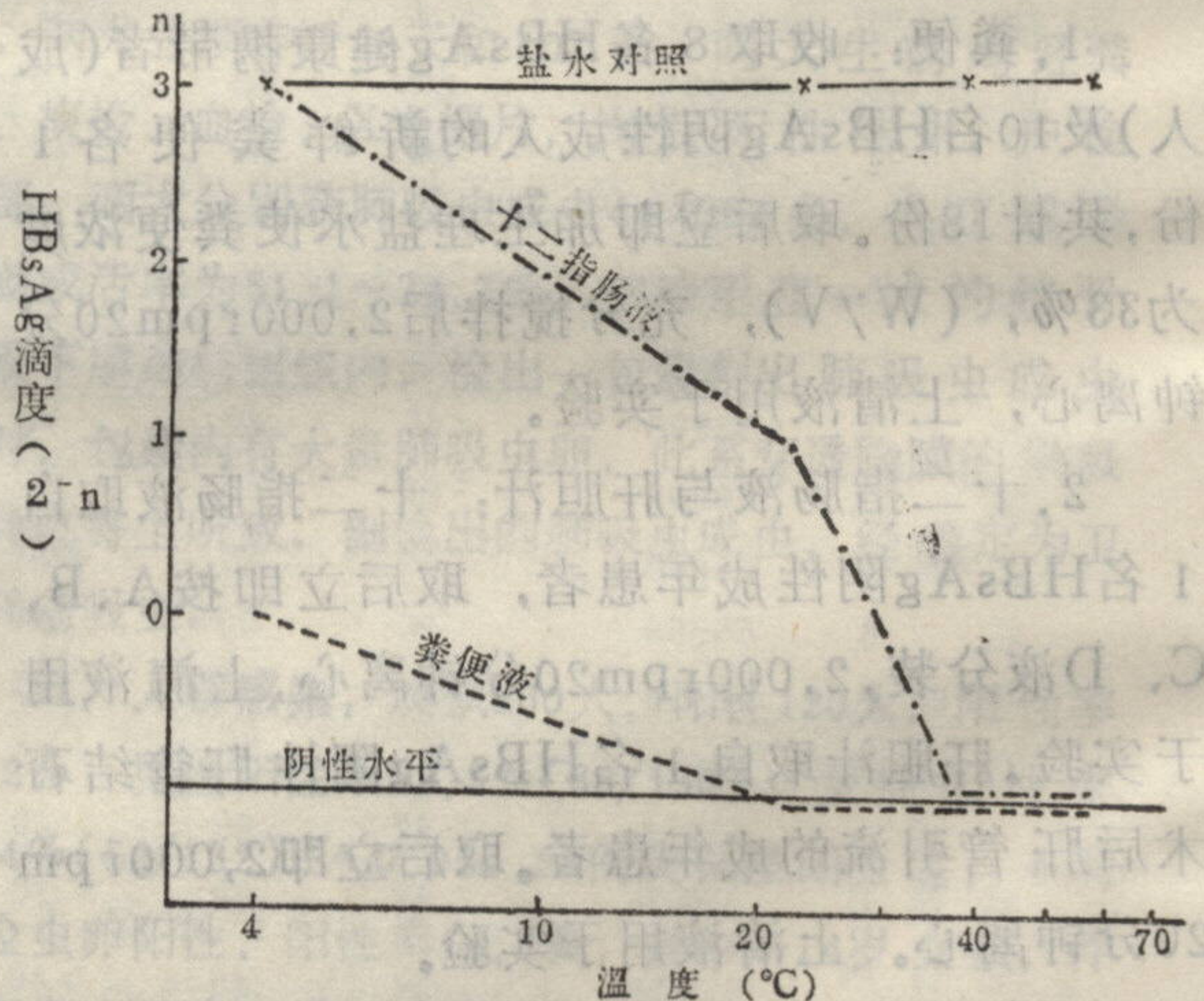


图 1 不同温度下粪便与十二指肠液对纯化HBsAg的作用(CEP)

