

我国健康成人血清中抗成人腹泻轮状病毒抗体调查

田野¹ 刘玑昌¹ 丘福禧¹ 李贵忠² 张新生³ 郝岩鹏¹ 陈化新¹ 王锡怀⁴ 崔峰根⁵

检测轮状病毒抗原的酶联免疫吸附(ELISA)方法已被广泛应用^[1~4],但是,以未知血清直接包被微量凹井板,用双抗体夹心ELISA法检测其中抗轮状病毒抗体的方法尚未见报道。最近我们建立了这种方法并检测我国一些省市1,380份健康成人血清中抗成人腹泻轮状病毒抗体获得成功。现将方法和应用结果报告如下。

材料和方法

一、材料:

1. 抗原: 取电子显微镜观察含有大量轮状病毒颗粒的成人流行性腹泻病例的粪液,以0.01M, pH7.2PBS稀释成50%悬液, 8,000转/分离心10分钟。取上清液加等量氯仿混合; 8,000转/分离心30分钟。取上清液51,000转/分离心2小时。用少量PBS重悬沉淀物, 收集悬液, 再经45%蔗糖、60%蔗糖和40%氯化铯40,000转/分密度梯度离心2小时, 收集在蔗糖与氯化铯之间的部分和下层氯化铯部分。用PBS透析后, 作为纯化的成人腹泻轮状病毒抗原。用电子显微镜观察, 见有结构典型的完整轮状病毒颗粒和大量降解物。病毒颗粒含量为 $10^{6.5} \sim 10^8/ml$ 。用聚丙烯酰胺凝胶电泳方法查见典型成人腹泻轮状病毒RNA基因组的11个片段^[5]。

2. 血清:

①兔抗成人腹泻轮状病毒免血清: 取体重2,000克健康家兔, 用上述纯化的成人腹泻轮状病毒抗原皮下和肌肉注射三次, 间隔2~3周。第一次加等量完全Freund佐剂, 第二

次加等量不完全Freund佐剂, 第三次用纯病毒抗原。每只兔共用4.5ml病毒抗原免疫, 二周后放血, 免疫扩散效价为1:16, IgG含量17.5mg/ml。

②豚鼠抗成人腹泻轮状病毒免疫血清: 取体重300克健康豚鼠, 免疫方法同上。每只豚鼠共用1.5ml病毒抗原。最后一次免疫后二周放血, 免疫扩散效价为1:8, IgG含量18.7mg/ml。

③辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗豚鼠IgG血清, 制备步骤如下:

a. 取正常豚鼠血清, 经饱和硫酸铵沉淀三次和DEAE-纤维素柱层析过滤, 用聚丙烯酰胺凝胶电泳法证实获得纯IgG, 含量为15mg/ml。

b. 取体重20公斤健康山羊, 用上述正常豚鼠IgG皮下和肌内注射三次, 方法同上。最后一次注射后10天放血, 免疫扩散效价>1:64。取羊血清, 经饱和硫酸铵沉淀二次和DEAE-纤维素柱层析提纯, 其IgG含量12.6mg/ml。

c. 取上述羊抗豚鼠IgG10mg, 用改进的过碘酸钠法与HRP(Sigma, VI type, RZ30)6mg结合, 最终酶-IgG结合物的克分子比值为1.29。

d. 正常兔血清: 作为本实验的阴性对照血清。

e. 健康成人血清: 共1,380份, 其中北京

1 中国预防医学科学院流研所

2 广西百色地区防疫站

3 昆明军事医学研究所

4 江西高安县防疫站

5 延边自治州防疫站

和河北省362份，宁夏自治区银川市105份，河南省许昌市和新野县62份，内蒙古自治区呼伦贝尔盟和牙克石市324份，江西省德兴市和高安县337份，西藏自治区50份，延边自治州50份，海南岛50份，青海省40份。

二、方法：

- 用第一抗体包被凹井板：用0.05M, pH9.6碳酸盐缓冲液分别稀释兔抗成人腹泻轮状病毒免疫血清（1:15）、正常兔血清（1:10）和1380份健康成人血清（1:2），分别包被凹井板，100μl/井，置37°C 2小时。

- 用0.01M, pH7.2~7.4PBS/Tween20(0.05%)反复洗板10分钟。

- 加成人腹泻轮状病毒抗原：用0.01M, pH7.2~7.4PBS/Tween20/EDTA稀释已提纯的成人腹泻轮状病毒抗原（1:20），100μl/井，置37°C 2小时。

- 反复洗板，与步骤②相同。

- 加第二抗体：用PBS/Tween20稀释豚鼠抗成人腹泻轮状病毒免疫血清（1:15），100μl/井，置37°C 2小时。

- 反复洗板，与步骤②相同。

- 加酶标记抗体：用PBS/Tween20稀释HRP标记的羊抗豚鼠IgG（1:60），100μl/井，置37°C 2小时。

- 反复洗板，与步骤②相同。

- 加底物：加入邻苯二胺（溶于0.05M柠檬酸-0.1M磷酸钠缓冲液，pH5.0, 0.5mg/ml，加入0.2% H₂O₂），100μl/井，置37°C 20分钟，然后加入2M H₂SO₄，100μl/井，终止反应。

