

快速检测成人腹泻轮状病毒 (ADRV) 抗原 和抗体的研究

孙长柱 涂贵兰 王锡九

(济南军区军事医学研究所, 济南)

张代民

(陆军54898医院, 临沂)

李志新

(陆军146医院, 临沂)

提 要

本文报道应用反相间接血凝和间接血凝试验技术快速检测ADRV抗原和抗体, 一般在60分钟左右作出诊断。用ELISA方法和协同凝集试验作对照, 结果一致。本实验与其它肠道病毒不发生交叉凝集反应, 与菌痢、肠炎病人粪便和正常人粪便标本也不发生非特异性反应。实验准确可靠。本实验用间接血凝试验技术快速检测了ADRV抗体, 观察了流行性腹泻病人血清中ADRV抗体持续时间。发现流行性腹泻患者发病后ADRV抗体存在半年以上, 八个月后有不同程度的下降, 流行地区的健康人的ADRV抗体水平占33%左右, 非流行地区正常人的ADRV抗体占11.3%左右。并用血凝抑制试验检测ADRV抗体, 与小儿轮状病毒抗体无交叉反应。本试验对流行性腹泻的流行病学研究和临床诊断具有实用意义。

关键词: 成人腹泻轮状病毒, 抗原和抗体的检测

近年来由成人腹泻轮状病毒(简称ADRV)引起的流行性腹泻仍在世界各地暴发流行, 造成数以百万计的青壮年发病, 同时还可造成小儿和老年人发病。因此引起各国病毒学家的极大关注。^[1,2,3] 由于急性腹泻的病因很多, 诊断和鉴别诊断仍占有重要地位。以往主要靠腹泻便液的直接电镜(EM)或免疫电镜(IEM)检查, 由于设备上的限制很难推广^[4]。目前国内应用ELISA方法和RNA的电泳分析诊断也需要十二小时以上的时间。我们应用反相间接血凝和间接血凝试验技术对ADRV进行了抗原和抗体的检测研究, 获得满意结果。

本文于1987年12月13日收到。

材料与方 法

一、材料

(一) 标本

1、ADRV 粪便标本：采集山东临沂市某部队流行性腹泻患者的粪便，存放无菌青霉素小瓶内， -30°C 冰箱保存。

2、正常人粪便标本：选自某部队健康青年人， -30°C 保存。

3、菌痢、肠炎患者粪便标本：采自济南市中心医院肠道门诊病人。

(二) 其它肠道病毒

小儿轮状病毒、埃柯病毒、克萨奇病毒、腺病毒均由山东医科院基础研究所提供；脊髓灰质炎病毒 I、II、III 型系由山东省卫生防疫站提供。

(三) 免疫血清

1、ADRV 抗血清：江西生物药厂和中国预防医学科学院病毒所提供。

2、小儿轮状病毒抗血清：山东医科院基础研究所提供。

3、病人恢复期血清：采集 ADRV 患者发病后 20 天左右的恢复期血清。

4、病人早期血清：采集 ADRV 患者发病三天内的血清。

5、正常人血清：本所流行病研究室提供。

(四) ADRV 的 ELISA 诊断试剂盒：购自江西生物药厂。

(五) 葡萄球菌 A 蛋白株 (Cowen 12598 株) 系联合国标准株，由解放军军事医学科学院微生物流行病研究所提供。

(六) 醛化“O”型人红血球：系长春生物制品研究所馈赠。

(七) ADRV 抗原：系经过电子显微镜和聚丙烯酰胺凝胶核酸电泳检查 ADRV 阳性标本。经玻璃球打碎，氯仿异戊醇抽提经 $10000\text{r}/\text{m}$ 离心 30 分钟，取上清液制备。

二、方法

(一) 反相间接血凝试验检测 ADRV 抗原：将免疫抗血清吸附在人“O”型红血球表面与 ADRV 抗原作血凝试验。操作方法见参考文献^[5,6]。

(二) 间接血凝试验查测 ADRV 抗体：将 ADRV 抗原吸附在红血球表面，然后与病人血清作血凝试验。操作方法见参考文献^[5,7]。

(三) 间接血凝抑制试验检测 ADRV 抗原：操作方法见参考文献^[7]。

(四) 协同凝集试验检测 ADRV 抗原：操作方法见参考文献^[8,9]。

(五) ELISA 方法检测 ADRV 抗原：操作方法见说明书^[15]。

结 果

一、反相间接血凝试验检测 ADRV 抗原结果

(一) ADRV 抗血清 SPA 效价滴定：将以上 ADRV 抗血清用 PBS 作 1:10、1:20、1:40、1:80、1:160 稀释，分别致敏 SPA 制备诊断液，与 ADRV 阳性标本作协同凝集试验，以出现肉眼观察明显凝集颗粒者为其血清效价。实验结果，所用 ADRV 抗血清