现十二指肠B液随水浴时间延长而表现抑制，不作孵育则无抑制；而粪便不作孵育也有抑制作用，孵育16、24及48小时观察，则发现原抑制作用消失(图2)。

3.不同离心速度及冻融等对抑制作用的影

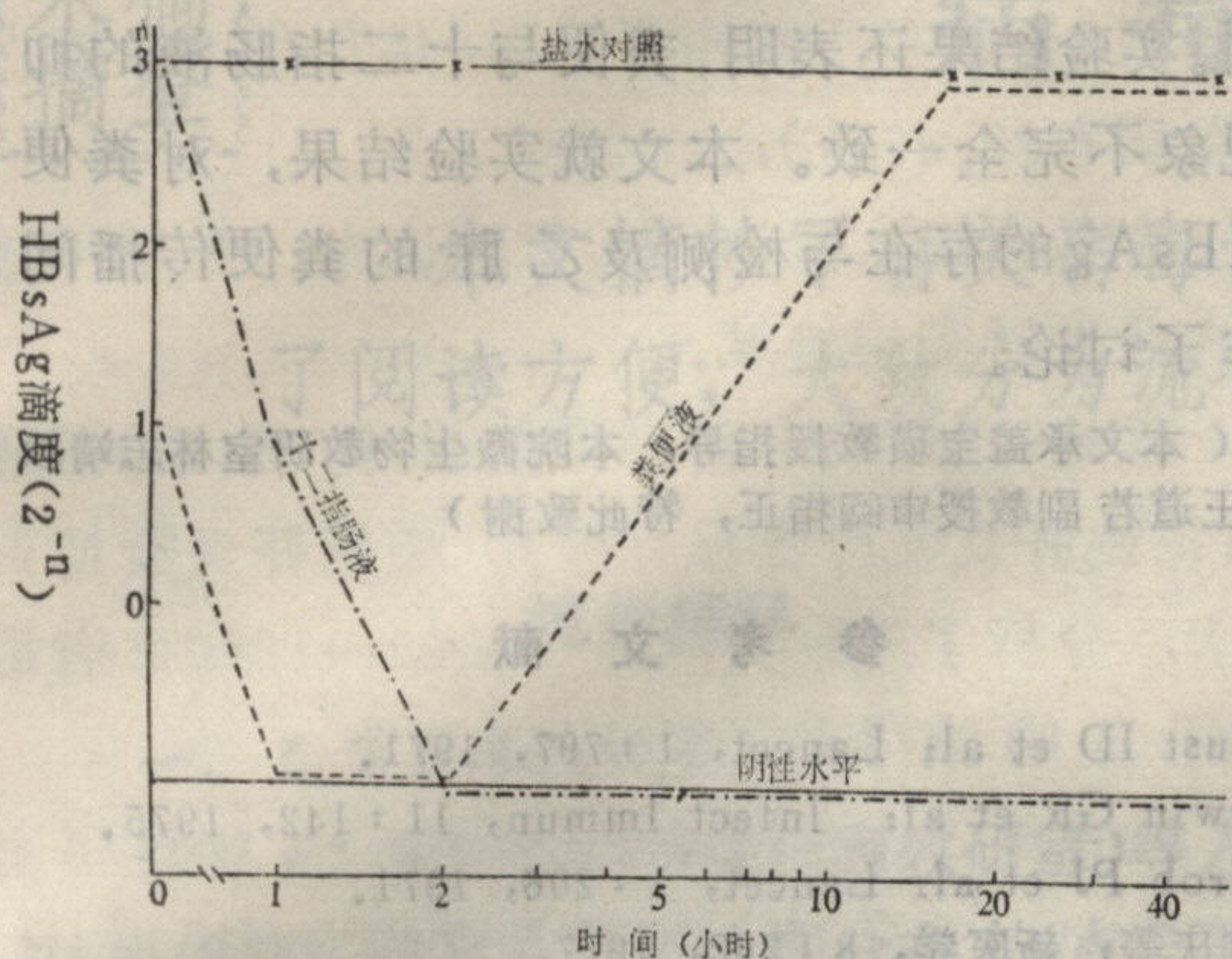


图2 不同孵育时间粪便与十二指肠液对纯化HBsAg的作用(CEP)

