

# ELISA检测正常人血清轮状病毒抗体的研究

山东省医学科学院基础医学研究所

吴惠联 郭进林 韩文清 张玉昆 孟红 冯连珠

近年来,轮状病毒(RV)致小儿腹泻一直在济南地区流行,1982~83年趋于较大流行。为此我们用ELISA间接法检测了该地区277份正常人血清中的RV抗体,以查明RV感染在本地区的分布状况和不同年龄组人群抗RV的不同免疫状态。同时对其中82份血清标本,用补体结合试验(CFT)进行复测,以比较两法的敏感性和特异性。其中用ELISA检测正常人群RV抗体及不同年龄组儿童RV抗体阳性率消长变化的情况,在我国均未见报告。

## 材料与方法

一、血清标本:于1984年9月和1985年3~4月,即流行季节前后,共采集健康儿童及成人(体或献血者)血清277份,其中5个月以下小儿的28份血清系取自非腹泻与非病毒性感染的患儿。被取材者男、女性大致相等,住市区或市郊,环境卫生情况一般。

二、病毒株:牛轮状病毒的NCDV株,由中国医学科学院医学生物研究所馈赠,用MA<sub>104</sub>细胞传代,CPE<sup>+++</sup>时收获,-60℃冰箱保存。

三、细胞系:MA<sub>104</sub>细胞(恒河猴胚肾传代细胞系)引自上海第一医学院附属儿童医院病毒室。用Eagle MEM(10%新生牛血清)常规传代培养。

四、酶结合物:辣根过氧化物酶标记羊抗人IgG结合物,购自卫生部药品生物制品检定所,批号8302,工作浓度1:10000。

五、ELISA检测血清抗体:

1. RV-ELISA抗原制备:用牛RV接种MA<sub>104</sub>细胞,按常规制备抗原<sup>[2]</sup>。

2. 抗原滴定:RV抗原及MA<sub>104</sub>细胞抗原均自1:20起,作倍比稀释至1:320。兔抗RV血清及正常兔血清(对照抗体),作1:10000稀释,酶标记羊抗兔IgG结合物(卫生部药品生物制品检定所产,批号83027),用40孔板(天津有机玻璃制品厂)按常规阵法作抗原滴定。

3. 血清抗体检测:按常规法进行<sup>[2]</sup>,RV抗原与细胞对照抗原均用pH9.6碳酸盐缓冲液作1:40稀释,待检血清标本用PBS-T<sub>20</sub>自1:200作倍比稀释至1:6400。酶结合物用PBS-T<sub>20</sub>作1:10000稀释,底物用邻苯二胺。反应在37℃进行,除终止剂用50μl/孔外,其他均用100μl/孔。

同时用两种方法判定结果:①肉眼观察,以阳性血清(出现棕黄色)为卅,阴性血清(无色或微黄)为一或土,以稀释度≥1:200出现卅为阳性。②用酶联免疫检测仪(DG-I,华东电子管厂)测490nm处OD值,以标本校正OD值≥0.6的血清最高稀释度算作滴度。

4. 阻断试验:将ELISA检测抗体滴度1:6400的24份血清,以pH7.4的0.01M PBS稀释为4个ELISA单位,分别与等量1:40的RV抗原和正常细胞抗原作用,再按ELISA间接法检测。阻断率≥50%,即为阻断试验阳性。

六、CFT测血清抗体:按常规法进行<sup>[3]</sup>。

## 结果

一、ELISA测定正常人血清RV抗体:测定了8个年龄组共277份正常人血清的RV抗体,抗体阳性者(抗体滴度≥1:200)233份,总阳性率为84.10%。



不同年龄组的抗体阳性率不同(附表), 6个月~1岁组最低, 为51.5%; 6个月以下组为53.0%; 1岁以上的四个儿童组的阳性率随年龄的增高, 而由83.8%渐增为92.3%; 成人及脐带血均为100%。