SPA 抗体效价均在 1:40 以上。用于反相间接血凝试验。

(二) 敏感性试验: 将江西生物药厂、病毒研究所血清和病人恢复期血清分别致敏鞣酸红血球, 制备红血球诊断试剂。将 ADRV 阳性标本作 1:1、1:2、1:4、1:8、1:16 倍稀释, 进行反相间接血凝试验。结果见表 1。

表1 各种 ADRV 抗血清敏感性试验结果
Table 1 Sensitivity of adrv serum antibody examination

抗血清	ADRV 抗原稀释倍数					对照
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	
生物药厂抗血清	+++	+++	+++	+	-	-
病毒所抗血清	+++	+++	+++	+	-	-
病人恢复期血清	+++	+++	+++	+++	-	-

(三) 检测 ADRV 标本结果: 用反相间接血凝试验检测了流行性腹泻患者粪便、菌痢、肠炎患者和正常人粪便上清液, 结果见表 2。

表2 反相间接血凝试验检测标本结果
Table 2 Results of sample examined passive hemagglutination assay

标本类别	标本份数	阳性数 (份)	阳性率 (%)
ADRV 粪便	30	25	83.3
痢疾、肠炎病人粪便	30	-	-
正常人粪便	20	-	-

二、三种方法检测 ADRV 的结果比较

应用江西生物药厂生产的 ELISA 诊断盒、协同凝集试验和反相间接血凝试验检测 ADRV 标本, 结果见表 3。

表3 三种方法检测 ADRV 结果
Table 3 Results of three methods for examining ADRV

方法	标本数 (份)	阳性数 (份)	阳性率 (%)
ELISA	30	25	83.3
协同凝集	30	25	83.3
反相间接血凝	30	25	83.3

三、特异性试验

(一) 应用以上三种方法分别检测小儿轮状病毒、脊髓灰质炎病毒 I、II、III 型、埃柯病毒、克萨奇病毒、腺病毒, 结果均阴性。未发现交叉反应现象。

(二) 用江西生物药厂抗血清、病毒研究所抗血清和病人恢复期血清制备的诊断血球与 ADRV 和小儿轮状病毒作反相间接血凝试验, 结果见表 4。

结果表明, 三种抗血清都与 ADRV 发生凝集, 只有病人恢复期血清与小儿轮状病毒发生凝集, 其余阴性。

表4 抗血清与小轮状病毒特异性试验结果

Table 4 Tests result of specificity of the antibody and rotavirus

抗血清	ADRV	小儿轮状病毒
生物药厂抗血清	++	-
病毒所抗血清	++	-
病人恢复期抗血清	++	++

四、间接血凝试验检测ADRV抗体结果

(一) 敏感性试验

用电镜和核酸电泳检查阳性的ADRV抗原致敏红血球制备诊断试剂，与流行性腹泻患者血清作间接血凝试验。将患者血清作1:1、1:2、1:4、1:8、1:16倍稀释，结果见表5。

表5 检测血清抗体敏感性试验结果

Table 5 Test results of adrv antibody sensitivity

血清	血清稀释倍数					对照
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	
流行性腹泻患者血清	+++	++	++	++	-	-
生物药厂抗血清	+++	+++	++	++	-	-
正常人血清	++	-	-	-	-	-

(二) 流行性腹泻患者恢复期血清和正常人血清抗体测定结果

将流行性腹泻患者发病后二十天左右的抗血清、疫区正常人和非疫区正常人血清作间接血凝试验，结果见表6。

表6 ADRV 抗体检测结果

Table 6 Results of adrv antibody examination

血清	标本数(份)	阳性数(份)	阳性率(%)
流行性腹泻患者血清	12	12	100
流行地区正常人血清*	30	10	33.3
非流行区正常人血清*	115	13	11.3

*表示未患流行性腹泻的健康人。

(三) 流行性腹泻患者 ADRV 抗体持续时间观察情况

表7 ADRV 抗体持续时间观察

Table 7 Successive examination of adrv antibody

不同时间血清	标本数(人份)	阳性数(人份)	阳性率(%)
三个月	12	12	100
六个月	12	12	100
八个月	10	8	80
十二个月	15	10	66.6