响:以CEP及RPHA检测,十二指肠B液及粪便液经2,000、4,000及12,000rpm30分钟离心及冻融(0°C与37°C交替)10次以上对抑制作用无影响。先经80°C30分钟及煮沸处理再与纯化HBsAg孵育,则发现抑制作用消失。

四、胃肠粘膜对HBsAg的作用观察:以CEP与RPHA检测,胃、十二指肠、回肠、空肠、横结肠及直肠各段粘膜对纯化HBsAg与血清HBsAg均未见抑制作用。

讨 论

本实验结果表明,十二指肠液对纯化HBsAg有抑制作用,证实了肠道中确有HBsAg抑制物存在。对抑制物性质的探讨表明,抑制过程可能有酶类起作用。肝胆汁无抑制作用提示,这种抑制不是仅由于胆汁酸引起。Woodle等^[9]曾观察到胆汁酸与蛋白酶一起同HBsAg孵育,可使HBsAg形态与抗原性受到破坏。由于十二指肠液内含有胆汁酸与蛋白酶,故我们观察到的抑制作用可能与Woodle等的研究结果一致。

实验观察到十二指肠液对血清HBsAg无抑制作用,其原因不清,可能是血清中某些物质起了稳定作用。

我们以CEP检测,发现粪便对HBsAg有抑制作用。但进一步研究发现,这种抑制物的

性质不完全与十二指肠液相同。其抑制作用在4°C时也能发生,不作孵育也能表现出抑制,孵育16小时后原抑制作用消失。实验中观察到,有时在电泳有抑制的标本孔边出现可疑沉淀线,呈8形。而且,我们用RPHA检测这些CEP检测有抑制的标本,结果均未发现粪便有任何抑制作用,即使加大粪便液量(16份粪便液加1份HBsAg液孵育)也未发现抑制。这些情况令人设想,CEP检测粪便抑制作用时,HBsAg与抗-HBs不起反应可能是粪便中某些物质干扰的结果。且有可能是影响电泳时抗原移动使之不能形成应有沉淀线之故。RPHA由于操作方法不同,不受抗原移动影响,故以RPHA检测未发现抑制作用。

粪便与HBsAg孵育16小时后,以CEP检测到的抑制作用消失,原受抑制的HBsAg抗原性仍表现出来,形成的沉淀线与对照完全一致。这一现象不易解释。Weng等^[8]曾观察到假单胞菌的噬菌体能与HBsAg结合并抑制其抗原性。这种结合是否可逆,能随孵育时间延长而解除, Weng在这方面未作叙述。本实验观察到的是否属这种情况,有待进一步研究。

我们经反复多次检测,均未发现胃、十二指肠、空肠、回肠、横结肠、直肠肠粘膜有抑制作用。Piazza等^[11]曾报道,肠粘膜内有抑制因子存在。本实验未能发现抑制作用,是否与选材不当有关,有待研究。

由于肝胆汁,胆囊胆汁中能测到HBsAg^[5,7],因此,可以设想,HBsAg随胆汁排出后,即遭到十二指肠液抑制。但在肠道下段,原抑制性酶类可能已受肠道细菌作用发生变化,不一定表现出抑制作用。这时,肠道下段因各种原因(如痔疮,粘膜受损或通透性增加)排出HBsAg时,如以合适方法检测或粪便中干扰因素不大时,则可能得到阳性结果。这或许可以解释为何粪中HBsAg不易检出,即使检出阳性率一般也较低的原因。我们在8位HBsAg阳性携带者中测出1名携带者的粪便为HBsAg阳性(收集此携带者粪便十余份,均呈阳性,RPHA

1:4~1:16,经抑制试验证实;以酶联免疫吸附试验检测亦为阳性(阳/阴消光值比率均大于2.1)。这一结果支持上述推测。

总之,就本实验结果来看,十二指肠液对HBsAg有抑制作用,而粪便实际上对HBsAg并无抑制。由此推论,如HBV的其他传染性成分在肠道不受破坏,则乙型肝炎是有可能造成粪便传播的。如前所述,倘若肠道下段只在特殊情况下才排出HBV,则乙型肝炎的粪便传播虽有可能,但意义或许较小。