附表 ELISA测定不同年龄组RV抗体阳性率

| 年龄组  | 例数  | 阳性数 | 阳性率% |
|------|-----|-----|------|
| <6月  | 28  | 15  | 53.0 |
| ~1岁  | 33  | 17  | 51.5 |
| ~2岁  | 31  | 26  | 83.8 |
| ~3岁  | 39  | 35  | 89.7 |
| ~6岁  | 40  | 36  | 90.2 |
| ~12岁 | 34  | 31  | 92.3 |
| 成人   | 60  | 60  | 100  |
| 脐带血  | 12  | 12  | 100  |
| 合计   | 277 | 233 | 84.1 |

二、ELISA阻断试验: ELISA检测24份正常人RV抗体阳性血清(1:6400)与工作稀释度的抗原(1:40)进行阻断试验, 结果23份为阳性, 表明ELISA法测得的抗体确为RV特异性抗体。

三、ELISA重复性试验: 同法制备的二批RV—ELISA抗原, 经同一批兔抗RV血清滴定, 滴度相同, 在同样条件下, 于不同时间对同一份阳性血清, 用ELISA间接法进行了四次检测, 测得OD值分别为1.57、1.48、1.71、1.61。平均OD值为 $1.59 \pm 0.027$ , 变异系数为6.0%表明本方法的重复性良好。

四、ELISA与CFT的比较: 对82份血清标本同时用ELISA与CFT检测RV抗体, 结果两法均阳性者68例, 均阴性者6例, ELISA阳性而CFT阴性者8例, 无ELISA阴性而CFT阳性者, 总符合率为90.24%。

ELISA所测抗体GMT为894.6, CFT为8.13, 经统计学处理, 相关系数 $r=0.67$ , 表明具有良好的正相关性。ELISA所测抗体滴度为CFT的110倍, 表明ELISA测RV抗体比CFT有更高的敏感性, 且方法稳定、简单、

快速。

### 讨 论

人群对RV感染有着普遍的易感性, 至今在世界上还没有发现无RV感染的孤立人群。关于RV感染的血清流行病学调查, 国外有用CFT[4], 免疫荧光法(IF)[4]及对流免疫电泳法(CIE)[5]等的报告, Yolken等[6]用ELISA作了人群RV抗体血清型的检测, 国内仅见李泉根等用CFT[7]及施惠达等[8]用CIE法的检测报道。本文以ELISA间接法检测了不同年龄组的正常人血清RV抗体, 总阳性率高达84.10%, 首次报告济南地区人群中RV感染的普遍性。

关于不同年龄组人群血清RV抗体的阳性率国外报道情况不一[1,9], 但一般认为, 因新生儿可从母体获得被动免疫, 血清多带有较高滴度的RV抗体, 至4~5月可降至最低值, 此后因不断受RV感染, 阳性率随年龄而升高, 至成人可达100%[5,1]。本文6个月~1岁组抗体阳性率最低, 仅51.5%, 6个月以下组稍高, 为53.0%, 两组在统计学上无差别( $P > 0.05$ )。1~2岁组抗体阳性率有明显升高, 达83.8%, 与前二组相比, 有非常显著差异( $P < 0.01$ )。国外报道RV感染多发生在6个月至2岁以下婴幼儿[1,10], 本室也曾查得在小儿腹泻流行期间, 临床诊断为本病的62例患儿中, 6个月至1岁者占77.4%, 这同本文上述结果联系起来看, 说明1岁内幼儿虽可带有来自母体的被动免疫抗体, 但尚不足以有效地保护其免受RV感染, 尤其是5~6个月后抗体水平已降到更低值的幼儿。至于5~6个月以下幼儿的较低易感性, 与来自母乳的IgA及胃肠道特有的形态与生理学特点等有关[9]。1岁后幼儿抗体的升高主要是由于感染RV所致。本文从2岁到12岁的3个年龄组, 阳性率渐次升高到92.3%, 在成人达100%, 由于这些年龄组的人群很少发病, 因此其血清抗体的存在, 应看作是反复的隐性感染所致[11]。本文