采集流行性腹泻抗体阳性患者发病后三个月、六个月、八个月、十二个月的血清，检测ADRV抗体。结果见表7。

(四) 血凝抑制试验检测ADRV抗体结果

用血凝抑制试验检测6份ADRV患者抗血清，结果全部阳性。检测4份ADRV患者早期血清和正常人血清均阴性，检测1份小凡轮状病毒抗血清阴性。

五、重复性试验

用反相间接血凝试验检测15份经电子显微镜和核酸电泳检查阳性的ADRV粪便标本，全部阳性，检查正常人阴性。

讨 论

目前对ADRV的诊断主要依靠电子显微镜和核酸电泳^[10,11]，国内虽有ELISA方法^[15]，一般需要12小时以上的时间才能作出诊断，我们研究了反相间接血凝与间接血凝试验技术快速检测ADRV抗原和抗体，一般在60分钟左右作出诊断，获得满意结果。用ELISA方法和协同凝集试验作对照，结果一致。实验证明，间接血凝试验技术虽然是老方法，但实验准确，结果可靠。

关于流行性腹泻病人ADRV抗体在体内存在多长时间的问题，目前国内还未见这方面的报道，我们研究了间接血凝技术并用其检测了流行性腹泻患者的ADRV抗体的变化，结果证明，流行性腹泻患者血清中ADRV抗体可持续6~12个月，8个月之后有的患者转阴，提示8个月之后有再次感染ADRV引起腹泻的可能性。实验中还发现，在发生过流行性腹泻的地区，健康正常人血清中存在ADRV抗体。占33%；而非流行区正常人血清中ADRV抗体只占11%左右。提示流行地区健康人存在着隐性感染，他们有可能成为潜在的传染源。应用间接血凝技术检测ADRV抗体，可作流行病学研究和监测正常人ADRV免疫水平的指标。

实验中发现，间接血凝技术的敏感性取决于抗原的浓度和抗体的效价。ADRV抗原的浓度高，致敏的红血球诊断液检测血清中ADRV抗体的敏感性好，反之却低。在ADRV抗体检测试验中还有非特异性凝集现象，如正常人原液血清作间接血凝试验易发生假阳性反应。我们将血清稀释后，即排除了非特异性凝集现象。在ADRV抗原检测中，如果粪便标本处理不好也易发生非特异性反应，应用10000r/m离心和未致敏的10%SPA悬液吸附标本上清液，即可解决非特异性凝集问题。提高了试验的特异性和诊断的准确性。

有关正常人血清中存在小儿轮状病毒抗体问题，Steinhoff^[13]和Jesudoss^[14]报告其抗体阳性率占正常人80%。本实验用流行性腹泻病人恢复期血清致敏的诊断血球与小儿轮状病毒发生了凝集反应(表4)，也证明了在成人血清中存在小儿轮状病毒抗体。小儿轮状病毒血清中未发现有ADRV抗体，有关这方面的问题，尚需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 洪涛等: 1984, 中华微生物学和免疫学杂志, 4(1): 125
 [2] Hang Tao et al; 1984, *Lancet* May 26
 [3] Hang Tao et al; 1983, *Lancet* 11 (8358) 1078
 [4] 洪涛: 1986, 国际医学病毒学新进展讲座, P: 45~61.
 [5] 第二军医大学附属长征医院: 1980 "临床免疫学技术" P: 142.
 [6] 袁佩娜等: 1986, 中华微生物学和免疫学杂志, 6(5): 290.
 [7] 韩秀娟等: 1986, 中华微生物学和免疫学杂志, 6(3): 179.
 [8] 孙长柱等: 1987, 免疫学快报, 7(1): 15~16.
 [9] 张学谦等: 1983, 中华流行病学杂志, 4(5): 281
 [10] 孙长柱等: 1985, 前卫医药, (1): 19~20
 [11] 孟庆海等: 1984, 中华流行病学杂志, (2): 65~67.
 [12] 洪涛: 1986, 中国公共卫生, 5(2): 3.
 [13] Steinhoff MC, 1980 *J Pediatr* 96(4): 611.
 [14] Jesudoss E satal; 1973 *J Med Res* 68: 383.
 [15] ADRV ELISA 诊断试剂盒说明书.

A Rapid Detection of Antigen and Antibody of Adult Diarrhea Rotavirus (ADRV)

Sun Chang-zhu Tui Gui-lan Wang xi-jiu
(*Institute of Military medicine, Jinan Corps, Jinan*)

Zhang Dai-min
(*The Army Hospital 54898, Linyi*)

Li Zhi-xing
(*The Army Hospital 146, Linyi*)

Indirect hemagglutination assay, enzyme-linked immunosorbent assay and co-agglutination test were applied to determine antigen and antibody of ADRV, the results of which were the same. Serum Ab to ADRV in patients with epizootic diarrhea persisted for over half a year. The positive rates of the normal human serum Ab to ADRV were 33.3% and 11.3% in the epidemic and non-epidemic areas.

Key words, ADRV, Detection of Ag and Ab,