- 观察结果：用肉眼观察，空白对照无色，阴性为浅黄色，阳性为深黄色至棕色。并且使用酶标记比色计（MB-1型，北京），波长492nm，测定阳性值/阴性值（P/N比值），将空白底物对照调节到0，阴性血清对照（正常兔血清）为0.05，阳性血清对照（兔抗成人腹泻轮状病毒免疫血清）为0.12。以检测的血清呈深黄色至棕色且其P/N比值>2.1的为阳性。

性。

11. 阻断试验：取25份检测结果阳性和1份检测结果阴性的健康成人血清（1:2）、阳性对照血清（兔抗成人腹泻轮状病毒免疫血清，1:15）和阴性对照血清（正常兔血清，1:10），用双抗体夹心ELISA法进行阻断试验。

结 果

检测1,380份健康成人血清，其中抗成人腹泻轮状病毒抗体阳性者141份，阳性百分率为10.2%（附表）。

附表 我国健康成人中抗成人腹泻轮状病毒抗体的检测

地 区	检 查 血 清 份 数	阳 性 份 数	百 分 率
北京, 河北省	362	25	6.9
宁夏自治区银川	105	16	15.2
河南省许昌、新野	62	13	21.0
内蒙古自治区呼伦 贝尔盟, 牙克石	324	54	16.7
江西省德兴, 高安	337	22	6.5
西藏自治区	50	0	0
延边自治州	50	7	14.0
海南岛	50	1	2.0
青海省	40	3	7.5
共 计	1,380	141	10.2

我们取检测结果为阳性的部分血清，进行了阻断试验，其结果是25份检测结果阳性的健康成人血清和阳性对照血清在阻断后的P/N比值全部低于阻断前的P/N比值，而1份检测结果阴性的健康成人血清和阴性对照血清在阻断后的P/N比值没有改变。

讨 论

用未知血清作为第一抗体直接包被凹井板进行ELISA的方法尚未见文献报道。我们建立和初步应用了这个方法检测抗体，并对已检测有抗体的25份健康成人血清和阳性对照血清进行了阻断试验，其结果是在阻断后的P/N比值全部下降，说明所用的这个方法是可靠的。

的。在这次调查的1,380份健康成人血清中，抗成人腹泻轮状病毒抗体阳性的有141份，阳性百分率为10.2%，在北京和河北省的25份血清中，有17份来自河北省迁安县一带农村；据了解，该地区前二年曾发生成人流行性腹泻，因此需要进一步作追溯调查。在西藏的50份血清中未查出抗成人腹泻轮状病毒的抗体，在海南岛的50份血清中只有1份阳性。这可能是因为西藏和海南岛同外界的交通不便利，因而近年来在国内其它省份爆发流行的成人腹泻还未明显地传播到西藏和海南岛。

摘要

本文报告以未知血清作为第一抗体直接包被微量凹井板，用双抗体夹心ELISA法检测抗成人腹泻轮状病毒抗体，得到成功的结果。此法应用于检测从中国一些省市收集的1,380份健康成人血清中抗成人腹泻轮状病毒抗体，其中141份阳性，总阳性率为10.2%，各地的感染率不同。对25份阳性血清进行了阻断试验，结果是在阻断后的P/N比值全部低于阻断前的P/N比值。这25份阳性血清中有17份来自河北省迁安县一带农村，该地区在两年前曾发生成人流行性腹泻。西藏50份血清均阴性，海南岛50份血清中仅1份阳性。

Investigations on the Antibody against Adult Diarrhoea Rotavirus among Healthy Population in China Tian Ye, et al., Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing, etc.

This article deals with a method of using unknown serum as the first antibody to coat wells of

the microtiter plate directly in application of the sandwich ELISA method with double antibodies for assay of the antibody against adult diarrhoea rotavirus. Successful results were obtained. This method was applied for assay of the antibody against adult diarrhoea rotavirus in a total of 1,380 sera of healthy adults obtained from some provinces and cities of China, of which 141 showed a positive result with a total positive rate of 10.2%. The infection rate varied in different regions. A blocking test was carried out on 25 positive sera the results of which revealed that P/N ratios after blocking were all lower than those before blocking. Seventeen of these 25 positive serum specimens were obtained from rural areas of Qian'an County, Hebei Province where adult epidemic diarrhoea had occurred two years ago. The antibody against adult diarrhoea rotavirus was not detected in 50 adult sera from Xizang Autonomous Region. Only one out of 50 adult sera from Hainan Island was positive for the antibody.

参考文献

1. Yolken RH, Leister FJ. Evaluation of enzyme immunoassays for the detection of human rotavirus. *J Infect Dis* 1981; 144:379.
2. Rodak L, et al. Detection by radioimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay of coronaviruses antibodies in bovine serum and lacteal secretions. *J Clin Microbiol* 1982; 16:34.
3. Wall RA, et al. Comparison of ELISA, SPACE, and electron microscopy for the routine diagnosis of rotavirus infection. *J Clin Pathol* 1982; 35:104.
4. Inouye S, et al. Efficient coating of the solid-phase with rotavirus antigens for enzyme-linked immunosorbent assay of immunoglobulin A antibody in feces. *J Clin Microbiol* 1984; 19:259.
5. Qiu XF, et al. RNA genome electrophoretic analysis of rotavirus from feces of epidemic adult diarrhoea occurring in Shandong Province, China. *J Diar Dis Res* 1985; 3:73.

更正：请将本刊1986年第4期第239页右栏正文倒数第20行的22.5倍，改成2.25倍。