首次揭示了在我国RV感染随年龄而消长的变化与国外的流行病学资料有着基本相同的规律性。

同时本文测得的1岁以下幼儿的低抗体阳性率,从血清流行病学和免疫学方面,表明其对RV有较高易感性,因此在我国也应当特别注意对1岁以下幼儿采取预防性保护措施。

**摘 要**

用ELISA间接法检测277份不同年龄组正常人血清标本的轮状病毒抗体,6个月~1岁组抗体阳性率最低,为51.5%,6个月以下组为53.0%,1岁以上各小儿组由83.8%渐增至92.3%,成人组及脐带血均100%。对其中82份标本同时作ELISA与补体结合法检测,前者阳性率92.68%,抗体GMT为894.6;后者阳性率79.27%,GMT为8.136,总符合率为90.24%,两法有良好的正相关性,相关系数 $r=0.67$ ,ELISA比CFT具更高的敏感性。

*A Study on the Rotavirus Antibody in the Normal Human Sera by Using ELISA* Wu Hui-lian, et al. Institute of Basic Medical Sciences Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan

In Jinan area, 277 serum samples from healthy persons of different ages were tested by ELISA for the presence of Rotavirus (RV) antibody. The positive rate gradually increases (83.8-100%) with age from 1 year to adulthood. The rate is the lowest (51.5%) in the 6 months-1 year age group and 53.0% in the group of less than 6 months. Eighty-two of the 277 samples were determined both by ELISA and complement fixation test (CFT). In ELISA the

positivity of RV antibody was 92.68% and its GMT was 894.6. In CFT the positivity was 79.27% and GMT was 8.136. The concordance rate of the two methods was 90.24%. The correlation coefficient ( $r$ ) was +0.67. However, the titer of RV antibody in the sera determined by ELISA was 110 times higher than that by CFT. It means that ELISA is more sensitive than CFT. The result of blocking test further confirmed the specificity of ELISA method. Therefore, it is a simple rapid and reliable method to be used in clinical diagnosis and epidemiologic investigation of RV infection.

**参 考 文 献**

1. Steinhoff MC. Rotavirus, The first five years. *J Pediatr* 1980;96(4):611~622.
2. 朱关福,等.应用微量酶联免疫吸附试验检测腺病毒抗体. *解放军医学杂志* 1982;7(1):22~25.
3. 上海市防疫站. *卫生防疫检验(病毒检验)*. 新1版. 上海:上海人民出版社, 1977:136~144.
4. 丘福禧. 轮状病毒和急性胃肠炎. *国外医学流行病学传染病分册* 1979;6(2):62~68.
5. Middleton PJ, et al. Counter-immunoelectro-osmophoresis for the detection of infantile gastroenteritis virus (orbi-group) antigen and antibody. *J Clin Pathol* 1976;29(3):191~197.
6. Yolken RH, et al. Epidemiology of human rotavirus types 1 and 2 as studied by enzyme-linked immunosorbent assay. *N Engl J Med* 1978;299:1156.
7. 李泉根,等. 婴幼儿急性胃肠炎病毒的研究. *解放军医学杂志* 1982;7(1):43~45.
8. 施惠达,等. 轮状病毒感染的血清流行病学调查. *中华流行病学杂志* 1985;6(2):85.
9. Estes MK, et al. Epidemic viral gastroenteritis. *Am J Med* 1979;66:1001.
10. Hara M, et al. Duovir in schoolchildren with gastroenteritis. *Lancet* 1976;1:311.
11. Kapikian AZ, et al. Human Reovirus-like agent as the major pathogen associated with "winter" gastroenteritis in hospitalized infants and young children. *N Engl J Med* 1976;294:965~972.

**本刊1986年第2期更正**

| 页数  | 行 数 | 误                  | 正                  |
|-----|-----|--------------------|--------------------|
| 封2  | 16  | 学会通讯               | 学会通讯               |
| 98  | 倒第4 | 单位购买0.05元一册        | 单位购买0.50元一册        |
| 127 | 倒第8 | 会议将交流自1970年第一次会议以来 | 会议将交流自1980年第一次会议以来 |