小 结

本实验作了粪便与十二指肠液对HBsAg的作用观察。结果表明,用对流电泳(CEP)与反向血凝(RPHA)检测,十二指肠液能抑制纯化HBsAg的抗原性,但对血清HBsAg无作用;以CEP检测,粪便对纯化HBsAg及血清

HBsAg有抑制作用,但以RPHA检测则未见抑制。实验结果还表明,粪便与十二指肠液的抑制现象不完全一致。本文就实验结果,对粪便中HBsAg的存在与检测及乙肝的粪便传播问题作了讨论。

(本文承盖宝璜教授指导,本院微生物教研室林志靖教授,王道若副教授审阅指正,特此致谢)

参 考 文 献

1. Gust ID et al: Lancet, 1:797, 1971.
2. Irwin GR et al: Infect Immun, 11:142, 1975.
3. Grob PJ et al: Lancet, 1:206, 1971.
4. 荆庆等:新医学, 8:262, 1977.
5. Akdamar KA et al: Lancet, 1:909, 1971.
6. Feinman SV et al: J Infect Dis, 140:407, 1979.
7. Piazza M et al: Path Microbiol, 43:307, 1975.
8. Weng LK et al: Infect Immun, 12:180, 1975.
9. Woodle JW et al: J Clin Path, 27:693, 1974.
10. Krabow VK et al: J Infect Dis, 131:658, 1975.
11. Piazza M et al: Brit Med J, 2:334, 1973.

1955~80年湖北省志贺氏菌的菌型分布及其变迁

湖北省卫生防疫站 叶玉春 叶友松

为了解志贺氏菌型的变化规律,以便加强菌痢的防治工作,我们整理了自1955~80年以来的资料,这些资料除一部分来自本站的工作总结以外,大部分来自近20个地、市、县卫生防疫站的工作总结。现报告如下:

一、志贺氏菌的组成:共统计17,718株志贺氏菌,其中福氏志贺氏菌占第一位,共14,128株,各个年代(五十年代、六十年代、七十年代,下同),所占比例波动在72.02%~85.19%之间,平均为79.74%。宋内氏志贺氏菌占第二位,共2,025株,各个年代所占比例波动在9.13%~11.66%之间,平均为11.43%。史密氏志贺氏菌共608株,各年代所占比例波动在1.30%~6.10%之间,平均为3.43%。鲍氏志贺氏菌共449株,各年代所占比例波动在0.91%~1.31%之间,平均为2.53%。痢疾志贺氏菌有173株,在五十年代和六十年代,分别为1.37%和1.96%,到七十年代下降为0.20%,平均为0.98%。志贺氏菌群的这些组成状况,与国内多数报告结果是一致的。

二、志贺氏菌群在城市和县区分布状况:17,718株志贺氏菌,城市组(县以上地区,下同)有9,010

株,其中福氏志贺氏菌6,926株占76.87%;宋内氏志贺氏菌1,287株占14.28%。县区组有8,708株,其中福氏志贺氏菌7,202株占82.71%;宋内氏志贺氏菌738株占8.47%。这两组的福氏菌和宋内氏菌所占比例,通过t测验处理,证明都有非常显著的差异(t值分别为9.73和12.9)。说明在县区福氏菌所占比例显著高于城市;而在城市宋内氏菌所占比例显著高于县区。其他三种志贺氏菌比例略。在地区分布上,看不出大的差别。

三、福氏志贺氏菌亚型的组成:统计分析7,247株福氏菌亚型结果,其中F_{2a}占第一位有2,466株,在六十年代占34.42%,七十年代占46.66%,1980年下降到20.19%,平均为34.02%。F_{1b}占第二位有1,338株,在六十年代为10.09%,七十年代为11.39%,到1980年上升到27.04%,平均为18.46%。F_{1a}占第三位,有1,077株,在六十年代为8.01%,七十年代为14.17%,1980年上升到16.32%,平均为14.86%。除F_{2a}以外,国内许多报告是以F₃和F₄为次,而我省是以F_{1b}和F_{1a}为次。